

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-519372
(P2024-519372A)

(43)公表日 令和6年5月10日(2024.5.10)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6834(2018.01)	C 1 2 Q 1/6834	Z
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全74頁)

(21)出願番号	特願2023-571610(P2023-571610)	(71)出願人	500358711 イルミナ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イルミナ ウェイ 5 2 0 0
(86)(22)出願日	令和4年5月19日(2022.5.19)	(71)出願人	502279294 イルミナ ケンブリッジ リミテッド 英国シービー 2 1・6 ディエフ、ケンプ リッジシャー、ケンブリッジ、グレート ・アビントン、グランタ・パーク 1 9 番
(85)翻訳文提出日	令和6年1月16日(2024.1.16)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/063647	(74)代理人	100221501 弁理士 式見 真行
(87)国際公開番号	WO2022/243480	(72)発明者	イアヴィコリ , パトリツィア
(87)国際公開日	令和4年11月24日(2022.11.24)		
(31)優先権主張番号	63/190,983		
(32)優先日	令和3年5月20日(2021.5.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 合成によって配列決定するための組成物及び方法

(57)【要約】

本出願は、合成によって配列決定するための組成物及び方法に関し、1つ以上のパラジウムスカベンジャーを使用して、配列決定メトリック、そのようなフェージング値及びプリフェージング値を改善した。

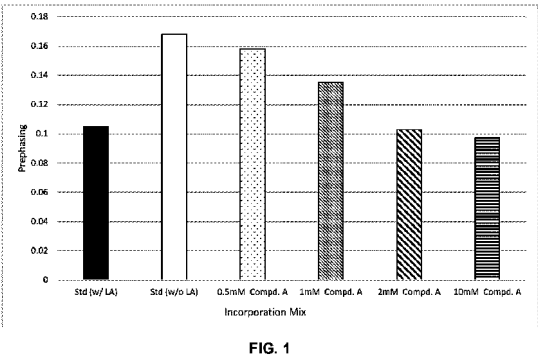


FIG. 1

【特許請求の範囲】

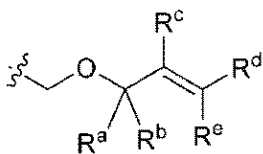
【請求項 1】

複数の標的ポリヌクレオチドの配列を決定するための方法であって、

(a) ハイブリダイゼーション条件下で、固体支持体を配列決定プライマーと接触させることであって、前記固体支持体が、その上に固定化された複数の標的ポリヌクレオチドを含み、前記配列決定プライマーが、前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、

(b) DNA ポリメラーゼ媒介プライマー伸長に好適な条件下で、前記固体支持体を、DNA ポリメラーゼ及び 4 つの異なるタイプのヌクレオチドのうちの 1 つ以上を含む第 1 の水溶液と接触させることであって、前記ヌクレオチドの各々が、前記ヌクレオチドの 3' 酸素に結合した構造

【化 1】



を有する 3' ブロッキング基を含む、接触させることと、

(c) 1 つのタイプのヌクレオチドを前記配列決定プライマーに組み込んで、伸長コピーポリヌクレオチドを生成することと、

(d) 前記伸長コピーポリヌクレオチドの 1 つ以上の蛍光測定を実行することと、

(e) 組み込まれた前記ヌクレオチドの前記 3' ブロッキング基をパラジウム触媒で除去することと、を含み、

残りのパラジウム触媒の少なくとも一部分が、1 つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化され、少なくとも 1 つのパラジウムスカベンジャーが、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、及び

-N⁺RR'-アリル、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される 1 つ以上のアリル部分を含み、

R^a、R^b、R^c、R^d、及び R^e の各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換 C₁ ~ C₆ アルキル、又は C₁ ~ C₆ ハロアルキルであり、

R が、H、非置換若しくは置換 C₁ ~ C₆ アルキル、非置換若しくは置換 C₂ ~ C₆ アルケニル、非置換若しくは置換 C₂ ~ C₆ アルキニル、非置換若しくは置換 C₆ ~ C₁₀ アリール、非置換若しくは置換 5 ~ 10 員ヘテロアリール、非置換若しくは置換 C₃ ~ C₁₀ カルボシクリル、又は非置換若しくは置換 5 ~ 10 員ヘテロシクリルであり、

R' が、H、非置換 C₁ ~ C₆ アルキル又は置換 C₁ ~ C₆ アルキルである、方法。

【請求項 2】

前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分の配列が決定されるまで、工程 (b) ~ (e) を繰り返すことを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(f) 前記組み込まれたヌクレオチドの前記 3' ブロッキング基の前記除去後に、前記固体支持体を第 2 の水溶液で洗浄することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分の配列が決定されるまで、工程 (b) ~ (f) を繰り返すことを更に含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (b) ~ (e) 又は (b) ~ (f) が、少なくとも 50 回、少なくとも 100 回、少なくとも 150 回、少なくとも 200 回、少なくとも 250 回、又は少なくとも 300 回繰り返される、請求項 2 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも 1 つのタイプの組み込まれたヌクレオチドが、検出可能な標識を含み、工程

(e) が、前記検出可能な標識も除去する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

1 つ以上のアリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、前記第 1 の水溶液中にある、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 の水溶液中の 1 つ以上のアリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーの濃度が、約 0 . 1 m M ~ 約 1 0 0 m M、0 . 5 m M ~ 約 5 0 m M、約 1 m M ~ 約 2 0 m M、又は約 2 m M ~ 約 1 0 m M である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

1 つ以上のアリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、前記第 2 の水溶液中にある、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。 10

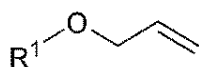
【請求項 10】

前記第 2 の水溶液中の 1 つ以上のアリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーの濃度が、約 0 . 1 m M ~ 約 1 0 0 m M、約 0 . 5 m M ~ 約 5 0 m M、約 1 m M ~ 約 2 0 m M、又は約 2 m M ~ 約 1 0 m M である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

1 つ以上の - O - アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、以下の構造を有し、

【化 2】



20

式中、 R^1 が、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、5 ~ 10 員ヘテロアリール、(5 ~ 10 員ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、($C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、3 ~ 10 員ヘテロシクリル、(3 ~ 10 員ヘテロシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NR^{f1}R^{g1}$ 、 $-P(=O)OR^{f1}OR^{g1}$ 、

30

$-C(=O)R^{h1}$ 、 $-C(=O)OR^{h1}$ 、又は $-S(=O)_2R^{j1}$ であり、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルの各々が、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換されており、

R^{f1} 及び R^{g1} の各々が、独立して、H、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^{h1} が、独立して、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^{j1} が、独立して、ヒドロキシ、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

40

各 R^x が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、($C_1 \sim C_6$ アルキル) アミノ、

C - アミド、N - アミド、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は $-O-CH_2-CH=CH_2$ である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

1 つ以上の - O - アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、

50

CC=COCOC(CO)Oc1ccc(cc1)C(=O)O, CC=COC(=O)[C@H](Cc1ccc(OCC=C)cc1)NC(=O)OC(C)(C)C, CC=COC[C@H]1O[C@H](CO)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O,
CC=COCOC(CO)COCC=C, CC=COC1=NC2=C(N1)N=CN=C2OCC=C, CC=COCN, CC=COC(=O)c1ccccc1,
CC=COP(=O)(O)O, CC=COS(=O)(=O)O, CC=COS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1, CC=COS(=O)(=O)O, 及び

並びにそれらの塩からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

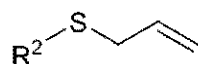
前記パラジウムスカベンジャーが、

C=CCOC1=CC=C(C=C1)C[C@H](C(=O)O)C(=O)OC(C)(C)C
C=CCOC1C(C(C(C(C1O)O)O)O)O

若しくは

30

【化 5】



式中、 R^2 が、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、5～10員ヘテロアリール、(5～10員ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、($C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、3～10員ヘテロシクリル、(3～10員ヘテロシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NR^{f2}R^{g2}$ 、 $-P(=O)OR^{f2}OR^{g2}$ 、 $-C(=O)R^{h2}$ 、 $-C(=O)OR^{h2}$ 、又は $-S(=O)_2R^{j2}$ であり、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5～10員ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、及び3～10員ヘテロシクリルの各々が、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換されており、

R^{f2} 及び R^{g2} の各々が、独立して、H、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、

50

又は 1 つ以上の R^Y で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^{h2} が、独立して、1 つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^Y で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^{j2} が、独立して、ヒドロキシ、1 つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^Y で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^Y が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、($C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、

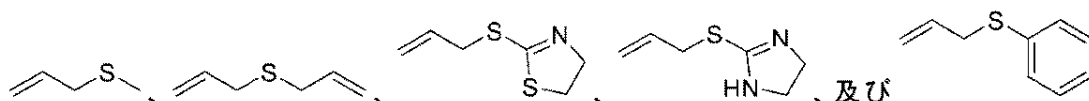
C - アミド、N - アミド、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は $-S-CH_2-CH=CH_2$ である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 15】

1 つ以上の $-S-$ アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、

【化 6】



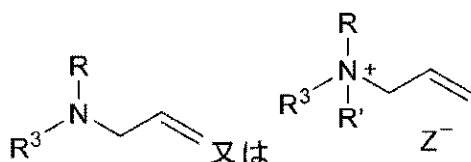
20

からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

1 つ以上の $-NR-$ アリル又は $-N^+RR'-$ アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、以下の構造を有し、

【化 7】



30

式中、Z が、アニオンであり、

各 R^3 が、独立して、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、5 ~ 10 員ヘテロアリール、(5 ~ 10 員ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、($C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、3 ~ 10 員ヘテロシクリル、(3 ~ 10 員ヘテロシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NR^fR^g$ 、 $-P(=O)OR^fOR^g$ 、 $-C(=O)R^h$ 、 $-C(=O)OR^h$ 、又は $-S(=O)_2R^j$ であり、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルの各々が、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換されており、

40

R^f 及び R^g の各々が、独立して、H、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^h が、独立して、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^j が、独立して、ヒドロキシ、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^Z で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1

50

つ以上の R² で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R² が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、(C₁ ~ C₆ アルキル)アミノ、

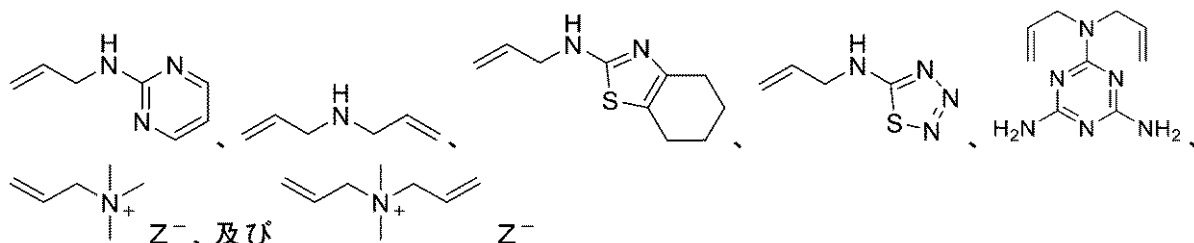
C - アミド、N - アミド、非置換及び置換 C₁ ~ C₆ アルキル、C₁ ~ C₆ ハロアルキル、非置換及び置換 C₁ ~ C₆ アルコキシ、C₁ ~ C₆ ハロアルコキシ、非置換及び置換 C₆ ~ C₁₀ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は - NH - CH₂ - CH = CH₂ である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

1つ以上の -NR- アリル又は -N⁺RR'- アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、

10

【化 8】



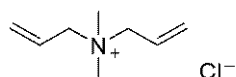
からなる群から選択され、 Z^- が、 $C1^-$ 又は F^- である、請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 18】

前記パラジウムスカベンジャーが、

【化 9】

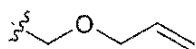


を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記ヌクレオチドの前記3'酸素に結合した構造

【化 1 0】



を有する前記 3' ブロッキング基である、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記パラジウム触媒が、パラジウム錯体及び水溶性ホスフィンからその場で生成された Pd (0) 触媒である、請求項 1 ～ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記パラジウム錯体が、 $[Pd(アリル)Cl]_2$ 、 Na_2PdCl_4 、 K_2PdCl_4 、 $[Pd(アリル)(THP)]Cl$ 、 $[Pd(アリル)(THP)_2]Cl$ 、 $Pd(CH_3CN)_2Cl_2$ 、 $Pd(OAc)_2$ 、 $Pd(PPh_3)_4$ 、 $Pd(dba)_2$ 、 $Pd(Acac)_2$ 、 $PdCl_2(COD)$ 、若しくは $Pd(TFA)_2$ 、又はそれらの組み合わせを含む、請求項20に記載の方法。

40

【請求項 22】

前記パラジウム錯体が、 $[Pd(アリル)Cl]_2$ 又は Na_2PdCl_4 を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記水溶性ホスフィンが、トリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン（ＴＨＰ）、トリス（ヒドロキシメチル）ホスフィン（ＴＨＭＰ）、１，３，５－トリアザ－７－ホスファアダマンタン（ＰＴＡ）、ビス（ｐ－スルホナトフェニル）フェニルホスフィン二水和物

50

カリウム塩、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、若しくはトリフェニルホスフィン - 3, 3', 3'' - トリスルホン酸三ナトリウム塩、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記パラジウム触媒の、1つ以上のアリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーに対するモル比が、約 1 : 100、1 : 50、1 : 20、1 : 10、又は 1 : 5 である、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 1つ以上のパラジウムスカベンジャーが、少なくとも 1つの Pd (II) スカベンジャーを更に含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 26】

前記 Pd (II) スカベンジャーが、イソシアノ酢酸 (ICNA) 塩、イソシアノ酢酸エチル、イソシアノ酢酸メチル、システイン若しくはその塩、L - システイン若しくはその塩、N - アセチル - L - システイン、チオ硫酸塩、チオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、エチルキサントゲン酸カリウム、イソプロピルキサントゲン酸カリウム、グルタチオン、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、イミノ二酢酸、ニトリロ二酢酸、トリメルカプト - S - トリアジン、ジメチルジチオカルバメート、ジチオトレイトール、メルカプトエタノール、アリルアルコール、プロパルギルアルコール、チオール、三級アミン及び/若しくは三級ホスフィン、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 Pd (II) スカベンジャーが、L - システイン又はチオ硫酸ナトリウムを含む、請求項 25 又は 26 に記載の方法。

20

【請求項 28】

前記 Pd (II) スカベンジャーが、前記第 1 の水溶液若しくは前記第 2 の水溶液中、又はその両方にある、請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1 又は前記第 2 の水溶液中の前記 Pd (II) スカベンジャーの濃度が、約 0.1 mM ~ 約 100 mM、0.2 mM ~ 約 75 mM、約 0.5 mM ~ 約 50 mM、約 1 mM ~ 約 20 mM、又は約 2 mM ~ 約 10 mM である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記固体支持体が、固定化された標的ポリヌクレオチドのアレイを含む、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

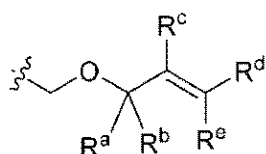
30

【請求項 31】

配列決定装置とともに使用するためのキットであって、

4つの異なるタイプのヌクレオチドのうちの 1つ以上であって、前記ヌクレオチドの各々が、前記ヌクレオチドの 3' 酸素に結合した構造

【化 11】



40

を有する 3' ブロッキング基を含み、R^a、R^b、R^c、R^d、及び R^e の各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換 C₁ ~ C₆ アルキル、又は C₁ ~ C₆ ハロアルキルである、4つの異なるタイプのヌクレオチドのうちの 1つ以上と、

1つ以上のパラジウムスカベンジャーであって、少なくとも 1つのパラジウムスカベンジャーが、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、及び -N⁺RR'-アリル、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される 1つ以上のアリル部分を含む、1つ以上のパラジウムスカベンジャーと、を含み、

式中、R が、H、非置換若しくは置換 C₁ ~ C₆ アルキル、非置換若しくは置換 C₂ ~

50

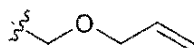
C₆ アルケニル、非置換若しくは置換 C₂ ~ C₆ アルキニル、非置換若しくは置換 C₆ ~ C₁₀ アリール、又は非置換若しくは置換 5 ~ 10 員ヘテロアリール、非置換若しくは置換 C₃ ~ C₁₀ カルボシクリル、又は非置換若しくは置換 5 ~ 10 員ヘテロシクリルであり、

R' が、H、非置換 C₁ ~ C₆ アルキル又は置換 C₁ ~ C₆ アルキルである、キット。

【請求項 3 2】

前記 3' ブロッキング基が、前記ヌクレオチドの前記 3' 酸素に結合した構造

【化 1 2】



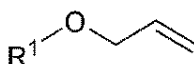
10

を有する、請求項 3 1 に記載のキット。

【請求項 3 3】

1 つ以上の - O - アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、構造

【化 1 3】



を有し、

式中、R¹ が、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₁ ~ C₁₂ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₂ ~ C₁₂ アルケニル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₂ ~ C₁₂ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、C₆ ~ C₁₀ アリール、(C₆ ~ C₁₀ アリール) C₁ ~ C₆ アルキル、5 ~ 10 員ヘテロアリール、(5 ~ 10 員ヘテロアリール) C₁ ~ C₆ アルキル、C₃ ~ C₁₀ カルボシクリル、(C₃ ~ C₁₀ カルボシクリル) C₁ ~ C₆ アルキル、3 ~ 10 員ヘテロシクリル、(3 ~ 10 員ヘテロシクリル) C₁ ~ C₆ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、- C(=O) NR^{f1} R^{g1}、- P(=O) OR^{f1} OR^{g1}、- C(=O) R^{h1}、- C(=O) OR^{h1}、又は - S(=O)₂ R^{j1} であり、C₆ ~ C₁₀ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、C₃ ~ C₁₀ カルボシクリル、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルの各々が、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換されており、

20

R^{f1} 及び R^{g1} の各々が、独立して、H、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₁ ~ C₆ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₆ ~ C₁₀ アリール、又は 1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

30

各 R^{h1} が、独立して、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₁ ~ C₆ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₆ ~ C₁₀ アリール、又は 1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^{j1} が、独立して、ヒドロキシ、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₁ ~ C₆ アルキル、1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された C₆ ~ C₁₀ アリール、又は 1 つ以上の R^x で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^x が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、(C₁ ~ C₆ アルキル) アミノ、

40

C - アミド、N - アミド、非置換及び置換 C₁ ~ C₆ アルキル、C₁ ~ C₆ ハロアルキル、非置換及び置換 C₁ ~ C₆ アルコキシ、C₁ ~ C₆ ハロアルコキシ、非置換及び置換 C₆ ~ C₁₀ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は - O - CH₂ - CH = CH₂ である、請求項 3 1 又は 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

1 つ以上の - O - アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、

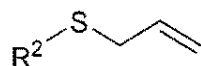
50

CC=COCOC(CO)Oc1ccc(cc1)C(=O)O, CC=COC(=O)[C@H](Cc1ccc(OCC=C)cc1)NC(=O)OC(C)(C)C, CC=COC[C@H]1O[C@H](CO)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O,
CC=COCOC(CO)COCC=C, CC=COC1=NC2=C(N1)N=CN=C2OCC=C, CC=COCN, CC=COC(=O)c1ccccc1,
CC=COP(=O)(O)O, CC=COS(=O)(=O)O, CC=COS(=O)(=O)c1ccc(C)cc1, CC=COS(=O)(=O)O, 及び

20

【請求項 35】

【化 1 5】



式中、 R^2 が、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、5～10員ヘテロアリール、($5 \sim 10$ 員ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、($C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、3～10員ヘテロシクリル、($3 \sim 10$ 員ヘテロシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NR^fR^g$ 、 $-P(=O)OR^fOR^g$ 、 $-C(=O)R^h$ 、 $-C(=O)OR^h$ 、又は $-S(=O)_2R^j$ であり、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5～10員ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、及び3～10員ヘテロシクリルの各々が、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換されており、

R^f 2 及び R^g 2 の各々が、独立して、H、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された C₁ ~ C₆ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された C₆ ~ C₁₀ アリール、又は1つ以上の R^y で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^{h2} が、独立して、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は1つ以上の R^y で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリールであり、

各 R^j 2 が、独立して、ヒドロキシ、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された C₁ ~ C₆ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された C₆ ~ C₁₀ アリール、又は1つ以上の R^y で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^y が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、(C₁ ~ C₆ アルキル) アミノ、

C - アミド、N - アミド、非置換及び置換 C₁ ~ C₆ アルキル、C₁ ~ C₆ ハロアルキ

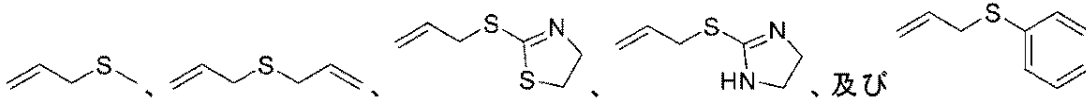
50

ル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は $-S-CH_2-CH=CH_2$ である、請求項 31 又は 32 に記載のキット。

【請求項 36】

1 つ以上の $-S-$ アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、

【化 16】



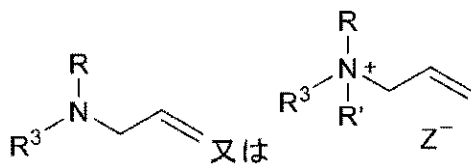
10

からなる群から選択される、請求項 35 に記載のキット。

【請求項 37】

1 つ以上の $-NR-$ アリル又は $-N^+RR'-$ アリル部分を含む前記パラジウムスカベンジャーが、構造

【化 17】



20

を有し、

式中、 Z が、アニオンであり、

R^3 が、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、5 ~ 10 員ヘテロアリール、(5 ~ 10 員ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、($C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、3 ~ 10 員ヘテロシクリル、(3 ~ 10 員ヘテロシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NR^fR^g$ 、 $-P(=O)OR^fOR^g$ 、 $-C(=O)R^h$ 、 $-C(=O)OR^h$ 、又は $-S(=O)_2R^j$ であり、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルの各々が、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換されており、

30

R^f 及び R^g の各々が、独立して、 H 、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^h が、独立して、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

各 R^j が、独立して、ヒドロキシ、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は 1 つ以上の R^2 で任意選択的に置換された 5 ~ 10 員ヘテロアリールであり、

40

各 R^2 が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、($C_1 \sim C_6$ アルキル) アミノ、

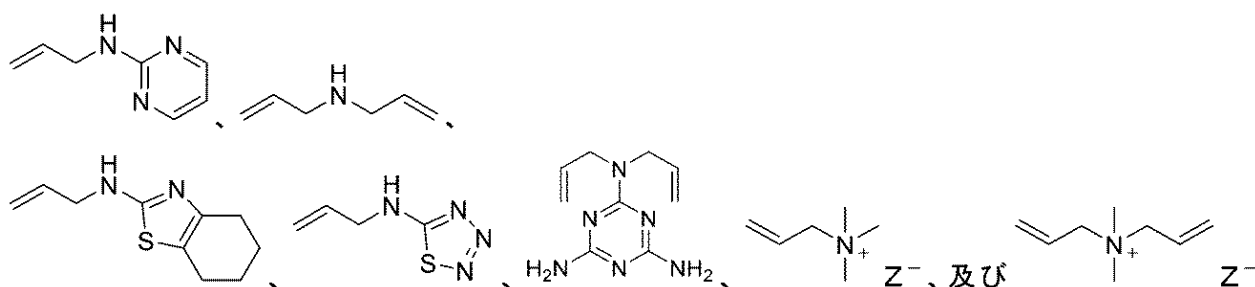
C -アミド、 N -アミド、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は $-NH-CH_2-CH=CH_2$ である、請求項 31 又は 32 に記載のキット。

【請求項 38】

1 つ以上の $-NR-$ アリル又は $-N^+RR'-$ アリル部分を含む前記パラジウムスカベ

50

【化 1 8】



10

からなる群から選択され、 Z^{-} が、 Cl^{-} 又は F^{-} である、請求項 37 に記載のキット

【請求項 39】

DNAポリメラーゼ及び1つ以上の緩衝組成物を更に含む、請求項31～38のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 40】

配列決定装置とともに使用するためのカートリッジであって、複数のチャンバを含み、前記複数のチャンバのうちの１つが、請求項３１～３９のいずれか一項に記載のキットとともに使用するためのものである、カートリッジ。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本開示は、概して、ポリヌクレオチド配列決定方法、組成物、及び配列決定するためのキットに関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

分子の研究における進歩は、部分的に、分子又はそれらの生物学的反応を特徴付けるために使用される技術の改善によって導かれている。特に、核酸DNA及びRNAの研究は、配列分析及びハイブリダイゼーション事象の研究に使用される現像技術から恩恵を受ける。

30

【 0 0 0 3 】

核酸の研究を改善した技術の例は、固定化された核酸の製造されたアレイの開発である。これらのアレイは、典型的には、固体支持体材料上に固定化されたポリヌクレオチドの高密度マトリックスからなる。例えば、マスクによって保護されているが、適切に修飾されたヌクレオチドホスホラミダイトの結合を可能にするために所定の領域で露出されている化学増感ガラス表面を使用して核酸を組み立てる方法を記載している、Fodor et al., Trends Biotech., 12: 19-26, 1994を参照された。製造アレイはまた、既知のポリヌクレオチドを所定の位置で固体支持体上に「斑点形成」する技術によって製造することができる（例えば、Stimpson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 6379-6383, 1995）。

40

【 0 0 0 4 】

アレイに結合した核酸のヌクレオチド配列を決定する１つの方法は、「合成による配列決定」又は「ＳＢＳ（sequencing by synthesis）」と呼ばれる。ＤＮＡの配列を決定するためのこの技術は、理想的には、配列決定されている核酸の反対側の正しい相補的ヌクレオチドの制御された（すなわち、一度に１つ）組み込みを必要とする。これにより、各ヌクレオチド残基が一度に１つずつ配列決定されるので、複数サイクルでヌクレオチドを付加することによる正確な配列決定が可能になり、したがって制御されていない一連の組み込みが起こることが阻止される。組み込まれたヌクレオチドは、標識部分及びその後の次の配列決定のラウンドを除去する前に、それに結合した適切な標識を使用して読み

50

取られる。

【0005】

単一の組み込みのみが発生することを確実にするために、構造修飾（「保護基」又は「ブロッキング基」）が、成長鎖に付加される各標識ヌクレオチドに含まれて、1つのヌクレオチドのみが組み込まれることを確実にする。保護基を有するヌクレオチドを付加した後、配列決定されているDNAの完全性を妨げない反応条件下で保護基を除去する。次いで、配列決定サイクルは、次の保護された標識ヌクレオチドの取り込みを継続することができる。DNA配列決定において有用であるために、通常はヌクレオチドトリホスファートであるヌクレオチドは、概して3'-ヒドロキシブロッキング基を必要として、それをポリヌクレオチド鎖に組み込むために使用されるポリメラーゼが、ヌクレオチド上の塩基が付加される際に複製し続けることを阻止する。

【0006】

様々な組成物が、配列決定のサイクルの各工程で採用される。例えば、ポリメラーゼ及び1つ以上の異なるタイプのヌクレオチドを含む組み込み組成物が、組み込み工程中に採用される。とりわけ、例えば、ヌクレオチドが検出のためのフルオロフォア標識を含む場合、検出工程中にポリヌクレオチドを光誘導損傷から保護するための酸化防止剤を含み得るスキャン組成物。組み込まれたヌクレオチドからブロッキング部分（例えば、3'-ヒドロキシブロッキング基）を切断するための試薬を含む脱ブロッキング組成物が、脱ブロッキング工程中に採用される。水溶性ホスフィン配位子の存在下でパラジウム錯体から調製されるパラジウム（Pd）触媒などの切断試薬は、脱ブロッキング組成物、例えば、米国特許出願公開第2020/0216891号及び米国特許出願公開第63/042,240号に報告されており、これらの各々は、その全体が参照により組み込まれる。Pdは、ほとんどの場合、その不活性Pd（II）形態で、DNAに粘着する能力を有し、DNAとポリメラーゼとの間の結合を妨げる可能性があり、増加したフェージングを引き起こす。Pdスカベンジャー化合物を含む切断後洗浄組成物は、脱ブロッキング工程に続いて使用され得る。例えば、国際公開第2020/126593号は、3,3'-ジチオジプロピオン酸（3,3'-dithiodipropionic acid、DDPA）及びリボ酸（lipoic acid、LA）等のPdスカベンジャーを開示しており、スキャン組成物及び/又は切断後洗浄組成物に含まれてもよい。切断後洗浄溶液におけるこれらのスカベンジャーの使用は、Pd（0）をスカベンジングし、Pd（0）を不活性Pd（II）形態に変換し、それによってプリフェージング値及び配列決定メトリックを改善し、シグナル分解を低減し、配列決定リード長を延長する目的を有する。しかしながら、性能を最適化するために配列決定の各工程で使用するための組成物を開発することに対する継続的な要求が存在する。

【発明の概要】

【0007】

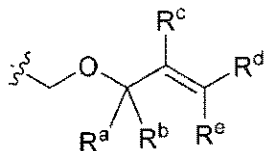
本開示のいくつかの態様は、複数の標的ポリヌクレオチドの配列を決定するための方法であって、

（a）ハイブリダイゼーション条件下で、固体支持体を配列決定プライマーと接触させることであって、固体支持体が、その上に固定化された複数の異なる標的ポリヌクレオチドを含み、配列決定プライマーが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、

（b）DNAポリメラーゼ媒介プライマー伸長に好適な条件下で、固体支持体を、DNAポリメラーゼ及び4つの異なるタイプのヌクレオチド（例えば、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP又はdUTP）のうちの1つ以上を含む第1の水溶液と接触させることであって、ヌクレオチドの各々が、ヌクレオチドの3'酸素に結合した構造

【0008】

【化 1】



を有する 3' ブロッキング基を含む、接触させることと、

(c) 1つのタイプのヌクレオチドを配列決定プライマーに組み込んで、伸長コピーポリヌクレオチドを産生することと、

(d) 伸長コピーポリヌクレオチドの 1つ以上の蛍光測定を実行することと、

10

(e) 組み込まれたヌクレオチドの 3' ブロッキング基をパラジウム触媒で除去することと、を含み、

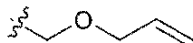
残りのパラジウム触媒の少なくとも一部分が、1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化され、少なくとも 1つのパラジウムスカベンジャーが、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、及び-N⁺RR'-アリル、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される 1つ以上のアリル部分を含み、

式中、R^a、R^b、R^c、R^d、及びR^eの各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換C₁~C₆アルキル、又はC₁~C₆ハロアルキルであり、R^aが、H、非置換若しくは置換C₁~C₆アルキル、非置換若しくは置換C₂~C₆アルケニル、非置換若しくは置換C₂~C₆アルキニル、非置換若しくは置換C₆~C₁₀アリール、非置換若しくは置換5~10員ヘテロアリール、非置換若しくは置換C₃~C₁₀カルボシクリル、又は非置換若しくは置換5~10員ヘテロシクリルであり、R^bが、H、非置換C₁~C₆アルキル又は置換C₁~C₆アルキルである、方法に関する。いくつかの実施形態では、残りのパラジウム触媒(Pd(0)及び/又はPd(II)の形態)は、1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化される。いくつかの実施形態では、第1の水溶液中のヌクレオチドの各々は、ヌクレオチドの3'酸素に結合した構造

20

【0009】

【化 2】



30

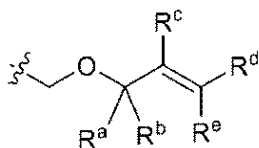
を有する 3' ブロッキング基を含む。いくつかの実施形態では、第1の水溶液中のヌクレオチドのうちの 1つ以上は、蛍光標識を含む。いくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドの一部の配列が決定されるまで、工程(b)~(e)が繰り返される。

【0010】

本開示のいくつかの態様は、配列決定装置とともに使用するためのキットであって、1つ以上の異なるタイプのヌクレオチドであって、ヌクレオチドの各々が、ヌクレオチドの 3'酸素に結合した構造

【0011】

【化 3】



40

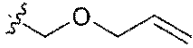
を有する 3' ブロッキング基を含み、R^a、R^b、R^c、R^d、及びR^eの各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換C₁~C₆アルキル、又はC₁~C₆ハロアルキルである、1つ以上の異なるタイプのヌクレオチドと、1つ以上のパラジウムスカベンジャーであって、少なくとも 1つのパラジウムスカベンジャーが、本明細書に記載の-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、及び-N⁺RR'-アリル、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される 1つ以上のアリル部分を含む、1つ以上のパラジウム

50

ムスカベンジャーと、を含む、キットに関する。いくつかの実施形態では、キット中のヌクレオチドの各々は、ヌクレオチドの 3' 酸素に結合した構造

【 0 0 1 2 】

【 化 4 】



を有する 3' ヒドロキシプロテクト基を含む。

【 0 0 1 3 】

本開示のいくつかの他の態様は、配列決定装置とともに使用するためのカートリッジであって、複数のチャンバを含み、各チャンバが、単一の組成物を含み、本明細書に記載されるキットが、チャンバのうちの 1 つに使用するためのもの、例えば、本明細書に記載される配列決定方法の組み込み工程に使用するためのものである、カートリッジに関する。追加の組成物としては、1 つ以上の酸化防止剤及び任意選択的にスカベンジャーを含むスキャン緩衝組成物、組み込まれたヌクレオチド及び / 又は蛍光標識の 3' ヒドロキシプロテクト基を除去するための P d 試薬を含む切断組成物、並びに切断反応後、配列決定の次のサイクルの前に、残りの P d 触媒 (P d (0) 及び / 又は P d (I I) の形態) を不活性化するための 1 つ以上の追加の P d スカベンジャーを含み得る洗浄緩衝液が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 リボ酸を使用する標準的な切断後洗浄と比較した、パラジウムスカベンジャー化合物 A が切断後洗浄溶液中で様々な濃度で 사용되는場合の配列決定ランのプリフェージング値を示す棒グラフである。

【 図 2 A 】 同じ動態アッセイにおけるスカベンジャーなしのものと比較した、動態アッセイにおける様々なパラジウムスカベンジャーの動態評価を示す折れ線グラフである。

【 図 2 B 】 いくつかのパラジウムスカベンジャーをリボ酸と比較する、図 2 A の円で囲まれた領域の拡大した折れ線グラフである。

【 図 3 】 P d (0) スカベンジャー化合物 B 又は C を含む組み込み混合物を、P d (0) スカベンジャーを含まないが、リボ酸切断後洗浄工程を利用する標準的な組み込み混合物と比較した場合の、I l l u m i n a の i S e q (商標) プラットフォーム上での配列決定ランのプリフェージングパーセント値を示す棒グラフである。

【 図 4 】 2 つの異なる組み込み時間 (2 4 秒及び 1 9 秒) でのいずれの P d スカベンジャーも含まない標準的な組み込み混合物と比較した、P d (0) スカベンジャー化合物 B 又は C を含むいくつかの組み込み混合物を利用する I l l u m i n a の i S e q (商標) プラットフォーム上での配列決定ランの配列決定メトリック (それぞれ、フェージング値、プリフェージング値、エラー率、及び Q 3 0) を示す。

【 図 5 】 P d (0) スカベンジャー化合物 O (D A D M A C) と比較した、P d (0) スカベンジャー化合物 B を使用する I l l u m i n a の i S e q (商標) プラットフォーム上での配列決定ランのリード 1 及びリード 2 についての平均プリフェージングパーセント値を示す。

【 図 6 】 いずれの P d (I I) スカベンジャーも含まないものと比較した、P d (I I) スカベンジャー L - システイン又はチオ硫酸ナトリウムを使用する I l l u m i n a の i S e q (商標) プラットフォーム上での配列決定ランのリード 1 及びリード 2 についての平均フェージングパーセント値を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 5 】

本開示のいくつかの態様は、核酸配列決定における配列決定メトリック、例えば、合成による配列決定におけるフェージング値及びプリフェージング値を改善するための方法に関する。特に、本明細書に記載される配列決定方法は、次の組み込みサイクルの前に、組

み込まれたヌクレオチドの 3' ヒドロキシプロッキング基を切断するためのパラジウム (Pd) 触媒の使用を伴う。Pd 触媒は、不活性化 Pd (II) 形態又は触媒的に活性な Pd (0) 形態のいずれかで、合成による配列決定中に DNA (例えば、コピーポリヌクレオチド) などの核酸に粘着する傾向を有する。Pd (II) が DNA に粘着する場合、それは、成長しているポリヌクレオチド鎖の DNA ポリメラーゼとの結合を減速させ、フェージングを生じさせ得る。過剰な Pd (0) が DNA に粘着する場合、それは、組み込み及び/又は蛍光測定工程の前に、組み込みミックス中のヌクレオチドの 3' ヒドロキシプロッキング基を切断し得る。これが起こると、プリフェージングが生じる。配列決定メトリックを改善するために、配列決定方法は、典型的には、任意の残りの Pd 触媒を除去するための切断後洗浄工程を含む。しかしながら、単純な洗浄緩衝液は、残留 Pd 触媒の活性を完全に抑制することができない場合がある。加えて、次のサイクルの前に残留パラジウム触媒を不活性化するために、組み込み工程の後に使用される 1 つ以上の緩衝溶液中に (例えば、切断後洗浄緩衝液中又はスキャン緩衝液中のいずれかに) 1 つ以上のパラジウムスカベンジャーが含まれてもよい。リポ酸は、活性 Pd (0) 触媒を Pd (II) 形態に酸化することによって活性 Pd (0) 触媒を不活性化するための効果的なパラジウムスカベンジャーとして使用されている。しかしながら、その酸化性質のために、リポ酸は、他の配列決定試薬と不適合性である。結果として、リポ酸の使用は、配列決定の次のサイクルの前に任意の過剰なリポ酸を除去するための別個の洗浄工程を必要とする。

【0016】

本開示のある特定の態様は、合成による配列決定のいくつかの工程において代替的なパラジウムスカベンジャーを採用することに関し、少なくとも 1 つのパラジウムスカベンジャーは、核酸に粘着する任意の残留 Pd (0) を消費するための競合基材として作用する 1 つ以上のアリル部分 (例えば、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、又は -N⁺RR'-アリル)、又はそれらの組み合わせを含む。本明細書に記載される配列決定方法は、配列決定メトリックを実質的に改善し (例えば、フェージング値及びプリフェージング値を低減し)、切断後処理工程をある程度排除することによって、各サイクルのための配列決定時間も低減し得る。

【0017】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当該技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。用語「含む (including)」、「並びに他の形態、例えば、「含む (include)」、「含む (includes)」、「及び「含まれる (included)」の使用は、限定的ではない。更に、用語「有する (having)」、「並びに他の形態、例えば、「有する (have)」、「有する (has)」、「及び「有した (had)」の使用は、限定的ではない。本明細書で使用される場合、移行句中か又は請求項の本文中のいずれであっても、「含む (comprise)」及び「含む (comprising)」という用語は、オープンエンドの意味を有するものとして解釈されるべきである。すなわち、上記の用語は、語句「少なくとも有する」又は「少なくとも含む」と同義であると解釈されるべきである。例えば、プロセスの文脈において使用される場合、「含む (comprising)」という用語は、プロセスが少なくとも列挙された工程を含むが、追加の工程を含み得ることを意味する。化合物、組成物、又はデバイスの文脈で使用される場合、「含む (comprising)」という用語は、化合物、組成物、又はデバイスが少なくとも列挙された特徴又はコンポーネントを含むが、追加の特徴又はコンポーネントも含み得ることを意味する。

【0018】

値の範囲が提供される場合、上限及び下限、並びに範囲の上限と下限との間の各介在値は、実施形態内に包含されることが理解される。

【0019】

本明細書で使用される場合、一般的な有機略語は、以下のように定義される。

【0020】

10

20

30

40

50

【表 1】

℃	摂氏温度	
d A T P	デオキシアデノシン三リン酸	
d C T P	デオキシシチジン三リン酸	
d G T P	デオキシグアノシン三リン酸	
d T T P	デオキシチミジン三リン酸	
d d N T P	ジデオキシヌクレオチド三リン酸	
f f N	完全官能化ヌクレオチド	
f f A	完全官能化「A」ヌクレオチド	10
f f C	完全官能化「C」ヌクレオチド	
f f T	完全官能化「T」ヌクレオチド	
f f G	完全官能化「G」ヌクレオチド	
I M X	組み込みミックス又は組み込み混 合物	
R T	室温	
S B S	合成による配列決定	

【0 0 2 1】20

本明細書で使用される場合、「アレイ」という用語は、異なるプローブ分子を相対的な位置に従って互いに区別することができるように、1つ以上の基材に結合されている異なるプローブ分子の集団を指す。アレイは、基材上の異なるアドレス可能な位置に各々配置されるプローブ分子を含むことができる。代替的に、又は追加的に、アレイは、各々が異なるプローブ分子を担持する別個の基材を含むことができ、異なるプローブ分子は、基材が結合される表面上の基材の位置に従って、又は液体中の基材の位置に従って特定することができる。別個の基材が表面上に位置する例示的なアレイには、例えば、米国特許第6,355,431(B1)号、米国特許出願公開第2002/0102578号、及び国際公開第00/63437号に記載されているように、ウェル中のビーズを含むものが挙げられるが、これらに限定されない。液体アレイ中のビーズを区別するために本発明に使用することができる例示的な形式は、例えば、蛍光活性化細胞選別装置(FACS)などのマイクロ流体デバイスを使用し、例えば、米国特許第6,524,793号に記載されている。本発明に使用することができるアレイの更なる例には、米国特許第5,429,807号、同第5,436,327号、同第5,561,071号、同第5,583,211号、同第5,658,734号、同第5,837,858号、同第5,874,219号、同第5,919,523号、同第6,136,269号、同第6,287,768号、同第6,287,776号、同第6,288,220号、同第6,297,006号、同第6,291,193号、同第6,346,413号、同第6,416,949号、同第6,482,591号、同第6,514,751号、及び同第6,610,482号、並びに国際公開第93/17126号、同第95/11995号、同第95/35505号、欧州特許第742287号、並びに欧州特許第799897号に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0 0 2 2】

本明細書で使用される場合、「共有結合した(「covalently attached」又は「covalently bonded」)」という用語は、原子間の電子対の共有によって特徴付けられる化学結合の形成を指す。例えば、共有結合したポリマーコーティングとは、他の手段、例えば、接着又は静電相互作用による表面への結合と比較して、基材の官能化表面と化学結合を形成するポリマーコーティングを指す。表面に共有結合したポリマーは、共有結合に加えて、手段によって結合され得ることが理解されるであろう。

【0 0 2 3】50

本明細書で使用される場合、パラジウム触媒を「不活性化する」又は「不活性化すること」としては、パラジウムスカベンジャーを使用する以下のいくつかのメカニズムが挙げられるが、これらに限定されない：(1)パラジウムスカベンジャーは、核酸に粘着している任意の残留活性Pd(0)を消費するための競合基材として作用し得る、(2)パラジウムスカベンジャーは、活性Pd(0)を不活性Pd(II)形態に変換するための酸化剤として作用し得る、及び(3)パラジウムスカベンジャーは、核酸に粘着しているPd(例えば、Pd(0)又はPd(II))を除去するための競合リガンドとして作用し得る。

【0024】

本明細書で使用される場合、任意の「R」基は、示された原子に結合することができる置換基を表す。R基は、置換であってもよく、又は非置換であってもよい。

10

【0025】

ある特定のラジカル命名法は、文脈に応じてモノラジカル又はジラジカルのいずれかを含むことができることを理解されたい。例えば、置換基が分子の残りの部分への2つの結合点を必要とする場合、置換基はジラジカルであることが理解される。例えば、2つの結合点を必要とするアルキルとして特定される置換基としては、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ などのジラジカルが挙げられる。他のラジカル命名法は、ラジカルが「アルキレン」又は「アルケニレン」などのジラジカルであることを明確に示す。

【0026】

本明細書で使用される場合、用語「ハロゲン」又は「ハロ」は、元素周期表の7族の、例えばフッ素、塩素、臭素、又はヨウ素のいずれか1つを意味し、フッ素及び塩素が好ましい。

20

【0027】

本明細書で使用される場合、「a」及び「b」が整数である「C_a~C_b」は、アルキル、アルケニル、若しくはアルキニル基の炭素原子の数、又はシクロアルキル若しくはアリール基の環原子の数を指す。すなわち、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキルの環、及びアリールの環は、「a」~「b」、両端の炭素原子を含有し得る。例えば、「C₁~C₄アルキル」基は、1~4個の炭素を有する全てのアルキル基、すなわち、 CH_3- 、 CH_3CH_2- 、 $CH_3CH_2CH_2-$ 、 $(CH_3)_2CH-$ 、 $CH_3CH_2CH_2CH_2-$ 、 $CH_3CH_2CH(CH_3)-$ 、及び $(CH_3)_3C-$ を指し、C₃~C₄シクロアルキル基は、3~4個の炭素原子を有する全てのシクロアルキル基、すなわち、シクロプロピル及びシクロブチルを指す。同様に、「4~6員ヘテロシクリル」基は、4~6個の全環原子を有する全てのヘテロシクリル基、例えば、アゼチジン、オキセタン、オキサゾリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリンなどを指す。「a」及び「b」がアルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、又はアリール基に関して指定されていない場合、これらの定義に記載される最も広い範囲が想定されるべきである。本明細書で使用される場合、用語「C₁~C₆」は、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、及びC₆、並びに2つの数字のうちのいずれかによって定義される範囲を含む。例えば、C₁~C₆アルキルは、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、及びC₆アルキル、C₂~C₆アルキル、C₁~C₃アルキルなどを含む。同様に、C₂~C₆アルケニルは、C₂、C₃、C₄、C₅、及びC₆アルケニル、C₂~C₅アルケニル、C₃~C₄アルケニルなどが含まれ、C₂~C₆アルキニルは、C₂、C₃、C₄、C₅、及びC₆アルキニル、C₂~C₅アルキニル、C₃~C₄アルキニルなどを含む。C₃~C₈シクロアルキルは各々、3、4、5、6、7、及び8個の炭素原子を含有する炭化水素環、又はC₃~C₇シクロアルキル又はC₅~C₆シクロアルキルなどの2つの数字のうちのいずれかによって定義される範囲を含む。

30

40

【0028】

本明細書で使用される場合、「アルキル」は、完全に飽和している(すなわち、二重結合又は三重結合を含有しない)直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖を指す。アルキル基は、1~2

50

0 個の炭素原子を有してもよい（本明細書に示されるときはいつでも、「1 ~ 20」などの数値範囲は、所与の範囲内の各整数を指す。例えば、「1 ~ 20 個の炭素原子」は、アルキル基が、1 個の炭素原子、2 個の炭素原子、3 個の炭素原子など、最大で 20 個の炭素原子からなり得るが、本定義はまた、「アルキル」という用語（数値範囲が指定されていない）の発生もカバーすることを意味する。アルキル基はまた、1 ~ 9 個の炭素原子を有する中規模のアルキルであってもよい。アルキル基はまた、1 ~ 6 個の炭素原子を有する低級アルキルであってもよい。アルキル基は、「C₁ ~ C₄ アルキル」又は同様の表記として指定されてもよい。一例にすぎないが、「C₁ ~ C₆ アルキル」は、アルキル鎖中に 1 ~ 6 個の炭素原子が存在することを示し、すなわち、アルキル鎖は、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、sec - ブチル、及び t - ブチルからなる群から選択される。典型的なアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、三級ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0029】

本明細書で使用される場合、「アルコキシ」は、「C₁ ~ C₉ アルコキシ」等の、R が上に定義されるアルキルである、式 - OR を指し、これには、メトキシ、エトキシ、n - プロポキシ、1 - メチルエトキシ（イソプロポキシ）、n - ブトキシ、イソブトキシ、sec - ブトキシ、及び tert - ブトキシ等が含まれるが、これらに限定されない。

【0030】

本明細書で使用される場合、「アルケニル」は、1 つ以上の二重結合を含有する直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖を指す。アルケニル基は、2 ~ 20 個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない「アルケニル」という用語の発生もカバーする。アルケニル基はまた、2 ~ 9 個の炭素原子を有する中規模のアルケニルであってもよい。アルケニル基はまた、2 ~ 6 個の炭素原子を有する低級アルケニルであってもよい。アルケニル基は、「C₂ ~ C₆ アルケニル」又は類似の表記で指定されてもよい。一例にすぎないが、「C₂ ~ C₆ アルケニル」とは、アルケニル鎖中に 2 ~ 6 個の炭素原子が存在することを示し、すなわち、アルケニル鎖は、エテニル、プロペン - 1 - イル、プロペン - 2 - イル、プロペン - 3 - イル、ブテン - 1 - イル、ブテン - 2 - イル、ブテン - 3 - イル、ブテン - 4 - イル、1 - メチル - プロペン - 1 - イル、2 - メチル - プロペン - 1 - イル、1 - エチル - エテン - 1 - イル、2 - メチル - プロペン - 3 - イル、ブタ - 1, 3 - ジエニル、ブタ - 1, 2 - ジエニル、及びブタ - 1, 2 - ジエン - 4 - イルからなる群から選択される。典型的なアルケニル基としては、エテニル、プロベニル、ブテニル、ペンテニル、及びヘキセニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0031】

本明細書で使用される場合、「アルキニル」は、1 つ以上の三重結合を含有する直鎖又は分岐鎖炭化水素鎖を指す。アルキニル基は、2 ~ 20 個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない「アルキニル」という用語の発生もカバーする。アルキニル基はまた、2 ~ 9 個の炭素原子を有する中規模のアルキニルであってもよい。アルキニル基はまた、2 ~ 6 個の炭素原子を有する低級アルキニルであってもよい。アルキニル基は、「C₂ ~ C₆ アルキニル」又は類似の表記で指定されてもよい。一例にすぎないが、「C₂ ~ C₆ アルキニル」は、アルキニル鎖中に 2 ~ 6 個の炭素原子が存在することを示し、すなわち、そのアルキニル鎖は、エチニル、プロピン - 1 - イル、プロピン - 2 - イル、ブチン - 1 - イル、ブチン - 3 - イル、ブチン - 4 - イル、及び 2 - ブチニルからなる群から選択される。典型的なアルキニル基としては、エチニル、プロピニル、ブチニル、ペンチニル、及びヘキシニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0032】

用語「芳香族」は、共役 π 電子系を有し、炭素環芳香族（例えば、フェニル）及び複素環式芳香族基（例えば、ピリジン）の両方を含む環又は環系を指す。この用語は、単環式又は縮合多環式（すなわち、隣接する原子対を共有する環）基を含むが、但し、環系全体が芳香族である。

50

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される場合、「アリール」は、環骨格中に炭素のみを含有する芳香環又は環系（すなわち、2個の隣接する炭素原子を共有する2つ以上の縮合環）を指す。アリールが環系である場合、系内の全ての環は芳香環である。アリール基は6～18個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない「アリール」という用語の発生もカバーする。いくつかの実施形態では、アリール基は、6～10個の炭素原子を有する。アリール基は、「C₆～C₁₀アリール」、「C₆若しくはC₁₀アリール」、又は類似の表記で指定されてもよい。アリール基の例としては、フェニル、ナフチル、アズレニル、及びアントラセニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 4 】

「アラルキル」又は「アリールアルキル」は、「C₇～₁₄アラルキル」などの、アルキレン基を介して置換基として結合されたアリール基であり、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、及びナフチルアルキルを含むがこれらに限定されない。いくつかの場合において、アルキレン基は、より低級アルキレン基（すなわち、C₁～C₆アルキレン基）である。

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される場合、「アリールオキシ」は、RO-を指し、ここで、Rは、フェニルなどであるが、これに限定されない、上に定義されるアリールである。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」は、環骨格中に窒素、酸素、及び硫黄を含むがこれらに限定されない、1個以上のヘテロ原子、すなわち炭素以外の元素を含有する芳香環又は環系（すなわち、2個の隣接する原子を共有する2つ以上の縮合環）を指す。ヘテロアリールが環系である場合、系内の全ての環は芳香環である。ヘテロアリール基は、5～18個の環員（すなわち、炭素原子及びヘテロ原子を含む、環骨格を構成する原子の数）を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない「ヘテロアリール」という用語の発生もカバーする。いくつかの実施形態では、ヘテロアリール基は、5～10個の環員又は5～7個の環員を有する。ヘテロアリール基は、「5～7員ヘテロアリール」、「5～10員ヘテロアリール」、又は類似の表記で指定され得る。ヘテロアリール環の例としては、フリル、チエニル、フトラジニル、ピロリル、オキサゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチアゾリル、インドリル、イソインドリル、及びベンゾチエニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 3 7 】

「ヘテロアラルキル」又は「ヘテロアリールアルキル」は、アルキレン基を介して置換基として結合されたヘテロアリール基である。例としては、2-チエニルメチル、3-チエニルメチル、フリルメチル、チエニルエチル、ピロリルアルキル、ピリジルアルキル、イソオキサゾリルアルキル、及びイミダゾリルアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合において、アルキレン基は、より低級アルキレン基（すなわち、C₁～C₆アルキレン基）である。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される場合、「カルボシクリル」は、環系骨格中に炭素原子のみを含有する非芳香環又は環系を意味する。カルボシクリルが環系である場合、2つ以上の環が、縮合、架橋、又はスピロ結合方式で一体に結合され得る。カルボシクリルは、環系中の少なくとも1つの環が芳香族ではないことを条件として、任意の飽和度を有してもよい。したがって、カルボシクリルとしては、シクロアルキル、シクロアルケニル、及びシクロアルキニルが挙げられる。カルボシクリル基は、3～20個の炭素原子を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「カルボシクリル」の発生もカバーする。カルボシクリル基はまた、3～10個の炭素原子を有する中規模のカルボシクリルであって

10

20

30

40

50

もよい。カルボシクリル基はまた、3～6個の炭素原子を有するカルボシクリルであってもよい。カルボシクリル基は、「C₃～C₆カルボシクリル」又は同様の表記で指定されてもよい。カルボシクリル環の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、2,3-ジヒドロ-インデン、ピシクル[2.2.2]オクタニル、アダマンチル、及びスピロ[4.4]ノナニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

本明細書で使用される場合、「シクロアルキル」は、完全飽和カルボシクリル環又は環系を意味する。例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、及びシクロヘキシルが挙げられる。

10

【0040】

本明細書で使用される場合、「ヘテロシクリル」は、環骨格中に少なくとも1個のヘテロ原子を含有する非芳香環又は環系を意味する。ヘテロシクリルとは、縮合、架橋、又はスピロ結合方式に、一体に結合されてもよい。ヘテロシクリルは、環系中の少なくとも1つの環が芳香族ではないことを条件として、任意の飽和度を有してもよい。ヘテロ原子は、環系中の非芳香環又は芳香環のいずれかに存在してもよい。ヘテロシクリル基は、3～20個の環員（すなわち、炭素原子及びヘテロ原子を含む、環骨格を構成する原子の数）を有し得るが、本定義はまた、数値範囲が指定されていない用語「ヘテロシクリル」の発生もカバーする。ヘテロシクリル基はまた、3～10個の環員を有する中規模のヘテロシクリルであってもよい。ヘテロシクリル基はまた、3～6個の環員を有するヘテロシクリルであってもよい。ヘテロシクリル基は、「3～6員ヘテロシクリル」又は類似の表記で指定されてもよい。好ましい6員単環式ヘテロシクリルでは、ヘテロ原子は、O、N又はSのうちの1つから3つまで選択される。好ましい5員の単環式ヘテロシクリルでは、ヘテロ原子は、O、N、又はSから選択される1個又は2個のヘテロ原子から選択される。ヘテロシクリル環の例としては、アゼピニル、アクリジニル、カルバゾリル、シノリニル、ジオキサニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、モルホリニル、オキシラニル、オキセパニル、チアパニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ジオキサピペラジニル、ピロリジニル、ピロリドニル、ピロリジオニル、4-ピペリドニル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、1,3-ジオキシニル、1,3-ジオキサニル、1,4-ジオキシニル、1,4-ジオキサニル、1,3-オキサチニル、1,4-オキサチニル、1,4-オキサチアニル、2H-1,2-オキサジニル、トリオキサニル、ヘキサヒドロ-1,3,5-トリアジニル、1,3-ジオキサニル、1,3-ジオキサニル、1,3-ジチオリル、1,3-ジチオラニル、イソオキサゾリニル、イソオキサゾリジニル、オキサゾリニル、オキサゾリジニル、オキサゾリジノニル、チアゾリニル、チアゾリジニル、1,3-オキサチオラニル、インドリニル、イソインドリニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオフエニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロ-1,4-チアジニル、チアモルフォリニル、ジヒドロベンゾフラニル、ベンズイミダゾリジニル、及びテトラヒドロキノリンが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0041】

本明細書で使用される場合、「(アリール)アルキル」は、上記のアルキレン基を介して置換基として結合した、上に定義されるアリール基を指す。アラルキルのアルキレン基及びアリール基は、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。例としては、ベンジル、2-フェニルアルキル、3-フェニルアルキル、及びナフチルアルキルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルキレンは、1、2、3、4、5、又は6個のメチレン単位を含有する非置換直鎖である。

40

【0042】

本明細書で使用される場合、「(ヘテロアリール)アルキル」は、上に定義されるアルキレン基を介して置換基として結合した、上に定義されるヘテロアリール基を指す。ヘテロアラルキルのアルキレン基及びヘテロアリール基は、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。例としては、2-チエニルアルキル、3-チエニルアルキル、フリル

50

アルキル、チエニルアルキル、ピロリルアルキル、ピリジルアルキル、イソオキサゾリルアルキル、及びイミダゾリルアルキル、並びにそれらのベンゾ縮合類似体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルキレンは、1、2、3、4、5、又は6個のメチレン単位を含有する非置換直鎖である。

【0043】

本明細書で使用される場合、「(ヘテロシクリル)アルキル」は、上に定義されるアルキレン基を介して置換基として結合した、上に定義される複素環基又はヘテロシクリル基を指す。(ヘテロシクリル)アルキルのアルキレン基及びヘテロシクリル基は、置換又は非置換であり得る。例としては、テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)メチル、(ピペリジン-4-イル)エチル、(ピペリジン-4-イル)プロピル、(テトラヒドロ-2H-チオピラン-4-イル)メチル、及び(1,3-チアジナン-4-イル)メチルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルキレンは、1、2、3、4、5、又は6個のメチレン単位を含有する非置換直鎖である。

10

【0044】

本明細書で使用される場合、「(カルボシクリル)アルキル」は、アルキレン基を介して置換基として結合したカルボシクリル基(本明細書で定義される)を指す。例としては、シクロプロピルメチル、シクロブチルメチル、シクロペンチルエチル及びシクロヘキシルプロピルが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、アルキレンは、1、2、3、4、5、又は6個のメチレン単位を含有する非置換直鎖である。

【0045】

本明細書で使用される場合、「アルコキシアルキル」又は「(アルコキシ)アルキル」は、 $C_2 \sim C_8$ アルコキシアルキル、又は($C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、例えば-(CH_2)₁₋₃- OCH_3 などのアルキレン基を介して結合されたアルコキシ基を指す。

20

【0046】

本明細書で使用される場合、「-O-アルコキシアルキル」又は「-O-(アルコキシ)アルキル」は、-O-(アルキレン)基を介して結合したアルコキシ基、例えば-O-($C_1 \sim C_6$ アルコキシ) $C_1 \sim C_6$ アルキル、例えば-O-(CH_2)₁₋₃- OCH_3 を指す。

【0047】

本明細書で使用される場合、「ハロアルキル」は、水素原子のうちの1つ以上がハロゲン(例えば、モノ-ハロアルキル、ジ-ハロアルキル、及びトリ-ハロアルキル)によって置き換えられているアルキル基を指す。そのような基としては、クロロメチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、及び1-クロロ-2-フルオロメチル、2-フルオロイソブチルが挙げられるが、これらに限定されない。ハロアルキルは、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。

30

【0048】

本明細書で使用される場合、「ハロアルコキシ」は、水素原子のうちの1つ以上がハロゲン(例えば、モノ-ハロアルコキシ、ジ-ハロアルコキシ、及びトリ-ハロアルコキシ)によって置き換えられているアルコキシ基を指す。そのような基としては、クロロメトキシ、フルオロメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、及び1-クロロ-2-フルオロメトキシ、2-フルオロイソブトキシが挙げられるが、これらに限定されない。ハロアルコキシは、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。

40

【0049】

「アミノ」基は、- NH_2 基を指す。本明細書で使用される「モノ-置換アミノ基」という用語は、水素原子のうちの1つが置換基によって置き換えられているアミノ(- NH_2)基を指す。本明細書で使用される「ジ-置換アミノ基」という用語は、2個の水素原子の各々が置換基によって置き換えられているアミノ(- NH_2)基を指す。本明細書で使用される「任意選択的に置換されたアミノ」という用語は、- $NR_A R_B$ 基を指し、 R_A 及び R_B は、独立して、本明細書で定義される水素、アルキル、シクロアルキル、アリ

50

ール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アラルキル、又はヘテロシクリル（アルキル）である。

【 0 0 5 0 】

「O - カルボキシ」基は、「 $-OC(=O)R$ 」基を指し、式中、R は、本明細書で定義される水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ～ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ～ 10 員ヘテロシクリルから選択される。

【 0 0 5 1 】

「C - カルボキシ」基は、「 $-C(=O)OR$ 」基を指し、式中、R は、本明細書で定義される水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ～ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ～ 10 員ヘテロシクリルからなる群から選択される。非限定的な例としては、カルボキシル（すなわち、 $-C(=O)OH$ ）が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

「スルホニル」基は、「 $-SO_2R$ 」基を指し、R は、本明細書で定義される水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ～ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ～ 10 員ヘテロシクリルから選択される。

【 0 0 5 3 】

「スルフィノ」基は、「 $-S(=O)OH$ 」基を指す。 20

【 0 0 5 4 】

「スルホ」基は、「 $-S(=O)_2OH$ 」又は「 $-SO_3H$ 」基を指す。

【 0 0 5 5 】

「スルホネート」基は、「 $-SO_3^-$ 」基を指す。

【 0 0 5 6 】

「サルフェート」基は、「 $-SO_4^-$ 」基を指す。

【 0 0 5 7 】

「S - スルホンアミド」基は、「 $-SO_2NR_A R_B$ 」基を指し、式中、 R_A 及び R_B は各々独立して、本明細書で定義される水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ～ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ～ 10 員ヘテロシクリルから選択される。 30

【 0 0 5 8 】

「N - スルホンアミド」基は、「 $-N(R_A)SO_2R_B$ 」基を指し、 R_A 及び R_B は各々独立して、本明細書で定義される水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ～ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ～ 10 員ヘテロシクリルから選択される。

【 0 0 5 9 】

「C - アミド」基は、「 $-C(=O)NR_A R_B$ 」基を指し、 R_A 及び R_B は各々独立して、本明細書で定義される水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ～ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ～ 10 員ヘテロシクリルから選択される。 40

【 0 0 6 0 】

「N - アミド」基は、「 $-N(R_A)C(=O)R_B$ 」基を指し、 R_A 及び R_B は各々独立して、本明細書で定義される水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル、 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5 ～ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ～ 10 員ヘテロシクリルから選択される。

【 0 0 6 1 】

「O - カルバミル」基は、「 $-OC(=O)N(R_A R_B)$ 」基を指し、ここで、 R_A 及び R_B は、S - スルホンアミドに関して定義されたものと同じであり得る。O - カルバミルは、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。

【 0 0 6 2 】

「N - カルバミル」基は、「 $\text{ROC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}_\text{A}) -$ 」基を指し、ここで、R 及び R_A は、N - スルホンアミドに関して定義されたものと同じであり得る。N - カルバミルは、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。

【 0 0 6 3 】

「O - チオカルバミル」基は、「 $- \text{OC}(=\text{S}) - \text{N}(\text{R}_\text{A}\text{R}_\text{B})$ 」基を指し、ここで、 R_A 及び R_B は、S - スルホンアミドに関して定義されたものと同じであり得る。O - チオカルバミルは、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。

【 0 0 6 4 】

「N - チオカルバミル」基は、「 $\text{ROC}(=\text{S})\text{N}(\text{R}_\text{A}) -$ 」基を指し、ここで、R 及び R_A は、N - スルホンアミドに関して定義されたものと同じであり得る。N - チオカルバミルは、置換されていてもよく、又は非置換であってもよい。

10

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される場合、「プロパルギルアミン」という用語は、プロパルギル基で置換されたアミノ基を指す ($\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$)。プロパルギルアミンが二価部分として文脈で使用される場合、 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{NR}_\text{A}-$ を含み、式中、本明細書で定義される場合、 R_A は水素であり、 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルケニル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルキニル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ カルボシクリル、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{10}$ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルが含まれる。

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、「プロパルギルアミド」という用語は、プロパルギル基 ($\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$) で置換された C - アミド又は N - アミド基を指す。プロパルギルアミドが二価部分として文脈で使用される場合、それは、 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{NR}_\text{A}-\text{C}(=\text{O})$ 又は $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_\text{A}-$ を含み、本明細書で定義されるように、 R_A は水素であり、 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルケニル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルキニル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ カルボシクリル、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{10}$ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルを含む。

20

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用される「アリルアミン」という用語は、アリル基で置換されたアミノ基を指す ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$)。アリルアミンが二価部分として文脈で使用される場合、それは $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NR}_\text{A}-$ を含み、式中、 R_A は、本明細書で定義されるように、水素、 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルケニル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルキニル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ カルボシクリル、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{10}$ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルである。

30

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される「アリルアミド」という用語は、アリル基 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$) で置換された C - アミド又は N - アミド基を指す。アリルアミドが二価部分として文脈で使用される場合、それには、本明細書で定義されるように、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NR}_\text{A}-\text{C}(=\text{O})$ - 又は $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_\text{A}-$ が含まれ、式中、 R_A は水素、 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルケニル、 $\text{C}_2\sim\text{C}_6$ アルキニル、 $\text{C}_3\sim\text{C}_7$ カルボシクリル、 $\text{C}_6\sim\text{C}_{10}$ アリール、5 ~ 10 員ヘテロアリール、及び 3 ~ 10 員ヘテロシクリルである。

40

【 0 0 6 9 】

「アルキルアミノ」又は「(アルキル)アミノ」という用語は、一方又は両方の水素がアルキル基で置き換えられているアミノ基を指す。

【 0 0 7 0 】

「(アルコキシ)アルキル」基は、「($\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルコキシ) $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキル」等のアルキレン基を介して結合したアルコキシ基を指す。

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用される「ヒドロキシ」という用語は、 $-\text{OH}$ 基を指す。

50

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される「シアノ」基という用語は、「-CN」基を指す。

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される「アジド」という用語は、-N₃基を指す。

【 0 0 7 4 】

基が「任意選択的に置換された」として記載される場合、それは非置換又は置換されていてもよい。同様に、基が「置換」として記載される場合、置換基は、示された置換基のうちの1つ以上から選択され得る。本明細書で使用される場合、置換基は、1個以上の水素原子が別の原子又は基に対して交換されている非置換親基から誘導される。別途記載のない限り、基が「置換されている」とみなされる場合、その基は、以下から独立して選択される1つ以上の置換基で置換されることを意味する。C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルケニル、C₁～C₆アルキニル、C₁～C₆ヘテロアルキル、C₃～C₇カルボシクリル（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、C₃～C₇カルボシクリル-C₁～C₆-アルキル（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、3～10員ヘテロシクリル（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、3～10員ヘテロシクリル-C₁～C₆-アルキル（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、アリール（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、（アリール）C₁～C₆アルキル（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、5～10員ヘテロアリール（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、（5～10員ヘテロアリール）C₁～C₆アルキル（任意選択的にハロ、C₁～C₆アルキル、C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルキル、及びC₁～C₆ハロアルコキシで置換される）、ハロ、-CN、ヒドロキシ、C₁～C₆アルコキシ、（C₁～C₆アルコキシ）C₁～C₆アルキル、-O（C₁～C₆アルコキシ）C₁～C₆アルキル；（C₁～C₆ハロアルコキシ）C₁～C₆アルキル；-O（C₁～C₆ハロアルコキシ）C₁～C₆アルキル；アリーロキシ、スルフヒドリル（メルカプト）、ハロ（C₁～C₆）アルキル（例えば、-CF₃）、ハロ（C₁～C₆）アルコキシ（例えば、-OCF₃）、C₁～C₆アルキルチオ、アリールチオ、アミノ、アミノ（C₁～C₆）アルキル、ニトロ、O-カルバミル、N-カルバミル、O-チオカルバミル、N-チオカルバミル、C-アミド、N-アミド、S-スルホンアミド、N-スルホンアミド、C-カルボキシ、O-カルボキシ、アシル、シアナト、イソシアナト、チオシアナト、イソチオシアナト、スルフィニル、スルホニル、-SO₃H、スルホネート、サルフェート、スルフィノ、-OSO₂C₁～₄アルキル、モノホスファート、ジホスファート、トリホスファート、及びオキソ（=O）。ある基が「任意選択的に置換されている」と記載されている場合には、その基が置換される場合には、上記置換基で置換され得る。

【 0 0 7 5 】

当業者には理解されるように、本明細書に記載の化合物は、イオン化形態、例えば、-CO₂⁻-SO₃⁻又は-O-SO₃⁻で存在してもよい。化合物が、正又は負に帯電した置換基、例えば、-SO₃⁻を含有する場合、化合物が全体として中性であるように、負又は正に帯電した対イオンを含有してもよい。他の態様では、化合物は塩形態で存在してもよく、対イオンは、共役酸又は塩基によって提供される。

【 0 0 7 6 】

置換基がジラジカルとして示される場合（すなわち、分子の残りの部分への2つの結合点を有する）は、特に指示がない限り、置換基が任意の方向性構成で結合することができ

10

20

30

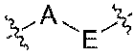
40

50

ることを理解されたい。したがって、例えば、 $-A-E-$ 又は

【0077】

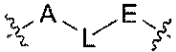
【化5】



として示される置換基は、Aが、分子の最も左の結合点で結合されるように、方向付けられている置換基、並びにAが、分子の最も右の結合点で結合される場合を示す。更に、基又は置換基が、

【0078】

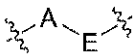
【化6】



として示される場合、Lは、任意に存在するリンカー部分と定義され、Lが存在しない（又は存在しない）場合、そのような基又は置換基は、

【0079】

【化7】



と同等である。

【0080】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」は、窒素含有複素環式塩基、糖、及び1つ以上のリン酸基を含む。それらは、核酸配列の単量体単位である。RNA中では、糖は、リボースであり、DNA中では、デオキシリボース、すなわち、リボース中に存在するヒドロキシ基を欠く糖である。窒素含有複素環式塩基は、プリン塩基又はピリミジン塩基であり得る。プリン塩基には、アデニン（A）及びグアニン（G）、並びに7-デアザアデニン若しくは7-デアザグアニンなどの、それらの修飾された誘導体又は類似体が含まれる。ピリミジン塩基としては、シトシン（C）、チミン（T）、及びウラシル（U）、並びにそれらの修飾された誘導体又は類似体が挙げられる。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（P）のN-9に結合される。

【0081】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシド」は、ヌクレオチドと構造的に類似しているが、リン酸部分を欠いている。ヌクレオシド類似体の例は、標識が塩基に連結され、糖分子に結合したリン酸基が存在しないものである。用語「ヌクレオシド」は、当業者によって理解されるその通常の意味で、本明細書で使用される。例としては、リボース部分を含むリボヌクレオシド、及びデオキシリボース部分を含むデオキシリボヌクレオシドが挙げられるが、これらに限定されない。修飾されたペントース部分は、酸素原子が炭素で置き換えられている、かつ/又は炭素が硫黄又は酸素原子で置き換えられている、ペントース部分である。「ヌクレオシド」は、置換塩基及び/又は糖部分を有し得る単量体である。更に、ヌクレオシドは、より大きなDNA及び/又はRNAポリマー及びオリゴマーに組み込まれ得る。

【0082】

用語「プリン塩基」は、当業者によって理解されるその通常の意味で、本明細書で使用され、その互変異性体を含む。同様に、用語「ピリミジン塩基」は、当業者によって理解されるその通常の意味で、本明細書で使用され、その互変異性体を含む。任意選択的に置換されたプリン塩基の非限定的なリストとしては、プリン、アデニン、グアニン、デアザプリン、7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、アロキサンチン、7-アルキルグアニン（例えば、7-メチルグアニン）、テオブロミン、カ

10

20

30

40

50

フェイン、尿酸、及びイソグアニンが挙げられる。ピリミジン塩基の例としては、シトシン、チミン、ウラシル、5, 6 - ジヒドロウラシル、及び5 - アルキルシトシン（例えば、5 - メチルシトシン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドが、本明細書に記載されるヌクレオシド又はヌクレオチドを「含む」又は「組み込む」として記載される場合、それは、本明細書に記載されるヌクレオシド又はヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと共有結合を形成することを意味する。同様に、ヌクレオシド又はヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに「組み込まれた」など、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの一部として記載される場合、それは、本明細書に記載のヌクレオシド又はヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドと共有結合を形成することを意味する。いくつかのそのような実施形態では、共有結合は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの3' ヒドロキシ基と、本明細書に記載のヌクレオチドの5' リン酸基との間で、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドの3' 炭素原子とヌクレオチドの5' 炭素原子との間のホスホジエステル結合として形成される。

10

【0084】

本明細書で使用される場合、「開裂可能なリンカー」という用語は、リンカー全体を除去する必要があることを意味するものではない。開裂部位は、リンカーの一部が、開裂後に検出可能な標識及び/又はヌクレオシド若しくはヌクレオチド部分に結合したままであることを確実にするリンカー上の位置に配置することができる。

20

【0085】

本明細書で使用される場合、「誘導体」又は「類似体」は、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シド誘導体を意味する。そのような誘導体及び類似体は、例えば、Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley & Son, 1980) 及びUhlman et al., Chemical Reviews 90: 543 - 584, 1990に考察されている。ヌクレオチド類似体はまた、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキル - ホスホネート、ホスホラニリデート (phosphoranilidate)、及びホスホラミデート連結を含む修飾されたホスホジエステルリンケージを含むことができる。本明細書で使用する「誘導体」、「類似体」、及び「修飾された」は、互換的に使用され得、本明細書で定義される用語「ヌクレオチド」及び「ヌクレオシド」に包含される。

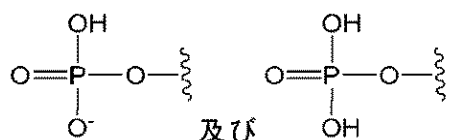
30

【0086】

本明細書で使用される場合、用語「リン酸塩」は、当業者によって理解される通常の意味で使用され、そのプロトン化形態（例えば、

【0087】

【化8】



40

）を含む。本明細書で使用される場合、用語「一リン酸」、「二リン酸」、及び「三リン酸」は、当業者によって理解される通常の意味で使用され、プロトン化形態を含む。

【0088】

本明細書で使用される用語「保護基」及び「保護基」は、分子中の既存の基が望ましくない化学反応を受けるのを阻止するために、分子に追加される任意の原子又は原子基を指す。時には、「保護基」及び「ブロック基」は、互換的に使用され得る。

【0089】

本明細書で使用される場合、用語「フェージング」は、3' ターミネータ及びフルオロフォアの不完全な除去、及び所与の配列決定サイクルにおけるポリメラーゼによるクラス

50

タ内のDNA鎖の一部の組み込みを完了不良によって引き起こされる、SBSにおける現象を指す。予備フェージングは、効果的な3'ターミネータなしでヌクレオチドを組み込むことによって引き起こされ、取り込みイベントは、終了不良により1サイクル前に進む。フェージング及び予備フェージングは、特定のサイクルに対する測定されたシグナル強度が、現在のサイクルからのシグナル、並びに前及び次のサイクルからのノイズからなるようにする。サイクル数が増加するにつれて、フェージング及び予備フェージングによって影響を受けた1つのクラスタ当たりの配列の割合は増加し、正しい塩基の識別を妨げる。予備フェージングは、合成による配列決定(SBS)中の微量の非保護又はブロックされていない3'-OHヌクレオチドの存在によって引き起こされ得る。保護されていない3'-OHヌクレオチドは、製造プロセス中、又は場合によっては、保存及び試薬処理プロセス中に生成され得る。したがって、予備フェージングの発生率を低下させるヌクレオチド類似体の発見は驚くべきことであり、既存のヌクレオチド類似体に対するSBS用途において大きな利点を提供する。例えば、提供されるヌクレオチド類似体は、より速いSBSサイクル時間、低いフェージング及び予備フェージング値、並びにより長い配列リードの長さをもたらし得る。

10

【0090】

パラジウム触媒を利用する配列決定方法

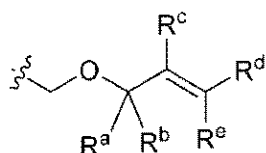
本開示のいくつかの態様は、標的ポリヌクレオチド(例えば、一本鎖ポリヌクレオチド)の配列を決定する方法であって、

(a) コピーポリヌクレオチド/標的ポリヌクレオチド複合体を、第1の水溶液中で1つ以上の異なるタイプのヌクレオチド(例えば、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP又はdUTP)と接触させることであって、ヌクレオチドの各々が、ヌクレオチドの3'酸素に結合した構造

20

【0091】

【化9】



30

を有する3'ブロック基を含み、コピーポリヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、

(b) 1つのタイプのヌクレオチドをコピーポリヌクレオチドに組み込んで、伸長コピーポリヌクレオチドを生成することと、

(c) 1つ以上の蛍光測定を実行して、組み込まれたヌクレオチドの同一性を決定することと、

(d) 組み込まれたヌクレオチドの3'ブロック基をパラジウム触媒で除去することと、を含み、

残りのパラジウム触媒の少なくとも一部分が、工程(d)の後に1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化され、少なくとも1つのパラジウムスカベンジャーが、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、及び-N⁺RR'-アリル、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上のアリル部分を含み、

40

R^a、R^b、R^c、R^d、及びR^eの各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換C₁~C₆アルキル、又はC₁~C₆ハロアルキルであり、

Rが、H、非置換若しくは置換C₁~C₆アルキル、非置換若しくは置換C₂~C₆アルケニル、非置換若しくは置換C₂~C₆アルキニル、非置換若しくは置換C₆~C₁₀アリール、非置換若しくは置換5~10員ヘテロアリール、非置換若しくは置換C₃~C₁₀カルボシクリル、又は非置換若しくは置換5~10員ヘテロシクリルであり、

R'が、H、非置換C₁~C₆アルキル又は置換C₁~C₆アルキルである、方法に関する。

50

【 0 0 9 2 】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、コピーポリヌクレオチド / 標的ポリヌクレオチド複合体は、標的ポリヌクレオチドを標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な一本鎖コピーポリヌクレオチドと接触させることによって形成される。いくつかの実施形態では、組み込まれたヌクレオチドは、標識ヌクレオチドであり、標識ヌクレオチドは、任意選択的に切断可能なリンカーを介してヌクレオチドに結合した蛍光標識を含む（例えば、蛍光標識は、切断可能なリンカーを通して核酸塩基に結合している）。いくつかのそのような実施形態では、工程（d）はまた、蛍光標識を除去する。いくつかの実施形態では、方法は、工程（e）：組み込まれたヌクレオチドの3'ブロッキング基の除去後に、固体支持体を第2の水溶液で洗浄することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、標的ポリヌクレオチド鎖の少なくとも一部分の配列が決定されるまで、工程（a）～（d）又は工程（a）～（e）を繰り返すことを更に含む。いくつかの実施形態では、サイクル（すなわち、工程（a）～（d）又は工程（a）～（e））は、少なくとも50回、少なくとも100回、少なくとも150回、少なくとも200回、少なくとも250回、又は少なくとも300回繰り返される。いくつかの実施形態では、1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化された残りのパラジウム触媒は、形態Pd（II）及び/又はPd（0）種である。いくつかの実施形態では、方法は、複数の異なるポリヌクレオチド（例えば、一本鎖ポリヌクレオチド）を決定するために並行して実行される。

10

【 0 0 9 3 】

本開示のいくつかの更なる実施形態は、複数の標的ポリヌクレオチドの配列を決定する方法であって、

（a）ハイブリダイゼーション条件下で、固体支持体を配列決定プライマーと接触させることであって、固体支持体が、その上に固定化された複数の異なる標的ポリヌクレオチドを含み、配列決定プライマーが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、

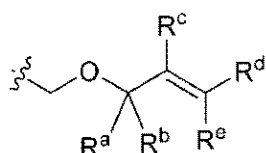
（b）DNAポリメラーゼ媒介プライマー伸長に好適な条件下で、固体支持体を、DNAポリメラーゼ及び4つの異なるタイプのヌクレオチド（例えば、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP又はdUTP）のうちの1つ以上を含む第1の水溶液と接触させることであって、ヌクレオチドの各々が、ヌクレオチドの3'酸素に結合した構造

20

30

【 0 0 9 4 】

【 化 1 0 】



を有する3'ブロッキング基を含む、接触させることと、

（c）1つのタイプのヌクレオチドを配列決定プライマーに組み込んで、伸長コピーポリヌクレオチドを生成することと、

（d）伸長コピーポリヌクレオチドの1つ以上の蛍光測定を実行することと、

（e）組み込まれたヌクレオチドの3'ブロッキング基をパラジウム触媒で除去することと、を含み、

残りのパラジウム触媒の少なくとも一部分が、工程（e）の後に1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化され、少なくとも1つのパラジウムスカベンジャーが、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、及び-N⁺RR'-アリル、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上のアリル部分を含み、

R^a、R^b、R^c、R^d、及びR^eの各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換C₁～C₆アルキル、又はC₁～C₆ハロアルキルであり、

Rが、H、非置換若しくは置換C₁～C₆アルキル、非置換若しくは置換C₂～C₆ア

40

50

ルケニル、非置換若しくは置換 $C_2 \sim C_6$ アルキニル、非置換若しくは置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、非置換若しくは置換 $5 \sim 10$ 員ヘテロアリール、非置換若しくは置換 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、又は非置換若しくは置換 $5 \sim 10$ 員ヘテロシクリルであり、

R' が、H、非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル又は置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルである、方法に関する。

【0095】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、1つ以上の組み込まれたヌクレオチドは、標識ヌクレオチドであり、標識ヌクレオチドは、任意選択的に切断可能なリンカーを通してヌクレオチドに結合した検出可能な標識（例えば、蛍光色素）を含む（例えば、検出可能な標識は、切断可能なリンカーを通して核酸塩基に結合している）。いくつかのそのような実施形態では、工程（e）はまた、検出可能な標識を除去する。いくつかの実施形態では、方法は、工程（f）：組み込まれたヌクレオチドの3'ブロック基の除去後に、固体支持体を第2の水溶液で洗浄することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分の配列が決定されるまで、工程（b）～（e）又は工程（b）～（f）を繰り返すことを更に含む。いくつかの実施形態では、サイクル（すなわち、工程（b）～（e）又は工程（b）～（f））は、少なくとも50回、少なくとも100回、少なくとも150回、少なくとも200回、少なくとも250回、又は少なくとも300回繰り返される。いくつかの実施形態では、形態Pd（II）及び/又はPd（0）種の1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化された残りのパラジウム触媒。

10

20

【0096】

本明細書に記載される方法の他の実施形態では、組み込まれたヌクレオチドは、標識されていない。1つ以上の蛍光色素を含有する標識親和性試薬を使用することによって、組み込み後に1つ以上の蛍光標識を導入することができる。例えば、第1の水溶液中の4つの異なるタイプのヌクレオチド（例えば、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP又はdUTP）のうちの1つ、2つ、3つ、又は各々は、標識されていない場合がある。4つのタイプのヌクレオチド（例えば、dNTP）の各々は、単一塩基のみがコピーポリヌクレオチドの3'末端にポリメラーゼによって付加され得ることを確実にするために、本明細書に記載される3'ヒドロキシブロック基を有する。非標識ヌクレオチドの組み込み後、次いで、組み込まれたdNTPに特異的に結合する親和性試薬を導入して、組み込まれたdNTPを含む標識された伸長産物を提供する。合成による配列決定における非標識ヌクレオチド及び親和性試薬の使用は、米国特許出願公開第2013/0079232号に開示されている。非標識ヌクレオチドを使用する本開示の修正された配列決定方法は、以下の工程：

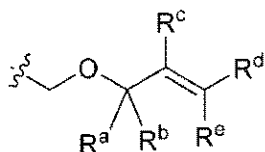
30

（a'）コピーポリヌクレオチド/標的ポリヌクレオチド複合体を、第1の水溶液中で1つ以上の非標識ヌクレオチド（例えば、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP又はdUTP）と接触させることであって、ヌクレオチドの各々が、ヌクレオチドの3'酸素に結合した構造

【0097】

【化11】

40



（ R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、及び R^e の各々が上に定義されている）を有する3'ブロック基を含み、コピーポリヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である、接触させることと、

（b'-1）1つのタイプのヌクレオチドをコピーポリヌクレオチドに組み込んで、伸長コピーポリヌクレオチドを産生することと、

50

(b' - 2) 伸長コピーポリヌクレオチドを一連の親和性試薬と、1つの親和性試薬が組み込まれた非標識ヌクレオチドに特異的に結合して標識された伸長コピーポリヌクレオチド/標的ポリヌクレオチド複合体を提供する条件下で、接触させることと、

(c') 標識された伸長コピーポリヌクレオチド/標的ポリヌクレオチド複合体の1つ以上の蛍光測定を実行して、組み込まれたヌクレオチドの同一性を決定することと、

(d') 組み込まれたヌクレオチドの3'ブロック基をパラジウム触媒で除去することと、を含み得、

残りのパラジウム触媒の少なくとも一部分が、工程(d')の後に1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化され、少なくとも1つのパラジウムスカベンジャーが、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、及び-N⁺RR'-アリル、並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上のアリル部分を含む。 10

【0098】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、コピーポリヌクレオチド/標的ポリヌクレオチド複合体は、標的ポリヌクレオチドを標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な一本鎖コピーポリヌクレオチドと接触させることによって形成される。親和性試薬は、ヌクレオチドのハプテン部分(例えば、ストレプトアビジン-ビオチン、抗DIG及びDIG、抗DNP及びDNP)、抗体(限定されないが、抗体の結合フラグメント、一本鎖抗体、二重特異性抗体等を含む)、アプタマー、ノッチン、アフィマー、又は組み込まれたヌクレオチドに適切な特異性及び親和性で結合する任意の他の公知の因子に結合し得る小分子又はタンパク質タグを含み得る。更なる実施形態では、1つの親和性試薬を同じ蛍光色素の複数のコピーで標識することができる。いくつかの実施形態では、Pd触媒は、標識親和性試薬も除去する。例えば、非標識ヌクレオチドのハプテン部分は、Pd触媒によって切断され得る切断可能なリンカーを通して核酸塩基に結合し得る。いくつかの実施形態では、方法は、標的ポリヌクレオチド鎖の少なくとも一部分の配列が決定されるまで、工程(a')~(d')を繰り返すことを更に含む。いくつかの実施形態では、サイクル(すなわち、工程(a')~(d'))は、少なくとも50回、少なくとも100回、少なくとも150回、少なくとも200回、少なくとも250回、又は少なくとも300回繰り返される。本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、方法は、(e')第2の水溶液を使用することによって、コピーポリヌクレオチド/標的ポリヌクレオチド複合体から除去された3'ブロック基を洗浄することを更に含む。いくつかの実施形態では、方法は、標的ポリヌクレオチド鎖の少なくとも一部分の配列が決定されるまで、工程(a')~(e')を繰り返すことを更に含む。いくつかの実施形態では、サイクル(すなわち、工程(a')~(e'))は、少なくとも50回、少なくとも100回、少なくとも150回、少なくとも200回、少なくとも250回、又は少なくとも300回繰り返される。いくつかの実施形態では、Pd(II)及び/又はPd(0)種の形態の1つ以上のパラジウムスカベンジャーによって不活性化された残りのパラジウム触媒。いくつかの実施形態では、この修正された方法は、複数の異なるポリヌクレオチド(例えば、一本鎖ポリヌクレオチド)を決定するために並行して実行される。 20 30

【0099】

本明細書に記載される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、パラジウムスカベンジャーは、1つ以上のアリル部分を含み、第1の水溶液中にある。いくつかの例では、第1の水溶液は、組み込みミックス(IMX)としても知られている。いくつかのそのような実施形態では、そのようなパラジウムスカベンジャーは、1つ以上の異なるタイプのヌクレオチドに加えて、ポリメラーゼ(DNAポリメラーゼなどの)も含み得る第1の水溶液中の他の配列決定試薬と適合性である。いくつかのそのような実施形態では、ポリメラーゼは、9°Nポリメラーゼの変異体(例えば、参照により組み込まれる国際公開第2005/024010号に開示されるもの)、例えば、Pol812、Pol1901、Pol1558、又はPol963などのDNAポリメラーゼである。Pol812、Pol1901、Pol1558、又はPol963 DNAポリメラーゼのアミノ酸配列は、例えば、米国特許出願公開第2020/0131484(A1)号及び同第20 40 50

20 / 0181587 (A1) 号に記載されており、それらの両方が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、第1の水溶液は、1つ以上の緩衝剤を更に含む。緩衝剤は、一級アミン、二級アミン、三級アミン、天然アミノ酸、若しくは非天然アミノ酸、又はそれらの組み合わせを含み得る。更なる実施形態では、緩衝剤は、エタノールアミン又はグリシン、あるいはそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、緩衝剤は、グリシンを含むか、又はグリシンである。更なる実施形態では、パラジウムスカベンジャーは、1つ以上のアリル部分を含み、次の組み込みサイクルの前に別個の洗浄工程を必要としない。更なる実施形態では、第1の水溶液中のパラジウムスカベンジャーは、本明細書に記載されるPd(0)スカベンジャーである。いくつかの実施形態では、Pd(0)スカベンジャーは、DNAポリメラーゼ及び/又は4つのタイプのヌクレオチドのうちの1つ以上(例えば、dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP又はdUTP)と予め混合される。他の実施形態では、Pd(0)スカベンジャーは、DNAポリメラーゼ及び/又は4つのタイプのヌクレオチドのうちの1つ以上とは別個に保存され、配列決定ランを開始する直前にこれらのコンポーネントと混合される。

10

【0100】

本明細書に記載される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、第1の水溶液中の1つ以上のアリル部分を含むパラジウムスカベンジャー(例えば、Pd(0)スカベンジャー)の濃度は、約0.1mM~約100mM、0.2mM~約75mM、約0.5mM~約50mM、約1mM~約20mM、又は約2mM~約10mMである。更なる実施形態では、パラジウムスカベンジャー(例えば、Pd(0)スカベンジャー)の濃度は、約0.1mM、0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.5mM、0.6mM、0.7mM、0.8mM、0.9mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM、5.5mM、6mM、6.5mM、7mM、7.5mM、8mM、8.5mM、9mM、9.5mM、10mM、12.5mM、15mM、17.5mM、若しくは20mM、又は前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲である。一実施形態では、Pdスカベンジャーは、約2mMの濃度の化合物Bである。他の実施形態では、Pdスカベンジャーは、約0.5mMの濃度の化合物Oである。更なる実施形態では、そのようなパラジウムスカベンジャーの濃度は、第1の水溶液中の濃度である。更なる実施形態では、第1の水溶液のpHは、約9である。

20

【0101】

本明細書に記載される方法のうちのいずれかのいくつかの他の実施形態では、パラジウムスカベンジャーは、1つ以上のアリル部分を含み、1つ以上の蛍光測定を実行するときに溶液中にある。そのような実施形態では、そのようなパラジウムスカベンジャーは、スキャンング溶液(スキャンミックスとしても知られている)の配列決定試薬と適合性である。更なる実施形態では、1つ以上のパラジウムスカベンジャーは、次の組み込みサイクルの前に別個の洗浄工程を必要としない。更なる実施形態では、スキャン溶液中のパラジウムスカベンジャーは、本明細書に記載されるPd(0)スカベンジャーである。

30

【0102】

本明細書に記載される方法の他の実施形態では、パラジウムスカベンジャーは、1つ以上のアリル部分を含み、切断後洗浄溶液(すなわち、第2の水溶液)中にある。更なる実施形態では、切断後洗浄溶液中のパラジウムスカベンジャーは、本明細書に記載されるPd(0)スカベンジャーである。いくつかのそのような実施形態では、切断後洗浄溶液は、リボ酸又は3,3'-ジチオジプロピオン酸(DDPA)を含まない。

40

【0103】

本明細書に記載される方法のなお他の実施形態では、パラジウムスカベンジャーは、1つ以上のアリル部分を含み、第1の水溶液(例えば、組み込みミックス)及び第2の水溶液(例えば、切断後洗浄溶液)の両方に存在するか、又は第1の水溶液及びスキャンミックスの両方に存在し得る。いくつかのそのような実施形態では、切断後洗浄溶液は、リボ酸又はDDPAを含まない。

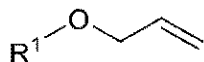
【0104】

50

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、1つ以上の - O - アリル部分を
含むパラジウムスカベンジャーは、構造：

【0105】

【化12】



を有し、

式中、 R^1 が、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、1つ
以上の R^x で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、1つ以上の R^x で任意選
択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、 $C_6 \sim C_{10}$ ア
リール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、5～10員ヘテロアリール、(
5～10員ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、(C_3
 $\sim C_{10}$ カルボシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、3～10員ヘテロシクリル、(3～10
員ヘテロシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸
部分、 $-C(=O)NR^{f1}R^{g1}$ 、 $-P(=O)OR^{f1}OR^{g1}$ 、 $-C(=O)R^{h1}$
、 $-C(=O)OR^{h1}$ 、又は $-S(=O)_2R^{j1}$ であり、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、5～
10員ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、及び3～10員ヘテロシクリルの
各々が、1つ以上の R^x で任意選択的に置換されており、

R^{f1} 及び R^{g1} の各々が、独立して、H、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された
 $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、
又は1つ以上の R^x で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリールであり、

各 R^{h1} が、独立して、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル
、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は1つ以上の R^x
で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリールであり、

各 R^{j1} が、独立して、ヒドロキシ、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim$
 C_6 アルキル、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は1
つ以上の R^x で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリールであり、

各 R^x が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、($C_1 \sim C_6$
アルキル)アミノ、

C - アミド、N - アミド、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキ
ル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、非置換及び置換
 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は $-O-CH_2-CH=CH_2$
である。

【0106】

いくつかの実施形態では、 R^1 は、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_1 \sim C$
 $_6$ アルキル、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_6$ アルケニル、非置換ア
ミノ、置換アミノ、1つ以上の R^x で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、1
つ以上の R^x で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリール、単糖部分、二糖部分
、アミノ酸部分、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-P(=O)(OH)_2$ 、又は $-S(=O)_2O$
Hであり、各 R^x が、独立して、アミノ、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、非置
換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ ア
ルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、又は $-O-CH_2-CH=CH$
 $_2$ である。いくつかのそのような実施形態では、 R^1 は、5員若しくは6員の糖環を有す
る単糖部分、又はその修飾類似体(例えば、グルコピラノシド)である。いくつかのその
ような実施形態では、 R^1 は、非置換であるか、又は1つ以上の R^x で置換された $C_1 \sim$
 C_6 アルキルであり、 R^x が、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、置換 $C_1 \sim C_6$ アル
コキシ、置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ(例えば、 $-OPh$)、及び $-O-CH_2-CH$
 $=CH_2$ である。いくつかのそのような実施形態では、 R^1 は、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル
(例えば、 C_3 アルケニル)である。いくつかのそのような実施形態では、 R^1 は、アミ

ノ酸部分であり、アミノ部分が、更に保護され得る（例えば、 R^1 は、N - B o c 保護チロシン残基である）。 R^1 がアミノ酸部分である場合、それはまた、アミノ酸部分の任意の誘導体又は類似体を含む。例えば、アミノ酸残基の遊離アミノ基は、アミノ保護基（例えば、t e r t - ブチルオキシカルボニル又はB o c 保護基）で保護され得る。アミノ酸残基のカルボキシ基は、エステル形態であってもよい。一実施形態では、 R^1 は、アミノ基である。いくつかの他の実施形態では、 R^1 は、1つ以上の R^x で任意選択的に置換されたO、S、及びNから選択される1、2、3、若しくは4個のヘテロ原子を含む、5、6、9、若しくは10員のヘテロアリール又はヘテロシクリルである（ R^x は、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、及び - O - C H ₂ - C H = C H ₂ である）。いくつかの他の実施形態では、 R^1 は、1つ以上の R^x で任意選択的に置換されたフェニルである（ R^x は、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、及び - O - C H ₂ - C H = C H ₂ である）。 R^1 がホスファート、スルホ、又はスルホネートを含む場合、1つ以上のヒドロキシ基は、アニオン形態であってもよく、パラジウムスカベンジャーはまた、スカベンジャーが塩形態であり、いかなる電荷を持たないように、1つ以上のカチオンを含んでもよい。1つ以上の - O - アリル部分を含むP d スカベンジャーの任意の実施形態では、アリル部分の1つ以上の水素原子は、（例えば、ハロゲン、C₁ ~ C₆ アルキル、又はC₁ ~ C₆ ハロアルキルで）置換され得る。

10

【0107】

1つ以上の - O - アリル又はアリル部分を含むパラジウムスカベンジャーの非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：

20

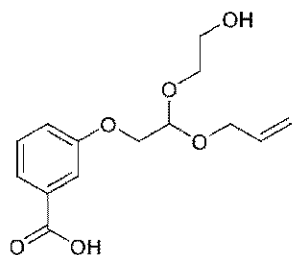
【0108】

30

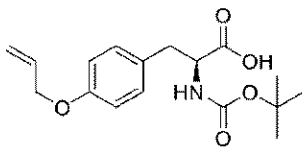
40

50

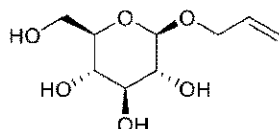
【化 1 3】



(化合物A)、

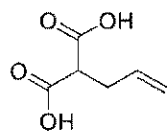


(化合物B、N-Boc

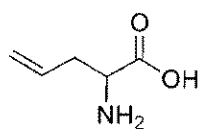


10

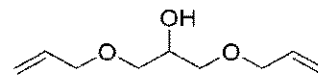
チロシン(アリル)-OH)、

(化合物C、アリル- β -d-グルコピラノシド)、

(化合物D)、

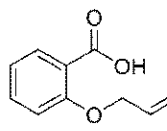


(化合物E)、

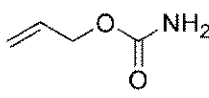


20

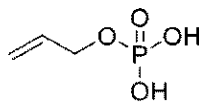
(化合物F)、HO-N=N-O-allyl (化合物G)、NH2-O-allyl (化合物H)、



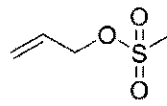
(化合物I)、



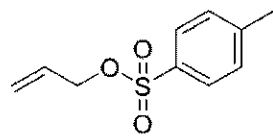
(化合物J)、



(化合物K)、

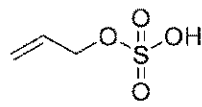


(化合物L)、



(化合物M)、及び

30



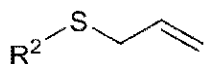
(化合物N)。

【0 1 0 9】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、1つ以上の - S - アリル部分を含むパラジウムスカベンジャーは、構造：

【0 1 1 0】

【化 1 4】



40

を有し、

式中、 R^2 が、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、1つ以上の R^Y で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、5 ~ 10 員ヘテロアリール、(5 ~ 10 員ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、($C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、3 ~ 10 員ヘテロシクリル、(3 ~ 10 員ヘテロシクリル) $C_1 \sim C_6$ アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NR^f R^g$ 、 $-P(=O)OR^f OR^g$ 、 $-C(=O)R^h$

50

、 $-C(=O)OR^{h2}$ 、又は $-S(=O)_2R^{j2}$ であり、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $5 \sim 10$ 員ヘテロアリール、 $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、及び $3 \sim 10$ 員ヘテロシクリルの各々が、1つ以上の R^y で任意選択的に置換されており、

R^{f2} 及び R^{g2} の各々が、独立して、 H 、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $5 \sim 10$ 員ヘテロアリールであり、

各 R^{h2} が、独立して、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $5 \sim 10$ 員ヘテロアリールであり、

各 R^{j2} が、独立して、ヒドロキシ、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、又は1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $5 \sim 10$ 員ヘテロアリールであり、

各 R^y が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、($C_1 \sim C_6$ アルキル)アミノ、

C -アミド、 N -アミド、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は $-S-CH_2-CH=CH_2$ である。

【0111】

いくつかの実施形態では、 R^2 は、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_6$ アルケニル、非置換アミノ、置換アミノ、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された $5 \sim 10$ 員ヘテロアリール、単糖部分、二糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-P(=O)(OH)_2$ 、又は $-S(=O)_2OH$ であり、各 R^y が、独立して、アミノ、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、又は $-S-CH_2-CH=CH_2$ である。いくつかのそのような実施形態では、 R^2 は、5員若しくは6員の糖環を有する単糖部分、又はその修飾類似体(例えば、グルコピラノシド)である。いくつかのそのような実施形態では、 R^2 は、非置換であるか、又は1つ以上の R^y で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 R^y が、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ(例えば、 $-OPh$)、及び $-S-CH_2-CH=CH_2$ である。いくつかのそのような実施形態では、 R^2 は、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル(例えば、 C_3 アルケニル)である。いくつかのそのような実施形態では、 R^2 は、アミノ酸部分であり、アミノ部分が、更に保護され得る(例えば、 R^2 は、 N - Boc 保護チロシン残基である)。 R^2 がアミノ酸部分である場合、それはまた、アミノ酸部分の任意の誘導体又は類似体を含む。例えば、アミノ酸部分の遊離アミノ基は、アミノ保護基(例えば、 $tert$ -ブチルオキシカルボニル又は Boc 保護基)で保護され得る。アミノ酸部分のカルボキシ基は、エステル形態であってもよい。一実施形態では、 R^2 は、アミノ基である。いくつかの他の実施形態では、 R^2 は、1つ以上の R^y で任意選択的に置換された O 、 S 、及び N から選択される1、2、3、若しくは4個のヘテロ原子を含む、5、6、9、若しくは10員のヘテロシクリル又はヘテロアリールである(R^y は、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、及び $-S-CH_2-CH=CH_2$ である)。いくつかの他の実施形態では、 R^2 は、1つ以上の R^y で任意選択的に置換されたフェニルである(R^y は、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、及び $-S-CH_2-CH=CH_2$ である)。 R^2 がホスファート、スルホ、又はスルホネートを含む場合、1つ以上のヒドロキシ基は、アニオン形態であってもよく、パラジウムスカベンジャーはまた、スカベンジャーが塩形態であり、いかなる電荷を持たないように、1つ以上のカチオンを含んでもよい。1つ以上の $-S$ -アリル部分を含む Pd スカベンジャーの任意の実施形態では、アリル部分の1つ以上の水素原子は、(例えば、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は $C_1 \sim C_6$ ハロ

10

20

30

40

50

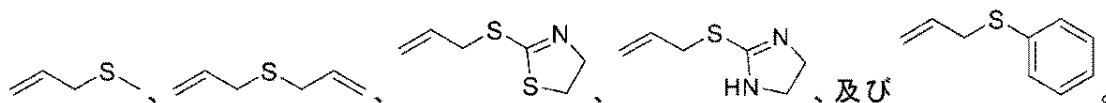
アルキルで)置換され得る。

【0112】

1つ以上の - S - アリル部分を含むパラジウムスカベンジャーの非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：

【0113】

【化15】



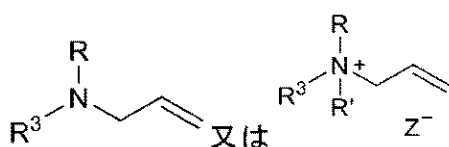
10

【0114】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、1つ以上の - NR - アリル又は - N⁺RR' - アリル部分を含むパラジウムスカベンジャーは、構造：

【0115】

【化16】



20

を有し、

式中、Zが、アニオンであり、

各R³が、独立して、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₁～C₁₂アルキル、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₂～C₁₂アルケニル、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₂～C₁₂アルキニル、非置換アミノ、置換アミノ、C₆～C₁₀アリール、(C₆～C₁₀アリール)C₁～C₆アルキル、5～10員ヘテロアリール、(5～10員ヘテロアリール)C₁～C₆アルキル、C₃～C₁₀カルボシクリル、(C₃～C₁₀カルボシクリル)C₁～C₆アルキル、3～10員ヘテロシクリル、(3～10員ヘテロシクリル)C₁～C₆アルキル、単糖部分、二糖部分、オリゴ糖部分、アミノ酸部分、-C(=O)NR^{f3}R^{g3}、-P(=O)OR^{f3}OR^{g3}、-C(=O)R^{h3}、-C(=O)OR^{h3}、又は-S(=O)₂R^{j3}であり、C₆～C₁₀アリール、5～10員ヘテロアリール、C₃～C₁₀カルボシクリル、及び3～10員ヘテロシクリルの各々が、1つ以上のR²で任意選択的に置換されており、

30

R^{f3}及びR^{g3}の各々が、独立して、H、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₁～C₆アルキル、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₆～C₁₀アリール、又は1つ以上のR²で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリールであり、

各R^{h3}が、独立して、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₁～C₆アルキル、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₆～C₁₀アリール、又は1つ以上のR²で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリールであり、

各R^{j3}が、独立して、ヒドロキシ、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₁～C₆アルキル、1つ以上のR²で任意選択的に置換されたC₆～C₁₀アリール、又は1つ以上のR²で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリールであり、

40

各R²が、独立して、アミノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、シアノ、(C₁～C₆アルキル)アミノ、

C-アミド、N-アミド、非置換及び置換C₁～C₆アルキル、C₁～C₆ハロアルキル、非置換及び置換C₁～C₆アルコキシ、C₁～C₆ハロアルコキシ、非置換及び置換C₆～C₁₀アリールオキシ、スルホ、スルホネート、又は-NH-CH₂-CH=CH₂である。

【0116】

いくつかの実施形態では、Rは、H又はC₁～C₆アルキルである。いくつかの実施形

50

態では、 R^1 は、H又は $C_1 \sim C_6$ アルキルである。いくつかの更なる実施形態では、 R^3 は、1つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_1 \sim C_6$ アルキル、1つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_2 \sim C_6$ アルケニル、非置換アミノ、置換アミノ、1つ以上の R^2 で任意選択的に置換された $C_6 \sim C_{10}$ アリール、1つ以上の R^2 で任意選択的に置換された5～10員ヘテロアリール、単糖部分、二糖部分、アミノ酸部分、 $-C(=O)NH_2$ 、 $-P(=O)(OH)_2$ 、又は $-S(=O)_2OH$ であり、各 R^2 が、独立して、アミノ、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、カルボキシ、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ ハロアルキル、非置換及び置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、非置換及び置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ、又は $-NH-CH_2-CH=CH_2$ である。いくつかのそのような実施形態では、 R^3 は、5員若しくは6員の糖環を有する単糖部分、又はその修飾類似体（例えば、グルコピラノシド）である。いくつかのそのような実施形態では、 R^3 は、非置換であるか、又は1つ以上の R^2 で置換された $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 R^2 が、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、置換 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、置換 $C_6 \sim C_{10}$ アリールオキシ（例えば、 $-OPh$ ）、及び $-NH-CH_2-CH=CH_2$ である。いくつかのそのような実施形態では、 R^3 は、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル（例えば、 C_3 アルケニル）である。いくつかのそのような実施形態では、 R^3 は、アミノ酸部分であり、アミノ部分が、更に保護され得る（例えば、 R^3 は、 $N-Boc$ 保護チロシン残基である）。 R^3 がアミノ酸残基である場合、それはまた、アミノ酸部分の任意の誘導体又は類似体を含む。例えば、アミノ酸部分の遊離アミノ基は、アミノ保護基（例えば、*tert*-ブチルオキシカルボニル又は Boc 保護基）で保護され得る。アミノ酸部分のカルボキシ基は、エステル

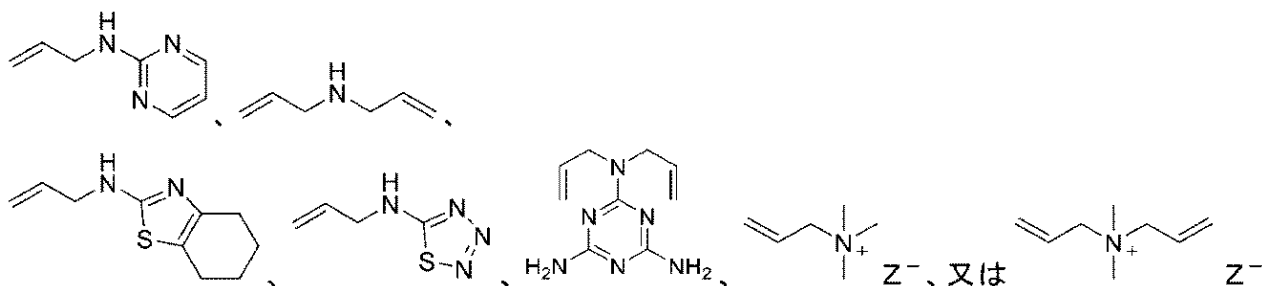
態であってもよい。一実施形態では、 R^3 は、アミノ基である。いくつかの他の実施形態では、 R^3 は、1つ以上の R^2 で任意選択的に置換されたO、S、及びNから選択される1、2、3、若しくは4個のヘテロ原子を含む、5、6、9、若しくは10員のヘテロシクリル又はヘテロアリールである（ R^2 は、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、及び $-NH-CH_2-CH=CH_2$ である）。いくつかの他の実施形態では、 R^3 は、1つ以上の R^2 で任意選択的に置換されたフェニルである（ R^2 は、独立して、ヒドロキシ、カルボキシ、及び $-NH-CH_2-CH=CH_2$ である）。 R^3 がホスファート、スルホ、又はスルホネートを含む場合、1つ以上のヒドロキシ基は、アニオン形態であってもよく、パラジウムスカベンジャーはまた、スカベンジャーが塩形態であり、いかなる電荷を持たないように、1つ以上のカチオンを含んでもよい。1つ以上の $-NR$ -アリル又は $-N^+RR$ -アリル部分を含むPdスカベンジャーの任意の実施形態では、アリル部分の1つ以上の水素原子は、（例えば、ハロゲン、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は $C_1 \sim C_6$ ハロアルキルで）置換され得る。

【0117】

1つ以上の $-NR$ -アリル又は $-N^+RR$ -アリル部分を含むパラジウムスカベンジャーの非限定的な例としては、以下の：

【0118】

【化17】



が挙げられ、 Z^- が、アニオン（例えば、 F^- 又は Cl^- などのハライドアニオン）である。一実施形態では、キットは、パラジウムスカベンジャー

【0119】

10

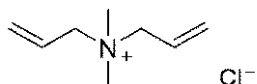
20

30

40

50

【化 18】



(化合物O、ジアリルジメチルアンモニウムクロリド、DADMACとしても知られている)を含む。

【0120】

1つ以上のアリル部分(例えば、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、又は-N⁺RR'-アリル)を含むPdスカベンジャーの任意の実施形態では、そのようなPdスカベンジャーは、Pd(0)スカベンジャーである。

10

【0121】

パラジウム触媒

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される3'ブロッキング基を除去又は切断するために使用されるPd触媒は、水溶性である。いくつかのそのような実施形態では、Pd触媒は、活性Pd(0)形態である。いくつかの例では、Pd(0)触媒は、アルケン、アルコール、アミン、ホスフィン、又は金属水素化物などの試薬によるPd錯体又はPdブレ触媒(例えば、Pd(II)錯体)の還元からその場で生成され得る。好適なパラジウム源としては、Pd(CH₃CN)₂Cl₂、[PdCl(アリル)]₂、[Pd(アリル)(THP)]Cl、[Pd(アリル)(THP)₂]Cl、Pd(OAc)₂、Pd(PPh₃)₄、Pd(dba)₂、Pd(Acac)₂、PdCl₂(COD)、及びPd(TFA)₂が挙げられる。そのような一実施形態では、Pd(0)錯体は、パラジウム酸塩(II)の有機塩又は無機塩、例えば、Na₂PdCl₄又はK₂PdCl₄からその場で生成される。別の実施形態では、パラジウム源は、アリルPd(II)クロリド二量体[(アリル)PdCl]₂又は[PdCl(C₃H₅)]₂である。いくつかの実施形態では、Pd(0)触媒は、Pd(II)錯体を水溶性ホスフィンと混合することによって水溶液中で生成される。好適なホスフィンとしては、トリス(ヒドロキシプロピル)ホスフィン(tris(hydroxypropyl)phosphine、THP)、トリス(ヒドロキシメチル)ホスフィン(tris(hydroxymethyl)phosphine、THMP)、1,3,5-トリアザ-7-ホスファアダマンタン(1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane、PTA)、ビス(p-スルホナトフェニル)フェニルホスフィン二水和物カリウム塩、トリス(カルボキシエチル)ホスフィン(tris(carboxyethyl)phosphine、TCEP)、及びトリフェニルホスフィン-3,3',3''-トリスルホン酸三ナトリウム塩、又はそれらの組み合わせなどの水溶性ホスフィンが挙げられる。

20

30

【0122】

いくつかの実施形態では、パラジウム触媒は、[(アリル)PdCl]₂をTHPとその場で混合することによって調製される。[(アリル)PdCl]₂とTHPとのモル比は、約1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、又は1:10であり得る。一実施形態では、[(アリル)PdCl]₂のTHPに対するモル比は1:10である。いくつかの他の実施形態では、パラジウム触媒は、Na₂PdCl₄又はK₂PdCl₄などの水溶性Pd試薬をTHPとその場で混合することによって調製される。Na₂PdCl₄又はK₂PdCl₄とTHPとのモル比は、約1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、又は1:10であり得る。一実施形態では、Na₂PdCl₄又はK₂PdCl₄のTHPに対するモル比は、約1:3である。別の実施形態では、Na₂PdCl₄又はK₂PdCl₄のTHPに対するモル比は、約1:3.5である。

40

【0123】

本明細書に記載される方法の切断工程で使用するためのPd錯体及び水溶性ホスフィンは、組成物又は混合物中にあり得、切断ミックスとも呼ばれる。いくつかの更なる実施形態では、切断ミックスは、一級アミン、二級アミン、三級アミン、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、炭酸塩、リン酸塩、若しくはホウ酸塩、又はそれらの組み合わせなどの追加の

50

緩衝剤試薬を含有し得る。いくつかの更なる実施形態では、緩衝剤試薬は、エタノールアミン (ethanolamine、E A)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (トリス)、グリシン、炭酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、ジメチルエタノールアミン (dimethylethanolamine、D M E A)、ジエチルエタノールアミン (diethylethanolamine、D E E A)、N, N, N', N' - テトラメチルエチレンジアミン (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine、T M E D A)、若しくは N, N, N', N' - テトラエチルエチレンジアミン (N, N, N', N'-tetraethylethylenediamine、T E E D A)、又はそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、1 つ以上の緩衝剤試薬は、D E E A を含む。別の実施形態では、1 つ以上の緩衝剤試薬は、炭酸塩、リン酸塩、若しくはホウ酸塩、又はそれらの組み合わせ等の 1 つ以上の無機塩を含有する。一実施形態では、無機塩は、ナトリウム塩である。

10

【0124】

いくつかの実施形態では、パラジウム触媒の、1 つ以上のアリル部分を含むパラジウムスカベンジャーに対するモル比は、約 1 : 100、1 : 50、1 : 20、1 : 10、又は 1 : 5 である。いくつかの更なる実施形態では、パラジウムスカベンジャーは、1 つ以上のアリル部分を含み、P d 触媒の活性形態である P d (0) のためのパラジウムスカベンジャーである。

【0125】

いくつかの実施形態では、3' ブロッキング基に対する切断条件は、ヌクレオチドの切断可能なリンカーを切断するための条件と同じである。例えば、ヌクレオチドは、3' ブロッキング基と同じであるリンカー部分を含み得る。他の実施形態では、3' ブロッキング基に対する切断条件は、ヌクレオチドの切断可能なリンカーを切断するための条件とは異なる。

20

【0126】

追加のパラジウムスカベンジャー

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、方法は、P d (I I) スカベンジャーなどの追加のパラジウムスカベンジャーを更に使用し得る。いくつかのそのような実施形態では、追加の P d スカベンジャーの使用は、配列決定メトリックのフェージング値を改善し得る。例えば、追加の P d スカベンジャーは、イソシアノ酢酸 (isocyanoacetate、I C N A) 塩、イソシアノ酢酸エチル、イソシアノ酢酸メチル、システイン (例えば、L - システイン) 若しくはその塩 (例えば、N - アセチル - L - システイン)、エチルキサントゲン酸カリウム、イソプロピルキサントゲン酸カリウム、グルタチオン、エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid、E D T A)、イミノ二酢酸、ニトリロ二酢酸、トリメルカプト - S - トリアジン、ジメチルジチオカルバメート、ジチオトレイトール、メルカプトエタノール、アリルアルコール、プロパルギルアルコール、チオール、チオ硫酸塩 (例えば、チオ硫酸ナトリウム又はチオ硫酸カリウム)、三級アミン及び/若しくは三級ホスフィン、又はそれらの組み合わせを含み得る。一実施形態では、方法はまた、L - システイン又はその塩の使用を含む。別の実施形態では、方法はまた、チオ硫酸ナトリウム (Na₂S₂O₃) などのチオ硫酸塩の使用を含む。いくつかの実施形態では、追加の P d スカベンジャーは、P d (I I) のためのスカベンジャーである。いくつかのそのような実施形態では、P d (I I) スカベンジャー (例えば、L - システイン又はチオ硫酸ナトリウム) は、第 1 の水溶液中にある。他の実施形態では、P d (I I) スカベンジャー (例えば、L - システイン又はチオ硫酸ナトリウム) は、切断後洗浄溶液 (すなわち、第 2 の水溶液) 中にある。他の実施形態では、P d (I I) スカベンジャー (例えば、L - システイン又はチオ硫酸ナトリウム) は、第 1 の水溶液及び第 2 の水溶液の両方の中に存在し得る。他の実施形態では、P d (I I) スカベンジャー (例えば、L - システイン又はチオ硫酸ナトリウム) は、スキャン混合物 (すなわち、組み込まれたヌクレオチドの 1 つ以上の蛍光測定が実行される溶液) 中に存在し得る。他の実施形態では、P d (I I) スカベンジャーは、組み込み混合物 (例えば、第 1 の水溶液)、スキャン混合物、又は切断後洗浄溶液 (例えば、第 2 の水溶液) のうちの 1 つ以上の中に

30

40

50

存在し得る。更なる実施形態では、第 1 の水溶液及び第 2 の水溶液中の L - システイン又はチオ硫酸ナトリウムなどの Pd (I I) スカベンジャーの濃度は、約 0 . 1 m M ~ 約 1 0 0 m M、0 . 2 m M ~ 約 7 5 m M、約 0 . 5 m M ~ 約 5 0 m M、約 1 m M ~ 約 2 0 m M、又は約 2 m M ~ 約 1 0 m M である。更なる実施形態では、L - システイン又はチオ硫酸ナトリウムなどの Pd (I I) スカベンジャーの濃度は、約 0 . 1 m M、0 . 5 m M、1 m M、2 m M、3 m M、4 m M、5 m M、6 m M、6 . 5 m M、7 m M、8 m M、9 m M、1 0 m M、1 2 . 5 m M、1 5 m M、1 7 . 5 m M、若しくは 2 0 m M、又は前述の値のうちのいずれか 2 つによって定義される範囲である。更なる実施形態では、Pd (I I) スカベンジャーは、第 2 の水溶液中にあり、第 2 の水溶液中の Pd (I I) スカベンジャーの濃度は、約 1 0 m M である。

10

【 0 1 2 7 】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、全ての Pd スカベンジャーは、第 1 の水溶液中にある。本明細書に記載される方法のいくつかの他の実施形態では、全ての Pd スカベンジャーは、第 2 の水溶液中にある。いくつかの他の実施形態では、1 つ以上のアリル部分を含む 1 つ以上の Pd スカベンジャー（例えば、Pd (0) スカベンジャー）は、組み込み混合物（すなわち、第 1 の水溶液）中にあり、Pd (I I) スカベンジャーは、切断後洗浄溶液（すなわち、第 2 の水溶液）中にある。更なる実施形態では、切断後洗浄溶液は、リボ酸又は D D P A を含有しない。他の実施形態では、方法は、切断後洗浄工程を含まない。

20

【 0 1 2 8 】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、1 つ以上のアリル部分を含む 1 つ以上の Pd スカベンジャー（例えば、Pd (0) スカベンジャー）の使用は、配列決定ランのプリフェージング値を約 0 . 1 %、0 . 0 9 %、0 . 0 8 %、0 . 0 7 %、0 . 0 6 %、0 . 0 5 %、0 . 0 4 %、0 . 0 3 %、0 . 0 2 %、又は 0 . 0 1 % 未満に低減する。いくつかの実施形態では、プリフェージング値は、5 0 サイクル、7 5 サイクル、1 0 0 サイクル、1 2 5 サイクル、1 5 0 サイクル、2 0 0 サイクル、2 5 0 サイクル、又は 3 0 0 サイクル後に測定された値を指す。

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、1 つ以上の Pd (I I) スカベンジャーの使用は、配列決定ランのフェージング値を約 0 . 5 %、0 . 4 %、0 . 3 %、0 . 2 %、0 . 1 %、0 . 0 9 %、0 . 0 8 %、0 . 0 7 %、0 . 0 6 %、又は 0 . 0 5 % 未満に低減する。いくつかの実施形態では、フェージング値は、5 0 サイクル、7 5 サイクル、1 0 0 サイクル、1 2 5 サイクル、1 5 0 サイクル、2 0 0 サイクル、2 5 0 サイクル、又は 3 0 0 サイクル後に測定された値を指す。

30

【 0 1 3 0 】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、基材の表面に固定化される。いくつかの更なる実施形態では、表面は、複数の固定化された標的ポリヌクレオチド、例えば、異なる固定化された標的ポリヌクレオチドのアレイを含む。いくつかのそのような実施形態では、基材は、ガラス、変性若しくは機能性ガラス、プラスチック、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、樹脂、シリカ、ケイ素、変性ケイ素、炭素、金属、無機ガラス、若しくは光ファイバー束、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの更なる実施形態では、基材は、フローセル、ナノ粒子、又はビーズ（例えば、球状シリカビーズ、無機ナノ粒子、磁性ナノ粒子、カドミウム系ドット、及びカドミウムフリードット、又は参照により組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 2 1 / 0 1 8 7 4 7 0 (A 1) 号に開示されるビーズ）である。一実施形態では、基材は、間隙領域によって分離されたパターン化ナノウェルを含むフローセルであり、固定化された標的ポリヌクレオチドは、パターン化ナノウェルの内側に常在する。

40

【 0 1 3 1 】

本明細書に記載される方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、方法は、自動配列決定機器上で実行され、自動配列決定機器は、異なる波長で（例えば、約 4 5 0 n m

50

～約460nm、及び約520nm～約540nm、特に約460nm及び約532nmで)動作する2つの光源を含む。他の実施形態では、自動配列決定機器は、1つの波長で動作する単一光源を含む。

【0132】

本明細書に記載される方法の任意の実施形態では、1つ以上のパラジウムスカベンジャーは、リポ酸又は3,3'-ジチオジプロピオン酸(DDPA)を含まない。

【0133】

本明細書に記載される方法の任意の実施形態では、当業者は、パラジウムスカベンジャーが、切断工程後に残留/残りのPd触媒(Pd(0)及び/又はPd(II)種の形態)を完全に不活性化しなくてもよく、微量のPd(0)又はPd(II)種が残っていてもよいことを理解すべきである。その結果、プリフェージング値及びフェージング値は、0に低減されない場合がある。

10

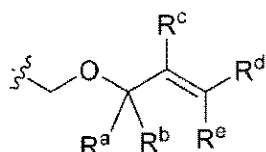
【0134】

3'ブロッキング基を有するヌクレオチド

本開示のいくつかの実施形態は、核酸塩基、リボース又はデオキシリボース部分、及びヌクレオチドの3'酸素に結合した構造

【0135】

【化19】



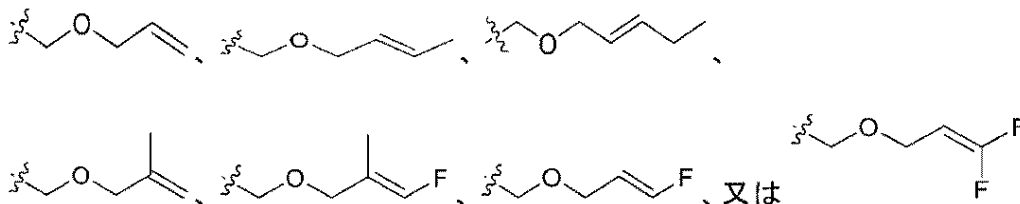
20

を有する3'ブロッキング基などの、アリル部分を含む3'ヒドロキシブロッキング基を含むヌクレオチド分子に関し、 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、及び R^e の各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は $C_1 \sim C_6$ ハロアルキルである。一実施形態では、 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、及び R^e の各々は、Hである。いくつかの他の実施形態では、 R^a 及び R^b の各々は、Hであり、 R^c 、 R^d 、及び R^e のうちの少なくとも1つは、独立して、ハロゲン(例えば、フルオロ、クロロ)又は非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル(例えば、メチル、エチル、イソプロピル、イソブチル、又はt-ブチル)である。例えば、 R^c は、非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 R^d 及び R^e の各々はHである。別の例では、 R^c はHであり、 R^d 及び R^e の一方又は両方は、ハロゲン又は非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。3'ブロッキング基の非限定的な実施形態としては、

30

【0136】

【化20】

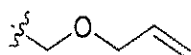


40

が挙げられる。一実施形態では、3'ブロッキング基は、

【0137】

【化21】

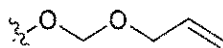


であり、3'酸素と一緒に、リボース又はデオキシリボース部分の3'炭素原子に結合した

50

【 0 1 3 8 】

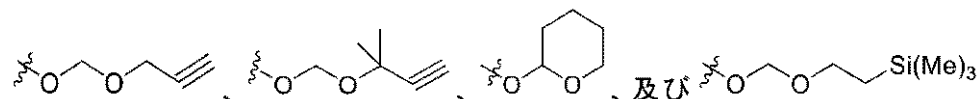
【 化 2 2 】



(「AOM」)基を形成する。3' ブロッキング基の追加の実施形態は、米国特許出願公開第 2020/0216891 (A1) 号に記載されており、これは、その全体が参照により組み込まれ、リボース又はデオキシリボース部分の 3' 炭素原子に結合した、

【 0 1 3 9 】

【 化 2 3 】



10

などの 3' ブロッキング基の追加の例を含む。本明細書に記載されるヌクレオチドの任意の実施形態では、ヌクレオチドは、3' ブロックされた 2 - デオキシリボース部分を含み得る。更に、ヌクレオチドは、ヌクレオシドトリホスファートであり得る。

【 0 1 4 0 】

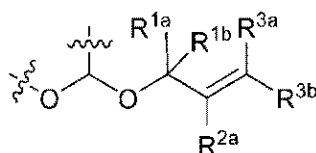
標識ヌクレオチド

いくつかの実施形態では、3' ブロックヌクレオチドは検出可能な標識も含み、そのようなヌクレオチドは標識ヌクレオチド又は完全官能化ヌクレオチド (fully functionalized nucleotide、f f N) と呼ばれる。標識 (例えば、蛍光色素) は、疎水性引力、イオン引力及び共有結合を含む様々な手段によって切断可能なリンカーを介してコンジュゲートされる。いくつかの態様では、色素は、切断可能なリンカーを介した共有結合によってヌクレオチドにコンジュゲートされる。当業者は、標識の官能基 (例えば、カルボキシル) をリンカーの官能基 (例えば、アミノ) と反応させることによって、標識がリンカーに共有結合し得ることを理解する。いくつかのそのような実施形態では、切断可能なリンカーは、3' ブロッキング基と同じである部分を含み得る。したがって、切断可能なリンカー及び 3' ブロッキング基は、同じ反応条件下で切断又は除去され得る。いくつかのそのような実施形態では、切断可能なリンカーは、アリール部分を含んでもよく、より具体的に、構造：

20

【 0 1 4 1 】

【 化 2 4 】



の部分を含み、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、及び R^{3b} の各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は $C_1 \sim C_6$ ハロアルキルである。

40

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、色素は、ヌクレオチド塩基を介してオリゴヌクレオチド又はヌクレオチドに共有結合していてもよい。例えば、標識ヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドは、ピリミジン塩基の C5 位置に取り付けられた標識、又は 7 デアザプリン塩基の C7 位置に切断可能リンカー部分を介して取り付けられた標識を有してもよい。

【 0 1 4 3 】

ヌクレオチドは、糖又は核酸塩基上の部位で標識されてもよい。当該技術分野において既知のように、「ヌクレオチド」は、窒素塩基、糖、及び 1 つ以上のリン酸基からなる。RNA 中では、糖はリボースであるが、DNA 中では、糖はデオキシリボース、すなわち

50

、リボース中に存在するヒドロキシ基を欠く糖である。窒素塩基は、プリン（例えば、デアザプリン、7-デアザプリン）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、ピリミジンはシトシン（C）及びチミン（T）であるが、又はRNAの文脈では、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（P）のN-9に結合される。ヌクレオチドもまたヌクレオシドのリン酸エステルであり、糖のC-3又はC-5に結合したヒドロキシ基にエステル化が生じる。ヌクレオシドは、通常、一リン酸、二リン酸、又は三リン酸である。

【0144】

塩基は通常、プリン又はピリミジンと呼ばれるが、当業者は、ヌクレオチド又はヌクレオシドの能力を変化させてワトソン・クリック塩基対合を起こすことのない誘導体及び類似体が利用可能であることを理解するであろう。「誘導体」又は「類似体」は、コア構造が親化合物と同じであるか、又は密接に類似しているが、例えば、異なる又は追加の側基（誘導体ヌクレオチド又はヌクレオシドが他の分子と連結されるのを可能にする）などの化学的又は物理的変更が加えられた化合物又は分子を意味する。例えば、塩基は、デアザプリンであり得る。特定の実施形態では、誘導体は、ワトソン・クリック対合を受けることができるべきである。「誘導体」及び「類似体」はまた、例えば、修飾塩基部分及び/又は修飾糖部分を有する合成ヌクレオチド又はヌクレオシド誘導体を含む。そのような誘導体及び類似体は、例えば、Scheit, Nucleotide analogs (John Wiley & Son, 1980) 及びUhlman, Chemical Reviews 90: 543-584, 1990に考察されている。ヌクレオチド類似体はまた、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキル-ホスホン酸塩、ホスホラニリデート（phosphoranilidate）、ホスホラミダイト連結等を含む修飾ホスホジエステルリンケージを含み得る。

【0145】

特定の実施形態では、標識ヌクレオチドは、酵素的に組み込み可能であり、酵素的に伸長可能であり得る。したがって、リンカー部分は、ヌクレオチドを化合物に接続するのに十分な長さであり得、その結果、化合物は、核酸複製酵素によるヌクレオチドの全体的な結合及び認知と有意なほどには干渉しない。したがって、リンカーはスパーサ単位も含み得る。スパーサは、例えば、切断部位又は標識からヌクレオチド塩基を遠ざける。

【0146】

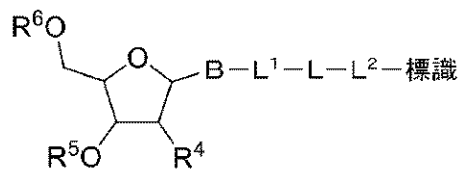
本開示はまた、本明細書に記載されるヌクレオチドを組み込むポリヌクレオチドを包含する。このようなポリヌクレオチドは、ホスホジエステル連結で接合されたデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドからそれぞれなるDNA又はRNAであってもよい。ポリヌクレオチドは、自然由来のヌクレオチド、本明細書に記載される標識化されたヌクレオチド以外の非自然由来（又は修飾）ヌクレオチド、又はこれらの任意の組み合わせを、本明細書に記載されるような少なくとも1つの修飾ヌクレオチド（例えば、色素化合物で標識化されたもの）と組み合わせて含むことができる。本開示によるポリヌクレオチドは、非自然由来の骨格結合及び/又は非ヌクレオチド化学修飾も含み得る。少なくとも1つの標識ヌクレオチドを含むリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドの混合物からなるキメラ構造も想到される。

【0147】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される標識ヌクレオチドは、式（I）の構造を含むか、又は有し、

【0148】

【化25】



10

20

30

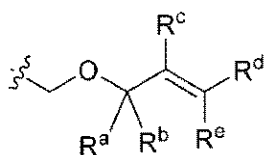
40

50

式中、B が、核酸塩基であり、
 R^4 が、H 又は OH であり、
 R^5 が、本明細書に記載の

【0149】

【化26】

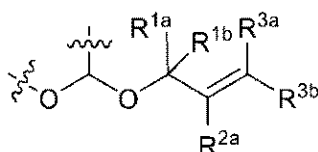


10

又はホスホラミダイトなどの、アリル含有3' ブロッキング基であり、
 R^6 が、H、モノホスファート、ジホスファート、トリホスファート、チオホスファート、リン酸エステル類似体、反応性リン含有基、又はヒドロキシ保護基であり、
L が、

【0150】

【化27】



20

などのアリル部分含有リンカーであり、

L^1 及び L^2 の各々が、独立して、任意選択的に存在するリンカー部分である。

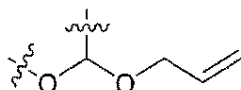
【0151】

本明細書に記載されるヌクレオチドのいくつかの実施形態では、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、及び R^{3b} の各々は、H である。他の実施形態では、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{2a} 、 R^{3a} 、及び R^{3b} のうちの少なくとも1つは、ハロゲン（例えば、フルオロ、クロロ）又は非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル（例えば、メチル、エチル、イソプロピル、イソブチル、又は *t*-ブチル）である。いくつかのそのような例では、 R^{1a} 及び R^{1b} の各々は、H であり、 R^{2a} 、 R^{3a} 、及び R^{3b} のうちの少なくとも1つは、非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル又はハロゲンである（例えば、 R^{2a} は、非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、 R^{3a} 及び R^{3b} の各々は H であるか、又は R^{2a} は H であり、 R^{3a} 及び R^{3b} の一方又は両方は、ハロゲン又は非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルである）。一実施形態では、切断可能なリンカー又は L は、

30

【0152】

【化28】



40

（「AOL」リンカー部分）を含む。

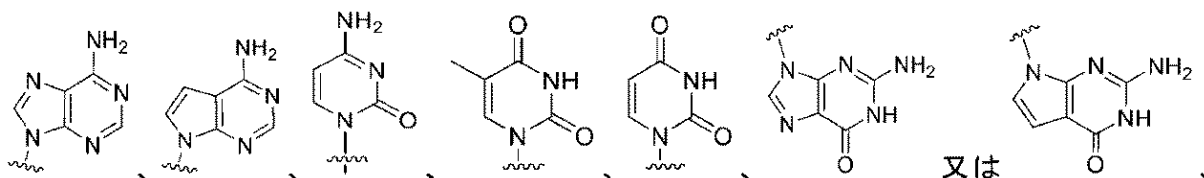
【0153】

本明細書に記載されるヌクレオチドのいくつかの実施形態では、核酸塩基（式（I）中の「B」）は、プリン（アデニン又はグアニン）、デアザプリン又はピリミジン（例えば、シトシン、チミン、又はウラシル）である。いくつかの更なる実施形態では、デアザプリンは、7-デアザプリン（例えば、7-デアザアデニン又は7-デアザグアニン）である。B の非限定的な例は、

【0154】

50

【化 2 9】

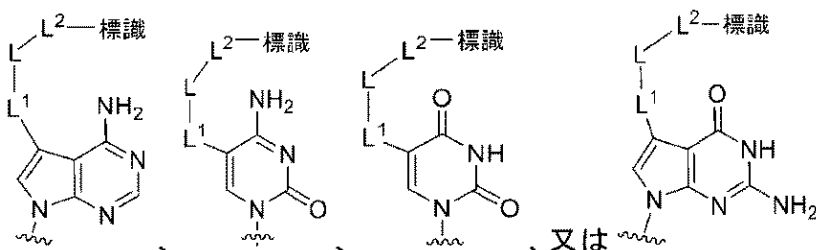


あるいは、任意選択的に置換されるその誘導体及び類似体を含む。いくつかの更なる実施形態では、標識核酸塩基は、構造

【0 1 5 5】

10

【化 3 0】



を含む。

20

【0 1 5 6】

本明細書に記載されるヌクレオチドのいくつかの他の実施形態では、 R^5 は、式(I)において、ホスホラミダイトである。そのような実施形態では、 R^6 は、自動合成条件下でのその後の単量体カップリングを可能にする酸切断性ヒドロキシ保護基である。

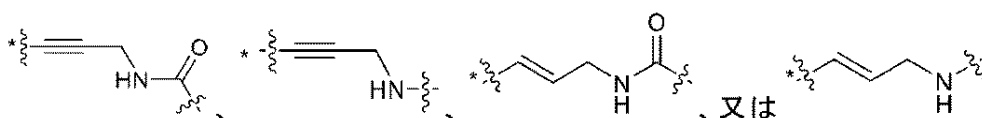
【0 1 5 7】

本明細書に記載されるヌクレオチドのいくつかの実施形態では、 L^1 が存在し、 L^1 は、プロパルギルアミン、プロパルギルアミド、アリルアミン、アリルアミド及び任意選択的に置換されたそれらのパリアントからなる群から選択される部分を含む。いくつかの更なる実施形態では、 L^1 は、

【0 1 5 8】

30

【化 3 1】



を含む。いくつかの更なる実施形態では、アスタリスク*は、核酸塩基（例えば、ピリミジン塩基のC5位又は7-デアザプリン塩基のC7位）に対する L^1 の結合点を示す。

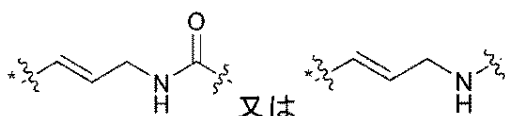
【0 1 5 9】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるヌクレオチドは、完全官能化ヌクレオチド(f f N)であり、本明細書に記載される3'-OHブロッキング基及び本明細書に記載される切断可能なリンカーを通して核酸塩基に共有的に結合した色素化合物を含み、切断可能なリンカーは、構造、

40

【0 1 6 0】

【化 3 2】



の L^1 を含み、*は、 L^1 の核酸塩基（例えば、シトシン、チミン、若しくはウラシル塩基のC5位、又は7-デアザアデニン若しくは7-デアザグアニンのC7位）への結合

50

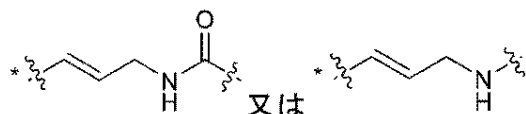
点を示す。いくつかの例では、本明細書に記載されるアリルアミン又はアリルアミドリンカー部分を有する $f f N$ は、 $f f N - DB$ 、 $f f N - db$ 、 $f f N - (DB)$ 、又は $f f N - (db)$ と呼ばれ、「 DB 」又は「 db 」の両方とも、リンカー部分の二重結合を指す。いくつかの例では、1つ以上の $f f N$ が $f f N - DB$ である $f f N$ セット ($f f A$ 、 $f f T$ 、 $f f C$ 、 $f f G$ を含む) を用いた配列決定の実行は、本明細書に記載のプロパルギルアミン又はプロパルギルアミドリンカー部分 ($f f N - PA$ 又は $f f N - (PA)$ としても知られる) を用いた $f f N$ セットと比較して、 $f f N$ の優れた組み込み速度を提供する。例えば、本明細書に記載のアリルアミン又はアリルアミドリンカー部分及び 3' - AOM ブロッキング基を用いた $f f N - DB$ セットは、同じ条件で同じ期間、3' - O - アジドメチルブロッキング基を用いた $f f N - PA$ セットと比較して、少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、200 %、300 %、400 %、又は 500 % の組み込み速度の改善をもたらし、それによってフェージング値を改善することができる。他の実施形態では、組み込み速度 / スピードは、基質 (例えば、フローセル又は $cBot$ システム) の表面上の表面反応速度 V_{max} によって測定される。例えば、3' - AOM ブロッキング基を有する $f f N - DB$ セットは、同じ条件で同じ期間、3' - O - アジドメチルブロッキング基を有する $f f N - PA$ セットと比較して、少なくとも 5 %、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、200 %、300 %、400 %、又は 500 % の V_{max} 値 (ms^{-1}) の改善をもたらし得る。いくつかの実施形態では、組み込み速度 / スピードは、周囲温度又は周囲温度より低い温度 (4 ~ 10 等) で測定される。他の実施形態では、組み込み速度 / スピードは、40、45、50、55、60、又は 65 等の高温で測定される。いくつかのそのような実施形態では、組み込み速度 / スピードは、塩基性 pH 環境で、例えば、pH 9.0、9.2、9.4、9.6、9.8、又は 10.0 の溶液中で測定される。いくつかのそのような実施形態では、組み込み速度 / スピードは、ポリメラーゼ (例えば、DNA ポリメラーゼ)、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ、又は逆転写酵素等の酵素の存在下で測定される。いくつかの実施形態では、 $f f N - DB$ は、 $f f T - DB$ 、 $f f C - DB$ 、又は $f f A - DB$ である。一実施形態では、本明細書に記載の改善されたフェージング値を有する $f f N - DB$ セットは、 $f f T - DB$ 、 $f f C$ 、 $f f A$ 及び $f f G$ を含む。別の実施形態では、本明細書に記載の改善されたフェージング値を有する $f f N - DB$ セットは、 $f f T - DB$ 、 $f f C - DB$ 、 $f f A$ 及び $f f G$ を含む。更に別の実施形態では、本明細書に記載の改善されたフェージング値を有する $f f N - DB$ セットは、 $f f T - DB$ 、 $f f C - DB$ 、 $f f A - DB$ 、及び $f f G$ を含む。

【0161】

いくつかの更なる実施形態では、本明細書に記載のヌクレオチドの核酸塩基がチミン又は任意選択的に置換されたその誘導体及び類似体 (すなわち、ヌクレオチドは T である) である場合、 L^1 は、アリルアミン部分又はアリルアミド部分、あるいは任意選択的に置換されたそのバリエーションを含む。特定の例では、 L^1 は、

【0162】

【化33】



を含み、* は、チミン塩基の C 5 位に対する L^1 の結合点を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T ヌクレオチドは、チミン塩基 (すなわち、 $f f T - DB$) の C 5 位に直接結合した

【0163】

10

20

30

40

50

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---} \text{NH} \end{array}$$
 又は

10

本明細書中に記載されるヌクレオシド又はヌクレオチドのいくつかの更なる実施形態には、式 (I a)、(I a ')、(I b)、(I c)、(I c ') 又は (I d) が含まれる：

【化 3 5】

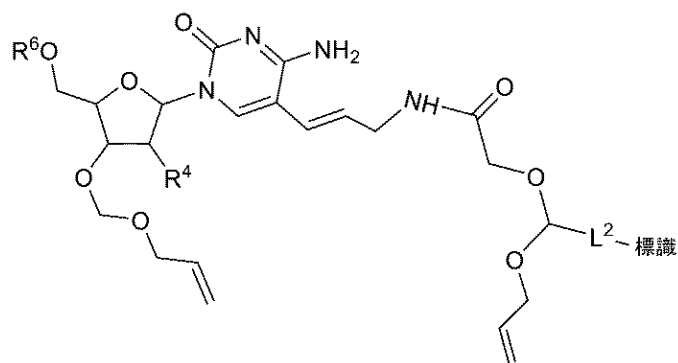


50

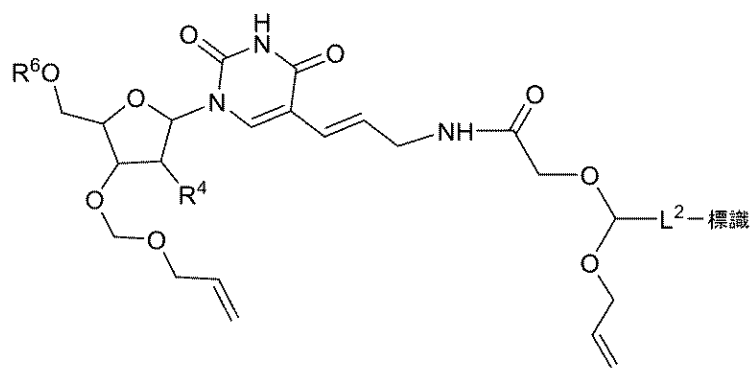
CCOC(=O)NCC#CC1=NC(=O)N=C(N1)C2OC(COC(=O)C=C)OC2OR6

Chemical structure of a nucleoside derivative. The structure features a pyrimidine ring substituted with an amino group (NH₂) and a carbonyl group (C=O). The ring is linked via a glycosidic bond to a sugar moiety. The sugar moiety is a furanose ring substituted with an R⁶O group and an R⁴ group. The sugar is further substituted with a side chain containing an amide linkage (NH-C(=O)-) and a terminal group labeled L²-標識 (L²-label).

(Ic), 10



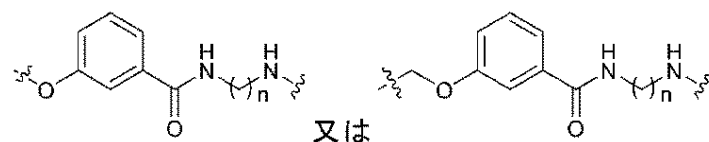
(Ic') 又は



(Id) .

本明細書に記載されるヌクレオチドのいくつかの更なる実施形態では、 L^2 が存在し、 L^2 は、

【化 3 7】

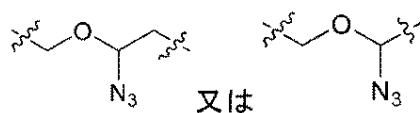


を含み、 n が、独立して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の整数であり、フェニル部分が、任意選択的に置換されている。いくつかのこのような実施形態では、 n は5であり、 L^2 のフェニル部分は非置換である。

本明細書に記載されるヌクレオチドの任意の実施形態では、切断可能なリンカー又は L^1 / L^2 は、ジスルフィド部分若しくはアジド部分（

【 0 1 7 0 】

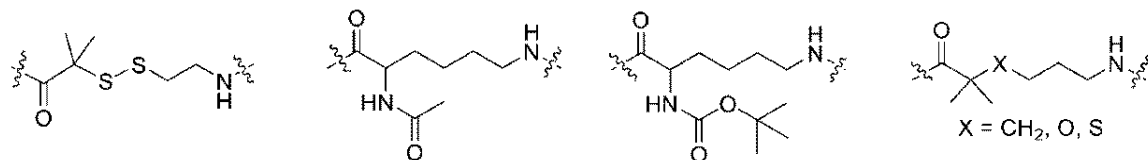
【化 3 8】



などの)、又はそれらの組み合わせを更に含み得る。リンカー部分の更なる非限定的な例は、

【0 1 7 1】

【化 3 9】



10

を含み L¹ 又は L² に組み込まれ得る。

更なるリンカー部分は、国際公開第 2 0 0 4 / 0 1 8 4 9 3 号及び米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 0 4 0 2 2 5 号に開示されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【0 1 7 2】

本明細書に記載される非限定的な例示的な標識ヌクレオチドとしては、以下のものが挙げられ、

20

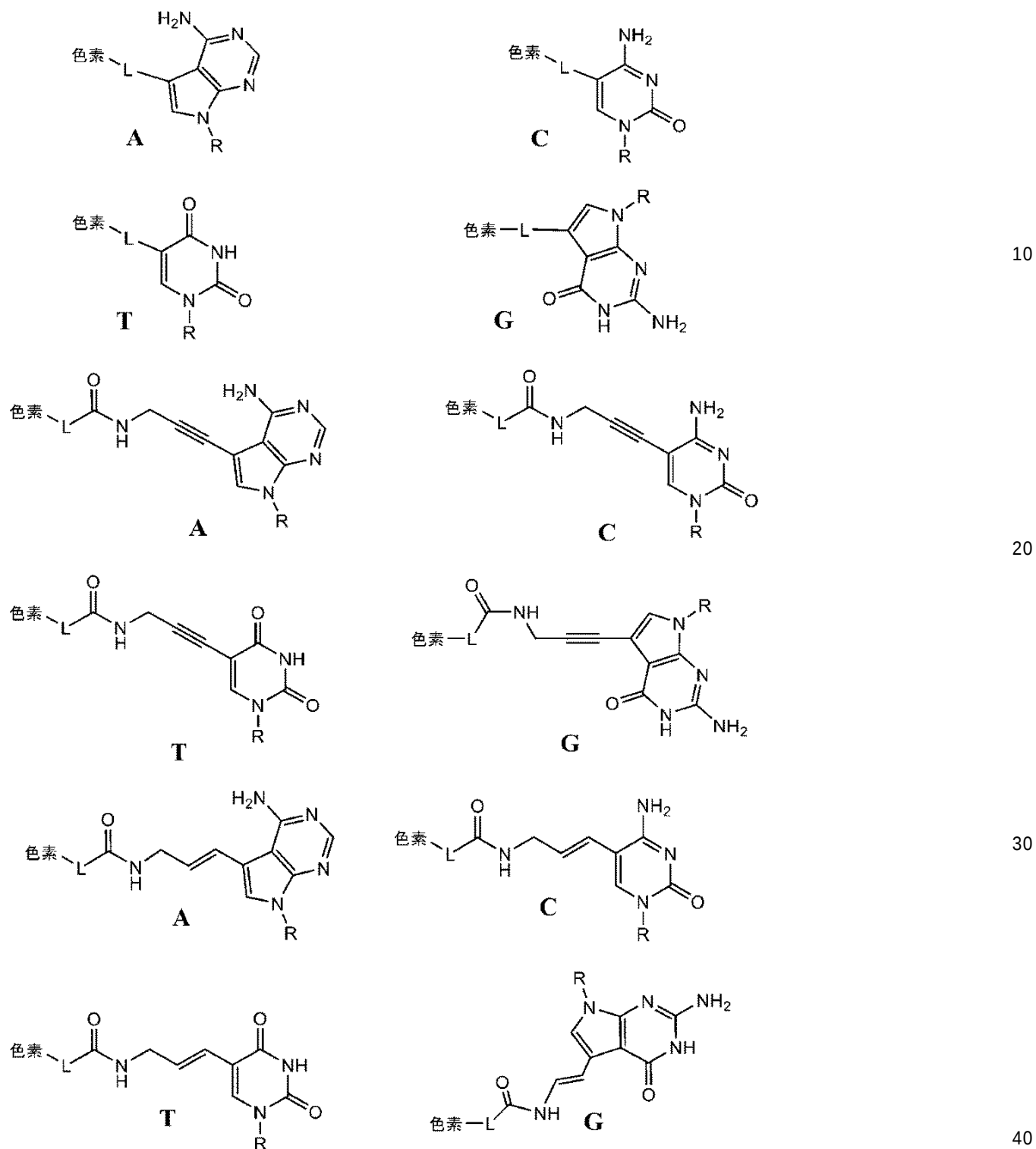
【0 1 7 3】

30

40

50

【化 4 0】



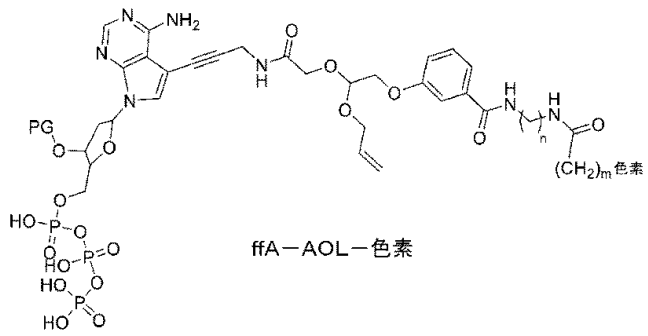
式中、Lは切断可能なリンカー（本明細書に記載のL²を任意選択的に含む）を表し、Rは上記のリボース若しくはデオキシリボース部分、又は1、2若しくは3個のホスファートで置換された5'位を有するリボース若しくはデオキシリボース部分を表す。

【0174】

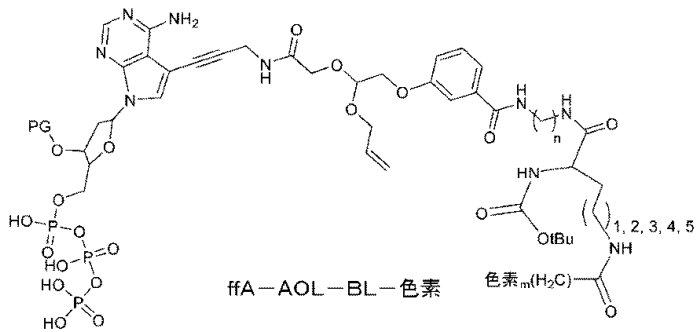
いくつかの実施形態では、非限定的な蛍光色素コンジュゲートが以下に示され、

【0175】

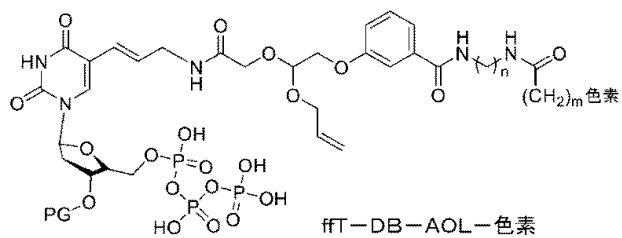
【化 4 1】



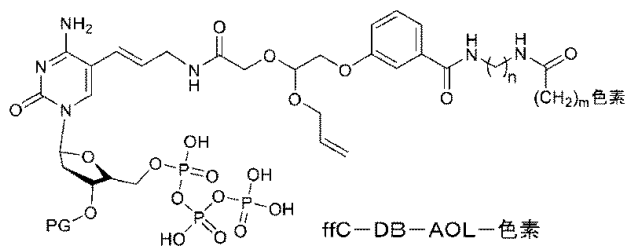
10



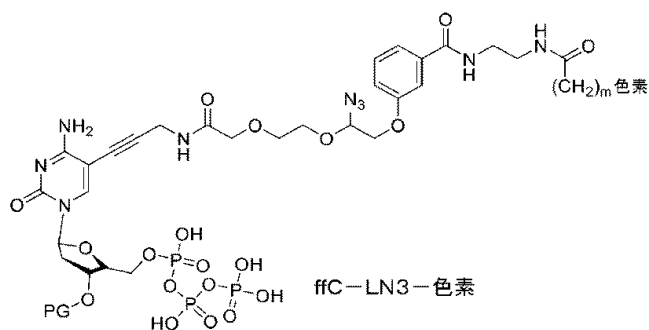
20



30



40

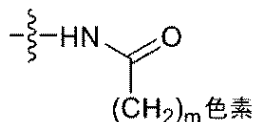


式中、PGは、本明細書に記載される3'プロテクト基を表し、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の整数であり、mは、0、1、2、3、4、又は5である。一実施形態では、-O-PGは、AOMである。一実施形態では、nは、5である。

【0176】

50

【化 4 2】



は、リンカー部分のアミノ基と色素のカルボキシル基との間の反応の結果としての、開裂可能なリンカーを有する色素の接続点を指す。

【0 1 7 7】

様々な蛍光色素、特に青色光（例えば、約 450 nm ~ 約 460 nm）又は緑色光（例えば、約 520 nm ~ 約 540 nm）によって励起され得るこれらの色素が、検出可能な標識として本開示において使用され得る。これらの色素はまた、それぞれ「青色色素」及び「緑色色素」と称され得る。クマリン色素、クロメノキノリン色素、及びビスホウ素含有複素環が挙げられるが、これらに限定されない、様々なタイプの青色色素の例は、米国特許出願公開第 2018/0094140 号、同第 2018/0201981 号、同第 2020/0277529 号、同第 2020/0277670 号、同第 2021/0188832 号、及び同第 2022/0033900 号、並びに米国特許出願公開第 17/550271 号、同第 17/736688 号、及び同第 63/325057 号に開示されており、これらの各々は、参照によりその全体が組み込まれる。シアニン又はポリメチン色素を含む緑色色素の例は、国際公開第 2013/041117 号、同第 2014/135221 号、同第 2016/189287 号、同第 2017/051201 号、及び同第 2018/060482 (A1) 号に開示されており、これらの各々は、その全体が参照により組み込まれる。

10

20

【0 1 7 8】

本明細書に記載されるヌクレオチドの任意の実施形態では、ヌクレオチドは、2' デオキシリボース部分を含む（すなわち、 R^4 は式 (I) であり、(Ia) ~ (Id) は H である）。いくつかの更なる関連では、2' デオキシリボースは、糖環の 5' 位に 1、2、又は 3 個のホスファート基を含有する。いくつかの更なる態様では、本明細書に記載されるヌクレオチドは、ヌクレオチドトリホスファートである（すなわち、 $-OR^6$ は式 (I) であり、(Ia) ~ (Id) はトリホスファートを形成する）。

30

【0 1 7 9】

本開示の更なる実施形態は、本明細書に記載のヌクレオシド又はヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドに関する。いくつかのそのような実施形態では、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは、鋳型又は標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする。いくつかのそのような実施形態では、鋳型ポリヌクレオチドは固体支持体上に固定化される。

【0 1 8 0】

本開示の更なる実施形態は、複数の固定化鋳型又は標的ポリヌクレオチドのアレイを含む固体支持体に関し、そのような固定化鋳型又は標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部は、本明細書に記載のヌクレオシド又はヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドにハイブリダイズする。

40

【0 1 8 1】

本出願はまた、DNA を参照して更に説明されるが、その説明は、別段示されない限り、RNA、PNA 及び他の核酸にも適用可能である。

【0 1 8 2】

切断可能なリンカーの切断条件

本明細書に記載されるヌクレオチド又はヌクレオシドの任意の実施形態では、3' ブロッキング基及び切断可能なリンカー（及び結合した標識）は、同じ又は実質的に同じ化学反応条件下で除去可能であり得、例えば、3' ブロッキング基及び検出可能な標識は、単一の化学反応で除去され得る。他の実施形態では、3' ブロッキング基及び検出可能な標識は、2 つの別個の工程で除去される。

50

【0183】

本明細書に記載の切断可能なリンカーは、様々な化学的条件下で除去又は切断され得る。非限定的な切断条件としては、ホスフィン配位子、例えばトリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン又はトリス（ヒドロキシメチル）ホスフィンの存在下でのPd（II）錯体（例えば、Pd（OAc）₂、アリルPd（II）クロリド二量体〔（アリル）PdCl〕₂、又はNa₂PdCl₄）などのパラジウム触媒が挙げられる。いくつかの実施形態では、3'ブロック基は、切断可能なリンカーのものと同一又は実質的に同一切断条件下で切断され得る。

【0184】

線形化との適合性

10

核酸配列決定反応のスループットを最大限にするために、複数の鋳型分子を並行して配列決定することができることが有利である。複数の鋳型の並列処理は、核酸配列技術の使用によって達成し得る。これらのアレイは、典型的には、固体支持体材料上に固定化されたポリヌクレオチドの高密度マトリックスからなる。

【0185】

国際公開第98/44151号及び同第00/18957号は両方とも、複数の同一の固定化されたポリヌクレオチド鎖及び複数の同一の固定化された相補鎖から形成されたクラスタ又は「コロニー」からなるアレイを形成するために、増幅産物を固体支持体上に固定化することを可能にする核酸増幅の方法を記載する。このタイプのアレイは、本明細書では「クラスタ化アレイ」と呼ばれる。これらの方法に従って調製されたクラスタ化されたアレイ上のDNAコロニー中に存在する核酸分子は、例えば、国際公開第98/44152号に記載されるような配列決定反応のための鋳型を提供することができる。国際公開第98/44151号及び同第00/18957号に記載されているような固相増幅反応の生成物は、固定化されたポリヌクレオチド鎖及び固定化された相補鎖の対のアニースリングによって形成されたいわゆる「架橋」構造であり、両方の鎖は5'末端で固体支持体に結合している。核酸配列決定により適した鋳型を提供するために、「架橋」構造の固定化鎖の1つの実質的に全部又は少なくとも一部を除去して、少なくとも部分的に一本鎖である鋳型を生成することが好ましい。したがって、一本鎖である鋳型の部分は、配列決定プライマーへのハイブリダイゼーションに利用可能である。「架橋」二本鎖核酸構造中の1本の固定化鎖の全部又は一部を除去するプロセスは、「線形化」と呼ばれる。線形化には、酵素的切断、光化学的切断、又は化学的切断を含むがこれらに限定されない様々な方法がある。線形化方法の非限定的な例は、国際公開第2007/010251号、米国特許出願公開第2009/0088327号、同第2009/0118128号、及び同第2019/0352327号に開示されており、これらは参照によりその全体が組み込まれる。

20

30

【0186】

いくつかの実施形態では、3'ブロック基及び/又は切断可能なリンカーの除去のための条件はまた、線形化プロセス、例えば、Pd錯体及びホスフィンの使用を含む化学的線形化プロセスと適合性である。いくつかの実施形態では、Pd錯体は、ホスフィン（例えば、THP）の存在下でその場でPd（0）を生成するPd（II）錯体（例えば、Pd（OAc）₂、〔（Allyl）PdCl〕₂又はNa₂PdCl₄）である。

40

【0187】

合成による配列決定の実施形態及び代替形態

いくつかの実施形態としては、パイロシークエンシング技術が挙げられる。パイロシークエンシングは、特定のヌクレオチドが新生鎖に組み込まれるときに無機ピロリン酸塩（PPi）の放出を検出する（Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996)「Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release」Analytical Biochemistry 242(1), 84-9、Ronaghi, M. (2001)「P

50

y rosequencing sheds light on DNA sequencing.」Genome Res. 11 (1), 3-11、Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998)「A sequencing method based on real-time pyrophosphate.」Science 281 (5375), 363、米国特許第6,210,891号、同第6,258,568号及び同第6,274,320号、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。パイロシーケンシングにおいて、放出されたPPiは、ATPスルフラゼによってアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate、ATP) に即座に変換されることによって検出することができ、生成されたATPのレベルはルシフェラーゼで生成された光子を介して検出される。配列決定される核酸は、アレイ中の特徴部に結合させることができ、アレイは、アレイの特徴部にヌクレオチドを組み込むことにより生成される化学発光シグナルを捕捉するために画像化することができる。アレイを特定のヌクレオチド型 (例えば、A、T、C、又はG) で処理した後に、画像を得ることができる。各ヌクレオチド型の添加後に得られる画像は、アレイ内のどの特徴部が検出されるかに関して異なる。画像内のこれらの差異は、アレイ上の特徴部の異なる配列コンテンツを反映する。しかしながら、各特徴部の相対的な位置は、画像内で変わらないままである。画像は、本明細書に記載の方法を使用して記憶、処理、及び分析することができる。例えば、アレイを各異なるヌクレオチド型で処理した後に得られる画像は、可逆的ターミネータベースの配列決定方法についての異なる検出チャンネルから得られる画像について、本明細書に例示されるものと同じ方法で処理することができる。

10

20

【0188】

別の例示的な種類のSBSでは、サイクル配列決定は、例えば、その開示が参照により組み込まれる、国際公開第04/018497号及び米国特許第7,057,026号に記載されているような切断可能な又は光漂白可能な色素標識を含む可逆的ターミネータヌクレオチドを段階的に付加することによって達成される。この手法は、Sollexa (現在Illumina, Inc.) によって商品化されており、国際公開第91/06678号及び同第07/123,744号にも記載されており、各々が参照により本明細書に組み込まれる。終端の両方を逆転させることができ、蛍光標識が切断された蛍光標識ターミネータの可用性は、効率的な循環可逆的終端 (cyclic reversible termination、CRT) 配列決定を容易にする。ポリメラーゼはまた、これらの修飾されたヌクレオチドを効率的に組み込み、かつそこから伸長するように共操作することもできる。

30

【0189】

好ましくは、可逆的ターミネータベースの配列決定実施形態では、標識は、SBS反応条件下での伸長を実質的に阻害しない。しかしながら、検出標識は、例えば、開裂又は分解によって除去可能であり得る。画像は、アレイ化された核酸特徴部への標識の組み込み後に撮影することができる。特定の実施形態では、各サイクルは、アレイへの4つの異なるヌクレオチド型の同時送達を伴い、各ヌクレオチド型は、スペクトル的に異なる標識を有する。次に、4つの異なる標識の1つに選択的な検出チャンネルをそれぞれ使用して、4つの画像を得ることができる。あるいは、異なるヌクレオチド型を順次追加することができる。各追加工程の間にアレイの画像を得ることができる。そのような実施形態では、各画像は、特定の型のヌクレオチドを取り込んだ核酸特徴を示す。各特徴部の配列コンテンツが異なるため、様々な画像に様々な特徴部が存在するか、存在しない。しかしながら、特徴部の相対的な位置は、画像内で変わらないままである。このような可逆的ターミネータ-SBS方法から得られる画像は、本明細書に記載されるように保存、処理、及び分析することができる。画像捕捉工程に続いて、標識を除去することができ、その後のヌクレオチド添加及び検出のサイクルのために可逆的ターミネータ部分を除去することができる。特定のサイクルで検出された後、及び後続のサイクルの前に標識を除去すると、サイクル間のバックグラウンド信号及びクロストークを低減できるという利点がある。有用な標識及び除去方法の例を以下に記載する。

40

【0190】

50

いくつかの実施形態は、4つ未満の異なる標識を使用する4つの異なるヌクレオチドの検出を利用することができる。例えば、SBSは、組み込まれた資料である米国特許出願公開第2013/0079232号に記載される方法及びシステムを使用して実施することができる。第1の例として、ヌクレオチド型の対は、同じ波長で検出することができるが、対のうちの1つのメンバーに対する強度の差に基づいて、又は、対の他の部材について検出された信号と比較して明らかなシグナルを出現又は消失させる、対の1つのメンバーへの変化（例えば、化学修飾、光化学修飾、又は物理的改質を行うことを介して）に基づいて区別され得る。第2の例として、4つの異なるヌクレオチド型のうちの3つを特定の条件下で検出することができ、一方、第4のヌクレオチド型は、それらの条件下で検出可能な標識がないか、又はそれらの条件下で最小限に検出される（例えば、バックグラウンド蛍光による最小限の検出など）。最初の3つのヌクレオチド型を核酸に組み込むことは、それらの対応するシグナルの存在に基づいて決定することができ、第4のヌクレオチド型を核酸に組み込むことは、任意のシグナルの不在又は最小限の検出に基づいて決定することができる。第3の例として、1つのヌクレオチド型は、2つの異なるチャンネルで検出される標識を含むことができ、一方、他のヌクレオチド型は、チャンネルのうちの1つ以下で検出される。前述の3つの例示的な構成は、相互に排他的であるとはみなされず、様々な組み合わせで使用することができる。3つ全ての例を組み合わせた例示的な実施形態は、第1のチャンネルで検出される第1のヌクレオチド型（例えば、第1の励起波長によって励起されたときに第1のチャンネルで検出される標識を有するdATP）、第2のチャンネルで検出される第2のヌクレオチド型（例えば、第2の励起波長によって励起されたときに第2のチャンネルで検出される標識を有するdCTP）、第1及び第2のチャンネルの両方において検出される第3のヌクレオチド型（例えば、第1及び/又は第2の励起波長によって励起されたときに両方のチャンネルで検出される少なくとも1つの標識を有するdTTP）、及びいずれのチャンネルでも検出されないか、又は最小限に検出される標識を欠く第4のヌクレオチド型（例えば、標識のないdGTP）を使用する蛍光ベースのSBS方法である。

【0191】

更に、組み込まれた資料である米国特許出願公開第2013/0079232号に記載のように、配列決定データは、単一のチャンネルを使用して得ることができる。このようないわゆる1つの染料配列決定方法では、第1のヌクレオチド型は標識されるが、第1の画像が生成された後に標識が除去され、第2のヌクレオチド型は、第1の画像が生成された後にのみ標識される。第3のヌクレオチド型は、第1及び第2の画像の両方においてその標識を保持し、第4のヌクレオチド型は、両方の画像において標識されていないままである。

【0192】

いくつかの実施形態は、ライゲーション技術による配列決定を利用することができる。このような技術は、DNAリガーゼを利用してオリゴヌクレオチドを組み込み、そのようなオリゴヌクレオチドの組み込みを識別する。オリゴヌクレオチドは、典型的には、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする配列中の特定のヌクレオチドの同一性と相関する異なる標識を有する。他のSBS方法と同様に、標識された配列決定試薬で核酸配列のアレイを処理した後、画像を得ることができる。各画像は、特定の型の標識を組み込んだ核酸特徴部を示す。各特徴部の配列コンテンツが異なるため、様々な画像に様々な特徴部が存在するか、存在しないが、特徴部の相対的な位置は、画像内で変わらないままである。ライゲーションベースの配列決定方法から得られる画像は、本明細書に記載されるように保存、処理、及び分析することができる。本明細書に記載の方法及びシステムとともに利用することができる例示的なSBSシステム及び方法は、米国特許第6,969,488号、同第6,172,218号、及び同第6,306,597号に記載されており、これらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0193】

いくつかの実施形態は、ナノ細孔配列決定を利用することができる（Deamer, D 50

. W. & Akesson, M. 「Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing.」 Trends Biotechnol. 18, 147 - 151 (2000)、Deamer, D. and D. Branton, 「Characterization of nucleic acids by nanopore analysis」, Acc. Chem. Res. 35: 817 - 825 (2002)、Li, J., M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, and J. A. Golovchenko, 「DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope」 Nat. Mater. 2: 611 - 615 (2003)、これらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。そのような実施形態では、標的核酸はナノ細孔を通過する。ナノ細孔は、 α -ヘモリジンなどの合成孔又は生体膜タンパク質であり得る。標的核酸がナノ細孔を通過するとき、各塩基対は、細孔の電気コンダクタンスの変動を測定することによって識別することができる。(米国特許第7,001,792号、Soni, G. V. & Meller, 「A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores.」 Clin. Chem. 53, 1996 - 2001 (2007)、Healy, K. 「Nanopore-based single-molecule DNA analysis.」 Nanomed. 2, 459 - 481 (2007)、Cockcroft, S. L., Chu, J., Amorin, M. & Ghadiri, M. R. 「A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution.」 J. Am. Chem. Soc. 130, 818 - 820 (2008)、これらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。ナノ細孔配列決定から得られるデータは、本明細書に記載されるように、保存、処理、及び分析することができる。具体的には、データは、本明細書に記載される光学画像及び他の画像の例示的な処理に従って、画像として処理することができる。

【0194】

配列決定方法のいくつかの他の実施形態は、その開示が参照により組み込まれる米国特許第9,222,132号に記載されているもの等の、ナノボール配列決定技術における本明細書に記載の3'ブロックヌクレオチドの使用を伴う。ローリングサークル増幅(rolling circle amplification、RCA)のプロセスを通して、多数の離散DNAナノボールが生成され得る。次いで、ナノボール混合物を、単一のナノボールが各位置と会合することを可能にする特徴を含むパターン化されたスライド表面に分配する。DNAナノボール生成では、DNAを断片化し、4つのアダプター配列の最初にライゲーションする。鋳型を増幅し、環状化し、II型エンドヌクレアーゼで切断する。アダプターの第2のセットを添加し、続いて増幅、環状化、及び切断する。残りの2つのアダプターについてこのプロセスを繰り返す。最終生成物は、各々が鋳型配列によって分離された4つのアダプターを有する円形鋳型である。ライブラリ分子はローリングサークル増幅工程を受け、DNAナノボールと呼ばれる大量のコンカテマーを生成し、次いでフローセル上に堆積される。Goodwin et al., 「Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies,」 Nat Rev Genet. 2016; 17(6): 333 - 51.

【0195】

いくつかの実施形態は、DNAポリメラーゼ活性のリアルタイムモニタリングを伴う方法を利用することができる。ヌクレオチドの組み込みは、例えば、両方が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,329,492号及び同第7,211,414号に記載されているようなフルオロフォア含有ポリメラーゼと γ -ホスファート標識ヌクレオチドとの間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)相互作用を介して検出することができ、又はヌクレオチドの組み込みは、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許

第 7, 315, 019 号に記載されているようなゼロモード導波路、並びに、例えば、両方が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 7, 405, 281 号及び米国特許出願公開第 2008/0108082 号に記載されているような蛍光ヌクレオチド類似体及び操作ポリメラーゼを使用して検出することができる。照明は、蛍光標識ヌクレオチドの組み込みが低バックグラウンドで観察され得るように、表面繫留ポリメラーゼの周囲のゼプトリットルスケールの体積に制限することができる (Levene, M. J. et al. 「Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations.」 Science 299, 682-686 (2003)、Lundquist, P. M. et al. 「Parallel confocal detection of single molecules in real time.」 Opt. Lett. 33, 1026-1028 (2008)、Korlach, J. et al. 「Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures.」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1176-1181 (2008)、これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。このような方法から得られる画像は、本明細書に記載されるように、記憶、処理、及び分析することができる。

10

20

30

40

【0196】

いくつかの SBS 実施形態は、伸長産物へのヌクレオチドの組み込み時に放出されるプロトンの検出を含む。例えば、放出されたプロトンの検出に基づく配列決定は、Ion Torrent 社 (Guilford, CT、Life Technologies 子会社) から市販されている電気検出器及び関連技術、又は米国特許出願公開第 2009/0026082 号、同第 2009/0127589 号、同第 2010/0137143 号、及び第 2010/0282617 号に記載されており、これらは全て参照により本明細書に組み込まれる。動力学的除外を使用して標的核酸を増幅するための本明細書に記載の方法は、プロトンを検出するために使用される基質に容易に適用することができる。より具体的には、本明細書に記載の方法を使用し、プロトンを検出するために使用されるアンブリコンのクローン集団を産生することができる。

【0197】

上記の SBS 方法は、複数の異なる標的核酸が同時に操作されるように、多重形式で有利に実施することができる。特定の実施形態では、異なる標的核酸は、共通の反応容器又は特定の基質の表面上で処理することができる。これにより、配列決定試薬の簡便な送達、未反応試薬の除去、及び取り込み事象の検出が多重方式で可能になる。表面結合された標的核酸を使用する実施形態では、標的核酸は、アレイ形式であり得る。アレイ形式では、標的核酸は、典型的には、空間的に区別可能な方式で表面に結合され得る。標的核酸は、直接共有結合、ピーズ若しくは他の粒子への結合、又は表面に結合したポリメラーゼ若しくは他の分子への結合によって結合され得る。アレイは、各部位 (特徴とも称される) における標的核酸の単一コピーを含むことができ、又は同じ配列を有する複数のコピーは、各部位若しくは特徴に存在することができる。複数のコピーは、以下で更に詳細に記載されるブリッジ増幅又はエマルジョン PCR などの増幅方法によって生成することができる。

【0198】

本明細書に記載の方法は、例えば、少なくとも約 10 個の特徴 / cm^2 、100 個の特徴 / cm^2 、500 個の特徴 / cm^2 、1,000 個の特徴 / cm^2 、5,000 個の特徴 / cm^2 、10,000 個の特徴 / cm^2 、50,000 個の特徴 / cm^2 、100,000 個の特徴 / cm^2 、1,000,000 個の特徴 / cm^2 、5,000,000 個の特徴 / cm^2 、又はそれ超を含む、様々な密度のいずれかの特徴を有するアレイを使用することができる。

50

【0199】

本明細書に記載の方法の利点は、複数の標的核酸の迅速かつ効率的な検出を並行して提供することである。したがって、本開示は、上記で例示されるものなどの当該技術分野において既知の技術を使用して核酸を調製及び検出することができる統合システムを提供する。したがって、本開示の統合システムは、増幅試薬及び/又は配列決定試薬を1つ以上の固定化されたDNAフラグメントに送達することができる流体コンポーネントを含むことができ、システムは、ポンプ、弁、リザーバ、流体ラインなどのコンポーネントを含む。フローセルは、標的核酸を検出するための統合システムで構成及び/又は使用することができる。例示的なフローセルは、例えば、米国特許出願公開第2010/0111768号及び米国特許出願第13/273,666号に記載され、その各々が参照により本明細書に組み込まれる。フローセルについて例示されるように、統合システムの流体コンポーネントの1つ以上を増幅方法及び検出方法に使用することができる。核酸配列決定の実施形態を一例として取ると、統合システムの流体コンポーネントの1つ以上を、本明細書に記載の増幅方法、及び上記に例示したような配列決定方法における配列決定試薬の送達に使用することができる。代替的に、統合システムは、増幅方法を実施し、検出方法を実施するための別々の流体システムを含み得る。増幅された核酸を作成し、また核酸の配列を決定することができる統合配列決定システムの例としては、MiSeq(商標)プラットフォーム(Illumina Inc., San Diego, CA)、及び参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第13/273,666号に記載のデバイスが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0200】

ポリヌクレオチドがシリカ系支持体に直接結合しているアレイは、例えば、国際公開第00/06770号(参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているものであり、ポリヌクレオチドは、ガラス上のペンダントエポキシド基と、ポリヌクレオチド上の内部アミノ基との間の反応によって、ガラス支持体上に固定化される。加えて、ポリヌクレオチドは、例えば、国際公開第2005/047301号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、硫黄系求核試薬と固体担体との反応によって固体支持体に結合することができる。固体支持型鑄型ポリヌクレオチドのまた更なる例として、鑄型ポリヌクレオチドが、シリカ系又は他の固体支持体上に支持されたヒドロゲルに取り付けられるものが挙げられる。その例が、例えば、国際公開第00/31148号、同第01/01143号、同第02/12566号、同第03/014392号、米国特許第6,465,178号、及び国際公開第00/53812号に記載されており、各々が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0201】

鑄型ポリヌクレオチドが固定化され得る具体的な表面としては、ポリアクリルアミドヒドロゲルが挙げられる。ポリアクリルアミドヒドロゲルは、上記に引用した参考文献及び参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2005/065814号に記載されている。使用され得る特定のヒドロゲルには、国際公開第2005/065814号及び米国特許出願公開第2014/0079923号に記載されるものが含まれる。一実施形態では、ヒドロゲルは、PAZAM(ポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-co-アクリルアミド))である。

40

【0202】

DNA鑄型分子は、例えば、米国特許第6,172,218号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、ビーズ又は微小粒子に結合させることができる。ビーズ又は微小粒子への結合は、配列決定用途に有用であり得る。各ビーズが異なるDNA配列を含むビーズライブラリを調製することができる。それらの作製のための例示的なライブラリ及び方法は、Nature, 437, 376-380(2005); Science, 309, 5741, 1728-1732(2005)に記載されており、これらは各々参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるヌクレオチドを使用したかかるビーズのアレイの配列決定は、本開示の範囲内である。

50

【0203】

配列決定される鋳型は、固体支持体上に「アレイ」の一部を形成してもよく、この場合、アレイは任意の便利な形態をとることができる。したがって、本開示の方法は、単一分子アレイ、クラスタ化アレイ、及びビーズアレイを含む全ての種類の高密度アレイに適用可能である。本開示の標識ヌクレオチドは、基本的に任意の種類のアレイ上で鋳型を配列決定するために使用されてもよく、そのようなアレイには、固体支持体上の核酸分子の固定化によって形成されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0204】

しかしながら、本開示の標識ヌクレオチドは、クラスタ化されたアレイの配列決定の状況において特に有利である。クラスタ化アレイでは、アレイ上の別個の領域（多くの場合、部位又は特徴部と呼ばれる）は、複数のポリヌクレオチド鋳型分子を含む。一般に、複数のポリヌクレオチド分子は、光学的手段によって個別に分解可能ではなく、代わりに、アンサンブル（集合体）として検出される。アレイがどのように形成されるかに応じて、アレイ上の各部位は、1つの個々のポリヌクレオチド分子の複数のコピー（例えば、部位は、特定の一本鎖若しくは二本鎖核酸種に対して均質である）、又は更には少数の異なるポリヌクレオチド分子の複数のコピー（例えば、2つの異なる核酸種の複数のコピー）を含んでもよい。核酸分子のクラスタ化アレイは、当該技術分野において一般的に知られている技術を使用して生成され得る。例として、国際公開第98/44151号及び国際公開第00/18957号は、各々が本明細書に組み込まれ、核酸の増幅方法を記載しており、鋳型及び増幅産物の両方は、固定化された核酸分子のクラスタ又は「コロニー」からなるアレイを形成するために、固体支持体上に固定化されたままである。これらの方法に従って調製されたクラスタ化アレイ上に存在する核酸分子は、本開示の色素化合物で標識化されたヌクレオチドを使用する配列決定に好適な鋳型である。

【0205】

本開示の標識ヌクレオチドは、単一分子アレイ上の鋳型の配列決定にも有用である。本明細書で使用される場合、用語「単一分子アレイ」又は「SMA」は、固体支持体の上に分布（又は配列）されたポリヌクレオチド分子の集団を指し、いかなる個々のポリヌクレオチドの、集団の全ての他のポリヌクレオチドからの離間距離は、個々のポリヌクレオチド分子を個々に見分けることが可能であるようになっている。したがって、固体支持体の表面上に固定化された標的核酸分子は、いくつかの実施形態では、光学的手段によって見分けることができる。これは、1つのポリヌクレオチドをそれぞれ表す1つ以上の別個のシグナルが、使用される特定の撮像装置が、見分けることができるエリア内で発生することを意味する。

【0206】

アレイ上の隣接するポリヌクレオチド分子間の間隔が、少なくとも100nm、より具体的には少なくとも250nm、更により具体的には少なくとも300nm、更により具体的には少なくとも350nmである、単一分子検出が達成され得る。したがって、各分子は個別に分解可能（見分けることが可能）であり、単一分子蛍光点として検出可能であり、この単一分子蛍光点からの蛍光はまた、単一工程でのフォトリーチを呈する。

【0207】

用語「個々に分解された」及び「個々の解像度」は、本明細書では、可視化されたときに、アレイ上の1つの分子をその隣接する分子と区別することが可能であることを指定するために使用される。アレイ上の個々の分子間の分離は、個々の分子を分解するために使用される特定の技術によって、部分的に決定される。単一分子アレイの一般的な特徴は、各々が参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第00/06770号及び国際公開第01/57248号を参照することによって理解されるであろう。本開示のヌクレオチドの1つの用途は合成による配列決定反応であるが、ヌクレオチドの有用性は、そのような方法に限定されない。実際に、このヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに組み込まれたヌクレオチドに結合した蛍光標識の検出を必要とする任意の配列決定方法において有利に使用され得る。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 8 】

具体的には、本開示の標識ヌクレオチドは、自動蛍光配列決定プロトコル、特に、サンガー及び共同研究者のチェーンターミネーション配列決定方法に基づく、蛍光色素ターミネータサイクル配列決定に使用することができる。このような方法は、一般に、酵素及びサイクル配列決定を使用して、プライマー伸長配列決定反応において蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドを組み込む。いわゆるサンガー配列決定方法、及び関連するプロトコル（サンガー型）は、標識されたジデオキシヌクレオチドでランダム化された鎖末端を利用する。

【 0 2 0 9 】

したがって、本開示はまた、3'位及び2'位の両方においてヒドロキシ基を欠いているジデオキシヌクレオチドである、標識ヌクレオチドを包含し、そのようなデオキシヌクレオチドは、サンガー型の配列決定方法などでの使用に好適である。

【 0 2 1 0 】

3'ブロッキング基を組み込んだ本開示の標識ヌクレオチドは、サンガー法及び関連するプロトコルで有用であるということが認識されるであろう。それは、ジデオキシヌクレオチドを使用することによって達成される効果と同じ効果が、3'-OHブロッキング基を有するヌクレオチドを使用することによって得られる（両者とも後続のヌクレオチドの組み込みを阻止できる）ためである。本開示によるヌクレオチドであって、3'ブロッキング基を有するヌクレオチドをサンガー型の配列決定方法で使用する場合、ヌクレオチドに結合した色素化合物又は検出可能な標識は開裂可能なリンカーを介して連結される必要がないということが理解されるであろう。というのは、本開示の標識ヌクレオチドが組み込まれる各事例においては、ヌクレオチドが、続いて組み込まれる必要はなく、したがって、標識をヌクレオチドから除去する必要がないためである。

【 0 2 1 1 】

本明細書に記載される方法の任意の実施形態では、配列決定用途で使用されるヌクレオチドは、本明細書に記載される3'ブロックヌクレオチド、例えば、式(I)及び(Ia)~(Id)のヌクレオチドである。任意の実施形態では、3'ブロックヌクレオチドは、ヌクレオシドトリホスファートである。

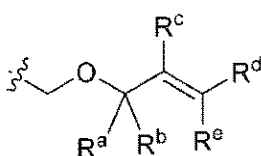
【 0 2 1 2 】

キット

本開示はまた、配列決定装置とともに使用するためのキットであって、1つ以上の異なるタイプのヌクレオチド（例えば、A、T、C、及びG又はUからの4つの異なるタイプのヌクレオチド；dATP、dTTP、dCTP、及びdGTP又はdUTP）であって、ヌクレオチドの各々が、ヌクレオチドの3'酸素に結合した構造

【 0 2 1 3 】

【 化 4 3 】



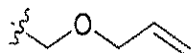
を有する3'ブロッキング基などの、アリル部分を含む3'ブロッキング基を含み、式中、 R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 、及び R^e の各々が、独立して、H、ハロゲン、非置換若しくは置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、又は $C_1 \sim C_6$ ハロアルキルである、1つ以上の異なるタイプのヌクレオチドと、1つ以上のパラジウムスカベンジャーであって、少なくとも1つのパラジウムスカベンジャーが、本明細書に記載の1つ以上のアリル部分（例えば、-O-アリル、-S-アリル、-NR-アリル、若しくは $-N^+RR'$ -アリル、又はそれらの組み合わせ）を含む、1つ以上のパラジウムスカベンジャーと、を含む、キットを提供する。

【 0 2 1 4 】

いくつかの実施形態では、キット中のヌクレオチドの各々における 3' ブロッキング基は、

【 0 2 1 5 】

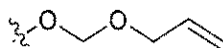
【 化 4 4 】



であり、3' 酸素と一緒にあって、リボース又はデオキシリボース部分の 3' 炭素原子に結合した

【 0 2 1 6 】

【 化 4 5 】



10

(「AOM」) 基を形成する。いくつかの実施形態では、1つ以上の異なるタイプのヌクレオチドは、本明細書に記載される標識ヌクレオチド、例えば、式 (I)、(Ia)、(Ia')、(Ib)、(Ic)、(Ic')、又は (Id) の 3' ブロックヌクレオチドである。特定の実施形態では、キットは、標識又は非標識ヌクレオチドと一緒にあって、少なくとも1つの標識 3' ブロックヌクレオチドを含むことができる。例えば、色素で標識されたヌクレオチドは、標識されていないか、若しくは天然のヌクレオチドと組み合わせ、かつ/又は蛍光標識されたヌクレオチドか、あるいはこれらの任意の組み合わせとともに供給され得る。ヌクレオチドの組み合わせは、別個の個々のコンポーネント (例えば、容器又はチューブ当たり1つのヌクレオチド型) として、又はヌクレオチド混合物 (例えば、同じ容器又はチューブ内で混合された2つ以上のヌクレオチド) として提供され得る。

20

【 0 2 1 7 】

他の実施形態では、ヌクレオチドは標識されておらず、キットは、本明細書に記載されるように、1つ以上の検出可能な標識を含む一連の親和性試薬とともに使用され得る。

【 0 2 1 8 】

いくつかの実施形態では、1つ以上の -O- アリル又はアリル部分を含む Pd スカベンジャーは、

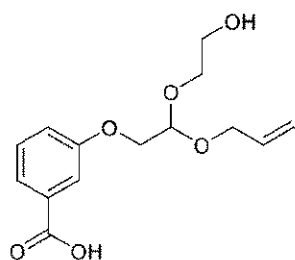
【 0 2 1 9 】

30

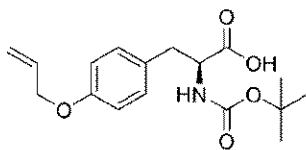
40

50

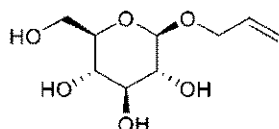
【化 4 6】



(化合物A)、



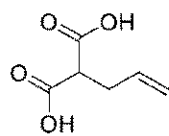
(化合物B、N-Boc



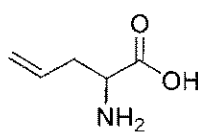
10

チロシン(アリル)-OH)、

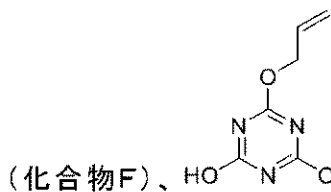
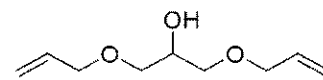
(化合物C、アリル-β-D-グルコピラノシド)、



(化合物D)、



(化合物E)、



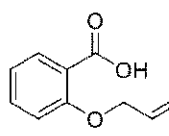
(化合物F)、

(化合物G)、

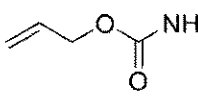
(化合物H)、

(化合物H)、

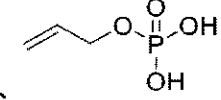
20



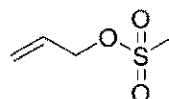
(化合物I)、



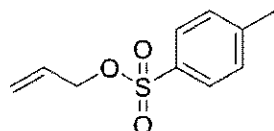
(化合物J)、



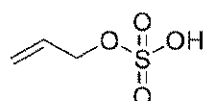
(化合物K)、



(化合物L)、



(化合物M)、及び



(化合物N)

30

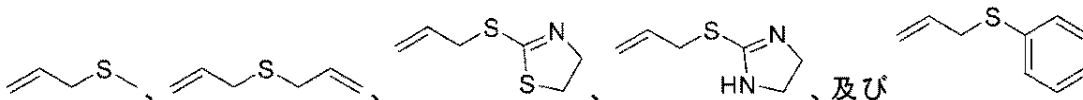
から選択され得る。一実施形態では、キットは化合物 A を含む。別の実施形態では、キットは化合物 B を含む。別の実施形態では、キットは化合物 C を含む。

【0 2 2 0】

いくつかの実施形態では、1つ以上の - S - アリル部分を含む Pd スカベンジャーは、

【0 2 2 1】

【化 4 7】



40

から選択され得る。

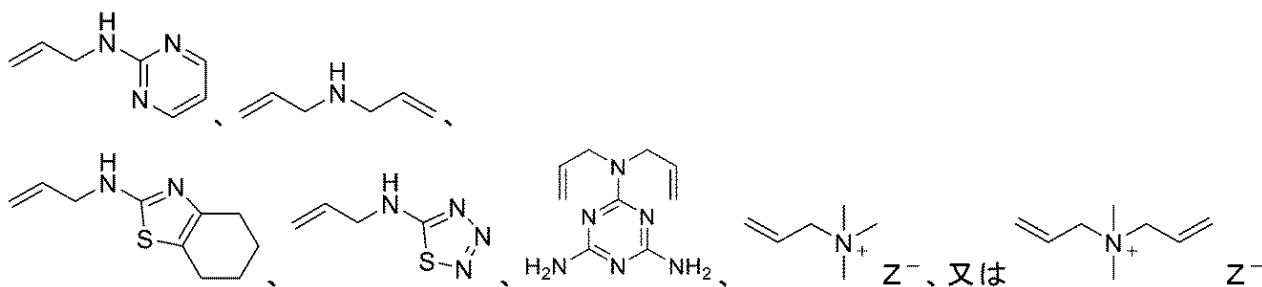
【0 2 2 2】

いくつかの実施形態では、1つ以上の - NR - アリル又は - N⁺RR' - アリル部分を含むパラジウムスカベンジャーは、

【0 2 2 3】

50

【化 4 8】

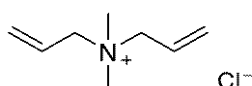


10

から選択され得、 Z^- が、アニオン（例えば、 F^- 又は Cl^- などのハライドアニオン）である。一実施形態では、キットは、パラジウムスカベンジャー

【0 2 2 4】

【化 4 9】



（化合物 O、ジアリルジメチルアンモニウムクロリド、DADMAC としても知られている）を含む。

【0 2 2 5】

20

いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される方法の組み込み工程で使用され得る。そのような実施形態では、キットは、9°N ポリメラーゼの変異体、例えば、Pol 812、Pol 1901、Pol 1558、又は Pol 963 などの DNA ポリメラーゼなどの追加の試薬を含んでもよい。Pol 812、Pol 1901、Pol 1558、又は Pol 963 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の 1 つ以上のヌクレオチド又は標識ヌクレオチド（A、C、T、及び G 又は U；dATP、dCTP、dTTP、及び dGTP 又は dUTP）を含み得る。いくつかの実施形態では、キットはまた、1 つ以上の緩衝剤を含み得る。例えば、1 つ以上の緩衝剤は、一級アミン、二級アミン、三級アミン、天然アミノ酸、若しくは非天然アミノ酸、又はそれらの組み合わせを含み得る。更なる実施形態では、緩衝剤は、エタノールアミン又はグリシン、あるいはそれらの組み合わせを含む。一実施形態では、緩衝剤は、グリシンを含むか、又はグリシンである。いくつかの実施形態では、キットは、Pd (II) 種（例えば、L-システイン若しくはその塩、又はチオ硫酸ナトリウムなどのチオ硫酸塩）を不活性化するための Pd (II) スカベンジャーなどの、本明細書に記載される追加の Pd スカベンジャーを更を含み得る。いくつかの実施形態では、Pd (II) スカベンジャーは、Pd (0) スカベンジャーとは別のコンパートメント内にある。例えば、Pd (0) スカベンジャーは組み込みミックス中にあり、Pd (II) スカベンジャーは切断後洗浄溶液中にある。他の実施形態では、Pd (0) 及び Pd (II) スカベンジャーは、同じコンパートメント内にある。

30

【0 2 2 6】

40

いくつかの実施形態では、キット中のコンポーネント又は試薬は乾燥又は凍結乾燥状態にあり、キットはいずれの水溶液も含有しない。したがって、キット中の試薬は、緩衝溶液に再構成されることになる。例えば、DNA ポリメラーゼ及び / 又は 1 つ以上の 4 つのタイプのヌクレオチドは、乾燥又は凍結乾燥形態であり得、これらは、再構成されて、組み込み混合物（例えば、第 1 の水溶液）を形成することになる。いくつかのそのような実施形態では、本明細書に記載の 1 つ以上のアリル部分を含む Pd スカベンジャー（例えば、Pd (0) スカベンジャー）はまた、乾燥又は凍結乾燥形態であり、DNA ポリメラーゼ及び / 若しくはヌクレオチドと予混合されるか、又は別個の容器 / コンパートメント内にあるかのいずれかであり、再構成され、ポリメラーゼ及びヌクレオチドと混合されて、配列決定ランの開始直前又は開始時に第 1 の水溶液を形成することになる。更なる実施形

50

態では、P d (I I) スカベンジャーはまた、乾燥又は凍結乾燥形態であり、D N A ポリメラーゼ及び / 又はヌクレオチドと予混合され得る。他の実施形態では、P d (0) スカベンジャーは、乾燥又は凍結乾燥形態ではなく、D N A ポリメラーゼ及び / 又はヌクレオチドとは別個に保存され、D N A ポリメラーゼ及びヌクレオチドを含有する組み込み混合物と混合され、第 1 の水溶液を形成する。他の実施形態では、P d (I I) スカベンジャーは、切断後洗浄溶液中にあるか、又は切断後洗浄溶液中で再構成されるように乾燥若しくは凍結乾燥状態であり得る。他の実施形態では、キット中のコンポーネントは、使用前に希釈される濃縮形態を提供され得る。そのような実施形態では、好適な希釈緩衝液も含まれ得る。他の実施形態では、キットのコンポーネントは、すぐに使える緩衝溶液（例えば、第 1 の水溶液又は第 2 の水溶液）中にある。いくつかの実施形態では、第 1 又は第 2 の溶液は、約 9 の p H を有する。 10

【 0 2 2 7 】

キットが、色素化合物などの検出可能な標識で標識化された複数の、特に 2 つ、又は 3 つ、又はより具体的には 4 つの 3 ' ブロックヌクレオチドを含む場合、異なるヌクレオチドは、異なる色素化合物で標識化されてもよく、又は色素化合物を含まない、暗色であってもよい。異なるタイプのヌクレオチドが異なる色素化合物で標識されている場合、色素化合物が分光的に区別可能な蛍光色素であるというのが本キットの特徴である。本明細書で使用される場合、用語「分光的に区別可能な蛍光色素」とは、2 つ以上の色素が 1 つの試料に存在する場合、蛍光検出装置（例えば、市販の毛管ベースの D N A 配列決定プラットフォーム）によって区別され得る波長で、蛍光エネルギーを放射する蛍光色素を指す。 20

いくつかの実施形態では、蛍光色素化合物で標識された 2 つ以上のヌクレオチドがキット形態で供給される場合、標識ヌクレオチドは、例えば同じレーザなどの、同じ波長で励起され得るというのが、いくつかの実施形態の特徴である。1 つのそのような特徴では、3 つのタイプのヌクレオチドは、同じ波長によって励起することができ、第 4 のタイプのヌクレオチドは標識されていない（暗色）。別の特徴では、2 つのタイプの標識ヌクレオチドは第 1 の波長で励起することができ、2 つのタイプの標識ヌクレオチドは第 2 の波長で励起することができ、第 2 のタイプの標識ヌクレオチドは第 2 の波長で励起することができ、第 3 のタイプの標識ヌクレオチドは第 1 の波長及び第 2 の波長の両方で励起することができ、更に、第 4 のタイプのヌクレオチドは、標識されていない。例えば、f f C は第 1 30

の波長で励起することができ、f f T は第 2 の波長で励起することができ、f f A は第 1 の波長及び第 2 の波長の両方で励起することができ、f f G は標識されていない（暗色）。特定の励起波長は、約 4 5 0 ~ 4 6 0 n m、約 4 9 0 ~ 5 0 0 n m、又は約 5 3 0 ~ 5 4 0 n m（例えば、約 5 3 2 n m）である。

【 0 2 2 8 】

他の実施形態では、キットは、4 つの標識 3 ' ブロックヌクレオチド（例えば、A、C、T、及び G 又は U；d A T P、d C T P、d T T P、及び d G T P 又は d U T P）を含み得、各タイプのヌクレオチドは同じ 3 ' ブロッキング基及び蛍光標識を含み、各蛍光標識は異なる蛍光最大値を有し、蛍光標識の各々は他の 3 つの標識と区別可能である。キットは、蛍光標識のうちの 2 つ以上が、吸収最大値であるが、異なるストークスシフトを有 40

するようなものであってもよい。いくつかの他の実施形態では、1 つのタイプのヌクレオチドは、標識されていない。

【 0 2 2 9 】

本開示はまた、配列決定装置とともに使用するためのカートリッジであって、複数のチャンバを含み、複数のチャンバのうちの 1 つが、本明細書に記載されるキット（例えば、本明細書に記載される配列決定方法の組み込み工程のための組み込みミックスキット）とともに使用するためのものである、カートリッジを提供する。ここでも、本明細書に記載される方法で特定されたコンポーネントのうちの 1 つ以上を、キットに含めることができる。本明細書に記載されるスキャンミックス、切断ミックス、又は切断後洗浄溶液は各々、本明細書に記載される配列決定カートリッジの別個のチャンバ内で使用されるように設 50

計されたキットの形態であってもよい。

【実施例】

【0230】

追加的实施形態が、以下の実施例において更に詳細に開示されるが、これらの実施例は、特許請求の範囲を限定することを意図したものではない。

【0231】

実施例1．iSeq（商標）プラットフォーム上での合成による配列決定に使用されるPdスカベンジャー化合物A

この実験では、Pdスカベンジャー（化合物A）の効率を、切断後洗浄溶液中のリボ酸を用いた標準的なSBSランに対して、IlluminaのiSeq（商標）で試験した。配列決定を、オンボードiSeq（商標）青色（約450nm）及び緑色（約520nm）励起源を使用する2励起/1発光SBS（又は2ExSBS）を使用して実行した。PhiXを配列決定鋳型として使用した。Na₂PdCl₄切断ミックスを使用する、標準的な再利用、35秒の組み込み、及び10秒の切断時間を含む、等温602ExSBS配列決定レシビを使用し、RTAデータを、IlluminaSequencingAnalysisソフトウェアを使用して分析した。化合物Aを組み込みミックス（IMX）に様々な濃度 - 0.5mM、1mM、2mM、及び10mMで添加した。組み込みミックスの追加のコンポーネントは、（1）ffC-db-AOM-AOL-色素1、ffA-db-AOM-AOL-色素2、ffT-db-AOM-AOL-NR550S0、及びpppG-AOM（暗色G）を含む一連のヌクレオチド、（2）DNAポリメラーゼPoly1901、並びに（3）グリシン緩衝液を含む。Pdスカベンジャーとしてリボ酸を使用する配列決定ランのために、2つの切断後洗浄工程を実行した。20mMのリボ酸は、第1の切断後洗浄溶液中にあり、10mMのL-システインを含有する第2の切断後洗浄溶液を使用して、次のサイクルの前に残りのリボ酸及び不活性Pd（II）を洗い流した。Pd（0）スカベンジャーとして化合物Aを使用する配列決定ランのために、リボ酸を含有する第1の切断後洗浄溶液を、L-システインを含有する第2の切断後洗浄溶液で置き換え、それによって配列決定ランにおける試薬の数を低減した。色素1は、米国特許出願公開第2018/0094140号に開示されているクマリン色素であり、ffCとコンジュゲートした場合に構造部分

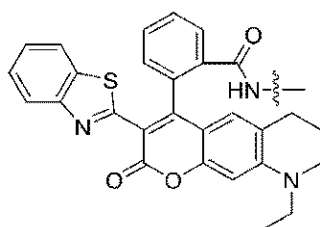
10

20

30

【0232】

【化50】

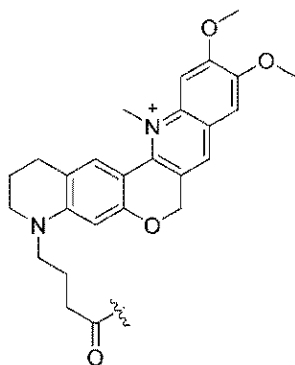


を有する。色素2は、米国特許出願公開第17/550271号に開示されているクロメノキノリン色素であり、ffAとコンジュゲートした場合に構造部分

40

【0233】

【化 5 1】



10

を有する。NR 5 5 0 S 0 は、参照により組み込まれる国際公開第 2 0 1 4 / 1 3 5 2 2 1 (A 1) 号に開示されている既知の緑色色素である。

【 0 2 3 4 】

図 1 に示すように、切断後洗浄緩衝液中にリポ酸を使用しなかった場合、プリフェージング値は、はるかに高かった。化合物 A を組み込みミックスに添加することにより、プリフェージングを改善することができた。2 mM 又は 1 0 mM の化合物 A を組み込みミックス中で使用した場合、プリフェージング値は、第 1 の切断後洗浄工程においてリポ酸を使用した場合の標準配列決定ランと同等であった。

20

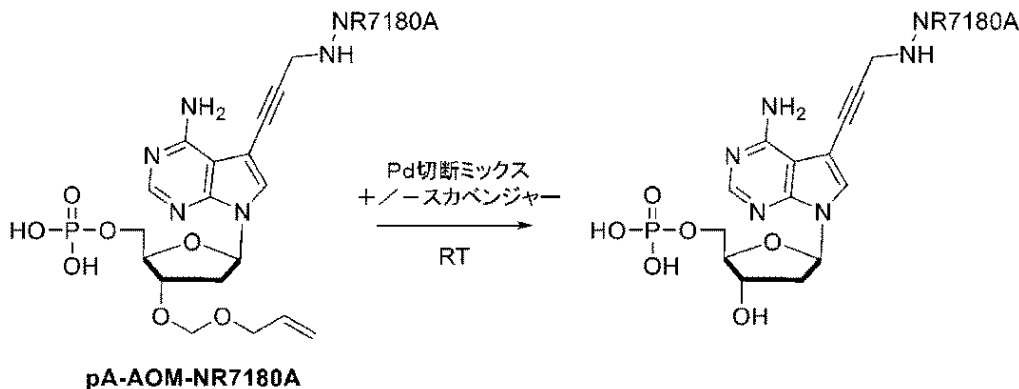
【 0 2 3 5 】

実施例 2 . 様々な P d スカベンジャーの動態評価

この実験は、標準的な基材 (p A - A O M - N R 7 1 8 0 A) と競合する場合の P d スカベンジャーの阻害能力を評価する目的で行った。

【 0 2 3 6 】

【化 5 2】



30

【 0 2 3 7 】

スカベンジャー候補を標準緩衝溶液 (溶解度に依存して 1 0 0 ~ 2 5 m M) 中に調製し、p H 9 . 1 ± 0 . 7 5 に調整した。エッペンドルフチューブ内に、H₂O (1 4 8 . 8 μ L)、2 M の D E E A (2 0 μ L、p H 9 . 4)、スカベンジャーストック溶液 (ストックの濃度に依存して 4 0 ~ 1 6 0 μ L)、Na C l、E D T A、T r i s、及び T w e e n - 2 0 を含有する緩衝溶液 (スカベンジャーストックの濃度に依存して 0 ~ 1 2 0 μ L)、0 . 7 6 m M の p A - A O M - N R 7 1 8 0 A (5 1 . 2 μ L) を添加した。最後に、1 0 m M [アリル P d C l]₂ 切断ミックス (2 0 μ L) を添加して、反応を開始した。各反応混合物は、4 0 0 μ L の総体積、並びに以下の組成：0 . 1 M の D E E A、1 0 m M のスカベンジャー、0 . 1 m M の p A - A O M - N R 7 1 8 0 A、及び 1 m M の P d を有していた。各時点で、4 0 μ L の溶液を 1 0 μ L の E D T A / H₂O₂ の 1 : 1 混合物 (0 . 2 5 : 0 . 2 5 M) で直ちにクエンチし、p A - A O M - N R 7 1 8 0 A の 3 ' O H - p A - N R 7 1 8 0 A への変換を U P L C によって分析した。NR 7 1 8 0 は、

40

50

その全体が参照により組み込まれる米国特許第 8 7 5 4 2 4 4 号に開示される既知のローダミン色素である。

【0238】

図 2 A 及び 2 B に示すように、化合物 A、B、及び C は、リポ酸と比較して、Pd (0) 種の同様の効率的な阻害を示し、変換を 4 % 以下に限定した。

【0239】

実施例 3 . i S e q (商 標) プラットフォーム上での合成による配列決定に使用される Pd スカベンジャー化合物 B 及び C

この実験では、2 つの Pd スカベンジャー (化合物 B 及び化合物 C) の効率を、上記の実施例 1 に記載される同様の条件に従って、切断後洗浄溶液中のリポ酸を用いた標準 S B S ランに対して、I l l u m i n a の i S e q (商 標) で試験した。69 の等温、再利用なし、24 秒の組み込み時間、及び 5 . 8 秒の切断時間を使用する配列決定レシピは、わずかに異なっていた。化合物 B 又は C を組み込みミックスに 2 m M で添加した。組み込みミックスの追加のコンポーネントは、(1) f f C - d b - A O M - A O L - 色素 1、f f A - d b - A O M - A O L - 色素 2、f f T - d b - A O M - A O L - N R 5 5 0 S 0、及び p p p G - A O M (暗色 G) を含む一連のヌクレオチド、(2) D N A ポリメラーゼ P o l y 1 9 0 1、並びに (3) グリシン緩衝液を含む。リポ酸を使用する配列決定ランのために、2 つの切断後洗浄工程を実行した。20 m M のリポ酸は、第 1 の切断後洗浄溶液中にあり、10 m M の L - システインを含有する第 2 の切断後洗浄溶液を使用して、次のサイクルの前に残りのリポ酸及び不活性 Pd (I I) を洗い流した。Pd (0) スカベンジャーとして化合物 B 又は C を使用する配列決定ランのために、リポ酸を含有する第 1 の切断後洗浄溶液を、L - システインを含有する第 2 の切断後洗浄溶液で置き換え、それによって配列決定ランにおける試薬の数を低減した。

【0240】

図 3 に示すように、化合物 B 又は化合物 C を組み込みミックスに添加することにより、標準的な切断後洗浄工程 (リポ酸を含有する第 1 の洗浄溶液、L - システインを含有する第 2 の洗浄溶液) を使用した場合と比較して、プリフェージングメトリックを改善することが可能になった。

【0241】

I M X 中の L - システインの適合性を試験するために、Pd スカベンジャー化合物 B 又は C を含有する組み込みミックスに 5 m M の L - システインを添加することによって、追加の実験を行った。加えて、2 つの配列決定レシピを使用した：24 秒又は 19 秒の組み込み時間、69 の等温、再利用なし、及び [アリル P d C l] ₂ 切断ミックスを用いた 6 秒の切断時間。化合物 B 又は C を組み込みミックスに 2 m M で添加した。組み込みミックスの追加のコンポーネントは、(1) f f C - d b - A O M - A O L - 色素 1、f f A - d b - A O M - A O L - 色素 2、f f T - d b - A O M - A O L - N R 5 5 0 S 0、及び p p p G - A O M (暗色 G) を含む一連のヌクレオチド、(2) D N A ポリメラーゼ P o l y 1 9 0 1、並びに (3) グリシン緩衝液を含む。切断後洗浄プロトコルは、以下の通りであった：(i) 20 m M のリポ酸を有する第 1 の洗浄溶液及び 10 m M の L - システインを有する第 2 の洗浄溶液、(i i) 10 m M の L - システインを有する 2 倍の洗浄溶液、(i i i) 及び (i v) L - システインを含有しない配列決定の他の工程 (例えば、クラスタリング及びベアエンドリーディングなどの) で使用される標準緩衝液 (T r i s、N a C l、E D T A、及び T w e e n - 2 0 を含有する水溶液) 。

【0242】

図 4 に示すように、組み込みミックス中のスカベンジャーは全て、標準的なレシピよりも低いフェージングを与えることを観察した。予想通り、より短い 19 秒の組み込み時間は、増加した E R % とともに大きなフェージング増加を与えた。L - システインを組み込みミックスに添加することにより、標準レシピから生成されたものと同様のプリフェージング値を提供することができた。L - システインを組み込みミックスに添加する主な利点は、別個の洗浄後試薬 / キットを開発する必要がないことである。配列決定の他の工程 (

クラスタリング及びペアエンドリーディング)で使用される標準的な緩衝溶液を切断後洗浄溶液として使用することができる。更に、配列決定実験は、Pdスカベンジャーと組み込みミックスの他のコンポーネントとの間の負の相互作用のいかなる証拠も示さなかった。

【0243】

プリフェージングを低減することに加えて、組み込みミックス中にこれらのスカベンジャーを含めることはまた、カートリッジ及び流体の交差汚染に関連するプリフェージング増加のリスクを抑制する潜在性を有する。

【0244】

実施例4. iSeq (商標) プラットフォーム上での合成による配列決定に使用される Pdスカベンジャー化合物O

Pd(0)スカベンジャーであるジアリルジメチルアンモニウムクロリド又はDADM AC (化合物O)の効率を、以前に試験したPdスカベンジャーであるN-Bocチロシン(アリル)-OH(化合物B)に対して、IlluminaのiSeq(商標)で試験した。配列決定を、オンボードiSeq青色(約450nm)及び緑色(約520nm)励起源を使用する2励起/1発光SBS(又は2Ex SBS)を使用して実行した。100pMのPhiXを配列決定鑄型として使用した。Na₂PdCl₄切断ミックスを使用する、標準的な再利用、25秒の組み込み、及び6秒の切断時間を含む、等温65 2Ex SBS配列決定レシピを使用した。RTAデータを、Telescopeを使用して分析した。

【0245】

化合物B又は化合物Oをそれぞれ2mM及び0.5mMで組み込みミックス(IMX)に添加した。組み込みミックスの追加のコンポーネントは、(1)ffC-db-AOM-AOL-色素1、ffA-db-AOM-AOL-色素2、ffT-db-AOM-AOL-NR550S0、及びpppG-AOM(暗色G)を含む一連のヌクレオチド、(2)DNAポリメラーゼPoly1901、並びに(3)グリシン緩衝液を含む。チオ硫酸ナトリウムを、10mMの最終濃度で切断後洗浄緩衝液に添加した。

【0246】

図5に示すように、0.5mMの化合物O又は2mMの化合物Bのいずれかを組み込みミックスに添加することにより、SBSランにおいて同等のプリフェージング値が得られた。

【0247】

実施例5. iSeq (商標) プラットフォーム上での合成による配列決定に使用される Pdスカベンジャーチオ硫酸ナトリウム

Pd(II)スカベンジャーチオ硫酸ナトリウムの効率を、同じ濃度で以前に試験したPd(II)スカベンジャーL-システインに対して、IlluminaのiSeq(商標)で試験した。配列決定を、オンボードiSeq青色(約450nm)及び緑色(約520nm)励起源を使用する2励起/1発光SBS(又は2Ex SBS)を使用して実行した。100pMのPhiXを配列決定鑄型として使用した。Na₂PdCl₄切断ミックスを使用する、標準的な再利用、25秒の組み込み、及び14秒の切断時間を含む、等温65 2Ex SBS配列決定レシピを使用した。RTAデータを、Telescopeを使用して分析した。

【0248】

Pd(0)スカベンジャー化合物Bを組み込みミックス(IMX)に2mMで添加した。組み込みミックスの追加のコンポーネントは、(1)ffC-db-AOM-AOL-色素1、ffA-db-AOM-AOL-色素2、ffT-db-AOM-AOL-NR550S0、及びpppG-AOM(暗色G)を含む一連のヌクレオチド、(2)DNAポリメラーゼPoly1901、並びに(3)グリシン緩衝液を含む。チオ硫酸ナトリウム若しくはL-システインのいずれかを切断後洗浄緩衝液に10mMの最終濃度で添加したか、又は何も添加しなかった。

10

20

30

40

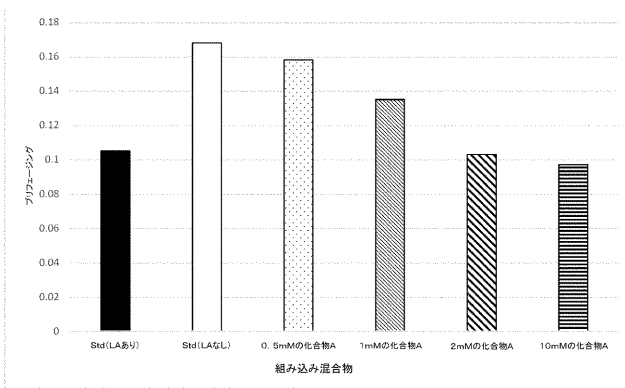
50

【 0 2 4 9 】

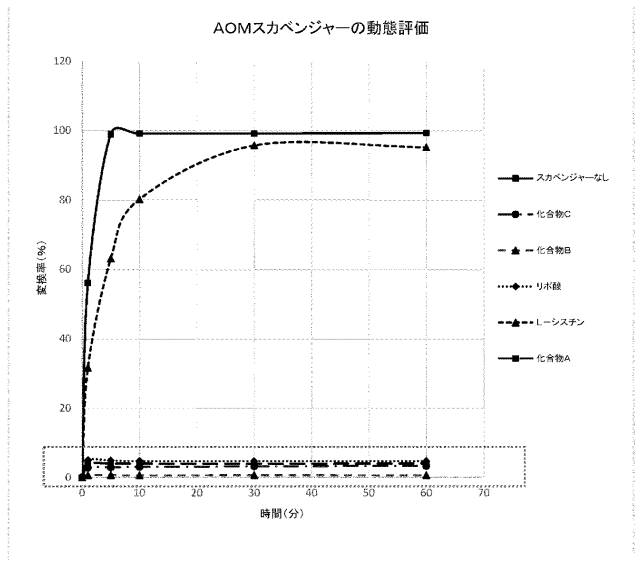
図 6 に示すように、Pd (I I) スカベンジャーを切断後洗浄緩衝液中で使用しなかった場合、フェージング値は、はるかに高かった。L - システイン又はチオ硫酸ナトリウムのいずれかを洗浄緩衝液に添加することにより、フェージングを改善することができた。

【 図 面 】

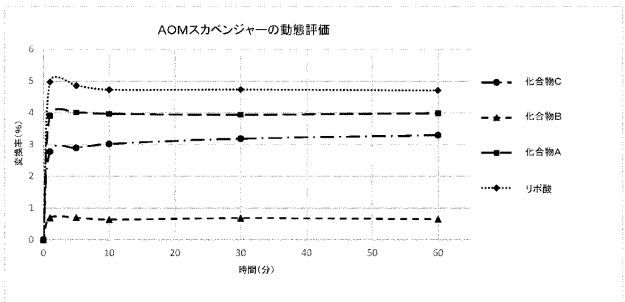
【 図 1 】



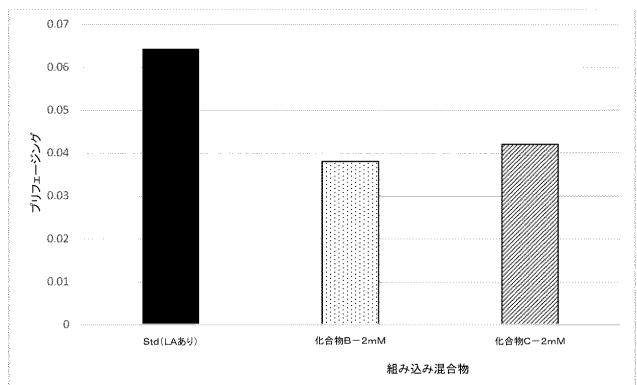
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 3 】



10

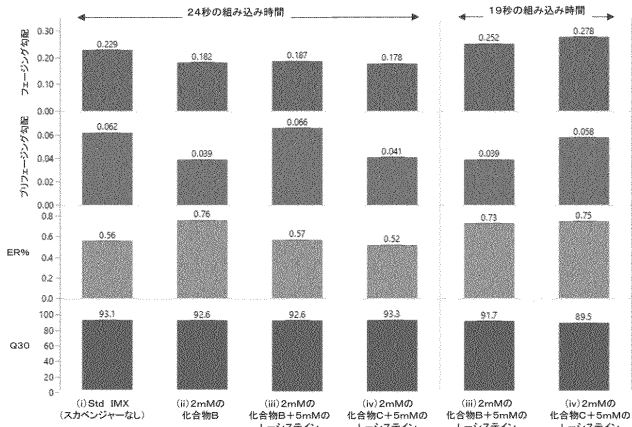
20

30

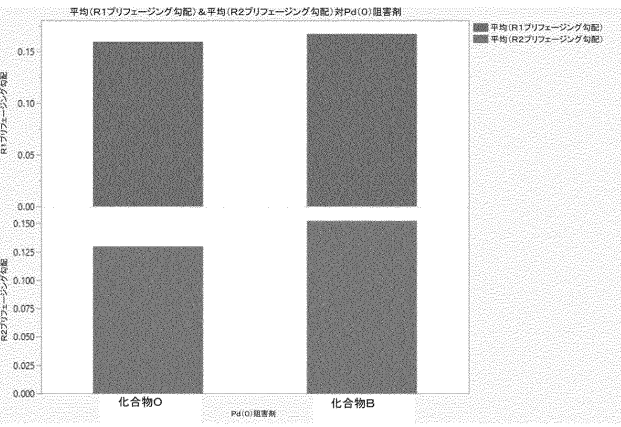
40

50

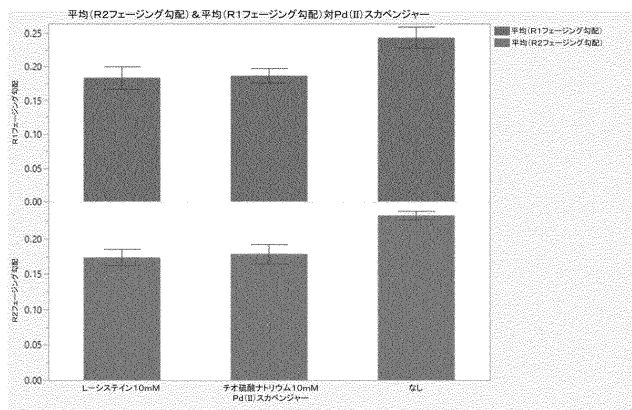
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/063647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6869
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/190569 A1 (GATTI-LAFRANCONI PIETRO	40
Y	[GB] ET AL) 18 June 2020 (2020-06-18)	
A	cited in the application	
	paragraph [0090]; claims 1,10; examples	1-11, 16,
	1-4	19-33,
	paragraph [0138]	37, 39
		12-15,
		17, 18,
		34-36, 38
Y	JP 2018 008186 A (MITSUBISHI CHEM CORP)	1-11, 16,
	18 January 2018 (2018-01-18)	19-33,
	paragraph [0001] - paragraph [0003]; claim	37, 39
	1	
	paragraph [0032] - paragraph [0034]	

	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2022

Date of mailing of the international search report

22/09/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tilkorn, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/063647

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/166705 A1 (MILTON JOHN [GB] ET AL) 19 July 2007 (2007-07-19) the whole document -----	1-40
X,P	US 2021/403500 A1 (FRANCAIS ANTOINE [GB] ET AL) 30 December 2021 (2021-12-30) paragraph [0168] - paragraph [0172] -----	1-10

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/063647

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020190569 A1	18-06-2020	AU 2019411266 A1 CA 3103744 A1 CN 112639125 A EP 3899040 A1 JP 2022512266 A KR 20210103932 A SG 11202012746X A US 2020190569 A1 WO 2020126593 A1	07-01-2021 25-06-2020 09-04-2021 27-10-2021 03-02-2022 24-08-2021 28-01-2021 18-06-2020 25-06-2020
JP 2018008186 A	18-01-2018	NONE	
US 2007166705 A1	19-07-2007	AU 2003259350 A1 CY 1120186 T1 DK 3002289 T3 DK 3363809 T3 DK 3587433 T3 EP 1530578 A2 EP 2607369 A1 EP 3002289 A1 EP 3363809 A1 EP 3587433 A1 EP 3795577 A1 ES 2407681 T3 ES 2550513 T3 GB 2395954 A JP 5748805 B2 JP 2006509040 A JP 2011088898 A JP 2014011999 A SI 3002289 T1 SI 3363809 T1 SI 3587433 T1 US 2007166705 A1 US 2009325172 A1 US 2010292452 A1 US 2012095201 A1 US 2013197209 A1 US 2016032378 A1 US 2016362737 A1 US 2020017908 A1 US 2020399692 A1 WO 2004018497 A2	11-03-2004 12-12-2018 23-04-2018 04-05-2020 18-05-2020 18-05-2005 26-06-2013 06-04-2016 22-08-2018 01-01-2020 24-03-2021 13-06-2013 10-11-2015 09-06-2004 15-07-2015 16-03-2006 06-05-2011 23-01-2014 31-07-2018 31-08-2020 31-08-2020 19-07-2007 31-12-2009 18-11-2010 19-04-2012 01-08-2013 04-02-2016 15-12-2016 16-01-2020 24-12-2020 04-03-2004
US 2021403500 A1	30-12-2021	US 2021403500 A1 WO 2021259881 A1	30-12-2021 30-12-2021

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,J
O,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,M
Z,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,
TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0、イルミナ
・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ユン, チョル スティーブン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0、イルミナ
・インコーポレイテッド内

(72)発明者 マリアーニ, アンジェリカ

英国シービー 2 1・6 ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グ
ランタ・パーク 1 9、イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

(72)発明者 フランセ, アントワーズ

英国シービー 2 1・6 ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グ
ランタ・パーク 1 9、イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

(72)発明者 トッピング, フレドリック ジェームズ

英国シービー 2 1・6 ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グ
ランタ・パーク 1 9、イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

(72)発明者 ウィナード, クリストファー

英国シービー 2 1・6 ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グ
ランタ・パーク 1 9、イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

(72)発明者 ボールディング, フィリップ

英国シービー 2 1・6 ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グ
ランタ・パーク 1 9、イルミナ・ケンブリッジ・リミテッド内

F ターム (参考) 4B063 QA13 QQ42 QQ52 QR08 QR62 QS34 QX02