



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102766630 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201210111246. 7

(22) 申请日 2007. 01. 27

(30) 优先权数据

60/762, 722 2006. 01. 27 US

60/805, 660 2006. 06. 23 US

(62) 分案原申请数据

200780010566. 0 2007. 01. 27

(71) 申请人 ISIS 制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 埃里克·E·斯威兹

普内特·P·塞思

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有

限公司 11111

代理人 杨颖 张一军

(51) Int. Cl.

*C12N 15/113* (2010. 01)

*C12N 5/00* (2006. 01)

*A61K 48/00* (2006. 01)

*A61P 43/00* (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 66 页

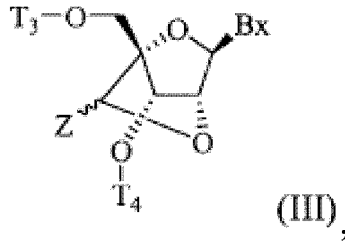
(54) 发明名称

6- 修饰的双环核酸类似物

(57) 摘要

本发明提供了 6- 修饰的双环核苷类似物以及包含这些核苷类似物的寡聚化合物。在优选的实施方案中该核苷类似物在 6 位具有 (R) 或 (S)- 手性。这种双环核苷类似物可用于提高寡聚化合物的性质包括核酸酶抗性。

1. 一种寡聚化合物,其具有至少一个具有式 III 的单体:



其中对每一个具有式 III 的单体独立而言:

Bx 是杂环碱基部分;

T<sub>3</sub> 为 H、羟基保护基团、联接的共轭基团或将具有式 III 的所述单体与所述寡聚化合物的单体亚基连接的核苷间联接基团;

T<sub>4</sub> 为 H、羟基保护基团、联接的共轭基团或将具有式 III 的所述单体与所述寡聚化合物的单体亚基连接的核苷间联接基团;

其中至少 T<sub>3</sub> 和 T<sub>4</sub> 之一为核苷间联接基团;且

Z 是 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基或取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基;且其中所述的取代基为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基;且

其中所述寡聚化合物包含长度为 8 到 40 的单体亚基,且其中所述寡聚化合物包含至少一个能与核酸分子杂交的区域。

2. 如权利要求 1 所述的寡聚化合物,其中各 Z 为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。

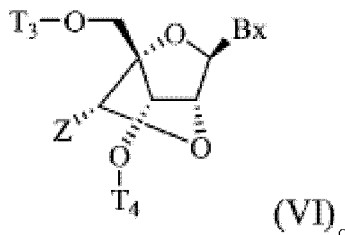
3. 如权利要求 2 所述的寡聚化合物,其中各 Z 为甲基。

4. 如权利要求 1 所述的寡聚化合物,其中各 Z 为取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基,其中所述的取代基为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基。

5. 如权利要求 4 所述的寡聚化合物,其中各取代基为 CH<sub>3</sub>O-。

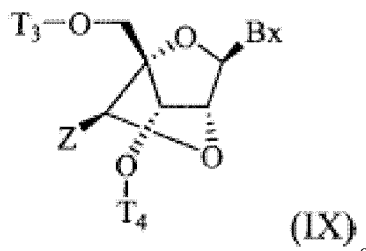
6. 如权利要求 4 所述的寡聚化合物,其中各 Z 为 CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-。

7. 如权利要求 1-6 任意一项所述的寡聚化合物,其中具有所述式 III 的至少一个单体具有如式 VI 所示的构型:



8. 如权利要求 7 所述的寡聚化合物,其中具有所述式 III 的各单体的各 Z 基团具有如式 VI 所示的构型。

9. 如权利要求 1-6 任意一项所述的寡聚化合物,其中具有所述式 III 的至少一个单体具有如式 IX 所示的构型:



10. 如权利要求 9 所述的寡聚化合物,其中具有所述式 III 的各单体的各 Z 基团具有如式 IX 所示的构型。

11. 如权利要求 1-10 任意一项所述的寡聚化合物,其中一个  $T_3$  为 H 或羟基保护基团。

12. 如权利要求 1-11 任意一项所述的寡聚化合物,其中一个  $T_4$  为 H 或羟基保护基团。

13. 如权利要求 1-12 任意一项所述的寡聚化合物,其包含至少一个由至少两个相邻的具有所述式 III 的单体组成的区。

14. 如权利要求 13 所述的寡聚化合物,其包含至少两个由至少两个相邻的具有所述式 III 的单体组成的区。

15. 如权利要求 14 所述的寡聚化合物,其包含有间隙的寡聚化合物。

16. 如权利要求 13 或 14 所述的寡聚化合物,其进一步包含至少一个由约 8 至约 14 个相邻的  $\beta$ -D-2'-脱氧核糖基核苷组成的区。

17. 如权利要求 16 所述的寡聚化合物,其进一步包含至少一个由约 9 至约 12 个相邻的  $\beta$ -D-2'-脱氧核糖基核苷组成的区。

18. 如权利要求 16 所述的寡聚化合物,其进一步包含至少一个由 8 至 10 个  $\beta$ -D-2'-脱氧核糖基核苷组成的区。

19. 如权利要求 1-18 任意一项所述的寡聚化合物,其包含长度为 8 至 20 个的核苷和/或修饰的核苷或模拟物。

20. 如权利要求 1-18 任意一项所述的寡聚化合物,其包含长度为 10 至 16 个的核苷和/或修饰的核苷或模拟物。

21. 如权利要求 1-18 任意一项所述的寡聚化合物,其包含长度为 10 至 14 个的核苷和/或修饰的核苷或模拟物。

22. 如权利要求 1-10 任意一项所述的寡聚化合物,其中  $T_3$  和  $T_4$  中至少一个包含选自磷酸二酯或硫代磷酸酯的核苷间连接基团。

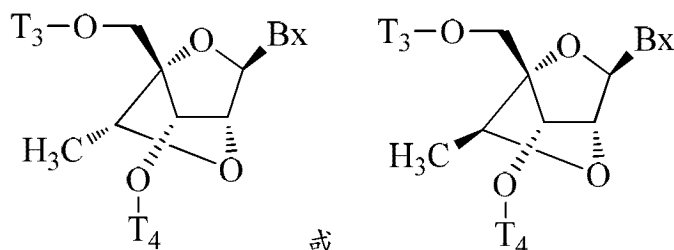
23. 如权利要求 1-22 任意一项所述的寡聚化合物,其中各核苷间连接基团独立地为磷酸二酯或硫代磷酸酯。

24. 如权利要求 1-22 任意一项所述的寡聚化合物,其中各核苷间连接基团为硫代磷酸酯。

25. 如权利要求 1-22 任意一项所述的寡聚化合物,其中各单体亚基为核苷和/或修饰的核苷或模拟物。

26. 如权利要求 25 所述的寡聚化合物,其中各修饰的核苷含有选自下组的修饰的糖基团:4'-硫代修饰的糖,双环修饰的糖,和具有 2'-F、2'-OCH<sub>3</sub>、或 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub> 取代基的取代糖。

27. 如权利要求 1-26 任意一项所述的寡聚化合物,其中至少一个具有所述式 III 的单体具有下式之一:



其中对各个具有所述式的单体独立而言：

B<sub>x</sub> 是尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤；

T<sub>3</sub> 和 T<sub>4</sub> 各自独立地是核苷间连接基团，但是当所述单体位于末端位置时，一个 T<sub>3</sub> 或一个 T<sub>4</sub> 是 H、羟基保护基团、或连接的共轭基团。

28. 如权利要求 27 所述的寡聚化合物，其中各个具有所述式 III 的单体具有相同的构型。

29. 如权利要求 1-28 任意一项所述的寡聚化合物在药物制备中的用途，所述药物用于抑制基因表达。

30. 如权利要求 29 所述的用途，其中所述药物用于在体内抑制基因表达。

31. 如权利要求 29 所述的用途，其中所述抑制基因表达包括用所述低聚化合物接触一种或多种细胞、组织或动物。

32. 一种在体外抑制基因表达的方法，其包括将一种或多种细胞或组织与如权利要求 1-28 任意一项所述的寡聚化合物接触。

33. 如权利要求 32 所述的方法，其中所述方法用于非诊断或治疗目的。

## 6- 修饰的双环核酸类似物

[0001] 本申请是申请号为 200780010566.0 (PCT/US2007/061183), 申请日为 2007 年 1 月 27 日的中国发明专利申请“6- 修饰的双环核酸类似物”的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请主张于 2006 年 1 月 27 日提交的题为“Substituted Bicyclic Nucleic Acid Analogs”的美国临时申请 60/762,722, 以及于 2006 年 6 月 23 日提交的题为“6-Substituted Bicyclic Nucleic Acid Analogs”的美国临时申请 60/805,660 的优先权, 这些披露的全文在此引用作为参考。

### 技术领域

[0004] 本发明提供了 6- 修饰的双环核苷及其制备的寡聚化合物和组合物。更具体而言, 本发明提供了具有 2' -O-C(H)(R)-4' 桥的核苷以及由其制备得到的寡聚物和组合物。在优选的实施方案中, R 具有形成 (R) 或 (S) 异构体的特定构型。在一些实施方案中, 本发明的寡聚化合物和组合物与靶标 RNA 的一部分杂交以使该靶标 RNA 丧失正常的功能。

### 背景技术

[0005] 反义技术是用于减少一种或多种特定基因产物表达的有效手段, 因而被证明在治疗、诊断和研究应用中具有独特的用途。化学修饰的核苷常用于整合入反义序列以增强一种或多种属性, 例如核酸酶抗性。一类这样的化学修饰包括双环核苷, 其中该核苷的呋喃糖部分包含了连接呋喃糖上两个原子以形成双环状环系统的桥。该种双环核苷具有各种名称, 包括对于双环核酸或锁核酸分别具有 BNA 和 LNA 的名称。

[0006] 各种 BNA 已得到制备, 并报道于专利文献和科技文献, 例如参见 Singh 等人, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin 等人, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar 等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Wengel 等人, PCT 国际申请 WO 98-DK393 19980914; Singh 等人, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039, 各文献的全文在此引用作为参考。已授权的美国专利和公布的申请的实例包括, 例如: 美国专利 7,053,207、6,770,748、6,268,490 和 6,794,499 以及公布的美国申请 20040219565、20040014959、20030207841、20040192918、20030224377、20040143114 和 20030082807; 各文献的全文在此引用作为参考。

[0007] 许多 LNA 具有毒性。例如, 参见 Swayze, E. E.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Migawa, M. T.; Wyrzykiewicz, T. K.; Hung, G.; Monia, B. P.; Bennett, C. F., *Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals*. *Nucl. Acids Res.*, doi:10.1093/nar/gkl1071 (2006 年 12 月, 提前在线出版)

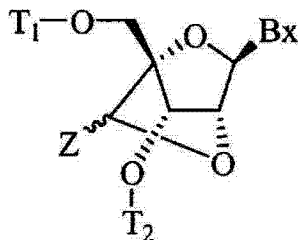
[0008] 因此, 对通过反义机制特异性调节基因表达的药剂仍有着长期需求。本文公开了可用于调节基因表达通路的 6- 取代的 BNA 和由其制备得到的反义化合物, 包括依赖于 RNA 酶 H、RNAi 和 dsRNA 酶等作用机制, 以及基于靶标降解或靶标占用的其它反义机制的调节。

本领域的技术人员在获知本公开内容后将能够在不进行过度实验的情况下鉴定、制备反义化合物和开发其用途。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供了具有下式的双环核苷：

[0011]



[0012] 其中：

[0013] Bx 是杂环碱基部分；

[0014] T<sub>1</sub> 是 H 或羟基保护基团；

[0015] T<sub>2</sub> 是 H、羟基保护基团或活性磷基团；

[0016] Z 是 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基、取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基、酰基、取代的酰基、或取代的酰胺。

[0017] 在一实施方案中，各被取代的基团独立地被任选被保护的取代基单或多取代，所述取代基独立地选自卤素、氧代、羟基、OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> 和 CN，其中各 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub> 和 J<sub>3</sub> 独立地为 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，X 是 O、S 或 NJ<sub>1</sub>。

[0018] 在一实施方案中，各被取代的基团独立地被取代基单或多取代，所述取代基独立地选自卤素、氧代、羟基、OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub> 和 NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> 的，其中各 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub> 和 J<sub>3</sub> 独立地为 H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基或取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，X 是 O 或 NJ<sub>1</sub>。

[0019] 在一实施方案中，Z 是 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基或取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，Z 是 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，Z 是甲基 (CH<sub>3</sub>-)。在另一实施方案中，Z 是乙基 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-)。在另一实施方案中，Z 是取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，Z 是取代的甲基。在另一实施方案中，Z 是取代的乙基。

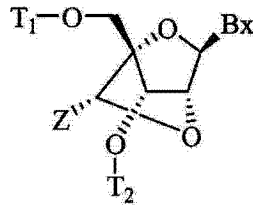
[0020] 在一实施方案中，该取代基为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基（例如，Z 是被一或多个 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基）。在另一实施方案中，该 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基取代基为 CH<sub>3</sub>O-（例如，Z 是 CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-）。在另一实施方案中，该 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基取代基可被进一步取代，例如 N(J<sub>1</sub>J<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>O-（例如，Z 是 N(J<sub>1</sub>J<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-）。在另一实施方案中，该取代基团为卤素（例如，Z 是被一或多个卤素取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基）。在另一实施方案中，该卤素取代基为氟（例如，Z 为 CH<sub>2</sub>FCH<sub>2</sub>-、CHF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- 或 CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-）。在另一实施方案中，该取代基为羟基（例如，Z 是被一或多个羟基取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基）。在另一实施方案中，Z 是 HOCH<sub>2</sub>-。在另一实施方案中，Z 是 CH<sub>3</sub>-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>F 或 HOCH<sub>2</sub>-。

[0021] 在一实施方案中，Z 基团为被一个或多个 X<sup>x</sup> 取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，其中各 X<sup>x</sup> 独立为 OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> 或 CN；其中各 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub> 和 J<sub>3</sub> 独立为 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，X 是 O、S 或 NJ<sub>1</sub>。在另一实施方案中，Z 基团为被一或多个 X<sup>x</sup> 取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，其中各 X<sup>x</sup> 独立为卤素（例如，氟）、羟基、烷氧基（例如，CH<sub>3</sub>O-）、取代的烷氧基或叠氮基。

[0022] 在一实施方案中, Z 基团为  $-\text{CH}_2\text{X}^x$ , 其中  $\text{X}^x$  为  $\text{OJ}_1$ 、 $\text{NJ}_1\text{J}_2$ 、 $\text{SJ}_1$ 、 $\text{N}_3$ 、 $\text{OC}(=\text{X})\text{J}_1$ 、 $\text{OC}(=\text{X})\text{NJ}_1\text{J}_2$ 、 $\text{NJ}_3\text{C}(=\text{X})\text{NJ}_1\text{J}_2$  或  $\text{CN}$ ; 其中各  $\text{J}_1$ 、 $\text{J}_2$  和  $\text{J}_3$  独立为  $\text{H}$  或  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷基,  $\text{X}$  是  $\text{O}$ 、 $\text{S}$  或  $\text{NJ}_1$ 。在另一实施方案中, Z 基团为  $-\text{CH}_2\text{X}^x$ , 其中  $\text{X}^x$  为卤素 (例如, 氟)、羟基、烷氧基 (例如,  $\text{CH}_3\text{O}-$ ) 或叠氮基。

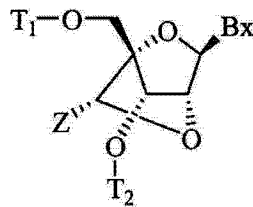
[0023] 在一实施方案中, Z 基团呈 (R)- 构型:

[0024]



[0025] 在另一实施方案中, Z 基团呈 (S)- 构型:

[0026]

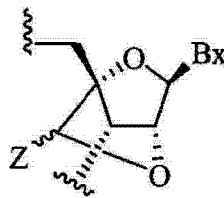


[0027] 在一实施方案中,  $\text{T}_1$  和  $\text{T}_2$  分别为羟基保护基团。羟基保护基团的优选列表包括苯甲基、苯甲酰基、2,6-二氯苯甲基、叔丁基二甲基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基、甲磺酸、甲磺酰基、二甲氧基三苯甲基 (DMT)、9-苯基黄嘌呤-9-基 (Pixyl) 以及 9-(对甲氧基苯基) 黄嘌呤-9-基 (MOX)。在一实施方案中,  $\text{T}_1$  为羟基保护基团, 该基团选自乙酰、苯甲基、叔丁基二甲基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基和二甲氧基三苯甲基, 其中更优选的羟基保护基团  $\text{T}_1$  为 4,4'-二甲氧基三苯甲基。

[0028] 在一实施方案中,  $\text{T}_2$  为活性磷基团, 其中优选的活性磷基团包括二异丙基氨基乙氧基亚磷酰胺和  $\text{H}$ -磷酸酯。在一优选的实施方案中,  $\text{T}_1$  为 4,4'-二甲氧基三苯甲基且  $\text{T}_2$  为二异丙基氨基乙氧基亚磷酰胺。

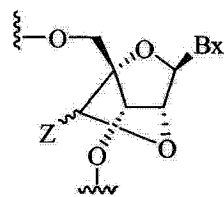
[0029] 本发明还提供了寡聚化合物, 其具有至少一个具有下式的单体:

[0030]



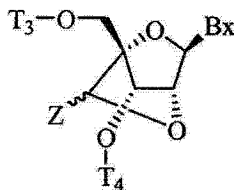
[0031] 或下式:

[0032]



[0033] 或下式:

[0034]



[0035] 其中：

[0036] Bx 是杂环碱基部分；

[0037] T<sub>3</sub> 为 H、羟基保护基团、联接的共轭基团或与核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、单体亚基或寡聚化合物连接的核苷间联接基团；[0038] T<sub>4</sub> 为 H、羟基保护基团、联接的共轭基团或与核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、单体亚基或寡聚化合物连接的核苷间联接基团；[0039] 其中 T<sub>3</sub> 和 T<sub>4</sub> 中至少一个为与核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、单体亚基或寡聚化合物连接的核苷间联接基团；且[0040] Z 是 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基、取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基、酰基、取代的酰基、取代的酰胺、硫醇或取代的硫。[0041] 在一实施方案中，各被取代的基团被任选被保护的取代基单或多取代，所述取代基独立地选自卤素、氧代、羟基、OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> 和 CN，其中各 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub> 和 J<sub>3</sub> 独立地为 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，X 是 O、S 或 NJ<sub>1</sub>。[0042] 在一实施方案中，各被取代的基团独立地被取代基单或多取代，所述取代基独立地选自卤素、氧代、羟基、OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、和 NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>，其中各 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub> 和 J<sub>3</sub> 独立地为 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，X 是 O 或 NJ<sub>1</sub>。[0043] 在一实施方案中，至少一个 Z 为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基或取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，各 Z 独立地为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基或取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，至少一个 Z 为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，各 Z 独立地为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，至少一个 Z 为甲基。在另一实施方案中，各 Z 均为甲基。在另一实施方案中，至少一个 Z 为乙基。在另一实施方案中，各 Z 均为乙基。在另一实施方案中，至少一个 Z 为取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，各 Z 分别独立为取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基。在另一实施方案中，至少一个 Z 为取代的甲基。在另一实施方案中，各 Z 均为取代的甲基。在另一实施方案中，至少一个 Z 为取代的乙基。在另一实施方案中，各 Z 均为取代的乙基。[0044] 在一实施方案中，至少一个取代基为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基（例如，至少一个 Z 是被一或多个 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基）。在另一实施方案中，各取代基独立为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基（例如，各 Z 独立地为被一或多个 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基）。[0045] 在一实施方案中，至少一个 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基取代基为 CH<sub>3</sub>O-（例如，至少一个 Z 是 CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-）。在另一实施方案中，各 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷氧基取代基均为 CH<sub>3</sub>O-（例如，各 Z 均为 CH<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>-）。[0046] 在一实施方案中，至少一个取代基为卤素（例如，至少一个 Z 是被一或多个卤素取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基）。在另一实施方案中，各取代基独立地为卤素（例如，各 Z 独立地为被一或多个卤素取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基）。在另一实施方案中，至少一个卤素取代基为氟（例如，至少一个 Z 为 CH<sub>2</sub>FCH<sub>2</sub>-、CHF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- 或 CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-）。在另一实施方案中，各卤素取代基均为氟（例如，各 Z 独立地为 CH<sub>2</sub>FCH<sub>2</sub>-、CHF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- 或 CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-）。



[0047] 在一实施方案中,至少一个取代基为羟基(例如,至少一个Z是被一或多个羟基取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)。在另一实施方案中,各取代基独立地为羟基(例如,各Z独立地为被一或多个羟基取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)。在另一实施方案中,至少一个Z为HOCH<sub>2</sub>-。在另一实施方案中,各Z均是HOCH<sub>2</sub>-。

[0048] 在一实施方案中,至少一个Z是CH<sub>3</sub>-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-、CH<sub>2</sub>F-或HOCH<sub>2</sub>-。在另一实施方案中,各Z独立地为CH<sub>3</sub>-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>-、CH<sub>2</sub>F-或HOCH<sub>2</sub>-。

[0049] 在一实施方案中,至少一个Z基团为被一或多个X<sup>x</sup>取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,其中各X<sup>x</sup>独立地为OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>或CN;其中各J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>和J<sub>3</sub>独立地为H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,X是O、S或NJ<sub>1</sub>。在另一实施方案中,至少一个Z基团为被一或多个X<sup>x</sup>取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,其中各X<sup>x</sup>独立地为卤素(例如,氟)、羟基、烷氧基(例如,CH<sub>3</sub>O-)或叠氮基。

[0050] 在一实施方案中,各Z基团独立地为被一或多个X<sup>x</sup>取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,其中各X<sup>x</sup>独立地为OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>或CN;其中各J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>和J<sub>3</sub>独立地为H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,X是O、S或NJ<sub>1</sub>。在另一实施方案中,各Z基团独立地为被一或多个X<sup>x</sup>取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,其中各X<sup>x</sup>独立地为卤素(例如,氟)、羟基、烷氧基(例如,CH<sub>3</sub>O-)或叠氮基。

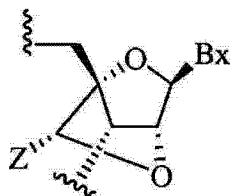
[0051] 在一实施方案中,至少一个Z基团为-CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>,其中X<sup>x</sup>为OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>或CN;其中各J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>和J<sub>3</sub>独立地为H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,X是O、S或NJ<sub>1</sub>。在另一实施方案中,至少一个Z基团为-CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>,其中X<sup>x</sup>为卤素(例如,氟)、羟基、烷氧基(例如,CH<sub>3</sub>O-)或叠氮基。

[0052] 在一实施方案中,各Z基团独立地为-CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>,其中各X<sup>x</sup>独立地为OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>或CN;其中各J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>和J<sub>3</sub>独立地为H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,X是O、S或NJ<sub>1</sub>。在另一实施方案中,各Z基团独立地为-CH<sub>2</sub>X<sup>x</sup>,其中各X<sup>x</sup>独立地为卤素(例如,氟)、羟基、烷氧基(例如,CH<sub>3</sub>O-)或叠氮基。

[0053] 在一实施方案中,至少一个Z为CH<sub>3</sub>-。在另一实施方案中,各Z均是CH<sub>3</sub>-。

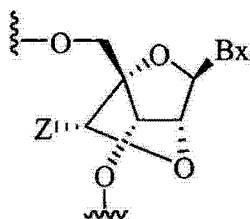
[0054] 在一实施方案中,至少一个单体的Z基团是由下式表示的(R)-构型:

[0055]



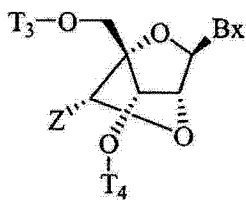
[0056] 或下式:

[0057]



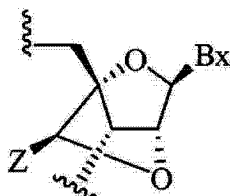
[0058] 或下式:

[0059]



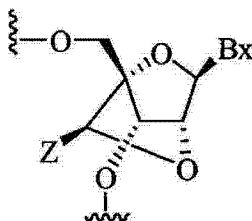
[0060] 在另一实施方案中,具有所述式的各单体的 Z 基团均为 (R)-构型。在一实施方案中,至少一个单体的 Z 基团是由下式表示的 (S)-构型:

[0061]



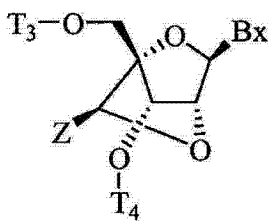
[0062] 或下式:

[0063]



[0064] 或下式:

[0065]

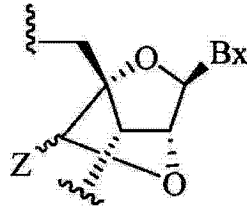


[0066] 在另一实施方案中,具有所述式的各单体的 Z 基团为 (S)-构型。

[0067] 在一实施方案中,  $T_3$  是 H 或羟基保护基团。在另一实施方案中,  $T_4$  是 H 或羟基保护基团。在进一步的实施方案中,  $T_3$  是与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间联接基团。在另一实施方案中,  $T_4$  是与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间联接基团。在另一实施方案中,  $T_3$  是与寡聚核苷或寡聚核苷酸连接的核苷间联接基团。在进一步的实施方案中,  $T_4$  是与寡聚核苷或寡聚核苷酸连接的核苷间联接基团。在一实施方案中,  $T_3$  是与寡聚化合物连接的核苷间联接基团。在进一步的实施方案中,  $T_4$  是与寡聚化合物连接的核苷间联接基团。在更进一步的实施方案中,  $T_3$  和  $T_4$  中至少一个包含了选自磷酸二酯或硫代磷酸酯的核苷间联接基团。

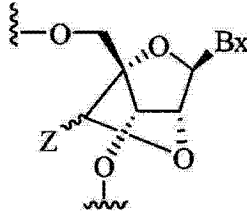
[0068] 在一实施方案中,寡聚化合物具有至少一个由至少两个具有下式的相邻单体构成的区域:

[0069]



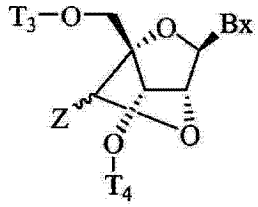
[0070] 或下式：

[0071]



[0072] 或下式：

[0073]



[0074] 在另一实施方案中，寡聚化合物包含至少两个由至少两个具有上式的相邻单体构成的区域。在另一实施方案中，该寡聚化合物包含了有间隙的 (gapped) 寡聚化合物。在另一实施方案中，该寡聚化合物包含至少一个由约 8 至约 14 个相邻  $\beta$ -D-2'-脱氧核糖基核苷构成的区域。在进一步的实施方案中，该寡聚化合物包含至少一个由约 9 至约 12 个相邻  $\beta$ -D-2'-脱氧核糖基核苷构成的区。

[0075] 在一实施方案中，该寡聚化合物包含至少一个由 2 至 3 个具有上式的相邻单体构成的区，任选的由具有上式的 1 或 2 个相邻单体构成的第二区以及由 8 至 14 个  $\beta$ -D-2'-脱氧核糖基核苷构成的第三区，其中所述第三区位于该第一和该第二区之间。在另一实施方案中，该寡聚化合物包含 8 至 10 个  $\beta$ -D-2'-脱氧核糖基核苷。

[0076] 在本发明的另一实施方案中，提供了具有长度为约 8 至约 40 个核苷和 / 或修饰的核苷或模拟物的寡聚化合物。在进一步的实施方案中，寡聚化合物包含了约 8 至约 20 个核苷和 / 或修饰的核苷或模拟物。在更进一步的实施方案中，寡聚化合物包含了约 10 至约 16 个核苷和 / 或修饰的核苷或模拟物。在另一实施方案中寡聚化合物包含了约 10 至约 14 个核苷和 / 或修饰的核苷或模拟物。

[0077] 本发明还提供了抑制基因表达的方法，其包括将一种或多种细胞、组织或动物与本发明的寡聚化合物接触。

[0078] 发明详述

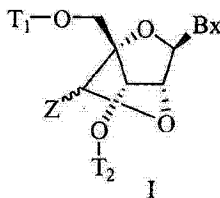
[0079] 本发明提供了 6- 修饰的双环核苷、由其制备的寡聚化合物及组合物、新的合成中间体，以及该核苷、寡聚化合物、组合物和新合成中间体的制备方法。更特定地，本发明提供了核苷，其在具有式 2'-O-C(H)(Z)-4' 的核糖部分的 4' 和 2' 位之间具有桥，以及由该核苷制备的寡聚体和组合物。在优选的实施方案中，Z 具有可形成 (R) 或 (S) 异构体的特定构型。在一些实施方案中，本发明的寡聚化合物和组合物经设计与靶标 RNA 的部分杂交。在

另一实施方案中,本发明的寡聚化合物可用于设计适体,该适体为能够在体内环境中结合异常蛋白的寡聚化合物。

[0080] 本发明的双环核苷可用于增强整合了它们的寡聚化合物的所需性质。本发明的寡聚化合物还可用作诊断应用中的引物和探针。在优选的实施方案中,本发明的6-修饰的双环核苷具有如下显示的结构:

[0081] 一方面,本发明提供了具有式 I 的双环核苷:

[0082]



[0083] 其中:

[0084] Bx 是杂环碱基部分;

[0085] T<sub>1</sub> 是 H 或羟基保护基团;

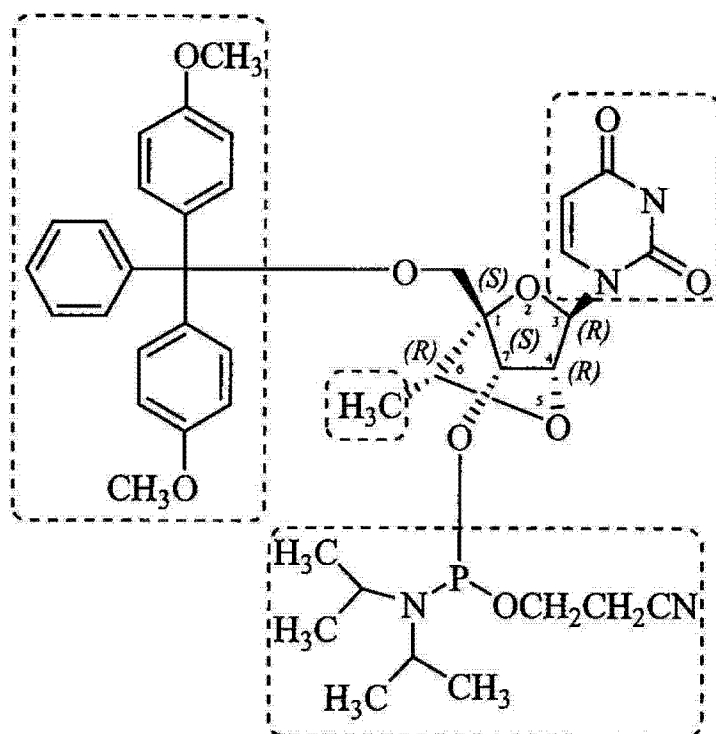
[0086] T<sub>2</sub> 是 H、羟基保护基团或活性磷基团;以及

[0087] Z 是 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基茛基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烯基茛基、取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、取代的 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> 炔基、取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基茛基、取代的 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烯基茛基、酰基、取代的酰基、取代的酰胺、硫醇、或取代的硫。

[0088] 在一实施方案中,各被取代的基团独立地被任选被保护的取代基单或多取代,所述取代基独立地选自卤素、氧代、羟基、OJ<sub>1</sub>、NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、SJ<sub>1</sub>、N<sub>3</sub>、OC(=X)J<sub>1</sub>、OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>、NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> 和 CN,其中各 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub> 和 J<sub>3</sub> 独立地为 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基,X 是 O、S 或 NJ<sub>1</sub>。

[0089] 在本发明的一方面中,制备的双环核苷具有正交保护的活性基团并进一步包含活性磷基团。该种双环核苷可用作寡聚体合成的单体。该种双环核苷单体的示范性例子具有下式:

[0090]



[0091] 其中由虚线框围绕的基团是可变的。在 6 位的基团还可制备为 S 构型（注意，根据基团的不同位置，对 R 和 S 的指定可因之而变化）。所显示的双环核苷单体一般被称为二甲氧基三苯甲基亚磷酰胺，或者更正式地采用 IUPAC 系统命名法为 (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2- 氰基乙氧基（二异丙基氨基）膦酰基]-1-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基氧甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲基-2, 5-二氧杂-双环 [2. 2. 1] 庚烷。

[0092] 本发明的 6- 修饰的双环核苷可用于在一个或多个位置修饰除此以外未经修饰的寡聚化合物。该种修饰的寡聚化合物可描述为具有特定的基序。适用于本发明的基序包括但不限于有间隙的基序、半修饰 (hemimer) 基序、阻断修饰 (blockmer) 基序、全修饰基序、定点修饰基序以及交替基序。结合这些基序，还可采用多种联接方式，包括但不限于统一或组合使用磷酸二酯和硫代磷酸酯联接。可简单优化 6- 修饰的双环核苷的定位和联接策略的使用以针对特定靶标形成最佳活性。指导制备代表性基序的代表性美国专利包括但不限于，5, 013, 830 ; 5, 149, 797 ; 5, 220, 007 ; 5, 256, 775 ; 5, 366, 878 ; 5, 403, 711 ; 5, 491, 133 ; 5, 565, 350 ; 5, 623, 065 ; 5, 652, 355 ; 5, 652, 356 ; 以及 5, 700, 922, 某些专利为与本申请共同拥有的申请或专利，其全文分别在此引用作为参考。基序还披露于 2005 年 6 月 2 日提交并于 2005 年 12 月 22 日公布为 WO 2005/121371 的国际申请 PCT/US2005/019219 以及于 2005 年 6 月 2 日提交并于 2005 年 12 月 22 日公布为 WO 2005/121372 的 PCT/US2005/019220 ; 其全文分别在此引用作为参考。

[0093] 术语“稳定的化合物”和“稳定的结构”指具有足够稳固性可从反应混合物分离至有用的纯度，并制成有效的治疗剂的化合物。本发明仅预期稳定的化合物。

[0094] 此处描述的化合物中选定的取代基以递归度表示。上下文中的“递归取代基”指一个取代基可以引用其本身的另一实例。由于该种取代基的递归性，理论上，在任意给定权利要求中可出现大量取代基。医药化学和有机化学领域的普通技术人员可理解该种取代基的总数受到靶标化合物的预期属性的合理限定。该种属性包括，例如但不限于，分子量、溶解性或 log P 等物理属性，靶向目的靶标的活性等应用属性，以及合成容易度等操作属性。

[0095] 递归取代基为本发明的目标方面。医药和有机化学领域的普通技术人员可以理解这样的取代基的多功能性。在本发明的权利要求所示的递归取代基的程度下,可根据上文所述确定其总数。

[0096] 此处所用的术语“烷基”指含有最多二十四个碳原子的饱和直链或支链烃基。烷基基团的实例包括,但不限于,甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、正己基、辛基、癸基、十二烷基等。烷基基团通常包含 1 至约 24 个碳原子,更通常包含 1 至约 12 个碳原子 ( $C_1$ - $C_{12}$  烷基),更优选包含 1 至约 6 个碳原子。此处所用的术语“低级烷基”包含 1 至约 6 个碳原子。此处所用的烷基可任选地包含一个或多个进一步的取代基。

[0097] 此处所用的术语“烯基”指含有最多二十四个碳原子并至少具有一个碳-碳双键的直链或支链烃基。烯基基团的实例包括,但不限于,乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基、如 1,3-丁二烯的二烯等。烯基基团通常包含 2 至约 24 个碳原子,更通常包含 2 至约 12 个碳原子,更优选包含 2 至约 6 个碳原子。此处所用的烯基可任选地包含一个或多个进一步的取代基。

[0098] 此处所用的术语“炔基”指含有最多二十四个碳原子并至少具有一个碳-碳三键的直链或支链烃基。炔基基团的实例包括,但不限于,乙炔基、1-丙炔基、1-丁炔基等。炔基基团通常包含 2 至约 24 个碳原子,更通常包含 2 至约 12 个碳原子,更优选包含 2 至约 6 个碳原子。此处所用的炔基可任选地包含一个或多个进一步的取代基。

[0099] 此处所用的术语“氨烷基”指氨基取代的烷基。该术语包括了在任何位置具有氨基取代基的  $C_1$ - $C_{12}$  烷基基团,其中该烷基基团将氨烷基连接至母体分子。氨烷基基团的烷基和 / 或氨基部分可以被取代基进一步取代。

[0100] 此处所用的术语“脂肪族”指最多包含二十四个碳原子的直链或支链烃基,其中任意两个碳原子之间的饱和度为单、双或三键。脂肪族基团优选包含 1 至约 24 个碳原子,更通常包含 1 至约 12 个碳原子,更优选包含 1 至约 6 个碳原子。脂肪族基团的直链或支链可被包括氮、氧、硫和磷等的一个或多个杂原子所中断。该种被杂原子中断的脂肪族基团包括但不限于聚烷氧基,例如聚亚烷基二醇、聚胺和聚亚胺。此处所用的脂肪族基团可任选地包括其它取代基。

[0101] 术语“脂环族的”指环状的环系统,其中该环为脂肪族环。该环系统可包含一个或多个环,其中至少一个环为脂肪族环。优选的脂肪族环包括环中具有约 5 至约 9 个碳原子的环。此处所用的脂肪族环可任选地包括其它取代基团。

[0102] 此处所用的术语“烷氧基”指在烷基基团和氧原子之间形成的基,其中该氧原子用于连接烷氧基基团和母体分子。烷氧基基团的实例包括,但不限于,甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、新戊氧基、正己氧基等。此处所用的烷氧基基团可任选地包括其它取代基团。

[0103] 此处所用的术语“卤素”指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0104] 此处所用的术语“芳基”和“芳香族的”指具有一个或多个芳环的单或多环碳环系统的基团。芳基基团的例子包括,但不限于,苯基、萘基、四氢化萘基、茛满基、茛基等。优选的芳基环系统在一个或多个环中具有约 5 至约 20 个碳原子。此处所用的芳基基团可任选地包括其它取代基团。

[0105] 此处所用的术语“芳烷基”指在烷基基团和芳基基团之间形成的基,其中该烷基基

团可用于连接芳烷基基团和母体分子。例子包括,但不限于,苯甲基、苯乙基等。此处所用的芳烷基基团可任选地包括与烷基、芳基或两者连接以形成基团的取代基。

[0106] 此处所用的术语“杂环基”指包括至少一个杂原子并且是不饱和、部分饱和或完全饱和的单或多环的环系统基团,因而包括了杂芳基。杂环还包括融合环系统,其中一种或多个融合环包含至少一个杂原子而其它环可包含一个或多个杂原子或任选地不包含杂原子。杂环基团通常包括至少一个选自硫、氮或氧的原子。杂环基团的实例包括,[1,3]二恶茂烷、吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、四氢噻唑基、异四氢噻唑基、喹啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基等。此处所用的杂环基团可任选地包括其它取代基。

[0107] 此处所用的术语“杂芳基”和“杂芳香族的”指包含单或多环芳环、环系统或融合环系统的基,其中至少一个环为芳环且包括一个或多个杂原子。杂芳基还包括例如融合环系统,其包含一个或多个不含杂原子的融合环的系统。杂芳基通常包括选自硫、氮或氧的一个环原子。杂芳基的例子包括,但不限于,吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、苯硫基、呋喃基、四氢喹啉基、异四氢喹啉基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、喹啉基等。杂芳基可直接或通过脂肪族基团或杂原子等连接部分连接至母体分子。此处所用的杂芳基任选地包括其它取代基。

[0108] 此处所用的术语“杂芳烷基”指具有可将杂芳烷基基团连接至母体分子的烷基的如前文定义的杂芳基。例子包括,但不限于,吡啶甲基、嘧啶乙基、萘啶基丙基等。此处所用的杂芳烷基基团可在杂芳环或烷基部分的一个或两者上任选地包括其它取代基团。

[0109] 本发明中采用的术语“单或多环结构”包括具有融合或联接的环的单或多环的所有环系统,并包括独立选自脂肪族、脂环族、芳基、杂芳基、芳烷基、杂环、杂芳基、杂芳香族、杂芳烷基的单环和混合环系统。该种单或多环结构可包含一致或变化的饱和度(包括完全饱和、部分饱和或完全不饱和)的环。各个环可包含选自C、N、O和S的环原子以形成杂环以及仅含有C环原子的环,其可表示为混合基序,例如,苯并咪唑,其中一个环仅具有碳环原子而融合环具有两个氮原子。单或多环结构可进一步被取代基取代,例如,具有连接至其中一个环的两个=O基的邻苯二甲酰亚胺。在另一方面,单或多环结构可直接通过环原子,通过取代基或双功能连接部分连接到母体分子。

[0110] 此处所用的术语“酰基”指从有机酸去除羟基基团并具有通式 $-C(O)-X$ 的基团,其中X通常为脂肪族、脂肪环族或芳香族。例子包括脂肪族羰基、芳香羰基、脂肪磺酰基、芳香亚磺酰基、脂肪族亚磺酰基、芳香磷酸酯、脂肪族磷酸酯。此处所用的酰基基团可任选地包括其它取代基。

[0111] 术语“烃基”包括包含C、O、H的基团。包括具有任意饱和度的直链、支链和环状基团。这样的烃基基团可包括一个或多个选自N、O和S的杂原子并可进一步被一或多个取代基单或多取代。

[0112] 此处所用的术语“取代基”包括通常添加至其它基团或母体化合物以增强所需性质或产生所需效果的基团。取代基可以是保护的或未保护的,并可添加至母体化合物的一个或多个可能的位点。取代基还可进一步被其它取代基所取代并且可以直接或通过联接基团(例如烷基或烃基基团)连接至母体化合物。该种基团包括但不限于卤素、羟基、烷基、烯基、炔基、酰基( $-C(O)R_{aa}$ )、羧基( $-C(O)O-R_{aa}$ )、脂肪族基团、脂肪环族基团、烷氧基、取代的

氧代 ( $-O-R_{aa}$ )、芳基、芳烷基、杂环基、杂芳基、杂芳烷基、氨基 ( $-NR_{bb}R_{cc}$ )、亚氨基 ( $=NR_{bb}$ )、氨基 ( $-C(O)N-R_{bb}R_{cc}$  或  $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$ )、叠氮基 ( $-N_3$ )、硝基 ( $-NO_2$ )、氰基 ( $-CN$ )、脲基 ( $-OC(O)NR_{bb}R_{cc}$  或  $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$ )、脲基 ( $-N(R_{bb})C(O)NR_{bb}R_{cc}$ )、硫脲基 ( $-N(R_{bb})C(S)NR_{bb}R_{cc}$ )、胍基 ( $-N(R_{bb})C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$ )、amidinyl ( $-C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$  或  $-N(R_{bb})C(NR_{bb})R_{aa}$ )、硫醇 ( $-SR_{bb}$ )、亚磺酰基 ( $-S(O)R_{bb}$ )、磺酰基 ( $-S(O)_2RH$ )、磺酰氨基 ( $-S(O)_2NR_{bb}R_{cc}$  或  $-N(R_{bb})-S(O)_2R_{bb}$ ) 以及共轭基团。其中  $R_{aa}$ 、 $R_{bb}$  和  $R_{cc}$  分别独立为 H, 任选联接的化学功能基团或进一步的取代基, 其优选列表包括但不限于 H、烷基、烯基、炔基、脂肪族、烷氧基、酰基、芳基、芳烷基、杂芳环、脂环族、杂环基和杂芳烷基。

[0113] 术语“氧代”指基团 ( $=O$ )。

[0114] 此处所述的化合物 (例如, 双环核苷) 可通过例如, 如下文实施例所示的任意有机合成的适用技术进行制备。众多该类技术已为本领域公知。多种已知技术列举于 Compendium of Organic Synthetic Methods (John Wiley&Sons, New York) 第 1 卷, Ian T. Harrison 和 Shuyen Harrison (1971); 第 2 卷, Ian T. Harrison 和 Shuyen Harrison (1974); 第 3 卷, Louis S. Hegedus 和 Leroy Wade (1977); 第 4 卷, Leroy G. Wade Jr., (1980); 第 5 卷, Leroy G. Wade Jr. (1984); 和第 6 卷, Michael B. Smith; 以及 March, J., Advanced Organic Chemistry, 第 3 版, John Wiley&Sons, New York (1985); Comprehensive Organic Synthesis. Selectivity, Strategy&Efficiency in Modern Organic Chemistry, 第 9 卷中, Barry M. Trost 主编, Pergamon Press, New York (1993); Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis, 第 4 版; Carey 和 Sundberg; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York (2001); Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure, 第 2 版, March, McGraw Hill (1977); Protecting Groups in Organic Synthesis, 第 2 版, Greene, T. W., 和 Wutz, P. G. M., John Wiley & Sons, New York (1991); 以及 Comprehensive Organic Transformations, 第 2 版, Larock, R. C., John Wiley&Sons, New York (1999)。

[0115] 在本发明的一方面中, 寡聚化合物可通过共价连接一个或多个共轭基团进行修饰。一般而言, 共轭基团可修饰所连接的寡聚化合物的一种或多种属性, 包括但不限于, 药效动力学、药代动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、储存和清除。共轭基团常用于化学领域并直接或通过任选联接部分或联接基团联接至诸如寡聚化合物等的母体化合物。共轭基团的优选列表包括但不限于, 嵌入剂、报告分子、多胺、聚酰胺、聚乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂肪、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、葱醌、金刚烷、吡啶、荧光素、若丹明、香豆素和染料。

[0116] 如本领域技术人员所知的联接基团或双功能联接部分可适用于本发明。联接基团可用于将化学功能基团、共轭基团、报告基团和其它基团连接至如寡聚化合物等母体化合物的选择性位点。一般而言, 双功能联接部分包含具有两个功能基团的烃部分。功能性基团之一被选择用于结合母体分子或靶标化合物, 而另一基团被选择用于主要结合任意选定基团, 例如化学功能性基团或共轭基团。在一些实施方案中, 该接头包含重复单元例如乙二醇或氨基酸单元的链结构或寡聚体。在双功能联接部分中常用的功能基团的实例包括, 但不限于, 用于与亲核基团反应的亲电试剂以及用于与亲电基团反应的亲核试剂。在一些实施方案中, 双功能联接部分包括氨基、羟基、羧酸、硫醇、不饱和性 (例如, 双或三键) 等。



双功能联接部分的部分非限制性实例包括 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (ADO)、琥珀酰亚胺 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸 (SMCC) 以及 6-氨基己酸 (AHEX 或 AHA)。其它的联接基团包括但不限于,取代的  $C_1$ - $C_{10}$  烷基、取代的或未取代的  $C_2$ - $C_{10}$  烯基或取代的或未取代的  $C_2$ - $C_{10}$  炔基,其中优选取代基的非限制性列表包括羟基、氨基、烷氧基、羧基、苯甲基、苯基、硝基、硫醇、硫烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基以及炔基。

[0117] 此处所用的术语“保护性基团”指如下所述的化学部分,其在本领域中已知可针对合成过程中不希望出现的反应来保护反应性基团(包括但不限于羟基、氨基和硫醇基等)。保护性基团通常可以选择性和/或正交采用以在其它活性位点的反应中保护位点,并可随后去除以留下不受保护的基团或供进一步反应。本领域已知的保护性基团一般描述于 Greene 和 Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版, John Wiley&Sons, New York (1999)。

[0118] 基团可作为前体选择性地结合至本发明的寡聚化合物。例如氨基基团可作为叠氮基团结合进本发明的化合物,并可在合成中理想的时间点被化学转化为氨基基团。一般来说,基团可被保护或作为前体存在,其对于修饰母体分子其它部位的反应呈现惰性,以在适当的时间转化成为其最终的基团。其它代表性保护或前体基团的讨论参见 Agrawal, 等人, *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, Eds, Humana Press; New Jersey, 1994; 第26卷,第1-72页。

[0119] 羟基保护基团的实例包括,但不限于,乙酰基、叔丁基、叔丁氧基甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、对氯苯基、2,4-二硝基苯基、苯甲基、2,6-二氯苯甲基、二苯基甲基、对硝基苯甲基、二(2-乙酰氧基乙氧基)甲基 (ACE)、2-三甲基硅烷基乙基、三甲基硅烷基、三乙基硅烷基、叔丁基二甲基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基、三苯基硅烷基、[(三异丙基硅烷基)氧基]甲基 (TOM)、苯甲酰甲酸盐、氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基、特戊酰基、苯甲酰基、对苯基苯甲酰基、9-芴甲基碳酸盐、甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐、三苯甲基 (trityl)、单甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基 (DMT)、三甲氧基三苯甲基、1(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基 (FPMP)、9-苯基黄嘌呤-9-基 (Pixyl) 以及 9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基 (MOX)。其中优选的羟基保护基团包括但不限于,苯甲基、2,6-二氯苯甲基、叔丁基二甲基硅烷基、叔丁基二苯基硅烷基、苯甲酰基、甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐、二甲氧基三苯甲基 (DMT)、9-苯基黄嘌呤-9-基 (Pixyl) 以及 9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基 (MOX)。

[0120] 氨基保护基团的实例包括但不限于,氨基甲酸盐保护基团,例如,2-三甲基硅烷基乙氧基羰基 (Teoc)、1-甲基-1-(4-联苯基)-乙氧基羰基 (Bpoc)、叔丁氧基羰基 (BOC)、烯丙氧基羰基 (Alloc)、9-芴甲基甲基氧基羰基 (Fmoc)、以及苯甲基氧基羰基 (Cbz); 酰胺保护基团,例如甲酰基、乙酰基、三卤代乙酰基、苯甲酰基、以及硝基苯基乙酰基; 磺酰胺保护基团,例如 2-硝基苯磺酰基; 以及亚胺和环状酰亚胺保护基团,例如苯二甲酰亚胺和二硫琥珀酰基。

[0121] 硫醇保护基团的实例包括,但不限于,三苯甲基 (trityl)、苯甲基 (Bn) 等。

[0122] 在一些优选的实施方案中,可以用任选被保护的含磷核苷间联接来连接核苷从而制备寡聚化合物。含磷核苷间联接(例如磷酸二酯和硫代磷酸酯联接)的代表性保护基团包括  $\beta$ -氰乙基、二苯基硅烷基乙基、 $\delta$ -氰丁烯基、氰对二甲苯基 (CPX)、N-甲基-N-三氟

乙酰乙基 (META)、乙酰氧基苯氧基乙基 (APE) 以及丁烯 -4- 基基团。例如参见美国专利号 4, 725, 677 以及 Re. 34, 069 ( $\beta$ - 氰乙基); Beaucage, S. L. 和 Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 49 No. 10, 第 1925-1963 页 (1993); Beaucage, S. L. 和 Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 49 No. 46, 第 10441-10488 页 (1993); Beaucage, S. L. 和 Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 48 No. 12, 第 2223-2311 页 (1992)。

[0123] 此处所用的术语“正交保护”指以不同类别的保护性基团保护的功能基团, 其中各类保护性基团可以按任意顺序并在所有其它类别存在的情况下去除 (例如, Barany, G. 和 Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 7363; *idem*, 1980, 102, 3084.)。正交保护已在例如自动寡核苷酸合成等领域得到了广泛应用。功能基团可在一种或多种不受去阻断过程影响的其它被保护功能基团的存在下被去阻断。该被去阻断的功能基团以某种形式反应, 且在某一时间点另一正交保护性基团在一组不同反应条件下被去除。这使得可以用选择性化学法获得所需的化合物或寡聚化合物。

[0124] 本发明提供了具有可用于形成核苷间联接 (包括例如磷酸二酯和硫代磷酸酯核苷间联接) 的活性磷基团的化合物。该种活性磷基团已为本领域所知并包含处于  $P^{III}$  或  $P^V$  价态的磷原子, 包括但不限于亚磷酰胺、H- 磷酸酯、磷酸三酯和含磷手性助剂。优选的合成固相合成采用亚磷酰胺 ( $P^{III}$  化学) 作为反应性亚磷酸。在优选的实施方案中, 中间体亚磷酸化合物随后通过已知的方法被氧化至  $P^V$  状态以获得磷酸二酯或硫代磷酸酯核苷间联接。其它的活性磷酸酯和亚磷酸披露于 *Tetrahedron Report Number 309* (Beaucage 和 Iyer, *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311)。

[0125] 可用于本发明的寡聚化合物的特定实例包括含有修饰的例如非天然的核苷间联接的寡核苷酸。通过磷原子的存在或缺失可定义核苷间联接的两个主要类别。具有磷原子的修饰的核苷间联接包括, 但不限于, 硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基和其它烷基磷酸酯包括 3' - 亚烷基磷酸酯、5' - 亚烷基磷酸酯以及手性磷酸酯、亚磷酸酯、氨基磷酸酯包括 3' - 氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯、硫羰基氨基磷酸酯、硫羰基烷基磷酸酯, 硫羰基烷基磷酸三酯、具有正常 3'-5' 键的硒代磷酸酯和硼代磷酸酯、它们的 2'-5' 联接的类似物, 以及具有反转极性的硒代磷酸酯和硼代磷酸酯, 其中一种或多种核苷酸间联接为 3' 至 3'、5' 至 5' 或 2' 至 2' 联接。具有反转极性的寡核苷酸可在 3' - 最末端核苷酸间联接包含单个 3' 至 3' 联接, 即, 可能是无碱基 (核苷碱基缺失或该位置被羟基取代) 的单个反转核苷残基。可包括多种盐、混合盐和游离酸的形式。

[0126] 指导制备上述含磷联接的代表性美国专利包括但不限于, 美国专利号: 3, 687, 808 ; 4, 469, 863 ; 4, 476, 301 ; 5, 023, 243 ; 5, 177, 196 ; 5, 188, 897 ; 5, 264, 423 ; 5, 276, 019 ; 5, 278, 302 ; 5, 286, 717 ; 5, 321, 131 ; 5, 399, 676 ; 5, 405, 939 ; 5, 453, 496 ; 5, 455, 233 ; 5, 466, 677 ; 5, 476, 925 ; 5, 519, 126 ; 5, 536, 821 ; 5, 541, 306 ; 5, 550, 111 ; 5, 563, 253 ; 5, 571, 799 ; 5, 587, 361 ; 5, 194, 599 ; 5, 565, 555 ; 5, 527, 899 ; 5, 721, 218 ; 5, 672, 697 以及 5, 625, 050, 其中某些专利为与本申请共同拥有的专利, 各专利全文在此引用作为参考。

[0127] 不具有磷原子的修饰的核苷间联接包括但不限于, 由短链烷基或环烷基核苷间联接、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间联接, 或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间联接

接构成的核苷间联接。这包括具有硅氧烷骨架；硫化物，亚砷和砷骨架；甲缩醛和硫甲缩醛骨架；亚甲基甲缩醛和硫甲缩醛骨架；核糖乙酰骨架；含烯烃骨架；氨基磺酸盐骨架；亚甲基亚胺和亚甲基胍基骨架；磺酸盐和磺酰胺骨架；酰胺骨架；和其它具有混合的 N, O, S 和 CH<sub>2</sub> 的组成部分的核苷间联接。

[0128] 指导制备上述寡核苷酸的代表性美国专利包括但不限于，美国专利号：5, 034, 506 ; 5, 166, 315 ; 5, 185, 444 ; 5, 214, 134 ; 5, 216, 141 ; 5, 235, 033 ; 5, 264, 562 ; 5, 264, 564 ; 5, 405, 938 ; 5, 434, 257 ; 5, 466, 677 ; 5, 470, 967 ; 5, 489, 677 ; 5, 541, 307 ; 5, 561, 225 ; 5, 596, 086 ; 5, 602, 240 ; 5, 610, 289 ; 5, 602, 240 ; 5, 608, 046 ; 5, 610, 289 ; 5, 618, 704 ; 5, 623, 070 ; 5, 663, 312 ; 5, 633, 360 ; 5, 677, 437 ; 5, 792, 608 ; 5, 646, 269 以及 5, 677, 439, 其中某些专利为与本申请共同拥有的专利，各专利全文在此引用作为参考。

[0129] 此处描述的化合物包含一个或多个不对称中心，并因此形成了对映体、非对映体以及其它立体异构形式，其从绝对立体化学的角度可定义为 (R)- 或 (S)-、 $\alpha$  或  $\beta$ 、或 (D)- 或 (L)- (如氨基酸)。本发明意在包括所有这些可能的异构体，以及它们的外消旋和光学纯形式。光学异构体可通过上述的过程由其相应的光学活性前体制备，或通过拆分外消旋混合物进行制备。该种拆分可在拆分剂的存在下，通过色谱或重复结晶或本领域技术人员已知的这些技术的组合进行。有关拆分进一步的细节可参见 Jacques, 等人, *Enantiomers, Racemates, and Resolutions* (John Wiley & Sons, 1981)。当此处所述的化合物包含烯烃双键、其它不饱和性或其它几何不对称中心时，除非另行指明，该化合物意在同时包括 E 和 Z 几何异构体或顺式 - 和反式 - 异构体。同样地，同样意在包括所有的互变异构形式。此处所示的任意碳 - 碳双键的构型仅为便利目的选择，若非文中指明，并非意在指定特定的构型；因此，此处任意描述的碳 - 碳双键或碳 - 杂原子双键可以是顺式、反式或任意比例的两者的混合物。

[0130] 本发明的上下文中的术语“寡聚化合物”指具有至少一个能与核酸分子杂交的区域的聚合物。术语“寡聚化合物”包括寡核苷酸、寡核苷酸类似物和寡核苷以及核苷酸模拟物和 / 或包含核酸和非核酸成分的混合聚合物。寡聚化合物通常可线性制备，但可连接或以其它方式制备成环状，且还可包括分支。寡聚化合物可形成双链构建体，例如，杂交形成双链组合物的双链。该双链组合物可连接或分离并可在末端包含悬端 (overhangs)。一般而言，寡聚化合物包含联接的单体亚基的骨架，其中每个联接的单体亚基直接或间接地连接至杂环碱基部分。寡聚化合物还可包括未联接至杂环碱基部分的单体亚基，从而提供非碱基位点。这些联接连接单体亚基、糖部分或替代物，且该杂环碱基部分可被独立修饰。包括或不包括杂环碱基的联接 - 糖单元可被肽核酸单体等模拟物取代。在寡聚化合物的各个位点修饰或取代部分或全部单体的能力可形成大量可能的基序。

[0131] 如本领域所知，核苷是碱基 - 糖组合。核苷的碱基部分通常为杂环碱基部分。该种杂环碱基最常见的两种类别为嘌呤和嘧啶。核苷酸为进一步包括了共价联接至核苷糖部分的磷酸基团的核苷。对于包含了呋喃戊糖的核苷，该磷酸基团可被联接至糖的 2'、3' 或 5' 羟基部分。在形成聚核苷酸时，该磷酸基团共价联接彼此相邻的核苷以形成线性聚合化合物。该线性聚合结构的相应末端可被连接以通过杂交或通过形成共价键得到环状结构，然而，通常希望开放的线性结构。在寡核苷酸结构中，磷酸基团通常形成寡核苷酸的核苷间联接。RNA 和 DNA 的常见核苷间联接为 3' 至 5' 磷酸二酯联接。

[0132] 在本发明的上下文中,术语“寡核苷酸”指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的寡聚体或聚合物。该术语包括由天然存在的核苷碱基、糖和共价核苷间联接构成的寡核苷酸。术语“寡核苷酸类似物”指具有一个或多个非天然存在部分的寡核苷酸。该种非天然存在的寡核苷酸由于其具有理想的性质而通常比天然存在的形式更理想,例如,提高的细胞摄取,对核酸靶标增强的亲和力以及在核酸酶存在下提高的稳定性。

[0133] 在本发明的上下文中,术语“寡核苷”指由不带磷原子的核苷间联接连接的核苷序列。该种类型的核苷间联接包括短链烷基、环烷基、混合杂原子烷基、混合杂原子环烷基、一或多种短链杂原子以及一或多种短链杂环。这些核苷间联接包括,但不限于,硅氧烷、硫化物、亚砷、砷、乙酰基、甲缩醛、硫 甲缩醛、亚甲基甲缩醛、硫甲缩醛、烯基、氨基磺酸盐、亚甲基亚胺基、亚甲基胍基、磺酸盐、磺酰胺、酰胺和其它具有混合的N、O、S和CH<sub>2</sub>的组成部分的核苷间联接。

[0134] 指导制备上述寡核苷酸的代表性美国专利包括但不限于,美国专利号:5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;5,792,608;5,646,269以及5,677,439,其中某些专利为与本申请共同拥有的专利,各专利全文在此引用作为参考。

[0135] 此处所用的术语“核苷碱基”或“杂环碱基部分”意在与“核酸碱基或其模拟物”同义。一般而言,核苷碱基为含有一个或多个能与核酸碱基氢联接结合的原子或原子组合的任意结构。

[0136] 此处所用的“未修饰的”或是“天然的”核苷碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核苷碱基包括其它合成的和天然的核苷碱基,例如,5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH<sub>3</sub>)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其它炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代特别是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基-腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-去氮鸟嘌呤和7-去氮腺嘌呤、3-去氮鸟嘌呤和3-去氮腺嘌呤、通用碱基、疏水碱基、混杂碱基、大小扩增碱基以及此处定义的氟化碱基。其它修饰的核苷碱基包括三环嘧啶如吩噻嗪胞嘧啶(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、吩噻嗪胞嘧啶(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、G型夹(G-clamps)例如取代的吩噻嗪胞嘧啶(例如9-(2-氨基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗪-2(3H)-酮)、咪唑胞嘧啶(2H-嘧啶并[4,5-b]咪唑-2-酮)、吡啶咪唑胞嘧啶(H-吡啶[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。修饰的核苷碱基还可包括以其它杂环取代嘌呤或嘧啶碱基的核苷碱基,例如7-去氮-腺嘌呤、7-去氮鸟苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。其它的核苷碱基包括披露于美国专利3,687,808的核苷碱基,披露于The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第858-859页,Kroschwitz,J.

I. 编, John Wiley&Sons, 1990 的核苷碱基; 披露于 Englisch 等人, *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613 的核苷碱基; 以及披露于 Sanghvi, Y. S., 第 15 章, *Antisense Research and Applications*, 第 289-302 页, Crooke, S. T. 和 Lebleu, B. 编, CRC Press, 1993 的核苷碱基。

[0137] 修饰的核苷碱基包括, 但不限于, 此处定义的通用碱基、疏水碱基、混杂碱基、大小扩增碱基以及氟化碱基。这些核苷碱基中部分可特别用于提高本发明的寡聚化合物的结合亲和力。这包括 5- 取代的嘧啶、6- 氮杂嘧啶以及 N-2、N-6 和 O-6 取代的嘌呤, 包括 2- 氨基丙基腺嘌呤、5- 丙炔基尿嘧啶和 5- 丙炔基胞嘧啶。5- 甲基胞嘧啶取代基已显示可以提高核酸双链稳定性 0.6-1.2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. 和 Lebleu, B. 编, *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, 第 276-278 页) 并且是目前优选的碱基取代基, 特别是在与 2'-O- 甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0138] 指导制备某些上述提到的修饰核苷碱基以及其它修饰的核苷碱基的代表性美国专利包括, 但不限于, 上述美国专利 3,687,808 以及美国专利 :4,845,205 ;5,130,302 ;5,134,066 ;5,175,273 ;5,367,066 ;5,432,272 ;5,457,187 ;5,459,255 ;5,484,908 ;5,502,177 ;5,525,711 ;5,552,540 ;5,587,469 ;5,594,121 ;5,596,091 ;5,614,617 ;5,645,985 ;5,830,653 ;5,763,588 ;6,005,096 ;以及 5,681,941, 其中某些专利为与本申请共同拥有的专利, 各专利全文在此引用作为参考; 以及美国专利 5,750,692, 其为与本申请共同拥有的专利, 并在此引用作为参考。

[0139] 本发明的寡聚化合物还可包含一种或多种具有修饰糖部分的核苷。呋喃糖环可以多种方式修饰, 包括以取代基取代, 桥连形成 BNA 以及以 S 或 N(R) 等杂原子取代 4'-O。指导该种修饰糖的制备的部分代表性美国专利包括, 但不限于, 美国专利 :4,981,957 ;5,118,800 ;5,319,080 ;5,359,044 ;5,393,878 ;5,446,137 ;5,466,786 ;5,514,785 ;5,519,134 ;5,567,811 ;5,576,427 ;5,591,722 ;5,597,909 ;5,610,300 ;5,627,053 ;5,639,873 ;5,646,265 ;5,658,873 ;5,670,633 ;5,792,747 ;5,700,920 ;6,600,032 以及于 2005 年 6 月 2 日提交并于 2005 年 12 月 22 日公布为 WO 2005/121371 的国际申请 PCT/US2005/019219, 其中一部分为与本申请共同拥有的申请或专利, 各文献全文在此引用作为参考。优选的修饰糖的代表性列表包括但不限于具有 2'-F、2'-OCH<sub>2</sub> 或 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub> 取代基的取代糖; 4'-硫代修饰的糖以及双环修饰的糖。

[0140] 此处所用的术语“核苷模拟物”意在包括那些用于替换寡聚化合物的一个或多个位点的糖或非联接的糖和碱基的结构, 例如, 具有吗啉或双环 [3.1.0] 己基糖模拟物 (例如, 具有磷酸二酯联接的非呋喃糖) 的核苷模拟物。术语“糖替代物”与含义更广的术语“核苷模拟物”略微重叠, 但仅指糖单元 (呋喃糖环) 的替换。术语“核苷酸模拟物”意在包括用于替换寡聚化合物的一个或多个位点的核苷和联接的结构, 例如, 肽核酸或吗啉 (被 -N(H)-C(=O)-O- 或其它非 - 磷酸二酯联接的吗啉)。

[0141] 如本发明所述的寡聚化合物可包含长度从约 8 至约 80 个的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域的普通技术人员将可理解本发明包含长度为 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个或其中任意范围的核苷和 / 或修饰

核苷或模拟物的寡聚化合物。

[0142] 在另一实施方案中,本发明的寡聚化合物为长度 8 至 40 个的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员将可理解其可具体为长度是 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 个或其中任意范围的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物的寡聚化合物。

[0143] 在另一实施方案中,本发明的寡聚化合物为长度 8 至 20 个的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员将可理解其可具体为长度是 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个或其中任意范围的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物的寡聚化合物。

[0144] 在另一实施方案中,本发明的寡聚化合物为长度 10 至 16 个的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员将可理解其可具体为长度是 10、11、12、13、14、15 或 16 或其中任意范围的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物的寡聚化合物。

[0145] 在另一实施方案中,本发明的寡聚化合物为长度 10 至 14 个的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员将可理解其可具体为长度是 10、11、12、13 或 14 个或其中任意范围的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物的寡聚化合物。

[0146] 嵌合寡聚化合物在两个或多个位置具有不同的修饰的核苷并通常定义为具有基序。本发明的嵌合寡聚化合物可形成上述两个或多个寡核苷酸、寡核苷酸类似物、寡聚核苷和 / 或寡核苷酸模拟物的复合结构。指导制备这样杂交结构的代表性美国专利包括,但不限于,美国专利:5,013,830;5,149,797;5,220,007;5,256,775;5,366,878;5,403,711;5,491,133;5,565,350;5,623,065;5,652,355;5,652,356;以及 5,700,922,其中某些专利为与本申请共同拥有的专利,各专利全文在此引用作为参考。

[0147] 本发明的一方面中,修饰和未修饰的核苷及其模拟物可参照文献描述的针对 DNA(Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal(1993), Humana Press) 和 / 或 RNA(Scaringe, Methods(2001), 23, 206-217; Gait 等人, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA:Protein Interactions, Ed. Smith(1998), 1-36; Gallo 等人, Tetrahedron(2001), 57, 5707-5713) 合成的适当方法进行寡聚。固相合成的其它方法可参见 Caruthers 的美国专利 4,415,732;4,458,066;4,500,707;4,668,777;4,973,679;和 5,132,418;以及 Koster 的美国专利 4,725,677 和 Re. 34,069。

[0148] 常规用于基于支持基质合成寡聚化合物和相关化合物的商业可获取设备已由多家供应商出售,包括,例如 Applied Biosystems(Foster City, CA)。本领域已知的任何其它该类合成方法均可另外或替代性采用。适用的固相技术(包括自动合成技术)的描述可见 F.Eckstein(编), Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, Oxford University Press, New York(1991)。

[0149] 随着对 RNAi 投入的增加, RNA 和相关类似物的合成相对于 DNA 和相关类似物的合成也逐渐增加。目前在商业上采用的初级 RNA 合成策略包括 5'-O-DMT-2'-O-叔丁基二甲硅烷基(TBDMS)、5'-O-DMT-2'-O-[1(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基](FPMP)、2'-O-[(三异丙基硅烷基)氧基]甲基(2'-O-CH<sub>2</sub>-O-Si(iPr)<sub>3</sub>(TOM)、以及 5'-O-硅醚-2'-ACE(5'-O-二(三甲基硅氧基)环十二烷氧基硅醚(DOD)-2'-O-二(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE)。目前提供 RNA 产品的主要的公司包括 Pierce Nucleic Acid Technologies、Dharmacon

Research 公司、Ameri Biotechnologies 公司和 Integrated DNA Technologies 公司。Princeton Separations 公司正在推广 RNA 合成活化剂,该活化剂据宣传可以特别针对 TOM 和 TBDMS 化学法减少偶合次数。该种活化剂也适用于本发明。

[0150] 用于商业 RNA 合成的初级基团为:

[0151] TBDMS=5'-O-DMT-2'-O-叔丁基二甲基硅烷基;

[0152] TOM=2'-O-[(三异丙基硅烷基)氧基]甲基;

[0153] DOD/ACE=(5'-O-二(三甲基硅氧基)环十二烷氧基硅醚-2'-O-二(2-乙酰氧基乙氧基)甲基

[0154] FPMP=5'-O-DMT-2'-O-[1(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基]。

[0155] 所有前述的 RNA 合成策略均适用于本发明。上述策略的混合(例如,采用一种策略中的 5'-保护基团和另一策略中的 2'-O-保护基团)通常可根据本发明而调整。

[0156] 在本发明的上下文中,“杂交”指寡聚化合物互补链的配对。在本发明中,一种配对机制涉及寡聚化合物链的互补核苷或核苷酸碱基(核苷碱基)之间的氢键结合,其可以是 Watson-Crick、Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 氢键结合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶为通过形成氢键进行配对的互补核苷碱基。杂交可在多种条件下进行。

[0157] 当寡聚化合物与靶标核酸的结合干扰靶标核酸的正常功能引起活性损失,且当具有足够程度的互补性以在希望产生特定结合的条件下(即,在体内测定或治疗时在生理条件下,以及在进行体外测定时在测定条件下)避免寡聚化合物和非靶标核酸序列的非特异性结合时,寡聚化合物具有特异可杂交性。

[0158] 此处所用的“互补性”指两个核苷碱基无论其所在位置精确配对的能力。例如,如果在寡聚化合物某位置的核苷碱基能够与靶标核酸(该靶标核酸为 DNA、RNA 或寡核苷酸分子)某位置的核苷碱基氢键结合,则寡核苷酸和靶标核酸之间的氢键结合的位置被认为是互补性位置。当各分子中的互补性位置被可以彼此以氢键结合的核苷碱基占据时,该寡聚化合物和该 DNA、RNA 或寡核苷酸分子彼此具有互补性。术语“特异可杂交性”和“互补性”是用于表示足够数量的核苷碱基中有足够精确的配对或互补程度、由此在寡核苷酸和靶标核酸之间形成稳定和特异性结合的术语。

[0159] 在本领域中可以理解寡聚化合物的序列不需要对其靶标核酸具有 100% 的互补性以达到特异可杂交性。此外,寡核苷酸可在一个或多个片段上杂交从而使中间的或邻近的片段不参与杂交(例如,环结构或发夹结构)。本发明的寡聚化合物对其靶向的靶标核酸序列中的靶标区域具有至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95% 或至少约 99% 的序列互补性。例如,当寡聚化合物中 20 个核苷中有 18 个与靶标区域互补,因而该寡聚化合物具有特异杂交性,则该寡聚化合物具有 90% 互补性。在该实例中,剩余的非互补性核苷碱基可以成簇或散布在互补性核苷碱基中,不需要彼此邻近或与互补性核苷碱基邻近。同样地,具有 4(四)个非互补性核苷碱基(其侧翼连接两个与靶标核酸完全互补的区域)的长度为 18 个核苷碱基的寡聚化合物对靶标核酸具有 77.8% 的总体互补性,并因此在本发明的范围之内。寡聚化合物与靶标核酸区域的互补性百分比可通过本领域已知的 BLAST 程序(基本局部比对搜索工具)和 PowerBLAST 程序常规测定(Altschul 等人, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang 和 Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)。

[0160] 本发明进一步包括了如反义寡聚化合物、反义寡核苷酸、核酶、外部指导序列

(EGS) 寡核苷酸、选择性剪切体、引物、探针等寡聚化合物,以及与靶标核酸的至少一个部分杂交的其它寡聚化合物。因此,这些寡聚化合物可以以单链、双链、环状或发夹寡聚化合物的形式引入,并可包含例如内部或末端突起或环的结构元件。本发明的寡聚化合物在引入系统后可引发一种或多种酶或结构蛋白的作用以实现靶标核酸的修饰。

[0161] 该种酶的非限制性实例之一为 RNA 酶 H,一种裂解 RNA:DNA 双链的 RNA 链的细胞内切酶。本领域已知“类 DNA”单链寡聚化合物引发 RNA 酶 H。RNA 酶 H 的激活可导致 RNA 靶标的裂解,从而大大增强寡核苷酸 - 介导的基因表达抑制的效率。其它的核糖核酸酶(例如属于 RNA 酶 III 和核糖核酸酶 L 酶家族的核糖核酸酶)也假定具有类似的作用。

[0162] 尽管寡聚化合物的一种形式为单链反义寡核苷酸,在许多物种中已显示引入双链结构(例如双链 RNA(dsRNA)分子)可以导致基因或其相关基因产物功能的强效和特异性反义介导的减少。该现象同时存在于植物和动物,并被认为是与病毒防御和转座子沉默具有进化联系。

[0163] 在一些实施方案中,在筛选可以调节所选定蛋白表达的其它寡聚化合物中可采用“适当的靶标片段”。“调节剂”为降低或提高编码蛋白的核酸分子表达、并且至少包含与适当靶标片段互补的 8-核苷碱基部分的寡聚化合物。该筛选方法包括将编码蛋白的核酸分子的适当靶标片段与一种或多种候选调节剂接触,并选择一种或多种提高或降低编码蛋白的核酸分子表达的候选调节剂的步骤。一旦显示候选调节剂能够调节(例如,提高或降低)编码肽的核酸分子表达,该调节剂可进一步用于肽功能的研究,或如本发明所述用作研究、诊断或治疗剂。

[0164] 本发明的适当靶标片段还可与其相应的本发明互补性反义寡聚化合物组合形成稳定的双链寡核苷酸。本领域已显示该种双链寡核苷酸部分可通过反义机制调节靶标表达并调节翻译和 RNA 加工。此外,对该双链部分还可进行化学修饰(Fire 等人, *Nature*, 1998, 391, 806-811; Timmons 和 Fire, *Nature* 1998, 395, 854; Timmons 等人, *Gene*, 2001, 263, 103-112; Tabara 等人, *Science*, 1998, 282, 430-431; Montgomery 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 15502-15507; Tuschl 等人, *Genes Dev.*, 1999, 13, 3191-3197; Elbashir 等人, *Nature*, 2001, 411, 494-498; Elbashir 等人, *Genes Dev.* 2001, 15, 188-200)。例如,这种双链部分已显示可通过双链的反义链与靶标进行经典杂交从而引发靶标的酶降解来抑制靶标(Tijsterman 等人, *Science*, 2002, 295, 694-697)。

[0165] 本发明的寡聚化合物还可用于药物开发和靶标确证领域。本发明包含了在药物开发中使用本发明的寡聚化合物和靶标以阐明蛋白和疾病状态、表型或症状之间存在的关系。这些方法包括检测或调节靶标肽,包括将样本、组织、细胞或生物体与本发明的寡聚化合物接触,在处理一段时间后检测靶标核酸或蛋白水平和/或相关的表型或化学终点,并任选地将测量值与未处理样本或以本发明其它寡聚化合物处理的样本进行比较。这些方法可以平行进行或与其它实验组合进行,以确定靶标确证过程中未知基因的功能,或者测定特定基因产物作为治疗或预防特定疾病、症状或表型的靶标的有效性。

[0166] 核苷修饰对 RNAi 活性的作用参照现有文献进行了评估(Elbashir 等人, *Nature* (2001), 411, 494-498; Nishikura 等人, *Cell* (2001), 107, 415-416; 以及 Bass 等人, *Cell* (2000), 101, 235-238)。



[0167] 本发明的寡聚化合物可用于诊断、治疗、预防,并可作为研究试剂和试剂盒。此外,能特异性抑制基因表达的反义寡核苷酸也常被本领域的普通技术人员用来阐明特定基因的功能或区分生物通路各种组分的功能。

[0168] 对于试剂盒或诊断应用,单独或与其它寡聚化合物或治疗剂联合使用的本发明寡聚化合物可用作差异性和/或组合分析的工具,以阐明在细胞和组织内表达的基因的部分或完整互补体的表达模式。

[0169] 作为一个非限制性实例,以一种或多种寡聚化合物处理的细胞或组织的表达模式可与未以寡聚化合物处理的对照细胞或组织进行比较,并分析各模式基因表达的差异水平,它们与例如疾病关联性、信号转导途径、细胞定位、以及所检测基因的表达水平、大小、结构或功能有关。这些分析可在影响表达模式的其它化合物和/或寡聚化合物存在或不存在的条件下对刺激或未刺激细胞进行。

[0170] 本领域已知的基因表达分析方法的实例包括 DNA 阵列或微阵列 (Brazma 和 Vilo, FEBS Lett., 2000, 480, 17-24; Celis 等人, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16)、SAGE (基因表达系列分析) (Madden 等人, Drug Discov. Today, 2000, 5, 415-425)、READS (消化的 cDNA 的限制性酶扩增) (Prashar 和 Weissman, Methods Enzymol., 1999, 303, 258-72)、TOGA (总基因表达分析) (Sutcliffe 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 1976-81)、蛋白阵列和蛋白组学 (Celis 等人, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Jungblut 等人, Electrophoresis, 1999, 20, 2100-10)、表达序列标记 (EST) 序列 (Celis 等人, FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson 等人, J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57)、消减 RNA 指纹 (SuRF) (Fuchs 等人, Anal. Biochem., 2000, 286, 91-98; Larson 等人, Cytometry, 2000, 41, 203-208)、消减克隆、差异展示 (DD) (Jurecic 和 Belmont, Curr. Opin. Microbiol., 2000, 3, 316-21)、比较基因组杂交 (Carulli 等人, J. Cell Biochem. Suppl., 1998, 31, 286-96)、FISH (荧光原位杂交) 技术 (Going 和 Gusterson, Eur. J. Cancer, 1999, 35, 1895-904) 以及质谱方法 (To, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2000, 3, 235-41)。

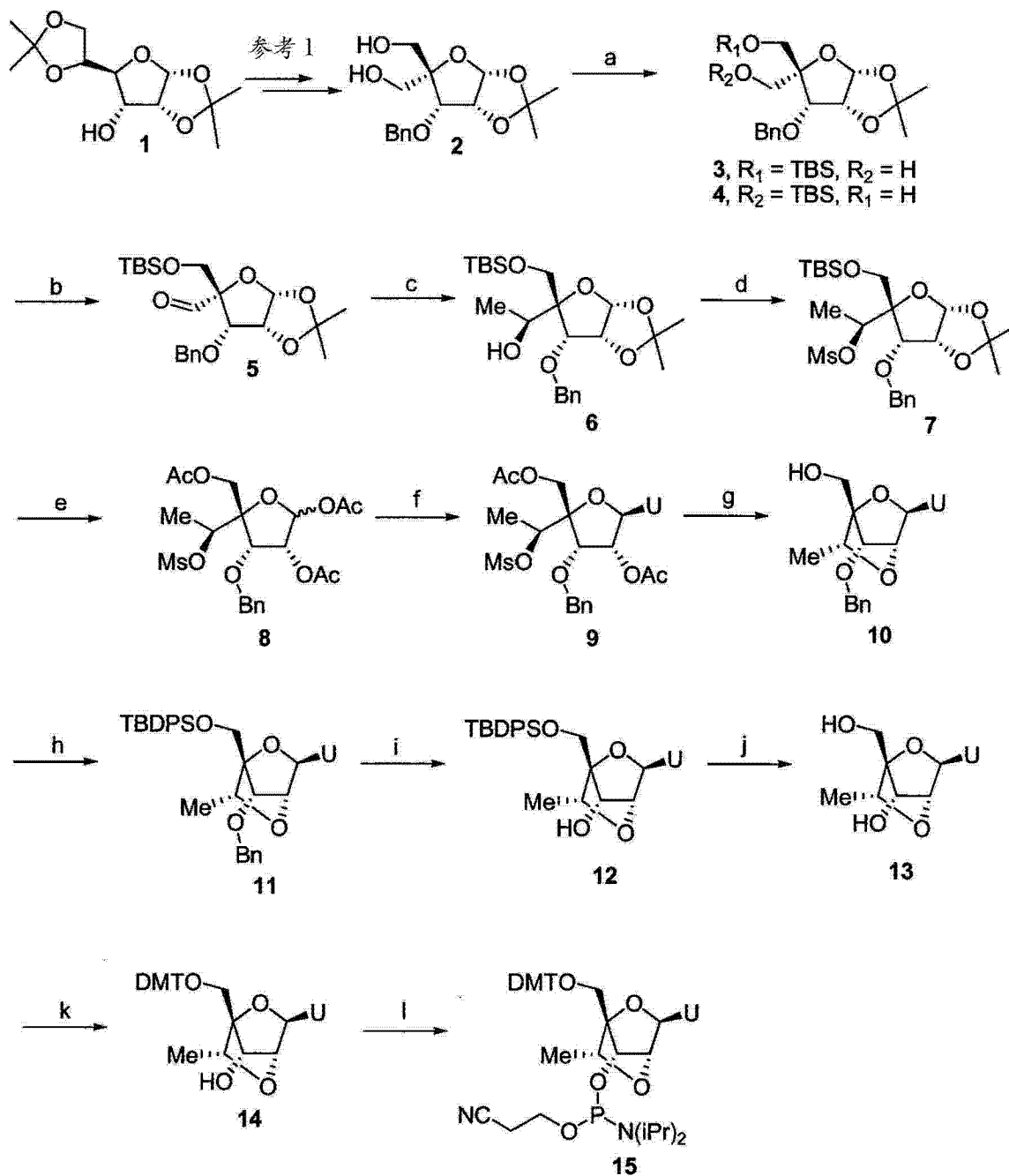
[0171] 本发明的寡聚化合物可用于研究和诊断,因为这些寡聚化合物可与编码蛋白的核酸杂交。例如,可在此处披露的条件下以在此披露的效率杂交从而成为有效蛋白抑制剂的寡核苷酸将在有利于基因扩增或检测的条件下分别作为有效的引物或探针。这些引物和探针可用于需要特异性检测编码蛋白的核酸分子的方法,并可用于核酸分子扩增以供检测或在进一步研究中使用。本发明的反义寡核苷酸,特别是引物和探针与核酸的杂交可通过本领域已知的方法进行检测。该方法可包括将酶偶联至寡核苷酸,对该寡核苷酸放射性标记或任何其它适用的检测方法。还可制备使用这些检测手段检测样本中选定蛋白水平的试剂盒。

[0172] 本发明已根据其一些实施方案进行了具体描述,以下实施例仅用于阐述本发明,并非意在对其进行限制。

[0173] 实施例 1

[0174] 尿苷 6-(R)-甲基 BNA 亚磷酰胺, (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环 [2.2.1] 庚烷 (15) 的制备

[0175]



[0176] 示意结构流程 1(a) TBSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 16 小时, 来自 3 的产率为 59%; (b) Swern 氧化 (c) MeMgBr, CeCl<sub>3</sub>, THF, -78 °C, 来自 3 的产率为 80%; (d) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 16 小时, 91%; (e) AcOH, Ac<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 室温, 16 小时, 88%; (f) 尿嘧啶, BSA, TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN, 回流, 2 小时; (g) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 室温, 16 小时; (h) TBDPSCI, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 16 小时, 来自 8 的产率为 79%; (i) BCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -15 °C, 60%; (j) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时; (k) DMTCl, 吡啶, 室温, 16 小时, 来自 12 的产率为 89%; (l) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF。

[0177] A) 5-O-(叔丁基二甲基硅烷基)-3-O-苯甲基-1,2-O-异亚丙基-4-C-羟甲基- $\alpha$ -D-赤式-戊呋喃糖 (3)

[0178] 通过加料漏斗在 10 分钟内向含有二醇 2 (12g, 38.8mmol, 参照 Moffatt 等人, J.

Org. Chem. 1979, 44, 1301, 参考 1 的方法进行制备)、三乙胺 (11.44mL, 81.5mmol) 以及 4-二甲基氨基嘧啶 (0.47g, 3.9mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (184mL) 冷 ( $0^\circ\text{C}$ ) 溶液中添加叔丁基二甲基硅烷基氯 (6.24g, 40.7mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液。添加完成后, 将反应逐渐加热至室温, 并继续搅拌 16 小时。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  稀释反应物, 依次以 5% HCl 水溶液、饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 10% 至 30% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化产生白色固体的醇 3 (11.53g, 59%) 和醇 4 (3.93g, 22%)。

[0179] B) 醇 (6)

[0180] 将二甲基亚砷 (3.36mL, 47.5mmol) 逐滴加入含有草酰氯 (2.08mL, 23.7mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  冷 ( $-78^\circ\text{C}$ ) 溶液 (130mL)。搅拌 30 分钟后, 向反应中添加醇 3 (6.7g, 15.8mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液 (20mL)。在  $-78^\circ\text{C}$  继续搅拌 45 分钟并向反应中添加三乙胺 (10.0mL, 71.2mmol)。在  $-78^\circ\text{C}$  下将反应物搅拌 15 分钟, 随后取走冰浴, 并在 45 分钟内对反应物逐渐加温。然后将反应物倒入  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中, 有机相先后以 5% HCl 水溶液、饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩以提供醛 5, 其在不作进一步纯化下使用。

[0181] 将氯化铯 III (5.84g, 23.7mmol) 的 THF (130mL) 悬浮液在室温下搅拌 90 分钟。在冰浴中冷却反应物, 在 5 分钟内添加甲基溴化镁 (17.0mL 的 1M 甲基溴化镁的 THF 溶液), 继续搅拌 90 分钟。将含有粗制醛 5 (由前面获得) 的 THF (20mL) 加入反应物中。继续搅拌 90 分钟后, 以饱和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液淬灭反应并将反应物倒入 EtOAc。依次以 5% HCl 水溶液、饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 15% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供醇 6 (5.52g, 来自 3 的产率为 80%)。

[0182] C) 甲磺酸 (7)

[0183] 向含有醇 6 (2.77g, 6.4mmol)、三乙胺 (1.1mL, 7.7mmol) 和 4-二甲基氨基嘧啶 (84mg, 0.7mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (14mL) 冰 ( $0^\circ\text{C}$ ) 溶液添加甲烷磺酰氯 (0.55mL, 7.0mmol)。室温搅拌 1 小时后, 将反应物倒入  $\text{CHCl}_3$ , 有机层依次以 5% HCl 水溶液、饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 15% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供甲磺酸 7 (2.97g, 91%)。

[0184] D) 三乙酸酯 (8)

[0185] 将浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3 滴) 加入甲磺酸 7 (2.97g, 5.8mmol) 的冰醋酸 (29mL) 和乙酸酐 (5.8mL) 溶液。室温搅拌 1 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 有机层依次以水、饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 33% 至 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供三乙酸酯 8 (2.48g, 88%)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\beta$  异头体):  $\delta$  7.39–7.30 (m, 5H), 6.23 (s, 1H), 5.37 (d, 1H), 5.19 (q, 1H), 4.62 (d, 1H), 4.52 (d, 1H), 4.38 (s, 1H), 4.34 (d, 1H), 3.98 (d, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.55 (d, 3H)。LCMS: 保留时间 1.35 分钟;  $M+23$  计算值 511.1, 实测值 511.0。

[0186] E) 核苷 (11)

[0187] 向三乙酸酯 8 (2.47g, 5.0mmol) 和尿嘧啶 (0.70g, 6.3mmol) 的  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15mL) 悬浮液添加 N, O-二(三甲基硅烷基)乙酰胺 (4.9mL, 20.0mmol)。在  $40^\circ\text{C}$  下加热 15 分钟以获得澄清溶液, 向反应中添加三甲基硅烷基三氟甲基磺酸盐 (1.18mL, 6.5mmol)。回流 2 小时后, 将反应冷却至室温并倒入 EtOAc。以饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩以提供粗制核苷 9, 其可在不作任何纯化下使用。

[0188] 向核苷 9 (由前面获得) 的 MeOH (50mL) 溶液添加  $K_2CO_3$  (2.07g, 15mmol)。在室温下搅拌 16 小时后, 真空去除溶剂并在 25% 嘧啶 /EtOAc 和盐水中分配残留物。收集有机相, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并真空浓缩提供 10, 其在不作进一步纯化下使用。 $^1H$  NMR (MeOD) :  $\delta$  7.74 (d, 2H), 7.29-7.14 (m, 5H), 5.53 (d, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.18 (s, 1H), 4.14 (sm, 1H), 3.92 (s, 1H), 3.66 (s, 2H), 1.08 (d, 3H)。LCMS : 保留时间 2.40 分钟 ;M+H 计算值 360.1, 实测值 361.0。

[0189] 向核苷 10 (由前面获得)、三乙胺 (1.4mL, 10.0mmol) 和 4-二甲基氨基嘧啶 (80mg, 0.7mmol) 的  $CH_2Cl_2$  (9mL) 冰 (0 $^\circ C$ ) 溶液中添加叔丁基二苯基硅烷基氯 (1.73mL, 6.7mmol)。室温搅拌 16 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 依次以 5% HCl 水溶液、饱和  $NaHCO_3$  洗涤有机相, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $SiO_2$ , 以 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 11 (2.02g, 来自 8 的产率为 79%)。

[0190] F) 核苷 (12)

[0191] 将三氯化硼 (1M 三氯化硼的 16.7mL  $CH_2Cl_2$  溶液) 小心加入核苷 11 (2.0g, 3.3mmol) 的  $CH_2Cl_2$  (40mL) 冷 (-15 $^\circ C$ ) 溶液。在 -15 $^\circ C$  下搅拌 1 小时后, 将反应物冷却至 -78 $^\circ C$  并通过添加 MeOH/ $CH_2Cl_2$  (1:1, 10mL) 小心淬灭反应。继续搅拌 10 分钟后, 将反应物倒入  $CH_2Cl_2$ , 依次以 5% HCl 水溶液、饱和  $NaHCO_3$ 、盐水洗涤有机相, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $SiO_2$ , 以 50% 至 80% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 12 (1.02g, 60%)。

[0192] G) 核苷 (13)

[0193] 在聚丙烯管中向核苷 12 (1.86g, 3.7mmol) 和三乙胺 (1.03mL, 7.3mmol) 的 THF (36mL) 溶液中添加三乙胺三氢氟酸盐 (2.98mL, 18.3mmol)。室温搅拌 16 小时后, 真空浓缩反应物并将残留物溶解于 EtOAc。依次以水、饱和  $NaHCO_3$ 、盐水洗涤有机相, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $SiO_2$ , 以 15% 的 MeOH/ $CHCl_3$  洗脱) 纯化提供白色固体核苷 13 (1.31g, 产物中掺杂了三乙胺)。

[0194] H) 核苷 (14)

[0195] 向核苷 13 (由前面获得) 的嘧啶 (18mL) 溶液添加 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (DMTC1) (1.23g, 3.7mmol)。室温搅拌 16 小时后, 向反应添加额外的 DMTC1 (0.12g), 继续搅拌 8 小时。然后将反应物倒入 EtOAc, 随后以盐水萃取有机相, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $SiO_2$ , 以 15% 的丙酮/ $CHCl_3$  洗脱) 纯化提供白色泡沫状的核苷 14 (1.85g, 89%)。 $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  8.03 (d, 1H), 7.44-2.28 (m, 14H), 6.86 (d, 4H), 5.63 (d, 1H), 5.60 (s, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.13 (s, 1H), 3.81 (s, 6H), 3.49 (d, 1H), 3.37 (d, 1H), 1.18 (d, 3H)。

[0196] I) 亚磷酰胺, (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)磷氧基]-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环 [2.2.1] 庚烷 (15) 的制备

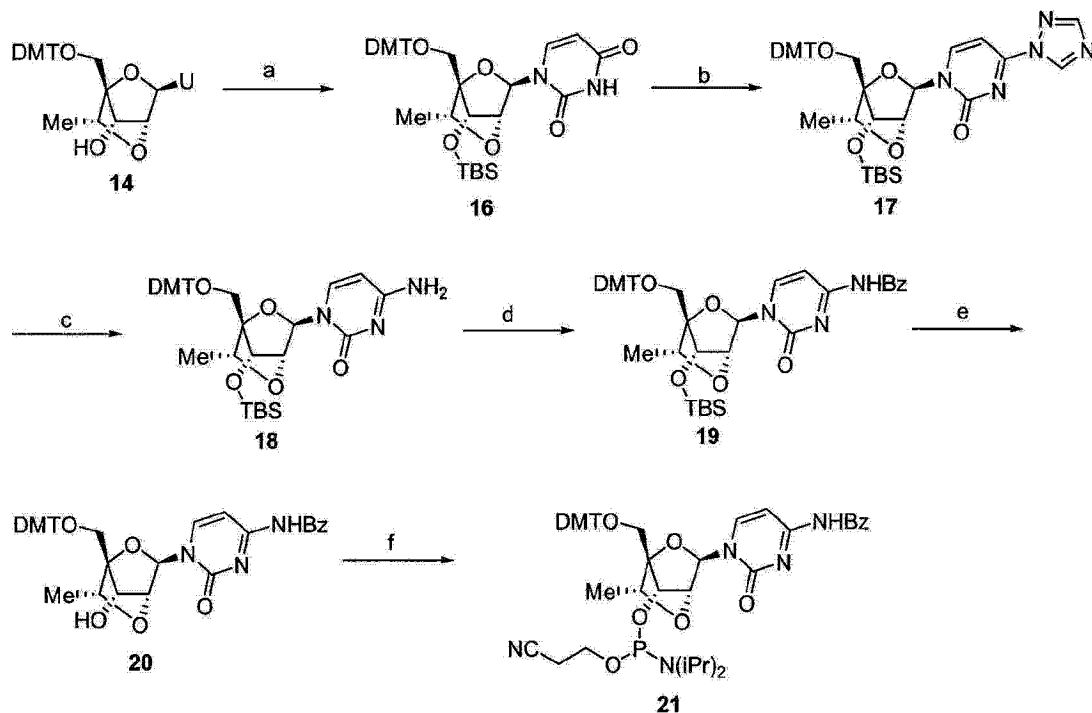
[0197] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (0.69mL, 2.2mmol) 加入核苷 14 (0.83g, 1.4mmol)、四唑 (80mg, 1.2mmol) 和 N-甲基咪唑 (29  $\mu$ L, 0.36mmol) 的 DMF (7.2mL) 溶液中。室温搅拌 8 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 依次以 90% 盐水、盐水洗涤有机层, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并浓缩。将残留物溶解于最少量的 EtOAc 中, 将该溶液添加至己烷中。收集所得的沉淀物, 进一步通过柱层析 ( $SiO_2$ , 以 66% 至 75% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供

白色固体亚磷酰胺 15 (1.04g, 94%)。<sup>31</sup>PNMR(CDCl<sub>3</sub>) δ : 149.21, 149.79。

[0198] 实施例 2

[0199] 尿苷 N-Bz-胞嘧啶-6-(R)-甲基 BNA 亚磷酰胺, (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N-苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷(21)的制备

[0200]



[0201] 示意结构流程 2(a) TBSCl, 咪唑, DMF, 室温, 16 小时, 99%; (b) POCl<sub>3</sub>, 1, 2, 4-三唑, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, 室温, 4 小时; (c) NH<sub>3</sub> 水溶液, 1, 4-二恶烷, 室温, 16 小时; (d) Bz<sub>2</sub>O, DMF, 室温, 16 小时, 来自 15 的产率为 90%; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时, 93%; (f) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF, 95%。

[0202] A) 核苷(16)

[0203] 将叔丁基二甲基硅烷基氯 (0.79g, 5.2mmol) 添加至核苷 14 (1.0g, 1.7mmol) 和咪唑 (0.70g, 10.4mmol) 的 DMF (3.5mL) 溶液。室温搅拌 16 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 以盐水萃取有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 50% 的 EtOAc/己烷洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 16 (1.17g, 99%)。

[0204] B) 核苷(19)

[0205] 将三氯氧磷 (1.27mL, 13.6mmol) 添加至 1, 2, 4-三唑 (4.0g, 58.0mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (21mL) 冷 (0°C) 悬浮液中。搅拌 15 分钟后, 向反应中添加三乙胺 (9.57 mL, 68mmol), 继续搅拌 30 分钟。在 0°C 下向反应中添加核苷 16 (1.17g, 1.7mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (10mL) 溶液。搅拌 10 分钟后, 去除冰浴并在室温下搅拌反应物 4 小时。真空去除溶剂, 在 EtOAc 和水之间分配残留物。然后以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供粗产物 17, 其可在不作任何纯化下使用。

[0206] 将氨水 (4mL) 添加至核苷 17 (由前面获得) 的二恶烷 (20mL) 溶液中。在室温下搅拌 16 小时, 真空浓缩反应物并在高度真空下干燥 8 小时以提供核苷 18, 其可在不作任何

纯化下使用。

[0207] 向核苷 18(由前面获得)的 DMF(3mL) 溶液添加苯甲酸酐(0.65g, 2.9mmol)。室温搅拌 16 小时后,将反应物倒入 EtOAc,以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水萃取有机相,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并真空浓缩。柱层析(SiO<sub>2</sub>,以 50%的 EtOAc/己烷洗脱)纯化提供白色固体的核苷 19(1.2g, 来自 16 的产率为 90%)。

[0208] C) 核苷(20)

[0209] 在聚丙烯管中向核苷 19(1.86g, 3.7mmol) 和三乙胺(1.03mL, 7.3mmol) 的 THF(15mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐(1.48mL, 9.1mmol)。室温下搅拌 16 小时后,真空浓缩反应物并将残留物溶解于 EtOAc,依次以水、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机相,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并真空浓缩。柱层析(SiO<sub>2</sub>,以 5%MeOH/CHCl<sub>3</sub>洗脱)纯化提供白色固体核苷 20(0.91g, 90%)。 <sup>1</sup>H NMR(MeOD) δ :8.62(d, 1H), 8.02(d, 1H), 7.63(m, 6H), 7.38(m, 7H), 6.96(d, 4H), 6.65s, 1H), 4.49(s, 1H), 4.36(s, 1H), 4.25(m, 1H), 3.53(d, 1H), 3.41(d, 1H), 1.18(d, 3H)。

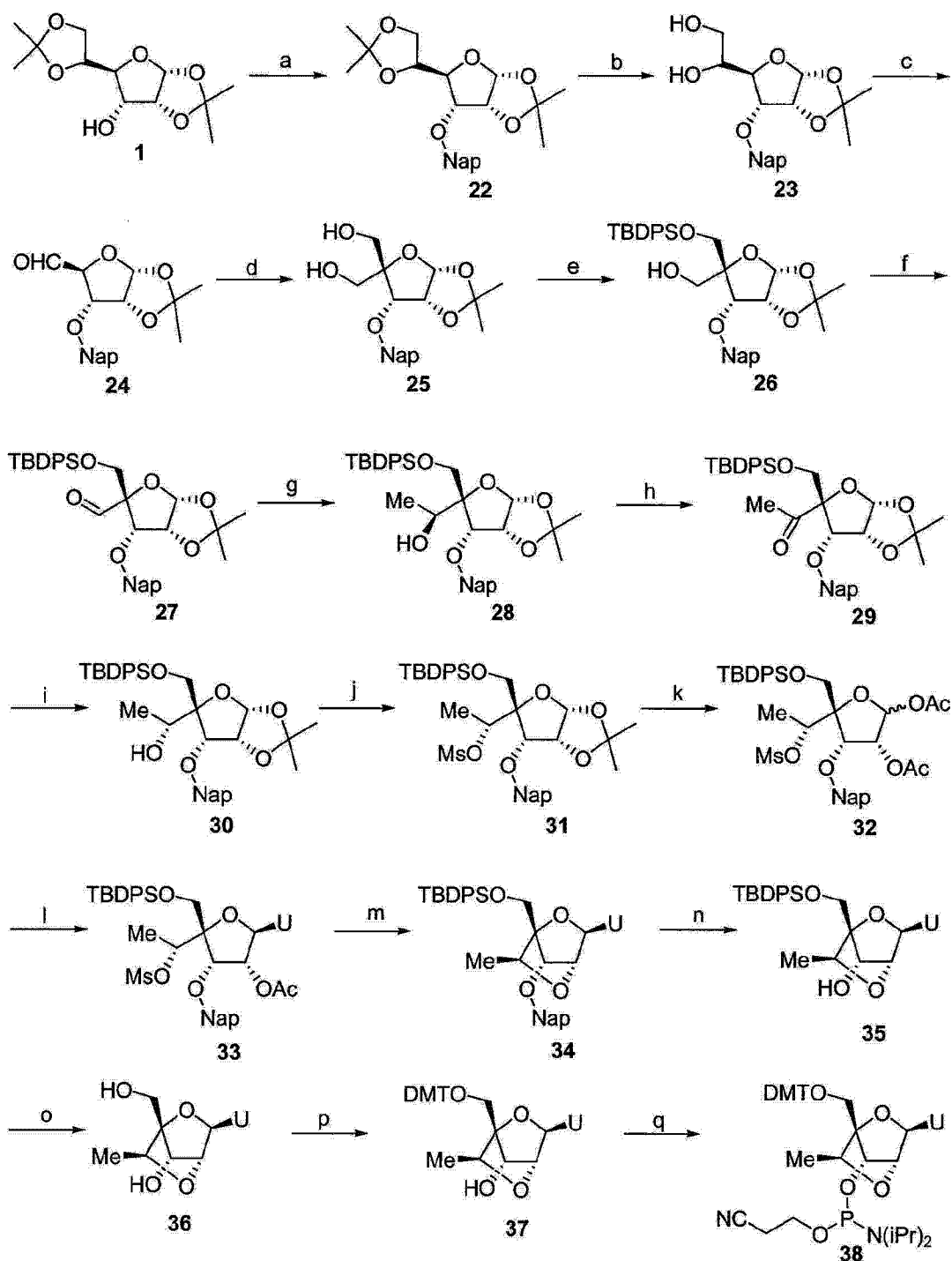
[0210] D) (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N-苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷(21)

[0211] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺(0.63mL, 2.0mmol) 加入含有核苷 20(0.89g, 1.3mmol)、四唑(73mg, 1.1mmol) 和 N-甲基咪唑(26 μL, 0.33mmol) 的 DMF(6.6mL) 溶液中。室温搅拌 8 小时后,将反应物倒入 EtOAc,依次以 90% 盐水、盐水洗涤有机相,干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并浓缩。将残留物溶解于最少量的 EtOAc,将该溶液添加至己烷。收集所得的沉淀物,进一步通过柱层析(SiO<sub>2</sub>,以 75%至 90%的 EtOAc/己烷洗脱)纯化提供白色固体亚磷酰胺 21(1.1g, 95%)。 <sup>31</sup>P NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ :149.34, 149.77。

[0212] 实施例 3

[0213] 尿苷-6-(S)-甲基 BNA 亚磷酰胺, (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷(38)的制备

[0214]



[0215] 示意结构流程 3(a)NaH, 溴化萘, DMF, 室温, 2h, 98%; (b) 醋酸,  $\text{H}_2\text{O}$ , 室温, 16 小时; (c)  $\text{NaIO}_4$ , 二恶烷,  $\text{H}_2\text{O}$ , 室温, 90 分钟; (d)  $\text{HCHO}$ ,  $\text{NaOH}$ , THF,  $\text{H}_2\text{O}$ , 室温, 16 小时, 由 22 为 80%; (e)  $\text{TBDPSCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 室温, 16 小时, 61%; (f) 草酰氯, DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $-78^\circ\text{C}$ ; (g)  $\text{MeMgBr}$ ,  $\text{CeCl}_3$ , 来自 26 的产率为 89%; (h) 草酰氯, DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $-78^\circ\text{C}$ ; (i)  $\text{DiBAL}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$ ; (j)  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 室温, 1 小时; (k)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 由 28 为 58%; (l) BSA, 尿嘧啶,  $\text{TMSOTf}$ , MeCN, 回流, 2 小时; (m)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 室温, 16 小时, 来自 34 的产率为 76%; (n) DDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 室温, 8 小时, 80%; (o)  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 定量; (p)  $\text{DMTC1}$ , 嘧啶, 室温, 16 小时, 86%; (q)  $\text{CN}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{NiPr}_2)_2$ , 四唑, NMI, DMF, 97%。

[0216] A) 醇 (22)

[0217] 将氢化钠 (2.39g, 59.8mmol) 小心添加至可从市场购得的 1,2:5,6-二-O-异亚丙基- $\alpha$ -D-呋喃阿洛糖 1 (12.0g, 46mmol) 的 DMF (75mL) 冷 (0°C) 溶液中。搅拌 20 分钟后, 向反应中添加溴化萘 (11.12g, 50.8mmol) 并继续搅拌 2 小时。以 H<sub>2</sub>O 小心淬灭反应并将其倒入 EtOAc, 以水、盐水洗涤有机层, 干燥并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 10% 至 33% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体醇 22 (18.1g, 98%)。

[0218] B) 二醇 (25)

[0219] 将醇 22 (18g, 46mmol) 溶解于冰醋酸 (150mL) 和 H<sub>2</sub>O (60mL)。在室温下搅拌反应物 16 小时, 然后将其真空浓缩。然后将残留物溶解于 EtOAc, 以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥并浓缩得到粗品 23, 其在不作进一步纯化下使用。

[0220] 将高碘酸钠 (48mmol, 10g) 水溶液 (350mL) 添加至上面获得的粗产品二醇 23 的 1,4-二恶烷 (140mL) 的溶液。室温搅拌 90 分钟后, 以 EtOAc 萃取反应物, 以水、盐水进一步洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩得到醛 24, 其可不作进一步纯化下使用。

[0221] 将由前面获得的粗品醛 24 溶解于 THF:H<sub>2</sub>O (1:1, 100mL) 混合物, 并将反应物在冰浴中冷却。向反应中添加甲醛 (25mL, 35%w/w) 和 1N NaOH (100mL)。室温搅拌 16 小时后, 向反应添加甲醛 (5mL) 并继续搅拌 32 小时。将反应物浓缩至干燥, 在 EtOAc 和水之间分配残留物。分层并以另外的 1N NaOH、水、盐水洗涤有机相, 干燥并浓缩得到白色固体二醇 25 (12.96g, 80%, 三步)。

[0222] C) 醇 (26)

[0223] 将叔丁基二苯基硅烷基氯 (0.75mL, 2.9mmol) 添加至二醇 25 (1g, 2.8mmol) 和三乙胺 (0.45mL, 3.2mmol) 的冷 (0°C) 溶液。室温搅拌 16 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 并依次用 5%HCl、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 10% 至 40% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供油状的醇 26 (1.02g, 61%) (还分离得到 0.42g 区域异构硅保护的二醇)。

[0224] D) 醇 (28)

[0225] 将二甲基亚砷 (1.6mL, 22.4mmol) 逐滴加入草酰氯 (0.98mL, 11.2mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70mL) 冷 (-78°C) 溶液。搅拌 30 分钟后, 向反应中添加醇 26 (4.8g, 8.0mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20mL) 溶液。在 -78°C 继续搅拌 45 分钟并向反应中添加三乙胺 (4.72mL, 33.7mmol)。在 -78°C 下将反应物搅拌 15 分钟, 随后取走冰浴, 并在 45 分钟内对反应物逐渐加温。然后将反应物倒入 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 依次以 5%HCl 水溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供醛 27, 其可在不作进一步纯化下使用。

[0226] 将氯化铯 III (2.96g, 12.0mmol) 的 THF (50mL) 悬浮液在室温下搅拌 90 分钟。在冰浴中冷却反应物, 历经 5 分钟添加甲基溴化镁 (1.4M 甲基溴化镁的 8.6mL THF 的溶液, 12mmol), 继续搅拌 90 分钟, 然后将反应冷却至 -78°C。将粗醛 27 (由前面获得) 的 THF (20mL) 溶液加入反应物。继续搅拌 90 分钟后, 以饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液淬灭反应并倒入 EtOAc。依次以 5%HCl 水溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 20% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供醇 28 (4.37g, 来自 26 的产率为 89%)。

[0227] E) 二乙酸 (32)

[0228] 将二甲基亚砷 (1.41mL, 19.9mmol) 逐滴加入草酰氯 (0.87mL, 10.0mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70mL) 冷 (-78°C) 溶液。搅拌 30 分钟后, 向反应中添加醇 28 (4.35g, 7.1 mmol) 的



CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20mL) 溶液。在 -78℃ 继续搅拌 45 分钟并向反应中添加三乙胺 (4.20mL, 30.0mmol)。在 -78℃ 下将反应物搅拌 15 分钟, 随后取走冰浴, 并在 45 分钟内对反应物逐渐加温。然后将反应物倒入 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 先后以 5% HCl 水溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供醛 29, 其可在不作进一步纯化下使用。

[0229] 将二异丁基氢化铝 (13.7mL 1M 二异丁基氢化铝的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液, 13.7mmol) 添加至酮 29 (由前面获得) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15mL) 冷溶液。在 -78℃ 下搅拌 2 小时后, 添加饱和 NH<sub>4</sub>Cl 淬灭反应并将其倒入 CHCl<sub>3</sub>。然后以 5% HCl 水溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供醇 30, 其可在不作任何纯化下使用。

[0230] 向含有醇 30 (由前面获得)、三乙胺 (1.77mL, 10.5mmol) 和 4-二甲基氨基嘧啶 (85mg, 0.7mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (21mL) 冷 (0℃) 溶液添加甲烷磺酰氯 (0.11mL, 1.4mmol)。室温搅拌 1 小时后, 将反应物倒入 CHCl<sub>3</sub>, 依次以 5% HCl 水溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供甲磺酸 31, 其可在不作任何纯化下使用。

[0231] 将浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 滴) 加入甲磺酸 31 (由前面获得) 的冰醋酸 (15mL) 和乙酸酐 (3.0mL) 溶液。室温搅拌 1 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 依次以水、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 20% 至 33% 的 EtOAc/己烷洗脱) 纯化提供二乙酸 32 (3.0g, 由 28 为 58%)。

[0232] F) 核苷 (34)

[0233] 向二乙酸 32 (3.0g, 4.1mmol) 和尿嘧啶 (0.57g, 5.1mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (20mL) 悬浮液添加 N, O-二(三甲基硅烷基)乙酰胺 (3.45mL, 14.0mmol)。在 40℃ 下加热 15 分钟以获得澄清溶液后, 向反应中添加三甲基硅烷基三氟甲磺酸盐 (0.95mL, 5.3mmol)。回流 2 小时后, 将反应冷却至室温并倒入 EtOAc。以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供粗制核苷 33, 其可在不作任何纯化下使用。

[0234] 向核苷 33 (由前面获得) 的 MeOH (40mL) 溶液添加 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.66g, 12.0mmol)。室温下搅拌 16 小时后, 真空浓缩反应物并将残留物溶解于 25% 嘧啶/EtOAc, 以盐水萃取, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 40% 的 EtOAc/己烷洗脱) 纯化提供白色固体核苷 34 (2.0g, 来自 32 的产率为 76%)。

[0235] G) 核苷 (35)

[0236] 向核苷 34 (2.0g, 3.1mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 和 H<sub>2</sub>O (1.5mL) 溶液添加 2, 3-二氯-5, 6-二氰-1, 4-苯醌 (DDQ) (1.4g, 6.2mmol)。室温下搅拌 3 小时, 再次向反应添加 DDQ (0.5g)。再搅拌 10 分钟后, 真空浓缩反应物并将残留物溶解于 EtOAc。依次以水、水: 饱和 NaHCO<sub>3</sub> (1:1)、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 80% 的 EtOAc/己烷) 纯化提供白色固体核苷 35 (1.25g, 80%)。

[0237] H) 核苷 (36)

[0238] 在聚丙烯管中向核苷 35 (1.25g, 2.5mmol) 和三乙胺 (1.0mL, 7.4mmol) 的 THF (25mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (2.4mL, 14.7mmol)。室温搅拌 24 小时后, 真空浓缩反应物并将残留物溶解于 EtOAc。依次以水、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥并浓缩 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 5% 至 10% 的 MeOH/CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供白色固体核苷 36 (0.88g) (产物混有 Et<sub>3</sub>N)。

[0239] I) 核苷 (37)

[0240] 向核苷 36 (由前面获得) 的嘧啶 (12mL) 溶液添加二甲氧基三苯甲基氯 (0.91g, 2.7mmol)。室温搅拌 16 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 以盐水洗涤有机层, 干燥并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 90% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体核苷 37 (1.28g, 来自 36 的产率为 86%)。

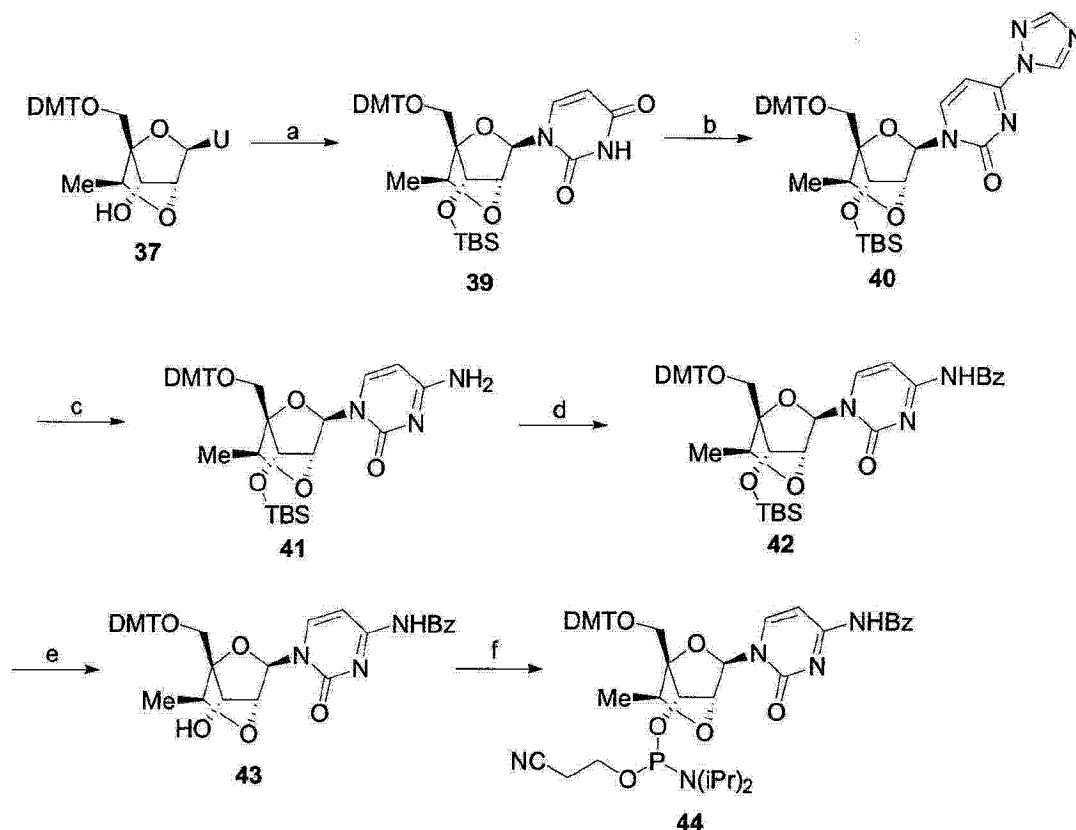
[0241] J) (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4, 4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲基-2, 5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (38)

[0242] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (0.46mL, 1.5mmol) 加入含有核苷 37 (0.59g, 1.0mmol)、四唑 (57mg, 1.1mmol) 和 N-甲基咪唑 (20 μL, 0.25mmol) 的 DMF (5mL) 溶液。室温搅拌 8 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 依次以 90% 盐水、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 66% 至 75% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体亚磷酰胺 38 (0.75g, 97%)。<sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 149.36, 149.53。

[0243] 实施例 4

[0244] N-Bz-胞嘧啶-6-(R)-甲基 BNA 亚磷酰胺, (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4, 4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N-苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲基-2, 5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (44) 的制备

[0245]



[0246] 示意结构流程 4(a) TBSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 16 小时 97%; (b) POCl<sub>3</sub>, 1, 2, 4-三唑, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, 室温, 4 小时; (c) NH<sub>3</sub> 水溶液, 1, 4-二恶烷, 室温, 16 小时; (d) Bz<sub>2</sub>O, DMF, 室温, 16 小时, 来自 39 的产率为 91%; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时, 87%; (f) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF, 90%。

[0247] A) 核苷 (39)

[0248] 将叔丁基二甲基硅烷基氯 (0.45g, 5.2mmol) 添加至核苷 37 (0.59g, 1.0mmol) 和咪唑 (0.41g, 6.0mmol) 的 DMF (2mL) 溶液中。室温搅拌 16 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 随后以盐水萃取有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 39 (0.68g, 97%)。

[0249] B) 核苷 (42)

[0250] 将三氯化磷 (0.74mL, 8.0mmol) 添加至 1, 2, 4- 三唑 (2.35g, 34.0mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (16mL) 冷 (0°C) 悬浮液。搅拌 15 分钟后, 向反应添加三乙胺 (5.6mL, 40mmol), 继续搅拌 30 分钟。在 0°C 下向反应添加核苷 39 (0.68g, 1.0mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (7mL) 溶液。搅拌 10 分钟后, 去除冰浴并在室温下搅拌反应物 4 小时。真空去除溶剂, 在 EtOAc 和水之间分配残留物。然后以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供粗产物 40, 其可在不作任何纯化下使用。

[0251] 将氨水 (2.5mL) 添加至核苷 40 (由前面获得) 的二恶烷 (12mL) 溶液。在室温下搅拌 16 小时, 真空浓缩反应物并在高度真空下干燥 8 小时以提供核苷 41, 其可在不作任何纯化下使用。

[0252] 向核苷 41 (由前面获得) 的 DMF (25mL) 溶液添加苯甲酸酐 (0.38g, 1.7mmol)。室温搅拌 16 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水萃取有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 42 (0.72g, 来自 39 的产率为 91%)。

[0253] C) 核苷 (43)

[0254] 在聚丙烯管中向含有核苷 42 (0.72g, 0.91mmol) 和三乙胺 (0.30mL, 2.2mmol) 的 THF (9mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (0.89mL, 5.5mmol)。室温下搅拌 16 小时后, 真空浓缩反应物并将残留物溶解于 EtOAc, 依次以水、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 25% 至 40% 的丙酮 /CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供白色固体核苷 43 (0.53g, 87%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.34 (s, br, 1H), 8.33 (d, 1H), 7.83 (d, 1H), 7.57-7.26 (m, 16H), 6.89 (d, 4H), 5.72 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.22 (s, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.83 (s, 6H), 3.63 (d, 1H), 3.46 (s, 1H), 1.20 (d, 3H)。

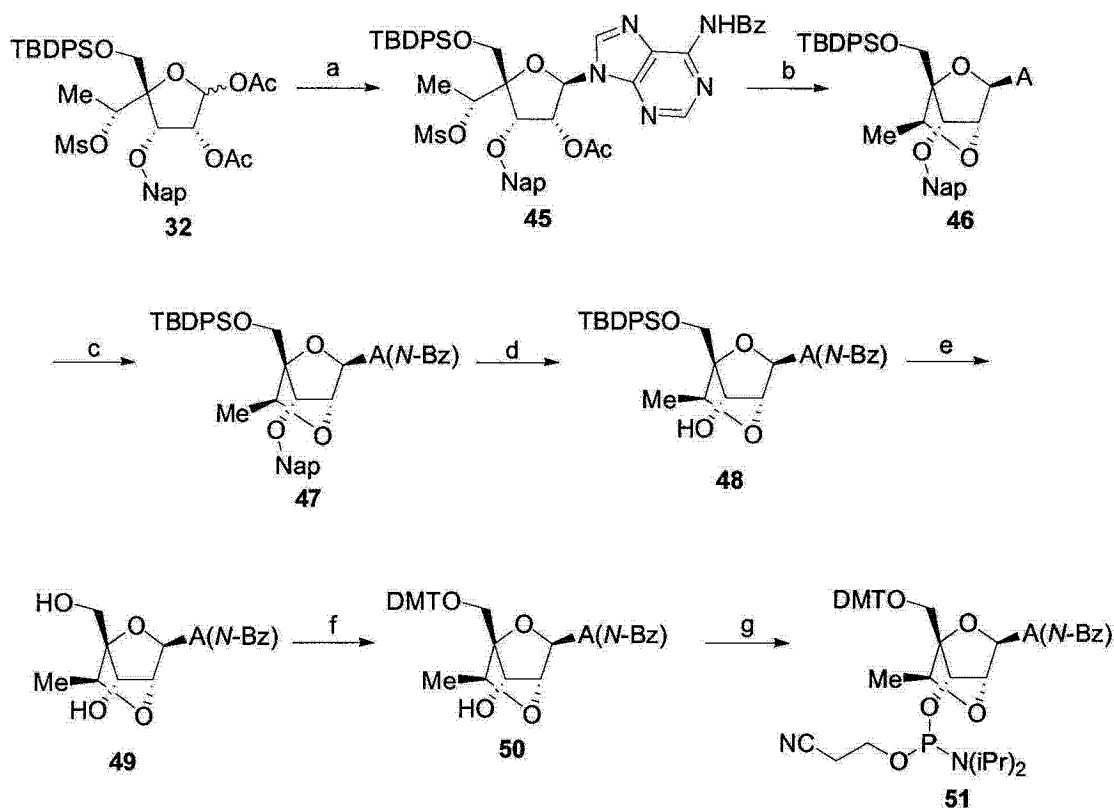
[0255] D) (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N- 苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲基-2, 5-二氧杂-双环 [2. 2. 1] 庚烷 (44)

[0256] 将 2- 氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (0.37mL, 1.2mmol) 加入含有核苷 43 (0.89g, 1.3mmol)、四唑 (43mg, 0.63mmol) 和 N- 甲基咪唑 (16 μL, 0.20mmol) 的 DMF (4mL) 溶液。室温搅拌 8 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 依次以 90% 盐水、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 75% 至 90% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体亚磷酰胺 44 (0.61g, 90%)。

[0257] 实施例 5

[0258] (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(6-N- 苯甲酰腺嘌呤-9-基)-6-甲基-2, 5-二氧杂-双环 [2. 2. 1] 庚烷 (51)

[0259]



[0260] 示意结构流程 5(a) 6-N-苯甲酰腺嘌呤, BSA, TMSOTf, DCE, 回流, 8 小时; (b)  $K_2CO_3$ , MeOH, 室温, 16 小时, 来自 32 的产率为 73%; (c)  $Bz_2O$ , DMF, 室温; (d) DDQ,  $CH_2Cl_2$ ,  $H_2O$ , 室温; (e)  $Et_3N \cdot 3HF$ ,  $Et_3N$ , THF, 室温, 16 小时; (f)  $DMTC1$ , 嘧啶, 室温, 16 小时; (g)  $CNCH_2CH_2OP(N-iPr)_2$ , 四唑, NMI, DMF。

[0261] A) 核苷 (46)

[0262] 向二乙酸 32 (1.0g, 1.4mmol) 和 6-N-苯甲酰腺嘌呤 (0.48g, 2.0mmol) 的二氯乙烷 (14mL) 悬浮液添加 N, O-二(三甲基硅烷基)乙酰胺 (1.1mL, 4.50mmol)。反应混合物在回流 45 分钟后变澄清, 并在冰浴中冷却, 添加三甲基硅烷基三氟甲基磺酸盐 (0.49mL, 2.7mmol)。回流 8 小时后, 将反应冷却至室温并倒入 EtOAc。以饱和  $NaHCO_3$  和盐水洗涤有机相, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并真空浓缩以提供粗制核苷 45, 其可在不作纯化下使用。

[0263] 向核苷 45 (由前面获得) 的 MeOH (14mL) 溶液添加  $K_2CO_3$  (0.38g, 2.7mmol)。室温搅拌 24 小时后将反应物真空浓缩。将残留物悬浮于 EtOAc, 用水和盐水萃取, 然后干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $SiO_2$ , 以 1% 至 2.5% 的 MeOH/ $CHCl_3$  洗脱) 纯化提供白色固体核苷 46 (0.69g, 来自 32 的产率为 73%)。

[0264] B) 核苷 47

[0265] 核苷 47 可由核苷 46 通过与干 DMF 中的苯甲酸酐 (1.5-2 当量) 反应进行制备。

[0266] C) 亚磷酰胺 51

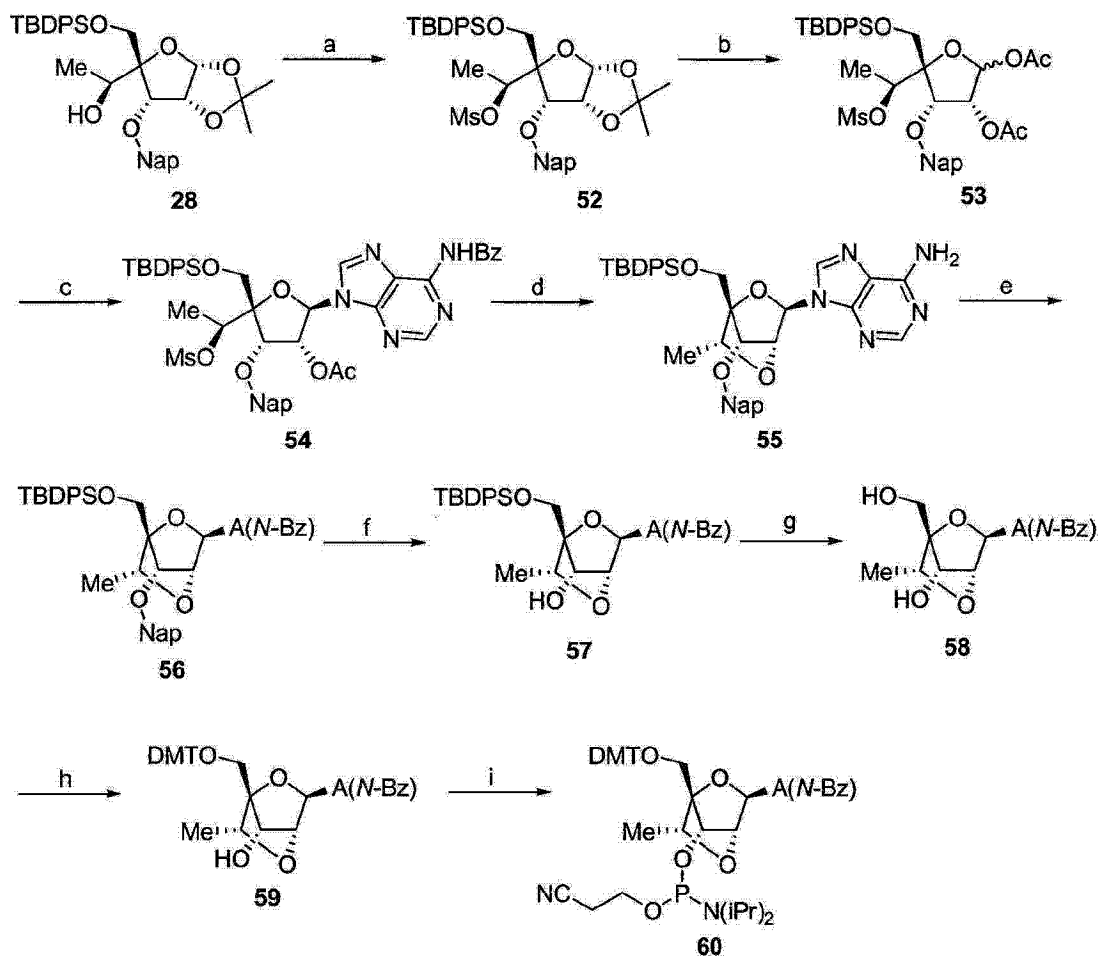
[0267] 亚磷酰胺 51 可通过实施例 3 所示的由核苷 34 得到亚磷酰胺 38 的方法由核苷 47 进行制备。

[0268] 实施例 6

[0269] (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(6-N-苯甲酰腺嘌呤-9-基)-6-甲基-2, 5-二氧杂-双环

## [2.2.1] 庚烷 (60)

[0270]



[0271] 示意结构流程 6(a) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 4 小时; (b) Ac<sub>2</sub>O, AcOH, 催化量 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 室温, 3 小时, 来自 28 的产率为 87%; (c) 6-N- 苯甲酰腺嘌呤, BSA, TMSOTf, DCE, 回流, 2 小时; (d) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 室温, 16 小时; (e) Bz<sub>2</sub>O, DMF, 室温; (f) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 室温; (g) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时; (h) DMTC1, 嘧啶, 室温, 16 小时; (i) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF。

[0272] A) 二乙酸 (52)

[0273] 向含有醇 28 (7.37g, 12.0mmol)、三乙胺 (2.82mL, 20.2mmol) 和 DMAP (0.20g, 1.1mmol) 的二氯甲烷 (25mL) 冷溶液 (0 °C) 逐滴添加甲烷磺酰氯 (1.33mL, 16.8mmol)。室温下搅拌 2 小时后, 以二氯甲烷稀释反应物, 以 5% HCl、饱和碳酸氢钠溶液、盐水洗涤有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。由此获得粗品甲磺酸 52, 其可在不作纯化下使用。

[0274] B) 二乙酸 (53)

[0275] 将浓硫酸 (10 滴) 加入甲磺酸 52 (由前面获得) 的乙酸酐 (7.2mL) 和醋酸 (36mL) 溶液。室温搅拌 2 小时后将反应物在高度真空下浓缩。将残留物溶解于乙酸乙酯, 以水、饱和碳酸氢钠溶液 (直至 pH>8) 和盐水小心洗涤有机层, 然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。以柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 25% 至 35% EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化残留物以提供粘性油二乙酸 53 (7.66g, 来自 28 的产率为 87%)。

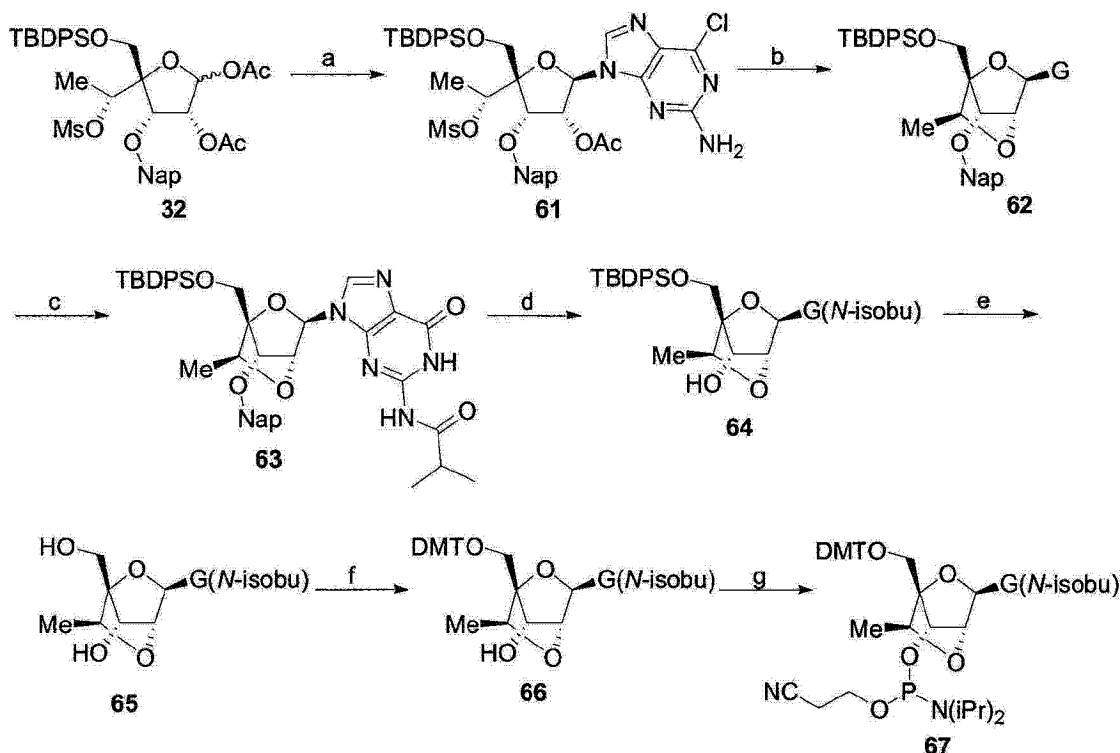
[0276] C) 亚磷酰胺 (60)

[0277] 亚磷酰胺 60 可通过实施例 3 所示的由二乙酸 32 得到亚磷酰胺 51 的方法由二乙酸 53 进行制备。

[0278] 实施例 7

[0279] (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2- 氨基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(2-N-异丁酰鸟嘌呤-9-基)-6-甲基-2, 5-二氧杂-双环[2. 2. 1]庚烷 (67)

[0280]



[0281] 示意结构流程 7(a) 2-氨基-6-氯嘌呤, BSA, TMSOTf, DCE, 回流, 2 小时; (b) 3-羟基丙腈, NaH, THF, 4 小时, 来自 32 的产率为 82%; (c) 异丁酸酐, DMAP, DMF, 60C, 24 小时, 71%; (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 室温, 16 小时, 91%; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时, 97%; (f) DMTCl, 咪啶, 室温, 16 小时, 85%; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF。

[0282] A) 核苷 (61)

[0283] 向二乙酸 32 (3.44g, 4.7mmol) 和 2-氨基-6-氯嘌呤 (1.18g, 7.0mmol) 的二氯乙烷 (46mL) 悬浮液添加 N, O-二(三甲基硅烷基)乙酰胺 (3.8mL, 15.5mmol)。回流 45 分钟得到澄清溶液后, 在冰浴中冷却反应物并添加三甲基硅烷基三氟甲基磺酸盐 (1.69mL, 9.4mmol)。回流 8 小时后, 将反应冷却至室温并倒入氯仿。以饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供粗制核苷 61, 其可在不作纯化下使用。

[0284] B) 核苷 (62)

[0285] 向氢化钠 (1.07g, 27.0mmol, 60%w/w) 的干 THF (10mL) 搅拌悬浮液逐滴添加 3-羟基丙腈 (1.67mL, 24.5mmol)。搅拌 20 分钟后, 添加粗品核苷 61 (由前面获得) 的干 THF (25mL) 溶液。室温下继续搅拌 5 小时, 然后通过添加饱和氯化铵溶液小心淬灭反应。然后将反应物倒入乙酸乙酯, 以盐水萃取有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。以柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以

CHCl<sub>3</sub> 至 2.5%MeOH/CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化残留物以提供浅棕色固体的核苷 62(3.18g, 来自 32 的产率为 82%)。

[0286] C) 核苷 (63)

[0287] 将异丁酸酐 (1.5mL, 9.3mmol) 添加至核苷 62(3.19g, 4.6mmol) 和 4-二甲氨基甲基嘧啶 (0.11g, 0.93mmol) 的 DMF(27mL) 溶液。在 60°C 下搅拌 14 小时后, 向反应再加入异丁酸酐 (1.5mL, 9.3mmol), 继续在 60°C 下搅拌 12 小时。将反应冷却至室温, 以 EtOAc 稀释, 并以水、饱和碳酸氢钠溶液、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 5% 至 15% 的丙酮 /CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供黄色泡沫状的核苷 63(2.5g, 71%)。

[0288] D) 核苷 (64)

[0289] 向核苷 63(2.5g, 3.3mmol) 的二氯甲烷 (33mL) 和 H<sub>2</sub>O(1.7mL) 溶液添加 DDQ(1.12g, 5.0mmol)。在室温下搅拌 2 小时后再次添加 DDQ(1.0g)。继续在室温下搅拌 6 小时, 然后将反应物在冰箱 (4°C) 中储存 16 小时。然后真空浓缩反应物并将残留物溶解于乙酸乙酯。以水、10% 亚硫酸氢钠溶液 (2×)、饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤有机层, 然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 5%MeOH/CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供核苷 64(1.84g, 91%)。

[0290] E) 核苷 (65)

[0291] 在聚丙烯管中向核苷 64(1.84g, 3.0mmol) 和三乙胺 (1.25mL, 8.9mmol) 的 THF(30mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (2.88mL, 17.9mmol)。室温搅拌 24 小时后, 真空浓缩反应物并将残留物溶解于 EtOAc。依次以水、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 5% 至 10% 的 MeOH/CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 65(1.05g, 97%)。

[0292] F) 核苷 (66)

[0293] 向核苷 65(1.00g, 2.7mmol) 的嘧啶 (13mL) 溶液添加二甲氧基三苯甲基氯 (1.07g, 3.2mmol)。室温搅拌 16 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 以盐水洗涤有机层, 干燥并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 2.5% 至 5% 的 MeOH/CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供白色泡沫状的核苷 66(1.52g, 85%)。

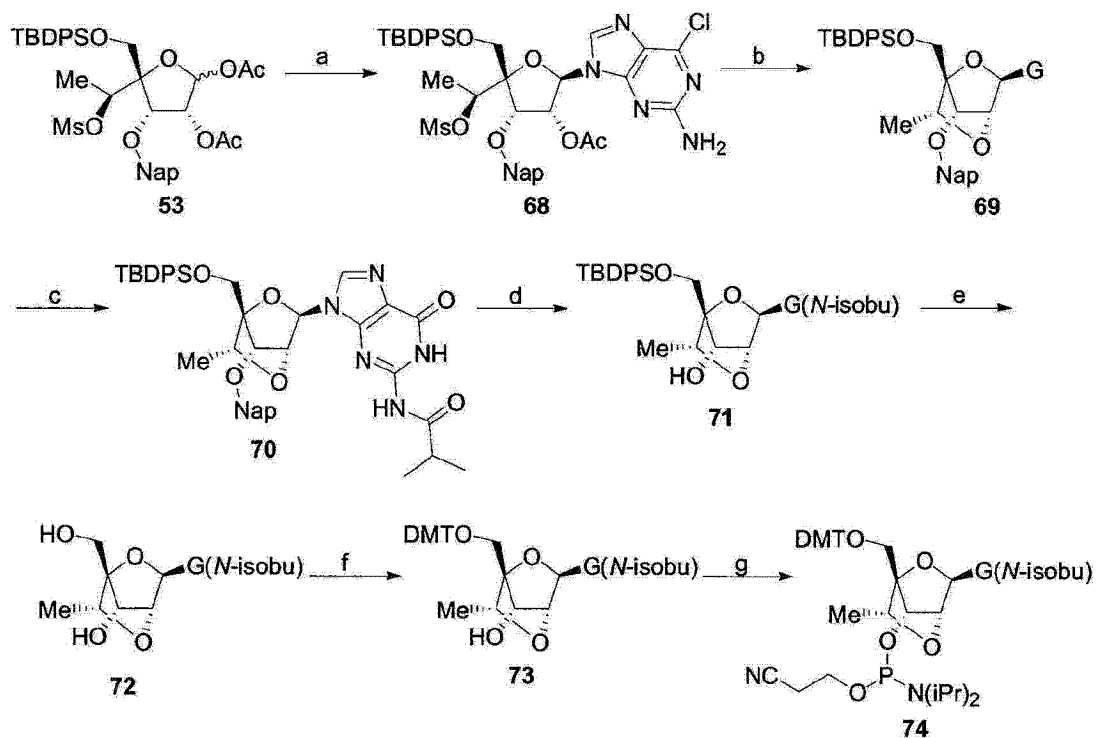
[0294] G) (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(2-N-异丁酰鸟嘌呤-9-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (67)

[0295] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (1.06mL, 3.4mmol) 加入含有核苷 66(1.52g, 2.2mmol)、四唑 (0.12g, 1.7mmol) 和 N-甲基咪唑 (45 μL, 0.56mmol) 的 DMF(11mL) 溶液。室温搅拌 8 小时后, 将反应物倒入 EtOAc, 依次以 90% 盐水、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 2.5% 的 MeOH/CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供白色固体亚磷酰胺 67(1.65g, 84%)。 <sup>31</sup>P NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ : 148.70, 145.81。

[0296] 实施例 8

[0297] (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(2-N-异丁酰鸟嘌呤-9-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (74)

[0298]



[0299] 示意结构流程 8(a) 2-氨基-6-氯嘌呤, BSA, TMSOTf, DCE, 回流, 2 小时; (b) 3-羟基丙腈, NaH, THF, 4 小时; (c) 异丁酸酐, DMAP, DMF, 60°C, 24 小时; (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 室温, 16 小时; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时; (f) DMTCl, 嘧啶, 室温, 16 小时; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF。

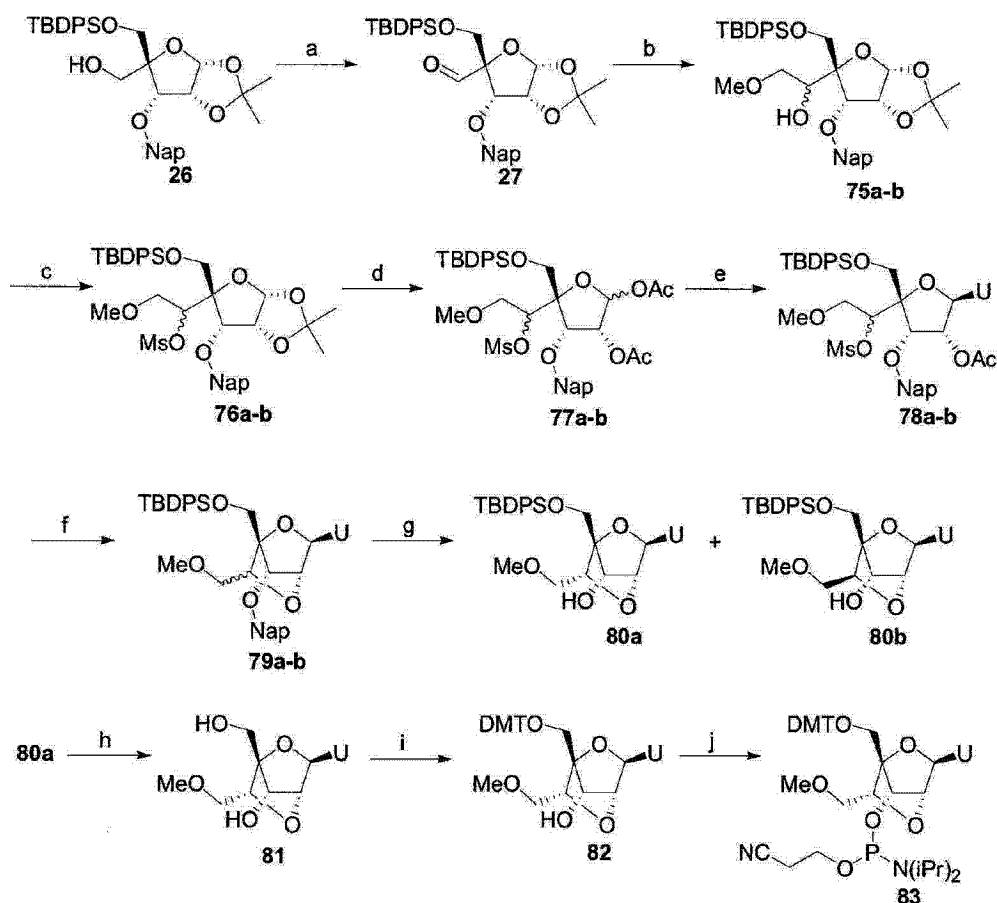
[0300] 亚磷酰胺 74 可通过与所示的由二乙酸 32 得到亚磷酰胺 67 的相同方法由二乙酸 53 进行制备。

[0301] 实施例 9

[0302] (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)磷氧基]-1-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲氧基甲基-2, 5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (83)

[0303]





[0304] 示意结构流程 9(a) 草酰氯, DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$ ; (b)  $\text{MeOCH}_2\text{Br}$ , Mg,  $\text{HgCl}_2$ , THF,  $-20^\circ\text{C}$ , 由 26 为  $>95\%$ ; (c)  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 85%; (d)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , AcOH,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 室温, 3 小时, 84%; (e) 尿嘧啶, BSA, TMSOTf, MeCN, 回流, 2 小时; (f)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 来自 77a-b 的产率为 89%; (g) DDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 8 小时, 室温, 80a 和 80b 的联合产率为 98%; (h)  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 室温, 16 小时; (i)  $\text{DMTCl}$ , 嘧啶, 16 小时, 室温, 90%; (j)  $\text{CN}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{N}-i\text{Pr}_2)_2$ , 四唑, NMI, DMF, 96%。

[0305] A) 醇 (75a-b)

[0306] 在  $-78^\circ\text{C}$  下向草酰氯 (2.2 mL, 25.0 mmol) 的二氯甲烷 (130 mL) 溶液添加二甲亚砜 (3.5 mL, 50.0 mmol)。搅拌 30 分钟后, 在 10 分钟向反应中添加醇 26 (10.0 g, 16.7 mmol) 的二氯甲烷 (30 mL) 溶液。继续搅拌 45 分钟后, 向反应中缓慢添加三乙胺 (10.5 mL, 75.0 mmol)。添加完成后, 去除冰浴并将反应逐渐升温至  $0^\circ\text{C}$  (约 1 小时) 并转移至分液漏斗。先后以 5% HCl、饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤有机层, 然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩以提供醛 27, 其在高度真空下干燥 (18 小时) 并可在不作纯化下使用。

[0307] 以干 THF (5 mL) 覆盖镁带 (2.5 g, 102.8 mmol) 和氯化汞 (II) (93 mg, 0.34 mmol) 的混合物, 并将反应物冷却至  $-20^\circ\text{C}$ 。滴入数滴纯甲氧基甲基溴以起始反应。等待数分钟后, 经大约 3 小时向反应加入甲氧基甲基溴 (9.33 mL, 102.8 mmol) 的 THF (12 mL) 溶液 (1 mL/10 分钟, 通过注射器)。在添加过程中外部浴的温度小心维持在  $-20$  和  $-25^\circ\text{C}$  之间。间歇 (在 3 小时内) 加入少量的干 THF (5 mL) 以促进搅拌。添加溴化物完毕后, 在  $-25^\circ\text{C}$  下搅拌反应物 100 分钟, 然后添加粗品醛 (27) 的 THF (30 mL) 溶液。在  $-20^\circ\text{C}$  下搅拌 45 分钟后, 通过 TLC 未检测到起始材料醛 27。以饱和氯化铵溶液小心淬灭反应并用乙酸乙酯稀释。以 5% HCl、

饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤有机层,然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 25% 至 30% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供混合物醇 75a-b (定量) (约 1:1 的异构体)。

[0308] B) 甲磺酸 (76a-b)

[0309] 向溶于三乙胺 (5.3mL, 37.9mmol) 的醇 75a-b (13.38g, 20.8mmol) 和 DMAP (0.36g, 2.9mmol) 的二氯甲烷 (42mL) 冷溶液 (0 °C) 添加甲烷磺酰氯 (2.3mL, 29.2mmol)。搅拌 2 小时后另外加入甲烷磺酰氯 (0.5mL)。继续搅拌 1 小时, 以氯仿稀释反应物。先后以 5% HCl、饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤有机层, 然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 20% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供粘性油状的甲磺酸 76a-b (12.8g, 85%)。

[0310] C) 二乙酸 (77a-b)

[0311] 将浓硫酸 (6 滴) 加入甲磺酸 76a-b (12.8g, 17.8mmol) 的醋酸 (50mL) 和乙酸酐 (10mL) 溶液。室温下搅拌 3 小时后以 LCMS 对反应物进行完全鉴定, 并在高度真空下挥发掉大部分溶剂。用乙酸乙酯稀释浓缩的混合物, 以水、饱和碳酸氢钠溶液 (直至 pH > 10) 和盐水洗涤有机相, 然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 20% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供粘性油状的二乙酸 77a-b 的异头体混合物 (11.44g, 84%)。

[0312] D) 核苷 (79a-b)

[0313] 向二乙酸 77a-b (11.44g, 15.0mmol) 和尿嘧啶 (3.35g, 29.9mmol) 的  $\text{CH}_3\text{CN}$  (75mL) 悬浮液添加 N, O-二(三甲基硅烷基)乙酰胺 (14.76mL, 59.9mmol)。40 °C 加热 15 分钟得到澄清溶液后, 在冰浴中冷却反应物并添加三甲基硅烷基三氟甲基磺酸盐 (4.06mL, 22.5mmol)。回流 2 小时后, 将反应冷却至室温并倒入 EtOAc。以半饱和碳酸氢钠和盐水洗涤有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩以提供粗品核苷 78a-b, 其可在不作纯化下使用。

[0314] 向核苷 78a-b (由前面获得) 的甲醇 (130mL) 溶液添加碳酸钾 (5.30g, 38.4mmol)。室温搅拌 16 小时后将反应物真空浓缩。将残留物溶剂于乙酸乙酯, 用水和盐水萃取, 然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 5 至 7.5% 的丙酮 / 氯仿洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 79a-b (9.0g, 来自 77a-b 的产率为 89%)。

[0315] E) 核苷 (80a 和 80b)

[0316] 向核苷 79a-b (9.0g, 13.3mmol) 的二氯甲烷 (130mL) 和水 (6.5mL) 溶液添加 DDQ (20.0mmol, 4.5g)。将两相反应物在室温下搅拌 2 小时, 然后再次添加 DDQ (向反应添加 2.75g)。另外 2 小时后再次向反应添加 DDQ (1.1g), 继续搅拌 4 小时, 然后将反应物在冰箱中贮存 16 小时。第二日早, LCMS 显示了痕量的核苷 79a-b, 因此再次向反应中加入 DDQ (0.9g), 继续搅拌 2 小时, 此时通过 TLC 和 LCMS 再未检测到核苷 79a-b。真空挥发溶剂, 并在乙酸乙酯和水之间分配残留物。以亚硫酸氢钠溶液 (2×)、饱和碳酸氢钠溶液和盐水洗涤有机层, 然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 10 至 20% 的丙酮 / 氯仿洗脱) 纯化分别提供核苷 80a (洗脱较慢的点) 和 80b (洗脱较快的点) (7.0g, 联合产率为 98%)。

[0317] F) 核苷 (81)

[0318] 向核苷 80a (6.7g, 12.5mmol) 和三乙胺 (5.2mL, 37.4mmol) 的 THF (120mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (12.2mL, 74.8mmol)。室温搅拌 16 小时后将反应物真空浓缩至干燥。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 7.5 至 12.5% 的 MeOH/ $\text{CHCl}_3$  洗脱) 纯化提供核苷 81 (混有三乙胺·氢氟酸盐, 产率 > 100%), 其可在不作进一步纯化下使用。

[0319] G) 核苷 (82)

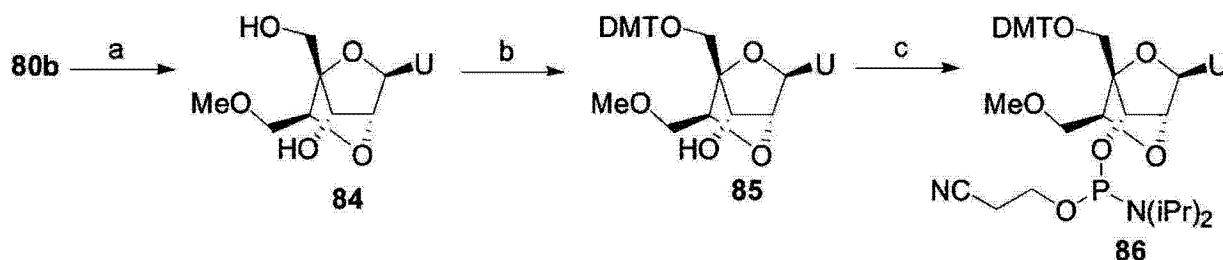
[0320] 向核苷 81 (约 12.5mmol) 的嘧啶 (75mL) 溶液添加 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (DMTC1, 4.8g, 14.3mmol)。在室温下搅拌 16 小时后再次向反应添加 DMTC1 (2.4g)。继续搅拌 4 小时后添加 MeOH (10mL)。搅拌 30 分钟后,以乙酸乙酯稀释反应物,并以水和盐水洗涤有机相,然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 60 至 75% 的 EtOAc/己烷) 纯化提供白色泡沫状的核苷 82 (6.73g, 90%)。H) (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲氧基甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (83)

[0321] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (1.58mL, 5.0mmol) 加入核苷 82 (2.0g, 3.3mmol)、四唑 (0.19g, 2.6mmol) 和 N-甲基咪唑 (68  $\mu\text{L}$ , 0.83mmol) 的 DMF (16mL) 溶液。室温搅拌 8 小时后将反应物倒入 EtOAc。依次以 90% 盐水和盐水洗涤有机层,然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 66% 至 75% 的 EtOAc/己烷洗脱) 纯化提供白色固体亚磷酰胺 83 (2.54g, 96%)。 $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149.78, 149.44。

[0322] 实施例 10

[0323] (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲氧基甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (86)

[0324]



[0325] 示意结构流程 10 (a)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 3HF,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 室温, 16 小时; (i) DMTC1, 嘧啶, 16 小时, 室温, 91%; (j)  $\text{CN}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{N-iPr})_2$ , 四唑, NMI, DMF, 96%。

[0326] A) 核苷 (84)

[0327] 向核苷 80b (6.43g, 12.0mmol) 和三乙胺 (5.0mL, 35.7mmol) 的 THF (125mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (11.6mL, 71.5mmol)。室温搅拌 16 小时后将反应物真空浓缩至干燥。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 7.5 至 12.5% 的 MeOH/ $\text{CHCl}_3$  洗脱) 纯化残留物提供核苷 84 (混有三乙胺·氢氟酸盐, 产率 >100%), 其可在不作进一步纯化下使用。

[0328] B) 核苷 (85)

[0329] 向核苷 84 (约 12.0mmol) 的嘧啶 (72mL) 溶液添加 4,4'-二甲氧基三苯甲基氯 (DMTC1, 4.6g, 13.8mmol)。在室温下搅拌 16 小时后再次向反应添加 DMTC1 (2.3g)。继续搅拌 4 小时后添加 MeOH (10mL)。搅拌 30 分钟后,以乙酸乙酯稀释反应物,并以水和盐水洗涤有机相,然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 60 至 75% 的 EtOAc/己烷) 纯化提供白色泡沫状的核苷 85 (6.52g, 91%)。C) (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(尿嘧啶-1-基)-6-甲氧基甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (86)

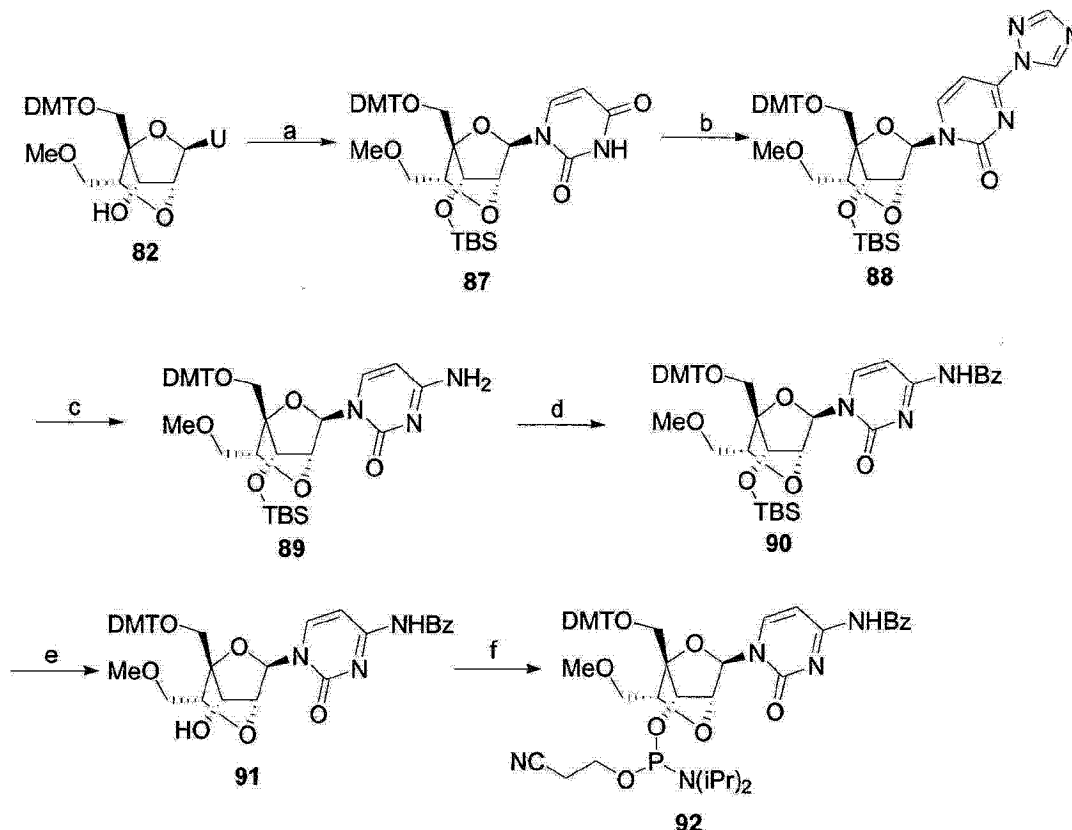
[0330] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (1.58mL, 5.0mmol) 加入核苷

85 (2.0g, 3.3mmol)、四唑 (0.19g, 2.7mmol) 和 N-甲基咪唑 (68  $\mu$ L, 0.83mmol) 的 DMF (17mL) 溶液。室温搅拌 8 小时后将反应物倒入 EtOAc。依次以 90% 盐水和盐水洗涤有机层, 然后干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 66% 至 75% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体亚磷酰胺 86 (2.55g, 96%)。 $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149.97, 149.78。

[0331] 实施例 11

[0332] (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N-苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲氧基甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (92)

[0333]



[0334] 示意结构流程 11(a) TBSCl,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 室温, 16 小时 98%; (b)  $\text{POCl}_3$ , 1, 2, 4-三唑,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 室温, 4 小时; (c)  $\text{NH}_3$  水溶液, 1, 4-二恶烷, 室温, 16 小时; (d)  $\text{Bz}_2\text{O}$ , DMF, 室温, 16 小时, 来自 82 的产率为 91%; (e)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 3HF,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 室温, 16 小时, 94%; (f)  $\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{OP}(\text{N-iPr})_2$ , 四唑, NMI, DMF, 84%。

[0335] A) 核苷 (87)

[0336] 将叔丁基二甲基硅烷基氯 (2.40g, 15.9mmol) 添加至核苷 82 (3.20g, 5.3mmol) 和咪唑 (2.16g, 31.8mmol) 的 DMF (10.6mL) 溶液。室温搅拌 16 小时后将反应物倒入 EtOAc。以盐水萃取有机相, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并真空浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体核苷 87 (3.70g, 98%)。

[0337] B) 核苷 (90)

[0338] 将三氯氧磷 (3.86mL, 41.4mmol) 添加至 1, 2, 4-三唑 (12.15g, 176.1mmol) 的  $\text{CH}_3\text{CN}$  (80mL) 冷悬浮液 ( $0^\circ\text{C}$ )。搅拌 15 分钟后加入三乙胺 (29.0mL, 207.2mmol), 继续搅拌 30 分钟。在  $0^\circ\text{C}$  下向反应混合物添加核苷 87 (3.70g, 5.2mmol) 的  $\text{CH}_3\text{CN}$  (20mL) 溶液。搅拌

10 分钟后,去除冰浴并在室温下搅拌反应物 4 小时。然后真空去除溶剂,在 EtOAc 和之间分配残留物。然后以饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相,然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供粗产物 88,其可在不作任何纯化下使用。

[0339] 将氨水 (10mL) 添加至核苷 88 (由前面获得) 的二恶烷 (50mL) 溶液。在室温下搅拌 16 小时后,真空浓缩反应物并在高度真空下干燥 8 小时以提供核苷 89,其可在不作纯化下使用。

[0340] 向核苷 89 (由前面获得) 的 DMF (10mL) 溶液添加苯甲酸酐 (1.99g, 8.8mmol)。室温搅拌 16 小时后将反应物倒入 EtOAc。依次以饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水萃取有机层,然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 90 (3.86g, 来自 87 的产率为 91%)。

[0341] C) 核苷 (91)

[0342] 在聚丙烯管中向核苷 90 (3.81g, 4.7mmol) 和三乙胺 (1.56mL, 11.2mmol) 的 THF (46mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (4.54mL, 27.9mmol)。室温搅拌 16 小时后,真空干燥反应物并将残留物溶解于 EtOAc。依次以水、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机层,然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 5%MeOH/CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供白色固体核苷 91 (3.07g, 94%)。

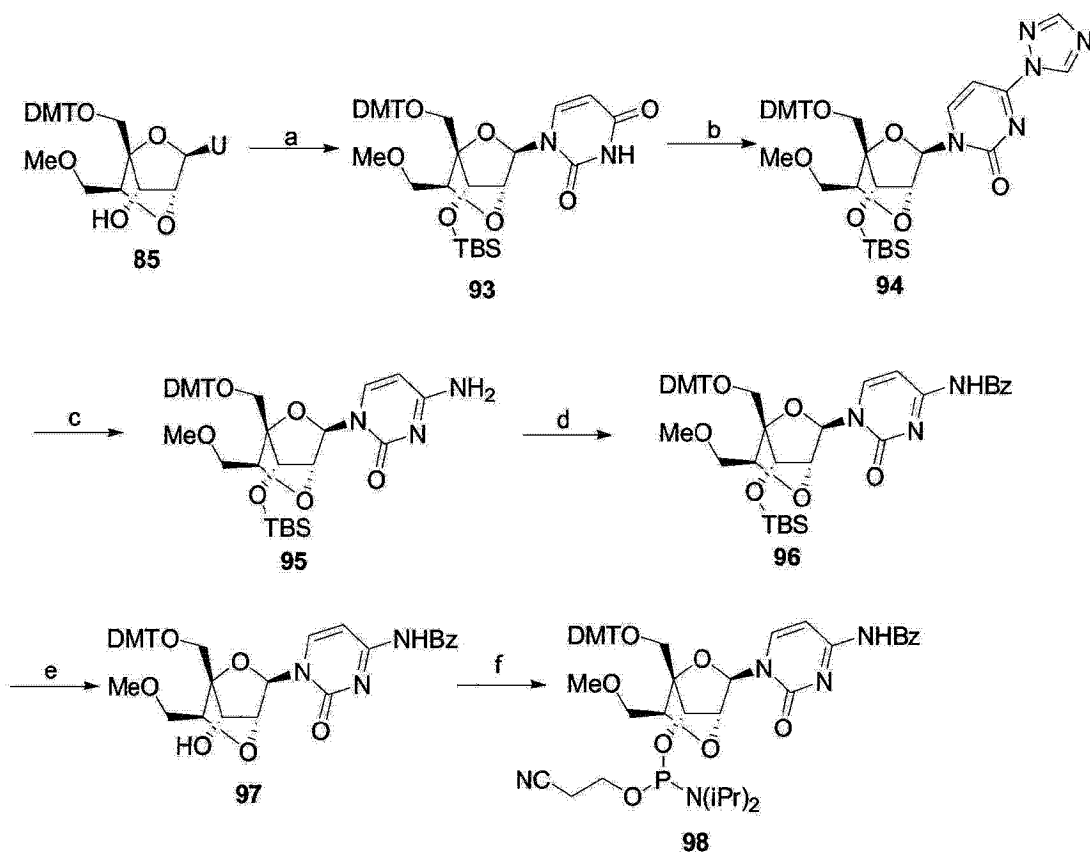
[0343] D) (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N-苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (92)

[0344] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (0.90mL, 4.3mmol) 加入核苷 91 (2.0g, 2.8mmol)、四唑 (0.16g, 2.3mmol) 和 N-甲基咪唑 (58 μL, 0.71mmol) 的 DMF (14mL) 溶液。室温搅拌 8 小时后将反应物倒入 EtOAc。依次以 90% 盐水和盐水洗涤有机层,然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。将残留物溶解于最小量的 EtOAc,将该溶液添加至己烷。收集所得的沉淀物,进一步通过柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 75% 至 90% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体亚磷酰胺 92 (2.14g, 84%)。 <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 149.82。

[0345] 实施例 12

[0346] (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N-苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲氧基甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (98)

[0347]



[0348] 示意结构流程 12(a) TBSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 室温, 16 小时, 97%; (b) POCl<sub>3</sub>, 1, 2, 4-三唑, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, 室温, 4 小时; (c) NH<sub>3</sub> 水溶液, 1, 4-二恶烷, 室温, 16 小时; (d) Bz<sub>2</sub>O, DMF, 室温, 16 小时, 来自 93 的产率为 89%; (e) Et<sub>3</sub>N, 3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时, 89%; (f) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF, 84%。

[0349] A) 核苷 (93)

[0350] 将叔丁基二甲基硅烷基氯 (2.25g, 15.0mmol) 添加至核苷 85 (3.0g, 5.0mmol) 和咪唑 (2.03g, 29.9mmol) 的 DMF (10mL) 溶液。室温搅拌 16 小时后将反应物倒入 EtOAc。以盐水萃取有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体核苷 93 (3.45g, 97%)。

[0351] B) 核苷 (96)

[0352] 将三氯氧磷 (3.59mL, 38.5mmol) 添加至 1, 2, 4-三唑 (11.3g, 163.9mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (80mL) 冷悬浮液 (0°C)。搅拌 15 分钟后向反应中加入三乙胺 (27.0mL, 192.8mmol), 继续搅拌 30 分钟。在 0°C 下向反应中添加核苷 93 (3.45g, 4.82mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (20mL) 溶液。搅拌 10 分钟后, 去除冰浴并在室温下搅拌反应物 4 小时。真空去除溶剂, 在 EtOAc 和之间分配残留物。然后以 NaHCO<sub>3</sub> 饱和溶液和盐水洗涤有机相, 然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供粗产物 94, 其在不作任何纯化下使用。

[0353] 将氨水 (10mL) 添加至核苷 94 (由前面获得) 的二恶烷 (50mL) 溶液。在室温下搅拌 16 小时, 真空浓缩反应物并在高度真空下干燥 8 小时以提供核苷 95, 其在不作纯化下使用。

[0354] 向核苷 95 (由前面获得) 的 DMF (9mL) 溶液添加苯甲酸酐 (1.63g, 7.2mmol)。室

温搅拌 16 小时后将反应物倒入 EtOAc。依次以饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水萃取有机层,然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 50% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体核苷 96 (3.53g, 来自 93 的产率为 89%)。

[0355] C) 核苷 (97)

[0356] 在聚丙烯管中向核苷 96 (3.53g, 4.3mmol) 和三乙胺 (1.43mL, 10.3mmol) 的 THF (43mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (4.20mL, 25.8mmol)。室温搅拌 16 小时后,真空干燥反应物并将残留物溶解于 EtOAc。依次以水、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机相,然后干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 25% 至 40% 的丙酮 /CHCl<sub>3</sub> 洗脱) 纯化提供白色固体的核苷 97 (2.87g, 95%)。

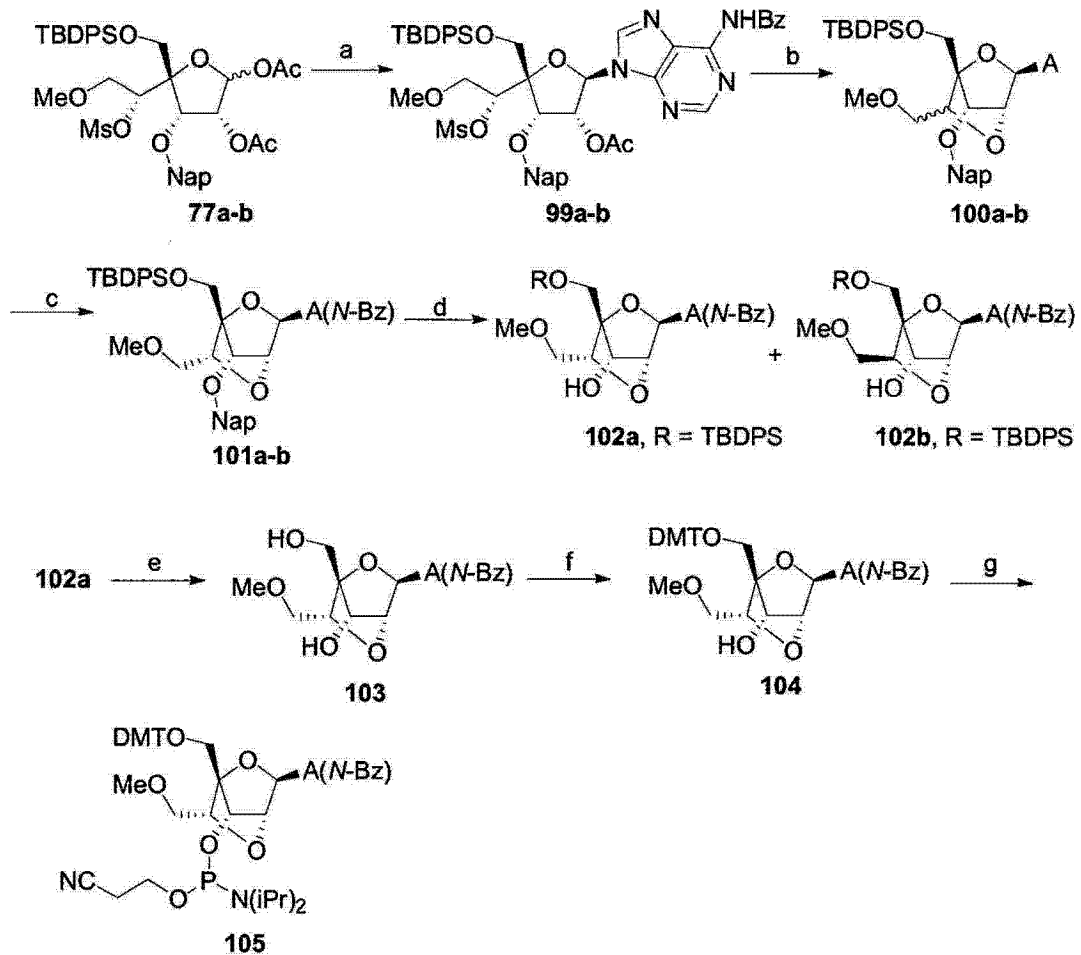
[0357] D) (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(4-N-苯甲酰胞嘧啶-1-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环 [2.2.1] 庚烷 (98)

[0358] 将 2-氰乙基四异丙基亚磷二酰胺 (1.35mL, 4.3mmol) 加入核苷 97 (2.0g, 2.8mmol)、四唑 (0.16mg, 2.3mmol) 和 N-甲基咪唑 (58 μL, 0.71mmol) 的 DMF (14mL) 溶液。室温搅拌 8 小时后,将反应物倒入 EtOAc,依次以 90% 盐水和盐水洗涤有机相,干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 75% 至 90% 的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供白色固体核苷 98 (2.15g, 84%)。 <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ : 150.33。

[0359] 实施例 13

[0360] (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基-(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(6-N-苯甲酰腺嘌呤-9-基)-6-甲氧基甲基-2,5-二氧杂-双环 [2.2.1] 庚烷 (105)

[0361]



[0362] 示意结构流程 13(a)6-N-苯甲酰腺嘌呤, BSA, TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN, 回流, 8 小时; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 室温, 16 小时; (c) Bz<sub>2</sub>O, DMF, 室温; (d) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 室温; (e) Et<sub>3</sub>N·3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时; (f) DMTCl, 嘧啶, 室温, 16 小时; (g) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF。

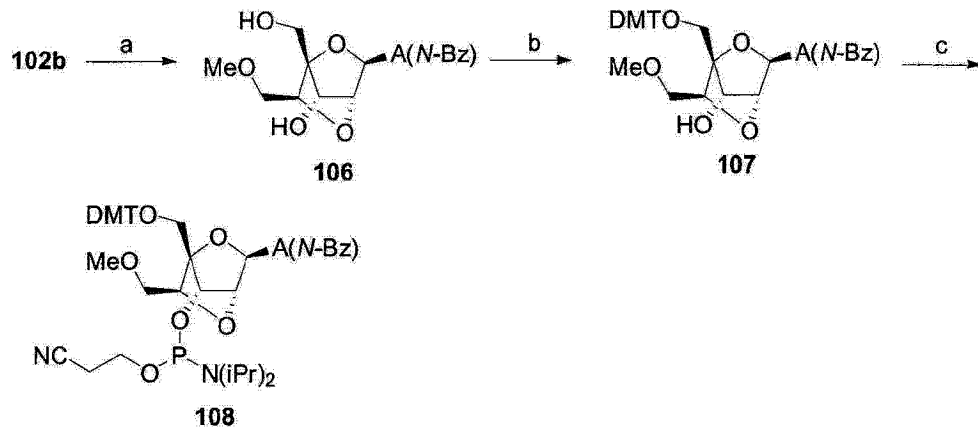
[0363] 亚磷酰胺 105 通过所示的由二乙酸混合物 77a-b 合成亚磷酰胺 83 的方法由二乙酸 77a-b 制备。

[0364] 实施例 14

[0365] (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)磷氧基]-1-(4,4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(6-N-苯甲酰腺嘌呤-9-基)-6-甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷 (108)

[0366]





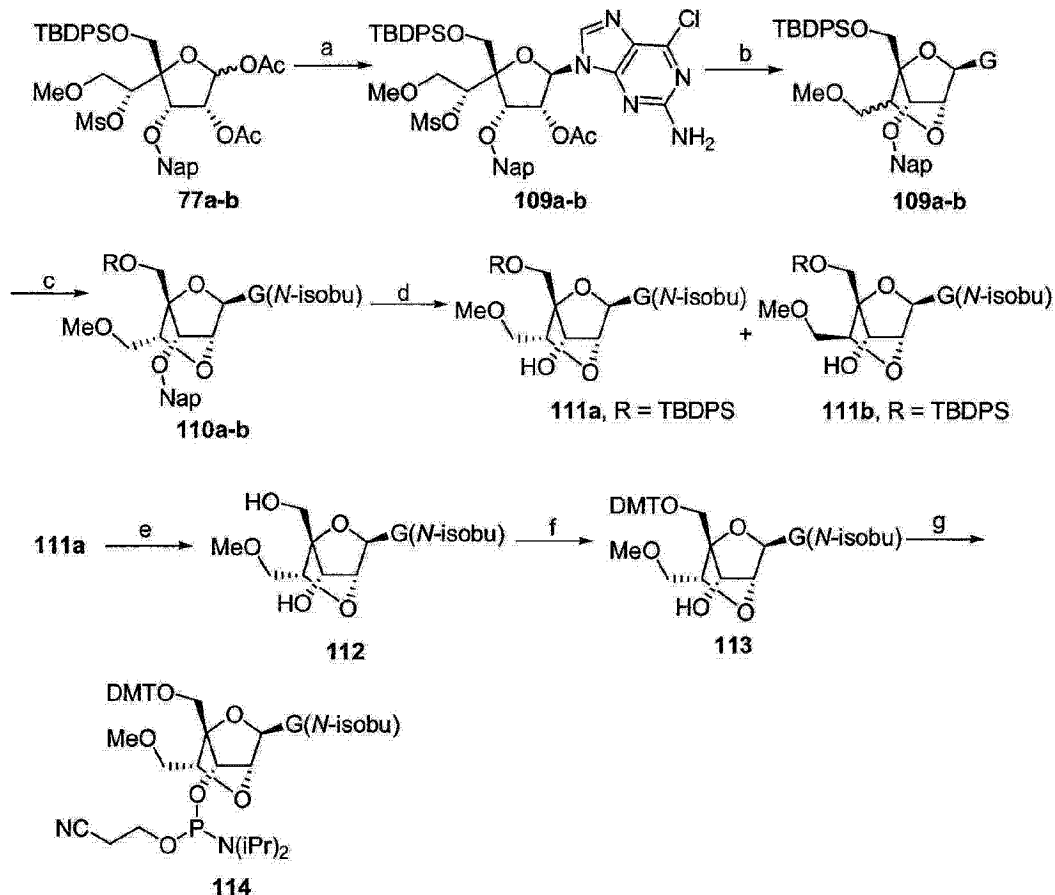
[0367] 示意结构流程 14 (a)  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 室温, 16 小时; (b) DMTCl, 咪啉, 室温, 16 小时; (c)  $\text{CNCH}_2\text{CH}_2\text{OP}(\text{N}-i\text{Pr})_2$ , 四唑, NMI, DMF。

[0368] 亚磷酰胺 108 通过所示的由 80b 合成亚磷酰胺 86 的方法由核苷 102b 制备。

[0369] 实施例 15

[0370] (1S, 3R, 4R, 6R, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4,4'-二甲氧三苯甲基氧基甲基)-3-(2-N-异丁酰鸟嘌呤-9-基)-6-甲氧基甲基-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷(114)

[0371]



[0372] 示意结构流程 15 (a) 2-氨基-6-氯嘌呤, BSA, TMSOTf,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 回流, 2 小时; (b) 3-羟基丙腈, NaH, THF, 4 小时; (c) 异丁酸酐, DMAP, DMF,  $60^\circ\text{C}$ , 24 小时; (d) DDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 室温, 16 小时; (e)  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 室温; (f) DMTCl, 咪啉, 室温; (g)

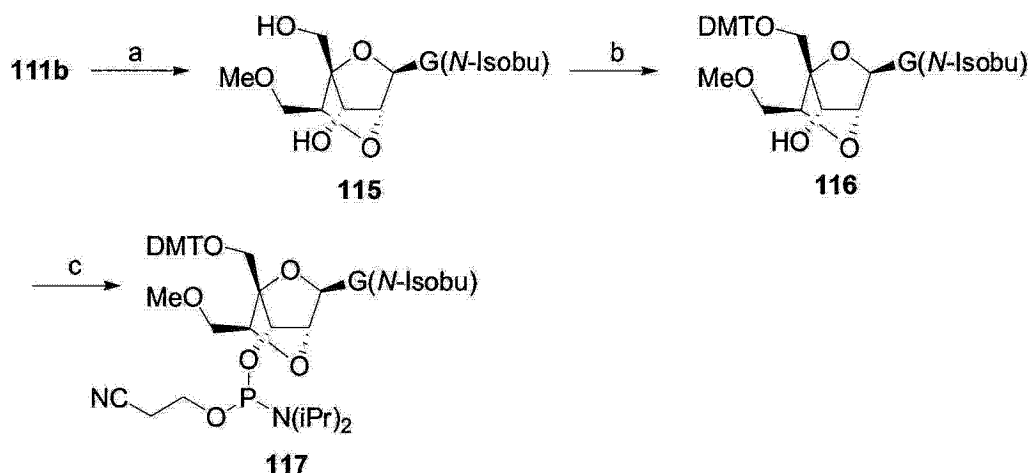
CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF。

[0373] 亚磷酰胺 114 通过所示的由二乙酸混合物 77a-b 合成亚磷酰胺 83 的方法由二乙酸 77a-b 制备。

[0374] 实施例 16

[0375] (1S, 3R, 4R, 6S, 7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-(4, 4'-二甲氧基三苯甲基氧基甲基)-3-(2-N-异丁酰鸟嘌呤-9-基)-6-甲氧基甲基-2, 5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷(117)

[0376]



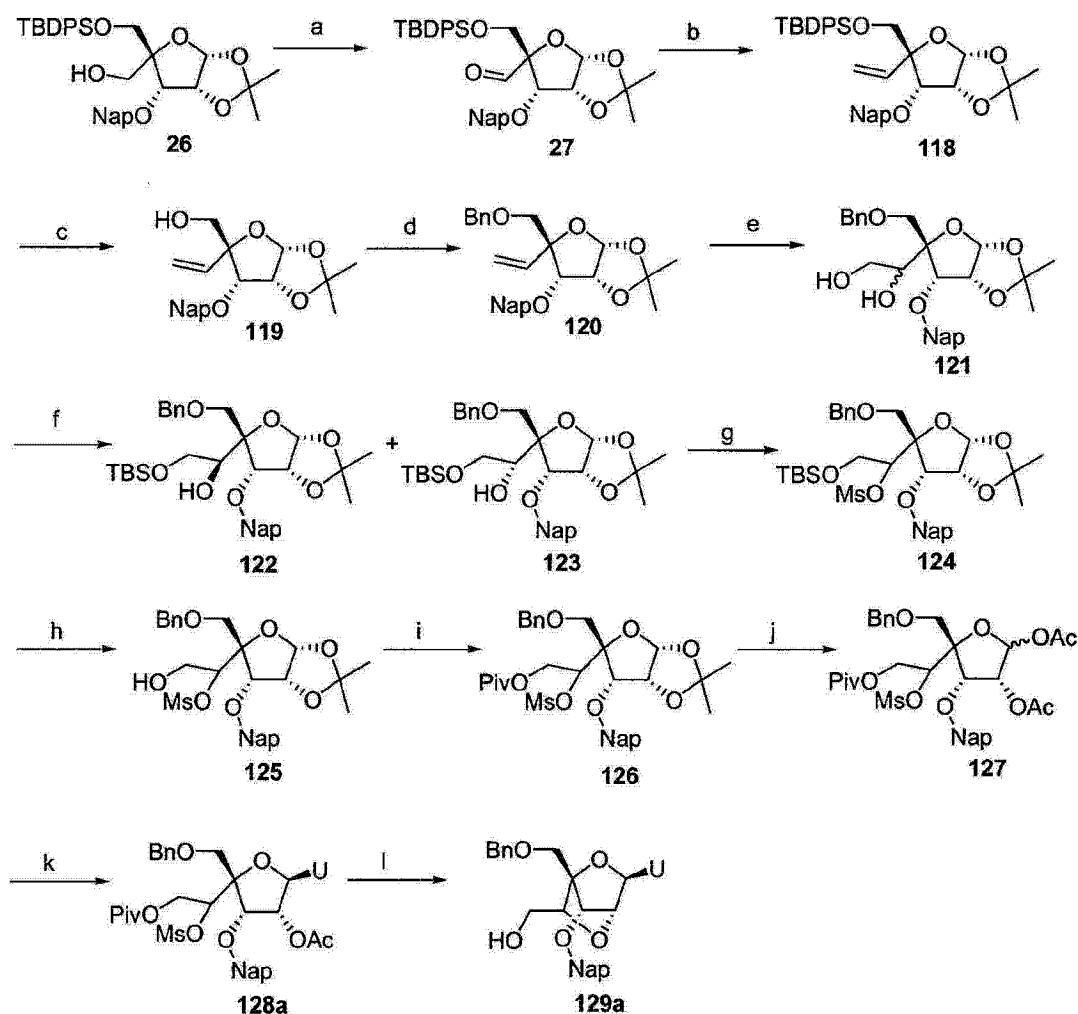
[0377] 示意结构流程 16 (a) Et<sub>3</sub>N, 3HF, Et<sub>3</sub>N, THF, 室温, 16 小时; (b) DMTCl, 咪啉, 室温, 16 小时; (c) CNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP(N-iPr)<sub>2</sub>, 四唑, NMI, DMF。

[0378] 亚磷酰胺 117 通过所示的由 80b 合成亚磷酰胺 86 的方法由核苷 111b 制备。

[0379] 实施例 17

[0380] 6-CH<sub>2</sub>OH BNA 合成

[0381]



[0382] 示意结构流程 17(a) 草酰氯, DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78$  至  $0^\circ\text{C}$ ; (b)  $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br}$ ,  $\text{nBuLi}$ , THF,  $-78^\circ\text{C}$  至室温, 来自 26 的产率为 97%; (c) TBAF, THF, 室温, 16 小时, 97%; (d)  $\text{NaH}$ ,  $\text{BnBr}$ , DMF, 室温, 1 小时, 定量; (e)  $\text{OsO}_4$ , NMO, 95% 丙酮水溶液, 室温, 48 小时, 87%; (f)  $\text{TBSOCl}$ , 吡啶,  $0^\circ\text{C}$ , 4 小时, 定量; (g)  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 室温, 16 小时, 分别为 44% 和 40% 收率; (h)  $\text{Et}_3\text{N}$ , 3HF,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 定量; (i)  $\text{PivCl}$ , DIPEA, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 室温, 16 小时; (j)  $\text{AcOH}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 催化量  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 来自 125 的产率为 92%; (k) BSA, 尿嘧啶,  $\text{TMSOTf}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 回流 2 小时; (l)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 来自 127 的产率为 74%。

[0383] A) 核苷 118

[0384] 将二甲基亚砷 (1.77mL, 25.0mmol) 逐滴加入草酰氯 (1.10mL, 12.5mmol) 的二氯甲烷 (60mL) 冷溶液 ( $-78^\circ\text{C}$ )。搅拌 30 分钟后, 向反应中添加醇 26 (5.0g, 8.4mmol) 的二氯甲烷 (20mL) 溶液。在  $78^\circ\text{C}$  下继续搅拌 45 分钟, 然后逐滴向反应中添加三乙胺 (5.05mL, 37.5mmol)。搅拌 10 分钟后, 去除冰浴并将反应逐渐升温至约  $0^\circ\text{C}$ , 此时 TLC 显示没有起始醇。以二氯甲烷稀释反应物, 并先后以 10% $\text{HCl}$ 、饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤有机相, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩以提供醛 27, 其不经纯化用于下一步骤。

[0385] B) 核苷 118

[0386] 向三苯基溴化磷 (3.88g, 10.9mmol) 的干 THF (60mL) 冷搅拌溶液 ( $0^\circ\text{C}$ ) 逐滴添加  $\text{nBuLi}$  (2.5M, 4.34mL, 10.9mmol)。搅拌 1 小时后, 将红色溶液冷却至  $-78^\circ\text{C}$ , 并逐滴向反应中添加由前面获得的醛 27 (8.4mmol) 的干 THF (15mL) 溶液。将反应物逐渐加热至室温, 继续

搅拌 16 小时。使用饱和  $\text{NH}_4\text{Cl}$  小心淬灭反应,且反应物在  $\text{EtOAc}$  和水之间分配。然后以盐水洗涤有机层,干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 10% $\text{EtOAc}$  的己烷溶液洗脱) 纯化提供无色油状的烯烃 118 (4.84g, 由 26 为 97%)。

[0387] C) 核苷 119

[0388] 将氟化四丁基铵 (1M 存在于 THF 中, 10.00mL, 10.0mmol) 添加至烯烃 118 (4.83g, 8.1mmol) 的 THF (35mL) 溶液。室温搅拌反应物 16 小时后, 真空去除溶剂并将残留物溶解于  $\text{EtOAc}$ 。然后以水、盐水洗涤有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 40% $\text{EtOAc}$  的己烷溶液洗脱) 纯化提供无色油状的醇 119 (2.79g, 97%)。

[0389] D) 核苷 120

[0390] 将氢化钠 (60%w/w 存在于矿物油中, 0.4g, 10mmol) 添加入醇 119 (1.44g, 4.1mmol) 和苯甲基溴 (0.71mL, 6.0mmol) 的 DMF (16mL) 冷溶液 ( $0^\circ\text{C}$ )。在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 1 小时后, 用水小心淬灭反应并在  $\text{EtOAc}$  和水之间分配。以盐水分离并洗涤有机相, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 10 至 25% $\text{EtOAc}$  的己烷溶液洗脱) 纯化提供无色油状的烯烃 120 (1.84g, 定量)。

[0391] E) 核苷 121

[0392] 将四氧化锇 (25% $\text{OsO}_4$  的  $i\text{PrOH}$  溶液, 1mL) 添加至烯烃 120 (1.80g, 4.0mmol) 和 N-甲基吗啉-N-氧化物 (NMO, 0.94g, 8.0mmol) 的 95% 丙酮 / 水 (25mL) 溶液。在室温下搅拌 16 小时后, 向反应中再度添加  $\text{OsO}_4$  溶液 (0.5mL) 和 NMO (0.40g)。搅拌总计 48 小时后, 以  $\text{EtOAc}$  稀释反应物并以 10% $\text{NaHSO}_3$ 、盐水洗涤, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 40% 至 50% $\text{EtOAc}$  的己烷溶液洗脱) 纯化提供无色油状的二醇 121 (1.68g, 87%, 约 1:1 的异构体混合物)。

[0393] F) 核苷 122 和 123

[0394] 将 TBSCl (0.66g, 4.4mmol) 添加至二醇 121 (1.63g, 3.4mmol) 的吡啶 (17mL) 冷溶液 ( $0^\circ\text{C}$ )。在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 4 小时后, 以  $\text{EtOAc}$  稀释反应物, 以水、盐水洗涤有机层, 干燥并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 10 至 20% $\text{EtOAc}$  的己烷溶液洗脱) 纯化提供无色油状的醇 122 和 123 (0.90g 和 1.117g, 未指定绝对立体化学)。

[0395] G) 核苷 124

[0396] 向醇 123 (未指定绝对立体化学, 0.9g, 1.5mmol)、三乙胺 (0.46mL, 3.3mmol) 和二甲基氨基吡啶 (37mg, 0.3mmol) 的二氯甲烷 (5mL) 冷溶液 ( $0^\circ\text{C}$ ) 添加甲烷磺酰氯 (0.24mL, 3.0mmol)。在室温下 7 小时后, 再向反应中添加甲基磺酰氯 (0.12mL) 和三乙胺 (0.23mL)。室温下搅拌 9 小时后, 将反应物倒入  $\text{EtOAc}$ , 以 10% $\text{HCl}$ 、饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤有机相, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 10% 至 15% $\text{EtOAc}$  的己烷溶液洗脱) 纯化提供甲磺酸 124 (0.44g, 44%) 和起始的二醇 123 (0.32g, 40%)。

[0397] H) 核苷 125

[0398] 向甲磺酸 124 (0.44g, 0.6mmol) 和三乙胺 (0.23mL, 1.7mmol) 的 THF (7mL) 溶液添加三乙胺三氢氟酸盐 (0.64mL, 4.0mmol)。室温下搅拌 16 小时后, 以  $\text{EtOAc}$  稀释反应物, 并以饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤有机相, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并浓缩。柱层析 ( $\text{SiO}_2$ , 以 50% $\text{EtOAc}$  的己烷溶液洗脱) 纯化提供醇 125 (0.40g, 定量)。

[0399] I) 核苷 127

[0400] 向醇 125 (0.72mmol, 0.4g)、二异丙基乙基胺 (DIPEA, 0.17mL, 1.0mmol) 和二甲基氨基嘧啶 (12mg, 0.1mmol) 的二氯甲烷 (2mL) 的冷溶液 (0℃) 逐滴添加特戊酰氯 (0.12mL, 1.0mmol)。去除冰浴, 在室温下搅拌反应物 2 小时, 然后再向反应中添加 DIPEA (0.17mL) 和新戊酰氯 (0.12mL), 并在室温下搅拌 16 小时。然后以 EtOAc 稀释反应物, 以 10%HCl、饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩得到粗品 pivaloate 126, 其在不作进一步纯化下使用。

[0401] 将浓硫酸 (2 滴) 加入粗品 pivaloate 126 (由前面获得) 的冰醋酸 (2.5mL) 和乙酸酐 (0.5mL) 溶液。在室温下搅拌 2 小时后在高度真空下去除溶剂并将残留物溶解于 EtOAc, 以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 10 至 15%EtOAc 的己烷溶液洗脱) 纯化提供无色油状的二乙酸 127 (0.45g, 来自 125 的产率为 92%) (异构体混合物)。

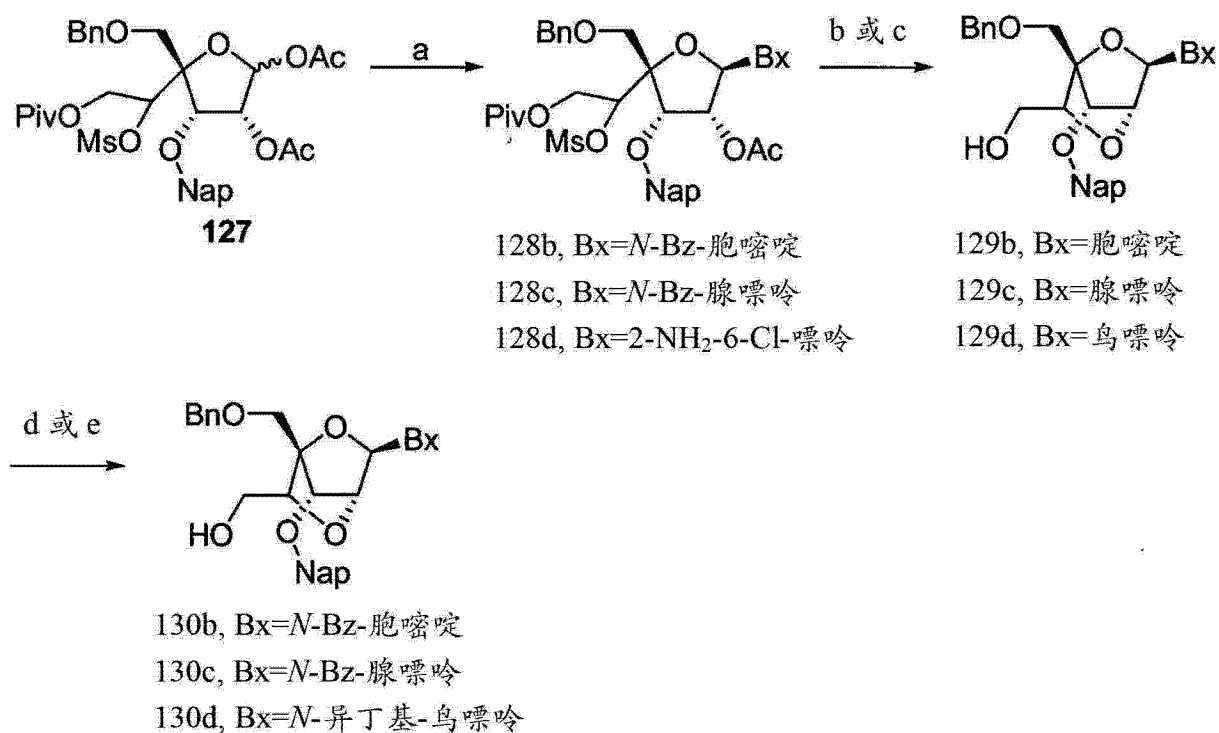
[0402] J) 核苷 129a

[0403] 向二乙酸 127 (0.45g, 0.65mmol) 和尿嘧啶 (0.15g, 1.3mmol) 的 CH<sub>3</sub>CN (3.5mL) 悬浮液添加 N, O-二(三甲基硅烷基)乙酰胺 (0.8mL, 3.3mmol)。在 40℃ 下加热 15 分钟以获得澄清溶液后, 向反应中添加三甲基硅烷基三氟甲基磺酸盐 (0.24mL, 1.3mmol)。回流 2 小时后, 将反应冷却至室温并倒入 EtOAc。以饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩以提供粗制核苷 128a, 其在不作任何纯化下使用。

[0404] 向核苷 128a (0.11g, 0.15mmol) 的 MeOH (1.5mL) 溶液添加 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40mg, 0.3mmol)。在室温下搅拌 16 小时后, 真空去除溶剂并在 EtOAc 和盐水之间分配残留物。收集有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并真空浓缩, 提供 129a (未确定绝对立体化学)。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 以 35% 丙酮的 CHCl<sub>3</sub> 溶液洗脱) 纯化提供核苷 129a (57mg, 由 127 为 74%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 9.37 (s, 1H), 7.92-7.61 (m, 5H), 7.55-7.23 (m, 9H), 5.58 (s, 1H), 5.43 (d, 1H, J=8.1), 4.79 (d, 1H, J=11.7), 4.66 (d, 1H, J=11.7), 4.58 (m, 2H), 4.51 (s, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.95-3.72 (m, 4H)。LCMS: 保留时间 3.34min; M+H 计算值 517.19, 实测值 517.1。

[0405] 实施例 18

[0406]



[0407] 示意结构流程 18(a) N-Bz-胞嘧啶或 6-N-Bz-腺嘌呤或 2-氨基-6-氯嘌呤, BSA, TMSOTf, MeCH, 回流; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 室温, 16 小时 (对于 129b-c); (c) NaH, 3-羟基丙腈, 室温 (对于 129d); (d) TMSCl, 嘧啶, BzCl 或 Bz<sub>2</sub>O, DMF (对于 130b-c); (e) TMSCl, 嘧啶, 异丁酰氯 (对于 130d)

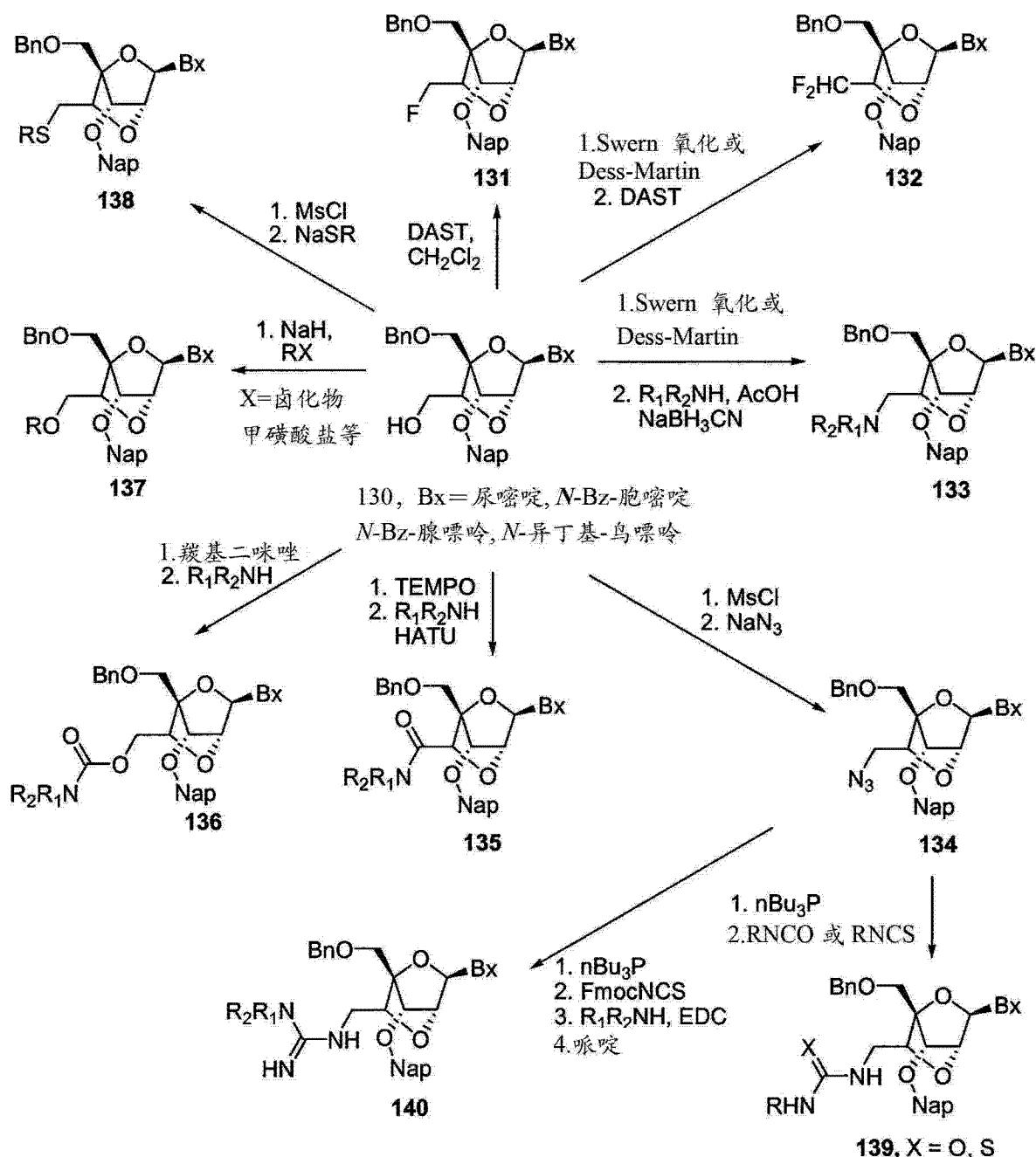
[0408] 核苷 128b、128c 和 128d 可分别采用 N-Bz-胞嘧啶, 6-N-Bz-腺嘌呤和 2-氨基-6-氯嘌呤通过 Vorbrugen 反应由糖前体 127 制备得到 (示意结构流程 18)。以 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 MeOH 处理 128b 和 128c 可分别提供核苷 129b 和 129c。以氢化钠和 3-羟基丙腈处理 128d 可提供核苷 129d。以 TMSCl 瞬时保护羟基基团然后与苯甲酰氯反应可分别提供核苷 130b 和 130c。可选择地, 上述转化也可通过以 DMF 为溶剂, 将核苷 129b 和 129c 与苯甲酸酐反应来实现。核苷 130d 可通过以存在于嘧啶中的过量 TMSCl 瞬时保护, 再与异丁酰氯反应制备得到。

[0409] 实施例 19

[0410] 6'-取代类似物的制备

[0411] 示意结构流程 19

[0412]



[0413] R、R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>分别独立为H、烷基、烯基、炔基、取代的烷基、取代的烯基、取代的炔基或保护性基团

[0414] 可以使用二氯甲烷为溶剂,通过如DAST等氟化剂处理核苷130制备得到核苷131。核苷132可通过首先以Dess-Martin高价碘或在Swern条件下氧化130的伯羟基,然后以DAST处理所得的醛制备得到。核苷133可通过首先以Dess-Martin高价碘或在Swern条件下氧化130的伯羟基,然后在冰醋酸和还原剂(例如,硼氢化氰钠)存在下以伯胺或仲胺将所得的醛还原胺化制备得到。核苷134可通过先将130的羟基基团转化为离去基团(甲磺酸、甲苯磺酸、卤化物),然后与过量的叠氮化钠加热制备得到。核苷135可通过先将130的伯醇氧化为羧酸,然后在HATU或任意其它肽偶合剂的存在下与胺反应制备得到。核苷136可通过先以羰基二咪唑活化130的羟基基团,然后与胺反应制备得到。核苷137可通过先以适当的碱将130的羟基基团去质子化,然后以烷基化试剂淬灭阴离子制备得到。核苷138

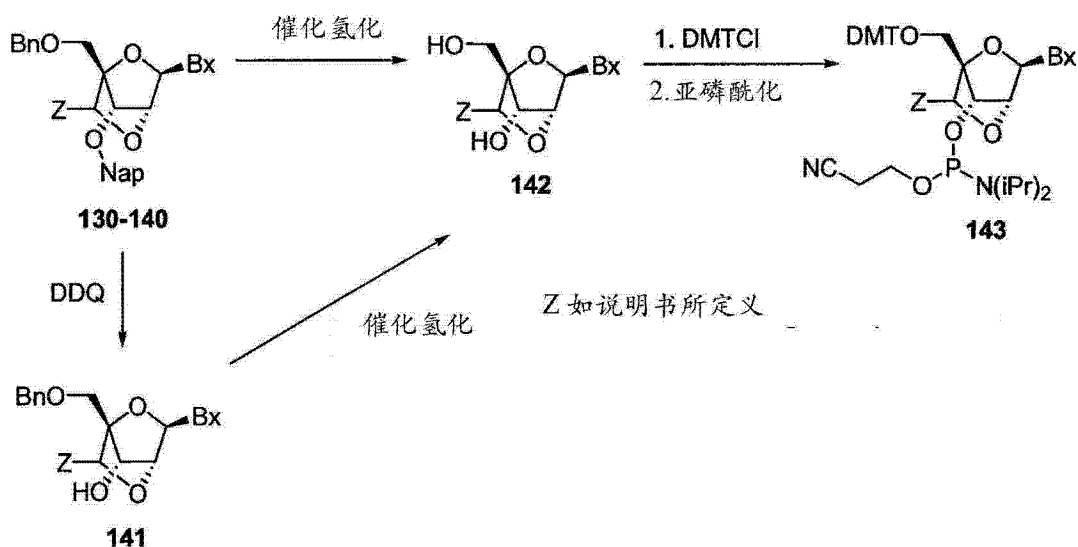
可通过先将 130 的羟基基团转化为离去基团,然后以硫醇亲核试剂取代制备得到。核苷 139 可通过还原 134 的叠氮基团,然后与异氰酸酯或异硫氰酸酯反应制备得到。核苷 140 可通过还原 134 的叠氮基团并与 FmocNCS 反应提供活化的硫脲进行制备。fmoc 活化的硫脲在 EDC 存在下进一步与胺反应可提供取代脒。去除 fmoc 保护性基团释放核苷 140。

[0415] 实施例 20

[0416] 6-取代的 BNA 亚磷酰胺核苷的制备

[0417] 示意结构流程 20

[0418]

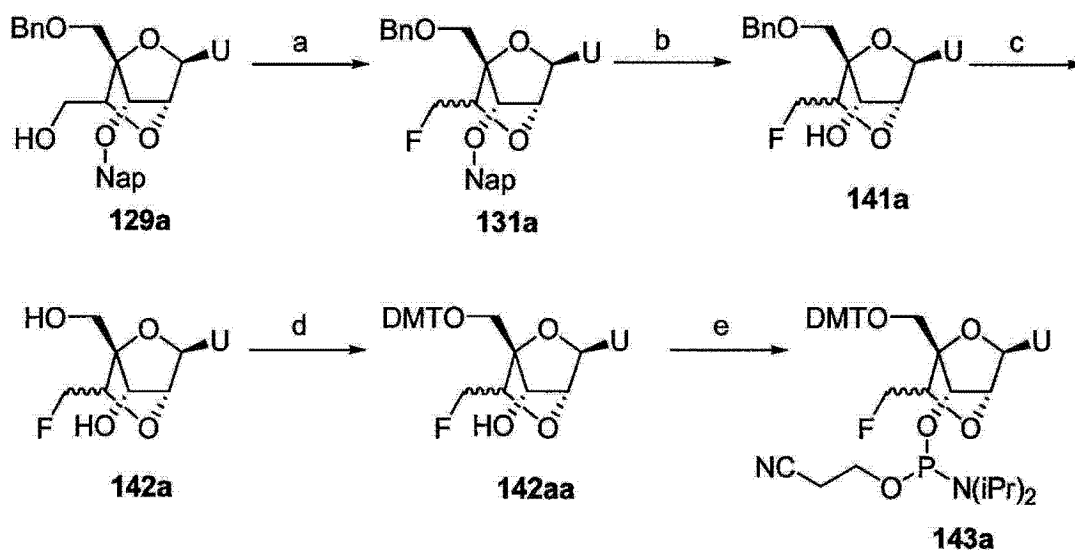


[0419] 可通过催化氢化去除核苷 130-140 的 3'-和 5'-O 保护基团制备得到核苷 142。或者,可通过首先以 DDQ 去除 130-140 的 3'-O-Nap 基团,然后催化氢化去除 5'-O-苯甲基基团制备得到 142。将 5' 羟基基团后续保护为二甲氧基三甲苯基醚,然后通过亚磷酰化反应可提供亚磷酰胺 143。

[0420] 实施例 21

[0421] 6-CH<sub>2</sub>F 核苷的制备

[0422]



[0423] 示意结构流程 23(a) DAST, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78℃ 至室温, 16 小时, 52%(b) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O,



室温, 8 小时, 定量, (e) 10%Pd/C, H<sub>2</sub> 气球, 50%(d) DMTCl, 嘧啶, 55%(e) (iPr<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NPOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, 四唑, NMI, DMF

[0424] A) 核苷 (131a)

[0425] 将二乙氨基三氟化硫 (DAS T, 0.16mL, 1.4mmol) 加入核苷 129a(0.1g, 0.2mmol) 的二氯甲烷 (2mL) 的冷溶液 (-50°C)。将反应逐渐加热至室温并搅拌 16 小时, 然后以饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液小心淬灭反应。在 EtOAc 和盐水之间分配反应物, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 33%EtOAc 的己烷溶液) 纯化提供核苷 131a(51mg, 52%, 混有 15-20% 的开环杂质) 的异构体混合物。<sup>19</sup>F NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ -227.98(m) 和 -231.07(m)。LCMS: 保留时间 3.84 分钟; M+H 计算值 519.19, 实测值 519.1, 以及 3.89min; M+H 计算值 519.19, 实测值 519.1。

[0426] B) 核苷 (141a)

[0427] 向核苷 131a(51mg, 0.1mmol) 的二氯甲烷 (1mL) 和水 (2 滴) 溶液添加 DDQ(44mg, 0.2mmol)。室温下搅拌 8 小时后, 以 EtOAc 稀释反应物, 并以 10%NaHSO<sub>3</sub> 溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液、盐水洗涤有机相, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 30% 丙酮的氯仿溶液) 纯化提供核苷 141a(41mg, 作为异构体混合物定量)。<sup>19</sup>F NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ -229.3(m) 和 -230.97(m)。LCMS: 保留时间 2.66 分钟; M+H 计算值 379.12, 实测值 379.0。

[0428] C) 核苷 (142a)

[0429] 使用氢气球氢化核苷 141a(41mg, 由前面获得) 和 10% 钯炭 (10mg) 在甲醇 (2mL) 中的混合物。3 小时后, 所有的起始核苷 141a 被耗尽 (通过对反应混合物的 LCMS 分析显示)。以硅藻土过滤反应物并减压浓缩滤除液。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 10 至 20% 甲醇的氯仿溶液) 纯化提供作为异构体混合物的核苷 142a(14mg, 50%)。<sup>19</sup>F NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ -231.45(t) 和 -232.88(dt)。LCMS: 保留时间 1.72 分钟; M+Na 计算值 311.08, 实测值 311.0。

[0430] D) 核苷 (142aa)

[0431] 向核苷 142a(14mg, 0.049mmol) 的嘧啶 (0.25mL) 溶液添加 DMTCl(24mg, 0.07mmol)。室温搅拌 3 小时后将反应物减压浓缩。柱层析 (SiO<sub>2</sub>, 20 至 30% 丙酮的氯仿溶液) 纯化提供作为异构体混合物的核苷 142aa(16mg, 55%)。<sup>19</sup>F NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ -228.6(t) 和 -230.91(dt)。LCMS: 保留时间 3.56 分钟; M+Na 计算值 613.21, 实测值 613.1。

[0432] E) 亚磷酰胺 (143a)

[0433] 亚磷酰胺 143a 可参照实施例 1 的描述通过亚磷酰化 (phosphitilation) 反应由核苷 142aa 制备得到。

[0434] 实施例 22

[0435] 核苷亚磷酰胺的合成

[0436] 核苷亚磷酰胺可参照此处和本领域 (例如但不限于美国专利 6,426,220 和公开的 PCT 申请 WO 02/36743) 所述的方法进行制备。

[0437] 实施例 23

[0438] 寡核苷酸和寡核苷的合成

[0439] 如本发明所述的寡聚化合物可通过公知的固相合成技术进行常规制备。进行该种合成的设备已由多家销售商出售, 例如, Applied Biosystems (Foster City, CA)。本领域已知的任何其它该类合成方法均可额外或替代性采用。使用类似技术制备寡核苷酸如硫代磷

酸酯和烷基化衍生物已众所周知。

[0440] 寡核苷酸：未取代和取代的磷酸二酯 (P=O) 寡核苷酸可在自动化 DNA 合成仪 (Applied Biosystems 394 型) 上采用被碘氧化的标准亚磷酰胺化学法合成得到。

[0441] 除以下区别外,硫代磷酸酯 (P=S) 的合成类似于磷酸二酯寡核苷酸:采用 10%w/v 的 3, H-1, 2- 苯并二硫醇 -3- 酮 1, 1- 二氧化物的乙腈溶液氧化亚磷酸联接以产生硫杂化。该硫杂化反应步骤的时间提高至 180 秒且在此之前进行常规的带帽步骤。从 CPG 柱裂解并在 55°C 下于浓氨水中去封闭 (12-16 小时) 后,以大于 3 倍体积的乙醇从 1M NH<sub>4</sub>OAc 溶液中沉淀回收寡核苷酸。亚磷酸酯寡核苷酸可参照美国专利 5, 508, 270 的描述进行制备。

[0442] 烷基磷酸酯寡核苷酸可参照美国专利 4, 469, 863 的描述进行制备。

[0443] 3'-脱氧-3'-亚甲基磷酸酯寡核苷酸可参照美国专利 5, 610, 289 或 5, 625, 050 的描述进行制备。

[0444] 亚磷酰胺寡核苷酸可参照美国专利 5, 256, 775 或 5, 366, 878 的描述进行制备。

[0445] 烷基硫代磷酸酯寡核苷酸可参照公布的 PCT 申请 PCT/US94/00902 和 PCT/US93/06976 (分别公布为 WO 94/17093 和 WO 94/02499) 的描述进行制备。

[0446] 3'-脱氧-3'-氨基磷酰胺酯寡核苷酸可参照美国专利 5, 476, 925 的描述进行制备。

[0447] 磷酸三酯寡核苷酸可参照美国专利 5, 023, 243 的描述进行制备。

[0448] 硼烷磷酸酯寡核苷酸可参照美国专利 5, 130, 302 和 5, 177, 198 的描述进行制备。

[0449] 寡核苷酸:亚甲基甲亚胺基连接的寡核苷(也被称为 MMI 连接的寡核苷)、亚甲基二甲基胍连接的寡核苷(也被称为 MDH 连接的寡核苷)、和亚甲基羰基氨基连接的寡核苷(也被称为酰胺-3 连接的寡核苷)、和亚甲基氨基羰基连接的寡核苷(也被称为酰胺-4 连接的寡核苷),以及具有例如交替的 MMI 和 P = O 或 P = S 联接的混合骨架寡聚化合物可参照美国专利 5, 378, 825 ;5, 386, 023 ;5, 489, 677 ;5, 602, 240 和 5, 610, 289 的描述进行制备。

[0450] 甲缩醛和硫甲缩醛连接的寡核苷可参照美国专利 5, 264, 562 和 5, 264, 564 的描述进行制备。

[0451] 环氧乙烷连接的寡核苷可参照美国专利 5, 223, 618 的描述进行制备。

[0452] 实施例 24

[0453] 寡核苷酸分离

[0454] 从可控孔玻璃固相载体上裂解并在 55°C 的浓氨水中去封闭 12-16 小时后,以大于 3 倍体积的乙醇从 1M NH<sub>4</sub>OAc 溶液中沉淀回收寡核苷酸或寡核苷。合成的寡核苷酸可通过电喷雾质谱(分子量测定)和毛细管凝胶电泳进行分析。在合成中获得的硫代磷酸酯和磷酸二酯联接的相对数量可通过正确分子量相对 -16amu 产品 (+/-32+/-48) 的比例进行确定。在某些研究中寡核苷酸通过 HPLC 进行纯化,例如描述于 Chiang 等人, J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162-18171。HPLC- 纯化材料所得的结果通常类似于从非-HPLC 纯化材料获得的结果。

[0455] 实施例 25

[0456] 寡核苷酸合成-96 孔板形式

[0457] 寡核苷酸可在能够以 96- 孔形式同时装配 96 个序列的自动化合成器中通过固相

P(III) 亚磷酸胺化学法合成得到。磷酸二酯核苷酸间联接可通过碘水溶液氧化得到。硫代磷酸酯核苷酸间联接可通过使用无水乙腈中的 3, H-1, 2 苯并二硫醇 -3- 酮 1, 1- 二氧化物 (Beaucage 试剂) 硫化得到。标准的碱基被保护的  $\beta$ - 氰乙基 - 二异丙基亚磷酸胺可从销售商 (例如 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA 或 Pharmacia, Piscataway, NJ) 处购得。非标准核苷可参照标准和专利方法进行合成。它们可作为碱基保护的  $\beta$ - 氰乙基 - 二异丙基亚磷酸胺。

[0458] 寡核苷酸从载体上裂解并在升高的温度 (55-60°C) 下在浓  $\text{NH}_4\text{OH}$  中去保护 12-16 小时, 在真空下干燥所释放的产品。将干燥的产品重悬于无菌水中以提供主平板, 从该平板上使用机械移液管稀释得到所有的分析和测试平板样本。

[0459] 实施例 26

[0460] 采用 96- 孔板形式进行寡核苷酸分析

[0461] 各微孔中的寡核苷酸浓度可通过稀释样本和 UV 吸收广谱测定。单个产品的全长完整性可以 96- 孔形式 (Beckman P/ACE™ MDQ) 或针对单独制备的样本在商用毛细管电泳设备 (例如, Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270) 上通过毛细管电泳 (CE) 进行评估。碱基和骨架组成可采用电喷雾质谱对寡聚化合物进行质谱分析确定。所有的测试平板均从主平板采用单和多道机械移液器稀释得到。如果平板上至少 85% 的寡聚化合物具有至少 85% 全长, 则可认为该平板可接受。

[0462] 实施例 27

[0463] 细胞培养和寡核苷酸处理

[0464] 寡聚化合物对靶标核酸表达的作用可在各种细胞类型中进行测试, 只要该靶标核酸以可测水平在该细胞类型中存在。这可通过使用, 例如 PCR 或 Northern 印迹分析等方法常规测定。来自多种组织和物种的细胞系可从美国菌种保藏中心 (ATCC, Manassas, VA) 获得。

[0465] 下列提供的细胞类型仅供阐述目的, 也可常规采用其它细胞类型, 只要靶标在选定的细胞类型中表达。这可通过本领域常规的方法, 例如, Northern 印迹分析、核糖核酸酶保护测定或 RT-PCR 等进行简便的测定。

[0466] b. END 细胞: 小鼠脑内皮细胞系 b. END 由 Max Plank 研究所 (Bad Nauheim, Germany) 的 Werner Risau 博士提供。b. END 细胞常规培养于添加了 10% 胎牛血清 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 的高糖 DMEM 中 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)。在汇合度达到约 90% 时, 通过胰蛋白酶化和稀释进行常规的细胞传代。将细胞以大约 3000 细胞 / 微孔的密度接种至 96- 孔板 (Falcon-Primaria#353872, BD Biosciences, Bedford, MA), 从而用于包括但不限于寡聚化合物转染实验。

[0467] 涉及以寡聚化合物处理细胞的实验:

[0468] 当细胞达到适当的汇合度时, 采用所述的转染方法以寡聚化合物对其进行处理。

[0469] LIPOFECTIN™

[0470] 当细胞达到 65-75% 汇合度时, 以寡核苷酸对其进行处理。将寡核苷酸与 LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 在 Opti-MEM™-1 低血清培养基 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) 中混合, 以实现寡核苷酸的理想浓度,

且 LIPOFECTIN™ 的浓度为每 100nM 寡核苷酸 2.5 或 3 μg/mL。将该转染混合物在室温下孵育约 0.5 小时。细胞生长于 96-孔板时,以 100 μL OPTI-MEM™-1 洗涤微孔一次,然后以 130 μL 转染混合物处理。类似地,用适当体积的培养基和寡核苷酸处理生长于 24-孔板或其它标准组织培养板中的细胞。重复两次或三次处理细胞并取得数值。在 37°C 下处理约 4-7 小时后,以新鲜培养基替换含转染混合物的培养基。寡核苷酸处理后 16-24 小时采集细胞。

[0471] 本领域已知的其它适用转染试剂包括,但不限于,CYTOFECTIN™、LIPOFECTAMINE™、OLIGOFECTAMINE™ 和 FUGENE™。本领域已知的其它适用的转染方法包括,但不限于电穿孔。

[0472] 实施例 28

[0473] 寡核苷酸抑制靶标表达的分析

[0474] 靶标表达的反义调节可通过本领域已知的多种方法进行测定。例如,靶标 mRNA 水平可通过,例如,Northern 印迹分析、竞争性聚合酶链式反应 (PCR) 或实时 PCR 进行定量。目前希望采用实时定量 PCR。可对总细胞 RNA 或 poly(A)+mRNA 进行 RNA 分析。本发明的一种 RNA 分析方法采用总细胞 RNA,如本文其它实施例中所述。RNA 分离的方法已为本领域公知。Northern 印迹分析也是本领域的常规方法。实时定量 (PCR) 通过使用来自 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA 的 ABI PRISM™ 7600、7700 或 7900 序列检测系统并参照生产商说明得以便利地实现。

[0475] 靶标蛋白水平可通过本领域公知的多种方法进行定量,例如免疫沉淀、Western 印迹分析(免疫印迹)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或荧光激活细胞分类 (FACS)。针对靶标的抗体可从多种来源例如抗体的 MSRS 目录 (Aerie Corporation, Birmingham, MI) 鉴定并获得,或者可通过本领域公知的常规单克隆或多克隆抗体生成方法制备得到。制备多克隆抗血清的方法可参见,例如, Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, 第 2 卷, 第 11.12.1-11.12.9 页, John Wiley&Sons, Inc., 1997。单克隆抗体的制备可参见,例如, Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, 第 2 卷, 第 11.4.1-11.11.5 页, John Wiley&Sons, Inc., 1997。

[0476] 免疫沉淀法是本领域的标准方法,并可参见例如, Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, 第 2 卷, 第 10.16.1-10.16.11 页, John Wiley&Sons, Inc., 1998。Western 印迹(免疫印迹)分析是本领域的标准方法,并可参见例如, Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, 第 2 卷, 第 10.16.1-10.80.21 页, John Wiley&Sons, Inc., 1997。酶联免疫吸附测定 (ELISA) 是本领域的标准方法,并可参见例如, Ausubel, F. M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, 第 2 卷, 第 11.4.1-11.2.22 页, John Wiley&Sons, Inc., 1991。

[0477] 实施例 29

[0478] 对靶标抑制剂用途的表型测定和体内研究的设计

[0479] 表型测定

[0480] 一旦靶标抑制剂通过此处披露的方法进行鉴定,可在一个或多个表型测定中进一步考察该寡聚化合物,其中每个测定具有预示对特定疾病状态或症状进行治疗的效力的可测端点。

[0481] 表型测定、其中适用的试剂盒和试剂已为本领域技术人员公知,并在此处用于考

察靶标在健康和疾病中的作用和 / 或关联。代表性的表型测定 (可从多个销售商中购得) 包括测定细胞活性、细胞毒性、扩增或细胞存活的测定 (Molecular Probes, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA), 基于蛋白的测定包括酶法测定 (Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA), 细胞调节、信号转导、炎症、氧化过程以及凋亡 (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI)、甘油三酯积累 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、血管生成测定、管道形成测定、细胞因子和激素测定以及代谢测定 (Chemicon International Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

[0482] 在一个非限制性实例中, 经测定适用于特定表型测定的细胞 (即, 选择用于乳腺癌研究的 MCF-7 细胞; 用于肥胖研究的脂肪细胞) 用体外研究鉴定的靶标抑制剂和对照化合物在最佳浓度下处理 (通过上述方法测定的)。在处理末期, 用一种或多种对测定特异的方法来分折经处理和未经处理的细胞来确定表型结果和终点。

[0483] 表型终点包括细胞形态随时间或处理剂量的变化以及细胞成分如蛋白、脂质、核酸、激素、糖或金属等的水平变化。对细胞状态 (包括 pH、细胞周期阶段、细胞对生物指示剂的摄取或排除) 的检测通常是感兴趣的。

[0484] 对处理后的细胞中一种或多种基因表达的检测同样可用作靶标抑制剂的效力或功效的指示。同时检测经处理和未经处理的细胞中的纯度印记基因或怀疑与特定疾病状态、症状或表型有关的那些基因。

[0485] 体内研究

[0486] 本文所述的体内研究中的个体对象为温血脊椎动物, 包括人。

[0487] 实施例 30

[0488] RNA 分离

[0489] Poly(A)+mRNA 分离

[0490] Poly(A)+mRNA 的分离可参照 Miura 等人的方法 (Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764)。其它的 poly(A)+mRNA 分离方法为本领域的常规方法。简言之, 对于生长于 96-孔板的细胞, 从细胞去除生长培养基并以 200  $\mu$ L 冷 PBS 洗涤每个微孔。向每个微孔添加 60  $\mu$ L 裂解缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mMEDTA, 0.5M NaCl, 0.5%NP-40, 20mM 氧钒-核糖核苷复合物), 轻柔摇动平板并在室温下孵育五分钟。将 55  $\mu$ L 裂解产物转移至涂覆了寡聚 d(T) 包被的 96-孔板 (AGCT Inc., Irvine CA)。将平板在室温下孵育 60 分钟, 以 200  $\mu$ L 洗涤缓冲液 (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 0.3M NaCl) 洗涤 3 次。末次洗涤后, 以纸巾吸去多余的洗涤缓冲液, 然后空气干燥 5 分钟。将预热至 70°C 的 60  $\mu$ L 洗脱缓冲液 (5mM Tris-HCl pH 7.6) 添加至各微孔, 将平板在 90°C 热板上孵育 5 分钟, 然后将洗脱物转移至新鲜的 96-孔板。

[0491] 生长于 100mm 或其它标准平板的细胞也可采用适当体积的所有溶液进行类似处理。

[0492] 总 RNA 分离

[0493] 总 RNA 可采用由 Qiagen Inc. (Valencia, CA) 购得的 RNEASY 96™ 试剂盒和缓冲液并参照生产商的推荐方法进行分离。简言之, 对于生长于 96-孔板的细胞, 从细胞去除生长培养基并分别以 200  $\mu$ L 冷 PBS 洗涤每个微孔。向每个微孔添加 150  $\mu$ L 缓冲 RLT 并将平

板剧烈摇动 20 秒。将 150  $\mu$ L 的 70% 乙醇添加至各微孔,然后通过上下吹吸三次混合内含物。随后将样本转移至装配了废物采集盘并连接至真空源的 QIA V AC™ 集流腔所连接的 RNEASY 96™ 孔板上。抽真空 1 分钟。将 500  $\mu$ L 缓冲 RW1 添加至 RNEASY 96™ 板的各微孔中并孵育 15 分钟,再次抽真空 1 分钟。再次将 500  $\mu$ L 缓冲 RW1 添加至 RNEASY 96™ 板的各微孔中并再次抽真空 2 分钟。然后将 1mL 的缓冲 RPE 添加至 RNEASY 96™ 板的各微孔中并抽真空 90 秒钟。重复用缓冲 RPE 洗涤,再次吸真空 3 分钟。然后从 QIA V AC™ 集流腔取走平板并用纸巾吸干。重新将平板连接至装配了含 1.2mL 采集管的采集管架的 QIA V AC™ 集流腔。然后通过向各微孔中移入 140  $\mu$ L 无 RNA 酶的水,孵育 1 分钟,抽真空 3 分钟洗脱 RNA。

[0494] 重复移液和洗脱步骤可通过 QIAGEN Bio-Robot 9604(Qiagen, Inc., Valencia CA) 自动完成。简言之,裂解培养平板上的细胞之后,将平板转移至进行移液、DNA 酶处理和洗脱步骤的机械平台上。

[0495] 实施例 31

[0496] 靶标 mRNA 水平的实时定量 PCR 分析

[0497] 靶标 mRNA 水平可采用 ABI PRISM™ 7600、7700 或 7900 序列检测系统 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) 并参照生产商的说明通过实时定量 PCR 实现定量。这是一个闭管、非凝胶式荧光检测系统,其允许对聚合酶链式反应 (PCR) 产物进行实时高通量定量。与扩增产物在 PCR 完成后定量的标准 PCR 不同,在实时定量 PCR 中的产物在其积累时定量。这一点可通过在 PCR 反应中包含在正向和反向 PCR 引物之间特异性退火并包含两个荧光染料的寡核苷酸探针来实现。报告染料 (例如, FAM 或 JOE, 来自 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA 或 Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) 被连接至探针的 5' 端而淬灭染料 (例如, TAMRA, 来自 PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, Operon Technologies Inc., Alameda, CA 或 Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA) 被连接至探针的 3' 端。当探针和染料完整时,报告染料的发射被邻近的 3' 端淬灭染料淬灭。在扩增过程中,探针与靶标序列的退火生成能被 Taq 聚合酶的 5'-核酸外切酶活性裂解的底物。在 PCR 扩增周期的延伸阶段, Taq 聚合酶对探针的裂解从探针的剩余部分 (并从而由淬灭部分) 释放了报告染料,从而生成了序列特异性荧光信号。在每一个周期中,附加的报告染料分子从其相应的探针中裂解,并可通过整合在 ABI PRISM™ 序列检测系统中的激光镜头定期监测荧光强度。在每一个测定中,一系列包含来自未处理对照样本的 mRNA 系列稀释物的平行反应生成标准曲线,它可用于对测试样本进行反义寡核苷酸处理后的抑制百分比进行定量。

[0498] 在定量 PCR 分析之前,对被测靶标基因特异性的引物-探针组与 GAPDH 扩增反应的“多重性 (multiplexed)”能力进行评估。在多重化中,靶标基因和内标基因 GAPDH 在单个样本中同时扩增。在该分析中,从未处理细胞中分离的 mRNA 被系列稀释。各稀释物可在仅特异性靶向 GAPDH、仅特异性靶向靶标基因 (“单重”) 或对两者都特异 (多重) 的引物-探针组的存在下扩增。PCR 扩增之后,可同时从单重和多重样本生成作为稀释函数的 GAPDH 和靶标 mRNA 信号的标准曲线。如果从多重样本中生成的 GAPDH 和靶标信号的斜率和相关系数均小于从单重样本所得相应数值的 10% 之内,则该对靶标具有特异性的引物-探针组可认为具有多重性。其它 PCR 方法已为本领域所知。

[0499] RT和PCR试剂可从Invitrogen Life Technologies(Carlsbad, CA)获得。RT,实时PCR可通过向含有30 μL总RNA溶液(20-200ng)的96-孔板添加20 μLPCR混合物(2.5×无MgCl<sub>2</sub>PCR缓冲液,6.6mM MgCl<sub>2</sub>, dATP、dCTP、dGTP和dGTP各375 μM,正向引物和反向引物各375nM,125nM探针,4单位RNA酶抑制剂,1.25单位PLATINUM® Taq,5单位MuLV逆转录酶以及2.5×ROX染料)得以实现。RT反应可通过在48°C下孵育30分钟得以实现。在95°C下孵育10分钟以激活PLATINUM® Taq后,进行40个循环的两步PCR法:95°C下进行15秒(变性)后在60°C下进行1.5分钟(退火/延伸)。

[0500] 通过RT,实时PCR得到的基因目标量通过GAPDH(一种表达恒定的基因)的表达水平或通过以RIBOGREEN™(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)定量总RNA来归一化。GAPDH表达可通过与靶标同时多重或单独运行实时RT-PCR来定量。总RNA可采用RiboGreen™ RNA定量试剂(Molecular Probes, Inc. Eugene, OR)进行定量。通过RIBOGREEN™进行RNA定量的方法可参见Jones, L. J., 等人, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374)。

[0501] 在该测定中,170 μL的RIBOGREEN™工作试剂(RIBOGREEN™试剂以1:350稀释于10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5)以移液管移入含有30 μL纯化细胞RNA的96-孔板。在CytoFluor 4000(PE Applied Biosystems)中读板,激发波长为485nm,发射波长为530nm。

[0502] 实施例 32

[0503] 靶标特异性引物和探针

[0504] 可采用公开的序列信息设计探针和引物,与靶标序列杂交。

[0505] 例如,对于人PTEN,可使用公开的序列信息(GENBANK™ 录入号U92436.1, SEQ ID NO:1)设计下列引物-探针组:

[0506] 正向引物:AATGGCTAAGTGAAGATGACAATCAT(SEQ ID NO:2)

[0507] 反向引物:TGCACATATCATTACACCAGTTCGT(SEQ ID NO:3)

[0508] 以及PCR探针:

[0509] FAM-TTGCAGCAATTCACCTGTAAGCTGGAAAGG-TAMRA(SEQ ID NO:4),其中FAM为荧光染料,TAMRA为淬灭染料。

[0510] 实施例 33

[0511] 靶标蛋白水平的Western印迹分析

[0512] Western印迹分析(免疫印迹分析)可采用标准方法进行。在寡核苷酸处理后16-20小时采集细胞,以PBS洗涤一次,悬浮于Laemmli缓冲液(100 μL/微孔),煮沸5分钟并上样至16%SDS-PAGE凝胶。在150V下跑胶1.5小时,并转移到膜上进行western印迹。采用适当的针对靶标的一抗,以及针对该一抗的放射标记或荧光标记的二抗。采用PHOSPHORIMAGER™(Molecular Dynamics, Sunnyvale CA)显示条带。

[0513] 实施例 34

[0514] 靶向PTEN的6-(R或S)-CH<sub>3</sub>和6-(R或S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>BNA 2-10-2带间隙寡聚体:体外研究

[0515] 如本发明所述,合成寡聚化合物并在一定剂量范围内检测其减少PTEN表达的能力。采用此处所述的方法以0.3125、0.0625、1.25、2.5、5、10或20nM浓度的6-(R或S)-CH<sub>3</sub>-BNA(分别为392748和392749)以及6-(R或S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>(分别为396004和396005)修饰的寡聚体处理b. END细胞。如此处其它实施例所述,PTEN的表达水平可通过实

时 PCR 测定并对 RIBOGREEN™ 归一化。所得的剂量 - 响应曲线可如下所示用于测定 EC50。可在 pH 7 的含 0.1mM EDTA 的 100mM 磷酸盐缓冲液中于 260nm 下使用 4 μM 6-(R 或 S)-CH<sub>3</sub>-BNA 或 6-(R 或 S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> 修饰的寡聚体和 4 μM 互补 RNA 评估 T<sub>m</sub>。

[0516]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	EC <sub>50</sub>	T <sub>m</sub> °C
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	10.3	58.9
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	6.4	59.1
05/396004	<b><u>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></u></b>	6.0	56.9
05/396005	<b><u>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></u></b>	5.0	57.6
05/392745	<b>C<sub>I</sub>U<sub>I</sub>TAGCACTGGCC<sub>I</sub>U<sub>I</sub></b>	7.5	58.6

[0517] 所有的核苷间联接为硫代磷酸酯,粗体的核苷为 6-(R 或 S)-CH<sub>3</sub>BNA 核苷,加下划线和粗体的核苷为 6-(R 或 S)-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>BNA 核苷,而下标 R 和 S 表示了 6 位碳原子处的构型。应当指出 6- 修饰的 BNA 寡聚化合物显示了更大的效力,尽管它的 T<sub>m</sub> 略微下降。

[0518] 实施例 35

[0519] 靶向 PTEN 的 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA 和 6-(R)-CH<sub>3</sub>-BNA 2-10-2 带间隙的寡聚体:体内研究

[0520] 在 3 周中每周两次向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 注射剂量为 0.5 或 2 μmol/kg 的靶向 PTEN 的 6-CH<sub>3</sub>-BNA 修饰寡聚体 (6-(S) 或 6-(R))。在最后一次施用后 48 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (%UTC)。

[0521]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	剂量 (μmol/kg)	%UTC
	盐水		100
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	2.0	31
05/392748	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b>	0.5	81
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	2.0	23
05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b>	0.5	73

[0522] 所有的核苷间联接为硫代磷酸酯,粗体核苷为 6-CH<sub>3</sub>-BNA 核苷而下标 R 和 S 表示了 6 位碳原子处的构型。

[0523] 实施例 36

[0524] 靶向 PTEN 的 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA 和 6-(R)-CH<sub>3</sub>-BNA 2-10-2 带间隙的寡聚体:体内研究

[0525] 向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 注射一次剂量为 1、2、4 或 8 μmol/kg 的靶向 PTEN 的 6-CH<sub>3</sub>-BNA 修饰的寡聚体 (6-(S) 或 6-(R))。在施用后 72 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (%UTC)。

[0526]



SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	剂量 ( $\mu\text{mol/kg}$ )	%UTC
盐水			100
05/392748	$\text{C}_R\text{U}_R\text{TAGCACTGGCC}_R\text{U}_R$	1	89
05/392748	$\text{C}_R\text{U}_R\text{TAGCACTGGCC}_R\text{U}_R$	2	66
05/392748	$\text{C}_R\text{U}_R\text{TAGCACTGGCC}_R\text{U}_R$	4	35
05/392748	$\text{C}_R\text{U}_R\text{TAGCACTGGCC}_R\text{U}_R$	8	11
05/392749	$\text{C}_S\text{U}_S\text{TAGCACTGGCC}_S\text{U}_S$	1	75
05/392749	$\text{C}_S\text{U}_S\text{TAGCACTGGCC}_S\text{U}_S$	2	51
05/392749	$\text{C}_S\text{U}_S\text{TAGCACTGGCC}_S\text{U}_S$	4	25
05/392749	$\text{C}_S\text{U}_S\text{TAGCACTGGCC}_S\text{U}_S$	8	9

[0527] 所有的核苷间联接为硫代磷酸酯,粗体的核苷为 6- $\text{CH}_3$ -BNA 核苷而下标 S 和 R 表示了 6 位碳原子处的构型。

[0528] 实施例 37

[0529] 靶向 PTEN 的 6-(S)- $\text{CH}_3$ -O- $\text{CH}_2$ -BNA 和 6-(R)- $\text{CH}_3$ -O- $\text{CH}_2$ -BNA 2-10-2 带间隙寡聚体:体内研究

[0530] 向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 注射一次剂量为 1、2、4 或 8  $\mu\text{mol/kg}$  (以下仅显示了 8  $\mu\text{mol/kg}$  的数据) 的靶向 PTEN 的 6- $\text{CH}_3$ -BNA 修饰的寡聚体 (6-(S) 或 6-(R))。在施用后 72 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (%UTC)。

[0531]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	剂量 ( $\mu\text{mol/kg}$ )	%UTC
盐水			100
05/396004	$\underline{\text{C}_R\text{U}_R}\text{TAGCACTGGCC}\underline{\text{C}_R\text{U}_R}$	8	37
05/396005	$\underline{\text{C}_S\text{U}_S}\text{TAGCACTGGCC}\underline{\text{C}_S\text{U}_S}$	8	37

[0532] 所有的核苷间联接均为硫代磷酸酯,粗体和带下划线的核苷为 6- $\text{CH}_3$ -O- $\text{CH}_2$ -BNA 核苷而下标 S 和 R 表示了 6 位碳原子处的构型。

[0533] 实施例 38

[0534] 以 SVPD 处理的 6-(R 或 S)- $\text{CH}_3$ -BNA 修饰的寡聚体的核酸酶稳定性

[0535] 6-(R 或 S)- $\text{CH}_3$ -BNA (分别为 392748 和 392749) 修饰的寡聚体的核酸酶稳定性可采用蛇毒磷酸二酯酶 (SVPD) 进行测定。该研究分别包括了可进行比较的 6-未取代的间隙体 (gapmer) (4'- $\text{CH}_2$ -O-2' 桥连的 BNA, 392745, 下标 1) 和 2'-O-MOE 间隙体 (2'-O-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>, 392753, 下标 e)。各寡聚体制备为含有以下成分的 500  $\mu\text{L}$  混合物: 5  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{M}$  寡聚体, 50  $\mu\text{L}$  含于 SVPD 缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 8mM MgCl<sub>2</sub>) 的 0.5 单位/mL 磷酸二酯酶, 其最终浓度为 0.05 单位/mL, 445  $\mu\text{L}$  SVP 缓冲液。将样本在 37°C 于水浴中孵育。在第 0、1、2 和 4 天取等份 (100  $\mu\text{L}$ ) 并在第 1 和 2 天添加新鲜的酶。在等份取出后立即添加 EDTA

以终止酶活性。在 IP HPLC/MS 上分析样本。

[0536]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	第 4 天全长%
05/392748	$C_R U_R TAGCACTGGCC_R U_R$	>90
05/392749	$C_S U_S TAGCACTGGCC_S U_S$	>70
05/392745	$C_I U_I TAGCACTGGCC_I U_I$	>40
05/392753	$C_e U_e TAGCACTGGCC_e U_e$	>30

SEQ ID NO. /ISIS NO.	在 24 小时的组 成%	在 48 小时的组 成%	在 96 小时的组 成%
05/392748	100%	89%	92%
05/392749	96%	84%	74%
05/392745	67%	56%	48%
05/392753	58%	46%	36%

[0537] 所有的核苷间联接为硫代磷酸酯,粗体核苷为修饰的核苷,下标 R 和 S 表示了 6-CH<sub>3</sub>-BNA 核苷在 6 位碳原子的构型,下标 e 表示了 2'-O-MOE 核苷而下标 I 表示了 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' 修饰的核苷。含有 6-甲基取代的 BNA 的化合物 (392748 和 392749) 比含有未取代 BNA 的化合物 (392745) 具有明显的提高。

[0538] 实施例 39

[0539] 以 SVPD 处理的 6-(R 或 S)-CH<sub>3</sub>-BNA、4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA 和 2'-O-MOE 修饰的寡聚体的核酸酶稳定性

[0540] 6-CH<sub>3</sub>-BNA 修饰的寡聚体的核酸酶稳定性可采用蛇毒磷酸二酯酶 (SVPD) 进行测定。各寡聚体制备为含有以下成分的 90 μL 混合物:5 μL 寡聚体 (2 μL 5 μM 寡聚体和 3 μL 5' <sup>32</sup>P- 标记的寡聚体)、75 μL H<sub>2</sub>O 以及 10 μL 10× 缓冲液 (500mM Tris-HCl, 700mM NaCl 以及 140mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.6)。在 0 分钟,从上述制备的寡聚体样本取出 9 μL 并添加至 10 μL 终止缓冲液 (6.67M 尿素, 16.67% 甲酰胺和 83.3mM EDTA) 然后添加 1 μL H<sub>2</sub>O 并在 100℃ 下加热 2.5 至 3 分钟。通过添加 9 μL SVPD (0.5 单位 /mL) 开始测定动力学。最终的酶浓度为 0.05 单位 /mL。将每等份的 10 μL 寡聚体动力学溶液添加至 10 μL 终止缓冲液并按如上所述热灭活。取 1、3、9、27、80、240 和 1290 为动力学时间点。通过 12% 丙烯酰胺 PAGE 在 45 瓦特 / 凝胶下跑 2 小时分析样本。

[0541]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	修饰
06/395421	TTTTTTTTTTTT <sub>e</sub> T <sub>e</sub>	粗体 2'-O-MOE
07/395423	TTTTTTTTTTTTU <sub>1</sub> U <sub>1</sub>	粗体 4'-CH <sub>2</sub> -O-2'
07/395424	TTTTTTTTTTTTU <sub>R</sub> U <sub>R</sub>	粗体 6-(R)-CH <sub>3</sub>
07/395425	TTTTTTTTTTTTU <sub>S</sub> U <sub>S</sub>	粗体 6-(S)-CH <sub>3</sub>
06/7157	TTTTTTTTTTTT	未修饰的 (2'-H)

[0542] 所有的核苷间联接均为硫代磷酸酯,粗体核苷为修饰的核苷,下标 R 和 S 表示了 6-CH<sub>3</sub>-BNA 核苷在 6 位碳原子的构型,下标 e 表示 2'-O-MOE 核苷而下标 1 表示 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' 修饰核苷。

[0543]

SEQ ID NO.	在 3 分钟的 ISIS No.	在 27 分钟的 组成%	在 80 分钟的 组成%	在 240 分钟 的组成%	在 1290 分钟 的组成%
06/395421	68.7	27.9	17.2	11.6	9.0
07/395423	32.6	4.7	2.5	2.2	2.2
07/395424	96.4	89.1	83.2	79.0	72.0
07/395425	96.0	86.3	83.7	82.3	82.7
06/7157	5.2	1.2	2.0	1.7	0.9

[0544] 实施例 40

[0545] 在三周、多剂量体内研究中靶向 PTEN 的 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA、4'-CH<sub>2</sub>-O-2-BNA 和 2'-O-MOE 修饰的寡聚体

[0546] 在三周中每周两次向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 注射剂量为 3.2、1.0、0.32 和 0.1 μmol/kg (以下仅显示了 3.2 和 1 μmol/kg 的数据) 的靶向 PTEN 的 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA (2-10-2, 14-聚体)、4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-BNA (2-10-2, 14-聚体) 和 2'-O-MOE (5-10-5, 20-聚体) 修饰的寡聚体。在最后一次施用后 48 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (%UTC)。处死后测定血浆化学和肝重。

[0547]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	剂量 (μmol/kg)	%UTC	ALT
盐水			100	41.3
05/392749	C <sub>5</sub> U <sub>5</sub> TAGCACTGGCC <sub>5</sub> U <sub>5</sub>	3.2	4.3	29.8

[0548]

05/392749	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> 1	36	24.5
05/392063	<b>C<sub>1</sub>U<sub>1</sub>TAGCACTGGCC<sub>1</sub>U<sub>1</sub></b> 3.2	4.2	279.3
08/392063	<sup>Me</sup> <b>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub>TAGCACTGGC<sup>Me</sup>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub></b> 1	26	41.0
09/116847	<b>C<sub>e</sub>T<sub>e</sub>G<sub>e</sub>C<sub>e</sub>T<sub>e</sub>AGCCTCTGG</b> 1	53	41.3

**AT<sub>e</sub>T<sub>e</sub>T<sub>e</sub>G<sub>e</sub>A<sub>e</sub>**

[0549] 所有的核苷间联接为硫代磷酸酯,粗体核苷为修饰的位置,下标 s 表示 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA,下标 1 表示 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA,下标 e 表示 2'-O-MOE 而 <sup>Me</sup>C 表示 5'-甲基胞嘧啶核苷。

[0550] 在研究的最高点,含 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA(392063,3.2 μmol/Kg 剂量组)的寡聚体的高剂量组动物显示肝重明显升高的(相对盐水为 153%)。与之相对,含 6-(S)-CH<sub>3</sub>BNA(392749,3.2 μmol/Kg 剂量组)寡聚体的肝重为盐水组的 117%。含 2'-O-MOE(116847,1.0 μmol/Kg 剂量组)寡聚体的肝重为盐水组的 116%。该实施例证明了 6-(S)-CH<sub>3</sub>-BNA 修饰在允许设计的反义寡聚体保持 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA 所赋予的效力的同时,其 ALT 水平相对 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA 修饰的化合物有显著提升。

[0551] 实施例 41

[0552] 靶向 PTEN 的 6-(R 或 S)-CH<sub>3</sub> 和 6-(R 或 S)-CH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>、4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA 2-10-2 带间隙的寡聚体:体内研究

[0553] 向六周大的 Balb/c 小鼠(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)注射一次剂量为 2.5、5、10 和 20 μmol/kg(以下仅显示了 5 和 10 μmol/kg 的数据)的靶向 PTEN 的修饰的 6-(R 或 S)-CH<sub>3</sub>(分别为 396568 和 396024)、6-(R 或 S)-CH<sub>2</sub>-OCH<sub>3</sub>(分别为 396007 和 396008)、4'-CH<sub>2</sub>-O-2' BNA 2-10-2 带间隙的寡聚体(6-(S) 或 6-(R))。在施用后 66 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化。

[0554]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5' 至 3')	剂量 (μmol/kg)	ALT
	盐水		41.3
05/396024	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> 10	10	250.5
05/396024	<b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b> 5	5	72.0
05/396568	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> 10	10	234.3
05/396568	<b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b> 5	5	62.0
05/396008	<u><b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b></u> 10	10	129.5
05/396008	<u><b>C<sub>S</sub>U<sub>S</sub>TAGCACTGGCC<sub>S</sub>U<sub>S</sub></b></u> 5	5	49.0
05/396007	<u><b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b></u> 10	10	49.0
05/396007	<u><b>C<sub>R</sub>U<sub>R</sub>TAGCACTGGCC<sub>R</sub>U<sub>R</sub></b></u> 5	5	36.3
08/392063	<sup>Me</sup> <b>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub>TAGCACTGGC<sup>Me</sup>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub></b> 10	10	925.0
08/392063	<sup>Me</sup> <b>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub>TAGCACTGGC<sup>Me</sup>C<sub>1</sub>T<sub>1</sub></b> 5	5	373.0

[0555] 所有的核苷间联接均为硫代磷酸酯,粗体的核苷为修饰的核苷,下标 R 和 S 表示所示的 6-CH<sub>3</sub>-BNA(仅粗体)和 6-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>-BNA(粗体并带下划线)核苷在 6 位碳原子的构型,下标 1 表示 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' 核苷而 <sup>Me</sup>C 表示 5'-甲基胞嘧啶核苷。

[0556] 上述寡核苷中,一个寡核苷 (Isis No. 392063) 在 6 位碳原子处不含手性核苷,其中其它四个 (Isis No. 396024、396568、396008 和 396007) 在 6 位碳原子处含手性的核苷。特别地,这四个寡核苷在 1、2、13 和 14 位具有一个该种核苷。在肝中,在 6 位碳原子处不含手性核苷的寡核苷比包括在 6 位碳原子处含手性核苷的四个寡核苷具有相对更高的毒性。

[0557] 实施例 42

[0558] 靶向 PTEN 的 2-14-2 带间隙的寡聚体:体内研究

[0559] 在向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 注射一次剂量为 2 或 10  $\mu\text{mol/kg}$  的靶向 PTEN 的 6- $\text{CH}_3$ -BNA 修饰的寡聚体。在施用后 72 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (%UTC)。

[0560]

SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成 (5'至 3')	修饰
10/394420	$^m\text{C}_e\text{T}_e\text{GCTAGCCTCTGGATT}_e\text{T}_e$	粗体 2'-O-MOE
11/400522	$^m\text{C}_R\text{U}_R\text{GCTAGCCTCTGGATU}_R\text{U}_R$	粗体 6-(R)- $\text{CH}_3$
11/400523	$^m\text{C}_S\text{U}_S\text{GCTAGCCTCTGGATU}_S\text{U}_S$	粗体 6-(S)- $\text{CH}_3$
11/400524	$^m\text{C}_R\text{U}_R\text{GCTAGCCTCTGGATU}_R\text{U}_R$	粗体 6-(R)- $\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$
11/400525	$^m\text{C}_S\text{U}_S\text{GCTAGCCTCTGGATU}_S\text{U}_S$	粗体 6-(S)- $\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$

ISIS NO.	剂量 ( $\mu\text{mol/kg}$ )	%UTC	标准偏差
盐水		100%	12%
394420	2	79%	2%
394420	10	26%	11%
400522	2	18%	3%
400522	10	4%	0%
400523	2	17%	2%
400523	10	4%	1%
400524	2	23%	7%
400524	10	4%	0%
400525	2	21%	3%
400525	10	3%	0%

[0561] 所有的核苷间联接均为硫代磷酸酯,粗体的核苷为修饰的核苷,下标 R 和 S 表示所示的 6- $\text{CH}_3$ -BNA 和 6- $\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ -BNA 核苷在 6 位碳原子的构型,下标 e 表示 2' -O-MOE 核苷而  $^m\text{C}$  表示 5' - 甲基胞嘧啶核苷。

[0562] 此处所引用的所有出版物、专利和专利申请均纳入本文作为参考。尽管在前述的

说明书中本发明通过某些优选实施方案进行了描述,且为了阐述的目的列举了众多具体内容,本领域技术人员显然理解本发明可采用其它的实施方案,且此处所述的某些具体内容可在不悖离本发明基本原则的情况下进行相当的变化。