I698530

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I698530 B**

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 07 月 11 日

(21)申請案號：108112168　(22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 11 月 04 日

(51)Int. Cl.：　*C12Q1/68 (2018.01)*　*C12Q1/6811 (2018.01)*

C12Q1/6869 (2018.01)　*C07C323/12 (2006.01)*

(30)優先權：2015/11/06　美國　62/251,884

2016/04/26　美國　62/327,555

(71)申請人：美商齊亞雋科學公司 (美國) QIAGEN SCIENCES, LLC　(US)

美國

(72)發明人：瑪瑪　夢 MARMA, MONG SANO (US)；奧勒尼可　傑茲 OLEJNIK, JERZY (US)；柯博　伊利亞 KORBOUKH, ILIA (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

US	7279563B2	US	2014/0234832A1
US	2015/0140561A1	WO	2015/069932A1

審查人員：蔡榮哲

申請專利範圍項數：21 項　圖式數：75　共 218 頁

(54)名稱

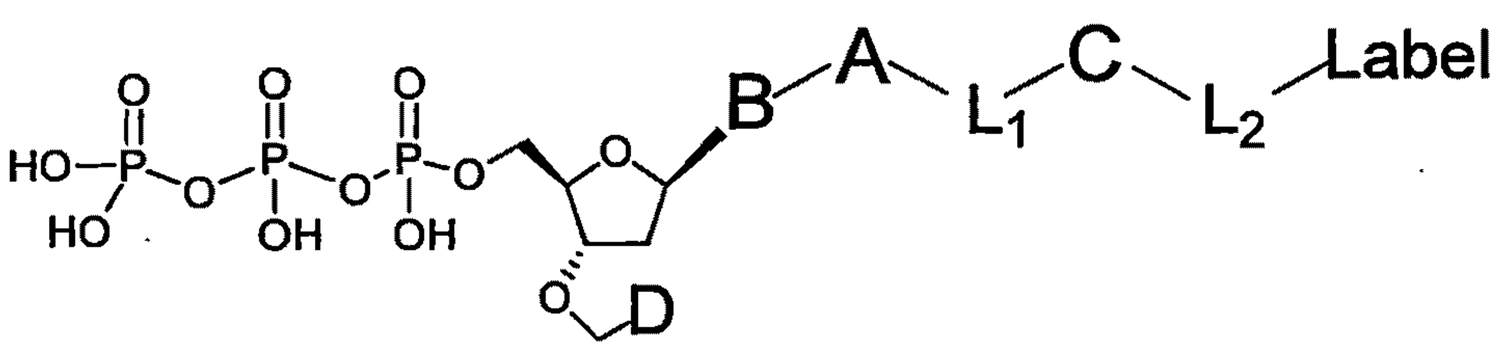
核苷酸類似物

(57)摘要

本發明提供利用去氧核苷三磷酸之方法、組成物、混合物及套組，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷(methylenedisulfide)作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置及可逆式連接至該去氧核苷之核鹼基的可檢測標識物。此等化合物提供未來定序技術之新的可能性，包括但不限於以合成定序。

The present invention provides methods, compositions, mixtures and kits utilizing deoxynucleoside triphosphates comprising a 3‘-O position capped by a group comprising methylenedisulfide as a cleavable protecting group and a detectable label reversibly connected to the nucleobase of said deoxynucleoside. Such compounds provide new possibilities for future sequencing technologies, including but not limited to Sequencing by Synthesis.

特徵化學式：



I698530

發明摘要

分割案

【發明名稱】(中文/英文)

核苷酸類似物

NUCLEOTIDE ANALOGUES

【中文】

本發明提供利用去氧核苷三磷酸之方法、組成物、混合物及套組，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷(methylenedisulfide)作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置及可逆式連接至該去氧核苷之核鹼基的可檢測標識物。此等化合物提供未來定序技術之新的可能性，包括但不限於以合成定序。

【英文】

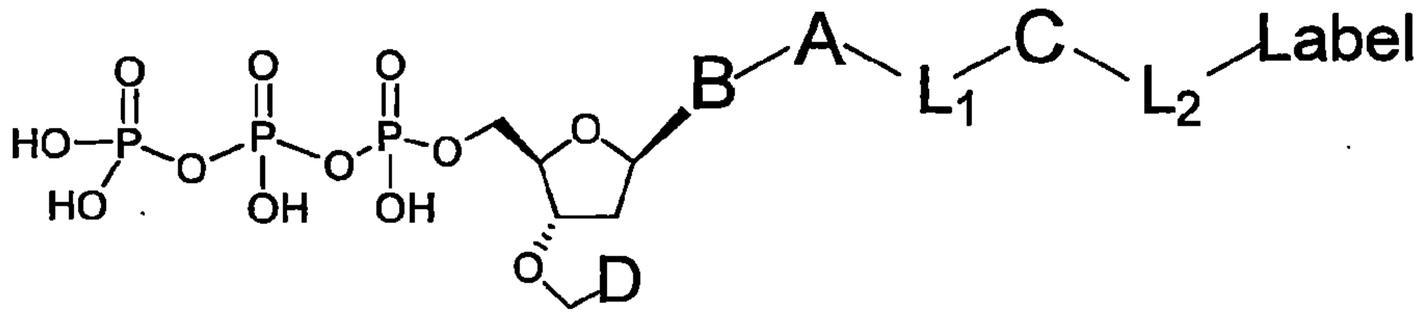
The present invention provides methods, compositions, mixtures and kits utilizing deoxynucleoside triphosphates comprising a 3‘-O position capped by a group comprising methylenedisulfide as a cleavable protecting group and a detectable label reversibly connected to the nucleobase of said deoxynucleoside. Such compounds provide new possibilities for future sequencing technologies, including but not limited to Sequencing by Synthesis.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】(中文/英文)

核苷酸類似物

NUCLEOTIDE ANALOGUES

相關申請案之交叉參考

本申請案主張在 2015 年 11 月 6 日申請之美國臨時專利申請案第 62/251,884 號及在 2016 年 4 月 26 日申請之美國臨時專利申請案第 62/327,555 號之權益，將該等併入本文以供參考。

【技術領域】

本發明提供利用去氧核苷三磷酸之方法、組成物、混合物及套組，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置及可逆式連接至去氧核苷之核鹼基的可檢測標識物。此等化合物提供未來定序技術之新的可能性，包括但不限於以合成定序。

【先前技術】

DNA 定序為現代生物技術中最重要的分析方法之一。對目前的定序技術之詳細評論於 M. L. Metzker 之 Nature Reviews 2010, 11, 31 [1]及 C. W. Fuller 等人之 Nature Biotechnology 2009, 27, 1013 [2]中提供。

熟知的定序方法為以合成定序(SBS)方法。根據此方法，核苷三磷酸係以 3'OH-保護基(特別為酯和醚)可逆式阻斷。酯的實例為鏈烷酸酯，如乙醯基、磷酸酯和碳酸酯。核苷三磷酸通常包含在鹼基上的標識物。

在使用可逆式 3'OH-阻斷之核苷三磷酸的逐步方式中經酶合成預定序列的聚核苷酸之方法由 Hiatt 和 Rose 說明(美國專利第 5,990,300 號)[3]。除了酯、醚、甲腈、磷酸酯、磷醯胺、碳酸酯、胺甲酸酯、硼酸酯、糖、胺基磷酸酯(phosphoramidate)、苯基亞磺酸酯(phenylsulfenate)、硫酸酯及碸以外，彼等亦揭示硝酸酯作為可裂解的 3'OH-保護基。去保護可以化學或酶方式進行。對硝酸酯基團既沒有揭示合成程序，亦沒有揭示去保護條件及酶併入數據。所主張之去阻斷溶液較佳地含有二價陽離子，如 Co2+，及生物緩衝液，如 Tris。未揭示 3'OH-阻斷之含有標識物的核苷三磷酸。

Buzby (US 2007-0117104)[4]揭示用於 SBS 之核苷三磷酸，其在 3'-羥基上受到可逆式保護且攜有在鹼基上的標識物。標識物係經由可裂解的連結子連接，諸如二硫化物連結子或光可裂解的連結子。連結子係由至多約 25 個原子所組成。除了羥胺、醛、烯丙胺、烯、炔、醇、胺、芳基、酯、醚、甲腈、磷酸酯、碳酸酯、胺甲酸酯、硼酸酯、糖、胺基磷酸酯、苯基胺磺酸酯(phenylsulfanate)、硫酸酯、碸和雜環以外，3'OH-保護基亦可為硝酸酯。

為了達成更長的讀取長度及更好精確度的核酸定序所

需要的是具有可裂解的保護基及可裂解的連結子之核苷酸類似物，其在裂解後沒有留下反應性殘留物[5]。

【發明內容】

本發明提供利用去氧核苷三磷酸之方法、組成物、混合物及套組，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置及可逆式連接至去氧核苷之核鹼基的可檢測標識物。在一個實施態樣中，本發明設想核苷酸類似物，其具有包含二硫甲烷之可逆式保護基及在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛(oxymethylenedisulfide)連結子。此等化合物提供未來定序技術之新的可能性，包括但不限於以合成定序。

在混合物方面，本發明於一個實施態樣中設想去氧核苷三磷酸，其包含在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子及以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置，該去氧核苷三磷酸係在與一或多個額外的定序試劑之混合物中，該定序試劑包括但不限於緩衝液、聚合酶、引子、模板及類似者。在套組方面，本發明於一個實施態樣中設想定序套組，其中定序試劑一起提供於單獨的容器中(或混合物中)，該套組包括去氧核苷三磷酸連同在定序中使用此等試劑之用法說明，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置。

不意欲使本發明受限於任何特別的聚合酶。本發明設

想具有增強核苷酸衍生物併入的工程化(例如突變)聚合酶。例如，Tabor, S.和 Richardson, C.C. ((1995) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 92:6339 [6])說明在水生棲熱菌(T. aquaticus) DNA 聚合酶中以酪胺酸代替苯基丙胺酸 667 及其具有以 DNA 聚合酶鑑定二去氧核苷酸的效應。在一個實施態樣中，本發明設想缺少 3 ' -5 '外核酸酶活性(命名為外-)之聚合酶。例如，9°N 聚合酶之外-變體係由 Perler 等人之 1998 US 5756334 [7]及 Southworth 等人之 1996 Proc. Natl Acad. Sci USA 93:5281 [8]說明。另一聚合酶實例為 Pfu DNA 聚合酶之 A486Y 變體(Evans 等人之 2000. Nucl. Acids. Res. 28:1059 [9])。另一實例為 Tsp JDF-3 DNA 聚合酶之 A485T 變體(Arezi 等人之 2002. J. Mol. Biol. 322:719 [10])。WO 2005/024010 A1 關於基序 A 區之修飾及 9°N DNA 聚合酶，將其特此併入本文以供參考[11]。

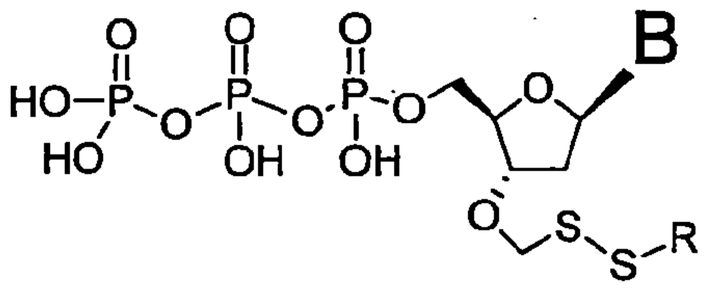
在方法方面，本發明設想兩種方法：合成去氧核苷三磷酸之方法，該去氧核苷三磷酸包含在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子及以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置，以及利用去氧核苷三磷酸之方法，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置。

在一個實施態樣中，本發明關於(a)具有以包含二硫甲烷(例如通式 $-CH_2-SS-R$)作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 之核苷三磷酸；及(b)彼等經標識之類似物，其中

標識物係經由可裂解的二硫甲醛連結子(-OCH_2-SS-)附著至核鹼基。此等核苷酸可用於以合成定序(SBS)核酸之技術中。在一個實施態樣中，本發明關於以包含二硫甲烷(例如–CH_2-SS-R)作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O之核苷酸的合成、去保護條件或酶併入。

在一個實施態樣中，本發明關於去氧核苷三磷酸，其包含在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子及以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O。在一個實施態樣中，該核苷之核鹼基為非天然。在一個實施態樣中，該核苷之非天然核鹼基係選自包含下列之群組：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。在一個實施態樣中，包含二硫甲烷之該基團為–CH_2-SS-R，其中 R 係選自包含下列之群組：烷基和經取代之烷基。在一個實施態樣中，該可檢測標識物係經由可裂解的二硫甲醛連結子(例如式-OCH_2-SS-)附著至該核鹼基。在一個實施態樣中，該可檢測標識物為螢光標識物。在一個實施態樣中，在式(-CH_2-S-S-R)中的 R 可能為烷基或烯丙基。

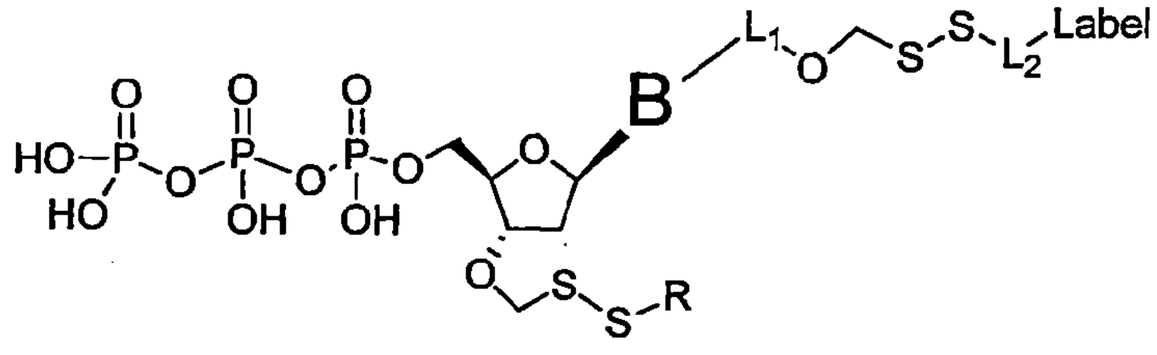
在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的去氧核苷三磷酸：



其中 B 為核鹼基，及 R 係選自包含下列之群組：烷基和經取代之烷基。在一個實施態樣中，該核鹼基為天然核鹼

基(胞嘧啶、鳥嘌呤、腺嘌呤、胸嘧啶和尿嘧啶)。在一個實施態樣中，該核鹼基為選自包含下列之群組的非天然核鹼基：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。在類似物的例子中，可檢測標識物亦可包括在核鹼基與該可檢測標識物之間的連結子分段。

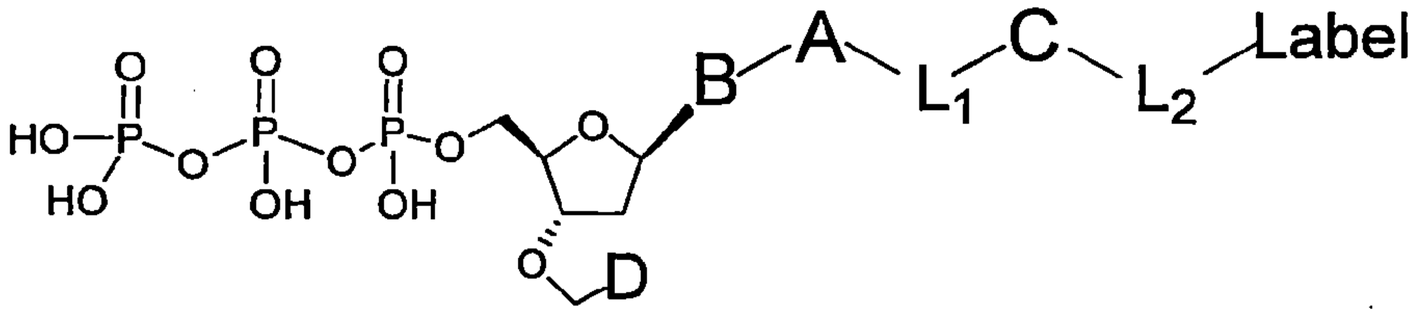
在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的經標識之去氧核苷三磷酸：



其中 B 為核鹼基，R 係選自包含下列之群組：烷基和經取代之烷基，及 L_1 和 L_2 為連接基團。在一個實施態樣中，該核鹼基為天然核鹼基類似物。在一個實施態樣中，該核鹼基為選自包含下列之群組的非天然核鹼基類似物：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和2-胺基腺嘌呤。在類似物的例子中，可檢測標識物亦可包括在核鹼基與該可檢測標識物之間的連結子分段。在一個實施態樣中，L_1 和 L_2 係獨立地選自包含下列之群組：–CO-、-CONH-、-NHCONH-、-O-、-S-、-C=N 和 -N=N-、烷基、芳基、支鏈烷基、支鏈芳基或彼等之組合。較佳的是 L_2 不為〝-S-〞。在一個實施態樣中，本發明設想成為在鹼基上的胺或在鹼基上的羥基之 L_1。在一個實施態樣中，該標識物係選自由下列所組成之群組：螢光團染料、

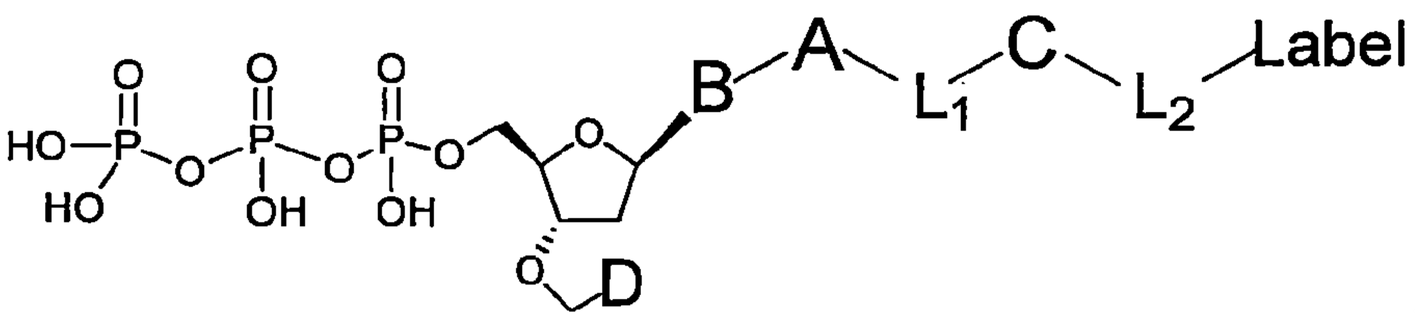
能量轉移染料、質量標籤(mass-tag)、生物素和半抗原。在一個實施態樣中，該標識物為可檢測標識物。

在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的經標識之去氧核苷三磷酸：

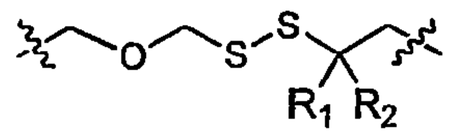
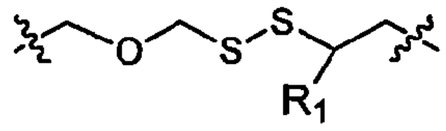
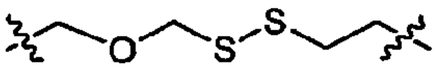


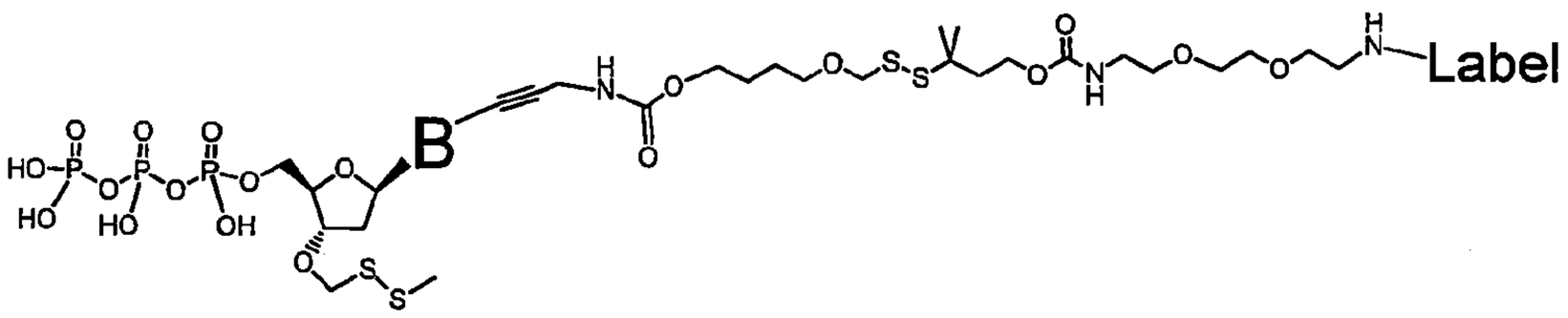
其中 D 係選自由下列所組成之群組：二硫化烯丙基和經二硫化物取代之烯丙基；B 為核鹼基；A 為附著基團；C 為可裂解的部位核心；L_1 和 L_2 為連接基團；及 Label 為標識物。

在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的經標識之去氧核苷三磷酸：

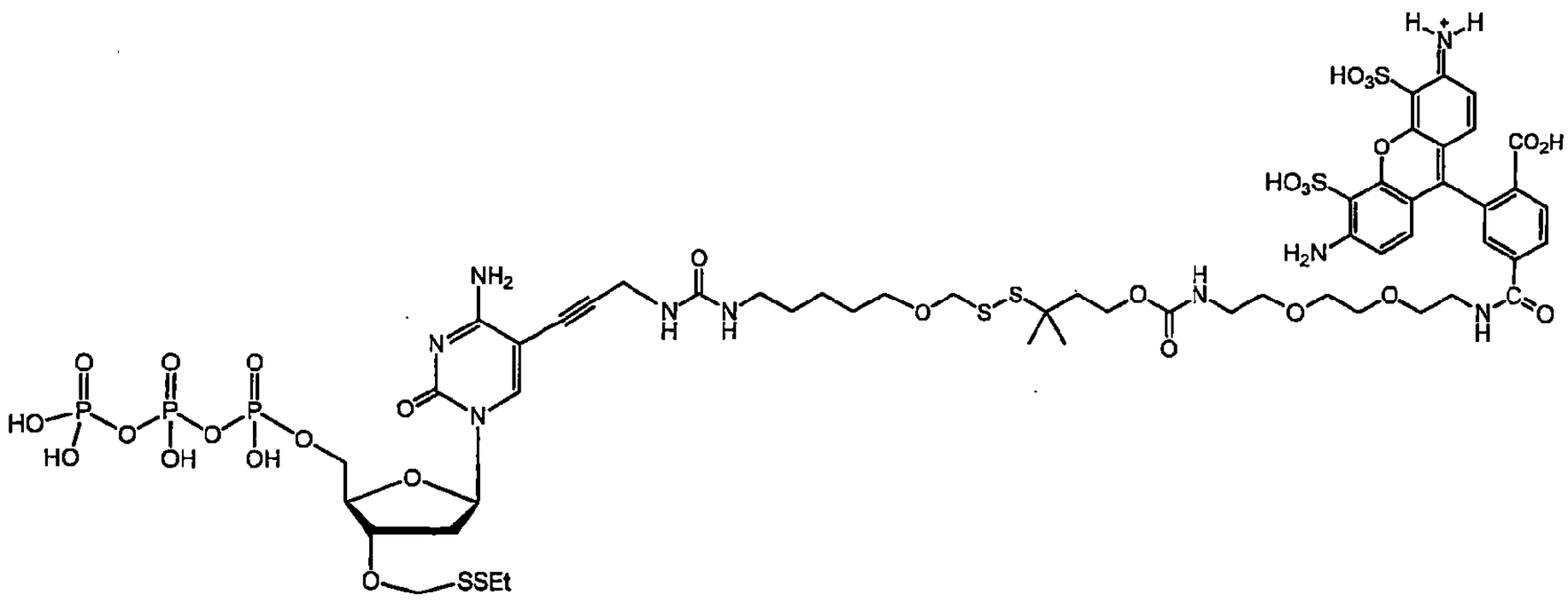


其中 D 係選自由下列所組成之群組：疊氮化物、二硫化烷基、經二硫化物取代之烷基；B 為核鹼基；A 為附著基團；C 為可裂解的部位核心；L_1 和 L_2 為連接基團；及 Label 為標識物(例如可檢測部分)。在一個實施態樣中，該核鹼基為選自由下列所組成之群組的非天然核鹼基類似物：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。在一個實施態樣中，該附著基團 A 為選自由下列所組成之群組的化學基團：炔丙基、羥甲基、環外胺、炔丙胺和炔丙基羥基。在一個實施態樣中，該可裂解的部

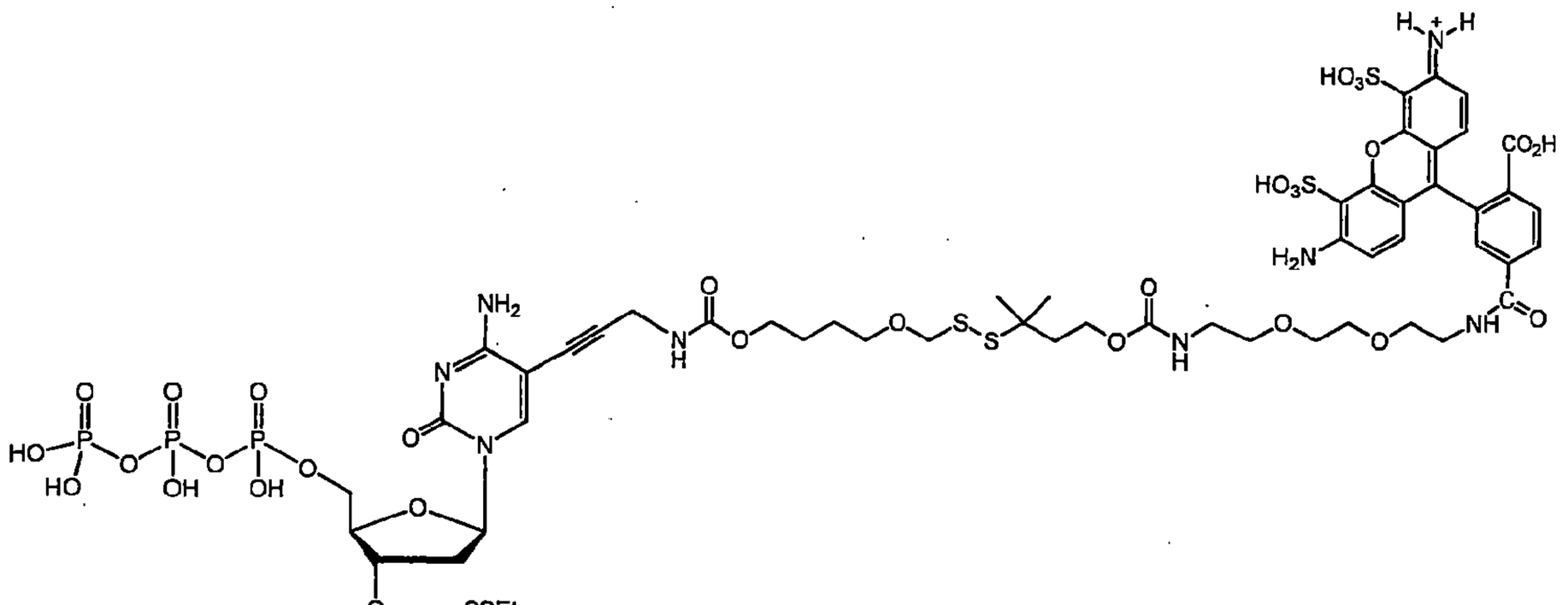
位核心係選自由下列所組成之群組：  、  和  ，R_1 和 R_2 係獨立地選自烷基。在一個實施態樣中，L_1 係選自由下列所組成之群組：$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO\text{-}O(CH_2)_x-$、$-CONH\text{-}(OCH_2CH_2O)_x-$、$-CO\text{-}O(CH_2CH_2O)_x-$和$-CO(CH_2)_x-$，其中 x 為 0 至 10，但更佳為從 1 至 6。在一個實施態樣中，L_2 係選自由下列所組成之群組：$-NH-$、$-(CH_2)_x\text{-}NH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xNH-$、$-CH(Me)(CH_2)_xNH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xCO-$、$-CH(Me)(CH_2)_xCO-$、$-(CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$、$-(CH_2)_xCONH(CH_2CH_2O)_y(CH_2)_zNH—$、和$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO(CH_2)_x-$，其中 x、y 和 z 各自獨立地選自 0 至 10，但更佳為從 1 至 6。在一個實施態樣中，該標識物係選自由下列所組成之群組：螢光團染料、能量轉移染料、質量標籤、生物素和半抗原。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



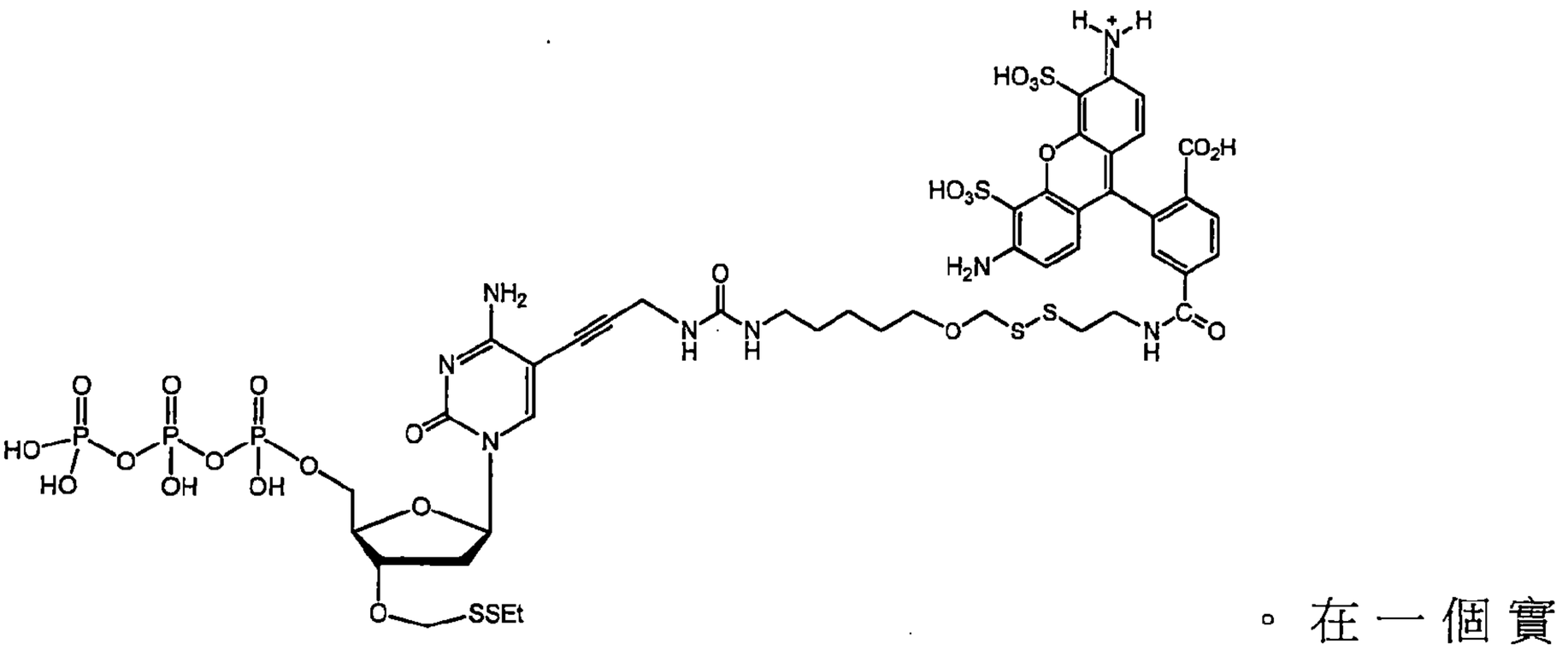
，其中該標識物為染料。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



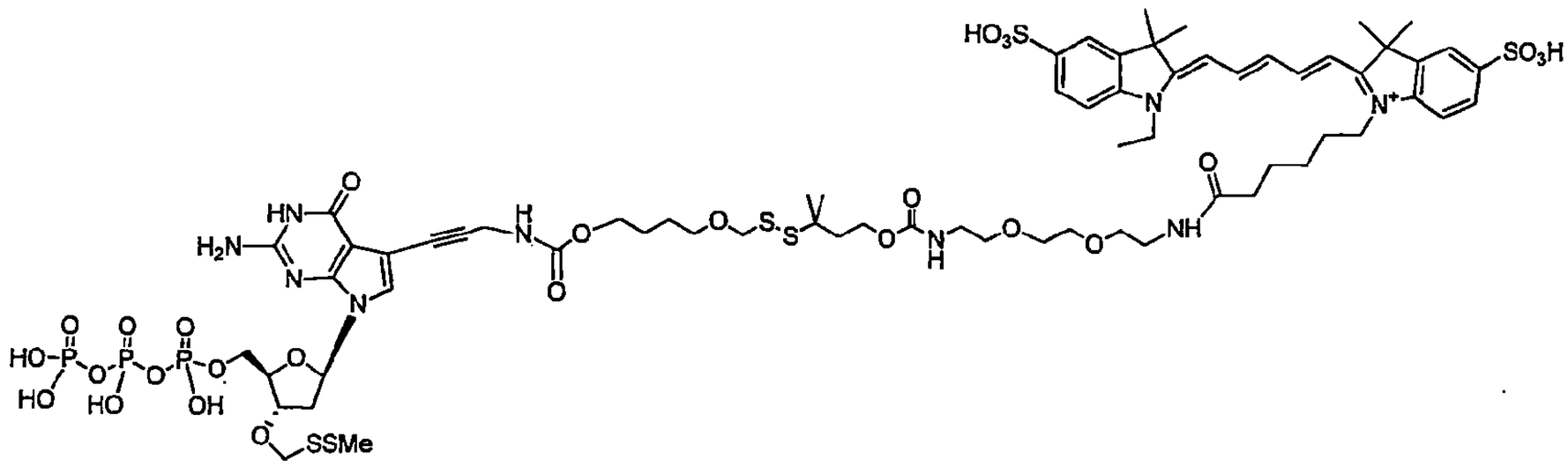
在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：

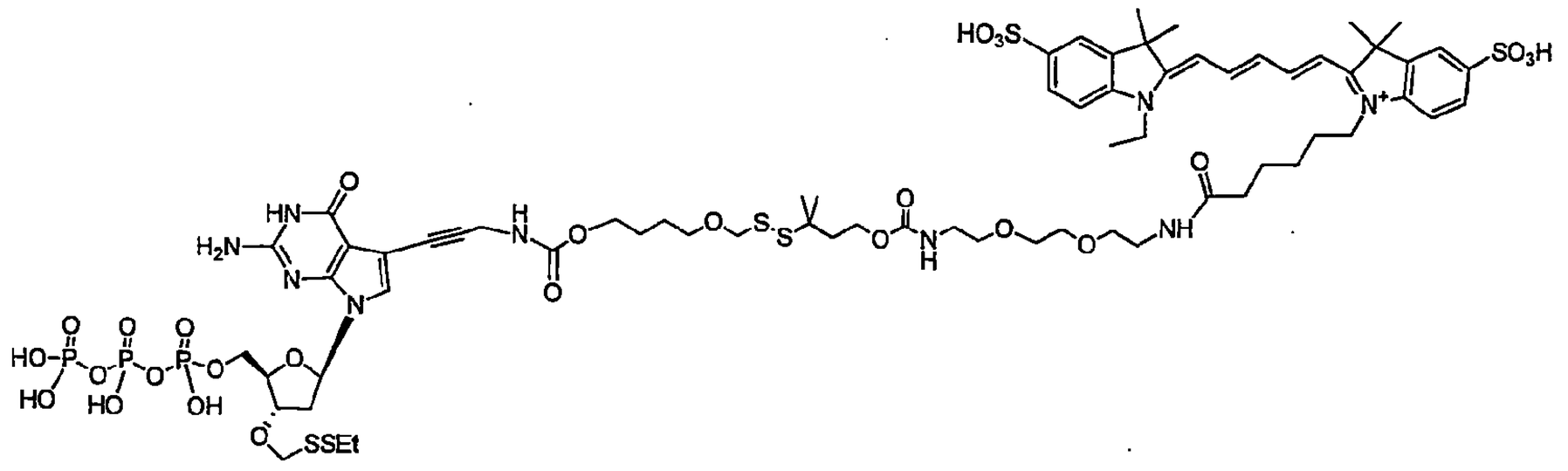


。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



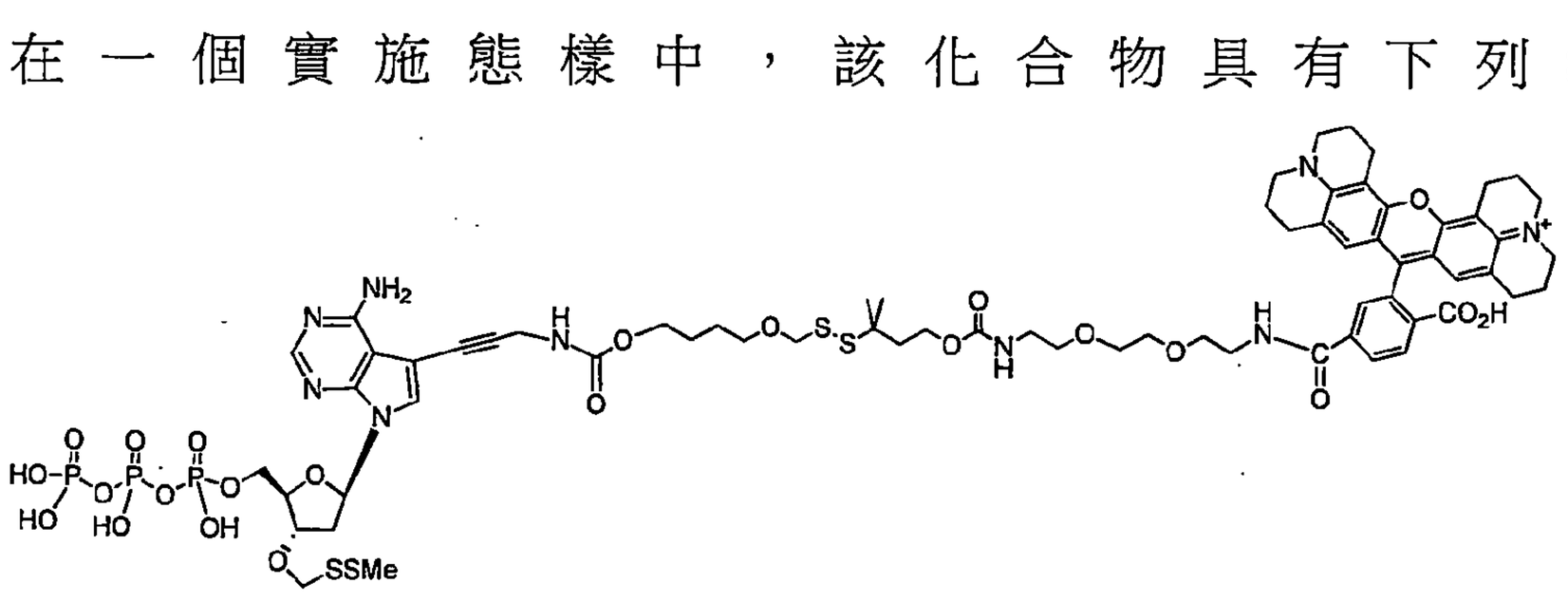
。

在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：

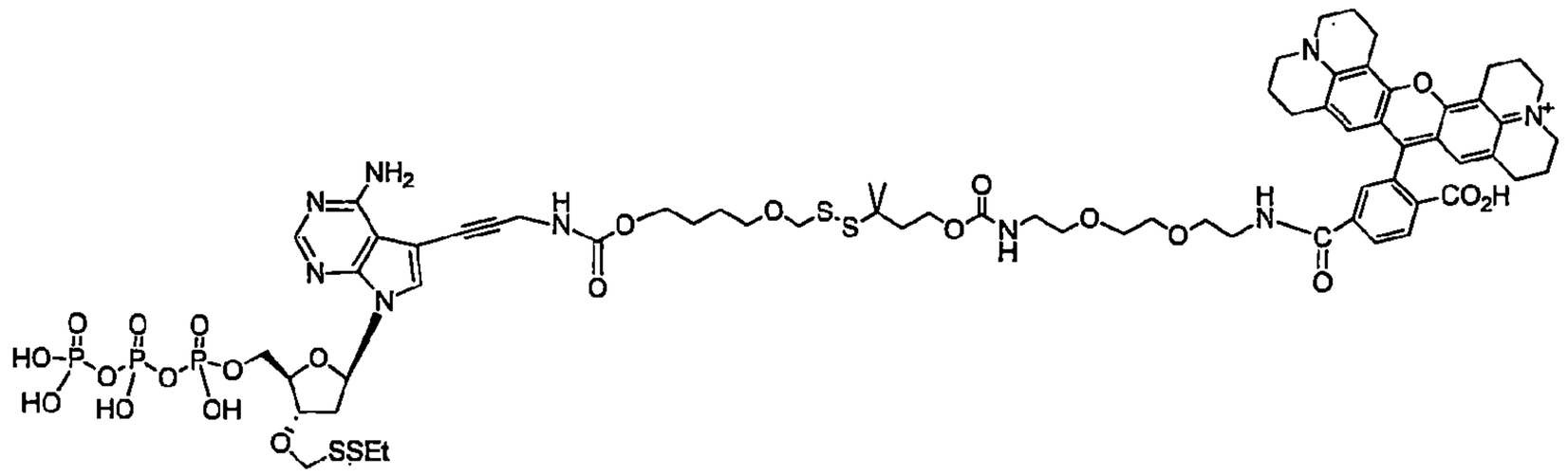


。

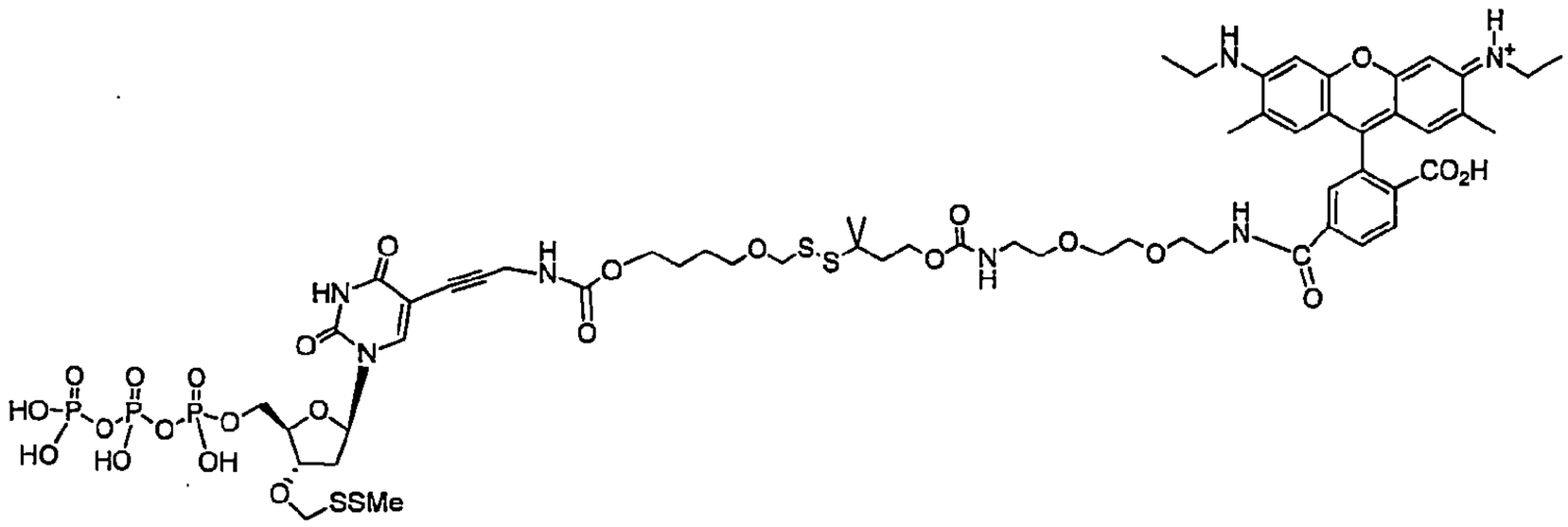
在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



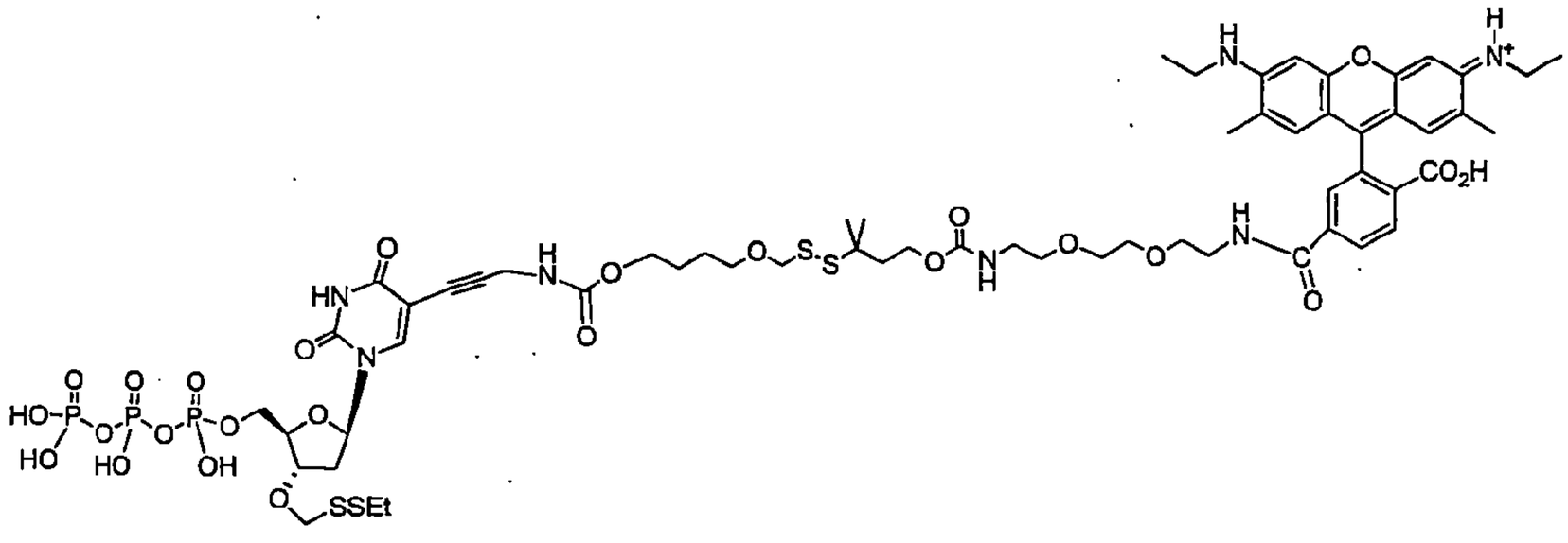
。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



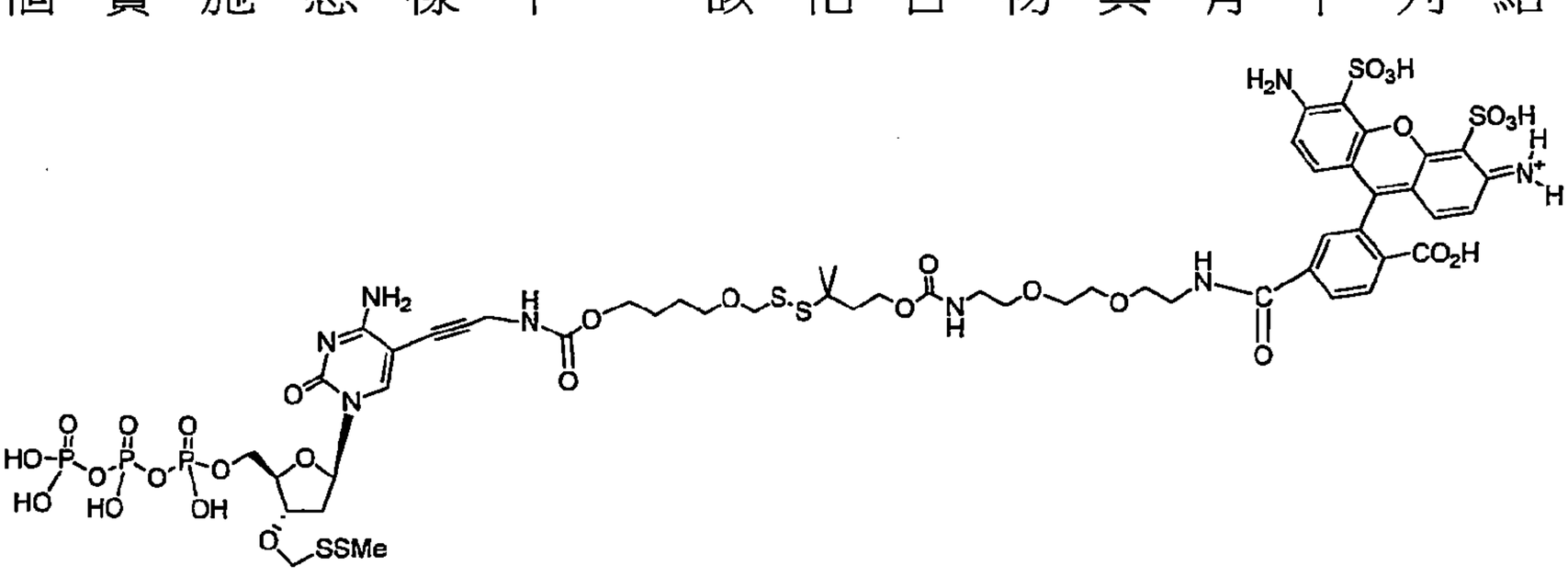
。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



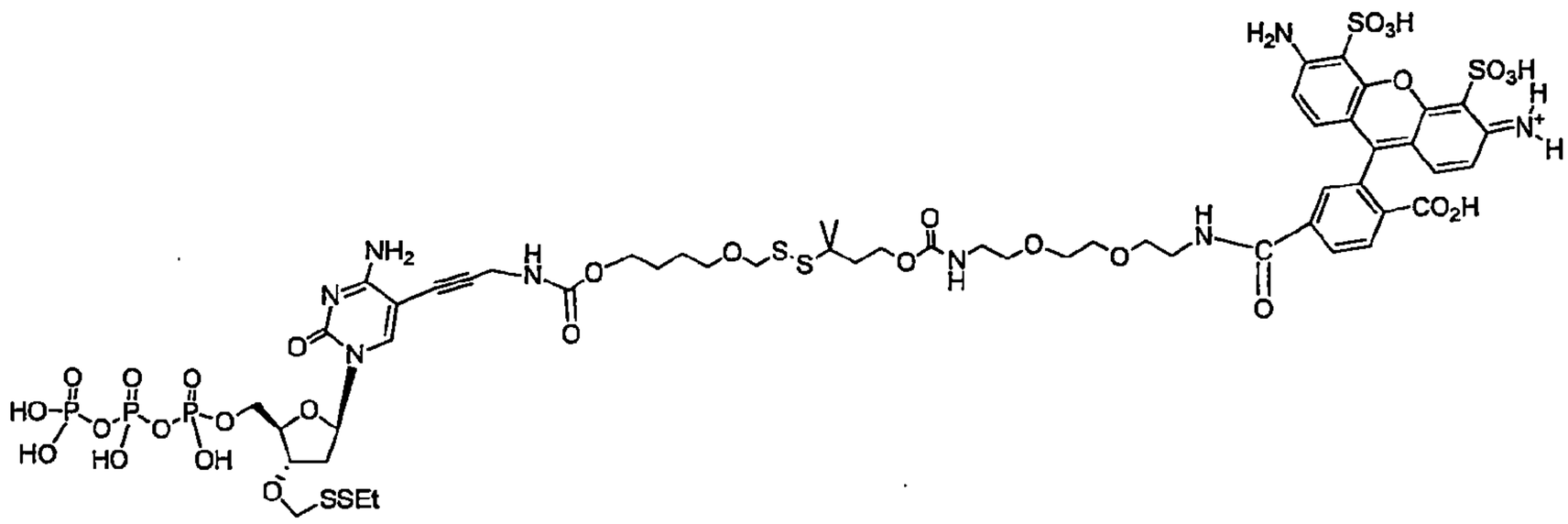
。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



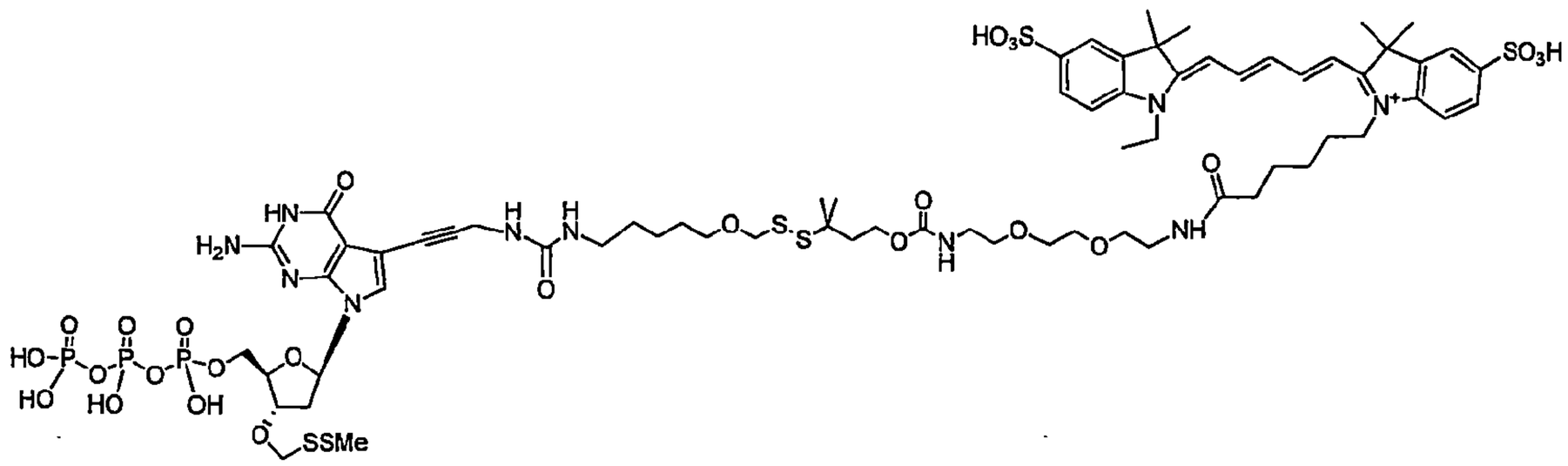
。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



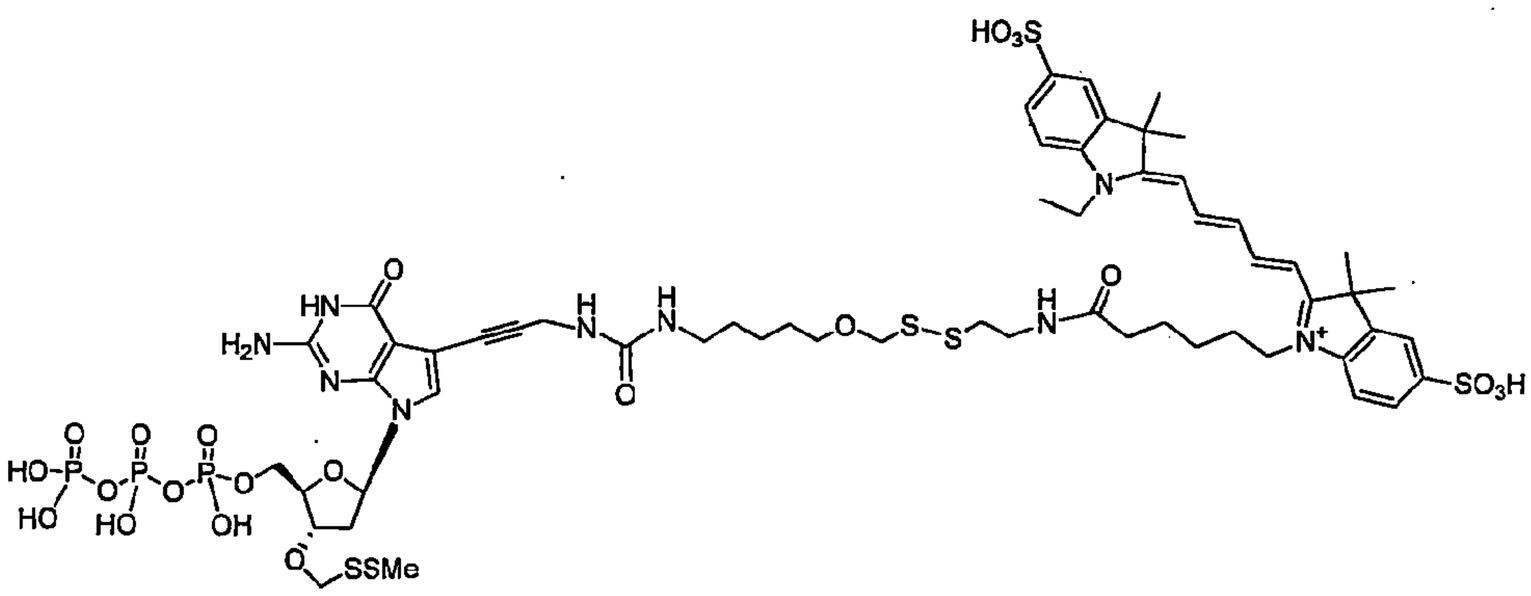
。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



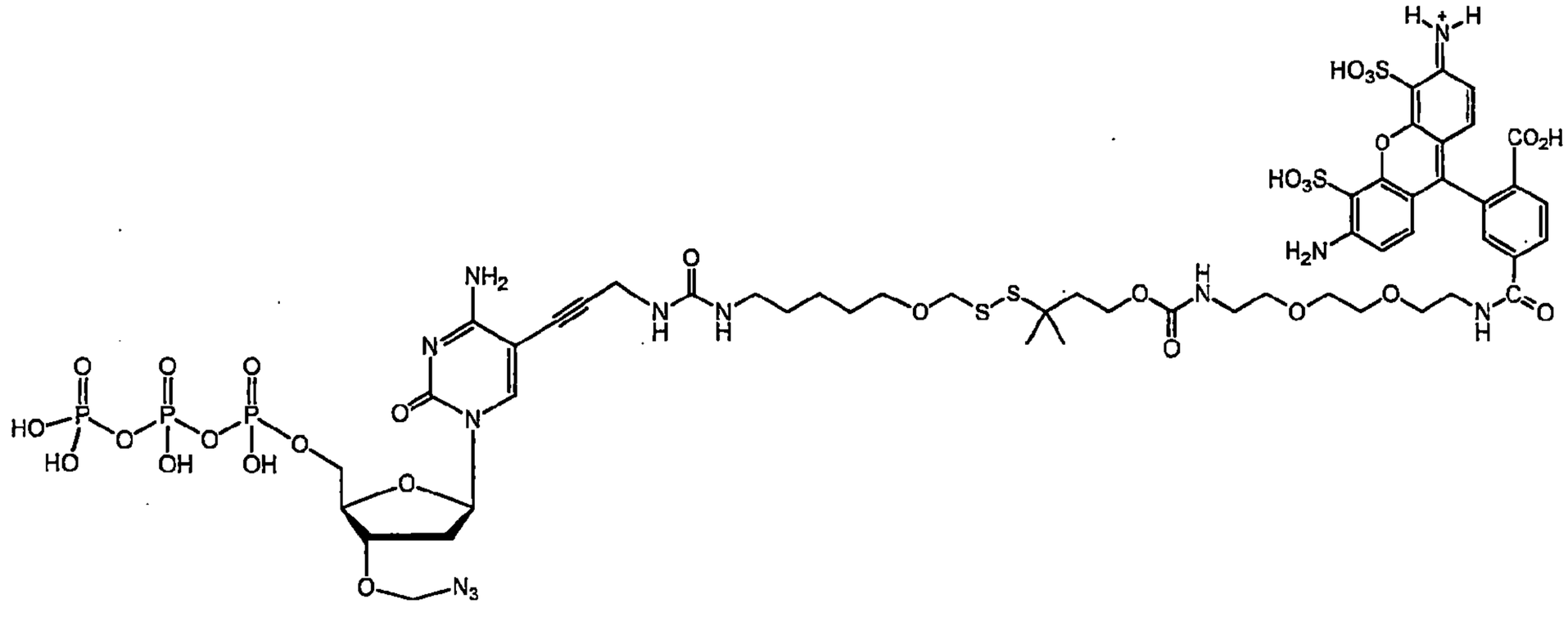
。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



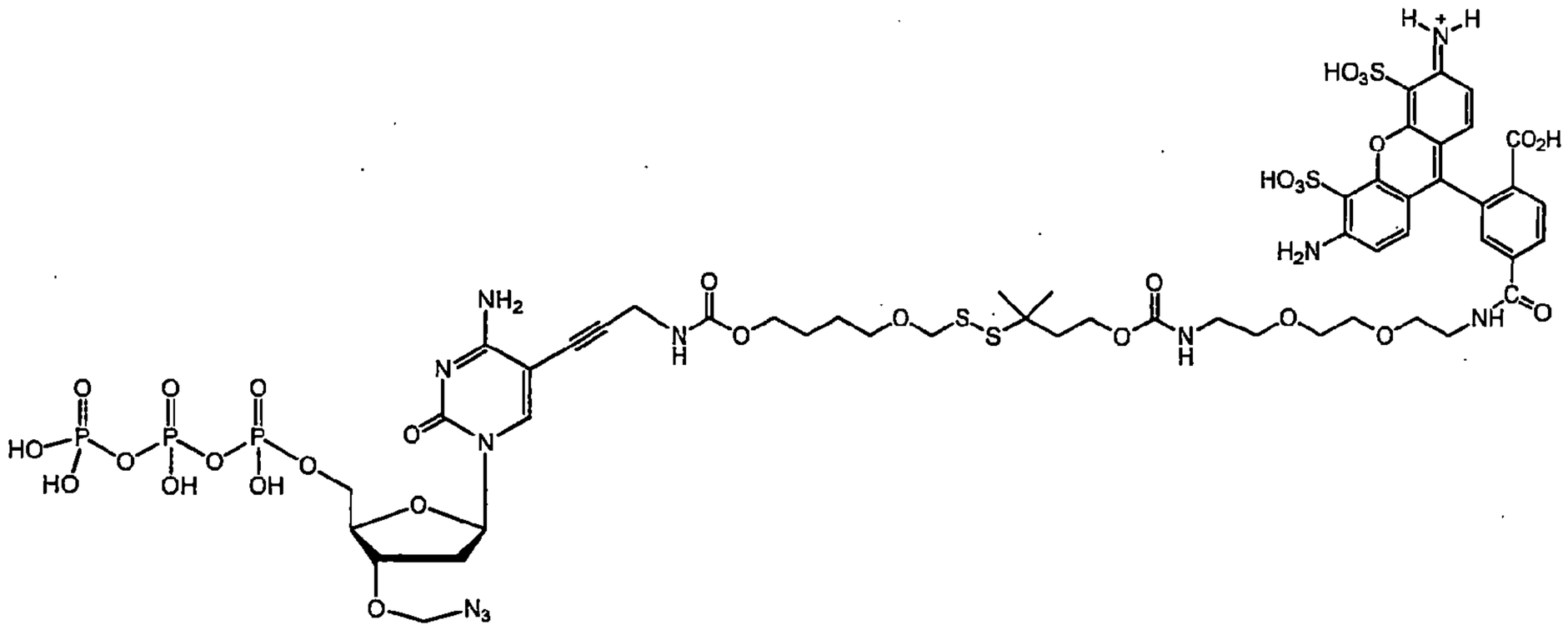
在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



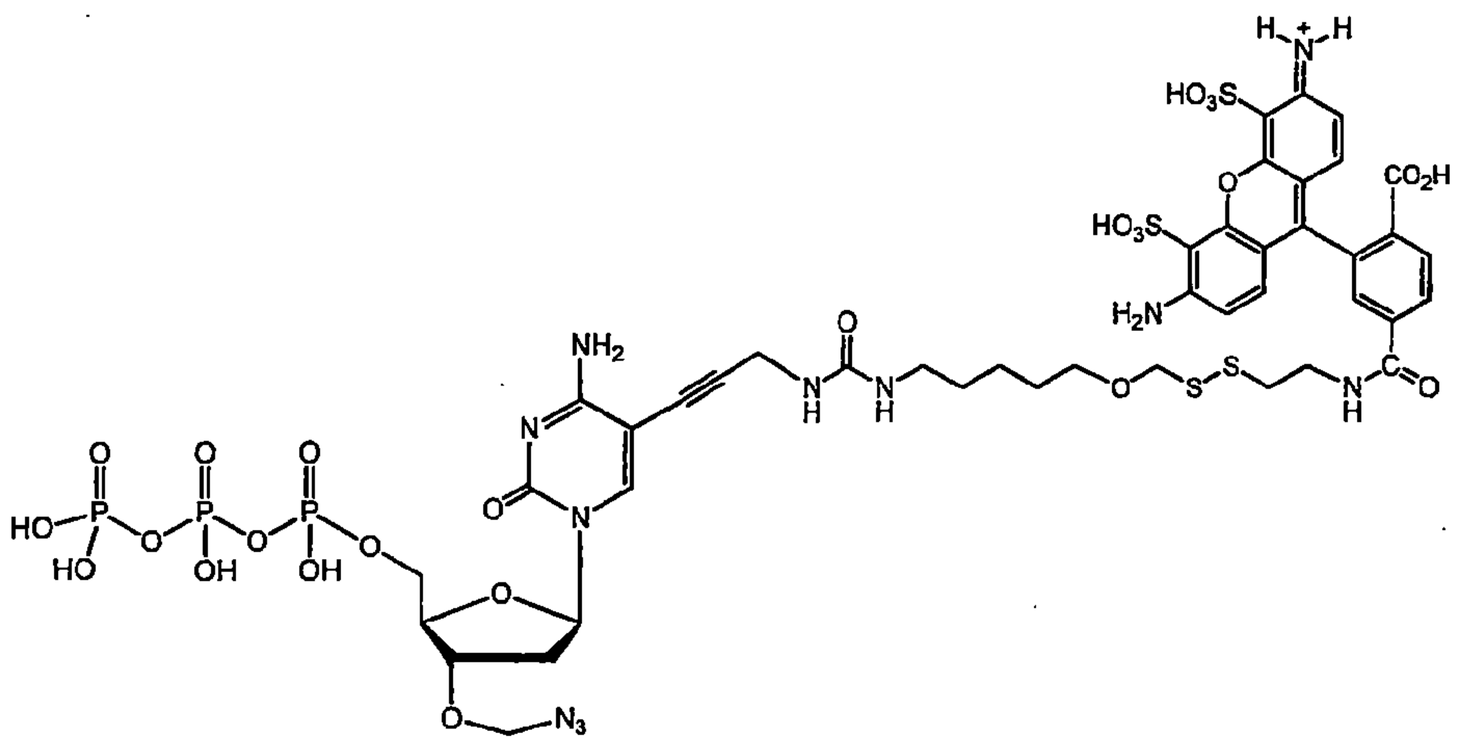
。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：

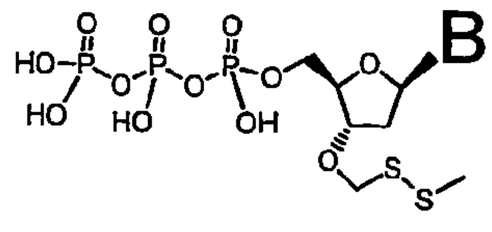


。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



。

在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的去氧核苷三磷酸：



其中 B 為核鹼基。

在一個實施態樣中，本發明關於包含 DNA 聚合酶及至少一種去氧核苷三磷酸之套組，該去氧核苷三磷酸包含在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子、以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O。在一個實施態樣中，該核鹼基為天然核鹼基類似物。在一個實施態樣中，該核苷之核鹼基為非天然。在一個實施態樣中，該核苷之非天然核鹼基係選自包含下列之群組：7-去氮雜

鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。

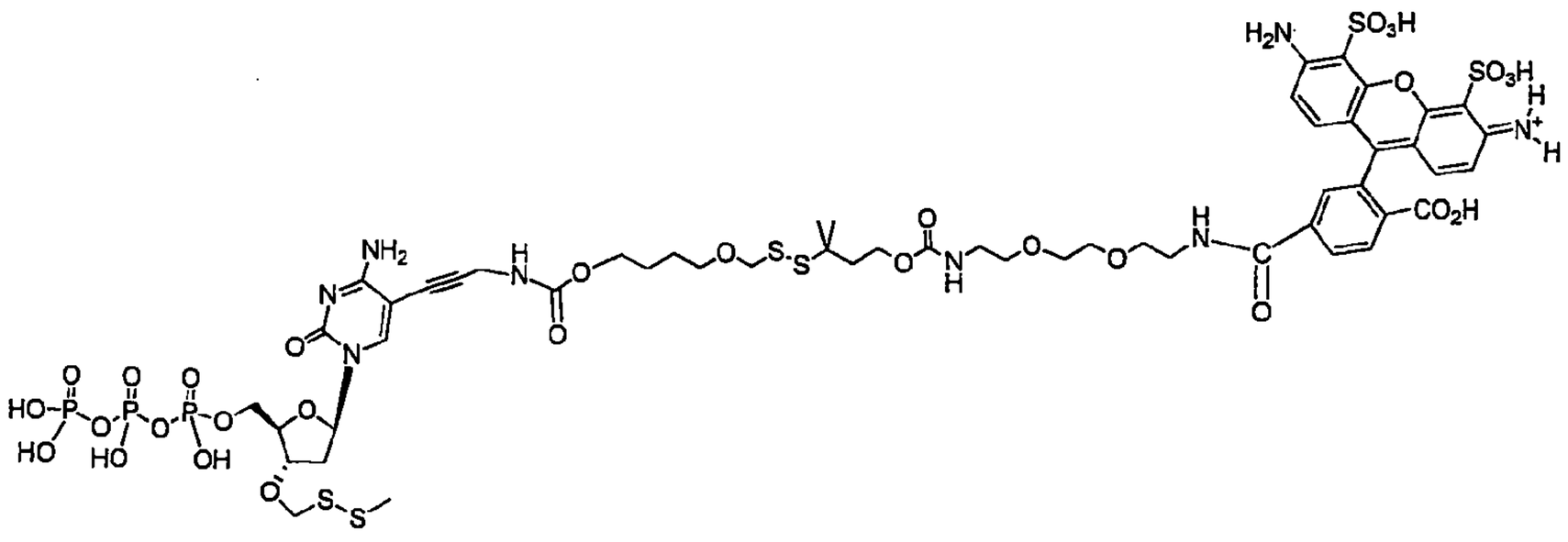
在一個實施態樣中，本發明關於包含核酸模板連同與該模板雜交之引子、DNA 聚合酶及至少一種去氧核苷三磷酸之反應混合物，該去氧核苷三磷酸包含核鹼基、標識物和糖、在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子，該糖包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O，其中該核苷另外包含與該核苷之核鹼基共價結合之可檢測標識物。

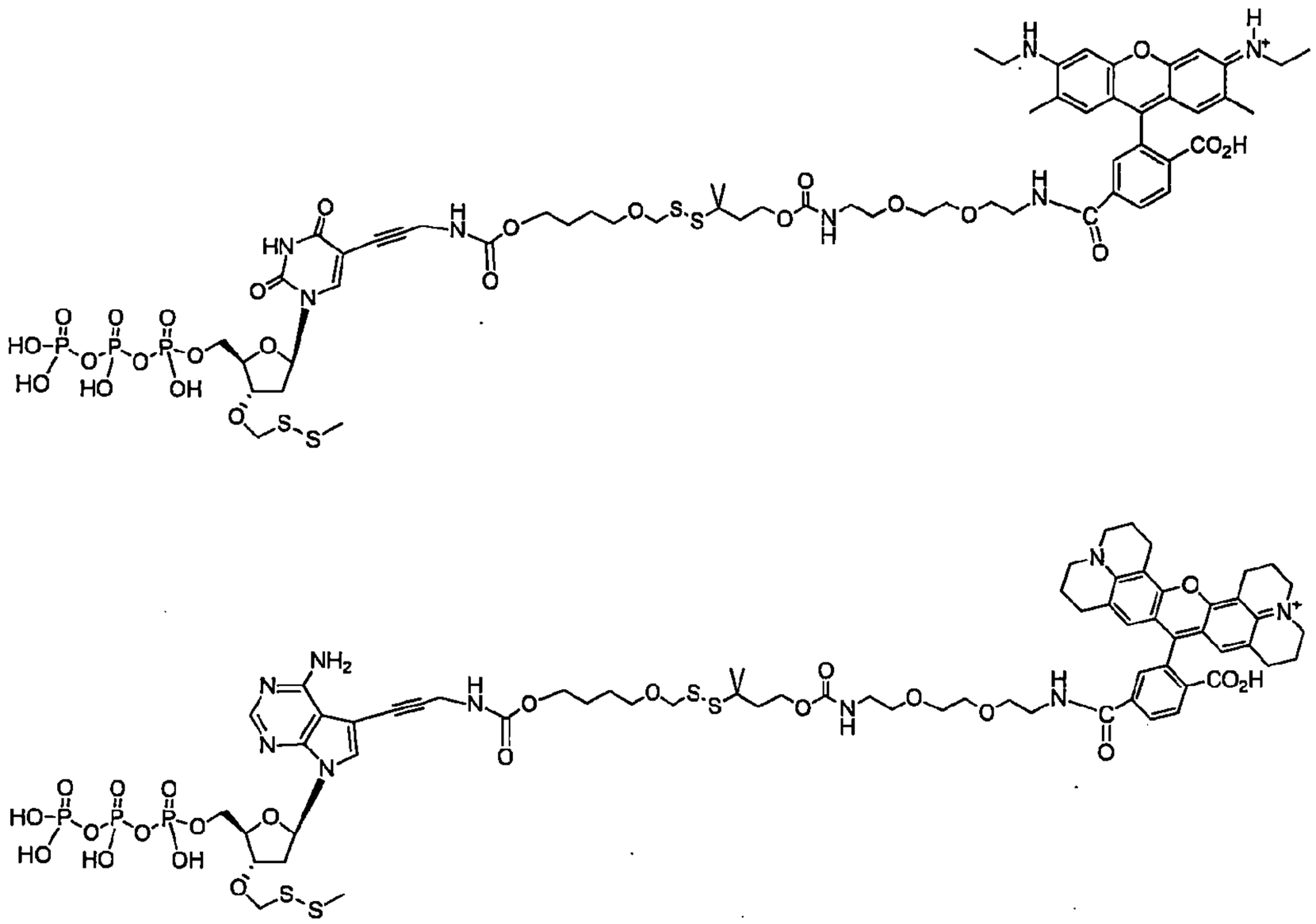
在一個實施態樣中，本發明關於進行 DNA 合成反應之方法，其包含步驟 a)提供核酸模板連同與該模板雜交之引子、DNA 聚合酶、至少一種去氧核苷三磷酸，該去氧核苷三磷酸包含在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子與以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O，及 b)使該反應混合物接受能使 DNA 聚合酶催化引子延伸反應的條件。在一個實施態樣中，該 DNA 聚合酶催化引子延伸反應為定序反應的一部分。在一個實施態樣中，該可檢測標識物係藉由暴露於還原劑而自該核鹼基移除。不意欲使本發明受限於一種型式的還原劑。可使用能夠還原二硫化物鍵之任何適合的還原劑實施本發明。在一個實施態樣中，還原劑為膦[12]，例如三苯基膦、三丁基膦、三羥甲基膦、三羥丙基膦、三乙氧羰基膦(TCEP)[13，14]。在一個實施態樣中，該還原劑為 TCEP。在一個實施態樣中，該可檢測標識物及 3'-OCH2-

SS-R 基團係藉由暴露於攜有硫醇之化合物而自該核鹼基移除[15]，以進行以二硫為底質之連結子及終止(保護)基團的裂解，此等含硫醇化合物包括(但不限於)半胱胺酸、半胱胺、二硫琥珀酸、二硫蘇糖醇、2,3-二巰基-1-丙烷磺酸鈉鹽、二硫丁胺[16]、內消旋-2,5-二巰基-N,N,N',N'-四甲基己二醯胺、2-巰基乙烷磺酸酯和 N,N'-二甲基,N,N'-雙(巰基乙醯基)-肼[17]。反應可以內含的硒醇(selenol)進一步催化[18]。另外，亦可出於此目的而使用硼氫化物，諸如硼氫化鈉[19](以及抗壞血酸[20])。另外，亦已知用於二硫化物鍵裂解之酶方法，諸如二硫化物和硫還原酶，且可由本發明化合物使用[21]。

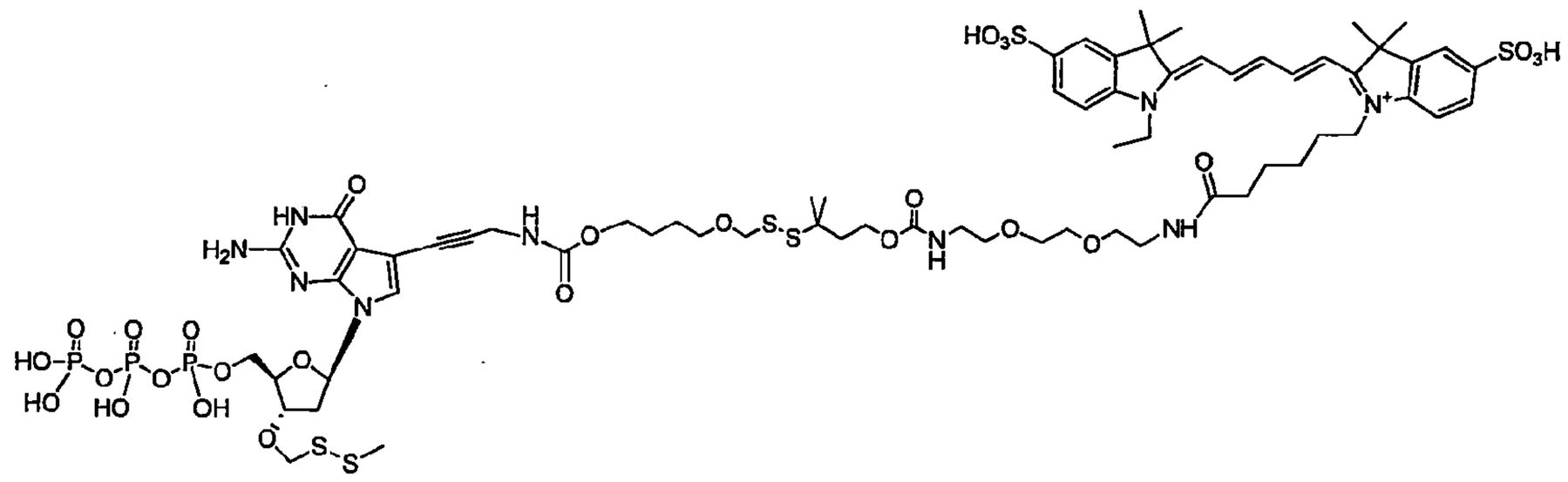
在一個實施態樣中，本發明關於分析 DNA 序列之方法，其包含步驟：a)提供核酸模板連同與該模板雜交之引子，以形成引子/模板雜交複合物，b)加入 DNA 聚合酶及第一去氧核苷三磷酸，該第一去氧核苷三磷酸包含核鹼基、在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子與以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O，c)使該反應混合物接受能使 DNA 聚合酶催化引子延伸反應的條件，以產生經改質之引子/模板雜交複合物，及 d)檢測在該經改質之引子/模板雜交複合物中的該去氧核苷三磷酸之該第一可檢測標識物。在一個實施態樣中，該方法另外包含步驟：e)自該經改質之引子/模板雜交複合物移除該可裂解的保護基及隨意地移除該可檢測標識物，及 f)重複步驟 b)至 e)至少一次。在一個實施態樣中，可裂解的含

二硫甲醛連結子為疏水性且具有大於 0 之 logP 值。在一個實施態樣中，可裂解的含二硫甲醛連結子為疏水性且具有大於 0.1 之 logP 值。在一個實施態樣中，可裂解的含二硫甲醛連結子為疏水性且具有大於 1.0 之 logP 值。在一個實施態樣中，該方法另外包含在重複步驟 b)期間添加第二去氧核苷三磷酸，其中該第二去氧核苷三磷酸包含第二可檢測標識物，其中該第二可檢測標識物不同於該第一可檢測標識物。在一個實施態樣中，該第二去氧核苷三磷酸之核鹼基不同於該第一去氧核苷三磷酸之核鹼基。在一個實施態樣中，在步驟 b)中使用至少 4 個經不同標識於 3'-O 之經二硫甲烷封端之去氧核苷三磷酸化合物的混合物，該去氧核苷三磷酸化合物代表 A、G、C 和 T 或 U 之類似物。在一個實施態樣中，在步驟 b)中使用至少 4 個經不同標識於 3'-O 之經二硫甲烷封端之去氧核苷三磷酸化合物的該混合物，該化合物具有下列結構：



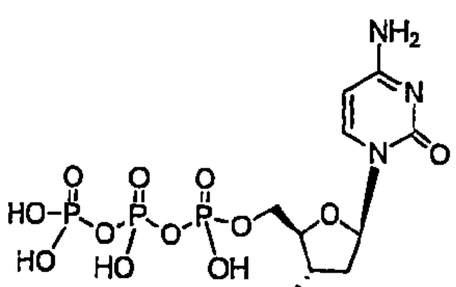


和

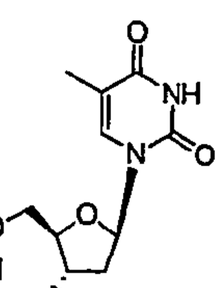


。

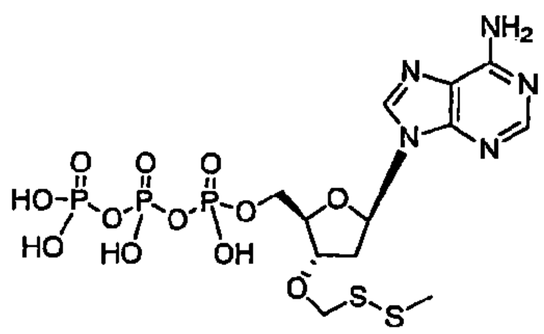
在一個實施態樣中，亦用於步驟 b)中的該混合物另外包含具有下列結構的未經標識於 3'-O 之經二硫甲烷封端之去氧核苷三磷酸化合物：



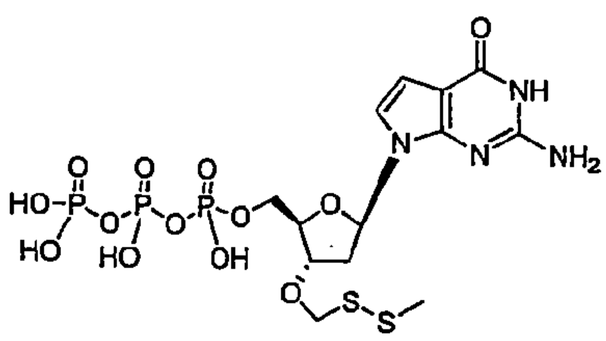
、



、



和



。在一個實施態樣中，步驟 e)係藉由將該經改質之引子/模板雜交複合物暴

露於還原劑來進行。在一個實施態樣中，該還原劑為TCEP。在一個實施態樣中，該可檢測標識物係藉由暴露於攜有硫醇之化合而自該核鹼基移除，以進行以二硫為底質之連結子及終止(保護)基團的裂解，此等含硫醇化合物包括(但不限於)半胱胺酸、半胱胺、二硫琥珀酸、二硫蘇糖醇、2,3-二巯基-1-丙烷磺酸鈉鹽、二硫丁胺、內消旋-2,5-二巯基-N,N,N',N'-四甲基己二醯胺、2-巯基-乙烷磺酸酯和 N,N'-二甲基,N,N'-雙(巯基乙醯基)-肼。

不意欲使本發明受限於特定的定序平台。然而，較佳的儀器為 QIAGEN's GeneReader DNA 定序系統(GR)。在一個實施態樣中，DNA 序列係以合成定序(SBS)方法測定。在一個實施態樣中，每一定序循環係由八個步驟所組成：延伸(Extend) 1、延伸 2、清洗 1、添加成像溶液、成像、清洗 2、裂解及清洗 3。成像循環期間收集的數據係以得到誤差率、產出值及適用的定相校正值之分析軟體處理。

可設想以相同或類似的方法可能改進一般其他的 SBS 平台 (亦即在類似的條件下操作的任何以合成定序方法)以及特定的 SBS 平台之性能，諸如來自 Illumina 之 HiSeq 和 miSeq 平台；Roche 454；Ion Torrent PGM 和 Proton 平台；及 PacificBio 平台。

不意欲使本發明僅受限於一種型式的定序。在一個實施態樣中，該去氧核苷三磷酸(包含核鹼基、標識物與糖、在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子，該

糖包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的3'-O)可用於焦磷酸定序中。

在一個實施態樣中，本發明關於包含核鹼基與糖之去氧核苷三磷酸，該核鹼基包含經由可裂解的二硫甲醛連結子附著之可檢測標識物，該糖包含以包含二硫甲烷基團作為可裂解的保護基封端之 3'-O。在一個實施態樣中，該核苷係在與聚合酶之混合物中。在一個實施態樣中，該核苷之核鹼基為非天然。在一個實施態樣中，該核苷之非天然核鹼基係選自包含下列之群組：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。在一個實施態樣中，包含二硫甲烷基團之該基團具有式–CH_2-SS-R，其中 R 係選自包含下列之群組：烷基和經取代之烷基。在一個實施態樣中，該混合物另外包含引子。在一個實施態樣中，該引子係與核酸模板雜交。在一個實施態樣中，該可檢測標識物為螢光標識物。在一個實施態樣中，將該核酸模板固定。

在一個實施態樣中，本發明關於製備 3'-O-(甲基硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷之方法，其包含：a)提供 5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷，其中該 5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷包含核鹼基與糖，及 ii)甲基硫甲基供體；及 b)在產生 3'-O-(甲基硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷的條件下處理該 5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷。在一個實施態樣中，該甲基硫甲基供體為 DMSO。在一個實施態樣

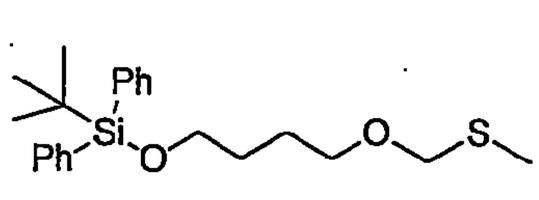
中，該條件包含酸性條件。在一個實施態樣中，該 5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷包含在該核苷的核鹼基上之保護基。在一個實施態樣中，該 3'-O-(甲基硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷係以管柱層析術純化。

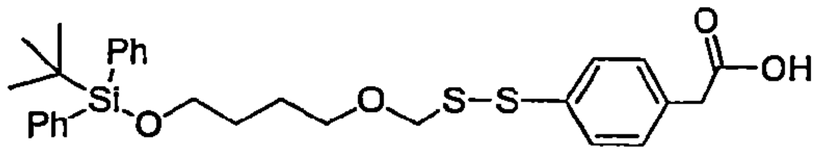
在一個實施態樣中，本發明關於製備 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷之方法，其包含：a)提供 i) 3'-O-(甲基硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷，及 ii) R-SH，其中 R 包含烷基或經取代之烷基；及 b)在產生 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷的條件下處理該 3'-O-(甲基硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷。在一個實施態樣中，該 R-SH 為乙硫醇。在一個實施態樣中，該條件包含鹼性條件。

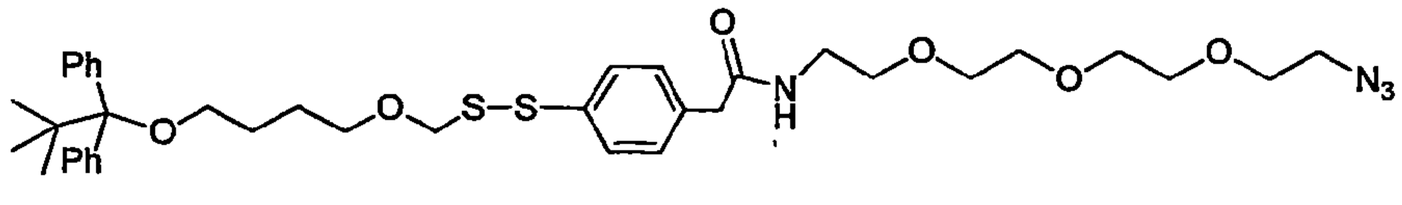
在一個實施態樣中，本發明關於製備 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷之方法，其包含：a)提供 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷；及 b)在產生 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷的條件下處理該 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧核苷。在一個實施態樣中，該條件包含將該 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷暴露於 NH_4F。

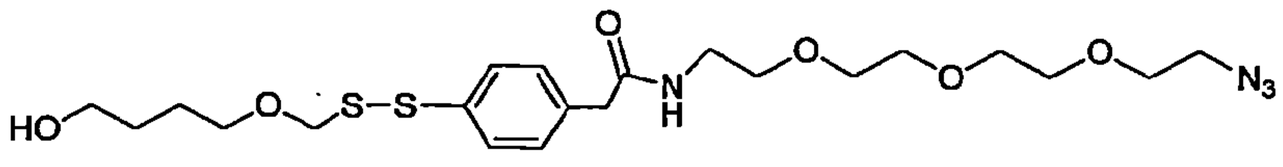
在一個實施態樣中，本發明關於製備 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷之三磷酸根的方法，其包含：a)提

供 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷；及 b)在產生 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷之三磷酸的條件下處理該 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷。在一個實施態樣中，該條件包含將該 3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-2'-去氧核苷暴露於$(MeO)_3PO$ 與 $POCl_3$ 及 Bu_3N。在一個實施態樣中，該方法另外包含步驟 c)移除該核鹼基保護基。在一個實施態樣中，該保護基包含 N-三氟乙醯基-胺基炔丙基保護基。在一個實施態樣中，該 N-三氟乙醯基-胺基炔丙基保護基係藉由溶劑分解而移除，以產生 5'-O-(三磷酸根)-3'-O-(經 R 取代-二硫甲基)-5-(胺基炔丙基)-2'-去氧核苷。

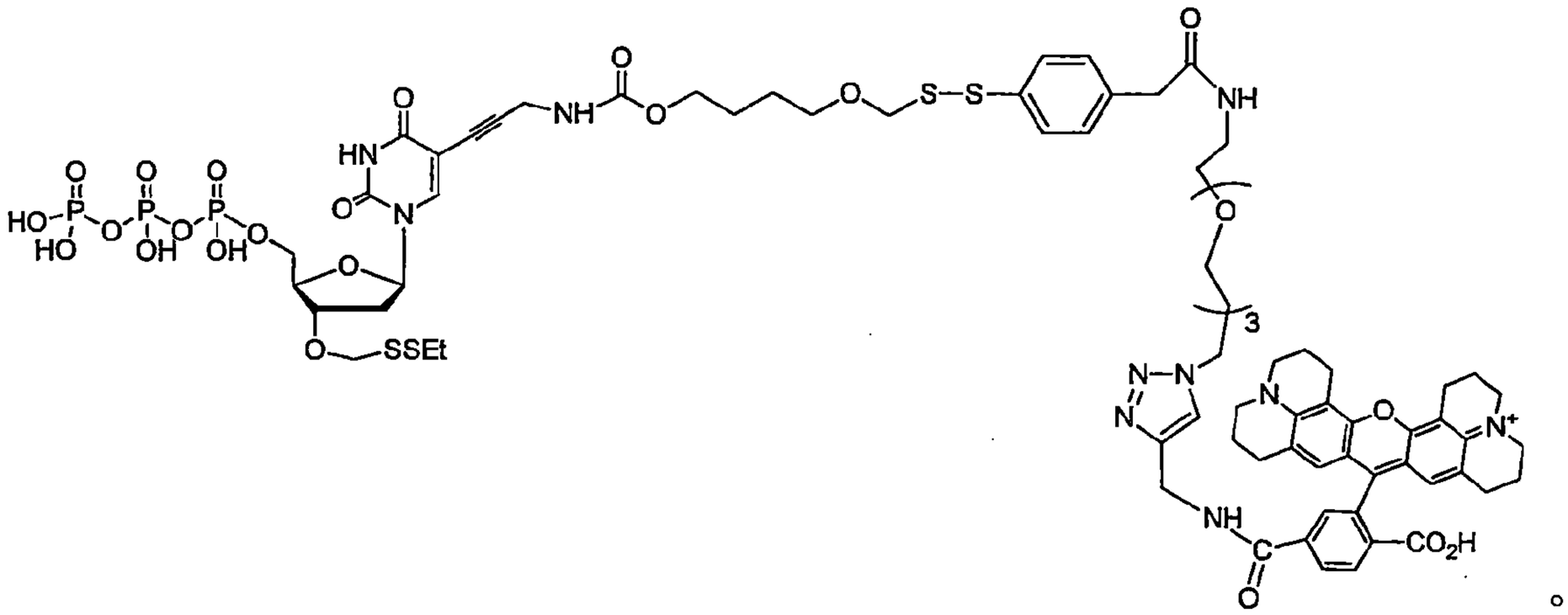
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

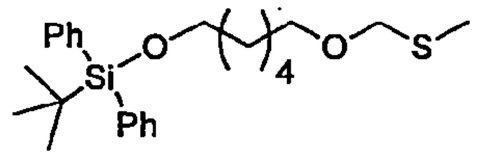
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

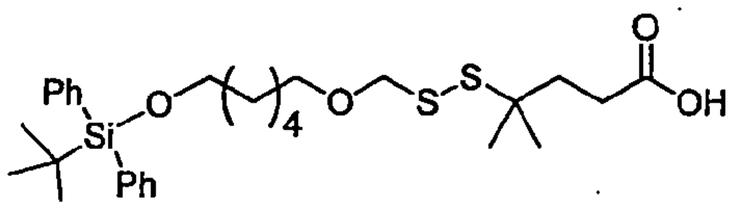
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

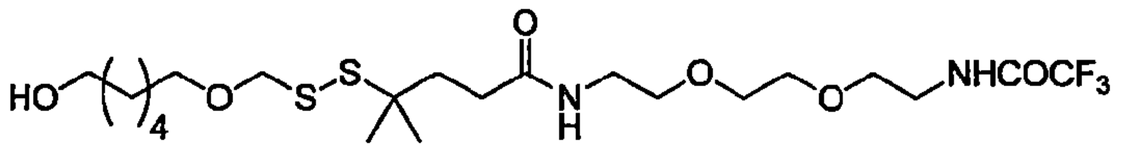
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：

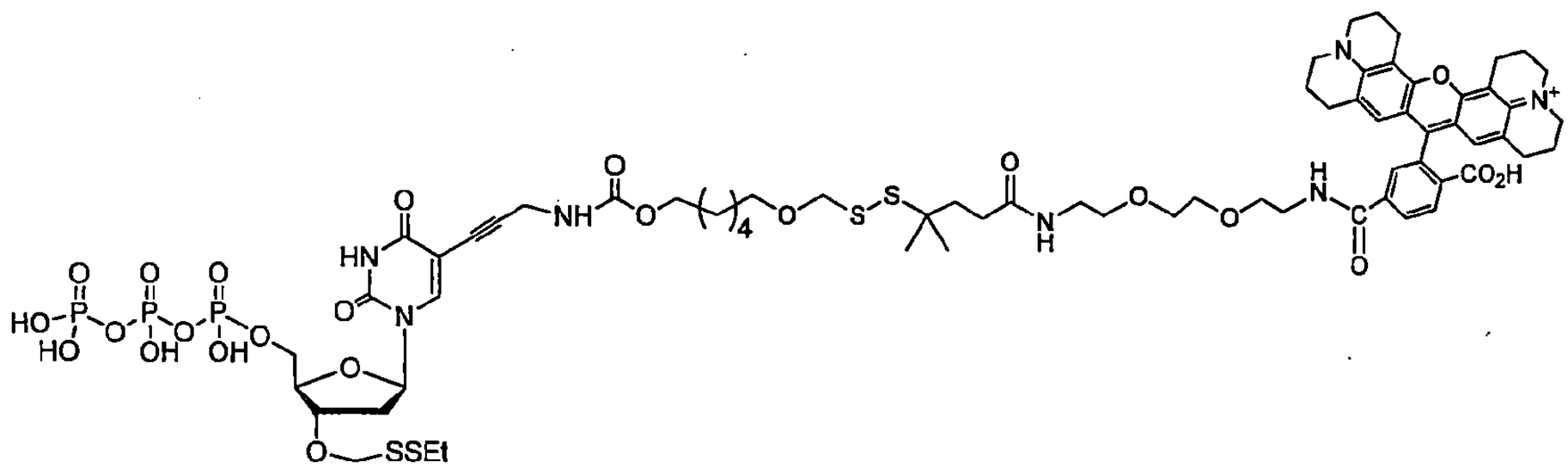


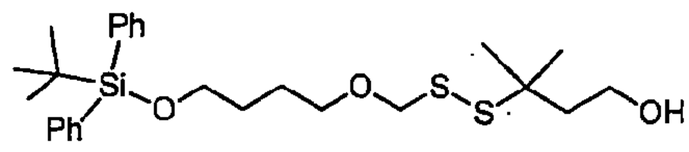
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

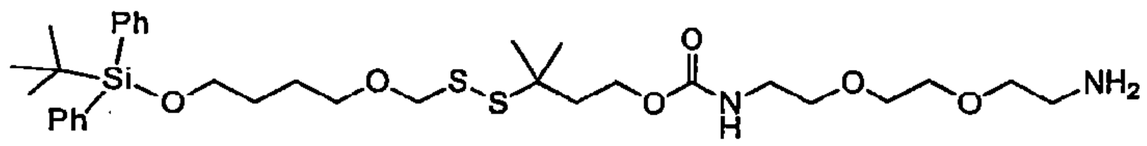
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

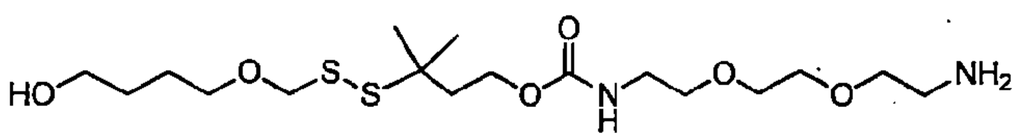
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

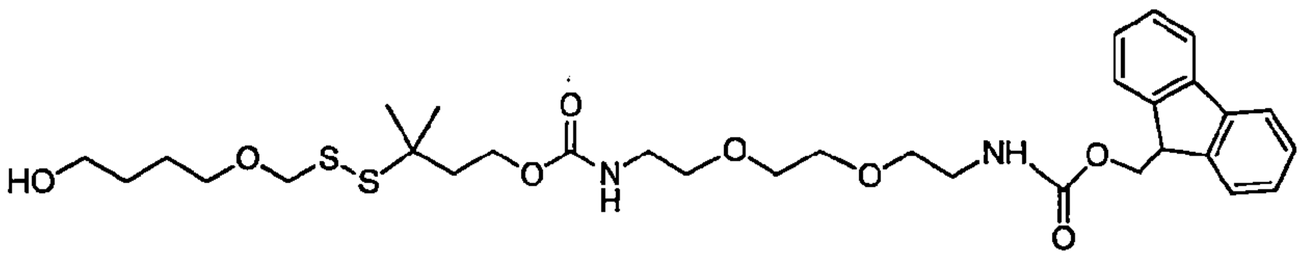
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：

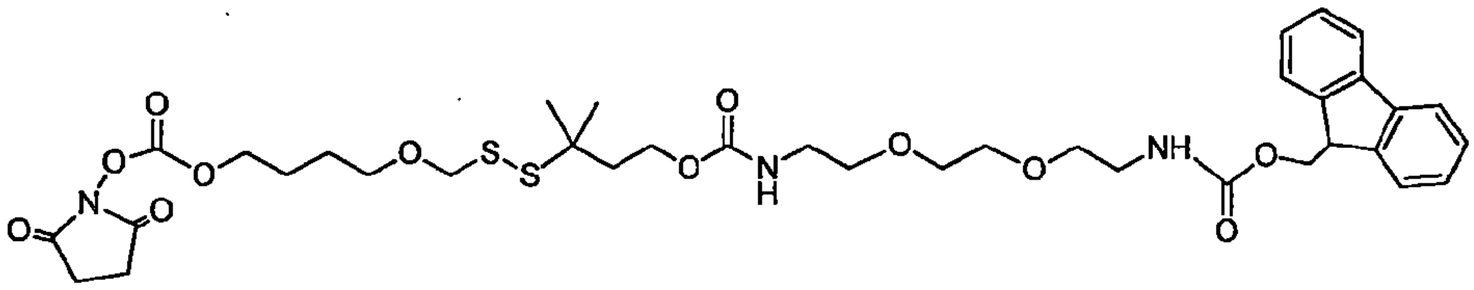


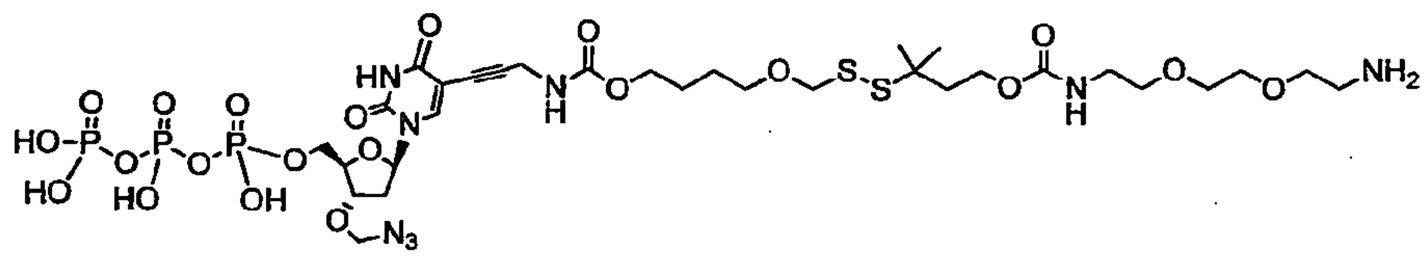
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

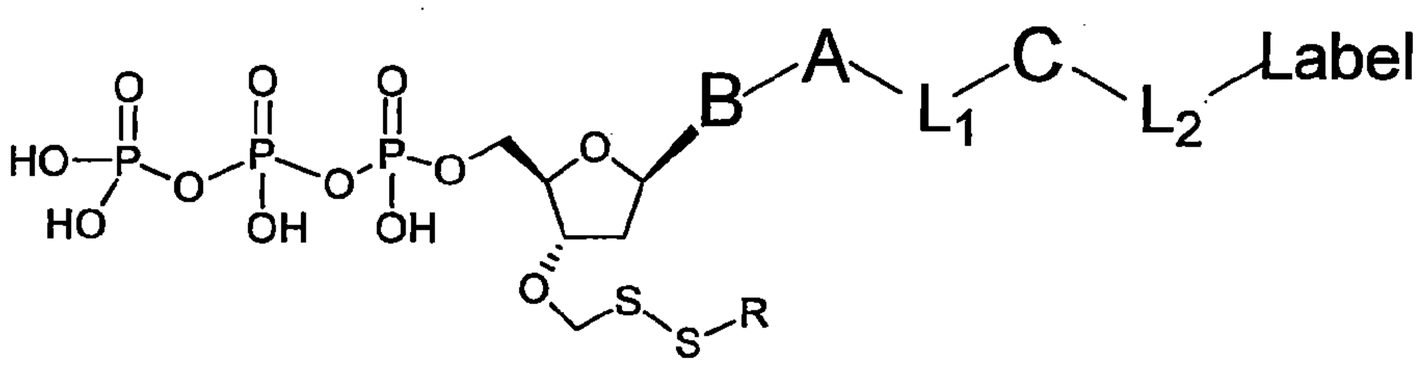
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

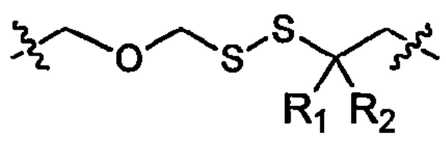
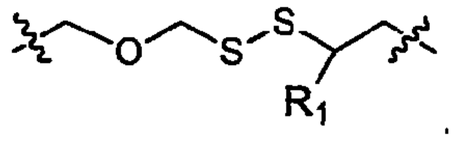
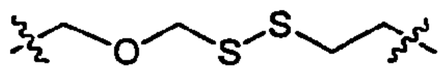
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

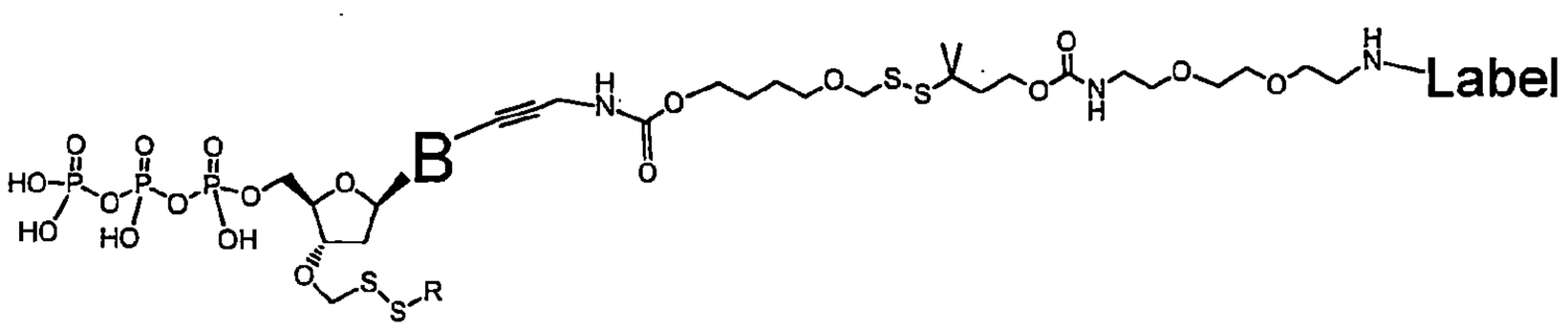
在一個實施態樣中，本發明關於其中結構如下之化合物：  。

在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的經標識之去氧核苷三磷酸：

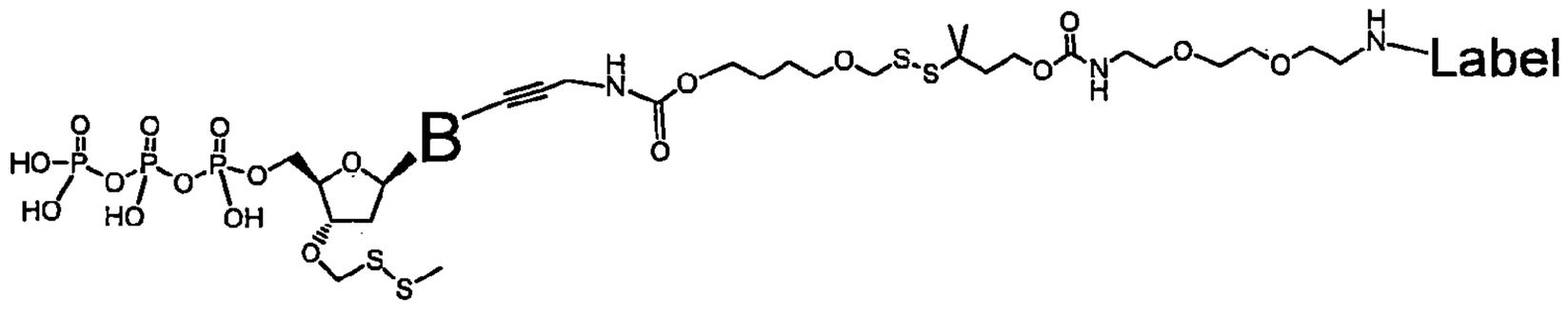


其中 R 係選自由下列所組成之群組：烷基、經取代之烷基、烯丙基、經取代之烯丙基；B 為核鹼基；A 為附著基團；C 為可裂解的部位核心；L_1 和 L_2 為連接基團；及 Label 為標識物。

在一個實施態樣中，該核鹼基為選自由下列所組成之群組的非天然核鹼基類似物：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。在一個實施態樣中，該附著基團 A 為選自由下列所組成之群組的化學基團：炔丙基、羥甲基、環外胺、炔丙胺和炔丙基羥基。在一個實施態樣中，該可裂解的部位核心係選自由下列所組成之群組：  、  和  ，其中 R_1 和 R_2 係獨立地選自烷基。在一個實施態樣中，其中 L_1 係選自由下列所組成之群組：$-CONH(CH_2)_x-$、$-COO(CH_2)_x-$、$-CO(CH_2)_x-$，其中 x 為 0 至 10，但是更佳為從 1 至 6。在一個實施態樣中，其中 L_2 係選自由下列所組成之群組：$-NH-$、$-(CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$、$-(CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$、$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO(CH_2)_x-$，其中 x、y 和 z 各自獨立地選自 0 至 10，但是更佳為從 1 至 6。在一個實施態樣中，該標識物係選自由下列所組成之群組：螢光團染料、能量轉移染料、質量標籤、生物素和半抗原。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：

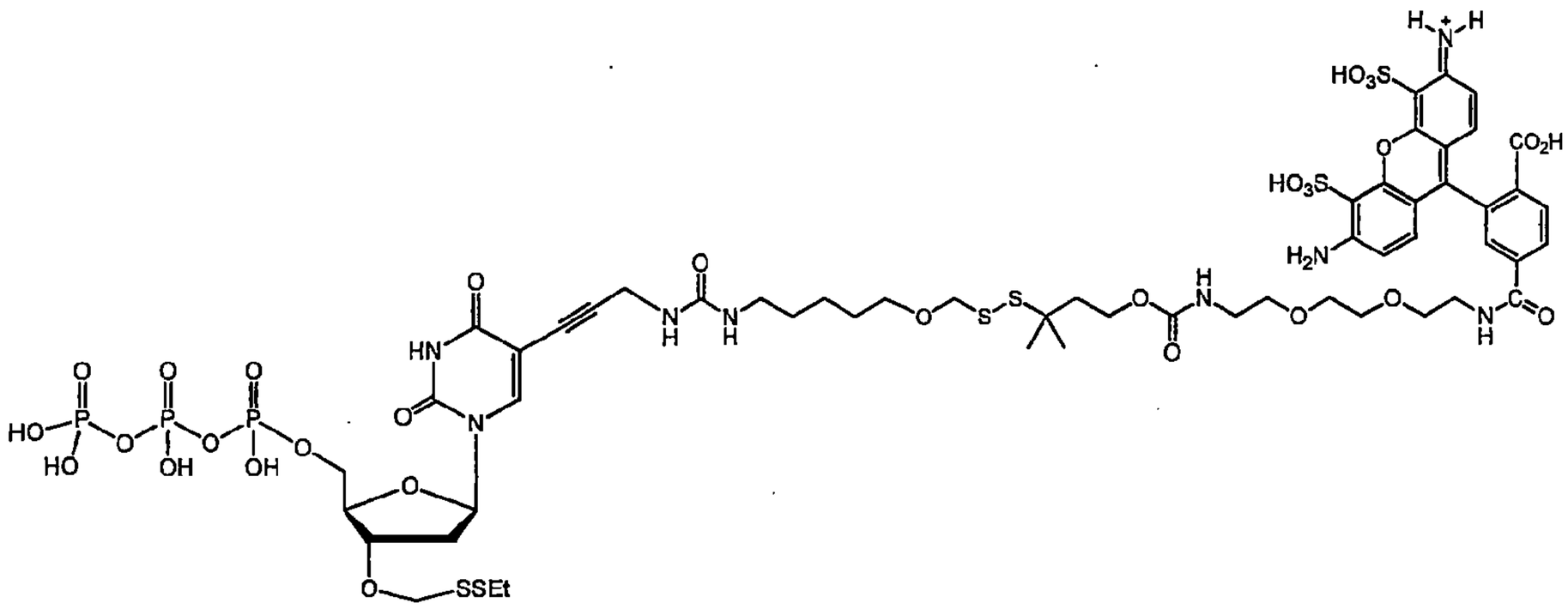


，其中該標識物為染料，且其中 R 係選自由下列所組成之群組：烷基、經取代之烷基、烯丙基、經取代之烯丙基。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



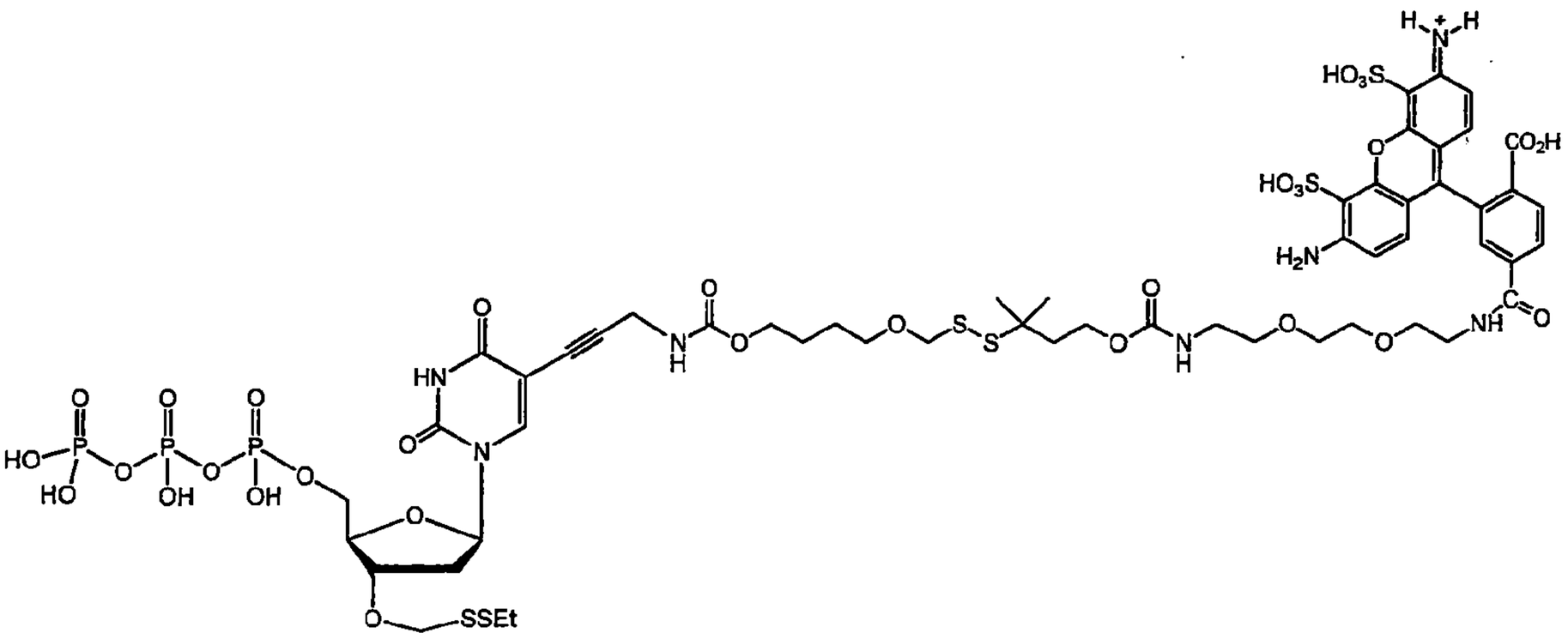
，其中該標識物為染料。

在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



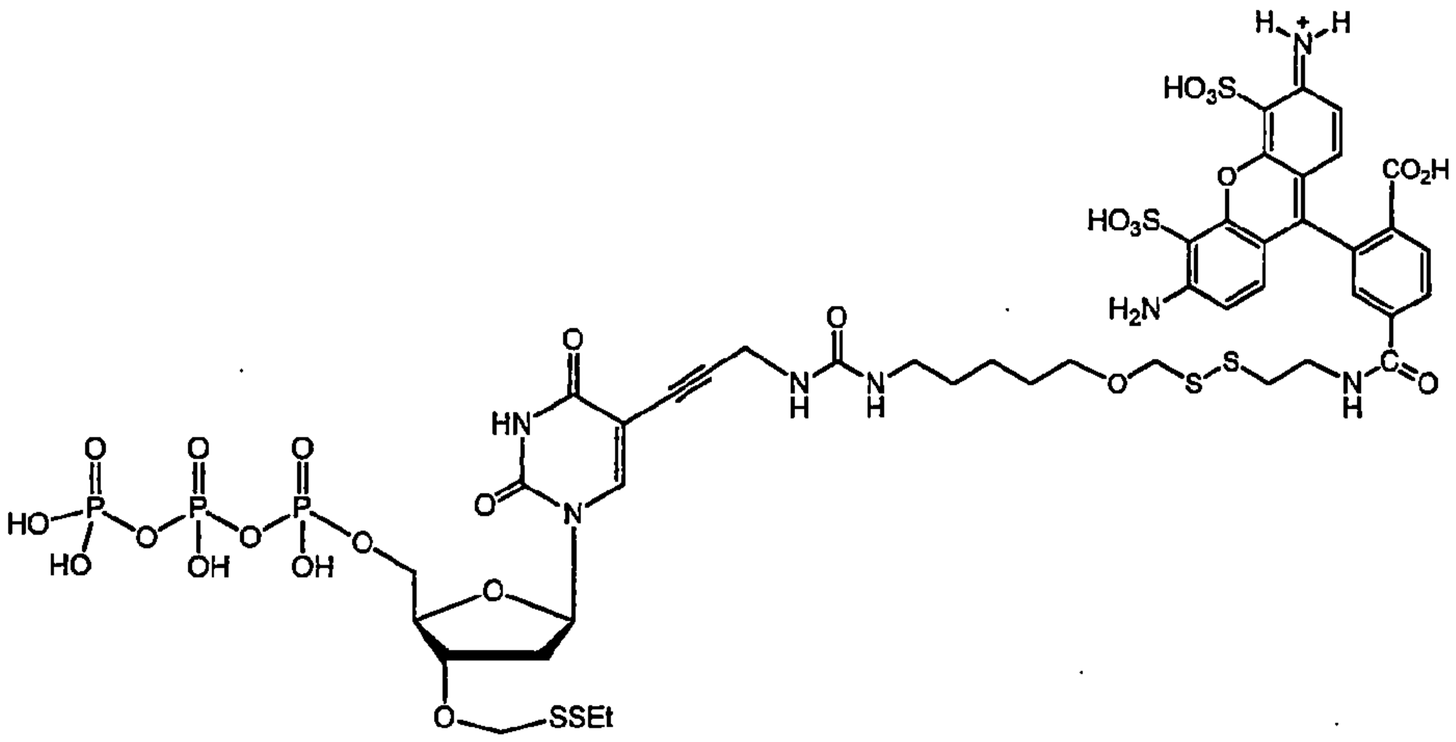
。

在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：

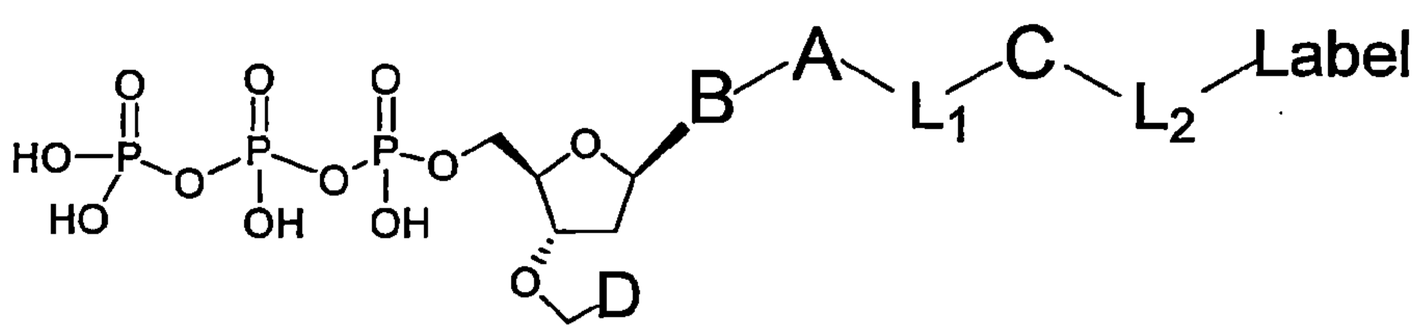


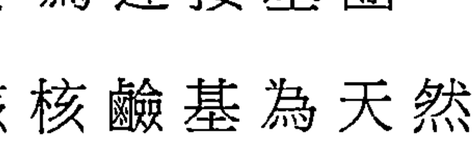
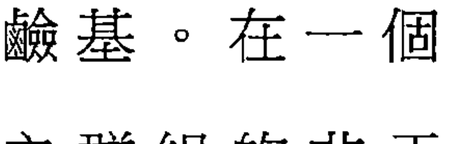
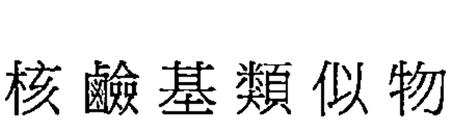
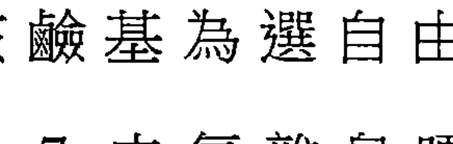
。

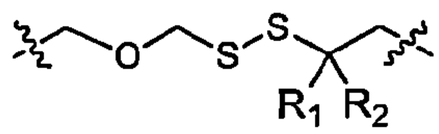
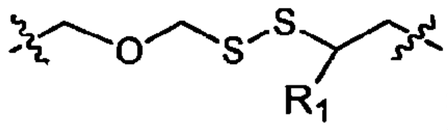
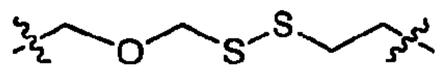
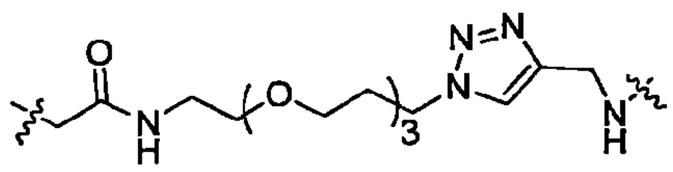
在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：

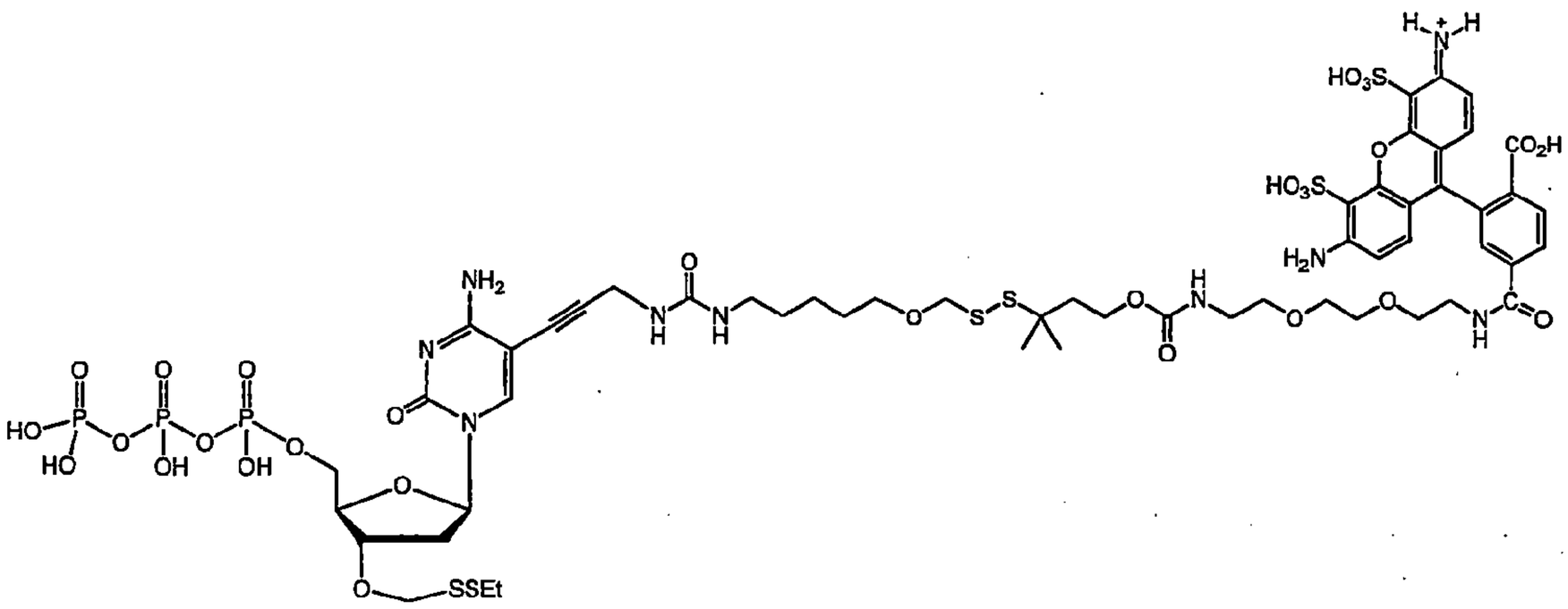


在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的經標識之去氧核苷三磷酸：

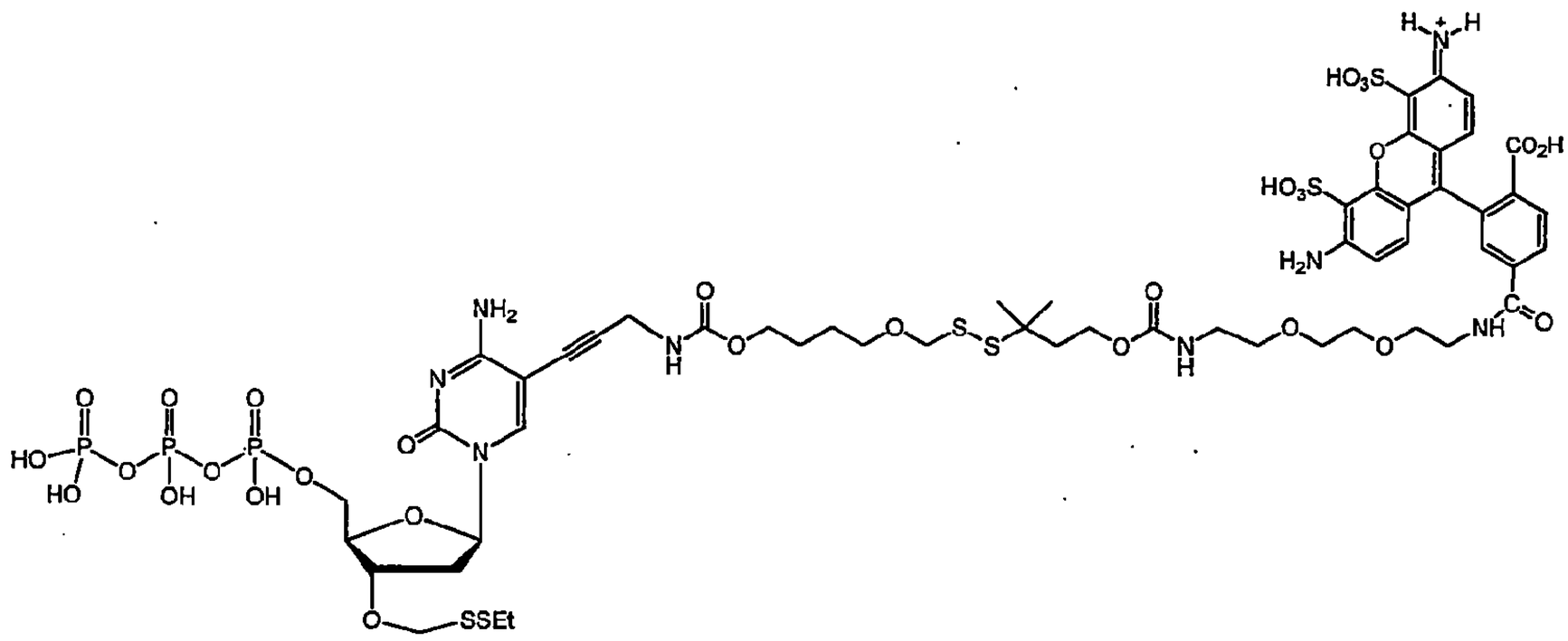


其中 D 係選自由下列所組成之群組：疊氮化物(-N_3)、二硫化烷基(-SS-R)和經二硫化物取代之烷基，B 為核鹼基，A 為附著基團，C 為可裂解的部位核心，L_1 和 L_2 為連接基團，及 Label 為標識物。在一個實施態樣中，該核鹼基為天然核鹼基。在一個實施態樣中，該核鹼基為選自由下列所組成之群組的非天然核鹼基類似物：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。在一個實施態樣中，該附著基團(A)為選自由下列所組成之群組的化學基團：炔丙基、羥甲基、環外胺、炔丙胺和炔丙基羥基。在一個實施態樣中，該可裂解的(C)部位核心係選自由下列所組成之群組：  、  、  和  ，其中 R_1 和

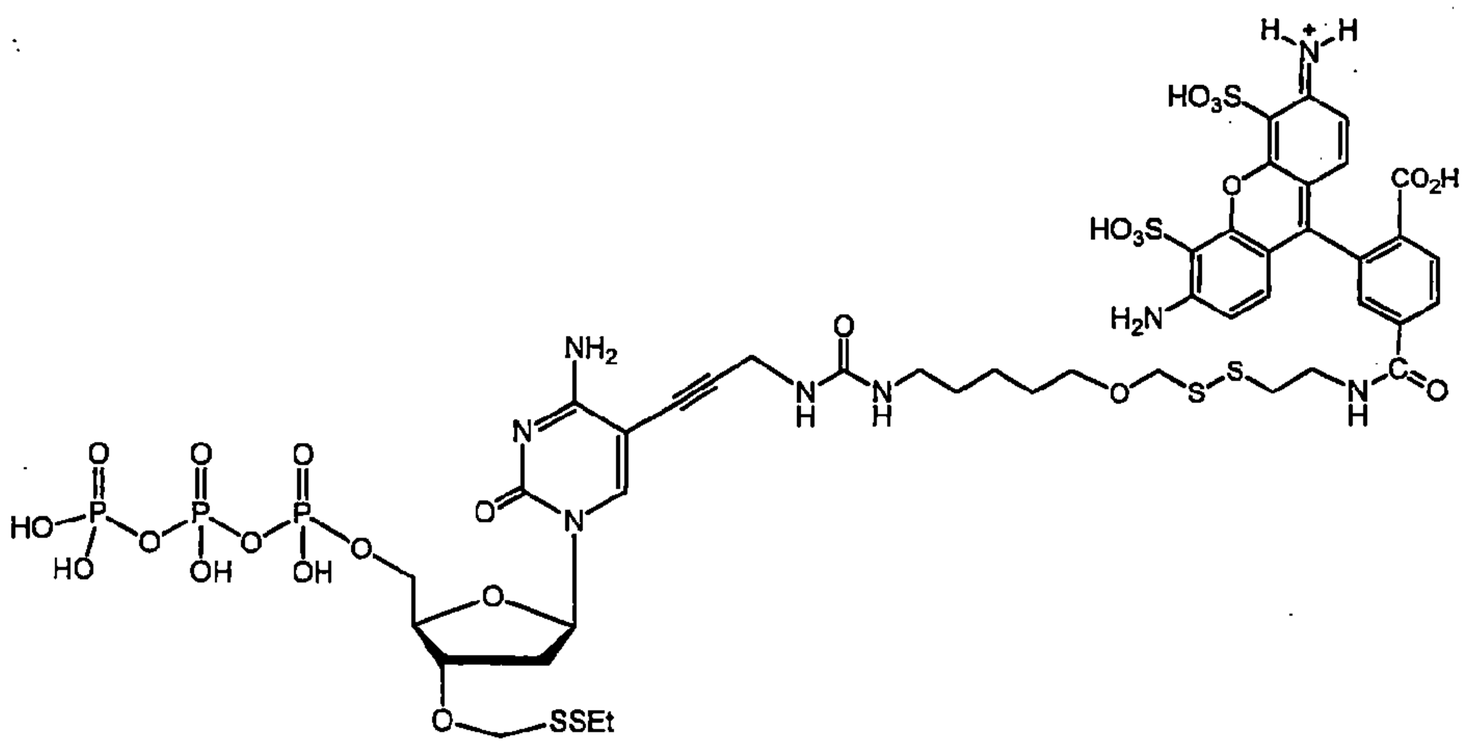
R_2係獨立地選自烷基。在一個實施態樣中，該可裂解的部位核心係選自由下列所組成之群組：  、  和  ，其中R_1和R_2係獨立地選自烷基。在一個實施態樣中，L_1係選自由下列所組成之群組：$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO\text{-}O(CH_2)_x-$、$-CONH\text{-}(OCH_2CH_2O)_x-$、$CO\text{-}O(CH_2CH_2O)_x-$和$-CO(CH_2)_x-$，其中x為0至100。在一些實施態樣中，x為0至10，但是更佳為從1至6。在一個實施態樣中，L_2係選自由下列所組成之群組：  、$-NH-$、$-(CH_2)_x\text{-}NH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xNH-$、$-CH(Me)(CH_2)_xNH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xCO-$、$-CH(Me)(CH_2)_xCO-$、$-(CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$、$-(CH_2)_xCONH(CH_2CH_2O)_y(CH_2)_zNH-$和$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO(CH_2)_x-$，其中x、y和z各自獨立地選自0至10，但是更佳為從1至6。在一個實施態樣中，L_2係選自由下列所組成之群組：$-NH-$、$-(CH_2)_x\text{-}NH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xNH-$、$-CH(Me)(CH_2)_xNH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xCO-$、$-CH(Me)(CH_2)_xCO-$、$-(CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$和$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO(CH_2)_x-$、其中x、y和z各自獨立地選自0至100。在一個實施態樣中，x、y和z各自獨立地選自0至10，但是更佳為從1至6。在一個實施態樣中，該標識物係選自由下列所組成之群組：螢光團染料、能量轉移染料、質量標籤、生物素和半抗原。在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：

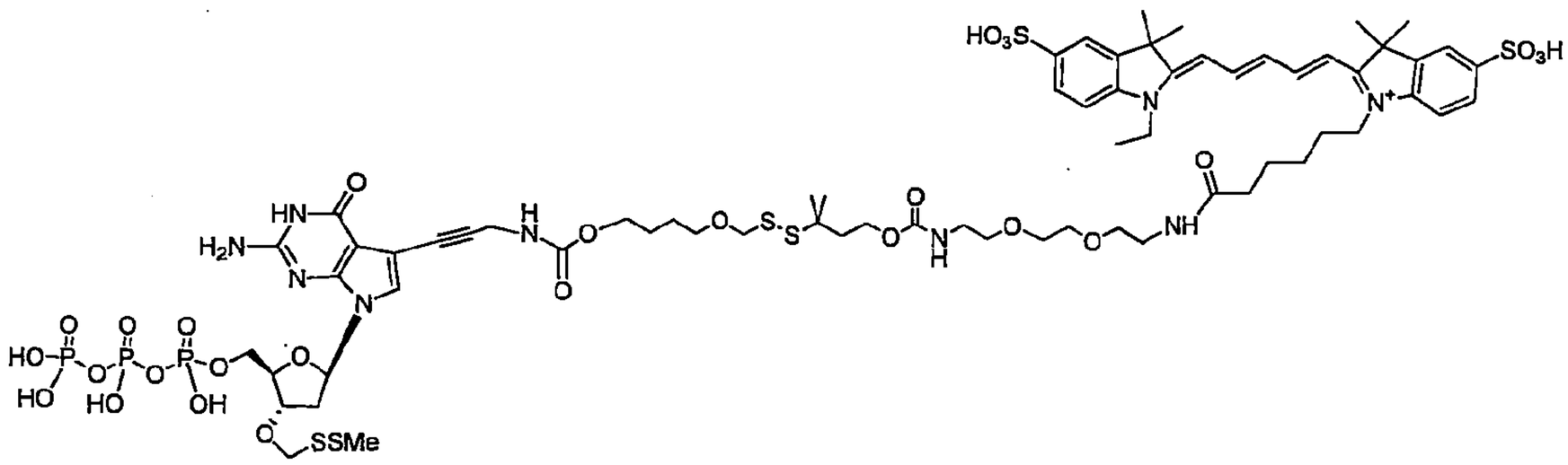


在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：

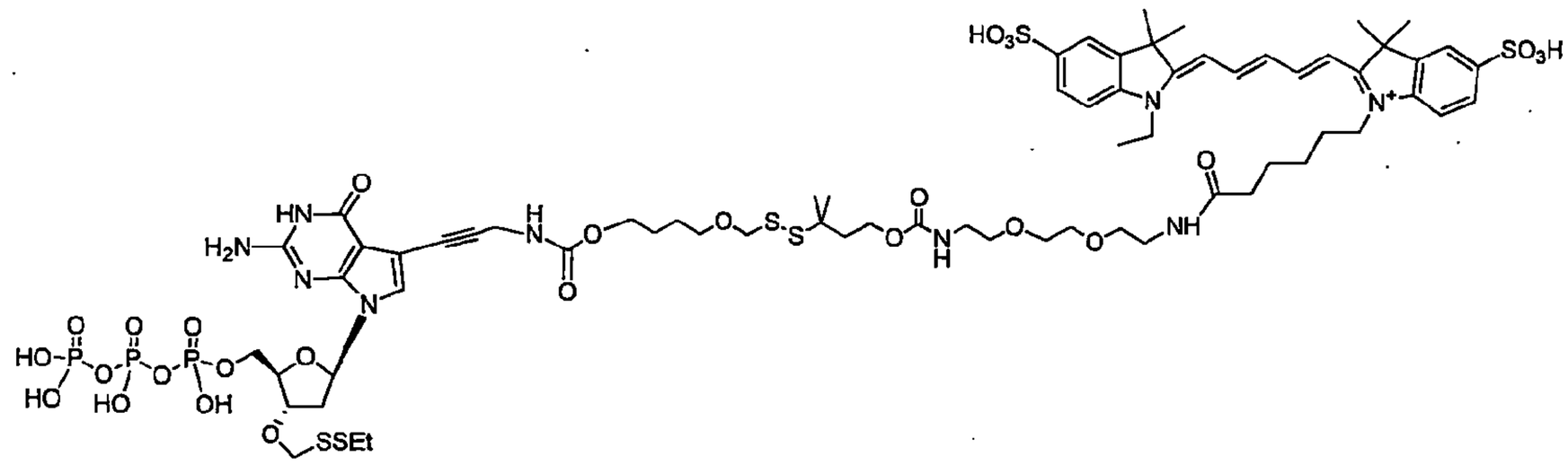


。在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸

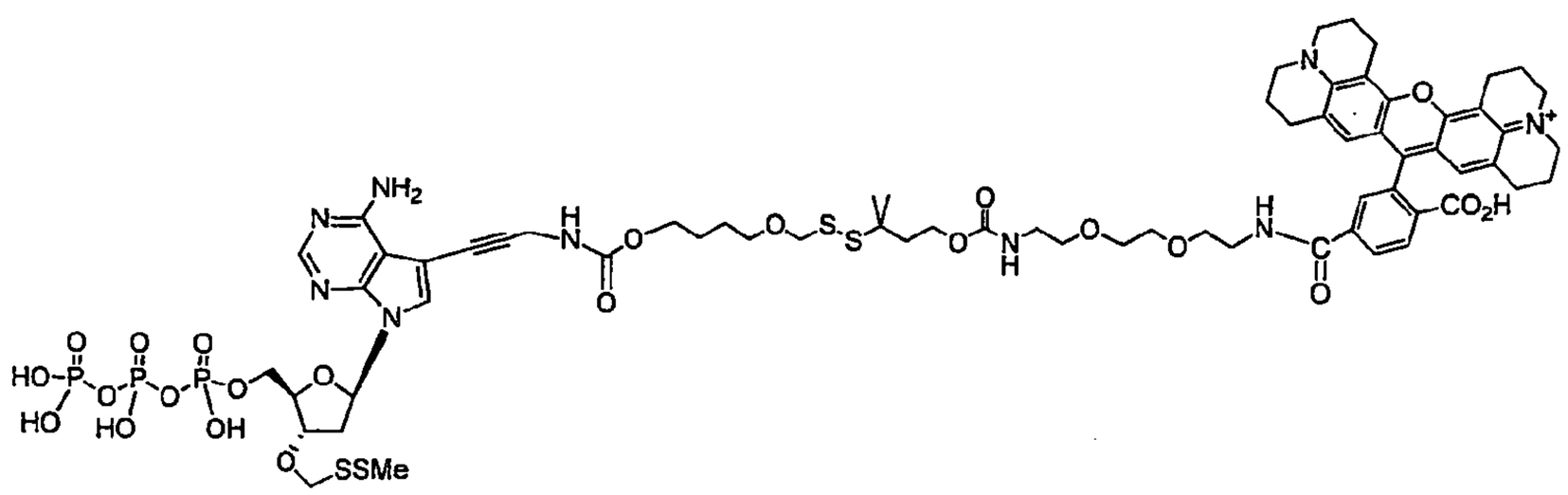
對應物：



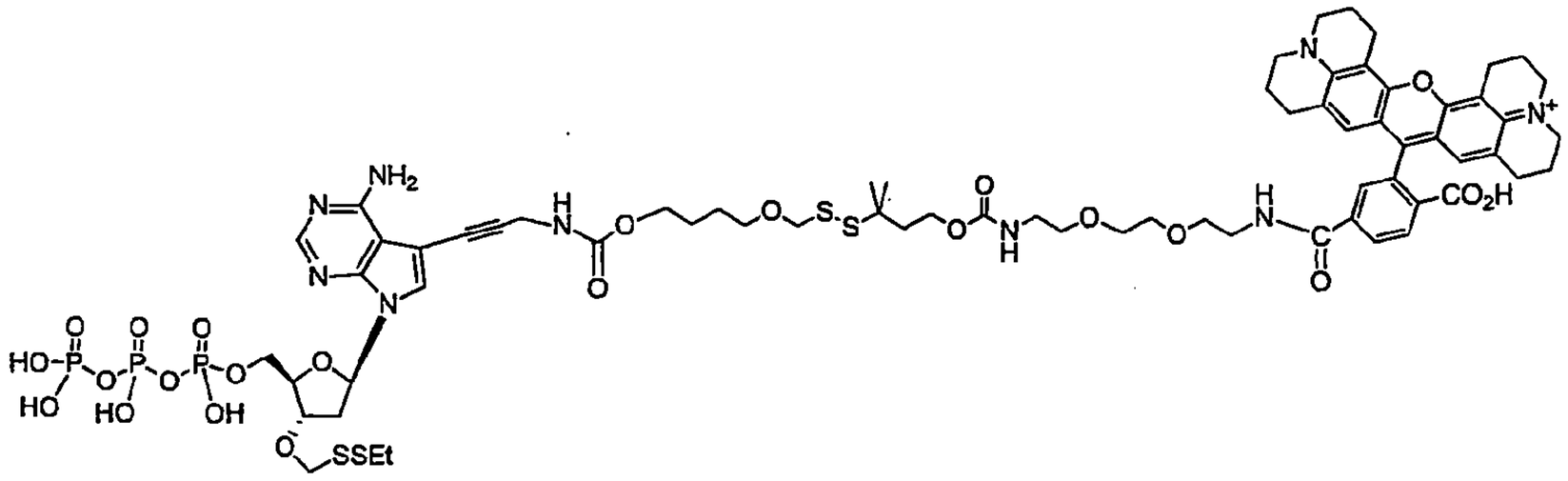
在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



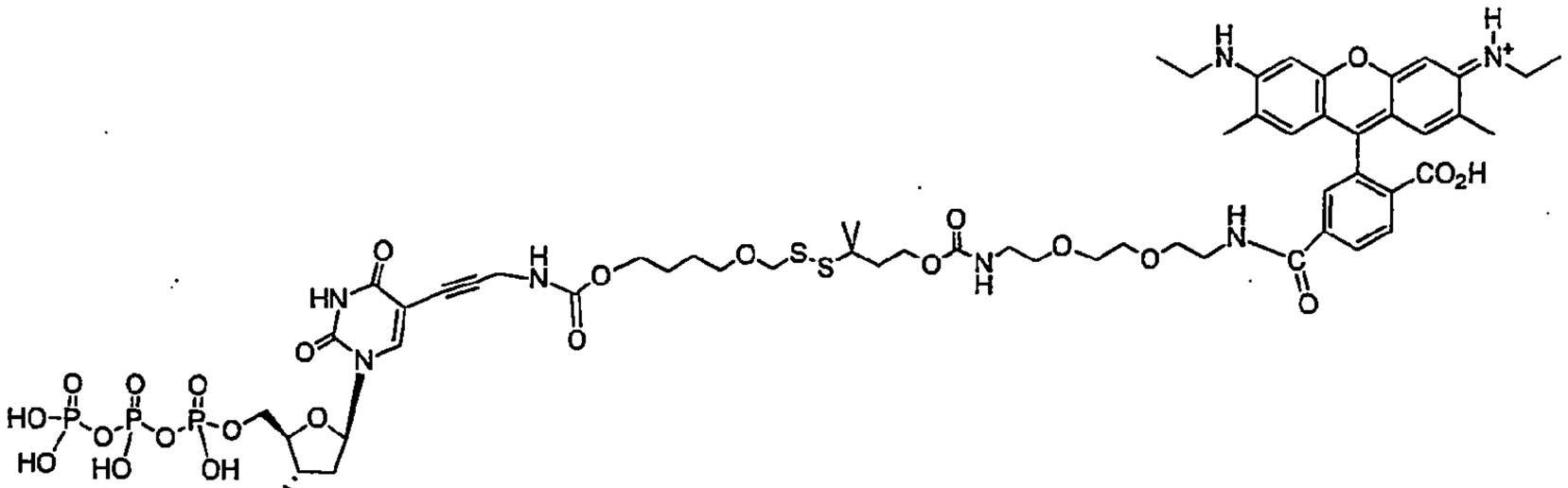
在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



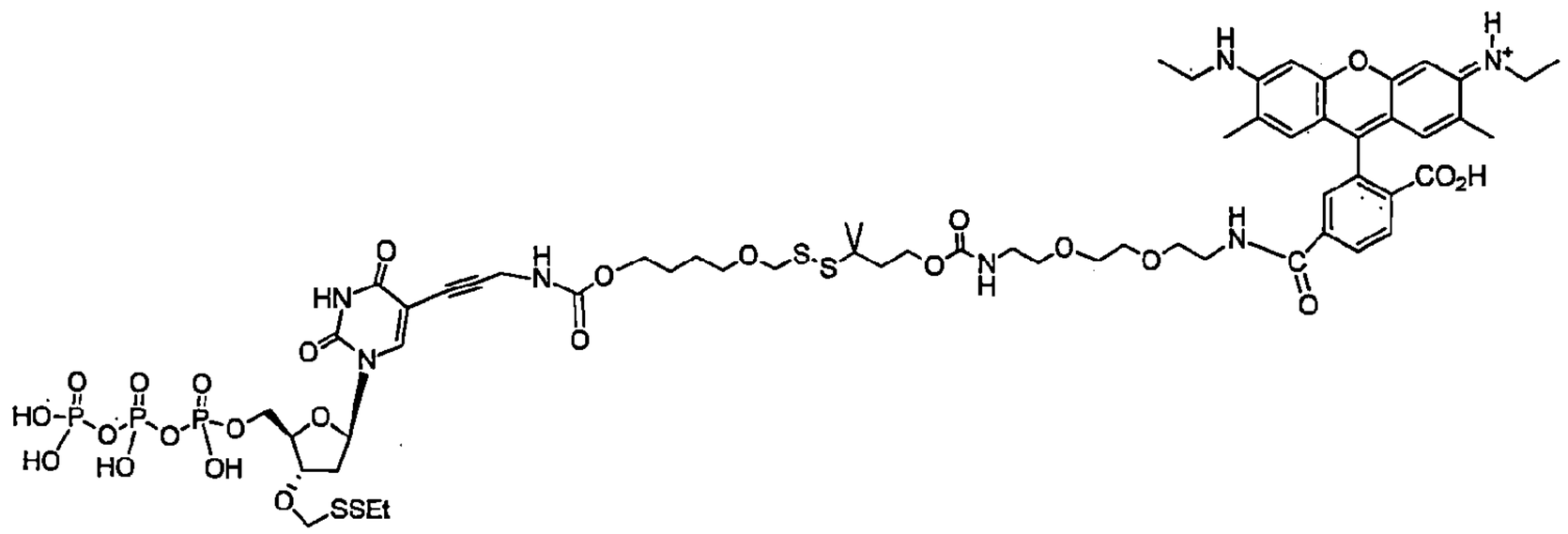
。在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



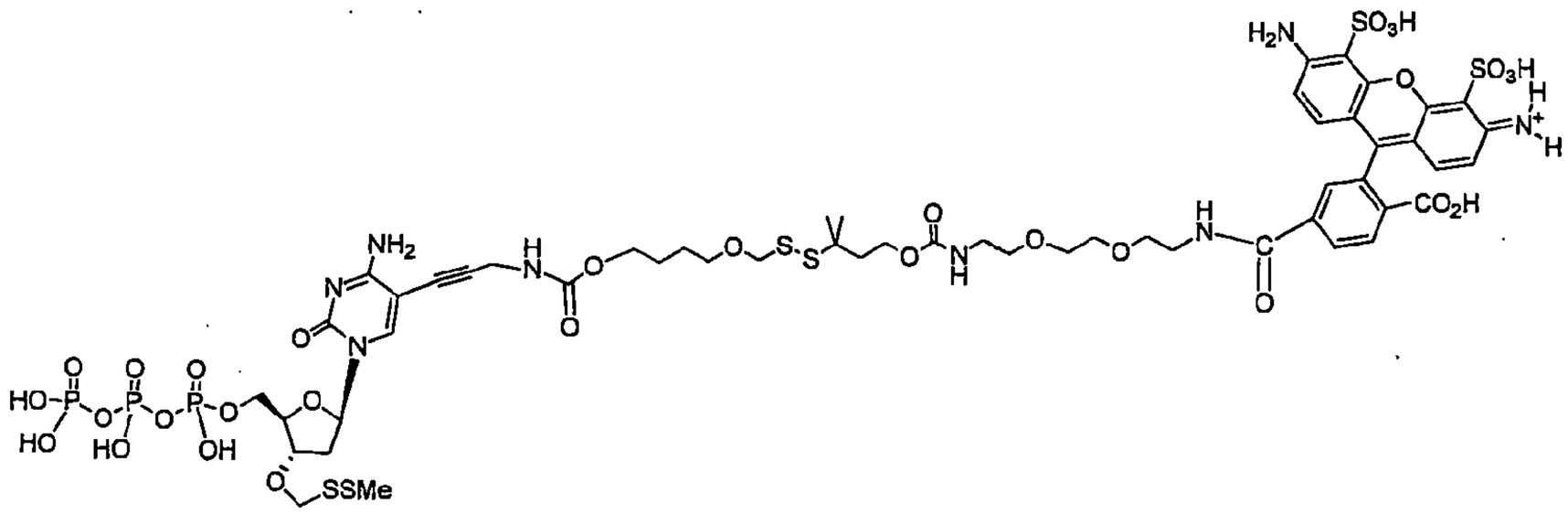
。在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



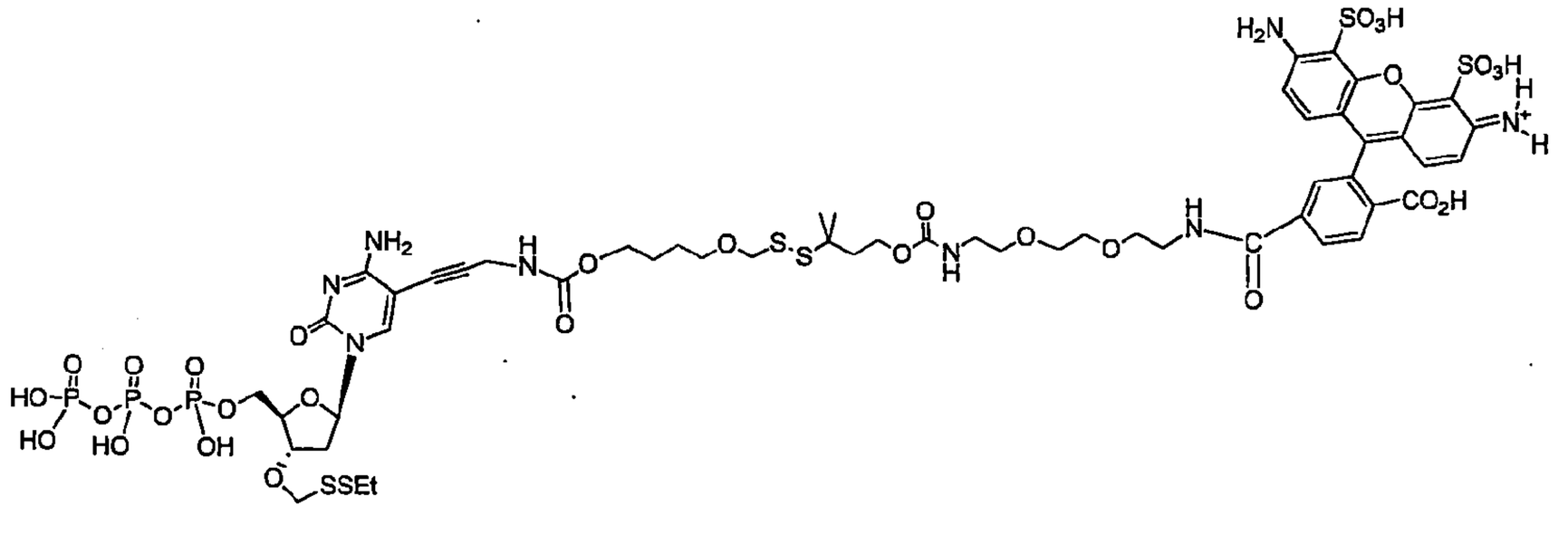
。在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



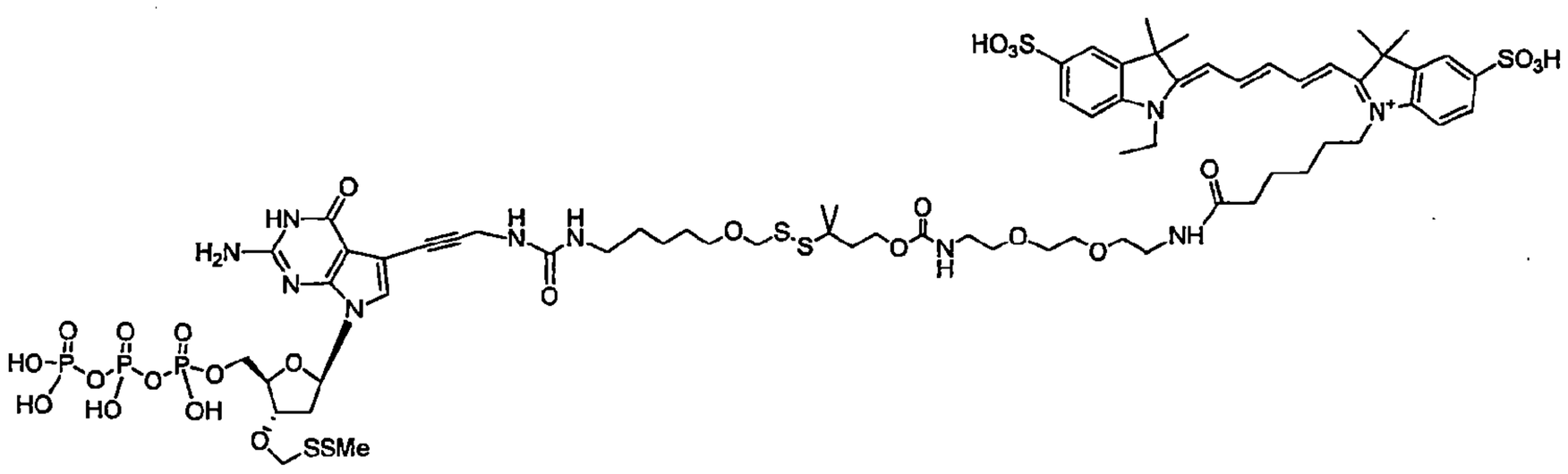
。在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



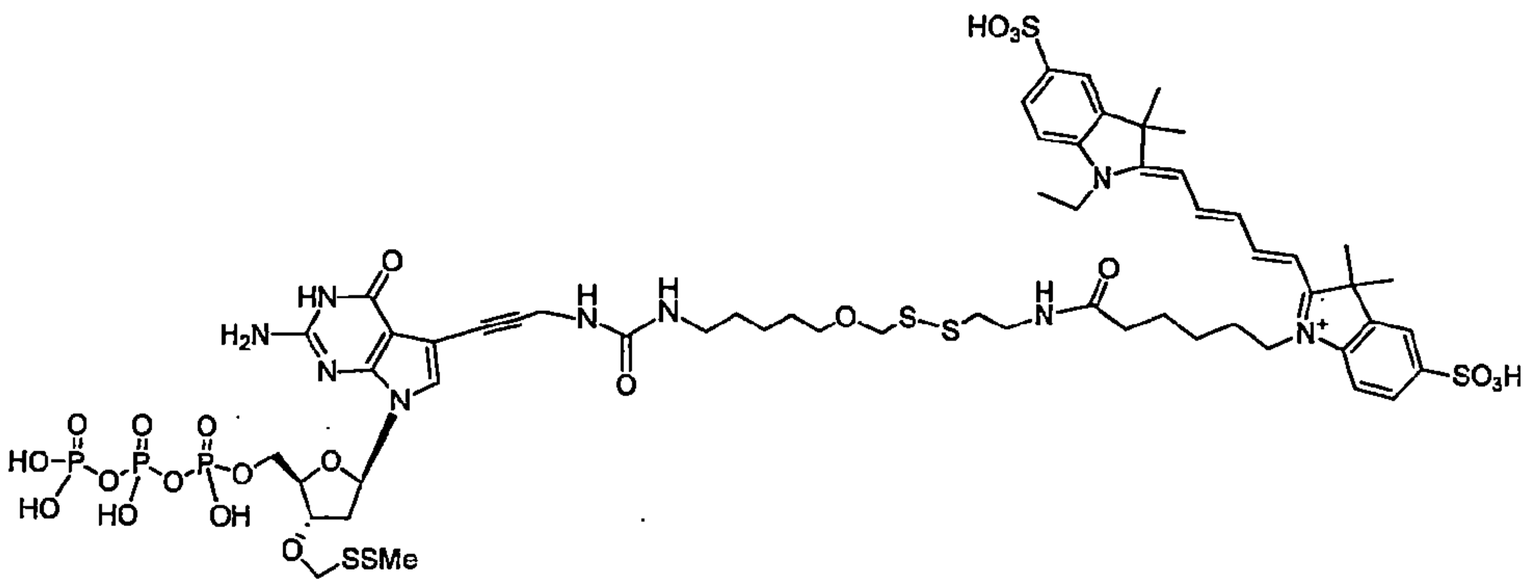
在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



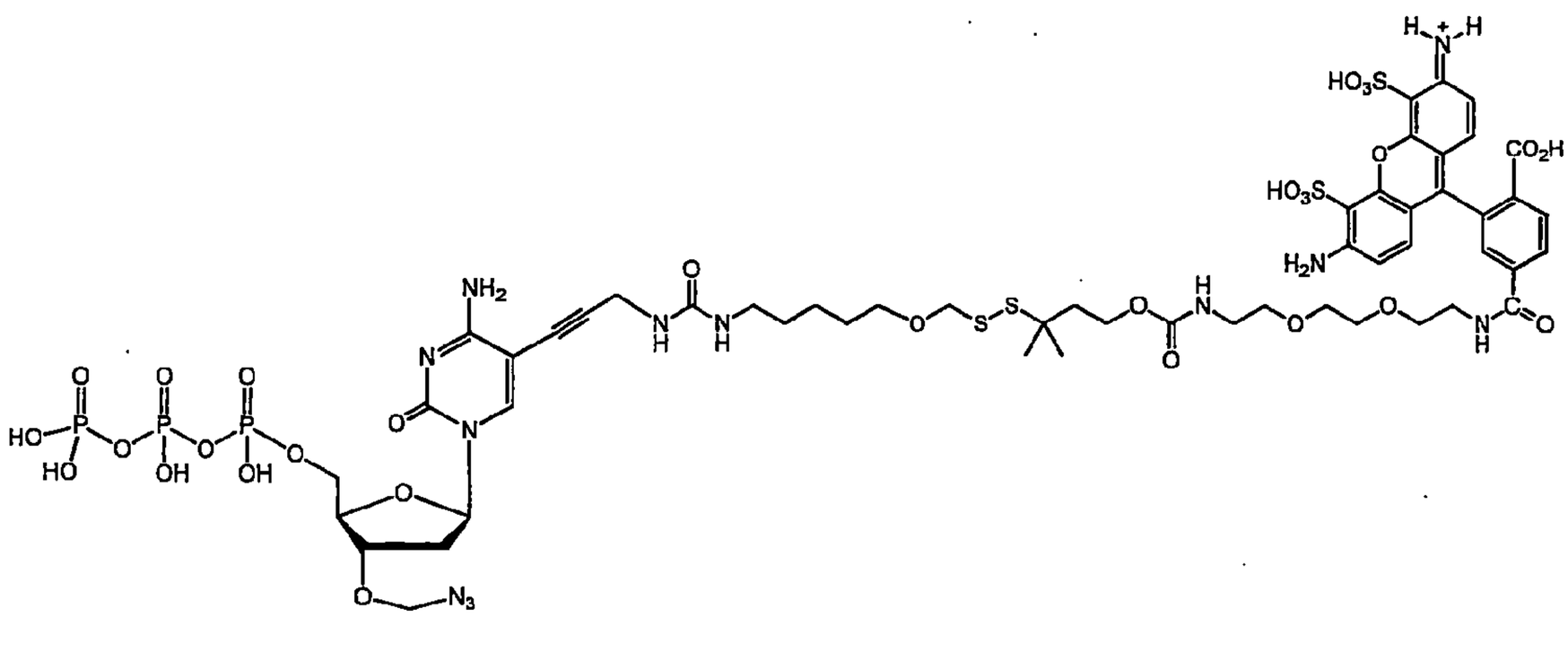
在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：

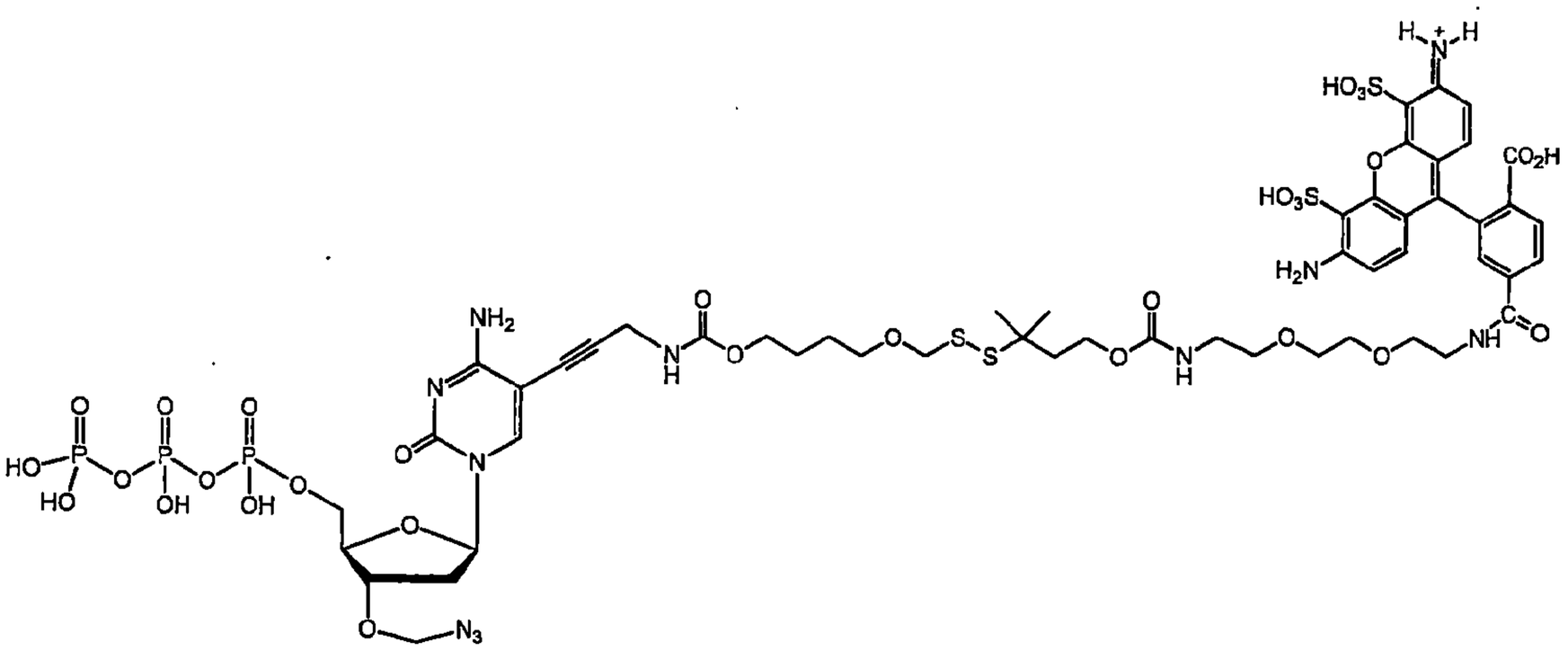


。在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



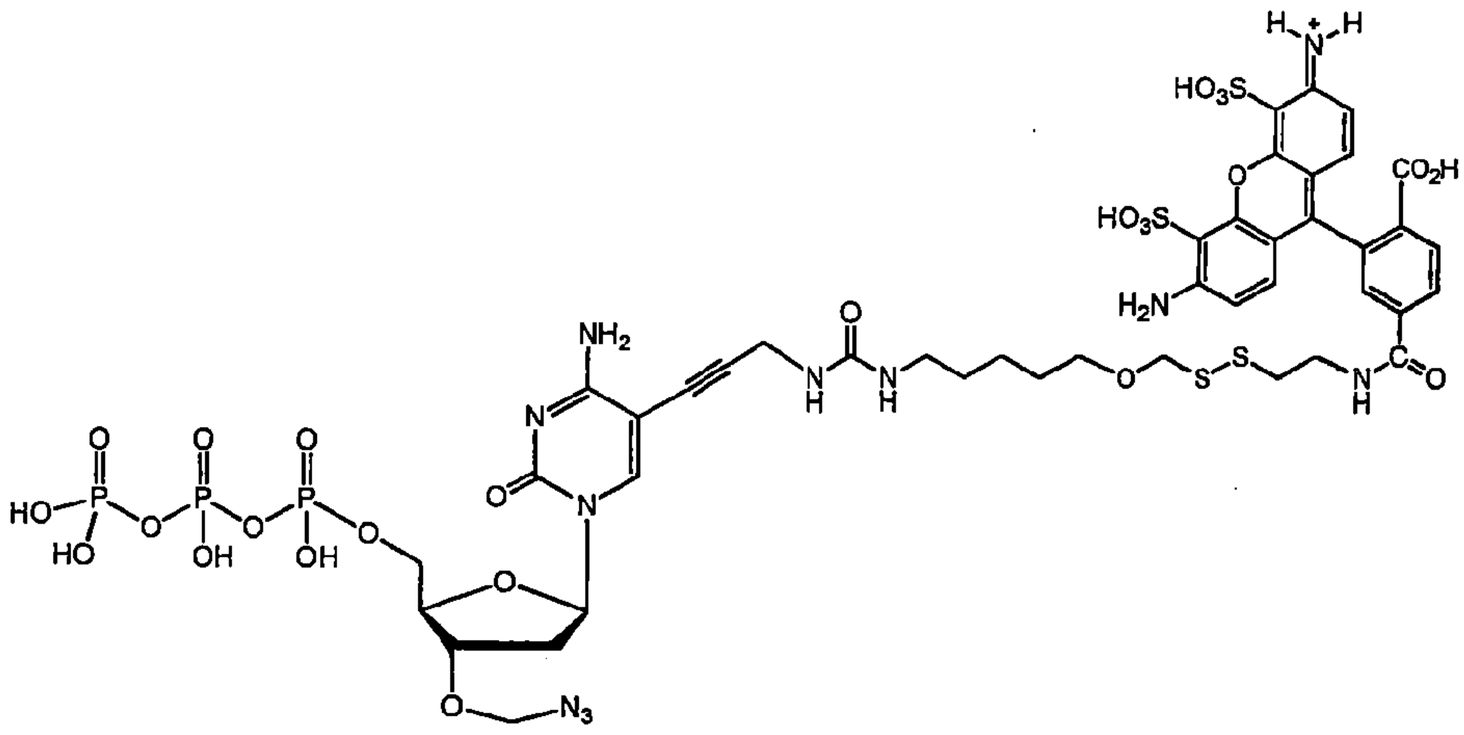
。

在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：



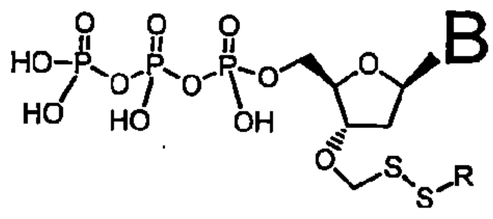
。

在一個實施態樣中，化合物具有下列結構及其他類似的核苷酸對應物：

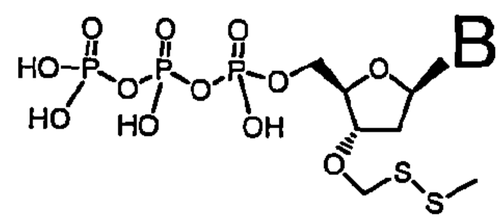


。

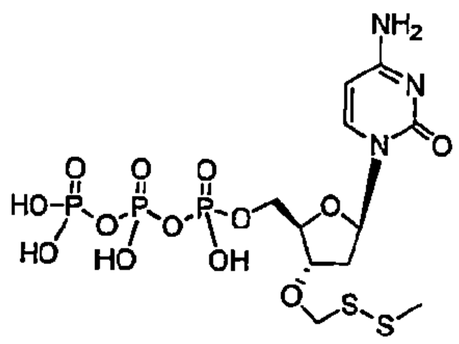
在一個實施態樣中，本發明設想未經標識之化合物。在一個實施態樣中，該化合物具有下列結構：



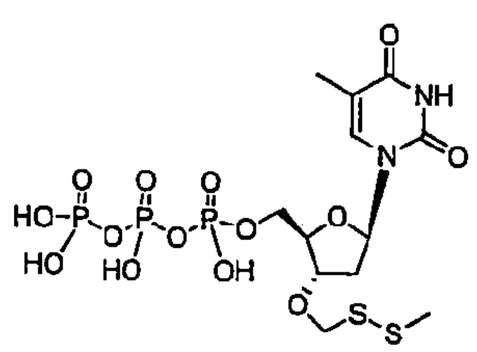
，其中 **R** 係選自由下列所組成之群組：烷基、經取代之烷基、烯丙基、經取代之烯丙基；及 **B** 為核鹼基。在一個實施態樣中，化合物具有結構(B 又為核鹼基)：



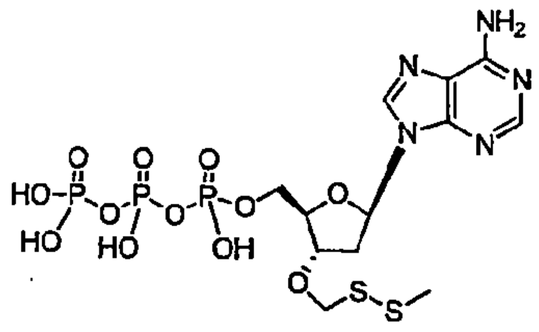
。在一個實施態樣中，化合物具有結構(B 又為核鹼基)：



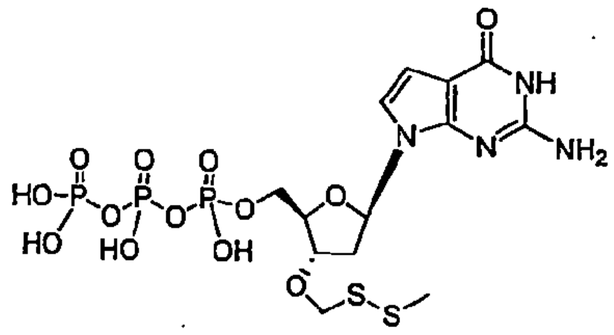
。在一個實施態樣中，化合物具有結構(B 又為核鹼基)：



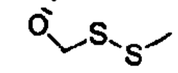
。在一個實施態樣中，化合物具有結構(B 又為核鹼基)：



。在一個實施態樣中，化合物具有結構(B



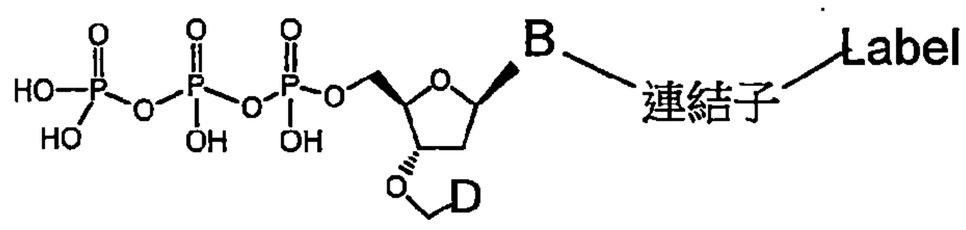
又為核鹼基)：



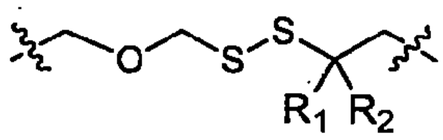
。在一個實施態樣中，該核鹼基為選自由下列所組成之群組的非天然核鹼基類似物：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。

在一個實施態樣中，本發明關於使用 3'-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇核苷作為中間物及 DMTSF 和二甲基二硫作為硫來源來合成 3'-OCH_2-SSMe 核苷酸類似物之方法，如圖 43 中所示。

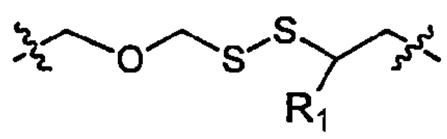
在一個實施態樣中，本發明關於根據下列結構的經標識之去氧核苷三磷酸：



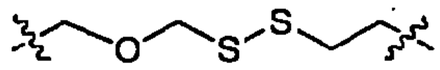
，其中 D 係選自由下列所組成之群組：疊氮化物、二硫化烷基、經二硫化物取代之烷基、二硫化烯丙基和經二硫化物取代之烯丙基；B 為核鹼基；連結子包含可裂解的含二硫甲醛部位核心。在一個實施態樣中，該可裂解的部位核心係選自由下列所組成之群組：



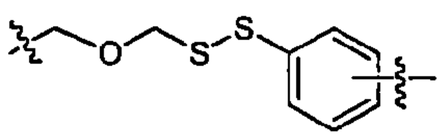
、



、



和



，其中 R_1 和 R_2 係獨立地選自烷基；及

Label 為標識物。在一個實施態樣中，該連結子為疏水性。在一個實施態樣中，該連結子具有大於 0 之 logP 值。在一個實施態樣中，該連結子具有大於 0.1 之 logP 值。在一個實施態樣中，該連結子具有大於 0.5 之 logP 值。在一個實施態樣中，該連結子具有大於 1.0 之 logP 值。

定義

為了加速瞭解本發明，在下文定義許多術語。本文所定義之術語具有熟習本發明相關領域之一般技術者共同瞭解的義意。諸如〝a〞、〝an〞及〝the〞之術語不意欲指為僅單一實體，但包括可用於例證之特定實例的一般類別。使用本文術語學說明本發明特定的實施態樣，但是彼等的使用不限定本發明，除了在申請專利範圍中所概述以外。

如本文所使用的〝氫〞意指-H；〝羥基〞意指-OH；〝酮基〞意指=O；〝鹵基〞係獨立地意指-F、-Cl、-Br 或-I；〝胺基〞意指-NH_2(參見下文關於含有術語胺基之基團(例如烷基胺基)的定義)；〝羥胺基〞意指-NHOH；〝硝基〞意指-NO_2；〝亞胺基〞意指=NH(參見下文關於含有術語亞胺基之基團(例如烷基亞胺基)的定義)；〝氰基〞意指-CN；〝疊氮基〞意指-N_3；〝巰基〞意指-SH；〝硫基〞意指=S；〝磺醯胺基〞意指-$NHS(O)_2$-(參見下文關於含有術語磺醯胺基之基團(例如烷基磺醯胺基)的定義)；

〝磺醯基〞意指-$S(O)_2$-(參見下文關於含有術語磺醯基之基團(例如烷基磺醯基)的定義)；及〝矽基〞意指-SiH_3(參見下文關於含有術語矽烷基之基團(例如烷基矽基)的定義)。

如本文所使用的〝亞甲基〞意指其中碳原子與兩個氫原子鍵結之化學種類。- CH_2- 基團被認為是標準的亞甲基。在鏈或環中的亞甲基促成其大小及親脂性。在此上下文中，去氧基亦指亞甲基。2,3-去氧基化合物特別與 2,3-亞甲基相同(2,3-亞甲基醣苷 =2,3-二去氧基醣苷)。

關於下文基團的下列括號下標進一步如下定義基團：〝(C_n)〞定義在基團中實際的碳原子數目(n)；〝$(C\leq n)$〞定義可在基團內的碳原子最大數目(n)；$(C_{n-n'})$定義在基團內的碳原子最小數目(n)及最大數目(n')二者。例如，〝烷氧基$_{(C\leq 10)}$〞代表具有從 1 至 10 個碳原子(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個或可於其中衍生的任何範圍(例如 3-10 個碳原子))的那些烷氧基。同樣地，〝烷基$_{(C2-10)}$〞代表具有從 2 至 10 個碳原子(例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個或可於其中衍生的任何範圍(例如 3-10 碳原子))的那些烷基。

當不以〝經取代〞修飾物使用時，則術語〝烷基〞係指具有飽和碳原子作為附著點、直鏈或支鏈、環、環狀或非環狀結構、無碳-碳雙鍵或參鍵及沒有除了碳和氫以外的原子之非芳族單價基團。基團- CH_3(Me)、- CH_2CH_3(Et)、- $CH_2CH_2CH_3$ (n-Pr)、- $CH(CH_3)_2$ (iso-Pr 或 i-Pr)、- $CH(CH_2)_2$ (環丙基)

、－ $CH_2CH_2CH_2CH_3$(n-Bu)、－ $CH(CH_3)CH_2CH_3$(二級丁基或 sec-Bu)、－ $CH_2CH(CH_3)_2$(異丁基或 i-Bu)、－ $C(CH_3)_3$(三級丁基或 t-Bu)、－ $CH_2C(CH_3)_3$ (新戊基)、環丁基、環戊基、環己基、環己基甲基為烷基的非限制性實例。術語〝經取代之烷基〞係指具有飽和碳原子作為附著點、直鏈或支鏈、環、環狀或非環狀結構、無碳-碳雙鍵或參鍵及至少一個原子獨立地選自由 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S 所組成之群組的非芳族單價基團。下列的基團為經取代之烷基的非限制性實例：－ CH_2OH、－ CH_2Cl、－ CH_2Br、－ CH_2SH、－ CF_3、－ CH_2CN、－ $CH_2C(O)H$、－ $CH_2C(O)OH$、－ $CH_2C(O)OCH_3$、－ $CH_2C(O)NH_2$、－ $CH_2C(O)NHCH_3$、－ $CH_2C(O)CH_3$、－ CH_2OCH_3、－ $CH_2OCH_2CF_3$、－ $CH_2OC(O)CH_3$、－ CH_2NH_2、－ CH_2NHCH_3、－ $CH_2N(CH_3)_2$、－ CH_2CH_2Cl、－ CH_2CH_2OH、－ CH_2CF_3、－ $CH_2CH_2OC(O)CH_3$、－ $CH_2CH_2NHCO_2C(CH_3)_3$和－ $CH_2Si(CH_3)_3$。

術語〝可裂解的二硫甲醛連結子〞及〝可裂解的含二硫甲醛連結子〞意謂著表明連結子包含二硫甲醛基團且不被認為僅受限於二硫甲醛基團，反而是可含有不僅是該基團的連結子，例如參見圖 25 中的化合物。同樣地，術語〝二硫甲醛部位核心〞及〝含二硫甲醛部位核心〞意謂著表明部位核心包含二硫甲醛且不被認為僅受限於二硫甲醛基團，反而是可含有不僅是該基團的連結子。

術語〝核酸〞通常係指 DNA 或 RNA 二者，不論其是否為擴增、經合成產生、RNA 之反轉錄產物或天然生成之產物。核酸通常為單或雙鏈分子且由天然生成核苷酸所

組成。雙鏈核酸分子可具有 3'-或 5'-突出端且確切而言不需要或假定在其整個長度上完全為雙鏈。此外，核酸可由非天然生成核苷酸及/或對天然生長核苷酸之修飾物所組成。在本文列示出實例，但不限於：分別以 5'或 3'核苷酸之磷酸化以容許接合或防止外核酸酶降解/聚合酶延伸；用於共價和近共價附著之胺基，硫醇，炔或生物素修飾物；螢光團和猝滅劑；在核苷酸之間的硫代磷酸酯、膦酸甲酯，胺基磷酸酯和磷酸三酯鍵聯以防止降解；甲基化；及經修飾之鹼基或核苷，諸如去氧肌苷、5-溴-dU、2'-去氧尿苷、2-胺基嘌呤、2',3'-二去氧胞苷、5-甲基-dC、鎖定核酸(LNA's)、iso-dC 和-dG 鹼基、2'-O-甲基 RNA 鹼基和經氟修飾之核苷。

術語〝互補〞通常係指在適當的溫度和離子緩衝條件下在兩個核苷酸的鹼基之間形成有利的熱力學穩定性和特異性配對之能力。此配對取決於各核苷酸的氫鍵結特性。其最基本的實例為胸嘧啶/腺嘌呤與胞嘧啶/鳥嘌呤鹼基之間的氫鍵對。在本發明中，用於擴增靶核酸之引子可與靶核酸分子在其整個長度上為完全互補或為〝半互補〞二者，其中引子含有最低能夠或不能夠與靶核酸雜交之額外的非互補序列。

術語〝雜交〞通常係指在與彼等之核苷酸序列一致的不同核酸分子之間的鹼基配對。術語〝雜交〞及〝黏合(anneal)〞可互換使用。

術語〝寡核苷酸〞通常係指典型地經設計為單鏈

DNA 且長度小於 75 個核苷酸的核酸序列。

術語〝引子〞通常係指能夠與核酸序列黏合或雜交且容許在充份的條件下(緩衝液、dNTP、聚合酶、單和二價鹽、溫度等等)延伸核酸至互補的引子之寡核苷酸。

術語〝模板核酸〞、〝模板分子〞、〝靶核酸〞及〝靶分子〞可交換使用且係指核酸分子，其為可隨意地以定序反應辨識以得出其序列信息之擴增反應的對象。模板核酸可為以克隆擴增方法所產生的核酸且其可以固定在固體表面上，亦即固定在珠粒或陣列上。

術語〝核苷〞係指由連結至糖(例如核糖或去氧核糖)的 C-1'碳之鹼基所組成的化合物。核苷之鹼基部分通常為雜環鹼，例如嘌呤或嘧啶。

術語〝核苷酸〞係指作為單體單元或在聚核苷酸內的核苷之磷酸酯。〝核苷 5'-三磷酸〞係指具有附著至糖 5'-碳位置的三磷酸酯基團之核苷酸且有時以〝NTP〞、〝dNTP〞(2'-去氧核苷三磷酸或去氧核苷三磷酸)及〝ddNTP〞(2',3'-二去氧核苷三磷酸或二去氧核苷三磷酸)表示。〝核苷 5'-四磷酸〞係指具有附著至糖 5'-碳位置的四磷酸酯基團之替代的活化核苷酸。PA-核苷酸係指炔丙基類似物。

如說明書及/或申請專利範圍中所使用的術語〝保護基〞係在習知的化學意義上用作為可逆地使官能基在所欲反應的特定條件下不反應的基團，且經瞭解其不為 H。在所欲反應之後，可移除保護基而使經保護之官能團去保

護。在較佳的實施態樣中，所有的保護基應在不使欲合成分子以相當比例降解的條件下可移除(且因此為不穩定的)。保護基亦可稱為〝封端基團〞或〝阻斷基團〞或〝可裂解的保護基〞。應註明為了方便起見而以保護基保護的官能度亦可顯示或稱為保護基的一部分。在本文所述之核苷酸衍生物的上下文中，保護基係用在於 3'位置上。不意欲使本發明受限於定序中所使用的可逆式終止核苷酸上的此保護基之本性或化學。出於此目的而設想各種保護基，包括但不限於：3'-O-疊氮甲基核苷酸、3'-O-胺氧基核苷酸、3'-O-烯丙基核苷酸；及二硫化物核苷酸、3'-O-疊氮烷基、3'-O-二硫甲基烷基、3'-O-二硫甲基芳基、3'-O-乙醯基、3'-O-肼甲酸酯(carbazate)、3'-O-烷基醚、3'-O-烷基酯、3'-O-醛肟(-O-N=CH-R)、3'-O-酮肟(-O-N=C(R,R'))。

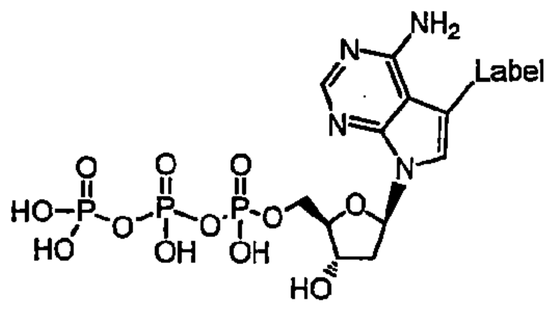
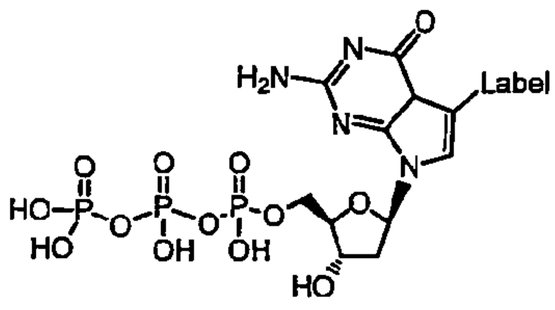
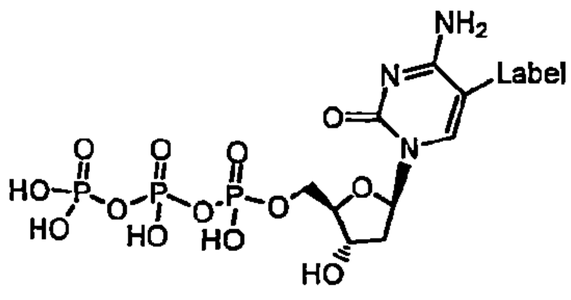
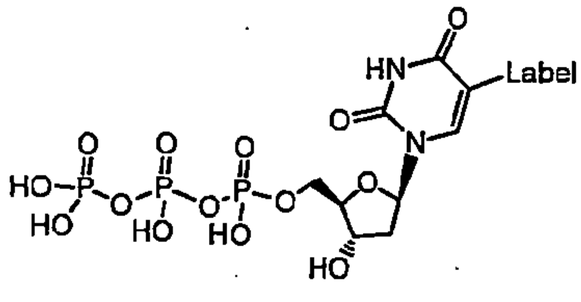
本發明之一個實施態樣設想經由保護基的官能化作用而使標記物直接附著至核苷酸的 3'-OH 官能上。

術語〝標識物〞或〝可檢測標識物〞以其廣義而言係指可檢測或容許與其相關聯的檢測之任何部分或性質。例如，包含標識物的核苷酸、寡或聚核苷酸是可檢測的。經標識之寡或聚核苷酸理想地准許檢測雜交複合物，特別在經標識之核苷酸以酶方式併入引子與模板核酸的該雜交複合物之後。標識物可共價地或非共價地附著至核苷酸、寡或聚核苷酸。在各種態樣中，標識物可另外或組合地：(i)提供可檢測信號；(ii)與第二標識物交互作用以修飾由

第二標識物所提供的可檢測信號，例如 FRET；(iii)穩定雜交，例如雙顯體形成；(iv)賦予補獲功能，例如疏水親和性、抗體/抗原、離子複合；或(v)改變物理性質，諸如電泳移動性、疏水性、溶解性或層析行為。標識物在彼等的結構上及彼等的作用機制上有廣泛的變化。標識物的實例包括但不限於螢光標識物、非螢光標識物、比色標識物、化學發光標識物、生物發光標識物、放射活性標識物、質量修飾基團、抗體、抗原、生物素、半抗原、酶(包括例如過氧化酶、磷酸酶等等)及類似者。為了進一步例證，螢光標識物可包括螢光素家族的染料、玫瑰紅家族的染料、花青家族的染料或薰草素、噁呯(oxazine)、硼二氮雜苯並二茚(boradiazaindacene)或彼等的任何衍生物。螢光素家族的染料包括例如 FAM、HEX、TET、JOE、NAN 和 ZOE。玫瑰紅家族的染料包括例如德克薩斯紅(Texas Red)、ROX、R110、R6G 和 TAMRA。FAM、HEX、TET、JOE、NAN、ZOE、ROX、R110、R6G 和 TAMRA 在市場上取自例如 Perkin-Elmer, Inc. (Wellesley, Mass., USA)，德克薩斯紅在市場上取自例如 Life 技術(Molecular Probes, Inc.) (Grand Island, N.Y.)。花青家族的染料包括例如 CY2、CY3、CY5、CY5.5 和 CY7 且在市場上取自例如 GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, N.J., USA)。

如本文所使用的術語〝經不同標識之〞係指具有不同的標識物之可檢測標識物，而不是在經標識之核苷核鹼基

上的不同位置所發現之標識物。

術語〝A、G、C 和 T 或 U 之類似物〞係指經修飾之去氧核苷三磷酸化合物，其中去氧核苷之核鹼基非常類似於對應之核苷去氧腺苷、去氧鳥苷、去氧胞苷和去氧胸苷或去氧尿苷。在可檢測的經標識之去氧核苷三磷酸化合物的例子中，A 或去氧腺苷之類似物可以  代表。在可檢測的經標識之去氧核苷三磷酸化合物的例子中，G 或去氧鳥苷之類似物可以  代表。在可檢測的經標識之去氧核苷三磷酸化合物的例子中，C 或去氧胞苷之類似物可以  代表。在可檢測的經標識之去氧核苷三磷酸化合物的例子中，T 或 U 或去氧胸苷或去氧尿苷之類似物可以  代表。額外的核鹼基可包括：選自由下列所組成之群組的非天然核鹼基：7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、2-胺基,7-去氮雜腺嘌呤和 2-胺基腺嘌呤。在類似物的例子中，可檢測標識物亦可包括在核鹼基與該可檢測標識物之間的連結子分段。

術語〝TCEP〞或〝三(2-羧乙基)膦〞係指經常用於生化及分子生物應用之還原劑。其時常經製備成具有 286.65 克/莫耳之分子量的鹽酸鹽(TCEP-HCl)且以該鹽酸鹽使用。其可溶於水中且在中性 pH 下以穩定的溶液取得，且固定在瓊脂糖載體上以加速還原劑移除。不意欲使本發明受限於一種型式的還原劑。可使用能夠還原二硫化物鍵之任何適合的還原劑實施本發明。在一個實施態樣中，還原劑為膦[12]，例如三苯基膦、三丁基膦、三羥甲基膦、三羥丙基膦、三乙氧羰基膦(TCEP)[13，14]。不意欲使本發明受限於使用 TCEP。在一個實施態樣中，該可檢測標識物及 3'-OCH2-SS-R 基團係藉由暴露於攜有硫醇基團之化合物而自該核鹼基移除，以進行以二硫為底質之連結子及終止(保護)基團的裂解，此等含硫氫基化合物包括(但不限於)半胱胺酸、半胱胺、二硫琥珀酸、二硫蘇糖醇、2,3-二巰基-1-丙烷磺酸鈉鹽、二硫丁胺、內消旋-2,5-二巰基-N,N,N',N'-四甲基己二醯胺、2-巰基-乙烷磺酸酯和 N,N'-二甲基,N,N'-雙(巰基乙醯基)-肼[17]。反應可以內含的硒醇進一步催化[18]。另外，亦可出於此目的而使用硼氫化物，諸如硼氫化鈉[19](以及抗壞血酸[20])。另外，亦已知用於二硫化物鍵裂解之酶方法，諸如二硫化物和硫還原酶，且可由本發明化合物使用[21]。

【圖式簡單說明】

併入且構成說明書一部分的所附圖形例證本發明之許

多實施態樣且與發明內容一起用於解釋本發明之原理。圖形僅以例證本發明較佳的實施態樣為目的且不應被解釋成限制本發明。

圖 1 顯示具有以包含二硫甲烷之基團封端的 3'-O 之核苷三磷酸的實例，其中 R 代表烷基，諸如甲基、乙基、異丙基、三級丁基、正丁基或彼等之類似物，具有含有雜原子(諸如 O、N、S 等等)之取代基。

圖 2 顯示具有 3'-O 之含二硫甲烷保護基之核苷三磷酸的經標識之類似物，其中標識物係經由可裂解的二硫甲醛連結子(-OCH_2-SS-)附著至核鹼基。類似物為(自左上端順時針方向)去氧腺苷、去氧胸苷或去氧尿苷、去氧胞苷和去氧鳥苷。

圖 3 顯示 3'-O 保護基以還原劑(諸如 TCEP)去保護之逐步機制。

圖 4 顯示裂解反應產物，傳統的經硫化物及經二硫甲醛連結的經標識之核苷酸。

圖 5 顯示經標識之核苷酸的實例，其中可裂解的連結子之間隔子包括炔丙醚連結子。類似物為(自左上端順時針方向)去氧腺苷、去氧胸苷或去氧尿苷、去氧胞苷和去氧鳥苷。

圖 6 顯示經標識之核苷酸的實例，其中可裂解的連結子之間隔子包括炔丙胺連結子。類似物為(自左上端順時針方向)去氧腺苷、去氧胸苷或去氧尿苷、去氧胞苷和去氧鳥苷。

圖 7 顯示經標識之核苷酸的實例，其中可裂解的連結子之間隔子包括在嘧啶之 5-位置上及在嘌呤之 7-去氮雜碳上直接附著至核鹼基的亞甲基(-$(CH_2)_n$-。此連結子可為亞甲基(n= 1)或聚亞甲基(n> 1)，其中在裂解之後，連結子在核鹼基之附著點上產生–$(CH_2)_n$OH 基團，及其中 L_1 和 L_2 代表間隔子，且取代基 R_1、R_2、R_3 和 R_4 為提供可裂解的連結子穩定性之原子基團，如先前所述。類似物為(自左上端順時針方向)去氧腺苷、去氧胸苷或去氧尿苷、去氧胞苷和去氧鳥苷。

圖 8 顯示未經標識之 dT 類似物(化合物 5)之合成。

圖 9 顯示 3'-O-(乙基二硫甲基)-dCTP (10)之合成。

圖 10 顯示對經標識之 dT 中間物具有特異性的經標識之核苷酸的合成途徑。

圖 11 顯示自 1,4-丁二醇開始的可裂解的連結子合成。

圖 12 顯示可裂解的連結子之另一變型，其中穩定之偕二甲基係附著至可裂解的連結子之 α -碳。

圖 13 顯示可裂解的連結子之合成，其中二硫化物係以偕二甲基側面相接且附著至可撓性乙二醇連結子(PEG)。連結子係經由胺甲酸酯基團(-NH-C(=O)O-)附著至 PA-核苷酸。所得核苷酸類似物在此例子中可如化合物 35(dUTP 類似物)。

圖 14 顯示用於 dATP 類似物之可裂解的連結子之合成，其中可裂解的二硫化物係以偕二甲基側面相接且連結

子係經由尿素基團(-NH(C=O)NH-)附著至 PA-核苷酸。其他的核苷酸類似物(例如 dCTP、dGTP、dUTP 之類似物)可藉由在反應順序的最後步驟以適當的 PA 類似物代替 42 而以類似方式合成。

圖 15 顯示可裂解的連結子化合物 45 之合成，其中連結子係經由尿素官能度繫於 PA-核苷酸且二硫化物係由兩個碳連結子連接至染料。所得核苷酸類似物在此例子中可如化合物 49(dGTP 類似物)。其他的核苷酸類似物(例如 dATP、dUTP、dCTP 之類似物)可藉由在反應順序的第三步驟以適當的 PA 類似物代替核苷酸 46 而以類似方式合成。

圖 16 顯示當經標識之核苷酸 50 在 65℃下暴露於 10 當量 TCEP 時，其產生許多副產物(包括化合物 52)與預期的產物 51。

圖 17 顯示在 292 nm(底端)與 524 nm(頂端)提取及在 5 分鐘暴露後分析之化合物 50 的經 TCEP 暴露之產物的 LC-MS 軌跡，其中在 11.08 分鐘之峰對應於化合物 51，在 10.88 分鐘之峰對應於化合物 52 及其他的峰對應於副產物。

圖 18 顯示在 292 nm(底端)與 524 nm(頂端)提取及在 15 分鐘暴露後分析之化合物 50 的經 TCEP 暴露之產物的 LC-MS 軌跡；其中在 11.32 分鐘之峰對應於化合物 51 及其他的峰對應於副產物。

圖 19 顯示經二硫甲醛連結之核苷酸 35 在相同的裂解

條件下完全地產生所欲裂解產物化合物 53 和 54。連結子之亞甲硫醇片段(-CH_2SH)在二硫化物基團裂解時完全自核苷酸消除。

圖 20 顯示在 292 nm(底端)與 524 nm(頂端)提取及在 5 分鐘暴露後分析之化合物 35 的經 TCEP 暴露之產物的 LC-MS 軌跡，其中在 11.24 分鐘之峰對應於化合物 53 及在 34.70 分鐘之峰對應於化合物 54。

圖 21 顯示在 292 nm(底端)與 524 nm(頂端)提取及在 15 分鐘暴露後分析之化合物 35 的經 TCEP 暴露之產物的 LC-MS 軌跡，其中在 11.25 分鐘之峰對應於化合物 53 及在 34.70 分鐘之峰對應於化合物 54。

圖 22 顯示在適當的步驟以甲硫醇或硫甲醇鈉代替巯基乙醇(EtSH)的 3'-OCH_2-SS-Me 類似物之合成，其不同於 3'-OCH_2-SS-Et 之合成(圖 10)。

圖 23 顯示 PA-核苷酸(例如 57)與適當的可裂解的-OCH_2-SS-連結子偶合及最後使用活化連結子 32 與螢光團染料偶合。

圖 24 顯示以不同的連結子達成的核苷酸類似物化合物 60 和 61。

圖 25 顯示經不同的螢光團報導基團標識之 4-核苷酸類似物的結構，其中 R = Me-或 Et-。

圖 26 顯示經不同的螢光團報導基團標識之 4-核苷酸類似物的結構，其中 R = Me-或 Et-基團。

圖 27 顯示經不同的螢光團報導基團標識之 4-核苷酸

類似物的結構，其中 R = Me-或 Et-基團。

圖 28 顯示包含本發明之新穎可裂解的連結子之一般通用的建造區塊結構。PG = 保護基，L1，L2–連結子(脂族、芳族、混合型極性直鏈或支鏈)。RG = 反應性基團。在本發明之一個實施態樣中，此等建造區塊攜有在連結子之一端的 Fmoc 保護基及在另一端的反應性 NHS 碳酸酯或胺甲酸酯。這較佳的組合在包含新穎可裂解的連結子的經修飾之核苷酸合成中特別有用。保護基應在與核酸/核苷酸化學可相容的條件下可移除且反應性基團應具有選擇性。在連結子上的活性 NHS 基團與胺終止之核苷酸反應之後，Fmoc 基團可使用鹼(諸如哌啶或氨)輕易地移除，因此暴露在用於附著可裂解的標記物之連結子的終端上之胺基。包含各種標記物之化合物庫可非常快速地以此方式建構。

圖 29 顯示攜有經由本發明之新穎連結子附著之可裂解的標記物之核苷酸的通用結構。S = 糖(亦即核糖、去氧核糖)，B = 核鹼基，R = H 或可逆式終止基團(保護基)。較佳的可逆式終止基團包括但不限於：疊氮甲基(-CH_2N_3)、二硫烷基(-CH2-SS-R)、胺氧基(-ONH_2)。

圖 30 顯示攜有經由本發明之可裂解的連結子附著之可裂解的標記物之核苷酸的另一通用結構，其中 D 係選自包含下列之群組：疊氮化物、二硫化烷基和經二硫化物取代之烷基，B 為核鹼基，A 為附著基團，C 為可裂解的部位核心，L_1 和 L_2 為連接基團，及 Label 為標識物(在具有

標識物之化合物中)。

圖 31 顯示在圖 32A-C 中所測試之化合物的化學結構(L 系列(96)、B 系列(97)、A 系列(98)和 G 系列(99)家族)。

圖 32A 顯示併入具有以各種二硫化物為底質之可裂解的連結子：L 系列(96)、B 系列(97)、A 系列(98)和 G 系列(99)家族的標識於 3'-O-疊氮甲基 Alexa488 之核苷酸類似物的時間過程。

圖 32B 顯示併入以各種二硫化物為底質之可裂解的連結子：L 系列(96)、B 系列(97)、A 系列(98)和 G 系列(99)家族的標識於 3'-O-疊氮甲基 Alexa488 之核苷酸類似物的反應速率。

圖 32C 顯示併入以各種二硫化物為底質之可裂解的連結子：L 系列(96)、B 系列(97)、A 系列(98)和 G 系列(99)家族的標識於 3'-O-疊氮甲基 Alexa488 之核苷酸類似物的反應速率對核苷酸濃度。

圖 33 顯示 dA 3'-可逆式終止核苷酸：$-CH_2-N_3$、$-CH_2-SS-Et$、$-CH_2-SS-Me$ 之併入動力學(incorporation kinetics)。

圖 34 顯示具有 3'–O-CH2-SS-Et 終止基團之 dC 3'-可逆式終止核苷酸與 3 種不同的 DNA 聚合酶：T9、J5 和 J8 之併入動力學。

圖 35 顯示在 GR 序列器上的延伸 A 反應所使用的核苷酸之最優化濃度[nM]。

圖 36 顯示如以原始誤差率所測量的 A 系列(98)核苷

酸之定序性能。

圖 37 顯示如以完美(無誤差)讀數百分比所測量的 A 系列(98)核苷酸之定序性能。

圖 38 顯示如以各種定序度量所測量的 A 系列(98)核苷酸之定序性能。

圖 39 顯示如以原始誤差率所測量的 G 系列(99)核苷酸之定序性能。

圖 40 顯示定如以完美(無誤差)讀數百分比所測量的 G 系列(99)核苷酸之定序性能。

圖 41 顯示在 ExtB 中及在 ExtB 和 A 二者中來自含有 3'-O-CH_2-SS-Et 核苷酸之定序操作的多重條形碼之鑑定。

圖 42 顯示在具有各種可裂解的連結子：B = B 系列(97)、G = G 系列(99)、A = A 系列(98)和 SS = L 系列(96)的經標識之可逆式終止 dC 的延伸 A 緩衝液中於升溫下的穩定性比較。

圖 43 顯示例證自化合物 62 合成化合物 63-67 之合成圖。此合成說明於實施例 33、實施例 34 和實施例 35 中。

圖 44 顯示例證自化合物 68 合成化合物 69-73 之合成圖。此合成說明於實施例 36、實施例 37 和實施例 38 中。

圖 45 顯示從頂端至底端之對應於 dCTP、dTTP、dATP 和 dGTP 的四種經標識之核苷酸的完全化學結構(A 系列，98)。

圖 46 顯示 GR 儀器上定序所使用的核苷酸(經標識之化合物 72、74、76、78)及未經標識之(化合物 120、126、132、138)的樣品濃度，所有皆在彼等的 3'上攜有–CH_2-SS-Me 作為可逆式終止基團。

圖 47 顯示使用全部皆攜有–CH_2-SS-Me 之新穎核苷酸(如圖 46 所說明的經標識及未經標識)在 GR 上定序操作所產生的強度之實例。

圖 48 顯示具有以包含二硫甲烷甲基之基團封端的 3'-O 之核苷三磷酸的一系列無連結子之實例。

圖 49 顯示具有以包含二硫甲烷甲基之基團封端的 3'-O 之經四種不同的螢光團報導基團標識之 4-核苷酸類似物的結構。

圖 50 為顯示合成常見的連結子之 NHS 活化形式的一個實施態樣之示意圖。

圖 51 為顯示合成 MeSSdATP 的一個實施態樣之示意圖。

圖 52 為顯示合成 MeSSdCTP 的一個實施態樣之示意圖。

圖 53 為顯示合成 MeSSdGTP 的一個實施態樣之示意圖。

圖 54 為顯示合成 MeSSdTTP 的一個實施態樣之示意圖。

圖 55 為顯示合成 MeSSdATP-PA 的一個實施態樣之示意圖。

圖 56 為顯示合成 147 的一個實施態樣之示意圖。

圖 57 為顯示合成 MeSSdCTP-PA 的一個實施態樣之示意圖。

圖 58 為顯示合成 156 的一個實施態樣之示意圖。

圖 59 為顯示合成 MeSSdGTP-PA 的一個實施態樣之示意圖。

圖 60 為顯示合成 MeSSdGTP-ARA-Cy5 的一個實施態樣之示意圖。

圖 61 為顯示合成 MeSSdUTP-PA 的一個實施態樣之示意圖。

圖 62 為顯示合成 175 的一個實施態樣之示意圖。

圖 63 為顯示 3'-OCH_2S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP 的結構之示意圖。

圖 64 為顯示自 3'-OCH_2S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP 合成 3'-(OCH_2SSMe)-dNTP 的一個實施態樣之示意圖。

圖 65 顯示用於合成 3'-(OCH_2SSMe)-dNTP-PA 之關鍵中間物。

圖 66 為顯示自 3'-OCH_2S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP-PA 合成 3'-(OCH_2SSMe)-dNTP-PA 的一個實施態樣之示意圖。

圖 67 為顯示連結子設置及螢光染料共軛之示意圖。

圖 68 顯示可用於附著本發明之連結子及終止基團的羥甲基衍生物核鹼基衍生物的結構。R = 可逆式終止基

團，CL = 本發明之可裂解的連結子。

圖 69 顯示在進行裂解後之羥甲基衍生物核鹼基衍生物的結構。

圖 70 顯示攜有硫醇之化合物的實例，該官能可用於進行本發明以二硫為底質之連結子及終止基團的裂解：A)-半胱胺，B)-二硫琥珀酸，C)-半胱胺，D)-二硫蘇糖醇，E)-2,3-二巯基-1-丙烷磺酸鈉鹽，F)-而硫丁胺，G)-內消旋-2,5-二巯基-N,N,N',N'-四甲基己二醯胺，H) 2-巯基乙烷磺酸酯，I)-N,N'-二甲基,N,N'-雙(巯基乙醯基)-肼。

圖 71 顯示連結子及 3'-保護基之選擇性及逐步裂解的實例-化學結構及反應流程。

圖 72 顯示連結子之選擇性及逐步裂解的實例-與裂解的各步驟相關之層析圖。

圖 73 顯示連結子之選擇性及逐步裂解的實例-自對應於選擇性裂解反應的所有步驟之峰提取之吸收光譜。

圖 74 顯示在 3'上攜有二硫保護基及攜有以二硫為底質之連結子的核苷酸之裂解反應流程。

圖 75A 顯示以 RP-HPLC 分析之起始材料及在以裂解試劑：二硫琥珀酸、L-半胱胺酸、DTT 和半胱胺培育 10 分鐘後的反應混合物之層析圖。

圖 75B 顯示如以 RP-HPLC 分析之反應混合物的組成物。

【實施方式】

本發明的說明

本發明提供利用去氧核苷三磷酸之方法、組成物、混合物及套組，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置及可逆式連接至該去氧核苷之核鹼基的可檢測標識物。此等化合物提供未來定序技術之新的可能性，包括但不限於以合成定序。本發明設想在說明書及圖形主體中所示之各種結構作為主題之組成。該等組成可用於反應中，包括但不限於引子延伸反應。該等組成可在混合物中。例如，經標識之核苷酸中之一或多者(例如那些在圖 25 中所示)可在與一或多種未經標識之核苷酸(例如那些在圖 48 中所示)之混合物中。彼等可在與其他試劑(例如緩衝液、聚合酶、引子等等)的套組中。

在一個實施態樣中，本發明的經標識之核苷酸需要許多合成步驟且包含連結各種染料至不同的鹼。希望能夠以模式化方式而不以逐步法進行連結子及染料附著。模式化方法包含預建造在一端具有保護基的連結子部分及在另一端的活化基團。接著可使用此等預建造之連結子與炔丙胺核苷酸偶合；接著可使遮蔽之胺基去保護及接著偶合活化基團。這與逐步合成法相比而具有更少的步驟及更高的產率之優點。

在一個實施態樣中，本發明的經標識之核苷酸係用於 DNA 定序中。DNA 定序為生物學中的基礎工具。其為基礎研究、生物醫學、診斷和法醫應用中及在許多其他的基

礎與應用研究領域中廣泛地使用的方法。新一代的 DNA 定序技術正在改變按慣例進行的生物學研究方式。在未來幾年內在精確的醫藥、伴隨的診斷等等領域中準備扮演關鍵角色。

以合成定序(SBS)為革命性新一代定序(NGS)技術，其中數百萬的 DNA 分子、單一分子或其成簇分子可同時定序。此技術的基礎為使用已知為可裂解的核苷酸終止子的經修飾之核苷酸，其容許在固體表面上的 DNA 分子之僅單一鹼基延伸及檢測，容許在 DNA 定序中的巨量並行運算(massive parallelism)(綜合性評論：Cheng-Yao, Chen 之 Frontiers in Microbiology, 2014, 5, 1 [22]；Fei Chen 等人之 Genomics Proteomics Bioinformatics, 2013, 11, 34-40 [5]；C.W. Fuller 等人之 Nature Biotechnology, 2009, 27, 1013 [2]；M.L. Metzker 之 Nature Reviews, 2010, 11, 31 [1]) – 將全部特此併入本文以供參考。

具有以併入 DNA 引子及後續的檢測後可以化學反應移除之可裂解的保護基阻斷之 3'-OH 位置的經修飾之核苷酸為 SBS 化學成功的關鍵(Ju 等人之 US 7,883,869, 2011 [23]；Ju 等人之 US 8,088,575, 2012 [24]；Ju 等人之 US 8,796,432, 2014 [25]；Balasubramanian 之 US 6,833,246, 2004 [26]；Balasubramanian 等人之 US 7785796B2, 2010 [27]；Milton 等人之 US 7,414,116 B2, 2008 [28]；Metzker, M. L.等人之核酸 s Res, 1994, 22:4259-4267 [29]；Ju 等人之 Proc. Nat. Acad, Sci. USA, 103 (52),

19635, 2006 [30]；Ruparel 等人之 Proc. Nat. Acad, Sci. USA, 102 (17), 5932, 2005 [31]；Bergmann 等人之 US 2015/0140561 A1 [32]；Kwiatkowski 之 US 2002/0015961 A1 [33]) – 將全部特此併入本文以供參考。

亦曾嘗試開發已知為實質的終止子之核苷酸類似物，其中 3'-OH 未經保護，但鹼基係以修飾基團防止在單一鹼基併入 DNA 模板後進一步延伸，強迫發生鏈終止事件的此一方式修飾(Andrew F. Gardner 等人之 NucleicAcidsRes 40(15), 7404-7415 2012 [34]， Litosh 等人之 Nuc. Acids, Res., 2011, vol 39, No. 6, e39 [35]，Bowers 等人之 Nat. 方法，2009, 6, 593 [36]) – 將全部特此併入本文以供參考。

亦揭示核糖核苷酸類似物，其中 2'-OH 係以可移除的基團保護，其防止相鄰的 3'-OH 基團參與鏈延伸反應，從而在單一鹼基延伸後停止(Zhao 等人之 US 8,399,188 B2, 2013 [37])，併入本文以供參考。

另一方面，Zon 提出使用二核苷酸終止子，其含有以可移除的基團阻斷之 3'-OH 的核苷酸之一(Gerald Zon 之 US 8,017,338 B2, 2011 [38])，併入本文以供參考。

先前已使用可裂解的二硫化物連結子(-SS-)附著螢光染料於經標識之核苷酸中，用於 GeneReader 定序。咸信–SH 痕跡在裂解步驟後留在生長的 DNA 菌株上，引起許多限制達成更長的讀取長度的副反應。

已知-SH 殘留物可在裂解步驟中所使用的 TCEP 存在

下經歷游離基反應，產生非所欲官能基且有可能傷害DNA 分子(MS, Zhouxi Wang 等人之 Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization, Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(3), 267-275 [39])。

-SH 痕跡亦可與進入的核苷酸在流動細胞內交互作用，使 3' OH 保護基過早裂解，引起進一步的鏈延長且由此可引起信號移相。

不利的-SH 副反應之最終結果為在定序操作中降低讀取長度及增加誤差率。

本發明之詳細說明

本發明提供利用去氧核苷三磷酸之方法、組成物、混合物及套組，該去氧核苷三磷酸包含以包含二硫甲烷作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 位置及可逆式連接至該去氧核苷之核鹼基的可檢測標識物。此等化合物提供未來定序技術之新的可能性，包括但不限於以合成定序。

在一個實施態樣中，本發明包含在 DNA 定序(例如以合成定序)中的經標識之核苷三磷酸之合成及用途，該經標識之核苷三磷酸包含在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子，具有包含具有式-CH_2-SS-R 之二硫甲烷作為保護基的 3'-O 基團，其中 R 代表烷基，諸如甲基、乙基、異丙基、三級丁基、正丁基或彼等之類似物，具有含有雜原子(諸如 O、N、S 等等)之取代基(參見圖 1)。在一

個實施態樣中，R 基團可含有可調節 3'-O 封端基團之穩定性及可裂解性且為 DNA 聚合酶可接受之官能基。

在另一態樣中，本發明關於經標識之核苷三磷酸，其包含在標識物與核鹼基之間可裂解的二硫甲醛連結子，具有以包含二硫甲烷之基團封端的 3'-O 位置，其中核鹼基可為天然或非天然鹼基，其可藉由氫鍵與 DNA 模板之天然核鹼基的交互作用而形成 DNA 雙顯體，且其可為 dG 和 dA 及 2-胺基-dA 之 7-去氮雜類似物。dA 和 dG 之 7-去氮雜類似物可由於缺少 7-N 原子而降低 DNA 三級結構的形成。在一個實施態樣中，展望此等核苷有可能藉由提高 DNA 模板與聚合酶交互作用來改進 DNA 定序讀取長度。亦有可能可使 2-胺基-dA 增加 DNA 雙顯體穩定性，由於與其互補鹼形成更穩定的 3 個氫鍵(而非天然狀態的 2 個氫鍵)，因此可降低在定序操作期間損失 DNA 引子的風險(A Jung 等人之 Mol. Pathol., 2002, 55 (1), 55-57 [40]；2-amino-dATP: Igor V. Kutyavin, Biochemistry, 2008, 47(51), 13666-73 [41])。

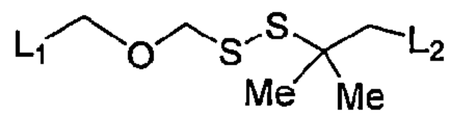
在另一實施態樣中，該核苷酸可具有經由可裂解的連結子 $-OCH_2SS-$ 連結至核鹼基之可檢測的報導子分子(諸如螢光染料)。其中 $-OCH_2-SS-$ 基團直接附著至核鹼基且使用其作為可裂解的連結子的經標識之核苷酸不為先前技術所知。與傳統的廣泛地使用之二硫化物連結子(-SS-)相反，此類別之可裂解的連結子($-OCH_2-SS-$)在還原裂解後未在 DNA 分子上留下硫痕跡，藉由所得中間物 $-OCH_2-SH$ 的快

速水解而完全地轉化成-OH 基團。因為此原因，所以此等連結子可為比傳統的二硫化物連結子更好的替代物。在傳統的以二硫化物為底質之連結子(-SS-)中，所得硫醇基團(-SH)在以還原試劑(諸如 TCEP)裂解時可經歷副反應，如下列圖 4 中所呈示(參考：MS, Zhouxi Wang 等人之 Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization, Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(3), 267-275 [39])。

在另一實施態樣中，報導子基團可附著至 5-C 位置上的嘧啶鹼基(dT，dC)及天然鹼基之 7-N 或去氮雜類似物之 7-C 上的嘌呤鹼基(dA，dG)。

在另一實施態樣中，經標識之核苷酸的結構可如圖 5 中所示，其中可裂解的連結子之間隔子包括炔丙醚連結子。具有炔丙醚之核鹼基可依照化學合成的先前技術來合成。L_1 和 L_2 代表化學間隔子，且取代基 R_1、R_2、R_3 和 R_4 為調節可裂解的連結子穩定性及可裂解性之原子基團。彼等可為氫原子、偕二甲基或任何烷基、苯基或經取代之烷基，諸如甲基、乙基、正丁基、苯基等等。彼等亦可含有具有 –O、=O、NH、-N=N、酸、醯胺、聚乙二醇鏈(PEG)等等的烴鏈。在核苷酸上的標識物可為螢光染料、能量轉移染料、放射活性標識物、化學發光探針、庚烷和容許以化學或物理方法檢測之其他形式的標識物。

在另一實施態樣中，經標識之核苷酸的結構可如圖 6

所示。可裂解的連結子之間隔子包括炔丙胺連結子。再者，L_1 和 L_2 代表間隔子，且取代基 R_1、R_2、R_3 和 R_4 為提供連結子穩定性及調節連結子可裂解性之原子基團，如先前所述。彼等可為氫原子、烷基(諸如甲基、乙基)和其他經取代之基團或彼等之鹽。不意欲受到任何理論的束縛，咸信在可裂解的二硫化物連結子之 α-碳上的偕二烷基(例如根據下列結構的偕二甲基類似物： )提供連結子更好的穩地性，容許經標識之核苷酸的模式化合成。經推測其防止在以二硫化物為底質之有機化合物之間普遍不成比例的反應。亦增加對連結子更大的疏水性，有助於經標識之核苷酸類似物的合成及純化[42-44]。咸信在連結子中存在的偕二甲基官能度不僅適合在電子上穩定二硫化物鍵，且亦防止分子間及分子內二者發生二硫化物交換，有可能經由立體效應。已證實在終止子上的二硫化物官能度係在胱胺的存在下參與二硫化物交換，而配備有偕二甲基的連結子不然。在圖 42 中的連結子研究比較具有及不具有偕二甲基的連結子。可從此研究觀察出不具有偕二甲基的連結子 G 和 L 與胱胺快速交換，導致產物降解。如預期，既未以吾等選擇之連結子 A，亦未以類似的連結子 B 觀察到此現像。另外，因為經標識之核苷酸含有兩個二硫化物，一個在分子的終止子上及一個在分子的連結子部分上，咸信此穩定效應防止在染料與終止子之間發生亂序。此穩定性對吾等的核苷酸之定序性能具有重要性。

在另一實施態樣中，經標識之核苷酸的結構可如圖 7 所示。可裂解的連結子之間隔子包括在嘧啶之 5-位置上及在嘌呤之 7-去氮雜碳上直接附著至核鹼基的亞甲基(-$(CH_2)_n$-。此連結子可為亞甲基(n= 1)或聚亞甲基(n> 1)，其中在裂解之後，連結子產生在核鹼基之附著點上的-$(CH_2)_n$OH 基團，及其中 L_1 和 L_2 代表間隔子，且取代基 R_1、R_2、R_3 和 R_4 為提供可裂解的連結子穩定性之原子基團，如先前所述。

在另一實施態樣中，本發明關於所主張之核苷酸的合成方法。封端基團及連結子可以例如修改所述之先前技術而合成，未經標識之 dT 類似物(化合物 5)可如圖 8 中所示合成。

在一個實施態樣中，本發明包含：(a)具有以包含二硫甲烷(例如式–CH_2-SS-R)作為可裂解的保護基之基團封端的 3'-O 之核苷三磷酸(參見圖 1)；及(b)彼等經標識之類似物(參見圖 2)，其中標識物係經由可裂解的二硫甲醛連結子(-OCH_2-SS-)附著至核鹼基。此等核苷酸可用於以合成定序(SBS)核酸之技術中。亦說明用於所主張之核苷酸的合成方法。

在一個實施態樣中，如圖 1 中所示，未經標識之核苷酸的通用結構具有以包含具有常見結構–CH_2-SS-R 的二硫甲烷之基團保護的 3'-O 基團，其中 R 可為正規烷基或經取代之烷基，諸如–Me、-Et、-nBu、-tBu、-$CH_2CH_2NH_2$、–CH_2CH_2NMe 等等，及 B 可為天然或非天然核鹼基。非天

然核鹼基的一些特定實例為 7-去氮雜 dG 和 dA、2-胺基-dA 等等。

在圖 2 中，經標識之類似物的通用結構顯示具有如圖 1 以包含二硫甲烷之基團保護的 3'-O，除此以外，可檢測的報導子(標識物)(諸如螢光團)係經由具有通用結構 $-L_1-OCH_2-SS-L_2-$ 之可裂解的連結子附著至核鹼基。分別以 L_1 代表分開核鹼基與可裂解的連結子之分子間隔子，而 L_2 代表在可裂解的連結子與標識物之間的分子間隔子。L_1 和 L_2 二者可具有適合於連接各個化學實體的官能基，諸如 -CO-、-CONH-、-NHCONH-、-O-、-S-、-C=N、-N=N- 等等。標識物可為螢光團染料、能量轉移染料、質量標籤、生物素、半抗原等等。在不同的核苷酸上用於同時檢測多重鹼基之標識物可能不同，或用於逐步檢測在固體表面上經空間分開的寡核苷酸或彼等擴增之克隆的標識物可能相同。

在一個實施態樣中，本發明關於新類別的核苷酸，其具有以 $-CH_2-SS-R$ 基團封端的 3'-O 及通過具有通用結構 $-O-CH_2-SS-$ 之可裂解的連結子附著至核鹼基之標識物。此等封端基團及連結子可藉由以 TCEP 或相關的化學品之單一處理而同時完全地裂解，未在 DNA 分子上留下硫軌跡。

此類別的核苷酸可具有足以賦予以熱活性聚合酶催化之核苷酸併入 DNA 模板上所需之相對高溫(~65℃)的穩定性，卻又具有在 DNA 可相容的條件下足以裂解(諸如以

TCEP 等等還原)的不穩定性。在一些實施態樣中，裂解可藉由暴露於二硫蘇糖醇來實現。

當暴露於還原劑(諸如 TCEP)時，則核苷酸係經由圖 3 中所示之逐步機制進行 3'-O 保護基之去封端，因此恢復 3'-OH 基團的天然狀態。已知 TCEP 及其類似物對 SBS 應用中不可或缺的生物分子是有利的。

在一個實施態樣中，本發明關於如圖 28 中所示之包含新穎可裂解的連結子之一般通用的建造區塊結構。PG = 保護基，L1，L2–連結子(脂族、芳族、混合型極性直鏈或支鏈)。RG = 反應性基團。在本發明之一個實施態樣中，此等建造區塊攜有在連結子之一端的 Fmoc 保護基及在另一端的反應性 NHS 碳酸酯或胺甲酸酯。這較佳的組合在包含新穎可裂解的連結子的經修飾之核苷酸合成中特別有用。保護基應在與核酸/核苷酸化學可相容的條件下可移除且反應性基團應具有選擇性。在連結子上的活性 NHS 基團與胺終止之核苷酸反應之後，Fmoc 基團可使用鹼(諸如哌啶或氨)輕易地移除，因此暴露在用於附著可裂解的標記物之連結子的終端上之胺基。包含各種標記物之化合物庫可非常快速地以此方式建構。

在一個實施態樣中，本發明關於攜有經由新穎連結子附著之可裂解的標記物之核苷酸的通用結構，如圖 29 所示。S = 糖(亦即核糖、去氧核糖)，B = 核鹼基，R = H 或可逆式終止基團(保護基)。較佳的可逆式終止基團包括但不限於：疊氮甲基(-CH_2N_3)、二硫烷基(-CH2-SS-R)、胺

氧基(-ONH_2)。

實施例

提供下列的實施例以證明及進一步例證本發明某些較佳的實施態樣及態樣，且不應被解釋為限制其範圍。

實施例 1

3'-O-(甲基硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧胸苷(2)之合成

將 5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧胸苷(1)(2.0 克，5.6 毫莫耳)在 250 毫升圓底燒瓶中溶解於由 DMSO (10.5 毫升)、乙酸(4.8 毫升)及乙酸酐(15.4 毫升)所組成的混合物中且在室溫下攪拌 48 小時。接著將混合物以加入 K_2CO_3 飽和溶液淬滅，直到停止放出氣態 CO_2 為止。接著混合物使用分液漏斗以 EtOAc (3X100 毫升)萃取。接著將合併的萃取物在分溶漏斗中以 $NaHCO_3$ 飽和溶液(2X150 毫升)清洗且將有機層經 Na_2SO_4 乾燥。將有機部分以旋轉蒸發濃縮。最後將反應混合物以矽膠管柱層析術純化(Hex：EtOAc/7:3 至 1:1)，參見圖 8。獲得成為白色粉末的 3'-O-(甲基硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧胸苷(2)，75%產率(1.75 克，R_f = 0.6，hex：EtOAc/1:1)。^{1}H-NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.16 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.28 (m, 1H), 4.62 (m, 2H), 4.46 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.78-3.90 (m, 2H), 2.39 (m, 1H), 2.14, 2.14 (s, 3H), 1.97 (m, 1H), 1.92

(s, 3H), 0.93 (s, 9H)及 0.13 (s, 3H) ppm。

實施例 2

3'-O-(乙基二硫甲基)-2'-去氧胸苷(4)之合成

將在高真空下經隔夜乾燥之化合物 2 (1.75 克，4.08 毫莫耳)溶解在 20 毫升無水 CH_2Cl_2 中，加入 Et_3N (0.54 毫升，3.87 毫莫耳)及 5.0 克分子篩-3A，且在 Ar 氛圍下攪拌 30 分鐘。接著將反應燒瓶放在冰浴上，使溫度到達零度以下，且緩慢地加入 1.8 當量於 CH_2Cl_2 中的 1M SO_2Cl_2 (1.8 毫升)且在相同的溫度下攪拌 1.0 小時。接著移除冰浴使溫度到達室溫，加入在 4 毫升無水 DMF 中的硫代甲苯磺酸鉀(1.5 克)之溶液且在室溫下攪拌 0.5 小時。

接著加入 2 當量 EtSH (0.6 毫升)且再攪拌 40 分鐘。接著將混合物以 50 毫升 CH_2Cl_2 稀釋且在漏斗中通過矽藻土-S 過濾。將樣品以適量的 CH_2Cl_2 清洗，以確保產物濾出。接著將 CH_2Cl_2 萃取物濃縮且以層析術在矽膠管柱上純化(Hex：EtOAc/1:1 至 1:3，在 Hex：EtOAc/1:1 中的 R_f =0.3)。接著所得粗製產物以在 20 毫升 MeOH 中的 2.2 克 NH_4F 處理。在 36 小時之後，將反應以 20 毫升飽和 $NaHCO_3$ 淬滅且以 CH_2Cl_2 經分溶萃取。將 CH_2Cl_2 部分經 Na_2SO_4 乾燥且以層析術純化(Hex：EtOAc/1:1 至 1:2)，參見圖 8。獲得成為白色粉末的純化產物(4)，18%產率，0.268 克，R_f = 0.3, Hex：EtOAc/1:2)。

在 $CDCl_3$ 中的 ^1H NMR：δ_H 11.25 (1H, S), 7.65

(1H,S), 6.1 (1H, m), 5.17 (1H, m), 4.80 (2H, S), 4.48 (1H, m), 3.96 (1H, m),3.60 (2H, m), 3.26 (3H, s), 2.80 (2H, m), 2.20 (2H, m)及 1.14 (3H, m) ppm。

實施例 3

3'-O-(乙基二硫甲基)-2'-去氧胸苷三磷酸(5)之合成

在配備有橡膠隔膜的 25 毫升燒瓶中，將質子海綿(210 毫克)加入化合物 4 (0.268 克，0.769 毫莫耳)中。將樣品在高真空下經隔夜乾燥。接著將材料在氬氛圍下溶解在 2.6 毫升$(MeO)_3PO$ 中。接著將配備有 Ar 氣供應的燒瓶放在冰浴上，以攪拌使溫度到達零度以下。接著立即以注射器加入 1.5 當量 $POCl_3$ 且在相同的溫度下及在氬氛圍下攪拌 2 小時。接著移除冰浴，且製備由焦磷酸三丁基銨(1.6g)及 Bu_3N(1.45 毫升)於無水 DMF(6 毫升)中所組成的混合物。立即加入整個混合物且攪拌 10 分鐘。接著反應混合物以 TEAB 緩衝液(30 毫升，100 mM)稀釋且在室溫下再攪拌 3 小時。將粗製產物以旋轉蒸發濃縮且以 C18 Prep HPLC 純化(方法：0 至 5 分鐘 100%A，接著以至多 50%B 之梯度經 72 分鐘，A = 50 mM TEAB 及 B = 乙腈)。在目標份冷凍乾燥之後，將半純度產物以使用 PL-SAXPrep 管柱的離子交換 HPLC 進一步純化(方法：0 至 5 分鐘 100%A，接著以至多 70%B 之梯度經 70 分鐘，其中 A = 在水中的 15%乙腈，B = 在 15%乙腈中的 0.85M TEAB 緩衝液)。最後以如上文所述之 C18 Prep HPLC 進行

純化，得到~25%產率之化合物 5，參見圖 8。

實施例 4

N^4-苯甲醯基-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-3'-O-(甲基硫甲基)-2'去氧胞苷(7)之合成

3'-O-(乙基二硫甲基)-dCTP (10)之合成係根據圖 9 達成。將 N^4-苯甲醯基-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧胞苷(6) (50.0 克，112.2 毫莫耳)在 2 公升圓底燒瓶中溶解於 DMSO (210 毫升)中。接著加入乙酸(210 毫升)及乙酸酐(96 毫升)且在室溫下攪拌 48 小時。在這段時間內，以 TLC 觀察到完全轉化成產物(R_f = 0.6，以 EtOAc：hex/10:1 用於產物)。

將混合物分成兩個相等份，將每一份轉移至 2000 毫升燒杯中且以緩慢地加入 K_2CO_3 飽和溶液中止，直到停止放出 CO_2 氣體為止(pH 8)。接著將混合物在分液漏斗中以 EtOAc 萃取。接著將有機部分以 $NaHCO_3$ 飽和溶液(2X1 公升)清洗，接著以蒸餾水(2X1 公升)清洗，接著將有機部分經 Na_2SO_4 乾燥。

接著將有機部分以旋轉蒸發濃縮。接著將產物以使用 puriflash 管柱之矽膠快速管柱層析術純化(Hex：EtOAc/1:4 至 1:9，在 15um，HC 300 克 puriflash 管柱上 3 次管柱操作)，獲得成為灰色粉末的 N^4-苯甲醯基-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-3'-O-(甲基硫甲基)-2'-去氧胞苷(7)，60%產率(34.0 克，R_f = 0.6，EtOAc:hex/9:1)，參見圖 9。

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

實施例 5

N^4-苯甲醯基-3'-O-(乙基二硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧胞苷(8)

將溶解在無水 CH_2Cl_2 (35 毫升)中的 N^4-苯甲醯基-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-3'-O-(甲基硫甲基)-2'-去氧胞苷(7)(2.526 克，5.0 毫莫耳)加入分子篩-3A (10 克)。將混合物攪拌 30 分鐘。接著加入 Et_3N (5.5 毫莫耳)且在冰鹽水浴上攪拌 20 分鐘。接著使用注射器緩慢地加入在 CH_2Cl_2 中的 1M SO_2Cl_2 (7.5 毫升，7.5 毫莫耳)且在相同的溫度下及在 N_2 氛圍下攪拌 2 小時。接著加入在 8 毫升無水 DMF 中的苯硫代磺酸鈉鹽(1.6 克，8.0 毫莫耳)且在室溫下攪拌 30 分鐘。最後加入 EtSH (0.74 毫升)且在室溫下再攪拌 50 分鐘。將反應混合物通過矽藻土-S 過濾，且以 CH_2Cl_2 洗出產物。在濃縮所得 CH_2CH_2 部分之後，將其以使用矽膠管柱之快速層析術純化(1:1 至 3:7/Hex：EtOAc)，獲得化合物 8，54.4%產率(1.5 克)，參見圖 9。化合物 8 之 ^{1}H-NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.40 (m, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.64 (m,

1H), 7.54 (m, 3H), 6.25 (m, 1H), 4.69 & 4.85 (2Xd, J = 11.60 Hz, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.84 & 3.99 (2Xdd, J = 11.59 & 2.79 Hz, 2H), 2.75 (m, 3H), 2.28 (m, 1H), 1.26 (m, 3H), 0.95 (s, 9H)及 0.16 (s, 6H) ppm。

實施例 6

N^4-苯甲醯基-3'-O-(乙基二硫甲基)-2'-去氧胞苷(9)

將 N^4-苯甲醯基-3'-O-(乙基二硫甲基)-5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-2'-去氧胞苷(8，1.50 克，2.72 毫莫耳)溶解在 50 毫升 THF 中。接著在冰冷卻溫度下及在氮氛圍下加入在 THF 中的 1M TBAF (3.3 毫升)。將混合物在室溫下攪拌 1 小時。接著將反應以加入 1 毫升 MeOH 淬滅且以旋轉蒸發 10 分鐘後移除溶劑。將產物以使用梯度 1:1 至 1:9/Hex：EtOAc 之矽膠快速層析術純化，得到化合物 9 (0.78 克，65%產率，在 1:9/Hex：EtOAc 中的 Rf = 0.6)，參見圖 9。化合物 9 之 ^{1}H-NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.41 (m, 1H), 8.0 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.50 (m, 2H), 6.15 (m, 1H), 4.80 & 4.90 (2Xd, J = 11.60 Hz, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.00 & 3.85 (2Xdd, J = 11.59 & 2.79 Hz, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.65 (m, 1H), 2.40 (m, 1H)及 1.3 (s, 3H) ppm。

最後，化合物 10 之合成係依照合成化合物 5(參見圖 8)所述之標準合成方案而自化合物 9 達成。

實施例 7

經標識之核苷酸的合成可依照圖 10 和圖 11 中所示之

合成途徑達成。圖 10 特別用於合成經標識之 dT 中間物，且可同樣地合成其他的類似物。

5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-5-(N-三氟乙醯基-胺基炔丙基)- 2'-去氧尿苷(12)之合成

將 5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-5-碘-2'-去氧尿苷(11，25.0 克，53.4 毫莫耳)在 2 頸圓底燒瓶中溶解於無水 DMF(200 毫升)中。將反應燒瓶以 Ar 氣填充之氣球吹洗。接著加入新鮮開口式真空乾燥之肆(三苯基膦)苯(0) (6.16 克，5.27 毫莫耳)及 CuI (2.316 克，12.16 毫莫耳)且在室溫下及在氬氛圍下攪拌 10 分鐘。接下來依序加入 N-三氟乙醯基炔丙胺(23.99 克，157.8 毫莫耳，2.9 當量)及 Et_3N (14.7 毫升，105.5 毫莫耳)。將混合物在室溫下攪拌 3.0 小時且以 TLC 確認完全反應(在用於產物之 EtOAc:Hex/3:2 中的 $R_f = 0.5$)。

接著以旋轉蒸發移除溶劑。將所得粗製產物溶解在 500 毫升 EtOAc 中且轉移至分液漏斗中。接著將有機部分分別以飽和 $NaHCO_3$(2X400 毫升)及飽和 NaCl (2X400 毫升)溶液清洗。接著將 EtOAc 部分經無水 Na_2SO_4 乾燥。在濾除 Na_2SO_4 鹽之後，將過濾物使用旋轉蒸發器濃縮。在與 3X40 克矽膠結合後，接著以矽膠快速層析術純化(1:1 之 Hex：EtOAc 至 2:3 之 Hex：EtOAc，200 克，15um HP puriflash 管柱，3 次管柱操作)，得到 21.994 克 12 (83.88%產率)，參見圖 10。

在化合物 12 中的 ^{1}H-NMR (DMF-d_7)：δH 11.65 (brs,

1H), 10.15 (brs, 1H), 8.15 (brs, 1H, H6), 6.37 (t, J = 5.99 Hz, 1H, H1'), 5.42 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.37 (brs, 2H，炔丙胺基之 NH-CH_2), 4.00 (m, 1H), 3.84-3.97 (m, 2H), 2.30 (m, 1H, H2'), 2.20 (m, 1H, H2'), 0.97 (s, 9H, 3X-CH_3, TBDMS)及 0.19 (s, 6H, 2X CH_3, TBDMS) ppm。

實施例 8

5'-O-(三級丁基二甲基矽基)-3'-O-(甲基硫甲基)-5-(N-三氟乙醯基-胺基炔丙基)-2'-去氧尿苷(13)之合成

將化合物 12 (21.99 克，44.77 毫莫耳)在 1000 毫升圓底燒瓶溶解於 DMSO (90 毫升)中。接著依序加入 AcOH (40 毫升)及乙酸酐(132 毫升)且在室溫下攪拌 48 小時。以 TLC 確認完全反應(R_f = 0.5；用於產物之 Hex：EtOAc/1:1)。

接著將反應混合物轉移至 2,000 毫升燒杯中且以飽和 K_2CO_3 中和，直到停止放出 CO_2 氣體為止(~pH 8.0)。接著將混合物轉移至分液漏斗中且萃取(2X500 毫升 CH_2Cl_2)。將合併的有機部分以飽和 $NaHCO_3$(1X500 毫升)清洗且經 Na_2SO_4 乾燥。在濾除 Na_2SO_4 之後，將有機部分以旋轉蒸發濃縮且以矽膠快速層析術純化(Hex：EtOAc/7:3 至 1:1)，得到 12.38 克化合物 13 (~50%產率)，參見圖 10。TLC：R_f = 0.5；Hex：EtOAc/1:1，化合物 13 之 ^{1}H-NMR (DMSO-d_6)：δH 11.69 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.93 (s, 1H, H6), 6.07 (m, 1H, H1'), 4.69 (m, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.19

(m, 2H), 4.03 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 0.86 (s, 9H)及 0.08 (s, 6H) ppm。

化合物 14、15 和 16 之合成可依照用於化合物 5 和 10 所述之相關步驟的合成方案達成。其他的 N-三氟乙醯基胺基炔丙基核鹼基之合成係如美國專利 8,017,338 中所述[38]，併入本文以供參考。移除 N-三氟乙醯基以產生胺基炔丙基核鹼基可藉由在溫和條件下的溶劑分解而得到[45]。

另一方面，可裂解的連結子合成可如圖 11 中所示而達成，該合成係自 1,4-丁二醇開始且說明於實施例 9 中。

實施例 9

4-O-(三級丁基二苯基矽基)-丁烷-1-O-(甲基硫甲基)，18 之合成

將在 1 公升燒瓶中溶解於 100 毫升無水吡啶中的 18.3 克 1,4-丁二醇，17 (18.3 克，203.13 毫莫耳)在氮氛圍下於冰浴上到達零下溫度。以注射器緩慢地加入三級丁基二苯基矽基氯(TBDPSCl，19.34 克，70.4 毫莫耳)。容許反應燒瓶以移除冰浴而溫熱至室溫且持續在室溫下攪拌隔夜。接著以旋轉蒸發移除溶劑且以快速層析術使用矽膠管柱純化(7:3 至 1:1/Hex：EtOAc)，得到 4-O-(三級丁基二苯基矽基)-丁烷-1-醇(13.7 克，59.5%產率，以 1:1/Hex：EtOAc 之 R_f = 0.7，^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δH 7.70 (4H, m), 7.40 (4H, m), 3.75 (2H, m), 3.65 (m, 2H), 3.70 (4H, m)及 1.09 (9H,

m) ppm。將 6.07 克(18.5 毫莫耳)所得產物溶解在 90 毫升無水 DMSO，參見圖 11。接著加入乙酸(15 毫升)及乙酸酐(50 毫升)。將混合物在室溫下攪拌 20 小時。接著轉移至分液漏斗且以 300 毫升蒸餾水清洗，以相同體積的 EtOAc 分溶。接著將 EtOAc 部分轉移至 1,000 毫升燒杯中且以 K_2CO_3 飽和溶液中和。將水性部分以分溶移除，且接著將 EtOAc 部分以蒸餾水(3X300 毫升)進一步清洗且經 $MgSO_4$ 乾燥。接著將 EtOAc 部分濃縮且以快速層析術在矽膠管柱上純化(Hex：EtOAc/97:3 至 90:10)，獲得 4-O-(三級丁基二苯基矽基)-1-O-(甲基硫甲基)–丁烷，18 (5.15 克，71.7%產率，在 9:1/Hex：EtOAc 中之 R_f = 0.8)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δH 7.70 (4H, m), 7.40 (6H, m), 4.62 (2H, s), 3.70 (2H, m), 3.50 (2H, m), 2.15 (2H, s), 1.70 (4H, m)及 1.08 (9H, m) ppm。

實施例 10

化合物 19 之合成

將化合物 18 (2.0 克，5.15 毫莫耳)溶解在 40 毫升無水 CH_2Cl_2 中且加入 10 克分子篩-3A 及 0.78 毫升 Et_3N (5.66 毫莫耳)。將混合物在 N_2 氣下及在室溫下攪拌 30 分鐘。接著將燒瓶放在冰浴上，使溫度到達零度以下。接著緩慢地加入 7.7 毫升 1M SO_2Cl_2/CH_2Cl_2 溶液(7.7 毫莫耳)且在 N_2 下攪拌 1 小時。接著移除冰浴，加入在 8 毫升 DMF 中的苯硫代磺酸 Na 鹽(1.6 克，8.24 毫莫耳)且在室

溫下攪拌 30 分鐘。接著加入在 7 毫升無水 DMF 中的 4-巯基苯基乙酸(1.73 克，10.3 毫莫耳，2.0 當量)且攪拌 2 小時。接著將整個粗製樣品通過矽藻土-S 過濾且以 EtOAc 洗出產物。接著將 EtOAc 萃取物以旋轉蒸發濃縮且在矽膠管柱上純化(1:1 至 3:7/Hex：EtOAc)，獲得 1.19 克化合物 19，43%產率，參見圖 11，R_f = 0.5，Hex：EtOAc/3:7。^{1}H NMR ($CDCl_3$): 7.65 (4H, m), 7.55 (2H, m), 7.45 (6H, m), 7.20 (2H, s), 4.80 (2H, m), 3.65 (4H, m), 3.50 (2H, m), 1.60 (4H, m)及 1.09 (9H, s) ppm。

實施例 11

化合物 20 之合成

將溶解在 20 毫升無水 DMF 中的化合物 19 (0.6 克，1.11 毫莫耳)在室溫下以 DSC (0.426 克，1.5 當量)及 Et_3N (0.23 毫升)處理且在氮氛圍下攪拌 1.5 小時。接著製備由在 5 毫升 DMF 中的 11-疊氮基-3,6,9-三氧雜癸-1-胺(2.0 當量)及 Et_3N (2.0 當量)所組成的混合物。將整個溶液立即加入反應混合物中且攪拌 1 小時。接著在真空下移除溶劑且以矽膠快速層析術使用梯度 0 至 10%之 CH_2Cl_2:MeOH 純化，獲得化合物 20，36%產率(0.297 克，R_f = 0.8，10%MeOH:CH_2Cl_2)，參見圖 11。^{1}H NMR (MeOH-d_4)：δ_H 7.70 (4H, m), 7.55 (2H, m), 7.40 (6H, m), 7.45 (2H, m), 4.85 (2H, s), 3.65-3.30 (22H, m), 1.65 (4H, m)及 1.09 (9H, m) ppm。

接著將產物 20 (0.297 克)在燒瓶中溶解於 7 毫升無水 THF 中且放在冰浴上，在氮氛圍下到達零下溫度。接著在冰冷卻溫度下逐滴加入 0.6 毫升在 THF 中的 1M TBAF 且攪拌 3 小時。將混合物以 1 毫升 MeOH 淬滅，以旋轉蒸發移除揮發物且以快速層析術純化，獲得 165 毫克產物 21，參見圖 11，^{1}H NMR (MeOH-d4)：δH 7.55 (2H, m), 7.25 (2H, m), 4.85 (2H, s), 3.75-3.30 (22H, m)及 1.50 (4H, m) ppm。此產物可使用點擊化學與經炔取代之染料偶合及使用 CDI 作為活化劑與核苷酸偶合，得到化合物 22。

可裂解的連結子之另一變型可依照圖 12 達成，其中穩定之偕二甲基係附著至可裂解的連結子之 α-碳。

實施例 12

在另一態樣中，可裂解的連結子可為化合物 30，其中二硫化物係以偕二甲基側面相接且附著至可撓性乙二醇連結子(PEG)。連結子係經由胺甲酸酯基團(-NH-C(=O)O-)附著至 PA-核苷酸(例如化合物 33)。所得核苷酸類似物在此例子中可如化合物 35(dUTP 類似物)，其可根據圖 13 合成。其他的核苷酸類似物(例如 dATP、dGTP、dCTP 之類似物)可藉由在反應順序的最後步驟以適當的 PA-核苷酸類似物代替 PA-核苷酸 33 而以類似方式合成。

實施例 13

化合物 28 之合成

將用於合成化合物 18)的化合物 18 (15.53 克，40 毫莫耳)(參見實施例 9)在圓底燒瓶中溶解於 450 毫升無水二氯甲烷中。加入分子篩(3Å，80 克)及三乙胺(5.6 毫升)且將反應混合物在 0℃下及在氮氛圍下攪拌 0.5 小時。接下來以注射器緩慢地加入 SO_2Cl_2 (在 DCM 中的 1M 溶液，64 毫升)且在 0℃溫度下攪拌 1.0 小時。接著移除冰水，立即加入在 20 毫升無水 DMF 中的硫代甲苯磺酸鉀(10.9 克，48.1 毫莫耳)之溶液且在室溫下攪拌 20 分鐘。接著將反應混合物倒入在 2 公升圓底燒瓶中溶解於 20 毫升 DMF 中的 3-巯基-3-甲基丁-1-醇(4.4 毫升，36 毫莫耳)中。將所得混合物在室溫下攪拌 0.5 小時且通過矽藻土過濾。將產物以乙酸乙酯萃取。將合併的有機萃取物在分液漏斗中以蒸餾水清洗，接著將粗製產物以旋轉蒸發濃縮。以快速層析術在矽膠上使用 EtOAc:己烷作為移動相純化之後獲得產物(28)，26%產率(5.6 克)，參見圖 13。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.67-7.70 (m, 4H), 7.37-7.47 (m, 6H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (t, J = 6.73 Hz, 2H), 3.70 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 6.55, 2H), 1.90 (t, J = 6.95 Hz, 2H), 1.58-1.77 (m, 4H), 1.34 (s, 6H)及 1.07 (s, 9H) ppm。

實施例 14

化合物 29 之合成

將化合物 28 (5.1 克，10.36 毫莫耳)在 500 毫升圓底燒瓶中溶解於 100 毫升無水吡啶中。將 1,1'-羰基二咪唑

(CDI) (3.36 克，20.7 毫莫耳)以一份加入此溶液中且將反應在室溫下及在氮氛圍下攪拌 1.0 小時。接著將反應混合物倒入由 2,2'-(伸乙二氧基)雙(乙胺)(7.6 毫升，51.8 毫莫耳)及無水吡啶(50 毫升)所組成的溶液中。將混合物在室溫下攪拌 1.0 小時且以旋轉蒸發移除揮發物。將所得粗製產物以快速層析術在矽膠上使用 MeOH:CH_2Cl_2/9.5:0.5 純化，以供給純化合物 29 (4.4 克，65%產率)，參見圖 13。^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ_H 7.63-7.68 (m, 4H), 7.34-7.44 (m, 6H), 4.76 (s, 2H), 4.17 (t, J = 7.07 Hz, 2H), 3.65 (t, J = 6.16 Hz, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.49-3.51 (m, 6H), 3.31-3.39 (m, 2H), 2.88 (m, 2H),1.9 (t, J = 7.06 Hz, 2H), 1.57-1.73 (m, 4H), 1.31 (s, 6H)及 1.03 (s, 9H) ppm。

實施例 15

化合物 31 之合成

將化合物 29 (0.94 克，1.42 毫莫耳)溶解在 40 毫升無水 THF 中且在 0℃及在氮氛圍下以在 THF 中的 1M TBAF (1.6 毫升，1.6 毫莫耳)處理。將反應混合物在 0℃下攪拌 2.0 小時，在這段時間內，以 LC-MS 確認完全移除 TBDPS 保護基。在以旋轉蒸發移除溶劑之後，將產物以快速層析術在 C18 Flash 管柱上純化(梯度：0 至 100%B 經 50 分鐘，其中 A = 50mM TEAB 及 B = 乙腈)。將目標份合併且冷凍乾燥，得到純化合物 30 (0.284 克，47%產率)，MS (ES+)經計算為(M+H) 429.21，經觀測為 m/z

429.18。接下來將化合物 30 (0.217 克，0.51 毫莫耳)在氮氛圍下溶解在 13 毫升無水乙腈中。將 DIPEA (97.7 微升，0.56 毫莫耳)及 Fmoc-NHS 酯(273.6 毫克，0.81 毫莫耳)在 0℃溫度下加入此溶液中且在相同的溫度下攪拌 2.0 小時。接著將產物以快速層析術在矽膠上 1:1 至 1:9/Hex：EtOAc 梯度純化，得到半純度產物，將其使用 2-5%/MeOH-CH_2Cl_2 梯度進一步純化，獲得化合物 31 (0.245 克，74%產率)，參見圖 13。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.70 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.59 (2H, d, J =7.6 Hz), 7.32 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.35 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.60-3.45 (12H, m), 3.36-3.26 (4H, m), 1.82 (2H, m), 1.60 (4H, m)及 1.22 (6H, s) ppm。

實施例 16

化合物 32 之合成

將化合物 31 (93 毫克，0.143 毫莫耳)在配備有磁棒及氮氣來源之圓底燒瓶中溶解於無水乙腈(12.0 毫升)中。將 DSC (56 毫克，0.21 毫莫耳)及 DIPEA (37.4 微升，0.21 毫莫耳)依序加入此溶液中，且將所得混合物在室溫下攪拌 5.0 小時。加入額外的 DSC (48 毫克，0.18 毫莫耳)及 DIPEA (37.4 微升，0.21 毫莫耳)且在室溫下持續攪拌 15.0 小時，在這段時間內，TLC 顯示完全轉化成活化 NHS 酯。在以矽膠快速層析術使用己烷-乙酸乙酯(3:7 至 1:9)梯度純化之後獲得成為濃油的產物 32 (59 毫克，53%產

率)且用於下一步驟中，參見圖 13。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.70 (2H, d, J = 7.53 Hz), 7.53 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.33 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.34 (2H, m), 4.28 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.57-3.46 (10H, m), 3.35-3.26 (4H, m), 2.75 (4H,s), 1.74 (4H, m), 1.62 (2H, m) 及 1.23 (6H, s) ppm。

實施例 17

化合物 34 之合成

將等分化合物 33 (10 微莫耳)(根據參考 US 2013/0137091 A1 所合成)在 15 毫升離心管中冷凍至乾燥。接著再懸浮於具有 60 微莫耳 DIPEA 的 1.0 毫升無水 DMF 中。在單獨的試管中，將化合物 32 (30 微莫耳，3 當量)溶解在 3.33 毫升無水 DMF 中且立即全部加入。將反應以手劇烈搖動而徹底混合且在室溫下放在搖動器上 12 小時。接下來加入哌啶(0.33 毫升)且在室溫下持續搖動 30 分鐘。接著將產物以使用 C18 管柱之 HPLC 純化(梯度：0-70%B 經 40 分鐘，其中 A = 50 mM TEAB 及 B = 乙腈)。在目標份凍乾之後獲得產物 34，73.3%產率(7.33 微莫耳)，參見圖 13。

實施例 18

化合物 35 之合成

將等分化合物 34 (4.9 微莫耳)在 15 毫升離心管中溶

解在 1.0 毫升蒸餾水及 0.5M Na_2HPO_4 (0.49 毫升)中。在單獨的試管中，將 10 毫克 5-CR_6G-NHS 酯(17.9 微莫耳)溶解在 0.9 毫升無水 DMF 中。接著將此溶液全部立即加入反應混合物中且在室溫下攪拌 6.0 小時。接著將反應混合物以 50mM TEAB (25 毫升)稀釋。將產物以 HPLC C18 純化(梯度：0-60%B 經 70 分鐘)。在目標份凍乾之後獲得化合物 35 (2.15 微莫耳，44%產率，以 HPLC 具有~ 98%純度)，且以 MS (ES+)確認結構：經計算為(M-H) $C_{58}H_{76}N_{10}O_{25}P_3S_2^-$，1469.36，經實測為 m/z 1469.67，參見圖 13。

dATP、dCTP 和 dGTP 的類似物同樣地依照以化合物 35 所述之類似程序合成且以 HPLC 及 LC-MS 特徵化，得到整組 A 系列(98，圖 45)。就 dATP 類似物經計算為(M-H) $C_{66}H_{83}N_{12}O_{23}P_3S_2$，1,568.4348，經實測為 m/z 1,568.4400；就 dCTP 類似物經計算為(M-H) $C_{52}H_{65}N_{11}O_{30}P_3S_4$，1,545.2070，經實測為 m/z 1,545.2080，且就 dGTP 類似物經計算為(M-H) $C_{66}H_{93}N_{12}O_{27}P_3S_4$，1,706.4369，經實測為 m/z 1,706.4400。在另一態樣中，本發明包含具有可裂解的連結子之核苷酸，如 dATP 類似物的化合物 43，其中可裂解的二硫化物係以偕二甲基側面相接且連結子係經由尿素基團(-NH(C=O)NH-)附著至 PA-核苷酸。化合物可根據圖 14 合成(dATP 類似物)。其他的核苷酸類似物(例如 dCTP、dGTP、dUTP 之類似物)可藉由在反應順序的最後步驟以適當的 PA 類似物代替 42 而以類似方式合成。

實施 19

化合物 37 之合成

在配備有攪拌棒的 1 公升圓底燒瓶中，將 5-(fmoc-胺基)-1-戊醇(36，20 克，62 毫莫耳)在室溫下溶解於 DMSO (256 毫升)中。將 AcOH (43 毫升)及 Ac_2O (145 毫升)依序加入溶液中。將燒瓶以橡膠隔膜密閉，放在 N_2 下且在室溫下攪拌 20 小時。以 TLC 確認完全反應。接著將反應混合物轉移至 3 公升燒杯中且將燒瓶以水清洗。將燒杯在冰浴中冷卻且將反應混合物以 50%飽和 K_2CO_3 (400 毫升)經 30 分鐘中和。將混合物轉移至分液漏斗中且以 EtOAc (2x700 毫升)萃取。接著將有機相以 50%飽和 K_2CO_3 (2x400 毫升)清洗，經 Na_2SO_4 乾燥，過濾且在真空中濃縮。將粗製油以矽膠層析術純化(0 至 20%B 經 20 分鐘，A = Hex，B = EtOAc)。收集且濃縮份得到成為白色固體的化合物 37 (17.77 克，75%)，參見圖 14。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.79 (d, J = 7.33, 2H), 7.63 (d, J = 7.83, 2H), 7.441 (t, J = 7.33, 2H), 7.357 (t, J = 7.58, 2H), 4.803 (bs, 1H), 4.643 (s, 2H), 4.43 (d, J = 6.82, 2H), 4.24 (t, J= 6.82, 1H), 3.54 (t, J = 6.32, 2H), 3.251 (m, 1H), 2.167 (s, 3H), 1.657-1.550 (m, 4H)及 1.446-1.441 (m, 2H) ppm。

實施例 20

化合物 38 之合成

將化合物 37 (2.77 克，7.2 毫莫耳)在配備有攪拌棒及隔板的 250 毫升圓底燒瓶中於 N_2 下溶解在 DCM (60 毫升)

中。將三乙胺(3.0 毫升，21.6 毫升，3 當量)及 4Å 分子篩(28 克)加入燒瓶中。將懸浮液在室溫下攪拌 10 分鐘，接著在冰浴中攪拌 30 分鐘。將 SO_2Cl_2 (在 DCM 中的 1M 溶液，14.4 毫升，14.4 毫莫耳，2 當量)加入燒瓶中且將反應混合物在冰浴中攪拌 1 小時。反應進度係經由 TLC (1:1 之 Hex：EtOAc)以起始材料的消失來監控。一旦完成 SO_2Cl_2 活化，則快速加入在 DMF (60 毫升)中的硫代甲苯磺酸鉀(2.45 克，10.8 毫莫耳，1.5 當量)之溶液。容許反應混合物經 1 小時緩慢地溫熱至室溫。接著將 3-巰基-3-甲基丁醇(1.8 毫升，14.4 毫莫耳，2 當量)裝入燒瓶中且在室溫下攪拌 1 小時。將反應混合物過濾且在 40℃之真空中濃縮。以 FCC 純化(0 至 50%B 經 30 分鐘，A = Hex，B = EtOAc)，以供給成為黃色油的 38 (482 毫克，14%)，參見圖 14。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.76 (d, J = 7.81, 2H), 7.59 (d, J = 7.32, 2H), 7.40 (t, J = 7.32, 2H), 7.31 (t, J = 7.32, 2H), 4.87 (bs, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.40 (d, J = 6.84, 2H), 4.21 (t, J = 6.84 1H), 3.78 (t, J = 6.84, 2H), 3.57 (t, J = 6.35, 2H), 3.20 (m, 2H), 1.88 (t, J = 6.84, 2H), 1.64-1.50 (m, 4H), 1.42-1.39 (m, 2H)及 1.32 (s, 6H) ppm。

實施例 21

化合物 39 之合成

將化合物 38 (135 毫克，0.275 毫莫耳)在 50 毫升圓底燒瓶中於真空下經 2 小時乾燥。除去真空且將燒瓶放在

N_2下。將化合物 38 溶解在 DMF (3.1 毫升)中且將 DIPEA (96 微升，0.55 毫莫耳，2 當量)裝入燒瓶中。將溶液攪拌 10 分鐘且接著添加一份量的 DSC 固體(120 毫克，0.468 毫莫耳，1.7 當量)。容許反應混合物攪拌 2 小時且經由 TLC (1:1 Hex：EtOAc)證明完全反應。接著將反應在真空中及在 35℃下濃縮且接著在高真空下經 1 小時進一步乾燥。將粗製油裝載於矽膠上且以 FCC 純化(0 至 50%B 經 14 分鐘，A = hex，B = EtOAc)。將份以 TLC 檢查且濃縮，以供給成為油的化合物 39 (133 毫克，76%)，其隨時間而結晶，參見圖 14。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.78 (d, J = 7.58, 2H), 7.61 (d, J = 7.58, 2H), 7.42 (t, J = 7.58, 2H), 7.33 (t, J= 7.58, 2H), 4.87 (bs, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.48 (t, J = 7.07, 2H), 4.44 (d, J = 6.82, 2H), 4.24 (t, J = 7.07, 1H), 3.58 (t, J = 6.32, 2H), 3.22 (m, 2H), 2.83 (s, 4H), 2.08 (m, 2H), 1.649-1.562 (m, 4H), 1.443-1.390 (m, 2H)及 1.366 (s, 6H) ppm。

實施例 22

化合物 40 之合成

將 2,2'-(伸乙二氧基)雙(乙胺)(92 微升，635 微莫耳，10 當量)及三乙胺(176 微升，1270 微莫耳，20 當量)溶解在 DMF (10 毫升)中。亦製備在 DMF (2.7 毫升)中的 6-ROX, NHS 酯(40 毫克，64 微莫耳，1 當量)之單獨溶液。將 6-ROX, NHS 酯溶液逐滴加入快速攪拌的含二胺之

溶液中。將反應攪拌 2 小時且以 C18 HPLC-MS 監控進度(0 至 100%B 經 10 分鐘，A = 50mM TEAB，B = MeCN)。一旦完成時，將反應經由製備性 C18-HPLC 純化(10 至 100%B 經 50 分鐘，A = 50 mM TEAB，B = MeCN)。將份合併且凍乾，得到成為紫紅色固體的化合物 40 (20 毫克，48%)，參見圖 14。MS (ES-)經計算為(M-H) $C_{39}H_{45}N_4O_6$ 664.33，經實測為 m/z 664.56。

實施例 23

化合物 41 之合成

將化合物 40 (10 毫克，15 微莫耳)溶解在 DMF (1 毫升)中且裝入 DIPEA (8 微升，45 微莫耳，3 當量)。將化合物 39 (28 毫克，45 微莫耳，3 當量)單獨溶解在 DMF (0.21 毫升)中。將化合物 39 之溶液快速加入具有化合物 40 之溶液中。將反應放在搖動盤上 1.5 小時，在此時以分析用 C18-HPLC (0 至 100%B 經 10 分鐘，A = 50 mM 乙酸鹽緩衝液 pH 5.2，B = MeCN)顯示剩餘化合物 40。加入額外的化合物 39 (13 毫克，21 微莫耳，1.4 當量)且將反應放在搖動盤上再 1 小時。不再進行分析，加入哌啶(300 微升)且容許反應 10 分鐘。接著將反應混合物直接注射在製備性 C18-HPLC 上(10 至 100%B 經 50 分鐘，A = 50 mM TEAB，B = MeCN)。收集且凍乾份，得到成為紫紅色固體的化合物 41 (4.7 毫克，34%)，參見圖 14。MS (ES+)經計算為 (M+H) $C_{51}H_{68}N_5O_9S_2^+$ 959.45，經實測為 m/z

959.76。

實施例 24

化合物 43 之合成

將胺 41 (2 毫克，2 微莫耳)、DSC (0.8 毫克，3 微莫耳，1.5 當量)、DIPEA (0.7 微升，4 微莫耳，2 當量)及 N,N-二甲基甲醯胺(1.7 毫升)裝入 5 毫升樣品小瓶中。將反應混合物放在搖動器上 1 小時。以 C18-HPLC 監控反應進度(0 至 100%B 經 10 分鐘，A = 50mM 乙酸鹽緩衝液 pH 5.2，B = MeCN)。接下來加入在 0.1 Na_2HPO_4 (3.3 毫升)中的核苷酸 42 (6 微莫耳，3 當量，參考 US 2013/0137091 A1)且將反應混合物放在搖動器上隔夜。接下來將反應以水稀釋且以製備性 C18-HPLC 純化(0 至 60%B 經 70 分鐘，A = 50 mM TEAB，B = MeCN)，得到標題化合物 43 (0.5 微莫耳，25%)，參見圖 14。MS (ES-)經計算為(M-H) $C_{67}H_{87}N_{13}O_{22}P_3S_2$ 1581.47，經實測為 m/z 1581.65。

實施例 25

在另一態樣中，可裂解的連結子可為化合物 45，其中連結子係經由尿素官能度繫於 PA-核苷酸且二硫化物係由兩個碳連結子連接至染料。所得核苷酸類似物在此例子中可如化合物 49(dGTP 類似物)，其可根據圖 15 合成。其他的核苷酸類似物(例如 dATP、dUTP、dCTP 之類似物)可藉由在反應順序的第三步驟以適當的 PA 核苷酸類似物代

替核苷酸 46 而以類似方式合成。

實施例 26

化合物 44 之合成

將 CH_2Cl_2 中的 37 (1.00 克，2.59 毫莫耳)、分子篩及三乙胺(0.72 毫升，5.18 毫莫耳)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中。將反應混合物在室溫下攪拌 10 分鐘且冷卻至 0℃。緩慢地加入磺醯氯(4.40 毫升，4.40 毫莫耳)且將所得混合物在 0℃下攪拌 1 小時。使用在己烷中的 20%乙酸乙酯之 TLC 分析表明起始材料消失，在 0℃下加入一份在 N',N'-二甲基甲醯胺(5 毫升)中的苯硫羰基磺酸鈉鹽(648 毫克，3.89 毫莫耳)之溶液且將反應混合物在室溫下攪拌 20 分鐘。接下來加入一份 N-(三氟乙醯胺基)乙硫醇(896 毫克，5.18 毫莫耳)且將所得混合物在室溫下攪拌 30 分鐘。濾除分子篩，在減壓下移除溶劑且將殘留物經由管柱層析術在矽膠上使用 0-20%乙酸乙酯-己烷梯度純化，得到成為黃色油的標題化合物 44 (529 毫克，39%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)，參見圖 15：δ_H 7.76 (d, J = 7.52 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 7.50 Hz, 2H), 7.40-7.38 (m, 2H), 7.30-7.25 (m, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.42 (d, 2H), 4.21-4.20 (m, 1H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.59-3.55 (m, 2H), 3.17-3.16 (m, 2H)及 1.64-1.40 (m, 6H) ppm。

實施例 27

化合物 45 之合成

將胺甲酸酯 44 (100 毫克，0.184 毫莫耳)及 1 毫升在 N,N-二甲基甲醯胺中的 20%哌啶溶液在室溫下裝入配備有磁攪拌棒的 25 毫升圓底燒瓶中。將反應混合物在室溫下攪拌 10 分鐘，接著以乙腈(5 毫升)稀釋且經由反相製備性 HPLC 使用 0-30%乙腈-TEAB 緩衝液梯度純化，得到成為透明油的標題化合物 45 (11 毫克，20%)，參見圖 15。^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_H 4.90 (s, 2H), 3.64-3.60 (m, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.98-2.93 (m, 2H), 2.86-2.82 (m, 2H), 1.66-1.60 (m, 2H), 1.50-1.48 (m, 2H)及 1.33-1.30 (m, 2H) ppm。

實施例 28

化合物 47 之合成

將胺 45 (0.960 毫克，3.0 微莫耳)、DSC (1.15 毫克，4.5 微莫耳)及三乙胺(60 微升，6.0 微莫耳)裝入 5 毫升樣品小瓶中且在室溫下搖動 2 小時。接著加入由在 200 微升 N,N-二甲基甲醯胺中的 3 當量核苷酸 46 所組成的溶液(參考 US 2013/0137091 A1)。將反應混合物放在搖動器上 12 小時。接下來將反應以 TEAB 緩衝液稀釋且以製備性反相 HPLC 使用 0-30%乙腈：50 mM TEAB 緩衝液梯度純化，得到標題化合物 47 (14%產率)，參見圖 15。MS (ES-)：經計算為(M-H) $C_{26}H_{37}F_3N_{10}O_{16}P_3S_2^-$，959.10，經實測為 m/z 959.24。

實施例 29

化合物 48 之合成

將核苷酸 47 (1 微莫耳)溶解在 TEAB 緩衝液(200 微升 50 Mm 水溶液)中且在室溫下以 200 微升氫氧化銨(30%水溶液)處理 50 分鐘。接著將反應以 TEAB 緩衝液(1 毫升 1M 溶液)及蒸餾水(5 毫升)稀釋。將所得混合物經由 C18-HPLC，0-30%乙腈：50 mM TEAB 緩衝液梯度純化，以供給標題化合物 48 (0.40 微莫耳，90%)，參見圖 15。MS (ES-)：經計算為(M-H) $C_{24}H_{38}N_{10}O_{15}P_3S_2^-$，863.12，經實測為 m/z 863.45。

實施例 30

化合物 49 之合成

將等分化合物 48 (0.04 微莫耳)在 3 毫升離心管(eppendorf tube)中溶解於 0.1 毫升蒸餾水及 0.5M Na_2HPO_4 (20 微升)中。在單獨的試管中，將 1 毫克 ROX-NHS 酯(0.168 微莫耳)溶解在 48 微升無水 DMF 中。接著將此溶液全部立即加入反應混合物中且在室溫下攪拌 6.0 小時。接著將反應混合物以 50 mM TEAB (5 毫升)稀釋。將產物以 C18-HPLC 純化(使用 0-60%B 梯度，A = 50mM TEAB，B = 乙腈)。在目標份凍乾之後獲得化合物 49 (0.03 微莫耳，30%產率)，參見圖 15。MS (ES-)：經計算為(M-H) $C_{57}H_{67}N_{12}O_{19}P_3S_2^-$，1380.33，經實測為 1380.25。

與正規的經二硫化物連結之核苷酸的裂解比較

將本文所揭示之此新類別的含有可裂解的二硫甲醛(-OCH_2-SS-)連結子之核苷酸與正規的經二硫化物(-SS-)連結之核苷酸(例如在美國專利申請案 2013/0137091[46]中所揭示之核苷酸 50)在建基於還原膦的裂解條件下比較。觀察到該兩種類別的核苷酸有很大的差別。當經標識之核苷酸 50 在 65℃下暴露於 10 當量 TCEP 時，其產生許多副產物，包括以 LC-MS 鑑定之化合物 52 與預期產物 51(圖 16 和圖 17，5 分鐘暴露)。不想要的副產物比例隨時間增加(圖 18，15 分鐘暴露)。在相同的裂解條件下，經二硫甲醛連結之核苷酸 35 完全地產生所欲裂解產物化合物 53 和 54。連結子之亞甲硫醇片段(-CH_2SH)在二硫化物基團裂解時完全自核苷酸消除(圖 20 和圖 21，5 分鐘暴露)。另外，延長暴露於 TCEP 不產生更多副產物，如以 LC-MS 所示(圖 22，15 分鐘暴露)。因此，此新類別的核苷酸可藉由消除在硫醇基團存在的固有副反應而在使用以合成定序(SBS)DNA 中提供顯著的優點，如圖 4 中所示。

實施例 31

化合物 57 之合成

在另一實施態樣中，核苷酸之 3'-OH 基團可以–CH_2-SS-Et 或–CH_2-SS-Me 封端，且螢光團染料係經由先前所述之可裂解的–OCH_2-SS-連結子之一附著至核鹼基(例如在化合物 35、43 和 49 中)。

具有 3'-OCH_2-SS-Et 及–OCH_2-SS-Me 之 PA 核苷酸的

合成可分別根據圖 10 和圖 22 達成。3'-OCH_2-SS-Me 類似物與 3'-OCH_2-SS-Et 的合成差別(圖 10)為在適當的步驟以甲硫醇或硫甲醇鈉代替巯基乙醇(EtSH)，如圖 22 中所示。-OCH_2-SS-Me 基團為所有可能的 3'-O-CH_2-SS-R 類似物之中最小的結構。因此，具有 3'-OCH_2-SS-Me 封端基團之核苷酸類似物在酶併入率及以還原劑(諸如 TCEP)的可裂解性方面應該比其他的類似物表現更好。

接下來可將所得 PA-核苷酸(例如 57)使用活化連結子 32 與適當的可裂解的–OCH_2-SS-連結子偶合及最後與螢光團染料偶合，如圖 23 中所示。而且具有不同染料的其他核苷酸可使用適當的 PA-核苷酸(例如 dATP、dGTP、dCTP 的 PA 類似物)及 NHS 活化染料(Alexa488-NHS、ROX-NHS、Cy5-NHS 酯等等)以類似方式合成，達成經不同的螢光團報導基團標識之核苷酸類似物。

實施例 32

具有不同連結子的核苷酸類似物可依照所述方案達成，如在合成化合物 60 和 61 中所示(圖 24)。

具有可裂解的連結子–OCH_2-SS-，但是鏈長度及在 α-碳上的取代不同的多樣組別之 3'-OCH_2-SS-Et 及 3'-OCH_2-SS-Me 核苷酸可以類似的方式合成。所得類別的核苷酸顯示於圖 25、圖 26 和圖 27 中。在圖 25 中所示之核苷酸中，可裂解的連結子係由附著至可撓性乙二醇連結子的穩定之偕二甲基側面相接且經由胺甲酸酯官能基(-NH-

C(C=O)-O-)附著至 PA-核鹼基，而在圖 26 中，將胺甲酸酯基團以尿素基團(-NH-C(C=O)-NH-)代替。另一方面，在圖 27 中所示之核苷酸中，二硫化物基團係附著至一級碳鏈且經由尿素官能基繫於 PA-核鹼基。

實施例 33

化合物 64 之合成：

將化合物 62 (3.0 克，4.58 毫莫耳)、25 毫升無水 CH_2Cl_2、3-Å 分子篩(5.0 克)及環己烯(0.55 毫升，5.4 毫莫耳)裝入 250 毫升圓底燒瓶中。將所得混合物在室溫下及在氮氛圍下攪拌 10 分鐘。接著將反應燒瓶放在冰浴上，經由注射器緩慢地加入 SO_2Cl_2 (6.8 毫升，在 CH_2Cl_2 中的 1M 溶液，1.5 當量)且在 0℃下攪拌 1 小時。接下來加入額外的 0.5 當量 SO_2Cl_2，以確保完全轉化成化合物 63。在真空下移除揮發物且保持溫度接近 10℃。將所得固體再懸浮於 20 毫升無水 DMF 中且保持在氮氛圍下。

在單獨的燒瓶中，將(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(2.45 克，11.44 毫莫耳)在氮氛圍下溶解在無水 DMF (30 毫升)中且以 NaH (274.5 毫克，在油中的 60%)處理，產生灰色漿液。將化合物 63 立即加入其中且在室溫下及在氮氛圍下攪拌 3 小時。接著將反應混合物在漏斗中通過矽藻土®-S (20 克)過濾，以 EtOAc (100 毫升)溶析出產物。接著將 EtOAc 溶液以蒸餾水(2X100 毫升)清洗。將 EtOAc 萃取物經 Na_2SO_4 乾燥，以旋轉蒸發濃縮且以快速層析術純

化(管柱：120 克 RediSepRfGold，梯度：80% Hex 至 50% Hex：EtOAc)。參見圖 43。獲得成為白色固體的目標化合物(64)(1.2 克，32%產率，R_f：0.4，Hex：EtOAc/3:2)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δH 8.13 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 6.12 (m, 1H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.31 (m, 3H), 4.00 (m, 1H), 3.82-3.60 (m, 13H), 2.39 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 0.78 (m, 9H)及 0.01 (m, 6H) ppm。

實施例 34

化合物 65 之合成：

將化合物 64 (1.2 克，1.46 毫莫耳)在高真空下以 P_2O_5 在乾燥器中經隔夜乾燥且在配備有磁攪拌器的 100 毫升燒瓶中溶解於 30 毫升無水 CH_2Cl_2 中。將二甲基二硫(0.657 毫升，7.3 毫莫耳)加入其中且將反應燒瓶放在冰浴上。接著加入四氟硼酸二甲基(甲硫基)鋶(DMTSF，316 毫克，1.1 當量)且在 0℃下攪拌 1.5 小時。將反應混合物轉移至 250 毫升分液漏斗，以 50 毫升 0.1M $NaHCO_3$ 水溶液中和且以 CH_2Cl_2 (2X50 毫升)萃取。參見圖 43。將有機部分經 Na_2SO_4 乾燥且以旋轉蒸發濃縮。將粗製產物在矽膠管柱上(80 克 RediSepRf gold)使用梯度 80-50% Hex-EtOAc 純化，得到 0.82 克化合物 65 (82%產率，R_F = 0.5，Hex：EtOAc/3:2)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δH 8.15 (m, 3H), 7.42 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 6.11 (m, 1H), 4.80-4.65 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.83-3.67 (m, 2H),

2.49 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.90 (m, 1H), 0.78 (m, 9H)及 0.10 (m, 6H) ppm。

實施例 35

化合物 66 之合成：

將化合物 65 (0.309 克，0.45 毫莫耳)及 10.0 毫升無水 CH_2Cl_2 (10.0 毫升)裝入配備有磁攪拌器的圓底燒瓶中且在氮氛圍下放在冰浴上。經由注射器緩慢地加入 TBAF (0.72 毫升，0.72 毫莫耳，1M 溶液)。將反應混合物在 0℃下攪拌 3 小時。接著將反應混合物轉移至分液漏斗且以 0.5 M $NaHCO_3$ 溶液(50 毫升)萃滅。將所得混合物以 EtOAc (2 X100 毫升)萃取且經 Na_2SO_4 乾燥。以矽膠管柱層析術在 40 克 RediSepRf 管柱上使用梯度 7:3 至 2:3 Hex：EtOAc 純化之後獲得成為白色粉末的產物 66，76%產率(196 毫克，R_f = 0.3，Hex：EtOAc/1:1)。參見圖 43。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δH 8.40 (s, 1H), 8.25 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.52 (m, 2H), 6.21 (m, 1H), 4.90-80 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.05-3.85 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.50 (s, 3H)及 2.31 (m, 1H) ppm。

在化合物 66 經由標準的三磷酸合成方法進行磷酸化之後，獲得產物 67(以 LC-MS 確認 m/z (M-H) 611.19 為 67 之 $C_{14}H_{23}N_4O_{13}P_3S_2$)(參見化合物 5 之合成細節且參見圖 8)。其根據圖 13、圖 14 和圖 15 中所呈示之用於化合物的所述程序進一步轉化成經染料標識之產物。

實施例 36

化合物 70 之合成：

將化合物 68 (7.3 克，13.8 毫莫耳)在乾燥器中經隔夜乾燥且在配備有攪拌棒及橡膠隔膜的 500 毫升無水圓底燒瓶中在 N_2 氛圍下溶解於無水 DCM (70 毫升)中。將環己烯 (1.54 毫升，15.2 毫莫耳，1.1 當量)及無水 3-Å 分子篩 (16.6 克)加入反應混合物中且將所得懸浮液在冰浴中於 0℃下攪拌 20 分鐘。接下來加入 SO_2Cl_2 (在 DCM 中的 1M 溶液，32.7 毫升，2.36 當量)且將所得混合物在 0℃下攪拌 1 小時。反應進度係經由 TLC (100% EtOAc)以起始材料的消失來監控。一旦完成 SO_2Cl_2 活化，則製備在 DMF (120 毫升)中的$(MeO)_3BnSH$ (7.4 克，34.5 毫莫耳，2.5 當量)及 NaH (1.32 克，33.12 毫莫耳，在礦物油中的 60%)之混合物且以一份快速加入。容許反應緩慢地溫熱至室溫且攪拌 1 小時。將反應混合物過濾且在 40℃之真空中濃縮。以管柱層析術在矽膠上純化(以 0 至 60%乙酸乙酯：己烷梯度經 15 分鐘，接著以 60%乙酸乙酯：己烷經 45 分鐘溶析)，以供給成為透明油的所欲化合物 70 (4.2 克，43.7%產率)。參見圖 44。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.72 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 6.03 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.73 (m, 13H), 2.52 (m, 2H), 0.81 (s, 9H)及 0.002 (d, 6H) ppm。

實施例 37

化合物 71 之合成：

將化合物 70 (2 克，2.87 毫莫耳)在配備有攪拌棒及橡膠隔膜的 200 毫升圓底燒瓶中於 N_2 氛圍中溶解在無水 DCM (38 毫升)中且在冰水浴上冷卻。將二甲基二硫(1.3 毫升，14.36 毫莫耳，5 當量)加入此混合物中，接著加入一份在 DCM (20 毫升)中成為溶液的 DMTSF (620 毫克，3.15 毫莫耳，1.1 當量)。容許所得混合物緩慢地溫熱至室溫且接著再攪拌 4 小時。將反應以加入 $NaHCO_3$ 飽和水溶液(100 毫升)淬滅，以 DCM (150 毫升 x 2)及 EtOAc (200 毫升)萃取，經 Na_2SO_4 乾燥且在真空中濃縮。以管柱層析術在矽膠上純化(以 0 至 60%乙酸乙酯：己烷梯度經 15 分鐘，接著以 60%乙酸乙酯：己烷經 45 分鐘溶析)，以供給成為白色粉末的所欲化合物 71 (1 克，62%產率)。參見圖 44。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.69 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.94 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.42 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 0.81 (s, 9H)及 0.00 (d, 6H) ppm。

實施例 38

化合物 72 之合成：

將化合物 71 (562 毫克，1.25 毫莫耳)在配備有攪拌棒及橡膠隔膜的 100 毫升圓底燒瓶中於 N_2 氛圍中溶解在無水 THF (30 毫升)且在冰水浴上冷卻。接著逐滴加入 TBAF

(1.5 毫升在 THF 中的 1M 溶液，1.5 當量)且在 0℃下攪拌 2 小時。反應進度係以 TLC 監控(100%乙酸乙酯，化合物 72 之 R_f = 0.205，化合物 71 之 R_f = 0.627)。在反應完成時加入甲醇(5 毫升)，將反應以旋轉濃縮且將殘留物經由管柱層析術在矽膠上純化(以 0 至 60%乙酸乙酯：己烷梯度經 15 分鐘，接著以 60%乙酸乙酯：己烷經 45 分鐘溶析)，以供給成為白色粉末的所欲化合物 72 (280 毫克，62%產率)。參見圖 44。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.69 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.25 (m, 1H), 4.83 (m, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.99 (m, 1H), 2.43 (s, 3H)及 2.41 (m, 1H) ppm。

接著將化合物 72 依照先前所述之標準的三磷酸合成法轉化成三磷酸 73 (參見圖 8 中的化合物 5 之合成)。

實施例 39

化合物 108 之合成：

將在 100 毫升無水吡啶中的 1,4-丁二醇(18.3 克，203.13 毫莫耳)裝入配備有攪拌棒的 1 公升圓底燒瓶中且在氮氛圍下冷卻至 0℃。接著經由注射器逐滴加入三級丁基二苯基矽基氯(13.8 毫升，70 毫莫耳)，容許反應逐漸地溫熱至室溫且在室溫下持續攪拌 12 小時。以旋轉蒸發移除揮發物且將殘留物吸收在 80 克矽膠上。經由快速管柱層析術在矽膠上使用在己烷中的 30 至 50%乙酸乙酯梯度

純化，得到 4-O-(三級丁基二苯基矽基)-丁-1-醇，108 (13.7 克，59.5%產率，R_f = 0.7，以 1:1/己烷：乙酸乙酯，^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.70 (m, 4H), 7.40 (m, 6H), 3.75 (m, 2H), 3.65 (2H, m), 1.70 (m, 4H), 1.09 (m, 9H) ppm。合成法於圖 50 中例證。

實施例 40

化合物 109 之合成：

將化合物 108 (6.07 克，18.5 毫莫耳)及 90 毫升無水 DMSO 裝入配備有磁攪拌棒的 250 毫升圓底燒瓶中。依序加入乙酸(15 毫升)及乙酸酐(50 毫升)且將反應在室溫下攪拌 20 小時，轉移至分液漏斗且分溶在 300 毫升蒸餾水與 300 毫升乙酸乙酯之間。接著將有機層轉移至 1 公升燒瓶且使用 K_2CO_3 飽和水溶液(500 毫升)中和。將有機層以蒸餾水(3 x 300 毫升)清洗且經 $MgSO_4$ 乾燥。在減壓下移除揮發物且將殘留物經由快速管柱層析術在矽膠上純化(己烷：乙酸乙酯/97:3 至 90:10)，獲得 4-O-(三級丁基二苯基矽基)-1-O-(甲基硫甲基)-丁烷，109 (5.15 克，71.7%產率，R_f = 0.8，以 9:1/己烷：乙酸乙酯)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.70 (m, 4H,), 7.40 (m, 6H), 4.62 (s, 2H), 3.70 (m, 2H), 3.50 (m, 2H,), 2.15 (s, 2H), 1.70 (m, 4H), 1.08 (m, 9H) ppm。合成法於圖 50 中例證。

實施例 41

化合物 110 之合成：

將化合物 109 (15.5 克，40 毫莫耳)、無水二氯甲烷(450 毫升)、3Å 分子篩(80 克)及三乙胺(5.6 毫升)裝入配備有磁攪拌棒的 1 公升圓底燒瓶中且將反應在 0℃下及在氮氛圍下攪拌 30 分鐘。接下來經由注射器緩慢地加入 SO_2Cl_2 (64 毫升在二氯甲烷中的 1M 溶液)且在 0℃下攪拌 1 小時。接著移除冰浴且立即加入在 20 毫升無水 DMF 中的硫代甲苯磺酸鉀(10.9 克，48.1 毫莫耳)之溶液。將所得混合物在室溫下攪拌 20 分鐘，立即加入含有在 DMF (20 毫升)中的 3-巯基-3-甲基丁-1-醇(4.4 毫升，36 毫莫耳)之溶液的 2 公升圓底燒瓶中。將反應在室溫下攪拌 30 分鐘且接著通過矽藻土-S 過濾。將產物分溶在等量的乙酸乙酯與水之間。將有機萃取物在分液漏斗中以蒸餾水清洗，接著以旋轉蒸發濃縮粗製產物。以快速管柱層析術在矽膠上使用乙酸乙酯：己烷梯度純化，得到標題化合物 110 (5.6 克，26%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.67-7.70 (m, 4H), 7.37-7.47 (m, 6H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (t, J = 6.73 Hz, 2H), 3.70 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 3.59 (t, J = 6.55, 2H), 1.90 (t, J = 6.95 Hz, 2H), 1.58-1.77 (m, 4H), 1.34 (s, 6H)及 1.07 (s, 9H) ppm。合成法於圖 50 中例證。

實施例 42

化合物 111 之合成：

將化合物 110 (5.1 克，10.36 毫莫耳)、無水吡啶(100

毫升)及 1,1'-羰基二咪唑(CDI)(3.36 克，20.7 毫莫耳)在氮氛圍下裝入配備有磁攪拌棒的 500 毫升圓底燒瓶中。將反應混合物在室溫下攪拌 1 小時且倒入在無水吡啶(50 毫升)中的 2,2'-(伸乙二氧基)雙(乙胺)(7.6 毫升，51.8 毫莫耳)之溶液中。持續攪拌 1 小時且以旋轉蒸發移除揮發物。將所得粗製物經由快速管柱層析術在矽膠上使用在 CH_2Cl_2 中的 0-15%甲醇純化，以供給化合物 111 (4.4 克，65%產率)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.63-7.68 (m, 4H), 7.34-7.44 (m, 6H), 4.76 (s, 2H), 4.17 (t, J = 7.07 Hz, 2H), 3.65 (t, J = 6.16 Hz, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.49-3.51 (m, 6H), 3.31-3.39 (m, 2H), 2.88 (m, 2H),1.9 (t, J = 7.06 Hz, 2H), 1.57-1.73 (m, 4H), 1.31 (s, 6H)及 1.03 (s, 9H) ppm。合成法於圖 50 中例證。

實施例 43

化合物 113 之合成：

將化合物 111 (0.94 克，1.42 毫莫耳)、無水 THF (40 毫升)及 TBAF (1.6 毫升在 THF 中的 1M 溶液，1.6 毫莫耳)在 0℃下及在氮氛圍下裝入配備有磁攪拌棒的 50 毫升圓底燒瓶中。將反應混合物在 0℃下攪拌 2.0 小時，在這段時間內，LC-MS 顯示完全移除 TBDPS 保護基。在以旋轉移除揮發物之後，將產物經由快速層析術在矽膠上純化(在二氯甲烷中的 0-5%甲醇梯度)，得到純化合物 112 (0.284 克，47%產率)，MS (ES+)：經計算為(M+H)

429.21，經觀測為 m/z 429.18。

接下來將化合物 112 (0.217 克，0.51 毫莫耳)在氮氛圍下溶解在無水乙腈(13 毫升)中且冷卻至 0℃。加入 DIPEA (97.7 微升，0.56 毫莫耳)及 Fmoc-NHS 酯(273.6 毫克，0.81 毫莫耳)且將反應在 0℃下攪拌 2 小時。以使用在己烷中的 50 至 90%乙酸乙酯梯度之快速管柱層析術在矽膠上純化，得到半純度產物，經由管柱層析術在矽膠上使用在 CH_2Cl_2 中的 2-5%甲醇梯度進一步純化，以供給化合物 113 (0.245 克，74%產率)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.70 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.59 (2H, d, J =7.6 Hz), 7.32 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.35 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.60-3.45 (12H, m), 3.36-3.26 (4H, m), 1.82 (2H, m), 1.60 (4H, m)及 1.22 (6H, s) ppm。合成法於圖 50 中例證。

實施例 44

化合物 114 之合成：

將化合物 7 (170 毫克，0.26 毫莫耳)、無水乙腈(15 毫升)、DSC (100 毫克，0.39 毫莫耳)及 DPIEA (68 微升，0.39 毫莫耳)裝入配備有磁攪拌棒的 50 毫升圓底燒瓶中。將反應混合物在室溫下攪拌 3 小時且加入額外的 DSC (100 毫克，0.39 毫莫耳)及 DIPEA (68 微升，0.39 毫莫耳)。將所得混合物在室溫下攪拌 12 小時。以 TLC 追蹤反應進度(起始材料之 R_f = 0.4，產物之 R_f = 0.8，在 9:1/乙

酸乙酯：己烷中)。以旋轉蒸發移除揮發物且將剩餘殘留物經由使用己烷-乙酸乙酯梯度之 3 個連續矽膠管柱純化，得到化合物 114 (121 毫克，59%產率)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.81 (m,2H), 7.63 (m, 2H), 7.42 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.43 (m, 2H), 4.37 (t, J = 7.65 Hz, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.18 (m, 2H), 3.67-3.55 (m, 10H), 3.39 (m, 4H), 2.84 (s, 4H), 1.88 (m, 4H), 1.73 (m, 4H)及 1.32 (s, 6H) ppm。合成法於圖 50 中例證。

實施例 45

化合物 117 之合成：

將化合物 115 (7.3 克，13.8 毫莫耳，在乾燥器中經隔夜預乾燥)、無水二氯甲烷(70 毫升)、環己烯(1.54 毫升，15.2 毫莫耳)及 3-Å 分子篩(16.6 克)裝入配備有磁攪拌棒的 500 毫升圓底燒瓶中且將所得懸浮液在 0℃下及在氮氛圍下攪拌 20 分鐘。接下來加入 SO_2Cl_2 (在二氯甲烷中的 1M 溶液，32.7 毫升，2.36 當量)且將所得混合物在 0℃下攪拌 1 小時。反應進度係經由 TLC (100% EtOAc)以起始材料的消失來監控。一旦完成 SO_2Cl_2 活化，則製備在 DMF (120 毫升)中的$(MeO)_3BnSH$ (7.4 克，34.5 毫莫耳，2.5 當量)及 NaH (1.32 克，33.12 毫莫耳，在礦物油中的 60%)之混合物且以一份快速加入。容許反應緩慢地溫熱至室溫且攪拌 1 小時。將反應混合物過濾且在 40℃之真空中濃縮。以管柱層析術在矽膠上使用在己烷中的 0 至 60%

乙酸乙酯梯度純化，以供給成為透明油的所欲化合物 117 (4.2 克，43.7%產率)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.72 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 6.03 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.73 (m, 13H), 2.52 (m, 2H), 0.81 (s, 9H)及 0.002 (d, 6H) ppm。合成法於圖 51 中例證。

實施例 46

化合物 118 之合成：

將化合物 117 (2.0 克，2.87 毫莫耳)及二氯甲烷(38 毫升)在 N_2 氛圍下裝入配備有磁攪拌棒的 200 毫升圓底燒瓶中且在冰浴上冷卻。將二甲基二硫(1.3 毫升，14.36 毫莫耳，5 當量)加入此混合物中，接著加入在二氯甲烷(20 毫升)中成為溶液的 DMTSF (620 毫克，3.15 毫莫耳，1.1 當量)。容許所得混合物緩慢地溫熱至室溫且再攪拌 4 小時。接著將反應以加入 $NaHCO_3$ 飽和水溶液(100 毫升)淬滅，以二氯甲烷(150 毫升 x 2)及乙酸乙酯(200 毫升)萃取，經 Na_2SO_4 乾燥且在真空中濃縮。以管柱層析術在矽膠上純化(以在己烷中的 0 至 60%乙酸乙酯梯度溶析)，得到成為白色粉末的所欲化合物 118 (1.0 克，62%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.69 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.94 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.42 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 0.81 (s, 9H)及 0.00 (d, 6H) ppm。合成法於圖

51 中例證。

實施例 47

化合物 119 之合成：

將化合物 118 (562 毫克，1.25 毫莫耳)在配備有攪拌棒及橡膠隔膜的圓底燒瓶中在 N_2 氛圍下溶解於無水 THF (30 毫升)中且在冰浴上冷卻。接著逐滴加入 TBAF (1.5 毫升在 THF 中的 1M 溶液，1.5 當量)且在 0℃下攪拌 2 小時。反應進度以 TLC 監控(100%乙酸乙酯，化合物 119 之 R_f = 0.2，化合物 118 之 R_f = 0.6)。在反應完成時，加入甲醇(5 毫升)，將反應以旋轉濃縮且將殘留物經由管柱層析術在矽膠上純化(以 0 至 60%乙酸乙酯：己烷梯度經 15 分鐘，接著以在己烷中的 60%乙酸乙酯經 45 分鐘溶析)，以供給成為白色粉末的所欲化合物 119 (280 毫克，62%產率)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.69 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.25 (m, 1H), 4.83 (m, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.99 (m, 1H), 2.43 (s, 3H)及 2.41 (m, 1H) ppm。

接著將化合物 119 參考使用標準的三磷酸合成方法轉化成三磷酸 120，除了去保護係藉由在室溫下以 10% NH_4OH 處理 5 小時來進行以外，使–SSMe 裂解最小化。產率 25%；HRMS-ES^+：經計算為 $C_{12}H_{20}N_5O_{12}P_3S_2$, 582.976，經觀測為 m/z 582.975。合成法於圖 51 中例證。

實施例 48

化合物 123 之合成：

將化合物 121 (2.5 克，4.94 毫莫耳)在乾燥器中經隔夜乾燥且在配備有攪拌棒及橡膠隔膜的無水圓底燒瓶中在 N_2 氛圍下溶解於無水二氯甲烷(25 毫升)中。將環己烯(0.55 毫升，1.1 當量)及無水 3-Å 分子篩(6.0 克)加入反應混合物中且將所得懸浮液在室溫下攪拌 20 分鐘。接著將反應燒瓶放在冰鹽水浴上，使溫度到達零度以下，且以注射器緩慢地加入 SO_2Cl_2 (7.4 毫升，在二氯甲烷中的 1M 溶液)。將所得混合物在 0℃下攪拌 1 小時，接著加入 0.5 當量 SO_2Cl_2，以完成完應。反應進度係經由 TLC 以起始材料的消失來監控。接下來在單獨的燒瓶中製備在 DMF (40 毫升)中的 $(MeO)_3BnSH$ (2.65 克，12.35 毫莫耳，2.5 當量)及 NaH (0.472 克，11.85 毫莫耳，在礦物油中的 60%)之懸浮液。將反應混合物合併，緩慢地溫熱至室溫且攪拌 1 小時。接著將反應混合物通過玻璃燒結之漏斗過濾以移除 MS，將過濾物以加入 50 mM NaH_2PO_4 水溶液(50 毫升)淬滅且以二氯甲烷萃取。將合併的有機物經 Na_2SO_4 乾燥且在真空中濃縮。以管柱層析術在矽膠上使用己烷：乙酸乙酯梯度純化，得到所欲化合物 123 (1.4 克，42.2%產率)。

^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.29 (m, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.48 (m, 1H), 7.38 (m, 2H), 6.15 (m, 1H), 5.99 (m, 2H), 4.55 (m, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.69 (m, 9H), 2.52 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 0.80 (m,

9H)及 0.01 (m, 6H) ppm。合成法於圖 52 中例證。

實施例 49

化合物 124 之合成：

將化合物 123 (1.4 克，2.08 毫莫耳)在配備有攪拌棒及橡膠隔膜的 200 毫升圓底燒瓶中在 N_2 氛圍下溶解於無水二氯甲烷(42 毫升)且在 0℃下冷卻。將二甲基二硫(0.93 毫升，10.4 毫莫耳，5 當量)加入此混合物中，接著加入 DMTSF (450 毫克，2.28 毫莫耳，1.1 當量)。將所得混合物在 0℃下攪拌 2 小時。將反應以加入 50 mM $NaHCO_3$ (100 毫升)淬滅，以二氯甲烷(100 毫升 x 2)萃取，經 Na_2SO_4 乾燥且在真空中濃縮。將產物以管柱層析術在矽膠上純化(以在二氯甲烷中的 0 至 30%乙酸乙酯梯度溶析)，以供給成為白色粉末的所欲化合物 124 (0.93 克，83.1%)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.48 (m, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.47 (m, 1H),7.37 (m, 2H) 6.00 (m, 1H), 4.73 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 2.44 (m, 1H), 2.33 (m, 3H), 2.25 (m, 1H), 0.76 (m, 9H)及 0.01 (m, 6H) ppm。合成法於圖 52 中例證。

實施例 50

化合物 125 之合成：

將化合物 124 (930 毫克，1.73 毫莫耳)在配備有攪拌棒及橡膠隔膜的 100 毫升圓底燒瓶中在 N_2 氛圍下溶解於

無水 THF (52 毫升)中且在冰水浴上冷卻至 0℃。接著逐滴加入 TBAF (3.5 毫升在 THF 中的 1M 溶液，1.5 當量)且在 0℃下攪拌 4 小時。在完成反應時，加入甲醇(5 毫升)以淬滅反應，在減壓下移除揮發物且將殘留物經由管柱層析術在矽膠上純化(在己烷中的 0 至 75%乙酸乙酯梯度)，以供給成為白色粉末的所欲化合物 125 (425 毫克，58%產率)。^{1}H-NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.24 (m, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.51-7.42 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 6.09 (m, 1H), 4.80 (m, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.40 (m, 3H)及 2.41 (m, 1H) ppm。合成法於圖 52 中例證。

實施例 51

化合物 126 之合成：

接著將化合物 125 使用參考的標準三磷酸酯合成方法轉化成三磷酸酯 126；最後去保護係藉由在室溫下以 10% NH_4OH 處理 2 小時來進行，使–SSMe 裂解最小化。30%產率，HR MS-ES$^+$：經計算為 $C_{11}H_{20}N_3O_{13}P_3S_2$, 558.965；經觀測為 m/z 558.964。合成法於圖 52 中例證。

實施例 52

化合物 130 之合成：

將 127 (2.0 克，2.8 毫莫耳)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中且在高真空下以 P_2O_5 在乾燥器中經

12 小時乾燥。在 N_2 下加入二氯甲烷(40 毫升)且將所得溶液在鹽冰浴上經 15 分鐘冷卻。加入環己烯(0.34 毫升，3.4 毫莫耳)，接著逐滴加入 SO_2Cl_2 (3.4 毫升，在二氯甲烷中的 1M 溶液，3.4 毫莫耳)。將所得混合物攪拌 30 分鐘，且將反應進度以 TLC 監控(乙酸乙酯：己烷/1:1，127 之 R_f = 0.5，128 之 R_f = 0.15，$-CH_2Cl$ 分解產物)。逐滴加入額外的 SO_2Cl_2 (3.1 毫升，在二氯甲烷中的 1M 溶液，3.1 毫莫耳)且將反應混合物再攪拌 40 分鐘，以確保完全轉化成化合物 128。接著將此混合物在 0℃之高真空下濃縮。

接著將無水二氯甲烷(40 毫升)在 N_2 下加入殘留物中且將混合物在 0℃下攪拌，直到所有的固體溶解為止。緩慢地加入在 DMF (8 毫升)中的對-甲苯硫代磺酸鉀(0.96 克，425 毫莫耳)之溶液且將所得反應混合物在 0℃下攪拌 1 小時。將混合物在減壓下及先在 0℃下及接著在室溫下濃縮。將殘留物以快速管柱層析術在矽膠上使用在己烷中的 0 至 100%乙酸乙酯梯度純化，得到成為奶油色固體的化合物 130 (1.1 克，51%；TLC R_f：0.35，乙酸乙酯：己烷/2:1)。MS (ES) m/z: 733 [$M+1^+$]。^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz)：δ_H 8.02 (br.s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.88 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.45 (m, 4H), 7.38 (m, 6H), 7.27 (m, 2H), 6.01 (t, J=6.6 Hz 1H), 5.46 & 5.38 (AB, J_{AB}=12.1 Hz, 2H), 4.97 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.74 (dd, J=12.5, 2.8 Hz, 1H), 3.55 (dd, J=12.5, 2.9 Hz, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.43 (s,

3H), 2.17 (m, 1H), 1.26 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.25 (d, J=6.9 Hz, 3H) ppm。合成法於圖 53 中例證。

實施例 53

化合物 131 之合成：

將二甲基二硫(0.66 毫升，7.5 毫莫耳)在 N_2 下加入在冰水浴上冷卻的二氯甲烷(無水，40 毫升)中的 130 (1.1 克，1.5 毫莫耳)之溶液中。將所得混合物攪拌 15 分鐘且加入一份 NaSMe (0.23 克，3.3 毫莫耳)。將所得反應混合物在 0℃下攪拌 4 小時。將反應進度以 TLC 監控(乙酸乙酯:己烷/2:1，130 之 R_f = 0.35，131 之 R_f = 0.45)。將混合物通過矽藻土-S 過濾且在減壓下濃縮。將殘留物在矽膠管柱上純化，以在己烷中的乙酸乙酯(0 ~ 100%)溶析，以供給成為白色固體的化合物 131 (0.68 克，75%；TLC R_f: 0.45，乙酸乙酯/己烷/2:1)。MS (ES) m/z: 625 [$M+1^+$]。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.02 (s, 1H), 8.00 (br。s, 1H), 7.45 (m, 4H), 7.39 (m, 4H), 7.28 (m, 2H), 6.24 (t, J=6.2 Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.99 & 4.94 (AB, J_{AB}=11.4 Hz, 2H), 4.27 (m, 1H), 3.99 (dd, J=12.5, 2.3 Hz, 1H), 3.86 (dd, J=12.5, 2.3 Hz, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.50 (m, 1H), 1.30 (d, J=6.6 Hz, 3H)及 1.29 (m, 3H) ppm。合成法於圖 53 中例證。

實施例 54

化合物 132 之合成：

接著將化合物 131 經由在標準方法章節中所述之標準的三磷酸合成方法轉化成三磷酸 132。25%產率；HRMS-ES^+：經計算為 $C_{12}H_{20}N_5O_{13}P_3S_2$, 598.971，經觀測為 m/z 598.970。合成法於圖 53 中例證。

實施例 55

化合物 134 之合成：

將化合物 133 (4.47 克，10.7 毫莫耳)及(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(TMPM-SH)在高真空下經 2 小時乾燥且接著放入具有 P_2O_5 的乾燥器中 12 小時。將化合物 133 溶解在無水 CH_2Cl_2 (50.0 毫升)中且加入環己烯(10 毫升，96.6 毫莫耳)。將所得混合物在-10℃下及在氮氛圍下攪拌 15 分鐘。接下來經由加料漏斗逐滴加入在 CH_2Cl_2 中的 1M SO_2Cl_2 之新鮮製備溶液(25 毫升，26.75 毫莫耳)且將所得混合物在-10℃下攪拌 1 小時。在真空中移除揮發物且保持浴溫在 10℃。接著將殘留物溶解在無水 DMF (52 毫升)中且保持在氮氛圍下。

在單獨的燒瓶中，將(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(4 克，18.7 毫莫耳)在氮氛圍下溶解在無水 DMF (48 毫升)中且冷卻至 0℃。接著加入 NaH (1.1 克，26.8 毫莫耳，在礦物油中的 60%)且將所得灰色漿液在 0℃下攪拌 15 分鐘。將其以一份加入先前溶液中且在室溫下攪拌 1 小時。接著將反應混合物在分液漏斗中分溶(150：300 毫升/食鹽水：

乙酸乙酯)。接著將有機層以食鹽水(2x150 毫升)清洗。將水層反萃取(4 x 50 毫升乙酸乙酯)。將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥。移除溶劑且將產物以快速層析術在矽膠管柱上純化(管柱：120 克 RediSepRfGold- ISCO，梯度在己烷中的 0 至 100%乙酸乙酯)。獲得成為白色固體的目標化合物 134，22%產率(1.35 克)。 ^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.17 (s, 1H), 7.39 (d, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.12 (s, 2H), 4.71 (dd, 2H), 4.43 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.83 (m, 9H), 3.74(dd, 1H), 2.74 (ddd, 1H), 2.34 (ddd, 1H), 1.93 (m, 2H) 1.53 (s, 3H), 0.93 (m, 9H), 0.11(m, 6H) ppm。LCMS (ESI)[M-H^+]經觀測為 581, R_f = 0.59 (4:6/己烷-乙酸乙酯)。而且亦分離出成為副產物的化合物 135，22.5%產率(1.13 克)。 ^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.55 (s, 1H), 7.41 (m, 1H), 6.12 (M, 3H), 4.76 (dd , 2H), 4.47 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.82 (m, 9H), 3.75(m, 1H), 2.29 (m, 2H), 2.04 (s, 3H)及 1.91 (m, 2H) ppm。LCMS (ESI)[M-H^+]經觀測為 467。合成法於圖 54 中例證。

實施例 56

化合物 136 之合成：

將化合物 134 (3.6 克，6.2 毫莫耳)在 100 毫升圓底燒瓶中於高真空下經 2 小時乾燥且接著與 P_2O_5 放入真空乾燥器中 12 小時。加入無水 CH_2Cl_2 (96 毫升)及二甲基二硫(2.8 毫升，30.9 毫莫耳)且將反應冷卻至 0℃。接著加入四

氟硼酸二甲基(甲硫基)鋶(DMTSF，1.34 克，6.82 毫莫耳)且將反應在 0℃下攪拌 1 小時。接下來將反應混合物轉移至 250 毫升分液漏斗，以 90 毫升 0.1 M $NaHCO_3$ 水溶液中和且以乙酸乙酯(2 x 200 毫升)萃取。將合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥且以旋轉濃縮。將殘留物以快速層析術在矽膠管柱上使用己烷中的 30-50%乙酸乙酯梯度純化。獲得成為白色固體的目標化合物 136 (2.1 克，77%產率)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.99 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 6.29(dd, 1H), 4.87 (dd, 2H), 4.49 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.5 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.45 (dd, 1H), 2.04 (dd, 1H)及 1.54 (s, 2H) , 0.93 (m, 9H)及 0.13 (m, 6H) ppm。LCMS (ESI) [$M-H^+$]經觀測為 447.0。合成法於圖 54 中例證。

實施例 57

化合物 137 之合成：

將在 100 毫升圓底燒瓶中於高真空下經 2 小時乾燥之化合物 136 (2.16 克，4.8 毫莫耳)溶解在無水 THF (40 毫升)中，接著加入乙酸(1.2 毫升)及在 THF 中的 TBAF (6.7 毫升 1M 溶液，6.72 毫莫耳)。將反應混合物在 0℃下攪拌 1 小時及接著在室溫下再 2 小時。在真空中移除揮發物且將殘留物經由快速層析術在 40 克 RediSepRf gold 管柱上使用二氯甲烷中的 0-8%甲醇梯度純化。獲得成為白色固體的目標化合物 137 (1.45 克，90%產率)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.12 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 6.11(t, 1H), 4.87

(dd, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.14 (q, 1H), 3.94 (dd, 1H), 3.83 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.4(m, 2H), 1.93 (s, 3H) ppm；LCMS (ESI) [M-H^+]經觀測為 333。合成法於圖 54 中例證。

實施例 58

化合物 138 之合成：

在化合物 137 參考使用標準的三磷酸合成方法進行磷酸化之後，獲得產物 138。40%產率，HR LC-MS：經計算為 $C_{12}H_{21}N_2O_{14}P_3S_2$, 573.965；經觀測為 m/z 573.964。合成法於圖 54 中例證。

實施例 59

化合物 141 之合成：

將化合物 139 (2.23 克，3.55 毫莫耳)、CH_2Cl_2 (20 毫升)、3-Å 分子篩(3.5 克)及環己烯(0.60 毫升)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中。將所得混合物在室溫下及在氮氛圍下攪拌 20 分鐘。將反應冷卻至 0℃且經由注射器緩慢地加入 SO_2Cl_2 (5.4 毫升，在 CH_2Cl_2 中的 1 M，1.5 當量)。將反應在 0℃下攪拌 1.5 小時，加入額外的 1.8 毫升 SO_2Cl_2 (在二氯甲烷中的 1M 溶液)且在 0℃下持續攪拌 40 分鐘，以確保完全轉化成化合物 140。在減壓下移除揮發物且保持浴溫接近 10℃。將所得固體再懸浮於 20 毫升無水 DMF 且保持在氮氛圍下。

在單獨的燒瓶中，將(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(1.98 克，9.25 毫莫耳)溶解在無水 DMF (15 毫升)中且以 NaH (247 毫克，在礦物油中的 60%，6.17 mM)處理，產生深灰色漿液。接下來加入一份化合物 140 溶液且將反應在室溫下攪拌 1 小時。接著將反應混合物分溶在蒸餾水(150 毫升)與乙酸乙酯(150 毫升)之間。將有機層進一步以蒸餾水(2 x 150 毫升)清洗且經 Na_2SO_4 乾燥。在減壓下移除揮發物且將殘留物以快速管柱層析術在矽膠管柱上使用己烷中的 80 至 100%乙酸乙酯梯度純化。獲得成為白色固體的目標化合物 141 (798 毫克，28%)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.33 (s, 1H), 7.57 (m, 1H), 6.53 (m, 2H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.44 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.80-3.60 (m, 11H), 3.10 (m, 6H), 2.36 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 0.80 (m, 9H)及 0.01 (m, 6H) ppm。以 LC-MS 進一步確認：(M-H)經觀測為 m/z 795.25。合成法於圖 55 中例證。

實施例 60

化合物 142 之合成：

將化合物 141 (0.779 克，0.98 毫莫耳，以 P_2O_5 經 12 小時真空乾燥)及無水 THF (20.0 毫升)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中且在氮氛圍下冷卻至 0℃。經由注射器緩慢地加入 TBAF (1.17 毫升，在 THF 中的 1M 溶液，1.17 毫莫耳)且將反應混合物在 0℃下攪拌 1.5 小時。

接下來加入額外的 TBAF (1 毫升，在 THF 中的 1M 溶液，1 毫莫耳)且在 0℃下反應 3 小時。接著將反應混合物轉移至分液漏斗中且以加入甲醇(5 毫升)淬滅，加入蒸餾水(100 毫升)且將反應以乙酸乙酯(2 x 100 毫升)萃取。將有機物經 Na_2SO_4 乾燥且在真空中濃縮。殘留物以管柱層析術在矽膠上使用己烷中的 80 至 100%乙酸乙酯梯度得到成為白色粉末的化合物 142 (525 毫克，79%)。^{1}H NMR (甲醇-d4)：δ_H 8.33 (s, 1H), 7.19 (m, 1H), 6.06(m, 2H), 6.03 (m, 1H), 4.72 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.75 (m, 9H), 3.16 (m, 6H), 2.80 (m, 1H)及 2.28 (m, 1H) ppm；LC-MS：M-H 經觀測為 m/z 680.0。合成法於圖 55 中例證。

實施例 61

化合物 143 之合成：

化合物 143 係自化合物 142 經由標準方法章節中所述之標準的三磷酸合成程序而合成。產率 65%，LRMS-ES$^-$：經計算為 $C_{25}H_{33}N_5O_{15}P_3S^-$，768.09；經觀測為 m/z 768.54 (M-H)。合成法於圖 55 中例證。

實施例 62

化合物 144 之合成：

將化合物 143 (3.80 毫升在 HPLC 等級水中的 5.25 mM 溶液，20 微莫耳)及 pH 4.65 之乙酸鹽緩衝液(4.75 毫

升)裝入 50 毫升錐形管中，且快速與 9.0 毫升在 pH 4.65 之乙酸鹽緩衝液中新鮮製備的 DMTSF (80 mM)溶液合併。將所得混合物在室溫下搖動 2 小時且以加入 $NaHCO_3$ 飽和水溶液(2 毫升)淬滅。將產物立即以製備性 HPLC 純化(管柱：30x250mm C_{18} Sunfire，方法：0 至 2.0 分鐘 100%A，接著以 50%B 經 70 分鐘，流速：25 毫升/分鐘，A = 50mM TEAB，B = 乙腈)。將適當的份凍乾且在溶解於 HPLC 等級水中之後合併，以供給 23.4 微莫耳化合物 144 (73%產率)。LRMS-ES^-：經計算為 $C_{16}H_{23}N_5O_{12}P_3S_2^-$，634.00，m/z 經觀測為 634.42 (M-H)。合成法於圖 55 中例證。

將化合物 144 根據標準方法章節中所述之程序轉化成經染料標識之產物(147)(圖 56)。以兩個步驟獲得 75%產率之化合物 146，LRMS-ES^+：經計算為 $C_{34}H_{59}N_7O_{19}P_3S_4$，1090.20，m/z 經觀測為 1090.24 (M+H)。自 146 獲得 50-70% 產率之化合物 147，HRMS-ES^-：經計算為 $C_{67}H_{86}N_9O_{23}P_3S_4$，1605.393；經觀測為 m/z 1605.380 (M-H)。

實施例 63

化合物 150 之合成：

將化合物 148 (3.0 克，4.58 毫莫耳)、25 毫升無水 CH_2Cl_2、3-Å 分子篩(5.0 克)及環己烯(0.55 毫升，5.4 毫莫耳)裝入 250 毫升圓底燒瓶中。將所得混合物在室溫下及

在氮氛圍下攪拌 10 分鐘。接著將反應燒瓶放在冰浴上，經由注射器緩慢地加入 SO_2Cl_2 (6.8 毫升，在 CH_2Cl_2 中的 1M，1.5 當量)且將反應在 0℃下攪拌 1 小時。接下來加入額外的 0.5 當量 SO_2Cl_2，以確保完全轉化成化合物 149。在真空下移除揮發物且保持溫度接近於 10℃。將所得固體再懸浮於 20 毫升無水 DMF 中且保持在氮氛圍下。

在單獨的燒瓶中，將(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(2.45 克，11.44 毫莫耳)在氮氛圍下溶解在無水 DMF (30 毫升)中且以 NaH (274.5 毫克，在矽油中的 60%)處理，產生灰色漿液。將化合物 149 立即加入其中且將反應在室溫下及在氮氛圍下攪拌 3 小時。接著將反應混合物通過以乙酸乙酯(100 毫升)清洗的矽藻土®-S 過濾。將乙酸乙酯溶液以蒸餾水(2 x 100 毫升)清洗，將有機萃取物經 Na_2SO_4 乾燥，在真空中濃縮且經由快速管柱層析術在矽膠管柱上使用己烷中的 20 至 50%乙酸乙酯梯度純化。獲得成為白色固體的目標化合物 150 (1.2 克，32%產率，R_f：0.4，己烷：乙酸乙酯/3:2)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.13 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 6.12 (m, 1H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.31 (m, 3H), 4.00 (m, 1H), 3.82-3.60 (m, 13H), 2.39 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 0.78 (m, 9H)及 0.01 (m, 6H) ppm。合成法於圖 57 中例證。

實施例 64

化合物 151 之合成：

將化合物 150 (1.2 克，1.46 毫莫耳)在高真空下以 P_2O_5 在乾燥器中經隔夜乾燥且在配備有磁攪拌棒的 100 毫升燒瓶中溶解於 30 毫升無水 CH_2Cl_2 中。將二甲基二硫(0.657 毫升，7.3 毫莫耳)加入其中且將反應燒瓶放在冰浴上。加入二四氟硼酸二甲基(甲硫基)銃(DMTSF，316 毫克，1.1 當量)且在 0℃下攪拌 1.5 小時。將反應混合物轉移至 250 毫升分液漏斗中，以 50 毫升 0.1M $NaHCO_3$ 水溶液中和且以 CH_2Cl_2 萃取(2 x 50 毫升)。將有機層經 Na_2SO_4 乾燥且以旋轉蒸發濃縮。將粗製產物在矽膠管柱上使用己烷中的 80-50%乙酸乙酯梯度純化，得到 0.82 克化合物 151 (82%產率，R_F = 0.5，己烷：乙酸乙酯/3:2)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.15 (m, 3H), 7.42 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 6.11 (m, 1H), 4.80-4.65 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.83-3.67 (m, 2H), 2.49 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.90 (m, 1H), 0.78 (m, 9H)及 0.10 (m, 6H) ppm。合成法於圖 57 中例證。

實施例 65

化合物 152 之合成：

將化合物 151 (0.309 克，0.45 毫莫耳)及 10.0 毫升無水 THF (10.0 毫升)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中且在氮氛圍下放在冰浴上。經由注射器緩慢地加入 TBAF (0.72 毫升，在 THF 中的 1M 溶液，0.72 毫莫耳)。將反應混合物在 0℃下攪拌 3 小時。接著將反應混合物轉

移至分液漏斗中且以 0.5M $NaHCO_3$ 水溶液(50 毫升)淬滅。接著將所得混合物以乙酸乙酯(2 x 100 毫升)萃取且經 Na_2SO_4 乾燥。在矽膠管柱上使用梯度 7:3 至 2:3 之己烷：乙酸乙酯進行矽膠管柱層析術之後，獲得成為白色粉末的產物 152，76%產率(196 毫克，R_f = 0.3，己烷：乙酸乙酯/1:1)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 8.40 (s, 1H), 8.25 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.52 (m, 2H), 6.21 (m, 1H), 4.90-80 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.05-3.85 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.50 (s, 3H)及 2.31 (m, 1H) ppm。合成法於圖 57 中例證。

實施例 66

化合物 153 之合成：

在化合物 152 參考使用標準三磷酸合成方法進行磷酸化之後，獲得 30%產率之化合物 153 (LC-MS：經計算為 $C_{14}H_{23}N_4O_{13}P_3S_2$，610.98；經觀測為 m/z 611.11 (M-H)。其根據在標準方法章節中所述之程序進一步轉化成經染料標識之產物(156)(圖 58)。以兩個步驟獲得 49%產率之化合物 155 及 60-85%產率之化合物 156，HRMS-ES^-：經計算為 $C_{53}H_{68}N_8O_{30}P_3S_6^-$，1581.156 (M-H)；經實測為 m/z 1582.160。

實施例 67

化合物 159 & 160 之合成：

將化合物 157 (2.04 克，2.39 毫莫耳)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中且以高真空經 12 小時乾燥。在以氬氣吹洗反應容器之後，依序加入 13 毫升無水 CH_2Cl_2 及環己烯(0.30 毫升，2.86 毫莫耳)。接著將反應燒瓶放在冰水鹽浴上且攪拌 10 分鐘，使混合物到達 0℃以下。經由注射器經 2 分鐘逐滴加入 SO_2Cl_2 (4.0 毫升，在 CH_2Cl_2 中 1M，4.0 毫莫耳)且將反應混合物在 0℃下攪拌 1 小時。經 1 分鐘逐滴加入額外 0.8 當量 SO_2Cl_2 (2.0 毫升，2.0 毫莫耳)且將反應在 0℃下再攪拌 1/2 小時。接下來在真空中移除揮發物且保持浴溫度在~10 °C。將所得固體再懸浮於 15 毫升無水 DMF 且保持在氬氛圍下。

在單獨的 100 毫升燒瓶中，將(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(TMPM-SH，1.27 克，6.0 毫莫耳，經隔夜真空乾燥)在氬氛圍下溶解在無水 DMF (16 毫升)中且以 NaH (195 毫克，在油中的 60%，4.88 毫莫耳)處理，產生灰色漿液 TMPMT-SNa 鹽。攪拌混合物，直到氣體的形成消退為止(約 10 分鐘)。將 TMPMT-SNa 鹽立即加入其中且將混合物在室溫下及在氬氛圍下攪拌，直到 TLC (微整理：二氯甲烷/水；溶劑：己烷：乙酸乙酯/1:1)確認完全轉化為止(1 小時)。接著將反應混合物在過濾漏斗中通過矽藻土®-S (10 克)過濾，以二氯甲烷(100 毫升)溶析產物。接著將二氯甲烷溶液以水(3x100 毫升)清洗。將水層以 3x100 毫升二氯甲烷萃取。將合併的二氯甲烷萃取物經 Na_2SO_4 乾燥且以旋轉蒸發濃縮。接著將其以快速層析術純化(管柱：

100 克，梯度：25% - 50%己烷：乙酸乙酯 5 CV，接著 50% EE 10 CV)。

獲得成為白色泡沫的目標化合物 160 (1.22 克，51%產率)。^{1}H NMR (DMSO-d_6)：δ_H 10.63 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.3-7.5 (m, 8H), 7.20-7.3 (m, 2H), 6.40 (m, 1H), 6.15 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.50 (dd, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.81 (m, 11H), 3.3 (m, 4H), 2.7 (m, 1H), 1.05 (m, 8H), 0.8 (m, 9H)及 0.11 (m, 6H) ppm。LCMS: 1019.371 Da。合成法於圖 59 中例證。

另外，獲得成為副產物的 TBDMS 去保護之產物 159，25%產率(0.48 克)。R_f = 0.2/己烷：乙酸乙酯/1:1。^{1}H NMR (DMSO-d_6)：δ_H 10.63 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.3-7.5 (m, 8H), 7.20-7.3 (m, 2H), 6.40 (m, 1H), 6.15 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.50 (dd, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.81 (m, 11H), 3.5 (m, 1H), 3.3 (m, 4H), 2.7 (m, 1H)及 1.04 (m, 8H) ppm。LCMS: 905.286 Da。

實施例 68

化合物 161 之合成：

將化合物 160 (0.36 克，0.35 毫莫耳)裝入配備有磁攪拌棒及橡膠隔膜的 100 毫升圓底燒瓶中且以高真空經 12 小時乾燥。在以氬氣吹洗之後，加入 7 毫升無水二氯甲烷及二甲基二硫(0.16 毫升，1.76 毫莫耳)。將反應燒瓶放在

冰浴上且攪拌 10 分鐘，使混合物到達 0℃。接著加入四氟硼酸二甲基(甲硫基)銃(DMTSF，80 毫克，0.4 毫莫耳)且將反應在 0℃下攪拌，直到 TLC (微整理：二氯甲烷/水；溶劑：己烷：乙酸乙酯/1:1)確認完全轉化為止。將反應混合物轉移至 250 毫升分液漏斗中，以 50 毫升 0.1M $NaHCO_3$ 水溶液中和且以 CH_2Cl_2 (3 x 50 毫升)萃取。將有機層經 Na_2SO_4 乾燥且以旋轉蒸發濃縮。將粗製產物在矽膠管柱上純化(管柱：25 克，梯度：10% - 50%己烷：乙酸乙酯 3 CV，接著 50%乙酸乙酯 5 CV)。獲得成為黃色泡泡沫的目標化合物 161 (0.23 克，74%產率)。合成法於圖 59 中例證。

實施例 69

化合物 162 之合成：

將化合物 161 (0.18 克，0.20 毫莫耳)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中，溶解在 7.0 毫升無水 THF 中且在氬氛圍下放在冰浴上。將混合物攪拌 10 分鐘，使其到達 0℃，且加入 0.28 毫升乙酸。經由注射器經 1 分鐘逐滴加入 TBAF (在 THF 中的 1M，0.47 毫升，0.47 毫莫耳)。將反應混合物在 0℃下攪拌 0.5 小時及接著在室溫下攪拌 1 小時。TLC (己烷：乙酸乙酯/1:1) 仍顯示出起始材料。經由注射器經 1 分鐘逐滴加入額外的 TBAF (在 THF 中的 1M，0.47 毫升，0.47 毫莫耳)且將反應混合物室溫下攪拌 1 小時。接下來將混合物以 2 毫升甲醇淬滅且在室溫

下攪拌 10 分鐘。以旋轉蒸發移除溶劑且將粗製產物以矽膠管柱層析術純化(管柱：10 克，己烷：乙酸乙酯/1:1 至 100%經 2 CV，接著 100%乙酸乙酯經 20 CV)，得到成為白色泡沫的化合物 162 (96 毫克，62%)。合成法於圖 59 中例證。

實施例 70

化合物 163 之合成：

在化合物 162 參考使用標準的三磷酸合成方法進行磷酸化之後，獲得化合物 163；除了在去保護步驟中使用 AMA 或甲醇氨代替氫氧化銨以外。其根據下文的標準程序進一步轉化成經染料標識之產物 166。自化合物 165 獲得 97%產率之化合物 166。HRMS-ES⁻經計算為 $C_{67}H_{96}N_9O_{27}P_3S_6$ (M-H) 1743.395，經實測為 1743.390。合成法於圖 59 中例證。

實施例 71

化合物 169 之合成：

將化合物 167 (3.120 克，5.66 毫莫耳)、30.0 毫升無水 CH_2Cl_2、3-Å 分子篩(5.0 克)及環己烯(0.70 毫升，6.9 毫莫耳)裝入 100 毫升圓底燒瓶中。將所得混合物在室溫下及在氮氛圍下攪拌 10 分鐘。接著將反應燒瓶放在冰浴上。將 SO_2Cl_2 (8.5 毫升，在 CH_2Cl_2 中的 1M，1.5 當量)經由注射器緩慢地加入其中且在 0℃下攪拌 1 小時。接下

來加入額外的 4.0 毫升 1M SO_2Cl_2 且攪拌 40 分鐘，以確保完全轉化成化合物 168。在真空下移除揮發物且保持溫度接近於 10℃。將所得固體再懸浮於 20 毫升無水 DMF 且保持在氮氛圍下。

在單獨的燒瓶中，將(2,4,6-三甲氧基苯基)甲硫醇(3.028 克，14.15 毫莫耳)在氮氛圍下溶解在無水 DMF (40 毫升)中且以 NaH (566 毫克，在油中的 60%，14.15 mM)處理，產生灰色漿液。將化合物 168 溶液立即加入其中且在室溫下及在氮氛圍下攪拌 2.5 小時。接著將反應混合物通過矽藻土®-S (20 克)以乙酸乙酯(200 毫升)過濾。接著將乙酸乙酯溶液以蒸餾水(3 x 200 毫升)清洗且經 Na_2SO_4 乾燥，以旋轉蒸發濃縮且以快速層析術在 120 克 RediSepRfGold 上純化，梯度：己烷：乙酸乙酯(7:3 至 3:7)。獲得成為白色固體的目標化合物(169)(1.43 克，35.5%產率，R_f：0.5，己烷：乙酸乙酯/1:1)。^{1}H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.98 (m, 1H), 6.09 (m, 1H), 6.00 (m, 2H), 4.67-4.51 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.22 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 3.80-3-60 (m, 11H), 2.31 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 0.80 (m, 9H)及 0.01 (m, 6H) ppm。合成法於圖 61 中例證。

實施例 72

化合物 170 之合成：

將化合物 169 (1.43 克，1.99 毫莫耳)在高真空下以 P_2O_5 經 12 小時乾燥且在配備有磁攪拌棒的燒瓶中及在氮

氣來源下溶解於無水 CH_2Cl_2 (25 毫升)中。將二甲基二硫(0.89 毫升，9.88 毫莫耳)加入其中且將反應燒瓶在冰浴上攪拌。接著加入四氟硼酸二甲基(甲硫基)銕(DMTSF，430 毫克，2.19 毫莫耳)且在 0℃下攪拌 1.0 小時。將反應混合物轉移至 500 毫升分液漏斗，以 100 毫升 50 mM $NaHCO_3$ 水溶液淬滅且以 CH_2Cl_2 (2X 150 毫升)萃取。將有機部分經 Na_2SO_4 乾燥且以旋轉蒸發濃縮。將粗製產物在矽膠管柱上使用己烷-乙酸乙酯(8:2 至 3:7)梯度純化(80 克 RediSepRf gold)，得到 0.622 克化合物 170 (54%產率，R_F = 0.6，己烷：乙酸乙酯/1:1)。^1H NMR ($CDCl_3$)：δ_H 7.99 (brs, 1H, NH), 7.98 (s, 1H), 6.12 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.19 (m, 2H), 4.06 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.60 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.88 (m, 1H), 0.78 (m, 9H)及 0.10 (m, 6H) ppm。合成法於圖 61 中例證。

實施例 73

化合物 171 之合成：

將化合物 170 (0.623 克，1.06 毫莫耳，以 P_2O_5 經 12 小時真空乾燥)及無水 THF (20.0 毫升)裝入配備有磁攪拌棒的 100 毫升圓底燒瓶中且在氮氛圍下放在冰浴上。經由注射器緩慢地加入 TBAF (1.27 毫升，在 THF 中的 1M 溶液，1.27 毫莫耳)。將反應混合物在 0℃下攪拌 1.5 小時，加入額外的 0.9 毫升在 THF 中的 1M TBAF 溶液且在 0℃

下總共攪拌 4 小時。接著將反應混合物轉移至分液漏斗且以 0.5M $NaHCO_3$ 溶液(50 毫升)淬滅。將所得混合物以乙酸乙酯(2 X100 毫升)萃取且經 Na_2SO_4 乾燥。在 80 克 RediSepRf 管柱上使用梯度 7:3 至 3:7 之乙烷中的乙酸乙酯進行矽膠管柱層析術之後，獲得成為白色粉末的產物 171，63%產率(311 毫克)。^1H NMR (甲醇-d_4)：δ_H 8.16 (s, 1H), 6.06 (m, 1H), 4.79 (m, 2H), 4.69 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 3.63 (m, 2H), 2.36 (m, 3H), 2.32 (m, 1H)及 2.08 (m, 1H) ppm，LRMS-ES-：M-H 經觀測為 m/z 468.0 Da。合成法於圖 61 中例證。

實施例 74

化合物 172 之合成：

在化合物 171 經由使用標準的三磷酸合成方法進行磷酸化之後，獲得 58%產率之產物 172。LRMS 經計算為 $C_{14}H_{21}N_3O_{14}P_3S_2^-$ (M-H)，611.97，經實測為 612.15。化合物 171 係根據參考標準方法章節中所述之程序進一步精製成經染料標識之產物(175)(圖 62)。以兩個步驟獲得 74%產率之化合物 174 (HRMS-ES$^-$經計算為 $C_{32}H_{55}N_5O_{21}P_3S_4^-$ (M-H) 1066.15，經實測為 1066.42。獲得 62%產率之化合物 175 (HRMS-ES$^-$經計算為 $C_{59}H_{80}N_7O_{25}P_3S_4^-$ (M-H)，1507.330，經實測為 1507.325。

實施例 75

用於三磷酸合成之標準方法：

將在高真空下經 P_2O_5 預乾燥之核苷(160 微莫耳)及質子海綿(1.5 當量)在 25 毫升梨形燒瓶中在 N_2 氛圍下溶解於磷酸三甲酯(0.8 毫升)中且攪拌 20 分鐘，直到所有的固體完全溶解為止。接著將燒瓶放在冰水浴上，使反應到達(-5 至 0℃)。接著經由注射器加入一份 $POCl_3$ (1.5 當量)且將反應攪拌 1 小時。

在 15 毫升錐形管中製備焦磷酸正丁基銨(0.36 克)、n-Bu_3N (0.36 毫升)與無水 DMF (1.3 毫升)的混合物，產生濃漿液。一旦完全溶解時，立即將其快速加入劇烈攪拌的混合物中且在室溫下攪拌 15 分鐘。

接著將反應混合物倒入在 250 毫升圓底燒瓶中的 100 毫升 0.1 M TEAB 緩衝液中且在室溫下攪拌 3 小時。接著在真空中濃縮至 25 毫升且在室溫下以 25 毫升氫氧化銨(28-30% NH_3 含量)處理 8 小時。在減壓下移除大部分的揮發物之後，將反應粗製物再懸浮於 0.1M TEAB 緩衝液(30 毫升)中且以 C18 製備性- HPLC 純化(30x250mm，C18 Sunfire 管柱，方法：0 至 2 分鐘 100%A，接著 50%B 經 70 分鐘，流速 25 毫升/分鐘；A = 50 mM TEAB，B = ACN)。將目標份凍乾且在溶解於 HPLC 等級水(20 毫升)之後合併。將此半純度產物在 PL-SAX Prep 管柱上以離子交換 HPLC 進一步純化(方法：0 至 5 分鐘 100%A，接著線性梯度至 70%B 經 70 分鐘，其中 A = 在水中的 15%乙腈，B = 在 15%乙腈中的 0.85 M TEAB 緩衝液)。最後的

純化係如上述以 C18 Prep HPLC 進行。在凍乾之後，獲得 20–65%產率之核苷三磷酸。

實施例 76

使用 DMTSF 轉化 3'-OCH_2S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP 成為 3'-(OCH_2SSME)-dNTP 之標準方法：

將 3'-OCH_2S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP (3.80 毫升在 HPLC 等級水中的 5.25 mM 溶液，20 微莫耳)及 pH=4.65 之乙酸鹽緩衝液(5.20 毫升)裝入 50 毫升錐形管中且與 9.0 毫升 DMTSF (在 pH=4.65 之乙酸鹽緩衝液中的 80 mM 溶液)快速合併。將所得混合物在室溫下搖動 2 小時且將反應以 2.0 毫升 $NaHCO_3$ 飽和溶液淬滅，且立刻以製備性 HPLC 在 30X250mm C18 Sunfire 管柱上純化，方法：0 至 2.0 分鐘 100% A，接著線性梯度至 50%B 經 70 分鐘，流速：25 毫升/分鐘，A = 50 mM TEAB，B = 乙腈。將目標份乾燥且在溶解於 HPLC 等級水之後合併，得到取決於核苷酸的 50-75% 產率之 3'-(OCH_2SSMe)-dNTP。3'-OCH_2S-(2,4,6-三甲氧基苯基)甲烷-dNTP 的結構實例於圖 63 中例證。

實施例 77

用於 NHS 活化之連結子共軛之標準方法：

將溶解於 HPLC 等級水(2 毫升)中的 MeSSdNTP-PA (10 微莫耳)以新鮮製備之 0.5 M Na_2HPO_4 水溶液(1 毫升)

稀釋。在錐形試管中，將 NHS 活化之連結子(NHS-A-Fmoc，114，35 毫克，2.5 當量)溶解在無水 DMF (2.0 毫升)中。接著立即加入 MeSSdNTP-PA/ Na_2HPO_4 溶液中且在室溫下攪拌 8 小時。

接著將反應以 0.1M TEAB 緩衝液(2.0 毫升)稀釋且以哌啶(0.6 毫升)處理。將混合物在室溫下攪拌 1 小時，再以 0.1M TEAB (10 毫升)稀釋且以 prep HPLC 在 30X250mm C18 Sunfire 管柱上快速純化，方法：0 至 2.0 分鐘 100%A，接著以線性梯度至 50%B 經 70 分鐘，流速：25 毫升/分鐘，A = 50 mM TEAB，B = 乙腈。將目標份凍乾且在溶解於 HPLC 等級水之後合併，得到 45-75%產率之 MeSSdNTP-A-NH_2。

實施例 78

以 NHS 染料標識之標準方法：

將在 2.0 毫升 HPLC 等級水中的 MeSSdNTP-A-NH_2 (4.55 微莫耳)在 15 毫升錐形管中以 Na_2HPO_4 (0.8 毫升 0.5M 水溶液)稀釋且與在 1.4 毫升無水 DMF 中的 NHS 活化之染料(2.5 當量)合併。將反應混合物在室溫下攪拌 8 小時，以 0.1M TEAB 緩衝液(40 毫升)稀釋且以 prep-HPLC 在 30X250 mm C18 Sunfire 管柱上純化，方法：0 至 5 分鐘 100%A，接著以線性梯度至 50%B 經 70 分鐘，流速：25 毫升/分鐘)。將目標份凍乾且在溶解於 HPLC 等級水之後合併，得到 50-80%產率的經標識之產物。

實施例 79

可裂解的連結子及標記物附著至核鹼基

用於附著可裂解的連結子之較佳的部分之一為以炔丙基為底質或以烯丙基為底質。亦設想附著可裂解的連結子及染料之其他方式。特別在染料裂解後造成少許或沒有殘留連結子的鹼基部分附著特別佳。在裂解後造成不帶有電荷的殘留連結子的鹼基部分附著亦較佳。這些特性對確保核苷酸在標識物/染料裂解後藉由酶以有效的方式併入生長的核酸鏈中具有重要性。由本發明設想的一個特別的實施態樣包含使用經羥甲基修飾之鹼基部分附著可裂解的染料。此等化合物的實例顯示於圖 68 中。圖 69 顯示在染料及 3'-O 保護基裂解後之羥甲基衍生物的結構。

實施例 80

可裂解的連結子及 3'-O 保護基之裂解

可使用各種裂解劑裂解本發明之連結子及保護基。例如，可使用各種攜有硫醇之化合物，如在("Thiol-Disulfide Interchange", Singh, R.和 Whitesides, G.M., Sulfur-Containing Functional Groups ; Supplement S, Patai, S., Eds., J. Wiley and Sons, Ltd., 1993. p633-658)中所述[15]。特別可使用具有降低的硫醇基團 pKa 之化合物以達成脂肪及有效的裂解產量，例如二硫丁胺、DTBA (Lukesh 等人之 J. Am. Chem. Soc., 2012, 134 (9), pp 4057–4059 [16])。可用於進行本發明之裂解的攜有硫醇之

化合物的實例顯示於圖 70 中。

適合於裂解本發明之二硫終止基團及連結子的另一類別的化合物為膦(Harpp 等人之 J. Am. Chem. Soc. 1968 90 (15) 4181-4182 [12]，Burns 等人之 J. Org. Chem. 1991, 56, 2648-2650 [13]，Getz 等人之 Analytical Biochemistry 273, 73–80 (1999) [14])。有用於裂解本發明的以二硫為底質之保護基及連結子之膦的實例包括：三苯基膦、三丁基膦、三羥甲基膦(THMP)、三羥丙基膦(THPP)、三乙氧羰基膦(TCEP)。在特定的例子中，可能希望能夠選擇性地裂解連結子或 3'-保護基。這可藉由設計保護基及連結子以及選擇裂解試劑來達成。例如，可出於此目的而使用攜有 3'-疊氮甲醚保護基及二硫化物連結子之核苷酸的組合。在此例子中，二硫化物橋的選擇性裂解可藉由使用以硫醇為底質之裂解試劑來實現及 3'-疊氮甲醚保護基的移除可藉由使用膦(諸如 TCEP)來達成。此等程序的實例於圖 71、圖 72 和圖 73 中例證。圖 71 顯示發生化學反應的流程及所形成的化合物結構；圖 72 顯示在各階段收集的 HPLC 層析圖；及圖 73 顯示自各峰提取之吸收光譜。步驟 A)經標識之 3'-O-經保護之核苷酸顯示一個峰(1)及在核苷酸(280 nm；應注意炔丙基化合物的最大峰向 280-290 nm 移動)及染料(575 nm)二者的吸收。步驟 B)以 DTT 處理產生具有染料吸收峰(575 nm)與遷移較慢(更疏水性)的峰 2 及具有(278 nm)吸收與由於更親水性特徵而遷移更快的峰 3。步驟 C)以 TCEP 的額外處理產生在 278 具有最大吸收

及在甚至更短的滯留時間上沒有染料的峰 4，與 3'-OH 保護基的失去一致。經裂解之染料分裂成額外的峰(5、6)，但是兩個峰具有相同的吸收。

裂解的另一實例顯示於圖 74 和圖 75 中。圖 74 顯示使用在 3'端攜有以二硫為底質之保護基及攜有以二硫為底質之連結子的核苷酸之裂解反應流程。如此圖顯示裂解反應可以一個步驟或 2 步驟方法進行。圖 75 顯示使用下列的各種裂解劑進行之裂解實驗的結果：二硫琥珀酸、L-半胱胺酸、DTT 和半胱胺。圖 75(A)顯示以起始材料及在以裂解劑二硫琥珀酸、L-半胱胺酸、DTT 和半胱胺培育後的反應混合物所產生的 RP-HPLC 層析圖。圖 75(B)顯示反應混合物的經鑑定之組成物，表明在 L-半胱胺酸、DTT 和半胱胺的例子中使連結子及 3'-保護基二者完全裂解，及在二硫琥珀酸的例子中選擇性裂解 3'-O-保護基。這表明選擇性可藉由選擇連結子、保護基的結構及裂解劑的本性而達成(亦即以 SH 基團不同的 pKa 及立體阻礙程度)。除了該等以外，可使用各種適合的裂解劑，諸如雙(2-巯乙基)碸(BMS)和 N,N'-二甲基-N,N'-雙(巯乙醯基)肼(DMH)(Singh 等人之 Bioorg. Chem., 22, 109-115 (1994) [17]。反應可以內含的硒醇進一步催化(Singh 等人之 Anal Biochem. 1995 Nov 20;232(1):86-91 [18])。亦可出於此目的而使用硼氫化物(諸如硼氫化鈉)(Stahl 等人之 Anal. Chem., 1957, 29 (1), pp 154–155 [19])以及抗壞血酸(Nardai 等人之 *J. Biol. Chem. 276,* 8825-8828 (2001)

[20])。另外，亦熟知用於裂解二硫化物鍵之酶方法，諸如二硫化物和硫還原酶，且可由本發明化合物使用(Holmgren 等人之 Methods in Enzymology, Volume 252, 1995, Pages 199–208 [21])。

實施例 81

清除劑

根據所使用的裂解劑，熟習本技術領域者必須選擇在完成裂解反應後移除過量裂解劑之清除劑。例如，可使用能夠與游離 SH 基團反應的清除劑用於攜有硫醇之裂解劑。例如，可使用烷基化劑，諸如碘乙醯胺或順丁烯二醯亞胺衍生物(美國專利第 8,623,598 號[47]，併入本文以供參考)。熟習本技術領域者可使用攜有酮之化合物用於硼氫化物，例如戊酮酸或類似的化合物。最後，亦可以使用氧化試劑，使過量裂解劑氧化成無反應性種類，例如過碘酸鹽(Molecules 2007, 12(3), 694-702 [48])。

實施例 82

模式化合成

本發明的經標識之核苷酸需要許多合成步驟且包含連結各種染料至不同的鹼。希望能夠以模式化方式而不以逐步法進行連結子及染料附著。模式化方法包含預建造在一端具有保護基的連結子部分及在另一端的活化基團。接著可使用此等預建造之連結子與炔丙胺核苷酸偶合、使遮蔽

之胺基去保護及接著偶合活化基團。這與逐步合成法相比而具有更少的步驟及更高的產率之優點。例如，在圖 13 中的化合物 32 為包含具有活化之反應性基團(二琥珀醯亞胺基碳酸酯)及經遮蔽/保護之胺(Fmoc)的可裂解的官能度之預活化連結子的實例。在與炔丙胺核苷酸上的游離胺偶合之後，保護基可藉由例如以鹼處理(水性氨、哌啶)而合宜地移除且可與活化之(NHS)染料分子偶合。

實施例 83

測試本發明之連結子以測量彼等的疏水性。化合物之 logP 值為在正辛醇與水之間的化合物分配係數之對數 $\log(c_{辛醇}/c_{水})$，該值為化合物親水性(或欠缺親水性)之完整確立的量度[49]。低的親水性及因此高的 logP 值引起差的吸收或穿透。在此例子中，logP 值係使用預測軟體計算，下表顯示結果，表明連結子(諸如在圖 25 中的連結子)為疏水性連結子，而一些在市場上使用的連結子為親水性。

		LogP			
連接子	分子式	Osiris*	ChemDraw	Molinsp. **	MarvinSketch
Legacy	C8H16N2O2S2	0.60	0.49	-0.14	-0.76
New	C22H43N3O8S2	2.57	2.09	1.30	0.71
ILMN PEG11	C43H74N6O18	-1.80	-1.80	-2.37	-1.30
ILMN PEG23	C63H114N6O28	-2.74	-3.60	-4.34	-1.77

雖然本發明已參考該等較佳的實施態樣予以說明，但是其他的實施態樣可達成相同的結果。本發明之變化及修改為那些熟習本技術領域者所明白且意欲使所有此等修改物及同等物涵蓋於所附之申請專利範圍內。將上文引述之

所有申請案、專利與公告及對應之申請案的完整揭示內容特此併入本文以供參考。

參考：

1. Metzker, M. L. (2010) "Sequencing Technologies - the Next Generation," Nat. Rev. Genet. 11(1), 31-46.

2. Fuller, C. W.等人之 (2009) "The Challenges of Sequencing by Synthesis," Nat. Biotechnol. 27(11), 1013-1023.

3. Hiatt, A. C.和 Rose, F. "Enzyme Catalyzed Template-Independent Creation of Phosphodiester Bonds Using Protected Nucleotides," United States Patent 5,990,300, Application 08/300,484, filed 9/2/1994. (發表於 11/23/1999).

4. Buzby, P. R. "Nucleotide Analogs," United States Patent Application Publication Number US 2007-0117104 A1, Application 11/295,406, filed 12/5/2005. (published 5/24/2007).

5. Chen, F.等人之 (2013) "The History and Advances of Reversible Terminators Used in New Generations of Sequencing Technology," Genomics Proteomics Bioinformatics 11(1), 34-40.

6. Tabor, S.和 Richardson, C. C. (1995) "A Single Residue in DNA Polymerases of the Escherichia coli DNA Polymerase I Family Is Critical for Distinguishing between Deoxy- and

Dideoxyribonucleotides," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92(14), 6339-6343.

7. Perler, F. B.和 Southworth, M. W. "Thermostable Dna Polymerase from 9on-7 and and Method for Producing the Same," United States Patent 5,756,334, Application 08/271,364, filed 7/6/1994. (發表於 5/26/1998).

8. Southworth, M. W.等人之(1996) "Cloning of Thermostable DNA Polymerases from Hyperthermophilic Marine Archaea with Emphasis on Thermococcus Sp. 9 Degrees N-7 and Mutations Affecting 3'-5' Exonuclease Activity," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93(11), 5281-5285.

9. Evans, S. J.等人之(2000) "Improving Dideoxynucleotide-Triphosphate Utilisation by the Hyper-Thermophilic DNA Polymerase from the Archaeon Pyrococcus Furiosus," Nucleic Acids Res. 28(5), 1059-1066.

10. Arezi, B.等人之(2002) "Efficient and High Fidelity Incorporation of Dye-Terminators by a Novel Archaeal DNA Polymerase Mutant," J. Mol. Biol. 322(4), 719-729.

11. Smith, G. P.等人之"Modified Polymerases for Improved Incorporation of Nucleotide Analogues," WIPO PCT Patent Publication Number WO/2005/024010, Application PCT/GB2004/003891, filed 9/10/2004. (published

3/17/2005).

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

13. Burns, J. A.等人之(1991) "Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine," J. Org. Chem. 56(8), 2648-2650.

14. Getz, E. B.等人之(1999) "A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry," Anal. Biochem. 273(1), 73-80.

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

16. Lukesh, J. C.等人之(2012) "A Potent, Versatile Disulfide-Reducing Agent from Aspartic Acid," J. Am. Chem. Soc. 134(9), 4057-4059.

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

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

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

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

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

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

23. Ju, J.等人之"Four-Color Dna Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators," United States Patent 7,883,869, Application 12/312,903, filed 7/9/2009. (發表於 2/8/2011).

24. Ju, J.等人之"Massive Parallel Method for Decoding DNA and RNA," United States Patent 8,088,575, Application 12/804,284, filed 7/19/2010. (發表於 1/3/2012).

25. Ju, J.等人之"Chemically Cleavable 3'-O-Allyl-Dntp-

Allyl-Fluorophore Fluorescent Nucleotide Analogues and Related Methods," United States Patent 8,796,432, Application 12/084,457, filed 4/30/2008. (發表於 8/5/2014).

26. Balasubramanian, S. "Polynucleotide Sequencing," United States Patent 6,833,246, Application 10/113,221, filed 3/29/2002. (發表於 12/21/2004).

27. Balasubramanian, S.等人之"Labelled Nucleotides," United States Patent 7,785,796, Application 12/460,741, filed 7/23/2009. (發表於 8/31/2010).

28. Milton, J.等人之"Labelled Nucleotides," United States Patent 7,414,116, Application 10/525,399, filed 2/23/2005. (發表於 8/19/2008).

29. Metzker, M. L.等人之(1994) "Termination of DNA Synthesis by Novel 3'-Modified-Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphates," Nucleic Acids Res. 22(20), 4259-4267.

30. Ju, J.等人之(2006) "Four-Color DNA Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103(52), 19635-19640.

31. Ruparel, H.等人之(2005) "Design and Synthesis of a 3'-O-Allyl Photocleavable Fluorescent Nucleotide as a Reversible Terminator for DNA Sequencing by

Synthesis," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102(17), 5932-5937.

32. Bergmann, F.等人之"Compound for Sequencing by Synthesis," United States Patent Application Publication Number US 2015-0140561 A1, Application 14/542,980, filed 11/17/2014. (published 5/21/2015).

33. Kwiatkowski, M. "Compounds for Protecting Hydroxyls and Methods for Their Use," United States Patent Application Publication Number US 2002-0015961 A1, Application 09/952,719, filed 9/12/2001. (published 2/7/2002).

34. Gardner, A. F.等人之(2012) "Rapid Incorporation Kinetics and Improved Fidelity of a Novel Class of 3'-Oh Unblocked Reversible Terminators," Nucleic Acids Res. 40(15), 7404-7415.

35. Litosh, V. A.等人之(2011) "Improved Nucleotide Selectivity and Termination of 3'-Oh Unblocked Reversible Terminators by Molecular Tuning of 2-Nitrobenzyl Alkylated Homedu Triphosphates," Nucleic Acids Res. 39(6), e39-e39.

36. Bowers, J.等人之(2009) "Virtual Terminator Nucleotides for Next Generation DNA Sequencing," Nat. Meth. 6(8), 593-595.

37. Zhao, C.等人之"Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing," United States Patent 8,399,188, Application 12/442,925, filed 12/23/2009. (發表於 3/19/2013).

38. Zon, G. "Reversible Di-Nucleotide Terminator Sequencing," United States Patent 8,017,338, Application 12/275,161, filed 11/20/2008. (發表於 9/13/2011).

39. Wang, Z. 等人之 (2010) "Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization by MS," Rapid Commun. Mass Spectrom. 24(3), 267-275.

40. Jung, A. 等人之 (2002) "7-Deaza-2`-Deoxyguanosine Allows PCR and Sequencing Reactions from CpG Islands," Mol. Pathol. 55(1), 55-57.

41. Kutyavin, I. V. (2008) "Use of Base-Modified Duplex-Stabilizing Deoxynucleoside 5'-Triphosphates to Enhance the Hybridization Properties of Primers and Probes in Detection Polymerase Chain Reaction," Biochemistry 47(51), 13666-13673.

42. Semenyuk, A.等人之(2006) "Synthesis of RNA Using 2'-O-Dtm Protection," J. Am. Chem. Soc. 128(38), 12356-12357.

43. Semenyuk, A.和 Kwiatkowski, M. (2007) "A Base-Stable Dithiomethyl Linker for Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides," Tetrahedron Lett. 48(3), 469-472.

44. Semenyuk, A. (2006) "Novel Methods for Synthesis of High Quality Oligonucleotides," Uppsala University.

45. Bellamy, A. J.等人之(2007) "The Use of Trifluoroacetyl as an N- and O-Protecting Group During the Synthesis of Energetic Compounds Containing Nitramine and/or Nitrate Ester Groups," Propellants Explos. Pyrotech. 32(1), 20-31.

46. Gordon, S.和 Olejnik, J. "Methods and Compositions for Incorporating Nucleotides," United States Patent Application Publication Number US 2013-0137091 A1, Application 13/305,415, filed 11/28/2011. (published 5/30/2013).

47. Olejnik, J.等人之"Methods and Compositions for Inhibiting Undesired Cleaving of Labels," United States Patent 8,623,598, Application 12/405,866, filed 3/17/2009. (發表於 1/7/2014).

48. Montazerozohori, M.等人之(2007) "Fast and Highly Efficient Solid State Oxidation of Thiols," Molecules 12(3), 694.

49. Clark, D. E. (1999) "Rapid Calculation of Polar Molecular Surface Area and Its Application to the Prediction of Transport Phenomena. 2. Prediction of Blood-Brain Barrier Penetration," J. Pharm. Sci. 88(8), 815-821.

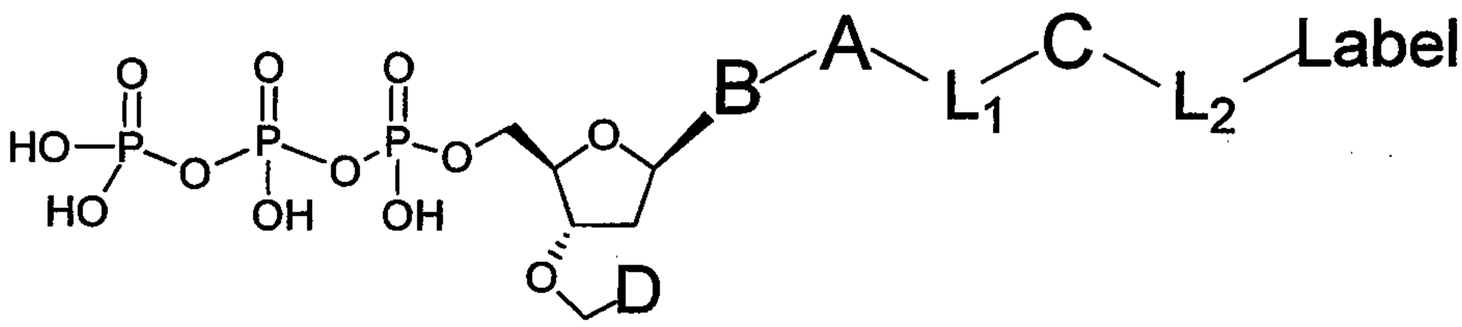
第 108112168 號　　民國 109 年 3 月 6 日修正

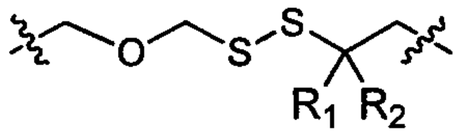
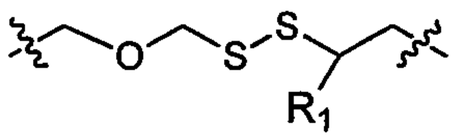
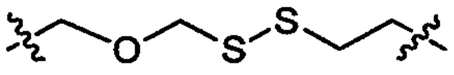
申請專利範圍

1. 一種檢測在 DNA 序列中的經標識之核苷酸之方法，其包含步驟：

a) 提供核酸模板及能與該模板雜交之引子以形成引子/模板雜交複合物，及包含含硫醇化合物之裂解劑；

b) 添加 DNA 聚合酶及第一去氧核苷三磷酸至該引子及模板以產生反應混合物，該第一去氧核苷三磷酸具有下列結構：



其中 D 係選自由下列所組成之群組：二硫化烷基和經二硫化物取代之烷基；B 為核鹼基；A 為選自由下列所組成之群組的附著基團：炔丙基、羥甲基、環外胺、炔丙胺和炔丙基羥基；C 為選自由下列所組成之群組的可裂解的部位核心：  、  和  ，其中 R_1 和 R_2 係獨立地選自烷基；L_1 和 L_2 為連接基團，其中 L_1 係選自由下列所組成之群組：$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO-O(CH_2)_x-$、$-CONH-(OCH_2CH_2O)_x-$、$-CO-O(CH_2CH_2O)_x-$ 和 $-CO(CH_2)_x-$，其中 x 為 0-10，且其中 L_2 係選自由下列所組成之群組：$-NH-$、$-(CH_2)_x-NH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xNH-$、$-CH(Me)(CH_2)_xNH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xCO-$、$-CH(Me)(CH_2)_xCO-$、$-(CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$、$-$

$(CH_2)_xCONH(CH_2CH_2O)_y(CH_2)_zNH-$ 和 $-CONH(CH_2)_x-$、$-CO(CH_2)_x-$、其中 x、y 和 z 各自獨立地選自 0-10；及 Label 為選自由下列所組成之群組的標識物：螢光團染料、能量轉移染料、質量標籤(mass-tag)、生物素和半抗原；

c) 使該反應混合物接受能使 DNA 聚合酶催化引子延伸反應的條件，以產生經改質之引子/模板雜交複合物，其中併入該第一去氧核苷三磷酸；

d) 檢測在該經改質之引子/模板雜交複合物中的該去氧核苷三磷酸之該第一可檢測標識物；及

e) 在條件下導入該裂解劑以自該經改質之引子/模板雜交複合物移除該可裂解的保護基及該可檢測標識物。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該方法另外包含在重複步驟 b)期間添加第二去氧核苷三磷酸，其中該第二去氧核苷三磷酸包含第二可檢測標識物。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該含硫醇化合物包含以二硫為底質之基團。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該含硫醇化合物包含選自由下列所組成之群組的化合物：半胱胺酸、半胱胺、二硫琥珀酸和二硫蘇糖醇。

5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該含硫醇化合物包含選自由下列所組成之群組的化合物：2,3-二巰基-1-丙烷磺酸鈉鹽、二硫丁胺、內消旋-2,5-二巰基-

N,N,N',N'-四甲基己二醯胺、2-巯基乙烷磺酸酯和 N,N'-二甲基,N,N'-雙(巯基乙醯基)-肼。

6. 根據申請專利範圍第 2 項之方法，其中該第二去氧核苷三磷酸的該核鹼基不同於該第一去氧核苷三磷酸的該核鹼基。

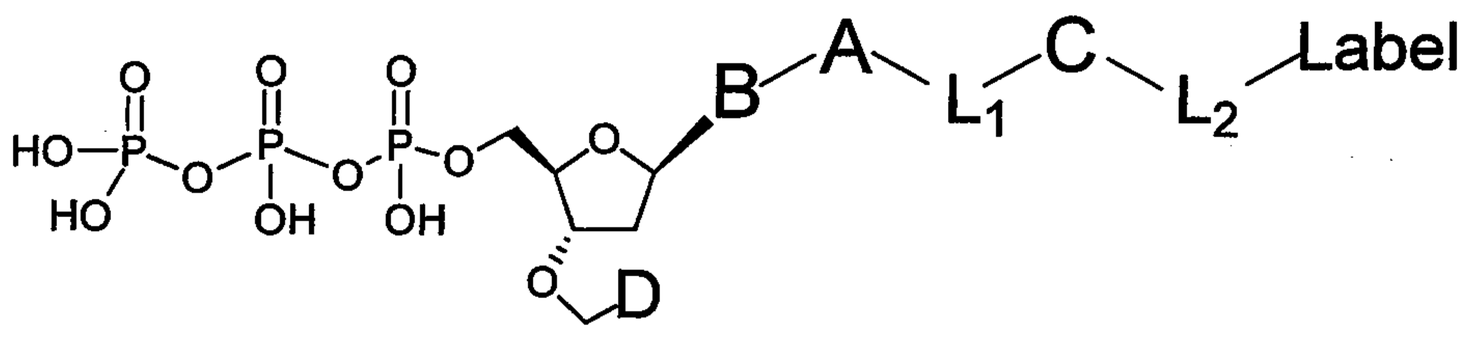
7. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中在步驟 b)中使用至少 4 個經不同標識於 3'-O 之經二硫甲烷封端之去氧核苷三磷酸化合物的混合物，該去氧核苷三磷酸化合物代表 A、G、C 和 T 或 U 之類似物。

8. 根據申請專利範圍第 7 項之方法，其中該檢測允許測定該併入之第一去氧核苷三磷酸的該核鹼基。

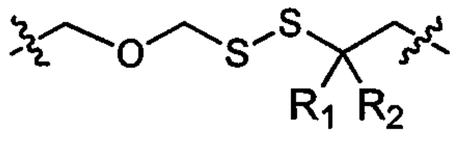
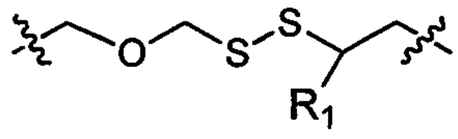
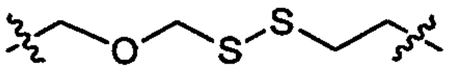
9. 一種檢測在 DNA 序列中的經標識之核苷酸之方法，其包含步驟：

a) 提供核酸模板及能與該模板雜交之引子以形成引子/模板雜交複合物，包含含硫醇化合物之裂解劑及裂解清除劑；

b) 添加 DNA 聚合酶及第一去氧核苷三磷酸至該引子及模板以產生反應混合物，該第一去氧核苷三磷酸具有下列結構：



其中 D 係選自由下列所組成之群組：二硫化烷基和經二硫化物取代之烷基；B 為核鹼基；A 為選自由下列所組成之

群組的附著基團：炔丙基、羥甲基、環外胺、炔丙胺和炔丙基羥基；C 為選自由下列所組成之群組的可裂解的部位核心：  、  和  ，其中 R_1 和 R_2 係獨立地選自烷基；L_1 和 L_2 為連接基團，其中 L_1 係選自由下列所組成之群組：$-CONH(CH_2)_x-$、$-CO-O(CH_2)_x-$、$-CONH-(OCH_2CH_2O)_x-$、$-CO-O(CH_2CH_2O)_x-$ 和 $-CO(CH_2)_x-$，其中 x 為 0-10，且其中 L_2 係選自由下列所組成之群組：$-NH-$、$-(CH_2)_x-NH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xNH-$、$-CH(Me)(CH_2)_xNH-$、$-C(Me)_2(CH_2)_xCO-$、$-CH(Me)(CH_2)_xCO-$、$-(CH_2)_xOCONH(CH_2)_yO(CH_2)_zNH-$、$-(CH_2)_xCONH(CH_2CH_2O)_y(CH_2)_zNH-$ 和 $-CONH(CH_2)_x-$、$-CO(CH_2)_x-$、其中 x、y 和 z 各自獨立地選自 0-10；及 Label 為選自由下列所組成之群組的標識物：螢光團染料、能量轉移染料、質量標籤(mass-tag)、生物素和半抗原；

c) 使該反應混合物接受能使 DNA 聚合酶催化引子延伸反應的條件，以產生經改質之引子/模板雜交複合物，其中併入該第一去氧核苷三磷酸；

d) 檢測在該經改質之引子/模板雜交複合物中的該去氧核苷三磷酸之該第一可檢測標識物；

e) 在條件下導入該裂解劑以自該經改質之引子/模板雜交複合物移除該可裂解的保護基及該可檢測標識物；及

f) 導入該裂解清除劑。

10. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該方法另外包含在重複步驟 b)期間添加第二去氧核苷三磷酸，其中該第二去氧核苷三磷酸包含第二可檢測標識物。

11. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該含硫醇化合物包含以二硫為底質之基團。

12. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該含硫醇化合物包含選自由下列所組成之群組的化合物：半胱胺酸、半胱胺、二硫琥珀酸和二硫蘇糖醇。

13. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該含硫醇化合物包含選自由下列所組成之群組的化合物：2,3-二巰基-1-丙烷磺酸鈉鹽、二硫丁胺、內消旋-2,5-二巰基-N,N,N',N'-四甲基己二醯胺、2-巰基乙烷磺酸酯和 N,N'-二甲基,N,N'-雙(巰基乙醯基)-肼。

14. 根據申請專利範圍第 10 項之方法，其中該第二去氧核苷三磷酸的該核鹼基不同於該第一去氧核苷三磷酸的該核鹼基。

15. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中在步驟 b)中使用至少 4 個經不同標識於 3'-O 之經二硫甲烷封端之去氧核苷三磷酸化合物的混合物，該去氧核苷三磷酸化合物代表 A、G、C 和 T 或 U 之類似物。

16. 根據申請專利範圍第 15 項之方法，其中該檢測允許測定該併入之第一去氧核苷三磷酸的該核鹼基。

17. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該方法另

外包含在重複步驟 b)期間添加第二去氧核苷三磷酸，其中該第二去氧核苷三磷酸包含經由第二可裂解的二硫甲醛連結子附著的第二可檢測標識物，其中該第二可檢測標識物不同於該第一可檢測標識物。

18. 根據申請專利範圍第 9 項之方法，其中該檢測允許測定該併入之第一去氧核苷三磷酸的該核鹼基。

19. 一種套組，其包含一或多種 DNA 定序試劑、描述根據申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項之方法的用法說明及包含含硫醇化合物之裂解劑，其中該一或多種 DNA 定序試劑係選自由包含下列之群組：聚合酶、引子、模板和核苷酸。

20. 根據申請專利範圍第 19 項之套組，其另外包含緩衝液。

21. 根據申請專利範圍第 19 項之套組，其另外包含裂解清除劑。

圖式

圖 1

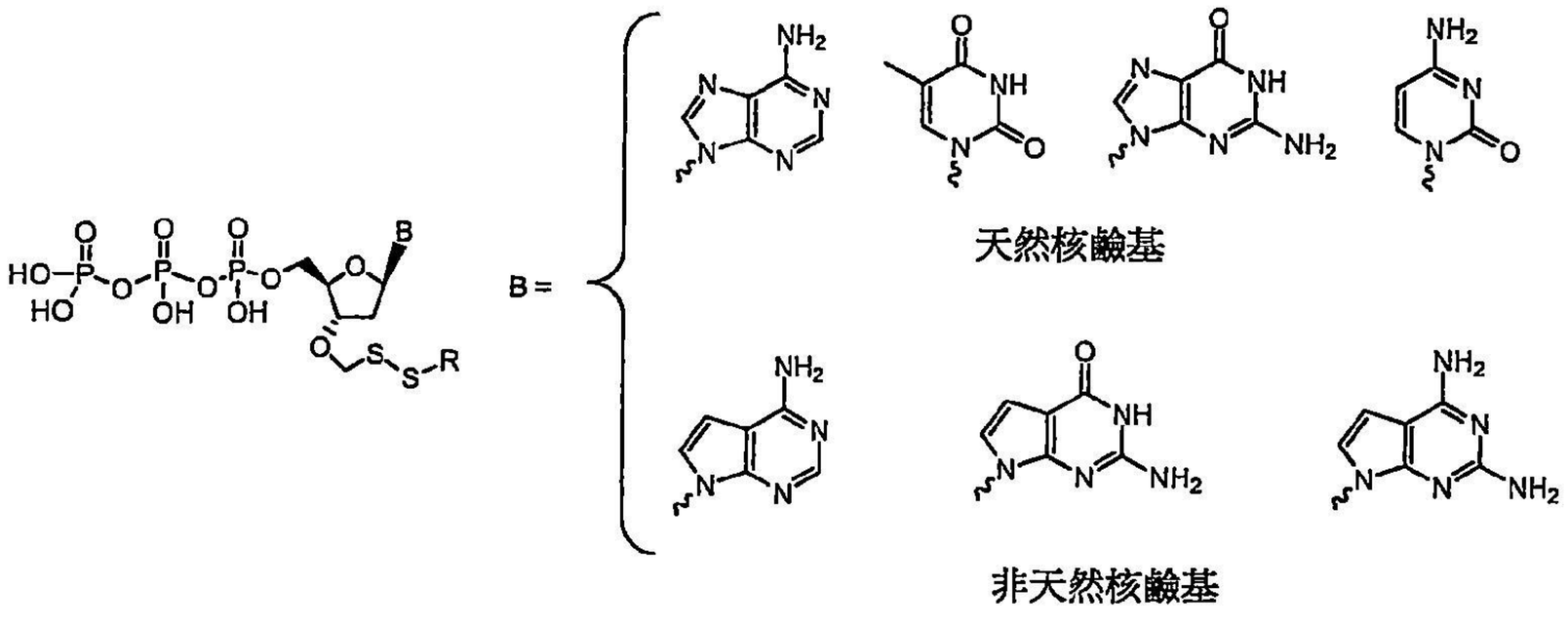


圖 2

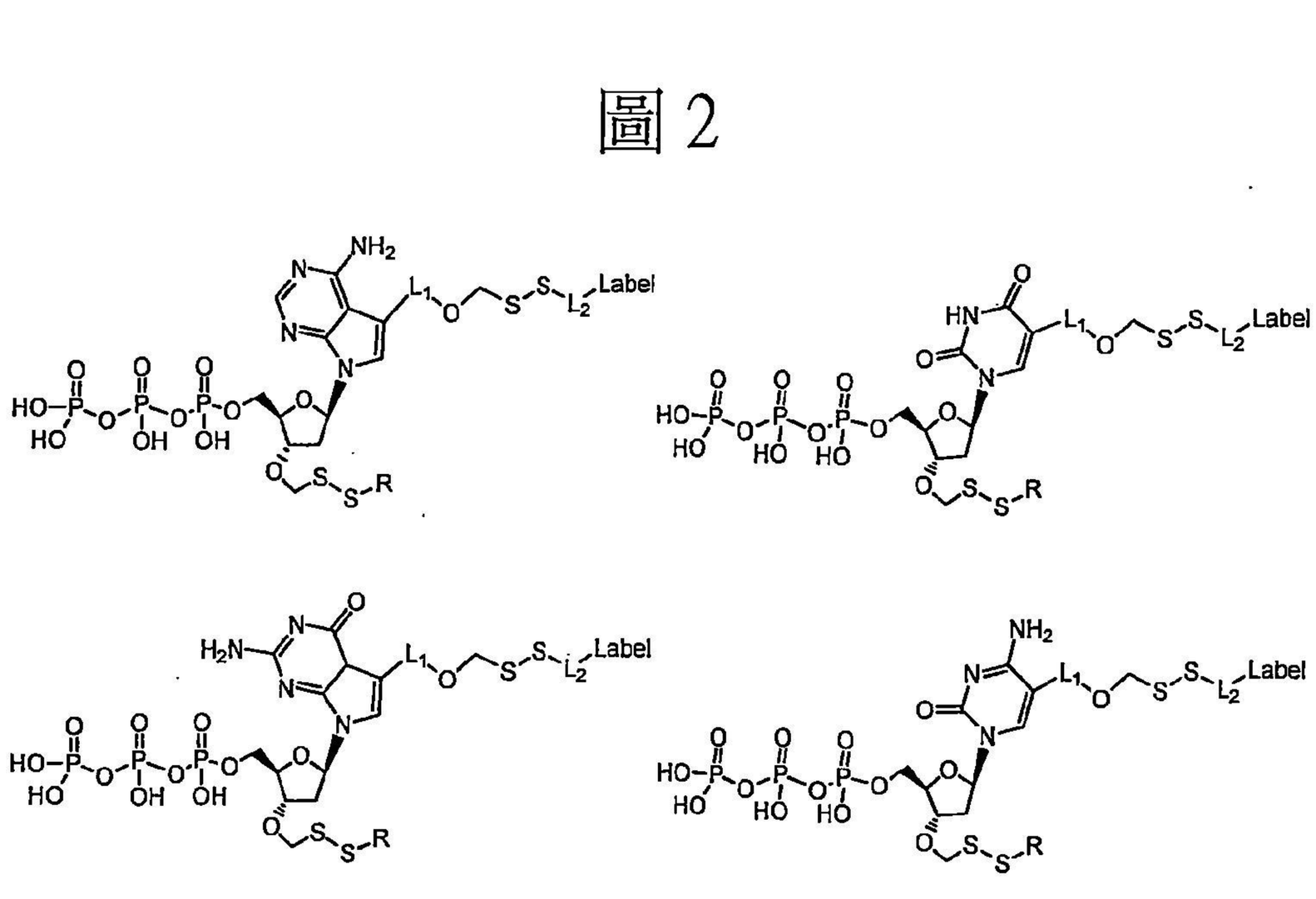


圖 3

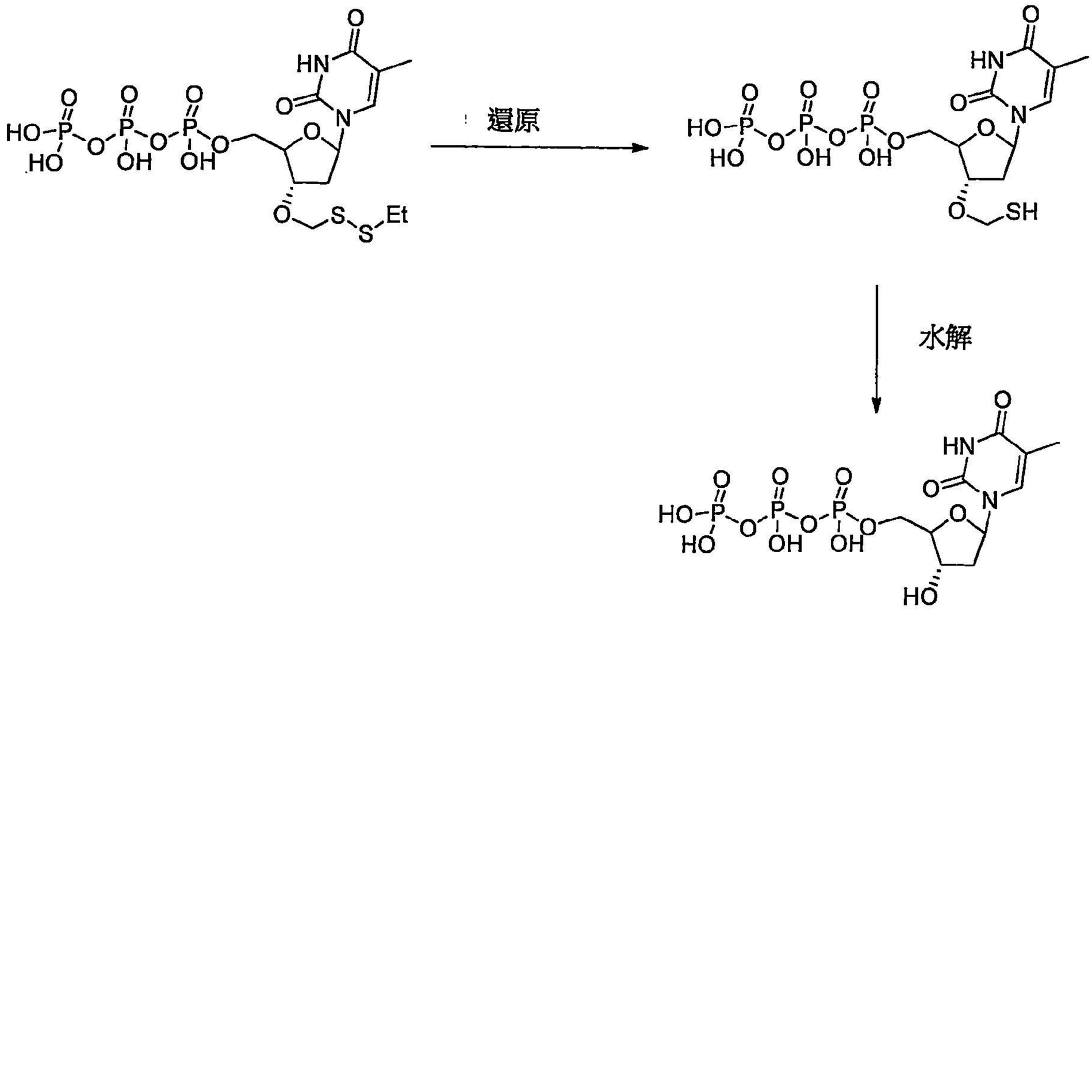


圖 4

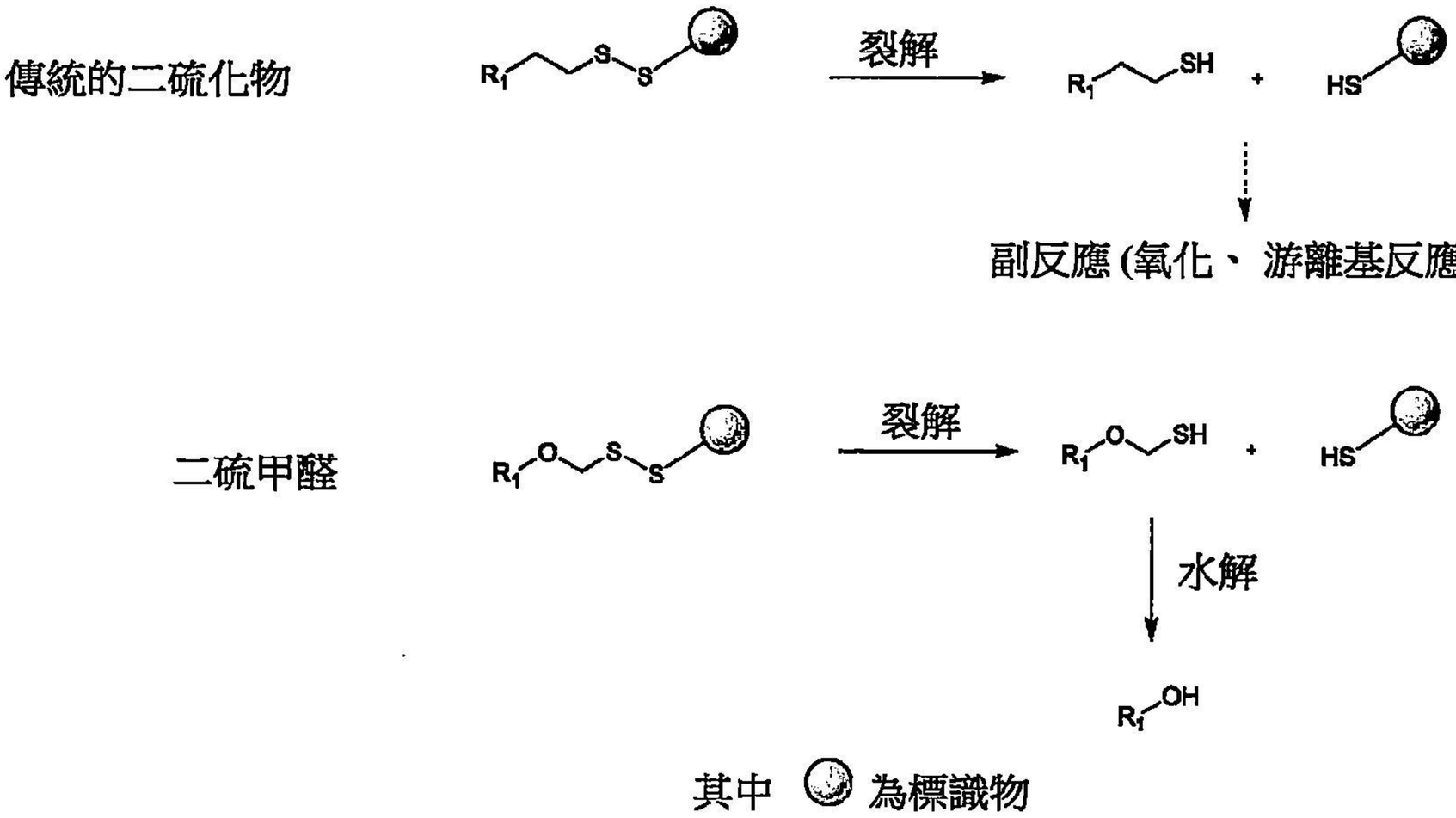


圖 5

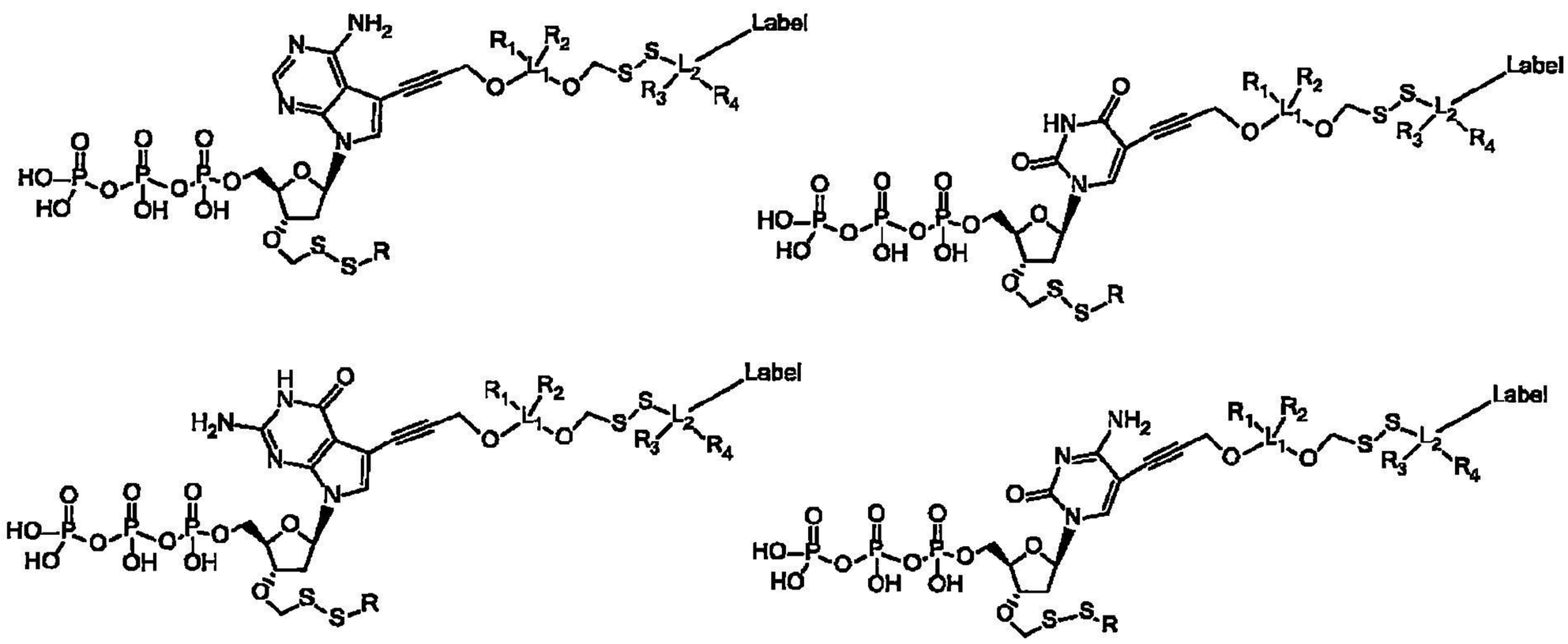


圖 6

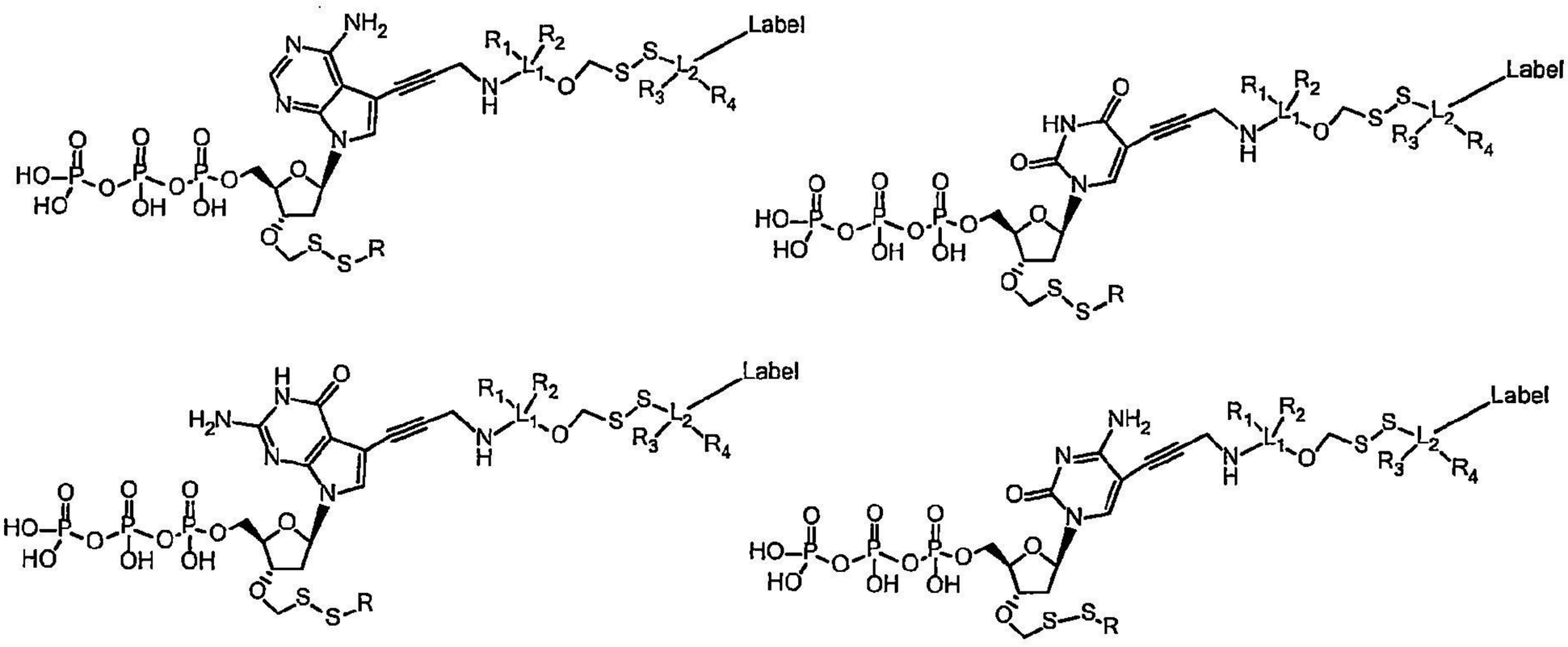


圖 7

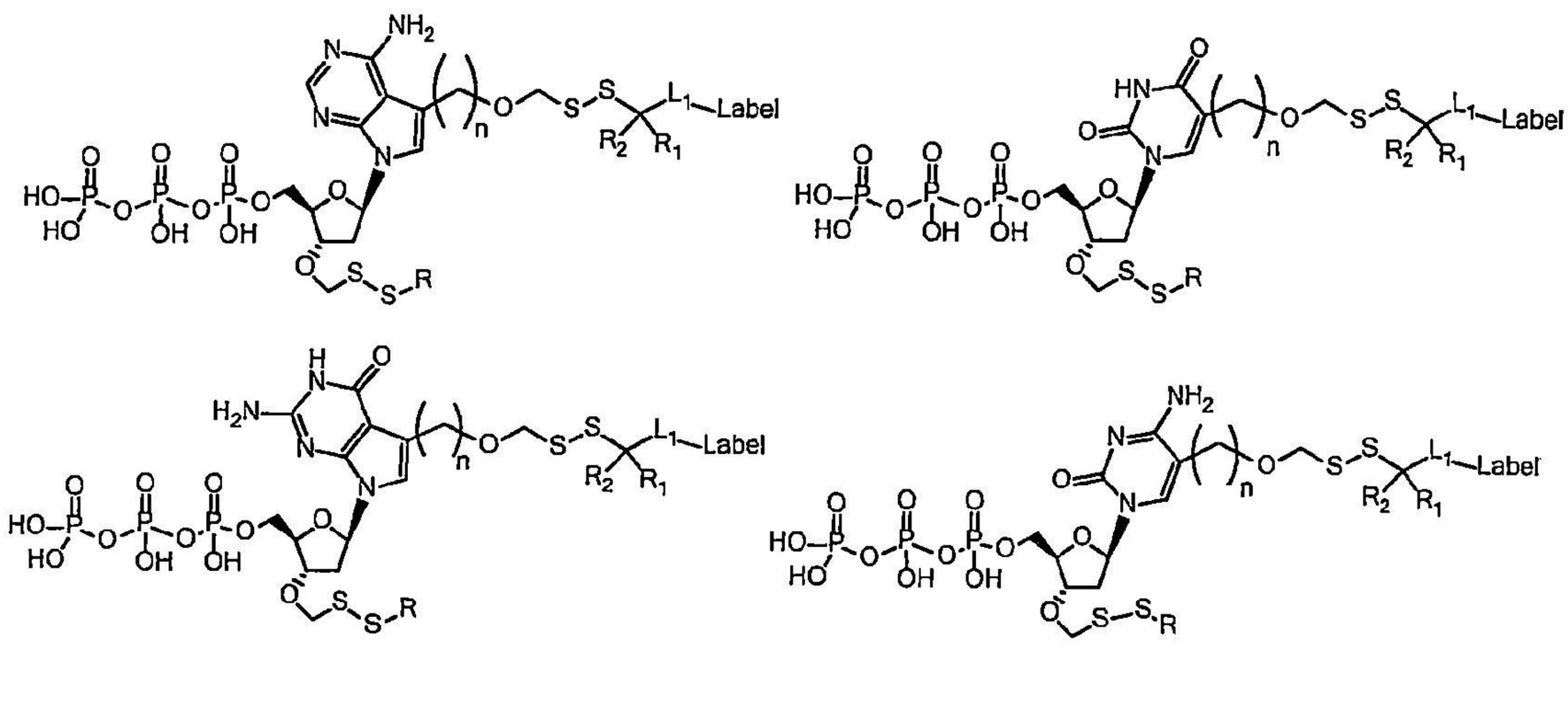
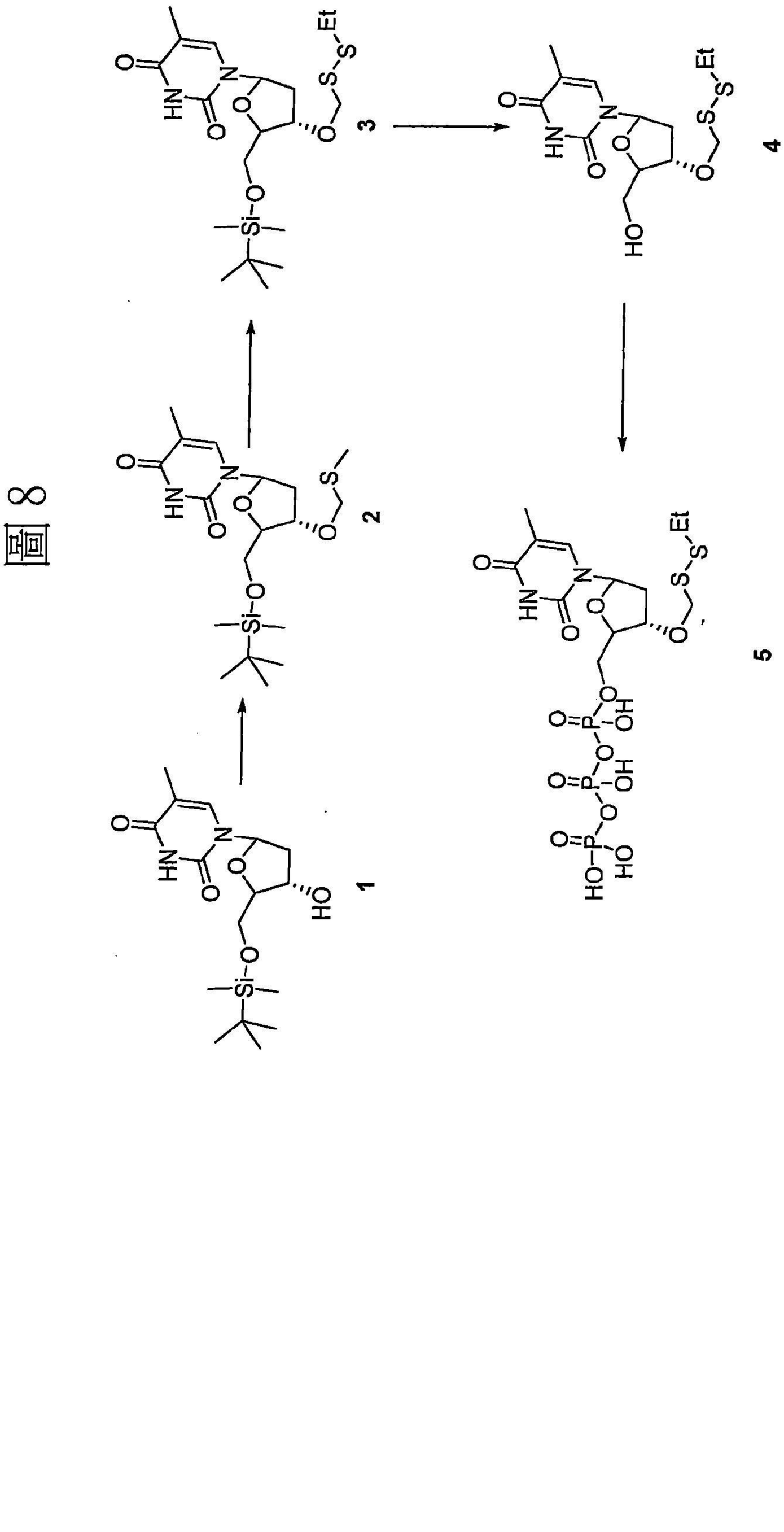


圖 8



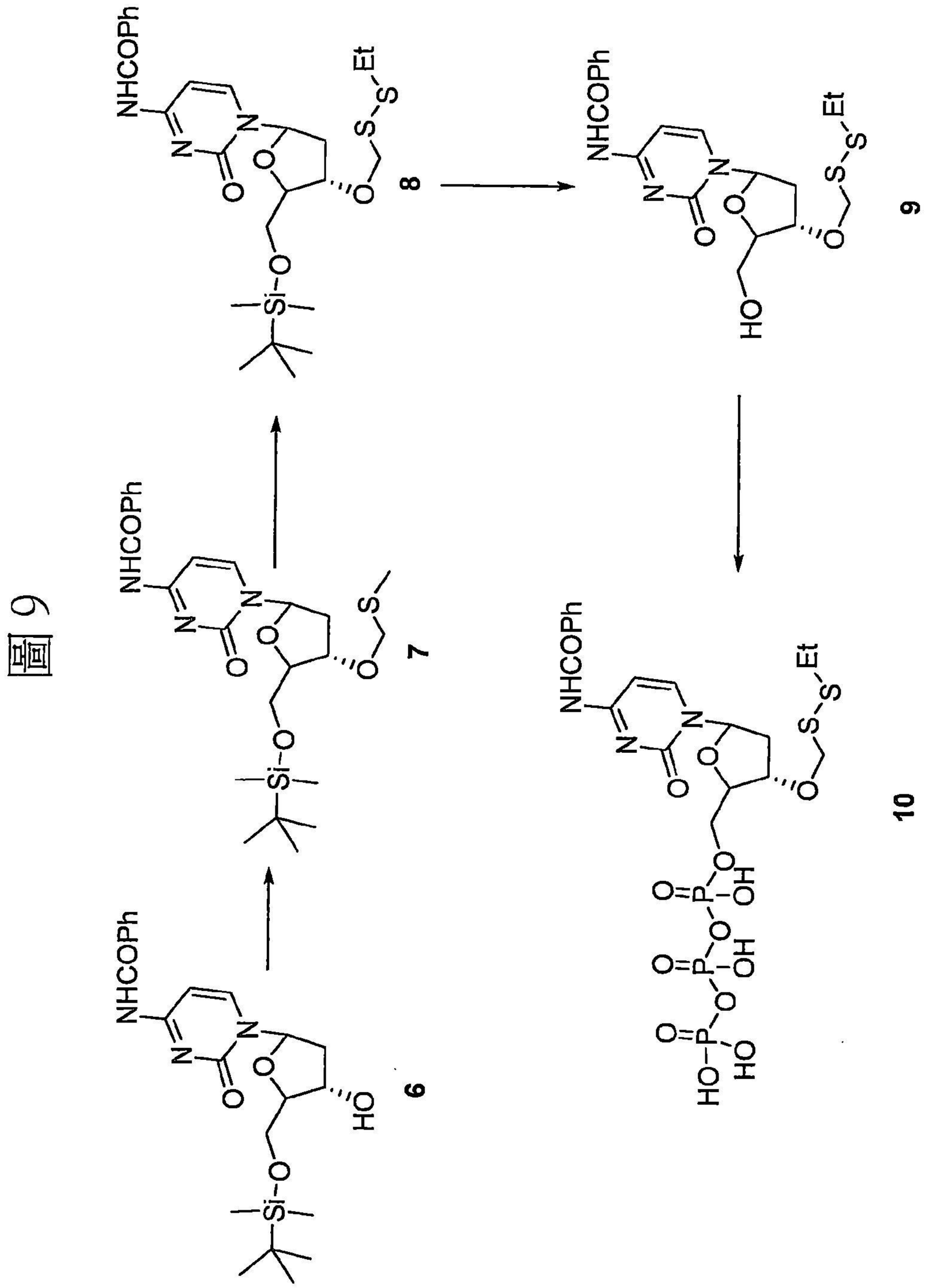


圖 9

圖 10

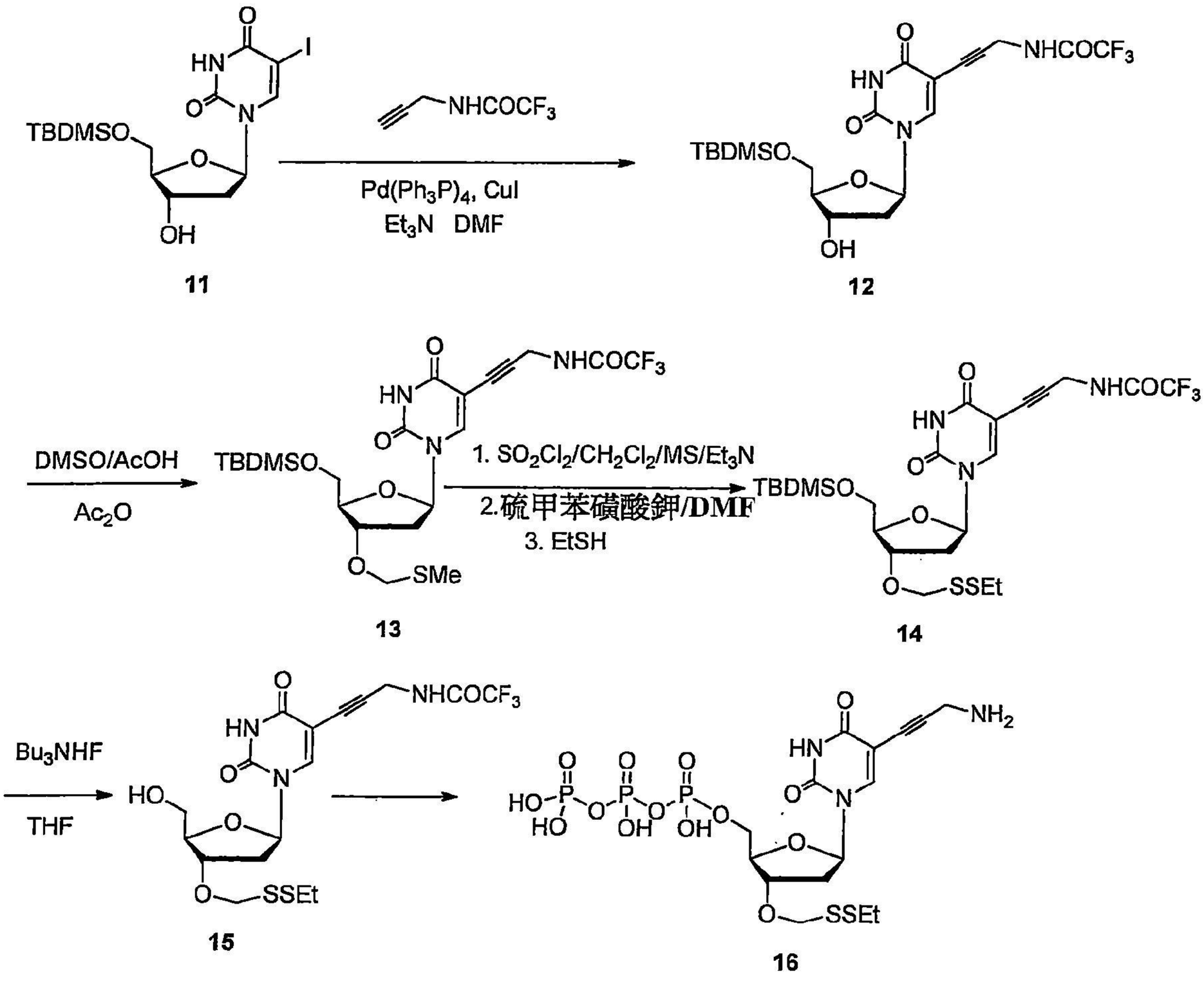

TBDMSO
HN
O
N
I
NHCOCF3
Pd(Ph3P)4, CuI
Et3N DMF
OH
11
12
DMSO/AcOH
Ac2O
1. SO2Cl2/CH2Cl2/MS/Et3N
2.硫甲苯磺酸鉀/DMF
3. EtSH
SMe
SSEt
13
14
Bu3NHF
THF
HO
15
NH2
16

圖 11

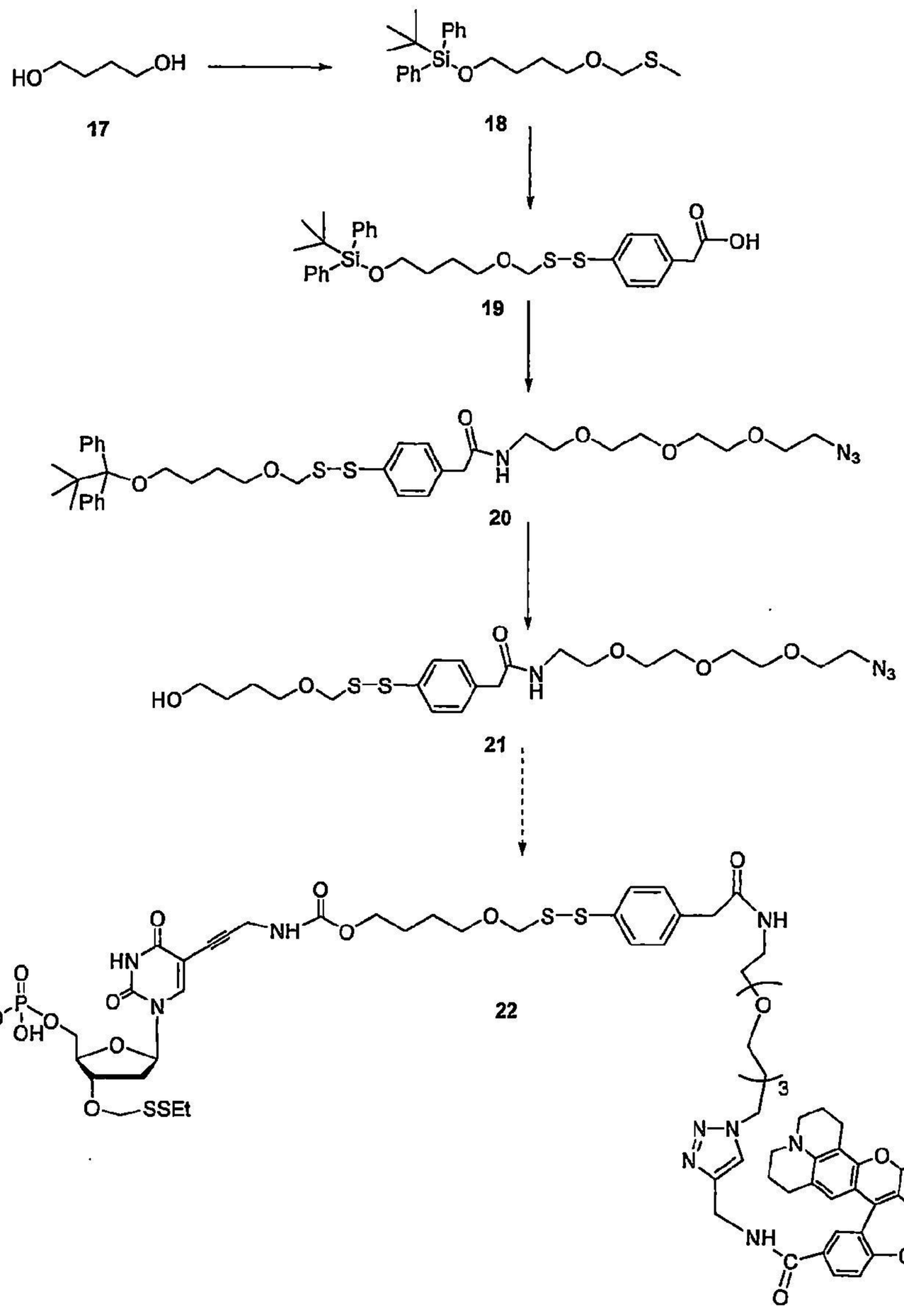

HO
OH
17
Ph
Si
Ph
O
O
S
18
O
OH
S–S
19
N
H
N3
20
21
HO
22
HO–P–O–P–O–P–O
OH
OH
HN
NH
SSEt
3
N–N
NH
CO2H

圖 12

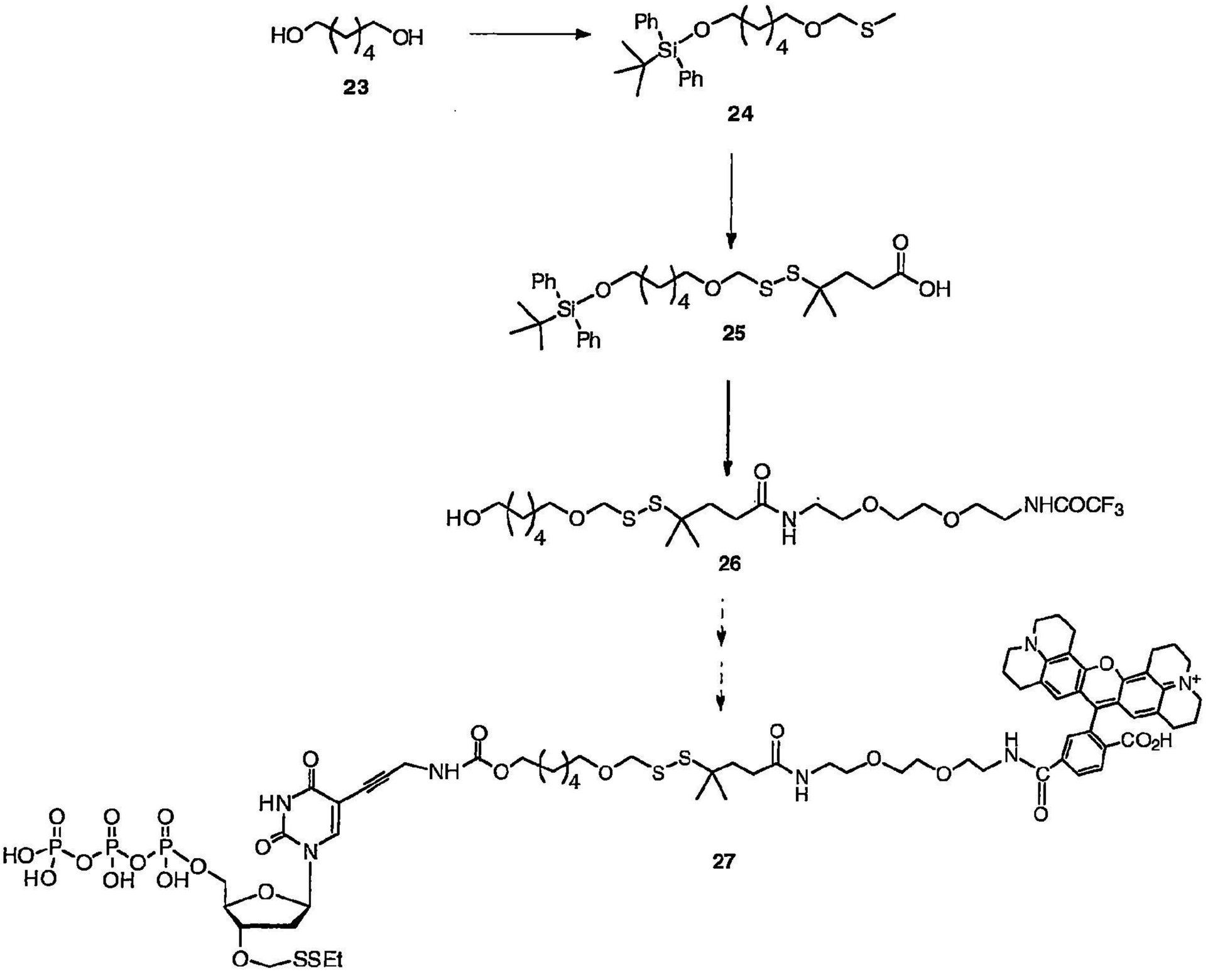

HO
OH
4
23
Ph
Si
Ph
O
4
O
S
24
25
HO
4
O
S
S
O
N
H
NHCOCF3
26
HO
P
O
OH
HN
NH
CO2H
N+
SSEt
27

圖 13

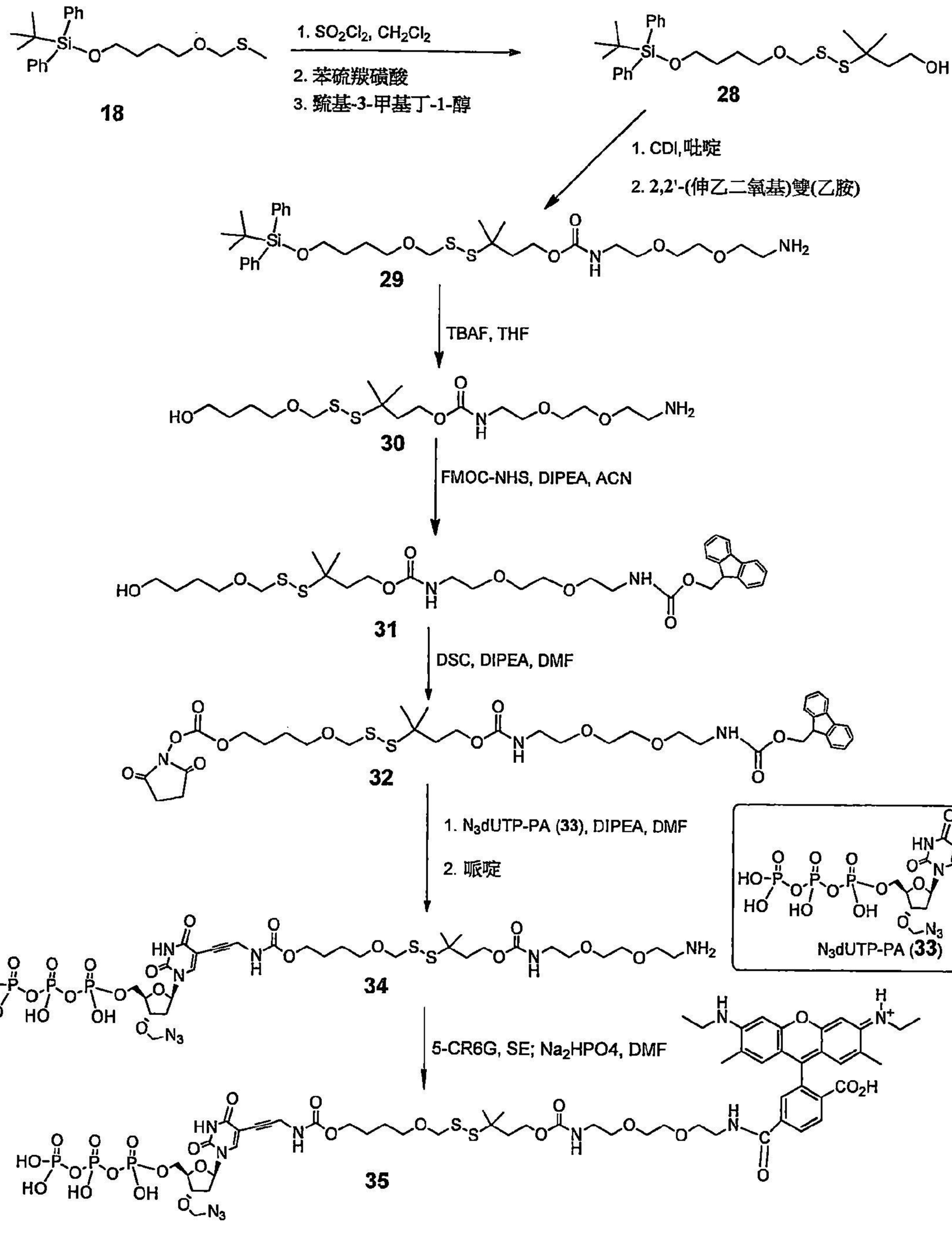

1. SO_2Cl_2, CH_2Cl_2
2. 苯硫羰磺酸
3. 巰基-3-甲基丁-1-醇
18
28
1. CDI,吡啶
2. 2,2'-(伸乙二氧基)雙(乙胺)
29
TBAF, THF
30
FMOC-NHS, DIPEA, ACN
31
DSC, DIPEA, DMF
32
1. N_3dUTP-PA (33), DIPEA, DMF
2. 哌啶
N_3dUTP-PA (33)
34
5-CR6G, SE; Na_2HPO4, DMF
35

圖 14

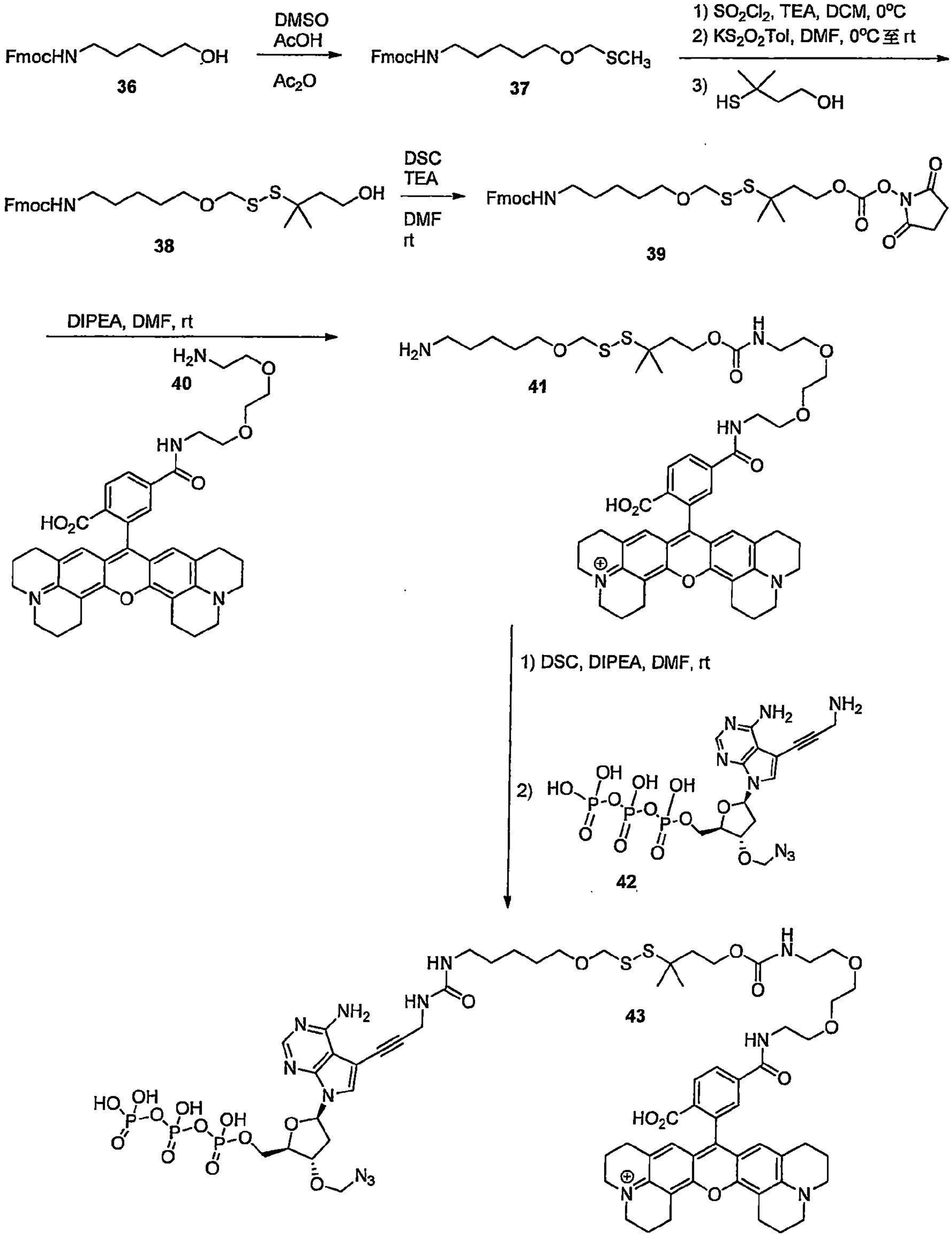

FmocHN
OH
36
DMSO
AcOH
Ac2O
FmocHN
O
SCH3
37
1) SO2Cl2, TEA, DCM, 0°C
2) KS2O2Tol, DMF, 0°C至 rt
3)
HS
OH
38
DSC
TEA
DMF
rt
39
DIPEA, DMF, rt
H2N
40
HN
HO2C
N
O
41
1) DSC, DIPEA, DMF, rt
2)
NH2
HO
OH
P
N3
42
43

圖 15

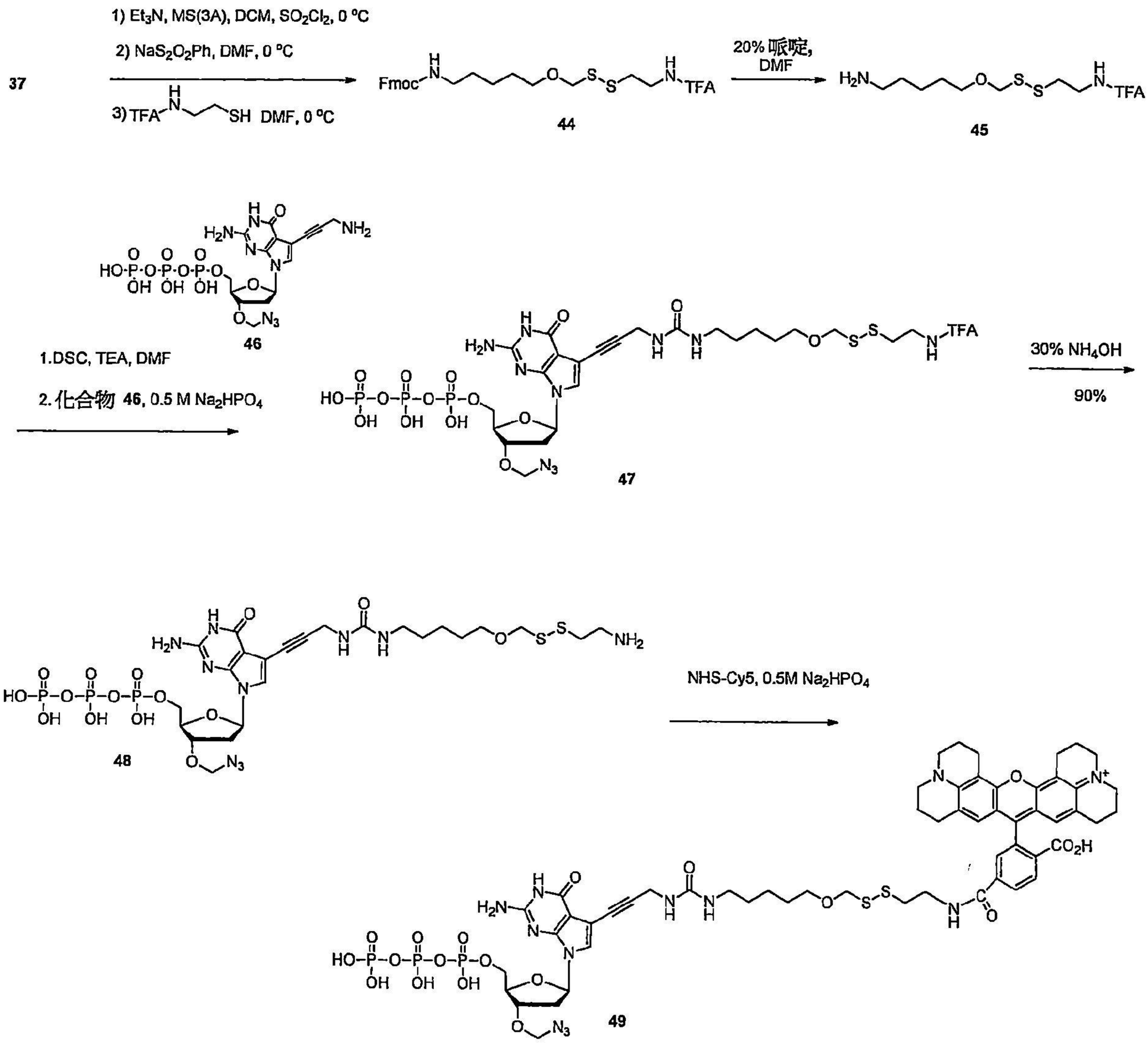

1) Et3N, MS(3A), DCM, SO2Cl2, 0 °C
2) NaS2O2Ph, DMF, 0 °C
3) TFA-NH-CH2-CH2-SH DMF, 0 °C
37
Fmoc-NH-(CH2)5-O-CH2-S-S-CH2-CH2-NH-TFA
44
20% 哌啶, DMF
H2N-(CH2)5-O-CH2-S-S-CH2-CH2-NH-TFA
45
46
1.DSC, TEA, DMF
2. 化合物 46, 0.5 M Na2HPO4
47
30% NH4OH
90%
48
NHS-Cy5, 0.5M Na2HPO4
49

圖 16

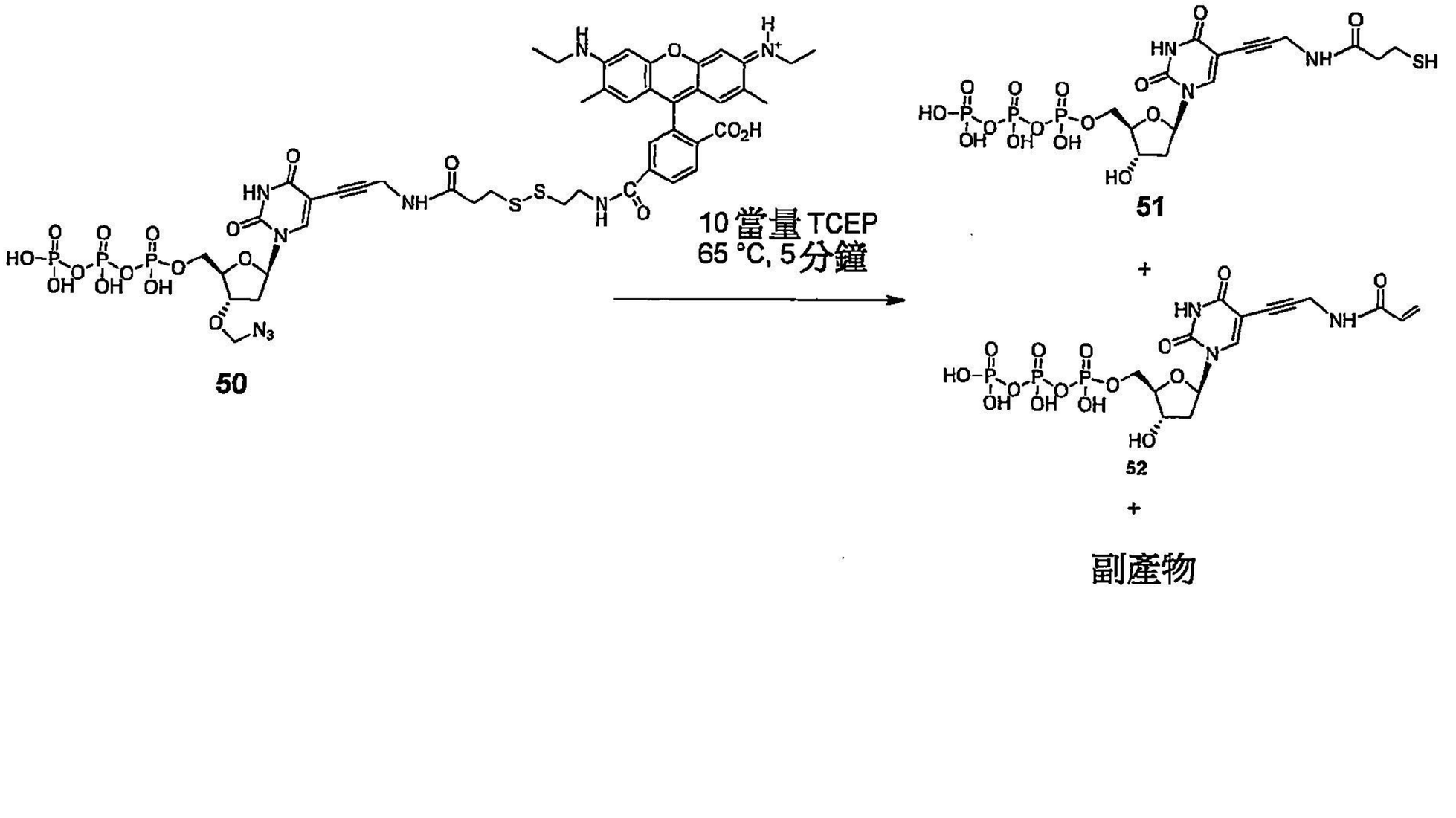


圖 17

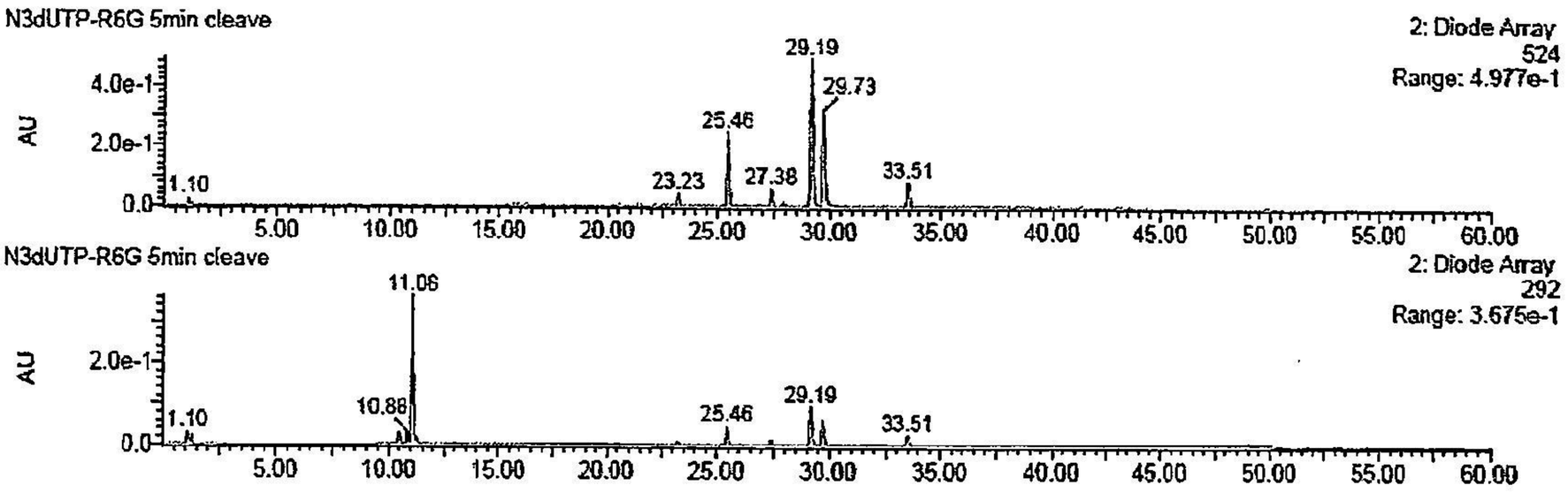
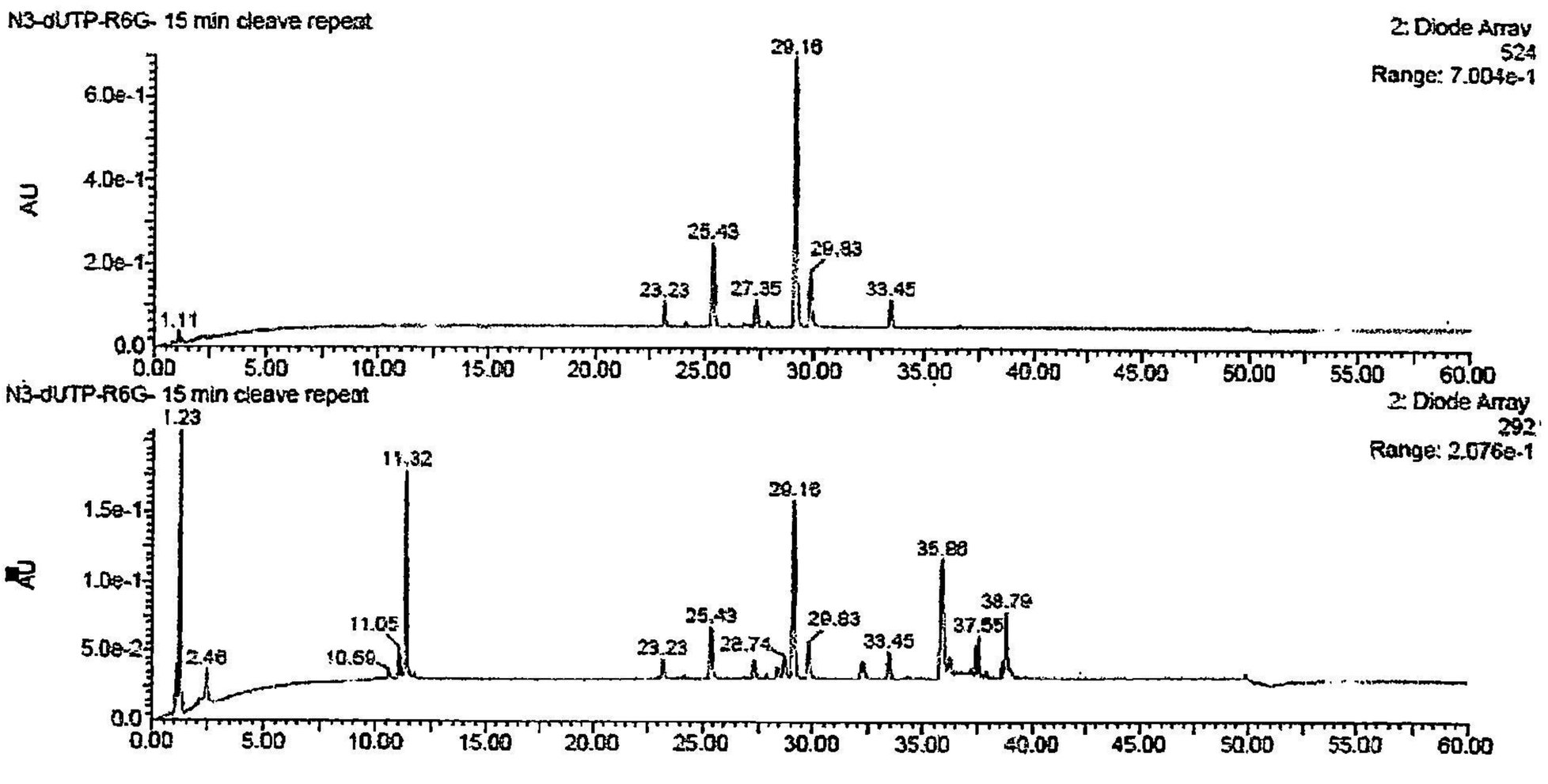
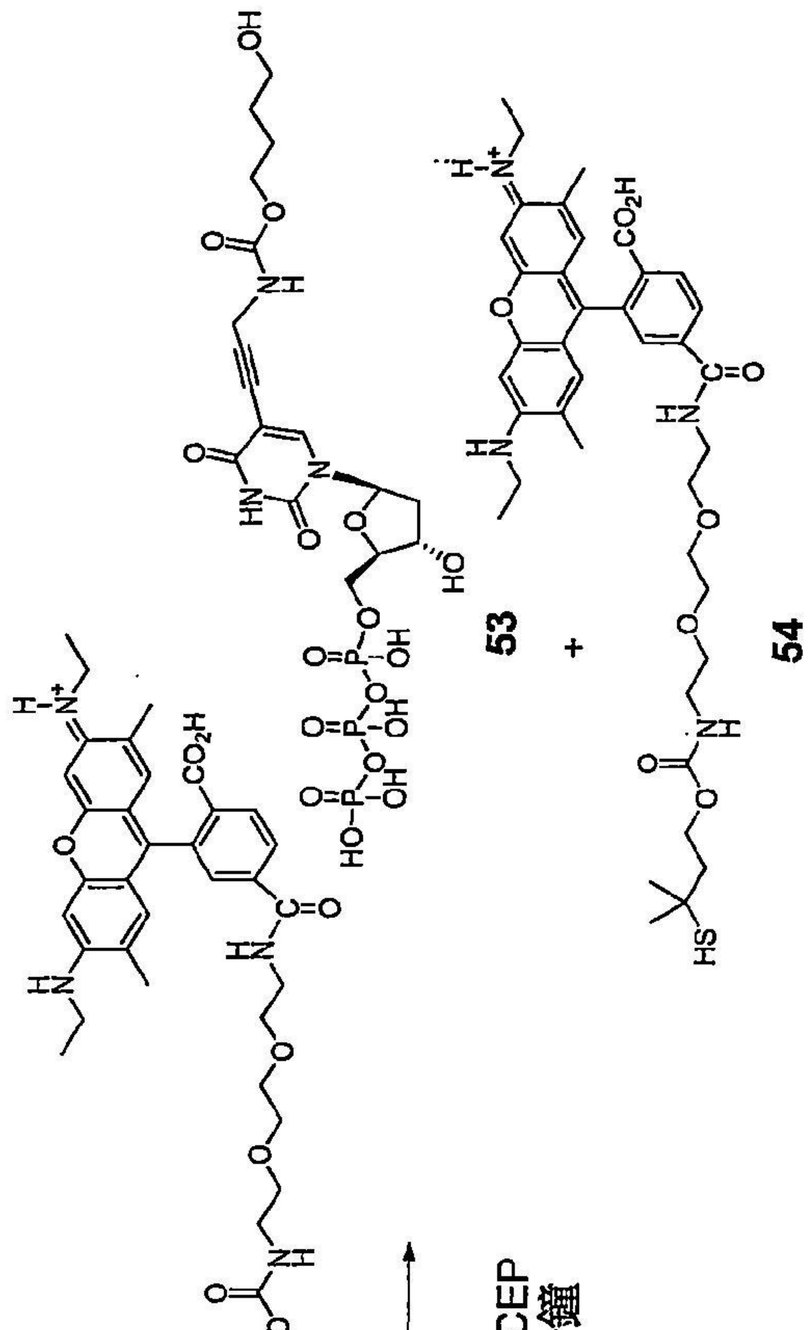

N3dUTP-R6G 5min cleave
2: Diode Array
524
Range: 4.977e-1
AU
4.0e-1
2.0e-1
0.0
1.10
23.23
25.46
27.38
29.19
29.73
33.51
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
N3dUTP-R6G 5min cleave
2: Diode Array
292
Range: 3.675e-1
AU
2.0e-1
0.0
1.10
10.88
11.06
25.46
29.19
33.51
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00

圖 18


N3-dUTP-R6G- 15 min cleave repeat
2: Diode Array
524
Range: 7.004e-1
AU
6.0e-1
4.0e-1
2.0e-1
0.0
1.11
23.23
25.43
27.35
29.16
29.83
33.45
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
N3-dUTP-R6G- 15 min cleave repeat
2: Diode Array
292
Range: 2.076e-1
AU
1.5e-1
1.0e-1
5.0e-2
0.0
1.23
2.48
10.69
11.05
11.32
23.23
25.43
26.74
29.16
29.83
33.45
35.88
37.55
38.79
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00



35

10 當量 TCEP
65 °C, 5 分鐘

53 + 54

圖 19

圖 20

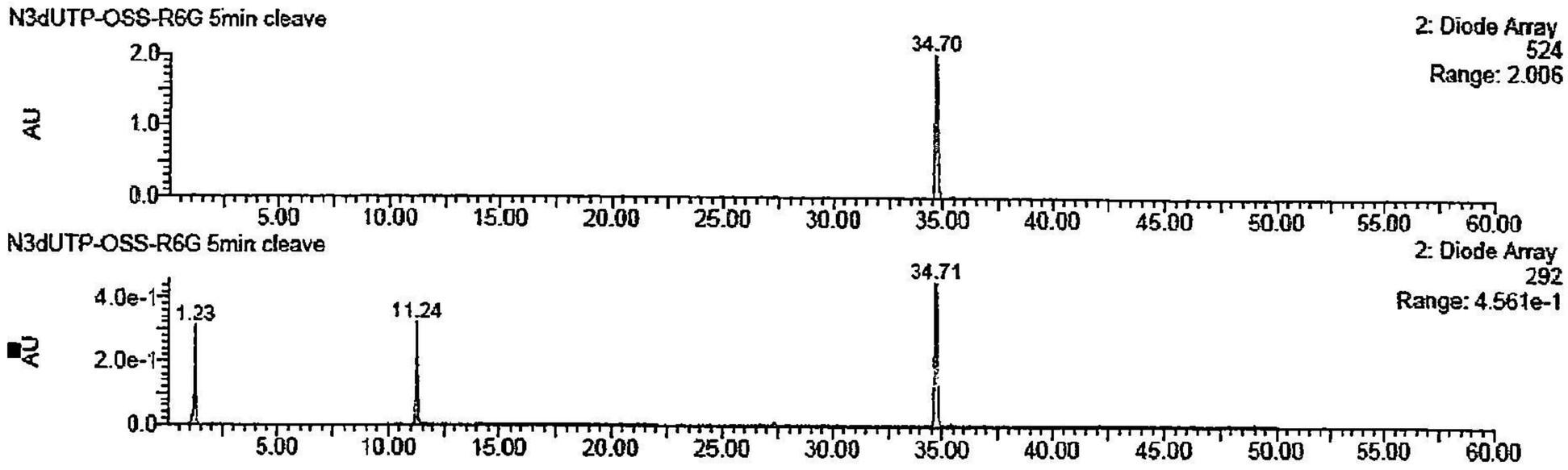

N3dUTP-OSS-R6G 5min cleave
2: Diode Array
524
Range: 2.006
34.70
AU
2.0
1.0
0.0
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
45.00
50.00
55.00
60.00
N3dUTP-OSS-R6G 5min cleave
2: Diode Array
292
Range: 4.561e-1
34.71
1.23
11.24
AU
4.0e-1
2.0e-1
0.0

圖 21

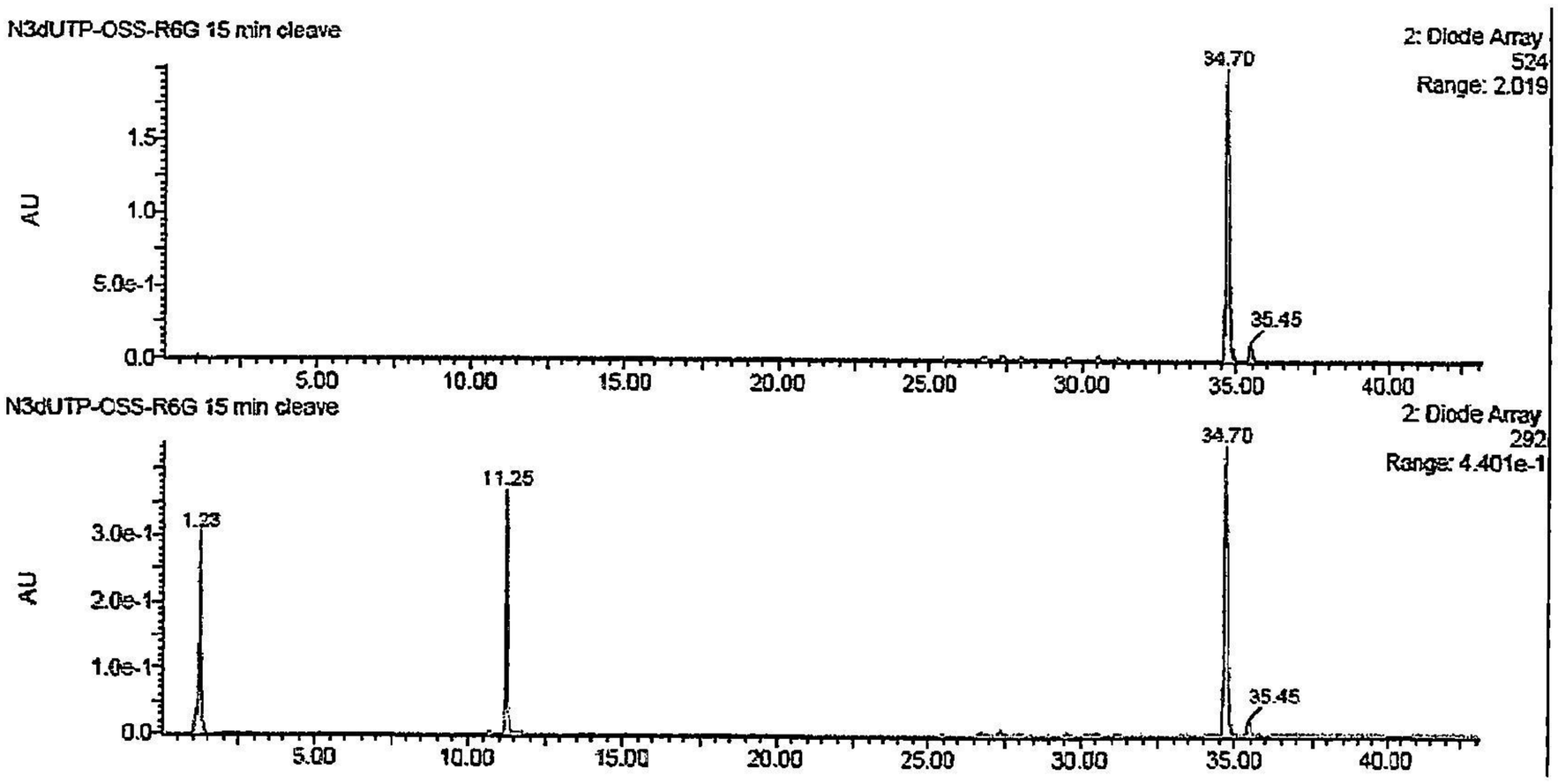

N3dUTP-OSS-R6G 15 min cleave
2: Diode Array
524
Range: 2.019
34.70
35.45
AU
1.5
1.0
5.0e-1
0.0
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
N3dUTP-OSS-R6G 15 min cleave
2: Diode Array
292
Range: 4.401e-1
34.70
11.25
1.23
35.45
AU
3.0e-1
2.0e-1
1.0e-1
0.0

圖 22

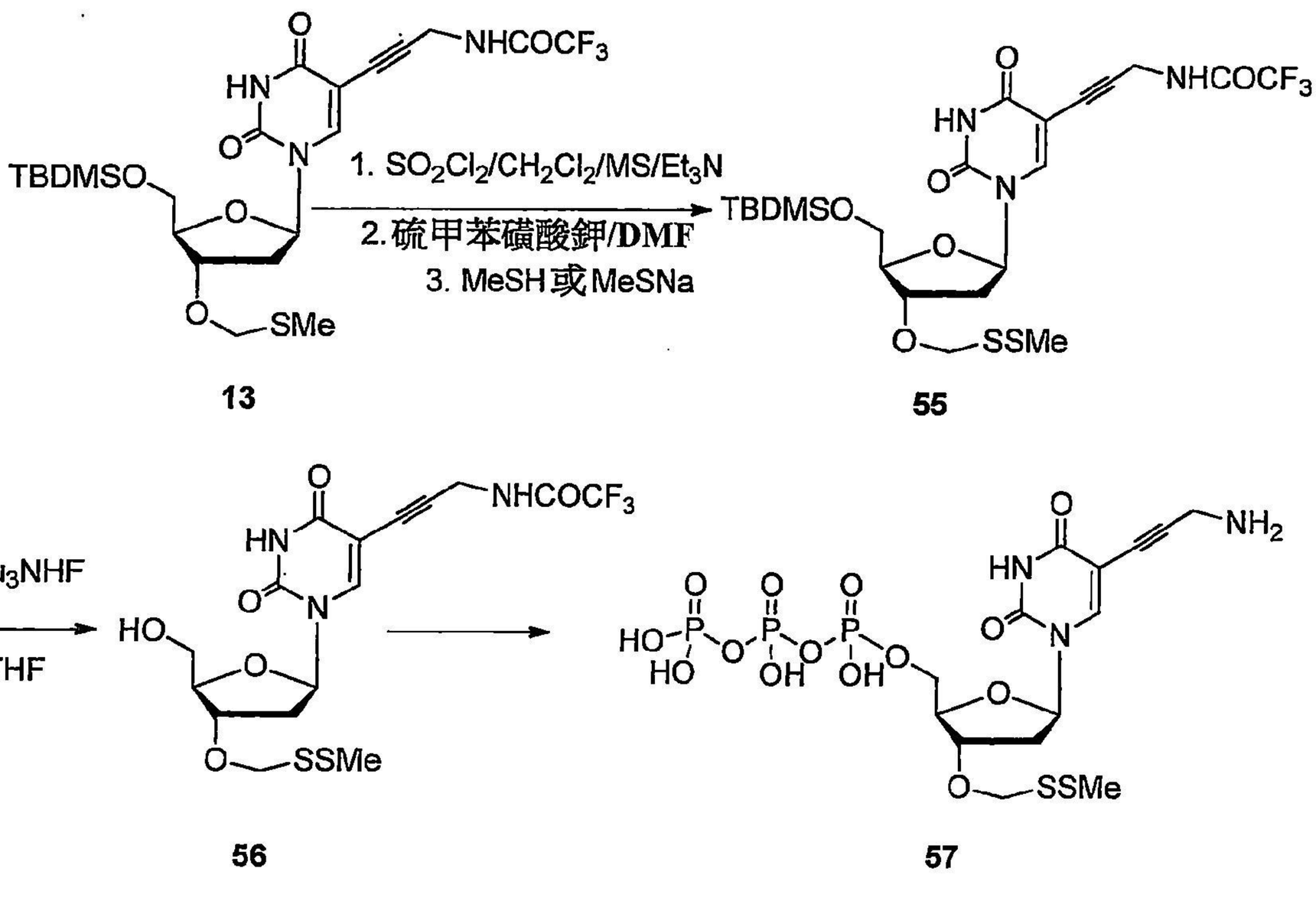

NHCOCF3
HN
O
N
TBDMSO
O
SMe
1. SO2Cl2/CH2Cl2/MS/Et3N
2.硫甲苯磺酸鉀/DMF
3. MeSH或MeSNa
SSMe
13
55
Bu3NHF
THF
HO
NH2
HO-P-O-P-O-P-O
OH
56
57

圖 23

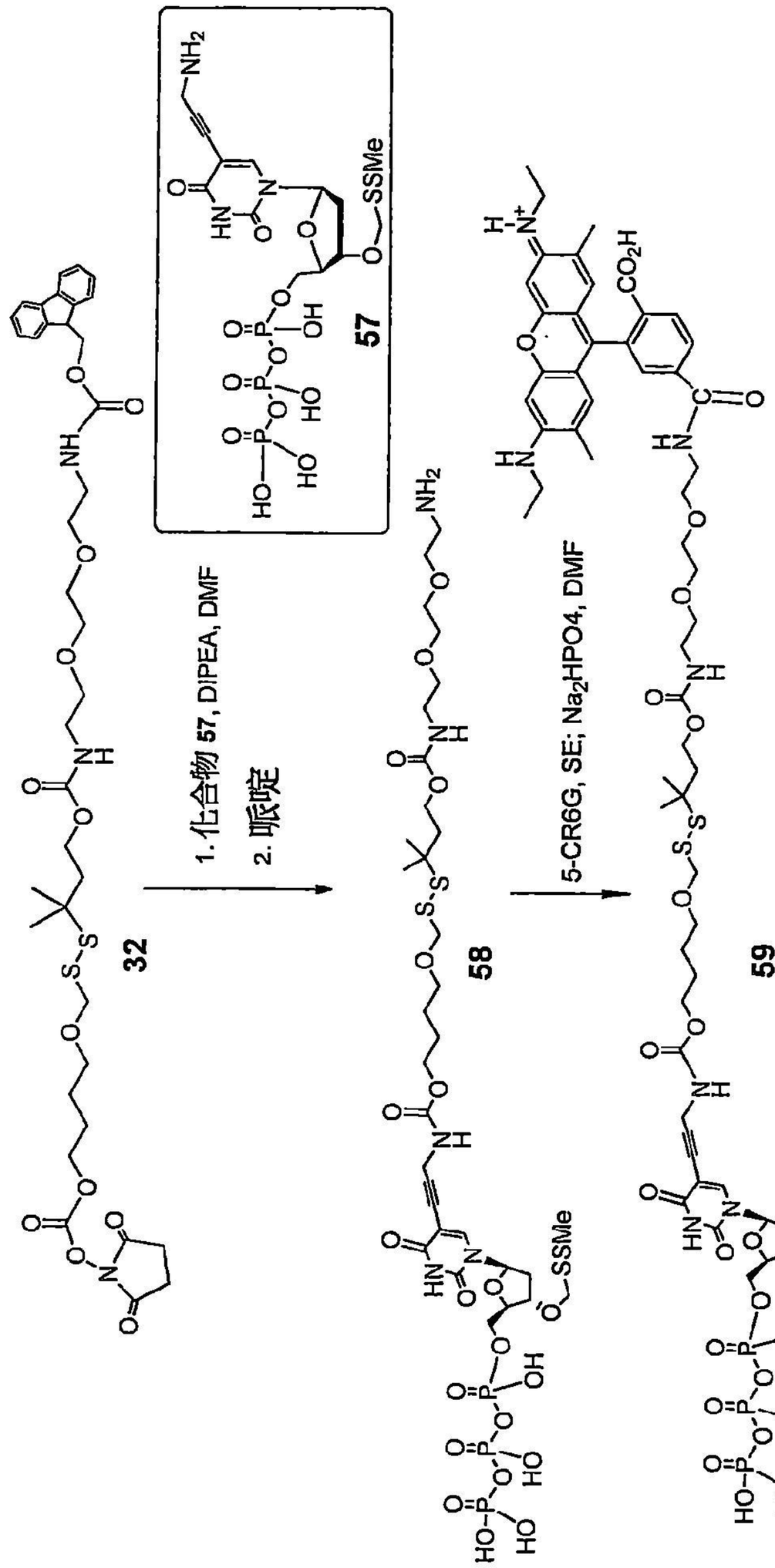

32
1. 化合物 57, DIPEA, DMF
2. 哌啶
58
5-CR6G, SE; Na2HPO4, DMF
59
57
SSMe
NH2
CO2H

圖 24

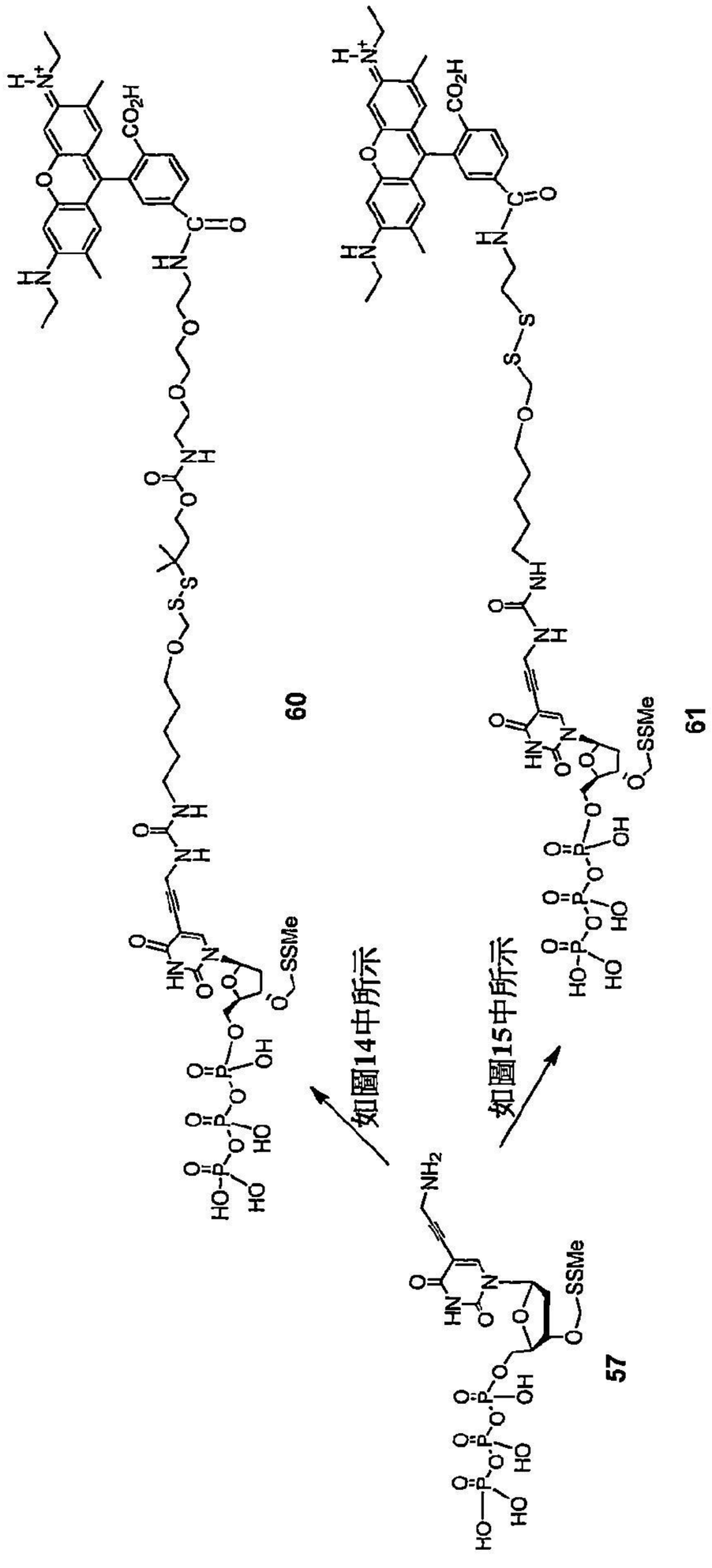


圖 25

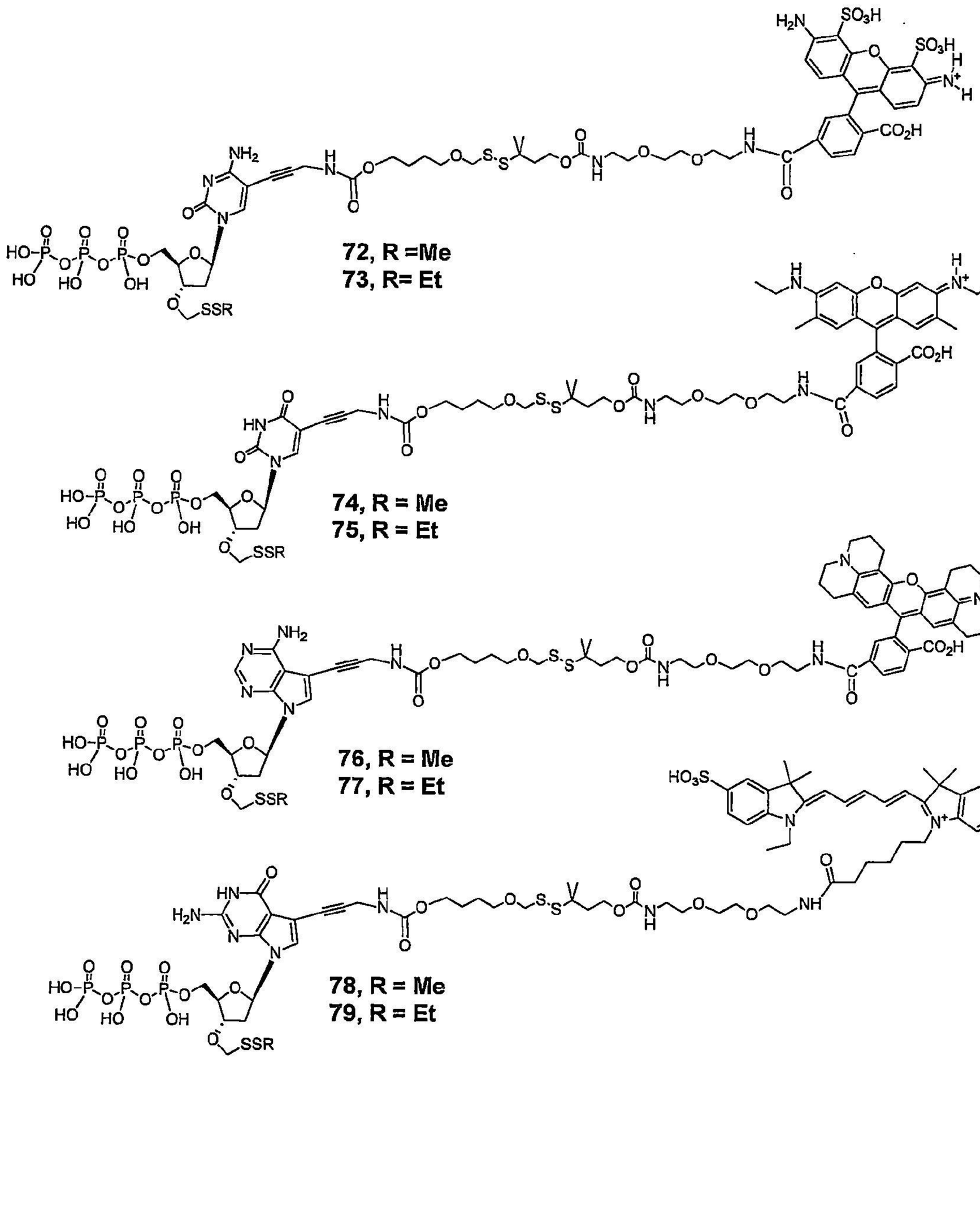


圖 26

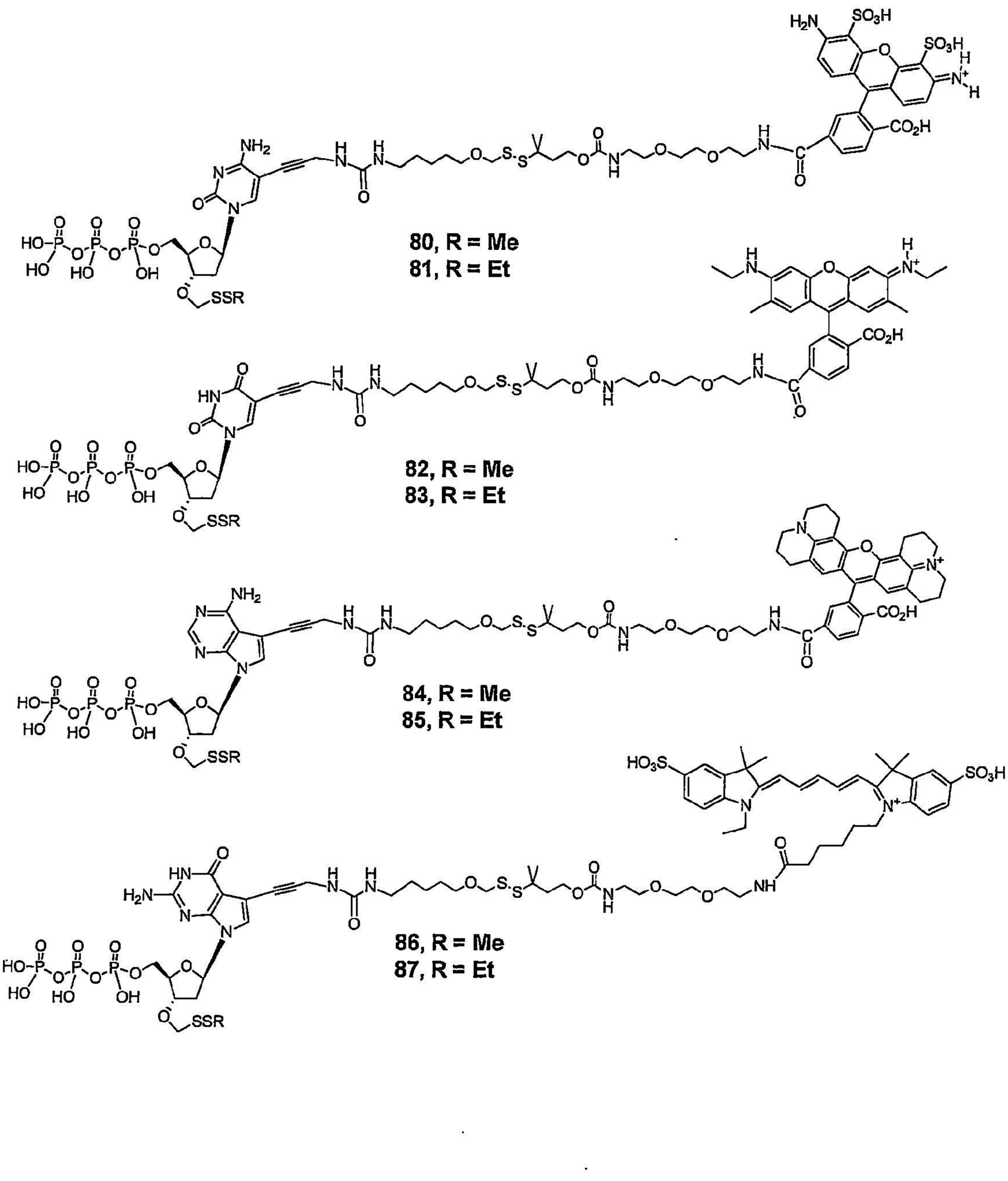


圖 27

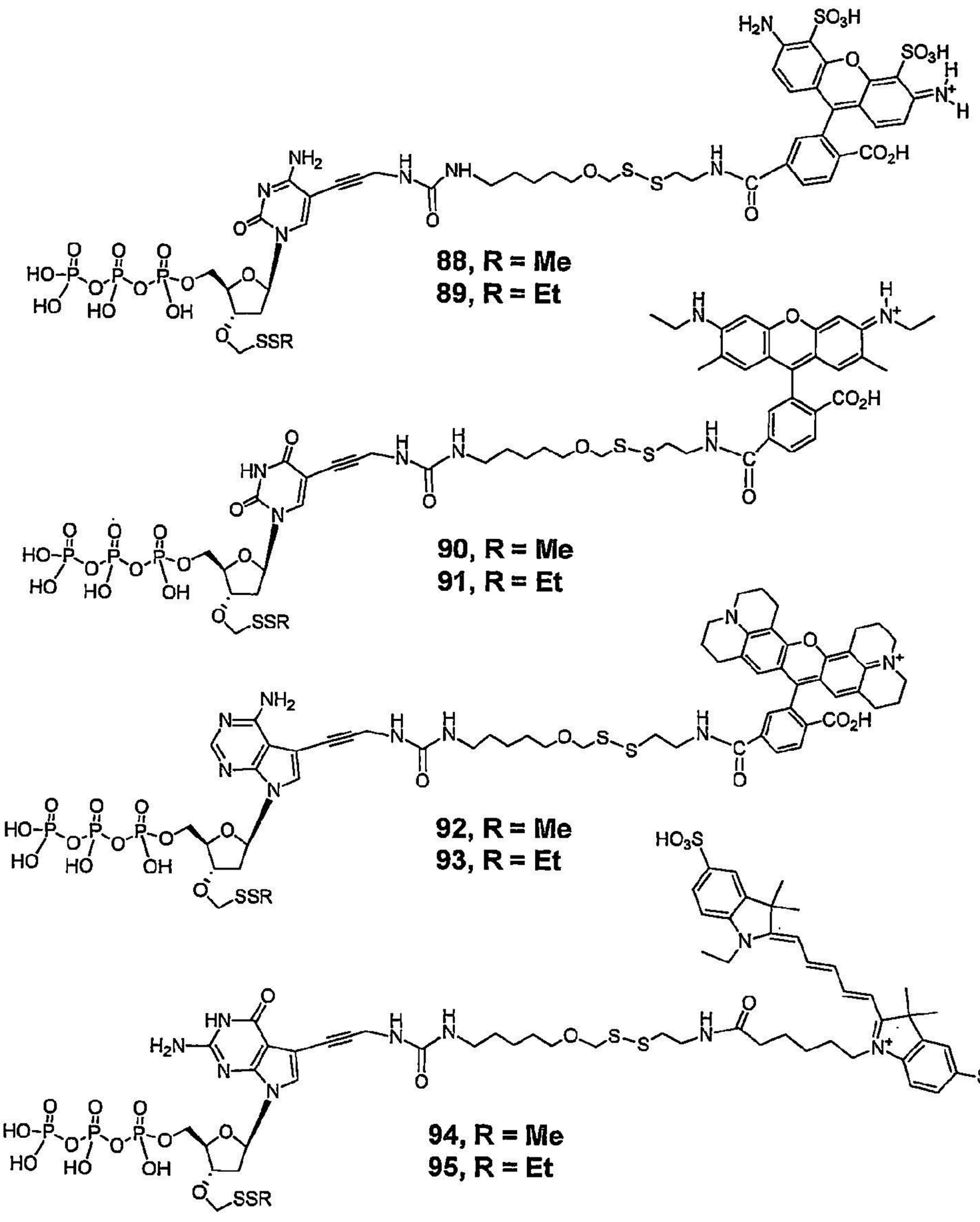


圖 28



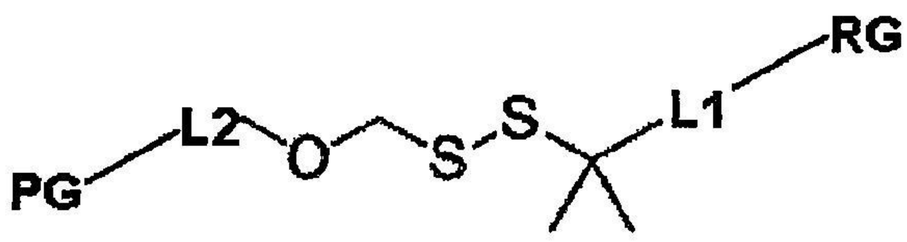


圖 29

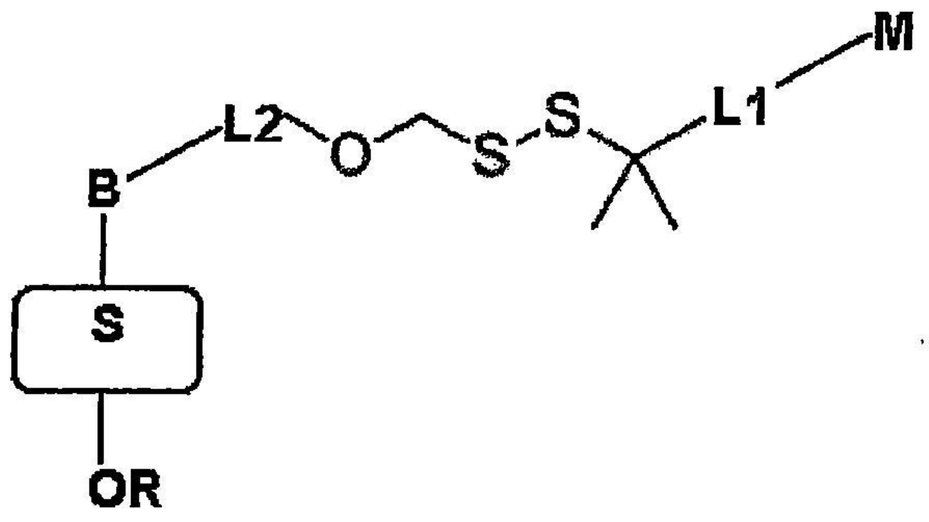


圖 30

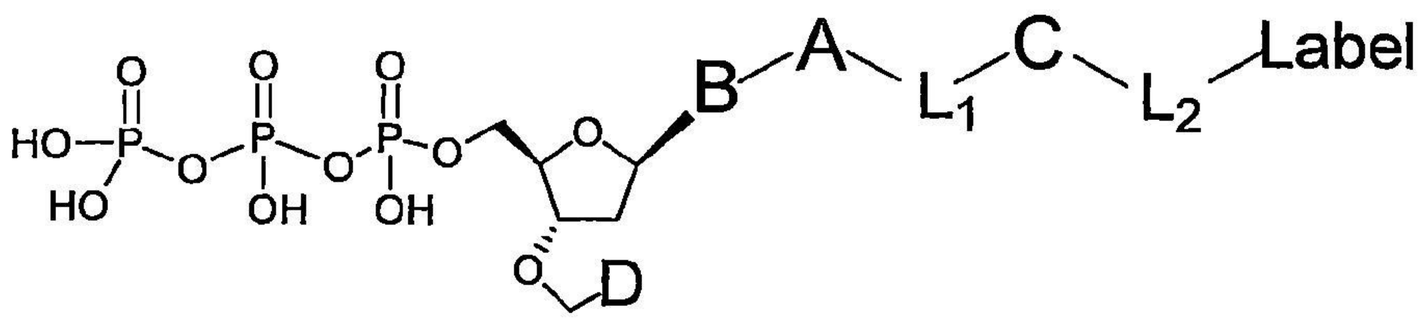
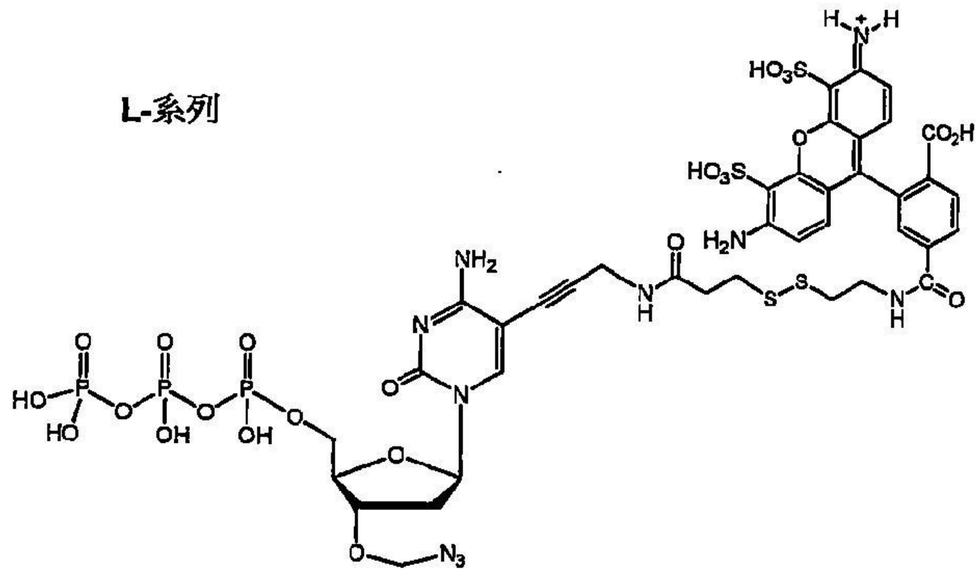


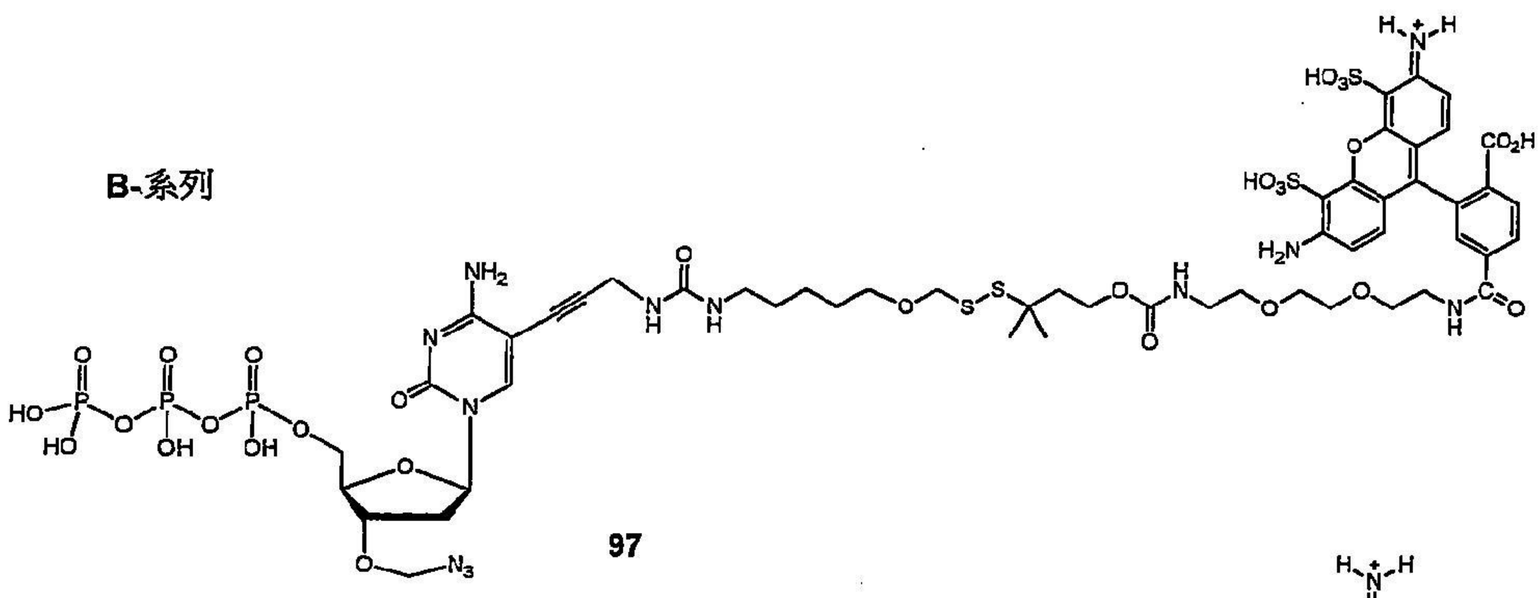
圖 31

L-系列



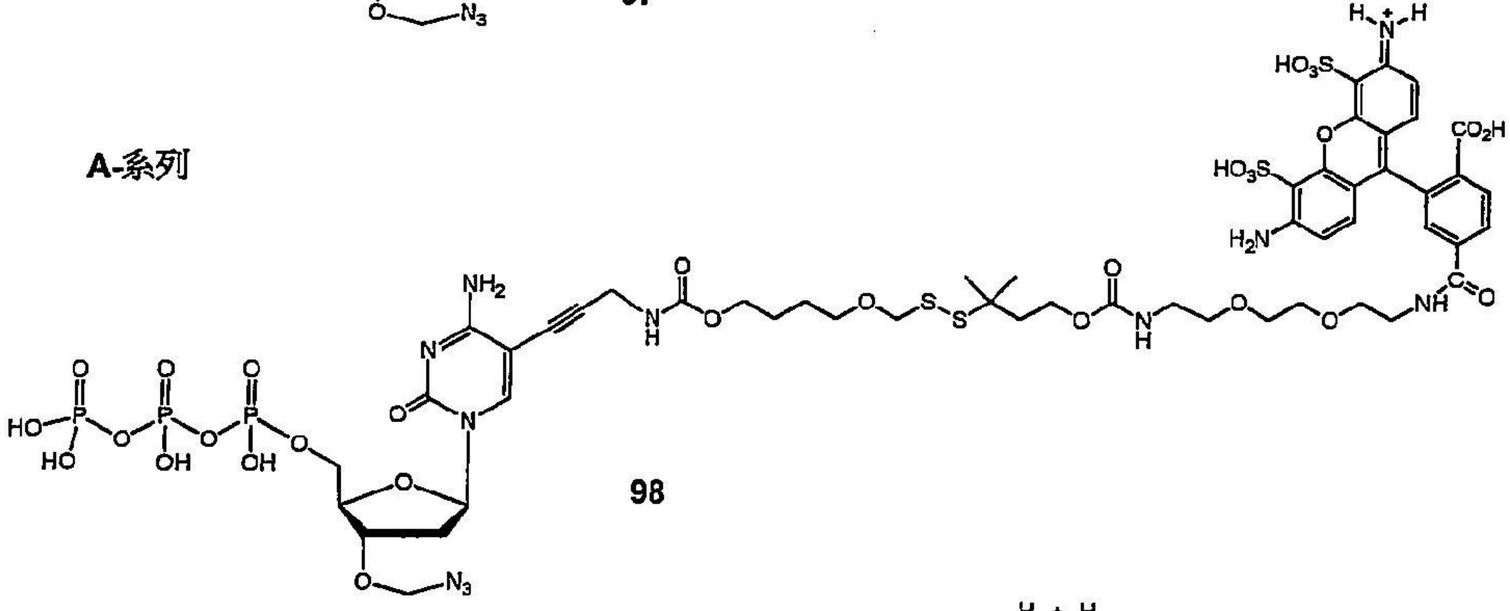
96

B-系列



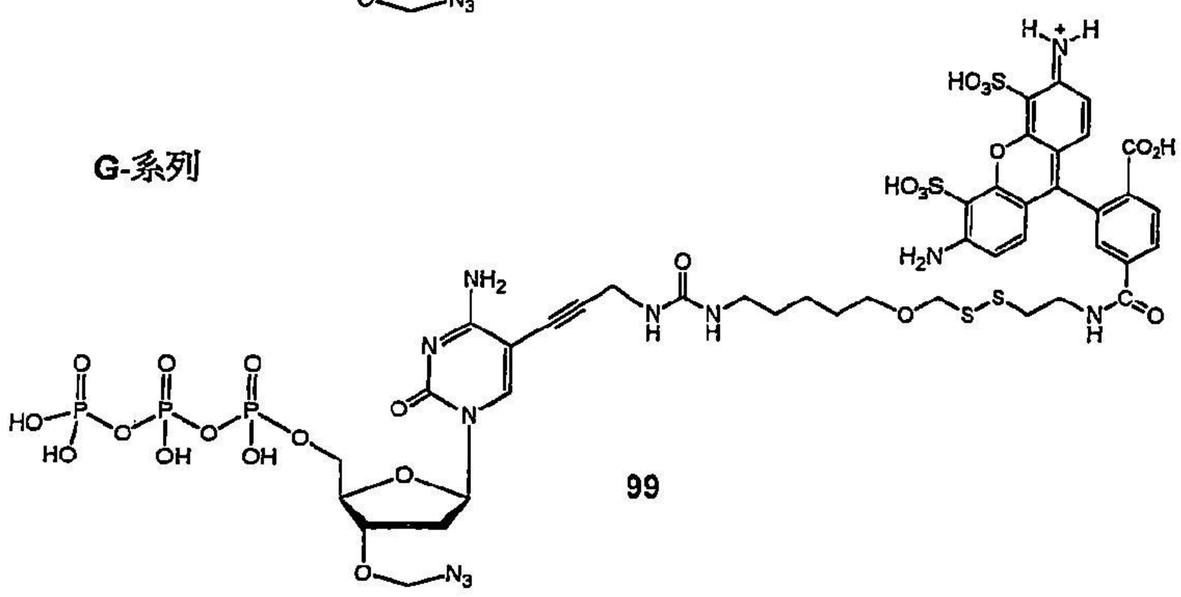
97

A-系列



98

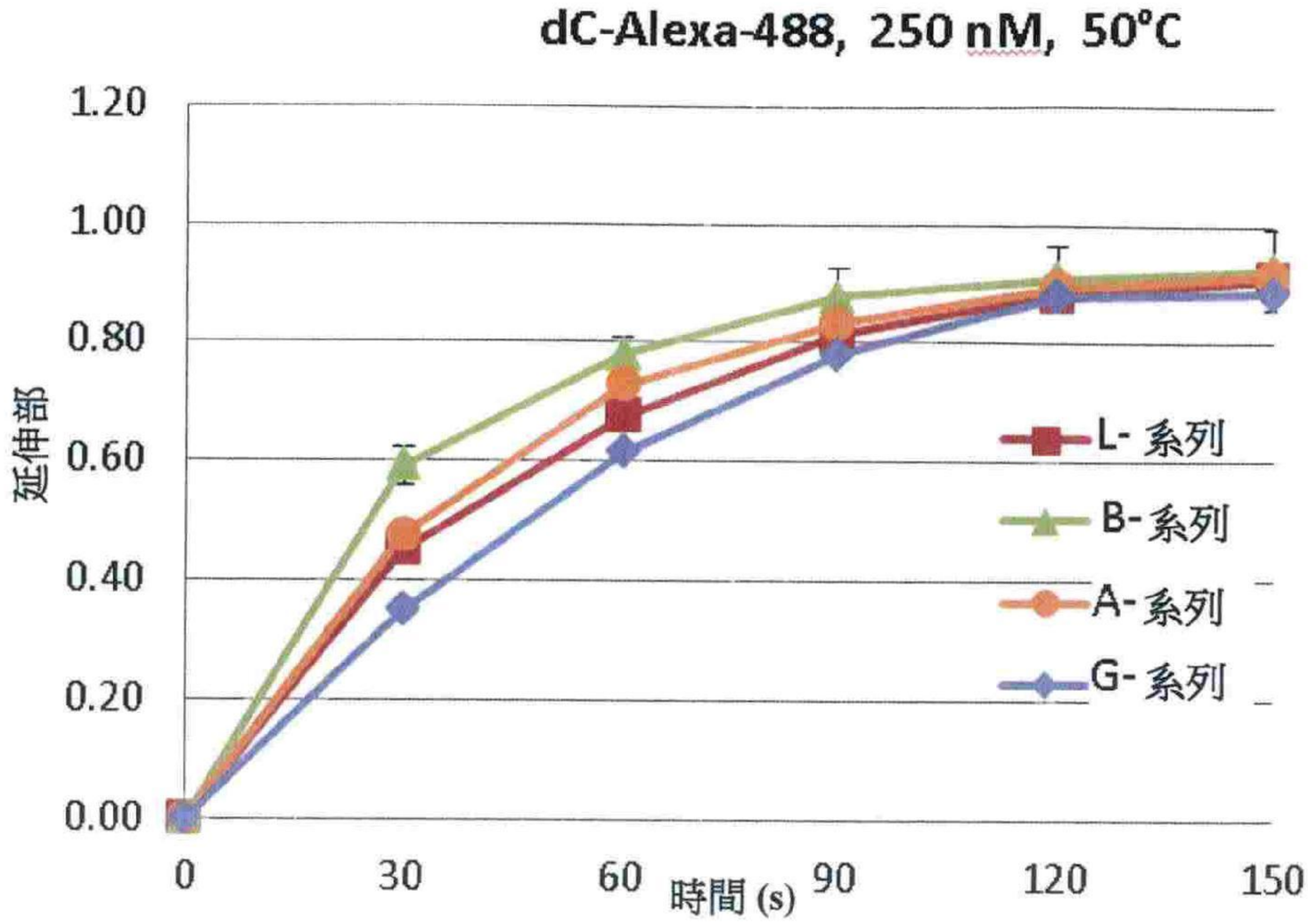
G-系列



99

圖 32

A



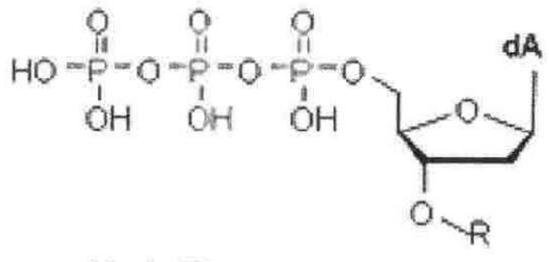
B

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

C

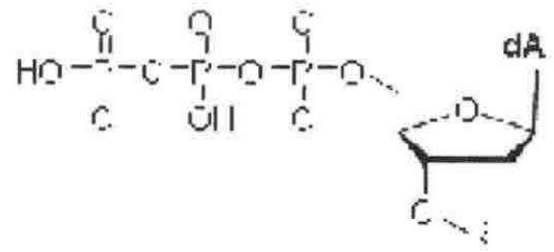
	率 s^{-1}		
	125nM	250nM	500nM
dC-Alexa-488 B-Series	0.0021	0.003	0.0051
dC-Alexa-488 A-Series	0.0015	0.0021	0.0024
dC-Alexa-488 L-Series	0.0009	0.0015	0.0035
dC-Alexa-488 G-Series	0.0013	0.0022	0.0033

圖 33



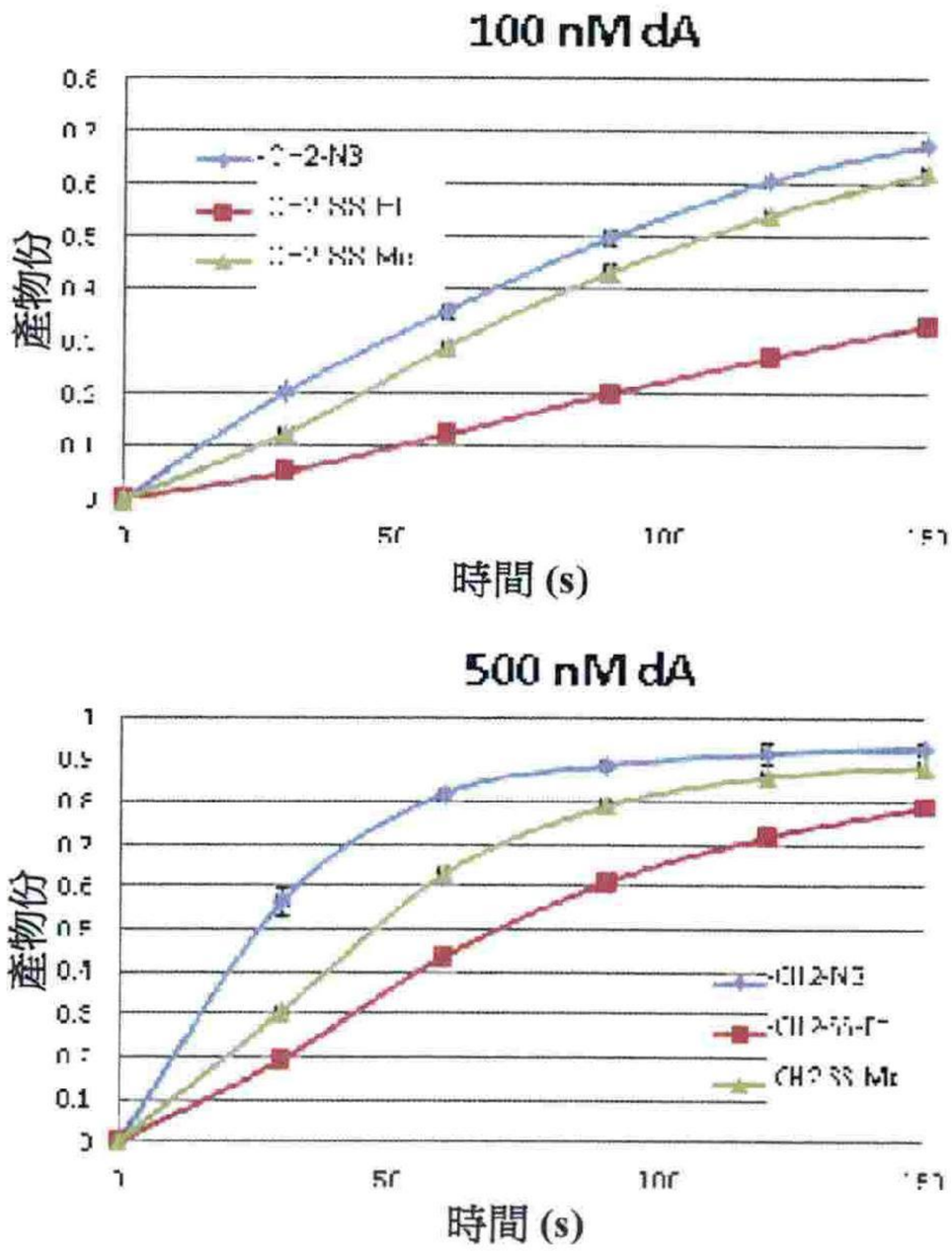
其中 R =

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



其中 R =

-CH2-N3
-CH2-SS-Et
-CH2-SS-Me



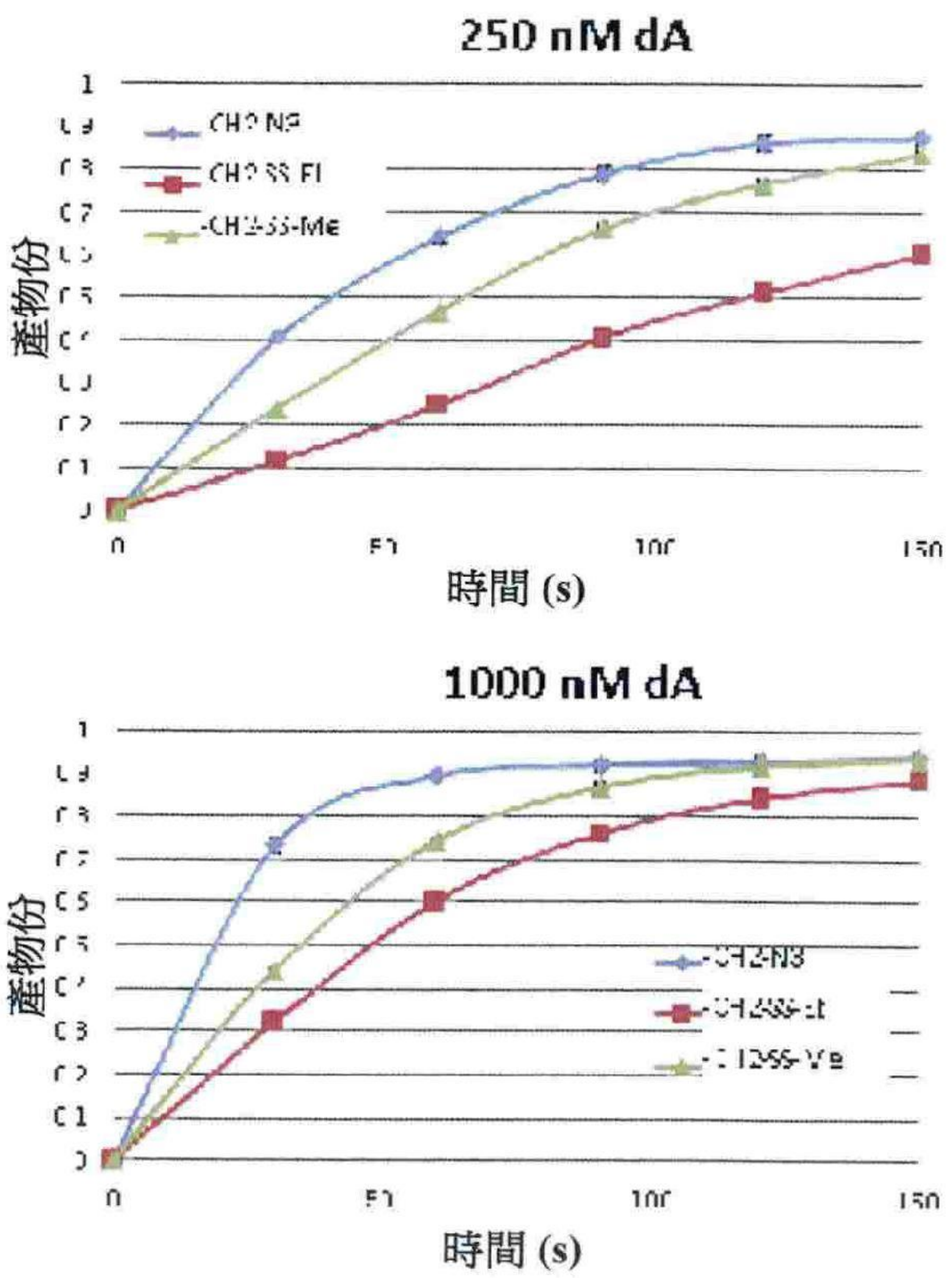


圖 34

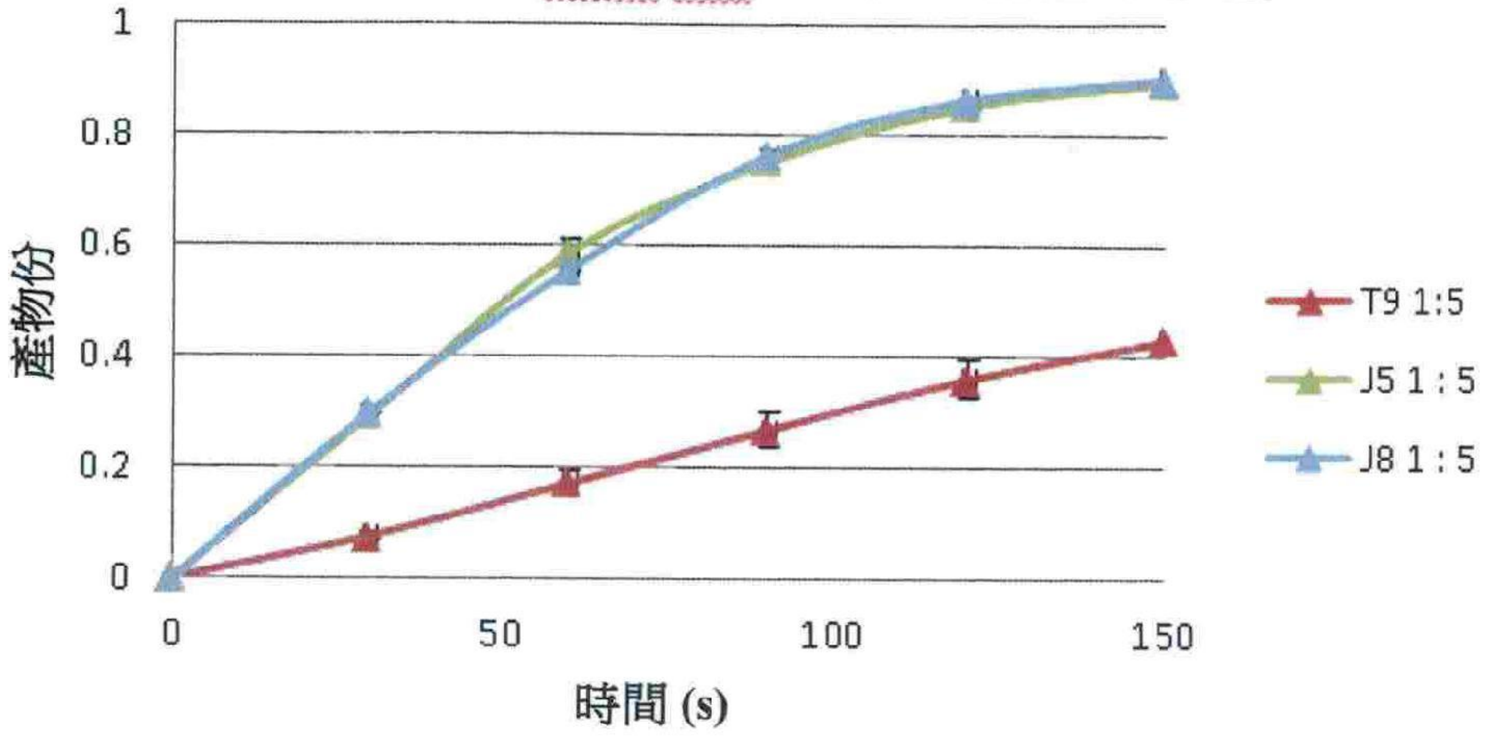

250 nM dC 3'-O– CH2-SS-Et
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
產物份
0
50
100
150
時間 (s)
T9 1:5
J5 1 : 5
J8 1 : 5

圖 35

	L-系列	G-系列	A-系列
	(96)	(99)	(98)
經標識之 C	400	250	180
經標識之 T	30	22.5	90
經標識之 A	100	150	120
經標識之 G	100	80	120
未經標識之 C	2000	2000	2000
未經標識之 T	2000	2000	2000
未經標識之 A	1000	1000	1000
未經標識之 G	500	500	500

圖 36

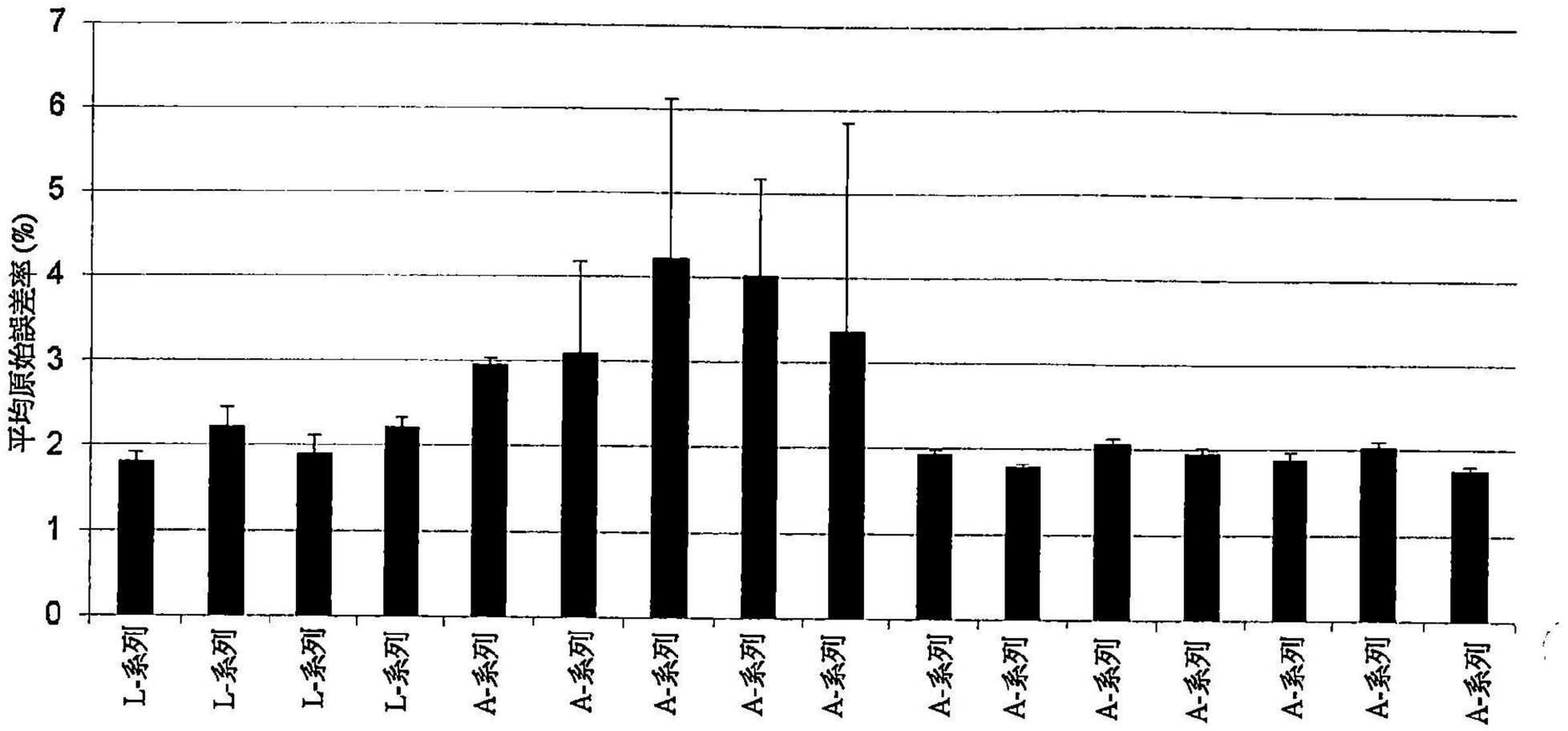

平均原始誤差率 (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
L-系列
L-系列
L-系列
L-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列

圖 37

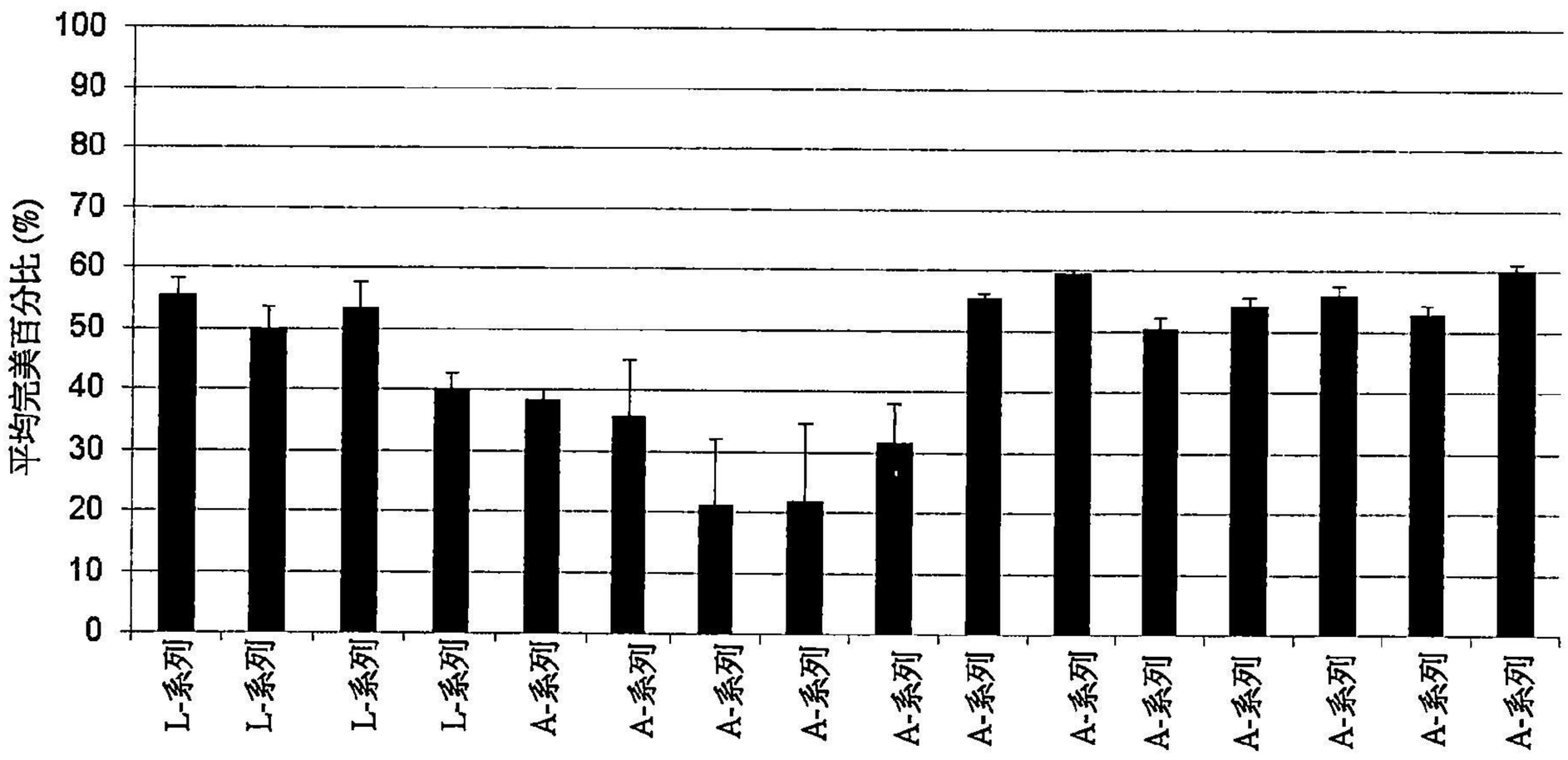

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
平均完美百分比 (%)
L-系列
L-系列
L-系列
L-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列
A-系列

圖 38

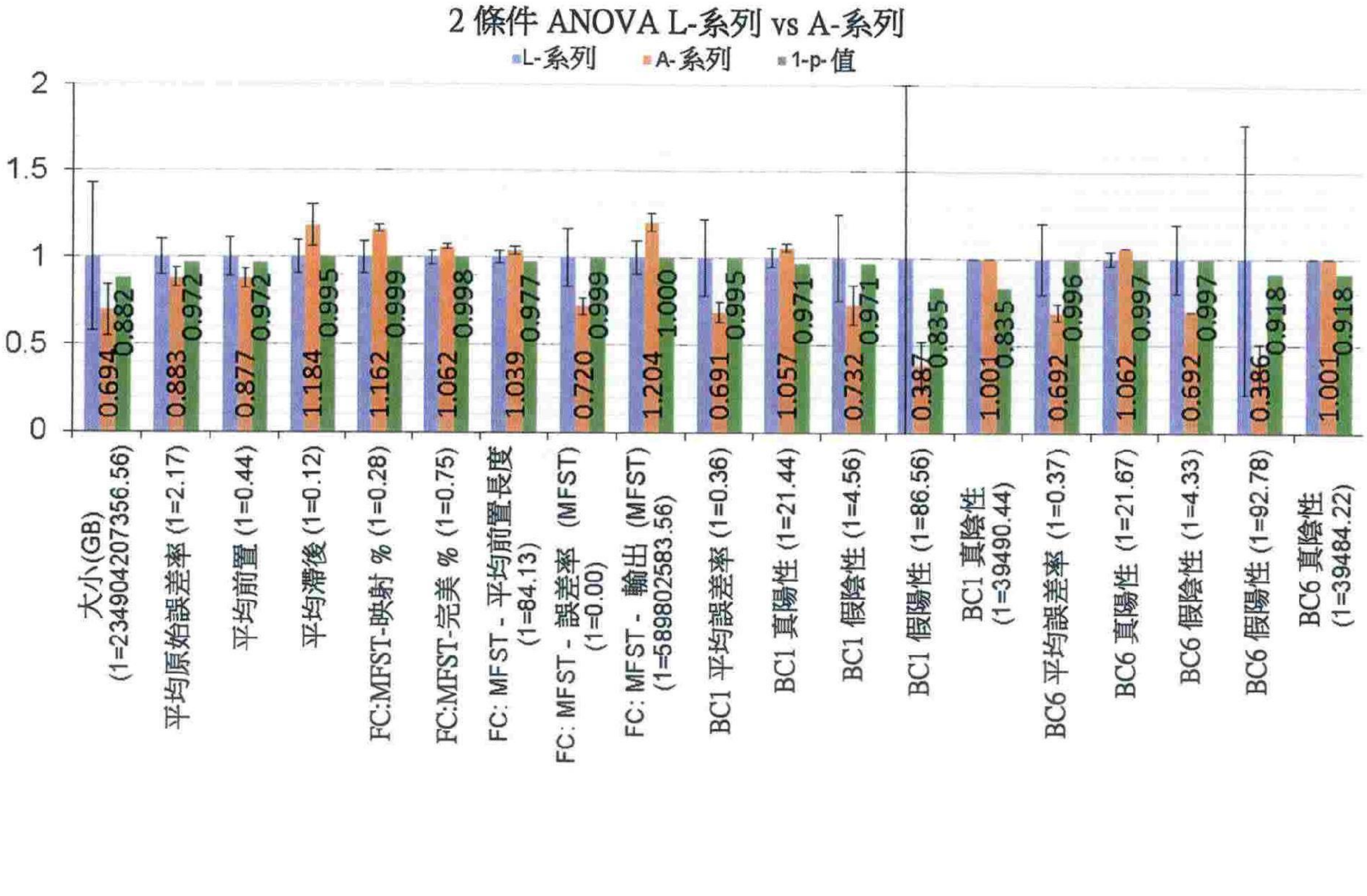

2 條件 ANOVA L-系列 vs A-系列
L-系列
A-系列
1-p-值
2
1.5
1
0.5
0
大小(GB) (1=23490420735 6.56)
平均原始誤差率 (1=2.17)
平均前置 (1=0.44)
平均滯後 (1=0.12)
FC:MFST-映射 % (1=0.28)
FC:MFST-完美 % (1=0.75)
FC: MFST - 平均前置長度 (1=84.13)
FC: MFST - 誤差率 (MFST) (1=0.00)
FC: MFST - 輸出 (MFST) (1=589802583.56)
BC1 平均誤差率 (1=0.36)
BC1 真陽性 (1=21.44)
BC1 假陰性 (1=4.56)
BC1 假陽性 (1=86.56)
BC1 真陰性 (1=39490.44)
BC6 平均誤差率 (1=0.37)
BC6 真陽性 (1=21.67)
BC6 假陰性 (1=4.33)
BC6 假陽性 (1=92.78)
BC6 真陰性 (1=39484.22)
0.694
0.882
0.883
0.972
0.877
0.972
1.184
0.995
1.162
0.999
1.062
0.998
1.039
0.977
0.720
0.999
1.204
1.000
0.691
0.995
1.057
0.971
0.732
0.971
0.387
0.835
1.001
0.835
0.692
0.996
1.062
0.997
0.692
0.997
0.386
0.918
1.001
0.918

圖 39

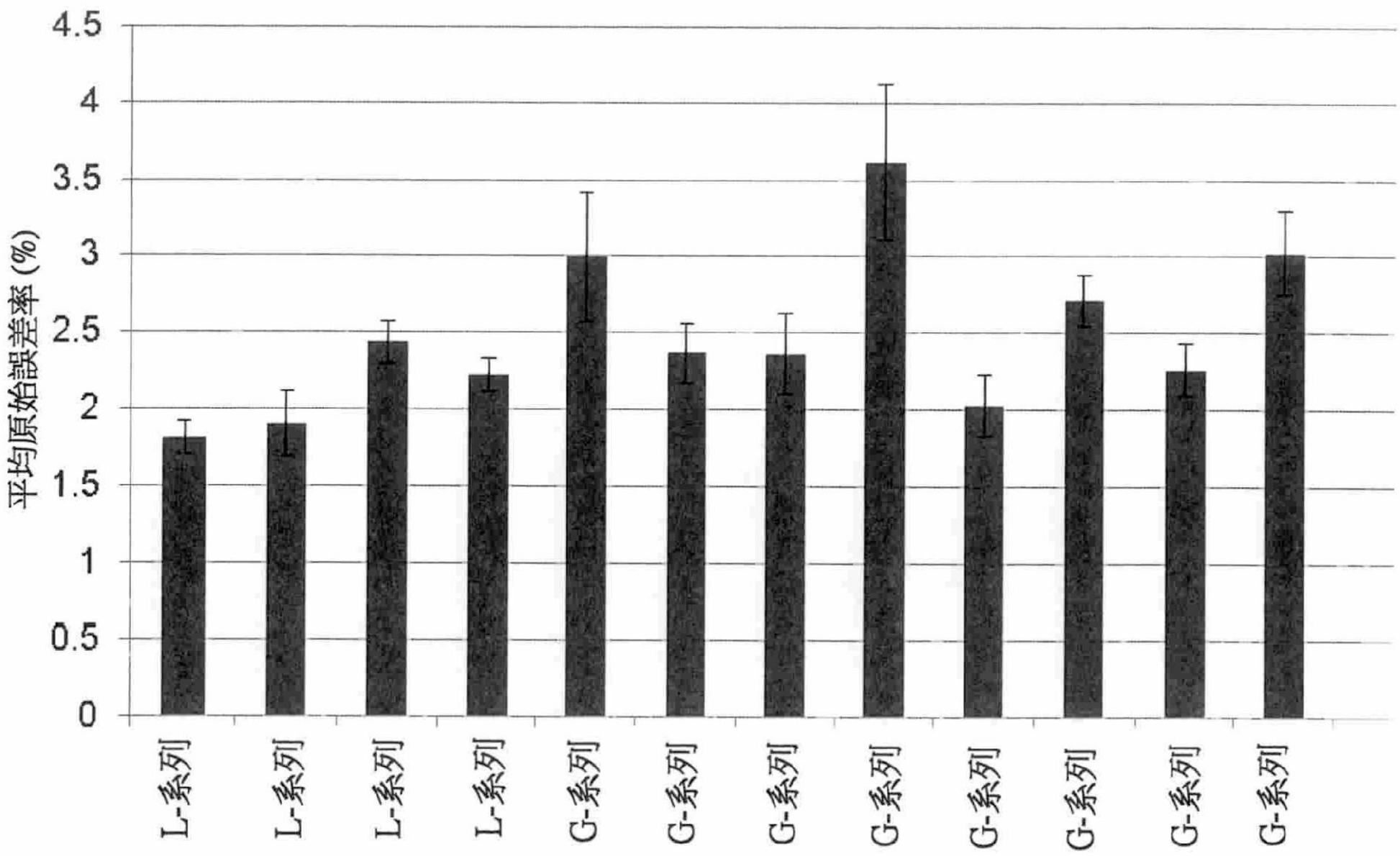

4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
平均原始誤差率 (%)
L-系列
L-系列
L-系列
L-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列

圖 40

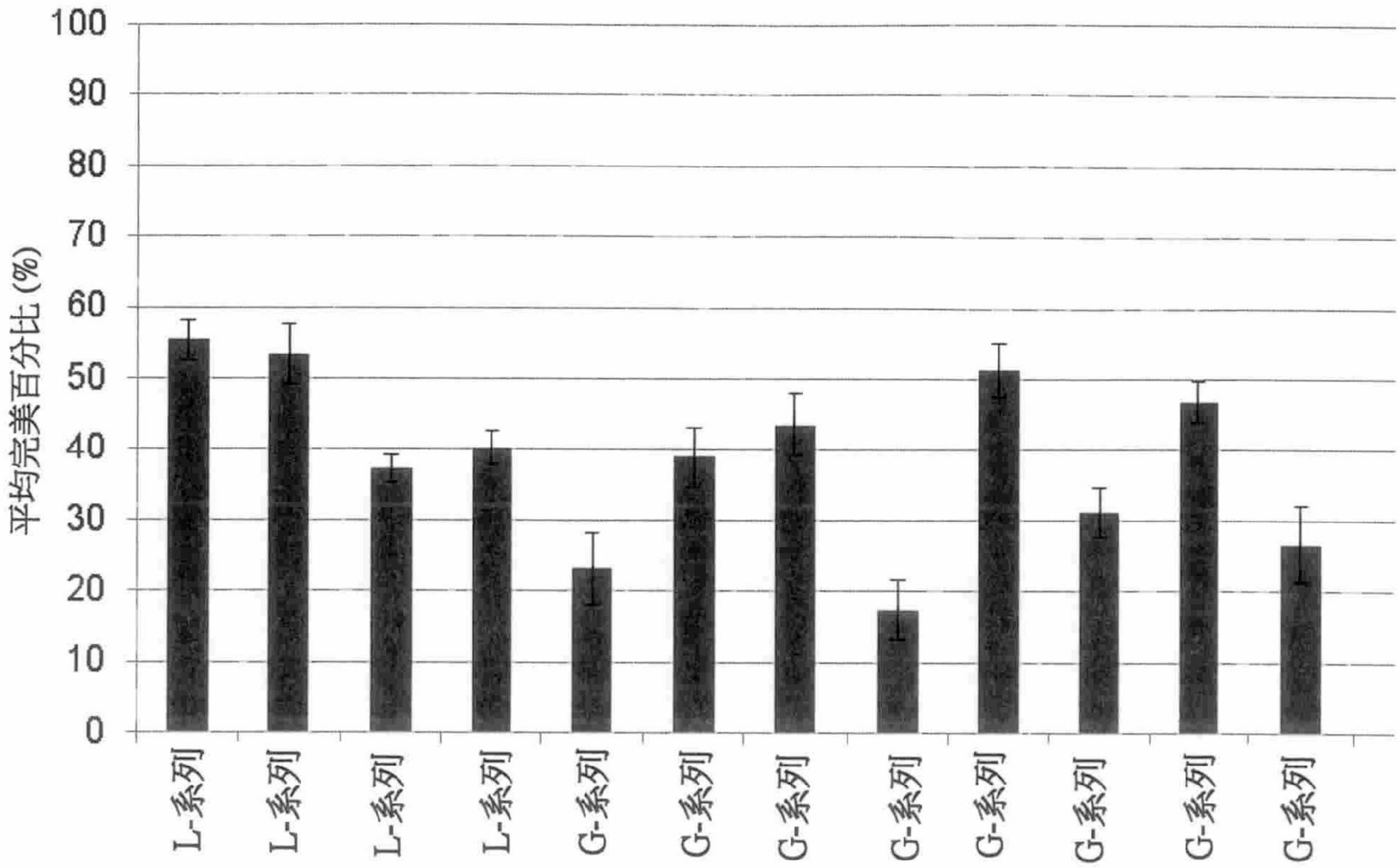

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
平均完美百分比 (%)
L-系列
L-系列
L-系列
L-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列
G-系列

圖 41

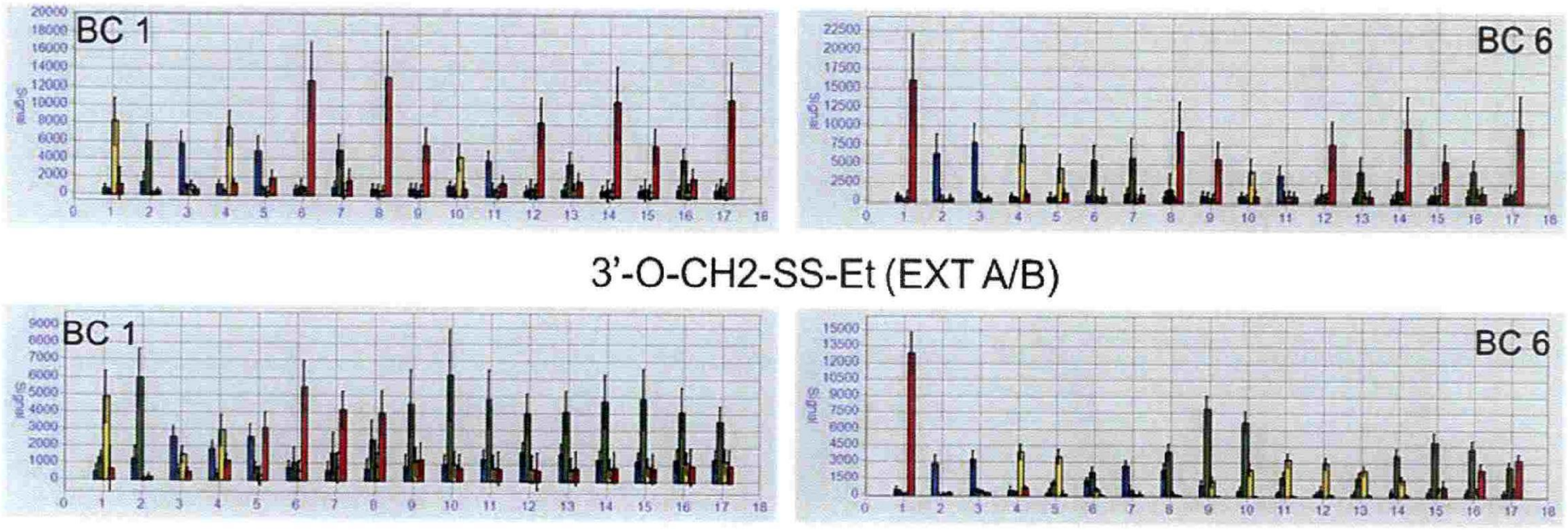


圖 42

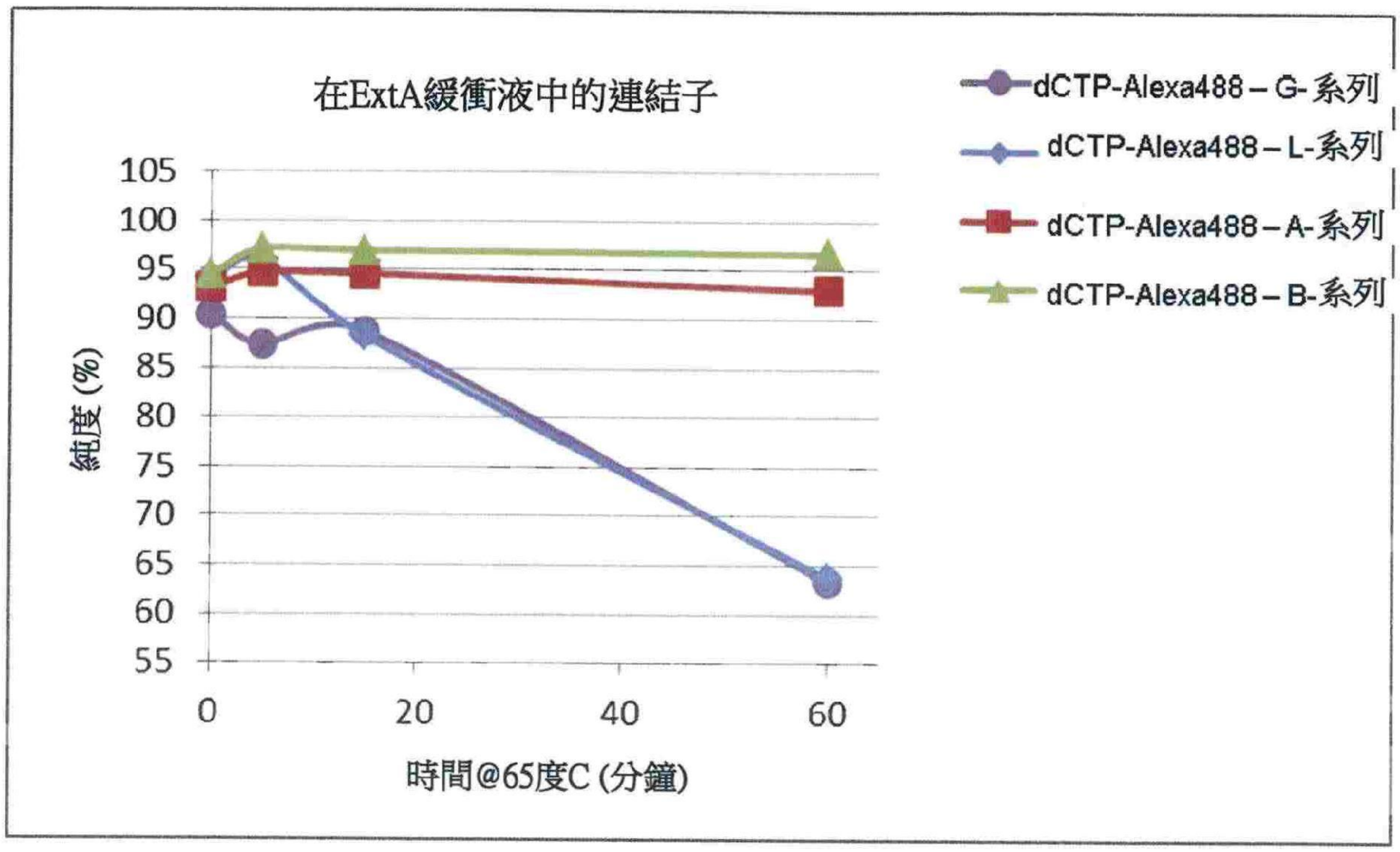

在ExtA緩衝液中的連結子
dCTP-Alexa488 – G-系列
dCTP-Alexa488 – L-系列
dCTP-Alexa488 – A-系列
dCTP-Alexa488 – B-系列
105
100
95
90
85
80
75
70
65
60
55
純度 (%)
0
20
40
60
時間@65度C (分鐘)

圖 43

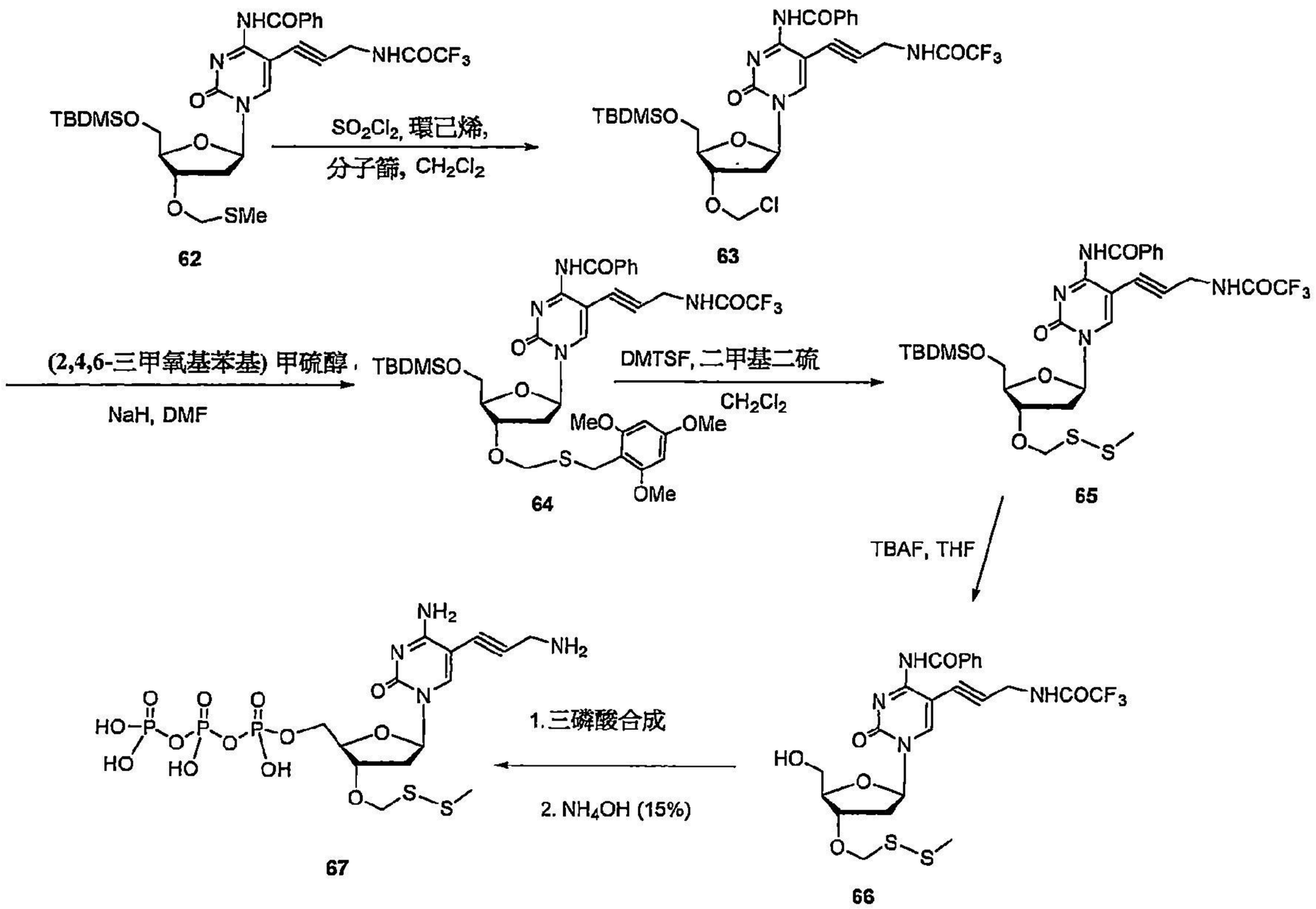

NHCOPh
NHCOCF3
TBDMSO
SMe
62
SO2Cl2, 環己烯,
分子篩, CH2Cl2
Cl
63
(2,4,6-三甲氧基苯基) 甲硫醇,
NaH, DMF
MeO
OMe
OMe
64
DMTSF, 二甲基二硫
CH2Cl2
65
TBAF, THF
NH2
HO
HO
HO
OH
67
1.三磷酸合成
2. NH4OH (15%)
66

圖 44

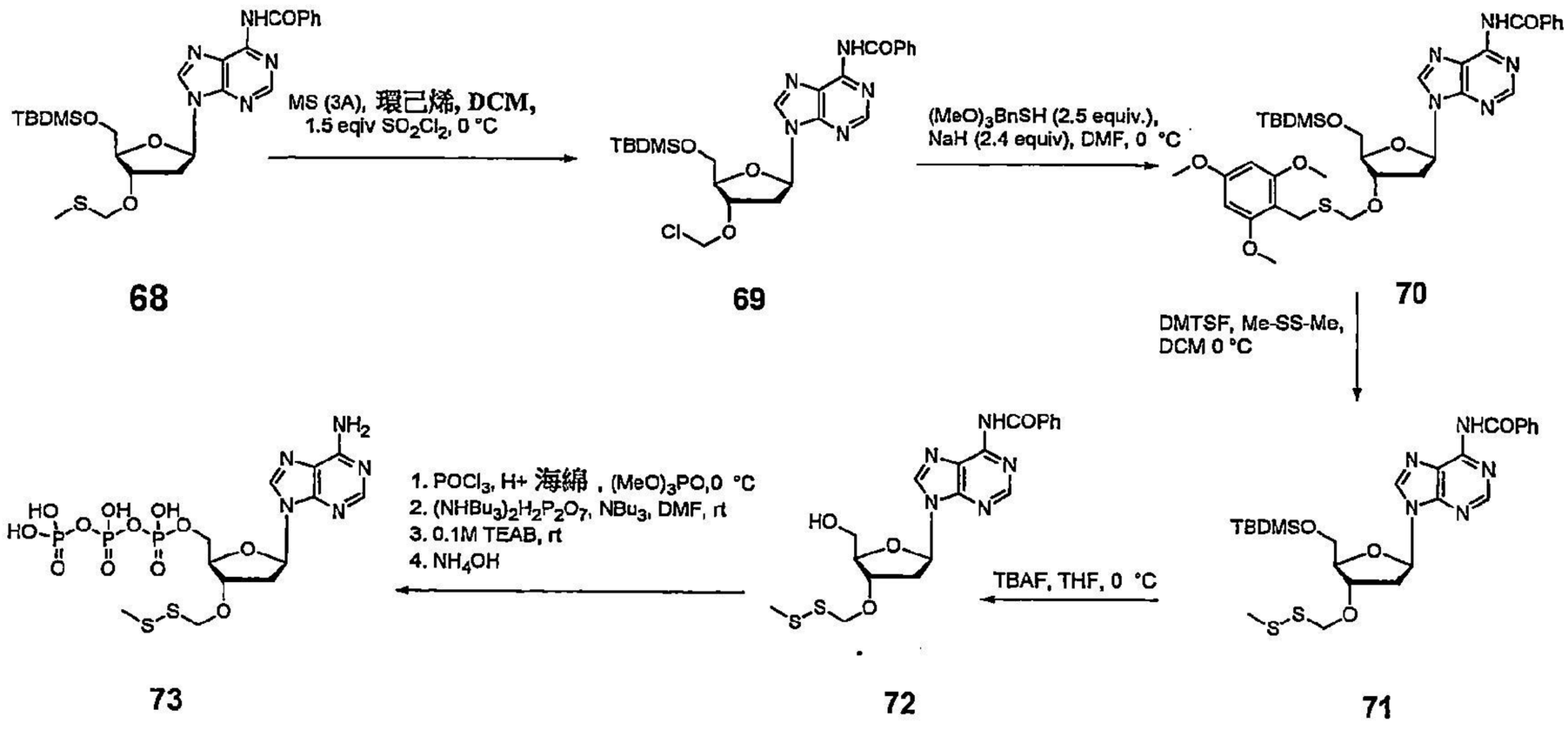

NHCOPh
TBDMSO
MS (3A), 環己烯, DCM,
1.5 eqiv SO_2Cl_2, 0 °C
Cl
(MeO)3BnSH (2.5 equiv.),
NaH (2.4 equiv), DMF, 0 °C
DMTSF, Me-SS-Me,
DCM 0 °C
HO
1. $POCl_3$, H+ 海綿 , $(MeO)_3PO$,0 °C
2. $(NHBu_3)_2H_2P_2O_7$, NBu_3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH_4OH
TBAF, THF, 0 °C
NH_2
68
69
70
71
72
73

圖 45

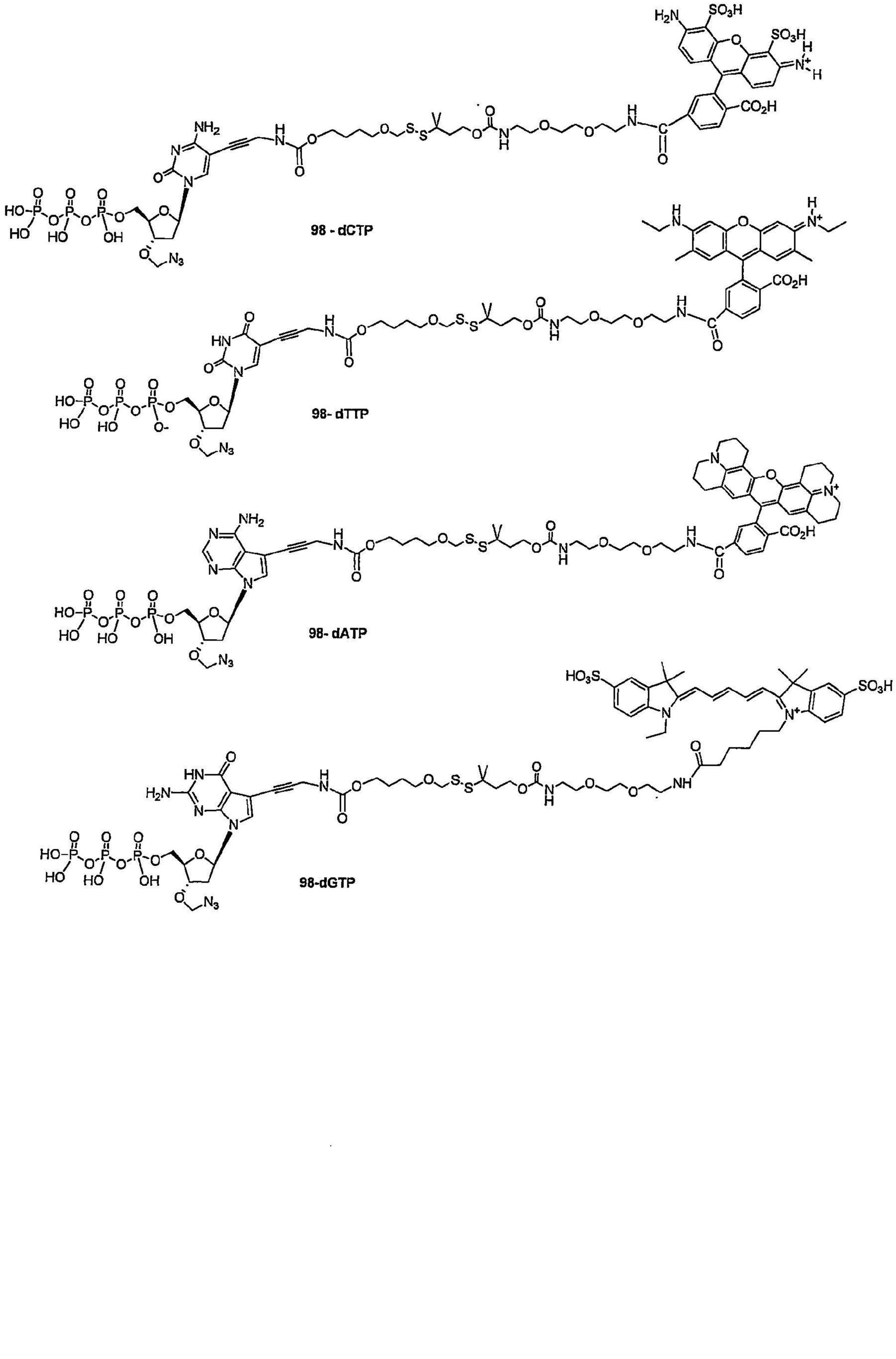


圖 46

	濃度 [nM]	化合物 編號
經標識之 C	180	72
經標識之 T	270	74
經標識之 A	360	76
經標識之 G	120	78
未經標識之 C	2000	126
未經標識之 T	2000	138
未經標識之 A	1000	120
未經標識之 G	500	132

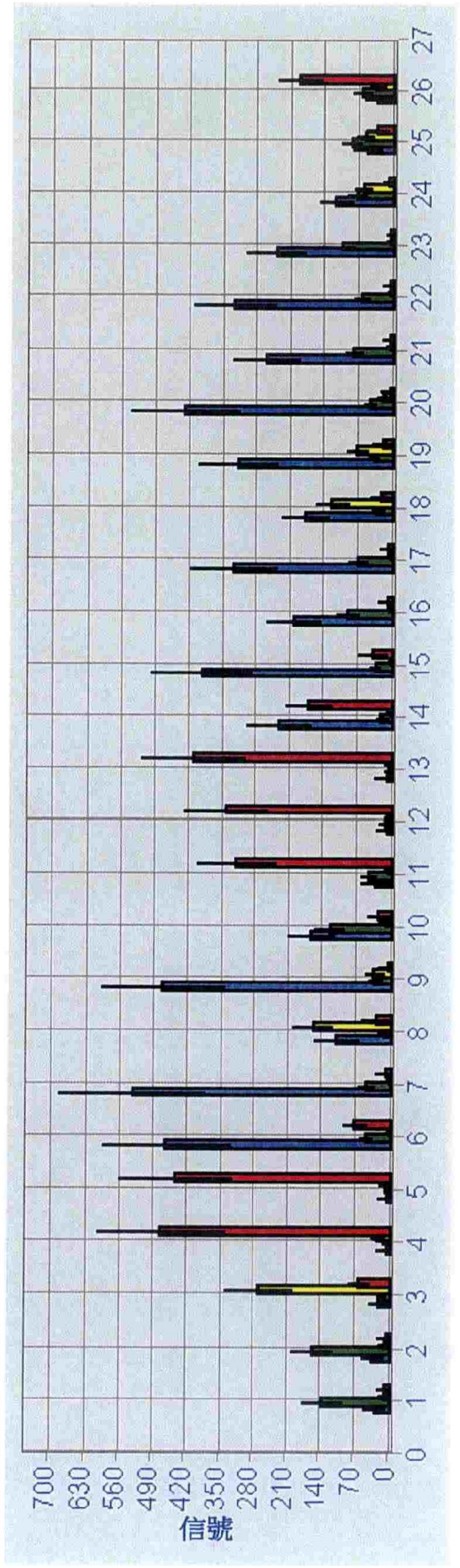
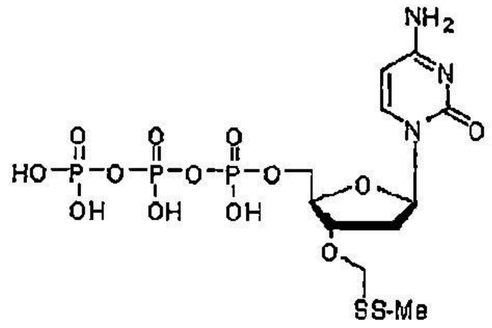

27
26
25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
700
630
560
490
420
350
280
210
140
70
0
信號

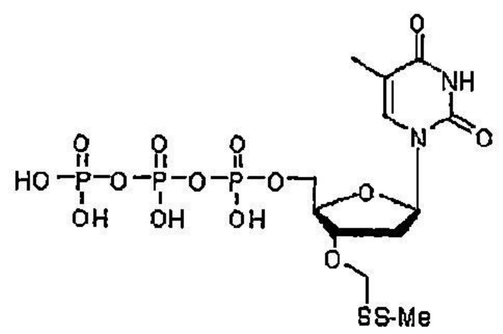
圖 47

圖 48

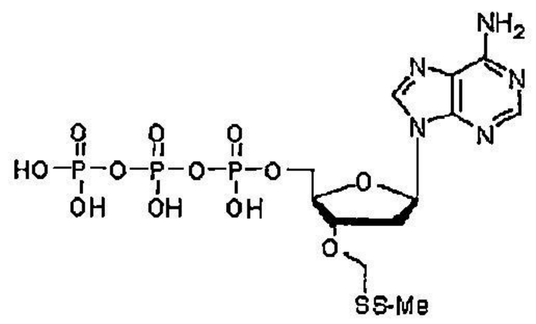
C


NH2
N
N
O
HO
P
O
OH
O
SS-Me

T


O
NH
N
O
HO
P
O
OH
O
SS-Me

A


NH2
N
N
N
N
HO
P
O
OH
O
SS-Me

G

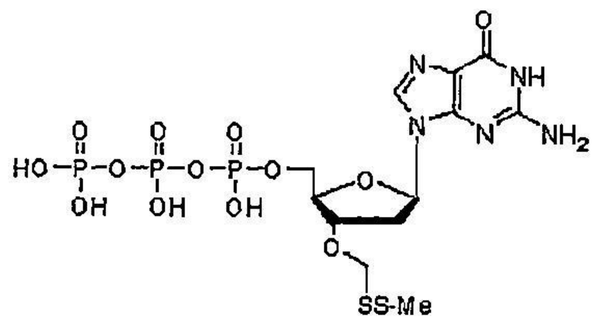

O
NH
N
N
N
NH2
HO
P
O
OH
O
SS-Me

圖 49

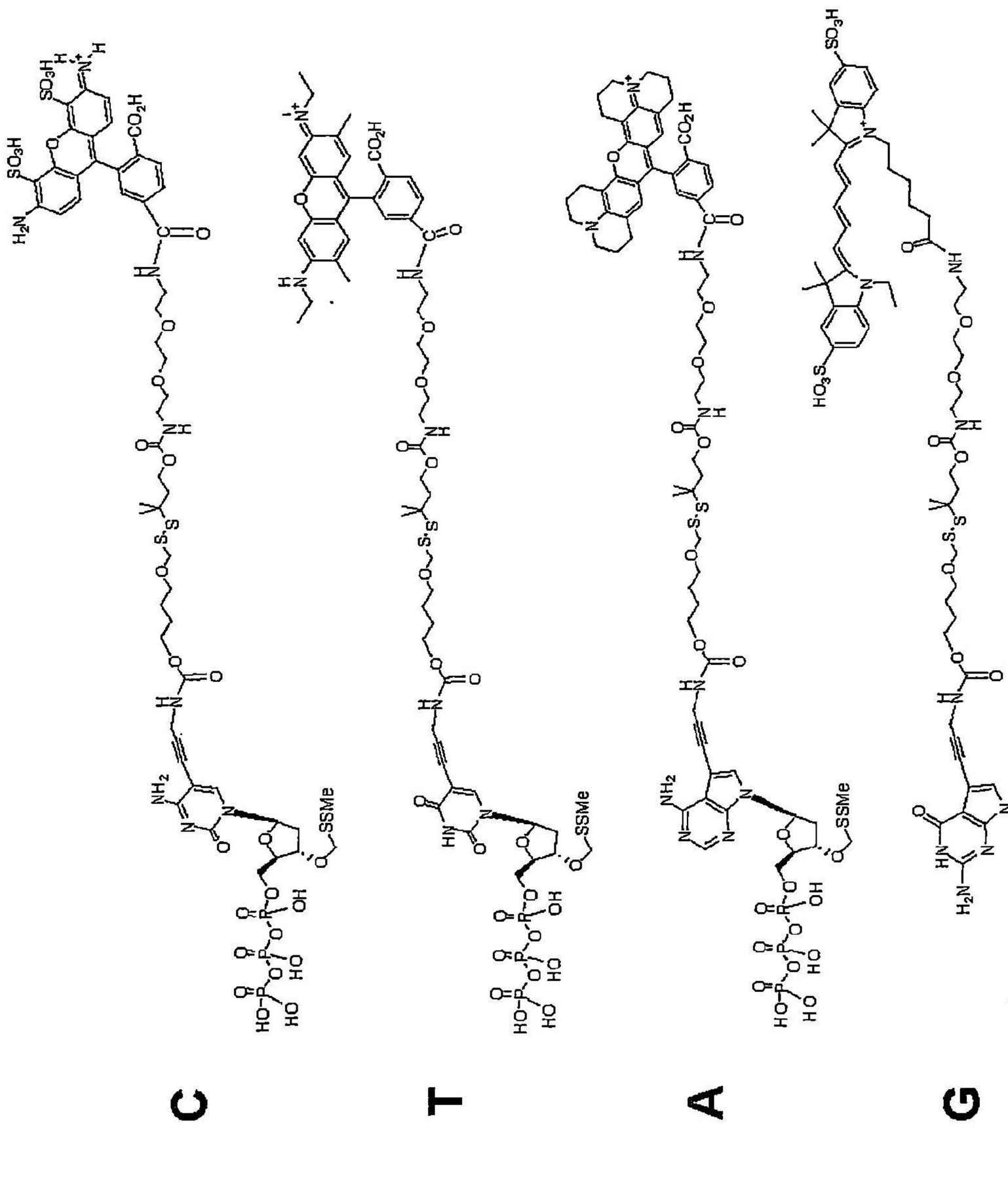


圖 50

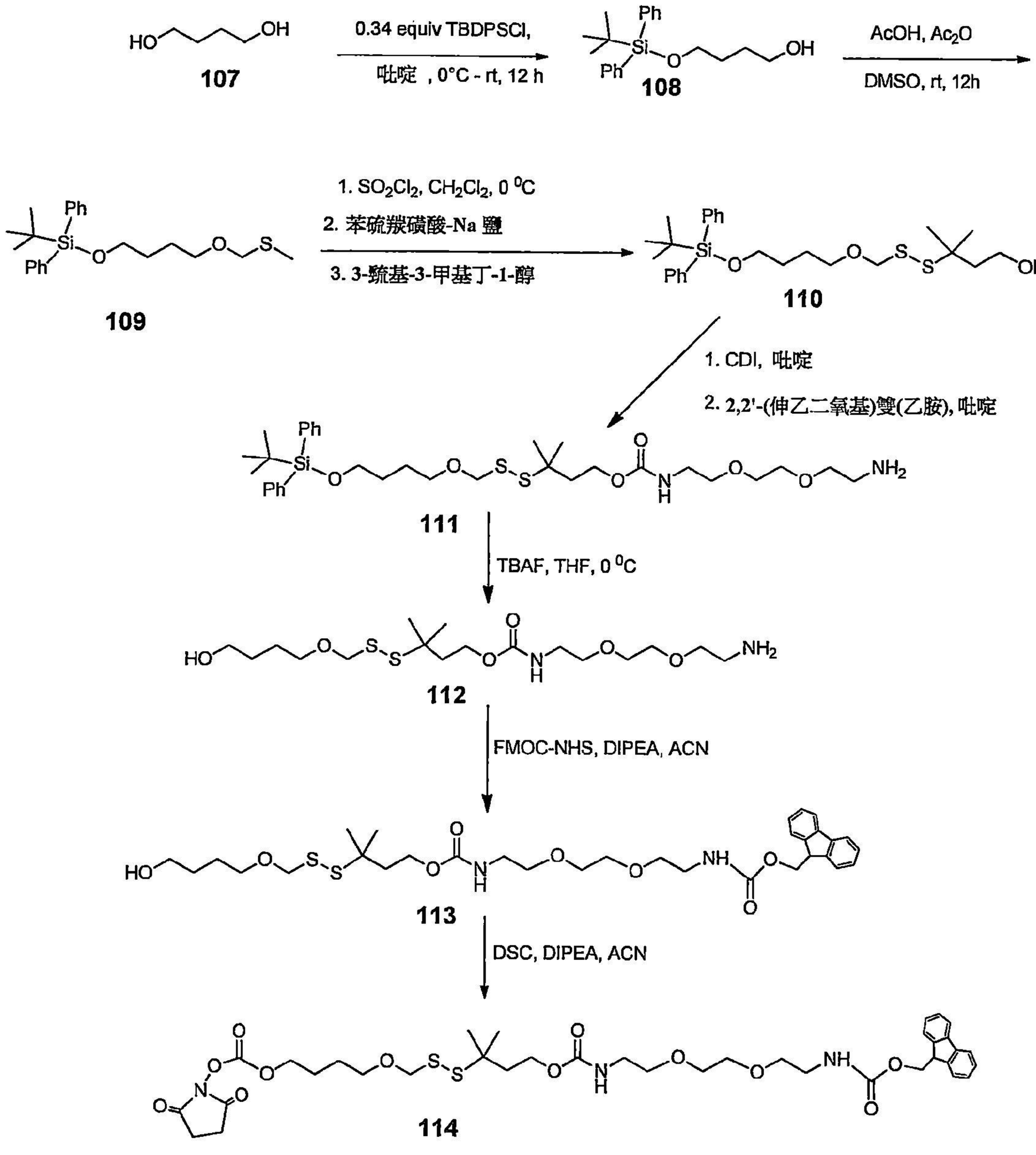

HO
OH
107
0.34 equiv TBDPSCl,
吡啶 , 0°C - rt, 12 h
Ph
Si
O
Ph
OH
108
AcOH, Ac2O
DMSO, rt, 12h
1. SO2Cl2, CH2Cl2, 0 °C
2. 苯硫羰磺酸-Na 鹽
3. 3-巰基-3-甲基丁-1-醇
S
109
110
1. CDI, 吡啶
2. 2,2'-(伸乙二氧基)雙(乙胺), 吡啶
O
N
H
NH2
111
TBAF, THF, 0 °C
HO
112
FMOC-NHS, DIPEA, ACN
NH
113
DSC, DIPEA, ACN
114

圖 51

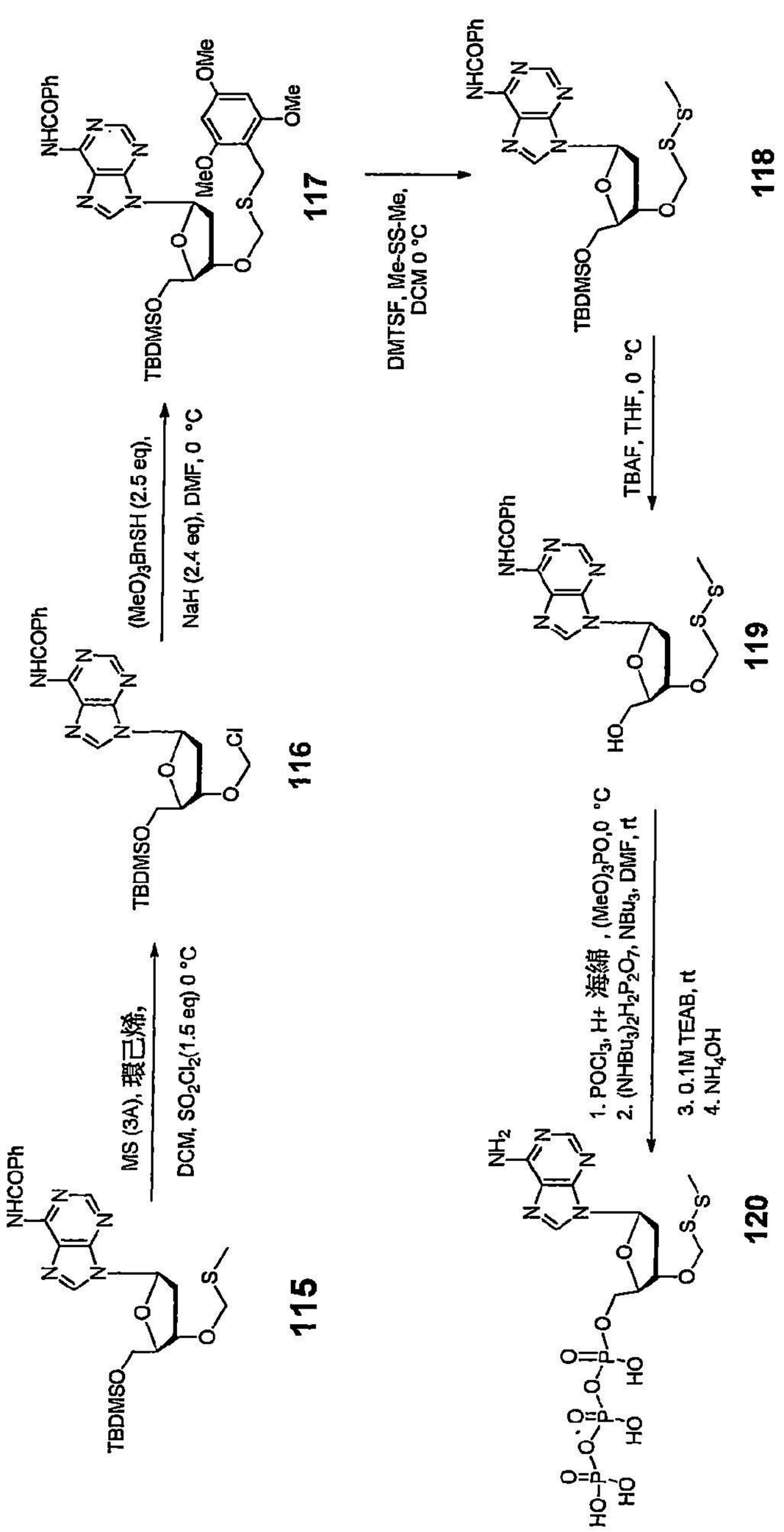

NHCOPh
TBDMSO
MS (3A), 環己烯,
DCM, SO_2Cl_2(1.5 eq) 0 °C
115
$(MeO)_3BnSH$ (2.5 eq),
NaH (2.4 eq), DMF, 0 °C
116
MeO
OMe
OMe
117
DMTSF, Me-SS-Me,
DCM 0 °C
118
TBAF, THF, 0 °C
119
1. $POCl_3$, H+ 海綿 , $(MeO)_3PO$,0 °C
2. $(NHBu_3)_2H_2P_2O_7$, NBu_3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH_4OH
120
HO
OH

圖 52

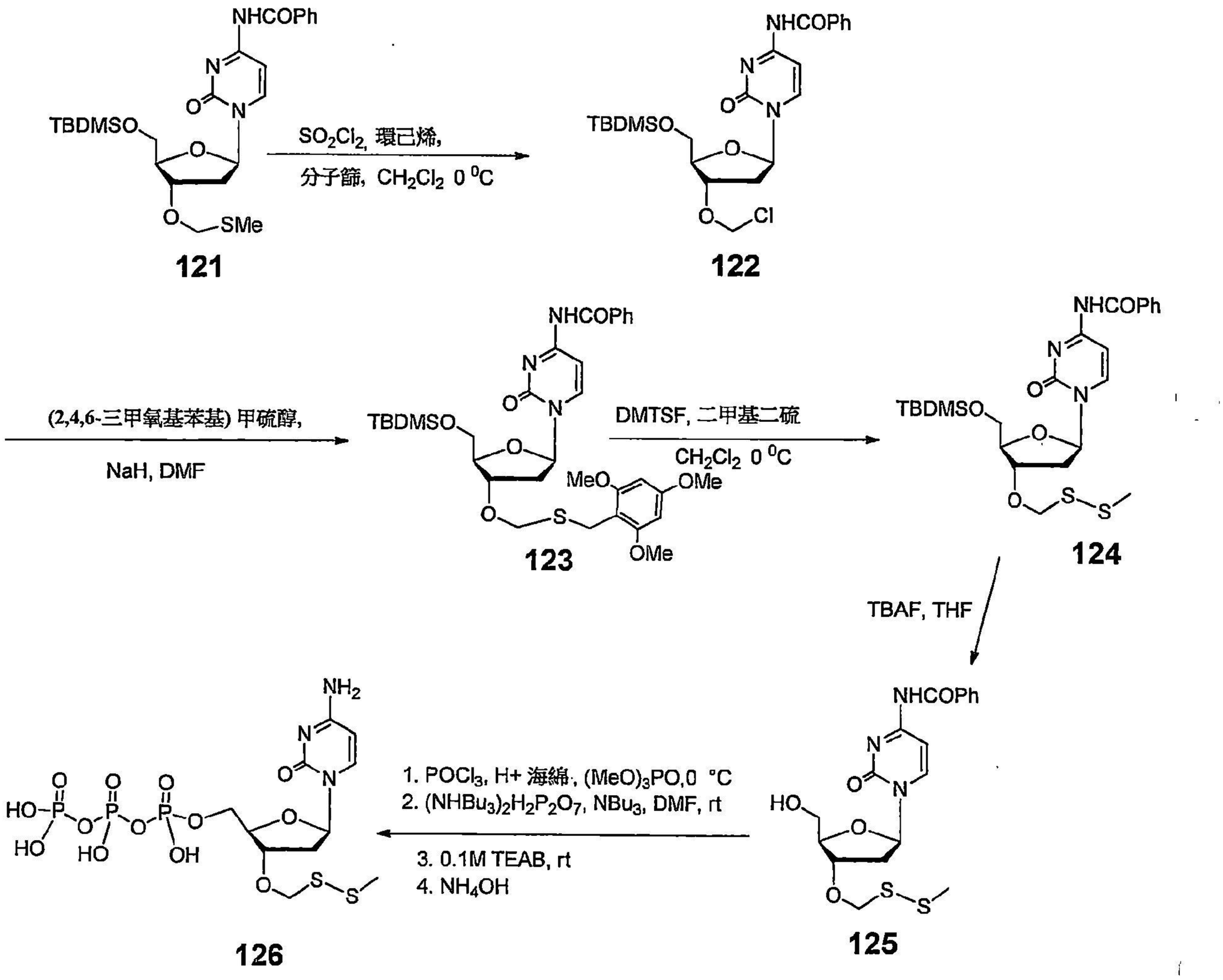

NHCOPh
TBDMSO
SMe
121
SO_2Cl_2, 環己烯,
分子篩, CH_2Cl_2 0 °C
Cl
122
(2,4,6-三甲氧基苯基) 甲硫醇,
NaH, DMF
123
MeO
OMe
OMe
DMTSF, 二甲基二硫
CH_2Cl_2 0 °C
124
TBAF, THF
125
HO
1. $POCl_3$, H+ 海綿, $(MeO)_3PO$,0 °C
2. $(NHBu_3)_2H_2P_2O_7$, NBu_3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH_4OH
NH_2
HO
OH
126

圖 53

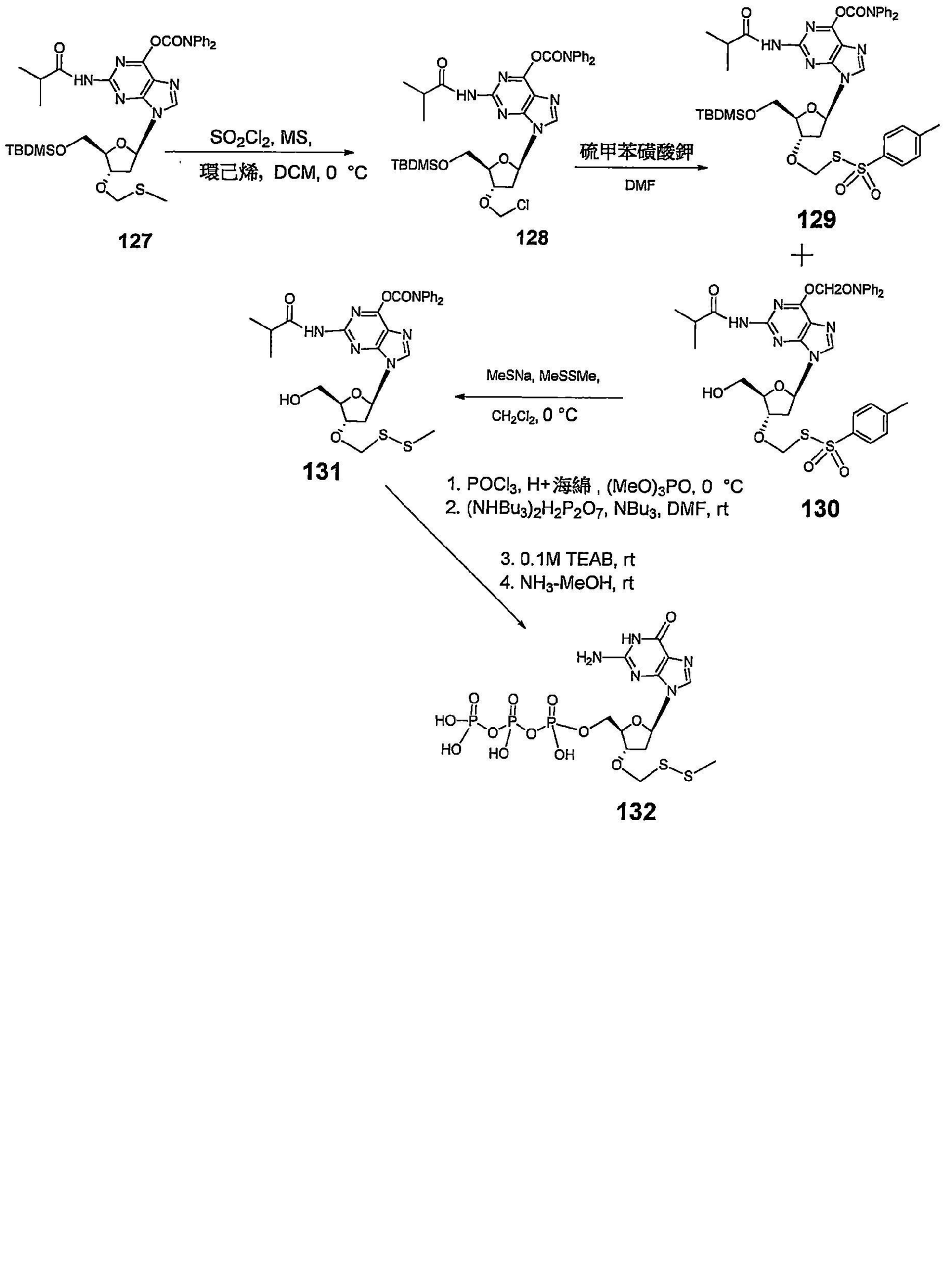

OCONPh2
TBDMSO
SO2Cl2, MS,
環己烯, DCM, 0 °C
硫甲苯磺酸鉀
DMF
127
128
129
130
131
OCH2ONPh2
HO
MeSNa, MeSSMe,
CH2Cl2, 0 °C
1. POCl3, H+海綿 , (MeO)3PO, 0 °C
2. (NHBu3)2H2P2O7, NBu3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH3-MeOH, rt
132

圖 54

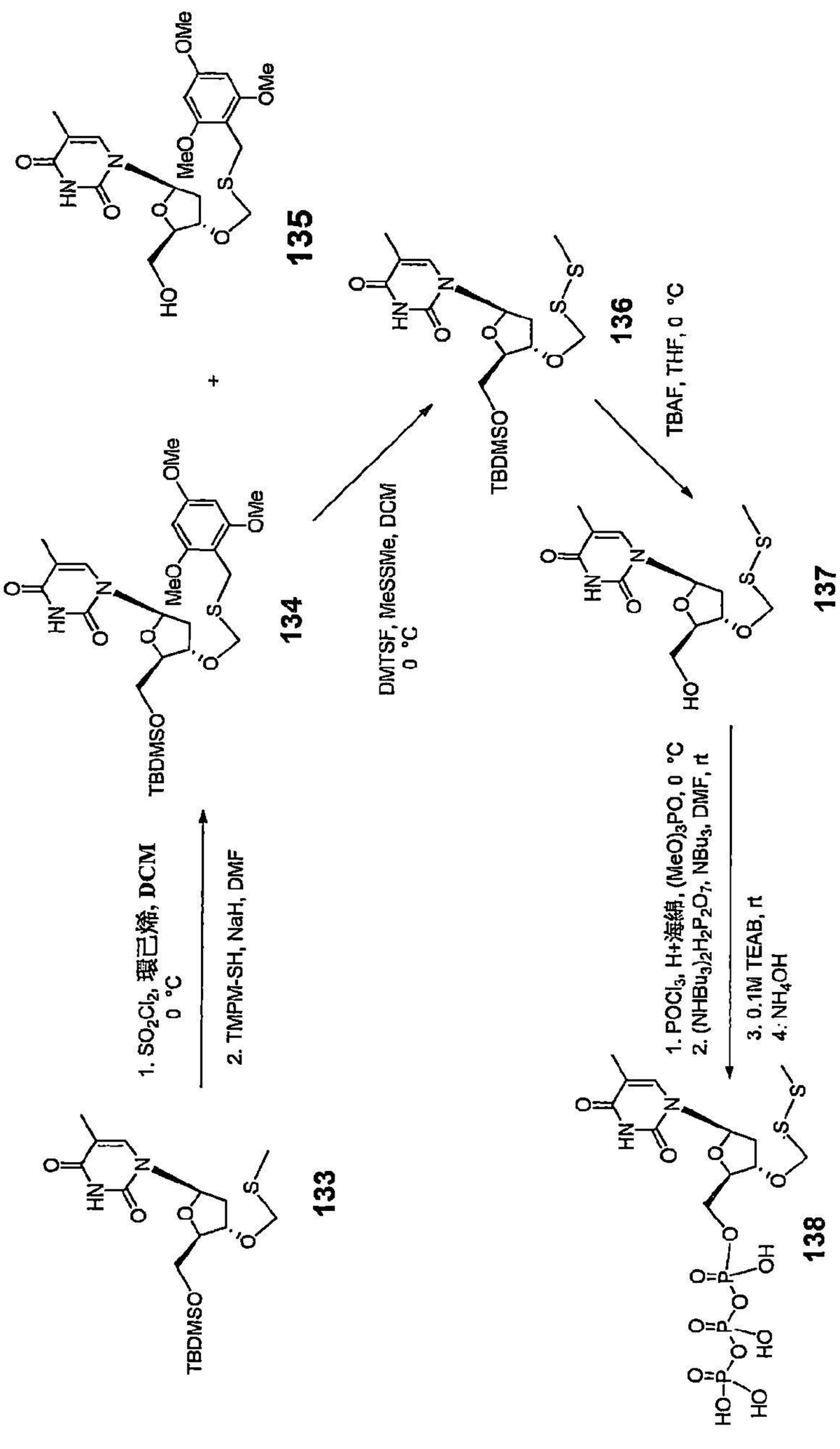

OMe
MeO
OMe
HO
135
+
OMe
MeO
OMe
134
DMTSF, MeSSMe, DCM
0 °C
TBDMSO
136
TBAF, THF, 0 °C
HO
137
1. SO2Cl2, 環己烯, DCM
0 °C
2. TMPM-SH, NaH, DMF
TBDMSO
133
1. POCl3, H+海綿, (MeO)3PO, 0 °C
2. (NHBu3)2H2P2O7, NBu3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH4OH
HO
138

圖 55

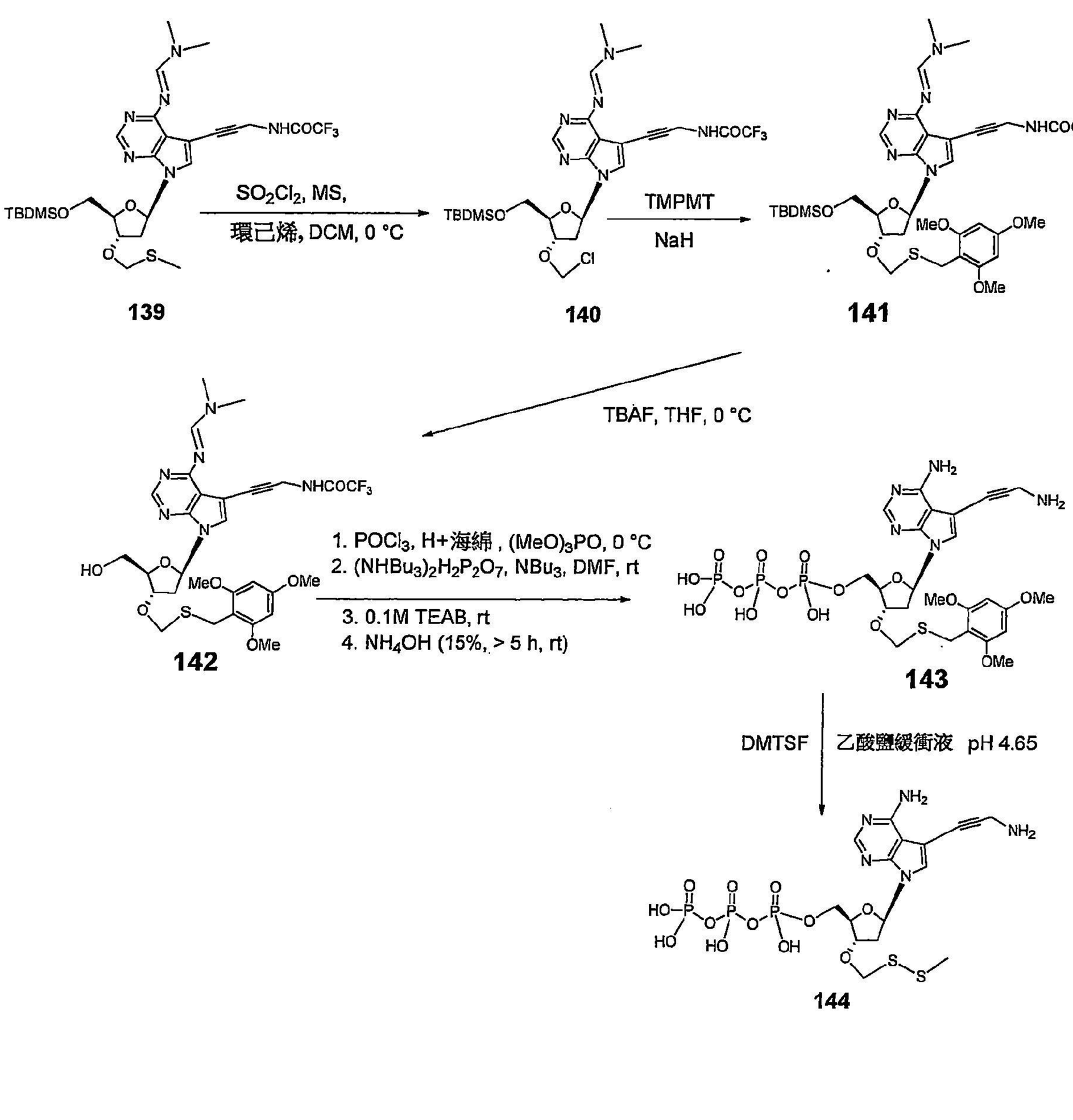

SO2Cl2, MS,
環己烯, DCM, 0 °C
TMPMT
NaH
TBAF, THF, 0 °C
1. POCl3, H+海綿 , (MeO)3PO, 0 °C
2. (NHBu3)2H2P2O7, NBu3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH4OH (15%, > 5 h, rt)
DMTSF
乙酸鹽緩衝液 pH 4.65
139
140
141
142
143
144

圖 56

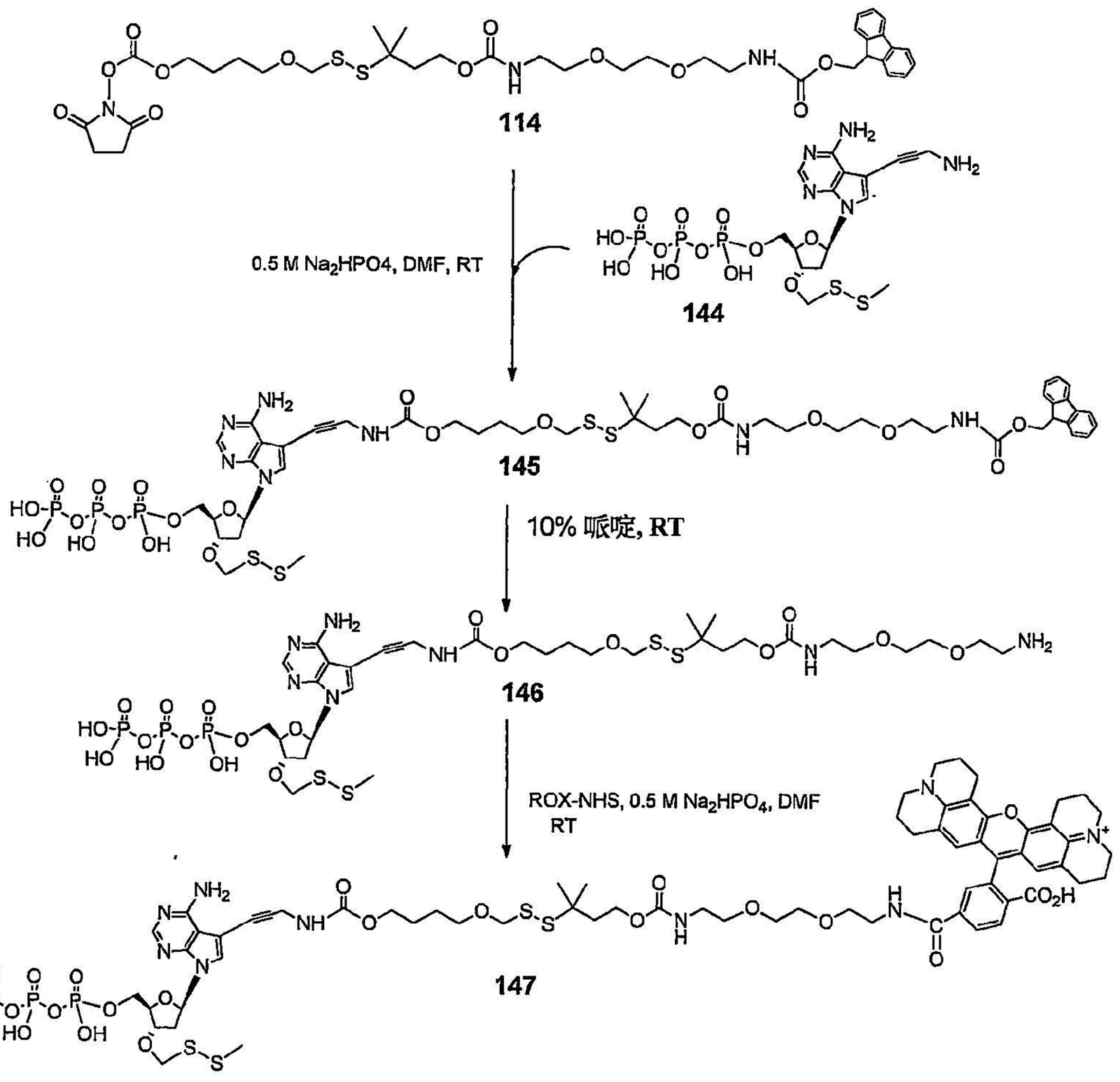

114
0.5 M Na2HPO4, DMF, RT
144
145
10% 哌啶, RT
146
ROX-NHS, 0.5 M Na2HPO4, DMF
RT
147

圖 57

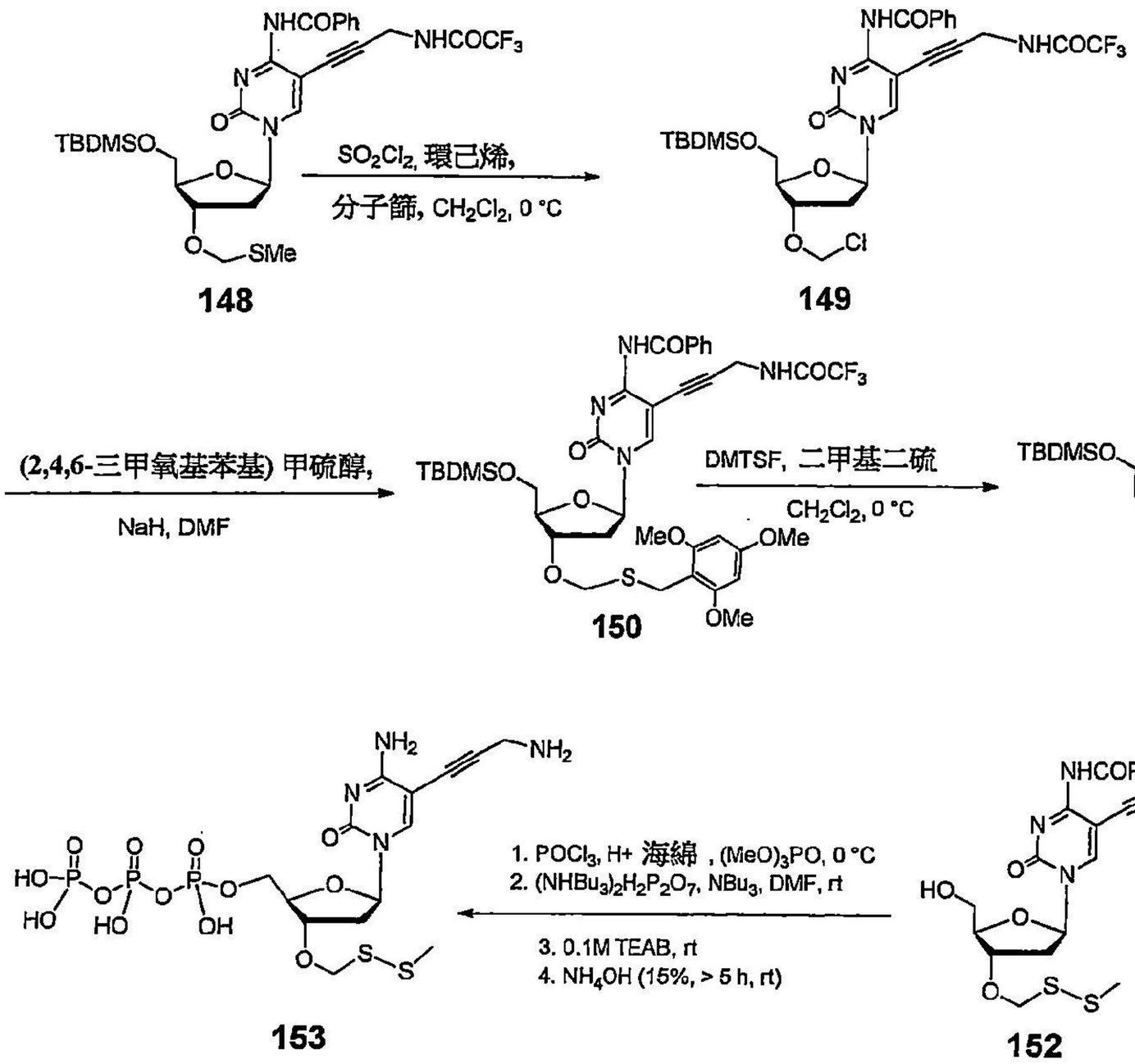

NHCOPh
NHCOCF3
TBDMSO
SMe
SO2Cl2, 環己烯,
分子篩, CH2Cl2, 0 °C
Cl
148
149
(2,4,6-三甲氧基苯基) 甲硫醇,
NaH, DMF
MeO
OMe
OMe
150
DMTSF, 二甲基二硫
CH2Cl2, 0 °C
151
TBAF, THF, 0 °C
HO
152
1. POCl3, H+ 海綿 , (MeO)3PO, 0 °C
2. (NHBu3)2H2P2O7, NBu3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH4OH (15%, > 5 h, rt)
NH2
HO
OH
153

圖 58

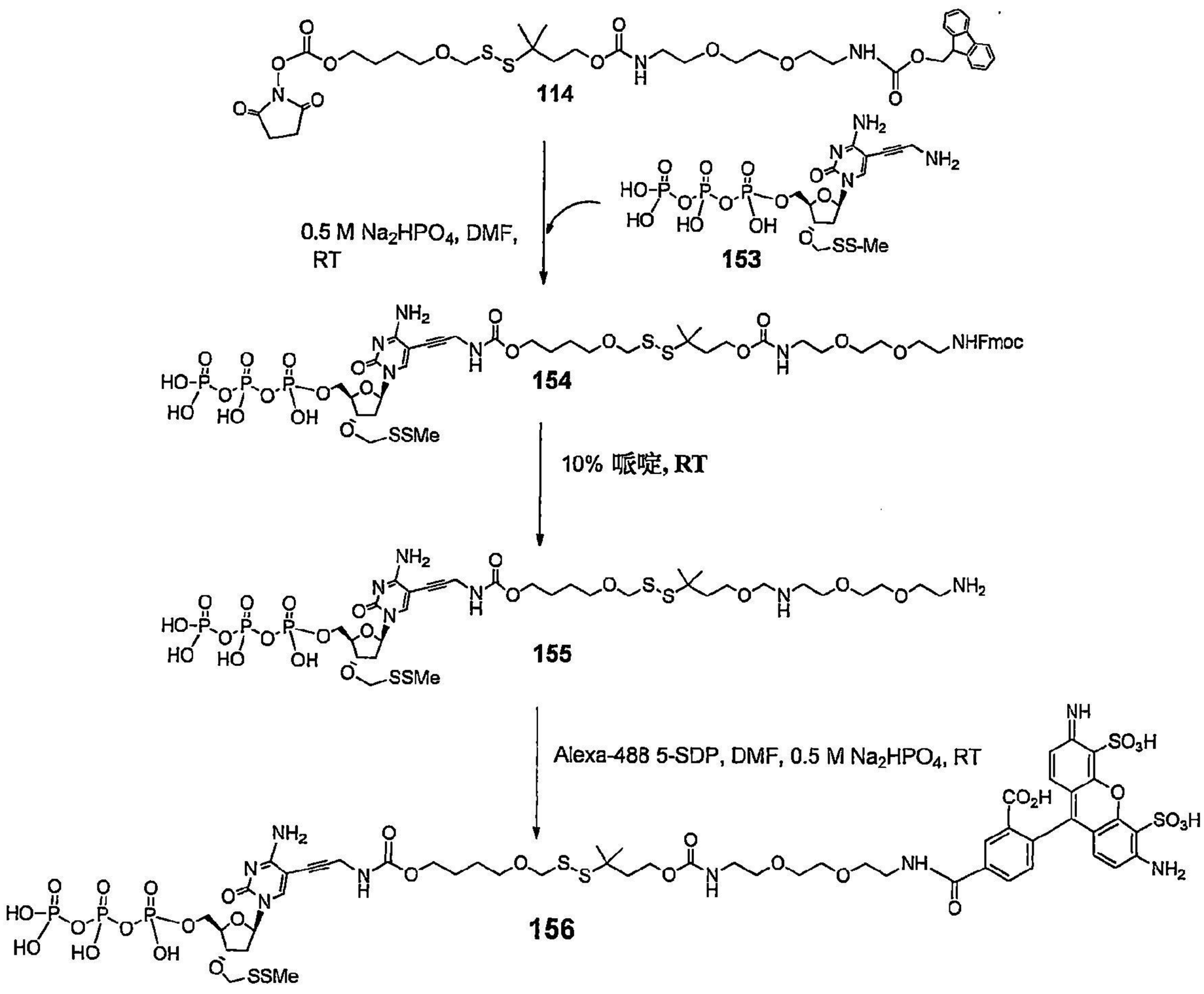

114
153
0.5 M Na2HPO4, DMF, RT
154
SSMe
10% 哌啶, RT
155
Alexa-488 5-SDP, DMF, 0.5 M Na2HPO4, RT
156

圖 59

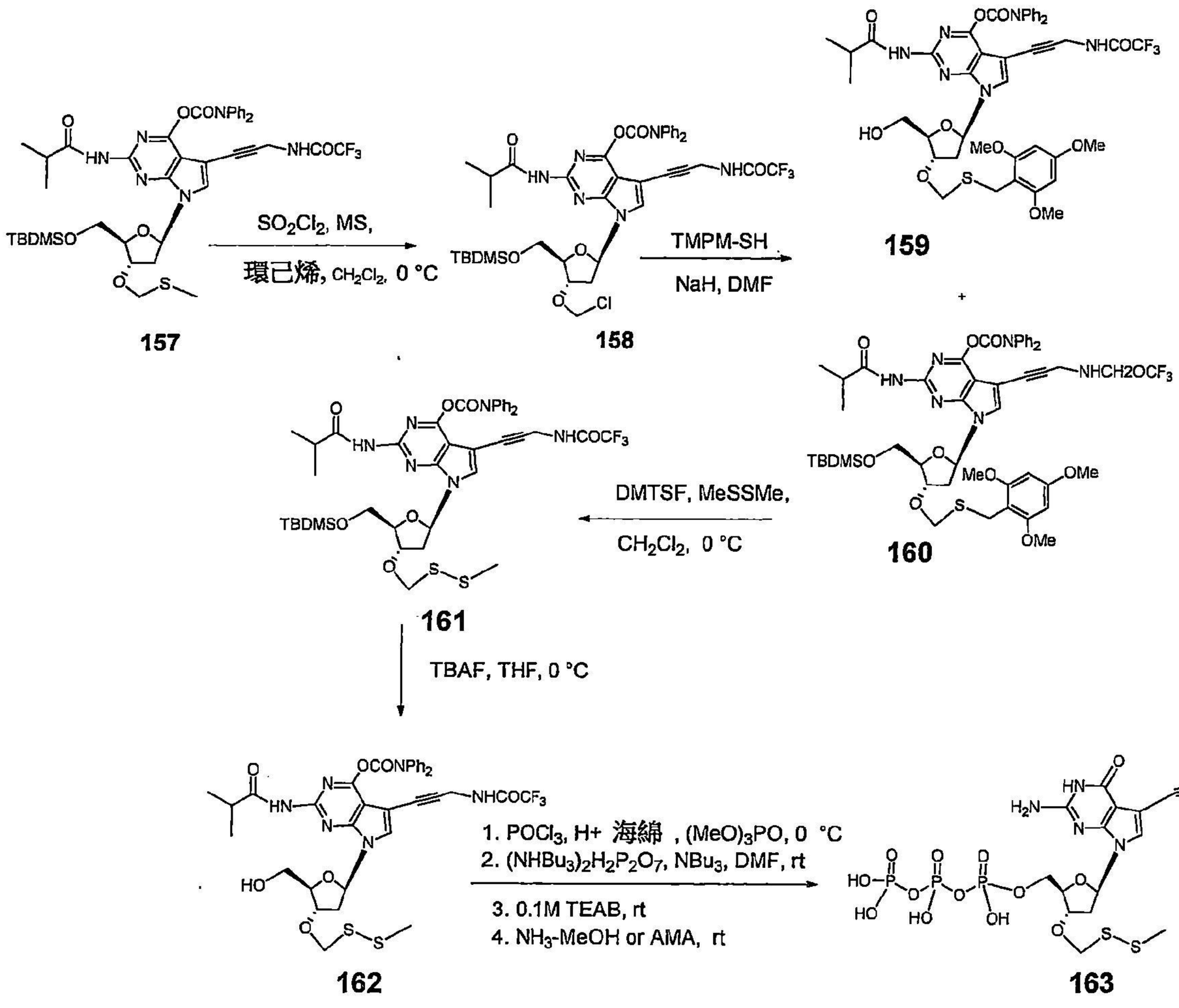

OCONPh2
NHCOCF3
HN
TBDMSO
SO2Cl2, MS,
環己烯, CH2Cl2, 0 °C
157
Cl
158
TMPM-SH
NaH, DMF
HO
MeO
OMe
159
NHCH2OCF3
160
DMTSF, MeSSMe,
CH2Cl2, 0 °C
161
TBAF, THF, 0 °C
162
1. POCl3, H+ 海綿 , (MeO)3PO, 0 °C
2. (NHBu3)2H2P2O7, NBu3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH3-MeOH or AMA, rt
H2N
NH2
OH
163

圖 60

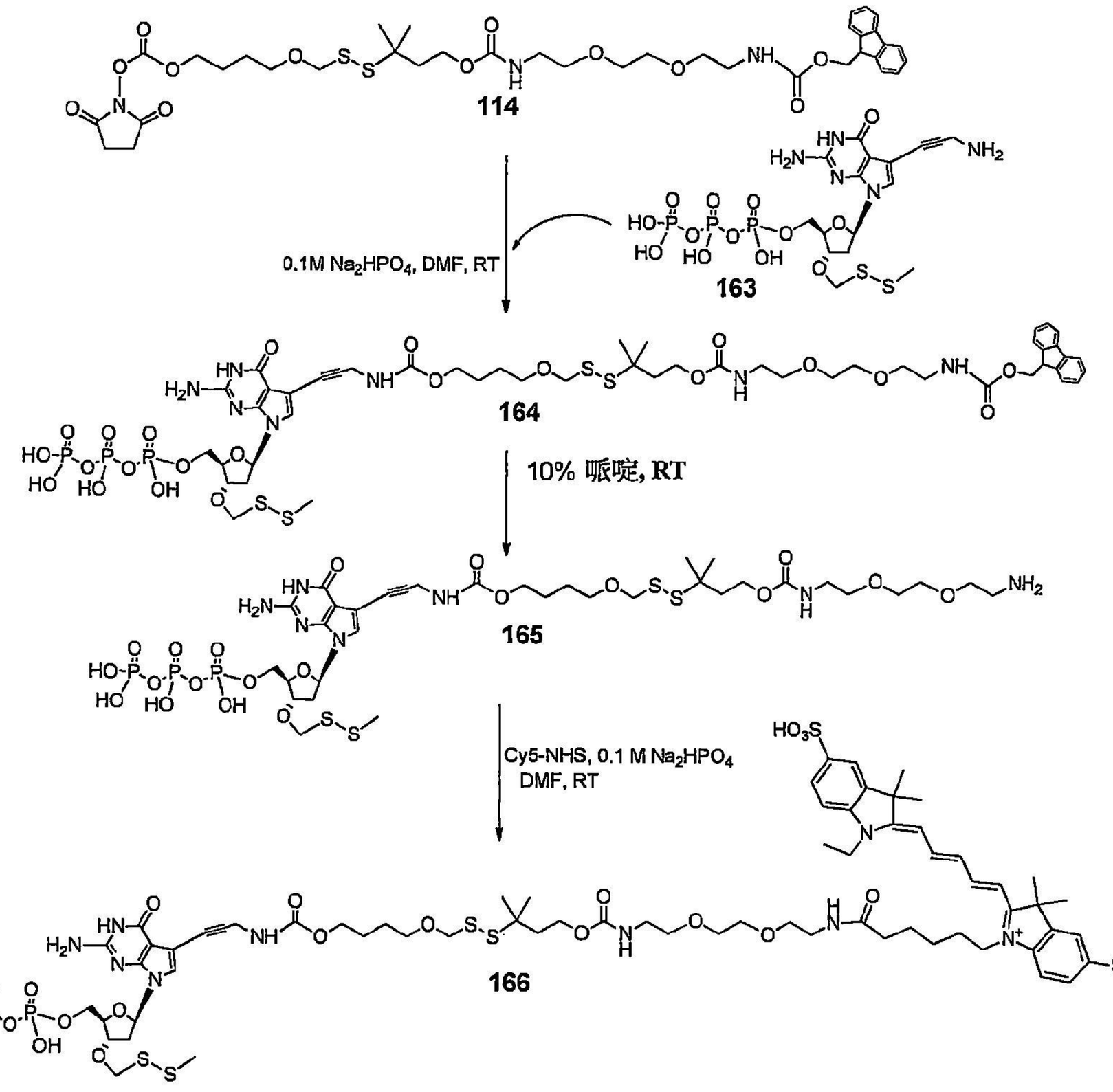

114
163
0.1M Na2HPO4, DMF, RT
164
10% 哌啶, RT
165
Cy5-NHS, 0.1 M Na2HPO4
DMF, RT
166

圖 61

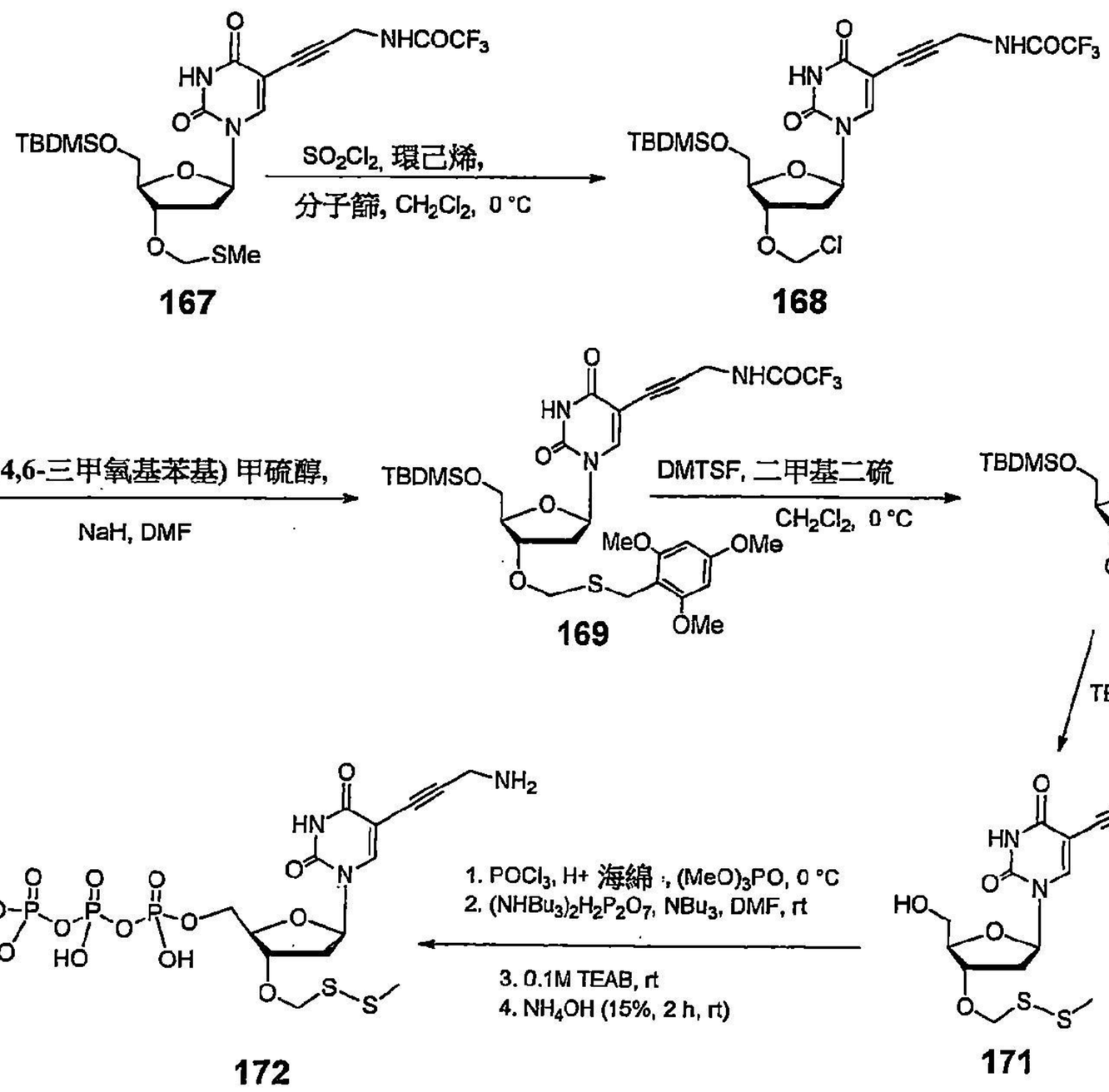

NHCOCF3
HN
O
N
TBDMSO
O
SMe
SO2Cl2, 環己烯,
分子篩, CH2Cl2, 0 °C
Cl
167
168
(2,4,6-三甲氧基苯基) 甲硫醇,
NaH, DMF
MeO
OMe
OMe
S
169
DMTSF, 二甲基二硫
CH2Cl2, 0 °C
170
TBAF, THF, 0 °C
HO
171
NH2
1. POCl3, H+ 海綿 :, (MeO)3PO, 0 °C
2. (NHBu3)2H2P2O7, NBu3, DMF, rt
3. 0.1M TEAB, rt
4. NH4OH (15%, 2 h, rt)
HO-P-O-P-O-P-O
OH
172

圖 62

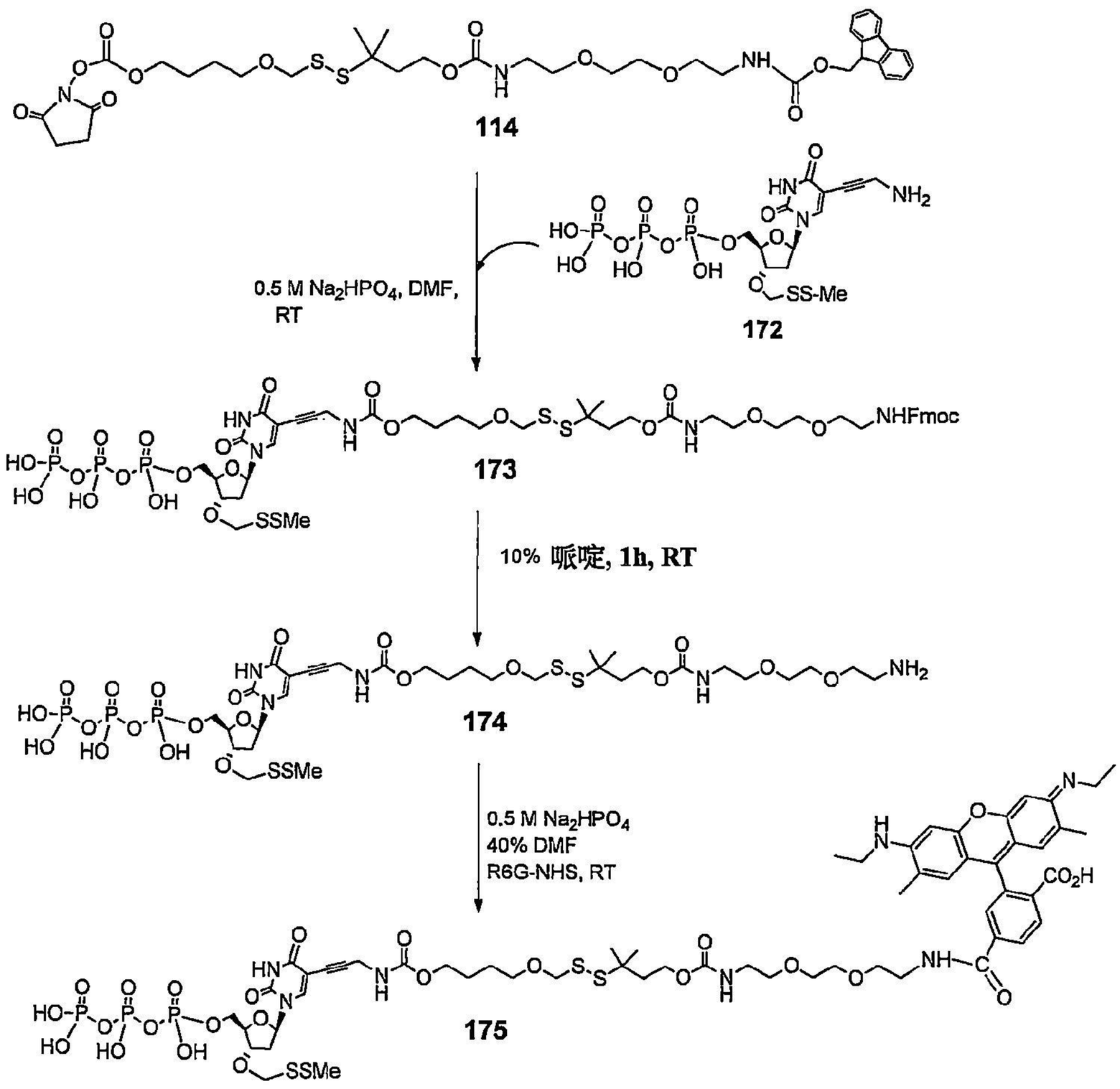
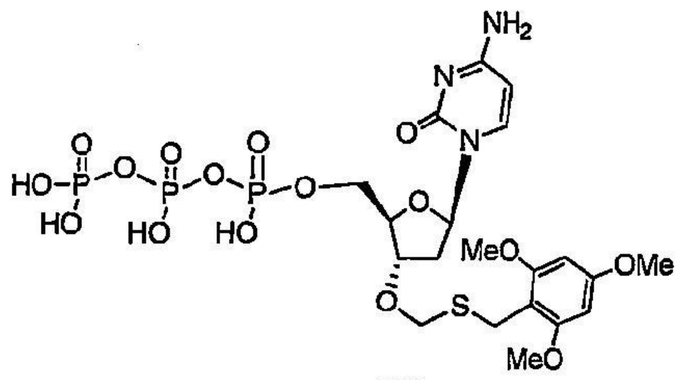
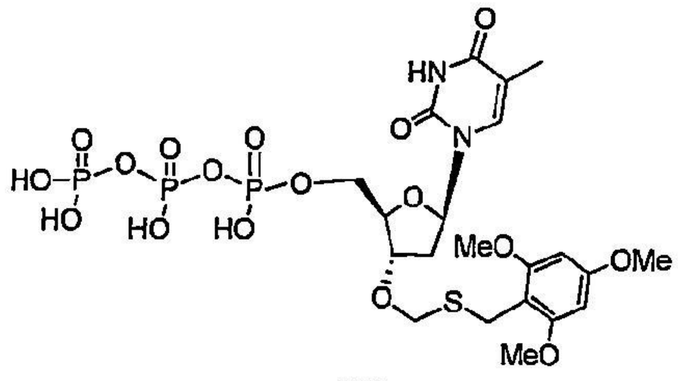

114
172
0.5 M Na2HPO4, DMF,
RT
173
10% 哌啶, 1h, RT
174
0.5 M Na2HPO4
40% DMF
R6G-NHS, RT
175

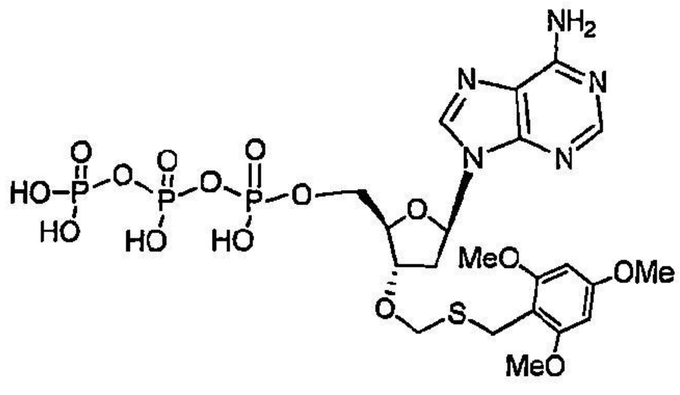
圖 63



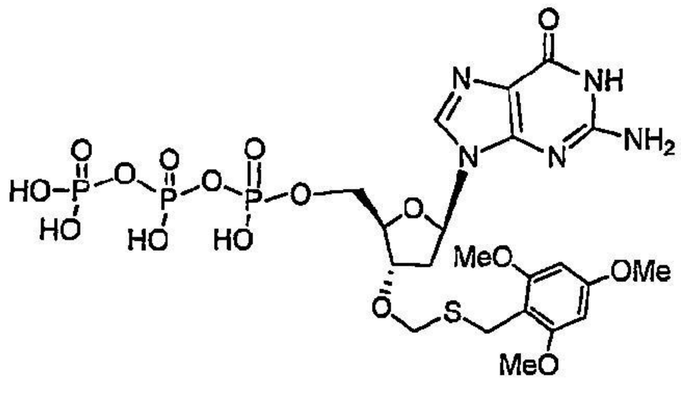
176



177



178



179

圖 64

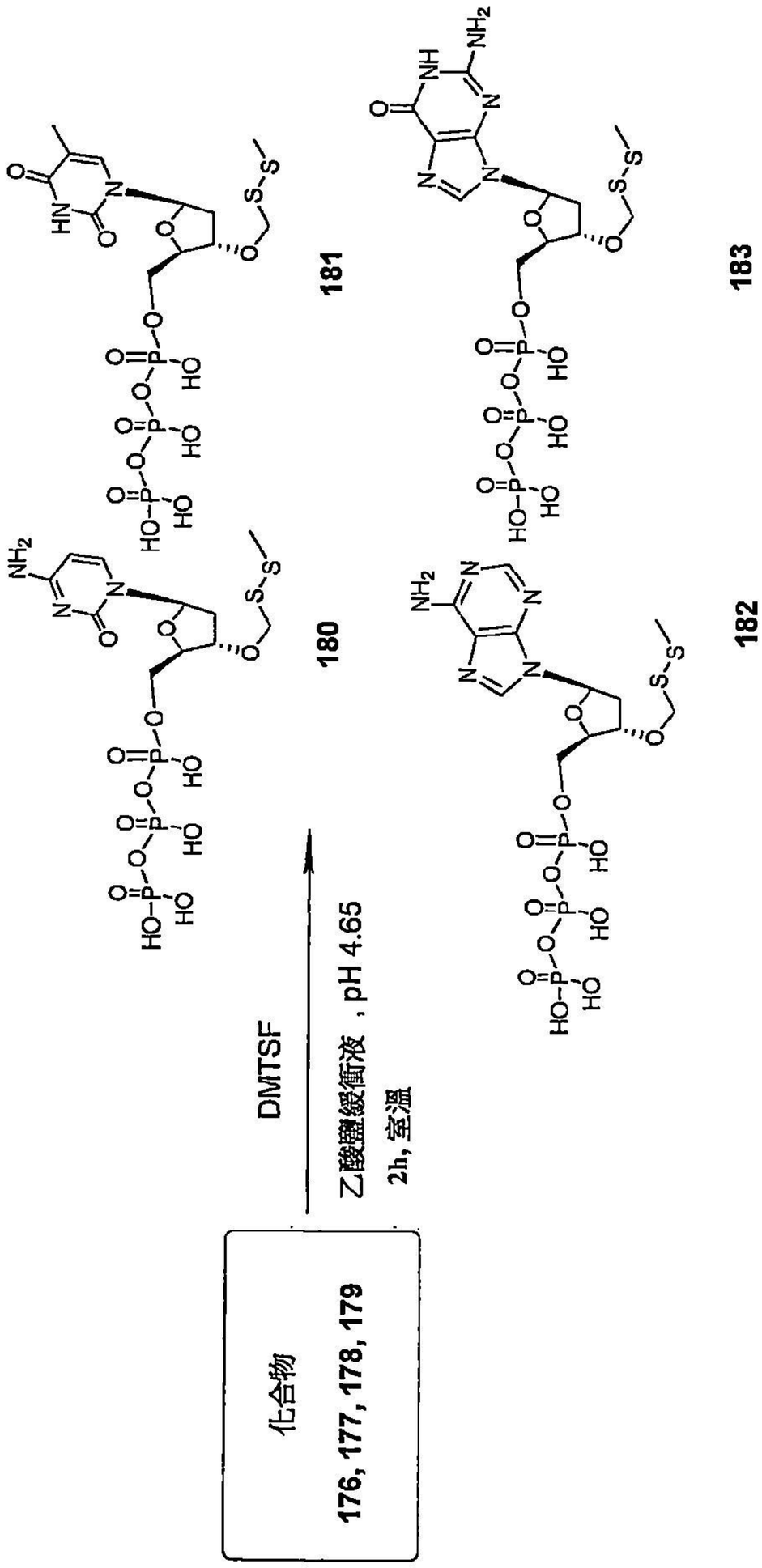
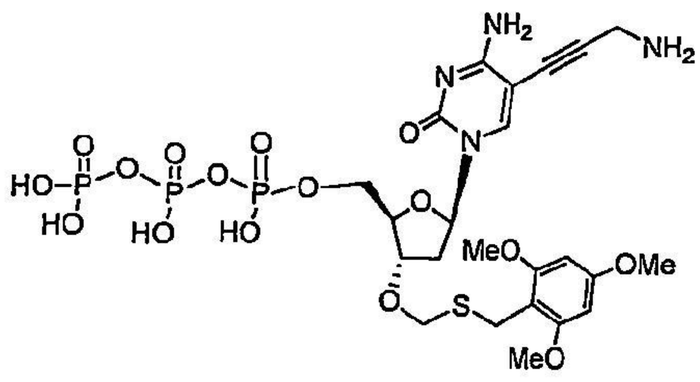
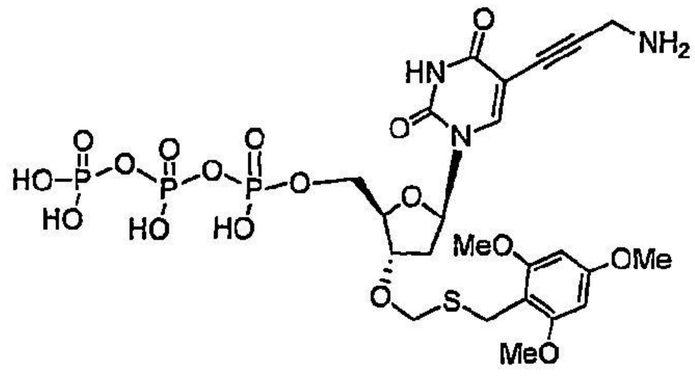


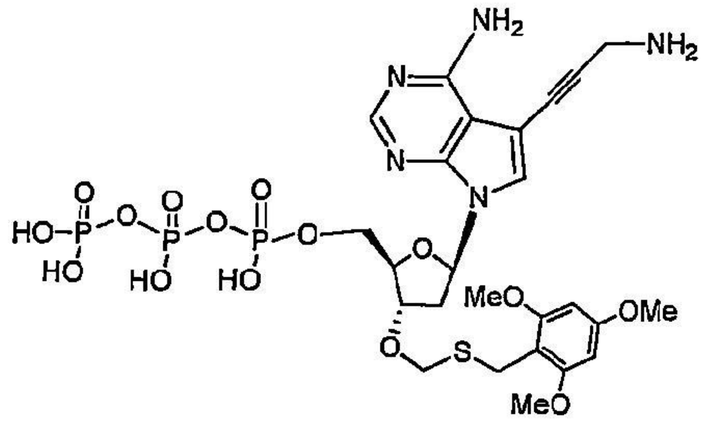
圖 65



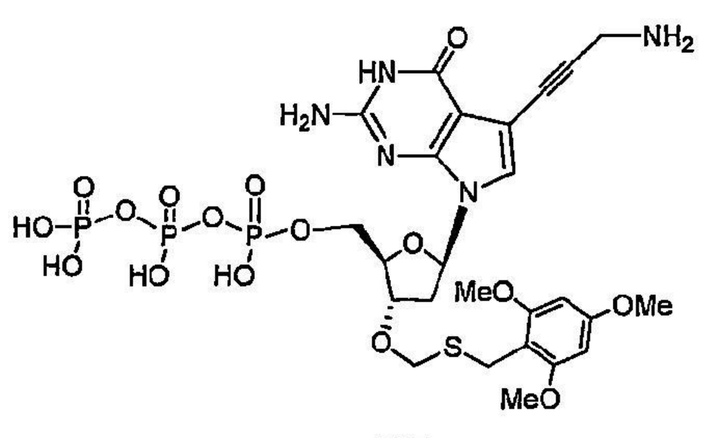
184



185



186



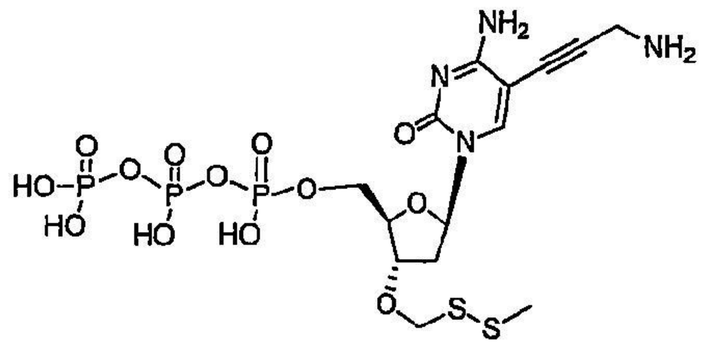
187

圖 66

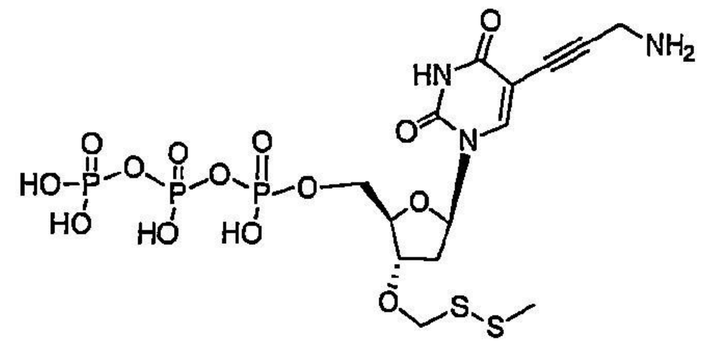
化合物

184, 185, 186, 187

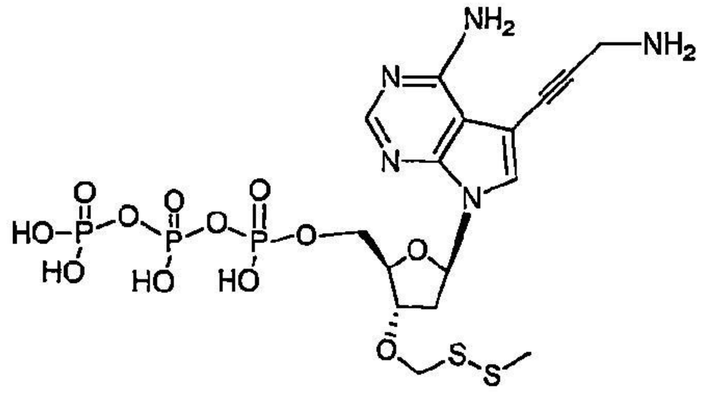
DMTSF | 乙酸鹽緩衝液 , pH 4.6
2h, 室溫



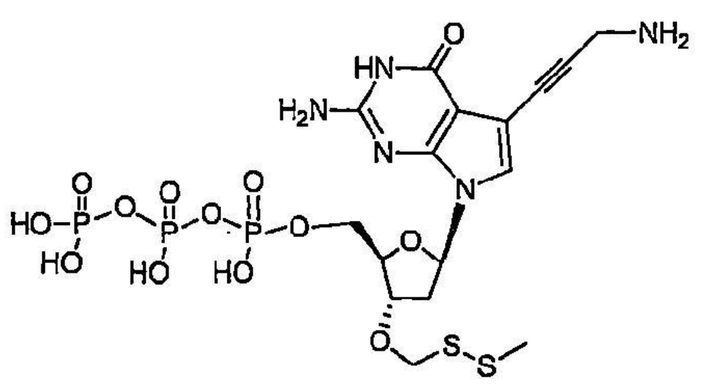
188



189



190



191

圖 67

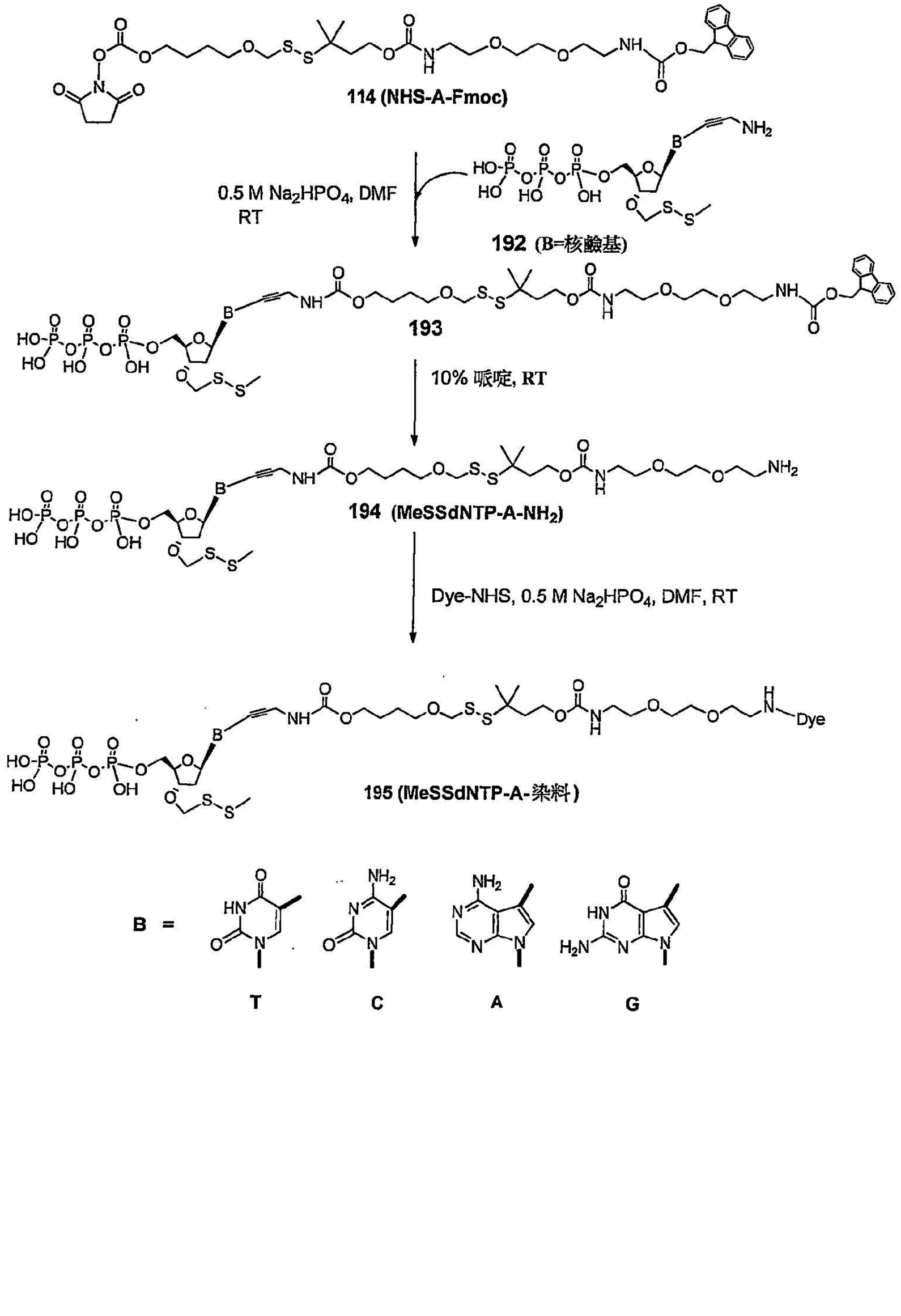
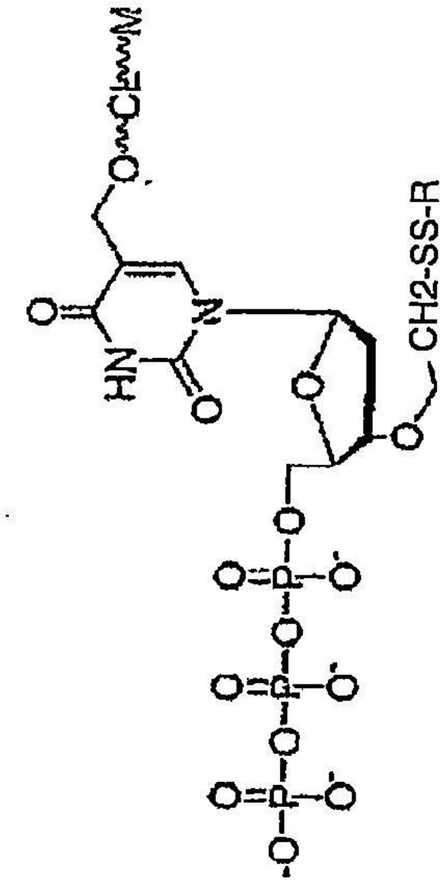
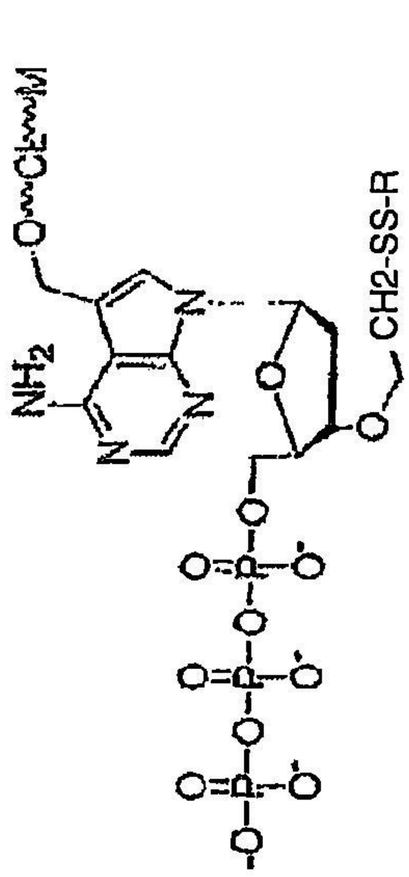
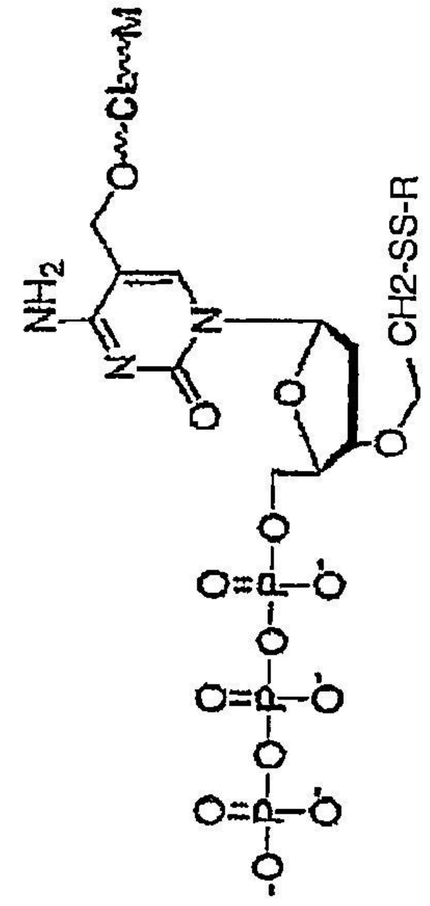
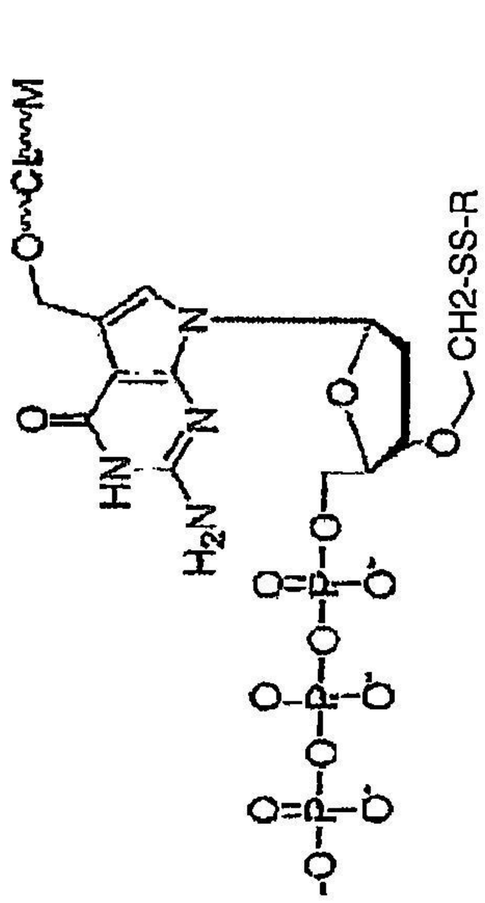

114 (NHS-A-Fmoc)
0.5 M Na2HPO4, DMF
RT
192 (B=核鹼基)
193
10% 哌啶, RT
194 (MeSSdNTP-A-NH2)
Dye-NHS, 0.5 M Na2HPO4, DMF, RT
195 (MeSSdNTP-A-染料)
B =
T
C
A
G

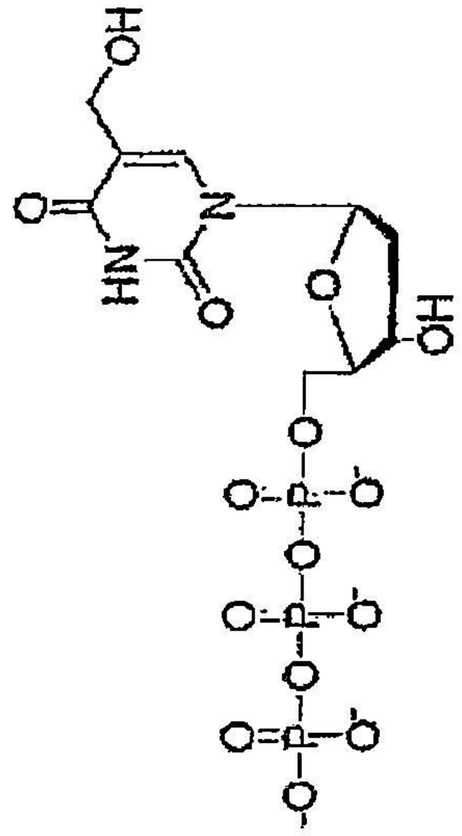
圖68

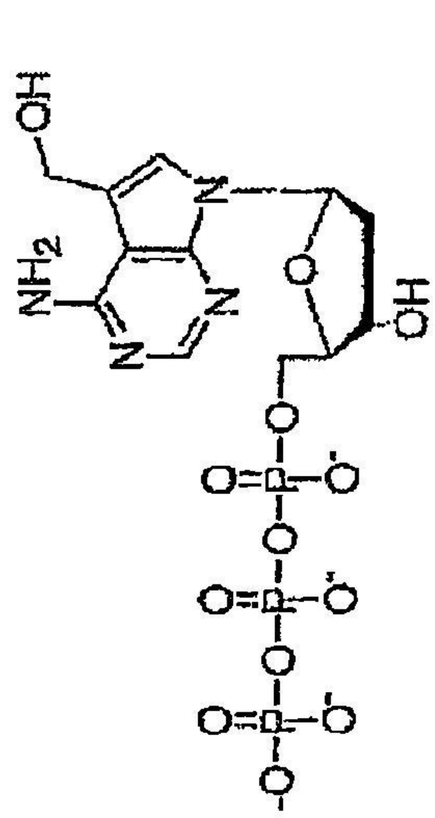

O-mC-mM
HN
O
O
N
O
CH2-SS-R


O-mC-mM
NH2
N
N
CH2-SS-R


O-mC-mM
NH2
N
N
O
CH2-SS-R

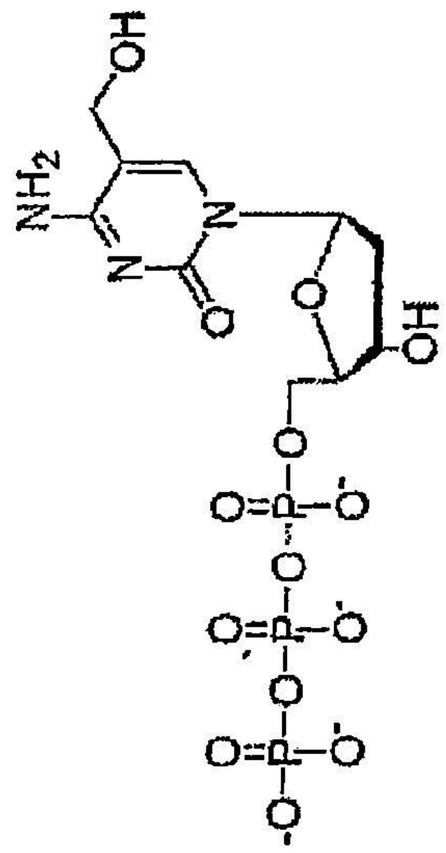

O-mC-mM
O
HN
N
H2N
N
CH2-SS-R





69

圖



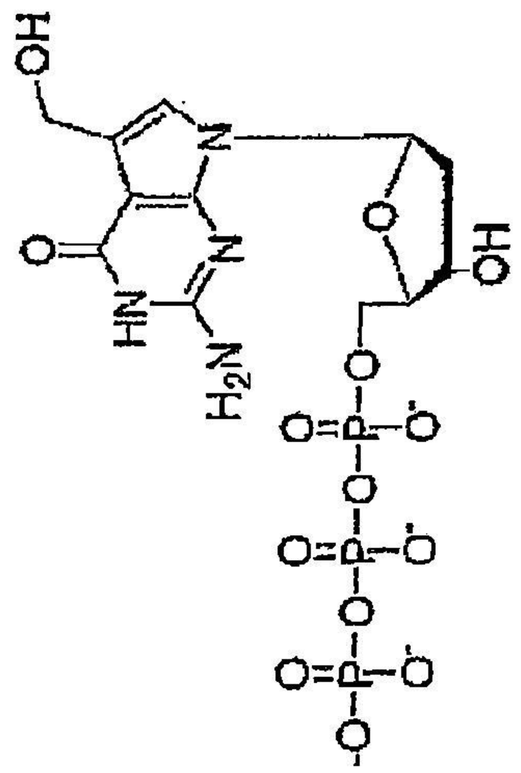


圖 70

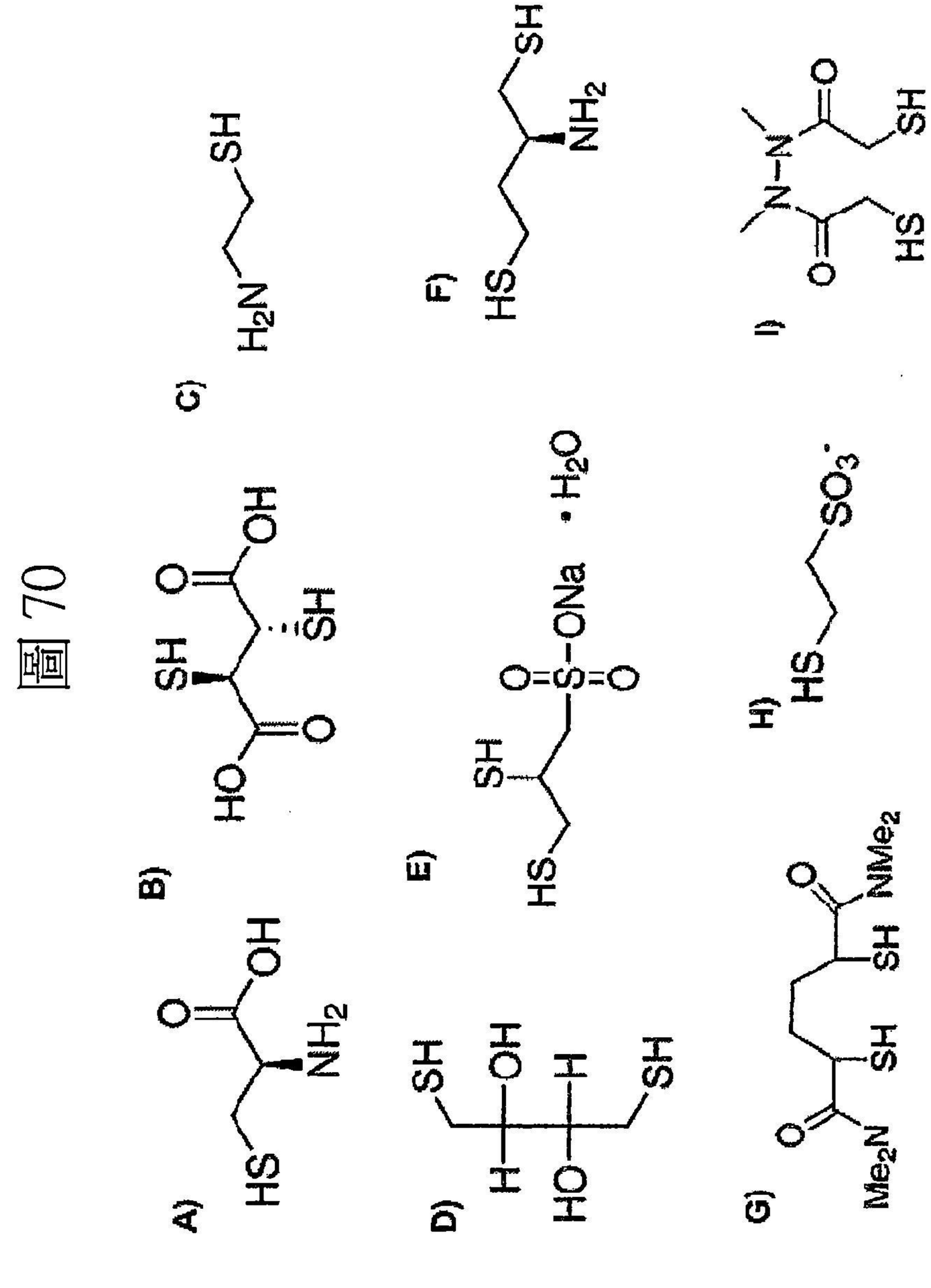


圖 71

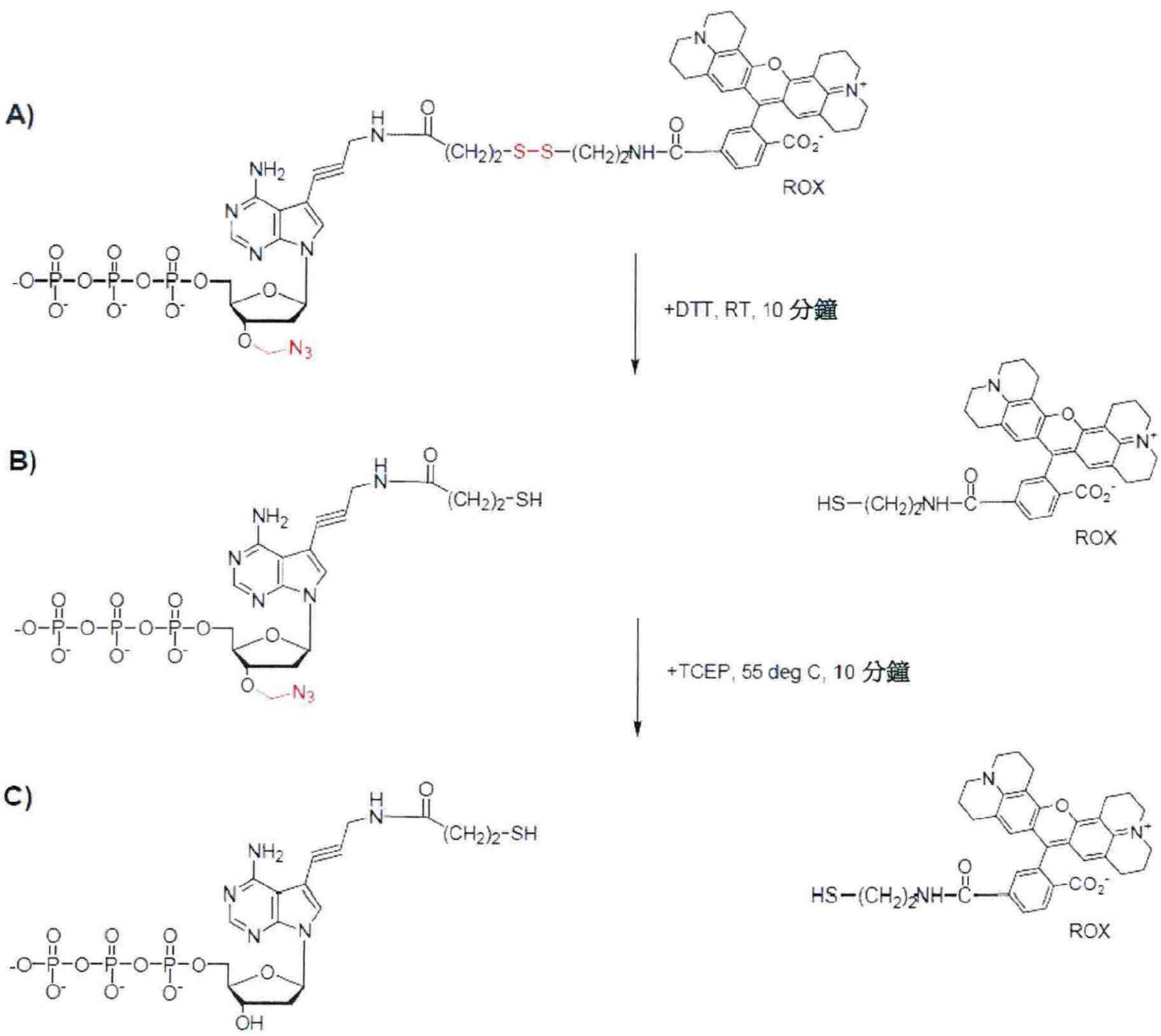


圖 72

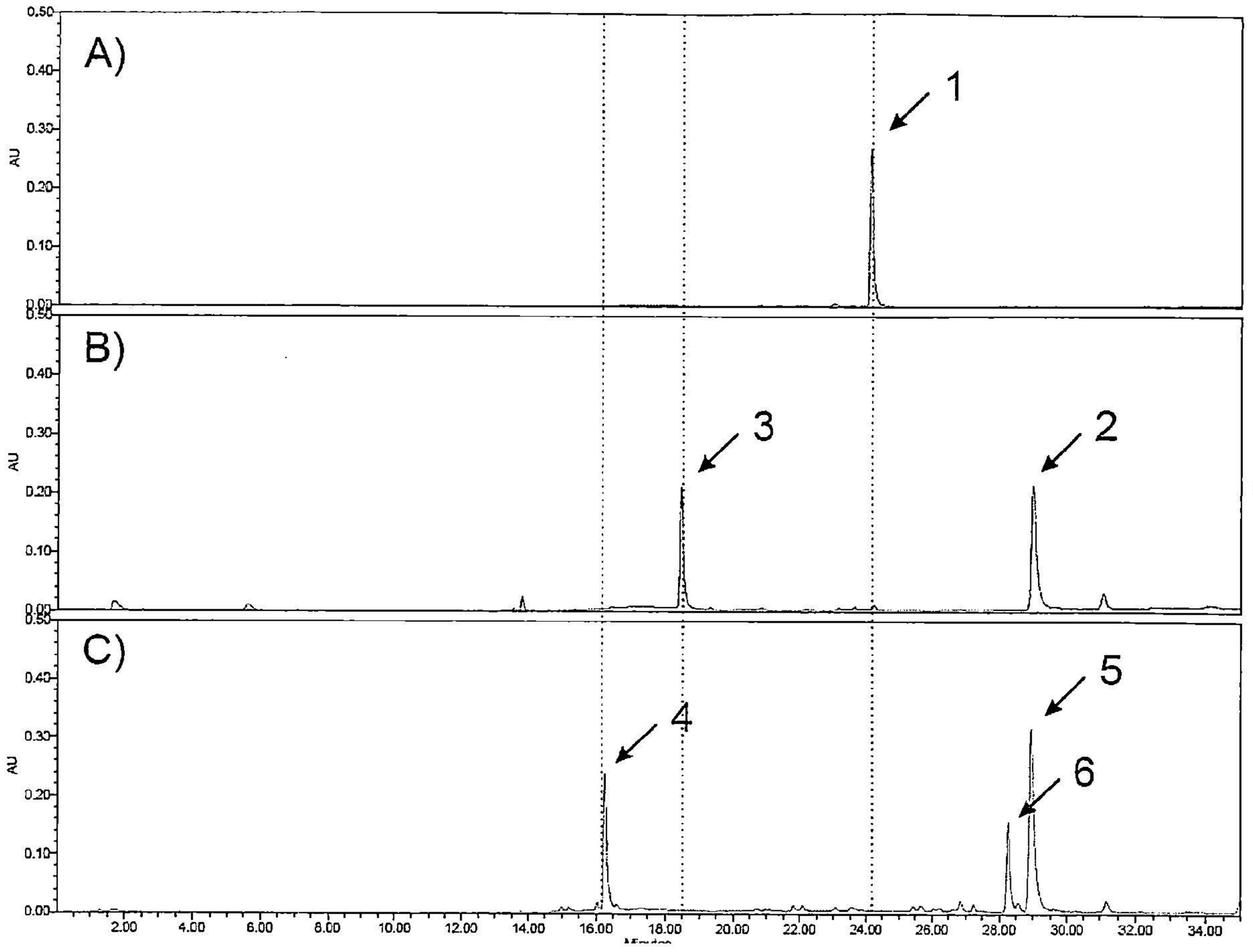
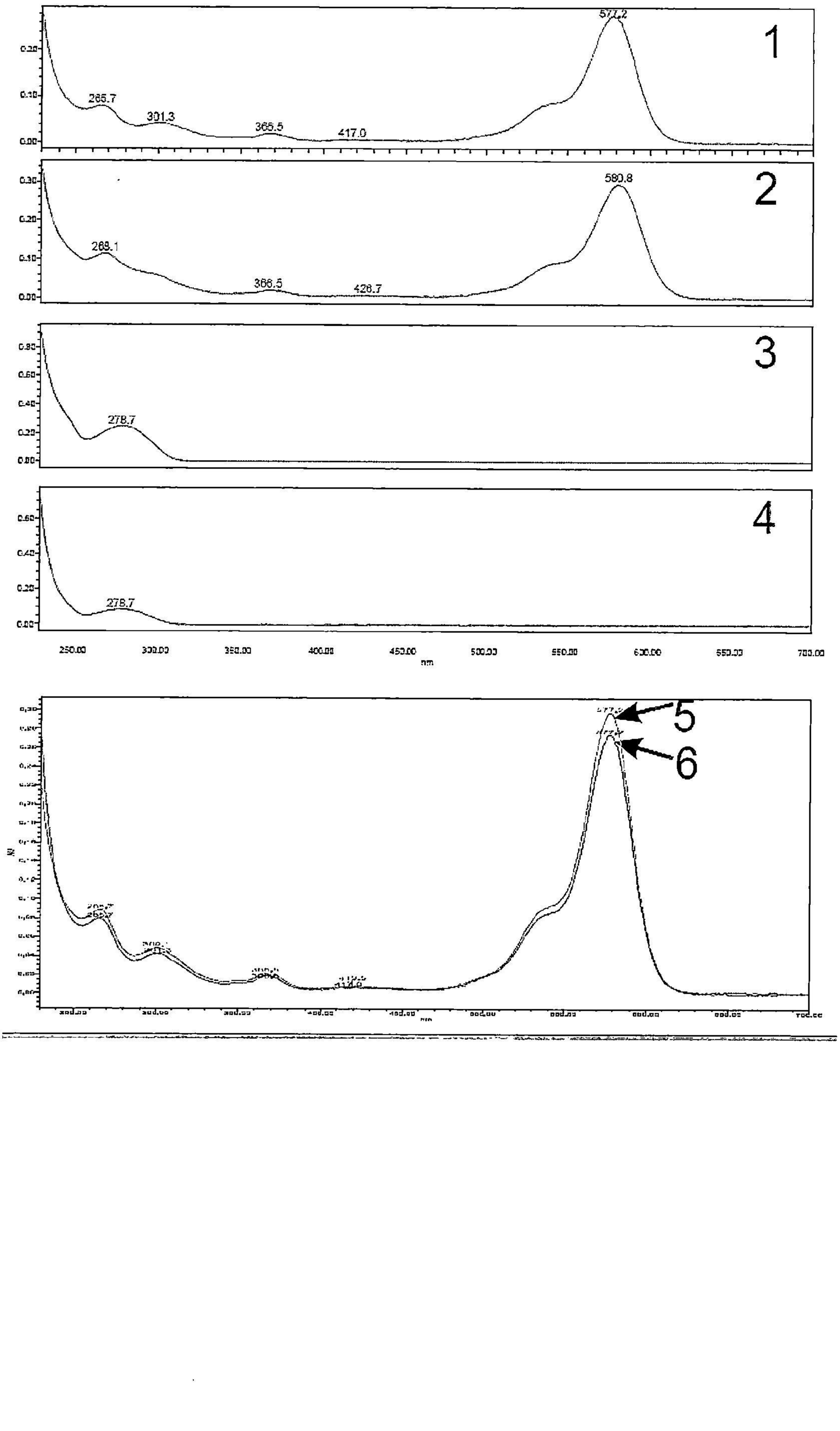

A)
B)
C)
AU
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
1
2
3
4
5
6
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00
34.00

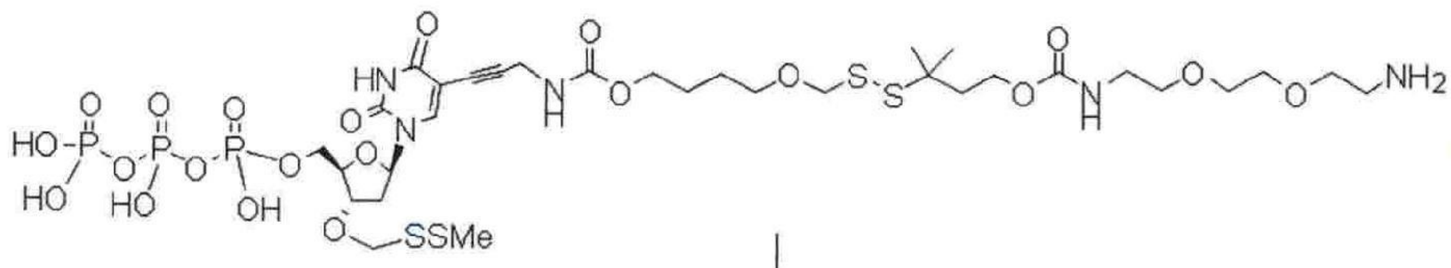
圖 73


1
265.7
301.3
365.5
417.0
577.2
2
269.1
366.5
426.7
580.8
3
278.7
4
278.7
250.00
300.00
350.00
400.00
450.00
500.00
550.00
600.00
650.00
700.00
nm

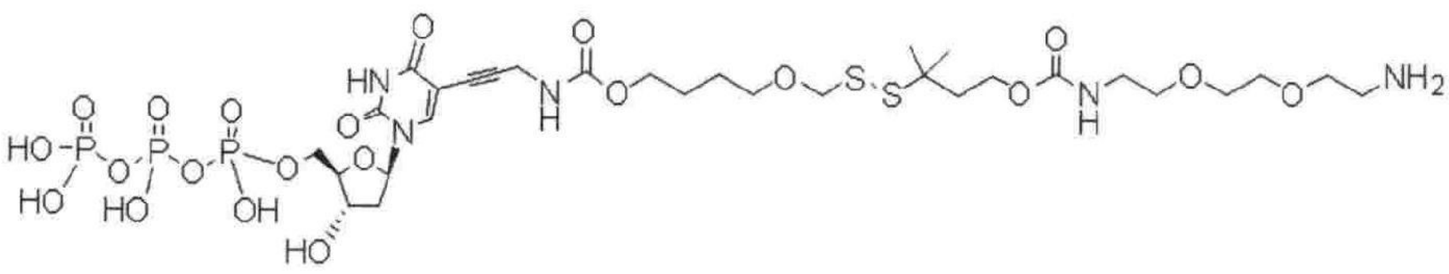
5
6
AU
nm

圖 74

1



2



3

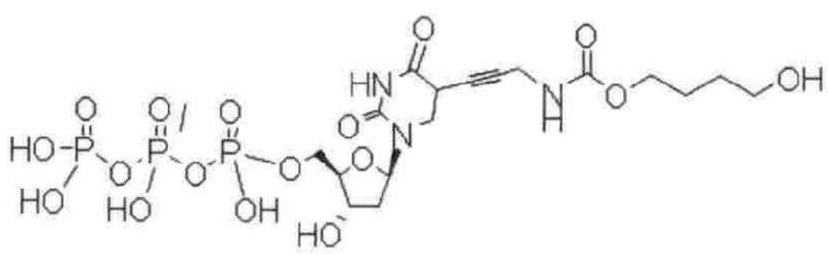
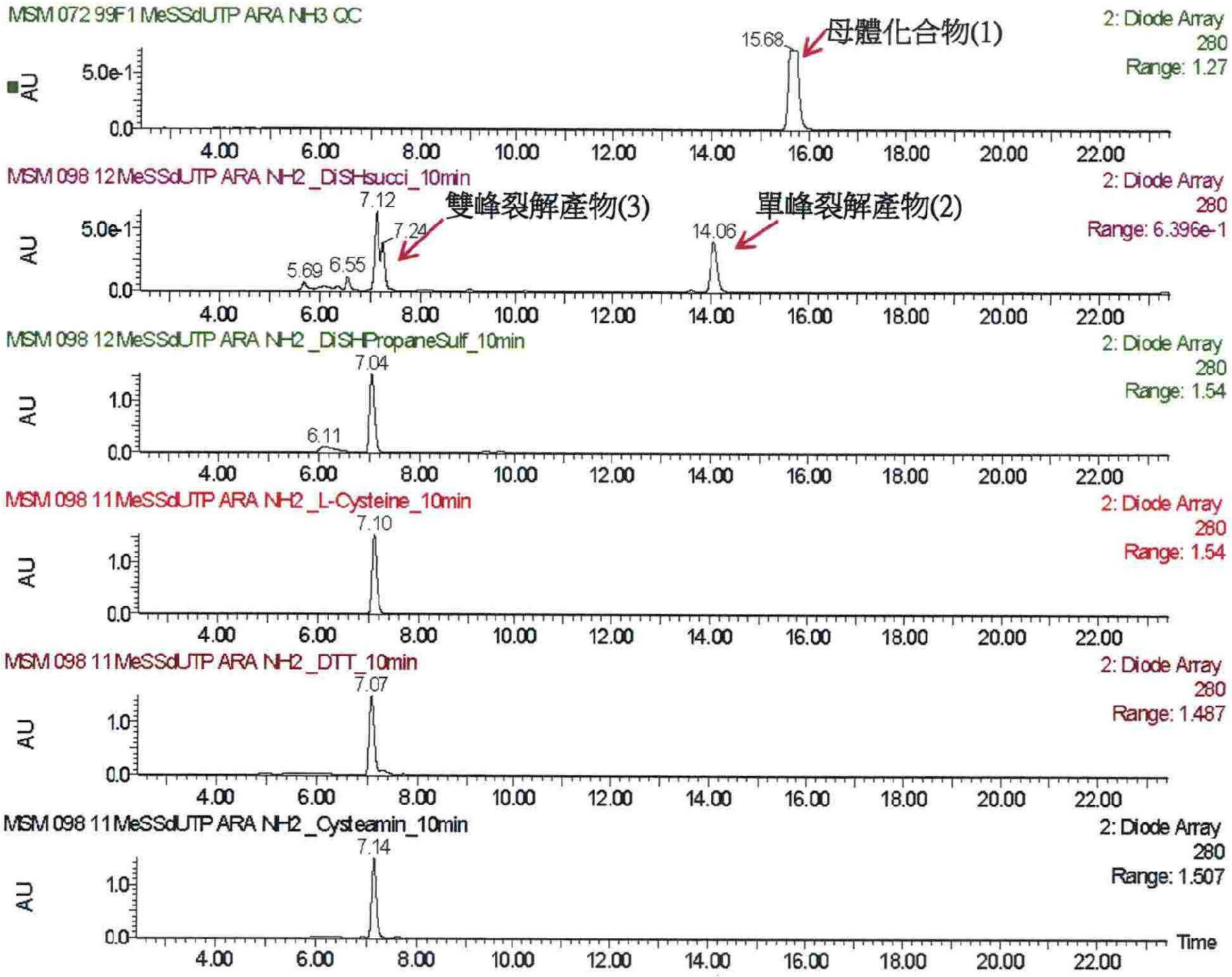


圖 75

A)



B)

裂解劑	反應條件	時間 & 溫度	化合物 1 [%]	化合物 2 [%]	化合物 3 [%]
二硫琥珀酸	核苷酸-0.5mM, 裂解劑-20mM, 緩衝液:200mM TE, pH8.5	10分鐘@65度C	0	~50	~50
L-半胱胺酸			0	0	100
DTT			0	0	100
半胱胺			0	0	100