

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03808763.4

[51] Int. Cl.

C07B 47/00 (2006.01)

C07F 9/24 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年4月9日

[11] 授权公告号 CN 100379709C

[22] 申请日 2003.2.24 [21] 申请号 03808763.4

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 22 [33] US [31] 60/359,124

[32] 2002. 3. 7 [33] US [31] 60/362,320

[86] 国际申请 PCT/US2003/005682 2003.2.24

[87] 国际公布 WO2003/072586 英 2003.9.4

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.19

[73] 专利权人 霍尼韦尔国际公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 C·维尔纳 F·内伦茨

A·坎施克-康拉德森 K. 瑞迪

[56] 参考文献

US 4725677A 1988.2.16

US 6274725B1 2001.8.14

nucleotides pyridinium salts – an effective class of catalysts for oligonucleotide synthesis. MARKUS BEIER. HELVETICA CHIMICA ACTA, Vol. 82 . 1999

审查员 宋 蕾

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 王景朝

权利要求书 3 页 说明书 18 页

[54] 发明名称

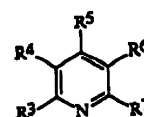
制备亚磷酸酯化 (phosphitylated) 化合物的方法

[57] 摘要

提供了制备亚磷酸酯化化合物包括 3'-O-亚磷酸酯化的方法, 包括将含羟基化合物在亚磷酸酯化活化剂的存在下与亚磷酸酯化试剂反应制备亚磷酸酯化化合物的步骤, 亚磷酸酯化活化剂选自 (1) 由通式 (I) 的胺碱衍生的酸-碱络合物, 其中 R、R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 独立的是 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 环烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂烷基、或 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基; (2) 由通式 (II) 的胺碱衍生的酸-碱络合物, 其中 R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、和 R<sup>7</sup> 独立的是氢、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 环烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂烷基、或 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基, R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、和 R<sup>7</sup> 中的至少一个不是氢; (3) 由二氮杂二环胺碱衍生的酸-碱络合物; (4) 两性离子胺络合物; 和 (5) 上述两种或多种的组合。



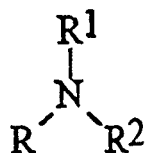
(I)



(II)

1. 一种制备亚磷酸酯化化合物的方法，包括将含羟基化合物在亚磷酸酯化活化剂的存在下与亚磷酸酯化试剂反应制备亚磷酸酯化化合物的步骤，亚磷酸酯化活化剂选自：

(1) 由通式 I 的胺碱衍生的酸-碱络合物



(I)

其中 R、R<sup>1</sup>、和 R<sup>2</sup> 独立的是 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 环烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂烷基或 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述的通式 I 的胺碱选自二异丙基乙胺、三丙胺、三乙胺、三甲胺、二乙基甲胺、N-甲基吗啉、四甲基乙二胺、三苄基胺以及它们中的两种或多种的组合。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述的通式 I 的胺碱是二异丙基乙胺。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述的亚磷酸酯化活化剂由酸衍生而来，该酸选自三氟乙酸、二氯乙酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、4-吡啶鎓亚甲基磺酸、无水氯化氢、无水溴化氢、无水碘化氢和 HBF<sub>4</sub>。

5. 权利要求 3 的方法，其中所述的酸-碱络合物由三氟乙酸衍生而来。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述的含羟基化合物是核苷或其衍生的低聚物。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述的核苷是 5'-O-保护的核苷。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述的亚磷酸酯化试剂选自双二异丙基氨基-2-氟基乙氧基膦；二烷氧基（二烷基氨基）膦；烷氧基烷基（二烷基氨基）膦，二（N,N-二异丙基氨基）-2-甲基三氟乙酰基氨基乙氧基膦；二（N,N-二异丙基氨基）-2-联苯基甲基甲硅烷基乙氧基膦；（烯丙氧基）二（N,N-二甲基氨基）膦；2-氟基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺；甲氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺；甲基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺；和它们中的两种或多种的混合物。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述的亚磷酸酯化试剂选自 2-氟基

乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺和甲氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述的亚磷酸酯化试剂是 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺。

11. 权利要求 1 的方法，还包括亚磷酸酯化化合物在沉淀溶剂中的沉淀步骤。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述的沉淀步骤包括提供含有亚磷酸酯化化合物和溶剂的化合物溶液，并将所述化合物溶液与沉淀溶剂接触沉淀出亚磷酸酯化化合物。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述的沉淀溶剂是石油醚。

14. 一种制备亚磷酸酯化化合物的方法，包括将 5'-O-保护的核苷在三氟乙酸-二异丙基乙胺络合物的存在下与亚磷酸酯化试剂反应形成 3'-O-亚磷酰胺的步骤。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述的亚磷酸酯化试剂是 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述的 5'-O-保护的核苷选自 N<sup>6</sup>-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺苷、N<sup>4</sup>-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞苷、N<sup>2</sup>-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟苷和 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷。

17. 权利要求 14 的方法，其中所述的 3'-O-亚磷酰胺选自 5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧腺苷(N<sup>6</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺，5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-(N<sup>4</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺，5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧鸟苷(N<sup>2</sup>-异丁酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺和 5'-O-二甲氧基三苯甲基胸苷-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺。

18. 权利要求 14 的方法，其中所述的 3'-O-亚磷酰胺通过 3'-O-亚磷酰胺在沉淀溶剂中沉淀进行纯化。

19. 一种制备亚磷酸酯化化合物的方法，包括将 5'-O-保护的核苷衍生的低聚物在三氟乙酸-二异丙基乙胺络合物的存在下与 3'-O-亚磷酰胺反应形成亚磷酸酯化低聚物化合物的步骤。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述的反应在自动 DNA 合成仪中

进行。

21. 权利要求 1 的方法，其中所述步骤在选自乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸正丙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙酸异丁酯、四氢呋喃及其两种或多种组合的溶剂存在下进行。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述的溶剂选自乙酸甲酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃及其两种或多种结合。

## 制备亚磷酸酯化 (phosphitylated) 化合物的方法

## 相关申请的交叉参考

本申请要求了 2002 年 2 月 22 日向美国专利商标局提交的美国临时申请序列号 60/359,124 和 2002 年 3 月 7 日向美国专利商标局提交的美国临时申请序列号 60/362,320 的优先权。上述两件临时申请在此处引入作为参考。

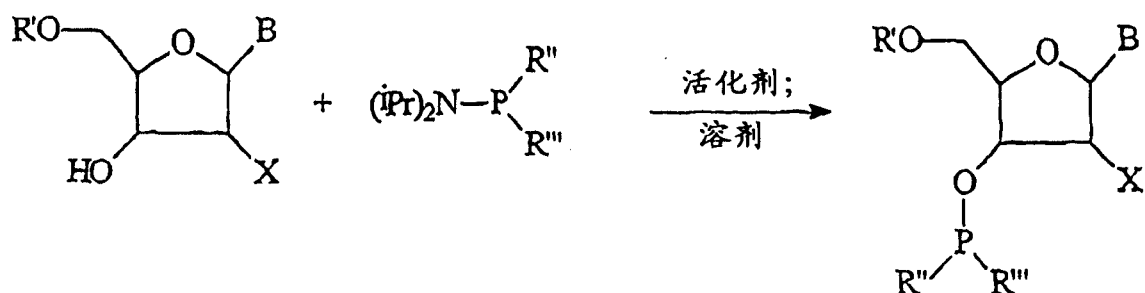
## 发明领域

本发明涉及通过含羟基化合物在亚磷酸酯化活化剂的存在下与亚磷酸酯化试剂反应制备亚磷酸酯化化合物的方法。

## 背景

通过含羟基化合物与磷试剂反应制备亚磷酸酯化化合物是一种转化，发现在多种有用化合物的合成中是实用的。例如，申请人认识到上述转化在由 5'-O-保护的核苷合成 3'-O-亚磷酰胺中是有用的，通常如方案 1 所示：

## 方案 1



其中，例如，X 是氢、烷氧基、-O-叔丁基二甲基甲硅烷基 (OTBDMS)、-O-甲氧基甲基 (OMOM)、2'-O-甲氧基乙基 (2'-O-MOE) 等；R' 是 DMT、二甲氧基三苯甲基、寡核苷酸及其类似物等；R'' 是烷基，如甲基等，或烷氧基，如 2-氰基乙基等；R''' 是二异丙胺等；和 B 是由腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、或尿嘧啶衍生的部分。

由方案 1 形成的亚磷酰胺可方便地偶联制备寡核苷酸，参见例如美国专利号 4,725,677 和 Mellor, Thomas, "Synthesis of analogues of oligonucleotides", *J. Chem Soc., Perkin Trans. 1*, 1998, 747-757 (两者

在此处引入作为参考)，在治疗和诊断应用包括，例如，抗致敏药物（如 Crooke, S.T. *Handbook of Experimental Pharmacology: Antisense Research and Application*; Springer-Verlag, Berlin, (1998) 所述，在此处引入作为参考）领域中具有日益增强的重要性。为了满足对上述寡核苷酸日益增长的需要，希望大规模改进核苷亚磷酸胺的合成（Noe, Kaufhold, *New Trends in Synthetic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCh Weinheim, 2000, 261，在此处引入作为参考）。

然而，申请人逐渐意识到，由于某些原因由含羟基化合物制备亚磷酸酯化合物，如 3'-O-亚磷酸胺的常规方法是不利的。多数常规方法的一个缺点是需要使用昂贵的和/或危险的活化试剂/化合物。例如，在 Beaucage 和 Carruthers, *Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 1859（此处引入作为参考）中，1*H*-四唑被推荐作最通用的亚磷酸酯活化剂。但是，这种活化剂/试剂是昂贵的和危险的。（参见，例如，Stull, *Fundamentals of Fire and Explosion*, AIChE Monograph Series, No. 10, New York, 1977, Vol. 73, 22，在此处引入作为参考）。鉴于富氮杂环的爆炸天性，处理上述组合物时需要特别安全防范。危险较小的化合物，4,5-二氰基咪唑，在某些核苷亚磷酸胺的制备中是有用的。不幸的是该化合物非常昂贵，其昂贵程度实际上阻碍了其在工业方法中的应用。由未取代吡啶衍生的亚磷酸酯活化剂在下列文献中公开，例如，Gryaznov, Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 5876; Gryaznov, Letsinger, *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 1879; Beier, Pfeleiderer, *Helvetica Chimica Acta*, 1999, 82, 879; Sanghvi 等人, *Organic Process Research and Development* 2000, 4, 175; 和美国专利号 6,274,725，已授权给 Sanghvi 等人，所有文献在此处引入作为参考。但是上述盐是有毒的和高水溶性的。因此，应用上述活化剂必须在系统中安装价值昂贵的废水处理装置。

制备亚磷酸酯化合物的多数常规方法的另一缺点是使用二氯甲烷作为优选溶剂。因为二氯甲烷对环境不安全，所以在二氯甲烷作为溶剂的该方法中需要同时使用相对昂贵的废物处理装置。

避免至少某些上述缺点的一种潜在方法是就地制备核苷亚磷酸胺，不用另外的活化步骤，例如，Zhang 等人在美国专利号 6,340,749B1 中所描述，所得溶液在固相支持体合成仪上直接使用。不幸的是上述

方法的效果相对较差，并且由上述方法获得的亚磷酸酰胺溶液是不稳定的，不适于储藏。

因此，申请人认识到需要避免常规方法缺点的制备亚磷酸酯化化合物的新方法。

### 发明内容和优选的实施方案

本发明通过提供制备多种亚磷酸酯化化合物的高效方法克服了上述缺陷，该方法相对于常规方法危险较小，成本较低。具体而言，申请人发现某些由相对位阻胺碱衍生的酸-碱络合物和两性离子络合物，可在由含羟基起始物质制备亚磷酸酯化化合物的方法中较有利地用作亚磷酸酯化活化剂。此处使用的术语“亚磷酸酯化化合物”一般指含有由含羟基化合物与亚磷酸酯化试剂反应形成的氧-磷键的化合物。申请人发现本发明的酸-碱和两性离子络合物与常规活化剂相比毒性较低，水溶性较低。

另外，申请人在许多实施方案中出乎意料地发现，尽管本发明的酸-碱和两性离子活化剂络合物比常规使用的活化剂有更多的位阻，亲核性更低，但本发明方法制备亚磷酸酯化化合物的产率与现有技术的方法获得的产率至少一样高，在某些情况下更高。虽然申请人不想限制于任何特殊的作用理论，但是可以相信亚磷酸酯化试剂用于制备亚磷酸酯化化合物的活化机理包括活化剂在亚磷酸酯化试剂的离去基团的亲核取代。例如，Berner 等人，*Nucleic Acids Res.* 1989,17,853 和 Dahl, B.等人，*Nucleic Acids Res.* 1987,15,1729 描述了所提议的双试剂 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酸酰胺与位阻较小的胺活化剂（如四唑）的活化机理，包括亲核性胺对二异丙基胺离去基团的取代，早于活化的双试剂与含羟基化合物的反应。

考虑到这一点，可以期望，包括与现有技术的胺活化剂如四唑和吡啶活化剂相比相对多，许多情况下显著多位阻的胺的本发明活化剂，在取代亚磷酸酯化试剂上的离去基团的效率会较低，所以活化上述试剂制备亚磷酸酯化化合物的效率也会较低。然而，如上所述，发明人惊奇地发现，本发明有显著多位阻的活化剂在制备亚磷酸酯化产物中的产率与常规活化剂如未取代吡啶盐的产率一样高，或更高。不想限制于任何特殊的作用理论，随后对所发现的预想不到的结果的调查使申请人相信，本发明活化剂的令人惊奇的高产率可能是由于，至

少部分是因为活化剂与某些含羟基起始物质的反应部分的副反应减少（例如，在 Nielsen 等人，*Nucleic Acids Res.* 1986,14,7391 中所讨论的鸟苷化合物中的内酰胺单元。）因此，本发明方法使得制备亚磷酸酯化化合物的产率与常规方法一样高，通常更高，同时也避免了上述常规方法的许多缺点。

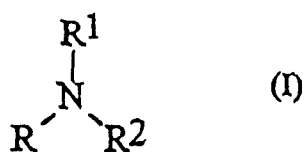
根据某些实施方案，本发明包括含羟基化合物在亚磷酸酯化活化剂的存在下与亚磷酸酯化试剂反应制备亚磷酸酯化化合物的步骤，亚磷酸酯化活化剂选自：由如下所述的通式 I 或通式 II 的胺衍生而来的酸-碱络合物，由二氮杂二环胺化合物衍生的酸-碱络合物，两性离子胺络合物，及其两种或多种的组合。

#### 亚磷酸酯化活化剂

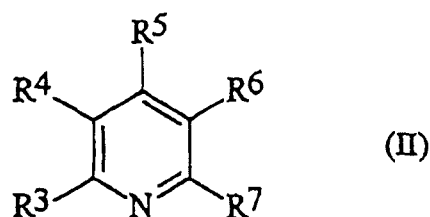
本发明此处所使用的术语“亚磷酸酯化活化剂”一般指促进含羟基化合物与亚磷酸酯化试剂的反应制备亚磷酸酯化化合物的化合物。申请人发现多种酸-碱络合物和两性离子络合物可有利地用作亚磷酸酯化活化剂。

##### A. 酸-碱络合物

本发明的酸碱络合物通过至少一种下文所述通式 I 或通式 II 的胺碱、或二氮杂二环胺碱和至少一种酸反应形成酸-碱络合物。



其中 R、R<sup>1</sup>、和 R<sup>2</sup> 独立的是烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂烷基、或杂芳基，每个具有约 1 至约 10 个碳原子（C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>）。



其中 R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、和 R<sup>7</sup> 独立的是氢、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 环烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 芳烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂烷基、或 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 杂芳基，其中

$R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、和  $R^7$  中的至少一个不是氢。

$R$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、和  $R^7$  中的  $C_1$ - $C_{10}$  烷基可以是直链或支链部分，例如，取代或未取代的：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、新戊基、正己基、正庚基、正辛基、2-乙基己基、壬基、癸基等。任一上述基团可被卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、烷基、氟烷基、芳烷基等所取代。

$R$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、和  $R^7$  中的  $C_1$ - $C_{10}$  环烷基可以是，例如，取代的或未取代的：环丙基、环丁基、环戊基、甲基环戊基、环己基、甲基环己基、二甲基环己基、环庚基、环辛基等。任一上述基团可被，例如，卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、烷基、氟烷基、芳烷基等所取代。

$R$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、和  $R^7$  中的  $C_1$ - $C_{10}$  芳基可以是，例如，取代的或未取代的：苯基、邻甲苯基、间甲苯基、对甲苯基、邻二甲苯基、间二甲苯基、对二甲苯基、 $\alpha$ -萘基、 $\beta$ -萘基等。任一上述基团可被，例如，卤素、羟基、芳氧基、烷基、氟烷基、芳烷基等所取代。

$R$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、和  $R^7$  中的  $C_1$ - $C_{10}$  芳烷基可以是，例如，取代的或未取代的：苄基、4-甲基苄基、邻甲基苄基、对甲基苄基、二苄基甲基、2-苄基乙基、2-苄基丙基、3-苄基丙基等。任一上述基团可被，例如，卤素、羟基、芳氧基、烷基、氟烷基、芳烷基等所取代。

通式 I 和 II 中的任两个邻近的  $R$ 、 $R^1$ 、和  $R^2$ ，或  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、和  $R^7$  基团可分别连结形成芳环、非芳族环或杂环。

适用于本发明方法的通式 I 胺碱的实例包括：三烷基胺，如，二异丙基乙胺（即 Hünig 碱）、三丙胺、三乙胺、三甲胺、二乙基甲胺、N-甲基吗啉（NMM）等；叔二胺，如，四甲基乙二胺（TMEDA）；聚胺和聚合物键连烷基胺；三芳胺，如，三苯胺等；三芳烷基胺，如，三苄基胺等；其它三取代胺，如二甲基苯胺；等等。通式 I 的某些优选的胺碱包括 Hünig 碱等。

适用于本发明方法的通式 II 胺碱的实例包括：二甲基氨基吡啶（DMAP）、4-二甲基氨基吡啶、和其它取代的吡啶，如，单烷基吡啶，包括甲基吡啶、2-甲基吡啶、3-甲基吡啶，二烷基吡啶，包括二

甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶, 三烷基吡啶, 包括三甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、连三甲基吡啶, 四烷基吡啶, 包括四甲基吡啶, 和五烷基吡啶, 包括五甲基吡啶等。通式 II 的某些优选的碱包括 2-甲基吡啶、连三甲基吡啶等。

适用于本发明方法的二氮杂二环胺碱的实例包括 1,5-二氮杂二环[4.3.0]壬-5-烯 (DBN); 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一-7-烯 (DBU); 1,1,3,3-四甲基胍; 等等。

多种酸中的任一种可与本发明的一种或多种碱结合形成本发明的酸-碱络合物。适合的酸包括: 乙酸衍生物, 如, 三氟乙酸 (TFA)、二氯乙酸等; 磺酸, 如, 甲磺酸、三氟甲磺酸、4-吡啶鎓亚甲基磺酸等; 无水氢卤酸, 如无水氯化氢、无水溴化氢、无水碘化氢等; 和  $\text{HBF}_4$ 。在某些优选的实施方案中, 本发明使用的酸是三氟乙酸。因此, 本发明的一个实施方案中, 亚磷酸酯化活化剂由酸进一步衍生而来, 该酸选自三氟乙酸、二氯乙酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、4-吡啶鎓亚甲基磺酸、无水氯化氢、无水溴化氢、无水碘化氢、和  $\text{HBF}_4$ 。另一个实施方案中, 上述的酸-碱络合物由三氟乙酸进一步衍生而来。

本发明某些优选的酸-碱络合物包括三氟乙酸和 Hünig 碱; 三氟乙酸和 2-甲基吡啶; 以及三氟乙酸和连三甲基吡啶的络合物。特别优选的酸-碱络合物是三氟乙酸和 Hünig 碱的络合物。

多种公知的形成酸-碱络合物的方法的任一种可适合用于制备本发明的酸-碱络合物。例如, 在某些实施方案中, 通过将至少一种酸加入到至少一种碱中形成络合物来制备本发明的酸-碱络合物。

本发明的酸和碱可在有或没有溶剂的存在下加入形成本发明络合物。在包括溶剂存在的实施方案中, 在酸和碱接触形成络合物之前, 酸和/或碱中的一个或两者可首先溶解在溶剂中形成酸溶液和/或碱溶液。本发明形成酸-碱络合物所使用的溶剂可与本发明亚磷酸酯化反应中所使用的任一任选的溶剂相同或不同。适用于制备本发明酸-碱络合物的溶剂包括非极性和极性, 非质子溶剂。适合的非极性和极性, 非质子溶剂的实例包括: 乙酸酯, 如, 乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙酸异丁酯等; 醚类, 如, 四氢呋喃 (THF)、甲基叔丁基醚 (MTBE) 等; 芳族溶剂, 如, 甲苯、氯苯等; 二氯甲

烷；乙腈；N-甲基-2-吡咯烷酮（NMP）；N,N-二甲基甲酰胺（DMF）以及上述两种或多种溶剂的组合。在某些实施方案中，酸-碱络合物中的碱，或络合物本身可用作溶剂。

任一适量的酸和碱可用于制备本发明的酸-碱络合物。通常，应使用足够的酸和碱使酸和碱成分在络合物中以大约 1:1 的摩尔比存在。在某些实施方案中，使用约 0.9 至约 1.5 当量的碱和约 0.9 至约 1.5 当量的酸。优选地，使用约 0.9 至约 1.3 当量的碱和约 0.9 至约 1.1 当量的酸，还更优选使用约 1.0 至约 1.3 当量的碱和约 1.0 至约 1.05 当量的酸。在某些特别优选的实施方案中，使用约 1.3 当量的碱和约 1.05 当量的酸。除非另外说明，所有的当量是摩尔当量。

本发明的酸-碱络合物可在本发明亚磷酸酯化反应中就地形成，或与其分开形成。在络合物就地形成的实施方案中，络合物可在膦和/或含羟基化合物加入前在反应混合物中形成。有选择性地，络合物可在膦和/或含羟基化合物加入到反应混合物中后随后加入络合物的酸和/或碱来制备。

任一适合的反应条件可用于形成本发明的络合物。例如，在某些实施方案中，本发明的酸和碱在约 0℃ 至约 100℃ 的温度下混合。优选地，酸和碱在约 10℃ 至约 60℃ 的温度下混合，更优选约 15℃ 至约 40℃。

## B. 两性离子络合物

此处所使用的术语“两性离子络合物”通常指在同一分子中（如内盐）中含有阳离子和阴离子的络合物离子，这在本领域是公知的。申请人出乎意料地发现上述两性离子络合物适于用作本发明的亚磷酸酯化活化剂。

多种两性离子化合物/内盐的任一种适用于本发明。适合的两性离子化合物的实例包括磺酸化合物，如，吡啶乙基磺酸等。

### 亚磷酸酯化试剂

此处所使用的术语“亚磷酸酯化试剂”通常指能够在亚磷酸酯化活化剂的存在下与含羟基化合物反应，在含羟基化合物的羟基的氧原子和亚磷酸酯化试剂的磷原子之间成键形成亚磷酸酯化化合物的任一试剂化合物。多种化合物的任一种适于用作本发明的亚磷酸酯化试剂。适合的化合物包括，例如，膦，如二取代膦，包括，烷氧基二（二

烷基氨基)磷,如双二异丙基氨基-2-氰基乙氧基磷;二烷氧基(二烷基氨基)磷;烷氧基烷基(二烷基氨基)磷,二(N,N-二异丙基氨基)-2-甲基三氟乙酰基氨基乙氧基磷;二(N,N-二异丙基氨基)-2-联苯基甲基甲硅烷基乙氧基磷;(烯丙氧基)二(N,N-二甲基氨基)磷;等等;还有亚磷酰胺,如羟基保护的N,N,N',N'-亚磷酰胺,包括,2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺(phosphorodiamidite);甲氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺;甲基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺等,和3'-O-亚磷酰胺,如,5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧腺苷(N<sup>6</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺,5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-(N<sup>4</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺,5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧鸟苷(N<sup>2</sup>-异丁酰基(isobutyryl))-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺,5'-O-二甲氧基三苯甲基胸苷-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺等;以及它们中的两种或多种的混合物。优选的亚磷酸酯化活化剂包括羟基保护的N,N,N',N'-亚磷酰胺,如,2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺、甲氧基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺、5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧腺苷(N<sup>6</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺、5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-(N<sup>4</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺、5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧鸟苷(N<sup>2</sup>-异丁酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺和5'-O-二甲氧基三苯甲基胸苷-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺。在特别优选的实施方案中,亚磷酸酯化试剂是2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺。

### 含羟基化合物

此处所使用的术语“含羟基化合物”通常指含有至少一个羟基的化合物,能够在亚磷酸酯化活化剂的存在下与亚磷酸酯化试剂反应,在含羟基化合物的至少一个羟基的氧原子和亚磷酸酯化试剂的磷原子之间成键形成亚磷酸酯化化合物。通常,能够在亚磷酸酯化活化剂的存在下与亚磷酸酯化试剂反应,在含羟基化合物的至少一个羟基的氧原子和亚磷酸酯化试剂的磷原子之间成键形成亚磷酸酯化化合物的包括至少一个羟基的化合物,适于用作本发明的含羟基化合物。在某些

优选的实施方案中，本发明的含羟基化合物包括任一天然的和/或非天然的核苷，包括 DNA 和/或 RNA 核苷，包括 Linked Nucleic Acid (LNA) 衍生物和被另外的基团如卤素取代基取代的核苷，含有探测物质 (Detector) 的核苷，包括生物素或荧光素连结的化合物；具有抗致敏作用配体的含效应物的化合物；和由上述两种或多种化合物衍生的寡聚结构。适合的 DNA 和 RNA 核苷的实例包括保护性核苷，如 5'-O-保护的核苷（有或没有另外的 N-保护，如通过苯甲酰基、异丁酰基、叔丁基苯氧基乙酰基“TAC”等进行保护），包括腺苷、胞苷、鸟苷、胸苷、脱氧腺苷、脱氧胞苷和脱氧鸟苷的 5'-O-保护的核苷；5'-O-保护-2'-保护的核苷，（有或没有另外的 N-保护），包括腺苷、胞苷、鸟苷、和尿苷（其中优选的 2'-保护基包括叔丁基二甲基甲硅烷基、甲氧基甲基 (MOM)、甲氧基乙基 (MOE) 和烷氧基，如甲氧基）的 5'-O-保护-2'-保护的核苷，和腺苷、胞苷、鸟苷、胸苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胞苷和脱氧鸟苷的 3'-O-保护的核苷，（有或没有另外的 N-保护），以及由它们衍生的寡聚结构。

本发明的一个实施方案中，含羟基化合物是核苷或其衍生的低聚物。

### 反应溶剂和条件

本方法可适于用作批量或连续加工。

根据某些实施方案，本发明亚磷酸酯化方法的反应步骤中还包含溶剂。本发明亚磷酸酯化反应中使用的溶剂可与本发明形成酸-碱络合物中所使用的任一任选的溶剂相同或不同。适用于本发明亚磷酸酯化反应的溶剂包括非极性和极性，非质子溶剂。适合的非极性和极性，非质子溶剂的实例包括：乙酸酯，如，乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙酸异丁酯等；醚类，如，THF、MTBE 等；芳族溶剂，如，甲苯、氯苯等；二氯甲烷；乙腈；NMP；DMF 以及上述两种或多种溶剂的组合。在某些实施方案中，酸-碱络合物中的碱，或络合物本身可用作溶剂。

任一适量的含羟基化合物和亚磷酸酯化试剂可用于本发明方法。在某些实施方案中，使用约 0.9 至约 1.5 当量的含羟基化合物和约 0.9 至约 1.5 当量的亚磷酸酯化试剂。优选地，使用约 0.9 至约 1.1 当量的含羟基化合物和约 0.9 至约 1.3 当量的亚磷酸酯化试剂，还更优选使

用约 0.9 至约 1.1 当量的含羟基化合物和约 1.0 至约 1.3 当量的亚磷酸酯化试剂。在某些特别优选的实施方案中，使用约 1.0 当量的含羟基化合物和约 1.1 当量的亚磷酸酯化试剂。除非另外说明，所有的当量是摩尔当量。

任一适合的反应条件，包括加入此处作为参考的任一文献中所公开的条件，可用于本发明的亚磷酸酯化反应。在某些实施方案中，亚磷酸酯化反应在约 0℃ 至约 100℃ 的温度下进行。优选地，亚磷酸酯化反应在约 0℃ 至约 40℃ 的温度下进行，更优选约 20℃。

通过本方法制备的亚磷酸酯化化合物可通过本领域公知的任一适合的方法纯化。例如，可使用水溶液洗涤、干燥、减压浓缩、色谱法、蒸馏、结晶、沉淀等方法。

根据某些优选的实施方案，申请人发现相对高纯度的亚磷酸酯化化合物，如 3'-O-亚磷酸酰胺，可通过亚磷酸酯化化合物在溶液中沉淀获得。在某些优选的实施方案中，本发明的沉淀方法包括提供含有将要沉淀的亚磷酸酯化化合物和溶剂的化合物溶液，和将所述化合物溶液与沉淀溶剂接触沉淀出亚磷酸酯化化合物。因此，本发明一个实施方案中，本发明的方法还包括亚磷酸酯化化合物在沉淀溶剂中的沉淀步骤。

多种适合溶剂的任一种可用于本发明的化合物溶液。适合的化合物溶液溶剂的实例包括：甲苯、二甲苯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸丁酯、两种或多种上述溶剂的组合等。优选的化合物溶液溶剂包括甲苯等。

化合物溶液可通过本发明多种方法中的任一种来提供。在某些优选的实施方案中，化合物溶液可作为本发明亚磷酸酯化反应的产物来提供。上述溶液可直接由亚磷酸酯化反应获得，或者通过纯化反应产物并将上述纯化的产物溶剂化来提供。有选择性地，通过不同于本发明反应的来源获得的亚磷酸酯化化合物，可溶解在化合物溶液溶剂中得到本发明的化合物溶液。

任一适合的沉淀溶剂可用于沉淀本发明的亚磷酸酯化化合物，包括烷烃，如石油醚、戊烷、己烷、异己烷、庚烷、异辛烷等，以及上述两种或多种烷烃的混合物。优选的沉淀溶剂包括石油醚、己烷、其两种或多种的混合物等。

在某些优选的实施方案中，可向沉淀溶剂中加入一种或多种助剂来影响本发明方法中沉淀物的结构。适合的助剂的实例包括，例如，三乙胺等。任一适量的助剂可加入到本发明的沉淀溶剂中。在某些优选的实施方案中，基于沉淀溶剂和助剂总重量使用约 0 至约 10% 重量的助剂，优选使用约 0 至约 5%。

本方法可使用化合物溶液和沉淀溶剂/助剂的任一适合的比率。在某些优选的实施方案中，化合物溶液加入到约 5 至约 25 当量的重量，优选约 20 至约 25 当量的沉淀溶剂或沉淀溶剂和助剂（如果存在）中。

沉淀可在任一适合的条件下来利用任一适合的实验设备来进行。优选地，沉淀在惰性气体，如氮气、氩气等下进行。可使用任一适合的温度，例如，约 -20℃ 至约 40℃。优选地，沉淀在约 0℃ 至约 30℃ 下进行，更优选地，约 5℃ 至约 25℃。任一适合的容器可用于沉淀。在某些优选的实施方案中，使用不锈钢容器。

#### 自动寡核苷酸合成

本领域技术人员会认识到，根据本方法，寡核苷酸可由包括核苷和/或其衍生的低聚物的含羟基化合物来合成，不仅可通过上文所描述的批量和/或连续加工，还可应用自动核苷酸合成技术，如下所述，例如，Applied BioSystems User's Manual for Models 392 和 394 DNA/RNA Synthesizer；Section 6 Chemistry for Automated DNA/RNA Synthesis (March 1994) 和 M. J. Gait, "Oligonucleotide Synthesis, A. Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press (1984, ISBN 0-904147-74-6)，加入此处作为参考。在上述实施方案中，核苷和/或寡核苷酸的含羟基化合物固定在固相支持体上，在自动 DNA 合成仪中在亚磷酸酯化活化剂的存在下与核苷亚磷酸酯化试剂反应形成寡核苷酸。根据本发明，可确定亚磷酸酯化反应的具体数目和顺序，来制备包含不同长度和核苷序列的寡核苷酸。

任一适合的固相支持体物质可适用于本发明。适合的固相支持体物质的实例包括可控孔度玻璃（“CPG”）、聚苯乙烯、二氧化硅、纤维素纸、及其两种或多种的组合。优选的一类固相支持体物质包括可控孔度玻璃、聚苯乙烯及其组合。

用于本方法的固相支持体可具有任一合适大小的孔。本领域技术人员会认识到，孔大小的选择至少部分依赖于要制备的低聚物的大小

和所使用的核苷酸合成方法。基于此教导，本领域技术人员会合理地选择适合孔大小的固相支持体物质用于多种应用。

多种固定有核苷的固相支持体是市售的。例如可由 Applied Biosystems (ABI) 获得的多种固定在 CPG 上的多种 n-保护的脱氧核苷(包括在 1000 埃 CPG 上的 0.2 微摩尔苯甲酰基保护的脱氧胞嘧啶)。

多种自动 DNA/RNA 合成仪的任一种可适用于本发明。适合的 DNA 合成仪的实例包括由 Applied Biosystems 提供的 Model Nos.3900、380、380B、392 和 394, Expedite 8800、8905、8909, Gene Assembler, OligoPilot, OligoPilotII, AKTAoligopilot 10 和 AKTAoligopilot 100, 以及 Beckmann Oligo 1000 和 1000M, MWG Biotech Oligo 2000, PolyPlex GeneMachine, Illumina Oligator, MerMade I 和 II, Imntelligent BioInstruments Primer Station 960, Proligo Polygen, Syntower 等。优选的一类合成仪包括 Model 394 等。

根据本发明的自动化方法可使用任一适量的固相支持的含羟基化合物和亚磷酸酯化试剂。在某些优选的实施方案中，每一反应使用过量，优选 50 倍过量的亚磷酸酯化试剂。

本发明还涉及一种制备亚磷酸酯化化合物的方法，包括将 5'-O-保护的核苷在三氟乙酸-二异丙基乙胺络合物的存在下与亚磷酸酯化试剂反应形成 3'-O-亚磷酰胺的步骤。

一个实施方案中，亚磷酸酯化试剂是 2-氟基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺。

另一实施方案中，5'-O-保护的核苷选自 N<sup>6</sup>-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺苷、N<sup>4</sup>-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞苷、N<sup>2</sup>-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟苷、和 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷。

另一实施方案中，3'-O-亚磷酰胺选自 5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧腺苷 (N<sup>6</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氟基乙基)亚磷酰胺，5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-(N<sup>4</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氟基乙基)亚磷酰胺，5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧鸟苷 (N<sup>2</sup>-异丁酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氟基乙基)亚磷酰胺、和 5'-O-二甲氧基三苯甲基胸苷-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氟基乙基)亚磷酰胺。

另一实施方案中，3'-O-亚磷酰胺通过 3'-O-亚磷酰胺在沉淀溶剂中沉淀进行纯化。

本发明还涉及一种制备亚磷酸酯化化合物的方法，包括将 5'-O-保护的核苷衍生的低聚物在三氟乙酸-二异丙基乙胺络合物的存在下与 3'-O-亚磷酰胺反应形成亚磷酸酯化低聚物化合物的步骤。其中的一个实施方案中，5'-O-保护的核苷衍生的低聚物在三氟乙酸-二异丙基乙胺络合物的存在下与 3'-O-亚磷酰胺的反应在自动 DNA 合成仪中进行。

### 实施例

根据下面的实施例对本发明进一步描述，该实施例只是说明性的，不是以任一方式加以限制。

#### 实施例 1-11

这些实施例阐述了几种保护性核苷试剂与 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺在本发明几种活化剂存在下的亚磷酸酯化。

进行 11 种亚磷酸酯化反应 (1-11)，包括保护性核苷试剂在本发明的酸-碱活化剂的存在下与 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺反应，计算每种产物的收率，如下文的一般方法所述。保护性核苷、活化剂碱、活化剂酸、溶剂的多种组合以及 11 种反应中每一种的收率列在表 1 中。

一般方法：活化剂碱 (1.1-1.2 当量) 加入到溶剂中，随后在室温下加入 0.95-1.1 当量的活化剂酸形成活化剂溶液。在单独的容器里约 1 当量的保护性核苷溶解于约 10 当量的溶剂中，然后减压蒸馏出约 3 当量的溶剂。约 1-1.2 当量的 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺室温下加入到核苷混合物中，然后室温下随着剧烈的搅拌将先前制备的活化剂溶液加入到核苷混合物中。12 小时后，反应混合物用甲苯稀释并用水洗涤。分出有机层，如果需要经硫酸钠干燥，减压浓缩。然后利用 HPLC 技术计算所要的酰胺 (amidite) 的收率，也就是，所得的产物混合物利用适合的洗脱剂通过 HPLC 柱，使用 HPLC 峰下的面积确定混合物中产物 % 收率。

表 1

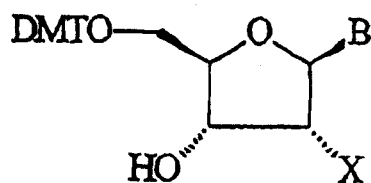
实施例	核苷	碱	酸	溶剂	% 收率
1	Bz-DMT-dA	2-甲基吡啶	TFA	乙酸甲酯	95
2	Bz-DMT-dA	连三甲基吡啶	TFA	乙酸甲酯	89
3	Bz-DMT-dA	Hünig 碱	TFA	乙酸甲酯	98
4	Bz-DMT-dC	2-甲基吡啶	TFA	乙酸异丁酯	91
5	Bz-DMT-dC	连三甲基吡啶	TFA	乙酸异丁酯	95
6	Bz-DMT-dC	Hünig 碱	TFA	乙酸异丁酯	92
7	iBu-DMT-dG	2-甲基吡啶	TFA	THF	67
8	iBu-DMT-dG	Hünig 碱	TFA	THF	92
9	DMT-T	2-甲基吡啶	TFA	THF	94
10	DMT-T	连三甲基吡啶	TFA	THF	95
11	DMT-T	Hünig 碱	TFA	THF	96

DMT = 二甲氧基三苯甲基; Bz = 苯甲酰基; iBu = 异丁酰基

#### 实施例 12-18

这些实施例阐述了几种保护性核苷试剂与 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺在本发明的 Hünig 碱-TFA 活化剂存在下的亚磷酸酯化。

7 种通式 III (下文) 的核苷试剂在 Hünig 碱-TFA 活化剂存在下与 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺根据实施例 1-11 的一般方法进行反应, 通过两种方法中的一种计算产物收率: (1) 所得的产物混合物利用适合的洗脱剂通过 HPLC 柱, 使用 HPLC 峰下的面积确定混合物中产物 % 收率; 或 (2) 所得的产物混合物利用乙酸甲酯/甲苯混合物通过短的硅胶柱纯化 (根据要纯化的特殊产物进行浓缩)。减压和溶剂中浓缩合适的产物部分直到获得所要酰胺的大约 50 % 的溶液。该溶液加入到约 5-25 当量的石油醚中沉淀产物, 过滤并用石油醚洗涤。然后干燥产物, 称重并计算百分收率。



(III)

其中，B 是由 N<sup>6</sup>-苯甲酰基腺嘌呤 (A (Bz))、N<sup>4</sup>-苯甲酰基胞嘧啶 (C (Bz))、N<sup>2</sup>-异丁酰基鸟嘌呤 (G (iBu))、胸腺嘧啶 (T)、或尿嘧啶 (U) 衍生的部分，和 X 是氢、OTBDMS、或甲氧基 (OMe)。每种核苷的 X 和 B 的详细的变化和每种反应的 % 收率如表 2 所示。

表 2

实施例	X	B	% 收率
12	OTBDMS	A(Bz)	92 - HPLC
13	OTBDMS	C(Bz)	93 - HPLC
14	OMe	C(Bz)	96 - HPLC
15	H	G(iBu)	94 - HPLC
16	OTBDMS	G(iBu)	92 - HPLC
17	H	T	80 - 分离
18	OTBDMS	U	85 - HPLC

### 实施例 19

该实施例阐述了本发明 N<sup>6</sup>-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺苷 (Bz-DMT-dA) 与三氟乙酸二异丙基乙基铵和 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺的亚磷酸酯化。

二异丙基乙基铵 6.4g (49.4mmol) 在反应容器中溶解于 20ml 的无水 THF 中。三氟乙酸 4.9g (43.6mmol) 室温下加入到 THF 混合物中形成以下反应步骤中使用的活化剂溶液。

Bz-DMT-dA 30g (45mmol) 在反应容器中溶解于 185ml 的无水 THF 中。然后减压蒸馏出 50ml 的 THF 形成反应混合物。室温下向反应混合物中加入 14.7g (47.2mmol) 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺。上文制备的活化剂溶液然后在室温下伴随着剧烈搅拌加入到

反应混合物中。12 小时后，反应混合物用 80ml 甲苯稀释并用 50ml 水洗涤。分出有机层并减压浓缩。所得的产物利用乙酸甲酯/甲苯 (80/20) 通过短的硅胶柱纯化。减压下和溶剂中浓缩适合的产物部分直到获得所要 5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧腺苷-(N<sup>6</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺 (PAm-Bz-DMT-dA) 的大约 50% 的溶液。大约 50% 的溶液伴随着剧烈搅拌 (约 500-600rpm) 在室温下加入到 1L 的配有机械搅拌器和含有 500ml 己烷的不锈钢反应器中。3 小时后过滤所得的沉淀，用 50ml 己烷洗涤，干燥得到 32g (83%) 的 Pam-Bz-DMT-dA。

### 实施例 20

该实施例阐述了本发明 N<sup>4</sup>-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞苷 (Bz-DMT-dC) 与三氟乙酸二异丙基乙基铵和 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺的亚磷酸酯化。

二异丙基乙胺 22.4g (173mmol) 在反应容器中溶解于 30ml 的无水 THF 中。三氟乙酸 18.4g (164mmol) 室温下加入到 THF 混合物中形成以下反应步骤中使用的活化剂溶液。

Bz-DMT-dC 103g (158.3mmol) 在反应容器中溶解于 450ml 的无水甲苯中。然后减压蒸馏出 100ml 的甲苯形成反应混合物。室温下向反应混合物中加入 51.4g (170.5mmol) 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺。上文制备的活化剂溶液然后在室温下伴随着剧烈搅拌加入到反应混合物中。12 小时后，反应混合物用 100ml 的醋酸铵水溶液洗涤两次。分出有机层并减压浓缩。所得的产物利用乙酸甲酯/甲苯/三乙胺 (100/30/2) 通过短的硅胶柱纯化。减压下和溶剂中浓缩适合的产物部分直到获得所要 5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-脱氧胞苷-(N<sup>4</sup>-苯甲酰基)-3'-N,N-二异丙基氨基-O-(2-氰基乙基)亚磷酰胺 (PAm-Bz-DMT-dC) 的大约 50% 的甲苯溶液。利用 3L 的配有机械搅拌器的不锈钢反应器，该溶液 5℃ 下随着剧烈搅拌 (约 500-600rpm) 加入到 19g 三乙胺的 1880ml 的己烷溶液中。3 小时后过滤所得的沉淀，用 100ml 己烷洗涤，干燥得到 112g (85%) 的 PAm-Bz-DMT-dC。

### 对比实施例 1-3

根据上文对实施例 12-18 所描述的一般方法进行三个对比亚磷酸酯化反应 (C1-C3)，包括将保护性核苷试剂在吡啶-TFA 活化剂的存

在下与 2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷二酰胺反应，计算每一种的产物收率。保护性核苷、溶剂的多种组合以及 3 个反应的每一个的收率如表 3 所示。如表 3 中的收率所述（与表 1 和 2 中的收率相比），本发明方法的收率与利用包含未取代吡啶的显著少位阻盐的常规活化剂的对比反应相比，令人惊奇地至少同样良好，在许多实施方案中更好。

表 3

实施例	核苷	溶剂	% 收率
C1	Bz-DMT-dA	乙酸甲酯	90-分离
C2	Bz-DMT-dC	乙酸异丁酯	91-分离
C3	DMT-T	THF	95-分离

### 实施例 21

该实施例阐述了本发明利用自动合成技术制备两个寡核苷酸序列（5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3'）和（5'-TTTTTTTTTTC-3'）。

ABI 394 DNA 合成仪配备 4 个基于 CPG（1000 埃）含有 0.2 微米苯甲酰基保护的脱氧胞嘧啶的合成柱（来自 ABI）。该合成仪再配备 4 个瓶子，每个含有四种 3'-O-亚磷酰胺（分别基于 dC、dA、dG、和 T）中的一种作为反应中亚磷酸酯化试剂的核苷源。合成仪再配备下列的溶液源：

活化剂溶液：1.0M 的 Hünig 碱/TFA 络合物（通过在 43.0 克的乙腈（Honeywell Burdick and Jackson）中合并 8.9 克二异丙基乙胺（Aldrich Biotech）和 8.9 克的 TFA 来制备）

Deblock-T: 3% 三氯乙酸的二氯甲烷溶液；

A Cap: 10% 乙酸酐/10% 吡啶/80% THF；

B Cap: 10% N-甲基咪唑/80% THF；和

Oxidation T: 0.02M 碘/2% 水/20% 吡啶/78% THF

核苷亚磷酸酯化试剂顺次反应，每个耦合用 50 倍的过量，得到所要的寡核苷酸“fos-21”（5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3'）和“CT10”（5'-TTTTTTTTTTC-3'）。利用配有 PDA 检测器的 Agilent

1100 Series HPLC 进行 HPLC 分析。Agilent ChemStation 的 LC 3D 软件用于收集和分析数据。所使用的 HPLC 柱是 Dionex DNAPak 100 (4x250mm) 柱。使用 1.0ml/min 流速的线性梯度。流动相是：B, 10 mM NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl pH, 8.3; D, 300 mM NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Tris pH, 8.3。梯度程序如下：

#### 寡核苷酸 HPLC 分析梯度程序-45 分钟

时间 (min)	%B	%D
0	100	0
5	75	25
30	40	60
35	0	100
40	100	0

在水中 50mg/ml 的浓度下，制备寡核苷酸进行分析。OD260 峰的粗 DNA 收率值用来计算浓度。制备 30ml 加样样品。每种寡核苷酸测试 4 个样品。测量平均收率，*fos-21* 大约 42.7%，CT-10 大约 85.2%。

#### 对比实施例 4

该实施例阐述了利用四唑和吡啶-TFA 活化剂通过自动合成方法合成两个寡核苷酸序列 (5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 和 (5'-TTTTTTTTTTC-3')。

寡核苷酸序列 (5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 和 (5'-TTTTTTTTTTC-3') 中的每一个根据实施例 22 所描述进行合成和测试，只是使用常规的活化剂溶液。在一个实验中，(5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 和 (5'-TTTTTTTTTTC-3') 都利用来自 Honeywell Burdick and Jackson, Inc. 的四唑作活化剂进行制备。在另一个实验中，(5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 和 (5'-TTTTTTTTTTC-3') 都利用 U.S. 专利号 6,274,725 所描述的吡啶-TFA 活化剂进行制备。

(5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 的平均收率，利用四唑作活化剂为 65%，利用吡啶-TFA 为 58.1%。(5'-TTTTTTTTTTC-3') 的平均收率，利用四唑作活化剂为 87.3%，利用吡啶-TFA 为 86.0%。