

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07H 19/06

C07H 21/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00807070.9

[43] 公开日 2002 年 5 月 15 日

[11] 公开号 CN 1349541A

[22] 申请日 2000.5.4 [21] 申请号 00807070.9

[30] 优先权

[32] 1999.5.4 [33] DK [31] PA199900603

[32] 1999.9.1 [33] DK [31] PA199901225

[32] 2000.1.11 [33] DK [31] PA200000032

[86] 国际申请 PCT/DK00/00225 2000.5.4

[87] 国际公布 WO00/66604 英 2000.11.9

[85] 进入国家阶段日期 2001.11.2

[71] 申请人 埃克西库恩公司

地址 丹麦韦兹拜克

[72] 发明人 叶斯佩尔·文格尔

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书 13 页 说明书 52 页 附图页数 4 页

[54] 发明名称 L-核糖-LNA 类似物

[57] 摘要

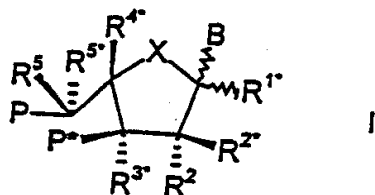
核苷类似物,其中,用在 C-3' 与 C-4' 转化的立体化学合成 2'-4'-桥接锁定核苷构型的核苷类似物,以提供 L-核糖-构型 LNA 核苷。该 L-核糖-LNA-核苷合成可应用于所有核碱基,该核碱基包含胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶。这些具有 L-核糖-构型的锁定核酸(LNA)已用于 2'-O-4'-亚甲基- $\alpha$ -L-核糖呋喃糖基核苷酸以及其中含有 L-核糖-LNA 核苷酸的寡核苷酸的合成。利用这些 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸,借助它们对于互补核酸的高亲和性,大幅改善靶标互补核酸的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

## 权 利 要 求 书

1. 一种寡聚物，包括至少一种通式 I 的核苷类似物，



其中 X 选自 -O-、-S-、-N(R<sup>N\*</sup>)-、-C(R<sup>6\*</sup>R<sup>6\*</sup>)-;

B 选自氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-酰氧基、核碱基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体;

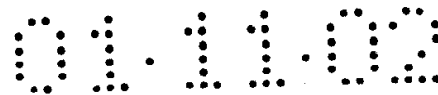
P 表示核苷间键连接到后一单体或 5' -端基的自由基位置，该核苷间键或 5' -端基任选地包含取代基 R<sup>5</sup> 或同等应用的取代基 R<sup>5\*</sup>;

P\* 表示核苷间键连接到前一单体，或 3' -端基;

R<sup>2\*</sup> 与 R<sup>4\*</sup> 表示选自 -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>3</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-和 >C=Z 的 1 至 4 个基团/原子组成的双自由基，

其中 Z 选自 -O-、-S-和 -N(R<sup>a</sup>)-，R<sup>a</sup> 和 R<sup>b</sup> 分别选自氢、任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-烯基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-炔基、羟基、C<sub>1-12</sub>-烷氧基、C<sub>2-12</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-12</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-12</sub>-烷羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳羰基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、甲酰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)-胺基-羰基、胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺羰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰胺基、甲酰胺基、C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基、磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷磺酰氧基、硝基、偶氮基、胺磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，其中芳基与杂芳基任选地被取代，成对取代基 R<sup>a</sup> 与 R<sup>b</sup> 都可为任选取代的亚甲基烯烃(=CH<sub>2</sub>);

在此取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup> 分别选自氢、任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-烯基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-炔基、羟



基、C<sub>1-12</sub>-烷氧基、C<sub>2-12</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-12</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-12</sub>-烷羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳羰基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、甲酰酰、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)-胺基-羰基、胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺羰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰胺基、甲酰胺基、C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基、磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷磺酰氧基、硝基、偶氮基、胺磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，其中芳基与杂芳基任选地被取代，成对取代基 R<sup>a</sup> 与 R<sup>b</sup> 都可为氧代基、硫代基、亚酰基或任选取代的亚甲基，或可共同形成由 1 至 5 个碳原子亚烷基链所组成的链双自由基，该亚烷基链任选地由单一或多个选自-O-、-S-和-(NR<sup>N</sup>)-的杂原子/基团中断和/或终断，其中 R<sup>N</sup> 选自氢和 C<sub>1-4</sub>-烷基，两相邻(非成对)取代基可表示形成双键的加成键；R<sup>N\*</sup> 当存在与双自由基无关时选自氢和 C<sub>1-4</sub>-烷基；

和其碱性盐类和酸加成盐类。

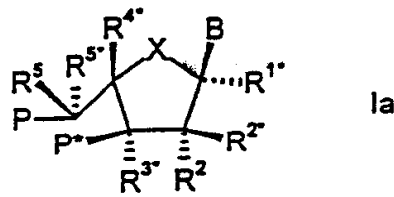
2.如权利要求 1 的寡聚物，包括 1 至 10000 个通式 I 的 L-核糖-LNA 及 0 至 10000 个选自天然产生核苷和核苷类似物的核苷，条件为核苷数目与 L-核糖-LNA 数目总和至少为 2，优选至少为 3，例如在 2 至 15000 的范围内。

3.如权利要求 2 的寡聚物，其中至少一个 L-核糖-LNA 包含核碱基作为取代基 B。

4.如权利要求 2 的寡聚物，其中该寡核苷酸包括至少 7 个，优选至少 9 个，特别为至少 11 个，尤其为至少 13 个连续 L-核糖-LNA 单体。

5.如权利要求 2 的寡聚物，其中该寡聚物的所有核苷单体为 L-核糖-LNA。

6.如权利要求 1 至 5 中任一项的寡聚物，其中该 L-核糖-LNA 具有下式 Ia



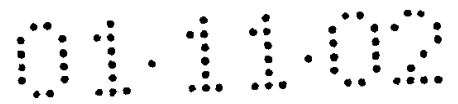
其中 P、P\*、B、X、R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>2\*</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>4\*</sup>、和<sup>5</sup>及 R<sup>5\*</sup> 权利要求 1 的定义。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项的寡聚物，其中 X 选自  $-(\text{CR}^6\text{R}^{6*})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  和  $-\text{N}(\text{R}^{\text{N}*})-$ ，优选为  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  和  $-\text{N}(\text{R}^{\text{N}*})-$ ，特别是  $-\text{O}-$ 。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项的寡聚物，其中经 R<sup>2\*</sup> 和 R<sup>4\*</sup> 取代的双自由基由选自  $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_r-\text{Y}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_s-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_r-\text{Y}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_s-\text{Y}-$ 、 $-\text{Y}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{Y}-$ 、 $-\text{Y}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_r-\text{Y}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_s-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-$ 、 $-\text{Y}-$ 、 $-\text{Y}-\text{Y}-$  所构成的双自由基，其中各 Y 分别选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^*)_2-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^*)-$ 、 $>\text{C}=\text{O}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^*)-$  和  $-\text{N}(\text{R}^*)-\text{C}(=\text{O})-$ ，各 R\* 分别选自氢、卤素、叠氮基、氰基、硝基、羟基、巯基、胺基、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，和/或两个相邻(非成对)R\* 可一起代表双键，以及各 r 和 s 为 0 至 4，条件为 r+s 总和为 1 至 4。

9. 如权利要求 8 的寡聚物，其中该双自由基选自  $-\text{Y}-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_r-\text{Y}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_s-$  和  $-\text{Y}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{Y}-$ ，其中各 r 和 s 为 0 至 3，条件为 r+s 总和为 1 至 4。

10. 如权利要求 9 的寡聚物，其中该双自由基选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^*)-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_r-\text{O}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_s-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_r-\text{S}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_s-$ 、 $-(\text{CR}^*\text{R}^*)_r-\text{N}(\text{R}^*)-(\text{CR}^*\text{R}^*)_s-$ 、 $-\text{O}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^*)-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{N}(\text{R}^*)-$ 、 $-\text{S}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^*)-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{N}(\text{R}^*)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^*)-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{S}-$  和  $-\text{S}-(\text{CR}^*\text{R}^*)_{r+s}-\text{N}(\text{R}^*)-$ ，其中各 r 和 s 为 0 至 4，条件为 r+s 总和为 1 至 4，且中 X 选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  和  $-\text{N}(\text{R}^{\text{H}})-$ ，其中 R<sup>H</sup> 表示氢或 C<sub>1-4</sub>-烷基。



11.如权利要求 10 的寡聚物, 其中 X 为 O,  $R^2$  选自氢、羟基和任选取代的  $C_{1-6}$ -烷基,  $R^{1*}$ 、 $R^{3*}$ 、 $R^5$  和  $R^{5*}$  表示氢。

12.如权利要求 11 的寡聚物, 其中该双自由基选自 -O-、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)-N(R^N)-(CH_2)_{1-3}-$ , 例如 -O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-和 -N(R<sup>N</sup>)-CH<sub>2</sub>-。

13.如权利要求 11 至 12 中任一项的寡聚物, 其中 B 选自核碱基。

14.如权利要求 8 的寡聚物, 其中该双自由基为  $-(CH_2)_{2-4}-$ 。

15.如权利要求 8 至 10 中任一项的寡聚物, 其中一  $R^*$  选自氢、羟基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷氧基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体, 以及任一其余取代基  $R^*$  为氢。

16.如权利要求 1 至 15 中任一项的寡聚物, 其中 L-核糖-LNA 的任一核苷间键选自由 2 至 4 个, 优选为 3 个选自  $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^H-$ 、 $>C=O$ 、 $>C=NR^H$ 、 $>C=S$ 、 $-Si(R'')_2-$ 、 $-SO-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-P(O)_2-$ 、 $-P(S)_2-$ 、 $-PO(R'')$ 、 $-PO(OCH_3)$  和  $-PO(NHR^H)$  的基团/原子组成的键, 其中  $R^H$  选自氢和  $C_{1-4}$ -烷基,  $R''$  选自  $C_{1-6}$ -烷基和苯基。

17.如权利要求 16 的寡聚物, 其中 L-核糖-LNA 的任一核苷间键选自  $-CH_2-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CO-CH_2-$ 、 $-CH_2-CHOH-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH=$ 、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-NR^H-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-CH_2-NR^H-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-O-$ 、 $-NR^H-CO-NR^H-$ 、 $-NR^H-CS-NR^H-$ 、 $-NR^H-C(=NR^H)-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-CH_2-NR^H-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-O-CO-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CO-O-$ 、 $-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-O-CO-NR^H-$ 、 $-NR^H-CO-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^H-$ 、 $-CH=N-O-$ 、 $-CH_2-NR^H-O-$ 、 $-CH_2-O-N=$ 、 $-CH_2-O-NR^H-$ 、 $-CO-NR^H-CH_2-$ 、 $-CH_2-NR^H-O-$ 、 $-CH_2-NR^H-CO-$ 、

-O-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-、-O-NR<sup>H</sup>-、-O-CH<sub>2</sub>-S-、-S-CH<sub>2</sub>-O-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、  
 -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-S-CH<sub>2</sub>-CH=、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-、  
 -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、  
 -O-SO-O-、-O-S(O)<sub>2</sub>-O-、-O-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、  
 -NR<sup>H</sup>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O,S)-O-、  
 -O-P(S)<sub>2</sub>-O-、-S-P(O)<sub>2</sub>-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O)<sub>2</sub>-S-、  
 -O-P(O,S)-S-、-O-P(S)<sub>2</sub>-S-、-S-P(O)<sub>2</sub>-S-、-S-P(O,S)-S-、-S-P(S)<sub>2</sub>-S-、  
 -O-PO(R'')-O-、-O-PO(OCH<sub>3</sub>)-O-、-O-PO(BH<sub>3</sub>)-O-、-O-PO(NHR<sup>H</sup>)-O-、  
 -O-P(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O,NR<sup>H</sup>)-O-和-O-Si(R'')<sub>2</sub>-O-。

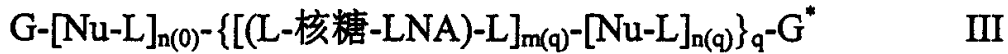
18.如权利要求 1 至 17 中任一项的寡聚物,其中该 L-核糖-LNA 存在的取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup>各选自氢、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-烯基、羟基、C<sub>1-6</sub>-烷氧基、C<sub>2-6</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-6</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-6</sub>-烷羰基、甲酰基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、胺甲酰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)-胺基-羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰胺基、胺甲酰胺基、叠氮基、C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基、磺酰基、胺磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体及卤素,其中两成对取代基都可表示氧基,其中存在且与双自由基无关的 R<sup>N\*</sup>选自氢和 C<sub>1-4</sub>-烷基。

19.如权利要求 1 至 18 中任一项的寡聚物,其中 X 选自-O-、-S-、和-NR<sup>N\*</sup>- ,且该 L-核糖-LNA 存在的取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup>各表示氢。

20.如权利要求 1 至 19 中任一项的寡聚物,其中 P 为选自氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷羰基、任选取代的芳氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐和-W-A'-的 5'-端基,其中 W 选自-O-、-S-和-N(R<sup>H</sup>)-,其中 R<sup>H</sup>选自氢和 C<sub>1-6</sub>-烷基, A'选自 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体。

21.如权利要求 1 至 20 中任一项的寡聚物, 其中 P\*为选自氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷羰氧基、任选取代的芳氧基和-W-A'-的 3' -端基基团, 其中 W 选自-O-、-S-和-N(R<sup>H</sup>)-, 其中 R<sup>H</sup>选自氢和 C<sub>1-6</sub>-烷基, A'选自 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体。

22.如权利要求 1 至 21 中任一项的寡聚物, 具有下式 III:



其中

q 为 1 至 50;

各 n(0),...,n(q)分别为 0 至 10000;

各 m(1),...,m(q)分别为 1 至 10000;

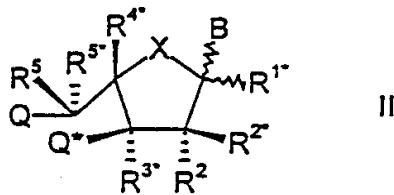
条件为 n(0),...,n(q)及 m(1),...,m(q)的总和为 2 至 15000;

G 表示 5' -端基;

各 Nu 分别表示选自天然核苷和核苷类似物的核苷;

各 L-核糖-LNA 分别表示选自 Nu 和 L-核糖-LNA 两基团之间的核苷间键, 或 L 与 G\*表示 3' -端基; 且各 L-核糖-LNA-L 分别表示该通式 I 的核苷类似物。

23.通式 II 的核苷类似物(L-核糖-LNA)



其中取代基 B 选自核碱基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体;

X 选自-O-、-S-、-N(R<sup>N\*</sup>)-和-C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-;

各 Q 和 Q\*分别选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Prot-O-、Act-O-、巯基、Prot-S-、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、胺基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-、Act-N(R<sup>H</sup>)-、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、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>-烯氧基、任选

取代的 C<sub>2-6</sub>-炔基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体、羧基、磺酰基、羟甲基、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、胺甲基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、羧甲基、磺酰甲基，其中 Prot 分别为 -OH、-SH 和 -NH(R<sup>H</sup>) 的保护基，Act 分别为 -OH、-SH 和 -NH(R<sup>H</sup>) 的活化基，R<sup>H</sup> 选自氢和 C<sub>1-6</sub>-烷基；和

R<sup>2\*</sup> 与 R<sup>4\*</sup> 一起表示双自由基，选自 -O-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s+1</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-、-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S- 和 -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-；

其中各 R<sup>\*</sup> 分别选自氢、卤素、叠氮基、氰基、硝基、羟基、巯基、胺基、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体，和/或两相邻(非成对)R<sup>\*</sup> 可共同表示双键，且各 r 和 s 为 0 至 3，条件为 r+s 总和为 1 至 4；

各存在的取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup> 分别选自氢、任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-烯基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-炔基、羟基、C<sub>1-12</sub>-烷氧基、C<sub>2-12</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-12</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-12</sub>-烷基羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳基羰基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、胺甲酰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-羰基、胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰基胺基、胺甲酰胺基、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、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，其中芳基与杂芳基可被任选取代，两成对取代基可共同表示氧基、巯基、酰亚胺基、或任选取代的亚甲基，或可共同形成由 1 至 5 个碳原子亚烷基链所组成的链双自由基，该亚烷基链任选地由单一或多个选自 -O-、-S- 和 -(NR<sup>N</sup>)- 的杂原子/基团中断和/或终断，其中 R<sup>N</sup> 选自氢和 C<sub>1-4</sub>-烷基，且两相邻(非成对)取代基可表示形成双键的加成

键；且当存在与双自由基无关的时  $R^{N^*}$  选自氢和  $C_{1-4}$ -烷基；

和其碱性盐类和酸加成盐类；

条件为在寡核苷酸合成进行的条件下具有反应性的任一化学基(包含任一核碱基)任选地被官能基保护。

24.如权利要求 23 的核苷类似物，其中 B 基选自核碱基和受官能基保护的核碱基。

25.如权利要求 23 至 24 中任一项的核苷类似物，其中 X 选自-O-、-S-和-N( $R^{N^*}$ )-。

26.如权利要求 23 至 25 中任一项的核苷类似物，其中存在的取代基  $R^{1^*}$ 、 $R^2$ 、 $R^{3^*}$ 、 $R^5$ 、 $R^{5^*}$ 、 $R^6$  和  $R^{6^*}$  各分别选自氢、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷基、任选取代的  $C_{2-6}$ -烯基、羟基、 $C_{1-6}$ -烷氧基、 $C_{2-6}$ -烯氧基、羧基、 $C_{1-6}$ -烷氧羰基、 $C_{1-6}$ -烷羰基、甲酰基、胺基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、胺甲酰基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)-胺基-羰基、 $C_{1-6}$ -烷基-羰胺基、胺甲酰胺基、叠氮基、 $C_{1-6}$ -烷酰氧基、磺酰基、胺磺酰基、 $C_{1-6}$ -烷硫基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体及卤素，其中两成对取代基可共同表示氧基，其中所存在且与双自由基无关的  $R^{N^*}$  选自氢和  $C_{1-4}$ -烷基，条件为任一羟基、胺基、一( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、胺磺酰基和羧基任选地受保护。

27.如权利要求 23 至 26 中任一项的核苷类似物，存在的取代基  $R^{1^*}$ 、 $R^2$ 、 $R^{3^*}$ 、 $R^5$ 、 $R^{5^*}$ 、 $R^6$  和  $R^{6^*}$  各表示为氢。

28.如权利要求 23 至 27 中任一项的核苷类似物，其中 Q 分别选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Prot-O-、巯基、Prot-S-、 $C_{1-6}$ -烷硫基、胺基、Prot-N( $R^H$ )-、一或二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷氧基、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  $C_{2-6}$ -烯氧基、任选取代的  $C_{2-6}$ -炔基、任选取代的  $C_{2-6}$ -炔氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯

合基、信息基、配体、羧基、磺酰基、羟甲基、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、胺甲基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、羧甲基、磺酰甲基，其中 Prot 分别为-OH、-SH 和 -NH(R<sup>H</sup>)的保护基，且 R<sup>H</sup>选自氢和 C<sub>1-6</sub>-烷基；和

Q\*分别选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Act-O-、巯基、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、胺基、Act-N(R<sup>H</sup>)-、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、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>-烯氧基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔氧基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体、羧基、磺酰基，其中 Act 分别为-OH、-SH 和 -NH(R<sup>H</sup>)的活化基，且 R<sup>H</sup>选自氢和 C<sub>1-6</sub>-烷基。

29. 如权利要求 23 至 28 的核苷类似物，其中 X 是 O，R<sup>2</sup>选自氢、羟基和任选取代的 C<sub>1-6</sub> 烷氧基，R\*、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup> 和 R<sup>5\*</sup>表示氧。

30. 如权利要求 23 至 29 的核苷类似物，其中双自由基选自-O-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-和-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-N(R<sup>H</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-。

31. 如权利要求 30 的核苷类似物，其中双自由基选自-O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-、-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-。

32. 如权利要求 23 至 31 的核苷类似物，其中双自由基为-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-，优选为-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-。

33. 如权利要求 1 至 26 中任一项的经 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的轭合物（寡聚物）以及选自蛋白质、扩增基因、酶、多醣类、抗体、半抗原、肽和 PNA 的化合物。

34. 如权利要求 23 至 32 中任一项定义的 L-核糖-LNA 在制备权利要求 1 至 34 中任一项的经 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)中的应用。

35. 如权利要求 33 的应用，其中 L-核糖-LNA 的结合调整寡核苷酸

作为核酸活化酶基质的能力。

36.如权利要求 23 至 32 中任一项定义的 L-核糖-LNA 在制备经 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的轭合物以及选自蛋白质、扩增基因、酶、多糖类、抗体、半抗原、肽和 PNA 的化合物中的应用。

37.如权利要求 23 至 32 中任一项定义的 L-核糖-LNA 作为核酸上酶活性基质的应用。

38.如权利要求 37 的应用,其中使用 L-核糖-LNA 作为 DNA 与 RNA 聚合酶基质。

39.如权利要求 23 至 32 中任一项定义的 L-核糖-LNA 作为治疗剂的应用。

40.如权利要求 23 至 32 中任一项定义的单一或多个 L-核糖-LNA 在构成固体表面中的应用,该固体表面上已经连接不同序列的经 LNA 改性的寡核苷酸。

41.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡聚物(核糖酶)在目标核酸序列特异性裂解中的应用。

42.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)在治疗中的应用,例如用作为反讯息、反基因或基因活化治疗剂。

43.如权利要求 42 的应用,其中该 LNA 改性寡核苷酸补充 RNaseH。

44.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的多于一种 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)复合物在治疗中的应用,例如用作为反讯息、反基因或基因活化治疗剂。

45.如权利要求 6 至 22 中任一项定义的  $\alpha$ -L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)在治疗中的应用,其中该  $\alpha$ -L-核糖-LNA 改性寡核苷酸会特定地与选自 tRNAs、rRNAs、snRNAs 和 scRNAs 的 RNA 相互作用,从而抑制任何选自转译(translation)、RNA 拼接、RNA 处理及其它主要细胞处理的细胞处理。

46.如权利要求 6 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)在诊断中的应用,例如用于天然或合成核酸的分离、纯化、扩增、检测、辨识、定量或捕获。

47.如权利要求 6 至 22 中任一项定义的  $\alpha$ -L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)在诊断中的应用,例如用于天然或合成核酸的分离、纯化、扩增、检测、辨识、定量或捕获,该  $\alpha$ -L-核糖-LNA 改性寡核苷酸可辨别 RNA 与 DNA,从而选择性地杂交到目标 RNA。

48.如权利要求 46 或 47 中任一项的应用,其中该寡核苷酸包含有助于寡核苷酸的直接或间接检测或使寡核苷酸固定在固体载体上的光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基或配体。

49.如权利要求 48 的应用,其中该光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基或配体包含一间隔基(K),该间隔基包含一化学可裂解基团。

50.如权利要求 49 的应用,其中该光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基或配体通过寡核苷酸的至少一个 LNA 双自由基(即,如 R<sup>\*</sup>)连接。

51.如权利要求 50 的应用,其用于天然或合成双链或单链核酸如 RNA 或 DNA 的捕获和检测。

52.如权利要求 47 的应用,其用于天然双链或单链核酸例如 RNA

或 DNA 的纯化。

53.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)在分子诊断中作为调适剂的应用。

54.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)的应用,其在 RNA 介导的催化过程中作为调适剂。

55.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)的应用,其作为调适剂用于抗生素、药物、胺基酸、肽类、结构蛋白质、蛋白质受体、蛋白酶、糖基、多糖基、生物辅因子、核酸或三磷酸盐的特异性结合。

56.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)的应用,其通过立体特异性结合在外消旋混合物对映异构物的分离中作为调适剂。。

57.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)的应用,其用于标识分子。

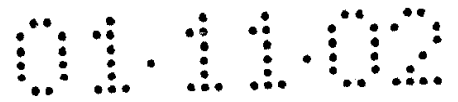
58.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)的应用,其用于活体内或试管内杂交至非蛋白质编码细胞 RNAs 例如 tRNA、rRNA、snRNA 和 scRNA。

59.如权利要求 1 至 22 中任一项定义的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)的应用,其用于建构一种包含一个荧光基团和一个淬熄基的寡核苷酸,而其设置方式为寡核苷酸的杂交状态可与未结合寡核苷酸状态通过来自探针的荧光信号的增加予以区别。

60.用于天然或合成核酸的分离、纯化、扩增、检测、辨识、定量或捕获的试剂盒,该试剂盒包括一个反应主体和如权利要求 1 至 22 中任一项定义的一或多个 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)。

61.用于天然或合成核酸的分离、纯化、扩增、检测、辨识、定量或捕获的试剂盒，该试剂盒包括一反应主和如权利要求 23 至 32 中任一项定义的单一或多个 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(一寡聚物)。

62.如权利要求 60 或 61 的试剂盒，其中 L-核糖-LNA 固定在该反主应体上。



# 说明书

## L-核糖-LNA 类似物

### 发明领域：

本发明涉及 L-核糖-构型双环状核苷类似物领域，以及用于合成寡核苷酸形成的核苷酸类似物的合成，该合成寡核苷酸可形成具有互补单链与双链核酸的核碱基特定性双显性组合(duplexes)。本发明还涉及可用来作为治疗药物并可结合于寡核苷酸的 L-核糖-构型双环状核苷类似物的领域。

### 发明背景：

合成寡核苷酸是在不同领域广泛使用的化合物，例如用于分子生物及以 DNA 为基础的诊断和治疗。

### 综合考虑：

为了广泛地用于不同的应用范围，寡核苷酸必须满足许多不同的要求。以作为治疗剂为例，有用的寡核苷酸必须能够穿过细胞膜，具有良好的抗细胞外及细胞内核酸酶的性能，优选具有补充如 RNAseH 的内源酶的能力。在以 DNA 为基础的治疗及分子生物学中，其它性能，例如寡核苷酸对于作用在天然核酸的大量不同酶成长作为有效基质的能力很重要，该天然核酸如聚合酶、激酶、连接酶和磷酸酶。然而，各种用途的基础是寡核苷酸的基本性能：寡核苷酸可辨识和杂交互补单链核酸的特异性序列，采用 Watson-Crick 氢键(A-T and G-C)或其它氢键结构如 Hoogsteen 模式。有两个重要术语即亲和力和特异性，常用于表现寡核苷酸的杂交性能。亲合性为该寡核苷酸对其互补目标序列的键合强度的测量(用该双显性组合的热稳定性(Tm)表示)。该双显性组合中各核碱基对增加热稳定性，因此亲合性随该寡核苷酸尺寸(核碱基)增大而增加。特异性为该寡核苷酸在完全互补和错配目标序列之间的辨别能力的测量。换言之，特异性为目标物中与错配核碱基有关的亲合性损失的测量。

在寡核苷酸尺寸恒定时，特异性随着该寡核苷酸及其目标物之间的错配数目增加而增加(亦即，错配的百分比增加)。反之，在错配数目恒定时，当寡核苷酸尺寸增加时，特异性会减少(即错配的百分比减少)。换言之，寡核苷酸亲合性的增加是以牺牲其特异性为代价的，反之亦然。

一般而言，考虑到天然寡核苷酸的缺点，增强特异性及亲合性的新方法对于以 DNA 为基础的治疗、诊断及对于分子生物技术极为令人期待。

### 受构型限制的核苷

已知寡核苷酸在杂交成为目标序列期间会经过构型转化，由单链态的相对任意线圈结构变成双链性组合态的规则结构。

因此，构型限制近年来已应用在寡核苷酸，以寻找较未改性(2'-脱氧)寡核苷酸显示改良的杂交性能。例如具有附加的 C-3'、C-5'-桥亚乙基的双环[3.3.0]核苷(M. Tarköy, M. Bolli, B. Schweizer and C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 1993, 76, 481; Tarköy and C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1432; M. Egli, P. Lubini, M. Dobler and C. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 5855; M. Tarköy, M. Bolli and C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 1994, 77, 716; M. Bolli and C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 694; M. Bolli, P. Lubini and C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 1995, 78, 2077; J. C. Litten, C. Epple and C. Leumann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, 5, 1231; J. C. Litten, C. Leumann, *Helv. Chem. Acta*, 1996, 79, 1129; M. Bolli, J. C. Litten, R. Schültz and C. Leumann, *Chem. Biol.*, 1996, 3, 197; M. Bolli, H.U. Trafelet and C. Leumann, *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 4660)、具有一附加 C-1'、C-6'或 C-6'、C-4'-桥亚甲基的双碳环 [3.1.0] 核苷 (K. -H. Altmann, R. Kesselring, E. Francotte and G. Rihs, *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 2331; K. -H. Altmann, R. Imwinkelried, R. Kesselring and G. Rihs, *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 7635; V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, A. Ezzitouni, P. Russ, J. Wang, R. W. Wagner and M. D. Matteucci, *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 3739; A. Ezzitouni and V. E. Marquez, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1997, 1073)、含有一与一未经改性核苷合成为二聚物的附加 C-2'、C-3'-二氧戊环的双环状 [3.3.0]-和 [4.3.0] 核苷，其中该

附加环为核苷间键替代天然磷酸二酯键的部份 (R. J. Jones, S. Swaminathan, J. F. Millagan, S. Wadwani, B.S. Froehler and M. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 9816; J. Wang and M. D. Matteucci, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, 7, 229) 、包含一具有 C-2'、C-3'-桥亚甲基作为酰胺及磺酰胺型核苷间键部份的二聚物 (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peoch, Y. S. Sanghvi and G. Just, *Synlett*, 1997, 378) 、双环状 [3.3.0] 葡萄糖衍生的核苷类似物透过甲醛核苷间键加入三聚物中间 (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peoch, Y. S. Sanghvi and G. Just, *Synlett*, 1997, 378) , 具有 C-2'、C-3'连接六元环和五元环的双环状 [4.3.0]-与[3.3.0]核苷 (P. Nielsen, H. M. Pfundheller, J. Wengel, *Chem. Commun.*, 1997, 826; P. Nielsen, H. M. Pfundheller, J. Wengel, XII International Roundtable: Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Application; La Jolla, California, September 15-19, 1996; Poster PPI 43) 已合成并结合到寡脱氧核苷酸中。在所发现的适度改善双显性组合稳定性的情形中, 仅涉及 DNA 或 RNA 目标物, 或关于完全改性而非部分改性的寡核苷酸, 反之亦然。

已经报告的大部分类似物的评估, 由于缺乏含 G、A 及 C 核碱基类似物的数据, 以及缺乏指示杂交特异性及杂交模式数据, 因而益发复杂。在许多情形中, 已经报告单体类似物的合成极为复杂, 而在另外一些情况下, 完全改性寡核苷酸的合成与广为人使用的标准 phosphoramidite 化学不兼容。

近来, 已报导含锁定核酸(LNA)的寡聚物 (Nielsen, P., Pfundheller, H. M., Olsen, C. E. and Wengel, J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1997, 3423; Nielsen, P., Pfundheller, H. M., Wengel, J., *Chem. Commun.*, 1997, 9, 825; Christensen, N. K., Petersen, M., Nielsen, P., Jacobsen, J. P. and Wengel, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 5458; Koshkin, A. A. and Wengel, J., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 2778; Obika, S., Morio, K. -I., Han, Y. and Imanishi, T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 515)。令人感兴趣的是, 含有 2'-O, 4'-C-桥亚甲基 LNA 单体结合到寡核苷酸序列导致该改性寡核苷酸杂交能力前所未有的改善 (Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. A., Olsen, C. E. and Wengel, J., *Chem. Commun.*, 1998, 455; Koshkin, A. K., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M.,

Olsen, C. E., and Wengel, J., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607; Koshkin, A. A. Rajwanshi, V. K., and Wengel, J., *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 4381; Singh, Sanjay K. and Wengel, J., *Chem. Commun.*, 1998, 1247; Kumar, R., Singh, S. K., Koshkin, A.A. Rajwanshi, V. K., Meldgaard, M., and Wengel, J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219; Obika, S. et al. *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 8735; Obika, S. et al. *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 5401; Singh, S. K., Kumar, R., and Wengel, J., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 6078; Koshkin, A. A., Nielsen, P., Meldgaard, M., Rajwanski, V. K., Singh, S. K. and Wengel, J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 13252; Singh, S. K., Kumar, R., and Wengel, J., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035)。包含这种 LNA 单体的寡核苷酸和对应的 2'-硫-LNA 类似物与互补的 DNA 和 RNA 形成具有热稳定性且以前未曾发现的双-或三环状核苷改性寡核苷酸( $\Delta T_m/\text{改性}=+3$  至  $+11^\circ\text{C}$ )的双显性组合, 并表现改善的选择性。

在一系列论文中, Seela 等人已研究包括单一或多个 2'-脱氧- $\beta$ -D-木糖呋喃糖基核苷酸单体(Rosemeyer, H.; Seela, F. *Helv. Chem. Acta* 1991, 74, 748; Rosemeyer, H.; Krecmerova, M.; Seela, F. *Helv. Chem. Acta* 1991, 74 2054; Seela, F.; Wörner, Rosemeyer, H. *Helv. Chem. Acta* 1994, 77, 883; Seela, F.; Heckel, M.; Rosemeyer, H. *Helv. Chem. Acta* 1996, 79, 1451; Rosemeyer, H.; Seela, F. *Nucleosides Nucleotides*, 1995, 14, 1041; Schoeppe, A.; Hinz, H. -J.; Rosemeyer, H.; Seela, F. *Eur. J. Biochem.* 1996, 239, 33)的木-DNA(图 1, 碱基=腺嘌呤-9-基、胞嘧啶-1-基、鸟嘌呤-9-基或胸腺嘧啶-1-基)。与对应的天然 2'-脱氧- $\beta$ -D 核糖呋喃糖基相比, 一般而言, 木-DNA 表现出如同镜像的二级结构, 此为在熵方面有利的双显性组合结构, 对于外切核酸酶有增加的稳定性, 对于包含少量 2'-脱氧- $\beta$ -D-木糖呋喃糖基单体的寡核苷酸, 对互补 DNA 有减少的热亲合性(Rosemeyer, H.; Seela, F. *Helv. Chem. Acta* 1991, 74, 2054; Seela, F.; Wörner, Rosemeyer, H. *Helv. Chem. Acta* 1994, 77, 883; Seela, F.; Heckel, M.; Rosemeyer, H. *Helv. Chem. Acta* 1996, 79, 1451)。

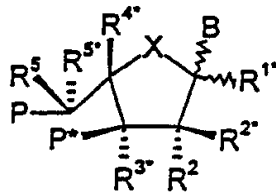
发明概述:

基于上述及 2'-O,4'-C-亚甲基桥连的 LNA 单体卓越的性能, 决定合成包含单一或多个 2'-O,4'-C-亚甲基- $\alpha$ -L-核糖呋喃糖基核苷酸单

体。 $\alpha$ -L-核糖-LNA 计算机模式同样地指出呋喃糖环的 S 型构型。故而，这项工作的目的在于合成 2'-O,4'-C-亚甲基- $\alpha$ -L-核糖呋喃糖基核苷酸单体以及研究含此单体的寡核苷酸的热稳定性。结果显示，改性的 L-核糖-LNA 有助于互补核酸的高亲合性靶标。当虑及在 C-3' 和 C-4' 转化的立体化学性质时，这是一个令人惊讶的事实。

因此，本发明人提供了新型的 LNA 核苷类似物(L-核糖-LNA)及其中包含具有 L-核糖-LNA 核苷类似物的寡核苷酸。利用胸腺嘧啶作为核碱基合成该新型 L-核糖-LNA 核苷类似物，但可以利用其它四个核碱基轻易合成，因此，提供了用于结合寡核苷酸的全组核苷类似物。

本发明涉及包含至少一种如通式 I 的核苷类似物(后文称为“L-核糖-LNA”)的寡聚物



其中 X 选自-O-、-S-、-N(R<sup>N\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-;

B 选自氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-酰氧基、核碱基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体;

P 表示核苷间键接到后一单体或 5' -端基的自由基位置，这种核苷间键或 5' -端基任选地包含取代基 R<sup>5</sup> 或相等应用的取代基 R<sup>5\*</sup>;

P\* 表示核苷间键至前一单体，或 3' -端基的自由基位置;

R<sup>2\*</sup> 与 R<sup>4\*</sup> 表示由选自-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>3</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-和 >C=Z 的 1 至 4 个基团/原子组成的双自由基，

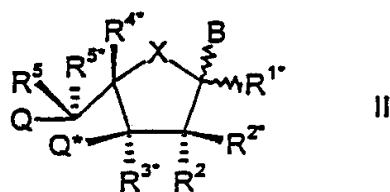
其中 Z 选自-O-、-S-和-N(R<sup>a</sup>)-，且 R<sup>a</sup> 及 R<sup>b</sup> 各分别选自氢、任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-烯基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-炔基、羟基、C<sub>1-12</sub>-烷氧基、C<sub>2-12</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-12</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-12</sub>-烷羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳羰基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、甲酰基、一和二

(C<sub>1-6</sub>-烷基)-胺基-羰基、胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺羰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰胺基、甲酰胺基、C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基、磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷磺酰氧基、硝基、偶氮基、胺磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，其中芳基与杂芳可任选地取代，且成对取代基 R<sup>a</sup> 与 R<sup>b</sup> 皆可为任选取代的亚甲基烯烃(=CH<sub>2</sub>)；

在此取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup> 各分别选自氢、任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-烯基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-炔基、羧基、C<sub>1-12</sub>-烷氧基、C<sub>2-12</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-12</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-12</sub>-烷羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、甲酰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)-胺基-羰基、胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺羰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰胺基、甲酰胺基、C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基、磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷磺酰氧基、硝基、叠氮基、胺磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，其中芳基与杂芳基可任选地取代，且成对取代基 R<sup>a</sup> 与 R<sup>b</sup> 都可为氧代基、硫代基、亚酰基或任选取代的亚甲基，或可共同形成由 1 至 5 个碳原子亚烷基链所组成的链双自由基，该亚烷基链任选地由单一或多个选自-O-、-S-和-(NR<sup>N</sup>)-的杂原子/基团中断和/或终断，其中 R<sup>N</sup> 选自氢与 C<sub>1-4</sub>-烷基，且两相邻(非成对)取代基可表示形成双键的加成键；且当存在与双自由基无关的 R<sup>N\*</sup> 时，选自氢与 C<sub>1-4</sub>-烷基；

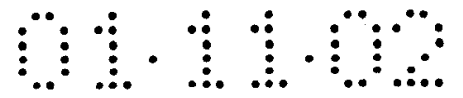
和其碱性盐类与酸加成盐类。

此外，本发明涉及通式 II 的核苷类似物(L-核糖-LNA)



其中 B 选自核碱基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体；

其中 X 选自-O-、-S-、-N(R<sup>N\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-；



各 Q 及 Q\* 分别选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Prot-O-、Act-O-、巯基、Prot-S-、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、胺基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-、Act-N(R<sup>H</sup>)-、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、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>-烯氧基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体、羧基、磺酰基、羟甲基、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、胺甲基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、羧甲基、磺酰甲基，其中 Prot 分别为 -OH、-SH 和 -NH(R<sup>H</sup>) 的保护基，Act 分别为 -OH、-SH 和 -NH(R<sup>H</sup>) 的活化基，且 R<sup>H</sup> 选自氢和 C<sub>1-6</sub>-烷基；且 R<sup>2</sup> 与 R<sup>4</sup> 皆表示选自 -O-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s+1</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-、-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、和 -S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-；

其中各 R\* 分别选自氢、卤素、叠氮基、氰基、硝基、羟基、巯基、胺基、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体，和/或两相邻(非成对)R\* 可一起表示双键，且各 r 及 s 为 0 至 3，条件是 r+s 总和为 1 至 4；

其中取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup> 分别选自氢、任选取代的 C<sub>1-12</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-烯基、任选取代的 C<sub>2-12</sub>-炔基、羟基、C<sub>1-12</sub>-烷氧基、C<sub>2-12</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-12</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-12</sub>-烷基羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳基羰基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、胺甲酰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-羰基、胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基-C<sub>1-6</sub>-烷基-胺基羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰基胺基、胺甲酰胺基、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、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，其中芳基与杂芳基可任选地取代，两成对取代基可一起表示氧基、硫基、酰亚胺基、或任选取代的亚甲基，或可共同形成由 1 至 5 个碳原

子亚烷基链所组成的链双自由基，该亚烷基链任选地由单一或多个选自-O-、-S-和-(NR<sup>N</sup>)-的杂原子/基团中断和/或终断，其中 R<sup>N</sup> 选自氢与 C<sub>1-4</sub>-烷基，且两相邻(非成对)取代基可表示形成双键的加成键；当 R<sup>N\*</sup> 存在与双自由基无关时选自氢与 C<sub>1-4</sub>-烷基；

以及其碱性盐类与酸加成盐类；

条件为寡核苷酸合成进行的条件下具有反应性的任何化学基(包含任一核碱基)任选地经官能基保护。

本发明还涉及该核苷类似物(L-核糖-LNA)在制备寡聚物中的应用，以及该寡聚物和该核苷类似物在诊断、分子生物学研究和治疗中的应用。

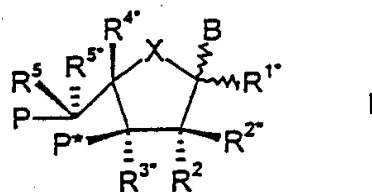
发明详细说明：

当本文提到 L-核糖-构型双环状核苷类似物时，使用术语“L-核糖-LNA”(L-ribo-configured Locked Nucleoside Analogues)，该 L-核糖-构型双环状核苷类似物可结合到本发明寡聚物中(通式 I)，或作为分离的化学物质(通式 II)。术语“单体的 L-核糖-LNA”特别指后一情形。

### 寡聚物和核苷类似物

如上所述，本发明涉及包含单一或多个 L-核糖-构型双环状核苷类似物(后文称为“L-核糖-LNA”)的新型寡聚物(寡核苷酸)。

结合到寡聚物(寡核苷酸)中的各可能的 L-核糖-LNA 具有通式 I



其中 X 选自-O- (L-核糖呋喃糖改性物)、-S-、-N(R<sup>N\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-，其中 R<sup>6</sup>、R<sup>6\*</sup>及 R<sup>N\*</sup>进一步定义如下。因此，该 L-核糖-LNA 结合到包含五元环作为该双环结构的主要部分的寡聚物。

在该可能的五元环中间，X 位置表示-O-、-S-和-N(R<sup>N\*</sup>)-似乎尤其令人感兴趣，且 X 位置为-O-时显得特别令人关注。

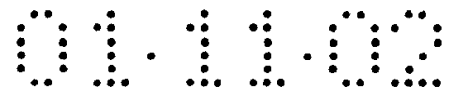
取代基 B 表示当该寡聚物与 DNA 或 RNA 复合时，能与 DNA 或

RNA(特别是 DNA 或 RNA 的核碱基)相互作用(例如通过氢键、共价键或电子相互作用)的基团。或者,取代基 B 可表示作为标记或信息基团,或取代基 B 可表示预期与 DNA 或 RNA 很少或没有相互作用的基团(例如氢)。因此,该取代基 B 优选选自氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>1-4</sub>-酰氧基、核碱基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体。

在本文中,术语“核碱基”涵盖天然核碱基及非天然核碱基。对于本领域的技术人员而言,应明白先前认为是“非天然”的不同核碱基其后已在自然界被发现。因此,“核碱基”不仅包括已知的嘌呤和嘧啶杂环,而且还包括其杂环类似物及互变异构物。核碱基的说明实例为腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、嘌呤、黄嘌呤、二胺基嘌呤、8-氧基-N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N<sup>4</sup>, N<sup>4</sup>-乙醇胞嘧啶、N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-乙醇-2,6-二胺基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-(C<sup>3</sup>-C<sup>6</sup>)炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、拟异-胞嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑吡啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、肌苷以及如 Benner 等人于美国专利第 5,432,272 号所述的“非天然”核碱基。术语“核碱基”意欲涵盖这些实例及其全部类似物和互变异构体。特别令人关注的核碱基为腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶,其被视为与在人体中涉及治疗及诊断应用的天然核碱基。

当用于本文时,“DNA 嵌体”表示能嵌入 DNA 或 RNA 链、双显性组合或三显性组合的基团。DNA 嵌体官能部位的实例为吡啶类,蒽类,醌类例如蒽醌、吡啶、喹啉、异喹啉,二氢醌类,蒽环素类(anthracyclines),四环素类(tetracyclines),亚甲基蓝,蒽环素酮,补骨脂内酯类,香豆素类,卤代乙锭, dynemicin, 金属配合物例如 1,10-菲咯啉-铜,三(4,7-二苯基-1,10-菲咯啉)钌-钴-烯二炔类例如 calcheamicin、吡啶类、偏端霉素、纺锤霉素(netropcin)、viologen、道诺霉素。特别令人感兴趣的实例有吡啶类,醌类如蒽醌,亚甲基蓝,补骨脂内酯类,香豆素类以及卤代乙锭。

在本文中,“光化学活性基”涵盖经光照射可以进行化学反应的化合物。其官能基的说明实例为醌类特别是 6-甲基-1,4-萘醌、蒽醌、萘醌和 1,4-二甲基-蒽醌, diazirines, 芳族叠氮类,二苯甲酮类,补骨脂



内酯类，重氮化合物类及 diazirino 化合物。

在本文中，“热化学反应基”定义为可以与其它基团进行由热化学引发的共价键形成的官能基。热化学反应基的官能部分的说明实例为羧酸类，羧酸酯类如活化酯类，羧酸卤素例如酰基氟类、酰基氯类、酰基溴类和酰基碘类，羧酸迭氮类，羧酸酰肼类，磺酸类，磺酸酯类，磺酸卤类，半缩脲类，硫半缩脲类，醛类，酮类，一级醇类，二级醇类，三级醇类，酚类，烷基卤类，硫醇类，二硫化物类，一级胺类，二级胺类，三级胺类，肼类，环氧化物类，马来酰亚胺类以及硼酸衍生物。

在本文中，术语“螯合基”表示包括超过一个键结位置及同时通过超过一个键结位置经常键合至其它分子、原子或离子的分子。螯合基官能部分的实例为亚胺基二乙酸、脒基二乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、胺基磷酸等。

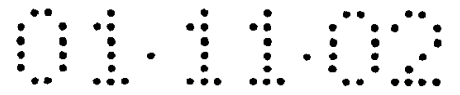
在本文中，术语“信息基”表示本身可检测或作为检测系统一部份的基团。信息基功能部分的实例为生物素、地谷新配基、荧光基（可吸收某种波长电磁辐射例如光线或 X 光，且经常呈较长波长辐射再度发出吸收能量的基团，例如丹酰 (5-二甲基胺基)-1-萘磺酰基)、DOXYL (N-氧基-4,4-二甲基噁唑烷)、PROXYL (N-氧基-2,2,5,5-四甲基吡咯烷)、TEMPO (N-氧基-2,2,6,6-四甲基哌啶)、二硝基苯基、吖啶类、香豆素类、Cy3 及 Cy5(生物检测系统公司商品名)、erythrosine、香豆酸、繖形酮、Texas Red、若丹明、四甲基若丹明、Rox、7-硝基苯并-2-噁-1-二唑(NBD)、嵌二萘、萤光素、镉、钆、钇及其它稀土金属、放射性同位素标记、化学发光标记(在化学反应中经由发光可被检测的标记)、旋转标记(自由基(例如取代的有机氮氧化物)或其它通过电子旋转共振光谱结合到被测生物分子的顺磁性探针(例如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ))、酶(例如过氧化酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、和葡萄糖氧化酶)、抗原类、抗体类、半抗原类(可组合抗原但本身无法引发免疫反应的基团，例如肽类和类固醇激素)，细胞膜穿透用的载体系统例如：脂肪酸残基、类固醇部分(胆固醇基)、维生素 A、维生素 D、维生素 E、特定受体的叶酸肽类、介导胞吞作用的基团、表皮生长因子(EGF)、血管舒缓激肽和血小板衍生生长因子(PDGF)。特别令人感兴趣有例如生物素、荧光基、Texas

Red、若丹明、二硝基苯基、地谷新配基、钆、铈、Cy5 和 Cy3。

在本文中，术语“配体”表示结合的部分。配体可包括例如：芳基(如苯、吡啶、萘、蒽及菲)，杂芳基(如噻吩，呋喃，四氢呋喃，吡啶，二噁烷和嘧啶)，羧酸类，羧酸酯类，羧酸卤素，羧酸叠氮类，羧酸酰肼类，磺酸类，磺酸酯类，磺酸卤素，半缩脲内，硫半缩脲类，醛类，酮类，一级醇类，二级醇类，三级醇类，酚类，烷基卤素类，硫醇类，二硫化物类，一级胺类，二级胺类，三级胺类，胍类，环氧化物类，顺丁烯二酰亚胺类， $C_1$ - $C_{20}$  烷基，其任选地用一或多个杂原子例如氧原子、氮原子和/或硫原子中断或终断，任选地包含芳族或一/多不饱和烃，聚氧乙烯例如聚乙二醇，寡/聚酰胺类例如聚- $\beta$ -苯胺、聚甘氨酸、聚离胺酸，肽类，寡/多糖类，寡/聚磷酸盐类，毒素，抗生素，细胞毒剂以及类固醇类，也称作“亲和配体”，即对特定蛋白质、抗生素、多糖及寡糖以及其它生物分子的位置具有特异性亲和力的官能基或生物分子。

对于本领域的技术人员而言，应明了 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体的上述特定实例对应所讨论基团的“活性/功能”部分。对于本领域的技术人员而言，应可进而明了 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基及配体通常以 M-K-形式表示，其中 M 为所讨论基团的“活性/功能”部分，而 K 为“活性/官能”部分连接到五元环的间隔基。因此，应可理解在基团 B 选自 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体的情形中，该基团 B 具有 M-K-形式，其中 M 分别为 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体的“活性/功能”部分，而 K 为介于五元环与“活性官能”部分间的包含 1-50 个原子、优选 1-30 个原子，特别是 1-15 个原子的任选间隔基。

在本文中，术语“间隔基”表示热化学和光化学非反应性距离形成基，用以将前述定义的两个或两个以上不同类型部分连接在一起。间隔基基于多种特性选择，该特性包括其疏水性、亲水性、分子挠性及长度(例如，参见 Hermanson et. Al., “Immobilized Affinity Ligand Techniques”, Academic Press, San Diego, California (1992), p. 137-ff)。一般而言，间隔基长度小于或大约 400Å，在某些应用中，优选小于 100Å。



该间隔基因因而包括一任选地以单一或多个如氧原子、氮原子和/或硫原子的杂原子中断或终止的碳原子链。因此，该间隔基可包括单一或多个酰胺、酯、胺、醚和/或硫醚官能基，通常包括任选的芳族或单/聚不饱和烃类、聚氧乙烯(如聚乙二醇)、寡/聚酰胺(如聚- $\beta$ -苯胺、聚甘氨酸、聚离胺酸、肽类、寡/多醣类。再者，间隔基可由其化合单元构成。考虑感兴趣基团的“活性官能”部分相对于五元环预定或需要定位及空间方向性，间隔基长度可有变化。特别令人感兴趣的实施方案中，间隔基包括化学可裂解基。化学可裂解基例如包括于还原条件下可裂解的二硫化物基，可由肽酶裂解的肽片段等。

在本发明的一个实施方案中，K 表示一可使所讨论基团的“活性/功能”部分直接连接到该五元环的单键。

在优选实施方案中，通式 I 与 II 中的取代基 B 优选选自核碱基，特别是选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶。

在本发明的寡聚物中(通式 I)，P 表示核苷间键连接到后一单体或 5'-端基的自由基位置。当所讨论的 L-核糖-LNA 并非 5'-端基“单体”时，适用前者，反之，当所讨论的 L-核糖-LNA 为 5'-端基“单体”时，适用后者。应可理解(进一步由以下核苷间键和 5'-端基的定义将更明了)这种核苷间键或 5'-端基可包含取代基  $R^5$ (或同样可应用：取代基  $R^{5*}$ )形成至基团 P 的双键。(5'-端基指在核苷中对应于核糖部分体的 5'-碳原子的位置)

另一方面， $P^*$ 表示核苷间键接到前一单体，或 3'-端基的自由基位置。相似地，当所讨论的 L-核糖-LNA 并非 3'-端基“单体”时，适用前者，反之，当所讨论的 L-核糖-LNA 为 3'-端基“单体”时，适用后者。(3'-端基指在核苷中对应于核糖部分体之 3'-碳原子的位置)

在本文中，术语“单体”表示 L-核糖-LNA 的天然核苷、非天然核苷、PNAs、LNAs 等。因此，术语“后一单体”是在 5'-端基方向邻近的单体，术语“前一单体”是在 3'-端基方向邻近的单体。该后一及前一单体由一 L-核糖-LNA 单体位置观察，可为天然核苷或非天然核苷，或甚至可进而为 L-核糖-LNA 单体。

因此，在本文中(如上述定义导出)，术语“寡聚物”指通过结合单一或多个 L-核糖-LNA 改性的寡核苷酸。

本发明的关键部分为结合五元环的 L-核糖-构型，前提条件为  $R^{2*}$  和  $R^{4*}$  共同表示在五元环上形成稠合环的双自由基。

在构成双自由基的基团中，Z 选自 -O-、-S- 和 -N( $R^a$ )-，且  $R^a$  和  $R^b$  分别选自氢、任选取代的  $C_{1-12}$ -烷基、任选取代的  $C_{2-12}$ -烯基、任选取代的  $C_{2-12}$ -炔基、羟基、 $C_{1-12}$ -烷氧基、 $C_{2-12}$ -烯氧基、羧基、 $C_{1-12}$ -烷氧羰基、 $C_{1-12}$ -烷羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳羰基、胺基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、甲酰基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)-胺基-羰基、胺基- $C_{1-6}$ -烷基-胺羰基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基- $C_{1-6}$ -烷基-胺基羰基、 $C_{1-6}$ -烷基-胺基羰基、甲酰胺基、 $C_{1-6}$ -烷酰氧基、磺酰基、 $C_{1-6}$ -烷磺酰氧基、硝基、偶氮基、胺磺酰基、 $C_{1-6}$ -烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，其中芳基与杂芳基可任选地被取代，且成对取代基  $R^a$  与  $R^b$  可一起表示任选取代的亚甲基烯烃(=CH<sub>2</sub>，任选地用如对芳基的任选取代基定义的取代基取代一或两次)。

在本文中，即在本说明书和权利要求书中，该双自由基的方向在使左手侧表示具有最低数目的取代基而右手侧表示具有最高数目的取代基，因此，当  $R^{2*}$  及  $R^{4*}$  共同表示一双自由基“-O-CH<sub>2</sub>-”时，可理解该氧原子表示  $R^{2*}$ ，例如该氧原子连接到  $R^{2*}$  的位置，该亚甲基表示  $R^{4*}$ 。

考虑结合到本发明寡聚物的 L-核糖-LNA 中双自由基结构令人关注的可能性，可相信该双自由基由成对的非-成对取代基构成，该双自由基优选选自  $-(CR^*R^{\square})_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-Y-$ 、 $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$ 、 $-Y-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-Y-$ 、 $-Y-Y-$  所构成的双自由基，其中各 Y 分别选自 -O-、-S-、-Si( $R^*$ )<sub>2</sub>-、-N( $R^*$ )-、>C=O、-C(=O)-N( $R^*$ )-和 -N( $R^*$ )-C(=O)-，各  $R^*$  分别选自氢、卤素、叠氮基、氰基、硝基、羟基、巯基、胺基、一或二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷氧基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，和/或两个相邻(非成对) $R^*$  可一起代表双键，以及各 r 和 s 为 0 至 4 条件为 r+s 总和为 1 至 4。特别令人感兴趣的是各双自由基分别选自 -Y-、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^*R^{\square})_r-Y-(CR^*R^*)_s$  和  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$ ，其中各 r 和 s 为 0 至 3 条件为 r+s 总和为 1 至 4。

特别令人感兴趣的寡聚物为适用于寡聚物的 L-核糖-LNA 下述标准的寡聚物： $R^{2*}$ 及 $R^{4*}$ 一起表示选自  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^*)-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-O-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-S-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-N(R^*)-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-O-(CR^*R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-S-(CR^*R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^*R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^*R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^*R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-S-(CR^*R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^*R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-N(R^*)-(CR^*R^*)_{r+s}-S-$ 、和  $-S-(CR^*R^*)_{r+s}-N(R^*)-$  其中之一 的双自由基；其中各 r 和 s 为 0 至 3 条件为 r+s 总和为 1 至 4， $R^*$  选自氢、羟基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷氧基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，以及任一其余取代基  $R^*$  为氢。

在一优选实施方案中，至少一个 LNA 的双自由基中的一基团  $R^*$  选自 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体（其中后面的基团可包括对取代基 B 定义的间隔基）。

在另一优选实施方案中，至少一个 LNA 的双自由基中的一基团  $R^*$  选自氢、羟基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷氧基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体，以及任一其余取代基  $R^*$  为氢。

关于存在的取代基  $R^{1*}$ 、 $R^2$ 、 $R^{3*}$ 、 $R^5$ 、 $R^{5*}$ 、 $R^6$  和  $R^{6*}$ ，分别选自氢、任选取代的  $C_{1-12}$ -烷基、任选取代的  $C_{2-12}$ -烯基、任选取代的  $C_{2-12}$ -炔基、羟基、 $C_{1-12}$ -烷氧基、 $C_{2-12}$ -烯氧基、羧基、 $C_{1-12}$ -烷氧羰基、 $C_{1-12}$ -烷羰基、甲酰基、芳基、芳氧基-羰基、芳氧基、芳羰基、杂芳基、杂芳氧基-羰基、杂芳氧基、杂芳羰基、胺基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、甲酰基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)-胺基-羰基、胺基- $C_{1-6}$ -烷基-胺羰基、一和二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基- $C_{1-6}$ -烷基-胺基羰基、 $C_{1-6}$ -烷基-胺基羰基、甲酰胺基、 $C_{1-6}$ -烷酰氧基、磺酰基、 $C_{1-6}$ -烷磺酰氧基、硝基、偶氮基、胺磺酰基、 $C_{1-6}$ -烷硫基、卤素、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体(其中该后者基团可包含如对取代基 B 所定义的间隔基)，其中芳基与杂芳基可任选地被取代，且成对取代基  $R^a$  与  $R^b$  皆可为氧代基、硫代基、亚酰基或任选取代的亚甲基，或可共同形成由 1 至 5 个碳原子亚烷基链所构成的链双自由基，该亚烷基链任选地由单一或多个选自  $-O-$ 、 $-S-$  和  $-(NR^N)-$  的杂原子/基团中断和/或终断，其中  $R^N$  选自氢与

C<sub>1-4</sub>-烷基，且两相邻(非成对)取代基可表示形成双键的加成键；且当存在与双自由基无关的 R<sup>N\*</sup>时，选自氢与 C<sub>1-4</sub>-烷基。

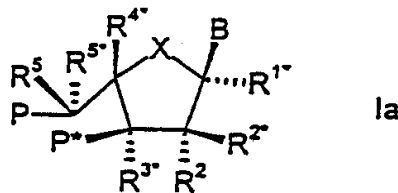
该 L-核糖-LNA 存在的各取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup> 优选选自氢、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-烯基、羟基、C<sub>1-6</sub>-烷氧基、C<sub>2-6</sub>-烯氧基、羧基、C<sub>1-6</sub>-烷氧羰基、C<sub>1-6</sub>-烷羰基、甲酰基、胺基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、胺甲酰基、一和二(C<sub>1-6</sub>-烷基)-胺基-羰基、C<sub>1-6</sub>-烷基-羰胺基、胺甲酰胺基、叠氮基、C<sub>1-6</sub>-烷酰氧基、磺酰基、胺磺酰基、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基及配体及卤素，其中两成对取代基可一起表示氧基，R<sup>N\*</sup> 当存在且与双自由基无关时选自氢及 C<sub>1-4</sub>-烷基。

在本发明的一个优选实施方案中，X 选自 -O-、-S-和 -N(R<sup>N\*</sup>)-，特别是 -O-，且该 L-核糖-LNA 存在的各取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5\*</sup>、R<sup>6</sup> 和 R<sup>6\*</sup> 表示氢。

在本发明更优选的实施方案中，X 为 O，取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup> 及 R<sup>5\*</sup> 表示氢，且结合到寡聚物之 L-核糖-LNA 的 R<sup>2\*</sup> 及 R<sup>4\*</sup> 一起表示选自 -O-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)-N(R<sup>N</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-和 (CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-，特别是 -O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-和 -NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>- 的双自由基。一般而言，以目前为止所得结果，构成 R<sup>2\*</sup> 及 R<sup>4\*</sup> 的双自由基形成两原子桥，即该双自由基与该呋喃糖环(X=O)形成五元环。

在本发明的一个实施方案中，双自由基为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>-。

对于这些令人感兴趣的实施方案，优选该 L-核糖-LNA 具有下列通式 Ia 的结构



还令人感兴趣的本发明的另一方面为式 Ia 变化例，其中 B 处于“ $\alpha$ -构型”。

本发明的寡聚物通常包括 1 至 10000 个如通式 I 的 L-核糖-LNA(或更复杂的通式 Ia)及 0 至 10000 个选自天然核苷及核苷类似物的核苷。

该核苷数目与 L-核糖-LNA 数目总和至少为 2，优选至少为 3，特别至少为 5，尤其至少为 7，例如在 2 至 15000 的范围内，优选在 2 至 100 的范围内，例如 3 至 100，特别是在 2 至 50 的范围内，例如 3 至 50 或 5 至 50 或 7 至 50。

已发现部分经 L-核糖-LNA 改性寡聚物会对 DNA 或 RNA 进行强烈杂交(具有增加的亲合性)。现在相信经 L-核糖-LNA 完全改性的寡聚物及 L-核糖-LNA 单体与其它 L-核糖-构型核苷酸类似物所构成的寡聚物将导致可相媲美的杂交性能。

在本文中，术语“核苷”表示杂环碱基的糖苷。该术语“核苷”广泛用于包含非天然核苷、天然核苷和其它核苷类似物。

核苷的说明实例为包括一核糖部分的核糖核苷和包括一脱氧核糖部分的脱氧核糖核苷。关于这种核糖的碱基，应可理解该碱基可为任一天然碱基，例如：腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶，以及其任一经改性的变体或任一可能的非天然碱基。

当考虑该定义及已知核苷(天然与非天然)和核苷类似物(包括已知双和三环类似物)时，可明了寡聚物可包含单一或多个 L-核糖-LNA(关于取代基的选择和双自由基的选择，该 L-核糖-LNA 可相同或不同)及单一或多个核苷和/或核苷类似物。在本文中，该“寡核苷酸”表示经由核苷间键连接核苷的连续链，然而，应可理解在寡聚物(寡核苷酸)中单一或多个核苷酸单元(单体)的核碱基可利用如上定义的取代基 B 改性。

该寡聚物可为线型、支链或环状。在支链寡聚物的情形中，支链可位于一核苷中，位于一核苷间键中或在一具体例中位于一 L-核糖-LNA。相信在后一情形中，该取代基  $R^2$  与  $R^{3*}$  可表示对前一单体的核苷间键的基团  $P^*$ ，特别是  $R^2$  表示另外的  $P^*$ 。

如上所述，寡聚物的 L-核糖-LNA 通过核苷间键连接其它单体。在本文中，术语“核苷间键”表示由 2 至 4 个，优选为 3 个选自  $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{H}}-$ 、 $>\text{C}=\text{O}$ 、 $>\text{C}=\text{NR}^{\text{H}}$ 、 $>\text{C}=\text{S}$ 、 $-\text{Si}(\text{R}'')_2-$ 、 $-\text{SO}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{P}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{P}(\text{S})_2-$ 、 $-\text{PO}(\text{R}'')-$ 、 $-\text{PO}(\text{OCH}_3)-$  和  $-\text{PO}(\text{NHR}^{\text{H}})-$  基团/原子组成的键，其中  $\text{R}^{\text{H}}$  选自氢及  $\text{C}_{1-4}$ -烷基，且  $\text{R}''$  选自  $\text{C}_{1-6}$ -烷基及苯基。核苷间键的说明实例为  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^{\text{H}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、

-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-CO-O-、  
 -NR<sup>H</sup>-CO-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-CS-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-C(=NR<sup>H</sup>)-NR<sup>H</sup>-、  
 -NR<sup>H</sup>-CO-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-O-CO-O-、-O-CO-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-CO-O-、  
 -CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-、-O-CO-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-CO-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-、  
 -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-CH=N-O-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-O-、-CH<sub>2</sub>-O-N=(当用作连接  
 后一单体时包括 R<sup>5</sup>)、-CH<sub>2</sub>-O-NR<sup>H</sup>-、-CO-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-O-、  
 -CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-CO-、-O-NR<sup>H</sup>-CH<sub>2</sub>-、-O-NR<sup>H</sup>-、-O-CH<sub>2</sub>-S-、-S-CH<sub>2</sub>-O-、  
 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-S-CH<sub>2</sub>-CH=(当用作连接后一单体时包  
 括 R<sup>5</sup>)、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-、-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-、-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-、  
 -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-SO-O-、-O-S(O)<sub>2</sub>-O-、-O-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、  
 -O-S(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-P(O)<sub>2</sub>-O-、  
 -O-P(O,S)-O-、-O-P(S)<sub>2</sub>-O-、-S-P(O)<sub>2</sub>-O-、-S-P(O,S)-O-、-S-P(S)<sub>2</sub>-O-、  
 -O-P(O)<sub>2</sub>-S-、-O-P(O,S)-S-、-O-P(S)<sub>2</sub>-S-、-S-P(O)<sub>2</sub>-S-、-S-P(O,S)-S-、  
 -S-P(S)<sub>2</sub>-S-、-O-PO(R'')-O-、-O-PO(OCH<sub>3</sub>)-O-、-O-PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-O-、  
 -O-PO(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S-R)-O-、-O-PO(BH<sub>3</sub>)-O-、-O-PO(NHR<sup>H</sup>)-O-、  
 -O-P(O)<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-、-NR<sup>H</sup>-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O,NR<sup>H</sup>)-O-、-CH<sub>2</sub>-P(O)<sub>2</sub>-O-、  
 -O-P(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-和-O-Si(R'')<sub>2</sub>-O-；在-CH<sub>2</sub>-CO-NR<sup>H</sup>-、-CH<sub>2</sub>-NR<sup>H</sup>-O-、  
 -S-CH<sub>2</sub>-O-、-O-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O,S)-O-、-O-P(S)<sub>2</sub>-O-、-NR<sup>H</sup>-P(O)<sub>2</sub>-O-、  
 -O-P(O,NR<sup>H</sup>)-O-、-O-PO(R'')-O-、-O-PO(CH<sub>2</sub>)-O-和-O-PO(NHR<sup>N</sup>)-O-，  
 其中 R<sup>H</sup>选自氢和 C<sub>1-4</sub>-烷基，且 R''选自 C<sub>1-6</sub>-烷基和苯基。在 Mesmaeker  
 等人所著 Current Opinion in Structural Biology 1995, 5, 343-355 中有进  
 一步的说明实例。该核苷间键的左手侧键连接至如 P\* 的五元环如取代  
 基 P\*，反之右手侧键连接至前一单体的 5'-位置。

由上述也可明了，在所讨论的 L-核糖-LNA 为 5'-端基单体的情  
 形中，该基团 P 也可表示一 5'-端基。该 5'-端基的实例为氢、羟基、  
 任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷羰  
 氧基、任选取代的芳氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐和-W-A'，  
 其中 W 选自-O-、-S-和-N(R<sup>H</sup>)-，其中 R<sup>H</sup>选自氢及 C<sub>1-6</sub>-烷基，A'选自  
 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体(其  
 中后面的基团可包含如对于该取代基 B 所定义的时间隔基)。

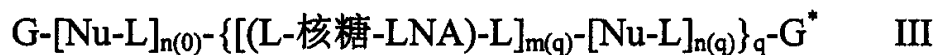
在本说明书和权利要求中，术语“一磷酸盐”、“二磷酸盐”、“三

磷酸盐”分别表示式： $-O-P(O)_2-O^*$ 、 $-O-P(O)_2-O-P(O)_2-O^*$ 及 $-O-P(O)_2-O-P(O)_2-O-P(O)_2-O^*$ 的基团。

在特别令人关注的实施方案中，该基团 P 表示选自一磷酸盐、二磷酸盐和三磷酸盐的 5'-端基。特别是式 II 的三磷酸盐变体作为如酶(特别是那些在核酸上具有活性的酶)的基质特别令人感兴趣。

同样地，在所讨论的 L-核糖-LNA 为 3'-端基单体的情形中，该基团 P\*可表示 3'-端基。该 3'-端基的实例为氢、羟基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷羰氧基、任选取代的芳氧基和-W-A'，其中 W 选自-O-、-S-和-N(R<sup>H</sup>)-，其中 R<sup>H</sup>选自氢及 C<sub>1-6</sub>-烷基，A'选自 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体(其中后面的基团可包含如对于该取代基 B 所定义间隔基)。

在本发明的一个优选实施方案中，该寡聚物具有下式 III：



其中

q 为 1 至 50；

各 n(0),...,n(q)分别为 0 至 10000；

各 m(1),...,m(q)分别为 1 至 10000；

条件为 n(0),...,n(q)和 m(1),...,m(q)的总和为 2 至 15000；

G 表示 5'-端基；

各 Nu 分别表示选自天然核苷和核苷类似物的核苷；

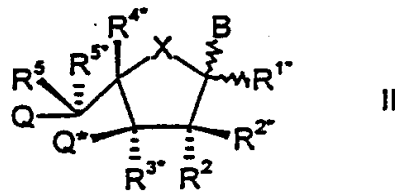
各 L-核糖-LNA 分别表示选自 Nu 和 L-核糖-LNA 两基团之间的核苷间键，或 L 与 G\*表示 3'-端基；且各 L-核糖-LNA-L 分别表示如上定义的通式 I，或优选为如上定义的通式 Ia 的核苷类似物。

在该实施方案中，总的来说，本发明提供了包括 L-核糖-LNA 与不同核碱基的可能性，特别是选自胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶的核碱基与选自腺嘌呤和鸟嘌呤的核碱基。在一具体例中，该寡聚物可包括至少一个其中 B(在式 I 或 Ia 中)选自包括腺嘌呤与鸟嘌呤之基的 L-核糖-LNA 及至少一个 L-核糖-LNA，其中 B 选自包括胸腺嘧啶、胞嘧啶与尿嘧啶。

除上述定义的寡聚物之外，本发明还提供了用于如制备寡聚物的

L-核糖-LNA 单体, 作为例如核酸聚合酶、聚核酸激酶、端基转化酶的基质, 及作为治疗剂, 进一步参见如下。单体 L-核糖-LNA 的整体结构 (特别就可能的双自由基而言) 对应于定义为寡聚物组成的 L-核糖-LNA。但就 P 和 P' 基而言, 单体 L-核糖-LNA 与寡聚物的组成略有差异, 如后文所述。此外, 单体 L-核糖-LNA 包含官能基保护基, 特别在单体 L-核糖-LNA 欲通过化学合成结合到寡聚物的情形时包含官能基保护基。

此外, 本发明涉及通式 II 的单体 L-核糖-LNA 核苷(L-核糖-LNA):



其中该取代基 B 选自核碱基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体; X 选自-O-、-S-、-N(R<sup>N\*</sup>)-和-C(R<sup>6</sup>R<sup>6\*</sup>)-, 优选选自-O-、-S-和-N(R<sup>N\*</sup>)-;

各 Q 及 Q\* 分别选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Prot-O-、Act-O-、巯基、Prot-S-、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、胺基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-、Act-N(R<sup>H</sup>)-、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、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>-烯氧基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体、羧基、磺酰基、羟甲基、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、胺甲基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、羧甲基、磺酰甲基, 其中 Prot 分别为-OH、-SH 和-NH(R<sup>H</sup>)的保护基, Act 分别为-OH、-SH 和-NH(R<sup>H</sup>)的活化基, 且 R<sup>H</sup> 选自氢及 C<sub>1-6</sub>-烷基; 和

R<sup>2\*</sup> 与 R<sup>4\*</sup> 一起表示选自-O-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s+1</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>s</sub>-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-、-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-、-N(R<sup>\*</sup>)-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、及-S-(CR<sup>\*</sup>R<sup>\*</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>\*</sup>)-的双自由基; 其中 R<sup>\*</sup> 如上述对于

寡聚物的定义；且与 Q 或 Q\* 无关的各取代基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3\*</sup>、R<sup>5</sup> 和 R<sup>5\*</sup> 如上述对于寡聚物的定义。

该单体 L-核糖-LNA 还包括其碱性盐类与酸加成盐类。

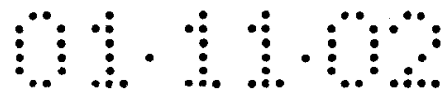
此外，应理解，在寡核苷酸合成进行的条件下具有反应性的任一化学基(包含任一核碱基)任选地被官能基保护，如本领域中所公知的。这表示如羟基、胺基、羧基、磺酰基及巯基和核碱基的单体 L-核糖-LNA 基团任选地被官能基保护。保护(与脱保护)通过本领域的技术人员公知的方法进行(参见，例如：Greene, T. W. and Wuts, P. G. M., "Protective Groups in Organic Synthesis" 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley, N. Y. (1991), and M. J. Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, 1984)。

羟基保护基的说明实例为任选取代的三苯甲基(Tr)如 4,4'-二甲氧三苯甲基(DMT)、4-单甲氧三苯甲基(MMT)及三苯甲基，任选取代的 9-(9-苯基)吡啶基(pixyl)，任选取代的乙氧羰氧基，对-苯基偶氮苯氧羰氧基，四羟基哌喃基(thp)，9-苄基甲氧羰基(Fmoc)，甲氧四羟基哌喃基(mthp)，硅烷氧基如三甲硅烷基(TMS)、三异丙硅烷基(TIPS)、叔丁基二甲基硅烷基(TBDMS)、三乙硅烷基(TEOS)及苯基-二甲硅烷基，苯氧基羰基或经取代的苯氧基羰基醚如 2-溴苯氧基羰基，叔丁基醚，烷基醚如甲醚，乙缩醛(包含两个羟基)，酰氧基如乙酰基或卤代乙酰基如氯代乙酰基或氟代乙酰基、异丁酰基、三甲基乙酰基、苯甲酰基和取代苯甲酰基、甲氧甲基(MOM)，苄醚或经取代的苄醚如 2,6-二氯苄基(2,6-Cl<sub>2</sub>Bzl)。或者，该羟基可任选地经连接基连到固体载体而被保护。

胺基保护基的说明实例为 Fmoc(苄基甲氧羰基)、BOC(叔丁氧基羰基)、三氟乙酰基、烯丙氧基羰基(alloc, AOC)、苄基-氧基羰基(Z, Cbz)、取代苄氧基羰基，例如：2-氯苄氧基羰基(2-ClZ)、单甲氧三苯甲基(MMT)、二甲氧三苯甲基(DMT)、苯二甲酰基和 9-(9-苯基)吡啶基(pixyl)。

羧基保护基的说明实例为烯丙基酯类，甲基酯类，乙基酯类，2-氰基乙基酯类，三甲基硅烷基乙基酯类，苄基酯类(Obzl)，2-金刚烷基酯类(O-2-Ada)，环己基酯类(OcHex)，1,3-噁唑啉类，噁唑类，1,3-噁唑啉类，酰胺类或酰肼类。

巯基保护基的说明实例为三苯甲基(T、乙酰胺基甲基(acm)、三甲

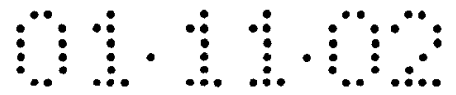


基乙酰胺基甲基(Tacm)、2,4,6-三甲氧苄基(Tmob)、叔丁基炔磺基(StBu)、9-苄基甲基(Fm)、3-硝基-2-吡啶基炔磺基(Nprs)和4-甲基苄基(Meb)。

此外，或许需要或希望保护任何单体 L-核糖-LNA 中所含的核碱基，特别是当依据本发明将单体 L-核糖-LNA 结合到寡聚物时。在本文中，术语“受保护的核碱基”表示所讨论的核碱基带有本领域技术人员公知的保护基(参见例如：Protocols for Oligonucleotides and Analogs, vol 20, (Sudhir Agrawai, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, NJ: S.L. Beaucage and R. P. Iyer, Tetrahedron, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage and R. P. Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223; and E. Uhlmann and A. Peyman, Chem. Rev., 90, 543.)。说明实例为苯甲酰基、异丁酰基、叔丁基、叔丁氧羰基、4-氯-苄氧羰基、9-苄基甲基、9-苄基甲氧羰基、4-甲氧苯甲酰基、4-甲氧三苯甲基、任选取代的三唑基、对甲苯磺酰基、任选取代的磺酰基、异丙基、任选取代的脒类、任选取代的三苯甲基、苯氧乙酰基、任选取代的酰基、pixyl、四氢哌喃基、任选取代的硅烷基醚类和4-甲氧苄氧羰基。在“Protocols for oligonucleotide conjugates”中第一章，Methods in Molecular Biology, vol 26, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, NJ. and S. L. Beaucage and R. P. Iyer, Tetrahedron, 1993, 48, 2223 公开了另外合适的实例。

在一优选实施方案中，在单体 L-核糖-LNA 中的 B 基优选选自核碱基和受保护的核碱基。

在本发明的单体 L-核糖-LNA 的具体例中，Q 及 Q\*其中之一，优选为 Q\*，表示选自 Act-O-、Act-S-、Act-N(R<sup>H</sup>)-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、Act-S-CH<sub>2</sub>-、Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-，Q 及 Q\*其中另一个，优选为 Q，表示选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Prot-O-、磺基、Prot-S-、C<sub>1-6</sub>-烷磺基、胺基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、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>-烯氧基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体、羧基、磺酰基、羟甲基、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、胺甲基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、羧甲基、磺酰甲基，且 R<sup>H</sup>选自氢及 C<sub>1-6</sub>-烷基。



上述情形中，Prot 基团分别表示-OH、-SH 和-NH(R<sup>H</sup>)的保护基。但考虑到需要有稳定且可逆的保护基，然而，考虑到对稳定的和可逆的保护基的需要，这种保护基选自如上定义的羟基保护基、巯基保护基以及胺基保护基。然而，-OH 的任何保护基优选选自任选取代的三苯甲基如二甲氧三苯甲基(DMT)、一甲氧三苯甲基(MMT)和三苯甲基，以及 9-(9-苯基) 吡吨基(pixyl)、任选取代的四羟基哌喃基(thp)(对于 phosphoramidite 寡核苷酸合成更适合的羟基保护基记载于 Agrawal, ed. "Protocols for Oligonucleotide Conjugates"; Methods in Molecular Biology, vol. 26, Humana Press, Totowa, NJ (1994) and Protocols for Oligonucleotides and Analogs, vol 20, (Sudhir Agrawal, ed), Humana Press, 1993, Totowa, NJ 中)，或经保护的乙缩醛；-SH 的任一保护基选自三苯甲基，例如：二甲氧三苯甲基(DMT)、单甲氧三苯甲基(MMT)及三苯甲基，及任选取代的 9-(9 苯基) 吡吨基(pixyl)、任选取代的四羟基哌喃基(thp)(对于 phosphoramidite 寡核苷酸合成更适合的巯基保护基记载于 Agrawal(参见上述))；-NH(R<sup>H</sup>)的任一保护基选自三苯甲基，例如：二甲氧三苯甲基(DMT)、单甲氧三苯甲基(MMT)及三苯甲基，及任选取代的 9-(9 苯基) 吡吨基(pixyl)、任选取代的四羟基哌喃基(thp)(对于 phosphoramidite 寡核苷酸合成更适合的胺基保护基也记载于 Agrawal(参见上述))。

在上述具体例中，如同本文所定义的任一单体 L-核糖-LNA，Act 分别表示-OH、-SH 和-NH(R<sup>H</sup>)的活化基。该活化基例如选自取代的 O-phosphoramidite、任选取代的 O-磷酸三酯、任选取代的 O-磷酸二酯、任选取代的 H-磷酸酯和任选取代的 O-磷酸酯。

在本文中，术语“phosphoramidite”表示式-P(OR<sup>x</sup>)-N(R<sup>y</sup>)<sub>2</sub>基，其中 R<sup>x</sup> 表示一任选取代的烷基，例如：甲基、2-氰基乙基或苄基，且各 R<sup>y</sup> 表示任选取代的烷基，例如：乙基或异丙基或基团-N(R<sup>y</sup>)<sub>2</sub> 形成一吗啉基(-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O)。R<sup>x</sup> 优选表示 2-氰基乙基且两 R<sup>y</sup> 优选为相同并表示异丙基。因此，特别有关的 phosphoramidite 为 N,N-二异丙基-O-(2-氰基乙基)phosphoramidite。

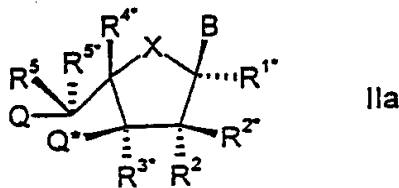
应能理解，本文中所用于单一单体 L-核糖-LNA 或多个单体 L-核糖-LNA 的保护基可选择，以便在这个/这些 L-核糖-LNA 结合本发明的

寡聚物时，可进行该官能基的同步脱保护或是连续脱保护作用。后一情形表现区域选择性地导入一个或数个例如 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体的“活化/官能”基的可能性，其中，该基团可经由如上所述的间隔基连接。

在一优选实施方案中，Q 分别选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Prot-O-、巯基、Prot-S-、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、胺基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、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>-烯氧基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体、羧基、磺酰基、羟甲基、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、胺甲基、Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、羧甲基、磺酰甲基，其中 Prot 分别为-OH、-SH 和-NH(R<sup>H</sup>)的保护基，且 R<sup>H</sup>选自氢及 C<sub>1-6</sub>-烷基；以及 Q\*分别选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、Act-O-、巯基、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-烷硫基、胺基、Act-N(R<sup>H</sup>)-、一或二(C<sub>1-6</sub>-烷基)胺基、任选取代的 C<sub>1-6</sub>-烷氧基、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>-烯氧基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔基、任选取代的 C<sub>2-6</sub>-炔氧基、DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基、配体、羧基、磺酰基，其中 Act 分别为-OH、-SH 和-NH(R<sup>H</sup>)的活化基，且 R<sup>H</sup>选自氢及 C<sub>1-6</sub>-烷基。

通式 II 的单体 L-核糖-LNA，如结合到寡聚物的 L-核糖-LNA，可代表各种立体异构物。因此，相信如上述对于结合到寡聚物的 L-核糖-LNA 的立体化学变体同样可应用在单体 L-核糖-LNA 的情形(然而，应注意 P 应用 Q 取代)。

在本发明的优选实施方案中，该单体 LNA 具有通式 IIa



其中取代基定义如上。

此外，关于取代基、双自由基、R\*等的定义，如上述对于本发明寡

聚物定义的不同优选实施方案也可应用在单体 L-核糖-LNA 的情形中。

在本发明单体 L-核糖-LNA 的特别令人关注的实施例中，B 表示核碱基，优选选自胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤(特别是腺嘌呤与鸟嘌呤)的核碱基，X 为-O-， $R^{2*}$  与  $R^{4*}$  一起表示选自  $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$  及  $-(CH_2)-N(R^N)-(CH_2)_{1-3}-$ ，特别是  $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$  和  $-R^N-CH_2-$  的双自由基，其中  $R^N$  选自氢及  $C_{1-4}$ -烷基。Q 表示 Prot-O-， $Q^*$  表示 Act-OH， $R^{1*}$ 、 $R^2$ 、 $R^{3*}$ 、 $R^5$  和  $R^{5*}$  各表示氢。在该具体例中， $R^N$  也可选自 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体。

在本发明的单体 L-核糖-LNA 更特别令人关注的具体例中，B 表示核碱基，优选为选自胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤(特别是腺嘌呤与鸟嘌呤)的核碱基，X 为-O-， $R^{2*}$  与  $R^{4*}$  一起表示选自  $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$  和  $-(CH_2)-N(R^N)-(CH_2)_{1-3}-$ ，特别是  $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$  和  $-R^N-CH_2-$  的双自由基，其中  $R^N$  选自氢及  $C_{1-4}$ -烷基，Q 选自羟基、巯基、 $C_{1-6}$ -烷硫基、胺基、一或二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷氧基、任选取代的  $C_{2-6}$ -烯氧基、任选取代的  $C_{2-6}$ -炔氧基、一磷酸盐、二磷酸盐、三磷酸盐， $Q^*$  选自氢、叠氮基、卤素、氰基、硝基、羟基、巯基、 $C_{1-6}$ -烷硫基、胺基、一或二( $C_{1-6}$ -烷基)胺基、任选取代的  $C_{1-6}$ -烷氧基、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  $C_{2-6}$ -烯氧基、任选取代的  $C_{2-6}$ -炔基、任选取代的  $C_{2-6}$ -炔氧基， $R^{3*}$  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， $R^{1*}$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  及  $R^{5*}$  各表示氢。同样， $R^N$  也可选自 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基与配体。

本发明的一方面提供固相和/或溶液相结合到寡聚物的 L-核糖-LNA 不同衍生物。至于说明实例，使用 phosphoramidite 法、磷酸三酯法和 H-磷酸酯法，分别适用于结合(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(胞嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(尿嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(鸟嘌呤-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(腺嘌呤-1-基)-2,5-二氧杂双环

[2.2.1]庚烷的单体分别为(1R, 3R, 4S, 7R)-7-(氰基乙基(二异丙基-胺基)磷基氧基)-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷-7-O-(2-氯苯基磷酸盐)、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷-7-O-(H-磷酸盐)及其3-(胞嘧啶-1-基)、3-(尿嘧啶-1-基)、3-(腺嘌呤-1-基)和3-(鸟嘌呤-1-基)类似物。此外,用亚甲基硫基、亚甲基胺基或1,2-亚乙基双自由基取代该单体的亚甲基氧基双自由基的类似物也期望构成本发明的特别令人关注的变体。相信该亚甲基硫基和亚甲基胺基类似物如同该亚甲基氧基类似物同样适用,因此考虑对应于所述结合(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(胞嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(尿嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(鸟嘌呤-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷、(1R, 3R, 4S, 7R)-7-羟基-1-羟甲基-3(腺嘌呤-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷的特定试剂也视为本发明范围内特别令人感兴趣的反应性单体。对于亚甲基胺基类似物而言,应注意二级胺带有选自任选取代的C<sub>1-6</sub>-烷基,例如甲基和苄基,任选取代的C<sub>1-6</sub>-烷基羰基,例如三氟乙酰基,任选取代的芳基羰基及任选取代的杂环芳基羰基。

本发明的另一同样令人关注的方面为通式II或IIa的变体,其中B处于“β-构型”。

### 单体的制备

在一优选实施方案中,含有一2'-O,4'-C-桥亚甲基的α-L-核糖-LNA是由下列步骤合成的:4-C-羟基甲基-α-D-木糖呋喃糖1的苯甲酰化(T. F. Tam and B. Fraser-Ried, Can. J. Chem., 1979, 57, 2818)生成二-O-苯甲酰基衍生物2,接着利用80%的乙酸进行乙酸水解,随后进行乙酰化,使该二-O-苯甲酰基衍生物转化为1,2-二-O-乙酰化的呋喃糖3。利用修改后的Vorbrüggen方法(H. Vorbrüggen and G. Höfle, Chem. Ber., 1981, 114, 1256),由胸腺嘧啶的现场硅烷化及三氟甲磺酸三甲基硅烷酯

介导的偶合立体选择性地得到该胸腺嘧啶  $\beta$ -构型核苷 4。利用甲醇钠处理化合物 4 导致脱乙酰化而得到核苷三醇 5。4,4'-二甲氧基三苯甲基保护接着进行甲苯磺酰化, 得到 5'-O-4,4'-二甲氧基三苯甲基保护的核苷衍生物 7。由碱基引起环闭合而得到双环核苷衍生物 8。脱苯甲基化产生双环核苷类似物 9, 其可转化为寡核苷酸合成的 phosphoramidite 衍生物 10。在实施例 14 中使用的偶合法仅为对本领域的技术人员来说显而易见的数种可能方法中的一种。

可使用如图 3 所示合成序列的另一途径。因此, 三甲磺酰基化核苷 5 得到可使用 NaOH/EtOH/H<sub>2</sub>O 环化的核苷 11。在使用的实验条件下, 发现该剩余的甲磺酰氧基伴随转变成羟基, 生成核苷 12。如在实施例 14 所述的标准 DMT 保护, 预期会生成核苷 8, 是合成  $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷 phosphoramidite 衍生物 10(第 2 图)的常规的中间物。

该所述实例用来说明本发明的步骤和实施例。并利用 1D NMR 来证实合成化合物的结构。

图 1、2 和 3 所述的方法可同样用来合成胸腺嘧啶之外的其它嘧啶碱基, 例如: 尿嘧啶、胞嘧啶、5-取代尿嘧啶、5-取代胞嘧啶和同样取代嘧啶的  $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷衍生物。或者, 利用已知方法(Koshin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K. Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel. J. Tetrahedron 1998, 54, 3607; Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J., Morio, K., Doi, T., Imanishi, T. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 5401)使该尿嘧啶衍生物可转化为对应的胞嘧啶衍生物, 以及将该胸腺嘧啶衍生物转化为对应的 5-甲基胞嘧啶衍生物。

对于嘌呤  $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷衍生物的合成而言, 可以设计一些合适的合成方法。应注意, 以下提到术语“ $\alpha$ -面”是指天然 RNA 核苷单体的  $\alpha$ -面, 以下提到术语“ $\beta$ -面”是指天然 RNA 核苷单体的  $\beta$ -面, 术语“ $\beta$ -嘌呤核苷”或“ $\beta$ -嘧啶核苷”表示该核碱基位于如天然 RNA 核苷单体中。至于该嘌呤  $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷衍生物的可能的合成途径的实例, 可采用 arabino-构型类似物(位于该呋喃糖环的  $\beta$ -面的 2'-OH 基)的环化。这些核苷可由对应的 arabino-构型母体核苷经由 5'-氧化、醛醇缩合和还原而制备。

5'-OH 基(位于该呋喃糖环的  $\beta$ -面)的保护基的控制与活化应该为

上述所需的环化准备。或者， $\beta$ -嘌呤核糖呋喃糖基核苷(具有位于该呋喃糖环 $\alpha$ -面的2'-OH与3'-OH基及位于该呋喃糖环 $\beta$ -面的3'-OH(或可选择位于该呋喃糖环 $\alpha$ -面)利用在C-3'位置的伴随转变)的4'-C-羟甲基衍生物的2'-OH基的2'-氧化接着立体选择性还原(使用例如 $\text{NaBH}_4$ )，将产生在2'-碳原子具有转化构型的希望的核苷。5'-OH基(位于该呋喃糖环的 $\beta$ -面)的保护基的控制与活化应该为上述所需要的环化而准备。可预期其它步骤有助于在 $\beta$ -嘌呤核糖呋喃糖基核苷(具有位于该呋喃糖环 $\alpha$ -面的2'-OH与3'-OH基及位于该呋喃糖环 $\beta$ -面的3'-OH(或可选择位于该呋喃糖环 $\alpha$ -面)利用在C-3'位置的伴随转变)的4'-C-羟甲基衍生物的2'-碳原子的构型转化，例如 Mitsunobu 反应或具有如乙酸酯、苯甲酸酯、烷氧化物等 O-亲核基的 2'-O-活化衍生物(例如：2'-O-甲磺酰基、2'-O-苯甲酰基或 2'-O-三氟甲磺酰基)亲核置换反应。然后进行脱保护以得到 5'-羟基-4'-C-羟甲基衍生物，活化以准备进行环化(例如：通过一或二甲磺酰基化、一或二苯甲酰基化或一或二三氟甲磺酰基化)，环化(如有需要则在 2'-OH 基脱保护后进行)，脱保护，将产生所需要的嘌呤 $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷。应注意，该嘌呤碱基优选应在目标单体中受到保护，在所选择步骤，或如最后步骤的合成途径期间，通过三甲基硅烷基化保护该嘌呤碱基的游离胺基而可完成该保护。在一实施方案中，可采用已知 Vorbrüggen 型偶合法(参见例如核苷 4 的合成，图 1)(Koshkin, A.A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J, *Tetrahedron* 1998, 54, 3607)，通过偶合呋喃糖衍生物 3 (第 1 图)与适合的受保护的腺嘌呤或鸟嘌呤衍生物，制备 $\beta$ -嘌呤核苷的起始 4'-C-羟甲基衍生物。

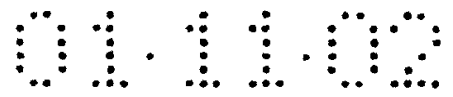
预期可在天然 $\beta$ -嘌呤核糖呋喃糖基核苷(具有位于该呋喃糖环 $\alpha$ -面的2'-OH及位于该呋喃糖环 $\beta$ -面的3'-OH(或可选择位于该呋喃糖环 $\alpha$ -面)利用在C-3'位置的伴随转变)上导入附加的4'-C-羟甲基，从而进行上述构型的转化，接着使用如上述的那些已知步骤。可预期，在适当衍生与保护的嘧啶核苷上的酶或化学转糖苷化反应，或是 arabino-构型 $\beta$ -嘧啶呋喃糖基核苷、arabino-构型4'-C-羟甲基- $\beta$ -嘧啶呋喃糖基核苷、或已环化的 $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶核苷为该嘌呤 $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷衍生物的可能合成途径。或者，可由呋喃糖或己糖起始，在 2-碳原

子的构型转化以及环化，或这些步骤之一或这些步骤之二(所需的步骤视所用的起始物质而定)进行 4-C-羟甲基化。随后，在环化之前或之后，用不同的碱基偶合(如有需要而受保护的嘌呤或嘧啶)，产生有助于在必需保护基控制和/或 OH-基活化之后完成用于合成  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶和嘌呤核苷的核苷衍生物。至于合成  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶或嘌呤核苷的另一步骤，可能为自适当衍生的呋喃糖衍生物，例如呋喃糖胺，在两个或多个化学步骤中直接合成所要的核碱基。

在一优选实施方案中，在实施例 15、16 和 17(第 4 图)中所述的步骤可用来制备嘌呤  $\alpha$ -L-LNA 单体，例如腺嘌呤或鸟嘌呤衍生物。因此，利用 N-6-苯甲酰基腺嘌呤糖 3 得到选择性脱乙酰化及其后转变为 2'-O-三氟甲磺酰基衍生物的核苷 13。利用乙酸钾伴随反应得到具有在 C2' 转化的 2'-O-乙酰衍生物 14。完成脱乙酰化后，重新保护腺嘌呤部分，选择性甲磺酰化两个一级羟基，用氢氧化钠水：二噁烷溶液处理生成  $\alpha$ -L-LNA 腺嘌呤核苷 15。核苷 15 的 DMT 保护后接着脱苯甲基化及 3'-O-phosphitylation(Koshkin, A.A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J, Tetrahedron 1998, 54, 3607)为获得 phosphoramidite 衍生物 16 的一种可能途径。15 的脱苯甲基化之后接着一级羟基的选择性 DMT-保护及 3'-O-phosphitylation 为生成 phosphoramidite 16 的另一途径。

上述对于  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘌呤核苷合成的所有方法和步骤也可选择用作  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶核苷合成的方法。

上述合成  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶与嘌呤核苷的方法自然导致有助于  $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷的 2'-胺基与 2'-硫基衍生物合成的方法。至于实例，通过攻击位于在适当活化的 5'-OH 基上呋喃糖环  $\beta$ -面的 2'-胺基或 2'-硫基的环化将产生 2'-胺基或 2'-硫基  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶或嘌呤核苷。或者，通过攻击位于在呋喃糖环  $\alpha$ -面适当活化的 2'-OH 基上呋喃糖环  $\beta$ -面的 5'-胺基或 5'-硫基的环化将产生 2'-胺基或 2'-硫基  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶或嘌呤核苷。至于另一方法，使用胺基或硫基亲核基(分别如苄胺和硫乙酸钾)环化适当经活化、受保护及构型的衍生物如 2'-O,5-二甲酰基、2'-O,5-二苯甲酰基或 2'-O,5-二三氟甲酰基核苷，将产生  $\alpha$ -L-LNA 核苷的 2'-胺基与 2'-硫基衍生物。



预期用于  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶核苷寡聚合化的方法可成功地用于  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘌呤核苷。或者，也可应用任何作为寡核苷酸及类似物的自动或溶液相合成的已知方法如磷酸三酯法、H-磷酸盐法或任何用于  $\alpha$ -L-核糖-LNA 嘧啶核苷寡聚合化方法的变体。

## 寡聚物的制备

使用有机化学领域中的普通技术人员公知的核酸化学聚合技术可制备本发明的线型-、支链- (M. Grötli and B. S. Sproat, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 495; R.H. E. Hudson and M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 2119; M. Von Büren, G. V. Petersen, K. Rasmussen, G. Brandenburg, J. Wengel and F. Kirpekar, *Tetrahedron*, 1995, 51, 8491) 及环形- (G. Prakash and E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 3523) 寡与聚核苷酸。可使用 phosphoramidite 化学 (S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223)，但也可使用例如 H-磷酸盐化学、磷酸三酯化学或酶合成。利用盐酸吡啶代替 1H-四唑作为在寡核苷酸合成期间活化核苷 phosphoramidite 的高效率试剂稍微修改 Phosphoramidite 法的标准偶合条件，并延长该偶合时间至 10 至 30 分钟之间。

在合成所要的序列之后，由固体载体脱保护与裂解(使用浓氨的甲醇溶液在室温下从固体载体裂解及去除保护基，历时 12 小时)，然后使用市售可处理滤筒(包含脱三苯甲基化)反相纯化，产生最终寡聚合产物。或者，可利用可处理反相 HPLC 和/或从乙醇或丁醇沉淀进行 L-核糖-LNA 寡核苷酸纯化。利用毛细管凝胶电泳证实该合成聚核苷酸类似物的纯度与组成，但也可利用反相 HPLC 及 MALDI-MS 证实纯度与组成。

总之，本发明提供了如本文定义 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸制备的 L-核糖-LNA 的应用。应理解，L-核糖-LNA 改性寡核苷酸可包括正常核苷 (例如：天然核苷如核糖核苷和/或脱氧核糖核苷)和不同于那些如通式 II 所定义的改性核苷。

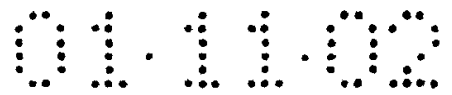
此外，具有固定在一任选地经核碱基保护及任选地经 5'-OH 保护的 LNA 的固体载体材料，特别令人关注，如作为在 3'-端基包含 LNA

单体的 LNA 改性寡核苷酸的合成材料。在此情形中，该固体载体优选为 CPG，例如容易得到(市售)的 CPG 材料，其利用如供货商所述对于特殊材料的条件，将一 3'-经官能基化、任选地经核碱基保护及任选地经 5'-OH 保护的 LNA 连接在该材料上。例如可以使用 BioGenex Universal CPG 载体(BioGenex, U.S.A.)。该 5'-OH 保护基可为如 DMT 基。应根据关于所讨论的 CPG 材料的应用条件来选择 3'-官能基。

## 应用

本发明公开了当 L-核糖-LNA 衍生物结合到部分改性寡核苷酸时，比未改性寡核苷酸会减少这种改性寡核苷酸对于互补 DNA 与 RNA 两者的亲合性。然而，当结合经 L-核糖-LNA 完全改性寡核苷酸时，会观察到戏剧性地增加对于互补 ssDNA 与 ssRNA 的杂交性能。除所述性能之外，该 L-核糖-LNA 的一特殊变体- $\alpha$ -L-核糖-LNA 具有在杂交时辨别 RNA 与 DNA 目标物的能力。完全改性 L-核糖-LNA 寡核苷酸因此提供不需放弃特异性而大幅增加标准寡核苷酸的亲合性(固定的寡核苷酸尺寸)，不需放弃亲合性而显著增加特异性(减少寡核苷酸尺寸)，或对 RNA 目标物特定杂交的可能性。

除大幅增加杂交性能之外，还相信 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸表现出正常 DNA 与 RNA 寡核苷酸许多有用的物理化学性能。包括优异的溶解度、LNA 改性寡核苷酸的反应对于象氯化钠和氯化四甲铵的盐类，表现与未改性寡核苷酸相似的反应、对于各种聚合酶 LNA 改性寡核苷酸扮演前体的能力、LNA 改性寡核苷酸在使用热稳定 DNA 聚合酶的目标扩增反应中扮演前体的能力、LNA 改性寡核苷酸对于 T4 聚核苷酸激酶扮演基质的能力、生物素化的 LNA 对于序列特定捕获 PCR 扩增基因序列到一抗生蛋白链菌素涂层的固体表面上的能力、固定 LNA 改性寡核苷酸对于序列特定捕获扩增基因序列的能力及 LNA 改性寡核苷酸通过由链入侵以序列特定靶标双链的非常重要的能力。因此，对于本领域的技术人员而言，这些新型核苷类似物在治疗、诊断及分子生物学中对于改善一般以寡核苷酸为基础的技术的性能来说，是非常有



用的工具。

本发明的一个目的在于提供本发明的单体 L-核糖-LNA，该单体 L-核糖-LNA 可利用寡核苷酸合成领域的技术人员公知的步骤与设备使其结合到寡核苷酸。

本发明的另一目的在于提供经 L-核糖-LNA 完全或部分改性的寡核苷酸(寡聚物)，其可以序列特定的方式杂交至互补寡核苷酸，形成比由未改性寡核苷酸所形成的对应复合物有大大提高的亲合性的双显性组合或三显性组合。

本发明的另一目的为使用经 L-核糖-LNA 完全改性的寡核苷酸以获得不需放弃亲合性而提高的寡核苷酸特异性。

本发明的另一目的在于提供包含两个 L-核糖-LNA-正常核苷及其它核苷类似物的经 L-核糖-LNA 完全或部分改性的寡核苷酸。

本发明的又一目的为开发高亲合性 L-核糖-LNA 以产生可通过“链置换”方法键合到 dsDNA 分子中目标序列的具有度亲合性的完全改性寡核苷酸。

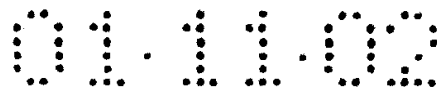
本发明的又一目的在于提供不同等级的 L-核糖-LNA，当结合到寡核苷酸时，对其互补核苷的亲合性不同。例如可以具有如经修改过的氢键可能衍生物取代正常核碱基 G、T、C 和 U 来完成。

本发明的又一目的在于提供 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸，较其未改性等同物具有更好的抗核酸酶性质。

本发明的又一目的在于提供 L-核糖-LNA 完全改性的寡核苷酸，其可在杂交时辨别出 DNA 和 RNA 目标物。通过  $T_m$  量测，令人惊讶地显示 L-核糖-LNA 的  $T_m$  对于互补 RNA 寡核苷酸为每改性增加  $5.7^\circ\text{C}$ ，相较于对于互补 DNA 为每改性仅增加  $2.7^\circ\text{C}$  (如实施例 11、表 3 所示)。因此，和对于 DNA 相比， $\alpha$ -L-核糖-LNAoligos 对于 RNA 具有增加的亲合性，使得  $\alpha$ -L-核糖-LNA 将特定杂交特定的 RNA 而不杂交具有相同碱基序列的 DNA。在以下所述的一些情形中可表现出辨别 RNA 与 DNA 的能力。

本发明的另一目的在于提供可补充 RNaseH 的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸。

本发明的另一目的在于提供可作为 DNA 与 RNA 聚合酶基质而使



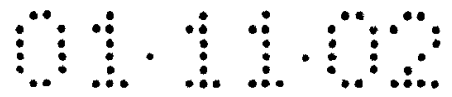
该类似物可结合到成长中的核酸链或作为链互变异构物的 L-核糖-LNA。

本发明的又一目的在于提供可作为治疗剂的 L-核糖-LNA。已知有许多治疗用的核苷类似物实例，且本文中公开利用从文献已知的步骤可以合成核苷类似物的相似衍生物(E. De Clercq, *J. Med. Chem.* 1995, 38 2491; P. Herdewijn and E. De Clercq: *Classical Antiviral Agents and Design of New Antiviral Agents*. In: *A Textbook of Drug Design and Development*; Eds. P. Krogsaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p. 425; I. K. Larsen: *Anticancer Agents*. In: *A Textbook of Drug Design and Development*; Eds. P. Krogsaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p 460)。

已证实，双链 RNA 具有抗病毒活性及肿瘤抑制活性(Sharp et al., *Eur. J. Biochem.* 230(1): 97-103, 1995, Lengyel-P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(13): 5893-5, 1993, and Laurent-Crawford et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 8(2): 285-90, 1992)。双链 LNA 可能与有疗效活性的双链 RNA 的效果相似，所以，这种双链 LNA 具有作为治疗剂的潜力。

本文中使用的术语“天然核酸”时，表示含义最广的核酸，例如存在于任何来源的完整细胞或病毒或由化学或物理方式从这种来源释放的核酸或由扩增从这种原始来源衍生的核酸。该天然核酸可为单、双或部分双链，且可为相对的纯种核酸或不同核酸的混合物。其也可为包含其它核酸及其它细胞成分的粗制生物样品的组成。另一方面，术语“合成核酸”表示任何由化学合成制备的核酸。

本发明还提供 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸在以核酸为基础的治疗、诊断及分子生物学的应用。该 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸可用于天然或合成核酸的检测、辨识、捕获、特征描述、定量和分段，并且在活体内或在试管内作为转译作用或转录作用的阻隔剂。在许多情况中，令人感兴趣的是使不同分子连接到 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸。可将此种分子连接到寡核苷酸的末端或连接到单一或多个内部部位。或者，可将这种分子通过间隔基连接到寡核苷酸 5'-或 3'-端基。这种分子的代表性基团为 DNA 嵌体、光化学活性基、热化学活性基、螯合基、信息基和配体。通常，利用这些分子来标记未改性 DNA 与 RNA 寡核苷酸



的所有方法也可用来标记 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸。同样地，用于检测经标记的寡核苷酸的所有方法一般可应用于相应经标记的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸。

L-核糖-LNA 改性寡核苷酸可用来标记细胞，其中该标记使该细胞得以区别或从未经标记的细胞中被分离出来。

## 治疗

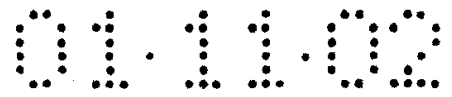
术语“链置换”涉及寡核苷酸由此键接到双链 DNA 或 RNA 中其互补的目标序列，以便由该目标链置换其它链。

本发明的一方面，在以“抗原”法为基础的新型医药的发展中，开发可以进行“链置换”的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸。与可以制造三链的寡核苷酸相比，这种“链置换”的寡核苷酸允许在 dsDNA 中任何序列可被靶标以及可存在于生理离子强度与 pH 下。

“链置换”寡核苷酸也优选用于反信息手段，用于分子内氢键造成的 RNA 目标序列无法接近的情况。这种分子内结构可能出现于 mRNAs，当试图通过反信息手段“关闭” mRNA 的转译时将造成重大问题。

细胞 RNA 的其它种类，例如 tRNAs、rRNAs、snRNAs 和 scRNAs，含有对于其功能而言重要的分子内结构。这种高度结构化 RNA 不能，但却能参与例如 mRNA 切片、聚腺苷化、转译、编辑、维持染色体末端完整等一连串的细胞功能。由于其高级结构赋予或防止正常寡核苷酸有效地杂交，至今仍难以使用这种 RNA 作为反信息目标物。然而，本文提供的具有新型、惊人效果的  $\alpha$ -L-核糖-LNA，如下所述，靶标具有  $\alpha$ -L-核糖-LNA 的 RNA 是有可能的。

已知一些抗体会和细菌核糖体相互作用并因此而抑制转译作用。已知某些抗体(例如：链霉素、四环素、放线壮观素、伊短菌素、潮霉素与新霉素)键合到细菌 16 S rRNA 的特定区域(Moazed D and Noller HF, Nature, 1987, 327(6121), 389)。同样地，其它抗体(例如：氯霉素、红霉素、碳霉素和春霉素 B)会和细菌中 23 S rRNA 的特定区域相互作用(Moazed D and Noller HF, Biochimie, 1987, 69(8), 879)。类似的方法似



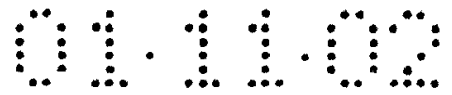
乎也适用于较高等的生物体(Spangler EA and Blackburn EH, J. Biol. Chem., 1985, 260(10), 6334)。

此外, 已知 PNAs-PNAs(肽核酸)为特定与呈 Watson-Crick 碱基对形式的 DNA 相互作用, 并可略为增加热稳定性( $T_m$ )-靶标核糖 RNA 的官能性及可接近的位置的分子, 该分子可抑制大肠杆菌中的转译作用 (Good L and Nielsen PE, Proc Natl Acad Sci U.S.A, 1998, 95(5), 2073), 可指出, 键合到 rRNA 特定区域的高亲合性的寡核苷酸, 该寡核苷酸与 rRNA 键结抗体的效果相似。由于 LNA 比 PNA 更能键合到具有更高  $T_m$  的 RNA, 因此很有可能将 LNA 用于特定键合到细菌 rRNA 以及抑制细菌中的转译作用。至于该方法的延伸, 可能在较高等生物之间开发出小型却有显著差异的 rRNA 序列, 以设计可抑制其中之一, 但却不抑制另一个生物的转译作用的 LNAoligos。本方法的一个显而易见的应用为特定开发抑制 Plasmodium 属(疟疾杆菌)、Schistosoma 属(引起 Bilharzia)、各种 filariae(引起 Elephantiasis 及 River Blindness)、钩虫(引起 anaemia)和其它致病寄生虫的转译作用的 LNA。

高亲合性 L-核糖-LNA 单体的应用可促使充分热稳定性的反信息探针的建构, 以便有效杂交至这种目标 RNA。因此, 在一优选实施方案中, 使用 L-核糖-LNA 赋予该寡核苷酸充分的亲合性以允许该寡核苷酸杂交至这些 RNA 种类, 由此调整在发现该 RNA 的粒子的定性和/或定量功能。

将想要用在反信息治疗中的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸设计成有高亲合性与补充 RNaseH 能力的双重目的。例如通过 L-核糖-LNA 片段侧接一未经改性的中间 DNA 片段可达到此目的。此外, 由于  $\alpha$ -L-核糖-LNA 优于 RNA, 因此可以在各种一般治疗用的反信息应用中, 开发出  $\alpha$ -L-核糖-LNA 辨别 RNA 和 DNA 的特殊能力。避免设计对于所关注的 RNA 特定键合的  $\alpha$ -L-核糖-LNA, 而非特定键合到具有如目标 RNA 相似核苷酸序列的 DNA 片段, 从而防止该  $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡核苷酸稳定结合至可改变 DNA 结构及诱导所讨论的基因突变的染色体 DNA。这种 DNA 结构的改变与相关突变可能引起不希望的毒性副作用。

本发明又一具体例设计具有提高特异性的核酸代酶。核酸代酶为

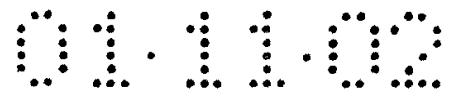


结合 RNase 催化活性及与互补 RNA 目标物的序列特定相互作用能力的寡脱氧核糖核苷酸及其类似物。这种核酸代酶已引起作为治疗分子的许多关注，并表现出可利用  $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡核苷酸引人注意的特性来改善导向特定 RNA 的核酸代酶的高度可能。

本发明又一具体例为与细胞特定核蛋白特定相互作用的 L-核糖-LNA 寡核苷酸，该细胞特定核蛋白含有作为活性蛋白整体及主要成分的 RNA，其两个实例为核糖体和端粒酶(telomerase)。可将 L-核糖-LNA 寡核苷酸抑制端粒酶的能力运用到重要的应用上。

较高等真核生物(包括人类)的染色体为线型。已说明该染色体末端的基本结构(DNA 序列)，结果证明所有染色体末端的 DNA 序列-在特殊生物中-由具有突出的单链末端的简单重复单元构成。该染色体末端称之为端粒。在人类端粒中含有双链多重重复 5'-TTAGGG-3'序列(单链序列，位于着丝点朝染色体末端的方向)的延长。由于所有 DNA 聚合酶需要模板链及寡核苷酸前体来起始互补 DNA 的合成。DNA 本身无法复制该染色体的末端。当复制染色体时，将会导致染色体逐渐缩短。注意在正常体细胞中端粒的长度，该端粒长度在复制的每个周期确实似乎变短直到该端粒仅有 5 至 15 kb 长度为止。当该端粒如此短的时候，细胞通常会停止分段并且逐渐进入衰老阶段。干细胞是仅有的一个例外。干细胞为特殊化细胞，可在生物的一生中能不断的分段。有趣的是干细胞的端粒可持续保持长度(10 至 15 kb)。干细胞能够如此是由于一特殊酶-端粒酶的活性。端粒酶是一个能特定延长端粒突出单链末端的独特酶，因此能维持稳定长度。端粒酶为一核糖核苷酶，即含有 RNA 的蛋白质且其酶活性取决于该 RNA。端粒酶的结构与逆转录酶（能利用 RNA 作为模板合成 DNA 的病毒蛋白）有点类似。

端粒酶可延长该端粒的能力取决于在 RNA 分子上游离端粒 3'末端的位置正确与否。能特定和端粒末端或端粒的 RNA 成分相互作用的分子将会抑制该酶。 $\alpha$ -L-核糖-LNA 可用来满足这些需求。在例如癌症治疗如-除干细胞之外-正常体细胞，相对于大部分含有容易检测的端粒酶活性的癌细胞，在血管中不含可检测的端粒酶活性。癌细胞是不死的，即它们不会衰老却会不断增生并形成肿瘤直到生物死亡为止。可确定此一看法的完整证据是端粒酶活性对于癌细胞的不死而言是不可



或缺的。有趣的是，癌细胞的端粒实质上要比干细胞短，显示癌细胞将比干细胞提早达到“端粒长度障碍”，故提出特定抑制端粒酶活性的药物用于作为抗癌药物。

在此观点中，开发 $\alpha$ -L-核糖-LNA 的优异性能来设计抑制人类癌细胞端粒酶活性为目的的，可导向抗端粒酶 RNA 组成的特定部分的短 $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡聚物将成为重要的议题。

本发明的另一实施例为利用 L-核糖-LNA 寡核苷酸特别是 $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡核苷酸作为调适剂。在试管内选择治疗用寡核苷酸有希望的新品种特定地键合到具有高亲合性的给定目标物。其键合特征为寡核苷酸能力的适当反映，通过分子内核碱基配对同时形成三维结构。含有 $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡核苷酸的调适剂显示出能开发成为治疗用途的有利特征。

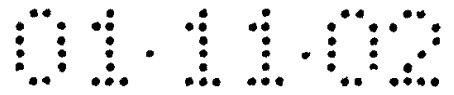
在一些情况中，向下调节基因的表达可能有利，反之在其它情况中活化该基因可能有利。如 Møllegaard 等人所示(Møllegaard, N. E.; Buchardt, O.; Egholm, M.; Nielsen, P. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994, 91, 3892)，具有“链置换”能力的寡聚物可当作 RNA 转录作用的激活体。在本发明的一方面，利用具有“链置换”能力的 LNA 来活化治疗体的基因。

在许多病毒感染及癌症的化学治疗中，已证明各种形态的核苷及核苷类似物有效。L-核糖-LNA 核苷可能用来作为此类以核苷为基础的药物。

在一些情况中，已报导双链 RNA(DS-RNA)具有特定的医药活性。与经 L-核糖-LNA 完全改性的寡核苷酸有关的双显性组合可能用来作为这种双链的药物。此外极有可能双链 $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡核苷酸会将重要分子添加至类似生物活性双链 RNA 分子的所有组成(repertoire)中。

因此，双链 LNA(DS-LNA)的治疗潜能可用于如下说明的癌症或病毒感染的治疗。

已报导单独或是与干扰素- $\gamma$  协和作用的各种类型的 DS-RNA 可抑制数种癌细胞的生长(Borecky et al. Tex Rep Biol Med, 1981, 41, 575; Sharp et al. Eur J Biochem, 1995, 230(1), 97)。DS-RNA 抑制培养中的癌



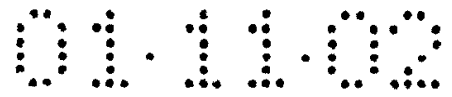
细胞生长如同抑制在试验动物中肿瘤的癌细胞生长一般。至少有两个双链 RNA 可活化酶似乎与 DS-RNA (双链 RNA-可活化蛋白质激酶 (PKR)及核糖核苷酶 L) 的肿瘤抑制活性有关 (Lengyel-P, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1993, 90(13), 5893)。反之, PKR 直接由 DS-RNA 活化, Rnase L 通过(2'-5')寡腺嘌呤核苷酸合成酶由 DS-RNA 活化, 该(2'-5')寡腺嘌呤核苷酸合成酶除非通过 DS-RNA 活化否则处于潜伏状态。DS-RNA 也会诱发天然杀手(NK)细胞的活性且此活性很可能促成 DS-RNA 的抗肿瘤活性。

尽管天然 DS-RNA 通常与病毒感染有关。已证实, DS-RNA 也具有抗病毒活性。DS-RNA 已显示其对于人体免疫缺乏病毒 HIV-1 与 HIV-2 的抗病毒活性(Haines et al. J Cell Biochem, 1991, 46(1), 9)。因此, DS-RNA 与 DS-LNA 可作为治疗 AIDS 治疗剂的可能的候选者。

DS-RNA 还证明了其在实用上的临床功效。然而, 哺乳细胞含有一些 DS-RNA 特定核酸酶, 并且可能因为这些活性 DS-RNA 会从病患身上迅速地消失。LNA 相当类似 RNA, 并且具有 RNA 大部分的化学特征(Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607)。LNA 形成稳定的双显性组合而且由 RNA 变为 LNA 的结构改变相当微妙。由于已证明 LNA 本身表现出外核溶解的稳定性, 因此适合的双链 LNA 很可能与特定 DS-RNA 的效果相仿且因此活化 PKR 和/或(2'-5')寡腺嘌呤核苷酸合成酶(Singh et al., Chem. Commun., 1998, 455), 与 DS-RNA 相比, DS-LNA-分子可能表现出改善的治疗功效。

本发明还涉及一种药物组合物, 该药物组合物包含药物活性的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸或如上定义的药物活性的 L-核糖-LNA 单体与药用可接受的结合。

这种组合物可适合口服、肠外(静脉内、腹膜内)、肌内、直肠、鼻内、皮肤、阴道内、颊、眼睛或肺部投药的形式, 优选口服的形式, 可以本领域的技术人员公知的方法制备该组合物, 如“Remington's Pharmaceutical Science”, 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.). Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 和最新版本及 Marcel Dekker 著“Drugs and the pharmaceutical Science”系列中的专题论文所概括说明的方法。



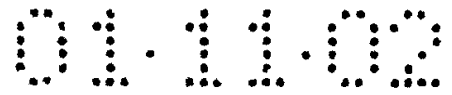
## 诊断

已经研究了许多诊断及分子生物学步骤，利用不同寡核苷酸嵌板同步分析存在的过多可能突变的目标核酸。通常，将寡核苷酸嵌板固定在固体载体上的预定图案中，以便能通过固体载体上的杂交位置显示出在目标核酸中特殊突变的存在。在核酸分析中，成功使用不同寡核苷酸嵌板的一个重要前提为在单一施加的杂交条件下，对于其特殊目标序列而言，不同寡核苷酸嵌板全部都是特定嵌板。由于对其互补目标序列而言，标准寡核苷酸的亲合性与特异性取决于其序列及尺寸，因此至今仍难以达到此标准。

此外，已研究了一些特征化各种类型 RNA 的技术，而该 RNA 可能被细胞所含有。特征化中常见的一种方法为核酸杂交，这类技术的实例为：现场杂交、印迹杂交、反印迹杂交、northern 杂交和逆转录作用聚合酶链反应(rtPCR)。这些技术经常在含有 DNA 和 RNA 的样本上制备，该事实常常造成检验的问题，但如果存在能充分辨别 DNA 和 RNA 的探针，则能轻易避免这个问题。特别是在不同组织样本进行现场杂交时是个问题。可设计对 RNA 具有高度可辨别的杂交性能的  $\alpha$ -L-核糖-LNAoligos 与样本中的 RNA 特定杂交，从而消除由杂交至具有相同序列的不恰当 DNA 而导致错误结果的可能。

因此，在一优选实施方案中，L-核糖-LNA 可用来作为增加探针亲合性和/或特异性的手段以及使不同寡核苷酸对其互补序列亲合性均等的手段。如本文所公开的，可通过例如：在寡核苷酸用带有相似核碱基的 L-核糖-LNA 取代所选择的核苷来完成这种亲合性的调整。特别是应用在  $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡核苷酸。

在另一优选实施方案中，在序列特定捕获及天然或合成核酸的纯化中，开发 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的高亲合性与特异性。一方面，使天然或合成核酸与固定在固体载体上的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸接触。在此情形中，同时发生杂交和捕获作用。例如，被捕获的核酸可通过本领域中公知的种种方法直接在表面上被检测、被特征化、被定量或被扩增或在这种特征化或扩增作用发生之前对固定、经改性寡



核苷酸及被捕获的核酸施加杂交条件，例如加热或使用低离子强度的缓冲液，使被捕获的核酸由表面释放。

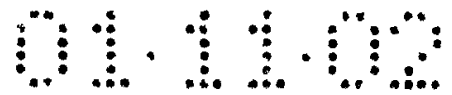
可从大量聚合材料例如 CPG(经控制的多孔玻璃)、聚丙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯或聚乙烯选择固体载体，且可制成各种形式例如管状、微滴定板、棒状、珠状、过滤器等。可将 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸利用在固定寡核苷酸常用的各种化学或光化学方法，或利用如经由使生物素化的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸键合到抗生蛋白链菌素的非共价偶合，经由其 5'或 3'末端(或经连接基和终端连接到 5'或 3'末端)固定到固体载体。在不同固体载体上固定 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的一个优选方法如(WO 96/31557)所述，是利用光化学活泼的蒽醌共价连接到该改性寡核苷酸 5'-或 3' -端基(任选地经由键)的光化学方法。因此，本发明也提供带有一 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的表面。

在另一方面，L-核糖-LNA 改性寡核苷酸带有共价连接在 5'-或 3'-端基的配体。在此情形中，使 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸与天然或合成核酸在溶液中接触，然后所形成的杂交被固体载体上带有可键合该配体的分子所捕获。

在又一方面，具有进行“链置换”能力的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸可用来捕获天然及合成核酸而不需要预先变性。在目标序列不同或由于快速形成稳定的分子内结构而不可能通过正常寡核苷酸达到的情况中，这种改性寡核苷酸特别有用。包含这种结构的核酸实例为 rRNA、tRNA、snRNA 和 scRNA。

在另一优选实施方案中，设计具有高特异性的 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸用来作为核酸序列中的前体或是在许多周知的扩增反应(如 PCR 反应)的任一反应中作为前体。如本文所示，L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的设计决定其是否将维持一指数或线性的目标扩增。可通过各种应用在分析由标准 DNA 前体所产生的扩增产物的方法分析扩增反应的产物。在设计 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸前体以维持线性扩增的特殊情况中，最终的扩增基因将带有无需变性即可通过互补探针选定的单链末端。可利用例如这类末端通过连接到一固体表面的其它互补 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸来捕获扩增基因。

自另一方面，可使用具有“链置换”能力的 L-核糖-LNA 改性 oligos



作为线性或指数扩增反应的前体。预期使用这种 oligos 会通过与其扩增反应后期中的扩增基因重新杂交的有效竞争而提高整体扩增基因的产率。Demers 等人在 Nucl. Acid Res. 1995, 23, 3050-3055 中公开了, 使用高亲合性、不可延长的 oligos 作为增加 PCR 反应整体产率的手段。相信该寡聚物通过介入 PCR 反应后期中的扩增基因重新杂交而引起这样的结果。预料在 3' 末端经封阻的 L-核糖-LNA 改性 oligos 将具有相同的优势。可以用许多方法例如通过该 3' 羟基与氢或磷酸盐交换来达到 3' 末端的封阻。也可使用这种 3' 封阻的 L-核糖-LNA 改性 oligos, 用类似 Yu 等人(Biotechniques, 1997, 23, 714-716)所述的方法选择性地扩增紧密相关的核酸序列。

最近几年中, 已发明例如可用在实时检测由目标扩增反应所产生的扩增基因的新型探针。一种这类探针被称为“分子信号(Molecular Beacons)”。这种探针合成为部分自行互补寡核苷酸, 在一端包含荧光基团, 而在另一端包含淬熄分子。当在溶液中游离时, 探针折叠成为发夹结构(由自行互补区所引导), 这样, 使淬熄基充分接近荧光基团, 从而可淬熄荧光信号。当探针杂交到目标核酸时, 发夹形状打开, 从而让荧光基团与淬熄基团分开而发出荧光信号。

另一类探针定名为“Taqman 探针”。Taqman 探针也包含一个荧光基团与一个淬熄分子。但与分子信号相反, 淬熄基淬熄来自荧光基团的荧光信号的能力在探针杂交至其目标序列后仍然维持。取而代之, 由聚合酶的 5' 核酸外切酶活性(引发由位于 Taqman 探针结合位置 5' 位置的前体开始合成)作用而以物理方式由探针卸下淬熄基或荧光基团杂交后产生荧光信号。

对目标位置的高度亲和力是两种探针的主要特色, 所以, 这种探针倾向于相当大(通常 30 至 40 mers)。结果, 在制造高品质探针时可能遭遇严重问题。因此, 在优选实施方案中, LNA 用以改良生产以及随后通过缩小尺寸同时维持要求的亲和力而改善 Taqman 探针和分子信号效能。

在另一方面, L-核糖-LNA 用以构成新亲和对(完全或部分改性寡核苷酸)。亲和常数容易在宽范围内调整, 可设计和合成大量亲和对。亲和对的一部分可由标准方法连接到感兴趣的分子(例如蛋白质、扩增基因、酶、多醣、抗体、半抗原、肽、PNA 等), 而亲和对的另一部分

例如连接到固体载体例如珠、膜、微滴定板、棒、管等。固体载体可选自宽范围的聚合物料例如聚丙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯或聚乙烯。亲和对可用于选择性分离、纯化、捕获以及检测前述多种目标分子。

利用与其它互补 L-核糖-LNA 寡核苷酸(完全或部分改性)相互作用捕获 L-核糖-LNA-标记分子的原则可用来产生无限的新型亲合性配对。

在另一优选实施方案中，在建构用于现场杂交的探针中，开发 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的高亲合性及特异性。例如，可使用 L-核糖-LNA 减少传统 DNA 探针尺寸，同时保持所要的亲合性，由此增加探针动力学及穿透试样样本的能力。

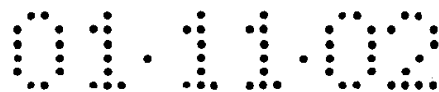
## 纯化

本发明的另一具体例是在 RNA 特定纯化步骤中使用 L-核糖-LNA 寡核苷酸特别是  $\alpha$ -L-核糖-LNA 寡核苷酸。传统上用来从原核细胞、真核细胞或从复杂生物样本分离核酸的方法是使用如酚和氯仿的有机溶剂。核酸的分离由通常用蛋白酶进行样本的酶消化开始，接着利用离子洗洁剂进行细胞溶解，然后利用酚或酚/氯仿的混合物萃取。分离有机相和水相，并利用酒精通过沉淀将分在水相的核酸回收。但酚或酚/氯仿混合物对人类皮肤有腐蚀性，被认为是有害废弃物，必须小心处理与适当丢弃。此外，利用酚/氯仿法的标准萃取会产生 RNA 与 DNA 的混合物。因此，通过开发可辨别 RNA 与 DNA 的  $\alpha$ -L-核糖-LNA 有利于制备核酸分离，由此得到纯 RNA 样本。

## 试剂盒

本发明也提供天然或合成核酸的分离、纯化、扩增、检测、辨识、定量或捕获的试剂盒，其中该试剂盒包含一反应主体以及如本文所定义的单个或多个 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸(寡聚物)。该 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸优选固定在该反应主体上。

本发明也提供天然或合成核酸的分离、纯化、放大、检测、辨识、定量或捕获的试剂盒，该试剂盒包含一反应主体以及如本文所定义的



单一或多个 L-核糖-LNA。该 L-核糖-LNA 优选固定在该反应主体上(例如利用上述的固定技术)。

对于本发明的试剂盒而言,反应主体优选为固体载体材料,例如选自硼硅酸盐玻璃、钠钙玻璃、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚苯烯、聚乙烯、聚乙二醇对苯二甲酸酯、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯基 咯啉酮、聚甲基丙烯酸甲酯和聚乙烯基氯,优选为聚苯乙烯和聚碳酸酯。该反应主体可呈样本管、小瓶、切片、薄片、薄膜、珠、丸、圆盘、板、环、柱、网、滤片、托盘、微滴定板、杆或多叶片杆的形式。

试剂盒通常附有书面说明书来说明试剂盒的最佳使用条件。

## 实验

### 综论

当使用无水溶剂时在氮气气氛下进行反应。利用硅胶 60(0.040-0.063 mm)在玻璃管柱中进行柱层析法。在管柱层析之后,收集含有产物的部分,减压下蒸发干燥及真空干燥而得到产物。在利用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  使有机相干燥之后进行过滤。使用蒸馏范围 60 至  $80^\circ\text{C}$  的石油醚。以 ppm 表示相对于以四甲基硅烷作为内标参考值( $^1\text{H}$  与  $^{13}\text{C}$  NMR)以及相对于  $85\%\text{H}_3\text{PO}_4$ ( $^{31}\text{P}$  NMR)的化学位移值  $\delta$ 。微量分析在 The Microanalytical Laboratory, Department of Chemistry, University of Copenhagen 进行。

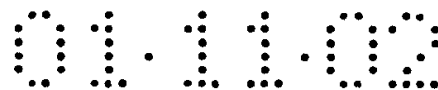
下面结合图 1-4 和表 1-3 进行具体说明。

### L-核糖-LNA 单体的制备

#### 实施例 1

5-O-苯甲酰基-4-C-苯甲酰基氧基甲基-3-O-苄基-1,2-O-异亚丙基- $\alpha$ -D-葡萄糖呋喃糖(2)

将苯甲酰氯( $4.1\text{ cm}^3$ , 0.035 mol)添加到 3-O-苄基-4-C-羟基甲基-1,2-异亚丙基- $\alpha$ -D-葡萄糖呋喃糖(1)(5.00 g, 0.016 mol)的无水吡啶( $60\text{ cm}^3$ )的搅拌冰冷溶液。在室温下搅拌 4 小时后,将反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$ , 添



加 H<sub>2</sub>O(50 cm<sup>3</sup>), 并用二氯甲烷(100 cm<sup>3</sup> x 3 次)萃取该混合物。利用碳酸氢钠饱和水溶液(30 cm<sup>3</sup> x 3 次)和盐水(20 cm<sup>3</sup> x 3 次)洗涤结合的有机相, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并在减压下蒸发干燥。在减压蒸发溶剂之后, 该残留物先使用石油醚/二氯甲烷(1:1, v/v)然后用二氯甲烷/甲醇(99:1, v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到黄色油状物的呋喃糖 2 (7.50g, 90%)。δ<sub>H</sub>(CDCl<sub>3</sub>) 8.02-7.23 (15H, m), 6.08(1H, d, J4.2), 4.81-4.50(7H, m), 4.22(1H, d, J1.0), 1.59(3H, s), 1.37(3H, s), δ<sub>C</sub>(CDCl<sub>3</sub>) 166.1, 165.8, 136.7, 133.1, 133.0, 129.9, 129.7, 129.6, 129.5, 128.5, 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 113.3, 105.4, 86.4, 85.1, 83.8, 72.3, 64.3, 63.8, 27.0, 26.4, FAB-MS m/z 521 [M+H]<sup>+</sup>。实测值(%) C, 69.1; H, 5.9; C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> 要求值 C, 69.2; H, 6.2

### 实施例 2

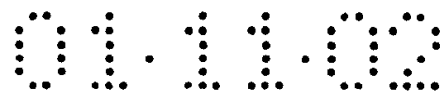
5-O-苯甲酰基-4-C-苯甲酰基氧基甲基-3-O-苄基-1,2-二-O-乙酰基-D-葡萄糖呋喃糖(3)

将呋喃糖 2 (7.40 g, 0.014 mol)的 80%乙酸(60 cm<sup>3</sup>)溶液在 90℃下搅拌 9 小时。将反应混合物在减压下蒸发干燥, 残留物利用甲苯(10 cm<sup>3</sup> x 3 次)共同蒸发并溶于无水吡啶(80 cm<sup>3</sup>)。添加乙酸酐(5.5 cm<sup>3</sup>), 溶液在室温下搅拌 46 小时。将反应混合物在减压下蒸发干燥, 残留物利用甲苯(10 cm<sup>3</sup> x 3 次)共同蒸发并溶于二氯甲烷(150 cm<sup>3</sup>)。利用碳酸氢钠饱和水溶液(30 cm<sup>3</sup> x 3 次)和盐水(30 cm<sup>3</sup> x 3 次)洗涤该溶液, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压浓缩。在减压蒸发溶剂之后, 该残留物先使用石油醚/二氯甲烷(1:1, v/v)然后用二氯甲烷/甲醇(99:1, v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到透明油状物的异构体混合物 3(α:β = 3:1, 7.33 g, 92%)。该油状物不经进一步纯化用于下个步骤。δ<sub>C</sub>(CDCl<sub>3</sub>) 169.4, 169.0, 165.8, 165.6, 137.0, 133.2, 133.1, 133.0, 129.6, 129.5, 129.2, 128.3, 127.8, 127.7, 127.4, 99.4, 92.3, 87.0, 83.2, 82.2, 80.7, 77.4, 76.9, 76.3, 73.2, 72.4, 20.9, 20.8, 20.6, 20.3, FAB-MS m/z 562 [M+H]<sup>+</sup>。

### 实施例 3

1-(2-O-乙酰基-5-O-苯甲酰基-4-C-苯甲酰基氧基甲基-3-O-苄基-β-D-木糖呋喃糖基)胸腺嘧啶(4)

将 N,O-双(三甲基硅烷基)乙酰胺(19.1 cm<sup>3</sup>, 0.077 mol)添加到异构



体混合物 3(7.25 g, 0.013 mol)和胸腺嘧啶(3.25g, 0.028 mol)的无水乙腈(80 cm<sup>3</sup>)的搅拌悬浮液中。将反应混合物在 60℃下搅拌 1 小时, 然后冷却至 0℃。滴加三氟甲磺酸三甲基硅烷酯(4.1 cm<sup>3</sup>, 0.023 mol), 历时 10 分钟, 然后该混合物在回流下加热 22 小时。冷却至室温后, 添加碳酸氢钠饱和水溶液(30 cm<sup>3</sup>)并且利用二氯甲烷(100 cm<sup>3</sup> x 3 次)进行萃取。利用碳酸氢钠饱和水溶液(30 cm<sup>3</sup> x 3 次)和盐水(50 cm<sup>3</sup> x 3 次)洗涤结合的有机相, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压浓缩。在减压蒸发溶剂之后, 该残留物使用二氯甲烷/甲醇(0.5-2.0%甲醇,v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到白色固体物的核苷 4(6.88g, 85%)。

$\delta_{\text{H}}(\text{CDCl}_3)$  8.97(1H, br, s), 8.04-7.23(16H, m), 6.37(1H, d, J3.6), 5.42(1H, t, J3.1), 4.89-4.56(6H, m), 4.22(1H, d, J2.6), 2.13(3 H, s), 1.74(1H, d, J0.8),  
 $\delta_{\text{C}}(\text{CDCl}_3)$  169.9, 166.0, 165.7, 163.4, 150.4, 136.2, 135.2, 133.5, 133.4, 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 129.0, 128.6, 128.4, 128.2, 112.0, 87.4, 86.0, 81.3, 80.3, 72.6, 63.1, 62.9, 20.8, 12.3, FAB-MS  $m/z$  629  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。实测值(%) C, 64.4; H, 4.9; N, 4.4; C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>·0.25H<sub>2</sub>O 要求值 C, 64.5; H, 5.1; N 4.4。

#### 实施例 4

1-(3-O-苄基-4-C-羟甲基-β-D-木糖呋喃糖基)胸腺嘧啶(5)

将甲醇钠(3.87 g, 0.0716 mol)添加到核苷 4(9.00g, 0.014 mol)的甲醇(130 cm<sup>3</sup>)搅拌溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 4 小时, 然后用稀盐酸中和。混合物减压蒸发干燥后, 接着利用甲苯(15 cm<sup>3</sup> x 3 次)共同蒸发。在减压蒸发溶剂之后, 该残留物使用二氯甲烷/甲醇(4-15%甲醇,v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到白色固体物的核苷三醇 5(4.82g, 89%)。  $\delta_{\text{H}}(\text{CD}_3\text{OD})$  7.89(1H, d, J1.2), 7.40-7.24(5H, m), 5.97(1H, d, J6.2), 4.83-4.65(2H, m), 4.53(1H, t, J6.2), 4.21(1H, d, J6.2), 3.84(1 H, d, J12.0), 3.63(1H, d, J12.0), 3.59(2H, d, J2.6), 1.82(1H, d, J1.1)  
 $\delta_{\text{C}}(\text{CD}_3\text{OD})$  164.4, 150.9, 137.5, 136.6, 127.5, 127.0, 125.9, 109.8, 86.7, 86.4, 82.8, 78.0, 72.1, 62.3, 61.1, 10.5 (CH<sub>3</sub>)。 FAB-MS  $m/z$  379  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。实测值(%) C, 56.2; H, 6.0; N, 7.0; C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·0.25H<sub>2</sub>O 要求值 C, 56.5; H, 5.9; N 7.3。

### 实施例 5

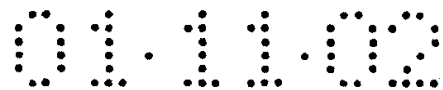
1-(3-O-苄基-4-C-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)- $\beta$ -D-木糖呋喃糖基)胸腺嘧啶(6)

将  $\text{AgNO}_3$  (2.66 g, 15.7 mmol) 添加到 1-(3-O-苄基-4-C-羟甲基- $\beta$ -D-木糖呋喃糖基)胸腺嘧啶 5 (5.38g, 14.2 mmol) 的无水四氢呋喃 (400  $\text{cm}^3$ ) 溶液中, 随后再添加无水吡啶 (5.7  $\text{cm}^3$ ) 和 4,4'-二甲氧基三甲苯基氯 (5.30g, 15.6 mmol)。将混合物在黑暗中在氮气及室温下搅拌 18 小时。添加碳酸氢钠饱和水溶液 (10  $\text{cm}^3$ ) 终止该反应, 并以二氯甲烷萃取所得混合物。减压蒸发干燥结合的有机相后, 利用甲苯共同蒸发, 在减压蒸发溶剂之后, 该残留物使用二氯甲烷/甲醇/吡啶 (0.5% 甲醇; 0.5 吡啶, v/v) 作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到白色发泡物的核苷 6 (3.13 g, 31%)。  $\delta_{\text{c}}((\text{CD}_3)_2\text{SO})$  164.1 (C-4), 158.4, 145.1, 138.5, 137.0, 135.9, 135.7, 130.1, 130.1, 129.2, 128.5, 128.5, 128.2, 128.1, 127.7, 127.6, 127.0, 125.7, 113.5, (DMT, 苄基, C-8), 151.4 (C-2), 110.1 (C-5), 85.5, 85.2, 84.6, 83.5 (C-1', C-3', C-4', DMT), 76.8 (C-2'), 72.3 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 65.2 (C-5''), 55.4 (2x $\text{CH}_3\text{O}$ ), 12.6 (5- $\text{CH}_3$ )。

### 实施例 6

1-(3-O-苄基-4-C-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-2,5-二-O-(对-甲苯磺酰基)- $\beta$ -D-木糖呋喃糖基)胸腺嘧啶(7)

将催化量的 4-(N,N-二甲基氨基)吡啶和对-甲苯磺酰氯 (6.50 g, 34 mmol) 添加到核苷 6 (2.79g, 3.9 mmol) 的无水吡啶 (50  $\text{cm}^3$ ) 溶液中。将混合物在黑暗中在氮气及室温下搅拌 24 小时。添加碳酸氢钠饱和水溶液 (100  $\text{cm}^3$ ) 终止该反应, 并用二氯甲烷萃取所得混合物。用碳酸氢钠饱和水溶液 (3 次 x 75  $\text{cm}^3$ ) 和氯化钠 (2 次 x 75  $\text{cm}^3$ ) 洗涤结合的有机相。将分离的有机相干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 减压蒸发干燥。该残留物使用二氯甲烷/甲醇/吡啶 (0.5% 甲醇; 0.5 吡啶, v/v) 作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到黄色发泡物的核苷 7 (2.40 g, 62%)。  $\delta_{\text{c}}((\text{CD}_3)_2\text{SO})$ , 163.2 (C-4), 158.2, 145.9, 145.1, 144.3, 136.8, 135.0, 134.9, 134.8, 131.8, 131.6, 130.2, 130.0, 129.7, 128.2, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.5, 127.4, 126.8, 113.3 (DMT, C-6, 2 x Ts, 苄基), 150.2 (C-2), 110.8 (C-5), 95.0, 86.2 (DMT, C-4'), 82.2, 81.9 (C-1', C-2'), 81.2 (C-3'), 72.9 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 79 (C-5''), 64 (C-5''),



55.1(2xCH<sub>3</sub>O), 21.2, 21.2(2 x CH<sub>3</sub>), 12.0(5-CH<sub>3</sub>)。

#### 实施例 7

(1R, 3R, 4S, 7R)-7-苯甲酰基-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷(8)

将 NaOH 水溶液(2M, 8 cm<sup>3</sup>)添加到核苷 7(3.87g, 3.92 mmol)的乙醇与 H<sub>2</sub>O 混合物(1:1, v/v)的溶液中。将混合物回流加热 24 小时, 冷却后用二氯甲烷萃取。利用碳酸氢钠饱和水溶液(2 次 x 75 cm<sup>3</sup>)洗涤结合的有机相, 减压蒸发干燥。在蒸发溶剂之后, 该残留物使用二氯甲烷/甲醇/吡啶(0.5%甲醇;0.5 吡啶, v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到核苷 8(2.10 g, 81%)。δ<sub>c</sub>((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO), 163.8(C-4), 158.2, 158.1, 144.7, 137.7, 135.9, 135.2, 135.1, 129.8, 129.7, 128.3, 127.9, 127.7, 127.7, 127.4, 126.7, 113.35(DMT, 苄基, C-6), 150.3(C-2), 108.1(C-5), 88.4, 85.5(C-4', DMT), 86.4(C-1'), 79.5(C-2'), 76.3(C-3'), 72.6(C-5''), 71.2(CH<sub>2</sub>Ph), 58.9(C-5'''), 55.1(2 x CH<sub>3</sub>O), 12.4(5-CH<sub>3</sub>)。

#### 实施例 8

(1R, 3R, 4S, 7R)-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-7-羟基-3-(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷(9)

将甲酸铵(0.33g, 5.29 mmol)添加到核苷 8(1.09g, 1.65 mmol)的甲醇(30 cm<sup>3</sup>)溶液中。添加催化量的 Pd/C 的甲醇(10 cm<sup>3</sup>)悬浮液, 将混合物回流加热 2 小时。在冷却至室温后减压蒸发干燥, 在蒸发溶剂之后, 该残留物使用二氯甲烷/甲醇/吡啶(2%甲醇;0.5 吡啶, v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到核苷 9(0.76 g, 80%)。δ<sub>c</sub>((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO), 163.9(C-4), 158.2, 144.8, 135.8, 135.4, 135.3, 129.8, 127.9, 127.7, 126.8, 113.3(DMT, C-6), 150.4(C-2), 108.0(C-5), 89.2, 85.4(C-4', DMT), 86.4(C-1'), 78.9(C-2'), 72.9(C-3'), 72.3(C-5''), 59.9(C-5'''), 55.1(2 x CH<sub>3</sub>O), 12.5(5-CH<sub>3</sub>)。

#### 实施例 9

(1R, 3R, 4S, 7R)-7-(2-氰基乙氧基(二异丙基胺基)膦氧基)-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷

(9)

将N,N-二异丙基乙基胺(0.4 cm<sup>3</sup>)和2-氰基乙基N,N-二异丙基-偶磷酰胺次氯化物(0.4 cm<sup>3</sup>)添加到核苷 9(420g, 0.73 mmol)的无水二氯甲烷(4 cm<sup>3</sup>)溶液中。将混合物在黑暗中在氮气及室温下搅拌 18 小时。添加甲醇终止该反应并以乙酸乙酯(10 cm<sup>3</sup>)稀释, 利用碳酸氢钠饱和水溶液(3 次 x 10 cm<sup>3</sup>)和氯化钠(2 次 x 10 cm<sup>3</sup>)洗涤, 减压蒸发干燥。该残留物用无水乙腈共同蒸发, 使用石油醚/乙酸乙酯/吡啶(30 至 40%乙酸乙酯;0.2 吡啶, v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到油状物。将此油状物溶于二氯甲烷(1 cm<sup>3</sup>)并在-40℃下激烈搅拌从石油醚沉淀产物。通过过滤收集沉淀物, 并以无水乙腈共同蒸发得到核苷 10(117 g, 21%)。δ<sub>p</sub>((CH<sub>3</sub>CN) 149.9, 149.3。

#### 实施例 10

未经改性寡核苷酸以及包含由 phosphoramidite 10(式 X)衍生的 L-核糖-LNA 寡核苷酸的合成

在 Biosearch 8750 DNA 合成器上制备 L-核糖-LNA 与对比寡核苷酸。利用“手工偶合”(在乙腈中以注射方式预先混合 amidite 与活化剂, 然后在偶合时间内持续以每分钟大约两次冲洗该管柱反应器; CPG 固体载体)进行 amidite 10 偶合。利用盐酸吡啶作为活化剂(10 至 30 分钟偶合时间; amidite 逐步偶合产率为 96 至 99%)完成 L-核糖-LNA 的合成。除了依据合成器 RNA 步骤所进行的 X 单体的立即偶合外, 利用合成器的标准 DNA 步骤以偶合未经改性的 2'-脱氧核苷 2-氰基乙基 N,N-二异丙基 phosphoramidites。在完成序列之后, 利用浓氨的甲醇溶液(32% (w/w), 室温, 12 小时)进行 5'-O-DMT-ON oligos 的脱保护, 随后进行反相纯化(市售可处理滤筒(Cruachem); 包含脱三苯甲基化的步骤), 产生最终寡聚产物。然而, 在完成序列之后, 立刻去除未经改性的寡核苷酸及包含唯一 X 单体 5'-O-DMT 基的 L-核糖-LNA。用浓氨的甲醇溶液(32% (w/w), 12 小时, 55℃)后处理, 乙醇沉淀产生产物寡聚物。利用毛细管凝胶电泳分析合成 L-核糖-LNA 的纯度。

杂交数据

## 实施例 11

### 含有单体 X 寡核苷酸的热稳定性

利用装置热调节 Peltier 组件的分光光度计用光谱测定 L-核糖-LNA 改性寡核苷酸的热稳定性。使用介质盐缓冲溶液(10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA)制备 1ml 杂交混合物与等莫耳(1 μM 或 1.5 μM)量的 L-核糖-LNA 寡核苷酸及其互补 DNA 或 RNA 寡核苷酸。如参考文献利用未经改性的寡核苷酸制备相同的杂交混合物。记录在 260 nm 的吸光度, 同时由 10 至 90°C(1°C/min)线性升高温度。由溶解曲线一次导数最大值(+/-1°C)得到熔体温度(T<sub>m</sub> 值)。表 1 至 3 总结该结果(L-核糖-LNA 以粗体字标示)。图 2 说明所使用的 L-核糖-LNA 单体。

由表 1 可看出单一或多个连续的 α-L-核糖-LNA 单体 X 结合到寡核苷酸序列(A)与(B), 不会改变 α-L-核糖-LNA 对互补 DNA 的亲合性, 同时对互补 DNA 的键合亲合性强烈地增加。

表 2 显示 homo-tyhmine 非镜像异构的 LNA 对于 RNA(rA<sub>14</sub>)、单错配 RNA(5'-r(A<sub>6</sub>CA<sub>7</sub>))、镜像 RNA(ent-rA<sub>14</sub>)及单错配的镜像 RNA(ent-5'-r(A<sub>6</sub>CA<sub>7</sub>))的键合研究。

表 3 显示混合-序列 9-聚物 DNA、LNA 和 α-L-核糖-LNA 的键合研究。

## 另外的方法

### 实施例 12

1-(3-O-苄基-2,5-二-O-甲磺酰基)-4-C-(甲磺酰基氧基甲基)-β-D-木糖呋喃糖基)胸腺嘧啶(11)

将无水吡啶(5 cm<sup>3</sup>)添加到核苷 5(1100mg, 2.91 mmol)的无水四氢呋喃(20 cm<sup>3</sup>)溶液中, 然后添加甲磺酰氯(1.2 ml, 15.5 mmol)。将混合物在氮气及室温下搅拌 18 小时。反应混合物在减压下蒸发干燥并溶于乙酸乙酯。有机相用碳酸氢钠饱和水溶液(3 次 x 10 cm<sup>3</sup>)洗涤, 然后干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。将有机相减压蒸发干燥。该残留物使用二氯甲烷/甲醇(2%甲醇, v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到核苷 11(908 mg,

51%)。  $\delta_c(\text{CDCl}_3)$  163.3, 150.6, 135.6, 134.6, 128.7, 128.3, 112.2, 87.9, 85.0, 83.1, 80.9, 77.2, 76.9, 76.6, 73.3, 66.6, 66.2, 38.6, 37.6, 37.6, 12.2。

### 实施例 13:

(1R, 3R, 4S, 7R)-1-(羟甲基)-7-苄氧基-3-(胸腺嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷(12)

将 6M NaOH(aq)(0.9 ml, 5.4 mmol)添加到核苷 11(329mg, 0.54 mmol)的乙醇/水(10 cm<sup>3</sup>, 1:1, v/v)溶液中。混合物在 80°C 回流 43 小时, 接着减压蒸发干燥。该残留物使用二氯甲烷/甲醇(2.4% 甲醇, v/v)作为洗脱剂通过硅凝胶管柱层析法纯化, 得到核苷 12(85 mg, 44%)。  $\delta_c((\text{CD}_3)_2\text{SO})$  163.8, 150.3, 138.0, 135.8, 128.3, 127.7, 127.6, 127.5, 108.0, 90.2, 86.5, 86.4, 79.3, 76.5, 72.5, 71.2, 57.2, 40.2, 40.0, 39.8, 39.6, 39.4, 39.2, 39.0, 12.3。

### 实施例 14

由核苷 12 合成核苷 8

对核苷 12 的主要羟基进行标准 DMT-保护(例如利用如 DMT-保护核苷 5 的主要羟甲基制备核苷 6 的相同步骤)将得到可用于合成  $\alpha$ -L-核糖-LNA 核苷 phosphoramidite 衍生物 10 的核苷 8(参见图 2 及相关实施例)。

### 实施例 15

9-(2-O-乙酰基-5-O-苯甲酰基-4-C-(苯甲酰基氧基甲基)-3-O-苄基- $\alpha$ -L-核糖呋喃糖基)-6-N-苯甲酰腺嘌呤(14)

在无水乙腈(30 mL)中溶解糖 3(2.05g)。添加 N-6-苯甲酰腺嘌呤(1.86g), 接着加入 SnCl<sub>4</sub>(1.3 mL), 所得混合物在室温下搅 3.7 小时, 随后添加 NaHCO<sub>3</sub> 饱和水溶液直到中和为止。在通过 Celite 过滤之后, 依序用 NaHCO<sub>3</sub> 饱和水溶液(3 次 x 150 mL)和 H<sub>2</sub>O(2 次 x 150 mL)洗涤过滤物, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压蒸发干燥。该残留物通过硅凝胶管柱层析法(40 至 60% NaOAc 在石油醚中)纯化, 得到完全受保护的核苷中间物(1.40 g, 52%产率)。将该中间物(1.29g)溶于甲醇(35 mL)并添加 NH<sub>3</sub> 的

甲醇(35 mL)饱和溶液。在 0°C 搅拌 2.3 小时后, 将该混合物减压蒸发干燥, 该残留物通过硅凝胶管柱层析法(1% 甲醇溶在二氯甲烷中)纯化, 得到溶于无水二氯甲烷(40 mL)的一中间物。冷却至 -50°C 之后, 添加无水吡啶(3 mL)与三氟甲磺酐无水物(0.65 mL)。搅拌 50 分钟之后, 添加附加的无水三氟甲磺酐(0.65 mL)并继续在 -10°C 搅拌 1 小时。添加二氯甲烷(100 mL), 利用 NaHCO<sub>3</sub> 饱和水溶液(3 次 x 100 mL)进行洗涤。将分离的有机相干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压蒸发干燥得到一中间物。将该中间物溶于甲苯(20 mL)中, 添加 KOAc(0.85g)和 18-冠-6(0.92g), 所得混合物在 80 搅拌 7 小时, 随后减压蒸发干燥生成一残留物, 该残留物通过硅凝胶管柱层析法(0 至 1.5% 甲醇溶在二氯甲烷中)纯化, 得到核苷 14。  
 $\delta_c(\text{CDCl}_3)$  168.8, 165.8, 142.7, 136.0, 133.5, 133.3, 132.7, 129.6, 129.6, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 128.4, 128.1, 127.8, 83.8, 82.2, 78.4, 74.3, 70.8, 64.7, 63.4, 20.5, MS (m/z) 742.0[M+H]<sup>+</sup>。

#### 实施例 16

(1R, 3R, 4S, 7R)-7-苄氧基 1-羟甲基-3-(N-6-苯甲酰基腺嘌呤-9-基)-2,5-二氧杂双环[2.2.1]庚烷(15)

在 NH<sub>3</sub> 的甲醇(200 mL)饱和溶液中溶解核苷 14(3.05g), 在室温下搅拌 4 天, 添加 NH<sub>3</sub> 的甲醇(200 mL)的 33% 水溶液(60 mL)继续搅拌 4 小时。混合物减压蒸发干燥得到一中间物, 该中间物溶于无水吡啶(100 mL)。添加 TMSCl(7.8 mL)并且在室温下继续搅拌 5 小时。冷却至 0°C 之后, 添加苯甲酰氯(2.4 mL), 在室温下继续搅拌 16 小时。添加 H<sub>2</sub>O(50 mL), 5 分钟之后接着添加 NH<sub>3</sub> 饱和水溶液(25 mL)。在室温搅拌 20 分钟之后, 混合物减压蒸发干燥, 该残留物通过硅凝胶管柱层析法(2 至 5% 甲醇溶在二氯甲烷中)纯化, 得到一中间物(1.76 g, 87% 历经两步骤)。该中间物(326 mg)溶于无水吡啶(50 mL)并于 0°C 在搅拌下添加甲磺酐氯(0.11 mL)。搅拌 2 小时之后, 添加 H<sub>2</sub>O(5 mL), 减压蒸发使混合物体积减少至大约 50%。添加二氯甲烷(100 mL), 用 NaHCO<sub>3</sub> 饱和水溶液(3 次 x 20 mL)进行洗涤。将有机相干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压蒸发干燥。该残留物通过由硅凝胶管柱层析法(2 至 4% 甲醇溶在二氯甲烷中)纯化, 得到一中间物(284 mg)。将该中间物溶于二噁烷(15 mL)、H<sub>2</sub>O(15 mL)和

2M NaOH(5.5 mL)中。回流搅拌 72 小时后, 添加 HCl 的二噁烷的 7% 溶液, 直到中和为止。利用 NaHCO<sub>3</sub> 饱和水溶液(2 次 x 100 mL)进行洗涤, 有机相干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压蒸发干燥。该残留物通过硅凝胶管柱层析法(0 至 4% 甲醇溶在二氯甲烷中)纯化, 得到双环核苷 15。

$\delta_c((CD_3)_2SO)$  156.0, 152.6, 149.4, 138.8, 138.0, 128.3, 127.7, 127.5, 118.3, 89.7, 83.9, 79.7, 77.0, 73.0, 71.2, 57.2,  $\delta_H((CD_3)_2SO)$  8.38 (1H, s), 8.14(1H, s), 7.40-7.30(7H, m), 6.37(1H, s), 5.06(1H, t, J5.8 Hz), 4.73-4.66(3H, m), 4.46(1H, s), 4.15(1H, d, J8.4 Hz), 4.04(1H, d, J8.2 Hz), 3.75(2H, d, J5.7 Hz)。

实施例 17:

(1R, 3R, 4S, 7R)-7-(2-氰基乙氧基(二异丙基胺基)膦氧基)-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(6-N-苯甲酰基腺嘌呤-9-基)-2,5-二氧杂双环 [2.2.1]庚烷(16)

DMT-保护核苷 15 接着脱苄基化及 3'-O-磷酸基化, 预期得到 phosphoramidite 衍生物 16。由核苷 15 得到 16 的另一可能途径为脱苄基化 15 接着选择性地 DMT-保护主要羟基及最后进行 3'-磷酸基化。本实施例说明的反应依照标准步骤(参见如 Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., Wengel, J. Tetrahedron 1998, 54, 3607)。

表 1:

序列 <sup>a</sup>		T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> (°C) <sup>c</sup>
5'-T <sub>7</sub> X <sub>1</sub> T <sub>6</sub>	(A)	32	33
5'-T <sub>5</sub> X <sub>4</sub> T <sub>5</sub>	(C)	36	46
5'-T <sub>3</sub> (Y) <sub>4</sub> (X) <sub>4</sub> T <sub>3</sub>	(F)	64	63
5'-X <sub>9</sub> T	(G)	63	66
5'-T <sub>10</sub>	(E')	24/20	18
5'-T <sub>14</sub>	(E)	32	28

<sup>a</sup>X=衍生自phosphoramidite10的单体

Y=含有2' -O, 4' -C-桥亚甲基的LNA单体, cf.Singh 等人(如上所述)

<sup>b</sup>C与5'-d-A<sub>14</sub>复合<sup>c</sup>与5'-rA<sub>14</sub>复合

表 2:

序列 <sup>a</sup>	rA <sub>14</sub> Tm(°C)	5'-r(A <sub>6</sub> CA <sub>7</sub> ) Tm(°C)	ent- rA <sub>14</sub> Tm(°C)	ent- 5'-r(A <sub>6</sub> CA <sub>7</sub> ) Tm(°C)
T <sub>10</sub>	18	无 Tm <sup>c</sup>	无 Tm <sup>c</sup>	无 Tm <sup>c</sup>
5'-(Y) <sub>9</sub> T	71	61	52	51
5'-(X) <sub>9</sub> T	66	49	39	无 Tm <sup>c</sup>
5'-(木-Y) <sub>9</sub> T	57	47	39	36
5'-(木-X) <sub>9</sub> T	无 Tm <sup>d</sup>	无 Tm <sup>d</sup>	无 Tm <sup>d</sup>	无 Tm <sup>d</sup>

<sup>a</sup>如表 1<sup>d</sup>在温度范围 10-95°C 没有测量到共同的熔点 Tm

表 3:

项目	5'-d(GZGAZAZGC) vs:					
	N=	3'-d(CACTNTACG)			3'-r(CACUNUACG)	
		A	C	T	G	A
	Tm(°C)	Tm(°C)	Tm(°C)	Tm(°C)	Tm(°C)	Tm(°C)
1 Z=T	28/28*	11/13*	12/15*	19/20*	28/29*	10/无 Tm*
2 Z=Y	44	23	27	30	50	33
3 Z=X	37	19	19	28	45	23

\*两个相同实验的结果

## 说明书附图

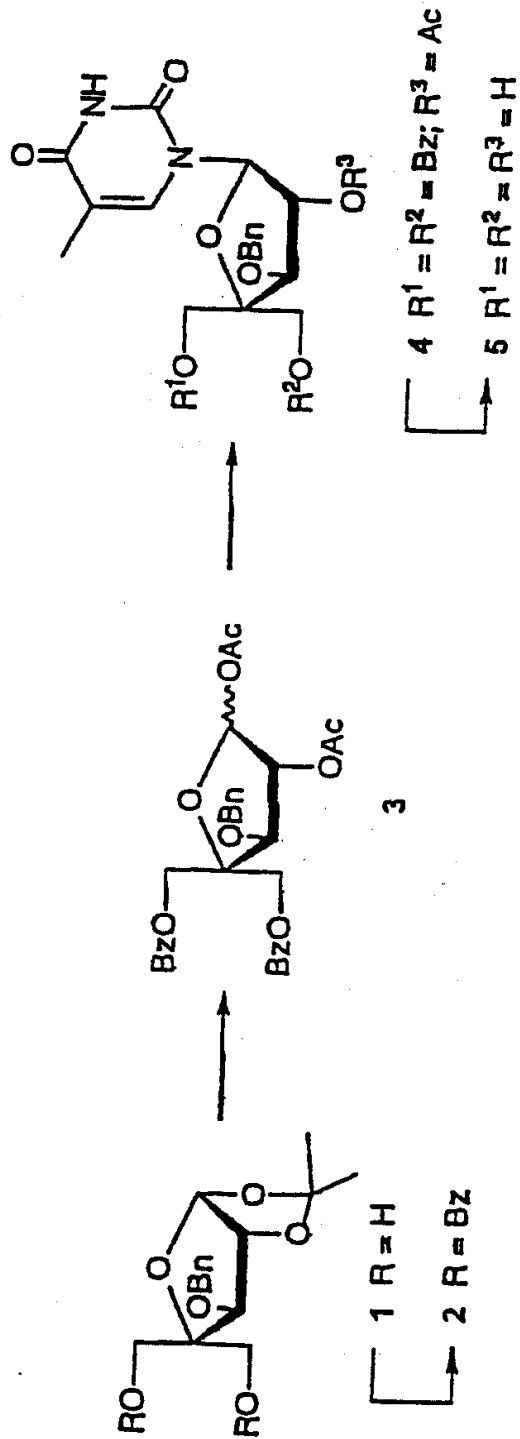


图 1

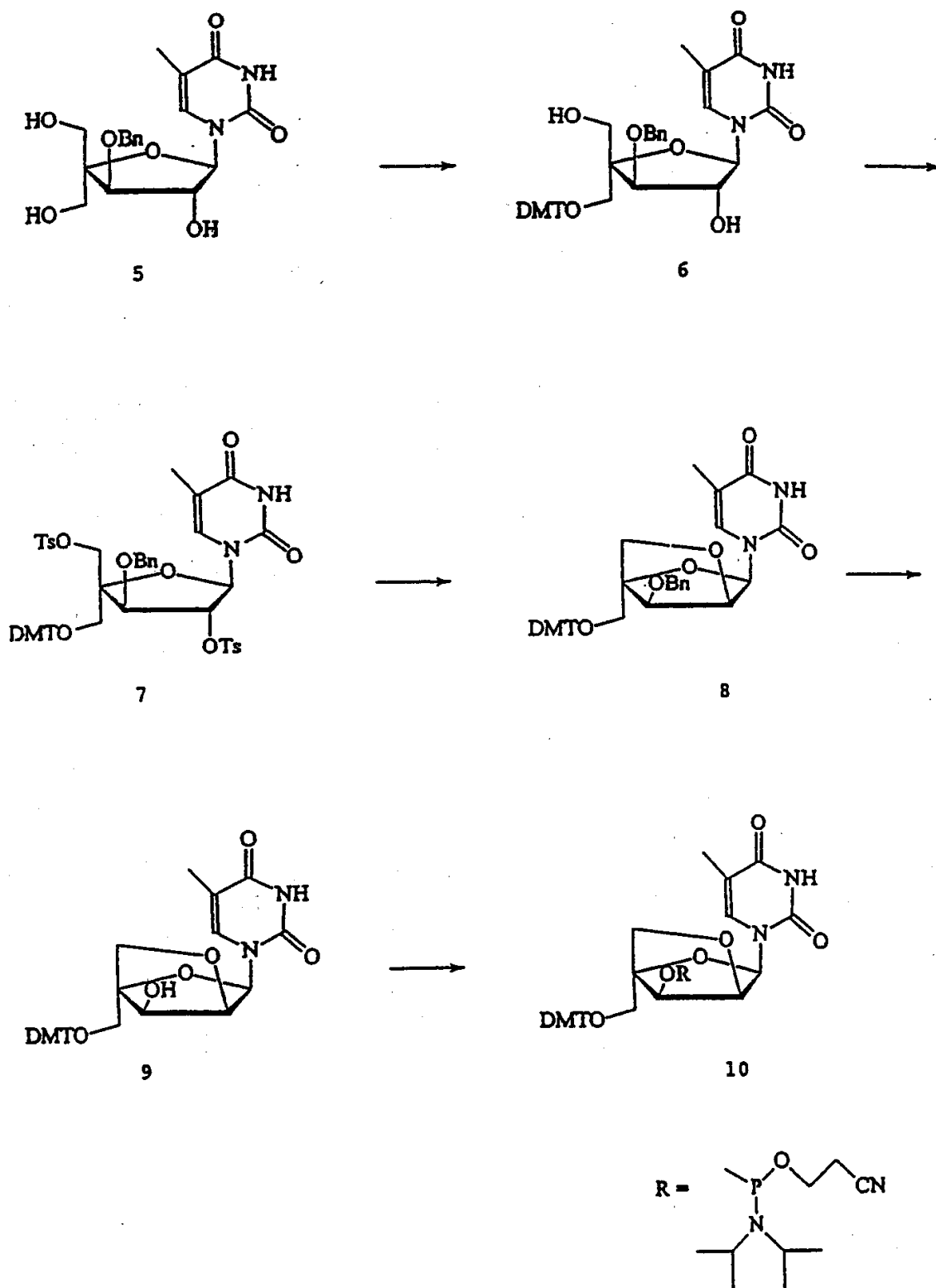
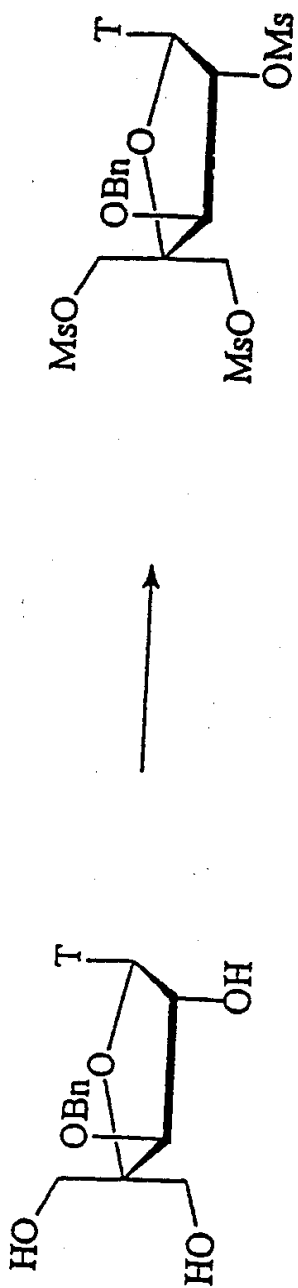
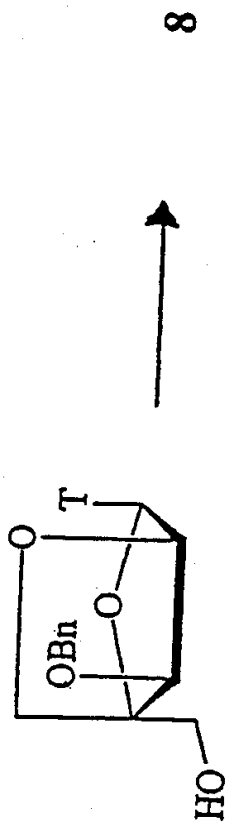


图 2



11

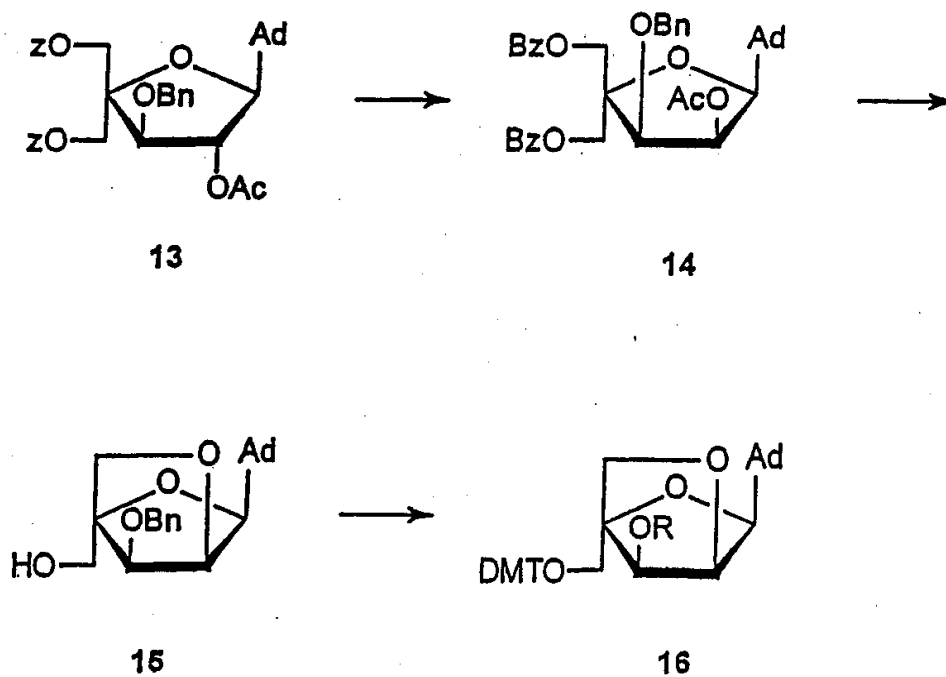
5



12

8

图 3



Ad = 6-N 苯甲酰腺嘌呤-9-基

R =  $\text{NC}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{N}^i\text{Pr}_2)$

图 4