



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110475784 B

(45) 授权公告日 2024.07.16

(21) 申请号 201880022722.3

(22) 申请日 2018.03.20

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110475784 A

(43) 申请公布日 2019.11.19

(30) 优先权数据  
17163506.3 2017.03.29 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2018/057069 2018.03.20

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/177825 EN 2018.10.04

(73) 专利权人 罗氏创新中心哥本哈根有限公司  
地址 丹麦霍尔斯特姆

(72) 发明人 K·布莱谢尔 E·D·丰德  
D·J·汉森

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 陈润杰 黄革生

(51) Int.Cl.  
C07H 1/00 (2006.01)  
C07H 21/02 (2006.01)  
C07H 21/04 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 104661664 A, 2015.05.27  
Natsuhisa Oka, et al..Solid-Phase  
Synthesis of Stereoregular  
Oligodeoxyribonucleoside  
Phosphorothioates Using Bicyclic  
Oxazaphospholidine Derivatives as Monomer  
Units.《Journal of the American Chemical  
Society》.2008,第130卷(第47期),第16031-  
16037.

审查员 柴莹莹

权利要求书3页 说明书35页 附图4页

(54) 发明名称

用于制备立体限定硫代磷酸酯寡核苷酸的正交保护基

(57) 摘要

本发明涉及立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸领域、包含含胺手性助剂基团的立体限定核苷单体、以及正交保护寡核苷酸合成期间手性助剂的氮、防止延伸后链裂解、提高立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的收率和纯度的方法。

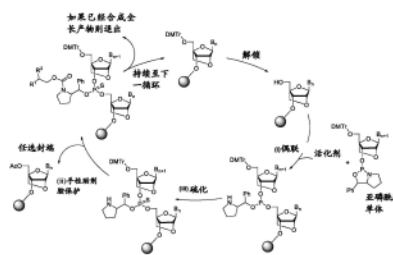


图 1

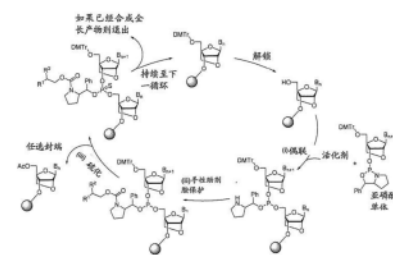
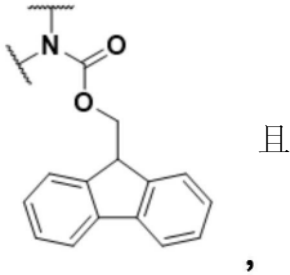


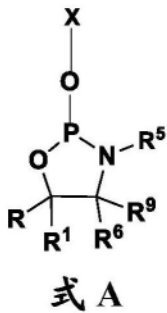
图 2

1. 用于合成立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的方法, 该方法包括步骤(i)使氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体与核苷的5'-OH基团偶联, 然后是步骤(ii)用氨基甲酸酯保护基保护氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺基, 和(iii)硫化, 其中该硫化步骤(iii)在偶联步骤(i)之后和胺保护步骤(ii)之前或之后进行, 其中步骤(ii)中涉及的胺的氨基甲酸酯保护基选自



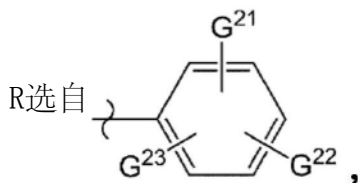
其中该方法还包括封端步骤(iv), 其在胺保护步骤(ii)之后进行。

2. 权利要求1的方法, 其中硫化步骤(iii)在胺保护步骤之前进行。
3. 权利要求1的方法, 其中硫化步骤(iii)在胺保护步骤之后进行。
4. 权利要求1的方法, 其中封端步骤(iv)在硫化步骤之前或之后进行。
5. 权利要求1的方法, 其中在固体支持物上合成寡核苷酸。
6. 权利要求1的方法, 其中在已经除去胺的氨基甲酸酯保护基之后, 在进行全面脱保护/从固体支持物上裂解之前除去手性助剂。
7. 权利要求6的方法, 其中胺的氨基甲酸酯保护基除去步骤进行少于8小时。
8. 权利要求6的方法, 其中胺的氨基甲酸酯保护基除去步骤在室温进行。
9. 权利要求1至8任一项的方法, 其中步骤(i)中使用的氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体具有式A:



其中X为核苷,

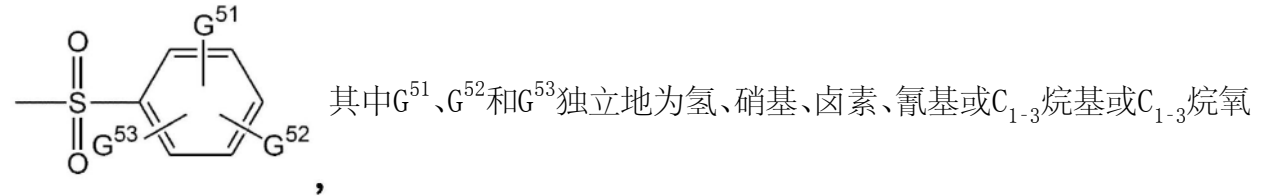
R<sup>1</sup>选自氢和C<sub>1-3</sub>烷基; R<sup>9</sup>为氢;



其中G<sup>21</sup>、G<sup>22</sup>和G<sup>23</sup>独立地为氢、硝基、卤素、氰基或C<sub>1-3</sub>烷基; 甲



芳烷基、C<sub>1-4</sub>烷基C<sub>6-14</sub>芳基、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>6-14</sub>芳基和C<sub>6-14</sub>芳基C<sub>1-4</sub>烷基；砜；



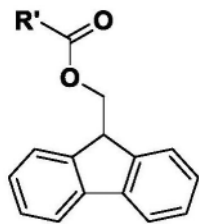
基；

R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>与式A的N原子一起形成包含3-16个碳原子的杂环。

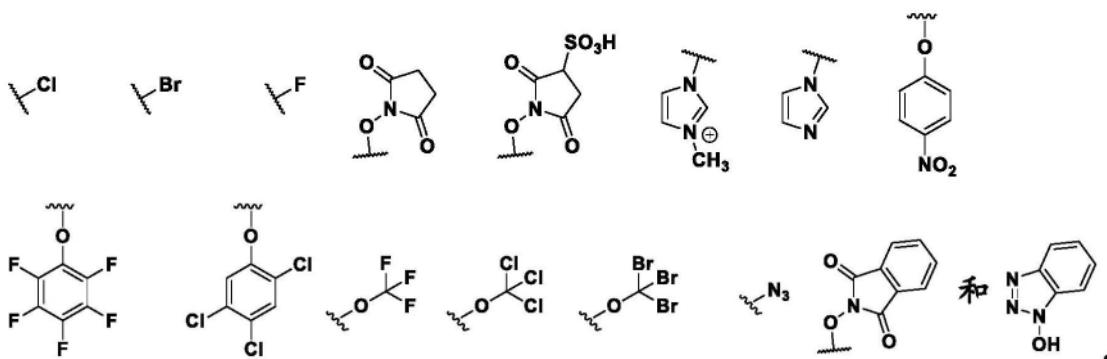
10. 权利要求9的方法，其中步骤i)中使用的氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体中，R为苯基，R<sup>1</sup>为H或甲基，R<sup>9</sup>为H，且R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>与式A的N原子一起形成包含4个碳原子和1个N的杂环。

11. 权利要求1-8任一项的方法，其中步骤(ii)包括使氨基甲酸酯前体和步骤(i)中提供的偶联的含胺手性助剂亚磷酰胺单体在一定条件下反应，该条件允许手性助剂的氮被氨基甲酸酯保护基取代。

12. 权利要求11的方法，其中氨基甲酸酯前体选自：



其中R'为离去基团，选自如下的离去基团：



13. 权利要求1-8任一项的方法，其中偶联步骤(i)在包含乙腈和芳族杂环溶剂和任选的活化剂的乙腈溶剂组合物中进行，其中所述芳族杂环溶剂选自吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、3-甲基吡啶、卢惕啶和吡咯，且其中所述活化剂包含N-甲基咪唑。

14. 权利要求13的方法，其中芳族杂环溶剂在20℃于水中具有pKa 4-7或7-17。

15. 权利要求13的方法，其中所述芳族杂环溶剂在乙腈溶剂组合物中的浓度为0.1%至50% v/v。

16. 权利要求13的方法,其中所述活化剂包含N-甲基咪唑,和4,5-二氰基咪唑(DCI)、四唑或5-(苄硫基)-1H-四唑。

17. 权利要求16的方法,其中全面脱保护和从固体支持物上裂解的步骤在少于8小时的时期进行。

18. 权利要求17的方法,其中全面脱保护和从固体支持物上裂解的步骤在4小时的时期进行。

## 用于制备立体限定硫代磷酸酯寡核苷酸的正交保护基

### 发明领域

[0001] 本发明涉及立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸(stereodefined phosphorothioate oligonucleotides)领域和包含含胺手性助剂基团的立体限定的核苷单体,以及在寡核苷酸合成期间正交保护手性助剂的氮、防止延伸后链裂解、增加立体限定硫代磷酸酯寡核苷酸的收率和纯度的方法。所述正交保护基也可以快速地被除去,典型地在4小时内。

### [0002] 发明背景

[0003] 立体限定的硫代磷酸酯核苷间连接键在寡核苷酸中的应用,允许优化治疗性寡核苷酸的药理学特征。然而,与非立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸相比,立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的制备目前相对低效。因此需要改善立体限定的寡核苷酸的合成效率。

[0004] Oka等人,J.AM.CHEM.SOC.2008,130,16031-16037报道了使用双环氧杂氮杂磷杂环戊烷(oxazaphospholidine)衍生物固相合成立体常规(stereoregular)DNA硫代磷酸酯。在Oka等人的方法中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂上的胺通过三氟乙酰化被保护。

[0005] EP 2 620 428A1的[0015]段报道了三氟乙酰基的除去引起长DNA链或化学不稳定RNA链合成的问题,可能是由于链分解或完全除去该基团中的问题。EP 2 620 428A1提出使用不同的手性助剂。

[0006] 本发明基于以下发现:Oka等人的方法导致显著的过早链终止,并且在氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺上使用氨基甲酸酯保护基而不是三氟乙酰基保护基,允许手性助剂的快速和有效脱保护和裂解,同时避免过早的链终止。

### [0007] 发明描述

[0008] 本发明提供一种合成立体限定硫代磷酸酯寡核苷酸的方法,该方法包括以下步骤:(i)使氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体与核苷的5'-OH基团偶联,接着是步骤(ii)用氨基甲酸酯保护基保护氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺基,并且(iii)硫化,其中硫化步骤(iii)在偶联步骤(i)之后和胺保护步骤(ii)之前或之后进行。

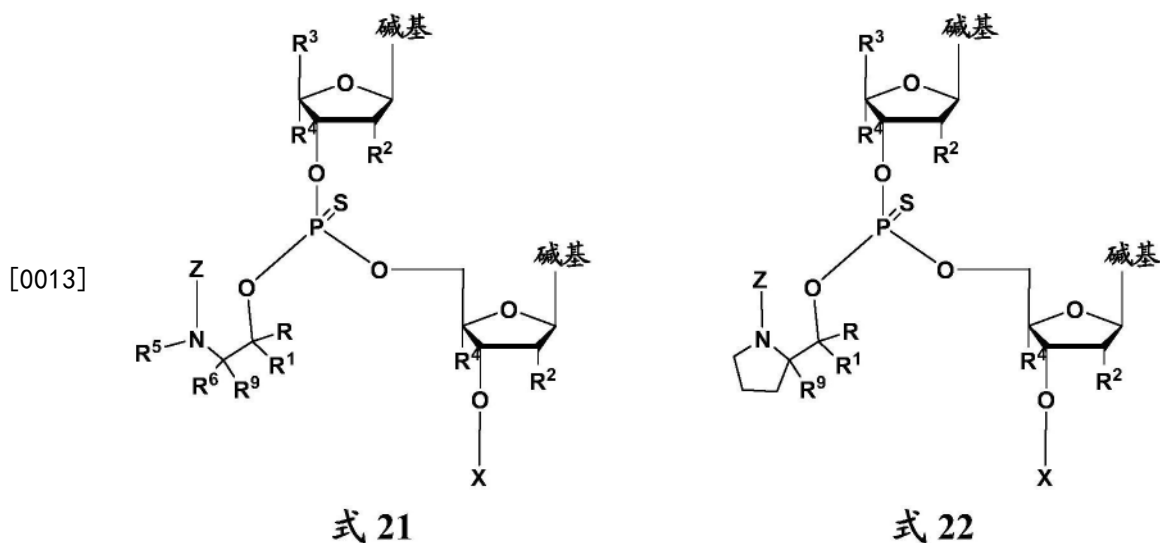
[0009] 本发明提供一种合成立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的方法,该方法包括以下步骤:(i)使氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺(phosphoramidite)单体偶联至核苷的5'-OH基团,生成亚磷酸三酯中间体,然后步骤(ii)用氨基甲酸酯保护基保护氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺基,并且(iii)用硫化试剂氧化亚磷酸三酯中间体,其中硫化步骤(iii)在偶联步骤(i)之后和胺保护步骤(ii)之前或之后进行。

[0010] 本发明提供一种合成立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的方法,该方法包括以下步骤:(i)使氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体偶联至与固体支持物结合的核苷的5'-OH基团,生成亚磷酸三酯中间体,然后是步骤(ii)用氨基甲酸酯保护基保护氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺基,并且(iii)用硫化试剂氧化亚磷酸三酯中间体,其中硫化步骤(iii)在偶联步骤(i)之后和胺保护步骤(ii)之前或之后进行,然后去除氨基甲酸酯保护基和从固体支持物上裂解寡核苷酸。

[0011] 本发明提供了使用氨基甲酸酯保护基如正交氨基甲酸酯保护基在手性助剂基团上,以防止在立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的合成过程中寡核苷酸的链断裂。被阻止的

链断裂可以是磷酸三酯上的链断裂。

[0012] 本发明提供了式21或22的化合物，



[0014] 其中X为固体支持物或连接至固体支持物的在先 (preceding) 核苷 (末端5' -OH基团) ;碱基为核碱基;

[0015]  $R^5$ 和 $R^6$ 独立地选自氢、烷基、环-烷基、芳基、杂芳基、取代的烷基、取代的环-烷基、取代的芳基和取代的杂芳基,或 $R^5$ 和 $R^6$ 与式(I)的N原子一起形成包含3-16个碳原子的杂环;

[0016]  $R^1$ 选自氢和 $C_{1-3}$ 烷基; $R^9$ 为氢;

[0017] R选自芳基、杂芳基、取代的芳基、取代的杂芳基、硝基、卤素、氰基、甲硅烷基、取代的甲硅烷基、砷、取代的砷(芳基取代的砷)、苄和取代的苄;

[0018]  $R^3$ =选自 $CH_2ODMTr$ 、 $CH_2$ -烷基-0-DMTr、 $CH-Me-0-DMTr$ 、 $CH_2OMMTr$ 、 $CH_2$ -烷基-0-MMTr、 $CH(Me)-0-MMTr$ 、 $CH-R^a-0-DMTrR^b$ 和 $CH-R^a-0-MMTrR^b$ ;

[0019]  $R^2$ 选自卤素如-F、氨基、叠氮基、-SH、-CN、-OCN、-CF<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-O( $R_m$ )-烷基、-S( $R_m$ )-烷基、-N( $R_m$ )-烷基、-O( $R_m$ )-烯基、-S( $R_m$ )-烯基、-N( $R_m$ )-烯基;-O( $R_m$ )-炔基、-S( $R_m$ )-炔基或-N( $R_m$ )-炔基;0-亚烷基(alkylenyl)-0-烷基、炔基、烷芳基、芳烷基、0-烷芳基、0-芳烷基、0-( $CH_2$ )<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、0-( $CH_2$ )<sub>2</sub>-O-N( $R_m$ )( $R_n$ )或0- $CH_2C(=O)-N(R_m)(R_n)$ 、-O-( $CH_2$ )<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>和-0-CH<sub>3</sub>,其中 $R_m$ 和 $R_n$ 各自独立地为H、氨基保护基或取代或未取代的 $C_{1-10}$ 烷基;

[0020]  $R^4$ =选自烷基、环-烷基、环-杂烷基、0-烷基、S-烷基、NH-烷基和氢;

[0021] 或 $R^2$ 和 $R^4$ 一起表示由1、2、3个基团/原子组成的二价桥,所述基团/原子选自-C( $R^aR^b$ )-、-C( $R^a$ )=C( $R^b$ )、-C( $R^a$ )=N、O、-Si( $R^a$ )<sub>2</sub>-、S-、-SO<sub>2</sub>-、-N( $R^a$ )-和 $>C=Z$ ;

[0022] 其中 $R^a$ 和存在时的 $R^b$ 各自独立地选自氢、任选取代的 $C_{1-6}$ -烷基、任选取代的 $C_{2-6}$ -烯基、任选取代的 $C_{2-6}$ -炔基、羟基、任选取代的 $C_{1-6}$ -烷氧基、 $C_{2-6}$ -烷氧基烷基、 $C_{2-6}$ -烯氧基、羧基、 $C_{1-6}$ -烷氧基羰基、 $C_{1-6}$ -烷基羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳基羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳基羰基、氨基、单-和二( $C_{1-6}$ -烷基)氨基、氨基甲酰基、单-和二( $C_{1-6}$ -烷基)-氨基-羰基、氨基- $C_{1-6}$ -烷基-氨基羰基、单-和二( $C_{1-6}$ -烷基)氨基- $C_{1-6}$ -烷基-氨基羰基、 $C_{1-6}$ -烷基-羰基氨基、脲基(carbamido)、 $C_{1-6}$ -烷酰氧基、磺酰基(sulphono)、 $C_{1-6}$ -烷基磺酰氧基、硝基、叠氮基、硫烷基、 $C_{1-6}$ -烷硫基、卤素,其中芳基和杂芳基可以任选被取代,且其中两个季位取代基 $R_a$ 和 $R_b$ 一起可以表示任选取代的亚甲基(=

CH<sub>2</sub>), 其中对于所有手性中心, 不对称基团可以以R或S取向存在; 且Z为氨基甲酸酯保护基。

[0023] 附图

[0024] 图1: 本发明的示例性寡核苷酸合成循环。注意, 所示例的核苷为β-D-氧基-LNA, 然而, 可以使用本文详述的另外的核苷。该图示例了方法, 其中步骤(i)、(iii)且然后(ii)依次进行, 且任选地在步骤(ii)后, 可以进行封端步骤。

[0025] 图2: 本发明的示例性寡核苷酸合成循环。注意, 所示例的核苷为β-D-氧基-LNA, 然而, 可以使用本文详述的另外的核苷。该图示例了方法, 其中步骤(i)、(ii)且然后(iii)依次进行, 且任选地在步骤(iii)后, 可以进行封端步骤。

[0026] 图3: 本发明的示例性寡核苷酸合成循环。注意, 所示例的核苷为β-D-氧基-LNA, 然而, 可以使用本文详述的另外的核苷。该图示例了方法, 其中步骤(i)、(ii)且然后(iii)依次进行, 且任选地在步骤(ii)之后和步骤(iii)之前, 可以进行封端步骤。

[0027] 图4: 色谱图, 其显示, 当在封端前进行Fmoc保护时, 与不进行Fmoc保护时相比, 观察到极为快速的手性助剂脱保护。

[0028] 图5: 在4小时脱保护后分析的、与等同但无Fmoc保护相比的、根据图1的合成循环合成的完全立体限定的寡核苷酸的色谱图, 表明仅当进行Fmoc保护时观察到快速脱保护。

[0029] 详细描述

[0030] 本文所用的术语“芳基”是指芳环, 其中每一个成环原子均是碳原子。芳基环由五个、六个、七个、八个、九个或九个以上的碳原子形成。芳基是取代或未取代的。在一个方面, 芳基是苯基或萘基。取决于结构, 芳基可以是单价基团或二价基团(即亚芳基)。在一个方面, 芳基是C<sub>6-10</sub>芳基。在一些实施方案中, 芳基是苯基。当被取代时, 芳基可以被选自下组的基团取代: C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>6-14</sub>芳基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>7-14</sub>芳烷基、C<sub>1-4</sub>烷基C<sub>6-14</sub>芳基、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>6-14</sub>芳基或C<sub>6-14</sub>芳基C<sub>1-4</sub>烷基。多重取代可以非独立地或独立地选自: C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>6-14</sub>芳基、C<sub>1-4</sub>烷氧基、C<sub>7-14</sub>芳烷基、C<sub>1-4</sub>烷基C<sub>6-14</sub>芳基、C<sub>1-4</sub>烷氧基C<sub>6-14</sub>芳基或C<sub>6-14</sub>芳基C<sub>1-4</sub>烷基; 或选自卤化物的基团, 如碘化物、氟化物、溴化物或氯化物, 如被卤化物如碘化物、氟化物、溴化物或氯化物取代的苯基。

[0031] “烷基”基团是指脂族烃基。烷基部分可以是饱和烷基(这意味着它不含任何不饱和单元, 例如碳-碳双键或碳-碳三键), 或者烷基部分可以是不饱和烷基(这意味着它含有至少一个不饱和单元)。无论是饱和的还是不饱和的, 烷基部分可以是支链的、直链的或包括环状部分。烷基的连接点位于不是环的一部分的碳原子上。“烷基”部分可具有1至10个碳原子(无论何时在本文中出现, 数值范围如“1至10”是指给定范围内的每个整数; 例如, “1至10个碳原子”表示烷基基团可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等组成, 直至并包括10个碳原子, 尽管本发明的定义还包括所出现的未指定数值范围的术语“烷基”)。烷基包括支链和直链烷基。本文所述化合物的烷基可定义为“C<sub>1-6</sub>烷基”或类似的名称。仅举例来说, “C<sub>1-6</sub>烷基”表示烷基链中存在一个、两个、三个、四个、五个或六个碳原子, 即烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、烯丙基、环丙基甲基、环丁基甲基、环戊基甲基、环己基甲基等。在一个方面, 烷基是C<sub>1-6</sub>或C<sub>1-4</sub>烷基或C<sub>1-3</sub>烷基。C<sub>1-3</sub>烷基是指具有1至3个碳原子的直链或支链烷基。C<sub>1-4</sub>烷基的实例是甲基、乙基、丙基和异丙基。C<sub>1-3</sub>烷基是指具有1至4个碳原子的直链或支链烷基。C<sub>1-3</sub>烷基的实例是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异

丁基和叔丁基。

[0032] “烯基”基团是含有至少一个碳-碳双键的直链、支链和环状烃基。烯基可以被取代。

[0033] “炔基”基团是含有至少一个碳-碳三键的直链、支链和环状烃基。炔基可以被取代。

[0034] “烷氧基”基团是指与氧连接的烷基,即(烷基)-O-基团,其中烷基如本文所定义。实例包括甲氧基(-OCH<sub>3</sub>)或乙氧基(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

[0035] “烯氧基”基团是指与氧连接的烯基,即(烯基)-O-基团,其中烯基如本文所定义。

[0036] “炔氧基”基团是指与氧连接的炔基,即(炔基)-O-基团,其中炔基如本文所定义。

[0037] “芳氧基”基团是指与氧连接的芳基,即(芳基)-O-基团,其中芳基如本文所定义。实例包括苯氧基(-OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)。

[0038] “甲硅烷基”是指H<sub>3</sub>Si-。如本文所用的“取代的甲硅烷基”是指有一个或多个甲硅烷基的氢被取代的部分。其实例包括但不限于TBDMS(叔丁基二甲基甲硅烷基)、TBDPS(叔丁基二苯基甲硅烷基)或TMS(三甲基甲硅烷基)基团。

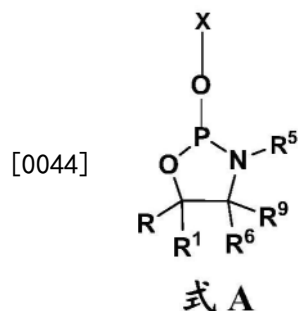
[0039] 术语“卤素”旨在包括氟、氯、溴和碘。术语“卤化物”包括氟化物、溴化物、碘化物和氯化物。

[0040] “酰基保护基”包括酰基-C(=O)-R<sup>7</sup>,其中R<sup>7</sup>是末端基团,例如选自烷基-、烷基-、烯基-、炔基-、环烷基-和芳基-基团的基团;或选自未取代的烷基-、未取代的烯基-、未取代的炔基-、未取代的环烷基-或未取代的芳基的基团;或选自取代的烷基-、取代的烯基-、取代的炔基-、取代的环烷基-或取代的芳基的基团。在一些实施方案中,R<sup>7</sup>可以选自未取代的C<sub>1-6</sub>-烷基-、未取代的C<sub>2-6</sub>-烯基-、未取代的C<sub>2-6</sub>-炔基-、未取代的C<sub>3-7</sub>-环烷基-或未取代的苯基;其中当被取代时,取代基可以是单取代或多取代的,例如被一个或多个选自下列的取代基取代:卤素、C<sub>1-6</sub>-烷基-、C<sub>2-6</sub>-烯基-、C<sub>2-6</sub>-炔基-、C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的芳氧基或任选取代的芳基。在一些实施方案中,酰基保护基是异丁酰基(-C(=O)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (在本文中也称为iBu)。术语异丁酰基也可以拼写为异丁酰基。

[0041] 氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺

[0042] 氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体可以称作氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺(本文也称作核苷单体、单体或亚酰胺(amidite)),例如式1的核苷单体,其包含乙腈、核苷单体和芳族杂环溶剂。

[0043] 在一些实施方案中,核苷单体具有式A:



[0045] 其中X为核苷的3' ,

[0046]  $R^5$ 和 $R^6$ 独立地选自氢、烷基、环-烷基、芳基、杂芳基、取代的烷基、取代的环-烷基、取代的芳基和取代的杂芳基,或 $R^5$ 和 $R^6$ 与式A的N原子一起形成包含3-16个碳原子的杂环;

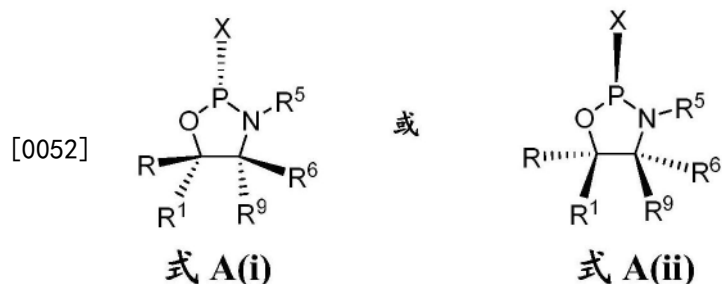
[0047]  $R^9$ 为氢;

[0048]  $R^1$ 选自氢和 $C_{1-3}$ 烷基;且

[0049] R选自芳基、杂芳基、取代的芳基、取代的杂芳基、硝基、卤素、氰基、甲硅烷基、取代的甲硅烷基、砷、取代的砷(芳基取代的砷)、茱和取代的茱;

[0050] 其中,当被取代时,R可以被选自如下的基团取代: $C_1$ -烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{7-14}$ 芳烷基、 $C_{1-4}$ 烷基 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基 $C_{6-14}$ 芳基或 $C_{6-14}$ 芳基 $C_{1-4}$ 烷基。多重取代可以非独立地或独立地选自 $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{7-14}$ 芳烷基、 $C_{1-4}$ 烷基 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基 $C_{6-14}$ 芳基或 $C_{6-14}$ 芳基 $C_{1-4}$ 烷基。

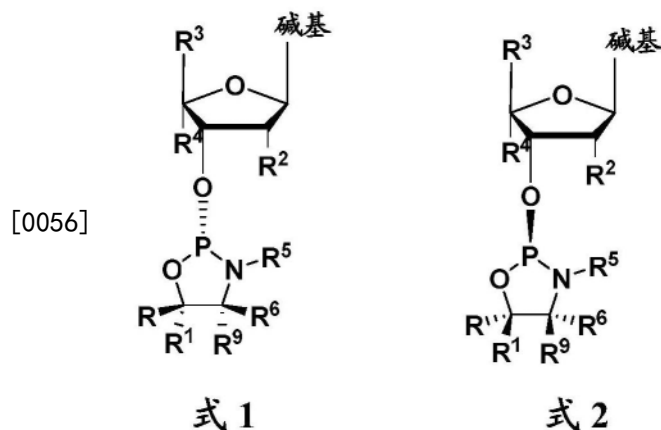
[0051] 式1中所示的单体可以以如下所示的两种手性同种型存在:



[0053] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体具有式A(i)。

[0054] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体具有式A(ii)。

[0055] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体具有式1或2:

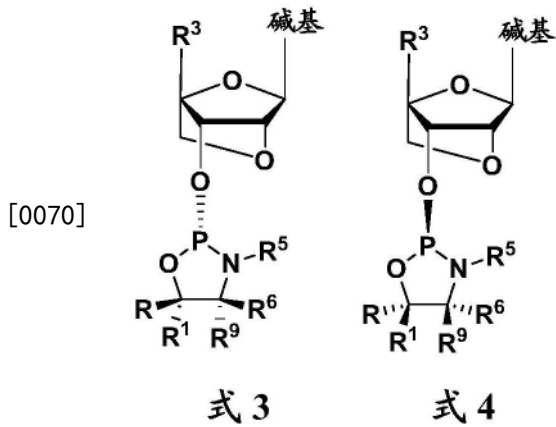


[0057] 其中碱基为核碱基;

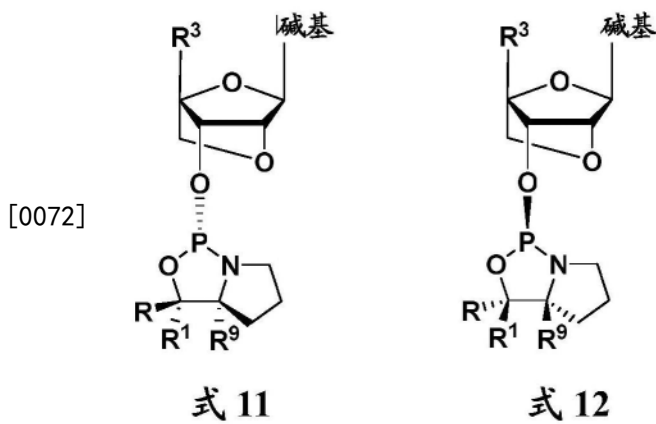
[0058]  $R^3$ 选自 $CH_2ODMTr$ 、 $CH_2$ -烷基- $O$ - $DMTr$ 、 $CH-Me-O-DMTr$ 、 $CH_2OMMTr$ 、 $CH_2$ -烷基- $O$ - $MMTr$ 、 $CH(Me)-O-MMTr$ 、 $CH-R^a-O-DMTrR^b$ 和 $CH-R^a-O-MMTrR^b$ ;  $R^2$ 选自卤素如-F、氨基、叠氮基、-SH、-CN、-OCN、- $CF_3$ 、- $OCF_3$ 、- $O(R_m)$ -烷基、- $S(R_m)$ -烷基、- $N(R_m)$ -烷基、- $O(R_m)$ -烯基、- $S(R_m)$ -烯基、- $N(R_m)$ -烯基; - $O(R_m)$ -炔基、- $S(R_m)$ -炔基或- $N(R_m)$ -炔基;  $O$ -亚烷基- $O$ -烷基、炔基、烷芳基、芳烷基、 $O$ -烷芳基、 $O$ -芳烷基、 $O(CH_2)_2SCH_3$ 、 $O-(CH_2)_2-O-N(R_m)(R_n)$ 或 $O-CH_2C(=O)-N(R_m)(R_n)$ 、 $O-(CH_2)_2OCH_3$ 和- $O-CH_3$ 、其中 $R_m$ 和 $R_n$ 各自独立地为H、氨基保护基或取代或未取代的 $C_{1-10}$ 烷基;

[0059]  $R^4$ =选自烷基、环-烷基、环-杂烷基、 $O$ -烷基、 $S$ -烷基、 $NH$ -烷基和氢;



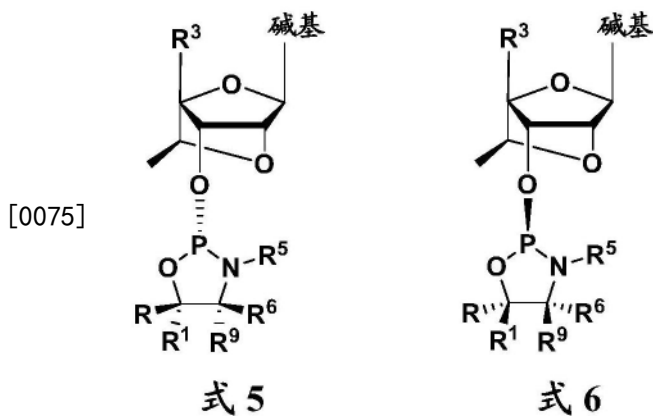


[0071] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体为式11或12的LNA单体:

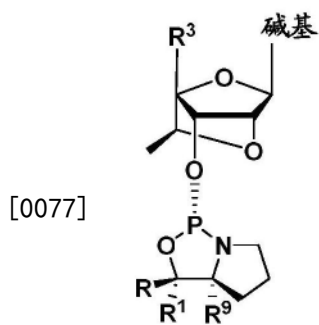


[0073] 在一些实施方案中,当氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体为LNA单体时,如式11或12中所示的那些,R为苯基,且R<sup>1</sup>为氢或甲基。

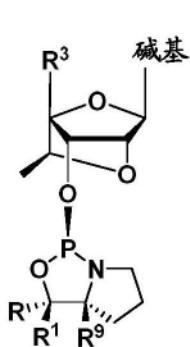
[0074] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体具有式5或6:



[0076] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体为式15或16:



式 15

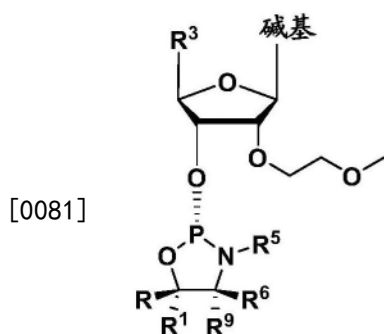


式 16

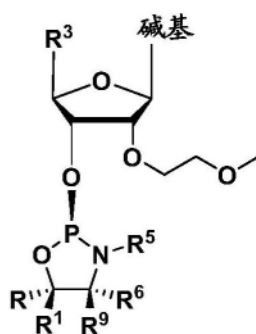
[0078] 在一些实施方案中,当氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体为式15或16的LNA单体时,R为苯基,且R<sup>1</sup>为氢或甲基。

[0079] 在一些实施方案中,如当R<sup>4</sup>为氢时,R<sup>2</sup>可以选自卤素如-F、氨基、叠氨基、-SH、-CN、-OCN、-CF<sub>3</sub>、-OCF<sub>3</sub>、-O(R<sub>m</sub>)-烷基、-S(R<sub>m</sub>)-烷基、-N(R<sub>m</sub>)-烷基、-O(R<sub>m</sub>)-烯基、-S(R<sub>m</sub>)-烯基、-N(R<sub>m</sub>)-烯基;-O(R<sub>m</sub>)-炔基、-S(R<sub>m</sub>)-炔基或-N(R<sub>m</sub>)-炔基;0-亚烷基-0-烷基、炔基、烷芳基、芳烷基、0-烷芳基、0-芳烷基、0(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>、0-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-0-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)或0-CH<sub>2</sub>C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)-0-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>和-0-CH<sub>3</sub>,其中R<sub>m</sub>和R<sub>n</sub>各自独立地为H、氨基保护基或取代或未取代的C<sub>1-10</sub>烷基。它们在本文中称作2'取代的单体。

[0080] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体为式7或8的2'-0-甲氧基乙基(2' MOE)单体:

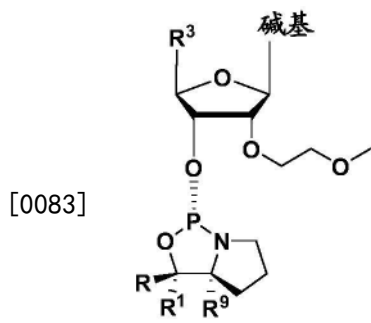


式 7

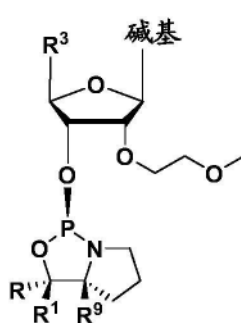


式 8

[0082] 在一些实施方案中,当氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体为2'取代的单体时,例如式7、8、13或14的单体,R为苯基,且R<sup>1</sup>为氢或甲基。



式 13



式 14

[0084] 式A的核苷的R和R<sup>1</sup>(R/R<sup>1</sup>)基团提供立体中心,当掺入寡核苷酸时,其导致形成核苷

3' 的Sp或Rp立体限定的硫代磷酸基团。

[0085] 在一些实施方案中,立体中心为L构型,如式A(i)、1、9、3、11、5、15、7&13中所示。这类单体在本文中称作L单体,其导致形成Sp立体中心。

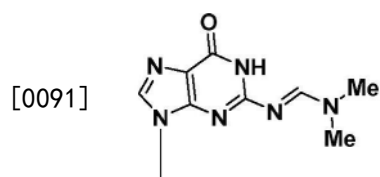
[0086] 在一些实施方案中,立体中心为D构型,如式A(ii)、2、10、4、12、6、16、8&14中所示。这类单体在本文中称作D单体,其导致形成Rp立体中心。

[0087] DMF保护的L-LNA-G

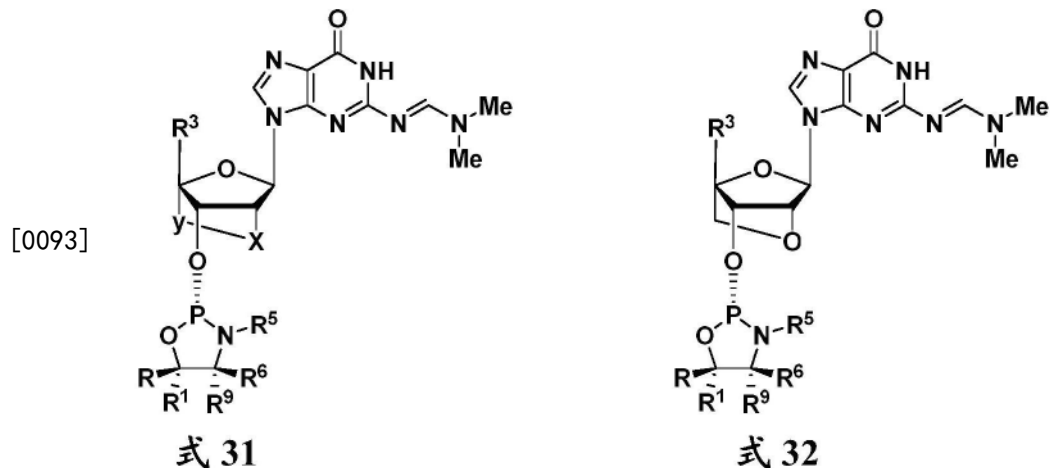
[0088] 如实施例中所示例,DMF保护的L-LNA-G单体难溶于乙腈溶剂。

[0089] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体不是包含DMF保护的鸟嘌呤核碱基(碱基)的L-LNA单体。

[0090] 在一些实施方案中,DMF保护的鸟嘌呤基团具有如下结构:

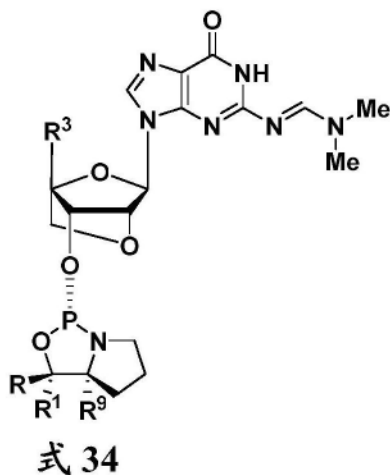
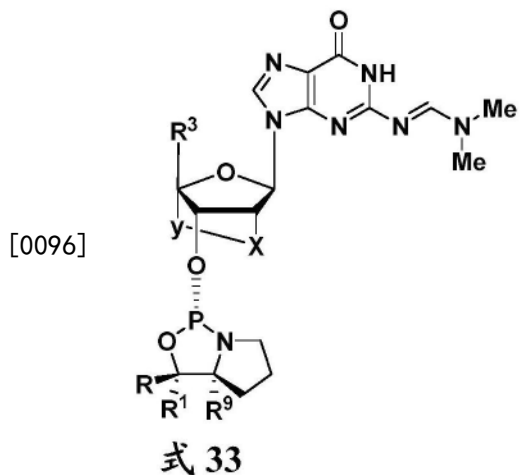


[0092] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体不是式31或32的单体



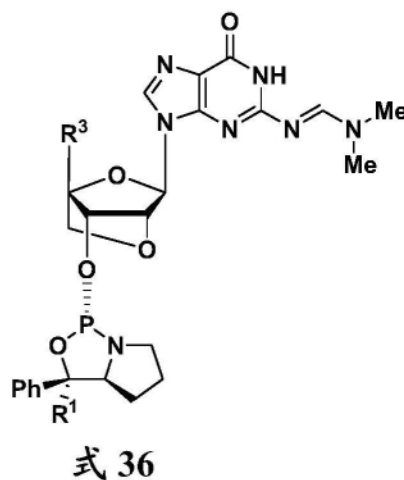
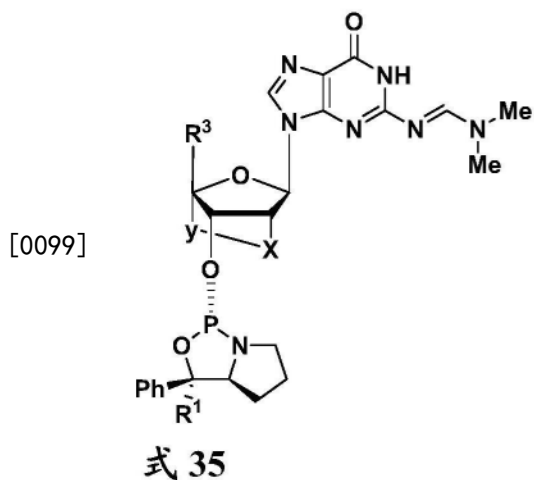
[0094] 其中R、R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>及R<sup>9</sup>如式1的单体所示,且其中对于式11的单体,X和Y一起表示二价桥接(例如如本文R<sup>2</sup>和R<sup>4</sup>,例如选自桥接-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-O-、-CH<sub>2</sub>-O-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-、-CH(CH<sub>3</sub>)-O-。在一些实施方案中,X和Y表示二价桥接-CH<sub>2</sub>-O-(亚甲氧基,也称作氧基-LNA)或-CH(CH<sub>3</sub>)-O-(甲基-亚甲基-氧基)。-CH(CH<sub>3</sub>)-O-桥接在该桥接内的碳原子上引入手性中心。在一些实施方案中,其为S位(例如本领域称作(S)cET的核苷-参见EP1984381)。在一些实施方案中,X和Y表示二价桥接-CH<sub>2</sub>-O-,其中该桥接为β-D构型(β-D-氧基LNA)。在一些实施方案中,X和Y表示二价桥接-CH<sub>2</sub>-O-,其中的桥接为α-L构型(α-L-D-氧基LNA)。在一些实施方案中,X和Y表示二价桥接-CH<sub>2</sub>-S-(硫LNA)或-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-(氨基LNA)。在其中X和Y一起表示二价桥接的实施方案中,R<sup>3</sup>可以为例如CH<sub>2</sub>-O-DMTr或CH<sub>2</sub>-O-MMTr。

[0095] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体不为式33或34的单体



[0097] 其中X、Y、R、R<sup>1</sup>、R<sup>9</sup>和R<sup>3</sup>如式1所述。鸟嘌呤碱基的环外氧可以任选地被保护,例如被氰基保护。

[0098] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体不为式35或36的单体

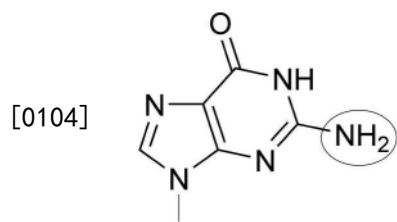


[0100] 其中X、Y、R<sup>1</sup>和R<sup>3</sup>如式1所述。鸟嘌呤碱基的环外氧可以任选地被保护,例如被氰基保护。在式35或66的一些实施方案中,R<sup>1</sup>为氢。在式35或36的一些实施方案中,R<sup>3</sup>为CH<sub>2</sub>-O-DMTr或CH<sub>2</sub>-O-MMTr。在一些实施方案中,本发明的氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体包含酰基保护的核苷(Z)。

[0101] 酰基保护的L-LNA-G

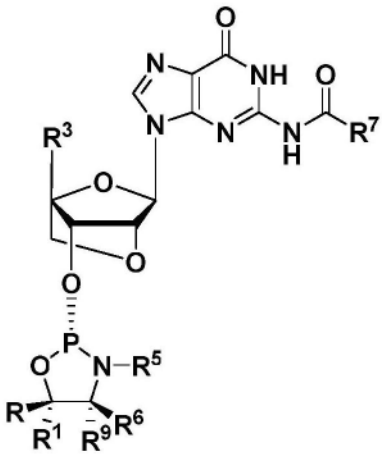
[0102] 如实施例中所示,DMF保护的L-LNA-G单体难溶于乙腈溶剂。然而,本发明人已经确定,在L-LNA-G单体的鸟嘌呤核苷上使用酰基保护基,克服了溶解度问题。

[0103] 鸟嘌呤的环外氨基团如下所示(环绕)。本发明的LNA中该基团可以被酰基保护,例如异丁酰基。已经发现这种酰基保护的L-LNA-G单体比通常的DMF保护的L-LNA-G单体更易溶和稳定,因此当含有胺的氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体为L-LNA-G单体时特别有用。氧基团也可任选地被保护,例如被氰基保护。

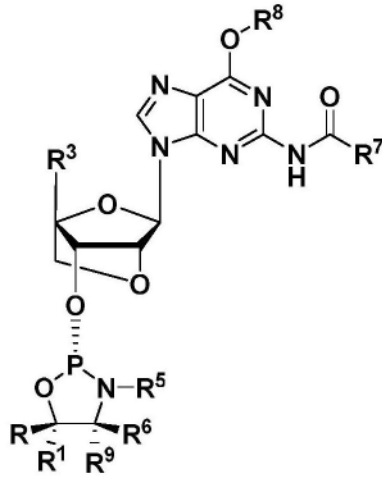


[0105] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体为包含酰基保护的鸟嘌呤核碱基的L-LNA单体,例如异丁酰基保护的鸟嘌呤。

[0106] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体为式23、24、25、26、27、28、29或30的L-LNA-G单体:

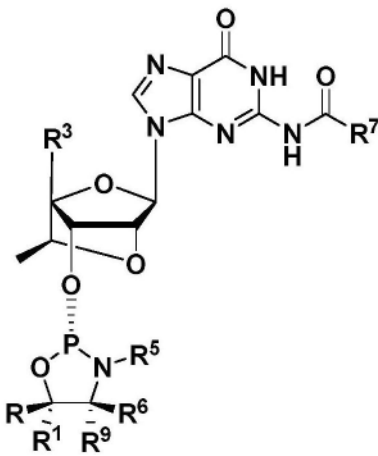


式 23

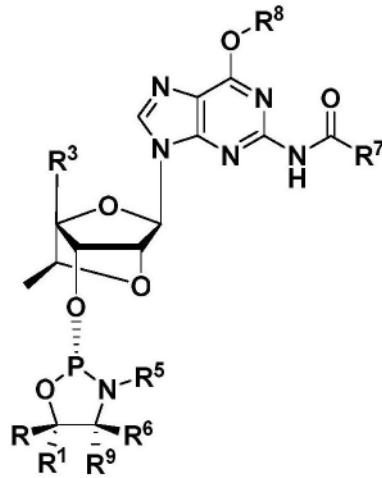


式 24

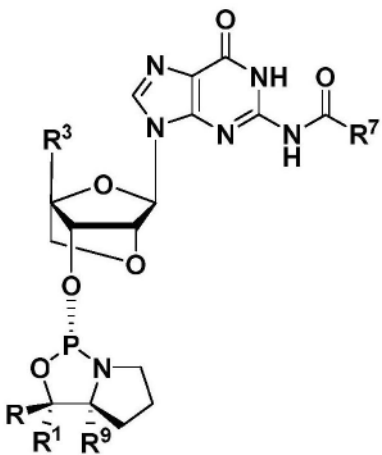
[0107]



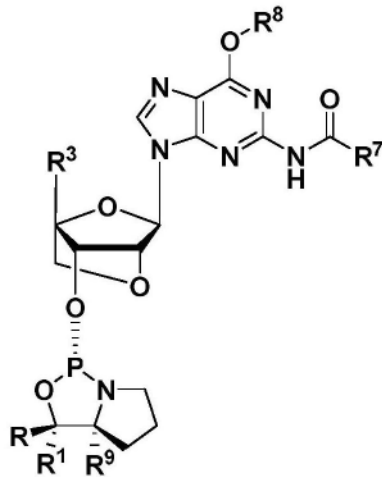
式 25



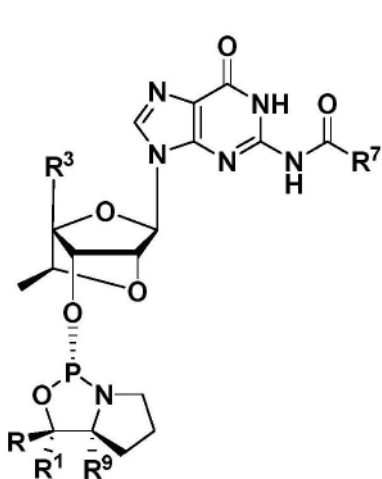
式 26



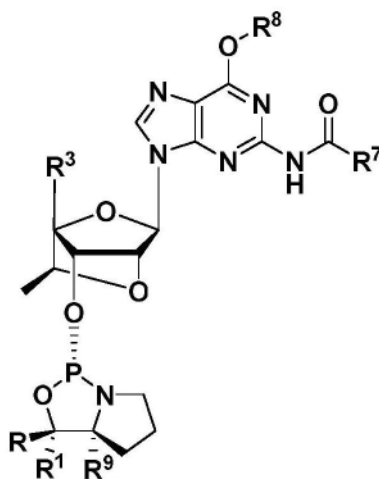
式 27



式 28

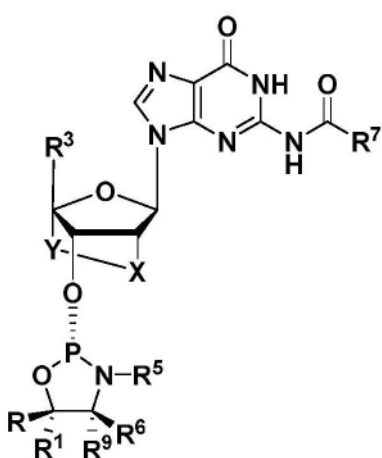


式 29

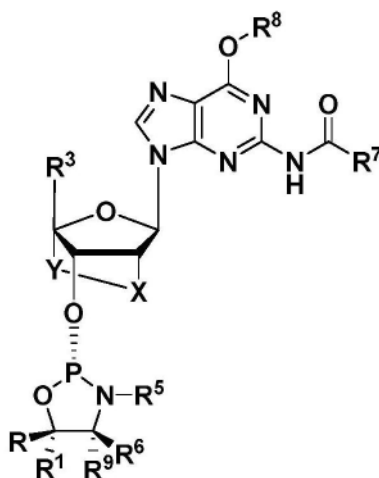


式 30

[0108]



式 31



式 32

[0109] 其中 $R$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^9$ 和 $R^6$ 如本发明化合物所述,且 $-C(=O)-R^7$ 为鸟嘌呤碱基环外氮上的酰基保护基,且 $R^8$ 当存在时为鸟嘌呤环外氧上的保护基。在一些实施方案中, $R^8$ 为氰基乙基。在一些实施方案中, $R$ 为苯基, $R^1$ 为氢或甲基,且 $R^3$ 任选地为 $CH_2-O-DMTr$ 或 $CH_2-O-MMTr$ 。在一些实施方案中, $R^7$ 为异丁酰基,在式31和32中, $Y$ 和 $X$ 如对式11所述。

[0110] 在一些实施方案中,例如当氧杂氮杂磷杂环戊烷单体具有式3、11、5或15时,氧杂氮杂磷杂环戊烷单体核苷上存在的核碱基(碱基)为鸟嘌呤核苷,其中鸟嘌呤核碱基包含鸟嘌呤环外氮基团上的酰基保护基。

[0111] “酰基保护基”包含酰基 $-C(=O)-R^7$ ,其中 $R^7$ 为末端基团,例如选自烷基-、烷基-、烯基-、炔基-、环烷基-和芳基的基团;或选自未取代的烷基-、未取代的烯基-、未取代的炔基-、未取代的环烷基-或未取代的芳基的基团;或选自取代的烷基-、取代的烯基-、取代的炔基-、取代的环烷基-或取代的芳基的基团。在一些实施方案中, $R^7$ 可以选自未取代的 $C_{1-6}$ -烷基-、未取代的 $C_{2-6}$ -烯基-、未取代的 $C_{2-6}$ -炔基-、未取代的 $C_{3-7}$ -环烷基-或未取代的苯基或取代的 $C_{1-6}$ -烷基-、取代的 $C_{2-6}$ -烯基-、取代的 $C_{2-6}$ -炔基-、取代的 $C_{3-7}$ -环烷基-或取代的苯基;其中当被取代时,取代基可以被例如一个或多个取代基单取代或多取代,所述取代基选自卤素、 $C_{1-6}$ -烷基、 $C_{2-6}$ -烯基、 $C_{2-6}$ -炔基、 $C_{1-6}$ -烷氧基、任选取代的芳氧基或任选取代的芳基。在一些实施方案中,酰基保护基为异丁酰基( $-C(=O)CH(CH_3)_2$ ) (本文也称作*iBu*)。术语

异丁酰基也可拼写为异丁酰基。

[0112] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷单体具有式3、11、5或15,且氧杂氮杂磷杂环戊烷单体核苷上存在的核碱基(碱基)为鸟嘌呤核苷,其中鸟嘌呤核碱基包含鸟嘌呤环外氮基团上的酰基保护基。在一些实施方案中,鸟嘌呤环外氮基团上存在的酰基保护基为异丁酰基。在一些实施方案中,“L-LNA-G”氧杂氮杂磷杂环戊烷单体为式1的LNA单体。在一些实施方案中,“L-LNA-G”氧杂氮杂磷杂环戊烷单体为式1的高亲和力LNA单体。

[0113] 手性助剂上的R基团

[0114] 当被取代时,R可以被选自如下的基团取代: $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{7-14}$ 芳烷基、 $C_{1-4}$ 烷基 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基 $C_{6-14}$ 芳基或 $C_{6-14}$ 芳基 $C_{1-4}$ 烷基。多重取代可以非独立地或独立地选自: $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{7-14}$ 芳烷基、 $C_{1-4}$ 烷基 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基 $C_{6-14}$ 芳基或 $C_{6-14}$ 芳基 $C_{1-4}$ 烷基。

[0115] 在一些实施方案中,R选自芳基、杂芳基、取代的芳基、取代的杂芳基、硝基、卤素、氰基、甲硅烷基、取代的甲硅烷基、砷、取代的砷(芳基取代的砷)、苄和取代的苄。

[0116] 在一些实施方案中,R选自芳基、杂芳基、取代的芳基和取代的杂芳基。

[0117] 在一些实施方案中,R为芳基、例如苯基。

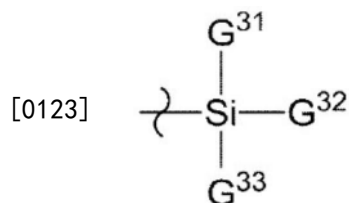
[0118] 在一些实施方案中,当R为取代的芳基时,R可以被卤化物取代,例如碘化物、氟化物、溴化物或氯化物,例如被卤化物例如碘化物、氟化物、溴化物或氯化物取代的苯基。

[0119] 在一些实施方案中, $R^1$ 为氢。在一些实施方案中, $R^1$ 为 $C_{1-3}$ 烷基、例如甲基、乙基或丙基。在一些实施方案中, $R^1$ 为甲基。

[0120] 在一些实施方案中,R为芳基如苯基,且 $R^1$ 为氢。

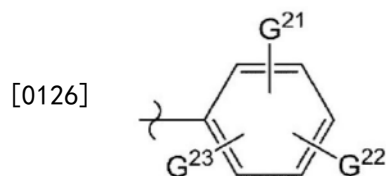
[0121] 在一些实施方案中,R为芳基如苯基,且 $R^1$ 为 $C_{1-3}$ 烷基如甲基、乙基或丙基。

[0122] 在一些实施方案中,R为



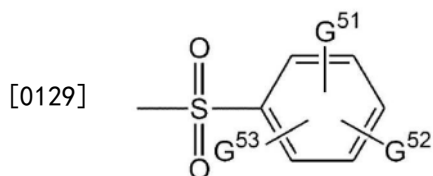
[0124] 其中 $G^{31}$ 、 $G^{32}$ 和 $G^{33}$ 独立地选自 $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{6-14}$ 芳基 $C_{1-4}$ 烷氧基、 $C_{7-14}$ 芳烷基、 $C_{1-4}$ 烷基 $C_{6-14}$ 芳基、 $C_{1-4}$ 烷氧基 $C_{6-14}$ 芳基和 $C_{6-14}$ 芳基 $C_{1-4}$ 烷基。

[0125] 在一些实施方案中,R为



[0127] 其中 $G^{21}$ 、 $G^{22}$ 和 $G^{23}$ 独立地为氢、硝基、卤素、氰基或 $C_{1-3}$ 烷基。

[0128] 在一些实施方案中,R为



[0130] 其中 $G^{51}$ 、 $G^{52}$ 和 $G^{53}$ 独立地为氢、硝基、卤素、氰基或 $C_{1-3}$ 烷基或 $C_{1-3}$ 烷氧基。

[0131] 在一些实施方案中, $R^5$ 和 $R^6$ 一起形成杂环(带有如式1中所示的环氮)-称作双环氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺的核苷单体。杂环可以包含例如3-16个碳原子,例如4个碳原子。

[0132] 双环氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体

[0133] 在一些实施方案中,单体为双环氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体,例如,在一些实施方案中, $R^5$ 和 $R^6$ 一起形成杂环。在一些实施方案中, $R^5$ 和 $R^6$ 一起形成杂环(具有式1所示的环状氮),其包含4个碳原子,在杂环中总计构成5个原子(式A或A(i)或A(ii)所示的4个碳和氮)。例如,本发明的化合物可以具有式9、10、11、12、13、14、15或16。

[0134] 在一些实施方案中, $R^5$ 和 $R^6$ 一起形成杂环(具有式I所示的环氮),其包含4个碳原子,在杂环中总计构成5个原子(式1所示的4个碳和氮),且R为芳基、例如苯基, $R^1$ 为氢或甲基。 $R^9$ 为氢。

[0135] 核碱基

[0136] 在一些实施方案中,B为选自下组的核碱基:腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶(pseudoisocytosine)、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤和2-氯-6-氨基嘌呤。

[0137] 在一些实施方案中,B为嘌呤核碱基。在一些实施方案中,碱基(B)为嘧啶核碱基。在一些实施方案中,碱基(B)为腺嘌呤。在一些实施方案中,碱基(B)为胸腺嘧啶。在一些实施方案中,碱基(B)为鸟嘌呤。在一些实施方案中,碱基(B)为胞嘧啶。在一些实施方案中,当碱基(B)为胞嘧啶时,其为5-甲基-胞嘧啶。

[0138] 应当理解,为了用于寡核苷酸合成,在亚酰胺单体中可以保护核碱基(碱基)(胸腺嘧啶经常在没有保护基的情况下使用)。适合的保护基包括二甲基甲酰胺(DMF)、二甲氧基三苯甲基(DMT)或酰基保护基,例如异丁酰基(iBu)或乙酰基保护基(Ac)或苯甲酰基保护基(Bz)。

[0139] 在一些实施方案中,例如当单体为L-LNA-G(鸟嘌呤)时,核碱基(碱基(B))不为DMF保护的鸟嘌呤(G)。 $R^3$ =选自 $CH_2ODMT$ 、 $CH_2$ -烷基-0-DMTr、 $CH$ -Me-0-DMTr、 $CH_2OMMTr$ 、 $CH_2$ -烷基-0-MMTr、 $CH$ (Me)-0-MMTr、 $CH-R^a$ -0-DMTr $R^b$ 和 $CH-R^a$ -0-MMTr $R^b$ 。

[0140] 高亲和性单体

[0141] 在一些实施方案中,当掺入寡核苷酸时,核苷(Z)与等同的DNA核苷相比赋予对互补RNA靶标的更高结合亲和力。这种核苷被称为高亲和力核苷。高亲和力核苷的实例包括2'-O-MOE,2'-氟代,2'-O-甲基和LNA核苷。在其中核苷为高亲和力核苷的实施方案中, $R^3$ 可以是例如 $CH_2$ -0-DMTr或 $CH_2$ -0-MMTr。

[0142] 在一些实施方案中, $R^2$ 选自氟(-F)、-O-( $CH_2$ )<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>和-O- $C_{1-3}$ 烷基,例如-O-CH<sub>3</sub>。在这类实施方案中,任选地 $R^4$ 为氢。

[0143] 在一些实施方案中,核苷为包含2'-4'桥接(二价基团)的LNA核苷(也称作双环核

苷)。

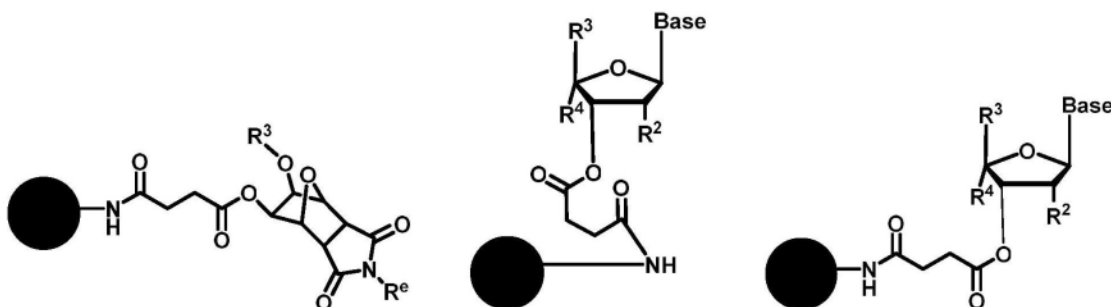
[0144] 在一些实施方案中, $R^2$ 和 $R^4$ 一起表示选自桥接 $-C(R^aR^b)-O-$ 、 $-C(R^aR^b)C(R^aR^b)-O-$ 、 $-CH_2-O-$ 、 $-CH_2CH_2-O-$ 、 $-CH(CH_3)-O-$ 的二价桥接。在一些实施方案中, $R^2$ 和 $R^4$ 表示二价桥接 $-CH_2-O-$ (亚甲基-氧基,也称作氧基-LNA)或 $-CH(CH_3)-O-$ (甲基-亚甲基-氧基)。 $-CH(CH_3)-O-$ 桥接在该桥接内的碳原子上引入手性中心,在一些实施方案中,其为S位上(例如核苷,本领域称作(S)cET-参见EP1984381))。在一些实施方案中, $R^2$ 和 $R^4$ 表示二价桥接 $-CH_2-O-$ ,其中该桥接位于 $\beta$ -D位( $\beta$ -D-氧基LNA)。在一些实施方案中, $R^2$ 和 $R^4$ 表示二价桥接 $-CH_2-O-$ ,其中该桥接位于 $\alpha$ -L位( $\alpha$ -L-D-氧基LNA)。在一些实施方案中, $R^2$ 和 $R^4$ 表示二价桥接 $-CH_2-S-$ (硫代LNA)或 $-CH_2-NH_2-$ (氨基LNA)。在其中 $R^2$ 和 $R^4$ 一起表示二价桥接的实施方案中, $R^3$ 可以为例如 $CH_2-O-DMTr$ 或 $CH_2-O-MMTr$ 。

[0145] 在一些其中核苷(X)为双环核苷酸(LNA)如 $\beta$ -D-氧基LNA或6'甲基 $\beta$ -D-氧基-LNA(也称作例如(S)cET)的实施方案中,R为芳基如苯基,且 $R^1$ 为氢或 $C_{1-3}$ 烷基。在这类实施方案中, $R^5$ 和 $R^6$ 可以一起形成杂环,例如5元杂环,如本文所述。

[0146] 核苷和固体支持物上的5'-OH基团

[0147] 根据本发明的合成立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的方法包括与在先核苷的5'-OH基团偶联的步骤。在先核苷可以直接或通过另外的其他核苷酸间接与固体支持物(寡核苷酸合成支持物)连接,并且在偶联步骤(i)之前,可以将5'-OH基团脱保护(例如通过去除3'保护基团(其可以如本文中 $R^3$ 所定义,如DMTr( $-CH_2-O-DMTr$ ))。适合的寡核苷酸支持物包括聚苯乙烯或可控孔径玻璃支持物,含有UnyLinker部分(参见Ravikumar等人,Org.Process Res.Dev.,2008,12(3),pp 399-410),或核苷3'-琥珀酸酯连接键:

[0148]

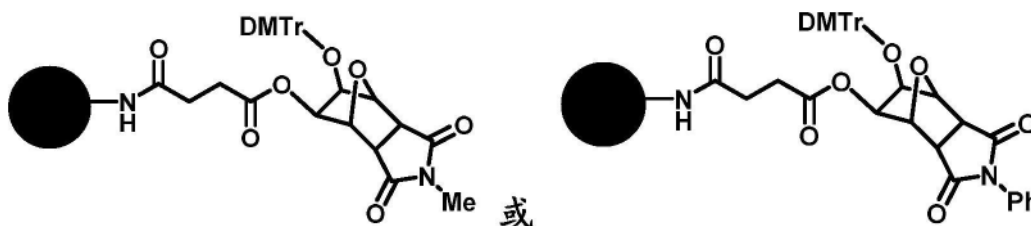


[0149] 其中 $R^e$ 为芳基或 $C_{1-10}$ 烷基,例如苯基、异丙基或甲基,且实心圆圈表示固体支持物基质,例如聚苯乙烯或可控孔径玻璃。其中 $R^e$ 为苯基或甲基的UnyLinker支持物为商购的且广泛应用于寡核苷酸合成。

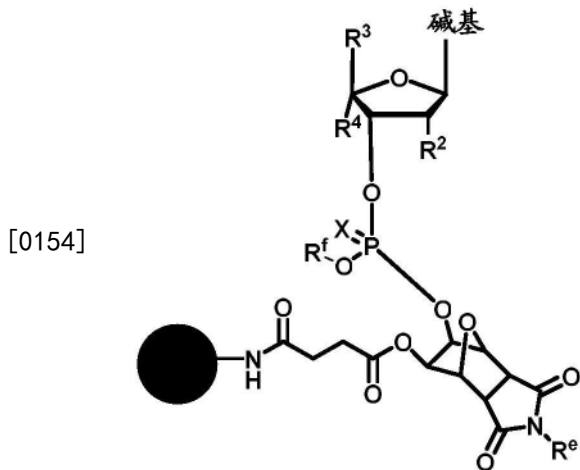
[0150] 在一些实施方案中, $R^e$ 可以不为苯基或甲基,例如可以使用另外的烷基或芳基。

[0151] 具体的支持物基质包括:

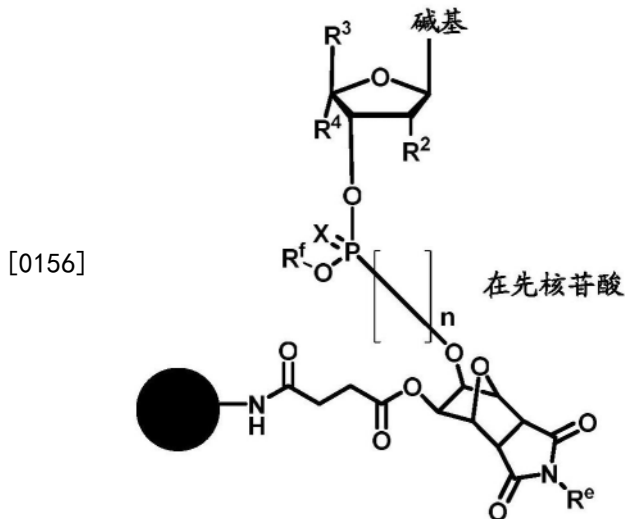
[0152]



[0153] 在先核苷,在其为偶联至固体支持物的第一核苷时,可以如下表示:

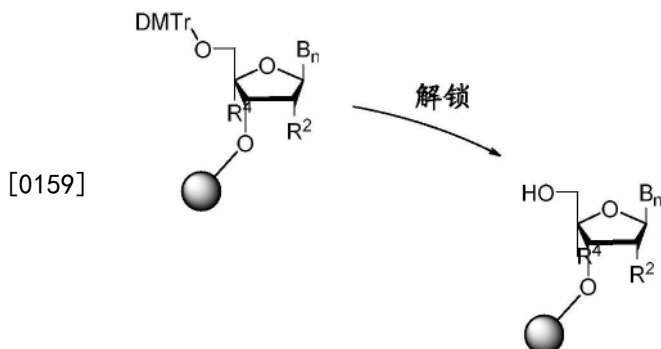


[0155] 或者,如果还有另外的在先核苷已经连接到固体支持物上,则连接至固体支持物上的在先核苷酸可以表示如下:



[0157] 其中 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^3$ 如对氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体所定义, $R^e$ 为芳基或 $C_{1-10}$ 烷基,例如苯基、异丙基或甲基, $R^f$ 为H或氰基乙基,X为O或S,且n表示在先核苷酸的数量。n可以为例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25。

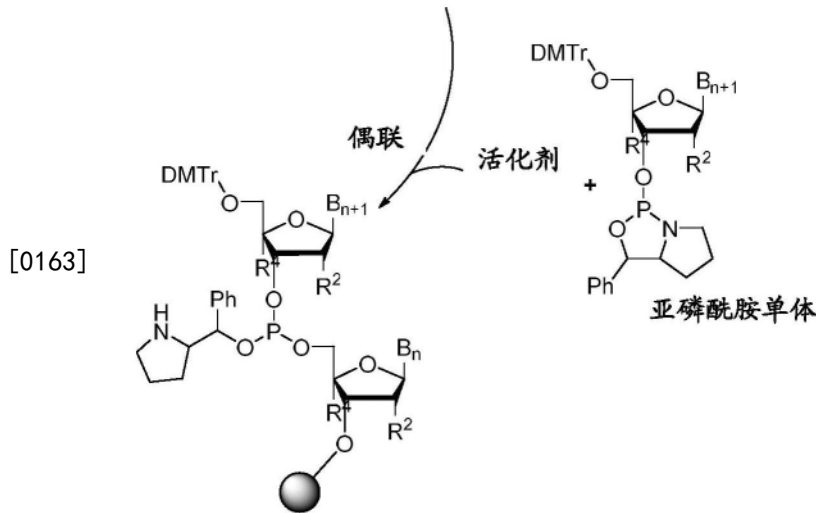
[0158] 可以在偶联步骤之前、通过去除 $R^3$ 基团(例如DMTr)以留下3'-OH基团来进行解锁。可以使用酸溶液如3%三氯乙酸(TCA)或3%二氯乙酸(DCA)在惰性溶剂(例如二氯甲烷或甲苯)中进行解锁。当 $R^3$ 基团含有DMTr基团时,形成的橙色DMT阳离子被洗掉;该步骤产生带有游离5'-末端羟基的固体支持物结合的寡核苷酸前体:



[0160] (仅用于示例目的)

[0161] 偶联步骤

[0162] 偶合步骤 (i) 包括氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体 (亚酰胺) 与在先单体的 5'-OH 基团的反应。偶联步骤可以在适合的溶剂如乙腈中和在活化剂存在下进行。



[0164] (仅用于示例目的)

[0165] 在一个优选的实施方案中,偶联步骤在乙腈溶剂组合物中进行,所述组合物包含乙腈和芳族杂环溶剂,以及任选的活化剂。在一些实施方案中,芳族杂环溶剂为吡啶。

[0166] 偶联溶剂

[0167] 用于本发明方法中的偶联溶剂可以为乙腈和芳族杂环碱溶剂。

[0168] 本发明提供了将氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体偶联至核苷或寡核苷酸的 5' 末端或与固体支持物 (例如 unylinker) 连接的羟基的方法,包括使核苷、寡核苷酸或固体支持物与氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体反应的步骤,其中所述反应在包含乙腈和芳族杂环溶剂的乙腈溶剂组合物中进行。

[0169] 本发明提供了将氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体偶联至核苷或寡核苷酸的 5' 末端或与固体支持物 (例如 unylinker) 连接的羟基的方法,包括使核苷、寡核苷酸或固体支持物与氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体反应的步骤,其中所述反应在包含乙腈和芳族杂环溶剂和活化剂的乙腈溶剂组合物中进行。

[0170] 本发明提供了用于寡核苷酸合成的方法,包括使氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体偶联至本发明的核苷或核苷酸的 5' -末端的过程。

[0171] 本发明提供了乙腈溶液组合物,其包含氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体、乙腈和芳族杂环溶剂。

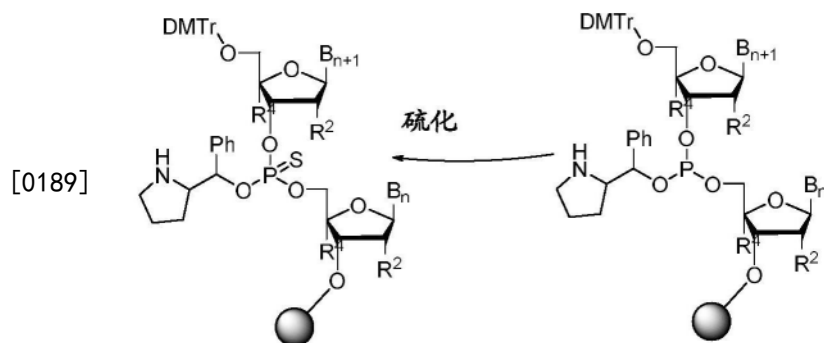
[0172] 本发明提供了用于溶解氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体的方法,该方法包括将单体添加到包含乙腈和芳族杂环溶剂和任选的活化剂的溶剂组合物中。

[0173] 本发明提供了芳族杂环溶剂在增强氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺在乙腈中的稳定性和/或溶解性中的用途。

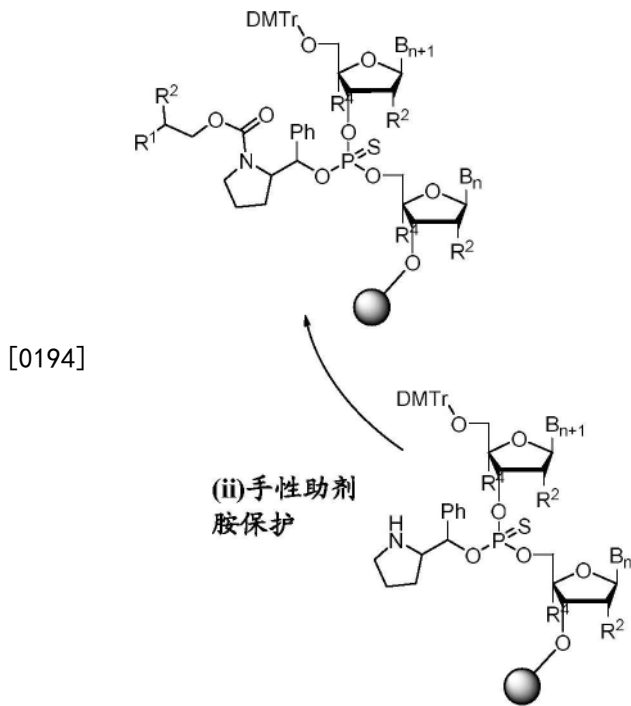
[0174] 本发明提供了芳族杂环溶剂在增强氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺在乙腈中的反应性中的用途,例如在寡核苷酸合成偶联步骤中的反应性。

[0175] 在一些实施方案中,芳族杂环溶剂具有 pKa 4-7 或 7-17,在 20°C 于水中。

- [0176] 在一些实施方案中,芳族杂环溶剂为芳族杂环碱。
- [0177] 在一些实施方案中,芳族杂环溶剂为芳族杂环酸。
- [0178] 在一些实施方案中,芳族杂环溶剂选自吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、3-甲基吡啶、卢惕啶和吡咯。
- [0179] 在一些实施方案中,芳族杂环溶剂为吡啶,例如在乙腈中0.5-5%的吡啶。
- [0180] 在一些实施方案中,芳族杂环溶剂在乙腈中的浓度(v/v)为约0.1%-约50%(v/v)。
- [0181] 在一些实施方案中,芳族杂环溶剂在乙腈中的浓度(v/v)为约0.5%-约10%,例如约1%-约5%,例如约2-3%,例如约2.5%。
- [0182] 在一些实施方案中,所述活化剂包含N-甲基咪唑。
- [0183] 在一些实施方案中,所述溶剂组合物包含N-甲基咪唑,其浓度为0.01-约1M N-甲基咪唑,例如约0.1M N-甲基咪唑。
- [0184] 在一些实施方案中,所述活化剂包含4,5-二氰基咪唑(DCI)、四唑或5-(苄硫基)-1H-四唑。
- [0185] 在一些实施方案中,所述溶剂组合物包含约0.5-约2M DCI。
- [0186] 胺保护之前的硫化
- [0187] 在偶联步骤之后,在一些实施方案中,所偶联的单体经历硫化反应。硫化可以通过用硫化剂如3H-1,2-苯并二噻茂(benzodithiol)-3-酮-1,1-二氧化物或苯基乙酰二硫化物或苍耳烷氢化物(xanthane hydride)、在适合的溶剂如乙腈和任选芳族杂环溶剂如吡啶或3-甲基吡啶中处理来进行。
- [0188] 在一些实施方案中,硫化在0.1M的苍耳烷氢化物的乙腈和吡啶1:1v/v的溶液中进行。硫化典型地在室温进行。



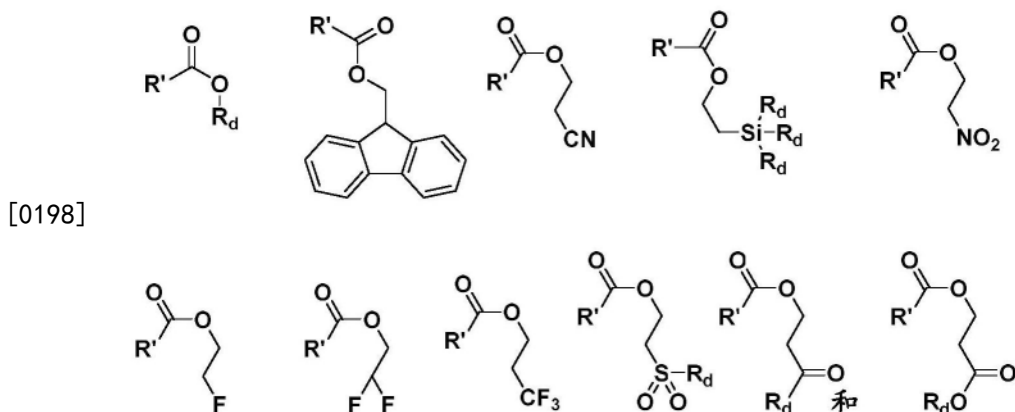
- [0190] (仅用于示例目的)
- [0191] 或者,硫化可以在胺保护步骤(ii)之后进行。
- [0192] 胺保护
- [0193] 本发明方法的步骤(ii)包括用氨基甲酸酯保护基保护氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺基:



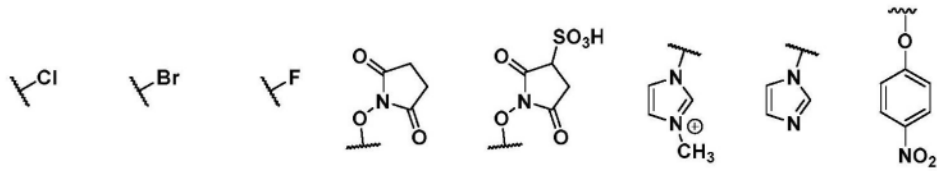
[0195] (仅用于示例目的)

[0196] 因此,步骤(ii)包括使氨基甲酸酯前体和步骤(i)中提供的偶联的含胺手性助剂亚磷酰胺单体在允许所述手性助剂的胺被氨基甲酸酯保护基保护的条件下反应,例如在适合的溶剂中,所述适合的溶剂任选地包含碱,例如非亲核碱,例如N,N-二异丙基乙胺。

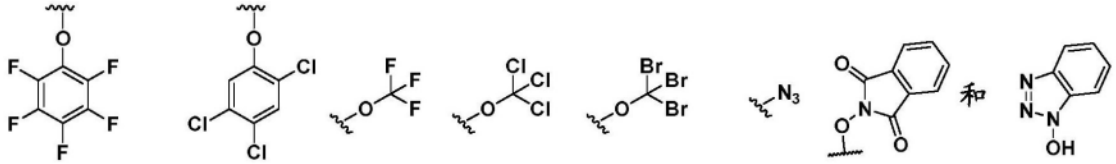
[0197] 换言之,在步骤(ii)期间,使氨基甲酸酯前体偶联至氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺基。在一些实施方案中,氨基甲酸酯前体选自:



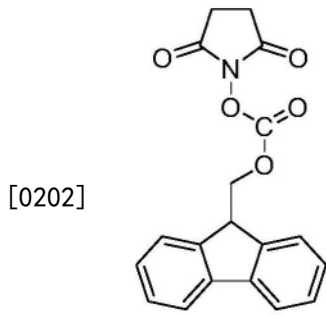
[0199] 其中 $R_d$ 选自氢、任选取代的 $C_{1-10}$ 烷基-、任选取代的 $C_{2-6}$ 烯基-、任选取代的 $C_{2-6}$ 炔基-、任选取代的 $C_{3-7}$ 环烷基-、任选取代的 $C_{1-10}$ 烷氧基或芳基-基团,且 $R'$ 为离去基团,例如选自如下的离去基团:



[0200]



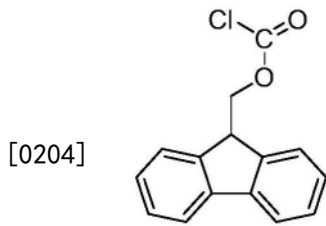
[0201] 在一些实施方案中,氨基甲酸酯前体为



[0202]

Fmoc-OSu

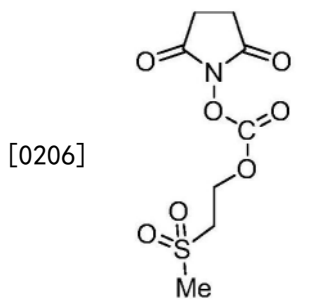
[0203] 在一些实施方案中,氨基甲酸酯前体为



[0204]

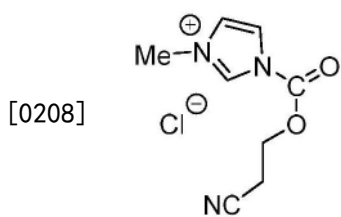
Fmoc-Cl

[0205] 在一些实施方案中,氨基甲酸酯前体为



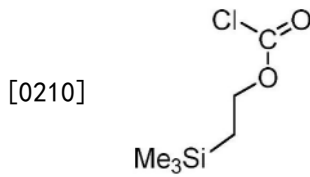
[0206]

[0207] 在一些实施方案中,氨基甲酸酯前体为



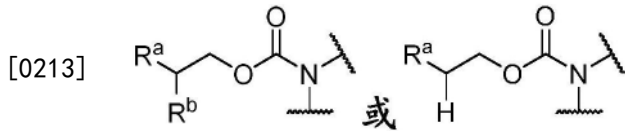
[0208]

[0209] 在一些实施方案中,氨基甲酸酯前体为



[0211] 氨基甲酸酯保护的胺

[0212] 在一些实施方案中,胺的氨基甲酸酯保护基为下式的取代的氨基甲酸乙酯保护基:



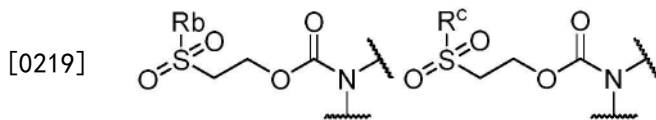
[0214] 其中N为存在于手性助剂中的氮,且 $R^a$ 和任选地存在时的 $R^b$ 为独立地选自如下的基团: $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^c$ 、 $-\text{SiR}_3^c$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{CO}-\text{R}^c$ ,其中 $\text{R}^c$ 独立地选自氢、任选取代的 $\text{C}_{1-10}$ 烷基-、任选取代的 $\text{C}_{2-6}$ 烯基-、任选取代的 $\text{C}_{2-6}$ 炔基-、任选取代的 $\text{C}_{3-7}$ 环烷基-、任选取代的 $\text{C}_{1-10}$ 烷氧基或芳基;或 $\text{R}^b$ 选自氢、任选取代的 $\text{C}_{1-10}$ 烷基-、 $\text{C}_{2-6}$ 烯基-、 $\text{C}_{2-6}$ 炔基-、 $\text{C}_{3-7}$ 环烷基-和芳基;

[0215] 或 $\text{R}^a$ 和 $\text{R}^b$ 一起形成苄基(如Fmoc实施方案所示例)。

[0216] 在一些实施方案中, $\text{R}^a$ 和任选地存在时的 $\text{R}^b$ 为吸电子基团。吸电子基团允许 $\beta$ -消去进行,使得手性助剂可以在碱性条件下脱保护。

[0217] 在一些实施方案中, $\text{R}^b$ 为氢。

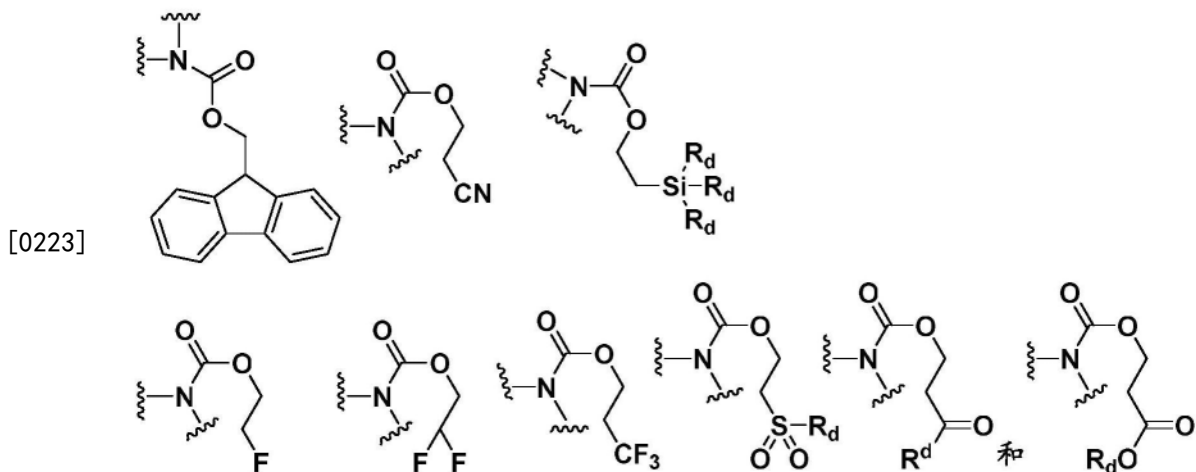
[0218] 在一些实施方案中,胺的氨基甲酸酯保护基为下式的任选取代的2'-磺酰基氨基甲酸酯保护基:



[0220] 其中N为存在于手性助剂中的氮,且其中 $\text{R}^c$ 独立地选自氢、任选取代的 $\text{C}_{1-10}$ 烷基-、任选取代的 $\text{C}_{2-6}$ 烯基-、任选取代的 $\text{C}_{2-6}$ 炔基-、任选取代的 $\text{C}_{3-7}$ 环烷基-、任选取代的 $\text{C}_{1-10}$ 烷氧基或芳基;

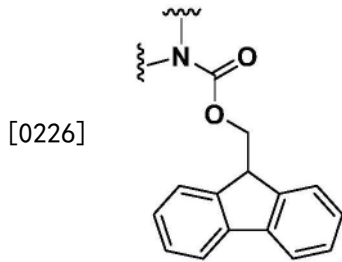
[0221] 在一些实施方案中, $\text{R}^b$ 为任选取代的 $\text{C}_{1-10}$ 烷基或芳基、例如苯基。

[0222] 在一些实施方案中,胺的氨基甲酸酯保护基[步骤(ii)中涉及]选自

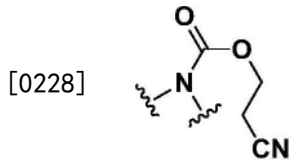


[0224] 其中N为存在于手性助剂中的N,且 $R_d$ 选自氢、任选取代的 $C_{1-10}$ 烷基-、任选取代的 $C_{2-6}$ 烯基-、任选取代的 $C_{2-6}$ 炔基-、任选取代的 $C_{3-7}$ 环烷基-、任选取代的 $C_{1-10}$ 烷氧基或芳基。在一些实施方案中, $R_d$ 为甲基取代的苯基。

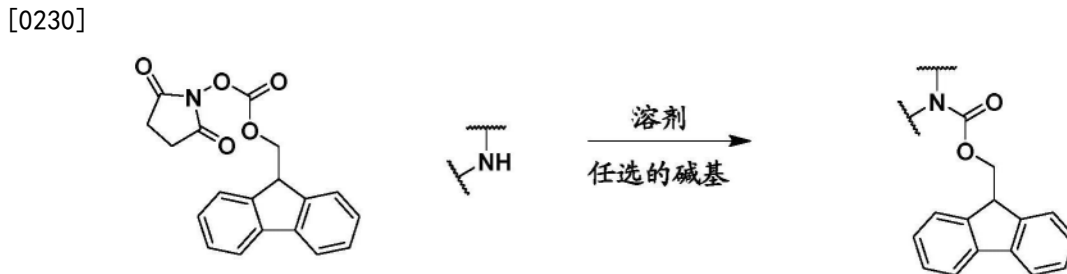
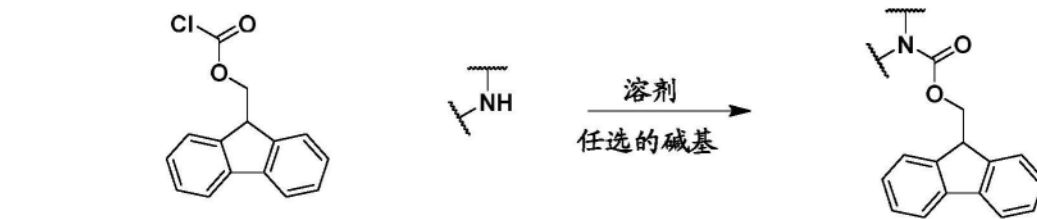
[0225] 在一些优选的实施方案中,氨基甲酸酯保护基为Fmoc:

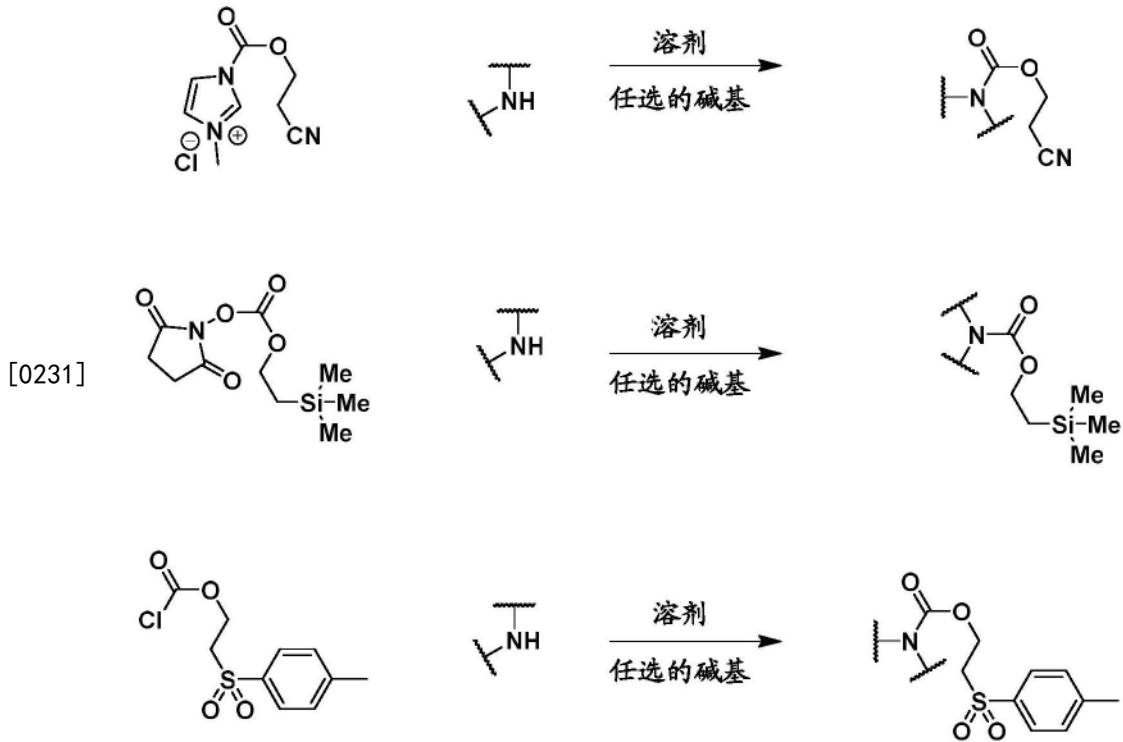


[0227] 在一些优选的实施方案中,氨基甲酸酯保护基为氨基甲酸氰基-乙酯:



[0229] 如下反应方案示例了所选择的氨基甲酸酯前体和手性助剂上的胺基之间的反应:



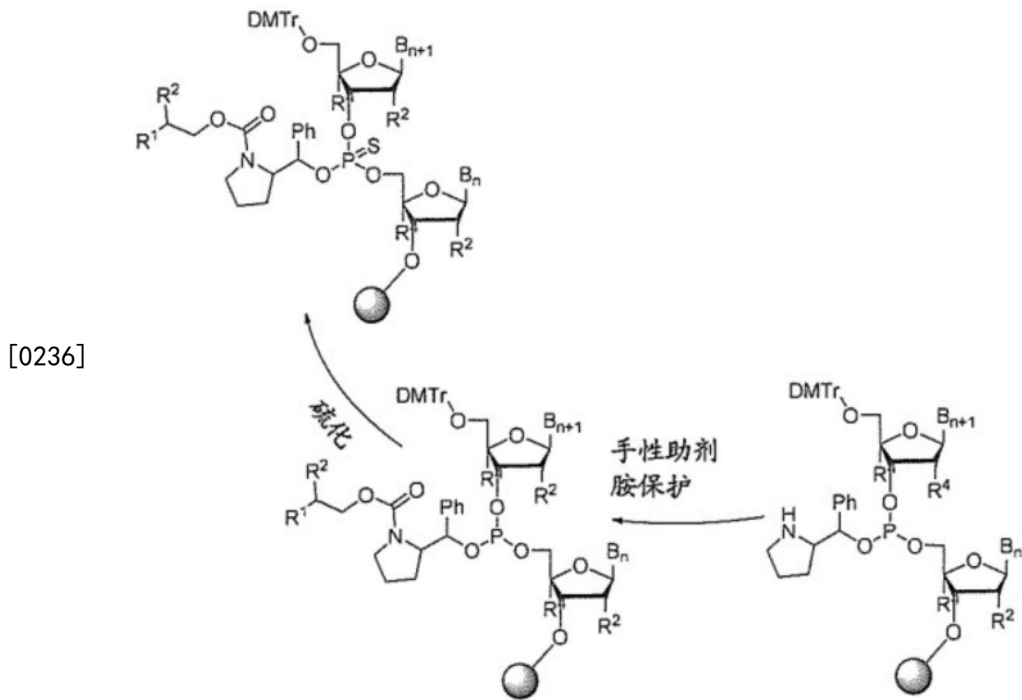


[0232] 胺保护后的硫化

[0233] 在保护手性助剂的胺基之后,如果在胺保护之前不进行,则偶联的胺保护的单体经历硫化反应。

[0234] 硫化可以通过用硫化剂如3H-1,2-苯并二噻茂-3-酮-1,1-二氧化物或苯基乙酰二硫化物或苍耳烷氢化物、在适合的溶剂如乙腈和任选芳族杂环溶剂如吡啶或3-甲基吡啶中处理来进行。

[0235] 在一些实施方案中,硫化在0.1M的苍耳烷氢化物的乙腈和吡啶1:1v/v的溶液中进行。硫化典型地在室温进行。



[0237] (仅用于示例目的)

[0238] 任选的封端步骤

[0239] 在一些实施方案中,在手性助剂胺保护步骤(ii)和硫化步骤(iii)之后进行封端步骤,与步骤(ii)然后是(iii)或(iii)然后是(ii)的顺序无关。封端是将未反应的在先核苷-0H基团封闭以免进一步链延伸、从而阻止形成具有内部碱基缺失(n-1)短聚体(shortmer)的寡核苷酸的过程。可以使用乙酸酐和N-甲基咪唑在一种或多种溶剂(典型地为乙腈、吡啶和/或THF)中的溶液进行封端。

[0240] 在一些实施方案中,在包含步骤(i)、(ii)和(iii)的延伸循环期间不进行封端步骤。在合成寡核苷酸的方法期间,在其他延伸循环中可以使用、也可以不使用封端步骤。在一些实施方案中,在硫化之后进行封端,因为在硫化之前封端可以导致寡核苷酸内磷酸二酯键水平的增加。

[0241] 进一步的延伸循环

[0242] 一旦硫化和手性助剂胺保护、且任选的封端已经完成,则产品可以继续寡核苷酸合成的进一步(链延伸)循环,或可以进行延伸后脱保护、手性助剂去除和从固体支持物上裂解。

[0243] 在一些实施方案中,寡核苷酸合成的方法包含另外的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个延伸循环。这类延伸循环可以根据如下本发明方法中的本发明方法的步骤(i)-(iii)(或步骤b)-f)进行:

[0244] 寡核苷酸合成方法

[0245] 本发明提供寡核苷酸合成的方法,包括下列步骤:

[0246] a) 提供固体支持物,其包含具有封锁末端-OH基团(末端5'-OH基团)的核苷(在先核苷);

[0247] b) 解锁在先核苷的末端-OH基团;

[0248] c) 使氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂亚磷酰胺单体与在先核苷的解锁5'-OH基团偶联;

[0249] d) 用氨基甲酸酯保护基保护氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的胺基;

[0250] e) 在保护步骤(d)之前或之后硫化氧杂氮杂磷杂环戊烷手性助剂的磷原子;

[0251] f) 任选地封端任何未反应的末端5'-OH基团,其中封端步骤在硫化步骤(e)之后进行,或在其中硫化在步骤(d)之前进行的实施方案中,封端步骤可以在步骤(d)之后进行;

[0252] g) 任选地重复步骤b)-f)(另外的链延伸循环);

[0253] h) 去除氨基甲酸酯保护基;

[0254] i) 去除手性助剂基团;

[0255] j) 从固体支持物上裂解寡核苷酸。

[0256] 其中步骤h)、i)和j)依次或同时进行,或步骤h)在去除手性助剂步骤和从固体支持物上裂解之前进行。

[0257] 在一些实施方案中,在寡核苷酸合成中,将步骤b)-f)重复7-25次,例如8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23和24次,例如7-16次。在一些实施方案中,步骤b)-f)的顺序反复为寡核苷酸合成中的连续循环。

[0258] 在一些实施方案中,在步骤g)之后或步骤h)之后,进行任选的胺洗涤步骤。胺洗涤

步骤是指用于寡核苷酸合成中的任意的操作,其中在使寡核苷酸暴露于用于裂解步骤中的强碱条件之前,将寡核苷酸用弱碱在有机溶剂中的溶液处理,例如用20%在乙腈中的二乙胺或1:1三乙胺/乙腈处理。胺洗涤导致去除磷酸氰基乙酯保护基,而不会从固体支持物上裂解寡核苷酸。包括胺洗涤的有益性导致避免了不需要的氰基乙基加合物,例如丙烯腈,其形成是归因于磷酸氰基乙酯保护基和杂环碱、特别是胸腺嘧啶的副反应。在一些实施方案中,手性助剂上的正交保护基的去除(步骤h)可以在胺洗涤步骤期间进行(即步骤h可以是合并的胺洗涤和氨基甲酸酯脱保护步骤),可以合并去除磷酸氰基乙酯保护基和正交保护基,例如存在于手性助剂的胺上的氨基甲酸酯保护基。在一些实施方案中,胺洗涤可以去除氰基乙基保护基、氨基甲酸酯保护基和手性助剂。

[0259] 作为替代方式,可以在胺洗涤步骤之前去除氨基甲酸酯保护基,例如当氨基甲酸酯保护基不是氰基乙基保护基时,例如当氨基甲酸酯保护基为Fmoc保护基或2'-磺酰基氨基甲酸酯时。作为替代方式,可以在胺洗涤步骤之后去除氨基甲酸酯保护基,例如当氨基甲酸酯保护基不是氰基乙基保护基时,例如当氨基甲酸酯保护基为Fmoc保护基或2'-磺酰基氨基甲酸酯时。

[0260] 在一些实施方案中,在步骤j)之后可以纯化寡核苷酸。纯化步骤i)可以使用任意适合的用于寡核苷酸纯化的方法,例如离子交换纯化或反相色谱法,或离子交换纯化和反相色谱法。在一些实施方案中,纯化包含如下依次步骤:a)离子交换纯化,b)脱盐,例如通过渗滤,然后是c)冻干和d)反相色谱法。在纯化之前,典型地去除氢氧化铵或至少稀释氢氧化铵。或者,在DMT-ON反相纯化后继之以脱三苯甲基也是纯化寡核苷酸的选择(参见Capaldi和Scozzari,第14章, *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*, CRC Press 2008)。

[0261] 由于氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体引入Sp或Rp硫代磷酸酯核苷间连接键,本发明的方法可以用于合成立体限定的寡核苷酸。因此,本发明提供了合成立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸的改进方法。在一些实施方案中,除掺入立体限定的硫代磷酸酯核苷间连接键外,所述合成方法还可以通过使用标准亚磷酰胺单体并入立体随机性(stereorandom)核苷间连接键。本发明的方法因此可以包括根据本发明的延伸循环,其产生连接引入的单体的立体限定的核苷间连接键3';以及使用标准化亚磷酰胺单体的另外的延伸循环,其引入立体随机性核苷间连接键。

[0262] 图1、2&3提供了本发明寡核苷酸合成方法的示例性实例。

[0263] 氨基甲酸酯保护基的去除

[0264] 一旦链延伸完成,则去除手性助剂的胺上的氨基甲酸酯保护基。与现有技术中使用的方法(Oka等人)相比,可以更快地和在更低的温度实现氨基甲酸酯保护基的去除。典型地,约4小时或更短的时间就足够。如实施例中所示例,氨基甲酸酯的正交脱保护通常可以在少于约3小时、例如更少和/或约2小时、例如少于或约1小时内实现。在一些实施方案中,氨基甲酸酯保护基的正交脱保护是在低于约55°C的温度实现,例如低于约50°C,例如低于约40°C,例如低于约30°C,例如在或约25°C或在室温。在一些实施方案中,氨基甲酸酯保护基的正交脱保护在小于约4小时的期限内、在低于约55°C的温度、例如低于约50°C、例如低于约40°C、例如低于约30°C、例如在或约25°C或在室温实现。在一些实施方案中,氨基甲酸酯保护基的正交脱保护在小于约2小时的期限内、在低于约55°C的温度、例如低于约50°C、

例如低于约40℃、例如低于约30℃、例如在或约25℃或在室温实现。在一些实施方案中,氨基甲酸酯保护基的正交脱保护在约1小时的期限内、在低于约55℃的温度、例如低于约50℃、例如低于约40℃、例如低于约30℃、例如在或约25℃或在室温实现。

#### [0265] 1罐法

[0266] 在一些实施方案中,氨基甲酸酯保护基的去除在全面脱保护和寡核苷酸从固体支持物上裂解期间进行(发生),本文称作1罐法。全面脱保护和裂解可以使用亚磷酰胺寡核苷酸合成中使用的标准方法,例如在约55℃至约60℃使用氢氧化铵。典型地,使用浓氢氧化铵(~28-35%),其由NH<sub>3</sub>在水中的饱和极限来定义。

#### [0267] 2罐法

[0268] 在一些实施方案中,在全面脱保护(正交脱保护)之前去除氨基甲酸酯保护基。选择性去除氨基甲酸酯保护基典型地通过用适合的碱在有机溶剂中处理来实现,例如在乙腈中的20%二乙胺或在二甲基甲酰胺中的20%哌啶。但是,对于例如氨基甲酸甲硅烷基酯,可以通过用氟离子处理来实现,典型地以在溶剂四氢呋喃中的氟化四丁基铵的形式。

[0269] 用于双-罐或三-罐法(以及任选的1罐法)的氨基甲酸酯保护基为正交保护基,其可以在去除或不除去手性助剂的情况下被特异性地去除(脱保护),但不伴随从固体支持物上的全面脱保护/裂解。

[0270] 用于去除氨基甲酸酯保护基的试剂可以针对每种特定的氨基甲酸酯基团进行优化。实例包括用N,N-二甲基甲酰胺中的20%哌啶(例如对于Fmoc)或在乙腈中的20%三乙胺或二乙胺(例如对于氨基甲酸氰基乙酯)或在四氢呋喃中的1M四丁基氟化物(这适用于含Si的保护基)处理。

[0271] 例如,当氨基甲酸酯保护基为Fmoc时,Fmoc保护基可以通过与哌啶溶液反应而从手性助剂的氮上正交去除,例如20%哌啶的DMF溶液,例如可以使用在室温保持1小时。

[0272] 或者,当氨基甲酸酯保护基为氨基甲酸氰基-乙酯时,可以使用胺洗涤将其正交去除,如本文所述(也参见例如US7186822)。一种优选的用于去除正交保护基如氰基-乙基的试剂为乙腈中的三乙胺(1:1,v/v),例如在25℃,或10%二乙胺的乙腈溶液,例如在25℃。

[0273] 在一些实施方案中,氨基甲酸酯保护基的正交脱保护在低于约55℃的温度、例如低于约50℃、例如低于约40℃、例如低于约30℃、例如在或约25℃或室温实现。

[0274] 在正交去除氨基甲酸酯保护基之后,寡核苷酸可以进行全面的脱保护、手性助剂的裂解和从固体支持物上的裂解(称为2罐法)。第一步(罐1)是氨基甲酸酯保护基从手性助剂的胺上的正交脱保护,然后是全面脱保护的第二步(罐2)。全面脱保护和裂解可以使用亚磷酰胺寡核苷酸合成中使用的标准方法,例如在55°使用氢氧化铵。

#### [0275] 3罐法

[0276] 在一些实施方案中,在正交去除氨基甲酸酯保护基之后,和在全面脱保护和从固体支持物裂解之前,进行手性助剂的裂解步骤。选择性去除手性助剂可以通过用DBU(1,8-二氮杂双环(5.4.0)十一碳-7-烯)处理来进行,例如可以在室温使用1小时。三罐法包括第一步(罐1)将氨基甲酸酯保护基从手性助剂的胺上正交脱保护,然后第二步(罐2)进行去除手性助剂基团,然后是第三步(罐3)全面脱保护和从固体支持物上裂解。

[0277] 使用2罐或3罐法允许更快速的脱保护和裂解过程,其可以在较低温度下进行,并且可以导致改善的寡核苷酸纯度/质量。因此,与使用三氟乙酰基胺保护基的现有技术方法

的非正交方法相比,正交保护方法(2罐和3罐法)是有益的。

#### [0278] 3'-LNA寡核苷酸

[0279] 在一些实施方案中,通过本发明方法合成的寡核苷酸为LNA寡核苷酸。在一些实施方案中,本发明的寡核苷酸的3'末端核苷为LNA寡核苷酸。如实施例所示,本发明人已发现具有与固体支持物(例如如本文所公开的含有UnyLinker部分的支持物)结合的3'末端LNA的LNA寡核苷酸可以在约1-约4小时、在全面脱保护和裂解条件下(例如氢氧化铵,在约55°C-约60°C)从固体支持物的Unylinker部分裂解下来。实际上,在全面脱保护的约4小时内,具有3'LNA核苷的LNA寡核苷酸,例如具有2'-O-CH<sub>2</sub>-4'桥接的LNA,可以从UnyLinker固体支持物上有效地裂解并脱保护。

#### [0280] 活化剂

[0281] 活化剂是在寡核苷酸合成的偶联步骤之前或期间使用的试剂,其活化亚磷酰胺单体以允许该单体偶联至与固体支持物或寡核苷酸链连接的5'末端基团。

[0282] 在一些实施方案中,该活化剂包含N-甲基咪唑。在一些实施方案中,该活化剂包含4,5-二氰基咪唑(DCI)、四唑、或5-(苄硫基)-1H-四唑。在一些实施方案中,该活化剂包含4,5-二氰基咪唑(DCI)、四唑或5-(苄硫基)-1H-四唑和N-甲基咪唑。

[0283] 如本文所公开,在一些实施方案中,偶联反应(i)在乙腈溶液中进行,任选地包含芳族杂环溶剂和活化剂。在一些实施方案中,芳族杂环溶剂为吡啶。

[0284] 在一些实施方案中,所用N-甲基咪唑的浓度为0.01M-约1M N-甲基咪唑,例如约0.1M N-甲基咪唑。在一些实施方案中,乙腈溶液包含N-甲基咪唑,其浓度为0.01M-约1M的N-甲基咪唑,例如约0.1M的N-甲基咪唑。

[0285] 在一些实施方案中,所述活化剂为DCI或四唑或5-(苄硫基)-1H-四唑,其可以以约0.5-约2M、例如约1M的浓度(例如在乙腈溶液中)使用。

#### [0286] 立体限定的硫代磷酸酯寡核苷酸

[0287] 典型地,将寡核苷酸硫代磷酸酯合成为R<sub>p</sub>和S<sub>p</sub>硫代磷酸酯连接键的无规混合物(也称为非对映异构体混合物)。在本发明的方法中,提供了硫代磷酸酯寡核苷酸,其中在寡核苷酸样品中存在的至少75%、如至少80%或至少85%或至少90%或至少95%或至少97%、如至少98%、如至少99%或(基本上)所有寡核苷酸分子中,寡核苷酸发硫代磷酸酯连接键的至少一个是立体限定的,即为R<sub>p</sub>或S<sub>p</sub>。立体限定的寡核苷酸包含至少一个为立体限定的硫代磷酸酯连接键。术语“立体限定的”可用于将一个或多个硫代磷酸酯核苷间连接键的限定手性描述为R<sub>p</sub>或S<sub>p</sub>,或可用于描述包含这类一个(或多个)硫代磷酸酯核苷间连接键的寡核苷酸。已经认识到,立体限定的寡核苷酸可以在任何一个位置包含少量的可替代的立体异构体,例如Wan等人报道了2014年11月NAR中报道的Gapmer的98%立体选择性。

#### [0288] LNA寡核苷酸

[0289] LNA寡核苷酸是包含至少一个LNA核苷的寡核苷酸。LNA寡核苷酸可以是反义寡核苷酸。

[0290] 本文使用的术语寡核苷酸定义为本领域技术人员通常所理解的包含两个或多个共价连接的核苷的分子。对于用作反义寡核苷酸,典型地合成长度为7-30个核苷的寡核苷酸。

[0291] 如本文所用的术语“反义寡核苷酸”是指能够通过靶核酸杂交、特别是与靶核酸

上的连续序列杂交来调节靶基因表达的寡核苷酸。反义寡核苷酸也可以通过其与靶核酸互补来定义。反义寡核苷酸是单链的。反义寡核苷酸基本上不是双链的,因此不是siRNA。反义寡核苷酸包含与靶核酸互补的连续核苷酸。反义寡核苷酸通常包含一个或多个修饰的核苷间连接键,并且作为非限制性实例可以是LNA Gapmer或混合翼(mixed wing) Gapmer的形式。在其他实施方案中,寡核苷酸可以是LNA混合物(mixmer)(LNA和非LNA核苷酸,例如LNA和DNA(参见例如W02007/112754,在此引入作为参考),或LNA和2'-O-MOE核苷酸,或LNA、DNA和2'-O-MOE核苷酸),或LNA单一体(totalmer)(仅有LNA核苷酸-参见例如W02009/043353,在此引入作为参考)。

[0292] 术语“修饰的核苷间连接键”定义为本领域技术人员通常所理解的连接键,除外磷酸二酯(P0)连接键,其将两个核苷共价偶联在一起。修饰的核苷间连接键特别适用于稳定体内应用的寡核苷酸,并且可用于保护免受核酸酶裂解。由于核酸酶抗性、有益的药物动力学和易于生产,硫代磷酸酯核苷间连接键特别有用。在一些实施方案中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的至少70%、例如至少80%或例如至少90%的核苷间连接键是硫代磷酸酯。在一些实施方案中,寡核苷酸或其连续核苷酸序列中的所有核苷间连接键是硫代磷酸酯,其中至少一个硫代磷酸酯核苷间连接键是立体限定的硫代磷酸酯核苷间连接键(源自寡核苷酸合成过程中氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体掺入寡核苷酸中)。在W02009/124238(在此引入作为参考)中公开了其他核苷间连接体。

[0293] 术语核碱基包括存在于核苷和核苷酸中的嘌呤(例如腺嘌呤和鸟嘌呤)和嘧啶(例如尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶)部分,其在核酸杂交中形成氢键。在本发明的上下文中,术语核碱基还包括修饰的核碱基,其可以不同于天然存在的核碱基,但在核酸杂交期间是有功能的。在一些实施方案中,通过修饰或替换核碱基来修饰核碱基部分。在本文中,“核碱基”是指天然存在的核碱基如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤和次黄嘌呤,以及非天然存在的变体。这些变体例如描述于例如Hirao等人(2012) *Accounts of Chemical Research*第45卷第2055页和Bergstrom(2009) *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*增刊37 1.4.1。

[0294] 核苷酸是寡核苷酸和多核苷酸的构建单元,并且出于本发明的目的,包括天然存在的和非天然存在的核苷酸。在自然界中,核苷酸如DNA和RNA核苷酸包含核糖部分、核碱基部分和一个或多个磷酸基团(其在核苷中不存在)。与等同的DNA或RNA核苷/核苷酸相比,修饰的核苷和核苷酸通过引入对核糖部分、核碱基部分的修饰或在修饰的核苷酸的情况下引入对核苷间连接键的修饰而被修饰。核苷和核苷酸也可互换地称为“单元”或“单体”。

[0295] 如本文所用的术语“修饰的核苷”或“核苷修饰”是指与等同的DNA或RNA核苷相比,通过引入糖部分或(核)碱基部分的一个或多个修饰而修饰的核苷。术语“修饰的核苷”在本文中也可与术语“核苷类似物”或修饰的“单元”或修饰的“单体”互换使用。修饰的核苷的实例在单独的“寡聚体修饰”部分及其子部分中描述。

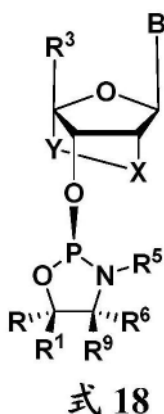
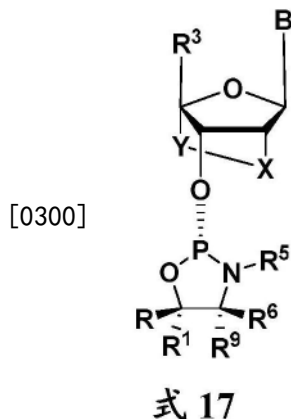
[0296] 锁核酸核苷(LNA)

[0297] LNA核苷是修饰的核苷,其包含核苷酸的核糖糖环的C2'和C4'之间的连接基团(称为二价基团或桥接) (即其中R<sup>2</sup>和R<sup>4</sup>一起表示二价桥接的实施方案)。

[0298] 这些核苷在文献中也称为桥接核酸或双环核酸(BNA)。

[0299] 在一些实施方案中,氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体为或包含LNA核苷,例如,

单体可以具有式17或18



[0301] 其中B表示核碱基;R、R<sup>1</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>5</sup>如式A、A(i)、A(ii)或式1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16的任一个所述。

[0302] 在式17的一些实施方案中,B不为DMF保护的鸟嘌呤。在一些实施方案中,B为腺嘌呤或胸腺嘧啶。在一些实施方案中,B为DMF保护的腺嘌呤。

[0303] X表示选自如下的基团:-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=N-、-O-、-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-和>C=Z。

[0304] 在一些实施方案中,X选自:-O-、-S-、-NH-、-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、-CH<sub>2</sub>-、-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>、-C(=CH<sub>2</sub>)-和-C(=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-。

[0305] 在一些实施方案中,X为-O-。

[0306] Y表示选自如下的基团:-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=N-、-O-、-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-和>C=Z。

[0307] 在一些实施方案中,Y选自:-CH<sub>2</sub>-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-和-C(R<sup>a</sup>)=N-。

[0308] 在一些实施方案中,Y选自:-CH<sub>2</sub>-、-CHR<sup>a</sup>-、-CHCH<sub>3</sub>-、-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-

[0309] 或-X-Y-一起表示二价连接基(也称作二价基团),它们一起表示由1、2或3个基团/原子组成的二价连接基,所述基团/原子选自-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=N-、-O-、-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-和>C=Z,

[0310] 在一些实施方案中,-X-Y-表示二价基团,其选自:-X-CH<sub>2</sub>-、-X-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-、-X-CHR<sup>a</sup>-、-X-C(HCH<sub>3</sub>)-、-O-Y-、-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-、-NH-CH<sub>2</sub>-、-O-CHCH<sub>3</sub>-、-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-、-O-CH(CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-、-O-NCH<sub>2</sub>-、-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-、-NR<sup>a</sup>-CH<sub>2</sub>-、-N-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-和-S-CHR<sup>a</sup>-。

[0311] 在一些实施方案中,-X-Y-表示-O-CH<sub>2</sub>-或-O-CH(CH<sub>3</sub>)-。

[0312] 且R<sup>a</sup>和存在时的R<sup>b</sup>各自独立地选自氢、任选取代的C<sub>1-6</sub>-烷基、任选取代的C<sub>2-6</sub>-烯基、任选取代的C<sub>2-6</sub>-炔基、羟基、任选取代的C<sub>1-6</sub>-烷氧基、C<sub>2-6</sub>-烷氧基烷基、C<sub>2-6</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-6</sub>-烷氧基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳基羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳基羰基、氨基、单-和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)氨基、氨基甲酰基、单-和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)-氨基-羰基、氨基-C<sub>1-6</sub>-烷基-氨基羰基、单-和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)氨基-C<sub>1-6</sub>-烷基-氨基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰基氨基、脲基、C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基、磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷基磺酰氧基、硝基、叠氮基、硫烷基、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、卤素,其中芳基和杂芳基可以任选地被取代,且其中两个

孪位取代基 $R^a$ 和 $R^b$ 一起可表示任选取代的亚甲基( $=CH_2$ ),其中对于所有手性中心,不对称基团可以为R或S取向。

[0313]  $R^{10}$ 可以为氢或在一些实施方案中可以选自:任选取代的 $C_{1-6}$ -烷基、任选取代的 $C_{2-6}$ -烯基、任选取代的 $C_{2-6}$ -炔基、羟基、 $C_{1-6}$ -烷氧基、 $C_{2-6}$ -烷氧基烷基、 $C_{2-6}$ -烯氧基、羧基、 $C_{1-6}$ -烷氧基羰基、 $C_{1-6}$ -烷基羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳基羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳基羰基、氨基、单-和二( $C_{1-6}$ -烷基)氨基、氨基甲酰基、单-和二( $C_{1-6}$ -烷基)-氨基-羰基、氨基- $C_{1-6}$ -烷基-氨基羰基、单-和二( $C_{1-6}$ -烷基)氨基- $C_{1-6}$ -烷基-氨基羰基、 $C_{1-6}$ -烷基-羰基氨基、脲基、 $C_{1-6}$ -烷酰氧基、磺酰基、 $C_{1-6}$ -烷基磺酰氧基、硝基、叠氮基、硫烷基、 $C_{1-6}$ -烷硫基、卤素,其中芳基和杂芳基可以任选地被取代,且其中两个孪位取代基一起可表示氧代、硫代、亚氨基或任选取代的亚甲基。

[0314] 在一些实施方案中, $R^{10}$ 选自 $C_{1-6}$ 烷基如甲基和氢。

[0315] 在一些实施方案中, $R^{10}$ 为氢。

[0316] 在一些实施方案中, $R^a$ 为氢或甲基。在一些实施方案中,当存在时, $R^b$ 为氢或甲基。

[0317] 在一些实施方案中, $R^a$ 和 $R^b$ 之一或它们两个为氢。

[0318] 在一些实施方案中, $R^a$ 和 $R^b$ 之一为氢,而另一个不为氢。

[0319] 在一些实施方案中, $R^a$ 和 $R^b$ 之一为甲基,而另一个为氢。

[0320] 在一些实施方案中, $R^a$ 和 $R^b$ 均为甲基。

[0321] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-O-CH_2-$ ,且 $R^{10}$ 为氢。在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-S-CH_2-$ ,且 $R^{10}$ 为氢。

[0322] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-NH-CH_2-$ ,且 $R^{10}$ 为氢。

[0323] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-O-CH_2-CH_2-$ 或 $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,且 $R^{10}$ 为氢。

[0324] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-O-CH_2-$ ,且 $R^{10}$ 为 $C_{1-6}$ 烷基、例如甲基。

[0325] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-O-CR^aR^b-$ ,其中 $R^a$ 和 $R^b$ 之一或它们两个不为氢,例如甲基,且 $R^{10}$ 为 $C_{1-6}$ 烷基如甲基。

[0326] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-表示二价连接基团 $-O-CH(CH_2OCH_3)-(2' O-甲氧基乙基双环核酸-Seth等人,2010,J.Org.Chem.,2010,75(5),pp1569-1581)$ 。在一些实施方案中,二价基团-X-Y-表示二价连接基团 $-O-CH(CH_2CH_3)-(2' O-乙基双环核酸-Seth等人,2010,J.Org.Chem)$ 。在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-O-CHR^a-$ 且 $R^{10}$ 为氢。

[0327] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-O-CH(CH_2OCH_3)-$ 且 $R^{10}$ 为氢。该LNA核苷在本领域也被称为环MOE(cMOE)并且公开于W007090071。

[0328] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-表示R-或S-构型的二价连接基团 $-O-CH(CH_3)-$ 。在一些实施方案中,二价基团-X-Y-一起表示二价连接基团 $-O-CH_2-O-CH_2-$ (Seth等人,2010,J.Org.Chem)。在一些实施方案中,二价基团-X-Y-是 $-O-CH(CH_3)-$ 且 $R^{10}$ 是氢。该6'甲基LNA核苷在本领域也被称为cET核苷,且可以是(S)cET或(R)cET立体异构体,其公开于W007090071( $\beta$ -D)和W02010/036698( $\alpha$ -L)。

[0329] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-O-CR^aR^b-$ ,其中在 $R^a$ 或 $R^b$ 中无一为氢,且 $R^{10}$ 为氢。在一些实施方案中, $R^a$ 和 $R^b$ 均为甲基。

[0330] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-S-CHR^a-$ ,且 $R^{10}$ 为氢。

[0331] 在一些实施方案中,二价基团-X-Y-为 $-C(=CH_2)-C(R^aR^b)-$ ,例如 $-C(=CH_2)-CH_2-$

或-C(=CH<sub>2</sub>)-CH(CH<sub>3</sub>)-, 且R<sup>10</sup>为氢。

[0332] 在一些实施方案中, 二价基团-X-Y-为-N(-OR<sup>a</sup>)-, 且R<sup>10</sup>为氢。在一些实施方案中, R<sup>a</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基如甲基。在一些实施方案中, 二价基团-X-Y-一起表示二价连接基-O-NR<sup>a</sup>-CH<sub>3</sub>- (Seth等人, 2010, J.Org.Chem)。在一些实施方案中, 二价基团-X-Y-为-N(R<sup>a</sup>)-, 且R<sup>10</sup>为氢。在一些实施方案中, R<sup>a</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基如甲基。

[0333] 在一些实施方案中, 且R<sup>10</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基如甲基。在这类实施方案中, 二价基团-X-Y-可以选自-O-CH<sub>2</sub>-或-O-C(HCR<sup>a</sup>)-, 例如-O-C(HCH<sub>3</sub>)-。

[0334] 在一些实施方案中, 二价基团为-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-如CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, 且R<sup>10</sup>为氢。在一些实施方案中, R<sup>a</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基如甲基。

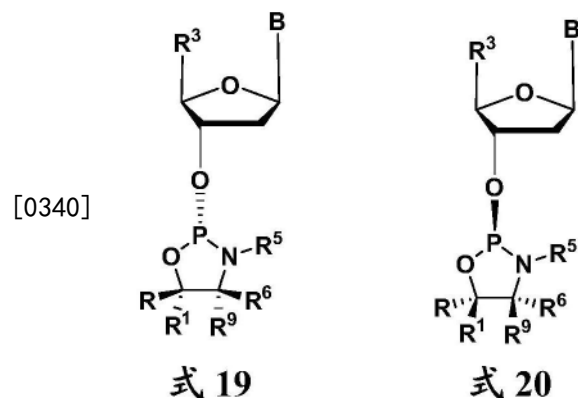
[0335] 在一些实施方案中, 二价基团为-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-O-CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>-如O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-, 且R<sup>10</sup>为氢。在一些实施方案中, R<sup>a</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基如甲基。

[0336] 可以理解, 除非具体指明, 否则LNA核苷可以是β-D或α-L立体异构形式。

[0337] 如实施例中所示, 在本发明的一些实施方案中, LNA核苷为或包含β-D-氧-LNA核苷, 例如其中2'-4'桥接如式I所述, 且其中X是氧, Y是CH<sub>2</sub>且R<sup>10</sup>是氢。

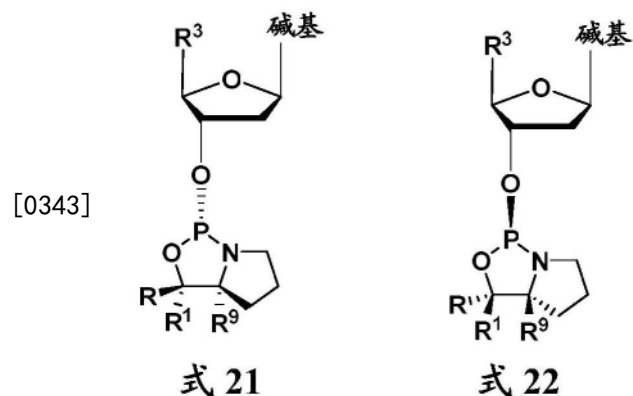
[0338] DNA核苷

[0339] 在一些实施方案中, 氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体是或包含DNA核苷, 例如该单体可以是式19或式20:



[0341] 其中B表示核碱基; R、R<sup>1</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>5</sup>如对式A、A(i)、A(ii)或式1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16的任意一个所述。在式20的一些实施方案中, B为腺嘌呤, 例如被保护的腺嘌呤, 例如Bz保护的腺嘌呤。

[0342] 在一些实施方案中, 氧杂氮杂磷杂环戊烷亚磷酰胺单体如对式21和22所述:



[0344] 其中碱基表示核碱基; R、R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>9</sup>如对式A、A(i)、A(ii)或式1、2、3、4、5、6、7、8、9、

10、11、12、13、14、15或16的任意一个所述。在式20或22的一些实施方案中,B为腺嘌呤,例如被保护的腺嘌呤,例如Bz保护的腺嘌呤。在式19、20、21或22的单体的一些实施方案中,R为苯基,且R<sup>1</sup>为氢或甲基。在式19、20、21或22的单体的一些实施方案中,R<sup>3</sup>为CH<sub>2</sub>-O-DMTr或CH<sub>2</sub>-O-MMTr。

[0345] 包含DNA和/或亲和力增强性核苷的寡核苷酸

[0346] 在一些实施方案中,寡核苷酸是DNA硫代磷酸酯寡核苷酸。DNA硫代磷酸酯寡核苷酸仅包含DNA核苷,并且在一些实施方案中可仅包含立体限定的硫代磷酸酯核苷间连接键。DNA硫代磷酸酯的长度可以是例如18-25个核苷酸。

[0347] 在一些实施方案中,该寡核苷酸包含一种或多种亲和力增强性核苷,例如本文所述的LNA或2'取代的核苷。亲和性增强性核苷如2'-O-MOE或2'-O-甲基通常用于反义寡核苷酸中,或者与其他核苷组合,例如DNA核苷,以例如混合体或Gapmer的形式,或可用于完全糖修饰的寡核苷酸,其中所有核苷不是DNA或RNA。

[0348] 在一些实施方案中,通过本发明工艺或非法合成的寡核苷酸可以为gapmer以及LNA gapmer或混合翼gapmer。

[0349] Gapmer

[0350] 如本文所用的术语Gapmer是指反义寡核苷酸,其包含RNaseH募集寡核苷酸区域(Gap/缺口),其通过一个或多个亲和力增强性修饰的核苷(侧翼)侧接5'和3'。本文描述了各种Gapmer设计。头部体(headmers)和尾部体(tailmers)是其中一个侧翼缺失的能够募集RNaseH的寡核苷酸,即寡核苷酸的末端中仅有一个末端包含亲和力增强性修饰的核苷。对于头部体,缺失3'侧翼(即5'侧翼包含亲和力增强性修饰的核苷),对于尾部体,缺失5'侧翼(即3'侧翼包含亲和力增强性修饰的核苷)。

[0351] LNA Gapmer

[0352] 术语LNA Gapmer是其中至少一种亲和力增强性修饰的核苷是LNA核苷的Gapmer寡核苷酸。

[0353] 混合翼Gapmer

[0354] 术语混合翼Gapmer是指其中侧翼区包含至少一种LNA核苷和至少一种非LNA修饰的核苷的LNA Gapmer,例如至少一种2'取代的修饰核苷,例如2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-DNA、阿糖核酸(arabino nucleic acid/ANA)、2'-氟-ANA和2'-F-ANA核苷。在一些实施方案中,混合翼Gapmer的一个侧翼包含LNA核苷(例如5'或3'),另一个侧翼(相应的为3'或5')包含2'取代的修饰核苷。

[0355] 长度

[0356] 当提及本文提到的核苷酸分子的长度时,长度对应于单体单元即核苷酸的数目,无论这些单体单元是核苷酸还是核苷酸类似物。关于核苷酸,术语单体和单元在本文中可互换使用。

[0357] 本发明的方法特别适用于纯化短寡核苷酸,例如由7至30个核苷酸、如7-10个如7、8、9、10或10至20个核苷酸、例如12至18个核苷酸、例如12、13、14、15、16、17或18个核苷酸组成的寡核苷酸。

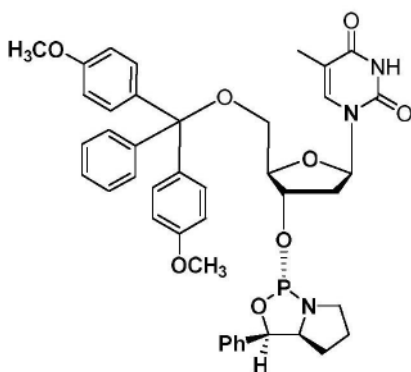
## 实施例

[0358] 我们预先已经示例了其中G残基被酰基保护的L-LNA-G单体在偶联溶剂中具有极大增加的溶解度和稳定性—参见EP 16161089.4,其通过引用结合到本文中。EP 16161089.4的实施例1-6在此通过引用整体并入。

[0359] 我们预先已经示例,向步骤(i)中使用的偶联溶剂中加入芳族杂环溶剂极大地提高了偶联效能—参见EP 16169429.4,其在此引入作为参考。EP 16169429.4的实施例1-12在此通过引用整体并入。

[0360] 实施例1

[0361] 使用负载T-琥珀酸酯的CPG固体支持物进行1 $\mu$ mol规模的合成。使用常规的5'-二甲氧基三苯甲基-3'- $\beta$ -氰基乙基脱氧胸苷亚磷酰胺,进行9次立体随机偶联,然后使用式23的脱氧胸苷亚磷酰胺进行1次立体限定偶联,然后再用5'-二甲氧基三苯甲基-3'- $\beta$ -氰基乙基脱氧胸苷亚磷酰胺进行5次立体随机偶联。所有合成步骤均根据图1所示的循环进行,使用下面列出的试剂。在单次立体限定的偶联中,在硫化步骤后、但在封端步骤前,将0.5M N-琥珀酰亚胺基碳酸9-苄基甲酯在二氯甲烷中的溶液与0.5M二异丙基乙胺溶液在合成仪上以各种比例(如图4所示)混合。然后将固体支持物与1mL浓氢氧化铵混合,在55 $^{\circ}$ C放置1h,然后真空蒸发。



[0362]

式 23

[0363] 合成循环中使用的试剂:

- |        |        |                          |
|--------|--------|--------------------------|
| [0364] | 解锁剂    | 含3%二氯乙酸的二氯甲烷(v/v)        |
| [0365] | 活化剂    | 含1M二氰基咪唑和0.1M N-甲基咪唑的乙腈  |
| [0366] | Cap A  | 含20%1-甲基咪唑的乙腈(v/v)       |
| [0367] | Cap B1 | 含40%乙酸酐的乙腈(v/v)          |
| [0368] | Cap B2 | 含60%吡啶或2,6-卢惕啶的乙腈(v/v)   |
| [0369] | 硫化试剂   | 0.1M在1:1v/v乙腈和吡啶中的苍耳烷氢化物 |

[0370] 在底部色谱图中,合成类似于上述进行,但没有Fmoc保护。在这种情况下,可以看出,存在对应于含有N-乙酰化手性助剂的产物的较大峰。如果在封端前引入Fmoc保护,则该峰实际上已消失,表明Fmoc保护高度有效,并且诱导了手性助剂从寡核苷酸中极为快速的裂解。参见图4。

[0371] 实施例2:封端前使用和不使用Fmoc保护的完全立体限定寡核苷酸的合成比较

[0372] 使用来自式23结构的亚磷酰胺进行如下完全立体限定寡核苷酸的1 $\mu$ mol合成。

[0373]  $5' - G_{srP}^{\circ} mC_{srP}^{\circ} a_{srP} a_{srP} g_{ssP} c_{ssP} a_{ssP} t_{srP} c_{ssP} c_{srP} t_{srP} G_{ssP}^{\circ} T^{\circ} - 3'$

[0374] 其中大写字母表示LNA核苷酸,小写字母表示DNA核苷酸,在两个相关核苷酸之间显示核苷酸间硫代磷酸酯的立体构型。“srP”表示R-构型的硫代磷酸酯,“ssP”表示S-构型的硫代磷酸酯。

[0375] 使用的合成循环如图1所示,且试剂与实施例1中相同,

[0376] 4h脱保护后的结果如图5中所示。

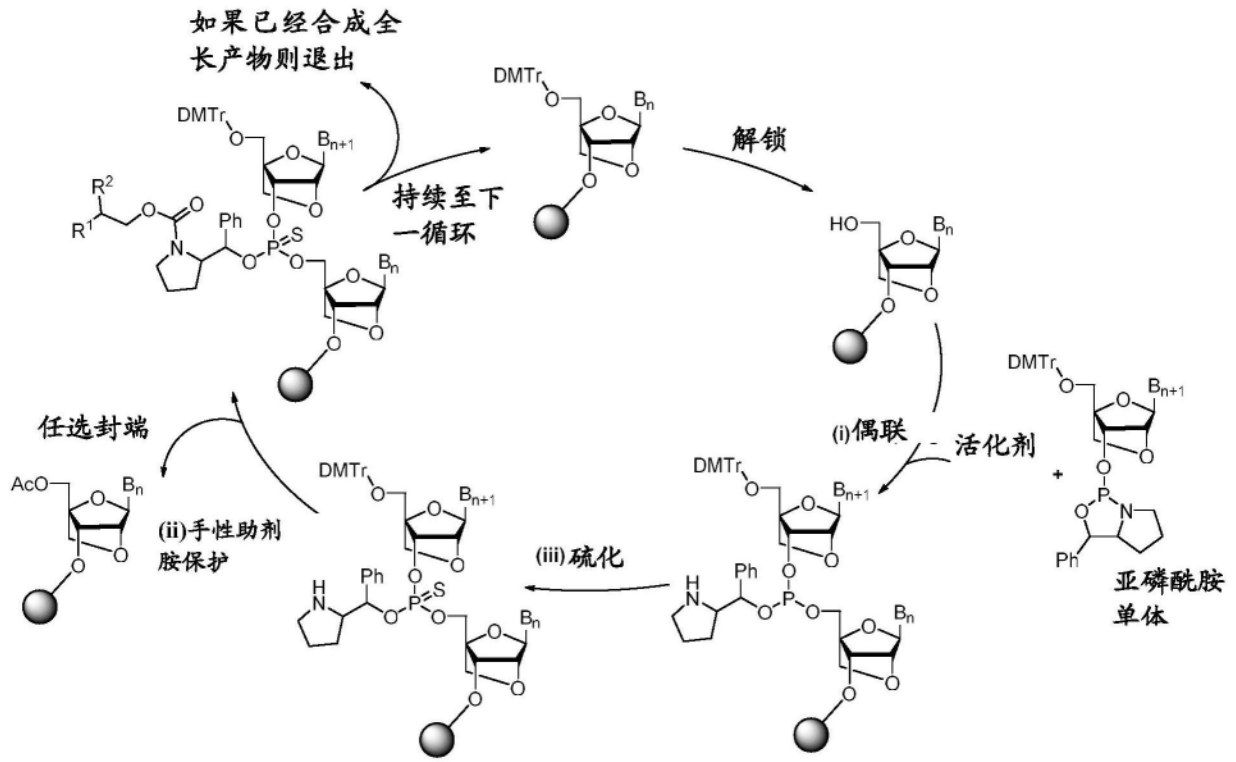


图1

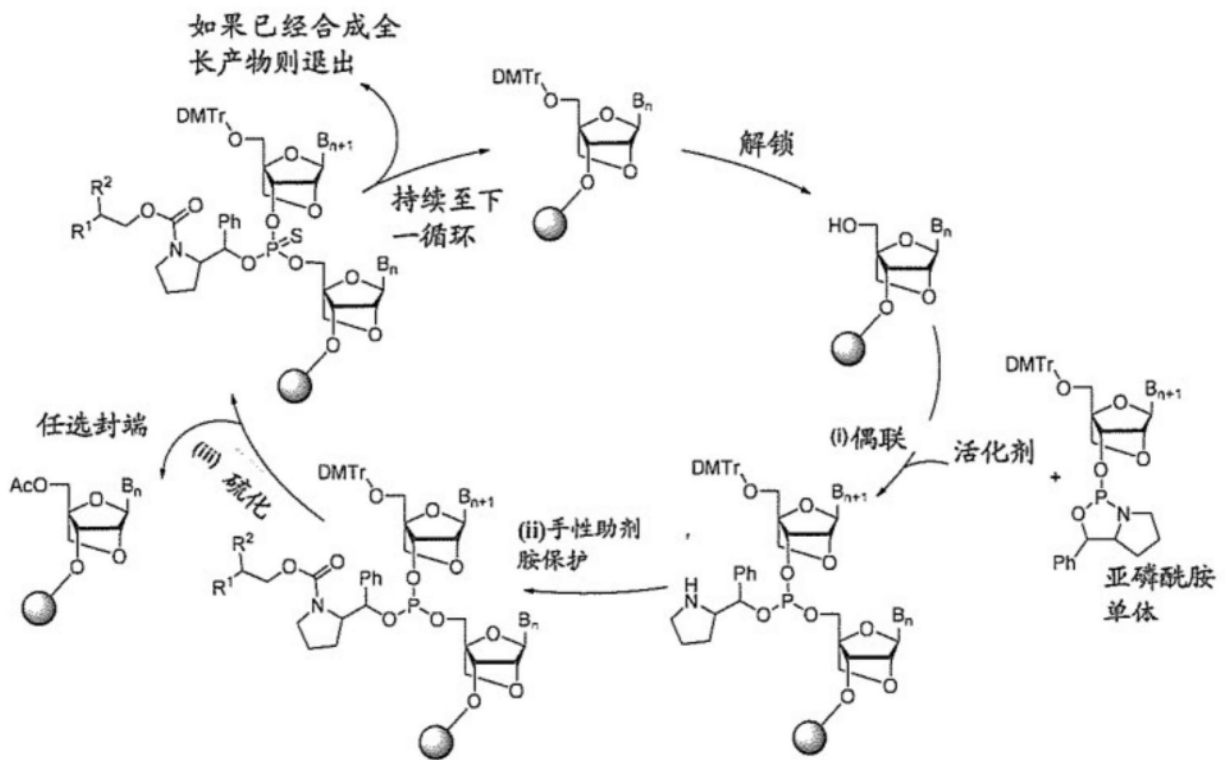


图2

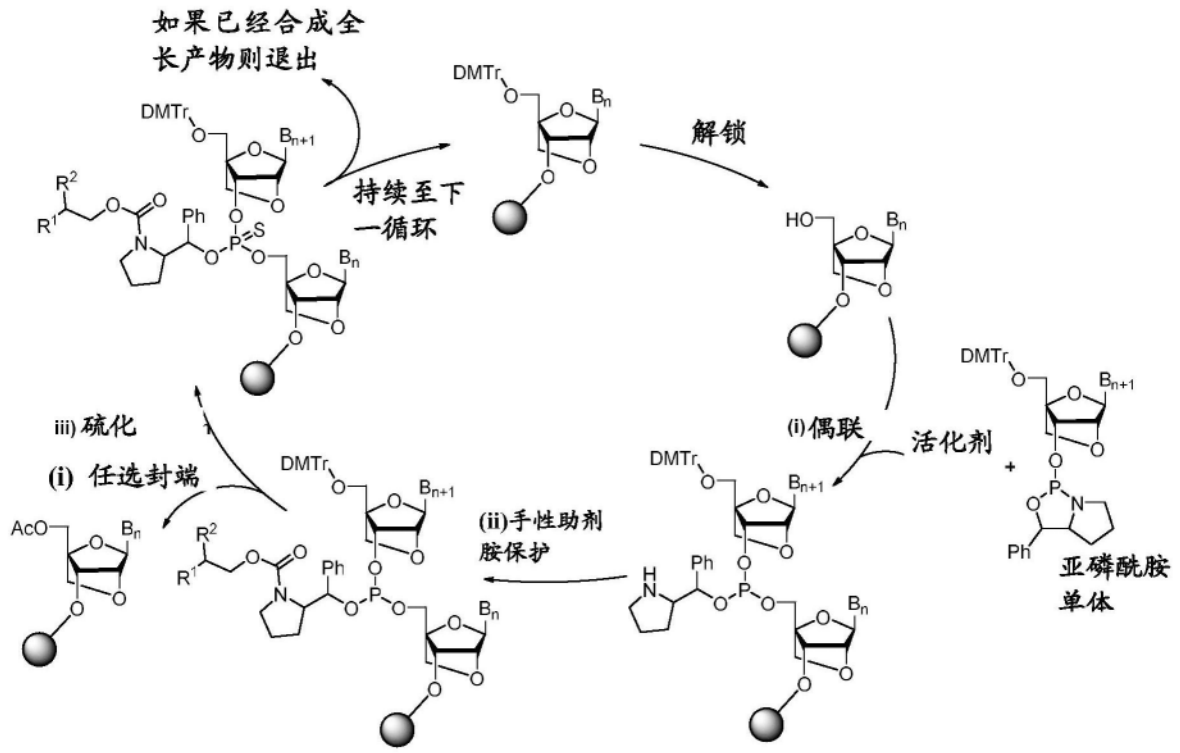


图3

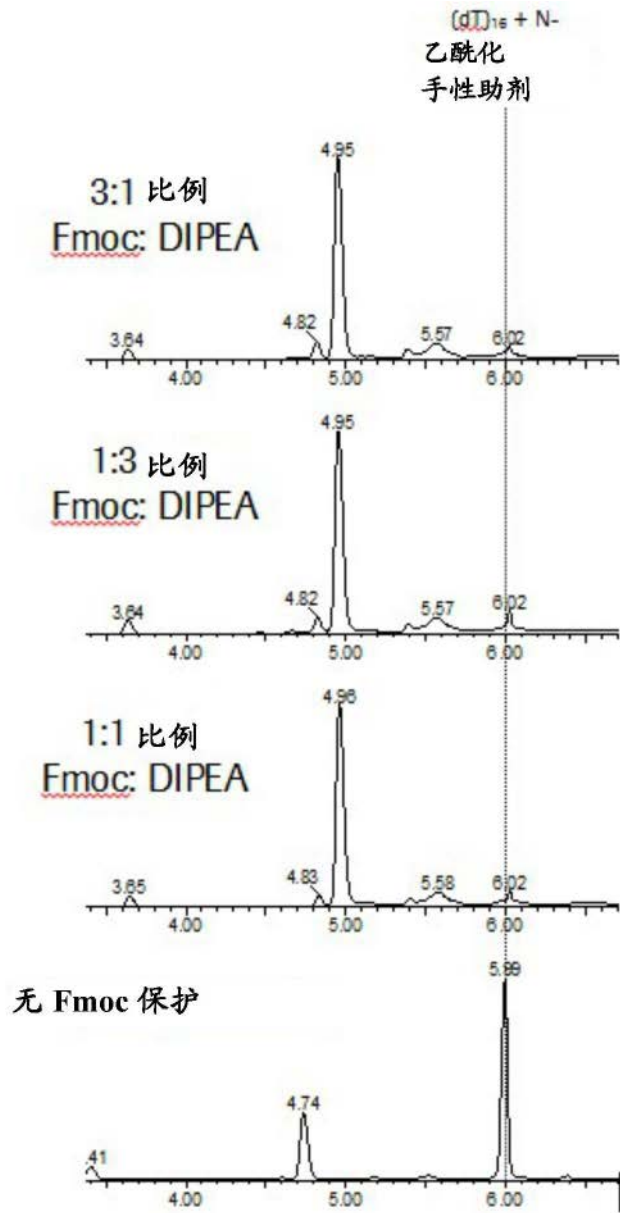


图4

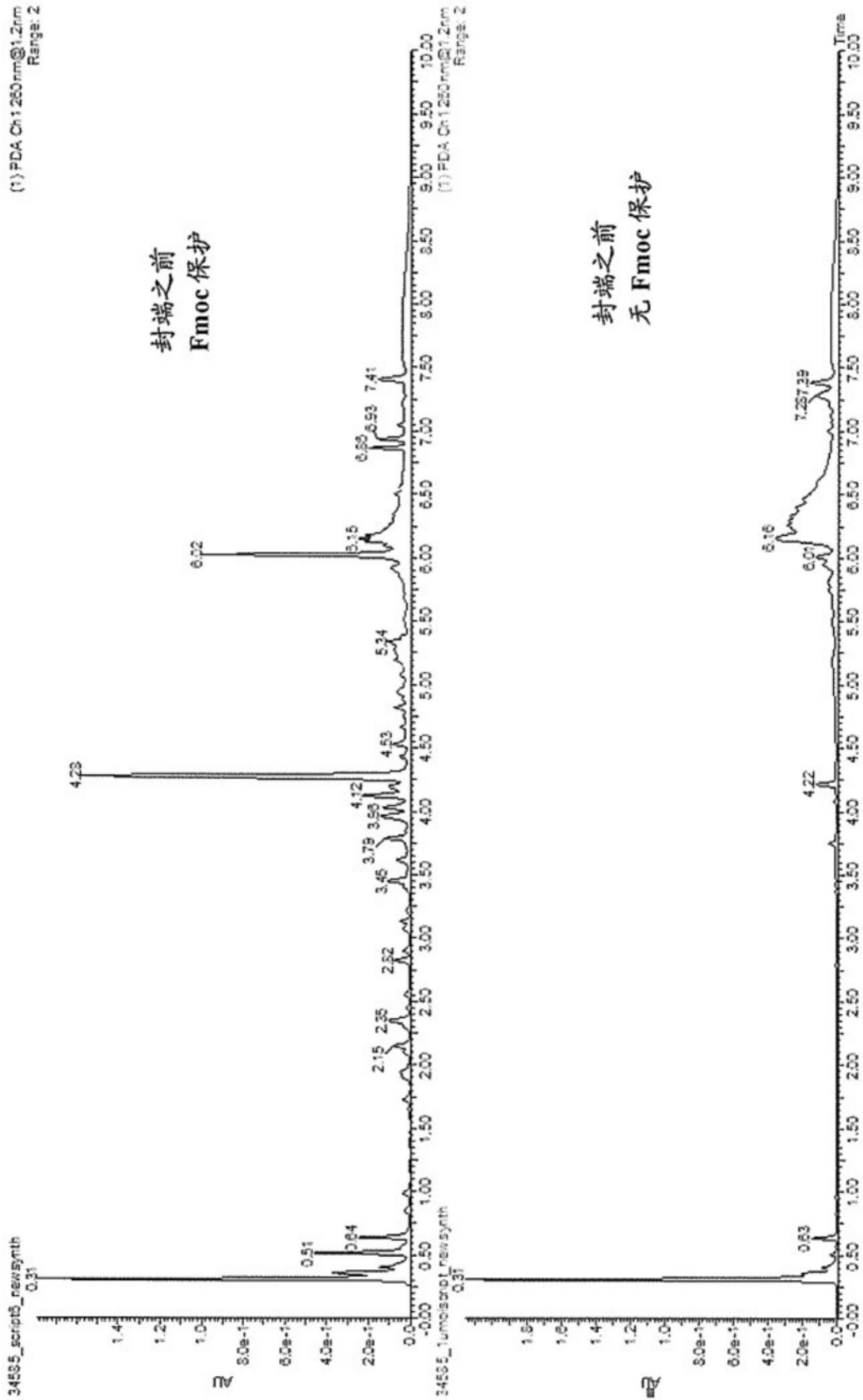


图5