



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102985435 B

(45)授权公告日 2016.10.26

(21)申请号 201180028946.3

(22)申请日 2011.04.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102985435 A

(43)申请公布日 2013.03.20

(30)优先权数据

61/323,145 2010.04.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.12.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/032143 2011.04.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/130289 EN 2011.10.20

(73)专利权人 私募蛋白质体公司

地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 J·罗洛夫 N·亚尼奇

J·D·卡特 C·福勒

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 刘鸿林 张晓威

(51)Int.Cl.

C07H 19/06(2006.01)

C07H 19/00(2006.01)

(56)对比文件

US 20090098549 A1,2009.04.16,

US 20030144231 A1,2003.07.31,

CN 1436082 A,2003.08.13,

WO 2008137776 A2,2008.11.13,

US 20090098549 A1,2009.04.16,

US 20090004667 A1,2009.01.01,

Jonathan D. Vaught,等.Expanding the Chemistry of DNA for in Vitro Selection.《JACS》.2010,第132卷(第12期),第4143页左栏方案1及第2段第9-14行.

Takanori Ito,等.Synthesis, thermal stability and resistance to enzymatic hydrolysis of the oligonucleotides containing 5-(N-aminohexyl)carbamoyl-2'-O-methyluridines.《Nucleic Acids Research》.2003,第31卷(第10期),第2518页方案1.

审查员 姚旻

权利要求书3页 说明书29页

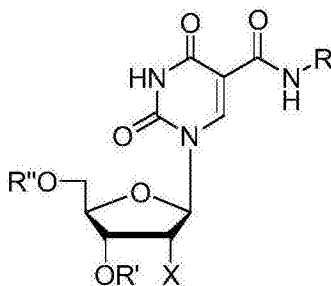
(54)发明名称

5-位修饰的嘧啶和它们的用途

(57)摘要

本公开内容涉及核酸化学领域,具体地涉及5-位修饰的尿苷及其亚磷酰胺和三磷酸酯衍生物。本公开内容还涉及其制备和使用方法。

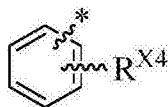
1. 化合物或其盐, 其中所述化合物选自具有以下结构的化合物:



其中

R选自 $-(CH_2)_n-R^{X1}$;

R^{X1} 选自:



*表示所述 R^{X1} 基团与 $(CH_2)_n$ 连接基的连接点

R^{X4} 是F;

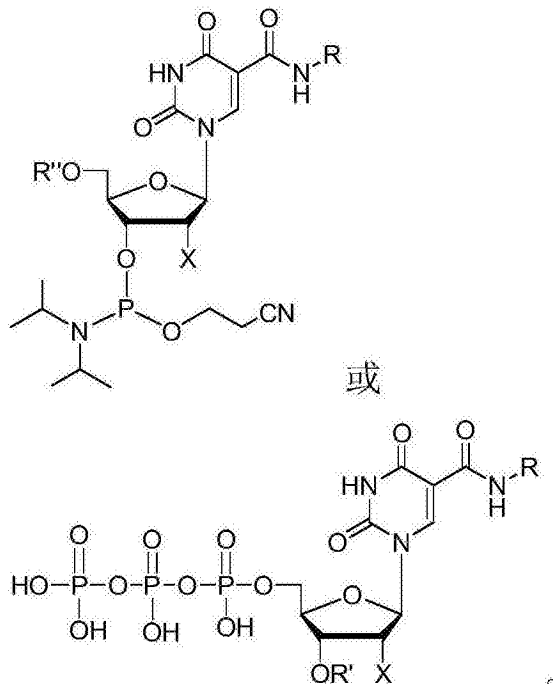
$n=0-10$;

X选自: -H、-OH、-OMe、-O-烯丙基、-F、-OEt、-OPr、-OCH₂CH₂OCH₃和-叠氮基;

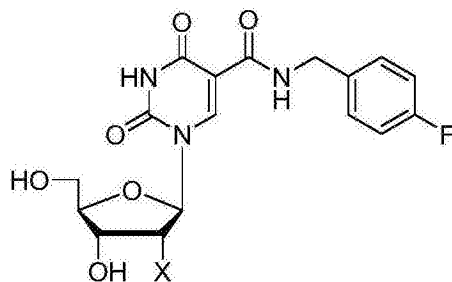
R'选自: H、-Ac、-Bz、-C(O)CH₂OCH₃、-P(N(iPr)₂)(OCH₂CH₂CN)和-SiMe₂tBu; 并且

R''选自: H、4,4'-二甲氧基三苯甲基和-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)₂或其盐。

2. 权利要求1的化合物或其盐, 所述化合物具有以下结构:



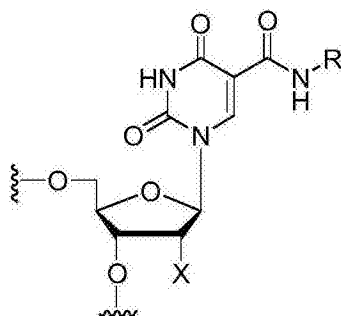
3. 化合物或其盐, 所述化合物具有以下结构:



其中

X选自：-H、-OH、-OMe、-O-烯丙基、-F、-OEt、-OPr、-OCH₂CH₂OCH₃和-叠氮基。

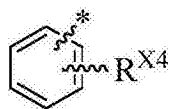
4. 权利要求1-3中任一项的化合物或其盐在制备寡核苷酸或适体中的用途，其中所述寡核苷酸或适体包含至少一个具有以下结构的修饰的核苷酸：



其中

R选自：-(CH₂)_n-R^{X1}；

R^{X1}选自：



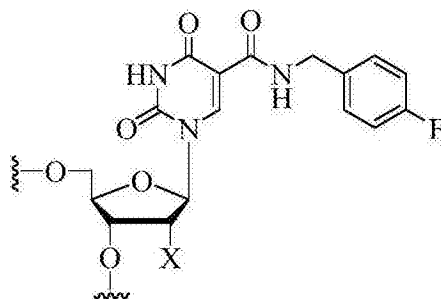
*表示所述R^{X1}基团与(CH₂)_n连接基的连接点

R^{X4}是F；

n=0-10；并且

X选自：-H、-OH、-OMe、-O-烯丙基、-F、-OEt、-OPr、-OCH₂CH₂OCH₃和-叠氮基。

5. 权利要求4的用途，其中所述寡核苷酸包含至少一个独立地选自以下结构的修饰的核苷酸：



其中

X选自：-H、-OH、-OMe、-O-烯丙基、-F、-OEt、-OPr、-OCH₂CH₂OCH₃和-叠氮基。

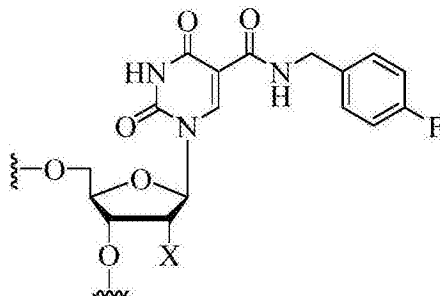
6. 权利要求4或5的用途，其中所述寡核苷酸选自核糖核酸或脱氧核糖核酸。

7. 权利要求6的用途，其中所述寡核苷酸另外包括至少一种化学修饰，所述化学修饰包

括在独立地选自核糖位置、脱氧核糖位置、磷酸酯位置和碱基位置的一个或多个位置处的化学取代。

8. 权利要求7的用途, 其中所述化学修饰独立地选自: 2'-位糖修饰、2'-NH₂、2'-F、2'-OMe、2'-OEt、2'-OPr、2'-O-CH₂CH₂OCH₃、5-位嘧啶修饰、主链修饰、甲基化、3' 加帽和5' 加帽。

9. 权利要求4的用途, 其中所述适体包含至少一个独立地选自以下结构的修饰的核苷酸:



其中

X选自: -H、-OH、-OMe、-O-烯丙基、-F、-OEt、-OPr、-OCH₂CH₂OCH₃和-叠氮基。

10. 权利要求4或9的用途, 其中所述适体选自核糖核酸或脱氧核糖核酸。

11. 权利要求10的用途, 其中所述适体另外包括至少一种化学修饰, 所述化学修饰包括在独立地选自核糖位置、脱氧核糖位置、磷酸酯位置和碱基位置的一个或多个位置处的化学取代。

12. 权利要求11的用途, 其中所述化学修饰独立地选自: 2'-位糖修饰、2'-NH₂、2'-F、2'-OMe、2'-OEt、2'-OPr、2'-O-CH₂CH₂OCH₃、5-位嘧啶修饰、主链修饰、甲基化、3' 加帽和5' 加帽。

5-位修饰的嘧啶和它们的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2010年4月12日提交的美国临时申请61/323,145的权益,将其通过援引全部加入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及核酸化学领域,具体地涉及5-位修饰的尿苷及其亚磷酰胺和三磷酸酯衍生物。本公开内容还涉及其制备和使用方法。本公开内容包括修饰的核苷作为寡核苷酸或适体的一部分的用途。

背景技术

[0004] 下面的描述提供了与本公开内容有关的信息的总结,且不是承认:在本文中提供的任何信息或引用的任何出版物是本公开内容的现有技术。

[0005] 已经非常关注开发修饰的核苷作为治疗剂、诊断剂和用于掺入寡核苷酸中。例如,修饰的核苷(诸如AZT、ddI、d4T等)已经被用于治疗AIDS。5-三氟甲基-2'-脱氧尿苷对疱疹性角膜炎是有效的,5-碘-1-(2-脱氧-2-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)胞嘧啶具有抗CMV、VZV、HSV-1、HSV-2和EBV的活性(A Textbook of Drug Design and Development, Povl Krogsgaard-Larsen和Hans Bundgaard编, Harwood Academic Publishers, 1991, 第15章)。

[0006] 修饰的核苷已经在诊断用途中表现出实用性。在这些用途中,将所述核苷掺入DNA中的可检测的位置,并使用各种诊断方法来检测修饰的核苷的位置。这些方法包括:放射性标记、荧光标记、生物素化和链裂解。链裂解的一个实例包括:使所述核苷与胼反应,以产生脲核苷,然后使所述脲核苷与哌啶反应,以造成链裂解(Maxam-Gilbert方法)。

[0007] 还已经将修饰的核苷掺入寡核苷酸中。存在几种可以将寡核苷酸用作治疗剂的方法。反义寡核苷酸可以结合生物体中的某些遗传编码区,以阻止蛋白的表达,或阻断各种细胞功能。此外,称作SELEX方法或指数富集的配体系统进化的方法使本领域技术人员能够鉴别和制备选择性地结合靶分子的寡核苷酸(称作“适体”)。所述SELEX方法描述在美国专利5,270,163中,其内容通过援引加入本文。

[0008] 所述SELEX方法包括:从候选物的混合物中选择寡核苷酸,以实现基本上任意的希望的结合亲和力和选择性标准。从寡核苷酸的随机混合物开始,所述方法包括:在有利于结合(或相互作用)的条件下使所述混合物接触靶,将未结合的寡核苷酸和已经与靶分子结合(或相互作用)的寡核苷酸分开,解离寡核苷酸-靶对,扩增从所述寡核苷酸-靶对解离出的寡核苷酸,以产生配体富集的寡核苷酸混合物,然后通过如所希望的多个循环,重复所述结合、分开、解离和扩增的步骤。

[0009] 可以将修饰的核苷掺入在SELEX方法中使用的或由SELEX方法鉴别出的反义寡核苷酸、核酶和寡核苷酸中。这些核苷可以赋予所述寡核苷酸对内切核酸酶和外切核酸酶的体内和体外稳定性,改变所述分子的电荷、亲水性或亲脂性,和/或提供三维结构的差异。

[0010] 以前已经描述的核苷的修饰包括:2'-位糖修饰、5-位嘧啶修饰、8-位嘌呤修饰、在

环外胺处的修饰、4-硫代尿苷的取代、5-溴或5-碘-尿嘧啶的取代、主链修饰和甲基化。修饰还包括3'和5'修饰诸如加帽。PCT WO 91/14696(通过援引加入本文)描述了化学修饰反义寡核苷酸以增强向细胞中的进入的方法。

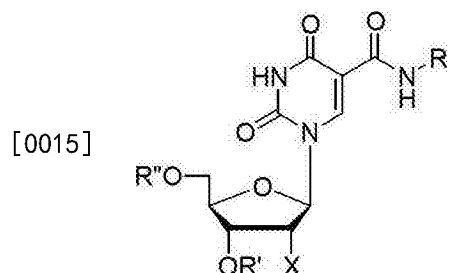
[0011] 美国专利5,428,149、5,591,843、5,633,361、5,719,273和5,945,527(它们通过援引整体加入本文)描述了通过钨偶联反应来修饰嘧啶核苷。在有些实施方案中,使亲核试剂和一氧化碳与嘧啶核苷偶联(所述嘧啶核苷含有在嘧啶环的5-位上的离去基),优选地形成酯和酰胺衍生物。

[0012] 已经使用多种方法来提供抗外切核酸酶降解的寡核苷酸。PCT WO90/15065描述了制备外切核酸酶抗性的寡核苷酸的方法,其中将2个或更多个亚磷酰胺、单硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯键掺入在寡核苷酸的5'和/或3'末端处。PCT WO 91/06629公开了在相邻核苷之间具有一个或多个磷酸二酯键的寡核苷酸,所述磷酸二酯键通过形成能够结合RNA或DNA的缩醛/缩酮型键而被替代。

[0013] 有利的是,提供用于治疗 and 诊断用途并用于包含在寡核苷酸中的新核苷。当掺入寡核苷酸中时,有利的是,提供这样的新寡核苷酸:其表现出与靶分子结合的不同的亲和力和,和/或表现出与从天然存在的核苷制备的寡核苷酸相比增加的对外切核酸酶和内切核酸酶的抗性。还有用的是,提供具有修饰的核苷酸,所述修饰会赋予不同于内切核酸酶和外切核酸酶抗性或除此之外额外的生物活性。

发明内容

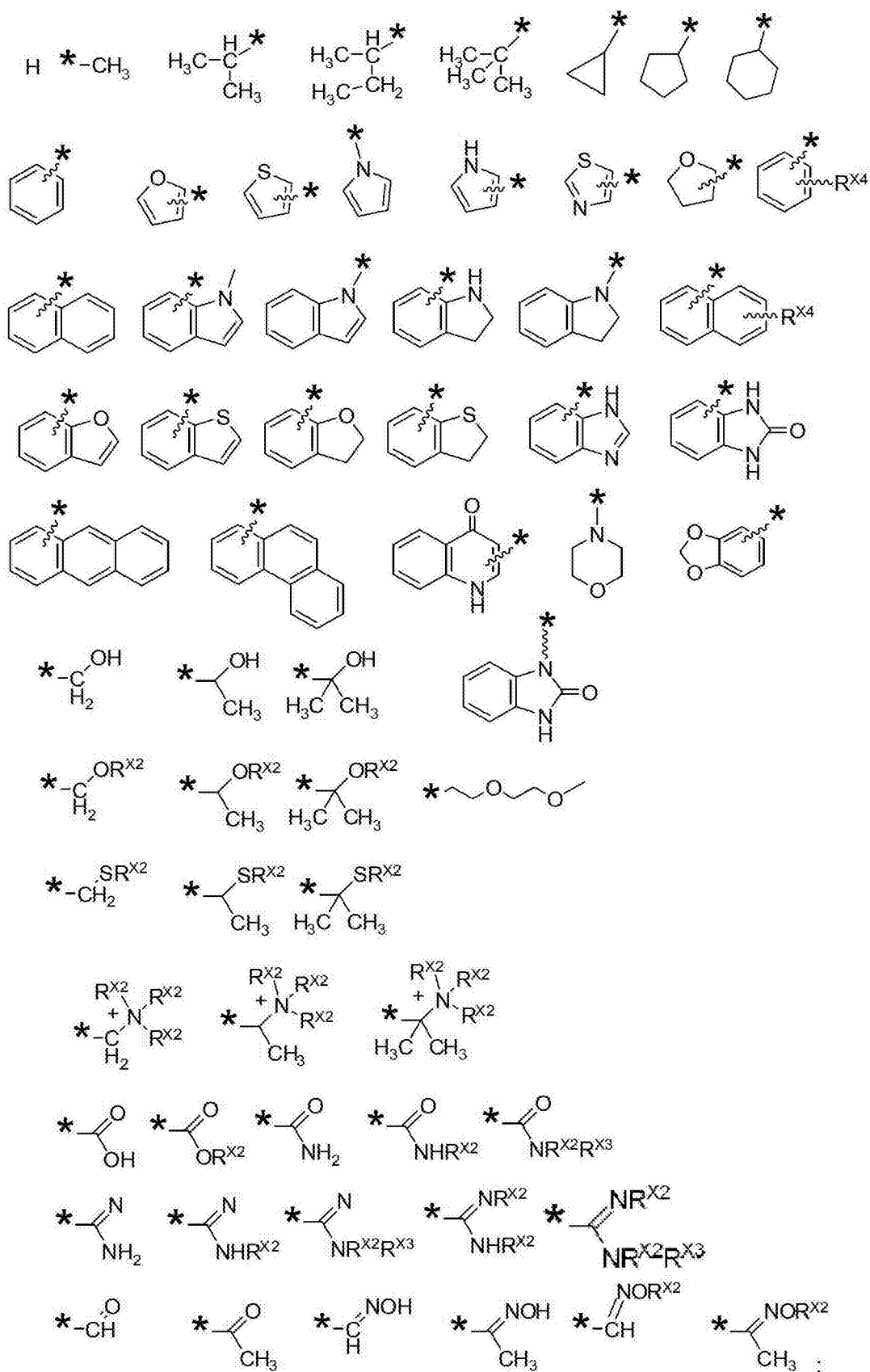
[0014] 本公开内容提供具有以下通式的5-位修饰的尿苷:



[0016] 其中

[0017] R选自 $-(CH_2)_n-R^{X1}$;

[0018] R^{X1} 选自:



[0020] *表示所述 $\text{R}^{\text{X}1}$ 基团与 $(\text{CH}_2)_n$ 连接基的连接点

[0021] 其中

[0022] $\text{R}^{\text{X}4}$ 选自：支链或直链低级烷基(C1-C20)；卤素(F、Cl、Br、I)；腈(CN)；硼酸(BO_2H_2)；

羧酸(COOH);羧酸酯($\text{COOR}^{\text{X}2}$);伯酰胺(CONH_2);仲酰胺($\text{CONHR}^{\text{X}2}$);叔酰胺($\text{CONR}^{\text{X}2}\text{R}^{\text{X}3}$);磺酰胺(SO_2NH_2);N-烷基磺酰胺($\text{SONHR}^{\text{X}2}$);

[0023] 其中

[0024] $\text{R}^{\text{X}2}$ 、 $\text{R}^{\text{X}3}$ 独立地选自:支链或直链低级烷基(C 1-C20);苯基(C_6H_5); $\text{R}^{\text{X}4}$ 取代的苯环($\text{R}^{\text{X}4}\text{C}_6\text{H}_4$),其中 $\text{R}^{\text{X}4}$ 如上面所定义;羧酸(COOH);羧酸酯($\text{COOR}^{\text{X}5}$),其中 $\text{R}^{\text{X}5}$ 是支链或直链低级烷基(C1-C20);和环烷基,其中 $\text{R}^{\text{X}2}=\text{R}^{\text{X}3}=(\text{CH}_2)_n$;

[0025] 其中 $n=0-10$;

[0026] 其中

[0027] X选自包括、但不限于以下部分的组: $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OMe}$ 、 $-\text{O}$ -烯丙基、 $-\text{F}$ 、 $-\text{OEt}$ 、 $-\text{OPr}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 和-叠氨基;

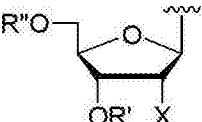
[0028] 其中

[0029] R' 选自包括、但不限于以下部分的组: $-\text{OAc}$ 、 $-\text{OBz}$ 和 $-\text{OSiMe}_2\text{tBu}$;

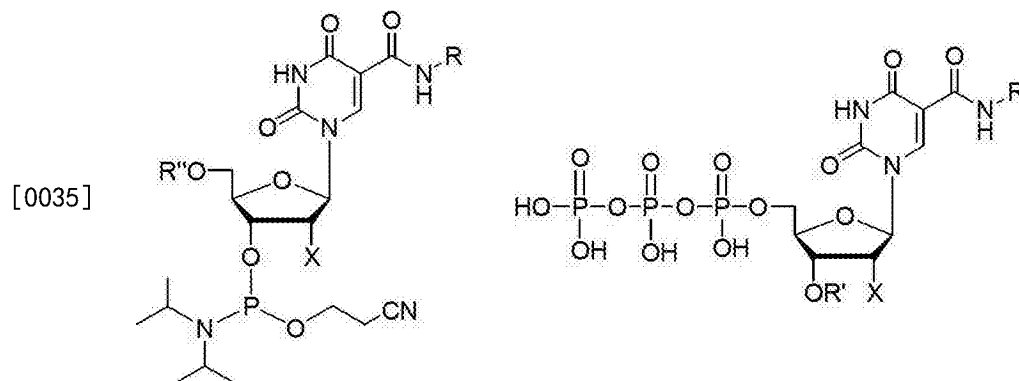
[0030] 其中

[0031] R'' 选自包括、但不限于以下部分的组: H 、DMT和三磷酸酯($-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$)或其盐;并且

[0032] 其中

[0033]  可以被下述部分替代:碳环糖类似物、 α -异头糖、诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖的差向异构糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和诸如甲基核苷的无碱基核苷类似物(abasic nucleoside analog)。

[0034] 本公开内容包括分别具有以下通式的所述化合物的3'-亚磷酰胺和5'-三磷酸酯衍生物或其盐:



[0036] 其中所有部分如上所定义。

[0037] 使用制备这些化合物的标准的合成方法或酶促方法,可以将本公开内容的化合物掺入寡核苷酸或适体中。

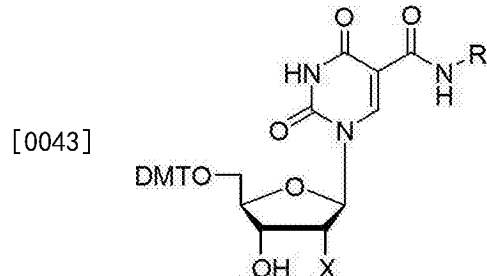
[0038] 本公开内容也提供制备本公开内容的化合物的方法和通过所述方法制备的化合物。

[0039] 在一个实施方案中,提供用于制备C-5修饰的氨基羰基嘧啶的方法,所述方法包括:在碱的存在下,使在5-位被三氟乙氧基羰基修饰的嘧啶与胺反应;和分离所述C-5修饰的氨基羰基嘧啶。

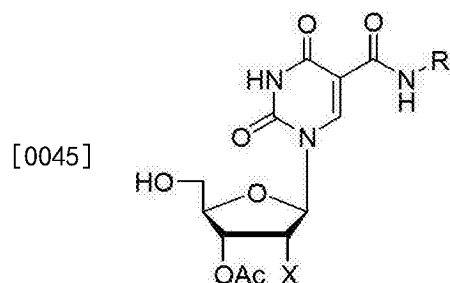
[0040] 在另一个实施方案中,提供用于制备C-5修饰的氨基羰基嘧啶的3'-亚磷酰胺的方法,所述方法包括:在碱的存在下,使所述C-5修饰的氨基羰基嘧啶与氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺反应;和分离所述3'-亚磷酰胺。

[0041] 在另一个实施方案中,提供用于制备C-5修饰的氨基羰基嘧啶的5'-三磷酸酯的方法,所述方法包括:

[0042] a)在碱的存在下,使具有下式的C-5修饰的氨基羰基嘧啶与乙酸酐反应:

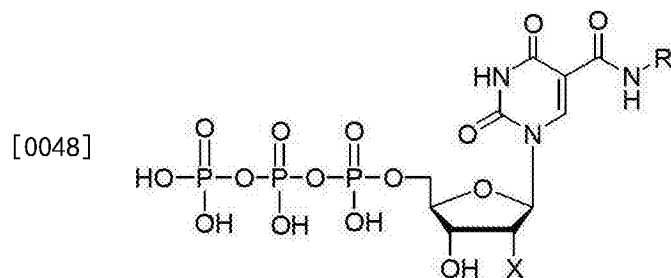


[0044] 其中R和X如上面所定义,随后用酸裂解5'-DMT基团,以形成具有以下结构的3'-乙酸酯:



[0046] b)对步骤a)的3'-乙酸酯进行Ludwig-Eckstein反应,继之以阴离子交换色谱;和

[0047] c)分离具有以下结构的C-5修饰的氨基羰基嘧啶的5'-三磷酸酯或其盐:



[0049] 详细描述

[0050] 现将详细参考本发明的代表性实施方案。虽然将结合所列举的实施方案描述本发明,但是应当理解,不旨在将本发明限制为那些实施方案。相反,本发明旨在涵盖可包括在由所附权利要求书限定的本发明范围内的所有替代方案、修改和等同。

[0051] 本领域技术人员会认识到许多与本文所述的那些类似或等效的方法和材料,它们可以用于本公开内容的实践中且在其范围内。本公开内容绝不限于所描述的方法和材料。

[0052] 除非另外定义,在本文中使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。尽管与本文所述的那些类似的或等效的任意的、方法和、装置和材料可以用于实践或试验本发明,但现在描述优选的方法、装置和材料。

[0053] 在本公开内容中引用的所有出版物、公开的专利文献和专利申请指明了本公开内容所属领域的技术水平。在本文中引用的所有出版物、公开的专利文献和专利申请都通过

援引加入本文,其程度如同明确地且单个地指示每篇单独的出版物、公开的专利文献或专利申请通过援引加入。

[0054] 如在本公开内容(包括所附权利要求书)中使用的,除非内容清楚地另有指示,单数形式的英文词“a”、“an”和“the”包括复数指代,且与“至少一个(种)”和“一个(种)或多个(种)”互换地使用。因此,对“适体”的提及也包括适体的混合物等。

[0055] 本文使用的术语“约”代表轻微的数值修饰或变异,使得这些数值相关的项目的基本功能不变。

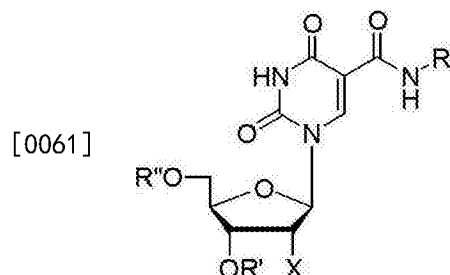
[0056] 当用于指代多个项目时,术语“每个”意图表示所述项目中的至少2个。不一定要求形成所述多个的所有项目满足有关的额外限制。

[0057] 本文使用的术语“包含”、“包括”、“含有”及其任意变体意图涵盖非排他性的包含,使得包含、包括或含有一种元件或一系列元件的过程、方法、方法限定的产品或物质组合物不仅包括这些元件,还可能包括没有明确列出的其它元件或这些过程、方法、方法限定的产品或物质组合物固有的其它元件。

[0058] 本文使用的术语“核苷酸”表示,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或它们的修饰形式以及它们的类似物。核苷酸包括含有嘌呤(例如,腺嘌呤、次黄嘌呤、鸟嘌呤和它们的衍生物和类似物)以及嘧啶(例如,胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶和它们的衍生物和类似物)的物质。

[0059] 化合物

[0060] 在一个实施方案中,本公开内容提供下式的化合物:

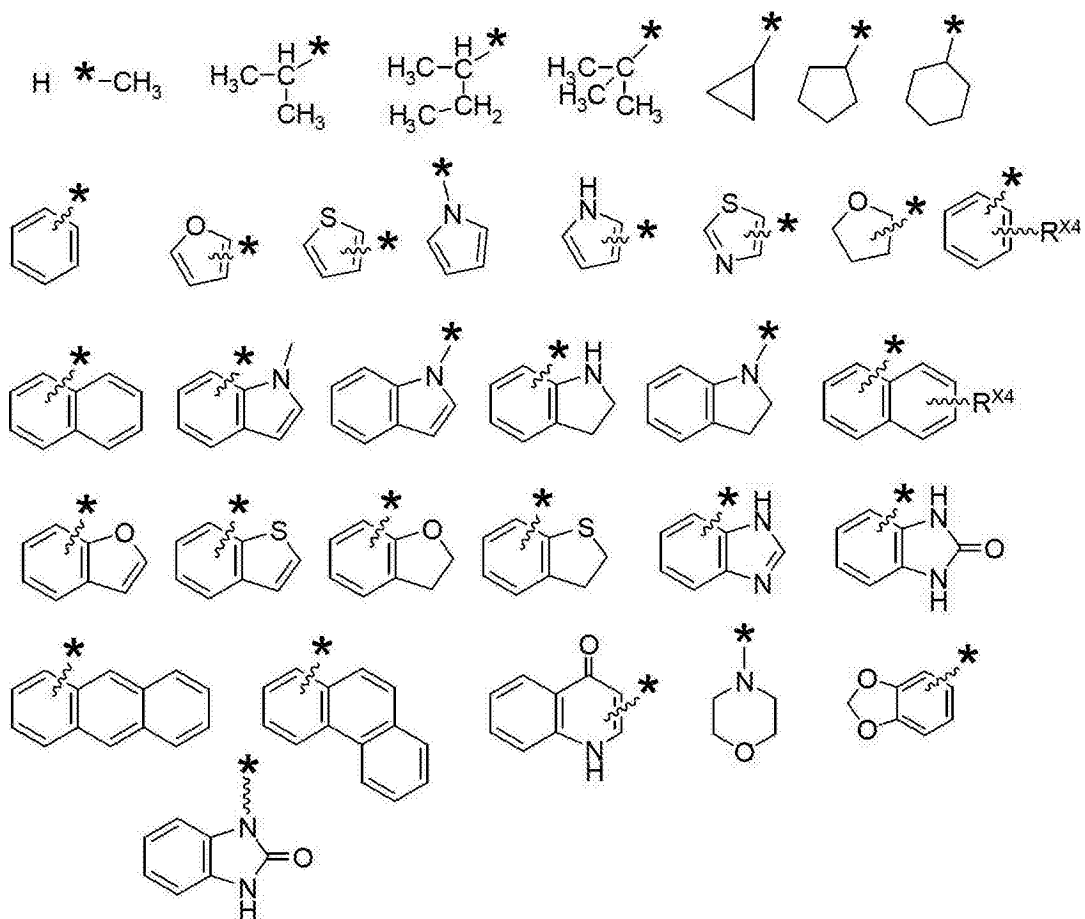


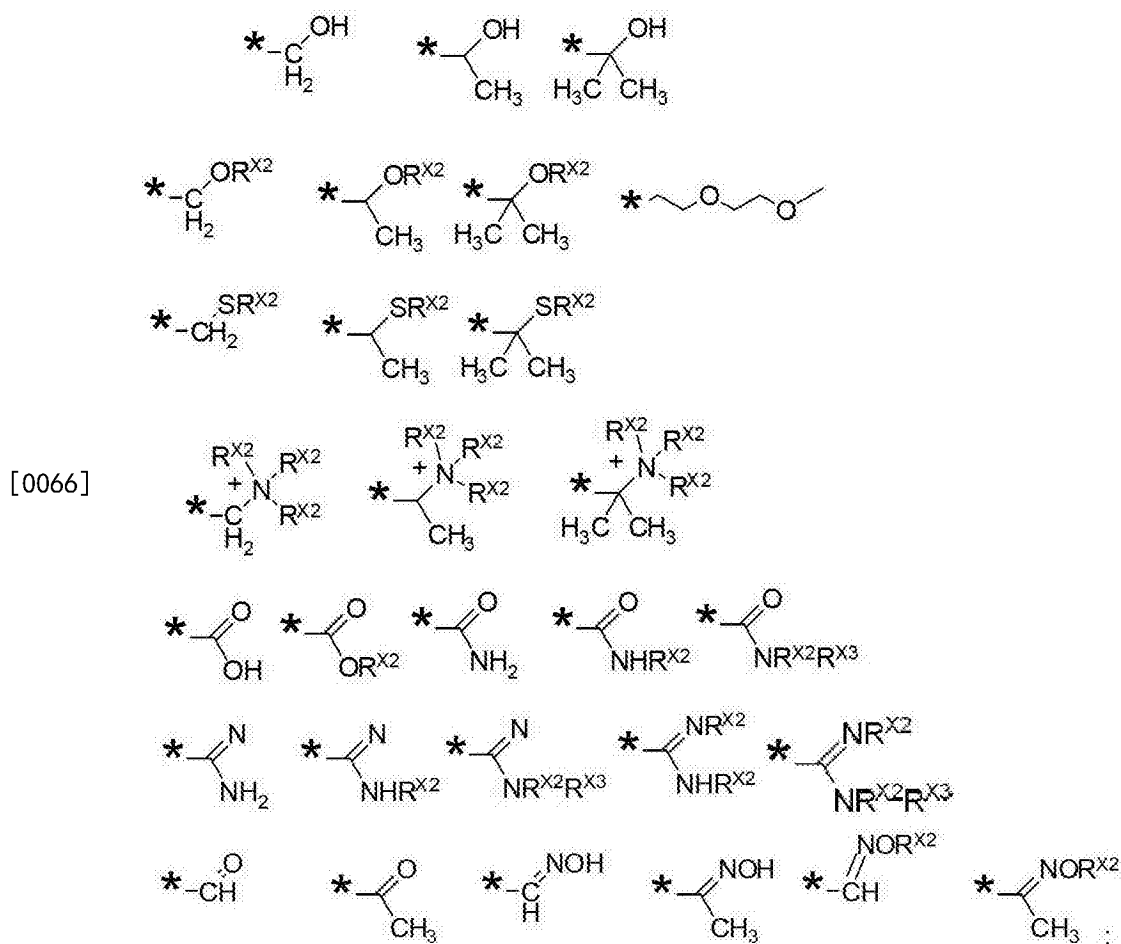
[0062] 其中

[0063] R选自 $-(CH_2)_n-R^{X1}$;

[0064] R^{X1} 选自:

[0065]





[0067] *表示所述 R^{X1} 基团与 $(CH_2)_n$ 连接基的连接点

[0068] 其中

[0069] R^{X4} 选自包括、但不限于以下部分的组：支链或直链低级烷基(C1-C20)；卤素(F、Cl、Br、I)；腈(CN)；硼酸(BO_2H_2)；羧酸($COOH$)；羧酸酯($COOR^{X2}$)；伯酰胺($CONH_2$)；仲酰胺($CONHR^{X2}$)；叔酰胺($CONR^{X2}R^{X3}$)；磺酰胺(SO_2NH_2)；和N-烷基磺酰胺($SONHR^{X2}$)；

[0070] 其中

[0071] R^{X2} 、 R^{X3} 独立地选自包括、但不限于以下部分的组：支链或直链低级烷基(C1-C20)；苯基(C_6H_5)； R^{X4} 取代的苯环($R^{X4}C_6H_4$)，其中 R^{X4} 如上面所定义；羧酸($COOH$)；羧酸酯($COOR^{X5}$)，其中 R^{X5} 是支链或直链低级烷基(C1-C20)；和环烷基，其中 $R^{X2}=R^{X3}=(CH_2)_n$ ；

[0072] 其中 $n=0-10$ ；

[0073] 其中

[0074] X选自包括、但不限于以下部分的组：-H、-OH、-OMe、-O-烯丙基、-F、-OEt、-OPr、-OCH₂CH₂OCH₃和-叠氮基；

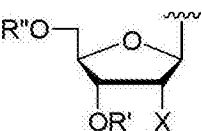
[0075] 其中

[0076] R' 选自包括、但不限于以下部分的组：-OH、-OAc、-OBz、-C(O)CH₂OCH₃和-O-SiMe₂tBu；

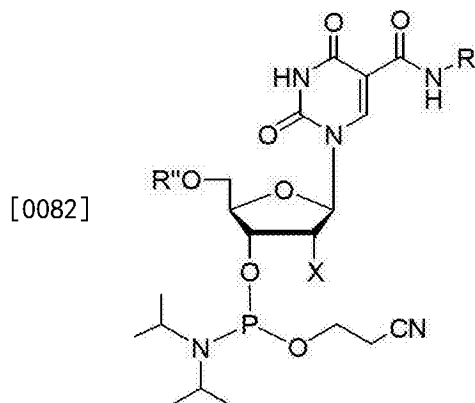
[0077] 其中

[0078] R'' 选自包括、但不限于以下部分的组：-H、4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)和三磷酸酯($-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$)或其盐；并且

[0079] 其中

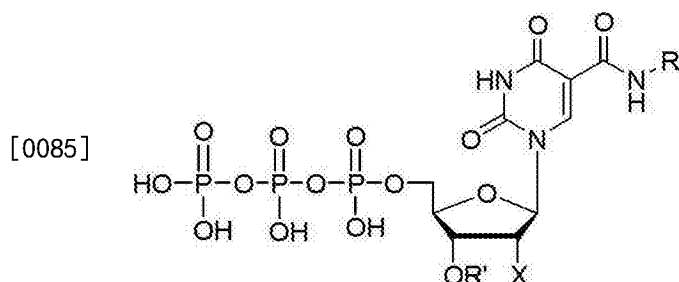
[0080]  可以被下述部分替代：碳环糖类似物、 α -异头糖、诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖的差向异构糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和诸如甲基核苷的无碱基核苷类似物。

[0081] 在另一个实施方案中，本公开内容提供下式的化合物或其盐：



[0083] 其中R、R''和X如上面所定义。该通式的化合物可用于通过化学合成将修饰的核苷掺入寡核苷酸中。

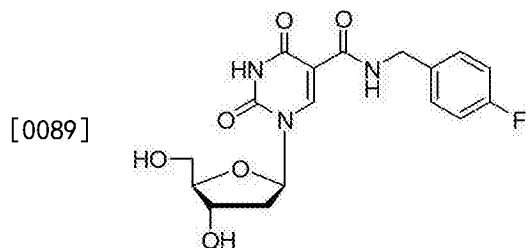
[0084] 在其它实施方案中，本公开内容提供下式的化合物或其盐：



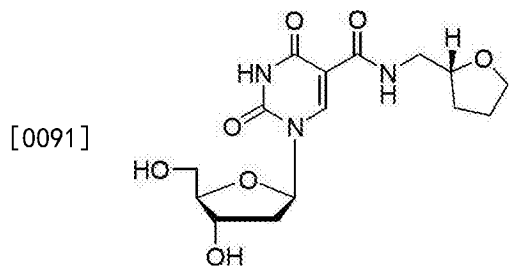
[0086] 其中R、R'和X如上面所定义。该通式的化合物可用于通过酶促合成将修饰的核苷掺入寡核苷酸中。

[0087] 本文使用的术语“C-5修饰的羧基酰胺尿苷”或“C-5修饰的氨基羰基尿苷”表示这样的尿苷：其具有在所述尿苷的C-5位处的羧基酰胺(-C(=O)NH-)修饰，包括、但不限于上述的那些部分(R)。C-5修饰的羧基酰胺尿苷的实例包括在美国专利5,719,273和5,945,527以及2010年12月14日提交的标题为“Nuclease Resistant Oligonucleotides”的美国临时申请61/422,957('957申请)中描述的那些。代表性的C-5修饰的嘧啶包括：5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(BndU)、5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-苄基羧基酰胺)-2'-氟尿苷、5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(iBudU)、5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-异丁基羧基酰胺)-2'-氟尿苷、5-(N-色氨基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(TrpdU)、5-(N-色氨基羧基酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-色氨基羧基酰胺)-2'-氟尿苷、5-(N-[1-(3-三甲基铵)丙基]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷氯化物、5-(N-萘基甲基羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷(NapdU)、5-(N-萘基甲基羧基酰胺)-2'-O-甲基尿苷、5-(N-萘基甲基羧基酰胺)-2'-氟尿苷或5-(N-[1-(2,3-二羟基丙基)]羧基酰胺)-2'-脱氧尿苷)。

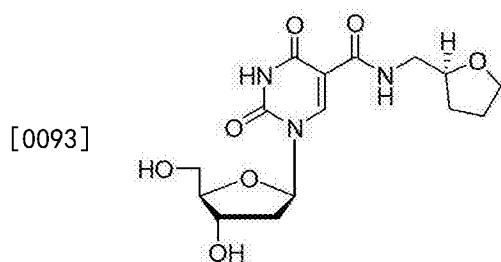
[0088] 仅仅为了例证目的在本文中描述的C-5修饰的氨基羰基尿苷的具体实例包括以下化合物以及所述化合物的5'-三磷酸酯和3'-亚磷酰胺及其盐,它们的合成描述在实施例1-5中。



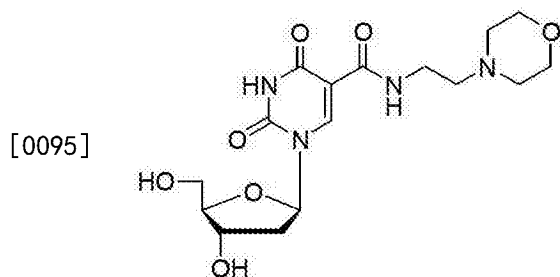
[0090] 5-(4-氟苄基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷,



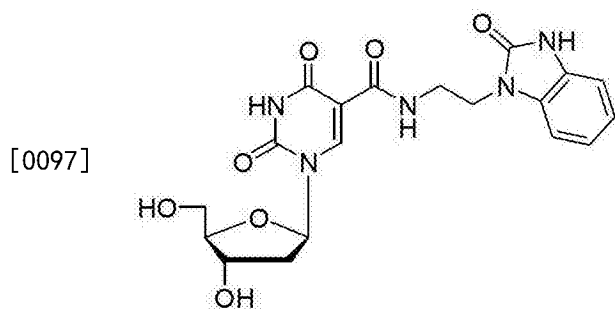
[0092] 5-((R)-2-糠基甲基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷,



[0094] 5-((S)-2-糠基甲基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷,



[0096] 5-(2-(4-吗啉代)乙基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷;和



[0098] 5-(2-(1-(3-苯并咪唑酮基))乙基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷。

[0099] 本文所述的C-5修饰的尿苷的化学修饰也可以与单个的或任意组合的下述修饰相

组合:2'-位糖修饰、在环外胺处的修饰和4-硫代尿苷的取代等等。

[0100] 盐

[0101] 可以方便地或合乎需要地制备、纯化和/或处理所述化合物的对应盐,例如,药学上可接受的盐。在Berge等人“Pharmaceutically Acceptable Salts”(1977) J.Pharm.Sci.66:1-19中,讨论了药学上可接受的盐的实例。

[0102] 例如,如果所述化合物是阴离子的,或具有可以呈阴离子的官能团(例如, $-\text{COOH}$ 可以是 $-\text{COO}^-$),那么可以与合适的阳离子形成盐。合适的无机阳离子的实例包括、但不限于:碱金属离子诸如 Na^+ 和 K^+ ,碱土金属阳离子诸如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,和其它阳离子诸如 Al^{+3} 。合适的有机阳离子的实例包括、但不限于:铵离子(即, NH_4^+)和取代的铵离子(例如, NH_3R^{x+} 、 $\text{NH}_2\text{R}^{x+}_2$ 、 NHR^{x+}_3 、 NR^{x+}_4)。一些合适的取代的铵离子的实例是得自以下的那些:乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨丁三醇,以及氨基酸,诸如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的一个实例是 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 。

[0103] 如果所述化合物是阳离子的,或具有可以呈阳离子的官能团(例如, $-\text{NH}_2$ 可以是 $-\text{NH}_3^+$),那么可以与合适的阴离子形成盐。合适的无机阴离子的实例包括、但不限于得自以下无机酸的那些:盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、磷酸和亚磷酸。

[0104] 合适的有机阴离子的实例包括、但不限于得自以下有机酸的那些:2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、依地酸、乙二磺酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟乙酸、羟基马来酸、羟基萘羧酸、羟乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘酸、油酸、草酸、棕榈酸、双羟基萘酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、对氨基苯磺酸、酒石酸、甲苯磺酸和戊酸。合适的聚合物有机阴离子的实例包括、但不限于得自以下聚合物酸的那些:鞣酸、羧甲基纤维素。

[0105] 除非另外指出,对特定化合物的提及也包括其盐形式。

[0106] 寡核苷酸的制备

[0107] 在一个方面,本公开内容提供单独地或与其它修饰的核苷和/或天然存在的核苷组合地使用本文所述的修饰的核苷来制备修饰的寡核苷酸的方法。寡脱氧核苷的自动化合成是许多实验室中的常规实践(参见例如,Matteucci,M.D.和Caruthers,M.H.,(1990) J.Am.Chem.Soc., 103:3185-3191,其内容通过援引加入本文)。寡核糖核苷的合成也是众所周知的(参见例如Scaringe,S.A.等人,Nucleic Acids Res.18:5433-5441(1990),通过援引加入本文)。如上面所指出的,所述亚磷酰胺可用于通过化学合成将所述修饰的核苷掺入寡核苷酸中,并且所述三磷酸酯可用于通过酶促合成将所述修饰的核苷掺入寡核苷酸中(参见例如,Vaught,J.V.等人(2010) J.Am.Chem.Soc., 132,4141-4151;Gait,M.J. “Oligonucleotide Synthesis a practical approach”(1984) IRL Press(Oxford,UK); Herdewijn,P. “Oligonucleotide Synthesis”(2005)(Humana Press,Totowa,NJ)(它们各自通过援引整体加入本文))。

[0108] 当与寡核苷酸结合使用时,本文使用的术语“修饰”、“修饰的”和它们的任意变体是指,所述寡核苷酸的4种组成核苷酸碱基(即,A、G、T/U和C)中的至少一种是天然存在的核苷酸的类似物或酯。在一些实施方案中,所述修饰的核苷酸会赋予寡核苷酸核酸酶抗性。额外的修饰可以包括:主链修饰,甲基化,异常碱基配对组合例如异碱基(isobase)异胞苷

(isocytidine)和异胍(isoguanidine)等等。修饰也可包括3'和5'修饰,如加帽。其它修饰可以包括:天然存在的核苷酸中的一个或多个被类似物取代,核苷酸间修饰例如不带电连接修饰(例如磷酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和带电连接修饰(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等),嵌入剂修饰(例如吡啶、补骨脂素等)、含有螯合剂的修饰(例如金属、放射性金属、硼和氧化性金属等),含有烷化剂的修饰和用修饰的连接修饰(例如 α 异头核酸等)。而且,通常存在于核苷酸的糖中的任何羟基可以被磷酸酯基团或磷酸酯基团替代,被标准保护基保护,或者被激活以制备与额外的核苷酸或固体载体的额外连接。5'和3'末端OH基团可以被磷酸化或者被胺、约1到约20个碳原子的有机加帽基团部分、聚乙二醇(PEG)聚合物(在一个实施方案中,约10至约80kDa)、PEG聚合物(在另一个实施方案中,约20至约60kDa)、或者其它亲水的或疏水的生物的或合成的聚合物取代。

[0109] 多核苷酸也可以含有本领域通常已知的核糖或脱氧核糖的类似形式,包括2'-O-甲基、2'-O-烯丙基、2'-O-乙基、2'-O-丙基、2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-氟-或2'-叠氮基、碳环糖类似物、 α -异头糖、诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖的差向异构糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和诸如甲基核苷的无碱基核苷类似物。如上面所指出的,一个或多个磷酸二酯键可被替代性的连接基替代。这些替代性的连接基包括其中磷酸酯被以下基团替代的实施方案:P(O)S(“硫代磷酸酯(thioate)”)、P(S)S(“二硫代磷酸酯(dithioate)”)、(O)NR^x₂(“酰胺”)、P(O)R^x、P(O)OR^x、CO或CH₂(“甲缩醛(formacetal)”),其中每个R^x或R^x'独立地是H或取代的或未取代的任选含有醚(-O-)连接的烷基(C1-C20)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。多核苷酸中的所有连接不一定都是一致的。糖、嘌呤和嘧啶的类似形式的取代在设计终产物方面可能是有利的,替代性的主链结构(如聚 酰胺主链)也是如此。

[0110] 如果存在的话,可以在聚合物装配之前或之后,实现对核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可以被非核苷酸组分中断。在聚合以后,可以进一步修饰多核苷酸,诸如通过与标记组分的缀合。

[0111] 本文使用的“核酸”、“寡核苷酸”和“多核苷酸”可互换地用于指示核苷酸的聚合物,且包括DNA、RNA、DNA/RNA杂交物以及这些类型的核酸、寡核苷酸和多核苷酸的修饰,其中包括各种实体或部分在任意位置处与核苷酸单元的连接。术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”包括双链或单链分子以及三螺旋分子。核酸、寡核苷酸和多核苷酸是比术语适体更广的术语,因而,术语核酸、寡核苷酸和多核苷酸包括作为适体的核苷酸的聚合物,但是术语核酸、寡核苷酸和多核苷酸不限于适体。

[0112] 当指示核酸的修饰时,本文使用的术语“至少一个核苷酸”是指所述核酸中的一个、几个或所有核苷酸,这指示,A、C、T、G或U中的任一个或全部在核酸中的任一次或所有出现可以被修饰或未被修饰。

[0113] 在其它方面,本公开内容提供单独地或与其它修饰的核苷和/或天然存在的核苷组合地使用本文所述的修饰的核苷来制备适体和SOMamer(在下面描述)的方法。在特定的实施方案中,使用如下所述的一般SELEX或改进的SELEX方法制备所述适体和SOMamer。

[0114] 本文使用的“核酸配体”、“适体”、“SOMamer”和“克隆”可互换地用于指示对靶分子具有希望的作用的非天然存在的核酸。希望的作用包括、但不限于:结合靶、催化地改变靶、以修饰或改变靶或靶的功能活性的方式与靶反应、共价地结合靶(如在自杀抑制剂的情况中)和促进靶与其它分子之间的反应。在一个实施方案中,所述作用是对靶分子的特异性结

合亲和力,这样的靶分子是三维化学结构而不是多核苷酸,其通过不依赖于Watson/Crick碱基配对或三螺旋形成的机理与所述核酸配体结合,其中所述适体不是具有被所述靶分子结合的已知生理功能的核酸。给定的靶的适体包括:通过以下方法从核酸的候选混合物中鉴别出的核酸,其中所述适体是所述靶的配体,所述方法包括:(a)使所述候选混合物接触所述靶,其中在所述候选混合物中的与其它核酸相比具有增加的对所述靶的亲亲和力的核酸可以与所述候选混合物的其余部分分开;(b)从所述候选混合物的其余部分中分离出亲和力增加的核酸;和(c)扩增所述亲和力增加的核酸,以产生配体富集的核酸混合物,由此鉴别出所述靶分子的适体。已知亲和相互作用是程度问题;但是,在该背景下,适体对其靶的“特异性结合亲和力”是指,所述适体与其靶的结合亲和力的程度通常远远大于它与混合物或样品中其它非靶组分的结合亲和力。“适体”、“SOMAmer”或“核酸配体”是一类或一种具有特定核苷酸序列的核酸分子的拷贝集合。适体可以包括任何适当数量的核苷酸。“适体”表示超过一个这样的分子集合。不同的适体可能具有相同或不同的核苷酸数量。适体可以是DNA或RNA,且可以是单链的、双链的,或含有双链或三链区域。

[0115] 本文使用的“SOMAmer”或慢解离速率修饰适体(Slow Off-Rate Modified Aptamer)表示具有改进的解离速率特征的适体。可以使用在标题为“Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates”的美国专利公开20090004667中描述的改进的SELEX方法制备SOMAmer。

[0116] 本文使用的“蛋白”与“肽”、“多肽”或“肽片段”同义地使用。“纯化的”多肽、蛋白、肽或肽片段基本上不含有来自细胞、组织或无细胞来源(所述氨基酸序列得自于此)的细胞物质或其它污染蛋白,或当化学地合成时,基本上不含有化学前体或其它化学试剂。

[0117] SELEX方法

[0118] 术语“SELEX”和“SELEX方法”在本文中互换地使用,通常是指以下二者的组合:(1)选择以希望的方式(例如高亲和力地结合蛋白)与靶分子相互作用的核酸,(2)扩增那些选择的核酸。SELEX方法可以用于鉴别对特定靶分子或生物标志物具有高亲和力的适体。

[0119] SELEX通常包括:制备核酸的候选混合物,使所述候选混合物与希望的靶分子结合以形成亲和复合物,使所述亲和复合物与未结合的候选核酸分开,从所述亲和复合物中分开并分离核酸,纯化所述核酸,并鉴别特异性的适体序列。所述方法可以包括多个循环,以进一步改进所选择的适体的亲和力。所述方法可以包括在所述方法中的一个或多个点处的扩增步骤。参见例如标题为“Nucleic Acid Ligands”的美国专利5,475,096。SELEX方法可以用于制备共价地结合它的靶的适体以及非共价地结合它的靶的适体。参见例如标题为“Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX”的美国专利5,705,337。

[0120] SELEX方法可以用于鉴别含有修饰的核苷酸的高亲和力适体,所述修饰的核苷酸赋予所述适体改进的特征,例如,提高的体内稳定性或改进的递送特征。这样的修饰的实例包括:在核糖和/或磷酸酯和/或碱基位置处的化学取代。在标题为“High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides”的美国专利5,660,985中描述了SELEX方法鉴别出的含有修饰的核苷酸的适体,该专利描述了含有在嘧啶的5'-和2'-位处被化学修饰的核苷酸衍生物的寡核苷酸。美国专利5,580,737(参见同上)描述了高度特异性的适体,所述适体含有一个或多个被2'-氨基(2'-NH₂)、2'-氟(2'-F)和/或2'-O-甲基

(2'-OMe)修饰的核苷酸。也参见标题为“SELEX andPHOTOSELEX”的美国专利申请公开20090098549,它描述了具有扩展的物理和化学性质的核酸文库和它们在SELEX和photoSELEX中的用途。

[0121] SELEX也可以用于鉴别具有希望的解离速率特征的适体。参见标题为“Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates”的美国专利公开20090004667(它通过援引整体加入本文),它描述了用于制备可以结合靶分子的适体的改进的SELEX方法。描述了用于产生适体和光适体的方法,所述适体和光适体具有更慢的与它们各自的靶分子解离的速率。所述方法包括:使所述候选混合物接触靶分子,允许形成核酸-靶复合物,并执行慢解离速率富集过程,其中具有快解离速率的核酸-靶复合物解离且不会重新形成,而具有慢解离速率的复合物保持完整。另外,所述方法包括在候选核酸混合物的制备中使用修饰的核苷酸,以产生具有改进的解离速率性能的适体(参见美国专利公开20090098549,标题为“SELEX andPhotoSELEX”)。(也参见美国专利7,855,054和美国专利公开20070166740)。这些申请中的每一篇通过援引整体加入本文。

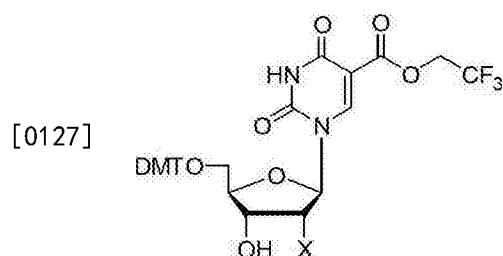
[0122] “靶”、“靶分子”或“靶”在本文中是指核酸可以以希望的方式对其起作用的任意化合物。靶分子可以是蛋白、肽、核酸、碳水化合物、脂质、多糖、糖蛋白、激素、受体、抗原、抗体、病毒、病原体、有毒物质、底物、代谢物、过渡态类似物、辅因子、抑制剂、药物、染料、营养物、生长因子、细胞、组织、任一种前述物质的任意部分或片段等,但不限于此。基本上任意的化学或生物学效应器可以是合适的靶。任意大小的分子均可以充当靶。还可以以某些方式修饰靶,以增强靶和核酸之间的相互作用的可能性或强度。靶还可以包括特定化合物或分子的任意微小变化,例如,在蛋白 的情况下,例如在氨基酸序列的微小变化、二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作和修饰,例如与标记组分的缀合,所述缀合基本上不改变分子同一性。“靶分子”或“靶”是一类或一种能够结合适体的分子或多分子结构的拷贝集合。“靶分子”或“靶”表示超过一个这样的分子集合。在标题为“Modified SELEX Processes Without Purified Protein”的美国专利6,376,190中描述了其中靶是肽的SELEX方法的实施方案。

[0123] 化学合成

[0124] 在本文中描述了在本公开内容中提供的化合物的化学合成方法。可以以已知的方式修改和/或改变这些和/或其它众所周知的方法,以便促进在本公开内容中提供的其它化合物的合成。

[0125] 参考路线1,在一种方案中,如下制备本公开内容的C-5位修饰的氨基羰基嘧啶:在碱的存在下,使在5-位被三氟乙氧基羰基修饰的嘧啶与胺反应;和分离所述C-5修饰的氨基羰基嘧啶。

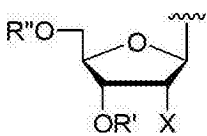
[0126] 在一些实施方案中,所述三氟乙氧基羰基嘧啶选自包括、但不限于具有以下结构的化合物的化合物组:



[0128] 其中

[0129] X选自包括、但不限于以下部分的组： $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-O$ -烯丙基、 $-F$ 、 $-OEt$ 、 $-OPr$ 、 $-OCH_2CH_2OCH_3$ 和-叠氮基，且

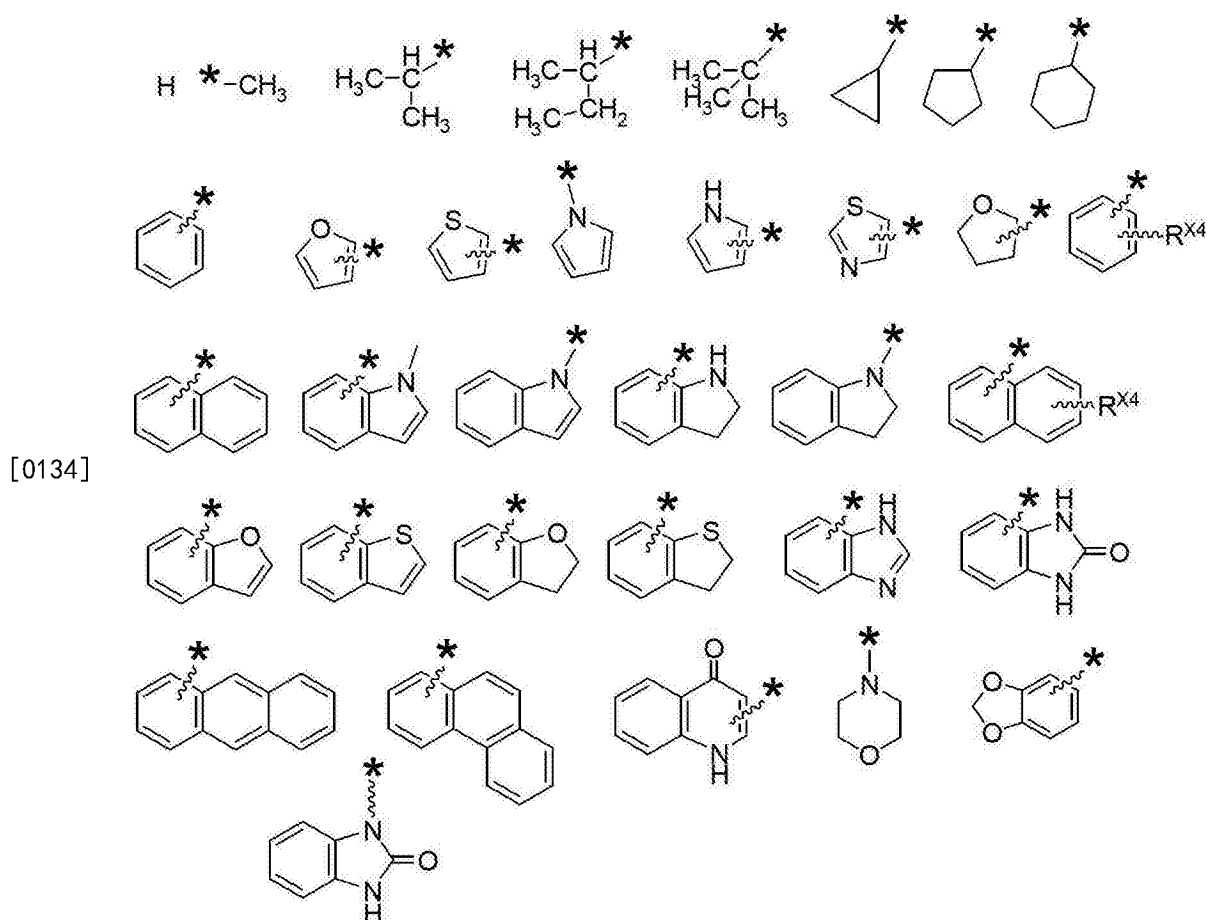
[0130] 其中

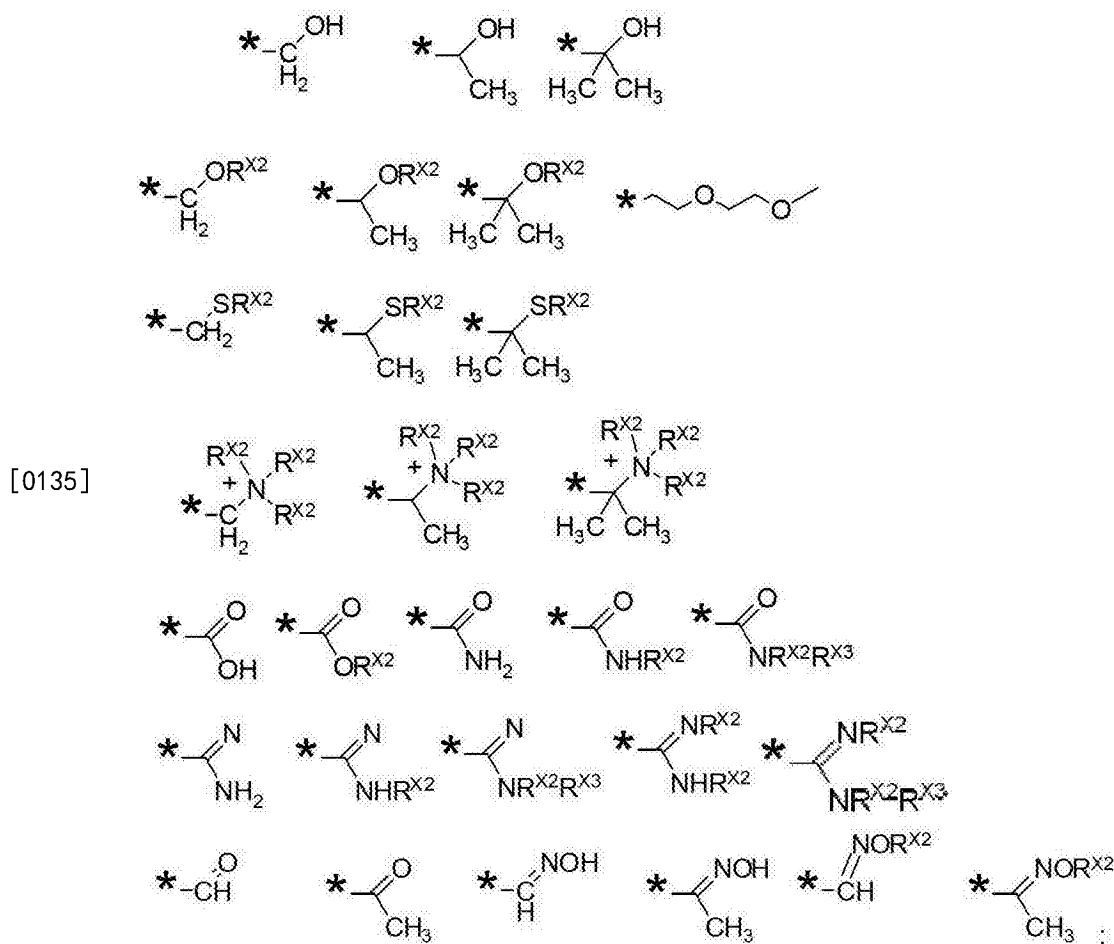
[0131]  可以被下述部分替代：碳环糖类似物、 α -异头糖、诸如阿拉伯糖、木

糖或来苏糖的差向异构糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和诸如甲基核苷的无碱基核苷类似物。在一些实施方案中，所述 胺选自包括、但不限于以下化合物的组：式 RNH_2 的化合物，其中

[0132] R选自 $-(CH_2)_n-R^{X1}$ ；

[0133] R^{X1} 选自：





[0136] *表示所述 R^{X1} 基团与 $(CH_2)_n$ 连接基的连接点

[0137] 其中

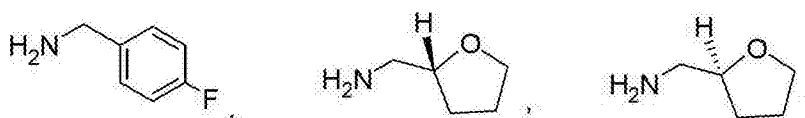
[0138] R^{X4} 选自：支链或直链低级烷基(C1-C20)；卤素(F、Cl、Br、I)；腈(CN)；硼酸(BO_2H_2)；羧酸($COOH$)；羧酸酯($COOR^{X2}$)；伯酰胺($CONH_2$)；仲酰胺($CONHR^{X2}$)；叔酰胺($CONR^{X2}R^{X3}$)；磺酰胺(SO_2NH_2)；N-烷基磺酰胺($SONHR^{X2}$)；

[0139] 其中

[0140] R^{X2} 和 R^{X3} 独立地选自：支链或直链低级烷基(C1-C20)；苯基(C_6H_5)； R^{X4} 取代的苯环($R^{X4}C_6H_4$)，其中 R^{X4} 如上面所定义；羧酸($COOH$)；羧酸酯($COOR^{X5}$)，其中 R^{X5} 是支链或直链低级烷基(C1-C20)；和环烷基，其中 $R^{X2}=R^{X3}=(CH_2)_n$ ；且

[0141] 其中 $n=0-10$ 。

[0142] 在特定的实施方案中，所述胺选自：

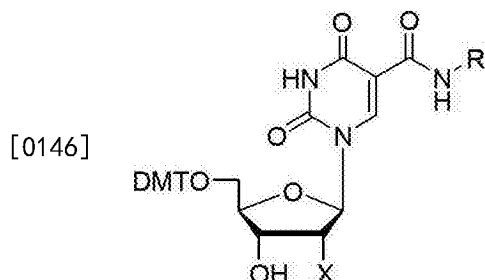


[0143]



[0144] 在一些实施方案中，所述碱是选自三乙胺、二异丙胺等的叔胺。

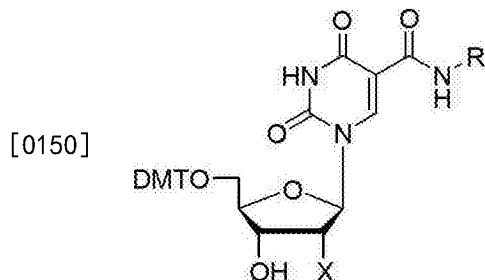
[0145] 参考路线1,本公开内容还提供用于合成C-5修饰的氨基羰基嘧啶的3'-亚磷酰胺的方法,所述方法包括:在碱的存在下,使所述C-5修饰的氨基羰基嘧啶与氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺反应;和分离所述3'-亚磷酰胺。在一些实施方案中,所述C-5修饰的氨基羰基嘧啶具有以下结构:



[0147] 其中R和X如上面所定义。在一些实施方案中,所述碱是选自三乙胺、二异丙胺等的叔胺。

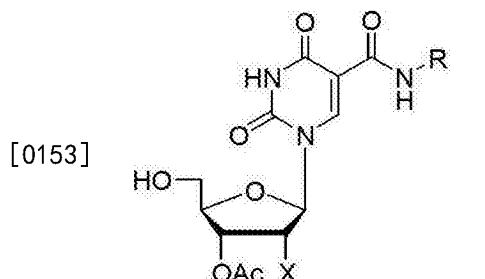
[0148] 再参考路线1,本公开内容还提供用于合成C-5修饰的氨基羰基嘧啶的5'-三磷酸酯的方法,所述方法包括:

[0149] a)在碱的存在下,使具有下式的C-5修饰的氨基羰基嘧啶与乙酸酐反应:



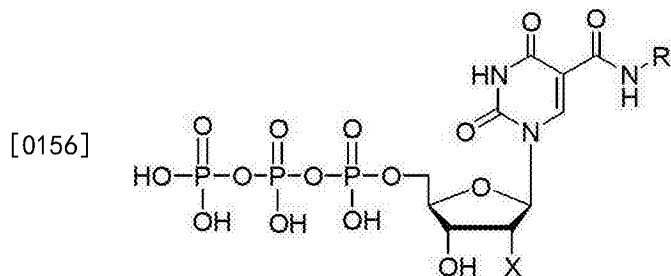
[0151] 其中R和X如上面所定义,

[0152] 随后用酸裂解5'-DMT基团,以形成具有以下结构的3'-乙酸酯:



[0154] b)对步骤a)的3'-乙酸酯进行Ludwig-Eckstein反应,继之以阴离子交换色谱;和

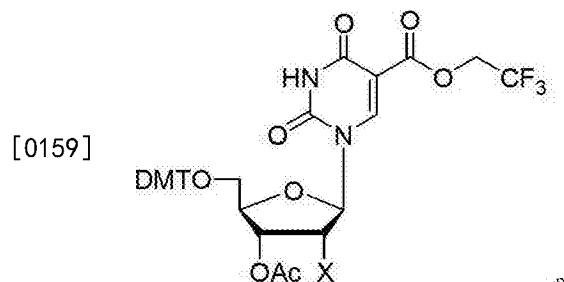
[0155] c)分离具有以下结构的C-5修饰的氨基羰基嘧啶的5'-三磷酸酯或其盐:



[0157] 使用的碱选自包括、但不限于叔胺的组。在一些实施方案中,所述碱是吡啶。在步

骤a中使用的酸选自包括、但不限于二氯乙酸、三氯乙酸和1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇的组：。

[0158] 在一个替代方案中,所述三氟乙氧基羰基嘧啶具有以下结构：



[0160] 参考路线2,通过在钯催化剂和碱的存在下使路线2的化合物(7)与一氧化碳和三氟乙醇反应,形成该化合物。所述碱选自包括、但不限于叔胺的组,所述叔胺选自三乙胺等。

[0161] 本公开内容包括通过上述方法中的每一种制备的化合物。

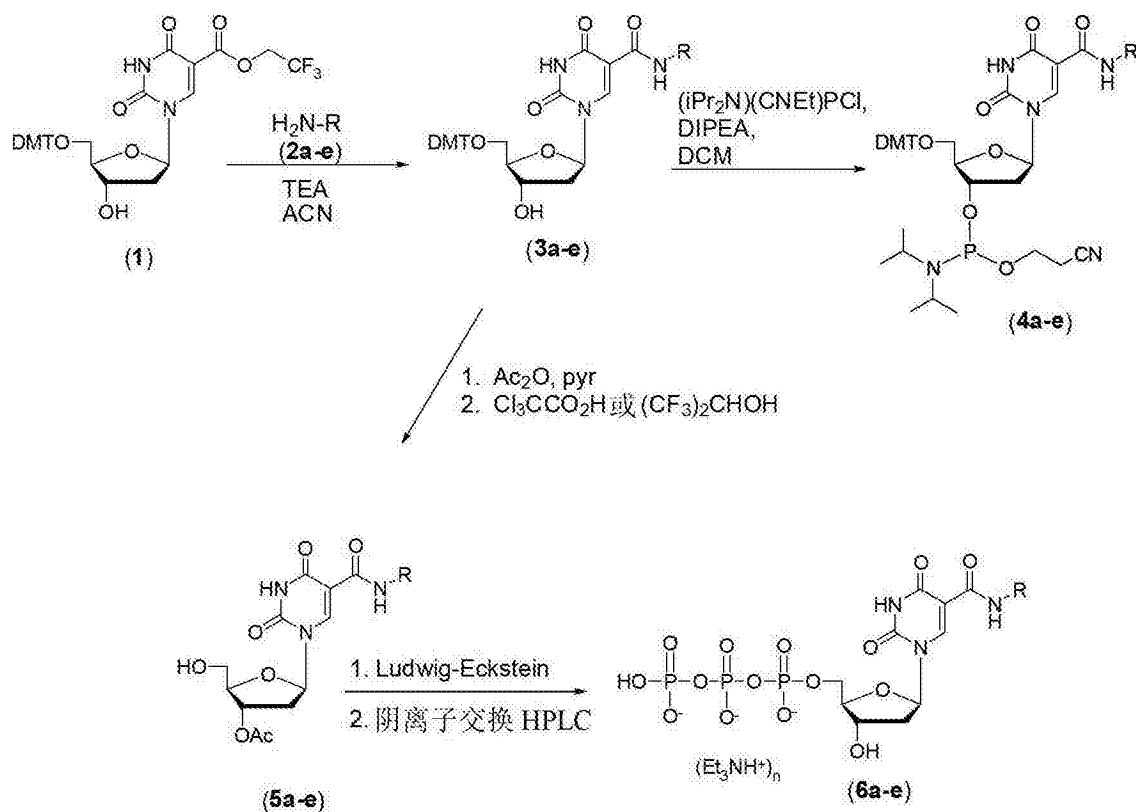
实施例

[0162] 下述实施例仅仅为了例证目的而提供,无意限制由所附权利要求限定的本发明的范围。使用本领域技术人员众所周知的且常规的标准技术,实现在本文中描述的所有实施例。可以如标准的实验室手册(诸如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,(2001))描述的那样实现在下述实施例中描述的常规分子生物学技术。

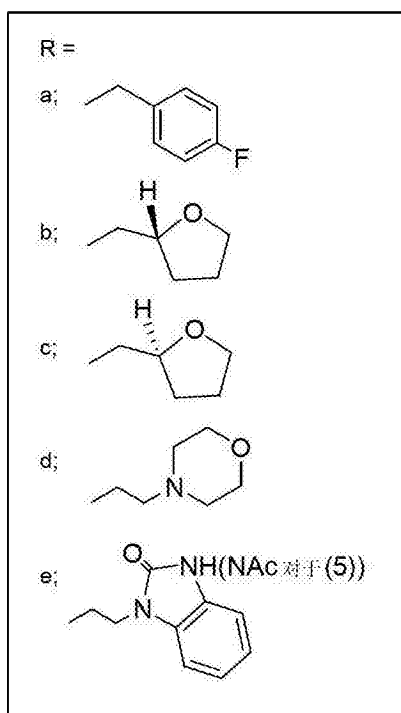
[0163] 使用下述的一般方法制备了在实施例1-3和5中描述的修饰的核苷。在本文中使用的命名法是基于Matsuda等人Nucleic Acids Research 1997, 25:2784-2791所述的系统。

[0164] 路线1

[0165]



[0166]



[0167] 实施例1.5'-O-DMT-dU-5-羧酰胺(3a-e)的合成

[0168] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-(4-氟苄基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷(3a)。通过Matsuda等人的方法(Nomura, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Research* 1997, **25**: 2784-2791; Ito, T., Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Research* 2003, **31**: 2514-2523)制备原料5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-三氟乙氧基羰基-2'-脱氧尿苷(1)。将(1)(9.85g, 15mmol)、4-氟苄胺(2a)(2.25g, 18mmol, 1.3当量)、三乙胺(4.2mL, 30mmol)和无水乙腈

(30mL)的溶液在惰性气氛下在60-70℃加热2-24小时。通过薄层色谱法(硅胶60,5%甲醇/二氯甲烷)或HPLC证实(1)向酰胺(3a)的定量转化。在真空中浓缩反应混合物,并使用在1%三乙胺/99%乙酸乙酯中的0-3%甲醇洗脱液,通过硅胶快速色谱法(Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A.J. Org. Chem. 1978, 43:2923)纯化残余物。合并含有纯产物的级分,并蒸发。通过与无水乙腈一起共蒸发,去除痕量的残余溶剂,随后在高真空下干燥,得到(3a),为白色固体(6.57g, 64%收率)。¹H-NMR(300MHz, CD₃CN) δ2.20-2.40(2H, m), 3.28(2H, d, J=4.3Hz), 3.76(6H, s), 4.01(1H, dd, J=3.8, 4.2Hz), 4.26-4.30(1H, m), 4.48(2H, bd, J=6.1Hz), 6.11(1H, t, J=6.5Hz), 6.85-7.46(13H, m), 7.03-7.36(4H, m), 8.58(1H, s), 9.01(1H, t, J=6.1Hz)。MS(m/z) C₃₈H₃₆FN₃O₈的计算值681.25;测量值680.4[M-H]⁻。

[0169] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-((R)-2-糠基甲基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷(3b)。如关于(3a)所述,使用(R)-2-糠基甲胺(2b)制备化合物(3b),并分离,为白色固体(9.3g, 94%收率)。色谱法的洗脱液是1%三乙胺/4%甲醇/95%乙酸乙酯。¹H-NMR(CD₃CN) δ1.51-1.57(1H, m), 1.84-1.94(3H, m), 2.18-2.38(2H, m), 3.25-3.52(4H, m重叠), 3.66-3.93(3H, m重叠), 3.78(6H, s), 3.97-4.02(1H, m), 4.24-4.29(1H, m), 6.12(1H, t, J=6.5), 6.86-7.47(13H, m), 8.54(1H, s), 8.83(1H, bs)。MS(m/z) C₃₆H₃₉N₃O₉的计算值657.27;测量值656.5[M-H]⁻。

[0170] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-((S)-2-糠基甲基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷(3c)。如关于(3b)所述,使用(S)-2-糠基甲胺(2c)制备化合物(3c),并分离,为白色固体(9.9g, 99%收率)。¹H-NMR(CD₃CN) δ1.50-1.59(1H, m), 1.84-1.95(3H, m), 2.18-2.40(2H, m), 3.24-3.50(4H, m重叠), 3.69-3.97(3H, m重叠), 3.78(6H, s), 3.98-4.02(1H, m), 4.25-4.30(1H, m), 6.14(1H, t, J=6.5), 6.87-7.47(13H, m), 8.54(1H, s), 8.84(1H, bs)。MS(m/z) C₃₆H₃₉N₃O₉的计算值657.27;测量值656.5[M-H]⁻。

[0171] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-(2-(4-吗啉代)乙基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷(3d)。如关于(3a)所述,使用2-(4-吗啉代)-乙胺(2d)制备化合物(3d),并分离,为白色固体(8.2g, 80%收率)。色谱法的洗脱液是5%甲醇/2%三乙胺/93%二氯甲烷。¹H-NMR(CD₃CN) δ2.21-2.39(2H, m), 2.39-2.41(4H, m), 2.48(2H, t, J=6.2Hz), 3.27-3.29(2H, m), 3.41(2H, dt, J=5.8, 6.2Hz), 3.61-3.64(4H, m), 3.78(6H, s), 3.98-4.02(1H, m), 4.25-4.30(1H, m), 6.10(1H, t, J=6.4), 6.86-7.47(13H, m), 8.55(1H, s), 8.79(1H, bt, J~6Hz)。MS(m/z) C₃₇H₄₂N₄O₉的计算值686.30;测量值685.7[M-H]⁻。

[0172] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-(2-(N-苯并咪唑酮基)乙基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷(3e)。如关于(3a)所述,使用N-苯并咪唑酮基-2-乙胺(2e)(CASRN64928-88-7)制备化合物(3e)。色谱法的洗脱液是2%甲醇/1%三乙胺/97%二氯甲烷。分离纯产物,为褐色固体(8.2g, 74.5%收率)。¹H-NMR(CD₃CN) δ2.20-2.36(2H, m), 3.27-3.29(2H, m), 3.60(2H, q, J=6.5Hz), 3.758(3H, s), 3.762(3H, s), 3.97(2H, t, J=6.5Hz), 3.98-4.02(1H, m), 4.27-4.30(1H, m), 6.09(1H, t, J=6.5Hz), 6.86-7.48(13H, m), 6.91-7.10(4H, m), 8.52(1H, s), 8.76(1H, t, J=6.1Hz)。MS(m/z) C₄₀H₃₉N₅O₉的计算值733.27;测量值732.0[M-H]⁻。

[0173] 实施例2.5'-O-DMT-核苷CE-亚磷酰胺(4a-4e)的合成

[0174] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-(4-氟苄基氨基羰基)-3'-O-[(2-氰基乙氧基)(N,N-二异丙基氨基)氧磷基]-2'-脱氧尿苷(4a)。在干燥的氩气氛下,将DMT-保护的核苷(3a)(4.00g, 5.9mmol)在无水二氯甲烷(40mL)中的溶液冷却至约-10℃。加入二异丙基乙胺

(3.1mL, 17.6mmol, 3当量), 随后逐滴加入2-氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺(1.7mL, 7.7mmol, 1.3当量)。将溶液搅拌1小时, 并通过薄层色谱法(硅胶60, 乙酸乙酯/己烷)证实反应结束。在冰冷的2%碳酸氢钠溶液(200mL)和乙酸乙酯(200mL)之间分配反应混合物。用盐水洗涤有机层, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 并浓缩。使用1%三乙胺/99%乙酸乙酯的流动相, 通过硅胶快速色谱法纯化残余物。合并含有纯产物的级分, 并在真空中蒸发(<30℃)。通过与无水乙腈一起共蒸发, 去除痕量的残余色谱溶剂, 并在高真空干燥, 得到(4a), 为白色稳定泡沫(4.10g, 80%收率)。¹H-NMR(CD₃CN, 2种异构体)δ1.02-1.16(12H, m), 2.27-2.57(2H, m), 2.51/2.62(2H, 2t, J=6.0/6.0Hz), 3.25-3.37(2H, m), 3.50-3.79(4H, m重叠), 3.738(3H, s), 3.742(3H, s), 4.13/4.16(1H, 2q, J=3.5/3.7Hz), 4.37-4.43(1H, m), 4.44-4.47(2H, m), 6.09/6.10(1H, 2t, J=6.4/7.1Hz), 6.83-7.44(13H, m), 7.01-7.30(4H, m), 8.58/8.60(1H, 2s), 8.98(1H, b, J~5.5Hz), 9.24(1H, bs)。³¹P-NMR(CD₃CN)δ148.01(s), 148.06(s)。¹⁹F-NMR(CD₃CN)δ-117.65(m)。MS(m/z)C₄₇H₅₃FN₅O₉P的计算值881.36; 测量值880.3[M-H]⁻。

[0175] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-((R)-2-糠基甲基氨基羰基)-3'-O-[(2-氰基乙氧基)(N,N-二异丙基氨基)氧磷基]-2'-脱氧尿苷(4b)。如关于(4a)所述, 制备化合物(4b)。分离非对映异构的亚磷酰胺的1:1混合物, 为白色固体泡沫(3.15g, 62%收率)。色谱法的洗脱液是1%三乙胺/20%己烷/79%乙酸乙酯。¹H-NMR(CD₃CN, 2种异构体)δ1.14-1.27(12H, m), 1.51-1.59(1H, m), 1.86-1.94(3H, m), 2.27-2.59(2H, m), 2.54/2.65(2H, 2t, J=6.0/5.7Hz), 3.27-3.38(2H, m), 3.44-3.97(9H, m重叠), 3.782(3H, s), 3.786(3H, s), 4.11-4.18(1H, m), 4.39-4.48(1H, m), 6.11/6.13(1H, 2t, J=5.6/6.1Hz), 6.96-7.47(13H, m), 8.58/8.60(1H, 2s), 8.75(1H, bt, J~5.4Hz), 9.36(1H, bs)。³¹P-NMR(CD₃CN)δ148.09(s), 148.13(s)。MS(m/z)C₄₅H₅₆N₅O₁₀P的计算值857.38; 测量值856.6[M-H]⁻。

[0176] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-((S)-2-糠基甲基氨基羰基)-3'-O-[(2-氰基乙氧基)(N,N-二异丙基氨基)氧磷基]-2'-脱氧尿苷(4c)。如关于(4b)所述, 制备化合物(4c)。分离非对映异构的亚磷酰胺的1:1混合物, 为白色固体泡沫(3.74g, 74%收率)。¹H-NMR(CD₃CN, 2种异构体)δ1.14-1.27(12H, m), 1.51-1.59(1H, m), 1.86-1.94(3H, m), 2.28-2.51(2H, m), 2.53/2.65(2H, 2t, J=6.0/6.0Hz), 3.25-3.41(2H, m), 3.44-4.14(9H, m重叠), 3.783(3H, s), 3.786(3H, s), 4.12-4.19(1H, m), 4.40-4.49(1H, m), 6.11/6.13(1H, 2t, J=6.3/6.3Hz), 6.86-7.48(13H, m), 8.58/8.60(1H, 2s), 8.75(1H, bt, J~5.4Hz), 9.36(1H, bs)。³¹P-NMR(CD₃CN)δ148.09(s), 148.13(s)。MS(m/z)C₄₅H₅₆N₅O₁₀P的计算值857.38; 测量值856.5[M-H]⁻。

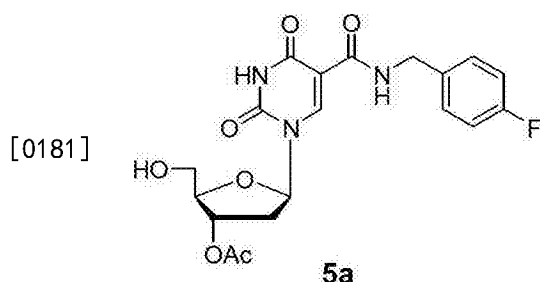
[0177] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-(2-(4-吗啉代)乙基氨基羰基)-3'-O-[(2-氰基乙氧基)(N,N-二异丙基氨基)氧磷基]-2'-脱氧尿苷(4d)。除了纯化使用1%三乙胺/5%无水乙醇/94%乙酸乙酯的色谱洗脱液以外, 如关于(4a)所述, 制备化合物(4d)。分离非对映异构的亚磷酰胺的1:1混合物, 为白色固体泡沫(3.9g, 75%收率)。¹H-NMR(CD₃CN, 2种异构体)δ1.04-1.19(12H, m), 2.28-2.59(2H, m), 2.43-2.47(6H, m重叠), 2.53/2.64(2H, 2t, J=6.2/6.2Hz), 3.27-3.76(8H, m重叠), 3.61-3.65(4H, m), 3.781(3H, s), 3.789(3H, s), 4.12-4.19(1H, m), 4.39-4.49(1H, m), 6.11/6.13(1H, 2t, J=5.2//5.2), 6.86-7.48(13H, m), 8.58/8.60(1H, 2s), 8.78(1H, bt, J~5.3Hz), 9.78(1H, bs)。³¹P-NMR(CD₃CN)δ148.08(s), 148.11(s)。MS(m/z)C₄₆H₅₉N₆O₁₀P的计算值886.4; 测量值885.7[M-H]⁻。

[0178] 5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-(2-(N-苯并咪唑酮基)乙基氨基羰基)-3'-O-[(2-氰

基乙氧基)(N,N-二异丙基氨基)氧磷基]-2'-脱氧尿苷(4e)。除了纯化使用1%三乙胺/10%无水甲醇/89%乙酸乙酯的色谱洗脱液以外,如关于(4a)所述,制备化合物(4e)。分离非对映异构的亚磷酰胺的1:1混合物,为白色固体泡沫(1.6g,31%收率)。¹H-NMR(CD₃CN,2种异构体) δ 1.03-1.18(12H,m),2.27-2.57(2H,m),2.52/2.63(2H,2t,J=6.0/6.0),3.27-3.37(2H,m),3.49-3.80(6H,m重叠),3.732(3H,s),3.735/3.738(3H,2s),4.00(2H,bt,J~6.0Hz),4.12-4.18(1H,m),4.30-4.47(1H,m),6.08/6.10(1H,2t,J=6.3/6.3Hz),6.85-7.48(13H,m),6.93-7.09(4H,m),8.57/8.60(1H,2s),8.82/8.83(1H,2bt,J~4.3/4.3Hz),9.48(1H,bs)。³¹P-NMR(CD₃CN) δ 148.07(s),148.10(s)。

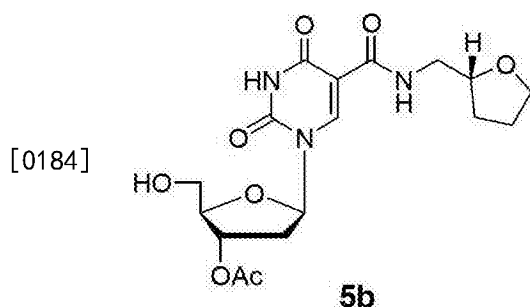
[0179] 实施例3.3'-O-乙酰基-核苷(5a-5e)的合成

[0180] 5-(4-氟苄基氨基羰基)-3'-O-乙酰基-2'-脱氧尿苷(5a)。



[0182] 将核苷(3a)(3.00g,4.4mmol)溶解于无水吡啶(30mL)和乙酸酐(3mL)的溶液中。将所述溶液搅拌过夜,并在真空中浓缩,得到3'-O-乙酰基-核苷。通过与无水甲苯(10mL)一起共蒸发,去除残余的溶剂。将残余物溶解于无水二氯甲烷(10mL)中,并用在二氯甲烷(58mL)中的3%三氯乙酸处理。将红色溶液搅拌过夜,在此期间产物结晶。将浆状物冷却至-20℃,过滤,并用乙醚洗涤。在真空中干燥残余物,得到(5a),为灰白色固体(1.10g,59%收率)。¹H-NMR(CD₃CN) δ 2.07(3H,s),2.33-2.38(1H,m),2.50-2.52(1H,m),3.63-3.64(2H,m),4.10(1H,bdd,J=3.1,5.1Hz),4.46(2H,d,J=6.0Hz),5.19-5.26(2H,m重叠),6.15(1H,t,J=7.0Hz),7.15(2H,tt,J=2.2,9.0Hz),7.31-7.38(2H,m),8.79(1H,s),9.14(1H,bt,J=6.1Hz),11.95(1H,bs)。¹⁹F-NMR(CD₃CN) δ -116.02(tt,J=5.5,9.0Hz)。⁺MS(m/z)C₁₉H₂₀FN₃O₇的计算值421.13;测量值419.8[M-H]⁻。

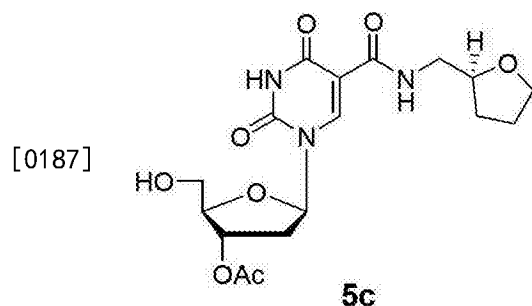
[0183] 5-((R)-2-糠基甲基氨基羰基)-3'-O-乙酰基-2'-脱氧尿苷(5b)。



[0185] 通过关于(5a)所述的方法,从(4b)制备化合物(5b),并通过从二氯甲烷和乙酸乙酯的混合物中沉淀来分离,为白色固体(1.27g,73%收率)。¹H-NMR(CDCl₃) δ 1.57-2.02(4H,m),2.12(3H,s),2.46-2.50(2H,m),3.03(1H,bs),3.43-3.64(2H,m),3.75-3.97(2H,m),3.78-4.10(3H,m),4.20-4.21(1H,m),5.40-5.42(1H,m),6.35(1H,dd,J=6.5,7.7Hz),8.91(1H,t,J=5.5Hz),9.17(1H,s),9.44(1H,bs)。⁺MS(m/z)C₁₇H₂₃N₃O₈的计算值397.15;测量值

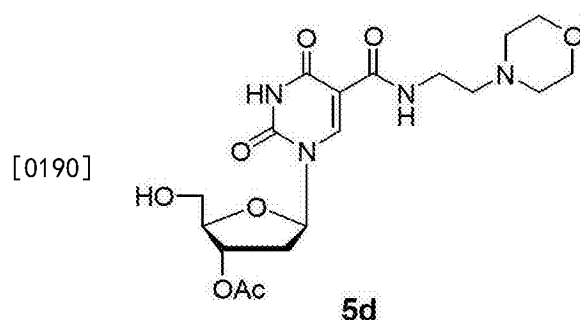
396.1[M-H]⁻。

[0186] 5-((S)-2-糠基甲基氨基羰基)-3'-O-乙酰基-2'-脱氧尿苷(5c)。



[0188] 通过关于(5a)所述的方法,从(4c)制备化合物(5c),并通过从二氯甲烷和乙醚的混合物中沉淀来分离,为浅橙色固体(1.35g,77%收率)。¹H-NMR(CDCl₃)δ1.57-2.03(4H,m), 2.12(3H,s),2.47-2.51(2H,m),2.98(1H,bs),3.40-3.68(2H,m),3.78-3.95(2H,m),3.90-4.12(3H,m),4.20-4.21(1H,m),5.39-5.42(1H,m),6.33(1H,dd,J=6.7,7.4Hz),8.90(1H,t,J=5.5Hz),9.15(1H,s),9.37(1H,bs)。MS(m/z)C₁₇H₂₃N₃O₈的计算值397.15;测量值395.9[M-H]⁻。

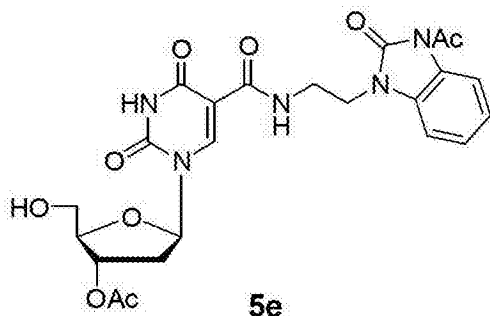
[0189] 5-(2-(4-吗啉代)乙基氨基羰基)-3'-O-乙酰基-2'-脱氧尿苷(5d)。



[0191] 将核苷(3d)(1.00g,1.37mmol)溶解于无水吡啶(10mL)和乙酸酐(1mL)的溶液中。将溶液搅拌过夜,并在真空中浓缩,得到3'-O-乙酰基-核苷。通过与无水甲苯(10mL)一起共蒸发,去除残余的溶剂。将残余物溶解于1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(20mL)(Leonard, N.J.Tetrahedron Letters,1995, 36:7833)中,并在约50℃加热3小时。通过薄层色谱法(tlc)证实DMT基团的完全裂解。通过将红色溶液混合物倒入充分搅拌的甲醇(200mL)中终止反应。在真空中浓缩得到的黄色溶液,并将残余物溶解于热的乙酸乙酯(20mL)中。在冷却后,产物结晶,并在-20℃老化得到的浆状物,随后过滤,并用乙酸乙酯洗涤。分离3'-O-乙酰基-核苷(5d),为白色固体(0.46g,79%收率)。¹H-NMR(DMSO-d₆)δ2.07(3H,s),2.32-2.45(7H,m重叠),2.49-2.52(1H,m),3.33-3.40(2H,m),3.57(4H,t,J=4.5Hz),3.60-3.63(2H,m),4.09(1H,bdd,J=3.2,5.2Hz),5.17-5.25(2H,m),6.14(1H,t,J=7.0Hz),8.74(1H,s),8.89(1H,bt,J=5.4Hz),11.90(1H,bs)。MS(m/z)C₁₈H₂₆N₄O₈的计算值426.18;测量值425.0[M-H]⁻。

[0192] 5-(2-(3-乙酰基-苯并咪唑酮-1-基)乙基氨基羰基)-3'-O-乙酰基-2'-脱氧尿苷(5e)。

[0193]

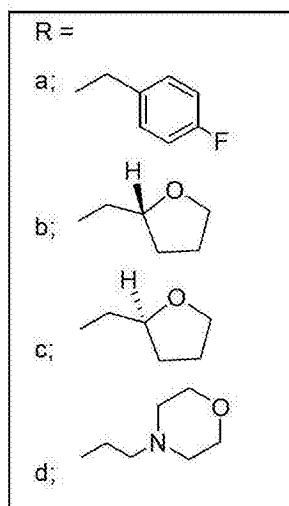
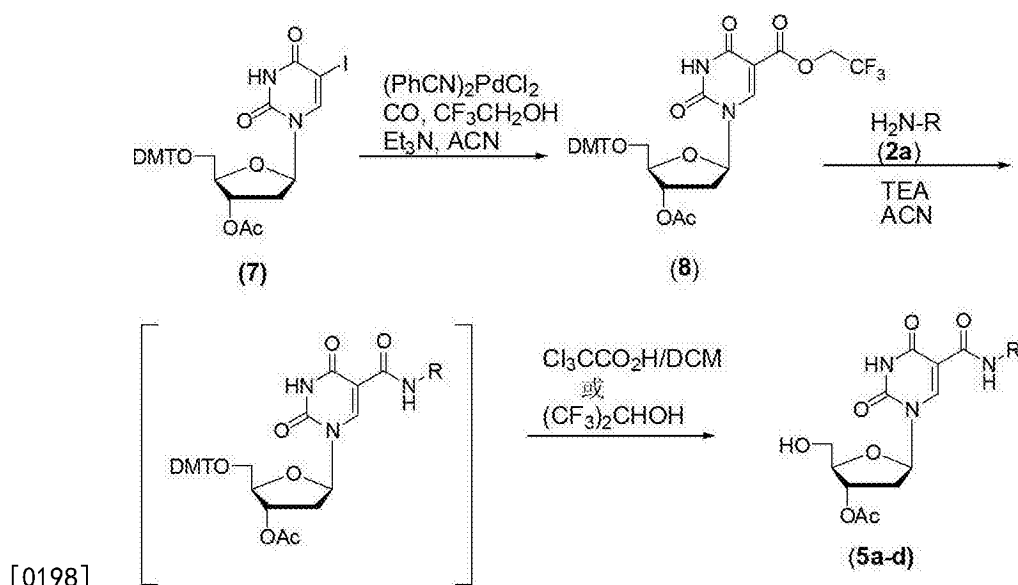


[0194] 除了在将DMT裂解反应物倒入甲醇中时产物直接结晶以外,如关于(5d)所述,制备化合物(5e)。通过过滤分离二乙酰基核苷(5e),为白色固体(0.55g,78%收率)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ2.07(3H, s), 2.30-2.37(1H, m), 2.49-2.52(1H, m), 2.63(3H, s) 3.33(1H, bs), 3.55-3.64(4H, m重叠), 3.99(2H, t, J=6.4Hz), 4.09(1H, bdd, J=2.3, 5.2Hz), 5.15-5.25(2H, m), 6.13(1H, dd, J=6.3, 7.6Hz), 7.11(1H, ddd, J=1.2, 7.6, 7.9Hz), 7.22(1H, ddd, J=1.2, 7.6, 7.9Hz), 7.33(1H, dd, J=0.8, 7.9Hz), 8.02(1H, dd, J=0.8, 8.0Hz), 8.05(1H, bs), 8.83(1H, bt), 8.71(1H, s), 11.87(1H, bs)。MS(m/z) C₂₃H₂₅N₅O₉的计算值515.17;测量值513.9[M-H]⁻。

[0195] 实施例4.3'-O-乙酰基-核苷(5a-5d)的替代性合成

[0196] 还通过一个替代性的途径(路线2),从原料3'-O-乙酰基-5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-碘-2'-脱氧尿苷(7)(Vaught, J.D., Bock, C., Carter, J., Fitzwater, T., Otis, M., Schneider, D., Rolando, J., Waugh, S., Wilcox, S.K., Eaton, B.E. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 4141-4151),合成3'-O-乙酰基-核苷(5a-d)。简而言之,参考路线2,钯(II)-催化的碘化物的三氟乙氧基羰基化得到活化的酯中间体(8)。使(8)与胺(2a-d)(1.3当量,三乙胺(3当量),乙腈,60-70℃,2-24小时)缩合,随后裂解5'-O-DMT保护基(3%三氯乙酸/二氯甲烷或1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇,室温),得到(5a-d),其与通过中间体(3a-d)(路线1)生成的产物相同。

[0197] 路线2



[0199] 3'-O-乙酰基-5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-(2,2,2-三氟乙氧基羰基)-2'-脱氧尿苷(8)。给500mL厚壁玻璃压力反应器充入氩,并装入3'-O-乙酰基-5'-O-二甲氧基三苯甲基-5-碘-2'-脱氧尿苷(7)(15.9g,22.8mmol)、无水乙腈(200mL)、三乙胺(7.6mL,54.7mmol)和2,2,2-三氟乙醇(16.4mL,228mmol)。剧烈搅拌得到的溶液,通过抽空脱气至<100mmHg持续2分钟。给烧瓶充入氩,并加入双(苄腈)二氯化钯(II)(175mg,0.46mmol)。将得到的黄色溶液再次脱气,然后从气体歧管充入一氧化碳(99.9%)(注意:毒气!)。维持1-10psi CO的压力,同时剧烈搅拌反应混合物,并在60-65℃加热12小时。过滤冷却的反应混合物(注意:毒气),以去除黑色沉淀物,并在真空中浓缩。在二氯甲烷(120mL)和10%碳酸氢钠(80mL)之间分配橙色残余物。用水(40mL)洗涤有机层,并经硫酸钠干燥,过滤,并浓缩,剩下橙色泡沫(17g)。该粗产物原样使用,或通过硅胶快速色谱法(使用30%己烷/1%三乙胺/69%乙酸乙酯洗脱液)进一步纯化,得到(8),为无色固体泡沫(12.7g,80%收率)。 $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{CN})$ δ 2.03(3H,s),2.37-2.56(2H,m),3.36-3.38(2H,m),3.78(6H,s),4.15-4.19(1H,m),4.37-4.55(2H,m),5.21-5.26(1H,m),6.09(1H,t,J=6.1Hz),6.84-7.46(13H,m),8.53(1H,s)。 $^{19}\text{F-NMR}(\text{CD}_3\text{CN})$ δ -74.07(t,J=8.8Hz)。MS(m/z) $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_{10}$ 的计算值698.21;测量值697.4[M-H]⁻。

[0200] 实施例5. 核苷5'-O-三磷酸酯的合成

[0201] 5-(4-氟苄基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷-5'-O-三磷酸酯(三-三乙基铵盐)(6a)。通过Ludwig和Eckstein的方法(Ludwig, J. 和Eckstein, F. J. Org. Chem. 1989, 54:631), 在500 μ mol规模(5x), 从3'-O-乙酰基-核苷(5a)合成三磷酸酯(6a)。如在一般方法(下文)中所述, 通过阴离子交换色谱法, 纯化在氨解和蒸发以后得到的粗三磷酸酯产物。

[0202] 三磷酸核苷的阴离子交换HPLC纯化的一般方法。使用HPLC柱, 通过阴离子交换色谱法, 纯化三磷酸核苷, 所述柱装有Source Q树脂(GE Healthcare), 安装在制备型HPLC系统上, 在278nm进行检测。线性洗脱梯度采用2种缓冲液(缓冲液A: 10mM三乙基碳酸氢铵/10%乙腈, 和缓冲液B: 1M三乙基碳酸氢铵/10%乙腈), 在洗脱过程中在环境温度从低缓冲液B含量至高缓冲液B运行所述梯度。希望的产物通常是最后从柱上洗脱的物质, 并显示为跨约10-12分钟保留时间的宽峰(较早洗脱的产物包括多种反应副产物, 最突出的是二磷酸核苷)。在产物洗脱过程中, 收集几个级分。通过在Waters 2795HPLC上的反相HPLC, 使用Waters Symmetry柱(PN: WAT054215)分析级分。在Genevac VC 3000D蒸发器中蒸发含有纯产物的级分(通常>90%), 得到无色至淡褐色树脂。在去离子水中重构级分, 并合并, 用于最终分析。通过使用Hewlett Packard 8452A二极管阵列分光光度计在278nm分析, 进行产物定量。经由方程式 $A = \epsilon CL$ 计算产物收率, 其中: A是紫外吸光度, ϵ 是估计的消光系数, L是光路长度(1cm)。

[0203] 将粗产物(6a)溶解于约5mL缓冲液A(表1: 制备型HPLC条件1)中。每次纯化注射包括: 将约1mL该溶液的过滤等分试样注射进具有486检测器的Waters 625HPLC中, 后者配有Resource Q 6mL柱(GE Healthcare产品代码: 17-1179-01), 以12mL/分钟, 使用0%-100%缓冲液B的流动相梯度, 洗脱50分钟。对于(6a) [$\epsilon_{278} = 13700 \text{ cm}^2 \text{ M}^{-1}$], 分离的纯化产物是130 μ mol (26%收率)。 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ 1.15(2H, t, J=7.3Hz), 2.32-2.37(2H, m), 3.07(18H, q, J=7.3Hz), 4.06-4.17(3H, m重叠), 4.42(2H, bd, J~0.7Hz), 4.49-4.53(1H, m), 4.70(>7H, bs, HOD), 6.12(1H, t, J=6.8Hz), 6.96-7.26(4H, m), 8.45(1H, s)。 $^{19}\text{F-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ -116.18(m)。 $^{31}\text{P-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ -10.58(d, J=20Hz), -11.45(d, J=20Hz), -23.29(t, J=20Hz)。MS(m/z) $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_{15}\text{P}_3$ 的计算值619.02; 测量值618.0[M-H] $^-$ 。

[0204] 表1. 制备型HPLC条件1

[0205]

流动相	A: 10 mM 三乙基碳酸氢铵/10%乙腈 B: 1 M 三乙基碳酸氢铵/10%乙腈
柱	Resource Q 6 mL
HPLC 系统	Waters 625HPLC/486 检测器
梯度(缓冲液 B 在流动相中的%)	0%-100%
运行时间/流速	50 分钟, 12 mL/分钟

[0206] 5-((R)-2-糠基甲基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷-5'-O-三磷酸酯(三-三乙基铵盐)

(6b)。如关于(6a)所述,从3'-O-乙酰基-核苷(5b)合成三磷酸酯(6b)。在具有Waters 2489检测器的Waters 2767制备型系统上,使用装有196mL Source 15Q树脂(GE Healthcare产品代码:17-0947-05)的Waters AP-5柱(Waters PN:WAT023331, 50mm x 100mm),以单次注射纯化粗产物(6b)。使用与上面相同的缓冲液,但是将洗脱梯度修改为25%至80%缓冲液B,以50mL/分钟洗脱90分钟(表2:制备型HPLC条件2)。在C18HPLC柱上进行第二次纯化,以去除残余的杂质(表4:制备型HPLC条件4)。对于(6b) [$\epsilon_{260}+10200\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$],分离的纯化产物是325 μmol (65%收率)。 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ 1.17(27H, t, J=7.3Hz), 1.49-1.63(1H, m), 1.77-2.02(3H, m), 2.34-2.39(2H, m), 2.85-3.83(5H, m重叠), 3.08(18H, q, J=7.3Hz), 4.01-4.19(3H, m重叠), 4.52-4.56(1H, m), 4.70(>7H, bs, HOD), 6.15(1H, t, J=6.8Hz), 8.48(1H, s)。 $^{31}\text{P-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ -10.50(d, J=20Hz), -11.51(d, J=20Hz), -23.25(t, J=20 Hz)。MS(m/z) $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_{16}\text{P}_3$ 的计算值595.04;测量值594.1[M-H] $^-$ 。

[0207] 表3.制备型HPLC条件3

[0208]

流动相	A: 10 mM 三乙基碳酸氢铵/10%乙腈 B: 1 M 三乙基碳酸氢铵/10%乙腈
柱	Resource Q 6 mL
HPLC 系统	Waters 625HPLC/486 检测器
梯度(缓冲液 B 在流动相中的%)	15%-60%
运行时间/流速	50 分钟, 12 mL/分钟

[0209] 5-((S)-2-糠基甲基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷-5'-O-三磷酸酯(三-三乙基铵盐)(6c)。如关于(6a)所述,从3'-O-乙酰基-核苷(5c)合成三磷酸酯(6c)。在具有Waters2489检测器的Waters2767制备型系统上,使用装有196mL Source15Q树脂(GE Healthcare产品代码:17-0947-05)的Waters AP-5柱(Waters PN:WAT023331, 50mm x100mm),以单次注射纯化粗产物(6c)。使用与上面相同的缓冲液,但是将洗脱梯度修改为25%至80%缓冲液B,以50mL/分钟洗脱90分钟(表2:制备型HPLC条件2)。在C18HPLC柱上进行第二次纯化,以去除残余的杂质(表4:制备型HPLC条件4)。对于(6c) [$\epsilon_{260}+10200\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$],分离的纯化产物是255 μmol (51%收率)。 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ 1.17(27H, t, J=7.3Hz), 1.49-1.63(1H, m), 1.78-2.01(3H, m), 2.34-2.39(2H, m), 2.85-3.82(5H, m重叠), 3.09(18H, q, J=7.3Hz), 4.01-4.19(3H, m重叠), 4.52-4.56(1H, m), 4.70(>7H, bs, HOD), 6.15(1H, t, J=6.7Hz), 8.48(1H, s)。 $^{31}\text{P-NMR}(\text{D}_2\text{O})$ δ -10.60(d, J=20Hz), -11.42(d, J=20Hz), -23.25(t, J=20Hz)。MS(m/z) $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_{16}\text{P}_3$ 的计算值595.04;测量值594.1[M-H] $^-$ 。

[0210] 5-(2-(4-吗啉代)乙基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷-5'-O-三磷酸酯(二-三乙基铵盐)(6d)。如关于(6a)所述,从3'-O-乙酰基-核苷(5d)合成三磷酸酯(6d)。使用与用于(6a)的相同的设备和缓冲液纯化粗产物(6d),但是将梯度修改为在50分钟洗脱内缓冲液B从15%至

60%,以提高产物的拆分(表3:制备型HPLC条件3)。对于(6d)[$\epsilon_{\text{碱}}+10200\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$],分离的纯化产物是 $54\mu\text{mol}$ (11%收率)。 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})\delta$ 1.17(18H,t,J=7.3Hz),2.37-2.41(2H,m),2.91-2.98(2H,m),3.09(12H,q,J=7.3Hz),3.20-3.27(4H,m),3.87-3.90(4H,m),3.63-3.68(2H,m),4.10-4.18(3H,m重叠),4.56-4.60(1H,m),4.70(>7H,bs,HOD),6.15(1H,bt,J=6.3Hz),8.48(1H,s)。 $^{31}\text{P-NMR}(\text{D}_2\text{O})\delta$ -9.99(d,J=21Hz),-11.90(d,J=20Hz),-23.19(t,J=20Hz)。MS(m/z) $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{P}_3$ 的计算值624.06;测量值623.1[M-H] $^-$ 。

[0211] 表2.制备型HPLC条件2

[0212]

流动相	A: 10 mM 三乙基碳酸氢铵/10%乙腈 B: 1 M 三乙基碳酸氢铵/10%乙腈
柱	装有 Source Q 196 mL 的 Waters AP-5
HPLC 系统	Waters 22767HPLC/2489 检测器
梯度(在流动相中的% 缓冲液 B)	25-80%
运行时间/流速	90 分钟, 50 mL/分钟

[0213] 表4.制备型HPLC条件4

[0214]

流动相	A: 100 mM 三乙基铵 B: 乙腈
柱	Waters Novapak C18, 19 mm x 300 mm
HPLC 系统	Waters 625HPLC/486 检测器
梯度(在流动相中的% 缓冲液 B)	10-25%
运行时间/流速	30 分钟, 8.5 mL/分钟

[0215] 5-(2-(N-苯并咪唑酮基)乙基氨基羰基)-2'-脱氧尿苷-5'-O-三磷酸酯(二-三乙基铵盐)(6e)。如关于(6a)所述,从3'-O-乙酰基-核苷(5e)合成三磷酸酯(6e)。使用与用于(6a)的相同的设备和缓冲液纯化粗产物(6e),但是将梯度修改为在50分钟洗脱内缓冲液B从15%至60%,以提高产物的拆分(表3:制备型HPLC条件3)。对于(6e)[$\epsilon_{\text{碱}}+13700\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$],分离的纯化产物是 $101\mu\text{mol}$ (20%收率)。 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})\delta$ 1.17(18H,t,J=7.3Hz),2.17-2.36(2H,m),3.09(12H,q,J=7.3Hz),3.60-3.73(2H,m),4.01(2H,t,J=5.4Hz),4.03-4.15(3H,m),4.45-4.50(1H,m),4.70(>7H,bs,HOD),6.04(1H,t,J=6.6Hz),6.95-7.12(4H,m),8.02(1H,s)。 $^{31}\text{P-NMR}(\text{D}_2\text{O})\delta$ -10.35(d,J=20Hz),-11.40(d,J=20Hz),-23.23(t,J=20Hz)。MS(m/z)

$C_{19}H_{24}N_5O_{16}P_3$ 的计算值671.04;测量值670.1[M-H]⁻。

[0216] 前述实施方案和实施例意图仅仅作作为实例。特定实施方案、实施例、或特定实施方案或实施例的元素都不应解释为任何权利要求的关键的、必需的或重要的元素或特征。进一步,在本文中描述的元素不是实践所附权利要求所必需的,除非明确地描述为“必需的”或“关键的”。对公开的实施方案可以进行各种改变、修改、替换和其它变化,而不背离所附权利要求限定的本发明的范围。说明书(包括实施例)应被认为是说明性的,而不是限制性的,而且所有这样的修改和替换意图包括在本发明的范围中。因此,本发明的范围应当由所附的权利要求和它们的法律等同方案(而不是又上面所给出的实施例)来确定。例如,在任何方法权利要求中叙述的步骤可以以任何可行的顺序来执行,并不限于在任何实施方案、实施例或权利要求中所表述的顺序。