(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111344296 A
(43)申请公布日 2020.06.26

(21)申请号 201880073408.8

(22)申请日 2018.11.14

(30)优先权数据
1718804.6 2017.11.14 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2018/053305 2018.11.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/097233 EN 2019.05.23

(71)申请人 核酸有限公司
地址 英国剑桥

(72)发明人 M•C•陈 G•R•米钦罗伊

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 安佩东 黄革生

(51)Int.Cl.
C07H 1/00(2006.01)
C07H 19/04(2006.01)
C07H 19/06(2006.01)
C07H 19/10(2006.01)
C07H 19/16(2006.01)
C07H 19/20(2006.01)
C12Q 1/68(2018.01)
C12P 19/34(2006.01)

权利要求书7页 说明书28页 附图12页

(54)发明名称

含有胺掩蔽的部分的核苷酸衍生物及其在模板化和非模板化酶促核酸合成中的用途

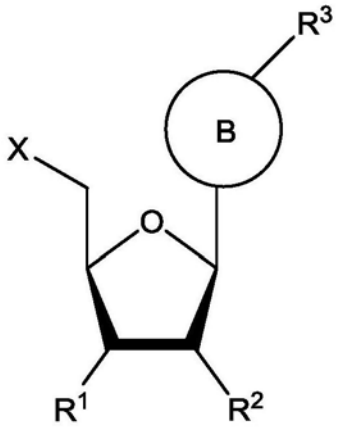
(57)摘要

本发明涉及胺掩蔽的部分在酶促核酸合成方法中的用途。本发明还涉及所述胺掩蔽的部分本身和制备包含所述胺掩蔽的部分的三磷酸核苷酸的方法。

CN 111344296 A

1.胺掩蔽的含氮杂环例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、异鸟嘌呤、异胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤的衍生物在酶促核酸合成方法中的用途。

2.式(I)化合物在酶促核酸合成方法中的用途：



(I)

其中：

R^1代表能够被去掩蔽以显现羟基的部分,包括

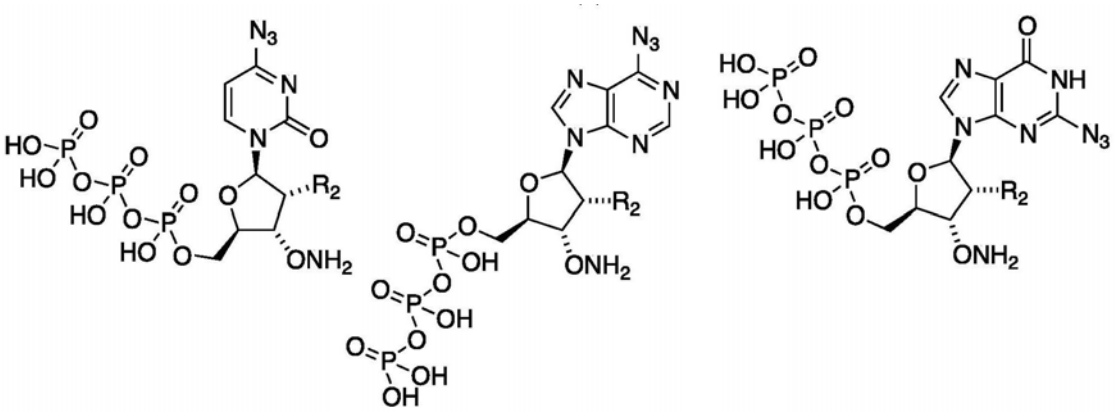
-H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、$-OPO_3^{2-}$、$-OCH_2SSCH_2CH_3$、$-OCOCH_3$、$-OCH_2CH_2CN$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基；

R^2代表-H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、$-OPO_3^{2-}$、$-OCH_2SSCH_2CH_3$、$-OCOCH_3$、$-OCH_2CH_2CN$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基或任何其它分子部分；

X代表-OH基团或一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合,其中所述基团能够赋予酶促加成的能力;R^3代表胺掩蔽基团,其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对,并且所述氨基的脱氨基化可导致与互补碱基的氢键键合改变;并且

B代表含氮杂环。

3.权利要求2所定义的用途,其中式(I)的化合物选自：



其中R_2如权利要求2中所定义,例如-OH或-H。

4.权利要求2所定义的用途,其中式(I)的化合物选自式$(I)^b$至$(I)^j$的化合物,例如$(I)^b$。

5.权利要求2所定义的用途,其中X代表-OH基团或三磷酸酯基团。

6.权利要求2至5任意一项所定义的用途,其中的氢键碱基配对选自:Watson-Crick、

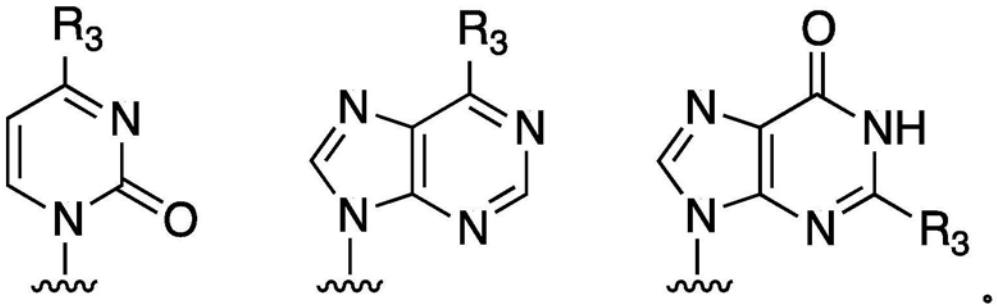
Hoogsteen或替代/扩展的遗传密码碱基配对。

7.权利要求2至6任意一项所定义的用途，其中R^1和R^2独立地代表--H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、$-OPO_3^{2-}$、$-OCH_2SSCH_2CH_3$、$-OCOCH_3$、$-OCH_2CH_2CN$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基或适宜的羟基保护基。

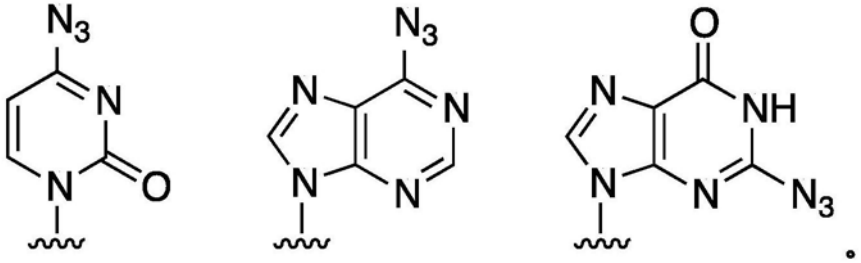
8.权利要求2至7任意一项所定义的用途，其中R^3选自叠氮化物($-N_3$)、苯甲酰基胺(N-苯甲酰基或-NHCOPh)、N-甲基(-NHMe)、异丁酰基胺、二甲基甲酰氨基胺、9-芴基甲基氨基甲酸酯、叔丁基氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯、乙酰胺(N-乙酰基或-NHCOMe)、三氟乙酰胺、邻苯二甲酰胺、苄基胺(N-苄基或$-NH-CH_2-$苯基)、三苯基甲基胺、亚苄基胺、甲苯磺酰基胺、异硫氰酸酯、N-烯丙基(例如N-二甲基烯丙基($-NHCH_2-CH=CH_2$))和N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)，例如叠氮化物($-N_3$)、N-乙酰基(-NHCOMe)、N-苄基($-NH-CH_2-$苯基)、N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)、N-甲基(-NHMe)、N-苯甲酰基(-NHCOPh)、N-二甲基烯丙基($-NHCH_2-CH=CH_2$)。

9.权利要求2至8任意一项所定义的用途，其中B代表选自嘌呤或嘧啶或其衍生物的含氮杂环。

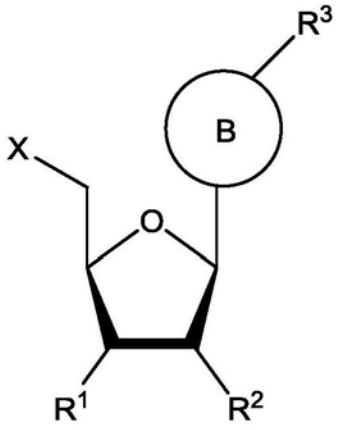
10.权利要求2至9任意一项所定义的用途，其中$-B-R_3$代表：



11.权利要求2至10任意一项所定义的用途，其中R^3代表叠氮化物($-N_3$)基团并且$-B-R_3$选自：



12.式$(I)^a$的化合物：



(I)a

其中：

R^1代表能够被去掩蔽以显现羟基的部分，包括

-H、-OH、-ONH_2、-ONC$(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基；

R^2代表-H、-OH、-ONH_2、-ONC$(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基或任何其它分子部分；

X代表一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合，其中所述基团能够赋予酶促加成的能力；

R^3代表胺掩蔽基团，其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对，并且所述氨基的脱氨基化可导致与互补碱基的氢键键合改变；并且

B代表含氮杂环。

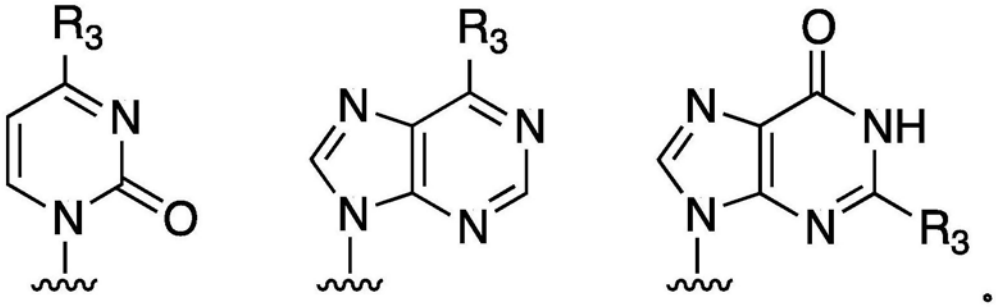
13.权利要求12所定义的化合物，其中X代表三磷酸酯基团。

14.权利要求12或权利要求13所定义的化合物，其中R^1和R^2独立地代表-H、-OH、-ONH_2、-ONC$(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基或适宜的羟基保护基。

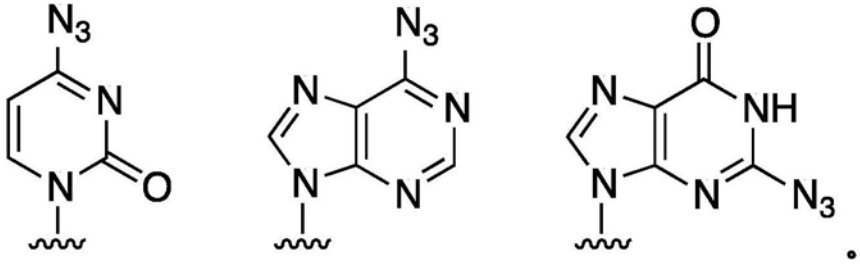
15.权利要求12至14任意一项所定义的化合物，其中R^3选自叠氮化物(-N_3)、苯甲酰基胺(N-苯甲酰基或-NHCOPh)、N-甲基(-NHMe)、异丁酰基胺、二甲基甲酰氨基胺、9-芴基甲基氨基甲酸酯、叔丁基氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯、乙酰胺(N-乙酰基或-NHCOMe)、三氟乙酰胺、邻苯二甲酰胺、苄基胺(N-苄基或-NH-CH_2-苯基)、三苯基甲基胺、亚苄基胺、甲苯磺酰基胺、异硫氰酸酯、N-烯丙基(例如N-二甲基烯丙基(-$NHCH_2$-CH＝CH_2))和N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)，例如叠氮化物(-N_3)、N-乙酰基(-NHCOMe)、N-苄基(-NH-CH_2-苯基)、N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)、N-甲基(-NHMe)、N-苯甲酰基(-NHCOPh)、N-二甲基烯丙基(-$NHCH_2$-CH＝CH_2)。

16.权利要求12至15任意一项所定义的化合物，其中B代表选自嘌呤或嘧啶的含氮杂环。

17.权利要求12至16任意一项所定义的化合物，其中-B-R_3代表：

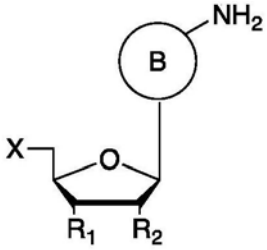


18.权利要求12至17任意一项所定义的化合物，其中R^3代表叠氮化物(-N_3)基团并且B选自：



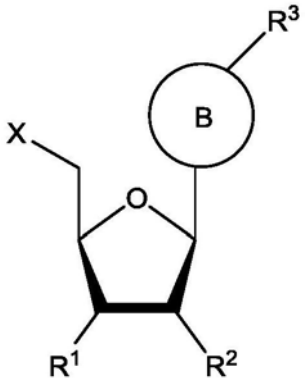
19.权利要求12至18任意一项所定义的化合物，其选自式(1)-(27)的化合物，例如(1)、(2)或(3)。

20.制备式(V)化合物的方法：



(V)

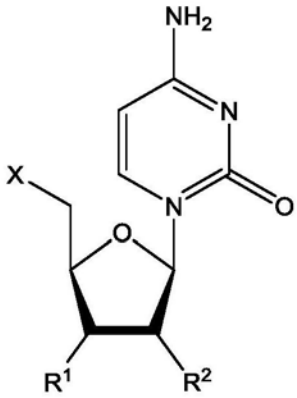
其中X、R^1、R^2和B如权利要求2中所定义，所述方法包括将式(I)化合物与化学物质、电磁辐射、热和/或电流反应：



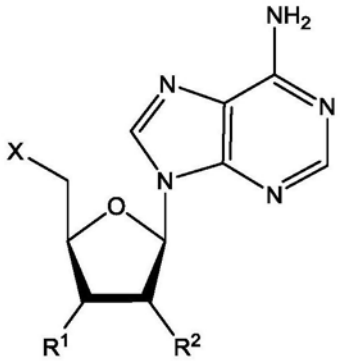
(I)

其中X、R^1、R^2、R^3和B如权利要求2中所定义。

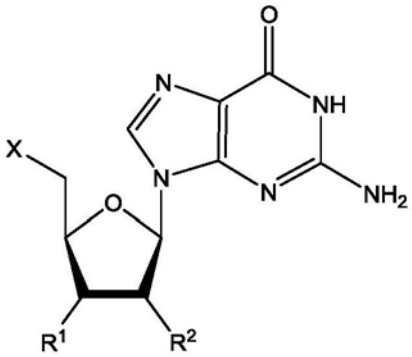
21.制备式(II)、(III)或(IV)的化合物的方法：



(II)

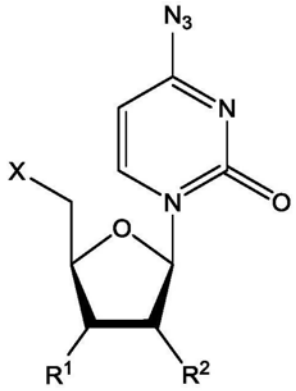


(III)

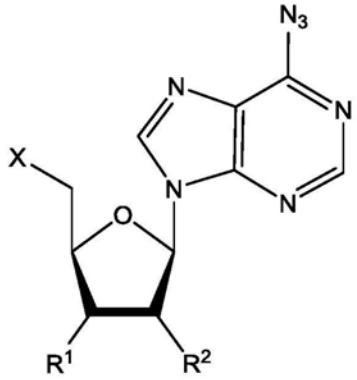


(IV)

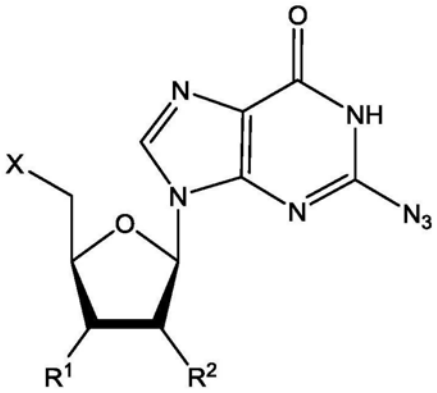
其中X、R^1和R^2如权利要求2中所定义，所述方法包括分别将式(II)^a、(III)^{a}或(IV)^{a}的化合物与化学物质、电磁辐射和/或电流反应：



(II)[a]



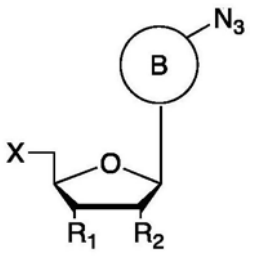
(III)[a]



(IV)[a]

其中X、R^1和R^2如权利要求2中所定义。

22.制备如权利要求21所定义的式(II)、(III)或(IV)的化合物的方法,该方法包括将式(VI)的化合物与还原剂反应:

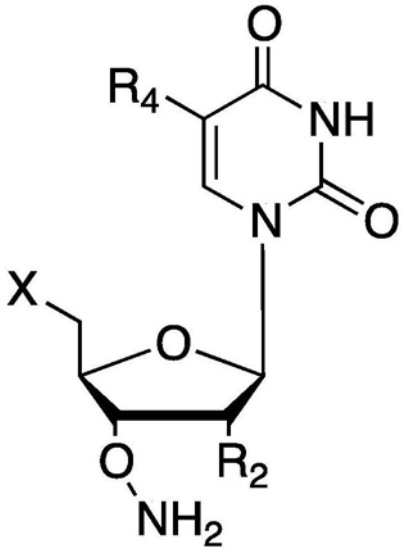


(VI)

其中X、R^1、R^2和B如权利要求2中所定义。

23.权利要求22所定义的方法,其中的还原剂选自β-巯基乙醇、二硫苏糖醇或基于膦的还原剂,例如三(羟甲基)膦(THP)、三(羟丙基)膦(THPP)和三(2-羧基乙基)膦(TCEP)。

24.式(VII)的化合物:



(VII)

其中R^2代表-H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、$-OPO_3^{2-}$、$-OCH_2SSCH_2CH_3$、$-OCOCH_3$、$-OCH_2CH_2CN$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基或适宜的羟基保护基；

X代表一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合；并且

R^4代表C_{2-6}烷基、-F、-Cl、-Br、-I、烷氧基、生物素、烷基胺或叠氮化物。

25.权利要求24所定义的式(VII)化合物在酶促核酸合成方法中的用途。

26.权利要求1至11和25任意一项所定义的用途，其中所述酶促核酸合成方法选自可逆终止的酶促核酸合成方法和模板化和非模板化从头酶促核酸合成方法。

含有胺掩蔽的部分的核苷酸衍生物及其在模板化和非模板化酶促核酸合成中的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及胺掩蔽的部分在酶促核酸合成方法中的用途。本发明还涉及所述胺掩蔽的部分本身和制备包含所述胺掩蔽的部分的三磷酸核苷酸的方法。

背景技术

[0002] 核酸合成对于现代生物技术是至关重要的。科学界人工合成DNA、RNA和蛋白质的能力使生物技术领域的快速发展成为可能。

[0003] 人工DNA合成(一个10亿英镑且不断增长的市场)使生物技术和制药公司能够开发一系列肽疗法,例如用于治疗糖尿病的胰岛素。它使研究人员能够表征细胞蛋白,从而开发新的小分子疗法,以治疗当今人口老龄化所面临的疾病,例如心脏病和癌症。正如Venter研究所在2010年将人工合成的基因组放入细菌细胞中时所证明的那样,它甚至为创造生命铺平了道路。

[0004] 但是,当前的DNA合成技术不能满足生物技术工业的需求。尽管DNA合成的益处很多,但一个经常提到的问题阻碍了人工DNA合成工业的进一步发展,从而阻碍了生物技术领域的进一步发展。虽然是一项成熟的技术,但实际上不可能合成长度超过200个核苷酸的DNA链,并且大多数DNA合成公司仅提供最多120个核苷酸。相比之下,平均蛋白质编码基因的数量级为2000-3000个核苷酸,而真核基因组的平均数量为数十亿个核苷酸。因此,目前所有主要的基因合成公司都依赖“合成和拼接”技术的变体,其中,合成重叠的40-60聚体片段并通过PCR拼接到一起(参见Young,L等人,(2004)Nucleic Acid Res.32,e59)。目前由基因合成工业提供的方法一般允许常规生产长达3 kb的长度。

[0005] DNA不能一次合成超过120-200个核苷酸的原因是由于目前的DNA生成方法,该方法使用合成化学方法(即亚磷酰胺技术)一次偶联一个核苷酸来制备DNA。由于每个核苷酸偶联步骤的效率为95.0-99.0%,因此从数学上讲,不可能以可接受的产率合成长度超过200个核苷酸的DNA。Venter研究所花费4年时间和2000万美元来合成相对较小的细菌基因组,从而说明了这一费力的过程(参见Gibson,D.G.等人,(2010)Science 329,52-56)。

[0006] 已知的DNA测序方法使用模板依赖性DNA聚合酶将3’-可逆终止的核苷酸加入到生长的双链底物中(参见Bentley,D.R.等人,(2008)Nature456,53-59)。在“合成测序”过程中,每个添加的核苷酸都包含一种染料,从而使用户可以识别模板链的确切序列。虽然是在双链DNA上,但这种技术仍能够产生500-1000碱基对长的链。但是,由于需要现有的核酸链作为模板,因此该技术不适于核酸的从头合成。

[0007] $-ONH_2$化学部分可用于多种生物技术应用,例如合成测序(SBS)、模板化酶促DNA合成和非模板化酶促DNA合成(D.Hutter等人,Nucleotides Nucleic Acids.29.(2010)879-895)。具体而言,$-ONH_2$化学部分的用途在于其可逆地掩蔽-OH官能团的能力,例如5’-三磷酸核苷酸中2’-脱氧核糖或核糖上的3’-OH位置。另外,与其它可逆终止部分如$-OCH_2N_3$相反,$-ONH_2$化学部分的小尺寸使其成为酶(如聚合酶)的更好底物。然而,将$-ONH_2$化学部分脱

保护所需的条件是不利的。用于将-ONH2转化为-OH的常用化学试剂是在酸性条件下的亚硝酸钠。问题是，如图1和4以及许多以前的研究所示(F.Kaudewitz,Nature.183(1959)1829-1830,F.Kodama等人,Mutat.Res.40(1976)119-124,R.Shapiro和S.H.Pohl,Biochemistry.7(1968)448-455)，在亚硝酸钠存在下，腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶的氧化脱氨反应的速率很高。这些碱基的脱氨基化将腺嘌呤转化为次黄嘌呤，将胞嘧啶转化为尿嘧啶，将鸟嘌呤转化为黄嘌呤。这些转化导致明显的突变，如次黄嘌呤与胞嘧啶配对，尿嘧啶与腺嘌呤配对。因此，这些突变限制了-ONH2可逆终止子的实际应用，特别是在用于合成生物学应用的非模板化酶促DNA合成中。

[0008] 已经提出添加类黄酮和其它酚类化合物作为减少核酸含氮杂环在亚硝酸钠的存在下脱氨基的潜在解决方案(C.Oldreive等人,Chem.Res.Toxicol.11(1998)1574-1579)。虽然先前的研究已经显示某些添加剂可防止核酸碱基脱氨基，但是相同的添加剂也会抑制实现可逆终止所需的3'-ONH2向3'-OH的转化。因此，类黄酮和其它酚类化合物的使用对于非模板化酶促DNA合成的用途有限。

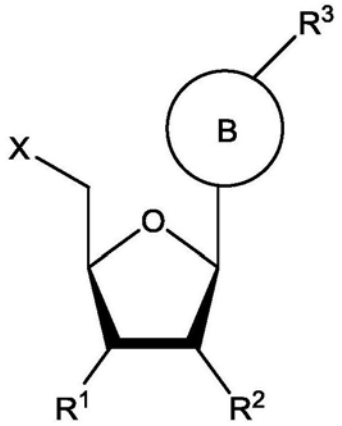
[0009] 因此，需要提供一种改进的核酸合成方法，其能够克服与目前可用的方法相关的问题。

发明内容

[0010] 根据本发明的第一方面，提供了胺掩蔽的含氮杂环例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、异鸟嘌呤、异胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤的衍生物在酶促核酸合成方法中的用途。

[0011] 根据本发明的另一方面，提供了式(I)化合物在酶促核酸合成方法中的用途：

[0012]



(I)

[0013] 其中：

[0014] R^1代表能够被去掩蔽以显现羟基的部分，包括

[0015] -H、-OH、-ONH2、-ONC(CH3)2、-OCH2N3、-OCH2CHCH2、-OPO3 2-、-OCH2SSCH2CH3、-OCOCH3、-OCH2CH2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基；

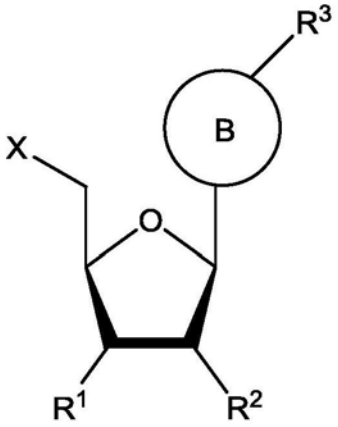
[0016] R^2代表-H、-OH、-ONH2、-ONC(CH3)2、-OCH2N3、-OCH2CHCH2、-OPO3 2-、-OCH2SSCH2CH3、-OCOCH3、-OCH2CH2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基或任何其它分子部分；

[0017] X代表-OH基团或一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基(boranophosphate)或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合，其中所述基团能够赋予酶促加成

的能力；

[0018] R^3代表胺掩蔽基团，其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对，并且所述氨基的脱氨基化可导致与互补碱基的氢键键合改变；并且B代表含氮杂环。

[0019] 根据本发明的另一方面，提供了式(I)^{a}化合物：

[0020] 

(I)^a

[0021] 其中：

[0022] R^1代表能够被去掩蔽以显现羟基的部分，包括

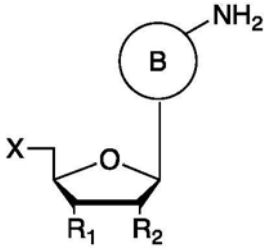
[0023] -H、-OH、-ONH_2、-$ONC(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基；

[0024] R^2代表-H、-OH、-ONH_2、-$ONC(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基或任何其它分子部分；

[0025] X代表一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合，其中所述基团能够赋予酶促加成的能力；

[0026] R^3代表胺掩蔽基团，其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对，并且所述氨基的脱氨基化可导致与互补碱基的氢键键合改变；并且B代表含氮杂环。

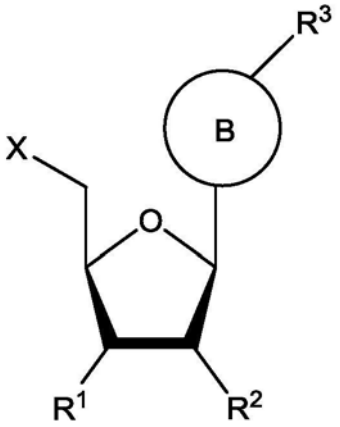
[0027] 根据本发明的另一方面，提供了一种制备式(V)化合物的方法：

[0028] 

(V)

[0029] 其中X、R^1、R^2和B如文中所定义，所述方法包括将式(I)化合物与化学物质、电磁辐射、热和/或电流反应：

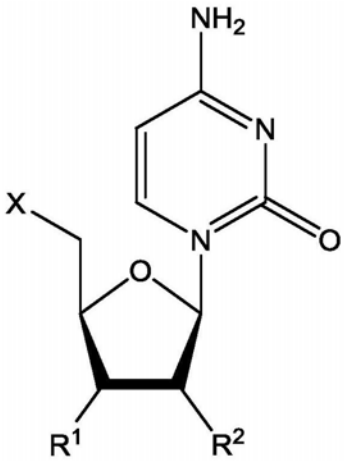
[0030]



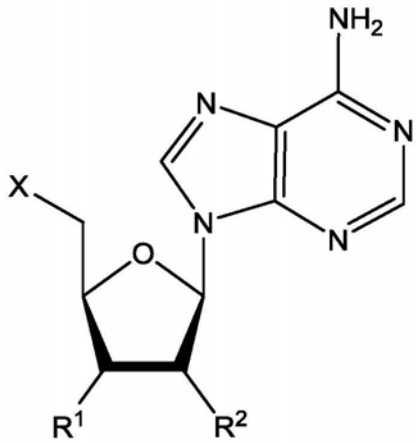
(I)

[0031] 其中X、R^1、R^2、R^3和B如文中所定义。

[0032] 根据本发明的另一方面，提供了一种制备式(II)、(III)或(IV)的化合物的方法：

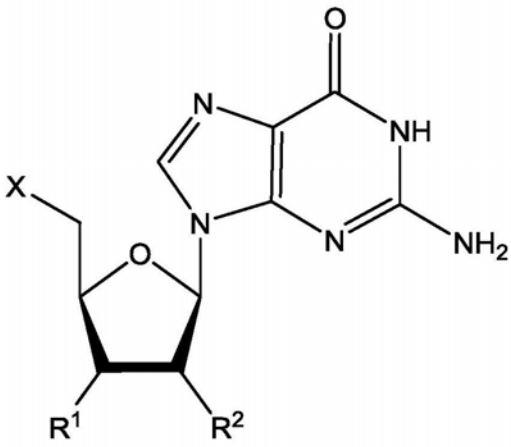


(II)



(III)

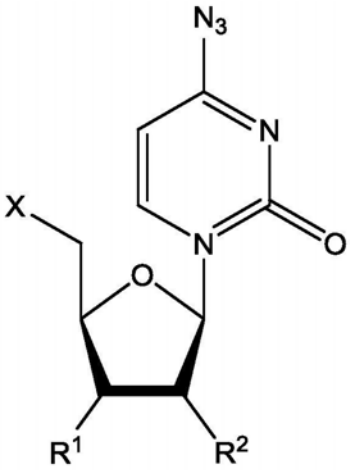
[0033]



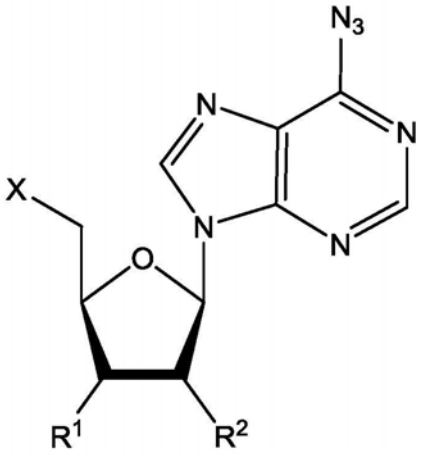
(IV)

[0034] 其中X、R^1和R^2如文中所定义，所述方法包括分别将式$(II)^a$、$(III)^a$或$(IV)^a$的化合物与化学物质、电磁辐射、热和/或电流反应：

[0035]

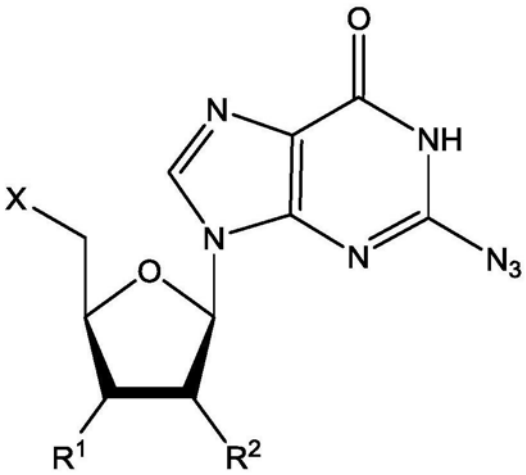


(II)[a]



(III)[a]

[0036]

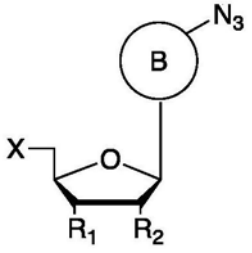


(IV)[a]

[0037] 其中X、R^1、R^2、R^3和B如文中所定义。

[0038] 根据本发明的另一方面，提供了一种制备如文中所定义的式(II)、(III)或(IV)的化合物的方法，该方法包括将式(VI)的化合物与还原剂反应：

[0039]



(VI)

[0040] 其中X、R^1、R^2和B如文中所定义。

[0041] 附图概述

[0042] 图1：显示在室温下，在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠，pH 5.5(1M)存在下2'-脱氧腺苷(1mM)的脱氨基化程度的时间曲线。(A)LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行。溶剂为A(20mM乙酸铵，pH 4.6)和B(20mM乙酸铵，pH 4.6[5%]/乙腈[95%])。

以0.5mL/min的速度在10分钟内从5-40％B进行梯度洗脱。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。约2.6分钟的峰对应于2'-脱氧腺苷，而约1.3分钟的峰对应于2'-脱氧肌苷(氧化脱氨基化产物)。(B)随时间变化的脱氨基百分比图。(C)如下所示的氧化脱氨基反应，将2′-脱氧腺苷转化为2′-脱氧肌苷。

[0043] 图2:在室温下，在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠，pH 5.5(1M)存在下，N6-叠氮基2'-脱氧腺苷(0.5mM)的脱氨基化程度的时间曲线，通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵，pH 4.6)和B(20mM乙酸铵，pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.5mL/min的速度在10分钟内从5-40％B进行梯度洗脱。数据显示为每个时间点在两个波长处的一系列LC色谱图(如上所标注)。保留时间约4.5分钟处的峰对应于6-叠氮基2'-脱氧腺苷。明显没有在约2.6分钟(2'-脱氧腺苷)或约1.3分钟(2'-脱氧肌苷;氧化脱氨基化产物)处的峰。

[0044] 图3:LC-MS分析显示，将6-叠氮基2'-脱氧腺苷(4.5分钟保留时间)暴露于TCEP导致向2'-脱氧腺苷(2.6分钟保留时间)的定量转化。分析在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行。溶剂为A(20mM乙酸铵，pH 4.6)和B(20mM乙酸铵，pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.5mL/min的速度在10分钟内从5-40％B进行梯度洗脱。

[0045] 图4:显示在室温下，在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠，pH 5.5(1M)存在下2'-脱氧胞嘧啶(1mM)的脱氨基化程度的时间曲线。(A)LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行。溶剂为A(20mM乙酸铵，pH 4.6)和B(20mM乙酸铵，pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25％B进行梯度洗脱。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。约1.05分钟的峰对应于2'-脱氧胞苷，约1.15分钟的峰对应于2'-脱氧尿苷(氧化脱氨基化产物)。(B)随时间变化的脱氨基百分比图。(C)如下所示的氧化脱氨基反应，将2'-脱氧胞苷(dC)转化为2'-脱氧尿苷(dU)。

[0046] 图5:在室温下，在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠，pH 5.5(1M)存在下，N4-叠氮基2'-脱氧胞苷(N4-叠氮基dC;1mM)的脱氨基化程度，通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵，pH 4.6)和B(20mM乙酸铵，pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25％B进行梯度洗脱。(A)显示具有所示的初始峰质量的初始化合物的描计图，证实在约2.7分钟处的化合物为N4-叠氮基dC。(B)如上所述将N4-叠氮基dC与亚硝酸盐溶液一起温育的时间曲线。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。明显没有对应于dC(还原产物)或dU(脱氨基化产物)的峰，这些峰在与亚硝酸盐溶液一起温育的dC标准品的第一张描计图中可以看见。(C)通过用还原剂处理，N4-叠氮基dC可以很容易地转化为dC。此时，与TCEP一起温育导致N4-叠氮基dC定量转化为dC。

[0047] 图6:在室温下，在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠，pH 5.5(1M)存在下，N4-乙酰基2'-脱氧胞苷(N4-乙酰基dC)的脱氨基化程度，通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵，pH 4.6)和B(20mM乙酸铵，pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25％B进行梯度洗脱。(A)显示具有所示的初始峰质量的初始化合物的描计图，证实在约2.1分钟处的化合物为N4-乙酰基dC。(B)如上所述将N4-乙酰基dC与亚硝酸盐溶液一起温育的时间曲线。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。与同亚硝酸盐溶液一起温育的dC标准品(参见图4)相比，对应于dC(还原产物)或dU

(脱氨基化产物)的峰明显减弱。(C)N4-乙酰基dC可以容易地转化为dC。一种这样的方法涉及用40％甲胺水溶液处理,可以看到,其导致在2.1分钟处的N4-乙酰基dC峰的消失和在1.05分钟处的dC峰的出现,如面板图(D)中的质量所证实的。

[0048] 图7:在室温下,在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠,pH 5.5(1M)存在下,N6-乙酰基腺苷(N6-乙酰基A)的脱氨基化程度,通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵,pH 4.6)和B(20mM乙酸铵,pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25％B进行梯度洗脱。(A)显示具有所示的初始峰质量的初始化合物的描计图,证实在约1.8分钟处的化合物为N6-乙酰基A。(B)如上所述将N6-乙酰基A与亚硝酸盐溶液一起温育的时间曲线。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。在48小时时观察到轻微的脱乙酰化,但未检测到脱氨基化产物。(C)N6-乙酰基A可以容易地转化为dC。一种这样的方法涉及用40％甲胺水溶液处理,可以看到,其导致在1.8分钟处的N6-乙酰基A峰的消失和在1.9分钟处的A峰的出现,如提取的对应于乙酰化的化合物(310.50提取图片)和脱乙酰化的化合物(268.00提取图片)的质量描计图所证实的。(D)另一种使N6-乙酰基A脱乙酰化的方法是用碳酸钾。此时,在室温下用50mM碳酸钾水溶液处理得到脱乙酰化的化合物,再次证明了310.50峰的消失和268.00峰的出现。

[0049] 图8:在室温下,在亚硝酸钠(700mM),乙酸钠,pH 5.5(1M)存在下,N6-苄基2'-脱氧腺苷(N6-苄基dA;1mM)的脱氨基化程度,通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵,pH 4.6)和B(20mM乙酸铵,pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25％B进行梯度洗脱,然后保持5分钟。(A)显示具有所示的初始峰质量的初始化合物的描计图,证实在约10.8分钟处的化合物为N6-苄基dA。(B)如上所述将N6-苄基dC与亚硝酸盐溶液一起温育的时间曲线。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。明显没有对应于dA(脱苄基化产物)或脱氧肌苷(dI;脱氨基化产物)的峰。

[0050] 图9:在室温下,在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠,pH 5.5(1M)存在下,N4-茴香酰基2'-脱氧胞苷(N4-茴香酰基dC)的脱氨基化程度,通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵,pH 4.6)和B(20mM乙酸铵,pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25％B进行梯度洗脱。(A)显示具有所示的初始峰质量的初始化合物的描计图,证实在约9.8分钟处的化合物为N4-茴香酰基dC。(B)如上所述将N4-茴香酰基dC与亚硝酸盐溶液一起温育的时间曲线。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。与同亚硝酸盐溶液一起温育的dC标准品(参见图4)相比,对应于dC(还原产物)或dU(脱氨基化产物)的峰明显减弱。(C)N4-茴香酰基dC可以容易地转化为dC。一种这样的方法涉及用40％甲胺水溶液处理,可以看到,其导致在约9.8分钟处的N4-茴香酰基dC峰的消失和在1.05分钟处的dC峰的出现,如提取的质量描计图所证实的。(D)另一种将N4-茴香酰基dC脱酰基化成dC的方法涉及用碳酸钾处理。此时,在室温下用50mM碳酸钾水溶液处理得到脱酰基化合物dC。

[0051] 图10:在室温下,在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠,pH 5.5(1M)存在下,N6-二甲基烯丙基氨基嘌呤的脱氨基化程度,通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵,pH 4.6)和B(20mM乙酸铵,pH 4.6[5％]/乙腈[95％])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25％B进行梯度洗脱。如上所述将N6-二甲基烯丙基氨

基嘌呤与亚硝酸盐溶液一起温育的时间曲线。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。明显没有对应于dA或dI的峰。

[0052] 图11:5'-三磷酸核苷与胺掩蔽部分的酶促结合。将工程化的末端脱氧核苷酸转移酶在适当的缓冲液中于37℃孵育10分钟,所述缓冲液包含氯化钴和带有5'-荧光团的DNA引物以及以下5'-三磷酸核苷:(A)泳道1:无延伸对照;泳道2:N6-苄基-dATP;泳道3:N6-苄基-rATP;泳道4:N6-甲基-dATP;泳道5:N6-甲基-rATP;(B)泳道1:无延伸对照;泳道2:3'-O-乙酰基-N4-苯甲酰基-dCTP;(C)泳道1:无延伸对照;泳道3:N6-苯甲酰基-dATP;泳道4:N4-苯甲酰基-dCTP。通过标准变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(TBE缓冲液)分析反应,并用荧光扫描仪成像。

[0053] 图12:在室温下,在亚硝酸钠(700mM)、乙酸钠,pH 5.5(1M)存在下,3'-叠氮基N4-苯甲酰基2'-脱氧胞苷(1mM)的脱氨基化程度,通过LC-MS在带有Synergi Polar RP柱的Bruker amaZon系统上进行分析。溶剂为A(20mM乙酸铵,pH 4.6)和B(20mM乙酸铵,pH 4.6[5%]/乙腈[95%])。以0.4mL/min的速度在10分钟内从5-25%B进行梯度洗脱,然后保持5分钟。(A)显示具有所示的初始峰质量的初始化合物的描计图,证实在约12.5分钟处的化合物为3'-叠氮基N4-苯甲酰基2'-脱氧胞苷。(B)如上所述将3'-叠氮基N4-苯甲酰基2'-脱氧胞苷与亚硝酸盐溶液一起温育的时间曲线。数据显示为260nm下的一系列LC色谱图。明显没有对应于dc(脱酰基化产物)或脱氧肌苷(脱氨基化产物)的峰,这些峰在位于底部的显示将dC与亚硝酸盐一起温育的描计图中可以看到。(C)用碳酸钾处理3′-叠氮基N4-苯甲酰基2′-脱氧胞苷产生3′-叠氮基dC。

[0054] 发明详述

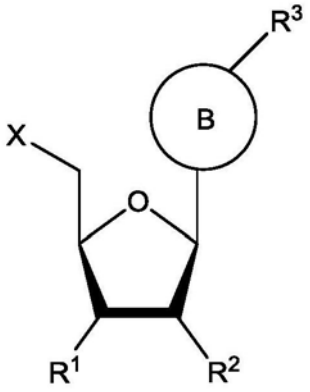
[0055] 根据本发明的第一方面,提供了胺掩蔽的含氮杂环例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、异鸟嘌呤、异胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤的衍生物在酶促核酸合成方法中的用途。

[0056] 根据本发明的另一方面,提供了胺掩蔽的含氮杂环例如腺苷、鸟苷和胞苷的衍生物在酶促核酸合成方法中的用途。

[0057] 本文提及的腺苷、鸟苷和胞苷的衍生物是指其脱氧衍生物(即脱氧腺苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)及其磷酸化衍生物(即单磷酸腺苷、二磷酸腺苷、三磷酸腺苷、单磷酸鸟苷、二磷酸鸟苷、三磷酸鸟苷、一磷酸胞苷、二磷酸胞苷、三磷酸胞苷及其所有脱氧核糖形式)。

[0058] 根据本发明的另一方面,提供了式(I)化合物在酶促核酸合成方法中的用途:

[0059]



(I)

[0060] 其中:

[0061] R^1代表能够被去掩蔽以显现羟基的部分，包括

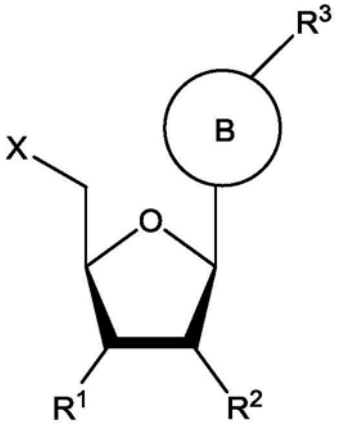
[0062] -H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、$-OPO_3^{2-}$、$-OCH_2SSCH_2CH_3$、$-OCOCH_3$、$-OCH_2CH_2CN$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基；

[0063] R^2代表-H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、$-OPO_3^{2-}$、$-OCH_2SSCH_2CH_3$、$-OCOCH_3$、$-OCH_2CH_2CN$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基或任何其它分子部分；

[0064] X代表-OH基团或一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合，其中所述基团能够赋予酶促加成的能力；

[0065] R^3代表胺掩蔽基团，其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对，并且所述氨基的脱氨基化可导致与互补碱基的氢键键合改变；并且B代表含氮杂环。

[0066] 根据本发明的另一方面，提供了式(I)化合物在酶促核酸合成方法中的用途：

[0067] 

(I)

[0068] 其中：

[0069] R^1和R^2独立地代表-H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基、氰基乙基、巯基或适宜的羟基保护基；

[0070] X代表-OH基团或一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合；

[0071] R^3代表胺掩蔽基团，其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对；并且

[0072] B代表含氮杂环。

[0073] 酶促核酸合成定义为在存在或不存在模板的情况下通过酶催化将核苷酸添加至核酸链的任何过程。例如，酶促核酸合成的方法可以包括利用PolX家族聚合酶(例如末端脱氧核苷酸转移酶)和可逆地终止的2'-脱氧核苷5'-三磷酸或核糖核苷5'-三磷酸的非模板化从头核酸合成。酶促核酸合成的另一种方法可以包括模板化核酸合成，包括合成测序。可逆终止的酶促核酸合成被定义为在存在或不存在模板的情况下通过酶催化将可逆终止的核苷酸添加至核酸链的任何过程。可逆终止的核苷酸是含有阻止随后的核苷酸添加的化学部分的核苷酸。通过化学、电磁、电流和/或加热对核苷酸上可逆终止的化学部分的脱保护或去除使得可以通过酶催化添加后续的核苷酸。因此，在一个实施方案中，酶促核酸合成方法选自可逆终止的酶促核酸合成方法和模板化和非模板化从头酶促核酸合成方法。

[0074] 式(I)化合物包含三个协同的组成部分，可总结如下：

[0075] (i)-R^3基团。R^3通常是含氮杂环上的一个化学部分，其可以被去掩蔽以暴露氨基(-

NH_2)基团；

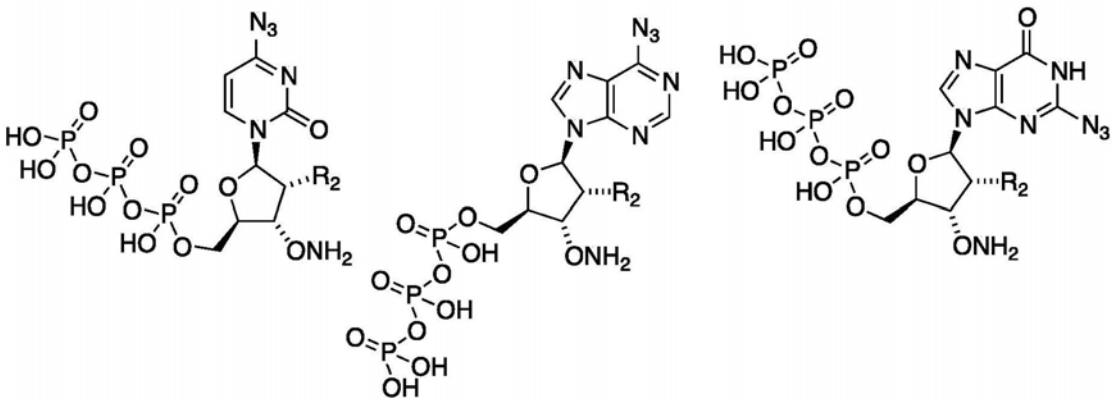
[0076] (ii)-R^1基团。R^1通常是糖上3'-位的化学部分，其可以被去掩蔽以暴露羟基(-OH)基团；

[0077] (iii)-X基团。X通常是赋予酶促加成能力的化学部分(例如5'-三磷酸基团)。

[0078] 不受理论的束缚，据信R^1、R^3和X的组合产生核苷酸类似物，该核苷酸类似物在本文所述的酶促核酸合成方法过程中保护组成部分(i)中的氨基免于突变。具体而言，一种酶促核酸合成方法将涉及具有特征性R^3、X和R^1的核苷酸类似物，其中R^1固定为-ONH_2基团。

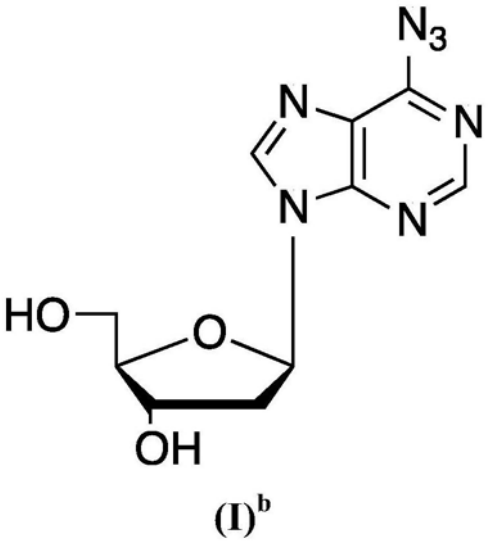
[0079] 在一个实施方案中，R^1和R^2独立地代表-H、-OH、-ONH_2、-$ONC(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基或适宜的羟基保护基。

[0080] 在一个实施方案中，式(I)的化合物选自：

[0081] 

[0082] 其中R^2如文中所定义，例如-OH或-H。在一个实施方案中，R^2是H。

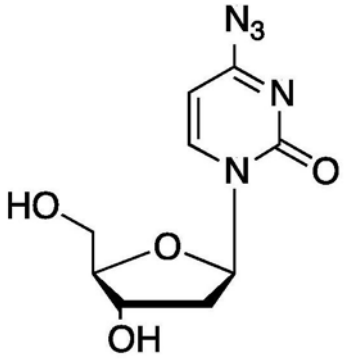
[0083] 在一个实施方案中，式(I)化合物是式$(I)^b$的化合物：

[0084] 

$(I)^b$

[0085] 式$(I)^b$的化合物在化学上被称为N6-叠氮基2'-脱氧腺苷。如图2所示，将式$(I)^b$的化合物暴露于亚硝酸钠后，未观察到向2'-脱氧肌苷的转化。方便地，当暴露于TCEP或另一种还原剂时，式$(I)^b$的化合物很容易地转化为2'-脱氧腺苷，如图3所示。

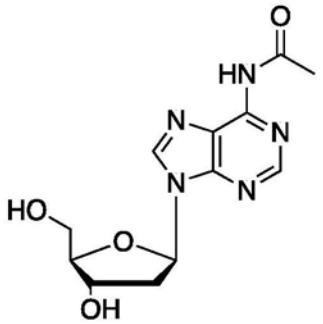
[0086] 在一个实施方案中，式(I)化合物是式$(I)^c$的化合物：

[0087] 

(I)[c]

[0088] 式(I)[c]的化合物在化学上被称为N4-叠氮基2'-脱氧胞苷。如图4所示,将式(I)[c]的化合物暴露于亚硝酸钠后,未观察到向2'-脱氧尿嘧啶的转化。方便地,当暴露于TCEP或另一种还原剂时,式(I)[c]的化合物很容易地转化为2'-脱氧胞苷,如图5所示。因此,本发明提供了为腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶在酸性条件下、在存在试剂例如亚硝酸钠的情况下的氧化脱氨问题提供解决方案的优点。

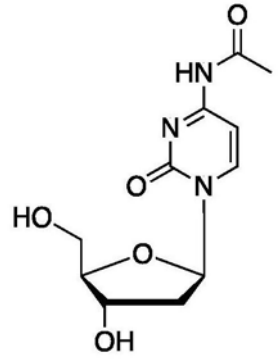
[0089] 在一个实施方案中,式(I)化合物是式(I)[d]的化合物:

[0090] 

(I)[d]

[0091] 式(I)[d]的化合物在化学上被称为N6-乙酰基2'-脱氧腺苷。如图7所示,将式(I)[d]的化合物暴露于亚硝酸钠后,未观察到向2'-脱氧肌苷的转化。方便地,当暴露于40%的甲胺水溶液、碳酸钾、氢氧化铵或氨(例如在乙醇中)或其它合适的试剂时,式(I)[d]的化合物很容易地转化为2'-脱氧腺苷,如图7所示。

[0092] 在一个实施方案中,式(I)化合物是式(I)[e]的化合物:

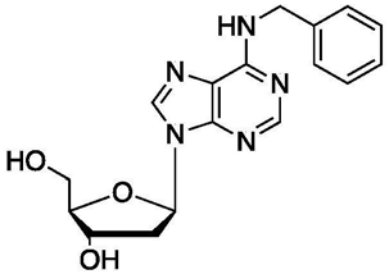
[0093] 

(I)[e]

[0094] 式(I)[e]的化合物在化学上被称为N4-乙酰基2'-脱氧胞苷。如图6所示,将式(I)[e]的

化合物暴露于亚硝酸钠后，未观察到向2'-脱氧尿嘧啶的转化。方便地，当暴露于甲胺或其他碱时，式(I)[e]的化合物很容易地转化为2'-脱氧胞苷，如图6所示。因此，本发明提供了为腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶在酸性条件下、在存在试剂例如亚硝酸钠的情况下的氧化脱氨问题提供解决方案的优点。

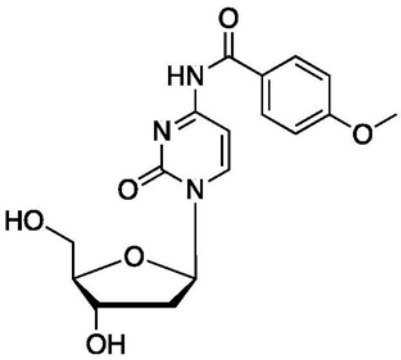
[0095] 在一个实施方案中，式(I)化合物是式(I)[f]的化合物：

[0096] 

(I)[f]

[0097] 式(I)[f]的化合物在化学上被称为N6-苄基2'-脱氧腺苷。如图8所示，将式(I)[f]的化合物暴露于亚硝酸钠后，未观察到向2'-脱氧肌苷的转化。方便地，在合适的催化剂(例如钯或镍)存在下用氢处理时，式(I)[f]的化合物很容易地转化为2'-脱氧腺苷。如图11所示，化合物(I)[f]的三磷酸酯形式可以在DNA合成过程中作为末端转移酶的底物。因此，本发明提供了一种解决氧化脱氨问题的方案，并可用于酶促DNA合成方法。

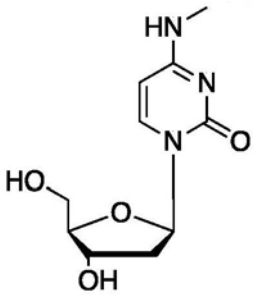
[0098] 在一个实施方案中，式(I)化合物是式(I)[g]的化合物：

[0099] 

(I)[g]

[0100] 式(I)[g]的化合物在化学上被称为N4-茴香酰基2'-脱氧胞苷。如图9所示，将式(I)[g]的化合物暴露于亚硝酸钠后，未观察到向2'-脱氧肌苷的转化。方便地，用甲胺或碳酸钾或其他合适的碱或试剂处理时，式(I)[g]的化合物很容易地转化为2'-脱氧胞苷，如图9所示。相同的化学方法适用于N4-苯甲酰基2'-脱氧胞苷和N6-苯甲酰基2'-脱氧腺苷中的苯甲酰基部分。

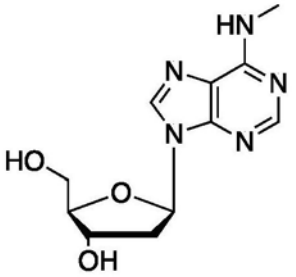
[0101] 在一个实施方案中，式(I)化合物是式(I)[h]的化合物：

[0102] 

$(I)^h$

[0103] 式$(I)^h$的化合物在化学上被称为N4-甲基2'-脱氧胞苷。如此处所示，保护仲胺以避免由亚硝酸盐溶液引起的氧化脱氨作用。因此，N-甲基将是合适的保护基。环外N-甲基可以通过用脱甲基酶例如AlkB处理而方便地除去(D.Li等人，Chem.Res.Toxicol.26(2013)1182-1187)。

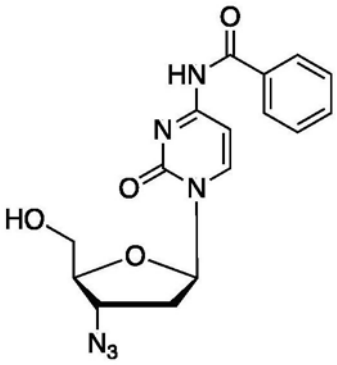
[0104] 在一个实施方案中，式(I)化合物是式$(I)^i$的化合物：

[0105] 

$(I)^i$

[0106] 式$(I)^i$的化合物在化学上被称为N6-甲基2'-脱氧腺苷。如此处所示，保护仲胺以避免由亚硝酸盐溶液引起的氧化脱氨作用。因此，N-甲基将是合适的保护基。环外N-甲基可以通过用脱甲基酶例如AlkB处理而方便地除去(D.Li等人，Chem.Res.Toxicol.26(2013)1182-1187)。如图11所示，化合物$(I)^i$的三磷酸酯形式可以在DNA合成过程中作为末端转移酶的底物。因此，本发明提供了一种解决氧化脱氨问题的方案，并可用于酶促DNA合成方法。

[0107] 在一个实施方案中，式(I)化合物是式$(I)^j$的化合物：

[0108] 

$(I)^j$

[0109] 式$(I)^j$的化合物在化学上称为3'-叠氮基N4-苯甲酰基2'-脱氧胞苷。如图12所示，将式$(I)^j$的化合物暴露于亚硝酸钠后，未观察到向3'-叠氮基2'-脱氧肌苷的转化。方便地，用甲胺或碳酸钾或其他合适的碱或试剂处理时，式$(I)^j$的化合物很容易地转化为3'-叠氮

基2'-脱氧胞苷，如图12所示。与(I)^{j}密切相关的化合物的三磷酸酯N4-苯甲酰基2'-脱氧胞苷三磷酸可以在图11所示的DNA合成过程中作为末端转移酶的底物。因此，本发明提供了一种解决氧化脱氨问题的方案，并可用于酶促DNA合成方法。

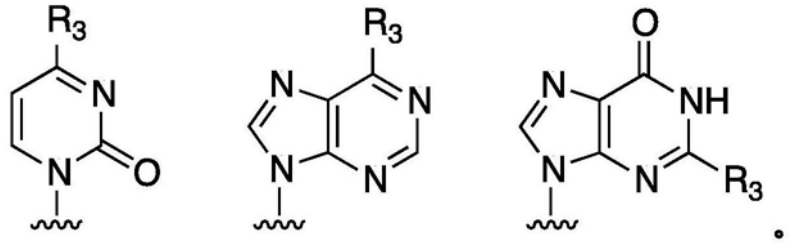
[0110] 在一个实施方案中，X代表-OH基团。在另一个实施方案中，X代表三磷酸酯基团。该实施方案的三磷酸酯基团具有通常可与核苷酸转移酶(例如，聚合酶)或允许通过酶催化或化学催化加成至核酸分子的任何化学部分一起使用的优点。

[0111] 本文中提及的"胺"是指-NH_2基团。

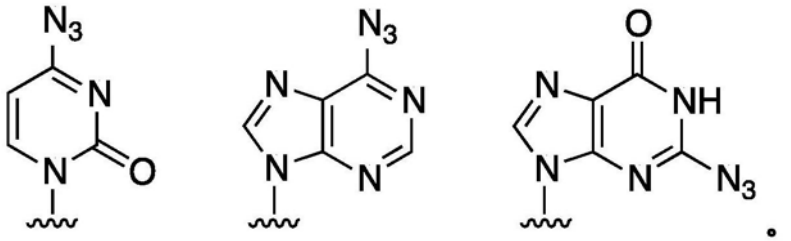
[0112] 本文中提及的"胺掩蔽基团"是指能够产生或"去掩蔽"涉及与互补碱基进行氢键碱基配对的胺基团的任何化学基团。通常，所述去掩蔽会发生化学反应，最合适的是简单的单步化学反应。在一个实施方案中，氢键碱基配对选自：Watson-Crick、Hoogsteen或替代/扩展的遗传密码碱基配对。

[0113] 适用于R^3的胺掩蔽基团的实例包括叠氮化物(-N_3)、苯甲酰基胺(N-苯甲酰基或-NHCOPh)、N-甲基(-NHMe)、异丁酰基胺、二甲基甲酰氨基胺、9-芴基甲基氨基甲酸酯、叔丁基氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯、乙酰胺(N-乙酰基或-NHCOMe)、三氟乙酰胺、邻苯二甲酰胺、苄基胺(N-苄基或-NH-CH_2-苯基)、三苯基甲基胺、亚苄基胺、甲苯磺酰基胺、异硫氰酸酯、N-烯丙基(例如N-二甲基烯丙基(-NHCH_2-CH＝CH_2))和N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)，例如叠氮化物(-N_3)、N-乙酰基(-NHCOMe)、N-苄基(-NH-CH_2-苯基)、N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)、N-甲基(-NHMe)、N-苯甲酰基(-NHCOPh)、N-二甲基烯丙基(-NHCH_2-CH＝CH_2)。

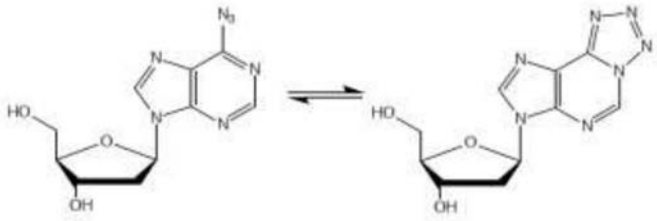
[0114] 在一个实施方案中，B代表选自嘌呤或嘧啶或其衍生物的含氮杂环。在另一个实施方案中，B和R^3可以组合成以下分子结构，其中含氮杂环连接至式(I)化合物的(脱氧)核糖1'位置：

[0115] 

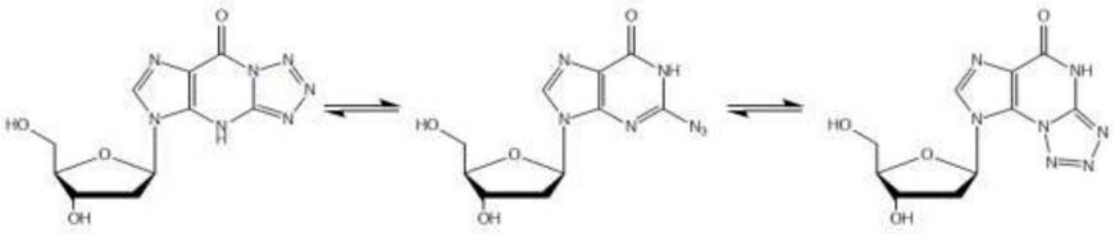
[0116] 在另一个实施方案中，R^3代表叠氮化物(-N_3)基团并且B选自：

[0117] 

[0118] 本文使用的术语"叠氮化物"或"叠氮基"是指-N_3，或者更具体地说，是指-N＝N^+＝N^-基团。还应当理解的是，叠氮化物扩展至四唑基部分的存在。"叠氮化物-四唑"平衡是本领域技术人员公知的，参见Lakshman等人(2010)J.Org.Chem.75,2461-2473。因此，当应用于本文所定义的R^3基团时，本文所提及的叠氮化物等同地扩展至四唑，例如如下所示：



[0119]

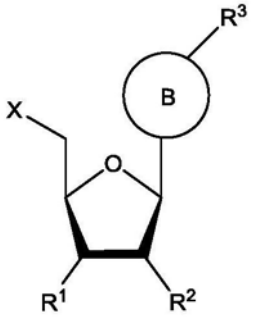


[0120] 该实施方案的优点是可逆地掩蔽-NH_2基团。碱基(B)被封闭在-N_3状态时，不会发生脱氨基化(例如，在亚硝酸钠存在下的脱氨基化)。通过暴露于还原剂(例如TCEP)，可以分别从4-叠氮基胞嘧啶、6-叠氮基腺嘌呤和2-叠氮基鸟嘌呤回收经典的胞嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤。因此，-N_3基团可作为有效的保护基团以防止脱氨基化，尤其是在亚硝酸钠存在下。

[0121] 应当理解，本发明的化合物可以容易地应用于本领域技术人员众所周知的酶促核酸合成方法。核酸合成的非限制性方法可以参见WO2016/128731、WO 2016/139477、WO 2017/009663、GB 1613185.6和GB1714827.1，其各自的内容通过引用并入本文。

[0122] 根据本发明的另一方面，提供了式$(I)^a$的化合物：

[0123]



$(I)^a$

[0124] 其中：

[0125] R^1代表能够被去掩蔽以显现羟基的部分，包括

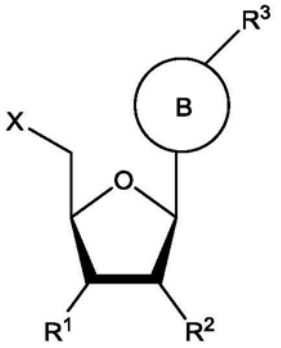
[0126] -H、-OH、-ONH_2、-ONC$(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基；

[0127] R^2代表-H、-OH、-ONH_2、-ONC$(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基或任何其它分子部分；

[0128] X代表一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合，其中所述基团能够赋予酶促加成的能力；

[0129] R^3代表胺掩蔽基团，其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对，并且所述氨基的脱氨基化可导致与互补碱基的氢键键合改变；并且B代表含氮杂环。

[0130] 根据本发明的另一方面，提供了式(I)[a]化合物：

[0131] 

(I)[a]

[0132] 其中：

[0133] R^1和R^2独立地代表-H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基、氰基乙基、巯基或适宜的羟基保护基；

[0134] X代表一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合；

[0135] R^3代表胺掩蔽基团，其中所述氨基参与与互补碱基的氢键碱基配对；并且

[0136] B代表含氮杂环。

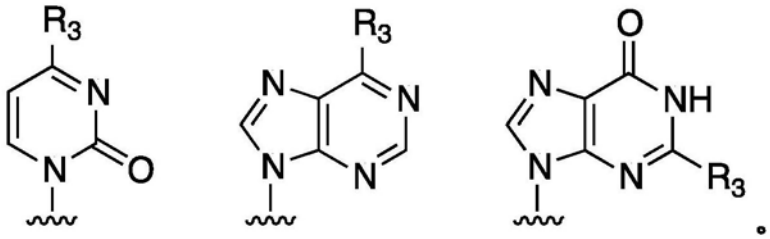
[0137] 在一个实施方案中，X代表三磷酸酯基团。

[0138] 在一个实施方案中，R^1和R^2独立地代表-H、-OH、$-ONH_2$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2N_3$、$-OCH_2CHCH_2$、$-OPO_3^{2-}$、$-OCH_2SSCH_2CH_3$、$-OCOCH_3$、$-OCH_2CH_2CN$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基。

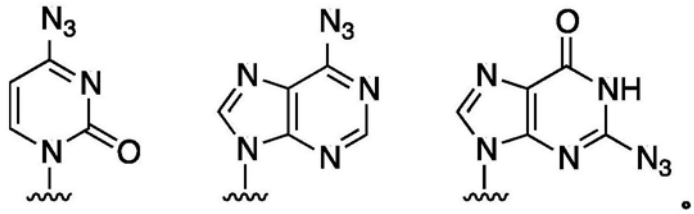
[0139] 在另一个实施方案中，R^1和R^2独立地代表-H、-OH、$-ONH_2$、$-N_3$、$-OCH_2N_3$、$-ONC(CH_3)_2$、$-OCH_2CHCH_2$、-O-甲氧基乙基、-O-烷基、-O-烷氧基、氰基乙基、巯基或适宜的羟基保护基。

[0140] 适用于R^3的胺掩蔽基团的实例包括叠氮化物($-N_3$)、苯甲酰基胺(N-苯甲酰基或-NHCOPh)、N-甲基(-NHMe)、异丁酰基胺、二甲基甲酰氨基胺、9-芴基甲基氨基甲酸酯、叔丁基氨基甲酸酯、苄基氨基甲酸酯、乙酰胺(N-乙酰基或-NHCOMe)、三氟乙酰胺、邻苯二甲酰胺、苄基胺(N-苄基或$-NH-CH_2-$苯基)、三苯基甲基胺、亚苄基胺、甲苯磺酰基胺、异硫氰酸酯、N-烯丙基(例如N-二甲基烯丙基($-NHCH_2-CH=CH_2$))和N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)，例如叠氮化物($-N_3$)、N-乙酰基(-NHCOMe)、N-苄基($-NH-CH_2-$苯基)、N-茴香酰基(-NHCOPh-OMe)、N-甲基(-NHMe)、N-苯甲酰基(-NHCOPh)、N-二甲基烯丙基($-NHCH_2-CH=CH_2$)。

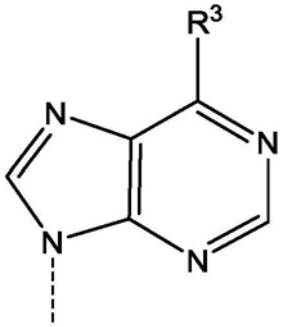
[0141] 在一个实施方案中，B代表选自嘌呤或嘧啶的含氮杂环。在另一个实施方案中，B和R^3可以组合成以下分子结构，其中含氮杂环连接至式(I)化合物的(脱氧)核糖1'位置：

[0142] 

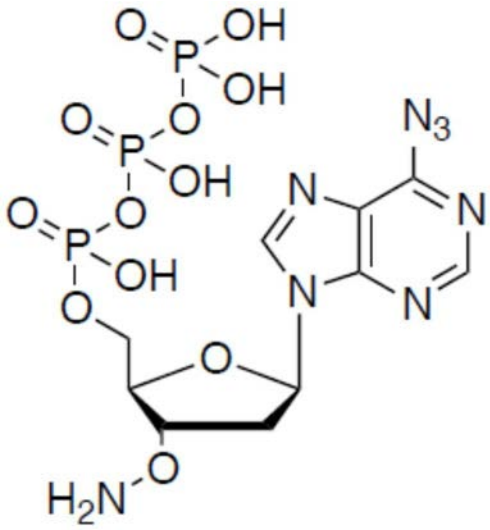
[0143] 在一个实施方案中，R^3代表叠氮化物($-N_3$)基团并且B选自：

[0144] 

[0145] 一个可以提到的具体的式(I)[a]化合物(1)是其中R^1代表-ONH_2,R^2代表H,X代表三磷酸酯基团,B代表:

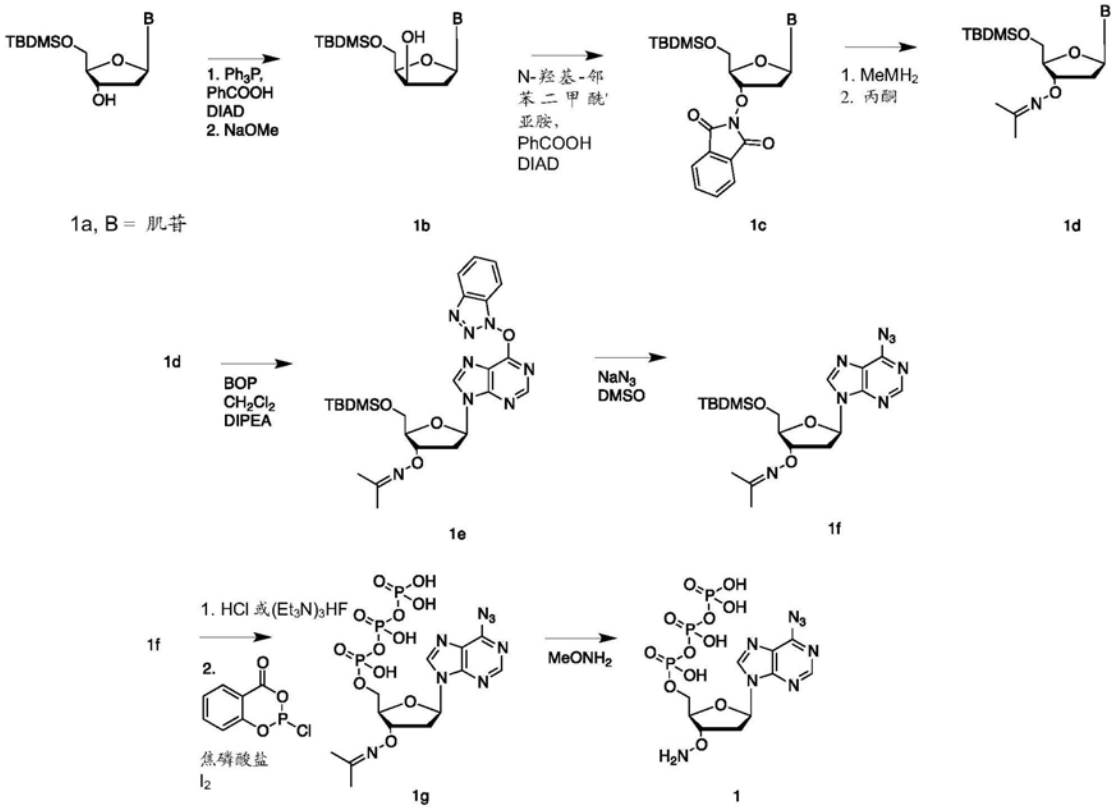
[0146] 

[0147] 并且R^3代表N_3的化合物,即式(1)的化合物:

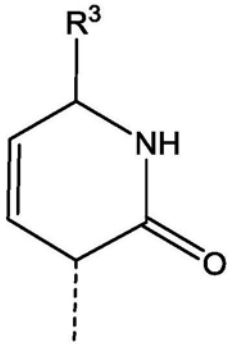
[0148] 

(1)。

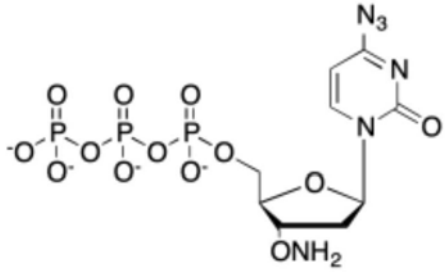
[0149] 式(1)的化合物可以按照如下合成方案制备:

[0150] 

[0151] 另一个可以提到的具体的式(I)[a]化合物(2)是其中R^1代表-ONH_2,R^2代表H,X代表三磷酸酯基团,B代表:

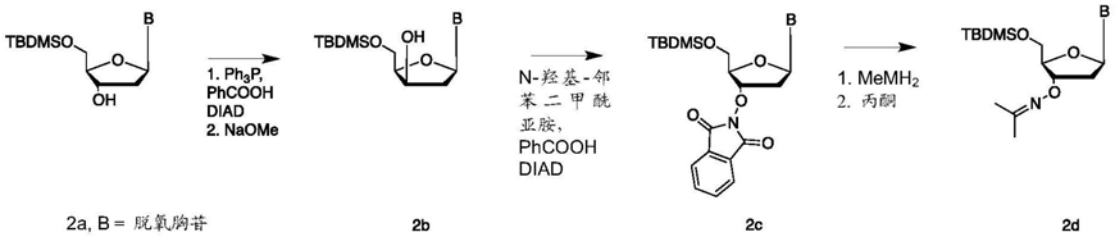
[0152] 

[0153] 并且R^3代表N_3的化合物,即式(2)的化合物:

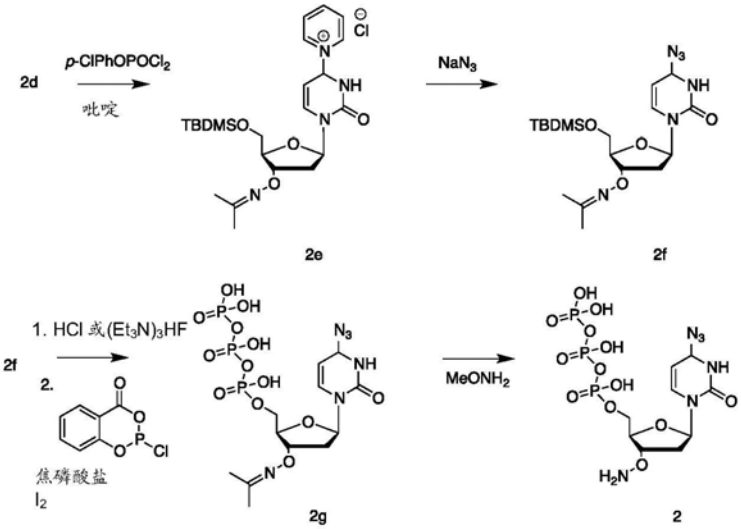
[0154] 

(2)。

[0155] 式(2)的化合物可以按照如下合成方案制备:

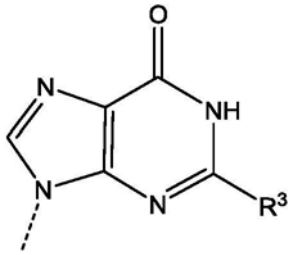


[0156]



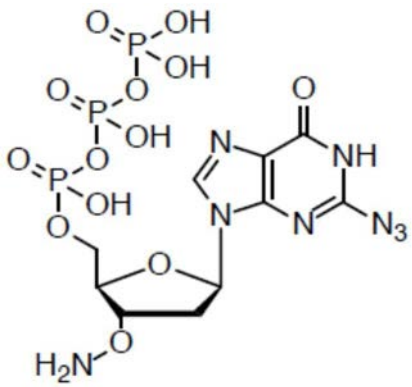
[0157] 另一个可以提到的具体的式(I)[a]化合物(3)是其中R^1代表-ONH_2,R^2代表H,X代表三磷酸酯基团,B代表:

[0158]



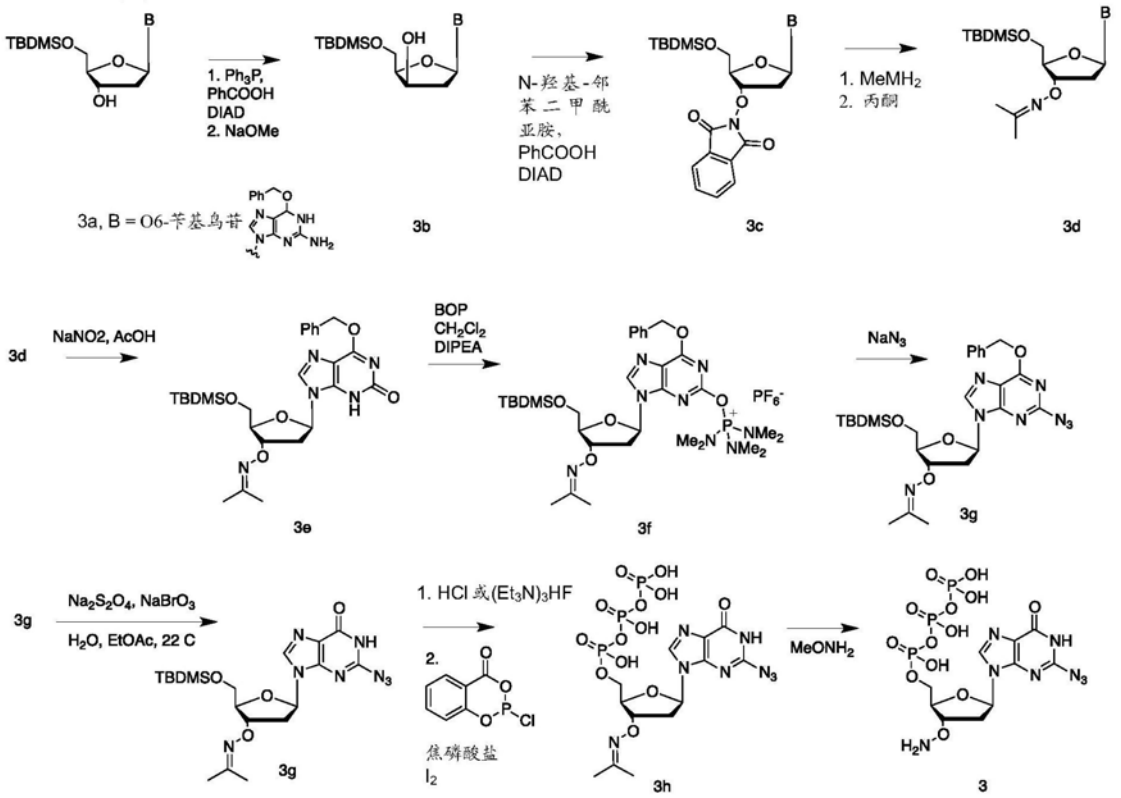
[0159] 并且R^3代表N_3的化合物,即式(3)的化合物:

[0160]

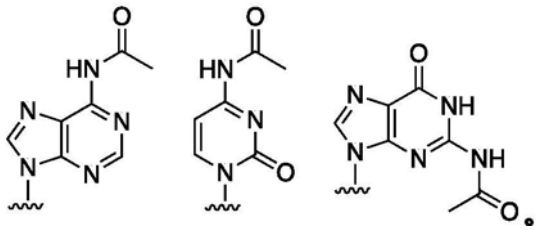


(3)。

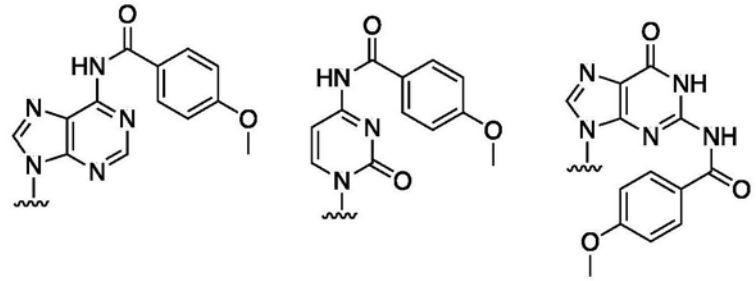
[0161] 式(3)的化合物可以按照如下合成方案制备:

[0162] 

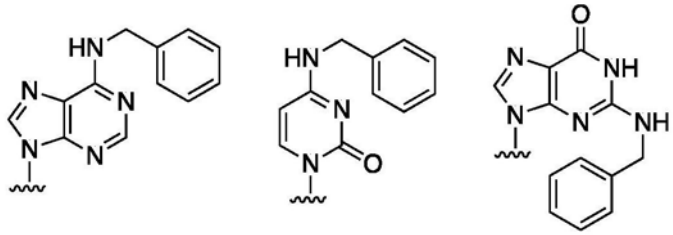
[0163] 在另一个实施方案中，R^3代表乙酰基(-Ac)基团并且B选自：

[0164] 

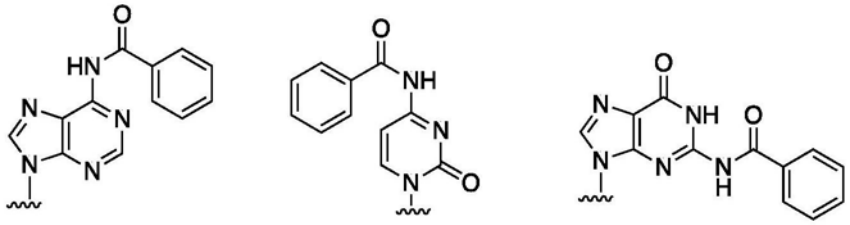
[0165] 在另一个实施方案中，R^3代表茴香酰基基团并且B选自：

[0166] 

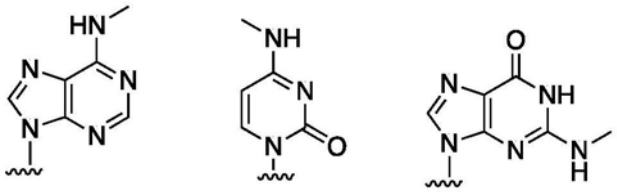
[0167] 在另一个实施方案中，R^3代表苄基基团并且B选自：

[0168] 

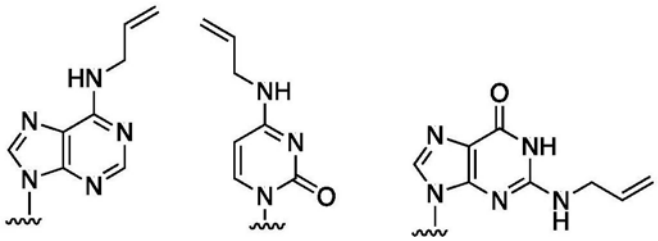
[0169] 在另一个实施方案中，R^3代表苄基基团并且B选自：

[0170] 

[0171] 在另一个实施方案中，R^3代表甲基基团并且B选自：

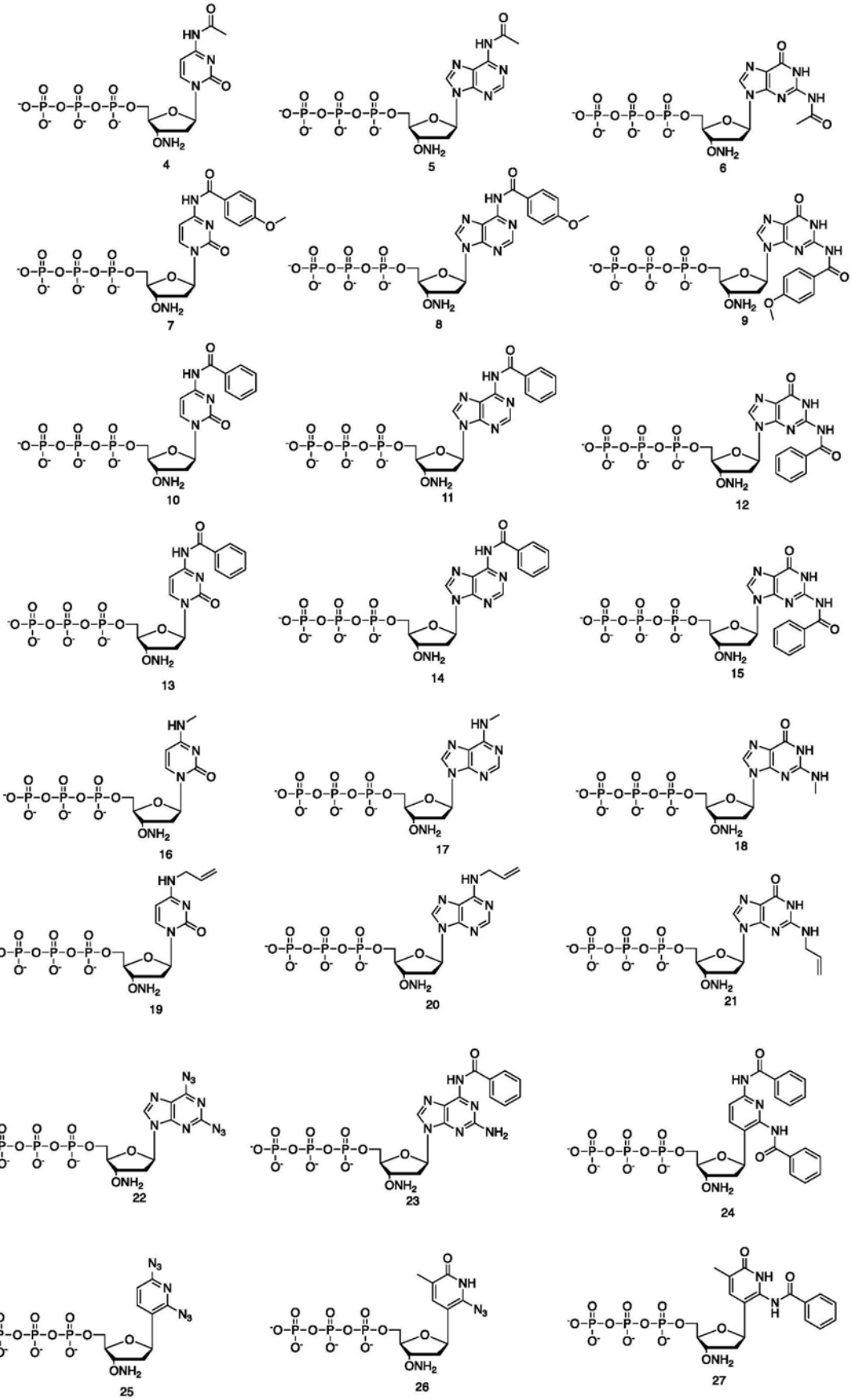
[0172] 

[0173] 在另一个实施方案中，R^3代表烯丙基基团并且B选自：

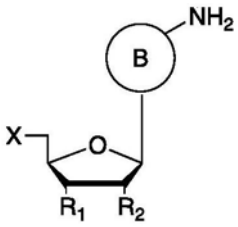
[0174] 

[0175] 可以提到的具体的式(I)^{a}化合物(4-27)是其中R^1代表-ONH_2，R^2代表H，X代表三磷酸酯基团并且B代表如上所述的碱基的化合物，其形成如下化合物：

[0176]

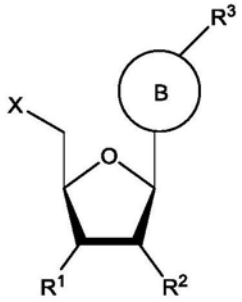


[0177] 根据本发明的另一方面,提供了一种制备式(V)化合物的方法:

[0178] 

(V)

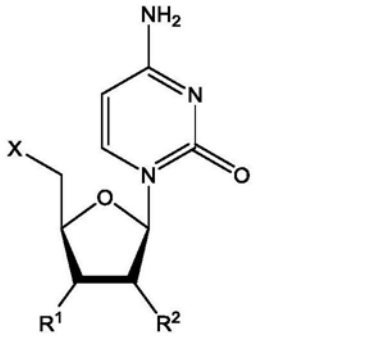
[0179] 其中X、R^1、R^2和B如文中所定义，所述方法包括将式(I)化合物与化学物质、电磁辐射、热和/或电流反应：

[0180] 

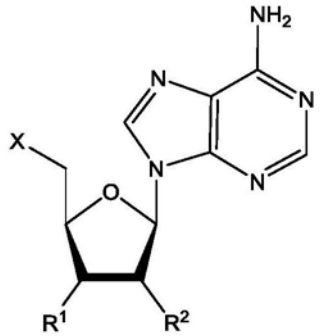
(I)

[0181] 其中X、R^1、R^2、R^3和B如文中所定义。

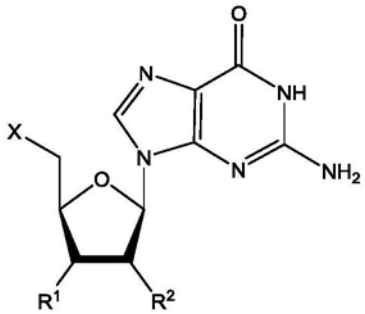
[0182] 根据本发明的另一方面，提供了一种制备式(II)、(III)或(IV)的化合物的方法：

[0183] 

(II)

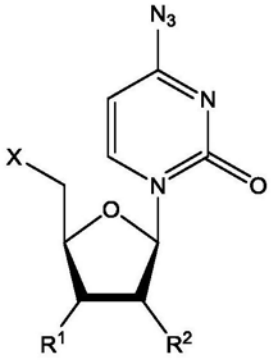


(III)

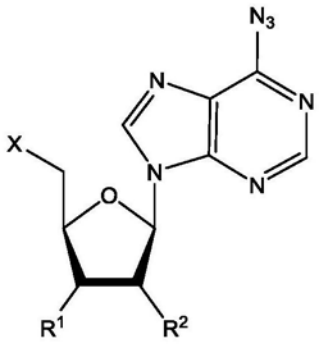


(IV)

[0184] 其中X、R^1和R^2如文中所定义，所述方法包括分别将式$(II)^a$、$(III)^a$或$(IV)^a$的化合物与化学物质、电磁辐射和/或电流反应：

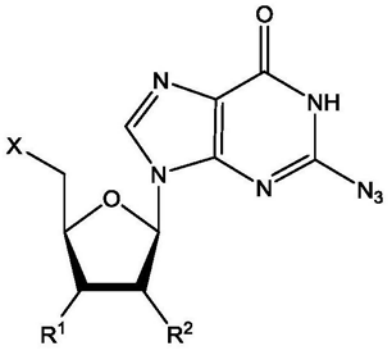


(II)[a]



(III)[a]

[0185]

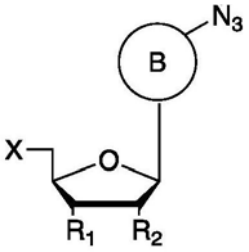


(IV)[a]

[0186] 其中X、R^1和R^2如文中所定义。

[0187] 根据本发明的另一方面，提供了一种制备如文中所定义的式(II)、(III)或(IV)的化合物的方法，该方法包括将式(VI)的化合物与还原剂反应：

[0188]

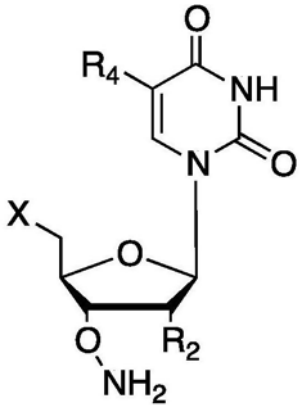


(VI)

[0189] 其中X、R^1、R^2和B如文中所定义。

[0190] 在一个实施方案中，还原剂选自β-巯基乙醇、二硫苏糖醇或基于膦的还原剂，例如三(羟甲基)膦(THP)、三(羟丙基)膦(THPP)和三(2-羧基乙基)膦(TCEP)。

[0191] 根据本发明的另一方面，提供了式(VII)的化合物：

[0192] 

(VII)

[0193] 其中R^2代表-H、-OH、-ONH_2、-ONC$(CH_3)_2$、-OCH_2N_3、-OCH_2CHCH_2、-OPO_3^{2-}、-$OCH_2SSCH_2CH_3$、-$OCOCH_3$、-OCH_2CH_2CN、-O-甲氧基乙基、-O-烷基或-O-烷氧基或适宜的羟基保护基；

[0194] X代表一个或多个磷酸酯基、硫代磷酸酯基、硼化磷酸酯基或亚氨基磷酸酯基团或其任何组合；并且

[0195] R^4代表C_{2-6}烷基、-F、-Cl、-Br、-I、烷氧基、生物素、烷基胺或叠氮化物。

[0196] 根据本发明的另一方面，提供了式(VII)化合物在酶促核酸合成方法中的用途。

[0197] 在一个实施方案中，酶促核酸合成方法选自可逆终止的酶促核酸合成方法和模板化和非模板化从头酶促核酸合成方法。

[0198] 以下研究说明了本发明：

[0199] 实施例1：使用叠氮化物掩蔽的含氮杂环的酶促DNA合成

[0200] 在下面的DNA合成方法中，使用工程化的末端脱氧核苷酸转移酶将3'-O-氨基氧基可逆终止的2'-脱氧核苷5'-三磷酸添加到DNA链的3'-末端。重复该加成过程，直到合成所期望的序列。在每个加成循环之后，必须将3'-O-氨基氧基部分脱氨基化(例如用酸性亚硝酸钠)以实现可逆终止。在每个加成循环之后的脱氨基化过程还导致含有胺的含氮杂环(例如腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤)的诱变脱氨基化。

[0201] 因此，在该实施例中，含氮杂环上的氨基部分用叠氮基团掩蔽，以防止氧化脱氨基化(图1-4)。例如，在每个加成循环期间，在工程化TdT和所需的缓冲液成分的存在下，使用2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N4-叠氮基胞苷5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N6-叠氮基腺嘌呤5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N2-叠氮基鸟苷5'-三磷酸和2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-5-乙基尿苷5'-三磷酸之一或其组合作为核苷酸构建块。

[0202] 由此合成具有胺掩蔽的含氮杂环(例如，N4-叠氮基胞嘧啶、N6-叠氮基腺嘌呤、N2-叠氮基鸟嘌呤)的DNA聚合物。通过暴露于还原剂(例如，TCEP)使所有胺掩蔽的含氮杂环去掩蔽以显现氨基。此时的DNA聚合物由具有去掩蔽的氨基的含氮杂环(例如，N4-叠氮基胞嘧啶去掩蔽为胞嘧啶，N6-叠氮基腺嘌呤去掩蔽为腺嘌呤，N2-叠氮基鸟嘌呤去掩蔽为鸟嘌呤)组成。现在，DNA聚合物可用于下游的分子生物学应用。

[0203] 实施例2：使用N-乙酰基掩蔽的含氮杂环的酶促DNA合成

[0204] 在下面的DNA合成方法中，使用工程化的末端脱氧核苷酸转移酶将3'-O-氨基氧基可逆终止的2'-脱氧核苷5'-三磷酸添加到DNA链的3'-末端。重复该加成过程，直到合成所

期望的序列。在每个加成循环之后，必须将3'-O-氨基氧基部分脱氨基化(例如用酸性亚硝酸钠)以实现可逆终止。在每个加成循环之后的脱氨基化过程还导致含有胺的含氮杂环(例如腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤)的诱变脱氨基化。

[0205] 因此，在该实施例中，含氮杂环上的氨基部分用乙酰基掩蔽，以防止氧化脱氨基化(图6和7)。例如，在每个加成循环期间，在工程化TdT和所需的缓冲液成分的存在下，使用2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N4-乙酰基胞苷5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N6-乙酰基腺嘌呤5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N2-乙酰基鸟苷5'-三磷酸和2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-5-乙基尿苷5'-三磷酸之一或其组合作为核苷酸构建块。

[0206] 由此合成具有胺掩蔽的含氮杂环(例如，N4-乙酰基胞嘧啶、N6-乙酰基腺嘌呤、N2-乙酰基鸟嘌呤)的DNA聚合物。如图6和7所示，通过暴露于碱(例如，碳酸钾)使所有胺掩蔽的含氮杂环脱乙酰化，从而去掩蔽以显现氨基。此时的DNA聚合物由具有去掩蔽的氨基的含氮杂环(例如，N4-乙酰基胞嘧啶去掩蔽为胞嘧啶，N6-乙酰基腺嘌呤去掩蔽为腺嘌呤，N2-乙酰基鸟嘌呤去掩蔽为鸟嘌呤)组成。现在，DNA聚合物可用于下游的分子生物学应用。

[0207] 实施例3：使用N-苯甲酰基-和N-茴香酰基-掩蔽的含氮杂环的酶促DNA合成

[0208] 在下面的DNA合成方法中，使用工程化的末端脱氧核苷酸转移酶将3'-O-氨基氧基可逆终止的2'-脱氧核苷5'-三磷酸添加到DNA链的3'-末端。重复该加成过程，直到合成所期望的序列。在每个加成循环之后，必须将3'-O-氨基氧基部分脱氨基化(例如用酸性亚硝酸钠)以实现可逆终止。在每个加成循环之后的脱氨基化过程还导致含有胺的含氮杂环(例如腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤)的诱变脱氨基化。

[0209] 因此，在该实施例中，含氮杂环上的氨基部分用苯甲酰基掩蔽，以防止氧化脱氨基化(图9和12)。例如，在每个加成循环期间，在工程化TdT和所需的缓冲液成分的存在下，使用2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N4-苯甲酰基胞苷5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N6-苯甲酰基腺嘌呤5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N2-苯甲酰基鸟苷5'-三磷酸和2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-5-乙基尿苷5'-三磷酸之一或其组合作为核苷酸构建块。

[0210] 由此合成具有胺掩蔽的含氮杂环(例如，N4-苯甲酰基胞嘧啶、N6-苯甲酰基腺嘌呤、N2-苯甲酰基鸟嘌呤)的DNA聚合物。如图9和12所示，通过暴露于碱(例如，甲胺)使所有胺掩蔽的含氮杂环脱苯甲酰化，从而去掩蔽以显现氨基。此时的DNA聚合物由具有去掩蔽的氨基的含氮杂环(例如，N4-苯甲酰基胞嘧啶去掩蔽为胞嘧啶，N6-苯甲酰基腺嘌呤去掩蔽为腺嘌呤，N2-苯甲酰基鸟嘌呤去掩蔽为鸟嘌呤)组成。现在，DNA聚合物可用于下游的分子生物学应用。

[0211] 实施例4：使用N-苄基掩蔽的含氮杂环的酶促DNA合成

[0212] 在下面的DNA合成方法中，使用工程化的末端脱氧核苷酸转移酶将3'-O-氨基氧基可逆终止的2'-脱氧核苷5'-三磷酸添加到DNA链的3'-末端。重复该加成过程，直到合成所期望的序列。在每个加成循环之后，必须将3'-O-氨基氧基部分脱氨基化(例如用酸性亚硝酸钠)以实现可逆终止。在每个加成循环之后的脱氨基化过程还导致含有胺的含氮杂环(例如腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤)的诱变脱氨基化。

[0213] 因此，在该实施例中，含氮杂环上的氨基部分用苄基掩蔽，以防止氧化脱氨基化(图8)。例如，在每个加成循环期间，在工程化TdT和所需的缓冲液成分的存在下，使用2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N4-苄基胞苷5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N6-苄基腺嘌呤5'-

三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N2-苄基鸟苷5'-三磷酸和2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-5-乙基尿苷5'-三磷酸之一或其组合作为核苷酸构建块。

[0214] 由此合成具有胺掩蔽的含氮杂环(例如,N4-苄基胞嘧啶、N6-苄基腺嘌呤、N2-苄基鸟嘌呤)的DNA聚合物。通过氢解(例如,Pd-C)或用叔丁醇盐和O_2在DMSO中处理使所有胺掩蔽的含氮杂环脱苄基化,从而去掩蔽以显现氨基。此时的DNA聚合物由具有去掩蔽的氨基的含氮杂环(例如,N4-苄基胞嘧啶去掩蔽为胞嘧啶,N6-苄基腺嘌呤去掩蔽为腺嘌呤,N2-苄基鸟嘌呤去掩蔽为鸟嘌呤)组成。现在,DNA聚合物可用于下游的分子生物学应用。

[0215] 实施例5:使用N-甲基掩蔽的含氮杂环的酶促DNA合成

[0216] 在下面的DNA合成方法中,使用工程化的末端脱氧核苷酸转移酶将3'-O-氨基氧基可逆终止的2'-脱氧核苷5'-三磷酸添加到DNA链的3'-末端。重复该加成过程,直到合成所期望的序列。在每个加成循环之后,必须将3'-O-氨基氧基部分脱氨基化(例如用酸性亚硝酸钠)以实现可逆终止。在每个加成循环之后的脱氨基化过程还导致含有胺的含氮杂环(例如腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤)的诱变脱氨基化。

[0217] 因此,在该实施例中,含氮杂环上的氨基部分用甲基掩蔽。例如,在每个加成循环期间,在工程化TdT和所需的缓冲液成分的存在下,使用2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N4-甲基胞苷5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N6-甲基腺嘌呤5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N2-甲基鸟苷5'-三磷酸和2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-5-乙基尿苷5'-三磷酸之一或其组合作为核苷酸构建块。

[0218] 由此合成具有胺掩蔽的含氮杂环(例如,N4-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、N2-甲基鸟嘌呤)的DNA聚合物。通过暴露于脱甲基酶使所有胺掩蔽的含氮杂环脱甲基化,从而去掩蔽以显现氨基。例如,可以将胺掩蔽的DNA聚合物暴露于已知脱甲基酶的合剂或一种单一脱甲基酶(例如DNA修复酶AlkB)。此时的DNA聚合物由具有去掩蔽的氨基的含氮杂环(例如,N4-甲基胞嘧啶去掩蔽为胞嘧啶,N6-甲基腺嘌呤去掩蔽为腺嘌呤,N2-甲基鸟嘌呤去掩蔽为鸟嘌呤)组成。现在,DNA聚合物可用于下游的分子生物学应用。

[0219] 实施例6:使用N-烯丙基掩蔽的含氮杂环的酶促DNA合成

[0220] 在下面的DNA合成方法中,使用工程化的末端脱氧核苷酸转移酶将3'-O-氨基氧基可逆终止的2'-脱氧核苷5'-三磷酸添加到DNA链的3'-末端。重复该加成过程,直到合成所期望的序列。在每个加成循环之后,必须将3'-O-氨基氧基部分脱氨基化(例如用酸性亚硝酸钠)以实现可逆终止。在每个加成循环之后的脱氨基化过程还导致含有胺的含氮杂环(例如腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤)的诱变脱氨基化。

[0221] 因此,在该实施例中,含氮杂环上的氨基部分用烯丙基掩蔽,以防止氧化脱氨基化(图10)。例如,在每个加成循环期间,在工程化TdT和所需的缓冲液成分的存在下,使用2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N4-烯丙基胞苷5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N6-烯丙基腺嘌呤5'-三磷酸、2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-N2-烯丙基鸟苷5'-三磷酸和2'-脱氧-3'-O-氨基氧基-5-乙基尿苷5'-三磷酸之一或其组合作为核苷酸构建块。

[0222] 由此合成具有胺掩蔽的含氮杂环(例如,N4-烯丙基胞嘧啶、N6-烯丙基腺嘌呤、N2-烯丙基鸟嘌呤)的DNA聚合物。通过暴露于四(三苯基膦)钯使所有胺掩蔽的含氮杂环脱烯丙基化,从而去掩蔽以显现氨基。此时的DNA聚合物由具有去掩蔽的氨基的含氮杂环(例如,N4-烯丙基胞嘧啶去掩蔽为胞嘧啶,N6-烯丙基腺嘌呤去掩蔽为腺嘌呤,N2-烯丙基鸟嘌呤去

掩蔽为鸟嘌呤)组成。现在,DNA聚合物可用于下游的分子生物学应用。

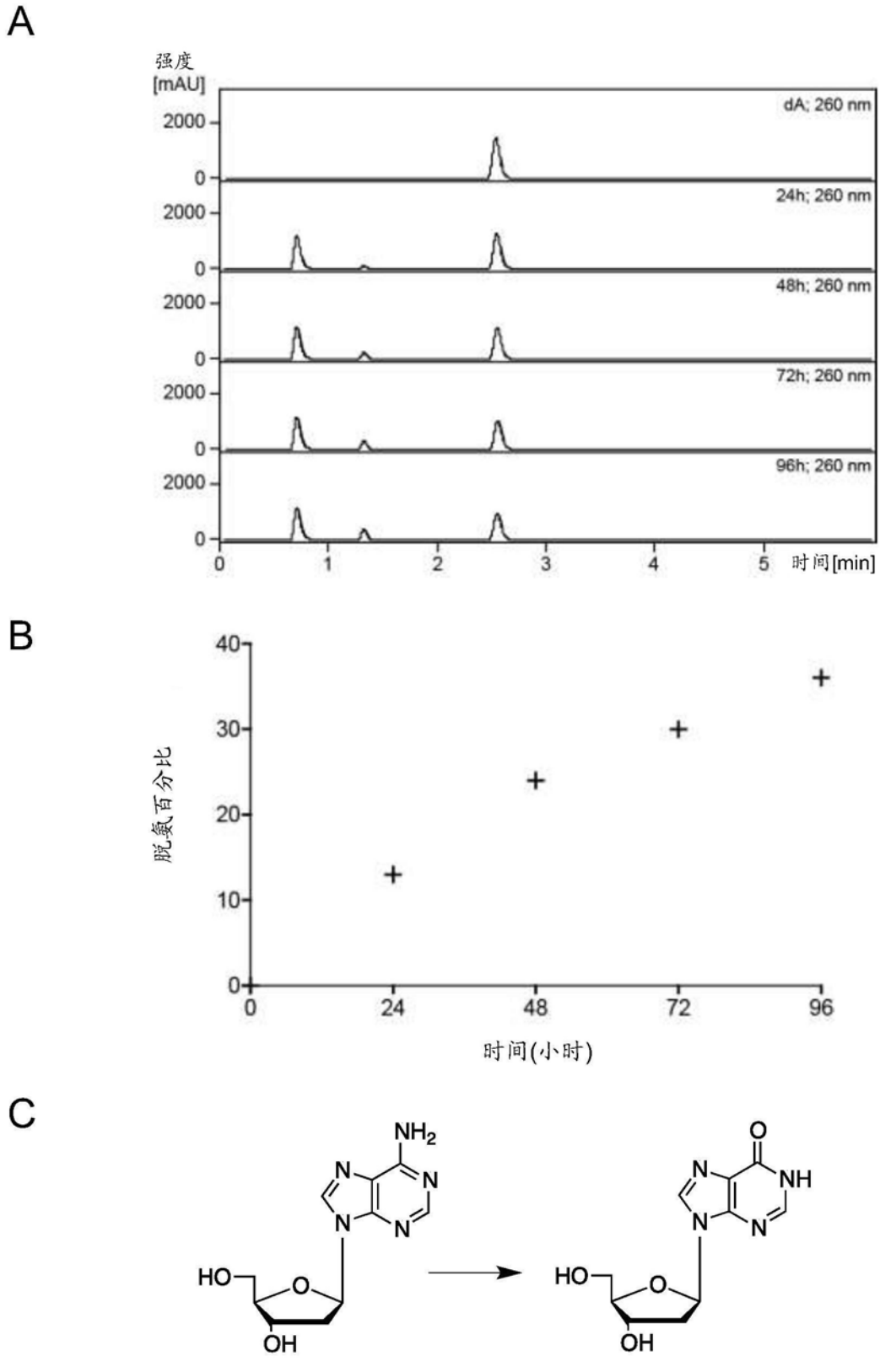

A
强度
[mAU]
dA; 260 nm
24h; 260 nm
48h; 260 nm
72h; 260 nm
96h; 260 nm
2000
0
时间[min]
B
脱氨百分比
时间(小时)
C
NH2
HO
OH
O
NH

图1

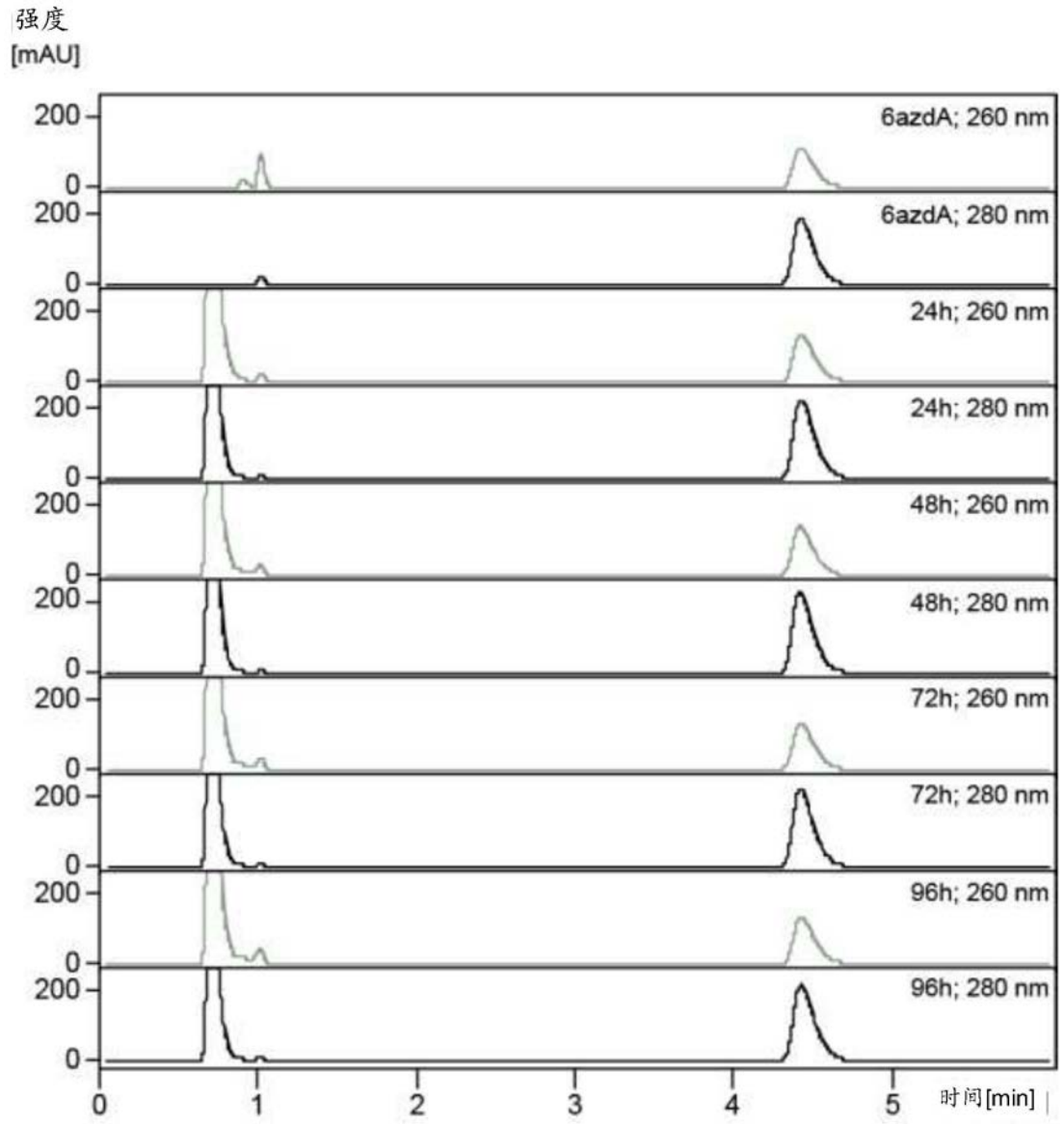

强度
[mAU]
6azdA; 260 nm
6azdA; 280 nm
24h; 260 nm
24h; 280 nm
48h; 260 nm
48h; 280 nm
72h; 260 nm
72h; 280 nm
96h; 260 nm
96h; 280 nm
200
0
0
1
2
3
4
5
时间[min]

图2

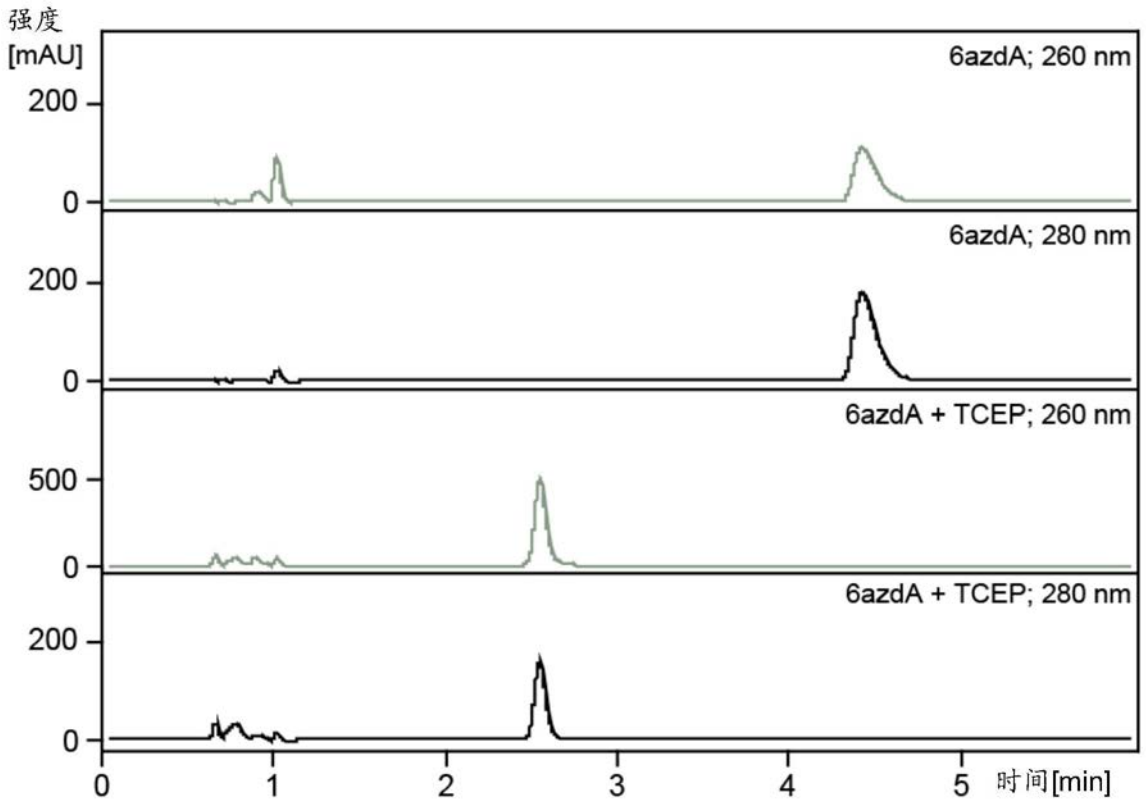

强度
[mAU]
6azdA; 260 nm
200
0
6azdA; 280 nm
200
0
6azdA + TCEP; 260 nm
500
0
6azdA + TCEP; 280 nm
200
0
0
1
2
3
4
5
时间[min]

图3

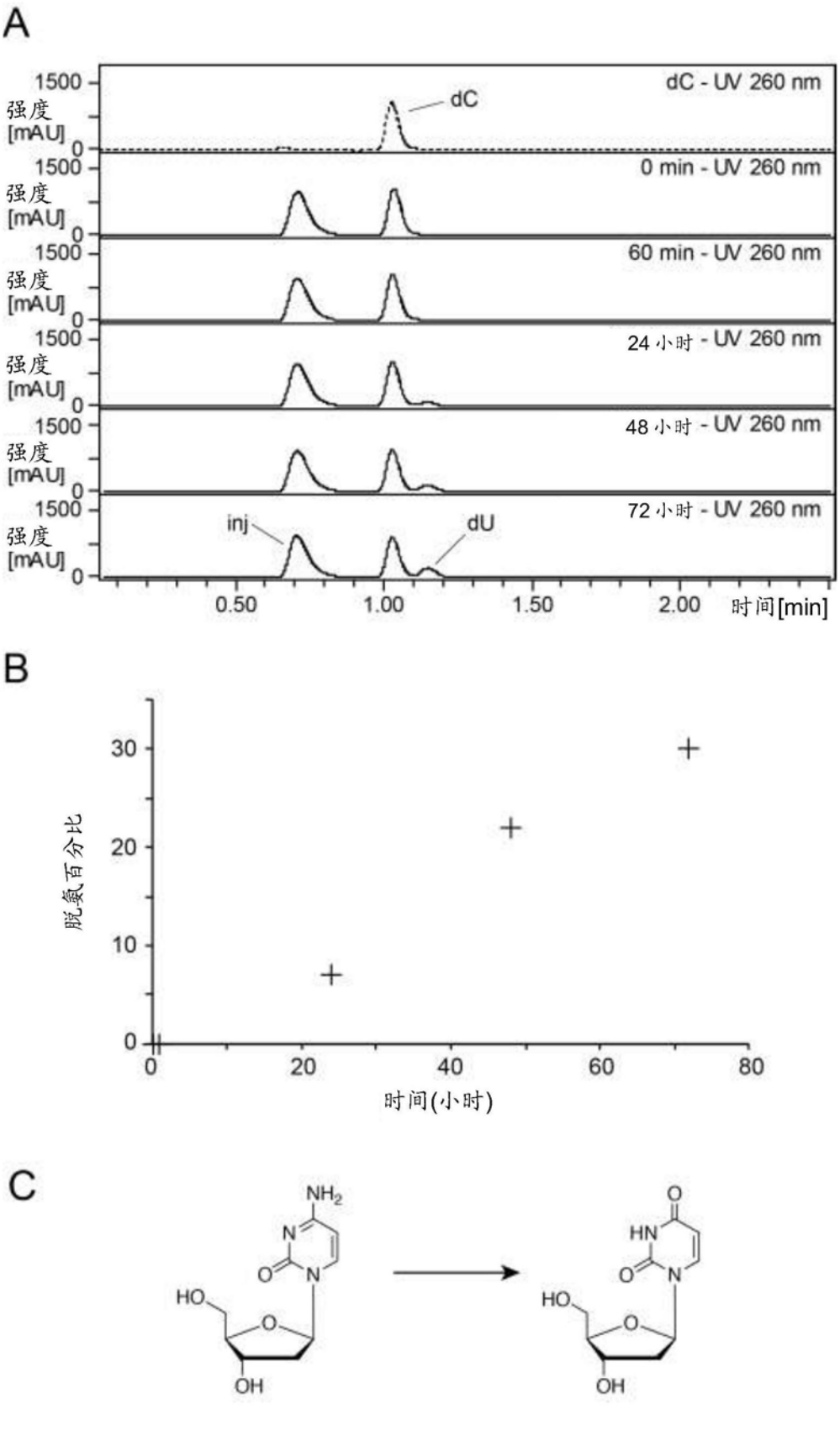

A
dC - UV 260 nm
0 min - UV 260 nm
60 min - UV 260 nm
24 小时 - UV 260 nm
48 小时 - UV 260 nm
72 小时 - UV 260 nm
强度 [mAU]
1500
0
dC
inj
dU
0.50
1.00
1.50
2.00
时间[min]
B
脱氨百分比
30
20
10
0
0
20
40
60
80
时间(小时)
C
NH2
N
O
HO
OH
HN

图4

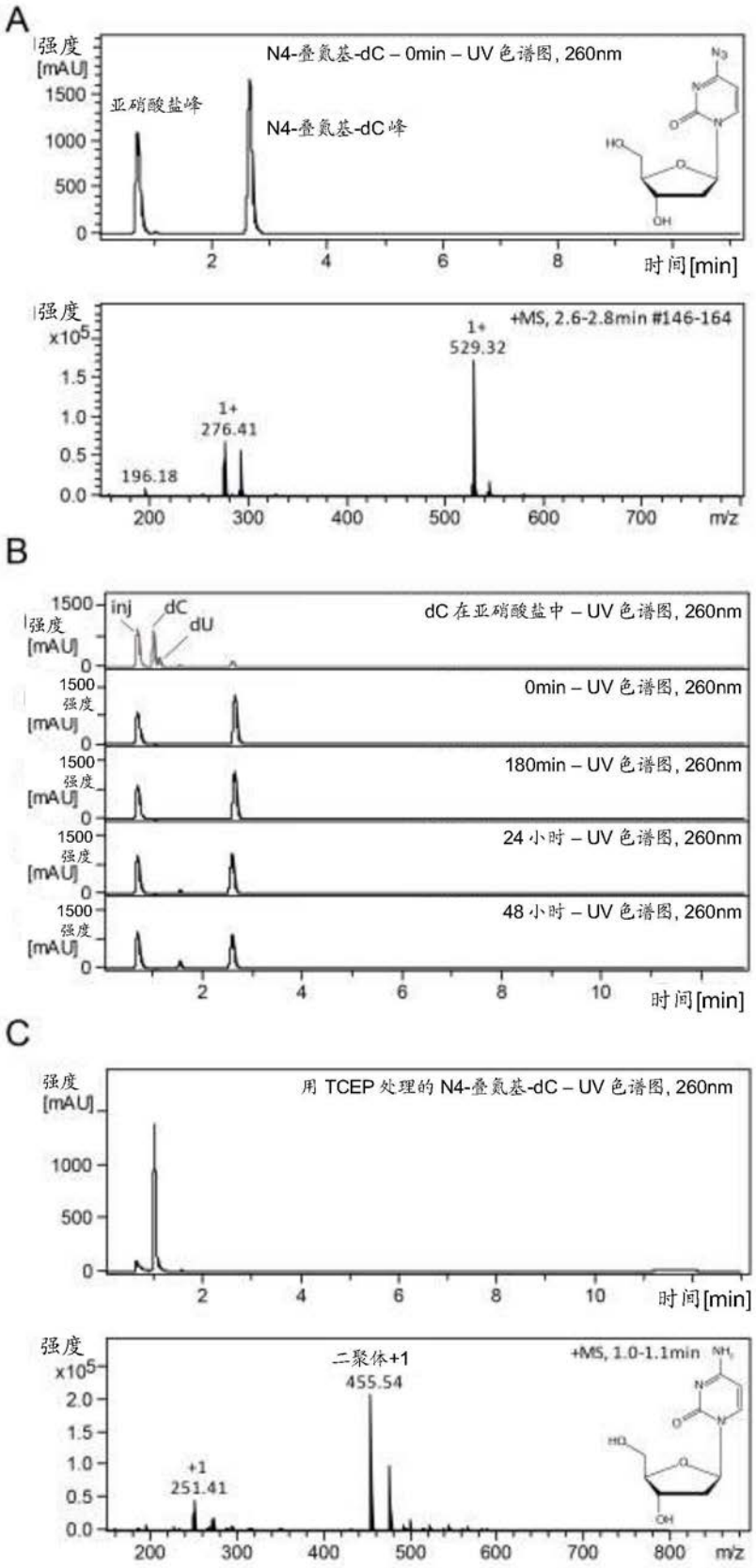

A
强度 [mAU]
N4-叠氮基-dC – 0min – UV 色谱图, 260nm
亚硝酸盐峰
N4-叠氮基-dC峰
时间[min]
强度 x10^5
+MS, 2.6-2.8min #146-164
1+ 529.32
1+ 276.41
196.18
m/z
B
inj
dC
dU
dC 在亚硝酸盐中 – UV 色谱图, 260nm
0min – UV 色谱图, 260nm
180min – UV 色谱图, 260nm
24 小时 – UV 色谱图, 260nm
48 小时 – UV 色谱图, 260nm
时间[min]
C
用 TCEP 处理的 N4-叠氮基-dC – UV 色谱图, 260nm
时间[min]
强度 x10^5
二聚体+1 455.54
+MS, 1.0-1.1min
+1 251.41
m/z

图5

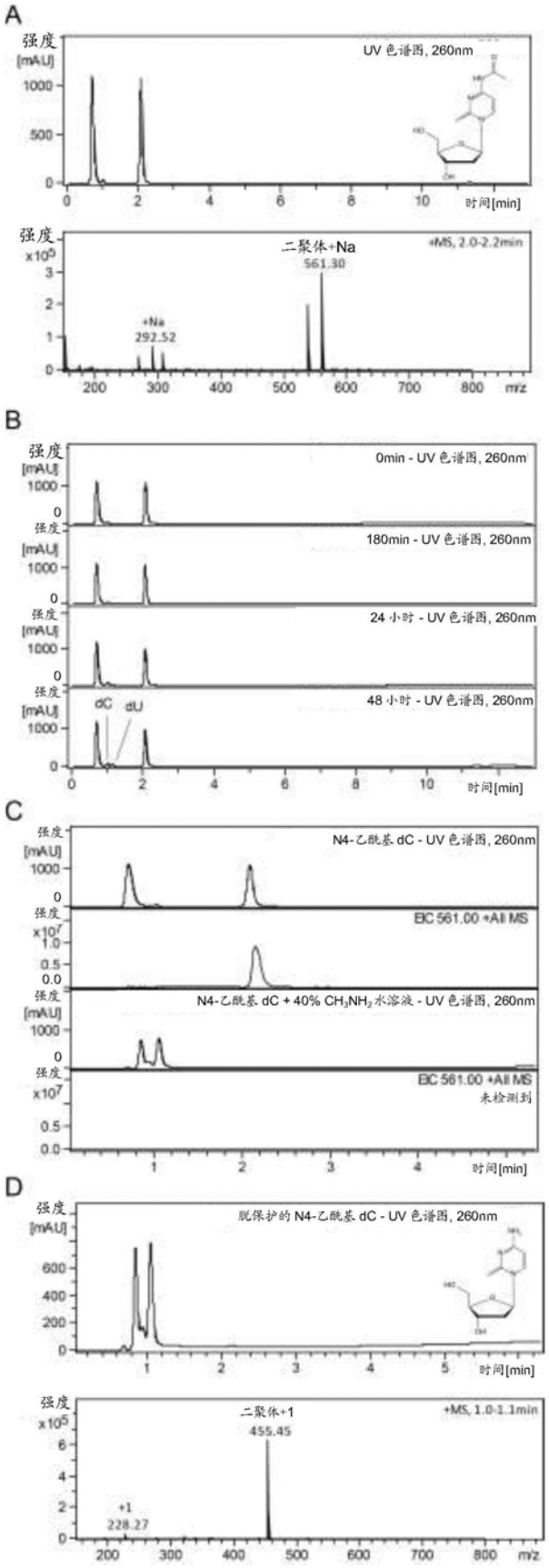

A
强度
[mAU]
UV 色谱图, 260nm
时间[min]
强度
x10^5
二聚体+Na
561.30
+MS, 2.0-2.2min
+Na
292.52
m/z
B
0min - UV 色谱图, 260nm
180min - UV 色谱图, 260nm
24 小时 - UV 色谱图, 260nm
48 小时 - UV 色谱图, 260nm
dC
dU
C
N4-乙酰基 dC - UV 色谱图, 260nm
EIC 561.00 +All MS
N4-乙酰基 dC + 40% CH3NH2 水溶液 - UV 色谱图, 260nm
未检测到
D
脱保护的 N4-乙酰基 dC - UV 色谱图, 260nm
二聚体+1
455.45
+MS, 1.0-1.1min
+1
228.27

图6

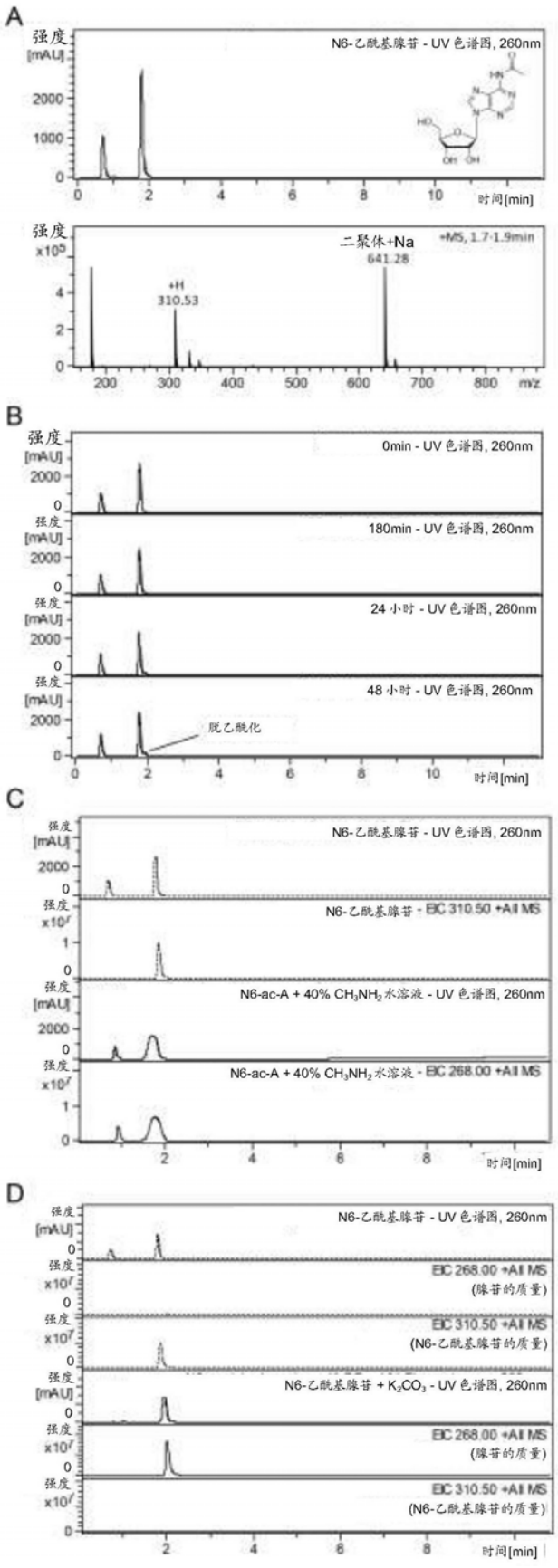

A
强度
[mAU]
N6-乙酰基腺苷 - UV 色谱图, 260nm
时间[min]
强度
x10^5
二聚体+Na
641.28
+MS, 1.7-1.9min
+H
310.53
m/z
B
0min - UV 色谱图, 260nm
180min - UV 色谱图, 260nm
24 小时 - UV 色谱图, 260nm
48 小时 - UV 色谱图, 260nm
脱乙酰化
C
N6-乙酰基腺苷 - UV 色谱图, 260nm
N6-乙酰基腺苷 - EIC 310.50 +All MS
N6-ac-A + 40% CH3NH2 水溶液 - UV 色谱图, 260nm
N6-ac-A + 40% CH3NH2 水溶液 - EIC 268.00 +All MS
D
N6-乙酰基腺苷 - UV 色谱图, 260nm
EIC 268.00 +All MS
(腺苷的质量)
EIC 310.50 +All MS
(N6-乙酰基腺苷的质量)
N6-乙酰基腺苷 + K2CO3 - UV 色谱图, 260nm

图7

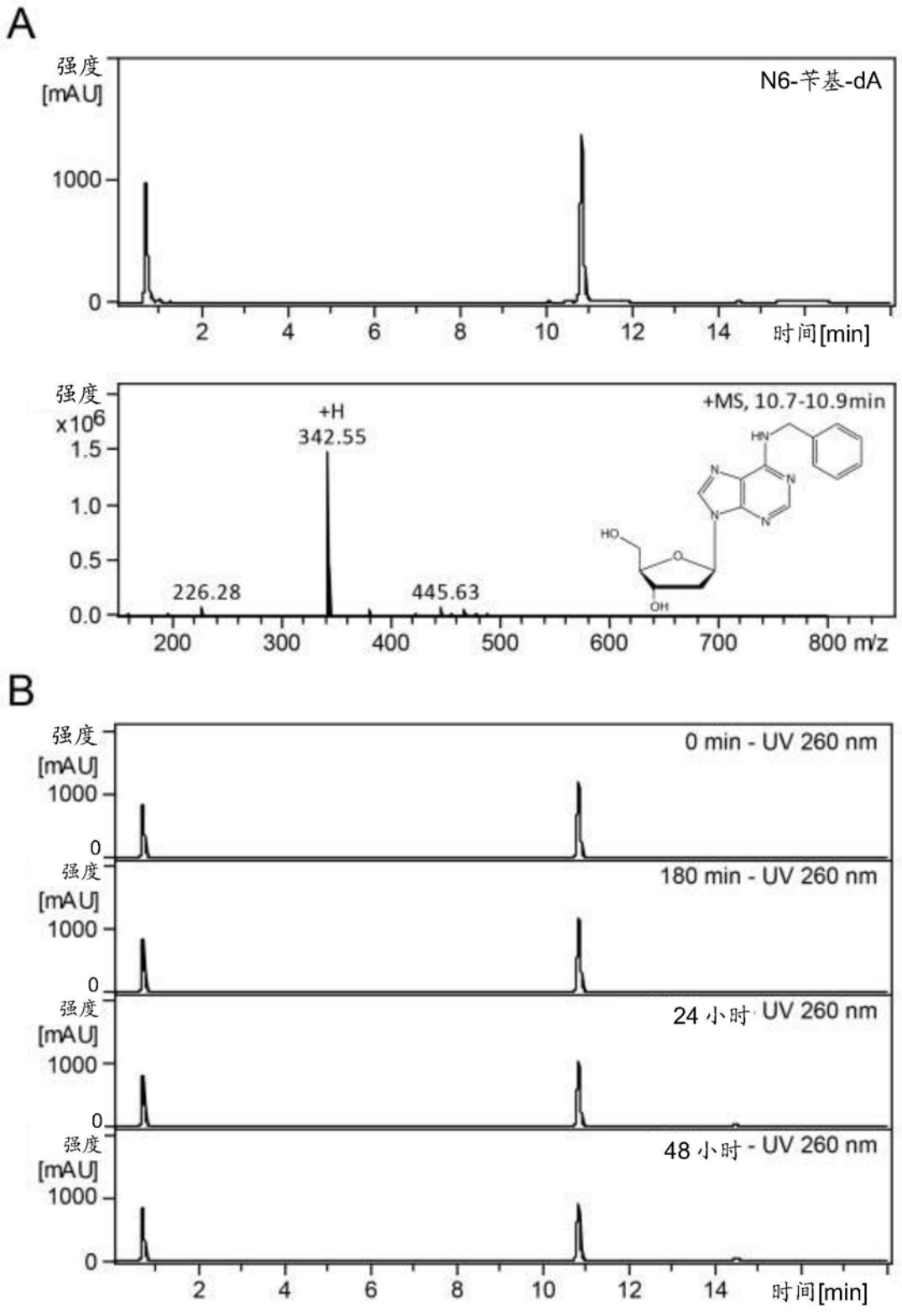

A
强度
[mAU]
1000
0
N6-苄基-dA
2
4
6
8
10
12
14
时间[min]
强度
x10^6
1.5
1.0
0.5
0.0
+H
342.55
226.28
445.63
+MS, 10.7-10.9min
200
300
400
500
600
700
800 m/z
B
强度
[mAU]
1000
0
0 min - UV 260 nm
180 min - UV 260 nm
24 小时 UV 260 nm
48 小时 - UV 260 nm
2
4
6
8
10
12
14
时间[min]

图8

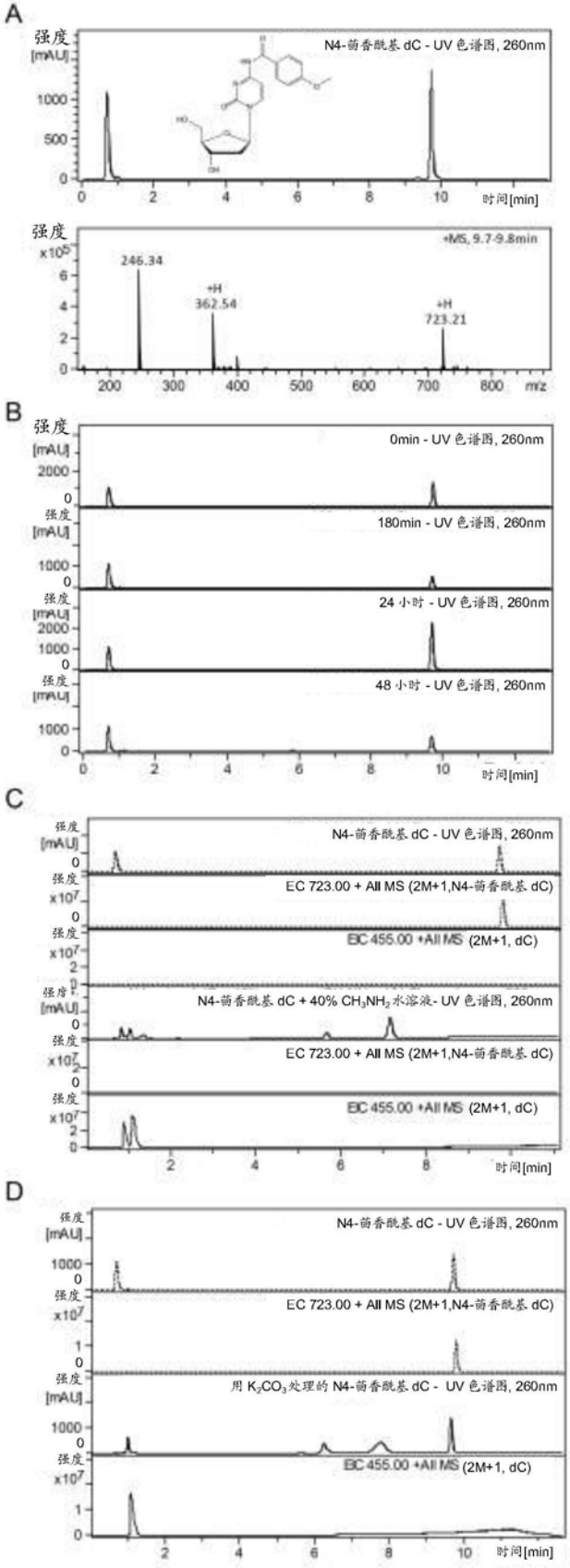
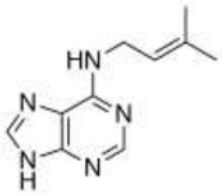

A
强度
[mAU]
N4-茴香酰基 dC - UV 色谱图, 260nm
时间[min]
+MS, 9.7-9.8min
246.34
+H
362.54
+H
723.21
m/z
B
0min - UV 色谱图, 260nm
180min - UV 色谱图, 260nm
24 小时 - UV 色谱图, 260nm
48 小时 - UV 色谱图, 260nm
C
N4-茴香酰基 dC - UV 色谱图, 260nm
EC 723.00 + All MS (2M+1,N4-茴香酰基 dC)
EIC 455.00 +All MS (2M+1, dC)
N4-茴香酰基 dC + 40% CH_3NH_2 水溶液- UV 色谱图, 260nm
D
N4-茴香酰基 dC - UV 色谱图, 260nm
EC 723.00 + All MS (2M+1,N4-茴香酰基 dC)
用 K_2CO_3 处理的 N4-茴香酰基 dC - UV 色谱图, 260nm

图9


HN
N
N
N
H
N

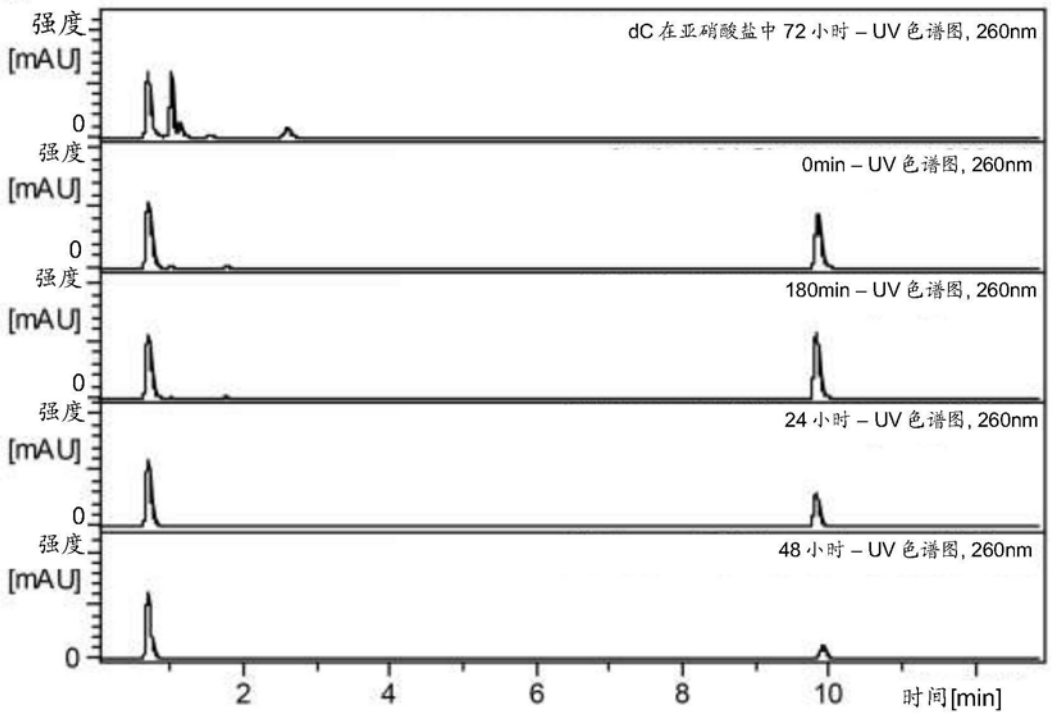

强度
[mAU]
0
dC 在亚硝酸盐中 72 小时 – UV 色谱图, 260nm
0min – UV 色谱图, 260nm
180min – UV 色谱图, 260nm
24 小时 – UV 色谱图, 260nm
48 小时 – UV 色谱图, 260nm
2
4
6
8
10
时间[min]

图10

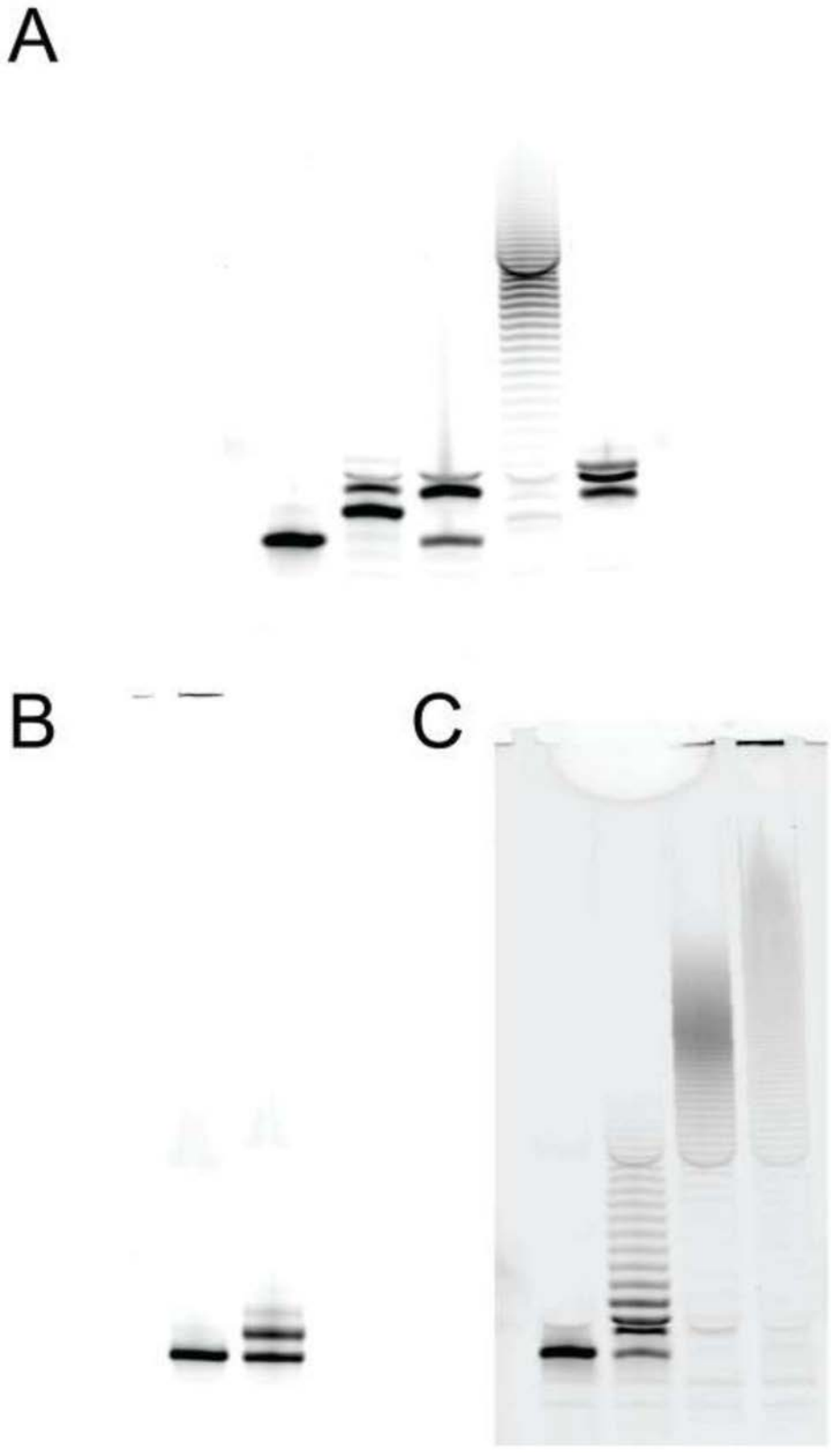


图11

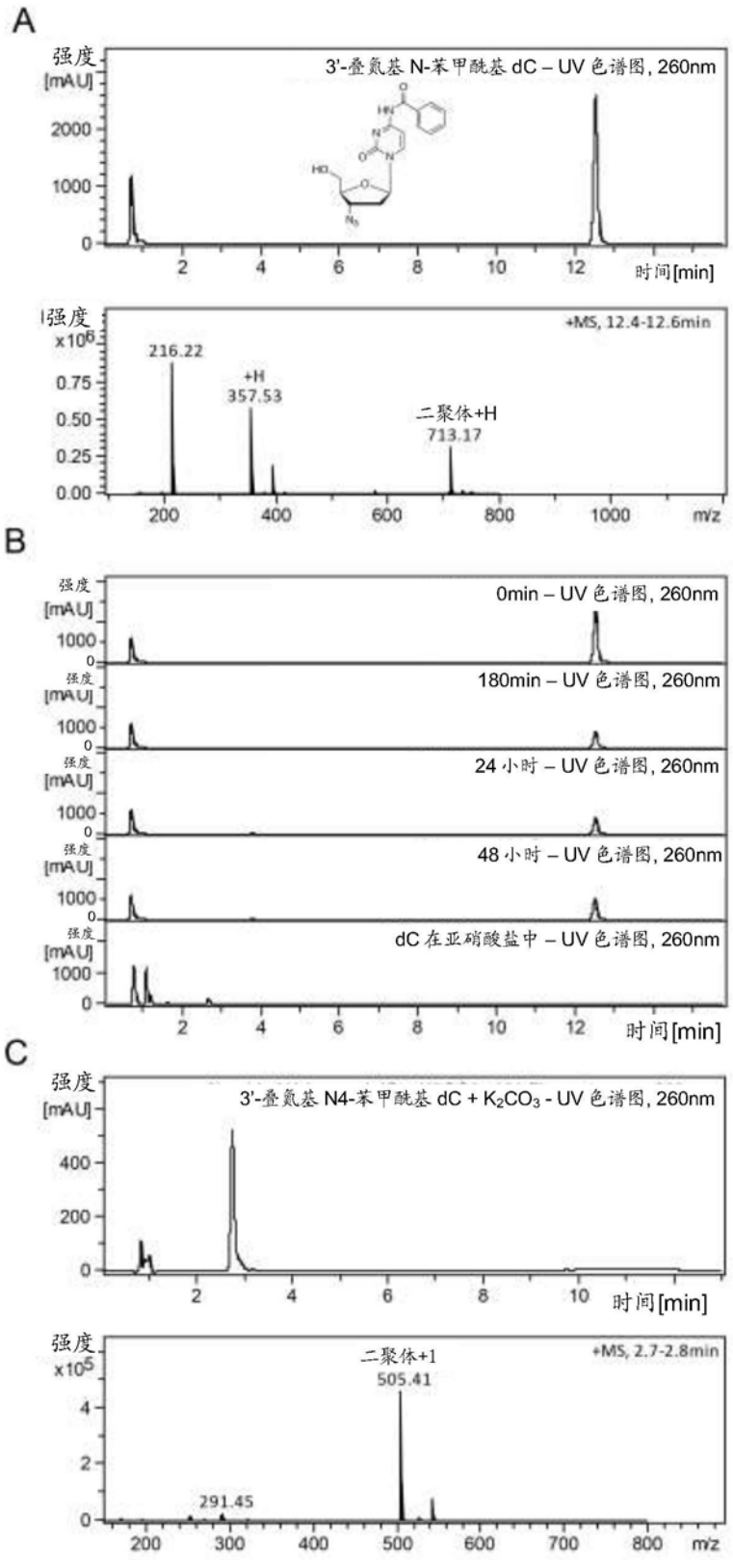

A
强度
[mAU]
3'-叠氮基 N-苯甲酰基 dC – UV 色谱图, 260nm
时间[min]
强度
x10^6
+MS, 12.4-12.6min
216.22
+H
357.53
二聚体+H
713.17
m/z
B
0min – UV 色谱图, 260nm
180min – UV 色谱图, 260nm
24 小时 – UV 色谱图, 260nm
48 小时 – UV 色谱图, 260nm
dC 在亚硝酸盐中 – UV 色谱图, 260nm
时间[min]
C
3'-叠氮基 N4-苯甲酰基 dC + K2CO3 - UV 色谱图, 260nm
时间[min]
强度
x10^5
+MS, 2.7-2.8min
二聚体+1
505.41
291.45
m/z

图12