

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-11999

(P2014-11999A)

(43) 公開日 平成26年1月23日(2014.1.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	4B024
<b>C07H 19/167 (2006.01)</b>	C07H 19/167 CSP	4B063
<b>C07H 19/173 (2006.01)</b>	C07H 19/173	4C057
<b>C07H 19/067 (2006.01)</b>	C07H 19/067	4H039
<b>C07H 19/073 (2006.01)</b>	C07H 19/073	

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-150717 (P2013-150717)	(71) 出願人	502279294
(22) 出願日	平成25年7月19日 (2013.7.19)		イルミナ ケンブリッジ リミテッド
(62) 分割の表示	特願2010-254204 (P2010-254204) の分割		イギリス, シービー 101 エック クス エル, エセックス, サッフロン ウォルデン, リトル チェスターフォ ード, チェスターフォード リサーチ パーク
原出願日	平成15年8月22日 (2003.8.22)	(74) 代理人	100107456
(31) 優先権主張番号	10/227, 131		弁理士 池田 成人
(32) 優先日	平成14年8月23日 (2002.8.23)	(74) 代理人	100148596
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 和弘
(31) 優先権主張番号	0230037.4	(74) 代理人	100123995
(32) 優先日	平成14年12月23日 (2002.12.23)		弁理士 野田 雅一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	0303924.5		
(32) 優先日	平成15年2月20日 (2003.2.20)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾されたヌクレオチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】除去可能な保護基を有するヌクレオチド、ポリヌクレオチドシーケンシング方法におけるその使用及び保護基の化学的脱保護のための方法の提供。

【解決手段】プリン又はピリミジン塩基と構造： $-O-Z$  (式中、 $Z$ は  $-C(R')_2-O-R''$ 、 $-C(R')_2-N(R'')_2$ 、 $-C(R')_2-N(H)R''$ 、 $-C(R')_2-S-R''$  及び  $-C(R')_2-F$  のいずれかであり、ここで例えば  $R'$  がアルキル又は置換アルキル、 $Z$  がアジドメチル基、 $R''$  がベンジル又は置換ベンジル基であり、そこに共有結合した除去可能な  $3'-OH$  遮断基を有するリボース又はデオキシリボース糖部分とを含む修飾されたヌクレオチド又はヌクレオシド分子。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

プリン又はピリミジン塩基と

構造：

- O - Z

(式中、Zは - C ( R ' ) <sub>2</sub> - O - R ' '、 - C ( R ' ) <sub>2</sub> - N ( R ' ' ) <sub>2</sub>、 - C ( R ' ) <sub>2</sub> - N ( H ) R ' '、 - C ( R ' ) <sub>2</sub> - S - R ' ' 及び - C ( R ' ) <sub>2</sub> - F のいずれかであり、

ここで各 R ' ' は除去可能な保護基であるか又はその一部であり；

各 R ' は別個に水素原子、アルキル、置換アルキル、アリーラルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アシル、シアノ、アルコキシ、アリーロキシ、ヘテロアリーロキシもしくはアミド基、又は連結基を介して付着した検出可能な標識；又は ( R ' ) <sub>2</sub> は式 = - C ( R ' ' ' ) <sub>2</sub> のアルキリデン基を表し、ここで各 R ' ' ' は同一かもしくは異なってよく、そして水素及びハロゲン原子及びアルキル基を含む群から選択され；そして

ここで前記分子は反応して、各 R ' ' が H と交換されるか、又は Z が - C ( R ' ) <sub>2</sub> - F の場合、F は OH、SH 又は NH<sub>2</sub>、好ましくは OH と交換される中間体を生成してもよく、この中間体は水性条件下で解離して遊離の 3 ' OH を有する分子をもたらす；

ただし Z が - C ( R ' ) <sub>2</sub> - S - R ' ' である場合、双方の R ' 基は H ではない)

の基を 3 ' 炭素原子が付着しているように、そこに共有結合した除去可能な 3 ' - OH 遮断基を有するリボース又はデオキシリボース糖部分と

を含む修飾されたヌクレオチド又はヌクレオシド分子。

## 【請求項 2】

R ' がアルキル又は置換アルキルである、請求項 1 に記載の分子。

## 【請求項 3】

- Z が式 - C ( R ' ) - N<sub>3</sub> である、請求項 1 又は 2 に記載の分子。

## 【請求項 4】

Z がアジドメチル基である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の分子。

## 【請求項 5】

R ' ' がベンジル又は置換ベンジル基である、請求項 1 又は 2 に記載の分子。

## 【請求項 6】

前記塩基が切断可能なリンカー又は切断不能なリンカーを介して検出可能な標識に連結されている、先行する請求項のいずれか一項に記載の分子。

## 【請求項 7】

前記リンカーが切断可能なリンカーである、請求項 6 に記載の分子。

## 【請求項 8】

検出可能な標識が切断可能な又は切断不能なリンカーにより遮断基を介して分子に連結されている、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の分子。

## 【請求項 9】

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の分子。

## 【請求項 10】

前記リンカーが酸に不安定か、光に不安定か、又はジスルフィド結合を含有する、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の分子。

## 【請求項 11】

1 つ以上の <sup>32</sup>P 原子をそのリン酸部分に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の修飾されたヌクレオチド分子。

## 【請求項 12】

式 PN - O - アリルのヌクレオシド、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド分子であって、ここで PN は前記ヌクレオシドもしくはヌクレオチドであるか、又は前記ポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドの 3' 末端ヌクレオチドであり；そして前記ヌクレオシド又はヌクレオチドはアリル遮断基に加えて更に切断可能な又は切断不能なリンカーによりその塩基に連結された検出可能な標識を含む、ヌクレオシド、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド分子。

【請求項 13】

前記リンカーが切断可能である、請求項 12 に記載の分子。

【請求項 14】

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項 12 又は 13 に記載の分子。

【請求項 15】

前記リンカーが酸に不安定か、光に不安定か、又はジスルフィド結合を含有する、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の分子。

10

【請求項 16】

式 R - O - アリル、 $R_2N$  (アリル)、 $RNH$  (アリル)、 $RN$  (アリル) $_2$  又は R - S - アリルの化合物を、アリル基が除去され、水素で置換される対応する化合物に変換する方法であって、式 R - O - アリル、 $R_2N$  (アリル)、 $RNH$  (アリル)、 $RN$  (アリル) $_2$  又は R - S - アリルの化合物を、遷移金属並びに水溶性ホスフィン及び水溶性窒素含有ホスフィンリガンドを含む群から選択される 1 つ以上のリガンドを含む遷移金属と水溶液中で反応させるステップを含み、ここで、その、又は各 R は、水溶性生物学的分子である方法。

【請求項 17】

前記化合物が式 R - O - アリルである、請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 18】

前記 R がヌクレオシド、ヌクレオチド又はポリヌクレオチド分子の一部である、請求項 16 又は 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ヌクレオシド、ヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、切断可能な又は切断不能なリンカーによりその塩基に連結された検出可能な標識を更に含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記リンカーが切断可能である、請求項 19 に記載の分子。

【請求項 21】

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項 19 又は 20 に記載の方法。

30

【請求項 22】

前記リンカーが酸に不安定か、光に不安定か、又はジスルフィド結合を含有する、請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記アリル基及び前記標識が単一のステップで除去される、請求項 19 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記遷移金属が白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム、オスミウム及びイリジウムを含む群から選択される、請求項 16 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 25】

前記遷移金属がパラジウムである、請求項 16 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記リガンドの群が誘導体化されたトリアリールホスフィンリガンド又は誘導体化されたトリアルキルホスフィンリガンドを含む、請求項 16 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記リガンドの群がアミノ、ヒドロキシル、カルボキシル及びスルホナート基を含む群から選択される 1 つ以上の官能基で誘導体化されている、請求項 16 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 28】

リガンドの群が 3, 3', 3'' - ホスフィニジントリス (ベンゼンスルホン酸) 及び トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン並びにその塩を含む、請求項 16 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

合成又はシークエンシング反応において、請求項 6 ~ 10 のいずれかで定義されるか又は請求項 12 ~ 15 のいずれかで定義され、標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの第 2 のヌクレオチドに相補的なヌクレオチドの取り込みを調節する方法であって、前記ヌクレオチドを伸長中の相補的なポリヌクレオチドに取り込むことを含み、前記ヌクレオチドの取り込みは引き続くヌクレオチド又はヌクレオチド分子が前記伸長中の相補的なポリヌクレオチドへ導入されることを阻止又は遮断する、方法。

10

## 【請求項 30】

前記ヌクレオチドの取り込みがターミナル・トランスフェラーゼ又はポリメラーゼ又は逆転写酵素により達成される、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

ポリメラーゼが *Thermococcus* 種である、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

*Thermococcus* 種が 9 °N 又はその単一変異体もしくは二重変異体である、請求項 31 に記載の方法。

20

## 【請求項 33】

二重変異体が - Y409V A485L である、請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 34】

標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって、相補的なヌクレオチドの逐次的な取り込みをモニターするステップを含み、ここで少なくとも 1 つの取り込みは請求項 6 ~ 10 のいずれかで定義されるか又は請求項 12 ~ 15 のいずれかで定義されるヌクレオチドの取り込みであり、そしてここで取り込まれたヌクレオチドの同一性は塩基に連結された標識を検出することにより決定され、そして遮断基及び前記標識は次の相補的なヌクレオチドの導入の前に除去される、方法。

## 【請求項 35】

ヌクレオチドの標識及び遮断基が単一の化学的処理ステップで除去される、請求項 34 に記載の方法。

30

## 【請求項 36】

標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって：

(a) 複数の異なるヌクレオチドを提供するステップであって、前記複数の異なるヌクレオチドは請求項 6 ~ 10 のいずれかで定義されるか又は請求項 12 ~ 15 のいずれかで定義されるいずれかであり、そしてここで各型のヌクレオチドに連結された検出可能な標識をその他の型のヌクレオチドに用いた検出可能な標識から検出時に区別できるステップと；

(b) ヌクレオチドを標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの相補体に取り込むステップと；

(c) (b) のヌクレオチドの標識を検出し、それにより取り込まれたヌクレオチドの型を決定するステップと；

40

(d) (b) のヌクレオチドの標識及び遮断基を除去するステップと；

(e) 場合によっては (b) ~ (d) のステップを 1 回以上繰り返すステップと；

を備え、それにより標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する、方法。

## 【請求項 37】

前記取り込みステップが *Thermococcus* 種により達成される、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

*Thermococcus* 種が 9 °N 又はその単一変異体もしくは二重変異体である、請求項 37 に記載の方法。

50

## 【請求項 39】

二重変異体が - Y 4 0 9 V A 4 8 5 L である、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 40】

ヌクレオチドの標識及び遮断基が単一の化学的処理ステップで除去される、請求項 36 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 41】

各々のヌクレオチドを連続的に標的と接触させ、次のヌクレオチドを添加する前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、標識及び遮断基の検出及び除去を各ヌクレオチドの添加後か、又は 4 つ全てのヌクレオチドの添加後のいずれかに実施する、請求項 36 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 42】

各々のヌクレオチドを同時に一緒に標的に接触させ、そして標識及び遮断基の検出の前及び除去に続いて取り込まれていないヌクレオチドを除去する、請求項 36 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 43】

第 1 工程及び第 2 工程を含み、第 1 工程では、4 つのヌクレオチドのうち 2 つを含む第 1 の組成物を標的と接触させ、そして標識の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして第 2 工程では、第 1 の組成物に含まれていない 2 つのヌクレオチドを含む第 2 の組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして場合によっては第 1 工程及び第 2 工程を 1 回以上繰り返す、請求項 36 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 44】

第 1 工程及び第 2 工程を含み、第 1 工程では、4 つのヌクレオチドのうち 1 つを含む組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして第 2 工程では、第 1 の組成物に含まれていない 3 つのヌクレオチドを含む第 2 の組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして場合によっては第 1 工程及び第 2 工程を 1 回以上繰り返す、請求項 36 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 45】

第 1 工程及び第 2 工程を含み、第 1 工程では、4 つのヌクレオチドのうち 3 つを含む第 1 の組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして第 2 工程では、第 1 の組成物に含まれていないヌクレオチドを含む組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして場合によっては第 1 工程及び第 2 工程を 1 回以上繰り返す、請求項 36 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 46】

( a ) 請求項 6 ~ 10 のいずれかで定義されるか又は請求項 12 ~ 15 のいずれかで定義されるヌクレオチドのいずれかである複数の異なるヌクレオチド；及び

40

( b ) そのための包装材料；

を含むキット。

## 【請求項 47】

各ヌクレオチドの検出可能な標識をその他の 3 つの型のヌクレオチドのいずれかに用いた検出可能な標識から検出時に区別することができる、請求項 46 に記載のキット。

## 【請求項 48】

酵素及び酵素の作用に適当なバッファーを更に含む、請求項 46 又は 47 に記載のキット。

## 【請求項 49】

サンガー又はサンガー型シーケンシング方法における、請求項 1 ~ 15 のいずれかで

50

定義されるヌクレオチドの使用。

【請求項50】

サンガー又はサンガー型シーケンシング方法を含む、請求項1に記載のヌクレオチドを使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は修飾されたヌクレオチドに関する。とりわけ本発明は除去可能な保護基を有するヌクレオチド、ポリヌクレオチドシーケンシング方法におけるその使用及び保護基の化学的脱保護のための方法を開示する。

10

【0002】

ひとつには分子又はその生物学的反応を特徴付けるために用いられる技術の改良により、分子の研究が進歩している。とりわけ、核酸DNA及びRNAの研究が配列分析及びハイブリダイゼーション事象の研究に用いられる技術の開発の恩恵を受けている。

【0003】

核酸の研究を改善している技術の実例は、固定核酸のアレイ作製の進歩である。これらのアレイは典型的には固体支持材料に固定されたポリヌクレオチドの高密度マトリックスから成る。例えば、マスキングするが、特定の部分で暴露させて適当に修飾されたヌクレオチド・ホスホラミダイトに付着させることにより化学的に増感されたガラス表面を用いる核酸を会合させる方法について記載しているFodorら、Trends Biotech. 12:19-26(1994)を参照のこと。アレイ作製を公知のポリヌクレオチドを固体支持体に予め決定された位置で「スポット」する技術により製造することもできる(例えばStimpsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6379-6383(1995))。

20

【0004】

DNAの合成によるシーケンシングは理想的には、シーケンシングされるオリゴヌクレオチドに向かい合う正確な相補的ヌクレオチドの調節された(すなわち1個ずつの)取り込みを必要とする。これにより各ヌクレオチド残基が1個ずつシーケンシングされるので、複数のサイクルでヌクレオチドを付加することにより正確なシーケンシングが可能になり、したがって調節されない一連の取り込みを生じることが阻止される。そこに付着された適当な標識を用いて、標識部分の除去及び続く次のラウンドのシーケンシングの前に取り込まれたヌクレオチドを読む。単一の取り込みのみが生じていることを確認するために、単一のヌクレオチドの取り込みを確実にするのにシーケンシングヌクレオチドの構造修飾(「遮断基」)が必要であるが、これは次いでいずれか別のヌクレオチドがポリヌクレオチド鎖に取り込まれるのを阻止する。次いでシーケンシングされるDNAの完全性に干渉しない反応条件下で遮断基は除去されなければならない。次いで、次の遮断、標識ヌクレオチドの取り込みを伴って、シーケンシングサイクルを続けることができる。実用のために、全過程は複数のシーケンシングサイクルを促す高収率の、高度に特異的な化学的及び酵素的工程から構成されるべきである。

30

【0005】

DNAシーケンシングに有用であるためには、一度ヌクレオチドの塩基が付加されると、ヌクレオチドのポリヌクレオチド鎖への取り込みに用いられるポリメラーゼが複製を続けるのを妨げるように、ヌクレオチド、及びより一般的にはヌクレオチド三リン酸は概して3'-OH-遮断基を必要とする。分子の遮断基としての適性には多くの制限がある。これは、更なるヌクレオチド分子がポリヌクレオチド鎖に付加されるのを妨げるが、同時にポリヌクレオチド鎖に損傷を引き起こさずに糖部分から容易に除去されるようなものでなければならない。更に、修飾されたヌクレオチドが、そのポリヌクレオチド鎖への取り込みに用いられるポリメラーゼ又はその他の適当な酵素に耐性がなければならない。したがって、理想的な遮断基は長期安定性を呈し、ポリメラーゼ酵素により効率的に取り込まれ、2次的な又は更なる取り込みの全体的な遮断を引き起こし、そしてポリヌクレオチ

40

50

ド構造に損傷を引き起こさない穏やかな条件下、好ましくは水性条件下で除去される能力を有する。これらのストリンジェントな要件は、必要な修飾が為されたヌクレオチドの設計及び合成には厄介な障害である。

【0006】

この目的のための可逆的な遮断基は以前に記載されているが、概してポリヌクレオチド、例えばDNA適合の化学に関する上記の基準に合致するものはない。

【0007】

Metzkerら、(Nucleic Acids Research 22(20): 4259-4267(1994))は8個の3'修飾2-デオキシリボヌクレオシド5'-三リン酸(3'修飾dNTP)の合成及び使用、並びに取り込み活性に関する2つのDNA鋳型アッセイにおける試験を開示している。3'修飾dNTPは3'-アリルデオキシリボアデノシン5'-三リン酸(3'-アリルdATP)を含む。しかしながら、3'-アリル遮断化合物は完全なサイクルの終止、脱保護及びDNA合成の再開を実証するためには用いられなかった。この化合物のDNA合成を終止する能力を示す試験結果が示されたのは、各々異なるDNAポリメラーゼを用いて行った8つのこのようなアッセイのうち1つの終止アッセイのみであった。

10

【0008】

国際公開公報第02/29003号(ニューヨーク市のコロンビア大学の管財人)はポリメラーゼ反応において伸長するDNA鎖の3'-OH基をキャップするアリル保護基の使用を含めることができるシーケンシング方法について記載している。アリル基はMetzker(前出)の手順にしたがって導入され、そしてKamalら(Tat.Let.40:371-372(1999))により報告される方法を用いることにより除去されると記載されている。

20

【0009】

Kamalの脱保護方法は、アセトニトリル溶媒中、その場でヨードトリメチルシランを生成するために、ヨウ化ナトリウム及びクロロトリメチルシランを用い、チオ硫酸ナトリウムでクエンチする。酢酸エチルへの抽出、及び乾燥(硫酸ナトリウム)の後、次いで減圧下濃縮、及びカラムクロマトグラフィー(溶離液として酢酸エチル:ヘキサン;2:3)の後、遊離アルコールが90~98%の収率で得られた。

【0010】

国際公開公報第02/29003号では、Kamalの条件は穏やかで特異的であるので、Kamalのアリル脱保護は、修飾せずにDNAシーケンシングに直接適用できると示唆されている。

30

【0011】

Metzkerは3'アリル遮断ヌクレオチド又はヌクレオシドの調製に関して報告しており、そして国際公開公報第02/29003号はシーケンシング中の3'-OHキャップとしてのアリル官能基の使用を示唆しているが、これらの文献のいずれも実際には、シーケンシングプロトコールの局面における3'-アリル化ヒドロキシル基の脱保護を教示していない。ヒドロキシル保護基としてのアリル基の使用は周知である(これは導入が容易であり、そして全pH範囲にわたって、及び高温に安定である)が、今のところ、DNA適合条件、すなわちDNAの完全性が全体的又は部分的に破壊されない条件下で3'-アリル基の切断に成功する明確な実施形態はない。換言すれば、3'-OHアリル遮断ヌクレオチドを用いてDNAシーケンシングを行うことはこれまでのところ不可能であった。

40

【0012】

TMS塩化物は加水分解され、TMSヨウ化物のその場での生成を妨げるので、Kamalの方法は水性溶媒中で行うのに不相当である。シーケンシングにおいてKamalの脱保護(アセトニトリル中)を実施する試みは不成功であることが本発明者らの手で判明している。

【0013】

50

本発明は多くの可逆性遮断基の驚くべき進歩及びDNA適合条件下でそれを脱保護する方法に基づいている。これらの遮断基にはそれ自体が新規であるものもあり；先行技術で開示されているものもあるが、上記したように、これらの遮断基をDNAシーケンシングに利用することが可能であるとは判明されていなかった。

【0014】

本発明の1つの特徴は、アリル脱保護の完全に新しい方法の開発に由来する。そしてKama1らの方法（これはアセトニトリル中で行う）及び高度に酸素及び水分感受性である、先行技術において一般に知られているその他の方法とは対照的に、本発明者らの手順は実質的には全てのアリル保護ヒドロキシル官能基の脱保護に広く適用でき、水溶液中で行うことができる。本発明の更なる特徴は新しいクラスの保護基の開発に由来する。これらはアセタール及び関連する保護基に基づくが、先行技術で公知のアセタール脱保護のいくつかの不利益を被らない。

10

【0015】

アリル脱保護方法は、遷移金属及び少なくとも部分的に水溶性のリガンドから形成される水溶性遷移金属触媒を利用する。水溶液中では、これらは少なくとも部分的に水溶性である遷移金属複合体を形成する。本明細書で水溶液とは、少なくとも20容量%、好ましくは少なくとも50%、例えば少なくとも75容量%、とりわけ少なくとも95容量%及び特に98容量%以上、理想的には100容量%の水を連続相として含む液体を意味する。

20

【0016】

当業者には理解されるように、アリル基をヒドロキシル基のみならず、チオール及びアミン官能基を保護するためにも使用することができる。更に例えばカルボン酸及びハロゲン化アリルとの間の反応からアリルエステルを形成することができる。当分野で公知の方法を用いて1級又は2級アミドを保護することもできる。本明細書に記載する新規の脱保護方法を全てのこれらのアリル化合物、例えばアリルエステル及びモノもしくはビスアリル化1級アミンもしくはアリル化アミドの脱保護、又はアリル化2級アミンの脱保護に用いることができる。この方法はまたアリルエステル及びチオエステルの脱保護にも適している。

30

【0017】

アセタール官能基を含む保護基は、以前に遮断基として用いられている。しかしながら、このような基及びエーテルの除去はDNA分子に有害な強い酸性脱保護を必要とする。しかしながらアセタールの加水分解は、不安定なヘミアセタール中間物質の形成に至り、これは水性条件下で天然のヒドロキシル基に加水分解される。本発明者はこの概念を利用し、そしてこれを更に、本発明のこの特徴が水性条件下で通常加水分解される中間分子を保護するための保護基を含む遮断基の利用に在るように適用している。これらの保護基は中間物質の構造を安定化する第2の官能基を備えるが、ポリヌクレオチドへの取り込みに続く後の段階でこれを除去することができる。官能基の特徴的化学は別の反応を干渉するので、有機合成反応において保護基は、これを一時的にマスキングするために用いられている。

40

【0018】

したがって、本発明の第1の態様によれば、プリン又はピリミジン塩基と

構造：

- O - Z

（式中、Zは  $-C(R')_2-O-R''$ 、 $-C(R')_2-N(R'')_2$ 、 $-C(R')_2-N(H)R''$ 、 $-C(R')_2-S-R''$  及び  $-C(R')_2-F$  のいずれかであり、

ここで各  $R''$  は除去可能な保護基であるか又はその一部であり；

各  $R'$  は別個に水素原子、アルキル、置換アルキル、アリーラルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、複素環、アシル、シアノ、アルコキシ、アリール

50

オキシ、ヘテロアリアルオキシもしくはアミド基、又は連結基を介して付着した検出可能な標識；又は  $(R')_2$  は式  $= - C (R''')_2$  のアルキリデン基を表し、ここで各  $R'''$  は同一かもしくは異なってよく、そして水素及びハロゲン原子及びアルキル基を含む群から選択され；そして

ここで前記分子は反応して、各  $R''$  が H と交換されるか、又は Z が  $- C (R')_2 - F$  の場合、F は OH、SH 又は  $NH_2$ 、好ましくは OH と交換される中間体を生成してもよく、この中間体は水性条件下で解離して遊離の 3' OH を有する分子をもたらす；

ただし Z が  $- C (R')_2 - S - R''$  である場合、双方の  $R'$  基は H ではない) の基を 3' 炭素原子が付着しているように、そこに共有結合した除去可能な 3' - OH 遮断基を有するリボース又はデオキシリボース糖部分と

を含む修飾されたヌクレオチド又はヌクレオシド分子が提供される。

#### 【0019】

別の態様の観点から、そのヌクレオチド又はヌクレオシドが、好ましくは切断可能なリンカーによりヌクレオチド又はヌクレオシドの塩基に連結された検出可能な標識を含む 3' - O - アリルヌクレオチド又はヌクレオシドを本発明は提供する。

#### 【0020】

更なる態様では、そのヌクレオチド又はヌクレオシドが、好ましくは切断可能なリンカーによりヌクレオチド又はヌクレオチドの塩基に連結された検出可能な標識を含む 3' - O - アリルヌクレオチド又はヌクレオシドを含むポリヌクレオチドを本発明は提供する。

#### 【0021】

更に別の態様の観点から、式  $R - O -$  アリル、 $R_2N$  (アリル)、 $RNH$  (アリル)、 $RN$  (アリル) $_2$  又は  $R - S -$  アリルの化合物を、アリル基が除去され水素で置換される対応する化合物に変換する方法を本発明は提供し、該方法は式  $R - O -$  アリル、 $R_2N$  (アリル)、 $RNH$  (アリル)、 $RN$  (アリル) $_2$  又は  $R - S -$  アリルの化合物を、水溶液中で遷移金属並びに水溶性ホスフィン及び水溶性窒素含有ホスフィンリガンドを含む群から選択される 1 つ以上のリガンドを含む遷移金属と反応させるステップを備え、ここでその又は各 R は水溶性生物学的分子である。

#### 【0022】

更なる態様では、合成又はシーケンシング反応において標的 1 本鎖ポリヌクレオチドのヌクレオチドに相補的なヌクレオチド分子の取り込みを調節する方法であって、伸長中の相補的なポリヌクレオチドに本発明の分子を取り込むステップを備え、該分子の取り込みは引き続きヌクレオチド又はヌクレオチド分子が該伸長中の相補的なポリヌクレオチドへ導入されることを阻止又は遮断する方法を本発明は提供する。

#### 【0023】

別の態様では、標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する方法を本発明は提供し、その方法は、相補的なヌクレオチドの逐次的な取り込みをモニターするステップを含み、ここで少なくとも 1 つの取り込み、及び好ましくは全ての取り込みが上記した本発明のヌクレオチドの取り込みであり、これは好ましくは切断可能なリンカーによりヌクレオチド又はヌクレオチドの塩基に連結された検出可能な標識を含み、そしてここで取り込まれたヌクレオチドの同一性は標識を検出することにより決定され、該遮断基及び該標識は次の相補的なヌクレオチドの導入の前に除去される。

#### 【0024】

別の態様から、標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する方法を本発明は提供し、その方法は

(a) 本明細書に上記した本発明の複数の異なるヌクレオチドを提供するステップであって、ヌクレオチドは好ましくは切断可能なリンカーにより塩基から検出可能な標識に連結され、そしてここで各型のヌクレオチドに連結された検出可能な標識をその他の型のヌクレオチドに用いた検出可能な標識から検出時に区別できるステップと；

(b) ヌクレオチドを標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの相補体に取り込むステップと；

(c) (b) のヌクレオチドの標識を検出し、それにより取り込まれたヌクレオチドの型

10

20

30

40

50

を決定するステップと；

(d) (b) のヌクレオチドの標識及び遮断基を除去するステップと；

(e) 場合によっては (b) ~ (d) のステップを 1 回以上繰り返すステップと；

を備え、それにより標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する。

【0025】

加えて、別の態様で

(a) 本発明の複数の異なる個々のヌクレオチド；及び

(b) そのための包装材料；

を含むキットを本発明は提供する。

【0026】

本発明の方法による、又は本発明の方法に用いられるヌクレオシド又はヌクレオチドは、プリン又はピリミジン塩基と、好ましくは 3' O の位置で共有結合している遮断基を有するリボース又はデオキシリボース糖部分とを含み、これは、3' - OH 基の遮断に必要な技術に有用な分子を更なるヌクレオチドの取り込みを妨げさせ、例えばシーケンシング反応、ポリヌクレオチド合成、核酸増幅、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、一塩基多型研究、及びその他のかかる技術においてである。

【0027】

「遮断基」という用語を本発明の局面において本明細書で用いる場合、これはアリル及び本明細書に記載する「Z」遮断基の双方を包含する。しかしながら、記載し、そして本明細書にて特許請求する本発明の方法において、ヌクレオチドの混合物を用いる場合、これらは各々同一の型の遮断、すなわちアリル遮断又は「Z」遮断を含むのが非常に好ましいことは理解されよう。「Z」遮断されたヌクレオチドを用いる場合、検出可能な標識が「Z」基の一部を形成する場合、すなわち塩基に付着していない場合を除いて、各「Z」基は概して同一の基である。

【0028】

一度遮断基が除去されると、別のヌクレオチドの遊離 3' - OH 基への取り込みが可能になる。

【0029】

塩基を介して望ましいリンカーにより分子を検出可能な標識に連結でき、この標識は例えばフルオロフォアでよい。所望の場合、検出可能な標識を代わりに式「Z」の遮断基に取り込むことができる。リンカーは酸に不安定、光に不安定であるか、又はジスルフィド結合を含有することができる。その他の結合、とりわけ、以下で更に詳細に記載するようにホスフィン切断可能なアジド含有リンカーを本発明に用いることができる。

【0030】

好ましい標識及び結合には、国際公開公報第 03 / 048387 号に開示されたものが含まれる。

【0031】

ヌクレオチドを取り込む方法では、例えば本発明の合成又はシーケンシング反応において標的 1 本鎖ポリヌクレオチドのヌクレオチドに相補的な核酸分子の取り込みを調節する方法では、分子の取り込みをターミナル・トランスフェラーゼ、ポリメラーゼ又は逆転写酵素を介して達成することができる。

【0032】

好ましくは、ポリメラーゼ、及びとりわけ *Thermococcus* 種に由来するもの、例えば 9°N、により分子を取り込む。より一層好ましくは、ポリメラーゼは変異体 9°N A485L であり、そしてより一層好ましくは、ポリメラーゼは二重変異体 Y409V 及び A485L である。

【0033】

本発明の相補的ヌクレオチドの逐次的な取り込みをモニターするステップを含む標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する方法では、遮断基及び標識を単一の化学処理工程で除去できるのが好ましい。したがって、本発明の好ましい実施形態では、遮断基は標識

10

20

30

40

50

と同時に切断される。これは言うまでもなく、検出可能な標識を取り込む式Zのこれらの遮断基に固有の特徴である。

【0034】

更に、好ましくは、遮断され標識された、修飾されたヌクレオチド塩基 A、T、C 及び G のヌクレオチド構築物は同一のポリメラーゼ酵素により基質として認識される。

【0035】

本明細書に記載した方法では、各々のヌクレオチドを逐次的に標的と接触させ、次のヌクレオチドを添加する前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、ここで標識及び遮断基の検出及び除去を各ヌクレオチドの添加後か、又は4つ全てのヌクレオチドの添加後のいずれかに実施する。

10

【0036】

その方法では、全てのヌクレオチドを同時に標的に接触させることができ、すなわち異なるヌクレオチド全てを含む組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去する。

【0037】

その方法は第1工程及び第2工程を含むことができ、第1工程では、4つの型の修飾されたヌクレオチドのうち2つを含む第1の組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして第2工程では、第1の組成物に含まれていない2つのヌクレオチドを含む第2の組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして場合によっては第1工程及び第2工程を1回以上繰り返すことができる。

20

【0038】

本明細書に記載する方法はまた、第1工程及び第2工程を含むことができ、第1工程では、4つのヌクレオチドのうち1つを含む組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして第2工程では、第1の組成物に含まれていない3つのヌクレオチドを含む第2の組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして場合によっては第1工程及び第2工程を1回以上繰り返すことができる。

30

【0039】

本明細書に記載する方法はまた、第1工程及び第2工程を含むことができ、第1工程では、4つのヌクレオチドのうち3つを含む第1組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして第2工程では、第1の組成物に含まれていないヌクレオチドを含む組成物を標的と接触させ、そして標識及び遮断基の検出及び引き続き除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして場合によっては第1工程及び第2工程を1回以上繰り返すことができる。

【0040】

本明細書の上記で定義したようなターミナル・トランスフェラーゼ、ポリメラーゼ又は逆転写酵素により本発明の方法の取り込みステップを達成することができる。検出可能な標識及び/又は切断可能なリンカーは、第2のヌクレオチド又はヌクレオシドの核酸分子への取り込みを阻止するのに十分な大きさのものでよい。

40

【0041】

標的1本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する本明細書に記載する特定の方法では、その1つが標的ポリヌクレオチドの第1の不对塩基に相補的である4つのヌクレオチドの各々を標的と連続的に接触させることができ、場合によっては次のヌクレオチドの添加の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去してもよい。取り込みの成功の決定を各ヌクレオチドの供給後か、又は全てのヌクレオチドの添加後のいずれかに実施することができる。4つより少ないヌクレオチドの添加の後に、1つが取り込まれたと決定される場合、取

50

り込まれたヌクレオチドに相補的なヌクレオチドを検出するために更にヌクレオチドを提供する必要はない。

【0042】

あるいは、全てのヌクレオチドを標的に同時に接触させることができ、すなわち異なるヌクレオチド全て（すなわち A、T、C 及び G 又は A、U、C 及び G）を含む組成物を標的に接触させ、そして標識の検出及び除去の前に取り込まれていないヌクレオチドを除去する。ヌクレオチドの逐次的な添加を含む方法は、第1下位工程及び場合によっては1つ以上のそれに続く下位工程を含むことができる。第1下位工程では4つの可能なヌクレオチドのうち1、2又は3つを含む組成物が提供される、すなわち標的に接触させる。その後、取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして検出工程を行ってヌクレオチドの1つが取り込まれたかどうかを決定することができる。1つが取り込まれている場合、リンカーの切断を行うことができる。この方法では標的ポリヌクレオチドのヌクレオチドの同一性を決定することができる。次いで未完成ポリヌクレオチドを伸長させて標的オリゴヌクレオチドにおける次の不对ヌクレオチドの同一性を決定することができる。

10

【0043】

上記の第1下位工程がヌクレオチドの取り込みに至らない場合、又は第1下位工程の直後には取り込まれたヌクレオチドの存在を追及しないのでこれが不明な場合、第1下位工程で提供されなかったこれらのヌクレオチドのいくつか又は全てが、適当な場合、同時又は連続的のいずれかで提供される1つ以上の続く下位工程を行うことができる。その後、いずれかの取り込まれていないヌクレオチドを除去し、そして検出工程を行って、ヌクレオチドのクラス1つが取り込まれているかどうかを決定することができる。1つが取り込まれている場合、リンカーの切断を行うことができる。この方法では標的ポリヌクレオチドのヌクレオチドの同一性を決定することができる。次いで未完成ポリヌクレオチドを伸長させて標的オリゴヌクレオチドにおける次の不对ヌクレオチドの同一性を決定することができる。必要な場合、第3の及び場合によっては第4の下位工程を第2下位工程に類似の様式で行うことができる。明らかに、一度4つの下位工程を行えば、4つの可能なヌクレオチド全てが提供され、そして1つは取り込まれている。

20

【0044】

1、2又は3つのヌクレオチドを含むいずれか特定の組み合わせが提供された後、ヌクレオチドの1つの型又はクラスが取り込まれているかどうかを決定するのが望ましい。この方法では、その他の（複数の）ヌクレオチドを提供するのに費やされる不必要な経費及び時間が削減される。しかしながらこれは本発明の必要とされる特徴ではない。

30

【0045】

シーケンシングのための方法が、更なるヌクレオチドが提供される前に取り込まれていないヌクレオチドを除去するために1つ以上の下位工程を含むこともまた望ましい。これもまた、本発明の必要とされる特徴ではない。明らかに、取り込まれたヌクレオチドの検出の前に、少なくともいくつかの、そして好ましくは実施可能なできるだけ多くの、取り込まれていないヌクレオチドを除去することが必要である。

【0046】

本発明のキットは（a）切断可能なリンカーを介して検出可能な標識、又は場合によっては切断可能なリンカーを介して式2の遮断基に連結されている検出可能な標識に連結されている塩基を各ヌクレオチドが有する、本明細書に上記した本発明による個々のヌクレオチドであって、各ヌクレオチドに連結された検出可能な標識をその他の3つのヌクレオチドに用いた検出可能な標識から検出時に区別することができるヌクレオチド；及び（b）そのための包装材料；を含む。キットは更に遮断基及び検出可能な標識の除去に適当な化学物質に加えて、ヌクレオチドを相補的なヌクレオチドに取り込むための酵素及び酵素の作用に適当なバッファーを含むことができ、好ましくはこれを同一の化学処理工程により除去することができる。

40

【0047】

ヌクレオチド/ヌクレオシドはDNA合成及びDNAシーケンシングプロトコルな

50

どの多くの多様なDNA基盤の方法における使用に適している。

【0048】

本発明は、3'-OH遮断基がそれに可逆的に共有結合することにより修飾されたヌクレオチド又はヌクレオシド分子に関し、そして遮断されたヌクレオチド又はヌクレオシド分子を必要とする反応、例えばシーケンシング反応、ポリヌクレオチド合成等においてその分子を使用することができる。

【0049】

遮断基がアリル基である場合、例えば Metzker が用いた標準的な文献記載の手順（以下参照）を用いてこれを3'位置に導入することができる。

【0050】

水溶性ホスフィン及び水溶性混合窒素ホスフィンリガンドを含む群から選択される1つ以上のリガンドの存在下、式R-O-アリル、 $R_2N$ （アリル）、RNH（アリル）、 $RN$ （アリル）<sub>2</sub>又はR-S-アリルの化合物（式中、Rは水溶性の生物学的分子である）を水溶液中で金属アリル複合体を形成することができる遷移金属と反応させることによりアリル基を除去する。

【0051】

言うまでもなく、水溶性の生物学的分子がアリル基で保護された1つ以上のヒドロキシル、酸、アミノ、アミド又はチオール官能基を含有すれば、それは特には制限されない。アリルエステルは式R-O-アリルの化合物の実例である。好ましい官能基はヒドロキシル及びアミノである。

【0052】

本明細書で用いる生物学的分子なる用語は生物学的役割を果たすいずれかの分子又は分子のクラスを包含する。このような分子には、例えばDNA及びRNAなどのポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及び単一のヌクレオチドなどがある。加えて、ペプチド及びペプチドミメティクス（ペプチド擬似物質）、例えば酵素及びホルモン等は本発明に包含される。2級アミド結合を含む化合物、例えばペプチド、又は2級アミン（このような化合物は2級アミン又はアミドの窒素原子でアリル化される）は、式 $R_2N$ （アリル）の化合物の実例であり、その双方のR基は同一の生物学的分子に属する。しかしながら、とりわけ好ましい化合物はポリヌクレオチド（オリゴヌクレオチドを含む）並びにヌクレオチド及びヌクレオシド、好ましくは切断可能なリンカーにより検出可能な標識に付着されている1つの塩基を含有するものである。このような化合物は本明細書に記載するオリゴヌクレオチドの配列の決定に有用である。

【0053】

本発明に有用な遷移金属は、金属アリル複合体を形成できるいずれかのものであり、例えば白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム、オスミウム及びイリジウムなどがある。パラジウムが好ましい。

【0054】

遷移金属、例えばパラジウムを塩、例えばハロゲン化物として導入するのが便利である。混合塩、例えば $Na_2PdCl_4$ を用いることもできる。その他の適当な塩及び化合物は当業者により容易に決定され、そして、例えば Aldrich Chemical 社から市販されている。

【0055】

適当なリガンドは、1つ以上のスルホナート、アミン、ヒドロキシル（好ましくは複数のヒドロキシル）又はカルボキシラート残基を導入することにより、リガンドがそれに水溶性を付与するために誘導体化されていることを特徴とする、当業者に公知のいずれかのホスフィン又は混合窒素ホスフィンリガンドである。アミン残基が存在する場合、アミン塩の形成が、リガンドひいては金属アリル複合体の可溶化を補助することができる。適当なリガンドの実例は、それを水溶性にするために誘導体化されたトリアリールホスフィン、例えばトリフェニルホスフィンである。トリアルキルホスフィン、例えばトリ-C<sub>1-6</sub>-アルキルホスフィン、例えばトリエチルホスフィンもまた好ましく；このようなトリ

10

20

30

40

50

アルキルホスフィンも同様にそれを水溶性にするために誘導体化されている。スルホナート含有及びカルボキシラート含有ホスフィンはとりわけ好ましく；前者の実例である 3, 3', 3'' - ホスフィニジントリス（ベンゼンスルホン酸）であり、Aldrich Chemical 社より三ナトリウム塩として市販されており；後者の好ましい実例はトリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィンであり、これは Aldrich より塩酸塩として市販されている。

【0056】

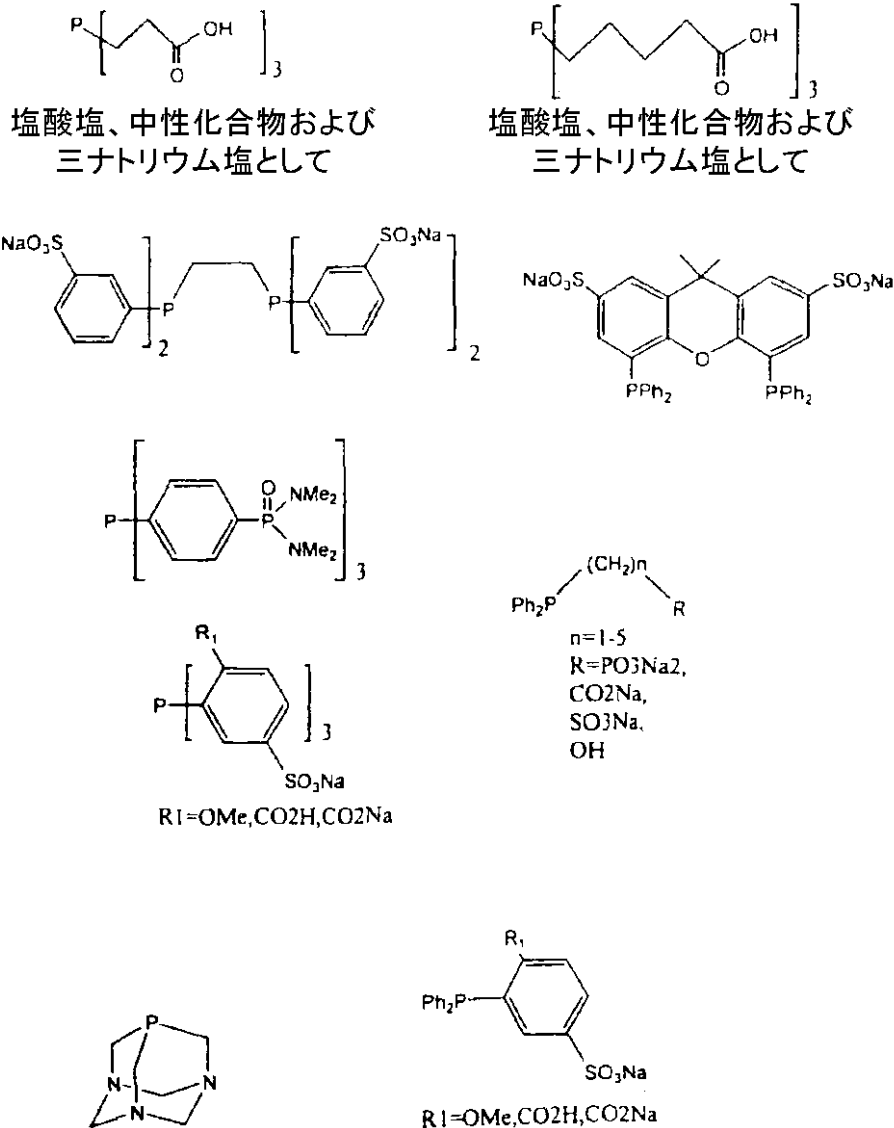
本明細書で記載する誘導体化された水溶性ホスフィン及び窒素含有ホスフィンをその塩として（例えば塩酸塩又はナトリウム塩として）、又は、例えば、本明細書で記載するスルホン酸及びカルボン酸含有ホスフィンの場合、遊離の酸として用いることができる。3, 3', 3'' - ホスフィニジントリス（ベンゼンスルホン酸）及びトリス（2 - カルボキシエチル）ホスフィンを三酸又は三ナトリウム塩のいずれかとして導入することができる。その他の適当な塩は当業者に明白である。ホスフィンが水溶液に可溶であれば、塩形態の存在は特に重要でない。

10

【0057】

用いることができるその他のリガンドには以下のものなどがある：

【化1】

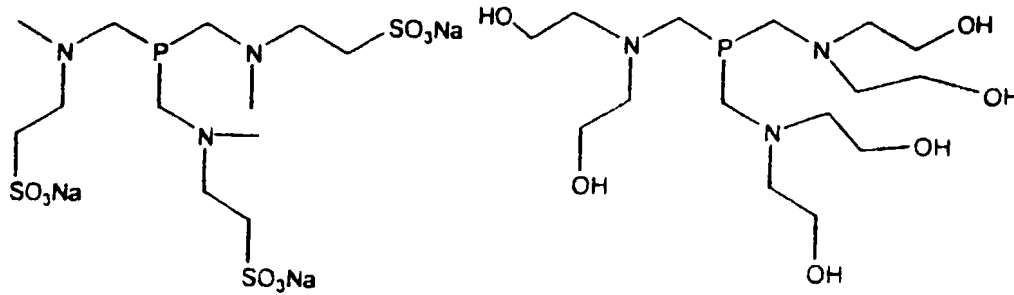


20

30

40

## 【化2】



10

## 【0058】

水溶性複合体の遷移金属にキレートされる原子が単価又は多価リガンドの一部でよいことは、当業者には認識されよう。このような多価リガンドのいくつかを上を示す。単価リガンドが好ましいが、このように本発明は水溶性二、三、四、五及び六価水溶性ホスフィン及び水溶性窒素含有ホスフィンリガンド用いる方法をも包含する。

## 【0059】

アリル遮断基に関連する本発明の種々の態様は、とりわけ3'-OHがアリル化されているポリヌクレオチドのシーケンシングにとりわけ有用である。しかしながら、存在する場合、2'-OHはアリル化、及び必要な場合本発明の方法による脱保護に同等に反応し易い。実際に、いずれのアリル化されたアルコールも本発明の方法にしたがって脱保護できる。しかしながら、好ましいアリル化アルコールは、1級及び2級アルコールから誘導されたものである。とりわけ好ましいのは、本明細書に記載するアリル化されたヌクレオチド及びヌクレオチドである。3級アリル化アルコールを脱保護することが可能であり、その反応は単純で緩徐である（しかしながらこのような、及び本発明のその他の脱保護では、必要な場合、溶液を例えば40℃、好ましくは50℃又はそれより高温、例えばおよそ60℃又は80℃までも加熱することにより脱保護を加速させることができる）。

20

## 【0060】

アリル化された1級又は2級アミン及びアリル化チオールを脱保護することも可能である。

## 【0061】

上記のように、アリル脱保護を行う水溶液は100%（連続相として）である必要はない。しかしながら、実質的に純粋な水（例えば少なくとも98容量%、好ましくは約100容量%）が好ましい。コソルベントは一般的に必要なではないが、脱アリル化のためのアリル化基質の可溶化を補助することができる。通常、生体分子は水（例えば純粋な水）に容易に溶解し、本明細書に記載する脱保護をその水中で行うことができる。所望の場合、1つ以上の水混和性コソルベントを用いることができる。適当な溶媒にはアセトニトリル又はジメチルスルホキシド、メタノール、エタノール及びアセトンなどがあり、メタノールが好ましい。あまり好ましくない溶媒にはテトラヒドロフラン（THF）及びジオキサンなどがある。

30

## 【0062】

本発明によるアリル脱保護の方法では、遷移金属及び1つ以上の水溶性ホスフィン及び水溶性窒素含有ホスフィンリガンドを含む可溶性金属複合体が形成される。脱アリル化反応において1つ以上の型の水溶性ホスフィン/窒素含有ホスフィンリガンドを用いることができるが、概してこれらのクラスのリガンドのただ1つの型を規定の反応で用いる。本発明者らは、脱アリル化反応は触媒性であると考えている。したがって、遷移金属、例えばパラジウムの量は1モル%未満でよい（脱保護されるアリル保護化合物に相対して算出）。触媒の量は1モル%より更に少ない、例えば<0.50モル%、好ましくは<0.10モル%、とりわけ<0.05モル%であるのが有利である。更に低量の金属を用いることができ、例えば<0.03又は<0.01モル%でよい。しかしながら、当業者には認識されるように、触媒の量が低減されれば、反応の速度も低減される。当業者はいずれの場

40

50

合でも、いずれかの特定の脱アリル化反応に最も適した遷移金属及び、したがって触媒の正確な量を判断することができよう。

【0063】

活性触媒を形成するのに必要とされる金属の量と対照的に、用いる水溶性リン含有リガンドの量は1モル当量以上でなければならない(これもまた脱保護されるアリル保護化合物に相対して算出)。好ましくは4よりも多く、例えば6よりも多く、例えば8~12モル当量のリガンドを用いることができる。所望の場合、例えば>20モル当量の更に高量のリガンドを用いることができる。

【0064】

当業者はいずれかの個々の反応に最も適したリガンドの量を決定することができる。

10

【0065】

遮断基が、 $-C(R')_2-O-R''$ 、 $-C(R')_2-N(R'')_2$ 、 $-C(R')_2-N(H)R''$ 、 $-C(R')_2-S-R''$ 及び $-C(R')_2-F$ のいずれか、すなわち式Zである場合、各R'は別個にH又はアルキルでよい。

【0066】

生成された中間体は水性条件下で自然に解離して、別のヌクレオチドの更なる取り込みを可能にする天然の3'ヒドロキシ構造に戻るのが有利である。本明細書で論じるように、いずれかの適当な保護基を用いることができる。好ましくは、Zは式 $-C(R')_2-O-R''$ 、 $-C(R')_2-N(R'')_2$ 、 $-C(R')_2-N(H)R''$ 及び $-C(R')_2-SR''$ である。とりわけ好ましくは、Zは式 $-C(R')_2-O-R''$ 、 $-C(R')_2-N(R'')_2$ 、及び $-C(R')_2-SR''$ である。R''はベンジル基又は置換されたベンジル基でよい。

20

【0067】

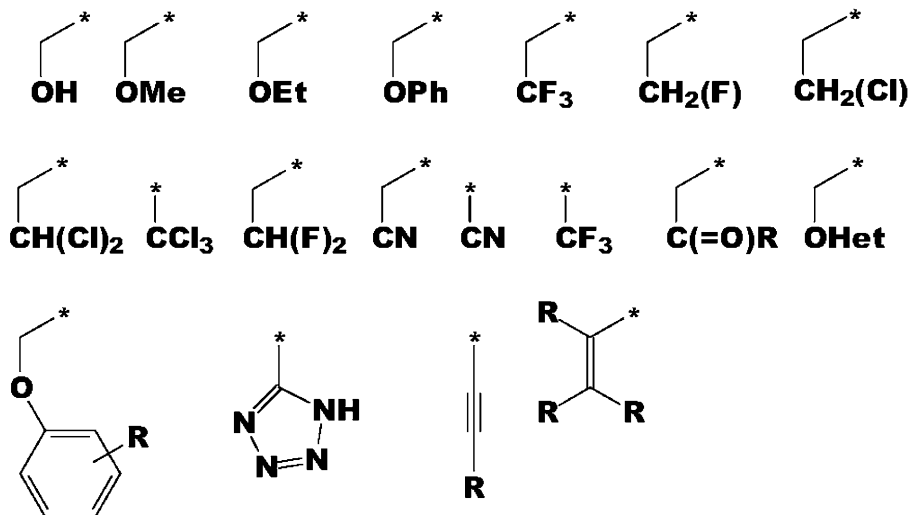
Zが $-C(R')_2-N(R'')_2$ である構造 $-O-Z$ の基の一例は、 $-N(R'')_2$ がアジド( $-N_3$ )のものである。このような好ましい実例の1つは、各R'がHであるアジドメチルである。あるいは、式 $-C(R')_2-N_3$ のZ基及びその他のZ基のR'は本明細書で論じるその他の基のいずれかでよい。

【0068】

典型的なR'基の実例には、 $C_{1-6}$ アルキル、とりわけメチル及びエチル、並びに以下のもの(その各構造はR'部分を、Z基のそれが付着する炭素原子に連結する結合を示す;アスタリスク(\*)は付着の点を示す)などがある:

30

【化3】



40

(ここで、各Rは置換されていてもよい $C_{1-10}$ アルキル基、置換されていてもよいアルコキシ基、ハロゲン原子又は官能基、例えばヒドロキシル、アミノ、シアノ、ニトロ、

50

カルボキシル等である)そして「Het」は複素環である(これは例えばヘテロアリアル基でよい)。上記のこれらのR'基は、その他のR'基が最初と同一であるか、又は水素である場合に好ましい。好ましいZ基は式 $-C(R')_2N_3$ (ここでR'基は上記した構造及び水素から選択されるか;又はここで $(R')_2$ は式 $=C(R''')_2$ のアルキリデン基、例えば $=C(Me)_2$ を表す)のものである。

【0069】

分子が式 $-C(R')_2N_3$ のZ基を含有する場合、アリル基を、式PN-O-アリル、式R-O-アリル、 $R_2N$ (アリル)、RNH(アリル)、 $RN(Aリル)_2$ 又はR-S-アリルの化合物からアリル基を切断するために提供される遷移金属複合体に関連して  
10  
詳記したホスフィン又は窒素含有ホスフィンリガンドとこのような分子を接触させることにより、アジド基をアミノに変換することができる。しかしながらアジドをアミノに変換する場合、遷移金属は必要ではない。あるいは、このような分子をチオール、とりわけ水溶性チオール、例えばジチオスレート(DTT)と接触させることにより、式 $C(R')_2N_3$ のZ基のアジドをアミノに変換することができる。

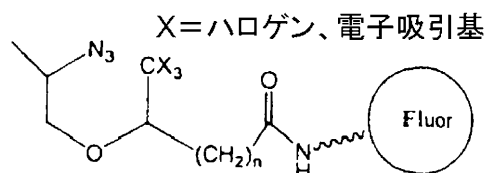
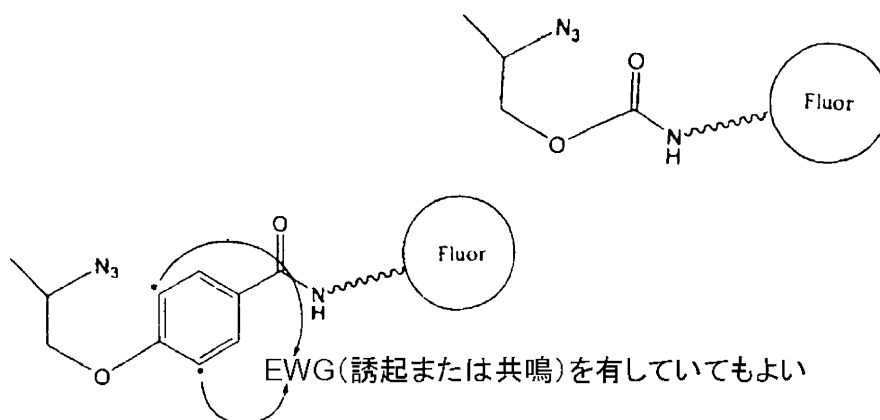
【0070】

R'基が連結基により付着された検出可能な標識を表す場合、その他のR'基又は「Z」のいずれかその他の部分は概して検出可能な標識を含有せず、ヌクレオシド又はヌクレオチドの塩基もまた検出可能な標識を含有しない。検出可能な標識を3'遮断基に連結するための適当な連結基は当業者に公知であり、そしてこのような基の実例を本明細書の後  
20  
記で更に詳記する。

【0071】

検出可能な標識を含有するR'基の連結の実例は1つ以上のアミド結合を含有するものである。このようなリンカーはまた鎖にアリーレン、例えばフェニレン基(すなわち連結部分-Ar-(ここでフェニル環はその1,4-配置の炭素原子によるリンカーの一部である))を含有する。フェニル環はその非結合位置で1つ以上の置換基、例えばアルキル、ヒドロキシル、アルキルオキシ、ハロゲン化物、ニトロ、カルボキシル、又はシアノ等、とりわけ電子求引基で置換されていてよく、この電子求引基は誘起又は共鳴のいずれか  
30  
による。R'基の連結はまた-O-、 $-S(O)_q$ (qは0、1又は2)、NHもしくはNアルキルのごとき部分を含むこともできる。このようなZ基の実例は以下のとおりである:

【化4】



10

20

30

40

50

(ここで、EWGは電子求引基を意味し；nは1～50の整数、好ましくは2～20の整数、例えば3～10の整数であり；そしてfluorはフルオロフォアを示す)。共鳴による電子求引基の実例はニトロであり；誘起により作用する基はフルオロである。その他の適当な電子求引基は当業者には認識されよう。加えて、フルオロフォアは検出可能な標識が存在するとして示されているが、本明細書の後記で更に詳細に論じるその他の検出可能な標識を代わりに含むことができることは理解されよう。

#### 【0072】

検出可能な標識が3'遮断位置でヌクレオチドに付着している場合、反応の次の工程の前に標識を「読み」そして除去することを必要とする、本明細書に記載するこれらの反応、例えばDNAシーケンシングにおいて有用であるためにリンカーは切断可能である必要はない。これは、標識が3'遮断基に付着している場合、本明細書に記載する中間化合物が「Z」基を水素原子と置換するために崩壊するときにヌクレオチドから分離するためである。上記したように、各R'は除去可能な保護基であるか又はその一部である。R'はベンジル基、又は置換されたベンジル基でよく、これは代替の実施形態である。

10

#### 【0073】

検出可能な標識をR'基に取り込むことができる場合、本発明はこの可能性を包含することは理解されよう。したがって、R'がベンジル基である場合、フェニル環はフルオロフォア又はその他の検出可能な基を付着するリンカー基を担持することができる。このような基の導入はこのようなR'を除去する能力を妨げず、そしてこれは式Zの遮断基の脱保護の間の望ましい不安定な中間体の生成を妨げない。

20

#### 【0074】

当分野で公知であるように、「ヌクレオチド」は窒素含有塩基、糖、及び1つ以上のリン酸基から成る。これは核酸配列の単量体単位である。RNAでは糖はリボースであり、そしてDNAではデオキシリボース、すなわちリボースに存在するヒドロキシル基を欠いている糖である。窒素含有塩基はプリン又はピリミジンの誘導体である。プリンはアデニン(A)及びグアニン(G)であり、そしてピリミジンはシトシン(C)及びチミン(T)(又はRNAではウラシル(U))である。デオキシリボースのC-1原子はピリミジンのN-1又はプリンN-9に結合する。ヌクレオチドはまた糖のC-5に付着しているヒドロキシル基で生じるエステル化を伴うヌクレオチドのリン酸エステルである。ヌクレオチドは通常一、二又は三リン酸エステルである。

30

#### 【0075】

「ヌクレオチド」は構造的にヌクレオチドに類似するが、リン酸部分を欠如している。ヌクレオチドアナログの実例は、標識が塩基に連結されており、そして糖分子に付着するリン酸基がないものである。

#### 【0076】

塩基は通常プリン又はピリミジンと称されるが、ヌクレオチド又はヌクレオチドのワトソン・クリック塩基対合を行う能力が変わらない誘導体及びアナログを利用できることは当業者には理解されよう。「誘導体」又は「アナログ」とはそのコア構造が親化合物と同一であるか又はそれに非常に類似しているが、化学的又は物理的修飾、例えば異なる又は更なる側鎖、又は誘導体化されたヌクレオチド又はヌクレオチドが別の分子に連結することを可能にする2'及び、もしくは3'遮断基を有している化合物又は分子を意味する。例えば、塩基はデアザプリンでよい。誘導体はワトソン・クリック塩基対合を行うことができるべきである。「誘導体」及び「アナログ」はまた修飾された塩基部分及び/又は修飾された糖部分を有する合成ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体を意味する。このような誘導体及びアナログは例えばScheit, Nucleotide Analogs (John Wiley & Son (1980))及びUhlmanら、Chemical Reviews 90:543-584 (1990)にて論じられている。ヌクレオチドアナログはまたホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、アルキルホスホナート、ホスホロアニリダート及びホスホロアミダート結合などの修飾されたホスホジエステル結合を含むこともできる。アナログはワトソン・クリック塩基対合を行うことができるべ

40

50

きである。本明細書で用いる「誘導体」、「アナログ」及び「修飾された」を互換的に用いることができ、そして本明細書で定義する「ヌクレオチド」及び「ヌクレオシド」なる用語を包含する。

【0077】

本発明の局面では、「取り込む」なる用語は核酸（例えばDNA）分子又はオリゴヌクレオチド又はプライマーの一部になることを意味する。オリゴヌクレオチドは、1つのヌクレオチドの五炭糖の3'位置と隣接するヌクレオチドの五炭糖の5'位置との間のホスホジエステル又は修飾されたホスホジエステル結合により形成されるヌクレオチドの共有結合した配列を含む合成又は天然分子を意味する。

【0078】

「アルキル」なる用語は直鎖、分岐鎖及びシクロアルキル基を意味する。その局面がそれ以外を示すのでなければ、「アルキル」なる用語は1~10個の炭素原子、例えば1~8個の炭素原子、及び典型的には1~6個の炭素原子、例えば1~4個の炭素原子を有する基を意味する。アルキル基の実例には、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、n-ペンチル、2-ペンチル、3-ペンチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル及びn-ヘキシル、並びにその異性体などがある。

【0079】

シクロアルキルの実例には、3~10個の環状原子を有するもの、とりわけシクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン及びシクロヘプタン、ピシクロヘプタン及びデカリンから誘導されたものなどの実例がある。

【0080】

アルキル（シクロアルキルを含む）基が置換されている場合、とりわけこれらが本発明の分子の双方のR'基のいずれかを形成する場合、適当な置換基の実例にはハロゲン置換基又は官能基、例えばヒドロキシル、アミノ、シアノ、ニトロ、カルボキシル等などがある。このような基はまた適当な場合、本発明の分子の別のR'基の置換基でもよい。

【0081】

アミノなる用語はNR<sup>\*</sup>R<sup>\*\*</sup>の型の基を意味し、ここでR<sup>\*</sup>及びR<sup>\*\*</sup>は別個に、水素、C<sub>1-6</sub>アルキル基から選択される（C<sub>1-6</sub>アルキルアミノ又はジ-C<sub>1-6</sub>アルキルアミノとも称される）。

【0082】

本明細書で用いる「ハロゲン」なる用語にはフッ素、塩素、臭素及びヨウ素が含まれる。

【0083】

本発明のヌクレオチド分子は、ヌクレオチドの検出を必要とする多様な方法で使用するのに適している。

【0084】

そのヌクレオチドを用いてDNAシーケンシング方法、例えば米国特許第5,302,509号で概要が示されている方法を実施することができる。

【0085】

本発明は、従来を検出可能な標識を利用することができる。蛍光分光法などのいずれかの適当な方法により、又はその他の光学的な手段により検出を行うことができる。好ましい標識は、エネルギーを吸収した後、規定の波長で放射するフルオロフォアである。多くの適当な蛍光標識が公知である。例えば、Welchら（Chem. Eur. J. 5（3）：951-960（1999））は、本発明で用いることができるダンシルの官能性を持たせた蛍光部分を開示している。Zhuら（Cytometry 28：206-211（1997））は、本発明で用いることができる蛍光標識Cy3及びCy5の使用について記載している。使用に適した標識はまたProberら（Science 238：336-341（1987））；Connellら（BioTechniques 5（4）：342-384（1987））、Ansoergeら（Nucl. Acids Res. 15（11）：4593-4602（1987））及びSmithら（Nature

10

20

30

40

50

321:674(1986))にも開示されている。その他の市販されている蛍光標識には、フルオレsein、ローダミン(TMR、テキサスレッド及びRoxなどを含む)、アレクサ、ボディピー(bodipy)、アクリジン、クマリン、ピレン、ベンズアントラセン及びシアニンなどがあるが、これらに限定されない。

【0086】

本発明において複数の標識を用いることもできる。例えばピ・フルオロフォアFRETカセット(Tet.Let.46:8867-8871(2000))は当分野で公知であり、そして本発明で利用することができる。マルチ・フルオロ・デンドリマー系(J.Amer.Chem.Soc.123:8101-8108(2001))を用いることもできる。

【0087】

蛍光標識が好ましいが、その他の形態の検出可能な標識も有用であるのは当業者に明らかであろう。例えば量子ドット(Empodoclesら、Nature 399:126-130(1999))、金ナノ粒子(Reichertら、Anal.Chem.72:6025-6029(2000))及びマイクロビーズ(Lacosteら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97(17):9461-9466(2000))などの微粒子を全て使用することができる。

【0088】

本発明において多成分標識を用いることもできる。多成分標識は検出する別の化合物との相互作用に依存する標識である。生物学で用いられる最も一般的な多成分標識はピオチン・ストレプトアビジン系である。ピオチンをヌクレオチド塩基に付着された標識として用いる。次いでストレプトアビジンを別個に加えて検出を行うのを可能にする。その他の多成分系も利用可能である。例えばジニトロフェノールは、検出に用いることができる、市販されている蛍光抗体である。

【0089】

本発明はヌクレオチドに関して記載されており、そして更に記載される。しかしながら、特記しない場合、ヌクレオチドに対する言及はまたヌクレオシドにも適用できることを意図している。本発明は更にDNAに関して記載されるが、特記しない場合、その記載はRNA、PNA及びその他の核酸にも適用できる。

【0090】

本発明の修飾されたヌクレオチドは標識をヌクレオチドに付着させるために切断可能なリンカーを使用することができる。切断可能なリンカーの使用により、必要な場合、検出後に標識を除去できることを確実にし、いずれかの続いて取り込まれた標識ヌクレオチドとの干渉シグナルを避けることができる。

【0091】

一般的に、とりわけ本明細書に上記した本発明の方法において、検出可能な標識が「Z」基の一部を形成することによりヌクレオチドに付着している場合を除けば、切断可能なリンカーの使用が好ましい。

【0092】

特定の型のヌクレオチドで無作為化された鎖終止に頼るいわゆるサンガー・シーケンシング法及び関連するプロトコール(サンガー型)におけるジデオキシヌクレオシド三リン酸の利用は当業者には認識されよう。サンガー型シーケンシングプロトコールの実例はMetzkerに記載されるBASS法である(後記)。その他のサンガー型シーケンシング法は当業者に公知であろう。

【0093】

サンガー及びサンガー型方法は概して、8つの型のヌクレオチドを提供し、そのうちの4つは3'OH基を含有し;4つにはOHがなく、そしてこれが互いに異なって標識されている実験を行なうことにより機能する。用いた3'OHがないヌクレオチド、すなわちジデオキシヌクレオチドを従来どおりにddNTPと略する。当業者には公知であるように、ddNTPは異なって標識されるので、取り込まれた末端ヌクレオチドの位置を決定

10

20

30

40

50

し、そしてこの情報を合わせるにより標的オリゴヌクレオチドの配列を決定することができる。

【0094】

認識されるように、本明細書に記載する新規3'-OH遮断基を用いることにより、ddNTPを用いることにより達成された効果と同一の効果を達成することができる(双方共に続くヌクレオチドの取り込みを防御する)ので、本発明のヌクレオチドはサンガー法及び関連するプロトコルで有用である。

【0095】

サンガー及びサンガー型シーケンシング法における本発明によるヌクレオチドの使用においては、検出可能な標識をヌクレオチドに連結するリンカーが切断可能でも切断できなくともよく、これを更に本発明の別の態様を成す。この態様の観点から、本発明はサンガー及びサンガー型シーケンシング法におけるこのようなヌクレオチドの使用を提供する。

10

【0096】

本発明による3'-OH Z遮断ヌクレオチドを用いる場合、本発明に標識ヌクレオチドが取り込まれる各例で、続いてヌクレオチドが取り込まれる必要はなく、そして標識をヌクレオチドから除去する必要はないので、ヌクレオチドに付着された検出可能な標識は切断可能なリンカーを介して連結される必要がないことは理解されよう。

【0097】

更に3'-OH遮断されたヌクレオチドの取り込みのモニターを、付着されるリン酸基における放射活性<sup>32</sup>Pの使用により決定できることは理解されよう。これらはddNTP自体か又は伸長に使用するプライマーのいずれかに存在できる。遮断基が式「Z」の基である場合、これは本発明の更なる態様を示す。

20

【0098】

この態様の観点から、本発明はサンガー及びサンガー型シーケンシング法における、「Z」基で遮断された3'-OH基を有するヌクレオチドの使用を提供する。この実施形態では、<sup>32</sup>P検出可能な標識は用いたddNTP又は伸長に用いたプライマーのいずれかに存在し得る。

【0099】

切断可能なリンカーは当分野で公知であり、そしてリンカーをヌクレオチド塩基及び標識に付着させるために従来化学を適用することができる。酸、塩基、求核試薬、求電子試薬、ラジカル、金属、還元又は酸化剤、光、温度、酵素等への暴露などのいずれかの適当な方法によりリンカーを切断することができる。本明細書にて論じるリンカーを3'-O-遮断基結合を切断するのに用いる触媒と同一の触媒を用いて切断することもできる。適当なリンカーを、Greene及びWuts、Protective Groups in Organic Synthesis、John Wiley & Sonsで開示されるような標準的な化学遮断基から適用することができる。固相合成で用いられる更に適当な切断可能なリンカーはGuillier (Chem. Rev. 100: 2092-2157 (2000))に開示されている。

30

【0100】

「切断可能なリンカー」なる用語の使用は、リンカー全体が例えばヌクレオチド塩基から除去されることを必要とすることを含意することを意味するものではない。検出可能な標識が塩基に付着されている場合、切断後にリンカーの一部がヌクレオチドに付着されたままであることを確実にするリンカーの位置にヌクレオチド切断部位を定めることができる。

40

【0101】

検出可能な標識が塩基に付着されている場合、ワトソン・クリック塩基対合を依然行うことができるならば、ヌクレオチド塩基のいずれかの位置でリンカーを付着させることができる。プリン塩基の局面では、リンカーがプリン又は好ましいデアザプリンアナログの7位を介して、8-修飾プリンを介して、N-6修飾アデノシン又はN-2修飾グアニン

50

を介して付着されれば好ましい。ピリミジンに関しては、付着はシトシン、チミジン又はウラシルの5位、及びシトシンのN-4位置を介するのが好ましい。適当なヌクレオチド構造を図1に示す。図1の各構造に関して、XはH、リン酸、二リン酸又は三リン酸でよい。R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は同一か又は異なってよく、そしてH、OH、O-アリルもしくは本明細書に記載する式Z、又はR<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の少なくとも1つがO-アリルもしくは本明細書に記載する式Zであれば、OHに変換できるいずれかその他の基、非限定例としてはカルボニル、などから選択される。R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>に適当ないくつかの官能基には図3及び4に示す構造などがある。

#### 【0102】

適当なリンカーを図3に示し、ジスルフィドリンカー(1)、酸に不安定なリンカー(2、3、4及び5；ジアルコキシベンジルリンカー(例えば2)、シーバー(Sieber)リンカー(例えば3)、インドールリンカー(例えば4)、t-ブチル・シーバー(Sieber)リンカー(例えば5))、求電子的に切断可能なリンカー、求核的に切断可能なリンカー、光切断可能なリンカー、還元条件下、酸化条件下での切断、セーフティ・キャッチ・リンカーの使用による切断、及び排除メカニズムによる切断などがあるが、これらに限定されない。

10

#### 【0103】

##### A．求電子的に切断可能なリンカー

求電子的に切断可能なリンカーは典型的にはプロトンにより切断され、そして酸に感受性のある切断を含む。適当なリンカーには修飾されたベンジル系、例えばトリチル、p-アルコキシベンジルエステル及びp-アルコキシベンジルアミドなどがある。その他の適当なリンカーにはt-ブチルオキシカルボニル(Boc)基及びアセタール系などがある。

20

#### 【0104】

チオアセタール又はその他のイオウ含有保護基の切断におけるチオフィリック金属、例えばニッケル、銀又は水銀の使用を適当なリンカー分子の調製のために考慮することもできる。

#### 【0105】

##### B．求核的に切断可能なリンカー

求核的切断もまたリンカー分子の調製においてよく知られた方法である。基例えば水中で不安定なエステル(すなわち単純に塩基性pHで切断され得る)及び非水性求核試薬に不安定な基を使用することができる。フッ素イオンを用いて基例えばトリイソプロピルシラン(TIPS)又はt-ブチルジメチルシラン(TBDMs)のシリコン-酸素結合を切断することができる。

30

#### 【0106】

##### C．光切断可能なリンカー

光切断可能なリンカーは糖質化学において広く用いられている。切断を活性化するのに必要な光は、修飾されたヌクレオチドのその他の成分に影響しないのが好ましい。例えば、フルオロフォアを標識として用いる場合、これがリンカー分子を切断するのに必要な波長とは異なる波長の光を吸収すれば好ましい。適当なリンカーにはO-ニトロベンジル化合物及びニトロベラトリル化合物に基づくものなどがある。ベンゾイン化学に基づくリンカーを用いることもできる(Leera, J. Org. Chem. 64: 3454-3460(1999))。

40

#### 【0107】

##### D．還元条件下での切断

還元性の切断の影響を受けやすいことが知られている多くのリンカーがある。パラジウム系の触媒を用いる接触水素化を用いてベンジル及びベンジルオキシカルボニル基の切断が行われている。ジスルフィド結合還元もまた当分野で公知である。

#### 【0108】

##### E．酸化条件下での切断

50

酸化系の方法は当分野で公知である。これには p - アルコキシベンジル基の酸化並びにイオウ及びセレンウムリンカーの酸化などがある。ジスルフィド及びその他のイオウ又はセレンウム系のリンカーを切断するための水性ヨウ素の使用もまた本発明の範囲内である。

#### 【0109】

##### F. セーフティ・キャッチ・リンカー

セーフティ・キャッチ・リンカーは2つの工程で切断するリンカーである。好ましい系では、第1工程は反応性求核中心の作製であり、その後切断に至る分子内環化に關与する第2工程が続く。例えばレプリン酸エステル結合をヒドラジン又は光化学で処理して活性アミンを放出させ、次いでこれを環化して分子の他の場所のエステルを切断することができる (Burgessら、J. Org. Chem. 62: 5165 - 5168 (1997))。

10

#### 【0110】

##### G. 排除メカニズムによる切断

排除反応を用いることもできる。例えば、例えば Fmoc 及びシアノエチルなどの基の塩基で触媒される排除、並びにアシル系のパラジウムで触媒される還元性排除を用いることができる。

#### 【0111】

切断部位と同様に、リンカーはスペーサーユニットを含むことができる。スペーサーは例えばヌクレオチド塩基を切断部位又は標識から遠ざける。ヌクレオチドと酵素との間の相互作用に何ら干渉されないために、標識がヌクレオチドから十分な距離を維持するのであれば、リンカーの長さは重要ではない。

20

#### 【0112】

好ましい実施形態では、リンカーは遮断基と同一の官能基から構成され得る。これは標識及び遮断基の双方を除去するのに必要なのは単一の処理のみであるので、脱保護及び脱遮断方法が更に効率的になる。

#### 【0113】

とりわけ好ましいリンカーはホスフィン切断可能なアジド含有リンカーである。

#### 【0114】

標的ポリヌクレオチドを別個に異なるヌクレオチドに接触させて標的ポリヌクレオチドの配列に対する相補体を形成し、そしてヌクレオチドの取り込みを検出することにより、標的ポリヌクレオチドの配列を決定するための方法を実施することができる。このような方法は、標的のヌクレオチドに相補的な正確なヌクレオチドを取り込むことによりポリメラーゼ酵素が相補鎖を伸長する重合を利用する。重合反応はまた重合を開始するための特異的プライマーを必要とする。

30

#### 【0115】

各サイクルで、修飾されたヌクレオチドの取り込みをポリメラーゼ酵素により実施し、そして次に取り込み事象を決定する。多様なポリメラーゼ酵素が存在し、そしてどれが最も使用に適しているかは当業者に明らかであろう。好ましい酵素には、DNAポリメラーゼ I、クレノウフラグメント、DNAポリメラーゼ II、T4 又は T7 DNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ又は Ventポリメラーゼなどがある。特別な特性を有するように操作されたポリメラーゼを用いることもできる。上記したように、分子はポリメラーゼ、そしてとりわけ Thermococcus 種に由来するもの、例えば 9°N により取り込まれるのが好ましい。なお更に好ましくは、ポリメラーゼは変異体 9°N A485L であり、そしてなお更に好ましくは、二重変異体 Y409V 及び A485L である。このような好ましい酵素の一例は、New England Biolabs から入手可能な Thermococcus 種 9°N exo Y409V A485L である。このような適当なポリメラーゼの実例は Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5281 - 5285 (1996)、Nucleic Acids Research 27: 2454 - 2553 (1999) 及び Acids Research 30: 60

40

50

5 - 6 1 3 ( 2 0 0 2 ) に開示されている。

【 0 1 1 6 】

シーケンシング方法は固体支持体に配列された標的ポリヌクレオチドを用いて実施するのが好ましい。複数の標的ポリヌクレオチドをリンカー分子により固体支持体に固定することができるか、又は固体支持体材料にも付着できる粒子、例えばマイクロスフェアに付着させることができる。ピオチン・アビジン相互作用の使用などの多くの手段によりポリヌクレオチドを固体支持体に付着させることができる。ポリヌクレオチドを固体支持体に固定する方法は当分野で公知であり、そしてリソグラフィック技術及び固体支持体上の規定の位置での個々のポリヌクレオチドの「スポットティング」などが含まれる。適当な固体支持体は当分野で公知であり、そしてガラススライド及びビーズ、セラミック及びシリコン表面並びにプラスチック材料が含まれる。支持体は通常平板な表面であるが、微視的なビーズ(マイクロスフェア)を用いることもでき、そして公知の手段により今度は別の固体支持体に付着させることができる。マイクロスフェアはいずれかの適当な大きさでよく、典型的には直径10nmから100nmの範囲でよい。好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドを直接平板な表面、好ましくは平板なガラス表面上に直接付着させる。共有結合による付着が好ましい。好ましくは、例えば国際出願の国際公開公報第00/06770号に開示されるような、使用されるアレイが明確に光学的に分離できる部分のポリヌクレオチドを含む単一分子アレイである。

10

【 0 1 1 7 】

単一のポリヌクレオチド分子及び多ポリヌクレオチド分子アレイ、すなわち明確な個々のポリヌクレオチド分子のアレイ及び1つの個々のポリヌクレオチド分子の複数のコピーを含む明確な領域のアレイの双方でシーケンシング方法を実施することができる。単一の分子アレイにより各々の個々のポリヌクレオチドが別個に分離されることが可能になる。単一の分子アレイの使用が好ましい。単一分子アレイの非破壊的シーケンシングにより空間的に位置指定が可能なアレイを形成することが可能になる。

20

【 0 1 1 8 】

方法は重合反応を利用して標的の相補的配列を作製する。重合反応に適合する条件は当業者に明らかであろう。

【 0 1 1 9 】

ポリメラーゼ反応を行うために、通常最初にプライマー配列を標的ポリヌクレオチドにアニーリングさせる必要があり、プライマー配列はポリメラーゼ酵素により認識され、そして相補鎖の続く伸長の開始部位として作用する。プライマー配列を標的ポリヌクレオチドに関して別個の成分として添加することができる。あるいは、プライマー及び標的ポリヌクレオチドは各々1つの1本鎖分子の一部でよく、プライマー部分は標的の一部と分子内2本鎖、すなわちヘアピンループ構造を形成する。この構造を分子のいずれかの点で固体支持体に固定することができる。ポリメラーゼ反応を実施するのに必要なその他の条件には温度、pH、バッファー組成などがあり、これは当業者に明らかであろう。

30

【 0 1 2 0 】

次に本発明の修飾されたヌクレオチドを標的ポリヌクレオチドに接触させて、重合を生じさせる。ヌクレオチドを逐次的に加える、すなわち各ヌクレオチド型(A、T、G又はC)の添加を別々に行うか、又は一緒に加える。これらを一緒に加える場合、各ヌクレオチド型に関して異なる標識を用いて標識するのが好ましい。

40

【 0 1 2 1 】

この重合工程はヌクレオチドの取り込みを可能にするのに十分な時間で進行させる。

【 0 1 2 2 】

次いで取り込まれなかったヌクレオチドを、例えばアレイを洗浄工程に供することにより除去し、そして次に取り込まれた標識の検出を行うことができる。

【 0 1 2 3 】

検出は慣用される手段でよく、例えば標識が蛍光部分である場合、走査型共焦点顕微鏡を用いてアレイの表面をレーザーで走査し、フルオロフォアの取り込まれた塩基に対する

50

直接的な結合を撮像することにより取り込まれた塩基の検出を行うことができる。あるいは、感受性のある 2-D 検出器、例えば電荷結合検出器 (CCD) を用いて生じた個々のシグナルを可視化することができる。しかしながらその他の技術、例えば近接場光学顕微鏡 (SNOM) が利用可能であり、そしてこれを高密度なアレイを撮像する場合に用いることができる。例えば SNOM を用いて、100 nm 未満、例えば 10 nm から 10 μm の距離で離れている場合に、個々のポリヌクレオチドを区別することができる。近接場光学顕微鏡の記載に関しては、Moyer ら、*Laser Focus World* 29 : 10 (1993) を参照のこと。ポリヌクレオチドアレイの撮像に用いるのに適当な装置は公知であり、技術的なセットアップは当業者に明らかであろう。

【0124】

検出の後、リンカー及び 3' OH 遮断基を切断して本発明の更なる修飾ヌクレオチドの取り込みを可能にする適当な条件を用いて標識を除去することができる。適当な条件はアシル基に関して、及び「Z」基脱保護に関して本明細書に記載した条件でよい。これらの条件をリンカー (切断可能な場合) 及び遮断基の双方の脱保護のために提供することができる。あるいは、当分野で公知のリンカーを切断し (これは O-遮断基結合を切断しない)、続いて脱保護する方法を用いることによりリンカーを別個にアシル基から脱保護することができる。

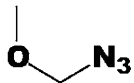
【0125】

本発明の範囲を限定するためではなく、本発明を説明するために提供される以下の実施例を参照して、本発明を更に理解することができる。

【0126】

ヘミアミナルの保護形態としてアジドメチル基で 3' OH 保護した：

【化 5】

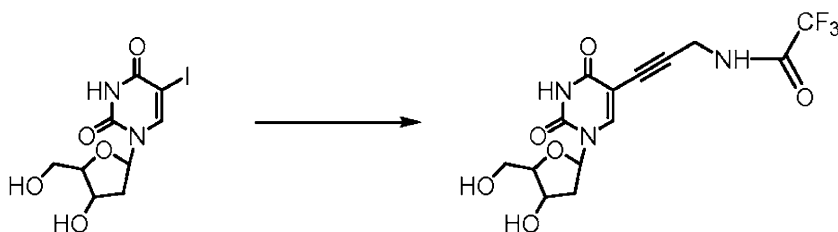


【0127】

3' 位置でこの遮断基を担持するヌクレオチドを合成し、DNA ポリメラーゼによりうまく取り込まれ、効率的に遮断することが示され、そして続いて中性の水性条件下で水性ホスフィン又はチオールを用いて除去され更なる伸長が可能になる。

【0128】

【化 6】



(1)

5 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2' - デオキシウリジン ( 1 )

乾燥 DMF ( 21 ml ) 中 5 - ヨード - 2' - デオキシウリジン ( 1.05 g , 2.96 ミリモル ) 及び CuI ( 114 mg , 0.60 ミリモル ) の溶液にトリエチルアミン ( 0.9 ml ) を加えた。5 分間攪拌した後、トリフルオロ - N - プロパ - 2 - イニル - アセトアミド ( 1.35 g , 9.0 ミリモル ) 及び Pd ( PPh<sub>3</sub> )<sub>4</sub> ( 330 mg , 0.29 ミリモル ) を混合物に加え、そして反応物を室温にて暗で 16 時間攪拌した。メタノール ( MeOH ) ( 40 ml ) 及び重炭酸 d o w e x を反応混合物に加え、そして 4 5

10

20

30

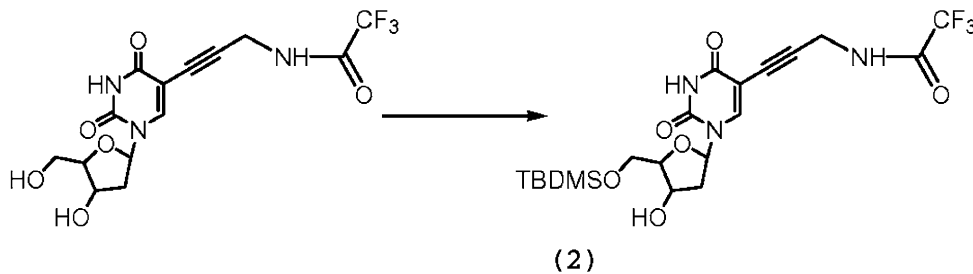
40

50

分間攪拌した。混合物を濾過し、そして濾過物を MeOH で洗浄し、そして溶媒を真空下除去した。粗製混合物をシリカのクロマトグラフィーにより精製し (酢酸エチル (EtOAc) から EtOAc : MeOH 95 : 5)、わずかに黄色の結晶が得られた (794 mg, 71%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> ジメチルスルホキシド (DMSO)) 2.13-2.17 (m, 2H, H-2'), 3.57-3.65 (m, 2H, H-5'), 3.81-3.84 (m, 1H, H-4'), 4.23-4.27 (m, 3H, H-3', CH<sub>2</sub>N), 5.13 (t, J = 5.0 Hz, 1H, OH), 5.20 (d, J = 4.3 Hz, 1H, OH), 6.13 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 8.23 (s, 1H, H-6), 10.11 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 11.70 (br s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> に関して計算値 377.08, 測定値 376.

【0129】

【化7】



10

20

5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-5-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシウリジン (2)

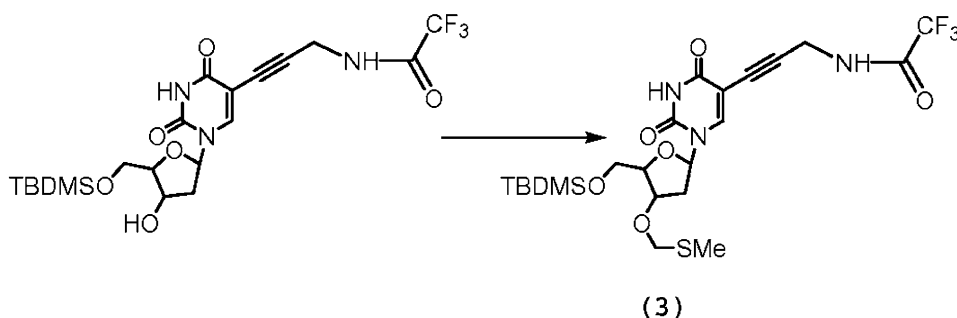
乾燥 DMF (15 ml) 中 (1) の溶液 (656 mg, 1.74 ミリモル) に塩化 t-ブチルジメチルシリル (288 mg, 1.91 ミリモル) を少しずつ、続いてイミダゾール (130 mg, 1.91 ミリモル) を加えた。TLC により反応を追跡し、室温で 8 時間攪拌した後、反応が完了した。飽和 NaCl 水溶液で反応をクエンチした。EtOAc (25 ml) を反応混合物に加え、そして水層を EtOAc で 3 回抽出した。合わせた有機層を乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) した後、溶媒を真空下除去した。シリカでのクロマトグラフィーによる精製 (EtOAc : 石油エーテル 8 : 2) でわずかに黄色の結晶として (2) (676 mg, 83%) が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 0.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (s, 9H, tBu), 1.93-2.00 (m, 1H, H-2'), 2.06-2.11 (m, 1H, H-2'), 3.63-3.75 (m, 2H, H-5'), 3.79-3.80 (m, 1H, H-4'), 4.12-4.14 (m, 3H, H-3', CH<sub>2</sub>N), 5.22 (d, J = 4.1 Hz, 1H, OH), 6.03 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 7.86 (s, 1H, H-6), 9.95 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH), 11.61 (br s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> Si に関して計算値 491.17, 測定値 490.

30

30

【0130】

【化8】



40

5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-3'-O-メチルチオメチル-5-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシウリジン (3)

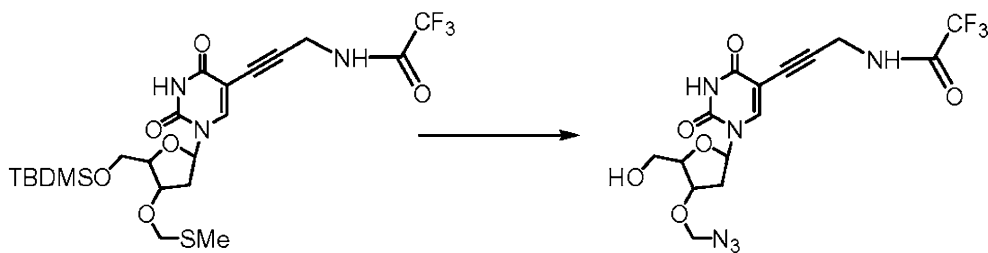
50

乾燥DMF(7ml)中(2)の溶液(1.84g, 3.7ミリモル)に酢酸(3.2ml)及び無水酢酸(10.2ml)を加えた。次いで混合物を室温で2日間攪拌した後、飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で反応をクエンチした。EtOAc(50ml)を加え、そして水層を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機層を飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で洗浄し、そして乾燥(MgSO<sub>4</sub>)した。減圧下で溶媒を除去した後、生成物(3)をシリカでのクロマトグラフィーにより精製(EtOAc:石油エーテル 8:2)し、透明な粘着性の油状物(1.83g, 89%)が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO): 0.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (s, 9H, tBu), 1.96-2.06 (m, 1H, H-2'), 1.99 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.20-2.26 (m, 1H, H-2'), 3.63-3.74 (m, 2H, H-5'), 3.92-3.95 (m, 1H, H-4'), 4.11-4.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.28-4.30 (m, 1H, H-3'), 4.59 (br s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.97 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 7.85 (s, 1H, H-6), 9.95 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH), 11.64 (s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>SSi に関して計算値 551.17, 測定値 550.

10

【0131】

【化9】



(4)

20

3'-O-アジドメチル-5-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシウリジン(4)

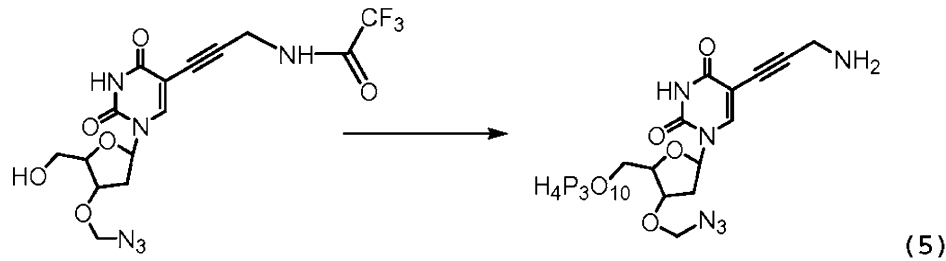
乾燥CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(5ml)中(3)(348mg, 0.63ミリモル)及びシクロヘキセン(0.32ml, 3.2ミリモル)の溶液に4で塩化スルフルル(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中1M, 0.76ml, 0.76ミリモル)をN<sub>2</sub>下で滴下した。10分後、TLCによりヌクレオシド(3)の完全な消費が示された。溶媒を蒸発させて、残渣を高真空に20分間供した。次いでこれを乾燥DMF(3ml)に再溶解し、そしてNaN<sub>3</sub>(205mg, 3.15ミリモル)で処理した。得られた懸濁液を室温で2時間攪拌した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で反応をクエンチし、そして有機層を飽和NaCl水溶液で洗浄した。溶媒を除去した後、得られた黄色ゴム状物質をTHF(2ml)に再溶解し、そして室温で30分間TBAF(THF中1M, 0.5ml)で処理した。溶媒を除去し、そしてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>及び飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で反応液を処理した。水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で3回抽出した。シリカのクロマトグラフィーによる精製(EtOAc:石油エーテル 1:1からEtOAc)で淡黄色の泡状物として(4)(100mg, 37%)が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.15-2.26 (m, 2H, H-2'), 3.47-3.57 (m, 2H, H-5'), 3.88-3.90 (m, 1H, H-4'), 4.14 (d, J = 4.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.24-4.27 (m, 1H, H-3'), 4.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 5.14 (t, J = 5.2 Hz, 1H, OH), 5.96-6.00 (m, 1H, H-1'), 8.10 (s, 1H, H-6), 10.00 (s, 1H, NHCOCF<sub>3</sub>), 11.26 (s, 1H, NH).

30

40

【0132】

## 【化10】



10

ビス(トリ-n-ブチルアンモニウム)ピロリン酸の調製(DMF中0.5M)

四ナトリウムピロリン酸十水和物(1.5g, 3.4ミリモル)を水(34ml)に溶解し、そして溶液をH<sup>+</sup>の形態のdowexのカラムに適用した。カラムを水で溶出した。溶出液を冷却し(氷浴)そして攪拌したEtOH(14ml)中トリ-n-ブチルアミン(1.6ml, 6.8ミリモル)溶液に直接滴下した。溶出液のpHが6に上昇するまでカラムを洗浄した。エタノール水溶液を蒸発乾固し、そして次にエタノールで2回及び無水DMFで2回同時蒸発させた。残渣をDMF(6.7ml)に溶解した。淡黄色溶液を4モレキュラーシーブ上で保存した。

## 【0133】

3'-O-アジドメチル-5-(3-アミノ-プロパ-1-イニル)-2'-デオキシウリジン 5'-O-ヌクレオシド三リン酸(5)

ヌクレオシド(4)及びプロトンスポンジを真空下P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>で一晩乾燥した。リン酸トリメチル(0.5ml)中(4)の溶液(92mg, 0.21ミリモル)及びプロトンスポンジ(90mg, 0.42ミリモル)を4モレキュラーシーブを用いて1時間攪拌した。新たに蒸留したPOCl<sub>3</sub>(24μl, 0.26ミリモル)を加え、溶液を4で2時間攪拌した。混合物をゆっくり室温まで加温し、そしてビス(トリ-n-ブチルアンモニウム)ピロリン酸(1.7ml, 0.85ミリモル)及び無水トリ-n-ブチルアミン(0.4ml, 1.7ミリモル)を加えた。3分後、0.1M TEAB(重炭酸トリエチルアンモニウム)バッファー(15ml)でクエンチし、そして3時間攪拌した。減圧下、水を除去し、そして得られた残渣を濃アンモニア(0.88, 15ml)に溶解し、そして室温で16時間攪拌した。次いで反応混合物を蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そして溶液をDEAE-セファデックスA-25カラムに適用した。TEABの直線グラジエントを用いてMPLCを行った。0.7Mと0.8Mバッファーの間で三リン酸塩が溶出した。生成物を含む画分を合わせて蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そしてHPLCで更に精製した。HPLC: t<sub>r</sub>(5): 18.8分(Zorbax C18調製用カラム、グラジエント: 30分で5%~35%B、バッファーA 0.1M TEAB、バッファーB MeCN)。生成物を白色泡状物として単離した(760.D. 7.6マイクロモル、3.8%、<sub>280</sub> = 10000)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 1.79 (s, C H<sub>2</sub>), 2.23-2.30; 2.44-2.50 (2 x m, 2H, H-2'), 3.85 (m, CH<sub>2</sub>NH), 4.10-4.18 (m, 2H, H-5'), 4.27 (br s, H-4'), 4.48-4.50 (m, H-3'), 4.70-4.77 (m, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 6.21 (t, J = 6.6 Hz, H-1'), 8.32 (s, 1H, H-6). <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O) -6.6 (m, 1P, P), -10.3 (d, J = 18.4 Hz, 1P, P), -21.1 (m, 1P, P). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub>に関して計算値576.02, 測定値575.

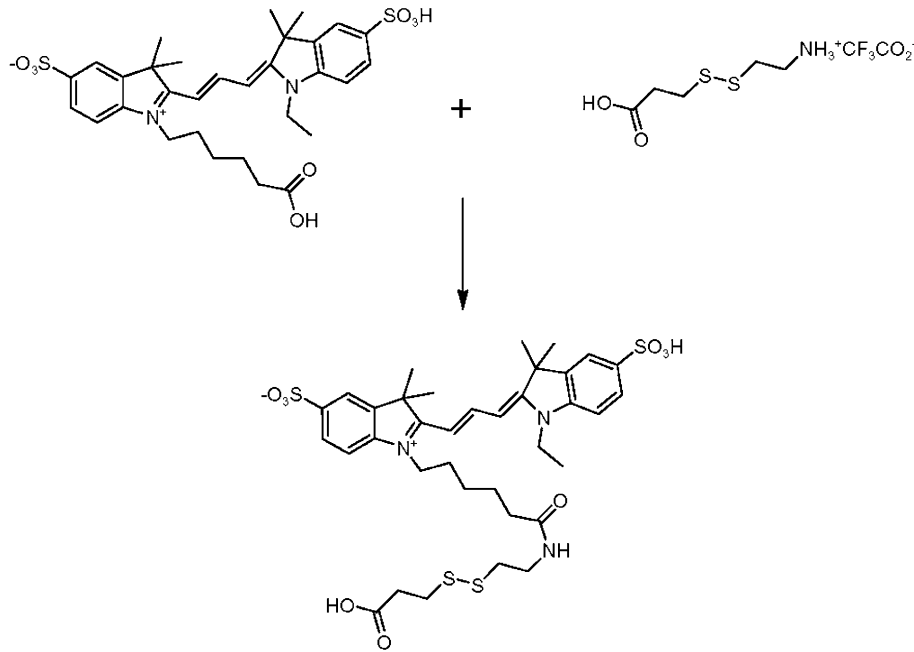
20

30

40

## 【0134】

## 【化 1 1】



10

## Cy - 3ジスルフィドリンカー

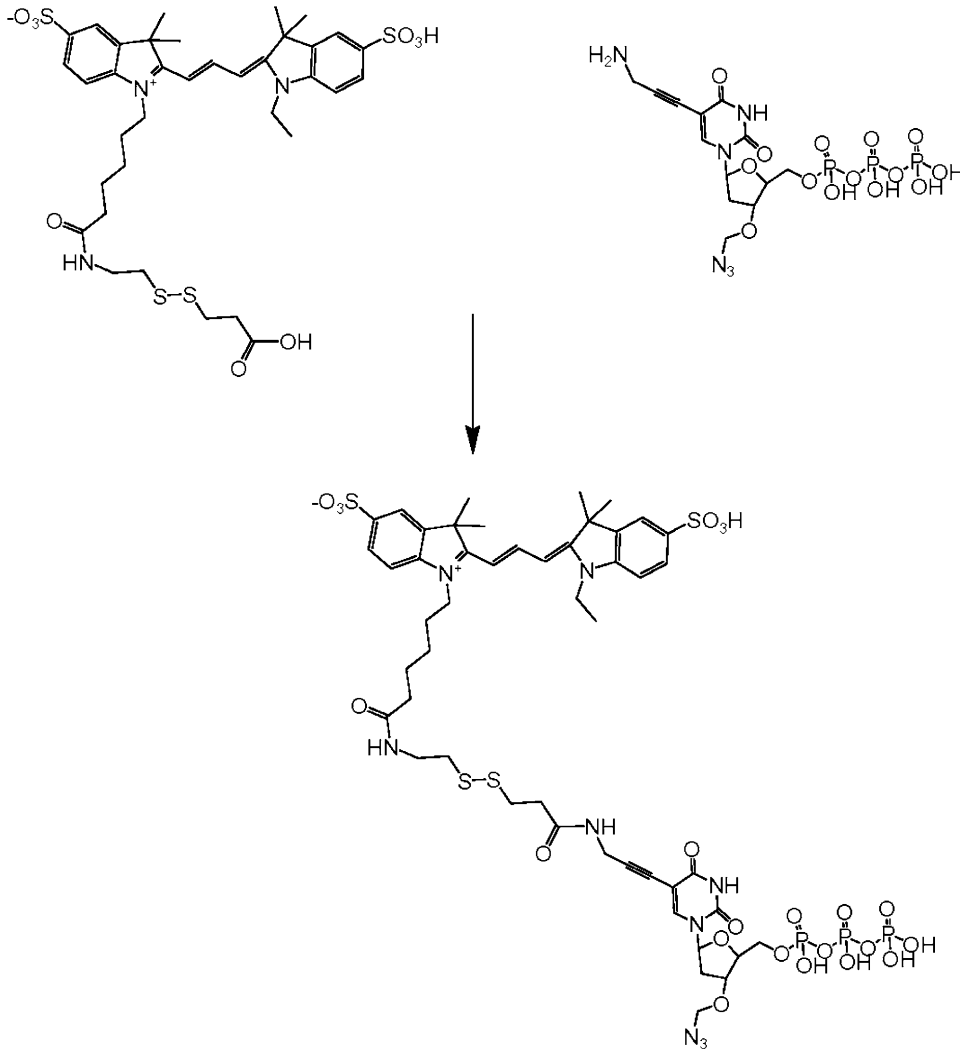
20

DMF (300  $\mu$ l) に出発ジスルフィド (4.0 mg, 13.1  $\mu$ mol) を溶解し、そしてジイソプロピルエチルアミン (4  $\mu$ l) をゆっくりと加えた。混合物を室温で攪拌し、そしてDMF (300  $\mu$ l) 中Cy - 3色素 (5 mg, 6.53  $\mu$ mol) を10分間かけて加えた。3.5時間後、反応完了時に、減圧下、揮発物質を蒸発させ、そして粗製残渣をZorbax分析カラムSB - C18で、流速1ml/分の0.1 M重炭酸トリエチルアンモニウムバッファー (バッファーA) 及びCH<sub>3</sub>CN (バッファーB) を用いて、以下のグラジエントを用いてHPLC精製した: 5分 2% B; 31分 55% B; 33分 95% B; 37分 95%; 39分 2% B; 44分 2% B。予測されるCy - 3ジスルフィドリンカーを吸湿性の固体として $t_r$ : 21.8分で収率70% (UV測定に基づく; H<sub>2</sub>O中 550 150, 000 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>) で溶出した。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 1.31-1.20 (m + t, J = 7.2 Hz, 5H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>), 1.56-1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.67 (s, 12H, 4 CH<sub>3</sub>), 1.79-1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.11 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.37 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.60 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.67 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.27 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.10-4.00 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 6.29 (dd, J = 13.1, 8.1 Hz, 2H, 2 = CH), 7.29 (dd, 2H, J = 8.4, 6.1 Hz, 2 = CH), 7.75-7.71 (m, 2H, 2 = CH), 7.78 (s, 2H, = CH), 8.42 (t, J = 12.8 Hz, 1H, = CH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>36</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>4</sub> に関して計算値793.22, 測定値792 (M - H), 396 [M/2].

30

## 【0135】

## 【化 1 2】



10

20

(6)

30

Cy-3ジスルフィドリンカー (2.5マイクロモル)、炭酸ジサクシンイミジル (0.96 mg, 3.75マイクロモル) 及びDMAP (0.46 mg, 3.75マイクロモル) を乾燥DMF (0.5 ml) に溶解し、室温で10分間攪拌した。TLC (MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 : 7) により全ての色素リンカーが消費されるまで反応をモニターした。次いでDMF (0.2 ml) 中 (5) (7.5マイクロモル) 及びn-Bu<sub>3</sub>N (30 μl, 125マイクロモル) の溶液を反応混合物に加え、そして室温で1時間攪拌した。TLC (MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4 : 6) により、活性化されたエステルの完全な消費が示され、そして暗赤色のスポットがベースラインに現れた。反応をTEABバッファ (0.1 M, 10 ml) でクエンチし、そしてDEAEセファデックスカラム (2 x 5 cm) に負荷した。カラムを最初に0.1 M TEABバッファ (100 ml) で溶出して有機残渣を洗い流し、そして次に1 M TEABバッファ (100 ml) で溶出した。望ましい三リン酸アナログ (6) を1 M TEABバッファで溶出した。生成物を含む画分を合わせ、蒸発させ、そしてHPLCにより精製した。HPLC条件: t<sub>r</sub> (6) : 16.1分 (Zorbax C18 調製用カラム、グラジエント: 30分で2% ~ 55% B, バッファ-A 0.1 M TEAB, バッファ-B MeCN)。生成物を暗赤色固体として単離した (1.35マイクロモル, 54%,  $\eta_{inh} = 1.50000$ )。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 1.17-1.28 (m, 6H 3 x CH<sub>2</sub>), 1.41-1.48 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.64 (s, 12H, 4 x CH<sub>3</sub>), 1.68-1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.07-2.10 (m, 3H, H-2', CH<sub>2</sub>), 2.

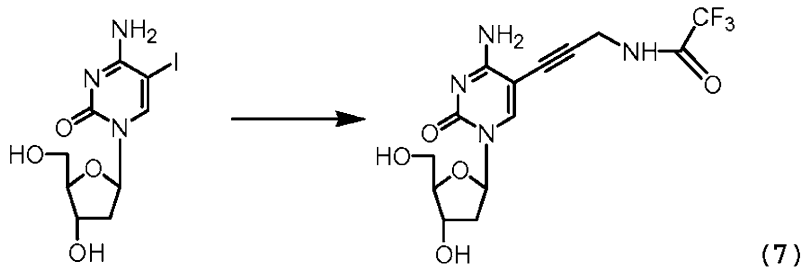
40

50

31-2.35 (m, 1H, H-2'), 2.50-2.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.65 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.76 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.26-3.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.88-3.91 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.94-4.06 (m, 3H, CH<sub>2</sub>N, H-5'), 4.16 (br s, 1H, H-4'), 4.42-4.43 (m, 1H, H-3'), 4.72-4.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 6.24 (dd, J = 5.8, 8.2 Hz, H-1'), 6.25 (dd, J = 3.5, 8.5 Hz, 2H, H<sub>A,r</sub>), 7.24, 7.25 (2d, J = 14.8 Hz, 2 x = CH), 7.69-7.86 (m, 4H, H<sub>A,r</sub>, H-6), 8.42 (t, J = 13.4 Hz, = CH). <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O) -4.85 (m, 1P, P), -9.86 (m, 1P, P), -20.40 (m, 1P, P). Mass ( - v e エレクトロスプレー ) C<sub>49</sub>H<sub>64</sub>N<sub>9</sub>O<sub>22</sub>P<sub>3</sub>S<sub>4</sub> に関して計算値 1351.23, 測定値 1372 (M - 2H + Na), 1270 [M - 80], 1190 [M - 160].

【0136】

【化13】



10

20

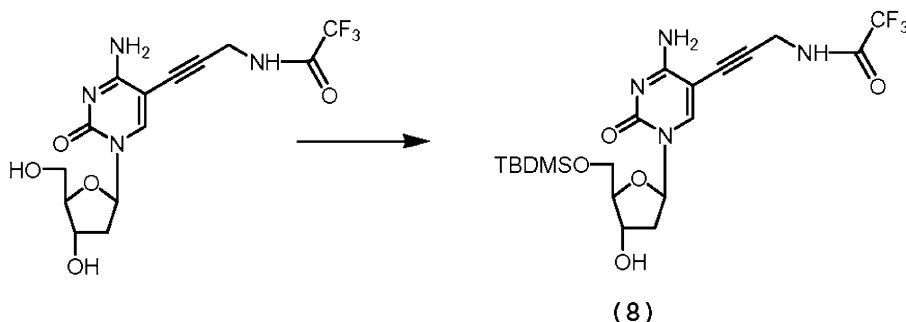
5 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2 ' - デオキシシチジン ( 7 )

遮光丸底フラスコでアルゴン雰囲気下、DMF ( 200 ml ) 中 5 - ヨード - 2 ' - デオキシシチジン ( 10 g , 28.32 ミリモル ) の溶液に CuI ( 1.08 g , 5.67 ミリモル )、トリエチルアミン ( 7.80 ml , 55.60 ミリモル )、2,2,2-トリフルオロ - N - プロパ - 2 - イニル - アセトアミド ( 12.8 g , 84.76 ミリモル ) 及び最後に Pd ( PPh<sub>3</sub> )<sub>4</sub> ( 3.27 g , 2.83 ミリモル ) を加えた。室温で 18 時間の後、重炭酸 d o w e x ( 20 mg ) を加え、そして混合物を更に 1 時間攪拌した。濾過し、そして減圧下、揮発性物質を蒸発させて残渣を得て、これをシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した ( CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc 1 : 1 , EtOAc : MeOH 9 : 1 )。予測される生成物 ( 7 ) が定量的な収率でベージュ色固体として得られた。<sup>1</sup>H NMR ( D<sub>2</sub>O ) 2.24-2.17 ( m , 1H , H-2' ) , 2.41-2.37 ( m , 1H , H-2' ) , 3.68 ( dd , J = 12.5 , 5.0 Hz , 1H , H-5' ) , 3.77 ( dd , J = 12.5 , 3.2 Hz , 1H , H-5' ) , 3.99 ( m , 1H , H-4' ) , 4.27 ( s , 2H , CH<sub>2</sub>N ) , 4.34 ( m , 1H , H-3' ) , 6.11 ( t , J = 6.3 Hz , 1H , H-1' ) , 8.1 ( br s , 1H , NH ) ; MS ( ES ) : m/z ( % ) ( M-H ) 375 ( 100 ) .

30

【0137】

【化14】



40

5 ' - O - ( t - ブチルジメチルシリル ) - 5 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2 ' - デオキシシチジン ( 8 )

DMF ( 3.0 ml ) 中 ( 7 ) 出発原料 ( 1.0 g , 2.66 ミリモル ) 及びイミダゾ

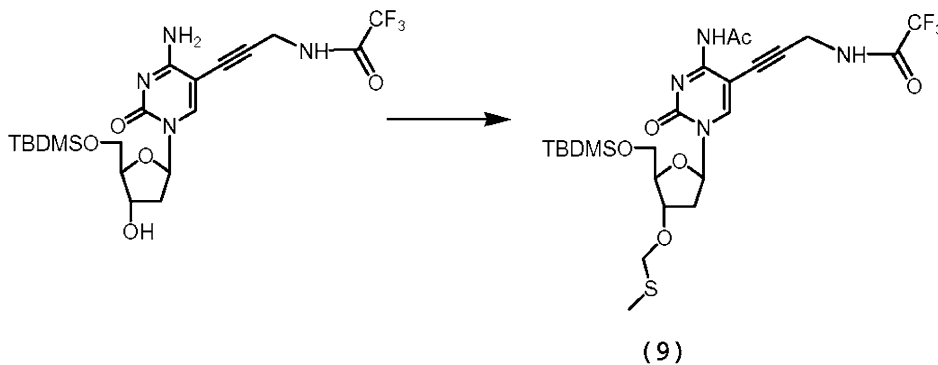
50

ール (200 mg, 2.93ミリモル) の溶液に 0 でゆっくりと 1 時間にわたり T B D M S C l (442 mg, 2.93ミリモル) を 4 回に分けて加えた。2 時間後、減圧下、揮発物質を蒸発させ、そして残渣をシリカゲルに吸収させ、そしてフラッシュクロマトグラフィにより精製した (E t O A c, E t O A c : M e O H 9.5 : 0.5)。予測される生成物 (8) を結晶性固体として単離した (826 mg, 64%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 0.00 (s, 1H, CH<sub>3</sub>); 0.01 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (s, 9H, tBu), 1.87-1.80 (m, 1H, H-2'), 2.12 (ddd, J = 13.0, 5.8 and 3.0 Hz, 1H, H-2'), 3.65 (dd, J = 11.5, 2.9 Hz, 1H, H-5'), 3.74 (dd, J = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H-5'), 3.81-3.80 (m, 1H, H-4'), 4.10-4.09 (m, 1H, H-3'), 4.17 (d, 2H, J = 5.1 Hz, NCH<sub>2</sub>), 5.19 (d, 1H, J = 4.0 Hz, 3'-OH), 6.04 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 6.83 (br s, 1H, NHH), 7.78 (br s, 1H, NH H), 7.90 (s, 1H, H-6), 9.86 (t, J = 5.1 Hz, 1H, -H<sub>2</sub>CNH); MS (ES) : m/z (%) (MH)<sup>+</sup> 491 (40%) .

10

【 0 1 3 8 】

【 化 1 5 】



20

4 - N - アセチル - 5' - O - ( t - ブチルジメチルシリル ) - 3' - O - ( メチルチオメチル ) - 5 - [ 3 - ( 2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2' - デオキシシチジン (9)

DMSO (6.3 ml) 中、及び N<sub>2</sub> 雰囲気下、出発原料 (8) (825 mg, 1.68ミリモル) の溶液に酢酸 (AcOH) (1.3 ml, 23.60ミリモル) 続いて無水酢酸 (Ac<sub>2</sub>O) (4.8 ml, 50.50ミリモル) をゆっくりと加えた。溶液を室温で 18 時間攪拌し、そして 0 で飽和 NaHCO<sub>3</sub> (20 ml) を添加することによりクエンチした。生成物を EtOAc に抽出し (3 x 30 ml)、有機抽出物を合わせ、乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) し、濾過し、そして揮発物質を蒸発させた。粗製残渣をシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィにより精製し (EtOAc : 石油エーテル 1 : 1)、無色油状物 (9) として予測される生成物が得られた (573 mg, 62%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO)

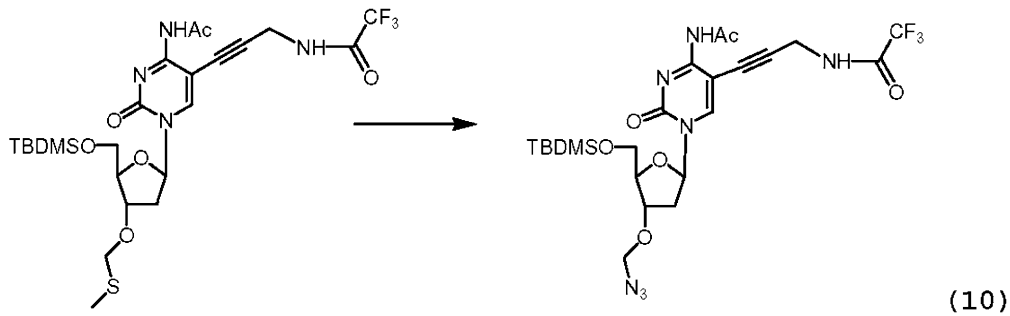
30

0.00 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, tBu), 2.01 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.19-1.97 (m, 2H, 2 x H<sub>2</sub>'), 2.25 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 3.67 (dd, 1H, J = 11.5 Hz, H-5'), 3.78 (dd, 1H, J = 11.5, 3.3 Hz, H-5'), 4.06-4.05 (m, 1H, H-4'), 4.17 (d, 2H, J = 5.1 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 4.30-4.28 (m, 1H, H-3'), 4.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-S), 5.94 (t, 1H, J = 6.5 Hz, H-1'), 8.17 (s, 1H, H-6), 9.32 (s, 1H, NHCO), 9.91 (t, 1H, J = 5.4 Hz, NHCH<sub>2</sub>); MS (ES) : m/z (%) (MH)<sup>+</sup> 593.

40

【 0 1 3 9 】

## 【化 1 6】



10

4 - N - アセチル - 3' - O - (アジドメチル) - 5' - O - (t - ブチルジメチルシリル) - 5 - [3 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド) - プロパ - 1 - イニル] - 2' - デオキシシチジン (10)

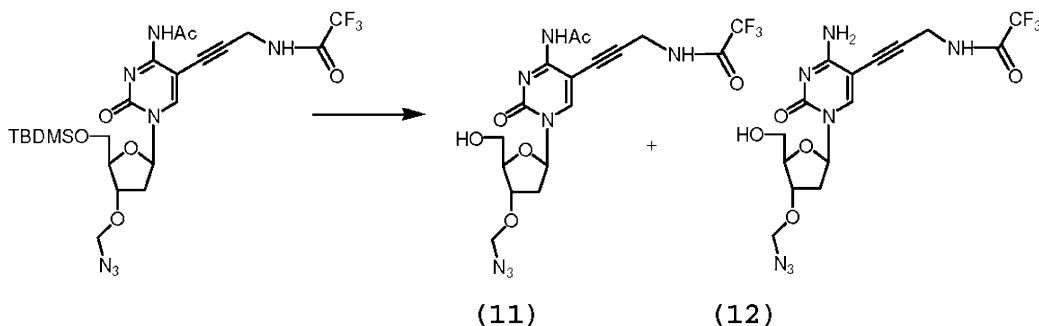
$N_2$  雰囲気下、0 まで冷却した、ジクロロメタン (DCM) (8 ml) 中出発原料 (9) (470 mg, 0.85 ミリモル) の溶液にシクロヘキセン (430  $\mu$ l, 4.27 ミリモル) 続いて  $SO_2Cl_2$  (DCM 中 1 M, 1.0 ml, 1.02 ミリモル) を加えた。溶液を 0 で 30 分間攪拌し、そして揮発性物質を蒸発させた。残渣を DMF (8 ml) に即座に溶解し、 $N_2$  下で攪拌し、そしてアジ化ナトリウム (275 mg, 4.27 ミリモル) をゆっくりと加えた。18 時間後、粗製生成物を蒸発乾固し、EtOAc (30 ml) に溶解し、そして  $Na_2CO_3$  (3  $\times$  5 ml) で洗浄した。合わせた有機層を別に維持した。生成物の水層からの第 2 の抽出を DCM (3  $\times$  10 ml) で行った。全ての合わせた有機層を乾燥 ( $MgSO_4$ ) し、濾過し、そして減圧下、揮発性物質を蒸発させて予測される生成物 (10) と同定される油状物が得られた (471 mg, 収率 94%)。これを更に精製することなく使用した。 $^1H$  NMR ( $d_6$  DMSO) 0.11 (s, 3H,  $CH_3$ ), 0.11 (s, 3H,  $CH_3$ ), 0.88 (s, 9H,  $^tBu$ ), 2.16-2.25 (m, 1H, H-2'), 2.35 (s, 3H,  $COCH_3$ ), 2.47-2.58 (m, 1H, H-2'), 3.79 (dd,  $J = 11.6, 3.2$  Hz, 1H, H-5'), 3.90 (dd,  $J = 11.6, 3.0$  Hz, 1H, H-5'), 4.17-4.19 (m, 1H, H-4'), 4.28 (s, 2H,  $NCH_2$ ), 4.32-4.35 (m, 1H, H-3'), 4.89 (dd,  $J = 14.4, 6.0$  Hz, 2H,  $CH_2-N_3$ ), 6.05 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H, H-1'), 8.25 (s, 1H, H-6), 9.46 (br s, 1H, NHH), 10.01 (br s, 1H, NHH)。

20

30

## 【 0 1 4 0】

## 【化 1 7】



40

4 - N - アセチル - 3' - O - (アジドメチル) - 5 - [3 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド) - プロパ - 1 - イニル] - 2' - デオキシシチジン及び 3' - O - (アジドメチル) - 5 - [3 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド) - プロパ - 1 - イニル] - 2' - デオキシシチジン (11)

0、 $N_2$  雰囲気下、THF (20 ml) 中出発原料 (11) (440 mg, 0.75 ミリモル) の溶液に THF 中 1.0 M TBAF (0.82 ml, 0.82 ミリモル) を加えた。1.5 時間後、減圧下、揮発性物質を蒸発させ、そして残渣をシリカゲルのフラ

50

ツシクロマトグラフィーにより精製した (EtOAc : 石油エーテル 8 : 2 から EtOAc 100% から EtOAc : MeOH 8 : 2)。2つの化合物を単離し、そして前記のように同定した。最初に 4 - N - アセチル (11) (53 mg, 15%) を溶出し、そして 2 番目に 4 - NH<sub>2</sub> (12) (271 mg, 84%) を溶出した。

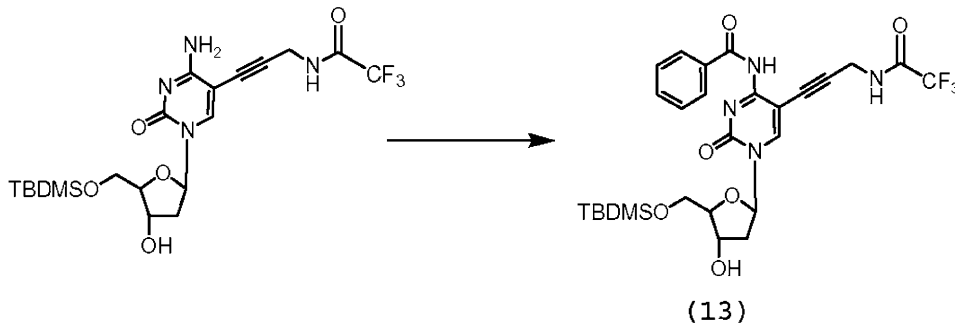
4 - N - アセチル化合物 (11) : <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2.14-2.20 (m, 2H, HH-2'), 3.48-3.55 (m, 1H, H-5'), 3.57-3.63 (m, 1H, H-5'), 3.96-4.00 (m, 1H, H-4'), 4.19 (d, J = 5.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.23-4.28 (m, 1H, H-3'), 4.77 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 5.2 (t, 1H, J = 5.1 Hz, 5' -OH), 5.95 (t, J = 6.2 Hz, 1H, H-1'), 8.43 (s, 1H, H-6), 9.34 (s, 1H, CONH), 9.95 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>) .

4 - NH<sub>2</sub> 化合物 (12) : <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 1.98-2.07 (2H, CHH-2'), 3.50-3.63 (m, 2H, CHH-5'), 3.96-4.00 (m, 1H, H-4'), 4.09 (d, J = 5.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.24-4.28 (m, 1H, H-3'), 4.76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 5.13 (t, J = 5.3 Hz, 1H, 5' -OH), 5.91 (br s, 1H, NHH), 6.11 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 8.20 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NCH<sub>2</sub>), 8.45 (s, 1H, H-6), 11.04 (br s, 1H, NHH) .

10

【0141】

【化18】



20

4 - N - ベンゾイル - 5' - O - (t - ブチルジメチルシリル) - 5 - [3 - (2, 2, 2 - トリフルオロアセトアミド) - プロパ - 1 - イニル] - 2' - デオキシシチジン (13)

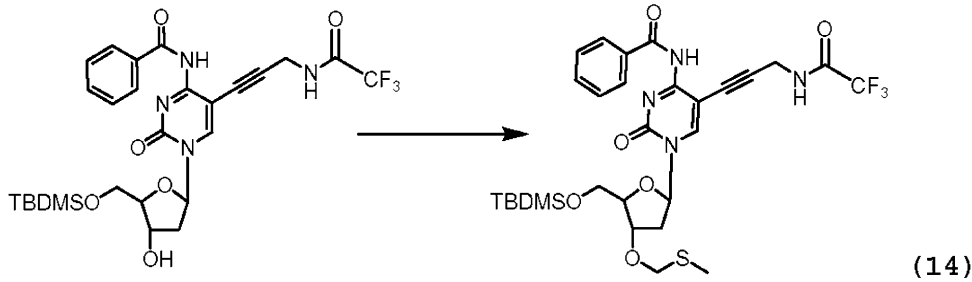
出発原料 (8) (10 g, 20.43 ミリモル) を乾燥ピリジン (2 × 100 ml) 中で共沸し、次いで N<sub>2</sub> 雰囲気下、乾燥ピリジン (160 ml) に溶解した。クロロトリメチルシラン (10 ml, 79.07 ミリモル) を溶液に滴下し、そして室温で 2 時間攪拌した。次いで塩化ベンゾイル (2.6 ml, 22.40 ミリモル) を溶液に加え、そして更に 1 時間攪拌した。反応混合物を 0 まで冷却し、蒸留水 (50 ml) を溶液にゆっくりと加え、そして 30 分間攪拌した。高真空下、ピリジン及び水を混合物から蒸発させて、褐色のゲルを生じ、これを飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 100 ml と DCM 溶液 (100 ml) 間で分配した。有機層を分離し、そして水層を更に DCM (2 × 100 ml) で抽出した。有機層を合わせ、乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) し、濾過し、そして減圧下、揮発性物質を蒸発させた。得られた褐色の油状物をシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーにより精製し (DCM : MeOH 99 : 1 ~ 95 : 5)、淡黄色の結晶性固体を生じた (13) (8.92 g, 74%)。 <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) : 0.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, tBu), 1.94 (m, 1H, H-2'), 2.27 (m, 1H, H-2'), 3.64 (d, 1H, J = 11.6 Hz, H-5'), 3.75 (d, 1H, J = 11.6 Hz, H-5'), 3.91 (m, 1H, H-4'), 4.09 (br m, 3H, CH<sub>2</sub>NH, H-3'), 5.24 (s, 1H, 3' -OH), 6.00 (m, 1H, H-1'), 7.39 (m, 2H, Ph), 7.52 (m, 2H, Ph), 7.86 (m, 1H, Ph), 8.0 (s, 1H, H-6), 9.79 (t, 1H, J = 5.4 Hz, NHCH<sub>2</sub>), 12.67 (br s, 1H, NH) . Mass (+ve エレクトロスプレー) C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si に関して計算値 594.67, 測定値 595 .

30

40

【0142】

【化19】



10

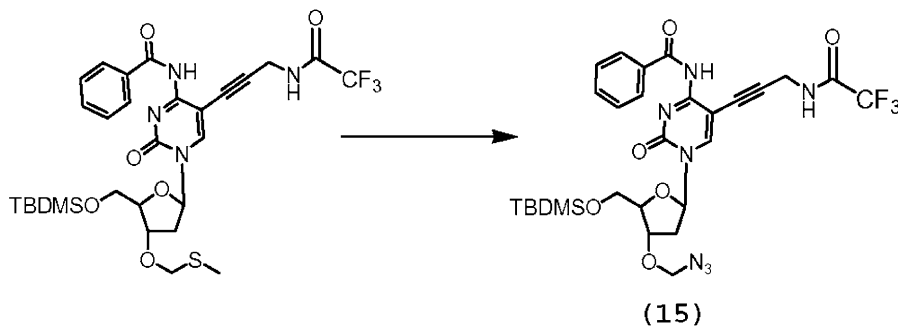
4 - N - ベンゾイル - 5' - O - ( t - ブチルジメチルシリル ) - 3' - O - メチルチオメチル - 5 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2' - デオキシシチジン ( 14 )

N<sub>2</sub> 雰囲気下、出発原料 ( 13 ) ( 2 . 85 g , 4 . 79 ミリモル ) を乾燥 DMSO ( 40 ml ) に溶解した。酢酸 ( 2 . 7 ml , 47 . 9 ミリモル ) 及び無水酢酸 ( 14 . 4 ml , 143 . 7 ミリモル ) を順にゆっくりと出発原料に加え、次いでこれを室温で 18 時間攪拌した。飽和 NaHCO<sub>3</sub> ( 150 ml ) 溶液を反応混合物に注意深く加えた。水層を EtOAc ( 3 × 150 ml ) で抽出した。有機層を合わせ、乾燥 ( MgSO<sub>4</sub> ) し、濾過し、そして蒸発させて橙色の液体を得て、これを続いて原料が固化するまでトルエン ( 4 × 150 ml ) と共沸した。粗製残渣をシリカゲルで精製し ( 石油エーテル : EtOAc 3 : 1 ~ 2 : 1 )、黄色の結晶性固体 ( 14 ) ( 1 . 58 g , 50 % ) を生じた。<sup>1</sup>H NMR ( d<sub>6</sub> DMSO ) : 0.00 ( s , 6H , CH<sub>3</sub> ) , 0.78 ( s , 9H , tBu ) , 1.99 ( s , 3H , CH<sub>3</sub> ) , 2.09 ( m , 1H , H-2' ) , 2.28 ( m , 1H , H-2' ) , 3.66 ( d , 1H , J = 11.5, 2.9 Hz , H-5' ) , 3.74 ( dd , 1H , J = 11.3 , 2.9 Hz , H-5' ) , 3.99 ( m , 1H , H-4' ) , 4.09 ( m , 1H , CH<sub>2</sub>NH ) , 4.29 ( m , 1H , H-3' ) , 4.61 ( s , 2H , CH<sub>2</sub>S ) , 6.00 ( m , 1H , H-1' ) , 7.37 ( m , 2H , Ph ) , 7.50 ( m , 2H , Ph ) , 7.80 ( d , 1H , J = 7.55 Hz , H<sub>A,r</sub> ) , 7.97 ( s , 1H , H-6 ) , 9.79 ( br t , 1H , NHCH<sub>2</sub> ) , 12.64 ( br s , 1H , NH ) . Mass ( - ve エレクトロスプレー ) C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>SSi に関して計算値 654 . 79 , 測定値 653 . 2 .

20

【0143】

【化20】



30

4 - N - ベンゾイル - 5' - O - ( t - ブチルジメチルシリル ) - 3' - O - アジドメチル - 5 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2' - デオキシシチジン ( 15 )

出発原料 ( 14 ) 1 . 65 g , 2 . 99 ミリモル ) を DCM ( 18 ml ) に溶解し、そして 0 °C まで冷却した。シクロヘキセン ( 1 . 5 ml , 14 . 95 ミリモル ) 及び SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 0 . 72 ml , 8 . 97 ミリモル ) を加え、そして氷浴中 1 時間攪拌した。TLC が、出発原料が依然存在することを示したときは、SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( 0 . 24 ml ) の更なるアリコートを加え、そして混合物を 0 °C で 1 時間攪拌した。蒸発させて揮発物質を除去し、淡褐色固体を生じ、これを N<sub>2</sub> 下、乾燥 DMF ( 18 ml ) 18 ml に再溶解した。次いでアジ化ナトリウム ( 0 . 97 g , 14 . 95 ミリモル ) を溶液に加え、そして室

40

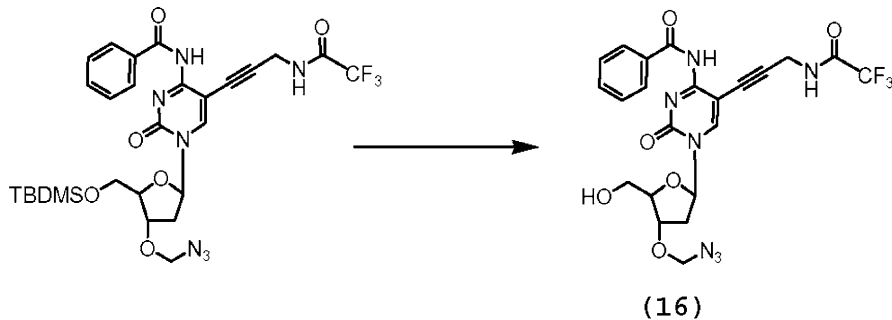
50

温で2.5時間攪拌した。反応混合物をシリカのパッドに通し、そしてEtOAcで溶出し、そして高真空蒸発により揮発性物質を除去した。得られた褐色のゲルをフラッシュクロマトグラフィーにより精製し(石油エーテル:EtOAc 4:1~2:1)、白色の結晶性固体として所望の生成物を生じた(15)(0.9g, 55%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) : 0.00 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, tBu), 2.16 (m, 1H, H-2'), 2.22 (m, 1H, H-2'), 3.70 (d, 1H, J = 11.5 Hz, H-5'), 3.75 (d, 1H, J = 11.3 Hz, H-5'), 4.01 (m, 1H, H-4'), 4.10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 4.23 (m, 1H, H-3'), 4.76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S), 5.99 (m, 1H, H-1'), 7.37 (m, 2H, Ph), 7.50 (m, 2H, Ph), 7.81 (d, 1H, J = 7.4 Hz, Ph), 7.95 (s, 1H, H-6), 9.78 (br s, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 12.64 (br s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Si に関して計算値 649.71, 測定値 648.2

10

【0144】

【化21】



20

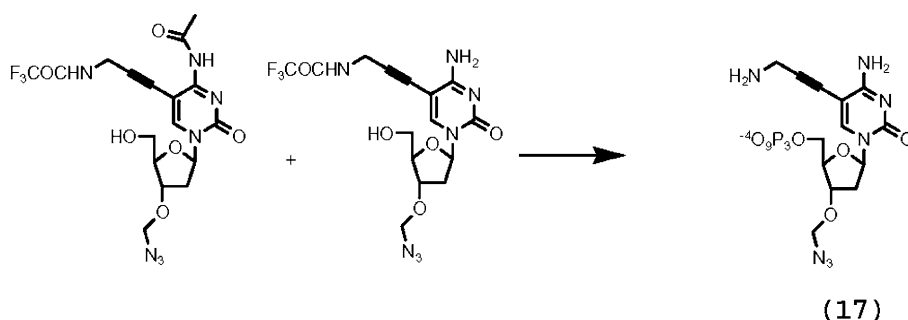
4-N-ベンゾイル-3'-O-アジドメチル-5-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシシチジン(16)

出発原料(15)(140mg, 0.22ミリモル)をTHF(7.5ml)に溶解した。TBAF(THF中1M溶液, 0.25ml)をゆっくりと加え、そして室温で2時間攪拌した。減圧下、揮発性材料を除去し、そして褐色のゲルを生じ、これをフラッシュクロマトグラフィーにより精製し(EtOAc:DCM 7:3)、薄く着色した結晶性固体として所望の生成物(16)を生じた(0.9g, 76%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) : 2.16 (m, 1H, H-2'), 2.22 (m, 1H, H-2'), 3.70 (d, 1H, J = 11.5Hz, H-5'), 3.75 (d, 1H, J = 11.3 Hz, H-5'), 4.01 (m, 1H, H-4'), 4.10 (m, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 4.23 (m, 1H, H-3'), 4.76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S), 5.32 (s, 1H, 5' OH), 5.99 (m, 1H, H-1'), 7.37 (m, 2H, Ph), 7.50 (m, 2H, Ph), 7.81 (d, 1H, J = 7.35 Hz, Ph), 7.95 (s, 1H, H-6), 9.78 (br s, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 12.64 (br s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> に関して計算値 535.44, 測定値 534.

30

【0145】

【化22】



40

5-(3-アミノ-プロパ-1-イニル)-3'-O-アジドメチル-2'-デオキシシチジン 5'-O-ヌクレオシド三リン酸(17)

50

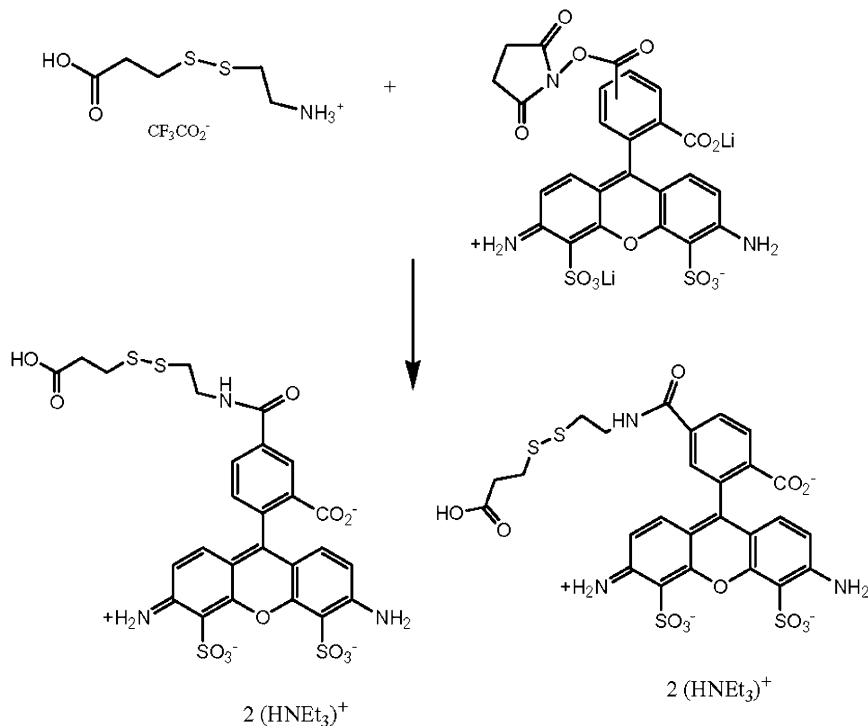
$\text{PO}(\text{OMe})_3$  (600  $\mu\text{l}$ ) 中 (11) 及び (12) (290 mg, 0.67 ミリモル) 並びにプロトンスポンジ (175 mg, 0.82 ミリモル) (双方共に予め  $\text{P}_2\text{O}_5$  下、少なくとも24時間乾燥した) の溶液に0 でアルゴン雰囲気下、 $\text{POCl}_3$  (新たに蒸留した) (82  $\mu\text{l}$ , 0.88 ミリモル) をゆっくりと加えた。溶液を0 で3時間、激しく攪拌し、そして次にDMF中三リン酸テトラ・トリブチルアンモニウム (0.5 M) (5.2 ml, 2.60 ミリモル)、続いて  $n\text{Bu}_3\text{N}$  (1.23 ml, 5.20 ミリモル) 及び0.1 M 重炭酸トリエチルアンモニウム (TEAB) (20 ml) の添加によりクエンチした。室温で1時間の後、アンモニア水溶液 (0.88, 20 ml) を混合物に加えた。溶液を室温で15分間攪拌し、減圧下、揮発性物質を蒸発させ、そして残渣をMPLCにより、0.05 M から0.7 M TEABのグラジエントで精製した。予測される三リン酸塩をおよそ0.60 M TEABでカラムから溶出した。Zorbax SB-C18カラム (内径21.2 mm x 25 cm) のHPLCで2回目の精製を行い、以下のグラジエント: 0~5分 5% B, 0.2 ml; 5~25分 80% B, 0.8 ml; 25~27分 95% B, 0.8 ml; 27~30分 95% B, 0.8 ml; 30~32分 5% B, 0.8 ml; 32~35分 95% B, 0.2 ml、を用いて0.1 M TEAB (ポンプA) 及び0.1 M TEAB中30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (ポンプB) で溶出し  $t_r$  (17): 20.8 (14.5 マイクロモル, 収率 2.5%) の前記の生成物が得られた;  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 162MHz) -5.59 (d,  $J = 20.1$  Hz,  $\text{P}_c$ ), -10.25 (d,  $J = 19.3$  Hz, 1P, P), -20.96 (t,  $J = 19.5$  Hz, 1P, P);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 2.47-2.54 (m, 1H, H-2'), 2.20-2.27 (m, 1H, H-2'), 3.88 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.04-4.12 (m, 1H, HH-5'), 4.16-4.22 (m, 1H, HH-5'), 4.24-4.30 (m, 1H, H-4'), 4.44-4.48 (m, 1H, H-3'), 6.13 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H, H-1'), 8.35 (s, 1H, H-6); MS (ES) :m/z (%) (M-H) 574(73%), 494 (100%) .

10

20

【0146】

【化23】



30

40

Alexa 488 ジスルフィドリンカー

市販されている Alexa Fluor 488 - NHS (35 mg, 54 マイクロモル) を DMF (700  $\mu\text{l}$ ) に溶解し、そして完全な活性化を確実にし、4 - DMAP (7 mg, 59 マイクロモル) 及び炭酸 N, N' - ジサクシンイミジル (15 mg, 59 マ

50

イクロモル)を順に加えた。15分後、完全に活性化したときに、ジイソプロピルエチルアミン(4 $\mu$ l)含有DMF(300 $\mu$ l)中、出発ジスルフィド(32.0mg, 108マイクロモル)を活性化した色素溶液上加えた。最終混合物にジイソプロピルエチルアミン(20 $\mu$ l)を更に添加し、5分間超音波処理し、そして暗中室温で18時間反応させた。減圧下、揮発性物質を蒸発させ、そして粗製残渣を短いイオン交換樹脂セファデックス-DEAE A-25(40-120 $\mu$ )カラムを通すことにより最初に精製し、最初に0.1M TEAB(25ml)、次に1.0M TEAB(75ml)で溶出した。2つの最終化合物を含有する最終混合物を濃縮し、そして残渣をZorbax SB-C18カラム(内径21.2mm $\times$ 25cm)で、0.1M TEAB(ポンプA)及びCH<sub>3</sub>CN(ポンプB)で以下のグラジエント: 0~2分 2%B, .2ml; 2~4分 2%B, .8ml; 4~15分 23%B, .8ml; 15~24分 23%B, .8ml; 24~26分 95%B, .8ml; 26~28分 95%B, .8ml、28~30分 2%B, .8ml, 30~33分 2%B, .2mlを用いて溶出してHPLC精製し、 $t_r$ : 19.0(左の位置異性体)及び $t_r$ : 19.5(右の位置異性体)の前記で詳記した双方の化合物が得られた。双方の位置異性体の各々をdowexイオン交換樹脂カラムに通し、各々16.2マイクロモル及び10.0マイクロモル、全収率62%が得られた(純度76%の市販されているAlexa Fluor 488-NHSに基づく)。; H<sub>2</sub>O中  $\epsilon_{493} = 71,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) (左の位置異性体) 2.51 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.66 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.71 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.43 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.64 (d, J = 9.2 Hz, 2H, H<sub>A,r</sub>), 6.77 (d, J = 9.2 Hz, 2H, H<sub>A,r</sub>), 7.46 (s, 1H, H<sub>A,r</sub>), 7.90 (dd, J = 8.1 and 1.5 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 8.20 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) (右の位置異性体) 2.67 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.82 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.93 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.68 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.72 (d, J = 9.3 Hz, 2H, H<sub>A,r</sub>), 6.90 (d, J = 9.3 Hz, 2H, H<sub>A,r</sub>), 7.32 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 8.03 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 8.50 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>)。Mass (-veエレクトロスプレー) C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub> 697.02, 測定値692 (M-H), 347 [M/2]。

10

20

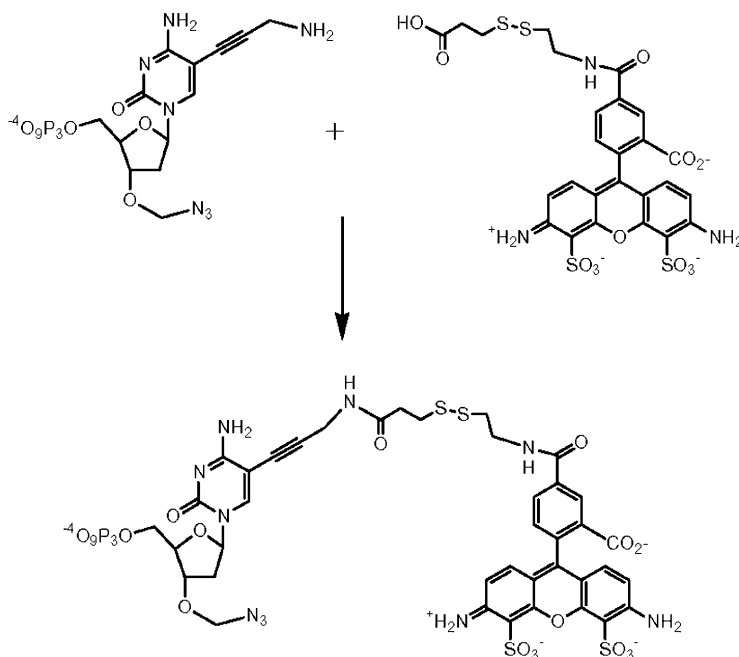
30

40

50

【0147】

【化24】

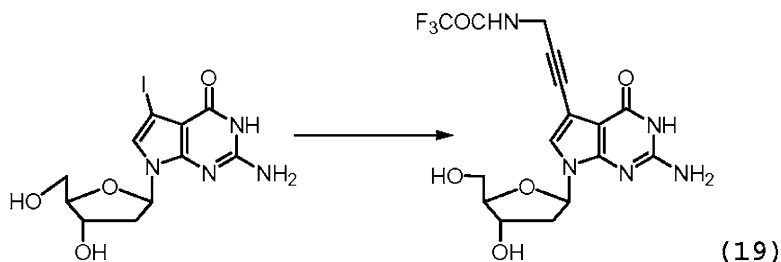


(18)

DMF (200  $\mu$ l) 中 Alexa Fluor 488 ジスルフィドリンカー (3.4 マイクロモル, 2.37 mg) の溶液に 4-DMAP (0.75 mg, 5.1 マイクロモル) 及び炭酸 N, N'-ジサクシンイミジル (1.70 mg, 5.1 マイクロモル) を加えた。酸が完全に活性化するまで混合物を 15 分攪拌し、次いでこれを 0 で nBu<sub>3</sub>N (40  $\mu$ l) 含有 DMF (0.3 ml) 中ヌクレオチド (17) (3.45 mg, 6.0 マイクロモル) の溶液に加えた。混合物を 3 分間超音波処理し、次いで遮光して連続的に 16 時間攪拌した。減圧下、揮発性物質を蒸発させ、そして残渣を最初に短いイオン交換樹脂セファデックス-DEAE A-25 カラムを通す濾過により、最初に 0.1 M TEAB (50 ml) で溶出して精製して未反応の色素-リンカーを除去し、次いで 1.0 M TEAB (100 ml) で溶出して予測される生成物 (18) を回収した。濃縮後、残渣を Zorbax SB-C18 カラム (内径 21.2 mm x 25 cm) で 0.1 M TEAB (ポンプ A) 及び CH<sub>3</sub>CN (ポンプ B) で以下のグラジエント: 0~2 分 2% B, .2 ml; 2~4 分 2% B, .8 ml; 4~15 分 23% B, .8 ml; 15~24 分 23% B, .8 ml; 24~26 分 95% B, .8 ml; 26~28 分 95% B, .8 ml、28~30 分 2% B, .8 ml, 30~33 分 2% B, .2 ml を用いて溶出して HPLC 精製し、r<sub>t</sub> (18) 19.8 (0.26 マイクロモル, UV 測定に基づいて収率 12%) の前記で詳記した生成物が得られた;  $\lambda_{max} = 493 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 71,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (H<sub>2</sub>O 中); <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O, 16 MHz) -5.06 (d, J = 20.6 Hz, 1P, P<sub>c</sub>), -10.25 (d, J = 19.3 Hz, 1P, P<sub>r</sub>), -21.21 (t, J = 19.5 Hz, 1P, P<sub>r</sub>); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 2.09-2.17 (m, 1H, HH-2'), 2.43-2.50 (m, 1H, HH-2'), 2.61 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C-S), 2.83 (2H, S-CH<sub>2</sub>), 3.68 (t, J = 6.0 Hz, 2H, ArCONCH<sub>2</sub>), 4.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.08-4.17 (m, 4H, HH-5'), 4.25-4.29 (m, 1H, H-4'), 4.46-4.50 (m, 1H, H-3'), 6.09 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H-1'), 6.88 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 6.89 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 7.15 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 7.17 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 7.64 (br s, 1H, H<sub>A,r</sub>), 8.00-7.94 (m, 2H, H<sub>A,r</sub>), 8.04 (s, 1H, H-6); MS (ES) :m/z (%) (M-H)1253 (46%), (M-H+ Na)<sup>-</sup> 1275 (100%) .

【 0 1 4 8 】

【 化 2 5 】



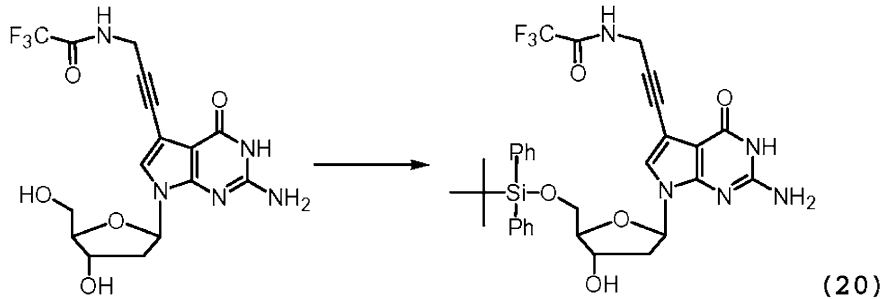
7-デアザ-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシグアノシン (19)

N<sub>2</sub> 下、DMF (40 ml) 中 7-デアザ-7-ヨード-グアノシン (2 g, 2.75 ミリモル)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (582 mg, 0.55 ミリモル)、CuI (210 mg, 1.1 ミリモル)、Et<sub>3</sub>N (1.52 ml, 1.1 ミリモル) 及びプロパギルアミン (2.5 g, 16.5 ミリモル) の懸濁液を N<sub>2</sub> 下室温で攪拌した。アルミ箔で遮光した。TLC が出発原料の完全な消費を示した後、反応混合物を濃縮した。残渣を MeOH (20 ml) で希釈し、そして dowex-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> で処理した。混合物を 30 分間攪拌し、そして濾過した。溶液を濃縮し、そしてシリカゲルクロマトグラフィーで精製し (石油エーテル: EtOAc 50:50 から石油エーテル: EtOAc: MeOH 40:40:20)、黄色粉末として (19) が得られた (2.1 g, 92%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.07-2.11 (m, 1H, H-2'), 2.31-2.33 (m, 1H, H-2'), 3.49-3.53 (m, 2H, H-5'), 3.77 (br s, 1H, H-4'), 4.25 (d, J = 4.3 Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>), 4.30 (br s, 1H, H-3')

, 4.95 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H, 5' -OH), 5.25 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H, 3' -OH), 6.27-6.31 (m, 1H, H-1'), 6.37 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 7.31 (s, 1H, H-8), 10.10 (br s, 1H,  $\text{NHCOCF}_3$ ), 10.55 (s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー)  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_5$  に関して計算値 415, 測定値 414.

【0149】

【化26】



10

5' - O - ( t - ブチルジフェニル ) - 7 - デアザ - 7 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2' - デオキシグアノシン ( 20 )

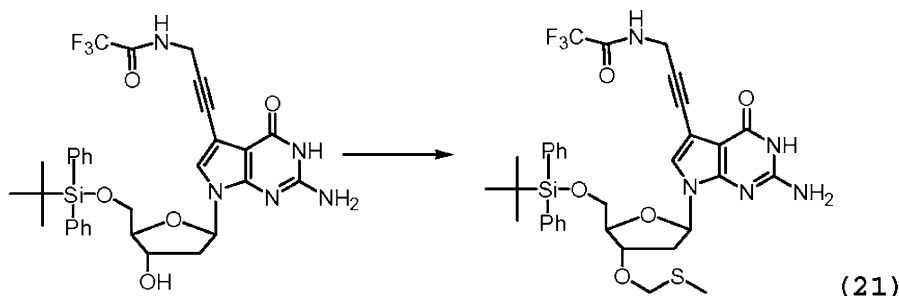
ピリジン ( 50 ml ) 中 ( 19 ) ( 2.4 g , 5.8 ミリモル ) の溶液に 0 で塩化 t - ブチルジフェニルシリル ( TBDPSCl ) ( 1.65 ml , 6.3 ミリモル ) を滴下した。次いで反応混合物を室温まで加温した。4 時間後、別の TBDPSCl ( 260  $\mu$  L , 1 ミリモル ) を加えた。出発原料が完全に消費されるまで TLC により反応をモニターした。MeOH ( ~ 5 ml ) で反応をクエンチし、そして蒸発乾固した。残渣を DCM に溶解し、そして NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液を加えた。水層を DCM で 3 回抽出した。合わせた有機抽出物を乾燥 ( MgSO<sub>4</sub> ) し、そして真空下濃縮した。シリカゲルのクロマトグラフィーによる精製 ( EtOAc から EtOAc : MeOH 85 : 15 ) で黄色泡状物 ( 20 ) が得られた ( 3.1 g , 82% ) 。<sup>1</sup>H NMR ( d<sub>6</sub> DMSO ) 1.07 ( s, 9H, CH<sub>3</sub> ), 2.19-2.23 ( m, 1H, H-2' ), 2.38-2.43 ( m, 1H, H-2' ), 3.73-3.93 ( m, 2H, H-5' ), 4.29 ( d,  $J = 5.0$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N ), 4.42-4.43 ( m, 1H, H-3' ), 5.41 ( br s, 1H, OH ), 6.37 ( t,  $J = 6.5$  Hz, H-1' ), 6.45 ( br s, 2H, NH<sub>2</sub> ), 7.24-7.71 ( m, 11H, H-8, H<sub>A</sub>r ), 10.12 ( t,  $J = 3.6$  Hz, 1H, NH ), 10.62 ( s, 1H, H-3 ) . Mass ( +ve エレクトロスプレー )  $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}$  に関して計算値 653, 測定値 654.

20

30

【0150】

【化27】



40

5' - O - ( t - ブチルジフェニル ) - 7 - デアザ - 3' - O - メチルチオールメチル - 7 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2' - デオキシグアノシン ( 21 )

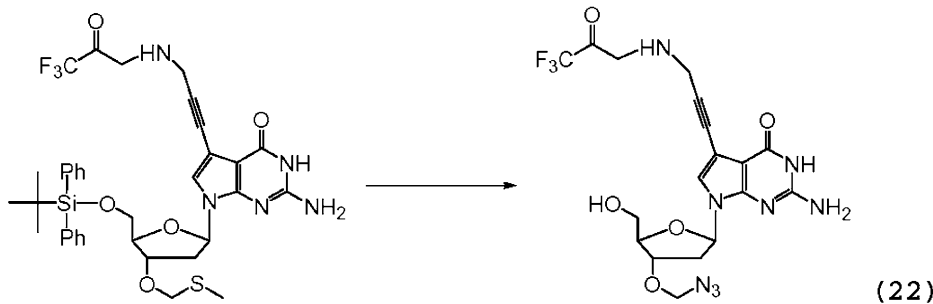
DMSO ( 15 ml ) 中 ( 20 ) の溶液 ( 1.97 g , 3.0 ミリモル ) を Ac<sub>2</sub>O ( 8.5 ml , 90 ミリモル ) 及び AcOH ( 2.4 ml , 42 ミリモル ) と処理し、そして室温で 15 時間、次いで 40 で 2 時間攪拌した。反応混合物を EtOAc ( 200 ml ) で希釈し、そして飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 ( 200 ml ) と共に 1 時間攪拌した。水層を EtOAc で 2 回洗浄した。有機層を合わせ、乾燥 ( MgSO<sub>4</sub> ) し、そして真空

50

下濃縮した。シリカのクロマトグラフィーによる精製 (EtOAc : ヘキサン 1 : 1 から EtOAc : ヘキサン : MeOH 10 : 10 : 1) により黄色泡状物として (21) が得られた (1.3 g, 60%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.04 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.08 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.19-2.35 (m, 2H, H-2), 3.67-3.71 (m, 2H, H-5'), 3.97-3.99 (m, 2H, H-4', H-3'), 4.23 (br s, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S), 6.31 (dd, J = 5.7, 7.9 Hz, H-1'), 7.19-7.62 (m, 11H, H<sub>8</sub>, H<sub>A</sub>r). Mass (+ve エレクトロスプレー) C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>SSi に関して計算値 713, 測定値 : 714.

【0151】

【化28】



10

3'-O-アジドメチル-7-デアザ-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシグアノシン (22)

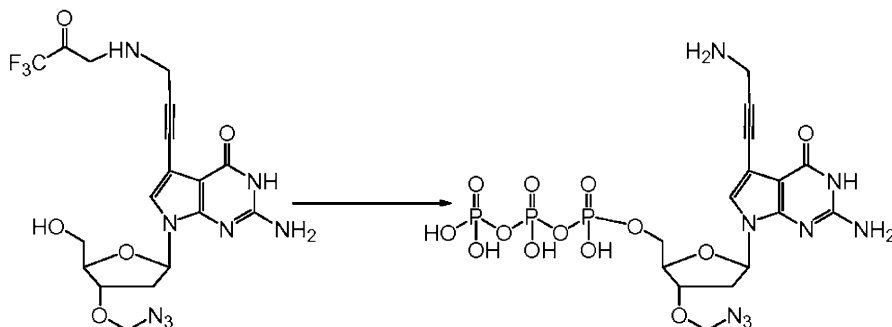
20

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) 中 (21) (1.3 mg, 1.8 ミリモル)、シクロヘキセン (0.91 ml, 9 ミリモル) の溶液に 4 で N<sub>2</sub> 下、塩化スルフィル (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中 1 M) (1.1 ml, 1.1 ミリモル) を滴下した。30 分後、TLC によりヌクレオシド (22) の完全な消費が示された。蒸発させて溶媒を除去した後、次に残渣を高真空に 20 分間供し、そして次に NaN<sub>3</sub> (585 ミリモル, 9 ミリモル) 及び DMF (10 ml) で処理した。得られた懸濁液を室温で 2 時間攪拌した。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / NaCl (10%) で抽出し、黄色ガム状物質を得て、これを室温で 20 分間、THF (1 M, 3 ml) 中 TBAF 及び THF (3 ml) で処理した。蒸発させて溶媒を除去し、EtOAc / 飽和 NaHCO<sub>3</sub> で抽出し、続いてシリカのクロマトグラフィーにより精製し (EtOAc から EtOAc : MeOH 9 : 1)、黄色泡状物が得られた (420 mg, 50%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) : 2.36-2.42 (m, 1H, H-2'), 2.49-2.55 (m, 1H, H-2'), 3.57-3.59 (m, 2H, H-5'), 3.97-4.00 (m, 1H, H-4'), 4.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.46-4.48 (m, 1H, H-3'), 4.92-4.96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 5.14 (t, J = 5.4 Hz, 1H, 5'-OH), 5.96-6.00 (dd, J = 5.7, 8.7 Hz, 1H, H-1'), 6.46 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.39 (s, 1H, H-6), 10.14 (s, 1H, NH), 10.63 (s, 1H, H-3).

30

【0152】

【化29】



40

3'-O-アジドメチル-7-デアザ-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセト

50

アミド) - プロパ - 1 - イニル] - 2' - デオキシグアノシン 5' - O - ヌクレオシド  
三リン酸 (23)

四ナトリウム三リン酸十水和物 (1.5 g, 3.4 ミリモル) を水 (34 ml) に溶解し、そしてその溶液を H<sup>+</sup> 形態の d o w e x 50 カラムに適用した。カラムを水で洗浄した。溶出液を冷却し (氷浴) そして攪拌した、E t O H (14 ml) 中トリ - n - ブチルアミン (1.6 ml, 6.8 ミリモル) 溶液に直接滴下した。溶出液の pH が 6 まで上昇するまでカラムを洗浄した。エタノール水溶液を蒸発乾固し、そして次にエタノールで 2 回、そして無水 D M F で 2 回同時蒸発させた。残渣を D M F (6.7 ml) に溶解した。淡黄色溶液を 4 モレキュラーシープ上に保存した。ヌクレオシド (22) 及びプロトンスポンジを真空下で一晩 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で乾燥した。リン酸トリメチル (0.4 ml) 中 (22) (104 mg, 0.22 ミリモル) 及びプロトンスポンジ (71 mg, 0.33 ミリモル) の溶液を 4 モレキュラーシープで 1 時間攪拌した。新たに蒸留した P O C l<sub>3</sub> (25 μl, 0.26 ミリモル) を加え、そして溶液を 4 で 2 時間攪拌した。混合物をゆっくりと室温まで加温し、そしてビス (トリ - n - ブチルアンモニウム) ピロリン酸 (1.76 ml, 0.88 ミリモル) 及び無水トリ - n - ブチルアミン (0.42 ml, 1.76 ミリモル) を加えた。5 分後、0.1 M T E A B (重炭酸トリエチルアンモニウム) バッファー (15 ml) で反応をクエンチし、そして 3 時間攪拌した。減圧下、水を除去し、そして得られた残渣を濃アンモニア (0.88, 10 ml) に溶解し、そして室温で 16 時間攪拌した。次いで反応混合物を蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そして溶液を D E A E - セファデックス A - 25 カラムに適用した。0.05 M 及び 1 M T E A B 各 2 L の直線グラジエントを用いて M P L C を行った。0.7 M と 0.8 M バッファーの間で三リン酸塩を溶出した。生成物を含有する画分を合わせ、そして蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そして H P L C により更に精製した。t<sub>r</sub> (23) = 20.5 分 (Z o r b a x C 18 調製用カラム, グラジエント: 30 分で 5% ~ 35% B, バッファー A 0.1 M T E A B, バッファー B M e C N)。白色泡状物として生成物を単離した (225 O . D ., 29.6 マイクロモル, 13.4%, <sub>260</sub> = 7, 600)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 2.43-2.5 (m, 2H, H-2'), 3.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.97-4.07 (m, 2H, H-5'), 4.25 (br s, 1H, H-4'), 4.57 (br s, 1H, H-3'), 4.74-4.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 6.26-6.29 (m, 1H, H-1'), 7.41 (s, 1H, H-8)。<sup>31</sup>P-NMR (D<sub>2</sub>O) -8.6 (m, 1P, P), -10.1 (d, J = 19.4 Hz, 1P, P), -21.8 (t, J = 19.4 Hz, 1P, P)。Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub> に関して計算値 614, 測定値 613。

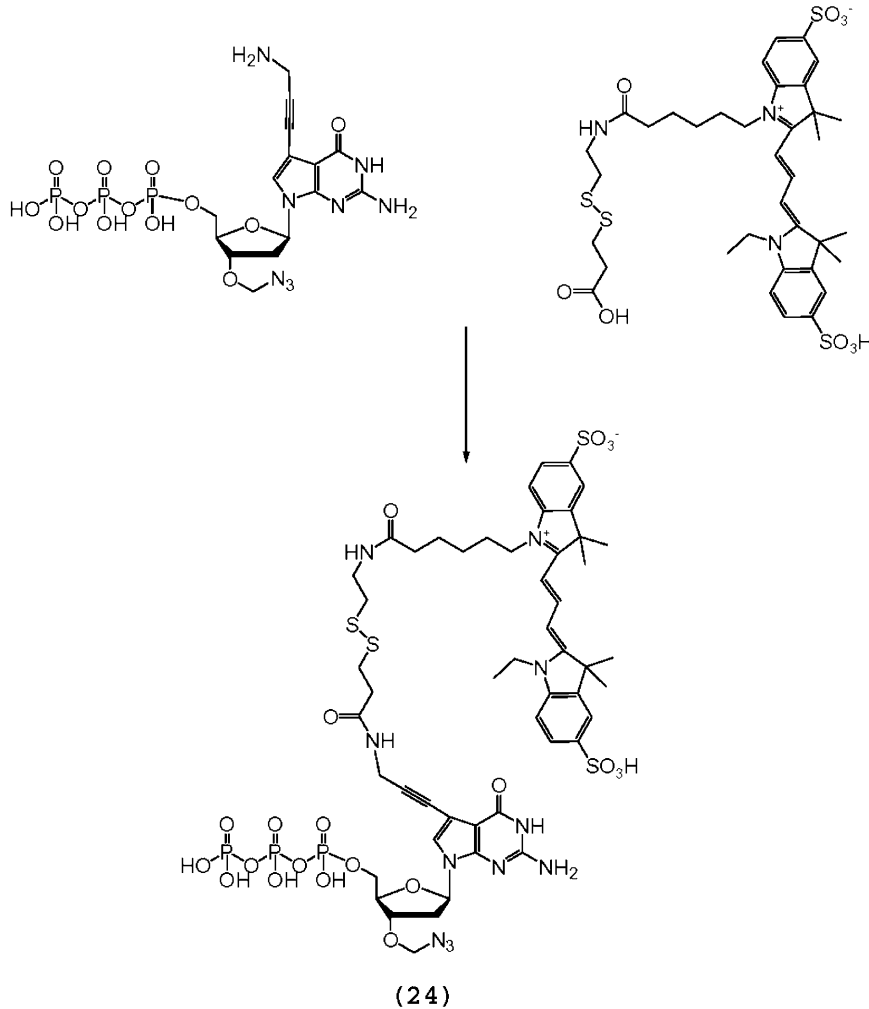
【0153】

10

20

30

## 【化 3 0】



10

20

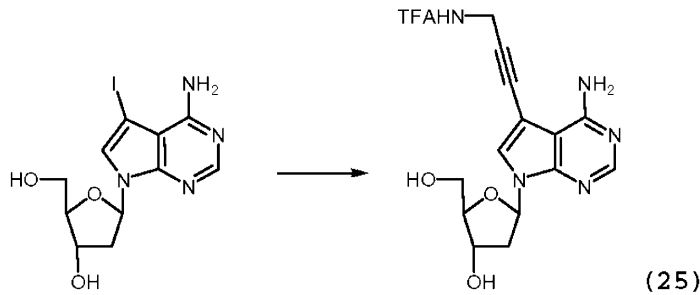
30

40

50

DMF (0.9 ml) 中ジスルフィドリンカー Cy3 (2.5 マイクロモル)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (0.95 mg, 5 マイクロモル)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) (0.68 mg, 5 マイクロモル) 及び N-メチルモルホリン (0.55  $\mu$ L, 5 マイクロモル) の混合物を室温で 1 時間攪拌した。水 0.1 ml 中 (23) の溶液 (44 O.D., 3.75 マイクロモル) を 4 で反応混合物に加え、そして室温で 3 時間放置した。TEAB バッファー (0.1 M, 10 ml) で反応をクエンチし、DEAE セファデックスカラム (2 x 5 cm) に負荷した。最初に 0.1 M TEAB バッファー (100 ml) で、そして次に 1 M TEAB バッファー (100 ml) で溶出した。所望の三リン酸生成物を 1 M TEAB バッファーで溶出した。生成物を含む画分を濃縮し、そして HPLC に適用した。t<sub>r</sub> (24) = 23.8 分 (Zorbax C18 調製用カラム, グラジエント: 30 分で 5% ~ 55% B, バッファー A 0.1 M TEAB, バッファー B MeCN)。生成物を赤色泡状物として単離した (0.5 マイクロモル, 20%, m<sub>ax</sub> = 150, 000)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 1.17-1.71 (m, 20H, 4 x CH<sub>2</sub>, 4 x CH<sub>3</sub>), 2.07-2.15 (m, 1H, H-2'), 2.21-2.30 (m, 1H, H-2'), 2.52-2.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.66-2.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.72-2.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.08-3.19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.81-3.93 (m, 6H, CH<sub>2</sub>, H-5'), 4.08-4.16 (m, 1H, H-4'), 4.45-4.47 (m, 1H, H-3'), 4.70-4.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 6.05-6.08 (m, 2H, H<sub>A</sub>), 6.15-6.18 (m, 1H, H-1'), 7.11 (s, 1H, H-8), 7.09-7.18 (m, 2H, CH), 7.63-7.72 (m, 4H, H<sub>A</sub>), 8.27-8.29 (m, 1H, CH)。<sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O) -4.7 (m, 1P, P), -9.8 (m, 1P, P), -19.7 (m, 1P, P)。Mass (-ve エレクトロスプレ) C<sub>51</sub>H<sub>66</sub>N<sub>11</sub>O<sub>21</sub>P<sub>3</sub>S<sub>4</sub> に関して計算値 1389.25, 測定値 1388

(M - H), 694 [M - 2H], 462 [M - 3H].  
 【0154】  
 【化31】



10

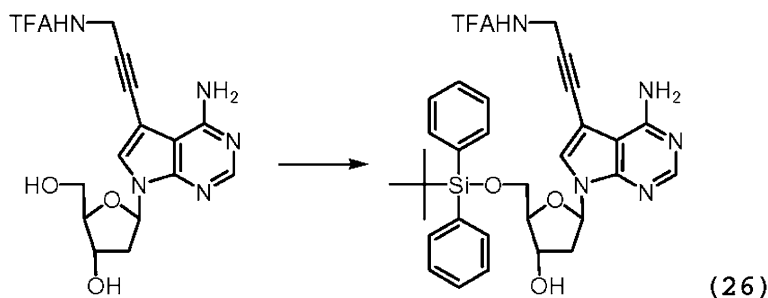
7 - デアザ - 7 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2 ' - デオキシアデノシン ( 2 5 )

乾燥 DMF ( 2 0 m l ) 中 7 - デアザ - 7 - ヨード - 2 ' - デオキシアデノシン ( 1 g , 2 . 6 5 ミリモル ) 及び CuI ( 1 0 0 m g , 0 . 5 3 ミリモル ) の懸濁液にトリエチルアミン ( 7 4 0 μ l , 5 . 3 ミリモル ) を加えた。5 分間攪拌した後、トリフルオロ - N - プロパ - 2 - イニル - アセトアミド ( 1 . 2 g , 7 . 9 5 ミリモル ) 及び Pd ( P P h <sub>3</sub> )<sub>4</sub> ( 3 0 8 m g , 0 . 2 6 ミリモル ) を混合物に加え、そして反応物を室温で暗く、1 6 時間攪拌した。MeOH ( 4 0 m l ) 及び重炭酸 d o w e x を反応混合物に加え、そして 4 5 分間攪拌した。混合物を濾過した。濾液を MeOH で洗浄し、そして溶媒を真空下除去した。粗製混合物をシリカのクロマトグラフィーにより精製し ( EtOAc から EtOAc : MeOH 9 5 : 2 0 ) 、わずかに黄色の粉末が得られた ( 2 5 ) ( 1 . 0 g , 9 5 % ) 。<sup>1</sup>H NMR ( d<sub>6</sub> DMSO ) 2.11-2.19 ( m , 1H , H-2' ) , 2.40-2.46 ( m , 1H , H-2' ) , 3.44-3.58 ( m , 2H , H-5' ) , 3.80 ( m , 1H , H-4' ) , 4.29 ( m , 3H , H-3' , CH<sub>2</sub>N ) , 5.07 ( t , J = 5.5 Hz , 1H , OH ) , 5.26 ( d , J = 4.0 Hz , 1H , OH ) , 6.45 ( dd , J = 6.1 , 8.1 Hz , 1H , H-1' ) , 7.74 ( s , 1H , H-8 ) , 8.09 ( s , 1H , H-2 ) , 10.09 ( t , J = 5.3 Hz , 1H , NH ) .

20

【0155】

【化32】



30

5 ' - O - ( t - ブチルジフェニルシリル ) - 7 - デアザ - 7 - [ 3 - ( 2 , 2 , 2 - トリフルオロアセトアミド ) - プロパ - 1 - イニル ] - 2 ' - デオキシアデノシン ( 2 6 )

40

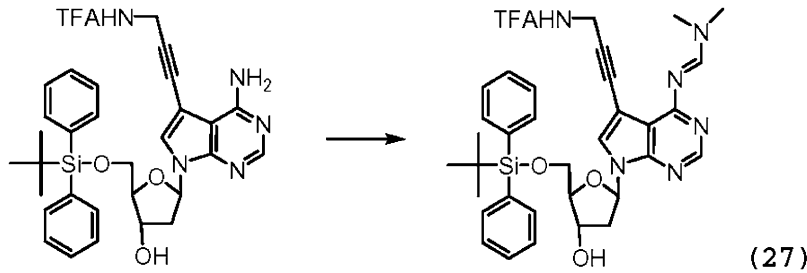
ヌクレオシド ( 2 5 ) ( 1 . 1 3 g , 2 . 8 2 ミリモル ) を乾燥ピリミジン ( 2 × 1 0 m l ) 中で 2 回同時蒸発させ、そして乾燥ピリジン ( 1 8 m l ) に溶解した。この溶液に塩化 t - ブチルジフェニルシリル ( 7 4 8 μ l , 2 . 8 7 ミリモル ) を 0 で少しずつ加えた。反応混合物を室温まで加温し、そして一晩攪拌した。飽和 NaCl 水溶液で反応をクエンチした。EtOAc ( 2 5 m l ) を反応混合物に加え、そして水層を EtOAc で 3 回抽出した。合わせた有機抽出物を乾燥 ( MgSO<sub>4</sub> ) した後、真空下、溶媒を除去した。シリカのクロマトグラフィーによる精製 ( DCM、次いで EtOAc から EtOAc : MeOH 8 5 : 1 5 ) によりわずかに黄色の粉末として ( 2 6 ) が得られた ( 1 . 7 6 g , 9 7 % ) 。<sup>1</sup>H NMR ( d<sub>6</sub> DMSO ) 1.03 ( s , 9H , tBu ) , 2.25-2.32 ( m , 1H , H-2' ) ,

50

2.06-2.47 (m, 1H, H-2'), 3.71-3.90 (m, 2H, H-5'), 3.90-3.96 (m, 1H, H-4'), 4.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.46 (m, 1H, H-3'), 5.42 (br s, 1H, OH), 6.53 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 7.38-7.64 (m, 11H, H-8 and H<sub>A,r</sub>), 8.16 (s, 1H, H-2), 10.12 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH).

【 0 1 5 6 】

【 化 3 3 】



10

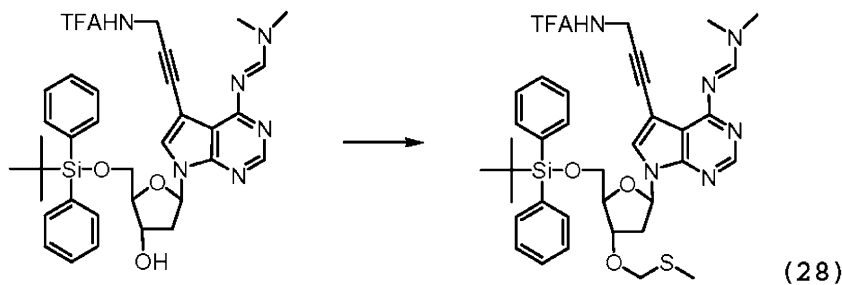
5'-O-(t-ブチルジフェニルシリル)-7-デアザ-4-N,N-ジメチルホルマジン-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシアデノシン(27)

ヌクレオシド(26)の溶液(831mg, 1.30ミリモル)をMeOH:N,N-ジメチルアセタール(30ml:3ml)に溶解し、そして40℃で攪拌した。反応をTLCによりモニターし、1時間後に反応は完了した。真空下溶媒を除去した。シリカのクロマトグラフィーによる精製により、(EtOAc:MeOH 95:5)わずかに褐色の粉末として(27)が得られた(777mg, 86%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 0.99 (s, 9H, tBu), 2.22-2.29 (m, 1H, H-2'), 2.50-2.59 (m, 1H, H-2'), 3.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.68-3.87 (m, 2H, H-5'), 3.88-3.92 (m, 1H, H-4'), 4.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.43 (m, 1H, H-3'), 6.56 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 7.36-7.65 (m, 10H, H<sub>A,r</sub>), 7.71 (s, 1H, H-8), 8.33 (s, 1H, CH), 8.8 (s, 1H, H-2), 10.12 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH).

20

【 0 1 5 7 】

【 化 3 4 】



30

5'-O-(t-ブチルジフェニルシリル)-7-デアザ-4-N,N-ジメチルホルマジン-3'-O-メチルチオメトキシ-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシアデノシン(28)

乾燥DMSO(8ml)中(27)の溶液(623mg, 0.89ミリモル)に酢酸(775μl, 13.35ミリモル)及び無水酢酸(2.54ml, 26.7ミリモル)を加えた。混合物を室温で一晩攪拌した。次いで反応物をEtOAc及び飽和NaHCO<sub>3</sub>(1:1)溶液に注ぎ、そして激しく攪拌した。有機層を飽和NaHCO<sub>3</sub>水溶液で1回以上洗浄し、そしてMgSO<sub>4</sub>上で乾燥した。減圧下、溶媒を除去した後、シリカのクロマトグラフィーにより生成物(28)を精製し(EtOAc:石油エーテル 1:2、次いでEtOAc)(28)を生じた(350mg, 52%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) : 1.0 (s, 9H, tBu), 2.09 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.41-2.48 (m, 1H, H-2'), 2.64-2.72 (m, 1H, H

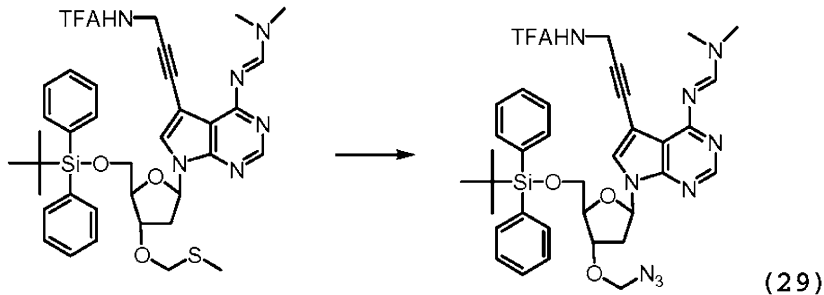
40

50

-2'), 3.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.66-3.89 (m, 2H, H-5'), 4.04 (m, 1H, H-4'), 4.26 (m, J = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.67 (m, 1H, H-3'), 4.74 (br s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.49 (t, J = 6.1, 8.1 Hz, 1H, H-1'), 7.37-7.48 (m, 5H, H<sub>A,r</sub>), 7.58-7.67 (m, 5H, H<sub>A,r</sub>), 7.76 (s, 1H, H-8), 8.30 (s, 1H, CH), 8.79 (s, 1H, H-2), 10.05 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH).

【 0 1 5 8 】

【 化 3 5 】



10

3'-O-アジドメチル-5'-O-(t-ブチルジフェニルシリル)-7-デアザ-4-N,N-ジメチルホルマジン-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシアデノシン(29)

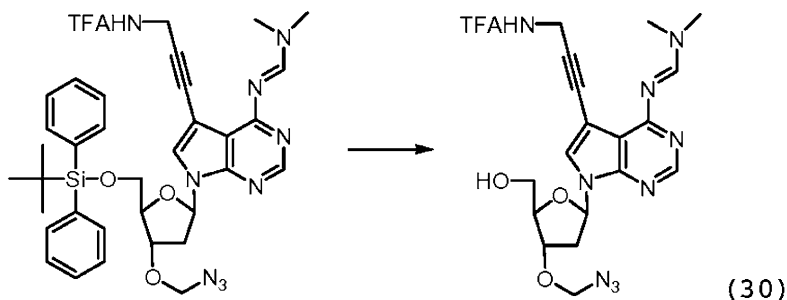
乾燥 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) 中 (28) (200 mg, 0.26 ミリモル) 及びシクロヘキセン (0.135 ml, 1.3 ミリモル) の溶液に N<sub>2</sub> 下、0 で塩化スルフルル (32 μl, 0.39 ミリモル) を加えた。10 分後、TLC によりヌクレオシド (28) の完全な消費が示された。溶媒を蒸発させ、そして残渣を 20 分間高真空に供した。次いでこれを乾燥 DMF (3 ml) に溶解し、0 まで冷却し、そして NaN<sub>3</sub> (86 mg, 1.3 ミリモル) で処理した。得られた懸濁液を室温で 3 時間攪拌した。反応物を EtOAc 及び水で分配した。水層を EtOAc で抽出した。合わせた有機層の抽出物を合わせ、そして乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) した。減圧下、溶媒を除去した後、混合物をシリカのクロマトグラフィーにより精製し (EtOAc)、油状物 (29) が得られた (155 mg, 80%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) : 0.99 (s, 9H, tBu), 2.45-2.50 (m, 1H, H-2'), 2.69-2.78 (m, 1H, H-2'), 3.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.67-3.88 (m, 2H, H-5'), 4.06 (m, 1H, H-4'), 4.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.61 (m, 1H, H-3'), 4.84-4.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.58 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 7.35-7.47 (m, 5H, H<sub>A,r</sub>), 7.58-7.65 (m, 5H, H<sub>A,r</sub>), 7.77 (s, 1H, H-8), 8.30 (s, 1H, CH), 8.79 (s, 1H, H-2), 10.05 (br s, 1H, NH).

20

30

【 0 1 5 9 】

【 化 3 6 】



40

3'-O-アジドメチル-7-デアザ-4-N,N-ジメチルホルマジン-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシアデノシン(30)

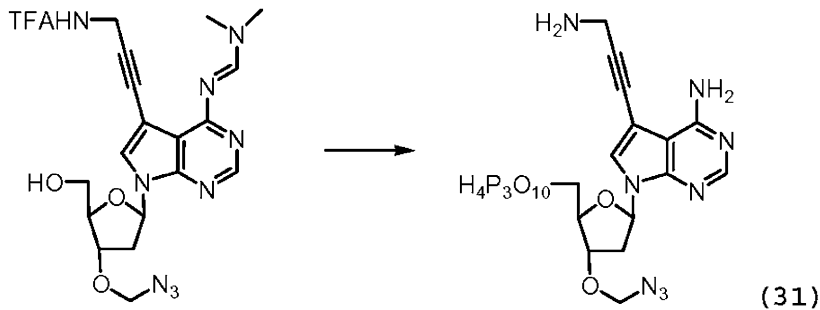
テトラヒドロフラン (THF) (3 ml) 中 (29) の溶液 (155 mg, 0.207 ミリモル) を 0 で TBAF (THF 中 1 M, 228 μl) で処理した。次いで氷浴をは

50

ずし、そして反応混合物を室温で攪拌した。2時間後、TLCによりヌクレオシドの完全な消費が示された。溶媒を除去した。シリカのクロマトグラフィーによる精製により (EtOAc : MeOH 95 : 5)、淡褐色油状物として (30) (86 mg, 82%) が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.40-2.48 (dd, J = 8.1, 13.6 Hz, 1H, H-2'), 2.59-2.68 (dd, J = 8.3, 14 Hz, 1H, H-2'), 3.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.52-3.62 (m, 2H, H-5'), 4.02 (m, 1H, H-4'), 4.28 (d, J = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.47 (m, 1H, H-3'), 4.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 5.19 (t, J = 5.6 Hz, 1H, OH), 6.49 (dd, J = 8.1, 8.7 Hz, 1H, H-1'), 7.88 (s, 1H, H-8), 8.34 (s, 1H, CH), 8.80 (s, 1H, H-2), 10.08 (s, 1H, NH) .

【0160】

【化37】



(31)

10

20

30

40

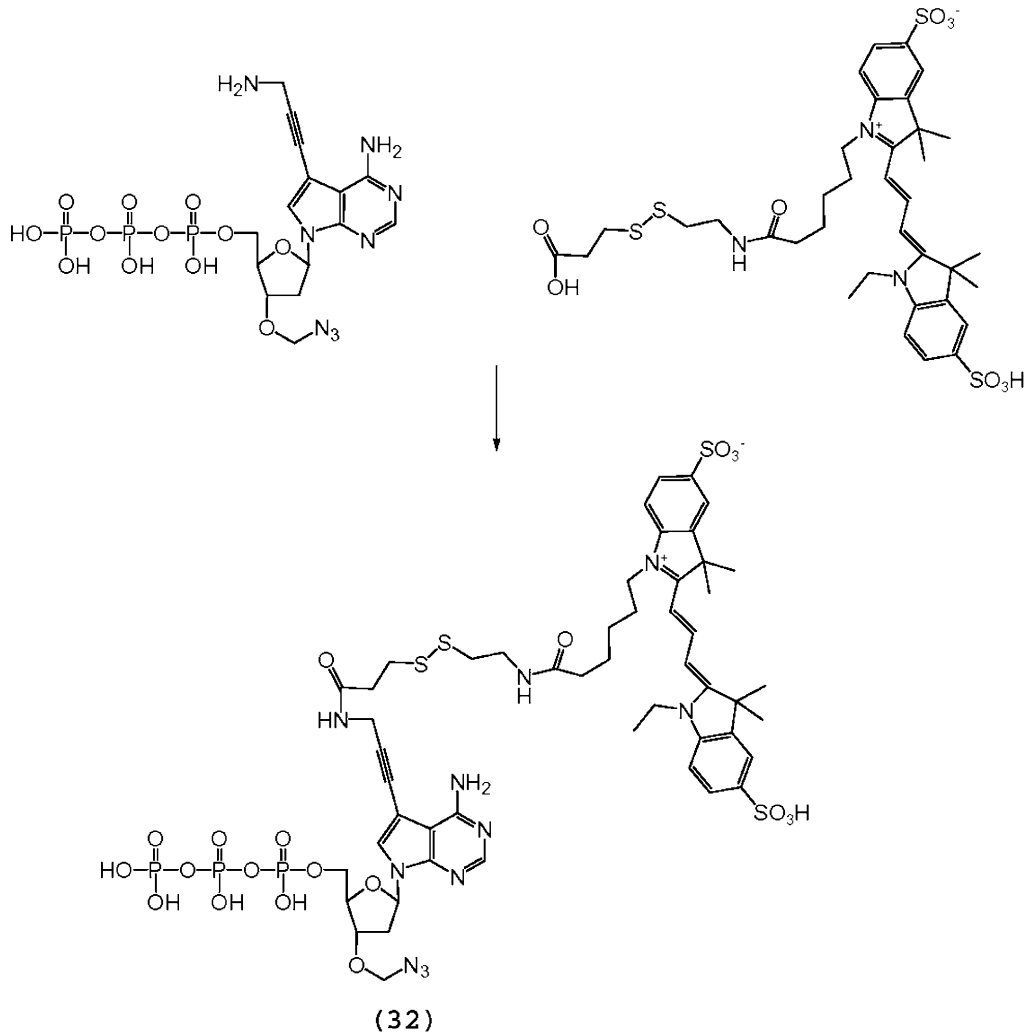
7 - (3 - アミノプロパ - 1 - イニル) - 3' - O - アジドメチル - 7 - デアザ - 2' - デオキシアデノシン 5' - O - ヌクレオシド三リン酸 (31)

ヌクレオシド (30) 及びプロトンスポンジを真空下で一晩、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で乾燥した。リン酸トリメチル (980 μl) 中 (30) (150 mg, 0.294ミリモル) 及びプロトンスポンジ (126 mg, 0.588ミリモル) の溶液を4 モレキュラーシーブで1時間攪拌した。新たに蒸留したPOCl<sub>3</sub> (36 μl, 0.388ミリモル) を加え、そして溶液を4 で2時間攪拌した。混合物をゆっくりと室温まで加温し、そしてDMF中0.5 Mビス(トリ - n - ブチルアンモニウム)ピロリン酸溶液 (2.35 ml, 1.17ミリモル) 及び無水トリ - n - ブチルアミン (560 μl, 2.35ミリモル) を加えた。5分後、0.1 M TEAB (重炭酸トリエチルアンモニウム) バッファー (15 ml) で反応をクエンチし、そして3時間攪拌した。減圧下、水を除去し、そして得られた残渣を濃アンモニア (0.88, 15 ml) に溶解し、室温で16時間攪拌した。次いで反応混合物を蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そして溶液をDEAE - セファデックス A - 25カラムに適用した。0.05 M から1 M TEABの直線グラジエントでMPLCを行った。生成物を含む画分を合わせ、そして蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そしてHPLCで更に精製した。HPLC : t<sub>r</sub> (31) : 19.94分 (Zorbax C18調製用カラム, グラジエント : 20分で5% ~ 35% B, バッファー A 0.1 M TEAB, バッファー B MeCN)。生成物 (31) を白色泡状物として単離した (17.5 マイクロモル, 5.9%, 280 = 15000)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)

2.67-2.84 (2m, 2H, H-2'), 4.14 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.17-4.36 (m, 2H, H-5'), 4.52 (br s, H-4'), 6.73 (t, J = 6.6 Hz, H-1'), 8.06 (s, 1H, H-8), 8.19 (s, 1H, H-2) .  
<sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O) -5.07 (d, J = 21.8 Hz, 1P, P), -10.19 (d, J = 19.8 Hz, 1P, P), -21.32 (t, J = 19.8 Hz, 1P, P) . Mass ( - ve エレクトロスプレー ) C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub> に関して計算値 598.05, 測定値 596 .

【0161】

## 【化 3 8】



10

20

30

40

50

DMF (450  $\mu$ l) 中 Cy3 ジスルフィドリンカー (1.3 マイクロモル) の溶液中に DMF 中 1 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - 3 - エチルカルボジイミド塩酸塩、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物及び N - メチルモルホリン (各 26  $\mu$ M) の混合物 50  $\mu$ l を 0 で加えた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した。全ての色素リンカーが消費されるまで TLC (MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 : 7) により反応をモニターした。次いで DMF (400  $\mu$ l) を 0 で加え、続いてヌクレオチド (31) (1.2 マイクロモル) を水溶液 (100  $\mu$ l) で加え、そして反応混合物を室温で一晩攪拌した。TLC (MeOH : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4 : 6) により活性化されたエステルの完全な消費が示され、そしてベースラインに暗赤色スポットが現れた。TEAB バッファー (0.1 M, 10 ml) により反応をクエンチし、そして DEAE セファデックスカラム (2 x 5 cm) に負荷した。カラムを最初に 0.1 M TEAB バッファー (100 ml) で溶出し、そして有機残渣を洗い流し、そして次に 1 M TEAB バッファー (100 ml) で溶出した。所望の三リン酸塩 (32) が 1 M TEAB バッファーで溶出された。生成物を含む画分を合わせ、蒸発させ、そして HPLC により精製した。HPLC 条件: t<sub>r</sub> (24) : 22.44 分 (Zorbax C18 調製用カラム, グラジエント: 20 分で 5% ~ 35% B, バッファー A 0.1 M TEAB, バッファー B MeCN)。生成物を暗桃色固体として単離した (0.15 マイクロモル, 12.5%,  $\eta_{inh} = 1.50000$ )。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 2.03 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (m, 1H, H-2'), 2.43 (m, 1H, H-2'), 2.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.99 (m, 4H, CH<sub>2</sub>N, H-5'), 4.18 (br s, 1H, H-4'), 6.02, 6.17 (2d, J = 13.64 Hz, 2H, H<sub>A</sub>), 6.30 (dd, J = 6.06, 8.58 Hz, H-1'), 7.08, 7.22 (2d, 2H, 2 x = CH), 7.58-7.82 (m, 5H, H<sub>A</sub>,

H-2, H-8), 8.29 (m, = CH).  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) -4.83 (m, 1P, P), -10.06 (m, 1P, P), -20.72 (m, 1P, P).

【0162】

3'-アジドメチル dNTPの酵素取り込み

50 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.01% Tween-20及び4 mM  $\text{MgSO}_4$  中100 nM DNAプライマー/鋳型(予めP32及びT4ポリヌクレオチドキナーゼで標識したプライマー)に、2  $\mu\text{M}$  化合物6及び100 nM ポリメラーゼ(Thermococcus種 9°N exo-Y409V A485L、New England Biolabsより入手)を加えた。遮断の影響を示すため、鋳型は10個のアデニン塩基の並びから成る。反応液を65で10分間加熱する。完全な遮断を示すために、4つの元来の遮断されていないヌクレオシド三リン酸で追跡を行う。単一のアジドメチル遮断されたdTTPの定量的な取り込みを観察することができ、そしてアジドメチル基が更なる取り込みに対する有効な遮断として作用することを示すことができる。

10

【0163】

ヘアピンDNA(共有結合した自己相補的プライマー/鋳型)をストレプトアビジンビーズに付着させることにより、図5及び6で示すように、反応を複数のサイクルで実施することができる。

【0164】

ストレプトアビジンビーズの調製

保存バッファーを除去し、そしてビーズをTEバッファー(10 mM Tris-HCl (pH 8)及び1 mM EDTA)で3回洗浄する。B&Wバッファー(10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA及び2.0 M NaCl)に再懸濁し、そして適当な突出鋳型配列を有するピオチン化 $^{32}\text{P}$ 標識ヘアピンDNAを加える。室温で15分間放置する。バッファーを除去し、そしてビーズをバッファーで3回洗浄する。

20

【0165】

完全に機能化されたヌクレオシド三リン酸(FFN)の取り込み

50 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.01% Tween-20、4 mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.4 mM  $\text{MnCl}_2$ 、(サイクル1(0.2 mM)を除く)の溶液に2  $\mu\text{M}$  FFN及び100 nM ポリメラーゼを加える。次いでこの溶液をビーズに加え、そして十分に混合し、そして65で10~15分間インキュベートする。反応混合物を除去し、そしてビーズをTEバッファーで3回洗浄する。

30

【0166】

脱遮断工程

トリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィン三ナトリウム塩(TCEP)(0.1 M)をビーズに加え、そして十分に混合する。次いで混合物を65で15分間インキュベートした。脱遮断溶液を除去し、そしてビーズをTEバッファーで3回洗浄する。

【0167】

キャッピング工程

0.1 mM リン酸塩(pH 6.5)中ヨードアセトアミド(431 mM)をビーズに加え、そして十分に混合し、次いでこれを室温で5分間放置する。キャッピング溶液を除去し、そしてビーズをTEバッファーで3回洗浄する。

40

【0168】

必要に応じて反復

【0169】

ビーズ溶液を標準的な12%ポリアクリルアミドDNAシーケンシングゲルのウェルの40%ホルムアミド負荷バッファー中に配置することにより反応生成物を分析することができる。変性条件下でゲルを作動させ、DNAをビーズからゲル上に放出させる。DNAバンドシフトは色素の存在及び余分なヌクレオチドの添加の双方により影響を受け、

50

そして、ホスフィンによる色素（及び遮断基）の切断によりゲル上での移動度のシフトが引き起こされる。

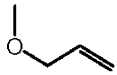
【0170】

化合物18(C)、24(G)及び32(A)の取り込みの2サイクル並びに化合物6での6サイクルを図5及び図6で示す。

【0171】

アリル基での3'-OH保護：

【化39】

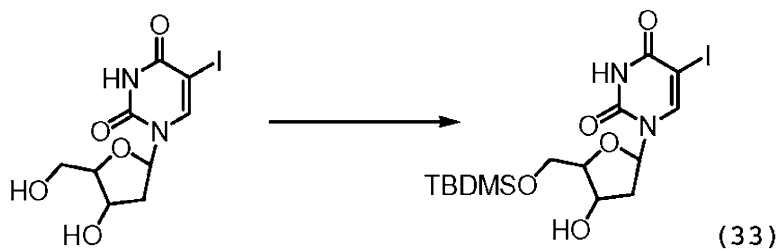


10

3'位置でこの遮断基を担持するヌクレオチドが合成され、DNAポリメラーゼによる取り込みの成功、有効な遮断が示され、そして続いて水溶性ホスフィン又はチオールを用いて中性の水溶性条件下で除去することができ、更なる伸長が可能になる。

【0172】

【化40】



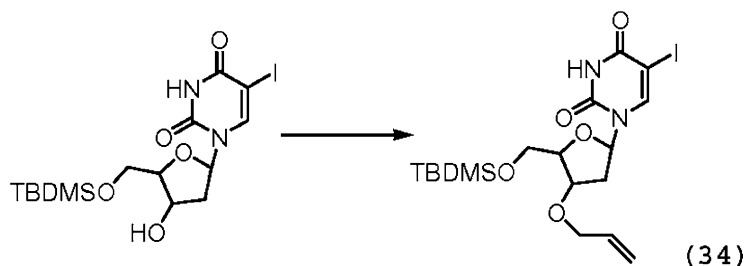
20

5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-5-ヨード-2'-デオキシウリジン(33)

乾燥N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)70ml中5-ヨード-2'-デオキシウリジン(5.0g, 14ミリモル)の溶液にイミダゾール(1.09g, 16ミリモル)、続いてTBDMSCl(2.41g, 16ミリモル)を0で加えた。混合物を氷浴中に置き、そして一晩攪拌した。反応物を飽和NaCl水溶液でクエンチし、そしてEtOAcで抽出した。乾燥(MgSO<sub>4</sub>)後、溶媒を除去し、そして粗製混合物をシリカのクロマトグラフィーにより精製した(EtOAc:石油エーテル 3:7)。無色固体として生成物(33)(5.9g, 90%)が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 0.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (s, 9H, tBu), 1.88-1.97 (m, 1H, H-2'), 2.00-2.05 (m, 1H, H-2'), 3.59-3.71 (m, 2H, H-5'), 3.75 (br s, 1H, H-4'), 4.06 (br s, 1H, H-3'), 5.18 (d, J = 4.0 Hz, 1H, OH), 5.98 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 7.89 (s, 1H, H-6), 11.62 (s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>I N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Si に関して計算値 468.06 測定値 467.

30

【化41】



40

【0173】

3'-O-アリル-5'-O-t-ブチルジメチルシリル-5-ヨード-2'-デオキ

50

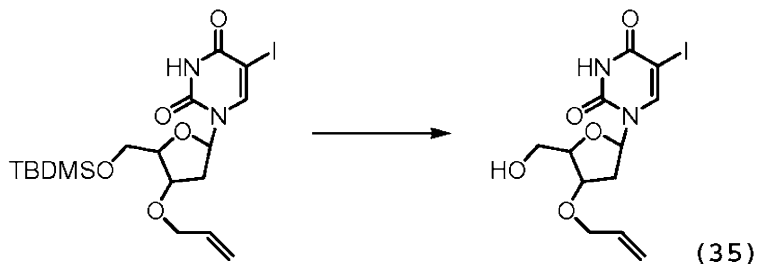
## シウリジン (34)

乾燥 THF (20 ml) 中 NaH の懸濁液 (497 mg, 12.4 ミリモル, 鉱物油中 60%) に乾燥 THF (50 ml) 中 5'-TBDMS 保護した 5-ヨード-2'-デオキシシウリジン (2.8 g, 5.9 ミリモル) の溶液を滴下した。気体発生が停止した後、混合物を更に 10 分間攪拌し、そして次に臭化アリル (561  $\mu$ l, 6.5 ミリモル) を滴下した。添加が完了した後、乳白色の反応混合物を室温で 16 時間攪拌した。飽和 NaCl 水溶液 (30 ml) の添加により反応をクエンチし、EtOAc を用いて水層を 3 回抽出し、そして飽和 NaCl 水溶液で洗浄した後、有機層を乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) した。溶媒を除去した後、粗製生成物をクロマトグラフィーにより精製した (EtOAc : 石油エーテル 1 : 1)。無色泡状物としてアリル化生成物 (2.39 g, 80%) が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO)  $\delta$  -0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, tBu), 1.94-2.01 (m, 1H, H-2'), 2.16-2.21 (m, 1H, H-2'), 3.61-3.71 (m, 2H, H-5'), 3.87-3.94 (m, 4H, H-3', H-4', OCH<sub>2</sub>), 5.04 (dd, J = 1.6, 10.4 Hz, 1H, =CH<sub>2</sub>), 5.15 (dd, J = 1.8, 17.3 Hz, 1H, =CH<sub>2</sub>), 5.72-5.81 (m, 1H, CH=), 5.92 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H-1'), 7.88 (s, 1H, 6-H), 11.6 (s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>I N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Si に関して計算値 508.09, 測定値 507.

10

【0174】

【化42】



20

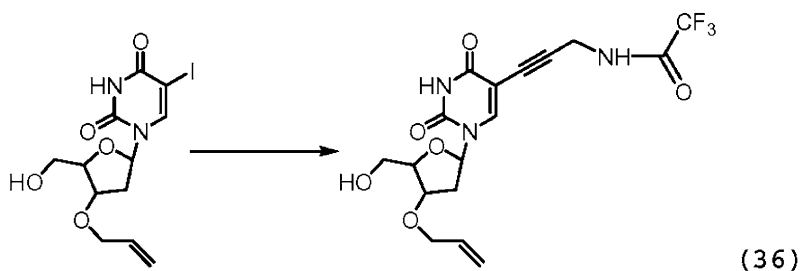
## 3'-O-アリル-5-ヨード-2'-デオキシシウリジン (35)

乾燥 THF 中 (34) の溶液 (2.34 g, 4.71 ミリモル) に TBAF (5.2 ml, 5.2 ミリモル, THF 中 1 M 溶液) を 0 で加えた。反応混合物を室温まで加温し、そして次に 16 時間攪拌した。飽和 NaCl 溶液 (20 ml) の添加により反応をクエンチし、そして EtOAc で 3 回抽出した。有機層を合わせて MgSO<sub>4</sub> で乾燥した。粗製混合物をシリカのクロマトグラフィーにより精製した (EtOAc : 石油 7 : 3)。生成物 (35) (1.4 g, 75%) を無色固体として単離した。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO)  $\delta$  2.02-2.39 (m, 2H, H-2'), 3.42-3.52 (m, 2H, H-5'), 3.84-3.88 (m, 3H, H-4', CH<sub>2</sub>), 3.97-4.00 (m, 1H, H-3'), 5.02-5.09 (m, 2H, OH, =CH<sub>2</sub>), (dd, J = 1.9, 17.3 Hz, 1H, =CH<sub>2</sub>), 5.73-5.82 (m, 1H, CH=), 5.94 (t, J = 6.8 Hz, 1H, H-1'), 8.24 (s, 1H, H-6), 11.56 (s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>I N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> に関して計算値 394.0 測定値 393.

30

【0175】

【化43】



40

50

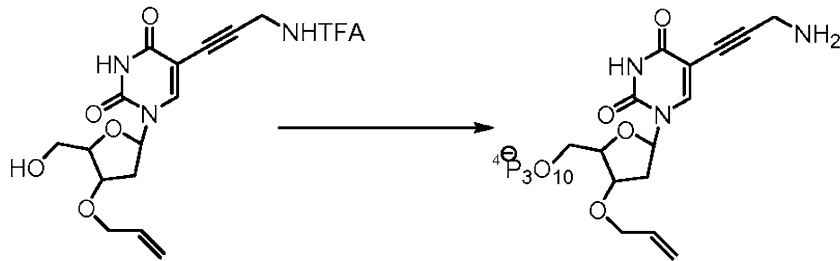
3'-O-アリル-5-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシウリジン(36)

乾燥DMF(10ml)中(35)(400mg, 1.0ミリモル)の溶液にCuI(38mg, 20マイクロモル)及びトリエチルアミン(300μl, 2.0ミリモル)を加えた。プロパルギルトリフルオロアセトアミド(453mg, 3.0ミリモル)を滴下し、続いてPd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(110mg, 9.5マイクロモル)を加えた。反応物を暗中で16時間攪拌した。MeOH(10ml)、DCM(10ml)及び重炭酸dowexを添加して反応をクエンチした。混合物を30分間攪拌し、そして次に濾過した。真空下溶媒を除去し、そしてシリカのクロマトグラフィーにより粗製生成物を精製した(EtOAc:石油 3:7~7:3)。生成物をわずかに黄色の結晶として単離した(398mg, 95%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.25-2.43 (m, 2H, H-2'), 3.65-3.76 (m, 2H, H-5'), 4.07-4.17 (m, 3H, H-4', CH<sub>2</sub>), 4.21-4.23 (m, 1H, H-3'), 4.34 (d, J = 5.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.25-5.27 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>, OH), 5.38 (dd, J = 1.83, 17.3 Hz, 1H, =CH<sub>2</sub>), 5.96-6.06 (m, 1H, =CH), 6.17 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H-1'), 8.29 (s, 1H, H-6), 10.17 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NHTFA), 11.78 (s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> に関して計算値417.11, 測定値416.

10

【0176】

【化44】



(37)

20

3'-O-アリル-5-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシウリジン 5'-O-ヌクレオシド三リン酸(37)

窒素下で、双方共に真空下P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で24時間乾燥した(36)(100mg, 0.24ミリモル)及びプロトンスポンジ(61.5mg, 0.28ミリモル)をOP(OMe)<sub>3</sub>(225μl)に溶解した。0で新たに蒸留したPOCl<sub>3</sub>を滴下し、そして混合物を1.5時間攪拌した。次いでピロリン酸塩(1.44ml, 0.72マイクロモル, DMF中0.5M)及びnBu<sub>3</sub>N(0.36ml, 1.5ミリモル)を加え、そして得られた混合物を更に1.5時間攪拌した。重炭酸トリエチルアンモニウム溶液(4.5ml, 0.1M溶液, TEAB)を加え、そして反応混合物を2時間攪拌した。次いでNH<sub>3</sub>水溶液(4.5ml)を加え、そして混合物を16時間攪拌した。溶媒を除去して乾燥した後、残渣を水に再溶解し、濾過し、そしてMPLCで精製し、続いてHPLC精製した。無色泡状物として望ましい三リン酸塩(37)(10.2マイクロモル, 4%, 280 = 10000)を単離した。MPLC条件: DEAE セファデックスカラムで0.05M TEABから0.7M TEAB、各々2lを用いてグラジエントを実行した。生成物を含有する画分は~0.4M TEABで溶出される。溶媒を除去した後、生成物をHPLC精製した。HPLC条件: t<sub>r</sub>(三リン酸): 21.9分(Zorbax C-18調製用カラム、バッファーA 0.1M TEAB、バッファーB 0.1M TEAB + 30%アセトニトリル、グラジエント 35分で5-35%バッファーB)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 2.17-2.23 (m, 1H, H-2'), 2.40-2.45 (m, 1H, H-2'), 3.67 (s, 2H, H<sub>2</sub>N), 3.99 (d, J = 5.9 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.02-4.17 (m, 2H, H-5'), 4.25 (br s, 1H, H-4'), 4.32-4.33 (m, 1H, H-3'), 5.13 (d, J = 10.3 Hz, 1H, =CH<sub>2</sub>), 5.23 (d, J = 17.2 Hz, 1H, =CH<sub>2</sub>), 5.78-5.88 (m, 1H, =CH), 6.16 (t, J = 6.7 Hz, 1H, H-1'), 8.33 (s, 1H, H-6). <sup>31</sup>P NMR (161.9MHz, D<sub>2</sub>O) -21.3 (t, J = 19.5 Hz, 1P, P), -10.3 (d, J

30

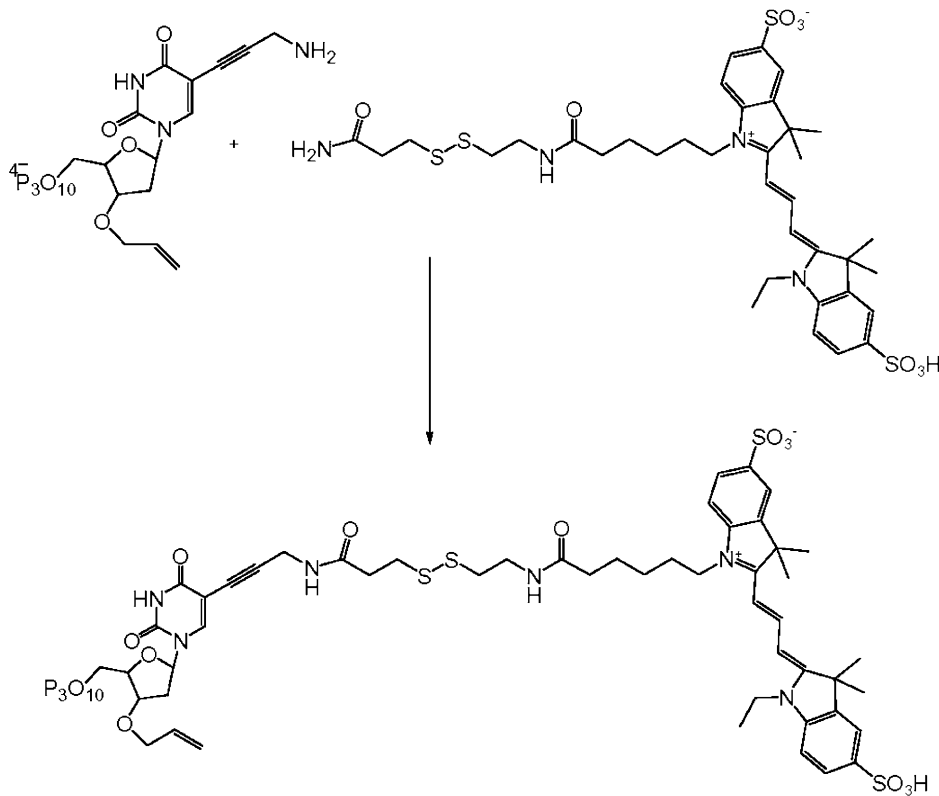
40

50

= 19 Hz, 1P, P ), -7.1 (d, J= 15.5 Hz, 1P, P ). Mass ( - v e エレクトロスプレ  
ー) C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub> に関して計算値 561.03, 測定値 560, 480  
[ M - リン酸 ], 401 [ M - 2 x リン酸 ] .

【 0 1 7 7 】

【 化 4 5 】



(38)

DMF ( 0 . 2 m l ) 中 Cy 3 ジスルフィドリンカー ( 2 . 5 マイクロモル ) の溶液に  
0 で炭酸ジサクシンイミジル ( 0 . 9 6 m g 3 . 7 5 マイクロモル ) 及び 4 - ( ジメ  
チルアミノ ) ピリジン ( DMAP ) ( 0 . 4 6 m g 3 . 7 5 マイクロモル ) を加えた。  
反応混合物を 1 0 分間攪拌し、そして次に TLC ( Me OH : DCM 3 : 7 ) で検査し  
た ( 活性化エステル  $r_f = 0 . 5$  ) 。別のフラスコで 3 ' - O - アリルチミジン三リン  
酸 ( 3 7 ) ( 5 3 2  $\mu$  l , 水中 1 4 . 1 m M , 7 . 5 マイクロモル ) を Bu<sub>3</sub>N ( 1 4 3  
 $\mu$  l ) と混合し、そして蒸発乾固した。その後、三リン酸塩 ( 3 7 ) を乾燥 DMF ( 0 .  
2 m l ) に溶解した。三リン酸塩 ( 3 7 ) 溶液に 0 で活性色素を加え、そして反応混合  
物を室温まで加温し、そして次に 1 6 時間攪拌した。溶媒を除去し、そして残渣を水に溶  
解した。反応混合物を 0 . 1 M TEAB ( 1 0 0 m l ) を用いて小型の DEAE セファ  
デックスカラム ( 2 x 5 c m ) に通してカップリング試薬及び未反応リンカー除去した。  
1 M TEAB ( 1 0 0 m l ) で三リン酸塩 ( 3 8 ) を溶出した。次いで混合物を HPLC  
により分離した。収量 : 暗赤色固体の生成物 1 . 4 1 マイクロモル ( 5 6 % ,  $M_n = 550$   
 $M_w = 150000$  ) を単離した。HPLC 条件  $t_r$  ( 3 8 ) : 1 9 . 6 分 ( Zorbax  
C - 1 8 調製用カラム、バッファー A 0 . 1 M TEAB、バッファー B アセトニト  
リル、グラジエント 2 9 分で 2 - 5 8 % バッファー B ) 。<sup>1</sup>H ( d<sub>6</sub> DMSO ) 0.75-0.79  
( m, 3H, CH<sub>3</sub> ), 1.17-1.28 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 1.48-1.55 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 1.64 ( s, 12H, 4 x C  
H<sub>3</sub> ), 1.70-1.77 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 1.96-2.02 ( m, 1H, H-2' ), 2.07-2.11 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 2.25-  
2.30 ( m, 1H, H-2' ), 2.51-2.55 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 2.64-2.68 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 2.75-2.81 ( m,  
2H, CH<sub>2</sub> ), 3.27-3.31 ( m, 2H, CH<sub>2</sub> ), 3.91-4.05 ( m, 9H, H-5', OCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>, 2 x NCH<sub>2</sub>-dy  
e ), 4.13 ( s, 1H, H-4' ), 4.22-4.24 ( m, 1H, H-3' ), 5.06 ( d, J = 10.5 Hz, 1H, = CH<sub>2</sub> )

, 5.15 (dd,  $J = 1.4$  Hz, 17.3 Hz, 1H, = CH<sub>2</sub>), 5.72-5.82 (m, 1H, = CH), 6.03-6.06 (m, 1H, H-1'), 6.20-6.29 (m, 2H, H), 7.23- 7.31 (m, 2H, H<sub>A,r</sub>), 7.63-7.79 (m, 5H, H-6, 4x H<sub>A,r</sub>), 8.31-8.45 (m, 1H, H). <sup>31</sup>P (161.9 MHz, d<sub>6</sub> DMSO) -20.2 (m, 1P, P), -10.0 (d,  $J$  18.5 Hz, 1P, P), -4.8 (d,  $J$  19.5 Hz, 1P, P). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>51</sub>H<sub>67</sub>S<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>22</sub>P<sub>3</sub> に関して計算値 1336.24, 測定値 1335.1, 688.1 [切断されたジスルフィド(色素), 647.9 [切断されたジスルフィド(ヌクレオチド)].

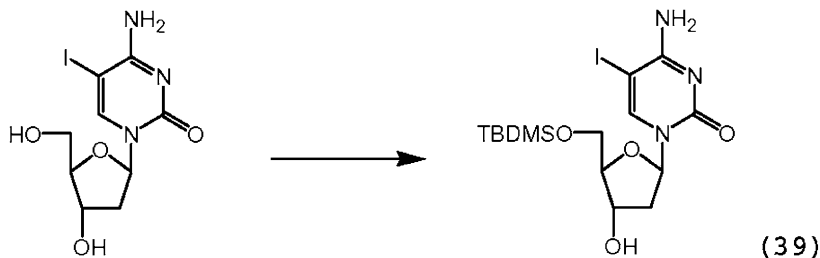
【0178】

化合物38の酵素取り込み

50 mM Tris-HCl (pH 8.8)、0.01% Tween-20 及び 4 mM MgSO<sub>4</sub> 中 100 nM DNA プライマー/鋳型(予め P32 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼで標識したプライマー)に 2 μM 化合物38 及び 100 nM ポリメラーゼ(Thermococcus 種 9° Nexo-Y409V A485L、New England Biolabs より入手)を加えた。遮断の影響を示すため、鋳型は 10 個のアデノシン塩基の並びから成る。反応物を 65 °C で 10 分間加熱する。完全な遮断を示すために、4 つの元来の遮断されていないヌクレオチド三リン酸で追跡を行う。アリル遮断の定量的な取り込みを観察することができ(図7)、そしてこれが更なる取り込みに対する有効な遮断として作用することを示すことができる。

【0179】

【化46】

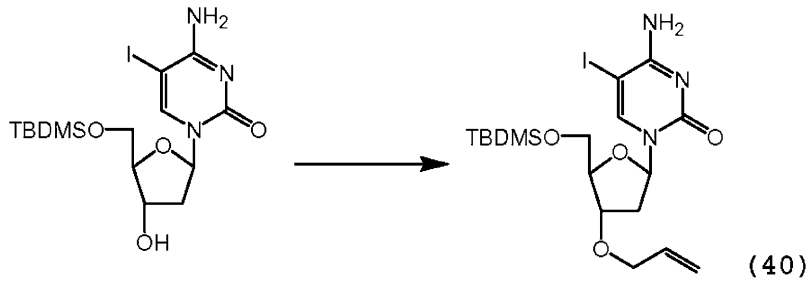


5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-5-ヨード-2'-デオキシチジン(39)

DMF (130 ml) 中 5-ヨード-2'-デオキシチジン(2.2 g, 6.23 ミリモル)の溶液にイミダゾール(467 mg, 6.85 ミリモル)を加えた。混合物を 0 °C で冷却し、そして、塩化 t-ブチルジメチルシリル(TBDMSCl)(1.33 g, 6.85 ミリモル)を 5 分間かけて加えた。室温で 18 時間の後、減圧下揮発性物質を蒸発させ、そして残渣をシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーにより EtOAc:MeOH (95:5~90:10) で精製して、予測される生成物(39)(2.10 g, 72%)が未反応出発原料(490 mg)と共に得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.90 (ddd,  $J = 13.2, 7.7$  and 5.7 Hz, 1H, HH-2'), 2.18 (ddd,  $J = 13.2, 5.7$  and 2.3 Hz, 1H, HH-2'), 3.72 (dd,  $J = 11.5, 3.6$  Hz, 1H, HH-5'), 3.80 (dd,  $J = 11.5, 2.8$  Hz, 1H, HH-5'), 3.86-3.89 (m, 1H, H-4'), 4.14-4.18 (m, 1H, H-3'), 5.22 (1H, d,  $J = 4.1$  Hz, OH), 6.09 (1H, dd,  $J = 7.8, 5.8$  Hz, H-1'), 6.60 (br s, 1H, NHH), 7.81 (br s, 1H, NHH), 7.94 (s, 1H, H-6); MS (ES) :m/z (%) (M + H) 468 (90%).

【0180】

【化 4 7】



10

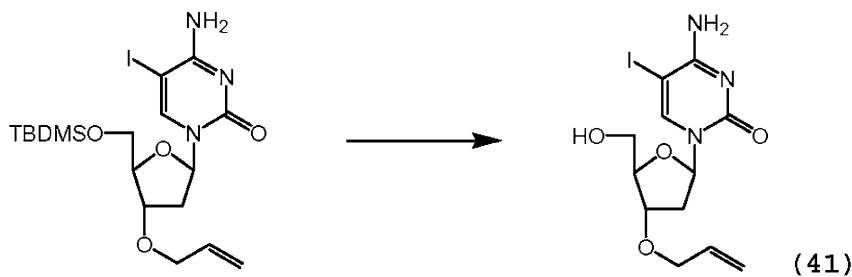
3'-O-アリル-5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-5-ヨード-2'-デオキシシチジン(40)

N<sub>2</sub> 雰囲気下、THF (26 ml) 中 NaH の溶液 (60%, 113 mg, 2.84 ミリモル) に THF (6 ml) 中 出発ヌクレオシド (39) (669 mg, 1.43 ミリモル) の溶液をゆっくりと加えた。混合物を室温で45分間攪拌し、0℃で冷却し、そして臭化アリル (134 μL, 1.58 ミリモル) をゆっくりと加えた。室温で15分後、溶液を0℃まで冷却し、H<sub>2</sub>O (5 ml) の添加により反応をクエンチした。減圧下、THF を蒸発させ、そして生成物を EtOAc (3 × 25 ml) に抽出した。有機抽出物を合わせ、乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) し、濾過し、そして減圧下揮発性物質を蒸発させて、残渣が得られ、これをシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーにより精製して無色油状の予測される3'-O-アリル生成物(40) (323 mg, 44%) がいくつかの未反応出発原料 (170 mg) と共に得られた; <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 0.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.84 (ddd, J = 13.3, 8.2 and 5.5 Hz, 1H, H-2'), 2.20-2.25 (m, 1H, H-2'), 3.62-3.72 (m, 2H, H-5'), 3.88-3.93 (m, 4H, H-3', 4', HHC-CH = ), 5.1 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 1H, CH = CHH), 5.16 (dd, J = 17.2, 1.7 Hz, 1H, CH = CHH), 5.75-5.83 (m, 1H, CH = CHH), 5.94 (dd, J = 8.4, 5.6 Hz, 1H, H-1'), 6.53 (br s, 1H, NHH), 7.74 (br s, 1H, NHH), 7.83 (s, 1H, H-6); MS (ES) :m/z (%) (M-H) 506 (100%) .

20

【 0 1 8 1】

【化 4 8】



30

3'-O-アリル-5-ヨード-2'-デオキシシチジン(41)

40

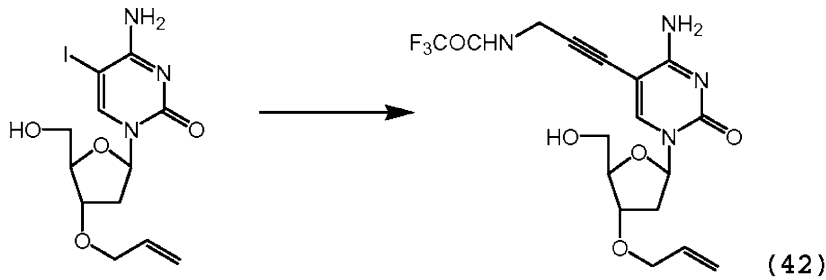
N<sub>2</sub> 保護雰囲気下、THF (15 ml) 中 出発ヌクレオシド (40) (323 mg, 0.64 ミリモル) の溶液に室温で THF 中 1 M フッ化テトラブチルアンモニウム (TBAF) (0.7 ml, 0.7 ミリモル) を加えた。混合物を1時間攪拌し、そして次に H<sub>2</sub>O (5 ml) の添加により反応をクエンチした。THF を蒸発させ、そして水性残渣を EtOAc (3 × 25 ml) に抽出した。有機層を合わせて乾燥 (MgSO<sub>4</sub>) し、濾過し、そして減圧下揮発性物質を蒸発させて粗製物質が得られ、これをプレパック式シリカカラムのフラッシュクロマトグラフィーにより、EtOAc で溶出して精製した。生成物 (41) が白色固体として得られた (233 mg, 93%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 1.96-2.05 (m, 1H, H-2') 2.24 (ddd, J = 13.5, 5.8 and 2.8 Hz, 1H, H-2'), 3.50-3.62 (m, 2H, H5'), 3.91-3.97 (m, 2H, H3', H4'), 4.03-4.07 (m, 2H, HHC-CH = ), 5.11-5.16 (

50

m, 2H, OH, CH = CHH), 5.24 (dd, J = 17.2, 1.6 Hz, 1H, CH = CHH), 5.82-5.91 (m, 1H, CH = CHH), 6.02 (dd, J = 7.6, 6.0 Hz, 1H, H-1'), 6.60 (s, 1H, NHH), 7.79 (s, 1H, NHH), 8.21 (s, 1H, H-6). MS(ES) :m/z (%) (M-H) 392 (100%).

【 0 1 8 2 】

【 化 4 9 】



10

3'-O-アリル-5-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシシチジン(42)

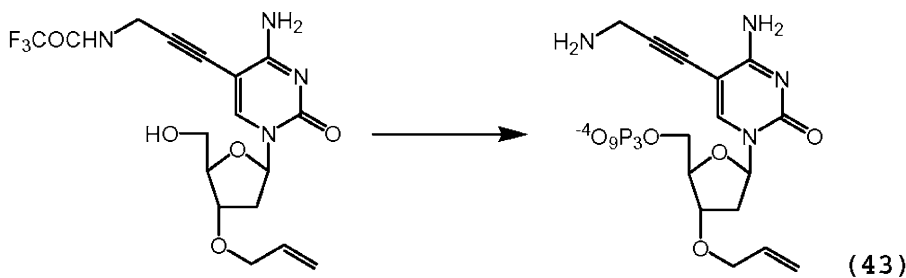
乾燥DMF(8.5ml)中出発ヌクレオシド(41)(200mg, 0.51ミリモル)の溶液に室温及びアルゴン雰囲気下でCuI(19mg, 0.10ミリモル)、NEt<sub>3</sub>(148μl, 1.02ミリモル)、2,2,2-トリフルオロ-N-プロパ-2-イニル-アセトアミド(230mg, 1.53ミリモル)及びPd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(58mg, 0.05ミリモル)をゆっくりと加えた。混合物を室温で攪拌し、そして4時間遮光し、重炭酸dowexを添加して反応をクエンチし、そして1時間攪拌し、次いで濾過し、そして減圧下揮発性物質を蒸発させた。残渣をを更にMeOH(15ml)から蒸発させ、そして次にシリカゲルのクロマトグラフィーにより精製した(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc 1:1、EtOAc:MeOH 97.5:2.5)。予測される生成物(42)がベージュ色の固体として得られた(180mg, 85%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 1.90 (ddd, J = 13.6, 7.7 and 6.0 Hz, 1H, H-2'), 2.16 (ddd, J = 13.6, 5.7 and 2.4 Hz, 1H, H-2'), 3.42-3.50 (m, 2H, H-5'), 3.84-3.87 (m, 3H, H-4', OHHC-CH = ), 3.94-3.96 (m, 1H, H-3'), 4.16 (d, J = 5.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C-N), 4.98-5.05 (m, 2H, OH, CH = CHH), 5.14 (dd, J = 17.3, 1.7 Hz, 1H, CH = CHH), 5.72-5.82 (m, 1H, CH = CHH), 5.95 (dd, J = 7.7, 5.8 Hz, 1H, H-1'), 6.74 (br s, 1H, NHH), 7.72 (br s, 1H, NHH), 8.01 (1H, s, H-6), 9.82 (br t, 1H, HN-CH<sub>2</sub>)。MS (ES) :m/z (%) (M-H) 415 (100%)。

20

30

【 0 1 8 3 】

【 化 5 0 】



40

3'-O-アリル-5-(3-アミノ-プロパ-1-イニル)-5'-O-三リン酸-2'-デオキシシチジン(43)

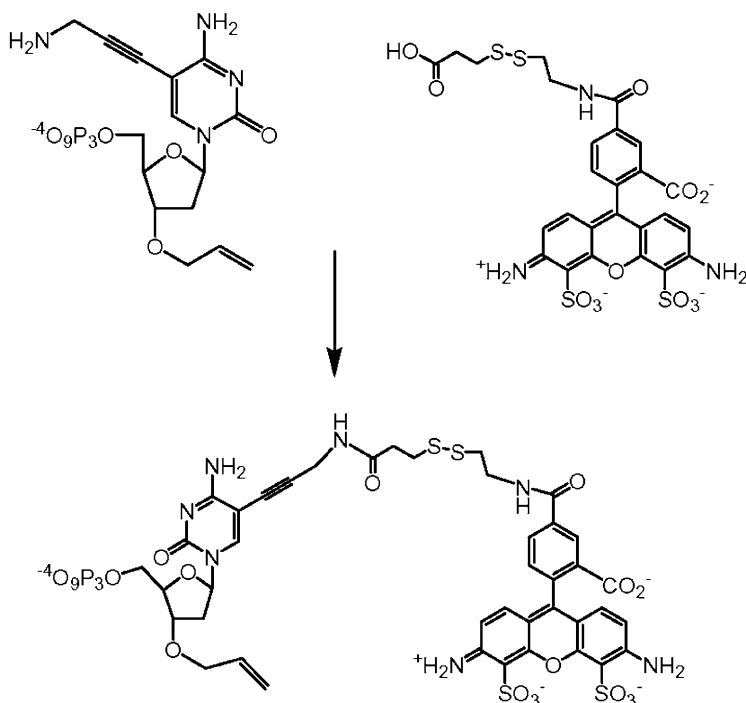
アルゴン雰囲気下で、PO(OMe)<sub>3</sub>(360μl)中ヌクレオシド(24)(170mg, 0.41ミリモル)及びプロトンスポンジ(105mg, 0.50ミリモル)(双方共に予めP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で少なくとも24時間乾燥した)の溶液に0 でPOCl<sub>3</sub>(新たに蒸留した)(50μl, 0.54ミリモル)をゆっくりと加えた。溶液を0 で3時

50

間激しく攪拌し、そして次にDMF中0.5M テトラトリブチルアンモニウム ニリン酸(3.20ml, 1.60ミリモル)、続いてnBu<sub>3</sub>N(0.75ml, 3.2ミリモル)及び0.1M 重炭酸トリエチルアンモニウム(TEAB)(12ml)の添加によりクエンチした。混合物を室温で3時間攪拌し、そして次にアンモニア水溶液(0.88 1.0ml)(12ml)を加えた。溶液を室温で15時間攪拌し、減圧下揮発性物質を蒸発させ、そして残渣をMPLCにより、0.05Mから0.7M TEABのグラジエントで精製した。予測される三リン酸塩(43)をおよそ0.51M TEABでカラムから溶出した。Zorbax SB-C18調製用カラム(内径21.2mm×25cm)のHPLCにより、以下のグラジエント: 0~5分 5%B, .2ml; 5~25分 80%B, .8ml; 25~27分 95%B, .8ml; 27~30分 95%B, .8ml; 30~32分 5%B, .8ml; 32~35分 95%B, .2mlを用いて0.1M TEAB(ポンプA)及び0.1M TEAB中30%CH<sub>3</sub>CN(ポンプB)で溶出して第2の精製を行い、t<sub>r</sub>(43): 20.5(20マイクロモル, 収率 5%)の前記で詳記した生成物(43)が得られた; <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O) -6.01 (d, J = 19.9 Hz, 1P, P ), -10.24 (d, J = 19.3 Hz, 1P, P ), -21.00 (t, J = 19.6 Hz, 1P, P ); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 2.19-2.26 (m, 1H, H-2'), 2.51 (1H, ddd, J = 14.2, 6.1 and 3.2 Hz, H-2'), 3.96-4.07 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OHHC-CH = ), 4.09-4.14 (m, 1H, H-5') 4.22-4.26 (m, 1H, H-5'), 4.30-4.37 (m, 2H, H-3', 4'), 5.20 (d, J = 10.4 Hz, 1H, CH = CHH), 5.30 (1H, dd, J = 17.3, 1.5 Hz, CH = CHH), 5.85-5.95 (m, 1H, CH = CHH), 6.18 (t, J = 6.5 Hz, 1H, H-1'), 8.40(s, 1H, H-6); MS (ES) :m/z (%) (M-H ) 559 (100%) .

【0184】

【化51】



(44)

DMF(500μl)中Alexa Fluor 488ジスルフィドリンカー(2.37mg, 3.4マイクロモル)の溶液に炭酸N,N-ジサクシイミジル(1.3mg, 5.1マイクロモル)及び4-DMAP(0.6mg, 5.1マイクロモル)を加えた。混合物を10分間攪拌し、次いでこれをnBu<sub>3</sub>N(30μl)含有DMF(100μl)中ヌクレオチド(43)の溶液(3.23mg, 5.8マイクロモル)に加えた。混合物を室温で連続的に16時間攪拌した。減圧下、揮発性物質を蒸発させ、そして残渣を

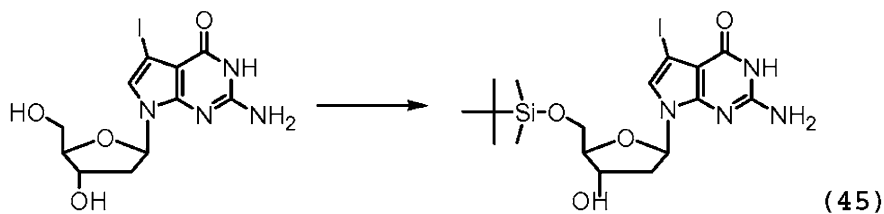
最初に短いイオン交換樹脂セファデックスDEAE A-25(40-120 $\mu$ )-カラムを通し、最初に0.1M TEAB(70ml)次いで1.0M TEAB(100ml)で溶出して精製した。予測される生成物(44)を含有する最終画分を濃縮し、そして残渣をZorbax SB-C18カラム(内径21.2mm $\times$ 25cm)で0.1M TEAB(ポンプA)及びCH<sub>3</sub>CN(ポンプB)で以下のグラジエント:0~2分2%B, .2ml;2~4分2%B, .8ml;4~15分23%B, .8ml;15~24分23%B, .8ml;24~26分95%B, .8ml;26~28分95%B, .8ml、28~30分2%B, .8ml,30~33分2%B, .2mlを用いて溶出してHPLC精製し、 $r_t$ (44):19.9(0.56マイクロモル,UV測定に基づいた収率17%;H<sub>2</sub>O中 $m_{max}$ =493nm,71,000cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>)の前記で詳記した生成物が得られた;<sup>31</sup>P NMR(D<sub>2</sub>O)-5.07(d, J=22.2 Hz, 1P, P<sub>c</sub>), -10.26(d, J=19.4 Hz, 1P, P<sub>c</sub>), -21.09(t, J=19.7 Hz, 1P, P<sub>c</sub>);<sup>1</sup>H NMR(D<sub>2</sub>O) 2.44-2.26(m, 2H, HH-2'), 2.50(t, J=6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.83(4H, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>), 3.58(t, J=6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.07-3.91(m, 6H, HH-5', NCH<sub>2</sub>, OHHC-CH=), 4.16-4.12(m, 1H, H-4'), 4.23-4.17(m, 1H, H-3'), 5.24-5.09(m, 2H, CH=CHH, CH=CHH), 5.84-5.74(m, 1H, CH=CHH), 5.98(t, J=8.1 Hz, 1H, H-1'), 6.79(d, J=9.1 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 6.80(d, J=9.3 Hz, 1H, H<sub>A,r</sub>), 7.06(t, J=8.8 Hz, 2H, H<sub>A,r</sub>), 7.55(br s, 1H, H<sub>A,r</sub>), 7.90-7.85(m, 2H, H<sub>A,r</sub>), 7.94(s, 1H, H-6); MS(ES):m/z(%) (M-H)<sup>-</sup> 1239(27%) .

10

【0185】

20

【化52】



5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-7-デアザ-7-ヨード-2'-デオキシグアノシン(45)

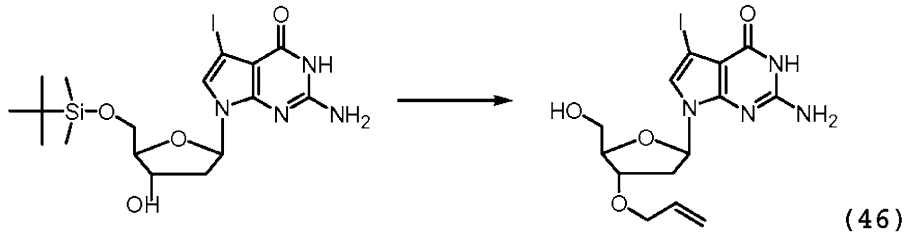
30

DMF(10ml)中(44)の溶液(0.55g, 1.4ミリモル)をイミダゾール(190mg, 2.8ミリモル)及びTBDMSCl(274mg, 1.82ミリモル)と室温で15分間処理した。反応をMeOH(~5ml)でクエンチした。混合物を蒸発乾固した。水(~300ml)を残渣に加え、そして少なくとも1時間攪拌してイミダゾールを完全に溶解した。濾過により褐色の固体が得られ、これを乾燥し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し(DCMからDCM:MeOH 90:10)、淡黄色粉末として(45)が得られた(394mg, 56%)。<sup>1</sup>H NMR(d<sub>6</sub> DMSO) 0.00, 0.01(2s, 6H, CH<sub>3</sub>), 0.82(s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.99-2.05, 2.16-2.22(2m, 2H, H-2'), 3.58-3.66(m, 2H, H-5'), 3.72-3.74(m, 1H, H-4'), 4.18-4.19(m, 1H, H-3'), 5.16(d, J=3.0 Hz, 1H, OH), 6.20(dd, J=6.0, 8.0 Hz, 1H, H-1'), 6.25(br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.58(s, 1H, H-8), 10.37(s, 1H, HN). Mass(-ve エレクトロスプレー) C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>I N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Siに関して計算値506, 測定値505.

40

【0186】

## 【化53】

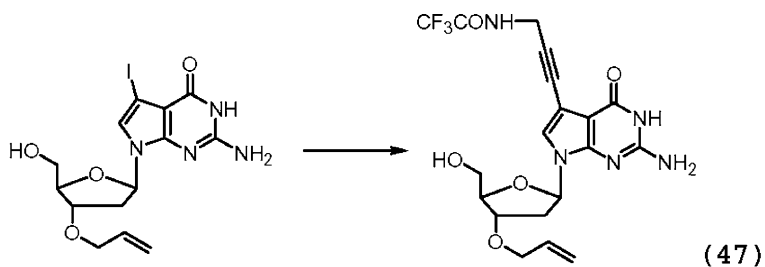


3'-O-アリル-5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-7-デアザ-7-ヨード-2'-デオキシグアノシン(46) 10

THF(25ml)中(45)の溶液(354mg, 0.7ミリモル)をNaH(42mg, 1.75ミリモル)と室温で1時間反応させた。臭化アリルを加え、懸濁液を室温で2日間攪拌した。~60%出発原料(45)を生成物(46)に変換した。飽和NaCl水溶液で反応をクエンチし、そしてDCMで3回抽出した。有機層を合わせ、乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、そして真空下濃縮した。残渣をTHF(1ml)中TBAF及びTHF(1ml)と30分間処理した。THFを蒸発させて除去した。残渣をDCMに溶解し、そしてNaHCO<sub>3</sub>(飽和)水溶液を加えた。水層をDCMで3回抽出した。有機層を合わせ、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥し、そして真空下濃縮した。シリカのクロマトグラフィーによる精製(EtOAcからEtOAc:MeOH 85:15)で黄色泡状の(46)が得られた(101mg, 35%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.15-2.31 (m, 2H, H-2'), 3.41-3.45 (m, 2H, H-5'), 3.82-3.85 (m, 1H, H-4'), 3.93 (d, J = 2.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.04-4.06 (m, 1H, H-3'), 4.99 (t, J = 5.4 Hz, OH), 5.08-5.24 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>), 5.79-5.89 (m, 1H, CH=), 6.15 (dd, J = 5.9, 9.1 Hz, 1H, H-1'), 6.27 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.07 (s, H-8), 10.39 (s, 1H, NH). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>IN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> に関して計算値432, 測定値431. 20

【0187】

## 【化54】



3'-O-アリル-5'-O-(t-ブチルジメチルシリル)-7-デアザ-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-プロパ-1-イニル]-2'-デオキシグアノシン(47) 30

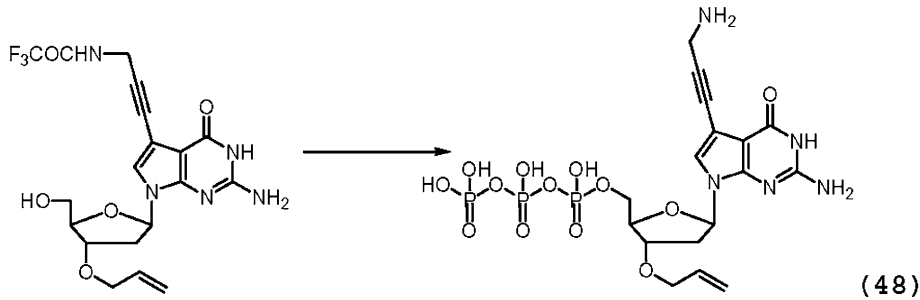
N<sub>2</sub>下、DMF(2ml)中(46)(104mg, 0.24ミリモル)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(24mg, 0.024ミリモル)、CuI(9.1mg, 0.048ミリモル)、Et<sub>3</sub>N(66μl, 0.48ミリモル)及びCH<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>NHCOCF<sub>3</sub>(89μl, 0.72ミリモル)の懸濁液を室温で15時間攪拌した。アルミ箔で反応物を遮光した。TLCが出発物質の完全な消費を示した後、反応混合物を濃縮した。残渣をMeOH(20ml)で希釈し、そしてdowex-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>で処理した。混合物を30分間攪拌し、そして濾過した。溶液を濃縮し、シリカゲルのクロマトグラフィー(石油エーテル:EtOAc 50:50から石油エーテル:EtOAc:MeOH 40:40:20)により精製し、黄色粉末として(47)が得られた(74mg, 70%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.15-2.39 (m, 2H, H-2'), 3.42-3.44 (m, 2H, H-5'), 3.83-3.87 (m, 1H, H 40

50

-4'), 3.93-3.95 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.0-4.07 (m, 1H, H-3'), 4.15 (d, J = 5.3 Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>), 4.91 (t, J = 5.4 Hz, OH), 5.08-5.24 (m, 2H, = CH<sub>2</sub>), 5.80-5.89 (m, 1H, CH = ), 6.15 (dd, J = 5.6, 8.9 Hz, 1H, H-1'), 6.28 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.24 (s, H-8), 9.98 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH), 10.44 (s, 1H, NH). Mass ( - v e エレクトロスプレー ) C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> に関して計算値 455, 測定値 454.

【0188】

【化55】



10

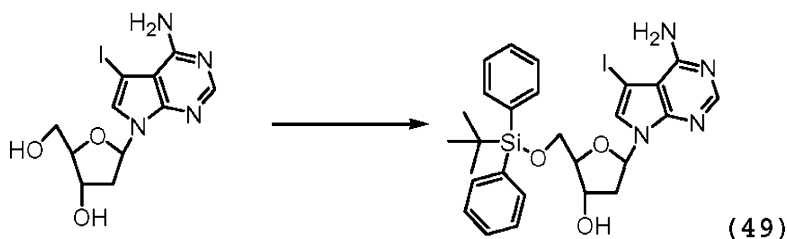
ヌクレオシド(47)及びプロトンスポンジを P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 上で 24 時間乾燥した。リン酸トリメチル(0.5 ml)、(47)(73 mg, 0.16 ミリモル)及びプロトンスポンジ(69 mg, 0.32 ミリモル)を 4 モレキュラーシーブで 1 時間攪拌した。新たに蒸留した POC<sub>l</sub><sub>3</sub>(18 μl, 0.19 ミリモル)を加え、そして溶液を 4 で 2 時間攪拌した。混合物をゆっくりと室温まで加温し、そしてビス(トリ-n-ブチルアンモニウム)ピロリン酸(1.3 ml, 0.88 ミリモル)及び無水トリ-n-ブチルアミン(0.3 ml, 1.28 ミリモル)を加えた。5 分後、0.1 M TEAB(重炭酸トリエチルアンモニウム)バッファー(10 ml)で反応をクエンチし、そして 3 時間攪拌した。減圧下、水を除去し、そして得られた残渣を濃アンモニア(0.88, 10 ml)に溶解し、そして室温で 16 時間攪拌した。次いで反応混合物を蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そして溶液を DEAE-セファデックス A-25 カラムに適用した。0.05 M 及び 1 M TEAB、各 2 l の直線グラジエントで MPLC を実施した。三リン酸塩を 0.7 M と 0.8 M バッファーの間で溶出した。生成物を含む画分を合わせ、そして蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、更に HPLC で精製した。t<sub>r</sub>(48): 20.3 分(Zorbax C-18 調製用カラム、グラジエント 30 分で 5-35% B、バッファー A 0.1 M TEAB、バッファー B MeCN)。生成物(48)を白色泡状物として単離した(147 O.D., 19.3 マイクロモル, 12%, <sub>260</sub> = 7, 600)。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) 2.38-2.46 (m, 2H, H-2'), 3.91 (m, 2H, CCH<sub>2</sub>), 3.98-4.07 (m, 4H, H-5', 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.25 (br s, 1H, H-4'), 4.40 (brs, 1H, H-3'), 5.16-5.30 (m, 1H, = CH<sub>2</sub>), 5.83-5.91 (m, 1H, = CH), 6.23-6.27 (m, 1H, H-1'), 7.44 (s, 1H, H-8)。<sup>31</sup>P NMR -7.1 (d, J = 16.5 Hz, 1P, P), -10.1 (d, J = 19.9 Hz, 1P, P), -21.5 (t, J = 18.0 Hz, 1P, P)。Mass ( - v e エレクトロスプレー ) C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub> に関して計算値 599, 測定値 598.

20

30

【0189】

【化56】



40

7-デアザ-5'-O-ジフェニルシリル-7-ヨード-2'-デオキシアデノシン(

50

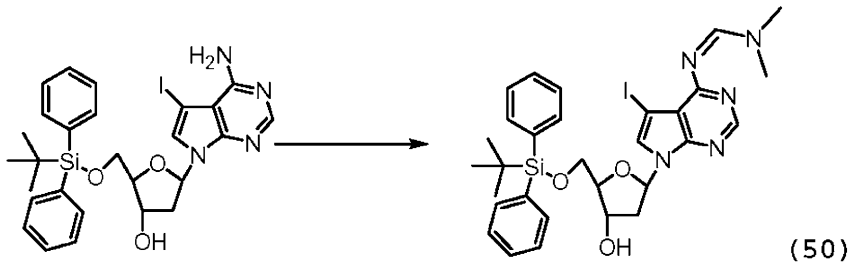
49)

TBDPSCl (0.87 g, 2.78ミリモル)を乾燥ピリジン(19 ml)中7-デアザ-7-ヨード-2'-デオキシアデノシン(1.05 g, 2.78ミリモル)の攪拌溶液にN<sub>2</sub>下5 で加えた。10分後、溶液を室温まで上昇させ、そして18時間攪拌した。溶液を減圧下蒸発させ、そして残渣をシリカのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した(DCMからDCM:MeOH 19:1)。これにより所望の生成物(49)が得られた(1.6 g, 83%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 1.07 (s, 9H), 2.31-2.36 (m, 1H), 3.76-3.80 (dd, 1H, J = 11.1, 4.7Hz), 3.88-3.92 (dd, 1H, J = 11.2, 3.9 Hz), 3.97-4.00 (m, 1H), 4.49-4.50 (m, 1H), 5.83 (s, 1H), 6.58-6.61 (t, 1H, J = 6.7 Hz), 7.44-7.55 (m, 6H), 7.68-7.70 (m, 5H), 8.28 (s, 1H)。Mass (エレクトロスプレー) C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>IN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Si に関して計算値 614.12, 測定値 613.

10

【0190】

【化57】



20

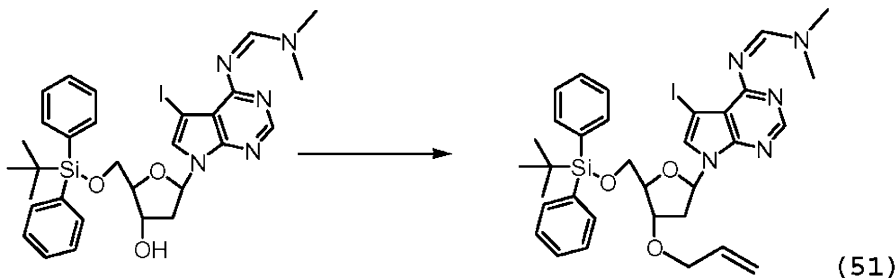
7-デアザ-6-N,N-ジメチルホルマジン-5'-O-ジフェニルシリル-7-ヨード-2'-デオキシアデノシン(50)

ジメチルホルムアミドジメチルアセタール(6.3 g, 53ミリモル)含有MeOH(70 ml)中(49)の溶液(1.6 g, 2.61ミリモル)を45 で18時間加熱した。溶液を冷却し、減圧下蒸発させ、そしてシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した(EtOAcからEtOAc:MeOH 98:2)。これにより望ましい生成物(50) 1.52 g (87%)が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 0.85 (s, 9H), 2.05-2.11 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 3.53-3.57 (dd, 1H, J = 11.1, 4.8 Hz), 3.65-3.69 (dd, 1H, J = 11.1, 4 Hz), 3.73-3.76 (q, 1H, J = 4 Hz), 4.26-4.28 (m, 1H), 5.21-5.22 (d, 1H, J = 4.3 Hz), 6.39-6.42 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 7.21-7.32 (m, 6H), 7.46 (s, 1H), 7.45-7.48 (m, 4H), 8.15 (s, 1H), 8.68 (s, 1H)。Mass (+ve エレクトロスプレー) C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Si に関して計算値 669.16, 測定値 670.

30

【0191】

【化58】



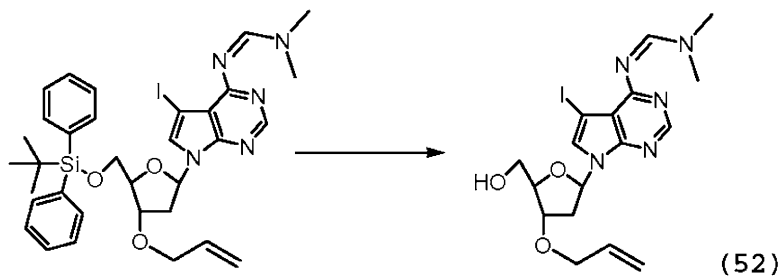
40

3'-O-アリル-7-デアザ-6-N,N-ジメチルホルマジン-5'-O-ジフェニルシリル-7-ヨード-2'-デオキシアデノシン(51)

乾燥THF(5 ml)中(50)の溶液(1.52 g, 2.28ミリモル)を乾燥THF(35 ml)中水素化ナトリウムの攪拌懸濁液(60%, 109 mg, 2.73ミリモ

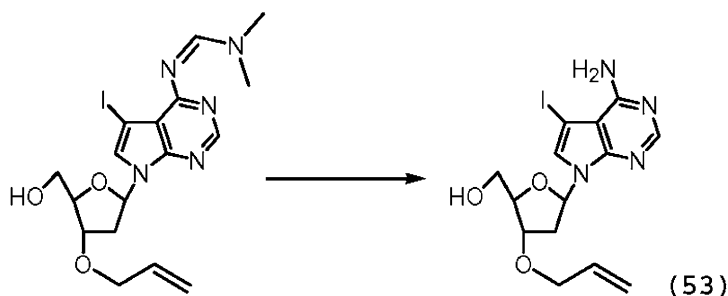
50

ル)に室温で滴下した。45分後、黄色の溶液を5℃まで冷却し、そして臭化アリル(0.413g, 3.41ミリモル)を加えた。溶液を室温まで上昇させ、そして18時間攪拌した。イソプロパノール(10滴)を加えた後、溶液を水(5ml)及びEtOAc(50ml)間で分配した。有機層を分離し、そして水溶液を更にEtOAc(2x50ml)で抽出した。合わせた有機溶液を乾燥(MgSO<sub>4</sub>)し、そして減圧下蒸発させた。残渣をシリカのフラッシュクロマトグラフィーにより精製し(石油エーテル:EtOAc 1:3からEtOAc)、ゴム状の所望の生成物(51)1.2g(74%)が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 1.03 (s, 9H), 2.39-2.45 (m, 1H), 2.60-2.67 (m, 1H), 3.2 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.70-3.74 (dd, 1H, J = 11.2, 4.6 Hz), 3.83-3.87 (dd, 1H, J = 11, 5.4 Hz), 4.03-4.08 (m, 3H), 4.30-4.31 (m, 1H), 5.18-5.21 (m, 1H), 5.28-5.33 (m, 1H), 5.89-5.98 (m, 1H), 6.49-6.53 (dd, 1H, J = 8.4, 5.8 Hz), 7.41-7.51 (m, 6H), 7.62-7.66 (m, 5H), 8.31 (s, 1H), 8.85 (s, 1H). Mass (+ve エレクトロスプレー) C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Si に関して計算値 709.19, 測定値 710. 【0192】 【化59】



3'-O-アリル-7-デアザ-6-N,N-ジメチルホルマジン-7-ヨード-2'-デオキシアデノシン(52)

THF中1M TBAF溶液(4.4ml, 4.4ミリモル)をTHF(100ml)中(51)の溶液(1.2g, 1.69ミリモル)にN<sub>2</sub>下、5℃で加えた。溶液を室温まで上昇させ、そして2日間攪拌した。溶液を減圧下蒸発させ、そしてシリカのフラッシュクロマトグラフィーにより精製した(EtOAcからEtOAc:MeOH 97:3)。これにより所望の生成物(52)593mg(77%)が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.54 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.72-3.8 (m, 2H), 4.18-4.21 (m, 1H), 4.23-4.27 (m, 3H), 4.4-4.42 (d, 1H, J = 5.7 Hz), 5.35-5.41 (m, 2H), 5.49-5.5 (q, 1H, J = 1.7 Hz), 5.53-5.55 (q, 1H, J = 1.7 Hz), 6.1-6.2 (m, 1H), 6.67-6.70 (dd, 1H, J = 8.8, 5.5 Hz), 7.96 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 9.06 (s, 1H). Mass (+ve エレクトロスプレー) C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> に関して計算値 471.08, 測定値 472. 【0193】 【化60】



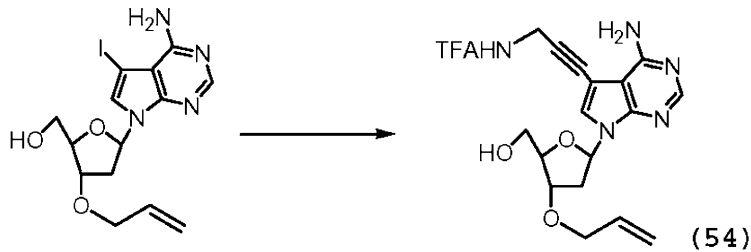
3'-O-アリル-7-デアザ-7-ヨード-2'-デオキシアデノシン(53)

35%アンモニア水(20ml)含有MeOH(20ml)中(52)の溶液(593mg) 50

mg, 1.3ミリモル)を50 で2日間加熱した。冷却後、溶液を減圧下蒸発させ、そして次にトルエン(3×10ml)で共沸した。これにより固体の所望の生成物(53) 530mg(98%)が得られた。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.39 (m, 1H), 3.56-3.65 (m, 2H), 4.03-4.05 (m, 1H), 4.09-4.11 (m, 2H), 5.23-5.25 (d, 1H, J = 10.6 Hz), 5.35-5.4 (d, 1H, J = 15.4 Hz), 5.95-6.05 (m, 1H), 6.48-6.51 (dd, 1H, J = 8.9, 5.5 Hz), 6.6-6.95 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 8.16 (s, 1H). Mass (+ve エレクトロスプレー) C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>IN<sub>4</sub>O<sub>3</sub> に関して計算値 416.03, 測定値 417.

【0194】

【化61】



10

3'-O-アリル-7-デアザ-7-[3-(2,2,2-トリフルオロアセトアミド)]-2'-デオキシアデノシン(54)

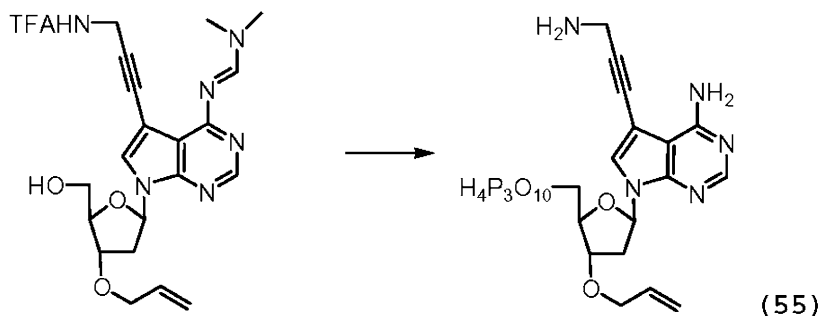
20

乾燥DMF(17ml)中(53)の溶液(494mg, 1.19ミリモル)にヨウ化銅(I)(45.1mg, 0.24ミリモル)、N-2,2,2-トリフルオロ-N-プロパ-2-イニルアセトアミド(538mg, 3.56ミリモル)、Et<sub>3</sub>N(240mg, 2.38ミリモル)及びPd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>(137mg, 0.12ミリモル)を室温で順に加えた。フラスコをホイルで包んで遮光し、そしてN<sub>2</sub>下18時間攪拌した。MeOH(10ml)及び小スパーテル1杯の重炭酸dowex H<sup>+</sup>形態を加え、そして混合物を30分間攪拌した。混合物を濾過し、減圧下蒸発させ、そして残渣をMeOHで粉砕してパラジウム塩を除去した。濾液を減圧下蒸発させ、そしてシリカのフラッシュクロマトグラフィー(DCMからDCM:MeOH 97:3)により精製した。所望の生成物(54)が褐色固体として得られた(490mg, 94%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub> DMSO) 2.25-2.31 (m, 1H), 2.98-3.04 (m, 1H), 3.41-3.49 (m, 2H), 3.88-3.95 (m, 3H), 4.10-4.12 (d, 1H, J = 5.2 Hz), 4.22-4.23 (d, 2H, J = 5.3 Hz), 5.07-5.12 (m, 2H), 5.19-5.24 (dd, 1H, J = 17.3, 1.9 Hz), 5.79-5.89 (m, 1H), 6.31-6.35 (dd, 1H, J = 8.6, 5.6 Hz), 7.69 (s, 1H), 8.02 (s, 1H). Mass (-ve エレクトロスプレー) C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> に関して計算値 439.15, 測定値 438.

30

【0195】

【化62】



40

3'-O-アリル-7-[3-アミノプロパ-1-イニル]-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン 5'-O-ヌクレオシド三リン酸(55)

ヌクレオシド(54)及びプロトンスポンジをP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上で真空下で一晩乾燥した。リ

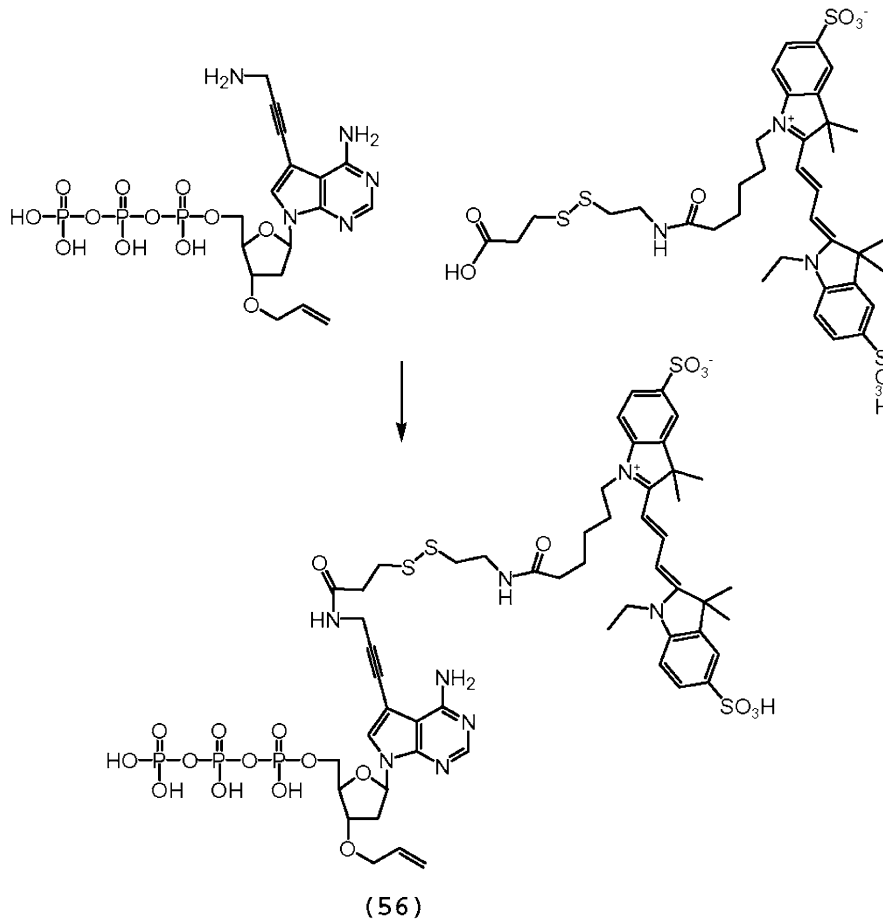
50

ン酸トリメチル (600  $\mu$ l) 中 (54) の溶液 (84 mg, 0.191 ミリモル) 及び  
 プロトンスポンジ (49 mg, 0.382 ミリモル) の溶液を 4 モレキュラーシーブで  
 1 時間攪拌した。新たに蒸留した  $\text{POCl}_3$  (36  $\mu$ l, 0.388 ミリモル) を加え、  
 そして溶液を 4 で 2 時間攪拌した。混合物を室温までゆっくりと加温し、そして DMF  
 中 0.5 M ビス(トリ-n-ブチルアンモニウム)ピロリン酸の溶液 (1.52 ml,  
 0.764 ミリモル) 及び無水トリ-n-ブチルアミン (364  $\mu$ l, 1.52 ミリモル)  
 ) を加えた。5 分後、0.1 M TEAB (重炭酸トリエチルアンモニウム) バッファー  
 (5 ml) で反応をクエンチし、そして 3 時間攪拌した。減圧下水を除去し、そして得ら  
 れた残渣を濃アンモニア (0.88, 5 ml) に溶解し、そして室温で 16 時間攪拌した。次いで反応混合物を蒸発乾固した。残渣を水に溶解し、そして溶液を DEAE-セフ  
 アデックス A-25 カラムに適用した。0.05 M から 1 M TEAB の直線グラジ  
 エントで MPLC を実施した。生成物を含有する画分を合わせ、そして蒸発乾固した。残  
 渣を水に溶解し、そして HPLC で更に精製した。HPLC:  $t_r$  (55) = : 22.6  
 0 分 (Zorbax C18 調製用カラム, グラジエント: 20 分で 5% ~ 35% B,  
 バッファー A 0.1 M TEAB, バッファー B MeCN) 生成物を白色泡状物として  
 単離した (17.5 マイクロモル, 5.9%,  $\lambda_{280} = 15000$ )。 $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )

2.67-2.84 (2m, 2H, H-2'), 4.14 (br s, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.17-4.36 (m, 2H, H-5'), 4.  
 52 (br s, 1H, H-4'), 6.73 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H-1'), 8.06 (s, 1H, H-8), 8.19 (s,  
 1H, H-2)。 $^{31}\text{P NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) -5.07 (d,  $J = 21.8$  Hz, 1P, P), -10.19 (d,  $J = 19.8$   
 Hz, 1P, P), -21.32 (t,  $J = 19.8$  Hz, 1P, P)。Mass (-ve エレクトロスプレー)  
 $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{P}_3$  に関して計算値 598.05, 測定値 596

【0196】

【化63】



DMF (450  $\mu$ l) 中 Cy3 ジスルフィドリンカー (2.6 マイクロモル) の溶液に

DMF中1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物及びN-メチルモルホリン(各26 $\mu$ M)の混合物100 $\mu$ lを0で加える。反応混合物を室温で1時間攪拌した。全ての色素リンカーが消費されるまでTLC(MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:6)により反応をモニターした。次いでDMF(400 $\mu$ l)を0で加え、続いてヌクレオチド(55)(3.9マイクロモル)を水溶液(100 $\mu$ l)で加え、そして反応混合物を室温で一晩攪拌した。TLC(MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 4:6)により活性化されたエステルの完全な消費が示され、そしてベースラインに暗赤色スポットが現れた。TEABバッファー(0.1M, 10ml)により反応をクエンチし、そしてDEAEセファデックスカラム(2x5cm)に負荷した。カラムを最初に0.1M TEABバッファー(100ml)で溶出し、そして有機残渣を洗い流し、そして次に1M TEABバッファー(100ml)で溶出した。望ましい三リン酸塩(56)が1M TEABバッファーで溶出された。生成物を含有する画分を合わせ、蒸発させ、そしてHPLCにより精製した。HPLC条件: t<sub>r</sub>(56): 21.38分(Zorbax C18調製用カラム, グラジエント: 1分で5%~15%B、次いで4分で15%B、次いで15分で15%~35%B, バッファーA 0.1M TEAB, バッファーB MeCN)。生成物を暗桃色固体として単離した(0.15マイクロモル, 12.5%,  $\epsilon_{550} = 15000$ )。<sup>1</sup>H NMR(D<sub>2</sub>O) 2.03(t, J = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.21-2.33(m, 1H, H-2'), 2.37-2.49(m, 1H, H-2'), 2.50(t, J = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.66(t, J = 5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.79(t, J = 6.4 Hz, 2H CH<sub>2</sub>), 3.99(m, 4H, CH<sub>2</sub>N, H-5'), 4.18(br s, 1H, H-4'), 6.02, 6.17(2d, J = 13.6 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.30(dd, J = 6.1, 8.6 Hz, H-1'), 7.08, 7.22(2d, J = 7.8, 8.6 Hz, 2H, 2x = CH), 7.58-7.82(m, 6H, 2H<sub>ar</sub>, H-2, H-8), 8.29(t, J = 13.6Hz, = CH)。<sup>31</sup>P NMR(D<sub>2</sub>O) -4.83(m, 1P, P), -10.06(m, 1P, P), -20.72(m, 1P, P)。

10

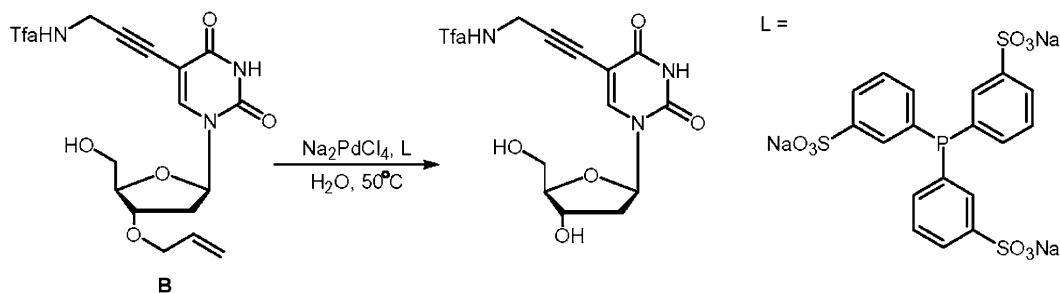
20

## 【0197】

水性条件での3'-アリル基の切断

以下は3'遮断されたヌクレオチドのための典型的な遮断手順を示し、ここでNa<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>およそ0.5当量及び水溶性ホスフィンリガンドL 4当量を水中、50で用いた。Tfaはトリフルオロアセチルを意味する:

## 【化64】



30

## 【0198】

エップンドルフバイアル内で、脱気した水(225 $\mu$ l)中リガンドL(7.8mg, 13.7マイクロモル)の溶液に脱気した水(25 $\mu$ l)中Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>(0.5mg, 1.6マイクロモル)の溶液を加えた。2つの溶液を十分に混合し、そして5分後、H<sub>2</sub>O(250 $\mu$ l)中Bの溶液(1mg, 2.3マイクロモル)を加えた。次いで反応混合物を50の加熱ブロックに置いた。反応をHPLCで追跡できた。反応混合物から50 $\mu$ lのアリコートを取り、エップンドルフフィルターバイアル(多孔性0.2 $\mu$ m)を通して濾過し; 溶液22 $\mu$ lをHPLCに注入して反応をモニターした。HPLCにより反応物を精製した。典型的な実験では、切断は終了した(すなわち30分後に>98%の切断が生じた)。

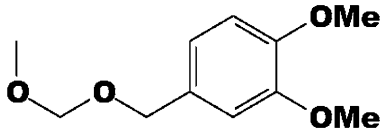
40

## 【0199】

ヘミアセタールの保護形態としての3,4ジメトキシベンジルオキシメチル基での3'-OH保護:

50

## 【化 6 5】

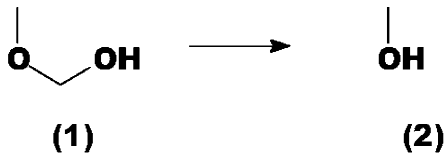


## 【0200】

この遮断基を担持するヌクレオチドはアリルの実例に類似する特性を有するが、取り込みはあまり迅速ではない。硝酸セリウムアンモニウム水溶性緩衝液又はDDQの使用により脱遮断を有効に達成することができ、双方の条件は更なる伸長の前に必要とされる(2)に分解されるヘミアセタール(1)を最初に遊離させることである：

10

## 【化 6 6】



(1)

(2)

## 【0201】

3'-OHをフェニル基が置換されていないベンジル基、例えばベンジルオキシメチルで保護することができ、またフェニル基が電子供与置換基を担持するベンジル基で保護することもできる；このような電子豊富なベンジル保護基の実例は3,4-ジメトキシベンジルオキシメチルである。

20

## 【0202】

対照的に、電子欠乏性ベンジル保護基、例えばフェニル環が1つ又はそれ以上のニトロ基で置換されているものは、式  $-C(R')_2-OH$ 、 $-C(R')_2-NH_2$  及び  $-C(R')_2-SH$  の中間基を形成するのに必要な条件が十分に厳しく、ポリヌクレオチドの取り込みがこのような電子欠乏性ベンジル保護基を脱保護するのに必要な条件により影響され得るので、あまり好ましくない。

## 【0203】

ヘミアセタールの保護形態としてのフルオロメチルオキシメチル基での3'-OH保護：

30



## 【0204】

この遮断基を担持するヌクレオチドを当業者に公知の触媒反応、例えば重金属イオン、例えば銀の使用により中間ヘミアセタールに変換することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0205】

【図1】本発明に有用な例示的なヌクレオチド構造を示す。各構造に関してXはH、リン酸、二リン酸又は三リン酸でよい。R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は同一か又は異なってよく、そしてH、OH又はOHに転換できるいずれかの基、カルボニルが含まれるがこれに限定されない、から選択することができる。R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>に適さないいくつかの官能基には図3及び図4に示す構造などがある。

40

【図2】本発明の特定の態様に有用なリンカーの構造を示し、(1)ジスルフィドリンカー及び酸に不安定なリンカー、(2)ジアロキシベンジルリンカー、(3)シーバー(Sieber)リンカー、(4)インドールリンカー、並びに(5)t-ブチルシーバー(Sieber)リンカーなどがある。

【図3】いくつかの切断可能なリンカー及びいくつかの適当なヒドロキシ保護基などの本発明に有用ないくつかの機能的分子を示す。これらの構造では、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は同一か又は異なってよく、そしてH、OH又はカルボニルなどのOHに転換できるいずれかの基でよい。R<sub>3</sub>はアルキル、アルコキシル、アミノ又はハロゲン基から別個に選択される1つ又はそれ以上の置換基を表す。R<sub>4</sub>及びR<sub>5</sub>はH又はアルキルでよく、そしてR<sub>6</sub>は

50

アルキル、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル又はベンジルでよい。XはH、リン酸、ニリン酸又は三リン酸でよい。

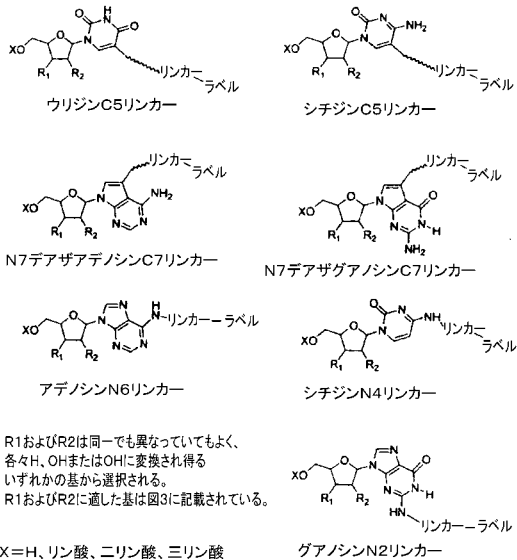
【図4】本発明にしたがって用いることができるいくつかのZ遮断基の略図である。

【図5】各々標識され、そして遮断されたD G T P、D C T P及びd A T P（化合物18、24及び32）の取り込みの2サイクルを示す。

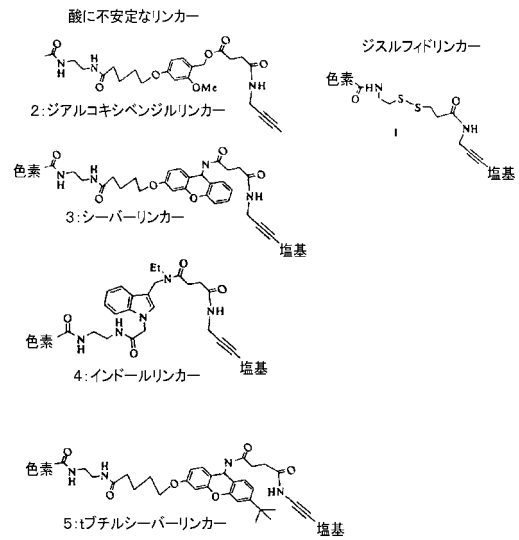
【図6】標識され、そして遮断されたD T T P（化合物6）の取り込みの6サイクルを示す。

【図7】化合物38（本発明の3'-Oアリルヌクレオチド）による有効な遮断を示す。

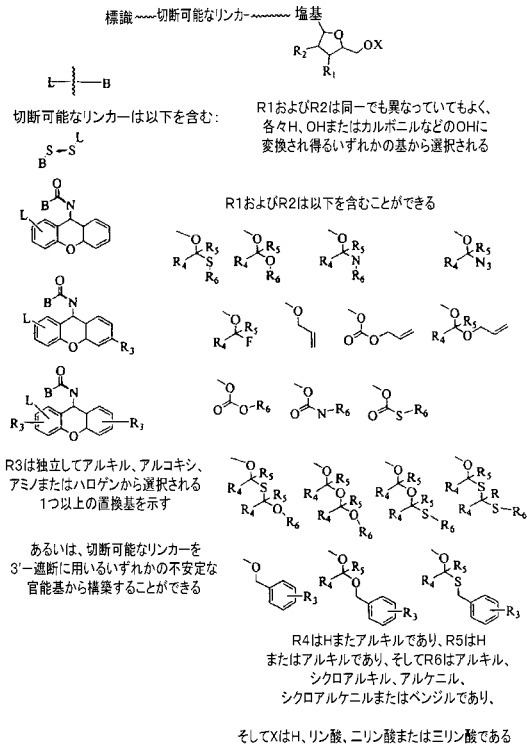
【図1】



【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】

保護されたヘミアセタール：



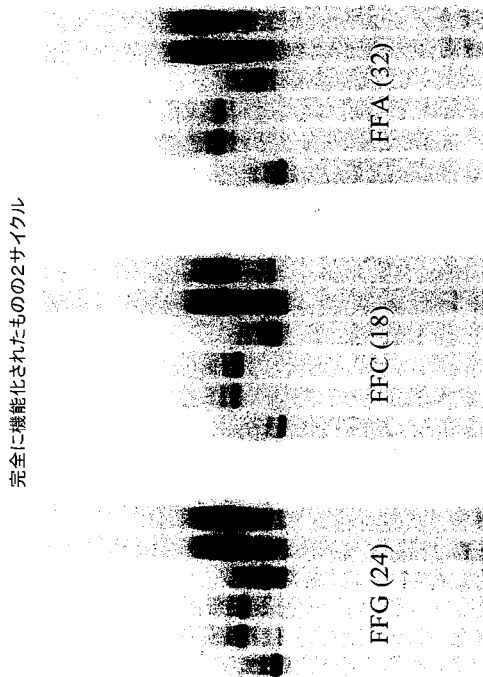
保護されたヘミチオセタール：



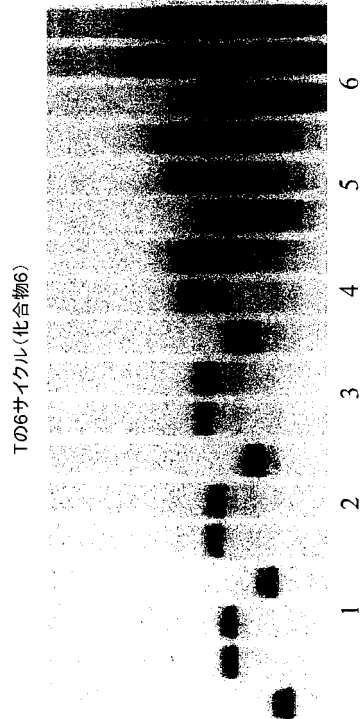
保護されたヘミアミンール：



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【 図 7 】



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年7月22日 (2013.7.22)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

標的 1 本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって、

相補的ヌクレオチドの逐次的な取り込みをモニターするステップを含み、ここで少なくとも 1 つの取り込みは式 PN - O - アリルのヌクレオチド分子の取り込みであり、ここで PN は前記ヌクレオチドであり；そして前記ヌクレオチドはアリル遮断基に加えて更に切断可能なリンカーによりその塩基に連結された検出可能な標識を含み、そして、

ここで取り込まれたヌクレオチドの同一性は塩基に連結された標識を検出することにより決定され、そして遮断基及び前記標識は次の相補的ヌクレオチドの導入の前に除去され、ヌクレオチドの標識及び遮断基が単一の化学的処理ステップで除去される、方法。

【 請求項 2 】

前記切断可能なリンカーが 3' 遮断に用いる不安定な官能基を含む、請求項 1 に記載の方法。

【 請求項 3 】

前記切断可能なリンカーが O - アリルを含む、請求項 2 に記載の方法。

【 請求項 4 】

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記単一の化学的処理ステップが、前記遮断基及び前記標識を、水溶液中で遷移金属並びに水溶性ホスフィン及び水溶性窒素含有ホスフィンリガンドからなる群から選択される1つ以上のリガンドを含む遷移金属と反応させるステップを備える、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記遷移金属が、白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム、オスミウム及びイリジウムからなる群から選ばれる、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記遷移金属が、パラジウムである、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記リガンドが、誘導体化されたトリアリールホスフィンリガンド及び誘導体化されたトリアルキルホスフィンリガンドからなる群から選ばれる、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記リガンドが、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基及びスルホナート基からなる群から選ばれる1つ以上の官能基によって誘導体化されている、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記リガンドが、3, 3', 3''-ホスフィニジントリス(ベンゼンスルホン酸)及びトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、並びに、これらの塩からなる群から選ばれる、請求項5～9のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

標的1本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって：

(a) 複数の異なるヌクレオチドを提供するステップであって、前記複数の異なるヌクレオチドは式PN-O-アリルの分子であり、ここでPNは前記ヌクレオチドであり；そして前記ヌクレオチドはアリル遮断基に加えて更に切断可能なリンカーによりその塩基に連結された検出可能な標識を含み、そしてここで各型のヌクレオチドに連結された検出可能な標識をその他の型のヌクレオチドに用いた検出可能な標識から検出時に区別できるステップと；

(b) ヌクレオチドを標的1本鎖ポリヌクレオチドの相補体に取り込むステップと；

(c) (b)のヌクレオチドの標識を検出し、それにより取り込まれたヌクレオチドの型を決定するステップと；

(d) (b)のヌクレオチドの標識及び遮断基を単一の化学的処理ステップで除去するステップと；

(e) 場合によっては(b)～(d)のステップを1回以上繰り返すステップと；

を備え、それにより標的1本鎖ポリヌクレオチドの配列を決定する、方法。

**【請求項 12】**

前記切断可能なリンカーが3'遮断に用いる不安定な官能基を含む、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記切断可能なリンカーがO-アリルを含む、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記検出可能な標識がフルオロフォアである、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記単一の化学的処理ステップが、前記遮断基及び前記標識を、水溶液中で遷移金属並びに水溶性ホスフィン及び水溶性窒素含有ホスフィンリガンドからなる群から選択される1つ以上のリガンドを含む遷移金属と反応させるステップを備える、請求項11～14のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記遷移金属が、白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム、オスミウム及びイリジウムからなる群から選ばれる、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記遷移金属が、パラジウムである、請求項 16 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記リガンドが、誘導体化されたトリアリールホスフィンリガンド及び誘導体化されたトリアルキルホスフィンリガンドからなる群から選ばれる、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 19】**

前記リガンドが、アミノ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基及びスルホナート基からなる群から選ばれる 1 つ以上の官能基によって誘導体化されている、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記リガンドが、3, 3', 3'' - ホスフィニジントリス(ベンゼンスルホン酸)及びトリス(2 - カルボキシエチル)ホスフィン、並びに、これらの塩からなる群から選ばれる、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 B 61/00	(2006.01)	C 0 7 B 61/00	3 0 0	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A	

(72)発明者 ミルトン, ジョーン  
イギリス, エセックス シービー10 1エクスエル, エヌアール. サッフロン ウォル  
デン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク, ソレックサ  
リミテッド

(72)発明者 ウー, シャオリン  
イギリス, エセックス シービー10 1エクスエル, エヌアール. サッフロン ウォル  
デン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク, ソレックサ  
リミテッド

(72)発明者 スミス, マーク  
イギリス, エセックス シービー10 1エクスエル, エヌアール. サッフロン ウォル  
デン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク, ソレックサ  
リミテッド

(72)発明者 プレンナン, ジョセフ  
イギリス, エセックス シービー10 1エクスエル, エヌアール. サッフロン ウォル  
デン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク, ソレックサ  
リミテッド

(72)発明者 バーニーズ, コリン  
イギリス, エセックス シービー10 1エクスエル, エヌアール. サッフロン ウォル  
デン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク, ソレックサ  
リミテッド

(72)発明者 リュー, シャオハイ  
イギリス, エセックス シービー10 1エクスエル, エヌアール. サッフロン ウォル  
デン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク, ソレックサ  
リミテッド

(72)発明者 リューディッガー, シルク  
イギリス, エセックス シービー10 1エクスエル, エヌアール. サッフロン ウォル  
デン, リトル チェスターフォード, チェスターフォード リサーチ パーク, ソレックサ  
リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 HA12  
4B063 QA01 QA05 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QR55 QS15 QX02  
4C057 BB02 CC01 DD01 LL10 LL11 LL18 LL19 LL21 LL30 LL39  
LL40 LL44  
4H039 CA60 CE20