

修饰的核苷或核苷酸

技术领域

本发明涉及核酸测序领域。具体地，本发明涉及修饰的核苷或核苷酸，所述修饰的核苷或核苷酸的 3'-OH 被可逆阻断。

背景技术

NGS 测序的出现克服了 Sanger 测序成本高、测序时间长等缺点，极大地推动了基因测序技术的应用。目前，NGS 测序已经在产前筛查、肿瘤诊断、肿瘤治疗、动植物育种等领域深度应用，带动了科技与医学的进步。

带有可逆阻断基团的核苷三磷酸（dNTP）类似物是 NGS 测序中关键原材料。由于可逆阻断基团的引入，使得 dNTP 中 3'-OH 基团可以保留，克服了 Sanger 测序中的缺点，同时保证了碱基识别的准确性。可以说带有可逆阻断基团的核苷三磷酸类似物（dNTP）是 NGS 测序中最为关键的技术。

目前已经有众多的带有可逆阻断基团的 dNTP 化合物被报道。实现 dNTP 可逆阻断主要通过两大类思路来实现。第一类思路是在 dNTP 的 3'-OH 直接引入可逆阻断基团，这类修饰的 dNTP 具有的优势是 3'-OH 的阻断保证了测序中的阻断效率。另一类思路是 3'-OH 不阻断，而是靠碱基的修饰进行聚合酶的阻断，这类策略的优势在阻断基团的修饰选择性更广，不受限于聚合酶。

总的来说，两类可逆阻断思路各有优缺点，但是直接在 3'-OH 引入基团阻断的方法更为可靠，其阻断效率明显更高。因此在目前已经商品化的 NGS 测序中，主要使用的这种方案。

发明内容

叠氮甲基是一类高效的 3'-OH 可逆阻断基团，它具有稳定性好、切除条件温和、切除速度快等巨大优势。仔细分析 3'-OH 叠氮甲基切除反应，其实质是一个串联反应（cascade reaction）。叠氮基团在磷试剂的作用下发生 Staudinger 反应后生成了中间体带有 3'-OH 亚甲胺基团，随后其发生快速的水解反应释放出 3'-OH 基团。在这个串联反应中，Staudinger 反应与水解反应都十分迅速，所以叠氮甲基的切除速度极快（如图 1 所示）。

叠氮基团是一类特殊的化学基团，其化学结构中三个氮原子形成共轭结构，处在一个平面。但是同时三个氮原子并未形成一条直线，而是形成了具有一定角度的折线结构。叠氮基团中三个氮原子形成的共轭结构有多个共振式，有利于其结构的稳定。

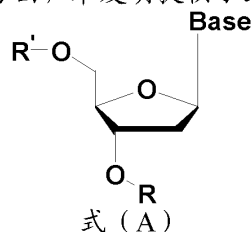
总的来说，叠氮基团具有一定的稳定性。但是由于三个氮原子的叠加结构，在合适的反应条件下，叠氮基团很容易发生反应并快速释放出氮气，因此叠氮基团具有很活泼的反应性与爆炸性风险。正是基于叠氮基团这个特点，它被广泛的应用于各种 Click reaction 中。

基于叠氮基团快速反应的特点，发明人设计了一类带有叠氮基团，可以发生串联反应的 3'-OH 阻断基团。这类 3'-OH 阻断基团利用 Staudinger 反应释放出氨基后，氨基对 3'-OH 基团的酯基/碳酸酯保护基进行进攻释放出 3'-OH（如图 2 所示）。以此类推，在合适条件下可以释放出亲核性原子的基团均适用于本设计，例如-S-SR 基团，-OCOR，-OCONHR 等。

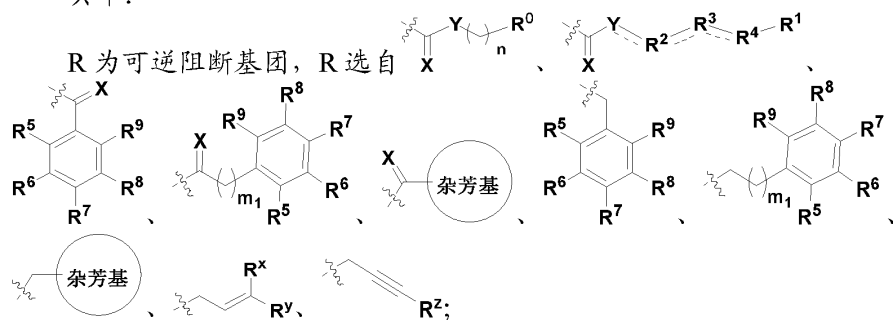
本发明旨在开发一类在 3'-OH 带有酯基、碳酸酯 dNTP 类似物用于 NGS 测序。这类 dNTP 类似物的结构通式如图 3 所示，可逆阻断基团保护 3'-OH，包

括 2'-脱氧尿苷三磷酸、2'-脱氧胸腺苷三磷酸、2'-脱氧胞苷三磷酸、2'-脱氧腺苷三磷酸、7-脱氮-2'-脱氧腺苷三磷酸、2'-脱氧鸟苷三磷酸与 7-脱氮-2'-脱氧鸟苷三磷酸的主体结构。

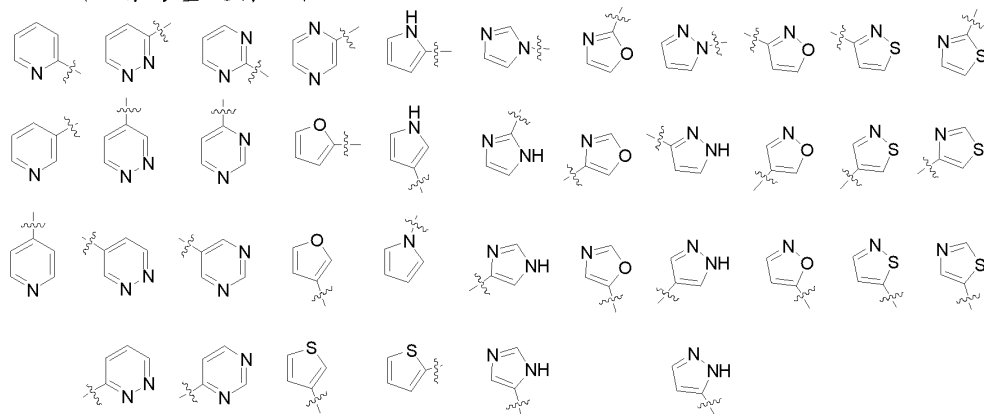
为此, 在本发明的第一方面, 本发明提供了式 (A) 所示的化合物或其盐,

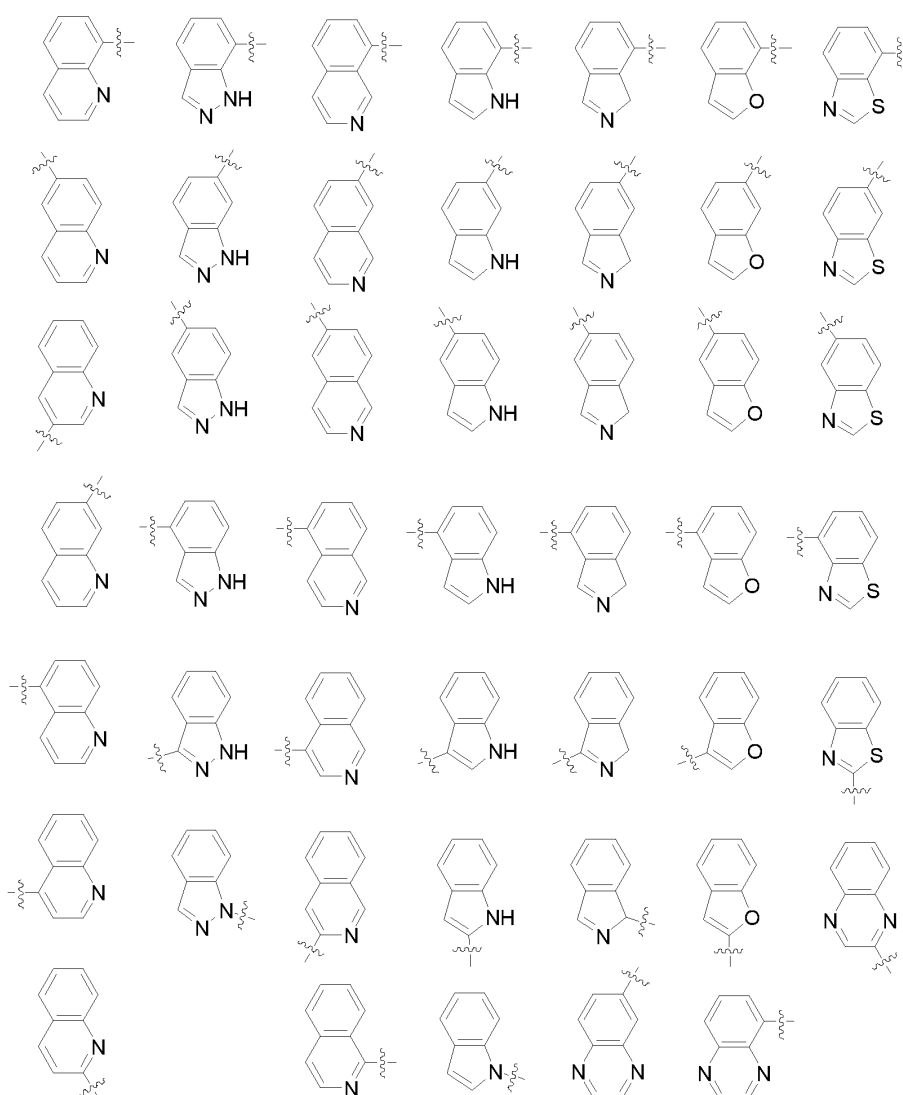


其中：



所述杂芳基选自以下:





，各杂芳基独立任选地被 1 个或多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2 个）R'' 所取代；

各 X 独立地选自 O、NH、S；

各 Y 独立地选自直接键、O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂；

R⁰ 选自 -N₃、-SS-C1-C6 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基）、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m，其中，各 R^m 独立地选自脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）或芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）；

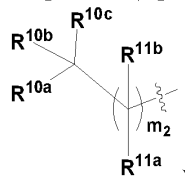
R¹ 选自 -N₃、-SS-C1-C6 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基）、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m，其中，各 R^m 独立地选自脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）或芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）；

R²、R³、R⁴ 各自独立地选自 O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂；

—表示单键——或双键=；

各 R'' 独立地选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如

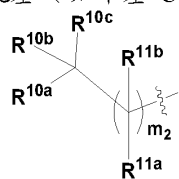
C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷



基)、F、I、Br、Cl、烷氧基(如 C1-C6 烷氧基)、

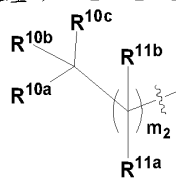
$\text{X}-\text{R}^{12}$, 且不同时为 H;

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^x 、 R^y 、 R^z 各自独立地选自 H、 $-\text{N}_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基(如 C1-C6 烷氧



基)、 $\text{X}-\text{R}^{12}$, 且 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 不同时为 H;

或者, R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^x 、 R^y 、 R^z 各自独立地选自 H、 $-\text{N}_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基(如 C1-C6



烷氧基)、C1-C6 烷基- $\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ -、

R^7 、 R^8 、 R^9 不同时为 H;

R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 、 R^{11a} 、 R^{11b} 、 R^{12} 各自独立地选自 H、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SS}-\text{C1-C6}$ 烷基(如 $-\text{SS}-\text{甲基}$ 、 $-\text{SS}-\text{乙基}$ 、 $-\text{SS}-\text{异丙基}$ 、 $-\text{SS}-\text{叔丁基}$ 或 $-\text{SS}-\text{异丁基}$)、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{OCOR}^m$ 、 $-\text{OCONHR}^m$ 、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基, 具体如甲基 Me、乙基 Et、异丙基 iPr、叔丁基 tBu)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基), 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)或芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基), 且 R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 不同时为 H;

n 选自 1、2、3、4、5;

各 m_1 独立地选自 1、2、3、4、5、6;

各 m_2 独立地选自 0、1、2、3、4、5、6;

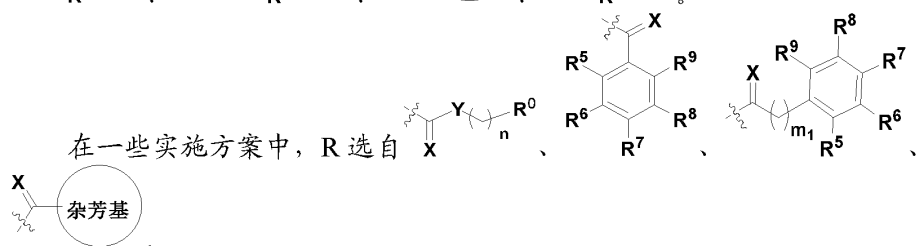
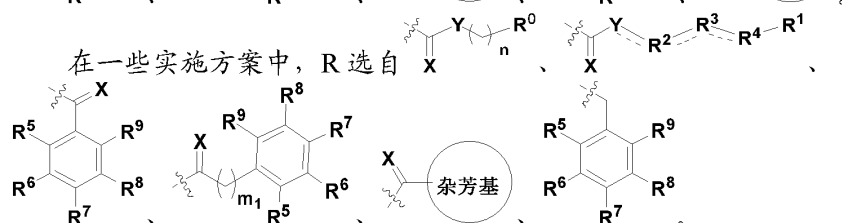
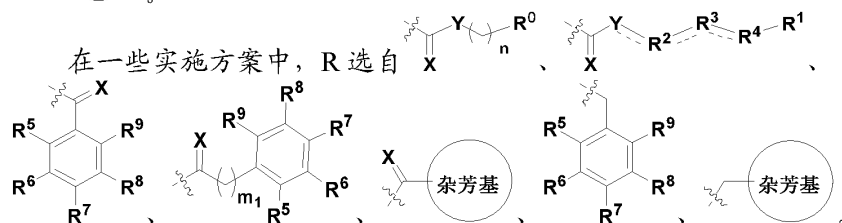
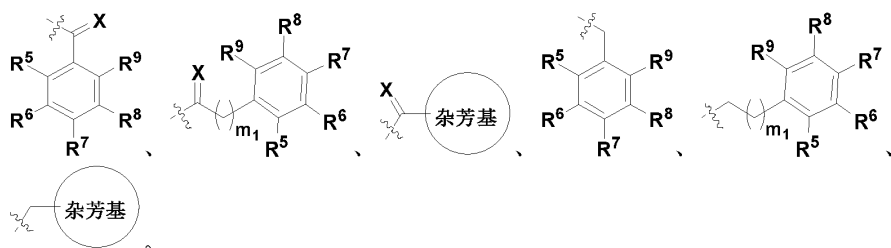
R^1 选自 H, 单磷酸基团 ($\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$), 二磷酸基团 ($\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$), 三磷酸基团 ($\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$);

或四磷酸基团 ($\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$);

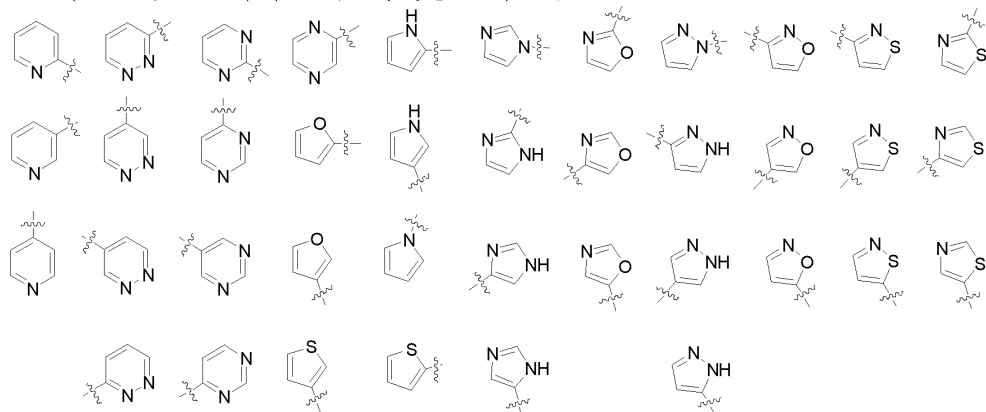
各 Z 独立地选自 O, S, BH;

Base 选自碱基、脱氮碱基或其互变异构体, 例如 Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体。

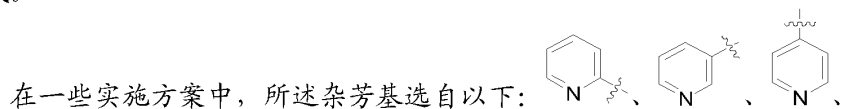
在一些实施方案中, R 选自 $\text{X}-\text{Y}(\text{R}^0)_n$ 、 $\text{X}-\text{Y}=\text{R}^2-\text{R}^3-\text{R}^4-\text{R}^1$ 、

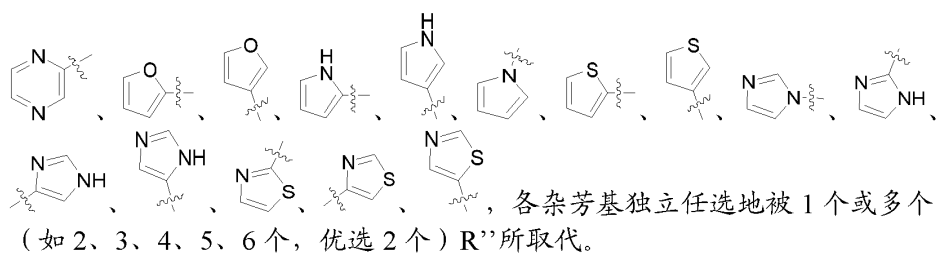


在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：



，各杂芳基独立任选地被1个或多个（如2、3、4、5、6个，优选2个）R''所取代。





在一些实施方案中, 所述杂芳基选自以下:

各杂芳基独立任选地被 1 个或多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代。

在一些实施方案中, 所述杂芳基选自以下:

各杂芳基独立任选地被 1 个或多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代。

在一些实施方案中, X 为 O 。

在一些实施方案中, 各 Y 独立地选自直接键、 CH_2 。

在一些实施方案中, R^0 为 $-N_3$ 或 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS$ -甲基, $-SS$ -乙基, $-SS$ -异丙基, $-SS$ -叔丁基)。

在一些实施方案中, R^0 为 $-N_3$ 。

在一些实施方案中, R^1 为 $-N_3$ 或 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS$ -甲基, $-SS$ -乙基, $-SS$ -异丙基, $-SS$ -叔丁基)。

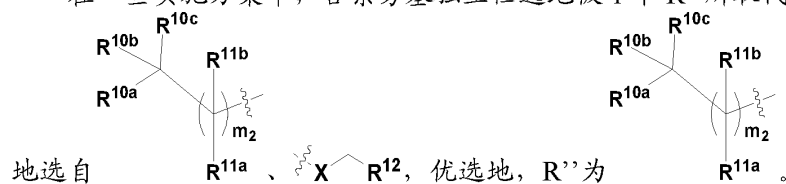
在一些实施方案中, R^1 为 $-N_3$ 。

在一些实施方案中, R^2 、 R^3 、 R^4 各自独立地选自 O 、 NH 、 S 、 CH 、 CH_2 、 $C(CH_3)_2$, 且满足以下条件: R^2 选自 O 、 S 时, R^3 和 R^4 为 CH_2 ; R^3 选自 O 、 S 时, R^2 和 R^4 为 CH_2 ; R^4 选自 O 、 S 时, R^2 和 R^3 为 CH_2 ; R^2 为 $C(CH_3)_2$ 时, R^3 和 R^4 为 CH_2 ; R^3 为 $C(CH_3)_2$ 时, R^2 和 R^4 为 CH_2 ; R^4 为 $C(CH_3)_2$ 时, R^2 和 R^3 为 CH_2 ; Y 为 CH 时, R^2 为 CH , R^3 和 R^4 为 CH_2 。

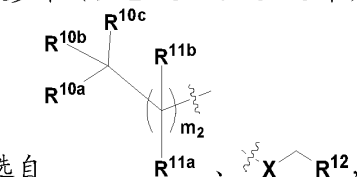
在一些实施方案中, R^2 、 R^3 、 R^4 各自独立地选自 CH 、 CH_2 。

在一些实施方案中, R^2 和 R^3 为 CH , R^4 为 CH_2 。

在一些实施方案中, 各杂芳基独立任选地被 1 个 R'' 所取代时, 各 R'' 独立



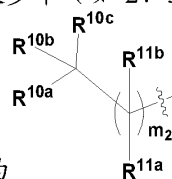
在一些实施方案中, 各杂芳基独立任选地被多个 (如 2、3、4、5、6 个,



优选 2 个) R'' 所取代时, 多个 R'' 中, 1 个 R'' 选自
 剩余 R'' 各自独立地选自 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 $C1-C6$ 烷基)、环烷基 (如 $C3-C6$ 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 $C1-C6$ 烷

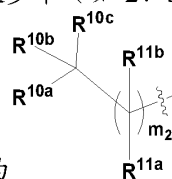
基)、F、I、Br、Cl、烷氧基(如C1-C6烷氧基)。

在一些实施方案中,各杂芳基独立任选地被多个(如2、3、4、5、6个,



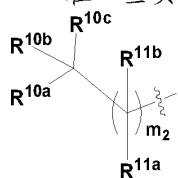
优选2个)R''所取代时,多个R''中,1个R''为独立地选自硝基、脂肪族烷基(如C1-C6烷基)、F、I、Br、Cl。

在一些实施方案中,各杂芳基独立任选地被多个(如2、3、4、5、6个,



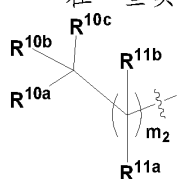
优选2个)R''所取代时,多个R''中,1个R''为独立地选自硝基、C1-C6烷基,优选地,剩余R''为C1-C6烷基。

在一些实施方案中,R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中的任意一个选自



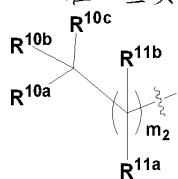
R^{11a}、X-R¹²,其余四个各自独立地选自H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基(如C1-C6烷基)、环烷基(如C3-C6环烷基)、芳香族烷基(如苯基C1-C6烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基(如C1-C6烷氧基)。

在一些实施方案中,R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中的任意一个选自



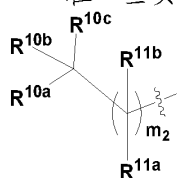
R^{11a}、X-R¹²,其余四个各自独立地选自H、硝基、C1-C6烷基。

在一些实施方案中,R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中,R⁵、R⁷或R⁹选自

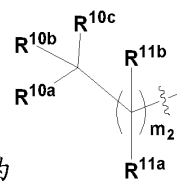


R^{11a}、X-R¹²,其余四个各自独立地选自H、硝基。

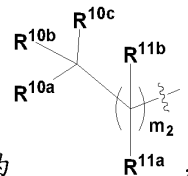
在一些实施方案中,R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中的任意一个选自



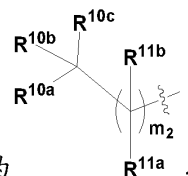
R^{11a}、X-R¹²,其余四个各自独立地选自H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基(如C1-C6烷基)、环烷基(如C3-C6环烷基)、芳香族烷基(如苯基C1-C6烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基(如C1-C6烷氧基)、C1-C6烷基-C(=O)-NH₂-。



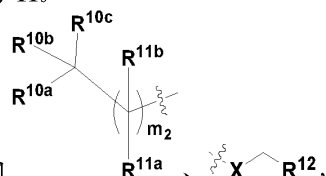
在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个为其余四个各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷基-C(=O)-NH₂-。



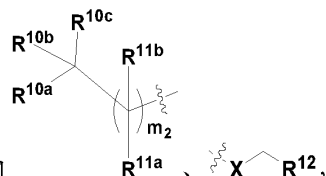
在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中， R^5 或 R^9 为其余四个各自独立地选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基。



在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中， R^5 或 R^9 为 R^7 选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基，其余三个为 H。

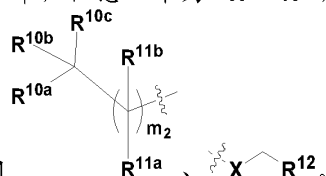


在一些实施方案中， R^x 、 R^y 中，任意一个选自另一个选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）。



在一些实施方案中， R^x 、 R^y 中，任意一个选自另一个为 H。

在一些实施方案中， R^x 、 R^y 中，任意一个为 $X-R^{12}$ ，另一个为 H。

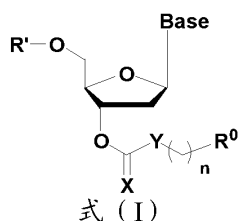


在一些实施方案中， R^z 选自

在一些实施方案中， R^z 为 $X-R^{12}$ 。

在一些实施方案中， R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个选自-N₃、-SS-C1-C6 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基或-SS-异丁基）、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m，另两个各自独立地选自 H、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基，具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基），其中，各 R^m独立地选自脂肪族烷基（如

C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)或芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)。



其中:

X 选自 O、NH、S;

Y 选自直接键、O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂;

R⁰ 选自 -N₃、-SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基, -SS-乙基, -SS-异丙基, -SS-叔丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m, 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基);

n 选自 1、2、3、4、5;

R' 选自 H, 单磷酸基团 (), 二磷酸基团 (), 三磷酸基团 (), 或四磷酸基团 ();

各 Z 独立地选自 O, S, BH;

Base 选自碱基、脱氮碱基或其互变异构体, 例如 Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体。

在一些实施方案中, X 为 O。

在一些实施方案中, Y 为 CH₂。

在一些实施方案中, R⁰ 为 -N₃ 或 -SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基, -SS-乙基, -SS-异丙基, -SS-叔丁基)。

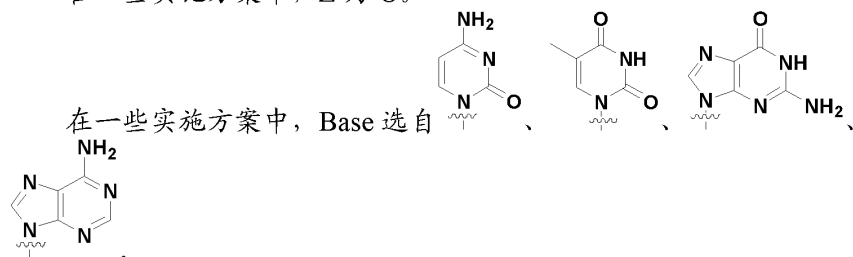
在一些实施方案中, R⁰ 为 -N₃。

在一些实施方案中, n 选自 1、2、3。

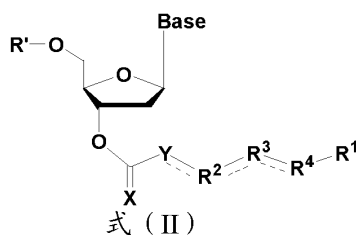
在一些实施方案中, n 为 2。

在一些实施方案中, R' 为三磷酸基团 ().

在一些实施方案中, Z 为 O。



在本发明的第三方面, 本发明提供了式 (II) 所示化合物或其盐,



其中:

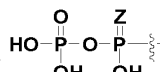
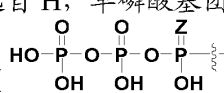
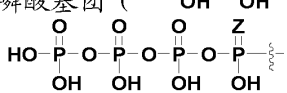
X 选自 O、NH、S;

Y 选自直接键、O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂;

R¹ 选自 -N₃、-SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基, -SS-乙基, -SS-异丙基, -SS-叔丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m, 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基);

R²、R³、R⁴ 各自独立地选自 O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂;

== 表示单键 — 或双键 =;

R' 选自 H, 单磷酸基团 () , 二磷酸基团 () , 三磷酸基团 () 或四磷酸基团 () ;

各 Z 独立地选自 O, S, BH;

Base 选自碱基、脱氮碱基或其互变异构体, 例如 Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体。

在一些实施方案中, X 为 O。

在一些实施方案中, Y 为直接键。

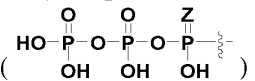
在一些实施方案中, R¹ 为 -N₃ 或 -SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基, -SS-乙基, -SS-异丙基, -SS-叔丁基)。

在一些实施方案中, R¹ 为 -N₃。

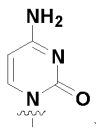
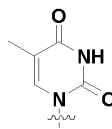
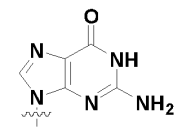
在一些实施方案中, R²、R³、R⁴ 各自独立地选自 O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂, 且满足以下条件: R² 选自 O、S 时, R³ 和 R⁴ 为 CH₂; R³ 选自 O、S 时, R² 和 R⁴ 为 CH₂; R⁴ 选自 O、S 时, R² 和 R³ 为 CH₂; R² 为 C(CH₃)₂ 时, R³ 和 R⁴ 为 CH₂; R³ 为 C(CH₃)₂ 时, R² 和 R⁴ 为 CH₂; R⁴ 为 C(CH₃)₂ 时, R² 和 R³ 为 CH₂; Y 为 CH 时, R² 为 CH, R³ 和 R⁴ 为 CH₂。

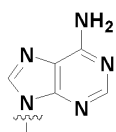
在一些实施方案中, R²、R³、R⁴ 各自独立地选自 CH、CH₂。

在一些实施方案中, R² 和 R³ 为 CH, R⁴ 为 CH₂。

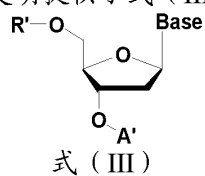
在一些实施方案中, R' 为三磷酸基团 ()。

在一些实施方案中, Z 为 O。

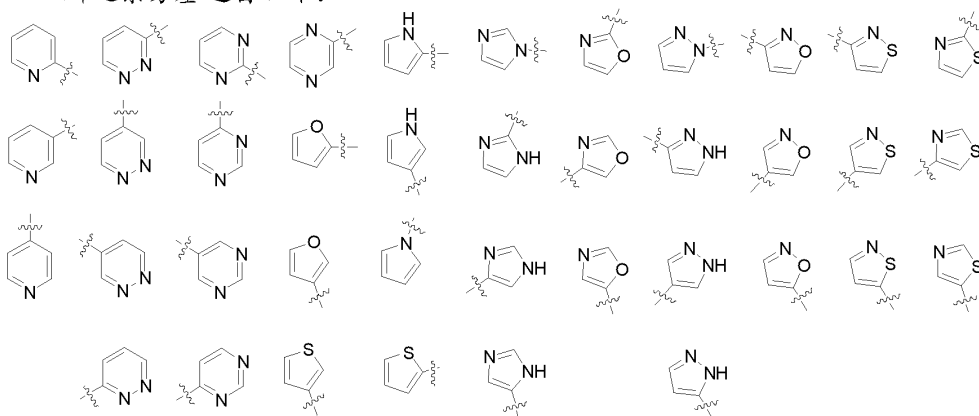
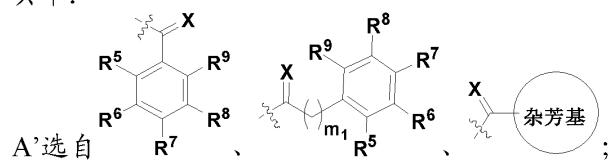
在一些实施方案中, Base 选自 、、、

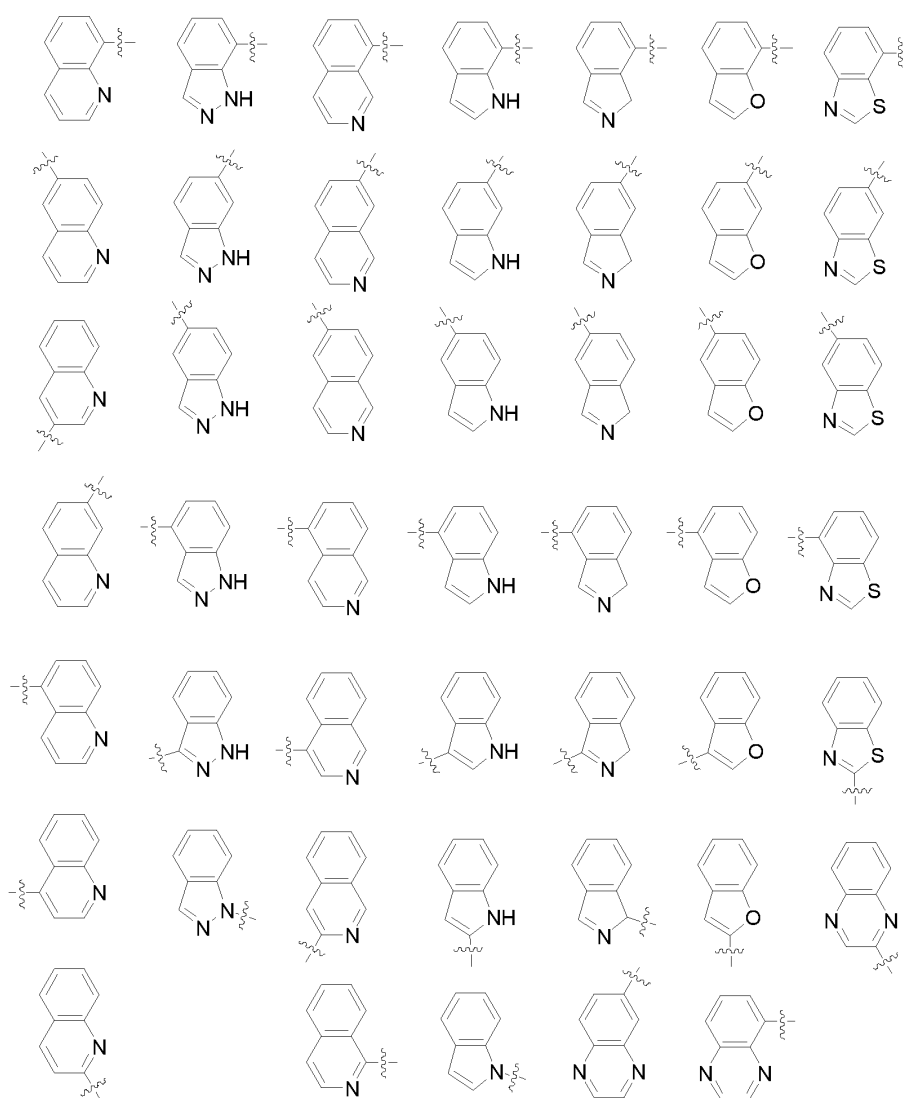


在本发明的第四方面，本发明提供了式（III）所示化合物或其盐，



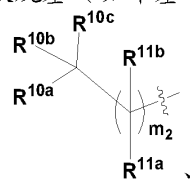
其中：





，各杂芳基独立任选地被 1 个或多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2 个）R'' 所取代；

各 R'' 独立地选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷

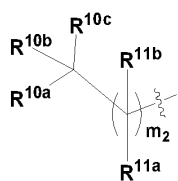


基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、

$\text{X}-\text{R}^{12}$;

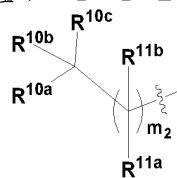
X 选自 O、NH、S；

R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹ 各自独立地选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、



、 $\text{X}-\text{R}^{12}$ ，且 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 不同时为 H；

或者， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 各自独立地选自 H、 $-\text{N}_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、C1-



C6 烷基- $\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ -、
同时为 H；

R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 、 R^{11a} 、 R^{11b} 、 R^{12} 各自独立地选自 H、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SS}-\text{C1-C6}$ 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基或-SS-异丁基）、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{OCOR}^m$ 、 $-\text{OCONHR}^m$ 、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基，具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基），其中，各 R^m 独立地选自脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）或芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基），且 R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 不同时为 H；

m_1 选自 1、2、3、4、5、6；

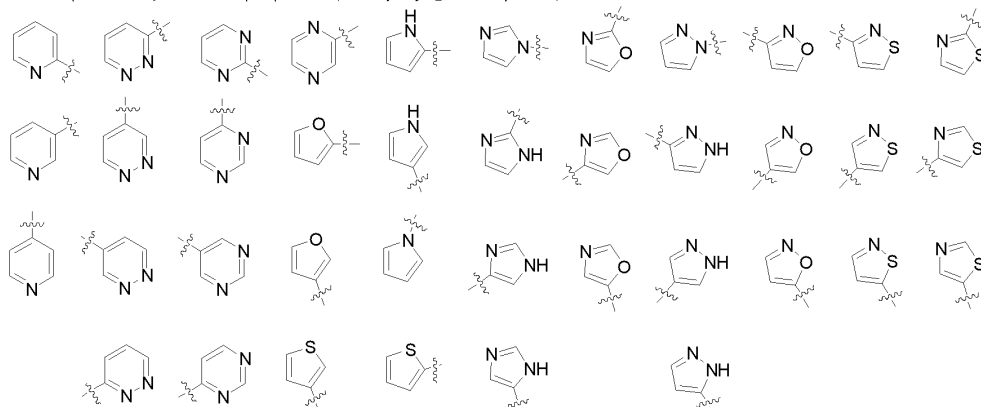
m_2 选自 0、1、2、3、4、5、6；

R' 选自 H，单磷酸基团（ $\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$ ），二磷酸基团（ $\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$ ），三磷酸基团（ $\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$ ）或四磷酸基团（ $\text{HO}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})-\text{O}-\text{P}(\text{OH})(\text{Z})$ ）；

各 Z 独立地选自 O，S，BH；

Base 选自碱基、脱氮碱基或其互变异构体，例如 Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体。

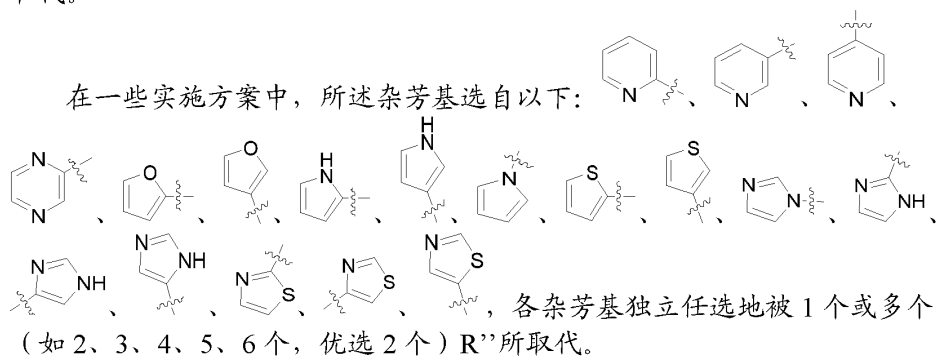
在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：



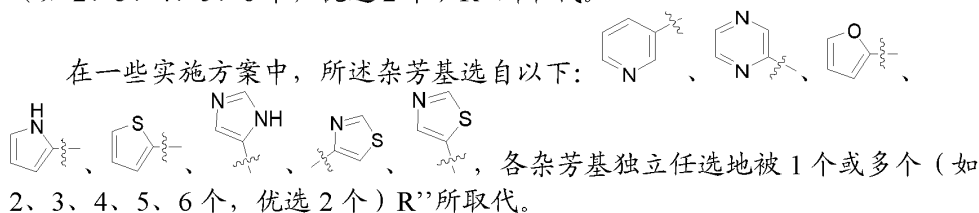
，各杂芳基独立任选地被 1 个或多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2 个） R'' 所

取代。

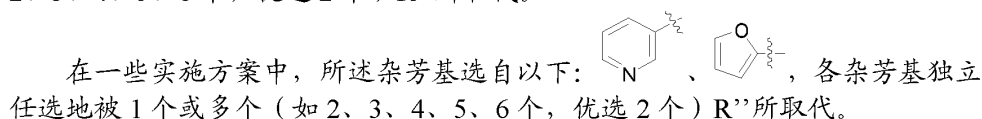
在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：



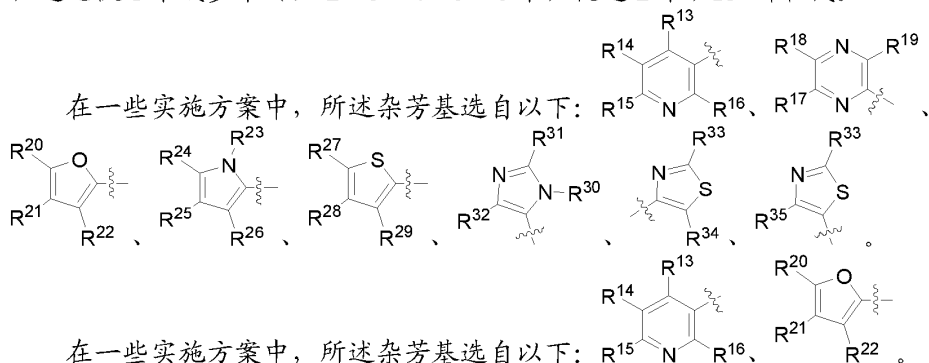
在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：



在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：

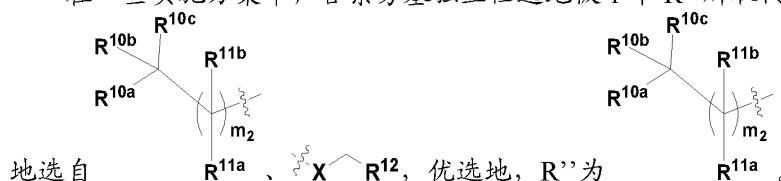


在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：

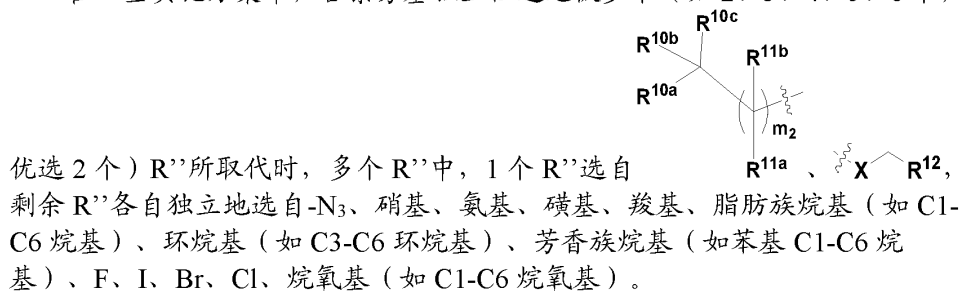


在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：

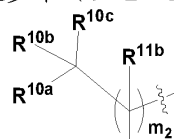
在一些实施方案中，各杂芳基独立任选地被 1 个 R'' 所取代时，各 R'' 独立



在一些实施方案中，各杂芳基独立任选地被多个 (如 2、3、4、5、6 个，

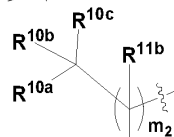


在一些实施方案中，各杂芳基独立任选地被多个（如 2、3、4、5、6 个，

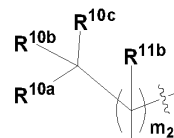


优选 2 个) R'' 所取代时，多个 R'' 中，1 个 R'' 为 R''，剩余 R'' 各自独立地选自硝基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl。

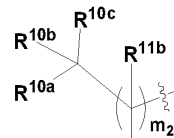
在一些实施方案中，各杂芳基独立任选地被多个（如 2、3、4、5、6 个，



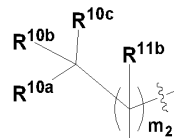
优选 2 个) R'' 所取代时，多个 R'' 中，1 个 R'' 为 R''，剩余 R'' 各自独立地选自硝基、C1-C6 烷基，优选地，剩余 R'' 为 C1-C6 烷基，更优选地，剩余 R'' 为甲基。



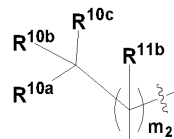
在一些实施方案中，R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶ 中，R¹⁶ 为 R¹⁶，R¹³、R¹⁴、R¹⁵ 各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）。



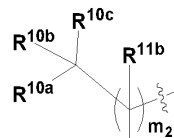
在一些实施方案中，R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶ 中，R¹⁶ 为 R¹⁶，R¹³、R¹⁴、R¹⁵ 为 H。



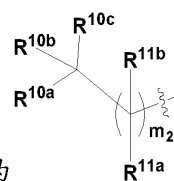
在一些实施方案中，R¹⁷、R¹⁸、R¹⁹ 中，R¹⁹ 为 R¹⁹，R¹⁷、R¹⁸ 各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）。



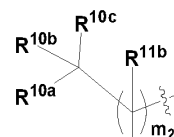
在一些实施方案中，R¹⁷、R¹⁸、R¹⁹ 中，R¹⁹ 为 R¹⁹，R¹⁷、R¹⁸ 为 H。



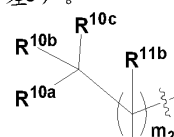
在一些实施方案中，R²⁰、R²¹、R²² 中，R²² 为 R²²，R²⁰、R²¹ 各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）。



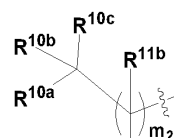
在一些实施方案中， R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 中， R^{22} 为 H。 R^{20} 、 R^{21} 为



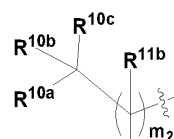
在一些实施方案中， R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 中， R^{26} 为 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）。



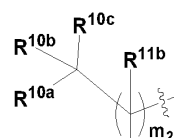
在一些实施方案中， R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 中， R^{26} 为 R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 为 H。



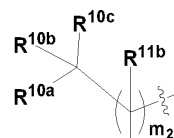
在一些实施方案中， R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 中， R^{29} 为 R^{27} 、 R^{28} 各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）。



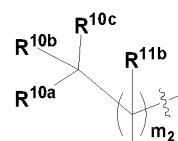
在一些实施方案中， R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 中， R^{29} 为 H。 R^{27} 、 R^{28} 为



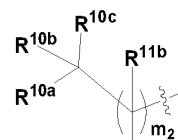
在一些实施方案中， R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} 中， R^{32} 为 R^{30} 、 R^{31} 各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）。



在一些实施方案中， R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} 中， R^{32} 为 H。 R^{30} 、 R^{31} 为



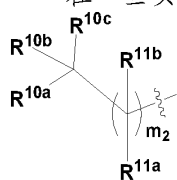
在一些实施方案中， R^{33} 、 R^{34} 、 R^{35} 中， R^{34} 或 R^{35} 为自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）。



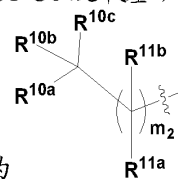
在一些实施方案中， R^{33} 、 R^{34} 、 R^{35} 中， R^{34} 或 R^{35} 为 H 或甲基。

在一些实施方案中，X 为 O。

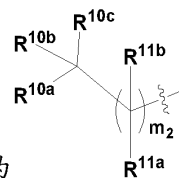
在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个选自



R^{11a} 、 $X-R^{12}$ ，其余四个各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）。

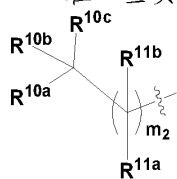


在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个为其余四个各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基。

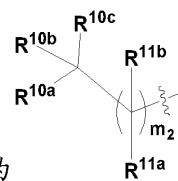


在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中， R^5 或 R^9 为其余四个各自独立地选自 H、硝基。

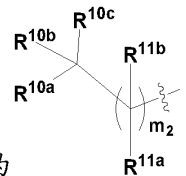
在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个选自



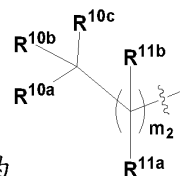
R^{11a} 、 $X-R^{12}$ ，其余四个各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、C1-C6 烷基-C(=O)-NH₂-。



在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个为其余四个各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷基-C(=O)-NH₂-。



在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中， R^5 或 R^9 为其余四个各自独立地选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基。



在一些实施方案中， R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中， R^5 或 R^9 为 R^7 选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基，其余三个为 H。

在一些实施方案中， R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个选自-N₃、-SS-C1-C6 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基或-SS-异丁基）、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m，另两个各自独立地选自 H、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基，具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基），其中，各 R^m独立地选自脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）或芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）。

在一些实施方案中， R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个为-N₃或-SS-C1-C6 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基或-SS-异丁基），另两个各自独立地选自 H、C1-C6 烷基（如甲基、乙基、异丙基、叔丁基）。

在一些实施方案中， R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个为-N₃或-SS-甲基，另两个各自独立地选自 H、甲基。

在一些实施方案中， R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个为-N₃、-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基、-SS-异丁基，另两个各自独立地选自 H、甲基。

在一些实施方案中， R^{11a} 、 R^{11b} 各自独立地选自 H、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基，具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基）。

在一些实施方案中， R^{11a} 、 R^{11b} 为 H。

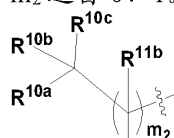
在一些实施方案中， R^{12} 选自-N₃、-SS-C1-C6 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基）、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m，其中，各 R^m独立地选自脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）或芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）。

在一些实施方案中， R^{12} 为-N₃或-SS-C1-C6 烷基（如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基）。

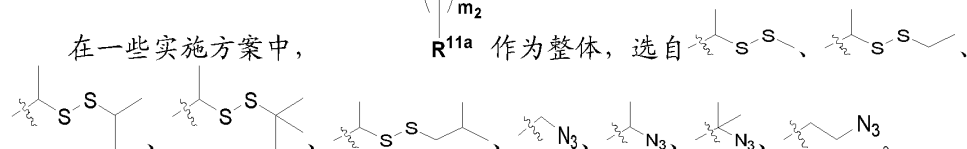
在一些实施方案中， R^{12} 为-N₃。

在一些实施方案中， m_1 为 1。

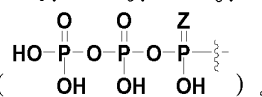
在一些实施方案中, m_2 选自 0、1。



在一些实施方案中,

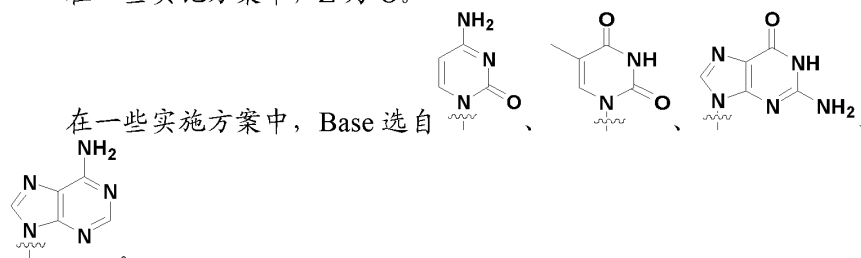


在一些实施方案中, R' 为三磷酸基团 (

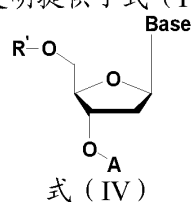


在一些实施方案中, Z 为 O。

在一些实施方案中, Base 选自

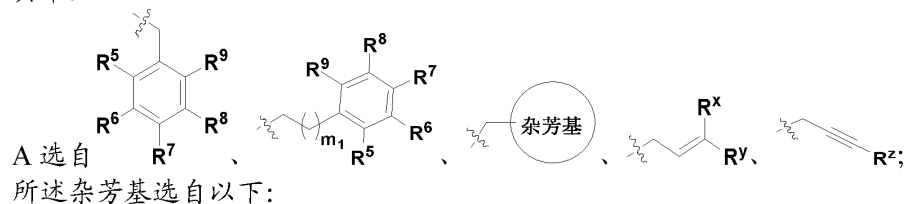


在本发明的第五方面, 本发明提供了式 (IV) 所示化合物或其盐,

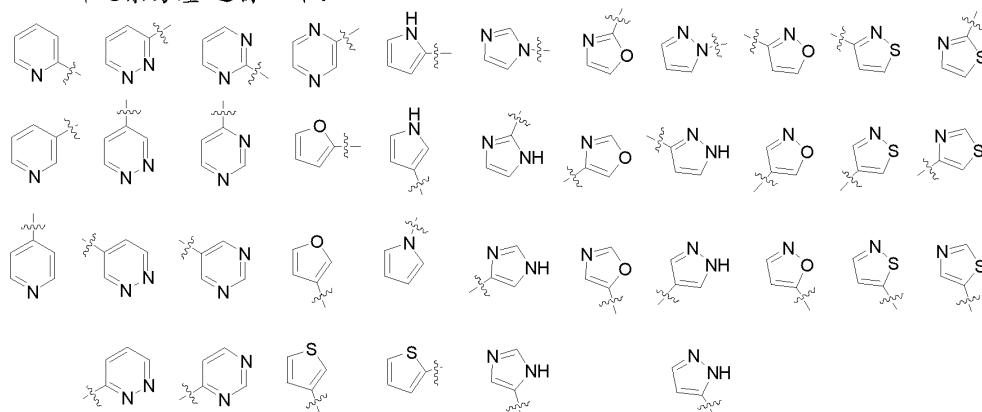


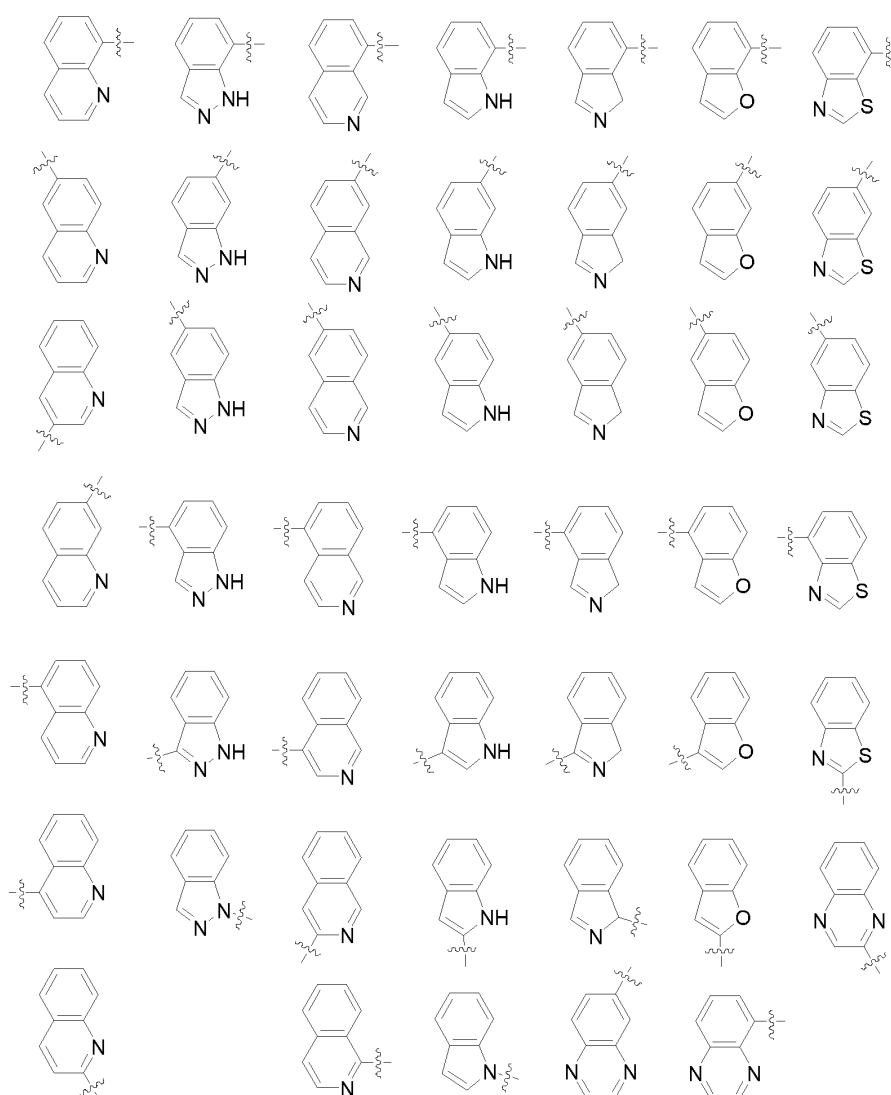
式 (IV)

其中:



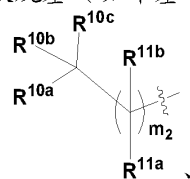
所述杂芳基选自以下:





，各杂芳基独立任选地被 1 个或多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2 个）R'' 所取代；

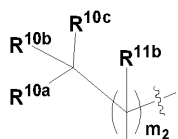
各 R'' 独立地选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷



基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、

$\text{X}-\text{R}^{12}$;

R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R^x、R^y、R^z 各自独立地选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧



基)、 R^{11a} 、 X 、 R^{12} , 且 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 不同时为 H;

R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 、 R^{11a} 、 R^{11b} 、 R^{12} 各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS$ -甲基、 $-SS$ -乙基、 $-SS$ -异丙基、 $-SS$ -叔丁基)、 $-ONH_2$ 、 $-OCOR^m$ 、 $-OCONHR^m$ 、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基), 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基), 且 R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 不同时为 H;

X 选自 O、NH、S;

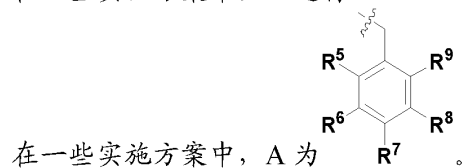
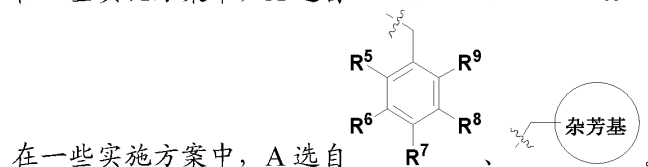
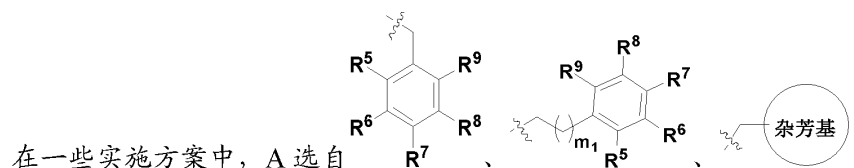
m_1 选自 1、2、3、4、5、6;

m_2 选自 0、1、2、3、4、5、6;

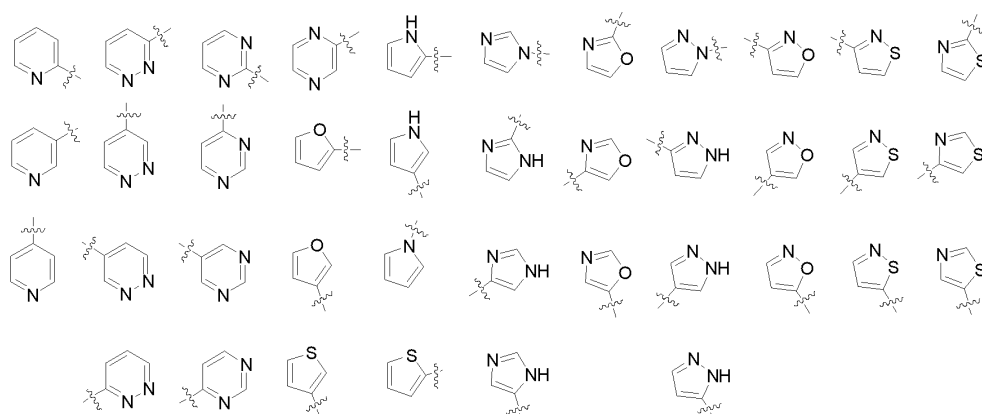
R' 选自 H, 单磷酸基团 ($HO-P(=O)(OH)-$), 二磷酸基团 ($HO-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-$), 三磷酸基团 ($HO-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-$) 或四磷酸基团 ($HO-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-$);

各 Z 独立地选自 O、S、BH;

Base 选自碱基、脱氮碱基或其互变异构体, 例如 Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体。

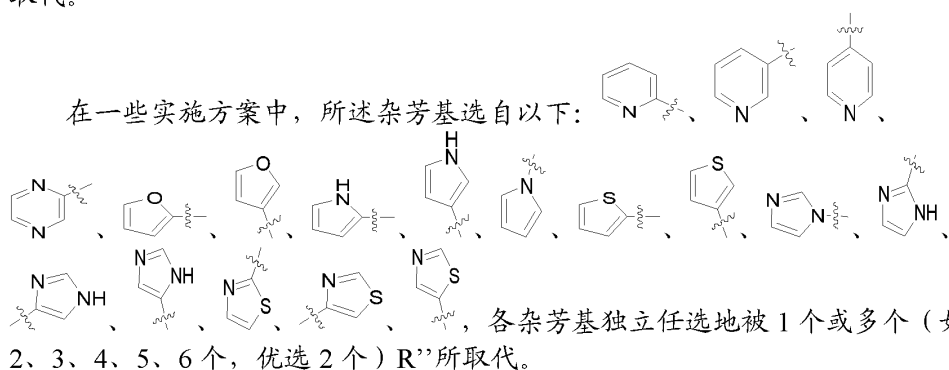


在一些实施方案中, 所述杂芳基选自以下:

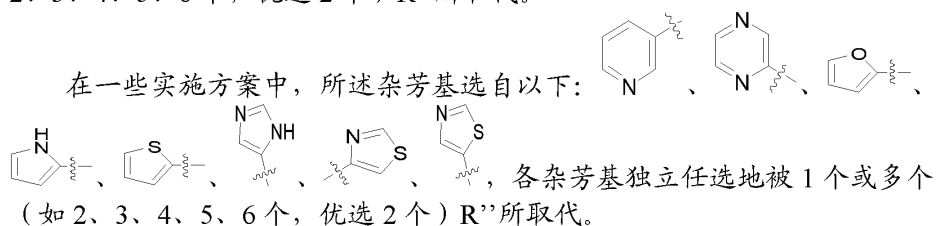


，各杂芳基独立任选地被 1 个或多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2 个）R'' 所取代。

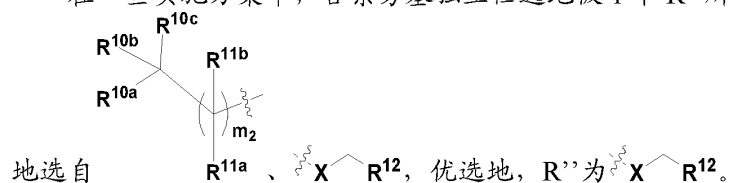
在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：



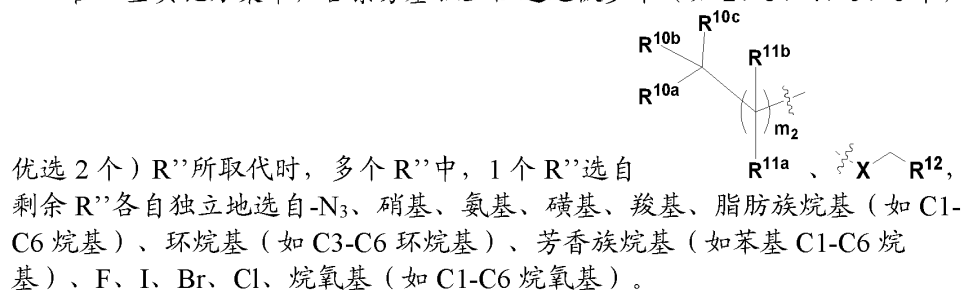
在一些实施方案中，所述杂芳基选自以下：



在一些实施方案中，各杂芳基独立任选地被 1 个 R'' 所取代时，各 R'' 独立



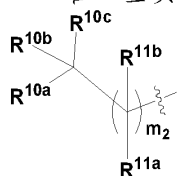
在一些实施方案中，各杂芳基独立任选地被多个（如 2、3、4、5、6 个，



在一些实施方案中, 各杂芳基独立任选地被多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代时, 多个 R'' 中, 1 个 R'' 为 $\text{X}-R^{12}$, 剩余 R'' 各自独立地选自硝基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl。

在一些实施方案中, 各杂芳基独立任选地被多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代时, 多个 R'' 中, 1 个 R'' 为 $\text{X}-R^{12}$, 剩余 R'' 各自独立地选自硝基、C1-C6 烷基, 优选地, 剩余 R'' 为 C1-C6 烷基。

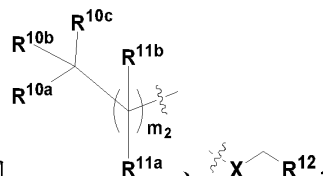
在一些实施方案中, R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个选自



R^{11a} 、 $\text{X}-R^{12}$, 其余四个各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基)。

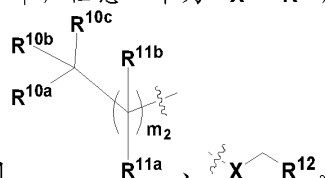
在一些实施方案中, R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个为 $\text{X}-R^{12}$, 其余四个各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基。

在一些实施方案中, R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中, R^7 为 $\text{X}-R^{12}$, 其余四个为 H。



在一些实施方案中, R^x 、 R^y 中, 任意一个选自另一个选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基)。

在一些实施方案中, R^x 、 R^y 中, 任意一个为 $\text{X}-R^{12}$, 另一个为 H。



在一些实施方案中, R^z 选自

在一些实施方案中, R^z 为 $\text{X}-R^{12}$ 。

在一些实施方案中, R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个选自 $-N_3$ 、 $-SS$ -C1-C6 烷基 (如 $-SS$ -甲基, $-SS$ -乙基, $-SS$ -异丙基, $-SS$ -叔丁基)、 $-ONH_2$ 、 $-OCOR^m$ 、 $-OCONHR^m$, 另两个各自独立地选自 H、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基), 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)。

在一些实施方案中, R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个为 $-N_3$ 或 $-SS$ -C1-C6 烷基 (如 $-SS$ -甲基, $-SS$ -乙基, $-SS$ -异丙基, $-SS$ -叔丁基), 另两个各自独立地选自 H、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基)。

在一些实施方案中, R^{11a} 、 R^{11b} 各自独立地选自 H、脂肪族烷基 (如 C1-C6

烷基，具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基）。

在一些实施方案中， R^{11a} 、 R^{11b} 为 H。

在一些实施方案中， R^{12} 选自 $-N_3$ 、 $-SS-C1-C6$ 烷基（如 $-SS$ -甲基、 $-SS$ -乙基、 $-SS$ -异丙基、 $-SS$ -叔丁基）、 $-ONH_2$ 、 $-OCOR^m$ 、 $-OCONHR^m$ ，其中，各 R^m 独立地选自脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）或芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）。

在一些实施方案中， R^{12} 为 $-N_3$ 或 $-SS-C1-C6$ 烷基（如 $-SS$ -甲基、 $-SS$ -乙基、 $-SS$ -异丙基、 $-SS$ -叔丁基）。

在一些实施方案中， R^{12} 为 $-N_3$ 。

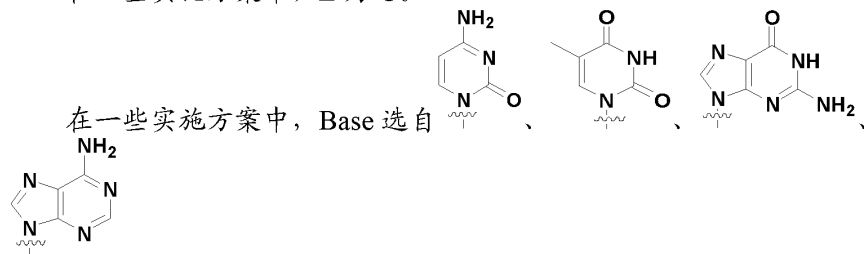
在一些实施方案中，X 为 O。

在一些实施方案中， m_1 为 1。

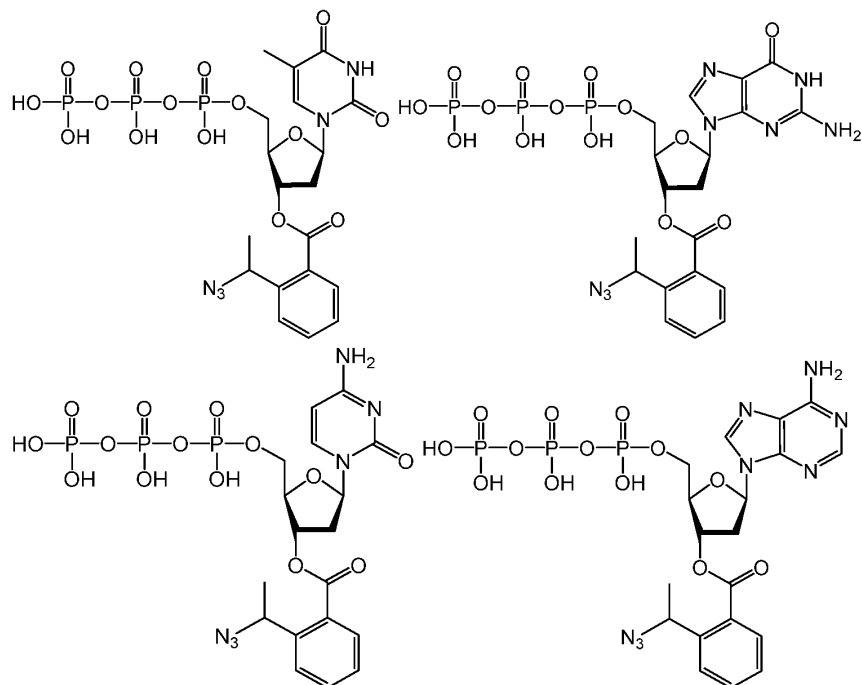
在一些实施方案中， m_2 选自 0、1。

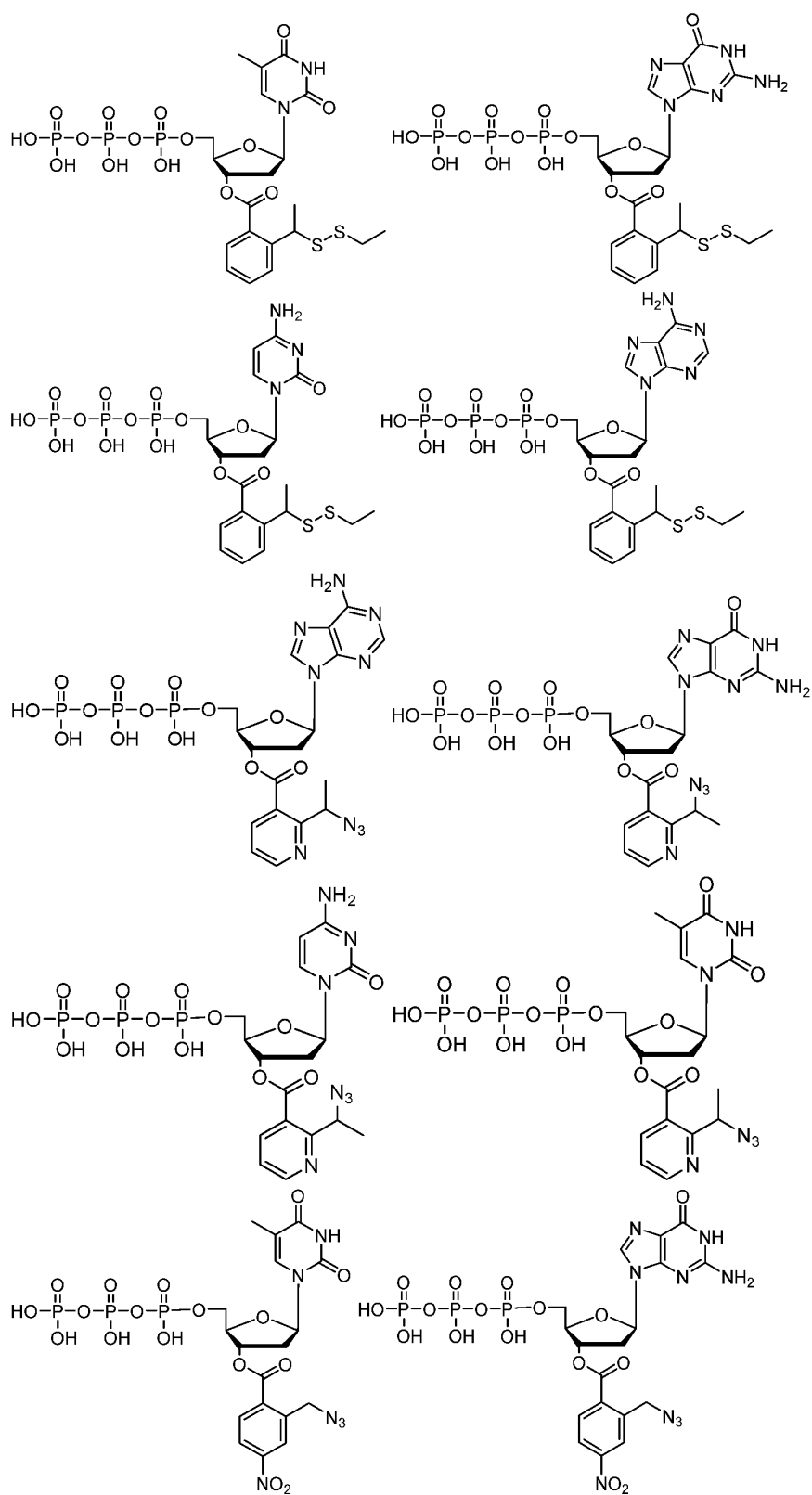
在一些实施方案中， R' 为三磷酸基团（ $HO-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(Z)(OH)-$ ）。

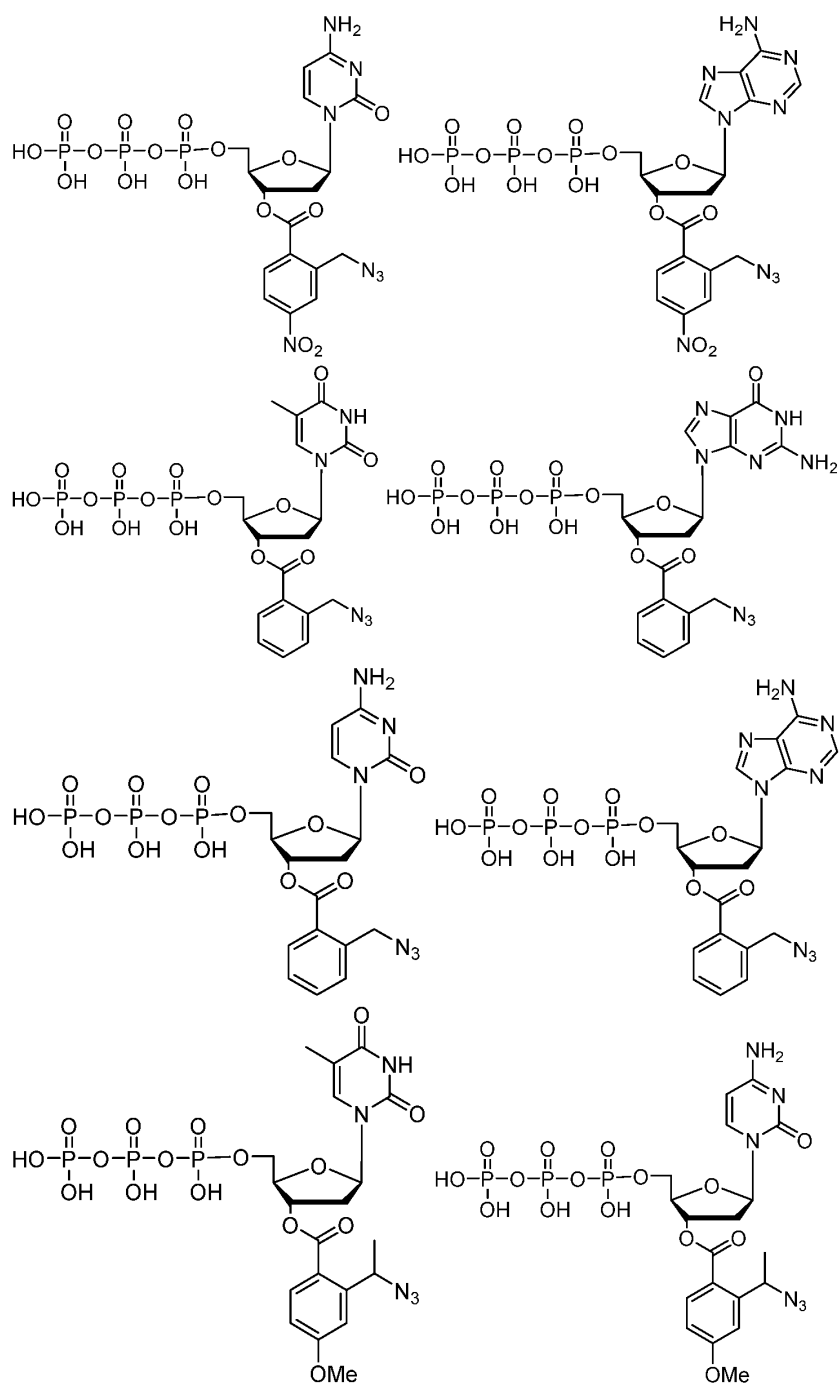
在一些实施方案中，Z 为 O。

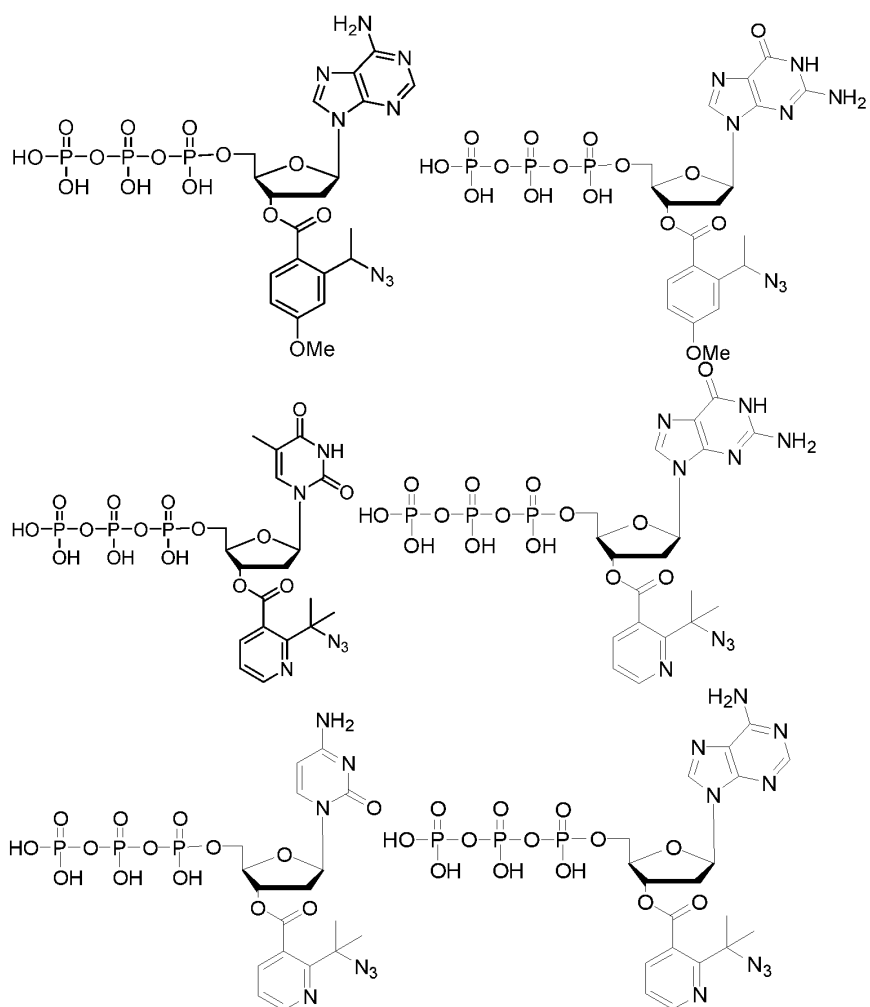


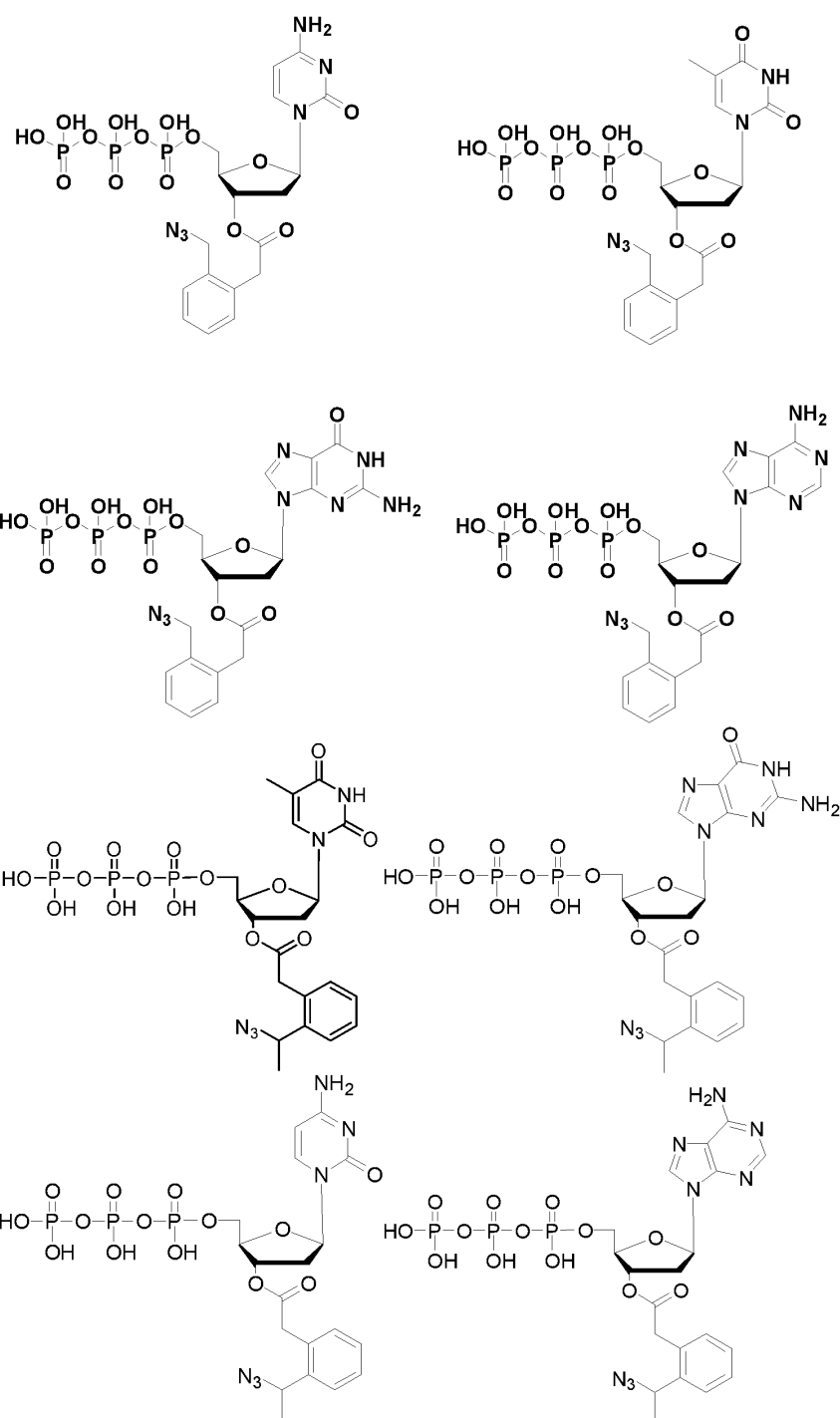
在本发明的第六方面，本发明提供了以下化合物或其盐，

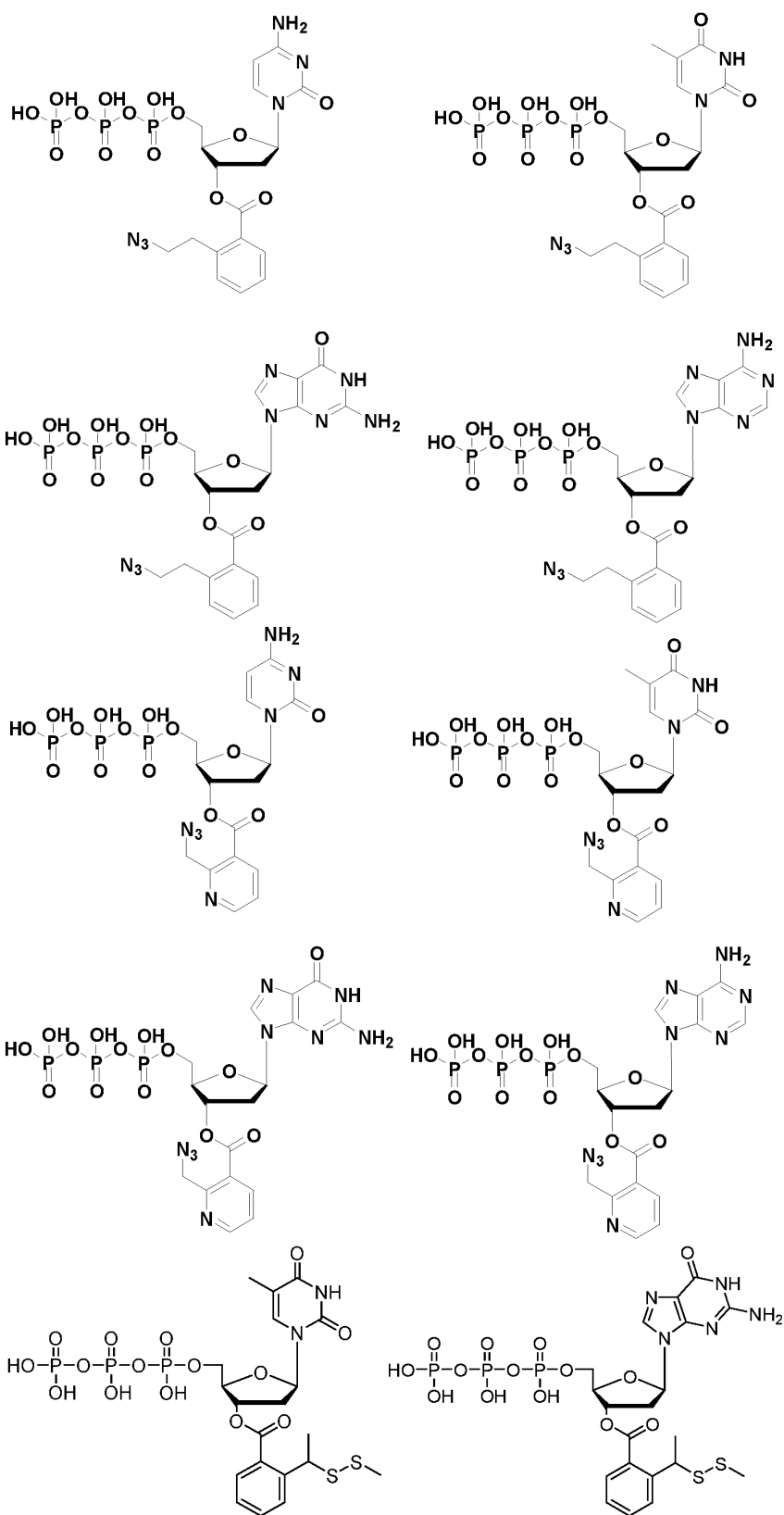


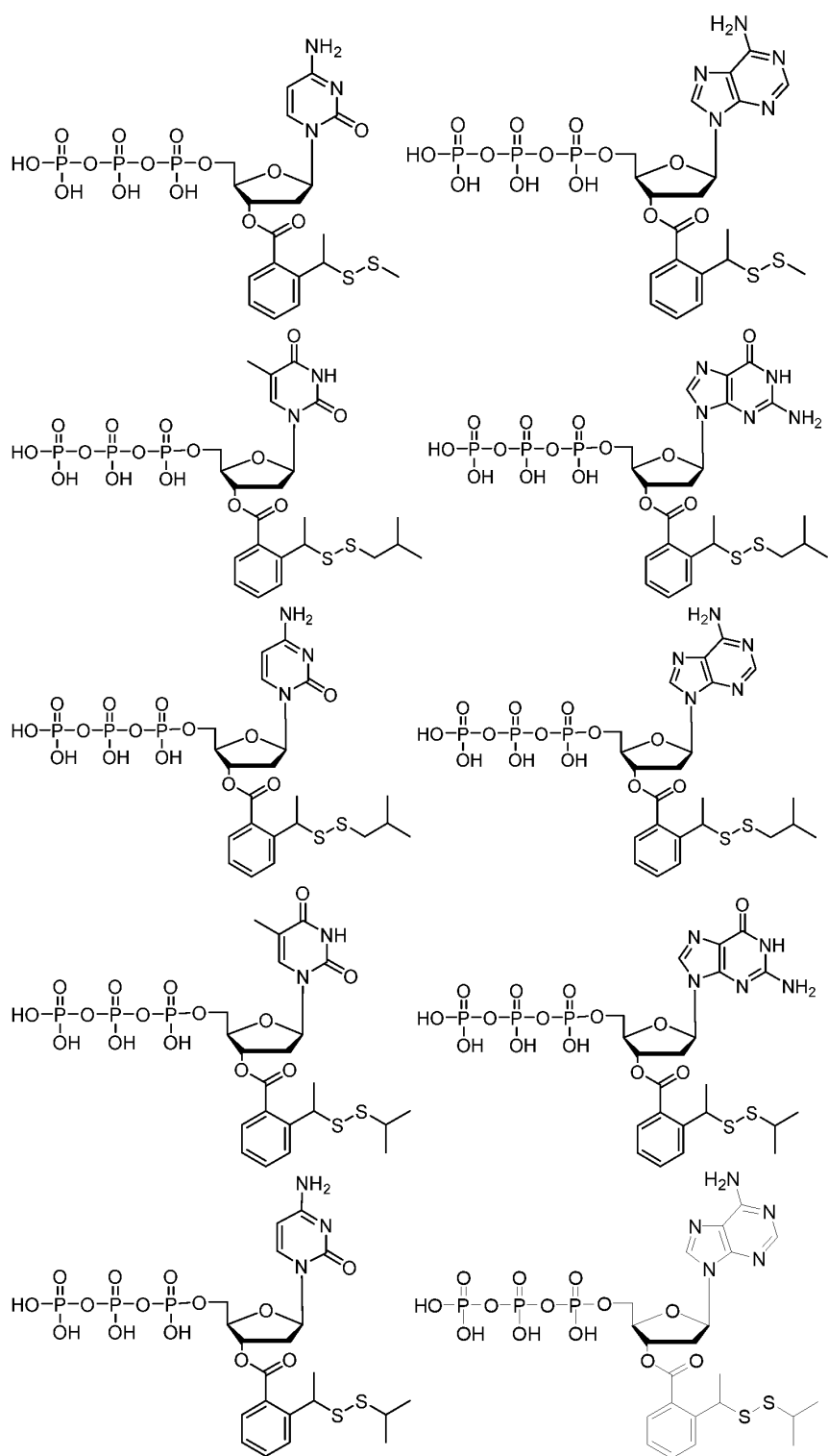


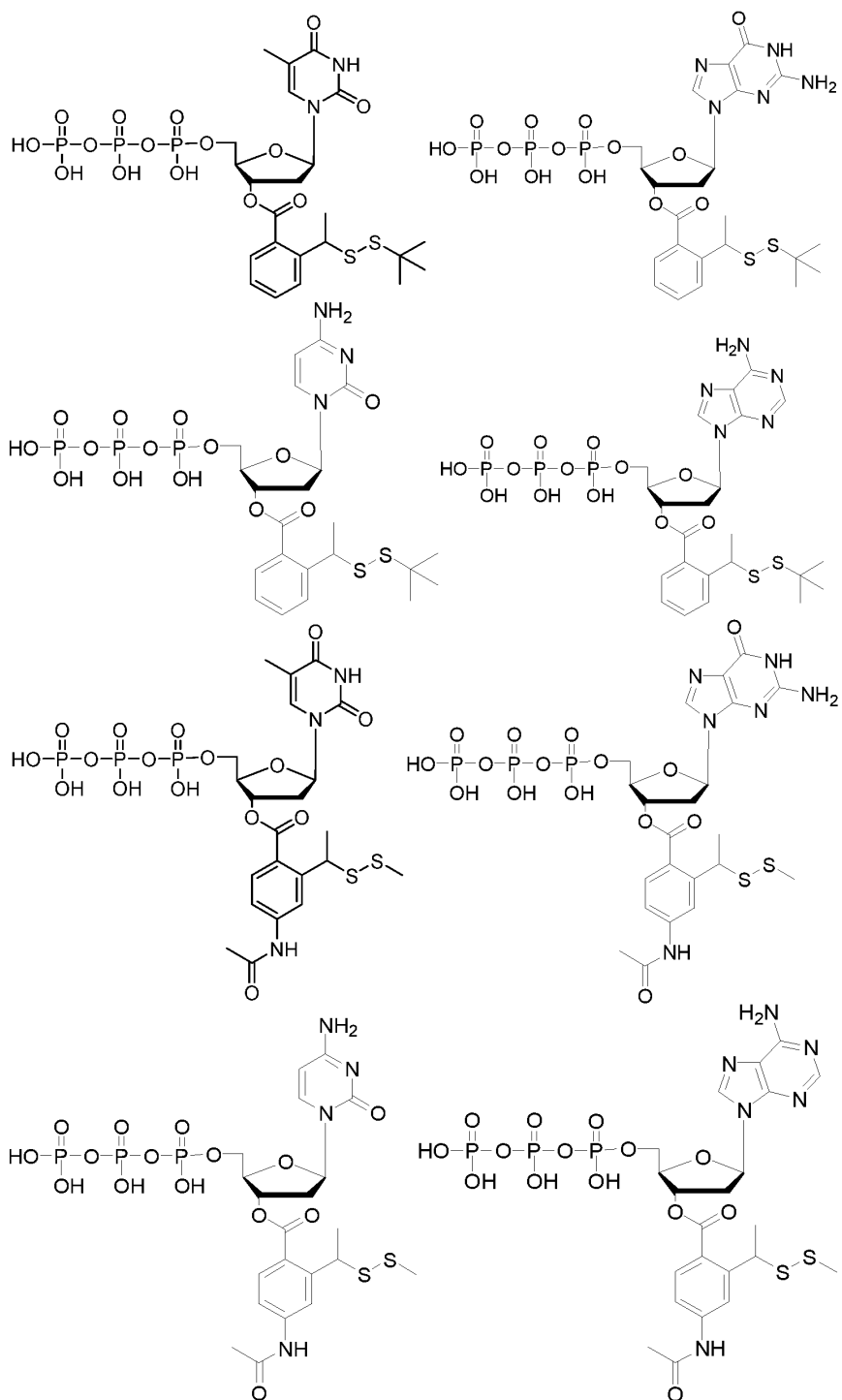


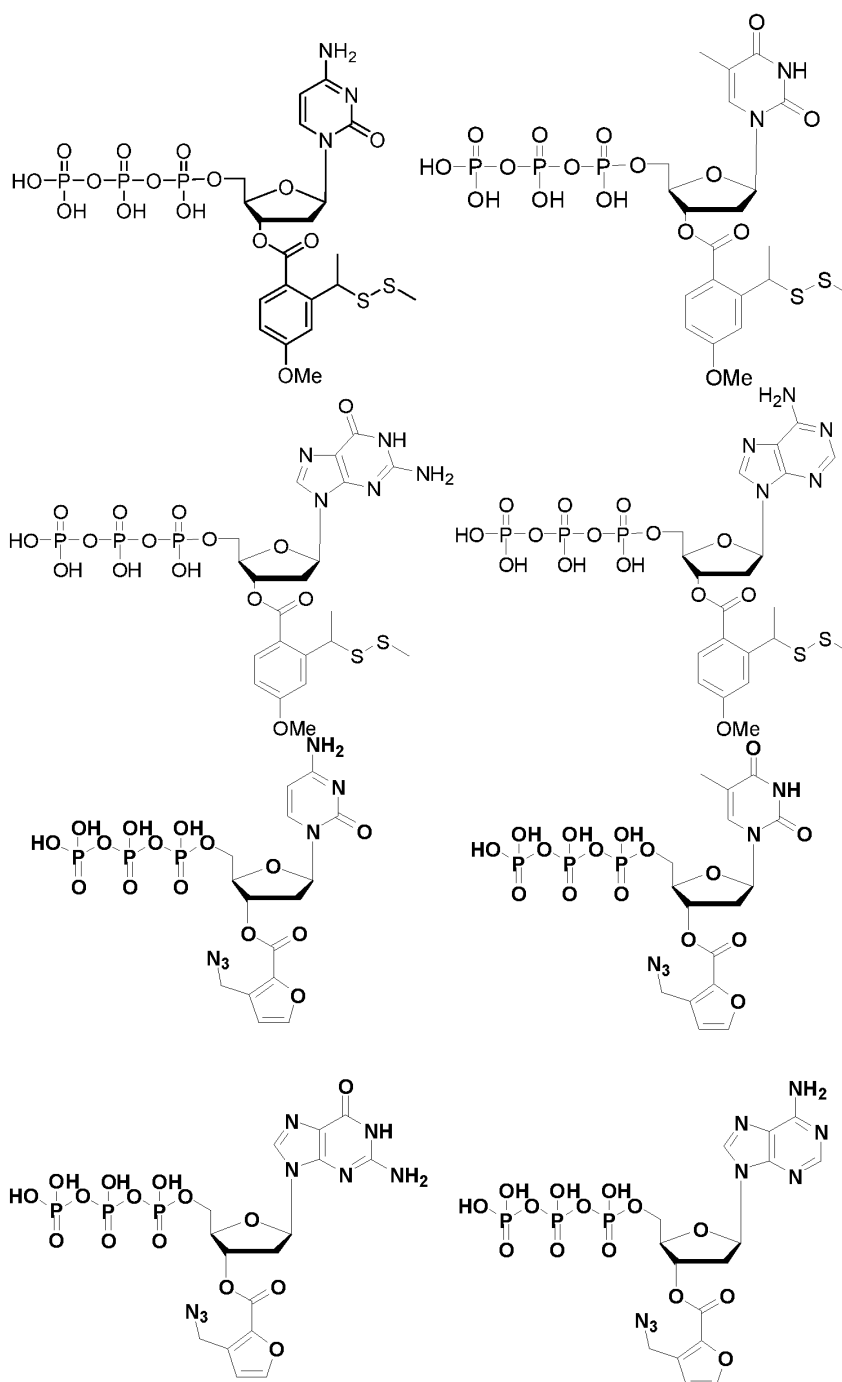


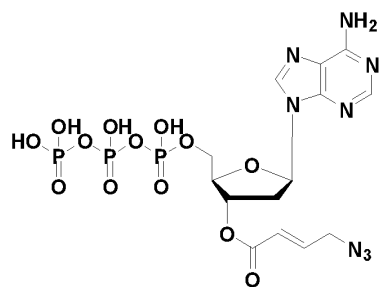
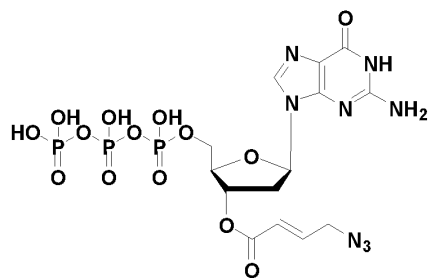
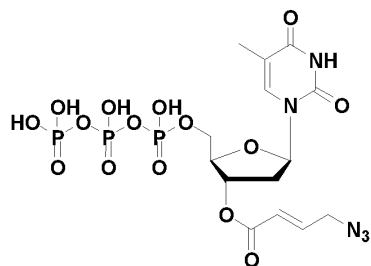
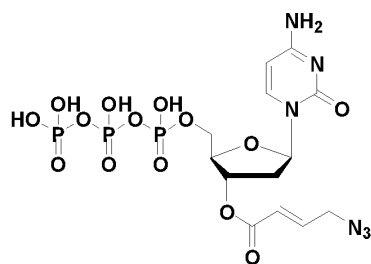
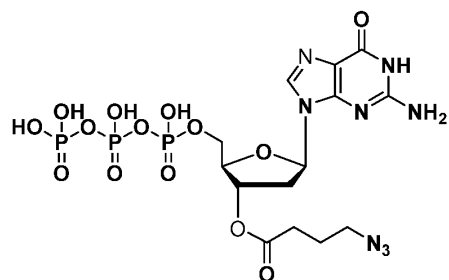
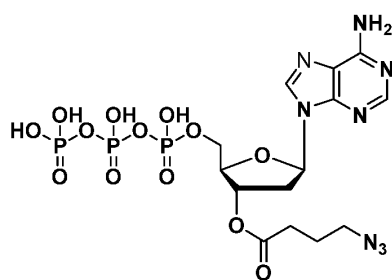
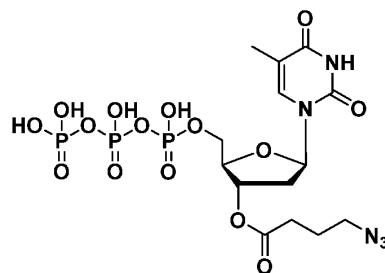
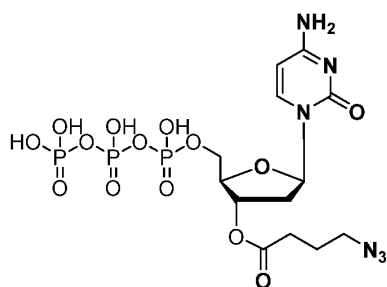


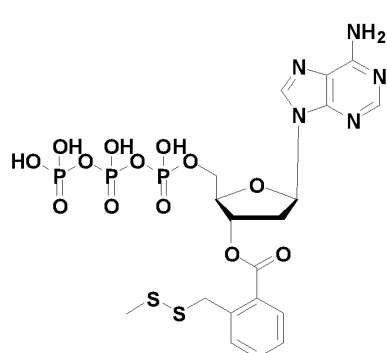
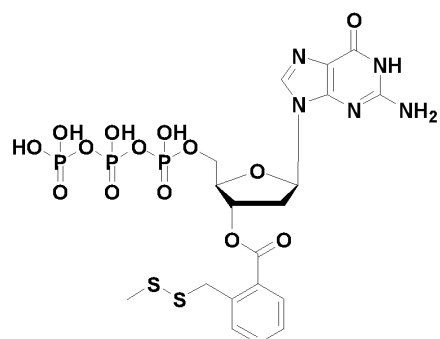
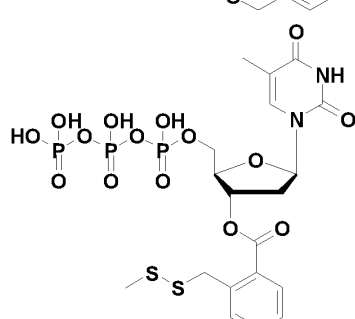
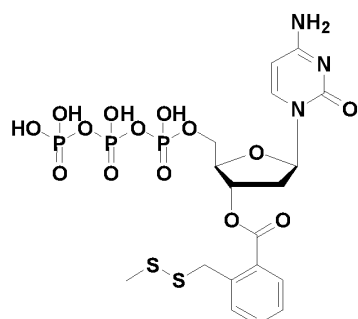
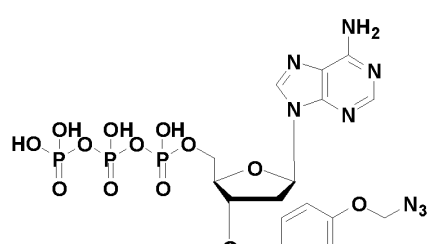
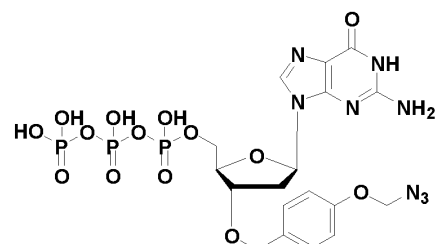
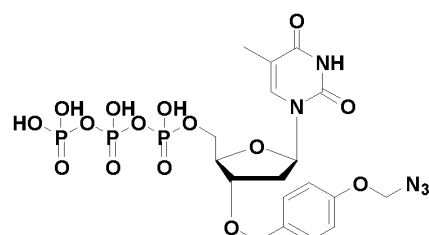
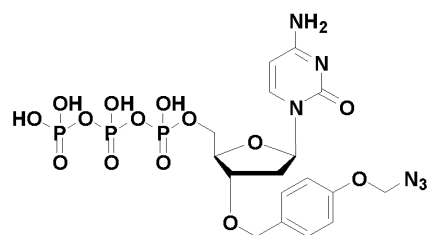


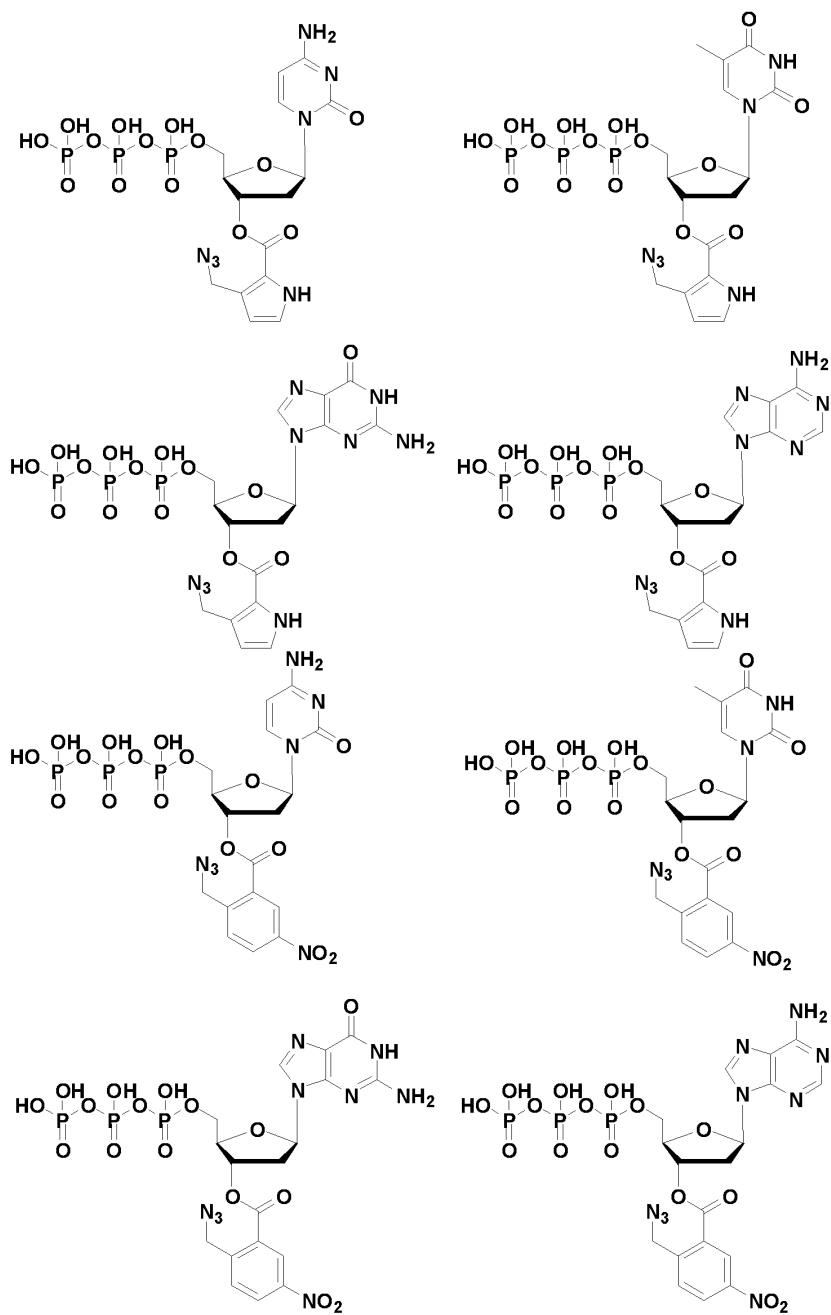


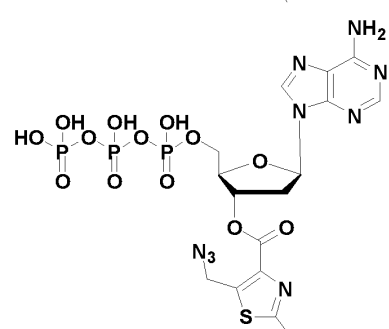
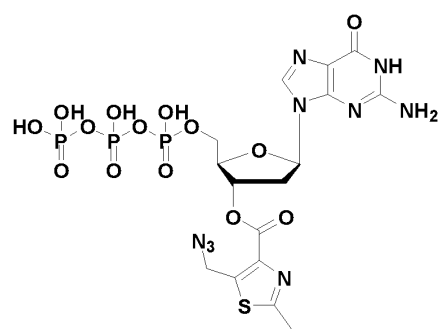
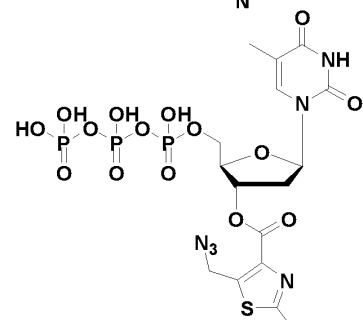
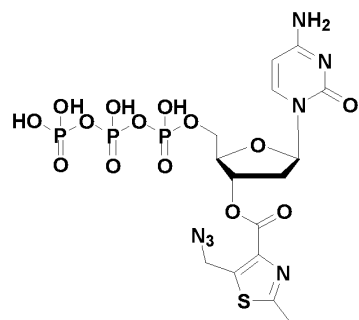
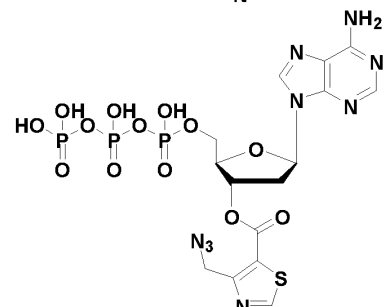
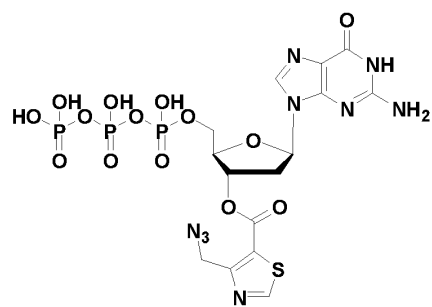
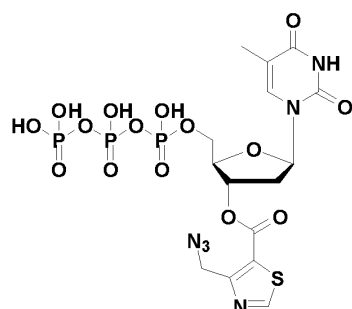
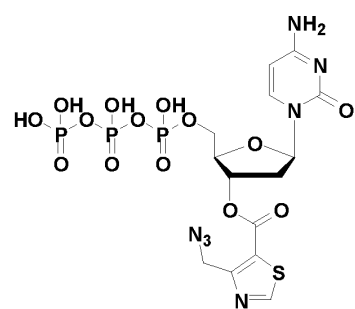


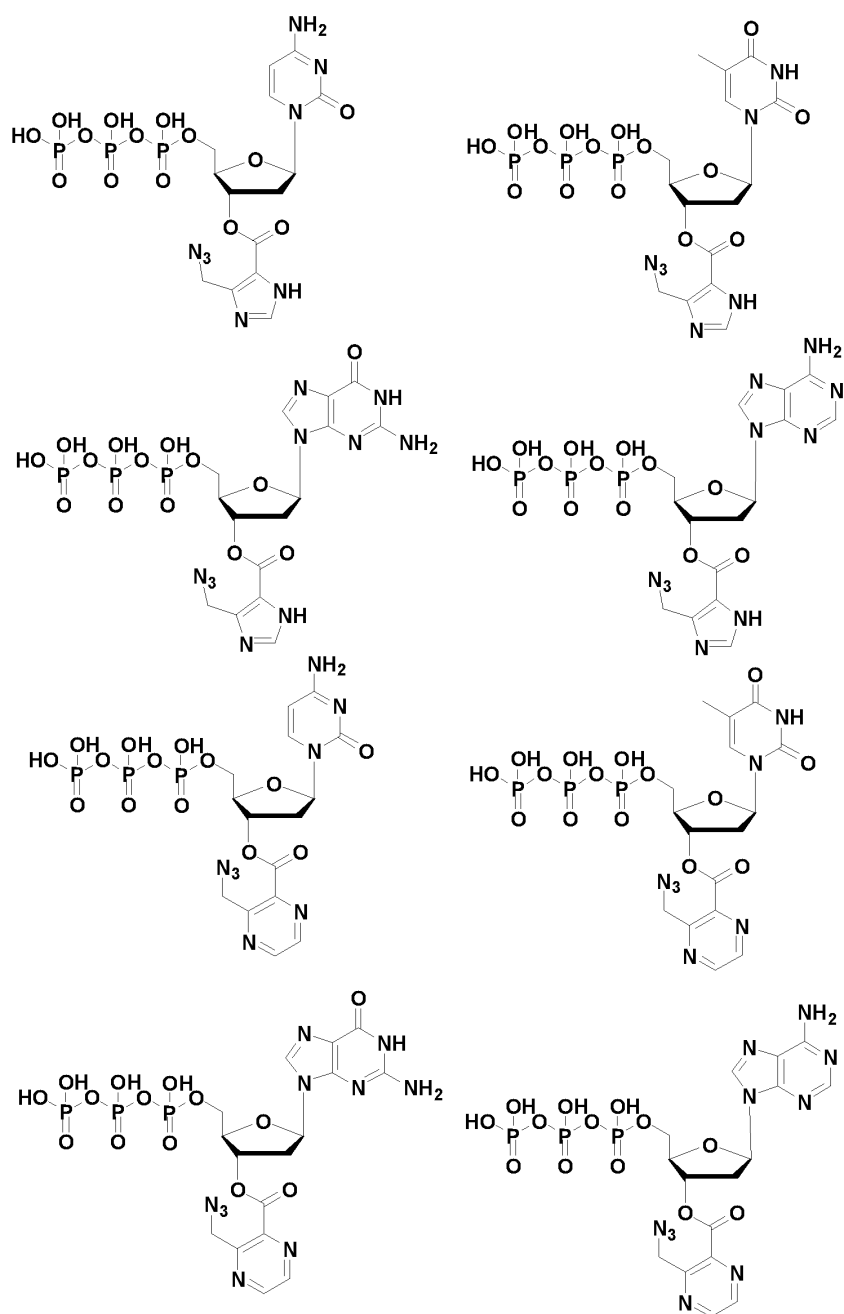


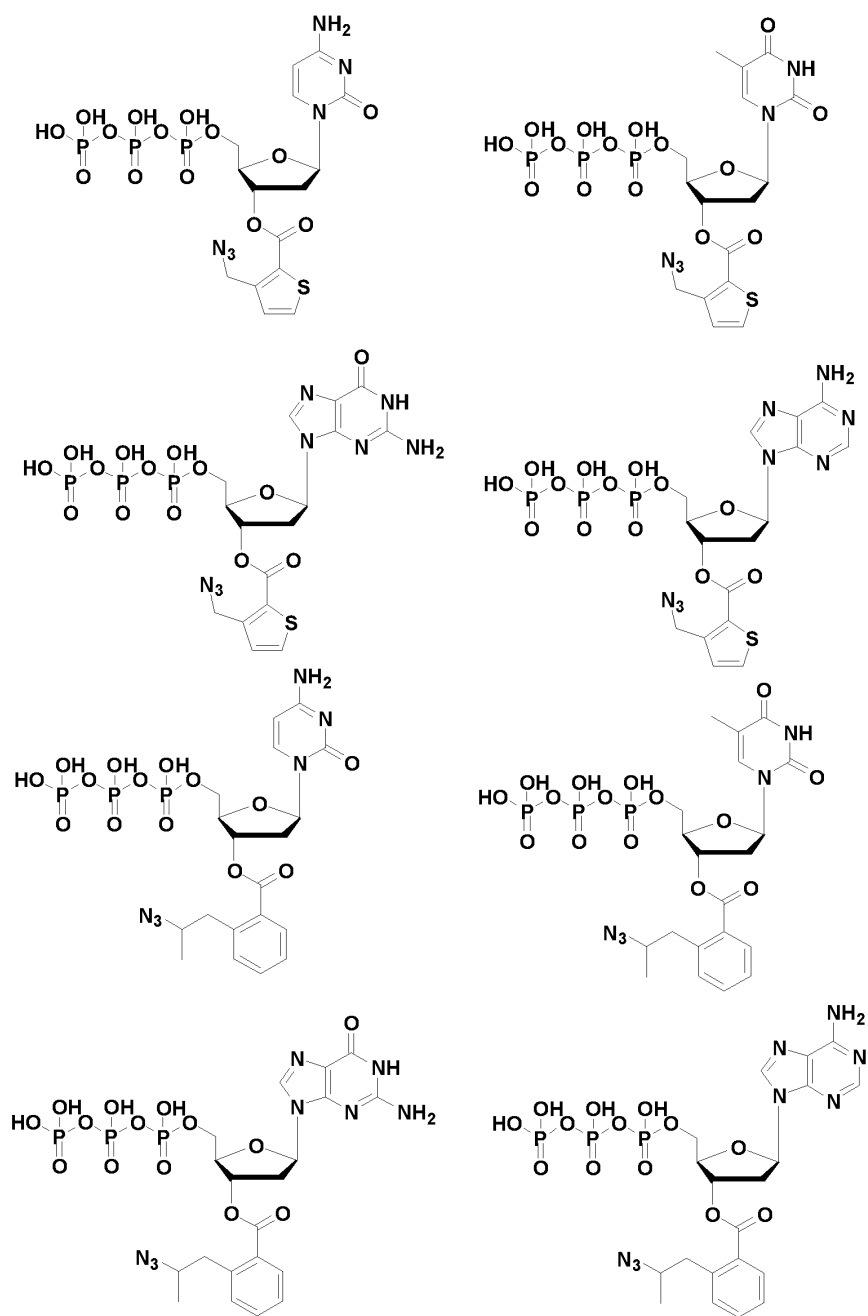


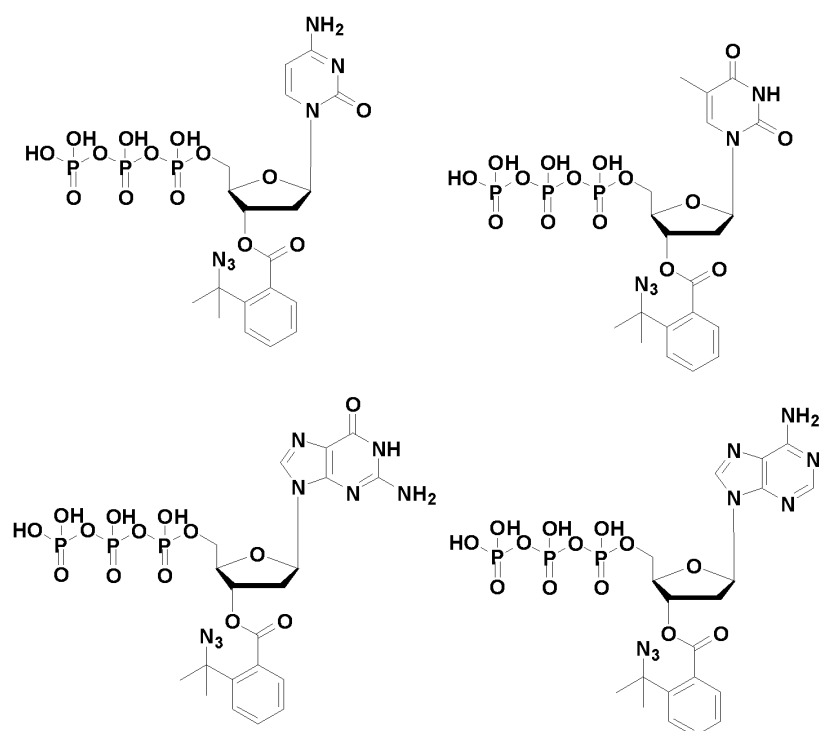












在一些实施方案中，前述的化合物或其盐携带额外的可检测标记（如荧光标记）。

在一些实施方案中，所述化合物或其盐携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）引入的，所述亲和试剂携带所述可检测标记，且所述亲和试剂可以特异性识别并结合所述化合物或其盐的表位。

在一些实施方案中，所述额外的可检测标记（如荧光标记）任选地通过连接基团与所述化合物或其盐连接。

在一些实施方案中，所述额外的可检测标记（如荧光标记）任选地通过连接基团与所述化合物或其盐的 Base 连接。

在一些实施方案中，所述额外的可检测标记（如荧光标记）任选地通过连

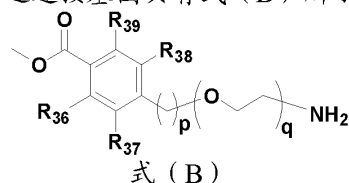
接基团与所述化合物或其盐的 Base 连接时，Base 的结构选自以下



在一些实施方案中，所述连接基团为可裂解的连接基团或不可裂解的连接基团。

在一些实施方案中，所述可裂解的连接基团选自亲电裂解的连接基团、亲核裂解的连接基团、可光解的连接基团、还原条件下裂解的连接基团、氧化条件下裂解的连接基团、安全拉手型连接基团、经消除机理裂解的连接基团，或其任何组合。

在一些实施方案中，所述连接基团具有式 (B) 所示结构：



其中：

R^{36} 、 R^{37} 、 R^{38} 、 R^{39} 各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、 N_3 -C1-C6 烷基、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基），所述 C1-C6 烷基任选地被 C1-C6 烷基所取代；

p 选自 1、2、3、4、5、6；

q 选自 1-12 之间任意整数。

在一些具体实施方案中， R^{36} 、 R^{37} 、 R^{38} 、 R^{39} 中，任意一个为 N_3 -C1-C6 烷基，且所述 C1-C6 烷基任选地被 C1-C6 烷基所取代，其余各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）。

在一些具体实施方案中， R^{36} 为 N_3 -C1-C6 烷基，且所述 C1-C6 烷基任选地被 C1-C6 烷基所取代， R^{37} 、 R^{38} 、 R^{39} 各自独立地选自 H、C1-C6 烷基。

在一些具体实施方案中， R^{36} 为 N_3 -甲基，且所述甲基任选地被甲基所取代， R^{37} 、 R^{38} 、 R^{39} 为 H。

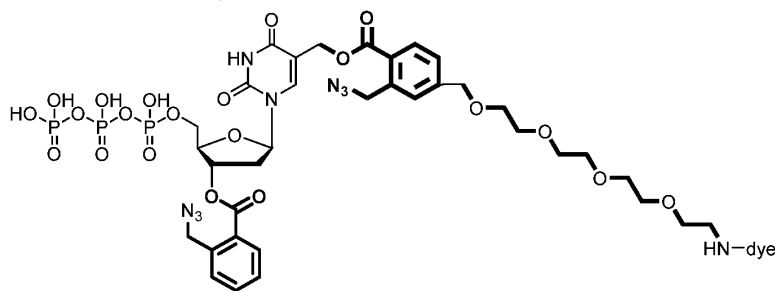
在一些具体实施方案中，p 选自 1、2、3。

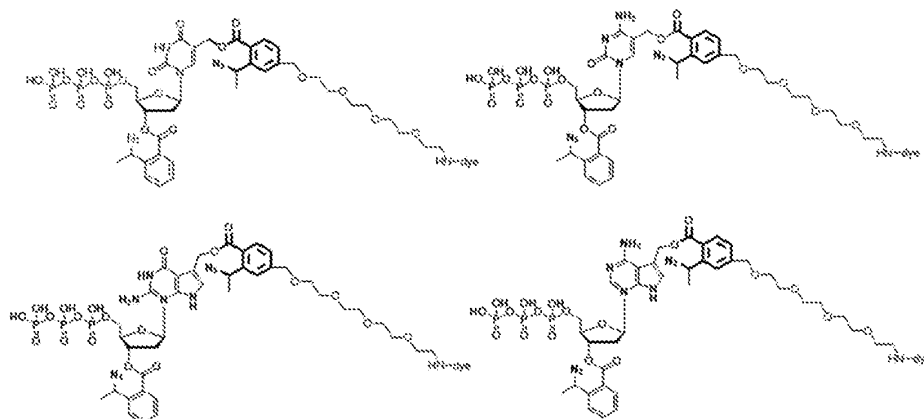
在一些具体实施方案中，p 为 1。

在一些具体实施方案中，q 选自 2、3、4、5、6。

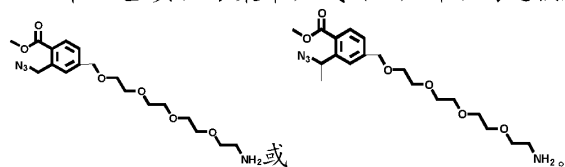
在一些具体实施方案中，q 为 4。

在一些实施方案中，式 (B) 所示的连接基团的甲基端与所述 Base 连接，氨基端与所述额外的可检测标记（如荧光标记）连接。例如，

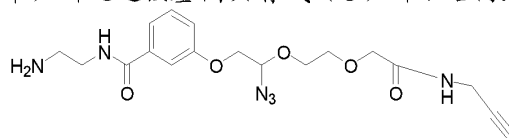




在一些实施方案中，式(B)所示的连接基团的结构式为

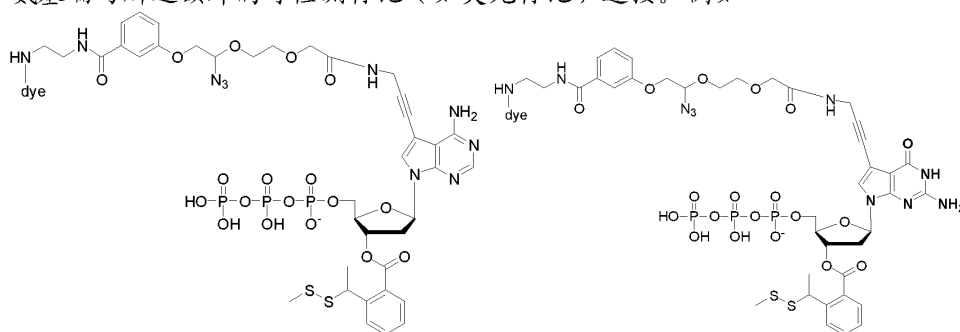


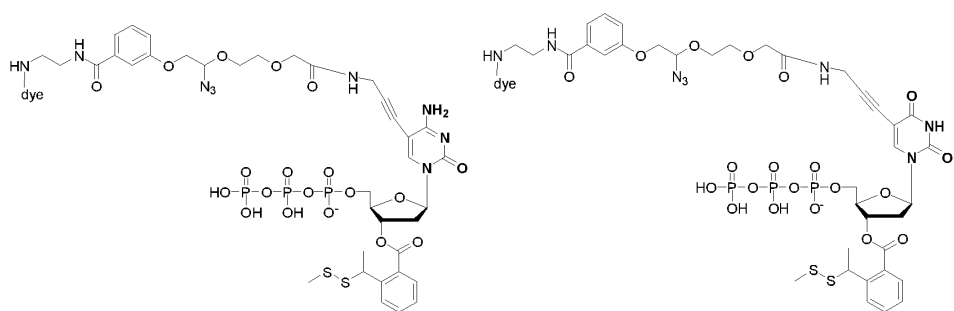
在一些实施方案中，所述连接基团具有式(C)所示结构：



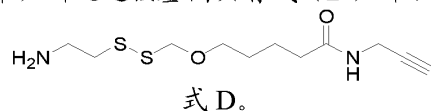
式C。

在一些实施方案中，式(C)所示的连接基团的炔基端与所述Base连接，氨基端与所述额外的可检测标记(如荧光标记)连接。例如



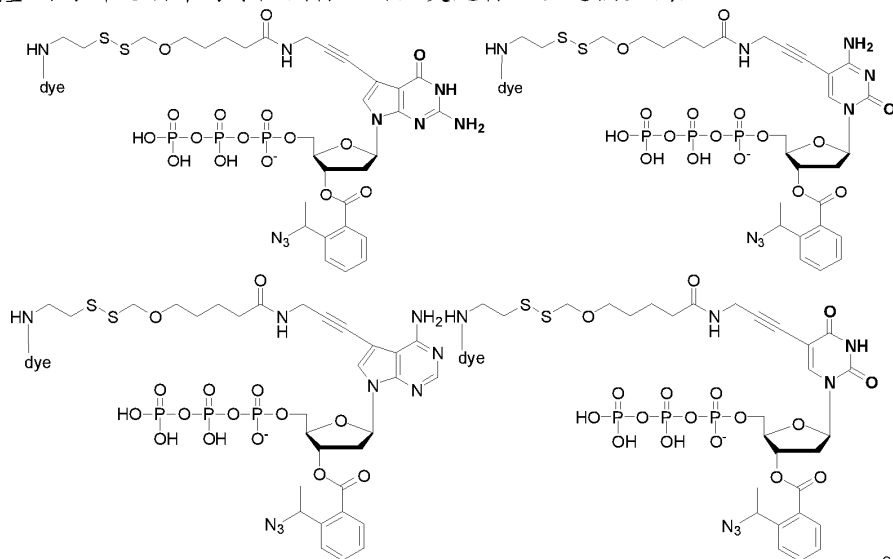


在一些实施方案中，所述连接基团具有式 (D) 所示结构：

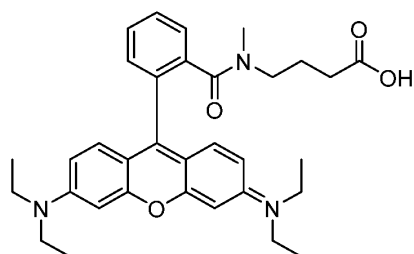
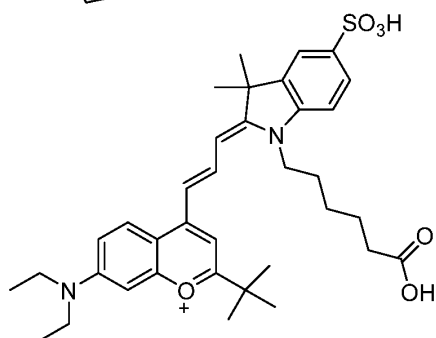
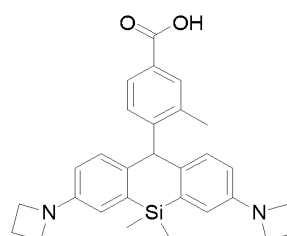
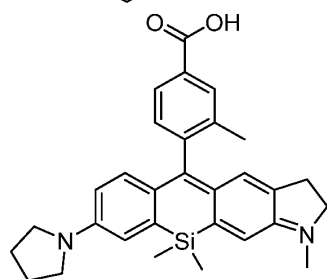
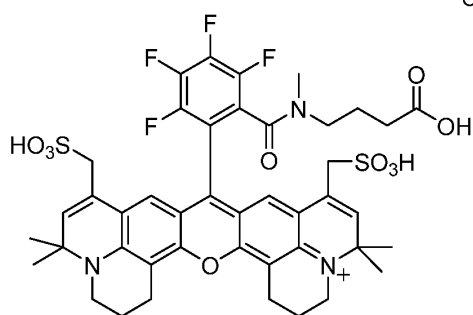
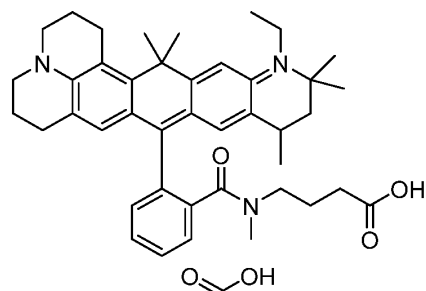
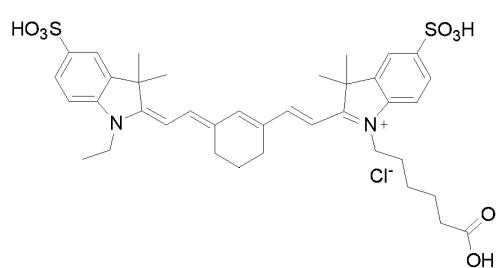
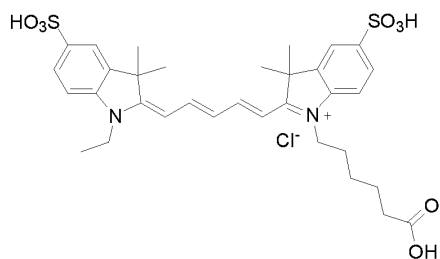
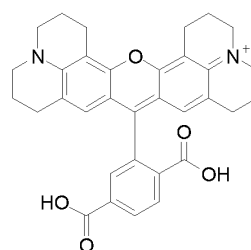
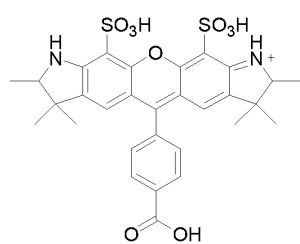


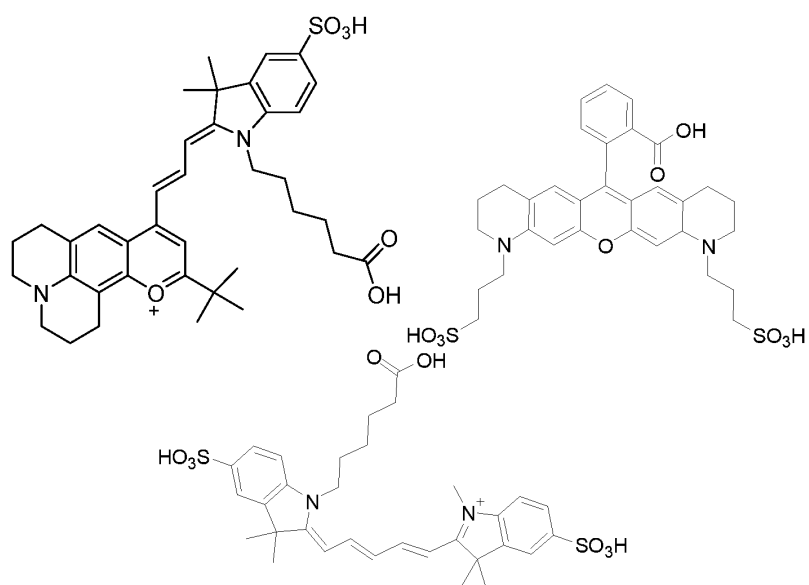
式 D。

在一些实施方案中，式 (D) 所示的连接基团的炔基端与所述 Base 连接，氨基端与所述额外的可检测标记（如荧光标记）连接。例如



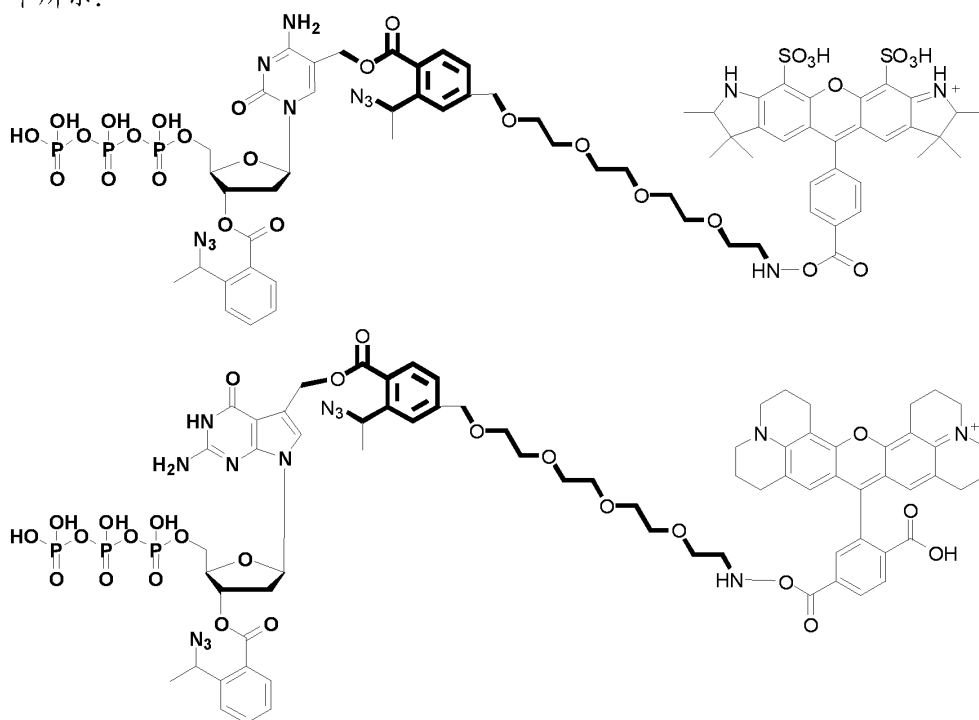
在一些实施方案中，所述可检测标记选自以下：

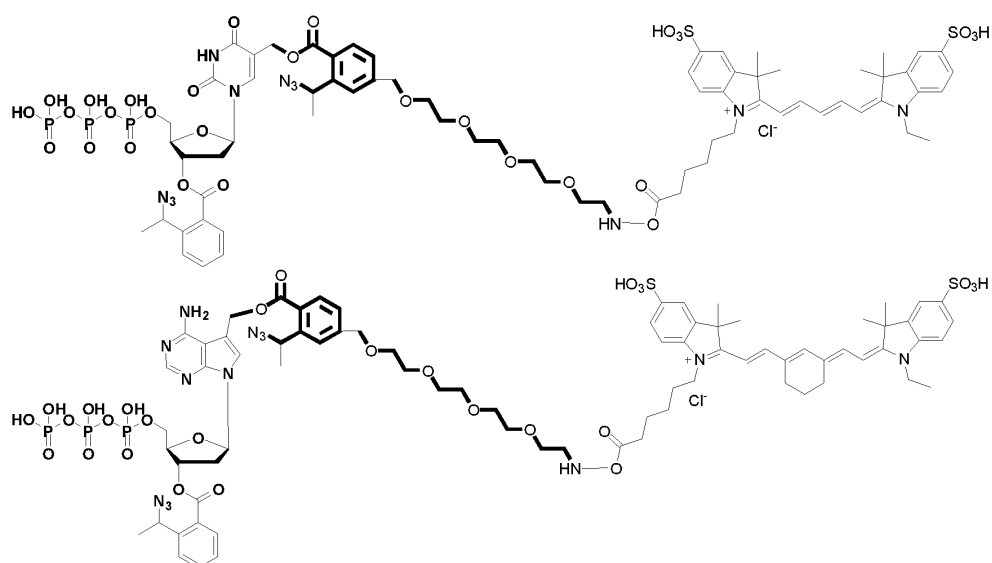




在一些实施方案中，Base 不同，所述可检测标记（如荧光标记）不同。

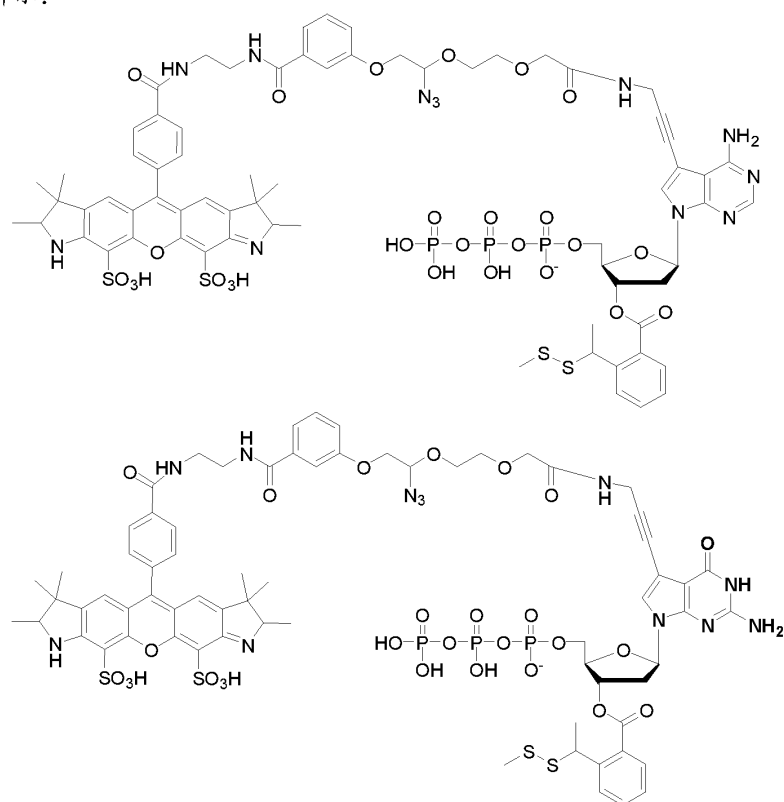
在一些实施方案中，携带额外的可检测标记的所述化合物或其盐的结构如下所示：

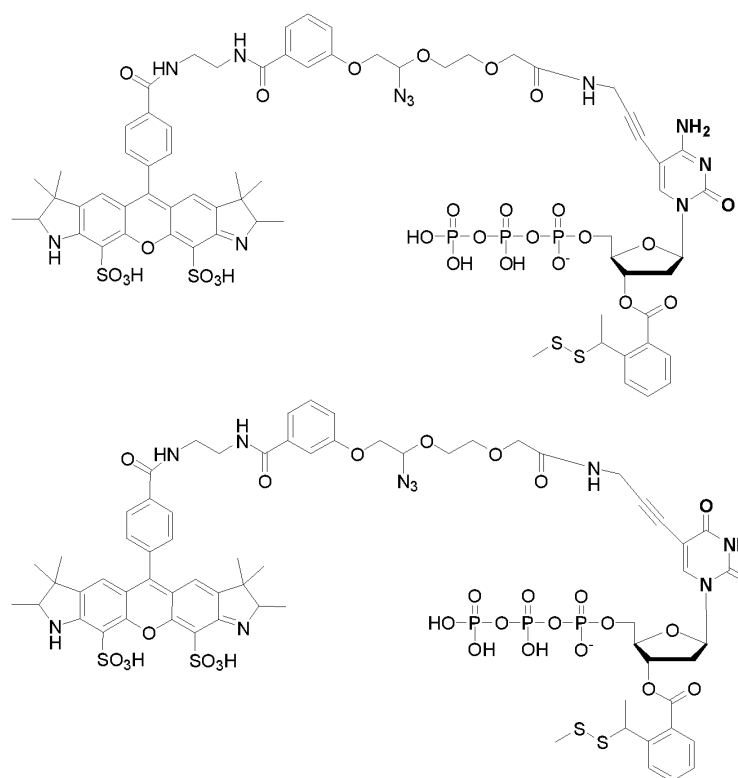




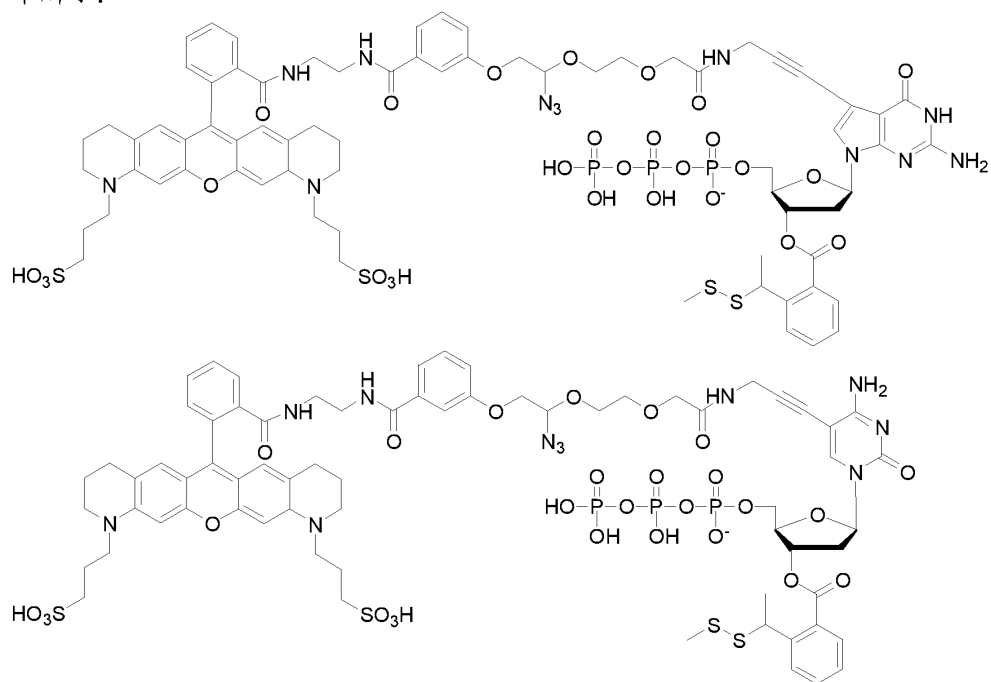
。

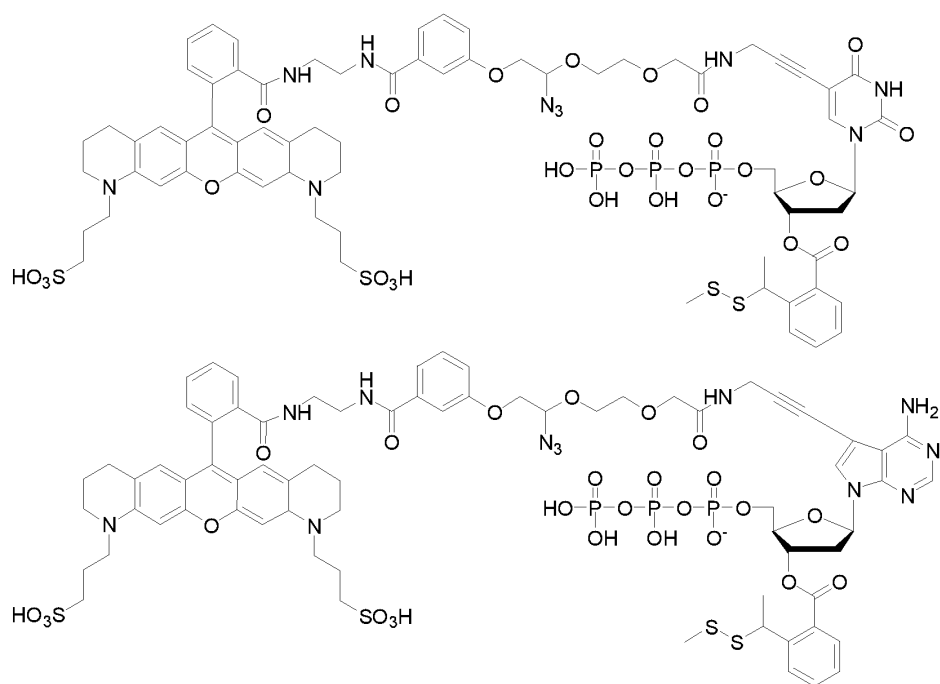
在一些实施方案中，携带额外的可检测标记的所述化合物或其盐的结构如下所示：



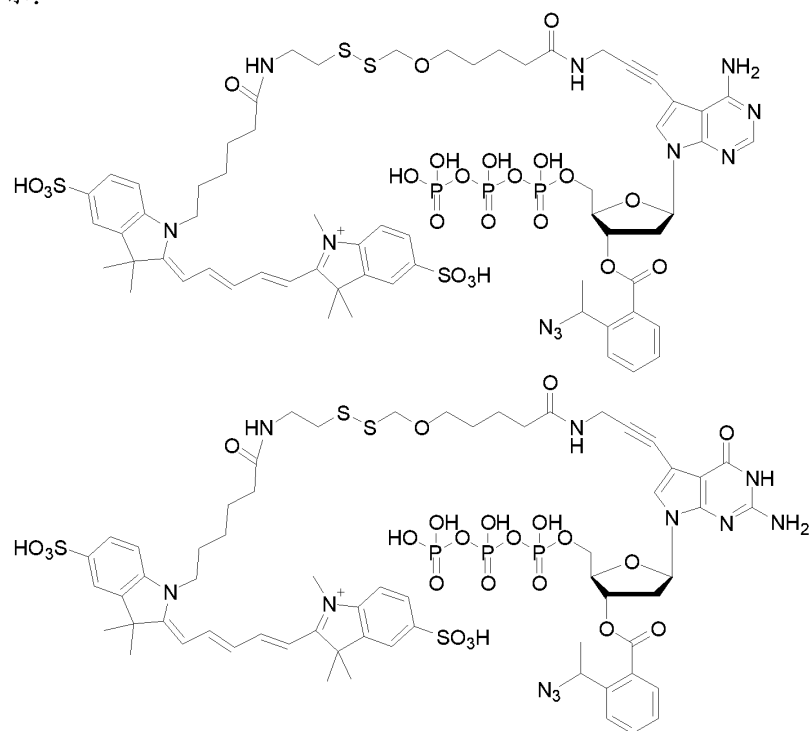


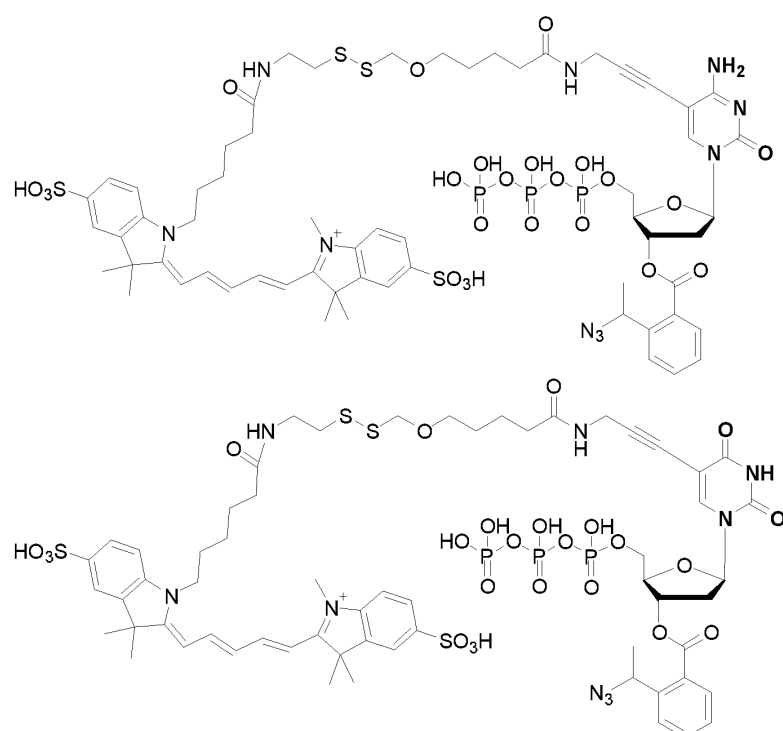
在一些实施方案中，携带额外的可检测标记的所述化合物或其盐的结构如下所示：





在一些实施方案中，携带额外的可检测标记的所述化合物或其盐的结构如下所示：





在本发明的第七方面，本发明提供了终止核酸合成的方法，其包括：将前述的化合物或其盐掺入待终止的核酸分子中。

在一些实施方案中，所述化合物或其盐的掺入通过末端转移酶、末端聚合酶或逆转录酶来实现。

在一些实施方案中，所述方法包括：使用聚合酶，将所述化合物或其盐掺入待终止的核酸分子中。

在一些实施方案中，所述方法包括：在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述化合物或其盐掺入待终止的核酸分子的3'端。

在本发明的第八方面，本发明提供了制备在测序反应中与目标单链多核苷酸互补的生长的多核苷酸的方法，其包括将前述的化合物或其盐掺入所述生长的互补多核苷酸，其中，所述化合物或其盐的掺入防止了任何后续的核苷酸引入所述生长的互补多核苷酸中。

在一些实施方案中，所述化合物或其盐的掺入通过末端转移酶、末端聚合酶或逆转录酶来实现。

在一些实施方案中，所述方法包括：使用聚合酶，将所述化合物或其盐掺入所述生长的互补多核苷酸。

在一些实施方案中，所述方法包括：在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述化合物或其盐掺入所述生长的互补多核苷酸的3'端。

在本发明的第九方面，本发明提供了测定目标单链多核苷酸的序列的方法，其包括：

1) 监测生长的核酸链中与目标单链多核苷酸互补的核苷酸的顺序掺入，其中，掺入的至少一个互补核苷酸是前述的化合物或其盐，且所述化合物或其盐

携带额外的可检测标记（如荧光标记），以及，

2) 检测所述可检测标记。

在一些实施方案中，所述额外的可检测标记（如荧光标记）任选地通过连接基团与所述化合物或其盐连接。

在一些实施方案中，所述连接基团如前所述。

在一些实施方案中，所述额外的可检测标记如前所述。

在一些实施方案中，Base 不同，所述化合物或其盐携带的可检测标记（如荧光标记）不同。

在一些实施方案中，在引入下一个互补核苷酸之前，将所述化合物或其盐中的可逆阻断基团（R）和所述可检测标记除去。

在一些实施方案中，所述可逆阻断基团和所述可检测标记被同时除去。

在一些实施方案中，所述可逆阻断基团和所述可检测标记被先后除去；例如，在所述可检测标记被除去之后，所述可逆阻断基团被除去，或者，在所述可逆阻断基团被除去之后，所述可检测标记被除去。

在一些实施方案中，所述方法包括以下步骤：

（a）提供多种不同的核苷酸，其中所述多种不同的核苷酸是前述的化合物或其盐，其中，每种类型的核苷酸携带的额外的可检测标记在检测时可以与其它类型的核苷酸携带的额外的可检测标记区分开；

（b）将所述多种不同的核苷酸掺入目标单链多核苷酸的互补序列中；

（c）检测（b）的核苷酸携带的额外的可检测标记，从而确定掺入的核苷酸的类型；

（d）除去（b）的核苷酸中的可逆阻断基团和其携带的可检测标记；和

（e）任选地重复步骤（b） - （d）一次或多次；

从而确定所述目标单链多核苷酸的序列。

在一些实施方案中，所述方法包括以下步骤：

（1）提供第一核苷酸、第二核苷酸、第三核苷酸和第四核苷酸，四种核苷酸中的至少一种是前述的化合物或其盐，所述四种核苷酸包含的 Base 互不相同，且所述四种核苷酸携带额外的可检测标记（如荧光标记），优选地，所述四种核苷酸携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）引入的，所述亲和试剂携带所述可检测标记，且所述亲和试剂可以特异性识别并结合每一种核苷酸的表位，或者优选地，所述四种核苷酸任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接，更优选地，所述四种核苷酸中的 Base 任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接，最优选地，所述四种核苷酸所携带的额外的可检测标记互不相同；

（2）将所述四种核苷酸与目标单链多核苷酸进行接触；除去未掺入生长的核酸链中的所述核苷酸；检测掺入生长的核酸链中的所述核苷酸所携带的所述可检测标记；除去掺入生长的核酸链中的所述核苷酸所包含的可逆阻断基团和所携带的所述可检测标记；

任选地，还包括（3）：重复（2）一次或多次。

在一些实施方案中，所述方法包括以下步骤：

（a）提供包含双链体、至少一种前述的化合物或其盐、聚合酶和切除试剂的混合物；所述双链体包含生长的核酸链以及待测序的核酸链；所述化合物或其盐携带额外的可检测标记（如荧光标记），优选地，所述化合物或其盐携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）引入

的, 所述亲和试剂携带所述可检测标记, 且所述亲和试剂可以特异性识别并结合所述化合物或其盐的表位, 或者优选地, 所述化合物或其盐任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接, 或者更优选地, 所述化合物或其盐中的 Base 任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接;

(b) 进行包含以下步骤 (i)、(ii) 和 (iii) 的反应, 任选地, 重复一次或多次:

步骤 (i): 使用聚合酶, 使所述化合物或其盐掺入生长的核酸链, 形成包含可逆阻断基团和可检测标记的核酸中间体;

步骤 (ii): 对所述核酸中间体所包含的可检测标记进行检测;

步骤 (iii): 使用切除试剂将所述核酸中间体所包含的可逆阻断基团和/或所述可检测标记切除。

在一些实施方案中, 对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除同时进行, 或者, 对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除分步进行 (例如, 先切除所述可逆阻断基团, 或者先切除所述可检测标记)。

在一些实施方案中, 对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除使用的切除试剂是同样的试剂。

在一些实施方案中, 对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除使用的切除试剂是不同的试剂。

在一些实施方案中, 所述双链体连接于支持物上。

在一些实施方案中, 所述生长的核酸链为引物。

在一些实施方案中, 所述引物通过退火至待测序的核酸链上, 形成所述双链体。

在一些实施方案中, 所述双链体、所述化合物或其盐、以及所述聚合酶一起形成含有溶液相和固相的反应体系。

在一些实施方案中, 所述化合物或其盐包含的 Base 互不相同。

在一些实施方案中, 所述化合物或其盐携带的额外的可检测标记互不相同。

在一些实施方案中, 在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下, 使用聚合酶, 使所述化合物或其盐掺入生长的核酸链, 形成包含可逆阻断基团和可检测标记的核酸中间体。

在一些实施方案中, 所述聚合酶选自 KOD 聚合酶或其突变体 (例如 KOD POL151、KOD POL157、KOD POL171、KOD POL174、KOD POL376、KOD POL391)。

在一些实施方案中, 在任意一个检测所述核酸中间体所包含的可检测标记步骤前, 移除前一步骤的反应体系的溶液相, 保留连接于支持物上的双链体。

在一些实施方案中, 所述切除试剂与所述双链体或所述生长的核酸链在含有溶液相和固相的反应体系中接触。

在一些实施方案中, 所述切除试剂能够切除掺入生长的核酸链的化合物中的可逆阻断基团和所述化合物携带的额外的可检测标记, 并且不会影响双链体骨架上的磷酸二酯键。

在一些实施方案中, 在任意一个切除所述核酸中间体所包含的可逆阻断基团和/或额外的可检测标记的步骤后, 移除这一步骤反应体系的溶液相。

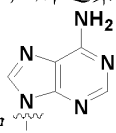
在一些实施方案中, 在任意一个包含移除操作的步骤之后, 进行洗涤操作。

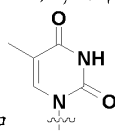
在一些实施方案中，步骤(ii)之后，进一步包括：根据步骤(ii)检测得到的信号，确定步骤(i)中掺入生长的核酸链的化合物的类型，并基于碱基互补配对原则，确定待测序的核酸链中相应位置处的核苷酸类型。

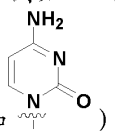
在本发明的第十方面，本发明提供了试剂盒，其包含至少一个前述的化合物或其盐。

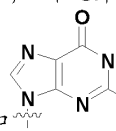
在一些实施方案中，所述试剂盒包含第一、第二、第三和第四化合物，所述第一、第二、第三和第四化合物各自独立地为前述的化合物或其盐。

在一些实施方案中，所述第一化合物中，Base选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤

或其互变异构体（例如 ）；所述第二化合物中，Base选自胸腺嘧啶、

尿嘧啶或其互变异构体（例如 ）；所述第三化合物中，Base选自胞嘧

啶或其互变异构体（例如 ）；所述第四化合物中，Base选自鸟嘌呤、7-

脱氮鸟嘌呤或其互变异构体（例如 ）。

在一些实施方案中，所述第一、第二、第三和第四化合物携带额外的可检测标记。

在一些实施方案中，所述第一、第二、第三和第四化合物携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）引入的，所述亲和试剂携带所述可检测标记，且所述亲和试剂可以特异性识别并结合所述第一、第二、第三或第四化合物的表位。

在一些实施方案中，所述第一、第二、第三和第四化合物任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接。

在一些实施方案中，所述第一、第二、第三和第四化合物中的Base任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接。

在一些实施方案中，所述第一、第二、第三和第四化合物包含的Base互不相同。

在一些实施方案中，所述第一、第二、第三和第四化合物所携带的额外的可检测标记互不相同。

在一些实施方案中，所述连接基团如前所述。

在一些实施方案中，所述可检测标记如前所述。

在一些实施方案中，所述试剂盒还包含：用于预处理核酸分子的试剂；用于连接待测序的核酸分子的支持物；用于将待测序的核酸分子与支持物连接（例如，共价或非共价连接）的试剂；用于起始核苷酸聚合反应的引物；用于进行核苷酸聚合反应的聚合酶；一种或多种缓冲溶液；一种或多种洗涤溶液；或其任何组合。

在本发明的第十一方面，本发明提供了前述的化合物或其盐或者前述的试

剂盒用于测定目标单链多核苷酸的序列的用途。

附图说明

图 1 表示本发明实施例的叠氮甲基的切除反应；

图 2 表示本发明实施例的亲核环化串联反应用于可逆阻断切除；

图 3 表示本发明实施例的 3'-OH 标记可逆阻断核苷酸类似物。

具体实施方式

下面通过具体实施例详细描述本发明的实施方式，但是无论如何它们不能解释为对本发明的限制。

除非特殊说明，上述基团和取代基具有药物化学领域的普通含义。

在本说明书的各部分，本发明公开化合物的取代基按照基团种类或范围公开。特别指出，本发明包括这些基团种类和范围的各个成员的每一个独立的次级组合。例如，术语“C1-C6 烷基”特别指独立公开的甲基、乙基、C3 烷基、C4 烷基、C5 烷基和 C6 烷基。

另外，需要说明的是，除非以其他方式明确指出，在本文中通篇采用的描述方式“各...独立地为/选自”和“...各自独立地为/选自”可以互换，均应做广义理解，其既可以是指在不同基团中，相同或不同的符号之间所表达的具体选项之间互相不影响，也可以表示在相同的基团中，相同或不同的符号之间所表达的具体选项之间互相不影响。

术语“脂肪族烷基”指的是任意的含有 1-20 个碳原子的直链或支链饱和基团，例如，C1-C12 烷基，优选 C1-C6 烷基。

术语“C1-C6 烷基”指的是任意的含有 1-6 个碳原子的直链或支链饱和基团，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、叔戊基、正己基等。

术语“烷氧基”指的是任意上述烷基（例如 C1-C6 烷基等），其通过氧原子 (-O-) 连接到分子的其余部分。

术语“环烷基”是指具有饱和环的 3-10 元单环系统的烃，例如，C3-C8 环烷基，优选 C3-C6 环烷基。

术语“C3-C6 环烷基”是指具有饱和环的 3-6 元单环系统的烃，C3-C6 环烷基可以为环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

术语“芳香族烷基”指的是芳基烷基或杂芳基烷基。其中烷基如上文所定义。

术语“杂芳基”是指芳族的杂环，通常为具有 1 至 3 个选自 N、O 或 S 的杂原子的 5-、6-、7-、8-元的杂环；杂芳基环可以任选地进一步稠合或连接于芳族和非芳族的碳环和杂环。所述杂芳基的非限制性的实例为例如吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、噻吩基、吡咯基、苯基-吡咯基、呋喃基、苯基-呋喃基、噁唑基、异噁唑基、吡唑基、噻吩基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并 1,3-二氧戊环（苯并二噁茂）、异二氢吡啶基、苯并咪唑基、吡唑基、喹啉基、异喹啉基、1,2,3-三唑基、1-苯基-1,2,3-三唑基、2,3-二氢吡啶基、2,3-二氢苯并呋喃基、2,3-二氢苯并噻吩基、苯并吡喃基、2,3-二氢苯并噁嗪基、2,3-二氢喹啉基等。

本发明中，表示基团与杂芳基相连。其余相似结构可参照前述内容进行理解。

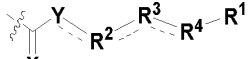
本发明中，R 可以选自,，其中，各杂芳基可以相同，也可以不同。另外，各杂芳基独立任选地被 1 个或多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2 个）R'' 所取代时，其表示，不同的杂芳基上的取代基 R'' 可以相同，也可以不同，而且，同一个杂芳基上的多个取代基 R'' 可以相同，也可以不同。

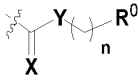
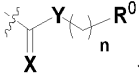
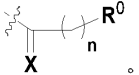
本发明中，“各 R'' 独立地选自 H、-N₃ 等等，且不同时为 H”，其表示，若所述杂芳基被 1 个或多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2 个）R'' 所取代，则至少有 1 个取代基 R'' 不为 H。

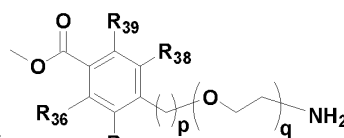
术语“芳基”指的是具有 6-14 个碳原子的碳环芳族体系的基团，例如 C₆-C₁₀ 芳基，优选苯基。

从所有上述描述中，对本领域技术人员显而易见的是，其名称是复合名称的任意基团，例如“苯基 C₁-C₆ 烷基”，应该指的是常规地从其衍生的部分例如从被苯基取代的 C₁-C₆ 烷基来构建，其中 C₁-C₆ 烷基如上文所定义。

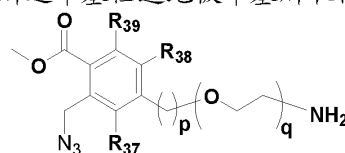
如本文所使用，术语“式(A)、式(I)、式(II)、式(III)或式(IV)所示的化合物的盐”的例子是由形成阴离子的有机酸形成的有机酸加合盐，包括但不限于甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、α-酮戊二酸盐、α-甘油磷酸盐、烷基磺酸盐或芳基磺酸盐；优选地，所述烷基磺酸盐为甲基磺酸盐或乙基磺酸盐；所述芳基磺酸盐为苯磺酸盐或对甲苯磺酸盐。也可形成合适的无机盐，包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐、硫酸盐或磷酸盐等。

本发明中，R 可以选自，其中，表示单键，且 R²、R³、R⁴ 各自独立地选自 O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂。可以理解的是，R² 和 R³ 之间，只有当 R² 和 R³ 均为 CH 时，R² 和 R³ 之间为双键，当 R² 和 R³ 各自独立地选自除 CH 外的其余原子或原子团（即 O、NH、S、CH₂、C(CH₃)₂）时，R² 和 R³ 之间为单键。例如，“R²、R³、R⁴ 各自独立地选自 CH、CH₂”，其表示：R² 和 R³ 均为 CH，且 R² 和 R³ 之间为双键，R⁴ 为 CH₂，且 R³ 和 R⁴ 之间为单键；或者，R³ 和 R⁴ 均为 CH，且 R³ 和 R⁴ 之间为双键，R² 为 CH₂，且 R² 和 R³ 之间为单键。类似地，Y 和 R² 之间，或者 R³ 和 R⁴ 之间的单键或双键可参照前述内容进行理解。

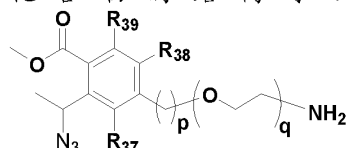
术语“直接键”表示其两侧的基团直接相连，例如，中，Y 为直接键，则将变为。



对于本发明的式 (B) 所示化合物，术语“R³⁶ 为 N₃-C1-C6 烷基，且所述 C1-C6 烷基任选地被 C1-C6 烷基所取代”，其指的是，R³⁶ 为 N₃-C1-C6 烷基，且所述 C1-C6 烷基上的 H 还可以被另外的 C1-C6 烷基所取代。例如，R³⁶ 为 N₃-甲基，且所述甲基任选地被甲基所取代时，式 (B) 所示



化合物的结构可以为，也可以为



。其余类似描述可以参照前述内容进行理解。

在本发明的方法中，只要是由生长的核酸链和待测序的核酸链这两条链组成的物质，均称其为“双链体”，与生长的核酸链或待测序的核酸链的链长无关，待测序的核酸链可以比生长的核酸链的链长更长。

在本发明的方法中，待测序的核酸分子可以是任何目的核酸分子。在某些优选的实施方案中，所述待测序的核酸分子包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的脱氧核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸、或其任何组合。在本发明的方法中，待测序的核酸分子不受其类型的限制。在某些优选的实施方案中，所述待测序的核酸分子为 DNA 或 RNA。在某些优选的实施方案中，所述待测序的核酸分子可以为基因组 DNA，线粒体 DNA，叶绿体 DNA，mRNA，cDNA，miRNA，或 siRNA。在某些优选的实施方案中，所述待测序的核酸分子为线性的或者环状的。在某些优选的实施方案中，所述待测序的核酸分子为双链的或者单链的。例如，所述待测序的核酸分子可以为单链 DNA(ssDNA)，双链 DNA(dsDNA)，单链 RNA(ssRNA)，双链 RNA(dsRNA)，或者 DNA 和 RNA 的杂合体。在某些优选的实施方案中，所述待测序的核酸分子为单链 DNA。在某些优选的实施方案中，所述待测序的核酸分子为双链 DNA。

在本发明的方法中，待测序的核酸分子不受其来源的限制。在某些优选的实施方案中，待测序的核酸分子可以获自任何来源，例如，任何细胞、组织或生物体(例如，病毒，细菌，真菌，植物和动物)。在某些优选的实施方案中，待测序的核酸分子源自哺乳动物(例如，人、非人灵长类动物、啮齿类动物或犬科动物)、植物、鸟类、爬行类、鱼类、真菌、细菌或病毒。

从细胞、组织或生物体中提取或获得核酸分子的方法是本领域技术人员公知的。合适的方法包括但不限于乙醇沉淀法，氯仿抽提法等。关于此类方法的详细描述可参见例如，J.Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F.M.Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley&Sons,Inc.，1995。另外，还可使用各种商业化的试剂盒来从各种来源(例如细胞、组织或生物体)提取核酸分子。

在本发明的方法中，待测序的核酸分子不受其长度的限制。在某些优选的实施方案中，待测序的核酸分子的长度可以为至少 10bp，至少 20bp，至少 30bp，至少 40bp，至少 50bp，至少 100bp，至少 200bp，至少 300bp，至少

400bp, 至少 500bp, 至少 1000bp, 或者至少 2000bp。在某些优选的实施方案中, 待测序的核酸分子的长度可以为 10-20bp, 20-30bp, 30-40bp, 40-50bp, 50-100bp, 100-200bp, 200-300bp, 300-400bp, 400-500bp, 500-1000bp, 1000-2000bp, 或者超过 2000bp。在某些优选的实施方案中, 待测序的核酸分子可具有 10-1000bp 的长度, 以利于进行高通量测序。

在本发明的制备多核苷酸的方法或测序方法中, 可使用合适的聚合酶来进行核苷酸聚合反应。在一些示例性实施方案中, 所述聚合酶能够以 DNA 为模板合成新的 DNA 链(例如 DNA 聚合酶)。在一些示例性实施方案中, 所述聚合酶能够以 RNA 为模板合成新的 DNA 链(例如反转录酶)。在一些示例性实施方案中, 所述聚合酶能够以 DNA 或 RNA 为模板合成新的 RNA 链(例如 RNA 聚合酶)。因此, 在某些优选的实施方案中, 所述聚合酶选自 DNA 聚合酶, RNA 聚合酶, 和反转录酶。可根据实际需要, 选择合适的聚合酶来进行核苷酸聚合反应。在某些优选的实施方案中, 所述聚合反应为聚合酶链式反应(PCR)。在某些优选的实施方案中, 所述聚合反应为反转录反应。

在本发明的方法中, 可以使用 KOD 聚合酶或其突变体进行核苷酸聚合反应。KOD 聚合酶或其突变体(例如 KOD POL151、KOD POL157、KOD POL171、KOD POL174、KOD POL376、KOD POL391)对本发明的修饰的核苷或核苷酸具有可接受的聚合效率。KOD POL391 和 KOD POL171 对本发明的修饰的核苷酸的具有可接受的聚合效率。在某些实施方案中, KOD POL391 或 KOD POL171 对本发明的修饰的核苷酸的聚合效率在 70 % 以上, 例如 70 % - 80 %、80 % - 90 % 或 90 % - 100 %。

在本发明的制备多核苷酸的方法或测序方法中, 核苷酸的聚合反应在适宜的条件下进行。适宜的聚合条件包括溶液相的组成以及各成分的浓度、溶液相的 pH、聚合温度等。在适宜的条件下进行聚合, 有利于获得可接受的、甚至高的聚合效率。

在本发明中, 所述式 (A) 所示化合物的脱氧核糖 3' 位置处的羟基(-OH)是受保护的(被 R 所保护), 因此, 它们能够终止聚合酶(例如 DNA 聚合酶)的聚合作用。例如, 当式 (A) 所示化合物被引入生长的核酸链的 3' 端时, 由于该化合物的脱氧核糖的 3' 位置处不存在游离的羟基(-OH), 聚合酶将无法继续进行下一轮的聚合反应, 从而聚合反应将被终止。在这种情况下, 在每一轮的聚合反应中, 将有且只有一个碱基被掺入生长的核酸链。

此外, 所述式 (A) 所示化合物的脱氧核糖 3' 位置处羟基(-OH)的保护基团(R)能够被去除, 并转变为游离的羟基(-OH)。随后, 可使用聚合酶和式 (A) 所示化合物对生长的核酸链进行下一轮的聚合反应, 并再次引入一个碱基。

因此, 所述式 (A) 所示化合物的脱氧核糖 3' 位置处羟基(-OH)被可逆阻断: 当式 (A) 所示化合物被掺入生长的核酸链的 3' 端时, 它们将终止聚合酶继续进行聚合作用, 终止生长的核酸链的进一步延伸; 并且, 在式 (A) 所示化合物所包含的阻断基团被去除后, 聚合酶将能够继续对生长的核酸链进行聚合作用, 继续延伸核酸链。

本文描述的某些实施方案涉及常规可检测标记的使用。可通过任何适合的方法进行检测, 包括荧光光谱学或其他光学手段。优选的标记为荧光标记即荧光团, 该荧光团在吸收能量后发出限定波长的辐射。已知许多种适合的荧光标记。例如, Welch 等人(Chem.Eur.J.5(3):951-960,1999) 公开了丹酰基-功能化的

荧光部分，其可在本发明中使用。Zhu 等人 (Cytometry28:206-211,1997)描述了荧光标记 Cy3 和 Cy5 的使用，其也可以在本发明中使用。Prober 等人 (Science238:336-341,1987)、Connell 等人(BioTechniques5(4):342-384,1987)、Ansorge 等人(Nucl.AcidsRes. 15(11):4593-4602,1987)和 Smith 等人 (Nature321:674,1986)也公开了适合使用的标记。其他可商业购得的荧光标记包括但不限于荧光素、若丹明(包括 TMR、德克萨斯红和 Rox)、alexa、氟硼荧、吖啶、香豆素、芘、苯并蒽和花青苷。

本申请中也可以使用多重标记，例如双荧光团 FRET 盒(Tet. Let. 46:8867 - 8871,2000)、也可以使用多荧光体树枝状系统(J.Am.Chem.Soc. 123:8101-8108,2001)。虽然优选荧光标记，对于本领域的普通技术人员来说其他形式的可检测标记也明显适用。例如微颗粒，包括量子点(Empodocles 等人, Nature 399:126- 130,1999)、金纳米颗粒(Reichert 等人,Anal.Chem.72:6025-6029,2000)和微珠(Lacoste 等人, Proc.Natl.Acad.Sci USA 97(17):9461-9466,2000)也都可以使用。

本申请也可以使用多组分标记。多组分标记是依赖于与用于检测的另外化合物的相互作用的标记。在生物学中最常用的多组分标记是生物素-链霉亲和素系统。生物素用作与核苷酸或修饰的核苷酸相连接的标记。然后单独加入链霉亲和素使检测发生。可以使用其他多组分系统。例如，二硝基苯酚具有可商业购得的可用于检测的荧光抗体。

在本文描述的某些实施方案中，可以通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）的引入使得修饰的核苷酸或核苷分子携带上文描述的可检测标记，所述亲和试剂可以特异性识别并结合所述修饰的核苷酸或核苷分子的表位，具体原理详见 WO2018129214A1。WO2018129214A1 中的全部相关内容引入本申请中。

在本文描述的另外一些实施方案中，可以将修饰的核苷酸或核苷分子与上文描述的可检测标记相连接。在某些这类实施方案中，所用的连接基团可裂解。使用可裂解的连接基团确保了在需要时所述标记能够在检测后被除去，这避免了与随后并入的任何标记的核苷酸或核苷的任何干扰信号。

在另一些实施方案中，所使用的连接基团是不可裂解的。因为在并入了本发明的标记核苷酸的每个情况中，不需要随后并入核苷酸，因此不需要将标记从核苷酸中除去。

本领域技术人员了解双脱氧核苷三磷酸酯在 Sanger 测序法及相关方案 (Sanger 型)中的效用，其依赖于在特定类型核苷酸处的随机链终止。本申请中的核苷酸在 Sanger 法及相关方案中具有效用，因为通过使用 ddNTPs 实现的相同效果可以通过使用本文描述的 3'-OH 阻断基团来实现：均防止了后续核苷酸的掺入。同样的，本申请中的修饰的核苷和核苷酸在高通量测序中也具有效用，特别是在基于边合成边测序的高通量测序平台中，使用本申请的可逆阻断核苷酸及其类似物，可在测序过程中逐个检测掺入的核苷酸类型。

可裂解的连接基团是本领域中熟知的，并且可应用常规化学将连接基团与核苷酸或修饰的核苷酸和标记相连。可通过任何适合的方法裂解所述连接基团，包括暴露于酸、碱、亲核试剂、亲电试剂、自由基、金属、还原剂或氧化剂、光、温度、酶等。还可以使用用于断裂 3'-O-保护基键的相同催化剂裂解本文中讨论的连接基团。如 Greene&Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基),John Wiley&Sons 中所公开的，合适的连接基团可修改自标

准的化学保护基。Guillier 等人(Chem.Rev.100:2092-2157,2000)中还公开了用于固相合成的合适的可裂解的连接基团。

使用术语“可裂解的连接基团”并非意味着需要除去整个连接基团,例如,从核苷酸或修饰的核苷酸中除去。当可检测标记与核苷酸或修饰的核苷酸相连接时,核苷裂解位点可位于连接基团上的位置,该位置能够确保在裂解后一部分的连接基团仍与所述核苷酸或修饰的核苷酸保持连接。

当可检测标记与核苷酸或修饰的核苷酸相连接时,连接基团可以连接在核苷酸或修饰的核苷酸上的任何位置上,只要 Watson-Crick 碱基配对仍然能够进行。

A. 亲电裂解的连接基团

亲电裂解的连接基团典型地被质子所裂解,并包括对酸敏感的裂解。合适的连接基团包括修饰的苄基系统,诸如三苯甲基、对炔氧基苄基酯和对炔氧基苄基酰胺。其他适合的连接基团包括叔丁氧羰基(Boc)基团和缩醛系统。

为制备合适的连接分子,还可以考虑在硫缩醛或其他含硫保护基的裂解中使用诸如镍、银或汞的亲硫金属。

B. 亲核裂解的连接基团

在连接分子的制备中,亲核裂解也是被公认的方法。可以使用在水中不稳定的基团(即,能够在碱性 pH 值下简单地裂解),例如酯类,以及对非水性亲核试剂不稳定的基团。氟离子可用于裂解诸如三异丙基硅烷(TIPS)或叔丁基二甲基硅烷(TBDMS)的基团中的硅氧键。

C. 可光解的连接基团

可光解的连接基团在糖化学中被广泛使用。优选地,激活裂解所需的光不影响修饰的核苷酸中的其他组分。例如,如果使用荧光团作为标记,优选地,该荧光团吸收与裂解所述连接分子所需的光不同波长的光。适合的连接基团包括那些基于 O-硝基苄基化合物和硝基苄基化合物的连接基团。也可以使用基于安息香化学的连接基团(Lee 等人,J.Org.Chem.64:3454-3460,1999)。

D. 还原条件下的裂解

已知多种对还原裂解敏感的连接基团。使用基于钨催化剂的催化氢化已用于裂解苄基和苄氧羰基基团。二硫键还原也为本领域所知。

E. 氧化条件下的裂解

基于氧化的方法为本领域所公知。这些方法包括对炔氧基苄基的氧化以及硫和硒连接基团的氧化。使用碘溶液(aqueous iodine)来使二硫化物和其他基于硫或硒的连接基团裂解也在本发明的范围内。

F. 安全拉手型连接基团

安全拉手型连接基团(safety-catch linker)为那些在两步中裂解的连接基团。在优选的系统中,第一步是反应性亲核中心的产生,随后的第二步涉及分子内环化,这导致裂解。例如,可以用肼或光化学方法处理乙酰丙酸酯连接来释放活性的胺,然后所述胺被环化以使分子中其他位置的酯裂解(Burgess 等人,J.Org.Chem.62:5165-5168,1997)。

G. 经消除机理裂解

也可以使用消除反应。可以使用诸如苄甲氧羰基和氰基乙基的基团的碱催化的消除以及烯丙基系统的钨催化的还原消除。

在某些实施方案中,连接基团可包含间隔单元。连接基团的长度并不重要,只要所述标记与核苷酸保持足够的距离,以免干扰核苷酸与酶之间的相互

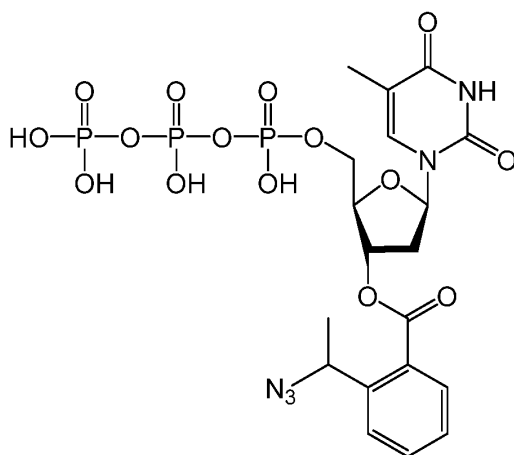
作用。

在某些实施方案中，连接基团可由与 3'-OH 保护基类似的功能组成。这会使脱保护和脱保护方法更加有效，因为仅需要单一处理就除去标记和保护基。特别优选的连接基团是可通过酶裂解的含叠氮化物的连接基团。

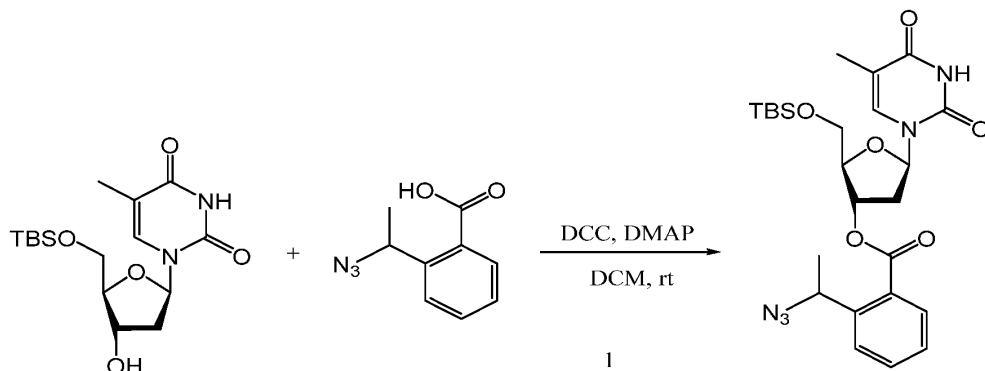
下面结合具体实施例对本发明进行进一步的解释说明。如无特别说明，以下实施例所使用的试剂均可以常规市购获得。另外，对于 3'-OH 的每一种修饰，如果制备了核苷酸类似物 dTTP、dATP、dCTP、dGTP 中的一种或几种，则本领域技术人员可以毫无疑问地制备获得剩余的一种或几种核苷酸类似物。

一、制备实施例

实施例一



目标产物结构为
(1) 步骤 1

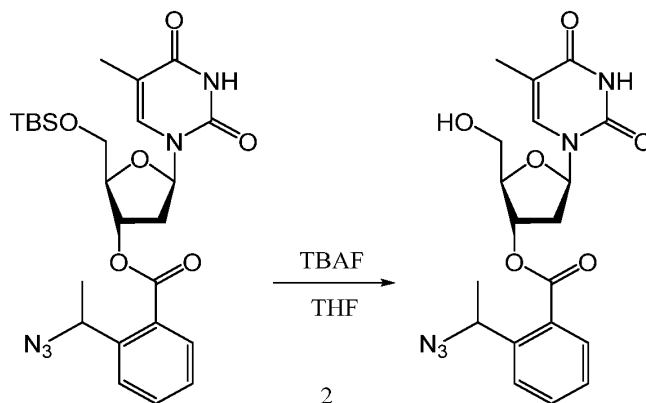


准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取 T 核苷 (500mg, 1.4mmol, 1eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-N-18102) 和叠氮保护基 (268mg, 1.4mmol, 1eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-H-20001) 分别加入圆底烧瓶中，注射器抽取 20mL 无水二氯甲烷作溶剂，室温条件下搅拌使其溶解。称取 DCC(435mg, 2.1mmol, 1.5eq) 和 DMAP(20mg, 0.14mmol, 0.1eq)，分别加入反应液中，氦气球做气体保护，室温条件下继续反应约 4h。每隔半小时采用 TLC 监测反应，直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane/EA=10/1~1/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 95%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.41 (1H, s); 7.97(1H, m); 7.61 (3H, m); 7.40 (1H, m);

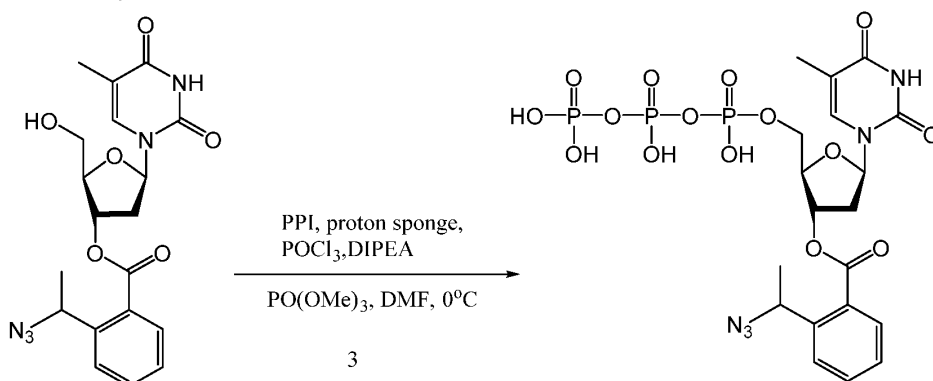
7.27(1H, s); 6.45 (1H, m); 5.67 (1H, m); 5.50 (1H, m); 4.28 (1H, m); 4.02 (1H, m); 2.59 (1H, m); 2.24 (1H, m); 1.96 (3H, s); 1.55 (3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.97 (9H, s); 0.10 (6H, s).

(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶, 称取步骤 1 得到的产物 (750mg, 1.4mmol, 1eq) 加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂, 搅拌使其溶解后, 注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液 (1.8mL, 1.8mmol, 1.3eq), 冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。每隔半小时采用 TLC 监测反应直至原料点基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后, 用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane/EA=10/1~1/1 转二氯甲烷: 无水甲醇=100/1~10/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 70%。
 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.34 (1H, s); 7.89 (1H, m); 7.78 (1H, s); 7.70–7.62 (2H, m); 7.50–7.46 (1H, m); 6.27–6.24 (1H, m); 5.58–5.55 (1H, m), 5.26 (1H, t); 4.19 (1H, br.); 3.71 (2H, br.); 1.79 (3H, d); 1.49 (3H, d, $J = 6.8$ Hz).

(3) 步骤 3

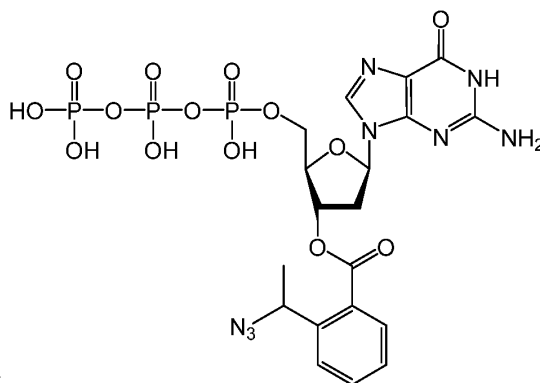


准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号, 称取步骤 2 中制备得到的产物 (350mg, 0.85mmol, 1eq), 质子海绵 (363.5mg, 1.7mmol, 2eq), 加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号, 称取三丁基焦磷酸铵 (932.5mg, 1.7mmol, 2eq) 加入两口瓶 2 号。将两口瓶 1 号中注入氩气, 加入 15mL 磷酸三甲酯, 搅拌使其充分溶解。反应转移至 0°C 环境下, 注射器抽取三氯氧磷 (120uL, 1.3mmol, 1.5eq), 缓慢加入反应体系。保持 0°C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气, 用注射器抽取 2mL 无水 DMF 和 DIPEA (740uL, 4.25mmol, 5eq), 0°C 条件下搅拌使其溶解。用注射器将反应

瓶1中的液体转移至反应瓶2中。保持0°C,继续搅拌3h后,加入20 mL TEAB溶液(0.1mol/L)淬灭反应。反应液用50mL去离子水稀释,然后用准备好的DEAE树脂柱梯度冲洗分离($\text{H}_2\text{O}:\text{TEAB}(1\text{mol/L})=10/1\sim 0/1$, DEAE柱直径4.5cm,装柱高度8cm)。分离得到的溶液分别用HPLC和MS鉴定,收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩到10mL后,用制备液相色谱分离产物,梯度为($\text{CH}_3\text{CN}:\text{TEAB}(0.1\text{mol/L})=2/98\sim 98/2$)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后,转移到塑料离心管中,然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW=655。本步骤产率为50%。

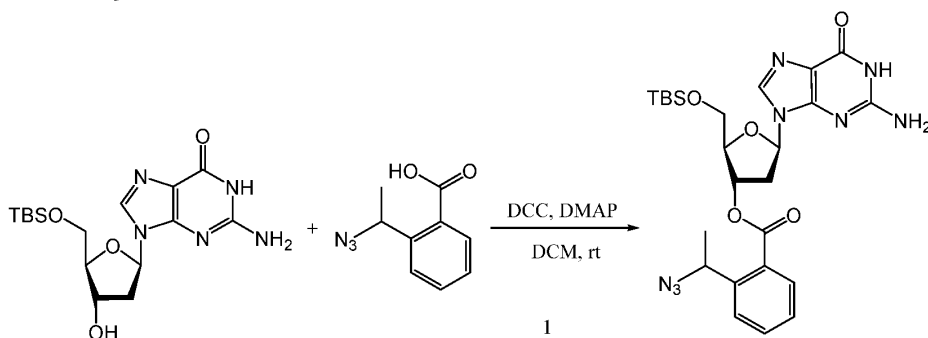
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.32 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.93 – 7.88 (m, 1H), 7.72 – 7.60 (m, 2H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 6.40 – 6.29 (m, 1H), 5.64 – 5.54 (m, 2H), 4.33 (s, 1H), 4.17 – 4.01 (m, 2H), 2.54 – 2.50 (m, 1H), 2.45 – 2.36 (m, 1H), 1.85 (s, 3H), 1.49 (dd, $J=6.7, 1.0$ Hz, 3H)。

实施例二



目标产物结构为

(1) 步骤1

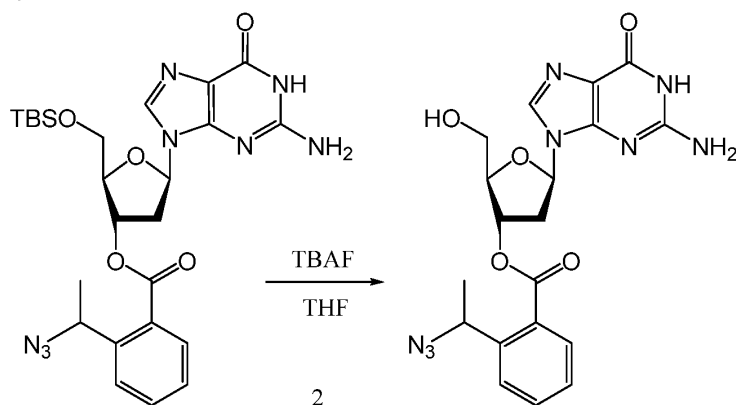


准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的100mL圆底烧瓶,称取G核苷(600mg, 1.58mmol, 1eq)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司,货号OK-N-18103)和叠氮保护基(302mg, 1.58mmol, 1eq)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司,货号OK-H-20001)分别加入圆底烧瓶中,注射器抽取20mL无水二氯甲烷作溶剂,室温条件下搅拌使其溶解。称取DCC(488mg, 2.37mmol, 1.5eq)和DMAP(20mg, 0.16mmol, 0.1eq),分别加入反应液中,氦气球做气体保护,室温条件下继续反应约4h。采用TLC每隔半小时监测反应,直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后,用硅胶柱色谱法分离产物(Hexane: EA=10/1~1/1, 硅胶柱直径3.5cm,装柱高度10cm)。本步骤反应产率为95%。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.65 (s, 1H), 7.99 – 7.84 (m, 2H), 7.79 – 7.61 (m,

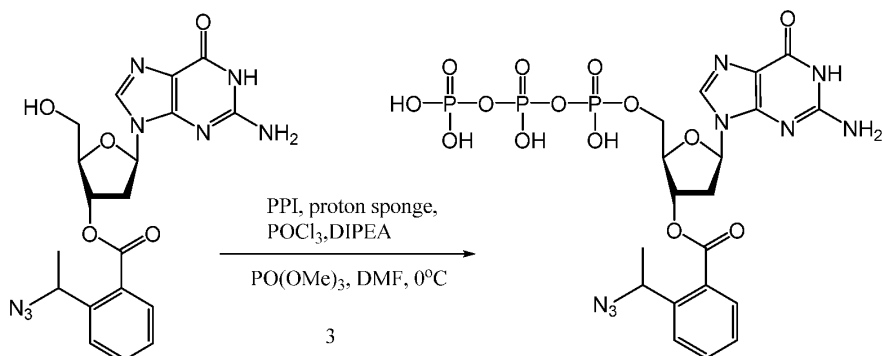
2H), 7.57 – 7.45 (m, 1H), 6.47 (s, 2H), 6.20 (ddd, $J = 9.1, 5.8, 3.6$ Hz, 1H), 5.65 – 5.49 (m, 2H), 4.27 (qd, $J = 4.8, 1.9$ Hz, 1H), 3.86 (dd, $J = 4.6, 2.2$ Hz, 2H), 2.99 – 2.80 (m, 1H), 2.78 – 2.61 (m, 1H), 1.50 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.07 (dd, $J = 4.5, 1.3$ Hz, 6H).

(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取步骤 1 得到的产物 (850mg, 1.54mmol, 1eq) 加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂，室温搅拌使其溶解后，注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液 (2.0mL, 2.0mmol, 1.3eq)，冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料点基本消失。反应液用旋转蒸发仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane/EA=10/1~1/1 转二氯甲烷/无水甲醇=100/1~10/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 70%。
 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.68 (H, s), 7.99 (1H, s), 7.91 (1H, m), 7.67 (2H, m), 7.46 (1H, m), 6.52 (2H, s), 6.17 (1H, m), 5.58 (2H, m), 5.25 (1H, m), 4.23 (1H, t), 3.66 (2H, t), 2.89 (1H, m), 2.61 (1H, m), 1.49 (3H, d, $J = 6.8$ Hz).

(3) 步骤 3

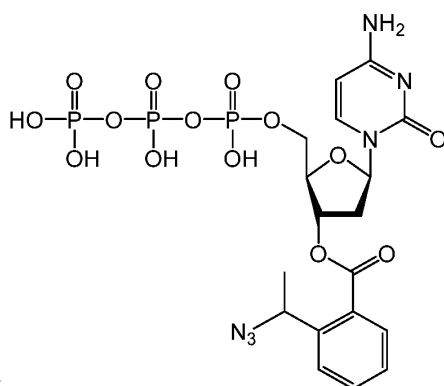


准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号，称取步骤 2 中制备得到的产物 (375mg, 0.85mmol, 1eq)，质子海绵 (363.5mg, 1.7mmol, 2eq)，加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号，称取三丁基焦磷酸铵 (932.5mg, 1.7mmol, 2eq) 加入两口瓶 2 号。将两口瓶 1 号中注入氩气，加入 15mL 磷酸三甲酯，搅拌使其充分溶解。反应转移至 0°C 环境下，注射器抽取三氯氧磷 (120uL, 1.3mmol, 1.5eq)，缓慢加入反应体系。保持 0°C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气，用注射器抽取 5mL 无水 DMF 和 DIPEA (740uL, 4.25mmol, 5eq)，0°C 条件下搅拌使其溶解。用注射器将反应

瓶 1 中的液体转移至反应瓶 2 中。保持 0°C，继续搅拌 3h 后，加入 20 mL TEAB 溶液(0.1mol/L)淬灭反应。反应液用 50mL 去离子水稀释，然后用准备好的 DEAE 树脂柱梯度冲洗分离 (H₂O/TEAB(1mol/L)=10/1~0/1, DEAE 柱直径 4.5cm, 装柱高度 8cm)。收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩后，用制备液相色谱分离产物，梯度为 (CH₃CN:TEAB(0.1mol/L)=2/98~98/2)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后，转移到塑料离心管中，然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW=680。本步骤反应产率为 45%。

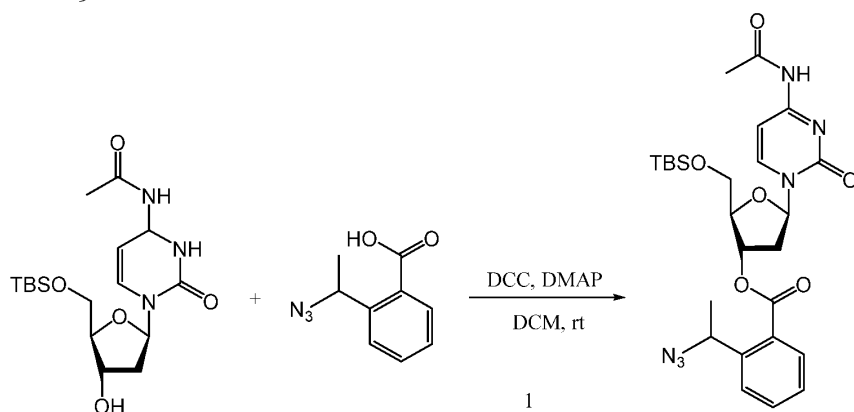
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.12 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.73 – 7.62 (m, 2H), 7.50 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.87 (s, 2H), 6.25 – 6.19 (m, 1H), 5.72 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.61 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.36 – 4.33 (m, 1H), 4.25 – 4.18 (m, 1H), 4.06 – 4.01 (m, 1H), 3.27 – 3.12 (m, 1H), 2.60 – 2.52 (m, 1H), 1.50 (dd, *J* = 6.7, 2.0 Hz, 3H).

实施例三



目标产物结构为

(1) 步骤 1

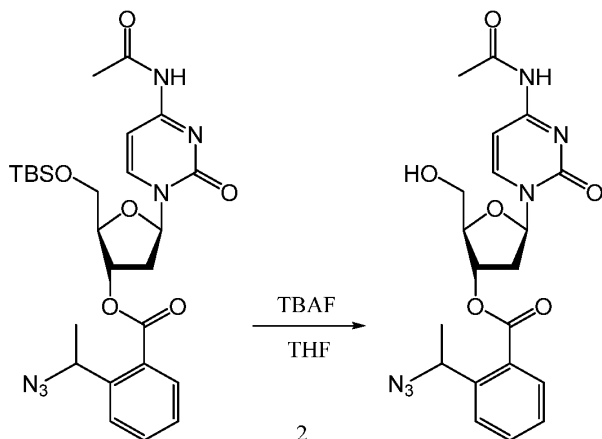


准备一个干燥的装有磁子和带氦气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取 C 核苷 (600mg, 1.56mmol, 1eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-N-18104) 和叠氮保护基 (297mg, 1.56mmol, 1eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20001) 分别加入圆底烧瓶中，注射器抽取 20mL 无水二氯甲烷作溶剂，室温条件下搅拌使其溶解。称取 DCC(480mg, 2.34mmol, 1.5eq)和 DMAP(20mg, 0.16mmol, 0.1eq)，分别加入反应液中，氦气球做气体保护，室温条件下继续反应约 4h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装

柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 95%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.91 (1H, s); 8.23 (1H, d, $J=7.52$ Hz); 7.89 (1H, d, $J=6.80$ Hz); 7.66 (2H, m); 7.48 (1H, m); 7.23 (1H, d, $J=7.48$); 6.19 (1H, t), 5.55 (1H, m); 5.44 (1H, d, $J=6.04$ Hz), 4.42 (1H, t); 3.92 (2H, m); 2.74 (1H, m); 2.32 (1H, m); 1.47 (3H, d, $J=6.7$ Hz); 0.86 (9H, s); 0.09 (6H, s).

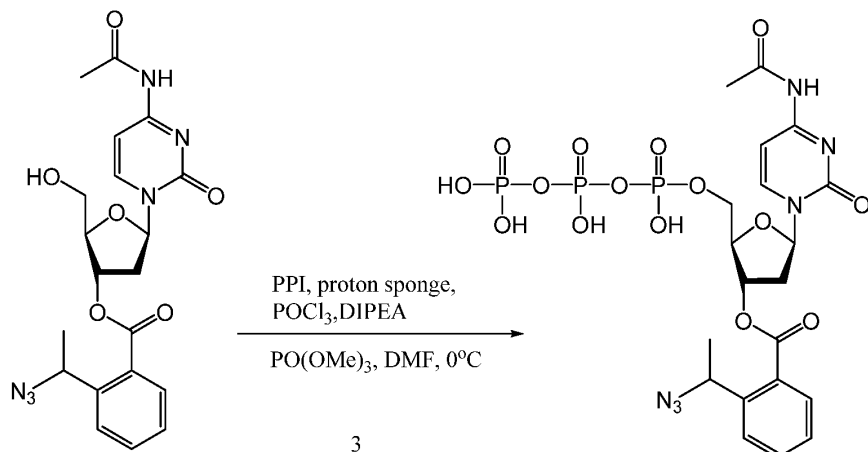
(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶, 称取步骤 1 得到的产物 (860mg, 1.54mmol, 1eq) 加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂, 搅拌使其溶解后, 注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液 (2.0mL, 2.0mmol, 1.3eq), 冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。采用 TLC 每隔半小时监测反应直至原料点基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后, 用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/1 转二氯甲烷: 无水甲醇 =100/1~10/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 70%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.90 (1H, s); 8.34 (1H, d, $J=7.48$ Hz); 7.89 (1H, d, $J=7.84$ Hz); 7.66 (2H, m); 7.48 (1H, m); 7.23 (1H, d, $J=7.48$ Hz); 6.22 (1H, t); 5.57 (1H, m); 5.47 (1H, d, $J=6.00$ Hz); 5.25 (1H, s); 4.32 (1H, m); 3.72 (1H, s); 2.67 (1H, m); 2.31 (1H, m); 1.45 (3H, d, $J=6.7$ Hz).

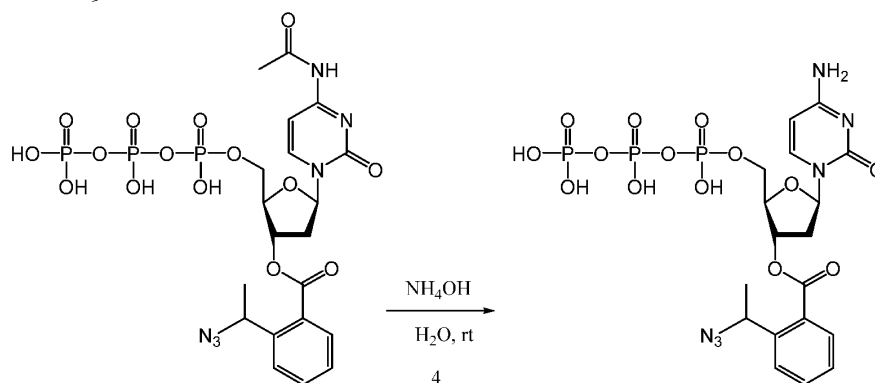
(3) 步骤 3



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号, 称取步骤 2 中制备得到的产物 (377mg, 0.85mmol, 1eq), 质子海绵 (363.5mg, 1.7mmol,

2eq), 加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号, 称取三丁基焦磷酸铵 (932.5mg, 1.7mmol, 2eq) 加入两口瓶 2 号。将两口瓶 1 号中注入氩气, 加入 15mL 磷酸三甲酯, 搅拌使其充分溶解。反应转移至 0 °C 环境下, 注射器抽取三氯氧磷 (120uL, 1.3mmol, 1.5eq), 缓慢加入反应体系。保持 0 °C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气, 用注射器抽取 2mL 无水 DMF 和 DIPEA (740uL, 4.25mmol, 5eq), 0 °C 条件下搅拌使其溶解。保持 0 °C, 继续搅拌 3h 后, 加入 20mL TEAB 溶液 (0.1mol/L) 淬灭反应。反应液用 50mL 去离子水稀释, 然后用准备好的 DEAE 树脂柱梯度冲洗分离 ($\text{H}_2\text{O}:\text{TEAB}(1\text{mol/L})=10/1\sim 0/1$, DEAE 柱直径 4.5cm, 装柱高度 8cm)。收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩, 用制备液相色谱分离产物, 梯度为 ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{TEAB}(0.1\text{mol/L})=2/98\sim 98/2$)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后, 转移到塑料离心管中, 然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW=684。本步骤反应产率为 40%。

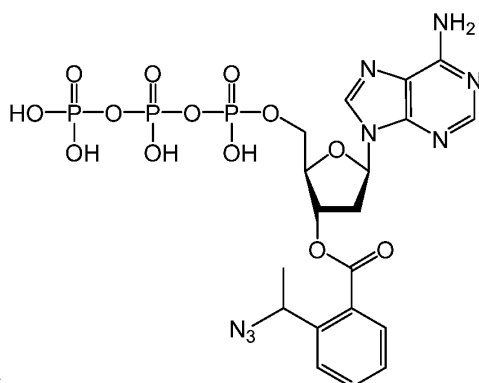
(4) 步骤 4



准备一个干燥的装有磁子的 100mL 圆底烧瓶, 称取步骤 3 中制备得到的三磷酸化产物 (500mg, 0.73mmol, 1eq) 加入 5ml 去离子水, 室温条件下搅拌使其充分溶解, 缓慢加入 25% 氨水溶液 (2.5g, 36.5mmol, 50eq)。室温条件下搅拌约 6h。用旋蒸仪真空除去溶液中的氨水, 然后用去离子水稀释至约 10mL。制备液相分离产物, 梯度为 ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{TEAB}(0.1\text{mol/L})=2/98\sim 98/2$)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后, 转移到塑料离心管中, 用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW=642。本步骤反应产率为 90%。

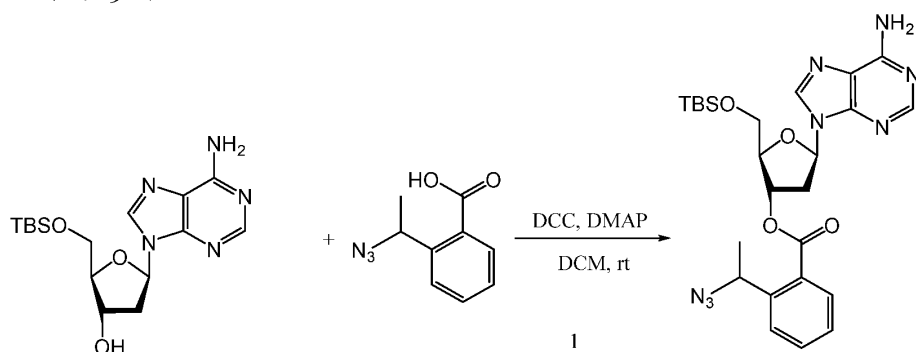
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.99 (dd, $J=7.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.71 - 7.63 (m, 2H), 7.54 - 7.42 (m, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.41 - 6.28 (m, 1H), 5.81 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.65 - 5.50 (m, 2H), 4.33 (s, 1H), 4.18 - 3.96 (m, 2H), 2.46 - 2.26 (m, 2H), 1.49 (dd, $J=6.7, 1.4$ Hz, 3H).

实施例四



目标产物结构为

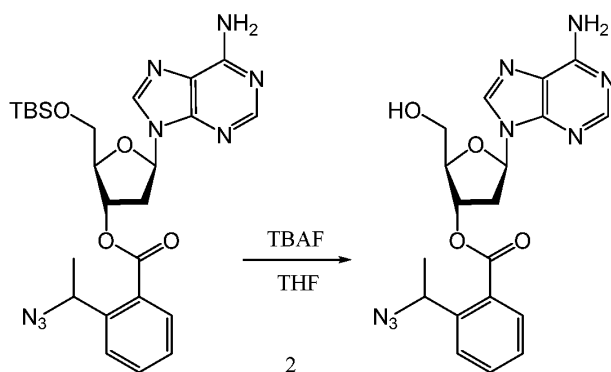
(1) 步骤 1



准备一个干燥的装有磁子和带氦气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取 A 核苷 (600mg, 1.65mmol, 1eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-N-18101) 和叠氮保护基 (314mg, 1.65mmol, 1eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-H-20001) 分别加入圆底烧瓶中，注射器抽取 20mL 无水二氯甲烷作溶剂，室温条件下搅拌使其溶解。称取 DCC(508mg, 2.5mmol, 1.5eq) 和 DMAP(24mg, 0.17mmol, 0.1eq)，分别加入反应液中，氮气球做气体保护，室温条件下继续反应约 4h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 95%。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.36 (1H, s); 8.28 (1H, d, $J=4.4$ Hz); 7.98 (1H, m); 7.65 (2H, m); 7.41 (1H, m); 6.60 (1H, t); 6.0 (2H, br.); 5.68 (2H, m); 4.40 (1H, br.); 4.01 (2H, br.); 1.93 (1H, m); 1.68 (1H, m); 1.56 (3H, d, $J=6.7$ Hz); 0.94 (9H, s); 0.15 (6H, s).

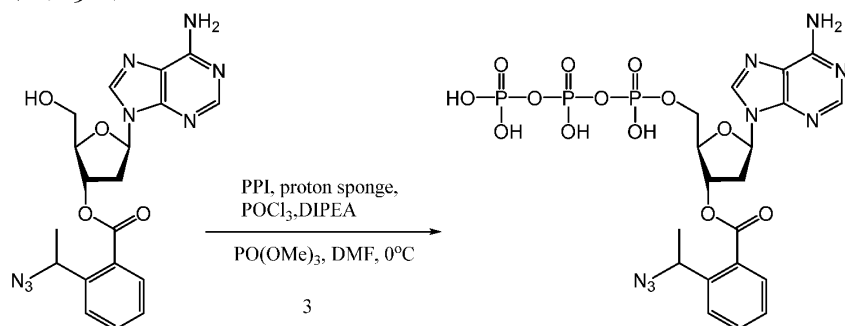
(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取步骤 1 得到的产物 (828mg, 1.54mmol, 1eq) 加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂，搅拌使其溶解后，注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液 (2.0mL, 2.0mmol, 1.3eq)，冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料点基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/1 转二氯甲烷: 无水甲醇 =100/1~10/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 70%。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.66 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.92 (ddd, $J = 8.0, 3.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.82–7.59 (m, 2H), 7.51 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.46 (s, 2H), 6.20 (dt, $J = 9.5, 5.4$ Hz, 1H), 5.58 (ddd, $J = 15.6, 6.2, 2.5$ Hz, 2H), 5.21 (td, $J = 5.6, 1.8$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 4.3, 1.7$ Hz, 1H), 3.77–3.55 (m, 2H), 2.91 (qd, $J = 9.1, 5.8$ Hz, 1H), 2.62 (dt, $J = 13.7, 6.6$ Hz, 1H), 1.51 (dd, $J = 6.7, 1.7$ Hz, 3H).

(3) 步骤 3



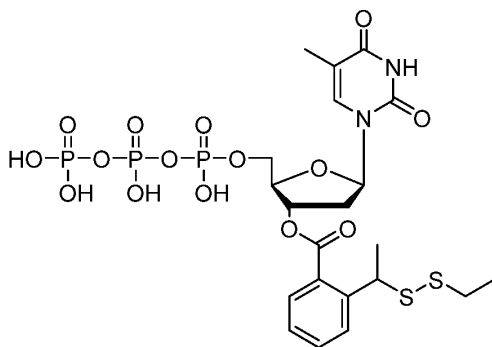
准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号，称取步骤 2 中制备得到的产物 (360mg, 0.85mmol, 1eq)，质子海绵 (363.5mg, 1.7mmol, 2eq)，加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号，称取三丁基焦磷酸铵 (932.5mg, 1.7mmol, 2eq) 加入两口瓶 2 号。将两口瓶 1 号中注入氩气，加入 15mL 磷酸三甲酯，搅拌使其充分溶解。反应转移至 0°C 环境下，注射器抽取三氯氧磷 (120uL, 1.3mmol, 1.5eq)，缓慢加入反应体系。保持 0°C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气，用注射器抽取 5mL 无水 DMF 和 DIPEA (740uL, 4.25mmol, 5eq)，0°C 条件下搅拌使其溶解。保持 0°C，继续搅拌 3h 后，加入 20 mL TEAB 溶液 (0.1mol/L) 淬灭反应。反应液用 50mL 去离子水稀释，然后用准备好的 DEAE 树脂柱梯度冲洗分离 ($\text{H}_2\text{O}:\text{TEAB}(1\text{mol/L})=10/1\sim 0/1$, DEAE 柱直径 4.5cm, 装柱高度 8cm)。收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩后，用制备液相色谱分离产物，梯度为 ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{TEAB}(0.1\text{mol/L})=2/98\sim 98/2$)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪

真空浓缩后，转移到塑料离心管中，然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。

MW=664.。本步骤反应产率为 40%。

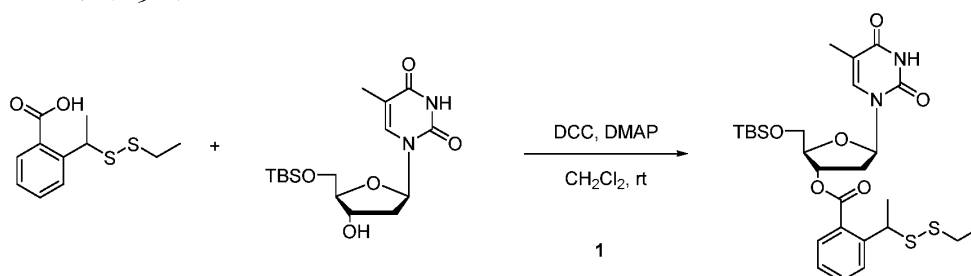
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.62 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.72 - 7.65 (m, 2H), 7.55 - 7.47 (m, 1H), 7.29 (s, 2H), 6.51 - 6.46 (m, 1H), 5.74 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.68 - 5.58 (m, 1H), 4.44 - 4.41 (m, 1H), 4.14 - 4.01 (m, 2H), 3.19 - 3.11 (m, 1H), 2.75 - 2.65 (m, 1H), 1.51 (dd, $J = 6.7, 1.5$ Hz, 3H).

实施例五



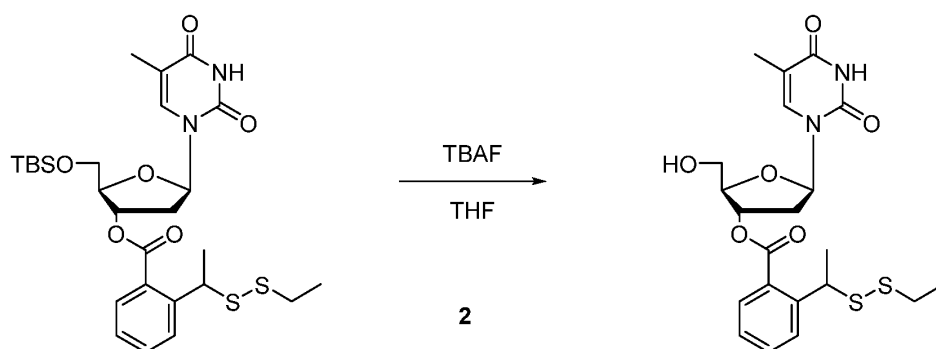
目标产物结构为

(1) 步骤 1



准备一个干燥的装有磁子和带氦气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取 T 核苷 (500 mg, 1.40 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号 OK-N-18102) 和二硫保护基 (340 mg, 1.40 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号：OK-H-21003) 分别加入圆底烧瓶中，注射器抽取 20 mL 无水二氯甲烷作溶剂，室温条件下搅拌使其溶解。称取 DCC (433mg, 2.10mmol, 1.5eq) 和 DMAP (17 mg, 0.14 mmol, 0.1 eq)，分别加入反应液中，氦气球做气体保护，室温条件下继续反应约 6h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)，本步骤反应产率为 85%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.61 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 7.84 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.63 - 7.57 (m, 2H), 7.52 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 11.0, 4.1$ Hz, 1H), 6.47 - 6.40 (m, 1H), 5.52 - 5.45 (m, 1H), 5.31 - 5.20 (m, 1H), 4.30 (d, $J = 21.8$ Hz, 1H), 4.07 - 3.94 (m, 2H), 3.51 - 3.44 (m, 1H), 2.63 - 2.53 (m, 1H), 2.29 - 2.20 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 1.69 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.12 - 1.07 (m, 3H), 0.96 (s, 9H), 0.17 (s, 6H).

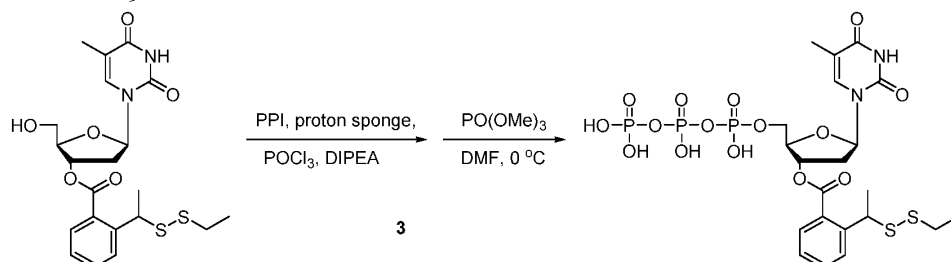
(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取步骤 1 得到的产物（690 mg, 1.19 mmol, 1eq）加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂，室温搅拌使其溶解后，注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液（1.6 mL, 1.6 mmol, 1.3eq），冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料点基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物（Hexane/EA=5/1~1/1 转二氯甲烷/无水甲醇=100/1~10/1，硅胶柱直径 3.5cm，装柱高度 10cm）。本步骤反应产率为 80%。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.57 (s, 1H), 7.87 – 7.80 (m, 1H), 7.60 (dd, J = 7.8, 1.9 Hz, 1H), 7.57 – 7.50 (m, 2H), 7.39 – 7.29 (m, 1H), 6.35 – 6.25 (m, 1H), 5.64 – 5.56 (m, 1H), 5.23 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 14.3, 2.4 Hz, 1H), 4.02 (dd, J = 4.9, 2.5 Hz, 2H), 2.59 – 2.55 (m, 2H), 2.29 – 2.19 (m, 2H), 1.94 (d, J = 0.6 Hz, 3H), 1.70 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.11 (td, J = 7.4, 2.6 Hz, 3H).

(3) 步骤 3

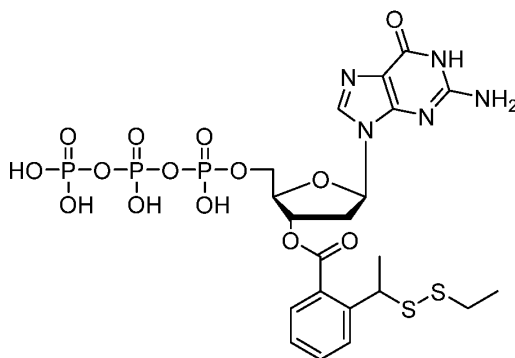


准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号，称取步骤 2 中制备得到的产物（396 mg, 0.85 mmol, 1 eq），质子海绵（363.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq），加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号，称取三丁基焦磷酸铵（932.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq）加入两口瓶 2 号。将两口瓶 1 号中注入氩气，加入 15mL 磷酸三甲酯，搅拌使其充分溶解。反应转移至 0 °C 环境下，注射器抽取三氯氧磷（120 μL , 1.3 mmol, 1.5 eq），缓慢加入反应体系。保持 0 °C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气，用注射器抽取 5mL 无水 DMF 和 DIPEA（740 μL , 4.25 mmol, 5 eq），0 °C 条件下搅拌使其溶解。保持 0 °C，继续搅拌 3h 后，加入 20 mL TEAB 溶液（0.1mol/L）淬灭反应。反应液用 50mL 去离子水稀释，然后用准备好的 DEAE 树脂柱梯度冲洗分离（ H_2O :TEAB(1mol/L)=10/1~0/1，DEAE 柱直径 4.5cm，装柱高度 8cm）。收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩后，用制备液相色谱分离产物，梯度为（ CH_3CN :TEAB(0.1mol/L)=2/98~98/2）。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后，转移到塑料离心管中，然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW

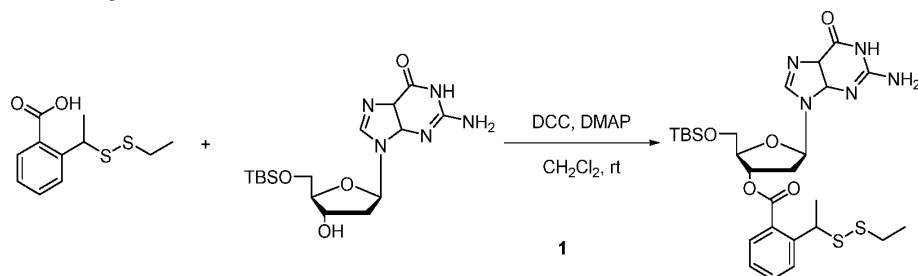
= 706。本步骤反应产率为 40%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.30 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 6.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.68 – 7.56 (m, 2H), 7.46 – 7.41 (m, 1H), 6.38 – 6.27 (m, 1H), 5.60 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.16 – 5.11 (m, 1H), 4.31 (d, $J = 20.8$ Hz, 1H), 4.18 – 4.00 (m, 2H), 2.58 – 2.51 (m, 1H), 2.44 – 2.22 (m, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.65 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.09 – 1.03 (m, 3H).

实施例六



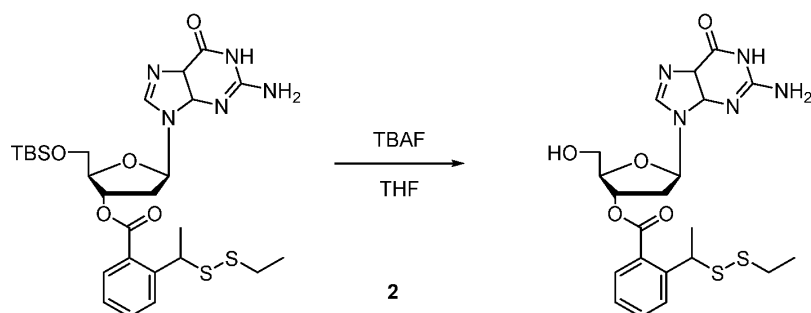
目标产物结构为
(1) 步骤 1



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取 G 核苷 (600 mg, 1.58 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-N-18103) 和二硫保护基 (605 mg, 1.58 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-H-21003) 分别加入圆底烧瓶中，注射器抽取 20mL 无水二氯甲烷作溶剂，室温条件下搅拌使其溶解。称取 DCC(488mg, 2.37mmol, 1.5eq) 和 DMAP(20mg, 0.16mmol, 0.1eq)，分别加入反应液中，氩气球做气体保护，室温条件下继续反应约 4h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/2, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 80%。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 12.00 (s, 1H), 7.93 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.88 – 7.83 (m, 1H), 7.59 (dd, $J = 13.6, 8.0$ Hz, 1H), 7.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.37 – 6.33 (m, 2H), 5.62 (s, 1H), 5.30 – 5.22 (m, 1H), 4.36 (dd, $J = 10.9, 1.5$ Hz, 1H), 4.01 – 3.89 (m, 2H), 3.51 – 3.40 (m, 1H), 2.78 – 2.66 (m, 2H), 2.33 – 2.22 (m, 2H), 1.70 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.13 (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 0.92 (s, 9H), 0.12 (s, 6H).

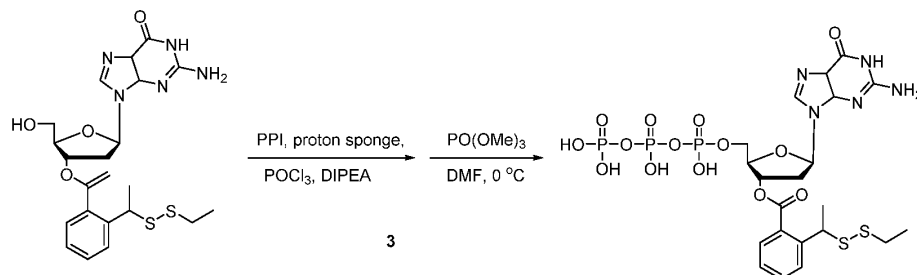
(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取步骤 1 得到的产物 (932 mg, 1.54 mmol, 1 eq) 加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂，搅拌使其溶解后，注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液 (2.0 mL, 2.0 mmol, 1.3 eq)，冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料点基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/1 转二氯甲烷: 无水甲醇=100/1~10/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 70%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 11.71 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.52 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.36–6.02 (m, 1H), 5.41–5.22 (m, 2H), 3.03–2.97 (m, 3H), 2.34 (dd, $J = 14.6, 7.2$ Hz, 2H), 2.26–2.20 (m, 1H), 2.06–1.97 (m, 1H), 1.69 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

(3) 步骤 3

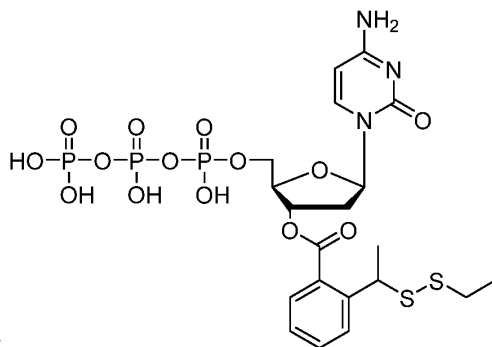


准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号，称取步骤 2 中制备得到的产物 (417 mg, 0.85 mmol, 1 eq)，质子海绵 (363.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq)，加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号，称取三丁基焦磷酸铵 (932.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq) 加入两口瓶 2 号。将两口瓶 1 号中注入氩气，加入 15mL 磷酸三甲酯，搅拌使其充分溶解。反应转移至 0°C 环境下，注射器抽取三氯氧磷 (120 μL , 1.3 mmol, 1.5 eq)，缓慢加入反应体系。保持 0°C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气，用注射器抽取 5mL 无水 DMF 和 DIPEA (740 μL , 4.25 mmol, 5 eq)，0°C 条件下搅拌使其溶解。保持 0°C，继续搅拌 3h 后，加入 20 mL TEAB 溶液 (0.1mol/L) 淬灭反应。反应液继续搅拌 0.5h。反应液用 50mL 去离子水稀释，然后用准备好的 DEAE 树脂柱梯度冲洗分离 (H_2O :TEAB(1mol/L)=10/1~0/1, DEAE 柱直径 4.5cm, 装柱高度 8cm)。收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩到 10mL 后，用制备液相色谱分离产物，梯度为 (CH_3CN :TEAB(0.1mol/L)=2/98~98/2)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后，转移到塑料离心管中，然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW = 706。本步骤反应产率为 40%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.82 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J =$

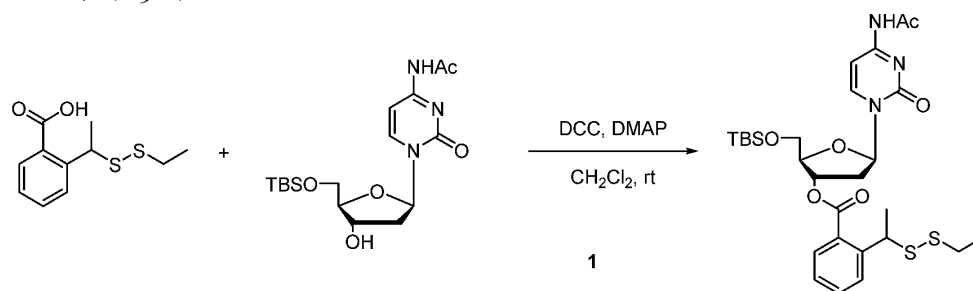
7.8 Hz, 1H), 7.69 – 7.58 (m, 2H), 7.46 – 7.42 (m, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.25 – 6.18 (m, 1H), 5.70 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.22 – 5.10 (m, 1H), 4.40 – 4.27 (m, 1H), 4.21 (dd, $J = 11.0$, 5.0 Hz, 1H), 4.01 (dd, $J = 7.0$, 3.7 Hz, 1H), 2.59 – 2.52 (m, 1H), 2.48 – 2.30 (m, 3H), 1.65 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.07 (t, $J = 5.1$ Hz, 3H).

实施例七



目标产物结构为

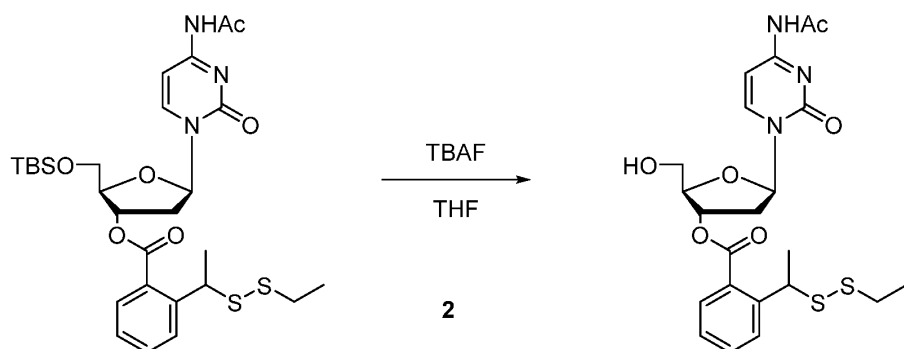
(1) 步骤 1



准备一个干燥的装有磁子和带氦气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取 C 核苷 (608 mg, 1.58 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号 OK-N-18104) 和二硫保护基 (605 mg, 1.58 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号：OK-H-21003) 分别加入圆底烧瓶中，注射器抽取 20mL 无水二氯甲烷作溶剂，室温条件下搅拌使其溶解。称取 DCC(488mg, 2.37mmol, 1.5eq) 和 DMAP(20mg, 0.16mmol, 0.1eq)，分别加入反应液中，氦气球做气体保护，室温条件下继续反应约 4h。采用 TLC 每隔半小时监测反应，直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/2, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 90%。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.53 (s, 1H), 8.35 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.87 (ddd, $J = 7.8$, 4.4, 1.3 Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54 – 7.50 (m, 1H), 7.41 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.32 (td, $J = 7.7$, 1.2 Hz, 1H), 6.44 – 6.38 (m, 1H), 5.50 – 5.48 (m, 1H), 5.29 – 5.21 (m, 1H), 4.45 – 4.36 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.50 – 3.44 (m, 1H), 2.93 – 2.86 (m, 1H), 2.24 – 2.12 (m, 2H), 1.69 (dd, $J = 7.0$, 0.6 Hz, 3H), 1.11 (td, $J = 7.4$, 3.3 Hz, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H).

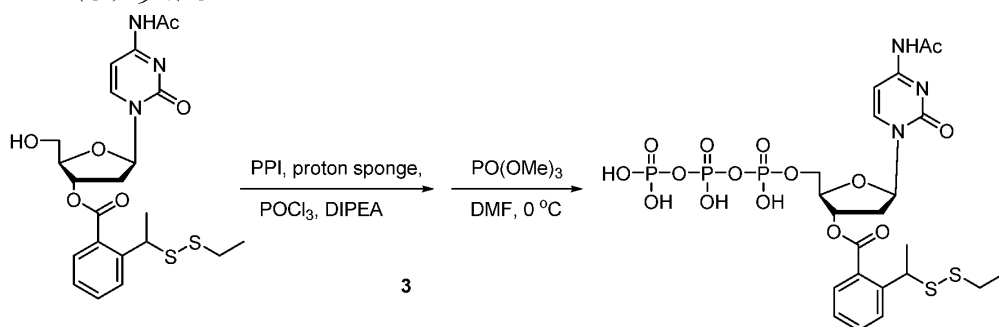
(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取步骤 1 得到的产物（938 mg, 1.54 mmol, 1 eq）加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂，搅拌使其溶解后，注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液（2.0 mL, 2.0 mmol, 1.3 eq），冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。采用 TLC 每隔半小时监测反应直至原料点基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物（Hexane: EA=10/1~1/1 转二氯甲烷：无水甲醇=100/1~10/1，硅胶柱直径 3.5cm，装柱高度 10cm）。本步骤反应产率为 80%。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.50 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.61 - 7.51 (m, 3H), 7.34 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 5.63 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 5.27 - 5.19 (m, 1H), 4.40 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 4.15 - 3.94 (m, 2H), 3.40 (s, 1H), 2.83 (td, $J = 14.3, 4.8$ Hz, 1H), 2.60 - 2.45 (m, 1H), 2.27 - 2.14 (m, 2H), 1.69 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.10 (q, $J = 6.8$ Hz, 3H).

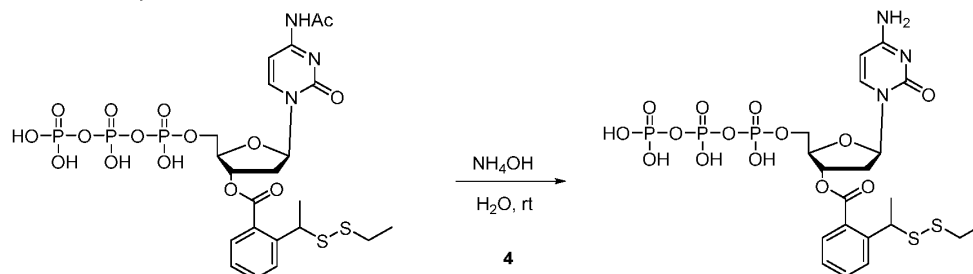
(3) 步骤 3



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号，称取步骤 2 中制备得到的产物（421 mg, 0.85 mmol, 1 eq），质子海绵（363.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq），加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号，称取三丁基焦磷酸铵（932.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq）加入两口瓶 2 号。将两口瓶 1 号中注入氩气，加入 15mL 磷酸三甲酯，搅拌使其充分溶解。反应转移至 0°C 环境下，注射器抽取三氯氧磷（120 μL , 1.3 mmol, 1.5 eq），缓慢加入反应体系。保持 0°C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气，用注射器抽取 5mL 无水 DMF 和 DIPEA（740 μL , 4.25 mmol, 5 eq），0°C 条件下搅拌使其溶解。保持 0°C，继续搅拌 3h 后，加入 20 mL TEAB 溶液（0.1mol/L）淬灭反应。反应液继续搅拌 0.5h。反应液用 50mL 去离子水稀释，然后用准备好的 DEAE 树脂柱梯度冲洗分离（ H_2O :TEAB(1mol/L)=10/1~0/1，DEAE 柱直径 4.5cm，装柱高度 8cm）。收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩后，用制备液相色谱

分离产物，梯度为(CH₃CN:TEAB(0.1mol/L)=2/98~98/2)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后，转移到塑料离心管中，然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW=733。本步骤产率为45%。

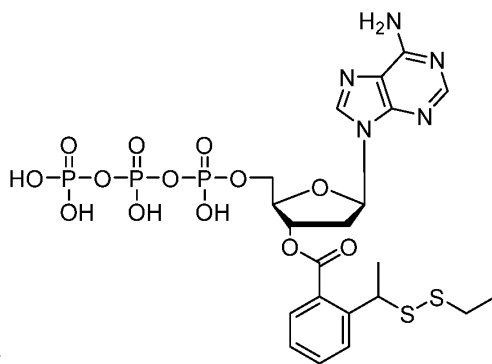
(4) 步骤4



准备一个干燥的装有磁子的 100mL 圆底烧瓶，称取步骤 3 中制备得到的三磷酸化产物(537 mg, 0.73 mmol, 1 eq)加入 5ml 去离子水，室温条件下搅拌使其充分溶解，加入 25%氨水溶液(2.5 g, 36.5 mmol, 50 eq)。室温条件下搅拌约 2h，用旋蒸仪真空除去溶液中的氨水，然后用去离子水稀释至约 10mL。制备液相分离产物，梯度为(CH₃CN:TEAB(0.1mol/L)=2/98~98/2)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后，转移到塑料离心管中，然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW=691。本步骤产率为90%。

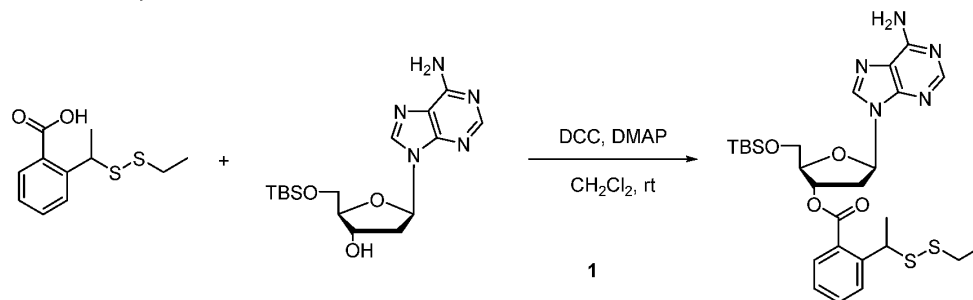
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.97 (dd, *J* = 7.4, 6.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.45 – 7.41 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.39 – 6.29 (m, 1H), 5.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.17 – 5.10 (m, 1H), 4.31 (d, *J* = 19.8 Hz, 1H), 4.13 – 4.01 (m, 2H), 2.46 – 2.23 (m, 4H), 1.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.09 – 1.03 (m, 3H).

实施例八



目标产物结构为

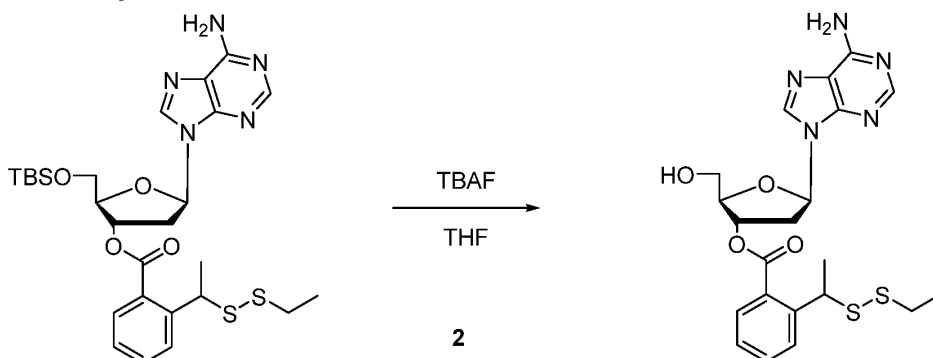
(1) 步骤1



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取 A 核苷 (577 mg, 1.58 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-N-18101) 和二硫保护基 (605 mg, 1.58 mmol, 1 eq) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号 OK-H-21003) 分别加入圆底烧瓶中，注射器抽取 20mL 无水二氯甲烷作溶剂，室温条件下搅拌使其溶解。称取 DCC(488mg, 2.37mmol, 1.5eq) 和 DMAP(20mg, 0.16mmol, 0.1eq)，分别加入反应液中，氩气球做气体保护，室温条件下继续反应约 4h。采用 TLC 每隔半小时监测反应直至原料基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/2, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 85%。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.34 (s, 1H), 8.24 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.87 (ddd, $J = 7.8, 4.4, 1.3$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.52 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 (td, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H), 6.58 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.21 (s, 2H), 5.68 – 5.61 (m, 1H), 5.27 (p, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.45 – 4.36 (m, 1H), 4.04 – 3.95 (m, 2H), 2.83 – 2.73 (m, 2H), 2.31 – 2.18 (m, 2H), 1.69 (dd, $J = 7.0, 0.6$ Hz, 3H), 1.11 (td, $J = 7.4, 3.3$ Hz, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (t, $J = 1.7$ Hz, 6H).

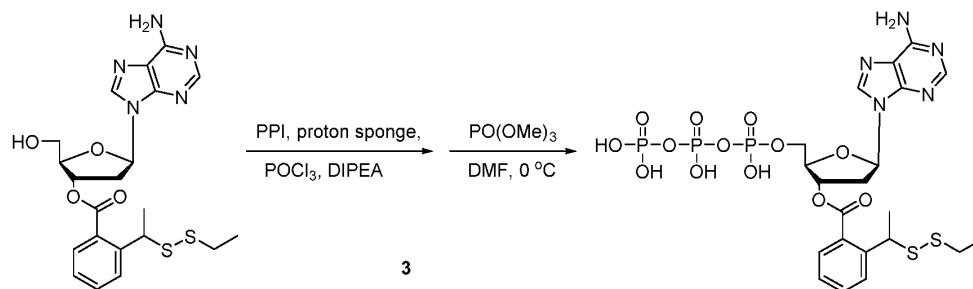
(2) 步骤 2



准备一个干燥的装有磁子和带氩气球橡皮塞的 100mL 圆底烧瓶，称取步骤 1 得到的产物 (907 mg, 1.54 mmol, 1 eq) 加入圆底烧瓶中。注射器抽取 20mL 无水 THF 作溶剂，搅拌使其溶解后，注射器抽取 1mol/L 的 TBAF 溶液 (2.0 mL, 2.0 mmol, 1.3 eq)，冰浴条件下缓慢滴加入反应液中。反应瓶移至室温条件下继续搅拌约 2h。采用 TLC 每隔半小时监测反应直至原料点基本消失。反应液用旋蒸仪浓缩后，用硅胶柱色谱法分离产物 (Hexane: EA=10/1~1/1 转二氯甲烷: 无水甲醇=100/1~10/1, 硅胶柱直径 3.5cm, 装柱高度 10cm)。本步骤反应产率为 80%。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.37 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.89 – 7.85 (m, 1H), 7.65 – 7.61 (m, 1H), 7.56 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H), 7.39 – 7.33 (m, 1H), 6.37 (dd, $J = 9.3, 5.3$ Hz, 1H), 6.02 (s, 2H), 5.83 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.31 – 5.23 (m, 1H), 4.48 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H), 4.09 – 3.97 (m, 2H), 3.33 – 3.28 (m, 1H), 2.63 (dd, $J = 14.0, 4.9$ Hz, 1H), 2.41 – 2.31 (m, 2H), 1.73 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.17 (td, $J = 7.4, 2.3$ Hz, 3H).

(3) 步骤 3

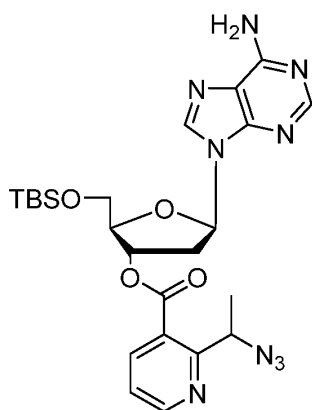


准备一个干燥的装有磁子和带氩气气球三通阀的 100mL 两口瓶 1 号，称取步骤 2 中制备得到的产物 (404 mg, 0.85 mmol, 1 eq)，质子海绵 (363.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq)，加入两口瓶 1 号。准备一个干燥的装有磁子和带氩气气球三通阀的 100mL 两口瓶 2 号，称取三丁基焦磷酸铵 (932.5 mg, 1.7 mmol, 2 eq) 加入两口瓶 2 号将两口瓶 1 号中注入氩气，加入 15mL 磷酸三甲酯，搅拌使其充分溶解。反应转移至 0 °C 环境下，注射器抽取三氯氧磷 (120 uL, 1.3 mmol, 1.5 eq)，缓慢加入反应体系。保持 0 °C 搅拌 1.5h。将反应瓶 2 注入氩气，用注射器抽取 5mL 无水 DMF 和 DIPEA (740 uL, 4.25 mmol, 5 eq)，0 °C 条件下搅拌使其溶解。保持 0 °C，继续搅拌 3h 后，加入 20 mL TEAB 溶液 (0.1mol/L) 淬灭反应。反应液继续搅拌 0.5h。反应液用 50mL 去离子水稀释，然后用准备好的 DEAE 树脂柱梯度冲洗分离 (H₂O:TEAB(1mol/L)=10/1~0/1，DEAE 柱直径 4.5cm，装柱高度 8cm)。收集含有三磷酸化产物的溶液并用旋蒸仪真空浓缩后，用制备液相色谱分离产物，梯度为 (CH₃CN:TEAB(0.1mol/L)=2/98~98/2)。分离得到的高纯度产物溶液用旋蒸仪真空浓缩后，转移到塑料离心管中然后用冻干机冻干至产物为粉末状固体。MW = 715。本步骤反应产率为 40%。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.60 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.69 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.60 - 7.54 (m, 2H), 7.27 (s, 2H), 6.25 - 6.18 (m, 1H), 5.70 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.22 - 5.10 (m, 1H), 4.40 - 4.27 (m, 1H), 4.21 (dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 7.0, 3.7 Hz, 1H), 2.59 - 2.52 (m, 1H), 2.48 - 2.30 (m, 3H), 1.65 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.07 (t, *J* = 5.1 Hz, 3H)。

实施例九

(1) 步骤 1

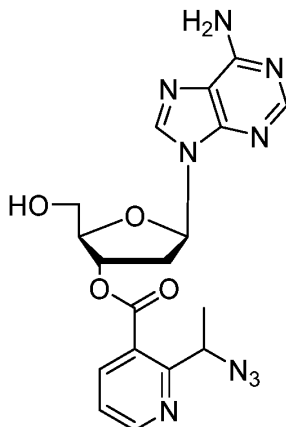


合成方法参考实施例四步骤 1，其中，将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-叠氮乙基)烟酸 (2-(1-azidoethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号：OK-H-20002)，本步骤反应产率

为 85%, MW = 539。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.86 (dd, $J = 4.7, 1.7$ Hz, 1H), 8.38 (dt, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.16 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 1H), 7.32 (s, 2H), 6.47 (ddd, $J = 8.5, 6.1, 2.9$ Hz, 1H), 5.66 (dq, $J = 6.2, 2.0$ Hz, 1H), 5.41 – 5.24 (m, 1H), 4.44 – 4.23 (m, 1H), 4.05 – 3.77 (m, 2H), 3.13 (ddd, $J = 14.3, 8.3, 6.3$ Hz, 1H), 2.87 – 2.68 (m, 1H), 1.61 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.86 (s, 9H), 0.04 (d, $J = 3.9$ Hz, 6H)。

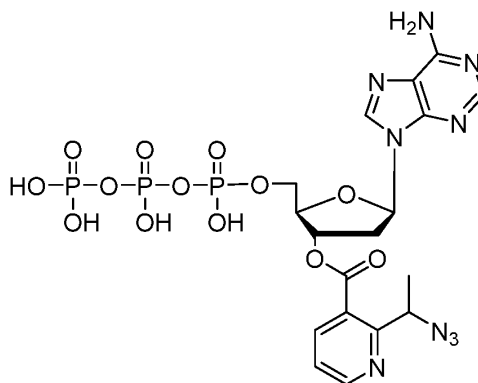
(2) 步骤 2



合成方法参考实施例四步骤 2, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-叠氮乙基)烟酸 (2-(1-azidoethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20002), 本步骤反应产率为 75%, MW = 425。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.86 (dd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, 1H), 8.45 – 8.31 (m, 2H), 8.16 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 1H), 7.38 (s, 2H), 6.47 (ddd, $J = 9.4, 5.8, 4.2$ Hz, 1H), 5.71 – 5.62 (m, 1H), 5.57 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 2.8$ Hz, 1H), 5.33 (p, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.34 (ddt, $J = 7.6, 4.1, 2.2$ Hz, 1H), 3.83 – 3.60 (m, 2H), 3.09 (ddd, $J = 14.5, 9.0, 5.9$ Hz, 1H), 2.85 – 2.65 (m, 1H), 1.61 (dd, $J = 6.7, 2.7$ Hz, 3H)。

(3) 步骤 3

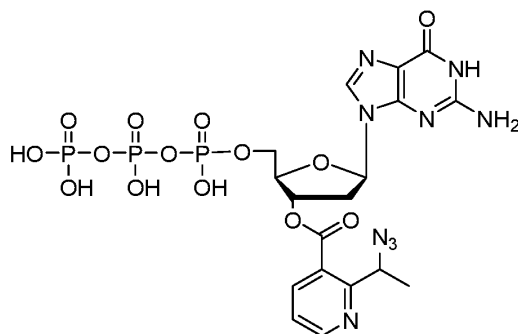


合成方法参考实施例四步骤 3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-叠氮乙基)烟酸 (2-(1-azidoethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20002), 本步骤反应产率为 40%, MW = 665。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.85 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 8.66 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 8.40 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.58 (dd, $J = 7.9, 4.8$ Hz, 1H), 7.31 (s, 2H), 6.54

– 6.45 (m, 1H), 5.77 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 5.37 – 5.28 (m, 1H), 4.44 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.14 – 4.02 (m, 2H), 3.23 – 3.12 (m, 1H), 2.76 – 2.66 (m, 1H), 1.61 (dd, $J = 6.7, 2.1$ Hz, 3H).

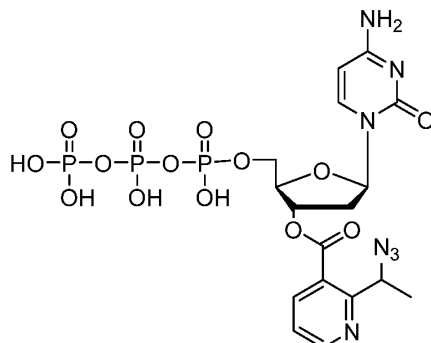
实施例十



合成方法参考实施例二步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-叠氮乙基)烟酸 (2-(1-azidoethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20002), 最后一步反应产率为 40%, MW = 681。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.77 (s, 1H), 8.84 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 8.39 – 8.29 (m, 1H), 8.02 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H), 6.71 (s, 2H), 6.28 – 6.16 (m, 1H), 5.73 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 5.35 – 5.28 (m, 1H), 4.36 (dd, $J = 10.4, 6.0$ Hz, 1H), 4.24 – 4.15 (m, 1H), 4.01 – 3.97 (m, 1H), 3.25 – 3.13 (m, 1H), 2.61 – 2.55 (m, 1H), 1.60 (dd, $J = 6.6, 2.6$ Hz, 3H).

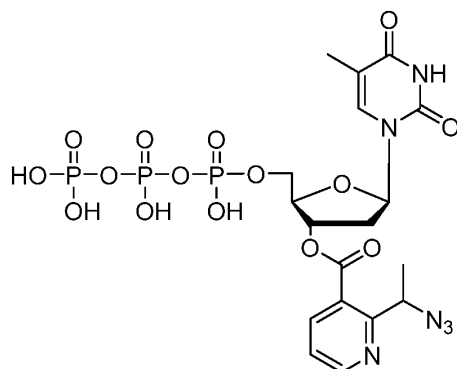
实施例十一



合成方法参考实施例三步骤 1-4, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-叠氮乙基)烟酸 (2-(1-azidoethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20002), 最后两步反应产率为 30%, MW = 641。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.83 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J = 7.4, 2.9$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.37 – 6.34 (m, 1H), 5.82 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.54 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 5.39 – 5.20 (m, 1H), 4.39 – 4.32 (m, 1H), 4.14 – 3.98 (m, 2H), 2.47 – 2.41 (m, 1H), 2.36 – 2.24 (m, 1H), 1.59 (dd, $J = 6.7, 1.7$ Hz, 3H).

实施例十二

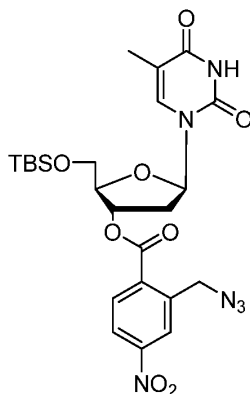


合成方法参考实施例一步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-叠氮乙基)烟酸 (2-(1-azidoethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20002), 最后一步反应产率为 45%, MW = 656。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.31 (s, 1H), 8.84 (dd, $J = 4.6, 1.1$ Hz, 1H), 8.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.56 (dd, $J = 7.9, 4.8$ Hz, 1H), 6.39 – 6.32 (m, 1H), 5.63 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.33 – 5.26 (m, 1H), 4.35 (s, 1H), 4.15 – 4.04 (m, 2H), 2.55 – 2.52 (m, 1H), 2.46 – 2.38 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.58 (dd, $J = 6.6, 1.3$ Hz, 3H).

实施例十三

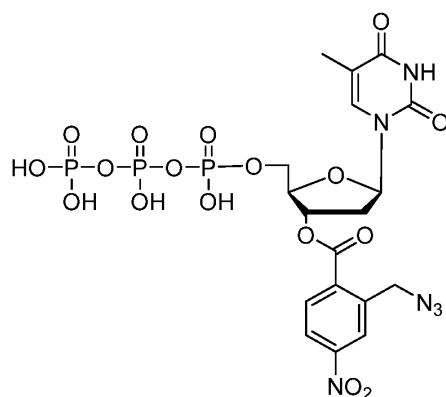
(1) 步骤 1



合成方法参考实施例一步骤 1, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl) benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)-4-硝基苯甲酸 (2-(azidomethyl)-4-nitrobenzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21004), 该步骤反应产率为 85%, MW = 560。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.43 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.34 – 8.23 (m, 2H), 8.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.45 (dd, $J = 9.3, 5.2$ Hz, 1H), 5.54 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 5.04 – 4.84 (m, 2H), 4.28 (q, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.12 – 3.92 (m, 2H), 3.48 (s, 1H), 2.60 (dd, $J = 14.0, 5.3$ Hz, 1H), 2.28 (ddd, $J = 14.0, 9.3, 6.1$ Hz, 2H), 1.95 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 0.97 (s, 9H), 0.18 (d, $J = 1.1$ Hz, 6H).

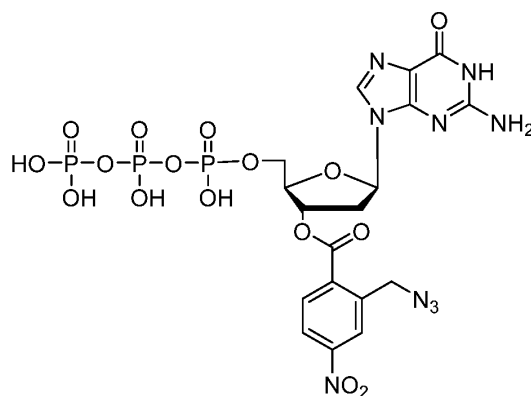
(2) 步骤 2-3



合成方法参考实施例一步骤 2-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl) benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)-4-硝基苯甲酸 (2-(azidomethyl)-4-nitrobenzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21004), 最后一步反应产率为 40%, MW = 686。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (s, 1H), 8.41 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.33 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.36 (dd, J = 9.0, 6.0 Hz, 1H), 5.65 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.37 (s, 1H), 4.15 - 4.04 (m, 2H), 2.56 - 2.52 (m, 1H), 2.44 (dd, J = 14.0, 5.9 Hz, 1H), 1.84 (s, 3H).

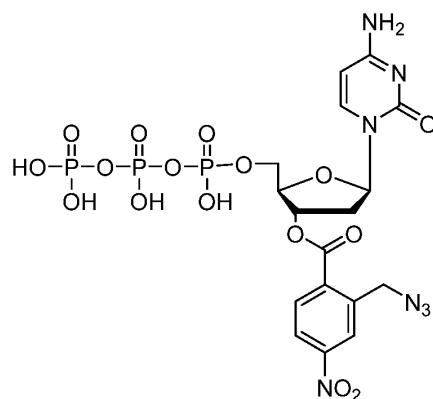
实施例十四



合成方法参考实施例二步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl) benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)-4-硝基苯甲酸 (2-(azidomethyl)-4-nitrobenzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21004), 最后一步反应产率为 40%, MW = 711。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.00 (s, 1H), 8.42 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.34 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.23 (dd, J = 9.2, 5.9 Hz, 1H), 5.76 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.39 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.25 - 4.00 (m, 2H), 3.31 - 3.14 (m, 1H), 2.59 (dd, J = 14.0, 6.4 Hz, 1H).

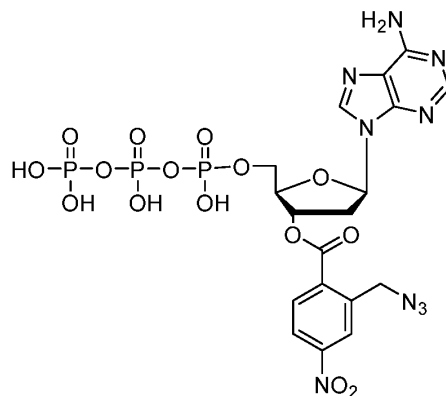
实施例十五



合成方法参考实施例三步骤 1-4, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl) benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)-4-硝基苯甲酸 (2-(azidomethyl)-4-nitrobenzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21004), 最后两步反应产率为 30%, MW = 671。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.41 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.33 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.37 (dd, J = 9.1, 5.6 Hz, 1H), 5.81 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 5.56 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.37 (s, 1H), 4.12 - 3.99 (m, 2H), 2.47 - 2.40 (m, 1H), 2.36 - 2.26 (m, 1H).

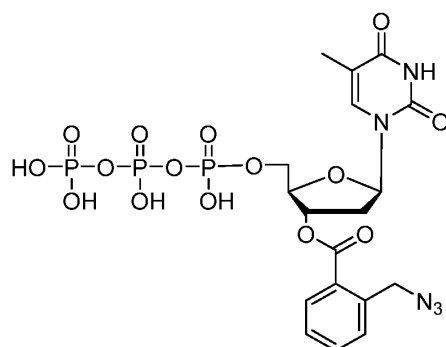
实施例十六



合成方法参考实施例四步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl) benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)-4-硝基苯甲酸 (2-(azidomethyl)-4-nitrobenzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21004), 最后一步反应产率为 40%, MW = 695。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.58 (s, 1H), 8.42 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.34 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 8.29 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.29 (s, 2H), 6.51 (dd, J = 9.0, 6.1 Hz, 1H), 5.77 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.47 (s, 1H), 4.14 - 4.00 (m, 2H), 3.17 - 3.08 (m, 1H), 2.75 - 2.70 (m, 1H).

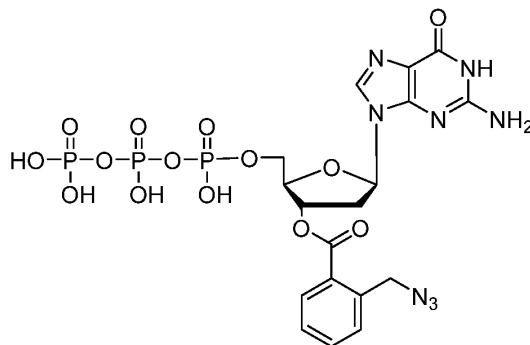
实施例十七



合成方法参考实施例一步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)苯甲酸 (2-(azidomethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20003), 最后一步反应产率为 45%, MW = 641。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (s, 1H), 7.99 (dd, J = 9.6, 8.7 Hz, 2H), 7.68 (td, J = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 7.61 – 7.50 (m, 2H), 6.35 (dd, J = 9.3, 5.7 Hz, 1H), 5.60 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.31 (s, 1H), 4.18 – 4.00 (m, 2H), 2.57 – 2.50 (m, 1H), 2.39 (dd, J = 13.9, 5.7 Hz, 1H), 1.84 (s, 3H)。

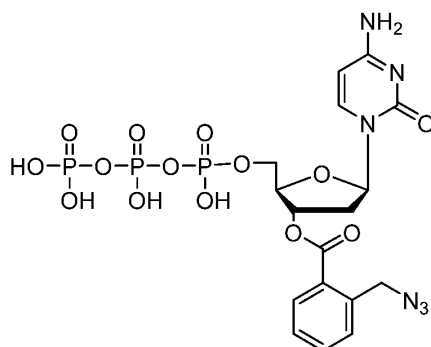
实施例十八



合成方法参考实施例二步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)苯甲酸 (2-(azidomethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20003), 最后一步反应产率为 40%, MW = 666。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.70 (s, 1H), 8.03 (d, J = 9.8 Hz, 2H), 7.69 (td, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.60 – 7.51 (m, 2H), 6.67 (s, 2H), 6.23 (dd, J = 9.4, 5.8 Hz, 1H), 5.68 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.40 – 4.30 (m, 1H), 4.21 – 4.16 (m, 1H), 4.05 – 3.96 (m, 1H), 3.22 – 3.10 (m, 1H), 2.60 – 2.51 (m, 1H)。

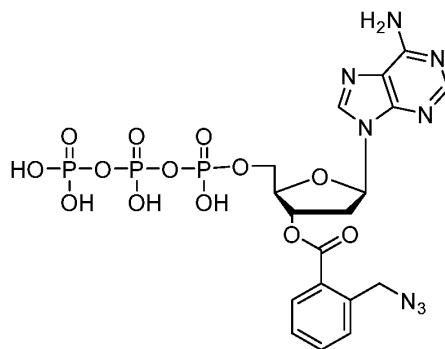
实施例十九



合成方法参考实施例三步骤 1-4, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)苯甲酸 (2-(azidomethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20003), 最后两步反应产率为 30%, MW = 626。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00 (dd, J = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.68 (td, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.61 – 7.50 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.37 (dd, J = 9.2, 5.5 Hz, 1H), 5.82 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 5.51 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.32 (s, 1H), 4.13 – 3.97 (m, 2H), 2.41 (dd, J = 13.8, 5.6 Hz, 1H), 2.30 (ddd, J = 14.4, 7.5, 4.6 Hz, 1H).

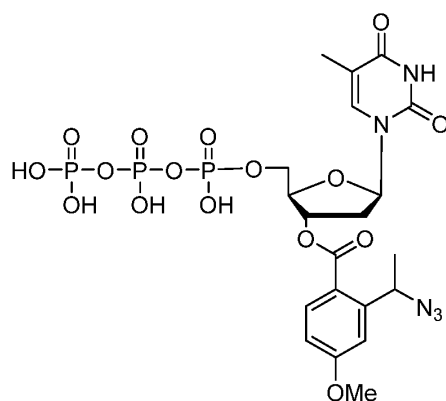
实施例二十



合成方法参考实施例四步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(叠氮甲基)苯甲酸 (2-(azidomethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20003), 最后一步反应产率为 40%, MW = 650。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.60 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.05 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.69 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 2H), 7.27 (s, 2H), 6.49 (dd, J = 8.8, 5.8 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.42 – 4.34 (m, 1H), 4.02 – 3.80 (m, 2H), 2.72 – 2.63 (m, 1H), 2.35 – 2.30 (m, 1H).

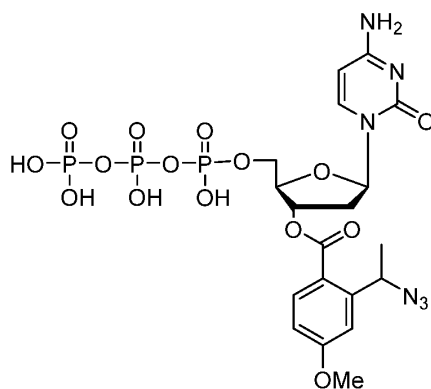
实施例二十一



合成方法参考实施例一步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸(2-(1-azidoethyl)benzoic acid)替换为 2-(1-叠氮乙基)-4-甲氧基苯甲酸(2-(1-azidoethyl)-4-methoxybenzoic acid)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21005), 最后一步反应产率为 45%, MW = 685。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (s, 1H), 8.00 – 7.90 (m, 2H), 7.11 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.04 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 6.39 – 6.29 (m, 1H), 5.74 – 5.68 (m, 1H), 5.55 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.30 (s, 1H), 4.16 – 3.98 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.48 – 2.30 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.48 (dd, J = 6.7, 1.4 Hz, 3H).

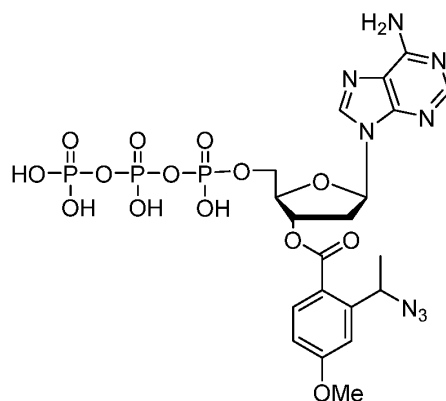
实施例二十二



合成方法参考实施例三步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸(2-(1-azidoethyl)benzoic acid)替换为 2-(1-叠氮乙基)-4-甲氧基苯甲酸(2-(1-azidoethyl)-4-methoxybenzoic acid)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21005), 最后两步反应产率为 30%, MW = 670。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00 – 7.89 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.11 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 7.05 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 6.41 – 6.31 (m, 1H), 5.82 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 5.74 – 5.68 (m, 1H), 5.49 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.30 (s, 1H), 4.10 – 4.00 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.42 – 2.36 (m, 1H), 2.33 – 2.23 (m, 1H), 1.48 (dd, J = 6.6, 1.5 Hz, 3H).

实施例二十三

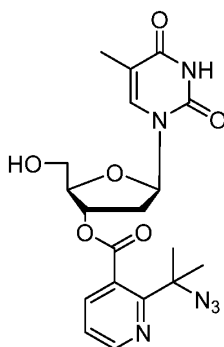


合成方法参考实施例四步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-叠氮乙基)-4-甲氧基苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)-4-methoxybenzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21005), 最后一步反应产率 40%, MW = 694。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.61 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 8.02 (dd, J = 8.7, 1.7 Hz, 1H), 7.30 (s, 2H), 7.12 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 6.51 - 6.46 (m, 1H), 5.78 - 5.72 (m, 1H), 5.68 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.43 - 4.36 (m, 1H), 4.14 - 4.00 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.18 - 3.08 (m, 1H), 2.71 - 2.62 (m, 1H), 1.50 (dd, J = 6.6, 2.0 Hz, 3H).

实施例二十四

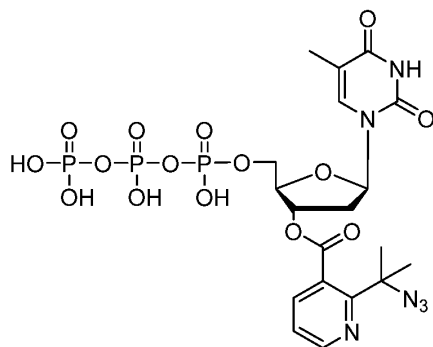
(1) 步骤 1-2



合成方法参考实施例一步骤 1-2, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(2-叠氮丙-2-基)烟酸 (2-(2-azidopropan-2-yl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20004), 最后一步反应产率为 90%, MW = 430。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (s, 1H), 8.31 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H), 6.96 (dd, J = 7.3, 5.2 Hz, 1H), 5.97 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 5.33 (dd, J = 5.1, 2.7 Hz, 1H), 4.02 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.70 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 2.72 (s, 1H), 2.25 (dd, J = 10.7, 5.1 Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.45 (s, 6H).

(2) 步骤 3

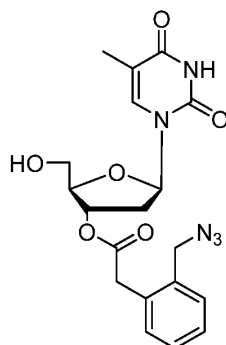


合成方法参考实施例一步骤 3，其中，将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(2-叠氮丙-2-基)烟酸 (2-(2-azidopropan-2-yl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号：OK-H-20004)，该步骤反应产率为 35%，MW = 670。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.30 (s, 1H), 8.67 (dd, *J* = 4.7, 1.4 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.47 (dd, *J* = 7.7, 4.8 Hz, 1H), 6.29 (dd, *J* = 9.2, 5.7 Hz, 1H), 5.61 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.19 – 4.03 (m, 2H), 2.56 – 2.52 (m, 1H), 2.36 (dd, *J* = 13.9, 5.6 Hz, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.70 (d, *J* = 3.8 Hz, 6H).

实施例二十五

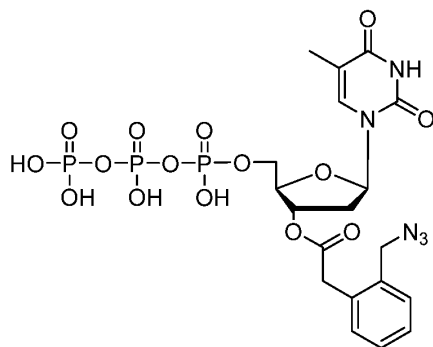
(1) 步骤 1-2



合成方法参考实施例一步骤 1-2，其中，将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(2-(叠氮甲基)苯基)乙酸 (2-(2-(azidomethyl)phenyl)acetic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号：OK-H-20005)，最后一步反应产率为 90%，MW = 415。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.08 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.39 – 7.32 (m, 3H), 7.30 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.20 (dd, *J* = 8.5, 5.9 Hz, 1H), 5.37 – 5.35 (m, 1H), 4.40 (s, 2H), 4.08 (q, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.90 (qd, *J* = 11.8, 2.6 Hz, 2H), 3.76 (s, 2H), 2.48 – 2.33 (m, 2H), 1.92 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H).

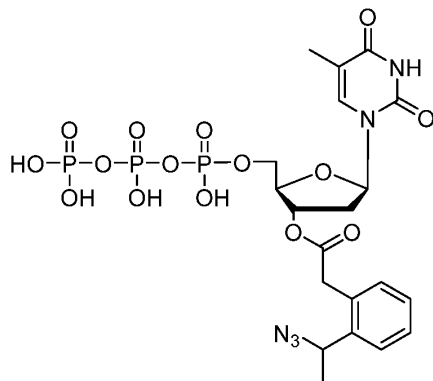
(2) 步骤 3



合成方法参考实施例一步骤 3，其中，将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(2-(1-叠氮甲基)苯基)乙酸 (2-(2-(azidomethyl)phenyl)acetic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号：OK-H-20005)，该步骤反应产率为 40%，MW = 655。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.33 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.43 – 7.28 (m, 4H), 6.26 (dd, J = 9.4, 5.6 Hz, 1H), 5.34 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.09 (s, 1H), 4.05 – 3.95 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 2.44 – 2.31 (m, 1H), 2.18 (dd, J = 13.9, 5.5 Hz, 1H), 1.82 (s, 3H).

实施例二十六

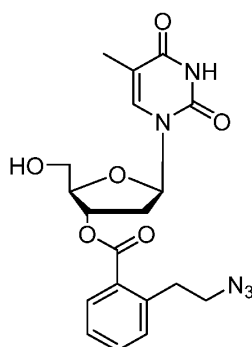


合成方法参考实施例一步骤 1-3，其中，将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(2-(1-叠氮乙基)苯基)乙酸 (2-(2-(1-azidoethyl)phenyl)acetic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司，货号：OK-H-20006)，最后一步反应产率为 40%，MW = 669。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.29 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.44 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.35 (dt, J = 7.9, 4.2 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 6.26 (dd, J = 9.5, 5.6 Hz, 1H), 5.33 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5.05 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 4.10 (s, 1H), 4.02 – 3.94 (m, 2H), 3.90 (d, J = 2 Hz, 2H), 2.42 – 2.33 (m, 1H), 2.21 – 2.12 (m, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.45 (dd, J = 6.7, 1.3 Hz, 3H).

实施例二十七

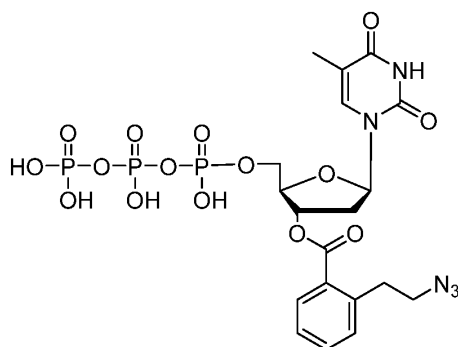
(1) 步骤 1-2



合成方法参考实施例一步骤 1-2, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(2-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(2-azidoethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21006), 最后一步反应产率为 90%, MW = 415。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.40 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.57 – 7.49 (m, 2H), 7.39 – 7.30 (m, 2H), 6.36 – 6.29 (m, 1H), 5.64 – 5.56 (m, 1H), 4.26 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.02 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 3.54 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.60 – 2.50 (m, 2H), 1.95 (s, 3H).

(2) 步骤 3

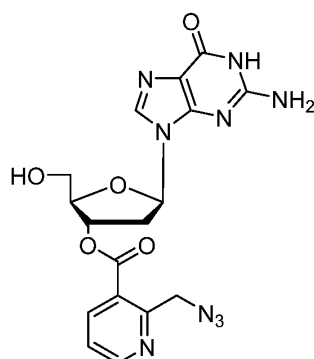


合成方法参考实施例一步骤 3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(1-azidoethyl)benzoic acid) 替换为 2-(2-叠氮乙基)苯甲酸 (2-(2-azidoethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21006), 该步骤反应产率为 40%, MW = 655。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.28 (s, 1H), 7.98 – 7.85 (m, 2H), 7.57 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.34 (dd, $J = 9.3, 5.7$ Hz, 1H), 5.57 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.30 (s, 1H), 4.08 – 4.02 (m, 2H), 3.57 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 3.21 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.55 – 2.52 (m, 1H), 2.43 – 2.27 (m, 1H), 1.84 (s, 3H).

实施例二十八

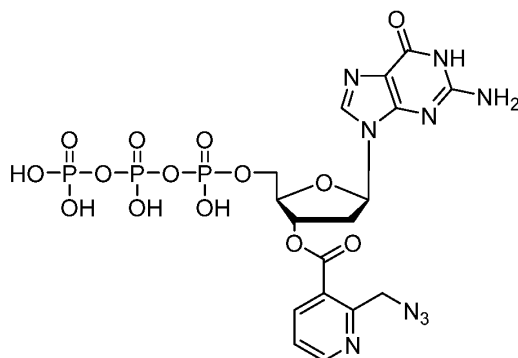
(1) 步骤 1-2



合成方法参考实施例二步骤 1-2, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸(2-(1-azidoethyl)benzoic acid)替换为 2-(叠氮甲基)烟酸(2-(azidomethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21007), 最后一步反应产率为 90%, MW = 427.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (s, 2H), δ = 8.20 (d, 1H), δ = 7.90 (d, 1H), δ = 7.58 (s, 1H), δ = 7.35 (dd, 1H), δ = 6.26 (t, 1H), δ = 5.59 (dq, 1H), δ = 5.11 (s, 2H), δ = 4.61 (dt, 1H), δ = 3.90 (m, 2H), δ = 2.38 (m, 2H).

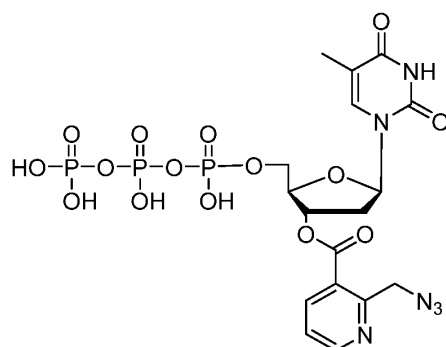
(2) 步骤 3



合成方法参考实施例二步骤 3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸(2-(1-azidoethyl)benzoic acid)替换为 2-(叠氮甲基)烟酸(2-(azidomethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21007), 该步骤反应产率为 30%, MW = 667.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.76 (s, 1H), 8.83 (dd, J = 4.8, 1.5 Hz, 1H), 8.40 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 6.73 (s, 2H), 6.23 (dd, J = 9.3, 5.8 Hz, 1H), 5.72 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.36 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.27 – 4.16 (m, 1H), 4.01 – 3.93 (m, 1H), 3.26 – 3.18 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 2.56 (dd, J = 13.7, 5.3 Hz, 1H).

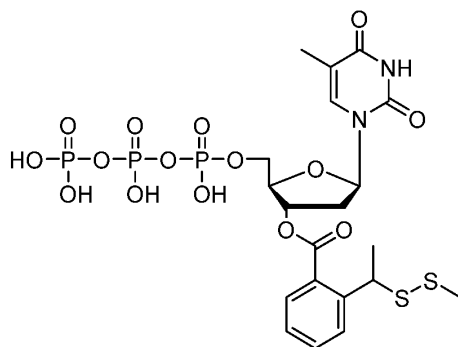
实施例二十九



合成方法参考实施例一步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-叠氮乙基)苯甲酸(2-(1-azidoethyl)benzoic acid)替换为 2-(叠氮甲基)烟酸(2-(azidomethyl)nicotinic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21007), 最后一步反应产率为 40%, MW = 642。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.29 (s, 1H), 8.81 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.39 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 6.35 (dd, J = 9.0, 6.0 Hz, 1H), 5.59 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.35 (s, 1H), 4.14 – 3.97 (m, 2H), 2.46 – 2.36 (m, 2H), 1.83 (d, J = 2.7 Hz, 3H).

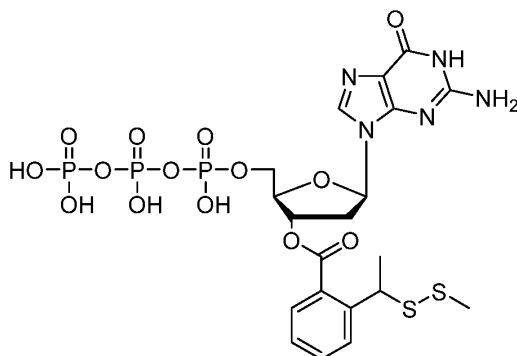
实施例三十



合成方法参考实施例五步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(ethyl-disulfaneyl)ethyl)benzoic acid)替换为 2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(methyl-disulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20007), 最后一步反应产率为 30%, MW = 692。

^1H NMR (400 MHz, D $_2$ O) δ 7.90 – 7.82 (m, 2H), 7.69 – 7.58 (m, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 1H), 6.47 – 6.35 (m, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.10 – 5.01 (m, 1H), 4.57 (dd, J = 13.6, 3.0 Hz, 1H), 4.41 – 4.24 (m, 2H), 2.65 – 2.52 (m, 2H), 1.98 (d, J = 15.2 Hz, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.68 (d, J = 7.2 Hz, 3H).

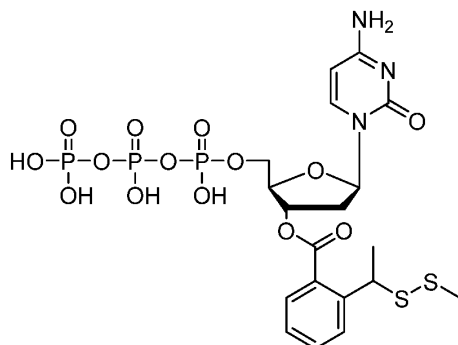
实施例三十一



合成方法参考实施例六步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(methyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20007), 最后一步反应产率为 30%, MW = 717。

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.14 (t, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.1, 3.1$ Hz, 1H), 7.55 (q, $J = 3.2$ Hz, 2H), 7.38 - 7.34 (m, 1H), 6.31 - 6.22 (m, 1H), 5.76 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 5.10 - 5.00 (m, 1H), 4.65 - 4.55 (m, 1H), 4.36 - 4.21 (m, 2H), 3.02 - 2.94 (m, 1H), 2.71 - 2.61 (m, 1H), 1.94 (dd, $J = 22.2, 3.2$ Hz, 3H), 1.62 (dd, $J = 7.2, 3.3$ Hz, 3H).

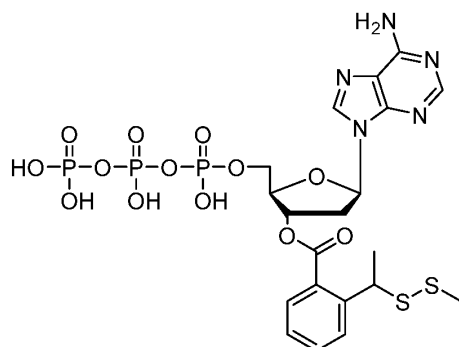
实施例三十二



合成方法参考实施例七步骤 1-4, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(methyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20007), 最后两步反应产率为 28%, MW = 677。

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.08 - 8.00 (m, 1H), 7.91 - 7.84 (m, 1H), 7.72 - 7.59 (m, 2H), 7.49 - 7.40 (m, 1H), 6.48 - 6.40 (m, 1H), 6.19 (dd, $J = 7.7, 2.3$ Hz, 1H), 5.73 - 5.64 (m, 1H), 5.13 - 5.02 (m, 1H), 4.60 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.36 - 4.27 (m, 2H), 2.71 - 2.64 (m, 1H), 2.55 - 2.44 (m, 1H), 2.00 (dd, $J = 9.5, 2.2$ Hz, 3H), 1.69 (dd, $J = 7.2, 2.1$ Hz, 3H).

实施例三十三

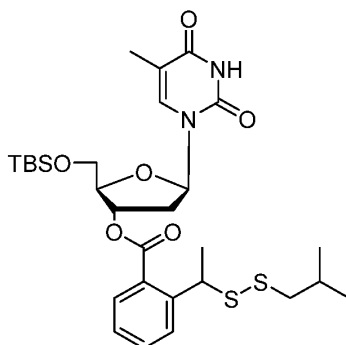


合成方法参考实施例八步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(methylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20007), 最后一步反应产率为 35%, MW = 701。

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.53 (dd, $J = 5.2, 1.8$ Hz, 1H), 8.18 – 8.10 (m, 1H), 7.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.55 – 7.51 (m, 2H), 7.38 – 7.34 (m, 1H), 6.49 – 6.40 (m, 1H), 5.81 – 5.73 (m, 1H), 5.07 – 5.00 (m, 1H), 4.67 – 4.57 (m, 1H), 4.39 – 4.18 (m, 2H), 3.06 – 2.95 (m, 1H), 2.75 (ddd, $J = 21.2, 14.2, 5.6$ Hz, 1H), 1.93 (dd, $J = 25.1, 1.9$ Hz, 3H), 1.60 (dd, $J = 6.9, 4.0$ Hz, 3H).

实施例三十四

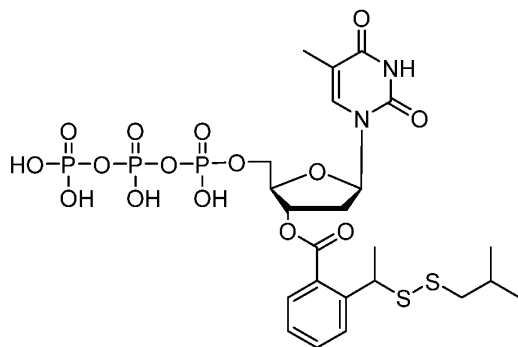
(1) 步骤 1-



合成方法参考实施例五步骤 1, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丁基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isobutylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21008), 该步骤反应产率为 79%, MW = 608。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.66 – 8.39 (m, 1H), 7.89 – 7.80 (m, 1H), 7.63 – 7.47 (m, 3H), 7.33 (td, $J = 8.8, 4.5$ Hz, 1H), 6.47 – 6.40 (m, 1H), 5.52 – 5.40 (m, 1H), 5.30 – 4.92 (m, 1H), 4.36 – 4.21 (m, 1H), 4.07 – 3.92 (m, 2H), 2.60 – 2.48 (m, 1H), 2.31 – 2.16 (m, 1H), 1.94 (s, 3H), 1.72 – 1.66 (m, 2H), 1.63 – 1.51 (m, 1H), 1.00 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 0.98 – 0.93 (m, 9H), 0.87 – 0.81 (m, 4H), 0.19 – 0.13 (m, 6H).

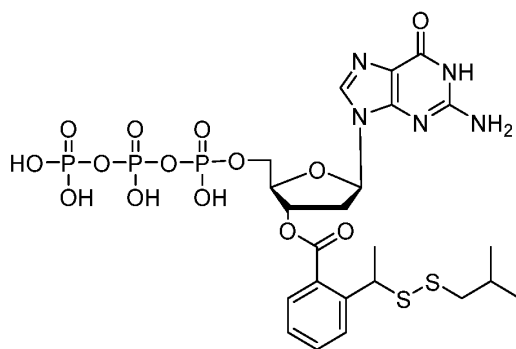
(2) 步骤 2-3



合成方法参考实施例五步骤 2-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylthio)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丁基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isobutylthio)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21008), 最后一步反应产率为 32%, MW = 734。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.31 (s, 1H), 7.96 (dd, J = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 7.46 - 7.41 (m, 1H), 6.33 (td, J = 9.7, 5.6 Hz, 1H), 5.63 - 5.55 (m, 1H), 5.18 - 5.08 (m, 1H), 4.30 (d, J = 23.4 Hz, 1H), 4.18 - 4.02 (m, 2H), 2.57 - 2.51 (m, 1H), 2.43 - 2.29 (m, 1H), 2.12 - 1.93 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.70 - 1.56 (m, 4H), 0.85 - 0.71 (m, 6H).

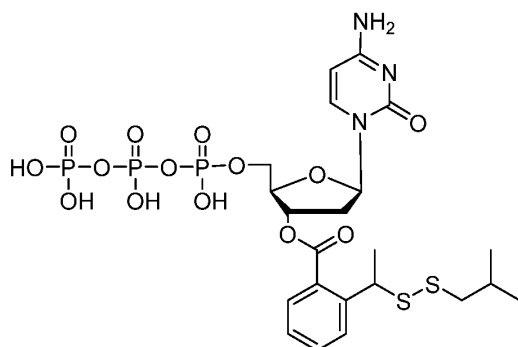
实施例三十五



合成方法参考实施例六步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylthio)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丁基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isobutylthio)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21008), 最后一步反应产率 40%, MW = 759。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.73 (s, 1H), 8.03 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.49 - 7.38 (m, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.27 - 6.15 (m, 1H), 5.69 (dd, J = 8.2, 4.0 Hz, 1H), 5.16 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 4.39 - 4.26 (m, 1H), 4.19 (dd, J = 10.6, 5.1 Hz, 1H), 4.01 (dd, J = 11.4, 5.9 Hz, 1H), 2.57 - 2.52 (m, 1H), 2.48 - 2.41 (m, 1H), 2.24 - 2.12 (m, 2H), 1.70 (dd, J = 13.2, 6.6 Hz, 1H), 1.65 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.85 - 0.74 (m, 6H).

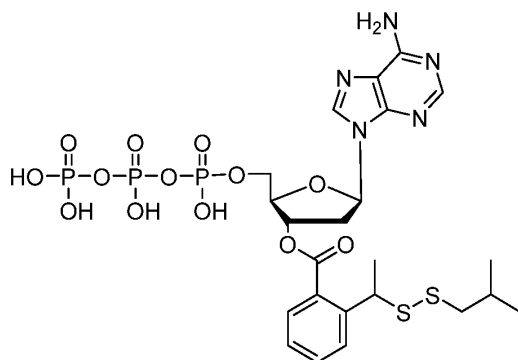
实施例三十六



合成方法参考实施例七步骤 1-4, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylidisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丁基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isobutyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21008) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21008), 最后两步反应产率 30%, MW = 719。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.98 (dd, J = 9.4, 7.6 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 7.46 - 7.42 (m, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.40 - 6.30 (m, 1H), 5.82 (dd, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 5.17 - 5.11 (m, 1H), 4.30 (d, J = 21.7 Hz, 1H), 4.16 - 4.01 (m, 1H), 2.46 - 2.27 (m, 2H), 2.15 - 1.98 (m, 2H), 1.71 - 1.58 (m, 4H), 0.80 (d, J = 2.5 Hz, 3H), 0.78 (d, J = 2.6 Hz, 3H).

实施例三十七

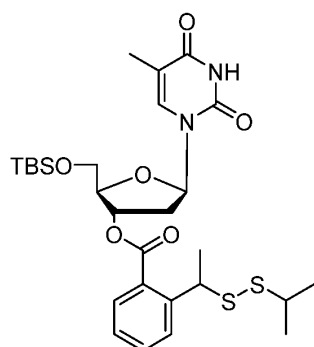


合成方法参考实施例八步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylidisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丁基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isobutyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21008) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21008), 最后一步反应产率 40%, MW = 743。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.67 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.94 - 7.87 (m, 1H), 7.64 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 7.46 (dt, J = 8.1, 4.2 Hz, 1H), 7.32 (s, 2H), 6.51 - 6.44 (m, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.18 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.45 - 4.33 (m, 1H), 4.16 - 4.04 (m, 2H), 3.25 - 3.12 (m, 1H), 2.71 - 2.57 (m, 1H), 2.19 - 2.01 (m, 2H), 1.73 - 1.59 (m, 4H), 0.81 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.78 (d, J = 6.7 Hz, 3H).

实施例三十八

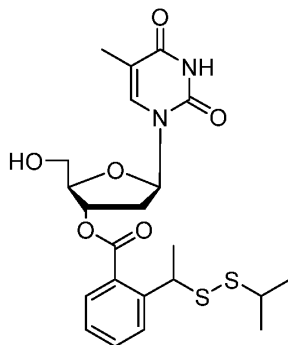
(1) 步骤 1



合成方法参考实施例五步骤 1, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isopropylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21009), 该步骤反应产率为 80%, MW = 594。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (s, 1H), 7.85 (ddd, $J = 12.8, 7.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.64 – 7.57 (m, 2H), 7.57 – 7.50 (m, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 1H), 6.45 (ddd, $J = 20.4, 9.2, 5.3$ Hz, 1H), 5.50 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.28 – 5.15 (m, 1H), 4.32 (dd, $J = 36.3, 1.3$ Hz, 1H), 4.07 – 3.96 (m, 2H), 2.59 (td, $J = 13.5, 5.3$ Hz, 1H), 2.47 – 2.16 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.70 (dd, $J = 7.0, 1.0$ Hz, 3H), 1.17 – 1.06 (m, 6H), 0.97 (s, 9H), 0.18 (s, 6H).

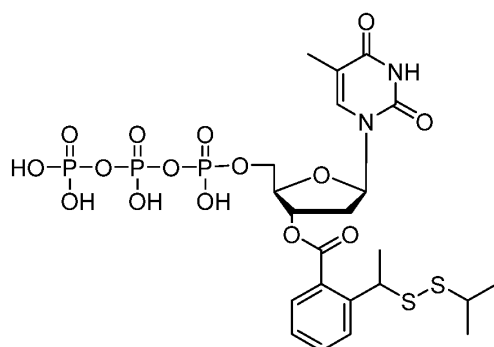
(2) 步骤 2



合成方法参考实施例五步骤 2, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isopropylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21009), 该步骤反应产率为 90%, MW = 594。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (s, 1H), 7.84 (ddd, $J = 7.4, 5.8, 1.3$ Hz, 1H), 7.65 – 7.49 (m, 3H), 7.33 (td, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H), 6.37 – 6.27 (m, 1H), 5.61 (tt, $J = 4.7, 2.5$ Hz, 1H), 5.22 (dq, $J = 13.9, 7.0$ Hz, 1H), 4.30 (dq, $J = 19.8, 2.4$ Hz, 1H), 4.03 (dd, $J = 5.7, 2.7$ Hz, 2H), 2.60 – 2.31 (m, 3H), 1.95 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H), 1.70 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.15 – 1.07 (m, 6H).

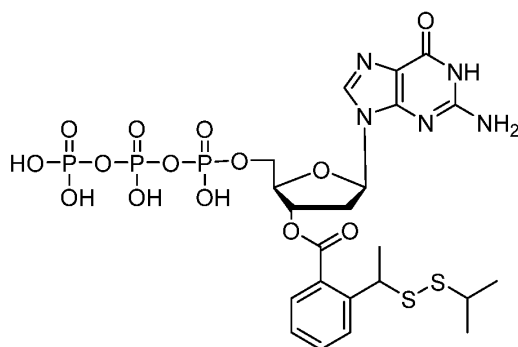
(3) 步骤 3



合成方法参考实施例五步骤3, 其中, 将2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid)替换为2-(1-(异丙基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(isopropylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21009), 该步骤反应产率为40%, MW = 720。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.29 (s, 1H), 7.98 (dd, J = 6.6, 0.9 Hz, 1H), 7.85 (dd, J = 7.7, 2.4 Hz, 1H), 7.61 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 7.45 - 7.40 (m, 1H), 6.36 - 6.31 (m, 1H), 5.60 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 5.11 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 4.30 (d, J = 20.0 Hz, 1H), 4.12 - 4.04 (m, 2H), 2.58 - 2.51 (m, 1H), 2.46 - 2.29 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.64 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.06 (d, J = 5.7 Hz, 6H).

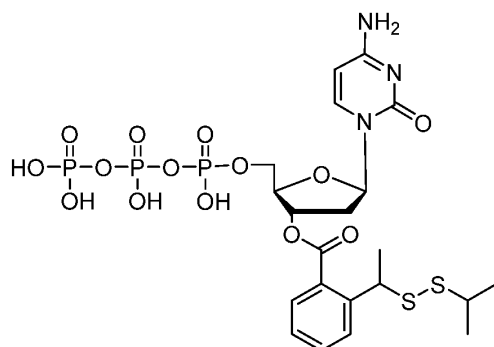
实施例三十九



合成方法参考实施例六步骤1-3, 其中, 将2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid)替换为2-(1-(异丙基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(isopropylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21009), 最后一步反应产率为40%, MW = 745。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.57 (s, 1H), 7.98 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 3.3 Hz, 2H), 7.47 - 7.40 (m, 1H), 6.63 (d, J = 25.9 Hz, 2H), 6.27 - 6.16 (m, 1H), 5.68 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 5.32 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 5.18 - 5.10 (m, 1H), 4.37 - 4.28 (m, 1H), 4.02 - 3.96 (m, 1H), 2.68 - 2.66 (m, 1H), 2.61 - 2.56 (m, 1H), 2.33 (dt, J = 3.5, 1.7 Hz, 1H), 1.65 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.13 (d, J = 7.9 Hz, 6H).

实施例四十

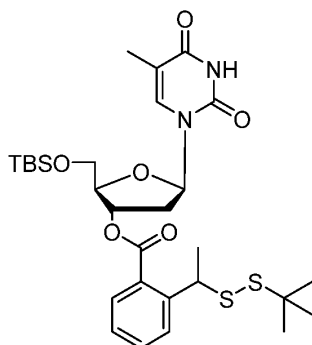


合成方法参考实施例七步骤 1-4, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(异丙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(isopropylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21009), 最后两步反应产率为 30%, MW = 705。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00 – 7.93 (m, 1H), 7.84 (dd, J = 7.6, 3.3 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 3.7 Hz, 2H), 7.47 – 7.38 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.38 – 6.33 (m, 1H), 5.81 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.52 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 5.11 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 4.30 (d, J = 19.7 Hz, 1H), 4.14 – 3.97 (m, 2H), 2.47 – 2.38 (m, 2H), 2.34 – 2.31 (m, 1H), 1.64 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.10 (d, J = 2.1 Hz, 6H).

实施例四十一

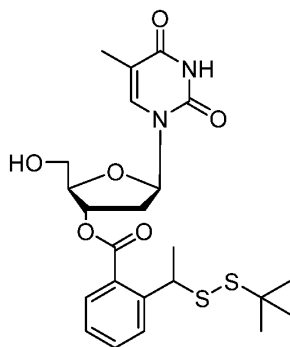
(1) 步骤 1



合成方法参考实施例五步骤 1, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 2-(1-(叔丁基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(tert-butylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21010), 该步骤反应产率为 80%, MW = 608。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.73 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.84 (ddd, J = 7.8, 3.5, 1.5 Hz, 1H), 7.70 – 7.45 (m, 3H), 7.32 (td, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 6.46 (td, J = 9.5, 5.3 Hz, 1H), 5.57 – 5.35 (m, 1H), 5.16 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 4.28 (dd, J = 17.9, 1.7 Hz, 1H), 4.13 – 3.90 (m, 2H), 2.58 (ddd, J = 14.7, 9.8, 5.3 Hz, 1H), 2.23 (dtd, J = 16.2, 6.2, 2.7 Hz, 1H), 1.98 – 1.92 (m, 3H), 1.69 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.22 (d, J = 11.2 Hz, 8H), 0.96 (s, 9H), 0.17 (s, 6H).

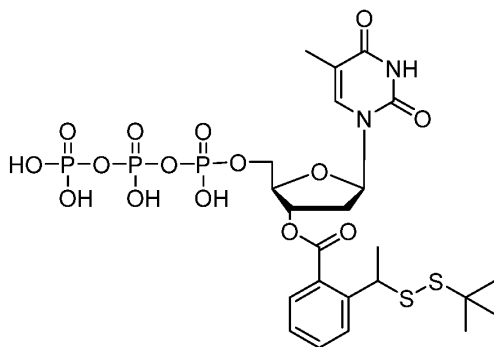
(2) 步骤 2



合成方法参考实施例五步骤2, 其中, 将2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid)替换为2-(1-(叔丁基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(tert-butylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21010), 该步骤反应产率为90%, MW = 494。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.90 (s, 1H), 7.83 (dt, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.55 (dtd, $J = 7.8, 4.0, 1.4$ Hz, 2H), 7.32 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 6.31 (ddd, $J = 8.4, 6.0, 2.8$ Hz, 1H), 5.59 (dt, $J = 5.4, 2.5$ Hz, 1H), 5.14 (dq, $J = 18.4, 7.0$ Hz, 1H), 4.27 (dt, $J = 8.4, 2.5$ Hz, 1H), 4.01 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 2.65 – 2.48 (m, 2H), 2.35 (s, 2H), 1.94 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 1.68 (dd, $J = 6.9, 1.4$ Hz, 3H), 1.22 (d, $J = 2.9$ Hz, 9H).

(3) 步骤3

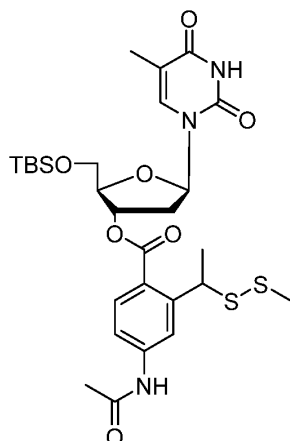


合成方法参考实施例五步骤3, 其中, 将2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid)替换为2-(1-(叔丁基二硫基)乙基)苯甲酸(2-(1-(tert-butylsulfaneyl)ethyl)benzoic acid)(北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21010), 该步骤反应产率为40%, MW = 734。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.30 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 7.44 – 7.39 (m, 1H), 6.37 – 6.29 (m, 1H), 5.56 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.07 – 4.98 (m, 1H), 4.29 (d, $J = 28.0$ Hz, 1H), 4.14 – 3.99 (m, 2H), 2.39 (dd, $J = 13.9, 5.9$ Hz, 1H), 2.31 (dd, $J = 14.2, 5.7$ Hz, 1H), 1.83 (s, 3H), 1.63 (dd, $J = 7.0, 1.1$ Hz, 3H), 1.19 (d, $J = 2.5$ Hz, 9H).

实施例四十二

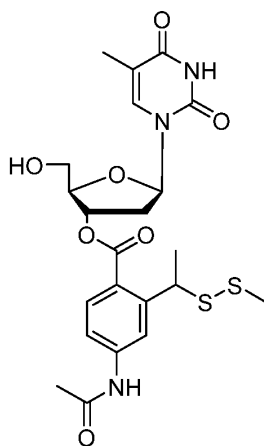
(1) 步骤1



合成方法参考实施例五步骤 1, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylidisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 4-乙酰氨基-2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (4-acetamido-2-(1-(methylidisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21002), 该步骤反应产率为 80%, MW = 623。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.64 – 7.58 (m, 2H), 7.46 (s, 1H), 6.42 (dd, $J = 9.3, 5.1$ Hz, 1H), 5.46 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 5.42 – 5.36 (m, 1H), 4.29 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.04 – 3.95 (m, 2H), 2.57 (dd, $J = 13.8, 5.3$ Hz, 1H), 2.29 – 2.23 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.94 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 1.68 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.95 (s, 9H), 0.17 (s, 6H).

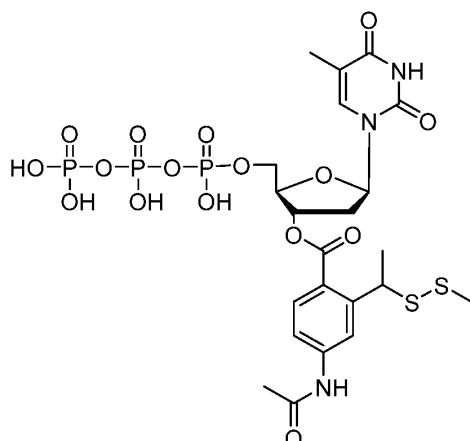
(2) 步骤 2



合成方法参考实施例五步骤 2, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylidisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 4-乙酰氨基-2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (4-acetamido-2-(1-(methylidisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21002), 该步骤反应产率为 75%, MW = 509。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.08 (s, 1H), 7.89 (dd, $J = 8.5, 5.6$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 6.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5.59 – 5.56 (m, 1H), 5.41 – 5.35 (m, 1H), 4.29 – 4.25 (m, 1H), 4.01 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 3.01 – 2.93 (m, 1H), 2.58 – 2.55 (m, 1H), 2.23 (s, 3H), 2.09 (d, $J = 5.6$ Hz, 3H), 1.95 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 1.68 (s, 3H).

(3) 步骤 3

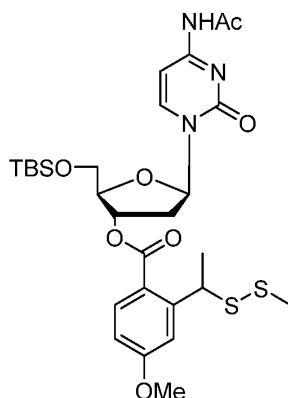


合成方法参考实施例五步骤 3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyldisulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 4-乙酰氨基-2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (4-acetamido-2-(1-(methylthioethyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21002), 该步骤反应产率为 35%, MW = 749。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.30 (s, 1H), 10.52 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 7.92 – 7.82 (m, 2H), 7.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.37 – 6.26 (m, 1H), 5.55 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 5.34 – 5.25 (m, 1H), 4.27 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H), 4.12 – 4.05 (m, 2H), 2.49 – 2.46 (m, 1H), 2.35 (td, $J = 13.9, 5.7$ Hz, 1H), 2.11 (d, $J = 12.7$ Hz, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.61 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

实施例四十三

(1) 步骤 1

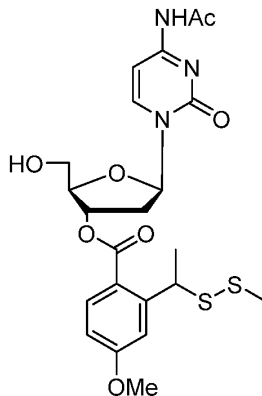


合成方法参考实施例七步骤 1, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylthioethyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 4-甲氧基-2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (4-methoxy-2-(1-(methylthioethyl)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21001), 该步骤反应产率为 80%, MW = 623。

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.92 (s, 1H), 8.24 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 8.7, 4.0$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.00 (ddd, $J = 8.8, 2.6, 1.4$ Hz, 1H), 6.19 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H), 5.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H), 5.46 – 5.37 (m, 1H),

5.37 – 5.27 (m, 1H), 4.37 (dd, $J = 21.7, 2.9$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J = 11.3, 3.2$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.78 – 2.62 (m, 1H), 2.38 – 2.26 (m, 1H), 2.14 – 2.09 (m, 6H), 0.86 (s, 9H), 0.09 (s, 6H).

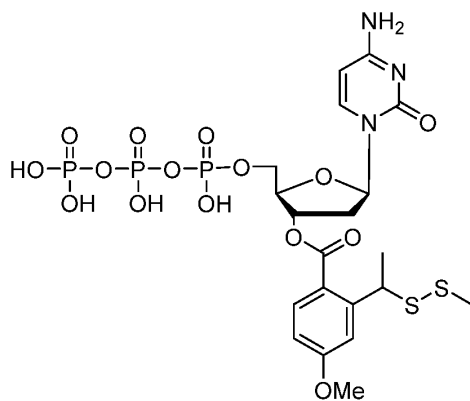
(2) 步骤 2



合成方法参考实施例七步骤 2, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylthio)ethyl)benzoic acid) 替换为 4-甲氧基-2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (4-methoxy-2-(1-(methylthio)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21001), 该步骤反应产率为 85%, MW = 509。

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.91 (s, 1H), 8.35 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 8.8, 4.1$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.00 (ddd, $J = 8.8, 2.7, 1.3$ Hz, 1H), 6.22 (dt, $J = 7.9, 6.0$ Hz, 1H), 5.43 (dt, $J = 6.6, 2.1$ Hz, 1H), 5.39 – 5.30 (m, 1H), 5.26 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 18.4, 2.7$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.72 (dd, $J = 5.5, 3.2$ Hz, 2H), 2.68 – 2.55 (m, 1H), 2.34 (dt, $J = 14.1, 7.0$ Hz, 1H), 2.16 – 2.08 (m, 6H), 1.65 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

(3) 步骤 3-4

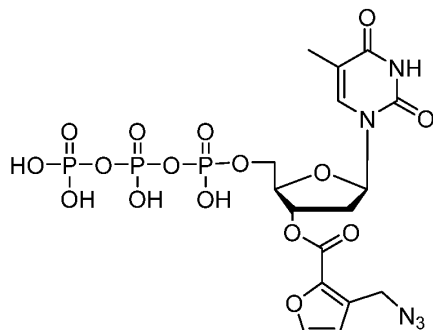


合成方法参考实施例七步骤 3-4, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethylthio)ethyl)benzoic acid) 替换为 4-甲氧基-2-(1-(甲基二硫基)乙基)苯甲酸 (4-methoxy-2-(1-(methylthio)ethyl)benzoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21001), 这两步的反应产率为 30%, MW = 707。

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.96 – 7.90 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.09 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 7.00 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 6.34 (dd, $J = 15.3, 6.6$ Hz, 1H), 5.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.47 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 5.33 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 17.7$ Hz, 1H), 4.13

– 3.97 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.43 – 2.22 (m, 2H), 2.13 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H), 1.64 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

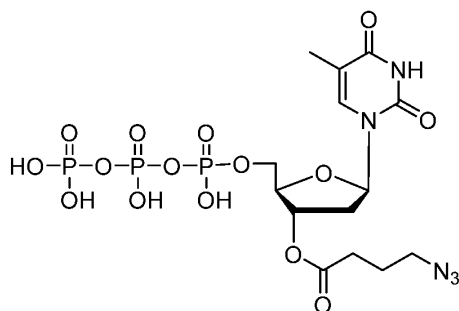
实施例四十四



合成方法参考实施例五步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyl-disulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 3-(叠氮甲基)呋喃-2-羧酸 (3-(azidomethyl)furan-2-carboxylic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-21011), 最后一步反应产率为 45%, MW = 631.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.31 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 22.7$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.33 (dd, $J = 9.4, 5.7$ Hz, 1H), 5.63 – 5.56 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.25 (s, 1H), 4.10 – 3.99 (m, 2H), 2.48 – 2.46 (m, 1H), 2.37 – 2.32 (m, 1H), 1.83 (s, 3H).

实施例四十五



合成方法参考实施例五步骤 1-3, 其中, 将 2-(1-(乙基二硫基)乙基)苯甲酸 (2-(1-(ethyl-disulfaneyl)ethyl)benzoic acid) 替换为 4-叠氮丁酸 (4-azidobutanoic acid) (北京欧凯纳斯生化科技有限公司, 货号: OK-H-20008), 最后一步反应产率为 20%, MW = 593.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.28 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 6.24 (dd, $J = 9.5, 5.6$ Hz, 1H), 5.33 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.09 (s, 1H), 4.04 – 3.95 (m, 2H), 3.38 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.44 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.41 – 2.33 (m, 1H), 2.18 (dd, $J = 13.8, 5.6$ Hz, 1H), 1.82 (s, 3H), 1.81 – 1.75 (m, 2H).

二、测试例

发明人发现, 本申请的核苷酸类似物具有优异的阻断效果, 同时具有优异的聚合效果; 且利用本申请的核苷酸类似物进行测序时, 测序效果优异, 测序比对率高, 错误率低。

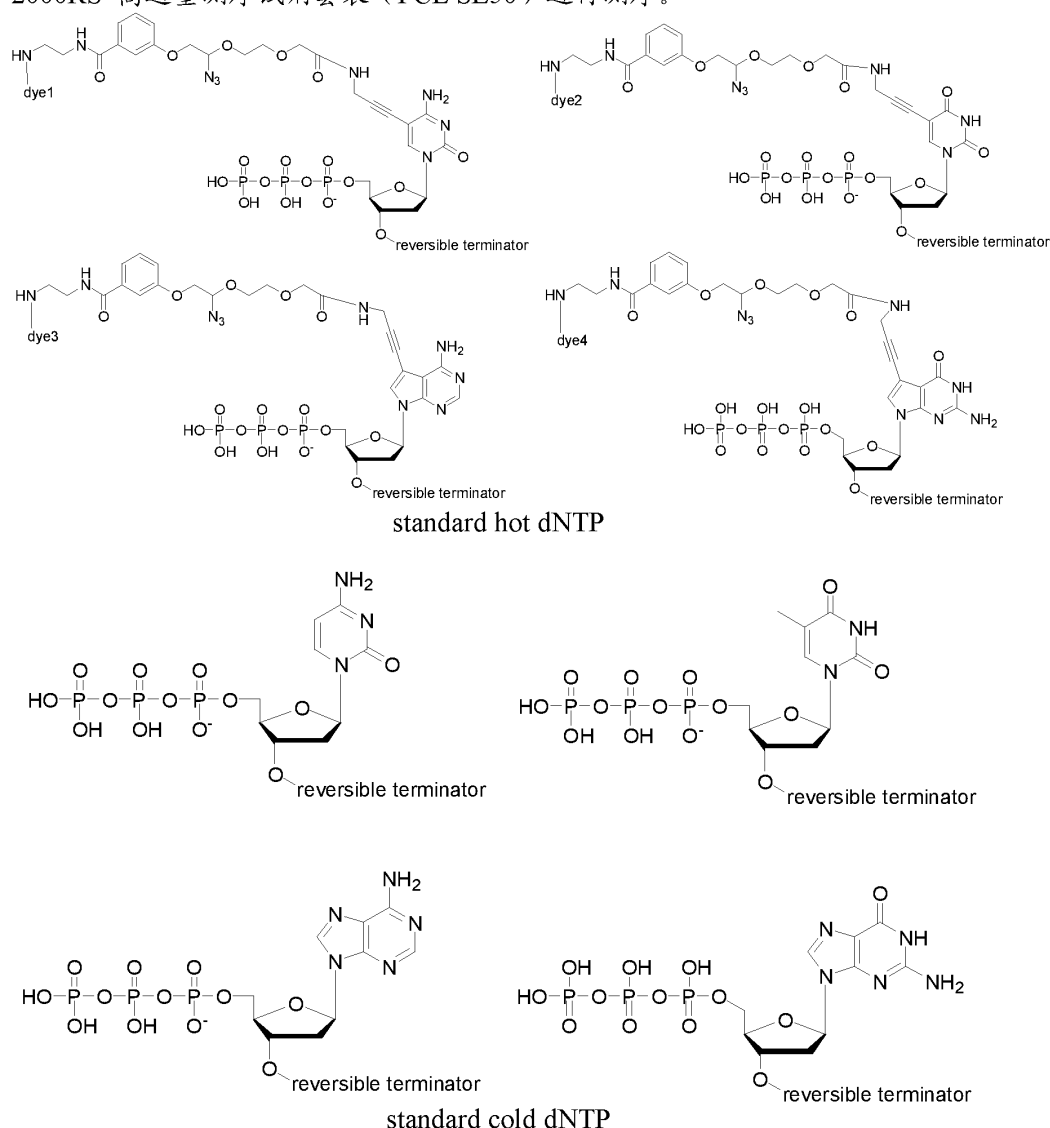
具体地, 发明人对前述制备实施例制备得到的核苷酸类似物在高通量测序

仪上进行了评估测试。

1、阻断效果评估

核苷酸底物：荧光标记的 standard hot dNTP（四种）和 standard cold dNTP（四种），结构如下，均来自于 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50），深圳华大智造科技股份有限公司，货号 1000012551；本发明核苷酸类似物 cold dNTP（包括 dTTP、dATP、dCTP、dGTP 四种，每次测试只使用一种，为了表示方便，对于 3'-OH 的每一种修饰，下表 1 仅展示了 dTTP 的测试结果）。

按照 MGISEQ2000 测序仪操作规程，使用上述核苷酸底物以及 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50）进行测序。



- (1) 利用 Ecoli 测序文库制备 DNA 纳米球；
- (2) 将 DNA 纳米球装载到 MGISEQ2000 测序芯片上；
- (3) 将装载完成的测序芯片加载至 MGISEQ2000 测序仪上，设置测序流

程;

(4) 第一轮上机测试: 聚合 standard hot dNTP, 拍照记录信号值, 然后用 thpp 试剂切除阻断基团, 65℃ 1min。

(5) 第二轮上机测试: 聚合 standard cold dNTP, 然后聚合 standard hot dNTP, 拍照记录信号值, 然后用 thpp 试剂切除阻断基团, 65℃ 1min。

(6) 第三轮上机测试: 聚合 standard hot dNTP, 拍照记录信号值。后用 thpp 试剂切除阻断基团, 65℃ 1min。

(7) 第四轮上机测试: 聚合本发明核苷酸类似物 cold dNTP (每次测试只聚合一种 cold dNTP), 然后聚合 standard hot dNTP, 拍照记录信号值。然后用 thpp 试剂切除阻断基团, 65℃ 1min。

(8) 第五轮上机测试: 聚合 standard hot dNTP, 拍照记录信号值。

(9) 评估聚合效率和切除效率, 结果见表 1。

聚合效率计算:
$$E_I = \frac{c_3 - c_4}{c_1 - c_2}$$

其中:

EI (Incorporation efficiency), 为测试核苷酸与对比核苷酸聚合效率比值;

C1 为第一轮上机测试信号值;

C2 为第二轮上机测试信号值;

C3 为第三轮上机测试信号值;

C4 为第四轮上机测试信号值;

$$E_c = 1 - \frac{\sum_{CGT} \left(\frac{c_3 - c_5}{c_3} \right) * 4}{3EI}$$

切除效率计算:

其中:

Ec (Cleavage efficiency), 为测试核苷酸与对比核苷酸切除效率比值;

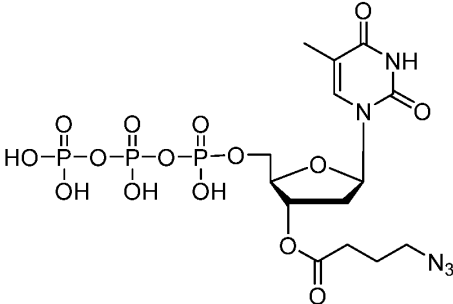
EI 为测试核苷酸与对比核苷酸聚合效率比值;

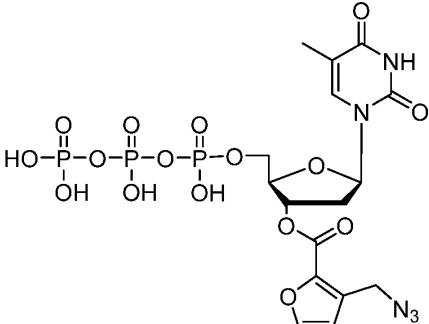
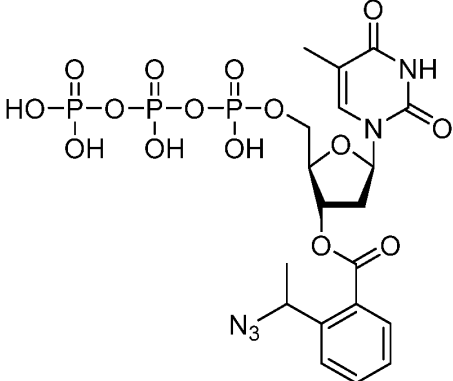
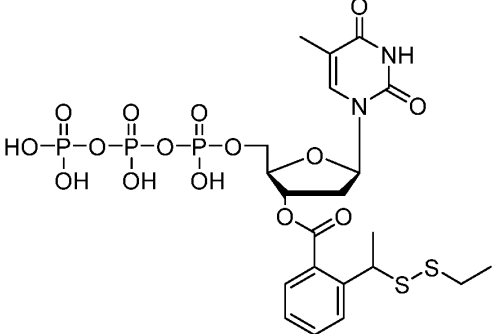
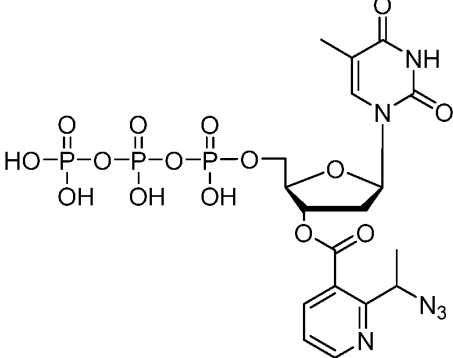
C3 为第三轮上机测试信号值;

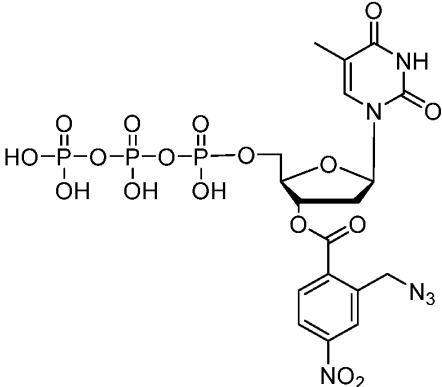
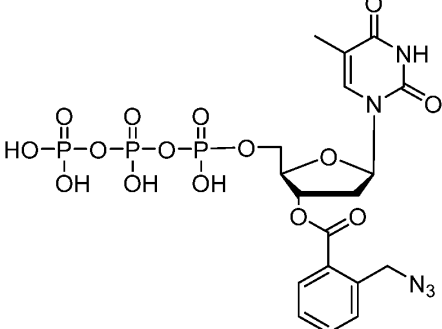
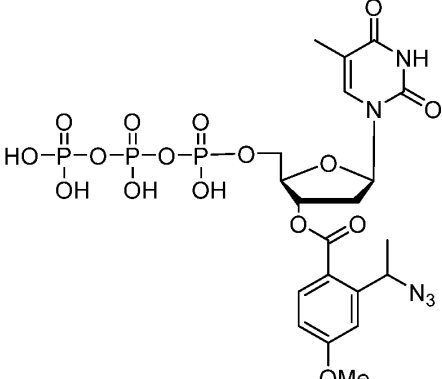
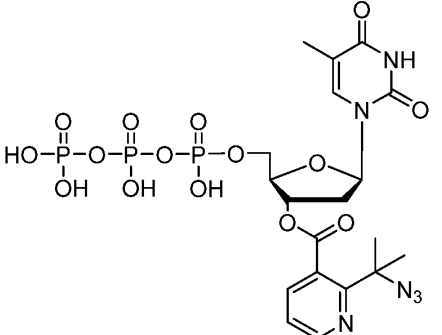
C5 为第五轮上机测试信号值;

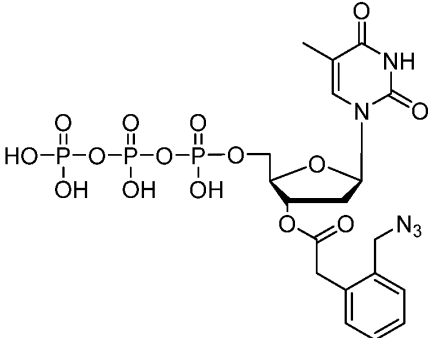
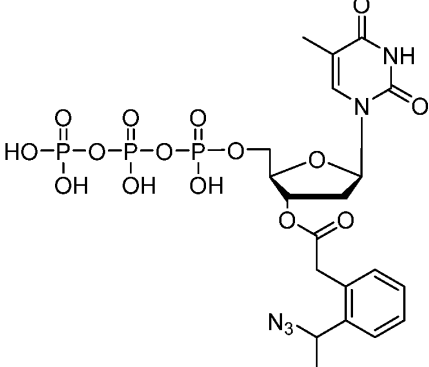
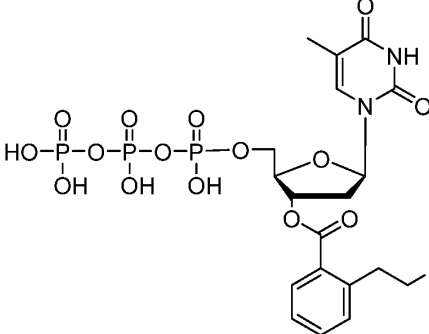
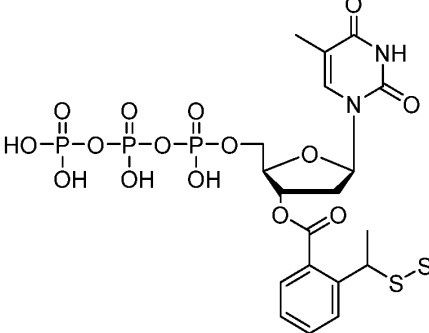
CGT 为第三轮中 C 碱基、G 碱基与 T 碱基的信号。

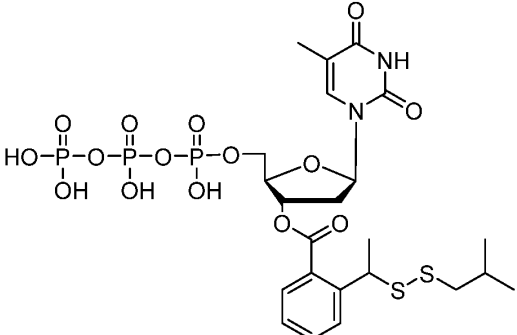
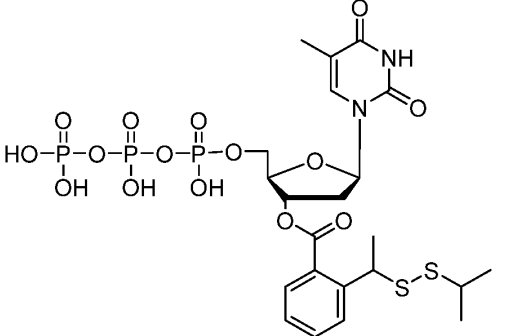
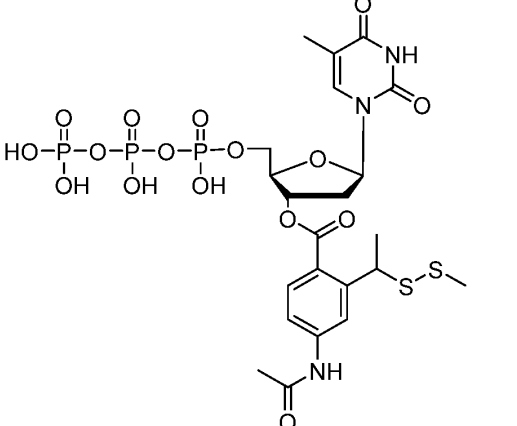
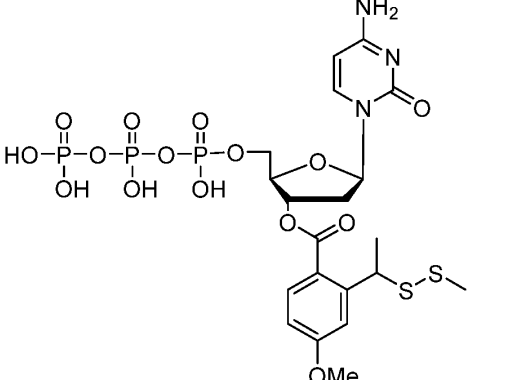
表 1 核苷酸类似物的聚合效率和切除效率 (仅展示 dTTP)

	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 95%
	切除效率 Cleavage efficiency (E _c) 36%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 101%

	切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 5%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 101% 切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 105%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 100% 切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 110%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 100% 切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 115%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 101%

	切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 112%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 98% 切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 91%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 101% 切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 98%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 95% 切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 110%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 95%

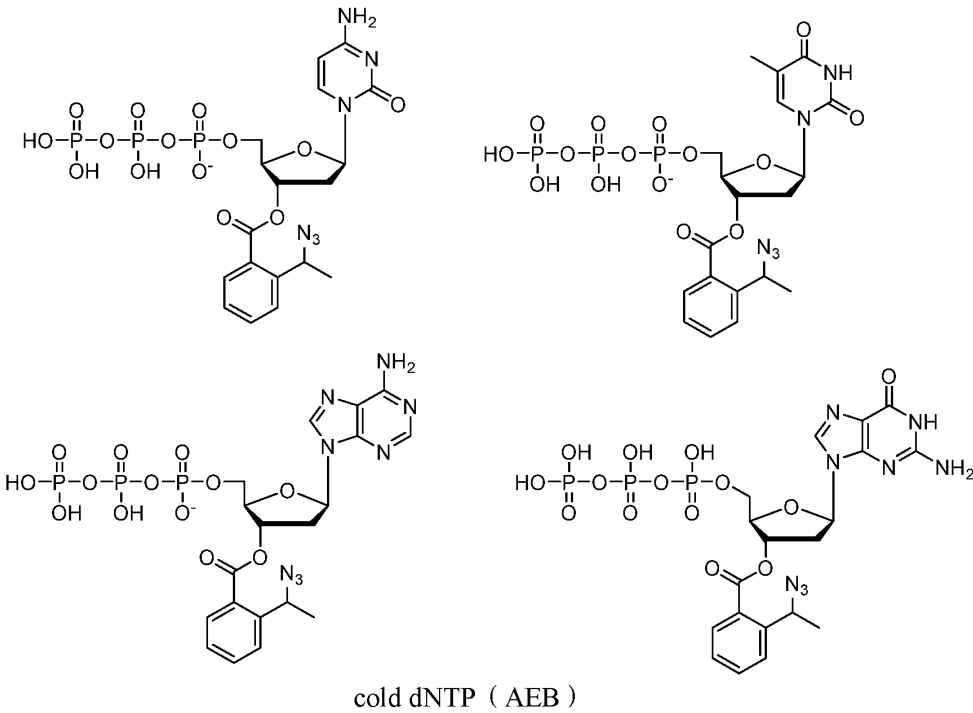
	切除效率 Cleavage efficiency (E _c) 89%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _i) 98% 切除效率 Cleavage efficiency (E _c) 91%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _i) 100% 切除效率 Cleavage efficiency (E _c) 100%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _i) 100% 切除效率 Cleavage efficiency (E _c) 111%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _i) 90%

	切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 98%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 95%
	切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 103%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 100%
	切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 98%
	聚合效率 Incorporation efficiency (E _I) 104% 切除效率 Cleavage efficiency (E _C) 101%

2、测序效果评估

测序例 1

核苷酸底物：荧光标记的 standard hot dNTP（四种，来自于 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50），深圳华大智造科技股份有限公司，货号 1000012551）；本发明核苷酸类似物 cold dNTP（四种，命名为 **AEB**），结构如下。



按照 MGISEQ2000 测序仪操作规程，使用上述核苷酸底物以及 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50）进行测序。

（1）利用 Ecoli 测序文库制备 DNA 纳米球；

（2）将 DNA 纳米球装载到 MGISEQ2000 测序芯片上；

（3）将装载完成的测序芯片加载至 MGISEQ2000 测序仪上，设置测序流程，hot dNTP 聚合：60℃ 2min; cold dNTP 聚合：60℃ 2min; 信号采集；切除阻断基团：65℃ 2min。

（4）下机数据进行 basecall 分析，输出测序指标，比对率，错误率，Q30 等，结果见表 2。

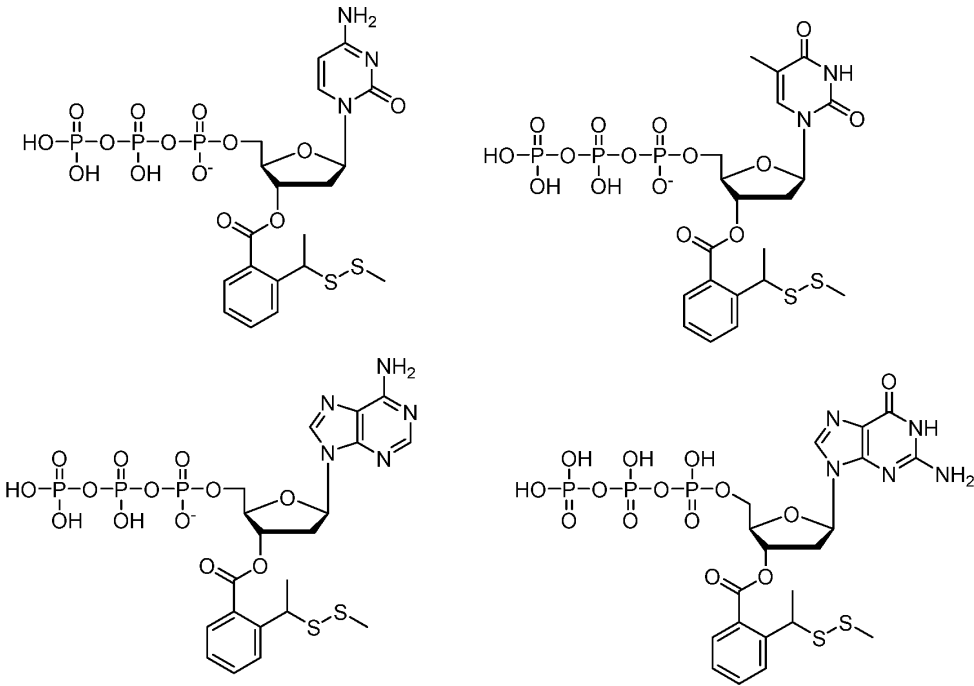
表 2 Basecall 分析结果

核苷酸类似物 cold dNTP Mix	AEB
参考基因（Reference）	Ecoli.fa
循环数（Cycle Number）	50
Q30（%）	84.61
Lag（1%）	0.18
Lag（2%）	0.23

Runon (1%)	0.3
Runon (2%)	0.37
ESR (%)	78.17
比对率 (Mapping Rate, %)	98.8
平均错误率 (AvgError Rate, %)	0.84
去除 N 后的平均错误率 (AvgError Rate!N, %)	0.81

测序例 2

核苷酸底物：荧光标记的 standard hot dNTP（四种，来自于 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50），深圳华大智造科技股份有限公司，货号 1000012551）；本发明核苷酸类似物 cold dNTP（四种，命名为 **SSEB**），结构如下。



cold dNTP (SSEB)

测序过程同上述测序例 1，Basecall 分析结果见表 3。

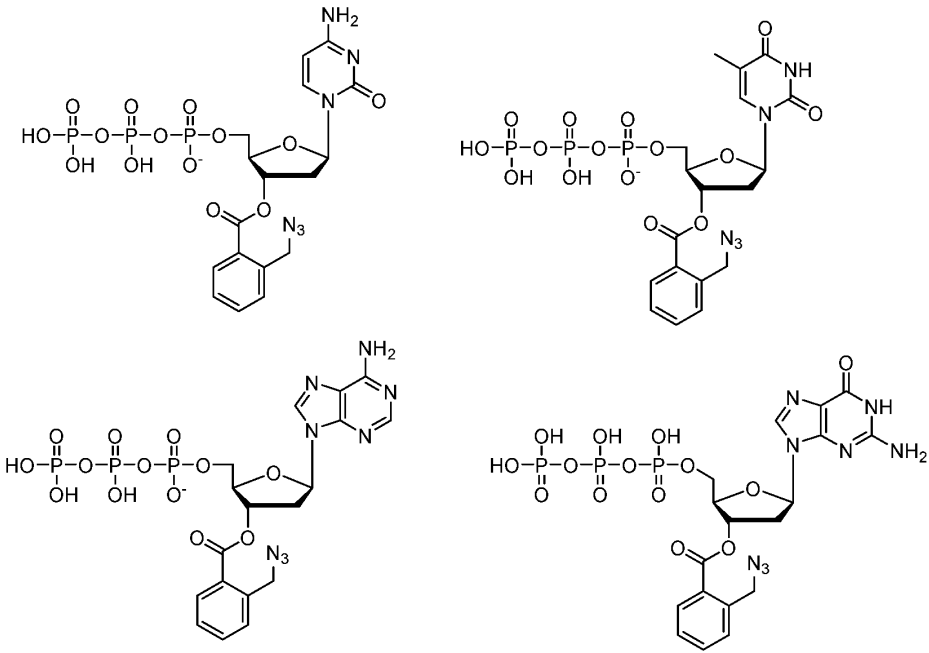
表 3 Basecall 分析结果

核苷酸类似物 cold dNTP Mix	SSEB
参考基因 (Reference)	Ecoli.fa
循环数 (Cycle Number)	50
Q30 (%)	91.89
Lag (%)	0.11

Runon (%)	0.23
ESR (%)	90.33
比对率 (Mapping Rate, %)	98.59
平均错误率 (AvgError Rate, %)	0.13

测序例 3

核苷酸底物：荧光标记的 standard hot dNTP（四种，来自于 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装（FCL SE50），深圳华大智造科技股份有限公司，货号 1000012551）；本发明核苷酸类似物 cold dNTP（四种，命名为 **AZBN**），结构如下。



cold dNTP Mix （**AZBN**）

测序过程同上述测序例 1，Basecall 分析结果见表 4。

表 4 Basecall 分析结果

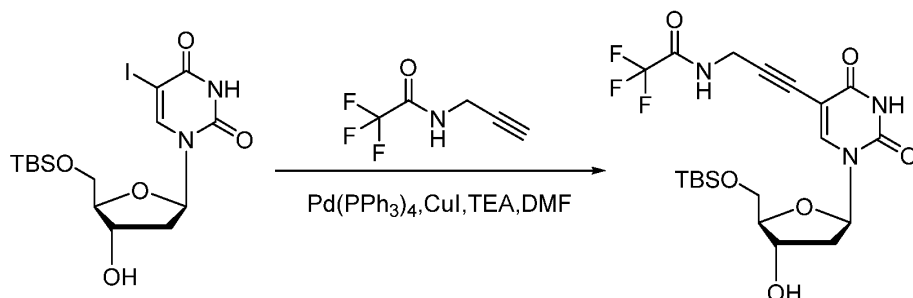
核苷酸类似物 cold dNTP Mix	AZBN
参考基因 (Reference)	Ecoli.fa
循环数 (Cycle Number)	50
Q30 (%)	61.39
Lag (%)	0.03
Runon (%)	0.12
ESR (%)	62.17
比对率 (Mapping Rate, %)	5.75

平均错误率 (AvgError Rate, %)	4.94
去除 N 后的平均错误率 (AvgError Rate!N, %)	4.89

测序例 4 使用 hot T-SSEB 进行测序

1、合成带有荧光基团的核苷酸类似物 dTTP (命名为 hot T-SSEB)

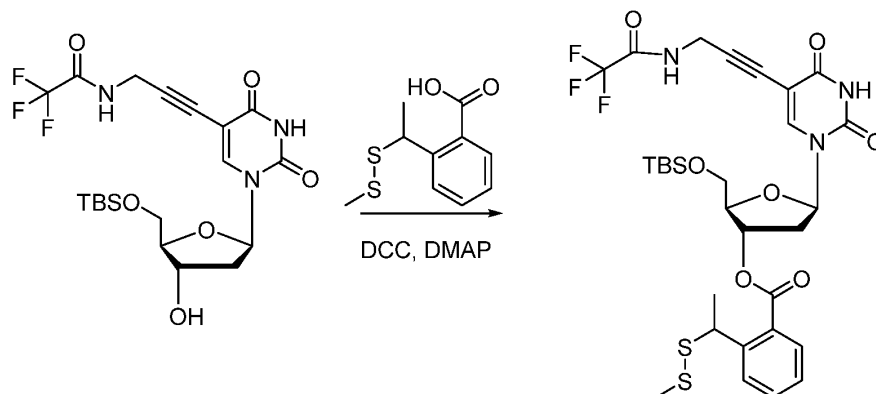
(1) 步骤 1



碘代核苷底物 T (OKeanos Tech, 货号 OK-N-16001) 1g 溶解于 DMF 中, 加入 Pd(PPh₃)₄ (10 mol%), CuI (15 mol%), 三乙胺 (3 eq) 与底物炔丙胺 (OKeanos Tech, 货号 OK20A410) (1.5eq) 在 60 度条件下反应 12h。加入水淬灭反应, DCM 萃取。浓缩后柱分离得到白色固体产品 1.1 g。

MS[ES(-)], m/z 491.1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.67 (s, 1H), 10.00 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 6.12 (dd, J = 7.6, 5.9 Hz, 1H), 5.28 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 4.26 - 4.12 (m, 3H), 3.88 (q, J = 2.8 Hz, 1H), 3.81 (dd, J = 11.5, 2.6 Hz, 1H), 3.73 (dd, J = 11.5, 3.1 Hz, 1H), 2.17 (ddd, J = 13.2, 6.0, 2.8 Hz, 1H), 2.05 (ddd, J = 13.3, 7.7, 5.8 Hz, 1H), 0.87 (s, 9H), 0.08 (d, J = 1.8 Hz, 6H).

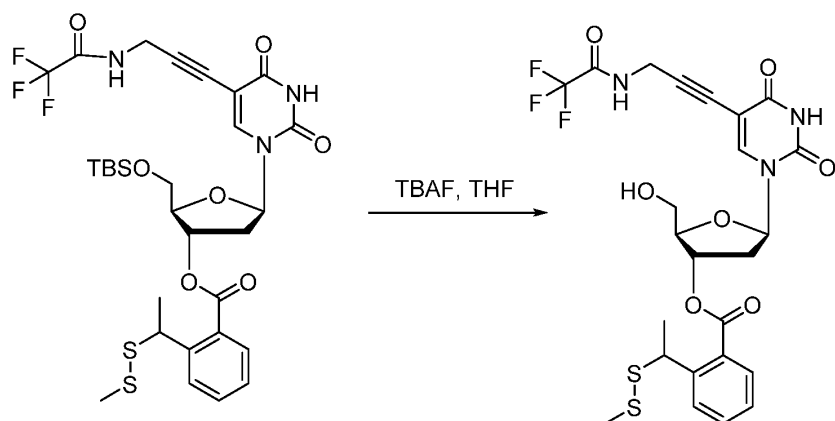
(2) 步骤 2



步骤 1 获得的核苷 300mg 溶解在 10mL 的 DMF 中, 加入 DCC (1.2 eq) 与 DMAP (10% mol), 反应搅拌 30 分钟后, 加入二硫羧酸底物 (OKeanos Tech, 货号 OK20A420) (1.5 eq)。反应搅拌 12 小时后, 直接柱分离得到白色固体 359mg。

MS[ES(-)], m/z 700.3. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.74 (s, 1H), 10.03 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.90 - 7.82 (m, 1H), 7.68 - 7.58 (m, 2H), 7.47 - 7.40 (m, 1H), 6.23 - 6.18 (m, 1H), 5.45 - 5.42 (m, 1H), 5.20 - 5.12 (m, 1H), 4.38 - 4.16 (m, 3H), 3.98 - 3.87 (m, 2H), 2.60 - 2.53 (m, 1H), 2.40 - 2.31 (m, 1H), 2.06 (d, J = 0.6 Hz, 3H), 1.65 (dd, J = 7.0, 1.0 Hz, 3H), 0.90 (s, 9H), 0.13 (d, J = 1.2 Hz, 6H).

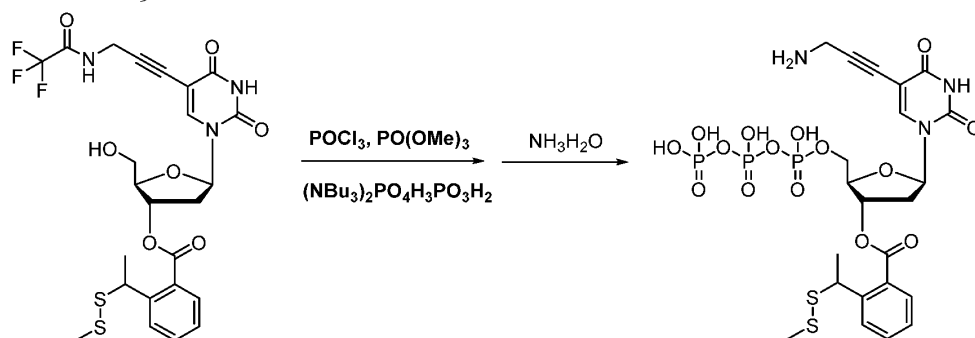
(3) 步骤 3



步骤2获得的核苷300mg溶解在10mL的THF中,在0度下加入TBAF(2 eq, 1M in THF),反应在0度搅拌30分钟后,升至室温搅拌4小时。反应直接柱分离得到白色固体200mg。

MS[ES(-)],m/z 587.2. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.68 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 10.06 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 7.88 – 7.78 (m, 1H), 7.66 – 7.56 (m, 2H), 7.43 – 7.39 (m, 1H), 6.25 – 6.13 (m, 1H), 5.48 – 5.45 (m, 1H), 5.31 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 5.18 – 5.12 (m, 1H), 4.28 – 4.16 (m, 3H), 3.76 – 3.67 (m, 2H), 2.50 – 2.40 (m, 2H), 2.04 (d, J = 9.2 Hz, 3H), 1.68 – 1.59 (m, 3H).

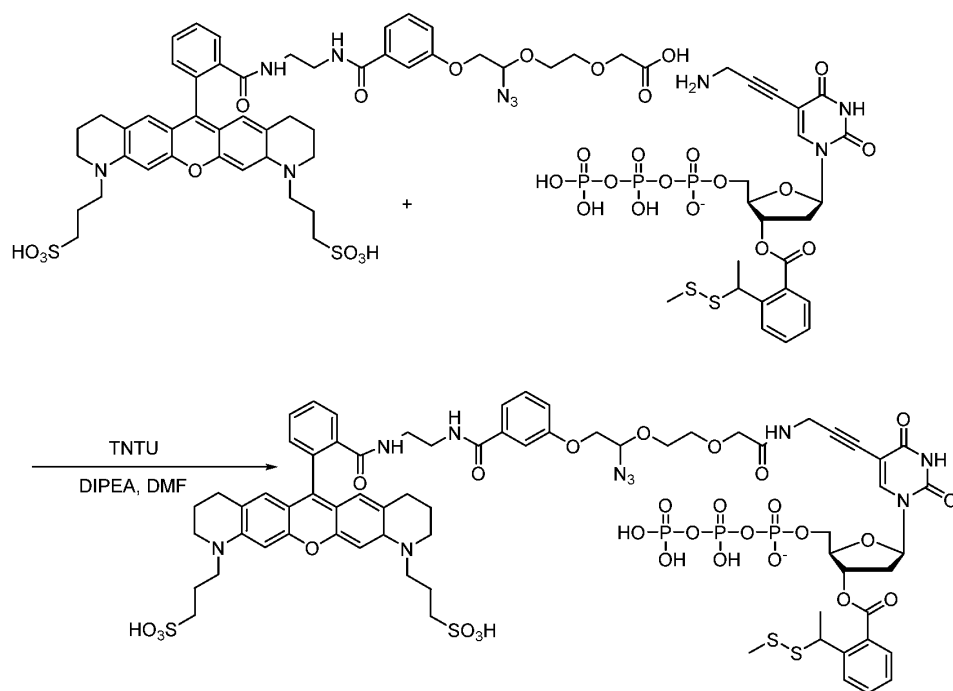
(4) 步骤4



步骤3获得的核苷200mg溶解在5mL的磷酸三甲酯中,在0度下加入三氯氧磷(1.5 eq),反应在0度搅拌120分钟后,将反应液加入到三丁基焦磷酸铵(2 eq)的DMF(5 mL)溶液中,反应在0度继续搅拌3h后,加入0.1 M TEAB缓冲液淬灭。反应利用制备HPLC反相柱(C18, 流动相: 0.1 M TEAB-乙腈)分离,浓缩后直接加入浓氨水3 mL,反应2h后利用制备HPLC反相柱(C18, 流动相: 0.1 M TEAB-乙腈)分离得到白色固体120mg。

MS[ES(-)],m/z 745.5. ^1H NMR (400 MHz, D $_2$ O) δ 8.51 (s, 1H), 7.90 (dd, J = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.67 (td, J = 7.6, 1.4 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 6.45 (td, J = 9.2, 5.7 Hz, 1H), 5.75 (t, J = 4.7 Hz, 1H), 5.15 – 5.07 (m, 1H), 4.72 – 4.64 (m, 1H), 4.39 (d, J = 3.3 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 2.82 – 2.76 (m, 1H), 2.64 – 2.54 (m, 1H), 2.02 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.73 (dd, J = 7.1, 2.2 Hz, 3H); ^{31}P NMR (162 MHz, D $_2$ O) δ -9.79 (dd, J = 20.3, 9.6 Hz, 1P), -11.68 (d, J = 19.2 Hz, 1P), -22.82 (td, J = 19.2, 6.1 Hz, 1P).

(5) 步骤5

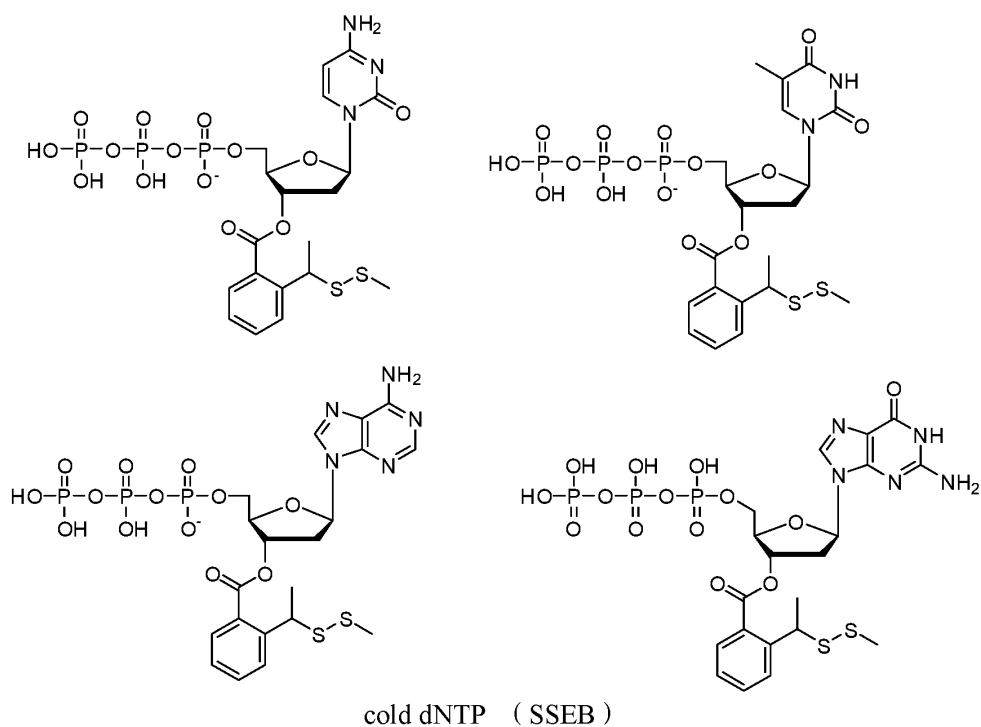


称取 dye-linker 固体 (Okeanos Tech, OK-F-20211) (9.3 mg, 1 eq.) 于带磁力搅拌子的 20 毫升干燥圆底烧瓶中, 用适量 DMF (3 ml) 溶解, 依次加入 TNTU 固体 (7 mg, 0.02 mmol, 2 eq.) 和 DIPEA (2.6 mg, 0.02 mmol, 2 eq.), DIPEA 称取于 1.5 ml PE 管中并用 0.5 ml DMF 稀释后滴加入反应体系, 作为搅拌反应。约 1 小时后, 取样溶于乙腈, 通过 HPLC 和 MS 监测 AF532-V4 原料消耗完毕。往上述反应体系加入 hot T-mSSEB 底物固体 (15 mg, 0.02 mmol, 1 eq.), 室温搅拌反应。1 小时后取样溶于乙腈, 通过 MS 和 HPLC 监测反应进程。反应过夜至 nhs 酯消耗完毕。加入 0.1 M TEAB 缓冲液淬灭。反应利用制备 HPLC 反相柱 (C18, 流动相: 0.1 M TEAB-乙腈) 分离, 浓缩后直接加入浓氨水 3 mL, 反应 2h 后利用制备 HPLC 反相柱 (C18, 流动相: 0.1 M TEAB-乙腈) 分离得到固体 10mg。

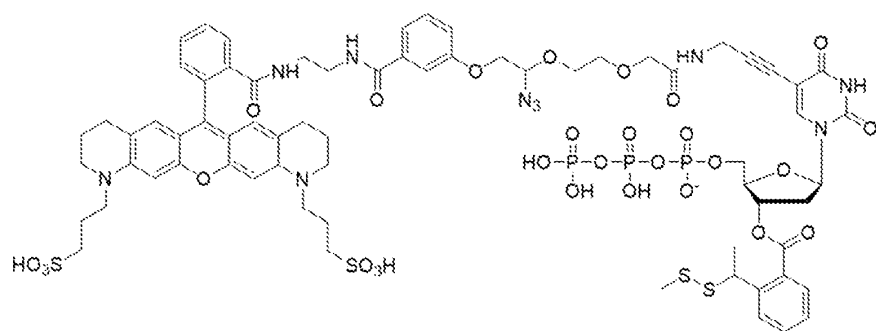
MS[ES(-)], m/z 1815.0. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.06 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 8.80 (d, J = 47.0 Hz, 1H), 8.28 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 8.18 - 8.00 (m, 1H), 7.86 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.75 - 7.66 (m, 2H), 7.66 - 7.58 (m, 3H), 7.58 - 7.40 (m, 4H), 7.39 - 7.33 (m, 1H), 7.17 - 7.07 (m, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.79 (s, 2H), 6.31 - 6.17 (m, 1H), 5.58 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 5.21 - 5.14 (m, 2H), 4.34 (d, J = 19.3 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 10.5, 3.9 Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 10.6, 4.5 Hz, 2H), 4.09 (d, J = 3.5 Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.95 - 3.82 (m, 2H), 3.68 (s, 6H), 3.52 (s, 4H), 3.33 - 3.24 (m, 2H), 3.22 - 3.15 (m, 2H), 3.14 - 3.06 (m, 2H), 2.65 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 2.57 (t, J = 7.1 Hz, 5H), 2.46 - 2.37 (m, 1H), 2.05 (d, J = 16.8 Hz, 3H), 2.01 - 1.93 (m, 4H), 1.86 - 1.81 (m, 3H), 1.77 - 1.72 (m, 1H), 1.65 (d, J = 6.9 Hz, 3H)。

2、使用包含前述制备的 hot T-SSEB 的核苷酸类似物进行测序

核苷酸底物: 荧光标记的 standard hot dNTP (来自于 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE50), 深圳华大智造科技股份有限公司, 货号 1000012551), 其中 hot dTTP 使用前述制备获得的 hot T-SSEB 替代, 结构如下; 本发明核苷酸类似物 cold dNTP (四种, 命名为 SSEB), 结构如下。



cold dNTP (SSEB)



hot dTTP (hot T-SSEB)

测序过程同上述测序例 1，Basecall 分析结果见表 5。

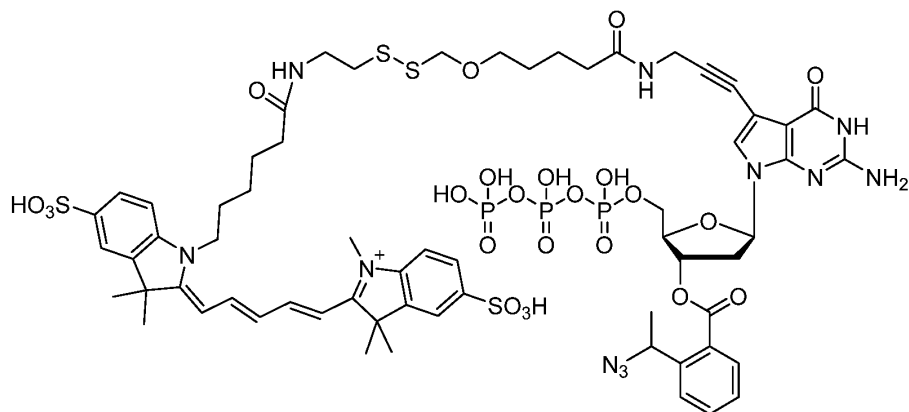
表 5 Basecall 分析结果

核苷酸类似物	hot T-SSEB + cold dNTP-SSEB, 其余为 standard hot dNTP
参考基因 (Reference)	Ecoli.fa
循环数 (Cycle Number)	50
Q30 (%)	87.24
Lag (%)	0.19
Runon (%)	0.24
ESR (%)	74.7

比对率 (Mapping Rate, %)	98.44
平均错误率 (AvgError Rate, %)	0.27

测序例 5 使用 SS-hot G 进行测序

1、合成带有荧光基团的核苷酸类似物 dGTP (命名为 SS-hot G)



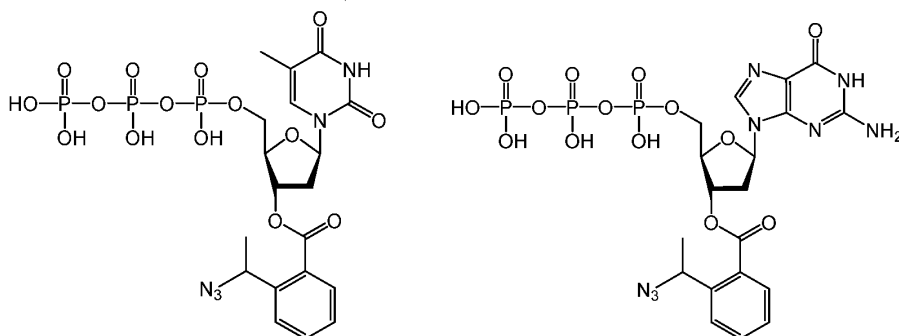
SS-hot G

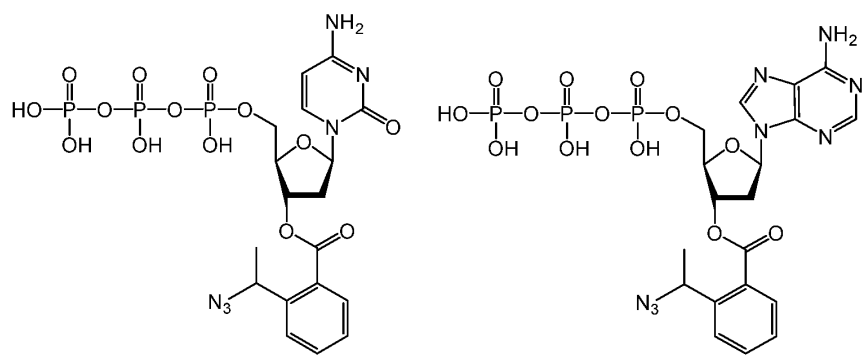
合成方法与测序例 4 类似。其中，使用碘代 G 核苷底物替代碘代 T 核苷底物，叠氮羧酸底物替代二巯羧酸底物，均由 OKeanos Tech 公司提供。dye-linker 固体需要替换，由 MyChem LLC 公司提供 (货号 110920Cy5)。获得终产品 10mg。

MS[ES(-)],m/z 1575. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.54 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.34 (t, J = 13.1 Hz, 2H), 8.07 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.92 (dd, J = 7.2, 4.6 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.67 - 7.62 (m, 4H), 7.49 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 3H), 6.58 (t, J = 12.3 Hz, 1H), 6.41 (s, 2H), 6.36 - 6.27 (m, 3H), 6.26 - 6.12 (m, 2H), 5.60 (dd, J = 13.1, 6.4 Hz, 3H), 4.86 (s, 2H), 4.48 (dd, J = 29.1, 16.7 Hz, 2H), 4.35 - 4.27 (m, 2H), 4.07 (d, J = 4.8 Hz, 4H), 3.59 (s, 2H), 3.50 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.34 - 3.29 (m, 2H), 2.78 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.13 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.07 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.68 (s, 12H), 1.53 - 1.48 (m, 8H), 1.35 (dt, J = 15.8, 8.1 Hz, 4H).

2、使用包含前述制备的 SS-hot G 的核苷酸类似物进行测序

核苷酸底物：荧光标记的 standard hot dNTP (来自于 MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (FCL SE50)，深圳华大智造科技股份有限公司，货号 1000012551)，其中 hot dGTP 使用前述制备获得的 SS-hot G 替代；本发明核苷酸类似物 cold dNTP (四种，命名为 SS-cold)，结构如下。





cold dNTP (SS-cold)

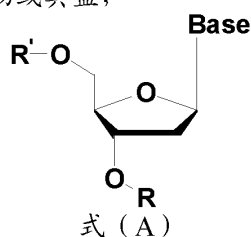
测序过程同上述测序例 1，Basecall 分析结果见表 6。

表 6 Basecall 分析结果

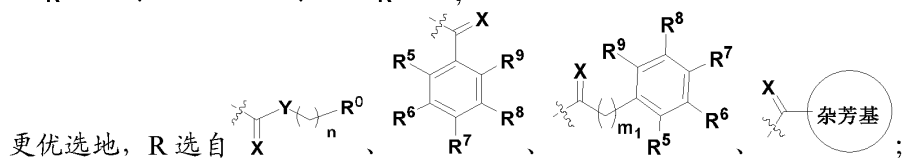
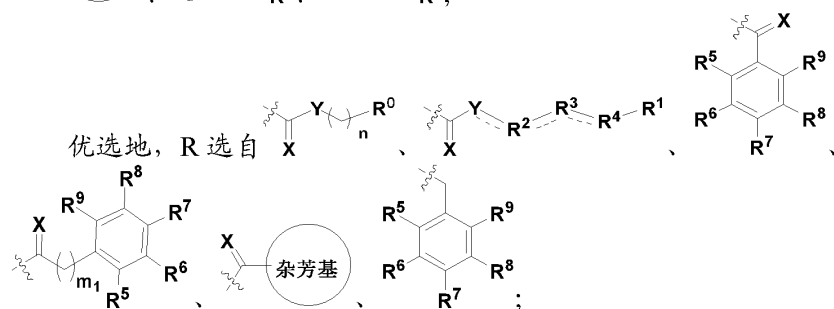
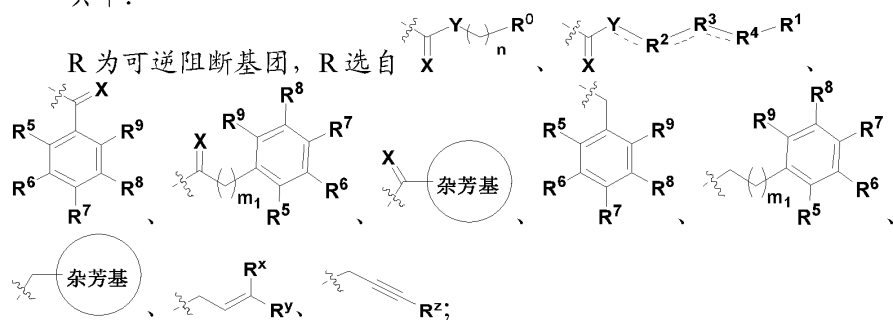
核苷酸类似物	SS-hot G + SS-cold dNTP，其余为 standard hot dNTP
参考基因 (Reference)	Ecoli.fa
循环数 (Cycle Number)	50
Q30 (%)	53.08
Lag (%)	0.24
Runon (%)	0.32
ESR (%)	66.96
比对率 (Mapping Rate, %)	0.13
平均错误率 (AvgError Rate, %)	5.14

权 利 要 求

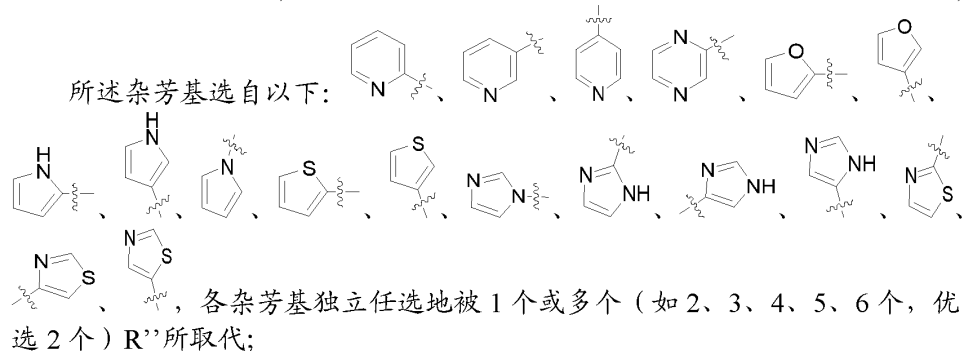
1、式(A)所示的化合物或其盐,



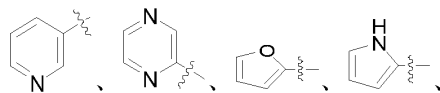
其中：

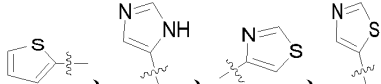


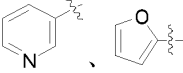
所述杂芳基选自以下:



优选地，所述杂芳基选自以下：




 , 各杂芳基独立任选地被 1 个或多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代;

更优选地, 所述杂芳基选自以下:
 
 , 各杂芳基独立任选地被 1 个或多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代;

各 X 独立地选自 O、NH、S;

优选地, X 为 O;

各 Y 独立地选自直接键、O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂;

优选地, 各 Y 独立地选自直接键、CH₂;

R^0 选自 -N₃、-SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m, 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基);

优选地, R^0 为 -N₃ 或 -SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基);

更优选地, R^0 为 -N₃;

R^1 选自 -N₃、-SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m, 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基);

优选地, R^1 为 -N₃ 或 -SS-C1-C6 烷基 (如 -SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基);

更优选地, R^1 为 -N₃;

R^2 、 R^3 、 R^4 各自独立地选自 O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂;

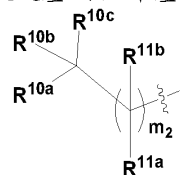
优选地, R^2 、 R^3 、 R^4 各自独立地选自 O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂, 且满足以下条件: R^2 选自 O、S 时, R^3 和 R^4 为 CH₂; R^3 选自 O、S 时, R^2 和 R^4 为 CH₂; R^4 选自 O、S 时, R^2 和 R^3 为 CH₂; R^2 为 C(CH₃)₂ 时, R^3 和 R^4 为 CH₂; R^3 为 C(CH₃)₂ 时, R^2 和 R^4 为 CH₂; R^4 为 C(CH₃)₂ 时, R^2 和 R^3 为 CH₂; Y 为 CH 时, R^2 为 CH, R^3 和 R^4 为 CH₂;

更优选地, R^2 、 R^3 、 R^4 各自独立地选自 CH、CH₂;

最优选地, R^2 和 R^3 为 CH, R^4 为 CH₂;

——表示单键, = 表示双键;

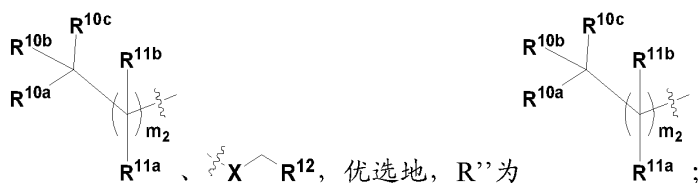
各 R'' 独立地选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷



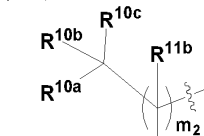
基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基)、

X 和 R^{12} , 且不同时为 H;

优选地, 各杂芳基独立任选地被 1 个 R'' 所取代时, 各 R'' 独立地选自

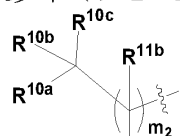


或者优选地, 各杂芳基独立任选地被多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2



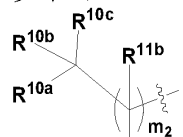
个) R'' 所取代时, 多个 R'' 中, 1 个 R'' 选自
 R'' 各自独立地选自 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基);

或者更优选地, 各杂芳基独立任选地被多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选



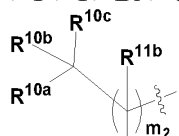
2 个) R'' 所取代时, 多个 R'' 中, 1 个 R'' 为
 选自硝基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl;

或者最优选地, 各杂芳基独立任选地被多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选

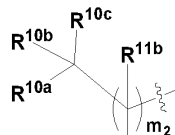


2 个) R'' 所取代时, 多个 R'' 中, 1 个 R'' 为
 选自硝基、C1-C6 烷基, 优选地, 剩余 R'' 为 C1-C6 烷基;

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^x 、 R^y 、 R^z 各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基)



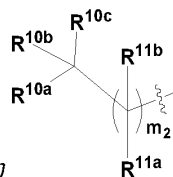
基)、C1-C6 烷基- $C(=O)-NH_2$ -、
 R^8 、 R^9 不同时为 H;



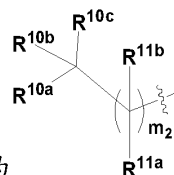
优选地, R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个选自

$X-R^{12}$, 其余四个各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基)、C1-C6 烷基-

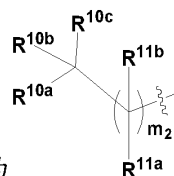
C(=O)-NH₂-;



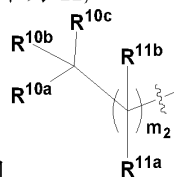
更优选地, R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中的任意一个为 R^{11a}, 其余四个各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷基-C(=O)-NH₂-;



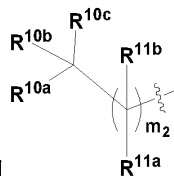
进一步优选地, R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中, R⁵或 R⁹为 R^{11a}, 其余四个各自独立地选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基;



最优选地, R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中, R⁵或 R⁹为 R^{11a}, R⁷选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基, 其余三个为 H;

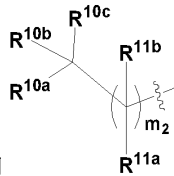


优选地, R^x、R^y中, 任意一个选自 R^{11a}、X-R¹², 另一个选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基(如 C1-C6 烷氧基);



更优选地, R^x、R^y中, 任意一个选自 R^{11a}、X-R¹², 另一个为 H;

最优选地, R^x、R^y中, 任意一个为 X-R¹², 另一个为 H;



优选地, R^z选自 R^{11a}、X-R¹²;

更优选地, R^z为 X-R¹²;

R^{10a}、R^{10b}、R^{10c}、R^{11a}、R^{11b}、R¹²各自独立地选自 H、-N₃、-SS-C1-C6 烷基(如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基或-SS-异丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷

基), 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基), 且 R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 不同时为 H;

优选地, R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个选自 $-N_3$ 、 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS-$ 甲基、 $-SS-$ 乙基、 $-SS-$ 异丙基、 $-SS-$ 叔丁基或 $-SS-$ 异丁基)、 $-ONH_2$ 、 $-OCOR^m$ 、 $-OCONHR^m$, 另两个各自独立地选自 H、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基), 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基);

更优选地, R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个为 $-N_3$ 或 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS-$ 甲基、 $-SS-$ 乙基、 $-SS-$ 异丙基、 $-SS-$ 叔丁基或 $-SS-$ 异丁基), 另两个各自独立地选自 H、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基);

最优选地, R^{10a} 、 R^{10b} 、 R^{10c} 中的任意一个为 $-N_3$ 、 $-SS-$ 甲基、 $-SS-$ 乙基、 $-SS-$ 异丙基、 $-SS-$ 叔丁基或 $-SS-$ 异丁基, 另两个各自独立地选自 H、甲基;

优选地, R^{11a} 、 R^{11b} 各自独立地选自 H、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基);

更优选地, R^{11a} 、 R^{11b} 为 H;

优选地, R^{12} 选自 $-N_3$ 、 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS-$ 甲基、 $-SS-$ 乙基、 $-SS-$ 异丙基、 $-SS-$ 叔丁基)、 $-ONH_2$ 、 $-OCOR^m$ 、 $-OCONHR^m$, 其中, 各 R^m 独立地选自脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基) 或芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基);

更优选地, R^{12} 为 $-N_3$ 或 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS-$ 甲基、 $-SS-$ 乙基、 $-SS-$ 异丙基、 $-SS-$ 叔丁基);

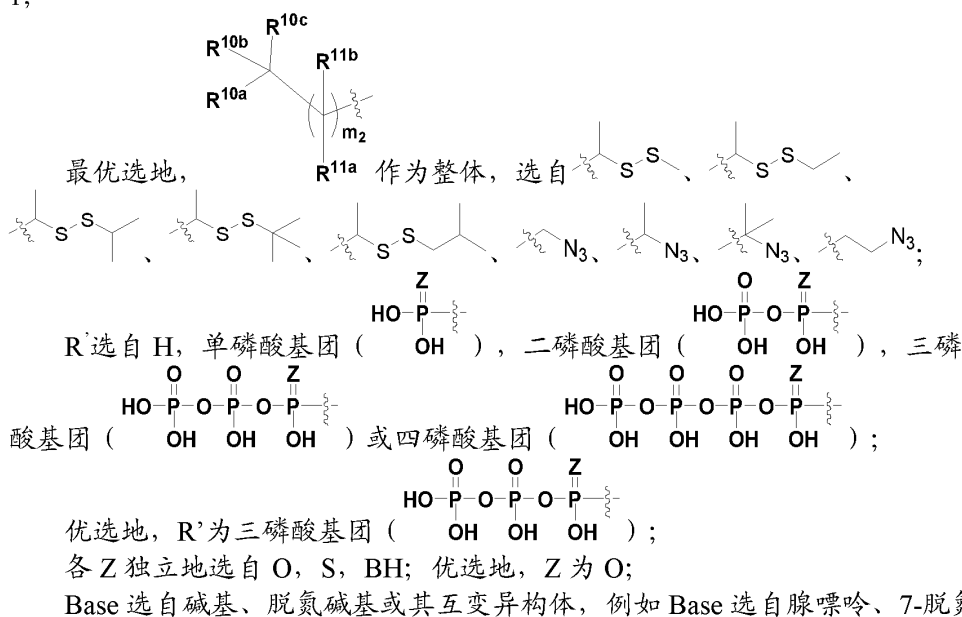
最优选地, R^{12} 为 $-N_3$;

n 选自 1、2、3、4、5; 优选地, n 选自 1、2、3; 更优选地, n 为 2;

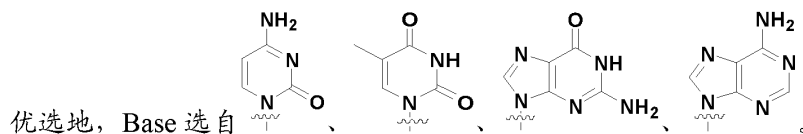
各 m_1 独立地选自 1、2、3、4、5、6; 优选地, m_1 为 1;

各 m_2 独立地选自 0、1、2、3、4、5、6; 优选地, 各 m_2 独立地选自 0、

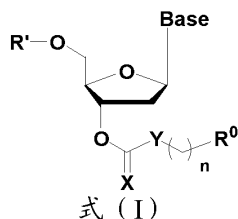
1;



腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体；



2、权利要求 1 的化合物或其盐，其中，所述化合物具有式 (I) 所示结构，



其中：

X 选自 O、NH、S；

优选地，X 为 O；

Y 选自直接键、O、NH、S、CH、CH₂、C(CH₃)₂；

优选地，Y 为 CH₂；

R⁰ 选自 -N₃、-SS-C1-C6 烷基（如 -SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基）、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m，其中，各 R^m 独立地选自脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）或芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）；

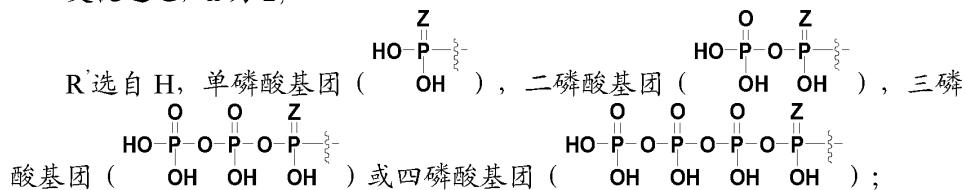
优选地，R⁰ 为 -N₃ 或 -SS-C1-C6 烷基（如 -SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基）；

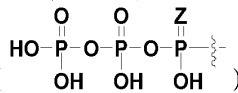
更优选地，R⁰ 为 -N₃；

n 选自 1、2、3、4、5；

优选地，n 选自 1、2、3；

更优选地，n 为 2；

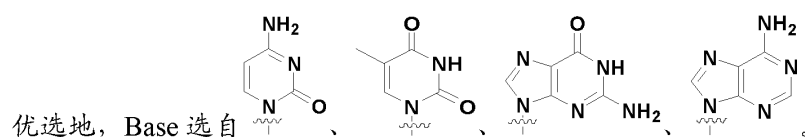


优选地，R' 为三磷酸基团 ()；

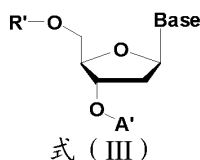
各 Z 独立地选自 O、S、BH；

优选地，Z 为 O；

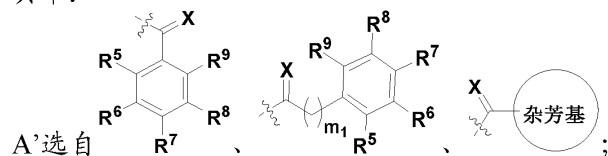
Base 选自碱基、脱氮碱基或其互变异构体，例如 Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体；

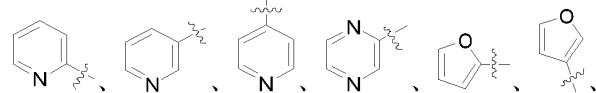


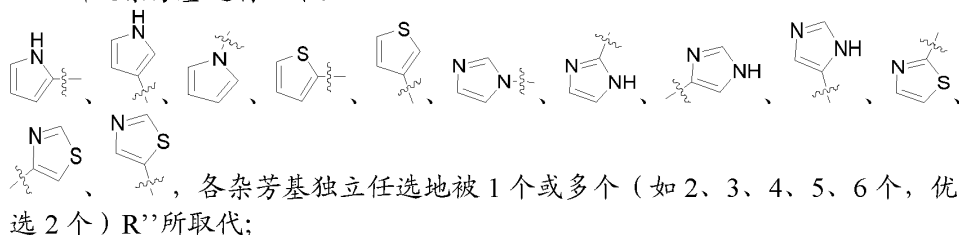
3、权利要求 1 的化合物或其盐, 其中, 所述化合物具有式 (III) 所示结构,

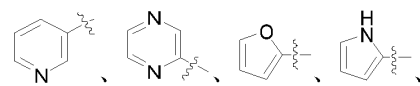


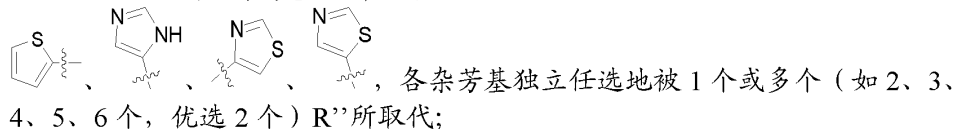
其中:

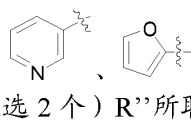


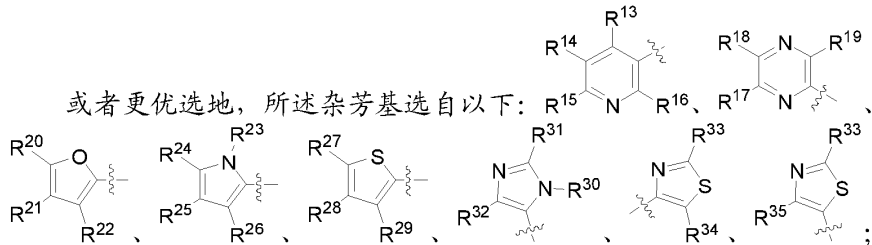
所述杂芳基选自以下: 

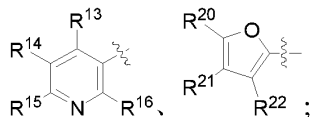
 , 各杂芳基独立任选地被 1 个或多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代;

优选地, 所述杂芳基选自以下: 

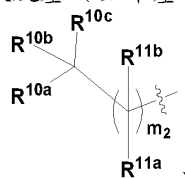
 , 各杂芳基独立任选地被 1 个或多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代;

更优选地, 所述杂芳基选自以下:  , 各杂芳基独立任选地被 1 个或多个 (如 2、3、4、5、6 个, 优选 2 个) R'' 所取代;

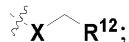


最优选地, 所述杂芳基选自以下: 

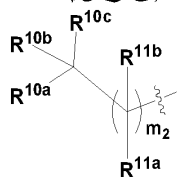
各 R'' 独立地选自 H、-N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、



基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、

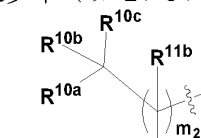


优选地，各杂芳基独立任选地被 1 个 R'' 所取代时，各 R'' 独立地选自



基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）、

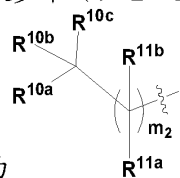
或者优选地，各杂芳基独立任选地被多个（如 2、3、4、5、6 个，优选 2



个）R'' 所取代时，多个 R'' 中，1 个 R'' 选自

R'' 各自独立地选自 -N₃、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、环烷基（如 C3-C6 环烷基）、芳香族烷基（如苯基 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl、烷氧基（如 C1-C6 烷氧基）；

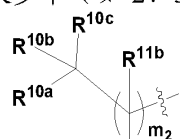
或者更优选地，各杂芳基独立任选地被多个（如 2、3、4、5、6 个，优选



2 个）R'' 所取代时，多个 R'' 中，1 个 R'' 为

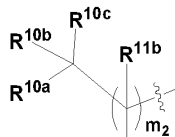
选自硝基、脂肪族烷基（如 C1-C6 烷基）、F、I、Br、Cl；

或者最优选地，各杂芳基独立任选地被多个（如 2、3、4、5、6 个，优选



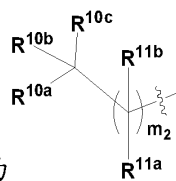
2 个）R'' 所取代时，多个 R'' 中，1 个 R'' 为

选自硝基、C1-C6 烷基，优选地，剩余 R'' 为 C1-C6 烷基，更优选地，剩余 R'' 为甲基；

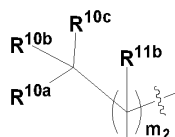


R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶ 中，R¹⁶ 为自 H、硝基、C1-C6 烷基（如甲基）；

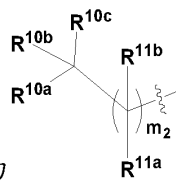
R¹³、R¹⁴、R¹⁵ 各自独立地选



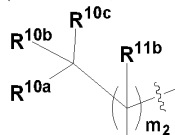
优选地, R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 、 R^{16} 中, R^{16} 为 H; R^{13} 、 R^{14} 、 R^{15} 为



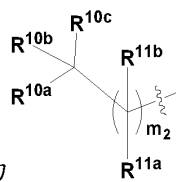
R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 中, R^{19} 为基、C1-C6 烷基 (如甲基); R^{17} 、 R^{18} 各自独立地选自 H、硝



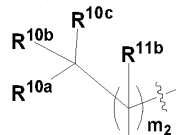
优选地, R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 中, R^{19} 为基, R^{17} 、 R^{18} 为 H;



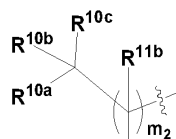
R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 中, R^{22} 为基、C1-C6 烷基 (如甲基); R^{20} 、 R^{21} 各自独立地选自 H、硝



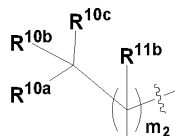
优选地, R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 中, R^{22} 为基, R^{20} 、 R^{21} 为 H;



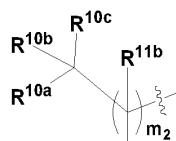
R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 中, R^{26} 为基、C1-C6 烷基 (如甲基); R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 各自独立地选



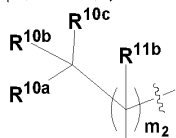
优选地, R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 、 R^{26} 中, R^{26} 为 H; R^{23} 、 R^{24} 、 R^{25} 为



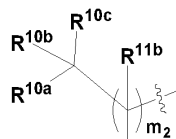
R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 中, R^{29} 为基、C1-C6 烷基 (如甲基); R^{27} 、 R^{28} 各自独立地选自 H、硝



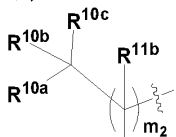
优选地, R^{27} 、 R^{28} 、 R^{29} 中, R^{29} 为 R^{11a} , R^{27} 、 R^{28} 为 H;



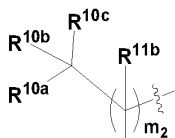
R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} 中, R^{32} 为 R^{11a} , R^{30} 、 R^{31} 各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基 (如甲基);



优选地, R^{30} 、 R^{31} 、 R^{32} 中, R^{32} 为 R^{11a} , R^{30} 、 R^{31} 为 H;



R^{33} 、 R^{34} 、 R^{35} 中, R^{34} 或 R^{35} 为 R^{11a} , R^{33} 选自 H、硝基、C1-C6 烷基 (如甲基);

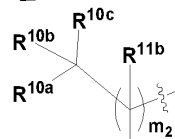


优选地, R^{33} 、 R^{34} 、 R^{35} 中, R^{34} 或 R^{35} 为 R^{11a} , R^{33} 为 H 或甲基;

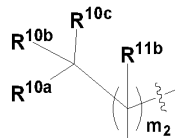
X 选自 O、NH、S;

优选地, X 为 O;

R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基)、C1-C6 烷基-



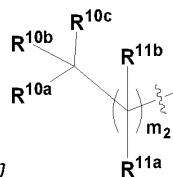
$C(=O)-NH_2-$ 、 R^{11a} 、 $X-R^{12}$, 且 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 不同时为 H;



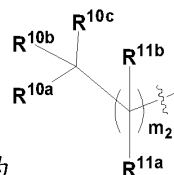
优选地, R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 中的任意一个选自

$X-R^{12}$, 其余四个各自独立地选自 H、 $-N_3$ 、硝基、氨基、磺基、羧基、脂肪族烷基 (如 C1-C6 烷基)、环烷基 (如 C3-C6 环烷基)、芳香族烷基 (如苯基 C1-C6 烷基)、F、I、Br、Cl、烷氧基 (如 C1-C6 烷氧基)、C1-C6 烷基-

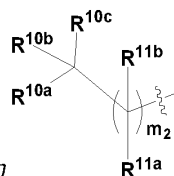
C(=O)-NH₂-;



更优选地, R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中的任意一个为 R^{11a}, 其余四个各自独立地选自 H、硝基、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷基-C(=O)-NH₂-;



进一步优选地, R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中, R⁵或 R⁹为 R^{11a}, 其余四个各自独立地选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基;



最优选地, R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹中, R⁵或 R⁹为 R^{11a}, R⁷选自 H、硝基、甲氧基、乙酰胺基, 其余三个为 H;

R^{10a}、R^{10b}、R^{10c}、R^{11a}、R^{11b}、R¹²各自独立地选自 H、-N₃、-SS-C1-C6 烷基(如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基或-SS-异丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基), 其中, 各 R^m独立地选自脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)或芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基), 且 R^{10a}、R^{10b}、R^{10c}不同时为 H;

优选地, R^{10a}、R^{10b}、R^{10c}中的任意一个选自-N₃、-SS-C1-C6 烷基(如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基或-SS-异丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m, 另两个各自独立地选自 H、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基)、芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基), 其中, 各 R^m独立地选自脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)或芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基);

更优选地, R^{10a}、R^{10b}、R^{10c}中的任意一个为-N₃或-SS-C1-C6 烷基(如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基、-SS-异丁基), 另两个各自独立地选自 H、C1-C6 烷基(如甲基、乙基、异丙基、叔丁基);

最优选地, R^{10a}、R^{10b}、R^{10c}中的任意一个为-N₃、-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基、-SS-异丁基, 另两个各自独立地选自 H、甲基;

优选地, R^{11a}、R^{11b}各自独立地选自 H、脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基, 具体如甲基、乙基、异丙基、叔丁基);

更优选地, R^{11a}、R^{11b}为 H;

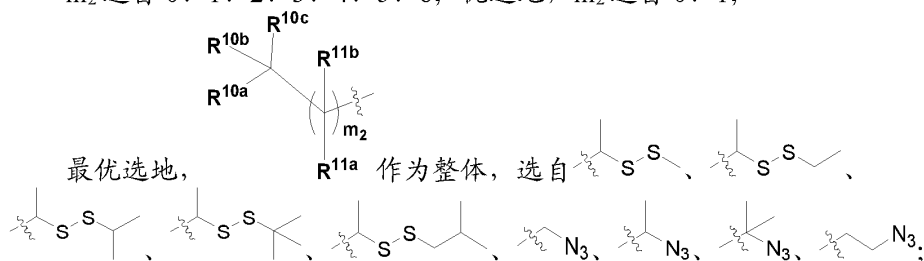
优选地, R¹²选自-N₃、-SS-C1-C6 烷基(如-SS-甲基、-SS-乙基、-SS-异丙基、-SS-叔丁基)、-ONH₂、-OCOR^m、-OCONHR^m, 其中, 各 R^m独立地选自脂肪族烷基(如 C1-C6 烷基)、环烷基(如 C3-C6 环烷基)或芳香族烷基(如苯基 C1-C6 烷基);

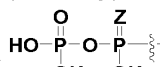
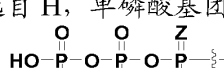
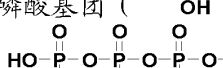
更优选地, R^{12} 为 $-N_3$ 或 $-SS-C1-C6$ 烷基 (如 $-SS$ -甲基, $-SS$ -乙基, $-SS$ -异丙基, $-SS$ -叔丁基);

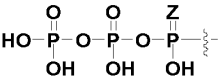
最优选地, R^{12} 为 $-N_3$;

m_1 选自 1、2、3、4、5、6; 优选地, m_1 为 1;

m_2 选自 0、1、2、3、4、5、6; 优选地, m_2 选自 0、1;



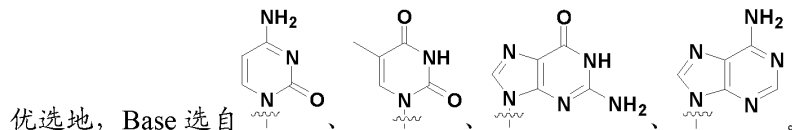
R' 选自 H, 单磷酸基团 () , 二磷酸基团 () , 三磷酸基团 () 或四磷酸基团 (

优选地, R' 为三磷酸基团 (

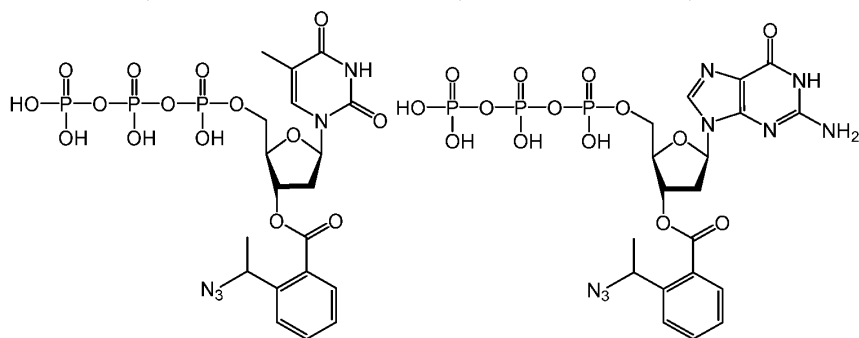
各 Z 独立地选自 O, S, BH;

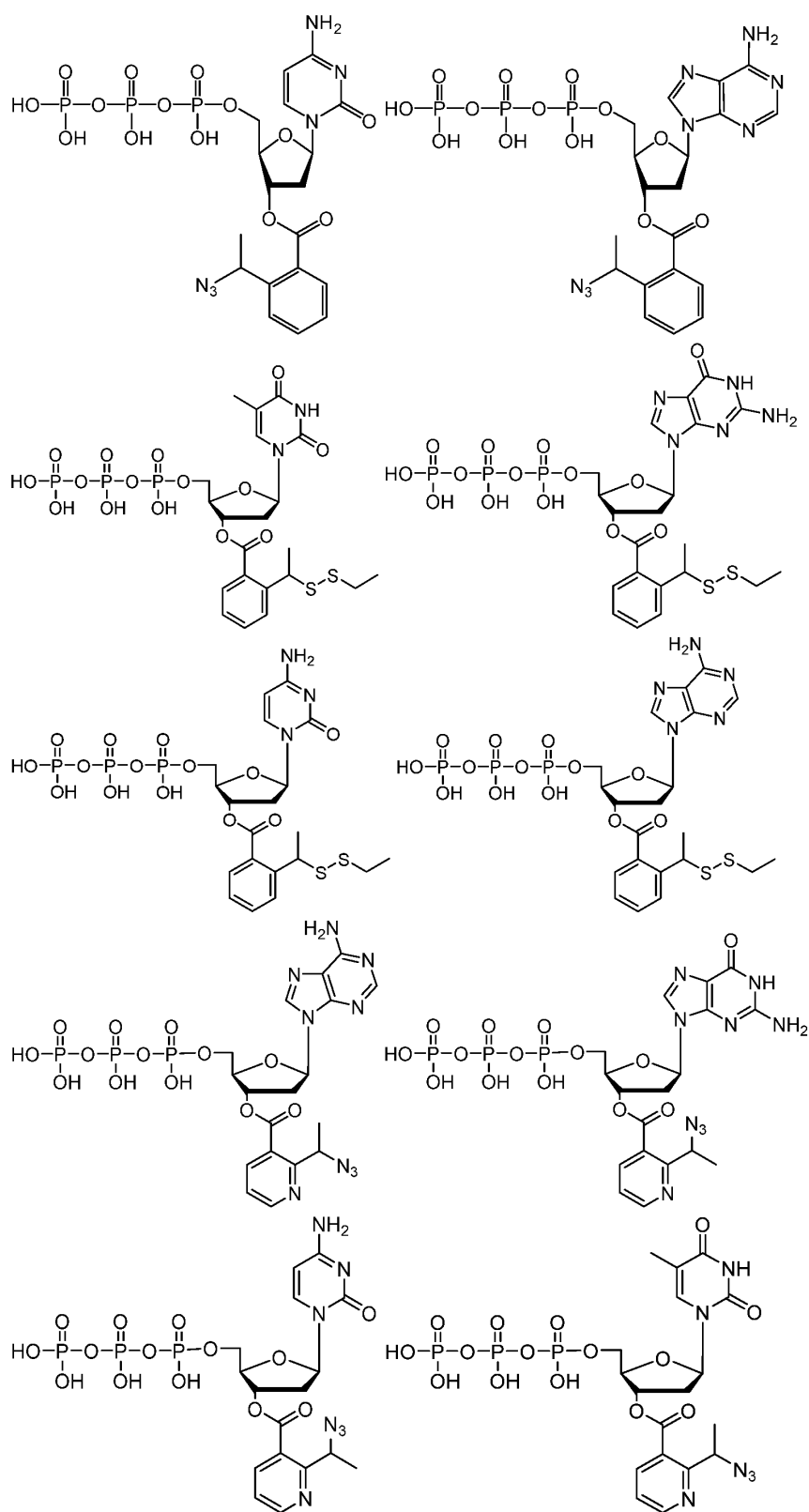
优选地, Z 为 O;

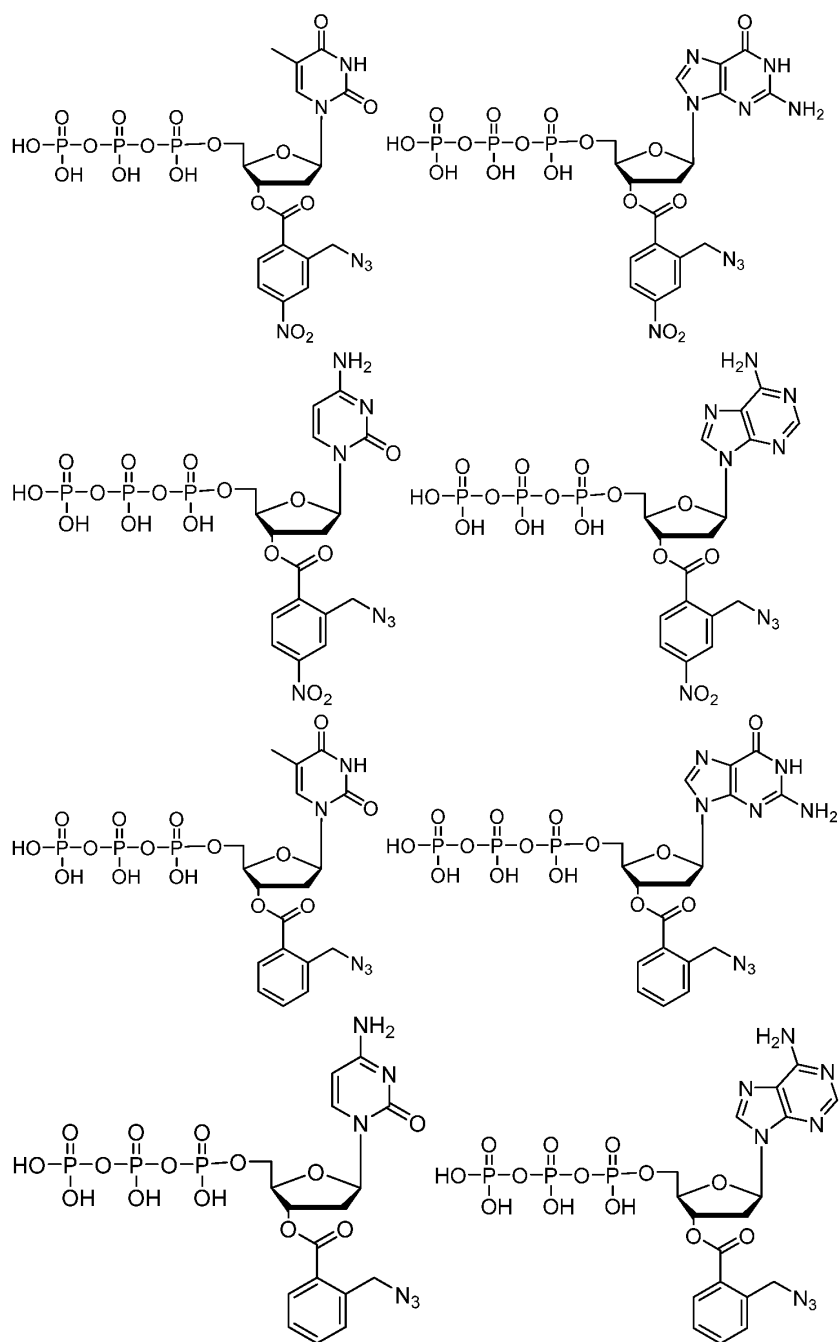
Base 选自碱基、脱氮碱基或其互变异构体, 例如 Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体;

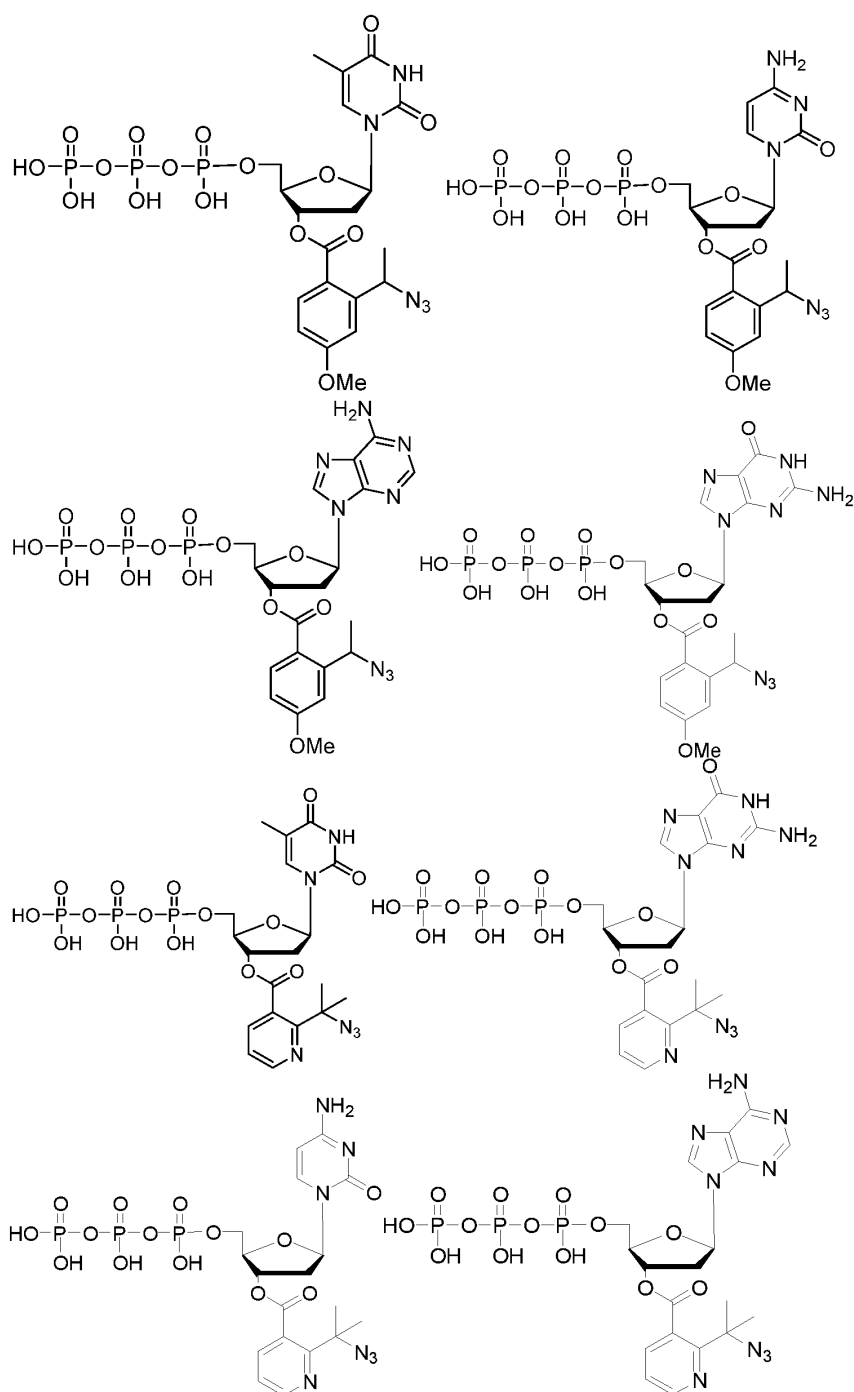


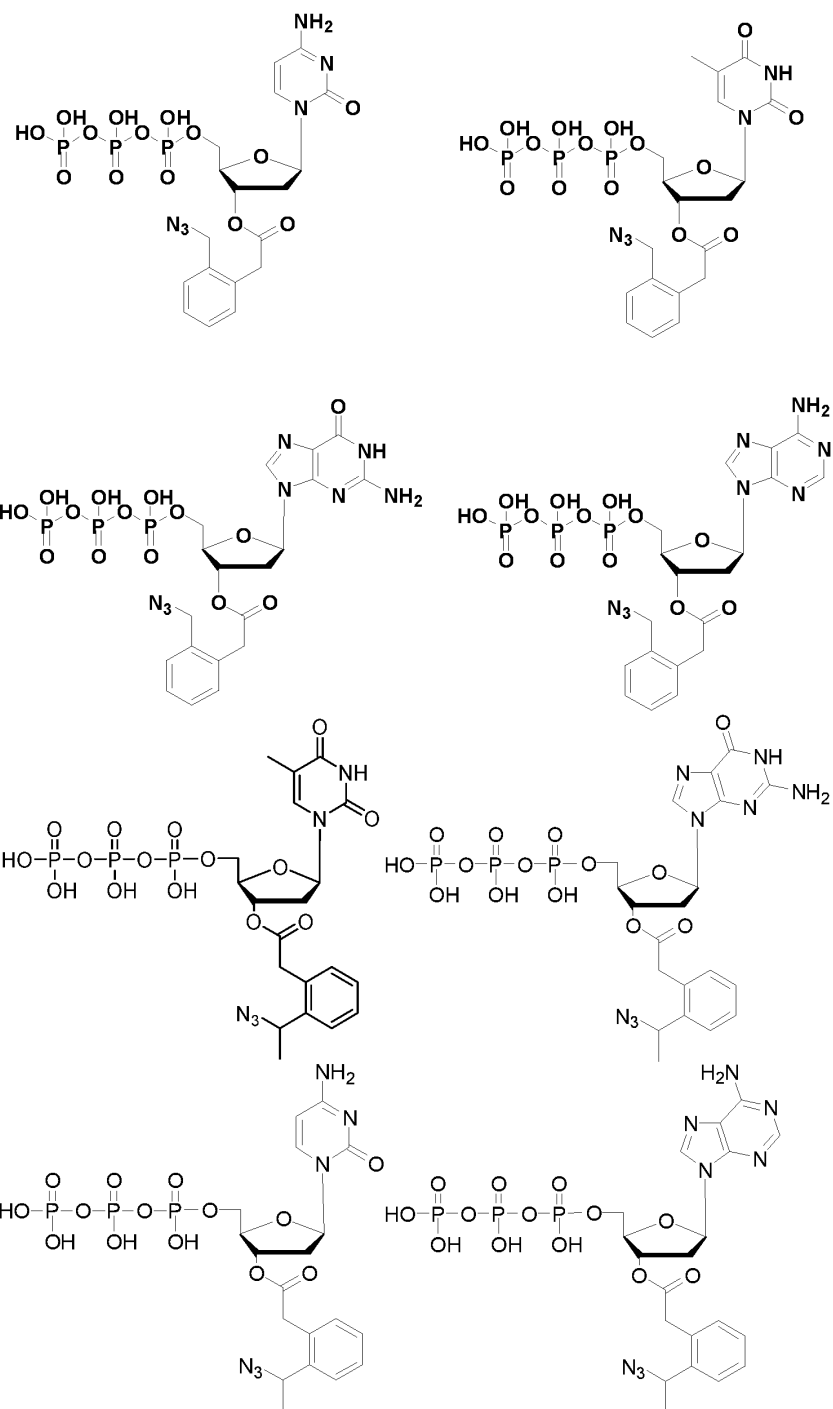
4、权利要求 1 的化合物或其盐, 其中, 所述化合物选自以下,

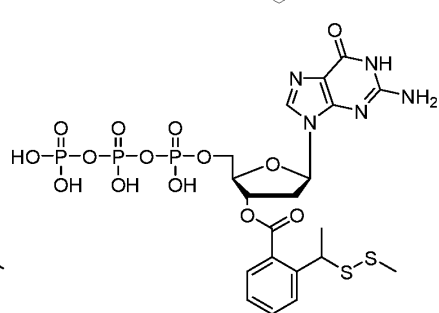
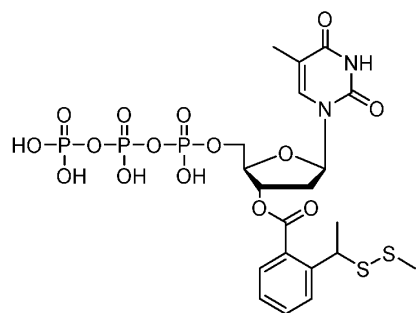
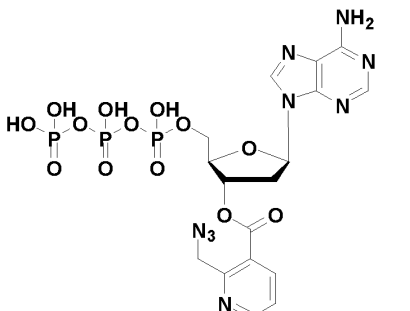
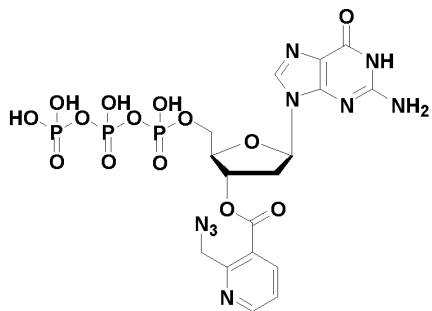
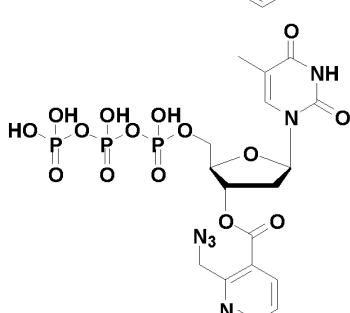
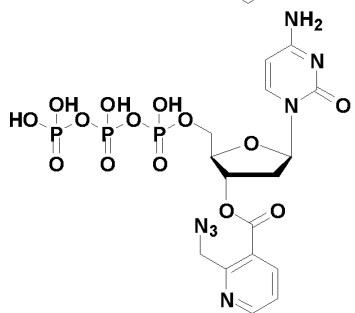
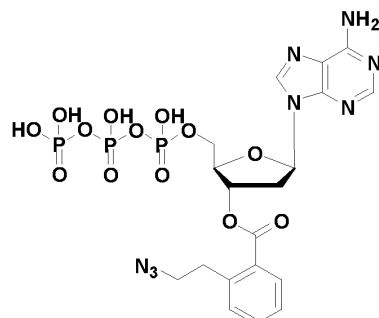
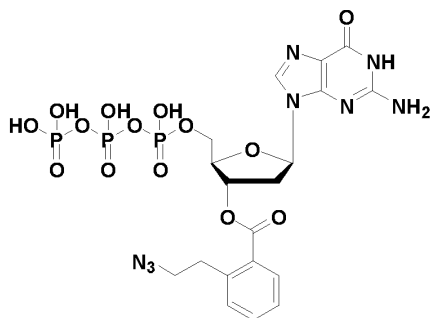
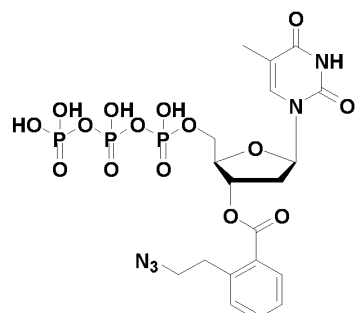
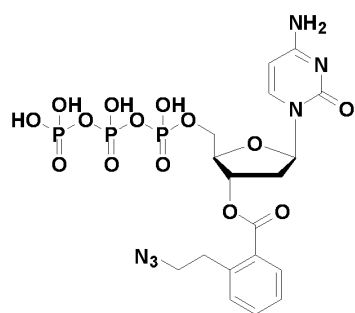


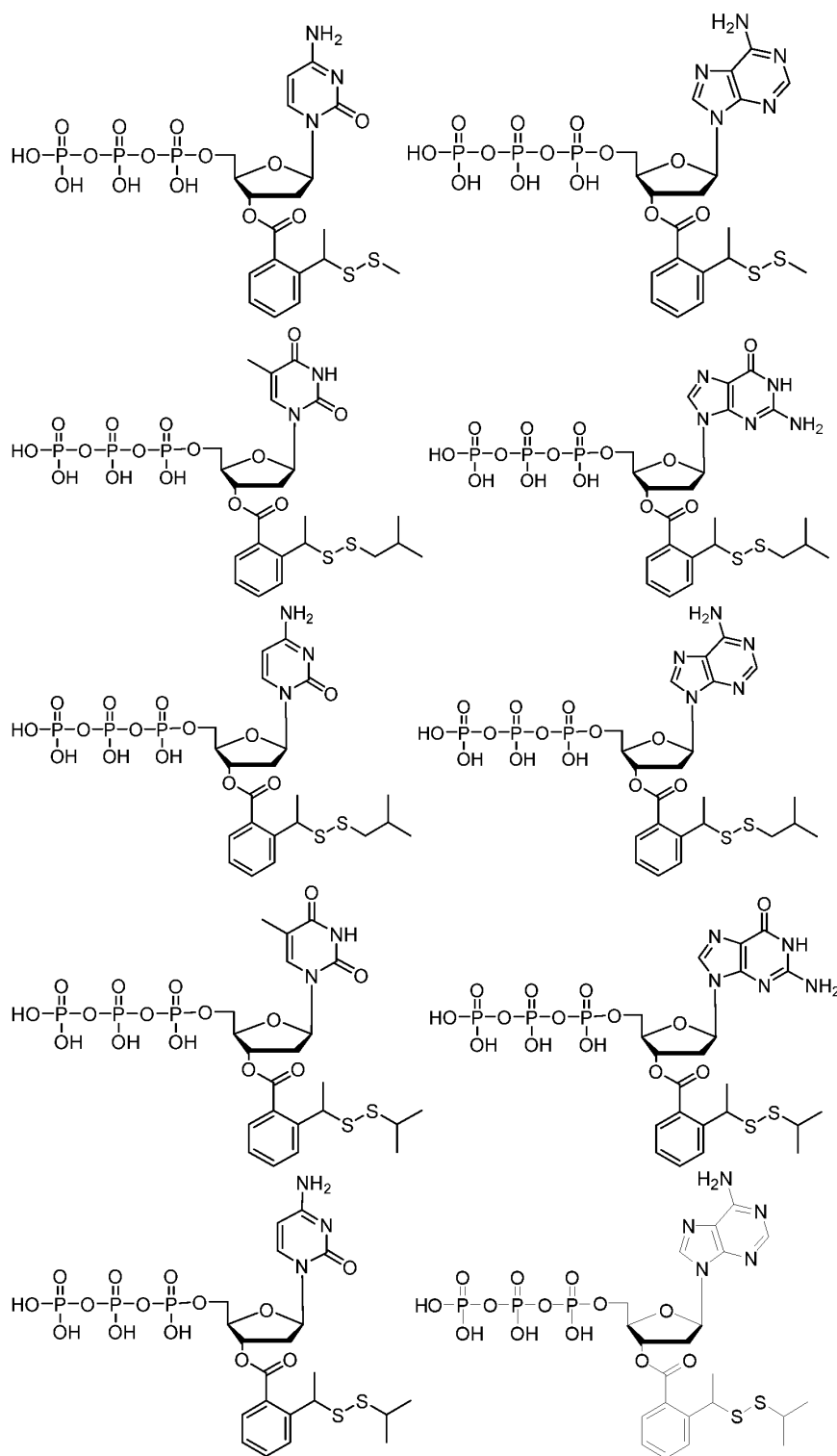


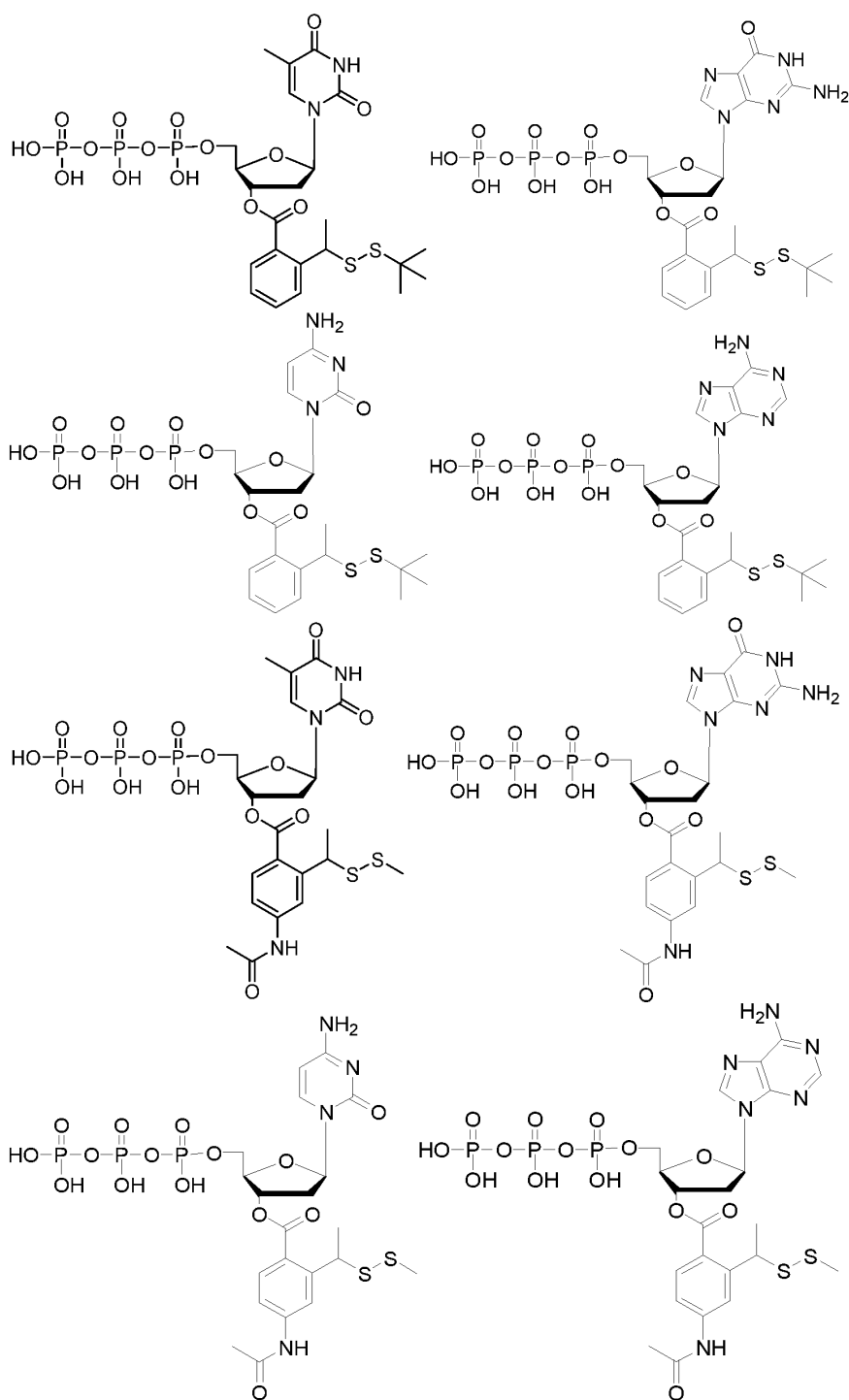


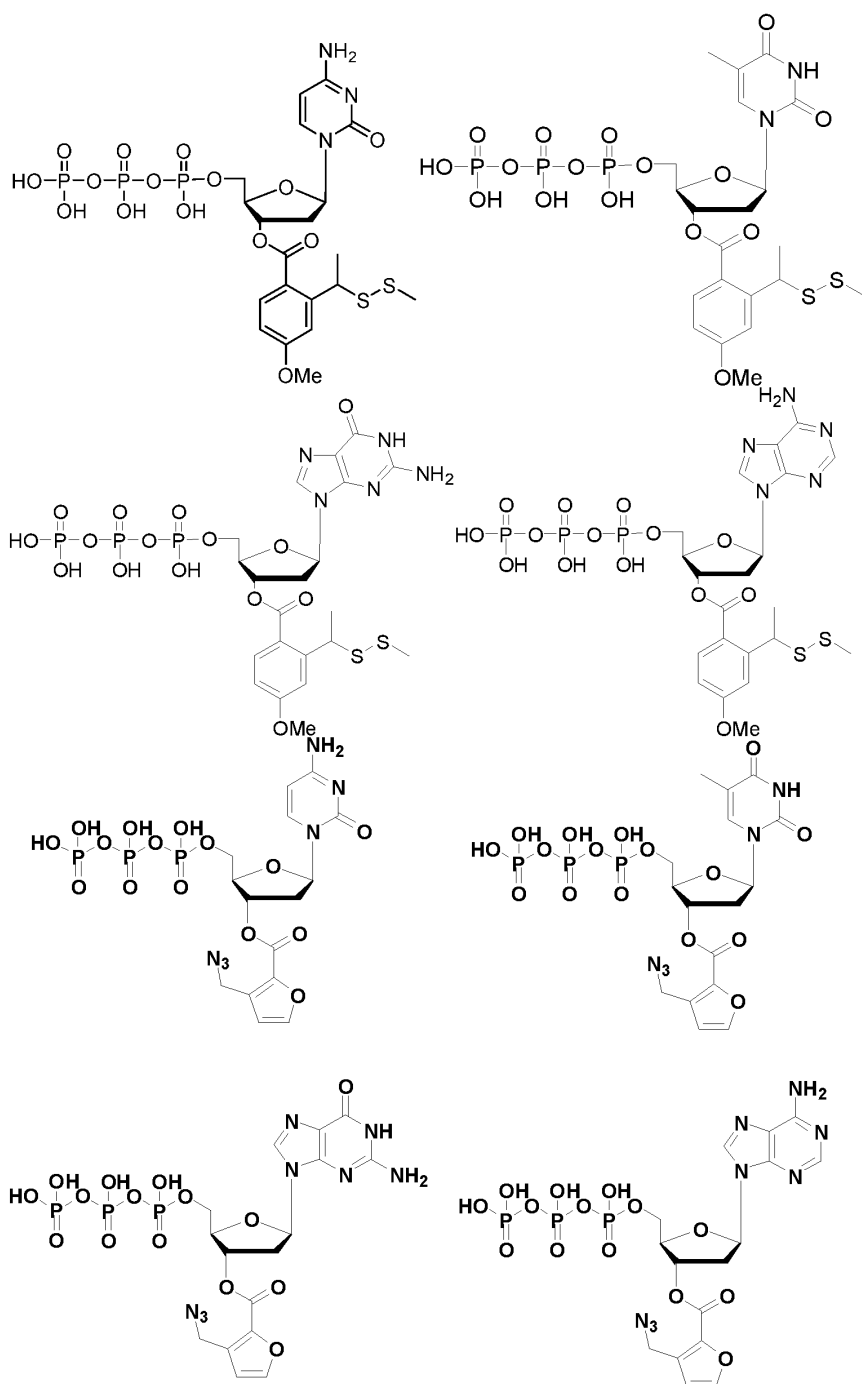


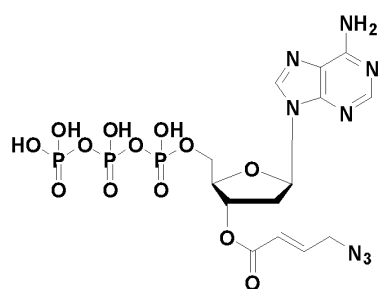
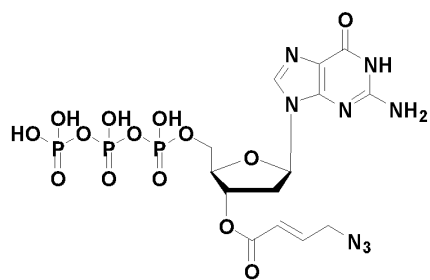
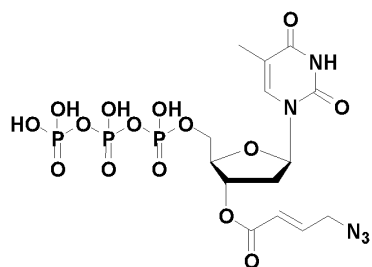
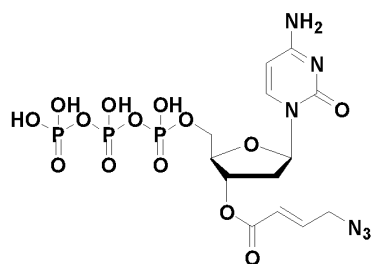
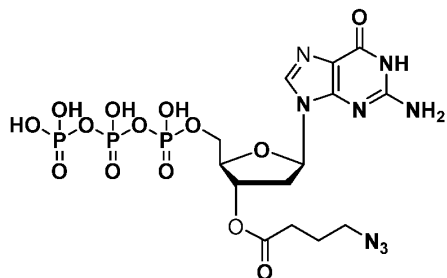
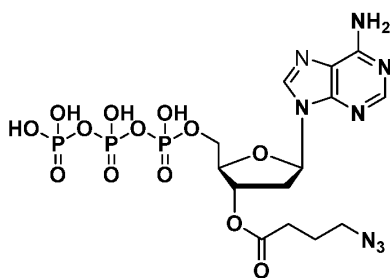
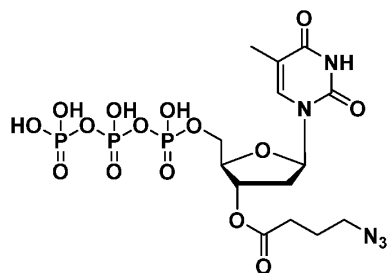
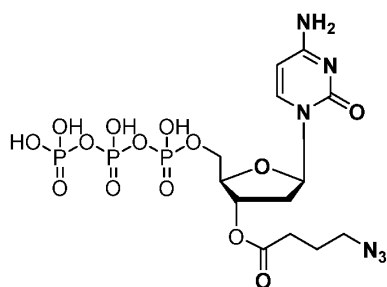


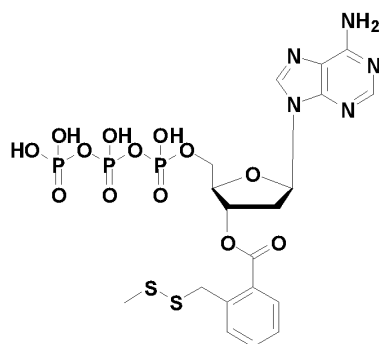
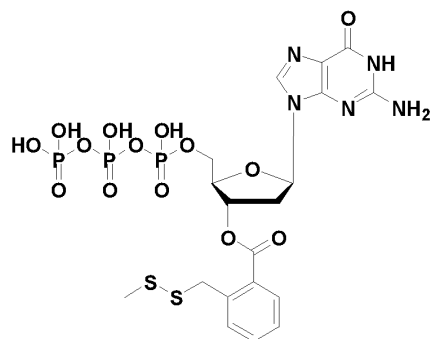
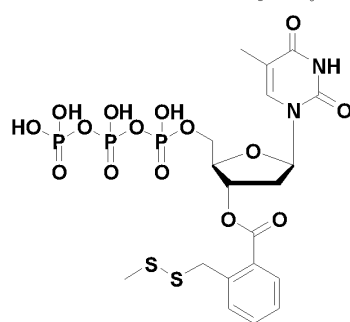
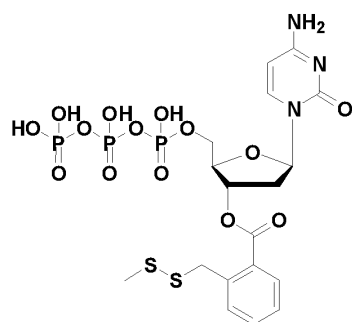
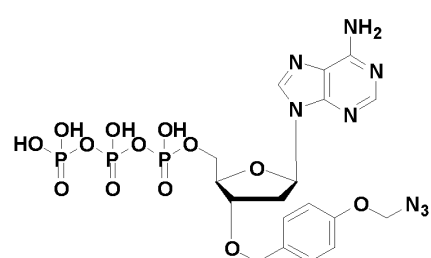
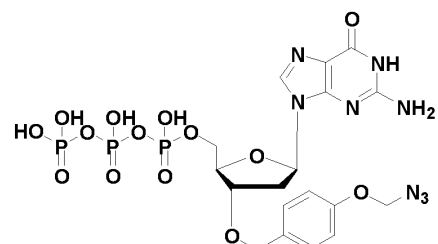
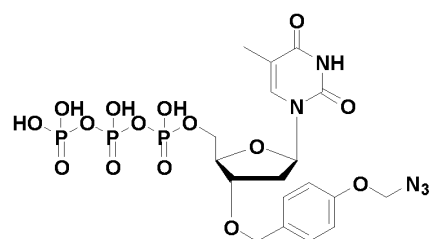
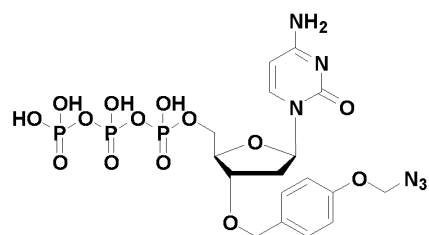


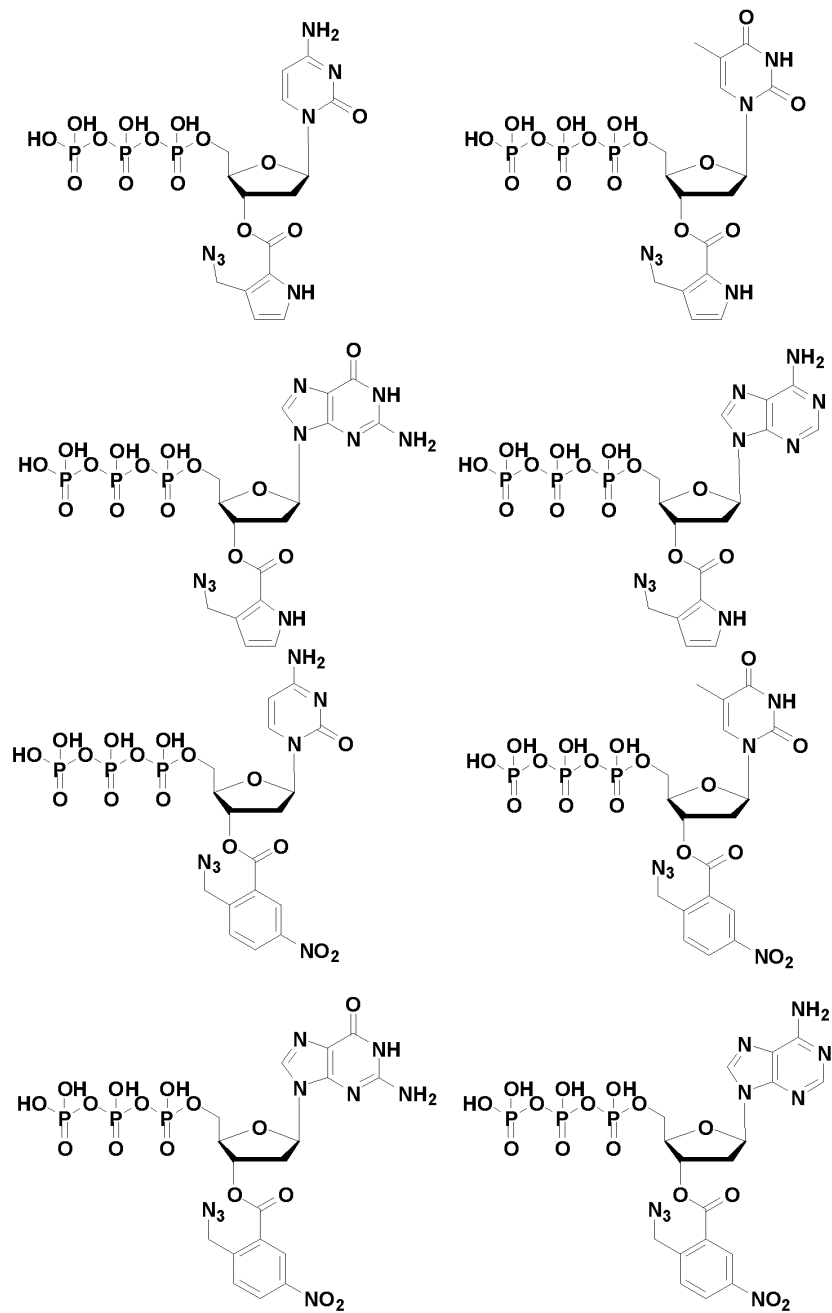


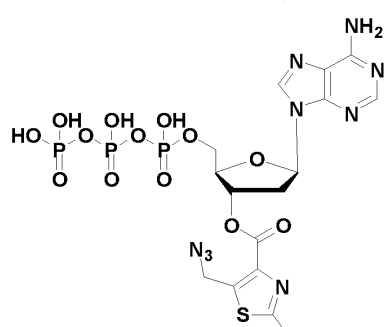
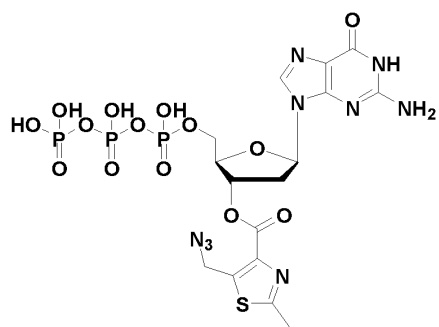
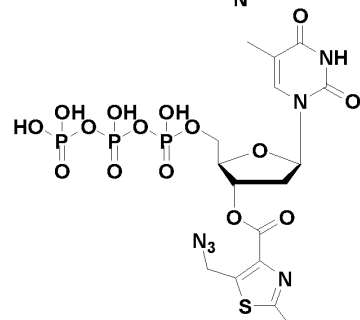
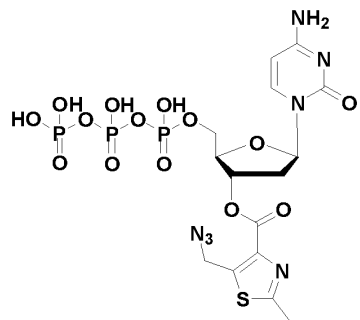
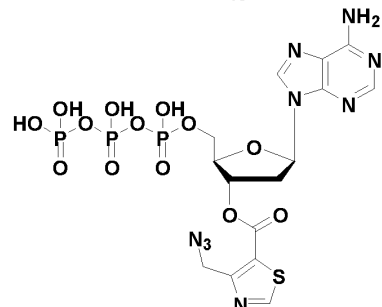
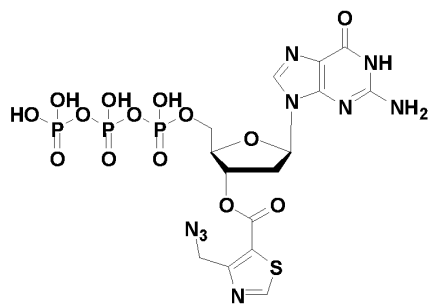
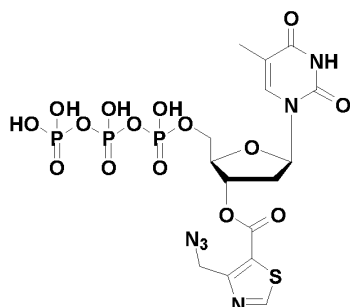
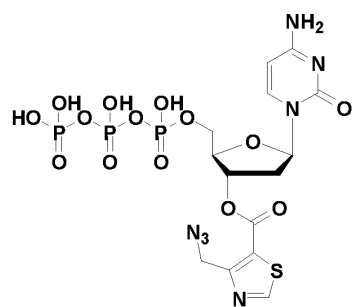


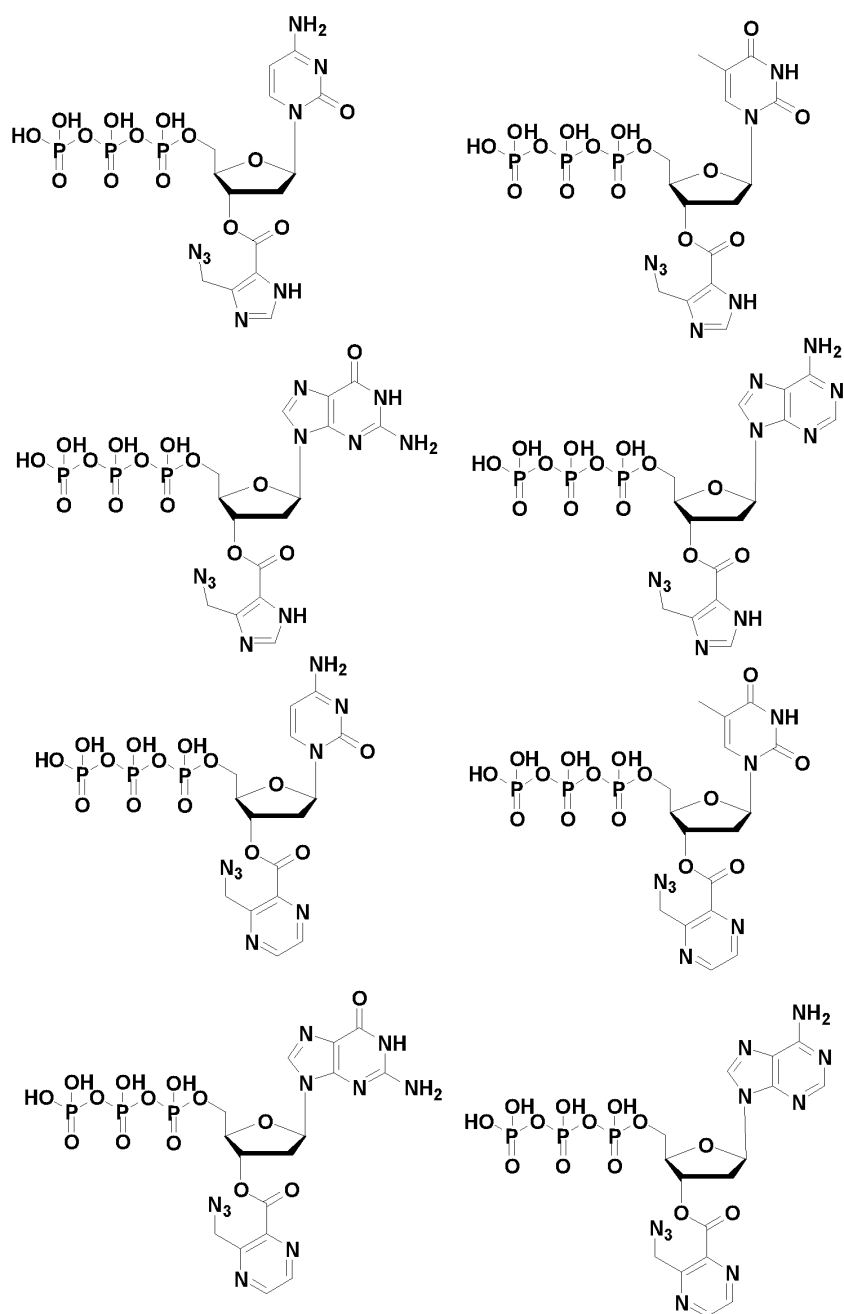


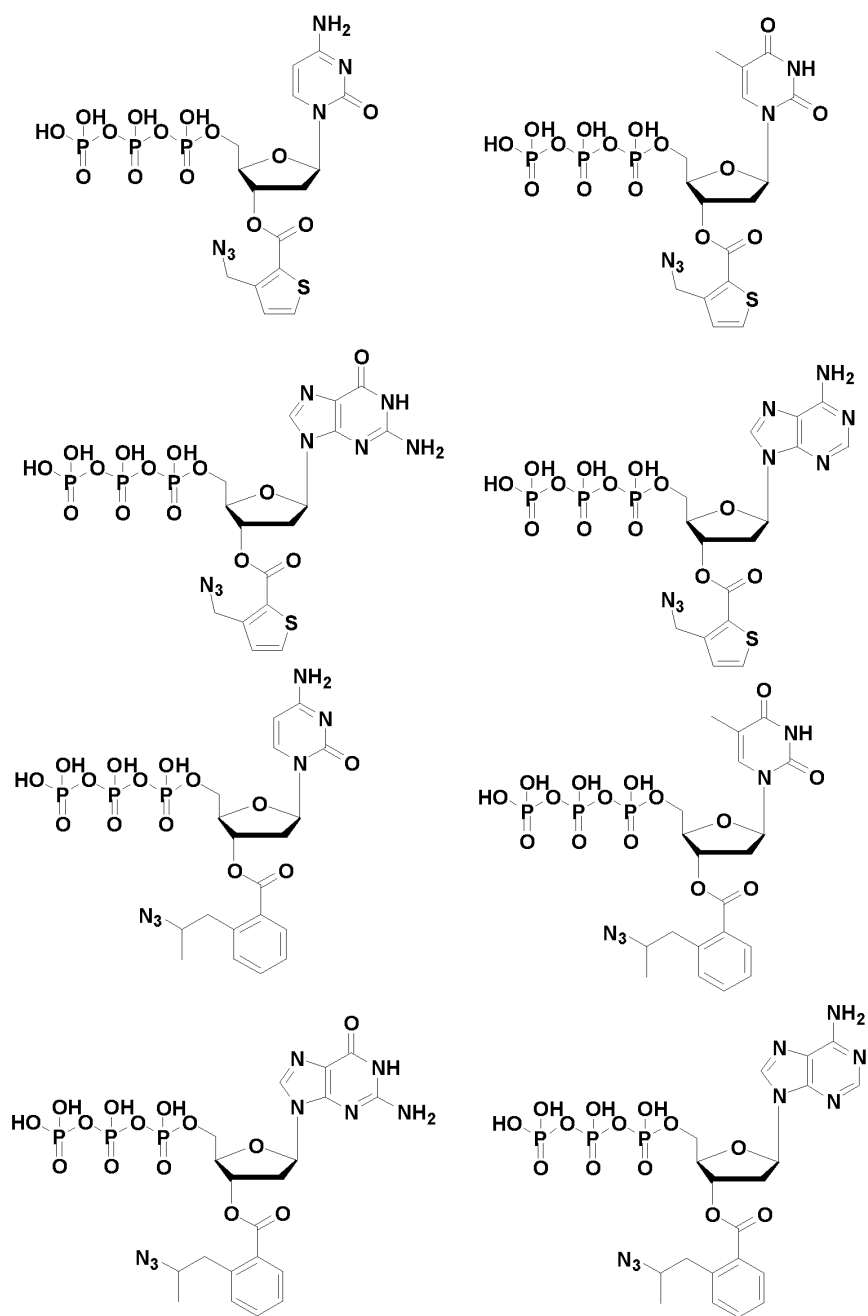


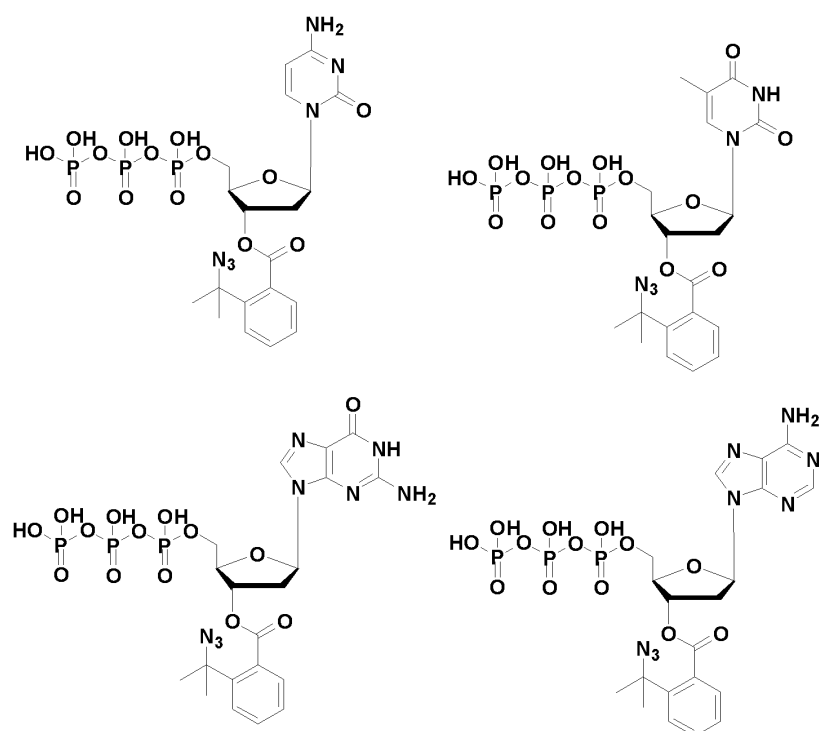












5、权利要求 1-4 任一项所述的化合物或其盐，其携带额外的可检测标记（如荧光标记）；

优选地，所述化合物或其盐携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）引入的，所述亲和试剂携带所述可检测标记，且所述亲和试剂可以特异性识别并结合所述化合物或其盐的表位；

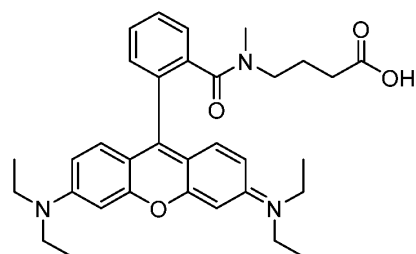
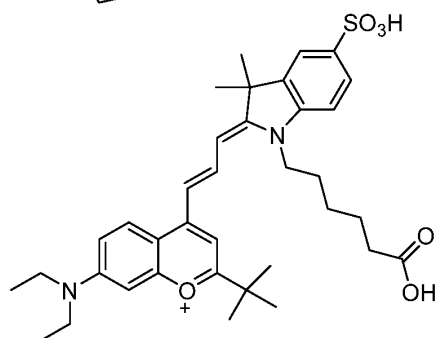
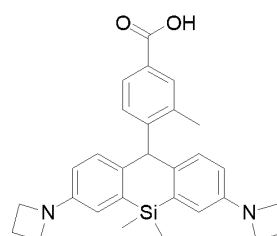
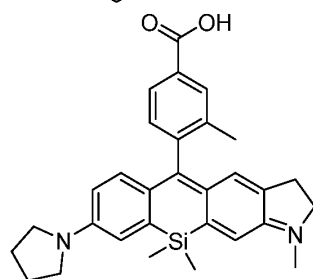
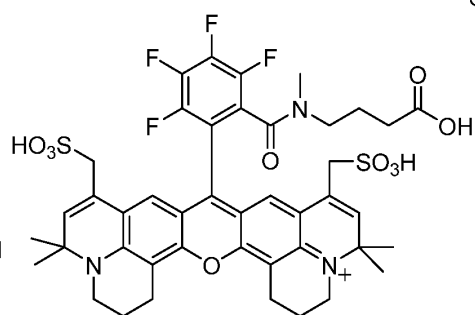
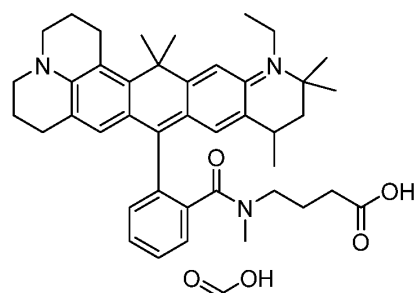
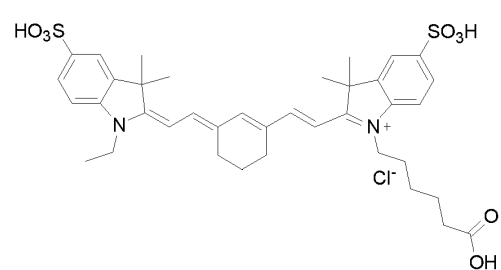
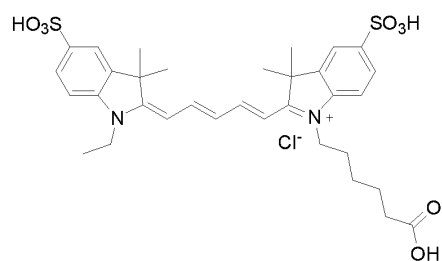
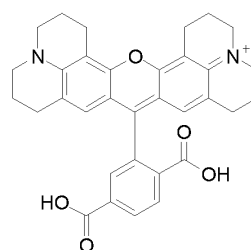
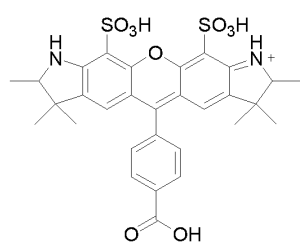
优选地，所述额外的可检测标记（如荧光标记）任选地通过连接基团与所述化合物或其盐连接；

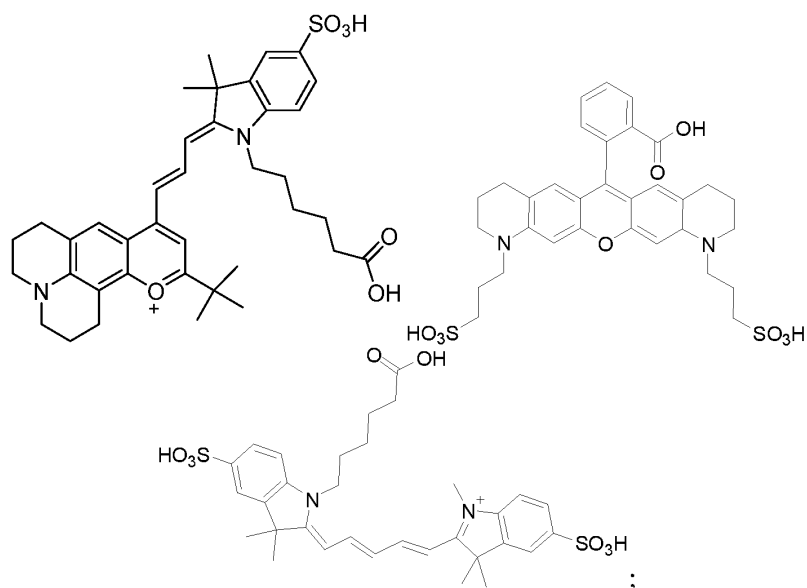
优选地，所述额外的可检测标记（如荧光标记）任选地通过连接基团与所述化合物或其盐的 Base 连接；

优选地，所述连接基团为可裂解的连接基团或不可裂解的连接基团；

优选地，所述可裂解的连接基团选自亲电裂解的连接基团、亲核裂解的连接基团、可光解的连接基团、还原条件下裂解的连接基团、氧化条件下裂解的连接基团、安全拉手型连接基团、经消除机理裂解的连接基团，或其任何组合；

优选地，所述可检测标记选自以下：





优选地，Base 不同，所述可检测标记（如荧光标记）不同。

6、终止核酸合成的方法，其包括：将权利要求 1-5 任一项所述的化合物或其盐掺入待终止的核酸分子中；

优选地，所述化合物或其盐的掺入通过末端转移酶、末端聚合酶或逆转录酶来实现；

优选地，所述方法包括：使用聚合酶，将所述化合物或其盐掺入待终止的核酸分子中；

优选地，所述方法包括：在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述化合物或其盐掺入待终止的核酸分子的 3'端。

7、制备在测序反应中与目标单链多核苷酸互补的生长的多核苷酸的方法，其包括将权利要求 1-5 中任一项所述的化合物或其盐掺入所述生长的互补多核苷酸，其中，所述化合物或其盐的掺入防止了任何后续的核苷酸引入所述生长的互补多核苷酸中；

优选地，所述化合物或其盐的掺入通过末端转移酶、末端聚合酶或逆转录酶来实现；

优选地，所述方法包括：使用聚合酶，将所述化合物或其盐掺入所述生长的互补多核苷酸；

优选地，所述方法包括：在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下，使用聚合酶进行核苷酸聚合反应，从而将所述化合物或其盐掺入所述生长的互补多核苷酸的 3'端。

8、测定目标单链多核苷酸的序列的方法，其包括：

1) 监测生长的核酸链中与目标单链多核苷酸互补的核苷酸的掺入，其中，掺入的至少一个互补核苷酸是权利要求 1-5 中任一项所述的化合物或其盐，且所述化合物或其盐携带额外的可检测标记（如荧光标记），以及，

2) 检测所述可检测标记，确定掺入的核苷酸；

优选地，所述额外的可检测标记（如荧光标记）任选地通过连接基团与所述化合物或其盐连接；

优选地，所述连接基团如权利要求 5 所限定；

优选地，所述额外的可检测标记如权利要求 5 所限定；

优选地，Base 不同，所述化合物或其盐携带的可检测标记（如荧光标记）不同；

优选地，在引入下一个互补核苷酸之前，将所述化合物或其盐中的可逆阻断基团（R）和所述可检测标记除去；

优选地，所述可逆阻断基团和所述可检测标记被同时除去；或者

优选地，所述可逆阻断基团和所述可检测标记被先后除去；例如，在所述可检测标记被除去之后，所述可逆阻断基团被除去，或者，在所述可逆阻断基团被除去之后，所述可检测标记被除去。

9、权利要求 8 的方法，其包括以下步骤：

（a）提供多种不同的核苷酸，其中所述多种不同的核苷酸是权利要求 1-5 任一项所述的化合物或其盐，其中，每种类型的核苷酸携带的额外的可检测标记在检测时可以与其他类型的核苷酸携带的额外的可检测标记区分开；

（b）将所述多种不同的核苷酸掺入目标单链多核苷酸的互补序列中；

（c）检测（b）的核苷酸携带的额外的可检测标记，从而确定掺入的核苷酸的类型；

（d）除去（b）的核苷酸中的可逆阻断基团和其携带的可检测标记；和

（e）任选地重复步骤（b） - （d）一次或多次；

从而确定所述目标单链多核苷酸的序列。

10、权利要求 8 的方法，其包括以下步骤：

（1）提供第一核苷酸、第二核苷酸、第三核苷酸和第四核苷酸，四种核苷酸中的至少一种是权利要求 1-5 中任一项所述的化合物或其盐，所述四种核苷酸包含的 Base 互不相同，且所述四种核苷酸携带额外的可检测标记（如荧光标记），优选地，所述四种核苷酸携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）引入的，所述亲和试剂携带所述可检测标记，且所述亲和试剂可以特异性识别并结合每一种核苷酸的表位，或者优选地，所述四种核苷酸任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接，或者更优选地，所述四种核苷酸中的 Base 任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接，最优选地，所述四种核苷酸所携带的额外的可检测标记互不相同；

（2）将所述四种核苷酸与目标单链多核苷酸进行接触；除去未掺入生长的核酸链中的所述核苷酸；检测掺入生长的核酸链中的所述核苷酸所携带的所述可检测标记；除去掺入生长的核酸链中的所述核苷酸所包含的可逆阻断基团和所携带的所述可检测标记；

任选地，还包括（3）：重复（2）一次或多次。

11、权利要求 8 的方法，其包括以下步骤：

（a）提供包含双链体、至少一种权利要求 1-5 中任一项所述的化合物或其盐、聚合酶和切除试剂的混合物；所述双链体包含生长的核酸链以及待测定的核酸链；所述化合物或其盐携带额外的可检测标记（如荧光标记），优选地，所述化合物或其盐携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、

Affimer、Knottin)引入的,所述亲和试剂携带所述可检测标记,且所述亲和试剂可以特异性识别并结合所述化合物或其盐的表位,或者优选地,所述化合物或其盐任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接,或者更优选地,所述化合物或其盐中的Base任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接;

(b)进行包含以下步骤(i)、(ii)和(iii)的反应,任选地,重复一次或多次:

步骤(i):使用聚合酶,使所述化合物或其盐掺入生长的核酸链,形成包含可逆阻断基团和可检测标记的核酸中间体;

步骤(ii):对所述核酸中间体所包含的可检测标记进行检测;

步骤(iii):使用切除试剂将所述核酸中间体所包含的可逆阻断基团和/或所述可检测标记切除;

优选地,对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除同时进行,或者,对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除分步进行(例如,先切除所述可逆阻断基团,或者先切除所述可检测标记);

优选地,对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除使用的切除试剂是同样的试剂;

优选地,对所述可逆阻断基团的切除和对所述可检测标记的切除使用的切除试剂是不同的试剂。

12、权利要求11的方法,其中,所述双链体连接于支持物上;

优选地,所述生长的核酸链为引物;

优选地,所述引物通过退火至待测序的核酸链上,形成所述双链体;

优选地,所述双链体、所述化合物或其盐、以及所述聚合酶一起形成含有溶液相和固相的反应体系;

优选地,所述化合物或其盐包含的Base互不相同;

优选地,所述化合物或其盐携带的额外的可检测标记互不相同;

优选地,在允许聚合酶进行核苷酸聚合反应的条件下,使用聚合酶,使所述化合物或其盐掺入生长的核酸链,形成包含可逆阻断基团和可检测标记的核酸中间体;

优选地,所述聚合酶选自KOD聚合酶或其突变体(例如KOD POL151、KOD POL157、KOD POL171、KOD POL174、KOD POL376、KOD POL391);

优选地,在任意一个检测所述核酸中间体所包含的可检测标记步骤前,移除前一步骤的反应体系的溶液相,保留连接于支持物上的双链体;

优选地,所述切除试剂与所述双链体或所述生长的核酸链在含有溶液相和固相的反应体系中接触;

优选地,所述切除试剂能够切除掺入生长的核酸链的化合物中的可逆阻断基团和所述化合物携带的额外的可检测标记,并且不会影响双链体骨架上的磷酸二酯键;

优选地,在任意一个切除所述核酸中间体所包含的可逆阻断基团和/或额外的可检测标记的步骤后,移除这一步骤反应体系的溶液相;

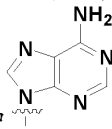
优选地,在任意一个包含移除操作的步骤之后,进行洗涤操作;

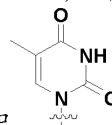
优选地,步骤(ii)之后,进一步包括:根据步骤(ii)检测得到的信号,确定步骤(i)中掺入生长的核酸链的化合物的类型,并基于碱基互补配对原

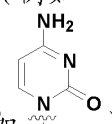
则，确定待测序的核酸链中相应位置处的核苷酸类型。

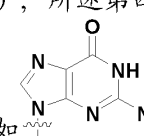
13、试剂盒，其包含至少一个权利要求 1-5 任一项所述的化合物或其盐；

优选地，所述试剂盒包含第一、第二、第三和第四化合物，所述第一、第二、第三和第四化合物各自独立地为权利要求 1-5 任一项所述的化合物或其盐；

优选地，所述第一化合物中，Base 选自腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤或其互变异构体（例如 ）；

所述第二化合物中，Base 选自胸腺嘧啶、尿嘧啶或其互变异构体（例如 ）；

所述第三化合物中，Base 选自胞嘧啶或其互变异构体（例如 ）；

所述第四化合物中，Base 选自鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤或其互变异构体（例如 ）；

优选地，所述第一、第二、第三和第四化合物携带额外的可检测标记；

优选地，所述第一、第二、第三和第四化合物携带的额外的可检测标记是通过亲和试剂（如抗体、适体、Affimer、Knottin）引入的，所述亲和试剂携带所述可检测标记，且所述亲和试剂可以特异性识别并结合所述第一、第二、第三或第四化合物的表位；

优选地，所述第一、第二、第三和第四化合物任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接；

优选地，所述第一、第二、第三和第四化合物中的 Base 任选地通过连接基团与所述额外的可检测标记连接；

优选地，所述第一、第二、第三和第四化合物包含的 Base 互不相同；

优选地，所述第一、第二、第三和第四化合物所携带的额外的可检测标记互不相同；

优选地，所述连接基团如权利要求 5 所限定；

优选地，所述可检测标记如权利要求 5 所限定。

14、权利要求 13 的试剂盒，其中，所述试剂盒还包含：用于预处理核酸分子的试剂；用于连接待测序的核酸分子的支持物；用于将待测序的核酸分子与支持物连接（例如，共价或非共价连接）的试剂；用于起始核苷酸聚合反应的引物；用于进行核苷酸聚合反应的聚合酶；一种或多种缓冲溶液；一种或多种洗涤溶液；或其任何组合。

15、权利要求 1-5 任一项所述的化合物或其盐或者权利要求 13-14 任一项所述的试剂盒用于测定目标单链多核苷酸的序列的用途。