

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6196972号

(P6196972)

(45) 発行日 平成29年9月13日 (2017. 9. 13)

(24) 登録日 平成29年8月25日 (2017. 8. 25)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 H 19/073 (2006. 01)

C O 7 H 19/073 C S P

C O 7 H 19/14 (2006. 01)

C O 7 H 19/14

C O 7 H 19/10 (2006. 01)

C O 7 H 19/10

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

G O 1 N 37/00 (2006. 01)

G O 1 N 37/00 1 O 1

請求項の数 24 (全 173 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-530802 (P2014-530802)
(86) (22) 出願日 平成24年9月13日 (2012. 9. 13)
(65) 公表番号 特表2014-532043 (P2014-532043A)
(43) 公表日 平成26年12月4日 (2014. 12. 4)
(86) 国際出願番号 PCT/US2012/055231
(87) 国際公開番号 W02013/040257
(87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)
審査請求日 平成27年9月1日 (2015. 9. 1)
(31) 優先権主張番号 61/627, 211
(32) 優先日 平成23年10月7日 (2011. 10. 7)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 61/534, 347
(32) 優先日 平成23年9月13日 (2011. 9. 13)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 509157281
レーザーゲン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒュースト
ン エル リオ ストリート 8052
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

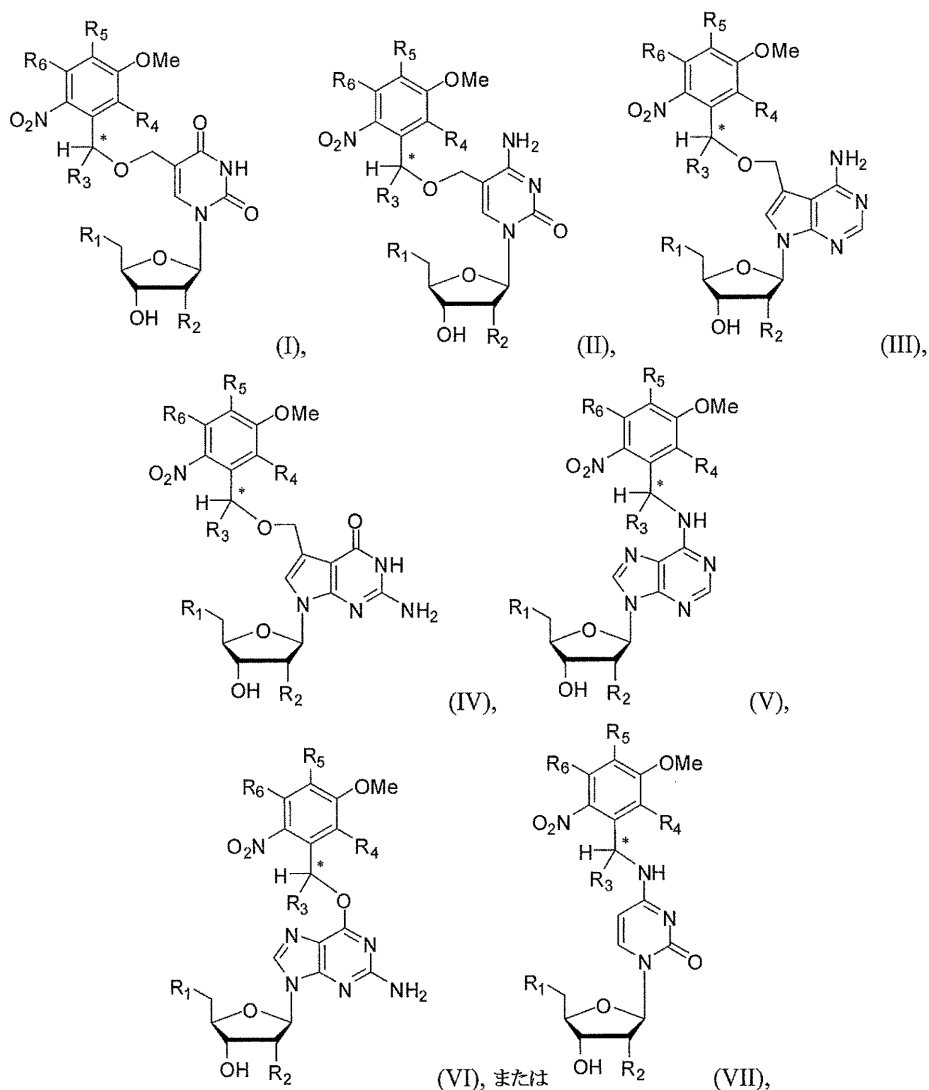
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 5-メトキシ3'-OH非遮断高速光開裂性末端ヌクレオチドおよび核酸配列決定のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式の化合物またはその塩、互変異性体もしくは光学異性体:



10

20

式中、

R_1 はヒドロキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、 α -チオトリホスフェートまたはポリホスフェートであり；

R_2 は水素またはヒドロキシであり；

R_3 はアルキル ($C \leq 8$) または置換アルキル ($C \leq 8$) であり；

R_4 は

水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

アルキル ($C \leq 6$)、アシル ($C \leq 6$)、アルコキシ ($C \leq 6$)、アシルオキシ ($C \leq 6$)、アルキルアミノ ($C \leq 6$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 6$)、アミド ($C \leq 6$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

R_5 および R_6 はそれぞれ独立して

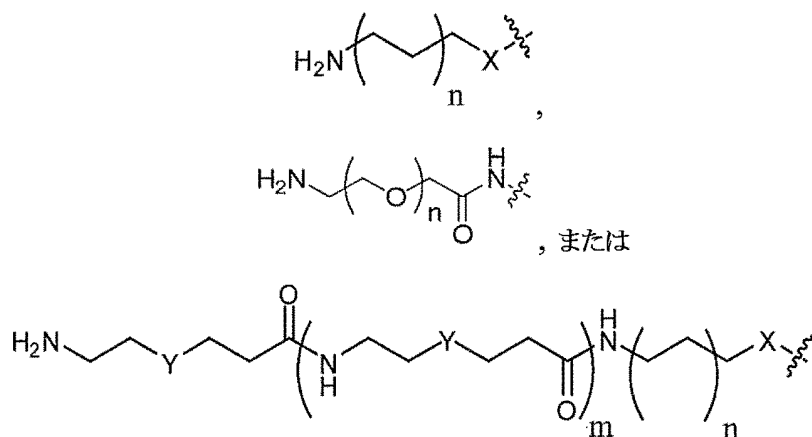
水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

アルキル ($C \leq 6$)、アルケニル ($C \leq 6$)、アルキニル ($C \leq 6$)、アリール ($C \leq 6$)、アラールキル ($C \leq 8$)、ヘテロアリール ($C \leq 6$)、アシル ($C \leq 6$)、アルコキシ ($C \leq 6$)、アシルオキシ ($C \leq 6$)、アルキルアミノ ($C \leq 6$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 6$)、アミド ($C \leq 6$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョン；

下記式の基：

30

40



10

式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

mは0～6の整数である；あるいは

-リンカー-レポーターである。

20

【請求項 2】

式Iの化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物。

【請求項 3】

式IIの化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物。

【請求項 4】

式IIIの化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物。

【請求項 5】

式IVの化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物。

30

【請求項 6】

式Vの化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物。

【請求項 7】

式VIの化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物。

【請求項 8】

式VIIの化合物としてさらに定義される、請求項1記載の化合物。

【請求項 9】

R_3 がイソプロピルまたはtert-ブチルである、請求項1記載の化合物。

【請求項 10】

R_5 が水素、ヨード、またはアルコキシ ($C \leq 6$) である、請求項1～9のいずれか一項記載の化合物。

40

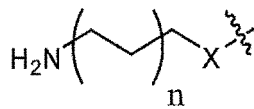
【請求項 11】

R_5 がメトキシである、請求項10記載の化合物。

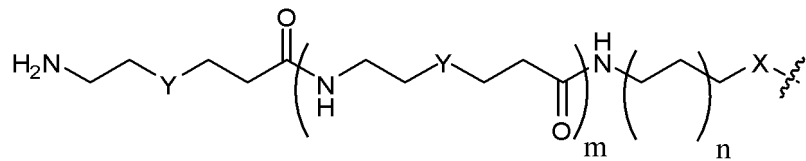
【請求項 12】

R_5 が、

a) 下記式の基：



または



10

式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

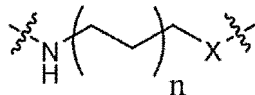
mは0～6の整数であるか、または

20

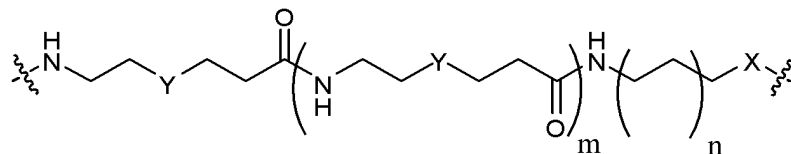
b)-リンカー-レポーターである、請求項1～9のいずれか一項記載の化合物。

【請求項13】

リンカーが、



または



30

式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

40

mは0～6の整数である、請求項12記載の化合物。

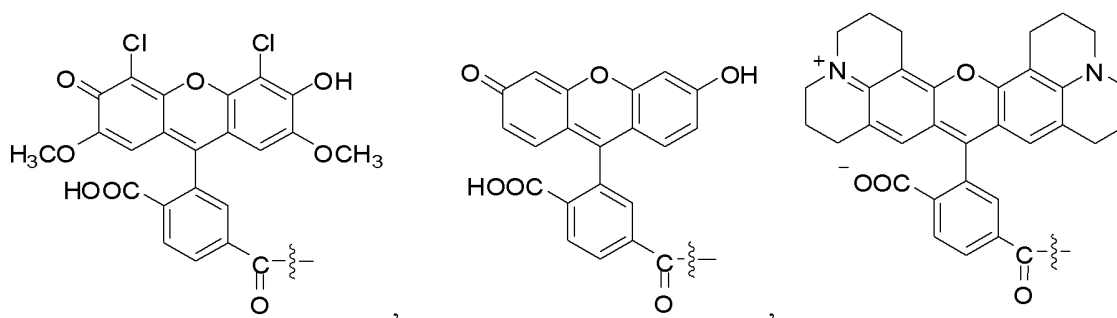
【請求項14】

i)Xがアルキンジイル ($C_2 \sim 8$) または-C≡C-であり；ii)Yが-CH₂-であり；iii)nがゼロであり；および／またはiv)mがゼロである、請求項12または13記載の化合物。

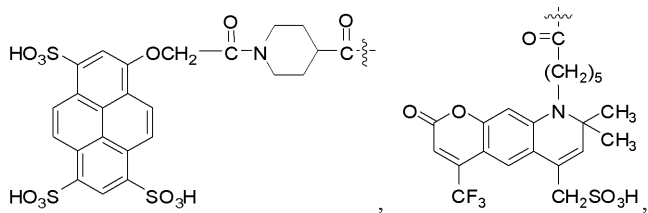
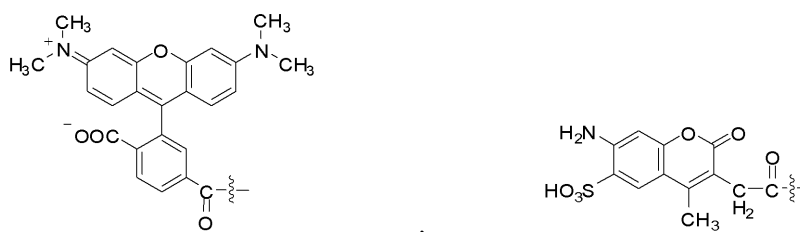
【請求項15】

レポーターが色素に基づき、該色素がキサンテン、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン、クマリン、ピレン、フタロシアニン、フィコビリタンパク質、またはスクアライン色素であるか；または

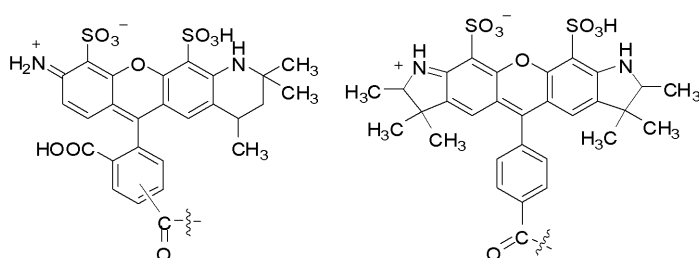
レポーターが下記式：



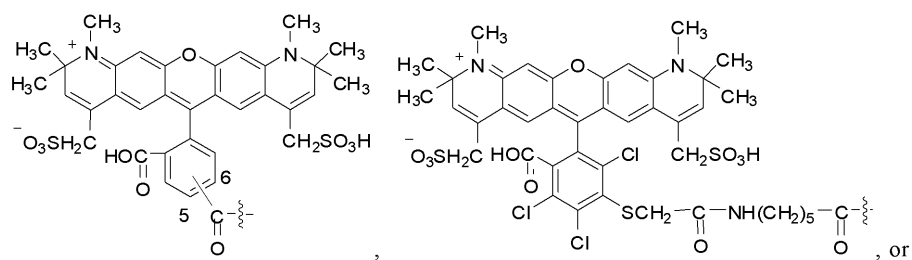
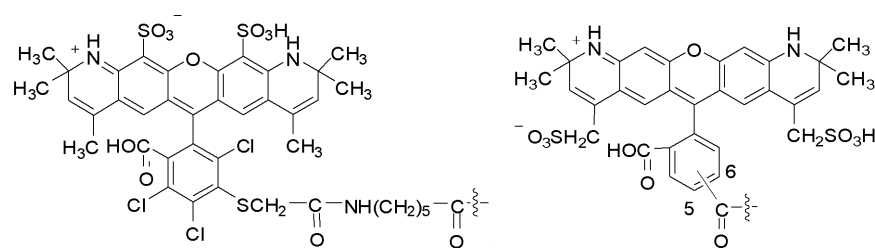
10



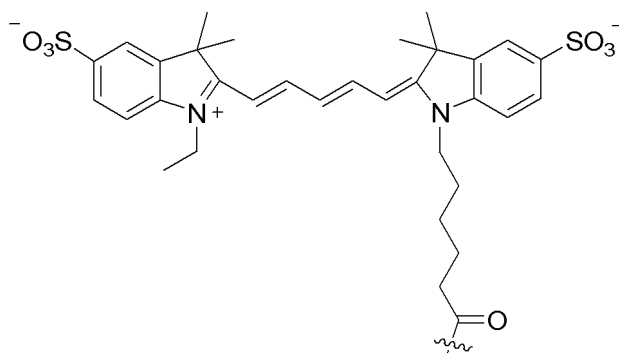
20



30



40



10

である、請求項12または13記載の化合物。

【請求項16】

R_6 が水素である、請求項1～15のいずれか一項記載の化合物。

【請求項17】

星付きの炭素原子がS配置である、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。

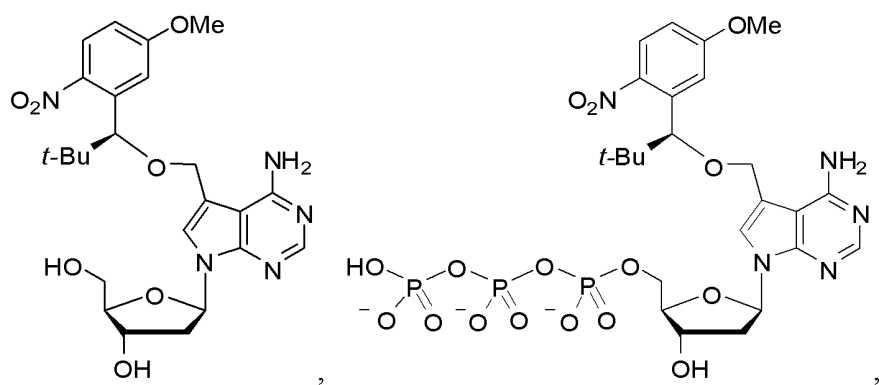
【請求項18】

星付きの炭素原子がR配置である、請求項1～16のいずれか一項記載の化合物。

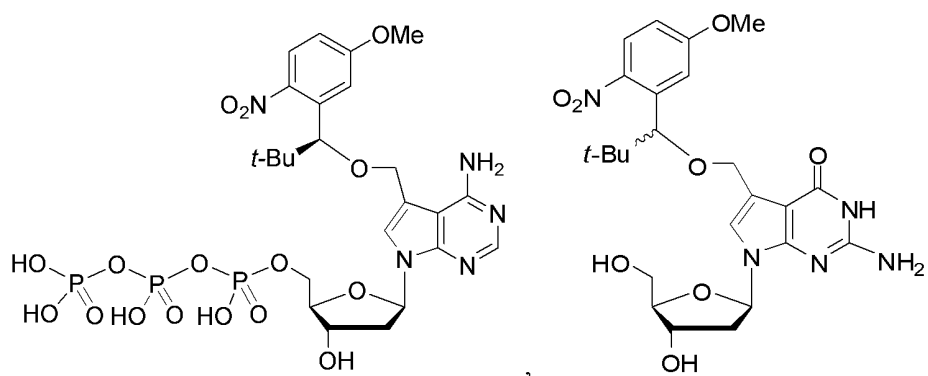
【請求項19】

下記式、またはこれらの式のいずれかの塩としてさらに定義される、請求項1記載の化合物：

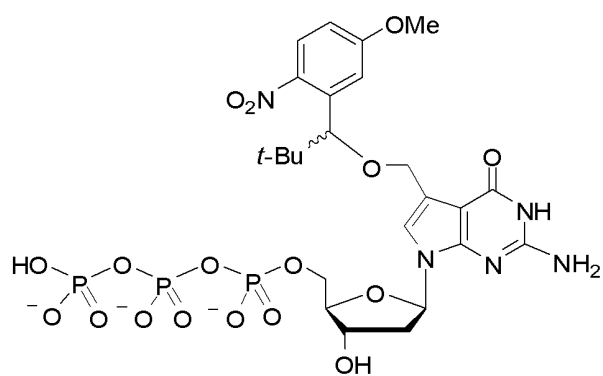
20



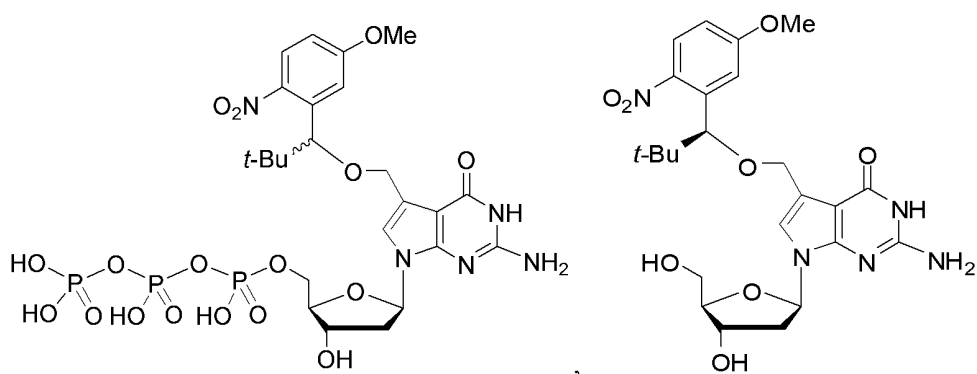
10



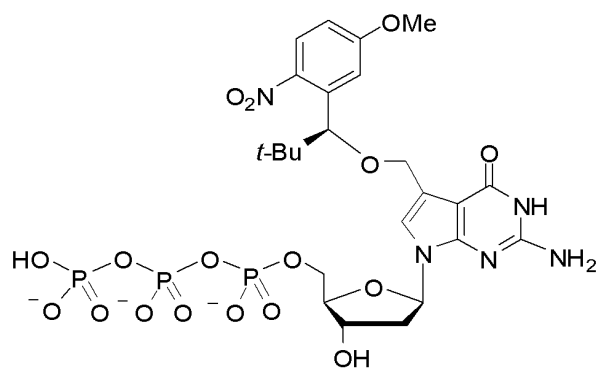
20



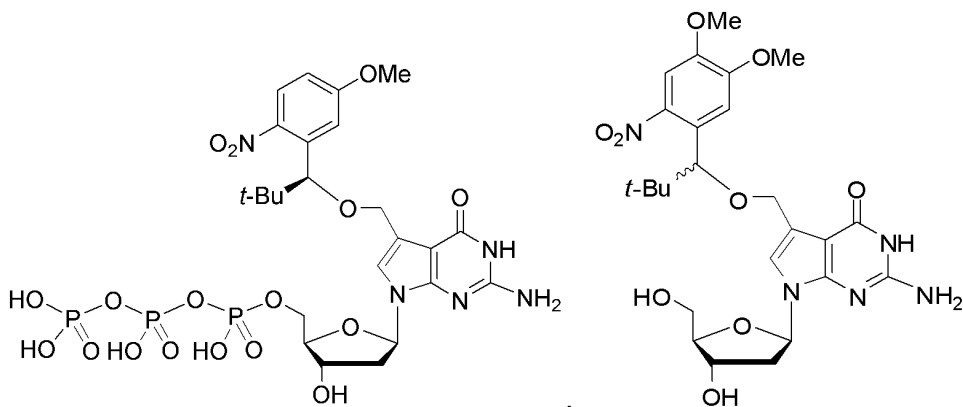
30



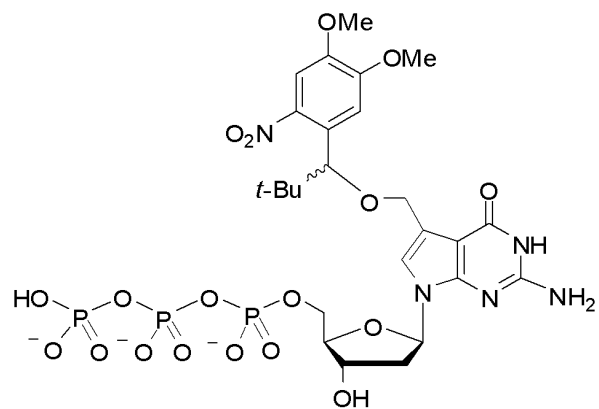
40



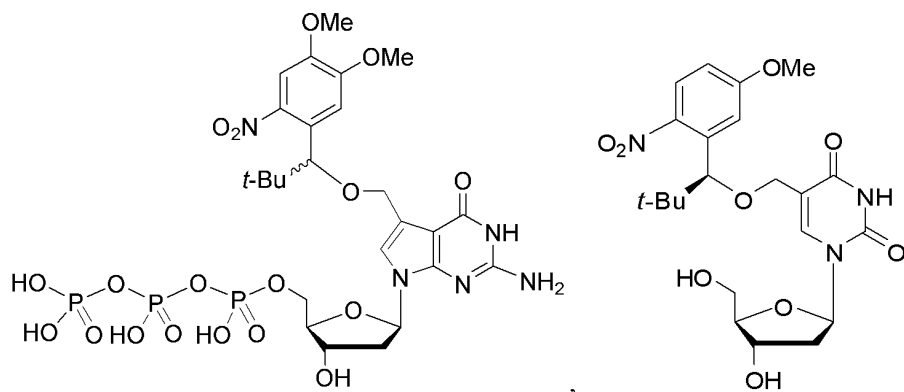
10



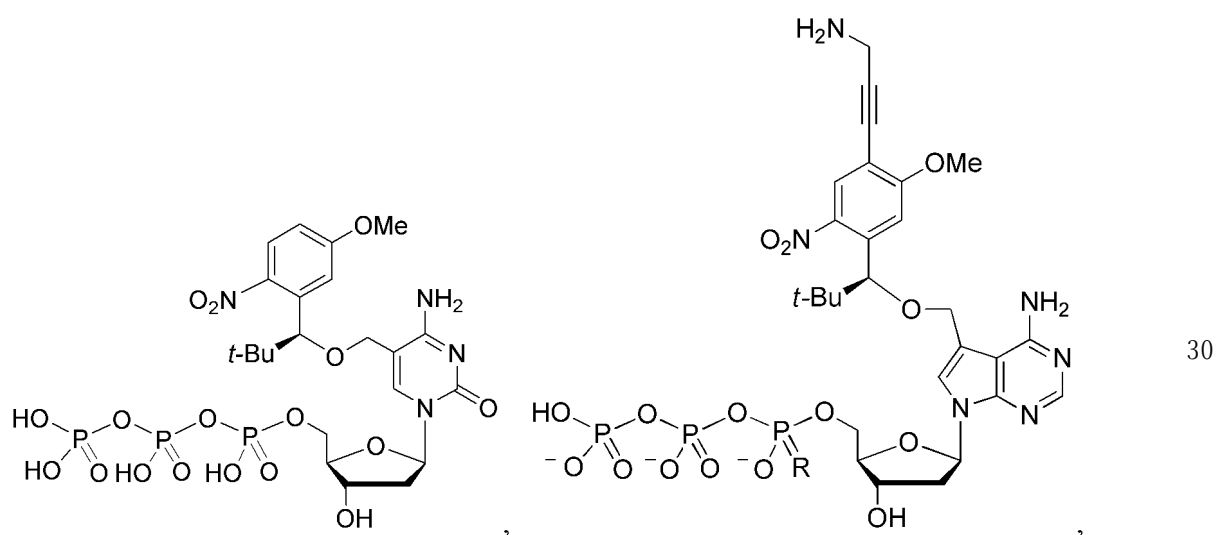
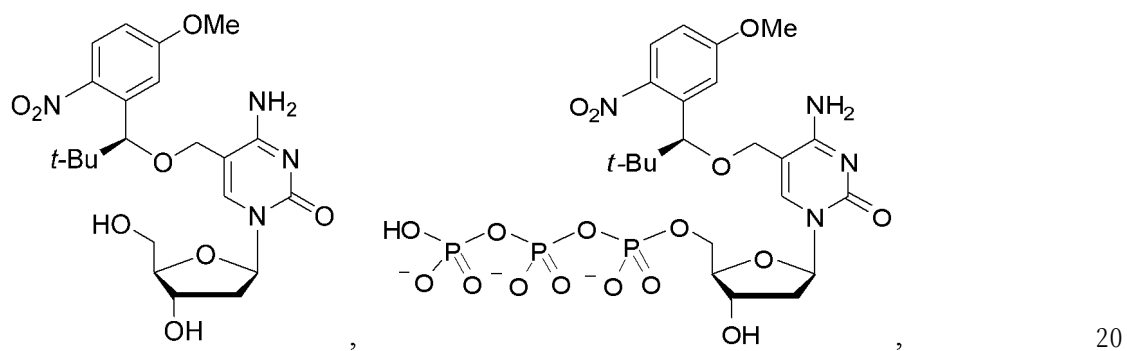
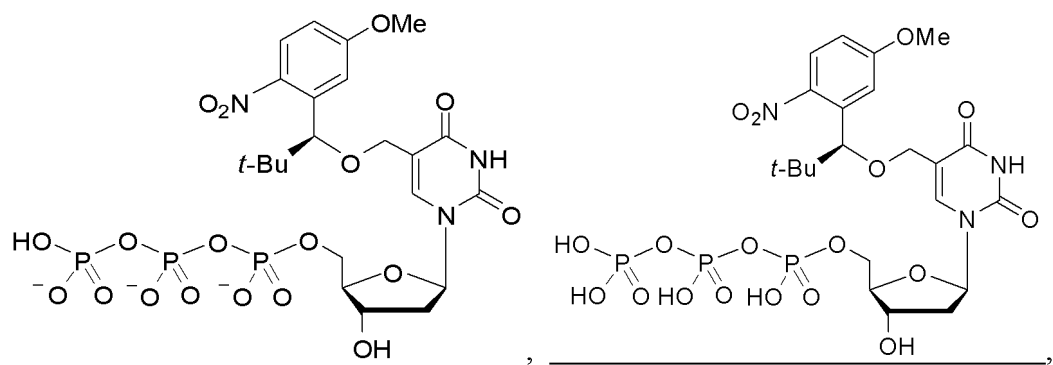
20

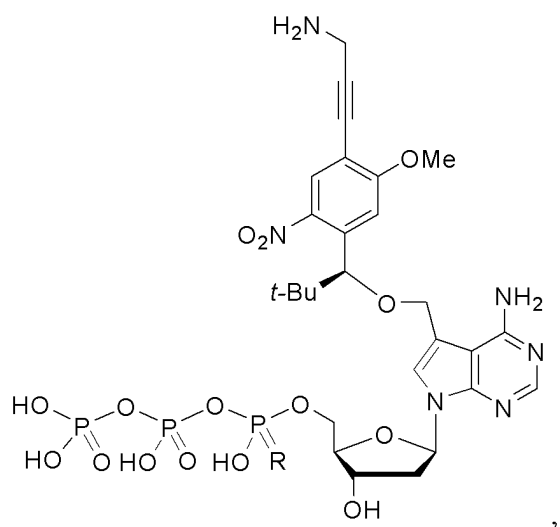


30

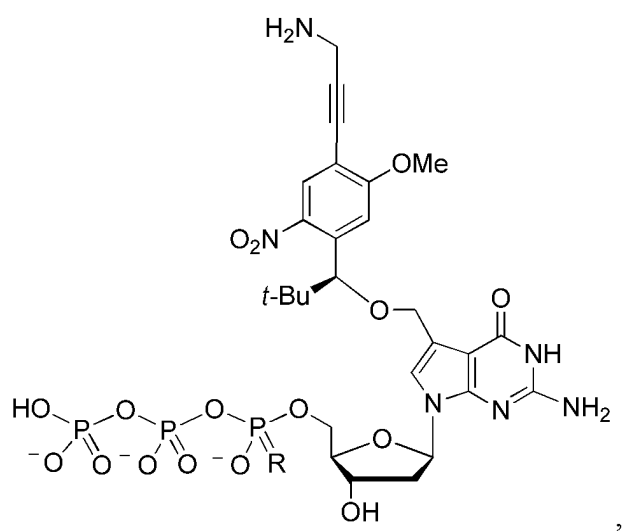


40

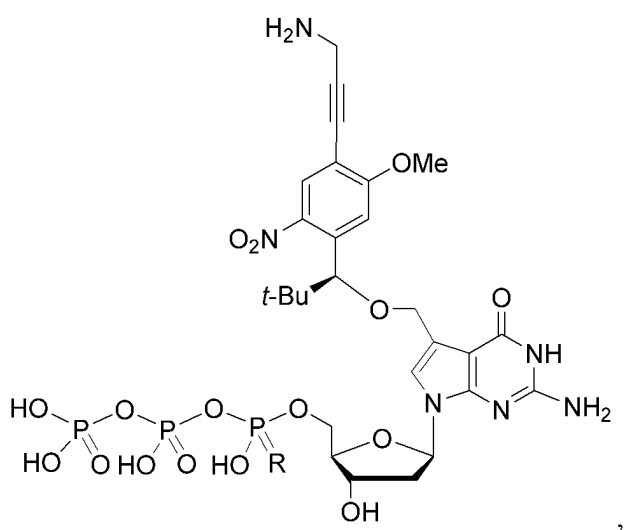




10

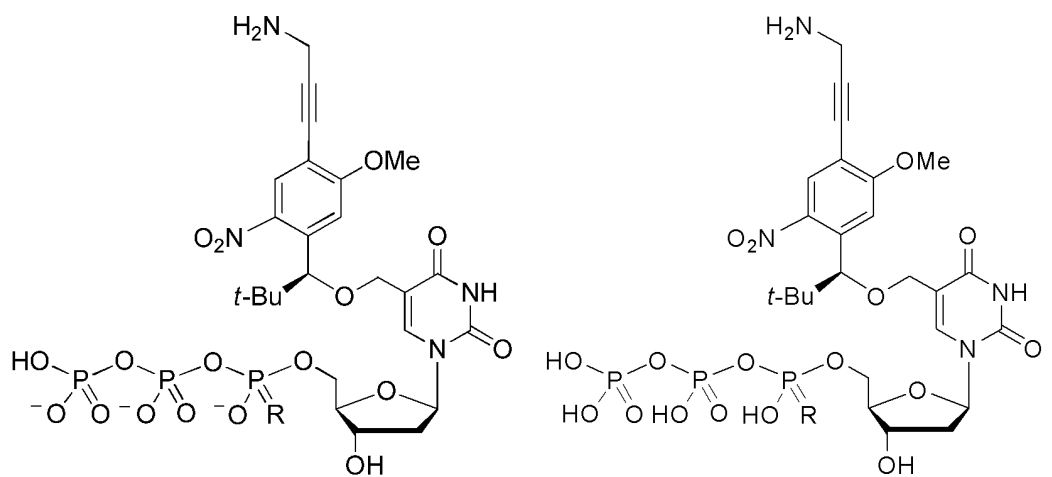


20

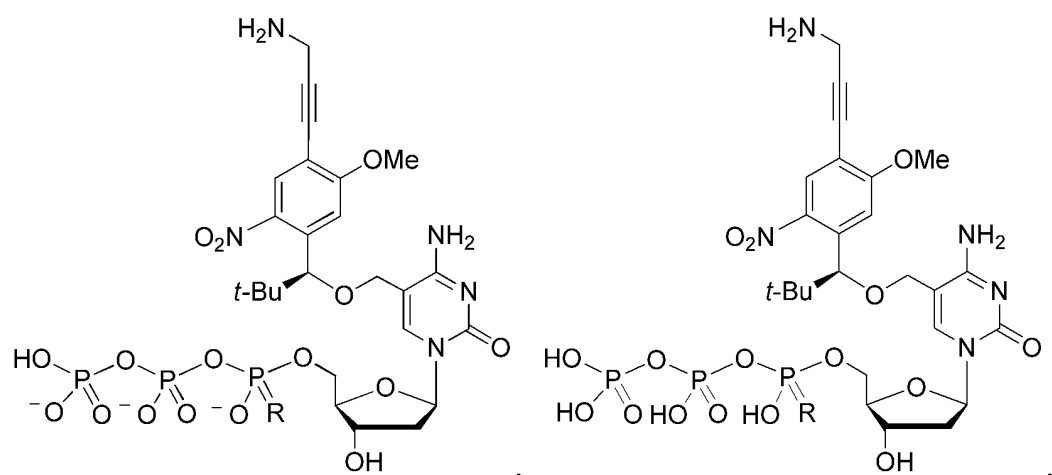


30

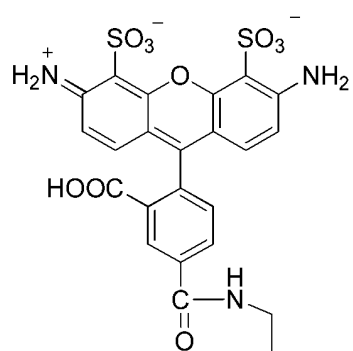
40



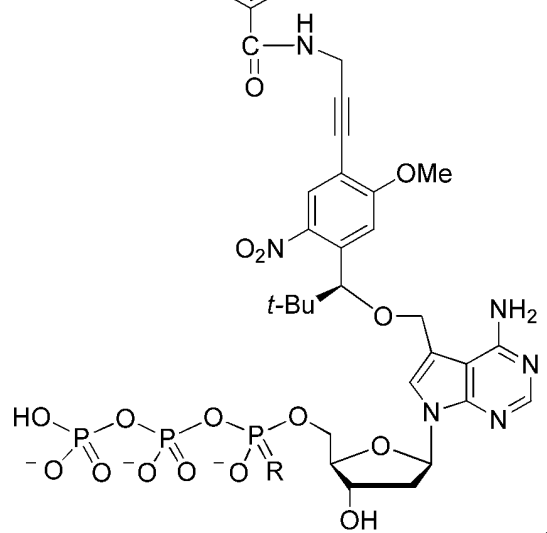
10



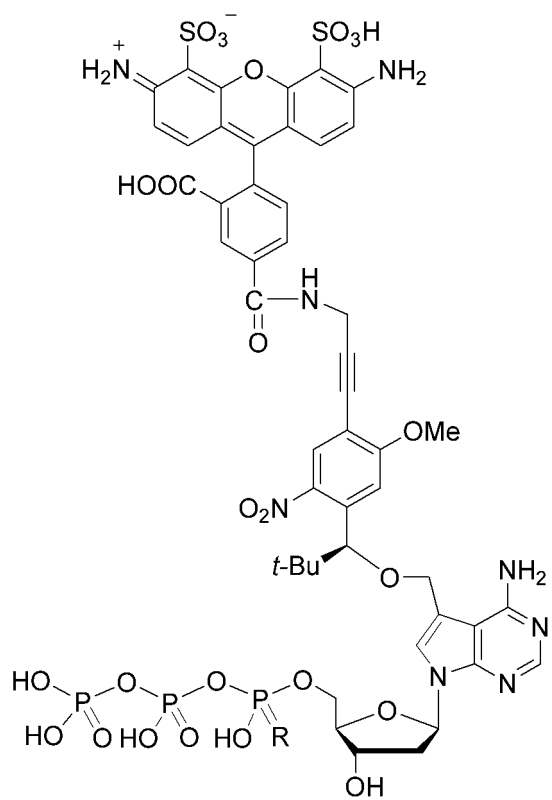
20



30

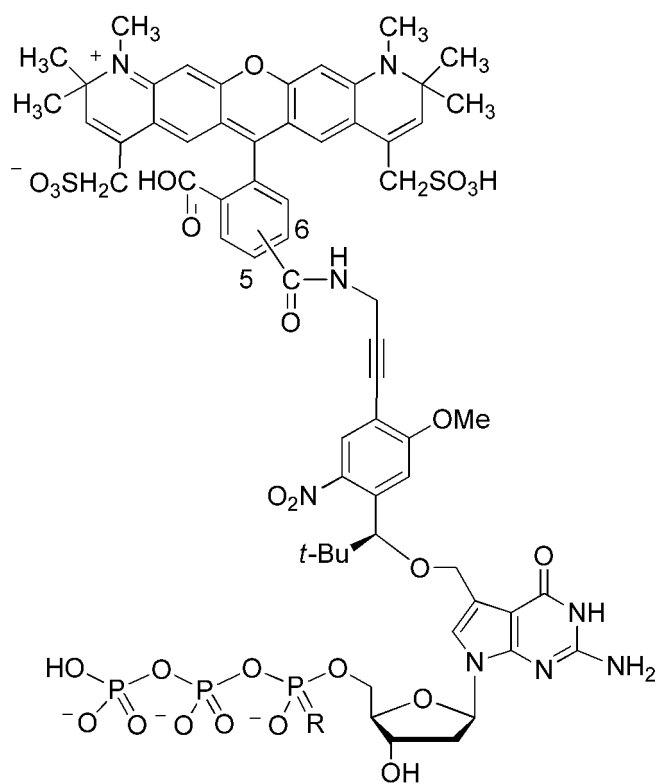


40



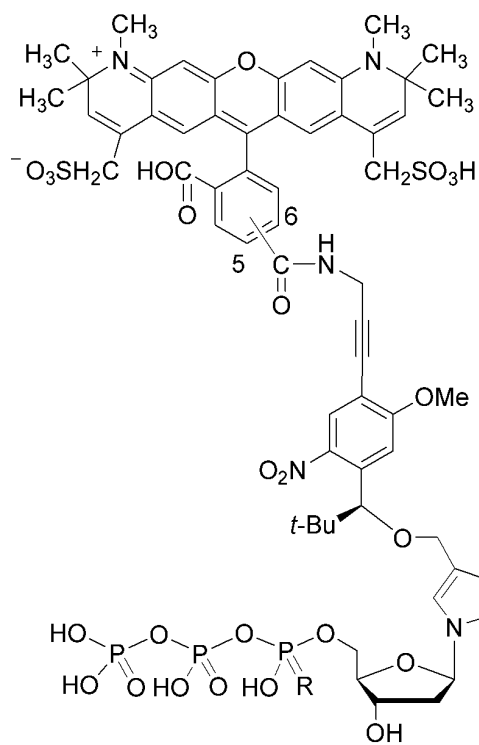
10

20



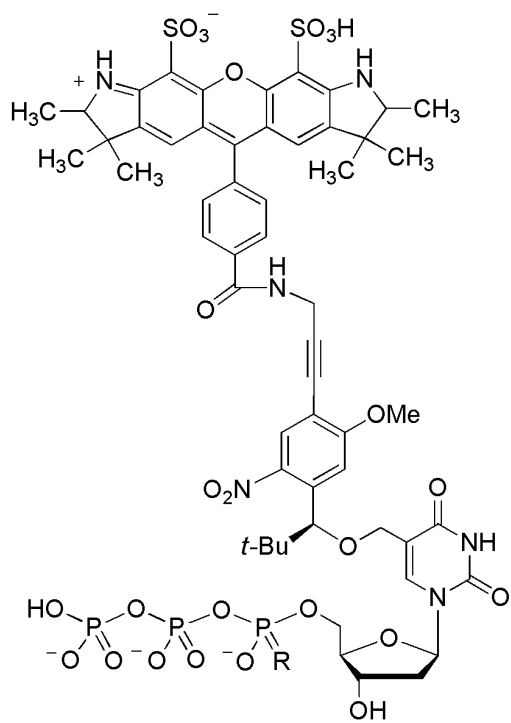
30

40

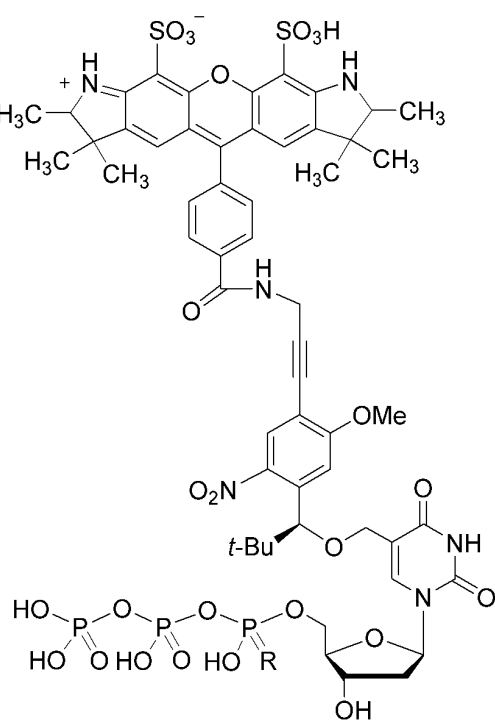


10

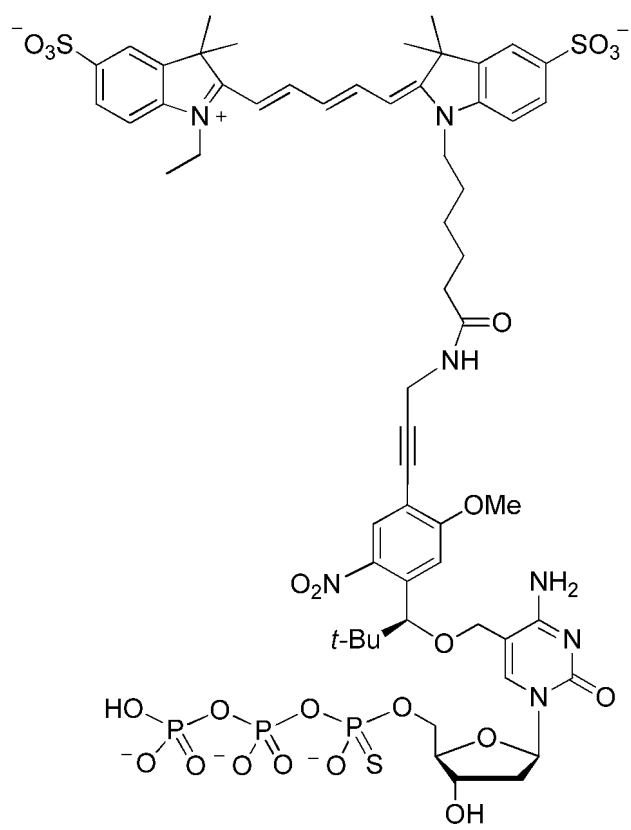
20



30

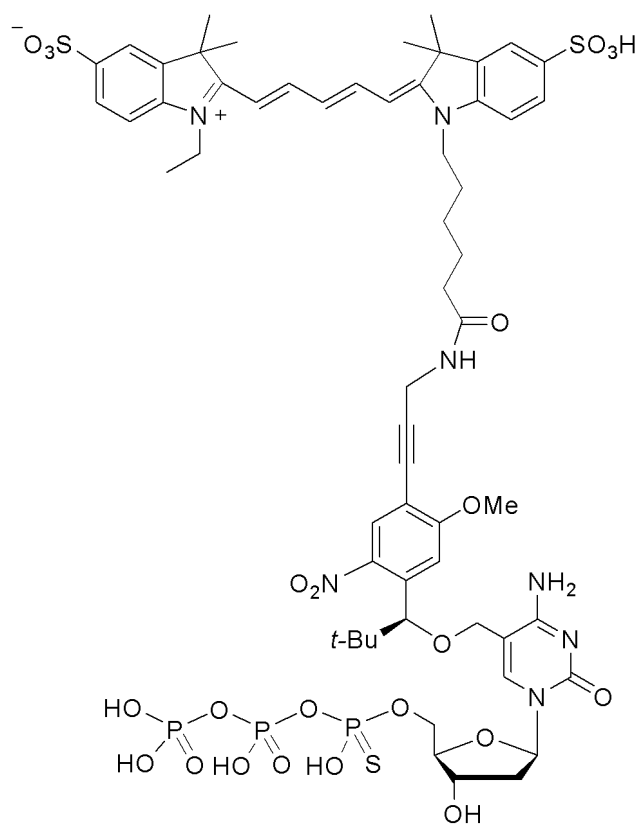


40



10

20



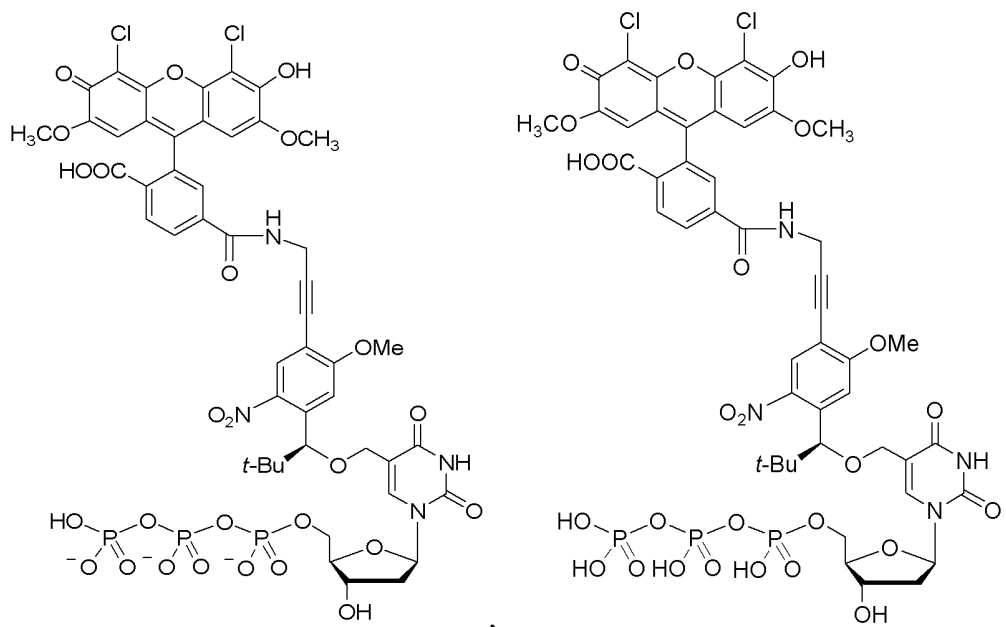
30

40

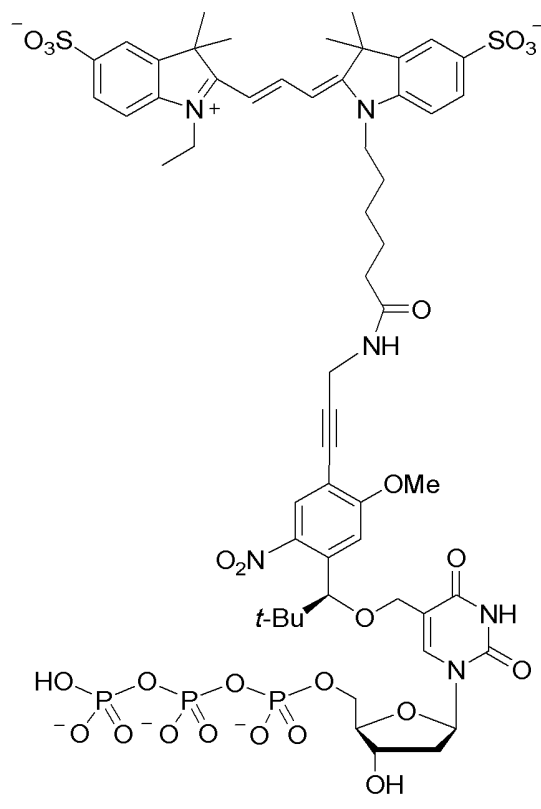


30





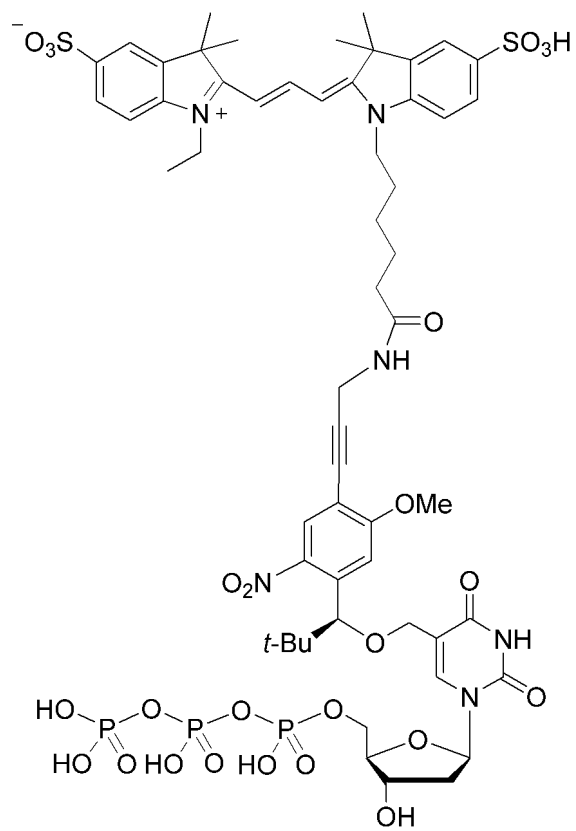
10



20

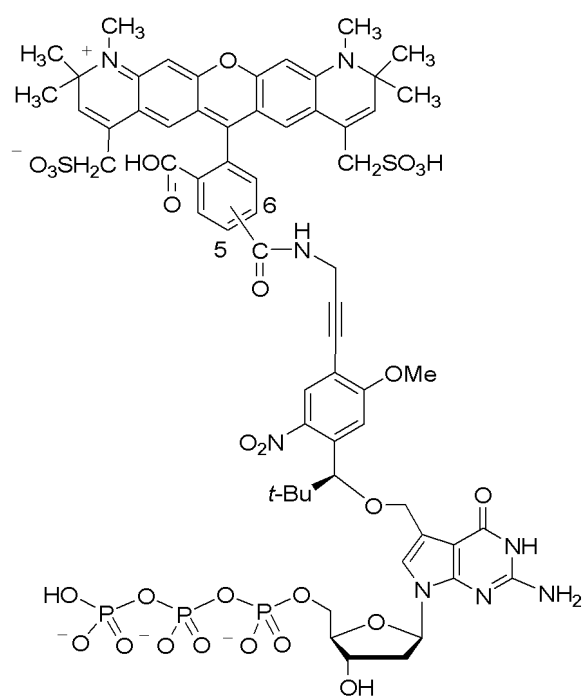
30

40



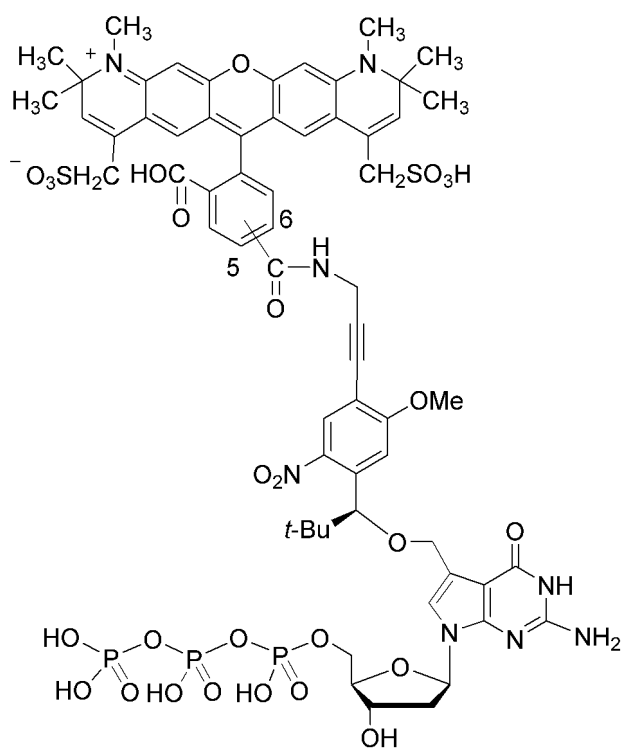
10

20

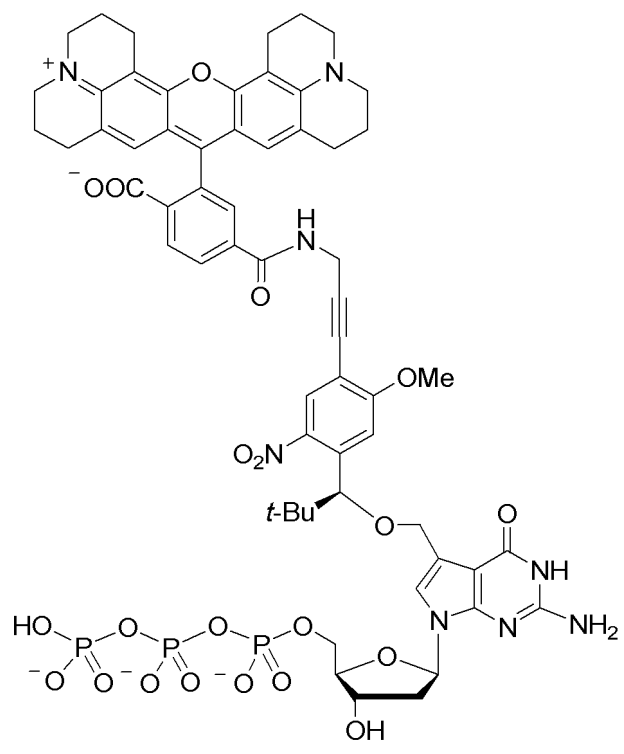


30

40



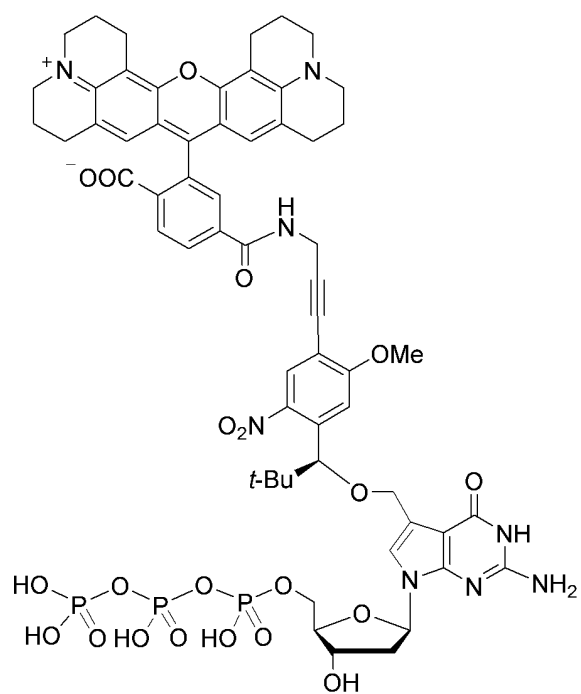
10



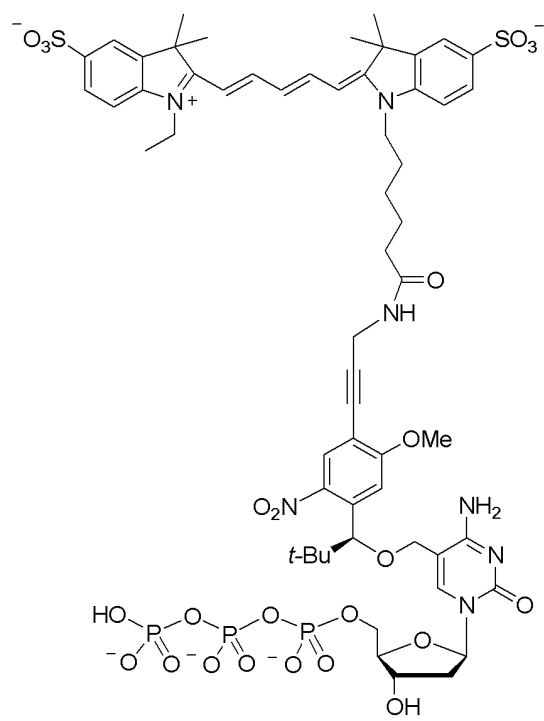
20

30

40



10

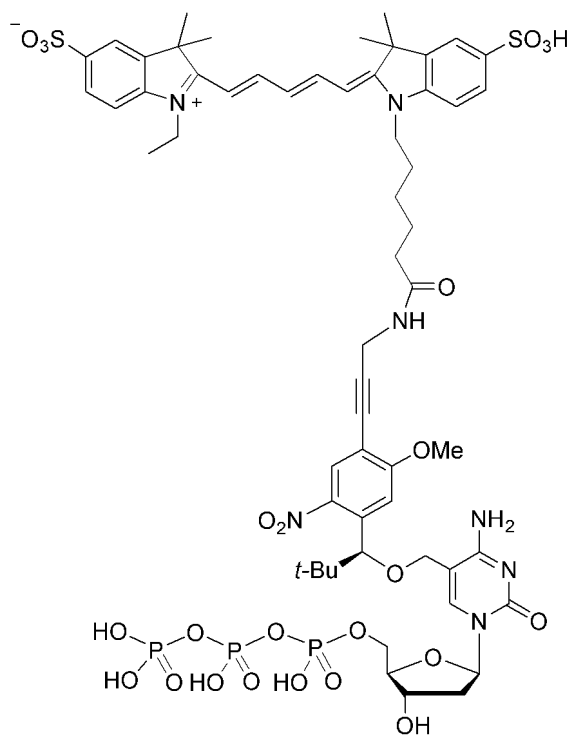


20

30

, または

40



10

20

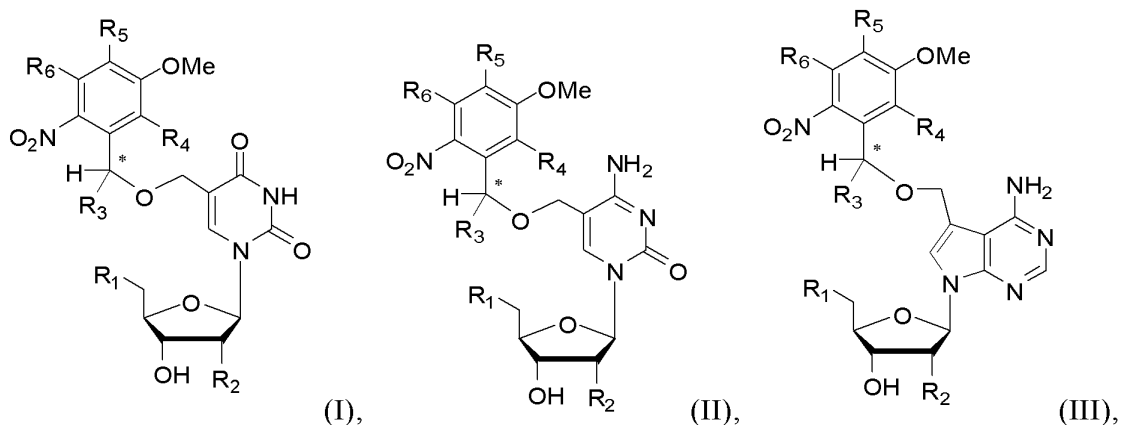
式中、Rは、=Oまたは=Sである。

【請求項 20】

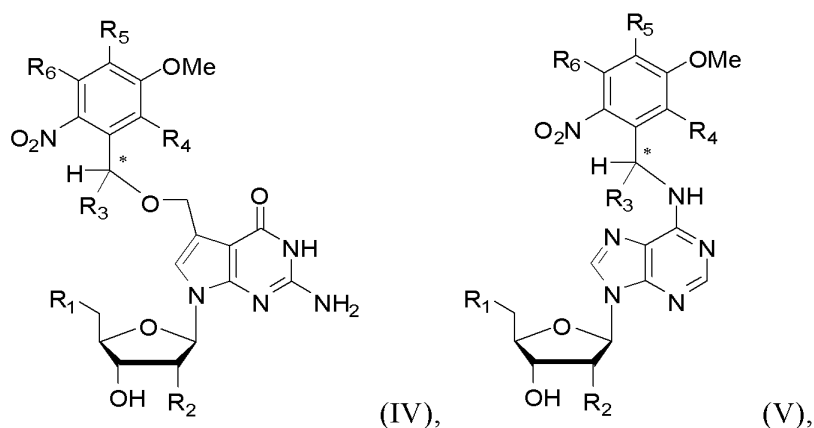
以下の段階を含む、標的核酸を配列決定する方法：

- (i) プライマーまたは核酸の5'-末端を固体表面に結合させる段階；
- (ii) それぞれハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体を形成するために、標的核酸と該固体表面に結合したプライマーとをハイブリダイズさせる段階、またはプライマーと該固体表面に結合した核酸とをハイブリダイズさせる段階；
- (iii) 異なる式I～VIIの化合物が異なるフルオロフォアを有するという条件で、ポリメラーゼ、および下記式およびその塩からなる群より選択される1つまたは複数の化合物を得る段階；

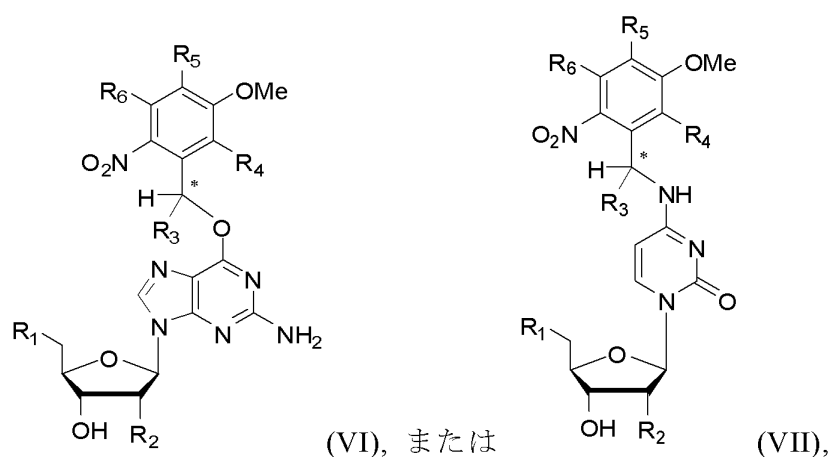
30



10



20



30

式中

R_1 は、トリホスフェート、 α -チオトリホスフェートまたはポリホスフェートであり；

40

R_2 は水素、またはヒドロキシであり；

R_3 はアルキル ($C \leq 8$) または置換アルキル ($C \leq 8$) であり；

R_4 は水素であり；

R_5 は-リンカー-レポーターであり、該レポーターはフルオロフォアに基づき；

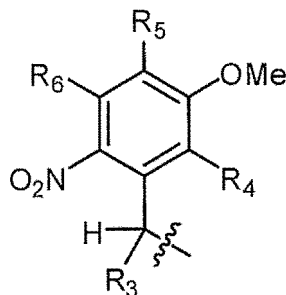
R_6 は水素である；

(iv) ポリメラーゼ反応を経由して伸長するプライマー鎖を形成するために、ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体と段階(iii)のポリメラーゼおよび1つまたは複数の化合物とを反応させる段階；

(v) 段階(iv)の取り込まれた化合物をそのフルオロフォアによって同定するために、伸長するプライマー鎖を撮像する段階；

50

(vi) R_3 、 R_4 、 R_5 、および R_6 は段階(iii)において定義される通りである下記式の光開裂性末端部分を除去することによって、伸長プライマーを得るために、伸長するプライマー鎖を有する固体表面を、光源に曝露する段階：



10

；ならびに

(vii) 標的核酸中の複数の塩基を同定するために、段階(iv)～(vi)を1回または複数回繰り返す段階であって、前回のサイクルの段階(vi)の伸長プライマーが後続のサイクルの段階(iv)においてハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体の代わりに反応する、段階。

【請求項 2 1】

段階(vi)がジチオスレイトール(DTT)の存在下で行われる、請求項20記載の方法。

【請求項 2 2】

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが、対応する天然ヌクレオチドの取り込み効率の70%～100%で生じ、式Iの化合物に対応する天然ヌクレオチドがデオキシチミジン5'-三リン酸、式IIおよびVIIの化合物に対応する天然ヌクレオチドがデオキシシチジン5'-三リン酸であり、式IIIおよびVの化合物に対応する天然ヌクレオチドがデオキシアデノシン5'-三リン酸であり、式IVおよびVIの化合物に対応する天然ヌクレオチドが、デオキシグアノシン5'-三リン酸である、請求項20記載の方法。

20

【請求項 2 3】

段階(vi)において光開裂性末端部分の85%～100%が光源に対する曝露によって除去される、請求項20記載の方法。

【請求項 2 4】

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが90%～100%の効率で生じた後、鎖伸長の終結が行われる、請求項20記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2011年10月7日出願の米国仮出願第61/627,211号および2011年9月13日出願の米国仮出願第61/534,347号の優先権の恩典を主張し、両出願の内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

I. 発明の分野

40

本発明は概して、DNA配列決定および他の種類のDNA分析のための組成物および方法に関する。より詳しくは、本発明は部分的に、光化学開裂性基を有する高速3'-OH非遮断ヌクレオチドおよびヌクレオシド、ならびに、生物医学研究における用途を含むいくつかのDNA配列決定方法におけるそれらの使用のための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

II. 関連技術の説明

DNAを迅速に配列決定するための方法が、集団における疾患および変異を分析しかつ治療を開発するために必要である(参照により本明細書に組み入れられるMetzker, 2010)。ヒト配列の変動の一般的に観察される形態は、ゲノム配列の塩基対約300個中1個～1000

50

個中1個において生じる一塩基多型(SNP)、ならびに遮断置換、挿入/欠失、反転、部分重複およびコピー数変異体を含む構造変異体(SV)である。構造変異体は、すべての可変性事象の22%、およびSNPが寄与する変異体塩基よりも多くの変異体塩基を占めうる(参照により本明細書に組み入れられるLevy et al., 2007)。この知見は、マイクロアレイに基づく方法を使用して個人270名を分析したScherer、Hurlesおよび共同研究者らの知見と一致している(参照により本明細書に組み入れられるRedon et al., 2006)。ヒトゲノムの全配列に基づく、SNPおよびSVのマッピングまたは直接的な結びつけによって一般的な疾患およびがんの根底にある遺伝的関連を同定するための試みが進行中である。応用医学において、迅速で高スループットかつ低コストのDNA配列決定に重点を置いた技術開発は、SNPおよびSVなどの遺伝情報の理解および使用を促進するであろう。

10

【0004】

一般に、SNPの10%~15%は、特定のアミノ酸残基を改変することでタンパク質機能に影響を与えるか、スプライシング機構を変化させることで遺伝子の適切な処理に影響を与えるか、あるいは制御機構を変動させることで遺伝子またはタンパク質の正常な発現レベルに影響を与える。また、SVはヒトの生体反応および疾患において重要な役割を果たしうる(参照により本明細書に組み入れられるIafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004; Tuzun et al., 2005; Stranger et al., 2007)。情報価値のあるSNPおよびSVの同定が、遺伝疾患のより正確な診断、リスク感受性のより良好な予測、または組織中の散発性変異の同定を導くと想定される。個人のSNPおよびSVプロファイルの1つの用途は、予防薬治療によって疾患の発症または進行を著しく遅延させることであろう。さらに、薬物代謝遺伝子のSNPおよびSVプロファイルが、より安全かつより効果的な結果を与える特定の投薬レジメンを処方するために使用されることがある。これらの野心的な目標を達成するために、ゲノム配列決定は、集団の大多数を部分配列決定する可能性を伴う再配列決定段階に移行しつつあり、再配列決定段階は、所与の複合疾患に関するSNPおよびSVプロファイルを得るために、ヒトゲノム全体を通じて分布する特定の領域を平行して配列決定することを包含するであろう。

20

【0005】

最も一般的な疾患の根底にある配列変動は、関連遺伝子の全体を通じて分散しかつ低頻度で存在する複数のSNP、SV、およびいくつかのその組み合わせを包含する可能性が高い。したがって、新規配列決定のための戦略を使用するDNA配列決定技術は、公知のSNPのみを標的化する技術に比べて、これらの稀少で広く分散した変異体を検出および/または発見する可能性が高い。

30

【0006】

SNP、SV、一塩基変異体(SNV)およびいくつかのその組み合わせの検出においてNGS技術をどのようにして適用できるかの一例は、がん診断法である。これらのアッセイは伝統的に単一マーカーで単一アッセイのアプローチであったが、このアプローチは最近、単一の実験アプローチによって複数のマーカーをアッセイすることに進化した。しかし、各がんは遺伝的に複雑であり、多くの場合、数多くの遺伝子において多くの変異が同時に生じる。したがって、伝統的な方法では、選ばれたいくつかの公知の配列変異体に関する情報しか与えないのに、試験が高価で時間のかかるものになっている。NGS技術の最近の進歩により、様々ながんの種類に関連する多くの医学的に作用可能な遺伝子標的に重点を置いた標的化アプローチが可能になった(Su et al., 2011; Beadling et al. 2012参照)。The Cancer Genome Atlas(TCGA)プロジェクト、International Cancer Genome Consortium(ICGC)プロジェクトおよびCatalogue of Somatic Mutations in Cancer(COSMIC)データベースなどの配列決定の試みの最近の成功が理由で、多くのがんの種類におけるこれらの遺伝子標的、およびそれら変異を含むがんに対する治療法の結果に関する知識の概要が存在する(Futreal et al., 2004参照)。部分的にはPediatric Cancer Genome Projectの結果としてのさらなる研究は、小児がんが、比較的少数の変異と代替的分子経路中での変異の広がりとを特徴とする特徴的な遺伝子プロファイルを有することを示した(Wu et al., 2012; Meldrum et al. 2011参照)。がん診断法において現在満たされていない最大の要求は、が

40

50

ん化を経る細胞の限定的な亜集団に属する稀少な配列変異体を同定するための早期検出に必要な精度および感度を有する、高速で高スループットの技術である。

【0007】

伝統的に、DNA配列決定は、DNAポリメラーゼを使用する2',3'-ジデオキシヌクレオチド(ddNTP)の取り込みによるDNA合成の連鎖終結を包含する「サンガー法」または「ジデオキシ法」によって達成された(参照により本明細書に組み入れられるMetzker et al., 2005)。2005年以降、ゲノム分析のための自動サンガー配列決定の適用からの根本的な転換が生じた。次世代配列決定(NGS)技術の利点としては、いくつかの場合では機器運転1回当たり1億の短配列読み取りを超える莫大な量のデータを安価に生成する能力が挙げられる。これらのアプローチの多くは、合成による配列決定法(SBS)と一般的に呼ばれるが、これはDNAを配列決定する異なる機構を明確に記述するものではない(参照により本明細書に組み入れられるMetzker, 2010; Metzker 2005)。DNAポリメラーゼ依存性戦略は、循環可逆的ターミネーター法(CRT)、一塩基付加法(SNA、例えばピロシーケンス法)、およびリアルタイム配列決定法に分類されている。DNAポリメラーゼをDNAリガーゼによって置き換えるアプローチは、ライゲーションによる配列決定(SBL)と呼ばれる。これらのアプローチは参照により本明細書に組み入れられるMetzker (2010)に記載されている。

【0008】

配列決定技術としては、(a) 鋳型調製、(b) 配列決定および撮像、ならびに(c) データ解析に広く分類されるいくつかの方法が挙げられる。特定のプロトコールの独自の組み合わせは、1つの技術を別の技術と区別するものであり、各プラットフォームから生成されるデータの種類を決定する。データ出力のこれらの差は、データ品質およびコストに基づいてプラットフォームを比較する際の課題となる。品質スコアおよび精度推定値は各製造業者によって与えられるが、1つのプラットフォームによる「品質ベース」が別のプラットフォームによるそれと同等であるという合意は存在しない。

【0009】

NGS反応用の鋳型を調製する上で使用される2つの方法としては、単一DNA分子に由来するクローン的に増幅された鋳型、および単一DNA分子鋳型が挙げられる。DNAポリメラーゼを使用する配列決定方法は、循環可逆的ターミネーター法(CRT)、一塩基付加法(SNA)およびリアルタイム配列決定法に分類される(Metzker 2010参照)。DNAポリメラーゼをDNAリガーゼによって置き換えるアプローチである、ライゲーションによる配列決定法(SBL)も、NGS技術において使用されている(例えばShendure et al., 2005; Valouev et al., 2008参照)。これらの配列決定戦略と組み合わせた撮像方法は、生物発光シグナルの測定から、単一分子事象の4色撮像にまで及ぶ。これらのNGSプラットフォームが生成する大量のデータによって、データ保存、追跡および品質管理に関する情報技術に対する要求が相当なものになっている(Pop & Salzberg, 2008参照)。

【0010】

調査中のゲノムから代表的で偏りのない核酸材料源を生成する堅牢な方法の必要性は、依然として重要な目標である。現行の方法は一般に、ゲノムDNAを比較的小さなサイズにランダムに破壊し、そこから断片鋳型またはメイトペア鋳型を作り出すことを包含する。NGS技術の共通テーマは、鋳型を固体表面または固体支持体に結合させるまたは固定化することである。空間的に隔てられた鋳型部位の固定化によって、数千回~数十億回の配列決定反応を同時に行うことが可能になる。

【0011】

クローン的に増幅された方法は細胞のクローン化に比べて特定の利点を示すが、いくつかのプロトコールは通常は実行が面倒であり、大量のゲノムDNA材料(3~20 µg)を必要とする。単一分子鋳型の調製は、より簡単であり、必要とする出発原料がより少ない(1 µg未満)。さらに、これらの方法はPCRを必要としない。PCRは、クローン的に増幅された鋳型中に変異を作り出してしまい、この配列変異体は隠蔽される。また、ATリッチおよびGCリッチな標的配列は産物産生における増幅の偏りを示すことがあり、その結果、ゲノムアラインメントおよびゲノムアセンブリにおいてこれらの配列が産生不足になる。RNA-seq(

Wang et al., 2009参照)などの定量的適用は、mRNA分子の提示される存在量を改変することがない非増幅鋳型源でより効果的に機能する。

【0012】

CRT法の重要な局面は可逆的ターミネーターであり、これには3'-O-遮断および3'-OH非遮断の、主に2種類が存在する(Metzker, 2010)。サンガー配列決定における連鎖ターミネーターとして作用するddNTPの使用は、ヌクレオチドの3'-末端に結合した可逆的遮断基の初期開発の基礎を提供した(Metzker et al., 1994; Canard & Sarfati, 1994)。3'-O-アシル-dNTP(Metzker et al., 1994; 米国特許第6,664,079号; Ju et al., 2006; 米国特許第7,057,026号; 米国特許第7,345,159号; 米国特許第7,635,578号; 米国特許第7,713,698号)および3'-O-アジドメチル-dNTP(米国特許第7,057,026号; Guo et al., 2008; Bentley et al., 2008; 米国特許第7,414,116号; 米国特許第7,541,444号; 米国特許第7,592,435号; 米国特許第7,556,537号; 米国特許第7,771,973号)などの遮断基がCRTにおいて使用された。3'-O-遮断ターミネーターは、フルオロフォアを核酸塩基から除去して3'-OH基を回復させるために、2個の化学結合の開裂を必要とする。これらの可逆的ターミネーターを使用する上での欠点は、3'-末端に結合した遮断基が通常、DNAポリメラーゼによる取り込みに対する偏りを引き起こすということである。多くの場合、3'-O-遮断ターミネーターの取り込みを促進するには、DNAポリメラーゼの変異誘発が必要である。多数の遺伝子改変DNAポリメラーゼを、1つもしくは複数のアミノ酸の置換、挿入および/または欠失を含む部位特異的変異誘発またはランダム変異誘発によって作り出した後、3'-遮断ヌクレオチドをより効率的に取り込むことを目標とする高スループットスクリーニングによって同定することが必要である。

【0013】

3'-O-遮断ターミネーターを効率的に取り込む修飾酵素を、変異DNAポリメラーゼの大きなライブラリーをスクリーニングすることで同定することは困難であったため、3'-非遮断可逆的ターミネーターの開発が導かれた。3'-OH非遮断ヌクレオチドの塩基に結合した小さな光開裂性基が、有効な可逆的ターミネーターとして作用するものであり、野生型DNAポリメラーゼによって効率的に取り込まれうることが示された(Wu et al., 2007; Metzker, 2010; Litosh et al., 2011; Gardner et al., 2012; 米国特許第7,897,737号、第7,964,352号および第8,148,503号、米国特許出願公開第2011/0287427号)。例えば、5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシウリジン(HOMedU)は、数多くのバクテリオファージおよび下等真核生物のゲノムに自然に見出される(参照により本明細書に組み入れられるGommers-Ampt, 1995)。そのヒドロキシメチル基は、小さな光開裂性末端基を結合させるための分子ハンドルとして役立ちうる。可逆的ターミネーターとして機能するようにさらに修飾される他の天然の超修飾塩基としては5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン(HOMedC)が挙げられ、これはT2、T4およびT6バクテリオファージのゲノム(Wyatt & Cohen, 1953; Gommers-Ampt, 1995)ならびに哺乳動物のゲノム(Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010)に自然に見出される。また、ピロロピリミジン環構造(7-デアザプリン)がヌクレオシド抗生物質(参照により本明細書に組み入れられるCarrasco & Vazquez, 1984)およびtRNA塩基(参照により本明細書に組み入れられるLimbach, et al., 1994)に自然に見出され、化合物7-デアザ-7-ヒドロキシメチル-2'-デオキシアデノシン(C⁷-HOMedA)(Rockhill et al., 1997)および7-デアザ-7-ヒドロキシメチル-2'-デオキシグアノシン(C⁷-HOMedG)(McDougall et al., 2001)が報告された。

【0014】

本発明の一面は、ヒドロキシメチルヌクレオシドおよびヌクレオチドの核酸塩基に結合した修飾2-ニトロベンジル基の使用である。半世紀以上に記載された2-ニトロトルエン(Wettermark, 1962)およびその誘導体(Wettermark, 1962; Hardwick et al., 1960; Mosher et al., 1960; Sousa & Weinstein, 1962; Weinstein et al., 1966)の溶液は、アシニトロアニオン中間体の一過的形成の結果であると考えられる現象であるフォトクロミズムの特性を示すと報告された(Weinstein et al., 1966; Morrison, 1969)。理論によって拘束されるものではないが、ニトロ基による光子の吸収が α -炭素からの水素引き抜き(

Mosher et al., 1960; Berson & Brown, 1955; De Mayo, 1960)、アシニトロアニオン中間体の形成、次いで「ケージ化」エフェクター分子の放出およびニトロソカルボニル副産物の創製(Corrie, 2005)を生じさせるということが一般に受け入れられている。これらの初期研究は、ベンジル炭素の α -置換(Wettermark, 1962)または電子供与性基によるベンゼン環の4位の置換(Sousa & Weinstein, 1962; Weinstein et al., 1966)がフォトクロミック効果の速度を増大させたことを示唆した。これらの知見は光感受性2-ニトロベンジル保護基の開発を導いた(Barltrop et al., 1966; Patchornik, 1968; Patchornik et al., 1970)。しかし、光化学開裂速度が改変される程度は通常、ベンジル炭素の置換(Walker et al., 1986; Hasan et al., 1997; Giegrich et al., 1998)、ベンジル環に結合した官能基(Wootton & Trentham, 1989; Hasan et al., 1997; Giegrich et al., 1998)、および脱離基(Walker et al., 1986)、ならびにpH(McCray et al., 1980; Walker et al., 1986; Wootton & Trentham, 1989)、溶媒(Sousa & Weinstein, 1962; McGall et al., 1997; Giegrich et al., 1998)および光強度(McCray et al., 1980; McGall et al., 1997)を含むと報告された数多くの因子に依存する。しかし、研究されていない1つの特性は立体化学配置であり、これによって2-ニトロベンジルのベンジル炭素または α -炭素の置換がキラル中心を生じさせる。ヌクレオチド合成の場合、ラセミ α -置換2-ニトロベンジルアルコールのカップリングは、ベンジル炭素における絶対配置(RまたはS)のみが異なる2つのジアステレオマーを生じさせるであろう。

【0015】

第1のヌクレオチド付加後の取り込みを停止させるための、かさ高い色素基の立体障害に依存する、3'-OH非遮断ヌクレオチドの別のクラスは、Mitra et al. (2003)およびTurcatti et al. (2008)によって記載された。Wu et al. (2007)、Litosh et al. (2011)およびGardner et al., 2012によって記載された置換2-ニトロベンジルヌクレオチド類似体が、蛍光色素などのかさ高い置換基を必要とせずにDNA合成の終結を引き起こすことに留意されたい。3'-非遮断ヌクレオチドのさらなるクラスはHelicos Biosciencesによって記載された。これらのヌクレオチドは、DNA合成阻害剤として作用する第2のヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体を使用する(Bowers et al., 2009; 米国特許第7,476,734号)。本発明の化合物とBowersによって記載された化合物とを比較する際に、終結特性の有意な差が観察される。例えば、Bowersらは2塩基ホモポリマー鋳型を使用する前定常状態の動態を記載しており、その $k_{pol(+2)}$ 速度はこれら鋳型の3'-OH非遮断「仮想」ターミネーターのすべてについて測定された。Bowersらはマイクロモル以下のヌクレオチド濃度(すなわち100~250nM)で終結アッセイを行った。対照的に、本発明のいくつかの化合物では10 μ Mにて0.5~20分の時間経過で行った。化合物dU.VおよびdU.VIはいずれも、第1の塩基の位置において迅速に取り込まれ(2分で100%)、次にその位置においてDNA合成を終結させた。認識可能なシグナルは、予想される第2の塩基の位置において20分のインキュベーション時間以内に検出できなかった。さらなる詳細に関してはGardner et al., 2012を参照。

【0016】

3'-OH非遮断可逆的ターミネーターは通常、3'-O-遮断ヌクレオチドに比べて、いくつかの利点を有する。例えば、多くの3'-OH非遮断可逆的ターミネーターでは、単結合のみの開裂によって核酸塩基から末端基およびフルオロフォア基の両方が除去される。これによって、次のCRTサイクルのためにヌクレオチドを回復させるためのより効率的な戦略が得られる。3'-OH非遮断可逆的ターミネーターの第2の利点は、これらの化合物の多くが、より好ましい酵素への取り込みを示し、いくつかの場合では野生型DNAポリメラーゼによって天然ヌクレオチドとして同様に取り込まれる(Wu et al., 2007; Litosh et al., 2011; Gardner et al., 2012; 米国特許第7,897,737号; 米国特許第7,964,352号; 米国特許第8,148,503号; 米国特許出願公開第2011/0287427号)ということであるが、他の場合ではこの効率は観察されなかった(Bowers et al., 2009; 米国特許第7,476,734号)。3'-OH非遮断ターミネーターの1つの課題は、一塩基付加後にDNA合成の終結を導く、塩基に対する適切な修飾を作り出すことである。このことは、非遮断3'-OH基が、到来する次のヌクレオチドを取り込むための天然基質であることから重要である。

【0017】

次世代配列決定(NGS)技術は重要な生物医学的発見を促進したが、いくつかの理由から、誤り率の減少、遅いサイクル時間の減少を含む化学的改善がなお必要である。可逆的ターミネーターがNGSアッセイにおいて有効であるには、ヌクレオチド取り込みの高速な動態、一塩基終結、高いヌクレオチド選択性、および/または末端基の迅速な開裂を例えば含むいくつかの理想的特性を示すことが通常は望ましい。したがって、これらの課題に対処する新規ヌクレオシドおよびヌクレオチドを開発することが必要である。

【発明の概要】

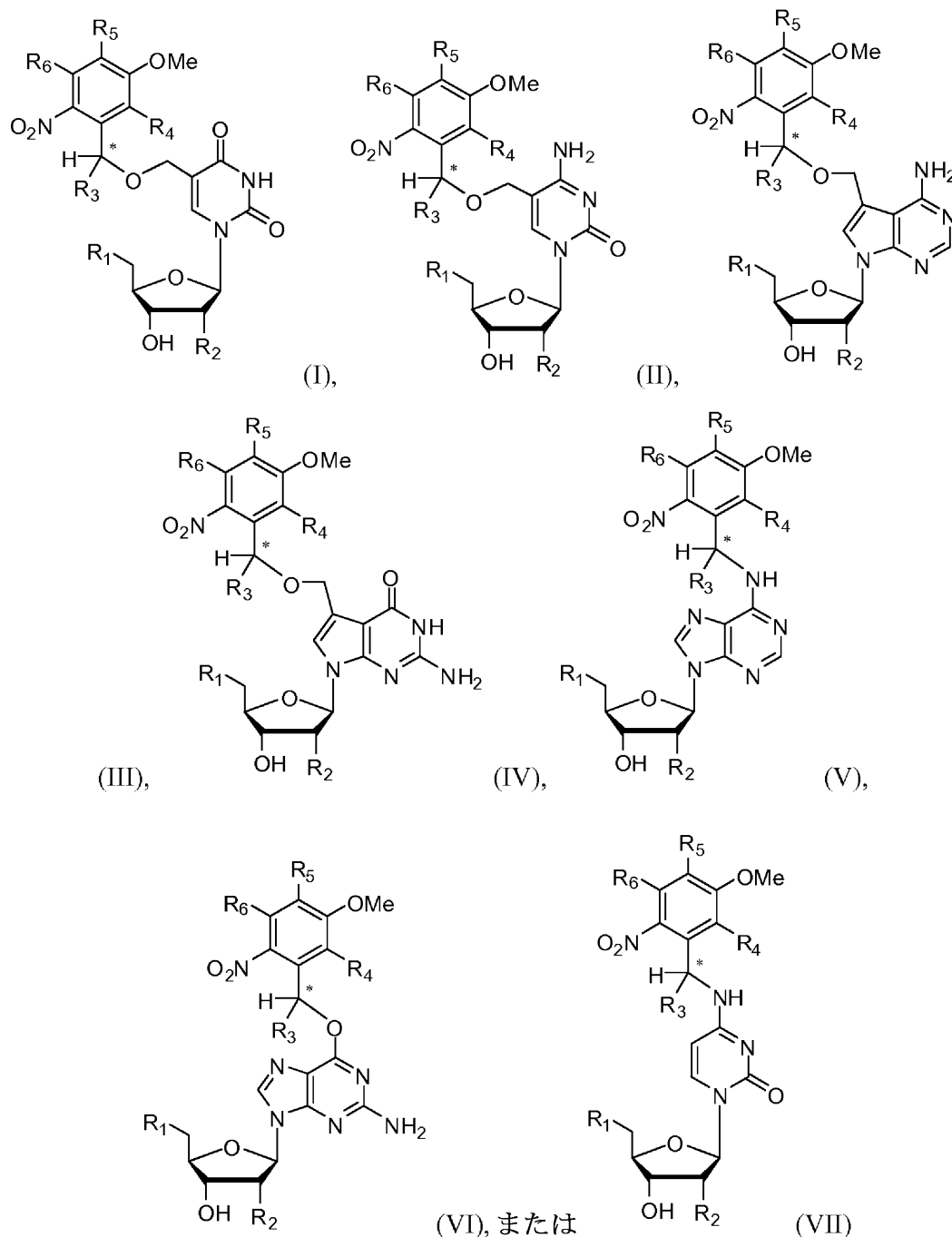
【0018】

いくつかの局面では、本開示は、高スループット配列決定反応におけるゲノム情報の効率的な配列決定において有用な新規の化合物および組成物を提供する。別の局面では、ゲノム情報を効率的にかつ余裕をもって与えることができる試薬および試薬組み合わせが提供される。さらなる局面では、本発明は、診断方法用の、および個人を標的化した治療法を開発するための、試薬のライブラリーおよびアレイを提供する。

10

【0019】

いくつかの局面では、本開示は、DNA配列決定において使用可能な新規化合物を提供する。例えば、本開示は、下記式の化合物またはその塩、互変異性体もしくは光学異性体を提供する：



式中、

R_1 はヒドロキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、 α -チオトリホスフェートまたはポリホスフェートであり；

R_2 は水素またはヒドロキシであり；

R_3 はアルキル ($C \leq 8$) または置換アルキル ($C \leq 8$) であり；

R_4 は

水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

アルキル ($C \leq 6$)、アシル ($C \leq 6$)、アルコキシ ($C \leq 6$)、アシルオキシ ($C \leq 6$)、アルキルアミノ ($C \leq 6$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 6$)、アミド ($C \leq 6$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

R_5 および R_6 はそれぞれ独立して

水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

アルキル ($C \leq 6$)、アルケニル ($C \leq 6$)、アルキニル ($C \leq 6$)、アリール ($C \leq 6$)、アラールキル ($C \leq 8$)、ヘテロアリール ($C \leq 6$)、アシル ($C \leq 6$)、アルコキシ ($C \leq 6$)、アシルオキシ ($C \leq 6$)

10

20

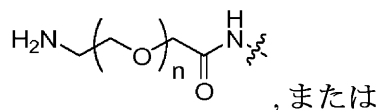
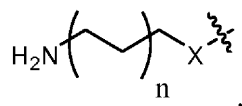
30

40

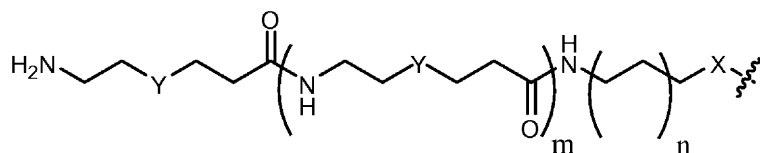
50

、アルキルアミノ ($C \leq 6$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 6$)、アミド ($C \leq 6$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョン;

下記式の基:



, または



式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-; あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり;

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり;

nは0~6の整数であり;

mは0~6の整数である; あるいは

-リンカー-レポーターである。

【0020】

いくつかの態様では、本化合物は式I、II、III、IV、V、VIまたはVIIの化合物としてさらに定義される。いくつかの態様では、 R_1 はヒドロキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、 α -チオトリホスフェートまたはポリホスフェートである。

【0021】

いくつかの態様では、 R_2 は水素、ヒドロキシである。いくつかの態様では、 R_3 はアルキル ($C \leq 8$)、例えばイソプロピルまたはtert-ブチルを含むアルキル ($C_3 \sim 4$) である。いくつかの態様では、 R_4 は水素、ニトロである。いくつかの態様では、 R_5 は水素、ヨード、またはメトキシを例えば含むアルコキシ ($C \leq 6$) である。いくつかの態様では、 R_5 は下記式の基である:



式中、

Xは

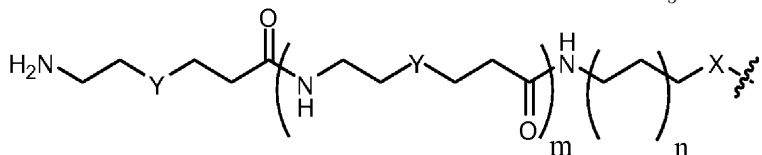
-O-、-S-または-NH-; あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり;

nは0~6の整数である。

【0022】

いくつかの態様では、Xはアルキンジイル ($C_2 \sim 8$)、例えば-C $\equiv$ C-である。いくつかの態様では、nはゼロである。いくつかの態様では、 R_5 は下記式の基である:



式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

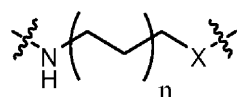
Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

mは0～6の整数である。

【0023】

いくつかの態様では、Xはアルキンジイル ($C_2 \sim 8$)、例えば-C≡C-である。いくつかの態様では、Yは-CH₂-である。いくつかの態様では、nはゼロである。いくつかの態様では、mはゼロである。いくつかの態様では、R₅は-リンカー-レポーターである。いくつかの態様では、リンカーは下記式である：



式中、

Xは

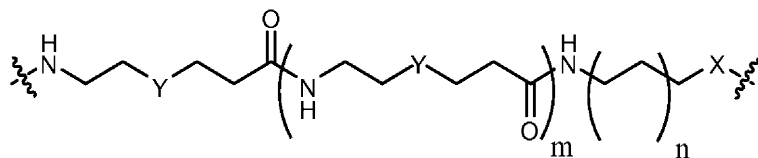
-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

nは0～6の整数である。

【0024】

いくつかの態様では、Xはアルキンジイル ($C_2 \sim 8$)、例えば-C≡C-である。いくつかの態様では、nはゼロである。いくつかの態様では、リンカーは下記式である：



式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

mは0～6の整数である。

【0025】

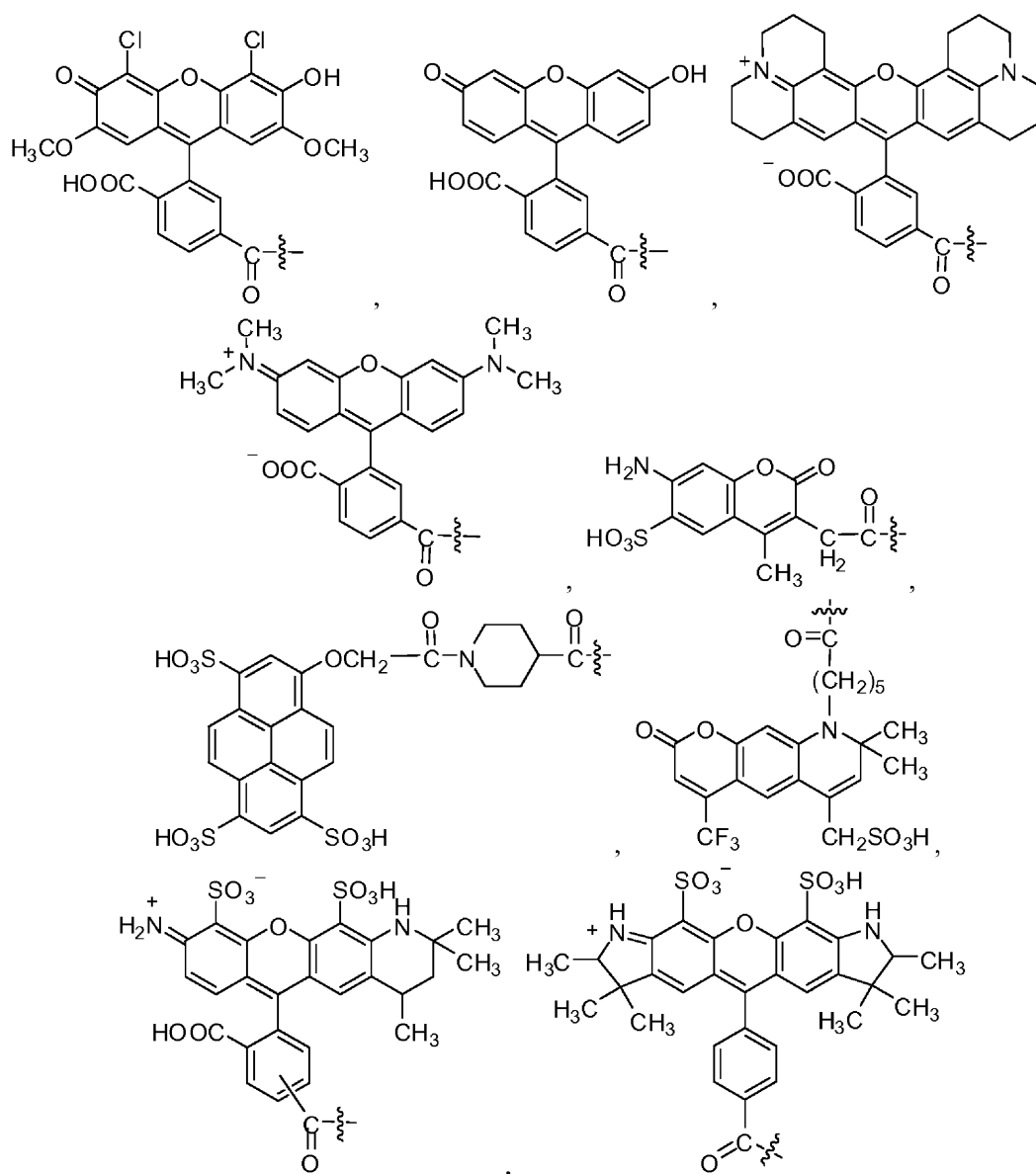
いくつかの態様では、Xはアルキンジイル ($C_2 \sim 8$)、例えば-C≡C-である。いくつかの態様では、Yは-CH₂-である。いくつかの態様では、nはゼロである。いくつかの態様では、mはゼロである。いくつかの態様では、レポーターは色素に基づき、色素はキサンテン、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン、クマリン、ピレン、フタロシアニン、フィコビリタンパク質、またはスクアライン色素である。いくつかの態様では、レポーターは下記式である：

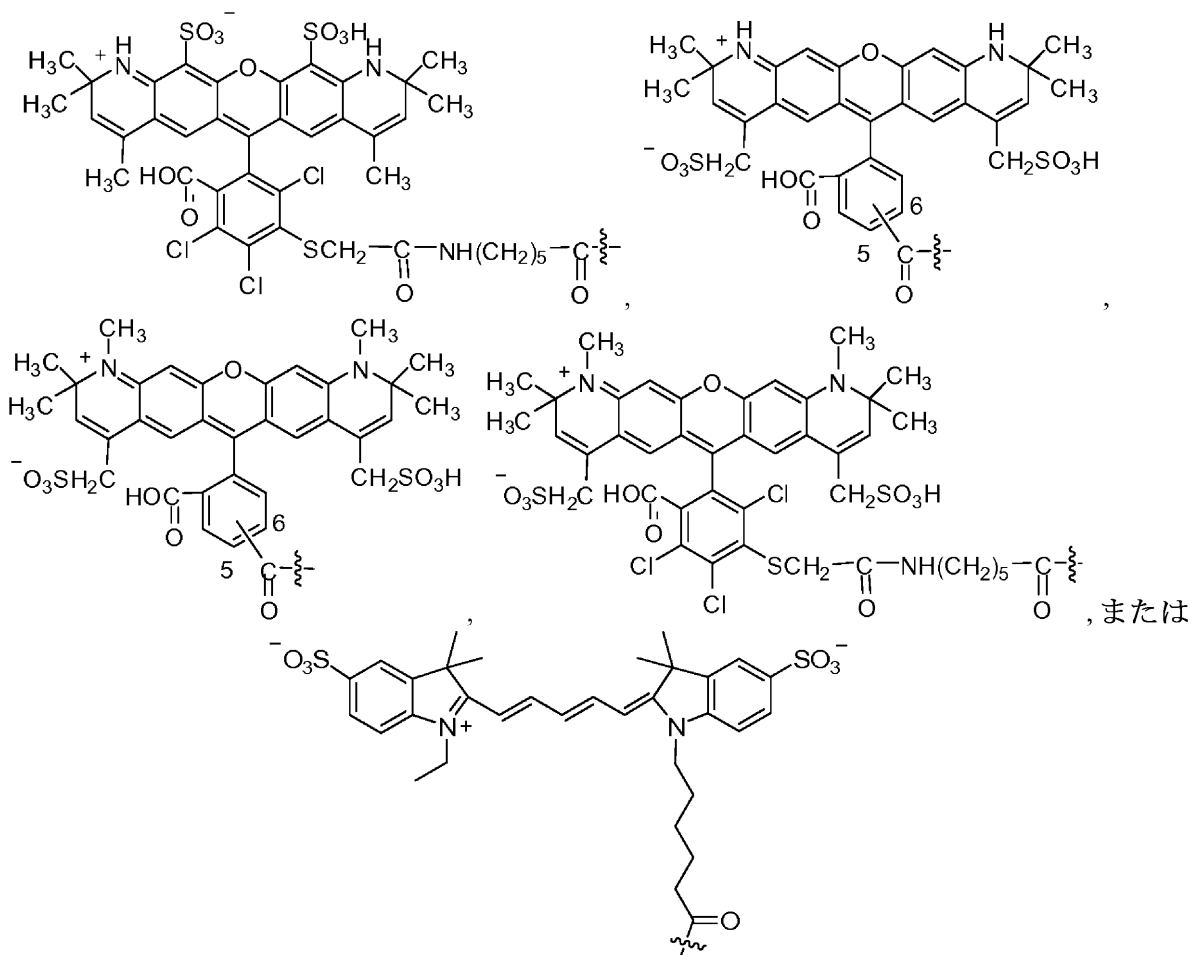
10

20

30

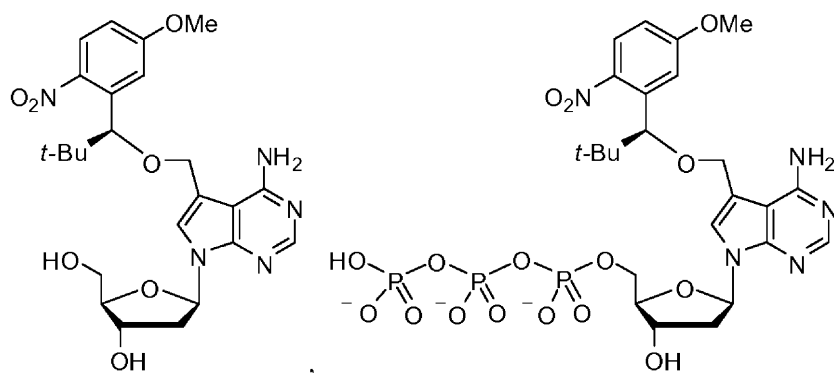
40





【0026】

いくつかの態様では、 R_6 は水素である。いくつかの態様では、星付きの炭素原子はS配置である。いくつかの態様では、星付きの炭素原子はR配置である。いくつかの態様では、本化合物は、下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義される：

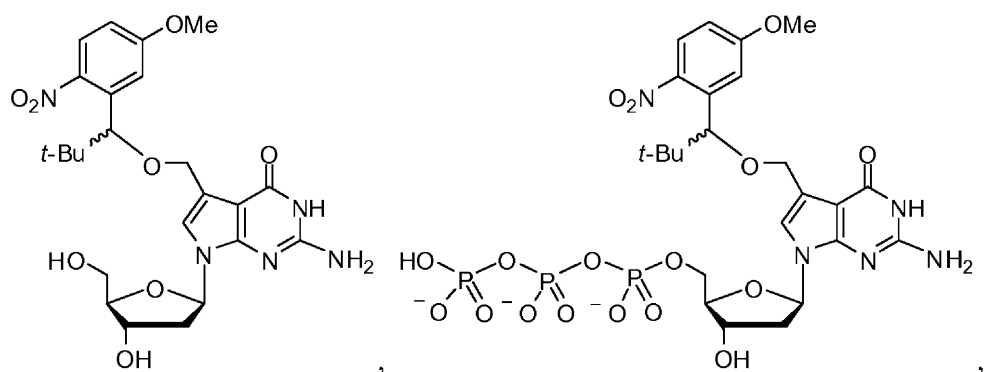


10

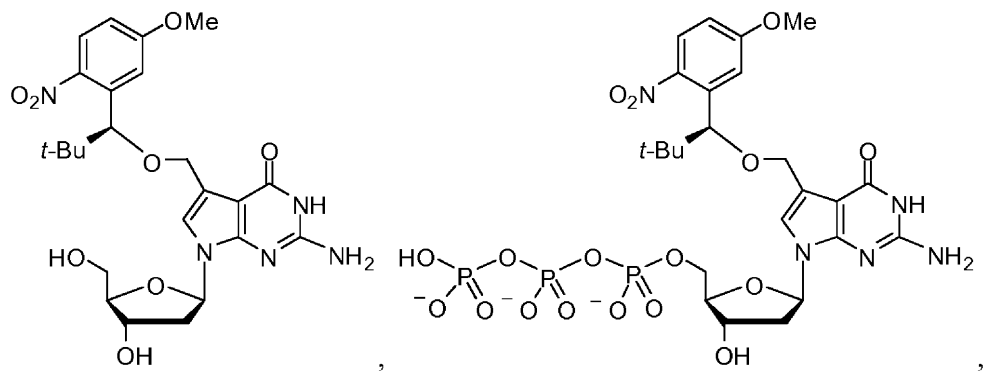
20

30

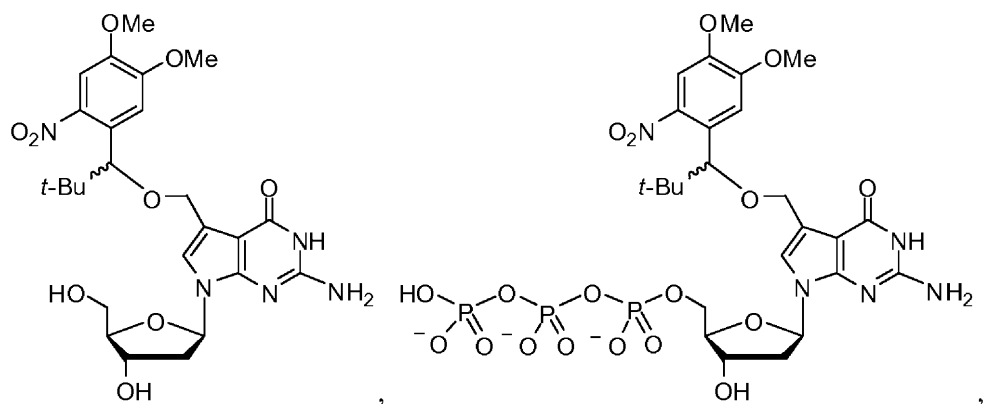
40



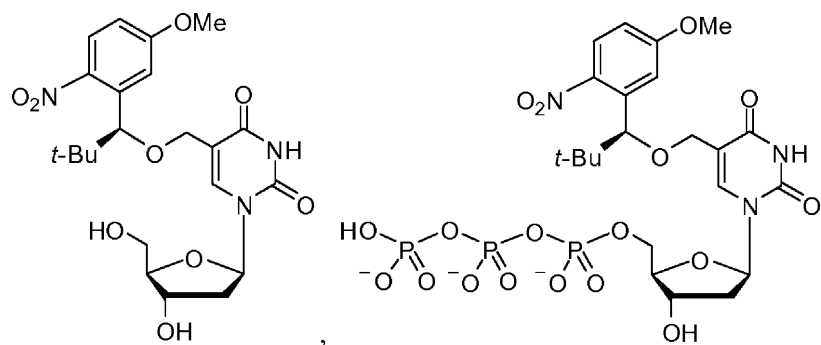
10



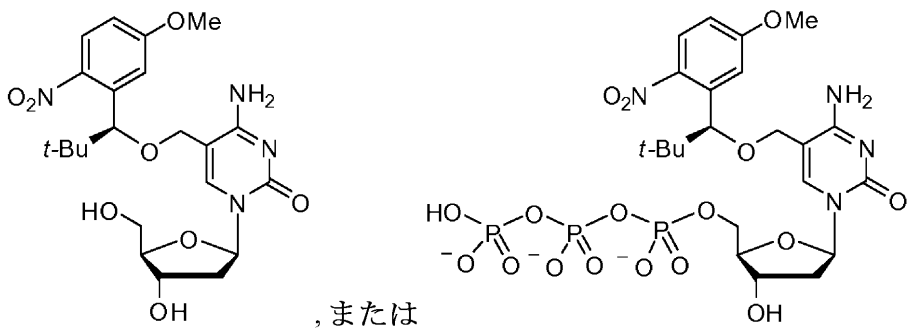
20



30



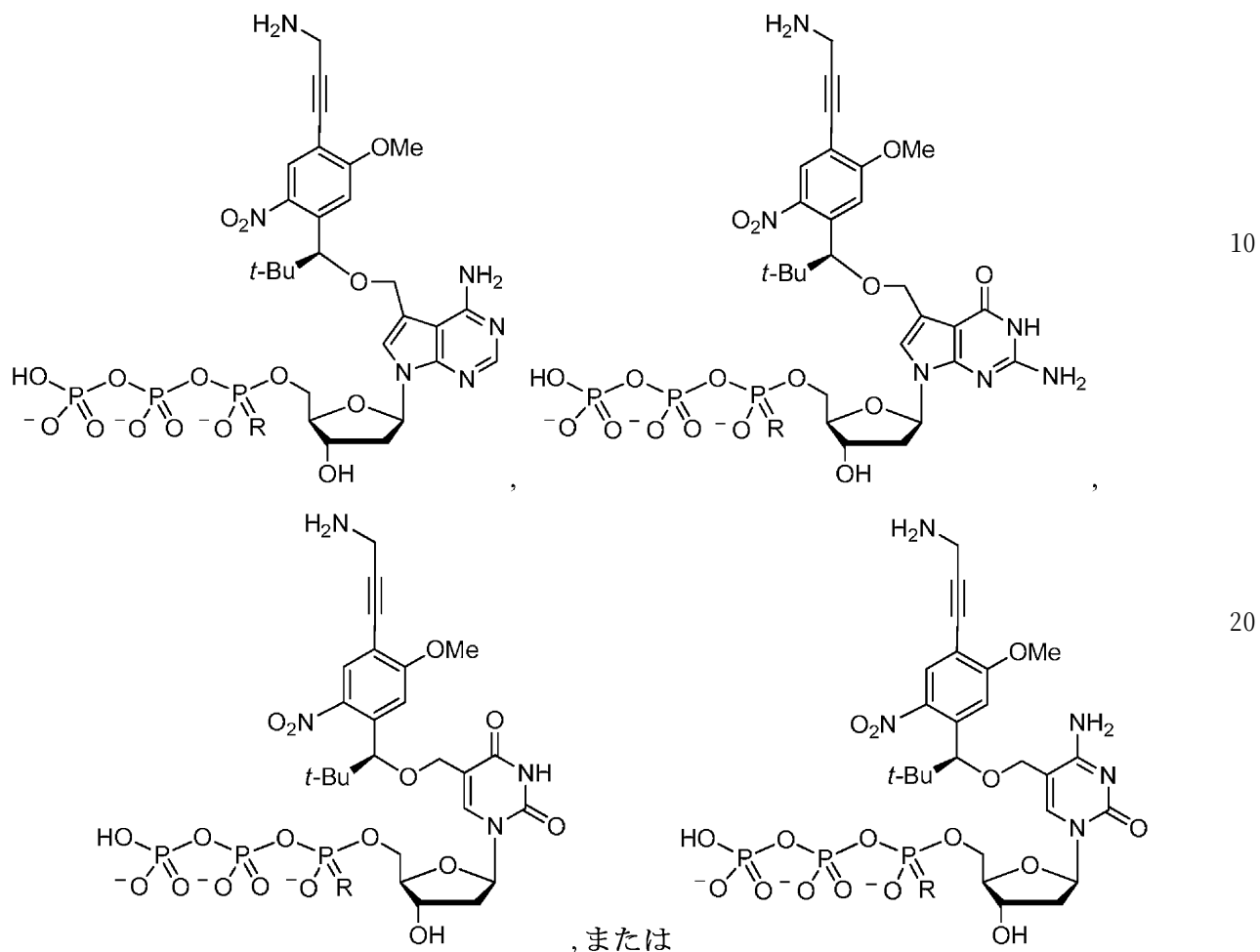
40



50

【0027】

いくつかの態様では、本化合物は、下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義され:

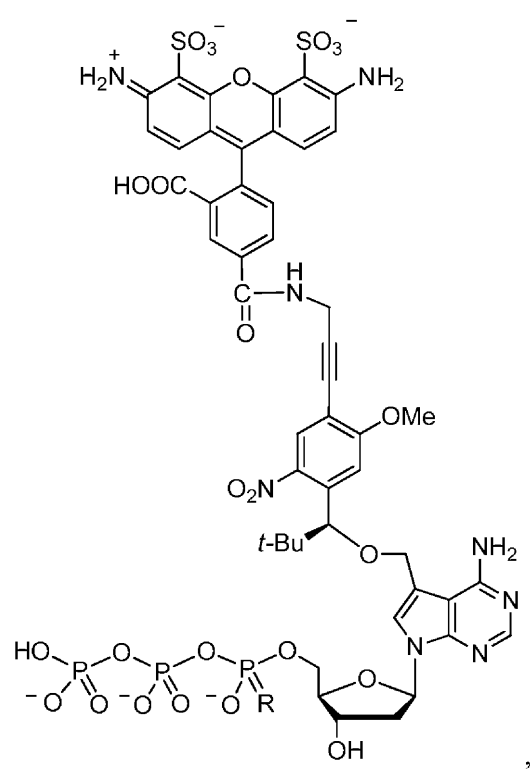


式中、Rは=Oまたは=Sである。

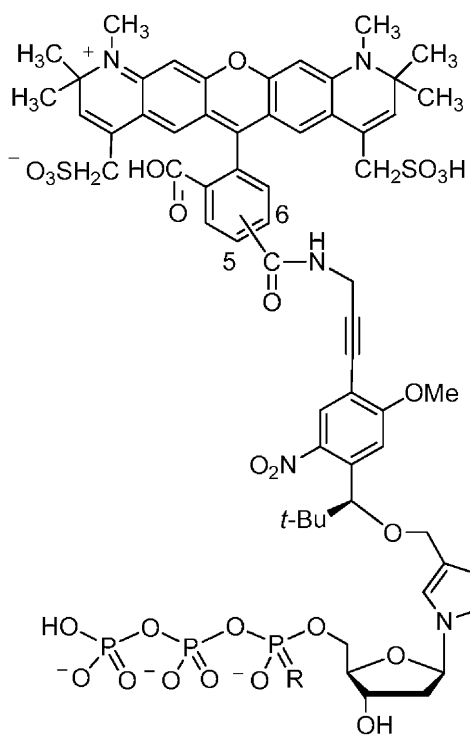
30

【0028】

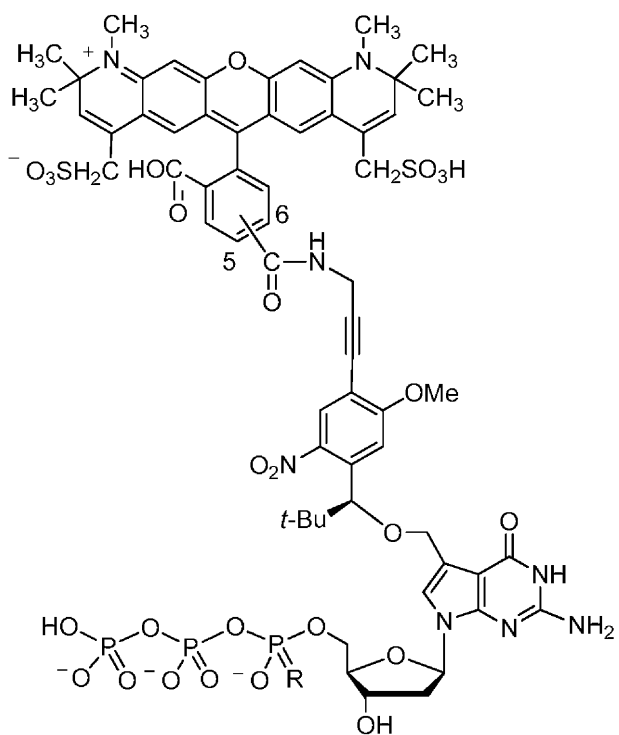
いくつかの態様では、本化合物は、下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義され:



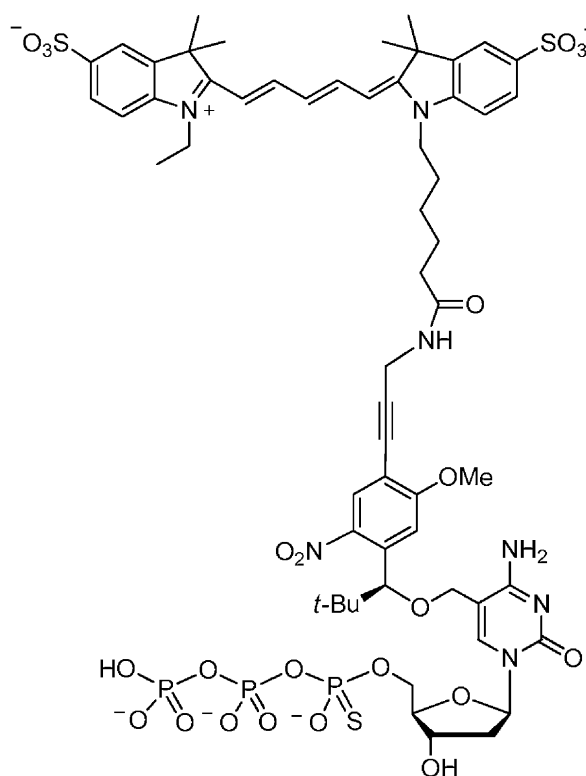
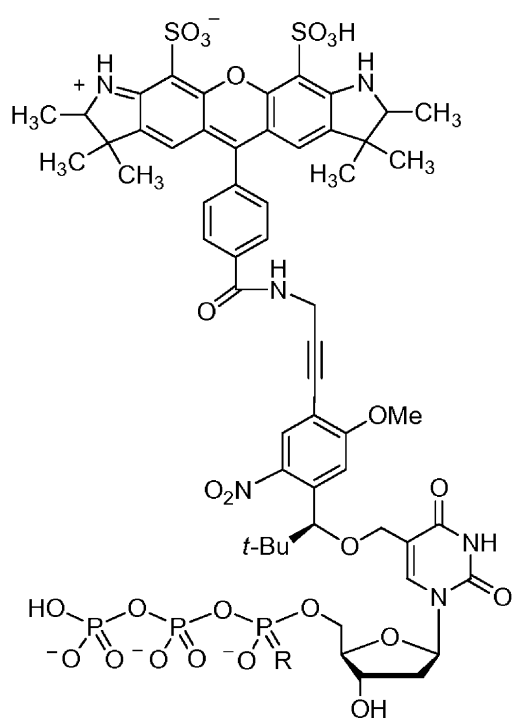
10



20



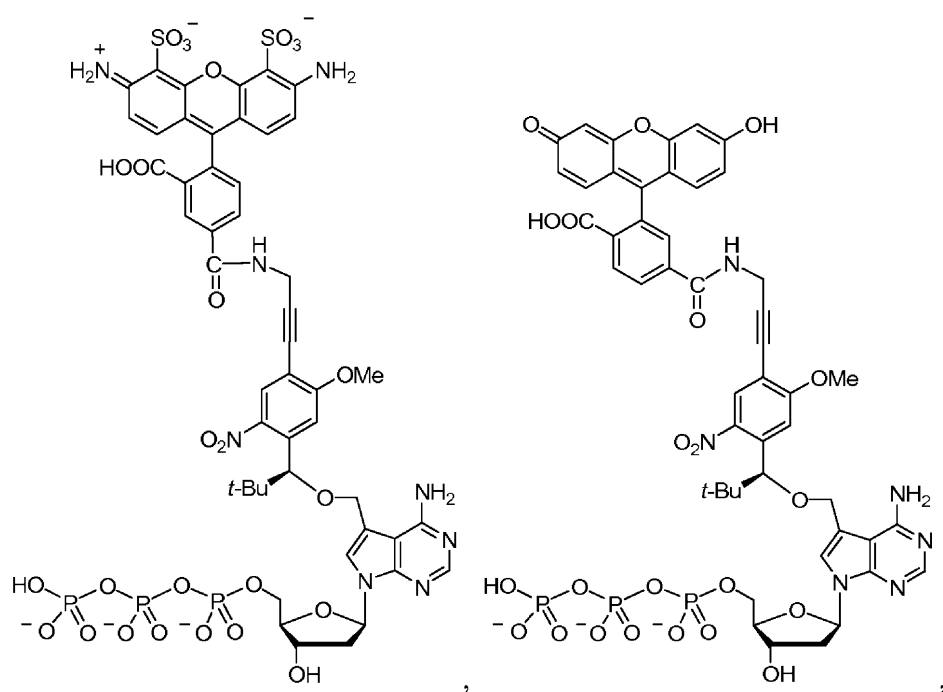
30



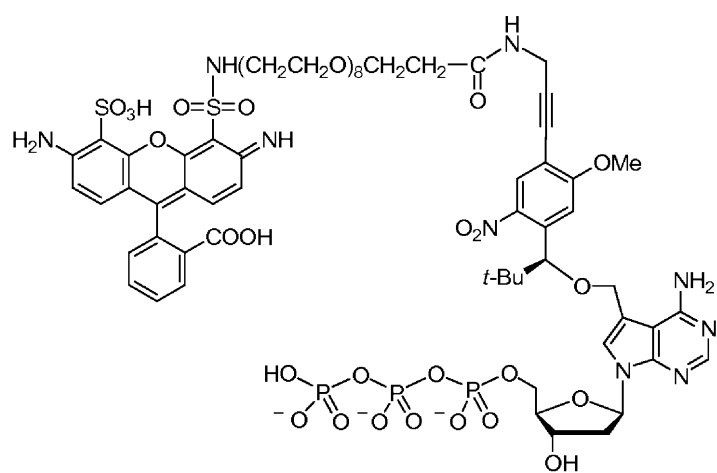
式中、Rは=Oまたは=Sである。

【 0 0 2 9 】

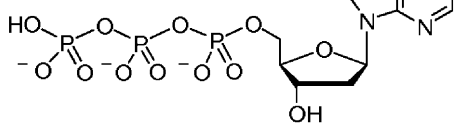
いくつかの態様では、本化合物は、下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義される：



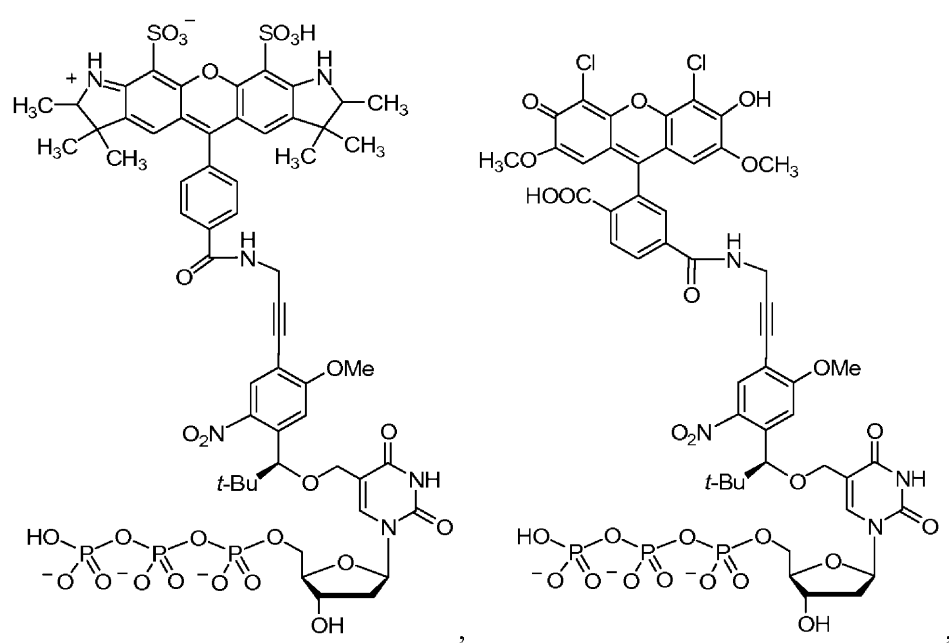
10



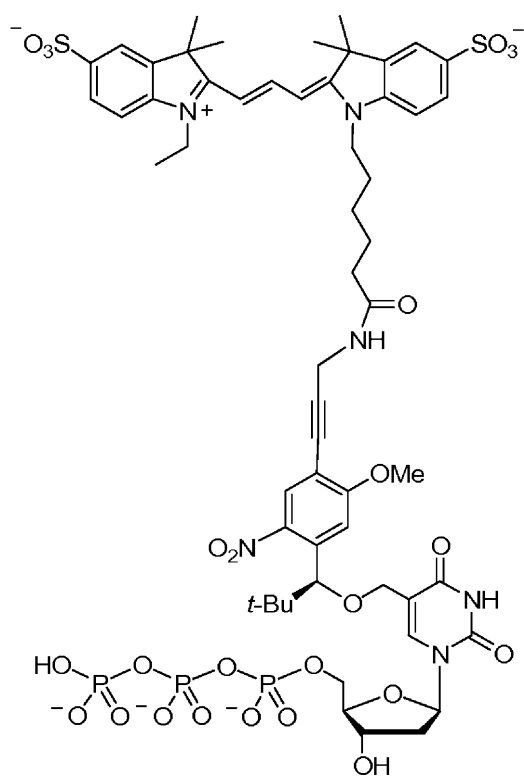
20



30

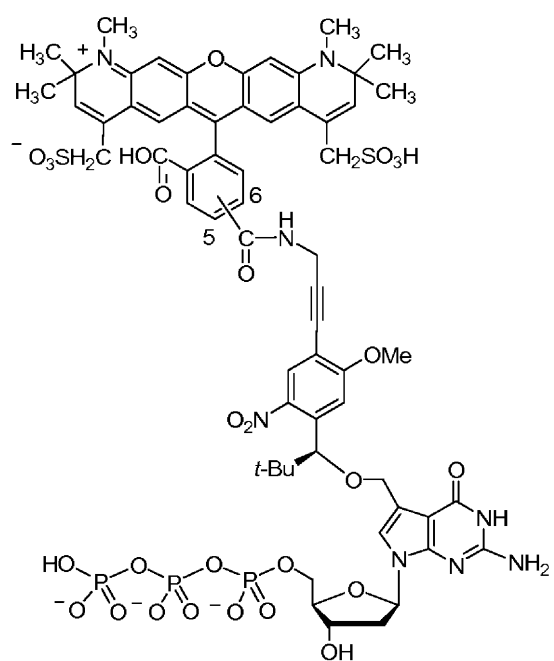


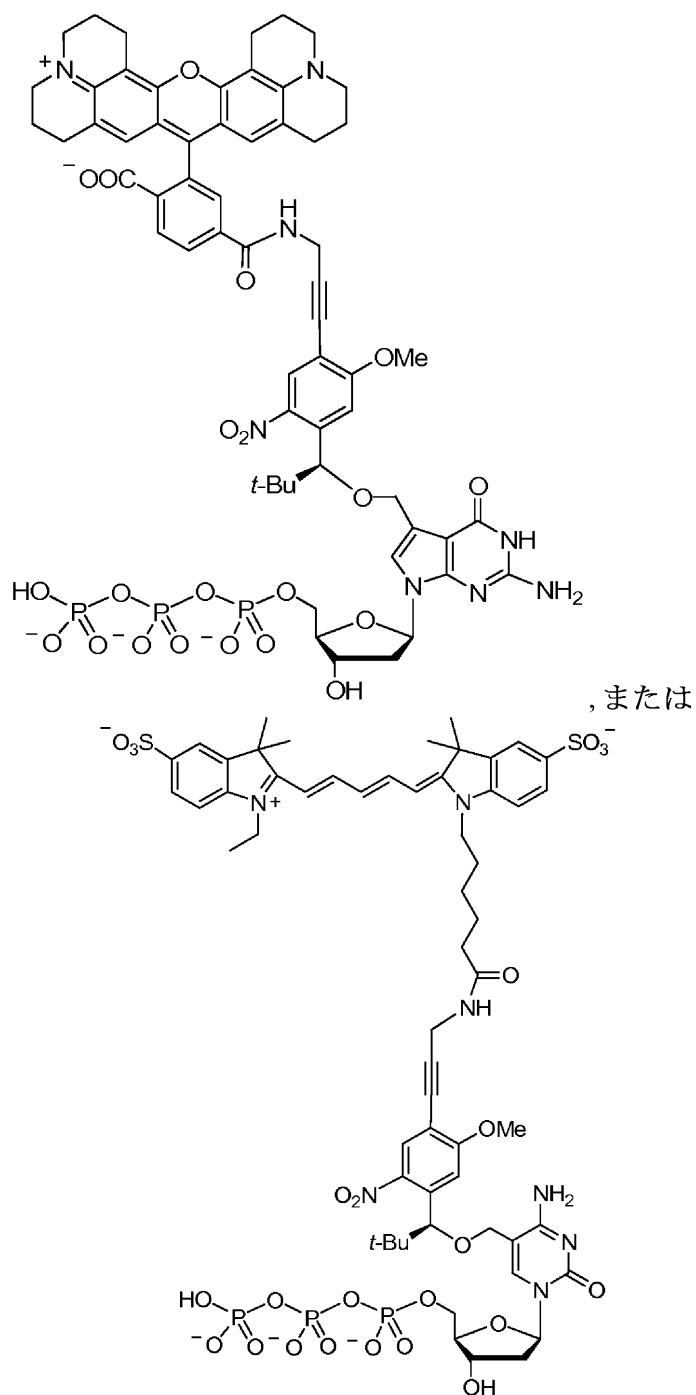
10



20

30





10

20

30

【0030】

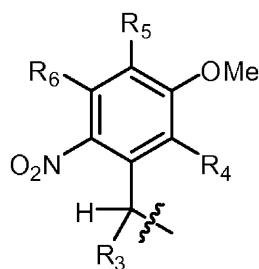
本発明の別の局面では、以下の段階を含む、標的核酸を配列決定する方法が提供される：

40

- (i) プライマーの5'-末端を固体表面に結合させる段階；
- (ii) ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体を形成するために、標的核酸と該固体表面に結合したプライマーとをハイブリダイズさせる段階；
- (iii) 異なる式I～VIIの化合物が異なるフルオロフォアを有するという条件で、ポリメラーゼおよび本明細書に記載の1つまたは複数の化合物を得る段階；
- (iv) ポリメラーゼ反応を経由して伸長するプライマー鎖を形成するために、ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体と段階(iii)のポリメラーゼおよび1つまたは複数の化合物とを反応させる段階；
- (v) 段階(iv)の取り込まれた化合物をそのフルオロフォアによって同定するために、伸長するプライマー鎖を撮像する段階；

50

(vi)段階(iii)において言及された本明細書に定義の変動要素を有する下記式の光開裂性末端部分を除去することによって、天然成分を有する伸長プライマーを得るために、伸長するプライマー鎖を有する固体表面を光源に曝露する段階：



10

；ならびに

(vii)標的核酸中の複数の塩基を同定するために、段階(iv)～(vi)を1回または複数回繰り返す段階であって、前回のサイクルの段階(vi)の伸長プライマーが後続のサイクルの段階(iv)においてハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体の代わりに反応する、段階。

【0031】

いくつかの態様では、段階(vi)はアジ化ナトリウムの存在下で行われる。いくつかの態様では、アジ化ナトリウム濃度は0.1mM～10mM、例えば約1mMである。いくつかの態様では、段階(vi)は酢酸ナトリウムの存在下で行われる。いくつかの態様では、酢酸ナトリウム濃度は0.1mM～10mM、例えば約1mMである。

20

【0032】

いくつかの態様では、段階(v)または(vi)はチオ尿素の存在下で行われる。いくつかの態様では、チオ尿素濃度は10mM～500mM、例えば約100mMである。

【0033】

いくつかの態様では、段階(vi)はジチオスレイトール(DTT)の存在下で行われる。

【0034】

別の局面では、以下の段階を含む、標的核酸を配列決定する方法が提供される：

(i) 核酸の5'-末端を固体表面に結合させる段階；

(ii) ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体を形成するために、プライマーと固体表面に結合した核酸とをハイブリダイズさせる段階；

30

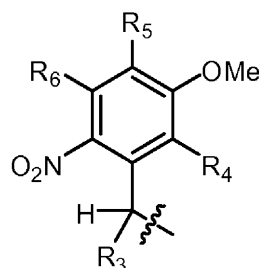
(iii) 異なる式I～VIIの化合物が異なるフルオロフォアを有するという条件で、ポリメラーゼおよび本明細書に記載の1つまたは複数の化合物を得る段階；

(iv) ポリメラーゼ反応を経由して伸長するプライマー鎖を形成するために、ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体と段階(iii)のポリメラーゼおよび1つまたは複数の化合物とを反応させる段階；

(v) 段階(iv)の取り込まれた化合物をそのフルオロフォアによって同定するために、伸長するプライマー鎖を撮像する段階；

(vi)本明細書に定義の変動要素を有する下記式の光開裂性末端部分を除去することによって、天然成分を有する伸長プライマーを得るために、伸長するプライマー鎖を有する固体表面を、光源に曝露する段階：

40



；ならびに

(vii)標的核酸中の複数の塩基を同定するために、段階(iv)～(vi)を1回または複数回繰り返す段階であって、前回のサイクルの段階(vi)の伸長プライマーが後続のサイクルの段

50

段階(iv)においてハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体の代わりに反応する、段階。

【0035】

いくつかの態様では、段階(vi)はアジ化ナトリウムの存在下で行われる。いくつかの態様では、段階(vi)はジチオスレイトール(DTT)の存在下で行われる。

【0036】

いくつかの態様では、段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みはその天然ヌクレオチド対応物の取り込み効率の約70%～約100%で生じる。いくつかの態様では、取り込み効率は約85%～約100%で生じる。

【0037】

いくつかの態様では、ポリメラーゼは逆転写酵素、末端転移酵素およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される。いくつかの態様では、段階(vi)において光開裂性末端部分の約85%～約100%が光源に対する曝露によって除去される。いくつかの態様では、段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが約90%～約100%の効率で生じた後、鎖伸長の終結が行われる。

【0038】

いくつかの態様では、パルスマルチライン励起検出器が段階(v)における撮像に使用される。

【0039】

いくつかの態様では、本方法は、段階(iv)の後または段階(vi)の前に伸長するプライマー鎖を洗浄する段階をさらに含む。

【0040】

いくつかの態様では、本方法は、段階(iv)の前に、段階(iv)において反応しなかった任意のプライマーまたは伸長するプライマー鎖を封止する段階をさらに含む。

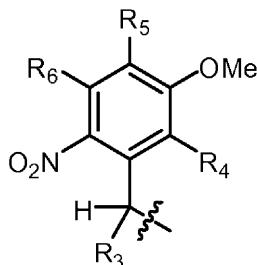
【0041】

いくつかの態様では、本方法は、複数の標的核酸を同時に配列決定する段階をさらに含む。

【0042】

本発明の別の局面では、以下の段階を含む、核酸分子中の非天然成分を天然成分に変換する方法が提供される：

- (i) 本明細書に記載の化合物を取り込む段階；
- (ii) 本明細書に定義の変動要素を有する下記式の光開裂性末端部分を核酸から除去するために、得られた核酸を光源に曝露する段階。



【0043】

いくつかの態様では、本方法は、複数の核酸分子中の非天然成分を天然成分に同時に変換する段階をさらに含む。いくつかの態様では、本方法は、複数の核酸合成を同時に終結させる段階をさらに含む。

【0044】

別の局面では、本発明は、ポリメラーゼの環境中に上記の3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドを配置し、核酸分子中への3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込みを可能にする段階を含む、核酸合成を終結させる方法を提供する。いくつかの態様では、3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み時のDNA合成の終結効率は約90%～約100%の範囲である。いくつかの態様では、3'-OH非遮断ヌクレオチドまた

10

20

30

40

50

はヌクレオシドの取り込み効率は、3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドと同じ塩基を有する天然ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率に比べて約70%～約100%の範囲である。

【0045】

別の局面では、本発明は、本明細書に記載の化合物を末端ヌクレオチド類似体として使用する段階を含む、サンガーまたはサンガー型配列決定を行う方法を提供する。

【0046】

別の局面では、以下の段階を含み、段階(i)～(iii)が任意の順序で行われうる、標的核酸の配列を決定する方法が提供される：

- (i) 標的核酸をサンガーまたはサンガー型配列決定装置に加える段階、
- (ii) 2種以上の塩基が存在する場合に各塩基が異なるフルオロフォアに結合するという条件で、本明細書に記載の1つまたは複数の化合物を配列決定装置に加える段階、
- (iii) 相補的プライマーおよびポリメラーゼ酵素を加える段階、
- (iv) 段階(ii)の少なくとも1つの化合物を伸長する核酸鎖に取り込むポリメラーゼ反応を行う段階、ならびに
- (v) 蛍光配列決定機器の使用またはパルスマルチライン励起蛍光によってサンガー配列決定反応の結果を分析する段階。

10

【0047】

いくつかの態様では、段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが約90%～約100%の効率で生じた後、鎖伸長の終結が行われる。いくつかの態様では、段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みがポリメラーゼ反応における同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%～約100%で生じる。いくつかの態様では、取り込み効率は約85%～約100%で生じる。いくつかの態様では、ポリメラーゼは逆転写酵素、末端転移酵素およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される。

20

【0048】

別の局面では、本発明は、以下の段階を含み、段階(i)～(iii)が任意の順序で行われうる、非天然成分を核酸に取り込む方法を提供する：

- (i) 標的核酸を配列決定装置に加える段階；
- (ii) 2種以上の塩基が存在する場合に各塩基が異なるフルオロフォアに結合するという条件で、本明細書に記載の1つまたは複数の化合物を配列決定装置に加える段階；
- (iii) ポリメラーゼ酵素を加える段階；および
- (iv) 段階(ii)の少なくとも1つの化合物を伸長する核酸鎖に取り込むポリメラーゼ反応を行う段階。

30

【0049】

いくつかの態様では、本方法は以下の段階をさらに含む：

- (v) 段階(ii)の少なくとも1つの化合物の取り込みに関してポリメラーゼ連鎖反応の結果を分析する段階。

【0050】

いくつかの態様では、段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが約90%～約100%の効率で生じた後、鎖伸長の終結が行われる。いくつかの態様では、段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みがポリメラーゼ反応における同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%～約100%で生じる。

40

【0051】

別の局面では、本発明は、本明細書に記載の化合物をミニ配列決定またはミニ配列決定型配列決定方法に加える段階を含む、ミニ配列決定またはミニ配列決定型配列決定を行う方法を提供する。

【0052】

上記の方法のいずれかのいくつかの態様では、本化合物は式I、II、III、IV、V、VIまたはVIIの化合物としてさらに定義される。

【0053】

50

別の局面では、本発明は、以下を含むシステムを提供する：

複数のビーズを含むフローセルであって、

本明細書に記載の化合物がポリメラーゼを使用して取り込まれたDNA分子に各ビーズが結合し；

フローセルが可視光線および紫外線に少なくとも部分的に透過性である、フローセル；

フローセルの画像を捕捉するように構成された撮像装置；

少なくとも4つのスペクトルフィルターを含んでおり、各フィルターの間で循環するように構成されたフィルターホイール；

フローセルからフィルターホイール中のフィルターを通じて撮像装置までの光路を作り出すように構成されたランプ；ならびに

フローセル上のDNA分子に紫外線を与えるように構成された紫外線源。

【0054】

いくつかの態様では、フローセルは微小流体フローセルである。いくつかの態様では、本システムは、フィルターホイールとフローセルとの間の対物レンズをさらに含む。いくつかの態様では、本システムは、光路を撮像装置に向けるように構成された鏡をさらに含む。

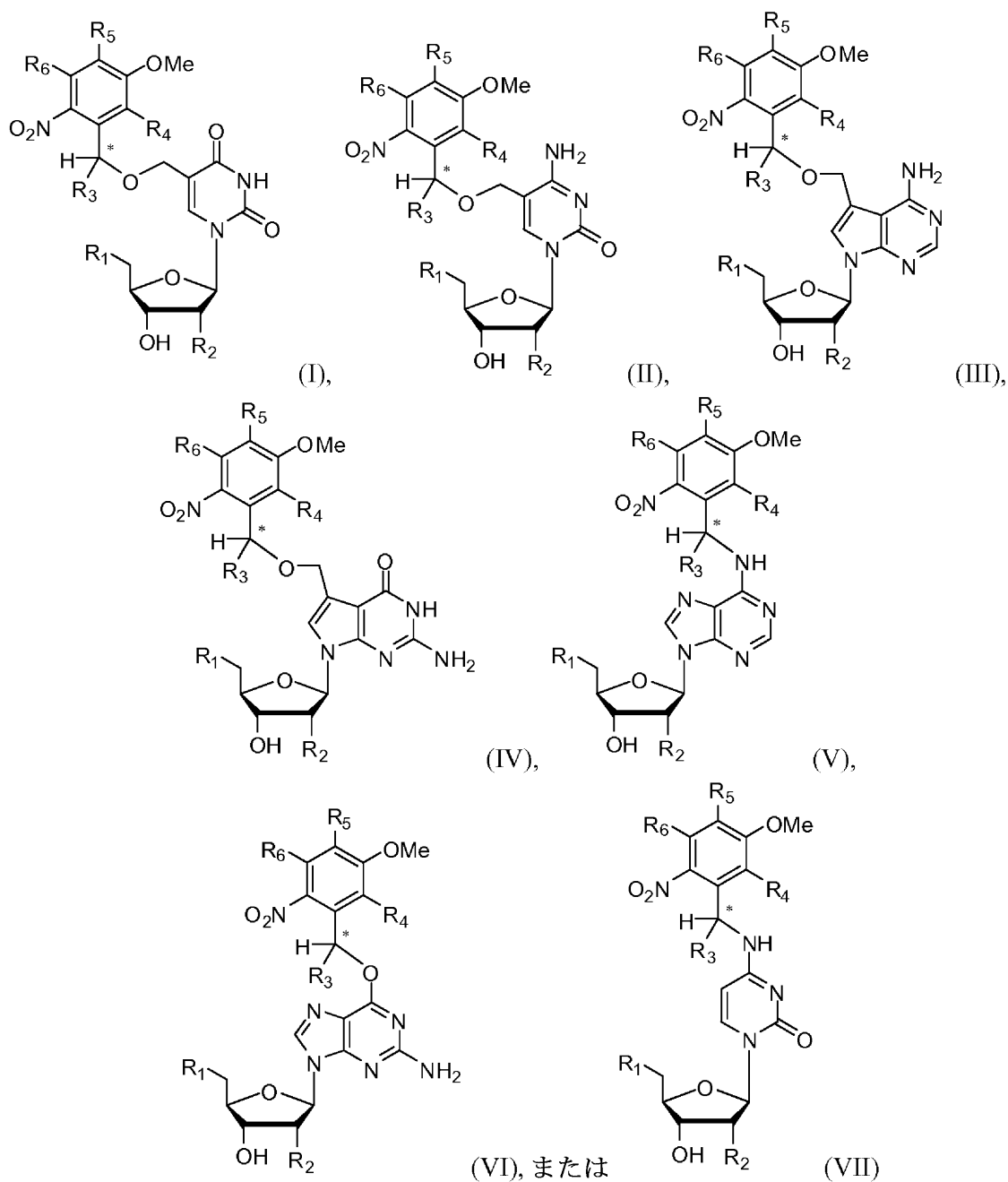
【0055】

いくつかの局面では、本開示は、がん化を経る細胞の限定的な亜集団に属する希少な配列変異体を同定するための早期検出用の、高速で、高スループットで正確かつ感度の高い、がん診断法を提供する。

【0056】

[本発明1001]

下記式の化合物またはその塩、互変異性体もしくは光学異性体：



式中、

R_1 はヒドロキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、 α -チオトリホスフェートまたはポリホスフェートであり；

R_2 は水素またはヒドロキシであり；

R_3 はアルキル ($C \leq 8$) または置換アルキル ($C \leq 8$) であり；

R_4 は

水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

アルキル ($C \leq 6$)、アシル ($C \leq 6$)、アルコキシ ($C \leq 6$)、アシルオキシ ($C \leq 6$)、アルキルアミノ ($C \leq 6$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 6$)、アミド ($C \leq 6$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

R_5 および R_6 はそれぞれ独立して

水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

アルキル ($C \leq 6$)、アルケニル ($C \leq 6$)、アルキニル ($C \leq 6$)、アリール ($C \leq 6$)、アラールキル ($C \leq 8$)、ヘテロアリール ($C \leq 6$)、アシル ($C \leq 6$)、アルコキシ ($C \leq 6$)、アシルオキシ ($C \leq 6$)、アルキルアミノ ($C \leq 6$)、ジアルキルアミノ ($C \leq 6$)、アミド ($C \leq 6$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョン；

10

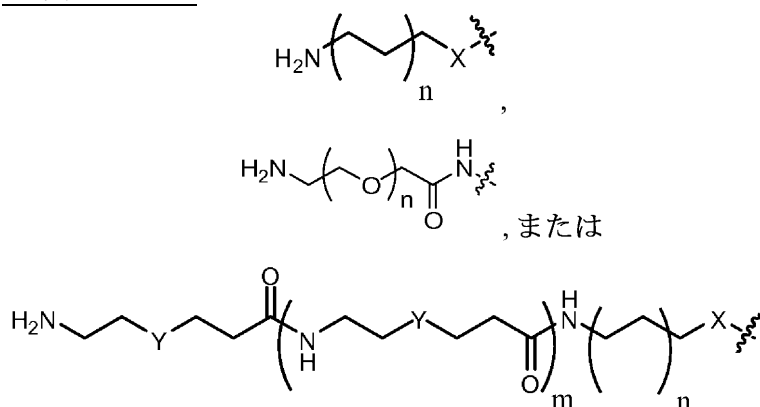
20

30

40

50

下記式の基：



10

式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

mは0～6の整数である；あるいは

-リンカー-レポーターである。

20

[本発明1002]

式Iの化合物としてさらに定義される、本発明1001の化合物。

[本発明1003]

式IIの化合物としてさらに定義される、本発明1001の化合物。

[本発明1004]

式IIIの化合物としてさらに定義される、本発明1001の化合物。

[本発明1005]

式IVの化合物としてさらに定義される、本発明1001の化合物。

[本発明1006]

式Vの化合物としてさらに定義される、本発明1001の化合物。

[本発明1007]

式VIの化合物としてさらに定義される、本発明1001の化合物。

[本発明1008]

式VIIの化合物としてさらに定義される、本発明1001の化合物。

[本発明1009]

R_1 がヒドロキシである、本発明1001～1008のいずれかの化合物。

[本発明1010]

R_1 がモノホスフェートである、本発明1001～1008のいずれかの化合物。

[本発明1011]

R_1 がジホスフェートである、本発明1001～1008のいずれかの化合物。

[本発明1012]

R_1 がトリホスフェートである、本発明1001～1008のいずれかの化合物。

[本発明1013]

R_1 が α -チオトリホスフェートである、本発明1001～1008のいずれかの化合物。

[本発明1014]

R_1 がポリホスフェートである、本発明1001～1008のいずれかの化合物。

[本発明1015]

R_2 が水素である、本発明1001～1014のいずれかの化合物。

[本発明1016]

30

40

50

R_2 がヒドロキシである、本発明1001～1014のいずれかの化合物。

[本発明1017]

R_3 がアルキル ($C_{\leq 8}$) である、本発明1001～1016のいずれかの化合物。

[本発明1018]

R_3 がアルキル ($C_{3\sim 4}$) である、本発明1017の化合物。

[本発明1019]

R_3 がイソプロピルである、本発明1018の化合物。

[本発明1020]

R_3 がtert-ブチルである、本発明1018の化合物。

[本発明1021]

R_4 が水素である、本発明1001～1020のいずれかの化合物。

[本発明1022]

R_4 がニトロである、本発明1001～1020のいずれかの化合物。

[本発明1023]

R_5 が水素である、本発明1001～1022のいずれかの化合物。

[本発明1024]

R_5 がヨードである、本発明1001～1022のいずれかの化合物。

[本発明1025]

R_5 がアルコキシ ($C_{\leq 6}$) である、本発明1001～1022のいずれかの化合物。

[本発明1026]

R_5 がメトキシである、本発明1025の化合物。

[本発明1027]

R_5 が下記式の基である、本発明1001～1022のいずれかの化合物:



式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-; あるいは

アルカンジイル ($C_{\leq 12}$)、アルケンジイル ($C_{\leq 12}$)、アルキンジイル ($C_{\leq 12}$)、アレーンジイル ($C_{\leq 12}$)、ヘテロアレーンジイル ($C_{\leq 12}$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり;

nは0～6の整数である。

[本発明1028]

Xがアルキンジイル ($C_{2\sim 8}$) である、本発明1027の化合物。

[本発明1029]

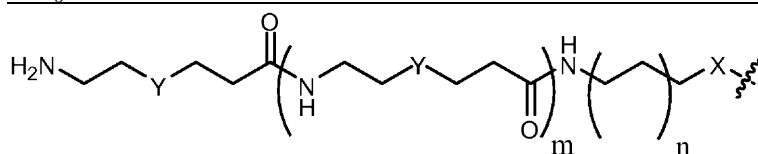
Xが-C≡C-である、本発明1028の化合物。

[本発明1030]

nがゼロである、本発明1027～1029のいずれかの化合物。

[本発明1031]

R_5 が下記式の基である、本発明1001～1022のいずれかの化合物:



式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-; あるいは

アルカンジイル ($C_{\leq 12}$)、アルケンジイル ($C_{\leq 12}$)、アルキンジイル ($C_{\leq 12}$)、アレーンジイル ($C_{\leq 12}$)、ヘテロアレーンジイル ($C_{\leq 12}$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり;

10

20

30

40

50

ジョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

mは0～6の整数である。

[本発明1032]

Xがアルキンジイル ($C_2 \sim 8$) である、本発明1031の化合物。

[本発明1033]

Xが-C≡C-である、本発明1032の化合物。

[本発明1034]

Yが-CH₂-である、本発明1031～1033のいずれかの化合物。

10

[本発明1035]

nがゼロである、本発明1031～1034のいずれかの化合物。

[本発明1036]

mがゼロである、本発明1031～1035のいずれかの化合物。

[本発明1037]

R₅が-リンカー-レポーターである、本発明1001～1022のいずれかの化合物。

[本発明1038]

リンカーが下記式である、本発明1037の化合物：



20

式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

nは0～6の整数である。

[本発明1039]

Xがアルキンジイル ($C_2 \sim 8$) である、本発明1038の化合物。

30

[本発明1040]

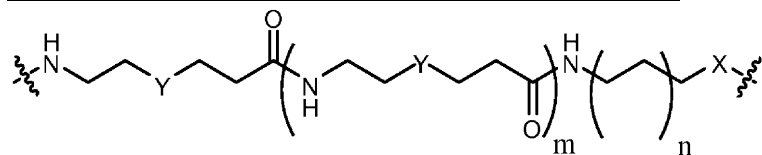
Xが-C≡C-である、本発明1039の化合物。

[本発明1041]

nがゼロである、本発明1038～1040のいずれかの化合物。

[本発明1042]

リンカーが下記式である、本発明1037の化合物：



40

式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル ($C \leq 12$)、アルケンジイル ($C \leq 12$)、アルキンジイル ($C \leq 12$)、アレーンジイル ($C \leq 12$)、ヘテロアレーンジイル ($C \leq 12$)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル ($C \leq 12$) または置換アルカンジイル ($C \leq 12$) であり；

nは0～6の整数であり；

mは0～6の整数である。

[本発明1043]

50

Xがアルキンジイル ($C_2 \sim 8$) である、本発明1042の化合物。

[本発明1044]

Xが $-C \equiv C-$ である、本発明1043の化合物。

[本発明1045]

Yが $-CH_2-$ である、本発明1042～1044のいずれかの化合物。

[本発明1046]

nがゼロである、本発明1042～1045のいずれかの化合物。

[本発明1047]

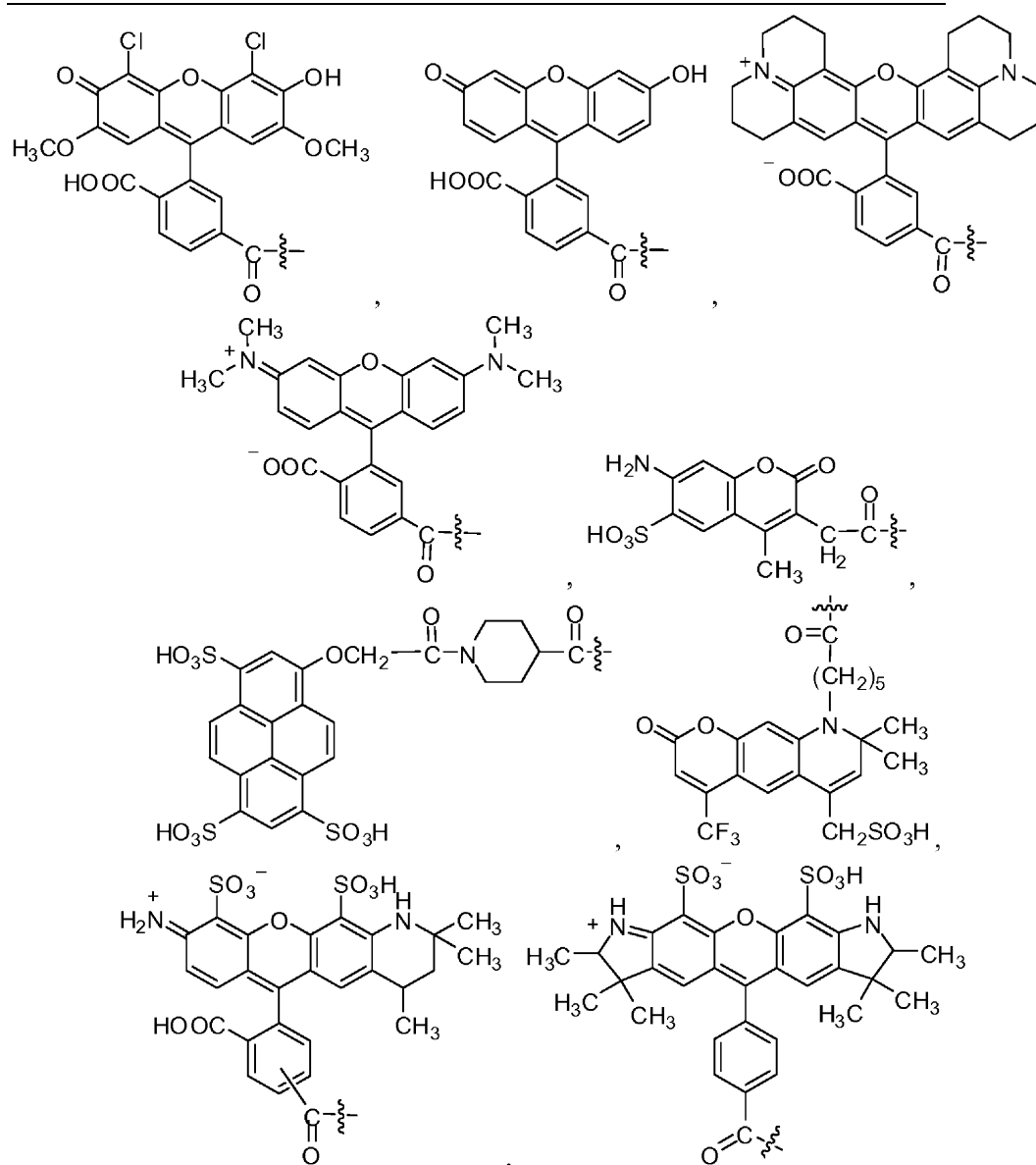
mがゼロである、本発明1042～1046のいずれかの化合物。

[本発明1048]

レポーターが色素に基づき、該色素がキサントン、フルオレセイン、ローダミン、BODI PY、シアニン、クマリン、ピレン、フタロシアニン、フィコビリタンパク質、またはスクアライン色素である、本発明1037～1047のいずれかの化合物。

[本発明1049]

レポーターが下記式である、本発明1037～1047のいずれかの化合物：

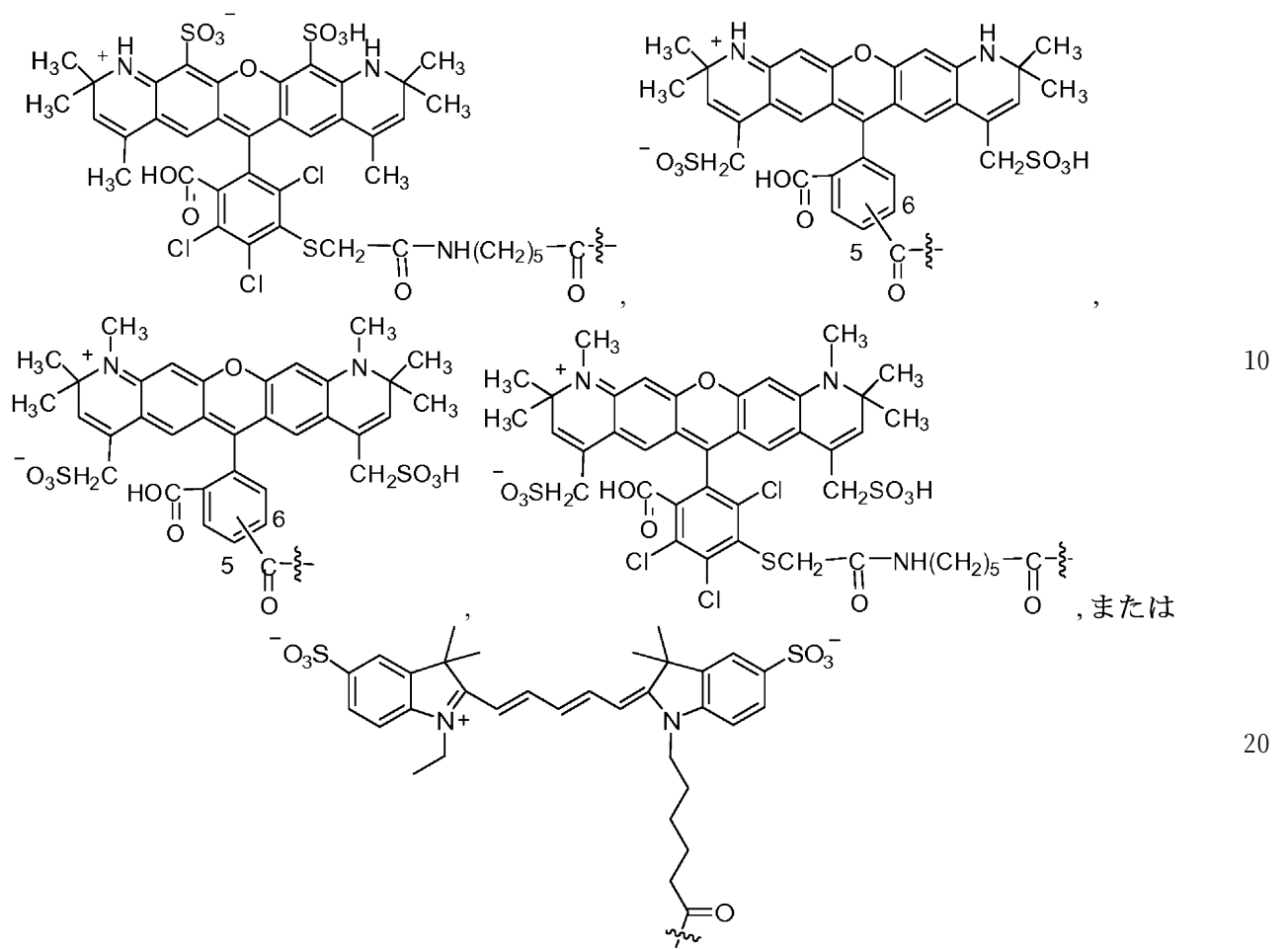


10

20

30

40



[本発明1050]

R_6 が水素である、本発明1001～1049のいずれかの化合物。

[本発明1051]

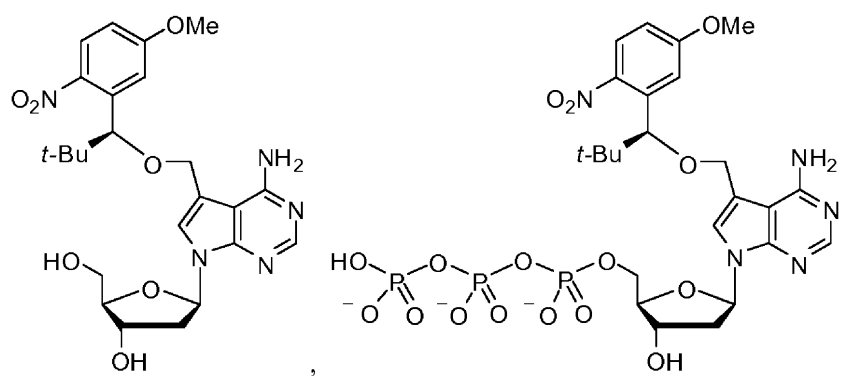
星付きの炭素原子がS配置である、本発明1001～1050のいずれかの化合物。

[本発明1052]

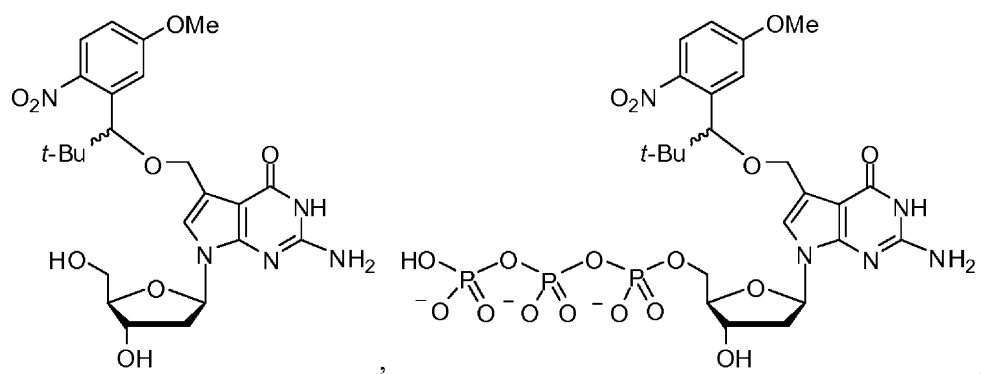
星付きの炭素原子がR配置である、本発明1001～1050のいずれかの化合物。

[本発明1053]

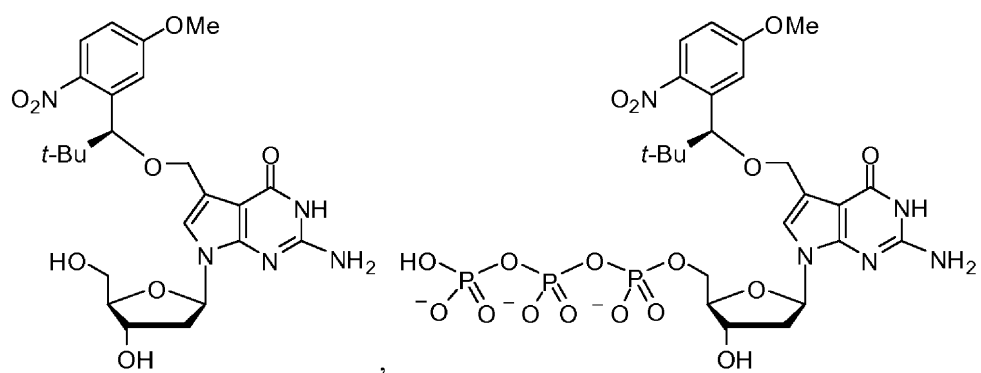
下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義される、本発明1001の化合物：



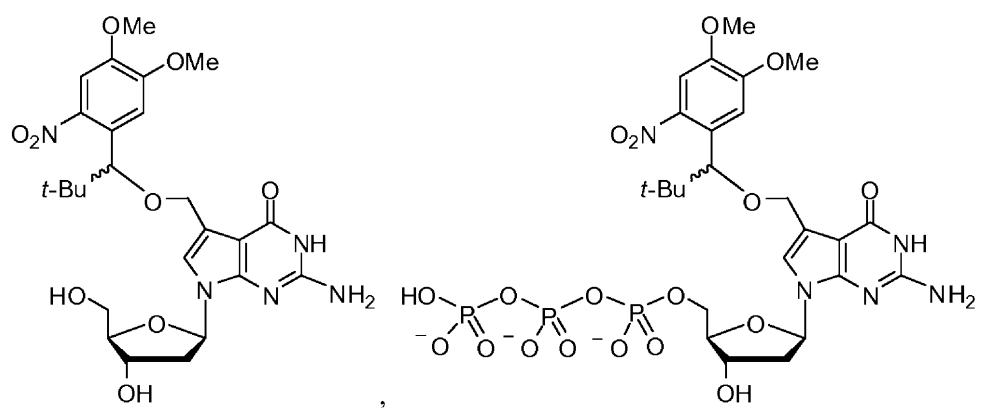
10



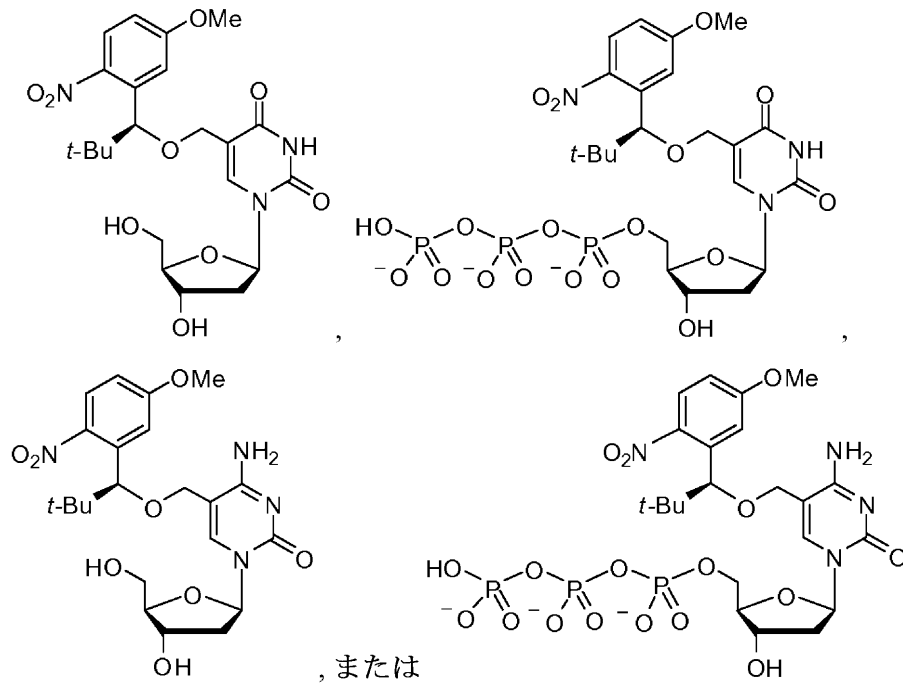
20



30



40

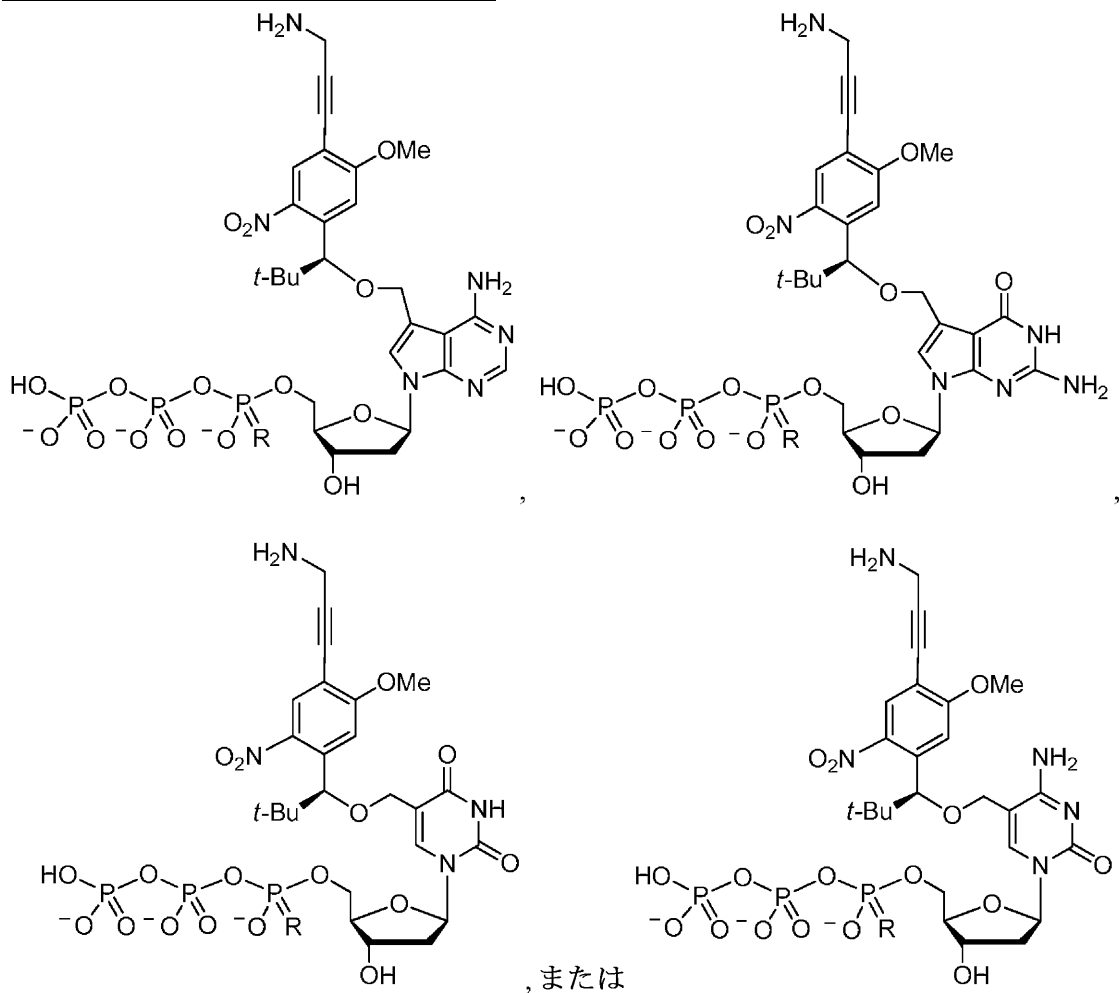


10

[本発明1054]

20

下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義される、本発明1001の化合物:



30

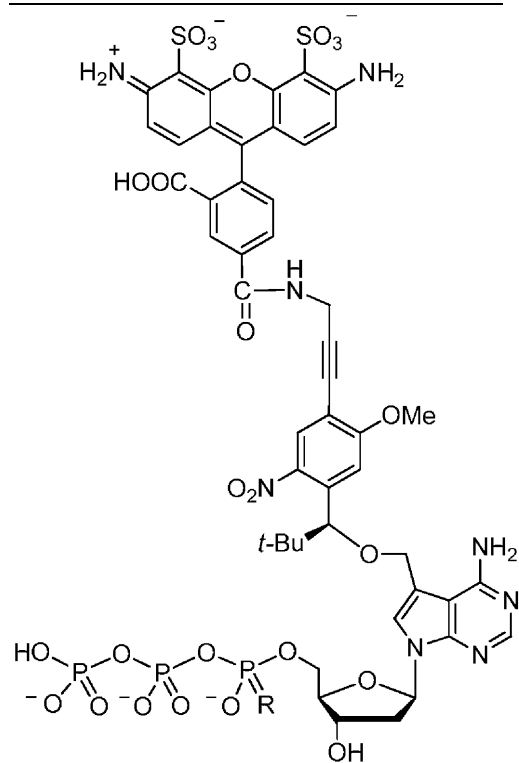
40

式中、Rは=Oまたは=Sである。

[本発明1055]

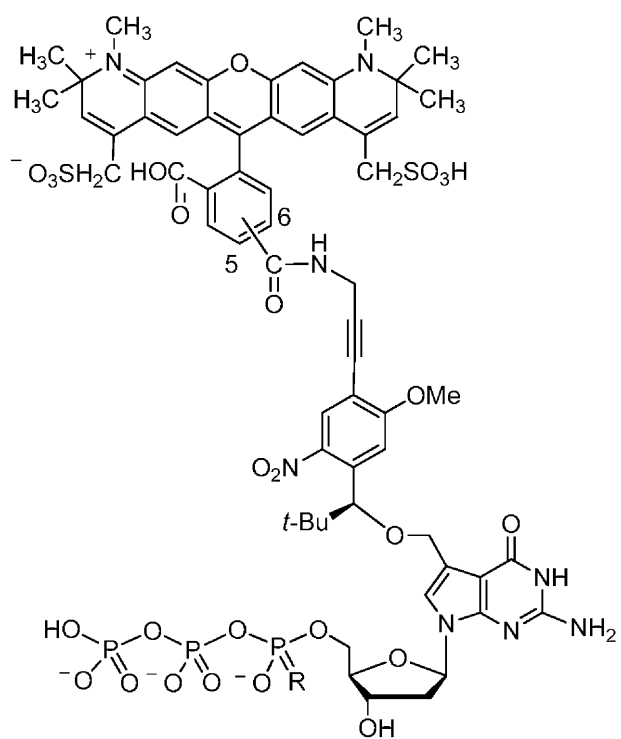
50

下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義される、本発明1001の化合物:



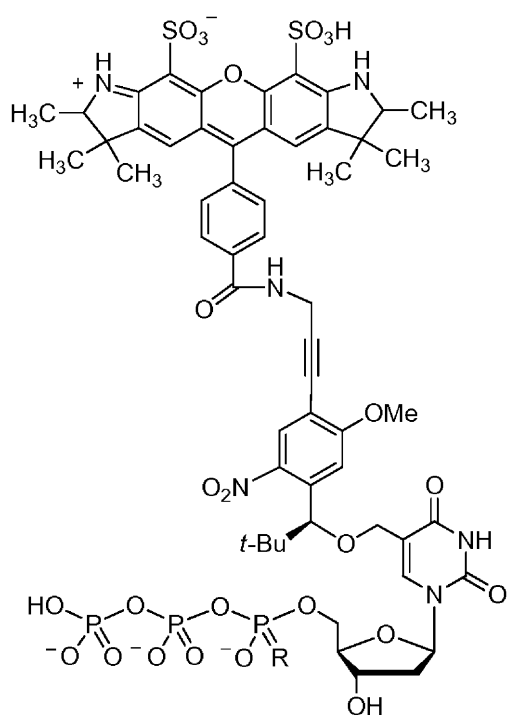
10

20



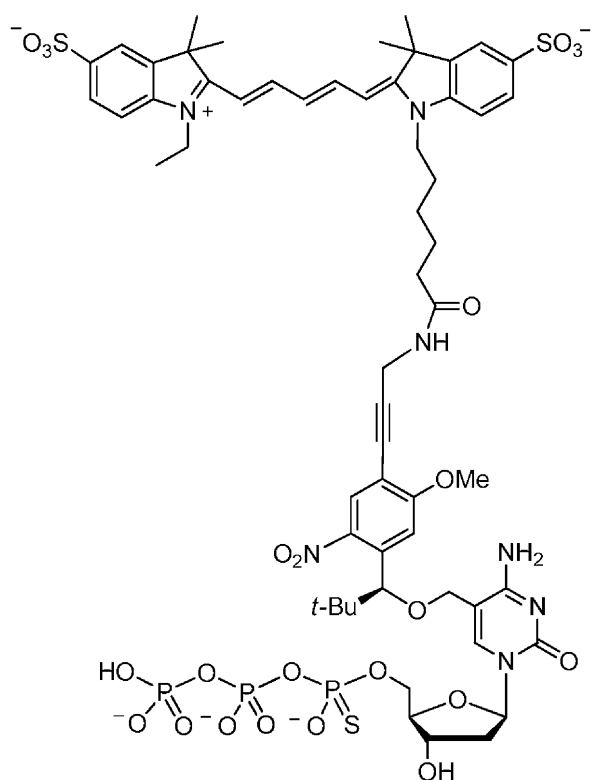
10

20



30

,または



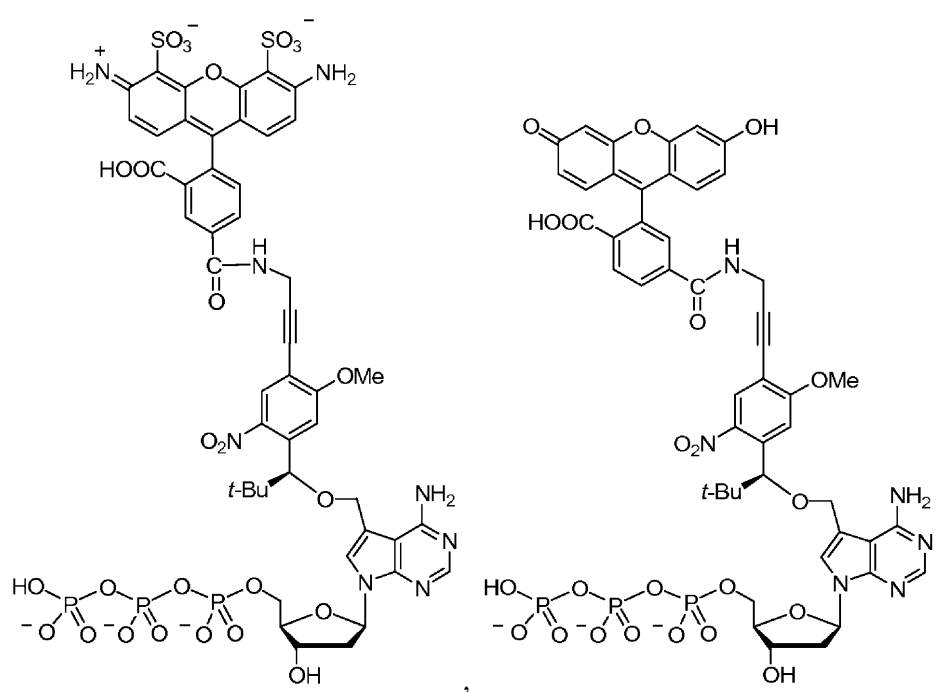
10

20

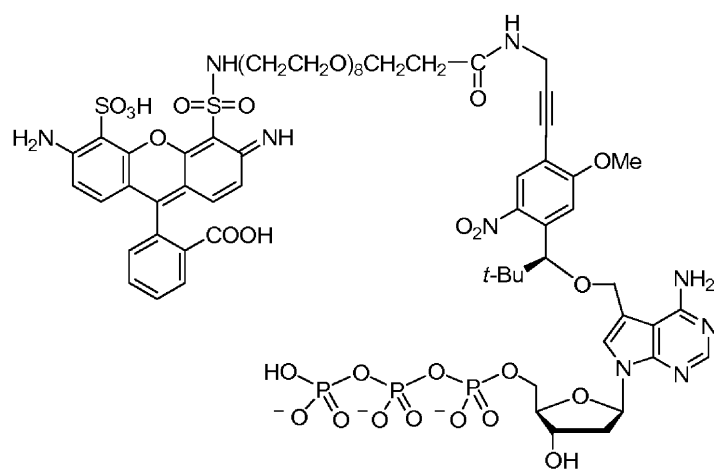
式中、Rは=Oまたは=Sである。

[本発明1056]

下記式、またはこれらの式のいずれかの塩および/もしくはプロトン化形態としてさらに定義される、本発明1001の化合物：

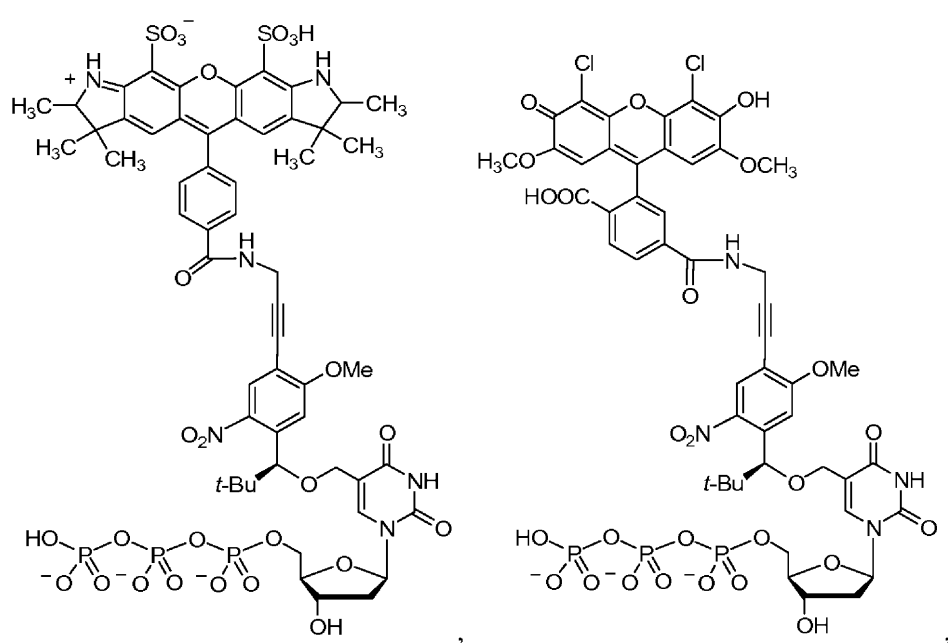


10

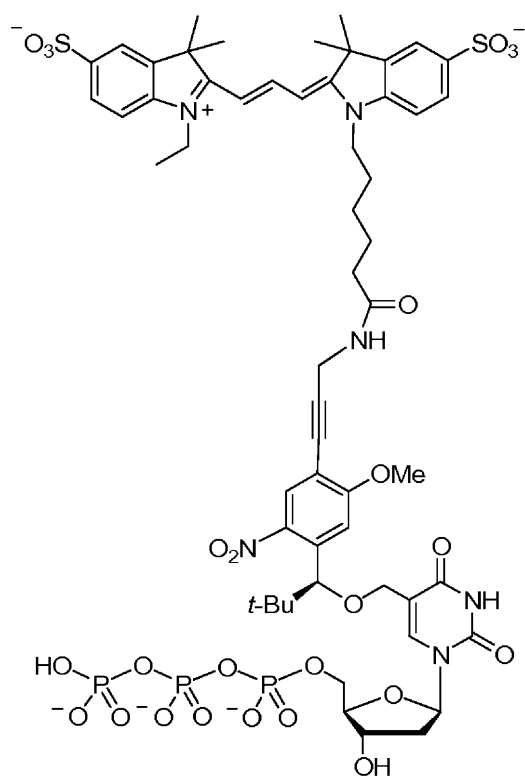


20

30

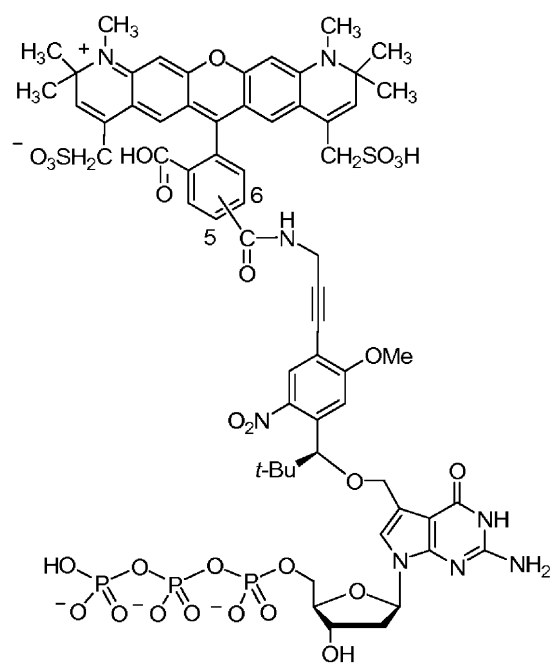


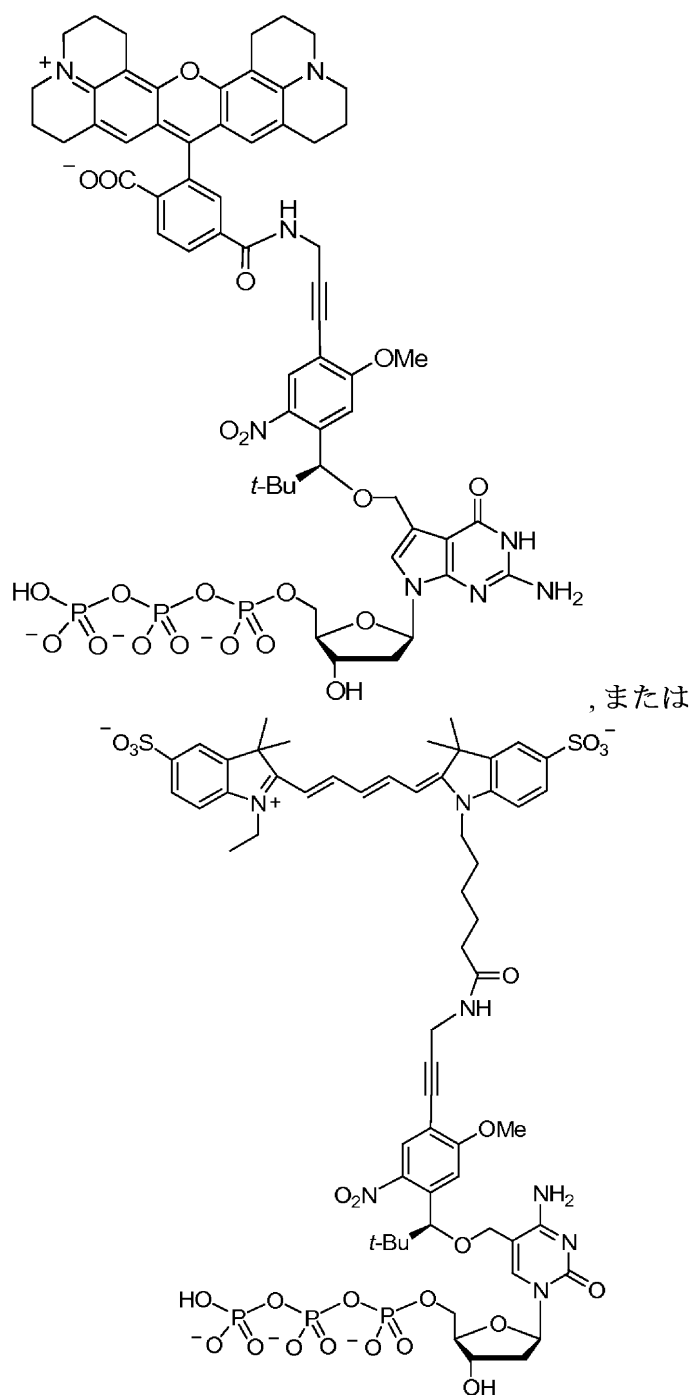
10



20

30





10

20

30

°
[本発明1057]

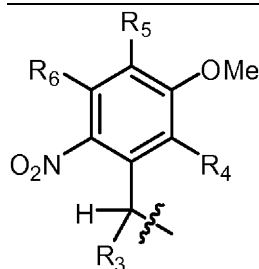
以下の段階を含む、標的核酸を配列決定する方法:

- (i) プライマーの5'-末端を固体表面に結合させる段階;
- (ii) ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体を形成するために、標的核酸と該固体表面に結合したプライマーとをハイブリダイズさせる段階;
- (iii) 異なる式I~VIIの化合物が異なるフルオロフォアを有するという条件で、ポリメラーゼおよび本発明1001~1056のいずれかの1つまたは複数の化合物を得る段階;
- (iv) ポリメラーゼ反応を経由して伸長するプライマー鎖を形成するために、ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体と段階(iii)のポリメラーゼおよび1つまたは複数の化合物とを反応させる段階;
- (v) 段階(iv)の取り込まれた化合物をそのフルオロフォアによって同定するために、伸長するプライマー鎖を撮像する段階;
- (vi) 段階(iii)において言及された本発明で定義される変動要素を有する下記式の光開

40

50

裂性末端部分を除去することによって、天然成分を有する伸長プライマーを得るために、伸長するプライマー鎖を有する固体表面を、光源に曝露する段階：



；ならびに

(vii) 標的核酸中の複数の塩基を同定するために、段階(iv)～(vi)を1回または複数回繰り返す段階であって、前回のサイクルの段階(vi)の伸長プライマーが後続のサイクルの段階(iv)においてハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体の代わりに反応する、段階。

[本発明1058]

段階(vi)がアジ化ナトリウムの存在下で行われる、本発明1057の方法。

[本発明1059]

アジ化ナトリウム濃度が0.1mM～10mMである、本発明1058の方法。

[本発明1060]

アジ化ナトリウム濃度が約1mMである、本発明1059の方法。

[本発明1061]

段階(vi)が酢酸ナトリウムの存在下で行われる、本発明1057の方法。

[本発明1062]

酢酸ナトリウム濃度が0.1mM～10mMである、本発明1061の方法。

[本発明1063]

酢酸ナトリウム濃度が約1mMである、本発明1061の方法。

[本発明1064]

段階(v)または(vi)がチオ尿素の存在下で行われる、本発明1057～1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

チオ尿素濃度が10mM～500mMである、本発明1064の方法。

[本発明1066]

チオ尿素濃度が約100mMである、本発明1064の方法。

[本発明1067]

段階(vi)がジチオスレイトール(DTT)の存在下で行われる、本発明1058の方法。

[本発明1068]

以下の段階を含む、標的核酸を配列決定する方法：

(i) 核酸の5'-末端を固体表面に結合させる段階；

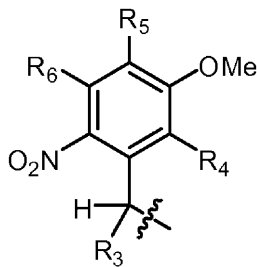
(ii) ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体を形成するために、プライマーと該固体表面に結合した核酸とをハイブリダイズさせる段階；

(iii) 異なる式I～VIIの化合物が異なるフルオロフォアを有するという条件で、ポリメラーゼおよび本発明1001～1056のいずれかの1つまたは複数の化合物を得る段階；

(iv) ポリメラーゼ反応を経由して伸長するプライマー鎖を形成するために、ハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体と段階(iii)のポリメラーゼおよび1つまたは複数の化合物とを反応させる段階；

(v) 段階(iv)の取り込まれた化合物をそのフルオロフォアによって同定するために、伸長するプライマー鎖を撮像する段階；

(vi) 段階(iii)において言及された本発明で定義される変動要素を有する下記式の光開裂性末端部分を除去することによって、天然成分を有する伸長プライマーを得るために、伸長するプライマー鎖を有する固体表面を、光源に曝露する段階；



；ならびに

(vii) 標的核酸中の複数の塩基を同定するために、段階(iv)～(vi)を1回または複数回繰り返す段階であって、前回のサイクルの段階(vi)の伸長プライマーが後続のサイクルの段階(iv)においてハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体の代わりに反応する、段階。

10

[本発明1069]

段階(vi)がアジ化ナトリウムの存在下で行われる、本発明1068の方法。

[本発明1070]

段階(vi)がジチオスレイトール(DTT)の存在下で行われる、本発明1069の方法。

[本発明1071]

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みがその天然ヌクレオチド対応物の取り込み効率の約70%～約100%で生じる、本発明1057および1068のいずれかの方法。

[本発明1072]

取り込み効率が約85%～約100%で生じる、本発明1071の方法。

20

[本発明1073]

ポリメラーゼが逆転写酵素、末端転移酵素およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される、本発明1057および1068のいずれかの方法。

[本発明1074]

段階(vi)において光開裂性末端部分の約85%～約100%が光源に対する曝露によって除去される、本発明1057および1068のいずれかの方法。

[本発明1075]

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが約90%～約100%の効率で生じた後、鎖伸長の終結が行われる、本発明1057および1068のいずれかの方法。

30

[本発明1076]

パルスマルチライン励起検出器が段階(v)における撮像に使用される、本発明1057および1068のいずれかの方法。

[本発明1077]

段階(iv)の後に伸長するプライマー鎖を洗浄する段階をさらに含む、本発明1057および1068のいずれかの方法。

[本発明1078]

段階(vi)の後に伸長プライマーを洗浄する段階をさらに含む、本発明1057および1068のいずれかの方法。

[本発明1079]

段階(iv)の前に、段階(iv)において反応しなかった任意のプライマーまたは伸長するプライマー鎖を封止する段階をさらに含む、本発明1057および1068のいずれかの方法。

40

[本発明1080]

複数の標的核酸を同時に配列決定する段階をさらに含む、本発明1057および1068のいずれかの方法。

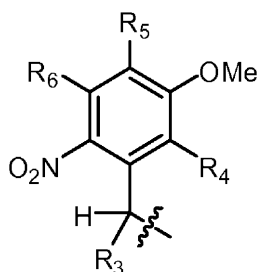
[本発明1081]

以下の段階を含む、核酸分子中の非天然成分を天然成分に変換する方法：

(i) 本発明1001～1056のいずれかの化合物を取り込む段階；

(ii) 段階(iii)において言及された本発明で定義される変動要素を有する下記式の光開裂性末端部分を核酸から除去するために、得られた核酸を光源に曝露する段階；

50



。

[本発明1082]

複数の核酸分子中の非天然成分を天然成分に同時に変換する段階をさらに含む、本発明1081の方法。

[本発明1083]

複数の核酸合成を同時に終結させる段階をさらに含む、本発明1082の方法。

[本発明1084]

ポリメラーゼの環境中に本発明1001の3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドを配置し、核酸分子中への3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込みを可能にする段階を含む、核酸合成を終結させる方法。

[本発明1085]

3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み時のDNA合成の終結効率が約90%～約100%の範囲である、本発明1084の方法。

[本発明1086]

3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率が、3'-OH非遮断ヌクレオチドまたはヌクレオシドと同じ塩基を有する天然ヌクレオチドまたはヌクレオシドの取り込み効率に比べて約70%～約100%の範囲である、本発明1084の方法。

[本発明1087]

本発明1001～1056のいずれかの化合物を末端ヌクレオチド類似体として使用する段階を含む、サンガーまたはサンガー型配列決定を行う方法。

[本発明1088]

化合物が式(I)の化合物としてさらに定義される、本発明1057、1068、1081、1084および1087のいずれかの方法。

[本発明1089]

化合物が式(II)の化合物としてさらに定義される、本発明1057、1068、1081、1084および1087のいずれかの方法。

[本発明1090]

化合物が式(III)の化合物としてさらに定義される、本発明1057、1068、1081、1084および1087のいずれかの方法。

[本発明1091]

化合物が式(IV)の化合物としてさらに定義される、本発明1057、1068、1081、1084および1087のいずれかの方法。

[本発明1092]

化合物が式(V)の化合物としてさらに定義される、本発明1057、1068、1081、1084および1087のいずれかの方法。

[本発明1093]

化合物が式(VI)の化合物としてさらに定義される、本発明1057、1068、1081、1084および1087のいずれかの方法。

[本発明1094]

化合物が式(VII)の化合物としてさらに定義される、本発明1057、1068、1081、1084および1087のいずれかの方法。

[本発明1095]

10

20

30

40

50

以下の段階を含み、段階(i)～(iii)が任意の順序で行われうる、標的核酸の配列を決定する方法:

(i) 標的核酸をサンガーまたはサンガー型配列決定装置に加える段階、

(ii) 2種以上の塩基が存在する場合に各塩基が異なるフルオロフォアに結合するという条件で、本発明1001～1056のいずれかの1つまたは複数の化合物を配列決定装置に加える段階、

(iii) 相補的プライマーおよびポリメラーゼ酵素を加える段階、

(iv) 段階(ii)の少なくとも1つの化合物を伸長する核酸鎖に取り込むポリメラーゼ反応を行う段階、ならびに

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

10

[本発明1096]

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが約90%～約100%の効率で生じた後、鎖伸長の終結が行われる、本発明1095の方法。

[本発明1097]

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みがポリメラーゼ反応における同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%～約100%で生じる、本発明1095の方法。

[本発明1098]

取り込み効率が約85%～約100%で生じる、本発明1097の方法。

[本発明1099]

20

ポリメラーゼが逆転写酵素、末端転移酵素およびDNAポリメラーゼからなる群より選択される、本発明1095の方法。

[本発明1100]

以下の段階を含み、段階(i)～(iii)が任意の順序で行われうる、非天然成分を核酸に取り込む方法:

(i) 標的核酸を配列決定装置に加える段階;

(ii) 2種以上の塩基が存在する場合に各塩基が異なるフルオロフォアに結合するという条件で、本発明1001の1つまたは複数の化合物を配列決定装置に加える段階;

(iii) ポリメラーゼ酵素を加える段階; および

(iv) 段階(ii)の少なくとも1つの化合物を伸長する核酸鎖に取り込むポリメラーゼ反応を行う段階。

30

[本発明1101]

(v) 段階(ii)の少なくとも1つの化合物の取り込みに関してポリメラーゼ連鎖反応の結果を分析する段階

をさらに含む、本発明1100の方法。

[本発明1102]

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みが約90%～約100%の効率で生じた後、鎖伸長の終結が行われる、本発明1100の方法。

[本発明1103]

段階(iv)に係る少なくとも1つの化合物の取り込みがポリメラーゼ反応における同じ塩基を有する天然基質の取り込み効率の約70%～約100%で生じる、本発明1100の方法。

40

[本発明1104]

本発明1001の化合物をミニ配列決定またはミニ配列決定型配列決定方法に加える段階を含む、ミニ配列決定またはミニ配列決定型配列決定を行う方法。

[本発明1105]

化合物が式(I)の化合物としてさらに定義される、本発明1095、1100および1104のいずれかの方法。

[本発明1106]

化合物が式(II)の化合物としてさらに定義される、本発明1095、1100および1104のいずれかの方法。

50

[本発明1107]

化合物が式(III)の化合物としてさらに定義される、本発明1095、1100および1104のいずれかの方法。

[本発明1108]

化合物が式(IV)の化合物としてさらに定義される、本発明1095、1100および1104のいずれかの方法。

[本発明1109]

化合物が式(V)の化合物としてさらに定義される、本発明1095、1100および1104のいずれかの方法。

[本発明1110]

化合物が式(VI)の化合物としてさらに定義される、本発明1095、1100および1104のいずれかの方法。

[本発明1111]

化合物が式(VII)の化合物としてさらに定義される、本発明1095、1100および1104のいずれかの方法。

[本発明1112]

以下を含むシステム：

複数のビーズを含むフローセルであって、

本発明1001～1056のいずれかの化合物がポリメラーゼを使用して取り込まれたDNA分子に各ビーズが結合し；

フローセルが可視光線および紫外線に少なくとも部分的に透過性である、フローセル；

フローセルの画像を捕捉するように構成された撮像装置；

少なくとも4つのスペクトルフィルターを含み、各フィルターの間で循環するように構成されたフィルターホイール；

フローセルからフィルターホイール中のフィルターを通じて撮像装置までの光路を作り出すように構成されたランプ；ならびに

フローセル上のDNA分子に紫外線を与えるように構成された紫外線源。

[本発明1113]

フローセルが微小流体フローセルである、本発明1112のシステム。

[本発明1114]

フィルターホイールとフローセルとの間の対物レンズをさらに含む、本発明1112のシステム。

[本発明1115]

光路を撮像装置に向けるように構成された鏡をさらに含む、本発明1112のシステム。

本開示の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかし、本発明の真意および範囲内の様々な変更および修正がこの詳細な説明から当業者に明らかになることから、本発明の具体的な態様を示す詳細な説明および具体例が例示のみを目的として示されると理解すべきである。単に特定の化合物が1つの特定の一般式に帰することをもって、それが別の一般式にも属することができないことを意味するわけではないことに留意されたい。

【図面の簡単な説明】

【0057】

以下の図面は、本明細書の一部を形成するものであり、本開示の特定の局面をさらに示すために含まれる。本明細書において提示される具体的な態様の詳細な説明との組み合わせでこれらの図面のうち1つを参照することで、本発明をより良く理解することができる。

。

【0058】

【図1】2-ニトロベンジルアルキル化HOMedNTP類似体の構造。「R」はH、イソプロピルま

10

20

30

40

50

たはtert-ブチルである。「R'」はH、4-OMe、5-OMe、4,5-ジ-OMeまたは6-NO₂である。具体例は一覧を参照。「*」は、この炭素原子における2つの異なる立体化学配置を示す。破線の楕円体内の式の部分は、紫外線に対する曝露時に開裂する末端官能基を強調する。

【図2】DTTによる一過的産物(TP)の除去。(A) 1mM NaN₃および(B) 1mM NaN₃、50mM DTTの存在下でTherminatorポリメラーゼによって取り込まれたdU.VIの紫外線光化学開裂時系列の蛍光ゲル画像。レーン: 「P」(プライマー)は、1x ThermoPol緩衝液中のBODIPY-FL標識プライマー1とハイブリダイズしたoligoTemplate-4に結合したTherminatorを含み(Wu et al., 2007; Litosh et al., 2011)、「I」(取り込み)は、レーン「P」に見られるものに加えて100nM dU.VIを含み、時点レーンは、レーン「I」に見られるものに加えて、0.70 W/cm²・365nmの光に曝露された列挙時点の試料を含む。「IP」は取り込まれた産物を示し、「CP」は開裂産物を示す。

10

【図3】(1S)-カンファン酸(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルのX線結晶構造。参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al. (2011)に記載のように、寸法0.50mm x 0.05mm x 0.05mmを有する(1S)-カンファン酸(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルの結晶について結晶学的測定を行った。データ収集: CuK α 線、 λ =1.54178 Å、T=110 $\pm$ 2 °K、2 $\theta_{\max}$ =120.0 °、収集反射数32,513、独立反射数2,913(R_{int}=0.0517)。最終GooF=1.091、R1=0.0681、wR2=0.1695、R指数は反射数2,913とI>2 σ (I)(F²に対する精密化)に基づく、パラメータ数290、制限数43。適用されるLpおよび吸収補正 μ =0.819mm⁻¹。絶対構造パラメータ: 0.05 $\pm$ 0.09。X線結晶構造解析データ: C₂₂H₂₉NO₇、M=419.46。斜方晶、a=6.29、b=15.00、c=22.27 Å (α 、 β 、 γ =90 °)、V=2,099.29 Å³、空間群P2₁2₁2₁、Z=4、D_c=1.327g/cm⁻³、F(000)=896。

20

【図4】DTTはニトロソ中間体(TP)を除去する。Therminator(商標)ポリメラーゼによって取り込まれたdU.VIの紫外線光化学開裂実験の蛍光ゲル画像。レーン: 「P」(プライマー)は、1x ThermoPol緩衝液中のBODIPY-FL標識プライマー1とハイブリダイズしたoligoTemplate-4に結合したTherminator(商標)を含み、「I」(取り込み)は、レーン「P」に見られるものに加えて100nM dU.VIを含む。一覧に最終濃度として列挙された試薬A~Gを加え、試料を0.70W/cm²・365nmの光に10秒間曝露した。「IP」は取り込まれた産物を示し、「CP」は開裂産物を示し、「TP」は一過的産物を示す。

【図5】紫外線光化学開裂測定用の光学設定。図5Aは、半分切断された修正0.5mLエッペンチューブ、PM100電力計、アークビームを整列させるために3軸手動並進ステージを使用する1,000 μ mピンホールカセットの模式図を示す。図5Bは、試料ホルダー、および10 μ Lまたは20 μ L反応試料の中心にアークビームを整列させるための内部整列カードを有する修正0.5mLエッペンチューブを示す。

30

【図6】光化学開裂反応の例。紫外線で誘発された光化学開裂の時点で、末端2-ニトロベンジル誘導体が放出されて天然ヒドロキシメチルヌクレオチドが得られる。ベンジル炭素において結合した立体特異的(S)-tert-ブチル基と、2-ニトロベンジル環上で修飾された5-OMe基との組み合わせによって、光化学開裂反応の速度が相当に増大した。C⁷-HOMedGの場合、速度はその対応する親類似体に比べて2桁以上増大した。

【図7】 α -炭素におけるtert-ブチル置換および5位におけるメトキシ置換は、光化学開裂速度の改善と相関している。この図では、C⁷-HOMedA、HOMedC、C⁷-HOMedGおよびHOMedUヌクレオシド上でアルキル化された親、(S)- α -tert-ブチルおよび(S)- α -tert-ブチル-5-OMe 2-ニトロベンジル基の光化学開裂速度が比較される。DT₅₀値の低下は光化学開裂速度の高速化を示す。

40

【図8】フローセル上で蛍光ビーズを撮像するためのシステムの模式図。

【図9】ビーズの調製および固定化方法の例。フローセル上でビーズ試料を例示的に調製する段階の模式図。

【図10】CRTサイクルにおける取り込み段階、蛍光撮像段階および光化学開裂段階の模式図。

【図11】3回のCRTサイクルおよびそれに続く個々のビーズからの塩基呼び出しからのタイル画像の図。

50

【図12】 一般的色素(「蛍光」)に結合した3'-OH可逆的ターミネーターの化学式。破線の楕円体によって包含される式の部分は、紫外線に対する曝露時に開裂する色素標識末端官能基を示す。

【図13】 ランダムニック配列決定(RNS)法の図。図に示すLightning Terminators(商標)は本発明の可逆的ターミネーターで構成される。

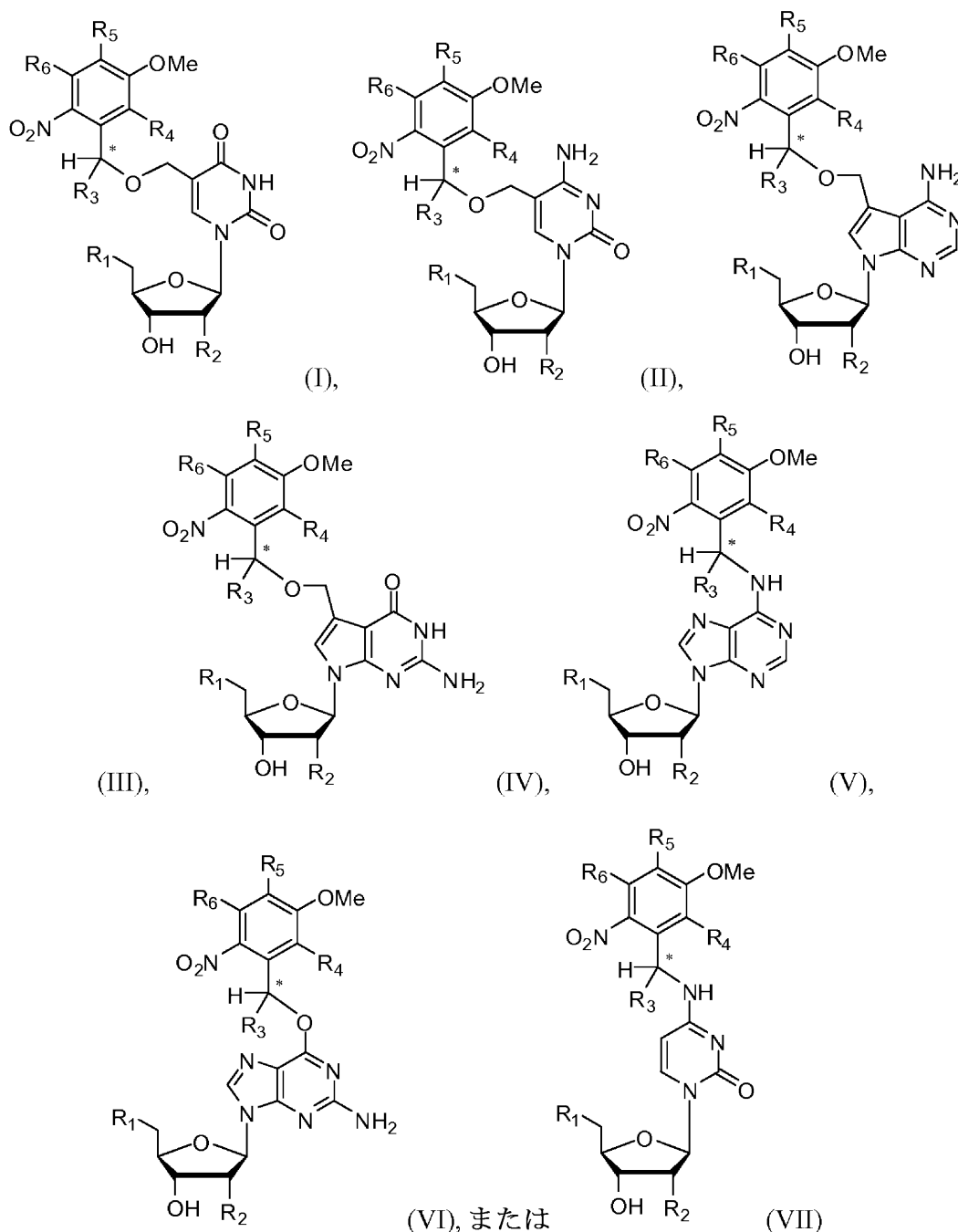
【発明を実施するための形態】

【0059】

例示的態様の説明

I. 可逆的ターミネーターおよびその合成方法

一局面では、本開示は、種々の異なるDNA配列決定用途において可逆的ターミネーターとして機能するように使用可能な新規化合物を提供する。本開示によって提供される化合物は可逆的ターミネーター、3'-OH非遮断可逆的ターミネーター、およびLightning Terminators(商標)とも呼ばれる。いくつかの態様では、下記式の化合物またはその塩、互変異性体もしくは光学異性体が提供される:



式中、

10

20

30

40

50

R₁はヒドロキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、α-チオトリホスフェートまたはポリホスフェートであり；

R₂は水素またはヒドロキシであり；

R₃はアルキル (C ≤ 8) または置換アルキル (C ≤ 8) であり；

R₄は

水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

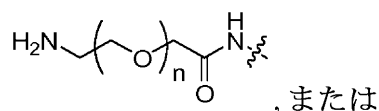
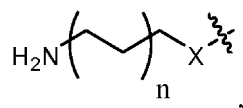
アルキル (C ≤ 6)、アシル (C ≤ 6)、アルコキシ (C ≤ 6)、アシルオキシ (C ≤ 6)、アルキルアミノ (C ≤ 6)、ジアルキルアミノ (C ≤ 6)、アミド (C ≤ 6)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

R₅およびR₆はそれぞれ独立して

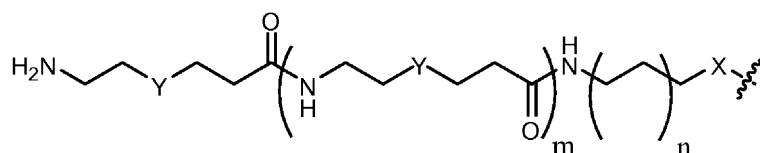
水素、ヒドロキシ、ハロ、アミノ、ニトロ、シアノ、アジドまたはメルカプト；

アルキル (C ≤ 6)、アルケニル (C ≤ 6)、アルキニル (C ≤ 6)、アリール (C ≤ 6)、アラルキル (C ≤ 8)、ヘテロアリール (C ≤ 6)、アシル (C ≤ 6)、アルコキシ (C ≤ 6)、アシルオキシ (C ≤ 6)、アルキルアミノ (C ≤ 6)、ジアルキルアミノ (C ≤ 6)、アミド (C ≤ 6)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョン；

下記式の基：



, または



式中、

Xは

-O-、-S-または-NH-；あるいは

アルカンジイル (C ≤ 12)、アルケンジイル (C ≤ 12)、アルキンジイル (C ≤ 12)、またはこれらの基のいずれかの置換バージョンであり；

Yは-O-、-NH-、アルカンジイル (C ≤ 12) または置換アルカンジイル (C ≤ 12) であり；

nは0～6の整数であり；

mは0～6の整数である；あるいは

-リンカー-レポーターである。

【0060】

色素標識 α-tBu-5-OMe-2-ニトロベンジルアルキル化ヒドロキシメチルヌクレオチドは以下のスキームおよび手順に従って合成することができる。

【0061】

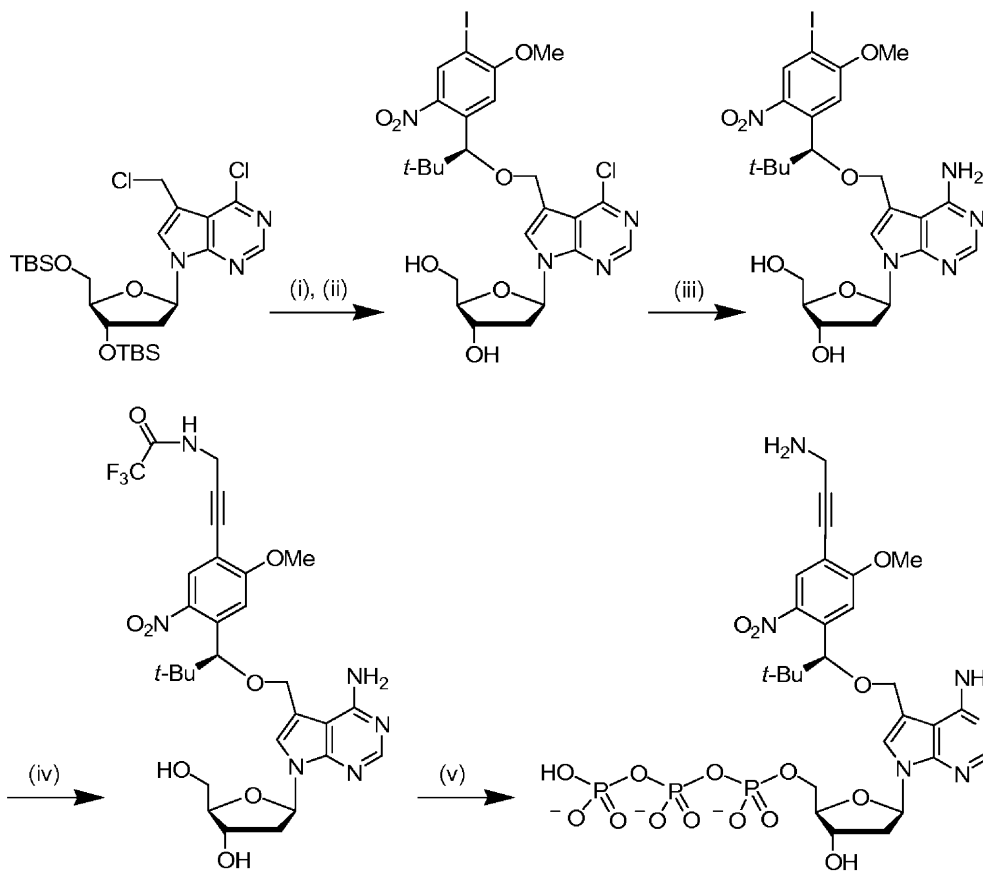
A. 色素標識7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7'-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸の合成

10

20

30

40



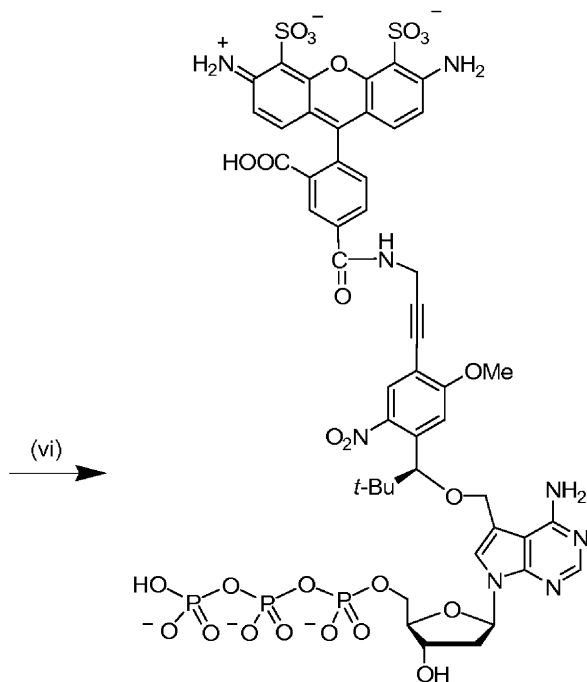
10

20

スキーム2a 色素標識7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピル
 オキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件:
 (i) (S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110°C; (ii)
 n-Bu₄NF、THF、室温; (iii) NH₃、1,4-ジオキササン/MeOH、100°C; (iv) N-プロパルギル
 トリフルオロアセトアミド、Pd(PPh₃)₄(0)、CuI、Et₃N、DMF; (v) POCl₃、(MeO)₃PO、0°C
 ; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

【0062】

30

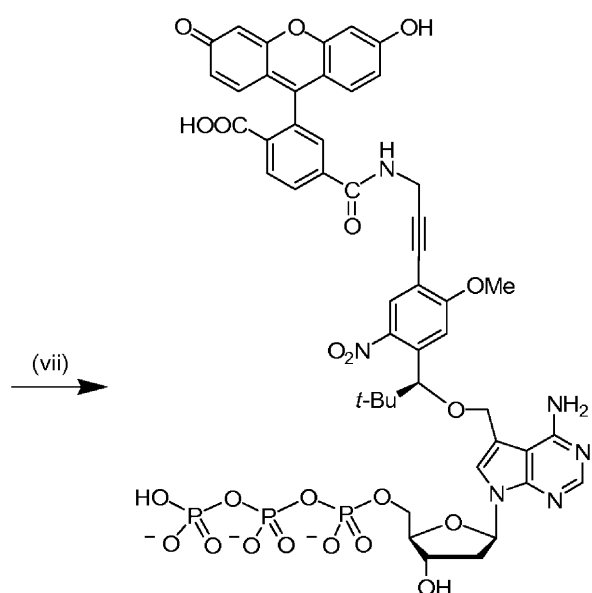


40

スキーム2b (vi) Alexa Fluor 488 NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0063】

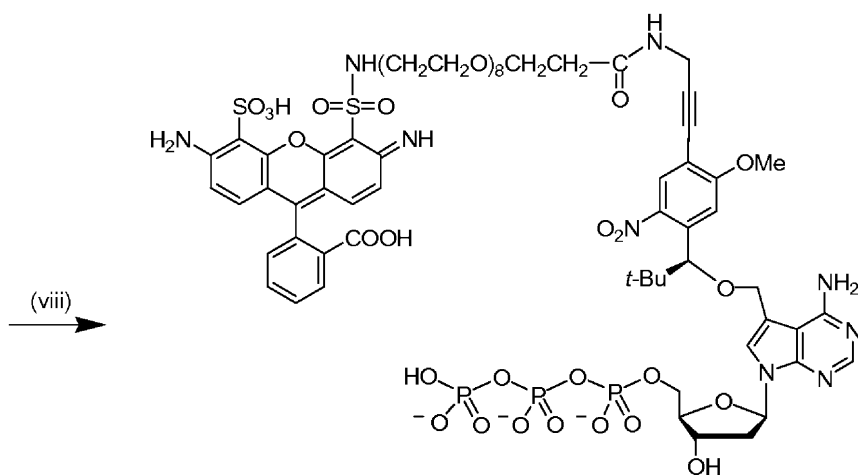
50



10

スキーム2c (vii) 6-FAM NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0064】



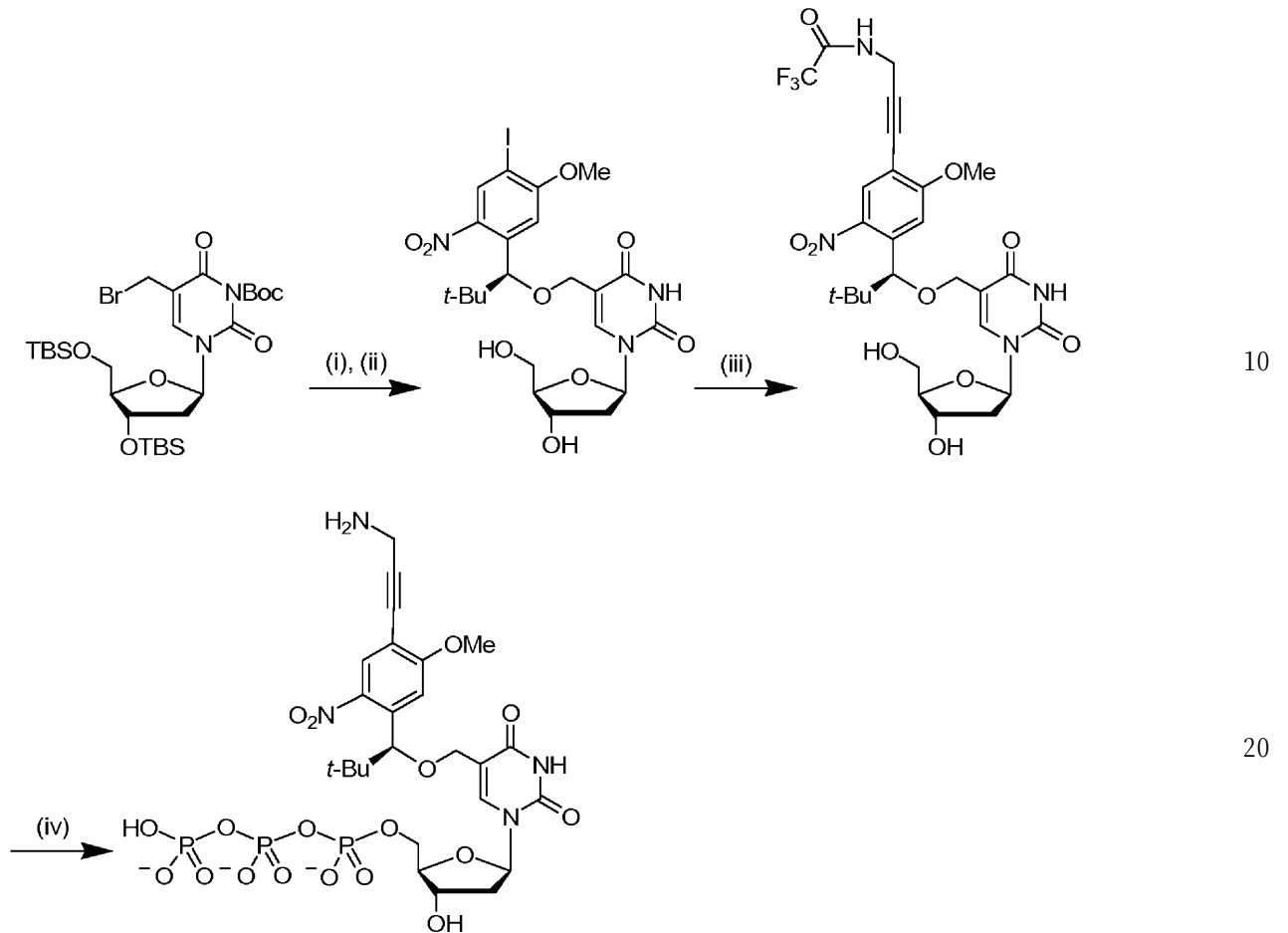
20

30

スキーム2d (viii) CF488A NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0065】

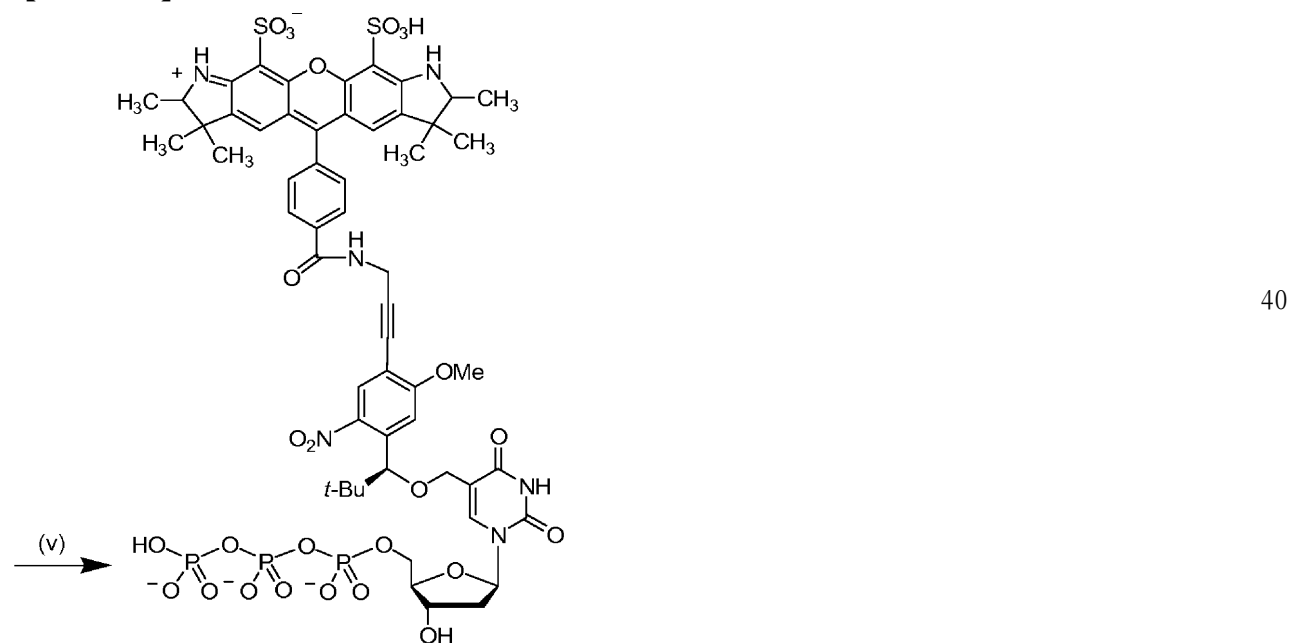
B. 色素標識5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸の合成



スキーム3a 色素標識5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピル
 オキシ]メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) (S)-1-(
 4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110℃; (ii) N
 H₄F、MeOH、50℃; (iii) N-プロパルギルトリフルオロアセトアミド、Pd(PPh₃)₄(0)、CuI
 、Et₃N、DMF; (iv) POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0℃; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu
₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

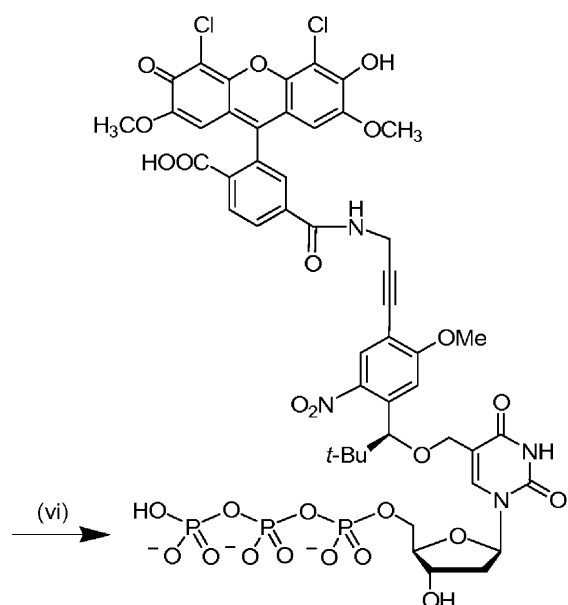
30

【0066】



スキーム3b (v) Alexa Fluor 532 NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

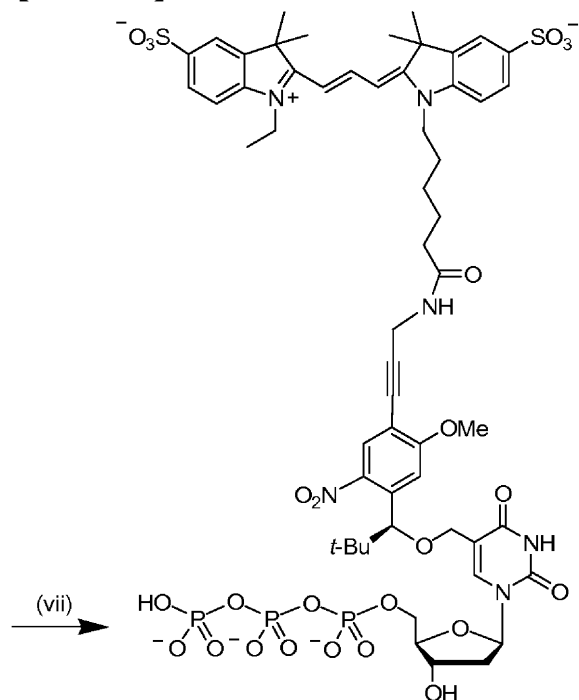
【0067】



10

スキーム3c (v) 6-JOE NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0068】



20

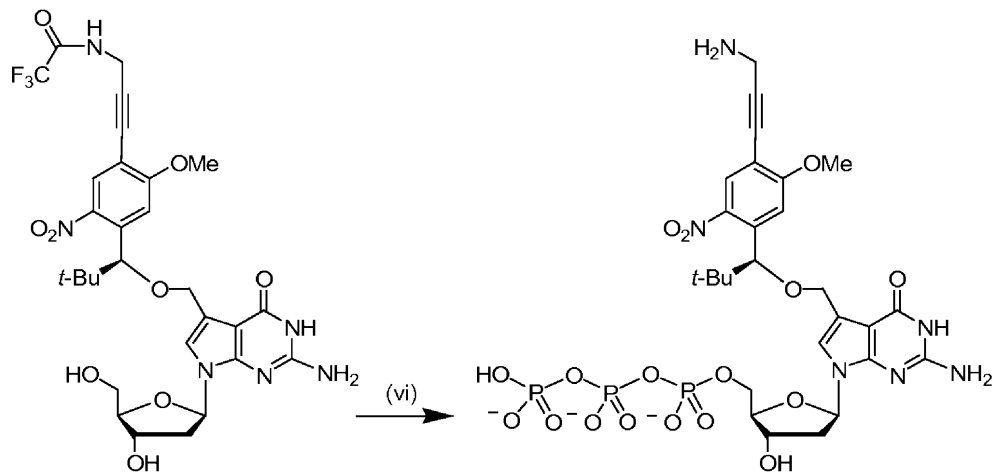
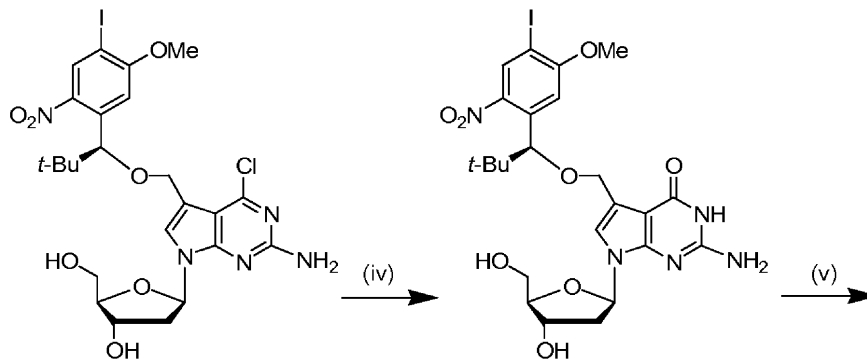
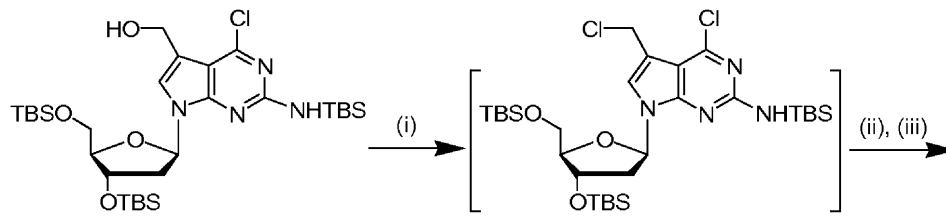
30

スキーム3d (v) Cy3 NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0069】

C. 色素標識7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メ
チル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸の合成

40

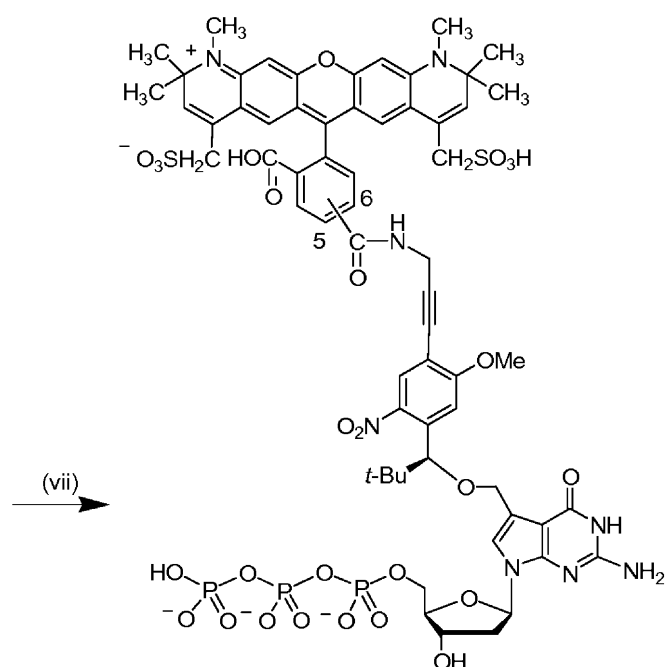


スキーム4a 色素標識7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピル
 オキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件：
 (i) MsCl、DMAP、CH₂Cl₂、0℃；(ii) (S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2
 ,2-ジメチル-1-プロパノール、115℃；(iii) n-Bu₄NF、THF、室温；(iv) syn-ピリジン-2
 -アルドキシム、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン、1,4-ジオキサン/DMF、70℃；(v) N-
 プロパルギルトリフルオロアセトアミド、Pd(PPh₃)₄(0)、CuI、Et₃N、DMF；(vi) POCl₃、
 プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0℃；(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF；1M HNEt₃HCO₃。
 【0070】

10

20

30

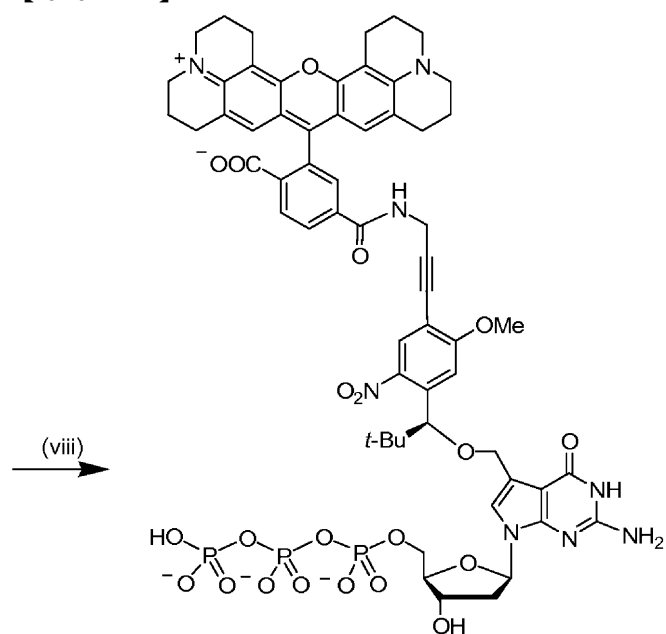


10

スキーム4b (vii) Alexa Fluor 594 NHS、0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (pH9.2)。

【0071】

20



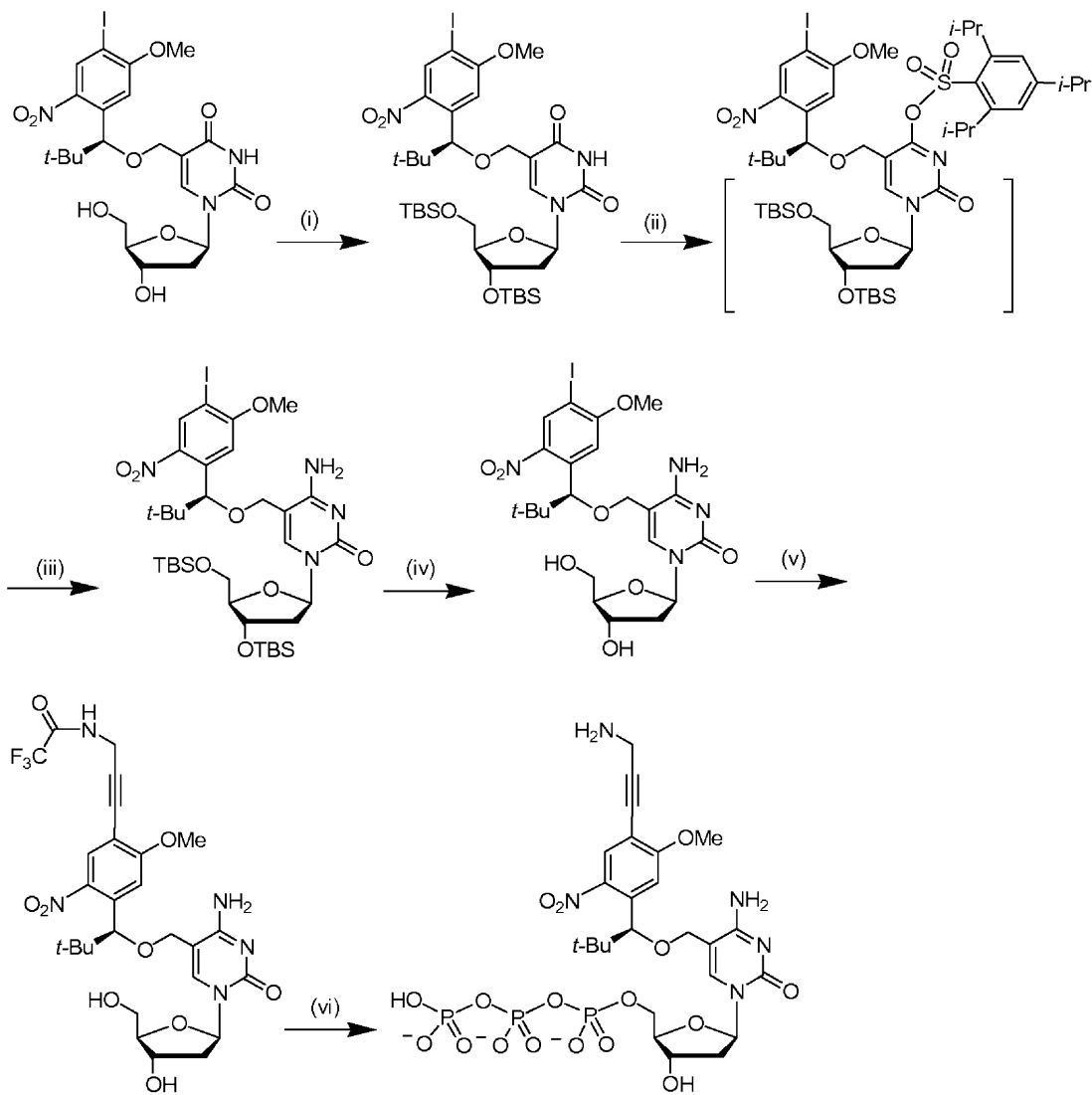
30

スキーム4c (vii) 6-ROX NHS、0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (pH9.2)。

【0072】

D. 色素標識5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸の合成

40



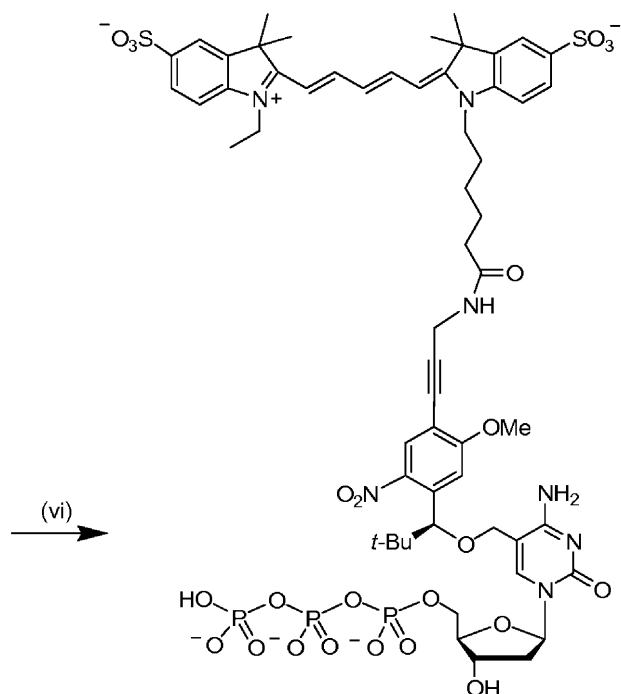
10

20

スキーム5a 色素標識5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピル
 オキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件：(i) TBSCl、
 イミダゾール、DMF、室温；(ii) 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド、
 DMAP、 Et_3N 、 CH_2Cl_2 、室温；(iii) NH_3 、1,4-ジオキサン、 90°C ；(iv) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ 、THF、室
 温、82%；(v) N-プロパルギルトリフルオロアセトアミド、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4(0)$ 、 CuI 、 Et_3N 、DM
 F；(vi) POCl_3 、プロトンスポンジ、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、 0°C ； $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、DMF；1
 M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

【0073】

30

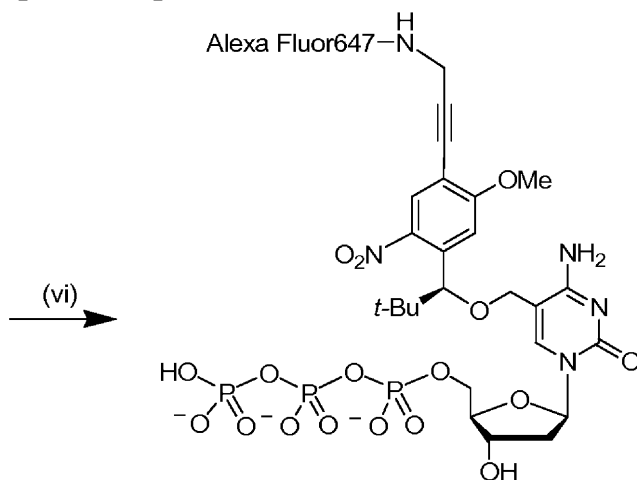


10

スキーム5b (vi) Cy5 NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0074】

20



30

スキーム5c (vi) Alexa Fluor 647 NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0075】

いくつかの態様では、 α -炭素において置換されたアルキルの立体化学配置が2-ニトロベンジル基の光化学開裂特性を改善しうることが観察された。いくつかの態様では、 α -炭素における立体特異的な基と2-ニトロベンジル環に結合した別の化学基とを組み合わせることで光化学開裂速度の高速化が得られることが観察された。例えば図7を参照。

【0076】

40

本開示の化合物は、上記の方法および以下の実施例の節に記載の方法を使用して作製することができる。例えば、そのエナンチオピュアな形態を含む α -tBu-5-OMe-2-ニトロベンジルアルコールを作製するための合成の概要を実施例8に示す。これらの方法は、当業者が適用する有機化学の原理および技術を使用してさらに修正および最適化することができる。例えば、そのような原理および技術は、参照により本明細書に組み入れられるMarch's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure (2007)において教示されている。

【0077】

本発明の方法において使用される化合物は、1個または複数の不斉置換炭素または窒素原子を含みうるものであり、光学活性体またはラセミ体として単離されうる。したがって

50

、特定の立体化学配置または異性体が特に示されない限り、ある構造のすべてのキラル体、ジアステレオ異性体、ラセミ体、エピマー体、およびすべての幾何異性体が意図される。化合物はラセミ体およびラセミ混合物、単一の鏡像異性体、ジアステレオマー混合物および個々のジアステレオマーとして生じうる。いくつかの態様では、単一のジアステレオマーが得られる。本発明の化合物のキラル中心はS配置またはR配置を有しうる。例えば、本開示のいくつかの局面では、修飾5-ヒドロキシメチルピリミジンまたは7-ヒドロキシメチル-7-デアザプリン塩基のベンジルエーテルの α -炭素の置換およびその立体化学配置が、3'-OH非遮断塩基修飾dNTPの生物学的機能および開裂反応速度に影響を与える。

【0078】

また、本発明の化合物は、本明細書に記載の適応症において使用される場合であれ、他の場合であれ、先行技術において公知の化合物に比べて有効であり、毒性が低く、長時間作用し、強力であり、生じる副作用が少なく、容易に吸収され、かつ/または良好な薬物動態プロファイル(例えば高い経口バイオアベイラビリティおよび/もしくは低いクリアランス)を示し、かつ/または他の有用な薬理学的、物理的もしくは化学的性質を示すことができるという利点を有しうる。

【0079】

本発明の化合物を表すために使用される化学式は通常、おそらくは数種類である異なる互変異性体のうち1つしか示さない。例えば、多くの種類のケトン基が対応するエノール基との平衡状態で存在することが知られている。同様に、多くの種類のイミン基がエナミン基との平衡状態で存在する。どの互変異性体が所与の化合物について示されるかにかかわらず、またどの互変異性体が最も優勢であるかにかかわらず、所与の化学式のすべての互変異性体が意図される。

【0080】

さらに、本発明の化合物を構成する原子は、そのような原子のすべての同位体形態を含むよう意図されている。本明細書において使用される同位体は、同一の原子番号を有するが異なる質量数を有する原子を含む。一般例としてかつ非限定的に、水素の同位体としてはトリチウムおよび重水素が挙げられ、炭素の同位体としては ^{13}C および ^{14}C が挙げられる。同様に、本発明の化合物の1個または複数の炭素原子をケイ素原子で置き換えることができると思定される。さらに、本発明の化合物の1個または複数の酸素原子を硫黄原子またはセレン原子で置き換えることができると思定される。

【0081】

いくつかの態様では、本明細書において提供される3'-OH非遮断可逆的ターミネーターは α -チオホスフェート基、好ましくは α -チオトリホスフェート基を有する。例えば、以下の実施例8の化合物54b、55b、59b、60b、63b、64b、68bおよび69bを参照。DNAポリメラーゼが3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示すことは当技術分野において周知である。3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の機能は、取り込まれたヌクレオチドのみをプライマー鎖から除去するというものである。多くの市販のDNAポリメラーゼは、検出可能なレベル未満にこの活性を減少させるために3'-5'エキソヌクレアーゼドメインを欠失または変異させる。にもかかわらず、いくつかのDNAポリメラーゼの低レベルの活性であっても、一次シグナルのタイミングのずれによって低い配列データ品質が生じることがある。いくつかの態様では、残留3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を減少させ、最小化しかつ/または除去するために、 α -チオトリホスフェート基を有する3'-OH非遮断可逆的ターミネーターを使用することができる。理論によって拘束されるものではないが、 α -チオトリホスフェートがエキソヌクレアーゼ活性に耐性があることは当技術分野において周知である。例えば、参照により本明細書に組み入れられるRosenthalおよびBrennerの欧州特許第EP 0 640 146号を参照。

【0082】

本発明の化合物はプロドラッグ形態でも存在しうる。プロドラッグが医薬品の数多くの望ましい性質(例えば溶解度、バイオアベイラビリティ、製造性など)を強化することが知られていることから、所望であれば、本発明のいくつかの方法において使用される化合物

10

20

30

40

50

をプロドラッグ形態で送達してもよい。したがって、本発明は、本発明の化合物のプロドラッグ、およびプロドラッグを送達する方法を想定する。本発明において使用される化合物のプロドラッグは、修飾が日常的な操作またはインビボのいずれかで開裂されて親化合物になるように、化合物に存在する官能基を修飾することで調製することができる。したがって、プロドラッグとしては例えば、プロドラッグが対象に投与される際に開裂してヒドロキシ、アミノまたはカルボン酸をそれぞれ形成する任意の基にヒドロキシ基、アミノ基またはカルボキシ基が結合した本明細書に記載の化合物が挙げられる。

【0083】

本開示は、迅速なDNA配列決定の技術において使用可能な、ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物、ならびにその塩、エステルおよびホスフェートをさらに提供する。しかし、本発明の任意の塩の一部を形成する特定のアニオンまたはカチオンは、その塩が全体として薬理学的に許容される限り重要ではないと認識すべきである。薬学的に許容される塩ならびにその調製方法および使用方法のさらなる例は、参照により本明細書に組み入れられるHandbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (2002)に提示されている。本化合物はリボヌクレオシド三リン酸(NTP)およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)の形態であってもよい。いくつかの場合、ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物は、蛍光色素などのレポーター基で標識された化学開裂性基または酵素開裂性基を含む。ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物は、DNA合成の終結および開裂を迅速に行うように設計された化学的または酵素的に除去可能な保護基を含み、したがってこれら単量体は迅速な配列決定に平行的に使用可能になる。ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物上の蛍光色素で標識されたそのような迅速に開裂可能な基の存在は、迅速な全ゲノム配列決定、ならびに多型および他の価値ある遺伝情報の同定を例えば可能にするように、DNAの大きなオリゴマーの平行的配列決定の速度および精度を向上させることができる。

【0084】

これらの3'-OH非遮断ターミネーターはいくつかの市販のDNAポリメラーゼによって十分に耐容され、このことは3'-O-遮断ターミネーターに比べて主要な利点となる。また、本明細書に開示される化合物のベンジル基は、選択される蛍光色素または他のレポーター基を含むように誘導体化されうる。

【0085】

II. 可逆的ターミネーターの特性

上記で論じたように、一局面では、循環可逆的ターミネーター(CRT)配列決定用途において、改善された可逆的ターミネーターとして使用可能な、高速光化学開裂特性を有する新規アルキル化2-ニトロベンジルヌクレオチドが提供される。そのような用途は、いずれも参照により本明細書に組み入れられるMetzker (2005, 2010)に記載されている。いくつかの態様では、種々の置換2-ニトロベンジル基を有する、修飾7-デアザ-7-ヒドロキシメチル-2'-デオキシアデノシン(C⁷-HOMedA)(Rockhill et al., 1997)および7-デアザ-7-ヒドロキシメチル-2'-デオキシグアノシン(C⁷-HOMedG)(McDougall et al., 2001)ならびにHOMedCおよびHOMedUが提供される。図1参照。いくつかの態様では、本明細書に開示される可逆的ターミネーターは、ヌクレオチド取り込みの高速な動態、一塩基終結、高いヌクレオチド選択性、および/または末端基の迅速な開裂を含むいくつかの好適な特性を示す。

【0086】

C⁷-HOMedA類似体を単一のジアステレオマーヌクレオチドに分離するためのクロマトグラフィー条件を同定し、第1の溶離異性体をds1と示し、第2の溶離異性体をds2と示した。2-ニトロベンジル環の4-メトキシ(4-OMe)および6-ニトロ(6-NO₂)修飾体で置換されたα-イソプロピル基の立体化学配置の光化学開裂効果を評価するために、3つのC⁷-HOMedA類似体dA.III.a~dA.III.cならびに親dA.Iを合成した(以下の実施例の節を参照)。これらの2-ニトロベンジルアルキル化C⁷-HOMedATP類似体について、取り込みアッセイを行った後、アジ化ナトリウム溶液中での紫外線光化学開裂実験に供した(表1)。

【0087】

(表1) C⁷-HOMedA類似体の光化学開裂速度

C ⁷ -HOMedA類似体	1mM NaN ₃ 中でのDT ₅₀	
	DTTなし	50 mM DTT
dA.I	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
dA.III.a ds1	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2
dA.III.a ds2	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
dA.III.b ds1	7.0 ± 0.3	6.1 ± 0.4
dA.III.b ds2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
dA.III.c ds1	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.2
dA.III.c ds2	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.1

10

【0088】

すべての場合において、dA.III.a～dA.III.cのds2異性体は、それらのds1対応物に比べてそれぞれ2.0倍、6.4倍および1.2倍高速な光化学開裂速度(すなわち低いDT₅₀値)を示した。興味深いことに、ds1異性体は親dA.I類似体に比べて同様の(dA.III.c)または高い(dA.III.aもしくはdA.III.b)DT₅₀値を示した。これらのデータは、置換α-イソプロピル基の立体化学配置が重要な決定要因であること、および、4-OMe置換との組み合わせによってdA.III.b ds2類似体がα-イソプロピルC⁷-HOMedAのセットで最小のDT₅₀値を生成したこと

20

【0089】

以前の研究は、α-tert-ブチル類似体dU.Vが一塩基終結および高いヌクレオチド選択性などの優れたCRT特性を示すことを示した(Litosh et al., 2011)。これにより、4つのα-tert-ブチルC⁷-HOMedG類似体dG.V.a～dG.V.dを親dG.Iと共に合成することによって(図1)、異なるα-置換用基と様々なOMe環置換との組み合わせを使用して立体特異的效果をさらに調査することが可能になった。紫外線光化学開裂実験は、α-イソプロピル-C⁷-HOMedATP類似体と一致して、dG.V.a～dG.V.dのds2異性体が、それらのds1対応物に比べてそれぞれ3.1倍、4.5倍、4.4倍および3.0倍高速な速度を示したことを明らかにした(表2)。

【0090】

30

(表2) C⁷-HOMedG類似体の光化学開裂速度

C ⁷ -HOMedG類似体	1mM NaN ₃ 中でのDT ₅₀	
	DTTなし	50 mM DTT
dG.I	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
dG.V.a ds1	11.0 ± 0.4	10.7 ± 0.2
dG.V.a ds2	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.3
dG.V.b ds1	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.3
dG.V.b ds2	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2
dG.V.c ds1	3.5 ± 0.3	3.0 ± 0.1
dG.V.c ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
dG.V.d ds1	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
dG.V.d ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1

40

【0091】

5-OMe ds1およびds2異性体はいずれも、対応する4-OMe異性体に比べてそれぞれ1.4倍高速な光化学開裂速度を示した。ビス置換4,5-ジ-OMe ds1異性体は、モノ置換4-OMe(2.0倍)または5-OMe(1.5倍)異性体に比べて高速な開裂速度を示した。逆に、5-OMe ds2および4,5

50

-ジ-OMe ds2異性体は、ちょうど0.8秒という同一のDT₅₀値を示した。Hasan et al. (1997)は、 α -置換用基の非存在下で5-OMe-2-ニトロベンジル類似体がその対応する親に比べて1.2倍しか速度を増大させなかったことを報告した。dG.V.cのds1およびds2異性体とdG.V.aのそれらとの比較はそれぞれ3.6倍および4.4倍の速度増大を明らかにした。このことは、立体特異的tert-ブチル基が5-OMe基の効果を向上させることを示唆している。4色CRT用途では、リンカー構造が色素標識類似体を作り出すように4位に結合することもあることから、この組み合わせは環系の有用性における良好な柔軟性を与える(米国特許第7,897,737号、第7,964,352号および第8,148,503号；米国特許出願公開第2011/0287427号；Metzker, 2010)。

【0092】

これらの α -tert-ブチルC⁷-HOMedG類似体の立体化学配置を決定するために、(R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの(1S)-カンファネートを分別晶出によってそのエナンチオピュアな(S)アルコールに分割した(Corrie et al., 1992)(図3)。この(S)アルコールおよび(S)- α -tert-ブチル-2-ニトロベンジルアルコール(米国特許第8,148,503号；Litosh et al., 2011)をそれぞれC⁷-HOMedGに結合させた(図1)。それらの対応する三リン酸のRP-HPLC分析は、dG.V.aおよびdG.V.cの両ds2異性体がそれぞれdG.VおよびdG.VIと同一のピーク保持時間を有したことを明らかにした。これにより本発明者らは、両ds2異性体が α -炭素において同一の(S)配置を有することを決定することが可能になる。推論によって、dG.V.aおよびdG.V.cの対応するds1異性体には(R)配置が割り当てられた。

【0093】

次に、光化学開裂速度に対する脱離基の効果を調査するために、これらの(S)アルコールを残留ヌクレオシドに結合させた。例えば、紫外線光化学開裂実験は、親2-ニトロベンジル類似体のDT₅₀値がdC.Iの2.0秒からdG.Iの9.2秒まで変動したことを明らかにした(図7および表3)。

【0094】

(表3) 可逆的ターミネーターの光化学開裂速度

ヌクレオチド類似体	1mM NaN ₃ 中でのDT ₅₀	
	DTTなし	50 mM DTT
dA.I	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
dA.V	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2
dA.VI	0.8 ± 0.1 ^[a]	0.8 ± 0.1
dC.I	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2
dC.V	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2
dC.VI	0.6 ± 0.1 ^[a]	0.6 ± 0.1
dG.I	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
dG.V	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2
dG.VI	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
dU.I	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
dU.V	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
dU.VI	0.7 ± 0.1 ^[a]	0.7 ± 0.1

^[a] ゲル電気泳動によって観察される一過的産物(TP)；DT₅₀値において開裂産物と考えられる。

【0095】

ベンジル炭素を(S)-tert-ブチルで置換することで開裂速度が親類似体に比べて1.5倍～

3.1倍に増大し、5-OMe基でさらに置換することで速度が3.0倍～11.5倍にさらに増大した。最大の速度改善はC⁷-HOMedG類似体を比較する際に観察され、DT₅₀値が9.2秒から0.8秒に減少した(図7、黒い棒)。(S)-5-OMe- α -tert-ブチル可逆的ターミネーターの完全なセットは0.6～0.8秒というより狭い範囲のDT₅₀値を示した。これらのデータは、(S)- α -tert-ブチル基および5-OMe基の併用効果が、特定のヌクレオチド脱離基について観察される開裂速度の変動を減少させる上で重要な役割を果たすことで、標準化されたより高速な開裂条件をCRTサイクルに与えるという実用的な用途を有することを示唆している。意外にも、紫外線に対する短時間の曝露後、取り込みアッセイによって一過的産物が(S)-5-OMe- α -tert-ブチル-C⁷-HOMedA、-HOMedCおよび-HOMedUで観察されたが-C⁷-HOMedGでは観察されなかった(HOMedUは図2の左側にのみ示す)。唯一の差が取り込まれたヌクレオチドのみであることから、本発明者らは、より高速に開裂する(S)-5-OMe- α -tert-ブチル-2-ニトロベンジル基によって、伸長するプライマー鎖の3'-末端ヌクレオチドを攻撃する反応性のより高い2-ニトロソケトン副産物が生成されると仮定した。

【0096】

ニトロソ中間体を反応停止させる条件を調査するために、いくつかのアミノおよびチオール作用物質を紫外線光化学開裂実験中に試験した(図5)。これらのうち、ジチオスレイトール(DTT)(Cleland, 1964)のみが一過的産物を除去した(図2、右側)。いくつかの態様では、有効DTT濃度は1mM～1Mである。いくつかの態様では、有効DTT濃度は5mM～100mMである。いくつかの態様では、有効DTT濃度は10mM～50mMである。いくつかの態様では、有効DTT濃度は約50mMである。いくつかの態様では、光化学開裂段階はアジ化ナトリウムの存在下で行われる。いくつかの態様では、有効アジ化ナトリウム濃度は0.1mM～1Mである。いくつかの態様では、有効アジ化ナトリウム濃度は1mM～100mMである。いくつかの態様では、有効アジ化ナトリウム濃度は1mM～50mMである。いくつかの態様では、有効アジ化ナトリウム濃度は約1mMである。

【0097】

速度効果を試験するために、すべての化合物についてDTTの存在下で紫外線光化学開裂実験を繰り返したところ、いくつかの親およびds1異性体のDT₅₀値が減少した(表1、表2および表3)。Barth et al. (2005)は、DTTが求核付加によってニトロソ基を攻撃すると主張したが、Corrie (2005)による後の考察では、ニトロソケトン副産物からの生物学的干渉の証拠が最小限にとどまることから、保護チオールが不要であると記載されている。本発明に記載の本発明者らの例では、DTTはそのような望ましくない反応に対する重要な保護的役割を果たす。

【0098】

α -置換された基と5-メトキシ基との組み合わせの立体特異的(S)配置が、高速開裂する可逆的ターミネーターを作り出す上での決定要因であることがわかった。反応性ニトロソケトン副産物を光化学開裂中にDTTの存在下で効果的に除去することで、CRT反応の生物学的完全性を維持する上で適切な条件を与えることができる。

【0099】

III. ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物ならびにDNA配列決定におけるそれらの使用
本発明の可逆的ターミネーターは、以下を含む種々のアプローチに基づくDNA配列決定方法において使用することができる。

・DNAポリメラーゼを使用する2',3'-ジデオキシヌクレオチド(ddNTP)の取り込みによるDNA合成の連鎖終結を包含する「サンガー法」または「ジデオキシ法」。参照により本明細書に組み入れられるMetzker et al., 2005を参照。

・DNAを配列決定する異なる機構を通常は明確に記述するものではない、合成による配列決定法(SBS)。参照により本明細書に組み入れられるMetzker, 2010; Metzker 2005を参照。

・循環可逆的ターミネーター法(CRT)、一塩基付加法(SNA、例えばピロシーケンス法)、およびリアルタイム配列決定法に分類されることもある、DNAポリメラーゼ依存性戦略。参照により本明細書に組み入れられるMetzker, 2010を参照。

・ランダムニック配列決定(RNS)アプローチを使用する単一分子配列決定。

【0100】

いくつかの態様では、本発明は、以下の段階を含む、標的核酸を配列決定する方法を提供する：

- (i) プライマーの5'-末端を固体表面に結合させる段階；
- (ii) 標的核酸と該固体表面に結合したプライマーとをハイブリダイズさせる段階；
- (iii) 2種以上の塩基が存在する場合に各塩基が異なるレポーター基に結合するという条件で、本明細書に記載の構造のいずれかに係る化合物を加える段階；
- (iv) 核酸複製酵素をハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体に加えることで段階(iii)の組成物を伸長するプライマー鎖に取り込む段階であって、段階(iii)の取り込まれた組成物がポリメラーゼ反応を約70%～約100%の効率で終結させる段階；
- (v) 固体表面を洗浄することで、取り込まれていない成分を除去する段階；
- (vi) 取り込まれたレポーター基を検出することで、段階(iii)の取り込まれた組成物を同定する段階；

10

(vii) 任意で1つまたは複数の化合物を加えることで非伸長プライマーを持続的に封止する段階；

(viii) 末端部分の光化学開裂除去を含む末端部分の除去によって、5-ヒドロキシメチルピリミジンまたは7-ヒドロキシメチル-7-デアザプリン塩基を有する伸長プライマーを得る段階；

(ix) 固体表面を洗浄することで、開裂した末端基を除去する段階；および

20

(x) 段階(iii)～(viii)を1回または複数回繰り返すことで標的核酸中の複数の塩基を同定する段階。

【0101】

いくつかの変形では、段階(iii)および(iv)の順序は逆転する。さらなる変形では、ポリメラーゼおよび本化合物は同時に加えられる。態様では、それらは同一溶液中にある。

【0102】

別の局面では、本発明は、以下の段階を含む、標的核酸を配列決定する方法を提供する：

- (i) 標的核酸の5'-末端を固体表面に結合させる段階；
- (ii) プライマーと固体表面に結合した標的核酸とをハイブリダイズさせる段階；
- (iii) 2種以上の塩基が存在する場合に各塩基が異なるレポーター基に結合するという条件で、本明細書に記載の構造のいずれかに係る化合物を加える段階；
- (iv) 核酸複製酵素をハイブリダイズしたプライマー/標的核酸複合体に加えることで段階(iii)の組成物を伸長するプライマー鎖に取り込む段階であって、段階(iii)の取り込まれた組成物がポリメラーゼ反応を約70%～約100%の効率で終結させる段階；
- (v) 固体表面を洗浄することで、取り込まれていない成分を除去する段階；
- (vi) 取り込まれたレポーター基を検出することで、段階(iii)の取り込まれた組成物を同定する段階；

30

(vii) 任意で1つまたは複数の化合物を加えることで非伸長プライマーを持続的に封止する段階；

40

(viii) 末端部分の光化学開裂除去を含む末端部分の除去によって、5-ヒドロキシメチルピリミジンまたは7-ヒドロキシメチル-7-デアザプリン塩基を有する伸長プライマーを得る段階；

(ix) 固体表面を洗浄することで、開裂した末端基を除去する段階；および

(x) 段階(iii)～(ix)を1回または複数回繰り返すことで標的核酸中の複数の塩基を同定する段階。

【0103】

いくつかの変形では、段階(iii)および(iv)の順序は逆転する。

【0104】

いくつかの態様では、本化合物は、DNAポリメラーゼである核酸複製酵素によって取り

50

込まれる。いくつかの態様で、DNAポリメラーゼはTaq DNAポリメラーゼ、Klenow(エキソ-)DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、VENT(登録商標)(エキソ-)DNAポリメラーゼ(サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)からクローン化され、D141AおよびE143A変異を含む、DNAポリメラーゼA)、Pfu(エキソ-)DNAポリメラーゼ、ならびにDEEPVENT(商標)(エキソ-)DNAポリメラーゼ(パイロコッカス(*Pyrococcus*)属GB-Dからクローン化され、D141AおよびE143A変異を含む、DNAポリメラーゼA)からなる群より選択される。いくつかの態様では、DNAポリメラーゼはAMPLITAQ(登録商標)DNAポリメラーゼFS(G46DおよびF667Y変異を含むTaq DNAポリメラーゼ)、THERMOSEQUENASE(商標)DNAポリメラーゼ(F667Y変異を含むTaq DNAポリメラーゼ)、THERMOSEQUENASE(商標)II DNAポリメラーゼ(THERMOSEQUENASE(商標)DNAポリメラーゼとT・アシドフィルム(*T. acidophilum*)ピロホスファターゼとのブレンド)、THERMINATOR(商標)DNAポリメラーゼ(テルモコッカス属9°N-7からクローン化され、D141A、E143AおよびA485L変異を含む、DNAポリメラーゼA)、THERMINATOR(商標)II DNAポリメラーゼ(さらなるY409V変異を含むTHERMINATOR(商標)DNAポリメラーゼ)、ならびにVENT(登録商標)(エキソ-)A488L DNAポリメラーゼ(A488L変異を含むVENT(登録商標)(エキソ-)DNAポリメラーゼ)からなる群より選択される。

10

【0105】

本開示の化合物は、実施例の節において概説される方法を使用して作製することができる。これらの方法は、当業者が適用する有機化学の原理および技術を使用してさらに修正および最適化することができる。例えば、そのような原理および技術は、参照により本明細書に組み入れられるWu et al. (2007); Litosh et al. (2011); Stupi et al. (2012); Gardner et al., 2012; 米国特許第7,897,737号、第7,964,352号および第8,148,503号; 米国特許出願公開第2011/0287427号において教示されている。

20

【0106】

いくつかの態様では、試料成分がSNPの決定を可能にする。本方法は、情報価値のあるSNPの高スループット同定のためのものでありうる。SNPはゲノムDNA材料、PCR増幅材料またはクローン化DNA材料から直接得ることができ、一塩基プライマー伸長法を使用してアッセイすることができる。一塩基プライマー伸長法は、単一非標識dNTP、単一標識dNTP、単一3'-0-修飾dNTP、一塩基修飾2'-dNTP、単一 α -チオ-dNTPまたは単一標識2',3'-ジデオキシヌクレオチドを使用することを含みうる。ミニ配列決定法は、単一非標識dNTP、単一標識dNTP、単一3'-0-修飾dNTP、一塩基修飾2'-dNTP、単一 α -チオ-dNTPまたは単一標識2',3'-ジデオキシヌクレオチドを使用することを含みうる。SNPはゲノムDNA材料、PCR増幅材料またはクローン化DNA材料から直接得ることができる。

30

【0107】

A. ヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物ならびにCRTにおけるそれらの使用

本発明のいくつかの局面では、本明細書において提供されるヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物(可逆的ターミネーター)を、循環可逆的終結法(CRT)に基づくDNA配列決定技術において使用することができる。CRTは、複数の鋳型の同時的な一塩基付加を検出する循環的方法である。このアプローチは、この分野を進歩させる上での大きなボトルネックであるゲル電気泳動を必要とせずに行うことができるという点で、サンガー法(参照により本明細書に組み入れられるMetzker, 2005)と区別される。しかし、サンガー配列決定と同様に、リード長が長くなるに従って、ゲノム全体を網羅するために必要な配列決定アッセイの数が少なくなる。CRTサイクルは通常、取り込み、撮像および脱保護という3つの段階を含む。「脱保護」という用語は「開裂」と同義的に使用されることがあり、したがってこの3つの段階は取り込み、撮像および開裂と記述されることもある。この手順では、サイクル効率、サイクル時間、および感度が重要な因子である。サイクル効率は脱保護効率と取り込み効率との積であり、CRTリード長を決定する。CRTサイクル時間は取り込み時間、撮像時間および脱保護時間の和である。全ゲノム配列決定用の迅速なCRTでは、高速および効率的な脱保護特性を示しうる、本明細書に開示されるヌクレオチドおよびヌクレオシド化合物を使用することができる。これらの化合物を、 α -炭素上のアジド置換を有するベンジル基に直接結合した蛍光色素などのレポーター基で標識することで、同様の脱

40

50

保護特性を有する可逆的蛍光ターミネーターを例えば得ることができる。可逆的ターミネーターは通常、市販のDNAポリメラーゼに対しては不良な基質として働くことから、長いC RTリードという目標を達成することは困難なままである。本発明の修飾ヌクレオチド類似体は、市販のDNAポリメラーゼによって天然ヌクレオチドと同等以上に取り込まれる基質を与えることで、この技術を改善するために使用することができる。

【0108】

3'-OH非遮断ヌクレオチドの塩基に結合した光開裂性基、例えば本明細書に記載の基は、有効な可逆的ターミネーターとして作用し得、野生型DNAポリメラーゼによって効率的に取り込まれうる。参照により本明細書に組み入れられるWu et al., 2007; Metzker, 2010; Litosh et al., 2011; Gardner et al., 2012; 米国特許第7,897,737号、第7,964,352号および第8,148,503号; 米国特許出願公開第2011/0287427号を参照。例えば、5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシウリジン(HOMedU)は、数多くのバクテリオファージおよび下等真核生物のゲノムに自然に見出される(参照により本明細書に組み入れられるGommers-Ampt, 1995)。そのヒドロキシメチル基は、小さな光開裂性末端基を結合させるための分子ハンドルとして役立ちうる。可逆的ターミネーターとして機能するように本明細書に記載のようにさらに修飾されうる他の天然の超修飾塩基としては5-ヒドロキシメチル-2'-デオキシシチジン(HOMedC)が挙げられ、これはT2、T4およびT6バクテリオファージのゲノム(Wyatt & Cohen, 1953; Gommers-Ampt, 1995)ならびに哺乳動物のゲノム(Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010)に自然に見出される。また、ピロロピリミジン環構造(7-デアザプリン)がヌクレオチド抗生物質(参照により本明細書に組み入れられるCarrasco & Vazquez, 1984)およびtRNA塩基(参照により本明細書に組み入れられるLimbach, et al., 1994)に自然に見出され、化合物7-デアザ-7-ヒドロキシメチル-2'-デオキシアデノシン(C⁷-HOMedA)(Rockhill et al., 1997)および7-デアザ-7-ヒドロキシメチル-2'-デオキシグアノシン(C⁷-HOMedG)(McDougall et al., 2001)は、可逆的ターミネーターとして機能するように本明細書に記載のようにさらに修飾されてもよい。

【0109】

本明細書に記載のいくつかの態様では、光開裂性基は、例えば365nmの紫外線で効率的に光化学開裂されうる置換2-ニトロベンジルヌクレオチドである。参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2010/0041041号を参照。DNAおよびタンパク質の損傷を最小化するために300nmを超える波長が使用されると一般に理解されており(Corrie, 2005)、365nm以外のいくつかの特定の波長は340nm(Kaplan et al., 1978)および355nm(Seo, 2005)である。

【0110】

いくつかの態様では、本明細書に記載の3'-OH非遮断可逆的ターミネーターは通常、単結合のみの光開裂によって核酸塩基から末端基およびフルオロフォア基の両方が除去されることを例えば含むいくつかの利点を有する。このことは、次のCRTサイクルのためにヌクレオチドをより効率的に回復させるために使用することができる。本明細書において提供される3'-OH非遮断可逆的ターミネーターの第2の利点は、これらの化合物の多くがより好ましい酵素への取り込みを示すものであり、いくつかの態様では、野生型DNAポリメラーゼによって天然ヌクレオチドと同程度に容易に取り込まれうるということである。

【0111】

3'-OH非遮断ターミネーターの1つの課題は、一塩基付加後にDNA合成の終結を導く、塩基に対する適切な修飾を作り出すことである。非遮断3'-OH基が、到来する次のヌクレオチドを取り込むための天然基質であることから、このことは通常、重要である。本明細書に記載の化合物はこの課題に対処する。例えば、いくつかの態様では、本明細書において提供される可逆的ターミネーターは一塩基付加後にDNA合成の終結を導く。

【0112】

いくつかの態様では、本明細書に開示される化合物は、ゲノムDNAから直接読み取るためにCRTにおいて使用されうる。断片化ゲノムDNAと、選択される染色体に広がるプライミング部位を含む高密度オリゴヌクレオチドチップとをハイブリダイズさせることができる

。各プライミング配列はCRT法の推定リード長の分、隔てられている。塩基付加と塩基付加の間に、蛍光撮像装置は高密度チップ全体を同時に撮像することができ、このことは速度および感度の有意な改善を示す。特定の態様では、 α -炭素上にアジド置換を有するベンジル基に、または本明細書に記載のその誘導体に結合したフルオロフォアは、塩基付加の次のラウンド用にベンジル基を放出する特定の化学反応または酵素反応によって除去される。別の特定の態様では、 α -炭素上にアミド置換を有するベンジル基に、または本明細書に記載のその誘導体に結合したフルオロフォアは、塩基付加の次のラウンド用にベンジル基を放出する特定の酵素反応または化学反応によって除去される。約500回のCRTサイクル後、完全および隣接ゲノム配列情報を参照ヒトゲノムと比較することで、個人の試料中の配列変動の程度および種類を決定することができる。より高い取り込み効率および脱保護効率を示す可逆的ターミネーターは通常、より高いサイクル効率、したがってより長いリード長を実現する。

10

【0113】

CRT効率は式 $(RL)^{C_{eff}}=0.5$ によって定義され、式中、RLは塩基中のリード長であり、 C_{eff} は全体的サイクル効率である。言い換えれば、リード長7塩基が全体的サイクル効率90%で実現され得、70塩基がサイクル効率99%で実現され得、700塩基がサイクル効率99.9%で実現されうる。本発明の化合物の取り込み効率は、類似天然ヌクレオシドの取り込みの約70%~約100%の範囲でありうる。好ましくは、取り込み効率は約85%~約100%の範囲である。光化学開裂効率は約85%~約100%の範囲であることが好ましい。さらに、本発明の化合物の取り込み時の核酸伸長の終結は約90%~約100%の範囲である。一態様におけるヌクレ

20

オチドおよびヌクレオシド化合物は少なくとも80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%のサイクル効率を有する。

【0114】

本発明の別の局面はピロシーケンス法の使用に関し、ピロシーケンス法は、一連の酵素反応によって無機ピロリン酸(PPi)を可視光線に比例的に変換することでPPiの放出を測定する非電気泳動的生物発光法である(参照により本明細書に組み入れられるRonaghi et al., 1998)。DNA合成を終結させるために修飾ヌクレオチドを使用する他の配列決定アプローチとは異なり、ピロシーケンス法アッセイはdNTPを限定された量で1回加えることでDNAポリメラーゼを操作する。そこでDNAポリメラーゼは、相補的dNTPの取り込み時にプライ

30

【0115】

マーを伸長させ、休止する。分注サイクルにおける次の相補的dNTPの付加後にDNA合成を再開する。光ピークの順序および強度をプログラムとして記録することで、基本的なDNA配列を明らかにする。最大6個のヌクレオチドのホモポリマー反復では、付加されるdNTPの数は光シグナルに直接比例する。6個を超えるヌクレオチドのホモポリマー反復は、ピロシーケンス法における最も一般的な誤差の種類である挿入の誤差を生じさせることがある。本発明の修飾ヌクレオチド類似体は、ホモポリマー反復、特に長さが6個を超えるヌクレオチドのホモポリマー反復を通じた正確な配列決定によって、この技術を改善することができる。

40

本発明の別の局面は、ヘテロ接合体検出に例えば適用されるサンガー配列決定の使用に

50

ゼによる偏った取り込み効果を減少させると、ヘテロ接合体検出の改善を導くことがある。本発明の修飾ヌクレオチド類似体は、天然ヌクレオチドと同等以上に取り込まれることでサンガー配列決定における取り込みの偏りを除去することによって、この技術を改善することができる。

【0116】

本発明の別の局面は、クローン的に増幅された鋳型および単一DNA分子鋳型の使用に関する。NGS技術のフロントエンドは、単一DNA分子に由来するクローン的に増幅された鋳型、および単一DNA分子鋳型という2つの群に分割されうる。DNAの固体表面への固定化が、プライマーを該表面に結合させ、標的核酸と該プライマーとをハイブリダイズさせること(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,770,367号; Harris et al., 2008)、またはクローン的な増幅で標的核酸を該表面に結合させ、プライマーと該標的核酸とをハイブリダイズさせること(参照により本明細書に組み入れられるDressman et al., 2003; Margulies et al., 2005)によって行われうることは、当技術分野において十分に認識されている。そこでDNAポリメラーゼに結合することでCRT法またはピロシーケンス法を開始させるために、いずれかの固定化構成を本発明において使用することができる。

【0117】

本発明の一局面は、大きなDNA断片(すなわち0.1~0.5メガベース)からなる単一鋳型分子の使用に関する。いくつかの態様では、ランダムニック配列決定(RNS)と呼ばれるアダプターなしの戦略を使用することができる。これには(a) PCRまたはアダプターとの連結が不要であること、(b) 精度を改善するための同一鋳型の冗長な配列決定、および(c) 局在的な新規アセンブリを与える単一分子鋳型にわたる可視的な配列決定反応部位、を含むいくつかの利点がある。例えば、PCRプロセスは、クローン的に増幅された鋳型中に、配列変異体に見せかけるような変異を作り出してしまう。また、ATリッチおよびGCリッチな標的配列は産物産生における増幅の偏りを示すことがあり、その結果、ゲノムアラインメントおよびゲノムアセンブリにおいてこれらの配列が提示不足になる。所与の単一分子鋳型の配列決定反応の位置を知ること、ゲノムアセンブリ中の、複雑なゲノムおよび構造領域の位置割り当ておよび組織化が単純化される。

【0118】

RNSアプローチでは、糖非特異的ヌクレアーゼ、例えばビブリオ・バルニフィカス(*Vibrio vulnificus*) (vvn)から単離されるヌクレアーゼは、dsDNA中でランダム一本鎖ニックを作り出し、ssDNAおよびRNAの両方を消化する(Hsia et al., 2005参照)。Vvn結合がDNAの副溝中で生じることで、核酸塩基の配列依存的な認識が回避される。これは、配列依存的な偏りなしにDNA分子に沿ってランダムにニックングを行う上での利点となる。ニックの上流鎖は、ポリメラーゼがRNS反応を開始するためのプライミング部位となる。いくつかの態様においてこのアプローチが機能するには、ポリメラーゼは、上流鎖を伸長させながら下流鎖を置換することが可能でなければならない。この特性を有するいくつかの周知のDNAポリメラーゼとしてはφ29(参照により本明細書に組み入れられるSoengas et al., 1995を参照)およびBst(参照により本明細書に組み入れられるAliotta et al., 1996を参照)ポリメラーゼが挙げられる。Vent(エキソ-)(参照により本明細書に組み入れられるGardner et al., 1999を参照)およびTherminator(商標)ポリメラーゼも鎖置換特性を示すが、おそらくは停止前の50塩基に限定される。紫外線開裂後、RNSの後続のラウンド用の優れた鋳型塩基として役立つヒドロキシメチルヌクレオチドが作り出される(図13)。RNS中の鎖置換により、インベーターアッセイが作り出すものと同様の二分枝dsDNA(フラップ)構造が作り出される(Lyamichev et al., 1999参照)。フラップエンドヌクレアーゼ(FEN1)は、これら二分枝構造を図13に示すように開裂させることで、ヌクレオチドギャップなしに下流5'-PO₄末端鎖を産生させることが知られている(Kaiser et al., 1999)。これにより、RNSの後続のラウンド用にdsDNA分子を修復するための連結可能な基質が作り出される。

【0119】

B. ポリメラーゼアッセイ

本発明の別の局面は、ポリメラーゼアッセイの使用に関する。「ポリメラーゼエンドポ

イントアッセイ」(参照により本明細書に組み入れられるWu et al., 2007)を使用して、天然および修飾ヌクレオチドについて取り込み効率を試験した。このアッセイでは、マッチおよびミスマッチ鋳型塩基に関して取り込み効率が調査される。取り込み効率は、化合物がプライマー-鋳型複合体の半分を取り込む濃度(IC₅₀)を決定することで測定される。IC₅₀を決定することが可能な曲線を作成するために、化合物濃度を増大させる滴定を行った。

【0120】

鋳型DNAの配列は、どの化合物を試験するかに応じて選択される。例えば、鋳型配列中のプライマーの後の第1の照合塩基は、取り込み効率を測定する場合は化合物の相補的塩基であり、ミスマッチ識別特性を測定する場合は3つのミスマッチ塩基のうちの1つである。

【0121】

アニーリング反応物各10 μLにDNAポリメラーゼ(例えばTHERMINATOR(商標)DNAポリメラーゼ、反応物当たり0.25単位、New England Biolabs)、1倍Thermopol緩衝液、および公知濃度の天然または修飾ヌクレオチドを加え、75°Cで10分間インキュベートし、氷上で冷却し、停止溶液(98%ホルムアミド:10mM Na₂EDTA、pH=8.0、25mg/mlブルーデキストラン)10 μLで反応停止させる。停止した溶液を75°Cに30秒間加熱してDNAを変性させた後、氷上に置く。伸長産物を10% Long Ranger(Lonza)ポリアクリルアミドゲル上でABIモデル377 DNA配列決定装置を使用して分析する。さらなる詳細は以下の実施例1に示す。

【0122】

C. ミスマッチ識別および終結

本発明の別の局面は、本明細書に記載の可逆的ターミネーターの使用を例えば通じた、ミスマッチ取り込みに対する識別の改善に関する。2-ニトロベンジル基のα-炭素における置換が開裂反応の速度を増大させることが報告されている(Reichmanis et al., 1985; Cameron and Frechet, 1991; Hasan et al., 1997は3つすべて参照により本明細書に組み入れられる)。理論によって拘束されるものではないが、本明細書において提示される結果は、2-ニトロベンジル基のα-炭素における置換が、3'-OH非遮断ヌクレオチド三リン酸のDNA合成の終結に影響を与え、ミスマッチ取り込みに対する識別を改善することもあることを示唆している。さらに、以下でさらに詳細に論じる結果に基づいて、2-ニトロベンジル基のα-炭素の置換の立体化学配置が、ミスマッチ識別の程度および開裂反応の速度に著しい影響を示しうることがわかった。理論によって拘束されるものではないが、a) 2-ニトロベンジル基のα-炭素における置換、およびb) ベンジル環の2位における置換という少なくとも2つの因子が、1回の取り込み後のDNA合成の終結に通常は影響を与えることがわかった。

【0123】

D. 紫外線による開裂速度

本発明の別の局面は、改善された紫外線開裂速度を有する可逆的ターミネーターを提供することに関する。類似体をプライマー鎖に取り込む際の、365nmの紫外線での末端置換2-ニトロベンジル基の開裂は、次の取り込みサイクルを再開することを可能にする。理論によって拘束されるものではないが、a) 2-ニトロベンジル基のα-炭素置換の立体化学配置、およびb) ベンジル環上の置換という少なくとも2つの因子が、取り込まれたヌクレオチド類似体の紫外線開裂速度に通常は影響を与えることがわかった。

【0124】

E. 次世代配列決定(NGS)技術

本発明の別の局面は、本明細書において提供される可逆的ターミネーターおよび方法を次世代配列決定方法に適用することに関する。配列決定技術としては、(a) 鋳型調製、(b) 配列決定および撮像、ならびに(c) データ解析に広く分類されるいくつかの方法が挙げられる。特定のプロトコルの独自の組み合わせは、1つの技術を別の技術と区別するものであり、各プラットフォームから生成されるデータの種類を決定する。データ出力のこれらの差は、データ品質およびコストに基づいてプラットフォームを比較する際の課題と

なる。品質スコアおよび精度推定値は各製造業者によって与えられるが、1つのプラットフォームによる「品質ベース」が別のプラットフォームによるそれと同等であるという合意は存在しない。本明細書に記載の化合物および方法は、以下に記載の1つまたは複数の鋳型フォーマットとの組み合わせで使用し、かつ/あるいはこの鋳型フォーマットに適用することができる。

【0125】

NGS反応用の鋳型を調製する上で使用される方法としては、単一DNA分子に由来するクローン的に増幅された鋳型、および単一DNA分子鋳型が挙げられる。DNAポリメラーゼを使用する配列決定方法は、循環可逆的終結法(CRT)、一塩基付加法(SNA)およびリアルタイム配列決定法に分類される。DNAポリメラーゼをDNAリガーゼによって置き換えるアプローチである、ライゲーションによる配列決定法(SBL)も、NGS技術において使用されている。例えば参照により本明細書に組み入れられるShendure et al., 2005およびValouev et al., 2008を参照。これらの配列決定戦略と組み合わせた撮像方法は、生物発光シグナルの測定から、単一分子事象の4色撮像にまで及ぶ。いくつかの態様では、そのような併用方法と、データ保存、追跡および品質管理に関連する局面を含む、NGSプラットフォームによって生成される大量のデータを取り扱い可能である好適な情報技術システムとをさらに組み合わせる。参照により本明細書に組み入れられるPop & Salzberg, 2008を参照。

【0126】

a) 鋳型調製

いくつかの態様では、本発明は、可逆的ターミネーターおよび配列決定方法を、1つまたは複数の鋳型または鋳型調製方法に適用し、かつ/あるいはそれらと組み合わせることに関する。例えば、いくつかの態様では、堅牢な鋳型調製方法を使用する。これらは、調査中のゲノムから代表的で偏りのない核酸材料源を生成する。いくつかの態様では、本方法は、ゲノムDNAを比較的小さなサイズにランダムに破壊し、そこから断片鋳型またはメイトペア鋳型を作り出すことを包含する。いくつかの態様、例えばNGS技術に関連する態様では、鋳型を固体表面または固体支持体に結合させるかまたは固定化する。空間的に隔てられた鋳型部位の固定化は、数千回～数十億回の配列決定反応を同時に行うことを可能にするために使用することができる。

【0127】

クローン的に増幅された鋳型

いくつかの態様では、本発明は、クローン的に増幅された鋳型、またはクローン的に増幅された鋳型の調製方法の使用を含む。例えば、そのような鋳型は、単一の蛍光事象を検出するように設計されていない撮像システムと共に使用することができる。例えば、2つの一般的な増幅方法はエマルジョンPCR(emPCRとも呼ばれる)および固相増幅である。いずれも参照により本明細書に組み入れられるDressman et al., 2003およびFedurco et al., 2006を参照。いくつかの態様では、無細胞系中で配列決定用鋳型を調製するためにemPCRを使用することができ、これには、細胞クローン化方法に通常固有の問題であるゲノム配列の恣意的な損失が回避されるという利点がある。いくつかの態様では、断片標的またはメイトペア標的のライブラリーを作り出し、普遍的プライミング部位を含むアダプターを標的末端に連結することで、複雑なゲノムが、共通PCRプライマーと共に増幅されるようにする。例えば、連結後に、DNAを一本鎖に分離し、ビーズ1個当たりDNA分子1個を指向する条件下でビーズ上に捕捉する。参照により本明細書に組み入れられるMetzker 2010の図1aを参照。例えば、emPCRビーズの増幅および濃縮の成功後に、数百万個を、標準的スライドガラス(Polonator機器と共に使用; 例えば参照により本明細書に組み入れられるShendure et al., 2005を参照)上のポリアクリルアミドゲル中に固定化するか、アミノコーティングガラス表面(Life/APG SOLiDおよびPolonator機器と共に使用; 例えば参照により本明細書に組み入れられるKim et al., 2007を参照)に化学的に架橋させるか、または、NGS化学反応を実行可能な、個々のPicoTiterPlate(PTP)ウェル(Roche/454機器と共に使用; 参照により本明細書に組み入れられるMargulies et al., 2005)、もしくはIonChipウェル(Ion Torrent機器と共に使用; 参照により本明細書に組み入れられるRothberg et al., 2

011)の中に沈着させることができる。いくつかの態様では、ランダムに分布してクローン的に増幅されたクラスターをスライドガラス上の断片鋳型またはメイトペア鋳型から生成するために、固相増幅を使用することができる。参照により本明細書に組み入れられるMetzker 2010の図1bを参照。いくつかの態様では、高密度の順方向および逆方向プライマーをスライドに共有結合させ、支持体上のプライマー対鋳型の比によって増幅クラスターの表面密度を画定する。いくつかの態様では、固相増幅を使用することで空間的に隔てられた1億~2億個の鋳型クラスター(Illumina/Solexa)を生成することができ、鋳型クラスターには遊離末端が設けられ、遊離末端と普遍的配列決定用プライマーとをハイブリダイズさせることでNGS反応を開始することができる。参照により本明細書に組み入れられるBentley et al., 2008を参照。

10

【0128】

単一分子鋳型

いくつかの態様では、本発明は、単一分子鋳型、または単一分子鋳型の調製方法の使用を含む。クローン的に増幅する方法は、細胞のクローン化に比べて特定の利点を示すが、いくつかのプロトコルは実行が面倒であり、大量のゲノムDNA材料(3~20 µg)を必要とする。単一分子鋳型の調製は、通常はより簡単であり、必要とする出発原料がより少ない(1 µg未満)。いくつかの態様では、これらの方法はPCRを必要としない。PCRは、クローン的に増幅された鋳型中に、配列変異体に見せかけるような変異を、通常は作り出してしまふ。また、ATリッチおよびGCリッチな標的配列は産物産生における増幅の偏りを示すことがあり、その結果、ゲノムアラインメントおよびゲノムアセンブリにおいてこれらの配列が提示不足になる。いくつかの態様では、RNA-seqなどの定量的適用を使用することができる。参照により本明細書に組み入れられるWang et al., 2009を参照。そのような適用は通常、mRNA分子の提示される存在量を改変することがない非増幅鋳型源でより効果的に機能する。いくつかの態様では、NGS反応を行う前に、単一分子鋳型を通常、少なくとも3つの異なるアプローチのうち1つを使用して固体支持体上に固定化する。いくつかの態様において使用可能な第1のアプローチでは、空間的に分布する個々のプライマー分子を固体支持体に共有結合させる(Harris et al., 2008参照)。次に、出発原料を小さなサイズ(例えば約200~250bp)にランダムに断片化して共通アダプターを断片末端に加えることで例えば調製可能な鋳型と、固定化プライマーとをハイブリダイズさせる。参照により本明細書に組み入れられるMetzker 2010の図1cを参照。いくつかの態様において使用可能な第2のアプローチでは、固定化プライマーから一本鎖の単一分子鋳型をプライミングし、伸長させることで、空間的に分布する単一分子鋳型を固体支持体に共有結合させる(Harris et al., 2008参照)。参照により本明細書に組み入れられるMetzker 2010の図1cを参照。いくつかの態様では、次に共通プライマーと鋳型とをハイブリダイズさせる。参照により組み入れられるMetzker 2010の図1dを参照。いずれのアプローチにおいても、例えば固定化プライミング鋳型構成に結合することでNGS反応を開始させるために、DNAポリメラーゼを使用することができる。いくつかの態様において使用可能な第3のアプローチでは、空間的に分布する単一ポリメラーゼ分子を固体支持体に結合させ(参照により本明細書に組み入れられるEid et al., 2009を参照)、ポリメラーゼ分子にプライミング鋳型分子を結合させる(参照により本明細書に組み入れられるMetzker 2010の図1eを参照)。一般に、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,329,492号および第6,255,083号を参照。この技術では例えば比較的大きなDNA分子(最大数万個の塩基対)を使用することができ、最初の2つのアプローチとは異なって、第3のアプローチはリアルタイム法と共に使用することができ、これにより潜在的に比較的長いリード長が得られる。

20

30

40

【0129】

b) 配列決定および撮像

クローン的に増幅された鋳型と単一分子鋳型とでは配列決定する上で根本的な差が存在する。いくつかの態様では、配列決定反応をそれぞれ経た同一の鋳型の集団を得るためにクローンの増幅を使用することができる。撮像時に観察されるシグナルは、所与のサイクルで同一の鋳型に加えられるヌクレオチドまたはプローブと一致する。通常、これにより

50

付加プロセスの効率に対する要求が大きくなる。というのも、鋳型集合の不完全な伸長によりラギング鎖のシーケンス反応のタイミングのずれ(dephasing) (2型のずれとも呼ばれる)が生じるためである。また、複数のヌクレオチドまたはプローブの付加が所与のサイクル中に生じることで、リーディング鎖のタイミングのずれ(1型のずれとも呼ばれる)が生じることがある。タイミングのずれの概念はCheesemanによって記載された(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,302,509号を参照)。シグナルのずれによって蛍光ノイズが増大し、塩基呼び出しの誤差およびリード長の短縮が引き起こされる(Erich et al., 2008参照)。タイミングのずれは単一分子鋳型で問題にならないことから、サイクル効率の要件が緩和される。しかし、単一分子は任意の所与のサイクル中で複数のヌクレオチドまたはプローブの付加を受けやすい。ここで、隣接する色素分子間の消光効果が理由でいくつかの態様において欠失型の誤差の発生が観察されることがあり、あるいは、暗いヌクレオチドまたはプローブの取り込みが理由でシグナルが検出されない。以下の節では、クローン的に増幅された鋳型および単一分子鋳型の両方を使用する配列決定および撮像戦略を論じる。本発明のいくつかの局面では、本明細書において提供される可逆的ターミネーターおよびそれらの使用方法を、CRT、SNAおよびリアルタイム配列決定を例えば含む任意の1つまたは複数のDNAポリメラーゼ依存性戦略に適用し、かつ/あるいはそれらとの組み合わせで使用することができる。いくつかの態様では、本発明の化合物およびそれらの使用方法をCRT法に適用しかつ/またはそれとの組み合わせで使用することができる。

【0130】

単一DNA分子の蛍光シグナルを撮像するいくつかの市販のNGSシステムが存在する(いずれも参照により本明細書に組み入れられるHarris et al., 2008; Eid et al., 2009を参照)。個々のDNA分子が光の回折限界(すなわち250nm)に近似する距離で隔てられている限り、アレイ上の単一分子の解像を高感度CCDカメラによって倍率100倍で行うことができる。倍率および表面平坦度に応じて変動が生じるものであり、このことは当業者には明白である。単一分子から蛍光シグナルを検出するために広く使用されている1つの技術は全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡法である(参照により本明細書に組み入れられるAxelrod, 1989を参照)。当技術分野において公知である、本発明において使用可能な他の技術としては、走査型近接場光学顕微鏡法(SNOM; 参照により本明細書に組み入れられるMoyer et al., 1993を参照)が挙げられるがそれに限定されない。

【0131】

F. 撮像システム

図8は、クローン的に増幅された鋳型に由来する蛍光シグナルを撮像するための撮像システム100の一態様を示す。システム100は、関心対象のDNAを含むミクロンビーズと共に調製された微小流体フローセル50を撮像するように構成されている。

【0132】

標準的4色撮像またはカラーブラインドパルスマルチライン励起などのある範囲の撮像技術を、様々な態様において3'-OH非遮断可逆的ターミネーターとの組み合わせで使用することができる。図示される態様は標準的4色撮像用に構成されている。

【0133】

システム100は、微小流体フローセル50中に固定化されたemPCR増幅鋳型ビーズに由来する蛍光シグナルを捕捉するように構成された撮像装置10(例えばデジタルカメラ、光電池など)を含む。

【0134】

ランプ14(例えばキセノンランプ)は微小流体フローセル50と撮像装置10との間に光路30を作り出す。ランプ14からの光はフィルターホイール16に移動する。図示される態様では、フィルターホイール16はモーター付きであり、4色画像を捕捉可能なように4つのスペクトルフィルターを含む。フィルターホイール16は、取り込まれた3'-OH非遮断可逆的ターミネーターから撮像装置10が4色画像を捕捉可能なように各タイル位置において4つの各スペクトルフィルターの間で切り替わるように構成されている。

【0135】

ランプ14からの光の一部分はフィルターホイール16から対物レンズ18を通じて微小流体フローセル50に移動する。ランプ14からの光の別の部分はフィルターホイール16から撮像装置10に移動する。図示される態様では、光路30は鏡12を使用して撮像装置10に向けられる。他の態様では、そのような鏡は必要ではないことがあり、一方さらに他の態様では、2つ以上の鏡が必要なことがある。

【0136】

システム100は、フローセル50に紫外線(UV)を与えるように構成された紫外線源20も含む。紫外線源20は、いくつかの態様では発光ダイオード(LED)であってもよく、任意の他の紫外線源であってもよい。

【0137】

G. オゾン汚染を最小化する

別の局面では、本発明は、オゾン汚染の効果を最小化する配列決定方法を提供する。オゾン(O_3)は酸素の同素体であり、地球上の生命に対して有益な性質および有害な性質の両方を有する。例えば、オゾンは太陽からの高エネルギー放射線によって成層圏中に作り出されるものであり、高エネルギー放射線は分子酸素(O_2)を2個の原子に分割し、これが次に異なる O_2 分子と組み合わせられることで O_3 が形成される。この成層圏層は、太陽によって生成される有害な紫外線から、この惑星上の生物を保護する。しかし、地上レベルまたは対流圏では、オゾンは大気汚染物質と考えられている。オゾンは、工業施設、電力事業者、自動車排ガス、ガソリン蒸気および化学溶剤によって生成される窒素酸化物と揮発性有機化合物との組み合わせに対して太陽光が作用するスモッグ条件下でも作り出される(EPA, 2011参照)。オゾンレベルは暑夏の数ヶ月中に増大し、オゾン障害の影響は相対湿度レベルの増大に伴って増大する。対流圏オゾンは、農作物および森林に対する激しいダメージ(Hewitt et al., 1990参照)、動物およびヒトにおける数多くの呼吸器の問題(Fairchild et al., 1959; Bhalla, 1994参照)、ならびに、自動車タイヤを含む多くの民生品(Crabtree and Kemp, 1946参照)、生地材料に見られる染料(Salvin and Walker, 1955参照)および分子生物学において使用される蛍光色素による有害効果を引き起こす。

【0138】

化学的観点からは、オゾンは、オレフィン化合物(すなわち炭素-炭素二重結合を含む化学物質)に一般的に見られる電子対との反応性が最も高い求電子剤である。大規模な研究が、オゾン酸化と呼ばれるオゾンの化学反応に重点を置いている。大規模な2巻本のシリーズが網羅的な考察を提供しており、この考察では、オゾンそれ自体の特性、およびオゾンが経ることがある有機基質との数多くの反応が記載されている。このシリーズの第1巻はほぼオゾンとオレフィン化合物との反応にのみ重点が置かれており(Bailey, 1978; Bailey 1982参照)、第1巻および第2巻は参照により組み入れられる。

【0139】

色素および色素中間体は文献周知であり、今日使用されている色素の種類の大多数が1世紀以上前に発見された(Gordon and Gregory, 1983)。色素は、どのようにして使用されるかに基づくクラス、または化学構造に基づくクラスに分類されうる(Gordon, 2009)。後者に関して、色素は(i) アゾ、(ii) アントラキノン、(iii) ベンゾジフラノン、(iv) 多環式芳香族カルボニル、(v) インジゴイド、(vi) ポリメチンおよび関連色素(すなわちシアニン)、(vii) スチリル、(viii) ジアリーールおよびトリアリールカルボニウムならびに関連色素(すなわちフルオレセイン、ローダミンおよびそれらのスルホン化誘導体)、(ix) フタロシアニン、(x) キノフタロン、(xi) 硫黄、(xii) ニトロおよびニトロソ、ならびに(xiii) その他(すなわちクマリンおよびBODIPY)という一般的クラスに分類された(Gregory, 2009)。すべてではないにしても大部分の色素および色素中間体は、オゾン酸化に対する感受性をそれらに与える複数の炭素-炭素二重結合を有する。1970年代中頃、Lofquistおよび共同研究者らは、大部分の色素がオゾン分解に感受性があるという一般的結論を教示した(米国特許第3,822,996号; 米国特許第3,859,045号; 米国特許第3,917,499号を参照)。

【0140】

染色生地に対するオゾン曝露の効果は色素退色(例えば色素堅牢性の損失)であり、1955年に最初に報告された。SalvinおよびWalkerは、「0-退色」という用語を生み出し、カーテン生地の実用試験において、いくつかの青色アントラキノン色素(すなわちEastman Blue GLF、Amacel BlueおよびInterchemical Blue B)ならびに黄色および赤色アントラキノン色素に曝露される際にオゾンが著しい色素退色を引き起こしたことを明らかにした(Salvin, 1955参照)。アントラキノン色素の他の例、例えばC.I. Basic Blue 47(米国特許第3,822,996号参照)およびDisperse Blue 3(米国特許第3,859,045号参照)は、0-退色に感受性があると報告された。高湿度は0-退色を増強させ(米国特許第3,917,449号; 米国特許第4,737,155号; 米国特許第3,822,996号; 米国特許第4,304,568号参照)、生地に関しては、オゾン酸化反応が生じる場合、水分が色素に、材料の表面に拡散するのに十分な移動性を与えることが示唆された(米国特許第4,737,155号参照)。

10

【0141】

また、蛍光色素、例えばポリメチンクラスに属する色素は、それらの蛍光シグナル強度を減少させる、オゾン酸化反応に対する感受性を有すると報告された。例えば、Cy3およびCy5色素は、遺伝子発現、遺伝子型判定および再配列決定の用途向けのマイクロアレイ技術において広く使用されている(Gershon, 2004参照)。Fareおよび共同研究者らは、Cy5およびそのスルホン化誘導体Alexa Fluor 647がオゾン障害に対して曝露レベル5~10ppbで10~30秒以内に感受性を示したという結果を示した(Fare et al., 2003参照)。また、Cy3およびそのスルホン化誘導体Alexa Fluor 555では、蛍光強度レベルがより高いオゾンレベル(100ppb超)で減少した。KadushinおよびGettsは、出発シグナルが1~5分で約10%に劣化するのを記している(米国特許出願公開第2004/0110196号参照)。

20

【0142】

オゾン分解防止剤として作用する多数の化学試薬が存在する。例としてはp-フェニルジアミン、ジヒドロキノリン、チオ尿素(米国特許第4,737,155号; 米国特許第4,631,066号参照)、飽和アルキル置換チオ尿素、亜リン酸アルキルおよびアリール(米国特許第3,822,996号参照)、エトキシ化脂肪族第三級アミン(米国特許第3,859,045号参照)、置換ピペリジンチオ尿素(米国特許第4,304,568号参照)、置換オキサジアジンチオンおよび置換チアジンチオン(米国特許第4,304,568号参照)、アクリルポリメラーゼ、メタクリレートまたはエチルアクリレートの共重合体(米国特許出願公開第2004/0110196号参照)、ならびにポリチオ尿素(米国特許第3,917,449号参照)が挙げられる。本発明において、いくつかの態様では、配列決定反応中の蛍光色素のオゾン分解を防止するために、チオ尿素を1つまたは複数の溶液中で使用することができる。参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報第2012/037394号は、NGS技術を包含する方法との組み合わせでチオ尿素を使用するための方法を提供する。いくつかの態様では、撮像段階および/または光化学開裂段階は、例えば上記の発明の概要に開示された濃度でのチオ尿素の存在下で行うことができる。

30

【0143】

H. 試料の調製

NGS分析用に関心対象のDNAを調製する方法としては例えば、クローニング的に増幅された鋳型、および非増幅(すなわち単一分子)鋳型が挙げられる。いくつかの態様では、エマルジョンPCR(emPCR)を使用することができる。図9に示すように、試料を以下のように調製することができる。第一に、ゲノムDNAを単離する。次にDNAをより小さなピースに断片化する。次に共通アダプターをそれら断片の末端に連結させる。次にアダプター連結DNA分子を一本鎖に分離し、ビーズ1個当たりDNA分子1個を指向する条件下で1 μ mサイズのビーズ上に捕捉する。水中油エマルジョンは、これらビーズ-DNA複合体を封入する個々の水滴を作り出す。同一鋳型配列の10⁴~10⁶個のコピーを含むビーズを作り出すために、これら液滴内でPCR増幅を行う。増幅および濃縮の成功後、数千万個~数億個のemPCRビーズを微小流体フローセル50に化学的に固定する。いくつかの態様では、フローセル50は8つのチャネルを含み得、ガラスで作製されうる。

40

【0144】

I. システム操作

50

フローセル50がビーズと共に調製された時点で、フローセル50を配列決定システム100に配置することができる。図10は、1回のCRTサイクル中の通常の段階を示す。単一のDNA分子を例示目的で示すが、当業者は、このプロセスが多くのDNA分子に対して行われることを理解するであろう。

【0145】

第一に、取り込み段階において、上記で論じたようにDNAポリメラーゼ(ジッパーとして示す)を使用して3'-OH可逆的ターミネーターを取り込む。

【0146】

次に蛍光標識DNA分子を撮像する。フローセル50から撮像装置10まで光路30が作り出されるようにランプ14を駆動する。撮像装置10は、フィルターホイール16の4つの各スペクトルフィルターを通じて画像を捕捉する。フィルターホイール16を使用して、各スペクトルチャンネルをタイル的に撮像することで、微小流体フローセル50内の蛍光シグナルを捕捉する。次に、個々のビーズの処理された蛍光強度から塩基呼び出しを行う(すなわち、3'-OH可逆的ターミネーターが青色色素で標識された場合には、純化された青色シグナルを「A」塩基と呼ぶことがある)。CRT法のリード長は、実行されるサイクル数の一次関数である(参照により本明細書に組み入れられるMetzker 2010; Metzker, 2005を参照)。

【0147】

次に光化学開裂を行うことができる。紫外線源20を使用して紫外線をフローセル50上に当てる。紫外線は末端基および蛍光基を光化学的に開裂除去する。こうして修飾核酸はその天然状態に戻る。

【0148】

次に洗浄液を供給することで末端基および蛍光基を洗い流す。取り込み段階、撮像段階、開裂段階および洗浄段階は所望の数のCRTサイクルで行うことができる。図11は、3回のサイクルおよびそれに続く個々のビーズからの塩基呼び出しに由来する、4色タイル画像を示す。

【0149】

IV. 定義

化学基の文脈で使用する場合、「水素」は-Hを意味し、「ヒドロキシ」は-OHを意味し、「オキシ」は=Oを意味し、「ハロ」は独立して-F、-Cl、-Brまたは-Iを意味し、「アミノ」は-NH₂を意味し、「ヒドロキシアミノ」は-NHOHを意味し、「ニトロ」は-NO₂を意味し、イミノは=NHを意味し、「シアノ」は-CNを意味し、「イソシアネート」は-N=C=Oを意味し、「アジド」は-N₃を意味し、一価の文脈で「ホスフェート」は-OP(0)(OH)₂またはその脱プロトン化体を意味し、二価の文脈で「ホスフェート」は-OP(0)(OH)O-またはその脱プロトン化体を意味し、「メルカプト」は-SHを意味し、「チオ」は=Sを意味し、「スルホニル」は-S(0)₂-を意味し、「スルフィニル」は-S(0)-を意味する。

【0150】

化学式の文脈で、「-」という記号は単結合を意味し、「=」は二重結合を意味し、「≡」は三重結合を意味する。

“----”

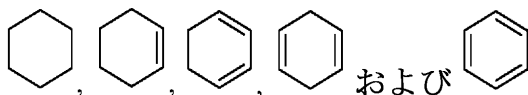
という記号は、存在する場合は単結合または二重結合のいずれかである任意の結合を表す。

“====”

という記号は単結合または二重結合を意味する。したがって、例えば



という構造は



10

20

30

40

50

という構造を含む。当業者が理解するように、そのような1個の環原子が2個以上の二重結合の一部を形成することはない。結合を垂直に横切って描かれる際の

“”

という記号は、基の結合点を示す。読者が結合点を迅速かつ明確に同定することを支援するために、通常は比較的大きな基についてのみ結合点がこのように同定されることに留意されたい。

“”

という記号は、楔形の太い端部に結合した基が「頁の外側に向かう」単結合を意味する。

“”

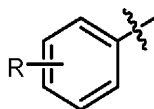
という記号は、楔形の太い端部に結合した基が「頁の内側に向かう」単結合を意味する。

“”

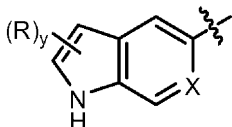
という記号は、立体配座(例えばRもしくはSのいずれか)または幾何学的配置(例えばEもしくはZのいずれか)が未確定である単結合を意味する。

【0151】

本出願において示す構造の原子上の任意の未定義の原子価は、その原子に結合している水素原子を暗に表す。「R」基が例えば下記式中の環系上の「浮遊している基」として図示される場合、



Rは、安定な構造が形成される限り、図示され、暗示され、または明示的に規定される水素を含む、任意の環原子に結合した任意の水素原子を置き換えることができる。「R」基が例えば下記式中の縮合環系上の「浮遊している基」として図示される場合、



Rは、別途指定されない限り、いずれかの縮合環の任意の環原子に結合した任意の水素を置き換えることができる。安定な構造が形成される限り置き換え可能な水素としては、図示される水素(例えば、上記式中の窒素に結合した水素)、暗示される水素(例えば、図示されていないが存在していると理解される上記式の水素)、明示的に規定される水素、および、その存在が環原子の独自性に依存する任意的な水素(例えば、Xが-CH-と等しい場合の、X基に結合した水素)が挙げられる。図示される例では、Rは、縮合環系の5員環または6員環のいずれかに存在しうる。上記式中の括弧に囲まれる「R」基に直ちに続く「y」という添字は変数を表す。別途指定されない限り、この変数は0、1、2、または2を超える任意の整数でありうるものであり、環または環系の置き換え可能な水素原子の最大数によってのみ限定される。

【0152】

以下の基およびクラスについて、以下の括弧付きの添字は以下のように基/クラスをさらに定義する。「(Cn)」は基/クラスの炭素原子の正確な数(n)を定義する。「(C≤n)」は基/クラスに存在しうる炭素原子の最大数(n)を定義し、最小数は対象となる基について可能な限り小さい数である。例えば、「アルケニル_(C≤8)」基または「アルケン_(C≤8)」クラスの炭素原子の最小数は2であると理解される。例えば、「アルコキシ_(C≤10)」は、1～10個の炭素原子(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個、またはその中で導出可能な任意の範囲(例えば3～10個の炭素原子))を有するアルコキシ基を意味する。(Cn～n')は、基の炭素原子の最小数(n)と最大数(n')との両方を定義する。同様に、「アルキル_(C2～10)」は、2～10個の炭素原子(例えば2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個、またはその中で導出可能な任意の範囲(例えば3～10個の炭素原子))を有するアルキル基を意味する。

【0153】

10

20

30

40

50

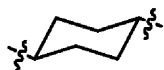
本明細書において使用される「飽和」という用語は、そのように修飾された化合物または基が、以下に記す場合を除いて炭素-炭素二重結合および炭素-炭素三重結合を有さないことを意味する。この用語は炭素-ヘテロ原子多重結合、例えば炭素酸素二重結合または炭素窒素二重結合を排除しない。さらに、ケト-エノール互変異性またはイミン/エナミン互変異性の一部として生じる炭素-炭素二重結合を排除しない。

【0154】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「脂肪族」という用語は、そのように修飾された化合物/基が非環式または環式であるが非芳香族である炭化水素化合物または基であることを意味する。脂肪族化合物/基においては、炭素原子は直鎖、分岐鎖または非芳香族環(脂環式)中で一緒に接合され得る。脂肪族化合物/基は飽和でもよく、すなわち単結合で接合されていてもよく(アルカン/アルキル)、不飽和で1個または複数の二重結合を有していてもよく(アルケン/アルケニル)、1個または複数の三重結合を有していてもよい(アルキン/アルキニル)。「脂肪族」という用語を「置換」という修飾語なしで使用する場合、炭素原子および水素原子のみが存在する。この用語を「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。

【0155】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルキル」という用語は、結合点としての炭素原子を有し、直鎖もしくは分岐、シクロ、環式または非環式構造を有し、炭素および水素以外の原子を有さない、一価の飽和脂肪族基を意味する。したがって、本明細書において使用されるシクロアルキルはアルキルのサブセットである。-CH₃(Me)、-CH₂CH₃(Et)、-CH₂CH₂CH₃(n-Prまたはプロピル)、-CH(CH₃)₂(i-Pr、ⁱPrまたはイソプロピル)、-CH(CH₂)₂(シクロプロピル)、-CH₂CH₂CH₂CH₃(n-Bu)、-CH(CH₃)CH₂CH₃(sec-ブチル)、-CH₂CH(CH₃)₂(イソブチル)、-C(CH₃)₃(tert-ブチル、t-ブチル、t-Buまたは^tBu)、-CH₂C(CH₃)₃(ネオペンチル)、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルおよびシクロヘキシルメチルといった基がアルキル基の非限定的な例である。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルカンジイル」という用語は、結合点としての1個または2個の飽和炭素原子を有し、直鎖もしくは分岐、シクロ、環式または非環式構造を有し、炭素-炭素二重結合または三重結合を有さず、炭素および水素以外の原子を有さない、二価の飽和脂肪族基を意味する。-CH₂-(メチレン)、-CH₂CH₂-, -CH₂C(CH₃)₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-および

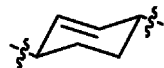


といった基がアルカンジイル基の非限定的な例である。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルキリデン」という用語は、二価の基=CRR'を意味し、ここでRおよびR'は独立して水素、アルキルであるか、またはRおよびR'は一緒になって、少なくとも2個の炭素原子を有するアルカンジイルを表す。アルキリデン基の非限定的な例としては=CH₂、=CH(CH₂CH₃)および=C(CH₃)₂が挙げられる。これらの用語のいずれかを「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。以下の基が置換アルキル基の非限定的な例である: -CH₂OH、-CH₂Cl、-CF₃、-CH₂CN、-CH₂C(O)OH、-CH₂C(O)OCH₃、-CH₂C(O)NH₂、-CH₂C(O)CH₃、-CH₂OCH₃、-CH₂OC(O)CH₃、-CH₂NH₂、-CH₂N(CH₃)₂および-CH₂CH₂Cl。「ハロアルキル」という用語は置換アルキルのサブセットであり、ここで1個または複数の水素原子はハロ基で置換されており、炭素、水素およびハロゲン以外の原子は存在しない。-CH₂Clといった基がハロアルキルの非限定的な例である。「アルカン」とは化合物H-Rを意味し、ここでRはアルキルである。「フルオロアルキル」という用語は置換アルキルのサブセットであり、ここで1個または複数の水素原子はフルオロ基で置換されており、炭素、水素およびフッ素以外の原子は存在しない。-CH₂F、-CF₃および-CH₂CF₃といった基がフルオロアルキル基の非限定的な例である。「アルカン」とは化合物H-

Rを意味し、ここでRはアルキルである。

【0156】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルケニル」という用語は、結合点としての炭素原子を有し、直鎖もしくは分岐、シクロ、環式または非環式構造を有し、少なくとも1個の非芳香族炭素-炭素二重結合を有し、炭素-炭素三重結合を有さず、炭素および水素以外の原子を有さない、一価の不飽和脂肪族基を意味する。アルケニル基の非限定的な例としては $-\text{CH}=\text{CH}_2$ (ビニル)、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ (アリル)、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$ および $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ が挙げられる。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルケンジイル」という用語は、結合点としての2個の炭素原子を有し、直鎖もしくは分岐、シクロ、環式または非環式構造を有し、少なくとも1個の非芳香族炭素-炭素二重結合を有し、炭素-炭素三重結合を有さず、炭素および水素以外の原子を有さない、二価の不飽和脂肪族基を意味する。 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ および



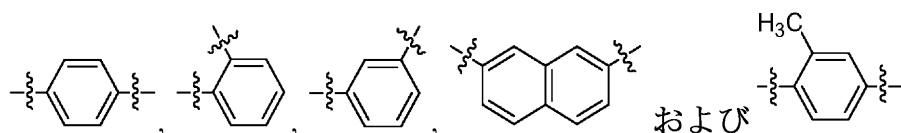
といった基がアルケンジイル基の非限定的な例である。これらの用語を「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して $-\text{OH}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ または $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}_2$ で置き換えられている。 $-\text{CH}=\text{CHF}$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCl}$ および $-\text{CH}=\text{CHBr}$ といった基が置換アルケニル基の非限定的な例である。「アルケン」とは化合物 $\text{H}-\text{R}$ を意味し、ここでRはアルケニルである。

【0157】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルキニル」という用語は、結合点としての炭素原子を有し、直鎖もしくは分岐、シクロ、環式または非環式構造を有し、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有し、炭素および水素以外の原子を有さない、一価の不飽和脂肪族基を意味する。本明細書において使用されるアルキニルという用語は、1個または複数の非芳香族炭素-炭素二重結合の存在を排除しない。 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ および $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ といった基がアルキニル基の非限定的な例である。アルキニルを「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して $-\text{OH}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ または $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}_2$ で置き換えられている。「アルキン」とは化合物 $\text{H}-\text{R}$ を意味し、ここでRはアルキニルである。

【0158】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アリール」という用語は、環原子がすべて炭素である1個または複数の6員芳香環構造の一部を形成する結合点としての芳香族炭素原子を有し、かつ炭素および水素以外の原子からなるわけではない、一価の不飽和芳香族基を意味する。2個以上の環が存在する場合、環は縮合していても縮合していなくてもよい。本明細書において使用されるこの用語は、第1の芳香環または存在する任意のさらなる芳香環に結合した1個または複数のアルキル基(炭素数の限定が可能である)の存在を排除しない。アリール基の非限定的な例としてはフェニル(Ph)、メチルフェニル、(ジメチル)フェニル、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_3$ (エチルフェニル)、ナフチル、およびビフェニルに由来する一価の基が挙げられる。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アレーンジイル」という用語は、環原子がすべて炭素である1個または複数の6員芳香環構造の一部を形成する結合点としての2個の芳香族炭素原子を有し、かつ一価の基が炭素および水素以外の原子からなるわけではない、二価の芳香族基を意味する。本明細書において使用されるこの用語は、第1の芳香環または存在する任意のさらなる芳香環に結合した1個または複数のアルキル基(炭素数の限定が可能である)の存在を排除しない。2個以上の環が存在する場合、環は縮合していても縮合していなくてもよい。アレーンジイル基の非限定的な例としては以下が挙げられる。



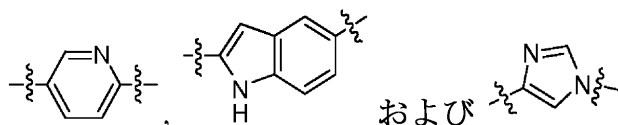
これらの用語を「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。「アレーン」とは化合物H-Rを意味し、ここでRはアリールである。

【0159】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アラルキル」という用語は一価の基-アルカンジイル-アリールを意味し、ここでアルカンジイルおよびアリールという用語は、上記で示した定義と一致した様式でそれぞれ使用される。アラルキルの非限定的な例としてはフェニルメチル(ベンジル、Bn)および2-フェニル-エチルがある。この用語を「置換」という修飾語付きで使用する場合、アルカンジイルおよび/またはアリールからの1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。置換アラルキルの非限定的な例としては(3-クロロフェニル)-メチルおよび2-クロロ-2-フェニル-エタ-1-イルがある。

【0160】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「ヘテロアリール」という用語は、環原子のうち少なくとも1個が窒素、酸素または硫黄である1つまたは複数の芳香環構造の一部を形成する結合点としての芳香族炭素原子または窒素原子を有し、ヘテロアリール基が炭素、水素、芳香族窒素、芳香族酸素および芳香族硫黄以外の原子からなるわけではない、一価の芳香族基を意味する。本明細書において使用されるこの用語は、芳香環または芳香環系に結合した1個または複数のアルキル基、アリール基および/またはアラルキル基(炭素数の限定が可能である)の存在を排除しない。2個以上の環が存在する場合、環は縮合していても縮合していなくてもよい。ヘテロアリール基の非限定的な例としてはフラニル、イミダゾリル、インドリル、インダゾリル(Im)、イソオキサゾリル、メチルピリジニル、オキサゾリル、フェニルピリジニル、ピリジニル、ピロリル、ピリミジニル、ピラジニル、キノリル、キナゾリル、キノキサリニル、トリアジニル、テトラゾリル、チアゾリル、チエニルおよびトリアゾリルが挙げられる。「N-ヘテロアリール」という用語は、結合点としての窒素原子を有するヘテロアリール基を意味する。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「ヘテロアレーンジイル」という用語は、環原子のうち少なくとも1個が窒素、酸素または硫黄である1つまたは複数の芳香環構造の一部を形成する2個の結合点としての2個の芳香族炭素原子、2個の芳香族窒素原子、または1個の芳香族炭素原子および1個の芳香族窒素原子を有し、二価の基が炭素、水素、芳香族窒素、芳香族酸素および芳香族硫黄以外の原子からなるわけではない、二価の芳香族基を意味する。本明細書において使用されるこの用語は、芳香環または芳香環系に結合した1個または複数のアルキル基、アリール基および/またはアラルキル基(炭素数の限定が可能である)の存在を排除しない。2個以上の環が存在する場合、環は縮合していても縮合していなくてもよい。ヘテロアレーンジイル基の非限定的な例としては以下が挙げられる。



これらの用語を「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。

【0161】

「置換」という修飾語なしで使用する場合は「ヘテロシクロアルキル」という用語は、環原子のうち少なくとも1個が窒素、酸素または硫黄である1つまたは複数の非芳香環構造の一部を形成する結合点としての炭素原子または窒素原子を有し、ヘテロシクロアルキル基が炭素、水素、窒素、酸素および硫黄以外の原子からなるわけではない、一価の非芳香族基を意味する。本明細書において使用されるこの用語は、環または環系に結合した1個または複数のアルキル基(炭素数の限定が可能である)の存在を排除しない。本明細書において使用されるこの用語は、得られる基が非芳香族にとどまるという条件で、環または環系中の1個または複数の二重結合の存在を排除しない。2個以上の環が存在する場合、環は縮合していても縮合していなくてもよい。ヘテロシクロアルキル基の非限定的な例としてはアジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、テトラヒドロピラニル、ピラニル、オキシラニルおよびオキセタニルが挙げられる。「N-ヘテロシクロアルキル」という用語は、結合点としての窒素原子を有するヘテロシクロアルキル基を意味する。「ヘテロシクロアルキル」という用語を「置換」という修飾語付きで使用する場合は、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃、-S(O)₂NH₂または-C(O)OC(CH₃)₃(tert-ブチルオキシカルボニル、BOC)で置き換えられている。

10

【0162】

「置換」という修飾語なしで使用する場合は「アシル」という用語は-C(O)R基を意味し、ここでRは水素、アルキル、アリール、アラルキルまたはヘテロアリールであり、それらの用語は上記定義の通りである。-CHO、-C(O)CH₃(アセチル、Ac)、-C(O)CH₂CH₃、-C(O)CH₂CH₂CH₃、-C(O)CH(CH₃)₂、-C(O)CH(CH₂)₂、-C(O)C₆H₅、-C(O)C₆H₄CH₃、-C(O)CH₂C₆H₅、-C(O)(イミダゾリル)といった基がアシル基の非限定的な例である。「チオアシル」は、-C(O)R基の酸素原子が硫黄原子で置き換えられて-C(S)Rとなる以外は類似して定義される。これらの用語のいずれかを「置換」という修飾語付きで使用する場合は、1個または複数の水素原子(もしあればカルボニル基またはチオカルボニル基に直接結合した水素原子を含む)が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。-C(O)CH₂CF₃、-CO₂H(カルボキシル)、-CO₂CH₃(メチルカルボキシル)、-CO₂CH₂CH₃、-C(O)NH₂(カルバモイル)および-CON(CH₃)₂といった基が置換アシル基の非限定的な例である。

20

30

【0163】

「置換」という修飾語なしで使用する場合は「アルコキシ」という用語は-OR基を意味し、ここでRはアルキルであり、その用語は上記定義の通りである。アルコキシ基の非限定的な例としては-OCH₃(メトキシ)、-OCH₂CH₃(エトキシ)、-OCH₂CH₂CH₃、-OCH(CH₃)₂(イソプロポキシ)、-O(CH₃)₃(tert-ブトキシ)、-OCH(CH₂)₂、-O-シクロペンチルおよび-O-シクロヘキシルが挙げられる。「置換」という修飾語なしで使用する場合は「アルケニルオキシ」、「アルキニルオキシ」、「アリールオキシ」、「アラルコキシ」、「ヘテロアリールオキシ」、「ヘテロシクロアルコキシ」および「アシルオキシ」という用語は、-ORとして定義される基を意味し、ここでRはそれぞれアルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキルおよびアシルである。「アルコキシジイル」という用語は-O-アルカンジイル-、-O-アルカンジイル-O-または-アルカンジイル-O-アルカンジイル-という二価の基を意味する。「置換」という修飾語なしで使用する場合は「アルキルチオ」および「アシルチオ」という用語は-SR基を意味し、ここでRはそれぞれアルキルおよびアシルである。これらの用語のいずれかを「置換」という修飾語付きで使用する場合は、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。「アルコール」と

40

50

いう用語は上記定義のアルカンに対応し、ここで少なくとも1個の水素原子がヒドロキシ基で置き換えられている。

【0164】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルキルアミノ」という用語は-NHR基を意味し、ここでRはアルキルであり、その用語は上記定義の通りである。アルキルアミノ基の非限定的な例としては-NHCH₃および-NHCH₂CH₃が挙げられる。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「ジアルキルアミノ」という用語は-NRR'基を意味し、ここでRおよびR'は同一のまたは異なるアルキル基でありうるか、あるいはRおよびR'は一緒になってアルカンジイルを表すことができる。ジアルキルアミノ基の非限定的な例としては-N(CH₃)₂、-N(CH₃)(CH₂CH₃)およびN-ピロリジニルが挙げられる。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルコキシアミノ」、「アルケニルアミノ」、「アルキニルアミノ」、「アリールアミノ」、「アラルキルアミノ」、「ヘテロアリールアミノ」、「ヘテロシクロアルキルアミノ」および「アルキルスルホニルアミノ」という用語は、-NHRとして定義される基を意味し、ここでRはそれぞれアルコキシ、アルケニル、アルキニル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキルおよびアルキルスルホニルである。アリールアミノ基の非限定的な例は-NHC₆H₅である。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アミド」(アシルアミノ)という用語は-NHR基を意味し、ここでRはアシルであり、その用語は上記定義の通りである。アミド基の非限定的な例は-NHC(O)CH₃である。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルキルイミノ」という用語は=NRという二価の基を意味し、ここでRはアルキルであり、その用語は上記定義の通りである。「アルキルアミノジイル」という用語は-NH-アルカンジイル-、-NH-アルカンジイル-NH-または-アルカンジイル-NH-アルカンジイル-という二価の基を意味する。これらの用語のいずれかを「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。-NHC(O)OCH₃および-NHC(O)NHCH₃という基が置換アミド基の非限定的な例である。

【0165】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルキルホスフェート」という用語は-O P(O)(OH)(OR)基を意味し、ここでRはアルキルであり、その用語は上記定義の通りである。アルキルホスフェート基の非限定的な例としては-OP(O)(OH)(OMe)および-OP(O)(OH)(OEt)が挙げられる。「置換」という修飾語なしで使用する場合の「ジアルキルホスフェート」という用語は-OP(O)(OR)(OR')基を意味し、ここでRおよびR'は同一のまたは異なるアルキル基でありうるか、あるいはRおよびR'は一緒になってアルカンジイルを表すことができる。ジアルキルホスフェート基の非限定的な例としては-OP(O)(OMe)₂、-OP(O)(OEt)(OMe)および-OP(O)(OEt)₂が挙げられる。これらの用語のいずれかを「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。

【0166】

「置換」という修飾語なしで使用する場合の「アルキルスルホニル」および「アルキルスルフィニル」という用語は-S(O)₂R基および-S(O)R基をそれぞれ意味し、ここでRはアルキルであり、その用語は上記定義の通りである。「アルケニルスルホニル」、「アルキニルスルホニル」、「アリールスルホニル」、「アラルキルスルホニル」、「ヘテロアリールスルホニル」および「ヘテロシクロアルキルスルホニル」という用語は類似して定義される。これらの用語のいずれかを「置換」という修飾語付きで使用する場合、1個または複数の水素原子が独立して-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-OC(O)CH₃または-S(O)₂NH₂で置き換えられている。

【0167】

本明細書において使用される「キラル補助基」とは、反応の立体選択性に影響することが可能である除去可能なキラル基を意味する。当業者はそのような化合物に精通しており、多くは市販されている。

【0168】

特許請求の範囲および/または明細書において「含む(comprising)」という用語との組み合わせで使用する場合の「1つ(a)」または「1つ(an)」という単語の使用は、「1つ」を意味しうるが、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つまたは2つ以上」の意味とも一致している。

【0169】

本明細書を通じて、「約」という用語は、ある値が、その値を決定するために使用される装置や方法に固有の誤差の変動、または試験対象の間で存在する変動を含むことを示すために使用される。

【0170】

「含む(comprise)」、「有する(have)」および「含む(include)」という用語は非限定的な連結動詞である。「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「有する(has)」、「有する(having)」、「含む(includes)」および「含む(including)」などの1つまたは複数のこれらの動詞の任意の形態または時制も非限定的である。例えば、1つまたは複数の段階を「含む(comprises)」か、「有する(has)」かまたは「含む(includes)」任意の方法は、それらの1つまたは複数の段階のみを有することに限定されず、他の列挙されていない段階も網羅する。

【0171】

明細書および/または特許請求の範囲において使用される「有効な」という用語は、所望の、予期されるまたは意図される結果を実現するために十分であることを意味する。患者または対象を化合物で処置する文脈において使用される場合の「有効量」、「治療有効量」または「薬学的有効量」とは、疾患を処置するために対象または患者に投与する際に疾患のそのような処置を実行するために十分なこの化合物の量を意味する。

【0172】

化合物に対する修飾語として使用する場合の「水和物」という用語は、該化合物が、例えば該化合物の固体形態において、各化合物分子に結合する1個未満(例えば半水和物)、1個(例えば一水和物)または2個以上(例えば二水和物)の水分子を有することを意味する。

【0173】

本明細書において使用される「IC₅₀」という用語は、得られる最大応答の50%である場合の阻害用量を意味する。この定量的尺度は、所与の生物学的、生化学的もしくは化学的プロセス(またはプロセスの構成要素、すなわち酵素、細胞、細胞受容体もしくは微生物)を半分阻害するために特定の薬物または他の物質(阻害剤)がどの程度必要であることを示す。

【0174】

第1の化合物の「異性体」は、各分子が第1の化合物と同一の構成分子を含有しているが三次元でのそれらの原子の配置が異なる、別個の化合物である。

【0175】

本明細書において使用される「患者」または「対象」という用語は、ヒト、サル、雌ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、またはそのトランスジェニック種などの生きている哺乳類生物を意味する。特定の態様では、患者または対象は霊長類である。ヒト対象の非限定的な例としては成人、若年、乳幼児および胎児がある。

【0176】

本明細書において一般的に使用される「薬学的に許容される」とは、正しい医学的判断の範囲内で、ヒトおよび動物の組織、臓器および/または体液と接触させて使用するために好適であり、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴わず、妥当な損益比に相応している、化合物、原料、組成物および/または剤形を意味する。

【0177】

「薬学的に許容される塩」とは、先に定義の通り薬学的に許容されかつ所望の薬理活性を有する、本発明の化合物の塩を意味する。そのような塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸；または1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、3-フェニルプロピオン酸、4,4'-メチレンビス(3-ヒドロキシ-2-エン-1-カルボン酸)、4-メチルピシクロ[2.2.2]オクタ-2-エン-1-カルボン酸、酢酸、脂肪族モノカルボン酸およびジカルボン酸、脂肪族硫酸、芳香族硫酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、炭酸、桂皮酸、クエン酸、シクロペンタプロピオン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルコン酸、グルタミン酸、グリコール酸、ヘプタン酸、ヘキサノ酸、ヒドロキシナフトエ酸、乳酸、ラウリル硫酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、ムコン酸、*o*-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、シュウ酸、*p*-クロロベンゼンスルホン酸、フェニル置換アルカン酸、プロピオン酸、*p*-トルエンスルホン酸、ピルビン酸、サリチル酸、ステアリン酸、コハク酸、酒石酸、*tert*-ブチル酢酸、トリメチル酢酸などの有機酸と共に形成される酸付加塩が挙げられる。薬学的に許容される塩は、存在する酸性プロトンが無機塩基または有機塩基と反応可能な場合に形成可能な塩基付加塩も含む。許容される無機塩基としては水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アルミニウムおよび水酸化カルシウムが挙げられる。許容される有機塩基としてはエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、*N*-メチルグルカミンなどが挙げられる。本発明の任意の塩の一部を形成する特定のアニオンまたはカチオンは、その塩が全体として薬理学的に許容される限り重要ではないと認識すべきである。薬学的に許容される塩ならびにその調製方法および使用方法のさらなる例はHandbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002)に提示されている。

【0178】

本明細書において使用される「薬学的に許容される担体」という用語は、化学薬剤を運搬または輸送することに関与する、液体もしくは固体充填剤、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料などの、薬学的に許容される材料、組成物または媒体を意味する。

【0179】

「予防」または「予防する」は、(1) 疾患の危険性がありかつ/または疾患に罹患しやすいことがあるが、疾患の病理または総体症状のいずれかまたは全部を未だ経験していないかまたは示していない対象または患者において、疾患の発症を阻止すること、および/あるいは(2) 疾患の危険性がありかつ/または疾患に罹患しやすいことがあるが、疾患の病理または総体症状のいずれかまたは全部を未だ経験していないかまたは示していない対象または患者において、疾患の病理または総体症状の発症を遅延させることを含む。

【0180】

「立体異性体」または「光学異性体」は、同一の原子が同一の他の原子に結合しているが三次元でのそれらの原子の配置が異なる、所与の化合物の異性体である。「鏡像異性体」は、左手および右手のように互いの鏡像である所与の化合物の立体異性体である。「ジアステレオマー」は、鏡像異性体ではない所与の化合物の立体異性体である。キラル分子は、立体中心または不斉中心とも呼ばれるキラル中心を含有し、キラル中心は、任意の2個の基の交換が立体異性体を生じさせる基を有する分子中の任意の地点であるが原子であるとは限らない。有機化合物中では、キラル中心は通常炭素原子、リン原子または硫黄原子であるが、他の原子が有機化合物および無機化合物中の立体中心であることも可能である。分子は、複数の立体中心を有することで、多くの立体異性体をそれに与えることができる。その立体異性が四面体不斉中心(例えば四面体炭素)による化合物では、仮説上可能な立体異性体の総数は $2n$ を超えず、ここで n は四面体立体中心の数である。多くの場合、対称性を有する分子は最大可能数よりも少ない数の立体異性体を有する。鏡像異性体の50:50混合物をラセミ混合物と呼ぶ。あるいは、一方の鏡像異性体が50%を超える量で存在するように鏡像異性体の混合物を鏡像異性的に濃縮してもよい。通常、鏡像異性体および/

またはジアステレオマーは当技術分野において公知の技術を使用して分割または分離することができる。立体化学配置が規定されていない任意の立体中心またはキラリティー軸について、その立体中心またはキラリティー軸がそのR型、S型、または、ラセミ混合物および非ラセミ混合物を含むR型とS型との混合物として存在すると想定される。本明細書において使用される「他の立体異性体を実質的に含まない」という語句は、組成物が15%以下、より好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下、最も好ましくは1%以下の別の立体異性体を含むことを意味する。

【0181】

「処置」または「処置する」は、(1) 疾患の病理または総体症状を経験するかまたは示す対象または患者において疾患を阻止すること(例えば、病理および/または総体症状のさらなる発生を止めること)、(2) 疾患の病理または総体症状を経験するかまたは示す対象または患者において疾患を寛解させること(例えば、病理および/または総体症状を逆転させること)、ならびに/あるいは(3) 疾患の病理または総体症状を経験するかまたは示す対象または患者において疾患の任意の測定可能な低下を起こすことを含む。

【0182】

本明細書において使用される「ヌクレオチド塩基」、「核酸塩基」または単に「塩基」という用語は、核酸に一般的に見られる種類の置換または非置換窒素含有親芳香族複素環、ならびにその天然、置換、修飾または操作変異体または類似体を意味する。通常の態様では、核酸塩基は適切な相補的核酸塩基とワトソン・クリックおよび/またはフーグスティーン水素結合を形成可能である。例示的核酸塩基としては以下が挙げられるがそれに限定されない:

2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、アデニン(A)、エテノアデニン、 N^6 - Δ^2 -イソペンテニルアデニン(6iA)、 N^6 - Δ^2 -イソペンテニル-2-メチルチオアデニン(2ms6iA)、 N^6 -メチルアデニン、グアニン(G)、イソグアニン、 N^2 -ジメチルグアニン(dmG)、7-メチルグアニン(7mG)、2-チオピリミジン、6-チオグアニン(6sG)、ヒポキサンチンおよび O^6 -メチルグアニンなどのプリン;

7-デアザアデニン(7-デアザ-A)、7-デアザグアニン(7-デアザ-G)、7-デアザ-7-ヒドロキシメチルアデニン、7-デアザ-7-アミノメチルアデニンおよび7-デアザ-7-ヒドロキシメチルグアニンなどの7-デアザ-プリン;

シトシン(C)、5-プロピニルシトシン、イソシトシン、5-ヒドロキシルメチルシトシン(HOMeC)、5-アミノメチル-シトシン、チミン(T)、4-チオチミン(4sT)、5,6-ジヒドロチミン、 O^4 -メチルチミン、ウラシル(U)、4-チオウラシル(4sU)、5-ヒドロキシルメチルウラシル(HOMeU)、5-アミノメチル-ウラシルおよび5,6-ジヒドロウラシル(ジヒドロウラシル; D)などのピリミジン;

ニトロインドールおよび4-メチルインドールなどのインドール; ニトロピロールなどのピロール; ネブラリン; 塩基(Y); など。

【0183】

さらなる例示的核酸塩基は、参照により組み入れられるLehninger, 2005、およびそこに引用された参考文献に見出すことができる。

【0184】

本明細書において使用される「ヌクレオシド」という用語は、5炭糖、通常はリボースまたはデオキシリボースに結合した核酸塩基からなるグリコシルアミンを意味する。これらの例としてはシチジン、2'-デオキシシチジン、5-ヒドロキシルメチルシチジン、2'-デオキシ-5-ヒドロキシルメチルシチジン、5-アミノメチルシチジン、2'-デオキシ-5-アミノメチルシチジン、ウリジン、2'-デオキシウリジン、5-ヒドロキシルメチルウリジン、2'-デオキシ-5-ヒドロキシルメチルウリジン、5-アミノメチルウリジン、2'-デオキシ-5-アミノメチルウリジン、アデノシン、2'-デオキシアデノシン、7-デアザ-7-ヒドロキシメチルアデノシン、2'-デオキシ-7-デアザ-7-ヒドロキシメチルアデノシン、7-デアザ-7-アミノメチルアデノシン、2'-デオキシ-7-デアザ-7-アミノメチルアデノシン、グアノシン、2'-デオキシグアノシン、7-デアザ-7-ヒドロキシメチルグアノシン、2'-デオキシ-7-デ

アザ-7-ヒドロキシメチル、7-デアザ-7-アミノメチルグアノシン、2'-デオキシ-7-デアザ-7-アミノメチルグアノシン、チミジンおよび2'-デオキシチミジンが挙げられるがそれに限定されない。

【0185】

「ヌクレオチド」は、鎖中でヌクレオシドの5炭糖に結合した1個、2個、3個またはそれ以上のホスフェート基を有するヌクレオシドで構成される。

【0186】

「タイミングのずれ (dephasing)」という用語は、CRT法、SNA法およびSBL法を含むがそれに限定されない段階的付加法によって生じる現象のことであり、伸長するプライマーが任意の所与のサイクルにおいて同期しなくなる際に起こる。ラギング鎖または2型のずれ(例えば予期されるサイクルから $n-1$)は、不完全な伸長により生じ、リーディング鎖または1型のずれ(例えば $n+1$)は、同一鋳型の集団中での複数のヌクレオチドまたはプローブの付加により生じる。

【0187】

「暗いヌクレオチド」または「暗いプローブ」という用語は、蛍光標識を含まないヌクレオチドまたはプローブを意味する。それは、以前のサイクル中での開裂、および以前のサイクルからの持ち越しによって発生することがあるか、または、現在のサイクル中にその色素標識対応物からインサイチュールで加水分解されることによる。

【0188】

別途指定されない限り、「リンカー」は、2つの他の基の間の共有結合性分子架橋として機能する1個または複数の二価の基(連結メンバー)を意味する。リンカーは、1個または複数の連結メンバー、および1種または複数種の連結メンバーを含みうる。例示的連結メンバーとしては $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 n が0、1または2である $-S(O)_n-$ 、 $-O-$ 、 $-OP(O)(OH)O-$ 、 $-OP(O)(O^-)O-$ 、アルカンジイル、アルケンジイル、アルキンジイル、アレーンジイル、ヘテロアレーンジイル、またはその組み合わせが挙げられる。いくつかのリンカーはペンダント側鎖もしくはペンダント官能基(またはその両方)を有する。そのようなペンダント部分の例としては親水性調整剤、例えば、 $-SO_3H$ または $-SO_3^-$ などのような可溶化基がある。いくつかの態様では、リンカーは化学的または酵素的に反応性のある基(例えば開裂性または非開裂性の末端部分)などの別の部分にレポーターを接続することができる。他の態様では、リンカーは生体成分および非生体成分、例えば核酸塩基、ヌクレオシドまたはヌクレオチドにレポーターを接続する。さらなる態様では、リンカーは核酸塩基、ヌクレオシドまたはヌクレオチドに化学的反応性基を接続する。レポーターに結合したリンカーによって形成される部分は $-L-$ レポーターと呼ばれることがある。連結される分子、および鎖合成の方法が行われる条件などの因子に応じて、リンカーは、安定性、長さ、FRET効率、特定の化学物質に対する耐性、および/または温度パラメータなどの特性を最適化するための長さおよび組成が変動しうるものであり、得られた抱合体が重合反応を最適化する上で有用であるように標識をヌクレオチドに操作可能に連結するために十分な立体選択性またはサイズを有しうる。リンカーは標準的の化学技術を使用して使用可能であり、ヌクレオチドに標識を結合させるためのアミンリンカー(例えば参照により本明細書に組み入れられるHobbsおよびTrainorの米国特許第5,151,507号を参照); ヌクレオチドに標識を操作可能に連結させるための第一級または第二級アミンを通常含むリンカー; およびヌクレオチド塩基に付加された強固な炭化水素腕(例えば参照により本明細書に組み入れられるService, 1998を参照)が挙げられるがそれに限定されない。塩基分子にレポーターを結合させるためのいくつかの例示的な連結方法論は、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる米国特許第4,439,356号および第5,188,934号; 欧州特許出願第87310256.0号; 国際出願第PCT/US90/05565号ならびにBarone et al., 2001に示される。

【0189】

「開裂性リンカー」とは、反応または条件の結果によって破壊されうる1個または複数の開裂性基を有するリンカーのことである。「開裂性基」という用語は、一部分の放出、

10

20

30

40

50

例えば蛍光発生部分または蛍光部分の放出を可能にする部分を意味する。そのような開裂は通常、化学的、光化学的または酵素的に媒介される。例示的な酵素開裂性基としては、ホスフェート、またはペプチド結合を経由して結合した基が挙げられる。

【0190】

本明細書において使用される「IC₅₀」という用語は、プライマー鋳型複合体上でそれを取り込まれることで等モル数の基質および産物が得られるヌクレオチド類似体の濃度を意味するがそれに限定されず、かつ/または、化合物がプライマー鋳型複合体の半数上で取り込まれる濃度を決定することで測定される取り込み効率として定義されることがあるがそれに限定されない。

【0191】

本明細書において使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、2~200個の共有結合性ヌクレオチドのDNA断片を意味する。

【0192】

本明細書において使用される「レポーター」という用語は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に生成可能な化学部分を意味する。レポーターの例としては蛍光色素基、放射性標識、または化学発光手段もしくは生物発光手段を通じてシグナルを産出する基が挙げられる。蛍光色素基の例としてはキサンテン、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン、クマリン、ピレン、フタロシアニン、フィコビリタンパク質、ALEXA FLUOR(登録商標)350、ALEXA FLUOR(登録商標)405、ALEXA FLUOR(登録商標)430、ALEXA FLUOR(登録商標)488、ALEXA FLUOR(登録商標)514、ALEXA FLUOR(登録商標)532、ALEXA FLUOR(登録商標)546、ALEXA FLUOR(登録商標)555、ALEXA FLUOR(登録商標)568、ALEXA FLUOR(登録商標)568、ALEXA FLUOR(登録商標)594、ALEXA FLUOR(登録商標)610、ALEXA FLUOR(登録商標)633、ALEXA FLUOR(登録商標)647、ALEXA FLUOR(登録商標)660、ALEXA FLUOR(登録商標)680、ALEXA FLUOR(登録商標)700、ALEXA FLUOR(登録商標)750、およびスクアライン色素が挙げられる。本発明のいくつかの態様において使用可能な蛍光色素基のさらなる例は、本明細書全体を通じて、また、参照により本明細書に組み入れられるHaugland, 2005ならびに米国特許第4,439,356号および第5,188,934号に開示されている。本発明のいくつかの態様においてレポーターとして使用可能な放射性標識の例、例えば³⁵S、³H、³²Pまたは³³Pは、当技術分野において周知である。化学発光手段または生物発光手段によって機能する、本発明のいくつかの態様においてレポーターとして使用可能なレポーターの例は、参照により本明細書に組み入れられるNieman, 1989; Given & Schowen, 1989; Orosz et al., 1996; およびHastings, 1983に記載されている。

【0193】

本明細書において使用される「鋳型」という用語は、DNA合成(取り込み)用の相補鎖として役立つオリゴヌクレオチド、または、公知の領域、通常は普遍的プライマーがそこに結合しうるベクターもしくはアダプター配列と、標的配列、通常は配列決定すべき未知の部分とで構成される組換えDNA分子を意味しうる。

【0194】

「断片鋳型」という用語は、ゲノムDNAを1kb未満の小さなサイズにランダムに剪断し、アダプターを断片の各端部に連結させることで調製された、断片のライブラリーを意味する。一般に、これらの鋳型は、必要とするDNAの量がメイトペアライブラリーよりも少ない。

【0195】

「メイトペア鋳型」という用語は、所与のサイズ(例としては2kbまたは5kbまたは10kbまたは20kbまたは任意の他の所望のサイズが挙げられる)について選別された剪断または断片化DNAを環状化させることで、以前は互いに離れていた端部を密接させることによって調製された、ゲノムライブラリーを意味する。これらの円環を線状DNA断片に切断することでメイトペア断片が作り出される。

【0196】

本明細書において使用される「プライマー」という用語は、DNA合成(取り込み)を開始

10

20

30

40

50

するために使用される鋳型鎖(通常は公知の配列)上の相補配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを意味する。

【0197】

本明細書において科学的または技術的意味で使用される「取り込み」という用語は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体が鋳型鎖との相補塩基対、およびポリメラーゼによるプライマー鎖との共有結合を形成することを意味する。プライマー鋳型複合体は最初のプライマー鎖から塩基1個または複数個分伸長する。

【0198】

本明細書において使用される「開裂」という用語は、化学的開裂、酵素的開裂などによる末端基の除去を意味する。

10

【0199】

本明細書において使用される「取り込みサイクル」という用語は、ポリメラーゼによるヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の取り込み、該ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の検出および同定、ならびに、ヌクレオチド類似体の場合では、末端基、および該ヌクレオチド類似体上に当初から存在する場合の蛍光色素基の該類似体からの開裂を意味する。

【0200】

本明細書において使用される「誤った取り込み」という用語は、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体が鋳型鎖との非相補塩基対、およびポリメラーゼによるプライマーとの共有結合を形成することを意味する。プライマー鋳型複合体は最初のプライマー鎖から塩基1個または複数個分伸長する。

20

【0201】

本明細書において使用される「識別」という用語は、ポリメラーゼによるヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の誤った取り込み対取り込みの、 IC_{50} 濃度の差を意味する。

【0202】

本明細書において使用される「終結」という用語は、鋳型鎖との相補または非相補塩基対、およびポリメラーゼによるプライマーとの共有結合を形成する、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の取り込みを意味する。プライマー鋳型複合体は、任意の所与の取り込みサイクルにおいて最初のプライマー鎖または伸長するプライマー鎖から塩基1個分のみ伸長する。

30

【0203】

本明細書において使用される「末端部分」および「末端基」という用語は同義であり、ヌクレオシド(すなわち糖もしくは核酸塩基)またはヌクレオチド(すなわち糖、核酸塩基もしくはホスフェート基)の少なくとも一部に結合される際にヌクレオシドまたはヌクレオチドに相当な終結特性を付与する、小さな化学基(例えば500ダルトン未満、リンカーまたはリンカー/色素などの任意の修飾を除く)を意味する。いくつかの態様では、末端部分はリンカー、および/または色素に結合したリンカーでさらに修飾される。好ましい態様では、そのような修飾末端基の終結特性は実質的に改変されない。

【0204】

本明細書において使用される「 DT_{50} 」という用語は、プライマー鋳型複合体に取り込まれた塩基類似体の50%を開裂させるために必要な時間を意味する。

40

【0205】

本明細書において使用される「類似体」という用語は、「所与の化合物」と同一の基本炭素骨格および炭素官能基を構造中に含まないが、1個または複数の適切な置換を取り込むこと、例えばヘテロ原子を炭素に置換することでその所与の化合物を模倣することができる、物質であると理解される。

【0206】

上記定義は、参照により本明細書に組み入れられる参考文献のいずれかにおける任意の矛盾する定義に取って代わる。しかし、特定の用語が定義されているという事実を、未定義の任意の用語が不確定であることを示すものと考えるべきではない。むしろ、すべての

50

使用される用語は、当業者が本発明の範囲を認識しかつ本発明を実践することができる用語で本発明を説明するものと考えられる。

【実施例】

【0207】

V. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を示すために含まれる。当業者は、以下の実施例で開示される技術が、本発明の実行において十分に機能することを本発明者が発見した技術を代表するものであり、したがってその実行の好ましい様式を構成すると考えられることを認識すべきである。しかし、当業者は、本開示に照らして、本発明の真意および範囲を逸脱することなく、開示されている具体的な態様に多くの変更を行い、なお類似または同様の結果を得ることができることを認識すべきである。

10

【0208】

実施例1

方法および材料

試薬および材料

別途記述がない限り、すべての試薬は商業的供給源から購入し、受け取ったまま使用した。

【0209】

分光学的および分析的機器使用

参照により本明細書に組み入れられるWu et al. (2007)に既に記載のように、¹H NMR、¹³C NMRおよび³¹P NMRスペクトルをBruker DPX 400分光計上で記録した。質量スペクトル分析をMD Anderson Cancer Center(テキサス州ヒューストン)のMass Spectrometry LaboratoryおよびRice University(テキサス州ヒューストン)のCore Mass Spectrometry Facilityが行った。X線結晶構造解析をTexas A&M University(テキサス州カレッジステーション)のX-ray Diffraction Laboratoryが行った。紫外可視測定値を、Beckman DU-800分光光度計を使用して取得した。アニオン交換クロマトグラフィーを、Q Sepharose FFカラム(2.5x20cm)を使用して、25%アセトニトリル中75%炭酸水素トリエチルアンモニウム(TEAB、0.1M)→25%アセトニトリル中75% TEAB(1.5M)の直線勾配によって、流量4.5mL/分で240分にわたって行った。逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を、128溶媒モジュール、および166紫外線検出器または168フォトダイオードアレイ紫外可視検出器を備えたBeckman System Goldを使用して行った。ヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体のRP-HPLCを、4.6mm x 250mm Aquapore OD-300 C₁₈カラムを使用して、100mM酢酸トリエチルアンモニウム(TEAA)(pH 7.0)を含有する緩衝液A、および100mM TEAA(pH 7.0)、70%アセトニトリル(v/v)を含有する緩衝液Bによって行った。

20

30

【0210】

実施例2

α-置換2-ニトロベンジルアルコールの合成

(R/S)-1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール

(R/S)-1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノールの合成は既に報告された。参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al. (2011)を参照。

40

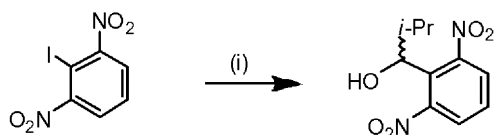
【0211】

(R/S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール

(R/S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの合成は既に報告された。参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al. (2011)を参照。

【0212】

(R/S)-1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール



1-ヨード-2,6-ジニトロベンゼン (R/S)-1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール

スキームS1 (R/S)-1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノールの合成。試薬および条件: (i) PhMgBr、THF、 -50°C ; i-PrCHO、 -50°C ～室温、30%。

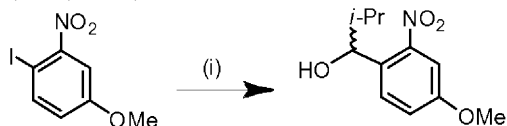
【0213】

1-ヨード-2,6-ジニトロベンゼン(参照により本明細書に組み入れられるSmith and Ho, 1990)(1.55g, 5.27mmol)の無水THF(18mL)溶液に、窒素雰囲気下 -50°C で、臭化フェニルマグネシウム(THF中2M、3.2mL、6.4mmol)を、温度が -45°C を超えない速度で滴下した。添加の完了時点で混合物を -50°C で5分間攪拌した後、イソブチルアルデヒド(0.96mL、11mmol)を加えた。混合物を室温に徐々に昇温させ、飽和 NH_4Cl 溶液(10mL)で反応させた後、水(50mL)で希釈した。混合物を CH_2Cl_2 (100mL)で3回抽出した。一緒にした有機相をブライン(50mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して(R/S)-1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール(0.375g、30%)を黄色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.82 (d, 2 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.59 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 4.83 (dd, 1 H, $J = 9.2$ および 7.6 Hz, Ph-CH), 2.87 (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, OH), 2.19 (m, 1 H, CH), 1.12 (d, 3 H, $J = 6.4$ Hz, CH_3), 0.76 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH_3)

【0214】

(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール



4-ヨード-3-ニトロアニソール (R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール

スキームS2 (R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノールの合成。試薬および条件: (i) PhMgCl、THF、 -40°C ; i-PrCHO、 -40°C ～室温、67%。

【0215】

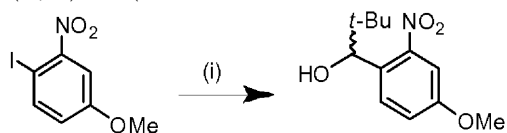
4-ヨード-3-ニトロアニソール(2.79g、10.0mmol)の無水THF(20mL)溶液に、窒素雰囲気下 -40°C で、塩化フェニルマグネシウム(THF中2M、6.0mL、12mmol)を、温度が -35°C を超えない速度で滴下した。添加の完了時点で混合物を -40°C で5分間攪拌した後、イソブチルアルデヒド(1.8mL、20mmol)を加えた。混合物を徐々に室温に昇温させ、飽和 NH_4Cl 溶液(5.0mL)で反応停止させ、 CH_2Cl_2 (100mL)で希釈し、水(100mL)で洗浄した。有機相を分離し、水相を CH_2Cl_2 (50mL)で3回抽出した。一緒にした有機相をブライン(40mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール(1.5g、67%)を明黄色油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$

(400 MHz, CDCl_3): δ 7.61 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz, Ph-H), 7.34 (d, 1 H, $J = 2.8$ Hz, Ph-H), 7.15 (dd, 1 H, $J = 8.8$ および 2.8 Hz, Ph-H), 4.92 (dd, 1 H, $J = 5.6$ および 3.2 Hz, Ph-CH), 2.46 (br s, 1 H, OH), 2.00 (m, 1 H, CH), 0.97 (d, 3 H, $J = 6.4$ Hz, CH_3), 0.86 (d, 3 H, $J = 6.8$ Hz, CH_3)

【0216】

(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール



4-ヨード-
3-ニトロアニソール

(R/S)-1-(4-メトキシ-
2-ニトロフェニル)-
2,2-ジメチル-1-プロパノール

スキームS3 (R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの合成。試薬および条件: (i) PhMgCl 、THF、 -40°C ; $(\text{CH}_3)_3\text{CCHO}$ 、 $-40^\circ\text{C} \sim \text{室温}$ 、74%。

10

【0217】

4-ヨード-3-ニトロアニソール(2.38g、8.50mmol)の無水THF(10mL)溶液に、窒素雰囲気下 -40°C で、塩化フェニルマグネシウム(THF中2M、4.7mL、9.4mmol)を、温度が -35°C を超えない速度で滴下した。添加の完了時点で混合物を -40°C で1時間攪拌した後、トリメチルアセトアルデヒド(1.13mL、10.2mmol)を加えた。混合物を -40°C で2時間、次に室温でさらに1時間攪拌した。反応液をブライン(100mL)で反応停止させ、混合物を CH_2Cl_2 (40mL)で3回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してラセミ(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(1.52g、74%)を得た。

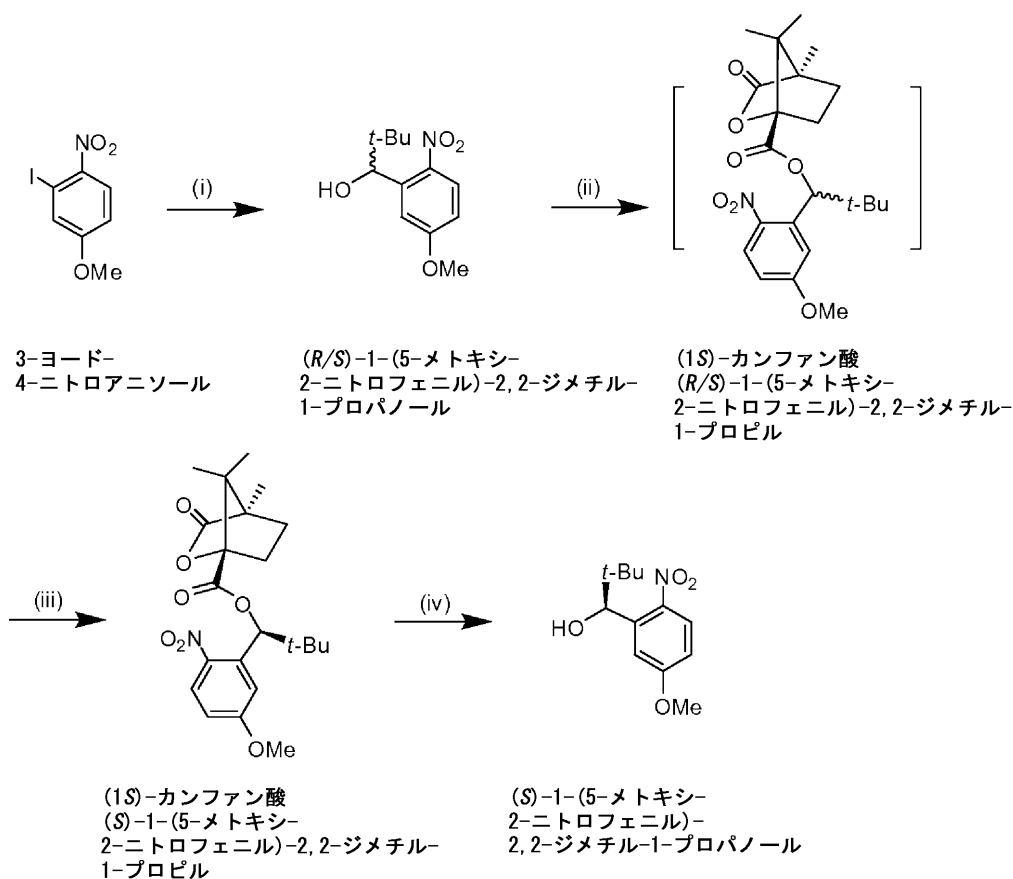
^1H NMR (400

20

MHz, CDCl_3): δ 7.67 (d, 1 H, $J = 9.2$ Hz, Ph-H), 7.22 (d, 1 H, $J = 2.4$ Hz, Ph-H), 7.12 (dd, 1 H, $J = 8.8$ および 2.8 Hz, Ph-H), 5.27 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, Ph-CH), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 2.01 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, OH), 0.86 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0218】

(R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールおよび(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール



10

20

スキームS4 (R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールおよび(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの合成。試薬および条件: (i) PhMgCl 、無水THF、 -40°C ; $(\text{CH}_3)_3\text{CCHO}$ 、 -40°C ～室温、88%; (ii) (1S)-カンファン酸クロリド、DMAP、 CH_2Cl_2 、室温; (iii) 酢酸エチル/ヘキサンからの分別晶出、43%; (iv) K_2CO_3 、MeOH、還流、99%。

【0219】

3-ヨード-4-ニトロアニソール(2.79g、10.0mmol)の無水THF(10mL)溶液に、窒素雰囲気下 -40°C で、塩化フェニルマグネシウム(THF中2M、4.2mL、8.3mmol)を、温度が -35°C を超えない速度で滴下した。添加の完了時点で混合物を -40°C で2時間攪拌した後、トリメチルアセトアルデヒド(1.1mL、10mmol)を加えた。混合物を -40°C で2時間、次に室温でさらに1時間攪拌した。次に反応液をブライン(100mL)で反応停止させ、混合物を CH_2Cl_2 (40mL)で3回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してラセミ(R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(1.76g、88%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400

MHz, CDCl_3): δ 7.89 (d, 1 H, $J = 9.2$ Hz, Ph-H), 7.27 (d, 1 H, $J = 2.8$ Hz, Ph-H), 6.84 (dd, 1 H, $J = 8.8$ および 2.8 Hz, Ph-H), 5.62 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, PhCH), 3.89 (s, 3 H, OCH_3), 2.08 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, OH), 0.89 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0220】

ラセミ(R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(1.75g、7.3mmol)およびDMAP(2.92g、23.9mmol)の無水 CH_2Cl_2 (10mL)溶液に(1S)-カンファン酸クロリド(参照により組み入れられるCorrie et al., 1992)(2.6g、12mmol)を加え、混合物を窒素雰囲気下、室温で終夜攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (50mL)で希釈し、飽和 NaHCO_3 溶液(50mL)で洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して(1S)-カンファン酸(R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェ

30

40

50

ニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(2.5g、85%、ジアステレオマーの1:1混合物)を得た。このカンファネートを酢酸エチル(30mL)に溶解させた後、攪拌下でヘキサン(120mL)をゆっくりと加えた。針状結晶が溶液から2時間かけて徐々に形成された。結晶を濾取して純粋な単一のジアステレオマーである(1S)-カンファン酸(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルを得た。濾液を減圧濾過し、晶出プロセスを2回繰り返してさらなる(1S)-カンファン酸(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルを得た(合計1.08g、43%)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.04 (d, 1 H, $J = 9.2$

Hz, Ph-H), 7.27 (d, 1 H, $J = 2.8$ Hz, Ph-H), 6.88 (dd, 1 H, $J = 2.8$ および 8.8 Hz, Ph-H), 6.81 (3, 1 H, Ph-CH), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 2.36 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 2 H, CH_2), 1.66 (m, 1 H, CH), 1.12 (s, 3 H, CH_3), 1.06 (s, 3 H, CH_3), 1.02 (s, 3 H, CH_3), 0.95 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0221】

X線結晶構造解析データを得るための方法

参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al. (2011)に記載のように、寸法0.50 mm x 0.05mm x 0.05mmを有する(1S)-カンファン酸(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルの結晶について結晶学的測定を行った。図3参照。

【0222】

データ収集

CuK α 線、 $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ 、 $T = 110 \pm 2^\circ \text{ K}$ 、 $2\theta_{\text{max}} = 120.0^\circ$ 、収集反射数32,513、独立反射数2,913($R_{\text{int}} = 0.0517$)。最終GooF=1.091、 $R_1 = 0.0681$ 、 $wR_2 = 0.1695$ 、R指数は反射数2,913と $I > 2\sigma(I)$ (F^2 に対する精密化)に基づく、パラメータ数290、制限数43。適用される L_p および吸収補正 $\mu = 0.819 \text{ mm}^{-1}$ 。絶対構造パラメータ: 0.05 ± 0.09 。

【0223】

X線結晶構造解析データ

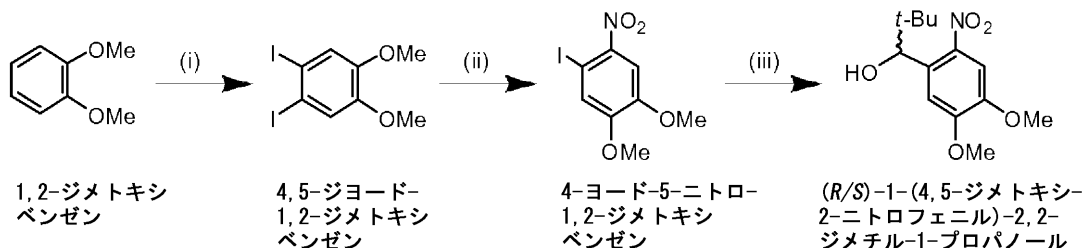
$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_7$ 、 $M = 419.46$ 。斜方晶、 $a = 6.29$ 、 $b = 15.00$ 、 $c = 22.27 \text{ \AA}$ (α 、 β 、 $\gamma = 90^\circ$)、 $V = 2,099.29 \text{ \AA}^3$ 、空間群 $P2_12_12_1$ 、 $Z = 4$ 、 $D_c = 1.327 \text{ g/cm}^3$ 、 $F(000) = 896$ 。

【0224】

(1S)-カンファン酸(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(590mg、1.4mmol)および K_2CO_3 (389mg、2.8mmol)のメタノール(MeOH 、25mL)中混合物を還流温度に1時間加熱した後、冷却し、減圧濃縮し、 CH_2Cl_2 (50mL)で希釈した。有機相をブライン(50mL)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してエナンチオピュアな(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(333mg、99%)を得た。 $^1\text{H NMR}$ はラセミアルコールのそれと同一であった。

【0225】

(R/S)-1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール



スキームS5 (R/S)-1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの合成。試薬および条件: (i) ICl 、 CH_3COOH 、 100°C 、62%; (ii) HNO_3 、 CH_3COOH 、室温、75%; (iii) PhMgCl 、 THF 、 -40°C ; $(\text{CH}_3)_3\text{CCHO}$ 、 $-40^\circ\text{C} \sim \text{室温}$ 、20%。

【0226】

1,2-ジメトキシベンゼン(5.0g、36mmol)を酢酸(10mL)に溶解させ、溶液を氷水浴中で冷

却した後、塩化ヨウ素(8.7g、54mmol)を滴下した。10分後、反応混合物を100℃に2時間加熱し、次に室温に冷却した。溶液から析出した針状結晶を濾過し、酢酸(5.0mL)で3回洗浄した。結晶を終夜高真空乾燥させて4,5-ジヨード-1,2-ジメトキシベンゼン(8.8g、62%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.28 (s, 2 H, Ph-H), 3.85 (s, 6 H, OCH_3)

【0 2 2 7】

4,5-ジヨード-1,2-ジメトキシベンゼン(8.8g、23mmol)を酢酸(300mL)に加え、混合物を100℃に加熱して固体を溶解させた。次に透明混合物を室温に冷却した後、硝酸(68~70%、120mL)を滴下した。反応混合物を室温で終夜攪拌した後、氷水(200mL)に注いだ。混合物を CH_2Cl_2 (100mL)で3回抽出した。一緒にした有機相を飽和 NaHCO_3 溶液(200mL)、ブライ

10

$^1\text{H NMR}$ (400

MHz, CDCl_3): δ 7.60 (s, 1 H, Ph-H), 7.38 (s, 1 H, Ph-H), 3.98 (s, 3 H, OCH_3), 3.92 (s, 3 H,

OCH_3)

【0 2 2 8】

4-ヨード-5-ニトロ-1,2-ジメトキシベンゼン(4.6g、15mmol)の無水THF(10mL)溶液に、窒素雰囲気下-40℃で、塩化フェニルマグネシウム(THF中2M、7.5mL、15mmol)を、温度が-35℃を超えない速度で滴下した。添加の完了時点で混合物を-40℃で2時間攪拌した後、トリメチルアセトアルデヒド(2.0mL、18mmol)を加えた。混合物を-40℃で2時間、次に室温でさらに1時間攪拌した。反応液をブライン(100mL)で反応停止させ、混合物を CH_2Cl_2 (40mL)で3回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してラセミ(R/S)-1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(0.8g、20%)を得た。

20

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.41 (1, 1 H, Ph-H), 7.21 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (s, 1 H, PhCH),

3.95 (s, 3 H, OCH_3), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 0.90 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3$)

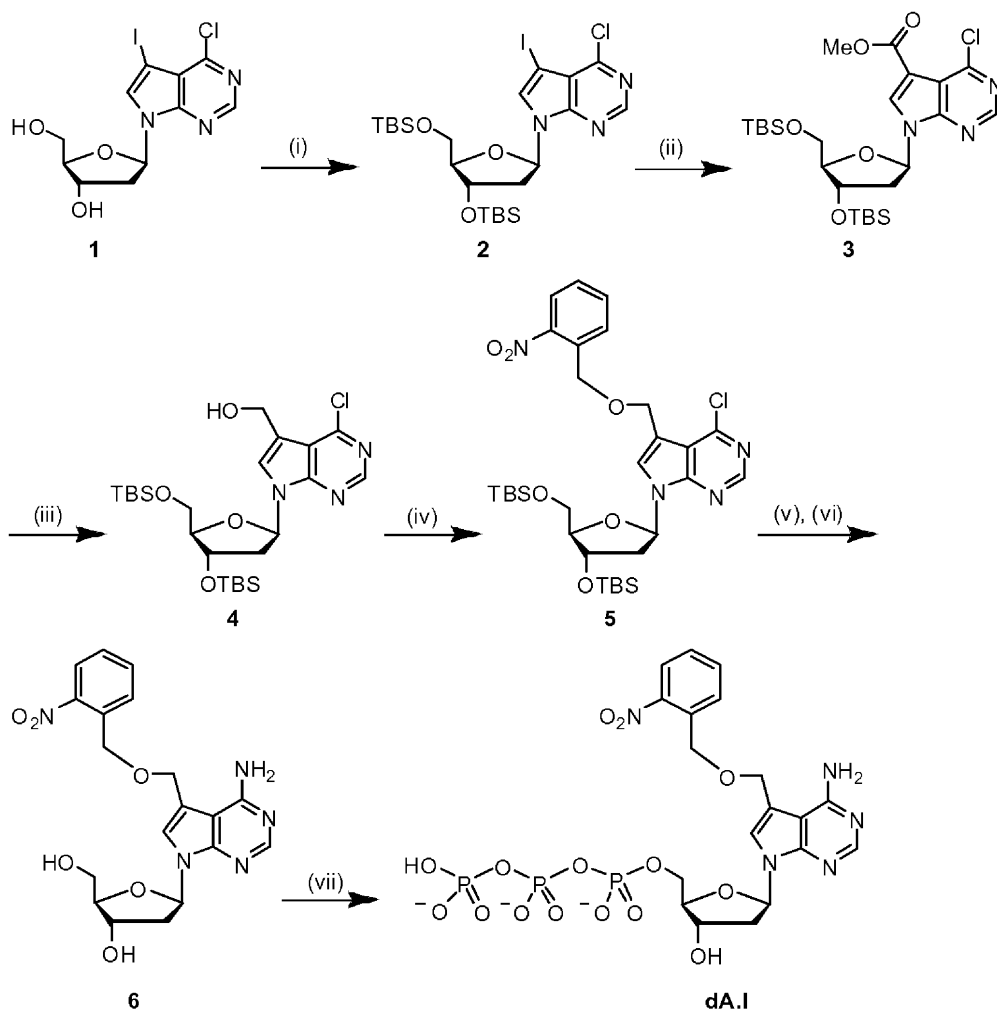
【0 2 2 9】

実施例3

30

7-HOMe-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン三リン酸類似体の合成

7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸



スキームS6 7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) TBSCl、イミダゾール、DMF、室温、87%; (ii) CO、PdCl₂[PhCN]₂、MeOH/1,4-ジオキサン、50°C、98%; (iii) LiBH₄、MeOH、THF、還流、45%; (iv) 2-ニトロベンジルブロミド、n-Bu₄NBr、CH₂Cl₂/NaOH水溶液、室温、50%; (v) n-Bu₄NF、THF、0°C~室温; (vi) NH₃、1,4-ジオキサン/MeOH、100°C、2工程で91%; (vii) POC l₃、(MeO)₃PO、-40°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

【0230】

化合物1(参照により本明細書に組み入れられるSeela et al. (2005))(0.79g、2.0mmol)を無水ピリジン(2.0mL)から3回蒸発させ、無水DMF(4.0mL)に溶解させた。tert-ブチルジメチルシリルクロリド(0.90g、6.0mmol)およびイミダゾール(0.82g、12mmol)を加え、混合物を室温で16時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β-D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-6-クロロ-7-ヨード-7-デアザプリン2(1.08g、87%)を白色泡状物として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.61 (s, 1 H, H-

2), 7.81 (s, 1 H, H-8), 6.74 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 4.56 (m, 1 H, H-4'), 4.01 (m, 1 H, H-3'), 3.87 (dd, 1 H, H-5'a), 3.79 (dd, 1 H, H-5'b), 2.39 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.96 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.91 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.18 (2s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.15 (s, 6 H, (CH₃)₂Si)

【0231】

化合物2(1.55g、2.48mmol)の無水1,4-ジオキサン(42mL)および無水MeOH(42mL)溶液にトリエチルアミン(0.87mL)を加えた。CO雰囲気下で10分間攪拌後、ビス(ベンゾニトリル)ジクロロパラジウム(II)(0.05g、0.13mmol)を加え、反応液をCO雰囲気下50°Cで48時間攪拌した。次に混合物を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β-

D-3',5'-O-bis-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-6-クロロ-7-メトキシカルボニル-7-デアザプリン3(1.36g、98%)を粘稠油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400

MHz, CDCl_3): δ 8.69 (s, 1 H, H-2), 8.31 (s, 1 H, H-8), 6.77 (t, 1 H, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 4.58 (m, 1 H, H-4'), 4.06 (m, 1 H, H-3'), 3.90 (s, 3 H, CH_3O), 3.87 (dd, 1 H, H-5'a), 3.81 (dd, 1 H, H-5'b), 2.42 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.93 (s, 18 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.13 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.12 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)

【0 2 3 2】

10

化合物3(0.28g、0.50mmol)の無水THF(4.0mL)溶液に水素化ホウ素リチウム(44mg、2.0mmol)を加えた後、MeOH(0.1mL)を加えた。反応混合物を室温で10分間攪拌した後、還流温度に45分間加熱した。周囲温度に冷却した時点で、混合物を CH_2Cl_2 (20mL)および水(2.0mL)で希釈した。有機層を分離し、ブラインで2回(5.0mL)洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β -D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-6-クロロ-7-ヒドロキシメチル-7-デアザプリン4(0.12g、45%)を白色泡状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

δ 8.62 (s, 1 H, H-8), 7.61 (s, 1 H, H-2), 6.75 (dd, 1 H, $J = 6.0$ および 7.2 Hz, H-1'), 4.96 (AB d, 1 H, $J = 11.6$ Hz, 7- CH_2a), 4.91 (AB d, 1 H, $J = 11.6$ Hz, 7- CH_2b), 4.57 (m, 1 H, H-4'), 4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.80 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.44 (m, 1 H, H-2'a), 2.04 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (2 s, 18 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.11 (2 s, 12 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)

20

【0 2 3 3】

化合物4(30mg、0.057mmol)の CH_2Cl_2 (2.0mL)溶液にn-Bu₄NBr(9mg、0.029mmol)、2-ニトロベンジルブロミド(37mg、0.17mmol)およびNaOH溶液(1M、2.0mL)を加えた。反応混合物を暗所中室温で48時間激しく攪拌した。有機層を分離し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β -D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-6-クロロ-7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザプリン5(19mg、50%)を粘稠油状物として得た。

30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.63 (s, 1 H, H-

2), 8.06 (dd, 1 H, $J = 8.4$ および 1.2 Hz, Ph-H), 7.84 (d, 1 H, $J = 7.6$ Hz, Ph-H), 7.64 (s, 1 H, H-8), 7.62 (m, 1 H, Ph-H), 7.43 (t, 1 H, Ph-H), 6.75 (dd, 1 H, $J = 7.2$ および 6.0 Hz, H-1'), 5.03 (s, 2 H, PhCH_2), 4.95 (AB d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 7- CH_2a), 4.88 (AB d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 7- CH_2b), 4.59 (m, 1 H, H-4'), 4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.80 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.48 (m, 1 H, H-2'a), 2.37 (m, 1 H, H-2'b), 0.92 (2 s, 18 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.11 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.10 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)

40

【0 2 3 4】

化合物5(18mg、0.028mmol)のTHF(1.0mL)溶液にn-Bu₄NF(17mg、0.054mmol)のTHF(1.0mL)溶液を0°Cで加えた。反応混合物を室温に徐々に昇温させ、2時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、1,4-ジオキササン(2.0mL)に溶解させた後、MeOH中 NH_3 溶液(7M、4.0mL)を加えた。混合物を封管に移し、100°Cで16時間攪拌した後、室温に冷却し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン6(10mg、91%)を白色泡状物として得た。

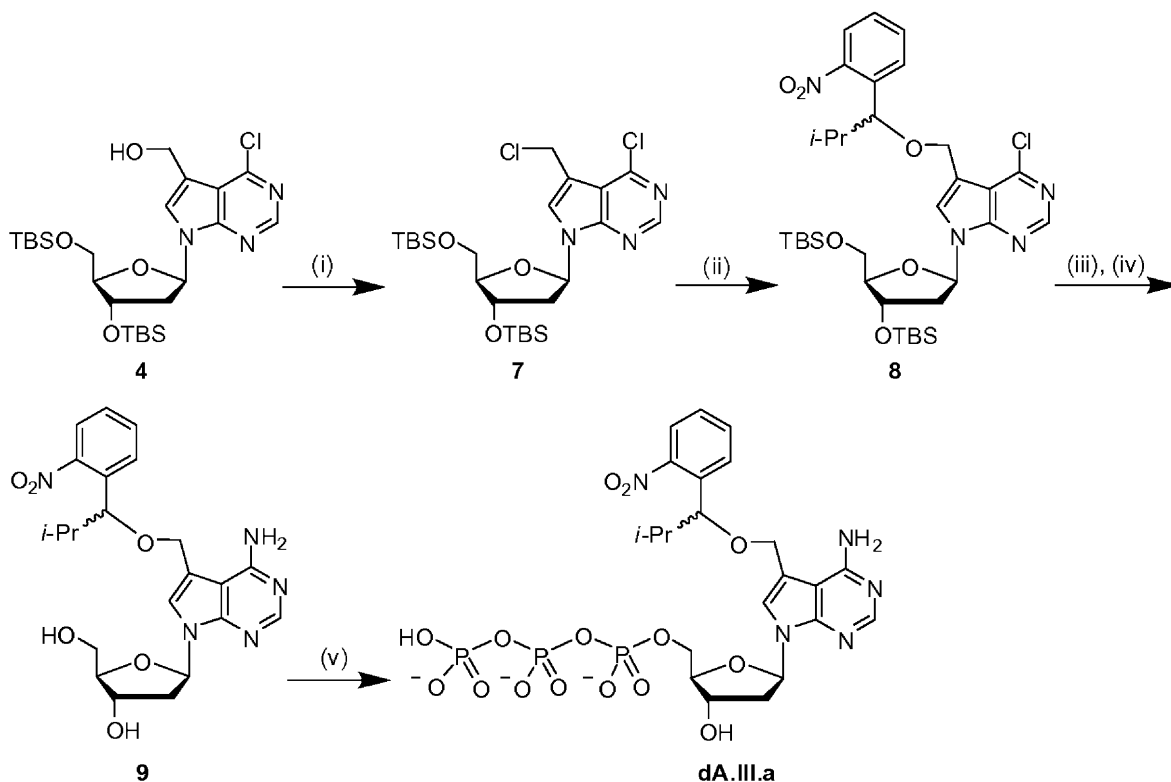
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.08 (s, 1 H, H-2), 8.06 (m, 1 H, Ph-H), 7.75 (m, 2 H, Ph-H), 7.58 (m, 1 H, Ph-H), 7.42 (s, 1 H, H-8), 6.64 (bs, 2 H, D_2O 交換可能, 6-NH₂), 6.48 (dd, 1 H, $J = 2.0$ および 6.0 Hz, H-1'), 5.25 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, D_2O 交換可能, 3'-OH), 5.08 (t, 1 H, $J = 5.6$ Hz, D_2O 交換可能, 5'-OH), 4.90 (s, 2 H, PhCH₂), 4.75 (AB dd, 2 H, 7-CH₂), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 3.81 (m, 1 H, H-4'), 3.54 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.47 (m, 1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b)

【0235】

化合物6(6mg、0.014mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.25mL)中 POCl_3 (2.6 μL 、0.028mmol)およびプロトンスポンジ(6mg、0.028mmol)によって-40℃で4時間リン酸化した。ビス-トリ-*n*-ブチルアンモニウムピロホスフェート(66mg、0.14mmol)およびトリ-*n*-ブチルアミン(28 μL)の無水DMF(0.28mL)溶液を加えた。30分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(1M、pH 7.5; 1.0mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を水(2.0mL)に溶解させ、濾過し、RP-HPLC(上記参照)を使用して精製して7-(2-ニトロ-ベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸dA.Iを得た。HRMS(ESI): 分子イオン $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_3$ [M-H]⁻について、計算質量は654.0403、実測質量は654.0397であった。

【0236】

7-[1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸



スキームS7 7-[1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) TsCl 、DMAP、 CH_2Cl_2 、室温、39%; (ii) ラセミ(R/S)-1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロパノール、未希釈、105℃、54%; (iii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ 、THF、0℃～室温; (iv) NH_3 、1,4-ジオキサン/MeOH、100℃、2工程で76%; (v) POCl_3 、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、-40℃～0℃; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、DMF; 1M HN Et_3HCO_3 。

【0237】

化合物4(0.26g、0.49mmol)の無水 CH_2Cl_2 (12mL)溶液に4-ジメチルアミノピリジン(DMAP;

0.15g、1.2mmol)および塩化トシル(0.11g、0.58mmol)を加えた。反応混合物を室温で18時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β-D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-6-クロロ-7-クロロメチル-7-デアザプリン7(0.103g、39%)を粘稠油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.64 (s, 1 H,

H-2), 7.72 (s, 1 H, H-8), 6.73 (t, 1 H, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 4.95 (AB d, $J = 12.4$ Hz, 7-CH_{2a}), 4.91 (AB d, $J = 12.0$ Hz, 7-CH_{2b}), 4.58 (m, 1 H, H-3'), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.82 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.41 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.95 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.93 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.12 (s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.11 (s, 6 H, (CH₃)₂Si)

10

【0238】

化合物7(54mg、0.10mmol)およびラセミ(R/S)-1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロパノール(191mg、0.98mmol)を無水CH₂Cl₂(10mL)に溶解させた。溶媒を減圧除去し、残渣を窒素雰囲気下で1時間加熱した後、最小量の酢酸エチルに溶解させ、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β-D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-6-クロロ-7-[1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン8(38mg、54%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

ジアステレオマーの $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.60 および 8.59 (2 s, 1 H,

H-2), 7.83 (m, 1 H, Ph-H), 7.79 (m, 1 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 7.48 および 7.47 (2 s, 1 H, H-8), 7.38 (m, 1 H, Ph-H), 6.70 (m, 1 H, H-1'), 4.81 (m, 1 H, Ph-CH), 4.70 (m, 1 H, 7-CH_{2a}), 4.58 (m, 2 H, 7-CH_{2b} および H-3'), 3.99 (m, 1 H, H-4'), 3.78 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.48 (m, 1 H, H-2'a), 2.35 (m, 1 H, H-2'b), 1.96 (m, 1 H, CH), 0.98 および 0.96 (2 d, 3 H, CH₃), 0.93 (2 s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.89 (2 s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.82 および 0.78 (2 d, 3 H, CH₃), 0.12 (2 s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.08 および 0.07 (2 s, 3 H, (CH₃)₂Si), 0.06 および 0.05 (2 s, 3 H, (CH₃)₂Si)

20

【0239】

化合物8(38mg、0.05mmol)のTHF(2.0mL)溶液にn-Bu₄NF(44mg、0.14mmol)のTHF(2.0mL)溶液を0℃で加えた。反応液を室温に徐々に昇温し、2時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、1,4-ジオキサン(4.0mL)に溶解させた後、MeOH中NH₃溶液(7M、8.0mL)を加えた。混合物を封管に移し、100℃で24時間攪拌し、室温に冷却した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン9(19mg、76%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

30

ジアステレオマーの

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.06 および 8.04 (2 s, 1 H, H-2), 7.90 (m, 1 H, Ph-H), 7.67 (m, 2 H, Ph-H), 7.56 (m, 2 H, Ph-H), 7.19 および 7.16 (2 s, 1 H, H-8), 6.63 (bs, 2 H, D₂O 交換可能, 6-NH₂), 6.39 (m, 1 H, H-1'), 5.23 (m, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 5.00 (m, 1 H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.72 (2 d, 1 H, Ph-CH), 4.45 (s, 2 H, 7-CH₂), 4.30 (m, 1 H, H-3'), 3.77 (m, 1 H, H-4'), 3.49 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.40 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b), 1.94 (m, 1 H, CH), 0.87 (m, 3 H, CH₃), 0.74 (m, 3 H, CH₃)

40

【0240】

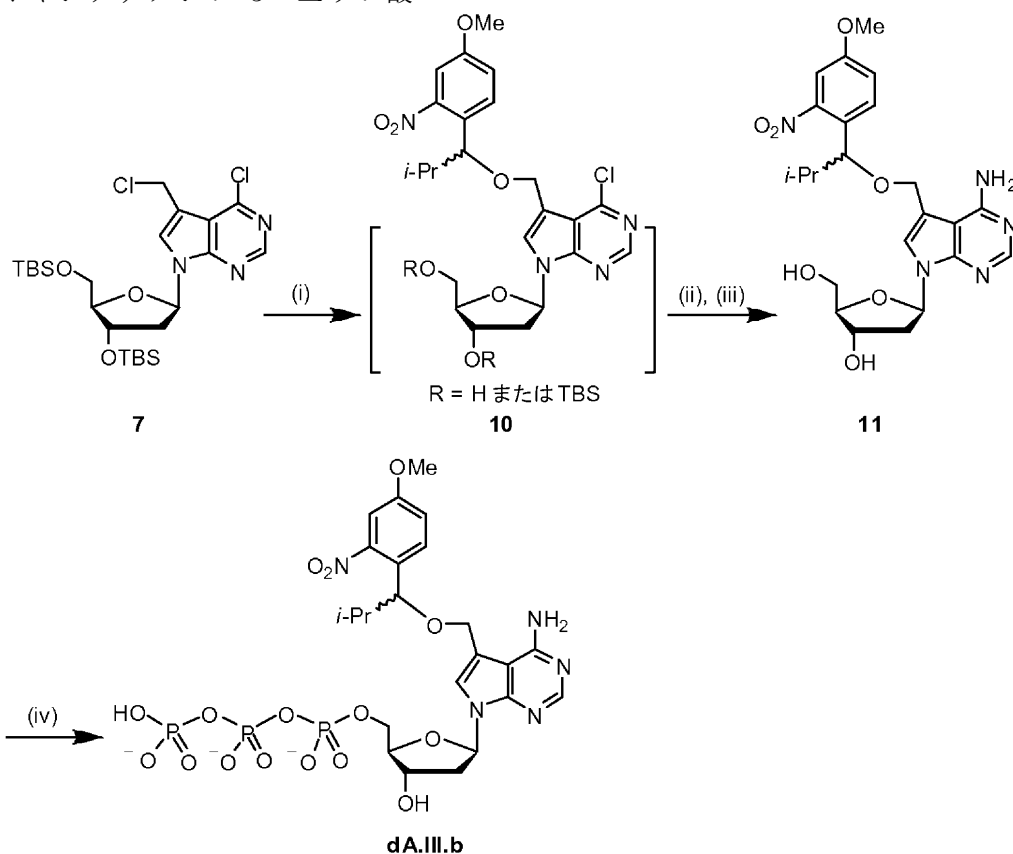
化合物9(19mg、0.041mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.4mL)中POCl₃(16 μL、0.16mmol)およびプロトンスポンジ(18mg、0.082mmol)によって-40℃で5時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(97mg、0.20mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(40 μL)の無水DMF(0.40mL)溶液を加えた。30分間攪拌後、炭酸水素トリエチル

50

アンモニウム緩衝液(1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を水(5.0mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[1-(2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸dA.II I.aを2つのジアステレオマーの1:1混合物として得て、これをRP-HPLCを使用して分離して単一のジアステレオマーdA.III.a ds1およびdA.III.a ds2を得た。いずれの場合でも、RP-HPLCによってジアステレオマー1(ds1)がジアステレオマー2(ds2)よりも速く溶離された。HRMS(ESI): 分子イオン $C_{22}H_{29}N_5O_{15}P_3$ [M-H]⁻について、計算質量は696.0873、実測質量は696.0864であった。

【0241】

7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸



スキームS8 7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) ラセミ(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール、108℃; (ii) n-Bu₄NF、THF、0℃～室温; (iii) NH₃、1,4-ジオキサン/MeOH、100℃、3工程で32%; (iv) POCl₃、(MeO)₃PO、0℃; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

【0242】

化合物7(103mg、0.19mmol)およびラセミ(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール(428mg、1.9mmol)を無水CH₂Cl₂(3.0mL)に溶解させた。溶媒を減圧除去し、残渣を窒素雰囲気下108℃で30分間加熱し、室温に冷却し、最小量の酢酸エチルに溶解させ、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して6-クロロ-7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン2'-デオキシリボヌクレオシド10を得た。試料をTHF(8.0mL)に溶解させ、0℃に冷却した後、n-Bu₄NF(68mg、0.22mmol)のTHF(2.0mL)溶液に加えた。反応液を室温に徐々に昇温させ、30分間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、1,4-ジオキサン(8.0mL)に溶解させた後、MeOH中NH₃(7N、24mL)を加えた。混合物を封管に移し、100℃で16時間攪拌した後、室温に冷却し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチ

ル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン11(30mg、3工程で32%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

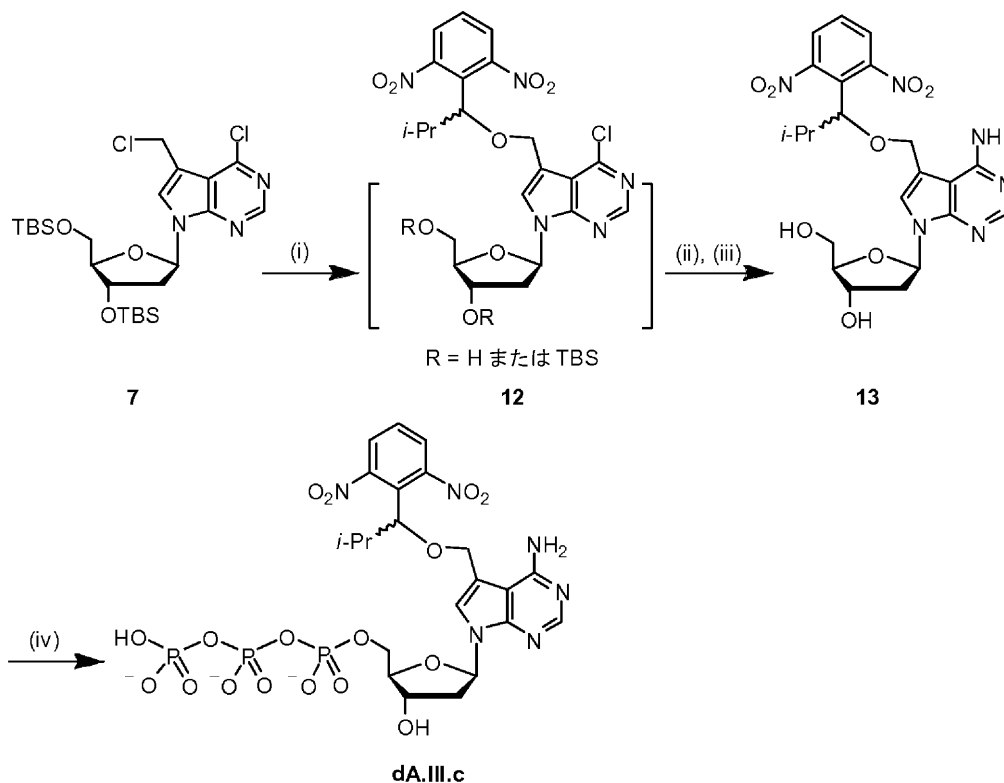
ジアステレオマーの¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.06 および 8.05 (2 s, 1 H, H-2), 7.57 および 7.54 (2 d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-H), 7.47 および 7.44 (2 d, 1 H, *J* = 2.6 Hz, Ph-H), 7.33 および 7.27 (2 dd, *J* = 8.8 および 2.6 Hz, 1 H, Ph-H), 7.18 および 7.15 (2 s, 1 H, H-8), 6.63 (bs, 2 H, D₂O 交換可能, 6-NH₂), 6.43 (m, 1 H, H-1'), 5.24 (m, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 5.03 (m, 1 H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.55 (m, 2 H, Ph-CH, 7-CH₂a), 4.30 (m, 2 H, 7-CH₂b および H-3'), 3.86 および 3.84 (2 s, 3 H, MeO), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.48 (m, 2 H, H-5'), 2.45 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b), 1.93 (m, 1 H, CH(CH₃)₂), 0.88 (m, 3 H, CH₃), 0.74 および 0.71 (2 d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, CH₃)

【0243】

化合物11(28mg、0.06mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(11 μL、0.12mmol)およびプロトンスポンジ(25mg、0.12mmol)によって0°Cで2時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(10mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸dA.III.bを2つのジアステレオマーの1:1混合物として得て、これをRP-HPLCを使用して分離して単一のジアステレオマーdA.III.b ds1およびdA.III.b ds2を得た。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₃H₃₁N₅O₁₆P₃[M-H]⁻について、計算質量は726.0979、実測質量は726.0984であった。

【0244】

7-[1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸



スキームS9 7-[1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'

'-デオキシ-アデノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件：(i) ラセミ(R/S)-1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール、108℃；(ii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ 、THF、0℃～室温；(iii) NH_3 、1,4-ジオキサン/MeOH、100℃、3工程で38%；(iv) POCl_3 、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、0℃； $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、DMF；1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

【0245】

化合物7(109mg、0.20mmol)およびラセミ(R/S)-1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-1-プロパノール(448mg、1.9mmol)を無水 CH_2Cl_2 (10mL)に溶解させた。溶媒を減圧除去し、残渣を窒素雰囲気下108℃で30分間加熱した後、最小量の酢酸エチルに溶解させ、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して6-クロロ-7-[1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン-2'-デオキシリボ-ヌクレオシド12を得た。試料をTHF(5.0mL)に溶解させ、0℃に冷却した後、 $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ (31mg、0.10mmol)のTHF(2.0mL)溶液に加えた。反応液を室温に徐々に昇温し、2時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、1,4-ジオキサン(4.0mL)に溶解させた後、MeOH中 NH_3 (7N、18mL)を加えた。混合物を封管に移し、100℃で36時間攪拌し、室温に冷却した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン13(38mg、3工程で38%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

ジアステレオマーの $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.17 (m,

1 H, Ph-H), 8.07 および 8.06 (2 s, 1 H, H-2), 7.85 (m, 1 H, Ph-H), 7.69 (m, 1 H, Ph-H), 7.20 および 7.18 (2 s, 1 H, H-8), 6.57 (bs, 2 H, D_2O 交換可能, 6- NH_2), 6.46 (m, 1 H, H-1'), 5.26 (d, J = 3.6 Hz, 1 H, D_2O 交換可能, 3'-OH), 5.01 (m, 1 H, D_2O 交換可能, 5'-OH), 4.60 (m, 2 H, Ph-CH および 7- CH_2a), 4.29 (m, 1 H, 7- CH_2b), 4.13 (m, 1 H, H-3'), 3.80 (m, 1 H, H-4'), 3.51 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.49 (m, 1 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_3$), 2.16 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.91 (m, 3 H, CH_3)

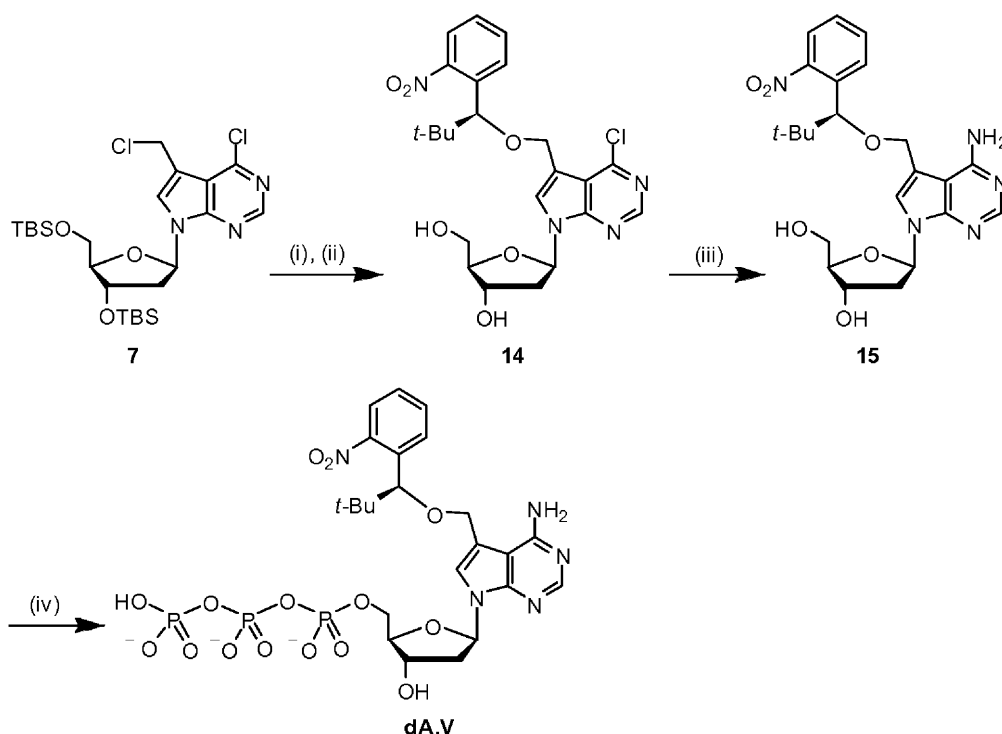
ToF-MS(ESI)：分子イオン $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_8$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ について、計算質量は503.1890、実測質量は503.2029であった。

【0246】

化合物13(30mg、0.06mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.4mL)中 POCl_3 (17 μL 、0.18mmol)およびプロトンスポンジ(26mg、0.12mmol)によって0℃で4時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(285mg、0.6mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(120 μL)の無水DMF(1.2mL)溶液を加えた。30分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(10mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[1-(2,6-ジニトロフェニル)-2-メチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸dA.III.cを2つのジアステレオマーの1:1混合物として得て、これをRP-HPLCを使用して分離して単一のジアステレオマーdA.III.c ds1およびdA.III.c ds2を得た。HRMS(ESI)：分子イオン $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_{17}\text{P}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ について、計算質量は741.0724、実測質量は741.0731であった。

【0247】

7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸



スキームS10 7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) (S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110°C; (ii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ 、THF、室温; 2工程で75%; (iii) NH_3 、1,4-ジオキサン/MeOH、100°C、93%; (iv) POCl_3 、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、DMF; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

【0248】

化合物7(130mg、0.24mmol)および(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(290mg、1.4mmol)を窒素雰囲気下110°Cで45分間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、THF(10mL)に溶解させた後、 $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ (189mg、0.60mmol)を加えた。混合物を室温で2時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を CH_2Cl_2 (20mL)に溶解させ、ブライン(30mL)で洗浄し、水相を CH_2Cl_2 (20mL)で2回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して6-クロロ-9-[β -D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン14(90mg、75%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.51 (s, 1 H, H-2), 7.68 (m, 2 H, Ph-H),

7.45 (t, 1 H, $J = 7.2$ Hz, Ph-H), 7.38 (s, 1 H, H-8), 7.29 (t, 1 H, $J = 7.2$ Hz, Ph-H), 6.39 (dd, 1

H, $J = 6.0$ および 8.0 Hz, H-1'), 4.97 (s, 1 H, Ph-CH), 4.70 (m, 3 H, 7- CH_2 および H-3'), 4.16 (m, 1 H, H-4'), 3.83 (m, 2 H, H-5'), 2.80 (m, 1 H, H-2'a), 2.35 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 (s, 9 H,

$\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0249】

化合物14(90mg、0.18mmol)を1,4-ジオキサン(8.0mL)に溶解させた後、MeOH中 NH_3 (7N、16mL)を加えた。混合物を封管に移し、100°Cで24時間攪拌し、室温に冷却した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン15(80mg、93%)を得た。

¹H NMR (400

MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.09 (s, 1 H, H-2), 7.91 (dd, 1 H, *J* = 1.2 および 8.0 Hz, Ph-H), 7.71 (m, 2 H, Ph-H), 7.58 (m, 1 H, Ph-H), 7.24 (s, 1 H, H-8), 6.68 (bs, 2 H, D₂O 交換可能, 6-NH₂), 6.46 (dd, 1 H, *J* = 6.0 および 8.0 Hz, H-1'), 5.27 (d, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 5.06 (t, 1 H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.87 (s, 1 H, Ph-CH), 4.65 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH₂a), 4.49 (m, 1 H, H-3'), 4.36 (d, 1 H, 7-CH₂b), 3.80 (m, 1 H, H-4'), 3.49 (m, 2 H, H-5'), 2.45 (m, 1 H, H-2'a), 2.17 (m, 1 H, H-2'b), 0.75 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

10

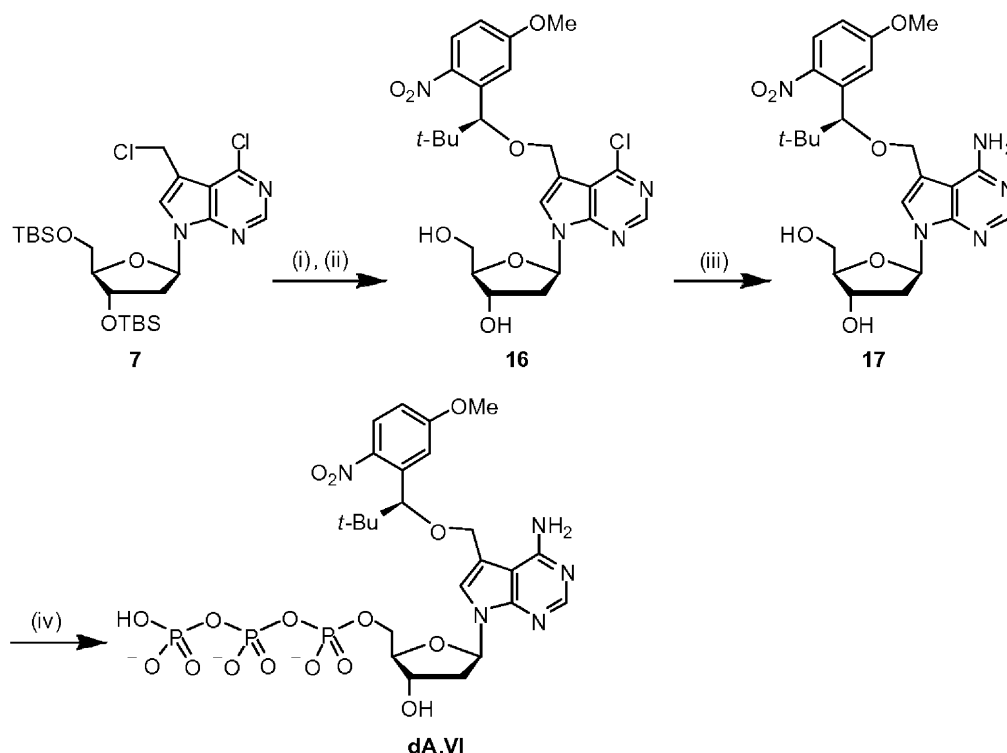
【0250】

化合物15(25mg、0.053mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(22 μL、0.24mmol)およびプロトンスポンジ(23mg、0.11mmol)によって0℃で4.5時間リン酸化した。ビス-トリ-*n*-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-*n*-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸dA.Vを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。HRMS(ESI) : 分子イオンC₂₃H₃₁N₅O₁₅P₃[M-H]⁻について、計算質量は710.1029、実測質量は710.1032であった。

20

【0251】

7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸



30

40

スキームS11 7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) (S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110℃; (ii) *n*-Bu₄NF、THF、室温; 2工程で78%; (iii) NH₃、1,4-ジオキサン/MeOH、100℃、74%; (iv) POCl₃、(MeO)₃PO、0℃; (*n*-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、*n*-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

50

【0252】

化合物7(165mg、0.30mmol)および(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(330mg、1.4mmol)を窒素雰囲気下110℃で45分間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、THF(10mL)に溶解させた後、n-Bu₄NF(236mg、0.75mmol)を加えた。混合物を室温で2時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(40mL)に溶解させ、ブライン(50mL)で洗浄し、水相をCH₂Cl₂(40mL)で2回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して6-クロロ-9-[β-D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン16(122mg、78%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (s,

10

1 H, H-2), 7.79 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.35 (s, 1 H, H-8), 7.15 (d, 1 H, *J* = 3.2 Hz, Ph-H), 6.68 (dd, 1 H, *J* = 3.2 および 9.2 Hz, Ph-H), 6.33 (dd, 1 H, *J* = 5.6 および 8.8 Hz, H-1'), 5.26 (s, 1 H, Ph-CH), 4.85 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, 7-CH₂a), 4.75 (m, 1 H, H-3'), 4.70 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, 7-CH₂b), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.95 (m, 1 H, H-5'a), 3.83 (s, 3 H, OCH₃), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.86 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 0.83 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

【0253】

化合物16(120mg、0.23mmol)を1,4-ジオキサン(10mL)に溶解させた後、MeOH中NH₃(7N、10mL)を加えた。混合物を封管に移し、100℃で24時間攪拌した後、室温に冷却し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン17(87mg、74%)を得た。

20

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.06 (s, 1 H, H-2), 7.97 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.22 (s, 1 H, H-8), 7.08 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 7.05 (dd, 1 H, *J* = 2.8 および 9.2 Hz, Ph-H), 6.66 (bs, 2 H, D₂O 交換可能, 6-NH₂), 6.42 (dd, 1 H, *J* = 6.0 および 8.0 Hz, H-1'), 5.25 (d, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 5.15 (s, 1 H, Ph-CH), 5.03 (t, 1 H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.64 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH₂a), 4.43 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH₂b), 4.30 (m, 1 H, H-3'), 3.84 (s, 3 H, OCH₃), 3.77 (m, 1 H, H-4'), 3.45 (m, 2 H, H-5'), 2.43 (m, 1 H, H-2'a), 2.14 (m, 1 H, H-2'b), 0.75 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

30

【0254】

化合物17(21mg、0.042mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(40 μL、0.43mmol)およびプロトンスポンジ(18mg、0.084mmol)によって0℃で7.5時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸dA.VIを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₄H₃₃N₅O₁₆P₃[M-H]⁻について、計算質量は740.1135、実測質量は740.1156であった。

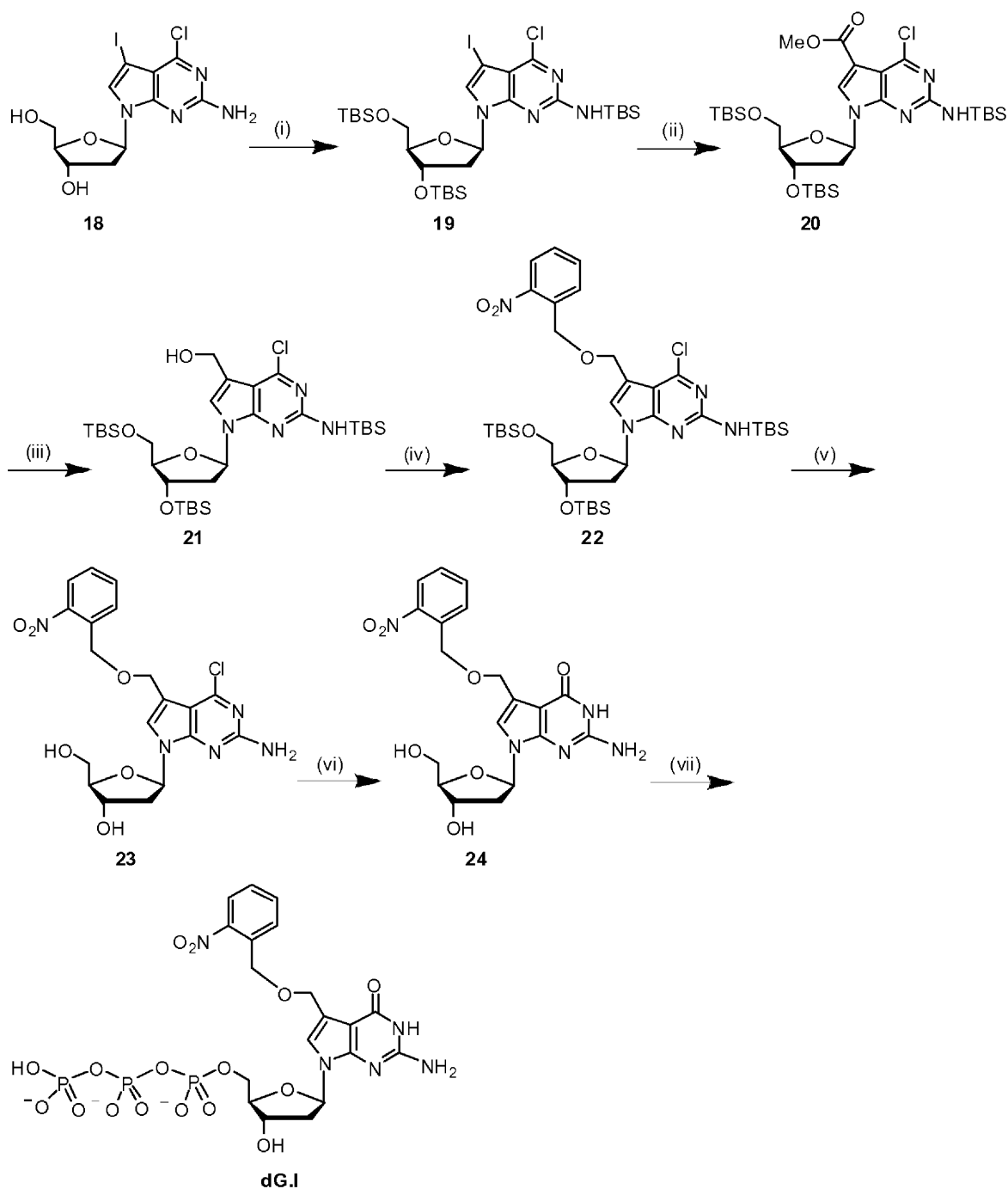
40

【0255】

実施例4

7-HOMe-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン三リン酸類似体の合成

7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸



スキームS12 7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) TBSCl、イミダゾール、DMF、室温、60%; (ii) CO、PdCl₂[PhCN]₂、MeOH/1,4-ジオキサン、50°C、91%; (iii) LiBH₄、MeOH、THF、還流、54%; (iv) 2-ニトロベンジルブロミド、n-Bu₄NBr、CH₂Cl₂/NaOH水溶液、室温、48%; (v) n-Bu₄NF、THF、0°C~室温、95%; (vi) DABCO、H₂O、還流、30%; (vii) POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

【0256】

化合物18(参照により本明細書に組み入れられるSeela and Peng, 2005)(1.35g、3.29mmol)を無水ピリジン(3.0mL)から3回蒸発させた後、無水DMF(6.0mL)に溶解させた。tert-ブチルジメチルシリルクロリド(5.95g、39.5mmol)およびイミダゾール(5.37g、78.9mmol)を加え、混合物を50°Cで48時間攪拌し、さらなるtert-ブチルジメチルシリルクロリド(2.97g、19.7mmol)およびイミダゾール(2.69g、39.4mmol)を6時間ごとに加えた。反応混合物を減圧濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β-D-3',5'-0-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-2-(tert-ブチルジメチルシリル)アミ

ノ-6-クロロ-7-ヨード-7-デアザプリン19(1.48g、収率60%)を白色泡状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.35

(s, 1 H, H-8), 6.53 (t, 1 H, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 4.70 (s, 1 H, 2-NH), 4.47 (m, 1 H, H-3'), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.78 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.23 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.98 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.95 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.90 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.29 (2 s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.13 (2 s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.09 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)

【0257】

化合物19(720mg、0.96mmol)の溶液を無水1,4-ジオキサン(30mL)に溶解させた。無水MeOH(30mL)およびトリエチルアミン(0.58mL)を加え、混合物をCO雰囲気下10分間攪拌した後、ビス(ベンゾニトリル)ジクロロパラジウム(II)(20mg、0.05mmol)を加えた。反応液をCO雰囲気下58℃で24時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β -D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-2-(tert-ブチルジメチルシリル)アミノ-6-クロロ-7-メトキシカルボニル-7-デアザプリン20(600mg、91%)を粘稠油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.92 (s, 1 H,

H-8), 6.57 (dd, 1 H, $J = 8.0$ および 6.0 Hz, H-1'), 4.78 (s, 1 H, 2-NH), 4.49 (m, 1 H, H-3'), 4.02 (m, 1 H, H-4'), 3.85 (s, 3 H, CH_3), 3.81 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.25 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.98 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.93 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.92 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.31 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.13 (2 s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.11 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)

【0258】

化合物20(1.11g、1.63mmol)の無水THF(56mL)溶液に水素化ホウ素リチウム(143mg、6.5mmol)を加えた後、MeOH(0.94mL)を加えた。反応混合物を還流温度に1時間加熱した。周囲温度で冷却した時点で、反応混合物を CH_2Cl_2 (700mL)で希釈し、水(70mL)で反応停止させた。有機相を分離し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β -D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-2-(tert-ブチルジメチルシリル)アミノ-6-クロロ-7-ヒドロキシメチル-7-デアザプリン21(0.58g、54%)を粘稠油状物として得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.16 (s, 1 H,

H-8), 6.56 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 4.79 (AB d, $J = 13.6$ Hz, 7- CH_2a), 4.75 (AB d, $J = 13.6$ Hz, 7- CH_2b), 4.70 (s, 1 H, 2-NH), 4.50 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.76 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.23 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.98 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.94 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.92 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.30 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.29 (s, 3 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.11 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.10 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)

【0259】

化合物21(150mg、0.23mmol)の CH_2Cl_2 (3.0mL)溶液にn-Bu₄NBr(37mg、0.12mmol)、2-ニトロベンジルブロミド(148mg、0.68mmol)およびNaOH溶液(1M、3.0mL)を加えた。反応混合物を暗所中室温で2日間激しく攪拌した。有機相を分離し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して9-[β -D-3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-2'-デオキシリボフラノシル]-2-(tert-ブチルジメチルシリル)アミノ-6-クロロ-7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザプリン22(87mg、48%)を粘稠油状物として得た。

¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃): δ 8.06 (dd, 1H, *J* = 8.0 および 1.2 Hz, Ph-H), 7.87 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ph-H), 7.61 (dt, 1 H, *J* = 7.6 および 1.2 Hz, Ph-H), 7.43 (m, 1 H, Ph-H), 7.20 (s, 1 H, H-8), 6.56 (dd, 1 H, *J* = 7.6 および 6.0 Hz, H-1'), 4.99 (s, 2 H, PhCH₂), 4.83 (AB d, 1 H, *J* = 11.4 Hz, 7-CH₂a), 4.75 (AB d, 1 H, *J* = 11.4 Hz, 7-CH₂b), 4.67 (s, 1 H, 2-NH), 4.50 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.77 (m, 2 H, H-5'a および H-5'b), 2.25 (m, 2 H, H-2'a および H-2'b), 0.98 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.92 (s, 18 H, (CH₃)₃CSi), 0.30 (s, 3 H, (CH₃)₂Si), 0.29 (s, 3 H, (CH₃)₂Si), 0.09 (m, 12 H, (CH₃)₂Si)

【0 2 6 0】

10

化合物22(105mg、0.13mmol)のTHF(3.0mL)溶液にn-Bu₄NF(123mg、0.39mmol)のTHF(2.0mL)溶液を0°Cで滴下した。反応混合物を0°Cで1時間、次に室温で2時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-クロロ-9-[β-D-2'-デオキシ-リボフラノシル]-7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザプリン23(57mg、95%)を黄色泡状物として得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ, 8.02 (m, 1 H, Ph-H),

7.74 (m, 2 H, Ph-H), 7.55 (m, 1 H, Ph-H), 7.41 (s, 1 H, H-8), 6.73 (s, 2 H, D₂O 交換可能, NH₂), 6.41 (dd, 1 H, *J* = 8.4 および 6.0 Hz, H-1'), 5.26 (d, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 4.91 (t, 1 H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.88 (s, 2 H, Ph-CH₂), 4.66 (dd, 2 H, *J* = 11.6 Hz, 7-CH₂), 4.31 (m, 1 H, H-3'), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.50 (m, 2 H, H-5'), 2.38 (m, 1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b)

【0 2 6 1】

20

23(38mg、0.085mmol)および1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン(11mg、0.1mmol)の水(4.0mL)中混合物を窒素雰囲気下、還流温度に4時間加熱した。水を減圧除去し、残渣をMeOH(3.0mL)から3回蒸発させ、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン24(11mg、30%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.4 (s, 1 H,

D₂O 交換可能, N-H), 8.03 (dd, 1 H, *J* = 8.4 および 0.8 Hz, Ph-H), 7.83 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 7.73 (m, 1 H, Ph-H), 7.55 (m, 1 H, Ph-H), 6.92 (s, 1 H, H-8), 6.28 (m, 1 H, H-1'), 6.26 (bs, 2 H, D₂O 交換可能, NH₂), 5.21 (d, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 4.89 (t, 1 H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.88 (s, 2 H, Ph-CH₂), 4.60 (dd, 2 H, 7-CH₂), 4.28 (m, 1 H, H-3'), 3.74 (m, 1 H, H-4'), 3.48 (m, 2 H, H-5'), 2.32 (m, 1 H, H-2'a), 2.08 (m, 1 H, H-2'b)

【0 2 6 2】

30

化合物24(11mg、0.025mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.3mL)中POCl₃(15 μL、0.05mmol)およびプロトンスポンジ(11mg、0.05mmol)によって0°Cで2時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(118mg、0.25mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(50 μL)の無水DMF(0.5mL)溶液を加えた。30分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(1M、pH 7.5; 5.0mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を水(10mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸dG.Iを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。HRMS(ESI): 分子イオンC₁₉H₂₃N₅O₁₆P₃[M-H]⁻について、計算質量は670.0353、実測質量は670.0344であった。

【0 2 6 3】

40

7-[1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸

50



30

40

50

20mL)で希釈し、酢酸溶液(0.1M、30mL)、飽和NaHCO₃溶液(30mL)およびブライン(30mL)で順次洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン26(27mg、70%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

ジアステレオマーの¹H NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ 7.79 (m, 1 H, Ph-H),

7.73 (m, 1 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 7.39 (m, 1 H, Ph-H), 6.87 および 6.86 (2 s, 1 H, H-8),

6.30 (m, 1 H, H-1'), 4.99 および 4.97 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.63-4.36 (m, 3 H, 7-CH₂ および H-3'),

3.91 (m, 1 H, H-4'), 3.69 (m, 2 H, H-5'), 2.48 (m, 1 H, H-2'a), 2.20 (m, 1 H, H-2'b), 0.79 および

0.77 (2 s, 9 H, (CH₃)₃)

10

【0 2 6 6】

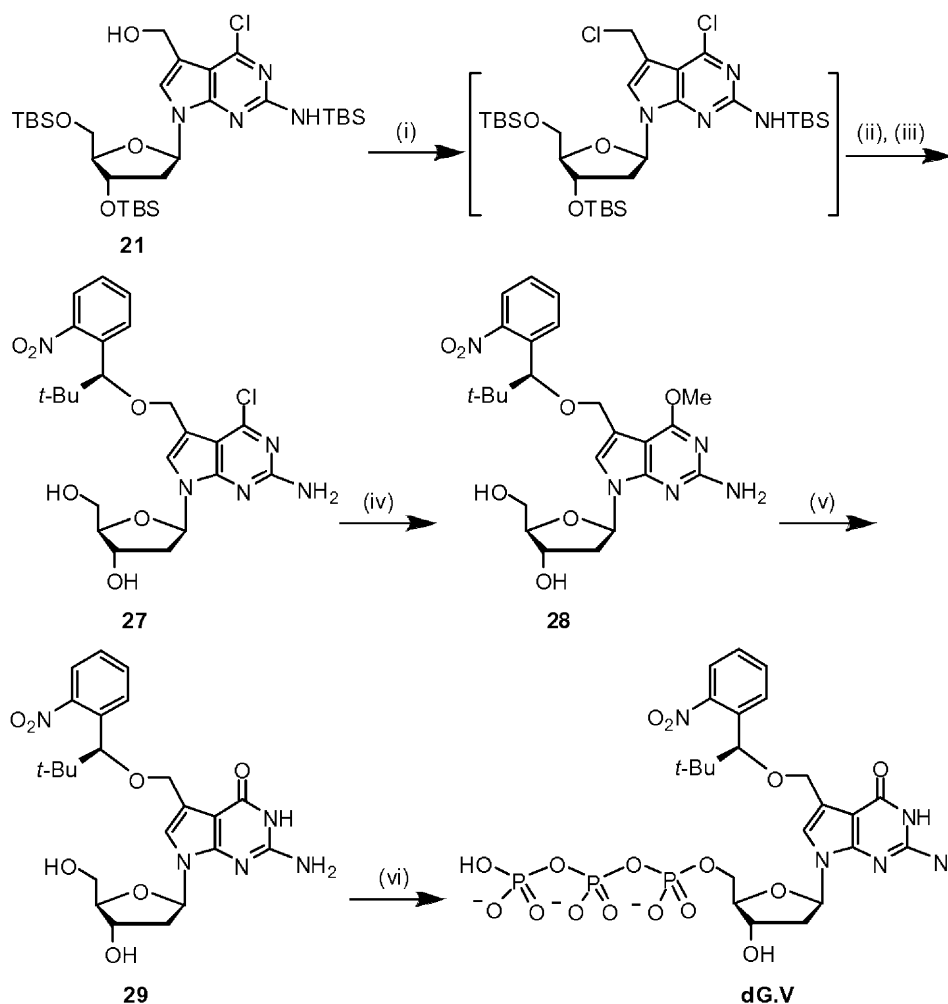
化合物26(25mg、0.05mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(20 μL、0.21mmol)およびプロトンスポンジ(21mg、0.1mmol)によって0°Cで3.5時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて

20

7-[1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸dG.V.aを2つのジアステレオマーの1:1混合物として得て、これをRP-HPLCを使用して分離して単一のジアステレオマーdG.V.a ds1およびdG.V.a ds2を得た。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₃H₃₁N₅O₁₆P₃[M-H]⁻について、計算質量は726.0979、実測質量は726.0992であった。

【0 2 6 7】

7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸



スキームS14 7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシ-グアノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) MsCl, DMAP、 CH_2Cl_2 、 0°C ; (ii) (S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、 115°C ; (iii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ 、THF、室温、3工程で35%; (iv) NaOMe、MeOH、還流、74%; (v) 1,4-ジオキサン、2M NaOH、還流、33%; (vi) POCl_3 、プロトンスポンジ、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、 0°C ; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、DMF; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

【0268】

化合物21(300mg、0.46mmol)の無水 CH_2Cl_2 (10mL)溶液にDMAP(224mg、1.8mmol)およびMsCl(107 μL 、1.4mmol)を窒素雰囲気下 0°C で加えた。反応液を 0°C で10分間攪拌し、 CH_2Cl_2 (20mL)で希釈した。溶液をショートシリカゲルプラグ(2 x 3cm)上に適用し、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン溶媒系(容積比80/20/0.5)で速やかに溶離した。溶離液を減圧濃縮し、残渣を(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(520mg、2.5mmol)と混合した。混合物を窒素雰囲気下 115°C で45分間加熱し、室温に冷却し、THF(20mL)に溶解させ、続いて $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ (491mg、1.6mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を CH_2Cl_2 (20mL)に溶解させ、ブライン(30mL)で洗浄し、水相を CH_2Cl_2 (20mL)で2回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-クロロ-9-[β -D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン27(81mg、3工程で35%)を得た。

^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4): δ 7.79 (m, 2 H, Ph-H), 7.60 (dt, 1 H, $J = 1.2$ および 8.0 Hz, Ph-H), 7.46 (dt, 1 H, $J = 1.2$ および 8.0 Hz, Ph-H), 7.27 (s, 1 H, H-8), 6.47 (dd, 1 H, $J = 6.4$ および 8.0 Hz, H-1'), 4.98 (s, 1 H, Ph-CH), 4.71 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 7-CH₂ a), 4.50 (m, 1 H, H-3'), 4.47 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 7-CH₂ b), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.73 (m, 2 H, H-5'), 2.59 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 0.80 (s, 9 H, (CH₃)₃)

【 0 2 6 9 】

ナトリウムメトキシドのMeOH(0.5M、10mL)溶液に化合物27(104mg、0.21mmol)を溶解させ、混合物を窒素雰囲気下、還流温度に1時間加熱した。反応混合物を室温に冷却し、酢酸で中和した後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-メトキシ-9-[β-D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン28(75mg、74%)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ

7.74 (m, 2 H, Ph-H), 7.52 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.36 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 6.71 (s, 1 H, H-8), 6.47 (dd, 1 H, $J = 5.6$ および 9.6 Hz, H-1'), 5.04 (s, 1 H, Ph-CH), 4.71 (m, 1 H, H-3'), 4.47 (dd, 2 H, $J = 12$ Hz, 7-CH₂), 4.15 (m, 1 H, H-4'), 3.94 (s, 3 H, OCH₃), 3.76 (m, 2 H, H-5'), 3.01 (m, 1 H, H-2'a), 2.19 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 (s, 9 H, (CH₃)₃)

【 0 2 7 0 】

化合物28(70mg、0.14mmol)を1,4-ジオキサン(6.0mL)に溶解させた後、水酸化ナトリウム水溶液(2M、12mL)を加えた。混合物を窒素雰囲気下、還流温度に4日間加熱し、室温に冷却し、希塩酸(1M)で中和し、減圧濃縮した。残渣をMeOH(5.0mL)から3回蒸発させた後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン29(22mg、33%)を得た。出発原料28(42mg、60%)も反応液から回収された。

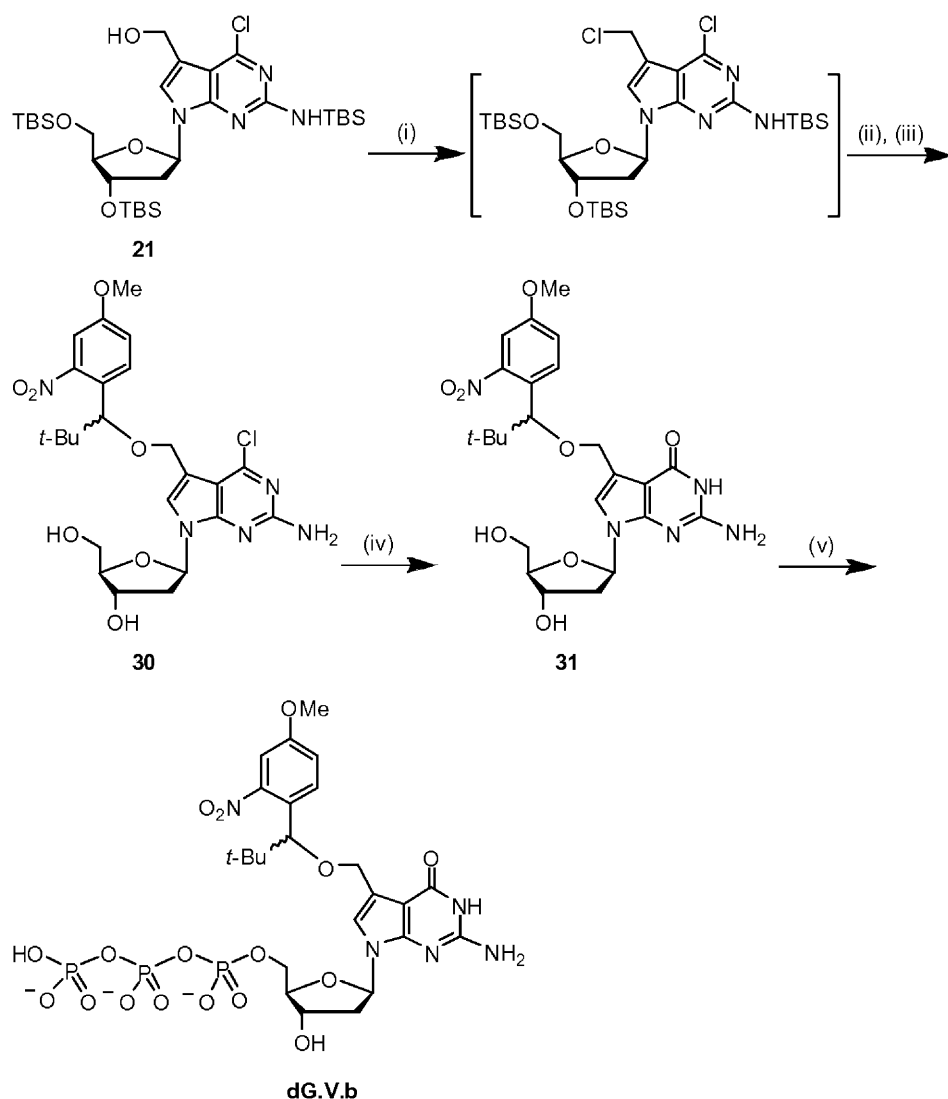
^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 11.02 (br s, 1 H, NH), 7.69 (m, 2 H, Ph-H), 7.52 (t, 1 H, $J = 7.2$ Hz, Ph-H), 7.33 (t, 1 H, $J = 7.2$ Hz, Ph-H), 6.66 (s, 1 H, H-8), 6.13 (t, 1 H, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 6.03 (br s, 2 H, 6-NH₂), 4.92 (s, 1 H, Ph-CH), 4.77 (m, 1 H, H-3'), 4.57 (d, 1 H, $J = 12.8$ Hz, 7-CH₂ a), 4.12 (m, 1 H, H-4'), 3.05 (d, 1 H, $J = 12.8$ Hz, 7-CH₂ b), 3.75 (m, 2 H, H-5'), 2.87 (m, 1 H, H-2'a), 2.29 (m, 1 H, H-2'b), 0.76 (s, 9 H, (CH₃)₃)

【 0 2 7 1 】

化合物29(16mg、0.033mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(17 μL、0.18mmol)およびプロトンスポンジ(14mg、0.066mmol)によって0℃で4時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸dG.Vを得て、RP-HPLC条件を使用してさらに精製した。dG.Vの保持時間は、同一条件を使用するRP-HPLC分析によるdG.V.a ds2のそれと同一であった(データは示さず)。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₃H₃₁N₅O₁₆P₃[M-H]⁻について、計算質量は726.0979、実測質量は726.0986であった。

【 0 2 7 2 】

7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸



スキームS15 7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件：(i) MsCl、DMAP、CH₂Cl₂、0℃；(ii) ラセミ(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、115℃；(iii) n-Bu₄NF、THF、室温、3工程で21%；(iv) syn-ピリジン-2-アルドキシム、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン、1,4-ジオキサン/DMF、70℃、59%；(v) POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0℃；(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF；1M HNEt₃HCO₃。

【0273】

化合物21(470mg、0.72mmol)の無水CH₂Cl₂(5.0mL)溶液にDMAP(346mg、2.8mmol)およびMsCl(165μL、2.1mmol)を窒素雰囲気下0℃で加えた。反応液を0℃で10分間攪拌し、CH₂Cl₂(20mL)で希釈した。溶液をショートシリカゲルプラグ(2 x 3cm)上に適用し、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン溶媒系(容積比80/20/0.5)で速やかに溶離した。溶離液を減圧濃縮し、残渣をラセミ(R/S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(1.6g、6.69mmol)と混合した。混合物を窒素雰囲気下115℃に45分間加熱し、室温に冷却し、THF(20mL)に溶解させ、続いてn-Bu₄NF(788mg、2.5mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(20mL)に溶解させ、ブライン(30mL)で洗浄し、水相をCH₂Cl₂(20mL)で2回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-クロロ-9-[β-D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[(S)-1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]-メチル-7-デアザプリン30(80mg、3工程で21%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

【0274】

化合物30(80mg、0.15mmol)の1,4-ジオキサン(1.0mL)およびDMF(2.0mL)溶液にsyn-ピリミジン-2-アルドキシム(366mg、3.0mmol)および1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(414 μ L、3.3mmol)を加え、混合物を窒素雰囲気下70°Cで終夜加熱した。反応混合物をCH₂Cl₂(20mL)で希釈し、酢酸(0.1M、30mL)、飽和NaHCO₃溶液(30mL)およびブライン(30mL)で順次洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシ-グアニシン31(45mg、59%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

ジアステレオマーの¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.31 (br s, 1 H,

10

D₂O 交換可能, NH), 7.63 および 7.62 (2 d, 1 H, J = 2,8 Hz, Ph-H), 7.41 および 7.40 (2 d, 1 H,

J = 2,8 Hz, Ph-H), 7.27 (m, 1 H, Ph-H), 6.98 および 6.96 (2 s, 1 H, H-8), 6.28 (m, 1 H, H-1'),

6.22 (br s, 2 H, D₂O 交換可能, NH₂), 5.22 (d, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 4.88 (t, 1

H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.73 および 4.71 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.47-4.24 (m, 3 H, 7-CH₂

および H-3'), 3.85 および 3.83 (2 s, 3 H, OCH₃), 3.74 (m, 1 H, H-4'), 3.48 (m, 2 H, H-5'), 2.28 (m,

1 H, H-2'a), 2.06 (m, 1 H, H-2'b), 0.80 および 0.78 (2 s, 9 H, (CH₃)₃)

【0275】

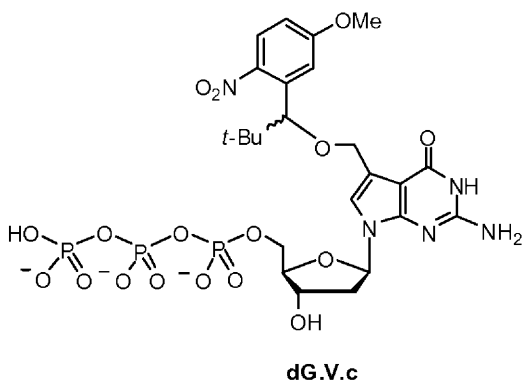
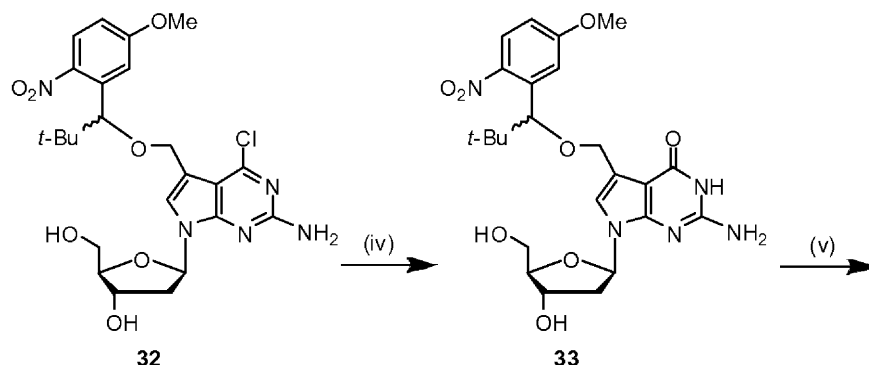
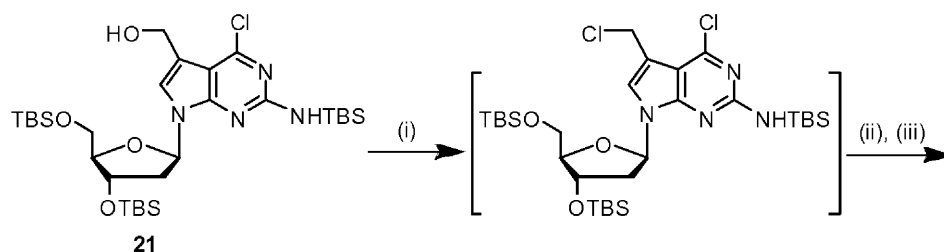
化合物31(25mg、0.048mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(15 μ L、0.18mmol)およびプロトンスポンジ(21mg、0.10mmol)によって0°Cで3.5時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μ L)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[1-(4-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン-5'-三リン酸dG.V.bを2つのジアステレオマーの1:1混合物として得て、これをRP-HPLCを使用して分離して単一のジアステレオマーdG.V.b ds1およびdG.V.b ds2を得た。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₄H₃₃N₅O₁₇P₃[M-H]⁻について、計算質量は756.1084、実測質量は756.1101であった。

20

30

【0276】

7-[1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン-5'-三リン酸



スキームS16 7-[1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件：(i) MsCl、D MAP、CH₂Cl₂、0℃；(ii) ラセミ(R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、115℃；(iii) n-Bu₄NF、THF、室温、3工程で24%；(iv) syn-ピリジン-2-アルドキシム、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン、1,4-ジオキサン/DMF、70℃、57%；(v) POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0℃；(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF；1M HNEt₃HCO₃。

【0277】

化合物21(410mg、0.62mmol)の無水CH₂Cl₂(5.0mL)溶液にDMAP(302mg、2.5mmol)およびMsCl(145μL、1.9mmol)を窒素雰囲気下0℃で加えた。反応液を0℃で10分間攪拌し、CH₂Cl₂(20mL)で希釈した。溶液をショートシリカゲルプラグ(2 x 3cm)上に適用し、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン溶媒系(容積比：80/20/0.5)で速やかに溶離した。溶離液を減圧濃縮し、残渣をラセミ(R/S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(800mg、2.2mmol)と混合した。混合物を窒素雰囲気下115℃で45分間加熱し、室温に冷却し、THF(10mL)に溶解させ、続いてn-Bu₄NF(683mg、3.3mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(20mL)に溶解させ、ブライン(30mL)で洗浄し、水相をCH₂Cl₂(20mL)で2回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-クロロ-9-[β-D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン32(80mg、3工程で24%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

ジアステレオマーの¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.86 および 7.83 (2 d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-H), 7.19 および 7.17 (2 d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.91 および 6.90 (2 s, 1 H, H-8), 6.80 および 6.75 (2 dd, 1 H, *J* = .8 および 8.8 Hz, Ph-H), 6.17 (m, 1 H, H-1'), 5.23 および 5.21 (2 s, 1 H, Ph-CH), 5.01 および 5.00 (2 br s, 2 H, NH₂), 4.73 (m, 1 H, H-3'), 4.65-4.49 (m, 2 H, 7-CH₂), 4.14 (m, 1 H, H-4'), 3.84 (m, 5 H, H-5' および OCH₃), 2.78 (m, 1 H, H-2'a), 2.33 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 および 0.81 (2 s, 9 H, (CH₃)₃)

【 0 2 7 8 】

化合物32(80mg、0.15mmol)の1,4-ジオキサン(1.0mL)およびDMF(2.0mL)溶液にsyn-ピリミジン-2-アルドキシム(360mg、3.0mmol)および1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(414 μL、3.3mmol)を加え、混合物を窒素雰囲気下70℃で終夜加熱した。反応混合物をCH₂Cl₂(20mL)で希釈し、酢酸(0.1M、30mL)、飽和NaHCO₃溶液(30mL)およびブライン(30mL)で順次洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン33(43mg、57%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

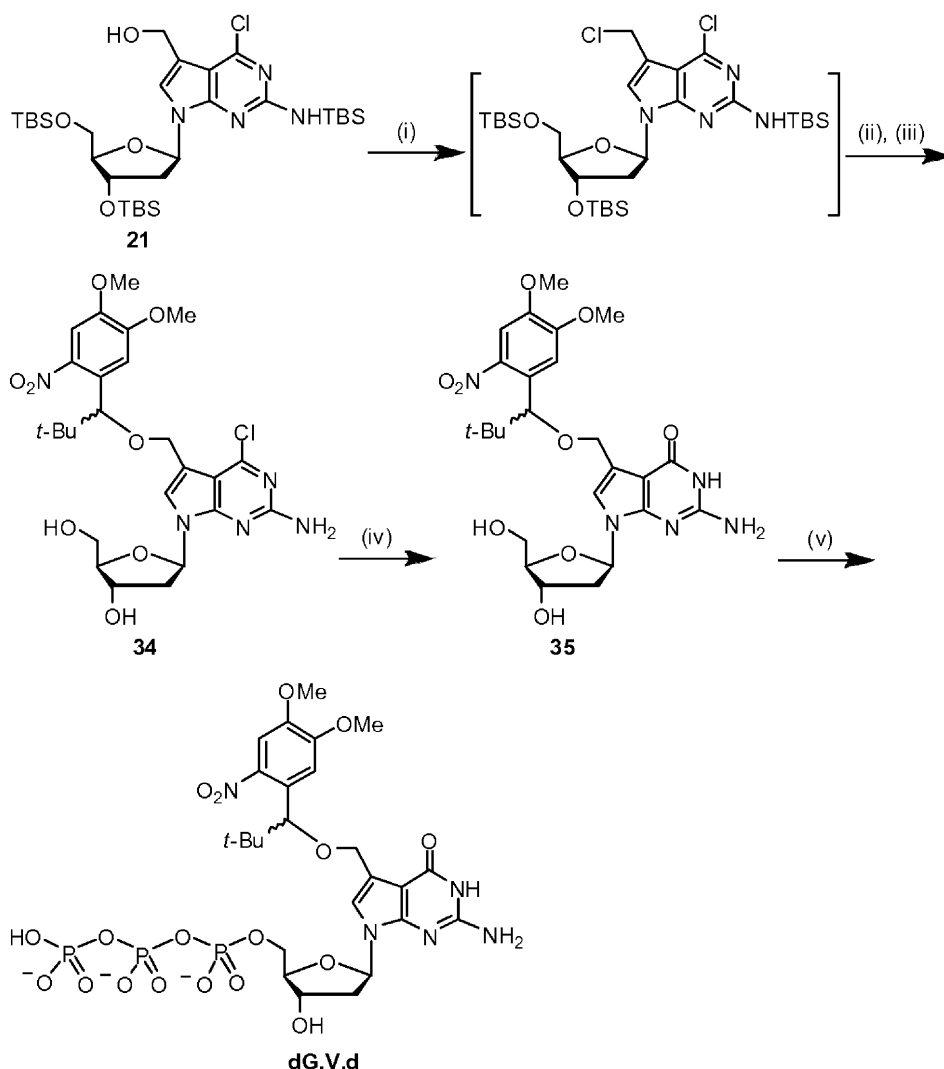
ジアステレオマーの¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.34 (br s, 1 H, D₂O 交換可能, NH), 7.92 および 7.89 (2 d, 1 H, *J* = 8,8 Hz, Ph-H), 7.15 (m, 1 H, Ph-H), 6.95 (m, 1 H, Ph-H), 6.82 および 6.81 (2 s, 1 H, H-8), 6.22 (m, 3 H, 2 H D₂O 交換可能, H-1' および NH₂), 5.19 (d, 1 H, D₂O 交換可能, 3'-OH), 5.12 および 5.10 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.84 (t, 1 H, D₂O 交換可能, 5'-OH), 4.47-4.31 (m, 2 H, 7-CH₂), 4.24 (m, 1 H, H-3'), 3.85 および 3.83 (2 s, 3 H, OCH₃), 3.71 (m, 1 H, H-4'), 3.44 (m, 2 H, H-5'), 2.24 (m, 1 H, H-2'a), 2.01 (m, 1 H, H-2'b), 0.76 および 0.74 (2 s, 9 H, (CH₃)₃)

【 0 2 7 9 】

化合物33(20mg、0.04mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.30mL)中POCl₃(25 μL、0.27mmol)およびプロトンスポンジ(16mg、0.08mmol)によって0℃で6時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン-5'-三リン酸dG.V.cを2つのジアステレオマーの1:1混合物として得て、これをRP-HPLCを使用して分離して単一のジアステレオマーdG.V.c ds1およびdG.V.c ds2を得た。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₄H₃₃N₅O₁₇P₃[M-H]⁻について、計算質量は756.1084、実測質量は756.1088であった。

【 0 2 8 0 】

7-[1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン-5'-三リン酸



スキームS17 7-[1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) MsCl, DMAP, CH₂Cl₂, 0°C; (ii) ラセミ (R/S)-1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール, 115°C; (iii) n-Bu₄NF, THF, 室温, 3工程で23%; (iv) syn-ピリジン-2-アルドキシム, 1,1,3,3-テトラメチルグアニジン, ジオキサン/DMF, 70°C, 68%; (v) POCl₃, プロトンスポンジ, (MeO)₃P=O, 0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1 M HNEt₃HCO₃。

【0281】

化合物21(370mg, 0.56mmol)の無水CH₂Cl₂(5.0mL)溶液にDMAP(273mg, 2.2mmol)およびMsCl(130 μL, 1.7mmol)を窒素雰囲気下0°Cで加えた。反応液を0°Cで30分間攪拌し、CH₂Cl₂(25mL)で希釈した。溶液をショートシリカゲルプラグ(2 x 3cm)上に適用し、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン溶媒系(容積比: 80/20/0.5)で速やかに溶離した。溶離液を減圧濃縮し、残渣をラセミ(R/S)-1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(800mg, 3.0mmol)と混合した。混合物を窒素雰囲気下115°Cで45分間加熱し、室温に冷却し、THF(10mL)に溶解させ、続いてn-Bu₄NF(530mg, 1.7mmol)を加えた。混合物を室温で2時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(40mL)に溶解させ、ブライン(50mL)で洗浄し、水相をCH₂Cl₂(40mL)で2回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-クロロ-9-[β-D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザプリン34(70mg, 3工程で23%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

ジアステレオマーの ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.42 および 7.39 (2 s, 1 H, Ph-H), 7.15 および 7.13 (2 s, 1 H, Ph-H), 6.89 および 6.84 (2 s, 1 H, H-8), 6.12 (m, 1 H, H-1'), 5.22 および 5.16 (2 s, 1 H, Ph-CH), 5.10 および 5.08 (2 bs, 2 H, NH_2), 4.71-4.41 (m, 3 H, H-3' および 7- CH_2), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.94 (4 s, 7 H, $\text{OCH}_3 \times 2$ および H-5'a), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.90 (m, 1 H, H-2'a), 2.25 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 および 0.80 (2 s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3$)

【0282】

化合物34(65mg、0.11mmol)の1,4-ジオキサン(1.0mL)およびDMF(2.0mL)溶液にsyn-ピリミジン-2-アルドキシム(292mg、2.4mmol)および1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(330 μL 、2.6mmol)を加え、混合物を窒素雰囲気下70°Cで終夜加熱した。反応混合物を CH_2Cl_2 (40mL)で希釈し、酢酸(0.1M、50mL)、飽和 NaHCO_3 溶液(50mL)およびブライン(50mL)で順次洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン35(42mg、68%)を2つのジアステレオマーの1:1混合物として得た。

ジアステレオマーの ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.33 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, NH), 7.47 および 7.44 (2 s, 1 H, Ph-H), 7.16 および 7.15 (2 s, 1 H, Ph-H), 6.83 および 6.82 (2 s, 1 H, H-8), 6.22 (m, 3 H, 2 H D_2O 交換可能, NH_2 および H-1'), 5.18 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, 3'-OH), 5.06 および 5.04 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.83 (t, 1 H, D_2O 交換可能, 5'-OH), 4.44-4.23 (m, 3 H, 7- CH_2 および H-3'), 3.82 (4 s, 6 H, $\text{OCH}_3 \times 2$), 3.70 (m, 1 H, H-4'), 3.42 (m, 2 H, H-5'), 2.22 (m, 1 H, H-2'a), 2.01 (m, 1 H, H-2'b), 0.77 および 0.75 (2 s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3$)

【0283】

化合物35(40mg、0.073mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中 POCl_3 (14 μL 、0.15mmol)およびプロトンスポンジ(31mg、0.15mmol)によって0°Cで2時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[1-(4,5-ジメトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン-5'-三リン酸dG.V.dを2つのジアステレオマーの1:1混合物として得て、これをRP-HPLCを使用して分離して単一のジアステレオマーdG.V.d ds1およびdG.V.d ds2を得た。HRMS(ESI): 分子イオン $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_{18}\text{P}_3[\text{M}-\text{H}]^-$ について、計算質量は786.1190、実測質量は786.1206であった。

【0284】

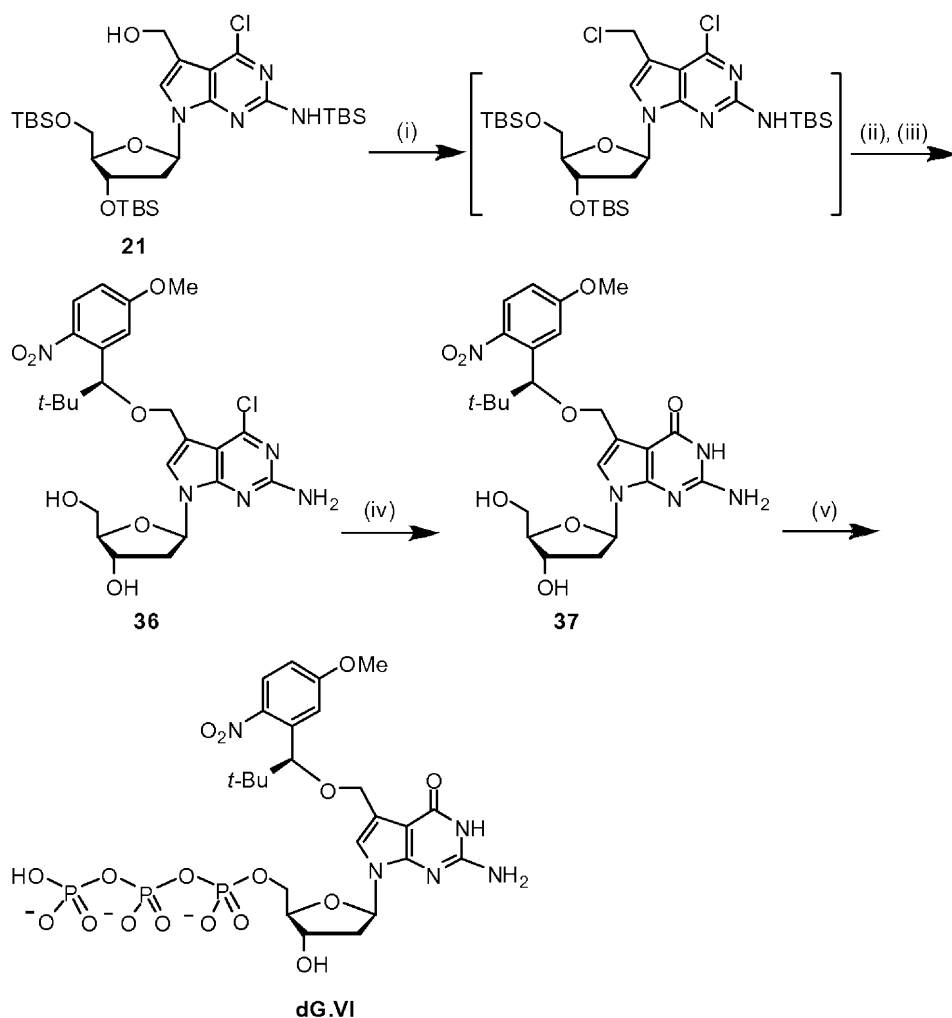
7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン-5'-三リン酸

10

20

30

40



スキームS18 7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) MsCl, DMAP, CH₂Cl₂, 0°C; (ii) (S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール, 115°C; (iii) n-Bu₄NF, THF, 室温, 3工程で27%; (iv) syn-ピリジン-2-アルドキシム, 1,1,3,3-テトラメチルグアニジン, 1,4-ジオキサン/DMF, 70°C, 76%; (v) POCl₃, プロトンスポンジ, (MeO)₃PO, 0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1M HNEt₃HC O₃。

【0285】

化合物21(300mg, 0.46mmol)の無水CH₂Cl₂(5.0mL)溶液にDMAP(224mg, 1.8mmol)およびMsCl(106 μL, 1.4mmol)を窒素雰囲気下0°Cで加えた。反応液を0°Cで10分間攪拌し、CH₂Cl₂(20mL)で希釈した。溶液をショートシリカゲルプラグ(2 x 3cm)上に適用し、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン溶媒系(容積比: 80/20/0.5)で速やかに溶離した。溶離液を減圧濃縮し、残渣を(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(500mg, 2.1mmol)と混合した。混合物を窒素雰囲気下115°Cで45分間加熱し、室温に冷却し、THF(10mL)に溶解させ、続いてn-Bu₄NF(507mg, 1.6mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(20mL)に溶解させ、ブライン(30mL)で洗浄し、水相をCH₂Cl₂(20mL)で2回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-クロロ-9-[β-D-2'-デオキシリボフラノシル]-7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]-メチル-7-デアザプリン36(67mg, 3工程で27%)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.82 (d, 1 H, J = 8.8 Hz, Ph-H), 7.16 (d, 1 H, J = 2.8 Hz, Ph-H), 6.90 (s, 1 H, H-8), 6.72 (dd, 1 H, J = 8.8 および 2.8 Hz, Ph-H), 6.12 (dd, 1 H, J = 9.2 および 6.0 Hz, H-1'), 5.22 (s, 1 H, Ph-CH), 5.15 (br s, 2 H, NH_2), 4.69-4.55 (m, 3 H, H-3' および 7- CH_2), 4.11 (m, 1 H, H-4'), 3.92 (m, 1 H, H-5'a), 3.82 (s, 3 H, OCH_3), 3.73 (m, 1 H, H-5'b), 2.81 (m, 1 H, H-2'a), 2.21 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3$)

【0286】

化合物36 (65mg、0.12mmol) の1,4-ジオキサン (1.0mL) およびDMF (2.0mL) 溶液に syn-ピリミジン-2-アルドキシム (292mg、2.4mmol) および1,1,3,3-テトラメチルグアニジン (331 μL 、2.6mmol) を加え、混合物を窒素雰囲気下70°Cで終夜加熱した。反応混合物を CH_2Cl_2 (20mL) で希釈し、酢酸 (0.1M、30mL)、飽和 NaHCO_3 溶液 (30mL) およびブライン (30mL) で順次洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン37 (48mg、76%) を得た。

^1H NMR (400

MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.37 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, NH), 7.95 (d, 1 H, J = 9.2 Hz, Ph-H), 7.18 (d, 1 H, J = 2.8 Hz, Ph-H), 7.03 (dd, 1 H, J = 9.2 および 2.8 Hz, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, H-8), 6.23 (m, 3 H, 2 H D_2O 交換可能, NH_2 および H-1'), 5.20 (d, 1 H, D_2O 交換可能, 3'-OH), 5.13 (s, 1 H, Ph-CH), 4.84 (t, 1 H, D_2O 交換可能, 5'-OH), 4.48 (d, 1 H, J = 12.0 Hz, 7- CH_2a), 4.32 (d, 1 H, J = 12.0 Hz, 7- CH_2b), 4.27 (m, 1 H, H-3'), 3.88 (s, 3 H, OCH_3), 3.73 (m, 1 H, H-4'), 3.46 (m, 2 H, H-5'), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 0.77 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3$)

【0287】

化合物37 (10mg、0.02mmol) を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル (0.3mL) 中 POCl_3 (26 μL 、0.26mmol) およびプロトンスポンジ (8mg、0.04mmol) によって0°Cで6.5時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート (237mg、0.50mmol) およびトリ-n-ブチルアミン (100 μL) の無水DMF (1.0mL) 溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液 (0.1M、pH 7.5; 10mL) を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液 (10mL) に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて7-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアニシン-5'-三リン酸dG.VIを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。dG.VIの保持時間は、同一条件下のRP-HPLC分析によるdG.V.c ds2のそれと同一であった。HRMS (ESI): 分子イオン $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_{17}\text{P}_3$ [M-H] $^-$ について、計算質量は756.1084、実測質量は756.1101であった。

【0288】

実施例5

5-HOMe-2'-デオキシウリジン三リン酸類似体の合成

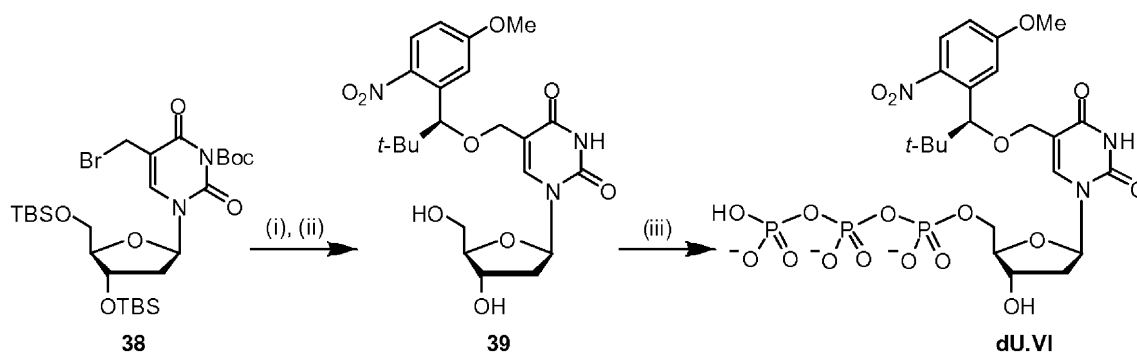
5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸

10

20

30

40



スキームS19 5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) (S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110°C; (ii) NH_4F 、 MeOH 、50°C、2工程で56%; (iii) POCl_3 、プロトンスポンジ、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、 DMF ; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

【0289】

化合物38(参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al., 2011)(315mg、0.49mmol)および(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(490mg、2.1mmol)を窒素雰囲気下110°Cで45分間加熱した。混合物を室温に冷却し、 MeOH (10mL)に溶解させた後、 NH_4F (400mg、11mmol)を加えた。混合物を50°Cで12時間攪拌し、減圧濃縮し、 CH_2Cl_2 (50mL)に溶解させ、ブライン(50mL)で洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン39(130mg、56%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.14

(br s, 1 H, NH), 7.90 (d, 1 H, $J = 9.2$ Hz, Ph-H), 7.67 (s, 1 H, H-6), 7.17 (d, 1 H, $J = 2.8$ Hz, Ph-H), 6.84 (dd, 1 H, $J = 9.2$ および 2.8 Hz, Ph-H), 6.18 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 5.22 (s, 1 H, Ph-CH), 4.56 (m, 1 H, H-3'), 4.24 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 5- CH_2a), 4.15 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 5- CH_2b), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.90 (m, 1 H, H-5'a), 3.88 (s, 3 H, OCH_3), 3.81 (m, 1 H, H-5'b), 2.35 (m, 2 H, H-2), 0.83 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0290】

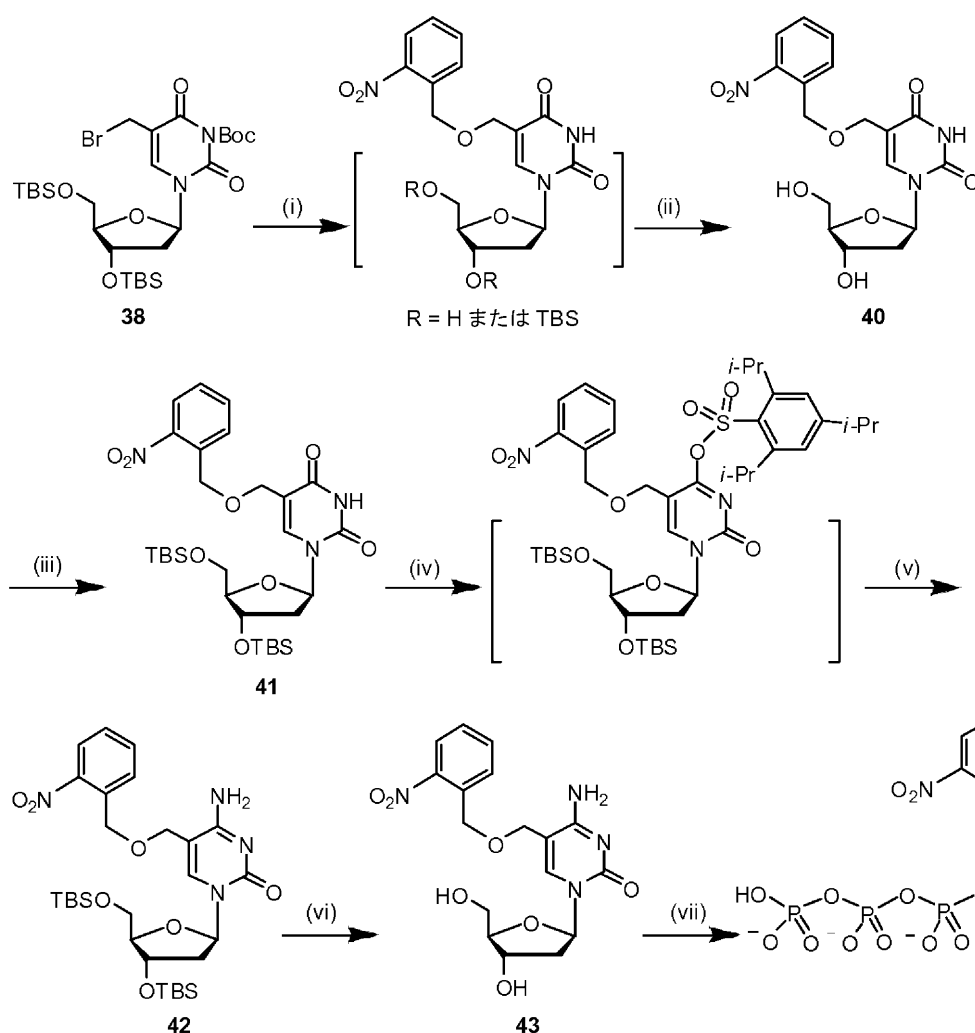
化合物39(30mg、0.065mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中 POCl_3 (9 μL 、0.097mmol)およびプロトンスポンジ(28mg、0.13mmol)によって0°Cで1時間リン酸化した。トリ- n -ブチルアンモニウムピロホスフェート(147mg、0.32mmol)およびトリ- n -ブチルアミン(64 μL)の無水 DMF (0.64mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(10mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸dU.VIを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。HRMS(ESI): 分子イオン $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{P}_3$ [M-H] $^-$ について、計算質量は718.0815、実測質量は718.0824であった。

【0291】

実施例6

5-HOMe-2'-デオキシシチジン三リン酸類似体の合成

5-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸



スキームS20 5-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) 2-ニトロベンジルアルコール、110°C; (ii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ 、THF、室温、2工程で53%; (iii) TBSCl、イミダゾール、DMF、室温、80%; (iv) 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド、DMAP、 Et_3N 、 CH_2Cl_2 、室温; (v) NH_3 、1,4-ジオキサン、90°C、2工程で69%; (vi) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ 、THF、室温、96%; (vii) POCl_3 、プロトンスポンジ、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、DMF; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

【0292】

化合物38(300mg、0.46mmol)および2-ニトロベンジルアルコール(500mg、3.3mmol)を窒素雰囲気下110°Cで45分間加熱した。混合物を室温に冷却し、THF(20mL)に溶解させた後、 $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ (362mg、1.2mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して5-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-2'-デオキシウリジン40(参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al., 2011)(95mg、53%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.45 (br s, 1 H, NH), 8.05 (s, 1

H, H-6), 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, Ph-H), 7.80 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.69 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.43 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 6.21 (t, 1 H, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 4.94 (dd, $J = 14.4$ Hz, 2 H, Ph- CH_2), 4.66 (m, 1 H, H-3'), 4.35 (s, 2 H, 5- CH_2), 3.95 (m, 3 H, H-4' および H-5'), 2.42 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b)

【0293】

化合物40(参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al., 2011)(70mg、0.18mmol)の無水DMF(2.0mL)溶液にTBSCl(60mg、0.40mmol)およびイミダゾール(54mg、0.80mmol)を

加えた。混合物を窒素雰囲気下、室温で終夜攪拌し、減圧濃縮し、 CH_2Cl_2 (20mL) に溶解させ、飽和 NaHCO_3 溶液 (30mL) で洗浄した。有機相と水相とを分離し、水相を CH_2Cl_2 (20mL) で2回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して3',5'-0-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-(2-ニトロベンジルオキシ)-メチル-2'-デオキシウリジン41 (90mg、80%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ

8.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, Ph-H), 7.98 (br s, 1 H, NH), 7.80 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.74 (s, 1 H, H-6), 7.64 (q, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.44 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 6.21 (q, 1 H, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 4.95 (s, 2 H, Ph- CH_2), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.34 (dd, 2 H, $J = 11.6$ Hz, 5- CH_2), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.79 (m, 2 H, H-5'), 2.29 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 0.89 (2 s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.08 (4 s, 12 H, CH_3)

10

【0294】

化合物41 (85mg、0.14mmol)、DMAP (19mg、0.16mmol) およびトリエチルアミン (0.18mL、1.3mmol) の無水 CH_2Cl_2 (5.0mL) 溶液に2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホンクロリド (176mg、0.59mmol) を加えた。混合物を窒素雰囲気下、室温で終夜攪拌し、減圧濃縮し、残渣を NH_3 の1,4-ジオキサン溶液 (0.5M、15mL) に溶解させた。混合物を封管中に移し、90℃で終夜加熱した。混合物を室温に冷却し、減圧濃縮し、 CH_2Cl_2 (30mL) に溶解させ、ブライン (30mL) で洗浄した。有機相と水相とを分離し、水相を CH_2Cl_2 (30mL) で2回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して3',5'-0-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-2'-デオキシシチジン42 (60mg、2工程で69%) を得た。

20

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.08 (d, $J =$

8.0 Hz, 1 H, Ph-H), 7.81 (s, 1 H, H-6), 7.65 (m, 2 H, Ph-H), 7.64 (q, 1 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.49 (m, 1 H, Ph-H), 6.29 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 5.75 (br s, 1 H, NH_2), 4.85 (dd, 2 H, $J = 13.6$ Hz, Ph- CH_2), 4.41 (s, 2 H, 5- CH_2), 4.34 (m, 1 H, H-3'), 3.95 (m, 1 H, H-4'), 3.89 (dd, 1 H, $J = 2.8$ Hz, H-5'a), 3.76 (dd, 1 H, $J = 2.8$ Hz, H-5'b), 2.46 (m, 1 H, H-2'a), 1.98 (m, 1 H, H-2'b), 0.92 および 0.89 (2 s, 18 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.11-0.08 (4 s, 12 H, CH_3)

30

【0295】

化合物42 (55mg、0.09mmol) のTHF (10mL) 溶液に $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ (63mg、0.20mmol) を加えた。混合物を室温で4時間攪拌し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して5-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-2'-デオキシシチジン43 (34mg、96%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz,

$\text{DMSO}-d_6$): δ 8.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, Ph-H), 7.89 (s, 1 H, H-6), 7.74 (m, 2 H, Ph-H), 7.55 (m, 1 H, Ph-H), 7.39 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, NH_2), 6.74 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, NH_2), 6.12 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 5.21 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, 3'-OH), 4.99 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, 5'-OH), 4.81 (s, 2 H, Ph- CH_2), 4.30 (dd, 2 H, $J = 11.6$ Hz, 5- CH_2), 4.20 (m, 1 H, H-3'), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 3.55 (m, 2 H, H-5'), 2.11 (m, 1 H, H-2'a), 1.95 (m, 1 H, H-2'b)

40

【0296】

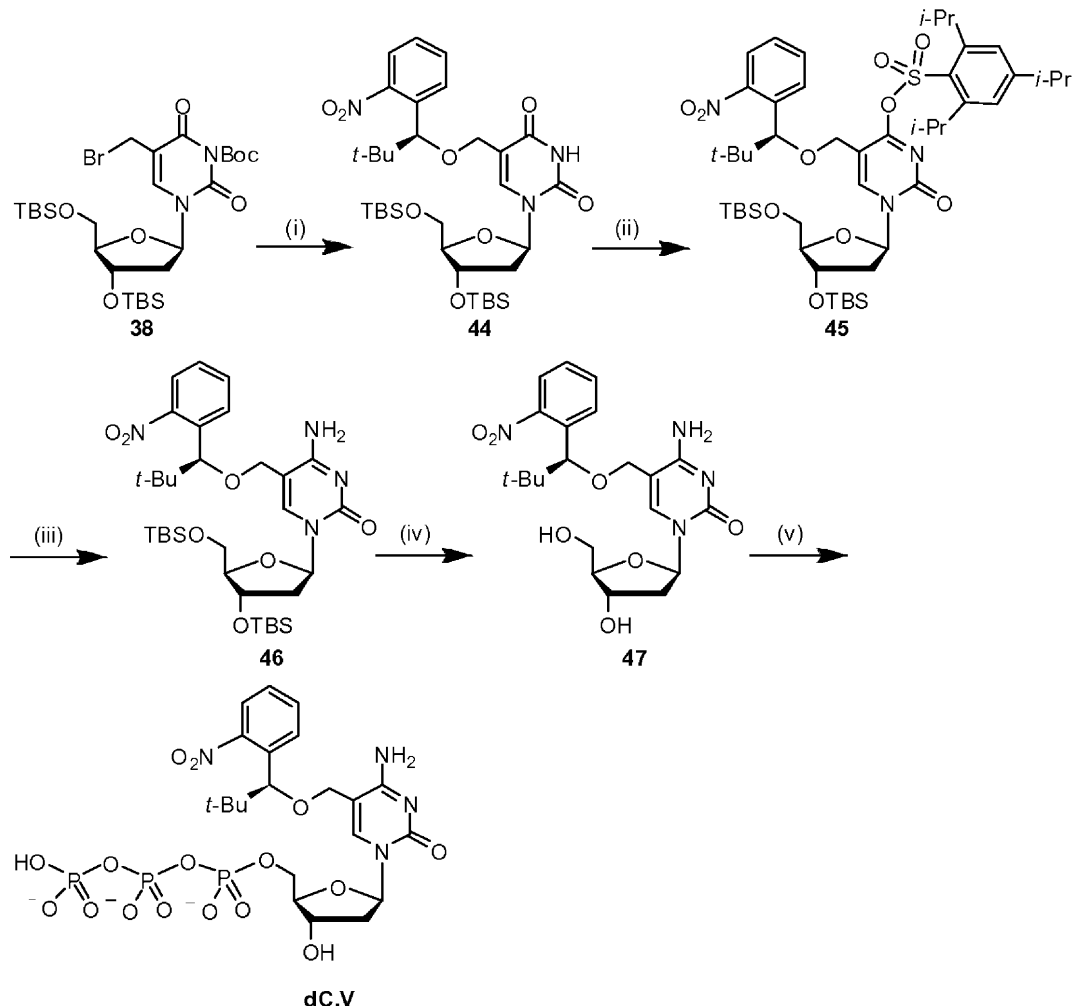
化合物43 (32mg、0.081mmol) を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル (0.35mL) 中 POCl_3 (30 μL 、0.32mmol) およびプロトンスポンジ (35mg、0.16mmol) によって0℃で3時間リン酸化した。トリ- n -ブチルアンモニウムピロホスフェート (237mg、0.50mmol) およびトリ- n -ブチルアミン (100 μL) の無水DMF (1.0mL) 溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアン

50

モニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて5-(2-ニトロベンジルオキシ)メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸dC.Iを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。HRMS(ESI): 分子イオン $C_{17}H_{22}N_4O_{16}P_3$ [M-H]⁻について、計算質量は631.0244、実測質量は631.0258であった。

【0297】

5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸



スキームS21 5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) (S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110°C、21%; (ii) 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド、DMAP、Et₃N、CH₂Cl₂、室温、31%; (iii) NH₃、1,4-ジオキサン、90°C、91%; (iv) n-Bu₄NF、THF、室温、82%; (v) POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

【0298】

化合物38(参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al., 2011)(520mg、0.80mmol)および(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(580mg、2.8mmol)を窒素雰囲気下110°Cで1時間加熱した。混合物を室温に冷却し、最小量の酢酸エチルに溶解させ、シリカゲルクロマトグラフィーで精製して3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン44(115mg、21%)を得た。(3'または5')-O-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン(78mg、

17%) および5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン(16mg、4%)も反応液から得られた。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.97 (s, 1

H, NH), 7.76 (d, 2 H, $J = 8.0$ Hz, Ph-H), 7.60 (m, 2 H, Ph-H および H-6), 7.41 (s, 1 H, Ph-H), 6.29 (dd, 1 H, $J = 6.0$ および 7.6 Hz, H-1'), 4.97 (s 1 H, Ph-CH), 4.42 (m, 1 H, H-3'), 4.28 (AB d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 5-CH₂a), 4.06 (AB d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 5-CH₂b), 3.92 (m, 1 H, H-4'), 3.76 (m, 2 H, H-5'), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 0.95 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.90 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.83 (s, 9 H, (CH₃)₃C), 0.12 (s, 3 H, CH₃Si), 0.09 (s, 3 H, CH₃Si), 0.07 (s, 3 H, CH₃Si), 0.06 (s, 3 H, CH₃Si)

10

【0299】

化合物44(110mg、0.16mmol)、DMAP(20mg、0.17mmol)およびトリエチルアミン(63 μ L、0.45mmol)の無水CH₂Cl₂(3.0mL)溶液に2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド(61mg、0.20mmol)を加えた。混合物を窒素雰囲気下、室温で36時間攪拌し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-0⁴-(2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニル)-2'-デオキシウリジン45(47mg、31%)を得た。

20

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):

δ 8.08 (s, 1 H, H-6), 7.80 (dd, 1 H, $J = 1.2$ および 8.0 Hz, Ph-H), 7.78 (dd, 1 H, $J = 1.6$ および 8.0 Hz, Ph-H), 7.67 (m, 1 H, Ph-H), 7.46 (m, 1 H, Ph-H), 7.20 (s, 2 H, Ph-H), 6.09 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 4.98 (s, 1 H, Ph-CH), 4.35 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (AB d, 1 H, $J = 11.6$ Hz, 5-CH₂a), 4.11 (AB d, 1 H, $J = 11.6$ Hz, 5-CH₂b), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.79 (dd, 1 H, $J = 3.6$ および 11.6 Hz, H-5'a), 3.74 (dd, 1 H, $J = 11.6$ および 3.6 Hz, H-5'b), 2.90 (m, 1 H, CH), 2.50 (m, 2 H, H-2'), 1.98 (m, 2 H, CH), 1.31 - 1.22 (m, 18 H, (CH₃)₂CH x 3), 0.88 (2 s, 18 H, (CH₃)₃CSi x 2), 0.87 (s, 9 H, (CH₃)₃C), 0.07 (s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.06 (s, 6 H, (CH₃)₂Si)

30

【0300】

化合物45(47mg、0.05mmol)の無水1,4-ジオキサン(2.0mL)溶液にNH₃の1,4-ジオキサン溶液(0.5M、2.0mL)を加えた。混合物を封管中に移し、90℃で10時間加熱した。混合物を室温に冷却し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して3',5'-O-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]-メチル-2'-デオキシシチジン46(31mg、91%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz,

CDCl_3): δ 7.67 (m, 3 H, Ph-H), 7.53 (s, 1 H, H-6), 7.45 (m, 1 H, Ph-H), 6.30 (t, 1 H, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 5.72 (br s, 2 H, NH₂), 4.88 (s, 1 H, Ph-CH), 4.32 (m, 1 H, H-3'), 4.28 (AB d, 1 H, $J = 12.8$ Hz, 5-CH₂a), 4.08 (AB d, 1 H, $J = 12.8$ Hz, 5-CH₂b), 3.87 (m, 1 H, H-4'), 3.74 (dd, 1 H, $J = 3.6$ および 14.8 Hz, H-5'a), 3.66 (dd, 1 H, $J = 3.6$ および 11.3 Hz, H-5'b), 2.41 (m, 1 H, H-2'a), 2.03 (m, 1 H, H-2'b), 0.90 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.87 (s, 9 H, (CH₃)₃CSi), 0.83 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.09 (2 s, 6 H, (CH₃)₂Si), 0.06 (2 s, 6 H, (CH₃)₂Si)

40

【0301】

化合物46(20mg、0.03mmol)のTHF(2.0mL)溶液にn-Bu₄NF(28mg、0.09mmol)のTHF(1.0mL)溶液を加えた。混合物を室温で30分間攪拌し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]

50

メチル-2'-デオキシシチジン47(11mg、82%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7.87 (s, 1 H, H-6), 7.82

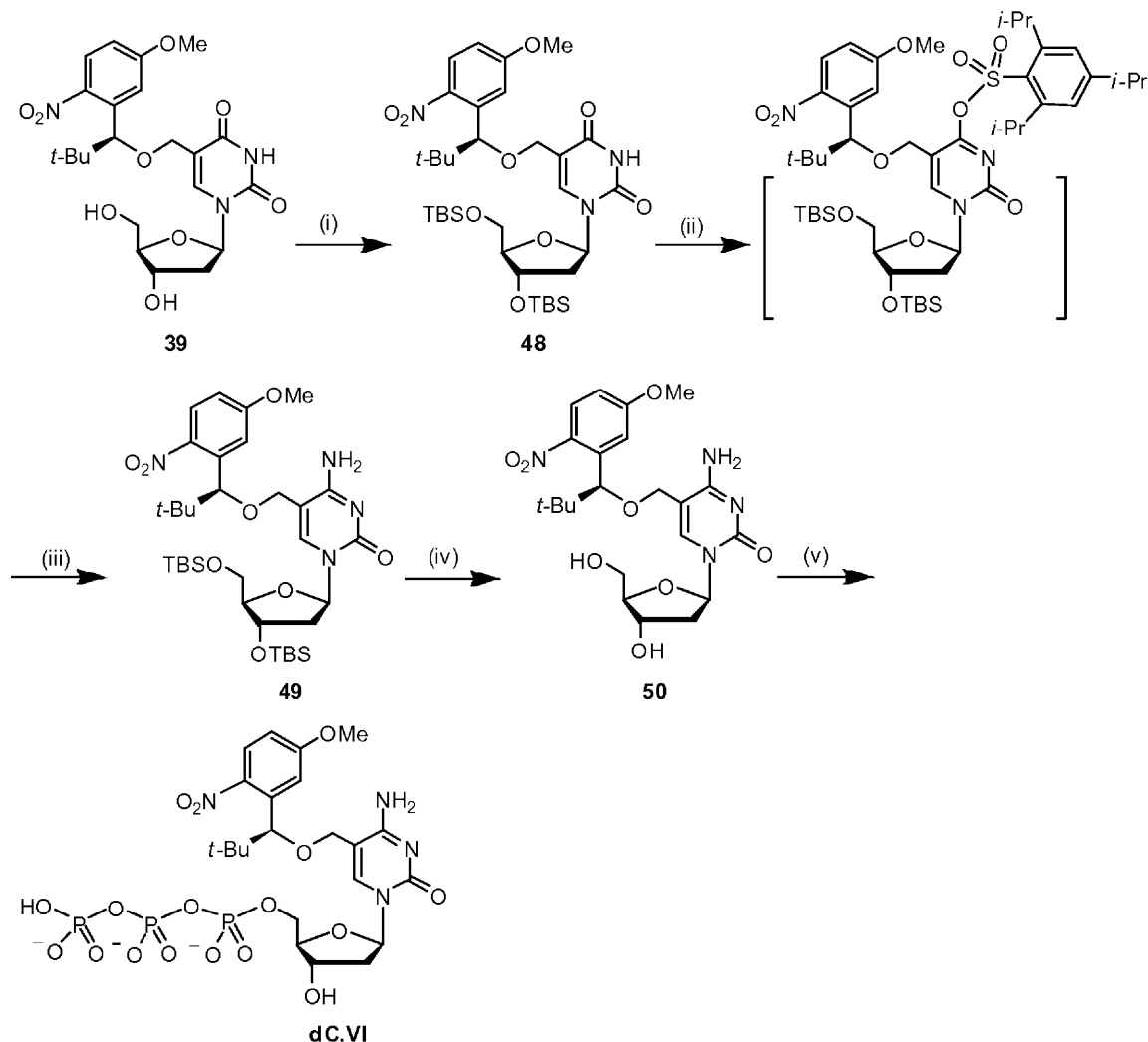
(dd, 1 H, $J = 1.2$ および 8.4 Hz, Ph-H), 7.76 (dd, 1 H, $J = 1.6$ および 8.0 Hz, Ph-H), 7.68 (m, 1 H, Ph-H), 7.51 (m, 1 H, Ph-H), 6.23 (t, 1 H, $J = 6.6$ Hz, H-1'), 4.94 (s, 1 H, Ph-CH), 4.44 (AB d, 1 H, $J = 13.2$ Hz, 5- CH_2a), 4.34 (m, 1 H, H-3'), 4.11 (AB d, 1 H, $J = 13.2$ Hz, 5- CH_2b), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.71 (dd, 1 H, $J = 3.2$ および 12.0 Hz, H-5'a), 3.63 (dd, 1 H, $J = 4.0$ および 12.0 Hz, H-5'b), 2.35 (m, 1 H, H-2'a), 2.14 (m, 1 H, H-2'b), 0.80 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0302】

化合物47(11mg、0.025mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.3mL)中 POCl_3 (7 μL 、0.075mmol)およびプロトンスポンジ(11mg、0.05mmol)によって0°Cで3時間リン酸化した。トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(59mg、0.125mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(30 μL)の無水DMF(0.25mL)溶液を加えた。5分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(1M、pH 7.5; 5.0mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(5.0mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて5-[(S)-1-(2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸dC.Vを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。HRMS(ESI): 分子イオン $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{P}_3[\text{M}-\text{H}]^-$ について、計算質量は687.0870、実測質量は687.0873であった。

【0303】

5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸



スキームS22 5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件: (i) TBSCl、イミダゾール、DMF、室温、70%; (ii) 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド、DMAP、Et₃N、CH₂Cl₂、室温; (iii) NH₃、1,4-ジオキサン、90°C、2工程で65%; (iv) n-Bu₄NF、THF、室温、82%; (v) POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

【0304】

化合物39(235mg、0.49mmol)の無水DMF(3.0mL)溶液にTBSCl(320mg、0.8mmol)およびイミダゾール(109mg、1.6mmol)を加えた。混合物を室温で6時間攪拌し、減圧濃縮し、CH₂Cl₂(20mL)に溶解させ、飽和NaHCO₃溶液(50mL)で洗浄した。有機相と水相とを分離し、水相をC 10
H₂Cl₂(30mL)で3回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して3',5'-0-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン48(245mg、70%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (br s, 1 H, NH), 7.88 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, Ph-H), 7.60 (s, 1 H, H-6), 7.22 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.84 (dd, 1 H, *J* = 2.8 および 8.0 Hz, Ph-H), 6.25 (dd, 1 H, *J* = 5.6 および 8.0 Hz, H-1'), 5.23 (s, 1 H, Ph-CH), 4.40 (m, 1 H, H-3'), 4.26 (d, 1 H, *J* = 12 Hz, 5-CH₂a), 4.11 (d, 1 H, *J* = 12 Hz, 5-CH₂b), 3.89 (m, 4 H, OCH₃ および H-4'), 3.78 (m, 2 H, H-5'), 2.27 (m, 1 H, H-2'a), 2.04 (m, 1 H, H-2'b), 0.90 および 88 (2 s, 18 H, SiC(CH₃)₃), 0.84 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.08 (3 s, 12 H, CH₃)

【0305】

化合物48(170mg、0.24mmol)、DMAP(32mg、0.26mmol)およびトリエチルアミン(0.34mL、2.4mmol)の無水CH₂Cl₂(8.0mL)溶液に2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド(363mg、1.2mmol)を加えた。混合物を窒素雰囲気下、室温で終夜攪拌し、減圧濃縮し、残渣をNH₃の1,4-ジオキサン溶液(0.5M、20mL)に溶解させた。混合物を封管中に移し、90°Cで終夜加熱した。混合物を室温に冷却し、減圧濃縮し、CH₂Cl₂(20mL)に溶解させ、ブライン(50mL)で洗浄した。有機相と水相とを分離し、水相をCH₂Cl₂(30mL)で3回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して3',5'-0-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン49(110mg、2工程で65%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, Ph-H), 7.50 (br s, 1 H, NH₂), 7.38 (s, 1 H, H-6), 7.08 (dd, 1 H, *J* = 2.8 および 8.8 Hz, Ph-H), 7.04 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.80 (br s, 1 H, NH₂), 6.13 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.09 (s, 1 H, Ph-CH), 4.31 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 5-CH₂a), 4.08 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 5-CH₂b), 3.87 (s, 3 H, OCH₃), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 3.64 (m, 2 H, H-5'), 3.76 (dd, 1 H, *J* = 2.8 Hz, H-5'b), 2.10 (m, 1 H, H-2'a), 2.00 (m, 1 H, H-2'b), 0.87 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.78 および 0.76 (2 s, 18 H, SiC(CH₃)₃), 0.07, 0.06, -0.01, および -0.04 (4 s, 12 H, SiCH₃)

【0306】

化合物49(130mg、0.18mmol)のTHF(10mL)溶液にn-Bu₄NF(141mg、0.44mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して5-[(S)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン50(72mg、82%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, Ph-H), 7.65 (s, 1 H, H-6), 7.42 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, NH_2a), 7.06 (m, 2 H, Ph-H), 6.72 (br s, 1 H, D_2O 交換可能, NH_2b), 6.11 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 5.17 (d, 1 H, D_2O 交換可能, 3'-OH), 5.12 (s, 1 H, Ph-CH), 4.78 (t, 1 H, D_2O 交換可能, 5'-OH), 4.25 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 5- CH_2a), 4.15 (m, 1 H, H-3'), 4.05 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 5- CH_2b), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 3.72 (m, 1 H, H-4'), 3.44 (m, 2 H, H-5'), 3.76 (dd, 1 H, $J = 2.8$ Hz, H-5'b), 2.08 (m, 1 H, H-2'a), 1.95 (m, 1 H, H-2'b), 0.77 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

10

【0307】

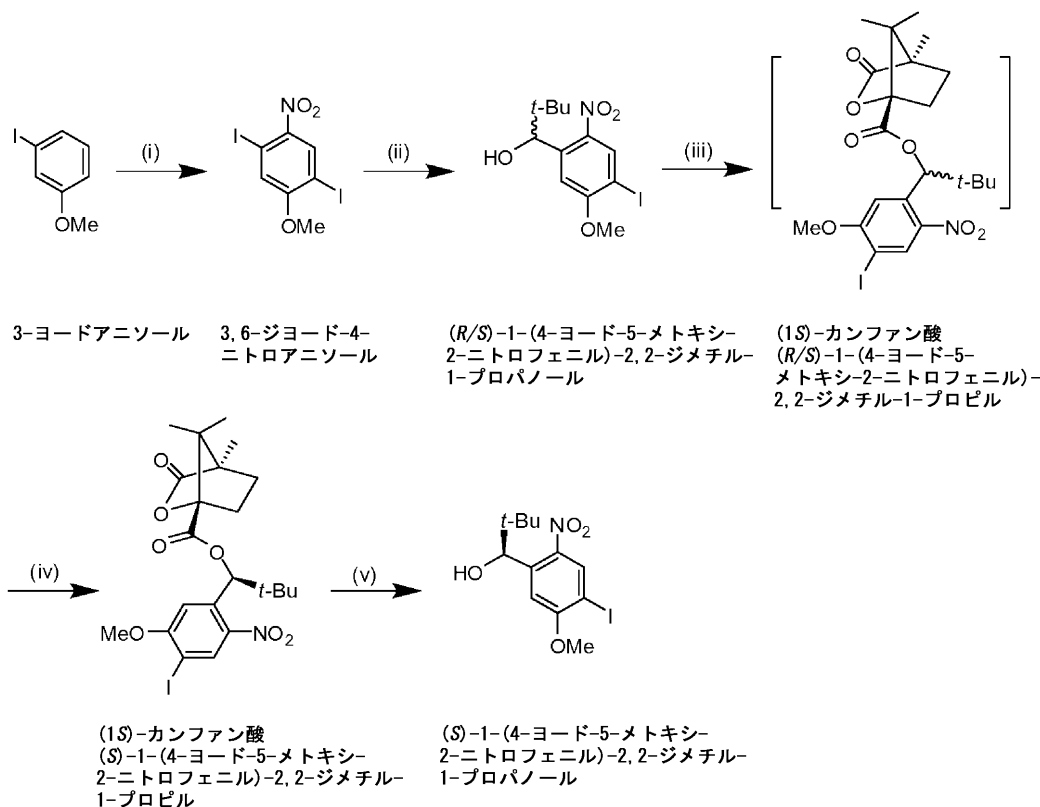
化合物50(20mg、0.043mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.3mL)中 POCl_3 (24 μL 、0.26mmol)およびプロトンスポンジ(19mg、0.086mmol)によって0°Cで6時間リン酸化した。トリ-*n*-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.50mmol)およびトリ-*n*-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム緩衝液(0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を20%アセトニトリル水溶液(20mL)に溶解させ、濾過し、アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥させて5-[(*S*)-1-(5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸dC.VIを得て、RP-HPLCを使用してさらに精製した。HRMS(ESI): 分子イオン $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{P}_3$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ について、計算質量は719.0975、実測質量は719.0983であった。

20

【0308】

実施例7

(*R/S*)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールおよび(*S*)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの合成



30

40

スキームS23 (*R/S*)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールおよび(*S*)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール

50

ールの合成。(i) NaNO_2 、 CH_3COOH 、 HNO_3 、室温； I_2 、 60°C 、2工程で25%(純度80%)；(ii) PhMgCl 、 $(\text{CH}_3)_3\text{CCHO}$ 、 THF 、 -40°C ～室温、72%；(iii) (1S)-カンファン酸クロリド、 DMAP 、 CH_2Cl_2 、室温、80%；(iii) エタノールからの分別晶出、63%；(iv) K_2CO_3 、 MeOH 、還流。

【0309】

硝酸(68～70%、125mL)を氷酢酸(125ml)と室温でゆっくりと混合した後、 NaNO_2 (400mg、5.8mmol)および3-ヨードアニソール(10g、42.7mmol)を加えた。反応液を室温で24時間攪拌した後、 I_2 (10.8g、42.7mmol)を加え、混合物を 60°C で終夜攪拌した。反応混合物を氷水(500ml)に注ぎ、 CH_2Cl_2 (100ml)で3回抽出した。一緒にした有機相を飽和 NaHCO_3 溶液(500ml)で中和し、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液(20%、100ml)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して粗3,6-ジヨード-4-ニトロアニソール(5.4g)を得て、これを1つの未知の副生成物(20%)と混合し、さらに精製せずに次の工程で使用した。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (s, 1 H, Ph-H), 7.33 (s, 1 H, Ph-H), 3.97 (s, 3 H, OCH_3)

【0310】

粗3,6-ジヨード-4-ニトロアニソール(770mg、純度80%、1.52mmol)の無水 THF (10mL)溶液に、窒素雰囲気下 -40°C で、塩化フェニルマグネシウム(THF 中2M、0.46mL、0.92mmol)を、温度が -35°C を超えない速度で滴下した。添加の完了時点で混合物を -40°C で2時間攪拌した後、トリメチルアセトアルデヒド(0.22mL、1.97mmol)を加えた。混合物を -30°C で2時間、次に室温でさらに1時間攪拌した。次に反応液をブライン(1.0mL)で反応停止させ、 CH_2Cl_2 (100mL)で希釈し、溶液を CH_3COOH (0.1N、50ml)およびブライン(50ml)で順次洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してラセミ(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(399mg、72%)を得た。

$^1\text{H NMR}$

(400 MHz, CDCl_3): δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH_3), 2.12 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz, OH), 0.89 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0311】

ラセミ(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(395mg、1.1mmol)および DMAP (263mg、2.16mmol)の無水 CH_2Cl_2 (5.0mL)溶液に(1S)-カンファン酸クロリド(参照により組み入れられるCorrie et al., 1992)(350mg、1.62mmol)を加え、混合物を窒素雰囲気下、室温で終夜攪拌した。反応混合物を CH_2Cl_2 (50mL)で希釈し、飽和 NaHCO_3 溶液(50mL)で洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して(1S)-カンファン酸(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(490mg、80%、ジアステレオマーの1:1混合物)を得た。

【0312】

(1S)-カンファン酸(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(3.4g)を沸騰エタノール(150ml)に溶解させ、溶液を温油浴中に保持し、室温にゆっくりと冷却し、終夜静置した。針状結晶が徐々に形成され、これを濾取して純粋な単一のジアステレオマーである(1S)-カンファン酸(R)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(870mg、51%)を得た。残留母液を減圧濃縮し、残渣を沸騰エタノール(150ml)に再度溶解させ、溶液を室温に速やかに冷却したところ、針状結晶が2時間以内に形成された。結晶を濾取して純粋な単一のジアステレオマーである(1S)-カンファン酸(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルを得た。晶出プロセスを2回繰り返してさらなる純粋な(S)-ジアステレオマーを得た(合計1.07g、63%)。

(1S)-カンファン酸(R)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルの¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.94 (s, 1 H, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, Ph-CH), 3.93 (s, 3 H, OCH₃), 2.42 (m, 1 H, CH), 2.11 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 1 H, CH₂), 1.75 (m, 1 H, CH₂), 1.11 (s, 3 H, CH₃), 1.05 (s, 3 H, CH₃), 0.97 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.86 (s, 3 H, CH₃)

(1S)-カンファン酸(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルの¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.95 (s, 1 H, Ph-H), 6.80 (s, 1 H, Ph-CH), 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 2.37 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 2 H, CH₂), 1.66 (m, 1 H, CH), 1.14 (s, 3 H, CH₃), 1.07 (s, 3 H, CH₃), 1.06 (s, 3 H, CH₃), 0.98 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

10

【0313】

(1S)-カンファン酸(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(1.1g、2.0mmol)およびK₂CO₃(552mg、4.0mmol)のメタノール(50mL)中混合物を還流温度に1時間加熱した後、冷却し、減圧濃縮し、CH₂Cl₂(50mL)で希釈した。有機相をブライン(50mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してエナンチオピュアな(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(720mg、98%)を得た。

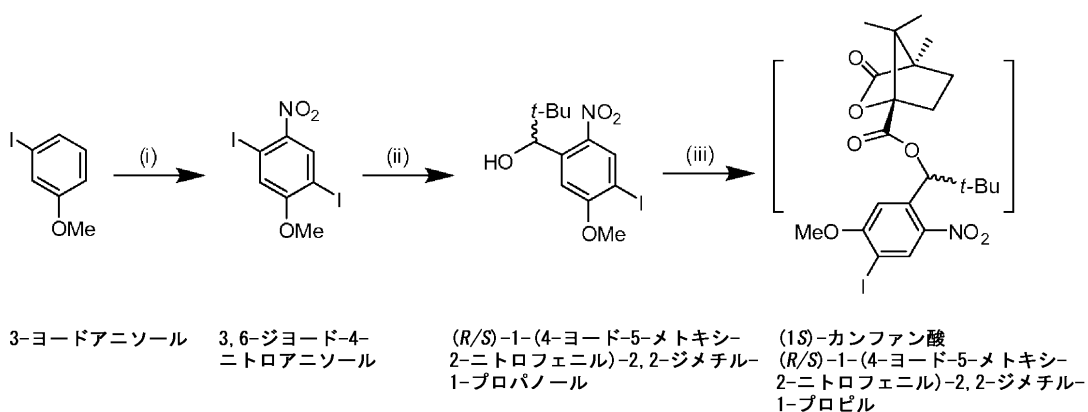
20

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, J = 4.0 Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH₃), 2.12 (d, 1 H, J = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃)

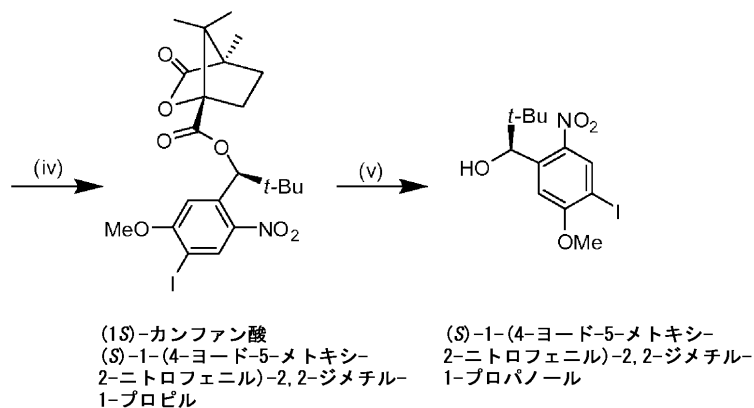
【0314】

実施例8

色素標識 tBu-5-OMe-2-ニトロベンジルアルキル化ヒドロキシメチルヌクレオチドの合成
(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールおよび
(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの合成



10



20

スキームS24 (R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールおよび(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノールの合成。(i) NaNO_2 、 CH_3COOH 、 HNO_3 、室温； I_2 、 60°C 、2工程で25%(純度80%)；(ii) PhMgCl 、 $(\text{CH}_3)_3\text{CCHO}$ 、THF、 -40°C ～室温、72%；(iii) (1S)-カンファン酸クロリド、DMAP、 CH_2Cl_2 、室温、80%；(iii) エタノールからの分別晶出、63%；(iv) K_2CO_3 、MeOH、還流、98%。

【0315】

硝酸(68～70%、125mL)を氷酢酸(125ml)と室温でゆっくりと混合した後、 NaNO_2 (400mg、5.8mmol)および3-ヨードアニソール(10g、42.7mmol)を加えた。反応液を室温で24時間攪拌した後、 I_2 (10.8g、42.7mmol)を加え、混合物を 60°C で終夜攪拌した。反応混合物を氷水(500ml)に注ぎ、 CH_2Cl_2 (100ml)で3回抽出した。一緒にした有機相を飽和 NaHCO_3 溶液(500ml)で中和し、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液(20%、100ml)で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して粗3,6-ジヨード-4-ニトロアニソール(5.4g)を得て、これを1つの未知の副生成物(20%)と混合し、さらに精製せずに次の工程で使用した。

30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.42 (s, 1 H, Ph-H), 7.33 (s, 1 H, Ph-H), 3.97 (s, 3 H, OCH_3)

【0316】

40

粗3,6-ジヨード-4-ニトロアニソール(770mg、純度80%、1.52mmol)の無水THF(10mL)溶液に、窒素雰囲気下 -40°C で、塩化フェニルマグネシウム(THF中2M、0.46mL、0.92mmol)を、温度が -35°C を超えない速度で滴下した。添加の完了時点で混合物を -40°C で2時間攪拌した後、トリメチルアセトアルデヒド(0.22mL、1.97mmol)を加えた。混合物を -30°C で2時間、次に室温でさらに1時間攪拌した。次に反応液をブライン(1.0mL)で反応停止させ、 CH_2Cl_2 (100mL)で希釈し、溶液を CH_3COOH (0.1N、50ml)およびブライン(50ml)で順次洗浄した。有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してラセミ(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(399mg、72%)を得た。

¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃): δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH₃), 2.12 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃)

【0317】

ラセミ(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(395mg、1.1mmol)およびDMAP(263mg、2.16mmol)の無水CH₂Cl₂(5.0mL)溶液に(1S)-カンファン酸クロリド(参照により組み入れられるCorrie et al., 1992)(350mg、1.62mmol)を加え、混合物を窒素雰囲気下、室温で終夜攪拌した。反応混合物をCH₂Cl₂(50mL)で希釈し、飽和NaHCO₃溶液(50mL)で洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して(1S)-カンファン酸(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(490mg、80%、ジアステレオマーの1:1混合物)を得た。

【0318】

(1S)-カンファン酸(R/S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(3.4g)を沸騰エタノール(150ml)に溶解させ、溶液を温油浴中に保持し、室温にゆっくりと冷却し、終夜静置した。針状結晶が徐々に形成され、これを濾取して純粋な単一のジアステレオマーである(1S)-カンファン酸(R)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(870mg、51%)を得た。残留母液を減圧濃縮し、残渣を沸騰エタノール(150ml)に再度溶解させ、溶液を室温に速やかに冷却したところ、針状結晶が2時間以内に形成された。結晶を濾取して純粋な単一のジアステレオマーである(1S)-カンファン酸(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピルを得た。晶出プロセスを2回繰り返してさらなる純粋な(S)-ジアステレオマーを得た(合計1.07g、63%)。

(1S)-カンファン酸(R)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-

1-プロピルの¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.94 (s, 1 H, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, Ph-CH), 3.93 (s, 3 H, OCH₃), 2.42 (m, 1 H, CH), 2.11 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 1 H, CH₂), 1.75 (m, 1 H, CH₂), 1.11 (s, 3 H, CH₃), 1.05 (s, 3 H, CH₃), 0.97 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.86 (s, 3 H, CH₃)

(1S)-カンファン酸(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-

1-プロピルの¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.95 (s, 1 H, Ph-H), 6.80 (s, 1 H, Ph-CH), 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 2.37 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 2 H, CH₂), 1.66 (m, 1 H, CH), 1.14 (s, 3 H, CH₃), 1.07 (s, 3 H, CH₃), 1.06 (s, 3 H, CH₃), 0.98 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

【0319】

(1S)-カンファン酸(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロピル(1.1g、2.0mmol)およびK₂CO₃(552mg、4.0mmol)のメタノール(50mL)中混合物を還流温度に1時間加熱した後、冷却し、減圧濃縮し、CH₂Cl₂(50mL)で希釈した。有機相をブライン(50mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製してエナンチオピュアな(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(720mg、98%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH₃), 2.12 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃)

【0320】

色素標識7-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジ

10

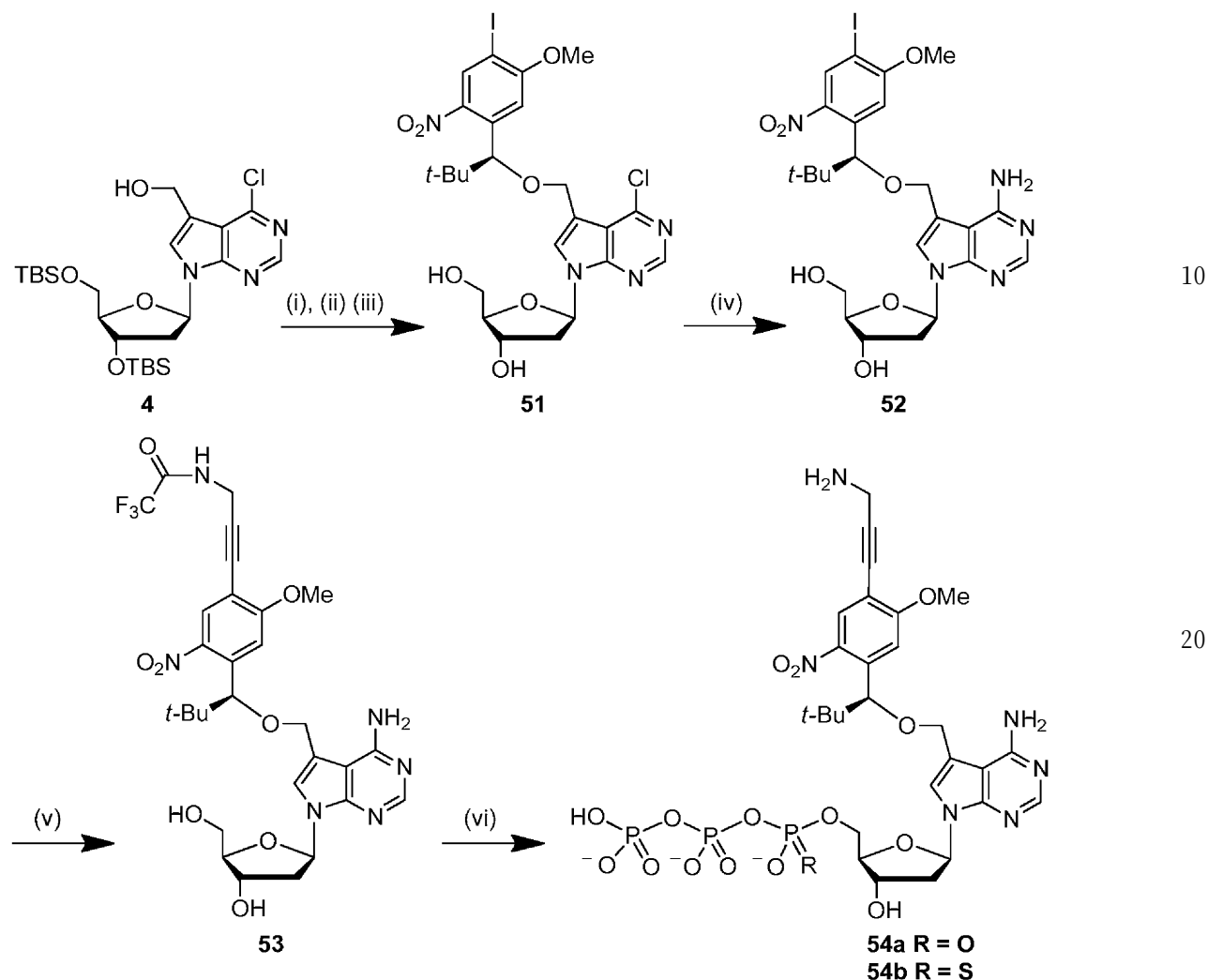
20

30

40

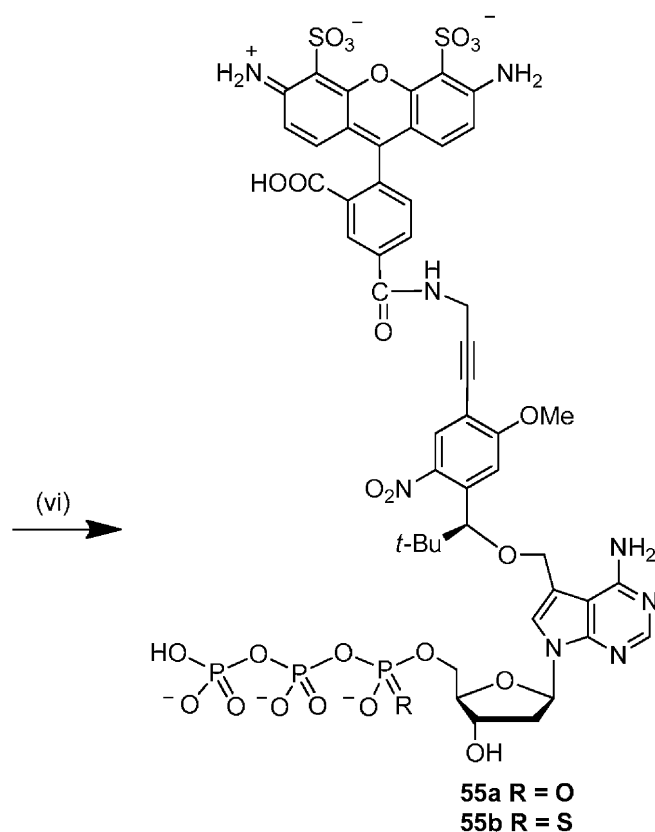
50

メチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸および5'- α -チオ三リン酸の合成



スキームS25a 色素標識7-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸および5'- α -チオ三リン酸の合成。試薬および条件: (i) MsCl、DMAP、CH₂Cl₂; (ii) (S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110°C; (iii) n-Bu₄NF、THF、室温; 3工程で29%; (iv) NH₃、1,4-ジオキサン/MeOH、100°C、80%; (v) N-プロパルギルトリフルオロアセトアミド、Pd(PPh₃)₄(0)、CuI、Et₃N、DMF、98%; (vi) 54a: POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃; NH₄OH。 54b: PSCl₃、2,4,6-コリジン、(EtO)₃PO、0°C~室温; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF; 1M HNEt₃HCO₃; NH₄OH。

【 0 3 2 1 】



スキームS25b (vi) Alexa Fluor 488 NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0322】

化合物4(400mg、0.76mmol)の無水CH₂Cl₂(5.0mL)溶液にDMAP(463mg、3.80mmol)およびMsCl(177μL、2.28mmol)を窒素雰囲気下0℃で加えた。反応液を0℃で10分間、室温でさらに3時間攪拌した。次に反応液をCH₂Cl₂(20mL)で希釈した。溶液をショートシリカゲルプラグ(2 x 3cm)上に適用し、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン溶媒系(80mL、容積比: 80/20/0.5)で速やかに溶離した。溶離液を減圧濃縮し、残渣を(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(500mg、1.37mmol)と混合した。混合物を窒素雰囲気下115℃で45分間加熱し、室温に冷却し、THF(10mL)に溶解させた。n-Bu₄NF(526mg、1.67mmol)を加え、混合物を室温で12時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(50mL)に溶解させ、ブライン(50mL)で洗浄し、水相をCH₂Cl₂(20mL)で2回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して6-クロロ-9-(β-D-2'-デオキシリボフラノシル)-7-[(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]-メチル-7-デアザプリン51(135mg、3工程で29%)を得た。

¹H NMR (400

MHz, CDCl₃): δ 8.56 (s, 1 H, H-2), 8.21 (s, 1 H, Ph-H), 7.34 (s, 1 H, H-8), 7.02 (s, 1 H, Ph-H), 6.35 (dd, 1 H, J = 6.0 および 8.8 Hz, H-1'), 5.20 (s, 1 H, Ph-CH), 4.76 (dd, 2 H, J = 12.4 および 36.4 Hz, 7-CH₂), 4.74 (m, 1 H, H-3'), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.96 (m, 1 H, H-5'a), 3.92 (s, 3 H, OCH₃), 3.80 (m, 1 H, H-5'b), 2.85 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 0.83 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

【0323】

化合物51(135mg、0.22mmol)を1,4-ジオキサン(10mL)に溶解させた後、MeOH中NH₃(7N、20mL)を加えた。混合物を封管に移し、100℃で24時間攪拌した後、室温に冷却し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]-メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノ

シン52(110mg、80%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (s, 1 H, H-2), 8.22 (s, 1H, Ph-H), 6.96 (s, 1 H, Ph-H), 6.79 (s, 1 H, H-8), 6.14 (dd, 1 H, $J = 6.0$ および 7.6 Hz, H-1'), 5.21 (s, 1 H, Ph-CH), 4.74 (m, 1 H, H-3'), 4.56 (dd, 2H, $J = 13.2$ および 24.8 Hz, 7- CH_2), 4.17 (m, 1 H, H-4'), 3.93 (m, 1H, H-5'a), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (m, 1H, H-5'b), 2.96 (m, 1 H, H-2'a), 2.21 (m, 1 H, H-2'b), 0.83 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0324】

化合物52(183mg、0.29mmol)、N-プロパルギルトリフルオロアセチルアミド(435mg、2.9 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)-パラジウム(0)(66mg、0.057mmol)、CuI(21 mg、0.11mmol)および Et_3N (170 μL 、1.22mmol)の無水DMF(4.0mL)溶液を50°Cで24時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して7-{(S)-1-[5-メトキシ-4-(3-トリフルオロアセトアミド-1-プロピニル)-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン53(185mg、98%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ 8.06 (s, 1 H, H-2), 7.89 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, H-8), 7.15 (s, 1 H, Ph-H), 6.37 (dd, 1 H, $J = 6.0$ および 7.6 Hz, H-1'), 5.23 (s, 1 H, Ph-CH), 4.68 (d, 1 H, $J = 12.8$ Hz, 7- CH_2a), 4.49 (m, 1 H, H-3'), 4.34 (s, 2H, CH_2), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 3.70 (m, 2 H, H-5'), 2.59 (m, 1 H, H-2'a), 2.2.8 (m, 1 H, H-2'b), 0.85 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

【0325】

化合物53(52mg、0.08mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.5mL)中 POCl_3 (14 μL 、0.15mmol)およびプロトンスポンジ(34mg、0.16mmol)によって0°Cで3時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.5mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して7-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸54aを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μm 、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。HRMS(ESI): 分子イオン $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_{16}\text{P}_3[\text{M}-\text{H}]^-$ について、計算質量は793.1401、実測質量は793.1426であった。

【0326】

化合物53(91mg、0.14mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリエチル(1.0mL)中 PSCl_3 (14 μL 、0.14mmol)および2,4,6-コリジン(34mg、0.28mmol)によって0°Cで1時間チオリン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(332mg、0.7mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(140 μL)の無水DMF(1.4mL)溶液を加えた。2分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、1M、pH 7.5; 20mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。チオ三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して7-{(S)-1

-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン-5'- α -チオ三リン酸54bを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。HRMS(ESI): 分子イオン $C_{27}H_{36}N_6O_{15}P_3S[M-H]^-$ について、計算質量は809.1172、実測質量は809.1155であった。

【0327】

三リン酸54a(1.6 μ mol)の $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 緩衝液(0.1M、pH 9.2、0.4mL)中溶液にAlexa Fluor 488 NHS(5mg、7.8 μ mol)の無水DMSO(200 μ L)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。混合物を最初にDionex DNAPac PA200カラム(250 x 4mm)上でのアニオン交換HPLCで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識三リン酸55aを含有する画分を一緒にし、少量に濃縮し、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。

10

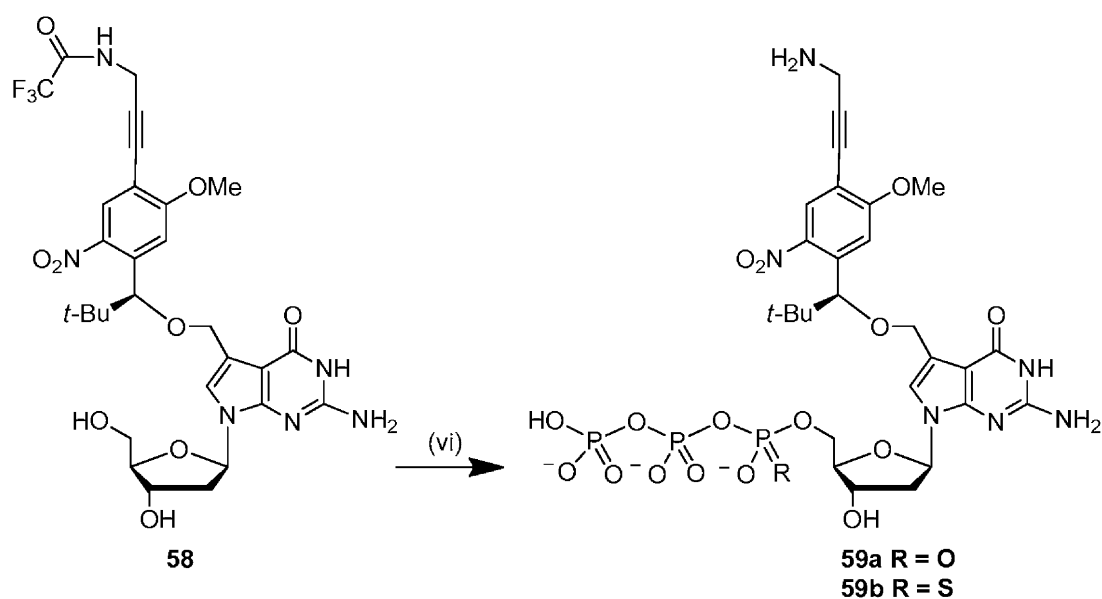
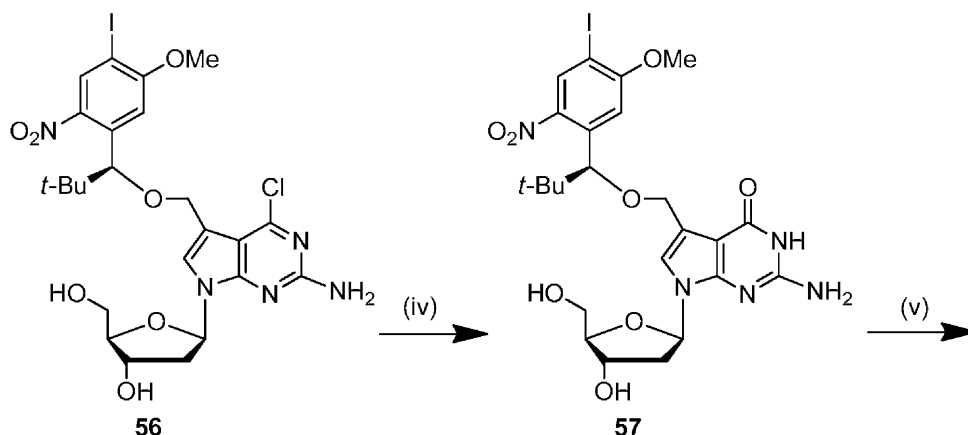
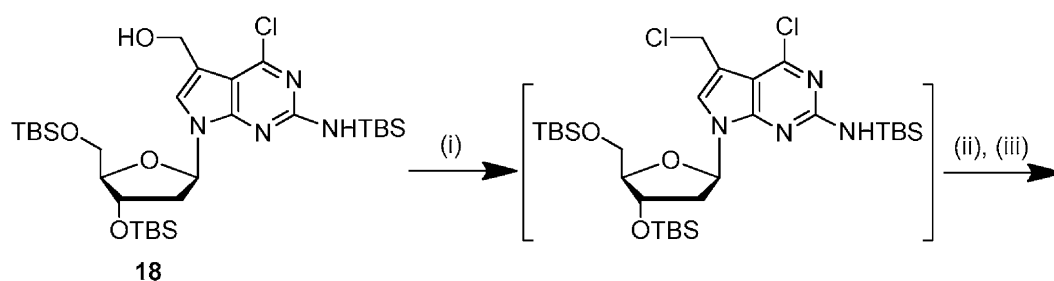
【0328】

チオ三リン酸54b(4.1 μ mol)の $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 緩衝液(0.1M、pH 9.2、1.0mL)中溶液にAlexa Fluor 488 NHS(5mg、7.8 μ mol)の無水DMSO(200 μ L)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。混合物を最初にQ Sepharose FFカラム(2.5 x 10cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識チオ三リン酸55bを含有する画分を一緒にし、凍結乾固させ、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。

20

【0329】

色素標識7-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸および5'- α -チオ三リン酸の合成



スキームS26a 色素標識7-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸および5'-α-チオ三リン酸の合成。試薬および条件：(i) MsCl、DMAP、CH₂Cl₂、0℃；(ii) (S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、115℃；(iii) n-Bu₄NF、THF、室温；3工程で18%；(iv) syn-ピリジン-2-アルドキシム、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン、1,4-ジオキサン/DMF、70℃、72%；(v) N-プロパルギルトリフルオロアセトアミド、Pd(PPh₃)₄(0)、CuI、Et₃N、DMF、96%；(vi) 59a: POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0℃；(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF；1M HNEt₃HCO₃；NH₄OH。59b: PSCl₃、2,4,6-コリジン、(EtO)₃PO、0℃～室温；(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF；1M HNEt₃HCO₃；NH₄OH。

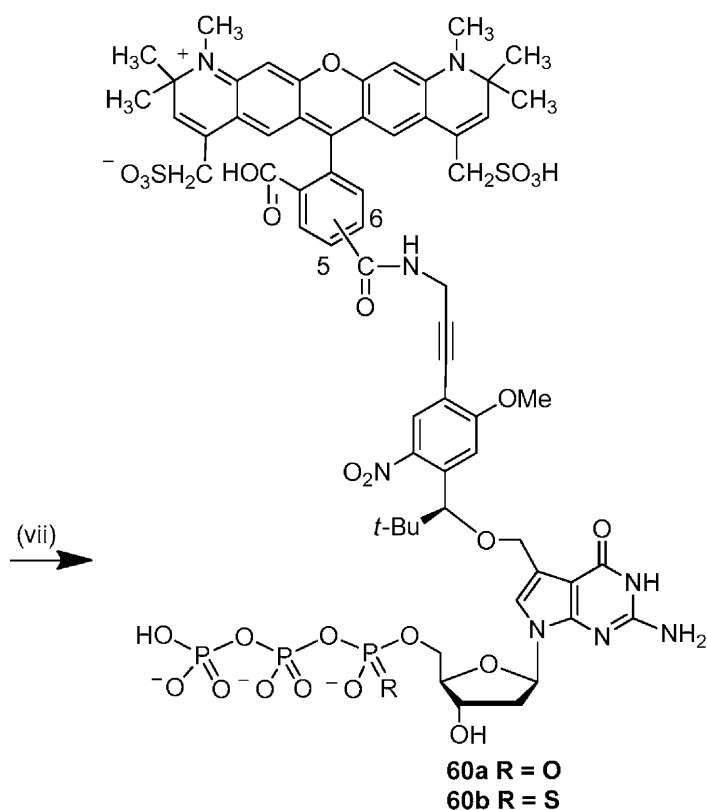
【0330】

10

20

30

40



スキームS26b (vii) Alexa Fluor 594 NHS、0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH9.2)。

【0331】

化合物18(680mg、1.0mmol)の無水CH₂Cl₂(6.0mL)溶液にDMAP(502mg、4.1mmol)およびMsCl(238 μL、3.1mmol)を窒素雰囲気下0℃で加えた。反応液を0℃で10分間攪拌した後、CH₂Cl₂(20mL)で希釈した。溶液をショートシリカゲルプラグ(2 x 3cm)上に適用し、ヘキサン/酢酸エチル/トリエチルアミン溶媒系(80mL、容積比: 80/20/0.5)で速やかに溶離した。溶離液を減圧濃縮し、残渣を(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(500mg、2.1mmol)と混合した。混合物を窒素雰囲気下115℃で45分間加熱し、室温に冷却し、THF(10mL)に溶解させた。n-Bu₄NF(1.07g、3.40mmol)を加え、混合物を室温で12時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をCH₂Cl₂(50mL)に溶解させ、ブライン(50mL)で洗浄し、水相をCH₂Cl₂(20mL)で2回抽出した。一緒にした有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して2-アミノ-6-クロロ-9-(β-D-2'-デオキシリボフラノシル)-7-[(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]-メチル-7-デアザプリン56(125mg、3工程で18%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (s, 1 H, Ph-H), 7.04 (s, 1 H, Ph-H), 6.91 (s, 1 H, H-8), 6.17 (dd, 1 H, J = 6.0 および 8.4 Hz, H-1'), 5.18 (s, 1 H, Ph-CH), 5.11 (br s, 2 H, NH₂), 4.71 (m, 1 H, H-3'), 4.59 (dd, 2 H, J = 12.4 および 24.4 Hz, 7-CH₂), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 3.88 (m, 1 H, H-5'a), 3.79 (m, 1 H, H-5'b), 2.76 (m, 1 H, H-2'a), 2.32 (m, 1 H, H-2'b), 0.81 (s, 9 H, (CH₃)₃)

【0332】

化合物56(100mg、0.16mmol)の1,4-ジオキサン(1.5mL)およびDMF(3.0mL)溶液にsyn-ピリミジン-2-アルドキシム(389mg、3.2mmol)および1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(439 μL、3.5mmol)を加え、混合物を窒素雰囲気下70℃で終夜加熱した。反応混合物をCH₂Cl₂(20mL)で希釈し、酢酸溶液(0.1M、50mL)、飽和NaHCO₃溶液(50mL)およびブライン(50mL)で順次洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して7-[(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピル

ルオキシ]メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン57(70mg、72%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOH- d_4): δ 8.20 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 6.82 (s, 1 H, H-8), 6.18 (m, 1 H, H-1'), 5.23 (s, 1 H, Ph-CH), 4.71 (d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 7-CH₂a), 4.52 (d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 7-CH₂b), 4.43 (m, 1 H, H-3'), 3.97 (s, 3 H, OCH₃), 3.91 (m, 1 H, H-4'), 3.71 (m, 2 H, H-5'), 2.49 (m, 1 H, H-2'a), 2.19 (m, 1 H, H-2'b), 0.85 (s, 9 H, (CH₃)₃)

【0333】

化合物57(50mg、0.08mmol)、N-プロパルギルトリフルオロアセチルアミド(117mg、0.8mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)-パラジウム(0)(18mg、0.02mmol)、CuI(5.9mg、0.03mmol)およびEt₃N(48 μ L、0.34mmol)の無水DMF(3.0mL)溶液を50°Cで12時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して7-{(S)-1-[5-メトキシ-4-(3-トリフルオロアセトアミド-1-プロピニル)-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン58(50mg、96%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOH- d_4): δ 7.87 (s, 1 H, Ph-H), 7.26 (s, 1 H, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, H-8), 6.20 (m, 1 H, H-1'), 5.25 (s, 1 H, Ph-CH), 4.67 (d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 7-CH₂a), 4.54 (d, 1 H, $J = 12.0$ Hz, 7-CH₂b), 4.43 (m, 1 H, H-3'), 4.33 (s, 2 H, CH₂), 3.95 (s, 3 H, OCH₃), 3.89 (m, 1 H, H-4'), 3.70 (m, 2 H, H-5'), 2.46 (m, 1 H, H-2'a), 2.18 (m, 1 H, H-2'b), 0.86 (s, 9 H, (CH₃)₃)

【0334】

化合物58(52mg、0.08mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(27 μ L、0.3mmol)およびプロトンスポンジ(33mg、0.16mmol)によって0°Cで4時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.5mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μ L)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して7-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸59aを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₇H₃₆N₆O₁₇P₃[M-H]⁻について、計算質量は809.1350、実測質量は809.1360であった。

【0335】

化合物59(50mg、0.075mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリエチル(0.5mL)中PSCl₃(9 μ L、0.09mmol)および2,4,6-コリジン(18mg、0.15mmol)によって室温で2.5時間チオリン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.5mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μ L)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。2分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、1M、pH 7.5; 20mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。チオ三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して7-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピル

オキシ}メチル-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'- α -チオ三リン酸59bを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相：A、0.1M TEAB；B、アセトニトリル。HRMS(ESI)：分子イオン $C_{27}H_{36}N_6O_{16}P_3S$ [M-H]⁻について、計算質量は825.1121、実測質量は825.1103であった。

【0336】

三リン酸59a(2.2 μ mol)のNaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液(0.1M、pH 9.2、0.5mL)中溶液にAlexa Fluor 594 NHS(4.2mg、5.2 μ mol)の無水DMSO(170 μ L)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。混合物を最初にDionex DNAPac PA200カラム(250 x 4mm)上でのアニオン交換HPLCで精製した。移動相：A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル；B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識三リン酸60aを含有する画分を一緒にし、少量に濃縮し、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相：A、0.1M TEAB；B、アセトニトリル。

10

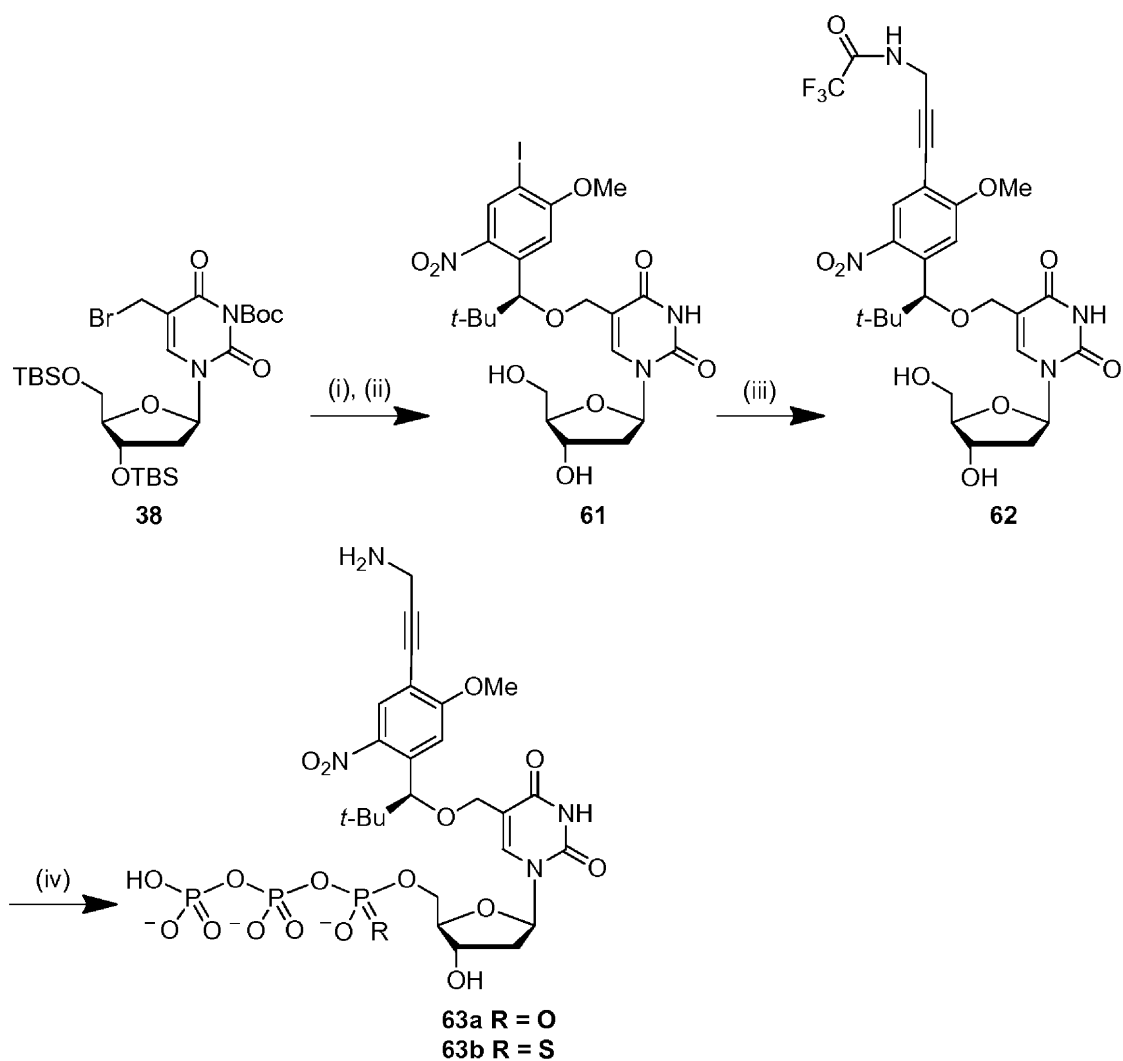
【0337】

チオ三リン酸59b(4.45 μ mol)のNaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液(0.1M、pH 9.2、0.78mL)中溶液にAlexa Fluor 594 NHS(5mg、6.2 μ mol)の無水DMSO(200 μ L)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。混合物を最初にQ Sepharose FFカラム(2.5 x 10cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相：A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル；B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識チオ三リン酸60bを含有する画分を一緒にし、少量に濃縮し、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相：A、0.1M TEAB；B、アセトニトリル。

20

【0338】

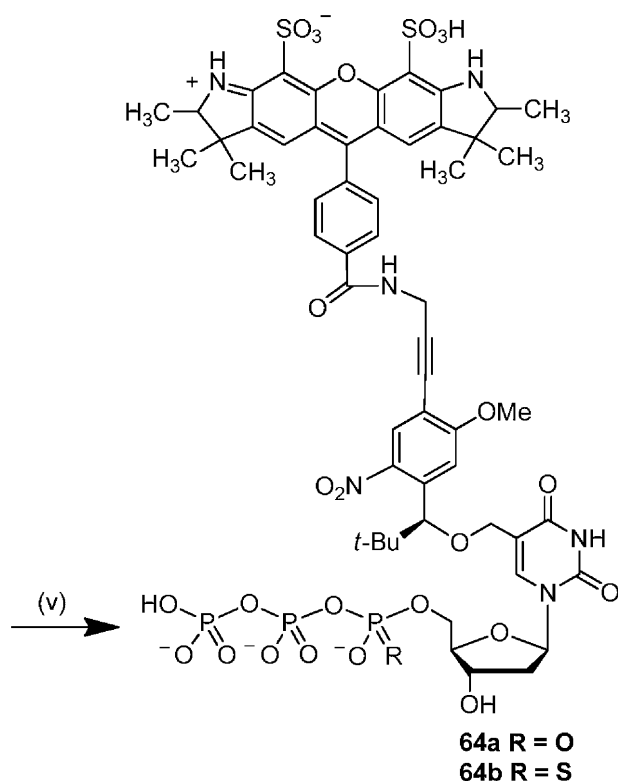
色素標識5-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸および5'- α -チオ三リン酸の合成



スキームS27a 色素標識5-[(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸の合成。

試薬および条件: (i) (S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール、110°C; (ii) NH_4F 、 MeOH 、50°C、2工程で28%; (iii) N-プロパルギルトリフルオロアセトアミド、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4(0)$ 、 CuI 、 Et_3N 、 DMF 、90%; (iv) 63a: POCl_3 、プロトンスポンジ、 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 、0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、 DMF ; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$; NH_4OH 。63b: PSCl_3 、2,6-ルチジン、 $(\text{EtO})_3\text{PO}$ 、0°C〜室温; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $n\text{-Bu}_3\text{N}$ 、 DMF ; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$; NH_4OH 。

【0339】



スキームS27b (v) Alexa Fluor 532 NHS、0.1M NaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液(pH9.2)。

【0340】

化合物38(350mg、0.54mmol)および(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-1-プロパノール(720mg、1.97mmol)を窒素雰囲気下110℃で45分間加熱した。混合物を室温に冷却し、MeOH(10mL)に溶解させた後、NH₄F(400mg、11.1mmol)を加えた。混合物を50℃で12時間攪拌し、減圧濃縮し、CH₂Cl₂(50mL)に溶解させ、ブライン(50mL)で洗浄した。有機相をNa₂SO₄で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して5-[(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン61(90mg、28%)を得た。

¹H NMR (400

MHz, CDCl₃): δ 8.34 (s, 1 H, Ph-H), 7.65 (s, 1 H, H-6), 7.12 (s, 1 H, Ph-H), 6.17 (t, 1 H, J = 6.8 Hz, H-1'), 5.18 (s, 1 H, Ph-CH), 4.59 (m, 1 H, H-3'), 4.27 (d, 1 H, J = 12.0 Hz, 5-CH₂a), 4.15 (d, 1 H, J = 12.0 Hz, 5-CH₂b), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.97 (s, 3 H, OCH₃), 3.95 (m, 1 H, H-5'a), 3.82 (m, 1 H, H-5'b), 2.34 (m, 2 H, H-2), 0.84 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

【0341】

化合物61(80mg、0.13mmol)、N-プロパルギルトリフルオロアセチルアミド(196mg、1.30 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)-パラジウム(0)(30mg、0.026mmol)、CuI(9.9mg、0.052mmol)およびEt₃N(80 μL)の無水DMF(3.0mL)溶液を50℃で12時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して5-{(S)-1-[5-メトキシ-4-(3-トリフルオロアセトアミド-1-プロピニル)-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシウリジン62(75mg、90%)を得た。

¹H NMR

(400 MHz, MeOD-*d*₄): δ 8.11 (s, 1 H, H-6), 8.08 (s, 1 H, Ph-H), 7.36 (s, 1 H, Ph-H), 6.27 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.33 (s, 1 H, Ph-CH), 4.47 (m, 1 H, H-3'), 4.44 (s, 2 H, 5-CH₂), 4.32 (d, 2 H, *J* = 2.0 Hz, CH₂), 4.08 (s, 3 H, OCH₃), 3.99 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.79 (m, 1 H, H-5'b), 2.30 (m, 2 H, H-2), 0.93 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

【0342】

化合物62(40mg、0.064mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(21 μL、0.22mmol)およびプロトンスポンジ(27mg、0.13mmol)によって0℃で4時間リン酸化した。ビス-トリ-*n*-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.5mmol)およびトリ-*n*-ブチルアミン(100 μL)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して5-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸63aを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μm、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。

【0343】

化合物62(130mg、0.21mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリエチル(0.6mL)中PSCl₃(26 μL、0.25mmol)および2,6-ルチジン(89mg、0.84mmol)によって室温で1時間チオリン酸化した。ビス-トリ-*n*-ブチルアンモニウムピロホスフェート(474mg、1.0mmol)およびトリ-*n*-ブチルアミン(200 μL)の無水DMF(2.0mL)溶液を加えた。2分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、1M、pH 7.5; 20mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。チオ三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して5-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシウリジン-5'-α-チオ三リン酸63bを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μm、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₅H₃₄N₄O₁₇P₃S[M-H]⁻について、計算質量は787.0853、実測質量は787.0884であった。

【0344】

三リン酸62a(1.07 μmol)のNaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液(0.1M、pH 9.2、0.3mL)中溶液にAlexa Fluor 532 NHS(2mg、2.76 μmol)の無水DMSO(80 μL)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。混合物を最初にDionex DNAPac PA200カラム(250 x 4mm)上でのアニオン交換HPLCで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識三リン酸63aを含有する画分を一緒にし、少量に濃縮し、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μm、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。

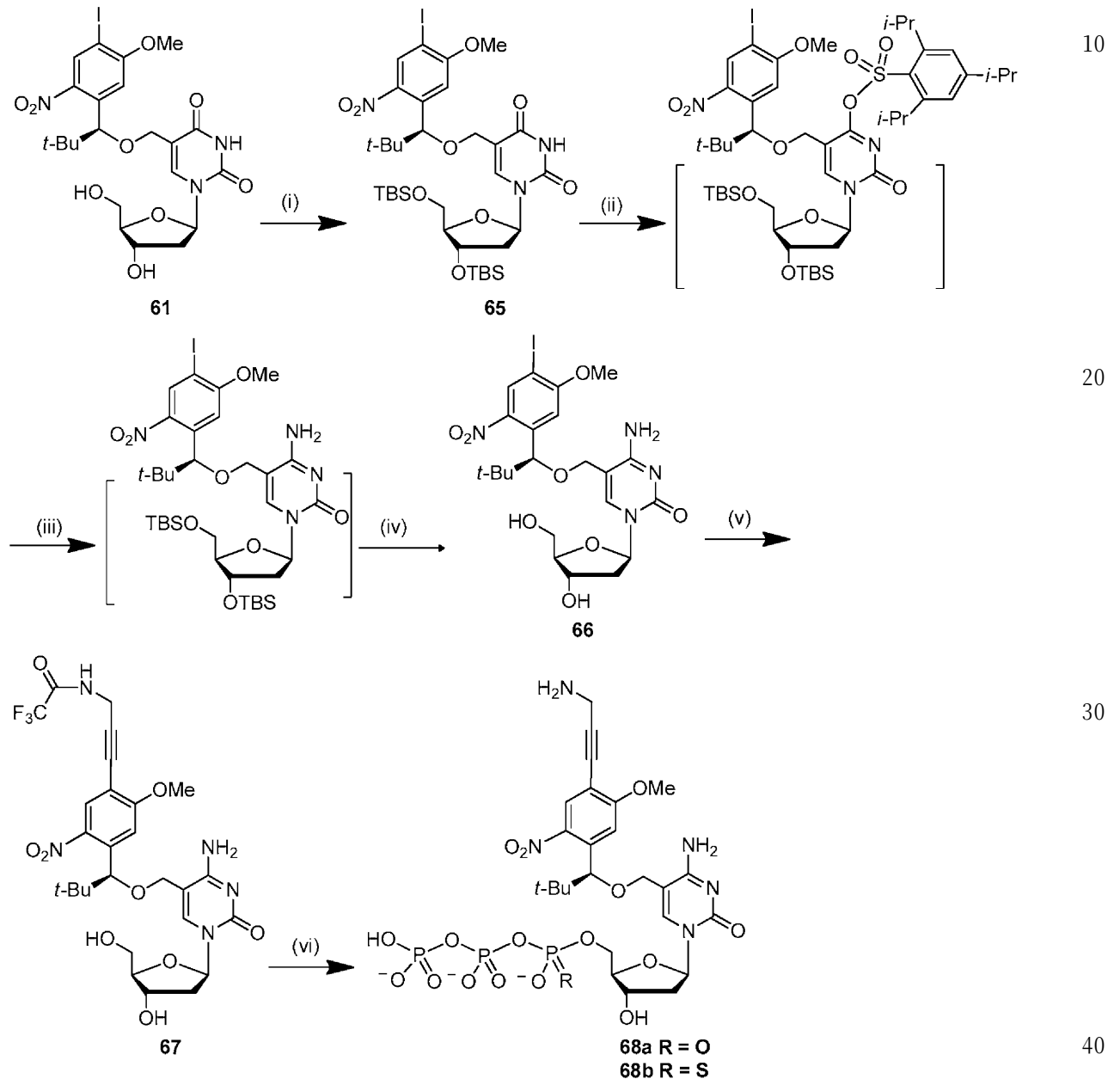
【0345】

チオ三リン酸62b(1.03 μmol)のNaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液(0.1M、pH 9.2、0.15mL)中溶液にAlexa Fluor 532 NHS(2.5mg、3.45 μmol)の無水DMSO(100 μL)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。混合物を最初にQ Sepharose FFカラム(2.5 x 10cm)を使用する

アニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相：A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル；B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識チオ三リン酸63bを含有する画分を一緒にし、凍結乾固させ、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相：A、0.1M TEAB；B、アセトニトリル。

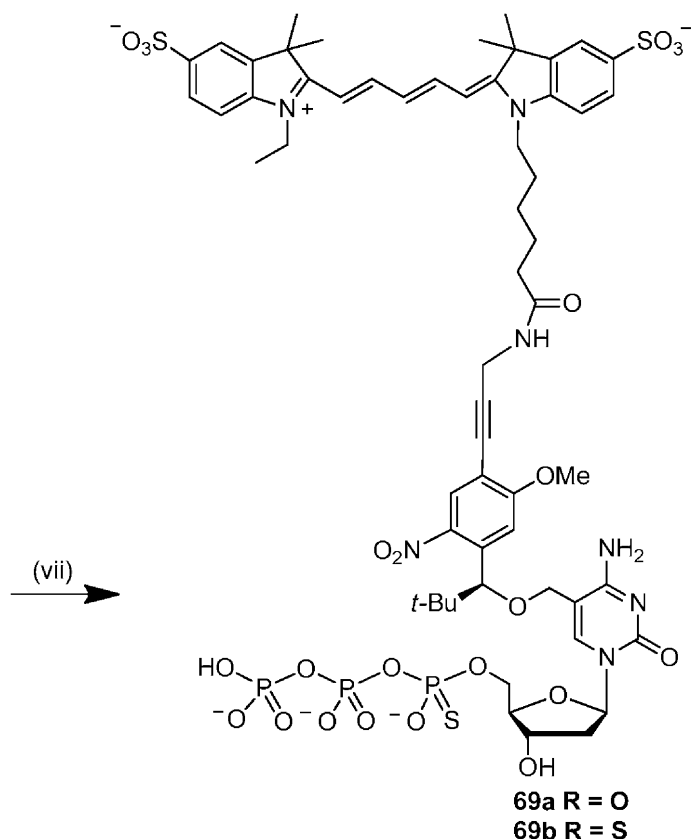
【0346】

色素標識5-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸および5'- α -チオ三リン酸の合成



スキームS28a 色素標識5-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸の合成。試薬および条件：(i) TBSCl、イミダゾール、DMF、室温、96%；(ii) 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホンクロリド、DMAP、Et₃N、CH₂Cl₂、室温；(iii) NH₃、1,4-ジオキサン、90℃；(iv) n-Bu₄NF、THF、室温、3工程で83%；(v) N-プロパルギルトリフルオロアセトアミド、Pd(PPh₃)₄(0)、CuI、Et₃N、DMF、91%；(vi) 68a: POCl₃、プロトンスポンジ、(MeO)₃PO、0℃；(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF；1M HNEt₃HCO₃；NH₄OH。68b: PSCl₃、2,6-ルチジン、(EtO)₃PO、0℃；(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇、n-Bu₃N、DMF；1M HNEt₃HCO₃；NH₄OH。

【0347】



スキームS28b (vii) Cy5 NHS、0.1M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 緩衝液 (pH9.2)。

【0348】

化合物61(295mg、0.49mmol)の無水DMF(5.0mL)溶液にTBSCl(185mg、1.23mmol)およびイミダゾール(160mg、2.35mmol)を加えた。混合物を室温で12時間攪拌し、減圧濃縮し、 CH_2Cl_2 (50mL)に溶解させた。溶液を飽和 NaHCO_3 溶液(50mL)で洗浄し、水相を CH_2Cl_2 (30mL)で3回抽出した。一緒にした有機相を Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して3',5'-0-ビス-(tert-ブチルジメチルシリル)-5-[(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシウリジン65(400mg、96%)を得た。

^1H NMR

(400 MHz, CDCl_3): δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.64 (s, 1 H, H-6), 7.12 (s, 1 H, Ph-H), 6.12 (t, 1 H, $J=6.8$ Hz, H-1'), 5.20 (s, 1 H, Ph-CH), 4.60 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (d, 1 H, $J=12.0$ Hz, 5- CH_2a), 4.14 (d, 1 H, $J=12.0$ Hz, 5- CH_2b), 4.02 (m, 1 H, H-4'), 3.97 (s, 3 H, OCH_3), 3.94 (m, 1 H, H-5'a), 3.83 (m, 1 H, H-5'b), 2.34 (m, 2 H, H-2), 0.90 および 88 (2 s, 18 H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.84 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.08 (3 s, 12 H, CH_3)

【0349】

化合物65(400mg、0.48mmol)、DMAP(64mg、0.53mmol)およびトリエチルアミン(0.60mL、4.32mmol)の無水 CH_2Cl_2 (15mL)溶液に2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド(581mg、1.92mmol)を加えた。混合物を窒素雰囲気下、室温で終夜攪拌し、減圧濃縮し、残渣を NH_3 の1,4-ジオキサン溶液(0.5M、20mL)に溶解させた。混合物を封管中に移し、90°Cで終夜加熱した。次に反応液を室温に冷却し、減圧濃縮し、残渣をTHF(8.0mL)に溶解させた後、 $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ (333mg、1.06mmol)を加えた。混合物を室温で4時間攪拌し、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して5-[(S)-1-(4-ヨード-5-メトキシ-2-ニトロフェニル)-2,2-ジメチル-プロピルオキシ]メチル-2'-デオキシシチジン66(240mg、全3工程で83%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOD}-d_4$): δ 8.33 (s, 1 H, Ph-H), 7.91 (s, 1 H, H-6), 7.10 (s, 1 H, Ph-H), 6.16 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 5.19 (s, 1 H, Ph-CH), 4.41 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 5-CH₂a), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 4.26 (d, 1 H, $J = 12.4$ Hz, 5-CH₂b), 3.97 (s, 3 H, OCH₃), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.70 (m, 2 H, H-5'), 2.34 (m, 1 H, H-2'a), 2.17 (m, 1 H, H-2'b), 0.84 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

【0350】

化合物66(245mg、0.4mmol)、N-プロパルギルトリフルオロアセチルアミド(603mg、4.0mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)-パラジウム(0)(92mg、0.8mmol)、CuI(30mg、0.16mmol)およびEt₃N(240 μ L、1.7mmol)の無水DMF(5.0mL)溶液を50℃で12時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して5-{(S)-1-[5-メトキシ-4-(3-トリフルオロアセトアミド-1-プロピニル)-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシシチジン67(230mg、91%)を得た。

10

$^1\text{H NMR}$

(400 MHz, $\text{MeOD}-d_4$): δ 7.98 (s, 1 H, Ph-H), 7.92 (s, 1 H, H-6), 7.19 (s, 1 H, Ph-H), 6.15 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 5.21 (s, 1 H, Ph-CH), 4.41 (d, 1 H, $J = 13.2$ Hz, 5-CH₂a), 4.33 (m, 3 H, H-3' および CH₂), 4.27 (d, 1 H, $J = 13.2$ Hz, 5-CH₂b), 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.72 (m, 2 H, H-5'), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b), 0.84 (s, 9 H, C(CH₃)₃)

20

【0351】

化合物67(45mg、0.072mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリメチル(0.35mL)中POCl₃(15 μ L、0.16mmol)およびプロトンスポンジ(31mg、0.14mmol)によって0℃で4時間リン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(237mg、0.5mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(100 μ L)の無水DMF(1.0mL)溶液を加えた。10分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、0.1M、pH 7.5; 10mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して5-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸68aを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。HRMS(ESI): 分子イオンC₂₅H₃₅N₅O₁₇P₃[M-H]⁻について、計算質量は770.1241、実測質量は770.1234であった。

30

【0352】

化合物67(118mg、0.19mmol)を窒素雰囲気下、リン酸トリエチル(0.5mL)中PSCl₃(24 μ L、0.23mmol)および2,6-ルチジン(80mg、0.75mmol)によって0℃で1時間チオリン酸化した。ビス-トリ-n-ブチルアンモニウムピロホスフェート(474mg、1.0mmol)およびトリ-n-ブチルアミン(200 μ L)の無水DMF(2.0mL)溶液を加えた。2分間攪拌後、炭酸水素トリエチルアンモニウム溶液(TEAB、1M、pH 7.5; 20mL)を加えた。反応液を室温で1時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣を75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル(20mL)に溶解させ、濾過し、Q Sepharose FFカラム(2.5 x 20cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。チオ三リン酸を含有する画分を一緒にし、凍結乾燥により乾固させた。残渣を水(10mL)に溶解させ、室温で濃水酸化アンモニウム(10mL、27%)によって1時間処理して5-{(S)-1-[4-(3-アミノ-1-プロピニル)-5-メトキシ-2-ニトロフェニル]-2,2-ジメチル-プロピルオキシ}メチル-2'-デオキシシチジン-5'- α -チオ三リン酸68bを得て、これをPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A

40

50

、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。HRMS(ESI): 分子イオン $C_{25}H_{35}N_5O_{16}P_3S[M-H]^-$ について、計算質量は786.1012、実測質量は786.0983であった。

【0353】

三リン酸68a(1.59 μ mol)の $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 緩衝液(0.1M、pH 9.2、0.35mL)中溶液にCy5 NHS(5mg、6.3 μ mol)の無水DMSO(200 μ L)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。色素標識三リン酸を最初にDionex DNAPac PA200カラム(250 x 4mm)上でのアニオン交換HPLCで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識三リン酸69aを含有する画分を一緒にし、少量に濃縮し、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。

10

【0354】

チオ三リン酸68b(2.96 μ mol)の $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 緩衝液(0.1M、pH 9.2、0.53mL)中溶液にCy5 NHS(5mg、6.3 μ mol)の無水DMSO(200 μ L)溶液を加えた。混合物を暗所中室温で1時間放置した。色素標識チオ三リン酸を最初にQ Sepharose FFカラム(2.5 x 10cm)を使用するアニオン交換クロマトグラフィーで精製した。移動相: A、75% 0.1M TEAB/25%アセトニトリル; B、75% 1.5M TEAB/25%アセトニトリル。色素標識チオ三リン酸69bを含有する画分を一緒にし、凍結乾固させ、生成物をPerkinElmer Aquapore OD-300カラム(7 μ m、250 x 4.6mm)上での逆相HPLCでさらに精製した。移動相: A、0.1M TEAB; B、アセトニトリル。

【0355】

本明細書において開示および特許請求したすべての方法を、本開示に照らして、過度の実験なしに実施および実行することができる。本発明の組成物および方法を特定の態様に関して説明してきたが、本発明の概念、真意および範囲を逸脱することなく、これらの方法、および本明細書に記載の方法の段階または段階の順序に変動を適用できることは、当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的にかつ生理学的に関連する特定の薬剤で、同一のまたは同様の結果を実現しながら、本明細書に記載の薬剤を代用することができることは明らかであろう。当業者に明らかなすべてのそのような同様の代用物および修正は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の真意、範囲および概念内にあると見なされる。

20

【0356】

実施例9

30

紫外線光開裂試験

紫外線光開裂速度は、光強度を含むいくつかの実験因子に依存することがわかった。いずれも参照により本明細書に組み入れられるMcCray et al. (1980)およびMcGall et al. (1997)を参照。本明細書に記載のヌクレオチド類似体間の光化学開裂速度を比較するために、1日の光強度出力 $0.70 \pm 0.01 W/cm^2$ を試料に送達するプロトコルを開発した。以下参照。これらの試験において使用したカスタム設計の紫外線脱保護装置は、参照により本明細書に組み入れられるWu et al. (2007)に既に記載されており、実行したプロトコルは以下に記載の通りである。

【0357】

紫外線脱保護装置の設定

40

製造業者によって記載される通り、電源を約30分間作動させた後、ランプおよび再循環浴を作動させた。赤外線液体フィルターを9°Cに冷却した。モデルPM100電力計(Thorlabs)、1000 μ mピンホール(Edmund Optics)、半分に切断された修正0.5mLエッペンチューブ、および3軸手動並進ステージ(Newport)を使用して光強度を決定した。図5参照。半分に切断されたエッペンチューブがピンホールおよび電力計検出ヘッドの前に配置され、このことが、反応溶液を通過する光の幾何学的形状の歪みの原因となった。そこで並進ステージを使用し、アークビームからの最高強度を用いて、チューブ/ピンホール/検出器の装置を整列させた。

【0358】

0.7W/cm²への強度調整

50

ランプの出力を安定化させるために、強度測定前に1時間点灯したままにした。その後、測定電力を、電源からの電流を増大させることで調整した。強度(I)0.70W/cm²を実現するために、下記式に従って測定電力(P)を約5.5mWに調整した：

$$I = \frac{P}{\pi \times r^2}$$

式中、rはピンホールの半径である。電力読取値を5分間(1秒間隔)にわたって記録し、6週間にわたる0.68±0.01~0.72±0.02W/cm²の範囲の強度読取値に変換した。

【0359】

0.5mLチューブホルダーとのビームの整列

次に修正エッペンチューブ、ピンホールおよび電力計を紫外線脱保護装置から取り外し、回転式試料ホルダーを高さ67.18±0.25mmで設置した。次に0.5mLエッペンチューブを試料ホルダー中に配置することでビームを集束させた。このチューブは、10μLおよび20μLの体積に相当する高さに基準線を設けるように内部整列カードで修正された。図5参照。基準線によって、ビームを所与の反応体積の中心に当てることが可能になった。後部反射器が生成するランプの水銀アーク像を観察することでビームの整列をさらに確認した。画像を見るために第2の整列カードを回転式試料ホルダー中に配置した。この画像は、反射器を使用して適切に整列される際に、アークギャップそれ自体の上に倒立したアーク像を生成する。この段階によって、電力出力約5.5mWを維持しながら、過熱を引き起こすことがあるアークホットスポットが重ね合わせられないことを確実にした。回転式試料ホルダーの速度を、Nova-Strobe DA Plusストロボスコープ(Monarch Instrument)を使用して、モーターのトルクを調整ねじによって調整することで、1,200~1,350rpmの範囲内に調整した。

【0360】

光化学開裂アッセイ

ヌクレオチド類似体を、PEPアッセイについて記載のように10μL反応液を使用して、最終濃度100nMで取り込んだ。参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al. (2011)を参照。BODIPY-FL標識プライマー1とそれぞれハイブリダイズしたoligoTemplate-2、oligoTemplate-5およびoligoTemplate-4をそれぞれC⁷-HOMedA、C⁷-HOMedGおよびHOMedU類似体を使用した。BODIPY-FL標識プライマー3とハイブリダイズしたoligoTemplate-8を、HOMedC類似体をアッセイするために使用した。取り込まれた反応液を1mMアジ化ナトリウム溶液；1mMアジ化ナトリウム、50mM DTT溶液；または試薬C~G(図4の一覧を参照)で反応停止させ、本発明者らの紫外線脱保護装置を使用して様々な時点で365nm紫外線(UV)に曝露させた後、氷上に配置した。停止溶液(98%脱イオン化ホルムアミド；10mM Na₂EDTA、pH 8.0；25mg/mLブルーデキストラン、分子量2,000,000)10μLを加え、試料をABモデル377 DNA配列決定装置を使用して分析した。参照により本明細書に組み入れられるLitosh et al. (2011)に記載のように、開裂アッセイを三つ組で行って平均DT₅₀値±1SDを計算した。

【0361】

参考文献

以下の参考文献、および付録に列挙されている参考文献は、それらが本明細書に開示の参考文献を補足する例示的な手順上のまたは他の詳細を与える限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

U.S. Patent 3,822,996	
U.S. Patent 3,859,045	
U.S. Patent 3,917,499	
U.S. Patent 4,737,155	
U.S. Patent 4,304,568	
U.S. Patent 4,631,066	
U.S. Patent 4,737,155	10
U.S. Patent 4,439,356	
U.S. Patent 5,151,507	
U.S. Patent 5,188,934	
U.S. Patent 5,302,509	
U.S. Patent 5,770,367	
U.S. Patent 6,664,079	
U.S. Patent 7,057,026	
U.S. Patent 7,345,159	20
U.S. Patent 7,414,116	
U.S. Patent 7,476,734	
U.S. Patent 7,541,444	
U.S. Patent 7,556,537	
U.S. Patent 7,592,435	
U.S. Patent 7,635,578	
U.S. Patent 7,713,698	30
U.S. Patent 7,771,973	
U.S. Patent 7,897,737	
U.S. Patent 7,964,352	
U.S. Patent 8,148,503	
U.S. Patent Appl. Publication 2004/0110196	
U.S. Patent Appl. Publ. 2006/0160081	

U.S. Patent Appl. Publ. 2010/0041041

WO 2012/037394

Aliotta *et al.*, *Genet Anal. Biomol Eng.*, 12:185-95, 1996.

Axelrod, *Methods Cell Biol.*, 30:245-70, 1989.

Bailey, *Ozonation in organic chemistry* Vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1978

Bailey, *Ozonation in organic chemistry* Vol. 2, Academic Press, Inc., New York, 1982

Barltrop *et al.*, *Chem. Commun.*, 822-23, 1966.

Barone *et al.*, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 20:1141-45, 2001.

Barth *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 119:4149-59, 1997.

Beadling *et al.*, *J. Mol. Diagn.*, 13:504-13, 2012.

Bentley *et al.*, *Nature*, 456:53-59, 2008.

Berson & Brown, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77:447-50, 1955.

Bhalla, *Toxicology Letters*, 73:91-101, 1994

Bowers *et al.*, *Nature Methods*, 6:593-95, 2009.

Cameron and Frechet, *J. Am. Chem. Soc.*, 113:4303-13, 1991.

Canard & Sarfati, *Gene*, 148:1-6, 1994.

Carrasco & Vázquez, *Med. Res. Rev.*, 4:471-512, 1984.

Cleland, *Biochemistry*, 3:480-82, 1964.

Corrie *et al.*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1015-19, 1992.

Corrie, in *Dynamics studies in biology*, Goeldner and Givens (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 1-28, 2005.

Crabtree and Kemp, *Indus. Eng. Chem.*, 38:278-296, 1946

De Mayo, in *Advances in Organic Chemistry*, Raphael *et al.* (Eds.), Interscience, NY, 2:367-425, 1960.

Dressman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:8817-8822, 2003.

Eid *et al.*, *Science*, 323:133-138, 2009.

EPA (2011) <http://www.epa.gov/oar/oaqps/gooduphigh/bad.html#6>. Last updated on Thursday, July 21, 2011.

European Patent Appln. 87310256.0

European Patent EP 0 640 146

Fairchild *et al.*, *Science*, 130:861-862, 1959

Fare *et al.*, *Anal. Chem.*, 75:4672-4675, 2003.

Futreal *et al.*, *Nature Rev. Cancer*, 4:177-83, 2004.

10

20

30

40

- Gardner *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 27:2545-53, 1999.
- Gardner *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 40:7404-15, 2012.
- Gershon, *Nature Methods*, 1:263-270, 2004.
- Giegrich *et al.*, *Nucleosides Nucleotides*, 17:1987-1996, 1998.
- Givens & Schowen, In *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*, J. W. Birks, Ed.; VCH: New York, pp 125-47, 1989.
- Gommers-Ampt *et al.*, *FASEB J.*, 9:1034-42, 1995.
- Gordon and Gregory, *Organic Chemistry of Colour*, Springer-Verlag, New York, 1983 10
- Gregory, *Encyclopedia of Chemical Technology* (Kirk, R. E., and Othmer, D. F., eds) pp. 1-66, 2009
- Guo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:9145-50, 2008.
- Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use*, Stahl & Wermuth (Eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.
- Hardwick *et al.*, *Trans. Farad. Soc.*, 56:44-50, 1960.
- Harris *et al.*, *Science*, 320:106-109, 2008. 20
- Hasan *et al.*, *Tetrahedron*, 53:4247-64, 1997.
- Hastings, *J. Mol. Evol.* 19:309–21, 1983.
- Haugland, In *The handbook. A guide of fluorescent probes and labeling technologies*, Invitrogen, 2005.
- Hewitt *et al.*, *Nature*, 344:56-58, 1990
- Hsia *et al.*, *Current Opinion in Structural Biology*, 15:126-134, 2005.
- Iafrate *et al.*, *Nature Genet.*, 36:949-51, 2004. 30
- Ito *et al.*, *Nature*, 466:1129-33, 2010.
- Ju *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:19635-40, 2006.
- Kaiser *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:21387-394, 1999.
- Kriaucionis & Heintz, *Science*, 324:929-30, 2009.
- Lehninger, In: *Principles of Biochemistry*, 273-305, W.H. Freeman and Co., NY, 2005.
- Levy *et al.*, *PLoS Biol.*, 5:e254, 2007.
- Limbach, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 22:2183-2196, 1994.
- Litosh *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 39:e39. 40
- Lyamichev *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 17:292-296, 1999.
- March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 2007.
- Margulies *et al.*, *Nature*, 437:376-80, 2005.
- McCray *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7237-41, 1980.

- McDougall *et al.*, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 20:501-6, 2001.
- McGall *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 119:5081-90, 1997.
- Meldrum *et al.* *Clin. Biochem. Rev.*, 32:177-95, 2011.
- Metzker *et al.*, *Biotechniques*, 25:446-462, 1998.
- Metzker *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 22:4259-67, 1994.
- Metzker, *Genome Res.*, 15:1767-76, 2005.
- Metzker, *Nature Rev. Genet.*, 11:31-46, 2010.
- Mitra *et al.*, *Anal. Biochem.*, 320:55-65, 2003. 10
- Morrison, In: *The chemistry of nitro and nitroso groups*, Feuer (Ed.), Interscience publishers, NY, 165-213, 1969.
- Mosher *et al.*, *J. Chem. Phys.* 32:1888-89, 1960.
- Moyer *et al.*, *Laser Focus World*, 29(10), 1993.
- Nieman, In *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*, J. W. Birks, Ed.; VCH: New York, pp 99-123, 1989.
- Orosz *et al.*, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 26:1-27. 1996. 20
- Patchornik *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 92:6333-35, 1970.
- Patchornik, In: *Pharmacology of hormonal polypeptides and proteins* (Back *et al.* (Eds.)), Plenum Press, NY, 11-16, 1968.
- PCT Appl. PCT/US90/05565.
- Ramanathan *et al.*, *Anal. Biochem.*, 330:227-241, 2004.
- Redon *et al.*, *Nature*, 444:444-454, 2006.
- Reichmanis *et al.*, *J. Polymer Sci.*, 23:1-8, 1985. 30
- Rockhill *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:10065-68, 1997.
- Ronaghi *et al.*, *Science*, 281:363-365, 1998.
- Salvin and Walker, *Textile Research Journal*, 25:571-581, 1955
- Sebat *et al.*, *Science*, 305:525-528, 2004.
- Seela and Peng, In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Beaucage *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., 1.10.1, 2005.
- Seo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102:5926-5931, 2005.
- Service, *Science*, 282:1020-1021, 1998. 40
- Smith and Ho, *J. Org. Chem.*, 55:2543, 1990.
- Soengas *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 253:517-29, 1995
- Sousa & Weinstein, *J. Org. Chem.*, 27:3155-59, 1962.
- Staudiner & Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 2:635, 1919.

Stranger *et al.*, *Science*, 315:848-853, 2007.

Stupi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51:1724-1727, 2012.

Su *et al.*, *J. Mol. Diagn.*, 13:74-84, 2011.

Tahiliani *et al.*, *Science*, 324:930-35, 2009.

Turcatti *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 36:e25, 2008.

Tuzun *et al.*, *Nature Genet.*, 37:727-32, 2005.

Walker *et al.*, *Biochemistry*, 25:1799-1805, 1986.

Weinstein *et al.*, *J. Org. Chem.*, 31:1983-1985, 1966.

Wettermark, *Nature*, 194:677, 1962.

Wootton & Trentham, In: *Photochemical probes in biochemistry (NATO Science Series C)*,

Nielsen (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Ann Arbor, 272:277-296, 1989.

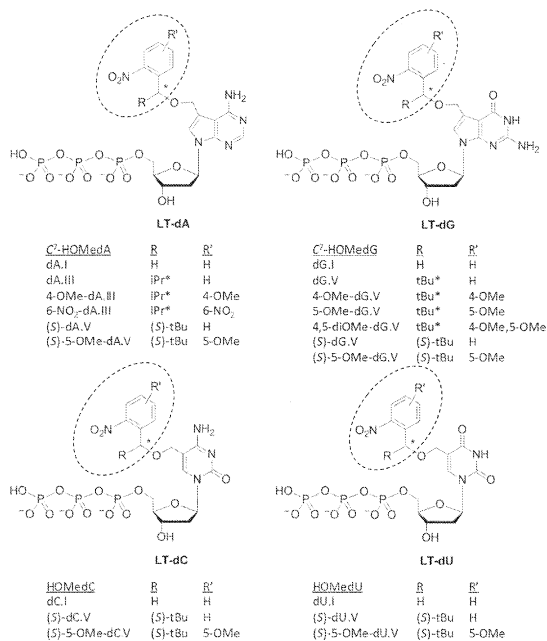
Wu *et al.*, *Nature Genet.*, 44:251-253, 2012.

Wu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 35:6339-6349, 2007.

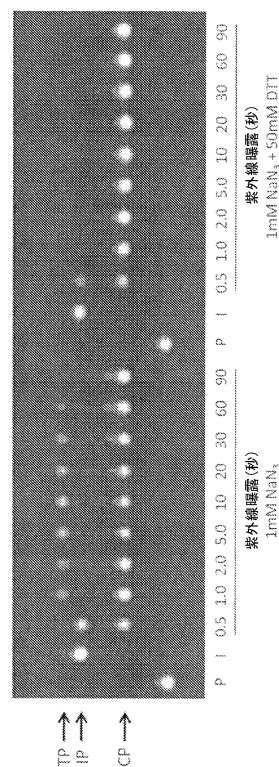
Wyatt & Cohen, *Biochem. J.*, 55:774-782, 1953.

10

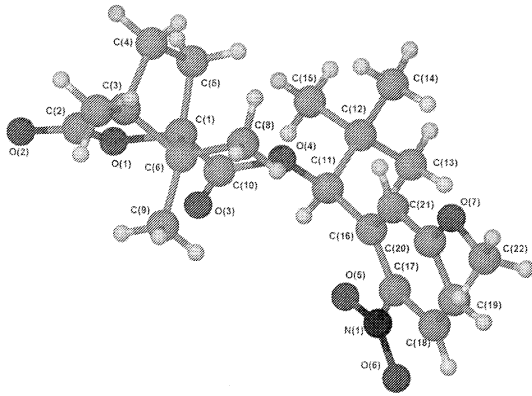
【図 1】



【図 2】

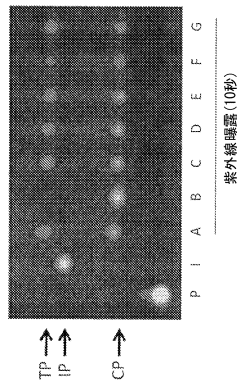


【図 3】

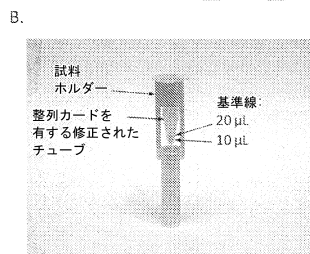
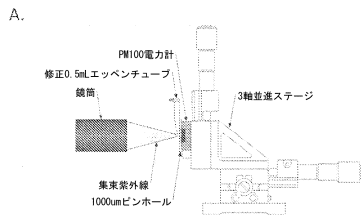


【図 4】

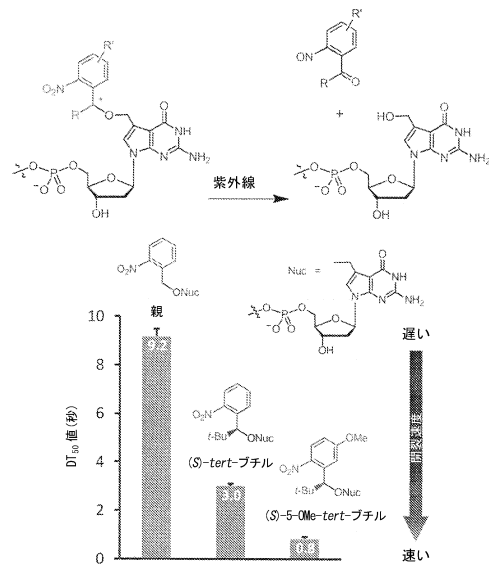
- 1 mM NaN₃, 50 mM DTT
 1 mM NaN₃, 10 mM ヒドラン
 1 mM NaN₃, 10 mM エタノールアミン
 1 mM NaN₃, 10 mM トリス-HCl, pH 8.0
 1 mM NaN₃, 10 mM シスアミン
 50mM NaN₃, 20mM トリス-HCl, pH 8.0,
 25% アセトニトリル, 1 mg/mL BSA
- A. B. C. D. E. F. G.



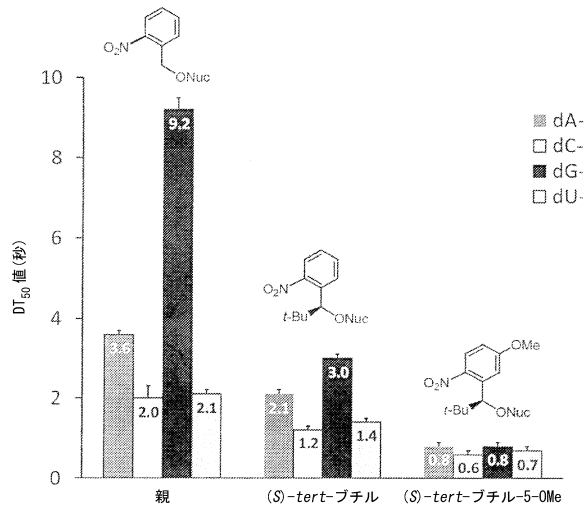
【図 5】



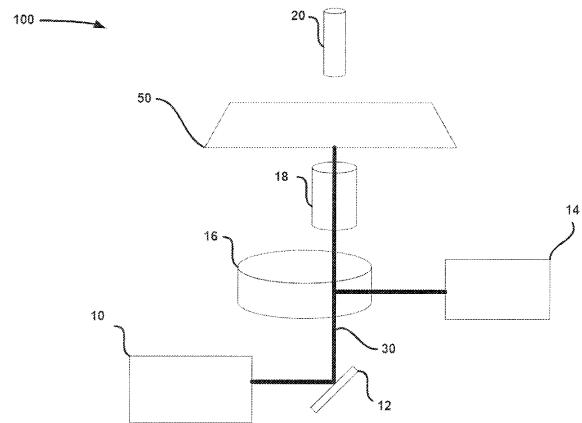
【図 6】



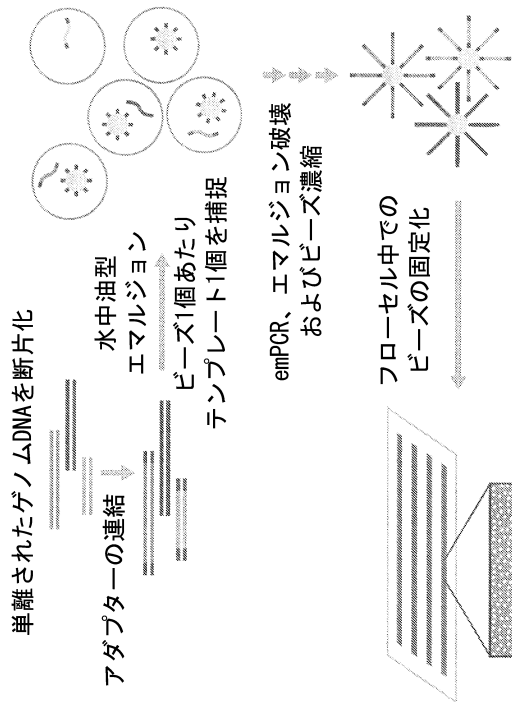
【図 7】



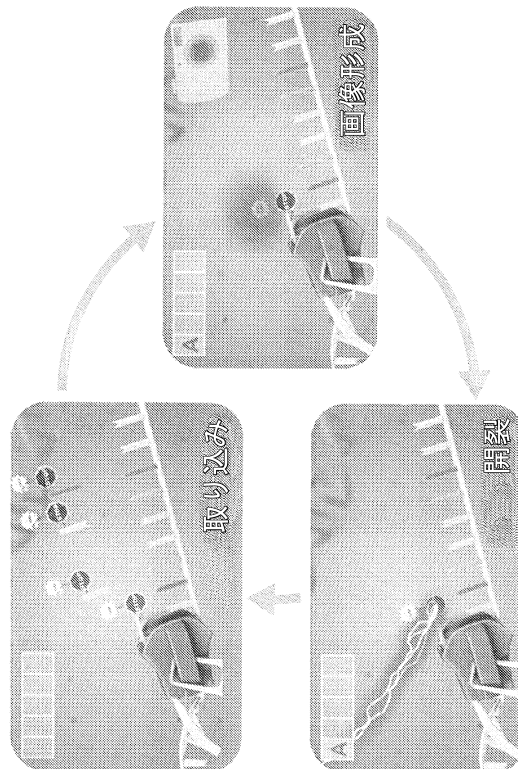
【図 8】



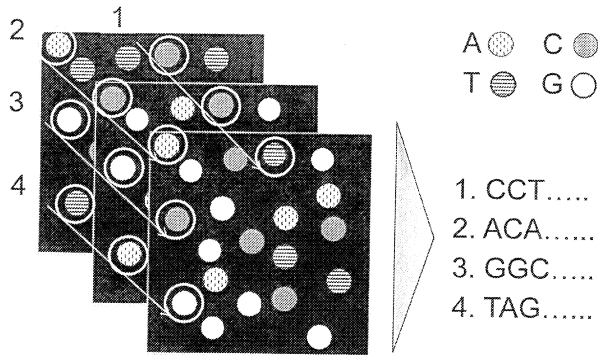
【図 9】



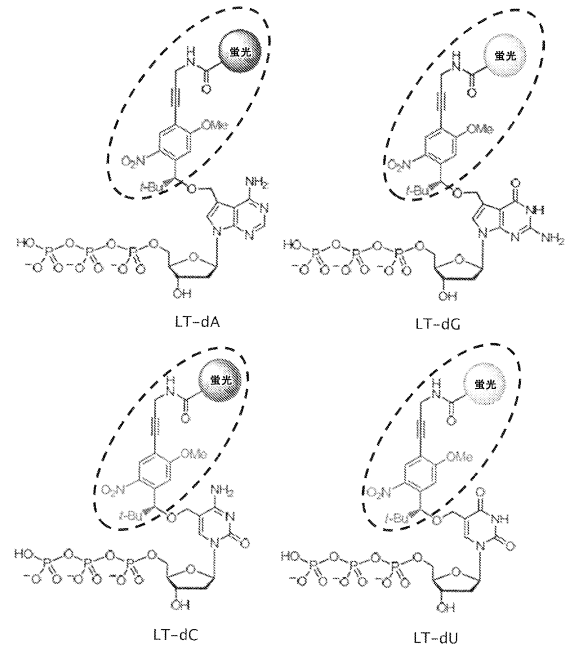
【図 10】



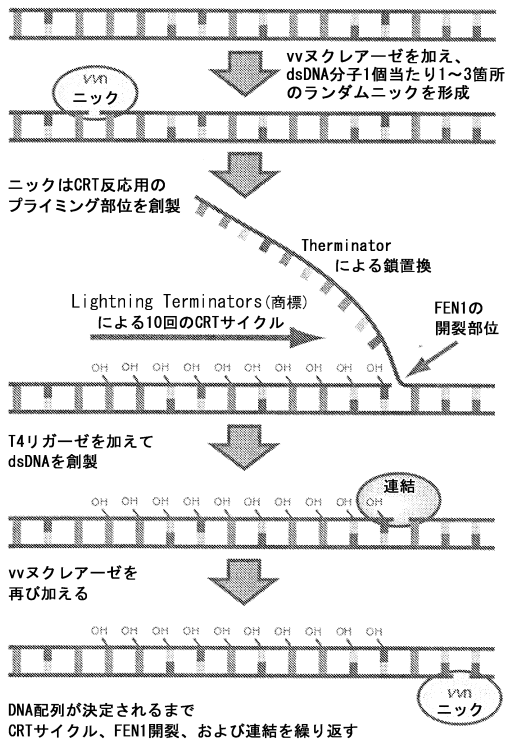
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 スチューピ ブライアン フィリップ
アメリカ合衆国 テキサス州 サイプレス インディアン チェリー フォレスト レーン 19
8 1 4
- (72)発明者 リー ホン
アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 ミルウォーキー ノース アードモア アベニュー 471
4
- (72)発明者 ウー ウェイドン
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ジャックウッド ストリート 5518
- (72)発明者 ハーシュ ミーガン エヌ.
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ノース ペンバートン サークル ドライブ 23
0
- (72)発明者 ヘルツォホ デビッド
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ミルフォード ストリート 1723
- (72)発明者 モーリス シドニー イー.
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン ノース ウェスト パーク ドライブ 10146
- (72)発明者 メッツカー マイケル エル.
アメリカ合衆国 テキサス州 ヒューストン マクダフィー ストリート 1511

審査官 伊佐地 公美

- (56)参考文献 国際公開第2009/152353 (WO, A2)
Org. Lett., 2007年, Vol.9, No.23, p.4717-4720
J. Org. Chem., 1999年, Vol.64, p.6319-6328
Nuc. Acid. Res., 2011年 1月, Vol.39, No.6, p.e39

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 H
C 1 2 Q
G 0 1 N
C 1 2 N
CAplus/REGISTRY (STN)