

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 21/00

C07H 1/00

A61K 31/70 C12N 15/09

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96100508.4

[45] 授权公告日 2001 年 1 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1060781C

[22] 申请日 1996.3.13 [24] 颁证日 2000.10.14

[21] 申请号 96100508.4

[30] 优先权

[32] 1995.3.13 [33] DE [31] 19508923.5

[32] 1995.11.24 [33] DE [31] 19543865.5

[73] 专利权人 赫彻斯特股份公司

地址 联邦德国法兰克福

[72] 发明人 A·裴曼 E·乌赫曼 G·布莱鲍尔

H·瓦迈尔

[56] 参考文献

EP-A-0552766 1993.7.28 C07H21/04

WO-A-9422868 1994.10.13 C07D473/18

审查员 刘亚文

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

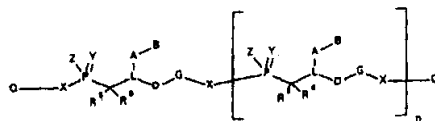
代理人 杜京英

权利要求书 13 页 说明书 97 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 膦酰基单酯核酸、其制备方法及应用

[57] 摘要

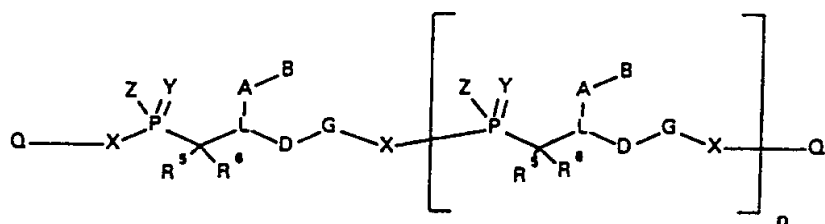
描述了式(I)的新的寡核苷酸类似物,其中 A、B、D、G、L、P、Q、Q'、R⁵、R⁶、X、Y、Z 和 n 如说明书中限定,其具有有用的物理学、生物学和药理学性质,本发明还描述了这些化合物的制备方法。它们的应用涉及用作基因表达的抑制剂(反义寡核苷酸、核酶、正义寡核苷酸及三链体形成寡核苷酸)、用作检测核酸的探针及在分子生物学中用作辅助剂。



ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 式 I 的化合物



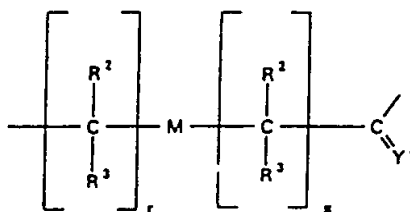
(I)

n 是 0 到 100 的数;

B 各自是天然核苷碱基或非天然核苷碱基;

L 是 N;

A 是式 IIb 的基团,



(IIb)

其中 r = 1, s 是零, 且 R², R³ = H, Y' = O 且 M 是单键;

D 和 G 各自为 CR⁵R⁶;

R⁵ 和 R⁶ 各自是氢或 (C₁-C₆) 烷基;

X 是 -O-;

Y 是 =O;

Z 是羟基、甲氧基、乙氧基、(4-硝基苯基)乙氧基、丙氧基、

异丙氧基、丁氧基、戊氧基、苯氧基或烯丙氧基；

Q 和 Q' 各自是氢、R⁸ 或未被修饰或被修饰的寡核苷酸，其中 R⁸ 为氢、(C₁-C₆)-烷基、(C₆-C₁₂)-芳基或 (C₆-C₁₂)-芳基-(C₁-C₆)-烷基；修饰的寡核苷酸中

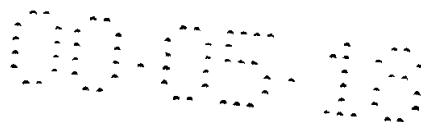
a) 3' - 和/或 5' - 磷酸二酯桥接部分被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、NR⁴R^{4'} - 氨基磷酸酯、磷酸 O-甲基酯、磷酸 O-乙基酯、磷酸 O-异丙基酯、甲基膦酸酯或苯基膦酸酯桥接部分完全或部分取代；

b) 嘧啶位置中及 5' 末端和/或 3' 末端上的 1 个、2 个或 3 个 3' - 或 5' - 磷酸二酯桥接部分被甲缩醛和/或 3' - 硫代甲缩醛取代；

c) 磷酸糖酯骨架被“PNA”或 PNA-DNA 杂合体完全或部分地取代；

d) B-D-2' - 脱氧核糖单位被 2' - F-2' - 脱氧核糖、2' - O-(C₁-C₆)-烷基核糖、2' - O-(C₂-C₆)-链烯基核糖或 2' - NH₂-2' - 脱氧核糖完全或部分地取代；

e) 天然核苷碱基被 5-(C₁-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴胞嘧啶、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-链烯基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-链烯基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基



腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤。

2. 如权利要求 1 中限定的式 I 的化合物, 其中

n 是 0 到 30 的数;

Q 的 Q' 各自是氢、R⁸, 其中 R⁸ 是 H、(C₁-C₆)-烷基、苯基或 2-(4-硝基苯基)乙基, 或未被修饰或被修饰的寡核苷酸, 其中

a) 3'-和/或 5'-磷酸二酯桥接部分被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或甲基膦酸酯桥接部分完全或部分地取代;

b) 在 5'-和 3'-末端的 1 个、2 个或 3 个 3'-或 5'-磷酸二酯桥接部分被取代;

c) 磷酸糖酯骨架被“PNA”或 PNA-DNA 杂合物完全或部分地取代;

d) B-D-2'-脱氧核糖单位被 2'-F-2'-脱氧核糖、2'-O-(C₁-C₄)-烷基核糖、2'-O-(C₂-C₄)-链烯基核糖或 2'-NH₂-2'-脱氧核糖完全或部分地取代;

e) 天然核苷碱基被 5-(C₃-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基胞嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基胞嘧啶、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-(C₂-C₇)-炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-(C₂-C₇)-链烯基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤。

3. 如权利要求 2 中所限定的式 I 的化合物, 其中

n 是 0 到 25 的数;

B各自是天然核苷碱基;

Z是羟基、乙氧基、(4-硝基苯基)乙氧基或苯氧基;

Q和Q'各自是氢、R⁸, 其中R⁸是H、(C₁-C₆)-烷基、苯基或2-(4-硝基苯基)乙基, 或者是未被修饰或被修饰的寡核苷酸, 其中

a) 3'-和/或5'-磷酸二酯桥接部分被硫代磷酸酯桥接部分完全或部分地取代;

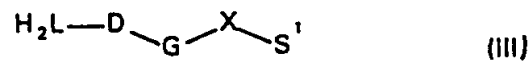
c) 磷酸糖酯骨架被“PNA”或PNA-DNA 杂合物完全或部分地取代;

d) β-D-2'-脱氧核糖被2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-或2'-O-丁基核糖完全或部分地取代;

e) 天然核苷碱基被5-己炔基胞嘧啶、5-己炔基尿嘧啶、5-己炔基胞嘧啶、7-脱氮杂-7-丙炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-丙炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-甲基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-甲基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤完全或部分地取代。

4. 制备如权利要求1-3限定的式I化合物的方法, 其包括

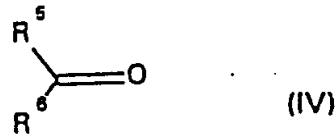
a₁) 使式III的化合物:



其中

D、G、L和X具有如权利要求1-3中限定的意义, 并且

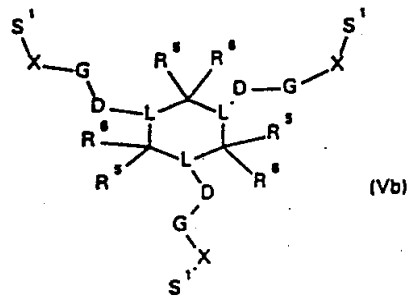
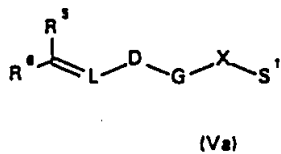
S¹ 是适当的保护基团, 如二甲氧基三苯甲基、一甲氧基三苯甲基、三苯甲基、pixyl、叔丁氧基羰基或苄基甲氧羰基,
 —与式 IV 的化合物:



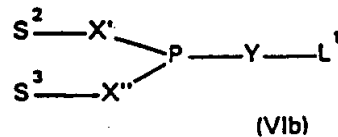
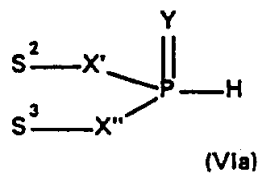
其中

R⁵ 和 R⁶ 具有如权利要求 1—3 中限定的意义

—在适当的有机溶剂中, 于 0 到 100℃ 的温度下反应, 得式 Va 或 Vb 的化合物

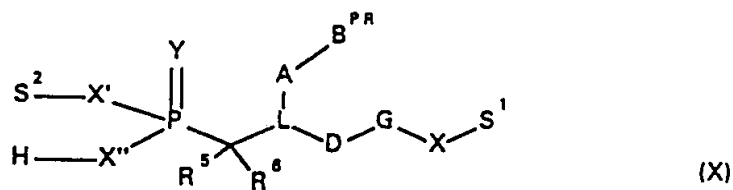


b₁) 使式 Va 或 Vb 的化合物与式 VIa 或 VIb 的化合物:



其中

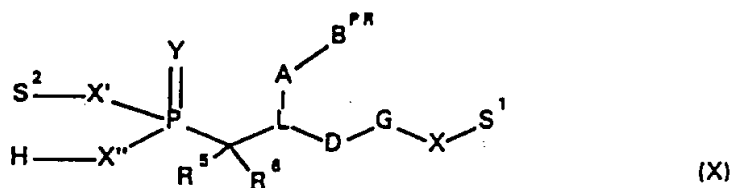
合物:



其中

A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、S³、X、X'、X'' 和 Y 定义同上;

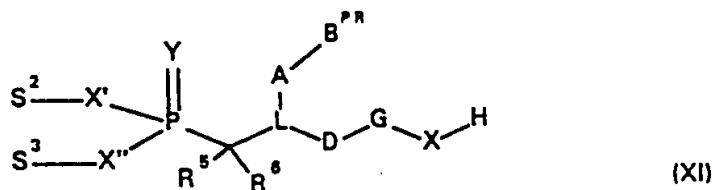
d₁) 用已知方法从式 IX 的化合物中除去保护基团 S³, 得到式 IX 的化合物:



其中

A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、X、X'、X'' 和 Y 定义同上;

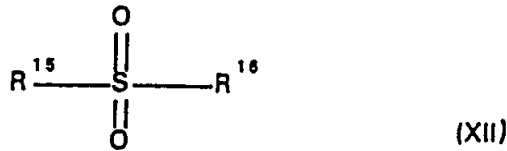
e₁) 用已知方法从式 IX 的化合物中除去保护基团 S¹, 得到式 XI 的化合物:



其中

A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S²、S³、X、X'、X'' 和 Y 定义同上;

f₁) 按照寡核苷酸化学中已知的“磷酸三酯法”使式 XI 的化合物与式 X 化合物在适当有机剂中、于-20℃到 100℃的温度下反应, 其中加入偶联剂或式 XII 的化合物



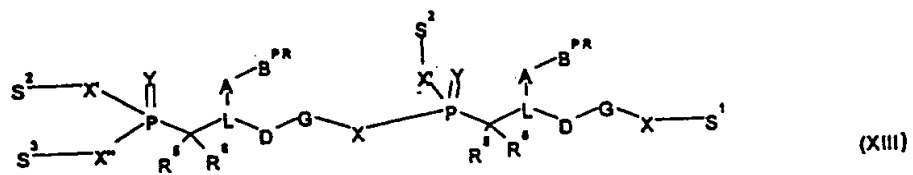
其中

R¹⁵ 是 (C₆-C₁₂)-芳基, 其可以被 (C₁-C₆)-烷基、(C₁-C₆)-烷氧基、硝基、氯或溴取代 1 到 4 次, 并且其中 1 以 3 个碳原子可被杂原子取代, 并且

R¹⁶ 是脱离基团

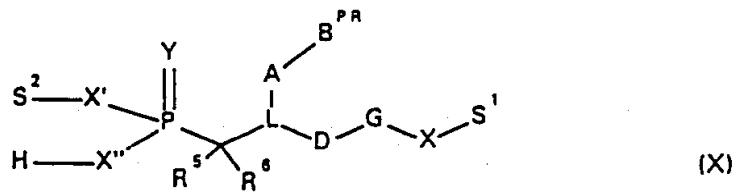
—可以加入或不加入催化剂, 其中偶联剂的制备可就地进行, 或者可分别完成并且可以在适当的溶剂中加入被活化化合物的溶液,

以得到式 XIII 的化合物:



其中

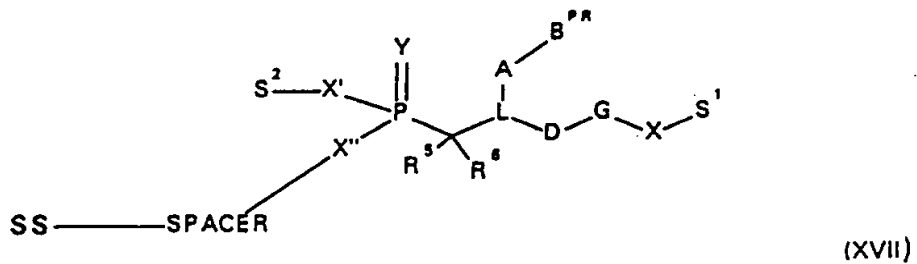
A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、S³、X、X'、X'' 和 Y 定义同上;



其中

A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、X、X'、X'' 和 Y 如权利要求 1—3 中所定义，

按已知方法通过 SPACER 偶联到固相载体上，得到式 XVII 的化合物：

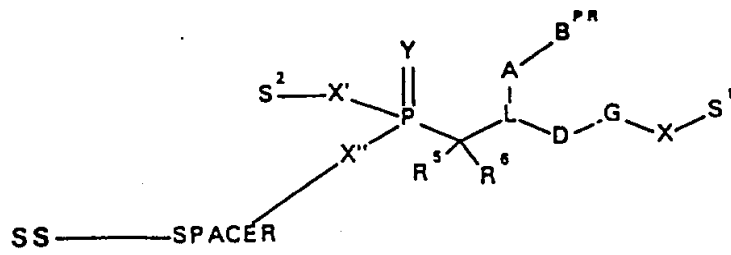


其中

A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、X、X'、X'' 和 Y 定义同上，SS 是适用于固相合成的固相载体，并且

SPACER 是在已发生合成后可从载体上除去的基团，例如是本领域技术人员已知的基团，或者 SPACER 是双功能团偶联分子 Q，其通过已知的可除去基团被连接到固相载体上；

b₃) 按权利要求 4 中 e₁) 所述方法，从式 XVII 的化合物除去保护基团 S¹：

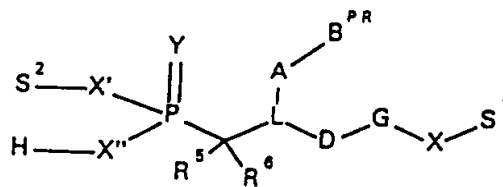


(XVII)

其中

A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、SS、SPACER、X、X'、X''
和 Y 定义同上;

c₃) 按权利要求 4 中 f₁) 所述方法, 使所得化合物与式 X 的化合物反应:



(X)

其中

A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、X'、X'' 和 Y 定义同上;

d₃) 重复步骤 b₃) 和 c₃) 直到所需的链长度;

e₃) 根据需要用已知方法偶联到偶联物 Q' 上;

f₃) 用已知方法从固相载体上除去以这样产生的化合物, 其中也可以在从载体上裂解之前除去保护基团, 并且可以用已知方法偶联至偶联物 Q, 其中可以改变 Q 和 Q' 的偶联(e₃、f₃)次序, 并且可以环化或不环化所得到的化合物。

7. 如权利要求 1 中限定的式 I 化合物在制备用作基因表达抑制剂的药物中的应用。

说 明 书

磷酸基单酯核酸，其制备方法及应用

本发涉及具有有用的物理学、生物学及药理学性质的新的寡核苷酸类似物，和其制备方法。它们的应用涉及用作基因表达的抑制剂(反义寡核苷酸、核酶、正义寡核苷酸及三链体形成寡核苷酸)、用作检测核酸的探针及分子生物学中的辅助剂。

寡核苷酸作为基因表达的抑制剂应用于越来越广泛(*J. F. Milligan, M. D. Matteucci and J. C. Martin, J. Med. Chem.* 36 (1993)1923; *E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews* 90 (1990)543; *S. T. Crooke, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 (1992)329)。

反义寡核苷酸是其碱基序列与被抑制的 mRNA 互补的核酸片段。该靶 mRNA 可以是细胞、病毒或其他病原体来源的。可能的细胞靶序列例如是受体、酶、生长因子、免疫调节剂、离子通道或致癌基因的序列。已描述了借助反义寡核苷酸抑制病毒复制，例如抑制 RSV (Rous 肉瘤病毒)、HSV-1 和 -2 (I 和 II 型单纯疱疹病毒)、HIV (人免疫缺陷病毒) 及流感病毒。在这种情况下，利用与病毒核酸互补的寡核苷酸。

然而要设计正义寡核苷酸的序列，以使它们结合(“俘获”)例如核酸结合蛋白质或核酸加工酶，并从而抑制它们的生物学活性(*C. Helene and J. J. Toulme, Biochim, Biophys. Acta* 1049(1990) 99)。这里可以提到的病毒靶例如有反向转录酶、DNA 聚合酶及反

式激活蛋白。一般说来，三链体形成寡核苷酸以 DNA 为靶，并在与之结合后形成三链螺旋结构。

借助反义寡核苷酸总地抑制 mRNA 的加工或抑制其翻译成蛋白质的，三链体形成寡核苷酸抑制 DNA 的转录和复制 (N. T. Thuong, and C. Helene, *Angew. Chem*, 105 (1993) 697; Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90 (1990) 543)。然而，也有可能第一次形成双链的杂交中用反义寡核苷酸结合单链核酸，然后在与三链体形成寡核苷酸的第二次杂交中形成三链体构。在此情况下反义和三链体结合区域可以容纳于两个分立的寡核苷酸中，或者在一个寡核苷酸中。

合成的寡核苷酸的进一步应用是所谓核酶，该酶作为其核酸酶活性的结果可破坏靶 RNA (D. Castarotto, J. J. Rossi. J. O. Deshler, *Critical Rev. Eukar. Gene Expr.* 2(1992)331)。

在 DNA 诊断中，应用带有适当标记的核酸片段作为所谓的 DNA 探针，与待检测的核酸进行特异性杂交。在这种情况下，新双链的特异形成是借助标记来监测的，所说的标记以非放射活性的为好。用这种方法可以检测遗传性、肿瘤性、病毒性或其他病原体引起的疾病。

对于所提到的大多数应用来说，其天然存在形式寡核苷酸并不是很适用的或者说是完全不适用的。必须对它们进行化学修饰以使之适应特定需要。为了使寡核苷酸能应用于生物学系统，例如用于抑制病毒复制，它们必须满足下列要求：

1. 在体内条件条件，即在血清和细胞内它们必须有足够高的稳定性。

2. 在它们的构成上必须能够使之通过细胞和核膜。

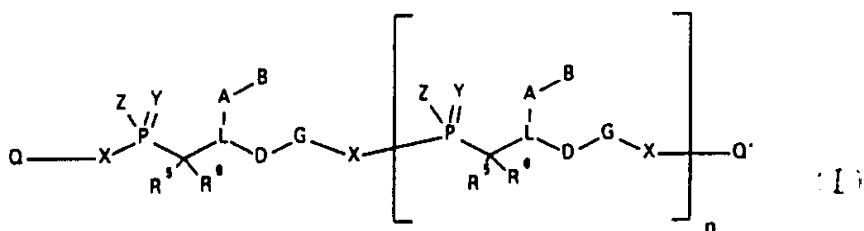
3. 它们必须在生理条件下以碱基特异方式与其靶核酸结合，以表现其抑制作用。

这些要求对于 DNA 探针不是必不可少的；然而，这些寡核苷酸必须被衍化，以使检测得以实现，例如借助荧光、化学发光、比色或特异性染色 (Beck and Koster, *Anal. Chem.*, 62(1990) 2258)。

许多寡核苷酸的化学变异都是已知的，已经合成了比未被修饰更好地满足上述要求的寡核苷酸。通常经适当地修饰磷酸酯骨架、核糖单位或核酸碱基进行对寡核苷酸的化学修饰 (Uhlmann and Peyman, *Chemical Review* 90(1990) 543)。修饰还包括用其他基团，例如已用“吗啉代核苷”寡聚体 (E. P. Stirchak et al., *Nucleic Acids Res.* 17(1989) 6129) 或“PNAs” (P. E. Nielsen et al., *Bioconj. Chem* 5 (1994) 3) 取代了其中之磷酸桥接和糖单位的寡核苷酸。具体地说，PNA 特征在于其对靶 RNA 有高亲和性，但又伴有其他一些不利性质，如缺乏溶解性或缺乏细胞穿透性 (W. Wang et al., *Tetrahedron Letters* 36 (1995) 1181; M. Egholm et al., in "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins, Nucleic Acids", Roger Epton, Ed. Mayflower Worldwide Limited, Birmingham, 1994, 145—148)。

因此目的之一是要找到具有有利性质的新的寡核苷酸类似物。

因此本发明涉及式 I 的化合物



其中上述 n 为 0 至 100 的数,

B 各自是氢、羟基、 (C_1-C_{20}) -烷基、 (C_1-C_{20}) -烷氧基、 (C_1-C_{20}) -烷硫基、 (C_6-C_{20}) -芳基、 (C_6-C_{20}) -芳基- $C(C_1-C_6)$ -烷基、 (C_6-C_{20}) -芳基- (C_1-C_6) -烷氧基、 (C_6-C_{20}) -芳基- (C_1-C_6) -烷硫基、芳香基团或杂环基团, 其中烷基、芳基和/或芳香或杂环基团可以被羟基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 $-NR^9R^{10}$ 、 $-C(O)OH$ 、氧代- $-C(O)OR^8$ 、 $C(O)NR^9R^{10}$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、

$-Br$ 、 $-NO_2$ 、 (C_2-C_6) -烷氧基烷基、 $-S(O)mR^8$ 、 $-(C_1-C_6)$ -烷基- $-S(O)mR^8$ 、 $-NHC(=NH)NHR^8$ 、 $-C(=NH)NHR^8$ 、 $-NR^9C(=O)R^8$ 、 $=NOR^8$ 、 $NR^9C(=O)OR^{10}$ 、 $-OC(=O)NR^9R^{10}$ 和 $-NR^9C(=O)NR^9R^{10}$ 一次或多次取代, 或者

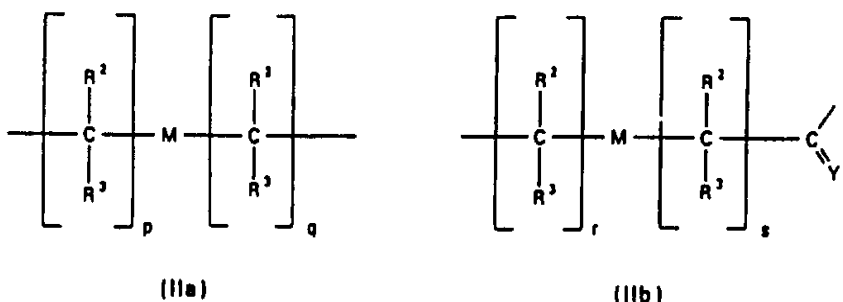
B 各自是天然核苷碱基、非天然核苷碱基或报告配基;

$A-B$ 也可以是通过羧基基团缩合的 D -或 L -氨基酸或者由这些氨基酸组成的具有多达 5 个氨基酸残基长度的肽,

L 各自是 N 或 R^1N^+ , 且

R^1 是氢或可被羟基、 (C_1-C_6) -烷氧基、 (C_1-C_6) -烷硫基或氨基取代的 (C_1-C_6) -烷基, 优选是氢或甲基;

A 各自是单键、亚甲基或式 IIa 或 IIb 的基团:



Y^1 是 $=O$ 、 $=S$ 、 $=CH_2$ 、 $=C(CH_3)_2$ 或 $=NR^1$ ，其中 R^1 是如上所限定的基团；

M 是单键、 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR^1-$ ，其中 R^1 定义同上；

R^2 和 R^3 各自是氢、羟基、 (C_1-C_6) -烷氧基、 (C_1-C_6) -烷硫基、氨基、卤素如 F 、 Cl 或 Br ，或可被羟基、 (C_1-C_6) -烷氧基或 (C_1-C_6) -烷硫基取代的 (C_1-C_6) -烷基，但优选氢；

p 和 q 各自是 0 至 5；

r 和 s 各自是 0 至 5；

D 和 G 各自是 CR^5R^6 ；

R^5 和 R^6 各自是氢、 (C_1-C_6) -烷基、 (C_6-C_{20}) -芳基、 (C_6-C_{20}) -芳基- (C_1-C_6) -烷基、羟基、 (C_1-C_6) -烷氧基、 (C_1-C_6) -烷硫基、和可被 SR^1 或 $NR^1R^{1'}$ 取代的烷基及芳基，其中 R^1 定义同上，并且独立于 R^1 的 $R^{1'}$ 具有如 R^1 的意义，但 R^5 和 R^6 较好是氢；

X 是 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NR^1-$ ，其中 R^1 定义同上；

Y 是 $=O$ 或 $=S$ ；

Z 是 $-OR^8$ 、 NR^9R^{10} 或 $X'Q''$ ，其中 X' 定义同 X ，且 Q'' 定义同

Q ；

R^8 是氢、 (C_1-C_{18}) -烷基、 (C_2-C_{18}) -链烯基、 (C_3-C_{18}) -炔基、 (C_6-C_{12}) -芳基、 (C_6-C_{12}) -芳基- (C_1-C_6) -烷基，其中烷基可以被羟基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 F 、 Cl 或 Br 取代一次或多

次，且芳基可被羟基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 (C_1-C_4) -烷基、 F 、 Cl 、 Br 、 NO_2 、 $-NR^9R^{10}$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)O-(C_1-C_6)$ -烷基或 $-C(O)NR^9R^{10}$ 取代1-3次，但较好是氢、 (C_1-C_6) -烷基、 (C_6-C_{12}) -芳基或 (C_6-C_{12}) -芳基- (C_1-C_6) -烷基，其中芳基可被 (C_1-C_4) -烷氧基、 (C_1-C_4) -烷基、 F 、 Cl 、 Br 或 NO_2 单取代，并且特别优选的是氢、 (C_1-C_6) -烷基、苯基或2-(4-硝基苯基)乙基；

R^9 和 R^{10} 各自是氢、 (C_1-C_{18}) -烷基、 (C_1-C_{18}) -链烯基、 (C_1-C_{18}) -炔基、 (C_6-C_{12}) -芳基、 (C_6-C_{12}) -芳基- (C_1-C_6) -烷基，其中烷基可被羟基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 F 、 Cl 或 Br 取代一次或多次，或者 R^9 和 R^{10} 可与连结它们的 N 原子一起形成4至7元环；

Q 和 Q' 各自是氢或 R^8 ，

或有利地影响反义寡核苷酸或三链体形成寡核苷酸之性质的偶联物或作为DNA探针的标记或在寡核苷酸类似物与靶核酸的杂交中经结合或交联攻击该靶核酸的偶联物，或者是可以未被修饰或经过修饰的寡核苷酸，可以举出下例变异体作为某些修饰的例子(例如参见E. Uhlmann and A. Peyman, *Chemical Reviews* 90 (1990)543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", *Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques*, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993中所述的修饰)：

a) 例如用硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、 NR^4R^4 -氨基磷酸酯、磷硼酸酯(boranophosphate)、磷酸- (C_1-C_{21}) -O-烷基酯、磷

酸-[(C₆-C₁₂)-芳基(C₁-C₁₂)-O-烷基]酯、2,2,2-三氯二甲基乙基磷酸酯、(C₁-C₈)烷基磷酸酯或(C₆-C₁₂)-芳基磷酸酯桥完全或部分取代3'-和/或5'-磷酸二酯桥,其中R'和R''各自是氢、(C₁-C₁₈)-烷基、(C₆-C₂₀)-芳基、(C₆-C₁₄)-芳基-(C₁-C₈)-烷基或-(CH₂)_c-[NH(CH₂)_c]_d-NR⁷R⁷,其中c是2到6的整数,d是0到6的整数,且R⁷各自是氢、(C₁-C₆)-烷基或(C₁-C₄)-烷氧基-(C₁-C₆)-烷基,R'和R''优选是氢、(C₁-C₈)-烷基或甲氧基乙基,特别优选的是氢、(C₁-C₄)-烷基或甲氧基乙基,或者R'和R''也可以连同连接它们的氮原子一起形成可以另外含有选自O、S和N系列之其他杂原子的5-或6元杂环;

b) 用“脱磷酸”桥接部分(例如参见Uhlmann and Peyman, "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, 355 ff), 例如用缩甲醛(formacetal)、3'-硫代缩甲醛、甲基羟胺、亚甲基二甲基联亚氨基、二亚甲基砷或甲硅烷基完全或部分地取代3'-或5'-磷酸二酯桥接部分;

c) 例如用“吗啉代核苷”寡聚体(E. P. Stirchak et al., Nucleic Acids Res. 17 (1989) 6129)或"PNA_s"(P. E. Nielsen et al., Bioconj. Chem. 5 (1994) 3)或例如DE-P 4408528.1和EP-A 0 672 677 (HOE 94/F 057)中所述的PNA-DNA杂合物完全或部分地取代磷酸糖酯骨架;

d) 例如用α-D-2'-脱氧核糖、L-2'-脱氧核糖、2'-F-2'

脱氧核糖、2'-O-(C₁-C₆)烷基-核糖、2'-O-(C₂-C₆)链烯基核糖、2'-NH₂-2'-脱氧核糖、β-D-木呋喃糖、α-阿拉伯呋喃糖、2,4-二脱氧-β-D-赤吡喃己糖, 和碳环(如参见 Froehler, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 8320) 和开链糖类似物(如参见 Vandendriesshe *et al.*, *Tetrahedron* 49 (1993) 7223) 或双环糖类似物(如参见 M. Tarkov *et al.*, *Helv. Chim. Acta* 76 (1993) 481) 完全或部分地取代 β-D-2'-脱氧核糖单位;

e) 例如用 5-(羟甲基)尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氢尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基尿嘧啶(例如在 Gutierrez *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 540 或 Sagi *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 2191 中所描述的)、5-(C₁-C₆)烷基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)链烯基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-炔基胞嘧啶(Gutierrez 等, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 540 或 Sagi 等 *Tetrahedron Lett.* 34 (1993) 2191)、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴胞嘧啶或 7-脱氮杂-7-取代的嘌呤(如参见 Seela, *Nucl. Acids Res.* 20 (1992) 2297); *Heterocycles* 34 (1992) 229) 完全或部分地取代天然核苷碱基。

Q 和 Q' 也可以是有利地影响反义寡核苷酸或三链体形成寡核苷酸之性质(例如细胞通透作用、核酸酶降解作用、对靶 RAN/DNA 的亲合性、药物动力学)的偶联物, 或作为 DNA 探针中的标记, 或在寡核苷酸类似物与靶核酸的杂交中经结合或交联攻击该靶核酸的偶联物。这些偶联物的例子是与多聚赖氨酸、与嵌入剂如

嵌二萜、吡啶、吩嗪、菲啶与荧光化合物例如荧光素、与交联剂如补骨脂素、迭氨基二氨基吡啶、与亲脂分子如(C₁₂-C₂₀)-烷基、与脂如1,2-二-十六烷基-rac-甘油、与维生素如维生素E、与多聚或寡聚乙二醇、与(C₁₂-C₁₈)-烷基磷酸二酯、与-O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₈)-烷基形成的偶联物。优选的偶联物是与亲脂分子如(C₁₂-C₂₀)-烷基、与类固醇如胆固醇或甾酮、与多聚或寡聚乙二醇、与维生素E、与嵌入剂如嵌二萜、与(C₁₄-C₁₈)-烷基磷酸二酯或与-O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₆)-烷基形成的偶联物。

这种类型的寡核苷酸偶联物的制备是本领域技术人员已知的(例如参见 Uhlmann & Peyman, *Chem. Rev.* 90(1990) 543; M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, P. 303 ff 和 EP-A 0 522 766)。另外,寡核苷酸可在3'或5'末端上携带有3'-3'和5'-5'倒位(例如参见 M. Koga et al., *J. Org. Chem* 56(1991) 3757)。

芳香基团例如可以是苯基、萘基、蒽基、蒽基、菲基、联苯基、双萘基、并四苯基、并五苯基、并六苯基、苯并菲基、蒽基或苯并蒽基。

杂环基团按其意义例如可以是苯并二氢吡喃基、苯并吡喃-1-基、咪唑基、异苯并二氢吡喃基、异苯并吡喃基、异喹啉基、哌嗪基、喹啉基、吡啶基、吡咯烷基、咪唑基、四氢咪唑基、氮丙啶基、环氧乙基、苯硫基、嘧啶基、硫杂茂烷基、噻唑基、氮杂卓基、吡咯基、四氢吡咯基、苯并咪唑基、吲哚基、异氮杂茛基、旋红基、二氧吲哚

基、吲哚氧基、香豆素基、苯并呋喃基、呋唑基、吡唑基、吡咯基、吲唑基、恶唑基、异恶唑基、噻唑基、1,2,4-三唑基、1,2,3-三唑基、四唑基、五唑基、哌啶基、哒嗪基、吩嗪基、吩恶嗪基、吩噻嗪基、吗啉基、噻嗪基、苯并二氮杂卓基、嘌呤基、黄嘌呤基、次黄嘌呤基、二甲基黄嘌呤基、咖啡碱基(*caffeinylyl*)、蝶啶基、蝶呤基、蝶啶基、咯嗪基和降托品基(*nortropinyl*)。

天然核苷碱基可以理解为例如尿嘧啶、胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤,并且非天然核苷碱基例如为5-硝基吲哚、5-(羟甲基)-尿嘧啶、5-氨基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氢尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基尿嘧啶、5-(C₃-C₆)-炔基尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基胞嘧啶、5-(C₃-C₆)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴胞嘧啶和7-脱氮杂-7-取代的嘌呤如7-脱氮杂-7-(C₃-C₇)-炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₃-C₇)-炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-烯基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-链烯基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤和7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤。

非天然的核苷碱基中优选的是5-(C₁-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基尿嘧啶、5-(C₃-C₆)-炔基尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基胞嘧啶、5-(C₃-C₆)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴胞嘧啶或7-脱氮杂-7-取代的嘌呤

如 7-脱氮杂-7-(C₃-C₇)-炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₃-C₇)-炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-链烯基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₂-C₇)-链烯基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤和 7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤，特别优选 5-(C₃-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基尿嘧啶、5-(C₃-C₆)-炔基尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-链烯基胞嘧啶、5-(C₃-C₆)-炔基胞嘧啶或 7-脱氮杂-7-取代的嘌呤，并且最优选的是 5-戊炔基胞嘧啶、5-己炔基尿嘧啶、5-己炔基胞嘧啶、7-脱氮杂-7-丙炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-丙炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-甲基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-甲基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-丙炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤。

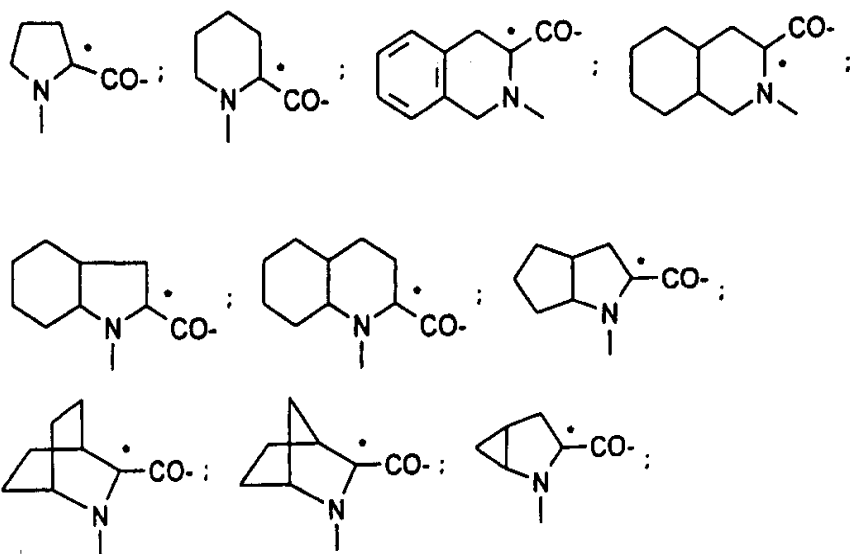
报告 配基例如是荧光素、生物素、吡啶、菲咯啉、菲啶和曙红。

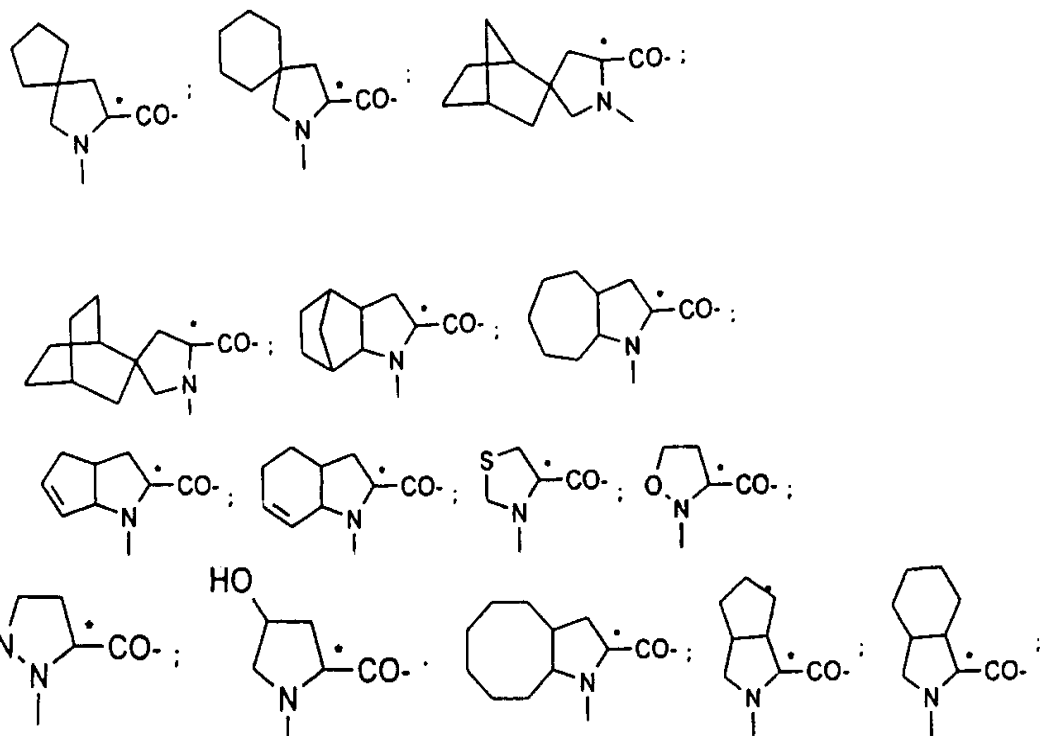
如果没有特别指出，可列举的 D-或 L-氨基酸如下(参见 Schroder, Lubke, *Peptides*, Vol. 1, New York 1965, pp. XXII-XXIII; Houben-Weyl, *Methoden der Organischen Chemie* 有机化学方法 Vol. XV/1 and 2, Stuttgart 1974):

Àad, Abu, γAbu, ABz, 2ABz, εAca, Ach, Acp, Adpd, Ahb, Aib, βAib, Ala, βAla, ΔAla, Alg, All, Ama, Amt, Ape, Apm, Apr, Arg, Asn, Asp, Asu, Aze, Azi, Bai, Bph, Can, Cit, Cys, Cyta, Daad, Dab, Dadd, Dap, Dapm, Dasu, Djen, Dpa, Dtc, Fel, Gln, Glu, Gly, Guv, hAla, hArg, hCys, hGln, hGlu, His, hIle, hLeu, hLys, hMet, hPhe, hPro, hSer, hThr, hTrp, hTyr, Hyl, Hyp, 3Hyp, Ile, Ise, Iva, Kyn, Lant, Lcn, Leu, Lsg, Lys, βLys, ΔLys, Met, Mim, Min, hArg, Nle, Nva, Oly, Orn, Pan, Pec, Pen, Phe, Phg, Pic,

Pro, ΔPro, Pse, Pya, Pyr, Pza, Qin, Ros, Sar, Sec, Sem, Ser, Thi, βThi, Thr, Thy, Thx, Tia, Tle, Tly, Trp, Trta, Tyr, Val 等, 没有立体描述符的缩写字是指L-型残基,

或者可以是环状氨基酸如吡咯烷-2-羧酸; 哌啶-2-羧酸; 1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸; 十氢异喹啉-3-羧酸; 八氢异喹啉-2-羧酸; 十氢喹啉-2-羧酸; 八氢环戊并[b]吡咯-2-羧酸; 2-氮杂双环[2.2.2]辛烷-3-羧酸; 2-氮杂双环[2.2.1]庚烷-3-羧酸; 2-氮杂双环[2.2.1]己烷-3-羧酸; 2-氮杂螺[4.4]壬烷-3-羧酸; 2-氮杂螺[4.5]癸烷-3-羧酸; 螺[(双环[2.2.1]庚烷)-2,3-吡咯烷-5-羧酸]; 螺[(双环[2.2.2]辛烷)-2,3-吡咯烷-5-羧酸]; 2-氮杂三环[4.3.0.1^{6,9}]癸烷-3-羧酸; 十氢环庚[b]吡咯-2-羧酸; 十氢环辛[b]吡咯-2-羧酸; 八氢环庚[C]吡咯-2-羧酸; 八氢异吲哚-1-羧酸; 2,3,3a,4,6a-六氢环庚[b]吡咯-2-羧酸; 2,3,3a,4,5,7a-六氢吲哚-2-羧酸; 四氢噻唑-4-羧酸; 异恶唑烷-3-羧酸; 吡唑烷-3-羧酸; 羟基吡咯烷-2-羧酸; 所有这些都可以被取代:





US-A 4,344,949, US-A 4,374,847, US-A 4,350,704,
 EP-A 29 488, EP-A 31 741, EP-A 46 953, EP-A 49 605,
 EP-A 49 658, EP-A 50 800, EP-A 51 020, EP-A 52 870,
 EP-A 79 022, EP-A 84 164, EP-A 89 637, EP-A 90 341,
 EP-A 90 362, EP-A 105 102, EP-A 109 020, EP-A 111 873,
 EP-A 271 865 and EP-A 344 682.

烷基和由之衍生的残基如烷氧基和烷硫基可以是分支的、未分支的或环状的，饱和的或单不饱和的或多不饱和的。

优选的式 I 化合物是其中有下列基团的化合物：

n 是 0 至 50 的数；

B 各自是天然核苷碱基或非天然核苷碱基；

L 是 N ；

A 是式 IIb 的基团，其中 $r=1$ ， S 是零，且 $R^2, R^3=H$ ， $Y'=O$ 且

M 是单键；

D 和 G 各自是 CHR^5 ；

R^5 是氢；

X 是 $-O-$;

Y 是 $=O$;

Z 是羟基、甲氧基、乙氧基、(4-硝基苯基)乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、戊氧基、苯氧基或烯丙氧基;

Q 和 Q' 各自是氢、 R^8 或可被修饰或未被修饰的寡核苷酸, 其中

a) 3' - 和/或 5' - 磷酸二酯桥接部分被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、 $NR'R'$ - 氨基磷酸酯、 $N3' \rightarrow P5'$ - 氨基磷酸酯(例如在 Gryaznov *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116(1994) 3143 中描述的)、磷酸 O-甲基酯、磷酸 O-乙基酯、磷酸 O-异丙基酯、甲基膦酸或苯基膦酸酯桥部分完全或部分地取代;

b) 嘧啶位中及 5' 末端和/或 3' 末端上的 1 个, 2 个或 3 个 3' - 或 5' - 磷酸二酯桥接部分被缩甲醛和/或 3' - 硫代缩甲醛取代;

c) 磷酸糖酯骨架被“PNA”或 PNA-DNA 杂合体完全或部分地取代;

d) β -D-2' - 脱氧核糖单位被 2' - F-2' - 脱氧核糖、2' - O-(C_1-C_6)-烷基核糖、2' - O-(C_2-C_6)-链烯基核糖或 2' - NH_2 -2' - 脱氧核糖完全或部分地取代;

e) 天然核苷碱基被 5-(C_1-C_6)-烷基尿嘧啶/5-(C_2-C_6)-链烯基尿嘧啶/5-(C_2-C_6)-炔基尿嘧啶、5-(C_2-C_6)-烷基胞嘧啶、5-(C_2-C_6)-链烯基胞嘧啶、5-(C_2-C_6)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴胞嘧啶、7-脱氮杂-7-(C_2-C_7)-炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C_2-C_7)-炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-(C_2

—C₇)—链烯基鸟嘌呤、7-脱氮杂—7—(C₂—C₇)—链烯基腺嘌呤、7-脱氮杂—7—(C₁—C₇)—烷基鸟嘌呤、7-脱氮杂—7—(C₁—C₇)—烷基腺嘌呤、7-脱氮杂—7—溴鸟嘌呤、7-脱氮杂—7—溴腺嘌呤。

更优选的式 I 化合物是其中包括下列基团的化合物：

n 是 0 至 30 的数；

Q 和 Q' 各自氢、R⁸，其中 R⁸ 是 H、(C₁—C₆)—烷基、苯基或 2-(4-硝基苯基)乙基，或者是可未被修饰或被修饰的寡核苷酸，其中

a) 3'-和/或 5'-磷酸二酯桥接部分被硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或甲磷酸酯桥接部分完全或部分地取代；

b) 5'-和 3'-末端上的 1 个、2 个或 3 个 3'-或 5'-磷酸二酯桥接部分被取代；

c) 磷酸糖酯骨架被“PNA”或 PNA-DAN 复合物完全或部分地取代；

d) β-D-2'-脱氧核糖被 2'-F-2'-脱氧核糖、2'-O-(C₁—C₄)—烷基核糖、2'-O-(C₂—C₄)—链烯基核糖或 2'-NH₂-2'-脱氧核糖完全或部分地取代；

e) 天然核苷碱基被 5-(C₃—C₆)—烷基尿嘧啶、5-(C₂—C₆)—链烯基尿嘧啶、5-(C₂—C₆)—炔基尿嘧啶、5-(C₁—C₆)—烷基胞嘧啶、5-(C₂—C₆)—链烯基胞嘧啶、5-(C₂—C₆)—炔基胞嘧啶、7-脱氮杂—7—(C₂—C₇)—炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂—7—(C₂—C₇)—炔基腺嘌呤、7-脱氮杂—7—(C₂—C₇)—链烯基鸟嘌呤、7-脱氮杂—7—(C₂—C₇)—链烯基腺嘌呤、7-脱氮杂—7—(C₁

-C₇)-烷基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-(C₁-C₇)-烷基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤。

最优的式 I 化合物是其中包括下列基团的化合物：

n 是从 0 到 25 的数；

B 各自是天然核苷碱基；

Z 是羟基、乙氧基、(4-硝基苯基)乙氧基或苯氧基；

Q 和 Q' 各自是氢、R^b，其中 R^b 是 H、(C₁-C₆)-烷基、苯基或 2-(4-硝基苯基)乙基，或者是可以未被修饰或被修饰的寡核苷酸，其中

a) 3'-和/或 5'-磷酸二酯桥接部分被硫代磷酸酯桥接部分完全或部分地取代；

c) 磷酸糖酸骨架被“PNA”或 PNA-DAN 杂合物完全或部分地取代；

d) β-D-2'-脱氧核糖被 2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-或 2'-O-丁基核糖完全或部分地取代；

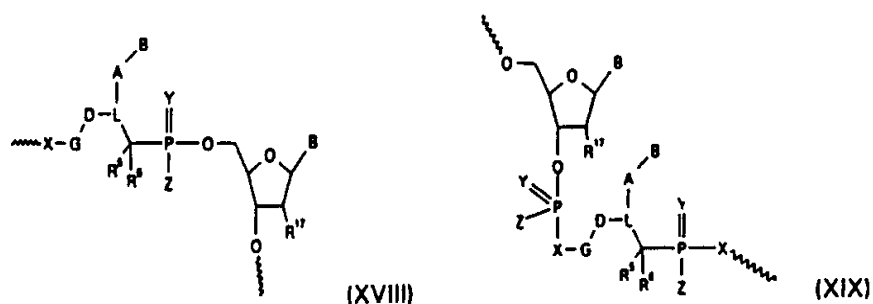
e) 天然核苷碱基被 5-己炔基胞嘧啶、5-己炔基尿嘧啶、5-己炔基胞嘧啶、7-脱氮杂-7-丙炔基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-丙炔基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-甲基鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-甲基腺嘌呤、7-脱氮杂-7-溴鸟嘌呤、7-脱氮杂-7-溴腺嘌呤完全或部分地取代。

本发明进一步涉及其中 Q 和 Q' 相连接，即形成环状分子的式 I 的化合物，其中仍有 Q 和 Q' 一起提供一条单键的可能性。可按照已描述的方法，例如 Gao 等人 (Nucl. Acids Res. 23(1995) 2025) 或 Wang 和 Kool (Nucl. Acids Res. 22(1994) 2326) 所述方

法合成这样的化合物。

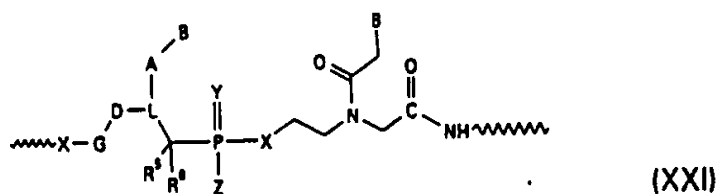
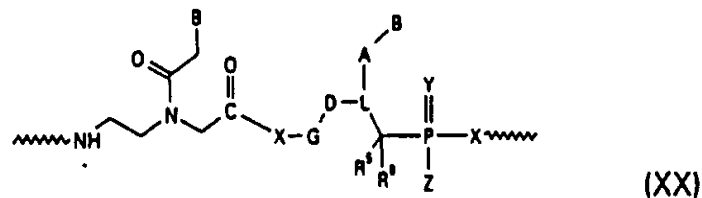
本发明进一步涉及寡核苷酸或被修饰的寡核苷酸,例如 PNA,其中式 I 的化合物被掺入在 3' 末端或 5' 末端,或 5' 和 3' 末端。

寡核苷酸与式 I 化合物的键合优选是通过核苷酸单位的 5' 或 3' 羟基基团,同样也可通过磷酸单酯键完成。式 XVIII 和 XIX 中借助实例说明与寡核苷酸的键合。



R^{17} 是 H、OH、F、2'-O-(C₁-C₆)-烷基或 2'-O-(C₂-C₆)-链烯基,较好是 H 或甲氧基或 O-烯丙基,特别优选的是 H。所有其他可变基团如上文所述。

式 XX 和式 XXI(其中可变基团具有如上所述的意义)举例说明了用 PNA 的键合。



根据本发明的式 I 化合物(如果 Q 和 Q' = H 即缩写 PMENA)与寡核苷酸或经修饰的寡核苷酸(例如 RNA 或如上所述的其他修饰)的组合将再次用图示说明(OLIGO 是未被修饰的或经过修饰的寡核苷酸):

这种组合的例子是:

5' - OLIGO - PMENA

5' - PMENA - OLIGO

5' - OLIGO - PMENA - OLIGO

所提到的进一步组合方式是:

5' - OLIGO - (PMENA - OLIGO)_a (a = 1-20)

5' - PMENA - OLIGO - PMENA

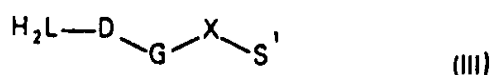
5' - PMENA - (OLIGO - PMENA)_a (a = 1-20)

以这样一种方式,即首先根据所合成的分子结构按如下所述方法合成 PMENA 单位,然后再将其与寡核苷酸单位偶联以合成这些组合的化合物。在该方法中,寡核苷酸作为单体单位进行偶联或经固相合成法进行嵌段缩合或按本领域已知的方法(Sonveaux, *Bioorganic Chemistry* 14 (1986) 274ff)进行溶液合成以完成偶联。另外也可以按酰胺酯(amidite)方法、H-磷酸酯方法或磷酸三酯方法(Sonveaux, *Bioorganic Chemistry* 14

(1986)274ff)进行缩合。相反,如果 PMENA 被偶联到 OLIGO 单位上,则优选使用 f_1) 中所述的方法。以同样的方式完成与 PNA 单位的偶联,如果(单体或寡聚体) PNA 单位偶联到 PMENA 单位上,则用本领域技术人员已知的肽合成或酯合成方法。

本发明进一步涉及制备式 I 化合物的方法,该方法包括:

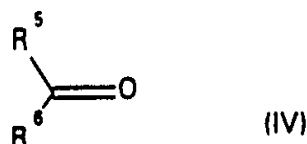
a₁)使式 III 的化合物:



其中 D、G、L 和 X 具有上述意义,并且

S' 是适当的保护基团,如二甲氧基三苯甲基、一甲氧基三苯甲基、三苯甲基、Pixyl、叔丁氧基羰基或苄基甲氧基羰基,较好是一甲氧基三苯甲基或叔丁氧羰基,

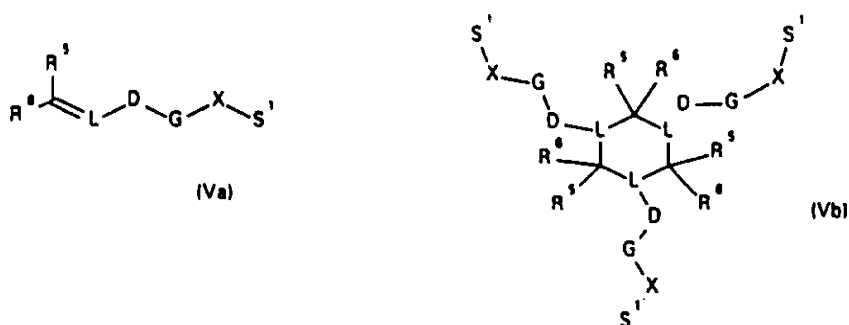
与式 IV 的化合物:



其中 R⁵ 和 R⁶ 具有上述的意义,

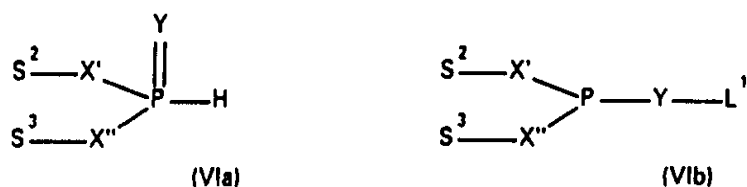
在适当的有机溶剂,如在甲醇、乙醇、异丙醇、丁醇、乙腈、二氯甲烷(DCM)、氯仿、苯、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、乙醚、乙酸乙酯(EA)、四氢呋喃(THF)、N-甲基吡咯烷酮、石油醚、二甲苯或甲苯或适当溶剂的混合物中,较好在甲醇或乙醇中,于 0°C 到 100°C,较好在 10 至 50°C 的温度下反

应,得到式 Va 或 Vb 的化合物



其中所选用的反应条件是本领域技术人员已知的(如参见 S. R. Sandler, W. Karo "Organic Functional Group Preparations", Vol. II, Second Edition, Academic Press, London, 1986, Chapter 12 ("Imines")),要注意的是它们是与保护基团 S¹ 相适应的,即如果选择对酸不稳定的保护基团如一甲氧基三苯甲基保护基团,则在反应期间不应加酸,

b₁) 使式 Va 和 Vb 的化合物与式 VIa 或 VIb 的化合物,较好是式 VIa 的化合物

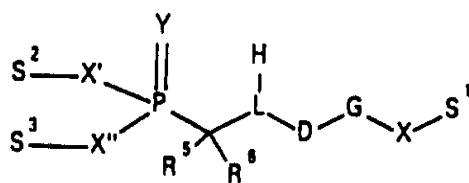


其中 Y 是如上限定的基团,

X' 和 X'' 各自是如 X 所限定的基团,

S² 和 S³ 各自是保护基团,如甲基、乙基、苯基、2-氟苯基、2,5-二氟苯基、2,4-二氟苯基、4-硝基苯基、4-甲氧基苯基、2-氟乙基、2-(4-硝基苯基)乙基、烯丙基、苄基、2,2,2-三氟

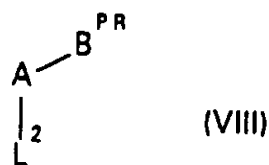
-1,1-二甲基乙基、4-甲氧基苄基、2,2,2-三氯乙基、8-羟基喹啉或如本领域技术人员已知的其他磷酸酯保护基团(*Sonveaux, Bioorganic Chemistry* 14(1986)274ff),但较好是甲基、乙基、苄基、2-(4-硝基苄基)乙基、烯丙基或2,2,2-三氯乙基,并且L'是离去基团,较好是(C₁-C₄)-烷基,在适当有机溶剂如甲醇、乙醇、异丙醇、丁醇、乙腈、苯、DMF、DMSO、DCM、EA、氯仿、乙醚、THF、N-甲基吡咯烷酮、石油醚、二甲苯或甲苯或适当溶剂的混合物中,较好是在THF中,在0°C至100°C,较好在50至80°C的温度下进行反应,必要时加入碱,如三-(C₁-C₆)-烷基胺、N-烷基吗啉、吡啶、N,N-二甲基氨基吡啶、丁基锂、二异丙基氨基锂(LDA)、氢氧化钠、氨基钠、碳酸钾、碳酸铯、叔丁醇钾或复合碱如氨基钠-R¹¹ONa,其中R¹¹是(C₂-C₆)-烷基或CH₃-CH₂-O-CH₂CH₃,或不带电荷的、全烷基化的聚氨基磷嗪碱(*Schwesinger, Nachr, Chem. Techn Lab.* 38(1990)1214; *Angew. Chem.* 99(1989)1212),但较好是不加碱,以得到式VII的化合物



(VII)

其中D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、S³、X、X'、X''和Y具有上文限定的意义;

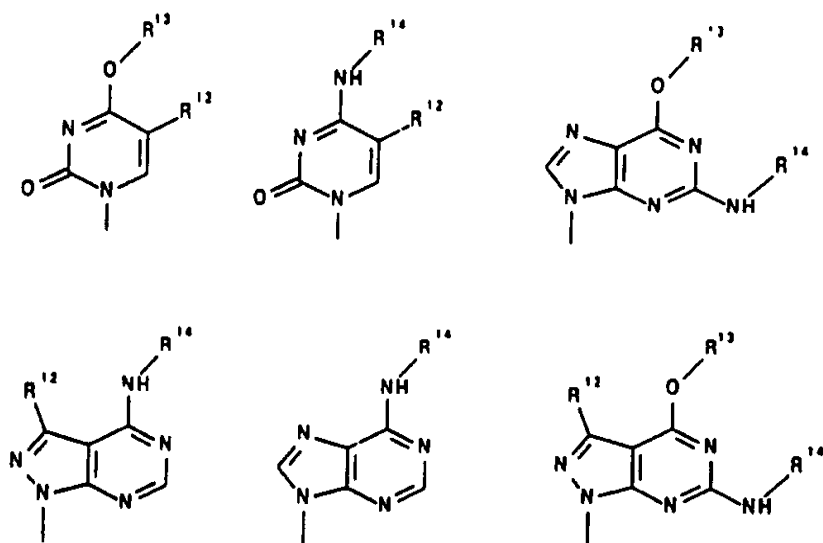
C₁)使式VII的化合物与式VIII的化合物



其合成例如参见 *Dueholm* 等人 (*J. Org. Chem.* 59(1994)5767) 所述,且其中

A 具有上述的意义,

B^{PR} 具有如 B 的定义,但其可能以被保护的形存在,即如果 B 是天然或非天然核苷碱基,则 B^{PR} 是其氨基或羟基基团被适当的已知保护基团,如用于保护羟基基团的对硝基苯乙基、苯甲酰基、烯丙基和对-(叔丁基)苯甲酰基,和用于保护氨基基团的乙酰基、苯甲酰基、对-(叔丁基)苯甲酰基、对-(甲氧基)苯甲酰基、对-硝基苯乙氧基羰基、异丁酰基、对-(叔丁基)苯乙酰基、N,N-二甲基甲酰亚氨基、苄基甲氧基羰基、苄氧基羰基或苄氧基乙酰,或在寡核苷酸化学中常用于核苷碱基的其他保护基团(*Sonveaux, Bioorganic Chemistry* 14(1986)274ff; *Beauage, Tetrahedron* 49(1993)2223ff)保护的核苷碱基,可提到的 B^{PR} 的基团较好是:



其中

R^{12} 是氢、1-丙炔基、1-丁炔基、1-戊炔基或 1-己炔基，特别是氢、1-丙炔基或己炔基；

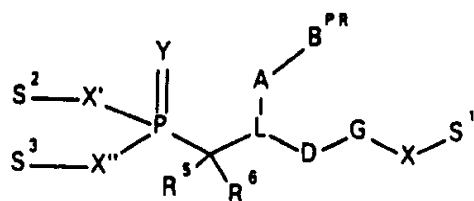
R^{13} 是氢、二苯基氨基甲酰基或 2-(4-硝基苯基)-乙基，及

R^{14} 是乙酰基、苯甲酰基、对-(叔丁基)苯甲酰基、对-(甲氧基)苯甲酰基、对-硝基苯基乙氧基羰基、异丁酰基、对-(叔丁基)苯基乙酰、苄氧基羰基或苯氧基乙酰，且

L^2 是本领域技术人员已知的离去基团，如 Cl 、 Br 、 $O-SO_2$ 甲基、 $O-SO_2$ 三氟甲基、 O -甲苯磺酸酯或 $O-C_6F_5$ ，或者如果 A 具有式 IIb 的意义，则其也可以是 OH ；

在适当的有机溶剂，如在乙腈、苯、 DMF 、 $DMSO$ 、 DCM 、 EA 、氯仿、乙醚、四甲基脲、 THF 、 N -甲基吡咯烷酮、石油醚、二甲苯或甲苯或适当溶剂的混合物中，较好在 DMF 中，在 $-20^\circ C$ 到 $100^\circ C$ ，较好在 0 到 $50^\circ C$ 的温度下进行反应，必要时可加入碱如三-(C_1-C_6)-烷基胺、 N -烷基吗啉、吡啶、 N,N -二甲基氨基吡啶、丁基锂、二异丙基氨基锂 (LDA)、氢氧化钠、氨基钠、碳酸钾、碳酸铯、叔丁醇钾或复合碱如氨基钠- $R^{11}ONa$ ，其中 R^{11} 是 (C_2-C_6)-烷基或 $CH_3CH_2-O-CH_2CH_3$ 或不带电荷的、全烷基化的聚氨基磷嗪碱 (Schwesinger, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* 38 (1990) 1214; Angrew. *Chem* 99 (1987) 1212)，如果 A 是式 IIb 且 L^2 是 OH ，优选加入三乙胺、二异丙基乙胺或 N -乙基吗啉或不加碱，并加入常规用于偶联肽键的偶联剂，

以得到或 IX 的化合物

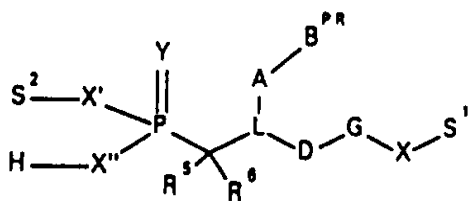


(IX)

其中 A 、 B^{PR} 、 D 、 G 、 L 、 R^5 、 R^6 、 S^1 、 S^2 、 S^3 、 X 、 X' 、 X'' 和 Y 是如上限定的；

d_1) 用已知方法(如参见 *Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Miley & Sons, New York 1991*)从式 IX 的化合物中除去保护基团 S^3 , 例如, 对于其中 S^2 和 S^3 是 2-(4-硝基苯基)乙基的式 IX 的化合物, 于室温溶解于吡啶或乙腈中的 0.1M 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)处理, 或者对于其中 S^2 和 S^3 是苯基或乙基的式 IX 的化合物, 用氨水处理, 或者对于其中 S^2 是 2-(4-硝基苯基)乙基且 S^3 是烯丙基的式 IX 的化合物, 用溶解于 DSM 中的 $Pd[P(C_6H_5)_3]_4$ 和三苯膦处理 (*Hayakawa et al., J Org. Chem, 58 (1993) 5551*), 或者对于其中 S^2 是 2-(4-硝基苯基)乙基且 S^3 是烯丙基的式 IX 的化合物, 用溶解于吡啶或乙腈中的 0.5M DBU 处理, 或者对于其中 S^2 是 2-氟乙基且 S^3 是烯丙基的式 IX 的化合物, 用溶解于吡啶中的三乙胺处理, 或者对于其中 S^2 是 2-(4-硝基苯基)乙基且 S^3 是 2,2,2-三氟-1,1-二甲基乙基的式 IX 的化合物, 则用三丁基膦外理,

得到式 X 的化合物

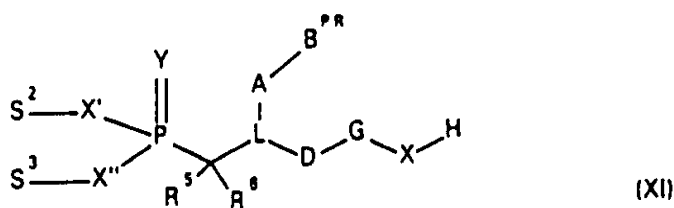


(X)

其中 A 、 B^{PR} 、 D 、 G 、 L 、 R^5 、 R^6 、 S^1 、 S^2 、 X 、 X' 、 X'' 和 Y 是如上文所限定的；

e_1) 用已知方法(如 *Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons, New York 1991; Sonveaux, Bioorganic Chemistry 14 (1986)274 ff*)从式 IX 的化合物中除去保护基团 S^1 , 例如用酸处理, 如用 80% 乙酸, 用溶解于二氯甲烷或氯仿中的 1-4% 二氯乙酸, 用溶解于 DCM/ 甲醇中的对甲苯磺酸或氯仿中的 1% 三氟乙酸处理, 以除去单甲氧基三苯甲基保护基团,

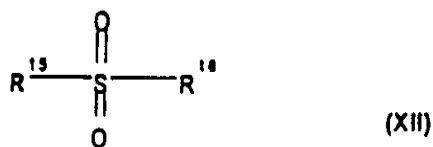
得到式 XI 的化合物



其中 A 、 B^{PR} 、 D 、 G 、 L 、 R^5 、 R^6 、 S^2 、 S^3 、 X 、 X' 、 X'' 和 Y 是如上文所限定的；

f_1) 按照寡核苷酸化学中已知的“磷酸三酯法”(Sonveaux, *Bioorganic Chemistry 14 (1986) 2744 ff, Reese, J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1993, 2291 ff*), 使式 XI 的化合物与式 X 的化合物在适当的有机溶剂, 如乙腈、苯、DMF、DMSO、DCM、EA、氯仿、乙醚、四甲基脲、THF、 N -甲基吡咯烷酮、石油醚、二甲苯或甲苯或适当溶剂的混合物中, 较好在吡啶中, 于 -20°C 到 100°C , 较好 0 到 50°C 的温度下反应, 其中加入偶联剂如 6-

硝基苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(NBOP, Hashmi, *Nucleosides & Nucleotides* 13 (1994) 1059)、苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP, B. Castro, J. R. Dormmoy, G. Evin and C. Selve, *Tetrahedron Lett.* 1975, 1219-1222)、苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷-1-基磷六氟磷酸盐(PyBOP, J. Coste, D. Le-Nguyen and B. Castro, *Tetrahedron Lett.* 1990, 205-208)、O-(7-氮杂)苯并三唑-1-基四甲基脲翁六氟磷酸盐(HATU, L. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 4397)、N,N-双[2-氧代-3-恶唑烷基]二氨基磷酸酐(Katti, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 2547)、2-氟-5,5-二甲基-2-氧代-1,3,2-二氧杂磷杂己环(Stawinski, *Nucl, Acids Res, Symp. Ser.* 24, 1991 229), 或式 XII 的化合物



其中

R^{15} 是(C₆-C₁₂)-芳基,其可以被(C₁-₆)-烷基、(C₁-C₆)-烷氧基、硝基、溴或氟取代1至4次,并且其中1至3个碳原子可以被杂原子,优选氮取代,即例如苯基、甲苯基、2,4,6-三甲基苯基、2,4,6-三异丙基苯基、2,3,5,6-四甲基苯(Losse, *Liebigs Am. Chem.* 1989, 19ff)、4-溴苯、2-硝基苯、4-硝基苯或8-喹啉基,较好是2,4,6-三甲基苯基或2,4,6-三异丙基苯

基, 并且

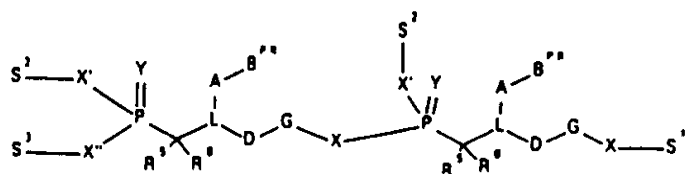
R^{16} 是离去基团如氟、溴、咪唑、三唑、4-硝基咪唑、1,2,3,4-四唑或 3-硝基-1,2,4-三唑,

优选使用式 XII 化合物的偶联剂或 BOP、PyBOP 或 HATU,

可以加入或不加催化剂 (Reese, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, 1993, 2291 ff), 如 *N*-甲基-咪唑, *N*-氧化吡啶如 4-甲氧基吡啶-*N*-氧化物或 4-乙氧基吡啶-*N*-氧化物、4,6-二硝基-1-羟基苯并三唑、1-羟基-5-苯基四唑、1-羟基-5-(4-硝基苯基)四唑、3-硝基-1*H*-1,2,4-三唑、5-(3-硝基苯基)-1*H*-四唑、5-(3,5-二硝基苯基)-1*H*-四唑、5-(1-甲基咪唑-2-基)-1*H*-四唑、5-[(1-甲基咪唑-2-基)甲基]-1*H*-四唑或 1-羟基-4-硝基-6-(三氟甲基)苯并三唑, 优选用 4-乙氧基吡啶-*N*-氧化物或 4-甲氧基吡啶-*N*-氧化物作为催化剂,

其中偶联剂的制备可就地完成或者可分别完成并且可以在适当的溶剂中加入与偶联剂组合的式 (X) 之被活化化合物的溶液,

得到式 XIII 的化合物

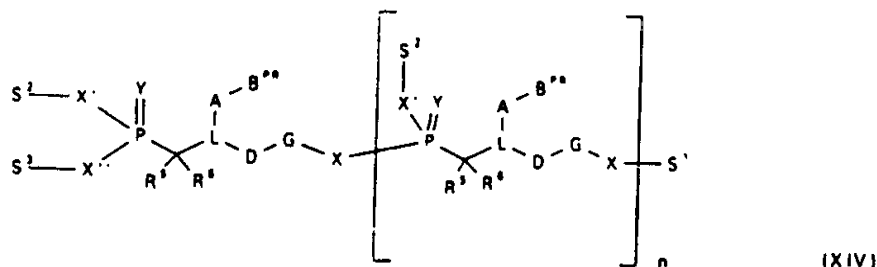


(xiii)

其中 $A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^1, S^2, S^3, X, X', X''$ 和 Y 如上

文所定义；

g₁) 以上述式 XIII 的化合物为起始物，重复上述 e₁) 和 f₁) 步骤直至所需链长，得到式 XIV 的化合物：



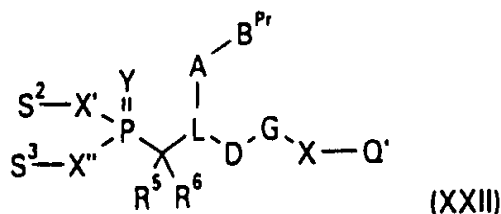
其中 A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、S³、X、X'、X''、Y 和 n 如上文所定义；

h₁) 按照已知方法(如 Greene. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, J. Wiley & Sons, New York 1991), 除去保护基团 S¹、S² 和 S³ 以及 B^{PR} 上的保护基团, 即, 例如按步骤 e₁) 中所述方法除去保护基团 S¹, 至于保护基团 S² 和 S³, 如果它们是 2-(4-硝基苯基)乙基, 于室温下用溶解于吡啶或乙腈中的 0.5M 1, 8-二氮杂-双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)处理, 如果 S² 或 S³ 是苯基, 用氨水处理, 如果 S² 或 S³ 是烯丙基, 用溶解于 DCM 中的 Pd[P(C₆H₅)₃]₄ 三苯基膦处理(Hayakawa et al., *J. Org. Chem.* 58 (1993) 5551), 如果 S² 或 S³ 是 2-氟乙基, 用溶解于吡啶中的三乙胺处理, 或者如果 S² 或 S³ 是 2, 2, 2-三氟-1, 1 二甲基乙基, 用三丁基膦处理, 而 B^{PR} 上的保护基团, 例如, 如果 R¹⁴ 是对硝基苯基乙氧基羰基可用溶解于吡啶中的 0.5M DBU 处理, 如果 R¹⁴ 是异丁酰基或苯甲酰基或对甲氧基苯甲酰基, 则于 20 至 60°C 用浓 NH₄OH 处理, 或者, 如

果 R^{13} 是 2-(4-硝基苯基)乙基, 优选用溶解于吡啶或乙腈中的 0.5M DBU 处理, 如果 S^1 等于一甲氧基三苯甲基并且 S^3 等于 2-(对硝基苯基)乙基, 可首先按步骤 e_1) 中所述除去一甲氧基三苯甲基, 然后按上述方法除去 S^2 , 然后除去例如核碱基上的剩余保护基团;

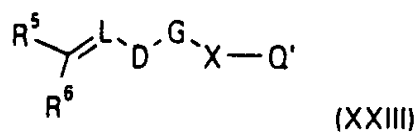
并且可以按本领域技术人员已知的方法(例如参见 Uhlmann & Peyman, *Chem. Rev.* 90 (1990) 543; M. Manoharan, in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds., CPR Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, P. 303 ff; EP-A 0 552 766; S. Agrawal, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 26, P. 93 ff, Humann, Press, Totowa 1994) 引入基团 Q 和 Q', 并且可以按 Wang (*Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 2326) 所述方法环化所得到的化合物, 从而得到式 I 的化合物。

另外, 也可以按本领域技术人员已知的方法(J. March, "Advanced Organic Chemistry", Fourth Ed., J. Wiley & Sons, 1992) 将偶联物 Q' 掺入式 XXII 的单体单位中, 然后按已述方法将其掺入式 I 的化合物中。



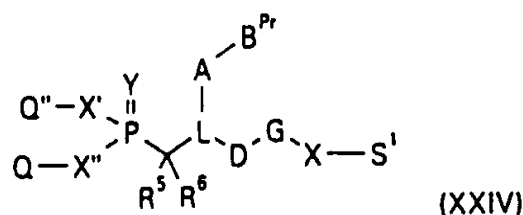
对于 Q' =烷基者, 例如可以使式 XXIII 的化合物与式 VIa 或 VIb 的化合物反应并进一步进行类似于式 Va 和 Vb 所述的反

应，以制备式 XXII 的化合物。



也可以通过除去保护基团 S' 并按已知方法 (J. March, "Advanced Organic Chemistry", Fourth Ed., J. Wiley & Sons, 1992) 引入基团 Q' 而从式 IX 的化合物制备式 XXII 的化合物。

另外，也可以按本领域技术人员已知的方法 (J. March, "Advanced Organic Chemistry", 4th Ed., J. Wiley & Sons, 1992) 将偶联物 Q 和 Q' 掺入式 XXIV 的单体单位中，然后再按所提到的方法将其掺入式 I 的化合物中。



例如在 Houben - Weyl, *Methoden der Organischen Chemie*, [有机化学方法] Vol. 15/2, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974 中描述的连接肽键的偶联剂 (参见 c1)) 及其他试剂如 BOP (B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin and C. Selve, *Tetrahedron Lett.* 1975, 1219-1222)、PyBOP (J. Coste, D. Le - Nguyen and B. Castro, *Tetrahedron Lett.* 1990, 205-208)、BroP (J. Coste, M. - N. Dufour, A. Pantaloni and B. Castro, *Tetrahedron Lett.* 1990, 669-672)、PyBroP (J. Coste, E. Frerot, P. Jouin and B. Castro, *Tetrahedron Lett.*

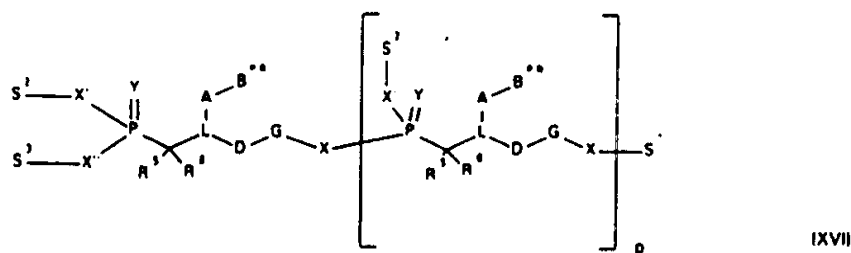
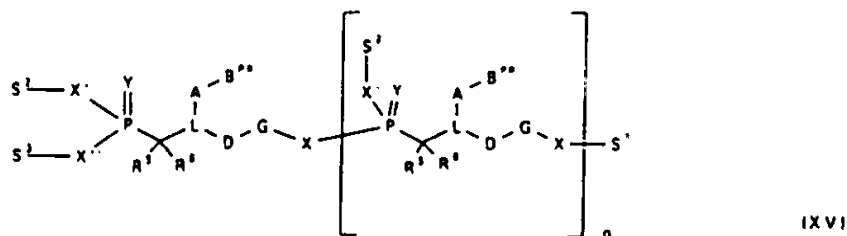
1991, 1967—1970) 和脲阳离子试剂, 如 HBTU (V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudron, *Synthesis* 1984, 572—547)、TBTU、TPTU、TSTU、TNTU (R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth and D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* 1989, 1927—1930)、TOTU (EP—A 0 460 446)、HATU (L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 4397—4398)、HAPyU、TAPipU (A. Ehrlich, S. Rothmund, M. Brudel, M. Beyermann, L. A. Carpino and M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* 1993, 4781—4784)、BOI (K. Akaji, N. Kuriyama, T. Kimura, Y. Fujiwara and Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* 1992, 3177—3180) 或酰基氯或酰基氟 (L. A. Carpino, H. G. Chao, M. Beyermann and M. Bienert, *J. Org. Chem.*, 56 (1991), 2635; J. —N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther and G. Sennyey in E. Giralt and D. Andreu (Eds.) *Peptides* 1990, Escom Science Publishers B. V. 1991, pp. 53—54; J. Green and K. Bradley, *Tetrahedron* 1993, 4141—4146)、2,4,6—三甲基苯磺酰基—3—硝基—1,2,4—三唑酰胺 (MSNT) (B. Blankemeyer—Menge, M. Nimitz and R. Frank, *Tetrahedron Lett.* 1990, 1701—1704)、2,5—二苯基—2,3—二氢—3—氧代—4—羟基噻吩二氧化物 (TDO) (R. Kirstgen, R. C. Sheppard, W. Steglich, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 1870—1871) 或各个参考文献中公开的活化的酯 (D. Hudson, *Peptide Res.* 1990, 51—55)。

另外优选使用碳化二亚胺, 如二环己基碳二亚胺或二异丙

基碳二亚胺。还优选使用磷鎓试剂，如 PyBOP 或 PyBrop、脲阳离子试剂，如 HBTU、TBTU、TPTU、TSTU、TNTU、TOTU 或 HATU 及 BOI。

在这种情况下，可以使用活化试剂并加入式 VIII 的化合物而直接完成偶联，并可任选加入 1-羟基苯并三唑(HOBT)(W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788(1970))或 3-羟基-4-氧代-3,4-二氢苯并三唑(HOObt)(W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2034(1970))添加剂，或者也可以分别预活化作为活化酯的单位，并可加入活化物质在适当溶剂中形成的溶液。

本发明进一步涉及制备其中 n 是 1 到 100 的式 I 的化合物的方法，该方法包括，在式 XV 和 XVI 的化合物中



其中 A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、S³、X、X'、X'' 和 Y 如上

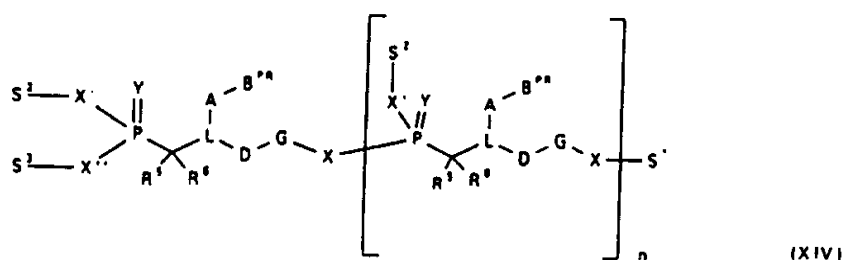
文所限定, o 和 p 各自是 0 至 50, 较好是 0 至 20 并且 $o+p+l=n$;

a_2) 在式 XV 的化合物中按 e_1) 所述方法除去保护基团 S^1 ,

b_2) 在式 XVI 的化合物中按 d_1) 所述方法除去保护基团 S^3 ,

并

c_2) 按 f_1) 所述方法将所得化合物相互偶联, 得到式 XIV 的化合物

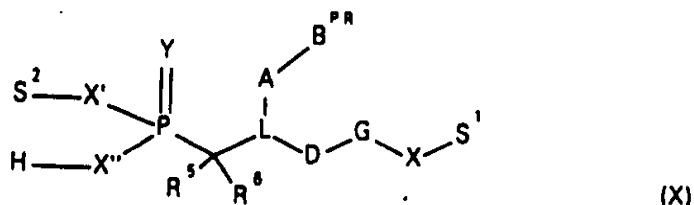


其中 $A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^1, S^2, S^3, X, X', X'', Y$ 和 n 具有如上所限定的意义,

d_2) 按 h_1) 所述使这些化合物反应, 得到式 I 的化合物。

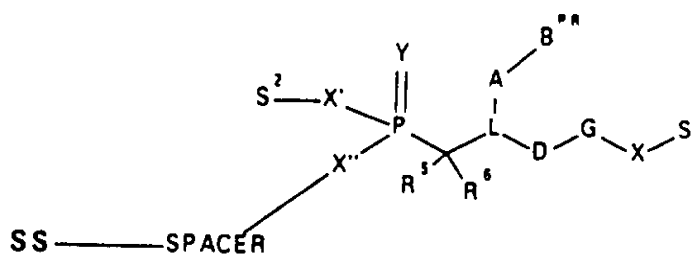
本发明的进一步涉及制备式 I 的化合物的方法, 该方法包括

a_3) 按照已知方法, 通过 SPACER 将式 X 的化合物



其中 $A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^1, S^2, S^3, X, X', X''$ 和 Y 具有如上所限定的意义

偶联到固相载体上, 得到式 XVII 的化合物,



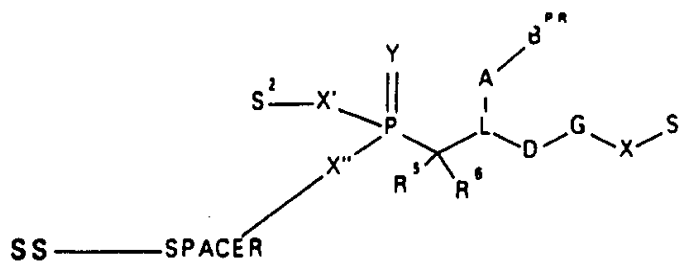
(XVII)

其中 A、B^{PR}、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、X、X'、X'' 和 Y 和具有如上所限定的意义

SS 是适用于固相合成的固相载体, 如氨基丙基-CPG (CPG=[®]Cotrolled Pore Glass) 或^RTentagel, 并且

SPACER 是在发生合成后可从载体上除去的基团, 其为本领域技术人员已知的 (Sonveaux, *Bioorganic Chemistry* 14 (1986) 274 ff), 例如 EP-A 0 552 766 (HOE 92/F012) 中的所述的双(羟乙基)磷酸基团, 或者 SPACER 是双功能团偶联物分子 Q, 其通过已知的可除去基团被连接到固相载体上, 例如通过琥珀酸残基结合到固相载体的核苷酸或寡核苷酸 (Sonveaux, *Bioorganic Chemistry* 14 (1986) 274 ff), 或通过琥珀酸残基结合到固相载体上的多聚-或寡聚乙二醇 (Jaschke, *Tetrahedron Lett.* 34(1993) 301), 或者例如是通过琥珀酸残基连接到固相载体上的胆固醇衍生物 (Mackellar, *Nucl. Acids Res.* 20 (1992) 3411);

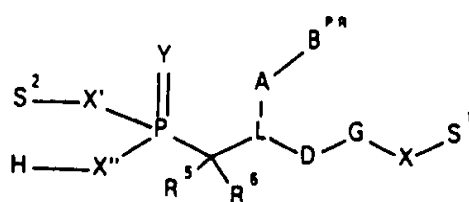
b₃) 按 e₁) 所述方法从式 XVII 的化合物除去保护基团 S¹



(XVII)

其中 A、Bⁿ、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、SS、SPACER、X、X'、X'' 和 Y 和具有如上所限定的意义，

c₃) 按 f₁) 所述方法，使所得到的化合物与式 X 的化合物反应



(IX)

其中 A、Bⁿ、D、G、L、R⁵、R⁶、S¹、S²、X、X'、X'' 和 Y 和具有如上所限定的意义；

d₃) 重复步骤 b₃) 和 c₃) 直达到到所需的链长度；

e₃) 或者可以用已知方法(如参见 Uhlmann & Peyman, *Chem. Rev.* 90 (1990) 5 43; M. Manoharan in " *Antisense Research and Applications*, " Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, P. 303 ff; EP-A 0 552 766; S. Agrawal in " *Methods in Molecular Biology* ", Vol. 26, P. 93 ff, Humana Press, Totowa 1994) 偶联偶联物 Q'；

f₃) 用已知方法从固相载体上除去以这样产生的化合物，例如，按 EP-A 0 552 766 (HOE92/F012) 中所述，经用 DBU 处理除去双(羟乙基)磺酰接头，经用氨水处理除去琥珀酸接头，

以及如步骤 h_1) 中所述除去保持基团, 也可以在从载体上裂碎之前除去保护基团, 并且可以按已知方法偶联偶联物 Q , 从而可改变 Q 和 Q' 的偶联次序 $[e_3, f_3]$, 并可以环化或不环化所得到的化合物。

式 I 的化合物被用作基因表达的抑制剂。因此本发明进一步涉及使用根据本发明的治疗活性化合物生产药物, 以及生产药物的方法, 该方法包括将根据本发明的化合物与生理上可接受的赋形剂及必要时与适当的添加剂和/或辅助剂混合。

治疗活性化合物一般是 (基于相当于核苷碱基之单位 B 的序列) 作为反义寡核苷酸、三链体形成寡核苷酸、*aptamers* (可与特异性靶分子如蛋白质或受体结合的 *RAN* 或 *DNA* 分子, 如参见 *L. C. Bock et al., Nature* 1992, 355, 564) 或核酶 (催化 *RNA*, 例如参见 *Castanetto et al., Critical Rev. Eukar, Gene Expr*, 1992, 2, 331) 类似物发挥功能, 特别是作为反义寡核苷酸和三链体形成寡核苷酸的类似物。

再者, 本发明进一步涉及使用根据本发明的化合物作为诊断剂, 例如检测生物学样品中是否存在特异性双链或单链核酸分子或其量。

为了按照本发明使用, 本发明的化合物具有大约 6—100, 较好大约 10—40, 特别是大约 12—31 核苷酸的长度。同样, 如上文所述优选范围、修饰或结合方式也适用于此。

本发明的药物可用于治疗如由病毒, 例如 *HIV*、*HSV-1*、*HSV-2*、流感病毒、*VSV*、乙型肝炎或乳头瘤病毒引起的疾病。

有抗这种类型的靶之活性的本发明的序列 (碱基序列) 例如

是:

a) 抗 HIV, 例如

ACACCCAATTCTGAAAATGG	SEQ ID NO:1
AGGTCCCTGTTCTGGGCGCCA	SEQ ID NO:2
GGTCCCTGTTCTGGGCGCCA	SEQ ID NO:26
GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA	SEQ ID NO:3
GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA	SEQ ID NO:4
GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTG	SEQ ID NO:5
GTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCATAGG	SEQ ID NO:6

b) 抗 HSV-1, 例如

GCGGGGCTCCATGGGGGTCG	SEQ ID NO:7
GGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:28
GGAGGATGCTGAGG	SEQ ID NO:29
CAGGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:30

本发明的药物也适用于治疗肿瘤或再狭窄症。例如, 在这种情况下可使用对抗负责肿瘤发生或肿瘤生长之靶的序列(碱基序列)。这种靶例如是:

1) 核癌蛋白质如 *c-myc*、*N-myc*、*c-myb*、*c-fos*、*c-fos/jun*、*PCNA*、*P120*,

2) 胞浆/膜相关癌蛋白质如 *EJ-ras*、*c-Ha-ras*、*N-ras*、*rrg*、*bcl-2*、*cdc-2*、*c-raf-1*、*c-mos*、*c-src*、*c-abl*,

3) 细胞受体如 *EGF* 受体、*c-erbA*、类视色素受体、蛋白质激酶调节亚单位、*d-fms*,

4) 细胞因子、生长因子、细胞外基质如 CSF-1、IL-6、IL-1a、IL-1b、IL-2、IL-4、bFGF、成髓细胞素、纤连蛋白。

有对抗这种类型靶的活性的本发明的序列(碱基序列) 例如是:

a) 抗 *c-Ha-ras*, 例如

CAGCTGCAACCCAGC SEQ ID NO:8

c) 抗 *c-myc*, 例如

GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC SEQ ID NO:9

AACGTTGAGGGGCAT SEQ ID NO:10

d) 抗 *c-myb*, 例如

GTGCCGGGGTCTTCGGGC SEQ ID NO:11

GTGCCGGGGTCTTCGGG SEQ ID NO:27

e) 抗 *c-fos*, 例如

GGAGAACATCATGGTCGAAG SEQ ID NO:12

CCCGAGAACATCATGGTCGAAG SEQ ID NO:13

GGGAAAGCCCGCAAGGGG SEQ ID NO:14

f) 抗 *p120*, 例如

CACCCGCCTTGGCCTCCAC SEQ ID NO:15

g) 抗 *EGF* 受体, 例如

GGGACTCCGGCGAGCGC SEQ ID NO:16

GGCAAACTTTCTTTTCCTCC SEQ ID NO:17

h) 抗 *p53* 肿瘤抑制因子, 例如

GGGAAGGAGGAGGATGAGG SEQ ID NO:18

GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG SEQ ID NO:19

i) 抗 bFGF, 例如

GGCTGCCATGGTCCC

SEQ ID NO:31

本发明的药物进一步适于如治疗受整联蛋白或细胞-细胞粘附受体, 例如 VLA-4、VLA-2、ICAM 或 ELAM 的影响所致的疾病。

有抗这种类型靶的活性的本发明的序列(碱基序列)例如是:

a) VLA-4, 例如

GCAGTAAGCATCCATATC

SEQ ID NO:20

b) ICAM, 例如

CCCCCACCCTTCCCCTCTC

SEQ ID NO:21

CTCCCCCACCCTTCCCCTC

SEQ ID NO:22

GCTGGGAGCCATAGCGAGG

SEQ ID NO:23

c) ELAM-1, 例如

ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG

SEQ ID NO:24

CAATCAATGACTTCAAGAGTTC

SEQ ID NO:25

本发明的药物还适于如治疗由如因子 α -TNF 诱发的疾病。

有抗这种类型靶活性的本发明的序列(碱基序列)例如是:

a) α -TNF, 例如

TCATGGTGCCTTTGCAGCC

SEQ ID NO:32

TCATGGTGCCTTTGCAG

SEQ ID NO:33

该药物可以以药物制剂的形式使用, 其可例如表皮或口服给药, 如以片剂、包衣片剂、硬或软明胶胶囊、溶液、乳剂或悬液形式给药。它们可以经直肠, 例如以栓剂形式给药, 或者例如以

注射溶液的形式经胃肠道外给药。为了生产药物制剂，可将这些化合物配制在治疗上呈惰性的有机或无机赋形剂中。用于片剂、包衣片剂及硬明胶胶囊的这种赋形剂的例子是乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石和硬脂酸或其盐。用于生产溶液的适当的赋形剂是水、多元醇、蔗糖、转化糖和葡萄糖。用于生产注射液的适当的赋形剂是水、醇、多元醇、甘油和植物油。用于生产栓剂的适用的赋形剂是植物油和硬化油、石蜡、脂肪和半液态多元醇。药物制剂也可含防腐剂、溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、香味剂、改变渗透压的盐、缓冲剂、包衣组合物、抗氧化剂、以及必要时还会有其他治疗活性化合物。

优选的给药方法是口服给药。进一步的优选给药方法是注射。为此，可将反义寡核苷酸配制成溶液，较好是在生理上可接受的缓冲液如 Hank 氏溶液或 Ringer 氏溶液中配制。但根据本发明的治疗活性化合物也可配制成固体形式，并在使用前溶解或悬浮之。全身给药的优选剂量是每天每公斤体重大约 0.01mg 到大约 50mg。

图 1 表示在 10mM HEPES, 20mM $MgCl_2$; 1M NaCl; pH7.5 中，在 1 当量 (dA)₉ 存在下 [PMENA- t_9] 的紫外吸收度对温度的曲线；

图 2 表示用凝胶迁移证明 PMENA-DNA 的结合。

序列表：

ACACCCAATTCTGAAAATGG	SEQ ID NO:1
AGGTCCCTGTTTCGGGCGCCA	SEQ ID NO:2
GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA	SEQ ID NO:3

GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA	SEQ ID NO:4
GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTCCTG	SEQ ID NO:5
GTCTCCGCTTCTTCTCCTGCCATAGG	SEQ ID NO:6
GCGGGGCTCCATGGGGGTCG	SEQ ID NO:7
CAGCTGCAACCCAGC	SEQ ID NO:8
GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC	SEQ ID NO:9
AACGTTGAGGGGCAT	SEQ ID NO:10
GTGCCGGGGTCTTCGGGC	SEQ ID NO:11
GGAGAACATCATGGTCGAAAAG	SEQ ID NO:12
CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG	SEQ ID NO:13
GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG	SEQ ID NO:14
CACCCGCCTTGGCCTCCCAC	SEQ ID NO:15
GGGACTCCGGCGCAGCGC	SEQ ID NO:16
GGCAAACTTTCTTTCTCCTC	SEQ ID NO:17
GGGAAGGAGGAGGATGAGG	SEQ ID NO:18
GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG	SEQ ID NO:19
GCAGTAAGCATCCATATC	SEQ ID NO:20
CCCCCACCCTTCCCCTCTC	SEQ ID NO:21
CTCCCCCACCCTTCCCCTC	SEQ ID NO:22
GCTGGGAGCCATAGCGAGG	SEQ ID NO:23
ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG	SEQ ID NO:24
CAATCAATGACTTCAAGAGTTC	SEQ ID NO:25
GGTCCCTGTTCCGGGCGCCA	SEQ ID NO:26
GTGCCGGGGTCTTCGGG	SEQ ID NO:27
GGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:28
GGAGGATGCTGAGG	SEQ ID NO:29
CAGGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:30
GGCTGCCATGGTCCC	SEQ ID NO:31
TCATGGTGTCTTTGCAGCC	SEQ ID NO:32
TCATGGTGTCTTTGCAG	SEQ ID NO:33

实施例:

1) *N*-(4-甲氧基三苯基甲氧基)乙基氨基甲膦酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

1a) *N*-苄基甲氧基羰基-2-氨基乙醇

将 8.61g (0.141mol) 2-氨基乙醇溶解在 250ml 二恶烷和 150ml 水中。于 15-20°C, 首先加入 17.79g (0.212mol) NaHCO_3 , 然后数次加入 50g (0.148mol) 苄基甲氧基羰基-*N*-琥珀酰亚胺。将混合物于室温下搅拌 1 小时, 然后蒸发至干。使残留物分配在二氯甲烷(DCM)和 H_2O 之间, 用 Na_2SO_4 干燥有机相并在真空下蒸发除去溶剂。残留物加 100ml 乙醚搅拌, 抽吸过滤产物并用水洗。产率为 38.77g (97%)。

MS (ES⁺): 284.2 (M+H)⁺; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS):
 δ = 3.05 (dd, 2H, CH_2OH); 3.39 (dd, 2H, N=CH₂); 4.25 (m, 3H, Ar-CH-CH₂); 4.61 (t, 1H, OH); 7.14-7.98 (m, 15H, Ar-H, NH).

1b) *N*-苄基甲氧基-2-氨基-1-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙烷

于 0°C 用 5.93g (45.93mmol) 二异丙基乙胺 (DIPEA) 和 10.91g (35.3mmol) 4-甲氧三苯基甲基氟处理溶解于 100ml 无水 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 中的 10g (35.3mmol) *N*-苄基甲氧基羰基-2-氨基乙醇 (得自实施例 1a), 于 0°C 搅拌 1 小时后于室温下搅拌 1 小时。蒸发反应混合物并使残留物分配于 DCM 和饱和 NaHCO_3 水溶液之间。水洗有机相并用 Na_2SO_4 干燥, 再于真空下蒸发除去溶剂。为了纯化产物, 在硅胶上 (首先

正庚烷/乙酸乙酯(EA)/三乙胺(TEA)70:29:1, 然后 EA/TEA 99:1)层析之。产率为 14.4g(73%)。

MS (FAB): 562.3 (M+Li)⁺; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS):
 δ = 2.95 (t, 2H, CH₂O-MMTr); 3.21 (dd, 2H, N-CH₂); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 4.25 (m, 3H, Ar-CH-CH₂); 4.61 (t, 1H, OH); 6.80-7.96 (m, 23H, Ar-H, NH).

1c) 2-氨基-1-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙烷

室温下用 6.55g(90mmol)二乙胺处理溶解于 50ml 无水 DMF 中的 5.0g(9mmol)N-苄基甲氧羰基-2-氨基-1-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙烷(得自实施例 1b)并将混合物搅拌 2 小时。在硅胶上层析(首先正庚烷/EA/TEA 50:49:1, 然后 EA/甲醇/TEA 79:20:1)纯化之。产率为 2.96g(98.7%)。

MS (ES⁺): 340.3 (M+Li)⁺; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS):
 δ = 2.75 (t, 2H, CH₂O-MMTr); 2.93 (dd, 2H, N-CH₂); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 6.83-7.47 (m, 14H, Ar-H).

1d) 2-甲基亚氨基-1-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙烷(三聚体)

冰冷却下用 1.08g(13.22mmol) 37% 甲醛处理溶解于 10ml 甲醇中的 2.96g(8.9mmol)2-氨基-1-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙烷(得自实施例 1c), 并于室温下搅拌 4 小时, 形成粘性沉淀物。蒸发反应混合物, 并在硅胶上层析(正庚烷/EA/TEA 50:49:1)纯化所得残留物。产率为 1.7g(55%)。

MS (FAB): 1042.8 (M+Li)⁺; 1034.8 (M-H)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2.60 (t, 6H, O-CH₂); 2.99 (t, 6H, N-CH₂); 3.69 (s, 9H, OCH₃); 6.78-7.42 (m, 42H, Ar-H).

1e) 亚磷酸二(2-(4-硝基苯基)乙基)酯

在氩气环境下, 将 23.42g(0.1mol)亚磷酸二苯酯与 33.43g(0.2mol)对硝基苯基乙醇于 100°C 加热 14 小时, 然后在硅胶上层析(正庚烷/EA 50:50, 然后 EA/甲醇 80:20)纯化之。产率: 55%。

MS (FAB): 403.1 (M+Na)⁺; 381.1 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 3.03 (t, 4H, Ar-CH₂); 4.20 (4H, dt, O-CH₂); 6.71 (d, J=140Hz; 1H, PH); 7.52 (d, 4H, Ar-H); 8.17 (d, 4H, Ar-H).

1f) N-(4-甲氧基三苯甲氧基)乙氧基甲磷酸二-(2-(对硝基苯基)乙基)酯

将 341mg(0.329mmol)2-甲亚氨基-1-(4-甲氧基三苯甲氧基)乙烷(三聚物)(得自实施例 1d)加到溶解于 2ml 无水四氢呋喃(THF)中的 500mg(1.32mmol)亚磷酸二(2-(4-硝基苯基)乙基)酯(得自实施例 1e)中, 并将混合物于 80°C 搅拌 3 小时。蒸发掉溶剂并将残留物于 100°C 继续搅拌 30 分钟。在硅胶上层析(首先用 EA/TEA 99:1, 然后用 EA/甲醇/TEA 90:9:1 洗脱)纯化之。产率: 83%。

MS (FAB): 732.3 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2.64-3.06 (m, 10H, Ar-CH₂ + P-CH₂ + CH₂-OMMTr + N-CH₂); 3.73 (s, 3H, OCH₃); 4.16 (dt, 4H, PO-CH₂); 6.78-8.08 (m, 22H, Ar-H).

2) N-(N⁶-甲氧苯酰)胞嘧啶)-1-基-乙酰-N-(4-甲氧基三苯甲氧基)乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)

酯

2a) 将 0.952g (8.27 mmol) *N*-乙基吗啉 (*NEM*)、0.834g (2.76 mmol) (*N*⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酸和 1.153g (3.03 mmol) *O*-(7-氮杂)苯并三唑-1-基四甲基脒六氟磷酸盐 (*HATU*, *L. Carpino, J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 4397) 加到溶解于 60 ml 无水 *DMF* 中的 2.00g (2.76 mmol) *N*-(4-甲氧基三苯甲氧基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯 (得自实施例 1f) 中, 并将混合物于室温搅拌 12 小时。然后再一次加入同样量的 *HATU* 并将混合物继续室温搅拌 3 小时。在硅胶上层析 (*DCM*/*甲醇*/*TEA* 95:4:1) 以纯化之。产率为 2.7g (97%)。

MS (*ES*⁺): 1012.0 (*M*+*H*)⁺. ¹*H*-*NMR* (200 MHz, *DMSO*, *TMS*): δ = 2.94 (t, 4H, *P*-*O*-*CH*₂-*CH*₂-*Ar*); 3.06 (t, 2H, *MMTr*-*O*-*CH*₂); 3.23-3.63 (m, 4H, *P*-*CH*₂ + *N*-*CH*₂); 3.75 (s, 3H, *OCH*₃); 3.83 (s, 3H, *OCH*₃); 4.10 (dt, 4H, *P*-*O*-*CH*₂); 4.79 (s, 宽峰, 2H, *CO*-*CH*₂); 6.80-8.18 (m, 28H, *Ar*-*H*, 胞嘧啶基 -*H*); 11.03 (s, 宽峰 1H, *NH*).

2b) 制备如实施例 2a 中所述的混合物, 但用 *O*-(氟基(乙氧基羰基)亚甲氨基)-1,1,3,3-四甲基脒四氟硼酸盐 (*TOTU*, *EP* 0 460 446) 代替 *HATU*。产率为 57%。光谱数据: 见实施例 2a。

3) *N*-(*N*⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)单脂

(三乙铵盐)

将 1g(0.99mmol)*N*-(*N*⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(得自实施例 2)溶解于 20ml 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)在无水电腈中制成的 0.1M 溶液中,并将混合物室温搅拌 4 小时。使反应混合物分配于 DCM 和 KH_2PO_4 水溶液(pH7)之间,用 Na_2SO_4 干燥有机相并真空蒸发掉溶剂。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 70:29:1)纯化残留物。产率为 540mg(57%)。

MS (FAB): 906.5 (M-H+2Na)⁺; 884.6 (M+Na)⁺; 862.5 (M+H)⁺.
¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 3.00 (m, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar + MMTr-O-CH₂); 3.38-3.60 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂); 3.73 (s, 3H, OCH₃); 3.82 (s, 3H, OCH₃); 4.01 (dt, 2H, P-O-CH₂); 4.79 & 5.03 (每种情况下 s, 宽峰, 2H, CO-CH₂); 6.78-8.20 (m, 24H, Ar-H, 胞嘧啶基-H); 11.00 (s 宽峰, 1H, NH).

4)*N*-(*N*⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(2-羟基)乙氧基-甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

将 1.00g(0.99mmol)*N*-(*N*⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酰基-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(得自实施例 2)溶解于 80ml 80%乙酸水溶液中,并将所得溶液室温搅拌 4 小时。蒸发掉溶剂并将残留物与苯共蒸发两次。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 85:14:1)以纯化之。产率为 522mg(71%)。

MS (FAB): 761.2 (M+Na)⁺; 739.3 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2.98 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar) 3.38-3.67 (m, 4H, N-CH₂CH₂-OH); 3.80-3.89 (m, 2H, P-CH₂); 3.91 (s, 3H, OCH₃); 4.12 (dt, 4H, P-O-CH₂); 4.78 & 4.87 (每种情况下 s, 宽峰, 2H, CO-CH₂); 6.98-8.19 (m, 14H, Ar-H, 胞嘧啶基-H); 11.02 (s, 宽峰, 1H, NH).



按与实施例7相似的方法,从N-(N⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸(2-(对硝基苯基)乙基)单酯(三乙铵盐)(实施例3)和N-(N⁶-甲氧苯甲酰)-胞嘧啶-1-基-乙酰基-N-(2-羟基)乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(实施例4)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 85:14:1)纯化该化合物。产率: 73%。

MS (FAB): 1605 (M+Na)⁺; 1583 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2.94-3.18 (m, 6H, P-O-CH₂-CH₂-Ar) 3.26-3.95 (m, 10H); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 3.85 (s, 6H, OCH₃); 3.99-4.36 (m, 8H, P-O-CH₂); 4.75-4.92 (m, 宽峰, 4H, CO-CH₂); 6.83-8.18 (m, 38H, Ar-H, 胞嘧啶基-H); 10.98 & 11.03 (每种情况下 s, 宽峰, 2H, NH).



按实施例4的相似方法从“5'-MMTr-Cⁿ-P(ONPE)-Cⁿ-P(ONPE)₂”(实施例5)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 85:14:1)纯化该化合物。产率为74%。

MS(FAB): 1332.4(M+Na)⁺; 1310.3(M+H)⁺;



按实施例 1f 的相似方法, 但使用亚磷酸二乙酯进行合成。
产率为 87.5%。

MS (FAB): 490.2 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS):
 δ = 1.22 (t, 6H, CH₂-CH₃); 2.80 (t, 2H, N-CH₂); 2.91 (d,
J = 12.5 Hz, 2H, P-CH₂); 3.02 (t, 2H, CH₂-OMMTr); 3.75
(s, 3H, OCH₃); 4.01 (dq, 4H, PO-CH₂); 6.84-7.45 (m, 14H,
Ar-H).

8) N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧基三苯基甲
氧基)乙氧基甲磷酸二乙酯

将 570.3mg (4.22mmol) 羟基苯并三唑(HOBT)、972.1mg
(8.44mmol) NEM、777mg (4.22mmol) 胸腺嘧啶-1-基-乙
酸和 639mg (5.06mmol) 二异丙基碳二亚胺加入溶解于 50ml 无
水 DMF 中的 2.04g (4.22mmol) -N-(4-甲氧基三苯基甲氧
基)乙氧基甲磷酸二乙酯(实施例 7)的溶液内。将混合物室温搅
拌 16 小时。蒸发除去溶剂, 将残留物溶解在 DCM 中并用饱和
NaHCO₃ 水溶液提取该溶液, 然后再用 NaCl 水溶液饱和之。用
Na₂SO₄ 干燥提取物并蒸发除掉溶剂。在硅胶上层析(EA/甲醇/
TEA 98:2:1)纯化所得产物。产率为 2.47g (90%)。

MS (FAB): 662.3 (M+Na)⁺; 656.3 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200MHz,
DMSO, TMS): δ = 1.12-1.32 (m, 6H, CH₂-CH₃); 1.68 & 1.75
(每种情况下 s, 3H, T-CH₃); 3.10-3.40 (m, 2H, CH₂-
OMMTr); 3.53-3.70 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂); 3.75 (s, 3H,
OCH₃); 3.83-4.16 (m, 4H, PO-CH₂); 4.62 & 4.72 (每种情况
下 s, 2H, CO-CH₂); 6.83-7.42 (m, 15H, Ar-H, T-H); 11.28
(s, 1H, NH).

9) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸单乙酯(三乙铵盐)

将 811mg (1.25mmol) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸二乙酯(实施例 8)悬浮在 3.75ml 1N NaOH 中。将混合物于室温下搅拌 3 小时, 然后于 50°C 搅拌 6 小时, 在真空下浓缩反应混合物并在硅胶上层析 (EA/甲醇/TEA 100:10:10, 然后 100:40:10) 纯化残留物。产率为 897mg (99.5%)。

MS (ES⁻): 620.4 (M-H)⁻. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS): δ = 1.18 (t, 9H, N-CH₂-CH₃); 1.68 & 1.74 (各情况下 s, 3H, T-CH₃); 2.96-3.08 (q, 6H, N-CH₂-CH₃); 3.35 (m, 2H, N-CH₂); 3.43-3.70 (d, J = 11 Hz, 2H, P-CH₂); 3.63 (t, 2H, CH₂-OMMTr); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 3.78 (dq, 2H, PO-CH₂); 4.60 & 4.86 (各情况下 s, 2H, CO-CH₂); 6.82-7.41 (m, 15H, Ar-H, T-H); 11.24 (s, 1H, NH).

10) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(2-羟基)-乙氧基甲磷酸二乙酯

按实施例 4 的相似方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸二乙酯(实施例 8)进行合成。在硅胶上层析 (EA/甲醇 90:10) 纯化所得产物。产率 80%。

MS (FAB): 400.1 (M+Na)⁺; 378.1 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS): δ = 1.17-1.32 (m, 6H, CH₂-CH₃); 1.78 (s, 3H, T-CH₃); 3.40-3.69 (m, 4H, CH₂-OH + N-CH₂); 3.89 (d, J =

11 Hz, 2H, P-CH₂); 3.92-4.19 (m, 4H, PO-CH₂); 4.70 (s, 2H, CO-CH₂); 4.98 (t, 1H, OH); 7.22 & 7.30 (各情况下 s, 1H, T-H); 11.25 (s, 1H, NH).

11) *N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸二苯酯

按实施例 1f) 的方法进行合成, 但其中使用的是亚磷酸二苯酯。产率 100%。

MS(FAB); 58.2(M+Li)⁺。

12) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氨基甲磷酸单苯酯(三乙铵盐)

按实施例 9) 的相似方法从 *N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸二苯酯(实施例 11) 和胸腺嘧啶-1-基-乙酸进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA/H₂O 90:10:5:0.5)纯化该产物。产率 47%。

MS (FAB): 682.3 (M + 2Li-H)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1.16 (t, 9H, N-CH₂-CH₃); 1.67 & 1.72 (各情况下 s, 3H, T-CH₃); 2.96-3.70 (m, 12H, N-CH₂-CH₃ + N-CH₂ + P-CH₂ + CH₂-OMMT_r); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 4.58 & 4.88 (各情况下 s, 2H, CO-CH₂); 6.74-7.46 (m, 20H, Ar-H, T-H); 11.23 (s, 1H, NH).

13) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氨基甲磷酸苯基酯 4-硝基苯基乙基酯

用无水吡啶将 385.4mg(0.5mmol) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸单苯酯(三乙铵盐)(实施例 12) 和 92mg(0.55mmol) 4-硝基苯乙醇共蒸发

三次,然后溶解于15ml无水吡啶中。于0℃加入403.4mg(0.15mmol)3-硝基-1-(对甲苯磺酰基)-1H-1,2,4-三唑(TSNT),然后于0-5℃将混合物搅拌16小时,真空下蒸馏除去吡啶,将残留物重新溶解于EA中,并先用饱和NaHCO₃水溶液、再用NaCl溶液连续洗涤该所得溶液。在硅胶上层析(EA/TEA100:2)纯化所得产物。产率为162mg。

MS(FAB):831.3(M+2Li-H)⁺;(M+Li)⁺。

14)N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

按实施例8的相似方法从N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(实施例1f)和胸腺嘧啶-1-基-乙酸进行合成。产率63%。

MS (ES⁺): 898.4 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS):
δ = 1.65 & 1.72 (每种情况下 s, 3H, T-CH₃); 2.96 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3.06 (t, 2H, N-CH₂); 3.67 (d, J = 11Hz, 2H, P-CH₂); 3.70 (m, 2H, MMTr-O-CH₂); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 3.83 (s, 3H, OCH₃); 4.10 (dt, 4H, P-O-CH₂); 4.59 & 4.62 (每种情况下 s, 宽峰, 2H, CO-CH₂); 6.83-8.18 (m, 23H, Ar-H, T-H); 11.30 (s, 宽峰, 1H, NH).

15)N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸4-硝基苯基乙基单酯(三乙铵盐)

15a)从30mg N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸苯基酯4-硝基苯乙酯(实施例13)合成

将 30mg *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸苯基酯 4-硝基苯乙酯(实施例 13)溶解于 1ml TEA、1ml 二噁烷和 80mg 对硝基苯甲脞的混合物中,并将所得溶液室温搅拌 3 小时。真空蒸除溶剂并将残留物与吡啶共蒸发 3 次,再与甲苯共蒸发 2 次。在硅胶上层析(EA/TEA 100:2,然后 EA/甲醇/TEA 60:40:2)纯化残留物。产率为 23mg。

MS (FAB): 755.3 ($M + 2Li-H$)⁺. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1.15 (t, 9H, N-CH₂-CH₃); 1.60 & 1.79 (m, 3H, T-CH₃); 2.80-3.60 (m, 14H, N-CH₂-CH₃ + N-CH₂ + P-CH₂ + CH₂-OMMTTr + Ar-CH₂); 3.73 (s, 3H, OCH₃); 4.01 (dt, 2H, P-O-CH₂); 4.58 -4.92 (m, 2H CO-CH₂); 6.82-8.18 (m, 19H, Ar-H, T-H); 11.30 (s, 1H, NH).

15b)从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(实施例 14)合成

按实施例 3 的相似方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(实施例 14)开始合成。但其中使用吡啶作为溶剂。产率 82%。光谱数据见实施例 15a。

16) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸

按实施例 15b 的相似方法进行合成。以 18%的产率得到作为副产物的 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基

甲氧基)-乙氨基甲磷酸。

MS(ES⁻): 592.2(M-H)⁻。

17) 5'-MMTr-T-P(O-乙基)-T-P(O-乙基)₂

将 361mg(0.5mmol) N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氨基甲磷酸单乙酯(三乙铵盐)(9)和 188.7mg(0.5mmol) N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-羟基)-乙氨基甲磷酸二乙酯(10)与无水吡啶一起共蒸发 2 次, 然后溶解于 10ml 无水吡啶中。于 5-10℃ 加入 1.5mmol TSNT 并将混合物于室温下搅拌 16 小时。真空蒸发除掉吡啶, 将残留物溶解于 EA 中, 依次用 Na₂HCO₃ 饱和水溶液和 NaCl 溶液连续洗涤所得溶液。用 Na₂SO₄ 干燥后浓缩并在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 92: 8: 2) 纯化该残留物。产率为 223mg(46%)。

MS (FAB): 987.5 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS) 特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 6.82-7.43 (m, 16H); CO-CH₂: 4.59-4.78 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.63-1.80 (m, 6H).

18) 5'-HO-T-P(O-乙基)-T-P(O-乙基)₂

按实施例 4 的相似方法从 5'-MMTr-T-P(O-乙基)-T-P(O-乙基)₂(实施例 17) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 85: 15: 2, 然后改为 100: 50: 1.5) 纯化所得产物。产率为 95%。

MS (FAB): 731.2 (M+Na)⁺ 709.1. (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS) 特征性信号是: 胸腺嘧啶-H: 7.21-7.36 (m, 2H); CO-CH₂: 4.60-4.76 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.63-1.79 (m, 6H).

19) 5'-MMTr-T-P(O-苯基)-T-P(O-乙基)₂

按实施例 17 的相似方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(2-羟基)-乙氨基甲磷酸二乙酯(实施例 10)和 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氨基甲磷酸单苯酯(三乙铵盐)(实施例 12)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 93:7:2)纯化产物。产率 58%。

MS (FAB): 1051.4 (M+Na)⁺; 1029.5 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS) 特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 6.82-7.53 (m, 21H); CO-CH₂: 4.52-4.82 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.62-1.80 (m, 6H).

20) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(2-羟乙基)氨基甲磷酸二(4-硝基苯基乙基)酯

按实施例 4 的相似方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇 90:10)纯化产物。产率为 85%。

MS (ES⁺): 620.3 (M+H)⁺. ¹H-NMR (500MHz, DMSO, TMS): δ = 1.73 (s, 3H, T-CH₃); 2.97 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3.41 (m, 2H, N-CH₂); 3.59 (m, 2H, CH₂-OH); 3.83 (d, 2H, J = 11Hz; P-CH₂); 4.08-4.30 (m, 4H, P-O-CH₂); 4.54 & 4.78 (每种情况下 s, 宽峰, 2H, CO-CH₂); 4.99 (t, 1H, OH); 7.14-8.19 (m, 9H, Ar-H, 胸腺嘧啶-H); 11.30 (s, 宽峰, 1H, NH).

21) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(O-乙基)₂

按实施例 17 的相似方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(2-羟基)乙氧基甲磷酸二乙酯(实施例 10)和 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15) 进行合成。用 3-硝基-1-(2,4,6-三异丙基苯磺酰)-1*H*-1,2,4-三唑(TIPSNT) 代替 TSNT 进行偶联。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA95:5:2, 然后改为 90:10:2)纯化所得产物。产率>90%。

MS (ES⁺): 1109.0 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS)

特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 6.82-8.18 (m, 20H); CO-CH₂: 4.51-4.76 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.61-1.78 (m, 6H).

22) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按实施例 21 的相似方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(2-羟基)乙氧基甲磷酸二乙酯(实施例 10)和 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15) 进行合成。利用 3-硝基-1-(2,4,6-三异丙基苯磺酰)-1*H*-1,2,4-三唑(TIPSNT) 代替 TSNT 进行偶联。产率>90%。

光谱数据见实施例 21。

23) 5'-HO-T-P(ONPE)T-P(OEt)₂

按实施例 4 的相似方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 22) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA90:10:2, 然后是 80:20:2)纯化所得产物。产率为 75%。

MS (ES+): 836.3 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS)

特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 7.11-8.22 (m, 6H); CO-CH₂: 4.55-4.77 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.71 (s, 宽峰, 6H).

24) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(O-乙基)₂

将 10mg(0.012mmole)“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 23)溶解在 DBU 在吡啶中制成的 1ml0.5M 溶液内并先于 4℃ 搅拌 24 小时, 然后于室温搅拌 24 小时。真空下蒸发除去溶剂, 用戊烷消化残留物两次, 然后再用乙醚消化两次。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 9:1:0.2, 然后是 70:30:2, 再后是 60:40:2)纯化合成产物。产率:10.2mg。

MS (FAB): 725.3 (M + 2Na-H)⁺; 703.3 (M+Na)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS) 特征性信号是: 胸腺嘧啶-H: 7.15-7.70 (m, 2H); CO-CH₂: 4.67-4.92 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.67-1.81 (m, 6H).

25) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按实施例 17 的相似方法在 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂(实施例 22)和 N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15)中加入 1.5 当量基于实施例 23)N-氧化-4-甲氧基吡啶进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 90:10:2, 然后 85:15:2)纯化产物。产率 61%。

MS (ES+): 1555.8 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS) 特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 6.83-8.20 (m, 25H); CO-CH₂: 4.52-4.75 (m, 6H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.61-1.78 (m, 9H).

26) 5'-HO-T-P(ONPE)T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按与实施例 4 相似的方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 25)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 70:30:2)纯化所得产物。产率为 89%。

MS(ES⁺): 1283.1(M+H)⁺; 1305.0(M+Na⁺)。

27) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按与实施例 17 相似的方法在“5'-HO-T-P(ONPE)T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 26)和 N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15)中加入 1.5 当量(基于实施例 23)N-氧化-4-甲氧基吡啶进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 90:10:2, 然后 80:20:2)纯化所得产物。产率 15%。

MS (ES⁺): 2007 (M+H)⁺; 2029 (M+Na)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS) 特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 6.79-8.21 (m, 30H); CO-CH₂: 4.53-4.87 (m, 8H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.58-1.89 (m, 12H).

28) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按实施例 4 所述的相似方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 27)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 70:30:2)纯化

所得产物。产率为55%。

MS(FAB): 1735(M+H)⁺; 1757(N+Na)⁺。

29) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)₂

按实施例17所述的相似方法从N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(2-羟乙基)氨基甲磷酸二(4-硝基苯基乙基)酯(实施例20)和N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氨基磷酸4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例15)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 100:10:1, 然后90:10:1)纯化所得产物。产率为87%。

MS (FAB): 1356.2 (M + 2Li-H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS)

特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 6.82-8.18 (m, 28H); CO-CH₂: 4.50-4.71 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.59-1.78 (m, 6H).

30) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)₂

按实施例4所述相似方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)₂”(实施例20)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 85:15:1, 然后80:20:1)纯化所得产物。产率为78%。

MS (ES⁺): 1072.7 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS)

特征性信号是: Ar-H & 胸腺嘧啶-H: 7.08-8.20 (m, 14H); CO-CH₂: 4.52-4.80 (m, 4H); 胸腺嘧啶-CH₃: 1.70 (s, 宽峰, 6H).

31) 5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂

按实例17的相似方法从N-(N⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1

—基—乙酰—*N*—(4—甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 2—
(对硝基苯基)乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 3)和“5′—HO—C^{An}
—P(ONPE)—C^{An}—P(ONPE)₂”(实施例 6) 进行合成。在硅胶
上层析(EA/甲醇/TEA80:19:1)纯化所得产物。产率 66%。

MS (FAB): 2155 (M+H)⁺; 2161 (M+Li)⁺; 2177 (M+
Na)⁺。

32) 5′—HO—C^{An}—P(ONPE)—C^{An}—P(ONPE)—C^{An}—P
(ONPE)₂

按实施例 4 的相似方法从 5′—MMTr—C^{An}—P(ONPE)—
C^{An}—P(ONPE)—C^{An}—P(ONPE)₂(实施例 31) 进行合成。在硅
凝胶上层析(EA/甲醇/TEA 85:15:1, 然后 80:20:1)纯化所得
合成产物。产率为 70%。

MS (FAB): 1882 (M+H)⁺; 1904 (M+Na)⁺。

33) *N*—(N⁶—甲氧苯甲酰)胞嘧啶—1—基—乙酰—*N*—(4
—甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸烯丙基酯 2—(对硝基苯基)
乙基酯

按实施例 17 的相似方法从 *N*—(N⁶—甲氧苯甲酰)胞嘧啶
—1—基—乙酰—*N*—(4—甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸烯
丙基酯 2—(对硝基苯基)乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 3)和烯丙
醇进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA95:5:1)以纯化合成
的产物。

MS (ES⁺): 902.1 (M+H)⁺; 924.1 (M+Na)⁺. ¹H-NMR (200MHz,
DMSO, TMS): δ = 2.94-3.70 (m, 8H, P-O-CH₂-CH₂-Ar + MMTr-
O-CH₂ + N-CH₂ + P-CH₂); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 3.86 (s, 3H,
OCH₃); 4.10-4.60 (m, 4H, P-O-CH₂); 4.79 & 4.84 (各情况

下 s, 宽峰, 2H, CO-CH₂); 5.09-5.39 (m, 2H, H₂C = CH-); 5.71-6.00 (m, 1H, H₂C = CH-); 6.83-8.19 (m, 24H, Ar-H, 胞嘧啶基-H); 11.03 (s, 宽峰, 1H, NH).

34) *N*-(*N*⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-羟基)乙氧基甲磷酸烯丙基酯 2-(对硝基苯基)乙酯

按实施例 4 的相似的方法从 *N*-(*N*⁶-甲氧苯甲酰)胞嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸烯丙基酯 2-(对硝基苯基)乙酯(实施例 33)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 94:5:1)纯化所合成的产物。产率为 83%。

MS (ES⁺): 630.2 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS): δ = 3.02 (t, 2H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3.37-3.72 (m, 4H, HO-CH₂-CH₂); 3.86 (s, 3H, OCH₃); 3.91 (d, J = 11 Hz, 2H, P-CH₂); 4.22 (dt, 2H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 4.40 (dd, 2H, O-CH₂-CH=CH₂); 4.78 & 5.01 (m, 2H, CO-CH₂); 5.11-5.33 (m, 2H, H₂C = CH-); 5.71-6.00 (m, 1H, H₂C = CH-); 6.99-8.21 (m, 14H, Ar-H, 胞嘧啶基-H); 11.03 (s, 宽峰, 1H, NH).

35) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸烯丙基酯 2-(对硝基苯基)乙酯

按实施例 17 的相似的方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸 4-硝基苯基乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15)和烯丙醇进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 97:3:20)以纯化的合成的产物。产率为 100%。

MS(FAB); 805.3(M+Na)⁺.

36) N -胸腺嘧啶-1-基-乙酰- N -(2-羟基)乙氧基磷酸 2-(对硝基苯基)乙酯

按实施例 4 的相似方法从 N -胸腺嘧啶-1-基-乙酰- N -(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸烯丙酯 2-(对硝基苯基)乙基酯(实施例 35)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 90:10:2)纯化所合成的产物。产率为 86%。

MS(ES+); 511.1(M+H)⁺。

37) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-烯丙基)

按实施例 17 的相似方法从 N -胸腺嘧啶-1-基-乙酰- N -(2-羟基)-乙氧基甲磷酸烯丙酯 2-(对硝基苯基)乙基酯(实施例 36)和 N -胸腺嘧啶-1-基-乙酰- N -(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 90:10:2)以纯化所合成的产物。产率为 90%。

MS(FAB); 1257.3(M+Na)⁺。

38) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按实施例 17 的相似方法从“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 28)和 N -胸腺嘧啶-1-基-乙酰基- N -(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 80:20:2)以纯化所合成的产物。产率 57%。

MS(FAB): 2460(M+H)⁺; 2482(M+Na)⁺。

39) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按实施例 4 的相似方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 38) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 70:30:2) 以纯化所合成的产物。产率为 55%。

MS(FAB): 2209(M+Na)⁺。

40) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

将 4.0mg(0.00183mmol)“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 39) 溶解在 DBU 在吡啶中制成的 1.1ml 0.5M 溶液中并于室温下搅拌 24 小时。真空蒸发反应混合物并将残留物与甲苯一起搅拌几次。使用注射器除去溶剂，并用戊烷再次搅拌残留物，再次使用注射器除去溶剂。真空中干燥产物。所得强吸湿粉末的产率为 4mg。

MS(ES⁻): 1589.7(M-H)⁻; 1611.8(M+Na-2H)⁻。

41) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

a) 按实施例 17 的相似方法从“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 39) 和 N-胸腺嘧啶-1-基-乙碳基-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸 4-硝基苯基乙基单酯(三

乙铵盐) (实施例 15) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 80:20:2, 然后改为 70:30:2) 以纯化所合成的产物。

MS (FAB): 2934 ($M + Na$)⁺, 2957 ($M + 2Na - H$)⁺, 2978 ($M + 3Na - 2H$)⁺。

b) 按实施例 17 的相似方法从“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)” (实施例 28) 和“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)” (实施例 42) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 80:20:2, 然后为 70:30:2) 以纯化所合成的产物。在真空下蒸发除去溶剂得目标部分, 然后加戊烷和乙醚研制之。MS 检测结果同上。

42) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)

将 24.7mg (0.02mmol) “5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-烯丙基)” (实施例 37) 连同 16.2mg (0.12mmol) 二乙铵碳酸氢盐溶解于 2ml 无水 DCM 中。在 15-20°C, 在 2 分钟期间内滴加 13.9mg (0.012mmol) 四(三苯基膦) 钨(0) 和 2.1mg (0.008mmol) 三苯膦在 2ml 无水 DCM 中制成的溶液。室温下将混合物搅拌 30 分钟。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 80:20:1, 然后 60:40:1) 上述反应混合物以纯化所需产物。在真空下蒸发产物部分并先用戊烷、再用 EA/乙醚、然后用戊烷研磨残留物并在真空中干燥之。产率 57%。

MS (ES⁻): 1193.6 (M-H)⁻。

¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS): 特征性信号: $\delta =$
1.67 & 1.72 (每种情况下 s, 3H, T-CH₃); 4.60 & 4.82
(每种情况下 s, 2H, CO-CH₂); 6.83-8.19 (m, 24H, Ar-H, T-H);

43) $5' - HO - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(OEt)_2$

按实施例 4 的类似方法从“ $5' - MMT_r - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(OEt)_2$ ”(实施例 41) 进行合成。反应发生后浓缩反应混合物, 将残留物与甲苯共蒸发 3 次, 然后先与 EA/乙醚、再与戊烷一起搅拌。在真空中干燥残留物。

MS(FAB); 2662(M+Na)⁺。

44) $5' - HO - T - P(ONPE) - T - P(ONPE)(O - 烯丙基)$

按实施例 4 的方法从“ $5' - MMT_r - T - P(ONPE) - T - P(ONPE)(O - 烯丙基)$ ”(实施例 37) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 90:10:1, 然后改为 80:20:1) 纯化所需产物。产率为 87%。

MS(EAB); 963.0(M+H)⁺; 985.1(M+Na)⁺。

45) $5' - MMT_r - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE)(OH)$

a) $5' - MMT_r - T - P(ONPE) - T - P(ONPE) - T - P(ONPE)(O - 烯丙基)$

按实施例 17 的相似方法从“ $5' - HO - T - P(ONPE) - T - P(ONPE)(O - 烯丙基)$ ”(实施例 44) 和 N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰基-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 90:10:1, 然后改为 85:15:1) 纯化所合成的产物。产率 55%。

b) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)

按实施例 42 中所述使“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-烯丙基)”(实施例 45a)与四(三苯磷)-钨(0)反应。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 80:20:2, 然后 70:30:2)以纯化产物。在真空中蒸发产物物部分, 并加戊烷和乙醚研磨残留物。产率 98%。

MS(ES+; LiCl): 1654. 1(M+Li⁺)。

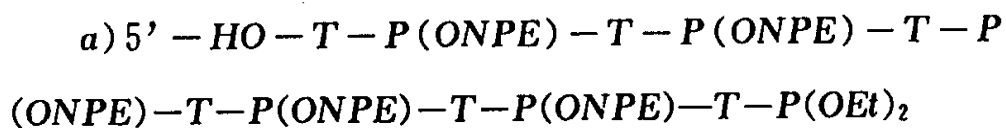
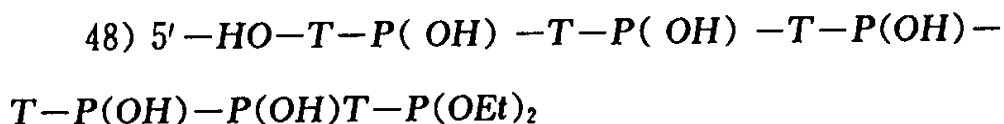
46) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

按实施例 17 的相似方法从 N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰基-N-(2-羟基)乙氨基甲磷酸二乙酯(实施例 10)和“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)”(实施例 45b)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 90:10:2, 然后 80:20:2)纯化该产物。加工、纯化和特征鉴定同实施例 27 中所述。

47) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

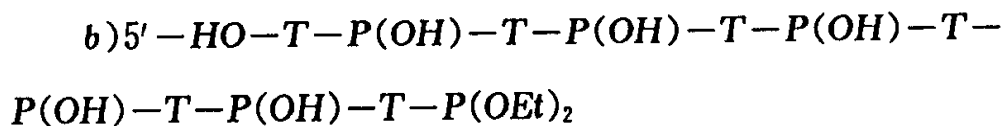
按实施例 17 的相似方法从“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 26)和“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)”(实施例 45b)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 80:20:2)纯化所合成的产物。真空中蒸发产物部分, 与甲苯共蒸发并用制备型 HPLC(高压液相层析法)纯化之; RPS LiChrospher 60, 水/乙

脞:1:1;0.1%乙酸铵;1ml/分钟。Rf=12.97分钟。



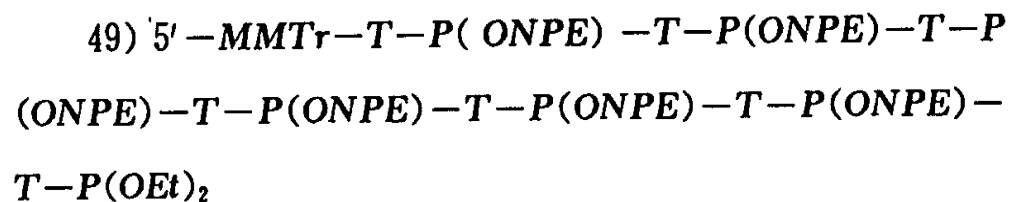
按实施例4的相似方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPT)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例47)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 70:30:2,然后改为60:40:2)以纯化所合成的产物。在真空蒸发产物部分,先加戊烷,再加乙醚搅拌残留物,并真空干燥之。产率100%。

MS(FAB):2662(M+Na)⁺,2684(M+2Ma-H)⁺,2706(M+3Na-2H)⁺。



使“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例48a)与DBU反应并按实施40所述相似方法处理。

MS(ES-):1892(M-H⁻);1915(M+Na-ZH)⁻



按实施例17的相似方法从“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OHPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例28)和

“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)
(OH)”(实施例 45b)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA
80:20:2,然后为 70:30:2)以纯化所得产物。真空下蒸发产物部
分,与甲苯共蒸发并用制备型 HPLC 纯化之:RP8 LiChrospher
60,水/乙腈:1:1;0.1%乙酸铵;1ml/分钟。Rf=15.24 分钟。

MS(FAB):3386(M+Na)⁺,3409(M+2Na-H)⁺。

50) 5'-OH-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P
(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)
-T-P(OEt)₂

按实施例 4 的相似方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-
T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P
(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 49)进行合
成。为纯化该产物,真空中蒸发并与甲苯共蒸发 3 次,先加戊烷再
加乙醚搅拌残留物,并真空干燥。产率:>90%。

MS(FAB):3114(M+Na)⁺。

51) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-
P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

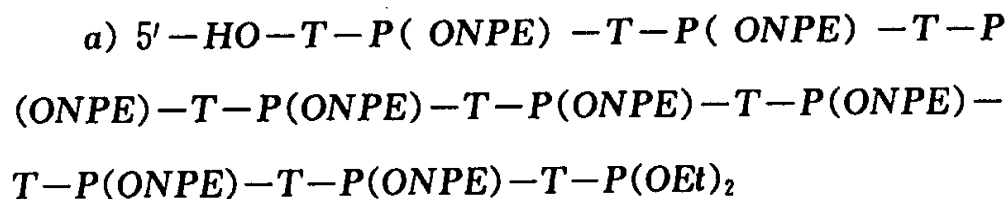
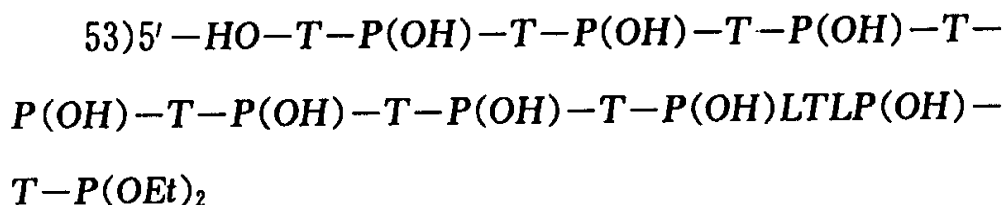
使“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P
(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-
T-P(OEt)₂”(实施例 50)与 DBU 反应并按实施例 40 的相似方
法处理。

MS(ES⁻):2196(M-H⁻)⁻;2218(M+Na-2H)⁻。

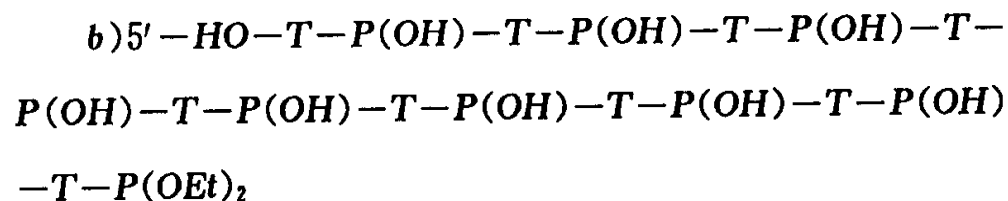
52) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P
(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-



按与实施例 17 相似的方法从“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 48a)和“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OHPE)(OH)”(实施例 45b)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/EA 70:30:2, 然后是 60:40:2)以纯化合成的产物。真空干燥产物部分, 与甲苯共蒸发并用制备型 HPLC 纯化之: RP8 LiChrospher 60, 水/乙腈:1:1; 0.1% 乙酸铵; 1ml/分钟。R_f=23.95 分钟。



按与实施例 4 相似的方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 52)进行合成。为了纯化产物, 在真空中蒸发并与甲苯共蒸发 3 次, 残留物先与戊烷再与乙醚一起搅拌, 并真空干燥。产率: >90%。



使“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂”(实施例 53a)与 DBU 反应并按实施例 40 所述相似方法进行处理。

MS(ES⁻): 2802(M-H⁻); 2825(M+Na-2H)⁻。

54) 2-(N'-叔丁氧基羰基氨基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

a) 1-甲基亚氨基-2-(N'-叔丁氧基羰基氨基)乙烷(三聚体)

冰冷却下用 1.5ml(18.72mmol)37% 甲醛处理溶解于 8ml 甲醇中的 2.0g(12.5mmol)2-氨基-1-(N'-叔丁氧基羰基氨基)乙烷,并将混合物室温搅拌/1 小时。将残留物重新溶解于 EA 中,先用饱和 NaHCO₃ 溶液洗两次再用 NaCl 溶液洗,干燥后过滤并真空蒸发。在硅胶上层析(EA/TEA 100:0.2,然后改为 EA/甲醇/TEA 90:10:0.2)。产率为 0.8g。

MS (FAB/LiCl) 523.4 (M + 2Li-H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS): δ = 1.38 (s, 27H, tBu-H); 2.40 (t, 6H, N-CH₂); 2.99 (t, 6H, N-CH₂); 3.25 (t, 6H, N-CH₂); 6.81 (t, 宽峰, 3H, NH).

b) 2-(N'-叔丁氧基羰基氨基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

按照与实施例 1f 相似的方法使 1-甲基亚氨基-2-(N'-叔丁氧基羰基氨基)乙烷(三聚物)(实施例 54a)与二(2-(4-硝基苯基))乙基)亚磷酸酯(实施例 1e)反应。在硅胶上层析(首先

甲苯/EA/TEA 20: 80:0.2; 然后 EA/TEA 100:0.2; 最后 EA/甲醇/TEA 0.5:5:0.2)。产率为 25%。

MS (ES⁺/LiCl) 553.3 (M+H)⁺, 559.3 (M+Li)⁺, ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS): δ = 1.37 (s, 9H, tBu-H); 2.83 (d, J=12Hz, 2H, P-CH₂); 2.55 (t, 4H, Ar-CH₂); 2.90-3.09 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-N); 4.16 (dt, 4H, PO-CH₂); 7.52 & 8.15 (每种情况下 d, 8H, Ar-H)。

55) N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰基-N-(2-N'-叔丁氧基羰基氨基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

按实施例 8 相似的方法从 2-(N'-叔丁氧基羰基氨基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯和胸腺嘧啶-1-基-乙酸进行合成。产率: 86%。

MS (FAB/LiCl): 725.3 (M+Li)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS): δ = 1.42 (s, 9H, tBu-H); 1.91 (s, 3H, T-CH₃); 2.99-3.58 (m, 8H, P-O-CH₂-CH₂-Ar & N-CH₂-CH₂-N); 3.75 (d, J=12Hz, 2H, P-CH₂); 4.06-4.38 (m, 4H, PO-CH₂); 7.37 & 8.15 (每种情况下 d, 8H, Ar-H)。

56) 与 DNA 相互作用: UV 融化曲线

以实例方式, 通过记录“5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂”(实施例 53b) 与 (dA)₉ 的 UV 融化曲线以证明本发明的化合物与互补核酸的相互作用。为此, 在各情况下均在 1ml 缓冲液 (1mM NaCl, 20mM Mg Cl₂, 10mM HEPES, pH 7.5) 中制备 0.3 OD 的“5'-HO-T

—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P—
(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OEt)₂”
和(dA)₉,并记录作为温度(0到80°C)函数的260nm的消光改
变。结果可在图1中看出。根据所得到的熔化曲线确定T_m值为
约23°C。

57)与DNA的相互作用:凝胶迁移实验

在凝胶迁移实验中将“5'—HO—T—P(OH)—T—P—
(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—
T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OEt)₂”(实施例53b)和(dA)₉
杂交,以实例证明本发明的化合物与互补核酸的相互作用,每种
情况下均将以上两物质自身或它们的1:1、1:2、1:5及1:10的
混合物加于非变性聚丙烯酰胺凝胶(20%,电泳缓冲液1×TBE,
10mM MgCl₂)上并确定电泳迁移。结果可从图2中看出:(dA)₉
迁移比“5'—HO—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—
P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—
—T—P(OEt)₂”快,在1:1混合物中两者只能微弱可见,而代之
以形成一条相当于两成分间的复合物的较慢的带。在2:1混合物
中,不再能看到(dA)₉,而新带是更加清楚。5:1或10:1混合物也
是这种情况,其中另外可测到明显过量的“5'—HO—T—P(OH)
—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P
(OH)—T—P(OH)—T—P(OH)—T—P(OEt)₂”。

58)5'—MMTr—T—P(ONPE)—T—P(O—乙基)₂(还参
见实施例21,另一种合成方法)

a) 将8.44mg(10μmol)N—胸腺嘧啶—1—基—乙酰—N—

(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 15)、3.77mg(10 μ mol)*N*-胸腺嘌呤-1-基-乙酰-*N*-(2-羟基)乙氧基甲磷酸二乙酯(实施例 10)和 64.6mg(500 μ mol)*N*-乙基二异丙基胺(DIPEA)溶解于 0.3ml 无水 DMF 中。向其中加入 44.2mg(100 μ mol)(苯并三唑基氧基)三(二甲氧基)磷六氟磷酸盐(BOP)。室温下将混合物搅拌 24 小时。根据 TLC(EA/甲醇/TEA 100:20:2; R_f =0.5)产率约为 70%

b) 按照实施例 58a 的相似方法合成,但使用 30 μ mol HATU (O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲翁六氟磷酸盐代替 100 μ mol BOP。根据 TLC 产率约为 65%。

59) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 2-(对硝基苯基)乙基酯 5'-[3'-(4-氧代戊酰)]胸腺嘧啶酯

按照实施例 17 的方法从 *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 4-硝基苯乙基单酯(三乙铵盐,实施例 15)和 3'-(4-氧代戊酰)胸腺嘧啶进行合成。在硅胶上层析(DCM/甲醇/TEA 98:2:0.25)纯化所得产物。产率为 46%。

MS(FAB/LiCl): 1071.4($M+Li$)⁺。

60) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 2-(对硝基苯基)乙基 5'-胸腺嘧啶二酯

将 64mg(0.06mmol) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氧基甲磷酸 2-(对硝基苯基)乙基酯 5'-[3'-(4-氧代戊酰)]胸腺嘧啶酯(实施例 59)溶解在 0.

5ml 二恶烷中。加入溶于 0.12ml 水中的 9mg (0.23mmol) NaBH_4 并将混合物于室温下搅拌 20 分钟。真空除去溶剂。将残留物重新溶解于 DCM 中并用水提取所得溶液,然后干燥之。在硅胶上层析(DCM/甲醇/TEA 92:8:0.5)以纯化所得产物。产率为 72%。

MS (FAB/LiCl): 973.4 (M+Li)⁺, 979.4 (M + 2Li-H)⁺, 985.4 (M + 3Li-2H)⁺.

61) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸 2-(对硝基苯基)乙基酯 5'-胸腺嘧啶脱氧核苷-3'-(*N,N*-二异丙基氨基磷酸氟乙酯)酯

将 31mg (0.032mmol) *N*-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸 2-(对硝基苯基)乙基 5'-胸腺嘧啶二酯(实施例 60)与无水 CH_3CN 共蒸发两次并溶解于 0.4ml 无水 THF 中。先向其中加入 12.4mg (0.096mmol) 二异丙基乙基胺,再加入 9.8mg (0.045mmol) 氟代二异丙基氨基磷酸氟乙酯。将混合物搅拌 3 小时,过滤并真空蒸发。产率为 63%。

MS (FAB/LiCl): 1173.3 (M+Li)⁺, 1180.4 (M + 2Li-H)⁺, 1186.4 (M + 3Li-2H)⁺.

62) *N*-[*N*⁹-(*O*⁶-二苯基氨基甲酰基-*N*²-乙酰鸟嘌呤)]乙酰-*N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

按实施例 2 的相似方法从 *N*-(4-甲氧三苯基甲氧基)-乙氧基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯和 *O*⁶-二苯基氨基甲酰

基-N²-乙酰鸟嘌呤乙酸进行合成。在硅胶上层析(EA/TEA 98:2)纯化所合成的产物。产率:87%。

MS(FAB/LiCl): 1154.8(M+H)⁺, 1160.7(M+Li)⁺。

63) N-[N⁹-(N⁴-甲氧苯甲酰)腺嘌呤]乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

按实施例2的相似方法从N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(实施例1f)和N⁴-甲氧苯甲酰腺嘌呤乙酸进行合成。在硅胶上层析(DCM/甲醇/TEA 95:4:1)纯化合成产物。产率:82%。

MS (ES⁺): 1035.7 (M+H)⁺. ¹H-NMR (200MHz, DMSO, TMS):
δ = 2.93 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3.09 (t, 2H, MMTr-O-CH₂); 3.23-3.75 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂); 3.75 (s, 3H, OCH₃); 3.87 (s, 3H, OCH₃); 4.08 (dt, 4H, P-O-CH₂); 5.28-5.42 (m, 2H, CO-CH₂); 6.81-8.20 (m, 28H, Ar-H, A-H); 11.00 (s broad, 1H, NH).

64) N-[N⁹-(N⁴-甲氧苯甲酰腺嘌呤)乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸单(2-(对硝基苯基)乙基)酯

按实施例3的相似方法从N-[N⁹-(N⁴-甲氧苯甲酰腺嘌呤)乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯(实施例63)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 65:35:2)以纯化产物。产率52%。

MS(FAB/LiCl) 874.3(M+2Li-H)⁺。

65) N-胸腺嘧啶-1-基-乙酰-N-(2-甲氧基)乙氨基甲磷酸二(2-(对硝基苯基)乙基)酯

按如实施例2所述的相似方法从 $N-(2\text{-甲氧基})\text{乙氨基甲磷酸二}(2\text{-}(\text{对硝基苯基})\text{乙基})\text{酯}$ (按实施例1所述相似方法从2-甲氧基乙胺开始, 经与甲醛和亚磷酸二(2-(4-硝基苯基)乙基)酯反应合成) 及胸腺嘧啶-1-基乙酸反应而合成。在硅胶上层析(EA/甲醇90:10)以纯化产物。产率:64%

MS(FAB/LiCl); 640.3(M+Li)⁺。

66) 5'-MMTr-Cⁿ-P(ONPE)-Cⁿ-P(ONPE)(O-烯丙基)

按照实施例17所述的相似方法从 $N-(N^6\text{-甲氧苯甲酰})\text{胞嘧啶-1-基-乙酰-N-(4-甲氧三苯基甲氧苯)乙氨基甲磷酸}(2\text{-}(\text{对硝基苯})\text{乙基})\text{单酯}$ (三乙铵盐, 实施例3) 和 $N-(N^6\text{-甲氧苯甲酰})\text{胞嘧啶-1-基-乙酰-N-(2-羟基)乙氨基甲磷酸烯丙基}2\text{-}(\text{对硝基苯基})\text{乙基二酯}$ (实施例34) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA85:14:1)以纯化合成产物。产率36%。

MS(FAB); 1474(M+H)⁺; 1496(M+Na)⁺。

67) 5'-HO-Cⁿ-P(ONPE)-Cⁿ-P(ONPE)(O-烯丙基)

按实施例4的相似方法从“5'-MMTr-Cⁿ-P(ONPE)-Cⁿ-P(ONPE)(O-烯丙基)” (实施例66) 进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA80:19:1)纯化所需产物。产率约55%。

MS(FAB); 1201.3(M+H)⁺, 1223.3(M+Na)⁺。

68) 5'-MMTr-Cⁿ-P(ONPE)-Cⁿ-P(ONPE)-Cⁿ-P(ONPE)(O-烯丙基)

按照实施例 17 所述的相似方法从 $N-(N^6\text{-甲氧苯甲酰})$ —胞嘧啶—1—基—乙酰— $N-(4\text{-甲氧三苯基甲氧基})$ 乙氨基甲磷酸 2—(对基苯基)乙基单酯(三乙铵盐)(实施例 3)和 $5'\text{-HO}-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O\text{-烯丙基})$ (实施例 67)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA80:20:1)以纯化产物。产率 58%

MS(FAB): 2046(M+H)⁺; 2068(M+Na)⁺。

69) $5'\text{-MMTr}-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(OH)$

按照实施例 42 的相似方法从“ $5'\text{-MMTr}-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O\text{-烯丙基})$ ”(实施例 68)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA 60:38:2)以纯化所得产物。产率:66%。

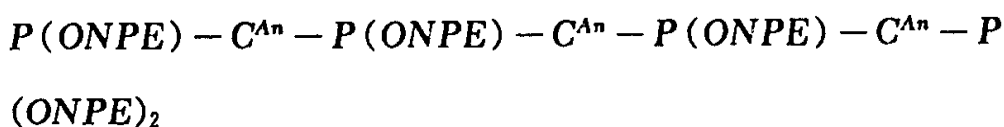
MS(FAB): 2027(M+Na)⁺; 2049(M+2Na-H)⁺。

70) $5'\text{-MMTr}-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)_2$

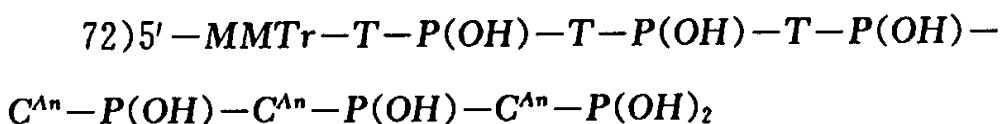
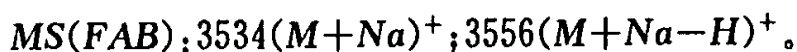
按照实施例 17 的相似方法从“ $5'\text{-MMTr}-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(OH)$ ”(实施例 69)和“ $5'\text{-HO}-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)_2$ ”(实施例 32)进行合成。在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA70:30:2)以纯所得需产物。产率:58%。

MS(FAB): 3892(M+Na)⁺; 3914(M+2Na-H)⁺。

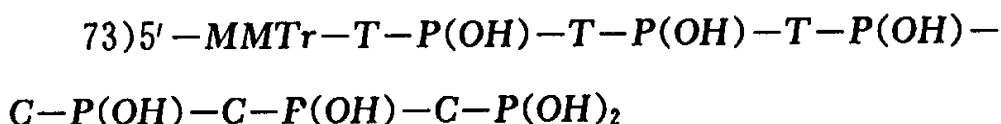
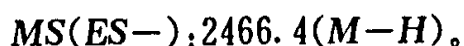
71) $5'\text{-MMTr}-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-$



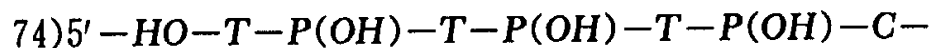
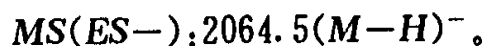
按照实施例 17 的相似方法从“5'-MMTr 从 T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)”(实施例 45) 和“5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂”(实施例 32) 进行合成。为纯化产物,在硅胶上层析(EA/甲醇/TEA60:40:2)。真空蒸发产物部分并用制备性 HPLC(高压液相层析法)纯化之: RP8 LiChrosper 60, 水/乙腈:1:1;0.1%乙酸铵;1ml/分钟。R_f=16.6 分钟。



按照实施例 40 的相似方法从“5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂”(2mg)(实施例 71) 合成。

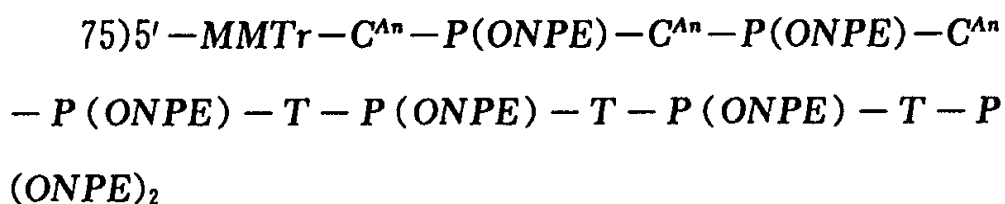
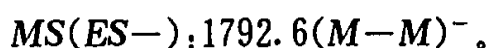


用 3ml 33% NH₄OH 水溶液处理约 1mg“5'-MMTr-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-C^{An}-P(OH)-C^{An}-P(OH)-C^{An}-P(OH)₂”(实施例 72) 并于室温下搅拌 24 小时。真空蒸发反应混合物。产率: 约 0.6mg(19 OD)。

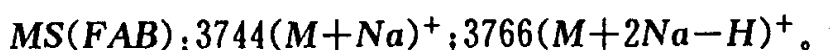




将 8 OD 的“5'-MMTr-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)₂”(实施例 73) 溶解于 0.5ml 水中并加到 Poly pakTM (Glen Research, #60-1100-10) 上。按制造商的说明 (Glen Research User Guide) 除去 MMTr 基团。产率: 约 0.35mg(11 OD)。



按照实施例 17 的相似方法从“5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(OH)” (实施例 69) 和“5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OHPE)-T-P(OEt)₂” (实施例 26) 合成。在硅凝胶上层析 (EA/甲醇/TEA 80:20:2; 然后 70:30:2) 以纯化合成的产物。产物部分与甲苯共蒸发, 真空蒸发并加戊烷研磨。产率: 48%。



序列表

(1) 一般信息:

(iii) 申请人:

(A) 名称: *Hoechst Aktiengesellschaft*

(C) 城市: *Frankfurt*

(E) 国家: 德国

(F) 邮政编码: 65926

(ii) 申请的题目: 磷酸基单酯核酸, 其制备方法及应用

(iii) 序列数: 33

(iv) 计算机可读形式:

(A) 媒体类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: Patent Release[#] 1.0, Version[#] 1.25(EPO)

(2) SEQ ID NO: 1 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 反义: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 外显子

(B) 定位: 1..20

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

ACACCCAATT CTGAAAATGG

(2) SEQ ID NO: 2 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..20

(xi)序列描述:SEQ ID NO:2:

AGGTCCCTGT TCGGGCGCCA

(2)SEQ ID NO:3 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:28 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..28

(xi)序列描述:SEQ ID NO:3:

GTCGACACCC AATTCTGAAA ATGGATAA

(2)SEQ I NO:4 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:25 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..25

(xi)序列描述:SEQ ID NO:4:

GCTATGTCGA CACCCAATTC TGAA

(2)FORSEQ ID NO:5:的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:26 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)名称/键:外显子

(B)定位:1..26

(xi)序列描述:SEQ ID NO:5:

GTCGCTGTCT CCGCTTCTTCTTCCTG

(2)SEQ ID NO:6 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 27 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 反义: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 外显子

(B) 定位: 1..27

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

GTCTCCGCTT CTTCTTCCTG CCATAGG

(2) SEQ IN NO: 7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 反义: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 外显子

(B) 定位: 1..20

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

CCGGGGCTCC ATGGGGGTCC

(2)SEQ ID NO:8 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:15 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..15

(xi)序列描述:SEQ ID NO:8:

CAGCTGCAAC CCAGC

(2)SEQ ID NO:9 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:21 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..21

(xi)序列描述:SEQ ID NO:9:

GGCTGCTGGA GCGGGGCACA C

(2)SEQ ID NO:10 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:15 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..15

(xi)序列描述:SEQ ID NO:10:

AACGTTGAGG GGCAT

(2)SEQ IN NO:11 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:18 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..18

(xi)序列描述:SEQ ID NO:11

GTGCCGGGGT CTTCGGGC

(2)SEQ IDNO:12 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:21 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..21

(xi)序列描述:SEQ ID NO:12:

GGAGAACATC ATGGTCGAAAG

(2)SEQ ID NO:13 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:22 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..22

(xi)序列描述:SEQ ID NO:13:

CCCGAGAACA TCATGGTCGA AG

(2)SEQ ID NO:14 的信息:

(i)序列特征:

(A)长度:20 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..20

(xi)序列描述:SEQ ID NO:14:

GGGGAAAGCC CGGCAAGGGG

(2)SEQ ID NO:15 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:20 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..20

(xi)序列描述:SEQ ID NO:15:

CACCCGCCTT GGCCTCCCTC

(2)(2)SEQ ID NO:16 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:18 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..18

(xi)序列描述:SEQ ID NO:16:

GGGACTCCGG CGCAGCGC

(2)SEQ ID NO:17 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:20 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..20

(xi)序列描述:SEQ ID NO:17:

GGCAAAC TTT CTTTTCCTCC

(2)SEQ ID NO:18 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:19 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..19

(xi)序列描述:SEQ ID NO:18:

GGGAAGGAGG AGGATGAGG

(2)SEQ ID NO:19 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:21 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..21

(xi)序列描述:SEQ ID NO:19:

GGCAGTCATC CAGCTTCGGAG

(2)SEQ ID NO:20 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:18 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..18

(xi)序列描述:SEQ ID NO:20:

GCAGTAAGCA TCCATATC

(2)SEQ ID NO:21 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:20 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..20

(xi)序列描述:SEQ ID NO:21:

CCCCCACCAC TTCCCCACTC

(2)SEQ ID NO:22 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:20 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..20

(xi)序列描述:SEQ ID NO:22;

CTCCCCCACC ACTTCCCCTC

(2)SEQ ID NO:23 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:19 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..19

(xi)序列描述:SEQ ID NO:23;

GCTGGGAGCC ATAGCGAGG

(2)SEQ ID NO:24 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:21 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..19

(xi)序列描述:SEQ ID NO:24:

ACTGCTGCCT CTTGTCTCAGG

(2)SEQ ID NO:25 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:22 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..22

(xi)序列描述:SEQ ID NO:25:

CAATCAATGA CTTCAAGAGT TC

(2)SEQ ID NO:26 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:19 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..19

(xi)序列描述:SEQ ID NO:26:

GGTCCCTGTT CGGGCGCCA

(2)SEQ ID NO:27 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:17 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..17

(xi)序列描述:SEQ ID NO:27:

GTGCCGGGGTCTTCGGG

(2)SEQ ID NO:28 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:17 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..17

(xi)序列描述:SEQ ID NO:28:

GGAGGATGCT GAGGAGG

(2)SEQ ID NO:29 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:14 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..14

(xi)序列描述:SEQ ID NO:29:

GGAGGATGCT GAGG

(2)SEQ ID NO:30 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 反义: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 外显子

(B) 定位: 1..19

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 30:

CAGGAGGATG CTGAGGAGG

(2) SEQ ID NO: 31 的信息

(i) 序列特征:

(A) 长度: 15 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单股

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 反义: 是

(ix) 特征:

(A) 名称/键: 外显子

(B) 定位: 1..15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 31:

GGCTGCCATG GTCCC

(2)SEQ ID NO:32 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:20 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..20

(xi)序列描述:SEQ ID NO:32:

TGATGGTGTC CTTTGCAGCC

(2)SEQ ID NO:33 的信息

(i)序列特征:

(A)长度:18 碱基对

(B)类型:核酸

(C)链型:单股

(D)拓扑结构:线性

(ii)分子类型:DNA(基因组)

(iii)反义:是

(ix)特征:

(A)名称/键:外显子

(B)定位:1..18

(xi)序列描述:SEQ ID NO:33:

TCATGGTGTC CTTTGCAG

图 1 在 1 当量(dA)q 存在下[PMENA-t₉]的 UV 吸收对温度的曲线

10 mM HEPES, 20 mM MgCl₂; 1M NaCl; pH 7,5

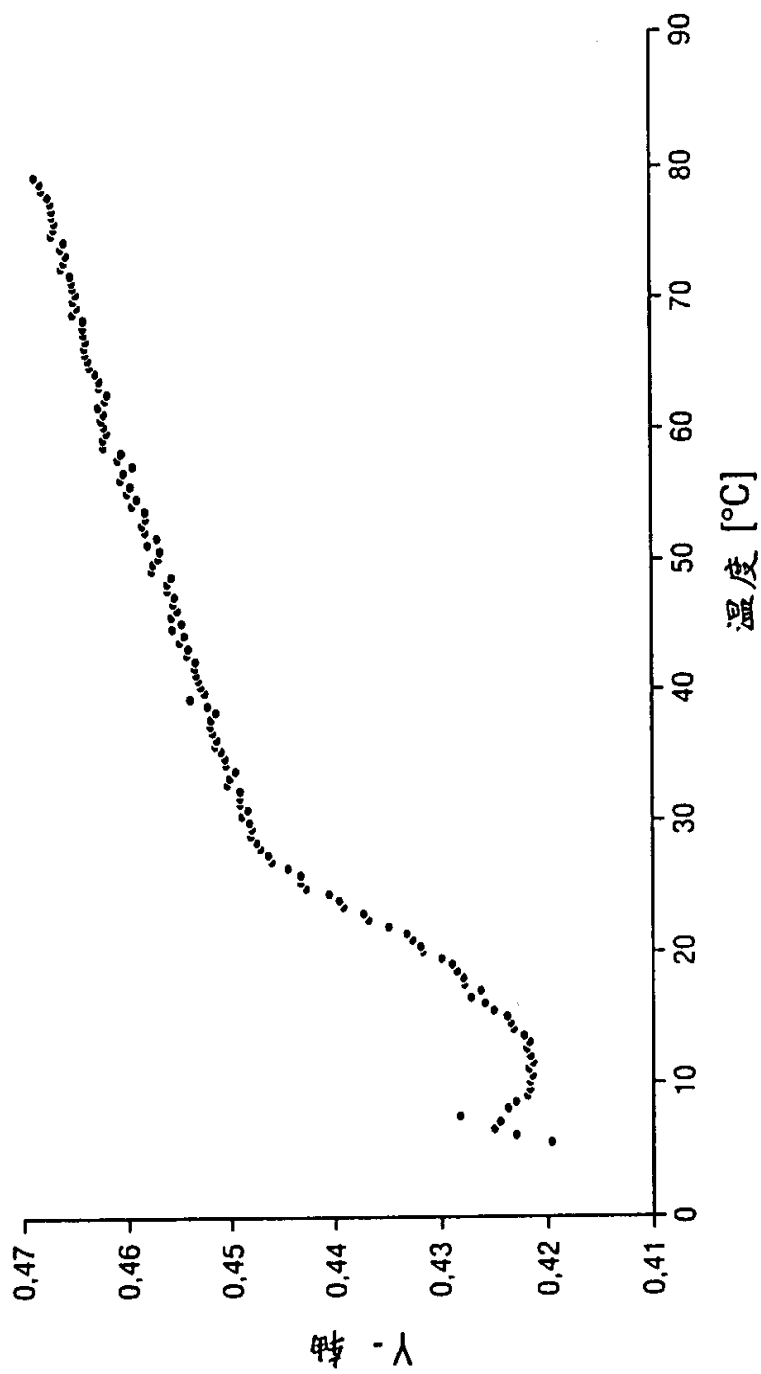


图2

PMENA—DNA 结合的凝胶迁移证据

