(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104024269 B
(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201280056158.X

(22)申请日 2012.09.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104024269 A

(43)申请公布日 2014.09.03

(30)优先权数据
61/534,347 2011.09.13 US
61/627,211 2011.10.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.05.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/055231 2012.09.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/040257 EN 2013.03.21

(73)专利权人 激光基因公司
地址 美国德克萨斯州

(72)发明人 布赖恩·菲利普·斯图皮 李红
吴卫东 梅根·N·赫什
大卫·赫佐格
西德尼·E·莫里斯
迈克尔·L·梅茨克

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 彭鲲鹏 郑斌

(51)Int.Cl.
C07H 19/073(2006.01)
C07H 19/10(2006.01)
C07H 19/20(2006.01)
C07H 19/173(2006.01)

(56)对比文件
WO 2009152353 A2,2009.12.17,
CN 101636406 A,2010.01.27,
WO 2009152353 A2,2009.12.17,
WO 2008070749 A2,2008.06.12,
CN 101460953 A,2009.06.17,
Andrew F. Gardner,等.Rapid incorporation kinetics and improved fidelity of a novel class of 3 -OH unblocked reversible terminators.《Nucleic Acids Research》.2012,第40卷(第15期),第1-12页,尤其是第3页图1.
Brian P. Stupi,等.Stereochemistry of Benzylic Carbon Substitution Coupled with Ring Modification of 2-Nitrobenzyl Groups as Key Determinants for Fast-Cleaving Reversible Terminators.《Angew. Chem. Int. Ed.》.2012,第51卷(第7期),第1724-1727页,尤其是1724页图1.

审查员 姚旻

权利要求书16页 说明书117页 附图13页

(54)发明名称

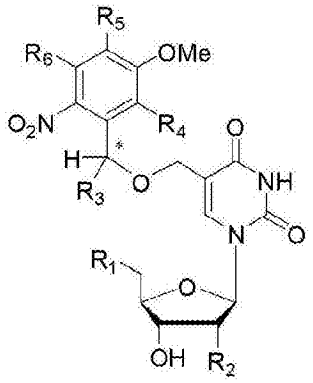
5-甲氧基,3'-OH未阻断,可快速光切割的终止核苷酸以及用于核酸测序的方法

(57)摘要

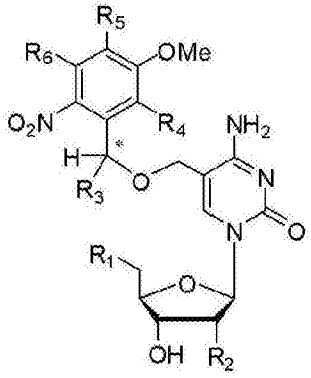
本发明总体而言涉及具有基于5-甲氧基-取代之硝基苄基的光可切割终止基团的标记和未标记的3′-OH未阻断核苷酸和核苷,其可用于与DNA和RNA测序和分析相关的方法和系统。这些化合物可用作可逆终止剂,因其表现出快速的核苷酸掺入动力学,单碱基终止,高核苷酸选择性,及导致天然存在之核苷酸的快速的终止基团切割。

CN 104024269 B

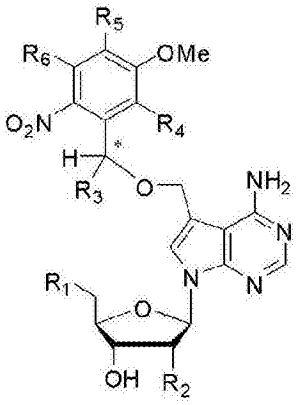
1.下式的化合物：



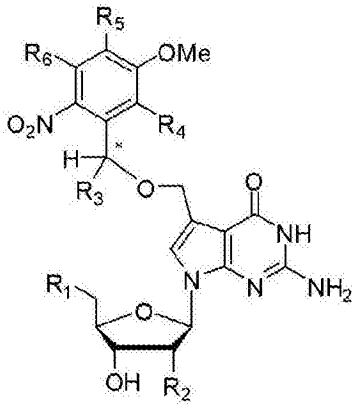
(I),



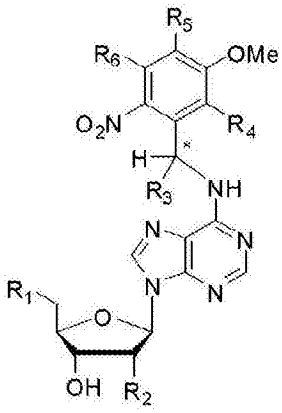
(II),



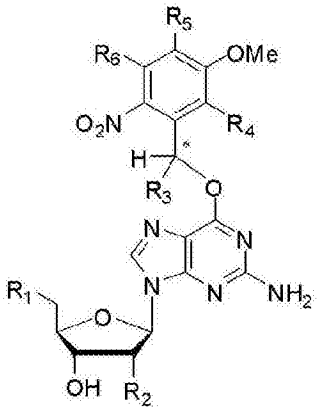
(III),



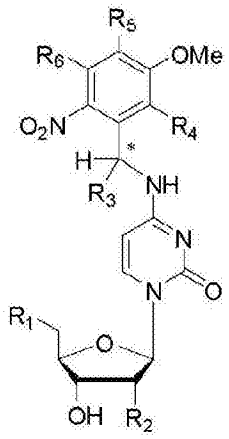
(IV),



(V),



(VI), 或



(VII),

其中：

R_1为羟基、一磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基或α-硫代三磷酸酯基；

R_2为氢或羟基；

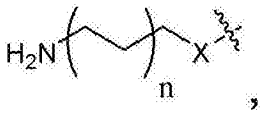
R_3为叔丁基；

R_4为氢；

R_5为：

氢、卤素或甲氧基；

下式的基团：



其中

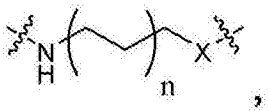
X为

-O-、-S-或-NH-;或

C≤12的亚烷基、C≤12的亚烯基或C≤12的亚炔基;并且

n为0;或

-接头-报告基团;其中所述接头为:



其中

X为

-O-、-S-或-NH-;或

C≤12的亚烷基、C≤12的亚烯基或C≤12的亚炔基;并且

n为0;并且

R_6为氢;

或其盐。

2.权利要求1的化合物,其进一步定义为式I的化合物。

3.权利要求1的化合物,其进一步定义为式II的化合物。

4.权利要求1的化合物,其进一步定义为式III的化合物。

5.权利要求1的化合物,其进一步定义为式IV的化合物。

6.权利要求1的化合物,其进一步定义为式V的化合物。

7.权利要求1的化合物,其进一步定义为式VI的化合物。

8.权利要求1的化合物,其进一步定义为式VII的化合物。

9.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_1为羟基。

10.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_1为一磷酸酯基。

11.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_1为二磷酸酯基。

12.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_1为三磷酸酯基。

13.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_1为α-硫代三磷酸酯基。

14.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_2为氢。

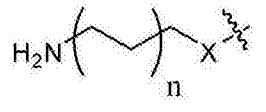
15.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_2为羟基。

16.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_5为氢。

17.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_5为碘。

18.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_5为甲氧基。

19.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_5为下式的基团:



其中

X为

-O-、-S-或-NH-;或

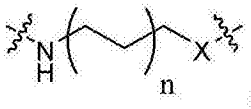
C≤12的亚烷基、C≤12的亚烯基或C≤12的亚炔基;并且

n为0。

20.权利要求19的化合物,其中X为C_{2-8}的亚炔基。

21.权利要求20的化合物,其中X为-C≡C-。

22.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中R_5为-接头-报告基团,其中所述接头为:



,

其中

X为

-O-、-S-或-NH-;或

C≤12的亚烷基、C≤12的亚烯基或C≤12的亚炔基;并且

n为0。

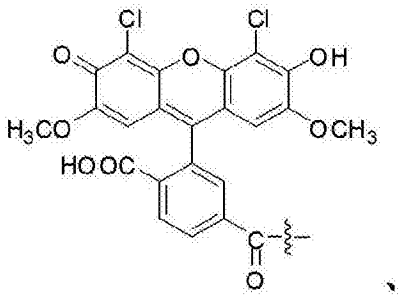
23.权利要求22的化合物,其中X为C_{2-8}的亚炔基。

24.权利要求23的化合物,其中X为-C≡C-。

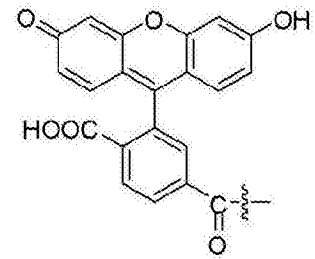
25.根据权利要求22的化合物,其中所述报告基团是基于染料的报告基团,其中所述染料为荧光素。

26.根据权利要求22的化合物,其中所述报告基团是基于染料的报告基团,其中所述染料为呫吨、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白、或方酸菁染料。

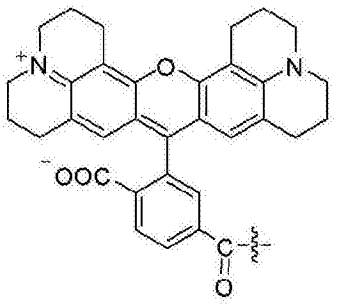
27.根据权利要求22的化合物,其中所述报告基团为:



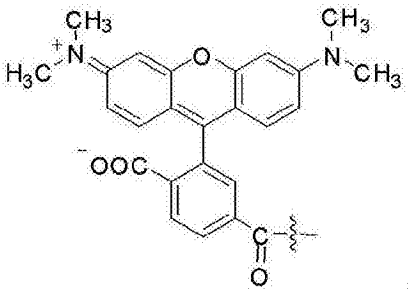
、



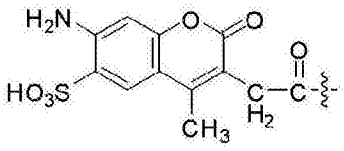
、



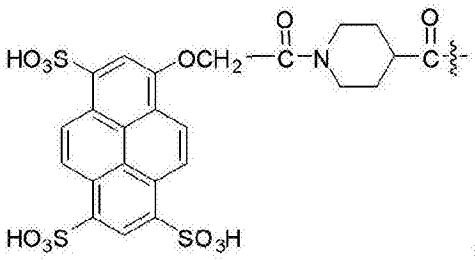
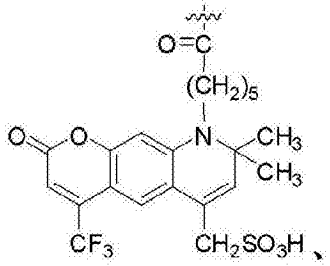
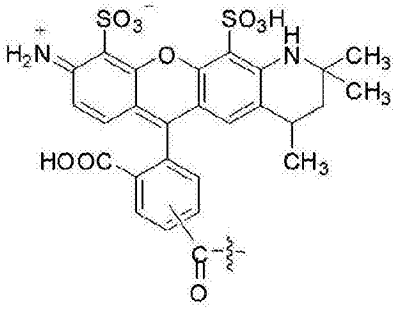
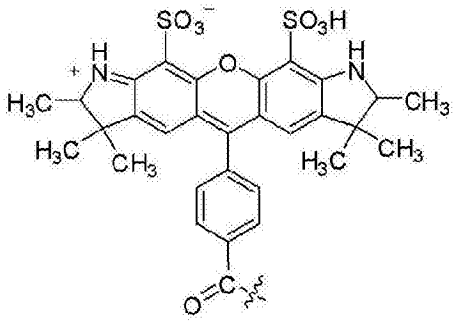
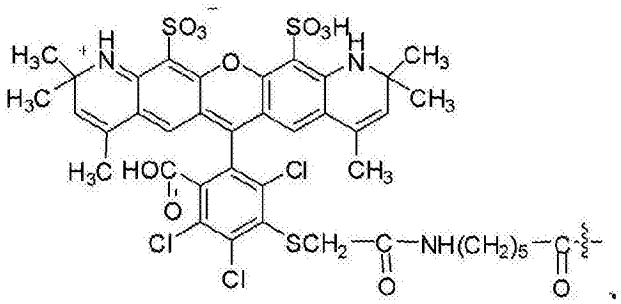
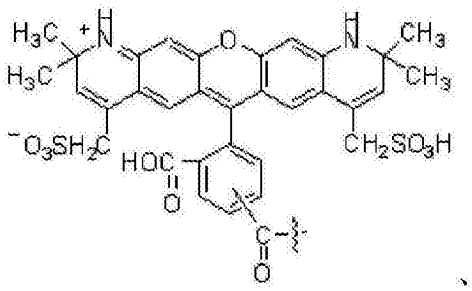
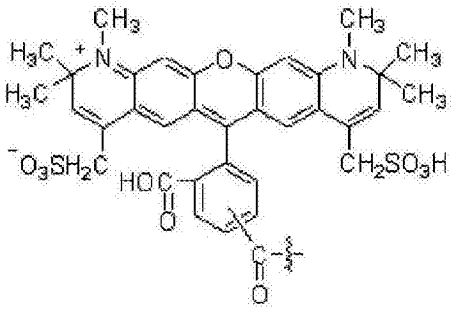
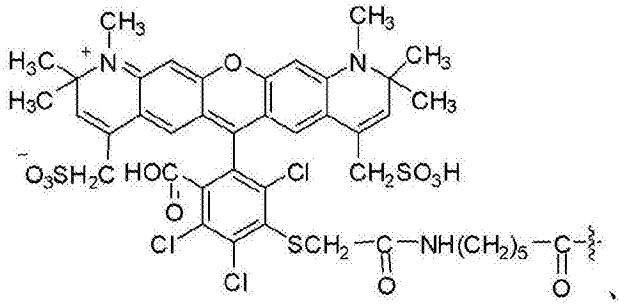
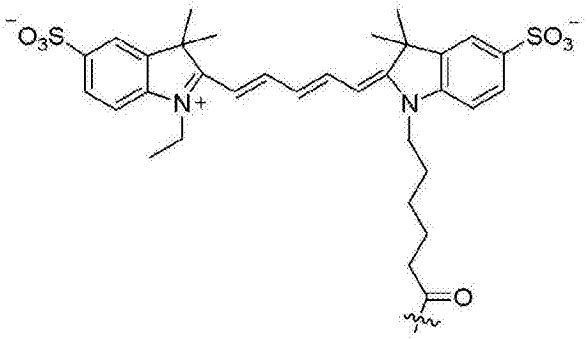
、



、



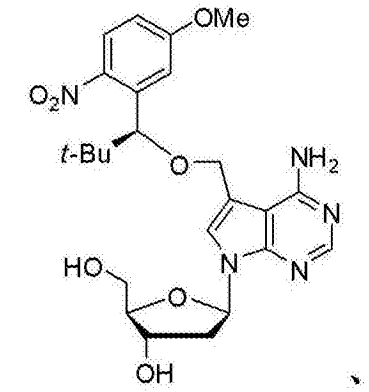
、


、

、

、

、

、

、

、

、或

。

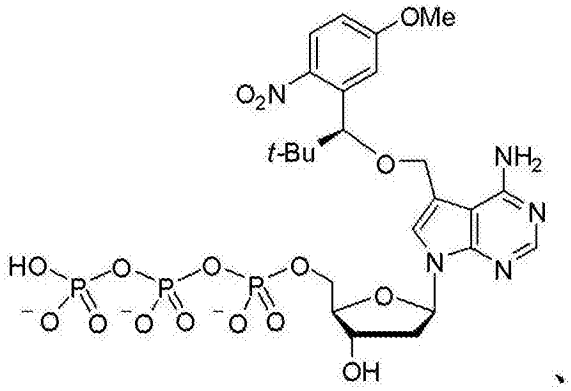
28.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中带星号的碳原子为S构型。

29.根据权利要求1至8中任一项的化合物,其中带星号的碳原子为R构型。

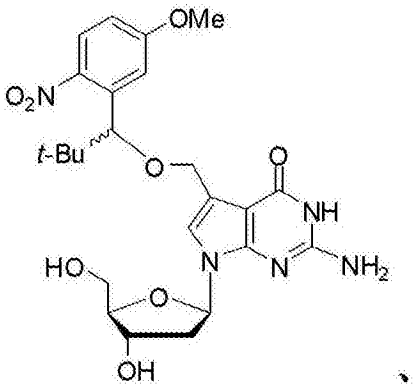
30.权利要求1的化合物，其进一步定义为：



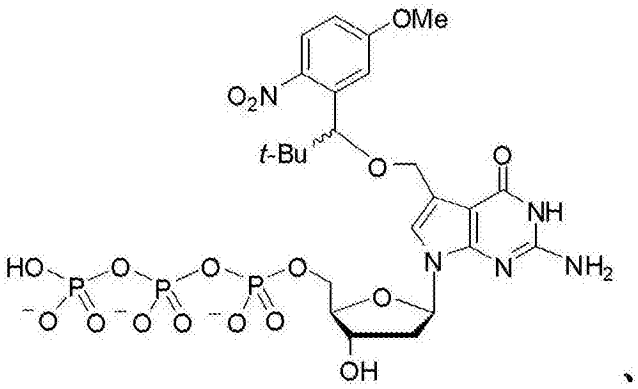
、



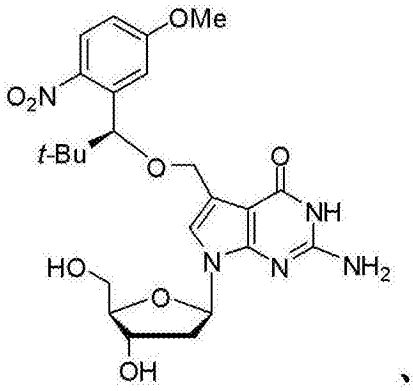
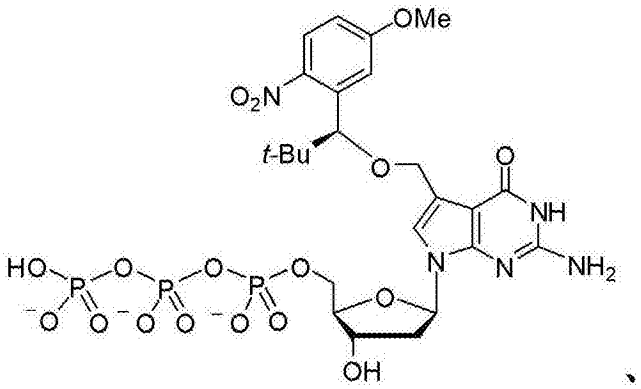
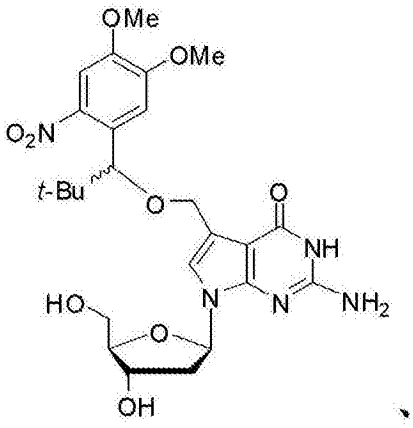
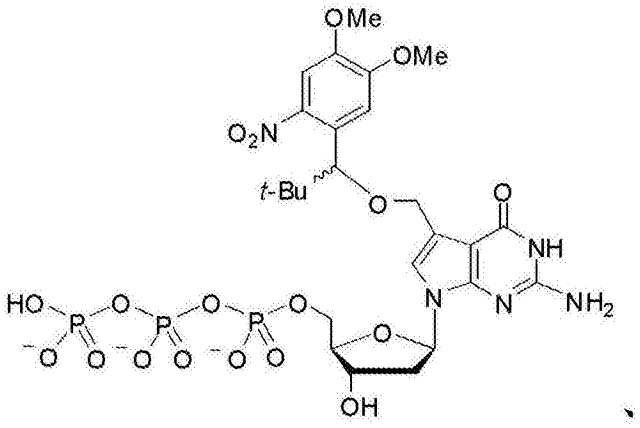
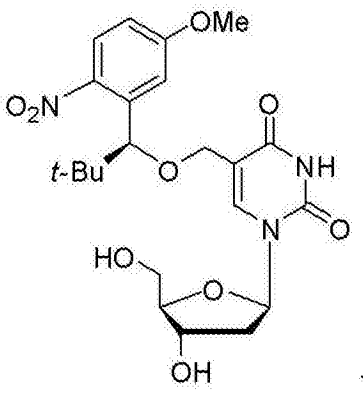
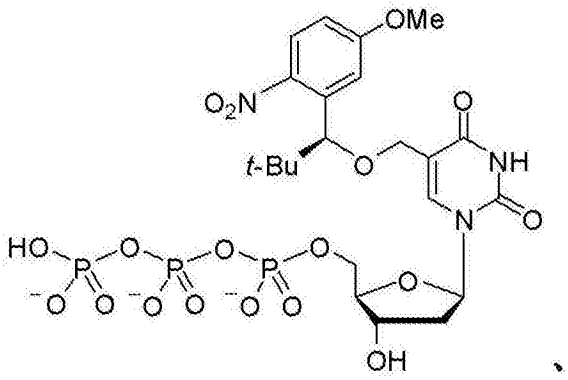
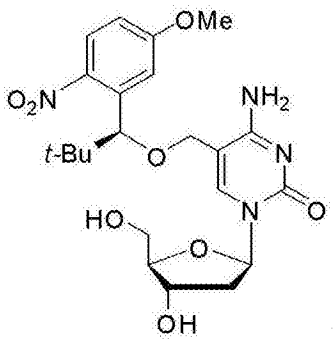
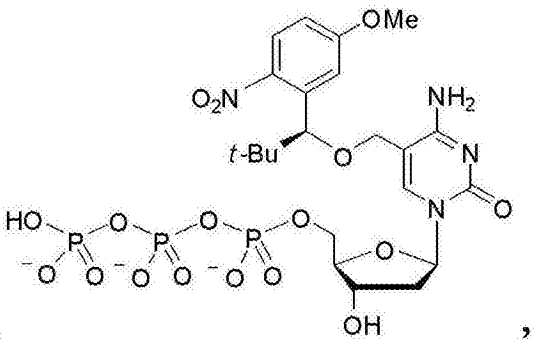
、



、

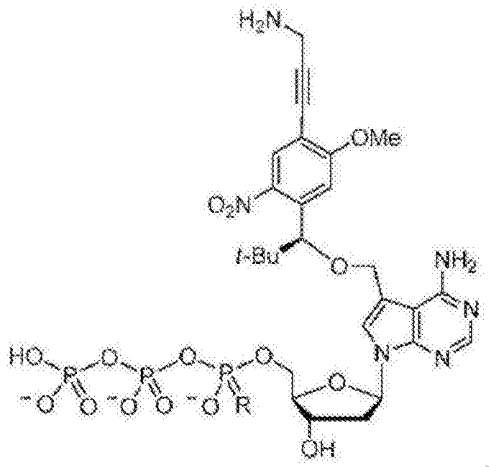
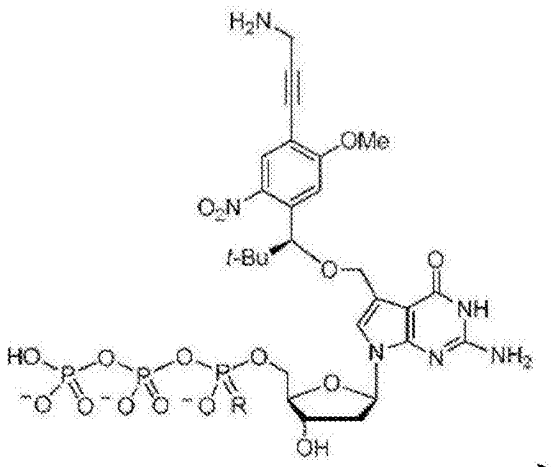
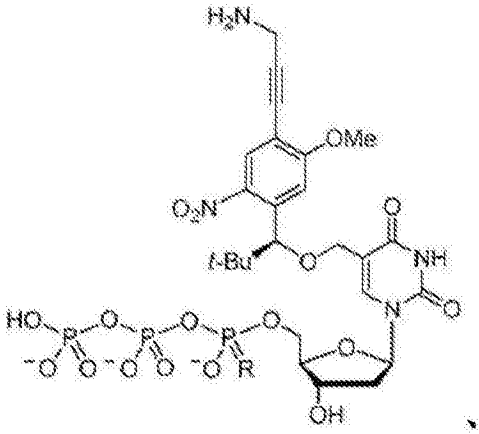
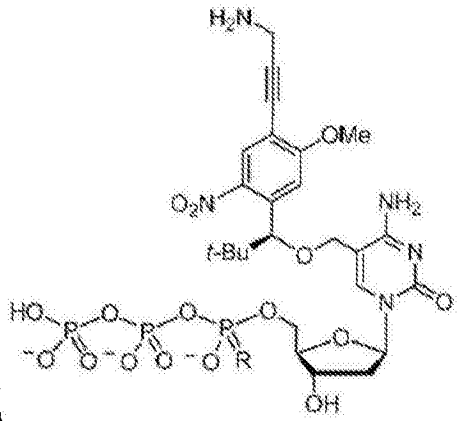


、


、

、

、

、

、

、

、或

，

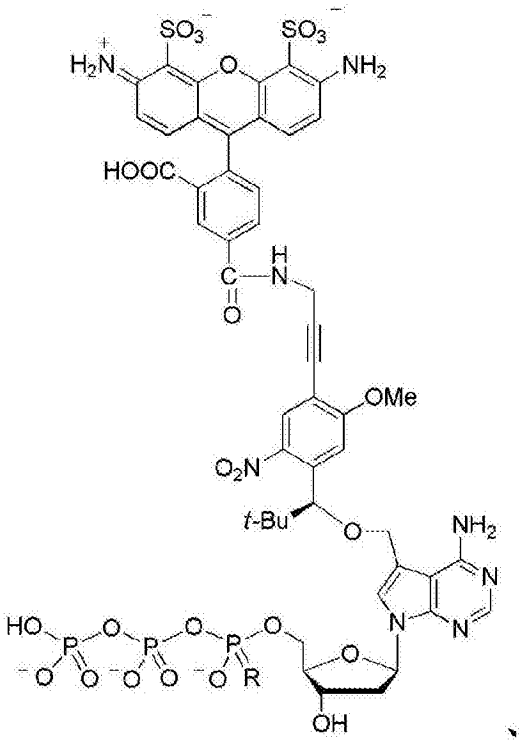
或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

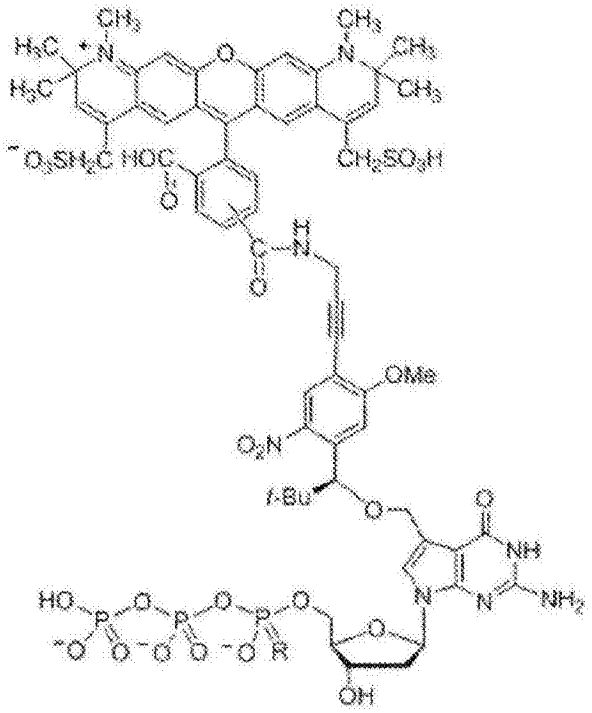
31.权利要求1的化合物，其进一步定义为：

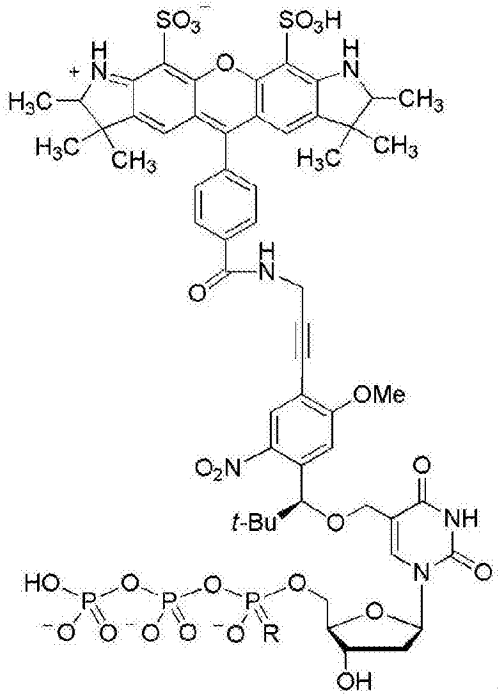

、

、


、或

其中R为O或S,或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

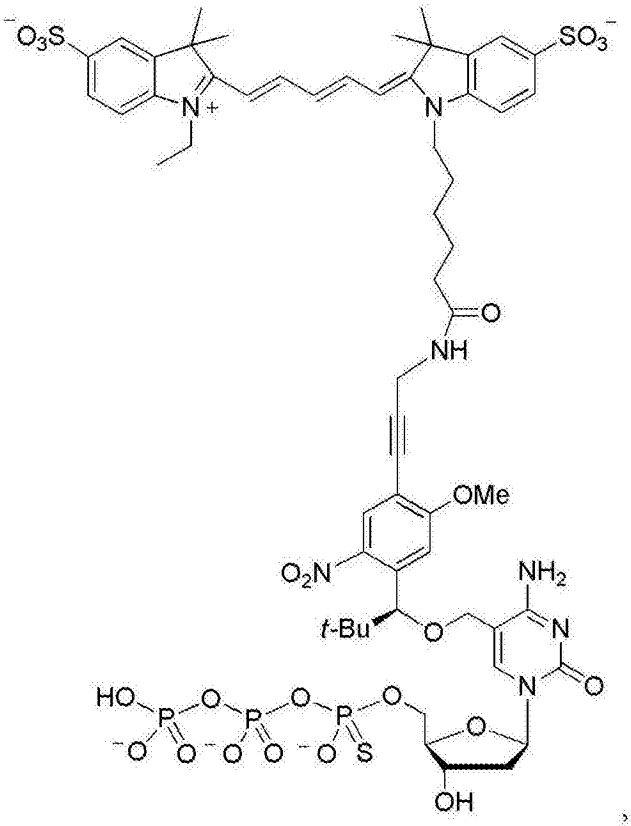
32.权利要求1的化合物,其进一步定义为:





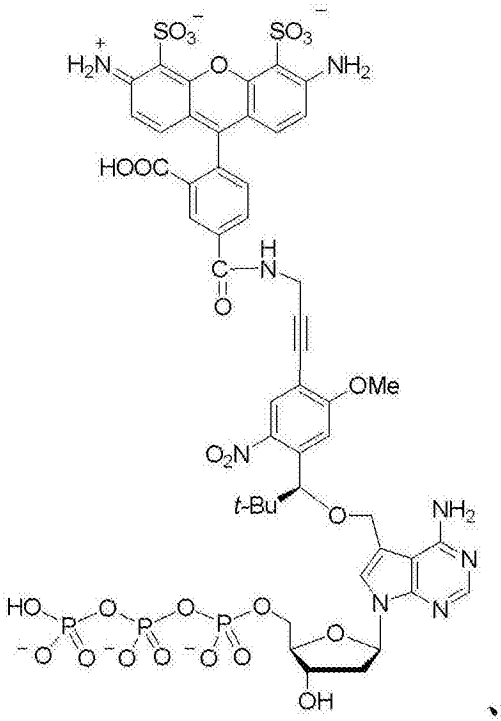


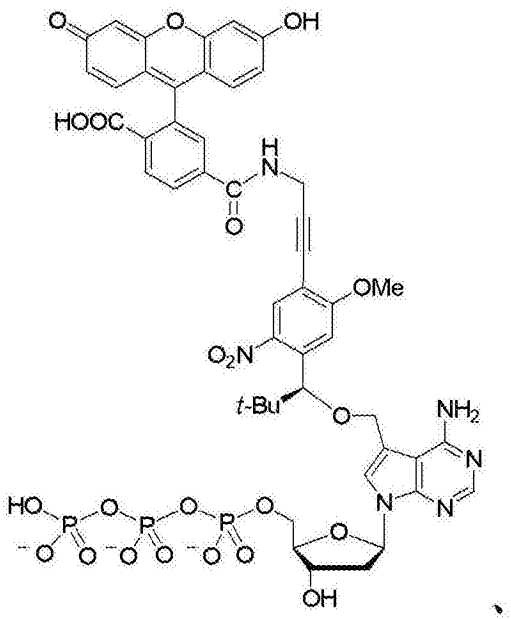
、或

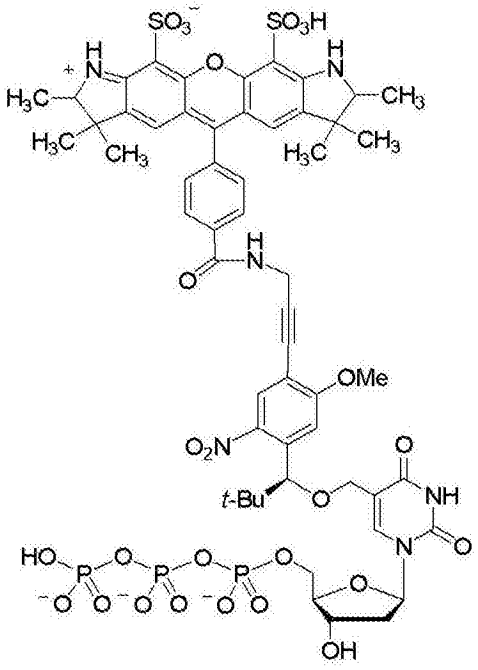


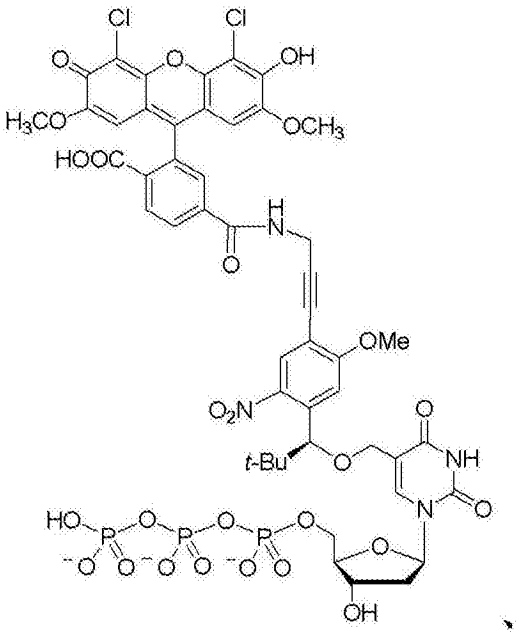
其中R为O或S,或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

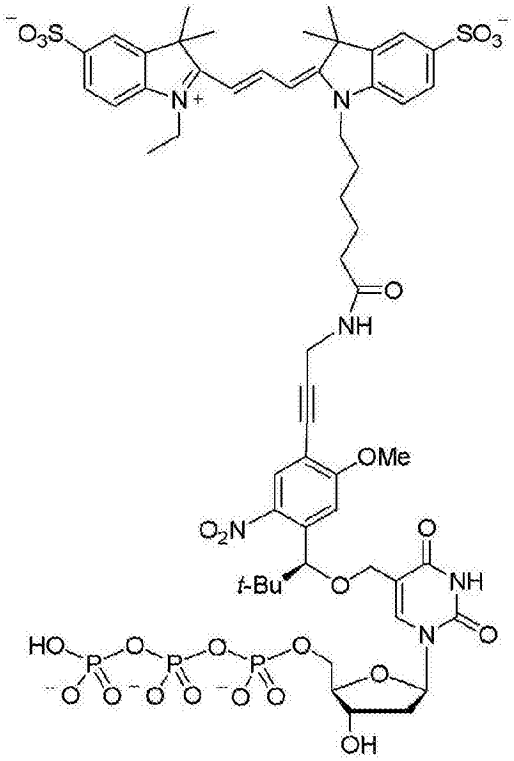
33.权利要求1的化合物,其进一步定义为:



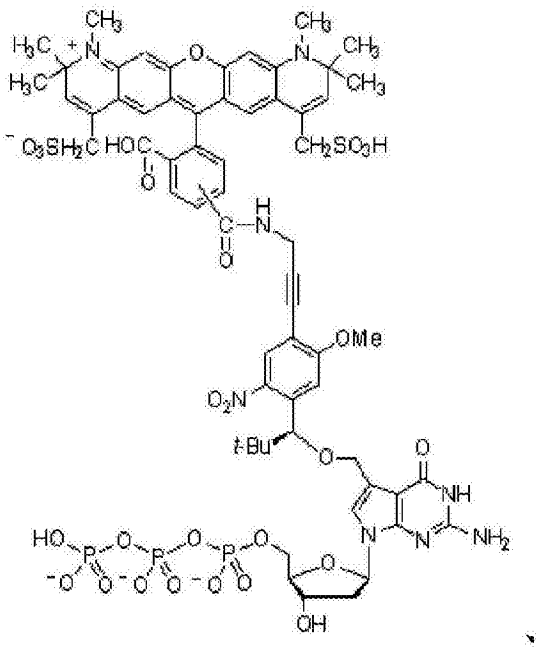




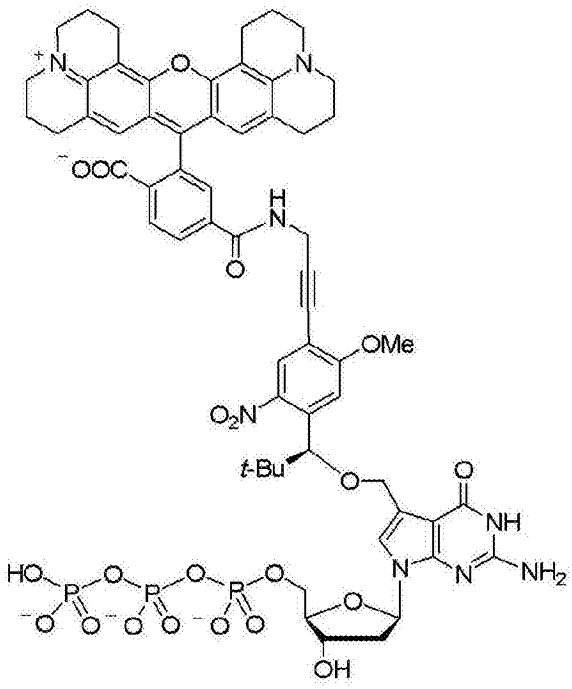




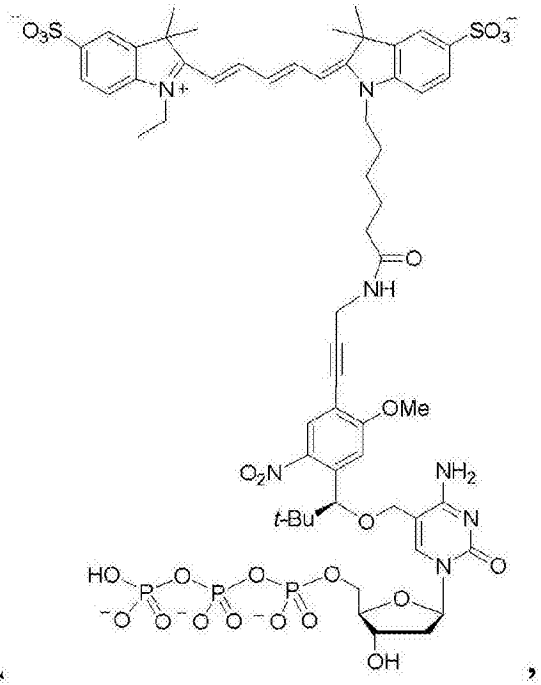
、



、



、或



，

或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

34.一种对靶核酸进行测序的方法，其包括如下步骤：

(i)使引物的5’端附着于固体表面；

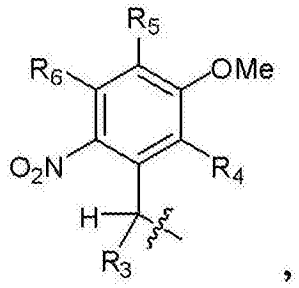
(ii)使靶核酸与附着于所述固体表面的所述引物杂交以形成引物/靶核酸杂交复合物；

(iii)得到聚合酶和根据权利要求1所述的一种或更多种化合物，前提是不同的式I至VII化合物具有不同的荧光团；

(iv)使所述引物/靶核酸杂交复合物与聚合酶和根据权利要求1所述的一种或更多种化合物反应,以通过聚合酶反应形成增长中的引物链;

(v)通过对所述增长中的引物链成像,以通过其荧光团鉴定步骤(iv)所掺入的所述化合物;

(vi)将具有所述增长中的引物链的所述固体表面暴露于光源以除去下式中的光可切割终止部分:



,

其可变基团如步骤(iii)中引用的权利要求所定义;以及

(vii)重复步骤(iv)至(vi)一次或更多次,以鉴定所述靶核酸中的多个碱基,其中前一个循环的步骤(vi)中的所述延伸引物代替下一循环的步骤(iv)中的所述引物/靶核酸杂交复合物进行反应。

35.权利要求34的方法,其中步骤(vi)在叠氮化钠的存在下进行。

36.权利要求35的方法,其中叠氮化钠的浓度为0.1mM至10mM之间。

37.权利要求36的方法,其中叠氮化钠的浓度为1mM。

38.权利要求34的方法,其中步骤(vi)在醋酸钠的存在下进行。

39.权利要求38的方法,其中醋酸钠的浓度为0.1mM至10mM。

40.权利要求38的方法,其中醋酸钠的浓度为1mM。

41.根据权利要求34至40中任一项的方法,其中步骤(v)或(vi)在硫脲的存在下进行。

42.权利要求41的方法,其中硫脲的浓度为10mM至500mM。

43.权利要求41的方法,其中硫脲的浓度为100mM。

44.权利要求35的方法,其中步骤(vi)在二硫苏糖醇的存在下进行。

45.一种对靶核酸进行测序的方法,其包括如下步骤:

(i)使核酸的5'端附着于固体表面;

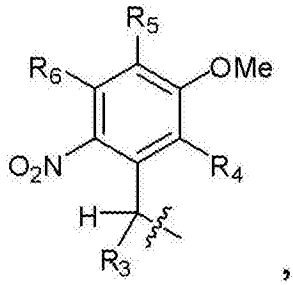
(ii)使引物与附着于所述固体表面的所述核酸杂交以形成引物/靶核酸杂交复合物;

(iii)得到聚合酶和根据权利要求1所述的一种或更多种化合物,前提是不同的式I至VII化合物具有不同的荧光团;

(iv)使所述引物/靶核酸杂交复合物与聚合酶和根据权利要求1所述的一种或更多种化合物反应,以通过聚合酶反应形成增长中的引物链;

(v)通过对所述增长中的引物链光学成像,以通过其荧光团鉴定步骤(iv)所掺入的所述化合物;

(vi)将具有所述增长中的引物链的所述固体表面暴露于光源以除去下式的光可切割终止部分:



，

其上可变基团如步骤(iii)中引用的权利要求所定义；

(vii)重复步骤(iv)至(vi)一次或更多次，以鉴定所述靶核酸中的多个碱基，其中前一个循环的步骤(vi)中的所述延伸引物代替下一个循环的步骤(iv)中的所述引物/靶核酸杂交复合物进行反应。

46.权利要求45的方法，其中步骤(vi)在叠氮化钠的存在下进行。

47.权利要求46的方法，其中步骤(vi)在二硫苏糖醇的存在下进行。

48.根据权利要求34和45中任一项的方法，其中根据步骤(iv)的至少一种化合物的掺入效率为相比于所述化合物之天然核苷酸对应物的掺入效率的70％至100％。

49.权利要求48的方法，其中掺入效率为85％至100％。

50.根据权利要求34和45中任一项的方法，其中所述聚合酶选自逆转录酶、末端转移酶和DNA聚合酶。

51.根据权利要求34和45中任一项的方法，其中85％至100％的光可切割终止部分通过在步骤(vi)中暴露于光源而去除。

52.根据权利要求34和45中任一项的方法，其中根据步骤(iv)掺入至少一种化合物后，以90％至100％的效率链终止增长。

53.根据权利要求34和45中任一项的方法，其中在步骤(v)中使用脉冲多线激发检测器进行成像。

54.根据权利要求34和45中任一项的方法，其还包括在步骤(iv)之后清洗所述增长中的引物链。

55.根据权利要求34和45中任一项的方法，其还包括在步骤(vi)之后清洗所述延伸引物。

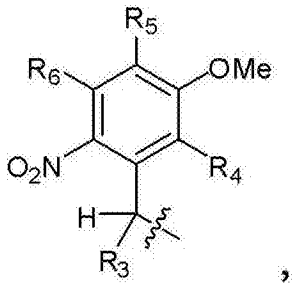
56.根据权利要求34和45中任一项的方法，其还包括在步骤(iv)之前对任何没有在步骤(iv)中反应的引物或增长中的引物链加帽。

57.根据权利要求34和45中任一项的方法，其还包括同步对多个靶核酸进行测序。

58.一种除去核酸分子中的光可切割终止部分的方法，其包括：

(i)掺入根据权利要求1的化合物；

(ii)将所产生的核酸暴露于光源以从所述核酸除去下式的光可切割终止部分：



，

其中可变基团如步骤(i)中引用的权利要求所定义。

59.权利要求58的方法,其还包括同步将多个核酸分子中的非天然组分转变为天然组分。

60.权利要求59的方法,其还包括同步终止多个核酸合成。

61.一种终止核酸合成的方法,其包括以下步骤:将根据权利要求1的化合物放置在聚合酶的环境中,使所述化合物掺入核酸分子中。

62.权利要求61的方法,其中掺入所述化合物后,终止DNA合成的效率为90%至100%。

63.权利要求61的方法,其中与掺入同所述化合物具有同样碱基的天然核苷酸或核苷的效率相比,掺入所述化合物的效率为70%至100%。

64.一种进行Sanger测序或Sanger型测序的方法,其包括使用根据权利要求1的化合物作为终止核苷酸类似物。

65.根据权利要求34、45、58、61和64中任一项的方法,其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(I)的化合物。

66.根据权利要求34、45、58、61和64中任一项的方法,其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(II)的化合物。

67.根据权利要求34、45、58、61和64中任一项的方法,其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(III)的化合物。

68.根据权利要求34、45、58、61和64中任一项的方法,其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(IV)的化合物。

69.根据权利要求34、45、58、61和64中任一项的方法,其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(V)的化合物。

70.根据权利要求34、45、58、61和64中任一项的方法,其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(VI)的化合物。

71.根据权利要求34、45、58、61和64中任一项的方法,其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(VII)的化合物。

72.一种测定靶核酸序列的方法,其包括:

(i)将靶核酸加入Sanger测序或Sanger型测序仪中;

(ii)将根据权利要求1的一种或更多种化合物加入所述测序仪中,前提是当存在多于一种碱基类型时,每种碱基与不同的荧光团相连接;

(iii)加入互补的引物和聚合酶;

(iv)进行聚合酶反应以将至少一种步骤(ii)所述的化合物掺入增长中的核酸链,以及

(v)利用荧光测序仪器或通过脉冲多线激发荧光分析Sanger测序反应的结果,

其中步骤(i)至(iii)可以任意顺序进行。

73.权利要求72的方法,其中根据步骤(iv)掺入至少一种化合物后,以90%至100%的效率终止链增长。

74.权利要求72的方法,其中在聚合酶反应中,与掺入具有相同碱基的天然底物的效率相比,根据步骤(iv)掺入至少一种化合物的效率为70%至100%。

75.权利要求74的方法,其中掺入效率为85%至100%。

76.权利要求72的方法,其中所述聚合酶选自逆转录酶、末端转移酶和DNA聚合酶。

77.一种将非天然组分掺入核酸的方法，其包括：

(i)将靶核酸加入测序仪中；

(ii)将根据权利要求1的一种或更多种化合物加入所述测序仪中，前提是当存在多于一种碱基类型时，每种碱基与不同的荧光团相连接；

(iii)加入聚合酶；以及

(iv)进行聚合酶反应以将至少一种步骤(ii)所述的化合物掺入增长中的核酸链，

其中步骤(i)至(iii)可以任意顺序进行。

78.权利要求77的方法，其还包括

(v)分析掺入至少一种来自步骤(ii)的化合物之聚合酶链式反应的结果。

79.权利要求77的方法，其中根据步骤(iv)掺入至少一种化合物后，以90％至100％的效率终止链增长。

80.权利要求77的方法，其中在所述聚合酶反应中，与掺入具有相同碱基的天然底物的效率相比，根据步骤(iv)掺入至少一种化合物的效率为70％至100％。

81.一种进行微测序或微测序型测序的方法，其包括将根据权利要求1的化合物加入微测序或微测序型测序方法。

82.根据权利要求72、77和81中任一项的方法，其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(I)的化合物。

83.根据权利要求72、77和81中任一项的方法，其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(II)的化合物。

84.根据权利要求72、77和81中任一项的方法，其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(III)的化合物。

85.根据权利要求72、77和81中任一项的方法，其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(IV)的化合物。

86.根据权利要求72、77和81中任一项的方法，其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(V)的化合物。

87.根据权利要求72、77和81中任一项的方法，其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(VI)的化合物。

88.根据权利要求72、77和81中任一项的方法，其中所述根据权利要求1的化合物进一步定义为式(VII)的化合物。

89.一种系统，其包含：

含有多个珠的流通池，其中：

每个珠与DNA分子相连接，其中已使用聚合酶将根据权利要求1的化合物掺入；并且

所述流通池至少部分对可见光和紫外光透明；

成像装置，其配置成采集所述流通池的图像；

滤光器转盘，其包含至少四个光谱滤光器，其中所述滤光器转盘配置成在每个滤光器之间循环；

灯，其配置成产生从所述流通池通过所述滤光器转盘中的滤光器至所述成像装置的光路；和

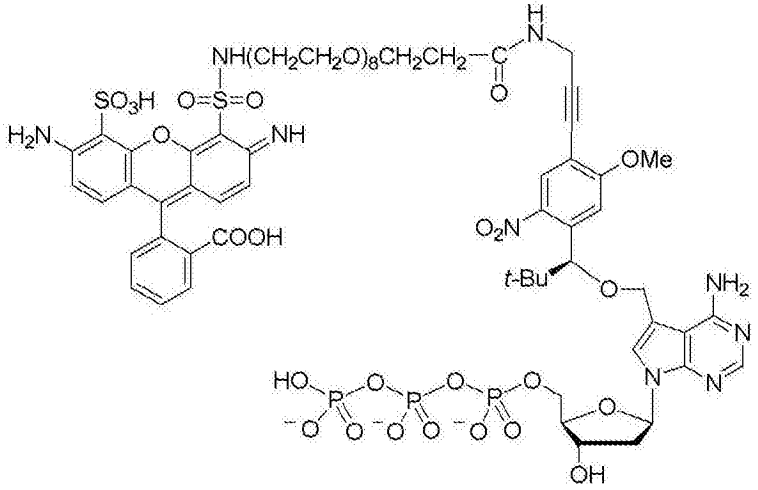
紫外光源，其配置成向所述流通池上的所述DNA分子提供紫外光。

90.权利要求89中的系统，其中所述流通池为微流体流通池。

91.权利要求89中的系统，其还包含所述滤光器转盘与所述流通池之间的物镜。

92.权利要求89中的系统，其还包含配置成将所述光路导引至所述成像装置的反光镜。

93.下式的化合物：



或者该式的盐和/或质子化形式。

5-甲氧基,3'-OH未阻断,可快速光切割的终止核苷酸以及用于核酸测序的方法

背景技术

[0001] 本申请要求美国临时专利申请No.61/627,211和61/534,347(分别于2011年10月7日和2011年9月13日提交)的优先权,其全部内容通过引用而并入本文。

I.技术领域

[0002] 本发明总体而言涉及用于DNA测序和其他类型DNA分析的组合物和方法。更特别地,本发明部分涉及具有快速光化学可切割基团的3'-OH未阻断核苷酸和核苷,以及将其用于多种DNA测序法中的方法,包括其在生物医学研究中的应用。

[0003] II现有技术描述

[0004] 快速DNA测序的方法已经成为分析人群中疾病和突变以及开发疗法的需求(Metzker,2010,通过引用并入本文)。通常观察到的人类序列变异形式为单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP),其在基因组序列的约每300至1000个碱基对中发生1处,和结构变体(structual variant,SV)(包括块的替换、插入/缺失、倒位、区段重复),以及拷贝数变体。结构变体可占所有变异事件的22%,比SNP导致的变体碱基更多(Levy等,2007,通过引用并入本文)。这一发现与Scherer、Hurles及其同事用基于微阵列的方法分析270名个体所得结论一致(Redon等,2006,通过引用并入本文)。基于人类基因组全序列,正努力通过SNP和SV作图或直接关联来鉴定与常见疾病和癌症背后的遗传联系。致力于快速、高通量且低成本DNA测序的技术发展将促进对遗传信息(如SNP和SV)的理解和其在应用医学中的使用。

[0005] 一般地,10%至15%的SNP会通过改变特定的氨基酸残基而影响蛋白质功能,通过改变剪接机制而影响基因的正确加工,或是通过改变调节机制而影响基因或蛋白质的正常表达水平。SV还可在人类生物学和疾病中发挥重要作用(Iafrate等,2004;Sebat等,2004;Tuzun等,2005;Stranger等,2007,通过引用并入本文)。人们设想,对信息性SNP和SV的鉴定会导致对遗传性疾病更准确的诊断,对风险易感性更好的预后,或是对组织中偶发突变的鉴定。个体SNP和SV谱的一个应用将是通过预防性药物治疗来显著地推迟疾病的发生或发展。此外,药物代谢基因的SNP和SV谱可用于制定特定的用药方案,以提供更安全和更有效的结果。为实现这些远大的目标,基因组测序将进入有潜力对大部分人口进行部分测序的再测序阶段,这将涉及对分布在整个人类基因组中的特定区域进行并行测序,以获得给定复杂疾病的SNP和SV谱。

[0006] 大多数常见疾病中内在的序列变异很可能涉及多个SNP、SV及其多种组合,它们散布于相关基因中并以低频率存在。因此,相比于仅以已知SNP为靶标的技术,采用从头测序策略的DNA测序技术更有可能检测和/或发现这些罕见的、广泛分布的变体。

[0007] 一种NGS技术可被用于检测SNP、SV和单核酸变体(single nucleotide variant,SNV)以及它们的各种组合的实例是癌症的诊断。这些检测方法传统上采用单一标记物、单一分析的手段,最近逐渐向在一个实验里分析多个标记物的手段演变。然而,每一种癌症在

基因上都是复杂的，经常在许多基因上同时产生多个突变。因此，传统的手段导致检测昂贵且费时，而且只能提供有选择的一些已知序列变种的信息。近来NGS技术的进展已经允许对着重于与多种癌症类型相关并且可以进行医学干预的基因靶标采用针对性的手段(参见Su等，2011；Beadling等2012)。由于最近测序方面工作的成功，例如癌症基因组图(The Cancer Genome Atlas，TCGA)计划、国际癌症基因组联盟(International Cancer Genome Consortium，ICGC)计划和癌症体细胞突变目录(Catalogue of Somatic Mutations in Cancer，COSMIC)数据库，提供了关于这些基因靶标在许多癌症类型中的知识以及含有这些突变的癌症的治疗效果的大量汇编(参见Futreal等2004)。另一些工作(一部分是儿童癌症基因组计划的结果)已经表明儿童癌症的独特的基因特征在于突变的数目很少并且突变主要存在于非常规分子途径中(参见Wu等，2012；Meldrum等，2011)。目前癌症诊断最大的未满足之需要是具有所需精确性和灵敏性的快速高通量早期检测技术来鉴定属于正在形成癌变的有限亚群细胞的稀有序列变种。

[0008] 传统上，DNA测序通过“Sanger”或“双脱氧(dideoxy)”法来实现，所述方法涉及通过用DNA聚合酶掺入2’，3’-双脱氧核苷酸(ddNTP)对DNA合成进行链终止(Mataker等，2005，通过引用并入本文)。自2005年起，采用全自动Sanger测序技术来进行基因组分析已基本不是主流。下一代测序(next-generation sequencing，NGS)技术的优势包括能够便宜地产生庞大的数据容量，在一些情况下每次仪器运行读出超过一亿短序列。许多这些方法被统称为合成测序(sequencing-by-synthesis，SBS)，这不能清晰地描述不同的DNA测序机制(Metzker，2010；Metzker，2005，通过引用并入本文)。DNA聚合酶依赖性策略已被分为循环可逆终止(cyclic reversible termination，CRT)、单核苷酸添加(single nucleotide addition，SNA，如焦磷酸测序)和实时测序。用DNA连接酶替代DNA聚合酶的方法被称为连接测序(sequencing-by-ligation，SBL)。Metzker(2010)已描述了这些方法，其通过引用并入本文。

[0009] 测序技术包括许多方法，大致分为(a)模板制备，(b)测序和成像，和(c)数据分析。各种具体试验方案的独特组合将各种技术彼此区分开并且决定了每种平台所产生的数据类型。这些数据上的差异给基于数据质量和花费来比较各种平台带来挑战。虽然每个制造厂家都会提供质量评分和精确度估计，对于出自一个技术平台的“达标的碱基”是否等同于另一个平台的“达标的碱基”还是有不同的看法。

[0010] 制备下一代测序(NGS)反应模板的方法有两种，包括：源自单个DNA分子经过克隆倍增的模板和单个DNA分子的模板。利用DNA聚合酶的测序方法分为循环可逆终止(cyclic reversible termination，CRT)、单核苷酸添加(single nucleotide addition，SNA)和实时测序(参见Metzker，2010)。连接测序(seq uencing-by-ligation，SBL)，即用DNA连接酶替代DNA聚合酶的方法，也已被用于NGS技术(参见如Shendure等，2005；Valouev等，2008)。这些测序策略所使用的成像方法涵盖测量生物性发光的信号至对单分子事件的四色成像。由这些NGS平台产生的巨量数据在数据储存、跟踪和质量控制方面对信息技术有很大的需求(参见Pop和Salzberg，2008)。

[0011] 对从所研究的基因组提出具有代表性、没有偏差的核酸材料源的可靠方法的需要仍然是一个重要的目标。目前的各种方法总的来说是将基因组DNA随机破碎成较小的尺寸，然后从中产生片段模板或伴侣配对的模板。各种NGS技术的一个共同之处在于模板是被连

接或固定在固体表面或载体上。这种不同模板位点在空间上隔开的固定方式使得数千到数十亿测序反应得以同时进行。

[0012] 虽然克隆倍增方法在有些方面优于细菌克隆，有些实验方案操作起来非常繁琐而且需要大量的基因组DNA材料(3至20μg)。单分子模板的制备更为直接而且需要起始材料更少(<1μg)。更进一步的是，这些方法不需要PCR，因PCR会在克隆倍增的模板上产生突变而被误认为序列变种。富含AT和GC的靶序列也会在产物收率上呈现倍增偏差，这样一来使这些系列在基因组比对和组装时代表性下降。定量应用(如RNA-测序(RNA-seq，参见Wang等，2009))，如果使用非倍增的模板来源，会更有效地进行，因为这样不会改变mRNA分子的代表性丰度。

[0013] 循环可逆终止(CRT)方法的重要方面是可逆终止剂，其分为两种类型：3'-O-阻断和3'-OH未阻断(Metzker，2010)。ddNTP作为Sanger测序的链终止剂的应用，为最初开发连接至核苷酸3′-端的可逆阻断基团提供了基础(Metzker等，1994；Canard和Sarfati，1994)。诸如3'-O-烯丙基-dNTP的阻断基团(Metzker等，1994；美国专利6,664,079；Ju等，2006；美国专利7,057,026；美国专利7,345,159；美国专利7,635,578；美国专利7,713,698)和3′-O-叠氮甲基-dNTP(美国专利7,057,026；Guo等，2008；Bentley等，2008；美国专利7,414,116；美国专利7,541,444；美国专利7,592,435；美国专利7,556,537；美国专利7,771,973)已被应用于CRT。3'-O-阻断终止剂需要裂解两个化学键来从碱基上除去荧光基团并恢复3'-羟基。使用这些可逆终止剂的缺点是连接至3′-端的阻断基团通常造成DNA聚合酶掺入的偏差。经常需要对DNA聚合酶的突变诱发来促进3'-O-阻断终止剂的掺入。大量基因工程改造的DNA聚合酶需要通过含有一个或更多个氨基酸替代、插入和/或消除的定位突变或者随机突变来产生，随后经过高通量筛选进行鉴别，达到更高效地掺入3'-O-阻断之核苷酸的目的。

[0014] 通过从巨大的突变DNA聚合酶库中筛选来鉴别能够高效地掺入3'-O-阻断终止剂的经过修饰的酶有很大难度，这导致了3'-未阻断的可逆终止剂的开发。已证实，连接至3'-OH未阻断核苷酸之碱基的小的光可裂解基团可以作为有效的可逆终止剂并且可被野生型DNA聚合酶高效地掺入(Wu等，2007；Metzker，2010；Litosh等，2011；Gardner等，2012；美国专利7,897,737、7,964,352和8,148,503，美国专利申请公布2011/0287427)。例如，5-羟甲基-2′-脱氧尿苷(HOMedU)被发现天然存在于许多噬菌体和低等真核生物的基因组中(Gommers-Ampt，1995，通过引用并入本文)。其羟甲基可以作为连接小的光可裂解终止基团的分子把柄(molecular handle)。其他天然存在的可被进一步修饰以发挥可逆终止剂功能的高度修饰碱基包括5-羟甲基-2′-脱氧胞苷(HOMedC)，其被发现天然存在于T2、T4和T6噬菌体的基因组中(Wyatt和Cohen，1953；Gommers-Ampt，1995)和哺乳动物基因组中(Kriaucionis和Heintz，2009；Tahiliani等，2009；Itoi等，2010)。吡咯并嘧啶环结构(7-脱氮嘌呤)也被发现天然存在于核苷抗生素(Carrasco和Vázquez，1984，通过引用并入本文)和tRNA碱基(Limbach等，1994，通过引用并入本文)中，而且化合物7-脱氮-7-羟甲基-2′-脱氧腺苷(C^7-HOMedA)(Rockhill等，1997)和7-脱氮-7-羟甲基-2′-脱氧鸟苷(C^7-HOMedG)(McDougall等，2001)已被报道过。

[0015] 本专利的一方面是与羟甲基核苷和核苷酸之碱基相连接的经修饰的2-硝基苄基的用途。半个世纪前就已被批露，2-硝基甲苯(Wettermark，1962)和它的衍生物

(Wettermark,1962;Hardwick等,1960;Mosher等,1960;Sousa和Weinstein,1962;Weinstein等,1966)被报道表现出光致变色的性能,这个现象被认为是瞬时生成酸硝基(aci-nitro)阴离子中间体的结果(Weinstein等,1966;Morrison,1969)。不受理论的局限,硝基吸收光子后导致从α-碳夺去氢(Mosher等,1960;Berson和Brown,1955;De Mayo,1960),生成酸硝基阴离子中间体,随后释放"笼住的"效应分子并生成亚硝羰基副产物(Corrie,2005),此过程被普遍接受。这些早期研究表明,苄基碳的α-取代(Wettermark,1962)或苯环4位上给电子基团(Sousa和Weinstein1962;Weinstein等1966)的取代增加了光致变色效应的速率。这些发现导致了对光敏感的2-硝基苄基保护基团的开发(Barltrop等,1966;Patchornik,1968;Patchornik等,1970)。然而,光化学裂解速率的改变程度通常取决于许多因素,已经报道的包括苄基碳的取代(Walker等,1986;Hasan等,1997;Giegrich等,1998)、苯环上的官能团(Wootton和Trentham,1989;Hasan等,1997;Giegrich等,1998)和离去基团(Walker等,1986),以及pH(McCray等,1980;Walker等,1986;Wootton和Trentham,1989)、溶剂(Sousa和Weinstein,1962;McGall等,1997;Giegrich等,1998)和光强度(McCray等,1980;McGall等,1997)。然而有一个尚未研究的性质是立体化学,这是因为2-硝基苄基的苄基取代或α-碳取代会形成手性中心。对于核苷酸合成的情形,与α-取代的2-硝基苄醇外消旋体的结合会生成两个非对映异构体,它们的唯一区别就在于苄基碳的绝对构型(R或S)。

[0016] 另一类3'-OH-未阻断核苷酸也已被Mitra等(2003)和Turcatti等(2008)描述过,所述化合物依赖于比较大的荧光基团(dye group)的空间位阻来阻止加入第一个核苷酸之后的掺入。需要注明的是,由Wu等(2007)、Litosh等(2011)和Gardner等(2012)描述的取代2-硝基苄基核苷酸类似物不需要体积大的取代基(如荧光团(fluorescent dye))来导致DNA合成的终止。另一类3'-未阻断核苷酸已被Helicos Biosciences描述。这些核苷酸利用第二核苷或核苷酸类似物作为DNA合成的抑制剂(Bowers等,2009;美国专利7,476,734)。观察到本发明的化合物与那些由Bowers描述的化合物相比,终止性能有显著差别。例如,Bowers等描述了采用双碱基同聚物模板的预稳态(pre-steady-state)动力学,其中测量了他们所有的3'-OH未阻断的"实质性"终止剂的$k_{pol(+2)}$速度。Bowers等所作的终止实验中核苷酸浓度低于微摩尔级(即100至250nM)。与此相对应,本发明的几个化合物是以10μM和0.5到20分钟的时间进程进行的。两个化合物,dU.V和dU.VI,均被迅速地在第一个碱基位置掺入(2分钟时达100%),然后在那个位置终止DNA的合成。即便孵育长达20分钟,在预料的第二碱基位置检测不到任何明显的信号。详情参见Gardner等,2012。

[0017] 3'-OH未阻断的可逆终止剂相对3'-O-阻断核苷酸通常有几个优势。例如,对于许多3'-OH未阻断的可逆终止剂而言只需一个化学键的裂解就可从碱基上同时除去终止基团和荧光基团。这进而导致更高效地将核苷酸复原以便进入下一个CRT循环的策略。3'-OH未阻断的可逆终止剂的第二个优势在于许多这些化合物都容易被酶掺入,而且在一些情形下,当采用野生型DNA聚合酶时,可以如天然核苷酸一样有效地掺入(Wu等,2007;Litosh等,2011;Gardner等,2012;美国专利7,897,737;美国专利7,964,352;美国专利8,148,503;美国专利申请公布2011/0287427),尽管在另一些情形下并没有观察到这种效率(Bowers等,2009;美国专利7,476,734)。3'-OH未阻断的终止剂面临的一个挑战是产生合适的碱基修饰来导致掺入一个碱基后终止DNA合成。这一点很重要,因为未阻断的3'-OH基团是掺入下一

个要进来的核苷酸的天然底物。

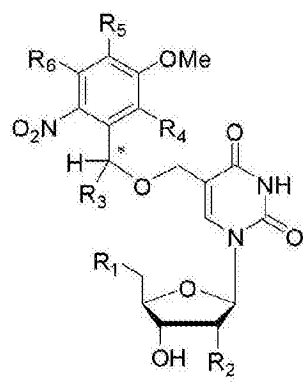
[0018] 下一代测序(NGS)技术已经促进了很多重要的生物医学发现，然而因下面多种原因仍然需要化学上的改进，包括降低错误率，缩短较慢的循环时间。如要有效地在NGS方法中应用，通常期望可逆终止剂表现出多种理想性质，包括例如快速的核苷酸掺入动力学、单碱基终止、高核苷酸选择性和/或终止基团的迅速裂解。因此，需要开发新的核苷和核苷酸来迎接这些挑战。

发明内容

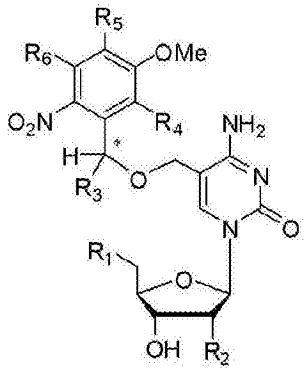
[0019] 在一些方面中，本公开内容提供了可用于在高通量测序反应中对基因组信息进行高效测序的新化合物和组合物。在另一方面中，提供了可高效且经济地提供基因组信息的试剂和试剂组合。在另一些方面中，本发明提供了用于诊断方法和用于针对个体开发靶向疗法的试剂库和阵列。

[0020] 在一些方面中，本公开内容提供了可用于DNA测序的新化合物。例如，本公开内容提供了下式的化合物：

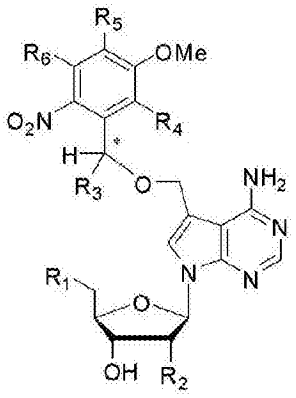
[0021]



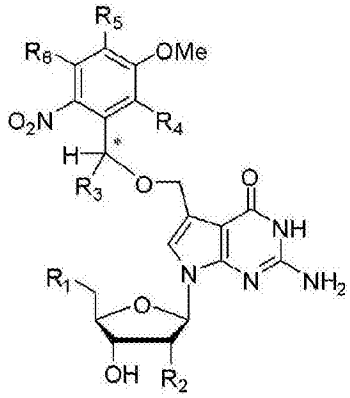
(I)、



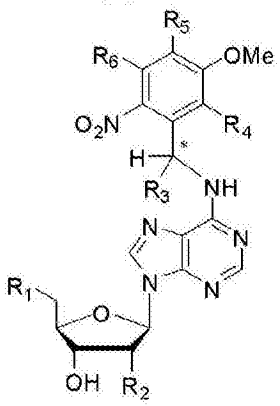
(II)、



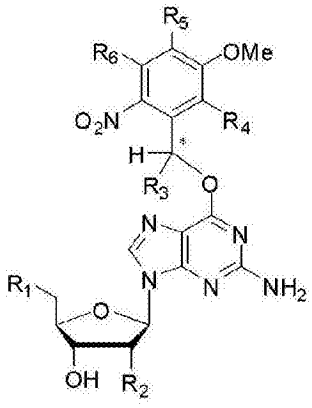
(III)、



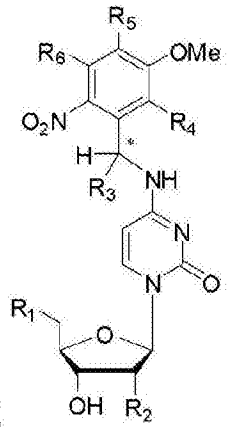
(IV)、



(V)、



(VI)、或



(VII),

[0022] 其中：

[0023] R_1为羟基、一磷酸酯基(monophosphate)、二磷酸酯基(diphosphate)、三磷酸酯基(triphosphate)、α-硫代三磷酸酯基(α-thiotriphosphate)或多磷酸酯基(polyphosphate)；

[0024] R_2为氢或羟基；

[0025] R_3为烷基$_{(C\leq 8)}$或取代的烷基$_{(C\leq 8)}$；

[0026] R_4为

[0027] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基、叠氮基或巯基；

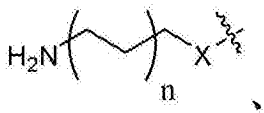
[0028] 烷基$_{(C\leq 6)}$、酰基$_{(C\leq 6)}$、烷氧基$_{(C\leq 6)}$、酰氧基$_{(C\leq 6)}$、烷基氨基$_{(C\leq 6)}$、二烷基氨基$_{(C\leq 6)}$、酰氨基$_{(C\leq 6)}$、或任何这些基团的取代形式；

[0029] R_5和R_6各自独立为：

[0030] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基、叠氮基或巯基；

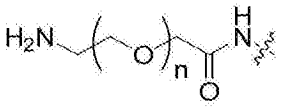
[0031] 烷基(C≤6)、烯基(C≤6)、炔基(C≤6)、芳基(C≤6)、芳烷基(C≤8)、杂芳基(C≤6)、酰基(C≤6)、烷氧基(C≤6)、酰氧基(C≤6)、烷基氨基(C≤6)、二烷基氨基(C≤6)、酰氨基(C≤6)、或任何这些基团的取代形式；

[0032] 下式的基团：

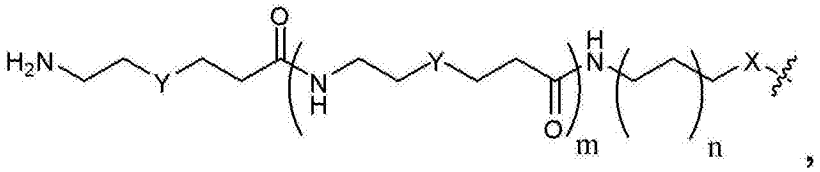


、

[0033]



、或



，

[0034] 其中

[0035] X为

[0036] -O-、-S-或-NH-；或

[0037] 亚烷基(alkanediyl)(C≤12)、亚烯基(alkenediyl)(C≤12)、亚炔基(alkynediyl)(C≤12)、或任何这些基团的取代形式；

[0038] Y为-O-、-NH-、亚烷基(C≤12)或取代的亚烷基(C≤12)；

[0039] n为0至6的整数；并且

[0040] m为0至6的整数；或

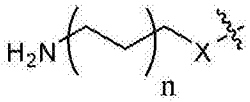
[0041] -接头-报告基团；

[0042] 或其盐，互变异构体，或光学异构体。

[0043] 在一些实施方案中，所述化合物被进一步定义为式I、II、III、IV、V、VI或VII的化合物。在一些实施方案中，R_1为羟基、一磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、α-硫代三磷酸酯基或多磷酸酯基。

[0044] 在一些实施方案中，R_2为氢、羟基。在一些实施方案中，R_3为烷基(C≤8)，例如烷基(C3-4)，包括异丙基或叔丁基。在一些实施方案中，R_4为氢、硝基。在一些实施方案中，R_5为氢、碘、或烷氧基(C≤6)，包括例如甲氧基。在一些实施方案中，R_5为下式的基团：

[0045]



[0046] 其中

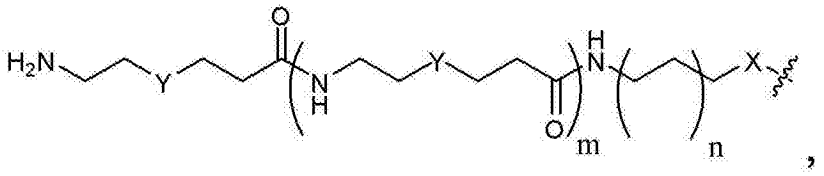
[0047] X为

[0048] -O-、-S-或-NH-；或

[0049] 亚烷基(C≤12)、亚烯基(C≤12)、亚炔基(C≤12)、亚芳基(arenediyl)(C≤12)、杂亚芳基(heteroarenediyl)(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；并且

[0050] n为0至6的整数。

[0051] 在一些实施方案中，X为亚炔基(C2-8)，例如-C≡C-。在一些实施方案中，n为0。在一些实施方案中，R_5为下式的基团：

[0052] 

[0053] 其中

[0054] X为

[0055] -O-、-S-或-NH-；或

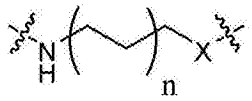
[0056] 亚烷基(C≤12)、亚烯基(C≤12)、亚炔基(C≤12)、亚芳基(C≤12)、杂亚芳基(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；

[0057] Y为-O-、-NH-、亚烷基(C≤12)或取代的亚烷基(C≤12)；

[0058] n为0至6的整数；并且

[0059] m为0至6的整数。

[0060] 在一些实施方案中，X为亚炔基(C2-8)，例如-C≡C-。在一些实施方案中，Y为$-CH_2-$。在一些实施方案中，n为0。在一些实施方案中，m为0。在一些实施方案中，R_5为-接头-报告基团。在一些实施方案中，所述接头为：

[0061] 

[0062] 其中

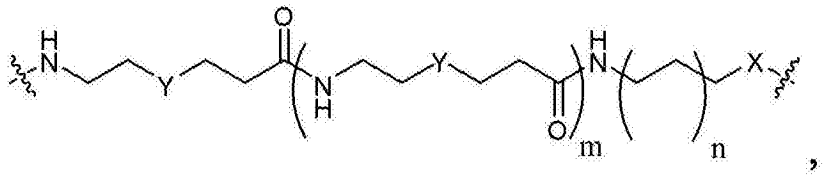
[0063] X为

[0064] -O-、-S-或-NH-；或

[0065] 亚烷基(C≤12)、亚烯基(C≤12)、亚炔基(C≤12)、亚芳基(C≤12)、杂亚芳基(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；并且

[0066] n为0至6的整数。

[0067] 在一些实施方案中，X为亚炔基(C2-8)，例如-C≡C-。在一些实施方案中，n为0。在一些实施方案中，所述接头为：

[0068] 

[0069] 其中

[0070] X为

[0071] -O-、-S-或-NH-；或

[0072] 亚烷基(C≤12)、亚烯基(C≤12)、亚炔基(C≤12)、亚芳基(C≤12)、杂亚芳基(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；

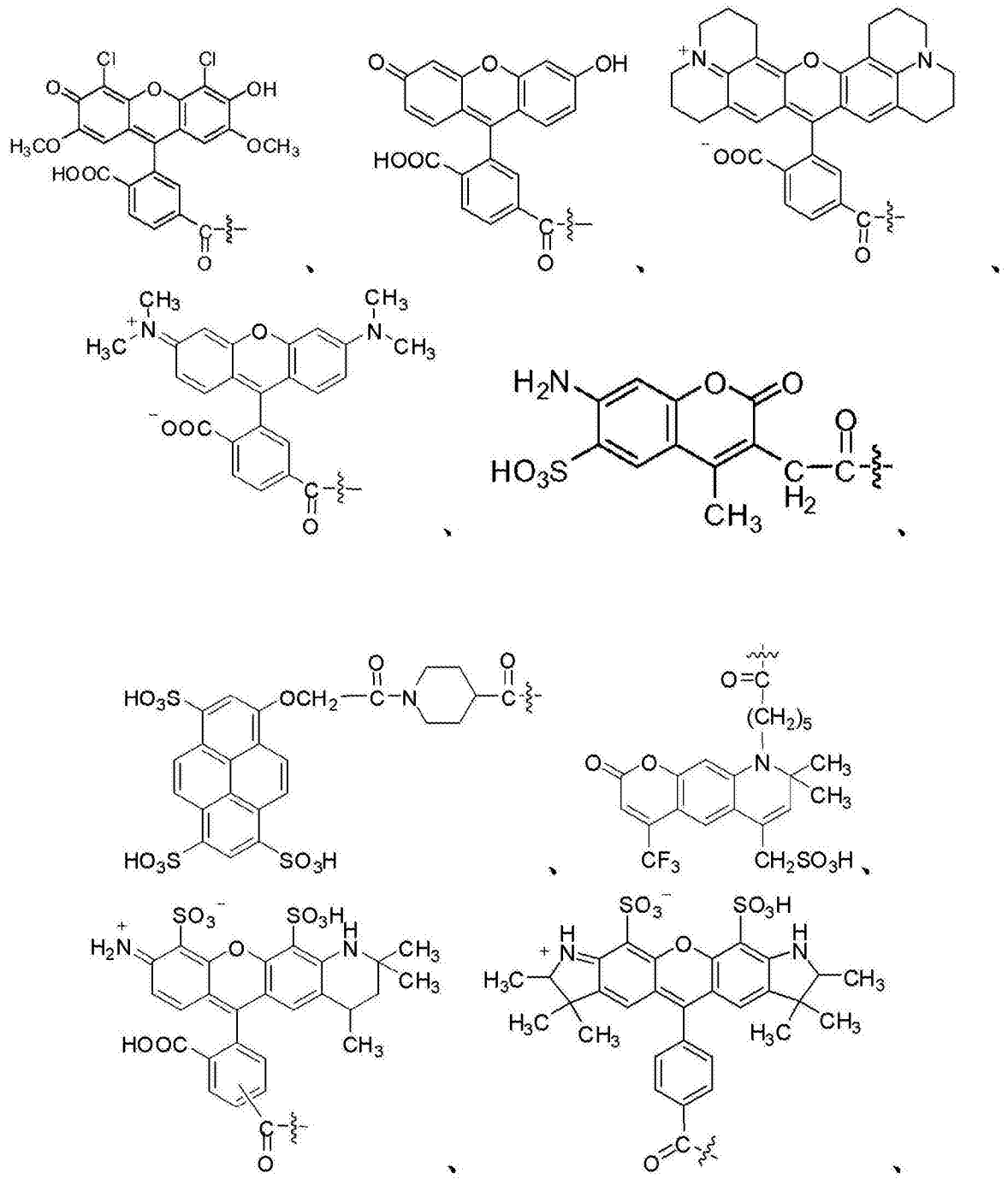
[0073] Y为-O-、-NH-、亚烷基(C≤12)或取代亚烷基(C≤12)；

[0074] n为0至6的整数;并且

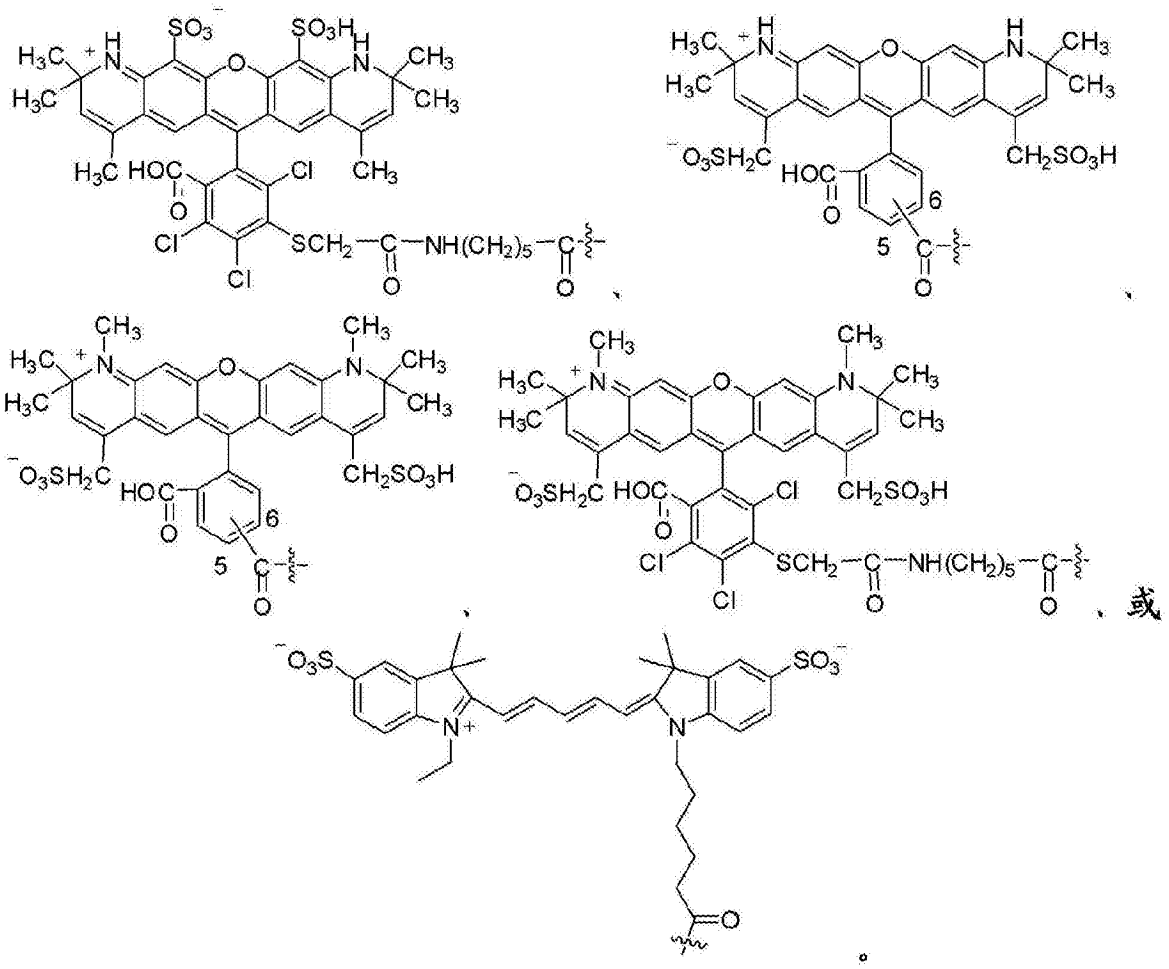
[0075] m为0至6的整数。

[0076] 在一些实施方案中,X为亚炔基$_{(C2-8)}$,例如-C≡C-。在一些实施方案中,Y为-CH_2-。在一些实施方案中,n为0。在一些实施方案中,其中m为0。在一些实施方案中,所述报告基团基于染料,其中所述染料为呫吨、荧光素、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白或方酸菁染料。在一些实施方案中,所述报告基团为:

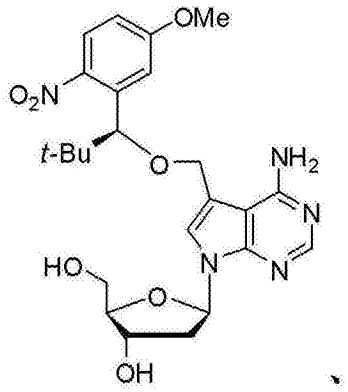
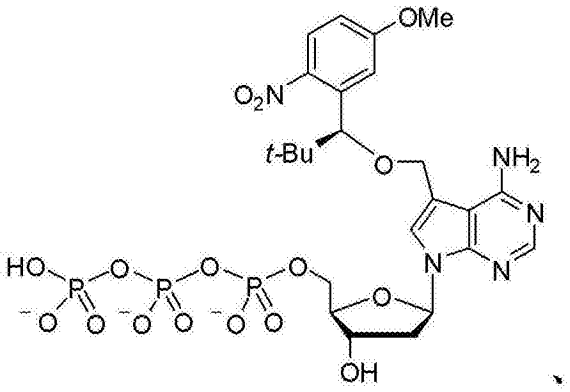
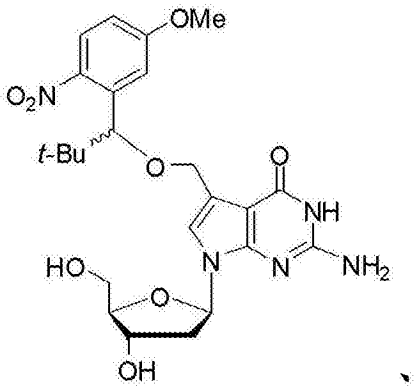
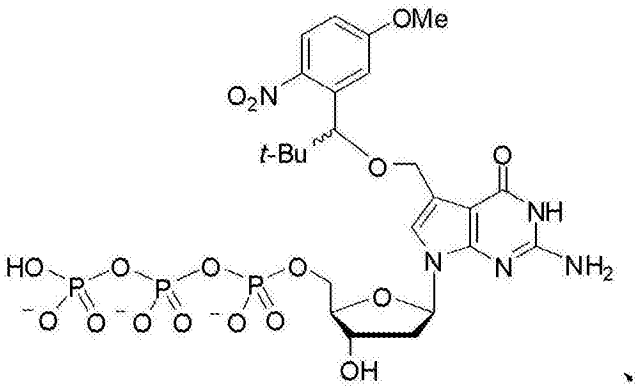
[0077]



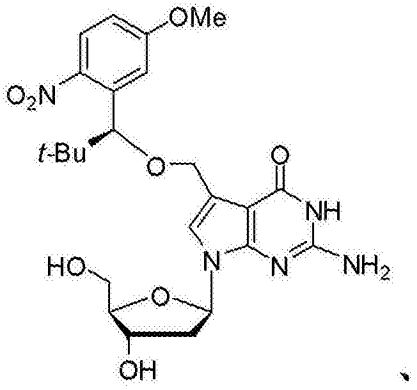
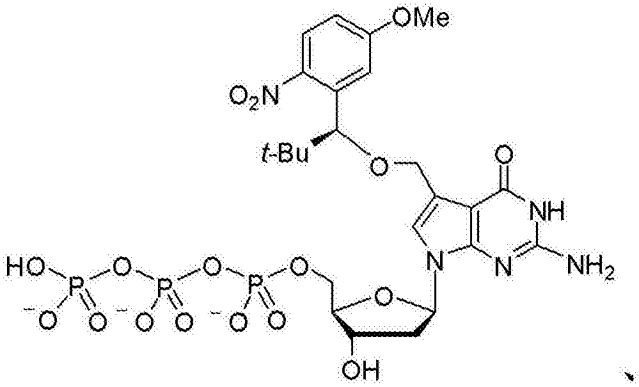
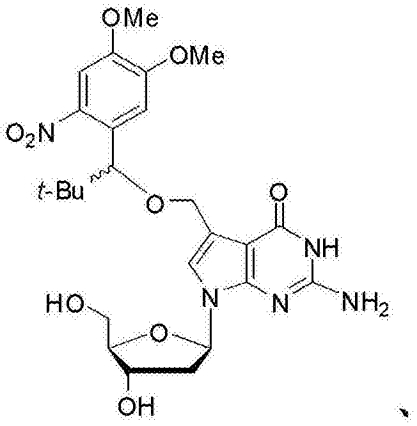
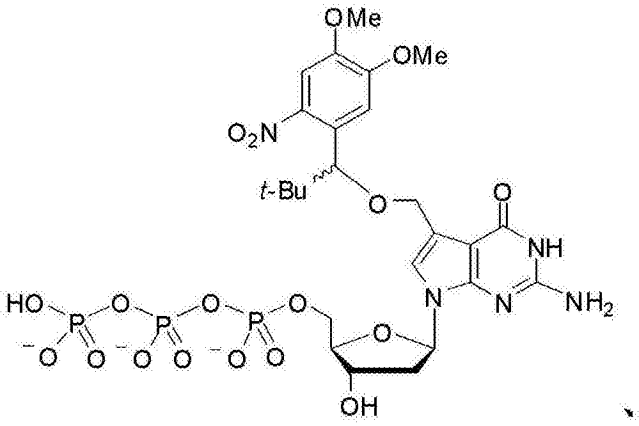
[0078]

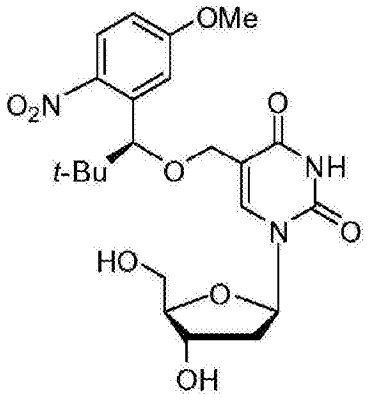


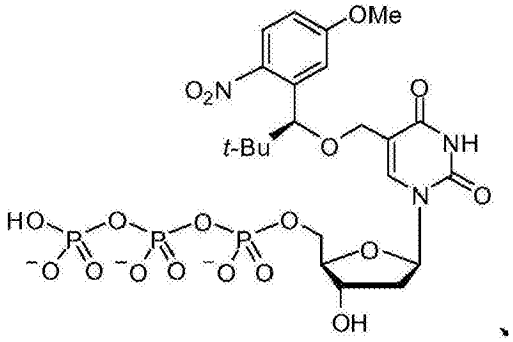
[0079] 在一些实施方案中，R_6为氢。在一些实施方案中，带星号的碳原子为S构型。在一些实施方案中，带星号的碳原子为R构型。在一些实施方案中，所述化合物进一步定义为：

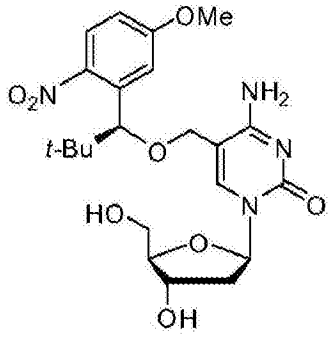
[0080]

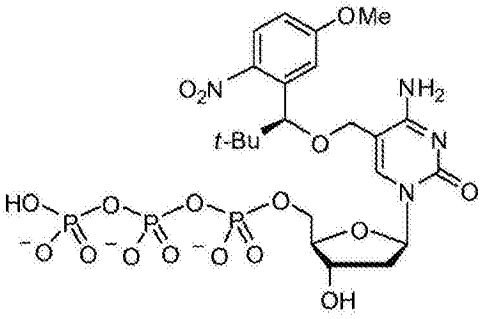





[0081] 

、

、

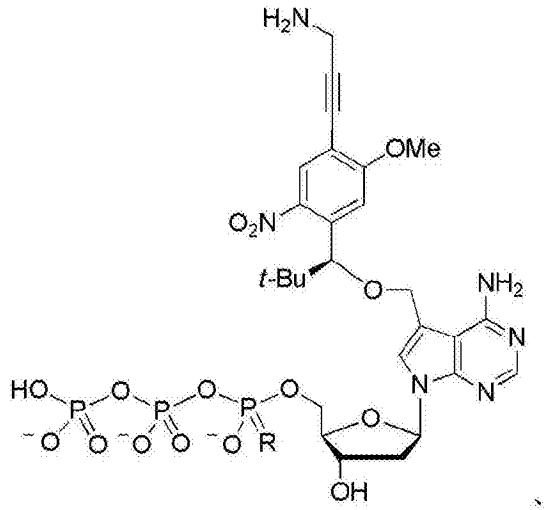


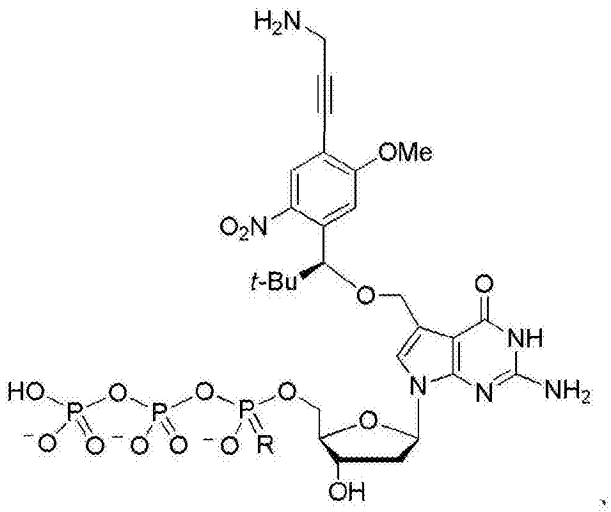
、或

，

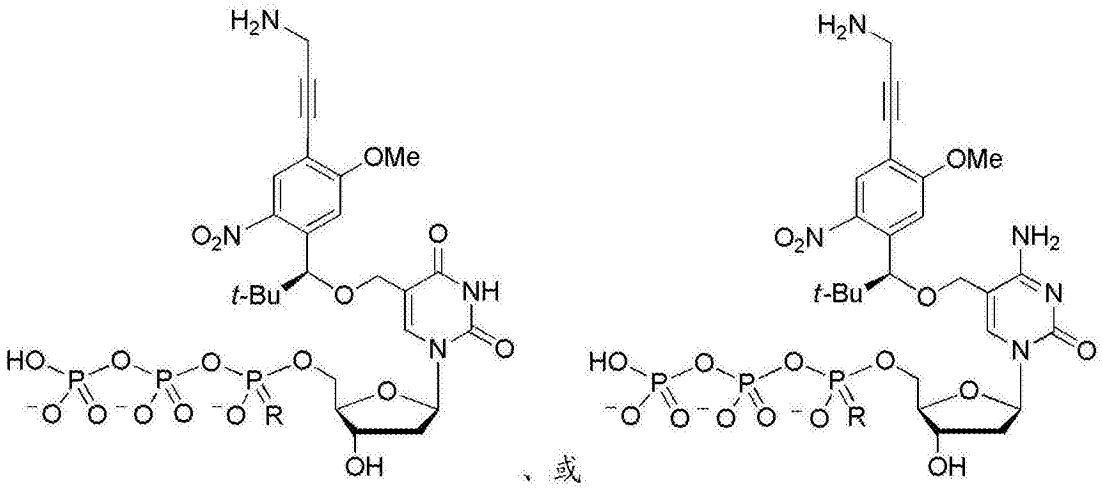
[0082] 或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

[0083] 在一些实施方案中，所述化合物进一步定义为：

[0084] 

、

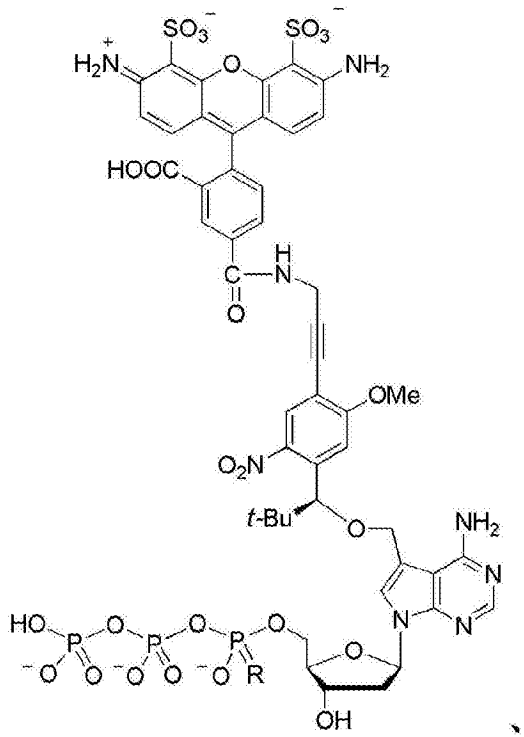
、

[0085] 

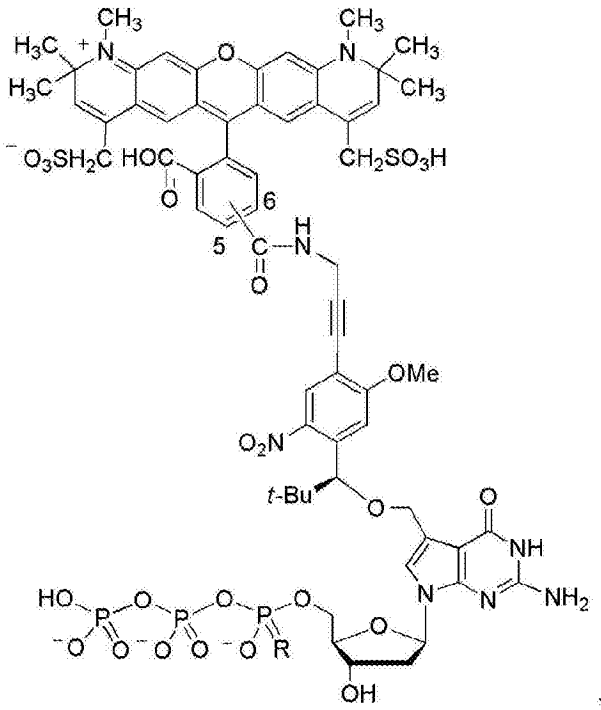
[0086] 其中R为＝O或＝S,或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

[0087] 在一些实施方案中,所述化合物进一步为:

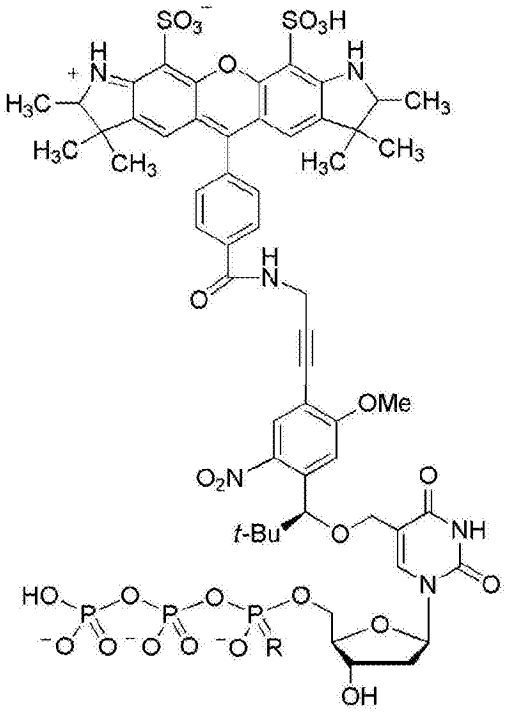
[0088]



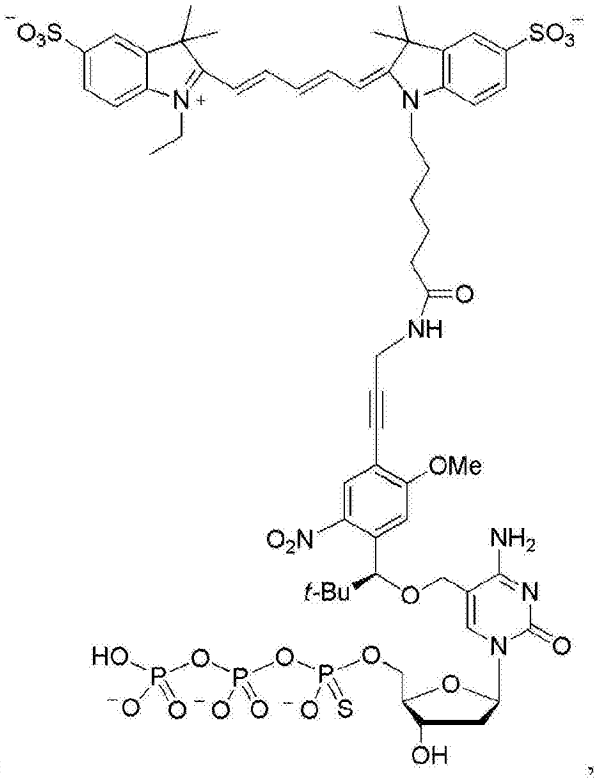
、



、



、

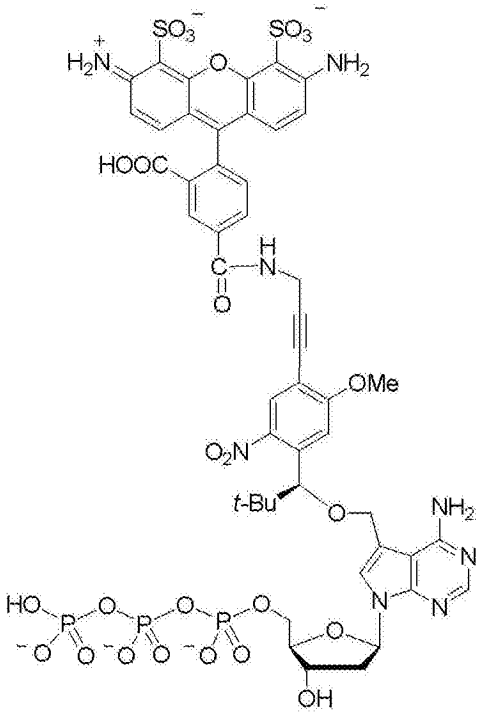


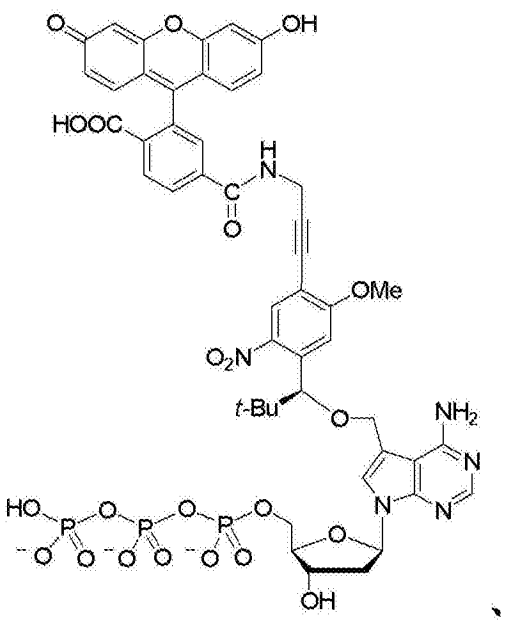
、或

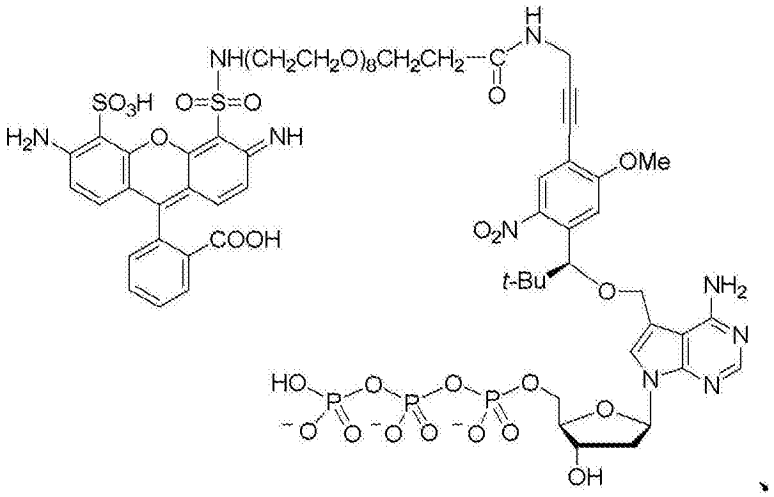
[0089] 其中R为=O或=S,或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

[0090] 在一些实施方案中,所述化合物进一步定义为:

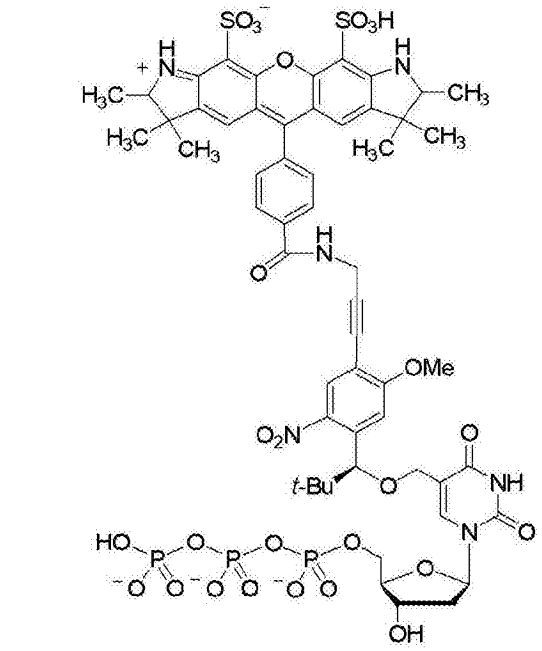
[0091]

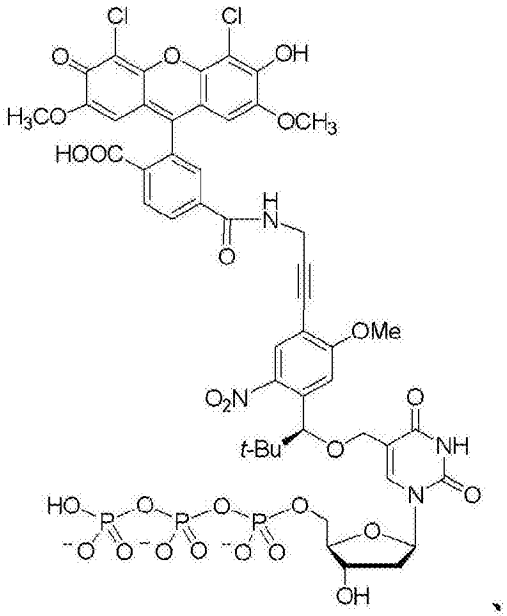


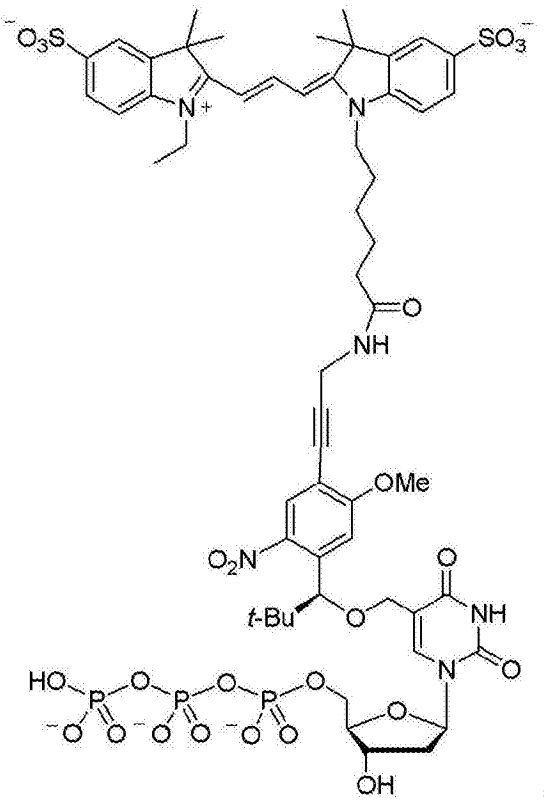


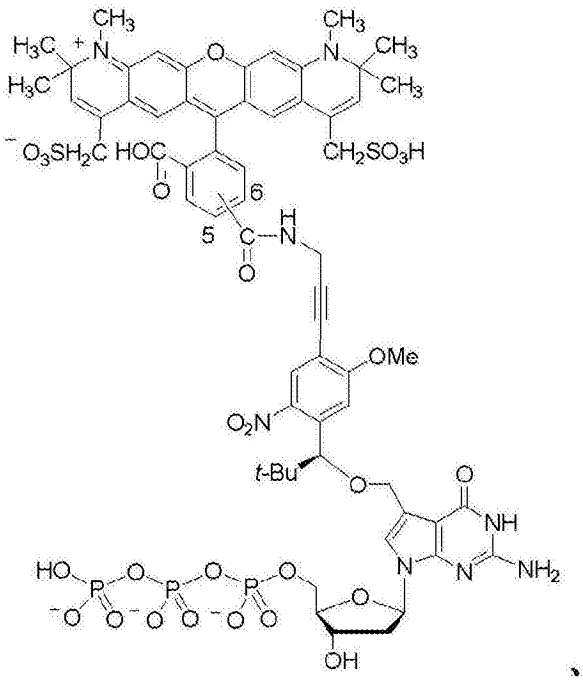


[0092]

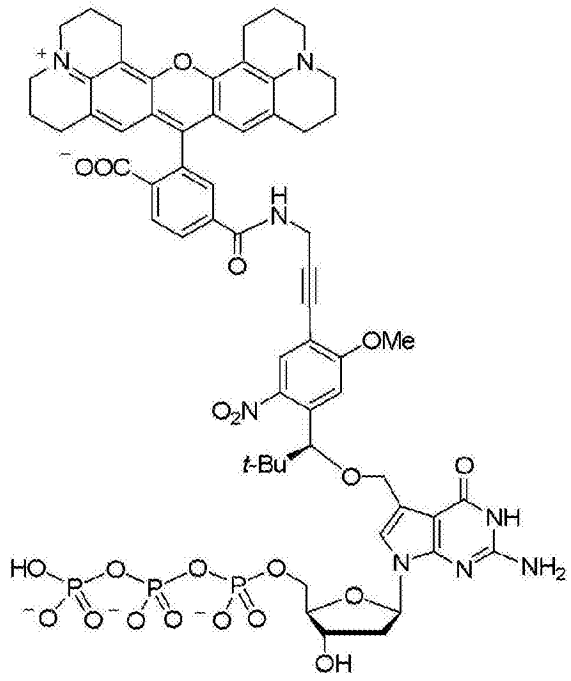




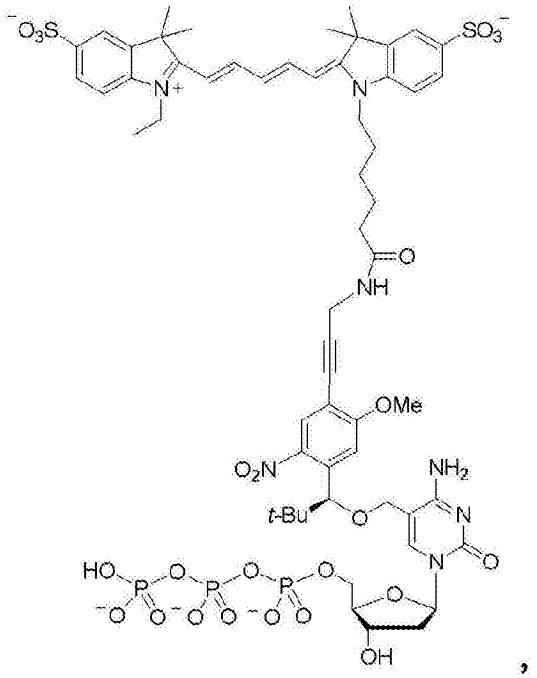




[0093]



、或



，

[0094] 或者这些式中任何化合物的盐和/或质子化形式。

[0095] 在另一方面中，本发明提供了一种对靶核酸进行测序的方法，其包括如下步骤：

[0096] (i)使引物的5’端附着于固体表面；

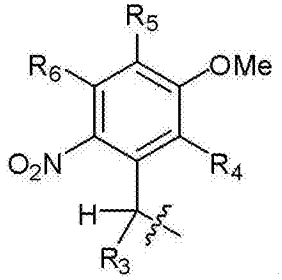
[0097] (ii)使靶核酸与附着于所述固体表面的所述引物杂交以形成引物/靶核酸杂交复合物；

[0098] (iii)得到聚合酶和本文所述的一种或更多种化合物，前提是不同的式I至VII化合物具有不同的荧光团；

[0099] (iv)使所述引物/靶核酸杂交复合物与步骤(iii)的聚合酶和一种或更多种化合物反应，以通过聚合酶反应形成增长中的引物链；

[0100] (v)通过对所述增长中的引物链成像，以通过其荧光团鉴定步骤(iv)所掺入的所述化合物；

[0101] (vi)将具有所述增长中的引物链的所述固体表面暴露于光源以除去下式中的光可切割终止部分：

[0102] 

，

[0103] 其可变基团如步骤(iii)中引用的本文内容所定义，从而产生具有天然组分的延伸引物；以及

[0104] (vii)重复步骤(iv)至(vi)一次或更多次，以鉴定所述靶核酸中的多个碱基，其中前一个循环的步骤(vi)中的所述延伸引物代替下一循环的步骤(iv)中的所述引物/靶核酸

杂交复合物进行反应。

[0105] 在一些实施方案中，所述步骤(vi)在叠氮化钠的存在下进行。在一些实施方案中，所述叠氮化钠的浓度为0.1mM至10mM，例如约1mM。在一些实施方案中，所述步骤(vi)在醋酸钠的存在下进行。在一些实施方案中，所述醋酸钠的浓度为0.1mM至10mM，例如，约1mM。

[0106] 在一些实施方案中，所述步骤(v)或(vi)在硫脲的存在下进行。在一些实施方案中，所述硫脲的浓度为10mM至500mM，例如，约为100mM。

[0107] 在一些实施方案中，所述步骤(vi)在二硫苏糖醇(DTT)的存在下进行。

[0108] 在另一方面中，提供了一种对靶核酸进行测序的方法，其包括如下步骤：

[0109] (i)使核酸的5'-端附着于固体表面；

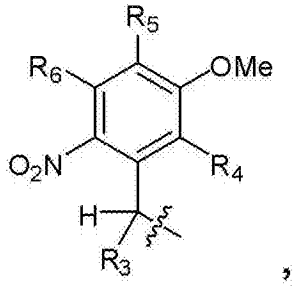
[0110] (ii)使引物与附着于所述固体表面的所述核酸杂交以形成引物/靶核酸杂交复合物；

[0111] (iii)得到聚合酶和本文所述的一种或更多种化合物，前提是不同的式I至VII化合物具有不同的荧光团；

[0112] (iv)使所述引物/靶核酸杂交复合物与步骤(iii)所述聚合酶和一种或更多种化合物反应，以通过聚合酶反应形成增长中的引物链；

[0113] (v)通过对所述增长中的引物链成像，以通过其荧光团鉴定步骤(iv)所掺入的所述化合物；

[0114] (vi)将具有所述增长中的引物链的所述固体表面暴露于光源以除去下式的光可切割终止部分：

[0115] 

，

[0116] 其上可变基团如本文所限定，从而产生具有天然组分的延伸引物；

[0117] (vii)重复步骤(iv)至(vi)一次或更多次，以鉴定所述靶核酸中的多个碱基，其中前一个循环的步骤(vi)中的所述延伸引物代替下一个循环的步骤(iv)中的所述引物/靶核酸杂交复合物进行反应。

[0118] 在一些实施方案中，步骤(vi)在叠氮化钠的存在下进行。在一些实施方案中，步骤(vi)在二硫苏糖醇(DTT)的存在下进行。

[0119] 在一些实施方案中，根据所述步骤(iv)掺入至少一种化合物以其天然核苷酸对应物掺入效率的约70％至约100％发生。在一些实施方案中，掺入效率达到约85％至约100％。

[0120] 在一些实施方案中，所述聚合酶选自逆转录酶、末端转移酶和DNA聚合酶。在一些实施方案中，约85％至约100％的光可切割终止部分通过在步骤(vi)中暴露于光源而被去除。在一些实施方案中，根据步骤(iv)掺入至少一种化合物后，链增长终止的效率为约90％至约100％。

[0121] 在一些实施方案中，在步骤(v)中使用脉冲多线激发检测器进行成像。

[0122] 在一些实施方案中，所述方法还包括在步骤(iv)或步骤(vi)之后清洗增长的引物

链。

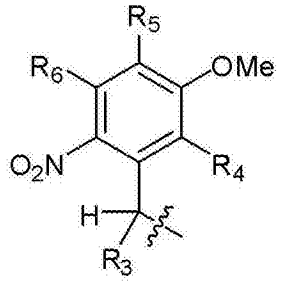
[0123] 在一些实施方案中，所述方法还包括在步骤(iv)之前对任何没有在步骤(iv)中反应的引物链或增长的引物链加帽。

[0124] 在一些实施方案中，所述方法还包括同步对多个靶核酸进行测序。

[0125] 本发明的另一方面，提供了将核酸分子中的非天然组分转变为天然组分的方法：

[0126] (i)掺入本文所述的化合物；

[0127] (ii)将所产生的核酸暴露于光源以从核酸上除去下式的光可切割终止部分：

[0128] 

，

[0129] 其上可变基团如本文所限定。

[0130] 在一些实施方案中，所述方法还包括同步将多个核酸分子中的非天然组分转变为天然组分。在一些实施方案中，所述方法还包括同步终止多个核酸合成。

[0131] 在另一方面中，本发明提供了终止核酸合成的方法，其包括将上文所述的3'-OH未阻断的核苷酸或核苷放置在聚合酶的环境中，使所述3'-OH未阻断的核苷酸或核苷掺入核酸分子的步骤。在一些实施方案中，掺入所述3'-OH未阻断的核苷酸或核苷后，终止DNA合成的效率为约90％至约100％。在一些实施方案中，与掺入同所述3'-OH未阻断的核苷酸或核苷具有同样碱基的天然核苷酸或核苷的效率相比，掺入所述3'-OH未阻断的核苷酸或核苷的效率为约70％至约100％。

[0132] 在另一方面中，本发明提供了进行Sanger测序或Sanger型测序的方法，其包括使用本文所述的化合物作为终止核酸类似物。

[0133] 在另一方面中，提供了测定靶核酸序列的方法，其包括：

[0134] (i)将靶核酸加入Sanger测序或Sanger型测序仪中；

[0135] (ii)将本文所述的一种或更多种化合物加入所述测序仪中，前提是当存在多于一种碱基类型时，每种碱基与不同的荧光团相连接；

[0136] (iii)加入互补的引物和聚合酶；

[0137] (iv)进行聚合酶反应以将至少一种步骤(ii)所述的化合物掺入增长中的核酸链，以及

[0138] (v)利用荧光测序仪器或通过脉冲多线激发荧光分析Sanger测序反应的结果，

[0139] 其中步骤(i)至(iii)可以任意顺序进行。

[0140] 在一些实施方案中，根据步骤(iv)掺入至少一种化合物后，以约90％至约100％的效率终止链增长。在一些实施方案中，在聚合酶反应中，根据步骤(iv)掺入至少一种化合物的效率为掺入含有相同碱基的天然底物之效率的约70％至约100％。在一些实施方案中，掺入效率为约85％至约100％。在一些实施方案中，聚合酶选自逆转录酶、末端转移酶和DNA聚合酶。

[0141] 在另一方面中，本发明提供了将非天然组分掺入核酸的方法，其包括：

[0142] (i)将靶核酸加入测序仪中；

[0143] (ii)将根据权利要求1的一种或更多种化合物加入所述测序仪中，前提是当存在多于一种碱基类型时，每种碱基与不同的荧光团相连接；

[0144] (iii)加入聚合酶；以及

[0145] (iv)进行聚合酶反应以将至少一种步骤(ii)所述的化合物掺入增长中的核酸链，

[0146] 其中步骤(i)至(iii)可以任意顺序进行。

[0147] 在一些实施方案中，所述方法进一步由以下组成

[0148] (v)分析掺入至少一种来自步骤(ii)的化合物之聚合酶链式反应的结果。

[0149] 在一些实施方案中，根据步骤(iv)掺入至少一种化合物后，以约90％至约100％的效率终止链增长。在一些实施方案中，在聚合酶反应中，根据步骤(iv)掺入至少一种化合物的效率为掺入含有相同碱基的天然底物之效率的约70％至约100％。

[0150] 在另一方面中，本发明提供了进行微测序或微测序型测序的方法，其包括将本文所述的化合物加入微测序或微测序型测序方法。

[0151] 在以上描述的任何一种方法的一些实施方案中，所述化合物进一步定义为式I、II、III、IV、V、VI或VII的化合物。

[0152] 在另一方面中，本发明提供了一种系统，其包含：

[0153] 含有多个珠的流通池，其中：

[0154] 每个珠与DNA分子相连接，其中已使用聚合酶将本文

[0155] 所述的化合物掺入；并且

[0156] 所述流通池至少部分对可见光和紫外光透明；

[0157] 成像装置，其配置成采集所述流通池的图像；

[0158] 滤光器转盘(filter wheel)，其包含至少四个光谱滤光器，其中所述滤光器转盘配置成在每个滤光器之间循环；

[0159] 灯，其配置成产生从所述流通池通过所述滤光器转盘中的滤光器至所述成像装置的光路；和

[0160] 紫外光源，其配置成向所述流通池上的所述DNA分子提供紫外光。

[0161] 在一些实施方案中，所述流通池为微流体流通池。在一些实施方案中，所述系统还包含滤光器转盘与流通池之间的物镜。在一些实施方案中，所述系统还包含配置成将光路导引至成像装置的反光镜。

[0162] 在另一方面中，本公开内容提供了快速、高通量、精确且灵敏的癌症诊断，用于早期检测来鉴定属于正在形成癌变的有限亚群细胞的稀有序列变种。

[0163] 本公开内容的其他目标、特征和优点将从下列详细描述中变得显而易见。然而，应该理解，详细描述和具体实施例尽管表明了本发明的具体实施方案，但仅用于举例说明目的，因为从该详细说明中，本发明精神和范畴内的多种变化和修饰对于本领域技术人员而言会变得显而易见。需要注意的是，将某个具体化合物归为某一特定通式并不意味着它不能同时属于另一通式。

附图说明

[0164] 以下附图构成本说明书的一部分，并被纳入以进一步阐明本公开内容的某些方

面。通过参考这些附图之一并结合对本文给出的具体实施方案的详细描述，可以更好地理解本发明。

[0165] 图1-2-硝基苄基烷基化的HOMedNTP类似物的结构："R"为氢，异丙基，或叔丁基。"R′"为氢，4-甲氧基，5-甲氧基，4,5-二甲氧基，或6-硝基。见具体实施例中的注释。"*"代表该碳原子处的两种不同的立体化学构型。式中虚线椭圆内的部分突出了暴露于紫外光时被切割的终止官能团。

[0166] 图2-用DTT消除过渡产物(Transient Product，TP)。在(A)1mM NaN_3和(B)1mM NaN_3，50mM DTT的存在下通过Therminator聚合酶掺入dU.VI后，对其进行光化学切割的时间序列的荧光凝胶图像。泳道："P"(引物)在1x ThermoPol缓冲液中含有与oligoTemplate-4结合的Therminator，所述oligoTemplate-4与BODIPY-FL标记的引物-1杂交(见Wu等，2007；Litosh等，2011)。"I"(掺入)含有泳道"P"中的物质加100nM dU.VI，并且时间点泳道含有泳道"I"中的物质加暴露于0.70W/cm^2之365nm光的所列时间的样品。"IP"表示掺入的产物，"CP"表示切割的产物。

[0167] 图3-(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯(camphanate)的X-射线晶体结构：晶体衍射测量在尺寸为0.50mm x0.05mm x0.05mm的(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯晶体上进行，如Litosh等(2011)所述，其通过引用并入本文)。数据收集：CuKα照射，$\lambda = 1.54178$ Å，T＝110±2°K，$2\theta_{max}$＝120.0°，收集了32,513个反射，2,913个独立反射(R_{int}＝0.0517)。最终GooF＝1.091，R1＝0.0681，wR2＝0.1695，R指数基于2,913个I>2σ(I)的反射(用F^2校正)，290个参数，43限制。应用了Lp和吸收校正，μ＝0.819mm^{-1}。绝对结构参数＝0.05±0.09。X射线晶体学数据：$C_{22}H_{29}NO_7$，M＝419.46，正交晶系，a＝6.29，b＝15.00，$c = 22.27$ Å(α，β，γ＝90°)，$V = 2.099.29$ $Å^3$，空间群$P2_12_12_1$，z＝4，D_c＝1.327g/cm^3，F(000)＝896。

[0168] 图4-DTT消除亚硝基中间体(TP)。通过Therminator™聚合酶掺入之dU.VI的UV光化学切割实验的荧光凝胶图像。泳道："P"(引物)在1x ThermoPol缓冲液中含有与oligoTemplate-4结合的Therminator™，所述oligoTemplate-4与BODIPY-FL标记的引物-1杂交。"I"(掺入)含有泳道"P"中的产物加100nM dU.VI。添加了试剂A至G，最终浓度如图所示，并将样品暴露于0.70W/cm^2之365nm光10秒。"IP"表示掺入的产物，"CP"表示切割的产物，并且"TP"表示过渡产物。

[0169] 图5A和B-用于UV光化学切割测量的光学设置。图5A示出原理图，其包含改进的切去一半的0.5mL微量离心管(Eppendorf tube)、PM100功率计、1000μm的针孔盒(pinhole cassette)，其使用3轴手动位移台调节电弧光束(arc beam)。图5B示出样品支架和改进的0.5mL微量离心管，其具有内部对位卡以将电弧光束调节至10μL或20μL反应样品的中心。

[0170] 图6-光化学切割反应的实例。在UV诱导的光化学切割过程中，2-硝基苯基衍生物终止基团被释放，产生天然的羟甲基核苷酸。在苄基碳处连接之立体特异性(S)-叔丁基和在2硝基苄基环上修饰的5-OMe基团的组合显著地增加了光化学切割反应的速率。对于C^7-HOMedG的情况，同对应的母体类似物相比，速率的增加超过一个数量级。

[0171] 图7-α碳处的叔丁基取代和5位的甲氧基取代与提高的光化学切割速率相关。该图比较了母体、用(S)-α-叔丁基和(S)-α-叔丁基-5-OMe对2-硝基苄基烷基化之母体对C^7-

HOMedA、HOMedC、C^7-HOMedG和HOMedU核苷的光化学切割速率。DT_{50}值越低表明光化学切割速率越快。

[0172] 图8.用于对流通池上荧光珠成像之系统的原理图

[0173] 图9-珠的制备和固定方法实例。例示了在流通池上示例性制备珠样品的步骤。

[0174] 图10.在CRT循环中核苷酸掺入、荧光成像和光化学切割的展示图。

[0175] 图11.例示了来自三个CRT循环的平铺成像(tile image)及随后从各个珠上的碱基指认。

[0176] 图12-与通用染料(“Fluor”)相连接的3’-OH可逆终止剂的化学式。式中被虚线椭圆包围的部分表示染料标记的终止官能团,其在暴露于紫外光时被切割。

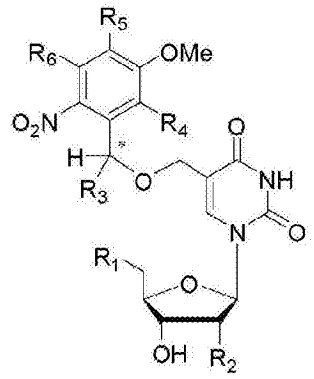
[0177] 图13-随机切口测序(Random Nick Sequencing,RNS)方法图。图中的闪电终止剂(Lightning Terminators™)由本发明中的可逆终止剂组成。

[0178] 发明详述

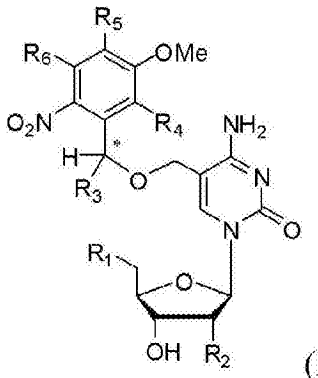
[0179] I.可逆终止剂及其合成方法

[0180] 在一方面中,本公开内容提供了可在许多不同的DNA测序应用中用于发挥可逆终止剂作用的新化合物。本公开内容提供的化合物也可被称为可逆终止剂、3’-OH未阻断可逆终止剂以及“闪电终止剂”(Lightning Terminators™)。在一些实施方案中,提供了下式的化合物:

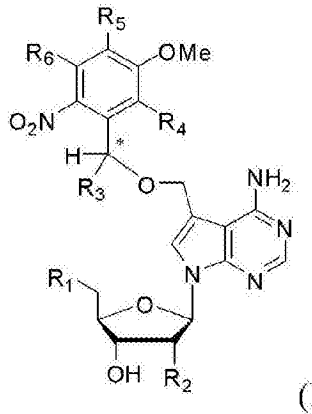
[0181]



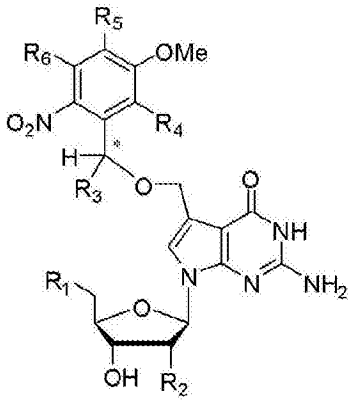
(I)、



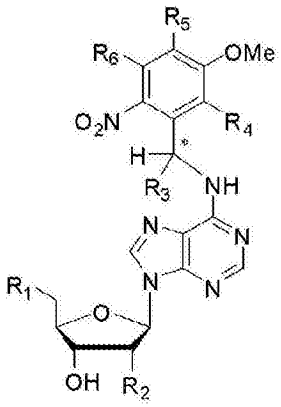
(II)、



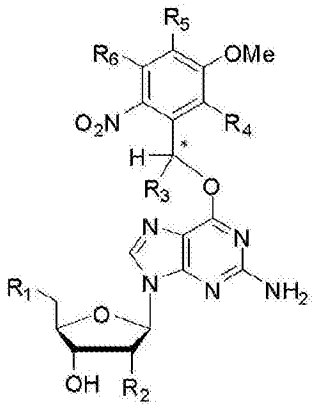
(III)、



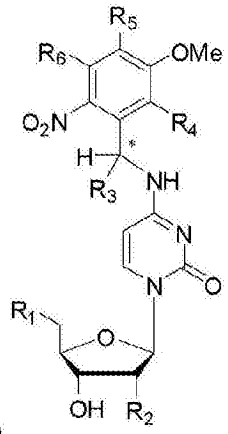
(IV)、



(V)、



(VI)、或



(VII)，

[0182] 其中：

[0183] R_1为羟基、一磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、α-硫代三磷酸酯基或多磷酸酯基；

[0184] R_2为氢或羟基；

[0185] R_3为烷基$_{(C\leq 8)}$或取代烷基$_{(C\leq 8)}$；

[0186] R_4为

[0187] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基、叠氮基或巯基；

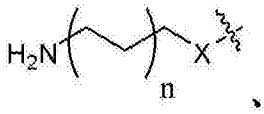
[0188] 烷基$_{(C\leq 6)}$、酰基$_{(C\leq 6)}$、烷氧基$_{(C\leq 6)}$、酰氧基$_{(C\leq 6)}$、烷基氨基$_{(C\leq 6)}$、二烷基氨基$_{(C\leq 6)}$、酰氨基$_{(C\leq 6)}$、或任何这些基团的取代形式；

[0189] R_5和R_6各自独立为：

[0190] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基、叠氮基或巯基；

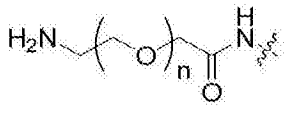
[0191] 烷基(C≤6)、烯基(C≤6)、炔基(C≤6)、芳基(C≤6)、芳烷基(C≤8)、杂芳基(C≤6)、酰基(C≤6)、烷氧基(C≤6)、酰氧基(C≤6)、烷基氨基(C≤6)、二烷基氨基(C≤6)、酰氨基(C≤6)、或任何这些基团的取代形式；

[0192] 下式的基团：

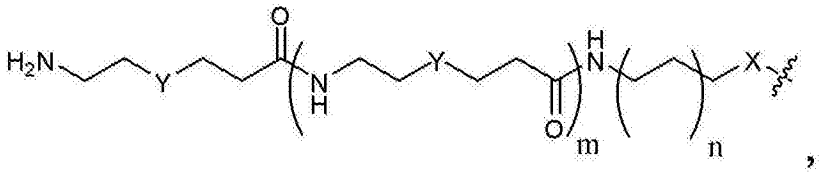


、

[0193]



、或



，

[0194] 其中

[0195] X为

[0196] -O-、-S-或-NH-；或

[0197] 亚烷基(C≤12)、亚烯基(C≤12)、亚炔基(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；

[0198] Y为-O-、-NH-、亚烷基(C≤12)或取代的亚烷基(C≤12)；

[0199] n为0至6的整数；并且

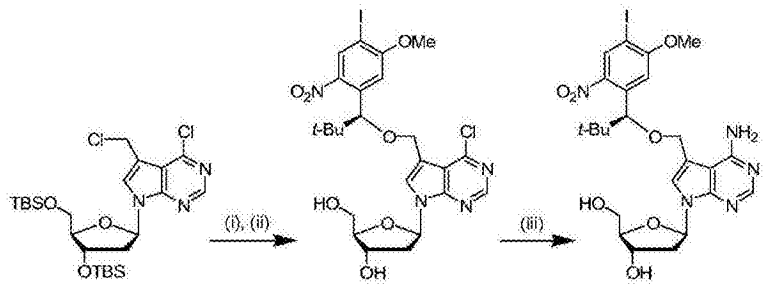
[0200] m为0至6的整数；或

[0201] -接头-报告基团；

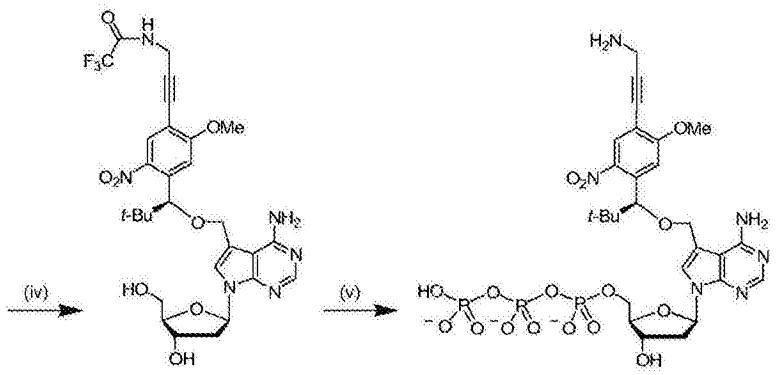
[0202] 或其盐，互变异构体，或光学异构体。

[0203] 染料标记的α-叔丁基-5-OMe-2-硝基苄基烷基化的羟甲基核苷酸可根据下面的方案和步骤合成。

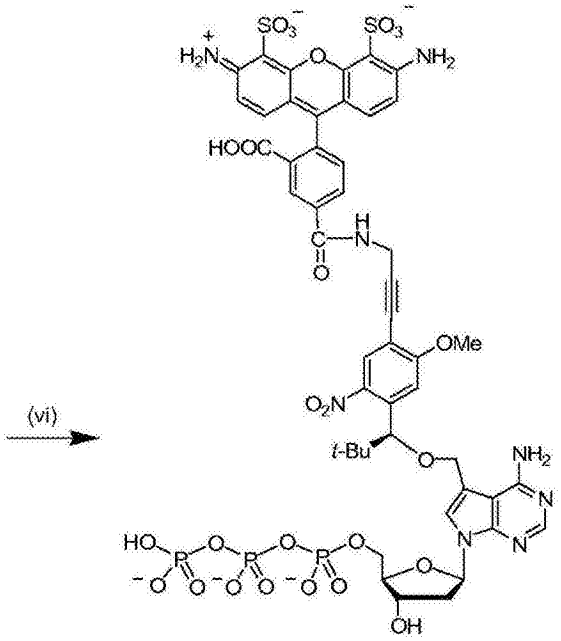
[0204] A.染料标记的7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的合成



[0205]

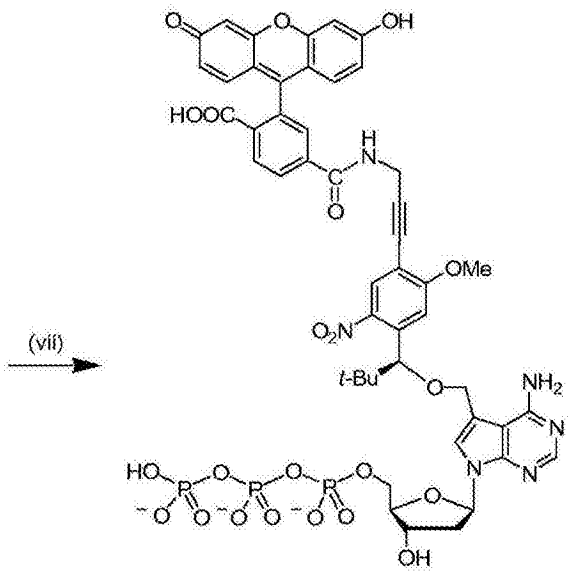


[0206] 方案2a.染料标记的7-[(S)-1-(5-甲氧基2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的合成.试剂和条件:(i)(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,110℃;(ii)n-Bu_4NF,THF,室温;(iii)NH_3,1,4-二氧六环/甲醇,100℃;(iv)N-炔丙基三氟乙酰胺,$Pd(PPh_3)_4(0)$,CuI,Et_3N,DMF;(v)$POCl_3$,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

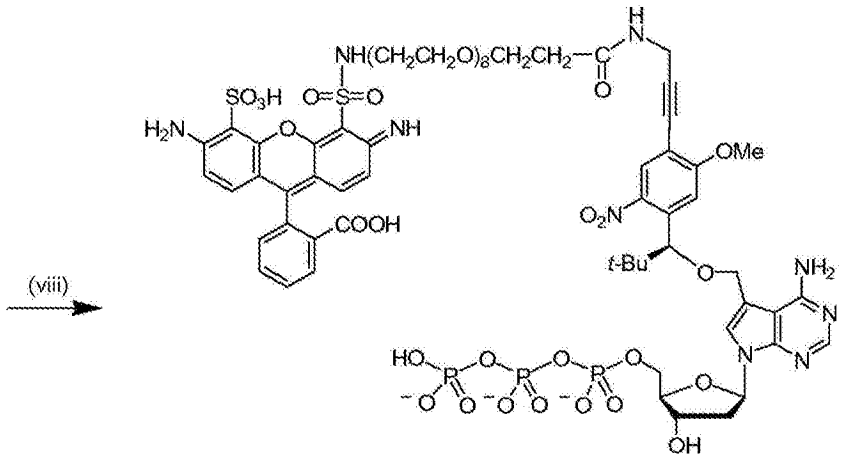


[0207]

[0208] 方案2b.(vi)Alexa Fluor488NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

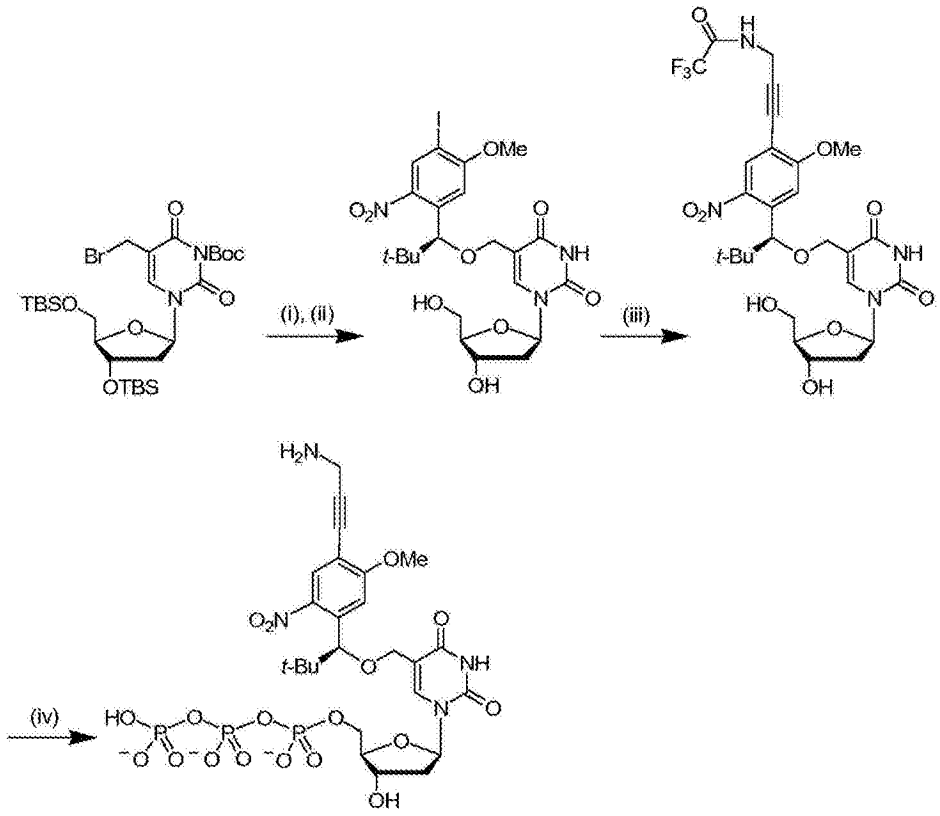
[0209] 

[0210] 方案2c.(vii)6-FAM NHS,0.1M Na_2CO_3/$NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

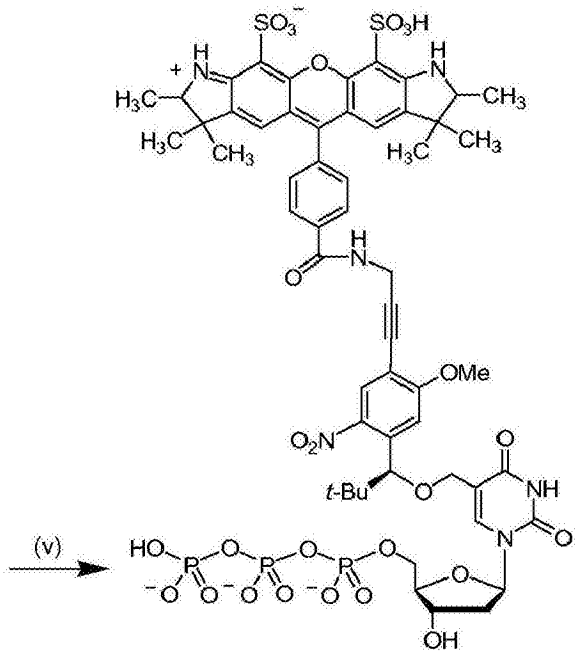
[0211] 

[0212] 方案2d.(viii)CF488A NHS,0.1M Na_2CO_3/$NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

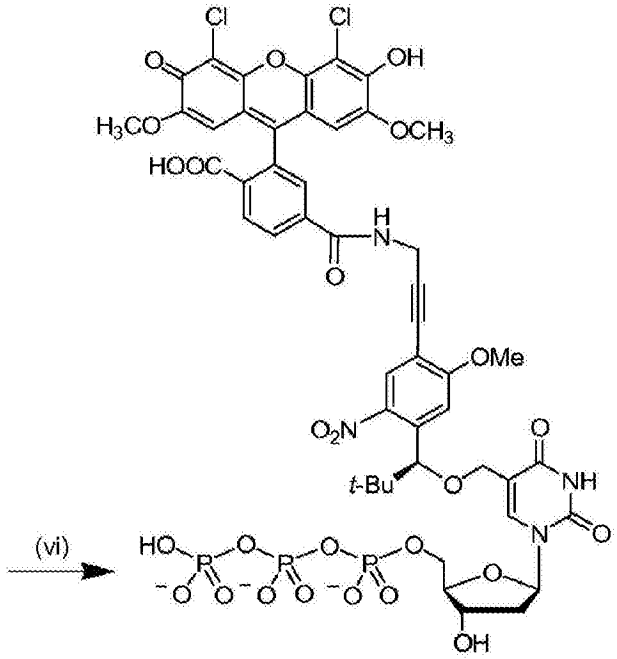
[0213] B.染料标记的5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯的合成

[0214] 

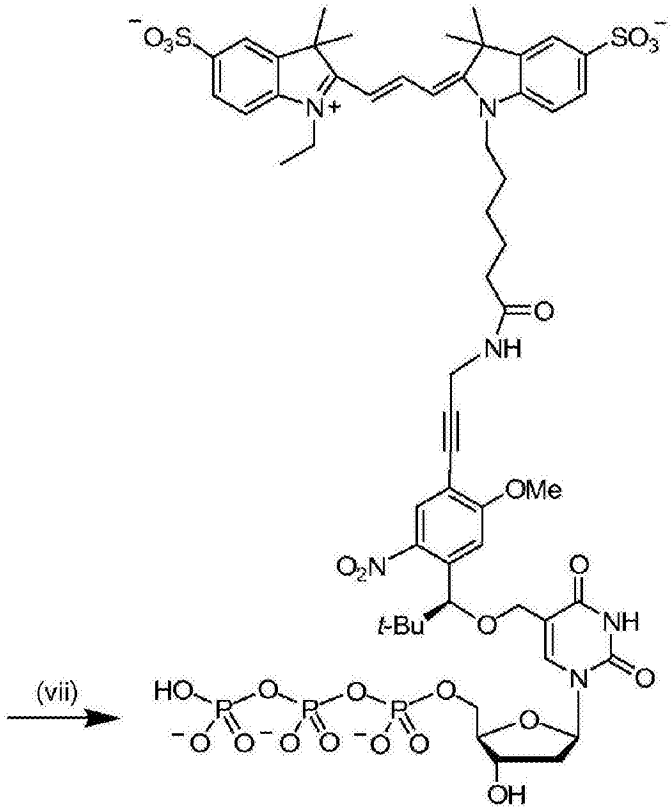
[0215] 方案3a.染料标记的5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,110℃;(ii)NH_4F,MeOH,50℃;(iii)N-炔丙基三氟乙酰胺,Pd$(PPh_3)_4$(0),CuI,Et_3N,DMF;(iv)$POCl_3$,质子海绵(proton sponge),$(MeO)_3PO$,0℃;(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0216] 

[0217] 方案3b.(v)Alexa Fluor532NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

[0218] 

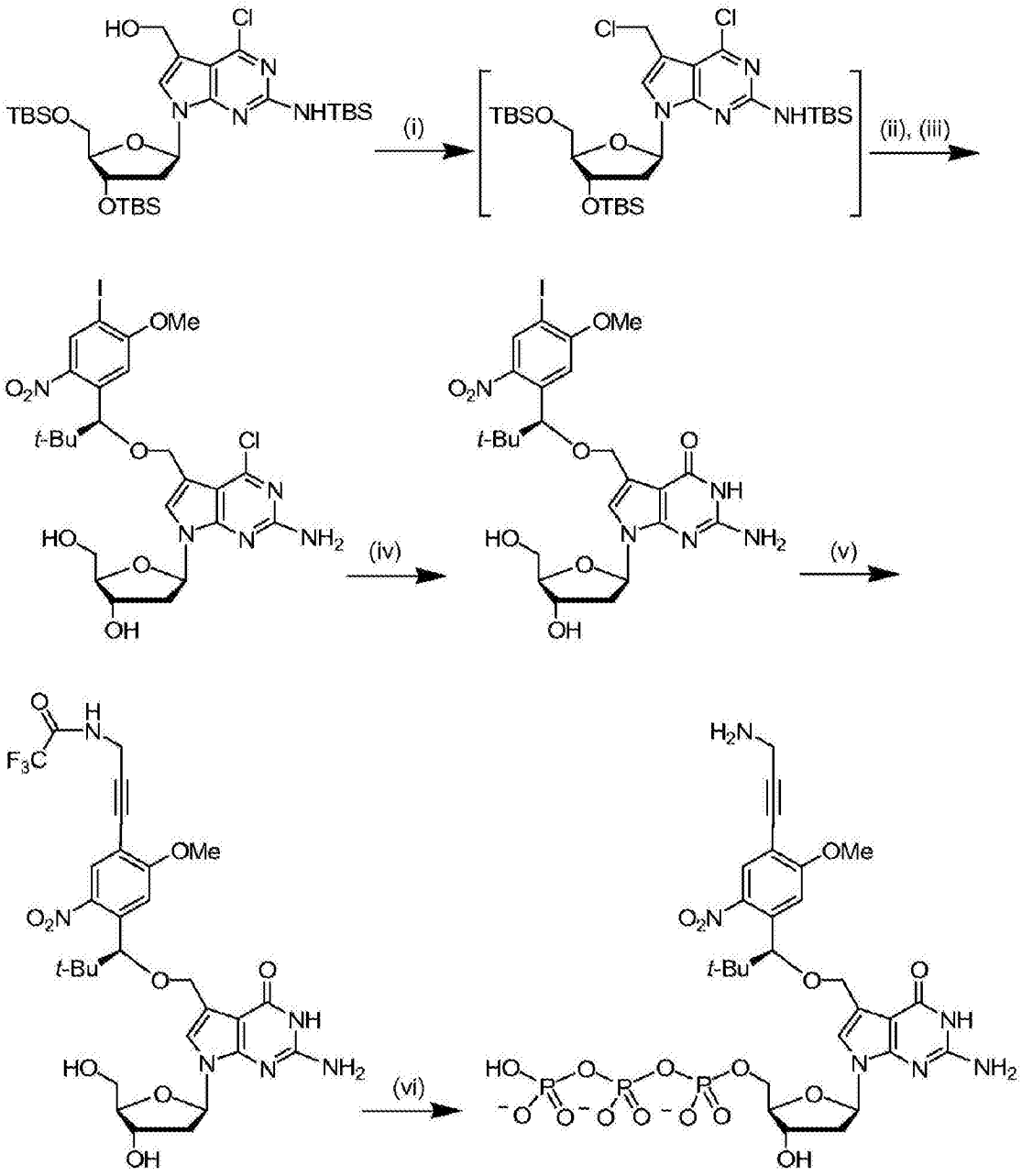
[0219] 方案3c.(v)6-JOE NHS,0.1M Na_2CO_3/$NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

[0220] 

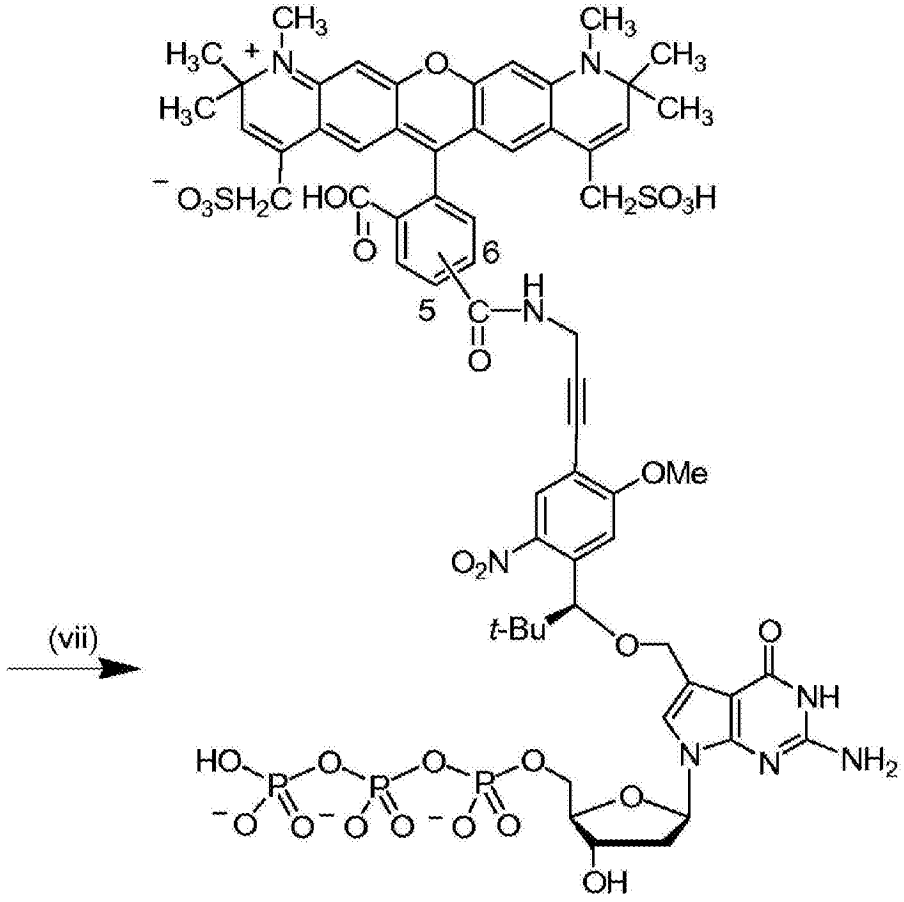
[0221] 方案3d.(v)Cy3NHS,0.1M Na_2CO_3/$NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

[0222] C.染料标记的7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成

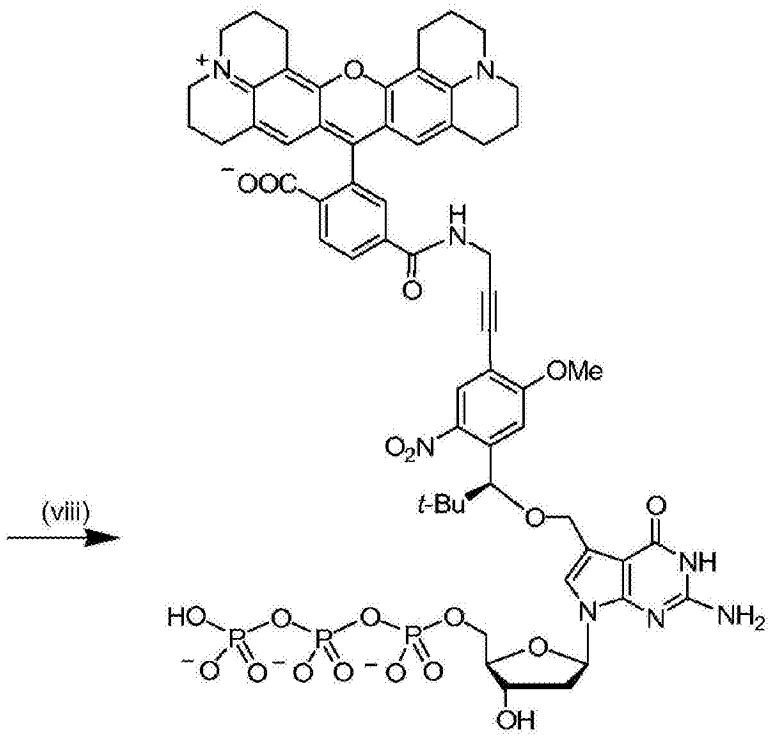
[0223]



[0224] 方案4a.染料标记的7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温;(iv)顺-吡啶-2-乙醛肟(syn-pyridine-2-aldoxime),1,1,3,3-四甲基胍,1,4-二氧六环/DMF,70℃;(v)N-炔丙基三氟乙酰胺,$Pd(PPh_3)_4$(0),CuI,Et_3N,DMF;(vi)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1MHNE$t_3HCO_3$。

[0225] 

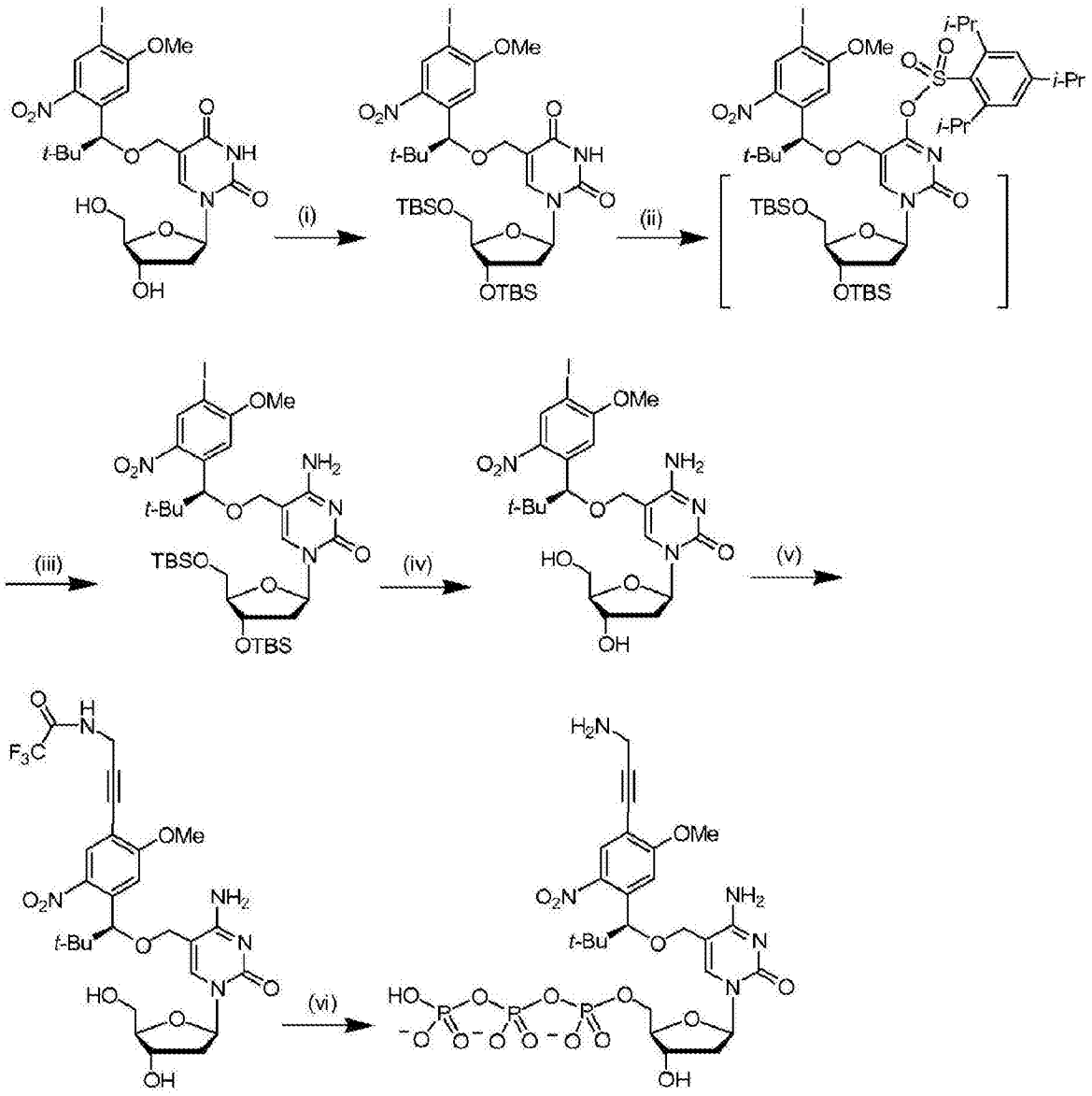
[0226] 方案4b.(vii)Alexa Fluor594NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

[0227] 

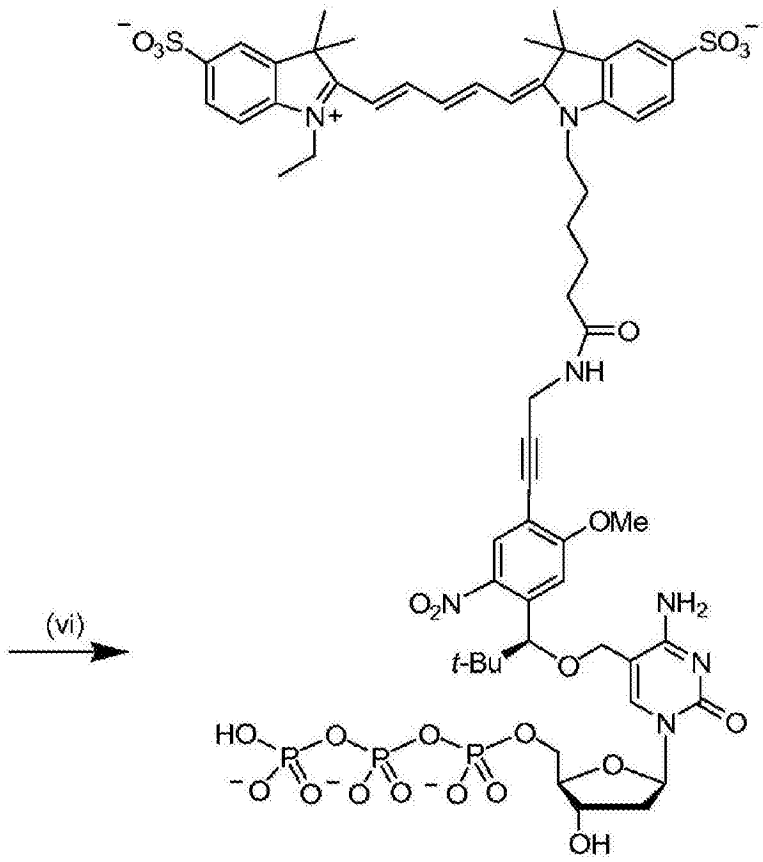
[0228] 方案4c.(vii)6-ROX NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

[0229] D.染料标记的5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯的合成

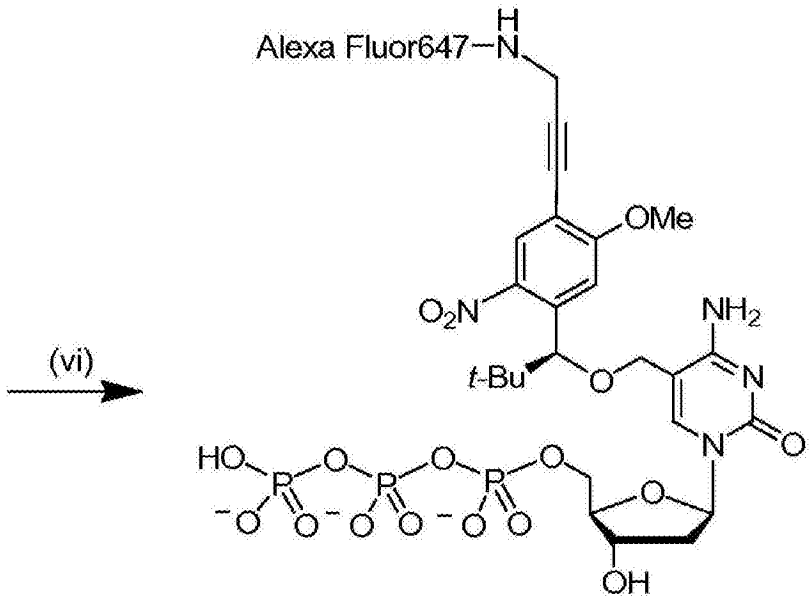
[0230]



[0231] 方案5a.染料标记的5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)TBSCl,咪唑,DMF,室温;(ii)2,4,6-三异丙基苯磺酰氯,DMAP,Et_3N,CH_2Cl_2,室温;(iii)NH_3,1,4-二氧六环,90℃;(iv)n-Bu_4NF,THF,室温,82%;(v)N-炔丙基三氟乙酰胺,Pd$(PPh_3)_4$(0),CuI,Et_3N,DMF;(vi)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1MHNE$t_3HCO_3$。

[0232] 

[0233] 方案5b.(vi)Cy5NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

[0234] 

[0235] 方案5c.(vi)Alexa Fluor647NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)。

[0236] 在一些实施方案中,观察到α-碳上烷基取代的立体化学能够提高2-硝基苄基的光化学切割性能。在一些实施方案中,观察到α-碳上的立体特异性基团与连接至2-硝基苄基环的另一个化学基团的组合导致光化学切割速度加快。参见例如图7。

[0237] 可使用上文所述和下文实施例部分的方法制得本公开内容的化合物。例如,实施例8提供了α-叔丁基-5-甲氧基-2-硝基苄醇(包括其光学纯形式)之合成的总结。这些方法可由本领域技术人员应用有机化学的原理和技术进一步改进和优化。此类原理和技术在例

如March's Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms,and Structure(2007)一书中有教导,其通过引用并入本文。

[0238] 本发明方法中采用的化合物可含有一个或更多个不对称取代的碳原子或氮原子,并可被分离为光学活性体或外消旋体。因此,除非具体指明特定的立体化学或异构形式,一个结构的所有手性异构体、非对映异构体、外消旋体、差向异构体以及所有几何异构体都包含在内。化合物可以外消旋体、消旋混合物、单个对映异构体、非对映异构体混合物以及个别非对映异构体存在。在一些实施方案中,得到单个的非对映异构体。本发明化合物的手性中心可具有S或R构型。例如,在本公开内容的一些方面中,修饰的5-羟甲基嘧啶或7-羟甲基-7-脱氮嘌呤碱基的苄醚上α-碳的取代及其立体化学影响3′-OH未阻断、碱基修饰的dNTP的生物性能和切割反应素速度。

[0239] 本发明化合物可能的优势还在于他们可能与现有技术已知的化合物相比更有效、毒性更小、作用时间更长、更高效、产生更少的副作用、更容易被吸收、和/或有更好的药代动力学特征(即,更高的口服生物利用度和/或更低的清除率),和/或有其他有用的药理、物理、或化学性质,不管是被应用在这里所述的用途或其他的用途。

[0240] 用于表示本发明化合物的化学式通常会仅显示可能的几种不同互变异构体之一。例如,已知许多类型的酮基与相应的烯醇基团平衡存在。同样地,许多类型的亚胺基团与烯胺基团平衡存在。对于给定化合物来说,不管画出哪一种互变异构体,而且不管哪一种最普遍,给定化学式代表其所有的互变异构体。

[0241] 此外,组成本发明化合物的原子旨在包括该原子的所有同位素形式。本文使用的同位素包括原子数相同但质量数不同的那些原子。例如但不限于,氢的同位素包括氚和氘,碳的同位素包括^{13}C和^{14}C。同样地,预期本发明化合物中一个或更多个碳原子可替换成硅原子。此外,预期本发明化合物中一个或更多个氧原子可替换成硫或硒原子。

[0242] 在一些实施方案中,本文提供的所述3′-OH未阻断可逆终止剂具有α-硫代磷酸酯基团,优选α-硫代三磷酸酯基团。参见,例如,下文实施例8中的化合物54b、55b、59b、60b、63b、64b、68b和69b。本领域熟知,DNA聚合酶表现出3'-5'核酸外切酶活性。3'-5'核酸外切酶活性的功能是从引物链中除去刚刚掺入的核苷酸。许多市场上可买到的DNA聚合酶删除了或突变了3'-5'核酸外切酶结构域,以将这种活性降低至检测不到的水平。尽管这样,一些DNA聚合酶的即便是低水平的核酸外切酶活性也会由于主要信号的相移导致测序数据质量差。在一些实施方案中,具有α-硫代三磷酸酯基团的3′-OH未阻断可逆终止剂可被用于降低、尽可能减少和/或消除残留的3'-5'核酸外切酶活性。不受理论的约束,本领域熟知α-硫代三磷酸酯基团耐受核酸外切酶活性。参见,例如,Rosenthal和Brenner的欧洲专利EP0640146,其通过引用并入本文。

[0243] 本发明的化合物也可以前药形式存在。由于已知前药提高药物的许多期望性质(例如,溶解度、生物利用度、生产等),在本发明的一些方法中采用的化合物可以,在需要的情况下,以前药的形式递送。因此,本发明包括本发明化合物的前药以及递送前药的方法。本发明采用的化合物的前药可通过以如下方式修饰存在于所述化合物中的官能团来制备:当修饰的部分通过常规操作或者在体内被切割后,产生所述母体化合物。因此,前药包括,例如,其中羟基、氨基或羧基与当将此前药施用至个体时分别切割形成羟基、氨基或羧酸之任何基团相连接的本文所述化合物。

[0244] 本公开内容还提供了可用于快速DNA测序技术的核苷酸和核苷化合物以及其盐、酯和磷酸酯。然而，应当承认，构成本发明中任何盐之一部分的特定阴离子或阳离子并不重要，只要所述盐作为整体在药理上是可接受的。药物可接受的盐的其他实例及其制备方法和用途陈述在Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,and Use(2002)中，其通过引用并入本文。所述化合物任选地为核糖核苷三磷酸酯(NTP)和脱氧核糖核苷三磷酸酯(dNTP)的形式。所述核苷酸和核苷化合物在一些情形下包括用报告基团(如荧光染料)标记的可化学或酶切割的基团。所述核苷酸和核苷化合物包括设计成迅速终止DNA合成及切割的可化学或酶切除的保护基，以使这些单体可用于并行处理的快速测序。此类用荧光染料标记的可快速切割基团在核苷酸和核苷化合物中的存在能够增强并行的DNA大寡聚物的测序速度和准确性，以允许例如快速全基因组测序以及鉴定多态性和其他有价值的遗传信息。

[0245] 这些3'-OH未阻断终止剂可被许多市售DNA聚合酶良好地耐受，这代表了其优于3'-O-封闭终止剂的关键优点。本文公开的化合物的苄基也可以被衍生化以包括选定的荧光染料或其他报告基团。

[0246] II.可逆终止剂的性能

[0247] 如其上所述，在一个方面中，提供了具有快速光化学切割性能的烷基化的2-硝基苄基核苷酸，其可作为改进的可逆终止剂应用于循环可逆终止(CRT)测序应用。所述应用由Mezker(2005,2010)描述过，其通过引用并入本文。在一些实施方案中，提供了经一系列取代的2-硝基苄基修饰的7-脱氮-7-羟甲基-2′-脱氧腺苷(C^7-HOMedA)(Rockhill等,1997)和7-脱氮-7-羟甲基-2′-脱氧鸟苷(C^7-HOMedG)(McDougall等,2001)以及HOMedC和HOMedU。参见图1。在一些实施方案中，本文公开的可逆终止剂表现出许多合适的性能，包括核苷酸掺入的快速动力学、单碱基终止、高核苷酸选择性、和/或终止基团的快速切割。

[0248] 鉴定了将C^7-HOMedA类似物分离成单个非对映异构体核苷酸的色谱条件，将首先洗脱的异构体以ds1表示，第二个以ds2表示。为了评价2-硝基苄基环上修饰有4-甲氧基(4-OMe)和6-硝基(6-NO_2)的α-异丙基取代之立体化学对光切割的影响，合成了三个C^7-HOMedA类似物dA.III.a-dA.III.c，，以及母体dA.I(参见下面的实施例部分)。这些2-硝基苄基烷基化的C^7-HOMedA类似物经掺入实验后在叠氮化钠溶液中进行UV光化学切割实验(表1)。

[0249] 表1.C^7-HOMedA类似物的光化学切割速度

[0250]

C^7-HOMedA 类似物	DT_{50} 在 1 mM NaN_3 中	
	无 DTT	50 mM DTT
dA.I	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
dA.III.a ds1	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2
dA.III.a ds2	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
dA.III.b ds1	7.0 ± 0.3	6.1 ± 0.4
dA.III.b ds2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
dA.III.c ds1	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.2
dA.III.c ds2	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.1

[0251] 在所有的情况下，dA.III.a-dA.III.c的ds2异构体的光化学切割速度分别为其相应ds2异构体的2倍、6.4倍、和1.2倍(即，较低的DT_{50}值)。值得指出的是，与母体dA.I类似物相比，ds1异构体表现出相近(dA.III.c)或更高(dA.III.a或dA.III.b)的DT_{50}值。这些数据提供证据表明取代的α-异丙基的立体化学是重要因素，再加上4-OMe的取代，dA.III.b ds2类似物在α-异丙基C^7-HOMedA系列中的DT_{50}值最低。

[0252] 以前的工作证实α-叔丁基类似物dU.V具有优良的CRT性能，如单碱基终止和高核苷酸选择性(Litosh等，2011)。这允许通过合成四个α-叔丁基C^7-HOMedG类似物，dG.V.a-dG.V.d、以及母体dG.I(图1)，使用与各种OMe环取代相结合的不同α-取代基来进一步研究立体特异性作用。与α-异丙基-C^7-HOMedATP类似物一致，UV光化学切割实验揭示了dG.V.a-dG.V.d的ds2异构体与其相应的ds1异构体相比，速度分别快3.1倍、4.5倍、4.4倍和3.0倍(表2)。

[0253] 表2.C^7-HOMedG类似物的光化学切割速度

[0254]

C^7-HOMedG 类似物	DT_{50} 在 1 mM NaN_3 中	
	无 DTT	50 mM DTT
dG.I	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
dG.V.a ds1	11.0 ± 0.4	10.7 ± 0.2
dG.V.a ds2	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.3
dG.V.b ds1	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.3
dG.V.b ds2	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2
dG.V.c ds1	3.5 ± 0.3	3.0 ± 0.1
dG.V.c ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
dG.V.d ds1	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
dG.V.d ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1

[0255] 5-甲氧基取代的ds1和ds2异构体与相应的4-甲氧基取代的异构体相比光化学切割速度均快1.4倍。双取代的4,5-双-甲氧基ds1异构体切割速度比单取代的4-甲氧基异构体快2倍，比单取代的5-甲氧基异构体快1.5倍。相反地，5-甲氧基ds2异构体和4,5-双-甲氧基ds2异构体有着相同的DT_{50}值(仅0.8秒)。在没有α-取代基的情况下，Hasan等(1997)报导了5-甲氧基-2-硝基苄基类似物的速度只比其相应的母体快1.2倍。dG.V.c的ds1和ds2异构体和dG.V.a的ds1和ds2异构体的对比揭示了其速度增幅分别为3.6和4.4倍，表明立体特异性的叔丁基增强了5-甲氧基的效应。对于四色CRT应用来说，该组合提供了环系统效用的良好灵活性，因为可以将接头结构连接至4-位来生成染料标记的类似物(美国专利7,897,737、7,964,352和8,148,503；美国专利申请公布2011/0287427；Metzker，2010)。

[0256] 为了确定这些α-叔丁基C^7-HOMedG类似物的立体化学，通过分步结晶将(R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-双甲基-1-丙醇的(1S)-莰烷酸酯拆分为其对映异构体纯的(S)醇(Corrie等，1992)(图3)。这种(S)醇和(S)-α-叔丁基-2-硝基苄醇(美国专利8,148,503；Litosh等，2011)均被连接至C^7-HOMedG上(图1)。它们相应的三磷酸酯的反相高效液相色谱分析揭示了dG.V.a和dG.V.c的dS2异构体均分别与dG.V和dG.VI有着完全相同的峰保

留时间，这样使我们可以断定这两个dS2异构体均在α-碳处有着同样的(S)构型。经过推理，dG.V.a和dG.V.c相应的ds1异构体的构型定为(R)。

[0257] 然后将这些(S)醇连接至剩余的核苷上来研究离去基团对光化学切割速度的影响。例如，UV光化学切割实验揭示了母体2-硝基苄基类似物的DT_{50}值在dC.I的2.0秒和dG.I的9.2秒之间变动(图7和表3)。

[0258] 表3.可逆终止剂光化学切割速度

[0259]

核苷类似物	DT_{50}在 1 mM NaN_3 中	
	无 DTT	50 mM DTT
dA.I	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
dA.V	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2
dA.VI	0.8 ± 0.1[a]	0.8 ± 0.1
dC.I	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2
dC.V	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2
dC.VI	0.6 ± 0.1[a]	0.6 ± 0.1
dG.I	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
dG.V	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2
dG.VI	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
dU.I	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
dU.V	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
dU.VI	0.7 ± 0.1[a]	0.7 ± 0.1

[0260] [a]通过凝胶电泳观察到过渡产物(TP)；在DT_{50}值中被视为切割产物.

[0261] 与母体类似物相比，苄基碳上(S)-叔丁基的取代导致了切割速度增快幅度在1.5～3.1倍，额外的5-甲氧基的取代进一步增快3.0～11.5倍。当比较C^7-HOMedG类似物时观察到最大的速度增加幅度，DT_{50}值从9.2降至0.8秒(图7，黑色条)。全系列的(S)-5-甲氧基-α-叔丁基可逆终止剂拥有更窄范围的DT_{50}值，从0.6到0.8秒。这些数据表明，在降低用特定核苷酸离去基团时观察到的切割速度差别上，(S)-α-叔丁基和5-甲氧基的组合效应起重要作用，在实际应用中可以为CRT循环提供常态化的更快的切割条件。出乎意料的是，除了(S)-5-甲氧基-α-叔丁基-C^7-HOMedG外，在(S)-5-甲氧基-α-叔丁基-C^7-HOMedA、-HOMedC和-HOMedU短暂暴露于UV光后的掺入实验中观察到过渡产物(HOMedU类似物仅在图2左边示出)。由于唯一的区别在于刚刚掺入的核苷酸，我们猜测更快速切割的(S)-5-甲氧基-α-叔丁基-2-硝基苄基产生了更活泼的2-亚硝基酮副产物，其攻击增长的引物链的3'-端核苷酸。

[0262] 为了研究淬灭亚硝基中间体的条件，对多种氨基和巯基试剂在UV光化学切割实验期间进行了测试(图5)。他们之中，只有二硫苏糖醇(DTT)(Cleland，1964)消除了过渡产物(图2，右侧)。在一些实施方案中，有效的DTT浓度为1mM至1M。在一些实施方案中，有效的DTT浓度为5mM至100mM。在一些实施方案中，有效的DTT浓度为10mM至50mM。在一些实施方案中，有效的DTT浓度为约50mM。在一些实施方案中，光化学切割步骤在叠氮化钠的存在下进行。

在一些实施方案中，有效的叠氮化钠浓度为0.1mM至1M。在一些实施方案中，有效的叠氮化钠浓度为1mM至100mM。在一些实施方案中，有效的叠氮化钠浓度为1mM至50mM。在一些实施方案中，有效的叠氮化钠浓度为约1M。

[0263] 为测试对速度的影响，在DTT存在下重复了所有化合物的UV光化学切割实验，其中几个母体和ds1异构体的DT_{50}值都降低(表1、2和3)。Barth等(2005)提出DTT通过亲核加成进攻亚硝基，尽管Corrie(2005)在随后的综述中记载了保护性硫醇是没有必要的，因为由亚硝基酮副产物引起的生物干扰的证据非常不足。在本发明我们所述的实例中，DTT对消除这样的不期望反应起重要的保护作用。

[0264] α-取代基团的立体特异性(S)构型加上5-甲氧基被发现是创造快速切割的可逆终止剂时的决定因素。活泼的亚硝基酮副产物可在DTT存在下在光化学切割过程中被有效地消除，这提供了合适的条件维持CRT反应的生物完整性。

[0265] III.核苷酸和核苷化合物及其在DNA测序中的应用

[0266] 本发明的可逆终止剂可被用于基于许多手段的DNA测序方法中，包括：

[0267] ●“Sanger”或“双脱氧”方法，其包括通过使用DNA聚合酶掺入2’,3’-双脱氧核苷酸(ddNTP)来终止DNA链合成。参见Metzker等，2005，其通过引用并入本文。

[0268] ●合成测序(Sequencing-by-syntehsis，SBS)，此方法通常不能清楚地区分DNA测序的不同机理。参见Metzker，2010；Metzker，2005，其通过引用并入本文。

[0269] ●基于DNA聚合酶的策略，此方法也可归类于循环可逆终止(CRT)、单核苷酸加入(SNA，即焦磷酸测序)以及实时测序。参见Metzker，2010，其通过引用并入本文。

[0270] ●单分子测序，其使用随意切口测序(Random Nick Sequencing，RNS)手段。

[0271] 在一些实施方案中，本发明提供了测定靶核酸序列的方法，其包括下列步骤：

[0272] (i)使引物的5’端附着于固体表面；

[0273] (ii)使靶核酸与所述附着于固体表面的引物杂交；

[0274] (iii)加入根据本文所述任何一种结构的化合物，前提是当多于一种碱基存在时，每个碱基连有不同的报告基团；

[0275] (iv)向所述引物/靶核酸杂交复合物加入核酸复制酶以将步骤(iii)中的组合物掺入增长的引物链，其中被掺入的步骤(iii)中的组合物以约70％至约100％的效率终止聚合酶反应；

[0276] (v)清洗固体表面以除去未掺入的组分；

[0277] (vi)检测所掺入的报告基团以鉴定所掺入的步骤(iii)之组合物；

[0278] (vii)任选地加入一种或更多种化合物来永久给未延长的引物加帽；

[0279] (viii)除去终止部分，其包括光化学切割该终止部分，生成具有5-羟甲基嘧啶或7-羟甲基-7-脱氮嘌呤碱基的延长的引物；

[0280] (ix)清洗固体表面以除去切割的终止基团；以及

[0281] (x)重复步骤(iii)至(viii)一次或更多次，以鉴定靶核酸中的多个碱基。在一些变动中，步骤(iii)和(iv)的次序可以相反。在进一步变动中，同时加入聚合酶和化合物。在一些实施方案中，它们在同一个溶液中。

[0282] 在另一个方面，本发明提供了测定靶核酸序列的方法，其包括下列步骤：

[0283] (i)使靶核酸的5’端附着于固体表面；

[0284] (ii)使引物与所述附着于固体表面的靶核酸杂交；

[0285] (iii)加入根据本文所述任何一种结构的化合物，前提是当多于一种碱基存在时，每个碱基连有不同的报告基团；

[0286] (iv)向所述引物/靶核酸杂交复合物加入核酸复制酶以将步骤(iii)中的组合物掺入增长的引物链，其中被掺入的步骤(iii)中的组合物以约70％至约100％的效率终止聚合酶反应；

[0287] (v)清洗固体表面除去未掺入的组分；

[0288] (vi)检测所掺入的报告基团以鉴定所掺入的步骤(iii)中的组合物；

[0289] (vii)任选地加入一种或更多种化合物来永久给未延长的引物加帽；

[0290] (viii)除去终止部分，其包括光化学切割该终止部分，生成具有5-羟甲基嘧啶或7-羟甲基-7-脱氮嘌呤碱基的延长的引物；

[0291] (ix)清洗固体表面以除去切割的终止基团；以及

[0292] (x)重复步骤(iii)至(viii)一次或更多次，以鉴定靶核酸中的多个碱基。在一些变动中，步骤(iii)和(iv)的次序可以相反。

[0293] 在一些实施方案中，所述化合物由核酸复制酶掺入，所述酶为DNA聚合酶。在一些实施方案中，所述DNA聚合酶选自：Taq DNA聚合酶、Klenow(外-)DNA聚合酶、Bst DNA聚合酶、VENT® (外-)DNA聚合酶(克隆自嗜热球菌(Thermococcus litoralis)的DNA聚合酶A，含有D141A和E143A突变)、Pfu(外-)DNA聚合酶和DEEPVENT™(外-)DNA聚合酶(克隆自火球菌属(Pyrococcus)物种GB-D的DNA聚合酶A，含有D141A和E143A突变)。在一些实施方案中，所述DNA聚合酶选自：AMPLITAQ® DNA聚合酶、FS(含有G46D和F667Y突变的Taq DNA聚合酶)、TERMOSEQUENASE™DNA聚合酶(含有F667Y突变的Taq DNA聚合酶)、THERMOSEQUENASE™II DNA聚合酶(THERMOSEQUENASE™DNA聚合酶与嗜酸热球菌(T.acidophilum)焦磷酸酶的混合物)、THERMINATOR™DNA聚合酶(克隆自热球菌物种9°N-7的DNA聚合酶A，含有D141A、E143A和A485L突变)、THERMINATOR™II DNA聚合酶(含有额外的Y409V突变的THERMINATOR™DNA聚合酶)和VENT® (外-)A488L DNA聚合酶(含有A488L突变的VENT® (外-)DNA聚合酶)。

[0294] 本公开内容的化合物可使用实施例部分概述的方法制得。这些方法可被本领域技术人员应用有机化学原理和技术进行进一步改进和优化。此类原理和技术在例如Wu等(2007)、Litosh等(2011)、Stupi等(2012)、Gardner等(2012)；美国专利7,897,737、7,964,352和8,148,503；美国专利申请公布2011/0287427中有教导，其通过引用并入本文。

[0295] 在一个实施方案中，样品组分允许测定SNP。该方法可用于信息性SNP的高通量鉴定。SNP可直接得自基因组DNA材料、PCR扩增的材料或者克隆的DNA材料，并可以用单核苷酸引物延伸法进行测定。单核苷酸引物延伸法可包括使用单种未标记的dNTP、单种标记的dNTP、单种3'-O-修饰的dNTP、单种碱基修饰的2'-dNTP、单种α-硫代-dNTP或单种标记的2',3'-双脱氧核苷酸。微测序法(mini-sequencing method)可包括使用单种未标记的dNTP、单种标记的dNTP、单种3'-O-修饰的dNTP、单种碱基修饰的2'-dNTP、单种α-硫代-dNTP或单种标记的2',3'-双脱氧核苷酸。SNP可直接得自基因组DNA材料、PCR扩增的材料或者克隆的DNA材料。

[0296] A.核苷酸和核苷化合物及其在CRT中的应用

[0297] 本发明的一些方面提供了可用于基于循环可逆终止(cyclic reversible termination,CRT)之DNA测序技术的本文提供的核苷酸和核苷化合物(可逆终止剂)。CRT是检测多个模板的同步单碱基添加的循环方法。该方法与Sanger法(Metzker,2005,通过引用并入本文)的区别在于其能够不需要凝胶电泳而进行,而这正是该领域发展的主要瓶颈。不过,像Sanger测序一样,更长的阅读长度转化成了覆盖全基因组所需的更少的测序试验。CRT循环通常包括三个步骤:掺入、成像和去保护。所述术语"去保护"可与"切割"同义地使用,因此所述三个步骤也可表述为掺入、成像和切割。对这一程序,循环效率、循环时间和灵敏度是重要的因素。循环效率取决于去保护和掺入效率,并决定了CRT的阅读长度。CRT循环时间是掺入、成像和去保护时间的总和。对全基因组测序的快速CRT而言,可使用本文公开的核苷酸和核苷化合物,其能够表现出快速且高效的去保护特性。这些化合物可用直接附着于α-碳上有叠氮基取代的苄基上的报告基团(如荧光染料)进行标记,提供诸如具有相似去保护特性的荧光可逆终止剂。仍难以实现长CRT阅读的目标,因为可逆终止剂通常不是市售DNA聚合酶的好底物。本发明的经修饰核苷酸类似物可用于通过提供使用市售DNA聚合酶时与天然核苷酸一样好或更好地掺入的底物来改进该项技术。

[0298] 连接至3'-OH未阻断的核苷酸的碱基上的光可切割基团,如本公开所述基团,可以作为有效的可逆终止剂并且可被野生型DNA聚合酶高效地掺入。参见Wu等,2007;Metzker,2010;Litosh等,2011;Gardner等,2012;美国专利7,897,737、7,964,352和8,148,503;美国专利申请公布2011/0287427,其通过引用并入本文。例如,5-羟甲基-2′-脱氧尿苷(HOMedU)被发现天然存在于许多噬菌体和低等真核生物的基因组中(Gommers-Ampt,1995,通过引用并入本文)。其羟甲基可以作为连接小的光可裂解终止基团的分子把柄。其他天然存在的可被进一步以本文所述方式修饰以发挥可逆终止剂功能的高度修饰碱基包括5-羟甲基-2′-脱氧胞苷(HOMedC),其被发现天然存在于T2、T4和T6噬菌体的基因组中(Wyatt和Cohen1953;Gommers-Ampt,1995)和哺乳动物基因组中(Kriaucionis和Heintz,2009;Tahiliani等,2009;Ito等,2010)。吡咯并嘧啶环结构(7-脱氮嘌呤)也被发现天然存在于核苷抗生素(Carrasco和Vázquez,1984,通过引用并入本文)和tRNA碱基(Limbach等,1994,通过引用并入本文)中,而且化合物7-脱氮-7-羟甲基-2′-脱氧腺苷(C^7-HOMedA)(Rockhill等,1997)和7-脱氮-7-羟甲基-2′-脱氧鸟苷(C^7-HOMedG)(McDougall等,2001)也可被进一步以本文所述方式修饰以发挥可逆终止剂功能。

[0299] 在本文描述的一些实验方案中,所述光可切割基团是取代的2-硝基苄基核苷酸,其可被如,365nm UV光,通过光化学方法有效地切割。参见美国专利申请公布2010/0041041,通过引用并入本文。普遍理解的是,使用大于300nm的波长将对DNA和蛋白质的损伤降至最小(Corrie,2005),除了365nm之外的几个特定波长是340nm(Kaplan等,1978)和355nm(Seo,2005)供使用。

[0300] 在一些实验方案中,本文所述3'-OH未阻断的可逆终止剂通常有几个优势,包括,例如,只需一个键的光切割就可从碱基上同时除去终止基团和荧光团。这反过来可被用于更高效地为下一个CRT循环将核苷酸复原。本文提供的3'-OH未阻断的可逆终止剂的第二个优势在于许多这些化合物都更容易被酶掺入,而且在一些实验方案中,可以如天然核苷酸一样容易被野生型DNA聚合酶掺入。

[0301] 3'-OH-未阻断的终止剂面临的一个挑战是找到合适的碱基修饰来导致加入单个碱基后终止DNA的合成。这一点很重要,因为未阻断的3'-OH基团是掺入下一个要进来的核苷酸的天然底物。本文描述的化合物解决了这个挑战。例如,在一些实验方案中,本文提供的可逆终止剂导致加入单个碱基后导致DNA合成的终止。

[0302] 在一些实验方案中,本文公开的化合物可以在CRT中用于直接从基因组DNA读出。片段化的基因组DNA可与包含覆盖所选染色体的引发位点的高密度寡核苷酸芯片杂交。各引发序列以CRT法的估计阅读长度分隔开。在碱基添加之间,荧光成像仪能够同时对整个高密度芯片成像,标志着速度和灵敏度的显著提高。在具体实施方案中,附着于α-碳上有叠氮基取代的苄基或本文所述其衍生物的荧光团,被特定的化学或酶反应去除以释放出苄基以备下一轮碱基添加之用。约500个CRT循环之后,可将完整且连续的基因组序列信息与参照人类基因组进行比较,以确定个体样品中序列变异的程度和类型。表现出更高掺入和去保护效率的可逆终止剂通常会实现更高的循环效率,并由此实现更长的阅读长度。

[0303] CRT效率由公式(RL)Ceff=0.5定义,其中RL为碱基的阅读长度,Ceff为总循环效率。换句话说,90%的总循环效率能够达到7碱基的阅读长度,99%的循环效率能够达到70碱基的阅读长度,99.9%的循环效率能够达到700碱基的阅读长度。本发明化合物的掺入效率可为类似天然核苷掺入的约70%至约100%。优选地,掺入效率会为约85%至约100%。光化学切割效率会优选地为约85%至约100%。此外,掺入本发明化合物后核酸延伸的终止会为约90%至约100%。一个实施方案中的核苷酸和核苷化合物的循环效率至少为80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。

[0304] 本发明的另一方面涉及使用焦磷酸测序,该方法为非电泳的生物发光方法,其通过一系列酶反应将无机焦磷酸盐(PPi)成比例转化成可见光来测量其释放(Ronaghi等,1998,通过引用并入本文)。与其他利用经修饰核苷酸终止DNA合成的测序方法不同,焦磷酸测序试验通过以有限量单次添加dNTP来操作DNA聚合酶。随后DNA聚合酶在掺入互补dNTP后延伸引物并暂停。在配给循环中加入下一种互补dNTP后重新起始DNA合成。光峰值的顺序和强度以流程图形式记录,揭示内在的DNA序列。对多至六个核苷酸的均聚物重复而言,添加的dNTP数与光信号成正比。大于六个核苷酸的均聚物重复可导致插入错误,这是焦磷酸测序中最常见的错误类型。本发明的经修饰核苷酸类似物可通过对均聚物重复,尤其是长度大于六个核苷酸的那些重复,进行精确测序来改进该项技术。

[0305] 本发明的另一方面涉及Sanger测序(例如应用于杂合子检测的Sanger测序)的应用。尽管已有很大进步,但用于精确杂合子检测的双脱氧-BigDye终止法测序化学法仍需要改进。通常认为原始数据中均匀的峰高分布会使碱基指认(base-calling)和杂合子检测更为可靠和准确。Sanger测序中的终止模式主要归因于DNA聚合酶的序列依赖性偏好掺入,其能够选择性地掺入天然核苷酸而非经修饰核苷酸(Metzker等,1998,通过引用并入本文)。这些掺入偏好效应在染料-终止剂化学法中比在染料-引物化学法中更为显著。这可归因于附着于终止核苷酸的大荧光染料结构的作用,使酶活性比天然底物至少降低10倍。因此,降低DNA聚合酶针对染料标记终止剂的偏好掺入效应可导致改进的杂合体检测。本发明的经修饰核苷酸类似物可通过与天然核苷酸一样或更好地掺入(并由此消除Sanger测序中的掺入偏好)来改进此项技术。

[0306] 本发明的另一方面涉及使用克隆扩增的模板和单一DNA分子模板。NGS技术的前沿可被分为两大阵营:从单一DNA分子克隆扩增的模板,以及单一DNA分子模板。本领域公知,通过将引物附着至所述表面并使所述引物与靶核酸杂交(美国专利No.5,770,367;Harris等,2008,通过引用并入本文),或者通过克隆扩增将靶核酸附着在所述表面上并使引物与所述靶核酸杂交(Dressman等,2003;Margulies等,2005,通过引用并入本文),可将DNA固定在固体表面上。两种固定方法中的任一种均可用于发明中,以备随后结合DNA聚合酶以启动CRT法或焦磷酸测序法。

[0307] 本发明的一方面涉及由大DNA片段(即,0.1～0.5兆碱基)构成的单模版分子的应用。在一些实施方案中,可以采用不需适配体的策略,称为随意缺口测序(Random Nick Sequencing,RNS)。其有几个优势,包括(a)无需PCR或适配体连接,(b)对同一模版冗余测序来提高精确度,和(c)单分子模版上可见的测序反应位置提供了局部的从头组装。例如,PCR过程在克隆倍增模版上产生被误认为序列变种的突变。富含AT及GC的靶标序列也可能在产物收率上呈现倍增偏差,导致在基因组对比和组装时代表性不足。对于给定单分子模版而言,知道测序反应的位置会简化基因组组装中复杂的基因组和结构区域的位置对比和组织。

[0308] 在RNS手段中,非糖特异性的核酸酶(如从创伤弧菌(Vibrio vulnificus(vvn))分离出来的)可在dSDNA上制造随机的单股缺口,并可同时消化ssDNA和RNA(参见Hsia等,2005)。Vvn的结合发生于DNA的小沟,避免了核碱基的序列依赖性识别。其优势在于沿DNA分子以随意的方式产生缺口,不会造成依赖于序列的偏差。缺口的上游片段成为聚合酶开始RNS反应的引物位点。为了使这一手段在一些实施方案中工作,聚合酶必须能够在延伸上游链的时候置换下游链。几个熟知的具有所述性能的DNA聚合酶包括φ29(参见Soengas等,1995,通过引用并入本文)和Bst(参见Aliotta等,1996,通过引用并入本文)聚合酶。Vent(外-)(参见Gardner等,1999,通过引用并入本文)和Therminator™聚合酶也具有链置换性能,尽管可能只限于50个碱基就停下来。UV切割后,生成的羟甲基核苷酸作为下一轮RNS的优良的模版碱基(图13)。RNS过程中的链置换产生与通过Invader实验(参见Lyamichev等,1999)所得类似的分岔dSDNA(折叠(flap))结构。已知折叠核酸内切酶(Flap endonucleases,FEN1)会切割如图13所示的这些分叉结构,生成没有核苷酸缺口的下游5′-PO_4末端链(Kaiser等1999)。这样就生成可连接的底物以为后续轮的RNS修复dsDNA分子。

[0309] B.聚合酶测定

[0310] 本发明的另一方面涉及聚合酶测定的应用。使用“聚合酶终点测定”测试了天然和经修饰核苷酸的掺入效率(Wu等,2007,通过引用并入本文)。该测定检测匹配和错配模板碱基的掺入效率。通过检测化合物掺入一半引物-模板复合物时的浓度(IC_{50})来测定掺入效率。用递增的化合物浓度进行滴定,以生成可用于确定IC_{50}的曲线。

[0311] 模板DNA的序列根据待测化合物来进行选择。例如,在测定掺入效率时,模板序列中引物后的第一个研究碱基为该化合物的互补碱基,而在测定错配区分特性时则为三种错配碱基之一。

[0312] 对退火反应,将DNA聚合酶(如THERMINATOR™DNA聚合酶,每次反应0.25单位,New England Biolabs)、1×Thermopol缓冲液和已知浓度的天然或经修饰核苷酸加入每个10μL反应中,并在75℃下孵育10分钟,在冰上冷却,并用10μL终止液(98%甲酰胺:10mM

Na_2EDTA，pH＝8.0，25mg/mL蓝色葡聚糖(Blue Dextran))猝灭。将终止后的反应物加热至75℃保持30秒以使DNA变性，随后置于冰上。将延伸产物在10％Long Ranger(Lonza)聚丙烯酰胺凝胶上用ABI377型DNA测序仪进行分析。更多细节见下述实施例1。

[0313] C.错配区分和终止

[0314] 本发明的另一个方面涉及改进的针对错配掺入的区分，例如，通过使用本文所述的可逆终止剂。已有报道，2-硝基苄基中α-碳上的取代可提高切割反应速率(Reichmanis等，1985；Cameron&Frechet，1991；Hasan等，1997，所有三者均通过引用并入本文)。不受理论约束，本文所示结果表明，2-硝基苄基中α-碳上的取代还能够影响3'-OH未阻断核苷酸三磷酸酯的DNA合成终止，并提高对错配掺入的区分。此外，基于以下更详细讨论的结果，发现2-硝基苄基中α-碳上取代的立体化学情况可对错配区分的程度和切割反应速率产生显著影响。不受理论约束，发现了至少两个通常影响单次掺入后DNA合成终止的因素：a)2-硝基苄基中α-碳的取代，和b)苄基环上2位的取代。

[0315] D.UV切割速度

[0316] 本发明的另一方面涉及提供具有改进的UV切割速度的可逆终止剂。当将类似物掺入引物链时，用365nm UV光切割取代的2-硝基苄基终止基团允许下一个掺入循环继续。不受理论约束，发现了至少两个通常影响掺入的核苷酸类似物的UV切割速度的因素：a)2-硝基苄基中α-碳取代的立体化学，和b)苄基环上的取代。

[0317] E.下一代测序(NGS)技术

[0318] 本发明的另一方面涉及将本文提供的可逆终止剂和方法应用于下一代测序方法。测序技术包括许多方法，大致可分为(a)模板制备，(b)测序和成像，和(c)数据分析。具体方案的独特组合将一种技术与另一种区分开并且决定了每个平台所产生的数据类型。这些数据输出的差异给基于数据质量和花费来比较各种平台带来挑战。虽然每个制造厂家都提供质量评分和精确度估计，对于出自一个平台的“达标的碱基”是否等同于另一个平台的“达标的碱基”还是有不同的看法。本文所述的化合物和方法可与下文所述的一种或更多种模板形式组合使用，和/或可应用于下文所述的一种或更多种模板形式。

[0319] 用于制备下一代测序(NGS)反应之模板的方法包括：源自单个DNA分子的经克隆倍增的模板和单个DNA分子模板。使用DNA聚合酶的测序方法分为循环可逆终止(cyclic reversible termination，CRT)、单核苷酸添加(single nucleotide addition，SNA)和实时测序。连接测序(sequencing-by-ligation，SBL)是用DNA连接酶替代DNA聚合酶的手段，也已被用于NGS技术。参见，例如，Shendure等，2005和Valouev等，2008，通过引用并入本文。这些测序策略所使用的成像方法涵盖测量生物性发光的信号至对单分子事件的四色成像。在一些实施方案中，这样的组合方法进一步与能够处理由NGS平台产生的巨量数据的适当信息技术系统组合，包括与数据储存、跟踪和质量控制相关的方面。参见Pop和Salzberg2008，通过引用并入本文。

[0320] a)模板制备

[0321] 在一些实施方案中，本发明涉及将可逆终止剂和测序方法应用于一种或更多种模板或模板制备方法，或者将可逆终止剂和测序方法与一种或更多种模板或模板制备方法结合。例如，在一些实施方案中，使用了可靠的模板制备方法。这些从所研究的基因组产生具代表性、不带偏差的核酸材料来源。在一些实施方案中，该方法包括将基因组DNA随机断裂

成更小的尺寸，从其中创建片段模板或伴侣配对模板。在一些实施方案中，例如与NGS技术相关的那些，该模板被连接或固定至固体表面或载体。这种空间上分离的模板位点的固定可以被用于允许数千到数十亿测序反应同时进行。

[0322] 克隆扩增模板。在一些实施方案中，本发明包括使用克隆扩增的模板或克隆扩增模板制备方法。例如，这样的模板可以与尚未被设计用于检测单个荧光事件的成像系统一起使用。例如，两种常见的扩增方法是乳液PCR(也称为emPCR)和固相扩增。见Dressman等，2003和Fedurco等，2006，均通过引用并入本文。在一些实施方案中，emPCR可用于在无细胞系统中制备测序模板，它具有避免任意丢失基因组序列的优点-该问题是细菌克隆方法通常固有的。在一些实施方案中，片段或伴侣配对靶的库被创建，并且含有通用的引发位点的适配体被连接至靶末端，使复杂的基因组通过通用PCR引物进行扩增。例如，连接后，将DNA分离成单链并在有利于每个珠一个DNA分子的条件下捕获至珠上。见Metzker，2010，图1a，通过引用并入本文。例如，在成功的扩增和emPCR珠富集后，可将数以百万计的珠固定在标准显微镜载玻片上的聚丙烯酰胺凝胶中(与Polonator仪器一起使用；见，例如，Shendure等，2005，通过引用并入本文)，与氨基修饰的玻璃表面化学地交联(与Life/APG SOLiD和Polonator仪器一起使用；见，例如，Kim等，2007，通过引用并入本文)，或沉积在其中可以进行NGS化学的单个PicoTiterPlate(PTP)的孔中(与Roche/454仪器一起使用；Margulies等，2005，通过引用并入本文)或IonChip孔中(与Ion Torrent仪器一起使用；Rothberg等，2011，通过引用并入本文)。在一些实施方案中，固相扩增可被用来从载玻片上的片段或伴侣配对模板产生随机分布、克隆扩增的簇。参见Metzker2010，图1b，通过引用并入本文。在一些实施方案中，高密度的正向和反向引物被共价地连接至载玻片上，并且载体上引物与模板的比值决定了扩增簇的表面密度。在一些实施方案中，固相扩增可被用来生产100-200兆空间上分离的模板簇(Illumina/Solexa)，提供了可与通用测序引物杂交以引发NGS反应的自由端。见Bentley等，2008，通过引用并入本文。

[0323] 单分子模板。在一些实施方案中，本发明包括使用单分子模板或单分子模板制备方法。虽然克隆扩增方法相比细菌克隆提供了某些优势，有些试验方案实施起来很繁琐，并需要大量的基因组DNA材料(3至20微克)。单分子模板的制备通常更直接，并且需要的起始原料较少(<1微克)。在一些实施方案中，这些方法不需要PCR，其通常在克隆扩增的模板中产生误认为序列变体的突变。富含AT和GC的靶序列也可在产物收率上显示扩增偏差，这导致它们在基因组对比及组装时代表性不足。在一些实施例中，可使用定量应用(如RNA-seq)。参见Wang等，2009，通过引用并入本文。这些应用通常在使用非扩增的模板来源时更有效地进行，所述非扩增的模板来源不改变mRNA分子的代表性丰度。在一些实施例中，在进行NGS反应之前，通常使用至少三种不同方法中的一种将单分子模板固定在固体载体上。在可用于某些实施方案的第一种方法中，空间分布的单个引物分子共价地连接至固体载体上(参见Harris等，2008)。然后使模板与经固定的引物杂交，所述模板可通过例如将起始原料随机片段化成小尺寸(例如，约200至250bp)并在片段末端添加常见的适配体来制备。见Metzker2010，图1c，通过引用并入本文。在可用于某些实施方案的第二种方法中，空间分布的单分子模板通过由经固定的引物杂交(priming)和延伸单链、单分子模板共价地连接至固体载体上(参见Harris等，2008)。见Metzker2010，图1c，通过引用并入本文。在一些实施方案中，然后使常见的引物与模板杂交。见Metzker2010，图1d，通过引用并入本文。在每一

方法中，DNA聚合酶可被用于，例如，结合至经固定和引物杂交的模板配置(template configuration)来启动NGS反应。在可用于某些实施方案的第三种方法中，空间分布的单个聚合酶分子附着于固体载体上(参见Eid等，2009，通过引用并入本文)，其与引物杂交的模板分子结合(见Metzker2010，图1e，通过引用并入本文)。在一般情况下，参见美国专利7,329,492和6,255,083，通过引用并入本文。较大的DNA分子(高达数万个碱基对)可以与本技术一起使用，例如，与前两种方法不同，第三种方法可以与实时方法一起使用，导致潜在更长的读取长度。

[0324] B)测序和成像

[0325] 克隆扩增测序和单分子模板测序有着根本的差异。克隆扩增可以在一些实施方案中用于得到相同的模板群，其中每一个经历测序反应。成像后，对于给定循环，所观察到的信号是加到相同模板上的核苷酸或探针的共识(consensus)。通常这对添加过程的效率有更大的需求，因为模板整体的不完全延伸导致滞后链失相(lagging-strand dephasing)(也称为2型相移(type2dephasing))。在给定循环中，也可以发生添加多个核苷酸或探针，导致领先链失相(leading-strand dephasing)(也称为1型相移(type1dephasing))。Cheeseman提出了相移(dephasing)的概念(参见美国专利5,302,509，通过引用并入本文)。信号相移增加了荧光噪音，造成碱基指认错误和较短的读取(参见Erlich等，2008)。因为相移对单分子模板来讲不是问题，其对循环效率的要求宽松。然而单分子很容易在任何给定循环中添加多个核苷酸或探针。这里，在一些实施方案中，可能会观察到发生删除错误，这是由于相邻染料分子间的淬灭效应，或由于掺入不带萤光的核苷酸或探针导致检测不到任何信号。使用这两种克隆扩增和单分子模板的测序和成像策略在以下部分中讨论。在本发明的一些方面中，本文提供的使用可逆终止剂的方法可以应用于任何一种或更多种依赖DNA聚合酶的策略，和/或与任何一种或更多种依赖DNA聚合酶的策略组合使用，包括，例如，CRT、SNA和实时测序。在一些实施方案中，本发明化合物及其使用方法可以应用于CRT方法，和/或与CRT方法组合使用。

[0326] 有几种可商购的NGS系统可以为单一DNA分子之荧光信号成像(见Harris等，2008；Eid等，2009，两者都通过引用并入本文)。在阵列上分辨单个分子可通过用高灵敏度的CCD照相机在100x放大倍率下进行，只要单个DNA分子隔开的距离近似于光的衍射极限(即250纳米)。变异可以发生，取决于放大倍率和表面平整度，这应该对本领域的普通技术人员是显而易见的。广泛用于从单分子检测荧光信号的一种技术是全内反射荧光(TIRF)显微镜。(参见Axelord，1989，通过引用并入本文)。在本发明中可以使用的本领域已知的其他技术包括，但不限于，扫描近场光学显微镜(SNOM；见Moyer等，1993，通过引用并入本文)。

[0327] F.成像系统

[0328] 图8示出用于对来自克隆扩增模板的荧光信号进行成像之成像系统100的一个实施方案。系统100被配置成为微流体流通池50成像，所述流通池已用包含感兴趣DNA的微珠制备。

[0329] 一系列成像技术，如标准的四色成像或色盲脉冲多线激发技术，可以在各种实施方案中与3′-OH未阻断可逆终止剂组合使用。所示的实施方案配置成用于标准的四色成像。

[0330] 系统100包含成像装置10(例如，数码相机、光池等)，其配置成捕获由固定在微流体流通池50中经emPCR扩增模板珠产生的荧光信号。

[0331] 灯14(例如,氙灯)在微流体流通池50和成像装置10之间建立光路30。光线从灯14传播至滤光器转盘16。在图示的实施方案中,滤光器转盘16被机动化并且包含四个光谱过滤器,使得可以捕获四色图像。滤光器转盘16被配置成在每个平铺位置处在四个光谱过滤器中的每一个之间进行切换,使成像装置10可由掺入的3′-OH未阻断可逆终止剂捕获四色图像。

[0332] 一部分来自灯14的光从滤光器转盘16经物镜18到达微流体流通池50。另一部分来自灯14的光从滤光器转盘16行进到成像装置10。在图示的实施方案中,使用反光镜12将光路30引导至成像设备10。在其他实施方案中这样的反光镜可能是不必要的,而在其他实施方案中,可能需要两个或更多个反光镜。

[0333] 系统100还包含紫外(UV)光源20,其配置成向流通池50提供UV光。UV光源20在一些实施方案中可以是发光二极管(LED),也可以是任何其他来源的UV光。

[0334] G.臭氧污染的尽可能减少

[0335] 在另一个方面,本发明提供了尽可能减少臭氧污染的影响的测序方法。臭氧(O_3)是氧的同素异形体,对地球上的生命兼具有益和有害的属性。例如,臭氧的产生是在平流层中通过来自太阳的高能辐射将分子氧(O_2)分割为两个原子,然后与不同的O_2分子结合而形成。该平流层保护这个星球上的生物不受由太阳产生的有害的紫外线辐射。然而,在地面或对流层,臭氧被认为是空气污染物。在烟雾条件下当阳光作用于氮氧化物与挥发性有机化合物的组合时也产生臭氧,所述挥发性有机化合物由工业设施、电力设施、机动车尾气、汽油蒸汽和化学溶剂产生(见EPA,2011)。在炎热的夏季臭氧水平增加,并且臭氧破坏的影响随相对湿度水平的提高加重。对流层臭氧导致作物和森林严重损坏(参见Hewitt等,1990),动物和人类的许多呼吸问题(见Fairchild等,1959;Bhalla,1994),以及对许多消费产品的不利影响,包括汽车轮胎(见Crabtree和Kemp,1946),纺织材料上的染料(见Salvin和Walker,1955),以及在分子生物学中使用的荧光染料。

[0336] 从化学角度来看,臭氧是亲电子试剂,对烯烃化合物(即,含有碳-碳双键的化学品)中通常具有的电子对最具反应性。已经有广泛的致力于臭氧化学的研究,即所谓臭氧化。广泛的两卷书系列提供了全方位的综述,描述了臭氧本身的特性和其能与有机底物进行的众多反应。该系列的第1卷几乎用来专述臭氧与烯烃化合物的反应(参见Bailey,1978;Bailey,1982),第1和第2卷都通过引用并入本文。

[0337] 染料及染料中间体在文献中是众所周知的,并且当今使用中的大多数染料类型已经在超过一个世纪以前就被发现了(Gordon和Gregory,1983)。染料可以基于如何使用或它们的化学结构来分类(Gordon,2009)。对于后者,染料已被分类为如下大类:(i)偶氮类,(ii)蒽醌,(iii)苯并二呋喃酮,(iv)多环芳香族羰基,(v)靛类,(vi)聚甲炔及相关染料(即花青),(vii)苯乙烯基,(viii)二芳基和三芳基正碳(carbonium)及相关染料(即,荧光素,罗丹明和其磺化衍生物),(ix)酞菁,(x)喹酞酮(quinophthalone),(xi)硫,(xii)硝基和亚硝基,及(xiii)杂类(即,香豆素和BODIPY)(Gregory,2009)。大多数,如果不是全部,染料和染料中间体具有多个碳-碳双键,使它们对臭氧化敏感。在20世纪70年代中期,Lofquist和同事教导的总的结论是大多数染料都可能容易遭受臭氧分解(见美国专利3,822,996,美国专利3,859,045,美国专利3,917,499。

[0338] 首次在1955年报道,染色织物暴露于臭氧的结果是染料褪色(例如,损失颜色牢固

性)。Salvin和Walker提出了"O-褪色(O-fading)"这个术语,在他们对装饰织物(drapery fabric)的处理测试中发现,当臭氧暴露于几种蓝色蒽醌染料,(即,Eastman Blue GLF,Amacel Blue和Interchemical Blue B)以及黄色和红色的蒽醌染料时,造成了染料的显著褪色(见Salvin,1955)。蒽醌染料的其他实例(例如C.I.Basic Blue47(参见美国专利3,822,996)和Disperse Blue3(参见美国专利3,859,045))已被报道为易遭受O-褪色。高的湿度促进O-褪色(参见美国专利3,917,449,美国专利4,737,155,美国专利3,822,996,美国专利4,304,568),并且对于纺织物而言,已经表明潮湿为染料提供了足够的流动性使其扩散至材料的表面上而发生臭氧化反应(参见美国专利4,737,155)。

[0339] 荧光染料(如属于聚甲炔类的那些)也已被报道为容易发生臭氧化反应,从而降低了它们的荧光信号强度。例如,Cy3和Cy5染料已在微阵列技术中广泛用于基因表达、基因分型和重测序应用(见Gershon,2004)。Fare和同事们的研究结果表明Cy5及其磺化衍生物Alexa Fluor647暴露于5至10ppb水平的臭氧后,在10至30秒内就会受到臭氧损害(见Fare等2003)。Cy3和它的磺化衍生物Alexa Fluor555在较高的臭氧水平(>100ppb)下荧光强度水平也降低。Kadushin和Getts注意到开始的信号可在1至5分钟内降低至约10%(参见美国专利申请公开2004/0110196)。

[0340] 有大量的化学试剂可作为抗臭氧剂。实例包括对苯二胺,二氢喹啉(dihydroquinoline),硫脲(参见美国专利4,737,155,美国专利4,631,066),饱和的烷基取代的硫脲,烷基和芳基亚磷酸酯(参见美国专利3,822,996),乙氧基化脂肪族叔胺(参见美国专利3,859,045),取代的哌啶硫脲(参见美国专利4,304,568),取代的噁二嗪硫酮和取代的噻嗪硫酮(参见美国专利4,304,568),丙烯酸聚合酶,甲基丙烯酸酯或乙基丙烯酸酯的共聚物(参见美国专利申请公开2004/0110196)和聚硫脲(参见美国专利3,917,449)。对于本发明,一些实施方案中,硫脲可在一种或更多种溶液中用于防止荧光染料在测序反应中的臭氧分解。WO2012/037394,其通过引用并入本文,提供了将硫脲与涉及NGS技术的方法组合使用的方法。在一些实施方案中,成像和/或光化学裂解步骤可在硫脲的存在下进行,例如,在上述发明概述中所公开的浓度。

[0341] H.样品制备

[0342] 为NGS分析来制备感兴趣的DNA的方法包括,例如,克隆扩增和非扩增(即,单分子)的模板。在一些实施方案中,可以使用乳液PCR(emPCR)。如图9所示,可如下制备样品。首先,分离基因组DNA。将DNA片段化成较小的碎片。然后,将常见的适配体连接至那些片段的末端。该适配体连接的DNA分子随后被分离成单链,并在有利于每个珠一个DNA分子的条件下被捕获至1微米大小的珠上。油-水乳液产生封装这些珠-DNA复合物的一个个水滴。PCR扩增就在这些液滴内进行,产生包含10^4至10^6份相同的模板序列拷贝的珠。继成功的扩增和富集后,数千万至数亿个emPCR珠之后化学地固定至微流体流通池50。在一些实施方案中,流通池50可以包含八个通道,并且可以由玻璃制成。

[0343] I.系统操作

[0344] 一旦用珠制备了流通池50,可以将流通池50放置在测序系统100内。图10显示出在一个CRT循环的典型步骤。为说明的目的只描绘了单个DNA分子,但本领域技术人员应当理解,该过程在许多DNA分子上进行。

[0345] 首先,在掺入步骤中,如上所讨论的,使用DNA聚合酶(描绘成拉链)将3′-OH可逆终

止剂掺入。

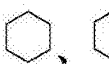
[0346] 接着，对荧光标记的DNA分子进行成像。将灯14激活，以建立从流通池50至成像装置10的光路30。成像设备10通过滤光器转盘16的四个光谱过滤器捕捉图像。通过滤光器转盘16的使用，在微流体流通池50内以平铺的方式(tiled fashion)对各光谱通道成像来捕捉荧光信号。然后，由各个珠的经处理的荧光强度进行碱基指认(即，纯化的蓝色信号可以被指认为“A”碱基，因为3′-OH可逆终止剂被蓝色染料标记)。CRT方法的读出长度与已执行的循环次数正相关(见Metzker2010;Metzker,2005,通过引用并入本文)。

[0347] 随后可以进行光化学切割。采用UV光源20，将UV光照射至流通池50。UV光通过光化学方式切割掉终止基团和荧光基团。经修饰的核酸以这种方式被恢复至其原始状态。

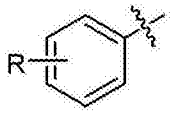
[0348] 然后进行清洗，洗去终止基团和荧光基团。掺入，成像，切割和洗涤的步骤可根据需要进行许多CRT循环。图11显示了来自三个循环的四色平铺图像和随后来自各个珠的碱基指认。

[0349] IV.定义

[0350] 当用于化学基团的情况下，“氢”意为-H，“羟基”意为-OH，“氧代”意为=O，“卤代”独立地意为-F、-Cl、-Br或-I，“氨基”意为$-NH_2$，“羟氨基”意为-NHOH，“硝基”意为$-NO_2$，“亚氨基”意为=NH，“氰基”意为-CN，“异氰酸酯基”意为-N=C=O，“叠氮基”意为$-N_3$，在一价情况下“磷酸酯基”意为-OP(O)$(OH)_2$或其去质子化形式，在二价情况下“磷酸酯基”意为-OP(O)(OH)O-或其去质子化形式，“巯基”意为-SH，“硫代”意为=S，“磺酰基”意为$-S(O)_2-$，“亚磺酰基”意为-S(O)-。

[0351] 在化学式中，符号“-”意为单键，“=”意为双键，“≡”意为三键。符号“----”代表任选的键，如果存在的话可以是单键或双键。符号“”代表单键或双键。因此，例如，结构包括结构和。本领域技术人员应当理解，没有一个这样的环原子形成一个以上双键的一部分。符号“”在绘制成垂直穿过键时表示所述基团的连接点。需要注意的是，通常仅对较大基团以此种方式标出连接点，以帮助读者快速并毫无疑义地辨别连接点。符号“”意为单键，其中连接至楔形粗端的基团“突出于页面上”。符号“”意为单键，其中连接至楔形粗端的基团“进入页面下”。符号“”意为构象(例如，R或S)未知或几何结构(例如，E或Z)未限定的单键。

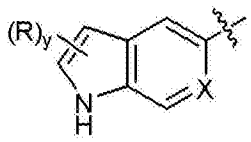
[0352] 在本申请中所示结构之原子上的任何未定义的化合价隐含地表示键合至该原子的氢原子。当基团“R”被描绘成环系统上的“浮动基团(floating group)”时，如下式中：

[0353] 

，

[0354] 则R可取代连接于任一环原子上的任一氢原子，包括已绘出、暗指的或明确定义的氢，只要形成稳定结构即可。

[0355] 当基团“R”被描绘成稠环系统上的“浮动基团”时，如下式中：

[0356] 

[0357] 则除非另有说明，否则R可取代连接于任一稠环中任一环原子上的任一氢。可被取代的氢包括已绘出的氢(如上式中连接于氮的氢)、暗指的氢(如上式中未标明但会理解到其存在的氢)、明确定义的氢，以及其存在依赖于某个环原子的认定的可选的氢(例如当X为-CH-时与基团X相连接的氢)，只要形成稳定结构即可。在所述实例中，R可位于稠环系统的5元或6元环上。在上式中，紧随括号内基团“R”后面的下标“y”代表数字变量。除非另有说明，否则该变量可以为0、1、2，或任一大于2的整数，仅受限于环或环系统上最大可取代氢原子数。

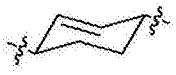
[0358] 对如下基团和分类，其后括号内的下标进一步对该基团/类别进行如下定义：“(Cn)”定义了所述基团/类别中碳原子的确切数目(n)。“(C≤n)”定义了能够存在于基团/类别中的最大碳原子数目(n)，同时最小数目对目的基团而言尽可能地小。例如，可以理解，在基团“烯基$_{(C\leq8)}$”或类别“烯烃$_{(C\leq8)}$”中最小碳原子数为2。例如，“烷氧基$_{(C\leq10)}$”意为含有1至10个碳原子(如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10，或是源于其中的任意范围(如3至10个碳原子)的那些烷氧基。(Cn-n′)定义了基团内碳原子的最小(n)和最大(n′)数目。同样地，“烷基$_{(C2-10)}$”指定了含有2至10个碳原子(如2、3、4、5、6、7、8、9或10，或是源于其中的任意范围(如3至10个碳原子)的那些烷基。

[0359] 本文所用的“饱和”一词指这样修饰的化合物或基团不具有碳-碳双键和碳-碳三键，以下所述除外。该术语并不排除碳-杂原子多重键，例如氧碳双键或碳氮双键。此外，它并不排除可作为酮-烯醇互变异构或亚胺/烯胺互变异构的一部分存在的碳-碳双键。

[0360] 在不与修饰语“取代的”一起使用时，术语“脂族”表示如此修饰的该化合物/基团为非环状或环状的，但不是芳族烃化合物或基团。在脂族化合物/基团中，碳原子可以通过直链、支链或非芳族环(脂环族)连接在一起。脂肪族化合物/基团可以是饱和的，即通过单键(烷烃/烷基)连接，或是不饱和的，具有一个或更多个双键(烯烃/烯基)或具有一个或更多个三键(炔烃/炔基)。术语“脂肪族”在没有修饰语“取代的”的情况下使用时，则仅有碳和氢原子存在。当该术语在有修饰语“取代的”的情况下使用时，一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-N$(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。

[0361] 术语“烷基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指一价饱和脂肪族基团，其以碳原子作为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，且除碳和氢外无其他原子。因此，本文使用的环烷基是烷基的子集。基团-CH_3(Me)、-CH_2CH_3(Et)、-$CH_2CH_2CH_3$(n-Pr或丙基)、-CH$(CH_3)_2$(i-Pr、^{i}Pr或异丙基)、-CH$(CH_2)_2$(环丙基)、-$CH_2CH_2CH_2CH_3$(n-Bu)、-CH$(CH_3)CH_2CH_3$(仲丁基)、-$CH_2CH(CH_3)_2$(异丁基)、-C$(CH_3)_3$(叔丁基、t-Bu或^{t}Bu)、-$CH_2C(CH_3)_3$(新戊基)、环丁基、环戊基、环己基和环己基甲基为烷基的非限制性实例。术语“亚烷基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指二价饱和脂肪族基团，具有一个或两个作为连接点的饱和碳原子，直链或支链、成环、环状或非环状结构，无碳-碳双键或三键，且除碳和氢外无其他原子。基

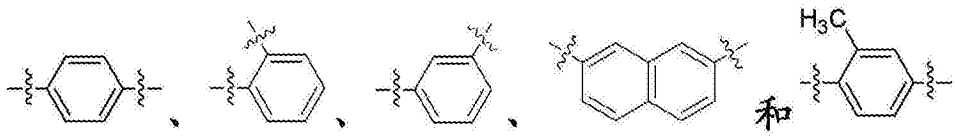
团-CH_2-(亚甲基)、-CH_2CH_2-、-$CH_2C(CH_3)_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2$-和为亚烷基的非限制性实例。术语"亚烷基"在不与修饰语"取代的"一起使用时,指二价基团=CRR',其中R和R'独立地为氢、烷基,或者R和R'合起来代表具有至少两个碳原子的亚烷基。亚烷基的非限制性实例包括:=CH_2、=$CH(CH_2CH_3)$和=$C(CH_3)_2$。当任何这些术语与修饰语"取代的"一起使用时,一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。下列基团为取代的烷基的非限制性实例:-CH_2OH、-CH_2Cl、-CF_3、-CH_2CN、-$CH_2C(O)OH$、-$CH_2C(O)OCH_3$、-$CH_2C(O)NH_2$、-$CH_2C(O)CH_3$、-CH_2OCH_3、-$CH_2OC(O)CH_3$、-CH_2NH_2、-$CH_2N(CH_3)_2$和-CH_2CH_2Cl。术语"卤代烷基"是取代的烷基的子集,其中一个或更多个氢原子已被卤素基团取代,并且除了碳、氢和卤素之外无其他原子存在。基团-CH_2Cl是卤代烷基的非限制性实例。"烷烃"指的是化合物H-R,其中R为烷基。术语"氟烷基"是取代烷基的子集,其中一个或更多个氢已被氟基团取代,并且除碳、氢和氟之外没有其他原子存在。基团-CH_2F、-CF_3和-CH_2CF_3是氟烷基的非限制性实例。"烷烃"是指化合物H-R,其中R为烷基。

[0362] 术语"烯基"在不与修饰语"取代的"一起使用时,指一价不饱和脂肪族基团,具有作为连接点的碳原子,直链或支链、成环、环状或非环状结构,至少有一个非芳族碳-碳双键,无碳-碳三键,且除碳和氢外无其他原子。烯基的非限制性实例包括:-CH=CH_2(乙烯基)、-CH=$CHCH_3$、-CH=$CHCH_2CH_3$、-CH_2CH=CH_2(烯丙基)、-CH_2CH=$CHCH_3$和-CH=CH-C_6H_5。术语"亚烯基"在不与修饰语"取代的"一起使用时指二价不饱和脂肪族基团,具有两个作为连接点的碳原子,直链或支链、成环、环状或非环状结构,至少一个非芳族碳-碳双键,无碳-碳三键,且除碳和氢外无其他原子。基团-CH=CH-、-CH=$C(CH_3)CH_2$-、-CH=$CHCH_2$-和是亚烯基的非限制性实例。当这些术语与修饰语"取代的"一起使用时,一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。基团-CH=CHF、-CH=CHCl和-CH=CHBr为取代的烯基的非限制性实例。"烯烃"指的是化合物H-R,其中R是烯基。

[0363] 术语"炔基"在不与修饰语"取代的"一起使用时,指一价不饱和脂肪族基团,具有作为连接点的碳原子,直链或支链、成环、环状或非环状结构,至少有一个碳-碳三键,且除碳和氢外无其他原子。如本文所用,术语炔基不排除一个或更多个非芳族碳-碳双键的存在。基团-C≡CH、-C≡CCH_3和-CH_2C≡CCH_3为炔基的非限制性实例。当炔基与修饰语"取代的"一起使用时,一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。"炔烃"指的是化合物H-R,其中R是炔基。

[0364] 术语"芳基"在不与修饰语"取代的"一起使用时,指一价不饱和芳香基团,具有作为连接点的芳族碳原子,所述碳原子构成一个或更多个六元芳环结构的一部分,其中环原子均为碳,并且其中所述基团除碳和氢外不包含其他原子。如果存在一个以上的环,所述环可以是稠合或非稠合的。如本文所用,该术语不排除连接至存在的第一个芳环或任何额外的芳环之一个或更多个烷基(碳原子数限制允许的话)的存在。芳基的非限制性实例包括苯

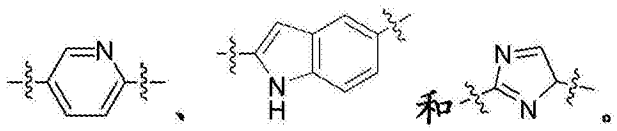
基(Ph)、甲基苯基、(二甲基)苯基、-$C_6H_4CH_2CH_3$(乙基苯基)、萘基,以及源自于联苯基的一价基团。术语"亚芳基"在不与修饰语"取代的"一起使用时,指二价芳族基团,具有两个作为连接点的芳族碳原子,所述碳原子构成一个或更多个六元芳环结构的一部分,其中环原子均为碳,并且其中所述一价基团除碳和氢外不包含其他原子。如果存在一个以上的环,所述环可以是稠合或非稠合的。亚芳基的非限制性实例包括:

[0365] 

[0366] 当这些术语与修饰语"取代的"一起使用时,一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-N$(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。"芳烃"指的是化合物H-R,其中R是芳基。

[0367] 术语"芳烷基"在不与修饰语"取代的"一起使用时,指一价基团-亚烷基-芳基,其中术语亚烷基和芳基各自的使用方式与上文提供的定义一致。芳烷基的非限制性实例为:苯甲基(苄基,Bn)和2-苯基-乙基。当该术语与修饰语"取代的"一起使用时,亚烷基和/或芳基中的一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-N$(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。取代的芳烷基的非限制性实例为:(3-氯苯基)-甲基和2-氯-2-苯基-乙-1-基。

[0368] 术语"杂芳基"在不与修饰语"取代的"一起使用时,指以芳族碳原子或氮原子为连接点的一价芳族基团,所述碳原子或氮原子构成一个或更多个芳环结构的一部分,其中环原子中至少有一个为氮、氧或硫,并且其中所述杂芳基除碳、氢、芳族氮、芳香氧和芳族硫外不包含其他原子。如本文所用,该术语并不排除连接至芳环或芳环系统的一个或更多个烷基、芳基和/或芳烷基(碳原子数限制允许的话)的存在。如果存在一个以上的环,所述环可以是稠合或非稠合的。杂芳基的非限制性实例包括呋喃基、咪唑基、吲哚基、吲唑基(Im)、异噁唑基、甲基吡啶基、噁唑基、苯基吡啶基、吡啶基、吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、喹啉基、喹唑啉基、喹喔啉基、三嗪基、四唑基、噻唑基、噻吩基和三唑基。术语"N-杂芳基"是指以氮原子作为连接点的杂芳基。术语"亚杂芳基"不与修饰语"取代的"一起使用时,是指二价芳族基团,具有作为两个连接点的两个芳族碳原子、两个芳族氮原子、或者一个芳族碳原子和一个芳族氮原子,所述原子形成一个或更多个芳环结构的一部分,其中至少一个环原子是氮、氧或硫,并且其中所述二价基团不包含除碳、氢、芳族氮、芳族氧和芳族硫之外的原子。如本文所用,该术语并不排除连接至芳环或芳环系统的一个或更多个烷基、芳基和/或芳烷基(碳原子数限制允许的话)的存在。如果存在一个以上的环,所述环可以是稠合或非稠合的。亚杂芳基的非限制性实例包括:

[0369] 

[0370] 当这些术语与修饰语"取代的"一起使用时,一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-N$(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。

[0371] 术语“杂环烷基”不与修饰语“取代的”一起使用时，是指单价非芳族基团，其具有碳原子或氮原子作为连接点，所述碳原子或氮原子形成一个或更多个非芳族环结构的一部分，其中至少一个环原子是氮、氧或硫，并且其中所述杂环烷基不包含除碳、氢、氮、氧和硫之外的原子。如本文所用，该术语并不排除连接至环或环系统的一个或更多个烷基(碳原子数限制允许的话)的存在。如本文所用，该术语不排除环或环体系中一个或更多个双键的存在，前提是所得到的基团仍为非芳族。如果存在一个以上的环，所述环可以是稠合或非稠合的。杂环烷基的非限制性实例包括吖丙啶基、氮杂环丁烷基(azetidinyl)、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基(tetrahydrothiofuranyl)、四氢吡喃基、吡喃基、环氧乙烷基(oxiranyl)、和氧杂环丁烷基。术语“N-杂环烷基”是指以氮原子作为连接点的杂环烷基。当术语“杂环烷基”与修饰语“取代的”一起使用时，一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、$-NH_2$、$-NO_2$、$-CO_2H$、$-CO_2CH_3$、-CN、-SH、$-OCH_3$、$-OCH_2CH_3$、-C(O)CH_3、$-NHCH_3$、$-NHCH_2CH_3$、$-N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、、$-S(O)_2NH_2$、或-C(O)$OC(CH_3)_3$(叔丁基氧羰基，BOC)取代。

[0372] 术语“酰基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指-C(O)R基团，其中R为是氢、烷基、芳基、芳烷基或杂芳基，如上面的定义那些术语那样。基团-CHO、-C(O)CH_3(乙酰基，Ac)、-C(O)CH_2CH_3、-C(O)$CH_2CH_2CH_3$、-C(O)$CH(CH_3)_2$、-C(O)$CH(CH_2)_2$、-C(O)C_6H_5、-C(O)$C_6H_4CH_3$、-C(O)$CH_2C_6H_5$、-C(O)(咪唑基)为酰基的非限制性实例。术语“硫代酰基”以类似的方式被定义，不同的是基团-C(O)R中的氧原子被置换为硫原子，-C(S)R。当任何一个这些术语与修饰语“取代的”一起使用时，一个或更多个氢原子(包括直接连在羰基或硫代羰基上的氢原子，如果有的话)已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、$-NH_2$、$-NO_2$、$-CO_2H$、$-CO_2CH_3$、-CN、-SH、$-OCH_3$、$-OCH_2CH_3$、-C(O)CH_3、$-NHCH_3$、$-NHCH_2CH_3$、$-N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或$-S(O)_2NH_2$取代。基团-C(O)CH_2CF_3、$-CO_2H$(羧基)、$-CO_2CH_3$(甲基羧基)、$-CO_2CH_2CH_3$、-C(O)NH_2(氨基甲酰基)、和-C(O)$N(CH_3)_2$为取代的酰基的非限制性实例。

[0373] 术语“烷氧基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指基团-OR，其中R为烷基，该术语定义如上。烷氧基的非限制性实例包括：$-OCH_3$(甲氧基)、$-OCH_2CH_3$(乙氧基)、$-OCH_2CH_2CH_3$、$-OCH(CH_3)_2$(异丙氧基)、$-OCH(CH_2)_3$(叔丁氧基)、$-OCH(CH_2)_2$、-O-环戊基和-O-环己基。术语“烯氧基”、“炔氧基”、“芳氧基”、“芳烷氧基”、“杂芳氧基”、“杂环烷氧基”和“酰氧基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指定义为-OR的基团，其中R分别为烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂环烷基和酰基。术语“亚烷基氧基”是指二价基团-O-亚烷基-，-O-亚烷基-O-或-亚烷基-O-亚烷基-。术语“烷硫基”和“酰硫基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，是指基团-SR，其中R分别是烷基和酰基。当任何一个这些术语与修饰语“取代的”一起使用时，一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、$-NH_2$、$-NO_2$、$-CO_2H$、$-CO_2CH_3$、-CN、-SH、$-OCH_3$、$-OCH_2CH_3$、-C(O)CH_3、$-NHCH_3$、$-NHCH_2CH_3$、$-N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或$-S(O)_2NH_2$取代。术语“醇”对应如上定义的烷烃，其中氢原子中的至少一个已被替换为羟基。

[0374] 术语“烷基氨基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指基团-NHR，其中R为烷基，该术语定义如上。烷基氨基的非限制性实例包括$-NHCH_3$、$-NHCH_2CH_3$。术语“二烷基氨基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指基团-NRR′，其中R和R可以是相同或不同的烷基，或者R和R可以合起来代表亚烷基。二烷基氨基的非限制性实例包括：$-N(CH_3)_2$、$-N(CH_3)(CH_2CH_3)$和N-吡咯烷基。术语“烷氧基氨基”、“烯基氨基”、“炔基氨基”、“芳基氨基”、“芳烷基氨基”、“杂芳

基氨基”、“杂环烷基氨基”和“烷基磺酰基氨基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指定义为-NHR的基团，其中R分别为烷氧基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂环烷基和烷基磺酰基，这些术语定义如上。芳基氨基的非限制性实例为-NHC_6H_5。术语“酰氨基”(酰基氨基)在不与修饰语“取代的”一起使用时，指基团-NHR，其中R为酰基，该术语定义如上。酰氨基的非限制性实例为-NHC(O)CH_3。术语“烷基亚氨基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指二价基团＝NR，其中R为烷基，该术语定义如上。术语“亚烷基氨基”指二价基团-NH-亚烷基-、-NH-亚烷基-NH-、或-亚烷基-NH-亚烷基-。当任何一个这些术语与修饰语“取代的”一起使用时，一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。基团-NHC(O)OCH_3和-NHC(O)$NHCH_3$为取代的酰氨基的非限制性实例。

[0375] 术语“烷基磷酸酯基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指基团-OP(O)(OH)(OR)，其中R为烷基，该术语定义如上。烷基磷酸酯基团的非限制性实例包括-OP(O)(OH)(OMe)和-OP(O)(OH)(OEt)。术语“二烷基磷酸酯基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，指基团-OP(O)(OR)(OR′)，其中R和R′可以是相同或不同的烷基，或者R和R′可以合起来表示亚烷基。二烷基磷酸酯基团的非限制性实例包括-OP(O)$(OMe)_2$、-OP(O)(OEt)(OMe)和-OP(O)$(OEt)_2$。当任何一个这些术语与修饰语“取代的”一起使用时，一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。

[0376] 术语“烷基磺酰基”和“烷基亚磺酰基”在不与修饰语“取代的”一起使用时，分别指基团-S(O)$_2$R和-S(O)R，其中R为烷基，该术语定义如上。术语“烯基磺酰基”、“炔基磺酰基”、“芳基磺酰基”、“芳烷基磺酰基”、“杂芳基磺酰基”和“杂环烷基磺酰基”以类似的方式定义。当任何一个这些术语与修饰语“取代的”一起使用时，一个或更多个氢原子已独立地被-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH_2、-NO_2、-CO_2H、-CO_2CH_3、-CN、-SH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-C(O)CH_3、-$NHCH_3$、-$NHCH_2CH_3$、-$N(CH_3)_2$、-C(O)NH_2、-OC(O)CH_3、或-S(O)$_2NH_2$取代。

[0377] 本文所用“手性助剂”指可移除的手性基团，其能够影响反应的立体选择性。本领域技术人员熟悉此类化合物，并且许多是市售的。

[0378] 在权利要求书和/或说明书中当词语“一”或“一个”与术语“包括”结合使用时可指“一”，但它也与“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”，和“一个/种或多于一个/种”的意思一致。

[0379] 在本申请全文中，术语“约”用于表示该值包括测定该值所用设备、方法的固有误差，或是研究个体中所存在的偏差。

[0380] 术语“包含”、“具有”和“包括”为开放式连接动词。一个或更多个这些动物的任意形式或时态也为开放式。例如，“包含”、“具有”或“包括”一个或更多个步骤的任何方法并不限于仅具有所述的一个或更多个步骤，还涵盖了其他未列出的步骤。

[0381] 说明书和/或权利要求中所用的术语“有效的”，意为能够实现期望的、预期的或计划得到的结果。当在用化合物治疗患者或个体的背景下使用时，“有效量”、“治疗有效量”或“药物有效量”意为在向个体或患者施用以治疗疾病时足以对该疾病实现这种治疗的该化合物的量。

[0382] 术语“水合物”在作为化合物的修饰语使用时，意为此化合物中每个化合物分子与

少于一个(如半水合物)、一个(如一水合物)或多于一个(如二水合物)水分子缔合,比如所述化合物的固体形式。

[0383] 如本文所用,术语"IC_{50}"指的是为所获得的最大应答的50%的抑制性剂量。此定量量度表示需要多少特定的药物或其他物质(抑制剂),以抑制给定的生物学、生物化学或化学过程(或过程的组成部分,即酶、细胞、细胞受体或微生物)到其一半。

[0384] 第一化合物的"异构体"为独立的化合物,其中每种分子包含与第一化合物相同的原子组成,但这些原子在三维构型上不同。

[0385] 本文所用术语"患者"或"个体"指活的哺乳动物生物体,例如人、猴、牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠或其转基因物种。在某些实施方案中,患者或个体为灵长类。人类个体的非限制性实例为成年人、青少年、婴幼儿和胎儿。

[0386] 本文通常所用的"药学上可接受的"是指那些化合物、材料、组合物和/或剂型,它们在合理的医学判断范围内,适用于与人类和动物的组织、器官和/或体液接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0387] "药学上可接受的盐"是指本发明化合物的如上面所定义的药学上可接受的盐,并且其具有期望的药理学活性。这样的盐包括与无机酸或有机酸形成的酸加成盐,所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,所述有机酸例如1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、2-萘磺酸、3-苯基丙酸、4,4′-亚甲基双(3-羟基-2-烯-1羧酸)、4-甲基双环[2.2.2]辛-2-烯-1-羧酸、乙酸、脂肪族一元羧酸和二羧酸、脂肪族硫酸、芳香族硫酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环戊烷丙酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡糖酸、谷氨酸、乙醇酸、庚酸、己酸、羟萘甲酸、乳酸、十二烷基硫酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘康酸、邻(4羟基苯甲酰基)苯甲酸、草酸、对氯苯磺酸、苯基取代的链烷酸、丙酸、对甲苯磺酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、叔丁基乙酸、三甲基乙酸等。药学上可接受的盐还包括当存在的酸性质子能够与无机或有机碱反应时可形成的碱加成盐。可接受的无机碱包括氢氧化钠、碳酸钠、氢氧化钾、氢氧化铝和氢氧化钙。可接受的有机碱包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡糖胺等。应当认识到,形成本发明任何盐的一部分的具体的阴离子或阳离子并非关键,只要该盐作为整体是可药用的。药学上可接受的盐及其制备和使用方法的其他实例列于Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,and Use(P.H.Stahl和C.G.Wermuth主编,Verlag Helvetica Chimica Acta,2002)。

[0388] 本文所用术语"药学上可接受的载体"是指参与携带或运输化学试剂的药学上可接受的材料、组合物或载体,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,。

[0389] "预防"包括:(1)抑制疾病在个体或患者中发病,所述个体或患者可具有患病风险和/或易于患病但尚未经历或表现该疾病的任何或所有病理学或总症状;和/或(2)减缓疾病在个体或患者中病理学或总症状的发生,所述个体或患者可具有患病风险和/或易于患病但尚未经历或表现该疾病的任何或所有病理学或总症状。

[0390] "立体异构体"或"光学异构体"是给定化合物的异构体,其中同样的原子与同样的其他原子成键,但这些原子的三维构型不同。"对映体"是给定化合物的如左手与右手一样互为镜像的立体异构体。"非对映体"是给定化合物的不是对映体的立体异构体。手性分子中含有手性中心,也称为立体中心或立体产生中心,其为携带基团使得任何两个基团之互换导致立体异构体的分子中的任何点,而不一定是原子。在有机化合物中,手性中心通常是

碳、磷或硫原子，但其他原子也可能是有机和无机化合物的立体中心。一个分子可以有多个立体中心，赋予它许多立体异构体。在立体异构现象是由于四面体立体产生中心(例如，四面体碳)的化合物中，假想可能的立体异构体的总数目不会超过2n，其中n是四面体立体中心的数目。具有对称性的分子的立体异构体数目经常少于可能的最大数目。对映异构体的50∶50混合物称为外消旋混合物。或者，对映异构体的混合物可以对映体富集，使一种对映体的存在量大于50％。典型地，对映体和/或非对映体可以使用本领域已知的技术拆分或分离。预期对于尚未定义立体化学的手性的任何立体中心或轴，手性的立体中心或轴可以它的R形式、S形式、或者作为R与S形式的混合物存在，包括外消旋的混合物和非外消旋的混合物。本文所用短语“基本上不含其他立体异构体”是指所述组合物包含≤15％、更优选≤10％、甚至更优选≤5％、或最优选≤1％的其他立体异构体。

[0391] “治疗”包括：(1)抑制个体或患者所患疾病，所述个体或患者正经历或表现出该疾病的病理学或总症状(例如，阻止病理学和/或总症状的进一步发展)，(2)改善个体或患者所患疾病，所述个体或患者正经历或表现出该疾病的病理学或总症状(例如，使病理学和/或总症状逆转)，和/或(3)实现个体或患者所患疾病的任何可测量的减轻，所述个体或患者正经历或表现出该疾病的病理学或总症状。

[0392] 本文所用术语“核苷酸碱基”、“核碱基”或简称“碱基”指通常在核酸中发现的取代或未取代的含氮母体杂芳环，以及其天然的、取代的、修饰的或改造的变体或类似物。在一个典型实施方案中，核碱基能够与合适的互补核碱基形成Watson-Crick和/或Hoogsteen氢键。示例性核碱基包括但不限于：

[0393] 嘌呤类，如2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、腺嘌呤(A)、亚乙烯基腺嘌呤、N^6-Δ^2-异戊烯基腺嘌呤(6iA)、N^6-Δ^2-异戊烯基-2-甲基硫代腺嘌呤(2ms6iA)、N^6-甲基腺嘌呤、鸟嘌呤(G)、异鸟嘌呤、N^2-二甲基鸟嘌呤(dmG)、7-甲基鸟嘌呤(7mG)、2-硫代嘧啶、6-硫代鸟嘌呤(6sG)、次黄嘌呤和O^6-甲基鸟嘌呤；

[0394] 7-脱氮嘌呤类，如7-脱氮腺嘌呤(7-脱氮-A)、7-脱氮鸟嘌呤(7-脱氮-G)、7-脱氮-7-羟甲基腺嘌呤、7-脱氮-7-氨甲基腺嘌呤和7-脱氮-7-羟甲基鸟嘌呤；

[0395] 嘧啶类，如胞嘧啶(C)、5-丙炔基胞嘧啶、异胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶(HOMeC)、5-氨甲基-胞嘧啶、胸腺嘧啶(T)、4-硫代胸腺嘧啶(4sT)、5,6-二氢胸腺嘧啶、O^4-甲基胸腺嘧啶、尿嘧啶(U)、4-硫代尿嘧啶(4sU)、5-羟甲基尿嘧啶(HOMeU)、5-氨甲基-尿嘧啶和5,6-二氢尿嘧啶(二氢尿嘧啶；D)；

[0396] 吲哚类，如硝基吲哚和4-甲基吲哚；吡咯类，如硝基吡咯；水粉荤素(nebularine)；碱基(Y)等等。

[0397] 其他的示例性核碱基可在Lehninger，2005中找到，该文献及其中引用的文献通过引用并入本文。

[0398] 本文所用术语“核苷”指由与五碳糖结合之核碱基构成的葡基胺，所述五碳糖通常为核糖或脱氧核糖。其实例包括但不限于：胞苷、2’-脱氧胞苷、5-羟甲基胞苷、2’-脱氧-5-羟甲基胞苷、5-氨甲基胞苷、2’-脱氧-5-氨甲基胞苷、尿苷、2’-脱氧尿苷、5-羟甲基尿苷、2’-脱氧-5-羟甲基尿苷、5-氨甲基尿苷、2’-脱氧-5-氨甲基尿苷、腺苷、2’-脱氧腺苷、7-脱氮-7-羟甲基腺苷、2’-脱氧-7-脱氮-7-羟甲基腺苷、7-脱氮-7-氨甲基腺苷、2’-脱氧-7-脱氮-7-氨甲基腺苷、鸟苷、2’-脱氧鸟苷、7-脱氮-7-羟甲基鸟苷、2’-脱氧-7-脱氮-7-羟甲基、

7-脱氮-7-氨甲基鸟苷、2'-脱氧-7-脱氮-7-氨甲基鸟苷、胸苷和2'-脱氧胸苷。

[0399] “核苷酸”由具有一个、两个、三个或更多个磷酸酯基团的核苷组成，所述磷酸酯基团呈链状与核苷上的五碳糖结合。

[0400] 术语“相移”是指在逐步添加方法(包括但不限于CRT、SNA和SBL方法)中当增长的引物对于任何给定的循环失去同步性时发生的现象。滞后链或2型相移(例如由预期循环的n-1)由不完全的延伸导致，而前导链或1型相移(例如n+1)由一群相同的模板中加入多个核苷酸或探针造成。

[0401] 术语“暗色核苷酸”或“暗探针”是指不包含荧光标记的核苷酸或探针。其可以从它的裂解产生并从上一循环保留下来，或来自从当前循环中的染料标记的对应物的原位水解。

[0402] 除非另有说明，否则“接头”指一个或更多个二价基团(连接组分)，其功能是作为两个其他基团之间的共价结合分子桥。接头可包含一个或更多个连接组分以及一种或更多种类型的连接组分。示例性连接组分包括：-C(O)NH-、-C(O)O-、-NH-、-S-、-S(O)$_n$-(其中n为0、1或2)、-O-、-OP(O)(OH)O-、-OP(O)(O^-)O-、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、杂亚芳基、或其组合。一些接头具有悬垂式侧链或悬垂式官能团(或两者兼备)。此类悬垂式部分的实例为亲水性修饰物，例如增溶基团，如-SO_3H或-SO_3^-。在一些实施方案中，接头可将报告基团与另一部分连接起来，如化学或酶学反应基团(例如可切割或不可切割的终止部分)。在另一些实施方案中，接头将报告基团连接至生物和非生物组分上，如核碱基、核苷或核苷酸。在另一些实施方案中，接头将化学反应性基团连接至核碱基、核苷或核苷酸上。由接头与报告基团相键合而形成的部分可命名为-L-报告基团。取决于诸如待连接分子和进行链合成方法所用条件等因素，可以改变接头的长度和组成，以优化特性，如稳定性、长度、FRET效率、对特定化学物质的抗性和/或温度参数；并具有足够的立体选择性或大小，以将标签有效连接至核苷酸上，从而使生成的缀合物可用于优化聚合反应。可通过标准化学技术运用接头，并包括但不限于：用于将标签连接至核苷酸的胺类接头(参见如Hobbs和Trainor，美国专利5,151,507，通过引用并入本文)；用于将标签有效连接至核苷酸的通常包含伯胺或仲胺的接头；以及加入核苷酸碱基中的刚性烃臂(参见如Service，1998，通过引用并入本文)。用于将报告基团连接至碱基分子的一些示例性连接方法学由美国专利4,439,356和5,188,934、欧洲专利申请87310256.0、国际申请PCT/US90/05565以及Barone等，2001提供，其各自通过引用整体并入本文。

[0403] “可切割接头”为具有一个或更多个可切割基团的接头，所述可切割基团可因某反应或条件而断裂。术语“可切割基团”指允许一部分(例如荧光或发荧光的部分)被释放的部分。此类切割通常为化学、光化学或酶介导的切割。示例性可酶切割基团包括磷酸酯基或通过肽键连接的基团。

[0404] 本文所用术语“IC_{50}”指(但不限于)核苷酸类似物在掺入引物-模板复合物时产生等摩尔数底物和产物时的核苷酸类似物浓度，和/或可定义为(但不限于)通过测定化合物掺入一半引物-模板复合物时的浓度来测量的掺入效率。

[0405] 本文所用术语“寡核苷酸”是指具有2至200个共价连接的核苷酸的DNA片段。

[0406] 如本文所用，“报告基团”是指其能够直接或间接产生可检测的信号的化学部分。报告基团的实例包括荧光染料基团、放射性标记或通过化学发光或生物发光方式产生信号

的基团。荧光染料基团的实例包括氧杂蒽(zanthene)、荧光素、罗丹明、BODIPY、花青、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白、ALEXA FLUOR ® 350、ALEXA FLUOR ® 405、ALEXA FLUOR ® 430、ALEXA FLUOR ® 488、ALEXA FLUOR ® 514、ALEXA FLUOR ® 532、ALEXA FLUOR ® 546、ALEXA FLUOR ® 555、ALEXA FLUOR ® 568、ALEXA FLUOR ® 568、ALEXA FLUOR ® 594、ALEXA FLUOR ® 610、ALEXA FLUOR ® 633、ALEXA FLUOR ® 647、ALEXA FLUOR ® 660、ALEXA FLUOR ® 680、ALEXA FLUOR ® 700、ALEXA FLUOR ® 750和方酸菁染料。可以在本发明的一些实施方案中使用的荧光染料基团的其他实例在本说明书和Haugland,2005以及美国专利4,439,356和5,188,934(通过引用并入本文)中公开。可以在本发明一些实施方案中用作报告基团的放射性标记物的实例是本领域所熟知的,如^{35}S、^{3}H、^{32}P、或^{33}P。通过化学发光或生物发光的方法实现报告基团的功能并可在本发明一些实施方案中作为报告基团使用的实例描述在Nieman,1989;Given和Schowen,1989;Orosz等,1996和Hastings,1983中,其以引用的方式并入本文。

[0407] 本文所用术语“模板”可指用作DNA合成(掺入)互补链的寡核苷酸,或者是由已知区域组成的重组DNA分子,其通常为可与通用引物结合的载体(vector)或适配体序列,以及通常为待测序的未知部分的靶序列。

[0408] 术语“片段模板”是指已由随机剪切基因组DNA成为小于1kb的小尺寸并将适配体连接至片段两端的片段库。这些模板需要的DNA通常少于伴侣配对库会需要的DNA。

[0409] 术语“伴侣配对模板”指的是基因组库,其已通过环化被剪切为选定成指定大小(实例包括2kb或5kb或10kb或20kb或任何其他期望大小)的片断化DNA,因而使之前彼此远离的末端紧密接近得到。将这些圆环切割成线性DNA片段产生伴侣配对的模板。

[0410] 本文所用术语“引物”指与用于起始DNA合成(掺入)的模板链(通常是已知的序列)上的互补序列杂交的寡核苷酸。

[0411] 从科技意义上说,本文所用术语“掺入”指与模板链形成互补碱基对并通过聚合酶与引物链形成共价键的核苷酸或核苷酸类似物。引物-模板复合物从起始引物链开始延伸一个或更多个碱基。

[0412] 本文所用术语“切割”指终止性基团通过光切割、酶切割等而被移除。

[0413] 本文所用术语“掺入循环”指通过聚合酶掺入核苷酸或核苷酸类似物、检测和鉴定所述核苷酸或核苷酸类似物,以及在核苷酸类似物情况下自所述类似物切割终止基团,以及荧光染料基团(如果开始就在核苷酸类似物上存在)。

[0414] 本文所用术语“错误掺入”指与模板链形成非互补碱基对并通过聚合酶与引物形成共价键的核苷酸或核苷酸类似物。引物-模板复合物从起始引物链开始延伸一个或更多个碱基。

[0415] 本文所用术语“区别”指核苷酸或核苷酸类似物通过聚合酶错误掺入与掺入之间的IC_{50}浓度差异。

[0416] 本文所述术语“终止”指掺入与模板链形成互补或非互补碱基对并通过聚合酶与引物形成共价键的核苷酸或核苷酸类似物。引物-模板复合物在任一给定掺入循环中仅从

起始引物链或增长的引物链延伸一个碱基。

[0417] 本文所用的术语“终止部分”和“终止基团”是同义的，是指当连接至核苷(即糖或核碱基)或核苷酸(即糖、核碱基或磷酸酯基团)的至少一部分时赋予该核苷或核苷酸实质性的终止性质的小化学基团(例如，<500道尔顿，不包括任何修饰，如接头或接头/染料)。在一些实施方案中，终止部分进一步被接头和/或连有染料的接头修饰。在优选的实施方案中，这种经修饰的终止部分的终止性质基本上没有改变。

[0418] 本文所用术语“DT_{50}”指在切割引物-模板复合体中所掺入碱基类似物的50％所需的时间量。

[0419] 本文所用术语“类似物”可理解为这样的物质，其结构中不包含与“给定化合物”相同的基本碳骨架和碳功能性，但能够通过掺入一个或更多个适当的替换(例如将碳替换成杂原子)而模拟给定化合物。

[0420] 以上定义代替通过引用并入本文的任何参考文献中的任何冲突的定义。然而，对某些术语进行定义这一事实不应该被认为是表示任何未定义的术语就是不确定的。相反，相信所使用的所有术语都明确描绘了本发明，使普通技术人员能够领会本发明的范畴并实践。

[0421] V.实施例

[0422] 包括了以下实施例以展示本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解，下文实施例中所公开的技术代表了发明人所发现在本发明实施中良好应用的技术，因此可以认为构成了其实施的优选模式。然而，本领域技术人员会理解，基于本公开内容，可对所公开的具体实施方案做出许多修改，同时仍然能够得到同样或相似的结果，而不背离本发明的精神和范畴。

[0423] 实施例1-方法与材料

[0424] 试剂与材料。除非另有注释，所有试剂从商业渠道购得并且直接使用。

[0425] 光谱和分析仪器。^{1}H NMR、^{13}C NMR和^{31}P NMR谱如之前Wu等(2007)(通过引用并入本文)中所述用Bruker DPX400光谱仪测定。质谱分析由MD安德森癌症中心(MD Anderson Cancer Center)(Houston，TX)质谱实验室(Mass Spectrometry Laboratory)和莱斯大学(Rice University)(Houston，TX)质谱研究中心(Core Mass Spectrometry Facility)提供。X射线晶体结构分析由得克萨斯农工大学(Texas A&M University)(College Station，TX)X射线衍射实验室完成。使用Beckman DU-800分光光度计进行了UV/Vis测量。阴离子交换层析在Q Sepharose FF柱(2.5x20cm)上用240分钟内从25％乙腈/75％三乙基碳酸氢铵(TEAB，0.1M)至25％乙腈/75％TEAB(1.5M)的线性梯度以4.5mL/min的流速进行。反相高效液相色谱(RP-HPLC)使用配有128型溶剂模块和166型UV检测器或168型光电二极管阵列UV/Vis检测器的Beckman System Gold进行。使用4.6mm×250mm的Aquapore OD-300C_{18}柱进行了核苷和核苷酸类似物的RP-HPLC，缓冲液A含有100mM三乙基乙酸铵(TEAA)，pH7.0，并且缓冲液B含有100mM TEAA，pH7.0，70％乙腈(v/v)。

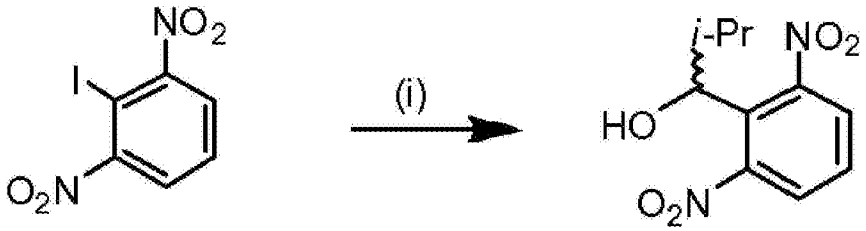
[0426] 实施例2-α-取代的2-硝基苄基醇类的合成

[0427] (R/S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇：(R/S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成曾经被报道过。见Litosh等(2011)，通过引用并入本文。

[0428] (R/S)-1-(2-硝基苯基)-2，2-二甲基-1-丙醇：(R/S)-1-(2-硝基苯基)-2，2-二甲

基-1-丙醇的合成曾经被报道过。见Litosh等(2011),通过引用并入本文。

[0429] (R/S)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇:

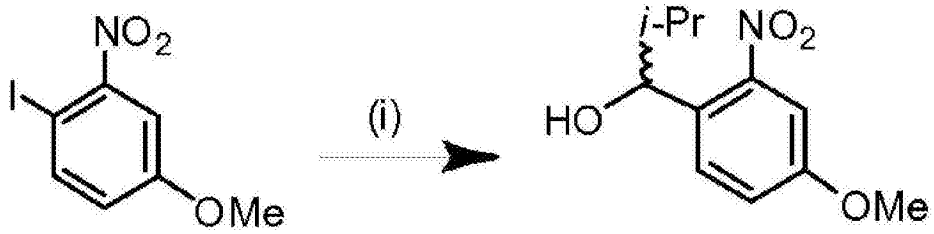
[0430] 

1-碘-2,6-二硝基苯 (*R/S*)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇

[0431] 方案S1.(R/S)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成。试剂和条件:(i)PhMgBr,THF,零下50℃;i-PrCHO,零下50℃至室温,30%。

[0432] 在氮气气氛中于零下50℃下向1-碘-2,6-二硝基苯(Smith和Ho,1990,通过引用并入本文)(1.55g,5.27mmol)的无水四氢呋喃(18mL)溶液中,以使得温度不超过零下45℃的速度滴加溴化苯镁(2M溶于THF,3.2mL,6.4mmol)。加完后于零下50℃下搅拌混合物5分钟,然后加入异丁醛(0.96mL,11mmol)。将混合物逐渐温热至室温,用饱和NH_4Cl溶液(10mL)猝灭,然后用水(50mL)稀释。将混合物用二氯甲烷(100mL)萃取3次。合并的有机相用盐水(50mL)清洗,经由Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以产生黄色油状的(R/S)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(0.375g,30%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.82(d,2H,J=8.0Hz,Ph-H),7.59(t,1H,J=8.0Hz,Ph-H),4.83(dd,1H,J=9.2和7.6Hz,Ph-CH),2.87(d,1H,J=7.6Hz,OH),2.19(m,1H,CH),1.12(d,3H,J=6.4Hz,CH_3),0.76(d,3H,J=6.8Hz,CH_3)。

[0433] (R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇:

[0434] 

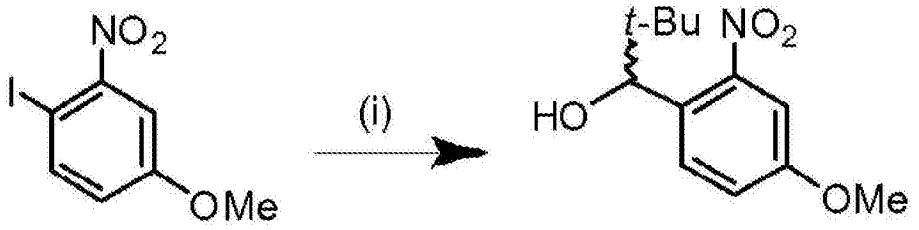
4-碘-3-硝基苯甲醚 (*R/S*)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇

[0435] 方案S2.(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成。试剂和条件:(i)PhMgCl,THF,零下40℃;i-PrCHO,零下40℃至室温,67%。

[0436] 在氮气气氛中向零下40℃的4-碘-3-硝基苯甲醚(2.79g,10.0mmol)的无水四氢呋喃(20mL)溶液中,以保持温度为零下35℃或更低的速度滴加氯化苯镁(2M溶于THF,6.0mL,12mmol)。加完后搅拌混合物5分钟,然后加入异丁醛(1.8mL,20mmol)。混合物逐渐温热至室温,用饱和NH_4Cl溶液(5.0mL)猝灭后稀释于二氯甲烷(100ml),然后用水(100mL)清洗。分离有机相,将水层用二氯甲烷(50mL)萃取3次。合并有机相,用盐水(40mL)清洗,经由Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以产生淡黄色油状的(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝

基苯基)-2-甲基-1-丙醇(1.5g,67%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.61(d,1H,J=8.8Hz,Ph-H),7.34(d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),7.15(dd,1H,J=8.8Hz和2.8Hz,Ph-H),4.92(dd,1H,J=5.6和3.2Hz,Ph-CH),2.46(br s,1H,OH),2.00(m,1H,CH),0.97(d,3H,J=6.4Hz,CH_3),0.86(d,3H,J=6.8Hz,CH_3)。

[0437] (R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇:

[0438] 

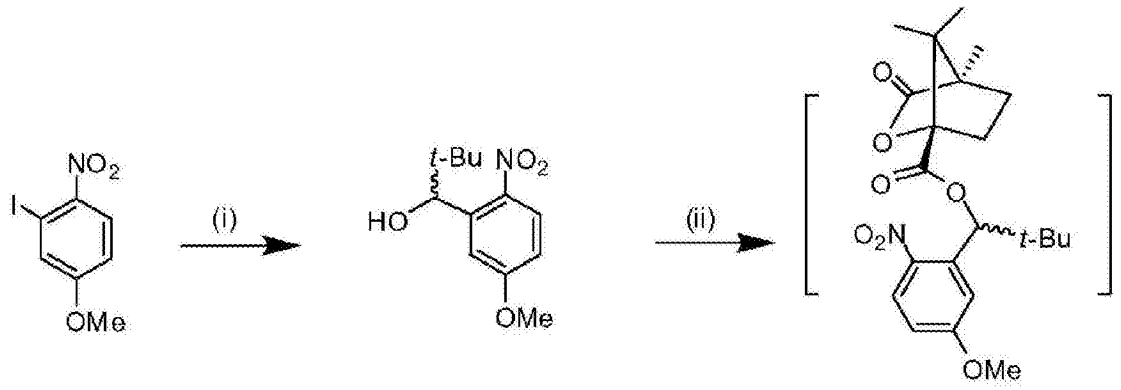
4-碘-3-硝基苯甲醚 (*R/S*)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇

[0439] 方案S3.(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成。试剂和条件:(i)PhMgCl,THF,零下40℃;$(CH_3)_3CCHO$,零下40℃至室温,74%。

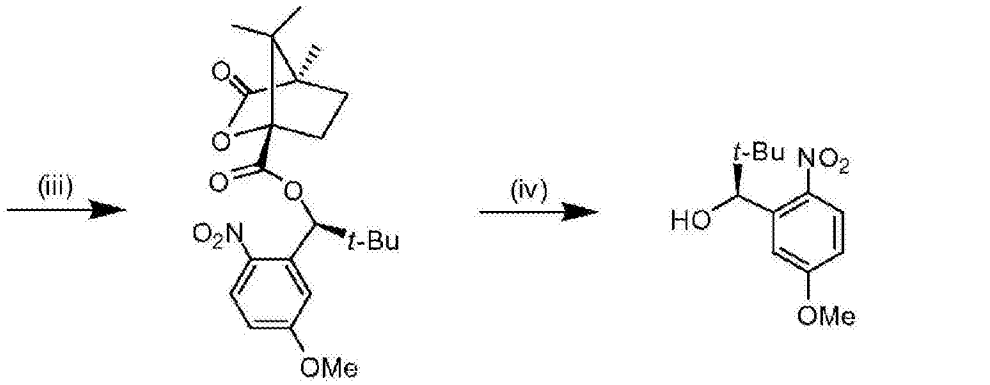
[0440] 在氮气气氛中向零下40℃的4-碘-3-硝基苯甲醚(2.38g,8.50mmol)的无水四氢呋喃(10mL)溶液中,以保持温度为零下35℃或更低的速度滴加氯化苯镁(2M溶于THF,4.7mL,9.4mmol)。加完后在零下40℃下搅拌混合物1小时,然后加入三甲基乙醛(1.13mL,10.2mmol)。混合物在零下40℃下搅拌2小时然后在室温下再搅拌1小时。反应用盐水(100mL)猝灭,混合物用二氯甲烷(40mL)萃取3次。合并有机相,经由Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以产生外消旋(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(1.52g,74%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.67(d,1H,J=9.2Hz,Ph-H),7.22(d,1H,J=2.4Hz,Ph-H),7.12(dd,1H,J=8.8Hz和2.8Hz,Ph-H),5.27(d,1H,J=4.0,Ph-CH),3.86(s,3H,OCH_3),2.01(d,1H,J=4.0,OH),0.86(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0441] (R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇

[0442]



3-碘-4-硝基苯甲醚 **(*R/S*)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇** **(*R/S*)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1*S*)-莰烷酸酯**



(*S*)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1*S*)-莰烷酸酯 **(*S*)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇**

[0443] 方案S4.(R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成。试剂和条件:(i)PhMgCl,无水THF,零下40℃;$(CH_3)_3CCHO$,零下40℃至室温,88%;(ii)(1S)-莰烷酰氯,DMAP,二氯甲烷,室温;(iii)乙酸乙酯/己烷中分步结晶,43%;(iv)K_2CO_3,MeOH,回流,99%。

[0444] 在氮气氛围下向零下40℃的3-碘-4-硝基苯甲醚(2.79g,10.0mmol)的无水THF(10mL)溶液中以使温度不超过零下35℃的速率逐滴加入氯化苯镁(2M THF溶液,4.2mL,8.3mmol)。加完后在零下40℃搅拌混合物2小时,然后加入三甲基乙醛(1.1mL,10.0mmol)。将混合物在零下40℃搅拌2小时,然后在室温下再搅拌1小时。将反应用盐水(100mL)猝灭,混合物用二氯甲烷(40mL)萃取三次。合并的有机相用Na_2SO_4干燥,并真空浓缩。残余物用硅胶柱层析纯化以产生外消旋(R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(1.76g,88%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.89(dd,1H,J=9.2Hz,Ph-H),7.27(dd,1H,J=2.8Hz,Ph-H),6.84(dd,1H,J=8.8和2.8Hz,Ph-H),5.62(d,1H,J=4.0Hz,Ph-CH),3.89(s,3H,OCH_3),2.08(d,1H,J=4.0Hz,OH),0.89(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0445] 将(1S)-莰烷酰氯(Corrie等,1992,通过引用并入本文)(2.6g,12mmol)加入(R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(1.75g,7.3mmol)和DMAP(2.92g,

23.9mmol)的无水二氯甲烷(10mL)中。混合物在室温下氮气气氛中搅拌过夜。反应混合物用二氯甲烷(50ml)稀释,并用饱和$NaHCO_3$溶液(50ml)清洗。有机相用Na_2SO_4干燥,真空浓缩。残余物用硅胶柱层析纯化以产生(R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-茨烷酸酯(2.5g,85%,非对映体的1∶1混合物)。将该茨烷酸酯溶于乙酸乙酯(30mL)中,然后边搅拌边缓慢地加入己烷(120ml)。针状晶体在两小时内逐渐从溶液中析出。过滤收集晶体以得到纯的单一非对映异构体(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-茨烷酸酯。将滤液真空浓缩并将结晶过程重复两次以提供另外的(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-茨烷酸酯(共计1.08g,43%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.04(d,1H,J=9.2Hz,Ph-H),7.27(d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),6.88(dd,1H,J=2.8和8.8Hz,Ph-H),6.81(s,1H,Ph-H),3.87(s,3H,OCH_3),2.36(m,1H,CH),1.92(m,2H,CH_2),1.66(m,1H,CH),1.12(s,3H,CH_3),1.06(s,3H,CH_3),1.02(s,3H,CH_3),0.95(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0446] 获得X射线晶体学数据的方法:晶体学测量如Litosh等(2011)所述(通过引用并入本文)在尺寸为0.50mm x0.05mm x0.05mm的(S)-1-(5-甲氧基-2硝基苯基)-2,2-二甲基-丙基(1S)-茨烷酸酯晶体上进行。见图3。

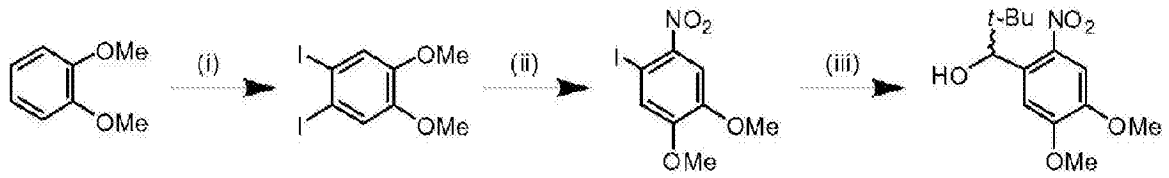
[0447] 数据收集:CuKα辐射,**λ = 1.54178 Å**,T=110±2°K,$2\theta_{max}$=120.0°,收集了32,513个反射,2,913个独特反射(R_{int}=0.0517)。最终GooF=1.091,R1=0.0681,wR2=0.1695,R指数基于2,913个I>2σ(I)的反射(用F^2校正),290个参数,43限制。应用Lp和吸收校正,μ=0.819mm^{-1}。绝对结构参数=0.05±0.09.

[0448] X射线晶体学数据:$C_{22}H_{29}NO_7$,M=419.46。正交晶系,a=6.29,b=15.00,**c = 22.27 Å** (α,β,γ=90°),**V = 2,099.29 Å^3**,空间群$P2_12_12_1$,Z=4,D_c=1.327g/cm^3,F(000)=896。

[0449] 将含(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-茨烷酸酯(590mg,1.4mmol)与K_2CO_3(389mg,2.8mmol)之混合物的甲醇(MeOH,25mL)加热回流1小时,然后冷却,真空浓缩,并用二氯甲烷(50mL)稀释。将有机相用盐水(50mL)清洗,经Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以产生对映体纯的(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(333mg,99%)。^1H NMR与外消旋醇的^1H NMR相同。

[0450] (R/S)-1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇:

[0451]



1,2-二甲氧基苯 **4,5-二碘-1,2-二甲氧基苯** **4-碘-5-硝基-1,2-二甲氧基苯** **(R/S)-1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇**

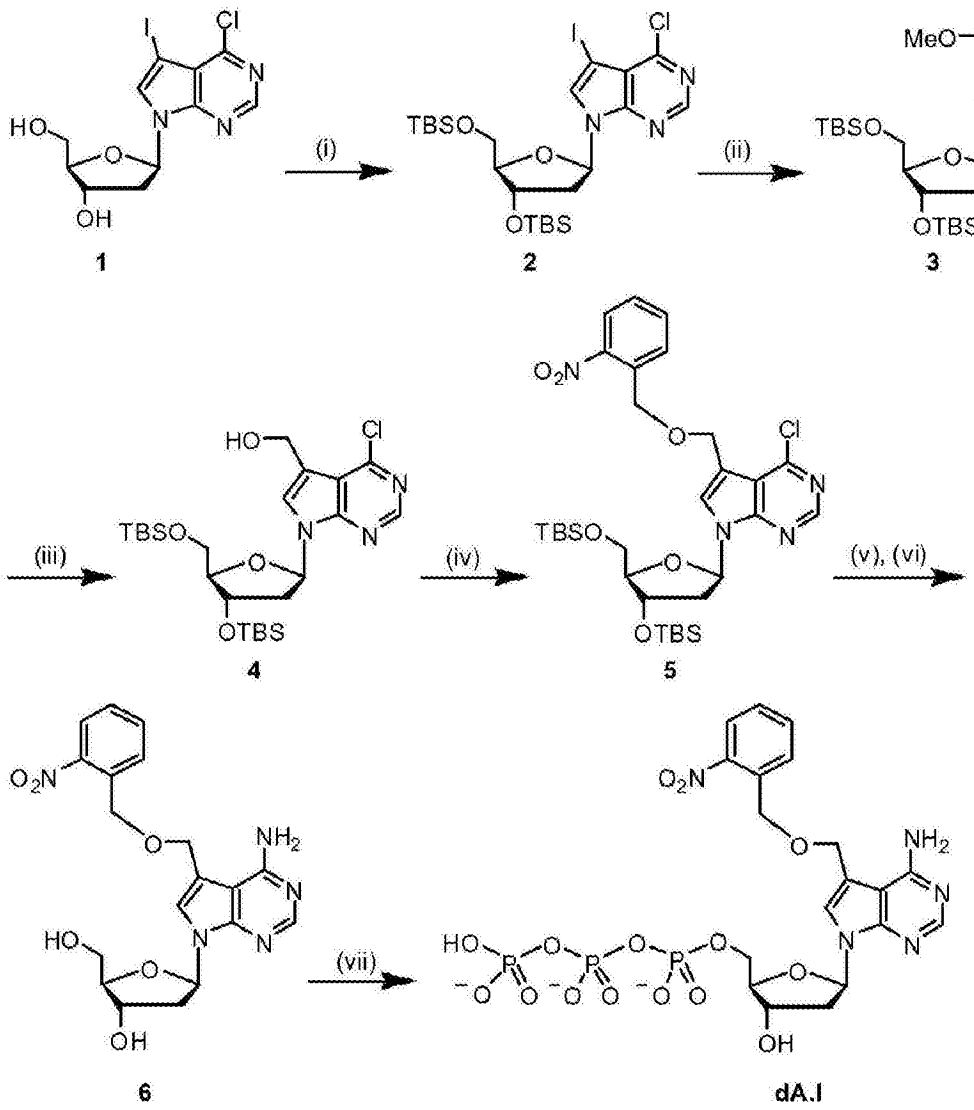
[0452] 方案5.(R/S)-1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成。试剂和条件:(i)ICl,CH_3COOH,100℃,62%;(ii)HNO_3,CH_3COOH,室温,75%;(iii)PhMgCl,THF,零下40℃;$(CH_3)_3CCHO$,零下40℃至室温,20%。

[0453] 将1,2-二甲氧基苯(5.0g,36mmol)溶于乙酸(10mL)中,并将溶液在冰水浴中冷却,然后滴加氯化碘(8.7g,54mmol)。10分钟后,将反应混合物加热至100℃保持2小时,然后冷却至室温。过滤从溶液中析出的针状晶体并用乙酸(5.0ml)洗三次。将晶体在高真空下干燥过夜,得到4,5-二碘-1,2二甲氧基苯(8.8g,62%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.28(s,2H,Ph-H),3.85(s,6H,OCH_3)。

[0454] 向乙酸(300mL)中加入4,5-二碘-1,2-二甲氧基苯(8.8g,23mmol)并将混合物加热至100℃以溶解固体。然后将澄清混合物冷却至室温,再滴加硝酸(68%至70%,120ml)。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后倒入冰水中(200ml)。将混合物用二氯甲烷(100ml)萃取3次。将合并的有机相用饱和$NaHCO_3$溶液(200ml)、盐水(100mL)清洗,经Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以产生4-碘-5-硝基-1,2二甲氧基苯(5.25g,75%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.60(s,1H,Ph-H),7.38(s,1H,Ph-H),3.98(s,3H,OCH_3),3.92(s,3H,OCH_3)。

[0455] 在氮气氛围下向零下40℃的4-碘-5-硝基-1,2二甲氧基苯(4.6g,15mmol)的无水THF(10mL)溶液中以使温度不超过零下35℃的速率逐滴加入氯化苯镁溶液(2M THF溶液,7.5mL,15mmol)。加完后在零下40℃搅拌混合物2小时,然后加入三甲基乙醛(2.0mL,18mmol)。将混合物在零下40℃搅拌2小时,然后在室温下再搅拌1小时。反应用盐水(100mL)猝灭,混合物用二氯甲烷(40mL)萃取三次。合并的有机相用Na_2SO_4干燥,并真空浓缩,残余物用硅胶柱层析纯化以产生外消旋的(R/S)-1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(0.8g,20%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.41(s,1H,Ph-H),7.21(s,1H,Ph-H),5.60(s,1H,PhCH),3.95(s,3H,OCH_3),3.92(s,3H,OCH_3),0.90(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0456] 实施例3-7-HOMe-7-脱氮-2'-脱氧腺苷三磷酸酯类似物的合成7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯

[0457] 

[0458] 方案S6.7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)TBSCl,咪唑,DMF,室温,87%;(ii)CO,$PdCl_2[PhCN]_2$,MeOH/1,4-二氧六环,50℃,98%;(iii)$LiBH_4$,MeOH,THF,回流,45%;(iv)2-硝基苄基溴,n-Bu_4NBr,CH_2Cl_2/NaOH水溶液,室温,50%;(v)n-Bu_4NF,THF,0℃至室温;(vi)NH_3,1,4-二氧六环/MeOH,100℃,两步法,91%;(vii)$POCl_3$,$(MeO)_3PO$,零下40℃;(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0459] 将化合物1(Seela等(2005),通过引用并入本文)(0.79g,2.0mmol)从无水吡啶(2.0mL)中蒸发三次,溶于无水DMF(4.0mL)。加入叔丁基二甲基甲硅烷基氯(0.90g,6.0mmol)和咪唑(0.82g,12mmol),并将混合物在室温下搅拌16小时。将反应物真空浓缩并用硅胶层析纯化,以产生白色泡沫状9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-碘-7-脱氮嘌呤2(1.08g,87%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.61(s,1H,H-2),7.81(s,1H,H-8),6.74(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),4.56(m,1H,H-4'),4.01(m,1H,H-3'),3.87(dd,1H,H-5'a),3.79(dd,1H,H-5'b),2.39(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.96(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.91(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.18(2s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.15(s,6H,$(CH_3)_2Si$)。

[0460] 向化合物2(1.55g,2.48mmol)的无水1,4-二氧六环(42mL)和无水甲醇(42mL)溶液中加入三乙胺(0.87mL)。在CO气氛中搅拌10分钟后,加入双(苄腈)二氯钯(II)(0.05g,

0.13mmol)，并将反应物在CO气氛中于50℃下搅拌48小时。然后将混合物真空浓缩，并将残余物用硅胶层析纯化以产生粘稠油状9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-甲氧羰基-7-脱氮嘌呤3(1.36g,98%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)：δ 8.69(s,1H,H-2)，8.31(s,1H,H-8)，6.77(t,1H,J=6.8Hz,H-1')，4.58(m,1H,H-4')，4.06(m,1H,H-3')，3.90(s,3H,CH_3O)，3.87(dd,1H,H-5'a)，3.81(dd,1H,H-5'b)，2.42(m,2H,H-2'a和H-2'b)，0.93(s,18H,$(CH_3)_3CSi$)，0.13(s,6H,$(CH_3)_2Si$)，0.12(s,6H,$(CH_3)_2Si$)。

[0461] 向化合物3(0.28g,0.50mmol)的无水THF(4mL)溶液中加入硼氢化锂(44mg,2.0mmol)，然后加入甲醇(0.1mL)。将反应混合物在室温下搅拌10分钟，然后加热回流45分钟。冷却至室温后，将混合物用二氯甲烷(20ml)和水(2.0mL)稀释。分离有机层，用盐水(5.0mL)清洗两次，经硫酸钠干燥，并真空浓缩。残余物用硅胶层析纯化以产生白色泡沫状9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-羟甲基-7-脱氮嘌呤4(0.12g,45%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)：δ8.62(s,1H,H-8)，7.61(s,1H,H-2)，6.75(dd,1H,J=6.0和7.2Hz,H-1')，4.96(AB d,1H,J=11.6Hz,7-CH_2a)，4.91(AB d,1H,J=11.6Hz,7-CH_2b)，4.57(m,1H,H-4')，4.00(m,1H,H-3')，3.80(m,2H,H-5'a和H-5'b)，2.44(m,1H,H-2'a)，2.04(m,1H,H-2'b)，0.91(2s,18H,$(CH_3)_3CSi$)，0.11(2s,12H,$(CH_3)_2Si$)。

[0462] 向化合物4(30mg,0.057mmol)的CH_2Cl_2(2.0mL)溶液中加入n-Bu_4NBr(9mg,0.029mmol)、2-硝基苄基溴(37mg,0.17mmol)和NaOH溶液(1M,2.0mL)。将反应混合物在室温下暗处剧烈搅拌48小时。分离有机层，经Na_2SO_4干燥，真空浓缩，并用硅胶层析纯化残余物，以产生粘稠油状9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤5(19mg,50%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)：δ8.63(s,1H,H-2)，8.06(dd,1H,J=8.4和1.2Hz,Ph-H)，7.84(d,1H,J=7.6Hz,Ph-H)，7.64(s,1H,H-8)，7.62(m,1H,Ph-H)，7.43(t,1H,Ph-H)，6.75(dd,1H,J=7.2和6.0Hz,H-1')，5.03(s,2H,$PhCH_2$)，4.95(AB d,1H,J=12.0Hz,7-CH_2a)，4.88(AB d,1H,J=12.0Hz,7-CH_2b)，4.59(m,1H,H-4')，4.00(m,1H,H-3')，3.80(m,2H,H-5'a和H-5'b)，2.48(m,1H,H-2'a)，2.37(m,1H,H-2'b)，0.92(2s,18H,$(CH_3)_3CSi$)，0.11(s,6H,$(CH_3)_2Si$)，0.10(s,6H,$(CH_3)_2Si$)。

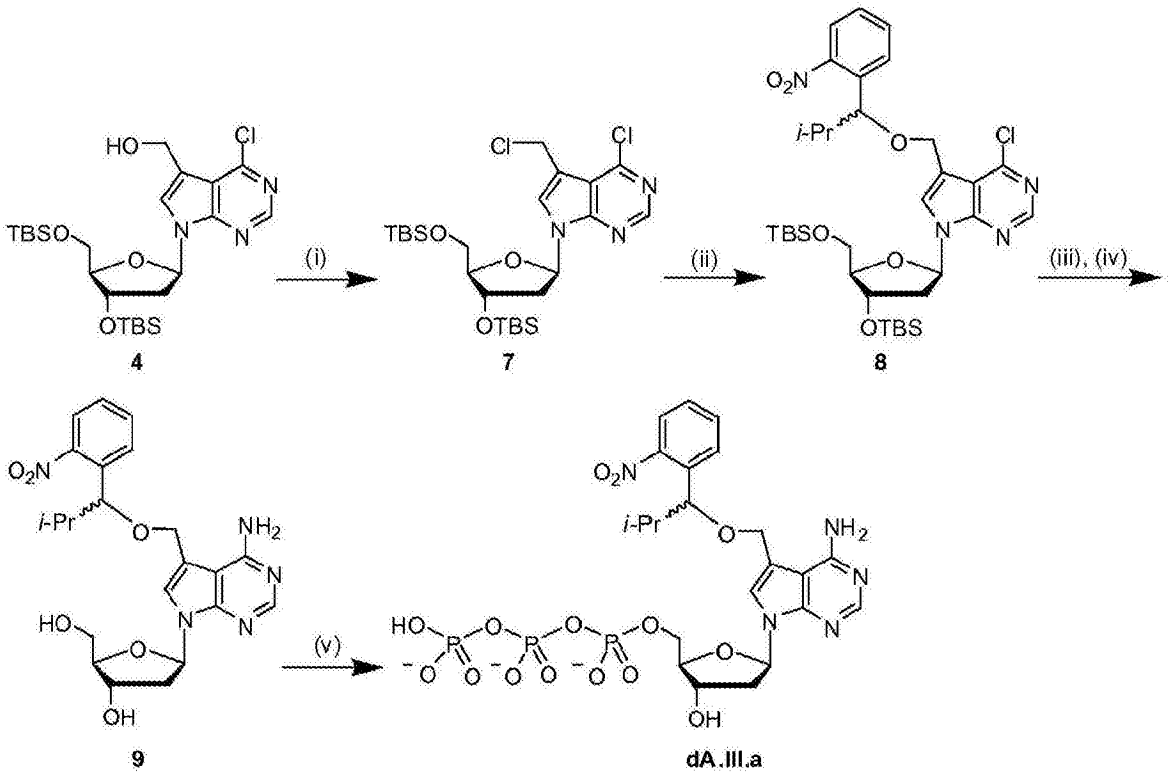
[0463] 0℃下将n-Bu_4NF(17mg,0.054mmol)的THF(1.0mL)溶液加入化合物5(18mg,0.028mmol)的THF(1.0mL)溶液中。将反应混合物逐渐温热至室温，搅拌2小时。将混合物真空浓缩，溶于1,4-二氧六环(2.0mL)，随后加入NH_3的甲醇溶液(7M,4.0mL)。将混合物转移至密封管，并在100℃下搅拌16小时，然后冷却至室温，真空浓缩，并将残余物用硅胶层析纯化，以产生白色泡沫状7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷6(10mg,91%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)：δ8.08(s,1H,H-2)，8.06(m,1H,Ph-H)，7.75(m,2H,Ph-H)，7.58(m,1H,Ph-H)，7.42(s,1H,H-8)，6.64(bs,2H,可交换D_2O,6-NH_2)，6.48(dd,1H,J=2.0和6.0Hz,H-1')，5.25(d,1H,J=4.0Hz,可交换D_2O,3'-OH)，5.08(t,1H,J=5.6Hz,可交换D_2O,5'-OH)，4.90(s,2H,$PhCH_2$)，4.75(AB dd,2H,7-CH_2)，4.33(m,1H,H-3')，3.81(m,1H,H-4')，3.54(m,2H,H-5'a和H-5'b)，2.47(m,1H,H-2'a)，2.15(m,1H,H-2'b)。

[0464] 在氮气氛围，零下40℃下用含$POCl_3$(2.6μL,0.028mmol)和质子海绵(6mg,0.028mmol)的磷酸三甲酯(0.25mL)将化合物6(6mg,0.014mmol)磷酸化4小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(66mg,0.14mmol)和三正丁胺(28μL)的无水DMF(0.28mL)溶液。搅拌30分钟后，加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;1.0mL)。将反应物在室温下搅拌1小时，然后真

空浓缩。将残余物溶于水(2.0mL)中,过滤,并使用RP-HPLC(见上文)纯化,以产生7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯dA.I。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{19}H_{23}N_5O_{15}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为654.0403,测得质量为654.0397。

[0465] 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯

[0466]



[0467] 方案S7.7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)TsCl,DMAP,CH_2Cl_2,室温,39%;(ii)外消旋(R/S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇,无水(neat),105℃,54%;(iii)n-Bu_4NF,THF,0℃至室温;(iv)NH_3,1,4-二氧六环/MeOH,100℃,两步法,76%;(v)$POCl_3$,$(MeO)_3PO$,零下40℃至0℃;$(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0468] 向化合物4(0.26g,0.49mmol)的无水二氯甲烷(12mL)溶液中加入4-二甲基氨基吡啶(DMAP,0.15g,1.2mmol)和对甲苯磺酰氯(0.11g,0.58mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,然后真空浓缩。残余物用硅胶层析纯化,以产生粘稠油状9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-氯甲基-7-脱氮嘌呤7(0.103g,39%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.64(s,1H,H-2),7.72(s,1H,H-8),6.73(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),4.95(AB d,J=12.4Hz,7-CH_{2a}),4.91(AB d,J=12.0Hz,7-CH_{2b}),4.58(m,1H,H-3'),4.00(m,1H,H-4'),3.82(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.41(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.95(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.93(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.12(s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.11(s,6H,$(CH_3)_2Si$)。

[0469] 将化合物7(54mg,0.10mmol)和外消旋(R/S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇(191mg,0.98mmol)溶于无水二氯甲烷(10mL)。真空除去溶剂,并将残余物在氮气氛围下加热1小时,然后溶于最少量的乙酸乙酯并用硅胶层析纯化,以产生9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]

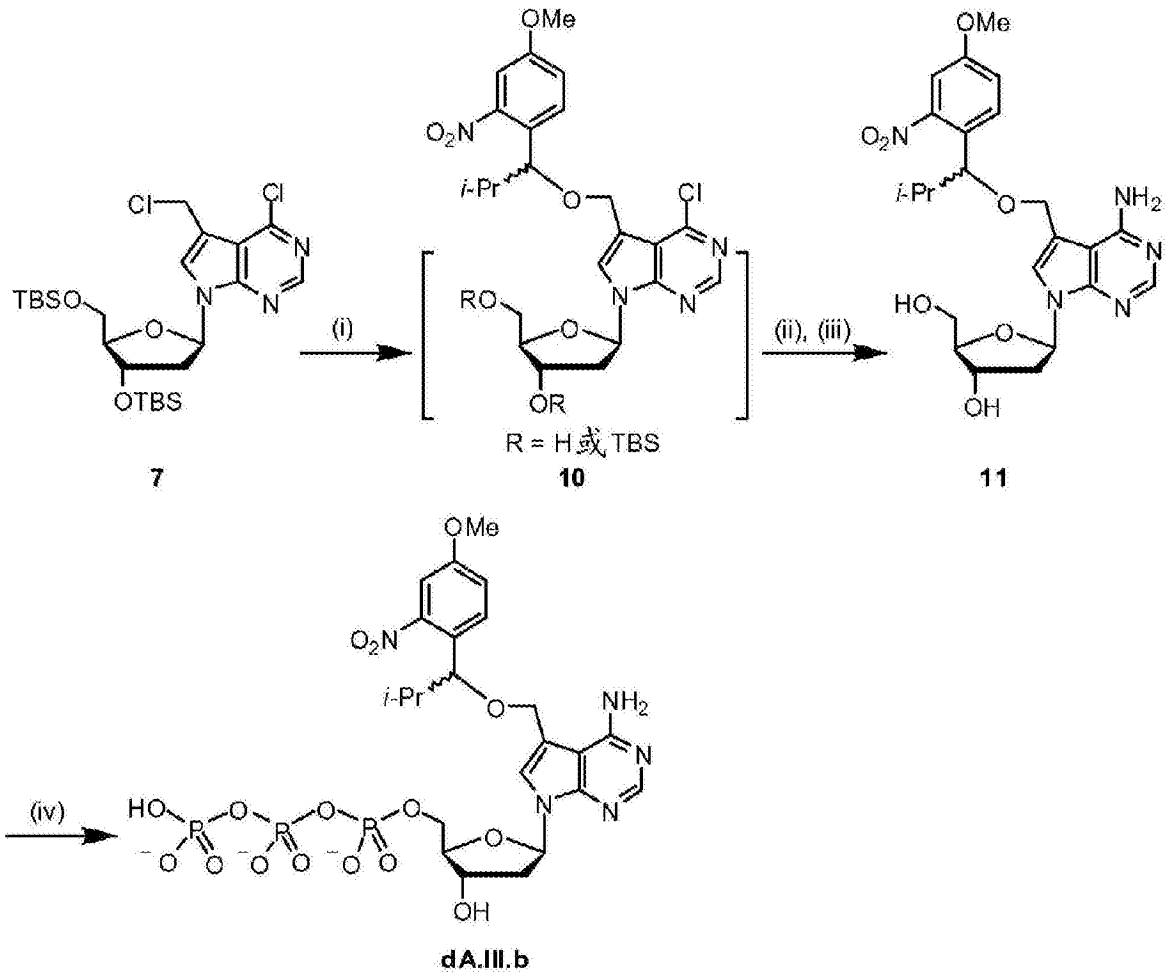
甲基-7-脱氮嘌呤8(38mg,54%,两种非对映体的1∶1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.60和8.59(2s,1H,H-2),7.83(m,1H,Ph-H),7.79(m,1H,Ph-H),7.56(m,1H,Ph-H),7.48和7.47(2s,1H,H-8),7.38(m,1H,Ph-H),6.70(m,1H,H-1'),4.81(m,1H,Ph-CH),4.70(m,1H,7-CH_{2a}),4.58(m,2H,7-CH_{2b}和H-3'),3.99(m,1H,H-4'),3.78(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.48(m,1H,H-2'a),2.35(m,1H,H-2'b),1.96(m,1H,CH),0.98和0.96(2d,3H,CH_3),0.93(2s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.89(2s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.82和0.78(2d,3H,CH_3),0.12(2s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.08和0.07(2s,3H,$(CH_3)_2Si$),0.06和0.05(2s,3H,$(CH_3)_2Si$)。

[0470] 0℃下将n-Bu_4NF(44mg,0.14mmol)的THF(2.0mL)溶液加入化合物8(38mg,0.05mmol)的THF(2.0mL)溶液中。将反应物逐渐温热至室温,搅拌2小时。将混合物真空浓缩,溶于1,4-二氧六环(4.0mL),随后加入NH_3的甲醇溶液(7M,8.0mL)。将混合物转移至密封管,在100℃下搅拌24小时,冷却至室温,然后真空浓缩。残余物用硅胶层析纯化,以得到7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷9(19mg,76%,两种非对映体的1∶1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.06和8.04(2s,1H,H-2),7.90(m,1H,Ph-H),7.67(m,2H,Ph-H),7.56(m,2H,Ph-H),7.19和7.16(2s,1H,H-8),6.63(bs,2H,可交换D_2O,6-NH_2),6.39(m,1H,H-1'),5.23(m,1H,可交换D_2O,3'-OH),5.00(m,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.72(2d,1H,Ph-CH),4.45(s,2H,7-CH_2),4.30(m,1H,H-3'),3.77(m,1H,H-4'),3.49(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.40(m,1H,H-2'a),2.12(m,1H,H-2'b),1.94(m,1H,CH),0.87(m,3H,CH_3),0.74(m,3H,CH_3)。

[0471] 用含$POCl_3$(16μL,0.16mmol)和质子海绵(18mg,0.082mmol)的磷酸三甲酯(0.4mL)将化合物9(19mg,0.041mmol)在氮气气氛中于零下40℃下磷酸化5小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(97mg,0.2mmol)和三正丁胺(40μL)的无水DMF(0.4mL)溶液。搅拌30分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于水(5mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯dA.III.a的两种非对映体的1∶1混合物,使用RP-HPLC将其分离以得到单一非对映体dA.III.a ds1和dA.III.a ds2。在所有情形中,对映体1(ds1)的洗脱快于对映体2(ds2)。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{22}H_{29}N_5O_{15}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为696.0873,测得质量为696.0864。

[0472] 7-[1-(4-甲氧基2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯

[0473]



[0474] 方案S8.7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)外消旋(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇,108℃;(ii)n-Bu_4NF,THF,0℃至室温;(iii)NH_3,1,4-二氧六环/MeOH,100℃,三步法,32%;(iv)$POCl_3$,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

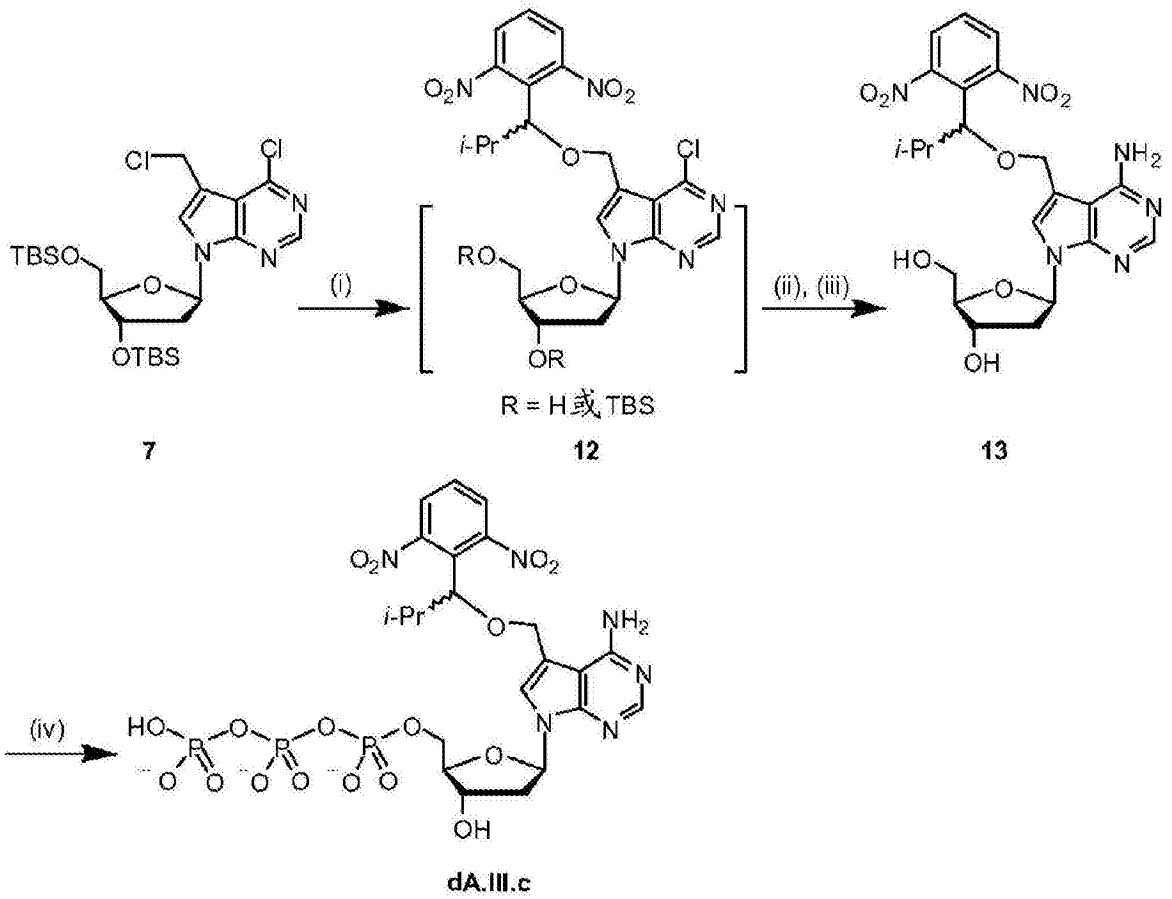
[0475] 将化合物7(103mg,0.19mmol)和外消旋(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(428mg,1.90mmol)溶于无水二氯甲烷(3.0mL)中。真空除去溶剂,将残余物在108℃、氮气氛围下加热30分钟,冷却至室温,溶于最少量的乙酸乙酯并用硅胶层析纯化,以得到6-氯-7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤2'脱氧核糖核苷10。将样品溶于THF(8.0ml),冷却至0℃,然后加入n-Bu_4NF(68mg,0.22mmol)的THF(2.0mL)溶液中。将反应物逐渐温热至室温,搅拌30分钟。将混合物真空浓缩,溶于1,4-二氧六环(8.0mL),随后加入NH_3的甲醇溶液(7N,24mL)。将混合物转移至密封管中,在100℃下搅拌16小时,然后冷却至室温,并真空浓缩。残余物用硅胶层析纯化以得到7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷11(30mg,两步法,32%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.06和8.05(2s,1H,H-2),7.57和7.54(2d,J=8.8Hz,1H,Ph-H),7.47和7.44(2d,1H,J=2.6Hz,Ph-H),7.33和7.27(2dd,J=8.8和2.6Hz,1H,Ph-H),7.18和7.15(2s,1H,H-8),6.63(bs,2H,可交换D_2O,6-NH_2),6.43(m,1H,H-1'),5.24(m,1H,可交换D_2O,3'-OH),5.03(m,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.55(m,2H,Ph-

CH,7-CH_2a),4.30(m,2H,7-CH_2b和H-3'),3.86和3.84(2s,3H,MeO),3.78(m,1H,H-4'),3.48(m,2H,H-5'),2.45(m,1H,H-2'a),2.12(m,1H,H-2'b),1.93(m,1H,$CH(CH_3)_2$),0.88(m,3H,CH_3),0.74和0.71(2d,J=6.8Hz,3H,CH_3)。

[0476] 用含$POCl_3$(11μL,0.12mmol)和质子海绵(25mg,0.12mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物11(28mg,0.06mmol)在氮气气氛中0℃下磷酸化2小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(10mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干,以得到7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯dA.III.b的两种非对映体的1:1混合物,使用RP-HPLC将其分离以得到单一非对映体dA.III.b ds1和dA.III.b ds2。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{23}H_{31}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为726.0979,测得质量为726.0984。

[0477] 7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯

[0478]



7 12 13 dA.III.c

[0479] 方案S9.7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧-腺苷-5'-三磷酸酯的合成.试剂和条件:(i)外消旋(R/S)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇,108℃;(ii)n-Bu_4NF,THF,0℃至室温;(iii)NH_3,1,4-二氧六环/MeOH,100℃,三步法38%;(iv)$POCl_3$,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

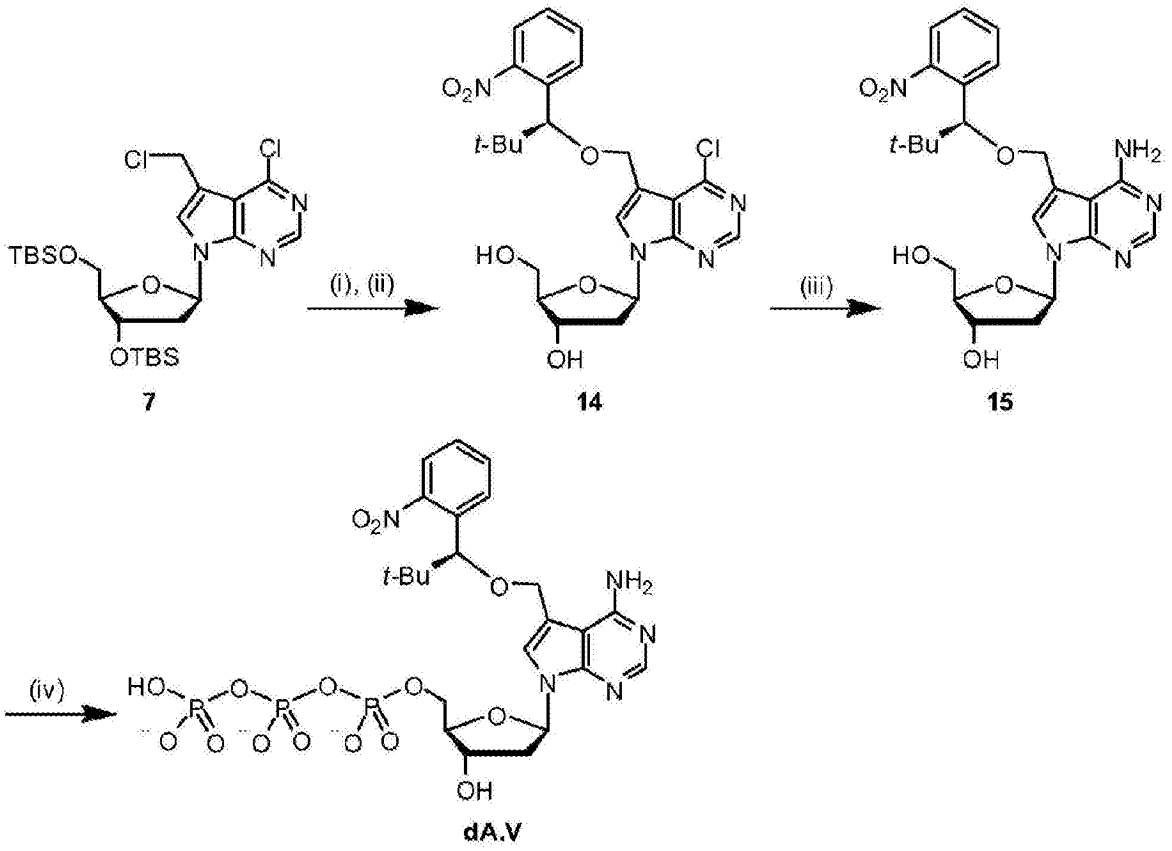
[0480] 将化合物7(109mg,0.20mmol)和外消旋(R/S)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙

醇(448mg,1.9mmol)溶于无水二氯甲烷(10mL)。真空除去溶剂,残余物在108℃氮气氛围下加热30分钟,然后溶于最少量的乙酸乙酯并用硅胶层析纯化以得到6-氯-7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤-2'-脱氧核糖-核苷12。将样品溶于THF(5.0ml),冷却至0℃,然后加入n-Bu_4NF(31mg,0.10mmol)的THF(2.0mL)溶液。将反应物逐渐温热至室温,搅拌2小时。将混合物真空浓缩,溶于1,4-二氧六环(4mL),随后加入NH_3的甲醇溶液(7N,18mL)。将混合物转移至密封管,在100℃下搅拌36小时,冷却至室温,然后真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷13(38mg,三步法38%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.17(m,1H,Ph-H),8.07和8.06(2s,1H,H-2),7.85(m,1H,Ph-H),7.69(m,1H,Ph-H),7.20和7.18(2s,1H,H-8),6.57(bs,2H,可交换D_2O,6-NH_2),6.46(m,1H,H-1'),5.26(d,J=3.6Hz,1H,可交换D_2O,3'-OH),5.01(m,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.60(m,2H,Ph-CH和7-CH_2a),4.29(m,1H,7-CH_2b),4.13(m,1H,H-3'),3.80(m,1H,H-4'),3.51(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.49(m,1H,$CH(CH_3)_3$),2.16(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.91(m,3H,CH_3),0.65(m,3H,CH_3)。ToF-MS(ESI):对于分子离子$C_{22}H_{27}N_6O_8$[M+H]$^+$,计算质量为503.1890,测得质量为503.2029。

[0481] 用含$POCl_3$(17μL,0.18mmol)和质子海绵(26mg,0.12mmol)的磷酸三甲酯(0.4mL)将化合物13(30mg,0.06mmol)在氮气气氛中于0℃下磷酸化4小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(285mg,0.6mmol)和三正丁胺(120μL)的无水DMF(1.2mL)溶液。搅拌30分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(10mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干以得到7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸dA.III.c的两种非对映体的1:1混合物,使用RP-HPLC将其分离以得到单一非对映体dA.III.c ds1和dA.III.c ds2。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{22}H_{28}N_6O_{17}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为741.0724,测得质量为741.0731。

[0482] 7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯

[0483]



[0484] 方案S10.7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,110℃;(ii)n-Bu_4NF,THF,室温;两步法75%;(iii)NH_3,1,4-二氧六环/MeOH,100℃,93%;(iv)$POCl_3$,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0485] 将化合物7(130mg,0.24mmol)和(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(290mg,1.4mmol)在氮气氛围下于110℃加热45分钟。将反应混合物冷却至室温并溶于THF(10ml),然后加入n-Bu_4NF(189mg,0.60mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时后真空浓缩。残余物溶于二氯甲烷(20mL)并用盐水(30ml)清洗,再用二氯甲烷(20ml)萃取水相两次。合并的有机相经Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化,以得到6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤14(90mg,75%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.51(s,1H,H-2),7.68(m,2H,Ph-H),7.45(t,1H,J=7.2Hz,Ph-H),7.38(s,1H,H-8),7.29(t,1H,J=7.2Hz,Ph-H),6.39(dd,1H,J=6.0和8.0Hz,H-1'),4.97(s,1H,Ph-CH),4.70(m,3H,7-CH_2和H-3'),4.16(m,1H,H-4'),3.83(m,2H,H-5'),2.80(m,1H,H-2'a),2.35(m,1H,H-2'b),0.82(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

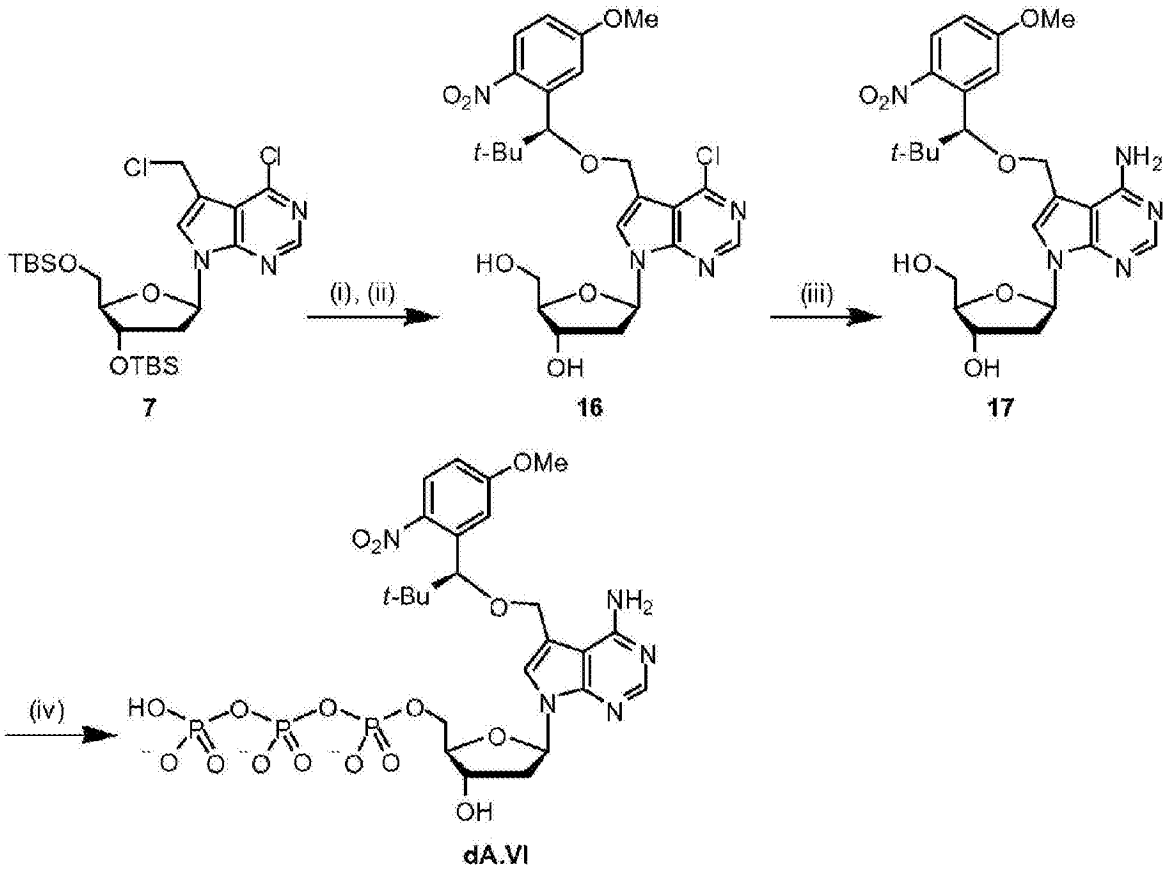
[0486] 将化合物14(90mg,0.18mmol)溶于1,4-二氧六环(8.0mL),随后加入含NH_3的甲醇(7N,16mL)。将混合物转移至密封管,并在100℃下搅拌24小时,冷却至室温,然后真空浓缩。残余物用硅胶层析纯化以得到7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷15(80mg,93%)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.09(s,1H,H-2),7.91(dd,1H,J=1.2和8.0Hz,Ph-H),7.71(m,2H,Ph-H),7.58(m,1H,Ph-H),7.24(s,1H,H-8),6.68(bs,2H,可交换D_2O,6-NH_2),6.46(dd,1H,J=6.0和8.0Hz,H-1'),5.27(d,1H,可交换D_2O,3'-OH),

5.06(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.87(s,1H,Ph-CH),4.65(d,1H,J=12.8Hz,7-CH_2a),4.49(m,1H,H-3'),4.36(d,1H,7-CH_2b),3.80(m,1H,H-4'),3.49(m,2H,H-5'),2.45(m,1H,H-2'a),2.17(m,1H,H-2'b),0.75(s,9H,C(CH_3)$_3$)。

[0487] 用含$POCl_3$(22μL,0.24mmol)和质子海绵(23mg,0.11mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物15(25mg,0.053mmol)在氮气气氛中于0℃下磷酸化4.5小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯dA.V,使用RP-HPLC将其进一步纯化。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{23}H_{31}N_5O_{15}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为710.1029,测得质量为710.1032。

[0488] 7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯

[0489]



[0490] 方案S11.7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,110℃;(ii)n-Bu_4NF,THF,室温;两步法78%;(iii)NH_3,1,4-二氧六环/MeOH,100℃,74%;(iv)$POCl_3$,$(MeO)_3PO$,0℃;(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M HNEt_3HCO_3。

[0491] 将化合物7(165mg,0.30mmol)和(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(330mg,1.4mmol)在氮气氛围中于110℃下加热45分钟。将反应混合物冷却至室温并溶

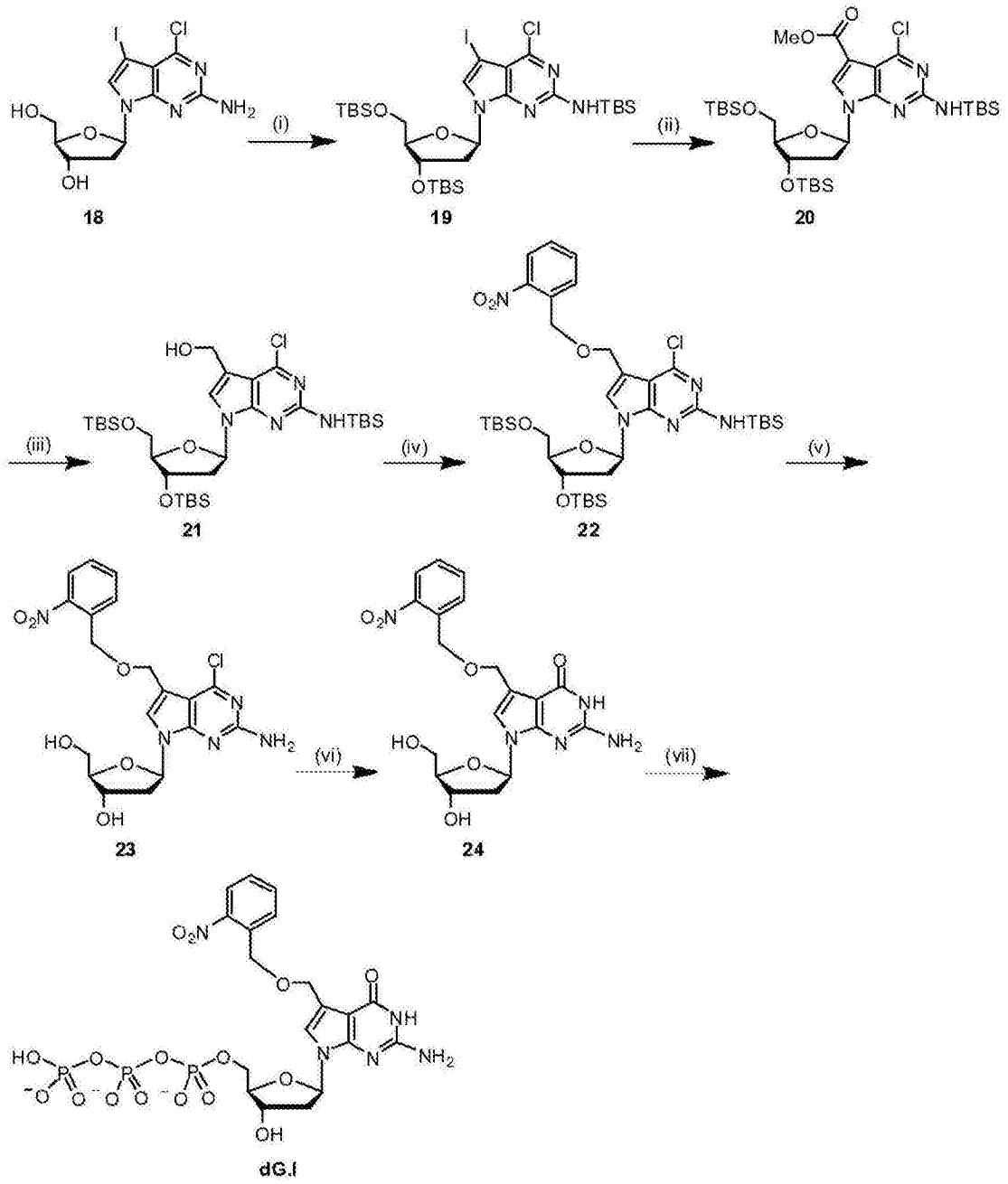
于THF(10ml),然后加入n-Bu_4NF(236mg,0.75mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时,然后真空浓缩,残余物溶于二氯甲烷(40mL)并用盐水(50ml)清洗,用二氯甲烷(40ml)萃取水相两次。合并的有机层经Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶层析纯化残余物,以得到6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤16(122mg,78%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.55(s,1H,H-2),7.79(d,1H,J=9.2Hz,Ph-H),7.35(s,1H,H-8),7.15(d,1H,J=3.2Hz,Ph-H),6.68(dd,1H,J=3.2和9.2Hz,Ph-H),6.33(dd,1H,J=5.6和8.8Hz,H-1'),5.26(s,1H,Ph-CH),4.85(d,1H,J=8.8Hz,7-CH_2a),4.75(m,1H,H-3'),4.70(d,1H,J=8.8Hz,7-CH_2b),4.13(m,1H,H-4'),3.95(m,1H,H-5'a),3.83(s,3H,OCH_3),3.78(m,1H,H-5'b),2.86(m,1H,H-2'a),2.30(m,1H,H-2'b),0.83(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0492] 将化合物16(120mg,0.23mmol)溶于1,4-二氧六环(10mL),随后加入含NH_3的甲醇(7N,10mL)。将混合物转移至密封管,并在100℃下搅拌24小时,然后冷却至室温,真空浓缩,残余物用硅胶层析纯化以得到7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷17(87mg,74%)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.06(s,1H,H-2),7.97(d,1H,J=9.2Hz,Ph-H),7.22(s,1H,H-8),7.08(d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),7.05(dd,1H,J=2.8和9.2Hz,Ph-H),6.66(bs,2H,可交换D_2O,6-NH_2),6.42(dd,1H,J=6.0和8.0Hz,H-1'),5.25(d,1H,可交换D_2O,3'-OH),5.15(s,1H,Ph-CH),5.03(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.64(d,1H,J=12.8Hz,7-CH_2a),4.43(d,1H,J=12.8Hz,7-CH_2b),4.30(m,1H,H-3'),3.84(s,3H,OCH_3),3.77(m,1H,H-4'),3.45(m,2H,H-5'),2.43(m,1H,H-2'a),2.14(m,1H,H-2'b),0.75(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0493] 用$POCl_3$(40μL,0.43mmol)和质子海绵(18mg,0.084mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物17(21mg,0.042mmol)在氮气气氛中于0℃下磷酸化7.5小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯dA.VI,使用RP-HPLC将其进一步纯化。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{24}H_{33}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为740.1135,测得质量为740.1156。

[0494] 实施例4-7-HOMe-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷三磷酸酯类似物的合成

[0495] 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯



[0496]

[0497] 方案S12.7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)TBSCl,咪唑,DMF,室温,60%;(ii)CO,$PdCl_2[PhCN]_2$,MeOH/1,4-二氧六环,50℃,91%;(iii)$LiBH_4$,MeOH,THF,回流,54%;(iv)2-硝基苄基溴,n-Bu_4NBr,CH_2Cl_2/NaOH水溶液,室温,48%;(v)n-Bu_4NF,THF,0℃至室温,95%;(vi)DABCO,H_2O,回流,30%;(vii)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0498] 从无水吡啶(3.0mL)中蒸发出化合物18(Seela和peng,2005,通过引用并入本文)(1.35g,3.29mmol)三次,然后溶于无水DMF(6.0mL)。加入叔丁基二甲基甲硅烷基氯(5.95g,39.5mmol)和咪唑(5.37g,78.9mmol),将混合物在50℃下搅拌48小时,每六小时另加叔丁基二甲基甲硅烷基氯(2.97g,19.7mmol)和咪唑(2.69g,39.4mmol)。将反应混合物真空浓缩并用硅胶层析纯化,以得到白色泡沫状9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-碘-7-脱氮嘌呤19(1.48g,60%

产率)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.35(s,1H,H-8),6.53(t,1H,J=6.0Hz,H-1'),4.70(s,1H,2-NH),4.47(m,1H,H-3'),3.97(m,1H,H-4'),3.78(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.23(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.98(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.95(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.90(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.29(2s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.13(2s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.09(s,6H,$(CH_3)_2Si$)。

[0499] 将化合物19(720mg,0.96mmol)溶液溶于无水1,4-二氧六环(30mL)。加入无水甲醇(30mL)和三乙胺(0.58mL),并将混合物在一氧化碳气氛下搅拌10分钟,然后加入二(苄腈)二氯钯(II)(20mg,0.05mmol)。将反应物在一氧化碳气氛中于58℃搅拌24小时,然后真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到粘稠油状9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-甲氧羰基-7-脱氮嘌呤20(600mg,91%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.92(s,1H,H-8),6.57(dd,1H,J=8.0和6.0Hz,H-1'),4.78(s,1H,2-NH),4.49(m,1H,H-3'),4.02(m,1H,H-4'),3.85(s,3H,CH_3),3.81(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.25(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.98(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.93(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.92(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.31(s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.13(2s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.11(s,6H,$(CH_3)_2Si$)。

[0500] 向化合物20(1.11g,1.63mmol)的无水THF(56mL)溶液中加入硼氢化锂(143mg,6.5mmol),然后加入甲醇(0.94mL)。将反应混合物加热回流1小时。冷却至室温后,将反应混合物用二氯甲烷(700mL)稀释,以水(70mL)猝灭。分离有机相,经硫酸钠干燥,并真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到粘稠油状9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-羟基甲基-7-脱氮嘌呤21(0.58g,54%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.16(s,1H,H-8),6.56(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),4.79(AB d,J=13.6Hz,7-CH_2a),4.75(AB d,J=13.6Hz,7-CH_2b),4.70(s,1H,2-NH),4.50(m,1H,H-3'),3.96(m,1H,H-4'),3.76(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.23(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.98(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.94(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.92(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.30(s,3H,$(CH_3)_2Si$),0.29(s,3H,$(CH_3)_2Si$),0.11(s,6H,$(CH_3)_2Si$),0.10(s,6H,$(CH_3)_2Si$)。

[0501] 向化合物21(150mg,0.23mmol)的CH_2Cl_2(3.0mL)溶液中加入n-Bu_4NBr(37mg,0.12mmol)、2-硝基苄基溴(148mg,0.68mmol)和NaOH溶液(1M,3.0mL)。将反应混合物在暗处室温下剧烈搅拌两天。分离有机相,经Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶层析纯化以得到粘稠油状9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤22(87mg,48%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.06(dd,1H,J=8.0和1.2Hz,Ph-H),7.87(d,1H,J=7.2Hz,Ph-H),7.61(dt,1H,J=7.6和1.2Hz,Ph-H),7.43(m,1H,Ph-H),7.20(s,1H,H-8),6.56(dd,1H,J=7.6和6.0Hz,H-1'),4.99(s,2H,$PhCH_2$),4.83(ABd,1H,J=11.4Hz,7-CH_2a),4.75(AB d,1H,J=11.4Hz,7-CH_2b),4.67(s,1H,2-NH),4.50(m,1H,H-3'),3.96(m,1H,H-4'),3.77(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.25(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.98(s,9H,$(CH_3)_3CSi$),0.92(s,18H,$(CH_3)_3CSi$),0.30(s,3H,$(CH_3)_2Si$),0.29(s,3H,$(CH_3)_2Si$),0.09(m,12H,$(CH_3)_2Si$)。

[0502] 在0℃下将n-Bu_4NF(123mg,0.39mmol)的THF(2.0mL)溶液逐滴加入化合物22(105mg,0.13mmol)的THF(3.0mL)溶液中。将反应混合物在0℃下搅拌1小时,然后在室温下搅拌2小时。将混合物真空浓缩并用硅胶层析纯化以得到黄色泡沫状2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤23(57mg,95%)。^{1}H NMR

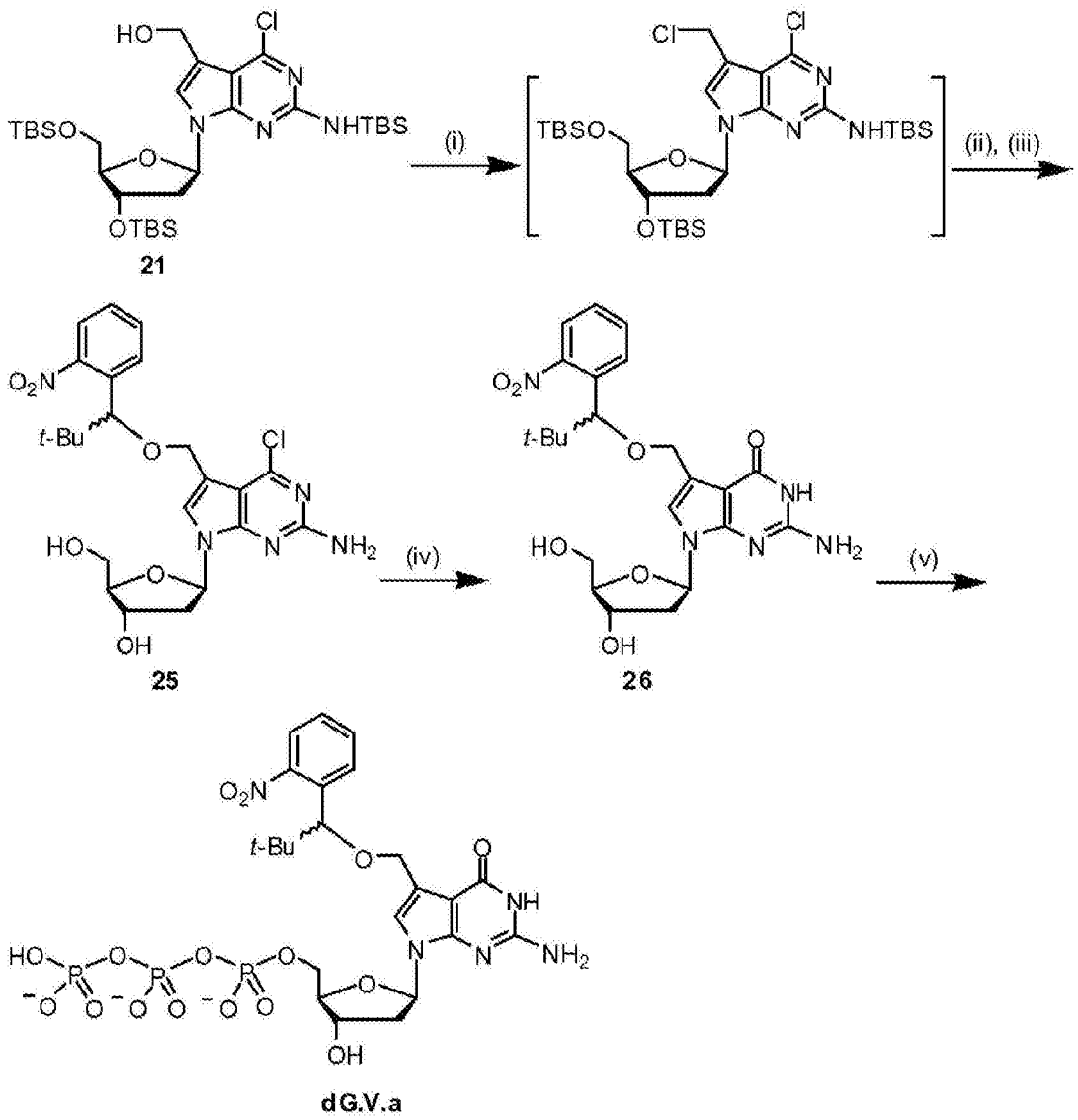
(400MHz,DMSO-d6):δ,8.02(m,1H,Ph-H),7.74(m,2H,Ph-H),7.55(m,1H,Ph-H),7.41(s,1H,H-8),6.73(s,2H,可交换D_2O,NH_2),6.41(dd,1H,J=8.4和6.0Hz,H-1'),5.26(d,1H,可交换D_2O,3'-OH),4.91(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.88(s,2H,Ph-CH_2),4.66(dd,2H,J=11.6Hz,7-CH_2),4.31(m,1H,H-3'),3.78(m,1H,H-4'),3.50(m,2H,H-5'),2.38(m,1H,H-2'a),2.15(m,1H,H-2'b)。

[0503] 在氮气气氛中将23(38mg,0.085mmol)和1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(11mg,0.1mmol)的水(4.0mL)混合物加热回流4小时。真空除去水,将残余物从甲醇(3.0mL)中蒸发3次,并用硅胶层析纯化以得到7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷24(11mg,30%)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d6):δ10.4(s,1H,可交换D_2O,N-H),8.03(dd,1H,J=8.4和0.8Hz,Ph-H),7.83(d,1H,J=7.6Hz,Ph-H),7.73(m,1H,Ph-H),7.55(m,1H,Ph-H),6.92(s,1H,H-8),6.28(m,1H,H-1'),6.26(bs,2H,可交换D_2O,NH_2),5.21(d,1H,可交换D_2O,3'-OH),4.89(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.88(s,2H,Ph-CH_2),4.60(dd,2H,7-CH_2),4.28(m,1H,H-3'),3.74(m,1H,H-4'),3.48(m,2H,H-5'),2.32(m,1H,H-2'a),2.08(m,1H,H-2'b)。

[0504] 用含$POCl_3$(15μL,0.05mmol)和质子海绵(11mg,0.05mmol)的磷酸三甲酯(0.3mL)将化合物24(11mg,0.025mmol)在氮气气氛中于0℃下磷酸化2小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(118mg,0.25mmol)和三正丁胺(50μL)的无水DMF(0.5mL)溶液。搅拌30分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;5.0mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于水(10mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯dG.I,使用RP-HPLC将其进一步纯化。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{19}H_{23}N_5O_{16}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为670.0353,测得质量为670.0344。

[0505] 7-[1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯

[0506]



[0507] 方案S13.7-[1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)外消旋(R/S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步法26%;(iv)顺-吡啶-2-乙醛肟(syn-pyridine-2-aldoxime),1,1,3,3-四甲基胍,1,4-二氧六环/DMF,70℃,70%;(v)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

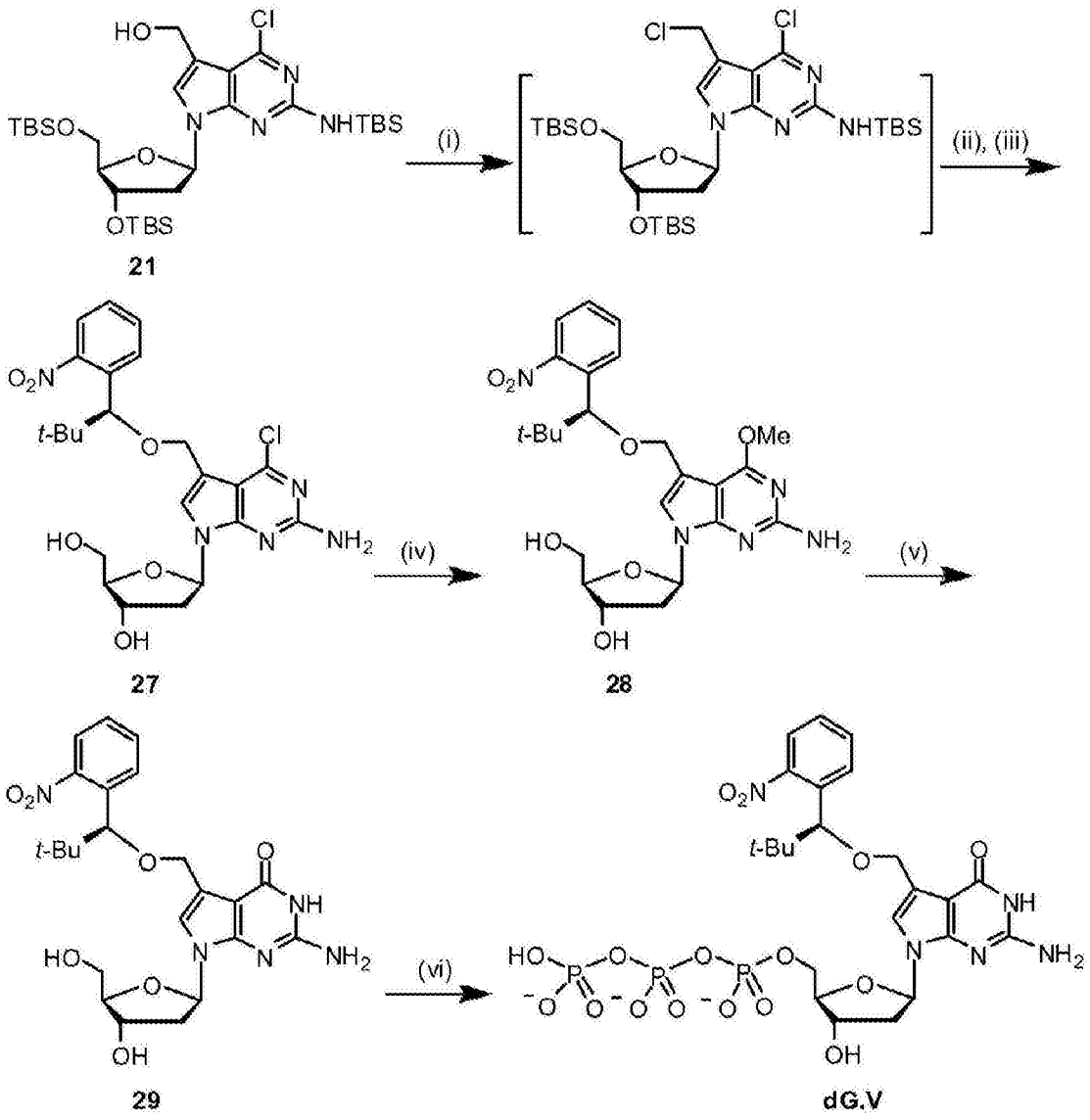
[0508] 0℃,氮气氛围下向化合物21(200mg,0.30mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中加入DMAP(148mg,1.2mmol)和MsCl(71μl,0.9mmol)。将反应在0℃搅拌10分钟后并二氯甲烷(15mL)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与外消旋(R/S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(500mg,2.4mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温,然后溶于四氢呋喃(10mL),再加入n-Bu_4NF(283mg,0.90mmol)。将混合物在室温下搅拌四小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(25ml)并用盐水(25ml)清洗,水相用二氯甲烷(25ml)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤25(40mg,三步26%,两种非对映体的1:1混合物)。

[0509] 向化合物25(40mg,0.08mmol)的1,4-二氧六环(1.0mL)和DMF(2.0ml)混合溶液中加入顺-吡啶-2-乙醛肟(180mg,1.5mmol)和1,1,3,3-四甲基胍(211μl,1.68mmol)。在氮气气氛中将混合物在70℃下加热过夜。将反应混合物用二氯甲烷(20ml)稀释,依次用乙酸溶液(0.1M,30ml),饱和碳酸氢钠溶液(30ml)和盐水(30ml)清洗。有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到7-[1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷26(27mg,70%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD):δ7.79(m,1H,Ph-H),7.73(m,1H,Ph-H),7.56(m,1H,Ph-H),7.39(m,1H,Ph-H),6.87和6.86(2s,1H,H-8),6.30(m,1H,H-1'),4.99和4.97(2s,1H,Ph-CH),4.63-4.36(m,3H,7-CH_2和H-3'),3.91(m,1H,H-4'),3.69(m,2H,H-5'),2.48(m,1H,H-2'a),2.20(m,1H,H-2'b),0.79和0.77(2s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0510] 在氮气气氛中用含$POCl_3$(20μL,0.21mmol)和质子海绵(21mg,0.1mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物26(25mg,0.05mmol)在0℃下磷酸化3.5小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.5mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯dG.V.a的两种非对映体的1:1混合物,使用RP-HPLC将其分离以得到单一的非对映体dG.V.a ds1和dG.V.a ds2。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{23}H_{31}N_5O_{16}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为726.0979,测得质量为726.0992。

[0511] 7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯

[0512]



[0513] 方案S14.7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧-鸟苷-5'-三磷酸酯的合成.试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步法35%;(iv)NaOMe,MeOH,回流,74%;(v)1,4-二氧六环,2M NaOH,回流,33%;(vi)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0514] 0℃,氮气氛围下向化合物21(300mg,0.46mmol)的无水二氯甲烷(10mL)溶液中加入DMAP(224mg,1.8mmol)和MsCl(107μl,1.4mmol)。反应在0℃下搅拌10分钟并用二氯甲烷(20ml)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),用已烷/乙酸乙酯/三乙胺(体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(520mg,2.5mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温并溶于四氢呋喃(20mL),然后加入n-Bu_4NF(491mg,1.6mmol)。将混合物在室温下搅拌4小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(20ml)并用盐水(30ml)清洗,水相用二氯甲烷(20ml)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧

基]甲基-7-脱氮嘌呤27(81mg,三步35%)。^{1}H NMR(400MHz,MeOH-d_4):δ7.79(m,2H,Ph-H),7.60(dt,1H,J=1.2和8.0Hz,Ph-H),7.46(dt,1H,J=1.2和8.0Hz,Ph-H),7.27(s,1H,H-8),6.47(dd,1H,J=6.4和8.0Hz,H-1'),4.98(s,1H,Ph-CH),4.71(d,1H,J=12.4Hz,7-CH_2a),4.50(m,1H,H-3'),4.47(d,1H,J=12.4Hz,7-CH_2b),3.96(m,1H,H-4'),3.73(m,2H,H-5'),2.59(m,1H,H-2'a),2.30(m,1H,H-2'b),0.80(s,9H,$(CH_3)_3$)。

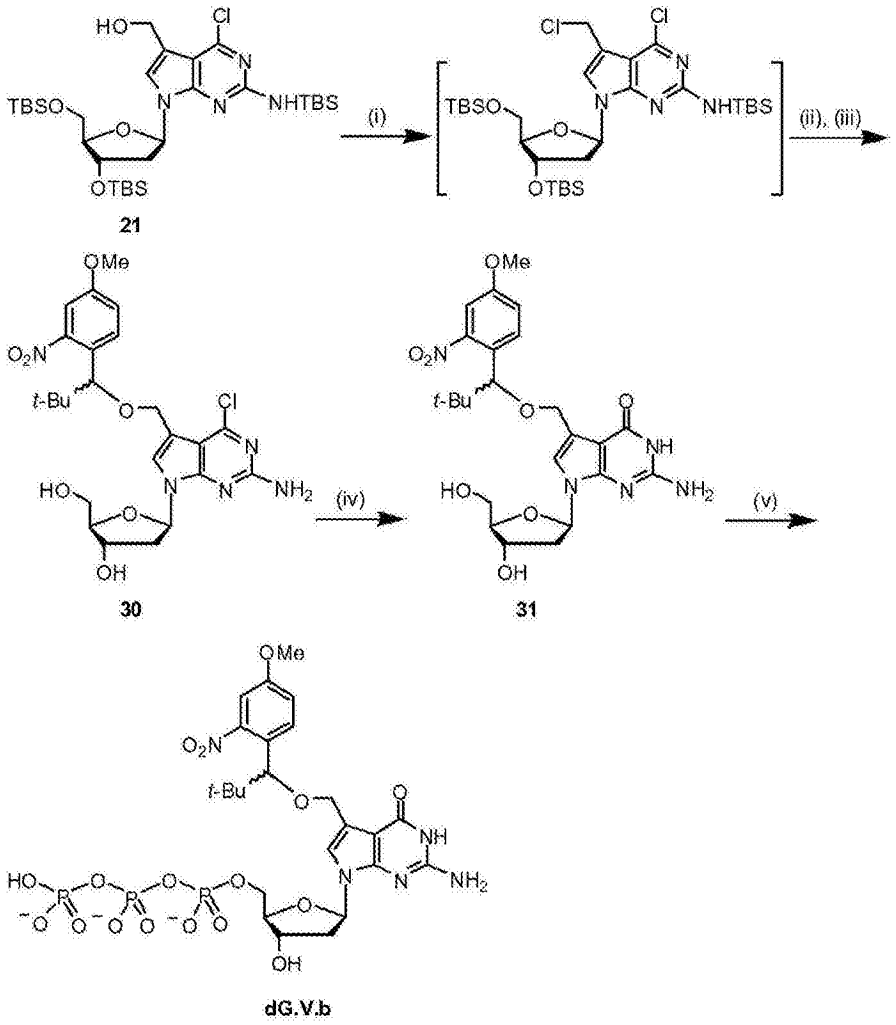
[0515] 将化合物27(104mg,0.21mmol)溶解于甲醇钠的甲醇溶液(0.5M,10ml),并将混合物在氮气氛围下加热回流1小时。将反应混合物冷却至室温,用乙酸中和后真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-甲氧基-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤28(75mg,74%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ,7.74(m,2H,Ph-H),7.52(t,1H,J=8.0Hz,Ph-H),7.36(t,1H,J=8.0Hz,Ph-H),6.71(s,1H,H-8),6.47(dd,1H,J=5.6和9.6Hz,H-1'),5.04(s,1H,Ph-CH),4.71(m,1H,H-3'),4.47(dd,2H,J=12Hz,7-CH_2),4.15(m,1H,H-4'),3.94(s,3H,OCH_3),3.76(m,2H,H-5'),3.01(m,1H,H-2'a),2.19(m,1H,H-2'b),0.82(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0516] 将化合物28(70mg,0.14mmol)溶解于1,4-二氧六环(6.0ml),然后加入NaOH水溶液(2M,12ml)。将混合物在氮气氛围下加热回流4天,冷却至室温,用稀盐酸(1M)中和并真空浓缩。将残余物从甲醇(5.0ml)中蒸发三次后用硅胶层析纯化以得到7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷29(22mg,33%)。还从反应中回收了起始原料28(42mg,60%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ11.02(br s,1H,NH),7.69(m,2H,Ph-H),7.52(t,1H,J=7.2Hz,Ph-H),7.33(t,1H,J=7.2Hz,Ph-H),6.66(s,1H,H-8),6.13(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),6.03(br s,2H,6-NH_2),4.92(s,1H,Ph-CH),4.77(m,1H,H-3'),4.57(d,1H,J=12.8Hz,7-CH_2a),4.12(m,1H,H-4'),3.05(d,1H,J=12.8Hz,7-CH_2b),3.75(m,2H,H-5'),2.87(m,1H,H-2'a),2.29(m,1H,H-2'b),0.76(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0517] 在氮气气氛中用含$POCl_3$(17μL,0.18mmol)和质子海绵(14mg,0.066mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物29(16mg,0.033mmol)在0℃下磷酸化4小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯dG.V,使用RP-HPLC条件进一步纯化。通过在相同条件下进行RP-HPLC分析,dG.V与dG.V.a ds2的保留时间相同(数据未示出)。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{23}H_{31}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为726.0979,测得质量为726.0986。

[0518] 7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯

[0519]



[0520] 方案S15.7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)外消旋(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步法21%;(iv)顺-吡啶-2-乙醛肟,1,1,3,3-四甲基胍,1,4-二氧六环/DMF,70℃,59%;(v)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0521] 0℃,氮气氛围下向化合物21(470mg,0.72mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中加入DMAP(346mg,2.8mmol)和MsCl(165μl,2.1mmol)。将反应在0℃搅拌10分钟并用二氯甲烷(20ml)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与外消旋的(R/S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(1.6g,6.69mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温,并溶于四氢呋喃(20mL),然后加入n-Bu_4NF(788mg,2.5mmol)。在室温下搅拌混合物4小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(20ml)并用盐水(30ml)清洗,水相用二氯甲烷(20ml)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]-甲基-7-脱氮嘌呤30(80mg,三步21%,两种非对映体的1:1混合物)。

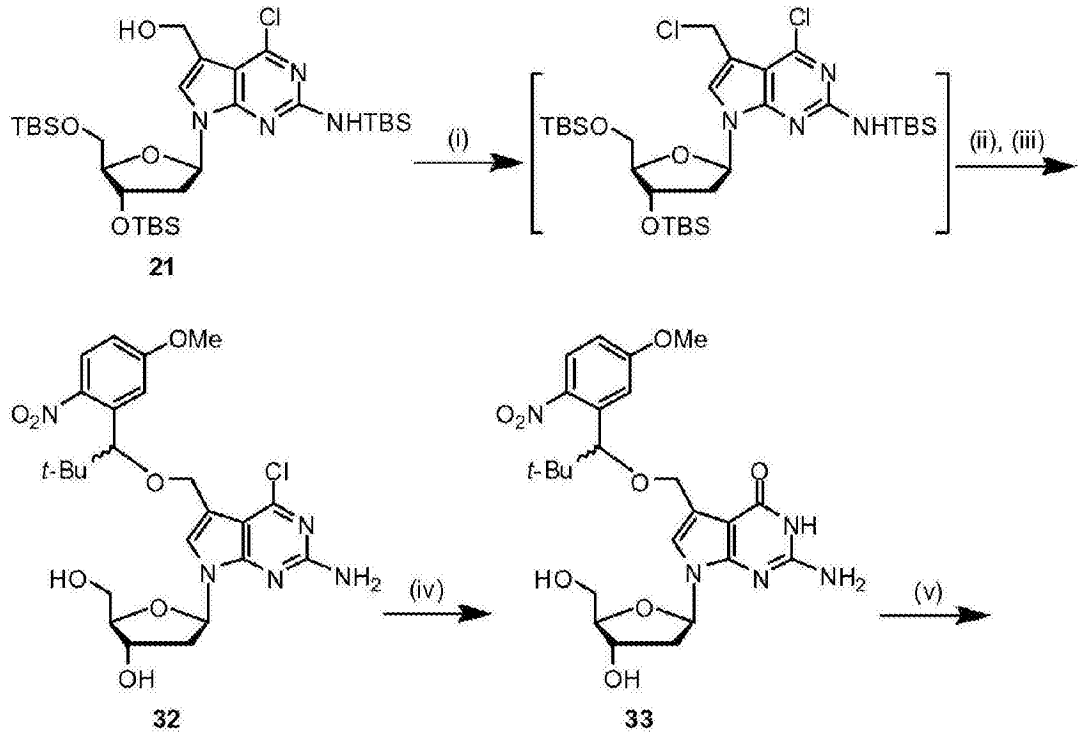
[0522] 向化合物30(80mg,0.15mmol)的1,4-二氧六环(1.0mL)和DMF(2.0ml)混合溶液中

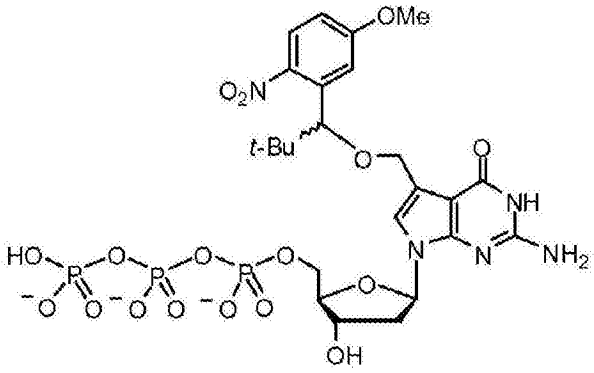
加入顺-吡啶-2-乙醛肟(366mg,3.0mmol)和1,1,3,3-四甲基胍(414μl,3.3mmol),并在氮气气氛中将混合物在70℃下加热过夜。反应混合物用二氯甲烷(20ml)稀释,依次用乙酸(0.1M,30ml)、饱和碳酸氢钠溶液(30ml)和盐水(30ml)清洗。有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到7-[(S)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧-鸟苷31(45mg,59%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ10.31(br s,1H,可交换D_2O,NH),7.63和7.62(2d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),7.41和7.40(2d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),7.27(m,1H,Ph-H),6.98和6.96(2s,1H,H-8),6.28(m,1H,H-1'),6.22(brs,1H,可交换D_2O,NH_2),5.22(d,1H,可交换D_2O,3'-OH),4.88(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.73和4.71(2s,1H,Ph-CH),4.47-4.24(m,3H,7-CH_2和H-3'),3.85和3.83(2s,3H,OCH_3),3.74(m,1H,H-4'),3.48(m,2H,H-5'),2.28(m,1H,H-2'a),2.06(m,1H,H-2'b),0.80和0.78(2s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0523] 在氮气气氛中用含$POCl_3$(15μL,0.18mmol)和质子海绵(21mg,0.10mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物31(25mg,0.048mmol)在0℃下磷酸化3.5小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯dG.V.b的两种非对映体的1:1混合物,使用RP-HPLC分离以得到单一的非对映体dG.V.b ds1和dG.V.b ds2。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{24}H_{33}N_5O_{17}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为756.1084,测得质量为756.1101。

[0524] 7-[1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯

[0525]





dG.V.c

[0526] 方案S16.7-[1-(5-甲氧基2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)外消旋(R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步法24%;(iv)顺-吡啶-2-乙醛肟,1,1,3,3-四甲基胍,1,4-二氧六环/DMF,70℃,57%;(v)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0527] 0℃,氮气氛围下向化合物21(410mg,0.62mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中加入DMAP(302mg,2.5mmol)和MsCl(145μl,1.9mmol)。将反应在0℃下搅拌10分钟并用二氯甲烷(20ml)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与外消旋的(R/S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(800mg,2.2mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温,并溶于四氢呋喃(10mL),然后加入n-Bu_4NF(683mg,3.3mmol)。将混合物在室温下搅拌4小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(20ml)并用盐水(30ml)清洗,水相用二氯甲烷(20ml)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[1-(5-甲氧基-2-

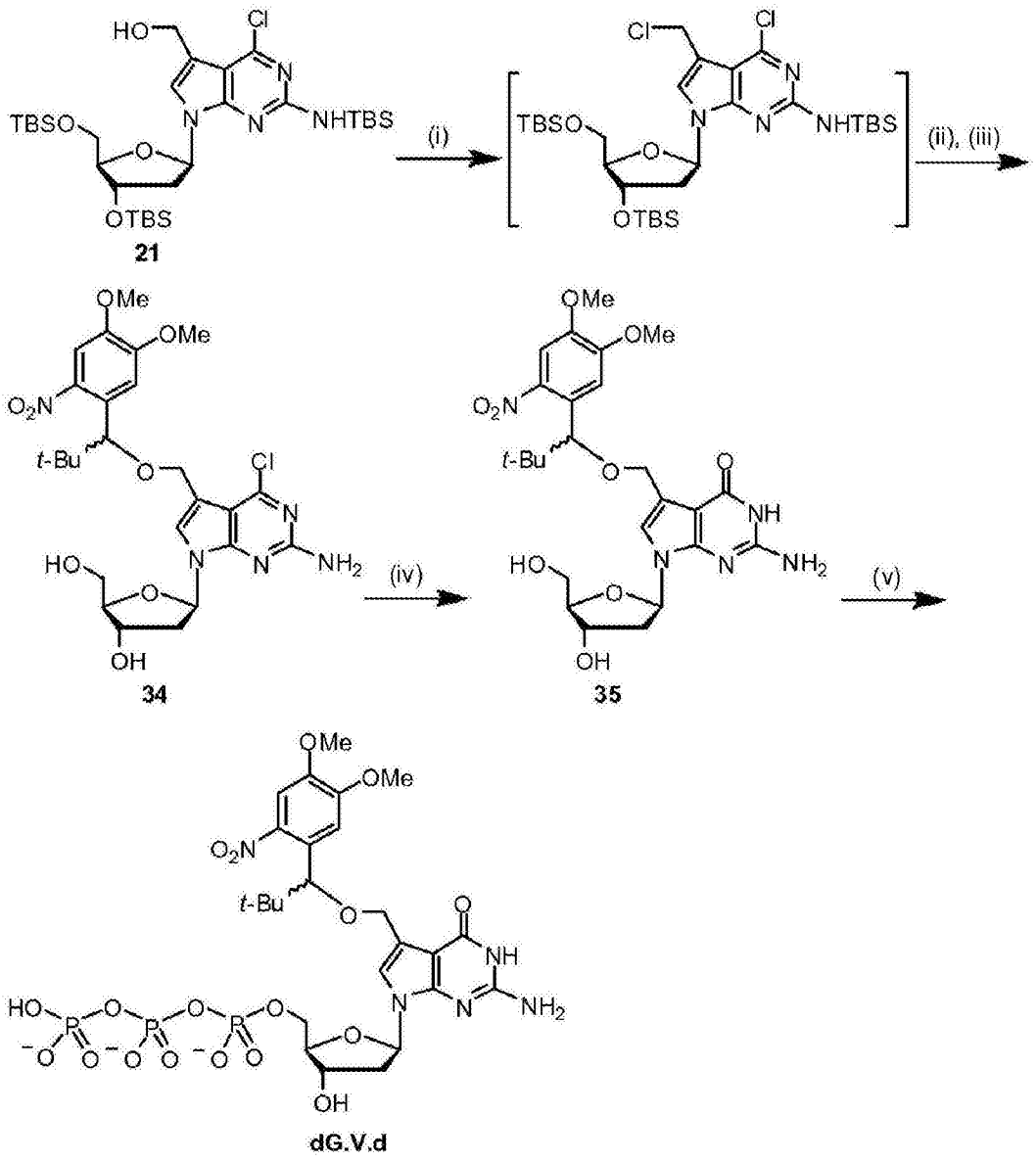
硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤32(80mg,三步24%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.86和7.83(2d,1H,J=8.8Hz,Ph-H),7.19和7.17(2d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),6.91和6.90(2s,1H,H-8),6.80和6.75(2dd,1H,J=.8和8.8Hz,Ph-H),6.17(m,1H,H-1'),5.23和5.21(2s,1H,Ph-CH),5.01和5.00(2br s,2H,NH_2),4.73(m,1H,H-3'),4.65-4.49(m,2H,7-CH_2),4.14(m,1H,H-4'),3.84(m,5H,H-5'和OCH_3),2.78(m,1H,H-2'a),2.33(m,1H,H-2'b),0.82和0.81(2s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0528] 向化合物32(80mg,0.15mmol)的1,4-二氧六环(1.0mL)和DMF(2.0ml)混合溶液中加入顺-吡啶-2-乙醛肟(360mg,3.0mmol)和1,1,3,3-四甲基胍(414μl,3.3mmol),并在氮气气氛中将混合物在70℃下加热过夜。将反应混合物用二氯甲烷(20ml)稀释,并依次用乙酸(0.1M,30mL)、饱和碳酸氢钠溶液(30mL)和盐水(30mL)清洗。有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到7-[1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷33(43mg,57%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ10.34(br s,1H,可交换D_2O,NH),7.92和7.89(2d,1H,J=8.8Hz,Ph-H),7.15(m,1H,Ph-H),6.95(m,1H,Ph-H),6.82和6.81(2s,1H,H-8),6.22(m,3H,2H可交换D_2O,H-1'和NH_2),5.19(d,1H,可交换D_2O,3'-OH),5.12和5.10(2s,1H,Ph-CH),4.84(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.47-4.31(m,2H,7-CH_2),4.24(m,1H,H-3'),3.85和3.83(2s,3H,OCH_3),3.71(m,1H,H-4'),3.44(m,2H,H-5'),2.24(m,1H,H-2'a),2.01(m,1H,H-2'b),0.76和0.74(2s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0529] 在氮气气氛中用含$POCl_3$(25μL,0.27mmol)和质子海绵(16mg,0.08mmol)的磷酸三甲酯(0.30mL)将化合物33(20mg,0.04mmol)在0℃下磷酸化6小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯dG.V.c的两种非对映体的1:1混合物,使用RP-HPLC分离以得到单一的非对映体dG.V.c ds1和dG.V.c ds2。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{24}H_{33}N_5O_{17}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为756.1084,测得质量为756.1088。

[0530] 7-[1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯

[0531]



[0532] 方案S17.7-[1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)外消旋(R/S)-1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步法23%;(iv)顺-吡啶-2-乙醛肟,1,1,3,3-四甲基胍,二氧六环/DMF,70℃,68%;(v)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1MHNE$t_3HCO_3$。

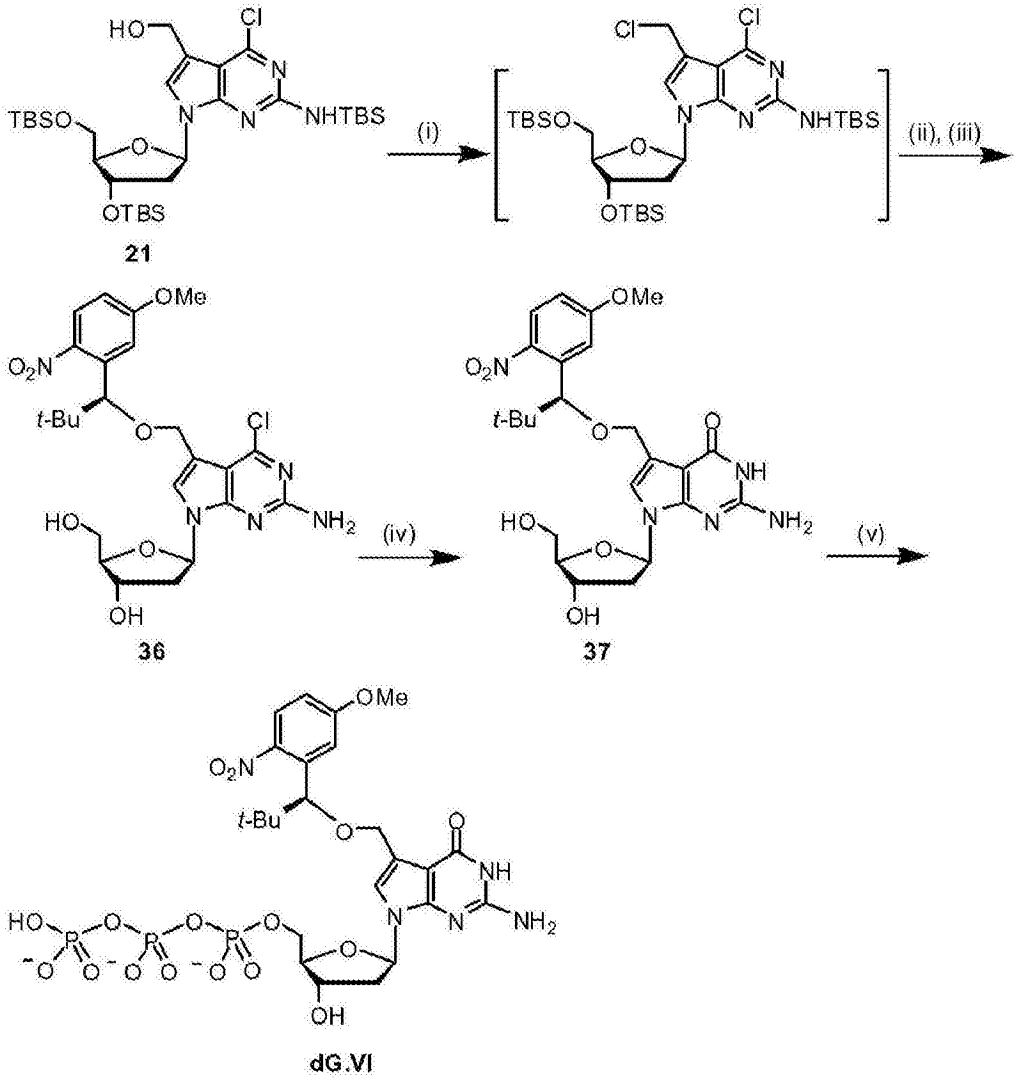
[0533] 0℃,氮气氛围下向化合物21(370mg,0.56mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中加入DMAP(273mg,2.2mmol)和MsCl(130μl,1.7mmol)。将反应在0℃搅拌30分钟并用二氯甲烷(25ml)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与外消旋的(R/S)-1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(800mg,3.0mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温,并溶于四氢呋喃(10mL),然后加入n-Bu_4NF(530mg,1.7mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(40ml)并用盐水(50ml)清洗,水相用二氯甲烷(40mL)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,并真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[1-(4,5-二甲氧

基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤34(70mg,三步23%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.42和7.39(2s,1H,Ph-H),7.15和7.13(2s,1H,Ph-H),6.89和6.84(2s,1H,H-8),6.12(m,1H,H-1'),5.22和5.16(2s,1H,Ph-CH),5.10和5.08(2br s,2H,NH_2),4.71-4.41(m,3H,H-3'和7-CH_2),4.13(m,1H,H-4'),3.94(4s,7H,OCH_3x2和H-5'a),3.78(m,1H,H-5'b),2.90(m,1H,H-2'a),2.25(m,1H,H-2'b),0.82和0.80(2s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0534] 向化合物34(65mg,0.11mmol)的1,4-二氧六环(1.0mL)和DMF(2.0ml)混合溶液中加入顺-吡啶-2-乙醛肟(292mg,2.4mmol)和1,1,3,3-四甲基胍(330μl,2.6mmol),并在氮气气氛中将混合物在70℃下加热过夜。将反应混合物用二氯甲烷(40mL)稀释,并依次用乙酸(0.1M,50mL)、饱和碳酸氢钠溶液(50mL)和盐水(50mL)清洗。有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到7-[1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷35(42mg,68%,两种非对映体的1:1混合物)。非对映体的^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ10.33(br s,1H,可交换D_2O,NH),7.47和7.44(2s,1H,Ph-H),7.16和7.15(2s,1H,Ph-H),6.83和6.82(2s,1H,H-8),6.22(m,3H,2H可交换D_2O,NH_2和H-1'),5.18(br s,1H,可交换D_2O,3'-OH),5.06和5.04(2s,1H,Ph-CH),4.83(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.44-4.23(m,3H,7-CH_2和H-3'),3.82(4s,6H,OCH_3x2),3.70(m,1H,H-4'),3.42(m,2H,H-5'),2.22(m,1H,H-2'a),2.01(m,1H,H-2'b),0.77和0.75(2s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0535] 在氮气气氛中用含$POCl_3$(14μL,0.15mmol)和质子海绵(31mg,0.15mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物35(40mg,0.073mmol)在0℃下磷酸化2小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到7-[1-(4,5-二甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯dG.V.d的两种非对映体的1:1混合物,使用RP-HPLC分离以得到单一的非对映体dG.V.d ds1和dG.V.d ds2。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{25}H_{35}N_5O_{18}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为786.1190,测得质量为786.1206。

[0536] 7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯

[0537] 

[0538] 方案S18.7-[(S)-1-(5-甲氧基2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步法27%;(iv)顺-吡啶-2-乙醛肟,1,1,3,3-四甲基胍,1,4-二氧六环/DMF,70℃,76%;(v)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0539] 0℃,氮气氛围下向化合物21(300mg,0.46mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中加入DMAP(224mg,1.8mmol)和MsCl(106μl,1.4mmol)。将反应在0℃下搅拌10分钟并用二氯甲烷(20mL)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(500mg,2.1mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温,并溶于THF(10mL),然后加入n-Bu_4NF(507mg,1.6mmol)。将混合物在室温下搅拌4小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(20mL)并用盐水(30mL)清洗,水相用二氯甲烷(20mL)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]-甲基-7-脱氮嘌呤36(67mg,三步27%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ 7.82(d,1H,J=8.8Hz,Ph-H),7.16(d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),6.90(s,1H,H-8),6.72(dd,1H,J

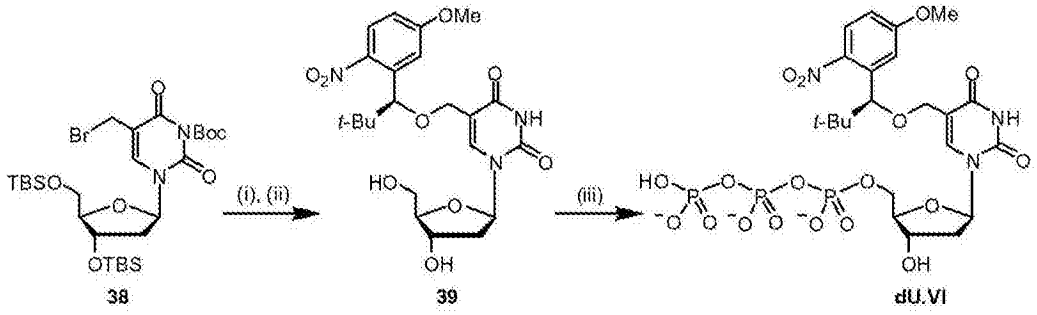
＝8.8和2.8Hz，Ph-H)，6.12(dd，1H，J＝9.2和6.0Hz，H-1')，5.22(s，1H，Ph-CH)，5.15(br s，2H，NH_2)，4.69-4.55(m，3H，H-3'和7-CH_2)，4.11(m，1H，H-4')，3.92(m，1H，H-5'a)，3.82(s，3H，OCH_3)，3.73(m，1H，H-5'b)，2.81(m，1H，H-2'a)，2.21(m，1H，H-2'b)，0.82(s，9H，$(CH_3)_3$)。

[0540] 向化合物36(65mg，0.12mmol)的1，4-二氧六环(1.0mL)和DMF(2.0mL)混合溶液中加入顺-吡啶-2-乙醛肟(292mg，2.4mmol)和1，1，3，3-四甲基胍(331μl，2.6mmol)，并在氮气气氛中将混合物在70℃下加热过夜。将反应混合物用二氯甲烷(20mL)稀释，并依次用乙酸(0.1M，30mL)、饱和碳酸氢钠溶液(30mL)和盐水(30mL)清洗。有机相经硫酸钠干燥，真空浓缩，并将残余物用硅胶层析纯化以得到7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2，2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷37(48mg，76％)。^1H NMR(400MHz，DMSO-d_6)：δ10.37(br s，1H，可交换D_2O，NH)，7.95(d，1H，J＝9.2Hz，Ph-H)，7.18(d，1H，J＝2.8Hz，Ph-H)，7.03(dd，1H，J＝9.2和2.8Hz，Ph-H)，6.84(s，1H，H-8)，6.23(m，3H，2H可交换D_2O，NH_2和H-1')，5.20(d，1H，可交换D_2O，3'-OH)，5.13(s，1H，Ph-CH)，4.84(t，1H，可交换D_2O，5'-OH)，4.48(d，1H，J＝12.0Hz，7-CH_2a)，4.32(d，1H，J＝12.0Hz，7-CH_2b)，4.27(m，1H，H-3')，3.88(s，3H，OCH_3)，3.73(m，1H，H-4')，3.46(m，2H，H-5')，2.30(m，1H，H-2'a)，2.05(m，1H，H-2'b)，0.77(s，9H，$(CH_3)_3$)。

[0541] 在氮气气氛中用含$POCl_3$(26μL，0.26mmol)和质子海绵(8mg，0.04mmol)的磷酸三甲酯(0.30mL)将化合物37(10mg，0.02mmol)在0℃下磷酸化6.5小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg，0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后，加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M，pH7.5；10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20％的乙腈水溶液(10mL)，过滤，并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分，冻干以得到7-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2，2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯dG.VI.，使用RP-HPLC进一步纯化。通过在相同条件下进行RP-HPLC分析，dG.VI和dG.V.c ds2的保留时间相同。HRMS(ESI)：对于分子离子$C_{24}H_{33}N_5O_{17}P_3$ $[M-H]^-$，计算质量为756.1084，测得质量为756.1101。

[0542] 实施例5-5-HOMe-2′-脱氧尿苷三磷酸酯类似物的合成

[0543] 5-[(S)-1-(5-甲氧基2-硝基苯基)-2，2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯

[0544] 

[0545] 方案S19.5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2，2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件：(i)(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2，2-二甲基-1-丙醇，110℃；(ii)NH_4F，MeOH，50℃，二步法56％；(iii)$POCl_3$，质子海绵，$(MeO)_3PO$，0℃；$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$，$n\text{-}Bu_3N$，DMF；1M $HNEt_3HCO_3$。

[0546] 将化合物38(Litosh等，2011，通过引用并入本文)(315mg，0.49mmol)和(S)-1-(5-

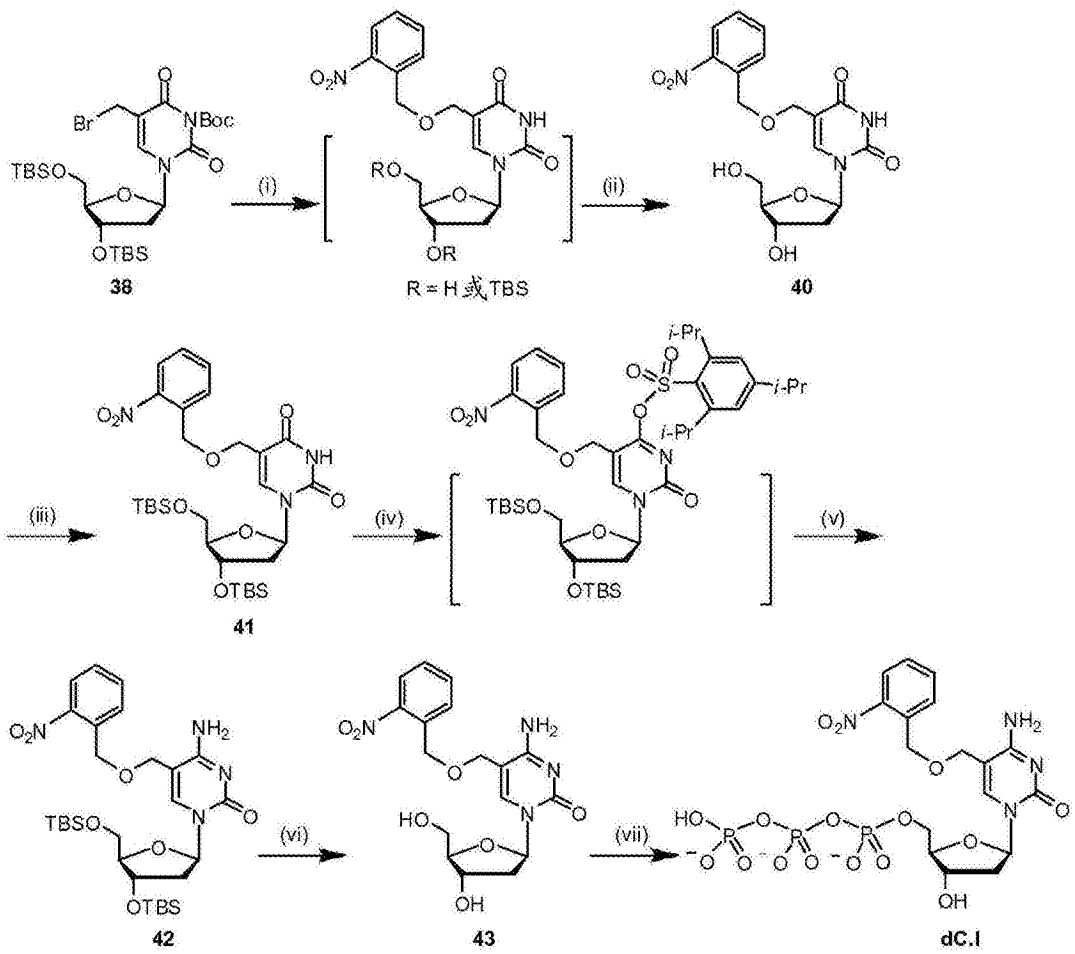
甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(490mg,2.1mmol)在氮气气氛中在110℃下加热45分钟。将混合物冷却至室温,溶于甲醇(10mL),然后加入氟化铵(400mg,11mmol)。将化合物在50℃下搅拌12小时,真空浓缩,溶于二氯甲烷(50mL)并用盐水(50mL)清洗。有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷39(130mg,56%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ9.14(br s,1H,NH)7.90(d,1H,J=9.2Hz,Ph-H),7.67(s,1H,H-6),7.17(d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),6.84(dd,1H,J=9.2和2.8Hz,Ph-H),6.18(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.22(s,1H,Ph-CH),4.56(m,1H,H-3'),4.24(d,1H,J=12.4Hz,5-CH_2a),4.15(d,1H,J=12.4Hz,5-CH_2b),4.00(m,1H,H-4'),3.90(m,1H,H-5'a),3.88(s,3H,OCH_3),3.81(m,1H,H-5'b),2.35(m,2H,H-2),0.83(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0547] 0℃下用含$POCl_3$(9μL,0.097mmol)和质子海绵(28mg,0.13mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物39(30mg,0.065mmol)磷酸化1小时。加入三正丁基焦磷酸铵(147mg,0.32mmol)和三正丁胺(64μL)的无水DMF(0.64mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(10mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯dU.VI.,使用RP-HPLC进一步纯化。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{22}H_{31}N_3O_{18}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为718.0815,测得质量为718.0824。

[0548] 实施例6-5-HOMe-2'-脱氧胞苷三磷酸酯类似物的合成

[0549] 5-(2-硝基苄氧基)甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯

[0550]



[0551] 方案S20.5-(2-硝基苄氧基)甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)2-硝基苯甲醇,110℃;(ii)n-Bu_4NF,THF,室温,两步53%;(iii)TBSCl,咪唑,DMF,室温,80%;(iv)2,4,6-三异丙基苯磺酰氯,DMAP,Et_3N,CH_2Cl_2,室温;(v)NH_3,1,4-二氧六环,90℃,两步69%;(vi)n-Bu_4NF,THF,室温,96%;(vii)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0552] 在氮气气氛中将化合物38(300mg,0.46mmol)和2-硝基苯甲醇(500mg,3.3mmol)在110℃下加热45分钟。将混合物冷却至室温,溶于四氢呋喃(20mL)中,然后加入n-Bu_4NF(362mg,1.2mmol)。将混合物在室温下搅拌4小时,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化以得到5-(2-硝基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷40(Litosh等,2011,通过引用并入本文)(95mg,53%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.45(br s,1H,NH),8.05(s,1H,H-6),8.02(d,1H,J=8.0Hz,Ph-H),7.80(d,1H,J=8.0Hz,Ph-H),7.69(t,1H,J=8.0Hz,Ph-H),7.43(t,1H,J=8.0Hz,Ph-H),6.21(t,1H,J=6.0Hz,H-1'),4.94(dd,J=14.4Hz,2H,Ph-CH_2),4.66(m,1H,H-3'),4.35(s,2H,5-CH_2),3.95(m,3H,H-4'和H-5'),2.42(m,1H,H-2'a),2.30(m,1H,H-2'b)。

[0553] 将化合物40(Litosh等,2011,通过引用并入本文)(70mg,0.18mmol)溶于无水DMF(2.0mL)。加入TBSCl(60mg,0.40mmol)和咪唑(54mg,0.80mmol)。将混合物在氮气氛围下室温搅拌过夜,真空浓缩,溶于二氯甲烷(20mL),并用饱和碳酸氢钠溶液(30mL)清洗。分离有机相和水相,水相用二氯甲烷(20mL)萃取2次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并用硅胶层析纯化残余物,以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-硝基苄氧基)甲

基-2'-脱氧尿苷41(90mg,80%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.04(d,J=8.0Hz,1H,Ph-H),7.98(br s,1H,NH),7.80(d,1H,J=8.0Hz,Ph-H),7.74(s,1H,H-6),7.64(q,1H,J=8.0Hz,Ph-H),7.44(t,1H,J=8.0Hz,Ph-H),6.21(q,1H,J=6.0Hz,H-1'),4.95(s,2H,Ph-CH_2),4.41(m,1H,H-3'),4.44(dd,2H,J=11.6Hz,5-CH_2),3.96(m,1H,H-4'),3.79(m,2H,H-5'),2.29(m,1H,H-2'a),2.05(m,1H,H-2'b),0.89(2s,18H,C(CH_3)$_3$),0.08(4s,12H,CH_3)。

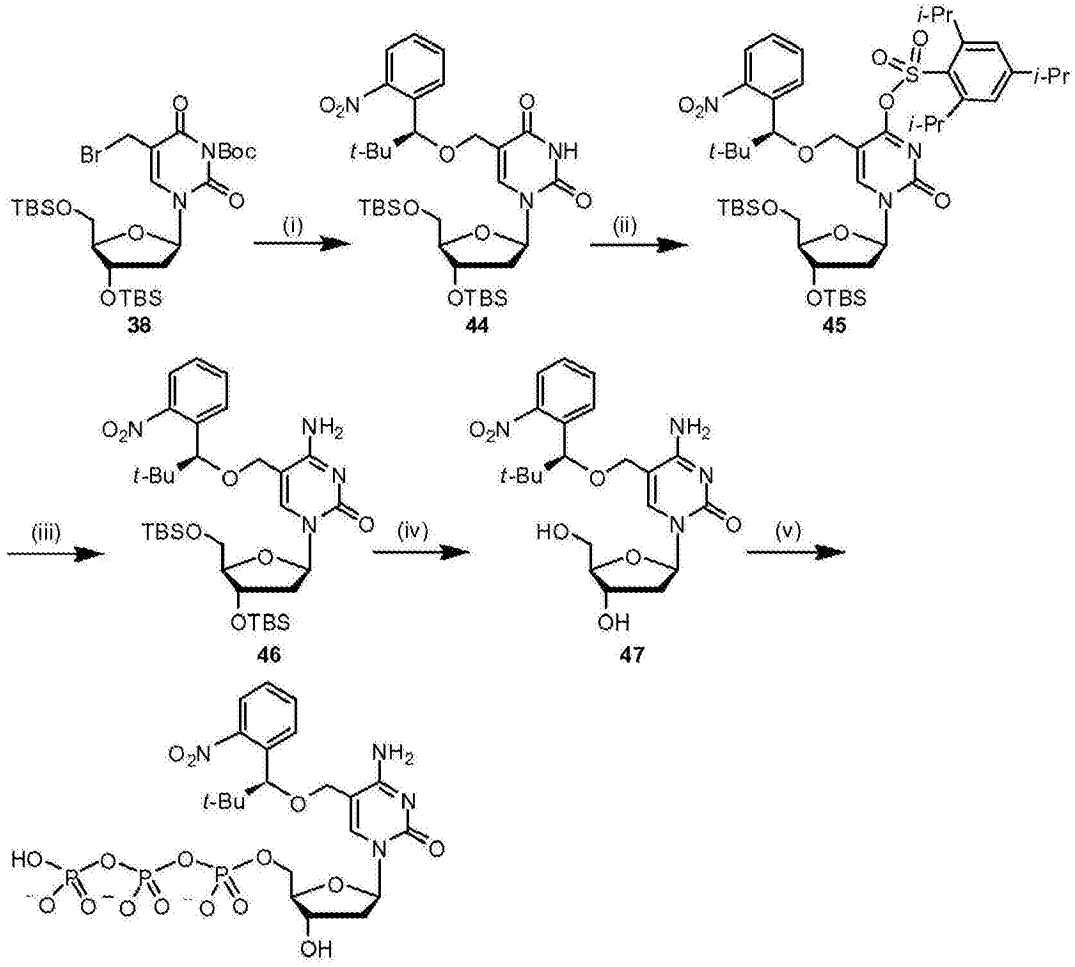
[0554] 向化合物41(85mg,0.14mmol)、DMAP(19mg,0.16mmol)和三乙胺(0.18mL,1.3mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中加入2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(176mg,0.59mmol)。将混合物在氮气气氛中于室温下搅拌过夜,真空浓缩,并将残余物溶于氨的1,4-二氧六环溶液(0.5M,15mL)中。将混合物转移至密封管中并在90℃下加热过夜。将混合物冷却至室温,真空浓缩,溶于二氯甲烷(30mL),并用盐水溶液(30ml)清洗。分离有机相和水相,水相用二氯甲烷(30mL)萃取2次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物,以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-硝基苄氧基)甲基-2'-脱氧胞苷42(60mg,两步69%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ8.08(d,J=8.0Hz,1H,Ph-H),7.81(s,1H,H-6),7.65(m,2H,Ph-H),7.64(q,1H,J=8.0Hz,Ph-H),7.49(m,1H,Ph-H),6.29(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.75(br s,2H,NH_2),4.85(dd,2H,J=13.6Hz,Ph-CH_2),4.41(s,2H,5-CH_2),4.34(m,1H,H-3'),3.95(m,1H,H-4'),3.89(dd,1H,J=2.8Hz,H-5'a),3.76(dd,1H,J=2.8Hz,H-5'b),2.46(m,1H,H-2'a),1.98(m,1H,H-2'b),0.92和0.89(2s,18H,C(CH_3)$_3$),0.11-0.08(4s,12H,CH_3)。

[0555] 向化合物42(55mg,0.09mmol)的THF(10mL)溶液中加入四正丁基氟化铵(63mg,0.20mmol)。将混合物在室温下搅拌四小时,真空浓缩并用硅胶柱层析纯化残余物以得到5-(2-硝基苄氧基)甲基-2'-脱氧胞苷43(34mg,96%)。1H NMR(400MHz,DMSO-d_6):δ8.05(d,J=8.0Hz,1H,Ph-H),7.89(s,1H,H-6),7.74(m,2H,Ph-H),7.55(m,1H,Ph-H),7.39(br s,1H,可交换D_2O,NH_2),6.74(br s,1H,可交换D_2O,NH_2),6.12(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.21(br s,1H,可交换D_2O,3'-OH),4.99(br s,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.81(s,2H,Ph-CH_2),4.30(dd,2H,J=11.6Hz,5-CH_2),4.20(m,1H,H-3'),3.76(m,1H,H-4'),3.55(m,2H,H-5'),2.11(m,1H,H-2'a),1.95(m,1H,H-2'b)。

[0556] 在氮气氛围中于0℃下用含$POCl_3$(30μL,0.32mmol)和质子海绵(35mg,0.16mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物43(32mg,0.081mmol)磷酸化3小时。加入三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到5-(2-硝基苄氧基)甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯dC.I,使用RP-HPLC进一步纯化。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{17}H_{22}N_4O_{16}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为631.0244,测得质量为631.0258。

[0557] 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯

[0558]



[0559] 方案S21.5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,110℃,21%;(ii)2,4,6-三异丙基苯磺酰氯,DMAP,Et_3N,CH_2Cl_2,室温,31%;(iii)NH_3,1,4-二氧六环,90℃,91%;(iv)n-Bu_4NF,THF,室温,82%;(v)$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-Bu_3N,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$。

[0560] 在氮气气氛中,将化合物38(Litosh等,2011,通过引用并入本文)(520mg,0.80mmol)和(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(580mg,2.8mmol)在110℃下加热一小时。将混合物冷却至室温,溶于最少量的的乙酸乙酯,并用硅胶层析纯化以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷44(115mg,21%)。从反应中还获得了(3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(78mg,17%)和5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(16mg,4%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.97(s,1H,NH),7.76(d,2H,J=8.0Hz,Ph-H),7.60(m,2H,Ph-H和H-6),7.41(s,1H,Ph-H),6.29(dd,1H,J=6.0和7.6Hz,H-1'),4.97(s,1H,Ph-CH),4.42(m,1H,H-3'),4.28(AB d,1H,J=12.0Hz,5-CH_2a),4.06(AB d,1H,J=12.0Hz,5-CH_2b),3.92(m,1H,H-4'),3.76(m,2H,H-5'),2.30(m,1H,H-2'a),2.05(m,1H,H-2'b),0.95(s,9H,$(CH_3)_3$CSi),0.90(s,9H,$(CH_3)_3$CSi),0.83(s,9H,$(CH_3)_3$C),0.12(s,3H,CH_3Si),0.09(s,3H,CH_3Si),0.07(s,3H,

CH_3Si),0.06(s,3H,CH_3Si)。

[0561] 向化合物44(110mg,0.16mmol)、DMAP(20mg,0.17mmol)和三乙胺(63μL,0.45mmol)的无水二氯甲烷(3.0mL)溶液中加入2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(61mg,0.20mmol)。将混合物在氮气气氛中于室温下搅拌36小时,真空浓缩,并用硅胶层析纯化,以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-O^4-(2,4,6-三异丙基苯磺酰基)-2'-脱氧尿苷45(47mg,31%)。^1H NMR(500MHz,$CDCl_3$):δ8.08(s,1H,H-6),7.80(dd,1H,J=1.2和8.0Hz,Ph-H),7.78(dd,1H,J=1.6和8.0Hz,Ph-H),7.67(m,1H,Ph-H),7.46(m,1H,Ph-H),7.20(s,2H,Ph-H),6.09(t,1H,J=6.4Hz,H-1′),4.98(s,1H,Ph-CH),4.35(m,1H,H-3′),4.25(AB d,1H,J=11.6Hz,5-CH_2a),4.11(AB d,1H,J=11.6Hz,5-CH_2b),3.97(m,1H,H-4′),3.79(dd,1H,J=3.6和11.6Hz,H-5′a),3.74(dd,1H,J=11.6和3.6Hz,H-5′b),2.90(m,1H,CH),2.50(m,2H,H-2′),1.98(m,2H,CH),1.31-1.22(m,18H,$(CH_3)_2$CH x3),0.88(2s,18H,$(CH_3)_3$CSi x2),0.87(s,9H,$(CH_3)_3$C),0.07(s,6H,$(CH_3)_2$Si),0.06(s,6H,$(CH_3)_2$Si)。

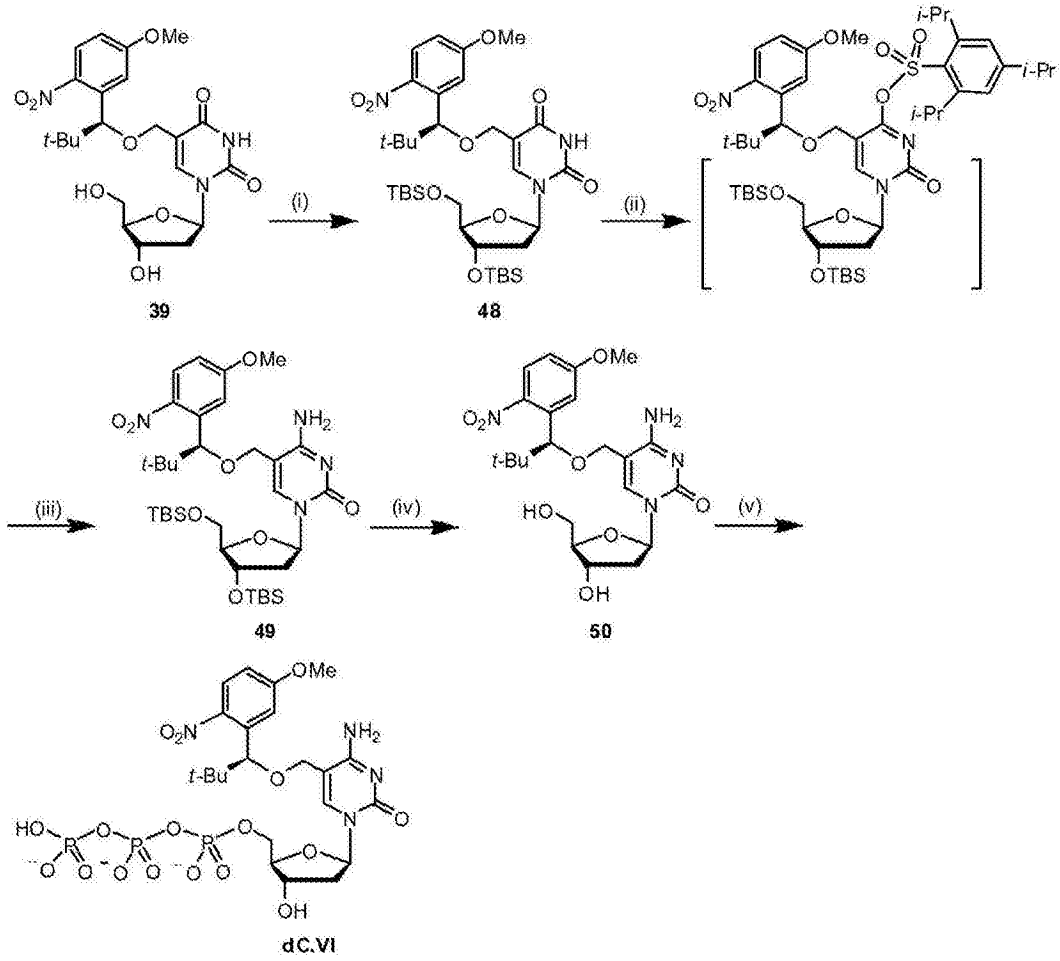
[0562] 向化合物45(47mg,0.05mmol)的无水1,4-二氧六环(2.0mL)溶液中加入氨的1,4-二氧六环溶液(0.5M,2.0mL)。将混合物转移至密封管中并在90℃下加热10小时。将混合物冷却至室温,真空浓缩,并将残余物用硅胶柱层析纯化,以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷46(31mg,91%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ7.67(m,3H,Ph-H),7.53(s,1H,H-6),7.45(m,1H,Ph-H),6.30(t,1H,J=6.6Hz,H-1'),5.72(br s,2H,NH_2),4.88(s,1H,Ph-CH),4.32(m,1H,H-3'),4.28(AB d,1H,J=12.8Hz,5-CH_2a),4.08(AB d,1H,J=12.8Hz,5-CH_2b),3.87(m,1H,H-4'),3.74(dd,1H,J=3.6Hz和14.8Hz,H-5'a),3.66(dd,1H,J=3.6和11.3Hz,H-5'b),2.41(m,1H,H-2'a),2.03(m,1H,H-2'b),0.90(s,9H,$(CH_3)_3$CSi),0.87(s,9H,$(CH_3)_3$CSi),0.83(s,9H,C$(CH_3)_3$),0.09(2s,6H,$(CH_3)_2$Si),0.06(2s,6H,$(CH_3)_2$Si)。

[0563] 向化合物46(20mg,0.03mmol)的THF(2.0mL)溶液中加入四正丁基氟化铵(28mg,0.09mmol)的THF(1.0mL)溶液。将混合物在室温下搅拌30分钟,真空浓缩并用硅胶柱层析纯化残余物以得到5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷47(11mg,82%)。^1H NMR(400MHz,CD_3OD):δ7.87(s,1H,H-6),7.82(dd,1H,J=1.2和8.4Hz,Ph-H),7.76(dd,1H,J=1.6和8.0Hz,Ph-H),7.68(m,1H,Ph-H),7.51(m,1H,Ph-H),6.23(t,1H,J=6.6Hz,H-1′),4.94(s,1H,Ph-CH),4.44(AB d,1H,J=13.2Hz,5-CH_2a),4.34(m,1H,H-3′),4.11(AB d,1H,J=13.2Hz,5-CH_2b),3.88(m,1H,H-4′),3.71(dd,1H,J=3.2和12.0Hz,H-5′a),3.63(dd,1H,J=4.0和12.0Hz,H-5′b),2.35(m,1H,H-2′a),2.14(m,1H,H-2′b),0.80(s,9H,C$(CH_3)_3$)。

[0564] 在氮气气氛中于0℃下用含$POCl_3$(7μL,0.075mmol)和质子海绵(11mg,0.05mmol)的磷酸三甲酯(0.3mL)将化合物47(11mg,0.025mmol)磷酸化3小时。加入三正丁基焦磷酸铵(59mg,0.125mmol)和三正丁铵(30μL)的无水DMF(0.25mL)溶液。搅拌5分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;5.0mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于水(5.0mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯dC.V,使用RP-HPLC进一步纯化。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{21}H_{30}N_4O_{16}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为

687.0870，测得质量为687.0873。

[0565] 5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯

[0566] 

[0567] 方案S22.5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件：(i)TBSCl，咪唑，DMF，室温，70％；(ii)2,4,6-三异丙基苯磺酰氯，DMAP，Et_3N，CH_2Cl_2，室温；(iii)NH_3，1,4-二氧六环，90℃，两步65％；(iv)n-Bu_4NF，THF，室温，82％；(v)$POCl_3$，质子海绵，$(MeO)_3PO$，0℃；$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$，n-$Bu_3N$，DMF；1M $HNEt_3HCO_3$。

[0568] 向化合物39(235mg，0.49mmol)的无水DMF(3.0mL)溶液中加入TBSCl(320mg，0.8mmol)和咪唑(109mg，1.6mmol)。将该混合物在室温下搅拌6小时，真空浓缩，溶于二氯甲烷(20mL)，并用饱和碳酸氢钠溶液(50mL)清洗。分离有机相和水相，将水相用二氯甲烷(30mL)萃取3次。合并的有机相经硫酸钠干燥，真空浓缩，并用硅胶层析纯化残余物，以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷48(245mg，70％)。^1H NMR(400MHz，$CDCl_3$)：δ8.00(br s，1H，NH)，7.88(d，J＝9.2Hz，1H，Ph-H)，7.60(s，1H，H-6)，7.22(d，1H，J＝2.8Hz，Ph-H)，6.84(dd，1H，J＝2.8和8.0Hz，Ph-H)，6.25(dd，1H，J＝5.6和8.0Hz，H-1')，5.23(s，1H，Ph-CH)，4.40(m，1H，H-3')，4.26(d，1H，J＝12Hz，5-CH_2a)，4.11(d，1H，J＝12Hz，5-CH_2b)，3.89(m，4H，OCH_3和H-4')，3.78(m，2H，H-5')，2.27(m，1H，H-2'a)，2.04(m，1H，H-2'b)，0.90和88(2s，18H，SiC

$(CH_3)_3$),0.84(s,9H,C$(CH_3)_3$),0.08(3s,12H,CH_3)。

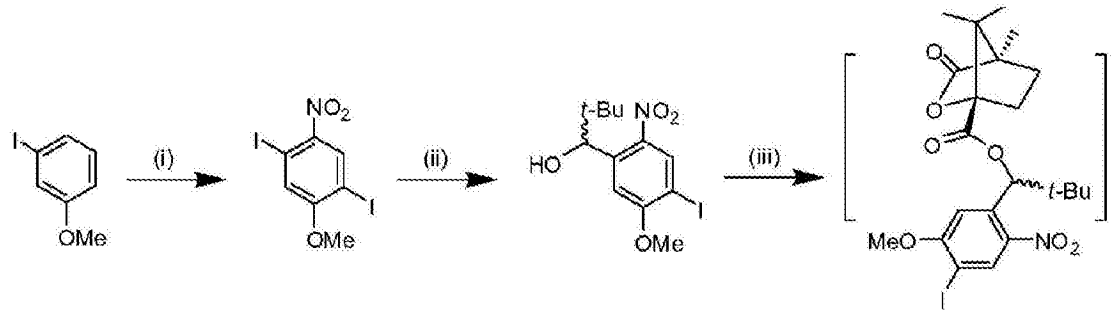
[0569] 向化合物48(170mg,0.24mmol)、DMAP(32mg,0.26mmol)和三乙胺(0.34mL,2.4mmol)的无水二氯甲烷(8.0mL)溶液中加入2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(363mg,1.2mmol)。将混合物在氮气气氛中于室温下搅拌过夜,真空浓缩,并将残余物溶于氨的1,4-二氧六环溶液(0.5M,20mL)中。将混合物转移至密封管中并在90℃下加热过夜。将混合物冷却至室温,真空浓缩,溶于二氯甲烷(20mL),用盐水(50mL)清洗。分离有机相和水相,将水相用二氯甲烷(30mL)萃取3次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物,以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷49(110mg,两步65%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.96(d,J=8.8Hz,1H,Ph-H),7.50(br s,1H,NH_2),7.38(s,1H,H-6),7.08(dd,1H,J=2.8和8.8Hz,Ph-H),7.04(d,1H,J=2.8Hz,Ph-H),6.80(br s,1H,NH_2),6.13(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.09(s,1H,Ph-CH),4.31(m,1H,H-3'),4.25(d,1H,J=12.8Hz,5-CH_2a),4.08(d,1H,J=12.8Hz,5-CH_2b),3.87(s,3H,OCH_3),3.76(m,1H,H-4'),3.64(m,2H,H-5'),3.76(dd,1H,J=2.8Hz,H-5′b),2.10(m,1H,H-2'a),2.00(m,1H,H-2'b),0.87(s,9H,C$(CH_3)_3$),0.78和0.76(2s,18H,SiC$(CH_3)_3$),0.07,0.06,-0.01和-0.04(4s,12H,$SiCH_3$)。

[0570] 向化合物49(130mg,0.18mmol)的THF(10mL)溶液中加入四正丁基氟化铵(141mg,0.44mmol)。将混合物在室温下搅拌四小时,真空浓缩并用硅胶柱层析纯化残余物以得到5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷50(72mg,82%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.99(d,J=8.0Hz,1H,Ph-H),7.65(s,1H,H-6),7.42(br s,1H,可交换D_2O,NH_2a),7.06(m,2H,Ph-H),6.72(br s,1H,可交换D_2O,NH_2b),6.11(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.17(d,1H,可交换D_2O,3'-OH),5.12(s,1H,Ph-CH),4.78(t,1H,可交换D_2O,5'-OH),4.25(d,1H,J=12.4Hz,5-CH_2a),4.15(m,1H,H-3'),4.05(d,1H,J=12.4Hz,5-CH_2b),3.87(s,3H,OCH_3),3.72(m,1H,H-4'),3.44(m,2H,H-5'),3.76(dd,1H,J=2.8Hz,H-5′b),2.08(m,1H,H-2'a),1.95(m,1H,H-2'b),0.77(s,9H,C$(CH_3)_3$)。

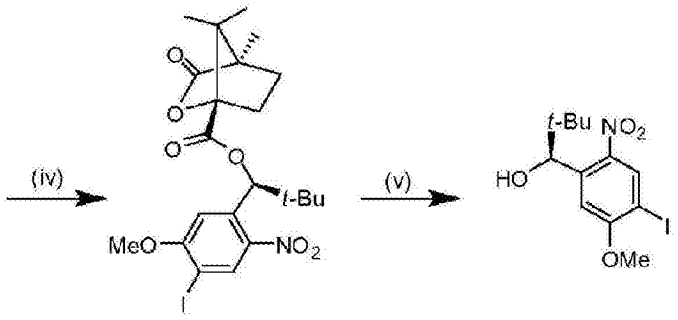
[0571] 在氮气氛围中于0℃下用含$POCl_3$(24μL,0.26mmol)和质子海绵(19mg,0.086mmol)的磷酸三甲酯(0.3mL)将化合物50(20mg,0.043mmol)磷酸化6小时。加入三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.50mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于20%的乙腈水溶液(20mL),过滤,并通过阴离子交换层析纯化。合并含有三磷酸酯的级分,冻干以得到5-[(S)-1-(5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯dC.VI,使用RP-HPLC进一步分离纯化。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{22}H_{32}N_4O_{17}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为719.0975,测得质量为719.0983。

[0572] 实施例7-(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成

[0573]



3-碘苯甲醚　3,6-二碘-4-硝基苯甲醚　(*R/S*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇　(*R/S*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1*S*)-莰烷酸酯



(*S*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1*S*)-莰烷酸酯　(*S*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇

[0574]

[0575] 方案S23.(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成。(i)$NaNO_2$,CH_3COOH,HNO_3,室温;I_2,60℃,两步25%(80%纯度);(ii)PhMgCl,$(CH_3)_3CCHO$,THF,零下40℃至室温,72%;(iii)(1S)-莰烷酰氯,DMAP,CH_2Cl_2,室温,80%;(iv)自乙醇分步结晶,63%;(v)K_2CO_3,MeOH,回流。

[0576] 在室温下将硝酸(68～70%,125ml)与冰乙酸(125ml)缓慢混合后向其中加入$NaNO_2$(400mg,5.8mmol)和3-碘苯甲醚(10g,42.7mmol)。将反应在室温下搅拌24小时后加入碘(10.8g,42.7mmol),并将混合物在60℃下搅拌过夜。将反应混合物倒入冰水(500ml)中并用二氯甲烷(100ml)萃取3次。合并的有机相用饱和碳酸氢钠溶液(500ml)中和,用硫代硫酸钠水溶液(20%,100ml)清洗,经硫酸钠干燥,真空浓缩。残余物用硅胶柱层析纯化得到粗制3,6-二碘-4-硝基苯甲醚(5.4g),其为与一种未知副产物(20%)的混合物。该混合物不经进一步纯化,用于下一步骤。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.42(s,1H,Ph-H),7.33(s,1H,Ph-H),3.97(s,3H,OCH_3)。

[0577] 在氮气氛围下向零下40℃的粗制3,6-二碘-4-硝基苯甲醚(770mg,80%纯度,1.52mmol)的无水THF(10mL)溶液中以使温度不超过零下35℃的速率逐滴加入氯化苯镁溶液(2M THF溶液,0.46mL,0.92mmol)。加完后在零下40℃下搅拌混合物2小时,然后加入三甲基乙醛(0.22mL,1.97mmol)。将混合物在零下30℃下搅拌2小时,然后在室温下再搅拌1小

时。随后将反应用盐水(1.0mL)猝灭,用二氯甲烷(100mL)稀释,并依次用醋酸(0.1N,50ml)和盐水(50ml)清洗。有机相用Na_2SO_4干燥,真空浓缩。残余物用硅胶柱层析纯化以得到外消旋(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(399mg,72%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.32(s,1H,Ph-H),7.17(s,1H,Ph-H),5.60(d,1H,J=4.0Hz,PhCH),3.98(s,3H,OCH_3),2.12(d,1H,J=4.0Hz,OH),0.89(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0578] 将(1S)-莰烷酰氯(Corrie等,1992,通过引用并入本文)(350mg,1.62mmol)加入外消旋(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(395mg,1.1mmol)和DMAP(263mg,2.16mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中,并将混合物在室温下氮气气氛中搅拌过夜,将反应混合物用二氯甲烷(50mL)稀释,并用饱和$NaHCO_3$溶液(50ml)清洗。有机相用Na_2SO_4干燥,并真空浓缩。残余物用硅胶柱层析纯化以得到(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯(490mg,80%,两种非对映体的1:1混合物)。

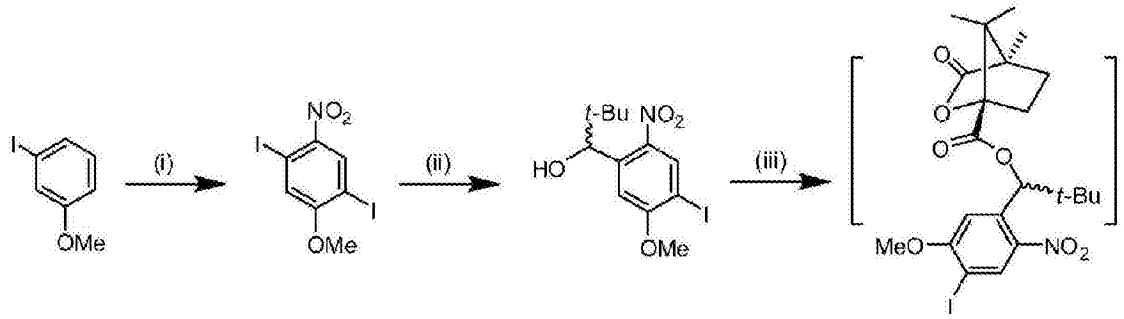
[0579] 将(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯溶于沸腾的乙醇(150mL)中,将该溶液置于在温热的油浴中缓慢冷却至室温并放置过夜。逐渐形成针状晶体,将其过滤收集以得到纯的单一非对映体(R)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯(870mg,51%)。将剩余的母液真空浓缩,并将残余物再次溶于沸腾的乙醇(150ml),将溶液迅速冷却至室温,在2小时内形成针状晶体。过滤收集晶体以得到纯的单一非对映体(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯。重复两次结晶过程以得到另外的纯的(S)-非对映体(一共1.07g,63%)。(R)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯的^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.48(s,1H,Ph-H),6.94(s,1H,Ph-H),6.84(s,1H,Ph-CH),3.93(s,3H,OCH_3),2.42(m,1H,CH),2.11(m,1H,CH),1.92(m,1H,CH_2),1.75(m,1H,CH_2),1.11(s,3H,CH_3),1.05(s,3H,CH_3),0.97(s,9H,$C(CH_3)_3$),0.86(s,3H,CH_3)。(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯的^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.48(s,1H,Ph-H),6.95(s,1H,Ph-H),6.80(s,1H,Ph-CH),3.96(s,3H,OCH_3),2.37(m,1H,CH),1.92(m,2H,CH_2),1.66(m,1H,CH),1.14(s,3H,CH_3),1.07(s,3H,CH_3),1.06(s,3H,CH_3),0.98(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0580] 将含(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯(1.1g,2.0mmol)和K_2CO_3(552mg,4.0mmol)的甲醇(50mL)的混合物加热回流1小时,然后冷却,真空浓缩,并用二氯甲烷稀释(50mL)。将有机相用盐水(50mL)清洗,经Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以得到对映体纯的(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(720mg,98%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.32(s,1H,Ph-H),7.17(s,1H,Ph-H),5.60(d,1H,J=4.0Hz,PhCH),3.98(s,3H,OCH_3),2.12(d,1H,J=4.0Hz,OH),0.89(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

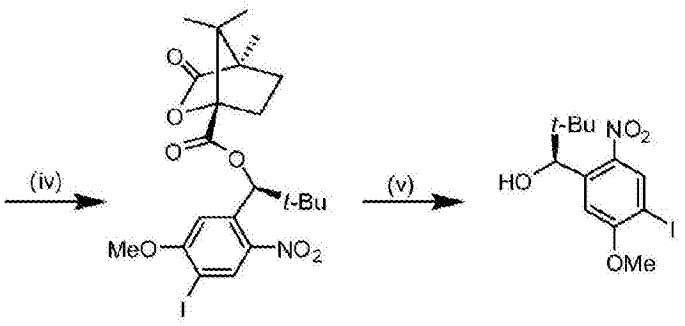
[0581] 实施例8-染料标记的叔丁基-5-甲氧基-2硝基苄基烷基化的羟甲基核苷酸的合成

[0582] (R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成。

[0583]



3-碘苯甲醚　3,6-二碘-4-硝基苯甲醚　(*R*/*S*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇　(*R*/*S*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1*S*)-莰烷酸酯



(*R*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1*S*)-莰烷酸酯　(*S*)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇

[0584] 方案S24.(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成。(i)$NaNO_2$,CH_3COOH,HNO_3,室温;I_2,60℃,两步25%(80%纯度);(ii)PhMgCl,$(CH_3)_3CCHO$,THF,零下40℃至室温,72%;(iii)(1S)-莰烷酰氯,DMAP,CH_2Cl_2,室温,80%;(iv)自乙醇中分步结晶,63%;(v)K_2CO_3,MeOH,回流,98%。

[0585] 在室温下将硝酸(68～70%,125ml)与冰乙酸(125ml)缓慢混合后向其中加入$NaNO_2$(400mg,5.8mmol)和3-碘苯甲醚(10g,42.7mmol)。在室温下搅拌反应24小时后加入碘(10.8g,42.7mmol),并将混合物在60℃下搅拌过夜。将反应混合物倒入冰水(500ml)中并用二氯甲烷(100ml)萃取3次。合并的有机相用饱和碳酸氢钠溶液(500ml)中和,用硫代硫酸钠水溶液(20%,100ml)清洗,经硫酸钠干燥,并真空浓缩。将残余物用硅胶柱层析纯化以得到粗制3,6-二碘-4-硝基苯甲醚(5.4g),其为与一种未知副产物(20%)的混合物。该混合物不经进一步纯化,用于下一步。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.42(s,1H,Ph-H),7.33(s,1H,Ph-H),3.97(s,3H,OCH_3)。

[0586] 在氮气氛围下向零下40℃的粗制3,6-二碘-4-硝基苯甲醚(770mg,80%纯度,1.52mmol)的无水THF(10mL)溶液中以使温度不超过零下35℃的速率逐滴加入氯化苯镁溶液(2M THF溶液,0.46mL,0.92mmol)。加完后在零下40℃下搅拌混合物2小时,然后加入三甲基乙醛(0.22mL,1.97mmol)。将混合物在零下30℃下搅拌2小时,然后在室温下再搅拌1小

时。然后用盐水(1.0mL)将反应猝灭,用二氯甲烷(100mL)稀释,并依次用醋酸(0.1N,50ml)和盐水(50ml)清洗。有机相用Na_2SO_4干燥,并真空浓缩。残余物用硅胶柱层析纯化以得到外消旋(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(399mg,72%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.32(s,1H,Ph-H),7.17(s,1H,Ph-H),5.60(d,1H,J=4.0Hz,PhCH),3.98(s,3H,OCH_3),2.12(d,1H,J=4.0Hz,OH),0.89(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

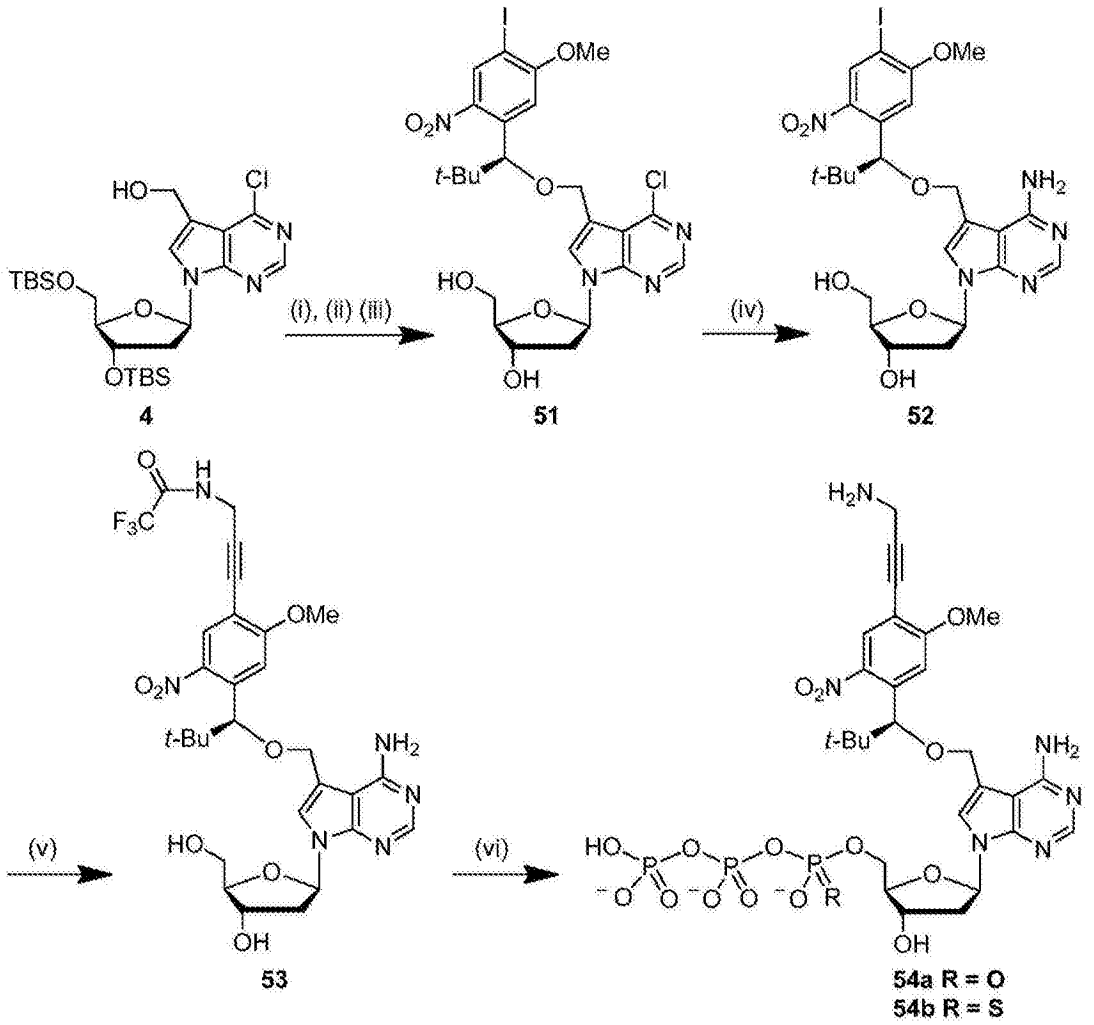
[0587] 将(1S)-莰烷酰氯(Corrie等,1992,通过引用并入本文)(350mg,1.62mmol)加入外消旋(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(395mg,1.1mmol)和DMAP(263mg,2.16mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中,并将混合物在室温下氮气气氛中搅拌过夜。将反应混合物用二氯甲烷(50ml)稀释,并用饱和$NaHCO_3$溶液(50mL)清洗。有机相用Na_2SO_4干燥,并真空浓缩。残余物用硅胶柱层析纯化以得到(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯(490mg,80%,两种非对映体的1:1混合物)。

[0588] 将(R/S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯溶于沸腾的乙醇(150mL)中,将该溶液置于温热的油浴中缓慢冷却至室温并放置过夜。逐渐形成针状晶体,将其过滤收集以得到纯的单一非对映体(R)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯(870mg,51%)。将剩余的母液真空浓缩,并将残余物再次溶于沸腾的乙醇(150ml),将该溶液迅速冷却至室温,在2小时内形成针状晶体。过滤收集晶体以得到纯的单一非对映体(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯。将该结晶过程重复两次以得到另外的纯(S)-非对映体(一共1.07g,63%)。(R)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯的^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.48(s,1H,Ph-H),6.94(s,1H,Ph-H),6.84(s,1H,Ph-CH),3.93(s,3H,OCH_3),2.42(m,1H,CH),2.11(m,1H,CH),1.92(m,1H,CH_2),1.75(m,1H,CH_2),1.11(s,3H,CH_3),1.05(s,3H,CH_3),0.97(s,9H,$C(CH_3)_3$),0.86(s,3H,CH_3)。(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯的^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.48(s,1H,Ph-H),6.95(s,1H,Ph-H),6.80(s,1H,Ph-CH),3.96(s,3H,OCH_3),2.37(m,1H,CH),1.92(m,2H,CH_2),1.66(m,1H,CH),1.14(s,3H,CH_3),1.07(s,3H,CH_3),1.06(s,3H,CH_3),0.98(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

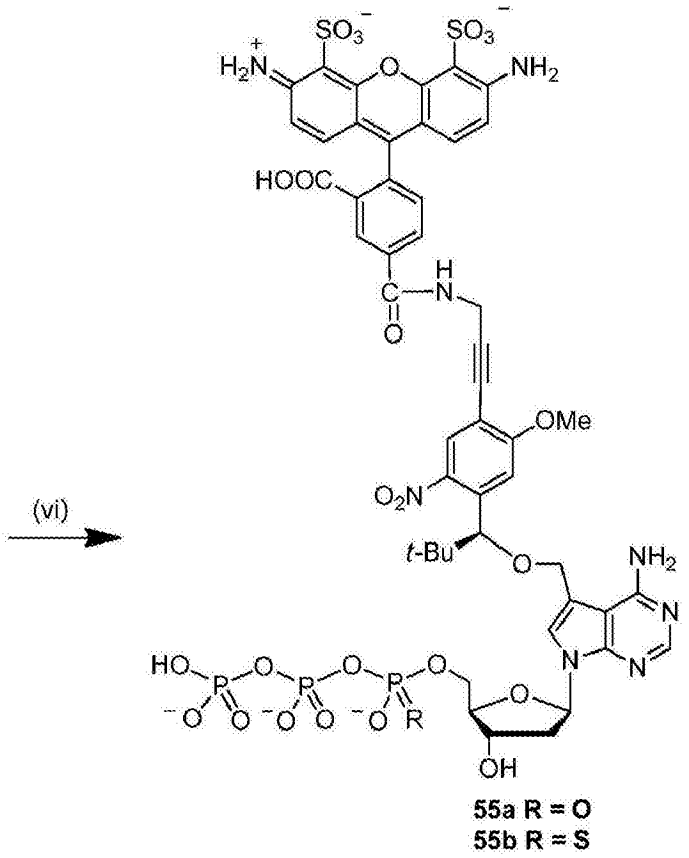
[0589] 将含(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基(1S)-莰烷酸酯(1.1g,2.0mmol)和K_2CO_3(552mg,4.0mmol)的甲醇(50mL)的混合物加热回流1小时,然后冷却,真空浓缩,并用二氯甲烷(50mL)稀释。将有机相用盐水(50mL)清洗,经无水Na_2SO_4干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以得到对映体纯的(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(720mg,98%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.32(s,1H,Ph-H),7.17(s,1H,Ph-H),5.60(d,1H,J=4.0Hz,PhCH),3.98(s,3H,OCH_3),2.12(d,1H,J=4.0Hz,OH),0.89(s,9H,$C(CH_3)_3$)。

[0590] 染料标记的7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯和5'-α-硫代三磷酸酯的合成

[0591]



[0592] 方案S25a.染料标记的7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯和5'-α-硫代三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷;(ii)(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,110℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步29%;(iv)NH_3,1,4-二氧六环/甲醇,100℃,80%;(v)N-炔丙基三氟乙酰胺,Pd$(PPh_3)_4$(0),CuI,Et_3N,DMF,98%;(vi)对于54a:$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$;NH_4OH。对于54b:$PSCl_3$,2,4,6-三甲基吡啶,$(EtO)_3PO$,0℃至室温;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$;NH_4OH。

[0593] 

[0594] 方案S25b.(vii)Alexa Fluor488NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)

[0595] 0℃,氮气氛围下向化合物4(400mg,0.76mmol)的无水二氯甲烷(5.0mL)溶液中加入DMAP(463mg,3.80mmol)和MsCl(177μl,2.28mmol)。将反应在0℃下搅拌10分钟后,在室温下再搅拌3小时。然后将反应物用二氯甲烷(20mL)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(80mL,体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(500mg,1.37mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温,并溶于THF(10mL)。加入n-Bu_4NF(526mg,1.67mmol),并将混合物在室温下搅拌12小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(50mL)并用盐水(50mL)清洗,水相用二氯甲烷(20mL)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,并真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到6-氯-9-(β-D-2'-脱氧呋喃核糖基)-7-[(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤51(135mg,三步29%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.56(s,1H,H-2),8.21(s,1H,Ph-H),7.34(s,1H,H-8),7.02(s,1H,Ph-H),6.35(dd,1H,J=6.0和8.8Hz,H-1'),5.20(s,1H,Ph-CH),4.76(dd,2H,J=12.4和36.4Hz,7-CH_2),4.74(m,1H,H-3'),4.13(m,1H,H-4'),3.96(m,1H,H-5'a),3.92(s,3H,OCH_3),3.80(m,1H,H-5'b),2.85(m,1H,H-2'a),2.30(m,1H,H-2'b),0.83(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0596] 将化合物51(135mg,0.22mmol)溶于1,4-二氧六环(10mL),随后加入NH_3的甲醇溶液(7N,20mL)。将混合物转移至密封管,并在100℃下搅拌24小时,然后冷却至室温,真空浓缩,并将残余物用硅胶层析纯化,以得到7-[(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷52(110mg,80%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.24(s,1H,H-2),8.22(s,1H,Ph-H),6.96(s,1H,Ph-H),6.79(s,1H,H-8),6.14(dd,1H,J=6.0和

7.6Hz,H-1')，5.21(s,1H,Ph-CH)，4.74(m,1H,H-3')，4.56(dd,2H,J＝13.2和24.8Hz,7-CH_2)，4.17(m,1H,H-4')，3.93(m,1H,H-5'a)，3.83(s,3H,OCH_3)，3.79(m,1H,H-5'b)，2.96(m,1H,H-2'a)，2.21(m,1H,H-2'b)，0.83(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0597] 将化合物52(183mg,0.29mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺(435mg,2.9mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(66mg,0.057mmol)、碘化亚铜(21mg,0.11mmol)、和三乙胺(170μL,1.22mmol)的无水DMF(4.0mL)溶液在50℃下搅拌24小时。将混合物真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以得到7-{(S)-1-[5-甲氧基-4-(3-三氟乙酰基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷53(185mg,98%)。^1H NMR(400MHz,MeOD-d4)：δ8.06(s,1H,H-2)，7.89(s,1H,Ph-H)，7.17(s,1H,H-8)，7.15(s,1H,Ph-H)，6.37(dd,1H,J＝6.0和7.6Hz,H-1')，5.23(s,1H,Ph-CH)，4.68(d,1H,J＝12.8Hz,7-CH_2a)，4.49(m,1H,H-3')，4.34(s,2H,CH_2)，3.97(m,1H,H-4')，3.86(s,3H,OCH_3)，3.70(m,2H,H-5')，2.59(m,1H,H-2'a)，2.28(m,1H,H-2'b)，0.85(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0598] 在氮气氛围,0℃下用含$POCl_3$(14μL,0.15mmol)和质子海绵(34mg,0.16mmol)的磷酸三甲酯(0.5mL)将化合物53(52mg,0.08mmol)磷酸化3小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.5mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(TEAB,0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤并使用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)通过阴离子交换层析纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10mL)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时以得到7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯54a,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{27}H_{36}N_6O_{16}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为793.1401,测得质量为793.1426。

[0599] 在氮气氛围,0℃下用含$PSCl_3$(14μL,0.14mmol)和2,4,6-三甲基吡啶(34mg,0.28mmol)的磷酸三乙酯(1.0mL)将化合物53(91mg,0.14mmol)磷酸化1小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(332mg,0.7mmol)和三正丁胺(140μL)的无水DMF(1.4mL)溶液。搅拌2分钟后,加入三乙基碳酸氢铵溶液(TEAB,1M,pH7.5;20mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤,并使用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)通过阴离子交换层析纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5MTEAB/25%乙腈。合并含有硫代三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10ml)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时,得到7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-α-硫代三磷酸酯54b,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{27}H_{36}N_6O_{15}P_3S$[M-H]$^-$,计算质量为809.1172,测得质量为809.1155。

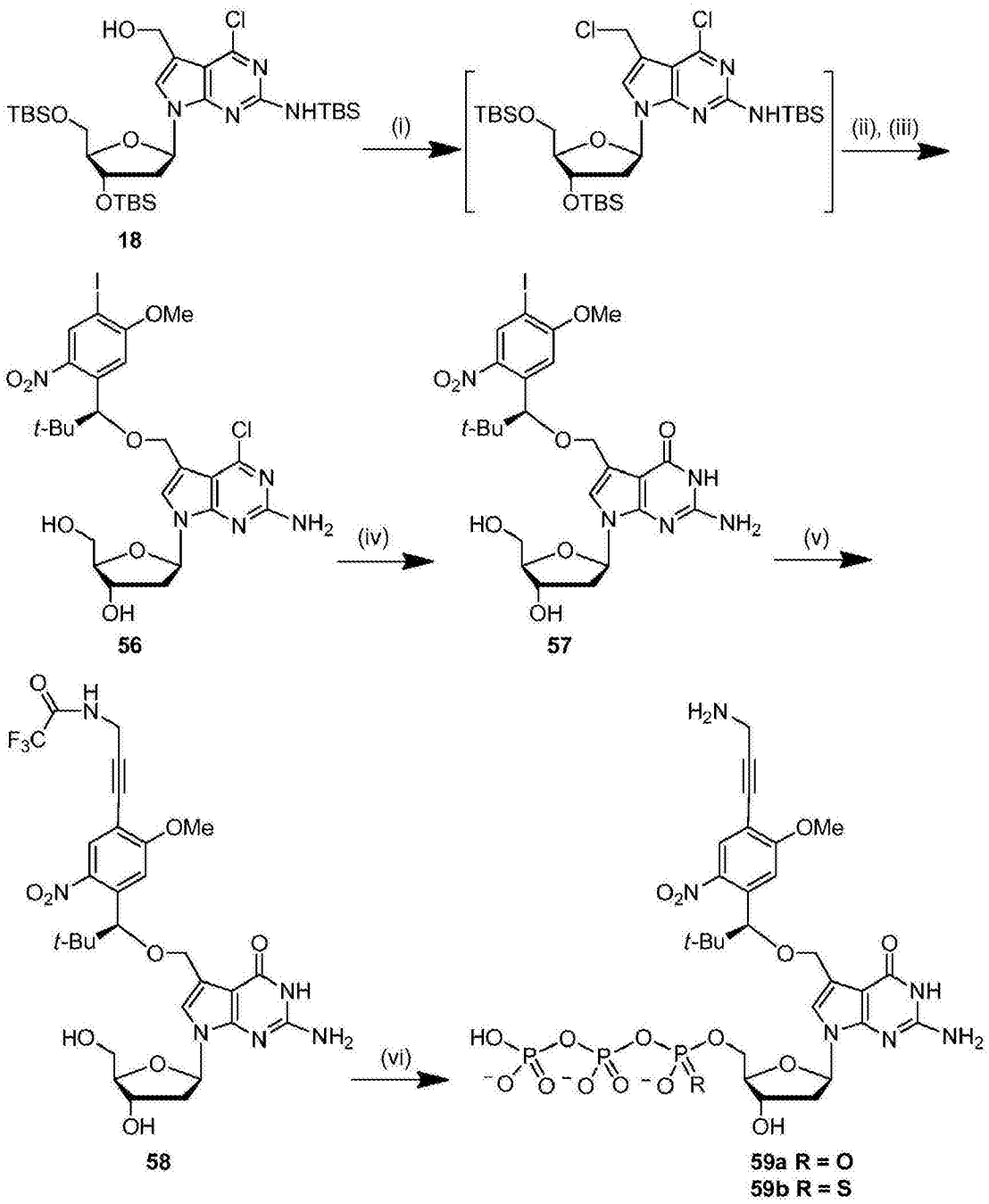
[0600] 将Alexa Fluor488NHS(5mg,7.8μmol)的无水DMSO(200μL)溶液加入三磷酸酯54a(1.6μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2,0.4ml)中。将混合物在室温下避光放置1小时。将反应物首先通过阴离子交换HPLC用Dionex DNApac PA200柱(250×4mm)纯化。流动

相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的三磷酸酯55a的级分并浓缩至小体积,并将产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

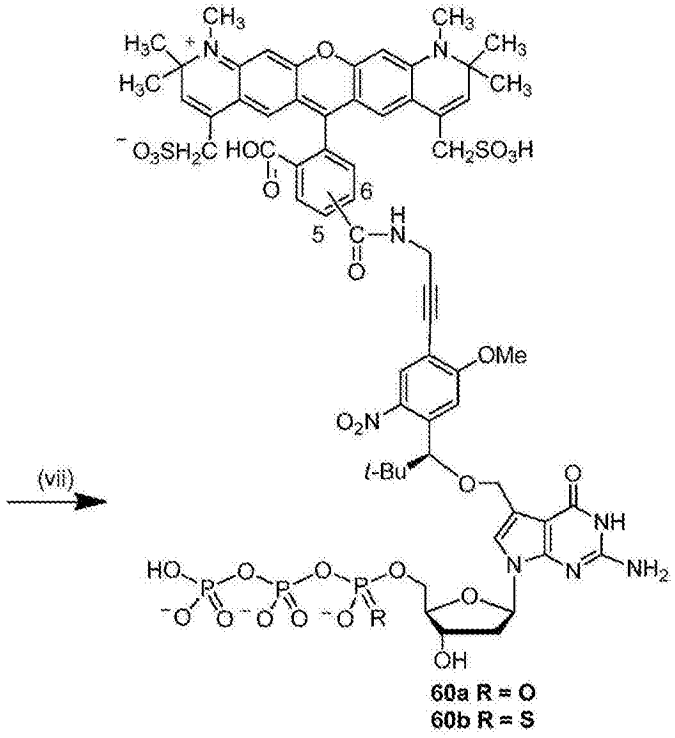
[0601] 将Alexa Fluor488NHS(5mg,7.8μmol)的无水DMSO(200μL)溶液加入硫代三磷酸酯54b(4.1μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2,1.0ml)的溶液中。将混合物在室温下避光放置1小时。将混合物首先通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×10cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的硫代三磷酸酯55b的级分并冻干,将产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0602] 染料标记的7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯和5'-α-硫代三磷酸酯的合成

[0603]



[0604] 方案S26a.染料标记的7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯和5'-α-硫代三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)MsCl,DMAP,二氯甲烷,0℃;(ii)(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,115℃;(iii)n-Bu_4NF,THF,室温,三步18%;(iv)顺-吡啶-2-乙醛肟,1,1,3,3-四甲基胍,1,4-二氧六环/DMF,70℃,72%;(v)N-炔丙基三氟乙酰胺,Pd(PPh_3)$_4$(0),CuI,Et_3N,DMF,96%;(vi)对于59a:$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M HNE$t_3HCO_3$;$NH_4OH$。对于59b:$PSCl_3$,2,4,6-三甲基吡啶,$(EtO)_3PO$,0℃至室温;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M HNE$t_3HCO_3$;$NH_4OH$。

[0605] 

[0606] 方案S26b.(vii)Alexa Fluor594NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)

[0607] 0℃,氮气氛围下向化合物18(680mg,1.0mmol)的无水二氯甲烷(6.0mL)溶液中加入DMAP(502mg,4.1mmol)和MsCl(238μl,3.1mmol)。将反应在0℃搅拌10分钟后用二氯甲烷(20ml)稀释。将溶液通过短硅胶柱(2x3cm),并用己烷/乙酸乙酯/三乙胺(80ml,体积比:80/20/0.5)溶剂系统快速洗脱。将洗脱液真空浓缩,并将残余物与(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(500mg,2.1mmol)混合。将混合物在氮气氛围中于115℃下加热45min,冷却至室温,并溶于THF(10mL),加入n-Bu_4NF(1.07g,3.40mmol),并将混合物在室温下搅拌12小时,然后真空浓缩。将残余物溶于二氯甲烷(50mL)并用盐水(50mL)清洗。水相用二氯甲烷(20mL)萃取两次。合并的有机相经硫酸钠干燥,并真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到2-氨基-6-氯-9-(β-D-2'-脱氧呋喃核糖基)-7-[(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]-甲基-7-脱氮嘌呤56(125mg,三步18%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.24(s,1H,Ph-H),7.04(s,1H,Ph-H),6.91(s,1H,H-8),6.17(dd,1H,J=6.0和8.4Hz,H-1'),5.18(s,1H,Ph-CH),5.11(br s,2H,NH_2),4.71(m,1H,H-3'),4.59(dd,2H,J=12.4和24.4Hz,7-CH_2),4.13(m,1H,H-4'),3.96(s,3H,OCH_3),3.88(m,1H,H-5'a),3.79(m,1H,H-5'b),2.76(m,1H,H-2'a),2.32(m,1H,H-2'b),0.81(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0608] 向化合物56(100mg,0.16mmol)的1,4-二氧六环(1.5mL)和DMF(3.0mL)溶液中加入顺-吡啶-2-乙醛肟(389mg,3.2mmol)和1,1,3,3-四甲基胍(439μL,3.5mmol),并将混合物在氮气氛围中于70℃下加热过夜。将反应混合物用二氯甲烷(20mL)稀释,并依次用乙酸溶液(0.1M,50mL)、饱和碳酸氢钠溶液(50mL)和盐水(50mL)清洗。有机相用硫酸钠干燥,真空浓缩,残余物用硅胶层析纯化,以得到7-[(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷57(70mg,72%)。^1H NMR(400MHz,MeOH-d4):δ8.20(s,1H,Ph-H),7.17(s,1H,Ph-H),6.82(s,1H,H-8),6.18(m,1H,H-1'),5.23(s,1H,Ph-CH),4.71(d,1H,J=12.0Hz,7-CH_2a),4.52(d,1H,J=12.0Hz,7-CH_2b),4.43(m,1H,H-3'),3.97(s,3H,

OCH_3),3.91(m,1H,H-4'),3.71(m,2H,H-5'),2.49(m,1H,H-2'a),2.19(m,1H,H-2'b),0.85(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0609] 将化合物57(50mg,0.08mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺(117mg,0.8mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(18mg,0.02mmol)、碘化亚铜(5.9mg,0.03mmol)、和三乙胺(48μL,0.34mmol)的无水DMF(3.0ml)溶液在50℃下搅拌12小时。将混合物真空浓缩并用硅胶柱层析纯化残余物以得到7-{(S)-1-[5-甲氧基-4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷58(50mg,96%)。^1H NMR(400MHz,MeOH-d4):δ7.87(s,1H,Ph-H),7.26(s,1H,Ph-H),6.84(s,1H,H-8),6.20(m,1H,H-1'),5.25(s,1H,Ph-CH),4.67(d,1H,J=12.0Hz,7-CH_2a),4.54(d,1H,J=12.0Hz,7-CH_2b),4.43(m,1H,H-3'),4.33(s,2H,CH_2),3.95(s,3H,OCH_3),3.89(m,1H,H-4'),3.70(m,2H,H-5'),2.46(m,1H,H-2'a),2.18(m,1H,H-2'b),0.86(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0610] 在氮气气氛中于0℃下用含$POCl_3$(27μL,0.3mmol)和质子海绵(33mg,0.16mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物58(52mg,0.08mmol)磷酸化4小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.5mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵溶液(TEAB,0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤,通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10mL)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时以得到7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸酯59a,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{27}H_{36}N_6O_{17}P_3$ $[M-H]^-$,计算质量为809.1350,测得质量为809.1360。

[0611] 在氮气氛围中于室温下用含$PSCl_3$(9μL,0.09mmol)和2,4,6-三甲基吡啶(18mg,0.15mmol)的磷酸三乙酯(0.5mL)将化合物59(50mg,0.075mmol)硫代磷酸化2.5小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.5mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌2分钟后,加入三乙基碳酸氢铵溶液(TEAB,1M,pH7.5;20mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤,通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有硫代三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10mL)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时,得到7-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-α-硫代三磷酸酯59b,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{27}H_{36}N_6O_{16}P_3S$ $[M-H]^-$,计算质量为825.1121,测得质量为825.1103。

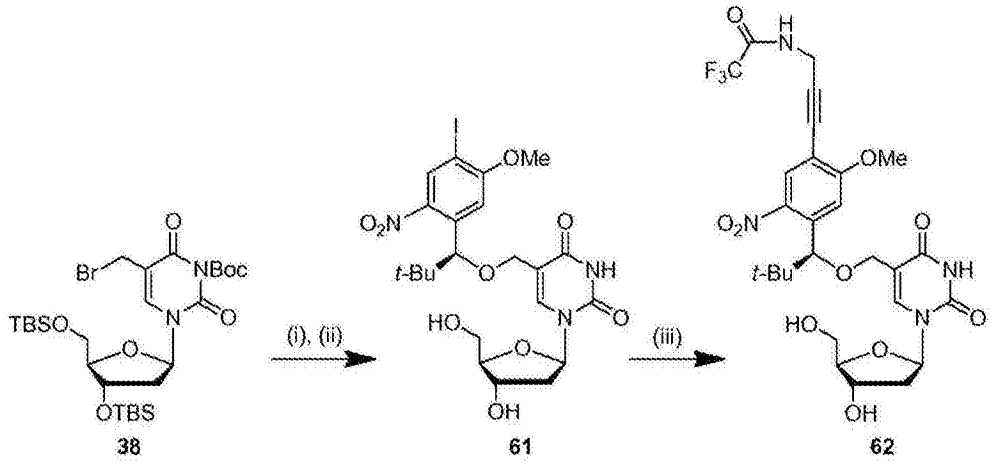
[0612] 将Alexa Fluor594NHS(4.2mg,5.2μmol)的无水DMSO(170μL)溶液加入三磷酸酯59a(2.2μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2;0.5mL)的溶液中。将混合物在室温下避光放置1小时。将混合物首先通过阴离子交换HPLC用Dionex DNApac PA200柱(250×4mm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的三磷酸酯60a的级分并浓缩至小体积。产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-

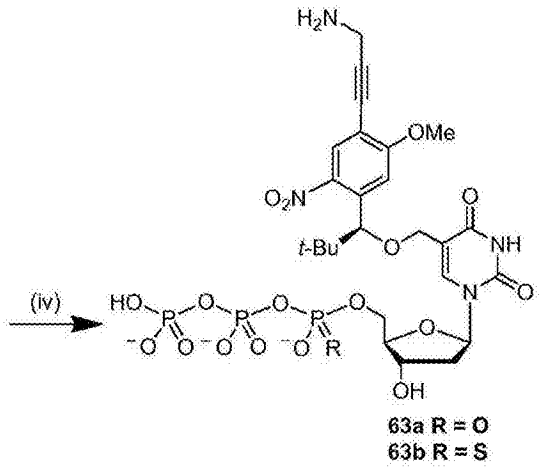
300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0613] 将Alexa Fluor594NHS(5mg,6.2μmol)的无水DMSO(200μL)溶液加入硫代三磷酸酯59b(4.45μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2;0.78ml)的溶液中。将混合物在室温下避光放置1小时。将混合物首先通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×10cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的硫代三磷酸酯60b的级分并浓缩至小体积,产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0614] 染料标记的5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯和5'-α-硫代三磷酸酯的合成

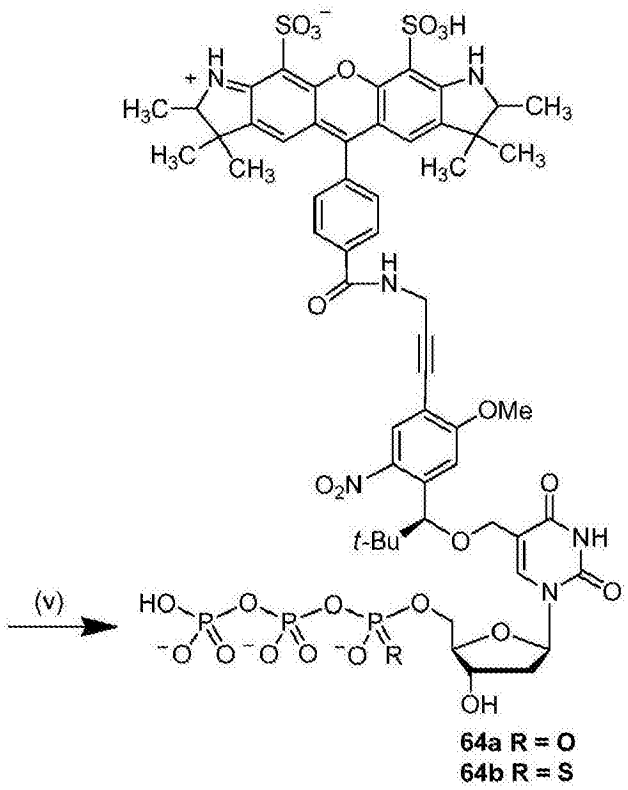
[0615]





[0616] 方案S27a.染料标记的5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇,110℃;(ii)NH_4F,MeOH,50℃,二步28%;(iii)N-炔丙基三氟乙酰胺,Pd$(PPh_3)_4$(0),CuI,Et_3N,DMF,90%;(iv)对于63a:$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,$n\text{-}Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$;NH_4OH。对于63b:$PSCl_3$,2,6-二甲基吡啶,$(EtO)_3PO$,0℃至室温;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,$n\text{-}Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$;NH_4OH。

[0617]



[0618] 方案S27b.(vii)Alexa Fluor532NHS,0.1M $Na_2CO_3/NaHCO_3$缓冲液(pH9.2)

[0619] 氮气氛围下将化合物38(350mg,0.54mmol)与(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(720mg,1.97mmol)于110℃下加热45min。将混合物冷却至室温,溶于甲醇(10mL),然后加入氟化铵(400mg,11.1mmol)。将混合物在50℃下搅拌12小时,真空浓缩,溶于二氯甲烷(50mL)并用盐水(50mL)清洗。有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩。将残余物用硅胶层析纯化以得到5-[(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷61(90mg,28%)。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$):δ8.34(s,1H,Ph-H),7.65(s,1H,H-6),7.12(s,1H,Ph-H),6.17(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),5.18(s,1H,Ph-CH),4.59(m,1H,H-3'),4.27(d,1H,J=12.0Hz,5-CH_2a),4.15(d,1H,J=12.0Hz,5-CH_2b),4.00(m,1H,H-4'),3.97(s,3H,OCH_3),3.95(m,1H,H-5'a),3.82(m,1H,H-5'b),2.34(m,2H,H-2),0.84(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0620] 将化合物61(80mg,0.13mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺(196mg,1.30mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(30mg,0.026mmol)、碘化亚铜(9.9mg,0.052mmol)、和三乙胺(80μL)的无水DMF(3.0mL)溶液在50℃下搅拌12小时。将混合物真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化残余物以得到5-{(S)-1-[5-甲氧基-4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧尿苷62(75mg,90%)。^1H NMR(400MHz,MeOD-d4):δ8.11(s,1H,H-6),8.08(s,1H,Ph-H),7.36(s,1H,Ph-H),6.27(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.33(s,1H,Ph-CH),4.47(m,1H,H-3'),4.44(s,2H,5-CH_2),4.32(d,2H,J=2.0Hz,CH_2),4.08(s,3H,OCH_3),3.99(m,1H,H-4'),3.87(m,1H,H-5'a),3.79(m,1H,H-5'b),2.30(m,2H,H-2'),0.93(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0621] 在氮气气氛中于0℃下用含$POCl_3$(21μL,0.22mmol)和质子海绵(27mg,0.13mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物62(40mg,0.064mmol)磷酸化4小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.5mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三

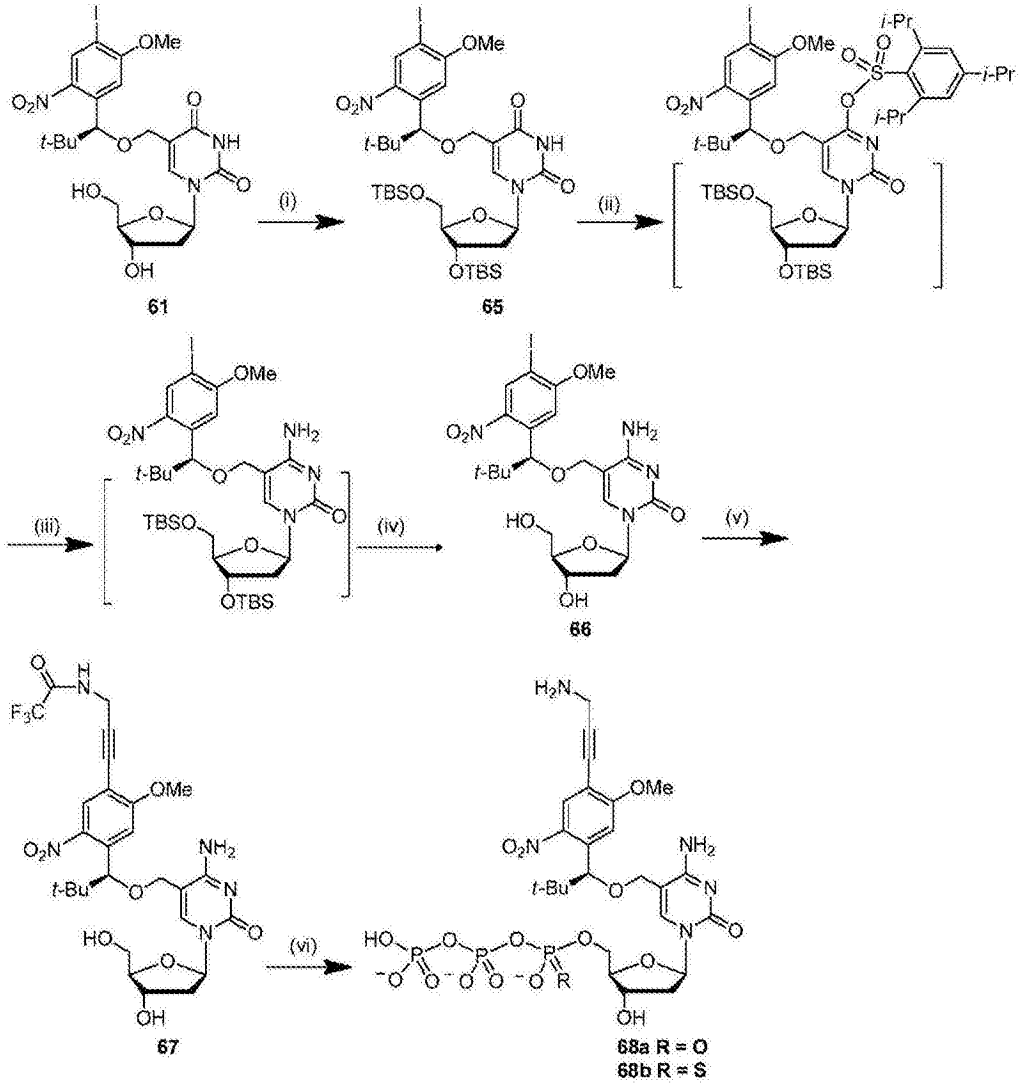
乙基碳酸氢铵溶液(TEAB,0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤,通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5MTEAB/25%乙腈。合并含有三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10mL)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时,得到5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸酯63a,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0622] 在氮气氛围中于室温下用含$PSCl_3$(26μL,0.25mmol)和2,6-二甲基吡啶(89mg,0.84mmol)的磷酸三乙酯(0.6mL)将化合物62(130mg,0.21mmol)硫代磷酸化1小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(474mg,1.0mmol)和三正丁胺(200μL)的无水DMF(2.0mL)溶液。搅拌2分钟后,加入三乙基碳酸氢铵溶液(TEAB,1M,pH7.5;20mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤,通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有硫代三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10mL)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时,得到5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧尿苷-5'-α-硫代三磷酸酯63b,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{25}H_{34}N_4O_{17}P_3S[M-H]^-$,计算质量为787.0853,测得质量为787.0884。

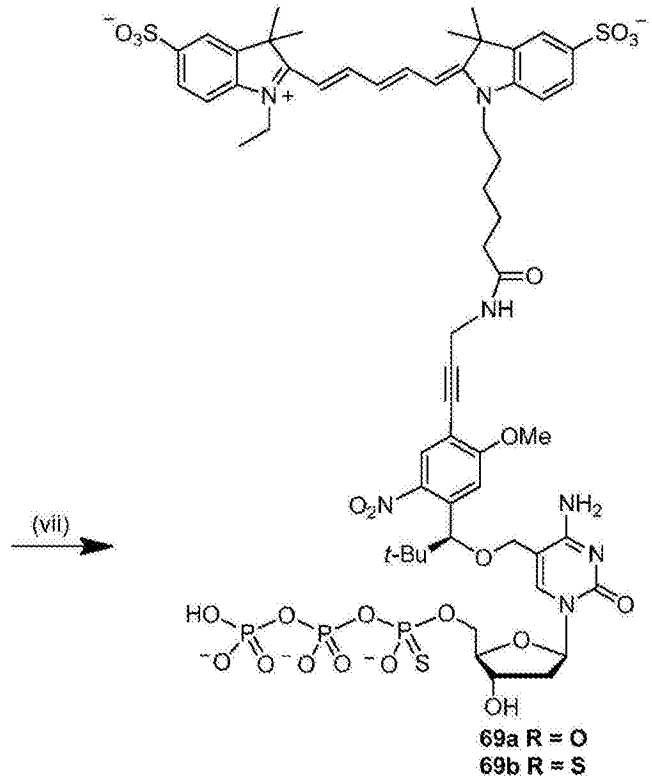
[0623] 将Alexa Fluor532NHS(2mg,2.76μmol)的无水DMSO(80μL)溶液加入三磷酸酯62a(1.07μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2,0.3ml)的溶液中。将混合物在室温下避光放置1小时。将混合物首先通过阴离子交换HPLC用Dionex DNApac PA200柱(250×4mm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的三磷酸酯63a的级分并浓缩至小体积。产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0624] 将Alexa Fluor532NHS(2.5mg,3.45μmol)的无水DMSO(100μL)溶液加入硫代三磷酸酯62b(1.03μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2,0.15mL)的溶液中。将混合物在室温下避光放置1小时。将混合物首先通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×10cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的硫代三磷酸酯63b的级分并冻干,产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0625] 染料标记的5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯和5'-α-硫代三磷酸酯的合成

[0626] 

[0627] 方案S28a.染料标记的5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯的合成。试剂和条件:(i)TBSCl,咪唑,DMF,室温,96%;(ii)2,4,6-三异丙基苯磺酰氯,DMAP,Et_3N,CH_2Cl_2,室温;(iii)NH_3,1,4-二氧六环,90℃;(iv)n-Bu_4NF,THF,室温,三步83%;(v)N-炔丙基三氟乙酰胺,Pd$(PPh_3)_4(0)$,CuI,Et_3N,DMF,91%;(vi)对于68a:$POCl_3$,质子海绵,$(MeO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$,NH_4OH。对于68b:$PSCl_3$,2,6-二甲基吡啶,$(EtO)_3PO$,0℃;$(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$,n-$Bu_3N$,DMF;1M $HNEt_3HCO_3$;NH_4OH。

[0628] 

[0629] 方案S28b.(vii)Cy5NHS,0.1MNa2CO3/NaHCO3缓冲液(pH9.2)

[0630] 向化合物61(295mg,0.49mmol)的无水DMF(5.0mL)溶液中加入TBSCl(185mg,1.23mmol)和咪唑(160mg,2.35mmol)。将混合物在室温下搅拌12小时,真空浓缩,并溶于二氯甲烷(50mL)。用饱和碳酸氢钠溶液(50mL)清洗该溶液,水相用二氯甲烷(30mL)萃取3次。合并的有机相经硫酸钠干燥,真空浓缩,并用硅胶层析纯化残余物,以得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷65(400mg,96%)。^{1}H NMR(400MHz,CDCl3):δ8.32(s,1H,Ph-H),7.64(s,1H,H-6),7.12(s,1H,Ph-H),6.12(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),5.20(s,1H,Ph-CH),4.60(m,1H,H-3'),4.25(d,1H,J=12.0Hz,5-CH2a),4.14(d,1H,J=12.0Hz,5-CH2b),4.02(m,1H,H-4'),3.97(s,3H,OCH3),3.94(m,1H,H-5'a),3.83(m,1H,H-5'b),2.34(m,2H,H-2),0.90和88(2s,18H,SiC(CH3)3),0.84(s,9H,C(CH3)3)0.08(3s,12H,CH3)。

[0631] 向化合物65(400mg,0.48mmol)、DMAP(64mg,0.53mmol)和三乙胺(0.60mL,4.32mmol)的无水二氯甲烷(15mL)溶液中加入2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(581mg,1.92mmol)。将混合物在氮气气氛中室温下搅拌过夜,真空浓缩,并将残余物溶于氨的1,4-二氧六环溶液(0.5M,20mL)。将混合物转移至密封管,并在90℃下加热过夜。然后将反应物冷却至室温,真空浓缩,并将残余物溶于四氢呋喃(8.0mL),然后加入正丁基氟化铵(333mg,1.06mmol)。将混合物在室温下搅拌4小时,真空浓缩并用硅胶柱层析纯化残余物以得到5-[(S)-1-(4-碘-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷66(240mg,共三步83%)。^{1}H NMR(400MHz,MeOD-d4):δ8.33(s,1H,Ph-H),7.91(s,1H,H-6),7.10(s,1H,Ph-H),6.16(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.19(s,1H,Ph-CH),4.41(d,1H,J=12.4Hz,5-CH2a),4.33(m,1H,H-3'),4.26(d,1H,J=12.4Hz,5-CH2b),3.97(s,3H,OCH3),3.88(m,1H,H-4'),3.70(m,2H,H-5'),2.34(m,1H,H-2'a),2.17(m,1H,H-2'b),0.89(s,9H,C(CH3)3)。

[0632] 将化合物66(245mg,0.4mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺(603mg,4.0mmol)、四(三苯基膦)钯(0)(92mg,0.8mmol)、碘化亚铜(30mg,0.16mmol)、和三乙胺(240μL,1.7mmol)的无水DMF(5.0mL)溶液在50℃下搅拌12小时。将混合物真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化以得到5-{(S)-1-[5-甲氧基-4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧胞苷67(230mg,91%)。^{1}H NMR(400MHz,MeOD-d_4):δ7.98(s,1H,Ph-H),7.92(s,1H,H-6),7.19(s,1H,Ph-H),6.15(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),5.21(s,1H,Ph-CH),4.41(d,1H,J=13.2Hz,5-CH_2a),4.33(m,3H,H-3'和CH_2),4.27(d,1H,J=13.2Hz,5-CH_2b),3.96(s,3H,OCH_3),3.88(m,1H,H-4'),3.72(m,2H,H-5'),2.30(m,1H,H-2'a),2.12(m,1H,H-2'b),0.84(s,9H,$(CH_3)_3$)。

[0633] 在氮气气氛中于0℃下用含$POCl_3$(15μL,0.16mmol)和质子海绵(31mg,0.14mmol)的磷酸三甲酯(0.35mL)将化合物67(45mg,0.072mmol)磷酸化4小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg,0.5mmol)和三正丁胺(100μL)的无水DMF(1.0mL)溶液。搅拌10分钟后,加入三乙基碳酸氢铵溶液(TEAB,0.1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤,通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5MTEAB/25%乙腈。合并含有三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10ml)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时,得到5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸酯68a,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{25}H_{35}N_5O_{17}P_3$[M-H]$^-$,计算质量为770.1241,测得质量为770.1234。

[0634] 在氮气氛围中于0℃下用含$PSCl_3$(24μL,0.23mmol)和2,6-二甲基吡啶(80mg,0.75mmol)的磷酸三乙酯(0.5mL)将化合物67(118mg,0.19mmol)硫代磷酸化1小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(474mg,1.0mmol)和三正丁胺(200μL)的无水DMF(2.0mL)溶液。搅拌2分钟后,加入三乙基碳酸氢铵溶液(TEAB,1M,pH7.5;20mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将残余物溶于75%0.1M TEAB/25%乙腈(20mL),过滤,通过阴离子交换层析用Q Sepharose FF柱(2.5×20cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有硫代三磷酸酯的级分并冻干。将残余物溶于水(10mL)并用浓氨水(10mL,27%)在室温下处理一小时,得到5-{(S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-5-甲氧基-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧胞苷-5'-α-硫代三磷酸酯68b,通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。HRMS(ESI):对于分子离子$C_{25}H_{35}N_5O_{16}P_3S$[M-H]$^-$,计算质量为786.1012,测得质量为786.0983。

[0635] 将Cy5NHS(5mg,6.3μmol)的无水DMSO(200μL)溶液加入三磷酸酯68a(1.59μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2,0.35mL)中。将混合物在室温下避光放置1小时。将染料标记的三磷酸酯首先通过阴离子交换HPLC用Dionex DNApac PA200柱(250×4mm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的三磷酸酯69a的级分并浓缩至小体积。产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0636] 将Cy5NHS(5mg,6.3μmol)的无水DMSO(200μL)溶液加入硫代三磷酸酯68b(2.96μmol)的$NaHCO_3/Na_2CO_3$缓冲液(0.1M,pH9.2;0.53mL)的溶液中。将混合物在室温下避光放置1小时。将染料标记的硫代三磷酸酯首先通过阴离子交换层析在Q Sepharose FF柱(2.5×10cm)纯化。流动相:A,75%0.1M TEAB/25%乙腈;B,75%1.5M TEAB/25%乙腈。合并含有染料标记的硫代三磷酸酯69b的级分并冻干。产物通过反相HPLC用PerkinElmer Aquapore OD-300柱(7μm,250×4.6mm)进一步纯化。流动相:A,0.1M TEAB;B,乙腈。

[0637] 基于本公开内容,能够实施本文所公开并要求保护的所有方法而无需过度实验。尽管已通过某些实施方案描述了本发明的组合物和方法,但对于本领域技术人员来说很明显的是,可对本文所述方法的方法、步骤或步骤顺序进行修改,而不背离本发明的构思、精神和范围。更具体地,很显然,可将本文所述试剂替换成某些在化学和生理学方面均相关的某些试剂,而得到相同或相似的结果。对于本领域技术人员而言显而易见的所有这些相似的取代和修改均认为是在所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和构思之内。

[0638] 实施例9-UV光切割的研究

[0639] UV光切割速率被发现与多种实验因素(包括光强度)有关系。见McCray等(1980)和McGall等(1997),均通过引用并入本文。为了比较本文中描述的核苷酸类似物之间的光化学切割速率,开发了向样品递送的每日光强度输出为0.70±0.01W/cm^2的程序。在这些研究中使用的定制设计的UV去保护装置之前已在Wu等(2007)(通过引用并入本文)中记载,并且所实施的程序如下所述。

[0640] UV去保护装置(UV deprotector)的搭建:按照制造商要求电源接通约30分钟以后,开灯并运行环流浴。将红外液体过滤器冷却至9℃。光强的确定见图5,使用PM100型功率计(Thorlabs)、1000μm的针孔(pinhole)(Edmund Optics)、切去一半的改进的0.5mL微量离心管(Eppendorf tube)和3轴手动位移台(Newport)。切去一半的微量离心管位于针孔和功率计探测头前用于检测光通过反应溶液后的几何形变。位移台用来调整离心管/针孔/检测器,以使电弧光束的强度达到最大。

[0641] 强度调节至0.7W/cm^2:为稳定光源输出,测量光强之前开启紫外光源并运行1小时。然后增加电源的电流以调整测出功率。根据如下公式,将测出功率(P)调节至约5.5mW以达到0.70W/cm^2的强度(I):

[0642] $$I=\frac{P}{\pi\times r^2}$$

[0643] 其中r为针孔的半径。功率读取间隔1秒,持续记录5分钟并将其转化为光强读数。在六周的时间里,光强读数保持在0.68±0.01至0.72±0.02W/cm^2的范围内。

[0644] 与0.5mL管支架的光束对位:接下来将改进的微量离心管、针孔和功率计从UV去保护装置上移除,并将转动样品支架(rotating sample holder)安装在67.18±0.25mm的高度。然后,通过将0.5mL微量离心管放置在样品支架内来聚焦光束。该离心管经过改进,其内安置有对位卡,以提供10μL至20μL体积高度的参照线,参见图5。参照线的作用是使光束能对准给定反应体积的中心。进一步的光束调节通过观察汞灯电弧在后反镜上的成像来核实。第二个对位卡安置在转动样品支架上来观察成像,当使用后反镜适当调节时,在电弧孔隙本身上面会出现倒过来的电弧图像。该步骤确保电弧的热点不会重叠,以避免在~5.5mW

的功率输出下不致过热。通过用调节螺丝调节马达的扭矩，将样品支架的转动速度控制在1,200～1,350rpm的范围内，转速通过Nova-Strobe DA Plus频闪观测器(Mona rch Instrument)测出。

[0645] 光化学切割测定：如聚合酶终点测定(PEP assay)描述的条件，掺入核苷酸类似物的反应体积为10μL，核苷酸类似物的终浓度为100nM。见Litosh等(2011)，通过引用并入本文。均与BODIPY-FL标记的引物-1杂交的核酸模板-2(OligoTemplate-2)、核酸模板-5(OligoTemplate-5)和核酸模板-4(OligoTemplate-4)分别用于C^7-HOMedA、C^7-HOMedG和HOMedU类似物。与BODIPY-FL标记的引物-3杂交的核酸模板-8(OligoTemplate-8)用于测定HOMedC类似物。掺入反应用1mM NaN_3溶液，1mM NaN_3、50mM DTT溶液，或试剂C至G(见图4说明)猝灭，利用我们的UV去保护装置暴露于365nm紫外(UV)光下不同时间后置于冰上。加入10μL终止液(98％去离子甲酰胺；10mM Na_2EDTA，pH8.0；25mg/mL蓝色葡聚糖，MW2,000,000)，并用AB377型DNA测序仪对样品进行分析。切割试验重复进行三次并计算平均DT_{50}值±1SD，如Litosh等(2011)(通过引用并入本文)所述。

[0646] 参考文献

[0647] 以下参考文献以及附录中列出的参考文献均以引用方式明确并入本文，其程度为它们对本文所述内容提供补充性的示例性方法或其他细节。

[0648] 美国专利3,822,996

[0649] 美国专利3,859,045

[0650] 美国专利3,917,499

[0651] 美国专利4,737,155

[0652] 美国专利4,304,568

[0653] 美国专利4,631,066

[0654] 美国专利4,737,155

[0655] 美国专利4,439,356

[0656] 美国专利5,151,507

[0657] 美国专利5,188,934

[0658] 美国专利5,302,509

[0659] 美国专利5,770,367

[0660] 美国专利6,664,079

[0661] 美国专利7,057,026

[0662] 美国专利7,345,159

[0663] 美国专利7,414,116

[0664] 美国专利7,476,734

[0665] 美国专利7,541,444

[0666] 美国专利7,556,537

[0667] 美国专利7,592,435

[0668] 美国专利7,635,578

[0669] 美国专利7,713,698

[0670] 美国专利7,771,973

[0671] 美国专利7,897,737

[0672] 美国专利7,964,352

[0673] 美国专利8,148,503

[0674] 美国专利申请公开2004/0110196

[0675] 美国专利申请公开2006/0160081

[0676] 美国专利申请公开2010/0041041

[0677] WO2012/037394

[0678] Aliotta et al.,Genet Anal.Biomol Eng.,12:185-95,1996.

[0679] Axelrod,Methods Cell Biol.,30:245-70,1989.

[0680] Bailey,Ozonation in organic chemistry Vol.1,Academic Press,Inc.,New York,1978

[0681] Bailey,Ozonation in organic chemistry Vol.2,Academic Press,Inc.,New York,1982

[0682] Barltrop etal.,Chem.Commun.,822-23,1966.

[0683] Barone etal.,Nucleosides,Nucleotides,and Nucleic Acids,20:1141-45,2001.

[0684] Barth et al.,J.Amer.Chem.Soc.,119:4149-59,1997.

[0685] Beadling et al.,J.Mol.Diagn.,13:504-13,2012.

[0686] Bentley et al.,Nature,456:53-59,2008.

[0687] Berson&Brown,J.Amer.Chem.Soc.,77:447-50,1955.

[0688] Bhalla,Toxicology Letters,73:91-101,1994

[0689] Bowers et al.,Nature Methods,6:593-95,2009.

[0690] Cameron and Frechet,J.Am.Chem.Soc.,113:4303-13,1991.

[0691] Canard&Sarfati,Gene,148:1-6,1994.

[0692] Carrasco&Vázquez,Med.Res.Rev.,4:471-512,1984.

[0693] Cleland,Biochemistry,3:480-82,1964.

[0694] Corrie et al.,J.Chem.Soc.,Perkin Trans.1,1015-19,1992.

[0695] Corrie,in Dynamics studies in biology,Goeldner and Givens(Eds.),Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA,Weinheim,pp.1-28,2005.

[0696] Crabtree and Kemp,Indus.Eng.Chem.,38:278-296,1946

[0697] De Mayo,in Advances inOrganic Chemistry,Raphael et al.(Eds.),Interscience,NY,2:367-425,1960.

[0698] Dressman et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100:8817-8822,2003.

[0699] Eid et al.,Science,323:133-138,2009.

[0700] EPA(2011)http://www.epa.gov/oar/oaqps/gooduphigh/bad.html#6.Last updated on Thursday,July21,2011.

[0701] 欧洲专利申请87310256.0

[0702] 欧洲专利EP0640146

[0703] Fairchild et al.,Science,130:861-862,1959

[0704] Fare et al.,Anal.Chem.,75:4672-4675,2003.

[0705] Futreal et al.,Nature Rev.Cancer,4:177-83,2004.

[0706] Gardner et al.,Nucleic Acids Res.,27:2545-53,1999.

[0707] Gardner et al.,Nucleic Acids Res.,40:7404-15,2012.

[0708] Gershon,Nature Methods,1:263-270,2004.

[0709] Giegrich et al.,Nucleosides Nucleotides,17:1987-1996,1998.

[0710] Givens&Schowen,In Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography,J.W.Birks,Ed.;VCH:New York,pp125-47,1989.

[0711] Gommers-Ampt et al.,FASEB J.,9:1034-42,1995.

[0712] Gordon and Gregory,Organic Chemistry of Colour,Springer-Verlag,New York,1983

[0713] Gregory,Encyclopedia of Chemical Technology(Kirk,R.E.,and Othmer,D.F.,eds)pp.1-66,2009

[0714] Guo et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,105:9145-50,2008.

[0715] Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,and Use,Stahl&Wermuth(Eds.),Verlag Helvetica Chimica Acta,2002.

[0716] Hardwick et al.,Trans.Farad.Soc.,56:44-50,1960.

[0717] Harris et al.,Science,320:106-109,2008.

[0718] Hasan et al.,Tetrahedron,53:4247-64,1997.

[0719] Hastings,J.Mol.Evol.19:309-21,1983.

[0720] Haugland,In The handbook.A guide of fluorescent probes and labeling technologies,Invitrogen,2005.

[0721] Hewitt et al.,Nature,344:56-58,1990

[0722] Hsia et al.,Current Opinion in Structural Biology,15:126-134,2005.

[0723] Iafrate et al.,Nature Genet.,36:949-51,2004.

[0724] Ito et al.,Nature,466:1129-33,2010.

[0725] Ju et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:19635-40,2006.

[0726] Kaiser et al.,J.Biol.Chem.,274:21387-394,1999.

[0727] Kriaucionis&Heintz,Science,324:929-30,2009.

[0728] Lehninger,In:Principles of Biochemistry,273-305,W.H.Freeman and Co.,NY,2005.

[0729] Levy et al.,PLoS Biol.,5:e254,2007.

[0730] Limbach,et al.,Nucleic Acids Res.,22:2183-2196,1994.

[0731] Litosh et al.,Nucleic Acid Res.,39:e39.

[0732] Lyamichev et al.,Nature Biotechnol.,17:292-296,1999.

[0733] March's Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms,and Structure,2007.

[0734] Margulies et al,Nature,437:376-80,2005.

[0735] McCray et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:7237-41,1980.

[0736] McDougall et al.,Nucleosides,Nucleotides&Nucleic Acids,20:501-6,2001.

[0737] McGall et al.,J.Amer.Chem.Soc.,119:5081-90,1997.

[0738] Meldrum et al.Clin.Biochem.Rev.,32:177-95,2011.

[0739] Metzker et al.,Biotechniques,25:446-462,1998.

[0740] Metzker et al.,Nucleic Acids Res.,22:4259-67,1994.

[0741] Metzker,Genome Res.,15:1767-76,2005.

[0742] Metzker,Nature Rev.Genet.,11:31-46,2010.

[0743] Mitra et al.,Anal.Biochem.,320:55-65,2003.

[0744] Morrison,In:The chemistry of nitro and nitroso groups,Feuer(Ed.),Interscienee publishers,NY,165-213,1969.

[0745] Mosher et al.,J.Chem.Phys.32:1888-89,1960.

[0746] Moyer et al.,Laser Focus World,29(10),1993.

[0747] Nieman,In Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography,J.W.Birks,Ed.;VCH:New York,pp99-123,1989.

[0748] Orosz et al.,Crit.Rev.Anal.Chem.,26:1-27.1996.

[0749] Patchornik et al.,J.Am.Chem.Soc.,92:6333-35,1970.

[0750] Patchornik,In:Pharmacology of hormonal polypeptides and proteins(Back et al.(Eds.),Plenum Press,NY,11-16,1968.

[0751] PCT申请PCT/US90/05565.

[0752] Ramanathan et al.,Anal.Biochem.,330:227-241,2004.

[0753] Redon et al.,Nature,444:444-454,2006.

[0754] Reichmanis et al.,J.Polymer Sci.,23:1-8,1985.

[0755] Rockhill et al.,J.Am.Chem.Soc.,118:10065-68,1997.

[0756] Ronaghi et al.,Science,281:363-365,1998.

[0757] Salvin and Walker,Textile Research Journal,25:571-581,1955

[0758] Sebat et al.,Science,305:525-528,2004.

[0759] Seela and Peng,In:Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,Beaucage etal.(Eds.),John Wiley&Sons,Inc.,1.10.1,2005.

[0760] Seo et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,102:5926-5931,2005.

[0761] Service,Science,282:1020-1021,1998.

[0762] Smith and Ho,J.Org.Chem.,55:2543,1990.

[0763] Soengas et al.,J.Mol.Biol.,253:517-29,1995

[0764] Sousa&Weinstein,J.Org.Chem.,27:3155-59,1962.

[0765] Staudiner&Meyer,Helv.Chim.Acta,2:635,1919.

[0766] Stranger et al.,Science,315:848-853,2007.

[0767] Stupi et al.,Angew.Chem.Int.Ed.,51:1724-1727,2012.

[0768] Su et al.,J.Mol Diagn.,13:74-84,2011.

[0769] Tahiliani et al.,Science,324:930-35,2009.

[0770] Turcatti et al.,Nucleic Acids Res.,36:e25,2008.

[0771] Tuzun et al.,Nature Genet.,37:727-32,2005.

[0772] Walker et al.,Biochemistry,25:1799-1805,1986.

[0773] Weinstein et al.,J.Org.Chem.,31:1983-1985,1966.

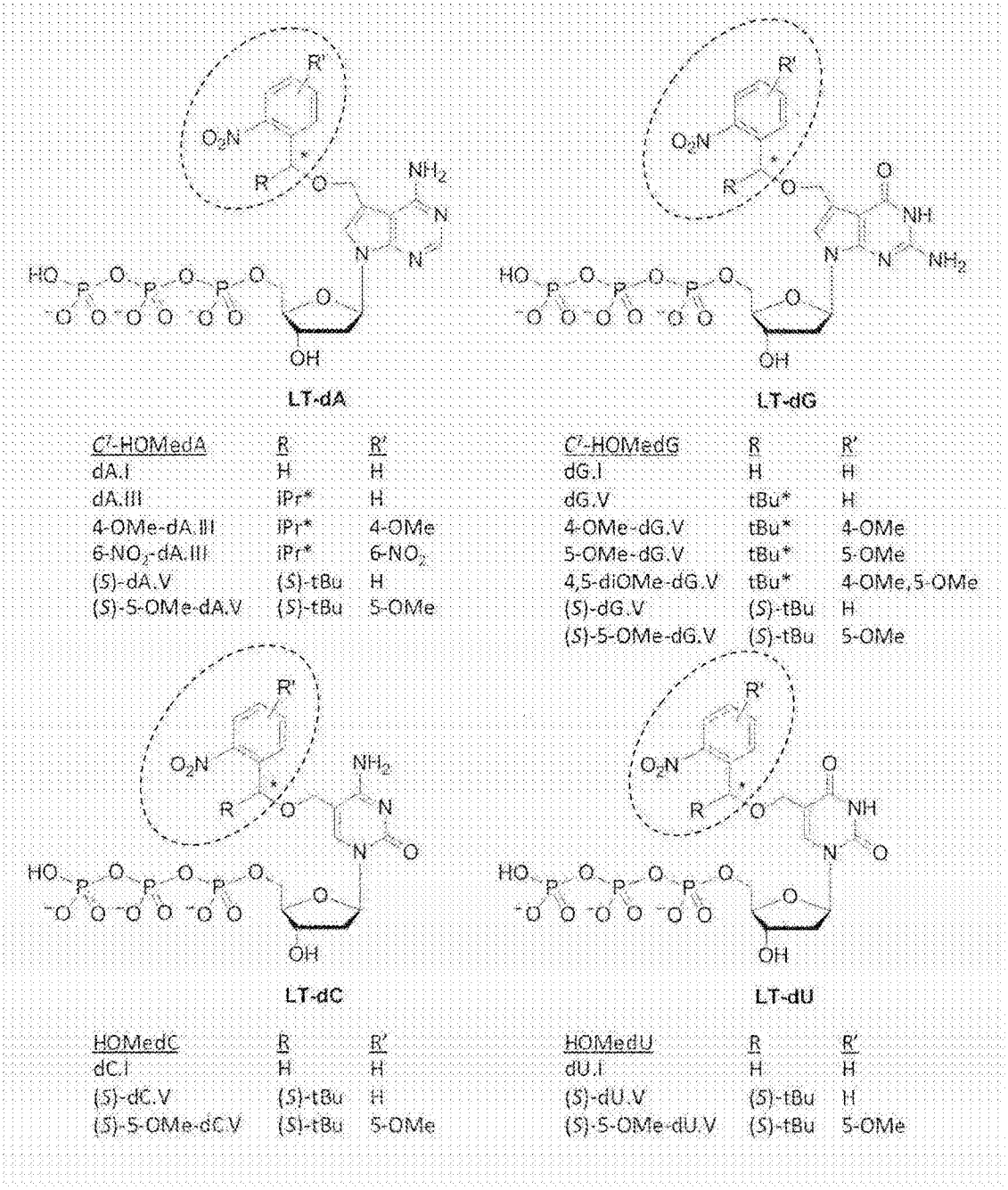
[0774] Wettermark,Nature,194:677,1962.

[0775] Wootton&Trentham,In:Photochemical probes in biochemistry(NATO Science Series C),Nielsen(Ed).,Kluwer Academic Publishers,Ann Arbor,272:277-296,1989.

[0776] Wu et al.,Nature Genet.,44:251-253,2012.

[0777] Wu et al.,Nucleic Acids Res.,35:6339-6349,2007.

[0778] Wyatt&COhen,Biochem.J.,55:774-782,1953.



C'-HOMedA	R	R'
dA.I	H	H
dA.III	iPr*	H
4-OMe-dA.III	iPr*	4-OMe
6-NO_2-dA.III	iPr*	6-NO_2
(*S*)-dA.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dA.V	(*S*)-tBu	5-OMe

C'-HOMedG	R	R'
dG.I	H	H
dG.V	tBu*	H
4-OMe-dG.V	tBu*	4-OMe
5-OMe-dG.V	tBu*	5-OMe
4,5-diOMe-dG.V	tBu*	4-OMe,5-OMe
(*S*)-dG.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dG.V	(*S*)-tBu	5-OMe

HOMedC	R	R'
dC.I	H	H
(*S*)-dC.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dC.V	(*S*)-tBu	5-OMe

HOMedU	R	R'
dU.I	H	H
(*S*)-dU.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dU.V	(*S*)-tBu	5-OMe

图1

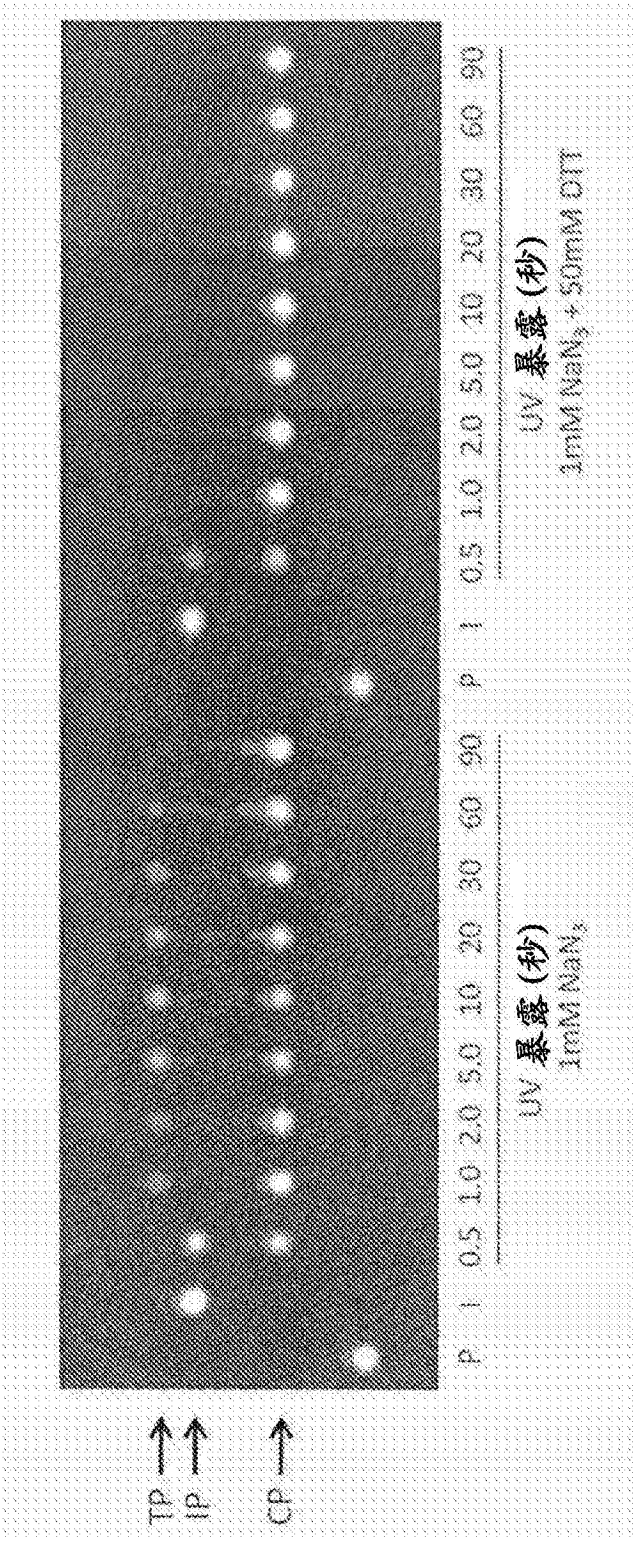

TP
IP
CP
P 1 0.5 1.0 2.0 5.0 10 20 30 60 90
UV 暴露 (秒)
1mM NaN3
P 1 0.5 1.0 2.0 5.0 10 20 30 60 90
UV 暴露 (秒)
1mM NaN3 + 50mM DTT

图2

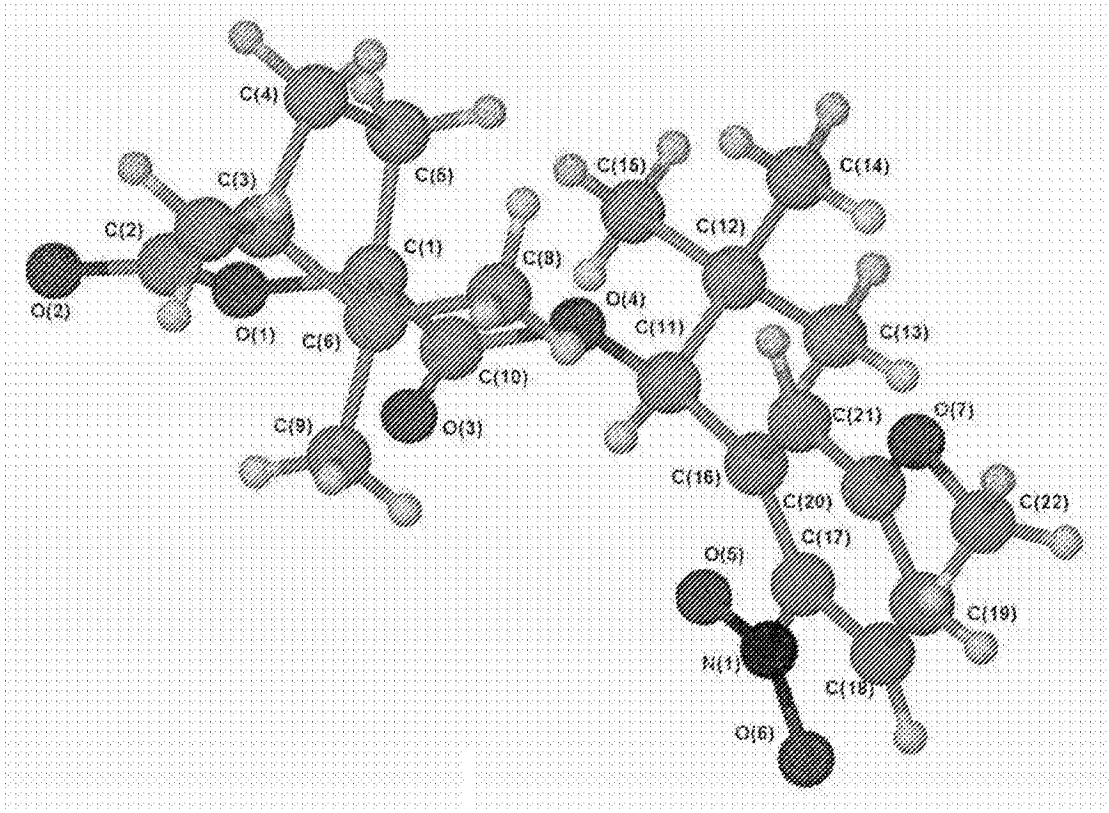

C(4)
C(3)
C(5)
C(2)
C(1)
C(8)
O(2)
O(1)
C(6)
C(10)
C(9)
O(3)
C(15)
C(14)
C(12)
O(4)
C(11)
C(13)
C(21)
O(7)
C(16)
C(20)
C(22)
C(17)
O(5)
C(19)
N(1)
C(18)
O(6)

图3

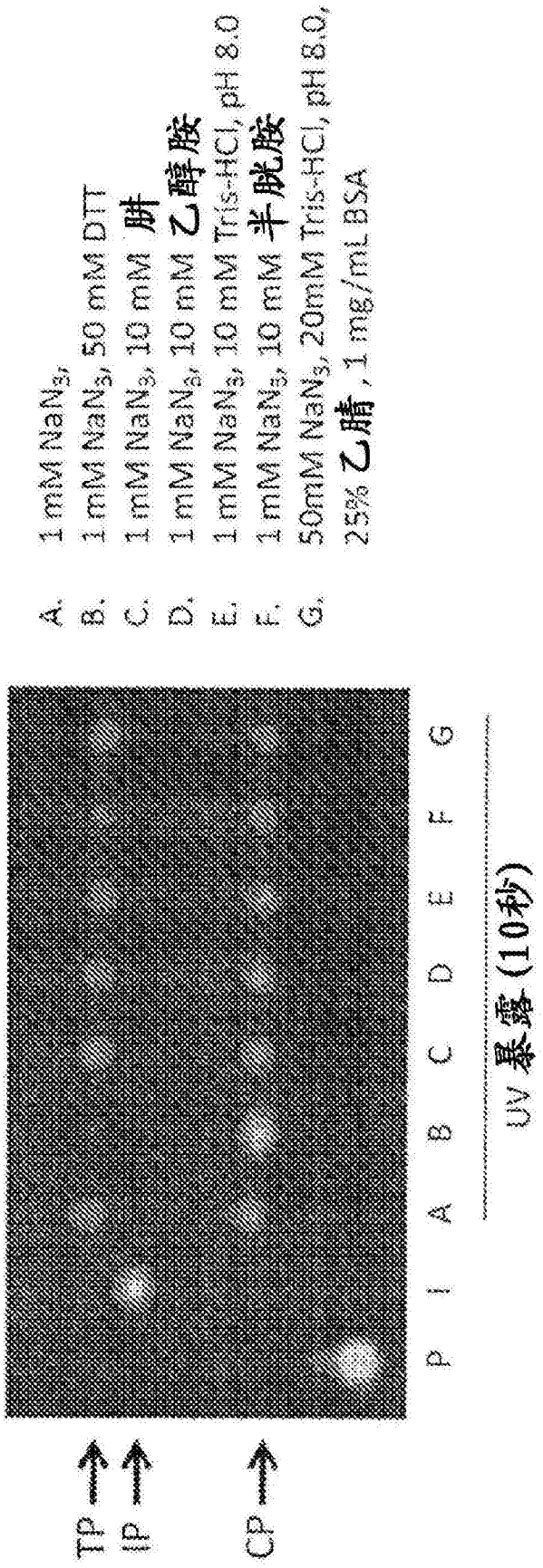
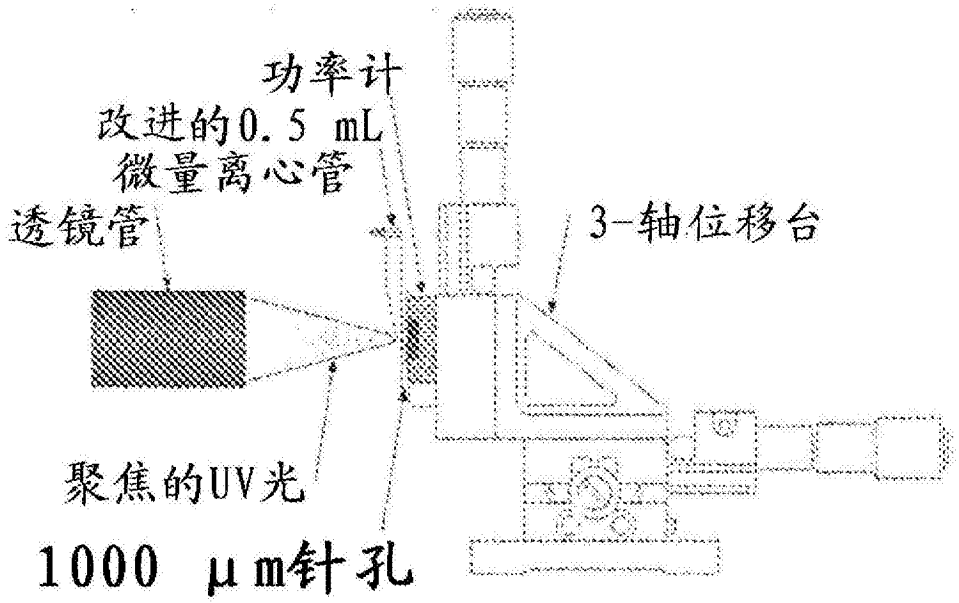

A. 1 mM NaN_3,
B. 1 mM NaN_3, 50 mM DTT
C. 1 mM NaN_3, 10 mM 肼
D. 1 mM NaN_3, 10 mM 乙醇胺
E. 1 mM NaN_3, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
F. 1 mM NaN_3, 10 mM 半胱胺
G. 50mM NaN_3, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 25% 乙腈, 1 mg/mL BSA
TP
IP
CP
P I A B C D E F G
UV 暴露 (10秒)

图4

A.


功率计
改进的0.5 mL
微量离心管
透镜管
3-轴位移台
聚焦的UV光
1000 μm针孔

B.

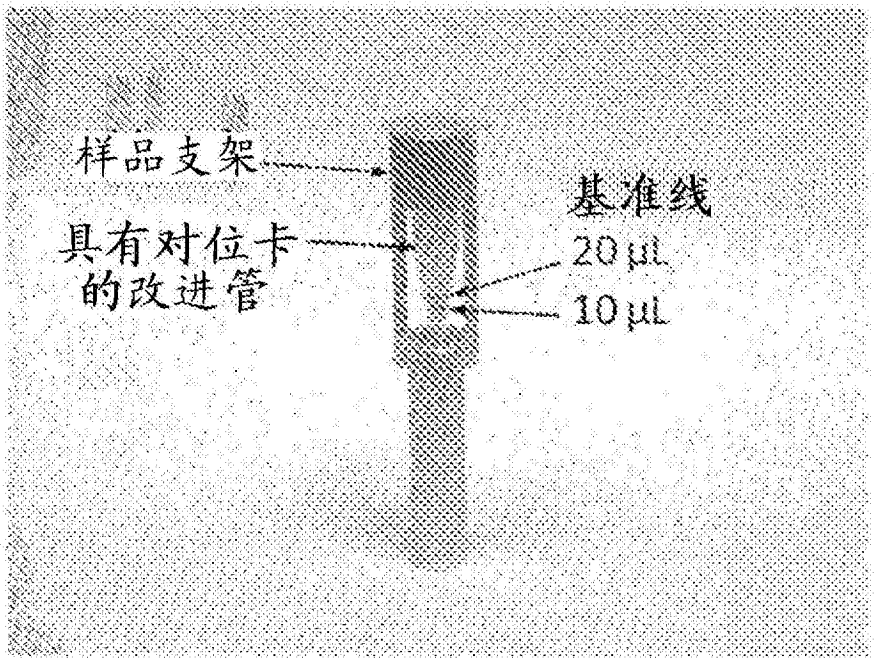

样品支架
具有对位卡
的改进管
基准线
20 μL
10 μL

图5

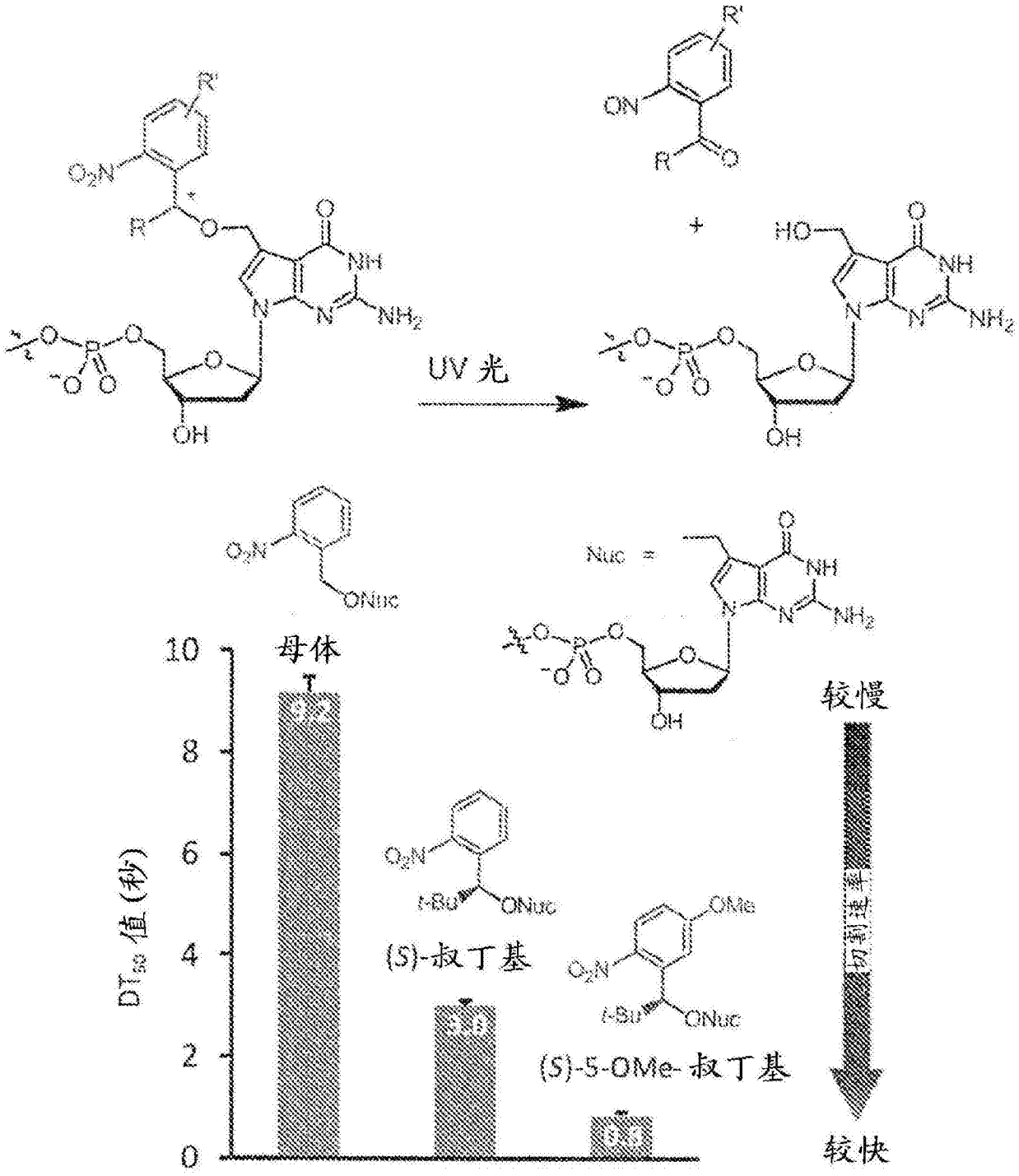


图6

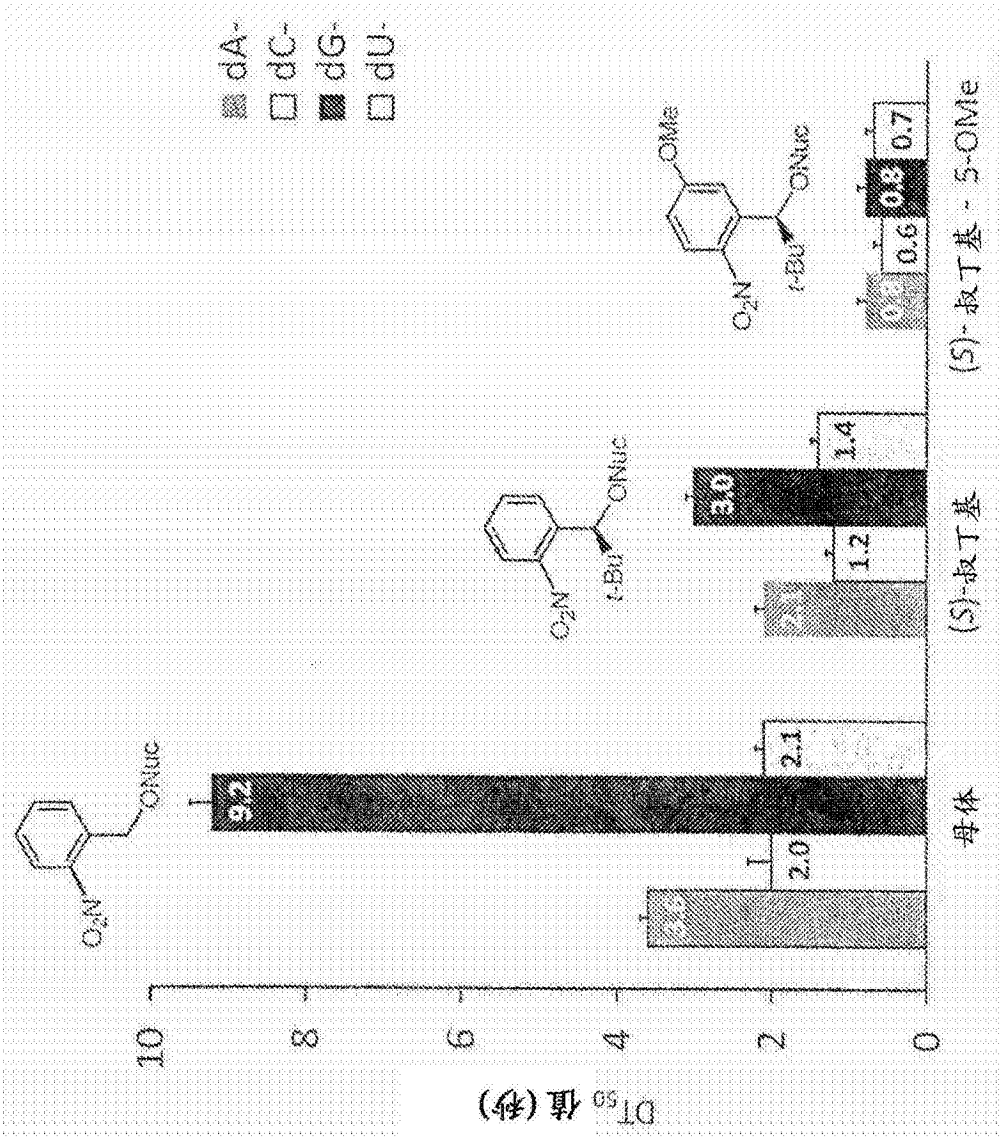

dA-
dC-
dG-
dU-
DT50 值 (秒)
10
8
6
4
2
0
母体
(S)-叔丁基
(S)-叔丁基 - 5-OMe
9.2
2.1
2.0
3.0
3.0
1.4
1.2
0.7
0.3
0.6
ONuc
OMe
t-Bu
O2N

图7

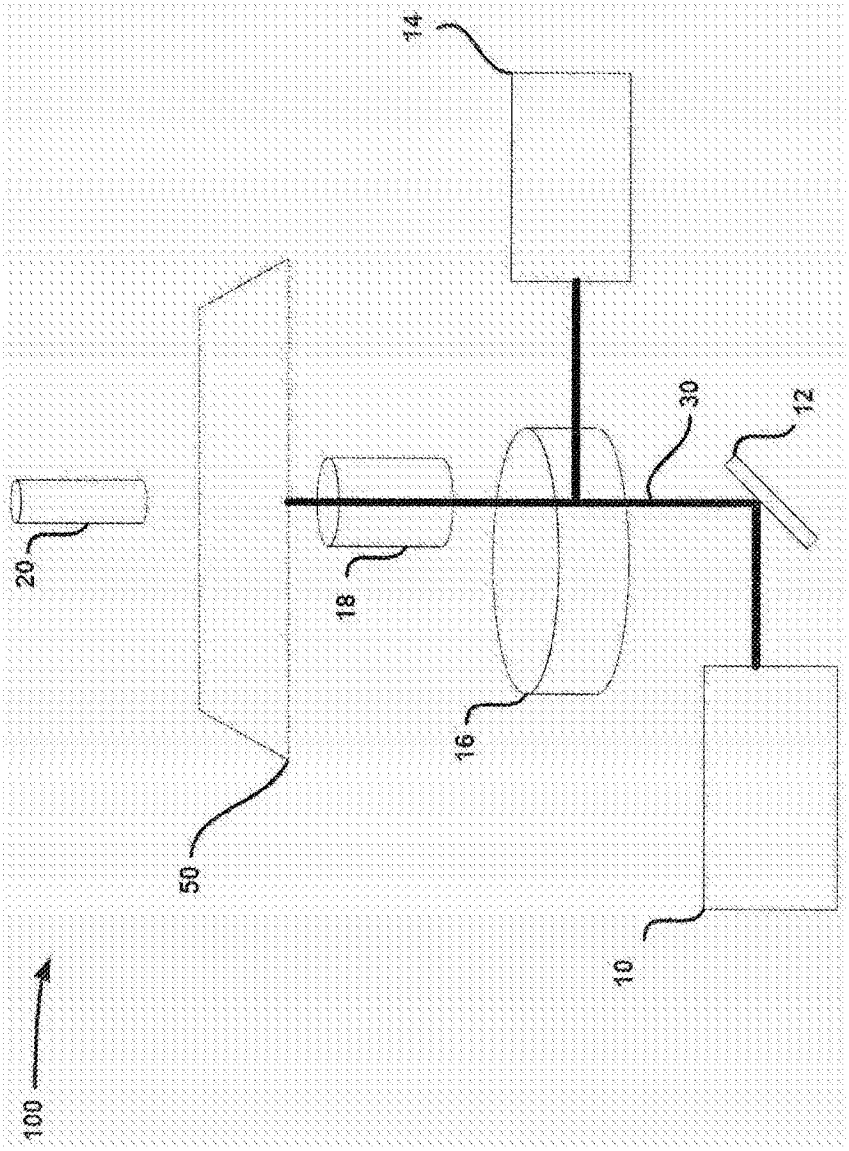


图8

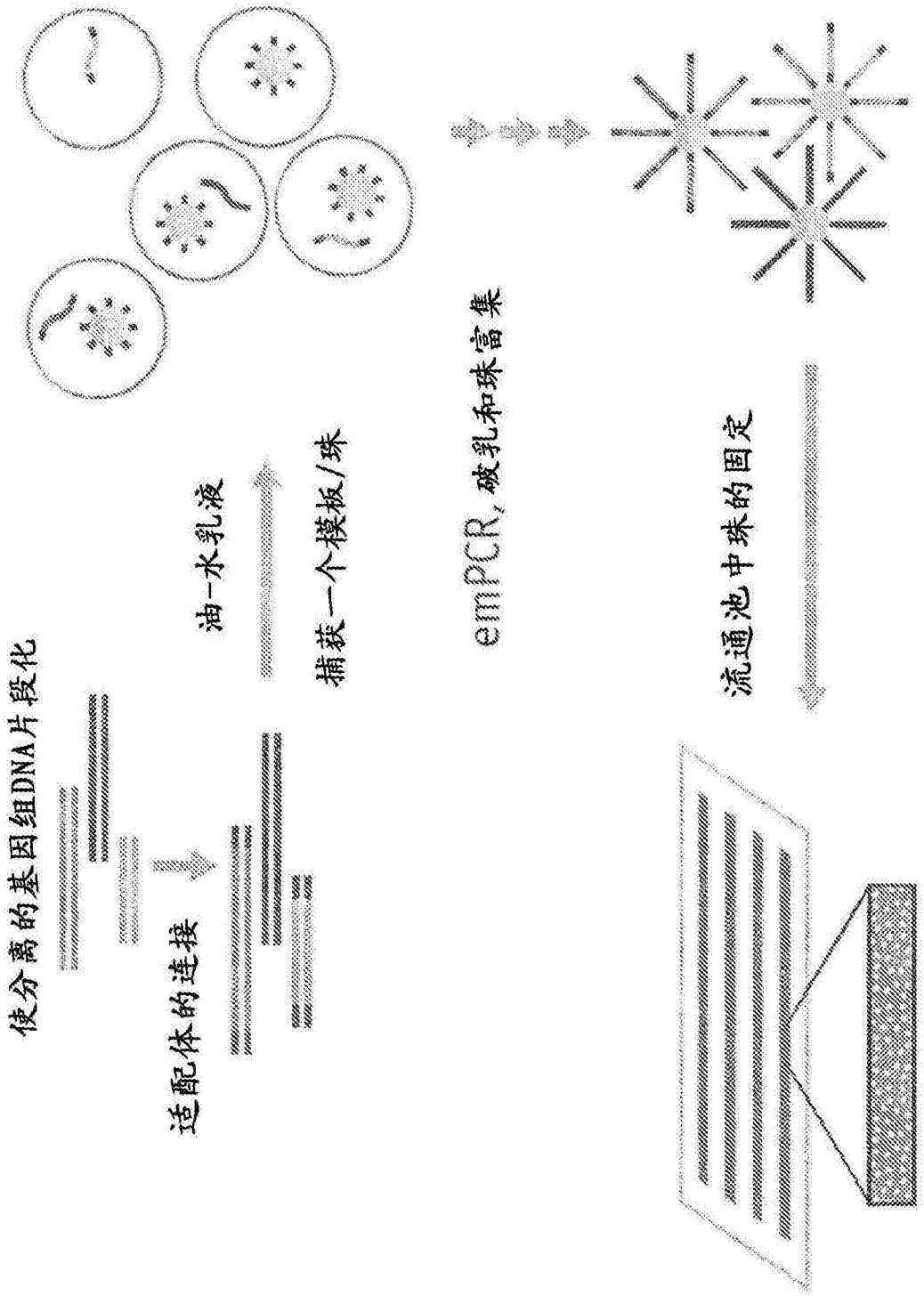


图9

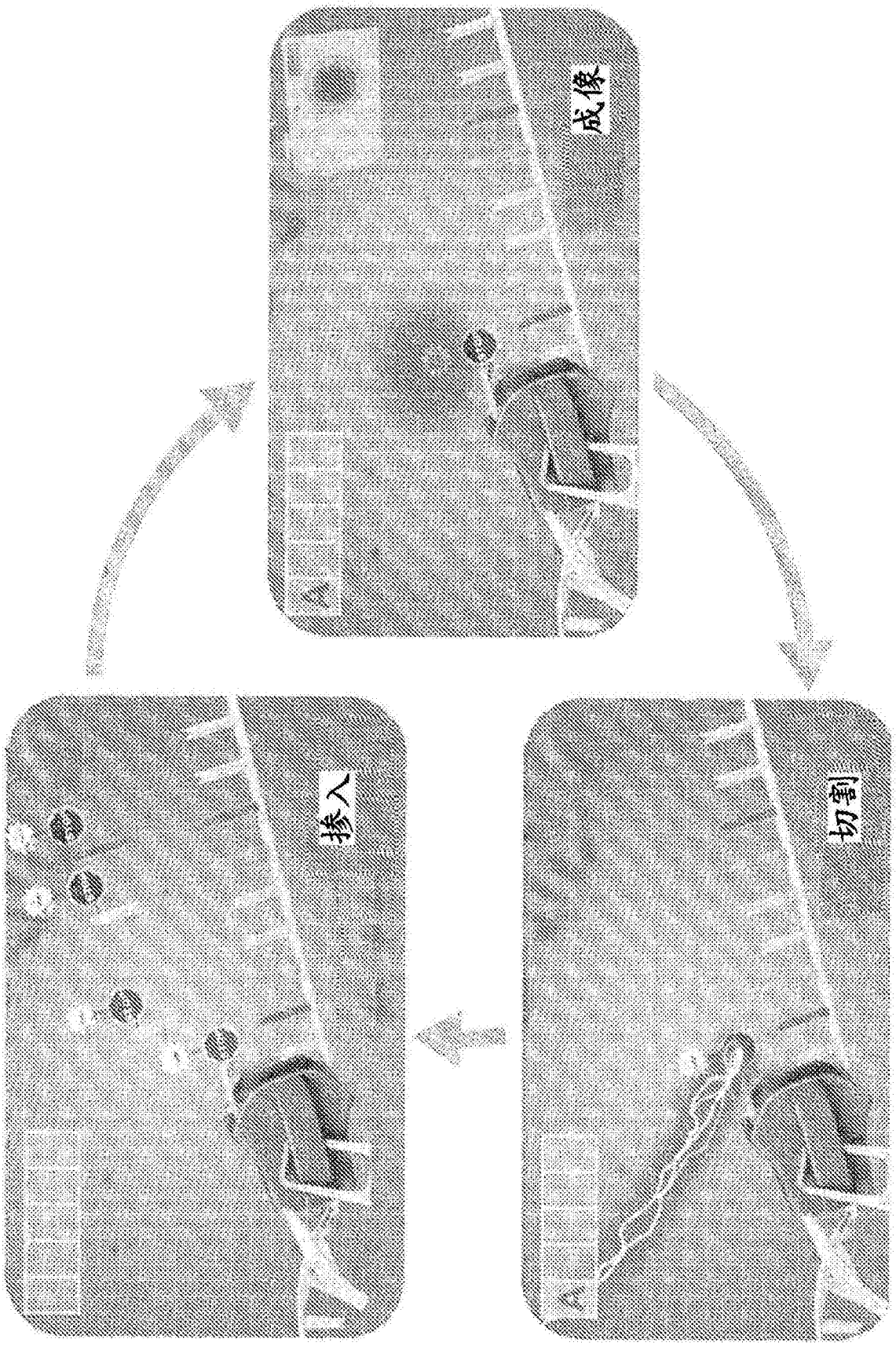


图10

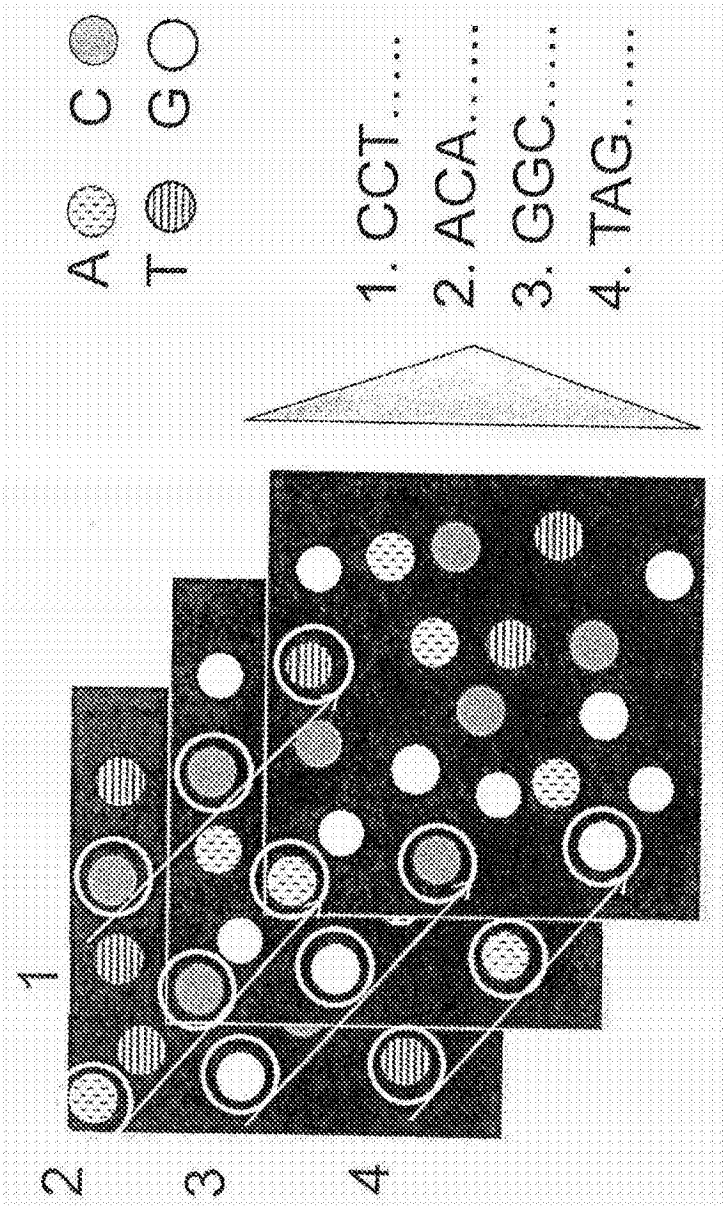


图11

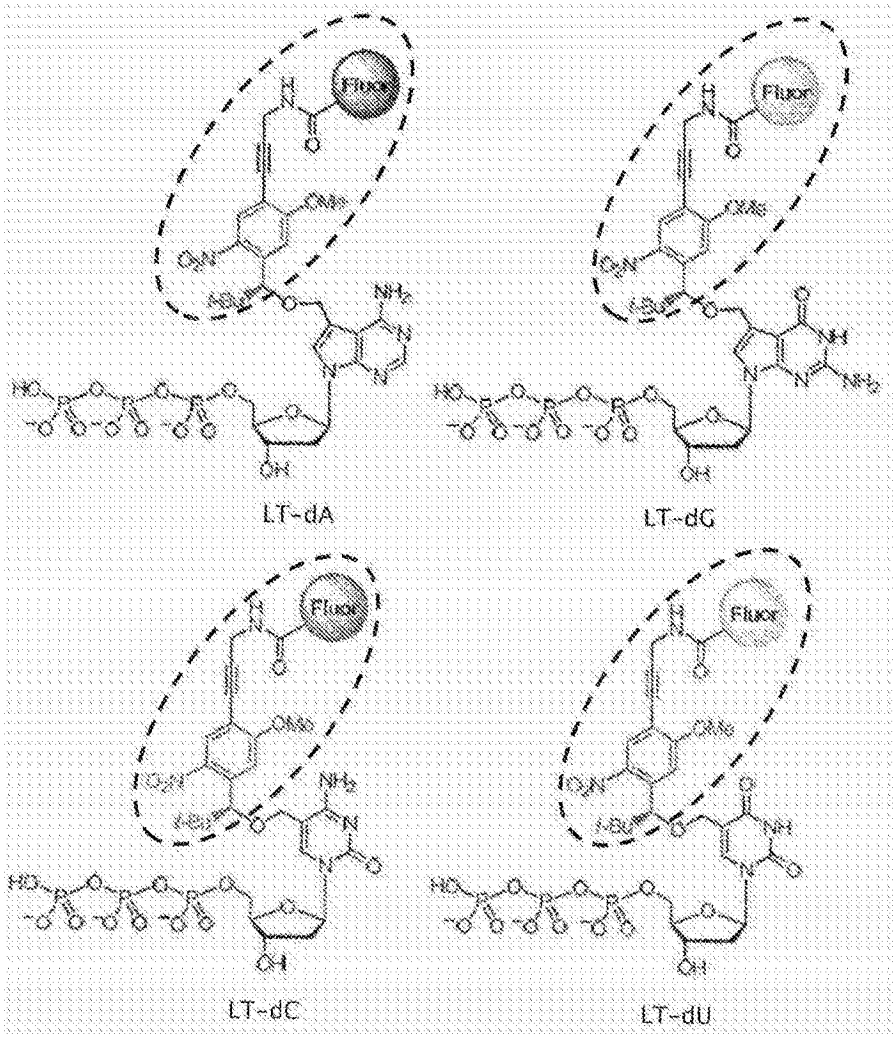


图12

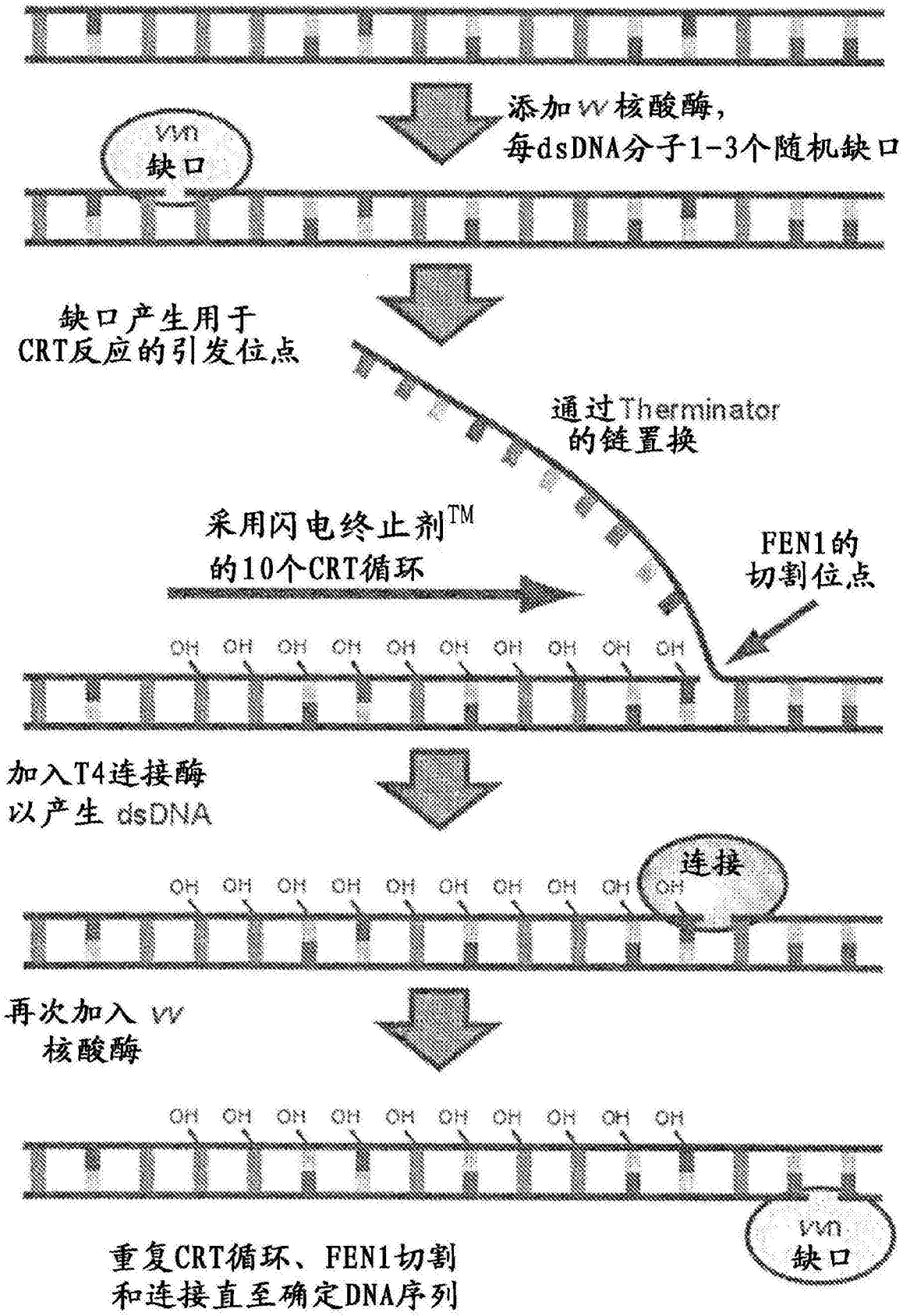

添加VV核酸酶，
每dsDNA分子1-3个随机缺口
VVn
缺口
缺口产生用于
CRT反应的引发位点
通过Therminator
的链置换
采用闪电终止剂TM
的10个CRT循环
FEN1的
切割位点
OH
加入T4连接酶
以产生 dsDNA
连接
再次加入 VV
核酸酶
VVn
缺口
重复CRT循环、FEN1切割
和连接直至确定DNA序列

图13