



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106459134 B

(45)授权公告日 2020.02.18

(21)申请号 201580022353.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.04.29

C07H 21/04(2006.01)

(续)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106459134 A

(56)对比文件

CN 1373768 A, 2002.10.09,

US 2012329858 A1, 2012.12.27,

WO 02077184 A2, 2002.10.03,

WO 9737691 A1, 1997.10.16,

US 2009175801 A1, 2009.07.09,

WO 2008094640 A2, 2008.08.07, (续)

(43)申请公布日 2017.02.22

(30)优先权数据

61/987,396 2014.05.01 US (续)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.10.26

审查员 郭冰洁

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/028327 2015.04.29

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2015/168310 EN 2015.11.05

(73)专利权人 美国杰龙生物医药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 P·H·拉米亚

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理

有限公司 11329

权利要求书5页 说明书90页

序列表5页 附图14页

代理人 孙涛 肖鹏

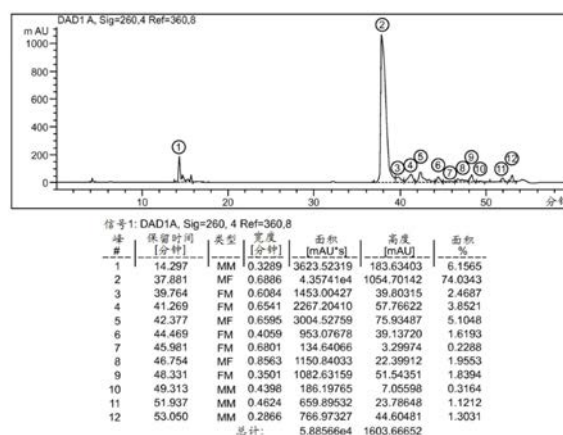
(54)发明名称

寡核苷酸组合物及其制备方法

酸组合物的药物组合物。

(57)摘要

本公开提供一种经由依次偶联循环来制备寡核苷酸的固相方法,所述方法包括二核苷酸二聚体亚基至少一次偶联于生长链的游离3'-端基。所述寡核苷酸包含至少两个通过N3'→P5'磷酸酯键连接的核苷亚基。所述方法可包括以下步骤:(a)使连接于固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护,所述脱保护形成游离3'氨基;(b)使所述游离3'氨基与3'-受保护的氨基-二核苷酸-5'-亚磷酸二聚体在亲核催化剂存在下接触以形成核苷间N3'→P5'亚磷酸酯键;以及(c)使所述键联氧化(例如硫化)。通过主题方法产生的组合物可包含降低量的一种或多种(N-x)寡核苷酸产物。还提供包含主题寡核苷



[接上页]

(30) 优先权数据

62/151,909 2015.04.23 US

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2006.01)

C12N 15/115(2006.01)

(56) 对比文件

Sergei Gryaznov,等. "Oligonucleotide N3'-P5' Thio-phosphoramidate Telomerase Template Antagonists as Potential Anticancer Agents".《NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS》.2003,第22卷(第5-8期),第577-581页.

Karen L. Fearon,等. "Investigation of the "n - 1" impurity in phosphorothioate oligodeoxynucleotides synthesized by the solid-phase  $\beta$ -cyanoethyl phosphoramidite method using stepwise sulfurization".

《Nucleic Acids Research》.1995,第23卷(第14期),第2754-2761页.

S. Gryaznov,等. "TELOMERASE INHIBITORS - OLIGONUCLEOTIDE PHOSPHORAMIDATES AS POTENTIAL THERAPEUTIC AGENTS".

《NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS》.2001,第20卷(第4-7期),第401-410.

Daniel C.Capaldi,等. "Highly efficient solid phase synthesis of oligonucleotide analogs containing phosphorodithioate linkages".《Nucleic Acids Research》.2000,第28卷(第9期),第e40页.

Jesse J. Chen,等. "N2'  $\rightarrow$  P3' Phosphoramidate Glycerol Nucleic Acid as a Potential Alternative Genetic System".《J. AM. CHEM. SOC.》.2009,第131卷第2119-2121页.

1.一种合成多核苷酸的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 使连接于固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护,所述脱保护形成游离3'氨基;

(b) 使所述游离3'氨基与3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体在亲核催化剂存在下接触以形成核苷间N3' → P5' 亚磷酰胺键联; 以及

(c) 使所述键联氧化。

2.如权利要求1所述的方法,其进一步包括:

(d) 使连接于固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护,所述脱保护形成游离3'氨基;

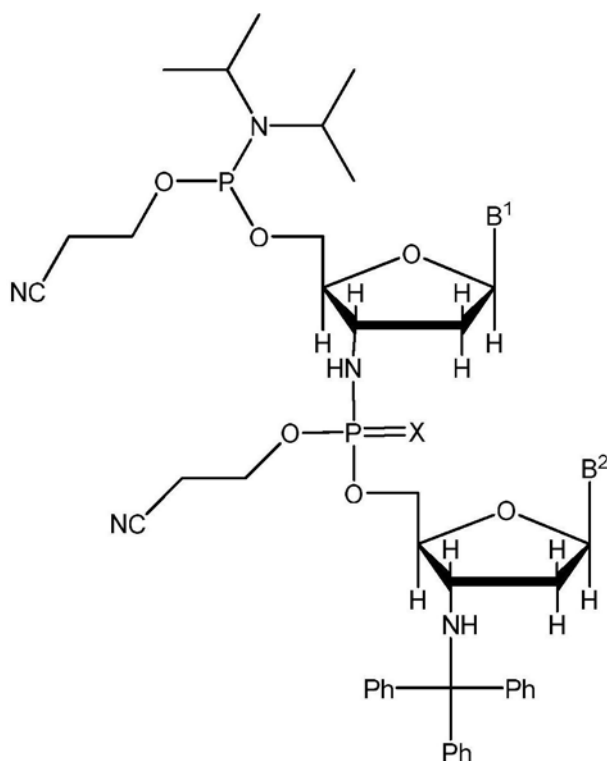
(e) 使所述游离3'氨基与3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体在亲核催化剂存在下接触以形成核苷间N3'→P5'亚磷酰胺键联;以及

(f) 使所述键联氧化。

3.如权利要求1和2中任一项所述的方法,其中在步骤(c)或(f)中使所述键联氧化包括硫化以产生硫代磷酰胺酯键联。

4.如权利要求1和2中任一项所述的方法,其中在步骤(c)或(f)中使所述键联氧化产生氧代磷酸酯键联。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体具有式:



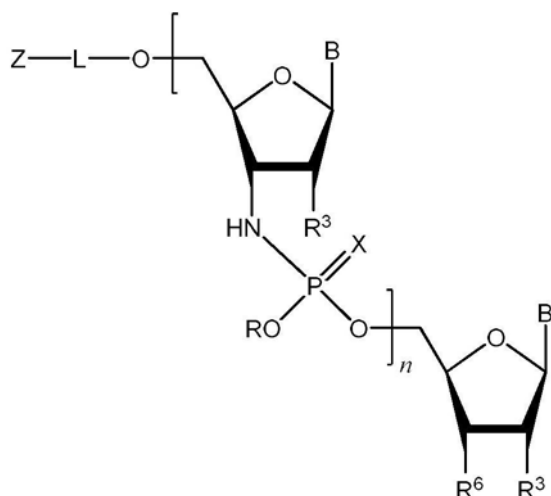
其中X是O或S,且B<sup>1</sup>和B<sup>2</sup>各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物。

6.如权利要求5所述的方法,其中所述B<sup>1</sup>和B<sup>2</sup>各自独立地选自受保护的腺嘌呤、受保护的胞嘧啶、受保护的鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

7. 如权利要求6所述的方法, 其中所述 $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地选自A (Bz)、A (DMF)、C (Bz)、G (异丁酰基)、T和U。

8. 如权利要求5-7中任一项所述的方法, 其中X是S。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸具有式:



其中:

各B独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶, 或其类似物;

各X独立地是氧或硫;

各 $R^3$ 是氢、氟, 或羟基、烷氧基、取代的烷氧基或受保护的羟基;

L是任选的接头;

Z是H、脂质、支撑物、载体、寡核苷酸、PEG、多肽、可检测标记或标签;

$R^6$ 是氨基、羟基、受保护的氨基、受保护的羟基、 $-O-L-Z$ 或 $-NH-L-Z$ ;

R是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基或磷酸酯保护基; 且

n是1至1000的整数; 或其盐;

并且所述方法包括以下步骤:

(a) 使连接至固相载体的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护, 所述脱保护形成游离3'氨基;

(b) 使所述游离3'氨基与以下任一者:

(i) 3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体; 或

(ii) 3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体;

在亲核催化剂存在下反应以形成核苷间 $N3' \rightarrow P5'$ 亚磷酰胺键联;

(c) 使所述键联氧化; 以及

(d) 重复步骤(a)至(c)直至合成所述多核苷酸, 其中所述重复步骤(a)至(c)包含进行步骤(b) (i) 至少一次。

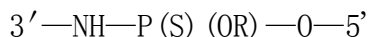
10. 如权利要求9所述的方法, 其中使所述键联氧化包括硫化以产生硫代磷酰胺酯键联。

11. 如权利要求9所述的方法, 其中使所述键联氧化产生氧代磷酰胺酯键联。

12. 如权利要求8-11中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸包含与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列, 并且其中至少两个所述核苷亚基通过 $N3' \rightarrow P5'$ 磷酰胺酯亚基间

键联接。

13. 如权利要求12所述的方法, 其中所述N3'→P5' 硫代磷酸酯亚基间键联是具有以下结构的N3'→P5' 硫代磷酸酯亚基间键联:

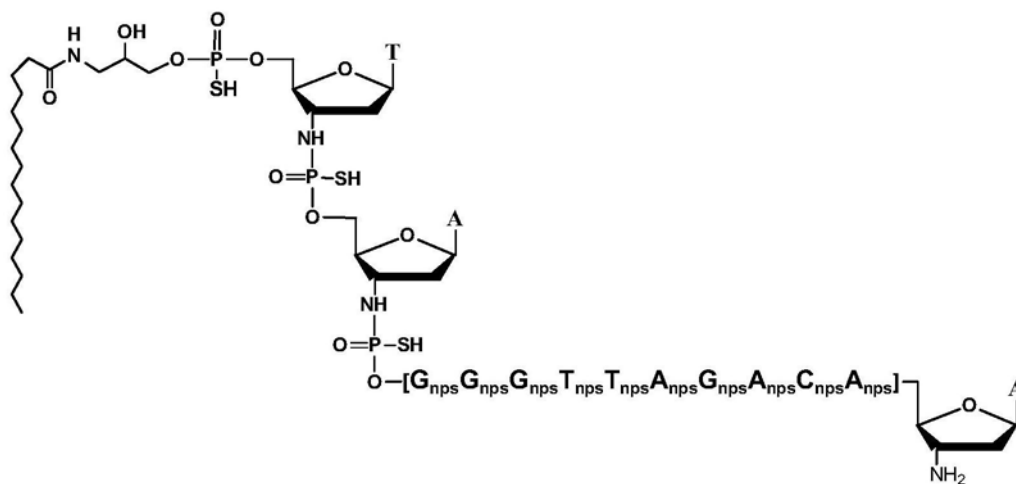


其中R选自由以下组成的组: 氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基, 或其盐。

14. 如权利要求9-13中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸包含序列TAGGGTTAGACAA。

15. 如权利要求14所述的方法, 其中所述TAGGGTTAGACAA序列的所有所述核苷酸间亚基间键联均是N3'→P5' 硫代磷酸酯亚基间键联。

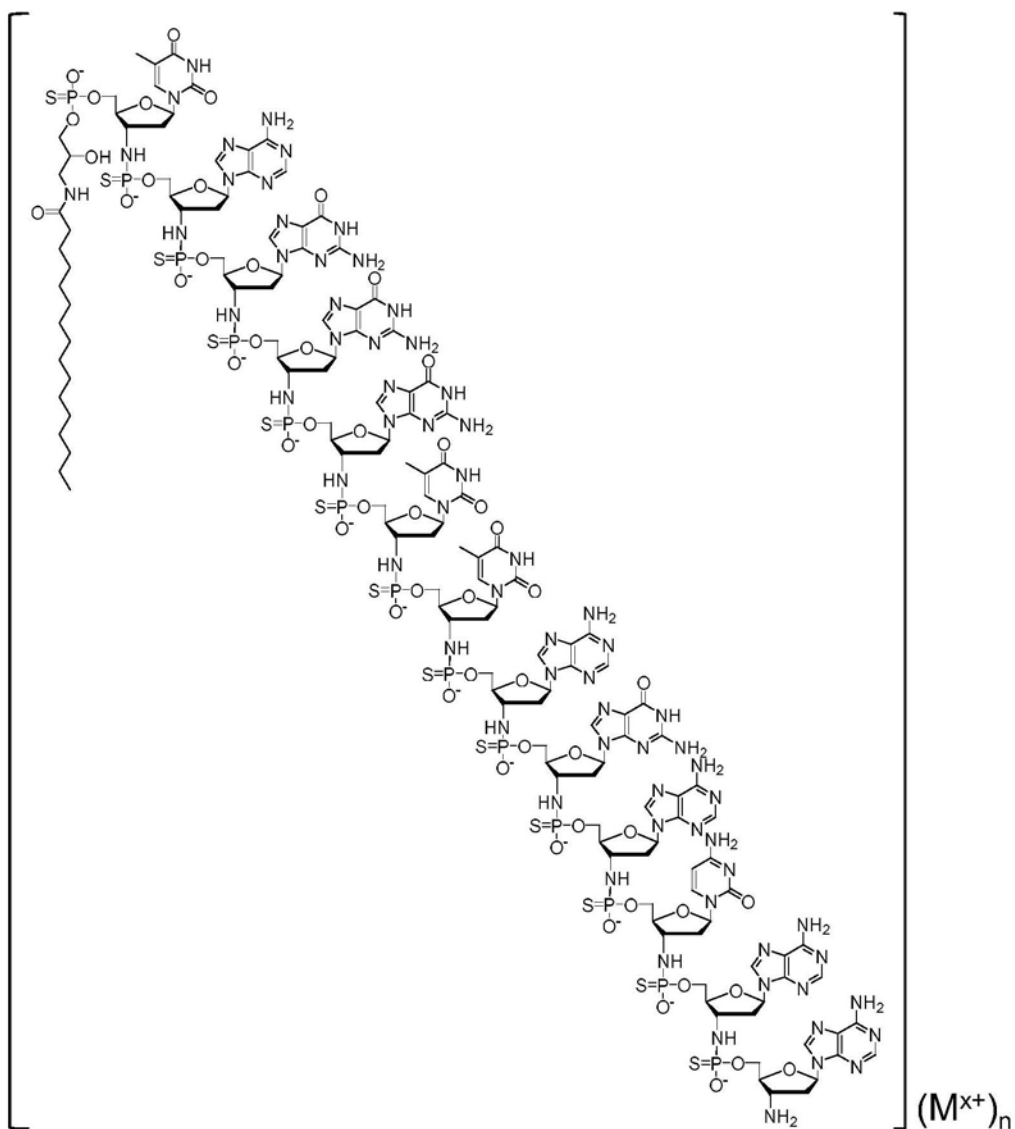
16. 如权利要求9-15中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸具有结构:



或其盐;

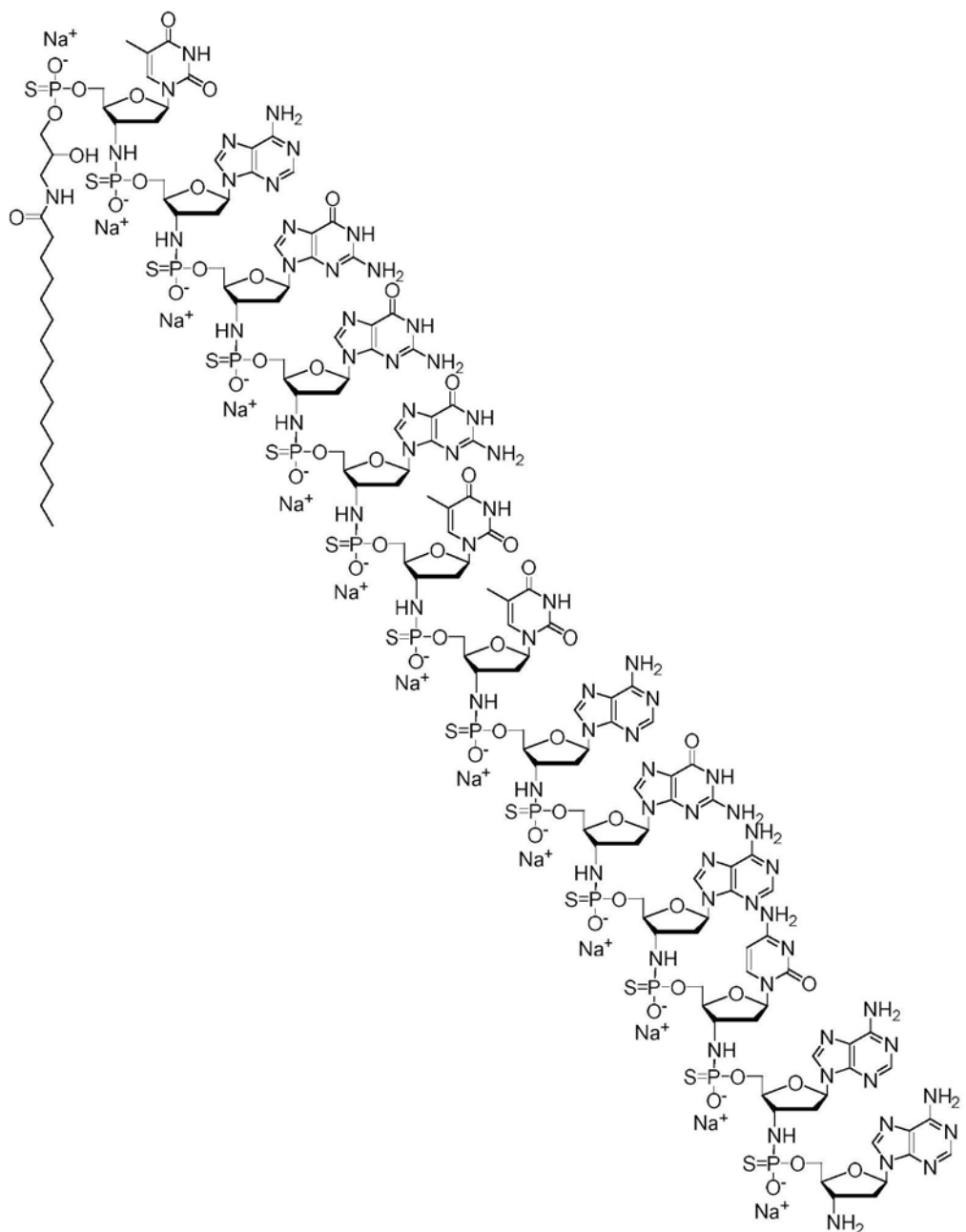
其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接于相邻核苷的5'-碳的硫代磷酸酯键联—NH—P(=O)(SH)—O—。

17. 如权利要求9-16中任一项所述的方法, 其中所述多核苷酸具有结构:



其中各 $M^{x+}$ 独立地是氢或药学上可接受的盐的抗衡离子,各 $x$ 独立地是1、2或3,且 $n$ 是5至13的整数。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述多核苷酸具有结构:



19. 如权利要求14所述的方法,其中所述TAGGGTTAGACAA序列的C11核苷酸残基来源于3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体。

20. 如权利要求14所述的方法,其中所述方法包括使以下3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体TA、GG、GT、TA、GA和AA以及3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体C依次偶联于所述固相支撑物。

21. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体由式X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>描述,其中X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>独立地选自受保护的腺苷、受保护的胞苷、受保护的鸟苷、胸苷和尿苷。

22. 如权利要求2所述的方法,其中所述3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体选自受保护的腺苷、受保护的胞苷、受保护的鸟苷、胸苷和尿苷。

## 寡核苷酸组合物及其制备方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35U.S.C. §119(e), 本申请要求2014年5月1日提交的美国临时申请序列第61/987,396号和2015年4月23日提交的美国临时申请序列第62/151,909号(代理人参考第185/002X号)的申请日的优先权,所述申请的公开内容以引用的方式并入本文。

[0003] 引言

[0004] 核酸聚合物化学已在医药、诊断和分析领域且更具体地说在反义和抗基因治疗学、组合化学、分支DNA信号放大以及基于阵列的DNA诊断学和分析中的许多开发中的技术中起作用。一些这种聚合物化学已涉及改进天然核酸聚合物如DNA的结合强度、特异性和核酸酶抗性。肽核酸(PNA)、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯和磷酰胺酯核苷间键联是已应用至寡核苷酸以提供一种或多种期望性质如核酸酶抗性、细胞摄取和溶解性的一些聚合物化学的实例。

[0005] 寡核苷酸N3'→P5'磷酰胺酯可与互补DNA和RNA链形成稳定双链体,以及与DNA双链体形成稳定三链体,并且对核酸酶具有抗性。已发现寡核苷酸N3'→P5'硫代磷酰胺酯在体外和体内用作有效反义剂。例如,含有抑制端粒酶活性的化合物的寡核苷酸可用于治疗端粒酶介导的病症(如癌症),因为癌细胞表达端粒酶活性且正常人类体细胞不具有生物学相关水平下的端粒酶活性。因此,制备和分离此类寡核苷酸的方法是令人感兴趣的。

[0006] 概述

[0007] 本公开提供一种经由依次偶联循环制备寡核苷酸的固相方法,所述方法包括二核苷酸二聚体亚基至少一次偶联至生长链的游离3'-端基(例如,3'-羟基或3'-氨基)。主题方法包括制备寡核苷酸,其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'磷酰胺酯亚基间键联连接。所述方法可包括以下步骤:(a)使连接至固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护,所述脱保护形成游离3'氨基;(b)使所述游离3'氨基与3'-保护的氨基-二核苷酸-5'-亚磷酰胺二聚体在亲核催化剂存在下接触以形成核苷间N3'→P5'亚磷酰胺键联;以及(c)使所述键联氧化。在一些情况下,使所述键联氧化包括硫化以产生核苷间N3'→P5'硫代磷酰胺酯键联。

[0008] 本公开的方面包括通过主题方法产生的寡核苷酸组合物,所述组合物包含减少量的一种或多种(N-x)寡核苷酸产物。在一些情况下,所述减少量是相对于N产物少于一种或多种(N-x)产物的(1.9x N)重量份至100重量份。根据主题方法制备的寡核苷酸包括具有与人端粒酶的RNA组分互补的N核苷亚基的序列的寡核苷酸,其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'硫代磷酰胺酯亚基间键联连接。还提供包含主题寡核苷酸组合物的药物组合物。

[0009] 附图简述

[0010] 图1A和1B示出TA二聚体硫代磷酰胺酯(化合物7e,方案1)的HPLC色谱图(A)和<sup>31</sup>P NMR谱(B)。

[0011] 图2A和2B示出AA二聚体硫代磷酰胺酯(化合物7a,方案1)的HPLC色谱图(A)和<sup>31</sup>P NMR谱(B)。

[0012] 图3A和3B示出GG二聚体硫代磷酰胺酯(化合物7c,方案1)的HPLC色谱图(A)和<sup>31</sup>P



NMR谱(B)。

[0013] 图4A和4B示出GT二聚体硫代磷酸酯(化合物7d,方案1)的HPLC色谱图(A)和<sup>31</sup>P NMR谱(B)。

[0014] 图5A和5B示出GA二聚体硫代磷酸酯(化合物7b,方案1)的HPLC色谱图(A)和<sup>31</sup>P NMR谱(B)。

[0015] 图6A和6B示出二聚体酰胺化物TA、AA、GA、GT和GG的LCMS迹线。

[0016] 图7示出使用单体偶联策略,伊美司他的140μmol规模合成的产物的HPLC色谱图。

[0017] 图8示出使用二聚体嵌段偶联策略,伊美司他的140μmol规模合成的产物的HPLC色谱图。

[0018] 定义

[0019] 除非另外指示,否则以下术语具有以下含义。任何未定义的术语具有其领域公认的含义。

[0020] 如本文所用,术语多核苷酸和寡核苷酸可互换使用。每当寡核苷酸由诸如“ATGUCCTG”的字母序列表示时,除非另外指示,否则应理解核苷酸是呈从左至右的5'→3'顺序,且“A”表示脱氧腺苷,“C”表示脱氧胞苷,“G”表示脱氧鸟苷,“T”表示胸苷,且“U”表示脱氧尿苷。

[0021] 如本文所用,“核苷”包括天然核苷,包括2'-脱氧和2'-羟基形式,例如如Kornberg和Baker,DNA Replication,第2版(Freeman, San Francisco, 1992)中所描述。提及核苷的“类似物”包括具有修饰的碱基部分和/或修饰的糖部分的合成核苷,例如通常由Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)描述。所述类似物包括经设计以增强结合性质(例如稳定性、特异性等)的合成核苷,如由Uhlmann和Peyman (Chemical Reviews, 90:543-584, 1990)所公开。在一些实施方案中,核苷或核苷类似物包括3'-羟基或3'-氨基。

[0022] 术语“碱基”和“核碱基”可互换使用且在本文定义为包括(i)常规DNA和RNA碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶),和(ii)修饰的碱基或碱基类似物(例如,5-甲基-胞嘧啶、5-溴尿嘧啶或肌苷)。碱基类似物是其分子结构模拟常规DNA或RNA碱基的分子结构的化学品。

[0023] 如本文所用,“嘧啶”意指存在于天然核苷中的嘧啶,包括胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以及其共同类似物,如含有氧基、甲基、丙炔基、甲氧基、羟基、氨基、硫代、卤代等取代基的那些。如本文所用的术语还包括具有连接的常见保护基的嘧啶,如N<sup>4</sup>-苯甲酰基胞嘧啶。其他常见的嘧啶保护基由Beaucage和Iyer Tetrahedron 48:2223-2311 (1992)公开。

[0024] 如本文所用,“嘌呤”意指存在于天然核苷中的嘌呤,包括腺嘌呤、鸟嘌呤和次黄嘌呤以及其共同类似物,如含有氧基、甲基、丙炔基、甲氧基、羟基、氨基、硫代、卤代等取代基的那些。如本文所用的术语还包括具有连接的常见保护基的嘌呤,如N<sup>2</sup>-苯甲酰基鸟嘌呤、N<sup>2</sup>-异丁酰基鸟嘌呤、N<sup>6</sup>-苯甲酰基腺嘌呤等。其他常见的嘌呤保护基由Beaucage和Iyer Tetrahedron 48:2223-2311 (1992)公开。如本文所用,作为化学名称的组成部分的术语“-受保护的-”是指本领域公认的用于化合物的特定部分的保护基,例如关于核苷之“5'-保护的-羟基”包括三苯基甲基(即三苯甲基)、对茴香基二苯基甲基(即单甲氧基三苯甲基或MMT)、二-对茴香基苯基甲基(即二甲氧基三苯甲基或DMT)等;且关于核碱基的受保护的核碱基包括用如二甲基氨基甲脒(DMF)、苯甲酰基(Bz)、异丁酰基等基团保护的杂原子。本领域

域公认的保护基包括在以下参考文献中描述的那些保护基:Gait编辑,Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach(IRE Press,Oxford,1984);Amarnath和 Broom, Chemical Reviews,77:183-217,1977;Pon等人,Biotechniques, 6:768-775,1988;Ohtsuka等人,Nucleic Acids Research,10:6553-6570, 1982;Eckstein编辑,Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach(IRE Press,Oxford,1991);Greene和Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,第2版(John Wiley&Sons,New York,1991);Narang编辑,Synthesis and Applications of DNA and RNA(Academic Press,New York,1987);Beaucage和Iyer Tetrahedron 48:2223-2311 (1992)以及类似参考文献。

[0025] 如本文所用,“寡核苷酸N3'→P5'磷酸酯”意指具有通过至少一个N3'→P5'磷酸酯键联接连接的核苷亚基的通常直链的寡聚物。一般而言,核苷亚基包含核苷或核苷类似物,但也可包含具有可相容化学的更一般性部分,如无碱基糖和其他烃部分,如以下参考文献中所描述:Newton等人,Nucleic Acids Research,21:1155-1162(1993);Griffin 等人,J. Am. Chem. Soc., 114:7976-7982(1992);Jaschke等人, Tetrahedron Letters,34:301-304(1992);Ma等人,国际申请 PCT/CA92/00423;Zon等人,国际申请PCT/US90/06630;Durand等人,Nucleic Acids Research,18:6353-6359(1990);Salunkhe等人,J. Am. Chem. Soc., 114:8768-8772(1992)等。在一些情况下,所述术语意指其中所有核苷间键联接均被N3'→P5'磷酸酯键联接置换的寡核苷酸,即所述术语包括部分以及完全“酰胺化的”寡聚物。在一些情况下,其意指其中所有核苷间键联接均被N3'→P5'磷酸酯键联接置换,且其中核苷亚基是天然核苷或其类似物的寡核苷酸。其中每个键联接均为N3'→P5'磷酸酯键联接的主题寡核苷酸N3'→P5'磷酸酯(“完全酰胺化”)可包埋于其他寡核苷酸或多核苷酸中或连接至其他寡核苷酸或多核苷酸以形成“部分酰胺化”的较大寡聚物。主题寡核苷酸N3'→P5'磷酸酯可包括任何适宜的3'和/或5'端基。在一些实施方案中,寡核苷酸 N3'→P5'磷酸酯包括3'-羟基端基或3'-氨基端基。

[0026] 如本文所用,术语“磷酸酯”和“磷酸酯基”意在涵盖硫代磷酸酯基和氧代磷酸酯基。

[0027] 如本文所用,术语“亚磷酸酯氨基”是指连接至亚磷酸酯基团的磷原子的氨基--NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>,并且术语“亚磷酸酯氮”是指亚磷酸酯氨基的氮原子。

[0028] “烷基”是指具有1至10个碳原子和如1至6个碳原子(例如,“1至6个碳原子的烷基”)或1至5(例如,“1至5个碳原子的烷基”)或1至4(例如,“1至4个碳原子的烷基”)或1至3个碳原子(例如,“1至3个碳原子的烷基”)的单价饱和脂族烃基。所述术语包括例如直链和支链烃基,如甲基(CH<sub>3</sub>-)、乙基(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-)、正丙基(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、异丙基((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-)、正丁基(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、异丁基((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>-)、仲丁基((CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)CH-)、叔丁基((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-)、正戊基(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)及新戊基((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>-)。

[0029] 术语“取代的烷基”是指如本文所定义的烷基,其中烷基链中的一个或多个碳原子已任选地被杂原子如-O-、-N-、-S-、-S(O)<sub>n</sub>- (其中n是0至2)、-NR- (其中R是氢或烷基)置换且具有选自以下组成的组的1至5个取代基:烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫

代杂环氧基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO- 烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO<sub>2</sub>-烷基、-SO<sub>2</sub>-芳基-SO<sub>2</sub>-杂芳基以及-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>，其中R<sup>a</sup>和R<sup>b</sup>可以是相同的或不同的并且选自氢、任选取代的烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基以及杂环。在一些实例中，“取代的烷基”是指如本文所定义的具有选自由以下组成的组的1至5个取代基的烷基：烷氧基、环烷基、环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、氨酰基、氨基酰氧基、氧基氨酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、羧基、羧基烷基、巯基、硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、磺酰胺基以及-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>，其中R<sup>a</sup>和R<sup>b</sup>可以是相同的或不同的且选自氢、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基以及杂环。

[0030] “亚烷基”是指直链或支链的优选具有1至6且更优选1至3个碳原子且任选地被选自-O-、-NR<sup>10</sup>-、-NR<sup>10</sup>C(O)-、-C(O)NR<sup>10</sup>-等的一个或多个基团间断的二价脂族烃基。所述术语包括例如亚甲基(-CH<sub>2</sub>-)、亚乙基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、正亚丙基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、异亚丙基(-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-)、(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)、(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-)、(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-)、(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-)等。

[0031] “取代的亚烷基”是指1至3个氢被如在下文“取代的”定义中针对碳所描述的取代基置换的亚烷基。

[0032] 术语“烷烃”是指如本文所定义的烷基和亚烷基。

[0033] 术语“烷基氨基烷基”、“烷基氨基烯基”和“烷基氨基炔基”是指基团R'NHR"-，其中R'是如本文定义的烷基，且R是如本文定义的亚烷基、亚烯基或亚炔基。

[0034] 术语“烷芳基”或“芳烷基”是指基团-亚烷基-芳基和-取代的亚烷基-芳基，其中亚烷基、取代的亚烷基和芳基是本文所定义。

[0035] “烷氧基”是指基团-O-烷基，其中烷基如本文所定义。烷氧基包括例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基等。术语“烷氧基”还指基团烯基-O-、环烷基-O-、环烯基-O-和炔基-O-，其中烯基、环烷基、环烯基和炔基如本文所定义。

[0036] 术语“取代的烷氧基”是指基团取代的烷基-O-、取代的烯基-O-、取代的环烷基-O-、取代的环烯基-O-和取代的炔基-O-，其中取代的烷基、取代的烯基、取代的环烷基、取代的环烯基以及取代的炔基如本文所定义。

[0037] 术语“烷氧基氨基”是指基团-NH-烷氧基，其中烷氧基是本文所定义。

[0038] 术语“卤代烷氧基”是指基团烷基-O-，其中烷基上的一个或多个氢原子已被卤代基团取代并且包括例如基团如三氟甲氧基等。

[0039] 术语“卤代烷基”是指如上所述的取代的烷基，其中烷基上的一个或多个氢原子已被卤代基团取代。此类基团的实例包括氟乙基、氟甲基、三氟甲基或三氟乙基等。

[0040] 术语“烷基烷氧基”是指基团-亚烷基-O-烷基、亚烷基-O-取代的烷基、取代的亚烷基-O-烷基以及取代的亚烷基-O-取代的烷基，其中烷基、取代的烷基、亚烷基以及取代的亚烷基如本文所定义。

[0041] 术语“烷基硫代烷氧基”是指基团-亚烷基-S-烷基、亚烷基-S-取代的烷基、取代的亚烷基-S-烷基以及取代的亚烷基-S-取代的烷基，其中烷基、取代的烷基、亚烷基以及取代的亚烷基如本文所定义。

[0042] “烯基”是指具有2至6个碳原子且优选2至4个碳原子并且具有至少1个且优选1至2个双键不饱和位点的直链或支链烃基。所述术语包括例如双乙烯基、烯丙基和丁-3-烯-1-基。所述术语内包括这些异构体的顺式和反式异构体或混合物。

[0043] 术语“取代的烯基”是指如本文所定义的具有选自由以下组成的组的1至5个取代基或1至3个取代基的烯基：烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨酰基、氨基酰氧基、氧基氨酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO<sub>2</sub>-烷基、-SO<sub>2</sub>-取代的烷基、-SO<sub>2</sub>-芳基以及-SO<sub>2</sub>-杂芳基。

[0044] “炔基”是指具有2至6个碳原子且优选2至3个碳原子并且具有至少1个且优选1至2个三键不饱和位点的直链或支链单价烃基。此类炔基的实例包括乙炔基(-C≡CH)和炔丙基(-CH<sub>2</sub>C≡CH)。

[0045] 术语“取代的炔基”是指如本文所定义的具有选自由以下组成的组的1至5个取代基或1至3个取代基的炔基：烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨酰基、氨基酰氧基、氧基氨酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO<sub>2</sub>-烷基、-SO<sub>2</sub>-取代的烷基、-SO<sub>2</sub>-芳基以及-SO<sub>2</sub>-杂芳基。

[0046] “炔氧基”是指基团-O-炔基，其中炔基如本文所定义。炔氧基包括例如乙炔氧基、丙炔氧基等。

[0047] “酰基”是指基团：H-C(O)-、烷基-C(O)-、取代的烷基-C(O)-、烯基-C(O)-、取代的烯基-C(O)-、炔基-C(O)-、取代的炔基-C(O)-、环烷基-C(O)-、取代的环烷基-C(O)-、环烯基-C(O)-、取代的环烯基-C(O)-、芳基-C(O)-、取代的芳基-C(O)-、杂芳基-C(O)-、取代的杂芳基-C(O)、杂环基-C(O)-以及取代的杂环基-C(O)-，其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的杂环如本文所定义。例如，酰基包括“乙酰基”CH<sub>3</sub>C(O)-。

[0048] “酰氨基”是指基团-NR<sup>20</sup>C(O)烷基、-NR<sup>20</sup>C(O)取代的烷基、-NR<sup>20</sup>C(O)环烷基、-NR<sup>20</sup>C(O)取代的环烷基、-NR<sup>20</sup>C(O)环烯基、-NR<sup>20</sup>C(O)取代的环烯基、-NR<sup>20</sup>C(O)烯基、-NR<sup>20</sup>C(O)取代的烯基、-NR<sup>20</sup>C(O)炔基、-NR<sup>20</sup>C(O)取代的炔基、-NR<sup>20</sup>C(O)芳基、-NR<sup>20</sup>C(O)取代的芳基、-NR<sup>20</sup>C(O)杂芳基、-NR<sup>20</sup>C(O)取代的杂芳基、-NR<sup>20</sup>C(O)杂环及-NR<sup>20</sup>C(O)取代的杂环，其中R<sup>20</sup>是氢或烷基并且其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的杂环如本文所定义。

[0049] “氨基羧基”或术语“氨酰基”是指基团-C(O)NR<sup>21</sup>R<sup>22</sup>，其中R<sup>21</sup>和 R<sup>22</sup>独立地选自由以下组成的组：氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的

杂环,并且其中 $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 任选地与与其结合的氮连接在一起以形成杂环或取代的杂环基团,并且其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环如本文所定义。

[0050] “氨基羰基氨基”是指基团 $-NR^{21}C(O)NR^{22}R^{23}$ ,其中 $R^{21}$ 、 $R^{22}$ 和 $R^{23}$ 独立地选自氢、烷基、芳基或环烷基,或其中两个R基团连接以形成杂环基。

[0051] 术语“烷氧基羰基氨基”是指基团 $-NRC(O)OR$ ,其中各R独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环基,其中烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基以及杂环基如本文所定义。

[0052] 术语“酰氧基”是指基团烷基 $-C(O)O-$ 、取代的烷基 $-C(O)O-$ 、环烷基 $-C(O)O-$ 、取代的环烷基 $-C(O)O-$ 、芳基 $-C(O)O-$ 、杂芳基 $-C(O)O-$ 以及杂环基 $-C(O)O-$ ,其中烷基、取代的烷基、环烷基、取代的环烷基、芳基、杂芳基和杂环基如本文所定义。

[0053] “氨基磺酰基”是指基团 $-SO_2NR^{21}R^{22}$ ,其中 $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 独立地选自以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环、取代的杂环,并且其中 $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 任选地与与其结合的氮连接在一起以形成杂环或取代的杂环基团,并且烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环如本文所定义。

[0054] “磺酰基氨基”是指基团 $-NR^{21}SO_2R^{22}$ ,其中 $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 独立地选自以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的杂环,并且其中 $R^{21}$ 和 $R^{22}$ 任选地与与其结合的源自连接在一起以形成杂环或取代的杂环基团,并且其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环如本文所定义。

[0055] “芳基”或“Ar”是指具有单环(如存在于苯基中)的6至18个碳原子的单价芳族碳环基团或具有多个稠环的环系统(此类芳族环系统的实例包括萘基、蒽基和茚满基),所述稠环可以是或可以不是芳族的,条件是连接点是通过芳族环的原子。所述术语包括例如苯基和萘基。除非另外通过针对芳基取代基的定义约束,否则此类芳基可任选地被选自以下的1至5个取代基或1至3个取代基取代:酰氧基、羟基、巯基、酰基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、取代的烷基、取代的烷氧基、取代的烯基、取代的炔基、取代的环烷基、取代的环烯基、氨基、取代的氨基、氨酰基、酰氨基、烷芳基、芳基、芳氧基、叠氮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、氨基酰氧基、氧基酰氨基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、 $-SO-$ 烷基、 $-SO-$ 取代的烷基、 $-SO-$ 芳基、 $-SO-$ 杂芳基、 $-SO_2-$ 烷基、 $-SO_2-$ 取代的烷基、 $-SO_2-$ 芳基、 $-SO_2-$ 杂芳基以及三卤代甲基。在这类情况下,被1至5个取代基(例如,如本文所描述)取代的芳基被称为“取代的芳基”。

[0056] “芳氧基”是指基团 $-O-$ 芳基,其中芳基如本文所定义,包括例如苯氧基、萘氧基等,包括任选取代的芳基,如也在本文中所定义。

[0057] “氨基”是指基团 $-NH_2$ 。

[0058] 术语“取代的氨基”是指基团 $-NRR$ ,其中各R独立地选自以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、环烷基、取代的环烷基、烯基、取代的烯基、环烯基、取代的环烯基、炔基、取代

的炔基、芳基、杂芳基以及杂环基,条件是至少一个R不是氢。

[0059] 术语“叠氮基”是指基团-N<sub>3</sub>。

[0060] “羧基 (Carboxyl)”、“羧基 (carboxy)”或“羧酸酯”是指其-CO<sub>2</sub>H盐。

[0061] “羧基酯 (Carboxyl ester)”或“羧基酯 (carboxy ester)”或术语“羧基烷基 (carboxyalkyl)”或“羧基烷基 (carboxylalkyl)”是指基团-C(0)O-烷基、-C(0)O-取代的烷基、-C(0)O-烯基、-C(0)O-取代的烯基、-C(0)O-炔基、-C(0)O-取代的炔基、-C(0)O-芳基、-C(0)O-取代的芳基、-C(0)O-环烷基、-C(0)O-取代的环烷基、-C(0)O-环烯基、-C(0)O-取代的环烯基、-C(0)O-杂芳基、-C(0)O-取代的杂芳基、-C(0)O-杂环以及-C(0)O-取代的杂环,其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的杂环如本文所定义。

[0062] “(羧基酯) 氧基”或“碳酸酯”是指基团-O-C(0)O-烷基、-O-C(0)O-取代的烷基、-O-C(0)O-烯基、-O-C(0)O-取代的烯基、-O-C(0)O-炔基、-O-C(0)O-取代的炔基、-O-C(0)O-芳基、-O-C(0)O-取代的芳基、-O-C(0)O-环烷基、-O-C(0)O-取代的环烷基、-O-C(0)O-环烯基、-O-C(0)O-取代的环烯基、-O-C(0)O-杂芳基、-O-C(0)O-取代的杂芳基、-O-C(0)O-杂环以及-O-C(0)O-取代的杂环,其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的杂环如本文所定义。

[0063] “氰基”或“腈”是指基团-CN。

[0064] “环烷基”是指具有单个或多个环状环的3至10个碳原子的环状烷基,包括稠合、桥联和螺环系统。适合的环烷基的实例包括例如金刚烷基、环丙基、环丁基、环戊基、环辛基等。此类环烷基包括例如单环结构,如环丙基、环丁基、环戊基、环辛基等;或多环结构,如金刚烷基等。

[0065] 术语“取代的环烷基”是指具有选自以下的1至5个取代基或1至3个取代基的环烷基:烷基、取代的烷基、烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨酰基、氨基酰氧基、氧基氨酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO<sub>2</sub>-烷基、-SO<sub>2</sub>-取代的烷基、-SO<sub>2</sub>-芳基以及-SO<sub>2</sub>-杂芳基。

[0066] “环烯基”是指具有单个或多个环且具有至少一个双键且优选1至2个双键的3至10个碳原子的非芳族环状烷基。

[0067] 术语“取代的环烯基”是指具有选自以下的1至5个取代基或1至3个取代基的环烯基:烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨酰基、氨基酰氧基、氧基氨酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO<sub>2</sub>-烷基、-SO<sub>2</sub>-取代的烷基、-SO<sub>2</sub>-芳基以及-SO<sub>2</sub>-杂芳基。

[0068] “环炔基”是指具有单个或多个环且具有至少一个三键的5至10个碳原子的非芳族环烷基。

[0069] “环烷氧基”是指-O-环烷基。

[0070] “环烯基氧基”是指-O-环烯基。

[0071] “卤代”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0072] “羟基(hydroxy)”或“羟基(hydroxyl)”是指基团-OH。

[0073] “杂芳基”是指1至15个碳原子如1至10个碳原子和1至10个环内杂原子的芳族基团,所述杂原子选自由氧、氮和硫组成的组。此类杂芳基可具有单环(如吡啶基、咪唑基或呋喃基)或环系统中的多个稠环(例如,如在基团如吲哚基、喹啉基、苯并呋喃、苯并咪唑基或苯并噻吩基中),其中环系统内的至少一个环是芳族的并且环系统内的至少一个环是芳族的,条件是连接点是通过芳族环的原子。在某些实施方案中,杂芳基的氮和/或硫原子任选被氧化以提供N-氧化物( $N \rightarrow O$ )、亚磺酰基或磺酰基部分。所述术语包括例如,吡啶基、吡咯基、吲哚基、噻吩基以及呋喃基。除非另外通过针对杂芳基取代基的定义约束,否则此类杂芳基可任选地被选自以下的1至5个取代基或1至3个取代基取代:酰氧基、羟基、巯基、酰基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、取代的烷基、取代的烷氧基、取代的烯基、取代的炔基、取代的环烷基、取代的环烯基、氨基、取代的氨基、氨酰基、酰氨基、烷芳基、芳基、芳氧基、叠氮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、氨基酰氧基、氧基酰氨基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、-S0-烷基,-S0-取代的烷基,-S0-芳基,-S0-杂芳基,-SO<sub>2</sub>-烷基,-SO<sub>2</sub>-取代的烷基,-SO<sub>2</sub>-芳基和-SO<sub>2</sub>-杂芳基以及三卤代甲基。在这类情况下,被1至5个取代基(例如,如本文所描述)取代的杂芳基被称为“取代的杂芳基”。

[0074] 术语“杂芳烷基”是指基团-亚烷基-杂芳基,其中亚烷基和杂芳基在本文定义。所述术语包括例如吡啶基甲基、吡啶基乙基、吲哚基甲基等。

[0075] “杂芳氧基”是指-O-杂芳基。

[0076] “杂环”、“杂环的”、“杂环烷基”和“杂环基”是指具有单环或多个稠环的饱和或不饱和基团,包括稠合、桥联和螺环系统且具有3至20个环原子,包括1至10个杂原子。这些环原子选自由氮、硫或氧组成的组,其中在稠环系统中,一个或多个环可以是环烷基、芳基或杂芳基,条件是连接点是通过非芳族环。在某些实施方案中,杂环基团的氮和/或硫原子任选被氧化以提供N-氧化物、-S(O)-或-SO<sub>2</sub>-部分。

[0077] 杂环和杂芳基的实例包括但不限于,氮杂环丁烷、吡咯、咪唑、吡唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、吲哚、异吲哚、吲哚、二氢吲哚、吲唑、嘌呤、喹啉、异喹啉、喹啉、酞嗪、萘基吡啶、喹喔啉、喹唑啉、噌啉、蝶啶、咔唑、咔啉、菲啶、吡啶、菲咯啉、异噻唑、吩嗪、异噻唑、吩噻唑、吩噻嗪、咪唑烷、咪唑啉、哌啶、哌嗪、二氢吲哚、邻苯二甲酰亚胺、1,2,3,4-四氢异喹啉、4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩、噻唑、噻唑烷、噻吩、苯并[b]噻吩、吗啉基、硫代吗啉基(也被称为硫杂吗啉基)、1,1-二氧化硫代吗啉基、哌啶基、吡咯烷、四氢呋喃基等。

[0078] 除非另外通过针对杂环取代基的定义约束,所述杂环基团可任选地被选自以下的1至5或1至3个取代基取代:烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨酰基、氨基酰氧基、氧基氨酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环

氧基、巯基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基、杂环基、杂环氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-S0-烷基、-S0-取代的烷基、-S0-芳基、-S0-杂芳基、-S0<sub>2</sub>-烷基、-S0<sub>2</sub>-取代的烷基、-S0<sub>2</sub>-芳基、-S0<sub>2</sub>-杂芳基以及稠合杂环。

[0079] “杂环基氧基”是指基团-O-杂环基。

[0080] 术语“杂环基硫基”是指基团杂环-S-。

[0081] 术语“亚杂环基”是指由如本文定义的杂环形成的二基基团。

[0082] 术语“羟基氨基”是指基团-NHOH。

[0083] “硝基”是指基团-NO<sub>2</sub>。

[0084] “氧代”是指原子(=O)。

[0085] “磺酰基”是指基团SO<sub>2</sub>-烷基、SO<sub>2</sub>-取代的烷基、SO<sub>2</sub>-烯基、SO<sub>2</sub>-取代的烯基、SO<sub>2</sub>-环烷基、SO<sub>2</sub>-取代的环烷基、SO<sub>2</sub>-环烯基、SO<sub>2</sub>-取代的环烯基、SO<sub>2</sub>-芳基、SO<sub>2</sub>-取代的芳基、SO<sub>2</sub>-杂芳基、SO<sub>2</sub>-取代的杂芳基、SO<sub>2</sub>-杂环和SO<sub>2</sub>-取代的杂环,其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的杂环如本文所定义。磺酰基包括例如甲基-SO<sub>2</sub>-、苯基-SO<sub>2</sub>-以及4-甲基苯基-SO<sub>2</sub>-。

[0086] “磺酰氧基”是指基团-OSO<sub>2</sub>-烷基、OSO<sub>2</sub>-取代的烷基、OSO<sub>2</sub>-烯基、OSO<sub>2</sub>-取代的烯基、OSO<sub>2</sub>-环烷基、OSO<sub>2</sub>-取代的环烷基、OSO<sub>2</sub>-环烯基、OSO<sub>2</sub>-取代的环烯基、OSO<sub>2</sub>-芳基、OSO<sub>2</sub>-取代的芳基、OSO<sub>2</sub>-杂芳基、OSO<sub>2</sub>-取代的杂芳基、OSO<sub>2</sub>-杂环和OSO<sub>2</sub>-取代的杂环,其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环以及取代的杂环如本文所定义。

[0087] 术语“氨基羰基氧基”是指基团-OC(O)NRR,其中各R独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基或杂环,其中烷基、取代的烷基、芳基、杂芳基以及杂环如本文所定义。

[0088] “巯基”是指基团-SH。

[0089] “硫代”或术语“硫酮基”是指原子(=S)。

[0090] “烷硫基”或术语“硫代烷氧基”是指基团-S-烷基,其中烷基如本文所定义。在某些实施方案中,硫可氧化为-S(O)-。亚砷可作为一种或多种立体异构体存在。

[0091] 术语“取代的硫代烷氧基”是指基团-S-取代的烷基。

[0092] 术语“硫代芳氧基”是指基团芳基-S-,其中芳基如本文所定义,包括也在本文定义的任选取代的芳基。

[0093] 术语“硫代杂芳氧基”是指基团杂芳基-S-,其中杂芳基如本文所定义,包括如也在本文定义的任选取代的芳基。

[0094] 术语“硫代杂环氧基”是指基团杂环基-S-,其中杂环基如本文所定义,包括如也在本文定义的任选取代的杂环基。

[0095] 除了本文的公开内容外,术语“取代的”当用于限定指定基团或自由基时还可意指指定基团或自由基的一个或多个氢原子彼此各自独立地被如下文定义的相同或不同的取代基基团置换。

[0096] 除了关于本文的单独术语公开的基团外,除非另外指明,否则用于取代指定基团或自由基中的饱和碳原子上的一个或多个氢(单个碳上的任何两个氢可被=O、=NR<sup>70</sup>、=N-OR<sup>70</sup>、=N<sub>2</sub>或=S置换)的取代基基团是-R<sup>60</sup>、卤代、=O、-OR<sup>70</sup>、-SR<sup>70</sup>、-NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、三卤代甲基、-



CN、-OCN、-SCN、-NO、-NO<sub>2</sub>、=N<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、-SO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-SO<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-SO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>、-OSO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-OSO<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OSO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>、-P(O)(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR<sup>70</sup>)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-P(O)(OR<sup>70</sup>)<sub>2</sub>、-C(O)R<sup>70</sup>、-C(S)R<sup>70</sup>、-C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>、-C(O)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-C(O)OR<sup>70</sup>、-C(S)OR<sup>70</sup>、-C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-OC(O)R<sup>70</sup>、-OC(S)R<sup>70</sup>、-OC(O)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OC(O)OR<sup>70</sup>、-OC(S)OR<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>以及 -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>，其中R<sup>60</sup>选自由以下组成的组：任选取代的烷基、环烷基、杂烷基、杂环烷基烷基、环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，各R<sup>70</sup>独立地是氢或R<sup>60</sup>；各R<sup>80</sup>独立地是R<sup>70</sup>或可替代地两个R<sup>80</sup>与它们所键合的氮原子一起形成5-、6-或7-元杂环烷基，其可任选地包括选自由O、N和S组成的组的1至4个相同或不同的另外杂原子，其中N可具有-H或C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基取代；并且各M<sup>+</sup>是具有净单个正电荷的抗衡离子。各M<sup>+</sup>可独立地是例如碱离子，如K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>；铵离子，如<sup>+</sup>N(R<sup>60</sup>)<sub>4</sub>；或碱土离子，如[Ca<sup>2+</sup>]<sub>0.5</sub>、[Mg<sup>2+</sup>]<sub>0.5</sub>或[Ba<sup>2+</sup>]<sub>0.5</sub>（“下标0.5意指此类二价碱土离子的一个抗衡离子可以是本发明化合物的离子化形式，并且另一个抗衡离子是如氯化物的抗衡离子，或本文公开的两种离子化化合物可充当此类二价碱土离子的抗衡离子，或本发明的双重离子化化合物可充当此类二价碱土离子的抗衡离子”）。作为指定实例，-NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>意指包括-NH<sub>2</sub>、-NH-烷基、N-吡咯烷基、N-哌嗪基、4N-甲基-哌嗪-1-基和N-吗啉基。

[0097] 除了本文的公开内容外，除非另外指明，否则用于“取代的”烯炔、炔炔、芳基和杂芳基种的不饱和碳原子上的氢的取代基基团是-R<sup>60</sup>、卤代、-O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OR<sup>70</sup>、-SR<sup>70</sup>、-S<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、三卤代甲基、-CF<sub>3</sub>、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-NO<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、-SO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-SO<sub>3</sub>R<sup>70</sup>、-OSO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OSO<sub>3</sub>R<sup>70</sup>、-PO<sub>3</sub><sup>-2</sup>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR<sup>70</sup>)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-P(O)(OR<sup>70</sup>)<sub>2</sub>、-C(O)R<sup>70</sup>、-C(S)R<sup>70</sup>、-C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-C(S)OR<sup>70</sup>、-C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-OC(O)R<sup>70</sup>、-OC(S)R<sup>70</sup>、-OCO<sub>2</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OCO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-OC(S)OR<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>以及 -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>，其中R<sup>60</sup>、R<sup>70</sup>、R<sup>80</sup>和M<sup>+</sup>如先前所定义，条件是在取代的烯炔或炔炔的情况下，所述取代基不是-O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OR<sup>70</sup>、-SR<sup>70</sup>或-S<sup>-</sup>M<sup>+</sup>。

[0098] 除了关于本文的单独术语公开的基团外，除非另外指明，用于“取代的”杂烷基和环杂烷基中的氮原子上的氢的取代基基团是-R<sup>60</sup>、-O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OR<sup>70</sup>、-SR<sup>70</sup>、-S<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、三卤代甲基、-CF<sub>3</sub>、-CN、-NO、-NO<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-S(O)<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-S(O)<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>、-OS(O)<sub>2</sub>R<sup>70</sup>、-OS(O)<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-OS(O)<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>、-P(O)(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>、-P(O)(OR<sup>70</sup>)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>、-P(O)(OR<sup>70</sup>)(OR<sup>70</sup>)、-C(O)R<sup>70</sup>、-C(S)R<sup>70</sup>、-C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>、-C(O)OR<sup>70</sup>、-C(S)OR<sup>70</sup>、-C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-OC(O)R<sup>70</sup>、-OC(S)R<sup>70</sup>、-OC(O)OR<sup>70</sup>、-OC(S)OR<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(O)OR<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>、-NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>、-NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>以及 -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>，其中R<sup>60</sup>、R<sup>70</sup>、R<sup>80</sup>和M<sup>+</sup>如先前所定义。

[0099] 除了本文的公开内容外，在某一实施方案中，被取代的基团具有1、2、3或4个取代基、1、2或3个取代基、1或2个取代基或1个取代基。

[0100] 应理解，在以上定义的所有取代的基团中，通过定义具有针对本身的其他取代基的取代基（例如，具有本身被取代的芳基取代的取代的芳基作为取代基的取代的芳基，其进一步被取代的芳基取代等）得到的聚合物不意图包括在本文中。在这类情况下，这类取代的最大数目是三。例如，在本文具体地考虑的取代的芳基的连续取代限于取代的芳基-（取代的芳基）-取代的芳基。

[0101] 除非另外指示，在本文未明确定义的取代基的命名法通过命名官能度的末端部

分、接着朝向连接点的相邻官能度来实现。例如,取代基“芳基烷基氧基羰基”是指基团(芳基)-(烷基)-O-C(=O)-。

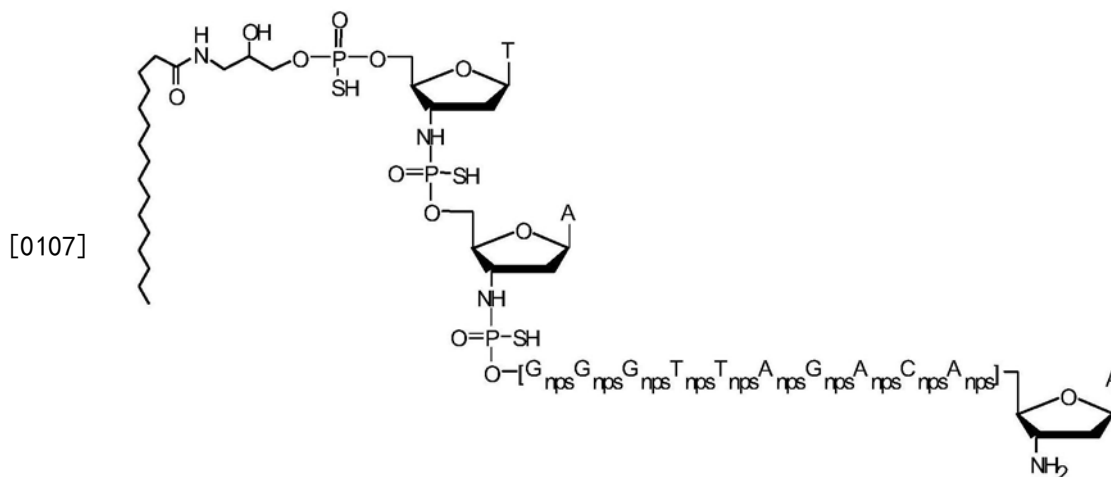
[0102] 关于本文公开的含有一个或多个取代基的任何基团,当然应理解这类基团不含有立体不切实际的和/或合成不可行的任何取代或取代型式。此外,主题化合物包括由这些化合物的取代产生的所有立体化学异构体。

[0103] 术语“药学上可接受的盐”意指可为向如哺乳动物的患者施用所接受的盐(具有抗衡离子的盐对于给定剂量方案具有可接受的哺乳动物安全性)。这类盐可源自药学上可接受的无机或有机碱和源自药学上可接受的无机或有机酸。“药学上可接受的盐”是指化合物的药学上可接受的盐,所述盐来源于本领域中熟知的各种有机和无机抗衡离子,并且包括(仅举例说明)钠盐等;并且当分子含有碱性官能度时,包括有机或无机酸的盐,如盐酸盐等。目标药学上可接受的盐包括但不限于铝、铵、精氨酸、钡、苄星青霉素(benzathine)、钙、胆茶碱、乙二胺、赖氨酸、锂、镁、葡甲胺、普鲁卡因、钾、钠、氨丁三醇、N-甲基葡糖胺、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、乙醇胺、哌嗪、锌、二异丙胺、二异丙基乙胺、三乙胺以及三乙醇胺盐。

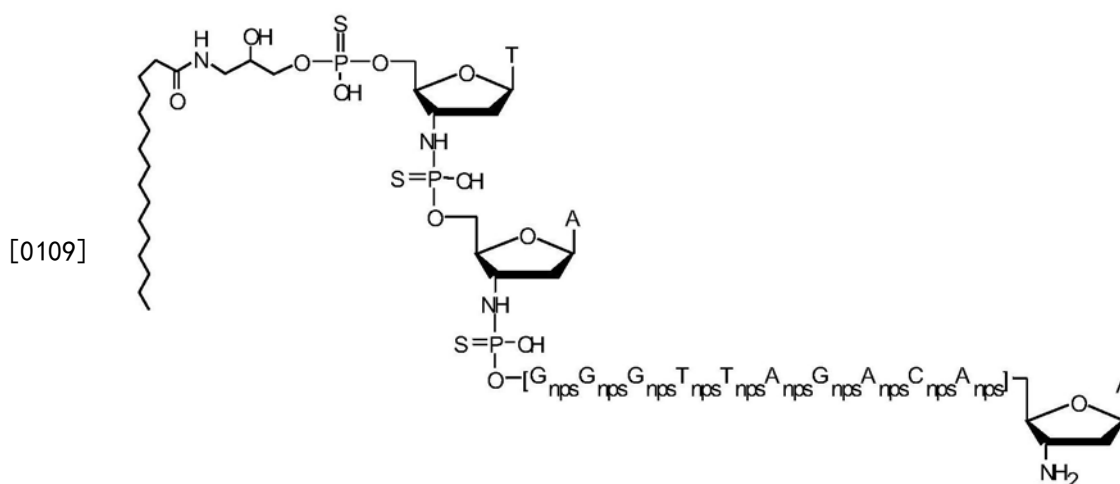
[0104] 术语“其盐”意指当酸的质子被阳离子如金属阳离子或有机阳离子等置换时形成的化合物。当适用时,所述盐是药学上可接受的盐,但是对于不意图用于施用至患者的中间体化合物的盐并不要求如此。作为举例,本发明化合物的盐包括其中化合物通过无机或有机酸质子化以形成阳离子的那些盐,其中无机或有机酸的缀合碱作为盐的阴离子组分。目标盐包括但不限于铝、铵、精氨酸、钡、苄星青霉素、钙、铯、胆茶碱、乙二胺、锂、镁、葡甲胺、普鲁卡因、N-甲基葡糖胺、哌嗪、钾、钠、氨丁三醇、锌、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、乙醇胺、哌嗪、二异丙胺、二异丙基乙胺、三乙胺以及三乙醇胺盐。应理解对于本文描绘的包括核苷间键联的主链的任何寡核苷酸结构,这类寡核苷酸还可包括任何适宜的盐形式。在一些实施方案中,为简单起见描绘核苷间键联的酸性形式。在一些实例中,主题化合物的盐是单价阳离子盐。在某些实例中,主题化合物的盐是二价阳离子盐。在一些实例中,主题化合物的盐是三价阳离子盐。“溶剂化物”是指由溶剂分子与溶质的分子或离子的组合形成的复合物。溶剂可以是有机化合物、无机化合物或两者的混合物。溶剂的一些实例包括但不限于,甲醇、N,N-二甲基甲酰胺、四氢呋喃、二甲亚砜和水。当溶剂是水时,所形成的溶剂化物是水合物。

[0105] “立体异构体(Stereoisomer/stereoisomers)”是指具有相同原子连接性、但空间中的原子排列不同的化合物。立体异构体包括顺式-反式异构体、E和Z异构体、对映异构体和非对映异构体。

[0106] “互变异构体”是指分子的仅在原子的电子键合方面和/或在质子的位置方面不同的替代性形式,如烯醇-酮和亚胺-烯胺互变异构体、-NH-P(=S)(OH)-O-和-NH-P(=O)(SH)-O-,或含有-N=C(H)-NH-环原子排列的杂芳基的互变异构形式,如吡唑、咪唑、苯并咪唑、三唑和四唑。本领域的普通技术人员将认识到本文描述的基团的其他互变异构排列也是可能的。例如,应理解描述为以下结构的寡核苷酸:



[0108] 也涵盖显示键联基团的一种可能的替代互变异构排列的以下结构：



[0110] 其中“nps”表示将一个核苷的3'-碳连接至相邻核苷的5'-碳的硫代磷酰胺酯键联(—NH—P(=O)(SH)—O—或—NH—P(=S)(OH)—O—)。应理解即使未明确指示,主题化合物的所有互变异构形式也均由其中描述所述化合物的基团的一种可能的互变异构排列的结构涵盖。主题化合物的基团的任何适宜的互变异构排列均可用于描述所述化合物。

[0111] 应理解术语“或其盐或溶剂化物或立体异构体”意图包括盐、溶剂化物和立体异构体的所有排列,如主题化合物的立体异构体的药学上可接受的盐的溶剂化物。应理解术语“或其盐”意图包括盐的所有排列。应理解术语“或其药学上可接受的盐”意图包括盐的所有排列。应理解术语“或其溶剂化物”意图包括溶剂化物的所有排列。应理解术语“或其立体异构体”意图包括立体异构体的所有排列。应理解术语“或其互变异构体”意图包括互变异构体的所有排列。因此例如,由此可见意图包括主题化合物的立体异构体的互变异构体的药学上可接受的盐的溶剂化物。

[0112] “药学有效量”或“治疗有效量”是指化合物的足以治疗指定病症或疾病或其一种或多种症状和/或预防所述疾病或病症的发生的量。关于致肿瘤增生性病症,药学或治疗有效量包含尤其足以导致肿瘤萎缩或降低肿瘤的生长速率的量。

[0113] “患者”是指人和非人受试者,尤其哺乳动物受试者。

[0114] 如本文所用的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指患者如哺乳动物(具体地说人)的疾病或医学病状的治疗,所述治疗包括:(a)预防所述疾病或医学病状发

生,如受试者的预防性治疗;(b)改善所述疾病或医学病状,如消除患者的疾病或医学病状或引起所述疾病或医学病状的消退;(c)抑制所述疾病或医学病状,例如通过减缓或阻止患者的疾病或医学病状的发展;或(d)缓解患者的疾病或医学病状的症状。

[0115] 如本文所用,术语“分离”意指描述目标化合物所处的环境不同于所述化合物天然存在所处的环境。“分离的”意图包括处于大体上富含目标化合物和/或其中目标化合物得以部分或大体上纯化的样品内的化合物。

[0116] 如本文所用,术语“大体上纯化的”是指从其天然环境中除去的化合物,并且至少60%不含、至少75%不含、至少80%不含、至少85%不含、至少90%不含、至少95%不含、至少98%不含或多于98%不含其所天然缔合的其他组分。

[0117] 术语“生理条件”意指涵盖可与活细胞相容的那些条件,例如可与活细胞相容的具有一定温度、pH、盐度等的主要水性条件。

[0118] 在进一步描述本发明之前,应理解本发明不限于所描述的特定实施方案,因而,当然也可有所变化。还应理解本文所用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,并且不意图具有限制性,因为本发明的范围将仅受随附权利要求限制。

[0119] 在提供值的范围的情况下,应理解本发明内涵盖所述范围的上限与下限之间的各介入值,准确到下限的单位的十分之一(除非上下文另外清楚指示),以及所述范围内的任何其它所述值或介入值。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在更小的范围内,并且也涵盖在本发明内,服从所述范围内任何明确排除在外的界限。在所述范围包括所述限值中的一个或两个的情况下,本发明中还包括排除那些所包括的限值中的任一个或两个的范围。

[0120] 应理解,出于清晰目的而在分开的实施方案的上下文中所描述的本发明的某些特征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,出于简洁目的而在单个实施方案的上下文中所描述的本发明的各种特征也可以分开地或以任何适合的子组合来提供。与本发明有关的实施方案的所有组合明确地由本发明包含并且就犹如每个和每一组合被单独地并明确地公开一样而在本文中公开,程度为这类组合包含例如为稳定化合物(即,可被制备、分离、表征且测试生物活性的化合物)的化合物的主题。此外,各种实施方案及其要素的所有子组合(例如,在描述这类变量的实施方案中所列举的化学基团的要素)也明确地由本发明包含,并且就犹如每个和每一这样的子组合被单独地并明确地公开在本文中一样而在本文中公开。

[0121] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管在实践或测试本发明中还可使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但是现在描述目标方法和材料。为了公开和描述公布在引用时所涉及的方法和/或材料,本文中提到的所有公布均以引用方式并入本文。

[0122] 必须指出,如本文和在所附权利要求书中所使用,单数形式“一个(a)/一种(an)”和“所述(the)”包括复数对象,除非上下文另外清楚地指出。应进一步指出,权利要求书可以经拟订以排除任何任选的要素。因此,所述表述旨在作为在列举权利要求要素时使用如“单独地”、“仅/只”等的独占性术语或使用“否定”限制的先行基础。

[0123] 应理解,出于清晰目的而在分开的实施方案的上下文中所描述的本发明的某些特

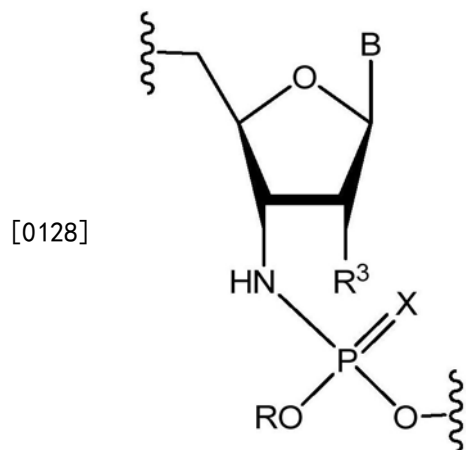
征也可以在单个实施方案中组合提供。相反,出于简洁目的而在单个实施方案的上下文中所描述的本发明的各种特征也可以分开地或以任何适合的子组合来提供。

[0124] 提供本文中讨论的公布仅仅是针对它们在本申请的提交日期之前的公开。本文中的任何内容均不应被理解为承认由于先前发明而使本发明无权享有这些公布的优先权。此外,所提供的公布日期可不同于可能需要独立确认的实际公布日期。

[0125] 详述

[0126] 如上文所概述,本公开提供一种经由依次偶联循环制备寡核苷酸的固相方法,所述方法包括二核苷酸二聚体偶联至生长链的游离3'端基(例如3'-羟基或3'-氨基)。一般而言,合成自靶寡核苷酸序列的5'-末端进行至3'-末端,并且包括至少一次二核苷酸二聚体偶联。二聚体可经由任何适宜化学偶联至生长链的游离3'端基。在一些情况下,二聚体是3'-保护的-二核苷酸-5'-亚磷酸酯二聚体,其中所述二核苷酸可包括任何适宜的核苷间键联。所述寡核苷酸可包含一个或多个磷酸酯亚基间键联(例如,氧代-磷酸酯或硫代磷酸酯键联)。

[0127] 在一些实施方案中,所述寡核苷酸包含含有至少一个由下式定义的亚基的核苷亚基的序列:



[0129] 其中B是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物;X是O或S;R选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、磷酸酯保护基;并且R<sup>3</sup>选自由氢、O-R<sup>2</sup>和卤素组成的组,其中R<sup>2</sup>是H、烷基、取代的烷基(例如-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>W(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>H,其中n是1-10之间,m是0-10之间且W是O、S或NH)或羟基保护基。应理解包含上式描述的亚基的一些寡核苷酸也可呈盐形式存在。此类形式只要其可存在就意图包括在本公开的范围內。

[0130] 相对于仅涉及核苷单体亚基偶联的方法,主题方法提供偶联循环的数目降低,并且提供合成的非靶寡核苷酸产物的量降低。可取决于如靶寡核苷酸的长度和序列的多种因素来选择用于制备靶寡核苷酸序列的逆合成策略以便使合成的特定非靶寡核苷酸产物的量最小。

[0131] 在一些实施方案中,主题方法提供制备相对于目标靶寡核苷酸具有降低量的一种或多种(N-x)产物的组合物。

[0132] 在某些实施方案中,本文所述的相对于目标靶寡核苷酸具有降低量的一种或多种(N-x)产物的任何组合物都是未纯化的。

[0133] 如本文所用,术语“(N-x)产物”(其中x是1至N-1的整数,并且N是靶寡核苷酸中的

核苷残基的数目)是指在主题制备方法期间产生的相对于长度为N个残基的靶寡核苷酸的序列缺乏x个核苷残基的非靶寡核苷酸。所述靶寡核苷酸是主题制备方法被设计来产生的产物。因此,(N-1)产物是缺乏出自靶寡核苷酸的序列的任一核苷残基的非靶寡核苷酸。因此,在一些情况下,术语“(N-1)产物”是指多种非靶寡核苷酸产物,其各自相对于靶寡核苷酸的序列缺乏一个核苷残基。类似地,术语“(N-x)产物”是指多种非靶寡核苷酸产物,其各自相对于靶寡核苷酸的序列缺乏x个核苷残基。因此,(N-2)产物是缺乏出自靶寡核苷酸的序列的任两个核苷残基的非靶寡核苷酸。在一些情况下,所述x个残基是相对于靶寡核苷酸序列彼此连续的。在其他情况下,所述x个残基是相对于靶寡核苷酸序列彼此不连续的。x个核苷残基可自靶序列的任何位置缺乏,并且可在偶联循环期间由未反应的3'-端基产生。主题方法的(N-x)产物可包括一种或多种由主题合成方法获得的其他修饰,例如部分脱保护修饰、损失核碱基(例如脱嘌呤)、端基加帽、经由合成试剂衍生(例如由硫化试剂实现苯基乙酰化)等。取决于所使用的寡核苷酸合成和试剂的化学,多种修饰的寡核苷酸是可能的。除非另外指示,否则所有此类修饰意指由术语(N-x)产物涵盖。

[0134] 在一些实施方案中,主题方法导致寡核苷酸合成的选自部分保护的产物或部分保护的(N-x)产物的一种或多种非靶产物的减少,例如,包含一个或多个核碱基保护基的寡核苷酸产物。在主题寡核苷酸组合物中,靶寡核苷酸序列可更易于与所述方法的其他含寡核苷酸产物(例如(N-x)产物和缺乏核碱基的产物)分离或纯化。

[0135] 在下文部分中更详细地描述主题方法和组合物的实施方案。

[0136] 制备寡核苷酸的方法

[0137] 本公开提供一种制备寡核苷酸的方法。主题方法可包括二核苷酸二聚体至少一次偶联至生长寡核苷酸链的游离3'端基。任何适宜的寡核苷酸合成方法和化学均可用于主题制备方法中。可适合于在主题方法中使用的目标寡核苷酸合成化学和方法包括但不限于亚磷酰胺、H-磷酸酯、磷酸二酯、磷酸三酯、亚磷酸三酯以及由Fearon等人在U.S.5,824,793中所述的那些,所述专利的公开内容以引用的方式整体并入本文。本发明化合物的寡核苷酸组分可通过使常规方案适合于所选化学类型来合成。用于合成具有N3'→P5'磷酰胺酯化学的寡核苷酸的目标方法包括但不限于McCurdy等人,(1997)Tetrahedron Letters, 38: 207-210以及Pongracz和Gryaznov,(1999)Tetrahedron Letters, 49:7661-7664中所述的那些方法。

[0138] 目标寡核苷酸可使用主题方法,经由自靶寡核苷酸序列的5'-末端开始,且进行至3'-末端的依次偶联来制备。5'-末端核苷亚基可经由任意的连接基团或5'-端基连接至任何适宜的固体支撑物。接着,可使用二聚体亚磷酰胺或单体亚磷酰胺实现亚基偶联至生长寡核苷酸链。或者,5'-末端二核苷酸亚基可经由任意的连接基团或5'-端基连接至任何适宜的固体支撑物。一旦第一亚基(例如单体或二聚体亚基)连接至固体支撑物,就可将所述亚基脱保护以产生游离、固定的3'-端基。在一些情况下,所述方法包括使支撑物结合的3'-端基与3'-保护的-二核苷酸-5'-亚磷酰胺二聚体偶联。在某些实施方案中,所述3'-端基是3'-羟基。在某些实施方案中,所述3'-端基是3'-氨基。

[0139] 在一些情况下,所述方法包括以下步骤:(a)使连接至固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护,所述脱保护形成游离3'氨基;(b)使所述游离3'氨基与3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酰胺酯或亚磷酰胺-5'-亚磷酰胺二聚体在亲核催化剂存在下接触以

形成核苷间 N3' →P5' 亚磷酰胺键联;以及(c)使所述键联氧化。

[0140] 靶寡核苷酸序列可使用逆合成策略来合成,所述策略包括二聚体亚基与单体亚基两者依次偶联至生长寡核苷酸链的3'端基。因此,在一些实施方案中,所述方法还包括以下步骤:(a)将连接至固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护,所述脱保护形成游离3'氨基;(b)使所述游离3'氨基与3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体在亲核催化剂存在下接触以形成核苷间N3' →P5' 亚磷酰胺键联;以及(c)使所述键联氧化以产生N3' →P5' 磷酰胺酯键联。

[0141] 如本文所用,术语“N3' →P5' 亚磷酰胺键联”是指N3' →P5' 磷酰胺酯键联的磷(III)中间体。一般而言,N3' →P5' 磷酰胺酯键联通过使 N3' →P5' 亚磷酰胺键联氧化成磷(V)产物(例如可包括氧代(P=O)或硫代(P=S)的N3' →P5' 磷酰胺酯键联)来形成。在一些情况下,氧化步骤可描述为使N3' →P5' 亚磷酰胺键联硫化以产生N3' →P5' 硫代磷酰胺酯键联。

[0142] 如本文所用,“N3' →P5' 磷酰胺酯”、“P5' →N3' 磷酰胺酯”和“磷酰胺酯”是指描述为下式的核苷间亚基键联:

[0143]  $3' -\text{NH}-\text{P}(=\text{X})(\text{OR})-\text{O}-5'$

[0144] 或其互变异构体,其中3'和5'是指通过键联连接的连续核苷的糖部分的碳原子,并且其中R是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基或磷酸酯保护基,并且X是硫属元素,如氧或硫。应理解,当R是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基或磷酸酯保护基时,由上式所描述的一些核苷间亚基键联也可以盐形式存在。此类形式只要其可存在就意图包括在本公开的范围内。在一些情况下,当X是硫时,磷酰胺酯可被称为硫代磷酰胺酯。在一些情况下,当X是氧时,“磷酰胺酯”可被称为“氧代磷酰胺酯”。在一些情况下,当R是磷酸酯保护基时,它可以是烷基、烯基、芳基、芳烷基或其取代型式。在一些情况下,R是含有10个或更少碳原子的磷酸酯保护基。在某些实例中,当R是磷酸酯保护基时,其是具有1至6个碳原子的烷基;吸电子β-取代的乙基(例如β-三卤代甲基-、β-氰基-、β-磺基-或β-硝基-取代的乙基);吸电子取代的苯基(例如卤代-、磺基-、氰基-或硝基-取代的苯基);或吸电子取代的苯基乙基。在一些实施方案中,当R是磷酸酯保护基时,其是甲基、β-氰基乙基或4-硝基苯基乙基。在某些实施方案中,R是氢、甲基或β-氰基乙基。目标吸电子取代基包括但不限于卤代、氰基、硝基、磺基或者单-、二-或三卤代甲基等。卤素原子取代基通常是氟、氯、溴或碘;并且在一些实例中,它们是氟或氯。“吸电子”表示取代基倾向于吸引作为其一部分的分子的价电子,即它是电负性的,例如March, Advanced Organic Chemistry, 第16-18页(John Wiley, New York, 1985)。用于选择磷酸酯保护基的指导提供于Beaucage和Iyer, Tetrahedron 48:2223-2311(1992)中。为方便起见,核苷酸磷酰胺酯有时在本文中由分别用于N3' →P5' 磷酰胺酯和P3' →N5' 磷酰胺酯的下标“np”或“pn”指示。因此,“U<sub>np</sub>U”是其中3'-氨基尿苷和尿苷通过N3' →P5' 磷酰胺酯键联连接的二核苷酸。当键联是氧代-磷酰胺酯时,核苷酸氧代-磷酰胺酯有时在本文中由分别用于N3' →P5' 磷酰胺酯和P3' →N5' 磷酰胺酯的下标“npo”或“opn”指示。类似地,核苷酸硫代磷酰胺酯有时在本文中由分别用于N3' →P5' 硫代磷酰胺酯和P3' →N5' 硫代磷酰胺酯的下标“nps”或“spn”指示。类似地,2'-氟取代基由下标“f”指示。因此,“U<sub>f,np</sub>U”是二核苷酸,其中最5'-3'-氨基-2'-氟尿苷通过N3' →P5' 磷酰胺酯键联连接至尿苷。单一先导下标“p”指示5'单磷酸酯,并且单一拖尾下标“n”指

示3'-氨基。

[0145] 在一些实例中,核苷间亚基键联描述为下式:

[0146]  $3' - \text{NH} - \text{P}(=\text{X})(\text{OR}) - \text{O} - 5'$

[0147] 或其互变异构体,其中3'和5'是指通过键联连接的连续核苷的糖部分的碳原子,并且其中R是氢且X是氧或硫。应理解对于本文所述的包括所述核苷间键联的任何寡核苷酸,所述寡核苷酸液可包括键联的任何适宜盐形式。因此,核苷间键联可呈包括任何适宜的抗衡离子的盐形式。

[0148] 任何适宜的保护基策略均可用于主题方法中以保护碱基、亚磷酰胺、磷酰胺酯、5'、2'和/或3'基团。目标保护基包括但不限于由Ohkubo等人,Org.Lett.,2010,12(11),第2496-2499页;以及Beaucage和Iyer, Tetrahedron 48:2223-2311(1992)描述的那些保护基。

[0149] 如本文所用,术语“磷酸酯保护基”是指可连接至寡核苷酸的含磷亚基间键联的保护基。当存在时,磷酸酯保护基可阻止(即阻断)在连接磷酸酯保护基所处的位置处的含磷键联的反应。任何适宜的含磷亚基间键联(例如P(III)和P(V)键联)均可由主题磷酸酯保护基保护,包括但不限于亚磷酰胺、氧代磷酰胺酯、硫代磷酰胺酯、磷酸酯、硫代磷酸酯、磷酸二酯键联等。磷酸酯保护基可连接至含磷亚基间键联的可用氧原子。任何适宜的保护基可用作磷酸酯保护基。目标磷酸酯保护基包括但不限于烷基、烯基、芳基、芳烷基、环烷基或其取代型式,如具有1至6个碳原子的烷基,如吸电子 $\beta$ -取代的乙基(例如, $\beta$ -三卤代甲基、 $\beta$ -氰基-、 $\beta$ -磺基-或 $\beta$ -硝基-取代的乙基);吸电子取代的苯基(例如卤代-、磺基-、氰基-或硝基-取代的苯基);或吸电子取代的苯基乙基、甲基、 $\beta$ -氰基乙基或4-硝基苯基乙基。在某些实施方案中,磷酸酯保护基是甲基或 $\beta$ -氰基乙基。目标吸电子取代基包括但不限于卤代(例如,氯或氟)、氰基、硝基、磺基或单-、二-或三卤代甲基等。

[0150] 生长寡核苷酸链的3'-端基可包括3'-羟基、3'-氨基或其保护型式。任何适宜的羟基和/或氨基保护基可在寡核苷酸合成期间在3'-端基处使用。在一些实施方案中,3'端基是受保护的3'-氨基,并且所述方法包括使保护基脱保护或移除以产生游离的3'氨基。

[0151] 如本文所用,关于单体和二聚体的术语“游离氨基”意指可用于与进入的单体或二聚体的亚磷酰胺基团反应的氨基。在一些实施方案中,游离氨基是伯胺。在脱保护(例如脱三苯甲基化)步骤之后,氨基可呈盐形式(例如用于脱三苯甲基化的酸的缀合碱的盐)。此盐任选地可在脱三苯甲基化步骤之后用如含2%三乙胺或吡啶的乙腈的碱性溶液中和。

[0152] 在一些实施方案中,3'-端基是受保护的3'-羟基,并且所述方法包括使保护基脱保护或移除以产生游离的3'-羟基。在一些实施方案中,3'-端基是受保护的3'-氨基,并且所述方法包括使保护基脱保护或移除以产生游离的3'-氨基。所述受保护的3'-氨基或3'-羟基可用三苯甲基保护基保护。在某些实施方案中,三苯甲基保护基是三苯基甲基(Tr,  $\text{Ph}_3\text{C}-$ )。在某些实施方案中,三苯甲基保护基是4,4'-二甲氧基三苯基甲基(DMT)。

[0153] 使3'-末端氨基或羟基脱保护可使用任何适宜的方法来实现。目标方法包括但不限于由Beaucage和Iyer, Tetrahedron 48:2223-2311(1992)描述的那些方法。在一些情况下,使末端核苷的受保护的3'氨基脱保护包括脱三苯甲基化以产生游离的3'端基,例如酸催化的脱三苯甲基化。

[0154] 一般而言,二聚体或单体亚基亚磷酰胺包括与连接至固体支撑物的末端核苷的3'



端基相同的受保护的3'-羟基或3'-氨基。进入的亚基亚磷酰胺的3'-保护阻止链的不合需要的聚合。

[0155] 任何适宜的固相支撑物可用于主题方法中。目标固体支撑物包括但不限于由可控孔径玻璃(CPG)制得的微粒、高度交联的聚苯乙烯(例如NittoPhase HL 400或GE Primer 350)、丙烯酸共聚物、纤维素、尼龙、葡聚糖、乳胶、聚丙烯醛等,如以下示例性参考文献中公开的那些:Meth.Enzymol., 章节A, 第11-147页, 第44卷(Academic Press, New York, 1976);美国专利第4,678,814号;第4,413,070号;和第4,046,720号;以及Pon, 第19章, Agrawal编辑, Methods in Molecular Biology, 第20卷, (Humana Press, Totowa, N.J., 1993)。其他目标支撑物包括聚苯乙烯珠粒;接枝有聚乙二醇的聚苯乙烯(例如TentaGel™, Rapp Polymere, Tubingen Germany)等。对如材料、孔隙度、尺寸、形状等的支撑物特征以及所用连接部分的类型的选择取决于多种因素,如所用的保护基、最终产物的长度、最终产物的量等。示例性连接部分公开于Pon等人, Biotechniques, 6:768-775 (1988);Webb, 美国专利第4,659,774号;Barany等人, 国际专利申请PCT/US91/06103;Brown 等人, J.Chem.Soc.Comm., 1989:891-893;Damha等人, Nucleic Acids Research, 18:3813-3821 (1990);Beattie等人, Clinical Chemistry, 39:719-722 (1993);Maskos和Southern, Nucleic Acids Research, 20: 1679-1684 (1992)等。

[0156] 在一些实施方案中,适用于主题方法中的固体支撑物包括CPG 和接枝有聚乙二醇且具有末端氨基的聚苯乙烯(例如TentaGel-NH<sub>2</sub>™, Rapp Polymere, Tubingen Germany)。氨基丙基可用作CPG与核苷键联之间之间隔区。在一些情况下,与第一核苷的5'-羟基的键联是琥珀酰基,其提供可在合成之后用氨水溶液裂解的碱不稳定性酯键联。

[0157] 在脱保护之后,支撑物结合的核苷能够与二聚体或单体亚基亚磷酰胺反应以形成核苷间键联。应理解支撑物结合的核苷可指连接至固体支撑物的单一残基,或可指寡核苷酸链的连接至支撑物的末端残基。

[0158] 任何适宜的偶联化学、偶联试剂和方法均可用于主题方法中。在主题方法的背景下进行涉及偶联条件、保护基、固相支撑物、连接基团、脱保护试剂、用于自固相支撑物裂解产物的试剂、产物的纯化等的选择的大量指导可见于例如以下文献中:Gait编辑, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984);Amarnath和 Broom, Chemical Reviews, 第77卷, 第183-217页 (1977);Pon等人, Biotechniques, 第6卷, 第768-775页 (1988);Ohtsuka等人, Nucleic Acids Research, 第10卷, 第6553-6570页 (1982);Eckstein编辑 Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991);Greene和Wuts“Protective Groups in Organic Synthesis”, 第3版, Wiley, New York 1999;Narang编辑, Synthesis and Applications of DNA and RNA (Academic Press, New York, 1987);Beaucage和Iyer, Tetrahedron 48:2223-2311 (1992)以及类似参考文献。

[0159] 主题方法的偶联步骤可在-20至200摄氏度的温度范围内进行。在一些实例中,所述反应在环境温度下进行(约15-30摄氏度)。反应可通过向含有(寡)核苷酸的共价连接至固体支撑物的游离氨基的反应容器中添加亚磷酰胺二聚体或单体的溶液和活化剂的溶液(或含有亚磷酰胺二聚体或单体和活化剂的溶液)来进行。一般来说,目标活化剂包括亲核催化剂,其置换更稳定的亚磷酰胺氨基以形成高度反应性(及较小稳定性)中间体,所述中

间体进而与固体支撑的寡核苷酸 N3' → P5' 磷酰胺酯的游离3' 氨基反应。接着通过如机械涡旋、用惰性气体喷射等的这类方法混合所述混合物。或者,可使二聚体或单体和活化剂的溶液流过含有固体支撑的具有游离3'-端基的(寡)核苷酸的反应容器(或柱)。单体和活化剂可预先混合,在适合合成仪的阀体中混合,在预活化容器中混合且必要时预先平衡,或其可分别添加至反应容器中。

[0160] 可用于主题方法中的目标活化剂包括但不限于四唑、5-(乙基硫基) 四唑、5-(4-硝基苯基) 四唑、5-(2-噻吩) 四唑、三唑、氯化吡啶鎓等,例如如由Beaucage和Iyer *Tetrahedron* 48:2223-2311 (1992); Berner 等人, *Nucleic Acids Research*, 17:853-864 (1989); Benson, *Chem. Rev.* 41:1-61 (1947) 所描述的活化剂。如本文所用,术语“四唑活化剂”是指为四唑或四唑衍生物的活化剂。在一些实施方案中,活化剂是四唑。适宜的溶剂包括但不限于乙腈、四氢呋喃、二氯甲烷等。可小心使用无水(不含水)二聚体或单体、活化剂以及用于偶联步骤的溶剂以及用于在偶联步骤之前立即洗涤固体支撑物的溶剂。

[0161] 在偶联之后,寡核苷酸的支撑物结合的生长链的未反应的3'-氨基可任选地在下一脱保护步骤(例如脱三苯甲基化步骤)之前用适宜的加帽剂加帽以使其对随后偶联步骤具有惰性。此加帽步骤可改进制备的HPLC概况以使得纯化更容易,且也可改进产物的总体产率。适用于主题方法中的加帽试剂包括亲电子试剂(如乙酸酐和异丁酸酐)、酸氯化物(如金刚烷基羰基氯化物、新戊酰氯等)、异硫氰酸酯、氯甲酸酯等。还适用的是亚磷酰胺连同活化剂一起,且接着氧化,且如异丙基-H-磷酸三乙铵的H-磷酸盐连同酸氯化物(如新戊酰氯或金刚烷基羰基氯化物)一起使用。

[0162] 在一些实施方案中,所述方法包括氧化核苷间N3' → P5' 亚磷酰胺键联。如本文所用,关于含磷核苷间键联的术语“氧化 (oxidize/oxidation/oxidizing)”等意指用于使键联的磷原子自磷(III)形式转化成磷(V)形式的过程或处理。核苷酸间键联的氧化可使用任何适宜的方法在合成中的任何适宜点处进行。在一些实施方案中,氧化以逐步方式,例如在每个偶联循环中进行。在其他实施方案中,在合成结束时进行多个核苷酸间键联的氧化。在一些实例中,使N3' → P5' 亚磷酰胺键联氧化(例如使用基于碘/水的氧化剂)会产生氧代-磷酰胺酯键联。在其他实例中,使N3' → P5' 亚磷酰胺键联氧化包括硫化以产生硫代磷酰胺酯键联。硫化可使用任何适宜的方法来进行。目标硫化方法包括由Gryazonov等人, W02001018015所述的那些方法,所述专利的公开内容以引用的方式整体并入本文。用于本发明中的硫化剂包括元素硫、二硫化秋兰姆(如二硫化四乙基秋兰姆)、酰基二硫化物(如苯甲酰甲基二硫化物)、硫膦基二硫化物(如S-Tetra<sup>TM</sup>)以及1,1- 二氧代-3H-1,2-苯并二巯基-3-酮。在一些实施方案中,硫化可使用元素硫(S8)来进行。在某些实施方案中,硫化可使用如由Iyer等人, *J. Organic Chemistry* 55:4693-4699, 1990所述的方法,使用Beaucage试剂来进行。

[0163] 适用于方法中的氧化剂包括碘、氯、溴、过酸(如间氯苯甲酸)、过氧化氢(如叔丁基过氧化氢、乙基过氧化氢、甲基过氧化氢等)、臭氧、混合酰基-亚磺酸酐(如3H-2,1-苯并氧硫杂环戊烷-3-酮-1-氧化物)、过硫酸盐(如过硫酸钠、过硫酸铵和过硫酸四丁铵等)、单过氧硫酸盐(如oxone<sup>TM</sup>)、次氯酸钠和/或其他次氯酸盐、过氧化物(如二乙基过氧化物或双(三甲基甲硅烷基)过氧化物,或过氧化氢或非水性过氧化氢等效物(如脲/过氧化氢复合物))等。可用于使磷(III)转化成磷(V)的其他适用的氧化剂描述于Beaucage和Iyer

Tetrahedron 48:2223-2311 (1992) 中。

[0164] 在一些情况下,氧化剂或硫化剂可具有经历与所需氧化并行的非所需阿尔布佐夫(Arbuzov)副反应的倾向(Beaucage和Iyer,以上引用)。Arbuzov副反应可产生脱保护的磷酸酯,其对随后脱三苯甲基化步骤的酸性条件不稳定,且导致寡核苷酸片段化。在某些实施方案中,过氧化氢用作氧化剂以使Arbuzov副反应最小化。在某些实施方案中,氧化包括使寡核苷酸与1.5%过氧化氢、3.5%水、20%吡啶和 75%THF的溶液接触。

[0165] 在一些实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0166] (a) 使连接至固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护,所述脱保护形成游离3'氨基;

[0167] (b) 使所述游离3'氨基与以下任一者:

[0168] (i) 3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酸酯-5'-亚磷酸二聚体;或

[0169] (ii) 3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酸单体;在亲核催化剂存在下反应以形成核苷间N3'→P5'亚磷酸键联;

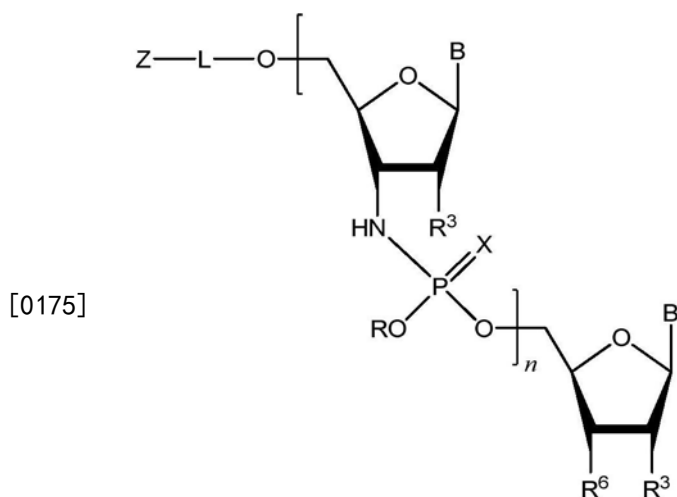
[0170] (c) 使所述键联氧化;以及

[0171] (d) 重复步骤(a)至(c)直到合成多核苷酸,其中所述重复步骤(a)至(c)包括进行步骤(b)(i)至少一次。

[0172] 在一些实施方案中,所述重复步骤(a)至(c)包括进行步骤(b)(i)两次或更多次。在某些实施方案中,所述重复步骤(a)至(c)包括进行步骤(b)(i)3次或更多,如4次或更多次、5次或更多次、6次或更多次、7次或更多次、8次或更多次、9次或更多次、10次或更多次、15次或更多次、20次或更多次或甚至30次或更多次。在某些实施方案中,所述重复步骤(a)至(c)包括在每个偶联步骤进行步骤(b)(i)。在某些实施方案中,所述重复步骤(a)至(c)包括在每个偶联步骤(除了一个)进行步骤(b)(i)。在某些实施方案中,所述重复步骤(a)至(c)包括进行步骤(b)(ii)一次且仅一次。在某些实施方案中,所述重复步骤(a)至(c)包括进行步骤(b)(ii)两次且仅两次。

[0173] 如本文所述,应理解术语磷酸酯键联意指涵盖氧代-磷酸酯键联与硫代磷酸酯键联两者(例如,如式I中所描绘)。在所述方法的某些实施方案中,使核苷间N3'→P5'亚磷酸键联氧化产生氧代磷酸酯键联。在所述方法的一些实施方案中,使核苷间N3'→P5'亚磷酸键联氧化包括硫化以产生硫代磷酸酯键联。

[0174] 在所述方法的一些实施方案中,所述寡核苷酸由式(I)描述:



式(I)

[0176] 其中：

[0177] 各B独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶，或其类似物；

[0178] 各X独立地是氧或硫；

[0179] 各R<sup>3</sup>是氢、氟、羟基、烷氧基、取代的烷氧基或受保护的羟基；

[0180] R<sup>6</sup>是氨基、羟基、受保护的氨基、受保护的羟基、-O-L-Z或-NH-L-Z；

[0181] 各L独立地是任选的接头；

[0182] 各Z独立地是H、脂质、支撑物、载体、寡核苷酸、聚合物、多肽、可检测标记或标签；

[0183] R是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基或磷酸酯保护基；且

[0184] n是1至1000的整数。当R是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基或磷酸酯保护基时，应理解一些式(I)寡核苷酸也可以盐形式存在。此类形式只要其可存在就意图包括在本公开的范围內。

[0185] 在式(I)的一些实施方案中，各R<sup>3</sup>是氢。在式(I)的一些实施方案中，各R<sup>3</sup>是氟。在式(I)的一些实施方案中，各R<sup>3</sup>是羟基。

[0186] 在式(I)的一些实施方案中，R<sup>6</sup>是氨基。在式(I)的某些实施方案中，R<sup>6</sup>是羟基。

[0187] 在式(I)的一些实施方案中，各R是氢。应理解当R是氢时，磷酸酯键联在如生理条件的水性条件下可带电荷。因此，应理解式(I)寡核苷酸也可包括键联的任何适宜盐形式。因此，式(I)核苷间键联可呈包括任何适宜的抗衡离子的盐形式。在式(I)的一些实施方案中，各R是烷基或取代的烷基。在式(I)的一些实施方案中，各R是芳基或取代的芳基。在式(I)的一些实施方案中，各R是磷酸酯保护基。

[0188] 在式(I)的一些实施方案中，Z是H。在式(I)的一些实施方案中，Z是脂质(例如，如本文所描述)。在某些情况下，脂质是脂肪酸(例如，如本文所描述)。在式(I)的一些实施方案中，Z是支撑物。在式(I)的一些实施方案中，Z是载体。在式(I)的一些实施方案中，Z是寡核苷酸。在式(I)的一些实施方案中，Z是聚合物。在某些情况下，聚合物是PEG。在式(I)的一些实施方案中，Z是多肽。在式(I)的一些实施方案中，Z是可检测标记。在式(I)的一些实施方案中，Z是标签。

[0189] 在式(I)的一些实施方案中，L是不存在。

[0190] 在一些实施方案中,各B独立地选自A、C、G、T和U或其受保护的型式。

[0191] 在式(I)的某些实施方案中,n是在1与500之间,如在1与100之间、在1与75之间、在1与50之间、在1与40之间、在1与30之间、在1与20之间、在1与15之间、在1与10之间,或在4与10之间的整数。在某些实施方案中,n是在1与100之间,如在5与50之间、在10与50之间、在10与40之间、在10与30之间、在10与25之间、在10与20之间、在12与18之间,或在12与16之间的整数。在某些实施方案中,n是4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25。

[0192] 在所述方法的某些实施方案中,寡核苷酸包含具有与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列,并且其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'磷酸酯亚基间键连接。

[0193] 在所述方法的一些实施方案中,寡核苷酸包括具有在3个与50个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的核苷连续亚基,如在5个与40个之间、在10个与40个之间、在10个与30个之间、在10个与25个之间、在10个与20个之间、在12个与18个之间,或在12个与16个之间的核苷亚基的序列。在某些实施方案中,寡核苷酸包括具有10个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基的序列。在某些实施方案中,寡核苷酸包括具有7个或更多个连续核苷亚基,如7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个连续核苷亚基的序列。在某些实施方案中,寡核苷酸包括具有11个或18个之间、如11个与16个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基的序列。

[0194] 在所述方法的一些实例中,N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联由以下结构所描述:

[0195]  $3' - \text{NH} - \text{P}(\text{S})(\text{OR}) - \text{O} - 5'$

[0196] 其中R选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基。应理解,当R选自由氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基组成的组时,由上式所描述的一些核苷间亚基键联也可以盐形式存在。此类形式只要其可存在就意图包括在本公开的范围。

[0197] 在所述方法的一些实例中,N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联由以下结构所描述:

[0198]  $3' - \text{NH} - \text{P}(\text{S})(\text{OR}) - \text{O} - 5'$

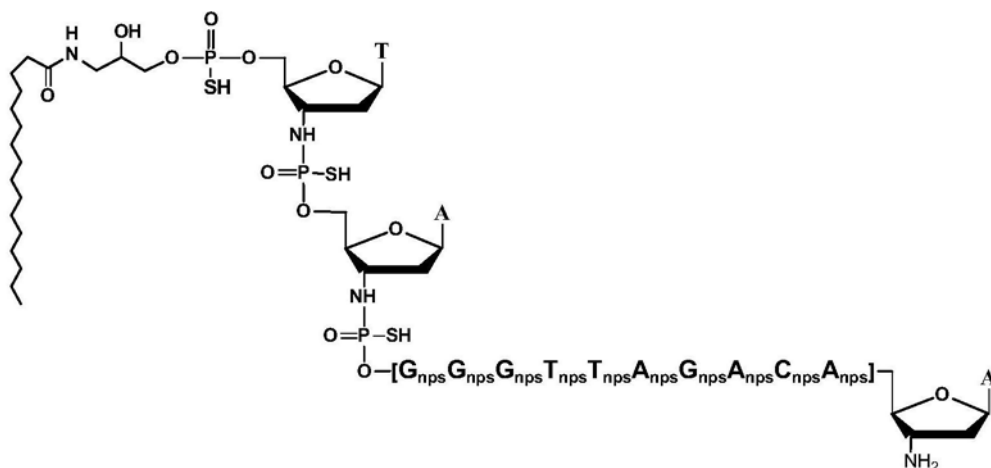
[0199] 其中R是氢。应理解对于本文所述的包括所述亚基间键联的任何寡核苷酸,所述寡核苷酸也可包括键联的任何适宜盐形式。因此,亚基间键联可呈包括任何适宜的抗衡离子的盐形式。

[0200] 在所述方法的一些实施方案中,所述寡核苷酸保护序列TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3)。在某些实施方案中,TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3)序列的所有核苷酸间亚基间键联都是N3'→P5'磷酸酯亚基间键联。在某些实例中,序列的所有N3'→P5'磷酸酯亚基间键联都是N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联(例如,nps键联)。在某些实例中,序列的所有N3'→P5'磷酸酯亚基间键联都是N3'→P5'氧代磷酸酯亚基间键联(例如,np键联)。

[0201] 在所述方法的一些实施方案中,多核苷酸包括3'-氨基或3'-羟基端基。在所述方法的某些实施方案中,多核苷酸包括3'-氨基端基。在所述方法的某些实施方案中,多核苷酸包括3'-羟基端基。

[0202] 在所述方法的一些实施方案中,所述寡核苷酸描述为以下结构:

[0203]

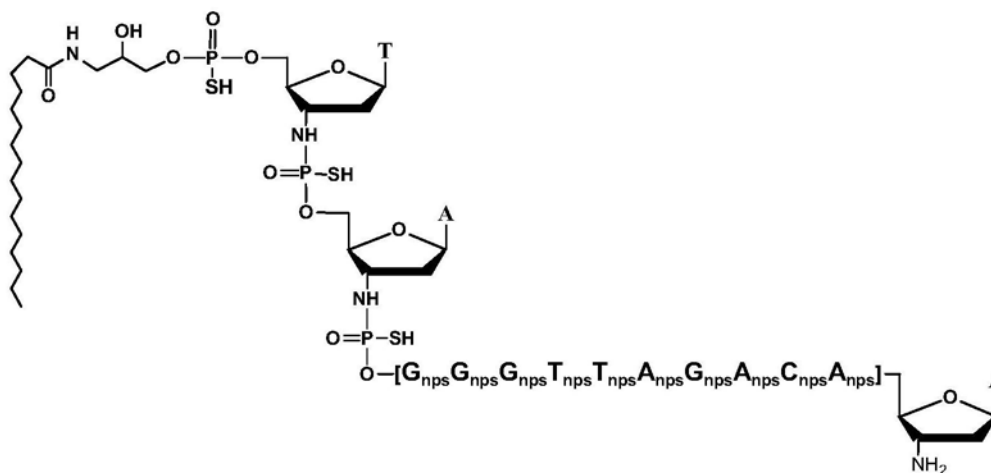


[0204] 其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接至相邻核苷的5'-碳的硫代磷酰胺酯键联(例如—NH—P(=O)(SH)—O—或其互变异构体)。

[0205] 应理解提及寡核苷酸的所有实施方案还适用于所述寡核苷酸的盐形式。

[0206] 在所述方法的一些实施方案中,所述寡核苷酸描述为以下结构:

[0207]

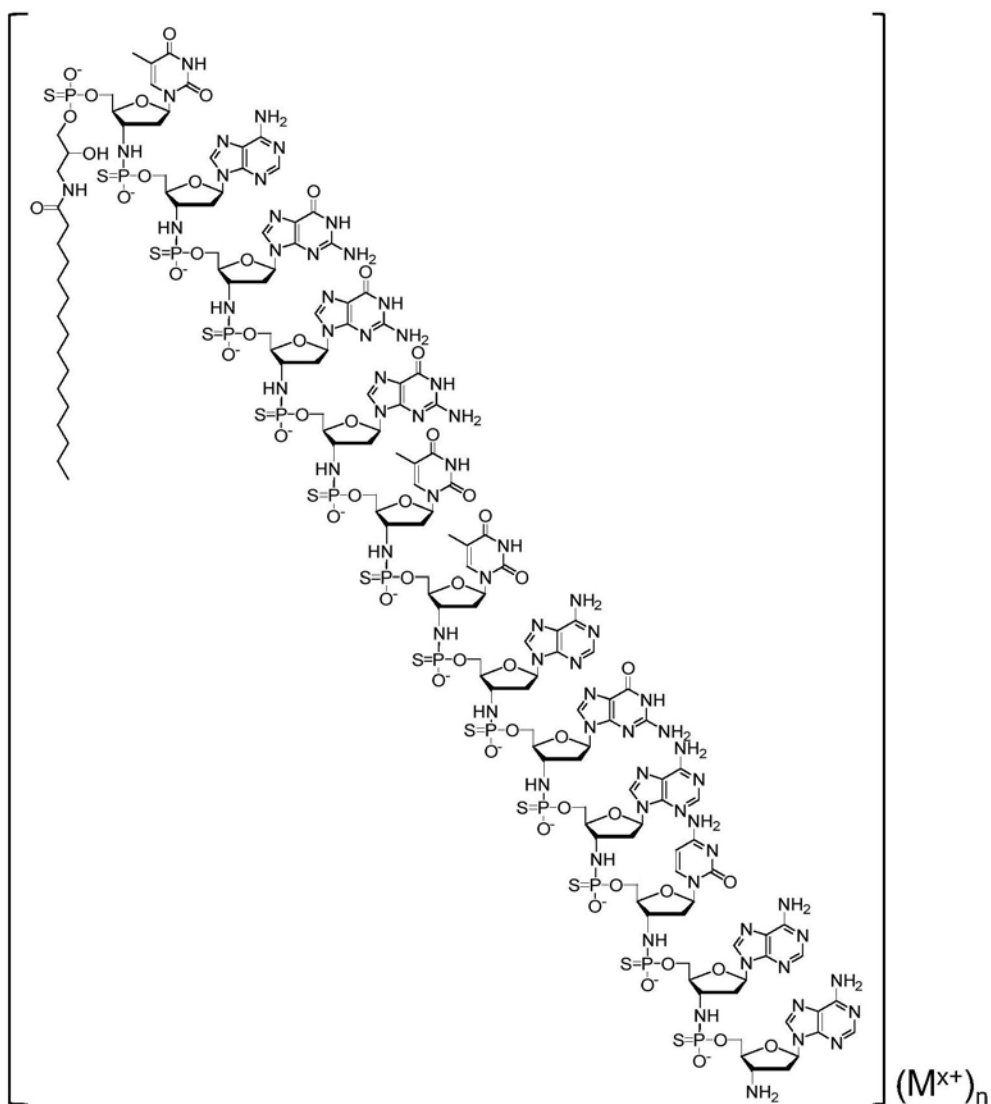


[0208] 或其盐;

[0209] 其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接至相邻核苷的5'-碳的硫代磷酰胺酯键联(例如—NH—P(=O)(SH)—O—或其互变异构体或其盐)。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的药学上可接受的盐。在某些实例中,所述组合物包含所述化合物的钠盐。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的二价阳离子盐,如所述化合物的镁盐。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的三价阳离子盐,如所述化合物的铝盐。

[0210] 在所述方法的某些实施方案中,寡核苷酸由以下结构所描述,其中各 $M^{x+}$ 独立地是氢或盐的任何适宜的抗衡离子,各x独立地是1、2 或3,并且n是5至13的整数,如5、6、7、8、9、10、11、12或 13,如n是13:

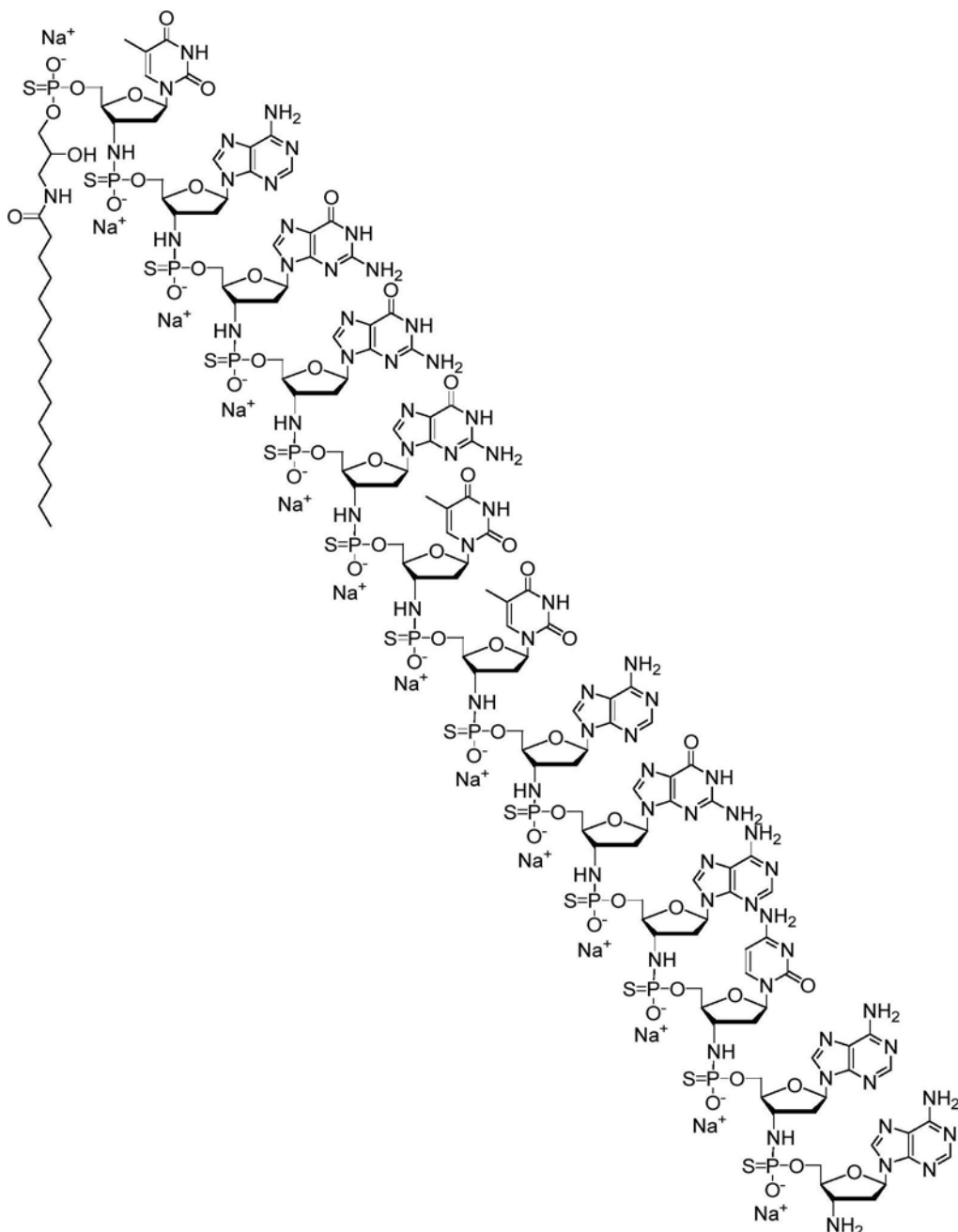
[0211]



[0212] 在某些实例中,各x是1。在某些实例中,各x独立地是1或2。在某些实例中,各x独立地是1或3。在某些实例中, $M^{x+}$ 是氢。

[0213] 在所述方法的某些实施方案中,所述寡核苷酸由以下结构描述并且可包括盐的任何适宜的阳离子抗衡离子:

[0214] 在所述方法的某些实施方案中,所述寡核苷酸描述为以下结构:



[0215]

[0216] 在所述方法的某些实施方案中, TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) 序列的C11核苷酸残基来源于3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体。“来源于”意指目标残基在合成期间经由特定亚基引入。在某些实例中, TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) 序列的T1至A10、A12 和A13残基来源于3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体。

[0217] 在一些情况下, 所述方法包括使以下3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体和3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体依次偶联至固相支撑物的端基:TA、GG、GT、TA、GA、C 和AA。应理解, 为简单起见, 适用于主题方法的偶联中的受保护的亚磷酰胺亚基可经由符号X<sup>1</sup>或X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>来描绘, 其中X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>独立地是经由任何适宜的核苷间键联(例如, 如本文所述)连接的任何适宜的核苷。可在主题方法中使用任何适宜的合成策略。以下显示一些目标策略以说明寡核苷酸靶序列的制备可如何向特定二聚体和/或单体亚基分配。



[0218] 提供示例性靶寡核苷酸序列TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) 的由顺序二聚体和/或单体亚基的以下清单表示的示例性逆合成策略。应理解此策略清单并非是详尽的,并且可针对向任何适宜的靶寡核苷酸合成的应用加以修改。在一些实施方案中,所述方法包括使 3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酸酯-5'-亚磷酸二聚体和/或3'-保护的氨基核苷-5'-亚磷酸单体的以下序列之一依次偶联至固相支撑物的端基:

- [0219] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0220] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0221] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0222] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0223] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0224] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0225] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、C、A、A
- [0226] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、C、A、A
- [0227] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、C、A、A
- [0228] T、A、G、G、G、T、T、A、G、AC、A、A
- [0229] T、A、G、G、G、T、T、A、G、A、CA、A
- [0230] T、A、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA
- [0231] TA、GG、G、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0232] TA、G、GG、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0233] TA、G、G、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0234] TA、G、G、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0235] TA、G、G、G、T、TA、G、A、C、A、A
- [0236] TA、G、G、G、T、T、AG、A、C、A、A
- [0237] TA、G、G、G、T、T、A、GA、C、A、A
- [0238] TA、G、G、G、T、T、A、G、AC、A、A
- [0239] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、CA、A
- [0240] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA
- [0241] T、AG、GG、T、T、A、G、A、C、A、A
- [0242] T、AG、G、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0243] T、AG、G、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0244] T、AG、G、G、T、TA、G、A、C、A、A
- [0245] T、AG、G、G、T、T、AG、A、C、A、A
- [0246] T、AG、G、G、T、T、A、GA、C、A、A
- [0247] T、AG、G、G、T、T、A、G、AC、A、A
- [0248] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、CA、A
- [0249] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、C、AA
- [0250] T、A、GG、GT、T、A、G、A、C、A、A
- [0251] T、A、GG、G、TT、A、G、A、C、A、A
- [0252] T、A、GG、G、T、TA、G、A、C、A、A

[0253] T、A、GG、G、T、T、AG、A、C、A、A  
[0254] T、A、GG、G、T、T、A、GA、C、A、A  
[0255] T、A、GG、G、T、T、A、G、AC、A、A  
[0256] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、CA、A  
[0257] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、C、AA  
[0258] T、A、G、GG、TT、A、G、A、C、A、A  
[0259] T、A、G、GG、T、TA、G、A、C、A、A  
[0260] T、A、G、GG、T、T、AG、A、C、A、A  
[0261] T、A、G、GG、T、T、A、GA、C、A、A  
[0262] T、A、G、GG、T、T、A、G、AC、A、A  
[0263] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、CA、A  
[0264] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、C、AA  
[0265] T、A、G、G、GT、TA、G、A、C、A、A  
[0266] T、A、G、G、GT、T、AG、A、C、A、A  
[0267] T、A、G、G、GT、T、A、GA、C、A、A  
[0268] T、A、G、G、GT、T、A、G、AC、A、A  
[0269] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、CA、A  
[0270] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、C、AA  
[0271] T、A、G、G、G、TT、AG、A、C、A、A  
[0272] T、A、G、G、G、TT、A、GA、C、A、A  
[0273] T、A、G、G、G、TT、A、G、AC、A、A  
[0274] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、CA、A  
[0275] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、C、AA  
[0276] T、A、G、G、G、T、TA、GA、C、A、A  
[0277] T、A、G、G、G、T、TA、G、AC、A、A  
[0278] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、CA、A  
[0279] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、C、AA  
[0280] T、A、G、G、G、T、T、AG、AC、A、A  
[0281] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、CA、A  
[0282] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、C、AA  
[0283] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、CA、A  
[0284] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、C、AA  
[0285] TA、GG、GT、T、A、G、A、C、A、A  
[0286] TA、GG、G、TT、A、G、A、C、A、A  
[0287] TA、GG、G、T、TA、G、A、C、A、A  
[0288] TA、GG、G、T、T、AG、A、C、A、A  
[0289] TA、GG、G、T、T、A、GA、C、A、A  
[0290] TA、GG、G、T、T、A、G、AC、A、A  
[0291] TA、GG、G、T、T、A、G、A、CA、A

- [0292] TA、GG、G、T、T、A、G、A、C、AA  
[0293] TA、G、GG、TT、A、G、A、C、A、A  
[0294] TA、G、GG、T、TA、G、A、C、A、A  
[0295] TA、G、GG、T、T、AG、A、C、A、A  
[0296] TA、G、GG、T、T、A、GA、C、A、A  
[0297] TA、G、GG、T、T、A、G、AC、A、A  
[0298] TA、G、GG、T、T、A、G、A、CA、A  
[0299] TA、G、GG、T、T、A、G、A、C、AA等  
[0300] TA、GG、GT、TA、G、A、C、A、A  
[0301] TA、GG、GT、T、AG、A、C、A、A  
[0302] TA、GG、GT、T、A、GA、C、A、A  
[0303] TA、GG、GT、T、A、G、AC、A、A  
[0304] TA、GG、GT、T、A、G、A、CA、A  
[0305] TA、GG、GT、T、A、G、A、C、AA等  
[0306] TA、GG、GT、TA、GA、C、A、A  
[0307] TA、GG、GT、TA、G、AC、A、A  
[0308] TA、GG、GT、TA、G、A、CA、A  
[0309] TA、GG、GT、TA、G、A、C、AA等  
[0310] TA、G、GG、TT、AG、AC、A、A  
[0311] TA、G、GG、TT、AG、A、CA、A  
[0312] TA、G、GG、TT、AG、A、C、AA  
[0313] TA、G、G、GT、TA、GA、CA、A  
[0314] TA、G、G、GT、TA、GA、C、AA  
[0315] TA、G、G、GT、TA、GA、CA、A  
[0316] TA、G、G、G、TT、AG、AC、AA  
[0317] TA、G、GG、T、TA、GA、CA、A  
[0318] TA、G、GG、T、TA、GA、C、AA  
[0319] TA、G、GG、T、TA、G、AC、AA等  
[0320] T、A、G、GG、TT、AG、AC、AA  
[0321] T、A、GG、G、TT、AG、AC、AA  
[0322] T、AG、G、G、TT、AG、AC、AA  
[0323] TA、G、G、G、TT、AG、AC、AA  
[0324] T、AG、G、GT、T、AG、AC、AA等  
[0325] T、AG、GG、T、T、AG、AC、AA等  
[0326] T、AG、GG、TT、A、G、AC、AA等  
[0327] T、AG、GG、TT、AG、A、C、AA等  
[0328] T、AG、GG、TT、AG、AC、A、A  
[0329] T、AG、GG、TT、AG、AC、AA  
[0330] TA、G、GG、TT、AG、AC、AA

[0331] TA、GG、G、TT、AG、AC、AA

[0332] TA、GG、GT、T、AG、AC、AA

[0333] TA、GG、GT、TA、G、AC、AA

[0334] TA、GG、GT、TA、GA、C、AA或

[0335] TA、GG、GT、TA、GA、CA、A。

[0336] 在一些实施方案中,所述方法包括使一系列3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酸酯-5'-亚磷酸胺二聚体和/或3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酸胺单体依次偶联至固相支撑物的端基,其中至少合成的末次偶联是二聚体偶联。在某些实施方案中,倒数第二次偶联和末次偶联是二聚体偶联。在某些情况下,当N是偶数时,所述方法包括N/2 二聚体偶联。在某些实例中,当N是偶数时,所述方法包括N/2-1二聚体偶联。在某些实例中,当N是偶数时,所述方法包括N/2-2二聚体偶联。在某些实例中,当N是偶数时,所述方法包括N/2-3二聚体偶联。在某些实例中,当N是偶数时,所述方法包括N/2-4二聚体偶联。在某些实例中,当N是偶数时,所述方法包括N/2-5二聚体偶联。在某些情况下,当N是奇数时,所述方法包括N/2-1次二聚体偶联。在某些实例中,当N是奇数时,所述方法包括N/2-2次二聚体偶联。在某些实例中,当N是奇数时,所述方法包括N/2-3次二聚体偶联。在某些实例中,当N是奇数时,所述方法包括N/2-4次二聚体偶联。在某些实例中,当N是奇数时,所述方法包括N/2-5次二聚体偶联。在某些实例中,当N是奇数时,所述方法包括N/2-6次二聚体偶联。例如,使以下系列的3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酸酯-5'-亚磷酸胺二聚体和/或3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酸胺单体依次偶联至固相支撑物的端基:

[0337] T、A、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA

[0338] T、A、G、G、G、T、T、A、G、AC、AA

[0339] T、A、G、G、G、T、T、A、GA、C、AA

[0340] T、A、G、G、G、T、T、AG、A、C、AA

[0341] T、A、G、G、G、T、TA、G、A、C、AA

[0342] T、A、G、G、G、TT、A、G、A、C、AA

[0343] T、A、G、G、GT、T、A、G、A、C、AA

[0344] T、A、G、GG、T、T、A、G、A、C、AA

[0345] T、A、GG、G、T、T、A、G、A、C、AA

[0346] T、AG、G、G、T、T、A、G、A、C、AA

[0347] TA、G、G、G、T、T、A、G、A、C、AA等

[0348] T、A、G、G、G、T、T、AG、AC、AA

[0349] T、A、G、G、G、TT、AG、AC、AA

[0350] T、A、G、GG、TT、AG、AC、AA

[0351] T、AG、GG、TT、AG、AC、AA

[0352] TA、G、GG、TT、AG、AC、AA

[0353] TA、GG、G、TT、AG、AC、AA

[0354] TA、GG、GT、T、AG、AC、AA

[0355] TA、GG、GT、TA、G、AC、AA

[0356] TA、GG、GT、TA、GA、C、AA。

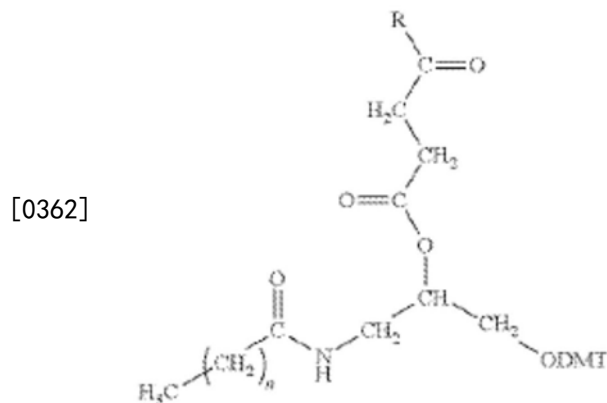
[0357] 在所述方法的一些实施方案中,3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酸酯-5'-亚磷酸酯二聚体由式X<sup>1</sup>X<sup>2</sup>描述,其中X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>独立地选自受保护的腺嘌呤、受保护的胞嘧啶、受保护的鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

[0358] 脂质修饰的寡核苷酸

[0359] 取决于所选键联的性质,多种合成方法可用于使脂质部分L'结合至寡核苷酸,包括Mishra等人,(1995) *Biochemica et Biophysica Acta*, 1264:229-237;Shea等人,(1990) *Nucleic Acids Res.*18:3777-3783;以及Rump等人,(1998) *Bioconj.Chem.*9:341-349中所述的方法。其中脂质部分缀合在寡核苷酸的5'或3'末端的化合物的合成可通过在适当末端使用可与羧酸、酰氯、酸酐和活性酯反应的适合官能团,在一些情况下使用氨基来实现。巯基基团也可用作官能团(参见Kupihar 等人,(2001) *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9:1241-1247)。具有不同链长度的氨基修饰剂与巯基修饰剂两者均可商购以用于寡核苷酸合成。具有N3'→P5'磷酸酯(例如N3'→P5'硫代磷酸酯)键联的寡核苷酸含有3'-氨基(而非见于大多数常规寡核苷酸化学中的3'-羟基),且因此这些寡核苷酸为脂质基团缀合至寡核苷酸的3'-末端提供独特机会。

[0360] 各种方法可用于使脂质基团连接至具有N3'→P5'磷酸酯(例如 N3'→P5'硫代磷酸酯)化学的寡核苷酸的末端(参见例如表2的3-棕榈酰氨基-1-0-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2-0-琥珀酰基丙二醇接头)。对于连接于3'-末端,可通过使完全受保护的固体支撑物结合的寡核苷酸的游离3'-氨基与相应酸酐反应,随后用氨脱保护并纯化来合成缀合的化合物。或者,使用如碳化二亚胺、HBTU或碘化2-氯-1-甲基吡啶鎓的偶联剂使脂质的羧酸偶联于支撑物结合的寡核苷酸的游离3'-氨基可用于缀合脂质基团。这两种方法在脂质与寡核苷酸之间形成酰胺键。也可使用在链延长期间偶联于寡核苷酸的脂质的亚磷酸酯衍生物使脂质连接于寡核苷酸。这种方法产生连接脂质和寡核苷酸的磷酸酯(例如硫代磷酸酯)键联(由丙基-棕榈酰基和2-羟基-丙基-棕榈酰基化合物例示)。另一方法涉及完全受保护的支撑物结合的寡核苷酸的游离3'-氨基与适合脂质醛反应,随后用氰基硼氢化钠还原,这产生胺键联。

[0361] 对于连接于5'末端,可使用修饰的含脂质固体支撑物,随后如 Pongracz和Gryaznov (1999)中所述在5'至3'方向上合成寡核苷酸来合成寡核苷酸。以下提供修饰的支撑物的实例。在其中n=14的实例中,脂肪酸是棕榈酸:3-氨基-1,2-丙二醇与棕榈酰氯反应,随后二甲氧基三苯甲基化和琥珀酰基化提供用于偶联于固体支撑物的中间体。R可以是长链烷基胺可控孔径玻璃。



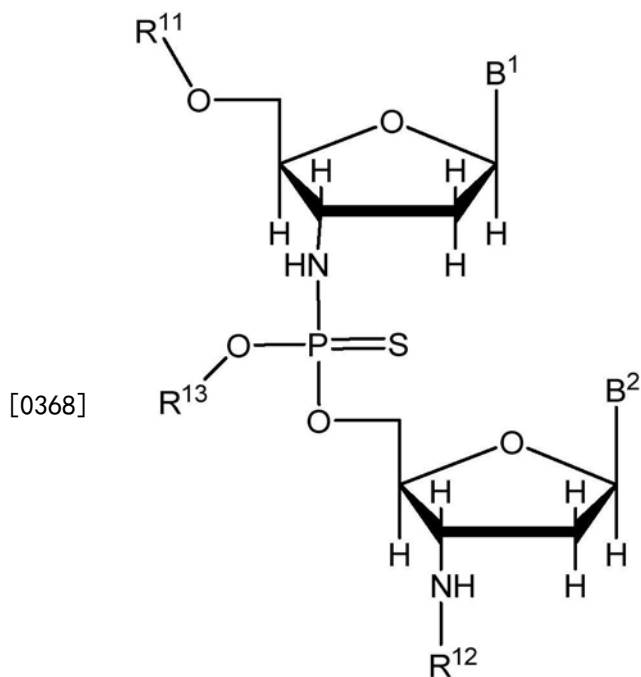
[0363] 适用于制备寡核苷酸的二聚体

[0364] 在制备寡核苷酸的方法的一些实施方案中,所述方法包括使支撑物结合的游离3'-端基(例如3'-羟基或3'-氨基)与二核苷酸二聚体亚基接触以形成亚基间键联。一般而言,二核苷酸二聚体的3'受保护,并且包括能够与3'-端基偶联的5'-基团。在一些实施方案中,二核苷酸二聚体包括5'-亚磷酰胺。二核苷酸二聚体可包括3'-受保护的氨基或3'-受保护的羟基。在一些实施方案中,二核苷酸由式 $X^1X^2$ 所描述,其中 $X^1$ 和 $X^2$ 独立地是经由任何适宜的核苷间键联(例如,如本文所述)连接的任何适宜的核苷(例如A、C、G、T或U或其受保护型式)。二核苷酸可在两个核苷之间包括任何适宜的核苷间键联。适用于二核苷酸二聚体中的目标核苷间键联包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、磷酰胺酯(例如硫代磷酰胺酯)和硫代磷酸酯键联。

[0365] 在一些情况下,二核苷酸二聚体时3'-受保护的-二核苷酸-5'-亚磷酰胺二聚体或其合成前体,其中所述二核苷酸由式 $X^1X^2$ 描述,其中 $X^1$ 和 $X^2$ 独立地选自A、C、G、T和U或其受保护型式,并且其中 $X^1$ 和 $X^2$ 经由磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、磷酰胺酯(例如硫代磷酰胺酯)或硫代磷酸酯键联或其受保护型式连接。

[0366] 在制备寡核苷酸的方法的一些实施方案中,方法包括使支撑物结合的游离3'-氨基与3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体接触以形成核苷间N3' → P5' 亚磷酰胺键联。任何适宜的3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体或其合成前体均可适用于主题方法中。在一些情况下,二聚体可由以下序列中的一个表示: AA、AC、AG、AT、AU、CA、CC、CG、CT或CU、GA、GC、GG、GT或GU、TA或UA、TC或UC、TG或UG以及TT或UU。在一些情况下,二聚体包括受保护的2'-羟基。

[0367] 在某些实施方案中,二核苷酸二聚体是由式(II)所描述的二核苷酸硫代磷酰胺酯化合物:



式(II)

[0369] 其中 $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物； $R^{11}$ 是氢、保护基或亚磷酰胺基团； $R^{12}$ 是氢或保护基；并且 $R^{13}$ 是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基或保护基。在一些情况下， $B^1$ 和/或 $B^2$ 包括核碱基保护基。应理解，当 $R^{13}$ 是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基或保护基时，由式(II)所描述的一些二核苷酸二聚体也可以盐形式存在。此类形式只要其可存在就意图包括在本公开的范围內。

[0370] 在式(II)的一些实施方案中， $R^{11}$ 是氢。在式(II)的一些实施方案中， $R^{11}$ 是保护基。任何适宜的保护基均可适用于式(II)的主题二聚体中。在式(II)的一些实施方案中， $R^{11}$ 是基于乙酰丙酸酯的保护基。在式(II)的一些实施方案中， $R^{11}$ 是乙酰丙酸酯保护基(即- $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COCH}_3$ )。在式(II)的一些实施方案中， $R^{11}$ 是5'-亚磷酰胺基团。

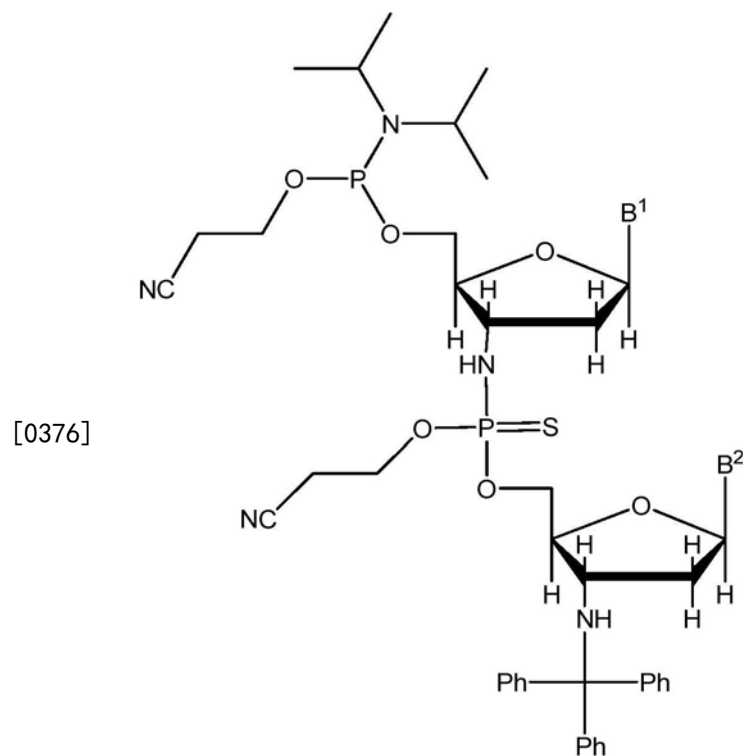
[0371] 在式(II)的一些实施方案中， $R^{12}$ 是氢。在式(II)的一些实施方案中， $R^{12}$ 是保护基。在某些实施方案中， $R^{12}$ 是三苯甲基(例如三苯基甲基(Trt)、单甲氧基三苯基甲基(MMT)或二甲氧基三苯基甲基(DMT))。在式(II)的一些实施方案中， $R^{12}$ 是Trt保护基。

[0372] 在式(II)的一些实施方案中， $R^{12}$ 是光可裂解的保护基。任何适宜的光可裂解的保护基均可适用于制备主题二核苷酸二聚体及其合成前体。在式(II)的一些实施方案中， $R^{12}$ 是取代的甲呋啶(pixyl)保护基，如硝基、氟、甲基、三氟甲基和/或甲氧基取代的甲呋啶保护基。在式(II)的一些实施方案中， $R^{12}$ 是甲呋啶保护基(即9-(9-苯基)氧杂蒽基)。

[0373] 在式(II)的一些实施方案中， $R^{11}$ 是乙酰丙酰基保护基，且 $R^{12}$ 是三苯甲基保护基。

[0374] 在式(II)的一些实施方案中， $R^{13}$ 是氢。在式(II)的一些实施方案中， $R^{13}$ 是保护基。在某些实施方案中， $R^{13}$ 是2-氰基-乙基。

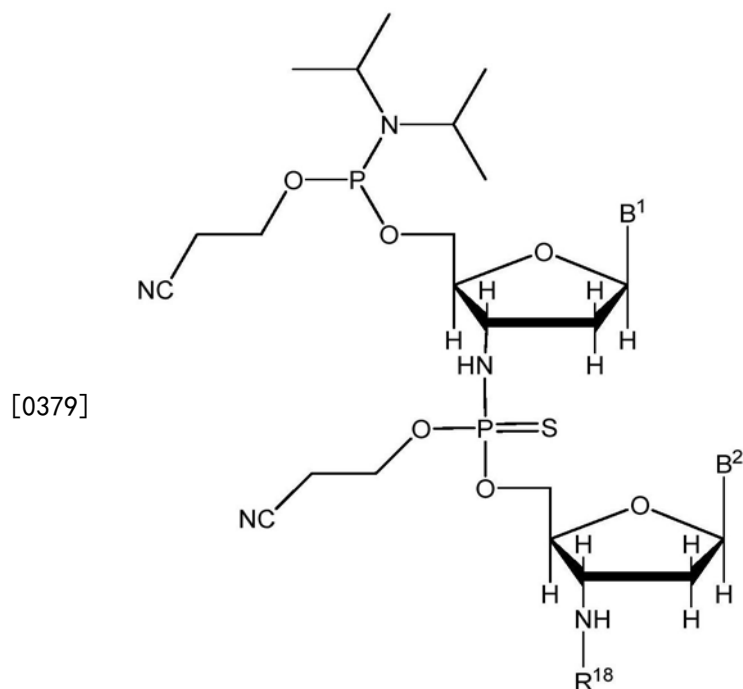
[0375] 在某些实施方案中，3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酸酯-5'-亚磷酰胺二聚体由式(III)描述：



式(III)

[0377] 其中 $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物。在一些情况下, $B^1$ 和/或 $B^2$ 包括核碱基保护基。

[0378] 在某些实施方案中,3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体由式(III)描述:



式(IV)

[0380] 其中 $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物;并且 $R^{18}$ 是三苯甲基保护基(如Trt、DMT或MMT)或甲胍啶保护基。

[0381] 在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地选自受保护的腺嘌呤、受保护的胞嘧啶、受保护的鸟嘌呤、胸腺嘧啶以及尿嘧啶。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地选自A(Bz)、A(DMF)、C(Bz)、G(异丁酰基)、T以及U。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是A(Bz)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是A(DMF)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是C(Bz)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是G(异丁酰基)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是T或U。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^2$ 是A(Bz)或A(DMF)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^2$ 是C(Bz)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^2$ 是G(异丁酰基)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^2$ 是T或U。

[0382] 在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是A(Bz)或A(DMF)且 $B^2$ 是A(Bz)或A(DMF)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是A(Bz)或A(DMF)且 $B^2$ 是C(Bz)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是A(Bz)或A(DMF)且 $B^2$ 是G(异丁酰基)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是A(Bz)或A(DMF)且 $B^2$ 是T或U。

[0383] 在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是C(Bz)且 $B^2$ 是A(Bz)或A(DMF)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是C(Bz)且 $B^2$ 是C(Bz)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是C(Bz)且 $B^2$ 是G(异丁酰基)。在式(II)或(III)的一些实施方案中, $B^1$ 是C(Bz)且 $B^2$ 是T或



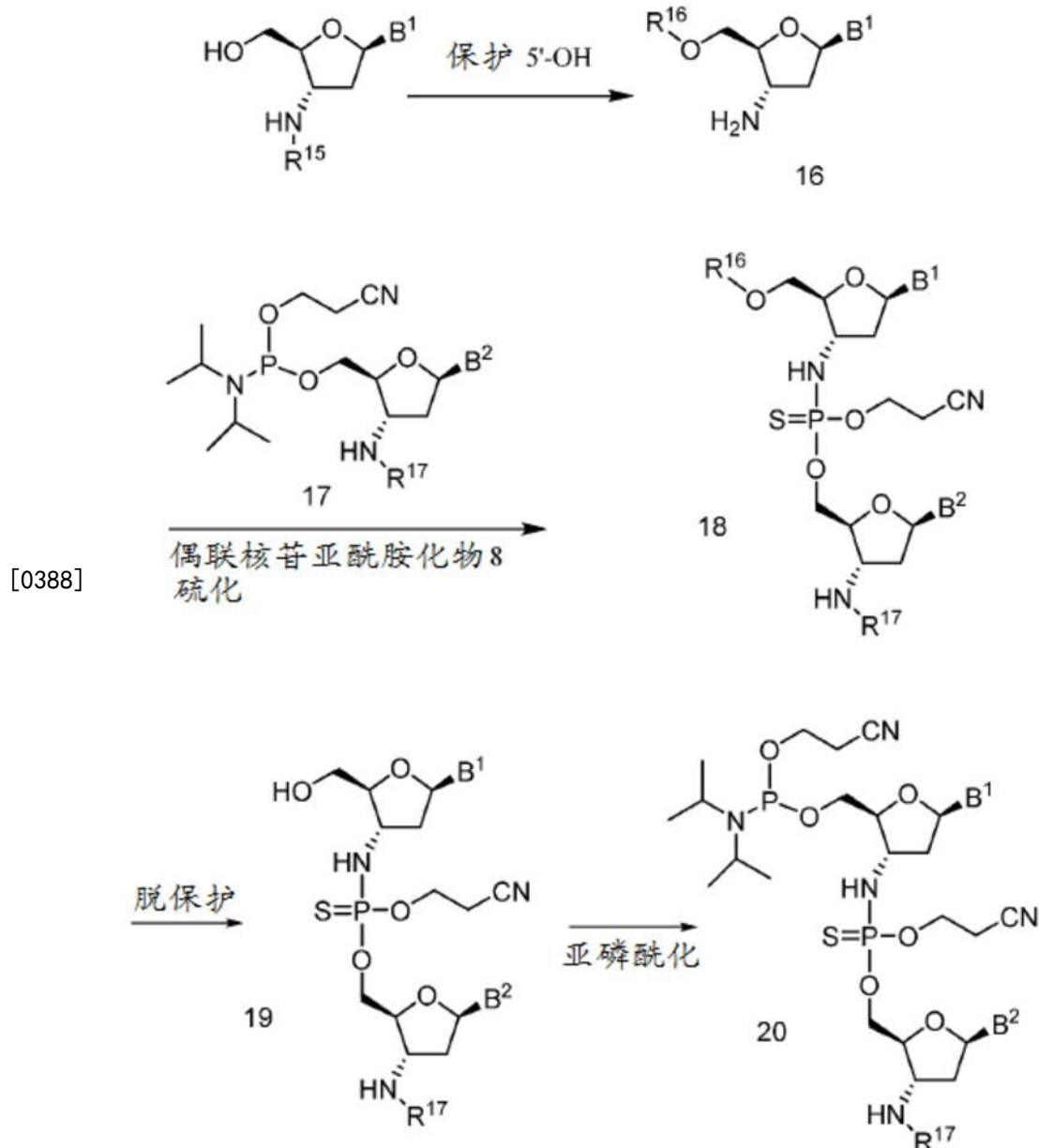
U。

[0384] 在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 G (异丁酰基) 且  $B^2$  是 A (Bz) 或 A (DMF)。在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 G (异丁酰基) 且  $B^2$  是 C (Bz)。在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 G (异丁酰基) 且  $B^2$  是 G (异丁酰基)。在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 G (异丁酰基) 且  $B^2$  是 T 或 U。

[0385] 在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 T 或 U 且  $B^2$  是 A (Bz) 或 A (DMF)。在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 T 或 U 且  $B^2$  是 C (Bz)。在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 T 或 U 且  $B^2$  是 G (异丁酰基)。在式 (II) 或 (III) 的一些实施方案中,  $B^1$  是 T 或 U 且  $B^2$  是 T 或 U。应理解, 本文所述的任何式 (II) 或 (III) 的实施方案也可应用于式 (IV)。

[0386] 本文所述的任何二聚体均可适合于在主题方法中使用。主题二聚体可根据任何适宜的方法自任何适宜的核苷单体制备。适用于制备主题核苷二聚体的目标核苷单体包括但不限于描绘于本文公开的合成方案中的单体 16、17、12 和 13。目标二核苷酸二聚体包括适用于制备主题亚磷酰化二核苷酸二聚体的非亚磷酰化二聚体, 如适用于制备如 20 的亚磷酰化二核苷酸二聚体的二聚体 18 和 19, 或适用于制备如 15 的亚磷酰化二核苷酸二聚体的二聚体 14。

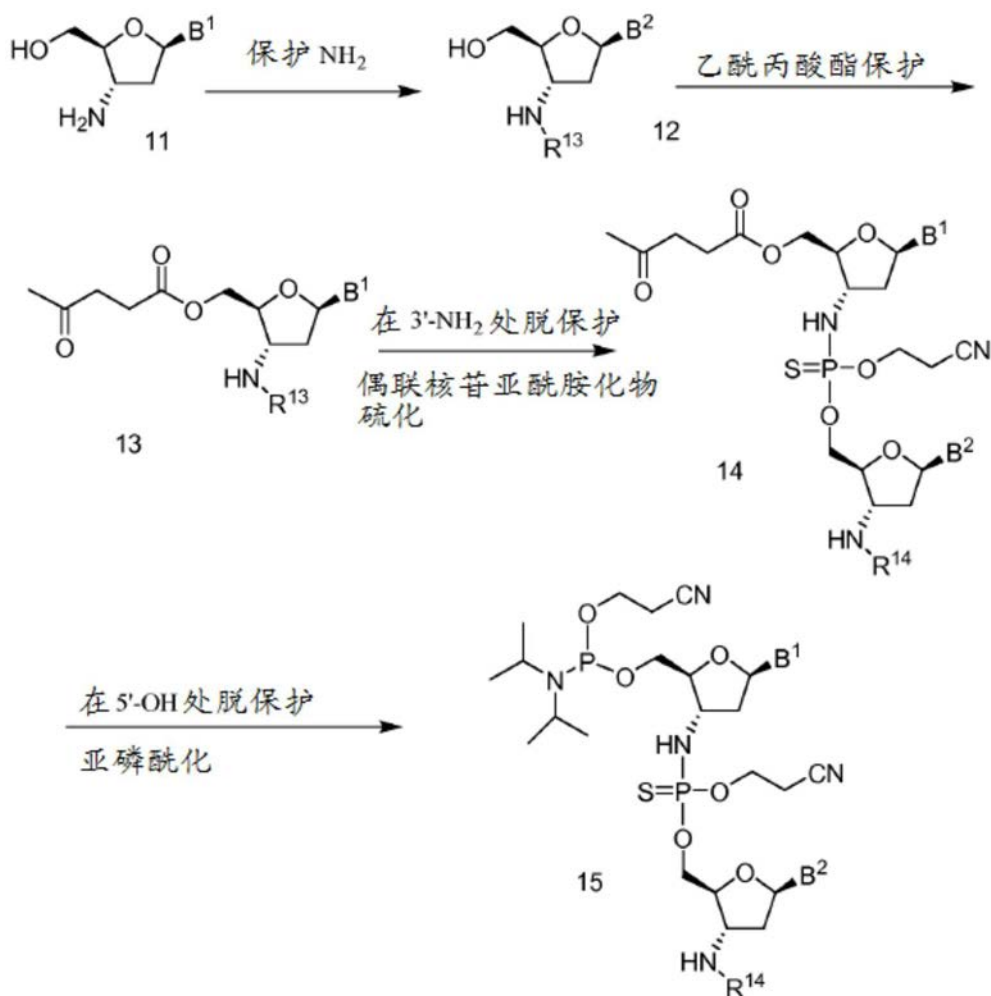
[0387] 在一些实施方案中, 式 (III) 和 (IV) 二聚体经由以下方案中描绘的方法制备:



[0389] 其中 $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物； $R^{15}$ 是氢或氨基保护基； $R^{17}$ 是氨基保护基；且  $R^{16}$ 是羟基保护基。在某些实施方案中， $R^{15}$ 是氢。在单体16的某些实施方案中， $R^{16}$ 是甲硅烷基。在单体16的某些实施方案中， $R^{16}$ 是 TBDMS (叔丁基二甲基甲硅烷基)。在单体17的某些实施方案中， $R^{17}$ 是三苯甲基 (Trt)。在单体17的某些实施方案中， $R^{17}$ 是单甲氧基三苯甲基 (MMT)。

[0390] 在单体17的某些实施方案中， $R^{17}$ 是二甲氧基三苯甲基 (DMT)。在单体17的某些实施方案中， $R^{17}$ 是甲胍啶。在二聚体18-20的某些实施方案中， $R^{17}$ 是三苯甲基 (Trt)。在二聚体18-20的某些实施方案中， $R^{17}$ 是单甲氧基三苯甲基 (MMT)。在二聚体18-20的某些实施方案中， $R^{17}$ 是二甲氧基三苯甲基 (DMT)。在二聚体18-20的某些实施方案中， $R^{17}$ 是甲胍啶。

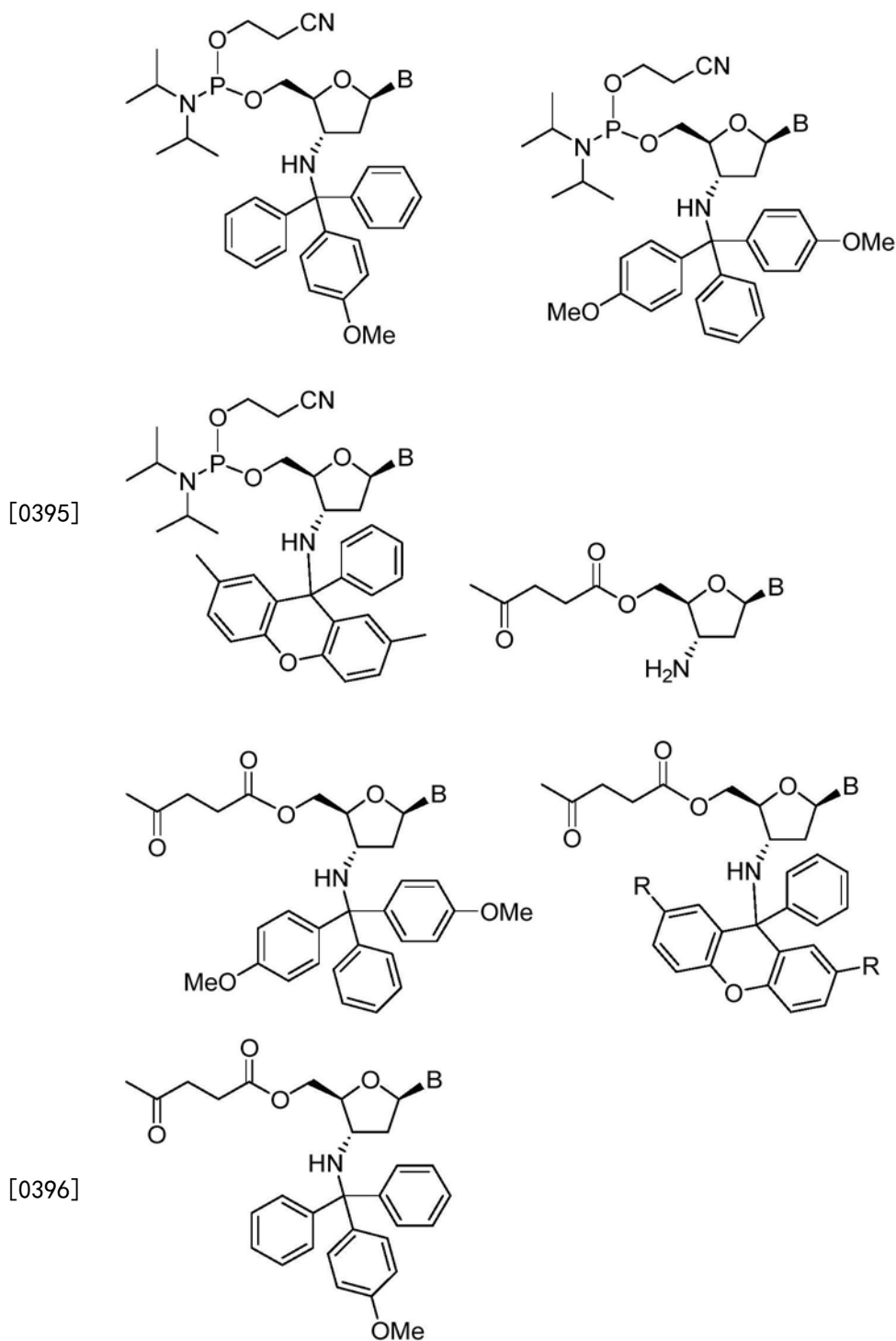
[0391] 在一些实施方案中，式 (III) 和 (IV) 二聚体经由以下方案中描绘的方法制备，其中单体13经由单体12自11制备，且与核苷亚酰胺化物 (amidite) 偶联以产生二聚体14，其转化成二聚体15：



[0392]

[0393] 其中 $\text{B}^1$ 和 $\text{B}^2$ 各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物；且 $\text{R}^{13}$ 和 $\text{R}^{14}$ 各自独立地是保护基。在单体12和13的某些实施方案中， $\text{R}^{13}$ 是三苯甲基。在单体12和13的某些实施方案中， $\text{R}^{13}$ 是甲胍。在二聚体14和15的某些实施方案中， $\text{R}^{14}$ 是三苯甲基。在二聚体14和15的某些实施方案中， $\text{R}^{14}$ 是二甲氧基三苯甲基。在二聚体14和15的某些实施方案中， $\text{R}^{14}$ 是单甲氧基三苯甲基。在二聚体14和15的某些实施方案中， $\text{R}^{14}$ 是甲胍。

[0394] 适用于根据本文所述的方法制备主题二核苷酸二聚体的目标单体包括但不限于：



[0397] 其中B是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物，且R是氢或烷基（例如甲基）或卤素（例如溴代）。在某些情况下，B选自A (Bz)、G (iBu)、T、A (DMF)、C (Bz) 或U。

[0398] 寡核苷酸组合物

[0399] 除靶寡核苷酸之外，可在寡核苷酸合成期间产生多种非靶寡核苷酸合成产物。可存在于寡核苷酸制剂中的次要产物包括但不限于缺失产物（例如缺乏一个或多个核苷残基的产物）、包括一种或多种保护基的产物、终止产物（例如包括加帽寡核苷酸链的产物）、缺乏一个或多个核碱基的产物、包括部分氧化的亚磷酸酰胺键联的产物和包括部分硫化键联的产物。如本文所用，靶寡核苷酸是指目标寡核苷酸序列，其是制备方法的靶产物。如本文所

用,术语“非靶产物”和“次要产物”可互换使用,并且是指不是靶产物且可在靶寡核苷酸合成的循环期间和之后存在的任何含寡核苷酸产物。

[0400] 主题方法提供包含纯度提高的靶寡核苷酸的组合物。在一些实施方案中,组合物包含50重量%或更多的靶寡核苷酸,如约55重量%或更多、约60重量%或更多、约65重量%或更多、约70重量%或更多、约75重量%或更多、约80重量%或更多、约85重量%或更多、约90重量%或更多,或甚至约95重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含50重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含55重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含60重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含65重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含70重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含75重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含80重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含85重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含90重量%或更多的靶寡核苷酸。在某些实施方案中,所述组合物包含95重量%或更多的靶寡核苷酸。

[0401] 在一些实施方案中,主题方法提供95%或更高,如96%或更高、97%或更高、98%或更高,或甚至98%或更高的偶联效率。

[0402] 在一些实施方案中,主题方法提供比仅使用单体亚基进行的对照合成的平均偶联效率高0.5%或更大,如0.75%或更大、1.0%或更大、1.25%或更大、1.5%或更大、1.75%或更大、2.0%或更大、2.5%或更大,或甚至3.0%或更大的平均偶联效率。在某些实施方案中,主题方法提供96%或更大的偶联效率。在某些实施方案中,主题方法提供比仅使用单体亚基进行的对照合成的偶联效率高2%或更大的偶联效率。

[0403] 在合成之后,主题组合物可经受一个或多个纯化步骤(例如HPLC 色谱、亲和色谱、离子交换色谱、凝胶过滤等)例如以从靶寡核苷酸移除一种或多种次要产物。应理解,在主题组合物中,通过主题制备方法提供的次要产物的量降低和/或靶寡核苷酸的量增加可指在合成后立即以及在已进行任何进一步纯化或分离步骤(例如HPLC色谱)之前获得的这类量和纯度。因此,在一些情况下,主题组合物可称为合成制剂,例如未纯化的合成制剂。未纯化意指未已对组合物进行色谱纯化步骤。色谱纯化是指包括使靶多核苷酸吸附于色谱支撑物,以及随后洗脱靶多核苷酸的任何适宜的纯化方法。在一些情况下,色谱纯化是指反相色谱纯化。

[0404] 主题方法提供包含降低量的一种或多种次要产物的组合物。降低量意指相对于对照合成,例如其中寡核苷酸仅使用单体偶联制备的合成,次要产物相对于靶寡核苷酸,在组合物中的以重量计的量得以降低。在一些实施方案中,降低量的次要产物是靶寡核苷酸的以重量计的量的约20%或更少,如靶寡核苷酸的以重量计的量的约15%或更少、约10%或更少,或约5%或更少。在某些实施方案中,降低量的次要产物是靶寡核苷酸的以重量计的量的20%或更少,如靶寡核苷酸的以重量计的量的15%或更少、10%或更少、9%或更少、8%或更少、7%或更少、6%或更少、5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少,或甚至1%或更少。在某些实施方案中,次要产物是(N-x)产物。

[0405] 主题制备方法可提供一种或多种(N-x)产物相对于目标靶寡核苷酸的量降低的组合物,其中x是1至N-1的整数,且N是靶寡核苷酸中的核苷残基的数目。因此,(N-1)产物可指

相对于靶寡核苷酸(例如N产物)缺乏任一核苷酸残基的任何和所有寡核苷酸产物。因此,(N-2)产物是指相对于靶寡核苷酸(例如,N产物)缺乏任何两个核苷酸残基的任何和所有寡核苷酸产物。在某些实施方案中,次要产物是(N-1)产物。在某些实施方案中,次要产物是(N-2)产物。在某些实施方案中,次要产物是(N-3)产物。在某些实施方案中,次要产物是(N-4)产物。在某些实施方案中,次要产物是(N-5)产物。在某些实施方案中,次要产物是(N-6)产物。在某些实施方案中,次要产物是(N-7)产物。

[0406] 在某些实施方案中,本文所述的相对于目标靶寡核苷酸具有降低量的一种或多种(N-x)产物的任何组合物都是未纯化的。

[0407] 在一些实施方案中,主题组合物包含低比率的(N-1)产物与靶寡核苷酸产物。在一些情况下,低比率是相对于靶寡核苷酸少于(N-1)产物的(2.0x N)重量份至100重量份,其中N是指靶寡核苷酸序列中的核苷酸残基的数目。在某些实施方案中,所述比率是相对于靶寡核苷酸少于(N-1)产物的(1.9x N)重量份至100重量份,如相对于靶寡核苷酸少于(N-1)产物的(1.8x N)重量份至100重量份、少于(1.7x N)重量份至100重量份、少于(1.6x N)重量份至100重量份、少于(1.5x N)重量份至100重量份、少于(1.4x N)重量份至100重量份、少于(1.3x N)重量份至100重量份、少于(1.2x N)重量份至100重量份、少于(1.1 x N)重量份至100重量份、少于(1.0x N)重量份至100重量份、少于(0.9x N)重量份至100重量份、少于(0.8x N)重量份至100重量份、少于(0.7x N)重量份至100重量份、少于(0.6x N)重量份至100重量份、少于(0.5x N)重量份至100重量份、少于(0.4x N)重量份至100重量份、少于(0.3x N)重量份至100重量份、少于(0.2x N)重量份至100重量份,或甚至少于(0.1x N)重量份至100重量份。在某些实施方案中,主题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于(N-1)产物的(1.5x N)重量份至100重量份的低比率。在某些实施方案中,主题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于(N-1)产物的(1.2x N)重量份至100重量份的低比率。在某些实施方案中,主题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于(N-1)产物的(1.0x N)重量份至100重量份的低比率。在某些实施方案中,主题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于(N-1)产物的(0.5x N)重量份至100重量份的低比率。

[0408] 在一些实施方案中,主题组合物包含低比率的(N-2)产物与靶寡核苷酸产物。在一些情况下,低比率是相对于靶寡核苷酸少于(N-2)产物的(2.0x N)重量份至100重量份,其中N是指靶寡核苷酸序列中的核苷酸残基的数目。在某些实施方案中,所述比率是相对于靶寡核苷酸少于(N-2)产物的(1.9x N)重量份至100重量份,如相对于靶寡核苷酸少于(N-2)产物的(1.8x N)重量份至100重量份、少于(1.7x N)重量份至100重量份、少于(1.6x N)重量份至100重量份、少于(1.5x N)重量份至100重量份、少于(1.4x N)重量份至100重量份、少于(1.3x N)重量份至100重量份、少于(1.2x N)重量份至100重量份、少于(1.1 x N)重量份至100重量份、少于(1.0x N)重量份至100重量份、少于(0.9x N)重量份至100重量份、少于(0.8x N)重量份至100重量份、少于(0.7x N)重量份至100重量份、少于(0.6x N)重量份至100重量份、少于(0.5x N)重量份至100重量份、少于(0.4x N)重量份至100重量份、少于(0.3x N)重量份至100重量份、少于(0.2x N)重量份至100重量份,或甚至少于(0.1x N)重量份至100重量份。在某些实施方案中,主题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于(N-2)产物的(1.5x N)重量份至100重量份的低比率。在某些实施方案中,主题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于(N-2)产物的(1.2x N)重量份至100重量份的低比率。在某些实施方案中,主

题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于 (N-1) 产物的 (1.0x N) 重量份至100重量份的低比率。在某些实施方案中,主题组合物包括相对于靶寡核苷酸少于 (N-2) 产物的 (0.5x N) 重量份至100重量份的低比率。

[0409] 在一些实施方案中,主题组合物包括的 (N-1) 产物的量是组合物中的总非靶寡核苷酸的20%或更少,如总非靶寡核苷酸的15%或更少、10%或更少,或甚至5%或更少。

[0410] 可使用本文所述的方法制备多种多样的寡核苷酸组合物中的任一种。多种类别和类型的寡核苷酸是使用主题方法(例如如本文所述) 制备所关注。适于根据主题方法制备的寡核苷酸包括但不限于反义寡核苷酸、RNA寡核苷酸、siRNA寡核苷酸、RNAi寡核苷酸、DNA适体、微小RNA等。

[0411] 与端粒酶的RNA组分互补的寡核苷酸

[0412] 本公开的方面包括包含与人端粒酶的RNA组分互补的寡核苷酸的化合物和组合物及其制备方法。化合物可以高效能抑制细胞中的端粒酶活性,且具有细胞摄取特征。

[0413] 如上所概述,主题方法提供合成的非靶寡核苷酸产物的量降低。在某些情况下,主题方法提供合成的靶寡核苷酸产物的量增加。在一些实施方案中,主题方法提供制备相对于目标靶寡核苷酸具有降低量的一种或多种 (N-x) 产物的组合物。表1阐述一些非靶寡核苷酸产物的目标量。

[0414] 在某些实施方案中,本文所述的相对于目标靶寡核苷酸具有降低量的一种或多种 (N-x) 产物的任何组合物都是未纯化的。

[0415] 表1. 目标组合物中的寡核苷酸产物水平。主题组合物可包含在表1中指示的一种水平下的一种或多种以下组分。

[0416]

产物	组合物的% (以重量计)	相对于靶标的阈值量 (按重量计)	相对于靶(以重量计)寡核苷酸的范围	相对于靶(以重量计)伊美司他的范围
靶标	50%或更多、55%或更多、60%或更多、65%或更多、70%或更多、75%或更多、80%或更多、85%或更多、90%或更多、95%或更多	不适用	不适用	不适用
(N-1) 产物(包括其衍生物, 如苯基乙酰基和 iBu 衍生物)(例如, 峰后 1 (N-1) 产物)	少于 11 % 少于 10 % 少于 9 % 少于 8 % 少于 7 % 少于 6 % 少于 5 % 少于 4 % 少于 3 % 少于 2 % 少于 1 % 少于 0.5 %	少于(1.9 x N)份至 100 份、少于(1.8 x N)份至 100 份、少于(1.7 x N)份至 100 份、少于(1.6 x N)份至 100 份、少于(1.5 x N)份至 100 份、少于(1.4 x N)份至 100 份、少于(1.3 x N)份至 100 份、少于(1.2 x N)份至 100 份、少于(1.1 x N)份至 100 份、少于(0.9 x N)份至 100 份、少于(0.8 x N)份至 100 份、少于(0.7 x N)份至 100 份、少于(0.6 x N)份至 100 份、少于(0.5 x N)份至 100 份、少于(0.4 x N)份至 100 份、少于(0.3 x N)份至 100 份、少于(0.2 x N)份至 100 份、少于(0.1 x N)份至 100 份	100 份中约 (0.1 x N)份至约(0.5 x N)份、100 份中约(0.1 x N)份至约 (0.4 x N)份、100 份中约 (0.2 x N)份至约(0.3 x N)份,  100 份中约 (0.1 x N)份、100 份中约 (0.2 x N)份、100 份中约 (0.3 x N)份、100 份中约 (0.4 x N)份、100 份中约 (0.5 x N)份,	100 份中约 1 份至约 20 份、100 份中约 1 份至约 10 份、100 份中约 1 份至约 8 份、100 份中约 1 份至约 6 份、100 份中约 1 份至约 5 份、100 份中约 2 份至约 4 份,  100 份中约 1 份、100 份中约 2 份、100 份中约 3 份、100 份中约 4 份、100 份中约 5 份  4 份中少于 1 份、5 份中少



[0417]

				于 1 份、6 份中少于 1 份、7 份中少于 1 份、8 份中少于 1 份、9 份中少于 1 份、10 份中少于 1 份、20 份中少于 1 份、25 份中少于 1 份、100 份中少于 1 份
(N-2) 和 (N-3) 产物单独地或组合地 (包括其衍生物如苯基乙酰基和 iBu 衍生物) (例如, 峰后 2+3+4, 或峰后 3+4, 或峰后 2、3 或 4)	4%或更多 6%或更多 8%或更多 10%或更多 12%或更多 14%或更多 16%或更多 18%或更多 20%或更多 25%或更多  少于 25% 少于 20% 少于 18% 少于 16% 少于 14% 少于 12% 少于 10%	至少(1.0 x N)份至 100 份、至少(1.5 x N)份至 100 份、至少(2.0 x N)份至 100 份、至少(2.5 x N)份至 100 份、至少(3.0 x N)份至 100 份、至少(3.3 x N)份至 100 份  至少(3.3 x N)份至 100 份、至少(3.0 x N)份至 100 份、至少(2.5 x N)份至 100 份、至少(2.0 x N)份至 100 份、至少(1.5 x N)份至 100 份、至少(1.0 x N)份至 100 份	100 份中约 (1.0 x N)份至约(5.0 x N)份、100 份中约(2.0 x N)份至约(5.0 x N)份、100 份中约(2.5 x N)份至约(4.0 x N)份、100 份中约(3.0 x N)份至约(4.0 x N)份、100 份中约(3.0 x N)份至约(3.5 x N)份  100 份中约 (1.0 x N)份、100 份中约(1.5 x N)份、100 份中约(2.0 x N)份、100 份中约(2.5 x N)份、100 份中约(3.0 x N)份、100 份中约(3.3 x N)份、	100 份中约 5 至约 50 份、100 份中约 10 至约 50 份、100 份中约 20 至约 50 份、100 份中约 30 至约 50 份、100 份中约 5 至约 40 份、100 份中约 5 至约 30 份、100 份中约 5 至约 20 份、100 份中约 10 至约 20 份  100 份中约 10 份、100 份中约 15 份、100 份中约 20 份、100 份中约 25 份、100 份中约 30 份、100 份中约 35 份、100 份中约 40 份、100 份中约 45 份、100 份中约 50 份

[0418]

			100 份中约 (3.5 x N)份	100 份中至少 5 份、100 份中至少 10 份、100 份中至少 12 份、100 份中至少 14 份、100 份中至少 15 份、100 份中至少 20 份、100 份中至少 30 份、100 份中至少 40 份
总非靶寡核苷酸	45%或更少、40%或更少、35%或更少、30%或更少、25%或更少、20%或更少	少于(8.5 x N)份至 100 份、少于(8.0 x N)份至 100 份、少于(7.5 x N)份至 100 份、少于(7.0 x N)份至 100 份、少于(6.5 x N)份至 100 份、少于(6.0 x N)份至 100 份、少于(5.5 x N)份至 100 份、少于(5.0 x N)份至 100 份、少于(4.5 x N)份至 100 份、少于(4.0 x N)份至 100 份、少于(3.5 x N)份至 100 份、少于(3.0 x N)份至 100 份、少于(2.5 x N)份至 100 份、少于(2.0 x N)份至 100 份、少于(1.5 x N)份至 100 份、少于(1.0 x N)份至 100 份	100 份中约 (0.4 x N)至约(5.0 x N)份、100 份中约(0.8 x N)至约(4.0 x N)份、100 份中约(1.6 x N)至约(4.0 x N)份、100 份中约(1.6 x N)至约(2.5 x N)份  约(1.9 x N)份至 100 份  至少(1.0 x N)份/100、至少(1.5 x N)份/100、至少(2.0 x N)份/100	100 份中约 5 至约 50 份、100 份中约 10 至约 50 份、100 份中约 20 至约 50 份、100 份中约 20 至约 40 份、100 份中约 20 至约 30 份，  100 份中约 25 份  100 份中至少 10 份、100 份中至少 15 份、100 份中至少 20 份、100 份中至少 25 份  100 份中少于 40 份、100 份中少于 30 份、100 份中少于 25 份、100 份中少于 20 份、100

[0419]				份中少于 15 份
--------	--	--	--	-----------

[0420] 在某些实施方案中,所述组合物具有相对于化合物少于(2.0x N) 重量份至100重量份的(N-1)产物,其中所述化合物包括具有N个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列的多核苷酸,其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联连接。在某些实施方案中,所述比率是相对于N产物少于(N-1)产物的(1.9x N)重量份至100重量份,如相对于N产物少于(N-1)产物的(1.8x N)重量份至 100重量份、少于(1.7x N)重量份至100重量份、少于(1.6x N)重量份至100重量份、少于(1.5x N)重量份至100重量份、少于(1.4x N)重量份至100重量份、少于(1.3x N)重量份至100重量份、少于(1.2x N)重量份至100重量份、少于(1.1x N)重量份至100重量份、少于(1.0x N)重量份至100重量份、少于(0.9x N)重量份至100重量份、少于(0.8 x N)重量份至100重量份、少于(0.7x N)重量份至100重量份、少于(0.6x N)重量份至100重量份、少于(0.5x N)重量份至100重量份、少于(0.4x N)重量份至100重量份、少于(0.3x N)重量份至100重量份、少于(0.2x N)重量份至100重量份,或甚至少于(0.1x N)重量份至100重量份。

[0421] 在一些实施方案中,所述组合物具有相对于化合物少于4重量份中1重量份的(N-1)产物(如相对于化合物少于5重量份中1重量份、少于6重量份中1重量份、少于7重量份中1重量份、少于8重量份中1重量份、少于9重量份中1重量份、少于10重量份中1重量份、少于15重量份中1重量份、少于20重量份中1重量份、少于25重量份中1重量份、少于50重量份中1重量份、少于100重量份中1重量份的(N-1)产物),其中所述化合物包含具有10个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列的多核苷酸,其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'硫代磷酸酯或氧代磷酸酯亚基间键联连接。在某些实施方案中,多核苷酸具有10个或更多个与人端粒酶的 RNA组分互补的核苷亚基,如10、11、12、13、14、15、16、17、 18、19、20个或更多个核苷亚基的序列。

[0422] 在某些情况下,多核苷酸包括13个或更多个与人端粒酶的RNA 组分互补的核苷亚基,如15个或更多个、20个或更多个、30个或更多个、50个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列。

[0423] 在某些实施方案中,多核苷酸包括具有7个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基,如7、8、9、10、11、12、13、14、 15、16或17个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列。在某些实施方案中,多核苷酸包括具有在11个与18个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基,如在11个与16个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基的序列。

[0424] 在一些实施方案中,多核苷酸包括在3个与50个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基,如在5个与40个之间、在 10个与40个之间、在10个与30个之间、在10个与25个之间、在 10个与20个之间或在12个与15个之间的核苷亚基。在某些实施方案中,寡核苷酸包括具有10个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基的序列。在某些实施方案中,组合物具有相对于化合物少于10重量份中1重量份的(N-1)产物。在某些实施方案中,组合物具有相对于化合物少于20重量份中1重量份的(N-1)产物。在某些实施方案中,组合物具有相对于化合物少于25重量份中1重量份的(N-1)产物。在某些实施方案中,组合物具有相对于化合物少于30重量份中1重量份的(N-1)产物。在某些实施方案中,组合物具

有相对于化合物少于50重量份中1重量份的(N-1)产物。

[0425] 在一些实施方案中,组合物具有相对于化合物少于4重量份中1重量份的任何(N-x)产物,如相对于化合物少于5重量份中1重量份、少于6重量份中1重量份、少于7重量份中1重量份、少于8重量份中1重量份、少于9重量份中1重量份、少于10重量份中1重量份、少于20重量份中1重量份、少于25重量份中1重量份、少于30重量份中1重量份,或甚至少于50重量份中1重量份的任何(N-x)产物。

[0426] 在一些实施方案中,组合物具有相对于化合物少于总共100重量份中40重量份的(N-x)含多核苷酸产物,如相对于化合物少于100重量份中35重量份、少于100重量份中30重量份、少于100重量份中25重量份、少于100重量份中20重量份,或甚至少于100重量份中15重量份的(N-x)含多核苷酸产物。

[0427] 在一些实施方案中,组合物具有相对于化合物至少100重量份中5重量份的(N-2)和(N-3)产物,如相对于化合物至少100重量份中10重量份、至少100重量份中12重量份、至少100重量份中14重量份、至少100重量份中15重量份、至少100重量份中20重量份、至少100重量份中30重量份,或至少100重量份中40重量份的(N-2)和(N-3)产物。

[0428] 在一些实施方案中,组合物具有(N-x)含多核苷酸产物的以下概况:

[0429] 相对于N产物少于4重量份中1重量份的(N-1)产物;以及相对于N产物至少100重量份中10重量份的(N-2)和(N-3)产物。

[0430] 在某些实施方案中,寡核苷酸N产物包含在(N-1)产物中不存在的3'-末端核苷亚基。

[0431] 寡核苷酸化合物可描述为下式:

[0432]  $O-(x'-L')_n$

[0433] 其中O表示包含具有与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列的寡核苷酸,x'是任选的接头基团,L'表示脂质部分,并且n是1-5的整数。

[0434] 因此,化合物的设计需要选择两种实体O和L',以及确定这些实体之间的结构键联,这可涉及任选的接头基团x'。

[0435] 在一些实施方案中,寡核苷酸化合物可描述为下式:

[0436]  $O-(x'-L')_n$

[0437] 其中O表示包含具有与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列的寡核苷酸,x'是任选的接头基团,L'表示脂质部分,并且n是1,如式(I)寡核苷酸或其盐,其中在式(I)中,Z是脂质部分,L是任选的接头,并且B基团对应于具有与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列。

[0438] 寡核苷酸组分O可视为化合物的“效应物”组分,因为此组分通过结合端粒酶的RNA组分来实现对端粒酶的抑制。因此,选择O的序列以使其包含与端粒酶RNA的序列(其示于SEQ ID NO:1中)互补的区域。在理论上可使与端粒酶RNA组分互补的区域靶向端粒酶RNA的任何部分,但端粒酶RNA的特定区域是抑制性寡核苷酸的优选靶标。一个优选靶区域是跨越SEQ ID NO:1的核苷酸30-67的区域,其包括“模板区域”,即具有跨越SEQ ID NO:1的核苷酸46-56的序列5'-CUAACCCUAAC-3'(SEQ ID NO:2)的11个核苷酸的区域。模板区域起指定端粒酶添加至染色体末端且是端粒酶的活性所必需的端粒重复序列的作用(参见Chen等人,Cell 100:503-514,2000;Kim等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 98(14):7982-7987,

2001)。因此,含有包含与模板区域的全部或一部分互补的序列的寡核苷酸部分的本发明化合物是特别优选的。另一优选靶区域是跨越hTR的核苷酸137-179 的区域(参见Pruzan等人,Nucl.Acids Research,30:559-588,2002)。在此区域内,跨越141-153的序列是优选靶标。PCT公布W0 98/28442 描述长度是至少7个核苷酸的寡核苷酸抑制端粒酶的用途,其中寡核苷酸被设计为与hTR序列的在模板区域外部的可及部分互补,包括 hTR的核苷酸137-196、290-319和350-380。

[0439] 0的靶向hTR序列的区域优选精确互补于相应hTR序列。尽管可容忍错配,但在某些实例中,预期其会降低所得寡核苷酸缀合物的特异性和活性。在具体实施方案中,因此选择寡核苷酸0的碱基序列以包括具有至少5个与端粒酶RNA精确互补的核苷酸的序列,并且如果采用长度增加的互补序列,如至少8个、至少10个、至少12 个、至少13个或至少15个与端粒酶RNA精确互补的核苷酸,则可获得增强的端粒酶抑制。在其他实施方案中,寡核苷酸的序列包括具有至少5个至20个、至少8个至20个、至少10个至20个或至少 10个至15个与端粒酶RNA序列精确互补的核苷酸的序列。当寡核苷酸0的全长被选择为与端粒酶RNA互补时,可获得最佳端粒酶抑制活性。然而,寡核苷酸组分的全长不必精确互补于靶序列,并且寡核苷酸序列可包括不互补于靶序列的区域。可添加这些区域例如以对化合物赋予其他性质,所述区域如有助于纯化的序列。如果寡核苷酸组分0欲包括不与靶序列互补的区域,则此类区域可位于5'末端或3'-末端中的一者或两者。在使具有精确互补性的区域靶向模板区域的情况下,可用在5'末端连接有端粒酶样(富含G)序列的具有精确互补性的短(5-8个核苷酸)区域实现有效端粒酶抑制。

[0440] 与人端粒酶RNA互补且可作为寡核苷酸组分0的一部分包括或可用作整个寡核苷酸组分0的示例性序列包括以下:

[0441] hTR互补序列(美国公布2012329858的寡核苷酸序列SEQ ID NO:1的区域)

[0442] GGGUUGCGAGGGUGGGCCU GGGAGGGGUG GUGGCCAUUU UUUGUCUAACCCUAACUGAG AAGGGCGUAG GCGCCGUGCU UUUGCUCCCC GCGCGCUGUUUUUCUCGCUG ACUUUCAGCG GGCGGAAAAG CCUCGGCCUG CCGCCUCCACCGUUCAUUC UAGAGCAAAC AAAAAAUGUC AGCUGCUGGC CCGUUCGCCCCUCCGGGGA CCUGCGGCGG GUCGCCUGCC CAGCCCCCGA ACCCCGCCUGGAGGCCGCGG UCGGCCCCGG GCUUCUCCGG AGGCACCCAC UGCCACCGCGAAGAGUUGGG CUCUGUCAGC CGCGGGUCUC UCGGGGGCGA GGGCGAGGUUCAGGCCUUUC AGGCCGCGAGG AAGAGGAACG GAGCGAGUCC CCGCGCGCGGCGGAUUECC UGAGCUGUGG GACGUGCACC CAGGACUCGG CUCACACAUGC (SEQ ID NO: 1)

[0443] GCTCTAGAATGAACGGTGAAGGCGGCAGG 137-166 (SEQ ID NO:6)

[0444] GTGGAAGGCGGCAGG 137-151 (SEQ ID NO:7)

[0445] GGAAGGCGGCAGG 137-149 (SEQ ID NO:8)

[0446] GTGGAAGGCGCA 139-151 (SEQ ID NO:9)

[0447] GTGGAAGGCGG 141-151 (SEQ ID NO:10)

[0448] CGGTGAAGGCGG 141-153 (SEQ ID NO:11)

[0449] ACGGTGAAGGCG 142-154 (SEQ ID NO:12)

[0450] AACGGTGAAGGCGG 143-155 (SEQ ID NO:13)

[0451] ATGAACGGTGAAGGCGG 144-158 (SEQ ID NO:14)

[0452] ACATTTTTTGTGCTCTAG 160-179 (SEQ ID NO:15)

[0453] TAGGGTTAGACAA 42-54 (SEQ ID NO:3)

[0454] GTTAGGGTTAG 46-56 (SEQ ID NO:4)

[0455] GTTAGGGTTAGAC 44-56 (SEQ ID NO:16)

[0456] GTTAGGGTTAGACAA 42-56 (SEQ ID NO:17)

[0457] GGGTTAGAC 44-52

[0458] CAGTTAGGG 50-58

[0459] CCCTTCTCAGTT 54-65 (SEQ ID NO:18)

[0460] CGCCCTTCTCAG 56-67 (SEQ ID NO:19)

[0461] 在一些实施方案中,多核苷酸包含选自以下组成的组的序列: GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4); TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3); 以及CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:5)。

[0462] 0组分的合成中使用的核苷间键联的类型可选自任何可用的寡核苷酸化学,包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、P3'→N5'磷酸胺酯、N3'→P5'磷酸胺酯、N3'→P5'硫代磷酸胺酯以及硫代磷酸酯键联。

[0463] 在一些实施方案中,寡核苷酸组分0具有至少一个N3'→P5'磷酸胺酯(例如N3'→P5'硫代磷酸胺酯)键联。在某些实施方案中,与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基均通过N3'→P5'磷酸胺酯亚基间键联连接。在某些情况下,N3'→P5'磷酸胺酯亚基间键联是N3'→P5'硫代磷酸胺酯亚基间键联。在某些情况下,N3'→P5'磷酸胺酯亚基间键联是N3'→P5'氧代-磷酸胺酯亚基间键联。

[0464] 在某些情况下,N3'→P5'硫代磷酸胺酯亚基间键联具有以下结构:

[0465] 3'—NH—P(S)(OR)—O—5'

[0466] 其中R选自以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基。应理解包含通过上式所述的亚基间键联的一些寡核苷酸组分0也可以盐形式存在,其中R选自氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基组成的组。此类形式只要其可存在就意图包括在本公开的范围。

[0467] 在一些实例中,N3'→P5'硫代磷酸胺酯亚基间键联描述为以下结构:

[0468] 3'—NH—P(S)(OR)—O—5'

[0469] 其中R是氢。应理解对于本文所述的包含这种亚基间键联的任何寡核苷酸组分0,此类寡核苷酸组分0也可包括键联的任何适宜的盐形式。因此,亚基间键联可呈包括任何适宜的抗衡离子的盐形式。

[0470] 本发明化合物在于细胞中产生端粒酶抑制方面比未缀合于脂质组分的相应寡核苷酸更有效。据信脂质组分L'起增强化合物的细胞摄取的作用,特别是在促进穿过细胞膜方面。尽管这种情况发生的机制尚未完全阐明,但一种可能性是脂质组分可促进化合物与细胞膜结合成单一分子或聚集体(微胞)形式,随后进行内化。然而,将要利用的发明并不需要对精确机制的理解。

[0471] 脂质组分可以是相对于未修饰的寡核苷酸,提供增强的细胞摄取的任何脂质或脂质衍生物。优选的脂质是烃、脂肪(例如甘油酯、脂肪酸和脂肪酸衍生物,如脂肪酰胺)和固醇。当脂质组分是烃时,L'组分可以是取代的或未取代的环烃或脂族直链或支链烃,所述烃可以是饱和或不饱和的。优选的实例是完全饱和或多不饱和的直链未分支烃。烃链的长度

可自C2-C30变化,但最佳端粒酶抑制可用C8-C22 碳链获得。以下列出饱和烃(烷烃)的优选实例:

[0472] 系统名称/碳链

[0473] 十四烷C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>

[0474] 十五烷C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>

[0475] 十六烷C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>

[0476] 十七烷C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>

[0477] 十八烷C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>

[0478] 十九烷C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>

[0479] 二十烷C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>

[0480] 还可选择烃的单不饱和及多不饱和形式(烯烃和多烯,如二烯烃和三烯烃),其中具有一个至三个双键的化合物是优选的,但可采用具有更多双键的化合物。也可利用炔烃(含有一个或多个三键)和烯炔(三键和双键)。

[0481] 烃的取代的形式可用于本发明化合物中,其中在体内和在体外为惰性的取代基是优选的。特别优选的取代基是氟。多氟化烃的示例性通用结构包括:CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>—其中m是至少1,优选至少2,并且n=1-30,如氟十三烷:CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>9</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>;以及CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>b</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>—其中a、b和c独立地是1-30。

[0482] 其他适合的脂质组分包括简单脂肪酸和脂肪酸衍生物、甘油酯以及更复杂的脂质,如固醇,例如胆固醇。脂肪酸及其衍生物可以是完全饱和的或单不饱和或多不饱和的。碳链的长度可自C2-C30变化,但最佳端粒酶抑制可用C8-C22碳链获得。以下列出饱和脂肪酸的优选实例:

[0483] 系统名称/俗名/碳链

[0484] 十四烷酸肉豆蔻酸14:0

[0485] 十六烷酸棕榈酸16:0

[0486] 十八烷酸硬脂酸18:0

[0487] 二十烷酸花生酸20:0

[0488] 也可采用脂肪酸的单不饱和及多不饱和形式,其中具有一个至三个双键的化合物是优选的,但也可采用具有更多双键的化合物。可采用的常见单不饱和及多不饱和脂肪酸的实例包括:

[0489] 系统名称/俗名/碳链

[0490] 顺式-9-十六烷酸棕榈油酸16:1 (n-7)

[0491] 顺式-6-十八烷酸岩芹酸18:1 (n-12)

[0492] 顺式-9-十八烷酸油酸18:1 (n-9)

[0493] 9,12-十八碳二烯酸亚油酸18:2 (n-6)

[0494] 6,9,12-十八碳三烯酸γ-亚油酸18:3 (n-6)

[0495] 9,12,15-十八碳三烯酸α-亚油酸18:3 (n-3)

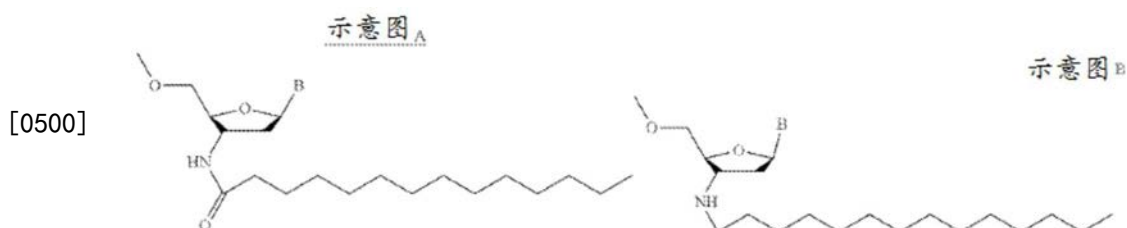
[0496] 5,8,11,14-二十碳四烯酸花生四烯酸20:4 (n-6)

[0497] 在碳链中具有一个或多个三键的脂肪酸以及分支脂肪酸也可用于本发明化合物中。脂肪酸的取代形式可用于本发明化合物中。如同烃基团,在体内和在体外为惰性的取代

基是优选的,其中氟是特别优选的。适用于本发明中的脂肪酸的多氟化衍生物的示例性通用结构是: $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$ 其中 $m$ 是至少1,优选至少2,且 $n=1-30$ ;以及 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_a(\text{CF}_2)_b(\text{CH}_2)_c\text{CO}-$ ,其中 $a$ 、 $b$ 和 $c$ 独立地是1-30

[0498] 在一些情况下,在一个与五个之间的 $L'$ 组分( $n=1-5$ )任选地经由接头共价连接于0组分。更通常地,利用1个或2个 $L'$ 组分( $n=1$  或2)。当多于一个 $L'$ 组分连接于0组分时,各 $L'$ 组分独立地加以选择。

[0499] 应理解描述为具有指定烃作为 $L'$ 部分的本发明化合物和描述为具有指定脂肪酸(具有与指定烃相同的碳原子数目)的化合物是密切相关的,并且仅在使 $L'$ 部分连接于寡核苷酸的键的性质方面而在结构上不同,这进而是用于产生化合物的合成程序的结果。例如,并且如以下更详细所描述,当合成具有结合于寡核苷酸(具有磷酰胺酯或硫代磷酰胺酯核苷间键联)的3'-氨基末端的 $L'$ 部分的化合物时,使用脂肪酸的醛形式(脂肪醛)作为起始物质导致在脂质链与寡核苷酸之间形成胺键联,以使脂质基团以烃形式呈现。相反,使用相同脂肪酸的羧酸、酸酐或酰氯形式导致形成酰胺酯键联,以使脂质基团以脂肪酸衍生物形式呈现,具体地在此实例中以脂肪酰胺形式呈现(如以上定义章节中所指示,为简单起见,术语“脂肪酸”在描述缀合的 $L'$ 基团时在本文中广泛用于包括脂肪酸衍生物,包括脂肪酰胺)。这说明于描绘磷酰胺酯寡核苷酸的3'-氨基末端连接于C14脂质组分的以下示意中。在示意A中, $L'$ 是十四烷酸(肉豆蔻酸),其中 $L'$ 基团与0基团之间的连接是酰胺。在示意B中, $L'$ 是十四烷,且 $L'$ 基团与0基团之间的连接是胺。



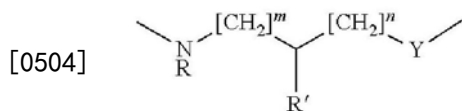
[0501] 0组分与 $L'$ 组分之间的键联可以是直接键联,或可经由任选的接头部分,例如 $x'$ 或式(I)的任选接头。接头基团可用于促进化合物的化学合成。无论接头基团是否用于介导0组分和 $L'$ 组分的缀合,在寡核苷酸组分0上均存在 $L'$ 组分可适宜地缀合的多个位点。适合键联点包括寡核苷酸的5'和3'末端、一个或多个糖环、核苷间主链和核碱基。在一些情况下, $L'$ 部分连接于寡核苷酸的3'或5'末端。

[0502] 如果 $L'$ 组分待连接于3'末端,则可直接连接于3'取代基,在优选磷酰胺酯和硫代磷酰胺酯寡核苷酸的情况下,所述3'取代基是3'-氨基,并且在如常规磷酸二酯寡核苷酸的其他实例中,所述3'取代基是3-羟基。或者, $L'$ 部分可经由3'-连接的磷酸酯基团连接,其中十六烷烃通过0-烷基接头连接于硫代磷酰胺酯寡核苷酸的3'磷酸酯。如果 $L'$ 部分待连接于5'末端,则其可通过5'-连接的磷酸酯基团连接。与0部分上的碱基连接可通过任何适合的原子实现,例如与鸟苷的N2氨基连接。当 $n>1$ 以使得多个脂质部分待连接于0组分时,单独选择的 $L'$ 组分可连接在任何适合的位点处。例如,一个 $L'$ 基团可连接于各末端,各种 $L'$ 基团可连接于碱基,或两个或更多个 $L'$ 基团可连接在一个末端。

[0503] 任选的接头组分 $x'$ 可用于连接化合物的0组分和 $L'$ 组分。应理解任选的接头(例如, $x'$ 或式(I)的L)可通过末端磷酸酯基团,例如3'-连接的或5'-连接的磷酸酯基团连接于多核苷酸(例如0)。如果待采用接头,则将其并入如本文所述的合成程序中。适合接头基

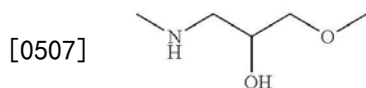


团的实例包括分别可由以下通用结构描绘的氨基甘油和O-烷基甘油型接头：

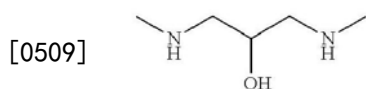


[0505] 其中R' = H、OH、NH<sub>2</sub>或SH；Y = O、S或NR；R = H、烷基或取代的烷基；并且n和m独立地是1-18之间的整数。

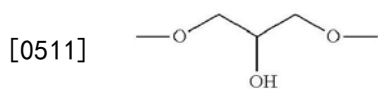
[0506] 适合接头的具体实例是氨基甘油接头，其中R' = OH，Y = O，并且m和n各自是1：



[0508] 双-氨基甘油接头，其中R' = OH，Y = NH，并且m和n各自是1：

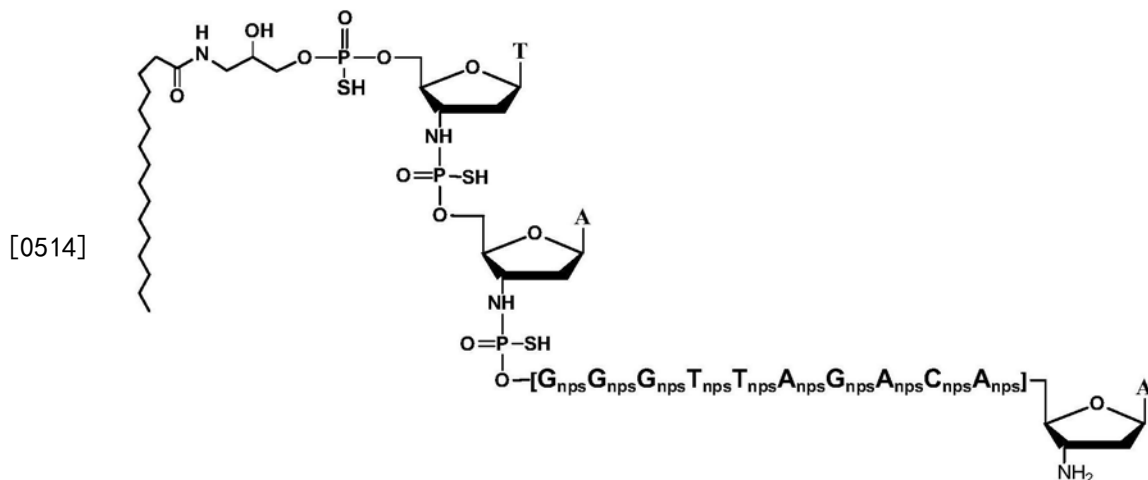


[0510] 以及O-烷基甘油接头，其中R = H：



[0512] 可根据主题方法制备的示例性脂质修饰的寡核苷酸包括 Gryaznov等人的美国申请US20120329858“Modified oligonucleotides for telomerase inhibition”的图1(例如如图1A-1DD)中所述的那些化合物，所述申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0513] 在某些实施方案中，所述组合物包含描述为以下结构的化合物：

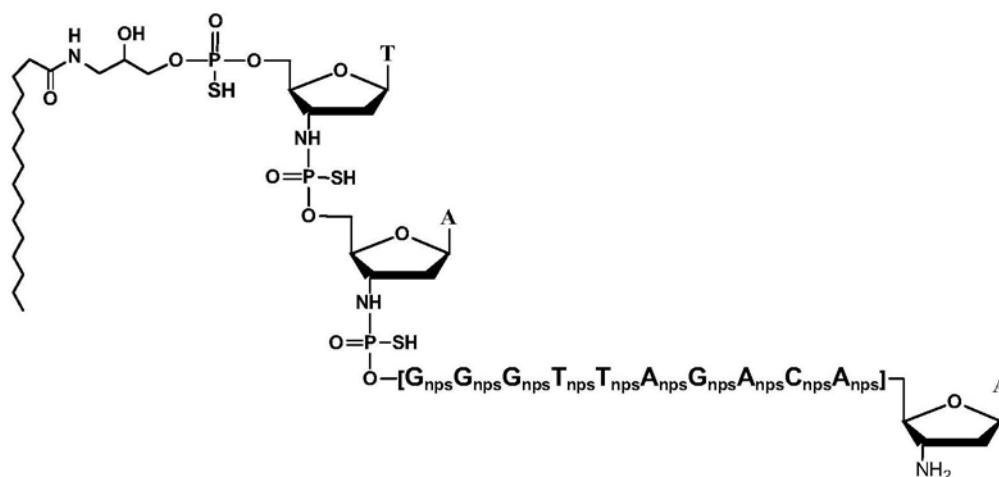


[0515] 其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接于相邻核苷的5'-碳的硫代磷酸酯键联(例如—NH—P(=O)(SH)—O—)。

[0516] 应理解关于化合物的所有实施方案均可适用于所述化合物的盐形式。

[0517] 在某些实施方案中，所述组合物包含描述为以下结构的化合物：

[0518]

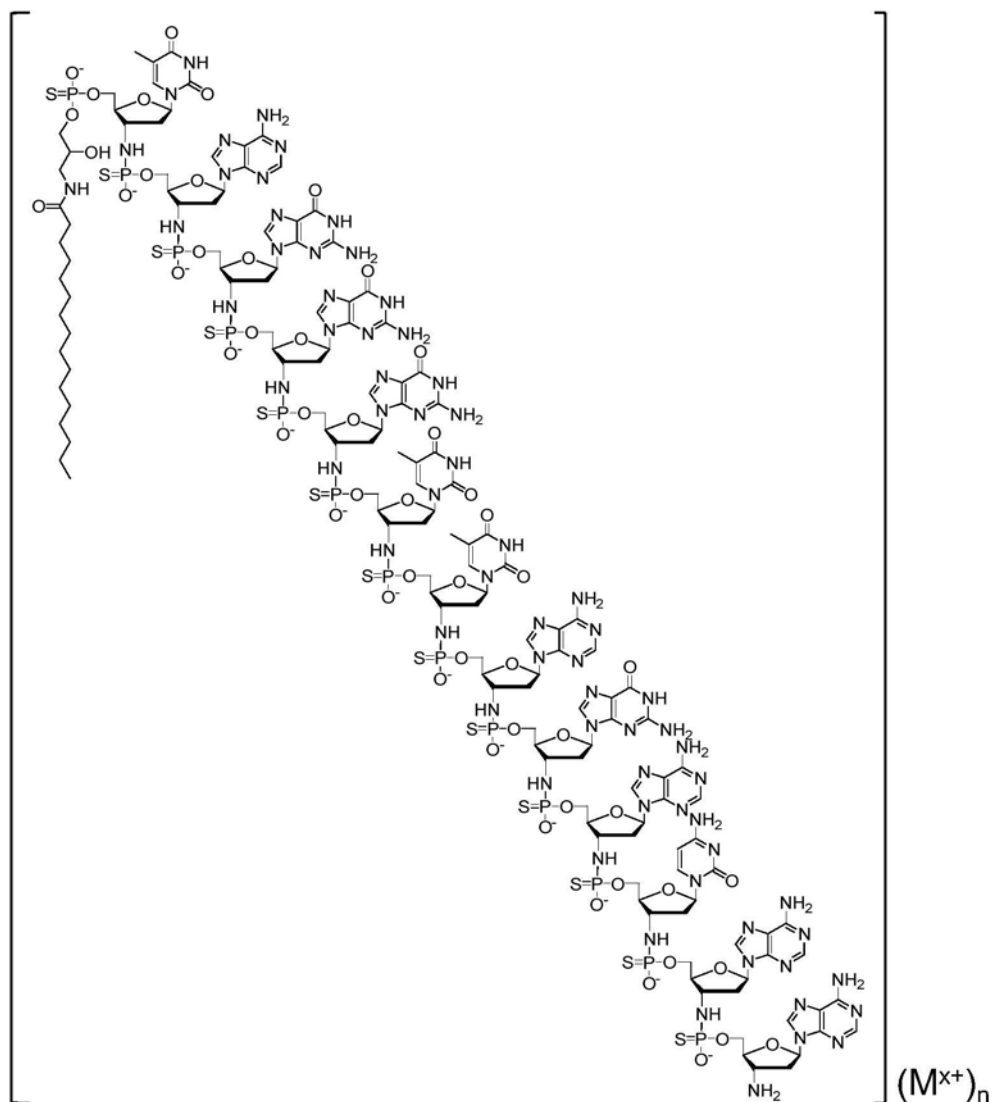


[0519] 或其盐；

[0520] 其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接至相邻核苷的5'-碳的硫代磷酰胺酯键联(例如—NH—P(=O)(SH)—O—或其互变异构体或其盐)。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的药学上可接受的盐。在某些实例中,所述组合物包含所述化合物的钠盐。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的二价阳离子盐,如所述化合物的镁盐。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的三价阳离子盐,如所述化合物的铝盐。

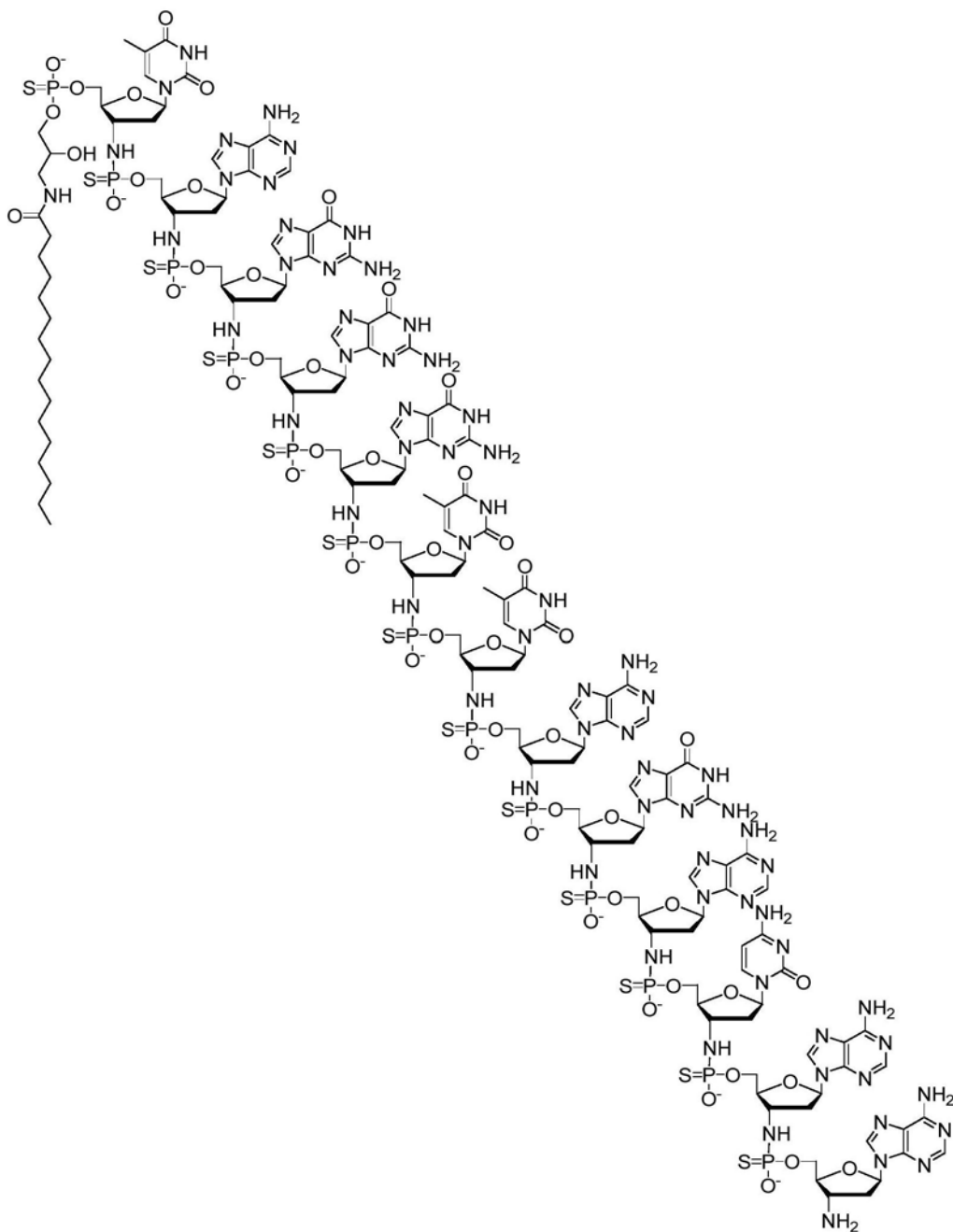
[0521] 在某些实施方案中,所述组合物包含描述为以下结构的寡核苷酸,其中各 $M^{x+}$ 独立地是氢或盐的任何适宜的抗衡离子,各x独立地是1、2或3,且n是5至13的整数,如5、6、7、8、9、10、11、12或13,如n是13:

[0522]



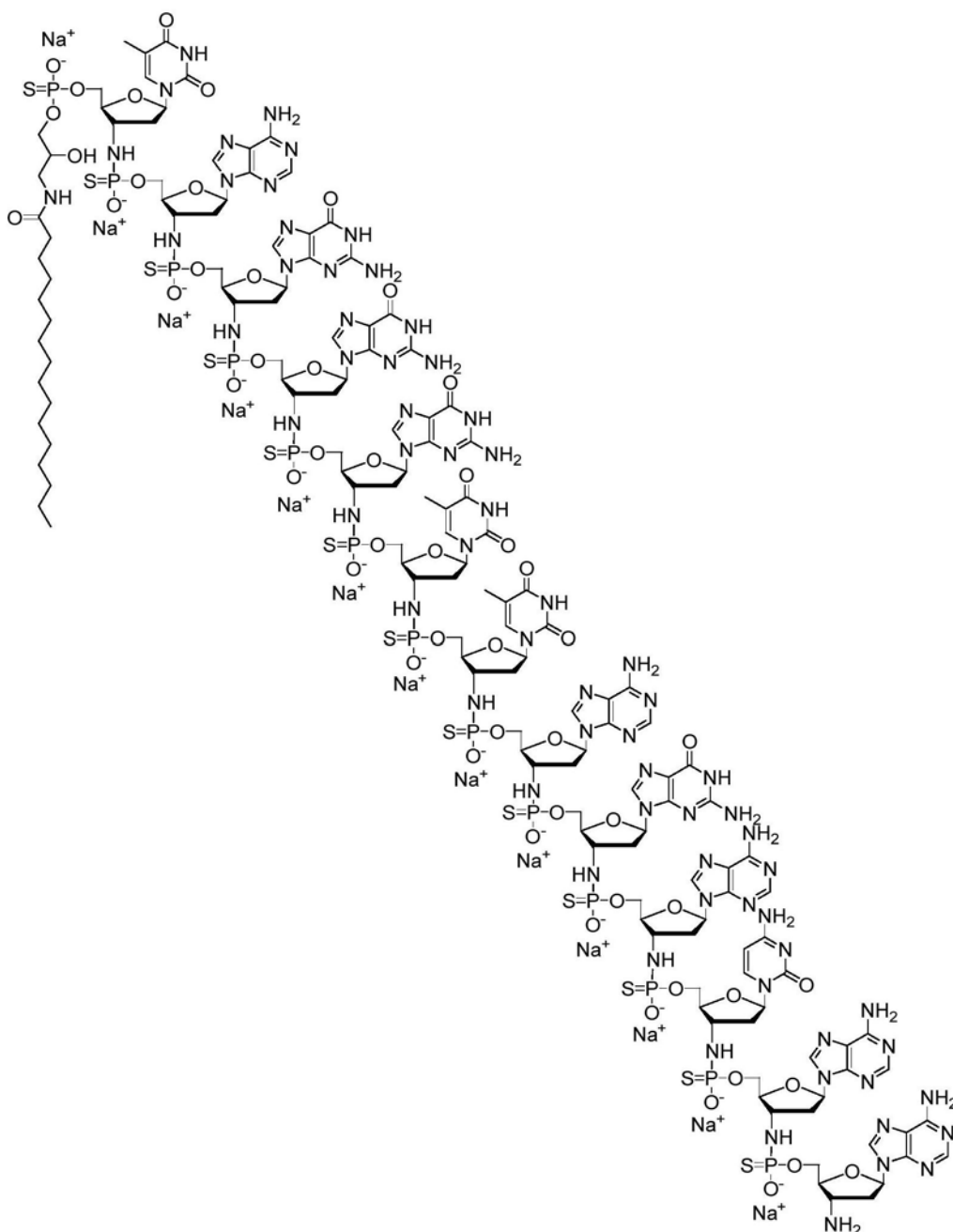
[0523] 在某些实例中,各x是1。在某些实例中,各x独立地是1或2。在某些实例中,各x独立地是1或3。在某些实例中, $M^{x+}$ 是氢。

[0524] 在某些实施方案中,所述组合物包含描述为以下结构的寡核苷酸,并且可包含盐的任何适宜的阳离子抗衡离子:



[0525]

[0526] 在某些实施方案中,所述组合物包含描述为以下结构的化合物:



[0528] 还提供包括含寡核苷酸化合物的化合物活性药物成分组合物。如本文所用，活性药物成分是指使用主题制备方法产生的组合物，其中所述组合物可任选地在合成后经受一个或多个进一步纯化步骤。一般而言，活性药物成分是适于配制成药物组合物的组合物。在一些情况下，在合成后不纯化化合物活性药物成分组合物，以使得所述组合物的含寡核苷酸组分反映在寡核苷酸合成期间产生的那些产物。

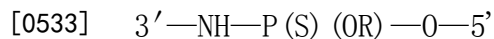
[0529] 在一些实施方案中，化合物活性药物成分具有少于9重量%的 (N-1) 产物，其中化合物包含具有10个或更多个与人端粒酶的RNA 组分互补的核苷亚基的序列的多核苷酸，其中至少两个核苷亚基通过  $\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$  硫代磷酸酯或氧代磷酸酯亚基间键联 (例如如本文所述) 连接。

[0530] 在一些实施方案中，化合物活性药物成分具有少于9重量%的 (N-1) 产物，其中化合物或其药学上可接受的盐包含具有10个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基

的序列的多核苷酸,其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'硫代磷酸酯或氧代磷酸酯亚基间键联(例如如本文所述)连接。

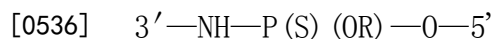
[0531] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,与人端粒酶的 RNA组分互补的核苷亚基均通过N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联连接。

[0532] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联具有以下结构:



[0534] 其中R选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基。当R选自由氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基组成的组时,应理解由上式所述的一些亚基间键联也可以盐形式存在。此类形式只要其可存在就意图包括在本公开的范围。

[0535] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联具有以下结构:



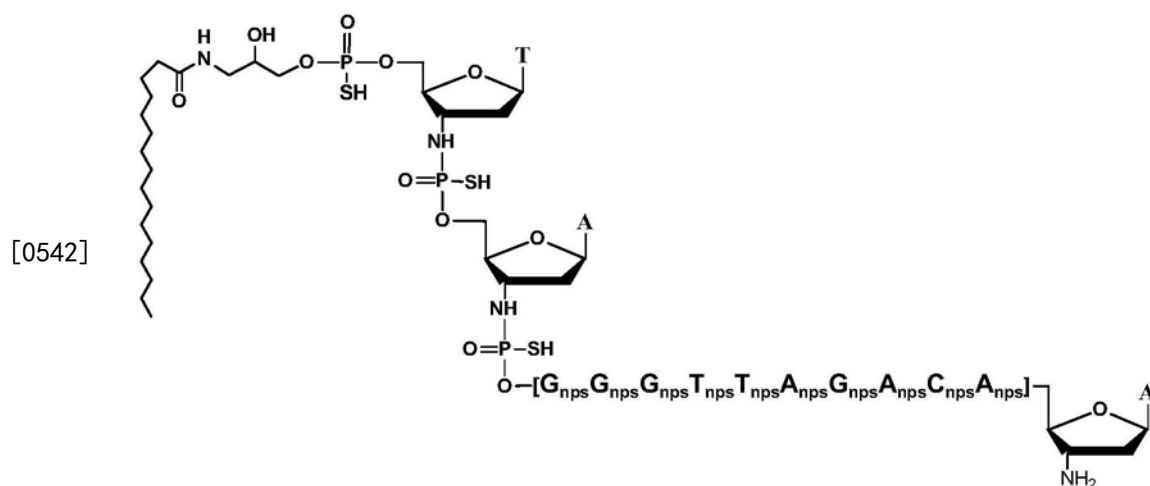
[0537] 其中R是氢。应理解对于本文所述的包含这种亚基间键联的任何化合物活性药物成分,这种化合物活性药物成分也可包括键联的任何适宜的药学上可接受的盐形式。因此,亚基间键联可呈包括盐的任何适宜的抗衡离子的药学上可接受的盐形式。

[0538] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,多核苷酸包含在 10个与50个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基(例如如本文所述)。

[0539] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,多核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4); TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3); 以及 CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:5)。

[0540] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,多核苷酸包含3' 氨基或3' -羟基端基。在所述化合物活性药物成分的某些实施方案中,多核苷酸包含3' 氨基端基。在所述化合物活性药物成分的某些实施方案中,多核苷酸包含3' -羟基端基。

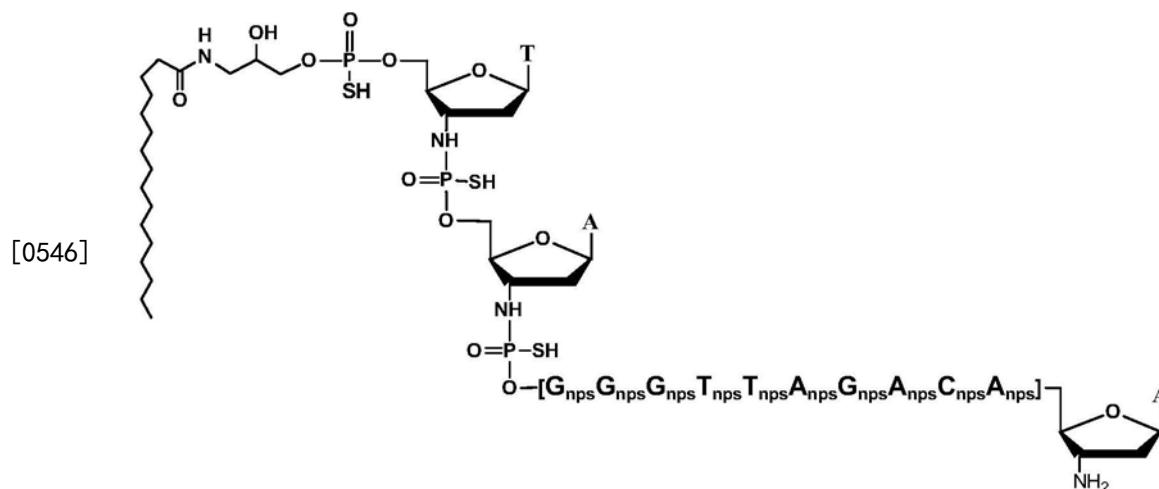
[0541] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,所述化合物具有结构:



[0543] 其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接于相邻核苷的5'-碳的硫代磷酸酯键联—NH—P(=O)(SH)—O—。

[0544] 应理解关于化合物活性药物成分的所有实施方案也可适用于所述化合物活性药物成分的盐形式。

[0545] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,所述化合物具有结构:

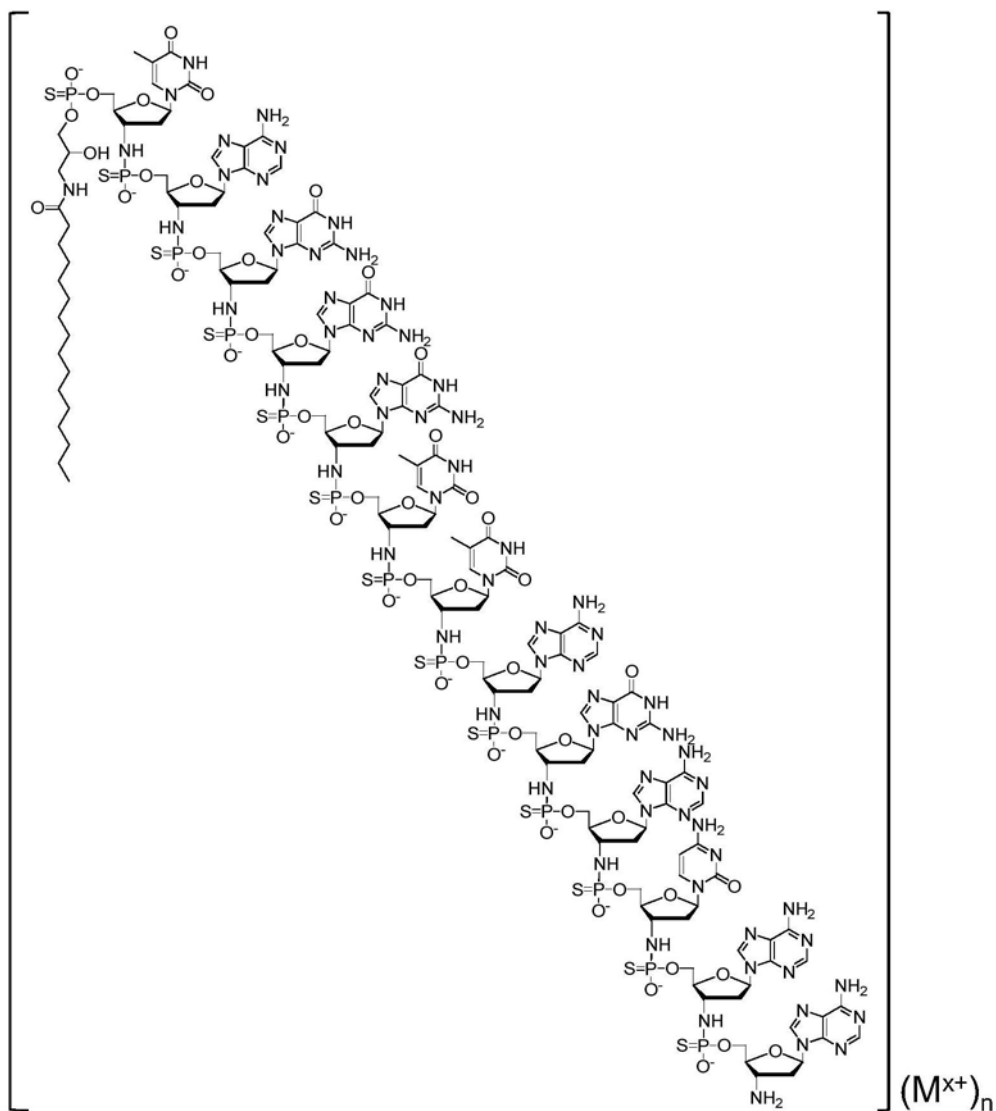


[0547] 或其药学上可接受的盐;

[0548] 其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接于相邻核苷的5'-碳的硫代磷酰胺酯键联—NH—P(=O)(SH)—O—(或其互变异构体或其药学上可接受的盐,如本文所述)。在所述化合物活性药物成分的某些实施方案中,组合物包含化合物的钠盐。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的二价阳离子盐,如化合物的镁盐。在某些实施方案中,所述组合物包含所述化合物的三价阳离子盐,如所述化合物的铝盐。

[0549] 在所述化合物活性药物成分的某些实施方案中,化合物描述为以下结构,其中各 $M^{x+}$ 独立地是氢或盐的任何适宜的抗衡离子,各x独立地是1、2或3,且n是5至13的整数,如5、6、7、8、9、10、11、12或13,如n是13:

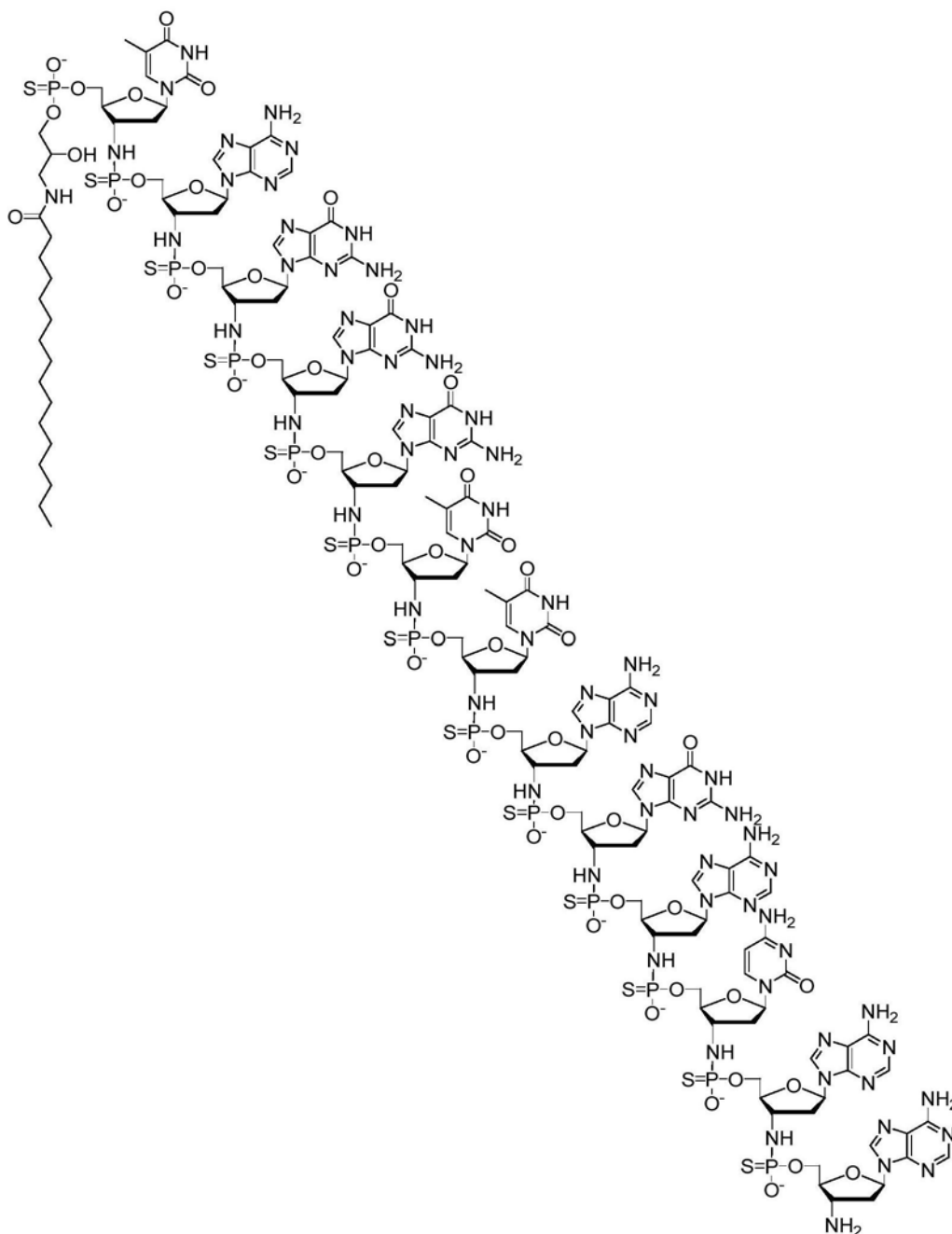
[0550]



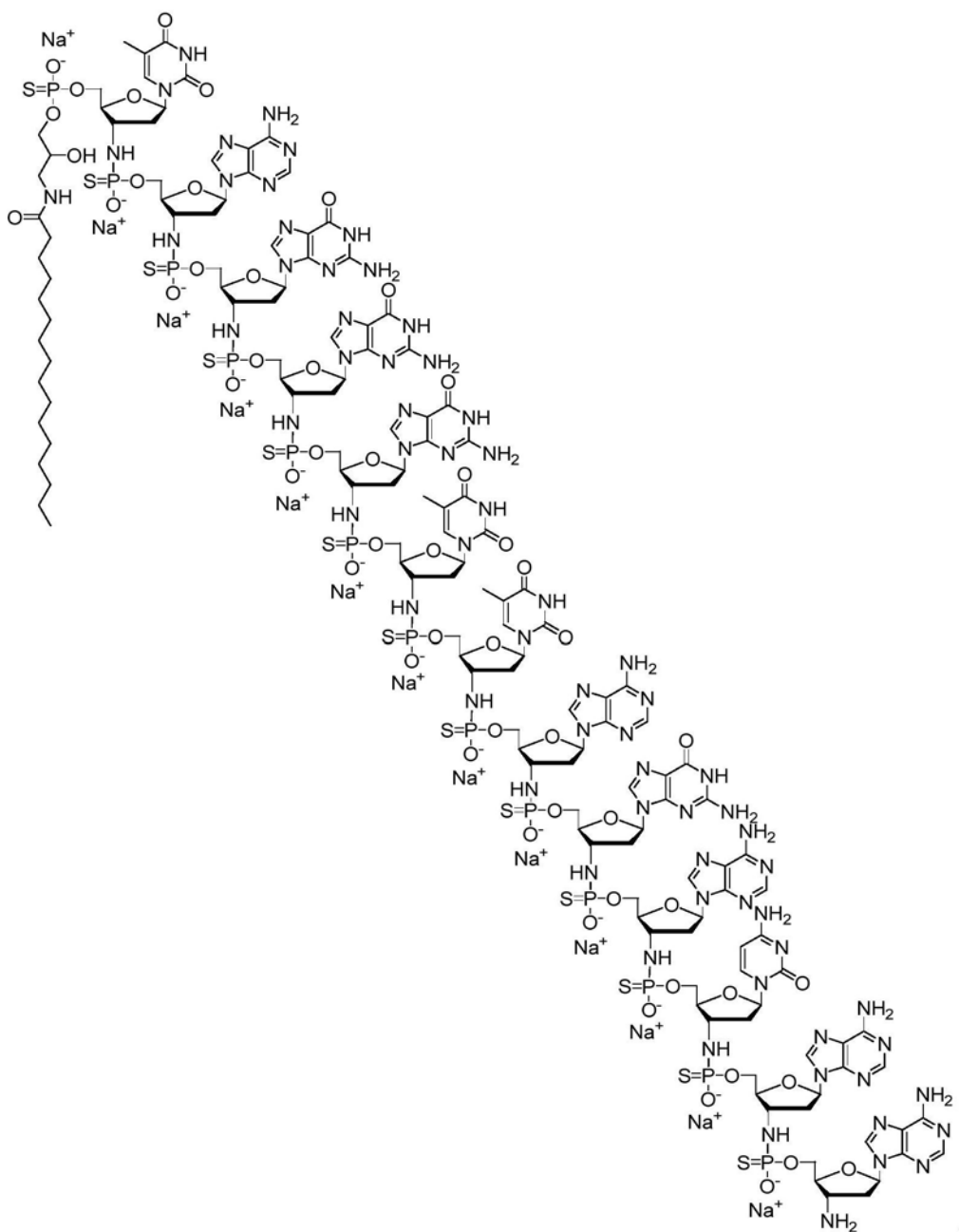
[0551] 在某些实例中,各x是1。在某些实例中,各x独立地是1或2。在某些实例中,各x独立地是1或3。在某些实例中, $M^{x+}$ 是氢。

[0552] 在所述化合物活性药物成分的某些实施方案中,化合物描述为以下结构,并且可包括盐的任何适宜的阳离子抗衡离子:





[0554] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,化合物描述为以下结构:



[0556] 在一些实施方案中,化合物活性药物成分具有少于9重量%的 (N-1) 产物,如少于8重量%、少于7重量%、少于6重量%、少于5重量%、少于4重量%、少于3重量%、少于2重量%,或甚至少于1重量%的 (N-1) 产物。在某些实施方案中,化合物活性药物成分具有少于5重量%的 (N-1) 产物。在某些实施方案中,化合物活性药物成分具有少于2重量%的 (N-1) 产物。

[0557] 在一些实施方案中,活性药物成分具有少于9重量%的任何 (N-x) 产物,如少于8重量%、少于7重量%、少于6重量%、少于5重量%、少于4重量%、少于3重量%、少于2重量%,或甚至少于1重量%的任何 (N-x) 产物。

[0558] 在一些实施方案中,化合物活性药物成分具有少于总共9重量%的 (N-x) 含多核苷酸产物,如少于总共8重量%、少于总共7重量%、少于总共6重量%、少于总共5重量%、少于总共4重量%、少于总共3重量%、少于总共2重量%,或甚至少于总共1重量%的 (N-x) 含多

核苷酸产物。

[0559] 在一些实施方案中,化合物活性药物成分具有(N-x)含多核苷酸产物的以下概况:

[0560] 相对于N产物少于4重量份中1重量份的(N-1)产物;以及

[0561] 相对于N产物至少100重量份中10重量份的(N-2)和(N-3)产物。

[0562] 制剂

[0563] 还提供包括寡核苷酸组合物(例如如本文所述)的药物组合物。寡核苷酸组合物(例如如本文所述)也可配制成药物组合物以抑制与靶基因的过度表达相关的疾病病状中的细胞中的转录或翻译。

[0564] 在一些实施方案中,药物组合物包括于药学上可接受的赋形剂中配制的寡核苷酸组合物(例如如本文所述)。在某些实施方案中,寡核苷酸组合物是具有少于9重量%的(N-1)产物的化合物活性药物成分,其中所述化合物包含具有10个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列的多核苷酸,其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键连接。

[0565] 本发明提供可特异性且有效抑制端粒酶活性并且可因此用于抑制如肿瘤细胞的端粒酶阳性细胞的增殖的化合物。非常广泛的癌细胞已显示呈端粒酶阳性,包括来自以下癌症的细胞:皮肤癌、结缔组织癌、脂肪癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫癌、肾癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、中枢神经系统(CNS)癌、视网膜癌以及血液学肿瘤(如骨髓瘤、白血病和淋巴瘤)。目标癌症包括但不限于骨髓纤维化、血小板增多症、脊髓发育不良综合征和骨髓性白血病。

[0566] 主题化合物可用于治疗血液学恶性肿瘤和骨髓增生性病症,包括但不限于特发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性骨髓性白血病(CML)、骨髓纤维化(MF)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性白血病以及急性骨髓性白血病(AML)。主题化合物可用于治疗骨髓发育不良综合征,其包括如以下的疾病:难治性贫血、伴有母细胞过量的难治性贫血、伴有多谱系发育不良的难治性血细胞减少症、伴有单谱系发育不良的难治性血细胞减少症以及慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)。主题化合物可用于治疗血液学疾病,如2013年11月15日提交的PCT专利申请第PCT/US13/070437号中所述的那些疾病,所述申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0567] 因此,本文提供的化合物广泛适用于治疗广泛范围的恶性肿瘤。更重要地,本发明化合物可有效提供在较高程度上区分恶性细胞与正常细胞的治疗,从而避免伴随依赖于不加区分地杀死分裂细胞的药剂的大多数当前化学治疗方案存在的许多有害副作用。此外,本发明化合物比等效未缀合的寡核苷酸更有效,这意味着其可在较低剂量下施用,从而提供安全性增强和治疗成本显著降低。因此,本发明的一个方面是一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效剂量的本发明化合物。包括本发明化合物的端粒酶抑制剂可连同包括手术移除原发性肿瘤、化学治疗剂和放射治疗的其他癌症治疗方法一起采用。因此,本发明涉及本文提供的用作药剂的化合物和组合物。本发明还涉及本文提供的用于治疗或预防上文提及的任一恶性肿瘤的化合物和组合物。

[0568] 对于治疗应用,本发明化合物以治疗有效量与药学上可接受的载体一起配制。一种或多种本发明化合物(例如具有不同L'或0组分)可包括在任何给定制剂中。药物载体可以是固体或液体。液体载体可用于制备溶液、乳液、悬浮液和加压组合物。将化合物溶解或

悬浮于药学上可接受的液体赋形剂中。用于胃肠外施用寡核苷酸制剂的液体载体的适合实例包括水(其可含有添加剂,例如纤维素衍生物,优选羧甲基纤维素钠溶液)、磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)、醇(包括一元醇和多元醇,例如二醇)及其衍生物、以及油(例如分馏椰子油和花生油)。液体载体可含有其他适合的药物添加剂,包括但不限于以下:增溶剂、悬浮剂、乳化剂、缓冲剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、防腐剂、稳定剂和渗透压调节剂。

[0569] 对于胃肠外施用化合物,载体也可以是油性酯,如油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯。无菌载体适用于供胃肠外施用的无菌液体形式组合中。

[0570] 无菌液体药物组合物、溶液或悬浮液可通过例如腹膜内注射、皮下注射、静脉内或以局部方式来利用。寡核苷酸也可血管内或经由血管支架来施用。

[0571] 用于加压组合物的液体载体可以是卤素化烃或其他药学上可接受的推进剂。这类加压组合物也可进行脂质封装以经由吸入进行递送。对于通过鼻内或支气管内吸入或吹入进行的施用,寡核苷酸可配制成可接着以气雾剂形式利用的水溶液或部分水溶液。

[0572] 化合物可通过与药学上可接受的含有活性化合物的媒介物一起配制以溶液、乳膏剂或洗剂形式局部施用。

[0573] 本发明的药物组合物可以任何可接受的剂型经口施用,包括但不限于呈胶囊、片剂、散剂或颗粒剂形式以及呈于水或非水性介质中的悬浮液或溶液形式的制剂。包含本发明的寡核苷酸的药物组合物和/或制剂可包含载体、润滑剂、稀释剂、增稠剂、调味剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂。在供经口使用的片剂的情况下,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。还可添加润滑剂,如硬脂酸镁。对于以胶囊形式进行的经口施用,适用稀释剂包括乳糖和干燥玉米淀粉。当需要用于口服使用的水性混悬液时,活性成分与乳化剂和混悬剂组合。必要时,还可添加某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0574] 尽管本发明化合物具有优异的细胞和组织渗透特征,但其可配制以提供甚至更大益处,例如于脂质体载体中配制。使用脂质体来促进细胞摄取例如描述于美国专利第4,897,355号和美国专利第4,394,448号中。众多出版物描述脂质体的配制和制备。化合物也可通过与其他渗透增强剂,如上述脂质部分的未缀合形式,包括脂肪酸和其衍生物混合来配制。实例包括油酸、月桂酸、癩酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癩酸酯、三癩酸酯、蓖麻醇酸酯、单油酸甘油酯(也称为1-单油酰基-外消旋-甘油)、二月桂酸甘油酯、辛酸、花生四烯酸、1-单癩酸甘油酯、1-十二基氮杂环庚-2-酮、酰基肉碱、酰基胆碱、单甘油酯和二甘油酯以及其生理可接受的盐(即油酸盐、月桂酸盐、癩酸盐、肉豆蔻酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、亚油酸盐等)。

[0575] 可使用包含一种或多种渗透增强剂的复合制剂。例如,胆盐可与脂肪酸组合用于制备复合制剂。示例性组合包括通常在约0.5%至2%的浓度下使用的鹅脱氧胆酸(CDCA)与通常在约0.5%至5%的浓度下使用的癩酸钠或月桂酸钠组合。

[0576] 包含本发明的寡核苷酸的药物组合物和/或制剂还可包含螯合剂、表面活性剂和非表面活性剂。螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)二钠、柠檬酸、水杨酸盐(例如水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸盐和高香草酸盐)、胶原蛋白的N-酰基衍生物、月桂醇聚醚-9(laureth-9)和 $\beta$ -二酮的N-氨基酰基衍生物(烯胺)。表面活性剂包括例如月桂基硫酸钠、聚氧化乙烯-9-月桂基醚和聚氧化乙烯-20-十六基醚;以及全氟化学乳液,如FC-43。非表面活性剂包括例如不饱和环脲、1-烷基-氮杂环-烷酮和1-烯基氮杂环-烷酮衍生物、以及非

类固醇消炎剂,如双氯芬酸钠、吲哚美辛和苯基丁氮酮。

[0577] 因此,在本发明的另一方面中,提供一种配制药物组合物的方法,所述方法包括提供如本文所述的化合物,以及组合所述化合物与药学上可接受的赋形剂。优选地,化合物在如下定义的药物纯度下提供。方法可进一步包括在添加赋形剂之前或之后向化合物中添加渗透增强剂。

[0578] 药物组合物可符合药物纯度标准。在一些情况下,对于用作药物制剂中的活性成分,主题化合物进行纯化以离开于其中制备其的混合物中存在的反应性或潜在免疫原性组分。

[0579] 药物组合物可以单剂量单位或多剂量单位等分和包装。用寡核苷酸化合物治疗的剂量要求随所采用的特定组合物、施用途径、呈现的症状的严重性、化合物的形式以及所治疗的特定受试者而变化。

[0580] 本发明的药物组合物可以有效实现在临床上合乎需要的结果的制剂和量向受试者施用。对于治疗癌症,合乎需要的结果包括肿瘤团块减小(如通过触诊或成像所确定;例如通过射线照相术、放射核苷酸扫描、CAT扫描或MRI)、肿瘤生长速率降低、转移形成速率降低(如例如通过对活检试样的组织化学分析所确定)、生物化学标记物减少(包括如ESR的一般性标记物和如血清PSA的肿瘤特异性标记物)、以及生活品质改善(如通过例如Karnofsky计分的临床评估所确定)、进展时间增加、无疾病存活和总体存活。

[0581] 为实现这类作用所需的每剂量化合物的量和剂量的数目将取决于许多因素而变化,所述因素包括疾病适应症、所治疗的患者的特征和施用模式。在一些情况下,制剂和施用途径将提供在疾病部位处的化合物局部浓度在1 $\mu$ M与1nM之间。

[0582] 一般而言,化合物在提供有效结果而不导致任何有害或不良副作用的浓度下施用。这种浓度可通过施用单一单位剂量,或通过全天在适合间隔下施用分成适宜次单位的剂量来实现。

[0583] 效用

[0584] 本发明的例如如上所述的方法和组合物适用于多种应用中。目标应用包括但不限于:治疗应用、诊断应用、研究应用和筛检应用,如以下更详细所评述。

[0585] 主题化合物适用于多种治疗应用中。在一些实施方案中,产生寡核苷酸的方法应用于制备提供治疗益处的寡核苷酸。可使用本发明组合物治疗的疾病的类型是无限的。例如,所述组合物可用于治疗许多遗传性疾病。在一些实施方案中,主题方法和组合物具有反义应用。在一些实施方案中,主题方法和组合物具有抗基因应用。在某些实施方案中,主题方法和组合物具有端粒酶抑制应用,如美国专利 6,835,826和美国公布20120329858中所述的应用,所述专利和所述公布的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0586] 主题化合物和方法可用于多种诊断应用中,包括但不限于开发临床诊断剂,例如体外诊断剂或体内肿瘤成像剂。这些应用适用于诊断或确认对疾病病状或其易感性的诊断。所述方法还适用于监测先前已诊断有疾病的患者的疾病进展和/或对治疗的反应。

## 实施例

[0587] 提出以下实施方案以便向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开和说明,并不意欲限制本发明人看待其发明的范围,也不意欲表示以下实验是进行

的全部或仅有的实验。已经努力确保相对于所用数字(例如量、温度等)的精确性,但一些实验误差和偏差应加以说明。除非另外指示,否则份是重量份,分子量是重均分子量,温度以摄氏度计,并且压力是在大气压下或接近大气压。“平均”意指算术平均值。可使用标准缩写,例如,bp,碱基对;kb,千碱基;pl,微微升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌肉内(肌肉内地);i.p.,腹膜内(腹膜内地);s.c.,皮下(皮下地)等。

[0588] 一般合成程序

[0589] 提供适用于合成所公开的化合物的通常已知的化学合成方案和条件的许多通用参考文献是可获得的(参见,例如Smith和March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 第五版, Wiley-Interscience, 2001; 或Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, 第四版, New York: Longman, 1978)。

[0590] 如本文所述的化合物可通过本领域中已知的任何纯化方案纯化,包括色谱,如HPLC、制备型薄层色谱、快速柱色谱和离子交换色谱。可使用任何适合的固定相,包括正相和反相以及离子树脂。在某些实施方案中,公开的化合物经由硅胶和/或氧化铝色谱纯化。参见,例如Introduction to Modern Liquid Chromatography, 第2版, 编辑 L.R. Snyder和J.J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; 以及Thin Layer Chromatography, E. Stahl编辑, Springer-Verlag, New York, 1969。

[0591] 在用于制备主题化合物的任何方法期间,可能有必要和/或需要保护所涉及的任何分子上的敏感性或反应性基团。这可通过如标准著作中所述的常规保护基来实现,所述著作如J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London and New York 1973; T.W. Greene和P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 第3版, Wiley, New York 1999; "The Peptides"; 第3卷(编辑: E. Gross和J. Meienhofer), Academic Press, London and New York 1981; "Methoden der organischen Chemie", Houben-Weyl, 第4版, 第15/1卷, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974; H.-D. Jakubke和H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, and Basel 1982; 和/或Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974。保护基可在适宜的随后阶段使用本领域中已知的方法来移除。

[0592] 主题化合物可使用可商购的起始物质和/或通过常规合成方法制备的起始物质,经由多种不同合成途径来合成。在以下方案中描述可用于合成本文公开的化合物的合成途径的多个实施例。

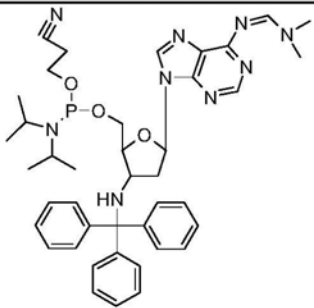
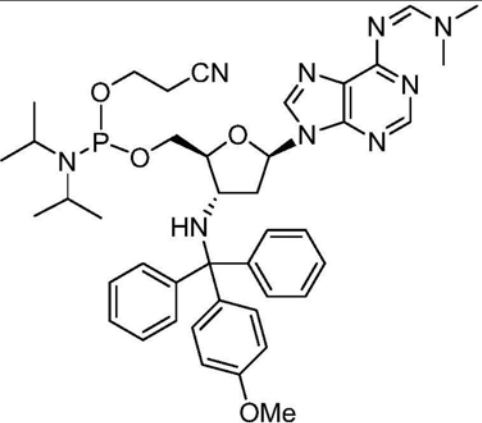
[0593] 实施例1

[0594] 使用二聚亚磷酰胺合成伊美司他钠。

[0595] 伊美司他钠使用固体支撑物(可控孔径玻璃或聚合物固体支撑物)和单体亚磷酰胺(如A<sup>Bz</sup>或A<sup>dmf</sup>、C、G<sup>iBu</sup>和T亚磷酰胺)按以下序列合成:

[0596] 5' R-TAGGGTTAGACAA-NH<sub>2</sub>-3' (SEQ ID NO: 3), 其中R=脂质接头基团

[0597] 表2: 亚酰胺化物和固体支撑物的结构

缩写名称	描述	结构
亚酰胺化物 A <sup>dmf</sup>	3'-三苯甲基氨基-N <sub>6</sub> -二甲基甲脒基-2',3'-二脱氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酸胺	
[0598] 亚酰胺化物 A <sup>dmf</sup> (MMT)	3'-单甲氧基三苯甲基氨基-N <sub>6</sub> -二甲基甲脒基-2',3'-二脱氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酸胺	

缩写名称	描述	结构
亚酰胺化物 $A^{dmf}$ (甲呱啶)	3'-(二甲基取代的甲呱啶)氨基- $N_6$ -二甲基甲脒基-2',3'-二脱氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺	
亚酰胺化物 $A^{dmf}$ (DMT)	3'-二甲氧基三苯甲基氨基- $N_6$ -二甲基甲脒基-2',3'-二脱氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺	
亚酰胺化物 $A^{Bz}$	3'-三苯甲基氨基- $N_6$ -苯甲酰基-2',3'-二脱氧腺苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺	
亚酰胺化物 $C(Bz)$	3'-三苯甲基氨基-N-苯甲酰基-2',3'-二脱氧胞苷 5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺	

[0599]



[0600]

缩写名称	描述	结构
亚酰胺化物 G(iBu)	3'-三苯甲基氨基-N2-异丁酰基-2',3'-二脱氧鸟苷-5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺	
亚酰胺化物 T	3'-三苯甲基氨基-3'-脱氧胸苷 5'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺	
棕榈酰基-氨基甘油-固体支撑物  或  NittoPhaseHL 棕榈酰基 400 聚合物固体支撑物	3-棕榈酰基酰胺基-1-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2-O-琥珀酰基丙二醇可控孔径玻璃支撑物        3-棕榈酰基酰胺基-1-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2-O-琥珀酰基丙二醇聚合物固体支撑物	

[0601] 伊美司他主链是类似于起始亚磷酰胺的NPS,且因此偶联效率是约92%。利用二聚体亚磷酰胺使得偶联步骤较少,这可导致在合成之后在中间阶段的产率和纯度较高。使用如合成方案1中所述的方法如以下所示来制备以下二聚体亚磷酰胺:

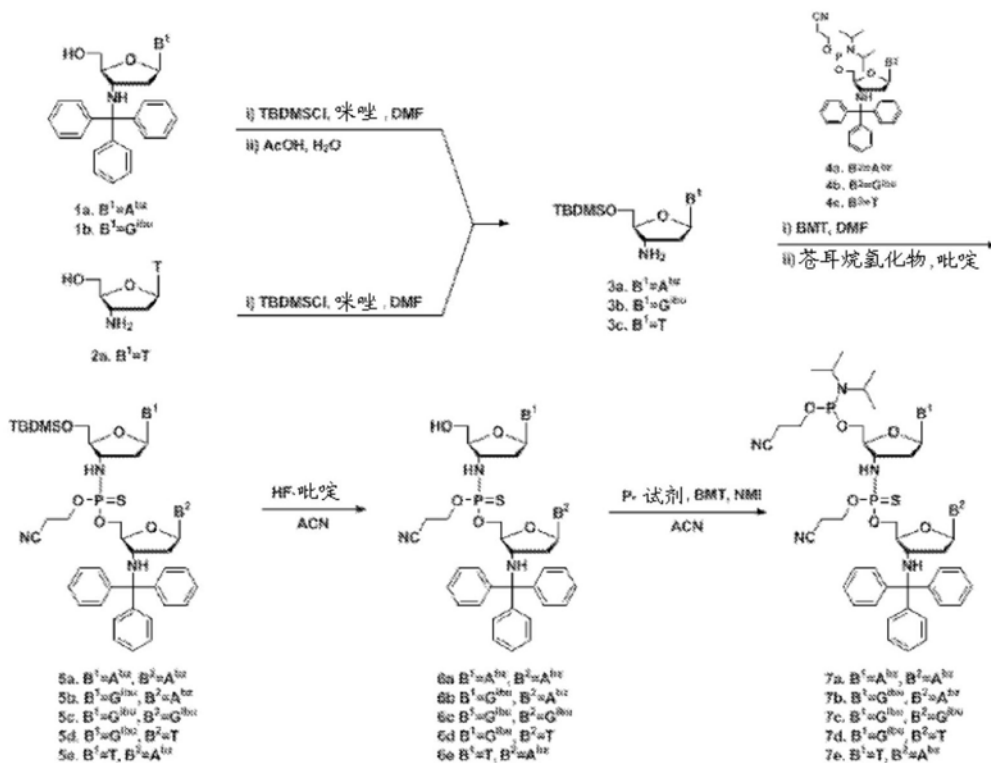
[0602] TA、AA、GA、GG和GT。

[0603] 合成二聚体亚磷酰胺需要A、G和T核苷的三种单体酰胺化物(4a至4c,方案1)和三种5'-TBDMS-3'-氨基核苷中间体(3a至3c,方案1)。TBDMS是叔丁基二甲基甲硅烷基。自以下两个种类的起始物质制备中间体(3a至3c,方案1):5'-OH-3'-NH-Tr-2'-脱氧-N-苯甲酰基腺苷(1a)、5'-OH-3'-NH-Tr-2'-脱氧-N-异丁酰基鸟苷(1b)和5'-OH-3'-氨基-胸苷(2)。Tr或Trt是指三苯甲基。

[0604] 使用叔丁基二甲基甲硅烷基氯化物和咪唑在DMF(N,N-二甲基甲酰胺)中用TBDMS基团保护1a和1b的5'-羟基,接着通过用乙酸在水中处理来使在3'-氨基位置处的三苯甲基脱保护。使用苄基巯基四唑(BMT)作为活化剂在二甲基甲酰胺中使所得中间体3a至3c与相应酰胺化物4a至4c偶联,且随后使用苍耳烷氯化物和吡啶进行硫化(P III至P V)(方案1)。一般而言,硫化反应易于完成。偶联反应的结果根据水分、反应时间和酰胺化物的当量而变化。使用氮气或氩气和快速偶联反应的无水条件是合乎需要的,因为较长反应时间会产生更多副产物,如P(V)氧化产物。二聚体的P(III)中间体具有不同稳定性。TA中间体足够稳定用以通过TLC和HPLC来监测反应完成。其他P(III)中间体不足够稳定用以监测偶联反应,且在硫化完成之后检查反应完成(方案1)。二聚体AA、GA、GG和GT的P(V)物质更稳定。对于TA二聚体(5e),1.3当量的酰胺化物(4c)用于偶联,而其他四种二聚体(5a~5d)需要约3当量的酰胺化物(4a和4b)(方案1)。酰胺化物单体4a-4c通过修改美国专利5,859,233中所述的方法来制备。

[0605] 方案1.二聚体酰胺化物的合成方案

[0606] (P-试剂是氰基乙氧基-双(N,N-二异丙基氨基)膦)



[0608] 使用HF·吡啶在乙腈中使在5'-羟基处的TBDMS保护基脱保护,且在BMT和N-甲基咪唑(NMI)存在下用亚磷酰化试剂进行最终亚磷酰化以制备二聚体硫代磷酰胺酯7a至7e(方案1)。通过柱色谱纯化最终产物(7)和三种中间体(3、5、6)。用各种量的所得最终酰胺化物进行的反应的步骤产率和总体产率列于表3中。五种二聚体酰胺化物的分析结果的概述

示于表4中。

[0609] 表3.二聚体合成的产率

二聚体(量)	5'-TBDMS-3'-氨基核苷	5'-TBDMS-3'-NH-Tr-二聚体	5'-OH-3'-NH-Tr 二聚体	二聚体酰胺化物	总体产率 (%)
[0610] TA (2.9 g)	58 %	91 %	71 %	51 %	19.1 %
AA (1.7 g)	58 %	82 %	70 %	47 %	15.6 %
GA (3.4 g)	58 %	77 %	60 %	55 %	14.7 %
GG (1.9 g)	58 %	67 %	57 %	38 %	8.4 %
[0611] GT (1.8 g)	58 %	99 %	42 %	38 %	9.2 %

[0612] 表4.二聚体分析的概述

二聚体	通过 HPLC 的纯度	<sup>31</sup> P-NMR	LCMS (计算值)	量(g)
[0613] TA	96.0 %	148.281(s), 148.193(s), 73.811(s), 73.723(s), 72.981(s), 72.592(s)	1169.4(1169.23)	2.9
AA	95.8 %	148.262(m), 74.034(m), 72.774(d), 72.267(d)	1282.5 (1282.35)	1.7
GG	94.5 %	148.156(m), 74.244(s), 73.993(s), 72.912(s), 72.761(s)	1268.5 (Na) (1246.32)	1.9
GT	95.3 %	148.159(m), 73.993(s), 73.811(s), 73.295(s), 73.100(s)	1151.4 (1151.22)	1.8
GA	96.2 %	148.168(m), 148.011(s), 74.175(s), 73.942(s), 73.170(s), 72.906(s)	1264.5 (1264.33)	3.4

[0614] 二聚体硫代磷酰胺酯的合成程序

[0615] 1) 制备5' -TBDMS-3' -氨基核苷(针对腺苷和鸟苷)。

[0616] a) 将5' -OH-3' -NH-Tr-2' -脱氧核苷(1.0当量)和咪唑(5.0当量)溶解于DMF中,并加热至60℃。

[0617] b) 添加TBDMSCl(1.2当量)至加热溶液中,接着在60℃下搅拌1小时。

[0618] c) 添加饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液至反应混合物中,接着用乙酸乙酯萃取。

[0619] d) 将有机层用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液和盐水溶液洗涤。

- [0620] e) 添加无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 至分离的有机层中以进行干燥,接着过滤。
- [0621] f) 浓缩滤液。
- [0622] g) 添加80%乙酸水溶液至浓缩反应混合物中,接着在环境温度下搅拌1小时。
- [0623] h) 通过过滤移除产物固体,接着添加饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液至滤液中,接着通过乙酸乙酯萃取四次。
- [0624] i) 有机层经无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,接着通过过滤移除固体。
- [0625] j) 浓缩滤液,接着通过柱色谱(洗脱剂:乙酸乙酯:甲醇=9:1→5:1)纯化。
- [0626] k) 获得呈白色固体状的5'-TBDMS-3'-氨基-2'-脱氧核苷。
- [0627] 2) 制备5'-TBDMS-3'-氨基核苷(针对胸苷)
- [0628] a) 将5'-OH-3'-氨基-2'-脱氧核苷(1.0当量)和咪唑(5.0当量)溶解于DMF中,并加热至60℃。
- [0629] b) 添加TBDMSCl(1.2当量)至加热溶液中,接着在60℃下搅拌1小时。
- [0630] c) 添加饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液至反应混合物中,接着用乙酸乙酯萃取四次。
- [0631] d) 添加无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 至有机层中以进行干燥,且过滤。
- [0632] e) 浓缩滤液。
- [0633] f) 浓缩的粗混合物通过柱色谱(洗脱剂:乙酸乙酯:甲醇=15:1→5:1)纯化。
- [0634] g) 获得呈白色固体状的5'-TBDMS-3'-氨基胸苷。
- [0635] 3) 制备5'-TBDMS-3'-NH-Tr二聚体
- [0636] a) 为移除水分,使5'-TBDMS-3'-氨基核苷(1.0当量)和BMT(苄基巯基四唑,1.0至5.0当量)与乙腈共沸三次,接着在环境温度下在 $\text{N}_2$ 氛围下溶解于DMF中。
- [0637] b) 逐滴添加含单体酰胺化物(3.0当量)的DMF(使用最小量以溶解单体酰胺化物)至反应溶液中,接着在环境温度下在氮气氛围下搅拌1小时。根据美国专利5,859,233中所述的方法制备单体酰胺化物。
- [0638] c) 添加苍耳烷氢化物(2.0当量)和吡啶(4.0当量)至反应溶液中,接着在环境温度下在氮气氛围下搅拌1小时。
- [0639] d) 添加饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液至反应混合物中,接着用乙酸乙酯萃取。
- [0640] e) 水层用乙酸乙酯萃取。
- [0641] f) 合并分离的有机层,接着用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液和盐水溶液洗涤。
- [0642] g) 添加无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 至有机层中以进行干燥,且过滤,接着浓缩滤液。
- [0643] h) 浓缩的粗混合物通过柱色谱(洗脱剂:乙酸乙酯:甲醇=1.5:1→仅EA)纯化。
- [0644] i) 获得呈浅黄色固体状的5'-TBDMS-3'-NH-Tr二聚体。
- [0645] 4) 制备5'-OH-3'-NH-Tr二聚体
- [0646] a) 在氮气氛围下将5'-TBDMS-3'-NH-Tr二聚体(1.0当量)溶解于ACN(20mL)中,接着在环境温度下在搅拌下添加HF-吡啶溶液,持续1.5小时。
- [0647] b) 添加饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液至反应混合物中,接着用乙酸乙酯萃取。
- [0648] c) 将分离的有机层用饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液和盐水溶液洗涤。
- [0649] d) 添加无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 至有机层中以进行干燥和过滤,接着浓缩滤液。
- [0650] e) 浓缩的粗混合物通过柱色谱(洗脱剂:乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷共溶剂)纯化
- [0651] f) 获得呈白色固体状的5'-OH-3'-NH-Tr二聚体。

[0652] 5) 制备二聚体硫代磷酰胺酯(二聚体酰胺化物)

[0653] A) 为移除任何水分,使5'-羟基-3'-NH-Tr二聚体与乙腈共沸三次,接着在环境温度下在氮气氛围下溶解于ACN中。

[0654] b) 添加BMT (1.3当量)、NMI (N-甲基咪唑,0.3当量) 和亚磷酰化试剂 (2.0当量) 至反应溶液中,接着在环境温度下搅拌1小时。

[0655] c) 添加饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液至反应混合物中,接着用乙酸乙酯萃取。

[0656] d) 将分离的有机层用盐水溶液洗涤。

[0657] e) 添加无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>至有机层中以进行干燥和过滤,接着浓缩滤液。

[0658] f) 将浓缩的反应混合物溶解于二氯甲烷 (10mL) 中,接着添加己烷以沉淀固体。

[0659] g) 倾析上层溶液以移除过量亚磷酰化试剂。(重复倾析过程5 次)。

[0660] h) 剩余固体通过柱色谱(洗脱剂:乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷共溶剂) 纯化

[0661] i) 获得呈白色固体状的二聚体。

[0662] 利用二聚体酰胺化物进行的伊美司他合成

[0663] 五种二聚体酰胺化物替代单体酰胺化物用于合成伊美司他的构筑嵌段,且将结果与自单体的酰胺化物获得的结果进行比较。对于C核苷偶联至伊美司他中,如以下序列中所描绘使用单体构筑嵌段。使用Akta Oligopilot 100在140μmol规模下进行合成。

[0664] 5' R-TA GG GT TA GA C AA-NH<sub>2</sub> 3' (SEQ ID NO:3)

[0665] 二聚体酰胺化物用于用以制备伊美司他的构筑嵌段。使用表5A 和5B中所列的试剂和合成参数,使如上所示的五种二聚体酰胺化物 (AA、TA、GG、GA和GT) 和一种单体酰胺化物 (C) 偶联以在低负载 CPG (PALM 0051,64.6μmol/g) 上制备伊美司他序列。偶联时间是500秒,且使用10当量的亚酰胺化物。在固相合成之后,支撑物用乙醇铵溶液 (NH<sub>4</sub>OH:EtOH=3:1 (v/v)) 在65℃下处理15小时。粗产物通过蒸发溶剂进行分离,且通过UV光谱术和HPLC进行分析。

[0666] 表5. 用于寡核苷酸合成的示例性合成参数 (A) 和试剂组成 (B) 。ACN是乙腈。DCA是二氯乙酸。PADS是苯基乙酰基二硫化物。ETT 是5-乙硫基-1H-四唑。

## A

步骤	试剂	时间	RPM	M
1	洗涤	3.5	300	<input type="checkbox"/>
2	气体	4.0	400	
3	去封闭	3.4	250	<input type="checkbox"/>
4	去封闭	2.0	250	<input type="checkbox"/>
5	D等待	60.0		
6	洗涤	12.0	350	<input type="checkbox"/>
7	活化	3.0	250	
8	偶联			
9	等待	300.0		
10	偶联			
11	活化	1.3	150	
12	等待	200.0		
13	洗涤	3.0	300	<input type="checkbox"/>
14	氧化	10.0	350	
15	等待	300.0		
16	氧化	10.0	350	
17	等待	300.0		
18	洗涤	5.0	350	<input type="checkbox"/>
19	帽A	3.0	200	
20	帽B	1.5	150	
21	D等待	1.5		
22	帽A	1.5	150	
23	帽B	1.5	150	
24	D等待	1.5		
25	洗涤	4.0	350	<input type="checkbox"/>

[0667]

## B

试剂名称	组合物
去封闭	5% DCA于甲苯中
亚酰胺化物	0.2M于ACN中
活化剂	0.5M ETT于ACN中
硫醇化	0.2M PADS于ACN:LTD=1:1中
帽A	20% NMI于ACN中
帽B	IBUA:LTD:ACN=1:1:8
DEA	20% DEA于ACN中

[0668] 使用Akta Oligopilot 100,利用单体嵌段方法和二聚体嵌段方法在140 $\mu$ mol规模上进行合成操作。用于合成操作的合成条件类似于表5A-B中所列的条件。

[0669] 表6.用于140 $\mu$ mol规模合成的合成参数(AKTA Oligopilot 100)

[0670]

参数		使用单体进行的伊美司他合成	使用二聚体进行的伊美司他合成
去封闭(5% DCA 于甲苯中)	CT (分钟)	3 分钟(第 2 个 6 分钟)	3 分钟
	CV	11.2 CV	
	线性流(cm/小时)	450 cm/小时	
偶联	酰胺化物	0.1M, 2.5 当量 (最后 2: 3.0 当量)	0.1M, 2.5 当量 (最后 AA: 3.0 当量)
	活化剂	0.5M ETT (酰胺化物:活化剂, 4:6)	
	最后 1 次偶联	双重偶联	
	针对流过流的 CT (分钟)	1.8 分钟	
	针对再循环的 CT (分钟)	1.8 分钟(第 1: 4 分钟)	
硫醇化 (0.1M PADS 于 AN:LTD=9:1 中)	CT (分钟)	5.27 分钟	
	CV	3.5 CV	
	线性流(cm/小时)	80 cm/小时	
加帽 (帽 A: 20% NMI 于 AN 中, 帽 B: IBUA:LTD:AN =1:1:8)	CT (分钟)	1 分钟(第 1: 2 分钟)	
	CV	1 CV (第 1: 2 CV)	
	线性流(cm/小时)	120 cm/小时	
DEA (20% DEA 于 AN 中)	CT (分钟)	10 分钟	
	CV	4.3 CV	
	线性流(cm/小时)	52 cm/小时	

[0671] 通过HPLC-MS对寡核苷酸分析显示当五种二聚体嵌段用于合成时,FLP(全长产物)纯度得以显著提高,根据HPLC得到72%纯度,如表7和8中所概述。使用单体嵌段制备的粗寡聚物仅显示45%FLP 纯度。此外,总OD(光密度)自5,299增加超过两倍达到11,623,从而得到粗产量3.34g/mmol。(N-1)产物含量和P0含量分别自11.2%和20%降低至2.4%和5%。

[0672] 使用二聚体嵌段的优点包括产生时间缩短,且在固相合成期间使用的溶剂的量降低。

[0673] 表7. 140μmol规模合成的分析结果

[0674]

属性		使用单体酰胺化物 进行的伊美司他合 成	使用二聚体酰胺化 物进行的伊美司他 合成
HPLC	FLP	44.4 %	74.0 %
	峰后 1 (N-1)产物	11.0 %	2.4%
UV	TOD	5299	11623
	重量(mg)	213 mg	468 mg
	g/mmol	1.52	3.34
LC/MS	FLP	70.3 %	71.9 %
	n-117	3.3 %	16.4 %
	n-133	6.5 %	6.7 %
	n-16	19.9 %	5.0 %

[0675] 自5'-羟基-3'-氨基核苷或5'-羟基-3'-三苯甲基氨基核苷成功完成五种二聚体酰胺化物的合成,其中产率是9%至19%,从而得到1.7 克至3.4克。未充分研究各步骤的反应条件的最佳化。在140 $\mu$ mol 规模上进行伊美司他的二聚体嵌段合成,且将结果与自使用单体酰胺化物进行的合成获得的数据进行比较。显示用于制备伊美司他的二聚体嵌段策略会提供实质性改进,因为例如在140 $\mu$ mol规模上,纯度和产率得以显著改进(HPLC纯度:二聚体74.0%(图8),单体44.4%(图 7),根据TOD(总光密度)的粗产量:二聚体468mg,单体213mg)。此外,产生较低量的npo键联,因为在使用二聚体进行的合成中存在较少偶联步骤。

[0676] 二聚体的偶联效率(140 $\mu$ mol规模合成)显示二聚体合成具有96%偶联效率,而单体合成是94%。因为对于二聚体,仅存在七次偶联,所以二聚体的FLP是71.6%,这接近于在72%下的理论计算的全长产物,且偶联13次的单体报道FLP 45.6%对在44%下的理论预测值。

[0677] 表8. 140 $\mu$ mol规模合成的结果的分析

[0678] 

单体合成的	保 留	单 体	二聚体合成	保留时	二聚体
-------	-----	-----	-------	-----	-----



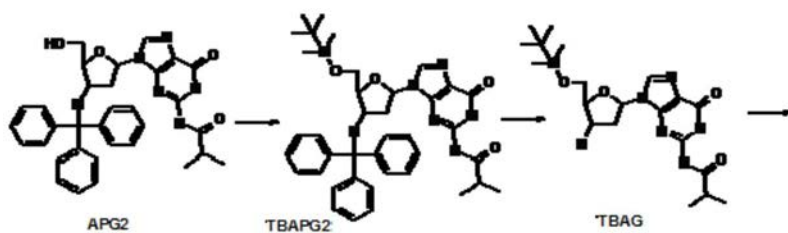
[0679]

产物	时间 (分钟)	合成面积 %	的产物	间 (分钟)	合成面积 %
靶标	38.2	44.4	靶标	37.9	74.0
峰后 1 N-1 (N-G)	39.8	11.0	峰后 1 N-1 (N-C)	39.8	2.5
峰后 2 N-2+iBu , N-2, N-G+苯基乙酰基	41.2	6.3	峰后 2 N-2+iBu , N-2, N-G+苯基乙酰基	41.3	3.9
峰后 3 N-2+苯基乙酰基, N-3 (N-A-A-C)	42.9	6.9	峰后 3 N-2+苯基乙酰基, N-3 (N-A-A-C)	42.4	5.1
峰后 4 N-3+苯基乙酰基	44.7	6.0	峰后 4 N-3+苯基乙酰基	44.5	1.6
总非靶寡核苷酸	39.8 – 54.7	49.5	总非靶寡核苷酸	39.7 – 53.1	19.8

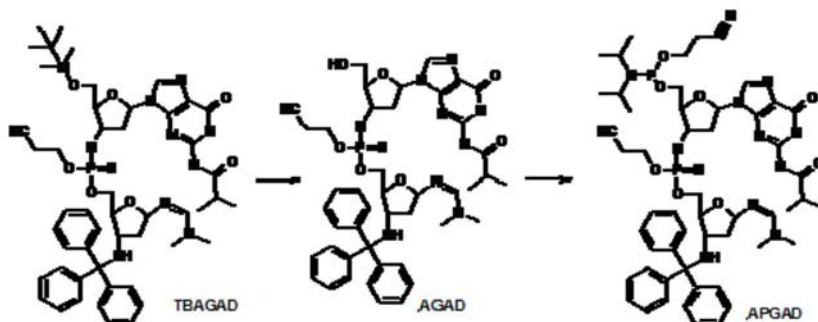
[0680] “+苯基乙酰基”表示由用氧化试剂进行的反应获得的产物

[0681] 利用较少偶联步骤进行的伊美司他合成提供的全长产物纯度与产率两者均实质上较高。对杂质的解析提供较易于纯化伊美司他,其中在HPLC中存在较小量的紧密接近于主峰流动的次要产物以产生伊美司他的纯度较高的组合物。该提高合乎降低用于制造伊美司他钠的商品成本的需要,例如当在制造规模下执行时,商品成本可减少 30-40%。

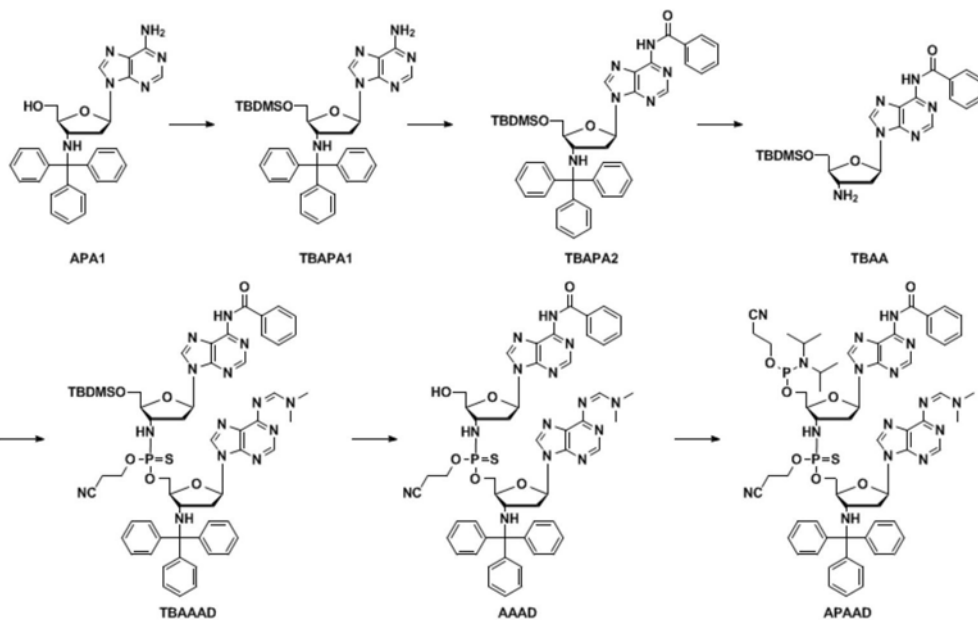
[0682] 方案2.GA二聚体酰胺化物的合成方案



[0683]

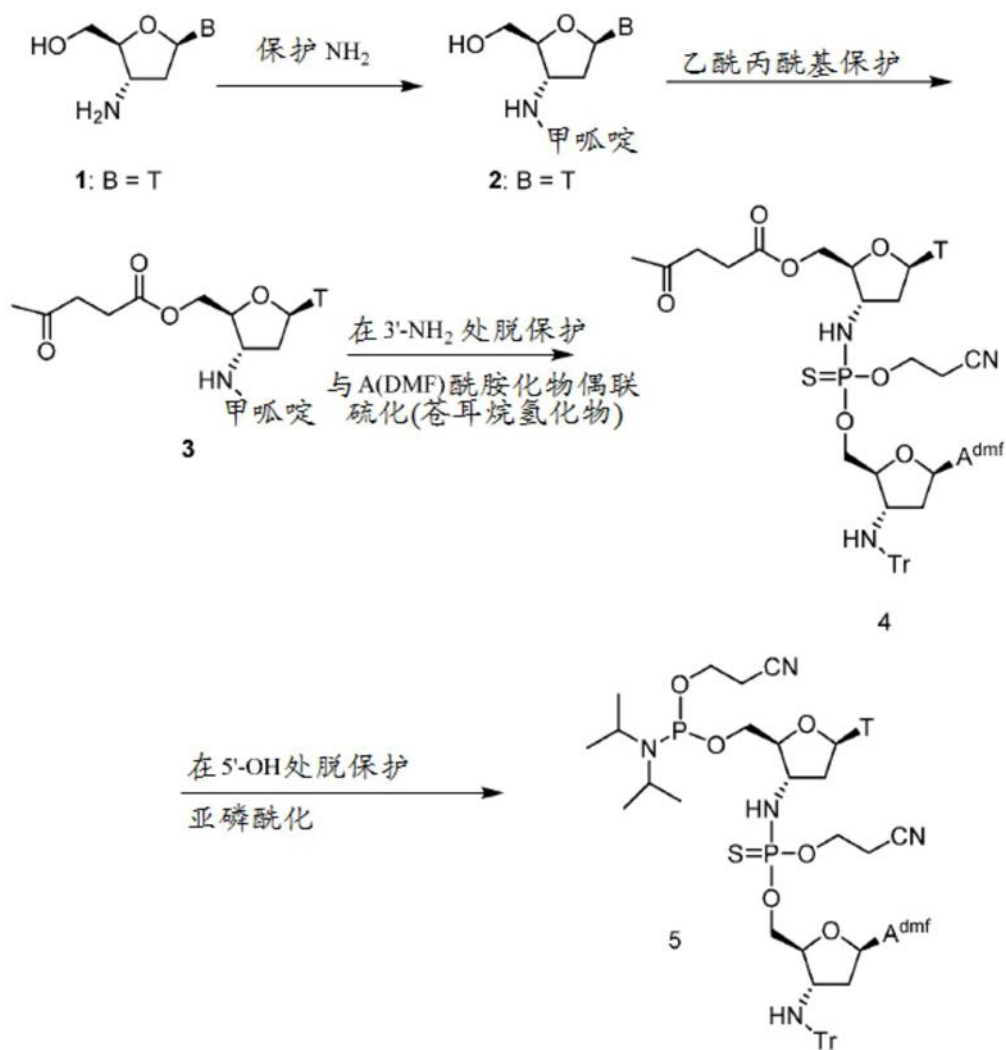


[0684] 根据本文所述的方法,经由方案2中所示的步骤,自300g APG2 制备85g TBAG。

[0685] 方案3. AA二聚体酰胺化物的合成方案

[0687] 根据本文所述的方法,经由方案3中所示的步骤,自800g粗 APA1 (纯度:46%) 获得430g TBAPA1。

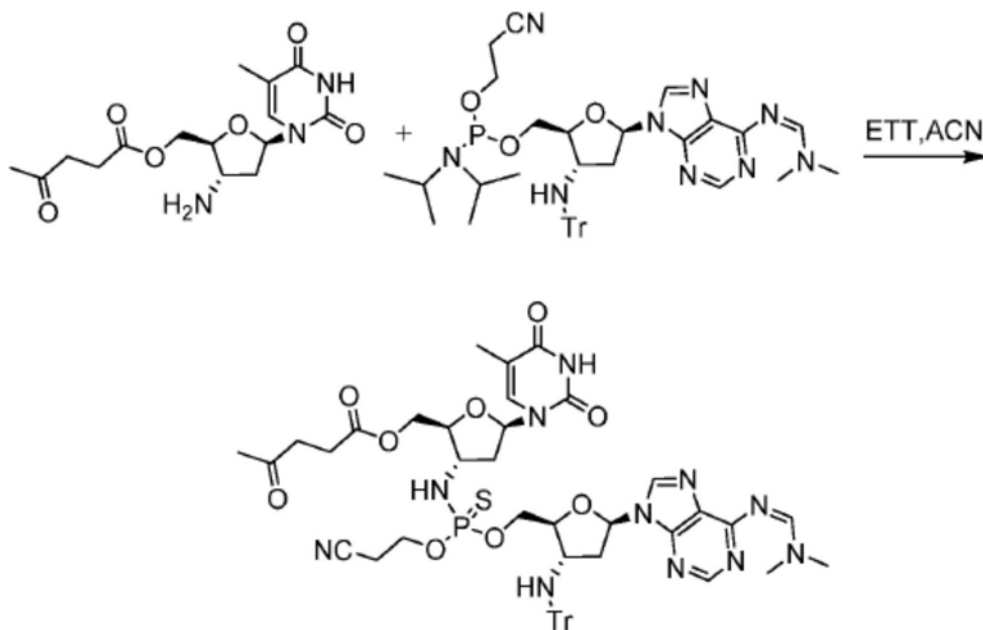
[0688] 方案4. TA二聚体酰胺化物的合成。



[0689]

[0690] 已根据本文所述的方法,经由方案4中所示的步骤,在自100mg 至1g的合成规模下制备TA二聚体酰胺化物(5)。

[0691] 方案5.在二聚体酰胺化物合成期间的偶联和硫化



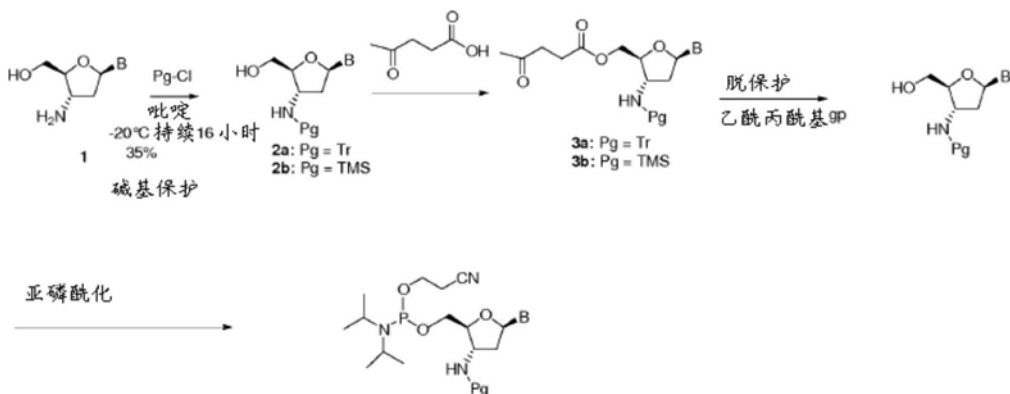
[0692]

[0693] 表9. 在二聚体酰胺化物合成期间的偶联和硫化

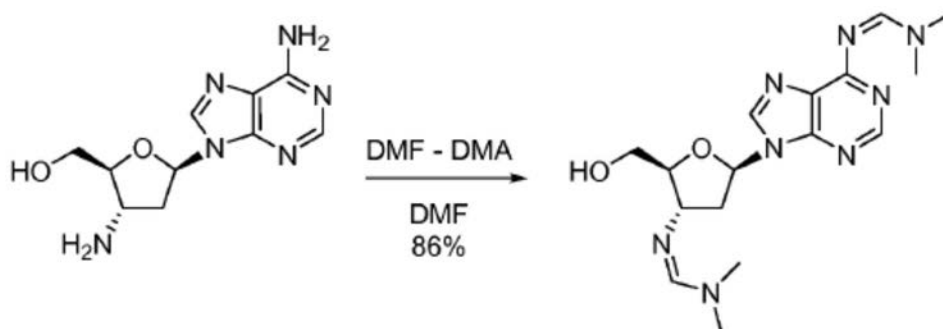
条 目	起 始 材料 量	试剂的摩尔当 量	溶 剂 类 型和 量	反 应 时间/ 温度	产物产 率 重量	分析
1	100 mg	ETT (1.0 当量) , 苍耳烷氢化物 (2.0 当量), 吡 啶(1.5 mL)	乙腈 (5.0 mL)	室 温 持 续 3+2 小时。	300 mg (粗)	LCMS
2	100 mg	0.4M ETT (2.0 mL), 苍耳烷氢化物 (1.2 当量), 吡 啶(2.0 mL)	纯净	室 温 持 续 3+2 小时。	350 mg (粗)	LCMS

[0695] 根据本文描述的用于制备二聚体化合物的方法制备多种核苷单体。

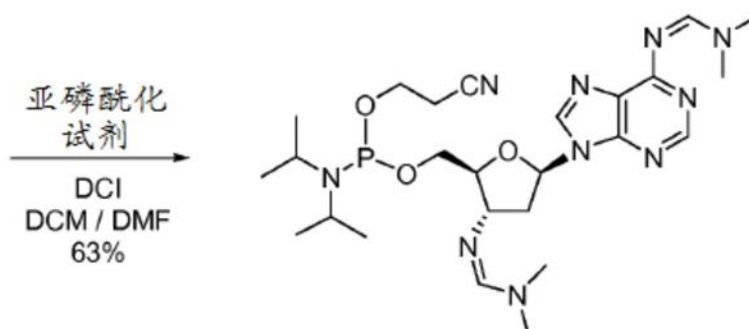
[0696] 方案6: 合成乙酰丙酸酯保护的单体



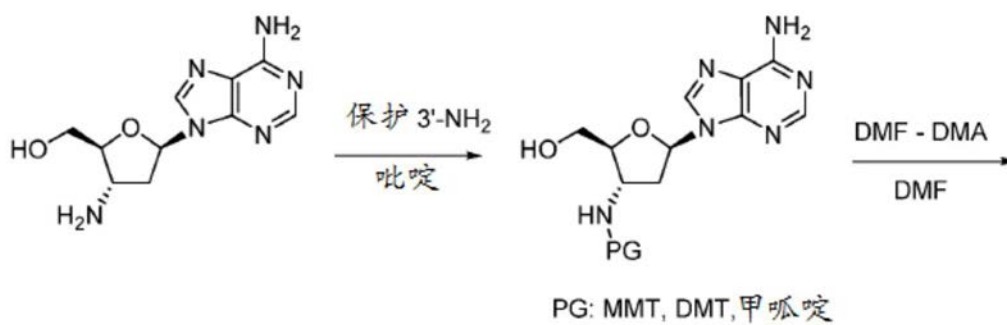
[0698] 方案7: 合成双DMF A亚酰胺化物



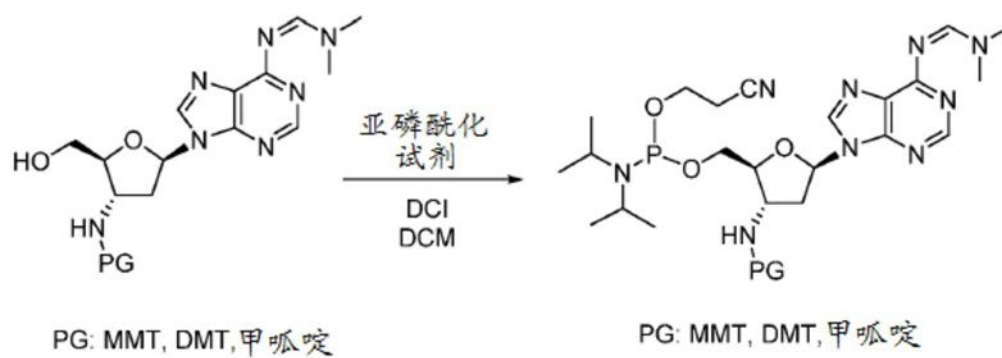
[0699]



[0700] 方案8:用于MMT、DMT和甲呱啉单体(A亚酰胺化物)的合成方案:



[0701]



[0702]

亚酰胺化物 $A^{dmf}$ (MMT)	3'-单甲氧基三苯甲基 氨基- $N_6$ -二甲基甲脒 基-2',3'-二脱氧腺苷 -5'-(2- 氟 基 乙 基 )- $N,N$ -二异丙基亚磷 酰胺	
亚酰胺化物 $A^{dmf}$ (甲呱啶)	3'-(二甲基取代的甲 呱啶)氨基- $N_6$ -二甲基 甲脒基-2',3'-二脱氧 腺苷-5'-(2- 氟 基 乙 基 )- $N,N$ -二异丙基亚磷 酰胺	
亚酰胺化物 $A^{dmf}$ (DMT)	3'-二甲氧基三苯甲基 氨基- $N_6$ -二甲基甲脒 基-2',3'-二脱氧腺苷 -5'-(2- 氟 基 乙 基 )- $N,N$ -二异丙基亚磷 酰胺	

[0703] 虽然本发明已经参考其特定实施方案进行了描述,但是本领域技术人员应理解,可以进行各种改变以及可进行等效物替换而不脱离本发明的真实精神和范围。此外,为了使特定的场合、材料、物质的组合物、方法、方法步骤或步骤适应本发明的目的、精神和范围,可以进行许多改进。所有此类修改意图处于所附权利要求书的范围内。

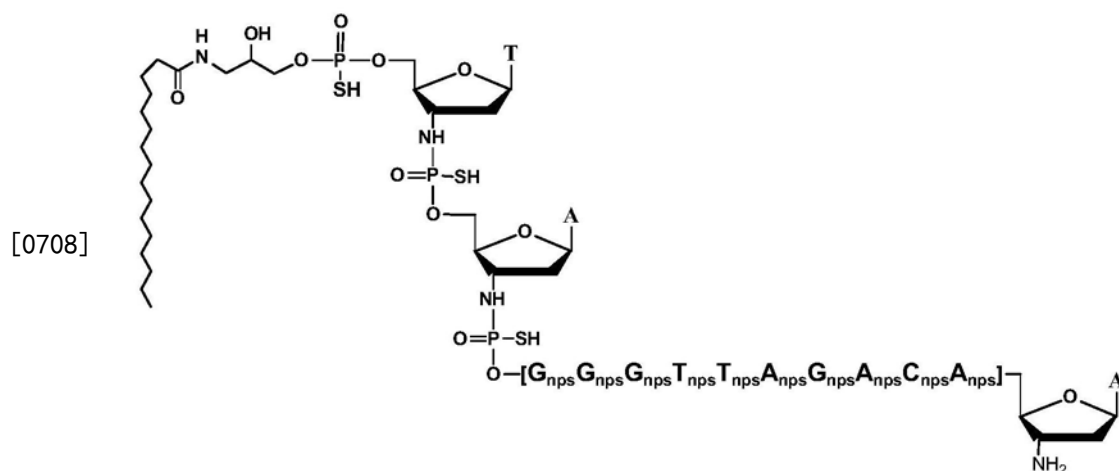
#### [0704] 实施方案

[0705] 本公开提供一种组合物,其具有相对于化合物或其盐少于4重量份中1重量份的(N-1)产物,其中所述化合物包括具有10个或更多个核苷亚基的序列的多核苷酸,并且至少两个所述核苷亚基通过  $N3' \rightarrow P5'$  磷酰胺酯亚基间键连接。在所述组合物的一些实施方案中, $N3' \rightarrow P5'$  磷酰胺酯亚基间键是具有结构:  $3' - NH - P(S)(OR) - O - 5'$  的  $N3' \rightarrow P5'$  硫代磷酰胺酯亚基间键,其中R选自由氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基组成的组;或其盐。

[0706] 在所述组合物的一些实施方案中,所述化合物包含具有10个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列的多核苷酸。在所述组合物的一些实施方案中,所述多核苷酸包含含有13个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列。在所述组合物的一些实施方案中,所述多核苷酸包含在3个与50个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基。在所述组合物的一些实施方案中,与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基均通过  $N3' \rightarrow P5'$  磷酰胺酯亚基间键连接。在所述组合物的一些实施方案中,多核苷酸包含选

自由以下组成的组的序列:GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4)、TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3) 和 CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:5)。在所述组合物的一些实施方案中,所述多核苷酸包含3' 氨基或3' -羟基端基。

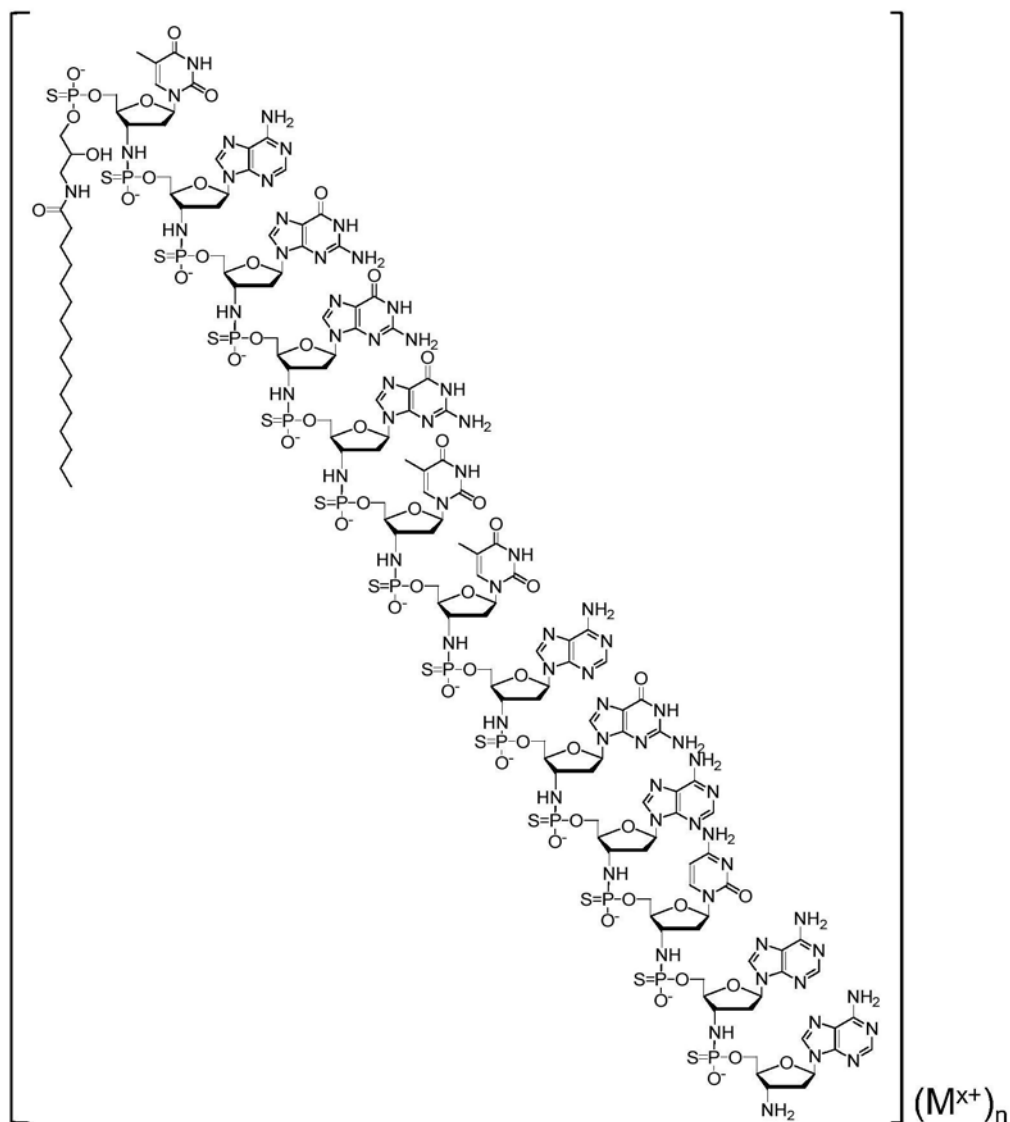
[0707] 在所述组合物的一些实施方案中,所述化合物具有结构:



[0709] 或其盐;其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接于相邻核苷的5'- 碳的硫代磷酸酯键联—NH—P(=O)(SH)—O—。在所述组合物的一些实施方案中,所述盐是药学上可接受的盐。

[0710] 在所述组合物的一些实施方案中,所述化合物具有结构:

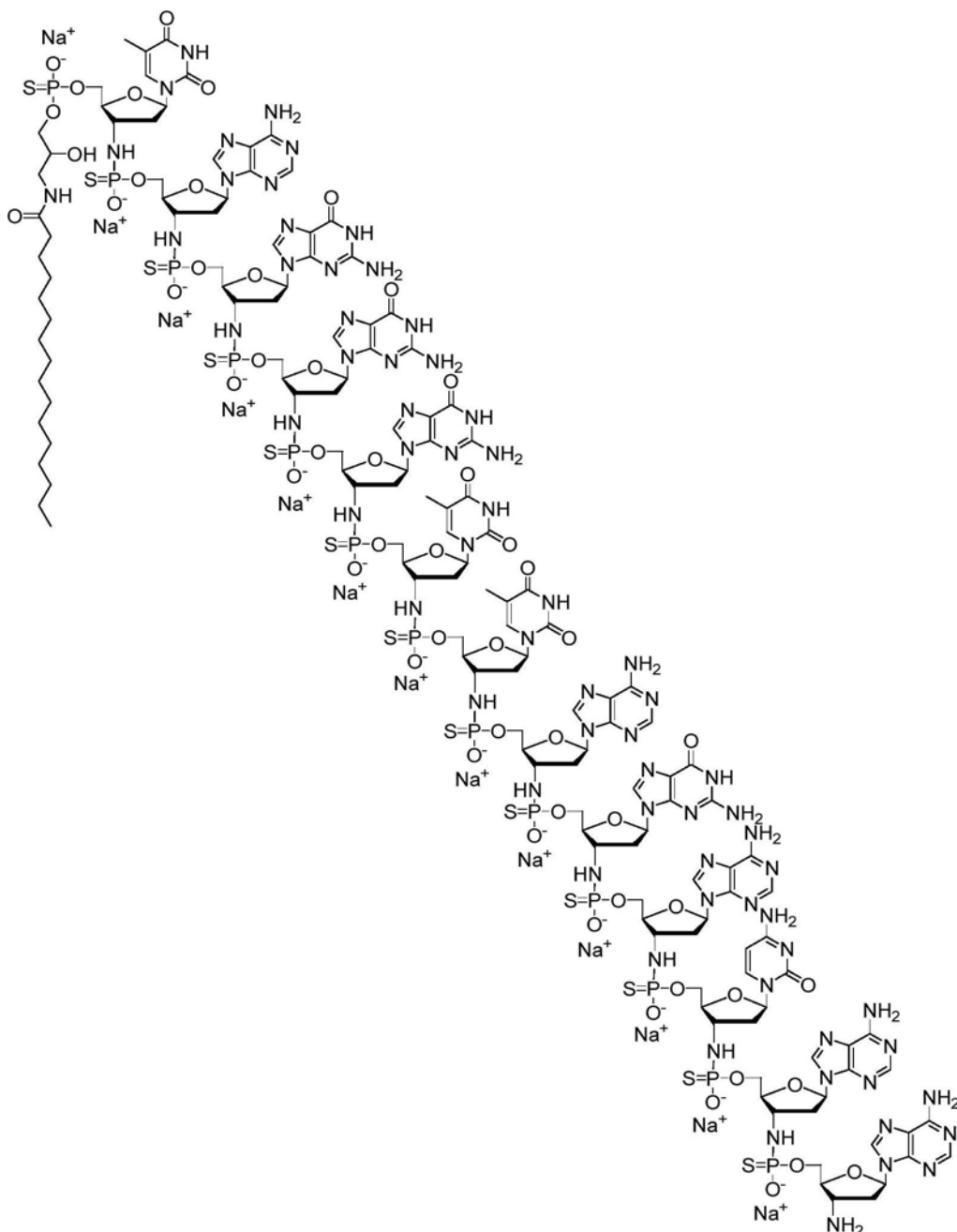
[0711]



[0712] 其中各 $M^{x+}$ 独立地是氢或盐的抗衡离子,各 $x$ 独立地是1、2或3,且 $n$ 是5至13的整数。  
在某些实例中, $M^{x+}$ 是氢。

[0713] 在所述组合物的一些实施方案中,所述化合物具有结构:





[0714]

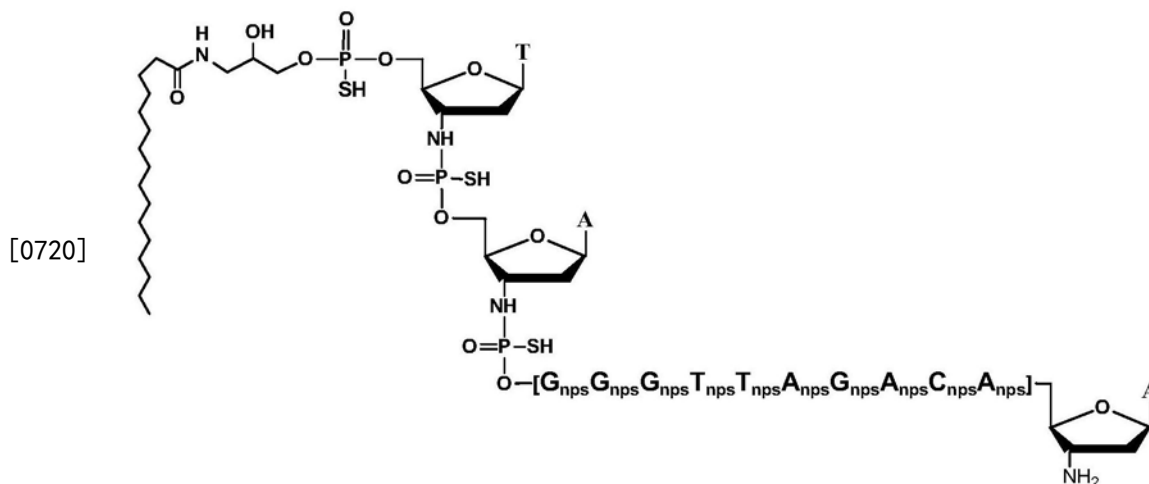
[0715] 在一些实施方案中,所述组合物具有相对于化合物少于6重量份中1重量份的(N-1)产物。在一些实施方案中,所述组合物具有相对于化合物少于10重量份中1重量份的(N-1)产物。在一些实施方案中,所述组合物具有相对于化合物少于20重量份中1重量份的(N-1)产物。在一些实施方案中,所述组合物具有相对于化合物少于4重量份中1重量份的任何(N-x)产物。在一些实施方案中,所述组合物具有相对于化合物少于100总重量份中40重量份的(N-x)含多核苷酸产物。在一些实施方案中,所述组合物具有(N-x)含多核苷酸产物的以下概况:相对于产物少于4重量份中1重量份的(N-1)产物;相对于化合物至少100重量份中10重量份的(N-2)和(N-3)产物。

[0716] 本公开提供一种具有少于11重量%的(N-1)产物的化合物活性药物成分,其中所述化合物或其药学上可接受的盐包含具有10个或更多个与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列的多核苷酸,其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'磷酸酯亚基间键联接。

[0717] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,与人端粒酶的 RNA组分互补的核苷亚基均通过N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联连接。在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,N3'→P5'磷酸酯亚基间键联是具有结构:3'—NH—P(S)(OR)—O—5'的硫代磷酸酯亚基间键联,其中R选自由氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基组成的组;或其药学上可接受的盐。

[0718] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,多核苷酸包含在 10个与50个之间的与人端粒酶的RNA组分互补的连续核苷亚基。在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,多核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:4); TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:3); 和CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO:5)。在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,多核苷酸包含3'氨基或3'-羟基端基。

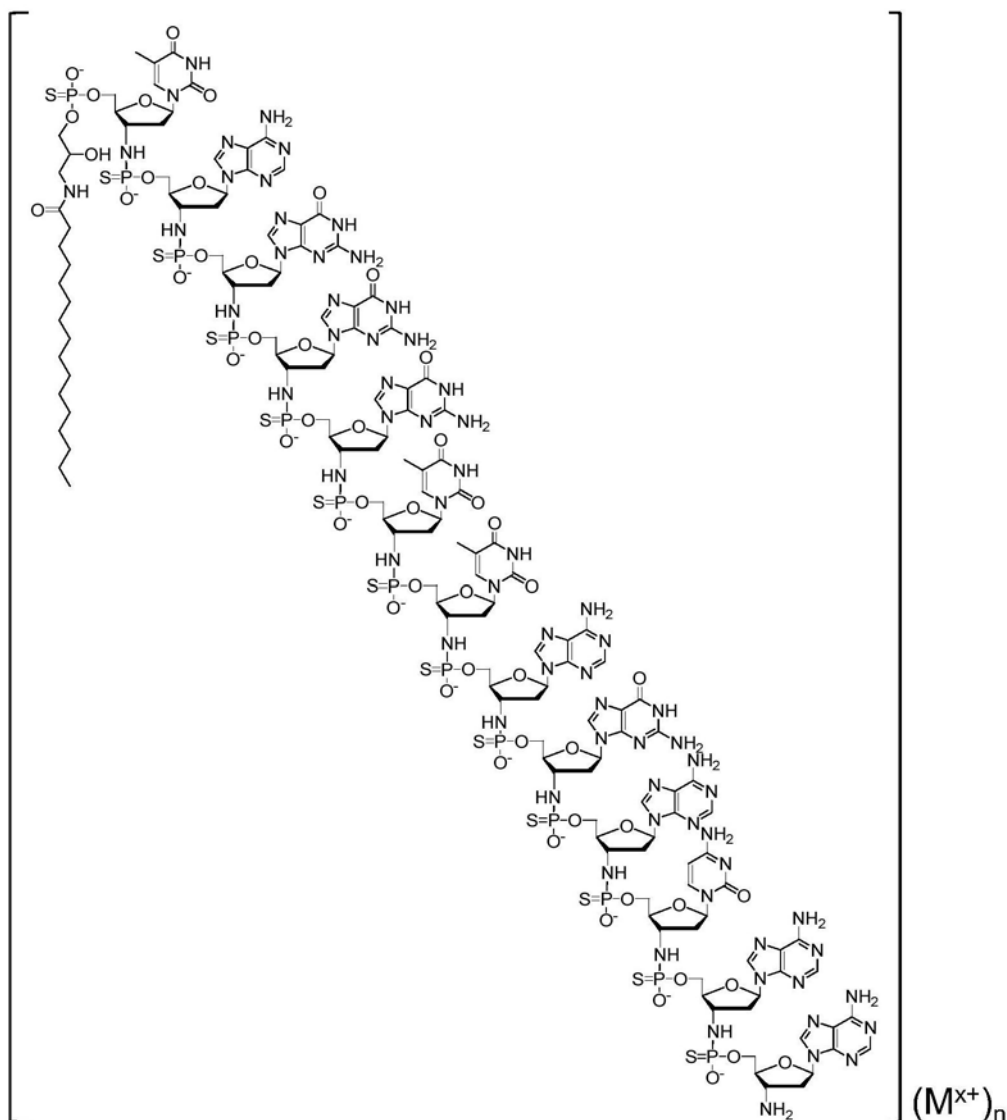
[0719] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,所述化合物具有结构:



[0721] 或其药学上可接受的盐;其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接于相邻核苷的5'-碳的硫代磷酸酯键联—NH—P(=O)(SH)—O—。

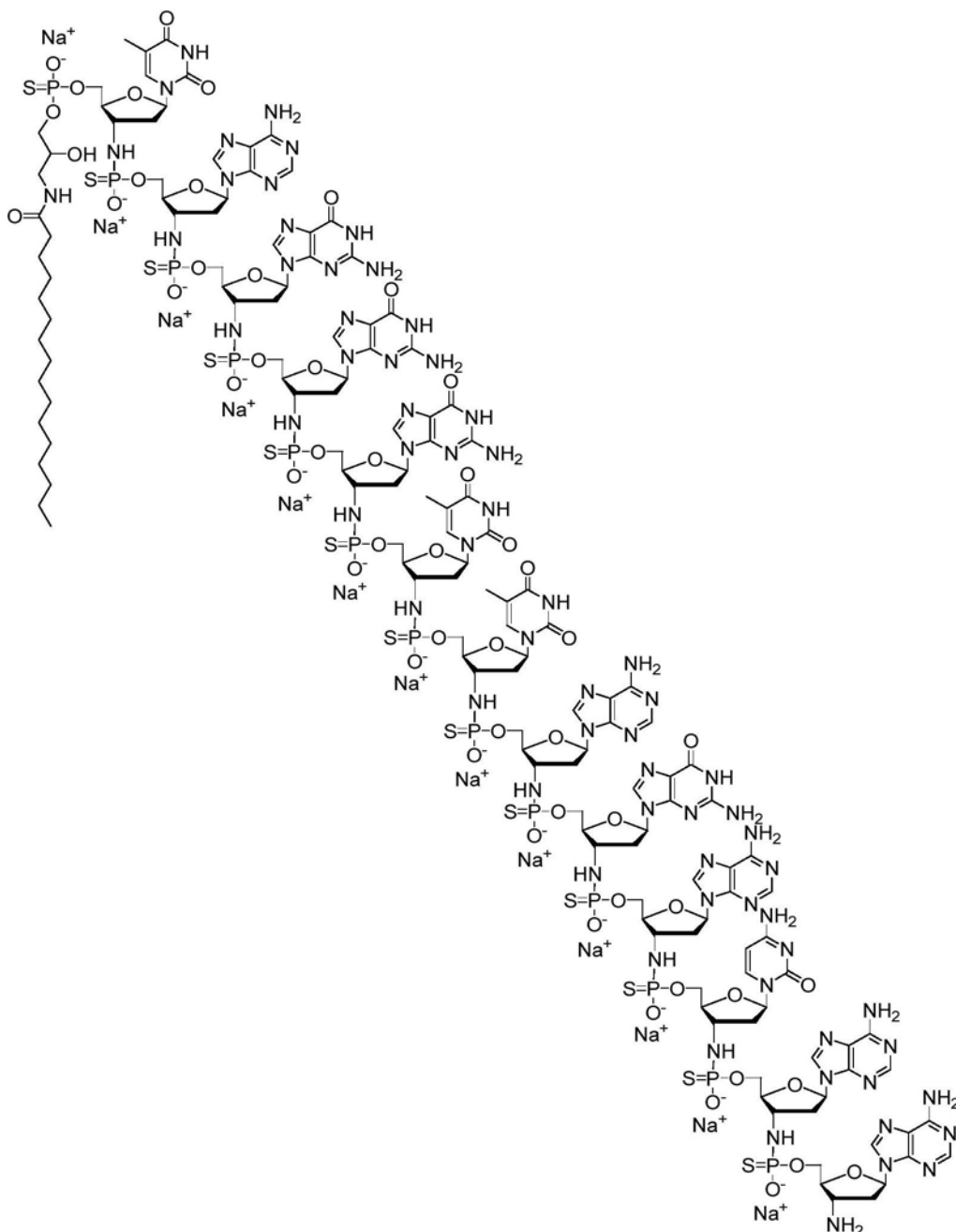
[0722] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,所述化合物具有结构:

[0723]



[0724] 其中各 $M^{x+}$ 独立地是氢或药学上可接受的盐的抗衡离子,各 $x$ 独立地是1、2或3,且 $n$ 是5至13的整数。在某些实例中, $M^{x+}$ 是氢。

[0725] 在所述化合物活性药物成分的一些实施方案中,所述化合物具有结构:



[0726]

[0727] 在一些实施方案中,所述化合物活性药物成分具有少于9重量%的(N-1)产物。在一些实施方案中,所述化合物活性药物成分具有少于5重量%的(N-1)产物。在一些实施方案中,所述化合物活性药物成分具有少于11%的任何(N-x)产物。在一些实施方案中,所述化合物活性药物成分具有少于45总重量%的(N-x)含多核苷酸产物。在一些实施方案中,所述化合物活性药物成分具有(N-x)含多核苷酸产物的以下概况:少于5重量%的(N-1)产物;以及至少10重量%的(N-2)和(N-3)产物。

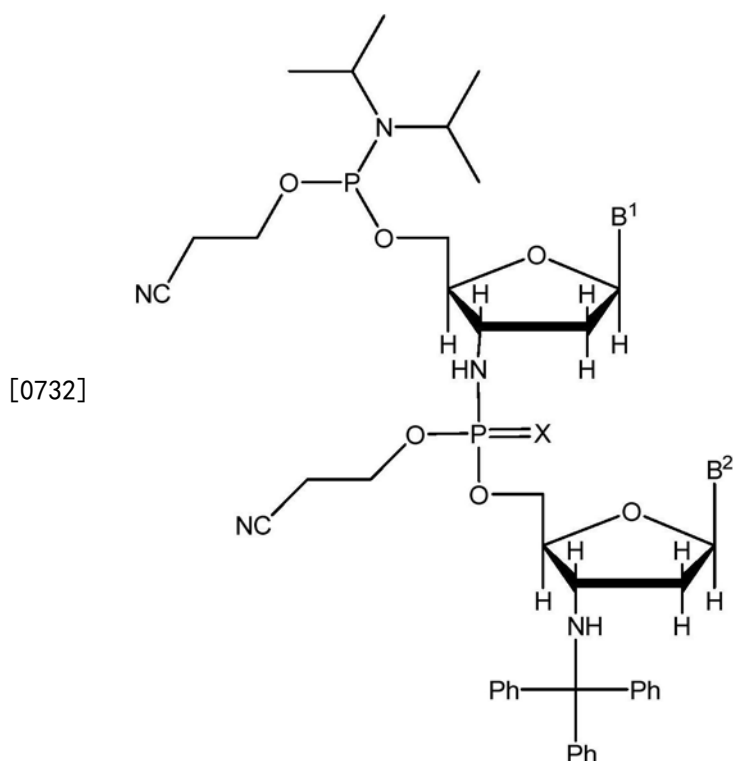
[0728] 还提供一种药物组合物,其包含于药学上可接受的赋形剂中配制的组合物(例如本文所述的任一实施方案的组合物)。还提供一种药物组合物,其包含于药学上可接受的赋形剂中配制的化合物活性药物成分(例如本文所述的任一实施方案的化合物活性药物成分)。

[0729] 本公开提供一种合成多核苷酸的方法。在一些实施方案中,所述方法包括以下步

骤：(a) 将连接于固相支撑物的末端核苷的受保护的 3' 氨基脱保护，所述脱保护形成游离 3' 氨基；(b) 使所述游离 3' 氨基与 3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酸酰胺酯-5'-亚磷酸胺二聚体在亲核催化剂存在下接触以形成核苷间 N3' → P5' 亚磷酸胺键联；以及 (c) 使所述键联氧化。

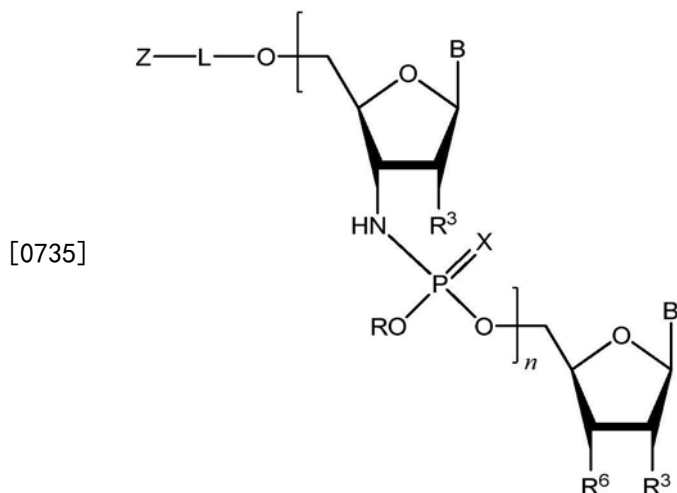
[0730] 在一些实施方案中，所述方法还包括：(a) 将连接于固相支撑物的末端核苷的受保护的 3' 氨基脱保护，所述脱保护形成游离 3' 氨基；(b) 使所述游离 3' 氨基与 3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酸胺单体在亲核催化剂存在下接触以形成核苷间 N3' → P5' 亚磷酸胺键联；以及 (c) 使所述键联氧化。在所述方法的一些实施方案中，使键联氧化包括硫化以产生硫代磷酸酯键联。在所述方法的一些实施方案中，使键联氧化产生氧代磷酸酯键联。

[0731] 在所述方法的一些实施方案中，3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酸酰胺酯-5'-亚磷酸胺二聚体具有式：



[0733] 其中 X 是 O 或 S，且 B<sup>1</sup> 和 B<sup>2</sup> 各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物。在所述方法的一些实施方案中，B<sup>1</sup> 和 B<sup>2</sup> 各自独立地选自受保护的腺嘌呤、受保护的胞嘧啶、受保护的鸟嘌呤、胸腺嘧啶以及尿嘧啶。在所述方法的一些实施方案中，B<sup>1</sup> 和 B<sup>2</sup> 各自独立地选自 A (Bz)、A (DMF)、C (Bz)、G (异丁酰基)、T 以及 U。在所述方法的一些实施方案中，X 是 S。

[0734] 在所述方法的一些实施方案中，多核苷酸具有式：



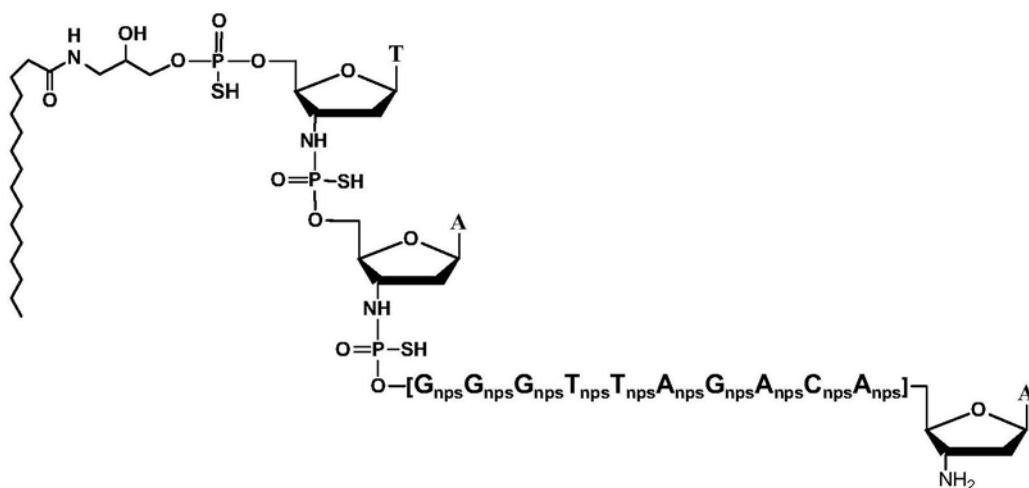
[0736] 其中：各B独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物；各X独立地是氧或硫；各R<sup>3</sup>是氢、氟基或羟基、烷氧基、取代的烷氧基或受保护的羟基；L是任选的接头；Z是H、脂质、支撑物、载体、寡核苷酸、PEG、多肽、可检测标记或标签；R<sup>6</sup>是氨基、羟基、受保护的氨基、受保护的羟基、-O-L-Z或-NH-L-Z；R是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基；且n是 1至1000的整数；或其盐；并且所述方法包括以下步骤：(a) 将连接于固相支撑物的末端核苷的受保护的3'氨基脱保护，所述脱保护形成游离3'氨基；(b) 使所述游离3'氨基与 (i) 3'-受保护的氨基-二核苷酸磷酸酰胺酯-5'-亚磷酸二聚体；或

[0737] (ii) 3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酸单体两者之一在亲核催化剂存在下反应以形成核苷间N3'→P5'亚磷酸键联；(c) 使所述键联氧化；以及 (d) 重复步骤 (a) 至 (c) 直至合成所述多核苷酸，其中重复步骤 (a) 至 (c) 包括进行步骤 (b) (i) 至少一次。

[0738] 在所述方法的一些实施方案中，使键联氧化包括硫化以产生硫代磷酸酯键联。在所述方法的一些实施方案中，使键联氧化产生氧代磷酸酯键联。在所述方法的一些实施方案中，多核苷酸包含具有与人端粒酶的RNA组分互补的核苷亚基的序列，并且其中至少两个核苷亚基通过N3'→P5'磷酸酯亚基间键联连接。在所述方法的一些实施方案中，N3'→P5'磷酸酯亚基间键联是具有结构：3'-NH-P(S)(OR)-O-5'的N3'→P5'硫代磷酸酯亚基间键联，其中R选自由氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基和磷酸酯保护基组成的组；或其盐。

[0739] 在所述方法的一些实施方案中，多核苷酸包含序列 TAGGGTTAGACAA。在所述方法的一些实施方案中，TAGGGTTAGACAA序列的所有核苷酸间亚基间键联均是N3'→P5'磷酸酯亚基间键联。在所述方法的一些实施方案中，多核苷酸具有结构：

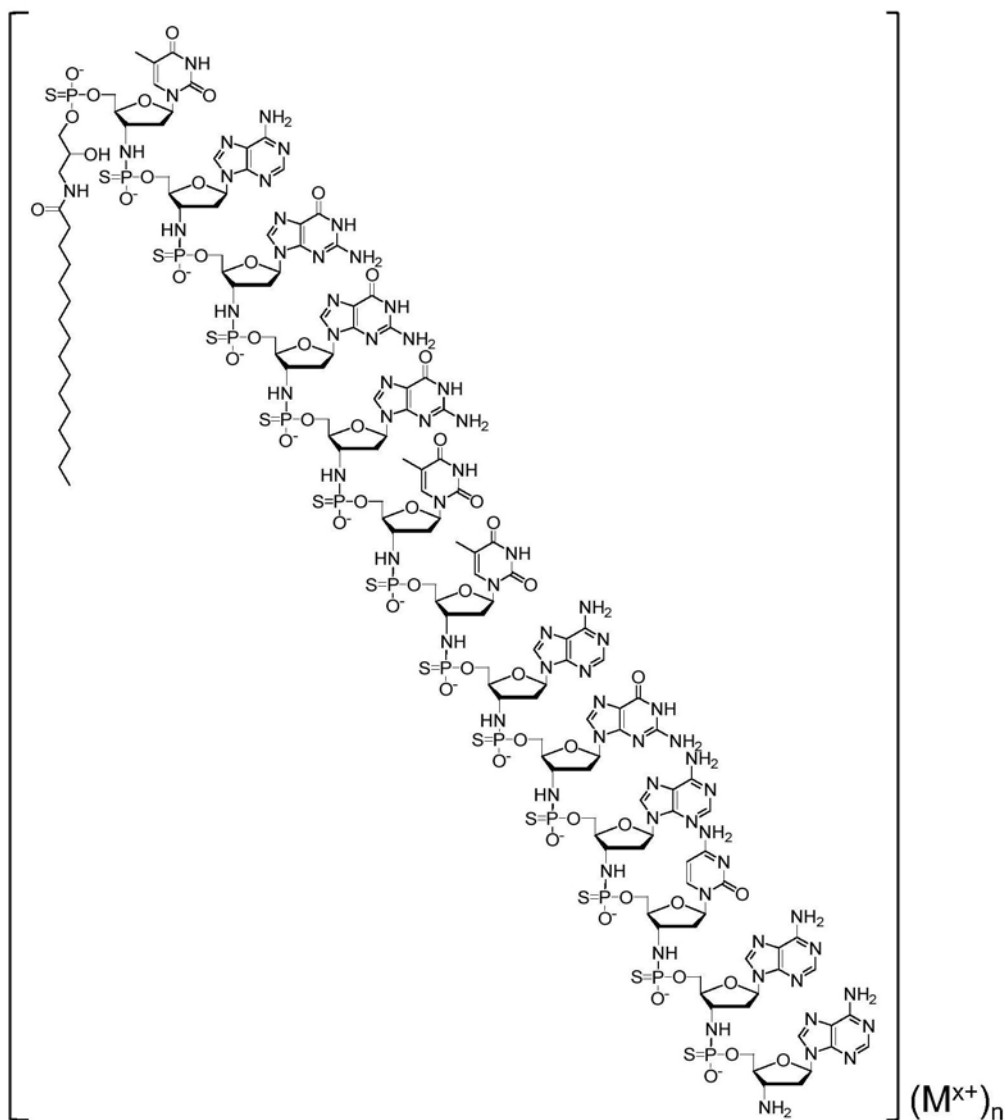
[0740]



[0741] 或其盐；其中“nps”表示使一个核苷的3'-碳连接于相邻核苷的5'-碳的硫代磷酸酯键联—NH—P(=O)(SH)—O—。

[0742] 在所述方法的一些实施方案中，多核苷酸具有结构：

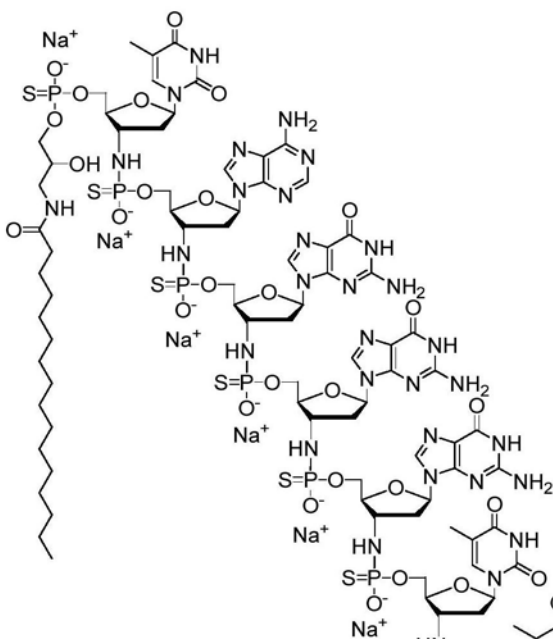
[0743]



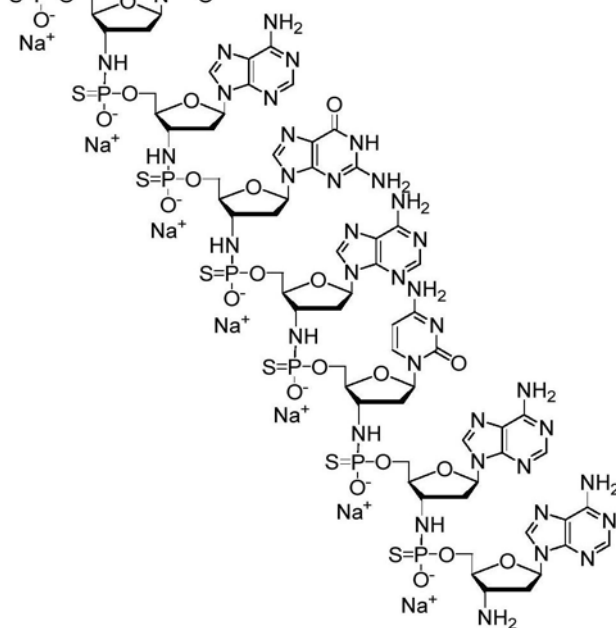
[0744] 其中各 $M^{x+}$ 独立地是氢或药学上可接受的盐的抗衡离子，各 $x$ 独立地是1、2或3，且 $n$

是5至13的整数。在某些实例中， $M^{x+}$ 是氢。

[0745] 在所述方法的一些实施方案中，多核苷酸具有结构：



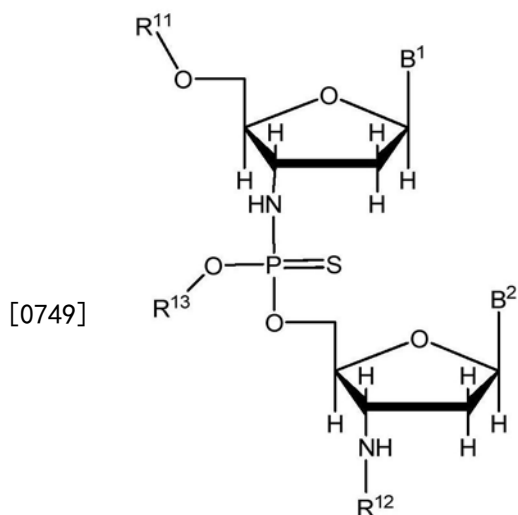
[0746]



[0747] 在所述方法的一些实施方案中，TAGGGTTAGACAA序列的C11 核苷酸残基由3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体获得。在一些实施方案中，所述方法包括使以下3'-受保护的氨基-二核苷酸硫代磷酰胺酯-5'-亚磷酰胺二聚体TA、GG、GT、TA、GA和AA以及3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺单体C依次偶联于固相支撑物。在所述方法的一些实施方案中，3'-受保护的氨基-二核苷酸亚磷酰胺-5'-亚磷酰胺二聚体由式 $X^1X^2$ 所述，其中 $X^1$ 和 $X^2$ 独立地选自受保护的腺嘌呤、受保护的胞嘧啶、受保护的鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。在所述方法的一些实施方案中，3'-受保护的氨基核苷-5'-亚磷酰胺二聚体选自受保护的腺嘌呤、受保护的胞嘧啶、受保护的鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。

[0748] 本公开提供一种由式(II)描述的二核苷酸硫代磷酰胺酯化合物：





式(II)

[0750] 其中： $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地是嘌呤、受保护的嘌呤、嘧啶或受保护的嘧啶或其类似物； $R^{11}$ 是氢、保护基或亚磷酰胺基团；且 $R^{12}$ 和  $R^{13}$ 各自独立地是氢或保护基；或其盐。

[0751] 在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地选自受保护的腺嘌呤、受保护的胞嘧啶、受保护的鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 和 $B^2$ 各自独立地选自A (Bz)、A (DMF)、C (Bz)、G (异丁酰基)、T和U。在所述化合物的一些实施方案中， $R^{11}$ 是5'-亚磷酰胺； $R^{12}$ 是保护基，且 $R^{13}$ 是保护基。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是A (Bz) 或A (DMF)，且 $B^2$ 是A (Bz) 或 A (DMF)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是A (Bz) 或A (DMF)，且 $B^2$ 是C (Bz)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是A (Bz) 或 A (DMF)，且 $B^2$ 是G (异丁酰基)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是A (Bz) 或A (DMF)，且 $B^2$ 是T。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是A (Bz) 或A (DMF)，且 $B^2$ 是U。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是C (Bz)，且 $B^2$ 是A (Bz) 或A (DMF)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是C (Bz)，且 $B^2$ 是C (Bz)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是C (Bz)，且 $B^2$ 是G (异丁酰基)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是C (Bz)，且 $B^2$ 是T。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是C (Bz)，且 $B^2$ 是U。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是G (异丁酰基)，且  $B^2$ 是A (Bz) 或A (DMF)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是G (异丁酰基)，且 $B^2$ 是C (Bz)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是G (异丁酰基)，且 $B^2$ 是G (异丁酰基)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是G (异丁酰基)，且 $B^2$ 是T。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是G (异丁酰基)，且 $B^2$ 是U。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是T或U，且 $B^2$ 是A (Bz) 或A (DMF)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是T或U，且 $B^2$ 是C (Bz)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是T或U，且 $B^2$ 是G (异丁酰基)。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是T或U，且 $B^2$ 是T。在所述化合物的一些实施方案中， $B^1$ 是T或U，且 $B^2$ 是U。

[0752] 以上指示的实施方案的所有可能的组合均被认为包括于本发明的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> P·H·拉米亚
- [0003] <120> 寡核苷酸组合物及其制备方法
- [0004] <130> GERN-185W0
- [0005] <150> US 61/987,396
- [0006] <151> 2014-05-01
- [0007] <150> US 62/151,909
- [0008] <151> 2015-04-23
- [0009] <160> 19
- [0010] <170> FastSEQ Windows版本4.0
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 451
- [0013] <212> RNA
- [0014] <213> 智人
- [0015] <220>
- [0016] <223> 合成多核苷酸
- [0017] <400> 1
- [0018] gggugcgga gggugggccu gggaggggug guggccauuu uuugucuaac ccuaacugag 60
- [0019] aagggcgugag gcgccgugcu uuugcucucc gcgcgcuguu uuucucgcug acuuucagcg 120
- [0020] ggcggaaaag ccucggccug ccgccuucca ccguucauuc uagagcaaac aaaaaauguc 180
- [0021] agcugcuggc ccguucgccc cucccgggga ccugcgggcg gucgccugcc cagccccga 240
- [0022] accccgccug gaggccgcgg ucggcccggg gcuucuccgg aggcacccac ugccaccgcg 300
- [0023] aagaguuggg cucugucagc cgcgggguc ucgggggcca gggcgagguu caggccuuuc 360
- [0024] aggccgcagg aagaggaacg gagcgagucc ccgcgcgcgg cgcgauuccc ugagcugugg 420
- [0025] gacgugcacc caggacucgg cucacacaug c 451
- [0026] <210> 2
- [0027] <211> 11
- [0028] <212> RNA
- [0029] <213> 人工序列
- [0030] <220>
- [0031] <223> 合成多核苷酸
- [0032] <400> 2
- [0033] cuaaccuaa c 11
- [0034] <210> 3
- [0035] <211> 13
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> 人工序列
- [0038] <220>

---

[0039]	<223> 合成多核苷酸
[0040]	<400> 3
[0041]	tagggttaga caa 13
[0042]	<210> 4
[0043]	<211> 11
[0044]	<212> DNA
[0045]	<213> 人工序列
[0046]	<220>
[0047]	<223> 合成多核苷酸
[0048]	<400> 4
[0049]	gttagggtta g 11
[0050]	<210> 5
[0051]	<211> 13
[0052]	<212> DNA
[0053]	<213> 人工序列
[0054]	<220>
[0055]	<223> 合成多核苷酸
[0056]	<400> 5
[0057]	cagttagggt tag 13
[0058]	<210> 6
[0059]	<211> 30
[0060]	<212> DNA
[0061]	<213> 人工序列
[0062]	<220>
[0063]	<223> 合成多核苷酸
[0064]	<400> 6
[0065]	gctctagaat gaacggtgga aggcggcagg 30
[0066]	<210> 7
[0067]	<211> 15
[0068]	<212> DNA
[0069]	<213> 人工序列
[0070]	<220>
[0071]	<223> 合成多核苷酸
[0072]	<400> 7
[0073]	gtggaaggcg gcagg 15
[0074]	<210> 8
[0075]	<211> 13
[0076]	<212> DNA
[0077]	<213> 人工序列

---

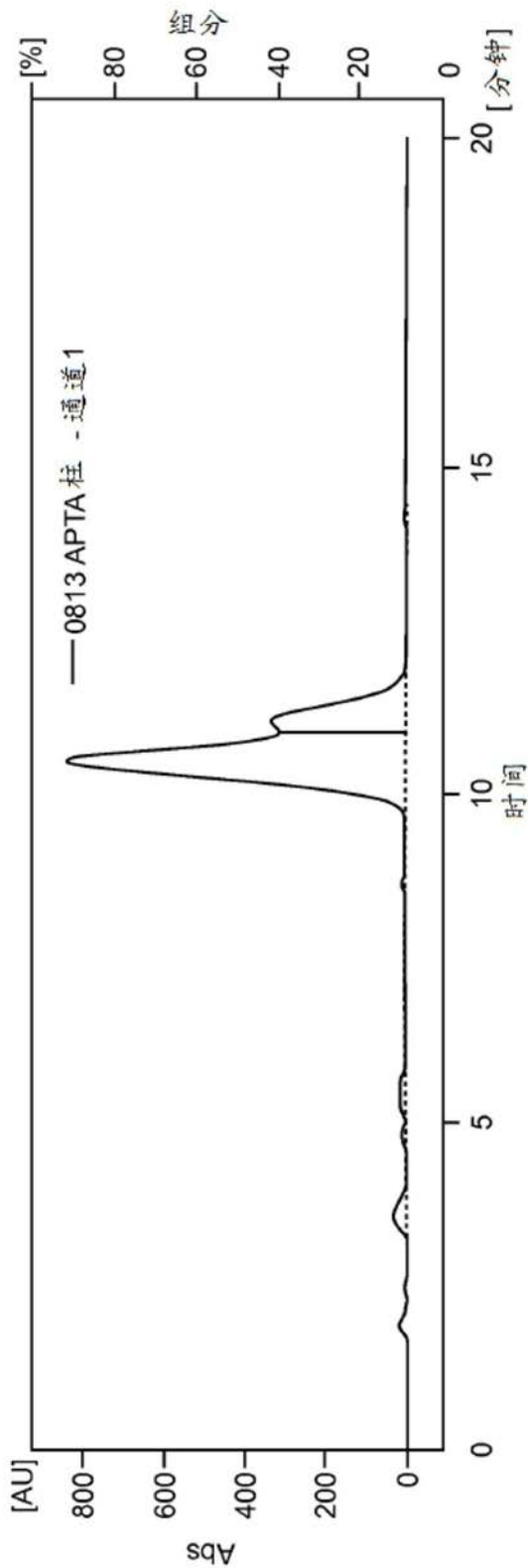
[0078]	<220>
[0079]	<223> 合成多核苷酸
[0080]	<400> 8
[0081]	ggaaggcggc agg 13
[0082]	<210> 9
[0083]	<211> 13
[0084]	<212> DNA
[0085]	<213> 人工序列
[0086]	<220>
[0087]	<223> 合成多核苷酸
[0088]	<400> 9
[0089]	gtggaaggcg gca 13
[0090]	<210> 10
[0091]	<211> 11
[0092]	<212> DNA
[0093]	<213> 人工序列
[0094]	<220>
[0095]	<223> 合成多核苷酸
[0096]	<400> 10
[0097]	gtggaaggcg g 11
[0098]	<210> 11
[0099]	<211> 13
[0100]	<212> DNA
[0101]	<213> 人工序列
[0102]	<220>
[0103]	<223> 合成多核苷酸
[0104]	<400> 11
[0105]	cgggtggaagg cgg 13
[0106]	<210> 12
[0107]	<211> 13
[0108]	<212> DNA
[0109]	<213> 人工序列
[0110]	<220>
[0111]	<223> 合成多核苷酸
[0112]	<400> 12
[0113]	acgggtggaag gcg 13
[0114]	<210> 13
[0115]	<211> 16
[0116]	<212> DNA

---

[0117]	<213> 人工序列
[0118]	<220>
[0119]	<223> 合成多核苷酸
[0120]	<400> 13
[0121]	aacggtggaa ggcggc 16
[0122]	<210> 14
[0123]	<211> 18
[0124]	<212> DNA
[0125]	<213> 人工序列
[0126]	<220>
[0127]	<223> 合成多核苷酸
[0128]	<400> 14
[0129]	atgaacggtg gaaggcgg 18
[0130]	<210> 15
[0131]	<211> 20
[0132]	<212> DNA
[0133]	<213> 人工序列
[0134]	<220>
[0135]	<223> 合成多核苷酸
[0136]	<400> 15
[0137]	acattttttg tttgctctag 20
[0138]	<210> 16
[0139]	<211> 13
[0140]	<212> DNA
[0141]	<213> 人工序列
[0142]	<220>
[0143]	<223> 合成多核苷酸
[0144]	<400> 16
[0145]	gtaggggta gac 13
[0146]	<210> 17
[0147]	<211> 15
[0148]	<212> DNA
[0149]	<213> 人工序列
[0150]	<220>
[0151]	<223> 合成多核苷酸
[0152]	<400> 17
[0153]	gtaggggta gacaa 15
[0154]	<210> 18
[0155]	<211> 12

---

[0156]	<212>	DNA
[0157]	<213>	人工序列
[0158]	<220>	
[0159]	<223>	合成多核苷酸
[0160]	<400>	18
[0161]		cccttctcag tt 12
[0162]	<210>	19
[0163]	<211>	12
[0164]	<212>	DNA
[0165]	<213>	人工序列
[0166]	<220>	
[0167]	<223>	合成多核苷酸
[0168]	<400>	19
[0169]		cgcccttctc ag 12



结果表(Uncal - 0813 APTA 柱 - 通道1)

	保留时间 [分钟]	面积 [mV.s]	高度 [mV]	面积 [%]
1	3.557	926.835	32.478	2.2
2	4.853	248.330	7.706	0.6
3	5.427	430.800	12.110	1.0
4	8.593	12.505	0.485	0.0
5	10.503	30344.332	839.556	73.4
6	11.120	9320.006	331.485	22.6
7	14.610	41.645	1.230	0.1
	总计	41324.453	1225.050	100.0

图1A

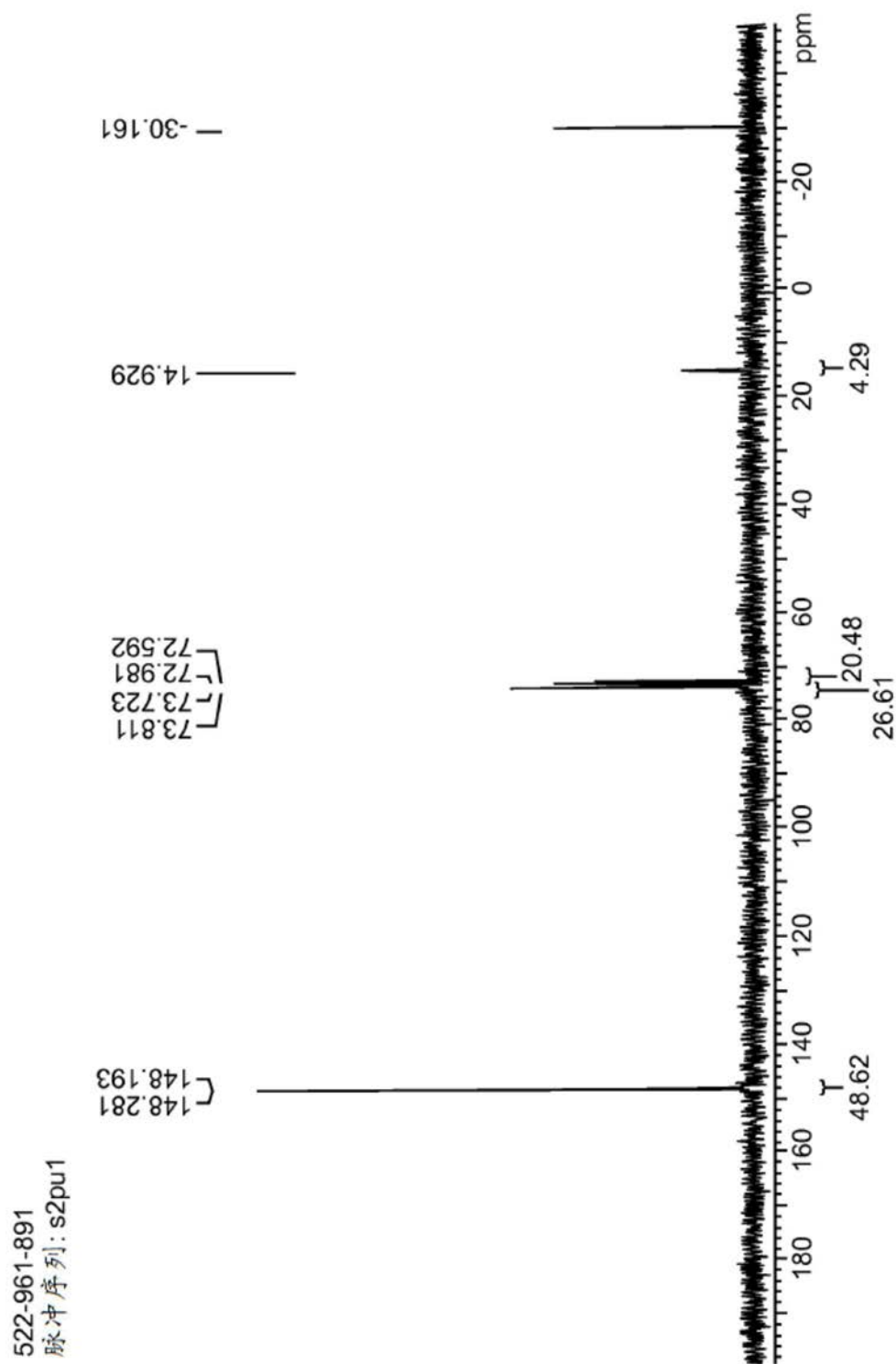
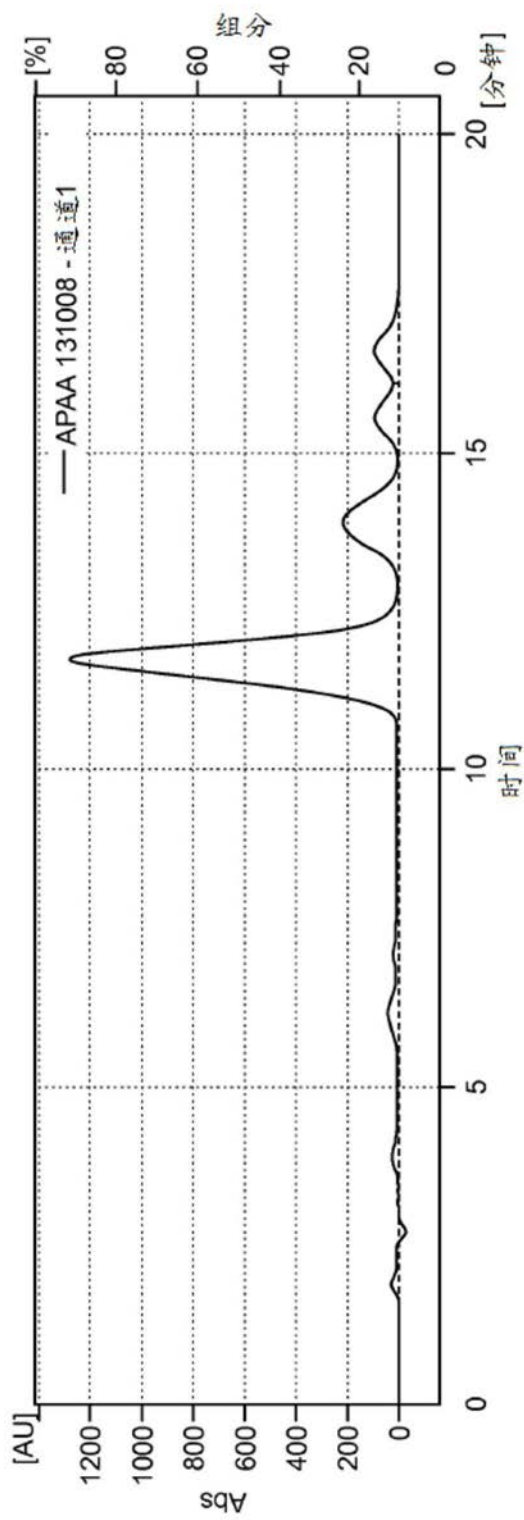


图1B





结果表 (Uncal - APAA 131008 - 通道1)

	保留时间 [分钟]	面积 [mV.s]	高度 [mV]	面积 [%]
1	3.890	683.024	21.161	0.9
2	6.157	1547.356	37.841	2.1
3	7.043	832.950	15.650	1.1
4	9.713	33.979	0.981	0.0
5	11.740	53142.367	1282.119	71.5
6	13.903	10883.314	214.185	14.6
7	15.543	3501.138	93.342	4.7
8	16.587	3742.492	93.843	5.0
	总计	74366.620	1759.121	100.0

图2A

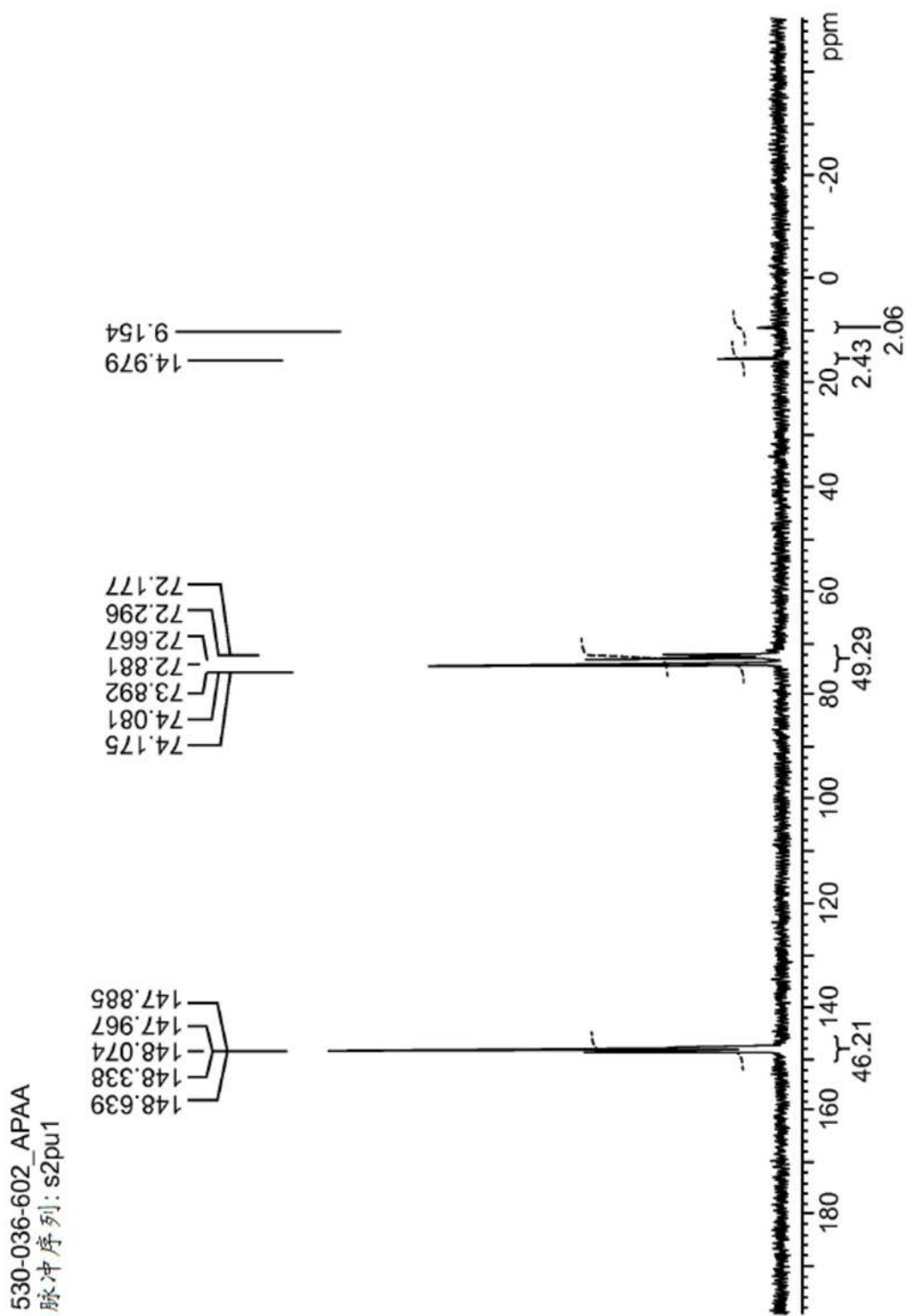
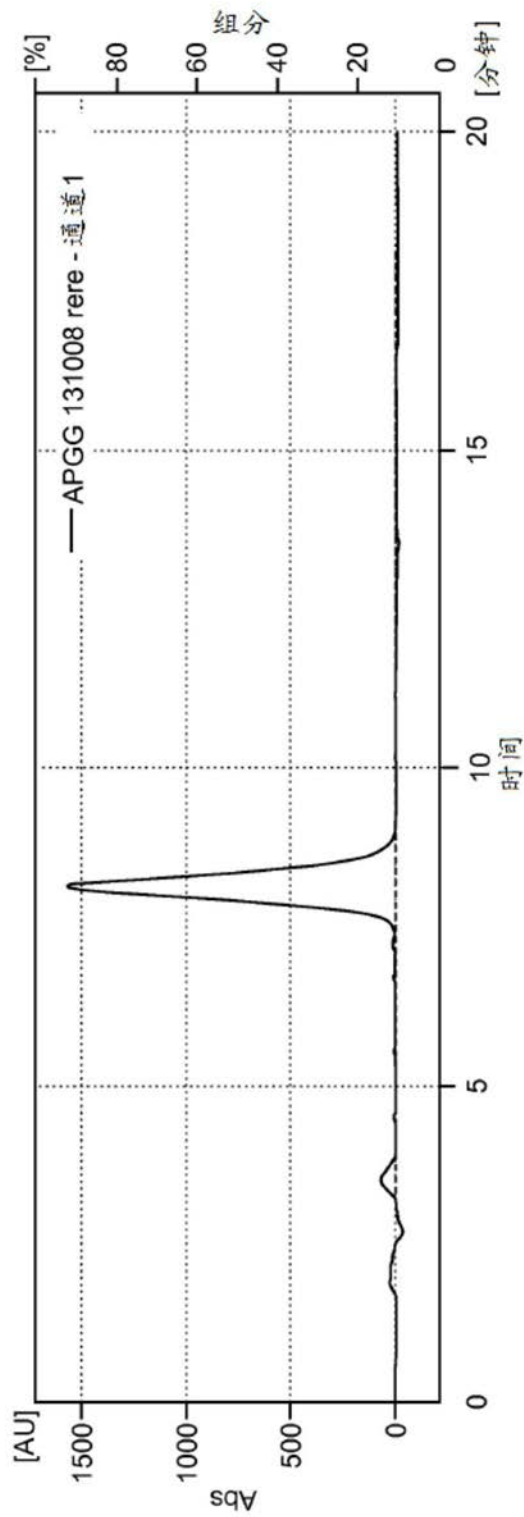


图2B



结果表(Uncal - APEG 131008 rere - 通道1)

	保留时间 [分钟]	面积 [mV.s]	高度 [mV]	面积 [%]
1	3.530	1726.515	70.546	3.6
2	4.473	167.636	5.052	0.3
3	5.543	111.014	4.805	0.2
4	6.220	84.336	3.982	0.2
5	7.487	387.810	16.415	0.8
6	8.120	45390.847	1580.744	94.5
7	10.147	31.679	1.149	0.1
8	11.213	111.591	3.775	0.2
	总计	48011.427	1686.468	100.0

图3A

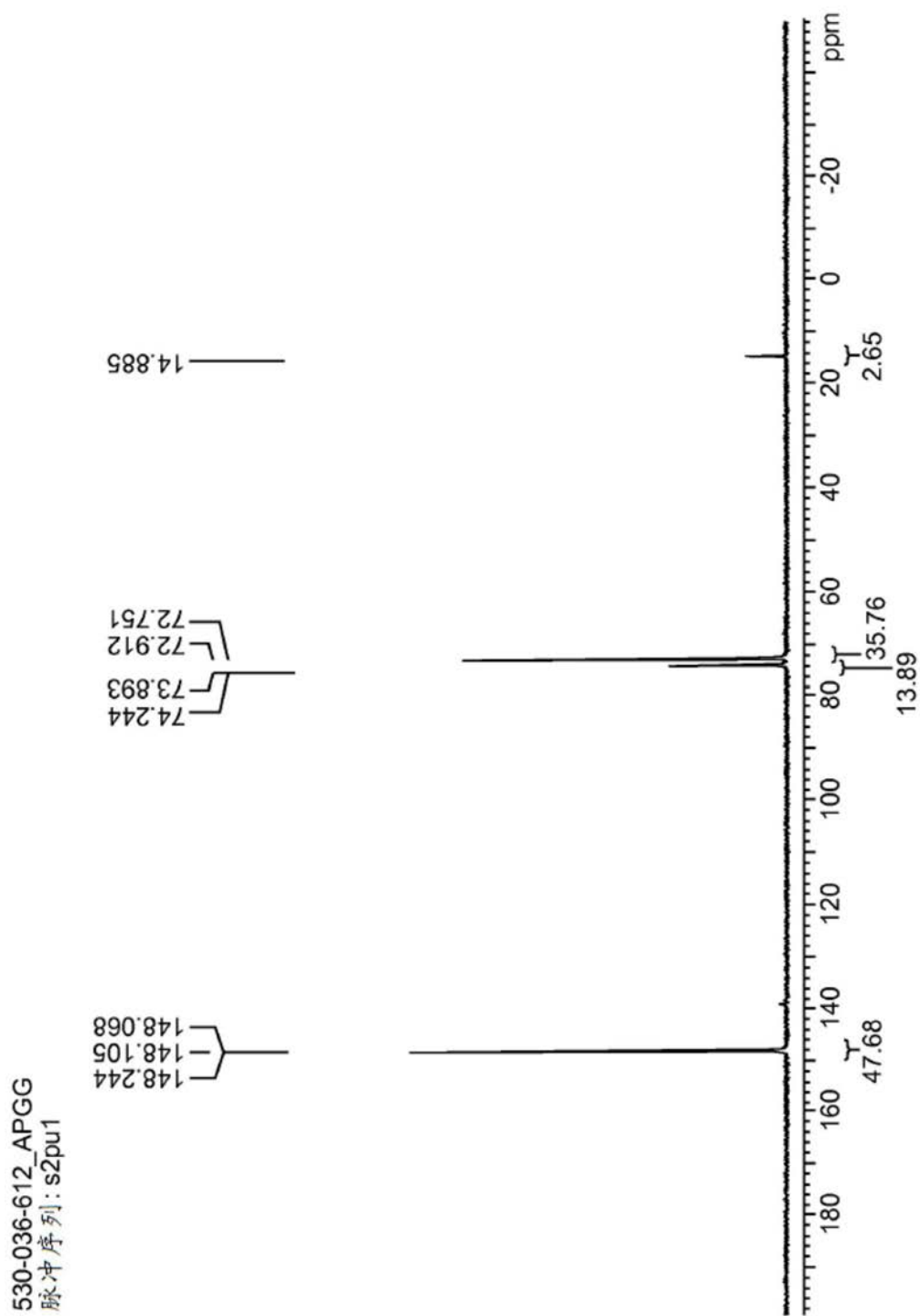
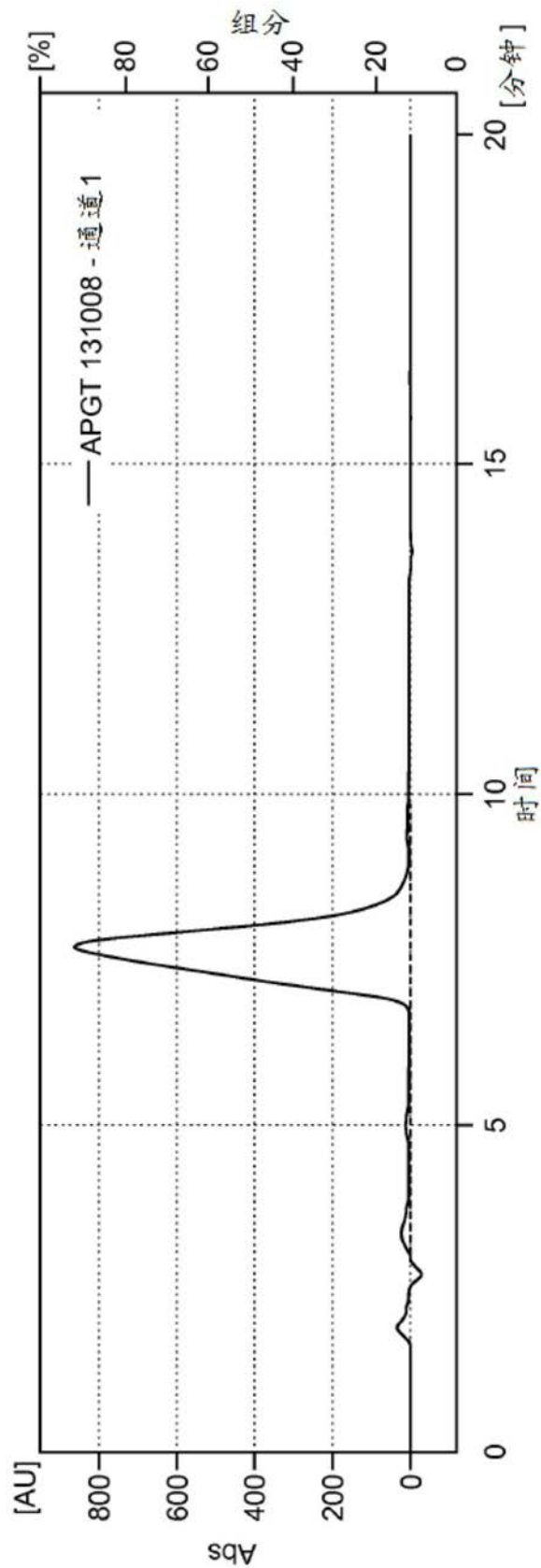


图3B



结果表(Uncal - APTG 131008 - 通道1)

	保留时间 [分钟]	面积 [mV.s]	高度 [mV]	面积 [%]
1	3.333	944.000	23.530	2.1
2	4.980	412.032	9.308	0.9
3	5.543	321.186	6.399	0.7
4	7.650	42081.239	864.466	95.3
5	9.353	388.891	5.485	0.9
总计		44147.348	909.188	100.0

图4A

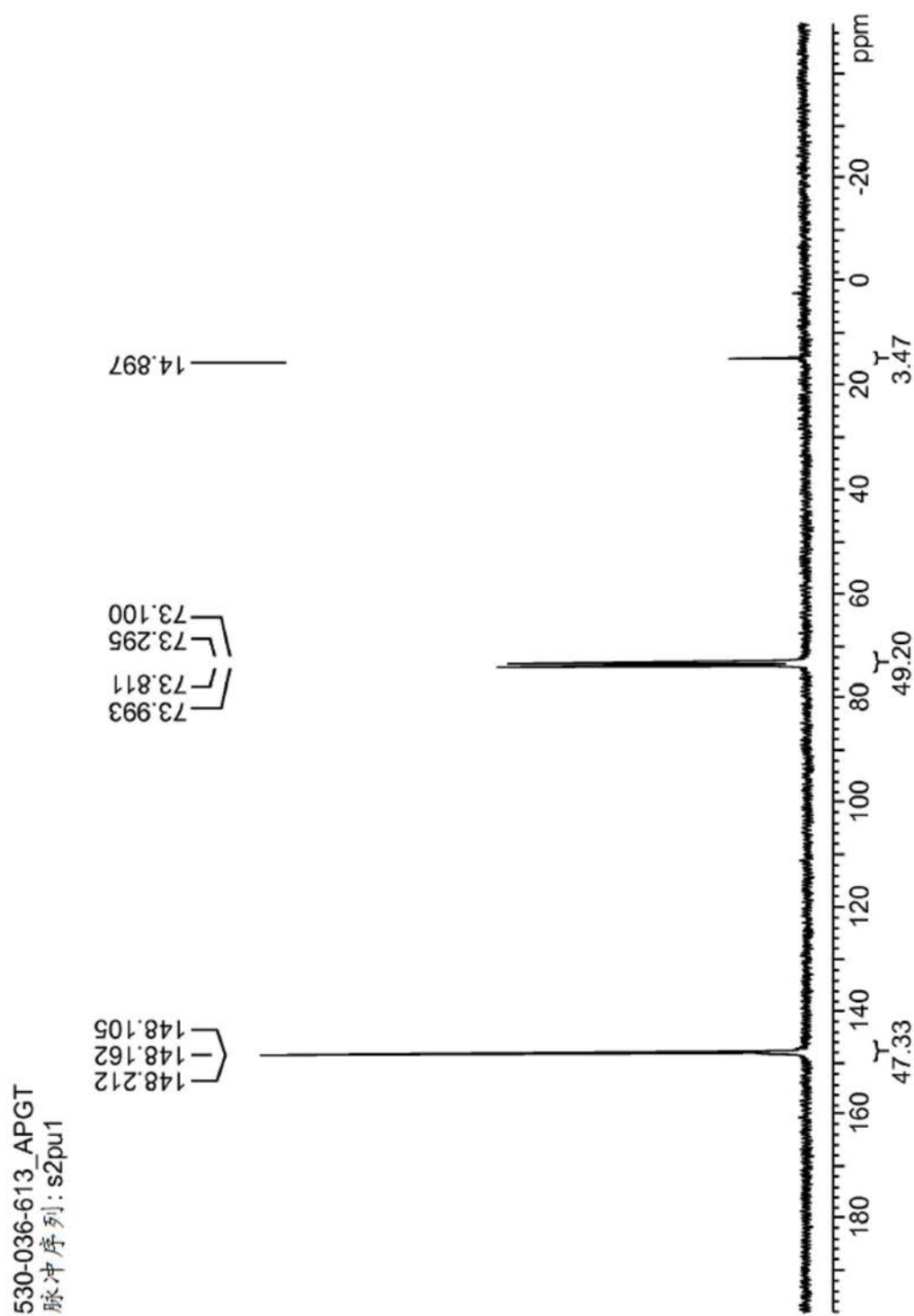
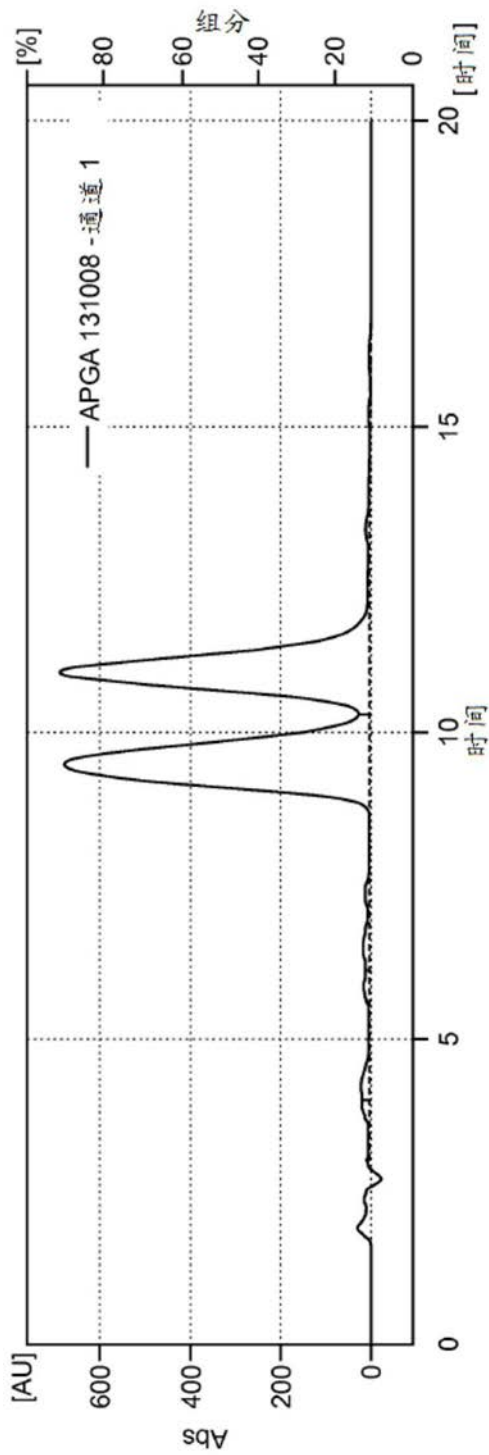


图4B



结果表(Uncal - APGT 131008 - 通道1)

	保留时间 [分钟]	面积 [mV.s]	高度 [mV]	面积 [%]
1	3.940	244.344	14.351	0.4
2	4.233	539.181	16.577	0.9
3	5.843	297.336	10.208	0.5
4	6.467	496.091	13.150	0.8
5	7.343	245.806	7.818	0.4
6	9.463	30522.359	670.507	51.8
7	10.980	26153.247	679.925	44.4
8	13.297	175.913	5.393	0.3
9	15.070	90.029	2.819	0.2
10	16.083	106.327	2.935	0.2
	总计	58870.634	1423.682	100.0

图5A

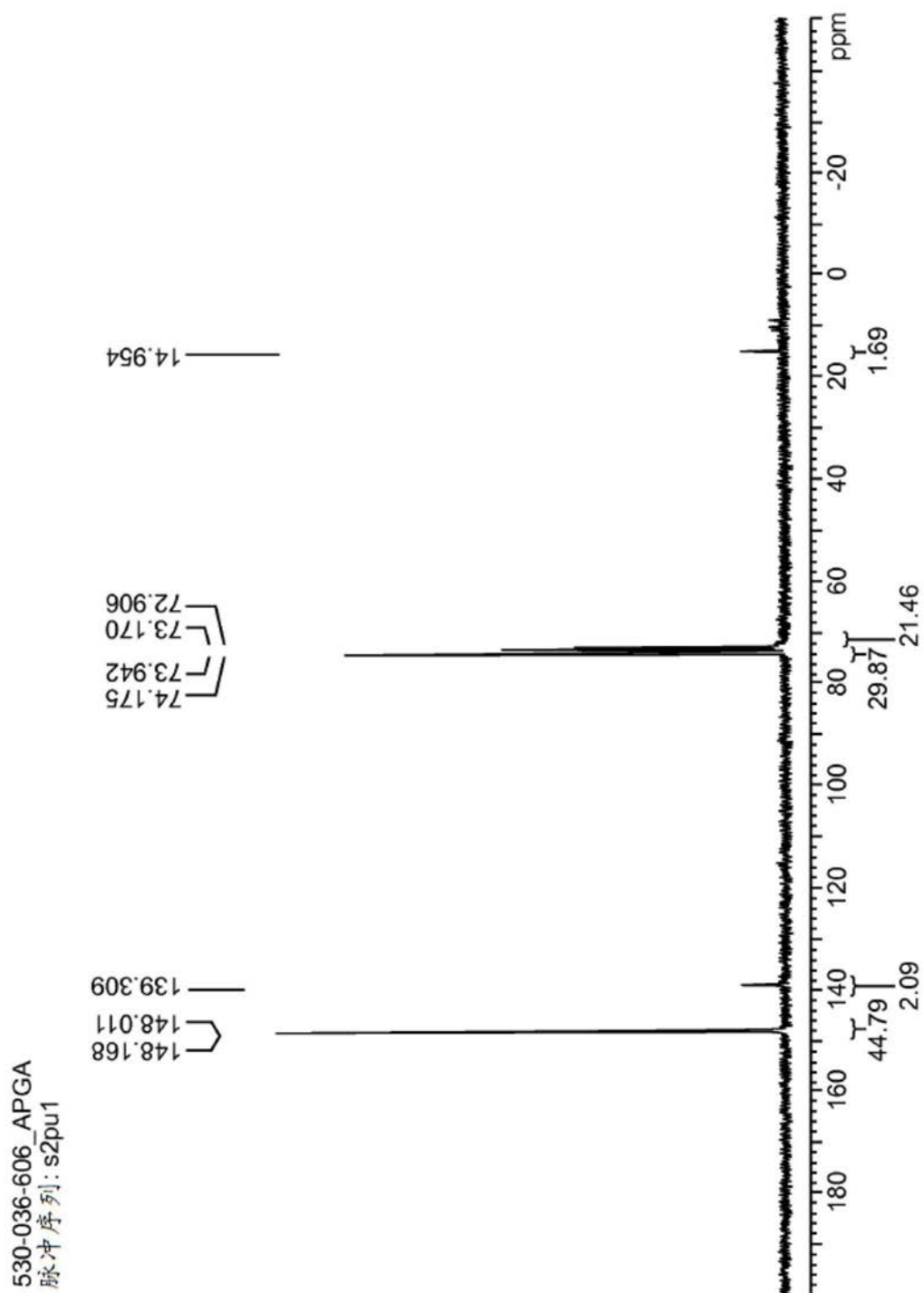


图5B



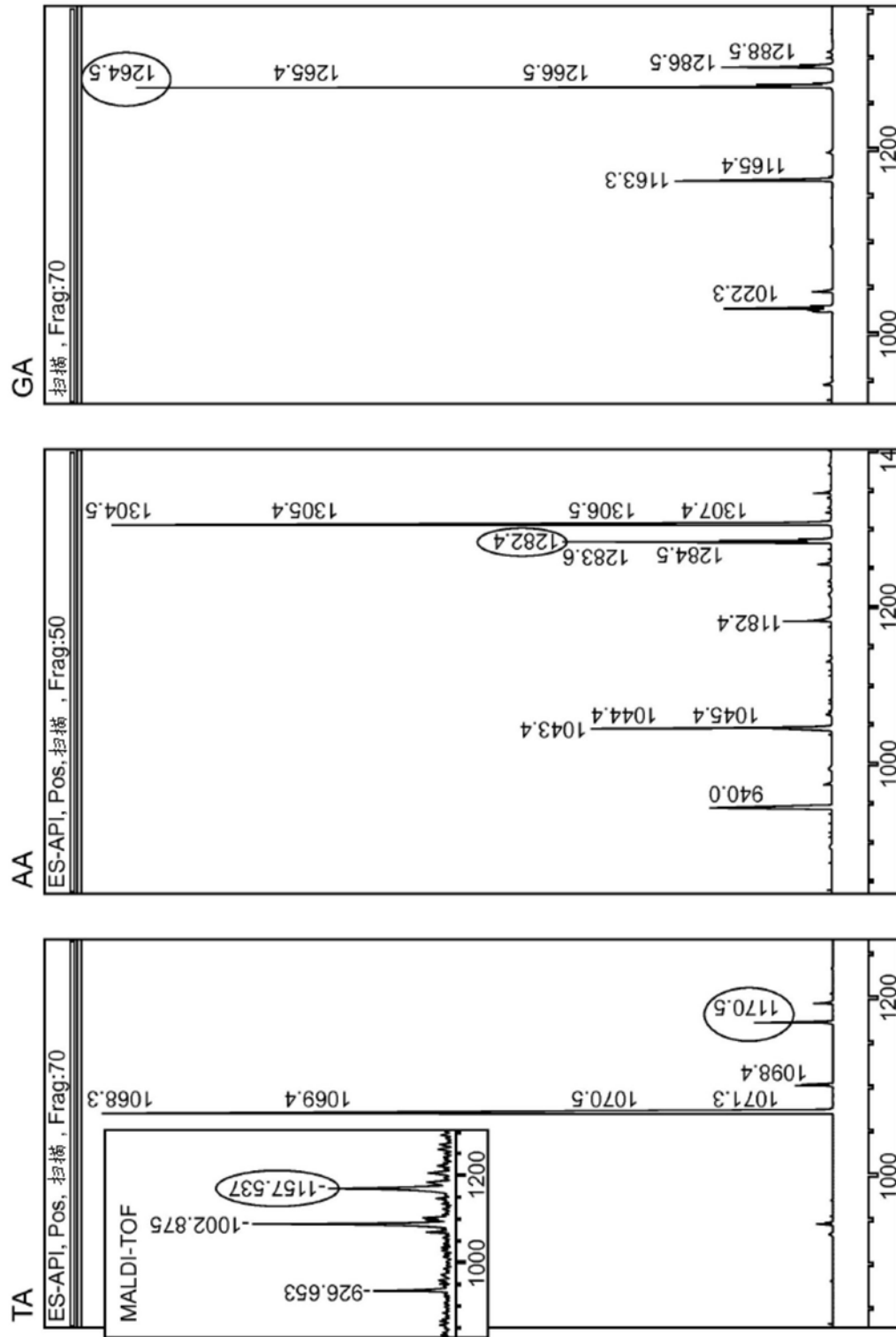


图6A

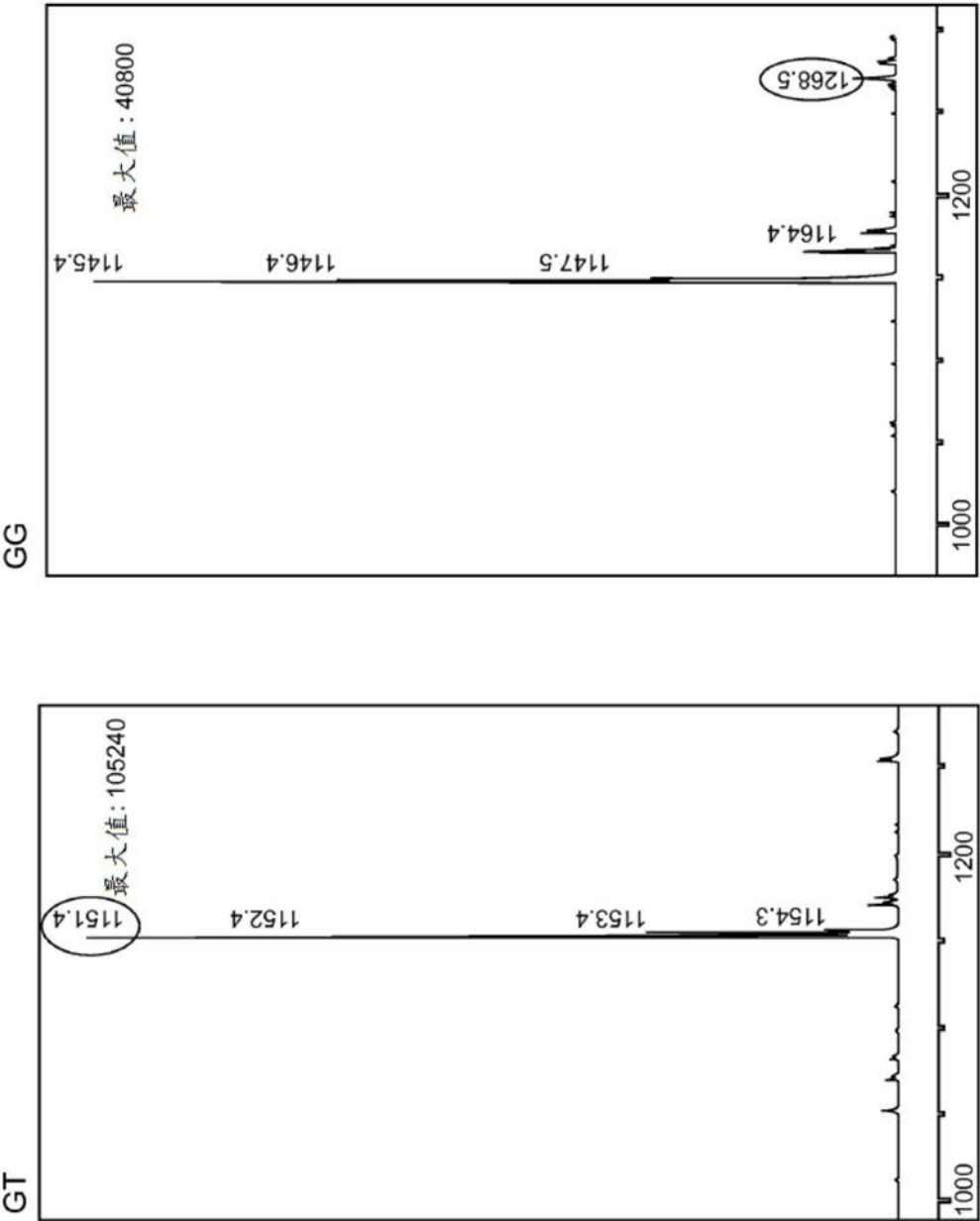


图6B

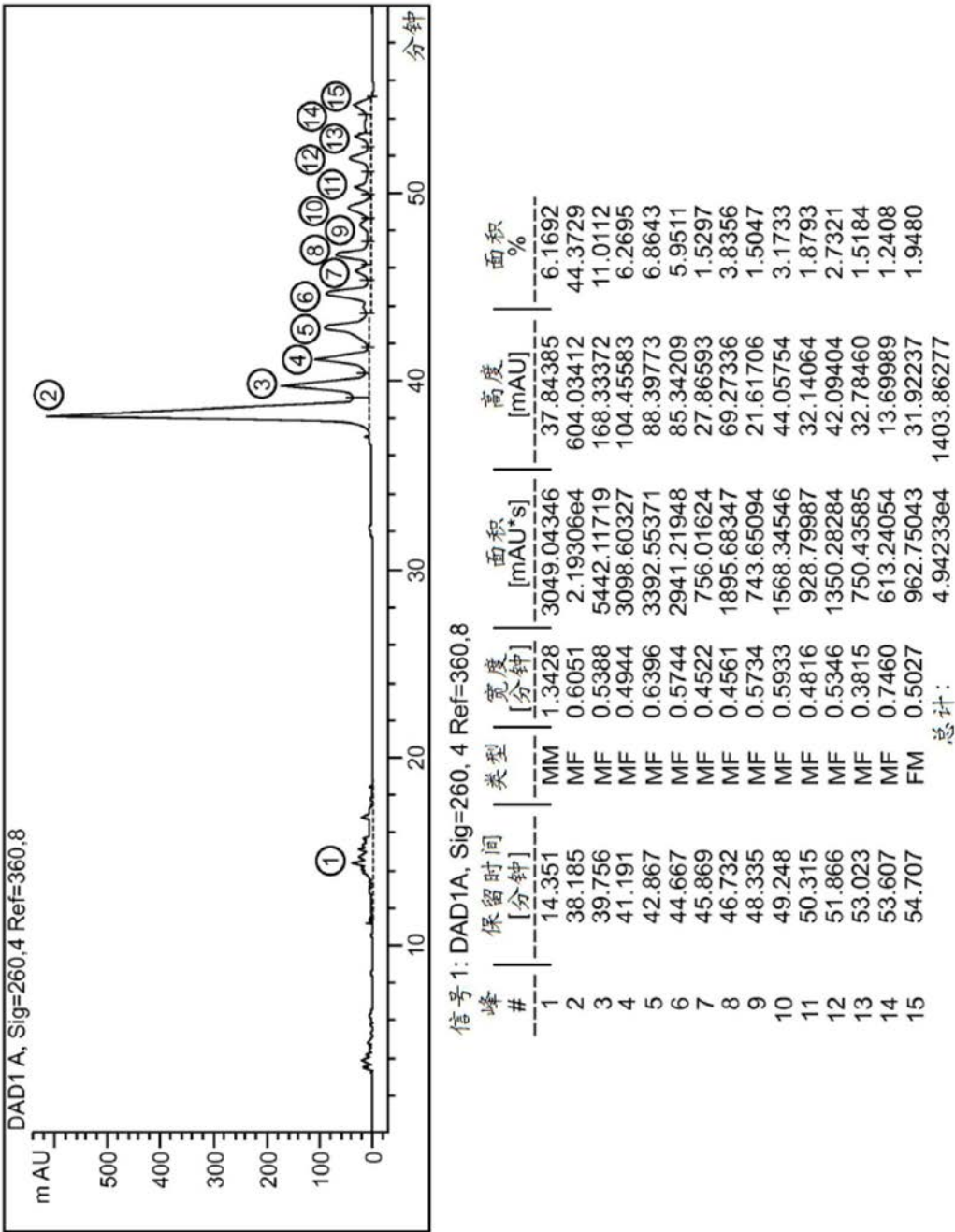


图7

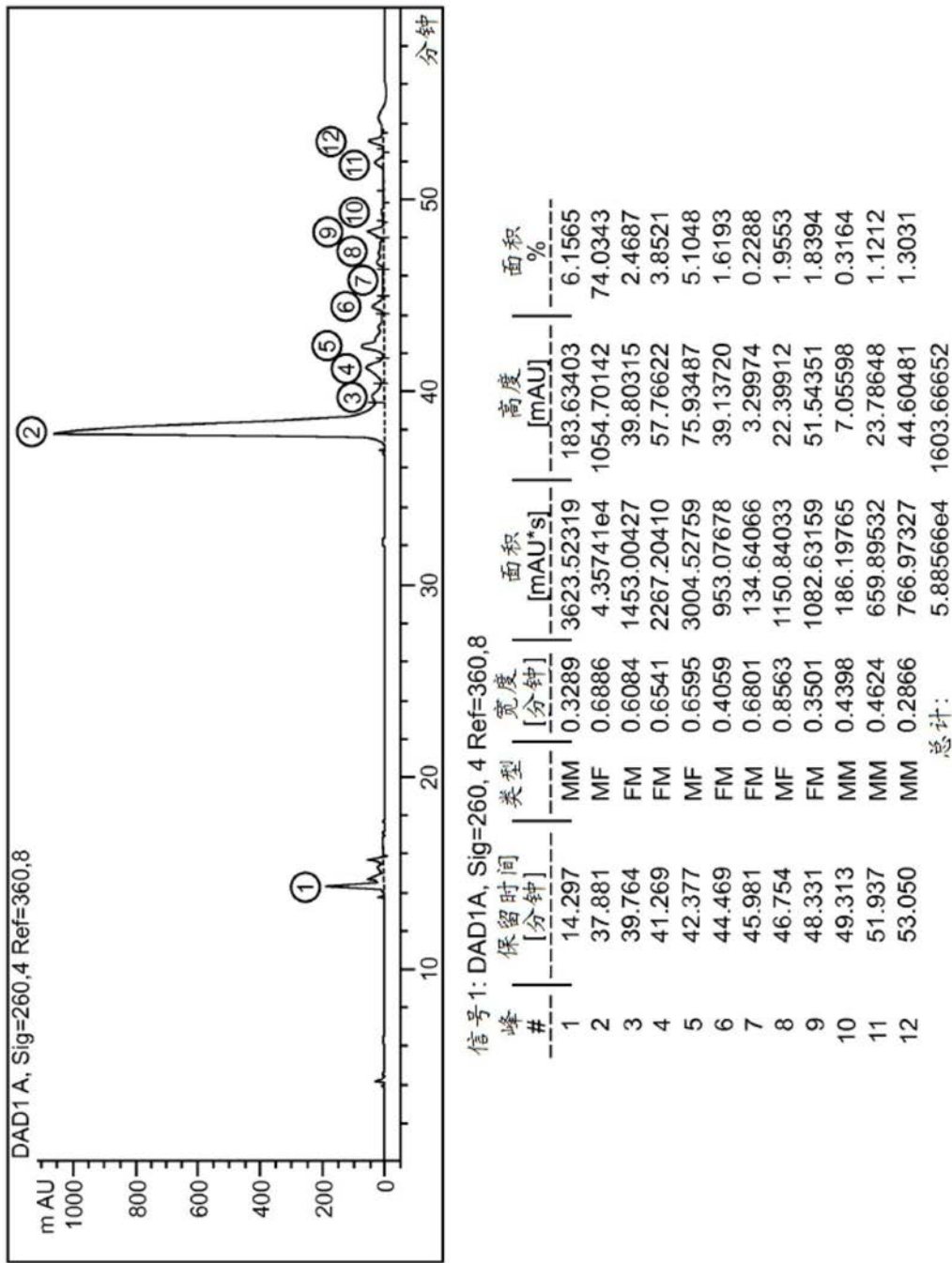


图8