(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101490074 B
(45)授权公告日 2013.06.26

(21)申请号 200780026285.4
(22)申请日 2007.05.10
(30)优先权数据
60/747,059 2006.05.11 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2009.01.12
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2007/068690 2007.05.10
(87)PCT申请的公布数据
WO2007/134181 EN 2007.11.22
(73)专利权人 ISIS 制药公司
地址 美国加利福尼亚州卡尔斯巴德市格兹尔街 2855 号
(72)发明人 普内特·P·塞思
埃里克·E·斯威兹
巴特·巴尔克利申
(74)专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111
代理人 杨颖 张一军
(51)Int.Cl.
C07H 19/04(2006.01)
C07H 21/00(2006.01)
(56)对比文件
US 2003/0105309 A1,2003.06.05,权利要求1-8.
WO 94/22890 A1,1994.10.13,权利要求1-12.
审查员 杨杰

权利要求书5页 说明书55页

(54)发明名称

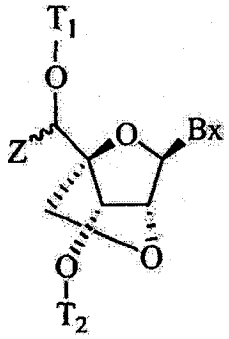
5'-修饰的双环核酸类似物

(57)摘要

本发明提供了5'-修饰的双环核苷类似物以及包含至少一种该类核苷类似物的低聚化合物。在优选的实施方式中该核苷类似物在5'位碳原子处具有(R)或(S)-手性。这种双环核苷类似物可用于增强低聚化合物的属性,包括如增强耐核酸酶性。

CN 101490074 B

1. 具有如下结构式的双环核苷：



其中：

Bx 是核苷碱基；

T_1 和 T_2 之一为 H 或羟基保护基团，而 T_1 和 T_2 的另一个为 H、羟基保护基团或反应性磷基团；其中所述反应性磷基团选自亚磷酰胺、H- 磷酸酯和磷酸三酯；

Z 是 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、或被独立选自卤素和 C_1-C_6 烷氧基的取代基团单取代或多取代的 C_1-C_6 烷基。

2. 如权利要求 1 所述的双环核苷，其中 Z 是被独立选自卤素和 C_1-C_6 烷氧基的取代基团单取代或多取代的 C_1-C_6 烷基。

3. 如权利要求 2 所述的双环核苷，其中 Z 是被独立选自卤素和 C_1-C_6 烷氧基的取代基团单取代或多取代的甲基。

4. 如权利要求 1 所述的双环核苷，其中 Z 是甲基、乙基或甲氧基甲基。

5. 如权利要求 1 所述的双环核苷，其中 Z 是甲基。

6. 如权利要求 1 所述的双环核苷，其中 Z 是乙烯基。

7. 如权利要求 1 所述的双环核苷，其中至少 T_1 和 T_2 之一为羟基保护基团。

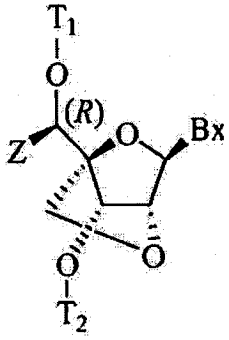
8. 如权利要求 7 所述的双环核苷，其中所述羟基保护基团各自独立选自乙酰基、叔丁基、叔丁氧基甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、1- 乙氧基乙基、1-(2- 氯乙氧基）乙基、2- 三甲基甲硅烷乙基、对氯苯基、2,4- 二硝基苯基、苄基、苯甲酰基、对苯基苯甲酰基、2,6- 二氯苄基、二苯基甲基、对硝基苄基、三苯基甲基 (trityl)、4,4′ - 二甲氧三苯甲基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯甲硅烷基、三苯甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、苯甲酰基甲酸酯、氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基、新戊酰基、9- 芴基甲基碳酸酯、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、三氟甲磺酸盐、三苯甲基、单甲氧基三苯甲基、二甲氧三苯甲基、三甲氧基三苯甲基、9- 苯基黄嘌呤 -9- 基 (Pixyl) 以及 9-(对甲氧基苯基）黄嘌呤 -9- 基 (MOX)。

9. 如权利要求 7 所述的双环核苷，其中 T_1 为乙酰基、苄基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基 - 二苯基甲硅烷基或 4,4′ - 二甲氧三苯甲基。

10. 如权利要求 1 所述的双环核苷，其中 T_2 为反应性磷基团，其中所述反应性磷基团为二异丙基氰基乙氧基亚磷酰胺或 H- 膦酸酯。

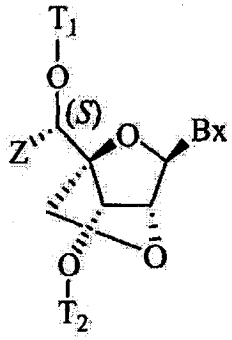
11. 如权利要求 10 所述的双环核苷，其中 T_2 为二异丙基氰基乙氧基亚磷酰胺，而 T_1 为 4,4′ - 二甲氧三苯甲基。

12. 如权利要求 1-11 任意一项所述的双环核苷，其具有如下构型：



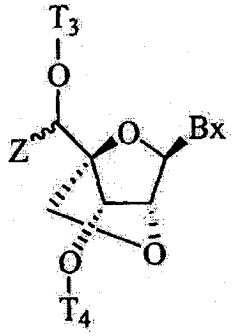
。

13. 如权利要求 1-11 任意一项所述的双环核苷，其中具有如下构型：



。

14. 具有至少一个如下结构式单体的低聚化合物：



，

其中对每一个具有所述结构式的单体独立而言，

Bx 是核苷碱基；

T_3 为 H，羟基保护基团，连接的共轭基团或与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团；

T_4 为 H，羟基保护基团，连接的共轭基团或与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团；

Z 是 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、或被独立选自卤素和 C_1-C_6 烷氧基的取代基团单取代或多取代的 C_1-C_6 烷基；

且

其中至少 T_3 和 T_4 之一为与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团；且

其中所述低聚化合物是长度为 8 到 40 个核苷和 / 或修饰的核苷的低聚化合物；且

其中所述低聚化合物至少具有一个区能与核酸分子特异性杂交；且

其中每一个修饰的核苷具有选自下组的修饰的糖基团：4’- 硫代修饰的糖基团，双环

修饰的糖基团和具有 2′ -F、或 2′ -O(CH$_2$)$_2$-OCH$_3$ 取代基团取代的糖基团。

15. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中 Z 是被独立选自卤素和 C$_1$-C$_6$ 烷氧基的取代基团单取代或多取代的 C$_1$-C$_6$ 烷基。

16. 如权利要求 15 所述的低聚化合物，其中 Z 是被独立选自卤素和 C$_1$-C$_6$ 烷氧基的取代基团单取代或多取代的甲基。

17. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中 Z 是甲基、乙基或甲氧基甲基。

18. 如权利要求 17 所述的低聚化合物，其中 Z 是甲基。

19. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中 Z 是乙烯基。

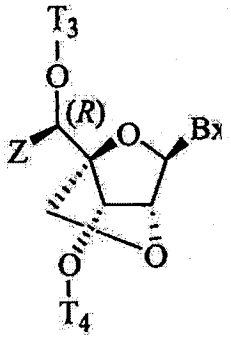
20. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中一个 T$_3$ 为 H 或羟基保护基团。

21. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中一个 T$_4$ 为 H 或羟基保护基团。

22. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中至少一个 T$_3$ 为与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团。

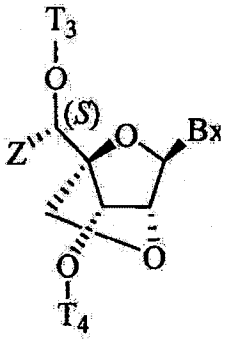
23. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中至少一个 T$_4$ 为与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团。

24. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其中至少一个单体具有如下构型：



。

25. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其中至少一个单体具有如下构型：



。

26. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其中 T$_3$ 和 T$_4$ 中至少一个是选自磷酸二酯或硫代磷酸酯的核苷间连接基团。

27. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其中各核苷间连接基团独立地为磷酸二酯或硫代磷酸酯。

28. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其包含所述结构式的至少两个相邻单体的至少一个区。

29. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其包含所述结构式的至少两个相邻单体的至少两个区。

30. 如权利要求 29 所述的低聚化合物，其为带间隙的低聚化合物。

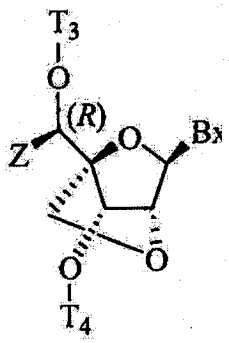
31. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其是长度为 8 至 20 个核苷和 / 或修饰核苷的低聚化合物。

32. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其是长度为 10 至 16 个核苷和 / 或修饰核苷的低聚化合物。

33. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物，其是长度为 10 至 14 个核苷和 / 或修饰核苷的低聚化合物。

34. 非诊断或治疗目的的抑制基因表达的方法，其包括将一种或多种细胞或组织与如权利要求 14 至 23 任意一项所述的低聚化合物相接触。

35. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中每个具有所述结构式的所述单体具有如下构型：



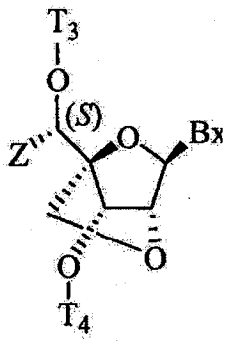
其中对每一个具有所述结构式的单体独立而言，

Z 为甲基；

Bx 为尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤；且

T_3 和 T_4 各自独立地是 H、羟基保护基团、连接的共轭基团或与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团，其中当所述单体位于末端位置时，一个 T_3 或一个 T_4 是 H、羟基保护基团、或连接的共轭基团。

36. 如权利要求 14 所述的低聚化合物，其中每个具有所述结构式的所述单体具有如下构型：



其中对每一个具有所述结构式的单体独立而言，

Z 为甲基；

Bx 为尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、5- 甲基胞嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤；且

T_3 和 T_4 各自独立地是 H、羟基保护基团、连接的共轭基团或与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团，其中当所述单体位于末端位置时，一个 T_3 或一个 T_4 是 H、羟基保护基团、或连接的共轭基团。

37. 如权利要求 14-23 任意一项所述的低聚化合物在药物制备中的用途，所述药物用于抑制基因表达。

38. 如权利要求 37 所述的用途，其中所述抑制基因表达包括用所述低聚化合物接触一种或多种细胞、组织或动物。

5’-修饰的双环核酸类似物

[0001] 序列表

[0002] 本申请随同提交了电子格式的序列表。所提供的该序列表文件名为CHEM0029WOSEQ.TXT，创建于2007年5月10日，大小为8kb。序列表的电子格式中的信息在此完全引用作为参考。

技术领域

[0003] 本发明提供了5’-修饰的双环核苷及由其制备的低聚化合物和组合物。更具体地，本发明提供了与位于5’位的其它基团形成2’-O-CH_2-4’桥的核苷，以及由其制备的低聚体或组合物。在优选的实施方式中，该5’-基团具有可形成(R)或(S)异构体的特定构型。在一些实施方式中，本发明的低聚化合物和组合物与目标RNA的一部分杂交以使该目标RNA丧失正常功能。

背景技术

[0004] 反义技术是用于减少一种或多种特定基因产物表达的有效手段，因而被证明在治疗、诊断和研究应用中具有独特的用途。化学修饰的核苷常用于整合入反义序列中以增强一种或多种属性，例如耐核酸酶属性。该类化学修饰的基团包括双环核苷，其中该核苷的呋喃糖部分包含了连接呋喃糖上两个原子而形成双环环系统的桥。该种双环核苷具有各种名称，如双环核酸或锁核酸分别称为BNA和LNA。

[0005] 已经制备出了各种BNA，并在专利文献和科技文献中有报道，例如参见Singh等人，Chem.Commun.，1998，4，455-456；Koshkin 等 人，Tetrahedron，1998，54，3607-3630；Wahlestedt等人，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.，2000，97，5633-5638；Kumar等人，Bioorg.Med.Chem.Lett.，1998，8，2219-2222；Wengel 等人，1998年9月14日提交的PCT国际申请PCT/DK98/00303(1999年3月25日公开为WO 99/14226)；Singh等人，J.Org.Chem.，1998，63，10035-10039，各文献的全文在此引用作为参考。已授权的美国专利和公开的申请的范例包括，例如美国专利6,770,748、6,268,490和6,794,499以及公开的美国申请 20040219565、20040014959、20030207841、20040192918、20030224377、20040143114、20030087230和20030082807，各文献的全文在此引用作为参考。

[0006] 已经制备出了各种5’-修饰的核苷，并在专利文献和科技文献中有报道，例如参见：Mikhailov等人，Nucleosides and Nucleotides，1991，10，393-343；Saha 等 人，J.Org.Chem.，1995，60，788-789；Beigleman等人，Nucleosides andNucleotides，1995，14，901-905；Wang，等人，Bioorganic & MedicinalChemistry Letters，1999，9，885-890；以及1994年10月13日公开的PCT国际申请WO 94/22890，各文献的全文在此引用作为参考。

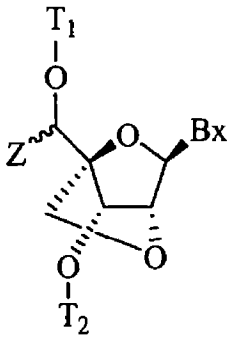
[0007] 因此，对通过反义机制特异性地调节基因表达的药剂仍有着长期未能满足的需求。此处公开的5’-修饰的BNA和由其制备得到的反义化合物可用于调节基因表达途径，包括依赖于RNaseH、RNAi和dsRNA酶等作用机制，以及基于目标降解或目标占用的其它反义机制的调节基因表达途径。本领域的技术人员在获知本公开后将能够在不进行额外实验

的情况下鉴定、制备和开发用于这些用途的反义化合物。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了具有下式的双环核苷：

[0010]



，

[0011] 其中：

[0012] Bx 是杂环碱基部分；

[0013] T_1 和 T_2 之一为 H 或羟基保护基团，而 T_1 和 T_2 的另一个为 H、羟基保护基团或反应性磷基团；

[0014] Z 是 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、取代的 C_1-C_6 烷基、取代的 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 炔基或取代的酰基 (-C(=O)-)；

[0015] 其中各个取代的基团被独立选自卤素、C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、取代的 C_2-C_6 炔基、OJ_1、SJ_1、NJ_1J_2、N_3、$COOJ_1$、CN、O-C(=O)NJ_1J_2、N(H)C(=NH)NR_1R_2 或 N(H)C(=X)N(H)J_2 的取代基团单取代或多取代，其中 X 为 O 或 S；且

[0016] J_1 和 J_2 各自独立为 H、C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、取代的 C_2-C_6 炔基、C_1-C_6 氨烷基、取代的 C_1-C_6 氨烷基或保护基团。

[0017] 在一个实施方式中，Z 是取代的 C_1-C_6 烷基。在另一实施方式中，Z 是取代的亚甲基，其中优选的取代基团包括一个或多个独立选自 F、NJ_1J_2、N_3、CN、OJ_1、SJ_1、O-C(=O)NJ_1J_2、N(H)C(=NH)NJ_1J_2 或 N(H)C(O)N(H)J_2 的基团。在一个实施方式中，J_1 和 J_2 各自独立为 H 或 C_1-C_6 烷基。

[0018] 在一个实施方式中，Z 是甲基、乙基或甲氧基甲基。在另一实施方式中，Z 是甲基。在另一实施方式中，Z 是乙烯基。在另一实施方式中，Z 是取代的酰基。在另一实施方式中，Z 是 C(=O)NJ_1J_2。

[0019] 在一个实施方式中，T_1 和 T_2 中至少一个是羟基保护基团，其中羟基保护基团的优选列表包括乙酰基、叔丁基、叔丁氧基甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、1- 乙氧基乙基、1-(2- 氯乙氧基）乙基、2- 三甲基甲硅烷乙基、对氯苯基、2,4- 二硝基苯基、苄基、苯甲酰基、对苯基苯甲酰基、2,6- 二氯苄基、二苯基甲基、对硝基苄基、三苯基甲基（三苯甲基）、4,4′ - 二甲氧三苯甲基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、三苯甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、苯甲酰基甲酸酯、氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基、新戊酰基、9- 芴基甲基碳酸脂、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、三氟甲磺酸盐、三苯甲基、单甲氧基三苯甲基、二甲氧三苯甲基、三甲氧基三苯甲基、9- 苯基黄嘌呤 -9- 基

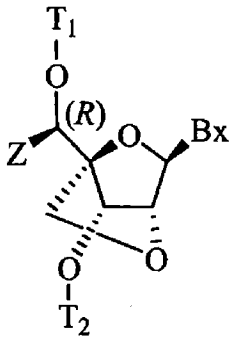
(Pixyl) 以及 9-(对甲氧基苯基) 黄嘌呤 -9- 基 (MOX)。更优选的羟基保护基团的列表包括乙酰基、苄基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基以及 4,4′ -二甲氧三苯甲基。

[0020] 在一个实施方式中，T_2 是反应性磷基团，其中反应性磷基团的优选列表包括二异丙基氰基乙氧基亚磷酰胺和 H- 膦酸酯。

[0021] 在一个实施方式中，T_2 是二异丙基氰基乙氧基亚磷酰胺而 T_1 是 4,4′ -二甲氧三苯甲基。

[0022] 在一种实施方式中，该 Z 基团呈 (R)- 构型：

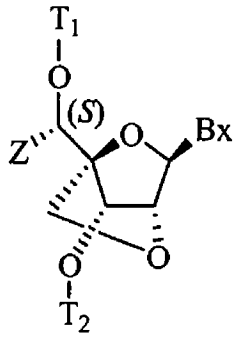
[0023]



。

[0024] 在一个实施方式中，该 Z 基团呈 (S)- 构型：

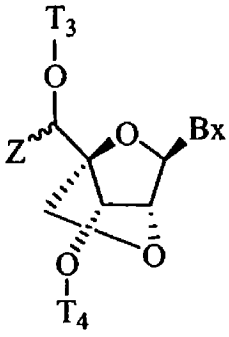
[0025]



。

[0026] 本发明还提供了具有至少一个下式单体的低聚化合物：

[0027]



，

[0028] 其中

[0029] Bx 是杂环碱基部分；

[0030] T_3 为 H，羟基保护基团，连接的共轭基团或与核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、单体亚基或低聚化合物连接的核苷间连接基团；

[0031] T_4 为 H，羟基保护基团，连接的共轭基团或与核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、单体亚基或低聚化合物连接的核苷间连接基团；

[0032] Z 是 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、取代的 C_1-C_6 烷基、取代的 C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 炔基或取代的酰基 (-C(= O)-)；

[0033] 其中各个取代的基团被独立选自卤素、C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、取代的 C_2-C_6 炔基、OJ_1、SJ_1、NJ_1J_2、N_3、$COOJ_1$、CN、O-C(= O)NJ_1J_2、N(H)C(= NH)NR_1R_2 或 N(H)C(= X)N(H)J_2 的取代基团单取代或多取代，其中 X 为 O 或 S；

[0034] J_1 和 J_2 各自独立为 H、C_1-C_6 烷基、取代的 C_1-C_6 烷基、C_2-C_6 烯基、取代的 C_2-C_6 烯基、C_2-C_6 炔基、取代的 C_2-C_6 炔基、C_1-C_6 氨烷基、取代的 C_1-C_6 氨烷基或保护基团；且

[0035] 其中 T_3 和 T_4 中的至少一个为与核苷、核苷酸、寡核苷、寡核苷酸、单体亚基或低聚化合物连接的核苷间连接基团。

[0036] 在一个实施方式中，Z 是取代的 C_1-C_6 烷基。在另一实施方式中，Z 是取代的亚甲基，其中优选的取代基团包括一个或多个独立选自 F、NJ_1J_2、N_3、CN、OJ_1、SJ_1、O-C(= O)NJ_1J_2、N(H)C(= NH)NJ_1J_2 或 N(H)C(O)N(H)J_2 的基团。在一个实施方式中，J_1 和 J_2 各自独立为 H 或 C_1-C_6 烷基。

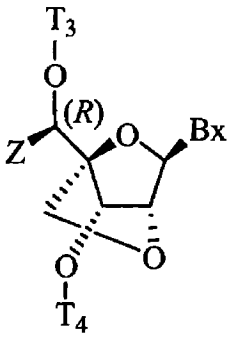
[0037] 在一个实施方式中，Z 是甲基、乙基或甲氧基甲基。在另一实施方式中，Z 是甲基。在另一实施方式中，Z 是乙烯基。在另一实施方式中，Z 是取代的酰基。在另一实施方式中，Z 是 C(= O)NJ_1J_2。

[0038] 在一种实施方式中，T_3 是 H 或羟基保护基团。在另一实施方式中 T_3 是与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团。在进一步的实施方式中 T_3 是与寡核苷或寡核苷酸连接的核苷间连接基团。在另一实施方式中 T_3 是与低聚化合物连接的核苷间连接基团。

[0039] 在一种实施方式中，T_4 是 H 或羟基保护基团。在另一实施方式中 T_4 是与核苷、核苷酸或单体亚基连接的核苷间连接基团。在进一步的实施方式中 T_4 是与寡核苷或寡核苷酸连接的核苷间连接基团。在另一实施方式中 T_4 是与低聚化合物连接的核苷间连接基团。

[0040] 在一个实施方式中，提供了具有至少一个单体的低聚化合物，其中该 Z 基团呈 (R) 构型：

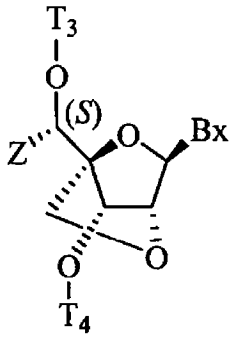
[0041]



。

[0042] 在一个实施方式中，提供了具有至少一个单体的低聚化合物，其中该 Z 基团呈 (S) 构型：

[0043]



。

[0044] 在一个实施方式中 T_3 和 T_4 中的至少一个包含选自磷酸二酯或硫代磷酸酯的核苷间连接基团。在另一实施方式中，该低聚化合物中的各核苷间连接基团分别独立为磷酸二酯或硫代磷酸酯。

[0045] 在一个实施方式中，提供了具有至少一个由至少两个相邻的本发明的 5’- 取代的双环核苷单体形成的区域的低聚化合物。在另一实施方式中，提 供了具有至少两个由至少两个相邻的本发明的 5’- 取代的双环核苷单体形成的区域的低聚化合物。在进一步的实施方式中，提供了具有至少两个分离的由至少两个相邻的本发明的 5’- 取代的双环核苷单体形成的区域的低聚化合物，其组成带间隙的低聚化合物。

[0046] 在一个实施方式中，提供了包含长度约 8 至约 40 个核苷和 / 或修饰的核苷或类似物的低聚化合物。在进一步的实施方式中，低聚化合物包含长度约 8 至约 20 个核苷和 / 或修饰的核苷或类似物。在更进一步的实施方式中，低聚化合物包含长度约 10 至约 16 个核苷和 / 或修饰的核苷或类似物。在另一实施方式中，低聚化合物包含长度约 10 至约 14 个核苷和 / 或修饰的核苷或类似物。

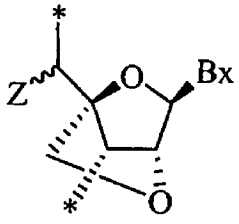
[0047] 本发明还提供了抑制基因表达的方法，其包括将一种或多种细胞、组织或动物与本发明的低聚化合物相接触。

[0048] 发明详述

[0049] 本发明提供了 5’- 修饰的双环核苷及由其制备的低聚化合物。更具体地，本发明提供了具有 5’- 修饰的双环呋喃核糖基糖部分的核苷（此处也称为 5’- 修饰的双环核苷或 5’- 修饰的 BNA）及由其制备的低聚体和组合物。在优选的实施方式中，修饰该 5’ 位的基团具有可形成 (R) 或 (S) 手性的特定构型。该化合物还可以以 IUPAC 命名法进行描述，例如该 5’-CH_3 取代的双环核酸尿嘧啶 DMT 亚磷酰胺可以命名为 :(1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基（二异丙基氨基）- 膦氧基]-1-[1-(S,R 或外消旋时没有符号)-(4,4’- 二甲氧三苯甲基）氧基 - 乙基]-3-（尿嘧啶 -1- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷（例如尿嘧啶 DMT 亚磷酰胺），其中该乙基的 1 号碳位置为 (R)、(S) 或外消旋，且该显示为尿嘧啶 -1- 基的杂环碱基可被此处所述的任意杂环碱基所取代。本发明的 5’- 修饰的 BNA 可用于增强整合了它们的低聚化合物的目标属性。本发明的低聚化合物还可用作诊断应用中的引物和探针。

[0050] 在优选的实施方式中，本发明的 5’- 修饰的双环核苷具有如下结构 :

[0051]



,

[0052] 其中星号独立地表示羟基、保护的羟基、将该 5'- 修饰的双环核苷连接至单体或低聚体的核苷间键合、反应性磷基团、任选连接的共轭基团或者此处讨论的或可用于反义技术的其它基团。

[0053] 一方面,可通过在实施例部分阐述的方法中取代商业可获得的(或合成的)Grignard 试剂来制备各种取代的 (5' -Z)BNA。例如,参见实施例 1,步骤 C,其中甲基溴化镁被用作 Grignard 试剂以提供该 5' $-CH_3$-BNA 类似物。还可通过本领域技术人员已知的功能类似的碳同系化反应导入取代基团。硝基甲烷的加成以及通过环氧化物的同系化描述于 G. ;Middleton, P. J. Tetrahedron Lett. 1996,37,2739-2742(还可参见 :Wang 等人, Bioorganic &Medicinal Chemistry Letters,1999,9,885-890 ;以及 Saha 等人, J. Org. Chem. ,1995,60,788-789) 中。此外,可在加成后利用适当功能化的 Grignard 或其它试剂以提供进一步官能化的类似物。例如,使用烯丙基或乙烯基溴化镁试剂可以导入双键,其可被功能化为许多的不同基团,包括例如卤甲基、甲氧基甲基、适当保护的羟基甲基、氨基甲基以及各种其它官能团功能化。

[0054] 在本发明的一方面,本发明的 5'- 修饰的双环核苷可用于在一个或多个位置修饰未经修饰的低聚化合物。该种修饰的低聚化合物可描述为具有特定的基序。可在本发明中使用的基序包括但不限于带间隙的基序、半修饰 (hemimer) 基序、阻断修饰 (blockmer) 基序、全修饰基序、定点修饰基序以及交替基序。结合这些基序还可采用多种接头,包括但不限于单用或联合使用磷酸二酯和硫代磷酸酯键合。6- 修饰的双环核苷的定位和连接策略的使用可简单地优化,以提供针对特定靶标形成的最佳活性。

[0055] 教导了代表性基序的制备的代表性美国专利包括但不限于 :5,013,830、5,149,797、5,220,007、5,256,775、5,366,878、5,403,711、5,491,133、5,565,350、5,623,065、5,652,355、5,652,356 ;以及 5,700,922,其中的某些与本申请被共同拥有,其全文分别在此引用作为参考。基序在 2005 年 6 月 2 日提交并于 2005 年 12 月 22 日公开为 WO 2005/121371 的国际申请 PCT/US2005/019219 以及于 2005 年 6 月 2 日提交并于 2005 年 12 月 22 日公开为 WO 2005/121372 的 PCT/US2005/019220 中也有公开,其全文分别在此引用作为参考。

[0056] 术语“稳定的化合物”和“稳定的结构”指具有足够稳固性而可从反应混合物分离至有用的纯度,并制成有效的治疗剂的化合物。此处仅涉及稳定的化合物。

[0057] 此处描述的化合物内选定的取代基团以递归度表示。上下文中的“递归取代基”指可以引用其本身的另一实例的取代基。由于该种取代基的递归性,理论上,在任意给定权利要求中可出现大量取代基。医药化学和有机化学的领域的普通技术人员可理解该种取代基的总数受目标化合物的预期属性的合理限制。该种属性包括例如但不限于 :分子量、溶解性或 log P 等物理属性,针对目标靶标的活性等应用属性,以及合成容易度等实施属性。

[0058] 递归取代基为本发明的目标方面。医药和有机化学的普通技术人员可以理解该种

取代基的多功能性。根据在本发明的权利要求所示的递归取代基的程度，可根据上文所述确定其总数。

[0059] 此处所用的术语“取代基”和“取代基团”包括通常加成至其它基团或母体化合物以增强目标属性或产生目标效果的基团。取代基团可以是保护或未保护的，并可加成至母体化合物的一个或多个可用位点。取代基团还可进一步被其它取代基团所取代并且可以直接或通过连接基团（例如烷基或烃基基团）连接至母体化合物。该种基团包括但不限于：卤素、羟基、烷基、烯基、炔基、酰基（$-C(O)R_{aa}$）、羧基（$-C(O)O-R_{aa}$）、脂肪族基团、脂环族基团、烷氧基、取代的氧基（$-O-R_{aa}$）、芳基、芳烷基、杂环、杂芳基、杂芳基烷基、氨基（$-NR_{bb}R_{cc}$）、亚氨基（$=NR_{bb}$）、酰氨基（$-C(O)N-R_{bb}R_{cc}$ 或 $-N(R_{bb})C(O)R_{aa}$）、叠氮基（$-N_3$）、硝基（$-NO_2$）、氰基（-CN）、脲基（$-OC(O)NR_{bb}R_{cc}$ 或 $-N(R_{bb})C(O)OR_{aa}$）、脲基（$-N(R_{bb})C(O)NR_{bb}R_{cc}$）、硫脲基（$-N(R_{bb})C(S)NR_{bb}R_{cc}$）、胍基（$-N(R_bb)C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$）、脒基（$-C(=NR_{bb})NR_{bb}R_{cc}$ 或 $-N(R_{bb})C(NR_{bb})R_{aa}$）、硫醇（$-SR_{bb}$）、亚磺酰（$-S(O)R_{bb}$）、磺酰（$-S(O)_2R_{bb}$）、磺胺基（$-S(O)_2NR_{bb}R_{cc}$ 或 $-N(R_{bb})-S(O)_2R_{bb}$）以及共轭基团。其中 R_{aa}、R_{bb} 和 R_{cc} 分别独立为 H，任选连接的化学官能团或具有包括但不限于 H、烷基、烯基、炔基、脂肪族、烷氧基、酰基、芳基、芳烷基、杂芳基、脂环族、杂环和杂芳基烷基的其它取代基团。

[0060] 连接基团或双功能连接部分，如本领所知的那些连接基团或双功能连接部分可使用于本发明。连接基团可用于将化学官能团、共轭基团、报道基团和其它基团连接至母化合物的选定位点。一般而言，双功能连接部分包含具有两个官能团的烃部分。所选的官能团之一结合母体分子或目标化 合物而所选的另一基团基本结合任意选定的基团，例如化学官能团或共轭基团。在一些实施方式中，该接头包含链结构或重复单元如乙二醇或氨基酸单元的寡聚体。在双功能连接部分中常用的官能团的范例包括但不限于：用于与亲核基团反应的亲电子试剂以及用于与亲电子反应的亲核试剂。在一些实施方式中，双功能连接部分包括氨基、羟基、羧酸、硫醇、不饱和键（例如，双或三键）等。双功能连接部分的部分非限制性范例包括 8- 氨基 -3,6- 二氧杂辛酸 (ADO)，琥珀酰亚胺 4-[N- 甲基马来酸]-1- 羧环己烷 (SMCC) 以及 6- 氨基己酸 (AHEX 或 AHA)。其它的连接基团包括但不限于：取代的 C_1-C_{10} 烷基、取代的或未取代的 C_2-C_{10} 烯基或取代的或未取代的 C_2-C_{10} 炔基，其中优选取代基团的非限制性列表包括羟基、氨基、烷氧基、羧基、苯甲基、苯基、硝基、硫醇、硫烷氧基、卤素、烷基、芳基、烯基以及炔基。

[0061] 术语“烃基”包括包含 C、O、H 的基团，包括具有任意饱和度的直链、支链和环状基团。该种烃基基团可包括一个或多个选自 N、O 和 S 的杂原子并可进一步被一个或多个取代基团单或多取代。

[0062] 此处所用的术语“烷基”指含有最多二十四个碳原子的饱和直链或支链烃基。烷基基团的范例包括但不限于：甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、正己基、辛基、癸基、十二烷基等。烷基基团通常包含 1 至约 24 个碳原子，更通常包含 1 至约 12 个碳原子（C_1-C_{12} 烷基），更优选包含 1 至约 6 个碳原子。此处所用的术语“低级烷基”包含 1 至约 6 个碳原子。此处所用的烷基任选包含一个或多个进一步的取代基团。

[0063] 此处所用的术语“烯基”指含有最多二十四个碳原子并至少具有一个碳 - 碳双键的直链或支链烃基。烯基基团的范例包括但不限于：乙烯基、丙烯基、丁烯基、1- 甲基 -2- 丁烯 -1- 基、1,3- 丁二烯等二烯等。烯基基团通常包含 2 至约 24 个碳原子，更通常包含 2 至

约 12 个碳原子，更优选包含 2 至约 6 个碳原子。此处所用的烯基任选地包含一个或多个进一步的取代基团。

[0064] 此处所用的术语“炔基”指含有最多二十四个碳原子并至少具有一个碳 - 碳三键的直链或支链烃基。炔基基团的范例包括但不限于：乙炔基、1- 丙炔基、1- 丁炔基等。炔基基团通常包含 2 至约 24 个碳原子，更通常包含 2 至约 12 个碳原子，更优选包含 2 至约 6 个碳原子。此处所用的炔基任选地包含一个或多个进一步的取代基团。

[0065] 此处所用的术语“氨烷基”指氨基取代的烷基。该术语包括在任何位置具有氨基取代基的 C_1-C_{12} 烷基基团，其中该烷基基团将该氨烷基连接至母体分子。氨烷基基团的烷基和 / 或氨基部分可以用取代基团进一步取代。

[0066] 此处所用的术语“脂肪族”指最多包含二十四个碳原子的直链或支链烃基，其中任意两个碳原子之间的饱和度为单、双或三键。脂肪族基团优选包含 1 至约 24 个碳原子，更通常包含 1 至约 12 个碳原子，更优选包含 1 至约 6 个碳原子。脂肪族基团的直链或支链可被包括氮、氧、硫和磷等一个或多个杂原子所中断。该种被杂原子中断的脂肪族基团包括但不限于聚烷氧基，例如聚亚烷基二醇、聚胺和聚亚胺。此处所用的脂肪族基团任选地包括其它取代基团。

[0067] 术语“脂环族的”或“脂环基”指环状的环系统，其中该环为脂肪族环。该环系统可包含一个或多个环，其中至少一个环为脂肪族环。优选的脂肪环包括环中具有约 5 至约 9 个碳原子的环。此处所用的脂肪环任选地包括其它取代基团。

[0068] 此处所用的术语“烷氧基”指在烷基基团和氧原子之间形成的基团，其中该氧原子用于连接该烷氧基基团和母体分子。烷氧基基团的范例包括但不 限于：甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、新戊氧基、正己氧基等。此处所用的烷氧基团任选地包括其它取代基团。

[0069] 此处所用的术语“卤素”指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0070] 此处所用的术语“芳基”指具有一个或多个芳环的单或多环碳环系统基。示范性的芳基基团包括但不限于：苯基、萘基、四氢化萘基、茚满基、茚基等。优选的芳基环系统在一个或多个环中具有约 5 至约 20 个碳原子。此处所用的芳基基团任选地包括其它取代基团。

[0071] 此处所用的术语“芳烷基”和“芳基烷基”指在烷基基团和芳基基团形成的基团，其中该烷基基团用于连接该芳烷基基团和母体分子。范例包括但不限于：苄基、苯乙基等。此处所用的芳烷基基团任选地包括与烷基、芳基或两者连接以形成基团的取代基团。

[0072] 此处所用的术语“杂环基”指包含至少一个杂原子并且是不饱和、部分饱和或完全饱和的单或多环的环系统，包括杂芳基基团。杂环还包括稠环系统，其中一种或多种稠环包含至少一个杂原子而其它环可包含一个或多个杂原子或任选地不包含杂原子。杂环基团通常包括至少一个选自硫、氮或氧的原子。杂环基团的范例包括 [1,3] 二氧戊环、吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、四氢噻唑基、异四氢噻唑基、喹喔啉基、哒嗪酮基、四氢呋喃基等。此处所用的杂环基团任选地包括其它取代基团。

[0073] 此处所用的术语“杂芳基”指包含单或多环芳香族环、环系统或稠环系统的基团，其中至少一个环为芳环且包含一个或多个杂原子。杂芳基还包括稠环系统，包括其中一个

或多个稠环不含有杂原子的系统。杂芳基基团通 常包括一个选自硫、氮或氧的环原子。杂芳基基团的范例包括但不限于：吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、苯硫基、呋喃基、四氢喹啉基、异四氢喹啉基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、喹喔啉基等。杂芳基基团可直接或通过脂肪族基团或杂原子等连接部分连接至母体分子。此处所用的杂芳基基团任选地包括其它取代基团。

[0074] 此处所用的术语“杂芳基烷基”指具有可将杂芳基烷基基团连接至母体分子的烷基的如前文所定义的杂芳基基团。范例包括但不限于：吡啶甲基、嘧啶乙基、萘啶丙基(napthyridinylpropyl)等。此处所用的杂芳基烷基基团任选地包括其它取代基团。

[0075] 本发明中采用的术语“单或多环结构”包括具有稠和或连接的环的单或多环环系统，并包括单独选自脂肪族、脂环族、芳基、杂芳基、芳烷基、芳基烷基、杂环、杂芳基、杂芳香基、杂芳基烷基的单独和混合环系统。该种单或多环结构包含一致或变化的饱和度（包括完全饱和、部分包含或完全不饱和）的环。各个环可包含形成杂环的选自 C、N、O 和 S 的环原子以和仅含有以混合基序存在的 C 环原子的环，例如，苯并咪唑，其中一个环仅具有碳环原子而该稠环具有两个氮原子。单或多环结构可进一步被取代基团取代，例如，具有连接至其中一个环的两个＝O 的邻苯二甲酰亚胺。在其它方面，单或多环结构可直接通过环原子、通过取代基团或双功能连接部分连接母体分子。

[0076] 此处所用的术语“酰基”指从有机酸去除羟基基团形成的并具有通式 -C(O)-X 的基团，其中 X 通常为脂肪族、脂环族或芳香族。范例包括脂肪族羰基、芳香羰基、脂肪磺酰、芳香磺酰、脂肪族亚磺酰、芳香磷酸盐、 脂肪族磷酸盐等。此处所用的酰基基团任选地包括其它取代基团。术语“氧基”指基团（＝O）。

[0077] 此处所述的化合物（例如，5’-修饰的双环核苷）可通过例如如下文实施例所示的任意适用的有机合成技术来制备。众多该类技术已为本领域公知。然而，许多已知技术在 Compendium of Organic Synthetic Methods(JohnWiley & Sons, New York)Vol.1, Ian T.Harrison 和 Shuyen Harrison(1971)；Vol.2, Ian T.Harrison 和 Shuyen Harrison(1974)；Vol.3, Louis S.Hegedus 和 Leroy Wade(1977)；Vol.4, Leroy G.Wade Jr., (1980)；Vol.5, Leroy G.WadeJr.(1984)；和 Vol.6, Michael B.Smith；以及 March, J., Advanced OrganicChemistry, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York(1985)；ComprehensiveOrganic Synthesis.Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern OrganicChemistry, In 9 Volumes, Barry M.Trost, 主编, Pergamon Press, New York(1993)；Advanced Organic Chemistry, Part B：Reactions and Synthesis, 4th Ed.；Carey 和 Sundberg；Kluwer Academic/Plenum Publishers：New York(2001)；Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure, 2ndEdition, March, McGraw Hill(1977)；Greene ′ s Protective Groups in OrganicSynthesis, 4th Edition, Greene, T.W., 和 Wutz, P.G.M., John Wiley & Sons, New York(2007)；以及 Comprehensive Organic Transformations, 2nd Edition, Larock, R.C., John Wiley & Sons, New York(1999) 中有说明。

[0078] 在本发明的一方面，低聚化合物可通过共价连接一个或多个共轭基团进行修饰。一般而言，共轭基团修饰所连接的低聚化合物的一种或多种属性，包括但不限于药效动力学、药代动力学、结合、吸收、细胞分布、细胞摄取、储存和清除。共轭基团常用于化学领域并

直接或通过任选部分或 连接基团连接至母体化合物，如低聚化合物。共轭基团的优选列表包括但不限于插入剂、报道分子、布洛芬等药物基团、聚胺、聚酰胺、聚乙烯乙二醇、硫醚、聚醚、胆固醇、硫胆固醇、胆酸部分、叶酸、脂、磷脂、生物素、吩嗪、菲啶、蒽醌、金刚烷、吖啶、荧光素、若丹明、香豆素和染料。

[0079] 此处所用的术语“保护基团”指本领域中已知的在合成过程中保护反应性基团，包括但不限于羟基、氨基和硫醇基团以避免发生不需要的反应的可变化学部分。保护基团通常可以选择性地和 / 或正交地使用以在其它位点的反应中保护位点，并可随后去除以留下未保护基团或供进一步反应。本领域已知的保护基团一般地描述于 Greene's Protective Groups in OrganicSynthesis,4th Edition,Greene,T.W.,和 Wutz,P.G.M.,John Wiley & Sons,New York(2007)。

[0080] 基团可作为前体选择性地结合至本发明的低聚化合物。例如，氨基基团可以作为叠氮基团结合至本发明的化合物，该叠氮基团可在合成的目标位点上化学转化为氨基基团。一般来说，基团可被保护或作为对反应惰性的前体存在，该反应修饰母体分子其它部位的反应以在适当的时间转化成为其最终基团。其它对代表性保护或前体基团的讨论参见 Agrawal，等人，Protocols for Oligonucleotide Conjugates，Eds，Humana Press ;New Jersey，1994 ;Vol.26pp.1-72。

[0081] 羟基保护基团的范例包括但不限于 :叔丁基、叔丁氧基甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、1- 乙氧基乙基、1-(2- 氯乙氧基) 乙基、2- 三甲基甲硅烷乙基、对氯苯基、2,4- 二硝基苯基、苄基、2,6- 二氯苄基、二苯基甲基、对硝基苄基、双 (2- 乙酰氧基乙氧基) 甲基 (ACE)、2- 三甲基甲硅烷乙基、三异丙 基甲硅烷基、[(三异丙基甲硅烷基) 氧基甲基 (TOM)、单甲氧基三苯甲基、二甲氧三苯甲基 (DMT)、三甲氧基三苯甲基、1-(2- 氟苯基)-4- 甲氧基哌啶 -4- 基 (FPMP)、9- 苯基黄嘌呤 -9- 基 (Pixyl) 以及 9-(对甲氧基苯基) 黄嘌呤 -9- 基 (MOX)、三苯基甲基 (三苯甲基)、4,4′ - 二甲氧三苯甲基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、三苯甲硅烷基、苯甲酰基甲酸酯、乙酸盐、氯乙酸盐、三氯乙酸盐、三氟乙酸盐、新戊酸盐 (pivaloate)、苯酸盐、对苯基苯酸酯、9- 芴基甲基碳酸脂、甲磺酸盐以及甲苯磺酸盐。其中优选的羟基保护基团包括但不限于 : 苄基、2,6- 二氯苄基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、苯甲酰基、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、二甲氧三苯甲基 (DMT)、9- 苯基黄嘌呤 -9- 基 (Pixyl) 以及 9-(对甲氧基苯基) 黄嘌呤 -9- 基 (MOX)。

[0082] 氨基保护基团的范例包括但不限于 :氨基甲酸盐保护基团，例如 2- 三甲基硅乙氧基羰基 (Teoc)、1- 甲基 -1-(4- 二苯基基)- 乙氧基羰基 (Bpoc)、叔丁氧基羰基 (BOC)、烯丙氧基羰基 (Alloc)、9- 芴基甲氧基羰基 (Fmoc)、以及苯甲氧基羰基 (Cbz) ;酰胺保护基团，例如甲酰基、乙酰基、三卤代乙酰基、苯甲酰基、以及硝基苯乙酰基 ;磺酰胺保护基团，例如 2- 硝基苯磺酰基 ;以及亚胺和环状酰亚胺保护基团，例如苯二甲酰亚胺和二硫琥珀酰基。

[0083] 硫醇保护基团的范例包括但不限于 :三苯甲基 (trityl)、苯甲基 (Bn) 等。

[0084] 在部分优选的实施方式中，可以通过用任选保护的含磷核苷间键合连接核苷来制备低聚化合物。含磷核苷间键合 (例如磷酸二酯和硫代磷酸酯键合) 的代表性保护基团包括 β- 氰乙基、二苯基硅乙基、δ- 氰丁烯基、氰对二甲苯基 (CPX)、N- 甲基 -N- 三氟乙酰乙基 (META)、乙酰氧基苯氧基乙基 (APE) 以及丁烯 -4- 基基团。例如参

见美国专利4,725,677以及Re.34,069(β-氰乙基)；Beaucage，S.L.和Iyer，R.P.，Tetrahedron,49No.10,pp.1925-1963(1993);Beaucage,S.L.和Iyer,R.P.,Tetrahedron,49No.46，pp.10441-10488(1993);Beaucage，S.L.和Iyer，R.P.，Tetrahedron,48No.12，pp.2223-2311(1992)。

[0085] 此处所用的术语“正交地保护”指以不同类别的保护基团保护的功能基团,其中各类别的保护基团可以以任意顺序并在所有其它类别存在的情况下去除（例如，Barany，G.和Merrifield，R.B.，J.Am.Chem.Soc,1977,99,7363;idem,1980,102,3084.）。正交保护已在自动寡核苷酸合成等领域得到广泛应用。功能基团可在一种或多种不受去阻断过程影响的其它保护功能基团的存在下被去阻断。该去阻断的功能基团以某种形式反应,在一些位点处其它的正交保护基团在不同的反应条件组合下被去除。这允许采用选择性化学方法以产生目标化合物或低聚化合物。

[0086] 本发明提供了具有可用于形成核苷间键合（例如,例如磷酸二酯和硫代磷酸酯核苷间键合）的反应性磷基团的化合物。该种反应性磷基团已为本领域所知并包含处于P^{III}或P^{V}价态的磷原子,包括但不限于亚磷酰胺、H-膦酸酯、磷酸三酯和含磷的手性助剂。优选合成的固相合成采用亚磷酰胺(P^{III}化学）作为反应性亚磷酸。在优选的实施方式中,中间体亚磷酸化合物随后通过已知的方法被氧化成P^{V}状态以获得磷酸二酯或硫代磷酸酯核苷酸间键合。附加的活性磷酸盐和亚磷酸披露于Tetrahedron Report Number 309(Beaucage和Iyer,Tetrahedron,1992,48,2223-2311)。

[0087] 可用于本发明的低聚化合物的特定范例包括含有修饰的（例如,非天然存在的）核苷间键合的寡核苷酸。通过磷原子的存在或缺失可定义核苷间键合的两个主要类别。具有磷原子的修饰的核苷间键合包括但不限于:硫代磷酸酯,手性硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,磷酸三酯,氨烷基磷酸三酯，甲基和其它烷基磷酸酯包括3′-亚烃基磷酸酯、5′-亚烃基磷酸酯以及手性磷酸酯,亚磷酸酯,磷酰胺包括3′-氨基磷酰胺和氨烷基磷酰胺,硫羰基磷酰胺,硫羰基烷基磷酸酯,硫羰基烷基磷酸三酯,具有正常3′-5′键合的硒代磷酸酯和硼代磷酸酯,其2′-5′连接的类似物,以及具有反转极性的硒代磷酸酯和硼代磷酸酯,其中一种或多种核苷酸间键合为3′至3′、5′至5′或2′至2′键合。具有反转极性的寡核苷酸可在3′-最末端键合处包含单个3′至3′键合,即可以是无碱基（核碱基缺失或该位置被羟基取代）的单个反转核苷残基。包括多种盐、混合盐和游离酸的形式。

[0088] 教导上述含磷键合的代表性美国专利包括但不限于:U.S.:3,687,808、4,469,863、4,476,301、5,023,243、5,177,196、5,188,897、5,264,423、5,276,019、5,278,302、5,286,717、5,321,131、5,399,676、5,405,939、5,453,496、5,455,233、5,466,677、5,476,925、5,519,126、5,536,821、5,541,306、5,550,111、5,563,253、5,571,799、5,587,361、5,194,599、5,565,555、5,527,899、5,721,218、5,672,697以及5,625,050,其中的一些与本申请被共同拥有,其全文分别在此引用作为参考。

[0089] 不具有磷原子的修饰的核苷间键合包括但不限于:由短链烷基或环烷基核苷间键合,混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键合,或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键合构成的核苷间键合。这包括具有硅氧烷骨架;硫化物、亚砜和砜骨架;甲缩醛和硫甲缩醛骨架;亚甲基甲缩醛和硫甲缩醛骨架;核糖乙酰骨架;含烯烃骨架;氨基磺酸盐骨架;亚甲基亚胺和亚甲基肼基骨架;磺酸盐和磺酰胺骨架;酰胺骨架;和其它具有混合的N、O、S和

CH_2 的组成部分的核苷间键合。

[0090] 教导了上述寡核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于：U.S. ：5,034,506、5,166,315、5,185,444、5,214,134、5,216,141、5,235,033、5,264,562、5,264,564、5,405,938、5,434,257、5,466,677、5,470,967、5,489,677、5,541,307、5,561,225、5,596,086、5,602,240、5,610,289、5,602,240、5,608,046、5,610,289、5,618,704、5,623,070、5,663,312、5,633,360、5,677,437、5,792,608、5,646,269 以及 5,677,439，其中的一些与本申请被共同拥有，其全文分别在此引用作为参考。

[0091] 此处描述的化合物包含一个或多个不对称中心，并因此形成了对映体，非对映体，以及其它立体异构形式，其从绝对立体化学而言可定义为 (R)- 或 (S)-，α 或 β，或是 (D)- 或 (L)-（如针对氨基酸等时）。本发明意在包括所有该种可能的异构体，以及它们的外消旋形式和光学纯的形式。光学异构体可通过上述的过程由其相应的光学活性前体制备，或通过拆分外消旋混合物进行制备。该种拆分可在拆分剂的存在下，通过色谱或重复结晶或这些本领域技术人员已知技术的组合进行。有关拆分进一步的细节可参见 Jacques，等人，Enantiomers，Racemates，and Resolutions（John Wiley & Sons，1981）。当此处所述的化合物包含烯烃双键、其它不饱和性、或其它几何不对称中心时，除非另行指明，该化合物意在同时包括 E 和 Z 几何异构体或顺式 (cis-) 和反式 (trans-) 异构体。同样地，同样意在包括所有的互变异构形式。此处所示的任意碳 - 碳双键的构型仅为便利目的被选择，若非文中指明，并非意在指定特定的构型；因此，此处任意描述为反式的碳 - 碳双键或碳 - 杂原子双键可以是顺式、反式或任意比例的两者的混合物。

[0092] 本发明的上下文中的术语“低聚化合物”指至少具有一个区能与核酸分子杂交的聚合物。术语“低聚化合物”包括寡核苷酸、寡核苷酸类似物和寡核 苷以及核苷酸模拟物和 / 或包含核酸和非核酸成分的混合聚合物。低聚化合物通常可线性地制备，但也可连接或以其它方式制备成环状，且还可包括分支。低聚化合物可形成双链构建体，例如，双链杂交以形成双链组合物。该双链组合物可连接或分离并可在末端包含悬挂。一般而言，低聚化合物包含连接的单体亚基的骨架，其中该连接的单体亚基直接或间接地连接至杂环碱基部分。低聚化合物还可包括未连接至杂环碱基部分的单体亚基，从而提供非碱基位点。该键合结合单体亚基、糖部分或替代物，且该杂环碱基部分可被独立修饰。包括或不包括杂环碱基的键合 - 糖单元可被肽核酸中的单体等模拟物取代。在低聚化合物的各个位点修饰或取代部分或全部单体的能力可形成大量可能的基序。

[0093] 如本领域所知，核苷是碱基 - 糖组合。核苷的碱基部分通常为杂环碱基部分。该种杂环碱基最常见的两种类别为嘌呤和嘧啶。核苷酸为进一步包含连接至核苷糖部分的磷酸酯基团的核苷。对于包含呋喃戊糖的核苷，该磷酸酯基团可被连接至糖的 2′、3′ 或 5′ 羟基部分。在形成聚核苷酸时，该磷酸酯基团共价连接彼此相邻的核苷以形成线性聚合化合物。可通过杂交或通过形成共价键连接该线性聚合结构的相应末端以形成环状结构，然而，通常开放的线性结构是理想的。在寡核苷酸结构中，磷酸酯基团通常形成寡核苷酸的核苷间键合。RNA 和 DNA 的常见核苷间键合为 3′ 至 5′ 磷酸二酯键合。

[0094] 在本发明的上下文中，术语“寡核苷酸”指核糖核酸 (RNA) 或脱氧核糖核酸 (DNA) 的单体或聚合物。该术语包括由天然存在的核碱基、糖和共价核苷间键合构成的寡核苷酸。术语“寡核苷酸类似物”指具有一个或多个非天然存在部分的寡核苷酸。该种非天然存在

的寡核苷酸通常比天然存在的形式更 理想，因为前者具有例如，强化细胞摄取、对核酸靶标增强的亲和力以及在核酸酶存在下提高的稳定性等优良属性。

[0095] 在本发明的上下文中，术语“寡核苷”指由不带磷原子的核苷间键合连接的核苷序列。该种类型的核苷间键合包括短链烷基、环烷基、混合杂原子烷基、混合杂原子环烷基、一种或多种短链杂原子以及一种或多种短链杂环。这种核苷间键合包括但不限于：硅氧烷、硫化物、亚砜、砜、乙酰、甲缩醛、硫甲缩醛、亚甲基甲缩醛、硫甲缩醛、烯烃基、氨基磺酸盐、亚甲基亚胺、亚甲基肼基、磺酸盐、磺酰胺、酰胺，和其它具有混合的 N、O、S 和 CH_2 的组成部分的核苷间键合。

[0096] 教导了上述寡核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于：U.S. ：5,034,506、5,166,315、5,185,444、5,214,134、5,216,141、5,235,033、5,264,562、5,264,564、5,405,938、5,434,257、5,466,677、5,470,967、5,489,677、5,541,307、5,561,225、5,596,086、5,602,240、5,610,289、5,602,240、5,608,046、5,610,289、5,618,704、5,623,070、5,663,312、5,633,360、5,677,437、5,792,608、5,646,269 以 及 5,677,439，其中的一些与本申请被共同拥有，其全文分别在此引用作为参考。

[0097] 此处所用的术语“核碱基”或“杂环碱基部分”与“核酸碱基或其模拟物”同义。一般而言，核碱基为含有一个或多个能与核酸碱基氢键结合的原子或原子组合的任意结构。术语杂环碱基部分包括嘌呤、嘧啶、杂环碱基、修饰的碱基、修饰的核碱基以及天然的和非天然存在的核碱基。

[0098] 此处所用的“未修饰的”或是“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤 (A) 和鸟嘌呤 (G)，以及嘧啶碱基胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 和尿嘧啶 (U)。修饰的核碱基包括但不限于：其它合成的和天然的核碱基，例如 5- 甲基胞嘧啶 (5-me-C)、5- 羟基甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤和 2- 氨基腺嘌呤。修饰的核碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环，例如 7- 去氮 - 腺嘌呤、7- 去氮鸟苷、2- 氨基吡啶和 2- 吡啶酮取代的核碱基。其它的核碱基包括披露于美国专利 3,687,808 的核碱基；披露于 The Concise Encyclopedia OfPolymer Science And Engineering，pages 858-859，Kroschwitz，J.I.，ed.JohnWiley & Sons，1990 的核碱基；披露于 Englisch 等人，Angewandte Chemie，International Edition，1991,30,613 的核碱基；以及披露于 Sanghvi,Y.S.,Chapter 15,Antisense Research and Applications,pages 289-302,Crooke,S.T.and Lebleu,B.,ed.,CRC Press,1993 的核碱基。

[0099] 修饰的核碱基包括但不限于：此处定义的通用碱基、疏水碱基、混杂碱基、大小扩增的碱基以及氟化碱基。某些这些核碱基可特别地用于提高本发明的低聚化合物的结合亲和力。这包括 5- 取代的嘧啶，6- 氮杂嘧啶以及 N-2、N-6 和 O-6 取代的嘌呤，包括 2- 氨基丙基腺嘌呤、5- 丙炔基尿嘧啶和 5- 丙炔基胞嘧啶。5- 甲基胞嘧啶取代基已显示可以提高核酸双链稳定性 0.6-1.2℃ (Sanghvi，Y.S.，Crooke，S.T. 和 Lebleu，B.，eds.，Antisense Researchand Applications，CRC Press，Boca Raton，1993，pp.276-278)，并且是目前优选的碱基取代基，特别是在结合 2′ -O- 甲氧基乙基糖修饰时。

[0100] 教导了特定的上述指出的修饰核碱基以及其它修饰的核碱基的制备的代表性美国专利包括但不限于：上述 U.S.3,687,808 以及 U.S. ：4,845,205、5,130,302、5,134,066、5,175,273、5,367,066、5,432,272、5,457,187、5,459,255、5,484,908、5,502,177、

5,525,711、5,552,540、5,587,469、5,594,121、5,596,091、5,614,617、5,645,985、5,830,653、5,763,588、6,005,096、以及 5,681,941，其中的一些与本申请被共同拥有，其全文分别在此引用作为参考；以及美国专利 5,750,692，其与本申请被共同拥有，其全文分别在此引用作为参考。

[0101] 除了具有至少一个 5'- 修饰的 BNA 修饰的核苷，本发明的低聚化合物还可包含一种或多种具有修饰的糖部分的附加核苷。呋喃基糖环可以以多种方式修饰，包括用取代基取代，桥连形成 BNA 以及用 S 或 N(R) 等杂原子取代 4′ -O。教导了该种修饰糖的制备的部分代表性美国专利包括但不限于：U.S. ：4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633、5,792,747、5,700,920、6,600,032 以及于 2005 年 6 月 2 日提交并于 2005 年 12 月 22 日公开为 WO 2005/121371 的国际申请 PCT/US2005/019219，其中的一些与本申请被共同拥有，其全文分别在此引用作为参考。优选的修饰糖的代表性列表包括但不限于具有 2′ -F、2′ $-OCH_2$ 或 2′ $-O(CH_2)_2-OCH_3$ 取代基团的取代糖；4′ - 硫代修饰的糖以及双环修饰的糖。

[0102] 本发明的低聚化合物还可包含一种或多种具有修饰的糖部分的附加核苷。呋喃基糖环可以以多种方式修饰，包括用取代基取代，桥连形成 BNA 以及用 S 或 N(R) 等杂原子取代 4′ -O。教导了该种修饰糖的制备的部分代表性美国专利包括但不限于：U.S. ：4,981,957、5,118,800、5,319,080、5,359,044、5,393,878、5,446,137、5,466,786、5,514,785、5,519,134、5,567,811、5,576,427、5,591,722、5,597,909、5,610,300、5,627,053、5,639,873、5,646,265、5,658,873、5,670,633、5,792,747、5,700,920、6,600,032 以及于 2005 年 6 月 2 日提交并于 2005 年 12 月 22 日公开为 WO 2005/121371 的国际申请 PCT/US2005/019219，其中的一些与本申请被共同拥有，其全文分别在此引 用作为参考。优选的修饰糖的代表性列表包括但不限于具有 2′ -F、2′ $-OCH_2$ 或 2′ $-O(CH_2)_2-OCH_3$ 取代基团的取代糖；4′ - 硫代修饰的糖以及双环修饰的糖。

[0103] 此处所用的术语“核苷模拟物”意在包括那些用于在低聚化合物的一个或多个位点替代糖或糖和碱基而非键合的结构，例如，具有吗啉或双环 [3.1.0] 己基糖模拟物（例如，具有磷酸二酯键合的非呋喃糖）的核苷模拟物。术语“糖替代物”与含义更广的术语“核苷模拟物”略微重叠，但仅指糖单元（呋喃糖环）的替代。术语“核苷酸模拟物”意在包括用于在低聚化合物的一个或多个部分替代核苷和键合的结构，例如，肽核酸或吗啉（被 -N(H)-C(= O)-O- 或其它非 - 磷酸二酯键合连接的吗啉）。

[0104] 如本发明所述的低聚化合物可包含长度约 8 至约 80 个核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域的普通技术人员可理解本发明包含长度为 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 或其任意范围内的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物的低聚化合物。

[0105] 在另一实施方式中，本发明的低聚化合物为长度 8 至 40 的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员可理解本发明包含长度为 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、

18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 或其任意范围内的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物的低聚化合物。

[0106] 在另一实施方式中，本发明的低聚化合物为长度 8 至 20 的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员可理解其包含长度为 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 或其任意范围内的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物的低聚化合物。

[0107] 在另一实施方式中，本发明的低聚化合物为长度 10 至 16 的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员可理解其包含长度为 10、11、12、13、14、15 或 16 或其任意范围内的核苷或修饰核苷或模拟物的低聚化合物。

[0108] 在另一实施方式中，本发明的低聚化合物为长度 10 至 14 的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。本领域普通技术人员可理解其包含长度为 10、11、12、13 或 14 或其任意范围内的核苷和 / 或修饰核苷或模拟物。

[0109] 本发明的一方面，修饰和未修饰的核苷及其模拟物可参照文献描述的适当 DNA(Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal(1993), Humana Press) 和 / 或 RNA(Scaringe, Methods(2001), 23, 206-217 ; Gait 等人, Applications of Chemically synthesized RNA in RNA : Protein Interactions, Ed. Smith(1998), 1-36 ; Gallo 等人, Tetrahedron(2001), 57, 5707-5713) 合成方法进行低聚。固相合成的其它方法可参见 Caruthers 的美国专利 4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679 和 5,132,418，以及 Koster 的美国专利 4,725,677 以及 Re. 34,069。

[0110] 常规用于基于支持介质的低聚化合物和相关化合物合成的商用设备由多家供应商 (包括，例如，Applied Biosystems(Foster City, CA)) 出售。本领域已知的任何其它该类合成方法均可附加地或替代性地采用。适用的固相技术 (包括自动合成技术) 的描述可见 F. Eckstein(ed.), Oligonucleotides andAnalogues, a Practical Approach, Oxford University Press, New York(1991)。

[0111] 随着对 RNAi 的投入的增加，RNA 和相关类似物的合成相对 DNA 和相关类似物的合成有所上升。目前在商业上采用的主要 RNA 合成策略包括 5′ -O-DMT-2′ -O- 叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS)、5′ -O-DMT-2′ -O-[1(2- 氟苯基)-4- 甲氧基哌啶 -4- 基](FPMP)、2′ -O-[(三异丙基甲硅烷基) 氧基] 甲基 (2′ -O-CH_2-O-Si(iPr)$_3$(TOM)、以及 5′ -O- 硅醚 -2′ -ACE(5′ -O- 二 (三甲基硅氧基) 环十二烷氧基硅醚 (DOD)-2′ -O- 二 (2- 乙酰氧基乙氧基) 甲基 (ACE)。目前提供 RNA 产品的主要的公司包括 Pierce Nucleic Acid Technologies、DharmaconResearch Inc.、Ameri Biotechnologies Inc. 和 Integrated DNA Technologies, Inc., Princeton Separations 公司所销售的 RNA 合成活化剂据宣传可以特别地减少与 TOM 和 TBDMS 化学物质的偶合次数。该种活化剂也适用于本发明。

[0112] 用于商业 RNA 合成的主要基团为 :

[0113] TBDMS = 5′ -O-DMT-2′ -O- 叔丁基二甲基甲硅烷基

[0114] TOM = 2′ -O-[(三异丙基甲硅烷基) 氧基] 甲基

[0115] DOD/ACE = (5′ -O- 二 (三甲基硅氧基) 环十二烷氧基硅醚 -2′ -O- 双 (2- 乙酰氧基乙氧基) 甲基

[0116] FPMP = 5′ -O-DMT-2′ -O-[1(2- 氟苯基)-4- 甲氧基哌啶 -4- 基]。

[0117] 所有前述的 RNA 合成策略均适用于本发明。上述策略的混合，例如一策略采用

5′ -保护基团而另一策略采用 2′ -O-保护基团也适用于本发明。

[0118] 在本发明的上下文中,“杂交”指低聚化合物互补链的配对。在本发明中,一种配对机制涉及在低聚化合物的链的互补核苷或核苷酸碱基(核苷碱基)之间的氢键结合,其可以是 Watson-Crick、Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 氢 键结合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶为通过形成氢键进行配对的互补核苷碱基。杂交可在多种条件下进行。

[0119] 如果低聚化合物与目标核酸的结合干扰该目标核酸的正常功能而导致活性丧失,且具有足够的互补性程度,从而避免在需要特异性结合的情况下(即在体内测定或治疗的生理条件下和在进行体外测定的条件下)该低聚化合物与非目标核酸序列发生非特异性结合,则该低聚化合物是可特异性地杂交的。

[0120] 此处所用的“互补”指两个碱基核苷在任意位置下精确配对的能力。例如,如果在低聚化合物某一位置的核苷碱基能够与目标核酸(该目标核酸为 DNA、RNA 或寡核苷酸分子)的某一位置的核苷碱基氢键结合,则该寡核苷酸和目标核酸之间的氢键结合的位置被认为是互补位置。当各分子中的互补位置被可以彼此氢键结合的核苷碱基占据时,该低聚化合物和其它 DNA、RNA 或寡核苷酸分子彼此是互补的。术语“可特异性杂交”和“互补”为是指足量核苷碱基精确配对或互补的程度足以使寡核苷酸和目标核酸之间形成稳定且特异性的结合。

[0121] 在本领域中可以理解,低聚化合物的序列不需要与其目标核酸的序列具有 100%的互补性以达到可特异性可杂交。此外,寡核苷酸可在一个或多个片段上杂交从而使中间的或邻近的片段不参与杂交(例如,环结构或发夹结构)。本发明的低聚化合物与其靶向的目标核酸序列中的目标区域具有至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 95%、或至少约 99%的序列互补性。例如,当低聚化合物 20 个核苷中有 18 个与目标区域互补时,该低聚化合物应该是可特异性杂交的,且表示具有 90%互补性。在该范例中,剩余的非互补核苷碱基可以成簇或散布在互补核苷碱基中,不需要彼 此邻近或与互补核苷碱基邻近。同样地,如果长度为 18 个核苷碱基的低聚化合物具有侧翼连接两个与目标核酸完全互补的区域的 4 个非互补性核苷碱基,则该低聚化合物与目标核酸具有 77.8%的总体互补性,并因而包含在本发明的范围之内。低聚化合物与目标核酸的互补性百分比可通过本领域已知的 BLAST 程序(基本的局部对比排列搜索工具)和 PowerBLAST 程序常规地测定(Altschul 等人,J.Mol.Biol.,1990,215,403-410 ;Zhang 和 Madden,Genome Res.,1997,7,649-656)。

[0122] 本发明进一步包括了如反义低聚化合物、反义寡核苷酸、核酶、外源指导序列(EGS)、寡核苷酸、选择性剪切体、引物、探针等低聚化合物,以及与目标核酸的至少一个部分杂交的其它低聚化合物。因此,这些低聚化合物可以以单链、双链、环状或发夹低聚化合物的形式引入,并可包含内部或末端突起或环等结构元件。本发明的低聚化合物一旦引入系统后,就可引发一种或多种酶或结构蛋白的作用以实现对目标核酸的修饰。

[0123] 本发明的一个方面,提供了与核酸靶标杂交并通过募集核酸内切酶降解该靶标的单链低聚体。该种酶的非限制性范例之一为 RNAse H,一种裂解 RNA :DNA 双链的 RNA 链的细胞内切酶。本领域已知“类 DNA”单链低聚化合物引发 RNAse H。RNAse H 的激活可导致 RNA 靶标的裂解,从而大大增强寡核苷酸-介导的基因表达抑制的效率。其它的核糖核酸酶(例如属于 RNAse III 和核糖核酸酶 L 酶家族的核糖核酸酶)也推定具有类似的作用。

[0124] 尽管低聚化合物的一种形式为单链反义寡核苷酸,但已经表明在许多物种中引入

双链结构，例如双链 RNA(dsRNA) 分子可诱导基因或其相关基因产物强的和特异性反义 - 介导的功能降低。该现象同时存在于植物和动物，并被认为与病毒防御和转座子沉默具有进化性联系。

[0125] 在一些实施方式中，在筛选调节选定蛋白表达的其它低聚化合物中可采用“适当的目标片段”。“调节剂”为降低或提高编码蛋白的核酸分子的表达，且至少包含一个与适当的目标片段互补的 8- 核苷碱基部分的低聚化合物。该筛选方法包括如下步骤 :将编码蛋白的核酸分子的适当目标片段与一种或多种候选调节剂接触，和选择一种或多种提高或降低编码蛋白的核酸分子的表达的候选调节剂。一旦显示候选调节剂能够调节（例如，提高或降低）编码肽的核酸分子的表达，则该调节剂就可用于该肽的功能的进一步考察研究，或如本发明所述用作研究、诊断、或治疗剂。

[0126] 本发明的适当目标片段还可与其各自的本发明的互补性反义低聚化合物组合形成稳定的双链寡核苷酸。本领域已显示该种双链寡核苷酸部分可调节目标表达并通过反义机制调节翻译和 RNA 加工。此外，该双链部分还可进行化学修饰 (Fire 等人，Nature，1998，391，806-811 ;Timmons 和 Fire，Nature 1998，395，854 ;Timmons 等人，Gene，2001，263，103-112 ;Tabara 等人，Science，1998，282，430-431 ;Montgomery 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，1998，95，15502-15507 ;Tuschl 等人，Genes Dev.，1999，13，3191-3197 ;Elbashir 等人，Nature，2001，411，494-498 ;Elbashir 等人，Genes Dev. 2001，15，188-200)。例如，已经表明该种双链部分可通过双链的反义链与靶标进行的经典杂交来抑制该靶标，从而引发目标的酶降解 (Tijsterman 等人，Science，2002，295，694-697)。

[0127] 本发明的低聚化合物还可用于药物发现和靶标验证领域。本发明包括将此处所确定的低聚化合物和靶标用于药物发现过程中以阐明蛋白与疾病状态、表型或症状之间存在的关系。这些方法包括检测或调节目标肽，包括将样本、组织、细胞或生物体与本发明的低聚化合物接触，检测在处理 一定时间后的目标处的核酸或蛋白水平和 / 或相关的表型或化学终点，并任选地将测量值与未处理样本或以本发明的其它低聚化合物处理的样本进行比较。这些方法还可平行地进行或与其它实验组合进行，以确定靶标验证过程使用的未知基因的功能，或者确定特定基因产物作为特定疾病、症状或表型治疗或预防靶标的效果。

[0128] 核苷修饰对 RNAi 活性的作用参照现有文献进行了评估 (Elbashir 等人，Nature(2001)，411，494-498 ;Nishikura 等人，Cell(2001)，107，415-416 ;以及 Bass 等人，Cell(2000)，101，235-238)。

[0129] 本发明的低聚化合物可用于诊断、治疗、预防并可作为研究试剂和试剂盒。此外，本领域的普通技术人员通常使用能够以超强特异性抑制基因表达的反义寡核苷酸来阐明特定基因的功能或区分生物途径各种组分的功能。单独或与其它低聚化合物或治疗剂联合使用的本发明低聚化合物可用作差异分析和 / 或组合分析的工具来阐明细胞和组织内表达的基因的部分或整个补体的表达模式。低聚化合物也可在有利于基因扩增或检测的条件下分别被有效地用作引物和探针。这些引物和探针可用于需要特异性检测编码蛋白的核酸分子的方法中，并可用于核酸分子扩增以供检测或在进一步研究中使用。本发明的反义寡核苷酸，特别是引物和探针与核酸的杂交可通过本领已知的方法进行检测。该种方法可包括将酶结合至寡核苷酸，对该寡核苷酸进行放射性标记或任何其它适用的检测方法。还可制备使用检测在样本中选定蛋白水平的这种检测装置的试剂盒。

[0130] 作为一个非限制性范例，将用一种或多种低聚化合物处理的细胞或组织中的表达模式与未用低聚化合物处理的对照细胞或组织进行比较，根据基因的表达水平差异分析所生成的模式，因为这些模式涉及例如所检测基 因的疾病相关性、信号转导途径、细胞定位、表达水平、大小、结构或功能。这些分析可在影响表达模式的其它化合物或低聚化合物存在或不存在的情况下对刺激的或未刺激的细胞进行。

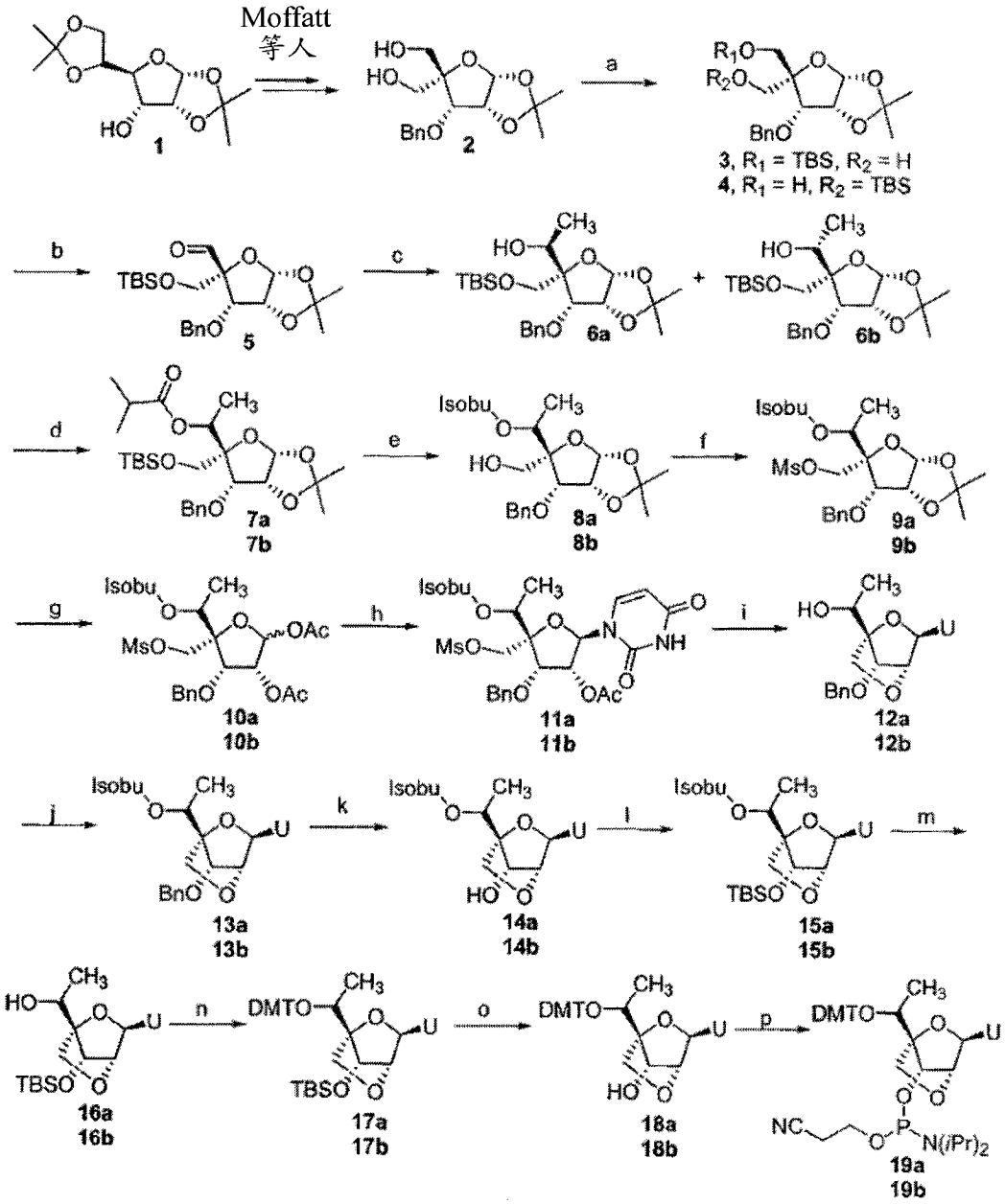
[0131] 本领域已知的基因表达分析方法的范例包括 DNA 阵列或微阵列 (Brazma 和 Vilo，FEBS Lett.，2000，480，17-24 ；Celis，等 人，FEBS Lett.，2000，480，2-16)，SAGE(基 因 表 达 系 列 分 析)(Madden，等 人，Drug Discov. Today，2000，5，415-425)，READS(消 化 的 cDNAs 的限制性酶扩增)(Prashar 和 Weissman，Methods Enzymol.，1999，303，258-72)，TOGA(总 基 因 表 达 分 析)(Sutcliffe，等 人，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.，2000，97，1976-81)，蛋白阵列和蛋白组学 (Celis，等人，FEBS Lett.，2000，480，2-16 ；Jungblut，等人，Electrophoresis，1999，20，2100-10)，表达序列标记 (EST) 测序 (Celis，等人，FEBS Lett.，2000，480，2-16 ；Larsson，等人，J. Biotechnol.，2000，80，143-57)，消减 RNA 指纹 (SuRF)(Fuchs，等人，Anal. Biochem.，2000，286，91-98 ；Larson，等人，Cytometry，2000，41，203-208)，消减克隆，差异展示 (DD)(Jurecic and Belmont，Curr. Opin. Microbiol.，2000，3，316-21)，比较基因组杂交 (Carulli，等人，J. Cell Biochem. Suppl.，1998，31，286-96)，FISH(荧光原位杂交) 技术 (Going and Gusterson，Eur. J. Cancer，1999，35，1895-904) 以及质谱方法 (To，Comb. Chem. High Throughput Screen，2000，3，235-41)。

[0132] 本发明已对其某些实施方式进行了特定描述，以下实施例仅用于阐述本发明，并非意在对其进行限制。

[0133] 实施例 1

[0134] (1R，3R，4R，7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(S)-(4，4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 - 乙基]-3-(尿嘧啶 -1- 基)-2，5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷 (19a) 的制备

[0135]



[0136] 路线 1(a)TBSCl,Et_3N,DMAP,CH_2Cl_2,室温,16h(b) 草酰氯,DMSO,Et_3N,CH_2Cl_2,-78℃至室温 (c)MeMgBr,$CeCl_3$,THF,-78℃ (d) 异丁酰氯,Et_3N,DMAP,CH_2Cl_2,室温,16h(e)70% HF/ 吡啶,室温,16h(f) 甲基磺酰氯,Et_3N,DMAP,CH_2Cl_2(g)AcOH,Ac_2O,浓 H_2SO_4(h) 尿嘧啶,BSA,TMSOTf,CH_3CN,回流,2h (i)NaOH,水,二噁烷 (j) 异丁酸酐,DMAP,吡啶 (k)Pd/C,H_2 气球 (l)TBSCl,咪唑,DMF(m)K_2CO_3,MeOH(n)DMTCl,2,6- 二甲基吡啶,吡啶,45℃ (o)$Et_3N.3HF$,Et_3N,THF(p)$(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$,四唑,NMI,DMF。

[0137] A) 化合物 4 的制备

[0138] 将叔丁基二甲基甲硅烷氯 (6.24g,40.7mmol) 的二氯甲烷溶液 (10mL) 在 10 分钟内通过加液漏斗添加至化合物 2(12g,38.8mmol,参照 Mo ffatt 等人, J.Org.Chem.1979,44,1301 的方法进行制备)、三乙胺 (11.44mL,81.5mmol) 以及 4- 二甲基氨乙基吡啶 (0.47g,3.9mmol) 的冷 (0℃)CH_2Cl_2 溶液 (184mL) 中。添加完成后,将反应逐渐加热至室温,并继续搅拌 16 小时。以 CH_2Cl_2 稀释反应物,依次以 5% HCl 水溶液、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤,干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。柱层析 (SiO_2,以 10%的 EtOAc/ 己烷 -20% EtOAc/ 己烷 -30%

EtOAc/hexane 洗脱）纯化提供白色固体状的化合物 3(11.53g,59％）和化合物 4(3.93g,22％）。

[0139] B) 化合物 5 的制备

[0140] 将二甲亚砜(1.84mL,26.0mmol)加入到草酰氯(1.14mL,13.0mmol)的 CH_2Cl_2(70mL)冷(-78℃）溶液中。将该溶液在 -78℃下搅拌 30 分钟，然后通过插管添加化合物 4(3.93g,9.3mmol)的 CH_2Cl_2(20mL)溶液。继续搅拌 45 分钟并向反应中添加三乙胺((5.48mL,39.0mmol)。将反应物继续搅拌 40 分钟，然后注入 CH_2Cl_2，并依次以 5％ HCl 水溶液，饱和 $NaHCO_3$，盐水洗涤有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩得到化合物 5，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0141] C) 化合物 6a 和化合物 6b 的制备

[0142] 将氯化铈 III(4.57g,18.6mmol)的 THF 溶液 (55mL) 在室温下搅拌 90 分钟。在冰浴中冷却反应物，在 5 分钟内添加甲基溴化镁 (13.3mL 的 1M THF 溶液)，然后继续搅拌 90 分钟。将粗化合物 5(由前面获得）的 THF 溶液 (15mL) 加入反应物。继续搅拌 90 分钟后，以饱和 NH_4Cl 溶液终止反应并注入 EtOAc。依次以 5％ HCl 水溶液、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤，干燥 (Na_2SO_4) 有机相并真空浓缩。通过柱层析 (SiO_2，依次以 $CHCl_3$；3％丙酮 /$CHCl_3$；最后以 5％丙酮 /$CHCl_3$ 洗脱）纯化得到化合物 6a(2.25g,55％，来自化合物 4) 和化合物 6b(1.84g,45％，来自化合物 4)。

[0143] 6a ^1H NMR(300MHz, $CDCl_3$) δ :7.44-7.29(m,5H),5.68(d,1H, J = 3.8),4.76(d,1H,J = 12.0),4.62(d,1H,J = 12.0),4.58(m,1H),4.44(d,1H,J = 10.3),4.08(d,1H,J = 5.3),3.95(m,1H),3.81(d,1H, J = 10.3),2.84(d,1H, J = 7.5),1.60(s,3H),1.30(s,3H),1.20(d,3H, J = 6.4),0.88(s,9H),0.08(s,3H),0.05(s,3H)。

[0144] 6b ^1H NMR(300MHz, $CDCl_3$) δ :7.39-2.29(m,5H),5.73(d,1H, J = 3.9),4.76(d,1H, J = 11.7),4.58(m,1H, 部分重叠),4.56(d,1H, J = 11.7),4.16(d,1H, J = 5.2),4.14-4.04(m,3H),2.43(d,1H, J = 3.8),1.62(s,3H),1.32(s,3H),1.17(d,3H, J = 6.52),0.88(s,9H),0.08(s,3H),0.05(s,3H)。

[0145] D) 化合物 7a 的制备

[0146] 向化合物 6a(2.29g,5.3mmol)，三乙胺 (1.06mL,7.6mmol) 和 4- 二甲基 - 氨基吡啶 (77mg,0.6mmol) 的冰 (0℃)CH_2Cl_2 溶液 (6mL) 中添加异丁酰氯 (0.67mL,6.3mmol)。室温搅拌 16 小时后，将该反应物注入 EtOAc，并依次以 5％ HCl 水溶液、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩得到化合物 7a，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0147] E) 化合物 8a 的制备

[0148] 将 70％ HF/ 吡啶 (1.25mL) 加入聚丙烯管中的粗品化合物 7a 的 THF 溶液 (25mL) 中。在室温下搅拌 16 小时后再向反应添加三乙胺 (1.25mL)。10 分钟后，将反应物注入 EtOAc，并以水、盐水萃取，干燥 (Na_2SO_4) 并过滤。再向该 EtOAc 溶液添加三乙胺 (1.25mL)，然后真空浓缩该反应物得到化合物 8a，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0149] F) 化合物 9a 的制备

[0150] 向粗品化合物 8a、三乙胺 (1.1mL,7.8mmol) 和 4- 二甲基氨基吡啶 (60mg,0.5mmol) 的冷 (0℃)CH_2Cl_2 溶液 (21mL) 中添加甲烷磺酰氯 (0.46mL,5.8mmol)。室温搅拌 1 小时后，将该反应物注入 $CHCl_3$，并依次以 5％ HCl 水溶液、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相，

干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩得到化合物 9a，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0151] G) 化合物 10a 的制备

[0152] 将浓 H_2SO_4(1 滴) 加入到溶于冰醋酸 (9mL) 和乙酸酐 (1.3mL) 的粗品化合物 9a 中。室温搅拌 1 小时后，将反应物注入 EtOAc，依次以水、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤，干燥 (Na_2SO_4) 有机相并真空浓缩。柱层析 (SiO_2，以 40％的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供无色油状的化合物 10a(2.71g，由化合物 6a 为 99％)。

[0153] H) 化合物 11a 的制备

[0154] 将 N,O- 双 (三甲基甲硅烷基) 乙酰胺 (3.9mL，15.7mmol) 加入到化合物 10a(2.7g，5.2mmol) 和尿嘧啶 (0.73g，6.5mmol) 的 MeCN 悬浮液 (16mL) 中。在 40℃下加热 15 分钟以获得澄清溶液，向反应物中添加三甲基甲硅烷基三氟甲磺酰盐 (1.23mL，6.8mmol)。回流 2 小时后，将反应物冷却至室温并注 入 EtOAc。以饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩得到化合物 11a，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0155] I) 化合物 12a 的制备

[0156] 将 NaOH 溶液 (2M，11mL) 添加至溶于 1,4- 二噁烷： H_2O(1 ： 1，12mL) 的粗品化合物 11a 中。室温搅拌 16 小时后，以 5％ HCl 水溶液 (pH ～ 7) 中和该反应物，并以 25％吡啶 /EtOAc 混合物进行萃取。然后以 50％盐水、盐水洗涤有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。柱层析 (SiO_2，5％ MeOH/$CHCl_3$) 纯化得到白色固定状的化合物 12a(1.56g，由化合物 10a 为 83％)。^1H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ ：8.48(s,br,1H)，7.71(d,1H,J ＝ 8.2)，7.40-7.29(m,5H)，5.71(d,1H,J ＝ 8.3)，5.67(s,1H)，4.67(d,2H,J ＝ 11.5)，4.54(d,1H,J ＝ 11.5)，4.48(s,1H)，4.19(m,1H)，4.03(s,1H,J ＝ 7.8)，3.91(s,1H)，3.76(d,1H,J ＝ 7.8)，1.32(d,3H,J ＝ 6.6)。

[0157] J) 化合物 13a 的制备

[0158] 将异丁酸酐 (0.86mL，5.2mmol) 添加至化合物 12a(1.56g，4.3mmol) 和 4- 二甲基氨基吡啶 (10mg) 的冰 (0℃) 吡啶溶液 (8.6mL) 中。将反应搅拌 16 小时，同时逐渐加温至室温。将反应物注入 EtOAc，以盐水萃取有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。柱层析 (SiO_2，50％ EtOAc/ 己烷) 纯化提供白色固体状的化合物 13a(1.68g，90％)。

[0159] K) 化合物 14a 的制备

[0160] 将 MeOH(20mL) 小心添加至 PdVC(10％ w/w，190mg) 和化合物 13a(1.68g，3.9mmol) 的混合物中。将上述混合物用 H_2 气球氢化 16 小时。用硅藻土过滤去除催化剂，浓缩提供化合物 13a 和 14a 的粗品混合物。重复上 述步骤直至在反应混合物中无法检测 (TLC) 到化合物 13a。柱层析 (SiO_2，7％ MeOH/$CHCl_3$) 纯化提供白色固体状的化合物 14a(1.35g，92％)。

[0161] L) 化合物 15a 的制备

[0162] 将叔丁基二甲基甲硅烷基氯 (1.95g，13.0mmol) 添加至化合物 14a(1.35g，4mmol) 和咪唑 (1.76g，25.9mmol) 的 DMF 溶液 (8mL) 中。室温搅拌 16 小时后，将反应物注入 EtOAc，以盐水萃取，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。柱层析 (5％ MeOH/$CHCl_3$) 纯化提供白色固体状的化合物 15a(1.63g，90％)。

[0163] M) 化合物 16a 的制备

[0164] 向化合物 16a 的 MeOH(20mL) 溶液中添加 K_2CO_3(0.99g，7.1mmol)。室温搅拌 16 小时后，浓缩该反应物并通过柱层析 (SiO_2，10％ MeOH/$CHCl_3$) 纯化得到白色固体状的化合物

16a(1.15g,75%)。

[0165] N)化合物17a的制备

[0166] 将4,4′-二甲氧三苯甲基氯(DMTCl)(2.53g,7.5mmol)加入到化合物16a(1.15g,3.0mmol)和2,6-二甲基吡啶(0.87mL,7.5mmol)的吡啶溶液(20mL)中。将反应物在45℃下加热24小时,然后再添加DMTCl(0.43g,1.3mmol)和2,6-二甲基吡啶(0.15mL,1.27g)。再在45℃下加热24小时后,将反应物注入EtOAc,以盐水萃取,干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2,25% EtOAc/己烷-50% EtOAc/己烷)纯化提供黄色泡沫状的化合物17a(2.0g,97%)。17a ^1H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ:8.75(s,br,1H),8.09(d,1H,J=8.2),7.49-7.19(m,9H),6.82(m,4H),5.68(s,1H),5.66(d,1H,J=8.2,部分重叠),4.33(s,1H),4.24(s,1H),3.86(d,1H,J=7.6),3.80(s,6H),3.72(m,2H),0.96(d,3H,J=6.5),0.77(s,9H),0.03(s,3H),-0.10(s,3H)。

[0167] N)化合物18a的制备

[0168] 在聚丙烯管中向化合物17a(1.09g,1.6mmol)和三乙胺(0.45mL,3.2mmol)的THF(8mL)溶液中添加三乙胺三氢氟酸盐(1.29mL,8.0mmol)。室温搅拌48小时后,将反应物注入EtOAc,依次以水、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥(Na_2SO_4)并真空浓缩。柱层析(SiO_2,以25%丙酮/$CHCl_3$-40%丙酮/$CHCl_3$洗脱)纯化提供白色泡沫状的化合物18a(0.79g,86%)。

[0169] O)(1R,3R,4R,7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′-二甲氧三苯甲基)氧基-乙基]-3-(尿嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷,化合物19a的制备

[0170] 将2-氰乙基N,N′-四异丙基亚磷酰胺(0.43mL,2.0mmol)加入到化合物18a(0.78g,1.4mmol)、四唑(76.0mg,1.1mmol)和N-甲基-咪唑(28μL,0.3mmol)的DMF溶液(7mL)中。室温搅拌8小时后,将反应物注入EtOAc,依次以90%盐水、盐水洗涤有机相,干燥(Na_2SO_4)并真空浓缩。柱层析(SiO_2,以60% EtOAc/己烷-75% EtOAc/己烷洗脱)纯化提供白色固体状的化合物19a(0.91g,87%)。19a ^{31}P NMR(300MHz,$CDCl_3$)δ:149.1,148.5。

[0171] 实施例2

[0172] (1R,3R,4R,7S)-7-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧.基]-1-[1-(R)-(4,4′-二甲氧三苯甲基)氧基-乙基]-3-(尿嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷,化合物19b的制备(路线1)

[0173] A)化合物7b的制备

[0174] 向化合物6b(1.90g,4.4mmol)、三乙胺(0.88mL,6.3mmol)和4-二甲基-氨基吡啶(53mg,0.4mmol)的冰(0℃)CH_2Cl_2溶液(5mL)中添加异丁酰氯(0.55mL,5.2mmol)。室温搅拌16小时后,将该反应物注入EtOAc,并依次以5% HCl水溶液、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥(Na_2SO_4)并真空浓缩得到化合物7b,其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0175] B)化合物8b的制备

[0176] 将70% HF/吡啶(2.0mL)加入聚丙烯管中的粗品化合物7b的THF溶液(30mL)中。在室温下搅拌16小时后,向反应添加三乙胺(2.0mL)。10分钟后,将反应物注入EtOAc,并以水、盐水萃取,干燥(Na_2SO_4)并过滤。再向该EtOAc溶液添加三乙胺(2.0mL),然后真空

浓缩该反应物得到化合物 8b，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0177] C) 化合物 9b 的制备

[0178] 向粗品化合物 8b、三乙胺 (0.88mL，6.3mmol) 和 4- 二甲基氨基吡啶 (53mg，0.4mmol) 的冷 (0℃) CH_2Cl_2 溶液 (16mL) 中添加甲烷磺酰氯 (0.40mL，5.2mmol)。室温搅拌 1 小时后，将该反应物注入 $CHCl_3$，并依次以 5% HCl 水溶液、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩得到化合物 9b，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0179] D) 化合物 10b 的制备

[0180] 将浓 H_2SO_4(1 滴) 加入溶于冰醋酸 (9mL) 和乙酸酐 (1.3mL) 的粗品化合物 9b 中。室温搅拌 1 小时后，将反应物注入 EtOAc，依次以水、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤，干燥 (Na_2SO_4) 有机相并真空浓缩。柱层析 (SiO_2，以 40％的 EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化提供无色油状的化合物 10b(2.0g，由 6b 为 90％)。

[0181] E) 化合物 11b 的制备

[0182] 将 N，O- 双 (三甲基甲硅烷基) 乙酰胺 (2.73mL，11.0mmol) 加入到化合物 10b(2.0g，3.9mmol) 和尿嘧啶 (0.52g，4.6mmol) 的 CH_3CN 悬浮液 (11mL) 中。在 40℃下加热 15 分钟以获得澄清溶液，向反应物中添加三甲基甲硅烷基三氟甲磺酰盐 (0.87mL，4.8mmol)。回流 2 小时后，将反应物冷却至室温并注入 EtOAc。以饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩得到化合物 11b，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0183] F) 化合物 12b 的制备

[0184] 将 NaOH 溶液 (2M，8.0mL) 添加至粗品化合物 11b 的 1，4- 二噁烷：H_2O(1 ： 1，8mL) 溶液中。室温搅拌 16 小时后，以 5% HCl 水溶液 (pH ～ 7) 中和该反应物，并以 25％吡啶 / EtOAc 混合物进行萃取。然后以 50％盐水、盐水洗涤该有机相，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。柱层析 (SiO_2，5% MeOH/$CHCl_3$) 纯化提供白色固体状的化合物 12b(1.30g，由化合物 10b 为 98％)。12b ^{1}HNMR(300MHz，$CDCl_3$) δ ：8.90(s，br，1H)，7.52(d，1H，J ＝ 8.2)，7.43-7.29(m，5H)，5.72(d，1H，J ＝ 8.2)，5.64(s，1H)，4.68(d，1H，J ＝ 11.5)，4.59(s，1H)，4.51(d，1H，J ＝ 11.5)，4.31(m，1H，部分重叠)，4.24(d，1H，J ＝ 8.1)，3.96(d，1H，J ＝ 8.1)，3.79(s，1H)，2.25(d，1H，J ＝ 5.2)，1.34(d，3H，J ＝ 6.6)。

[0185] G) 化合物 13b 的制备

[0186] 将异丁酸酐 (0.60mL，3.6mmol) 添加至化合物 12b(1.08g，3.0mmol) 和 4- 二甲基氨基吡啶 (5mg) 的冰 (0℃) 吡啶溶液 (6mL) 中。将反应搅拌 16 小时，同时逐渐升温至室温。将反应物注入 EtOAc，并以盐水萃取，干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩得到化合物 13b，其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0187] H) 化合物 14b 的制备

[0188] 将 MeOH(20mL) 小心添加至 Pd/C(10％ w/w，170mg) 和化合物 13b 的混合物中。将上述混合物用 H_2 气球氢化 16 小时。用硅藻土过滤去除催化 剂，浓缩提供化合物 13b 和 14b 的粗品混合物。重复上述步骤直至在反应混合物中无法检测 (TLC) 到化合物 13b。柱层析 (SiO_2，7％ MeOH/$CHCl_3$) 纯化提供白色固体状的化合物 14b(0.84g，由化合物 12b 为 83％)。

[0189] I) 化合物 15b 的制备

[0190] 将叔丁基二甲基甲硅烷基氯 (1.49g，9.9mmol) 添加至化合物 14b(0.84g，2.5mmol) 和咪唑 (1.35g，19.9mmol) 的 DMF 溶液 (5mL) 中。室温搅拌 16 小时后，将反应物

注入EtOAc，以盐水萃取，干燥（Na_2SO_4）并真空浓缩。柱层析（5％ MeOH/$CHCl_3$）纯化提供白色固体状的化合物15b(0.92g,81％）。

[0191] J）化合物16b的制备

[0192] 向化合物15b的MeOH溶液（10mL）添加K_2CO_3(0.70g,5.1mmol)。室温搅拌16小时后，浓缩该反应物并在90％盐水和25％吡啶/EtOAc之间进行分配。收集有机相，干燥（Na_2SO_4）并真空浓缩提供化合物16b，其可在不作进一步纯化下用于下一步骤。

[0193] K）化合物17b的制备

[0194] 将4,4′-二甲氧三苯甲基氯（DMTCl)(1.87g,5.5mmol)加入到化合物16b(0.71g,1.8mmol)和2,6-二甲基吡啶（0.64mL,5.5mmol）的吡啶溶液（20mL）中。在45℃下加热48小时后，将反应物注入EtOAc，以盐水萃取，干燥（Na_2SO_4）并浓缩。柱层析（SiO_2，25％ EtOAc/己烷-50％ EtOAc/己烷）纯化提供黄色泡沫状的化合物17b(1.29g，由化合物15b为93％）。17b ^1H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ：8.70(s，br,1H)，7.61(d,1H，J＝8.2)，7.49-7.16(m,9H)，6.82(d,4H，J＝8.9)，5.63(s,1H)，5.56(d,1H，J＝8.2)，4.25(s,1H)，3.97(d,1H,J＝8.1)，3.85(s,1H)，3.79(s,6H)，3.70(d,1H,J＝8.1)，3.58(m,1H)，1.12(d,3H,J＝6.6)，0.79(s,9H)，0.01(s,3H)，-0.01(3H)。

[0195] L）化合物18b的制备

[0196] 在聚丙烯管中向化合物17b(0.89g,1.3mmol)和三乙胺（0.46mL,3.3mmol）的THF(6.5mL)溶液中添加三乙胺三氢氟酸盐（1.06mL,6.5mmol）。室温搅拌48小时后，将反应物注入EtOAc，依次以水、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤有机相，干燥（Na_2SO_4）并真空浓缩。柱层析（SiO_2，以30％丙酮/$CHCl_3$-45％丙酮/$CHCl_3$洗脱）纯化提供白色泡沫状的化合物18b(0.73g,98％）。

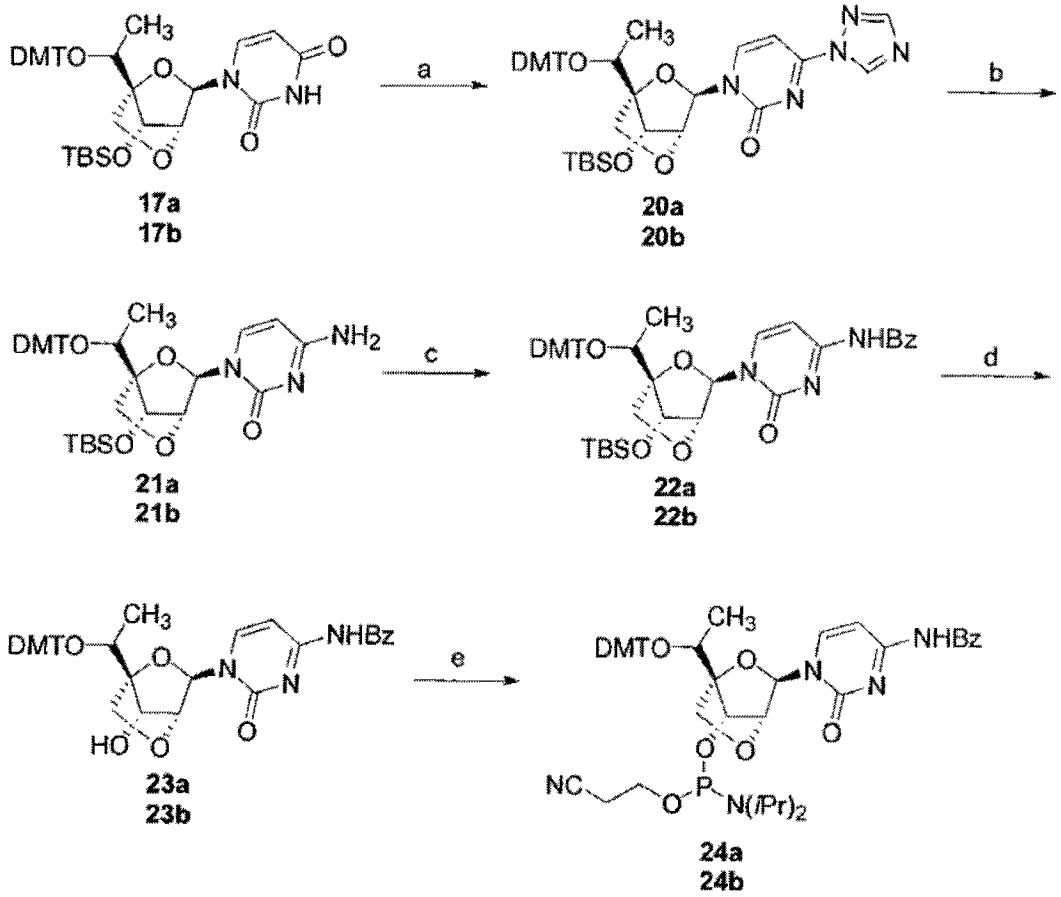
[0197] M)(1R,3R,4R,7S)-7-[2-氰基乙氧基（二异丙基氨基）膦氧基]-1-[1-(R)-(4,4′-二甲氧三苯甲基）氧基-乙基]-3-(尿嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷，化合物19b的制备

[0198] 将2-氰乙基NN′-四异丙基亚磷酰胺（0.60mL,1.9mmol）加入到化合物18b(0.73g,1.3mmol)、四唑（71mg,1.0mmol）和N-甲基咪唑（26μL,0.3mmol）的DMF溶液（6mL）中。室温搅拌8小时后，将反应物注入EtOAc，依次以90％盐水、盐水洗涤有机相，干燥（Na_2SO_4）并真空浓缩。柱层析（SiO_2，以10％丙酮/$CHCl_3$-15％丙酮/$CHCl_3$洗脱）纯化提供白色固体状的化合物19b(0.89g,91％）。19b ^{31}P NMR(300MHz,$CDCl_3$) δ：149.4,148.6。

[0199] 实施例3

[0200] (1R,3R,4R,7S)-7-[2-氰基乙氧基（二异丙基氨基）膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′-二甲氧三苯甲基）氧基-乙基]-3-(4-N-苯甲酰基-胞嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂-双环[2.2.1]庚烷，化合物24a的制备

[0201]



[0202] 路线 2(a)1,2,4- 三唑,$POCl_3$,Et_3N,CH_3CN(b) 氨水,二噁烷 (c) 苯甲酸酐,DMF(d) $Et_3N.3HF$,Et_3N,THF(e) $(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$,NMI,四唑,DMF

[0203] A) 化合物 20a 的制备

[0204] 将三氯氧磷 (0.98mL,10.5mmol) 逐滴添加至 1,2,4- 三唑 (3.10g,44.9mmol) 冷 (0℃) 的 CH_3CN 悬浮液 (17mL) 中。搅拌 10 分钟后,向反应物中加入三乙胺 (7.4mL,51.8mmol),继续搅拌 30 分钟。将化合物 17a(0.91g,1.3mmol) 的 CH_3CN 溶液 (8mL) 添加至反应物中,继续在室温下搅拌 4 小时。将该反应物注入 EtOAc,以 H_2O、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩得到粗品化合物 20a,其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0205] B) 化合物 21a 的制备

[0206] 将氨水溶液 (4mL) 添加至化合物 20a 的 1,4- 二噁烷溶液 (20mL) 中。室温搅拌 16 小时后,将反应物真空浓缩。柱层析 (SiO_2,以 5% 的 MeOH/$CHCl_3$ 洗脱) 纯化提供白色固体状的化合物 21a(0.80g,由化合物 17a 为 89%)。

[0207] C) 化合物 22a 的制备

[0208] 向化合物 21a(0.80g,1.2mmol) 的 N,N- 二甲基甲酰胺溶液 (3mL) 中添加苯甲酸酐 (0.41g,1.8mmol)。室温搅拌 16 小时后,将反应物在高真空下浓缩。柱层析 (SiO_2,以 50% EtOAc/ 己烷洗脱) 纯化得到化合物 22a(0.81g,88%)。

[0209] D) 化合物 23a 的制备

[0210] 向化合物 22a(0.81g,1.1mmol) 和三乙胺 (0.35mL,2.5mmol) 的 THF 溶液 (7mL) 中添加三乙胺三氢氟酸盐 (1.00mL,6.1mmol)。室温搅拌 48 小时后,将反应物注入 EtOAc,依次以 H_2O、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。柱层析 (SiO_2,以 90% EtOAc/

己烷洗脱）纯化得到化合物 23a(0.68g,99％）。

[0211] E)(1R,3R,4R,7S)-7-[2-氰基乙氧基（二异丙基氨基）膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′-二甲氧三苯甲基）氧基-乙基]-3-(4-N-苯甲酰基-胞嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂-双环 [2.2.1] 庚烷,化合物 24a 的制备

[0212] 将 2-氰乙基 N,N′-四异丙基亚磷酰胺 (0.48mL,1.5mmol) 加入到化合物 23a(0.68g,1.0mmol)、四唑 (56mg,0.81mmol) 和 N-甲基咪唑 (20μL,0.3mmol) 的 DMF 溶液 (5mL) 中。室温搅拌 8 小时后,将反应物注入 EtOAc,依次以 90％盐水、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。柱层析 (SiO_2,以 60％ EtOAc/ 己烷 90％ EtOAc/ 己烷洗脱）纯化提供白色固体状的化合物 24a(0.73g,84％）。24a ^{31}P NMR(300MHz,$CDCl_3$) δ :149.4,148.6。

[0213] 实施例 4

[0214] (1R,3R,4R,7S)-7-[2-氰基乙氧基（二异丙基氨基）膦氧基]-1-[1-(R)-(4,4′-二甲氧三苯甲基）氧基-乙基]-3-(4-N-苯甲酰基-胞嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂-双环 [2.2.1] 庚烷,化合物 24b 的制备（路线 2)

[0215] A) 化合物 20b 的制备

[0216] 将三氯氧磷 (1.3mL,14.0mmol) 逐滴添加至 1,2,4-三唑 (4.10g,59.5mmol) 的冷 (0℃)CH_3CN 悬浮液 (30mL) 中。搅拌 10 分钟后,向反应中加入三乙胺 (9.80mL,70.0mmol),继续搅拌 30 分钟。将化合物 17b(1.20g,1.8mmol) 的 CH_3CN 溶液 (10mL) 添加至反应中,继续在室温下搅拌 4 小时。将该反应物注入 EtOAc,以 H_2O、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩得到粗品化合物 20b,其可在不作任何纯化下用于下一步骤。

[0217] B) 化合物 21b 的制备

[0218] 将氨水溶液 (5mL) 添加至三唑 (triazolide)20b（由上文获得）的 1,4-二噁烷溶液 (25mL) 中。室温搅拌 16 小时后,将反应物浓缩得到化合物 21b,其在高真空下干燥 24 小时,并不经纯化直接用于下一步骤。

[0219] C) 化合物 22b 的制备

[0220] 向化合物 21b(0.80g,1.2mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (3mL) 中添加苯甲酸酐 (0.59g,2.6mmol)。室温搅拌 16 小时后,将反应物在高真空下浓缩。柱层析 (SiO_2,以 50％ EtOAc/ 己烷洗脱）纯化得到化合物 22b(1.36g,由化合物 17b 为 87％）。

[0221] D) 化合物 23b 的制备

[0222] 向化合物 23b(1.35g,1.7mmol) 和三乙胺 (0.57mL,4.1mmol) 的 THF 溶液 (12mL) 中添加三乙胺三氢氟酸盐 (1.66mL,10.2mmol)。室温搅拌 48 小时后,将反应物注入 EtOAc,依次以 H_2O、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。柱层析 (SiO_2,以含于氯仿的 20％至 40％丙酮洗脱）纯化得到化合物 23b(1.03g,90％）。

[0223] E)(1R,3R,4R,7S)-7-[2-氰基乙氧基（二异丙基氨基）膦氧基]-1-[1-(R)-(4,4′-二甲氧三苯甲基）氧基-乙基]-3-(4-N-苯甲酰基-胞嘧啶-1-基)-2,5-二氧杂-双环 [2.2.1] 庚烷,化合物 24b 的制备

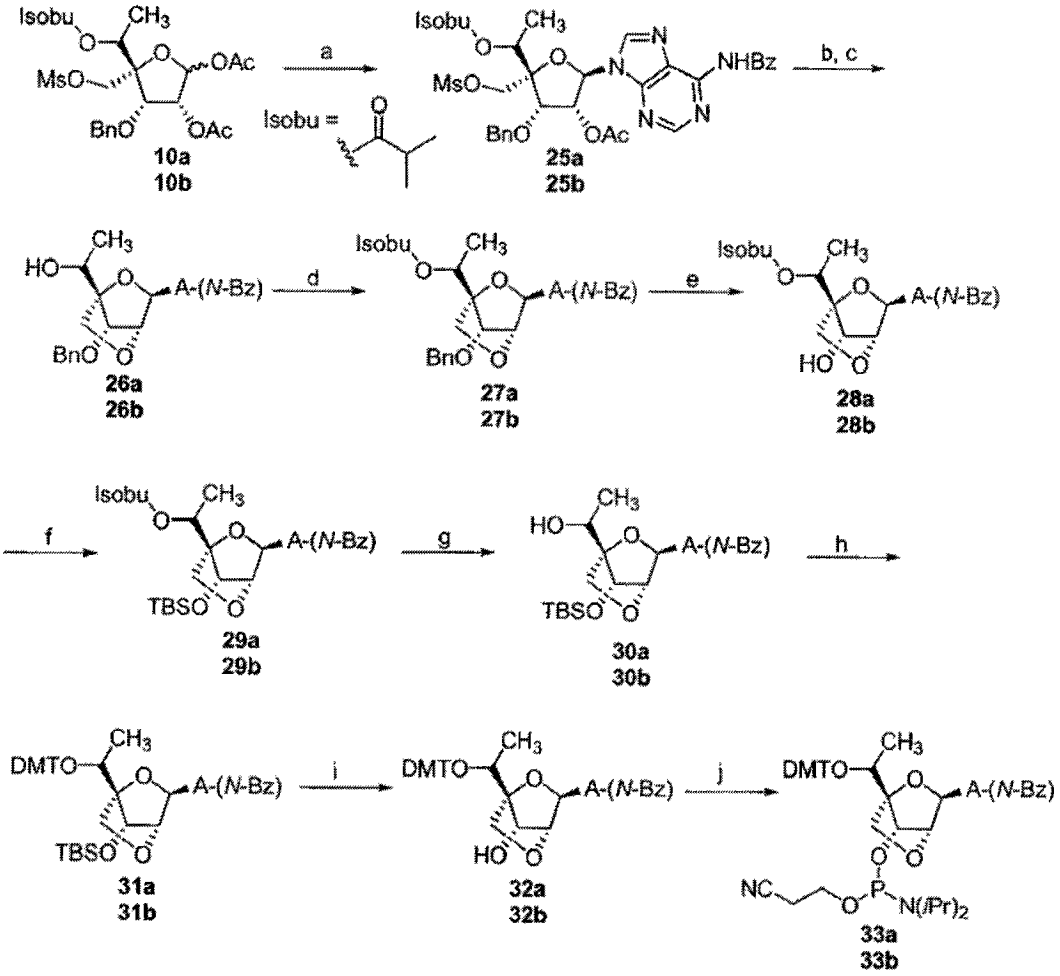
[0224] 将 2-氰乙基 N,N′-四异丙基亚磷酰胺 (0.73mL,2.3mmol) 加入化合物 23b(1.03g,1.53mmol)、四唑 (85mg,1.2mmol) 和 N-甲基咪唑 (31μL,0.38mmol) 的 DMF 溶液 (7.7mL) 中。室温搅拌 8 小时后,将反应物注入 EtOAc,依次以 90％盐水、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并真空浓缩。柱层析 (SiO_2,以 60％至 90％的 EtOAc/ 己烷洗脱）纯化提

供白色固体状的化合物 24b(1.22g,91％)。24b ^{31}P NMR(300MHz,$CDCl_3$) δ :149.5,148.8。

[0225] 实施例 5

[0226] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 - 乙基]-3-(6-N- 苯甲酰基腺嘌呤 -9- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷,化合物 33a 的制备

[0227]



[0228] 路线 3(a)6-N-Bz- 腺嘌呤,BSA,TMSOTf(b)K_2CO_3,MeOH(c)TMSCl,吡啶然后为 BzCl,氨水 (d) 异丁酸酐,DMAP,吡啶,16h,室温 (e)10％ Pd/C,H_2 气球,24h 至 48(f)TBSCl,咪唑,DMF,室温,48h(g)K_2CO_3,MeOH,室温,16h(h)DMTCl,2,6- 二甲基吡啶,吡啶,45℃,48h(i)$Et_3N.3HF$,Et_3N,THF,室温,48h(j)$(iPr_2)NPO(CH_2)_2CN$,NMI,四唑,DMF

[0229] 在回流的二氯乙烷中以 6-N-Bz- 腺嘌呤、BSA 和 TMSOTf 通过化合物 10a 的 Vorbruggen 反应制备化合物 25a。将 25a 与氢氧化钠在二噁烷 / 水中继续反应,然后以苯甲酰氯再保护 4- 氨基基团得到核苷化合物 26a。通过所 示的以化合物 11a 制备化合物 19a 的相同步骤由核苷化合物 26a 制备亚磷酰胺,化合物 33a。

[0230] 实施例 6

[0231] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(R)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 - 乙基]-3-(6-N- 苯甲酰基腺嘌呤 -9- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷,化合物 33b 的制备 (路线 3)

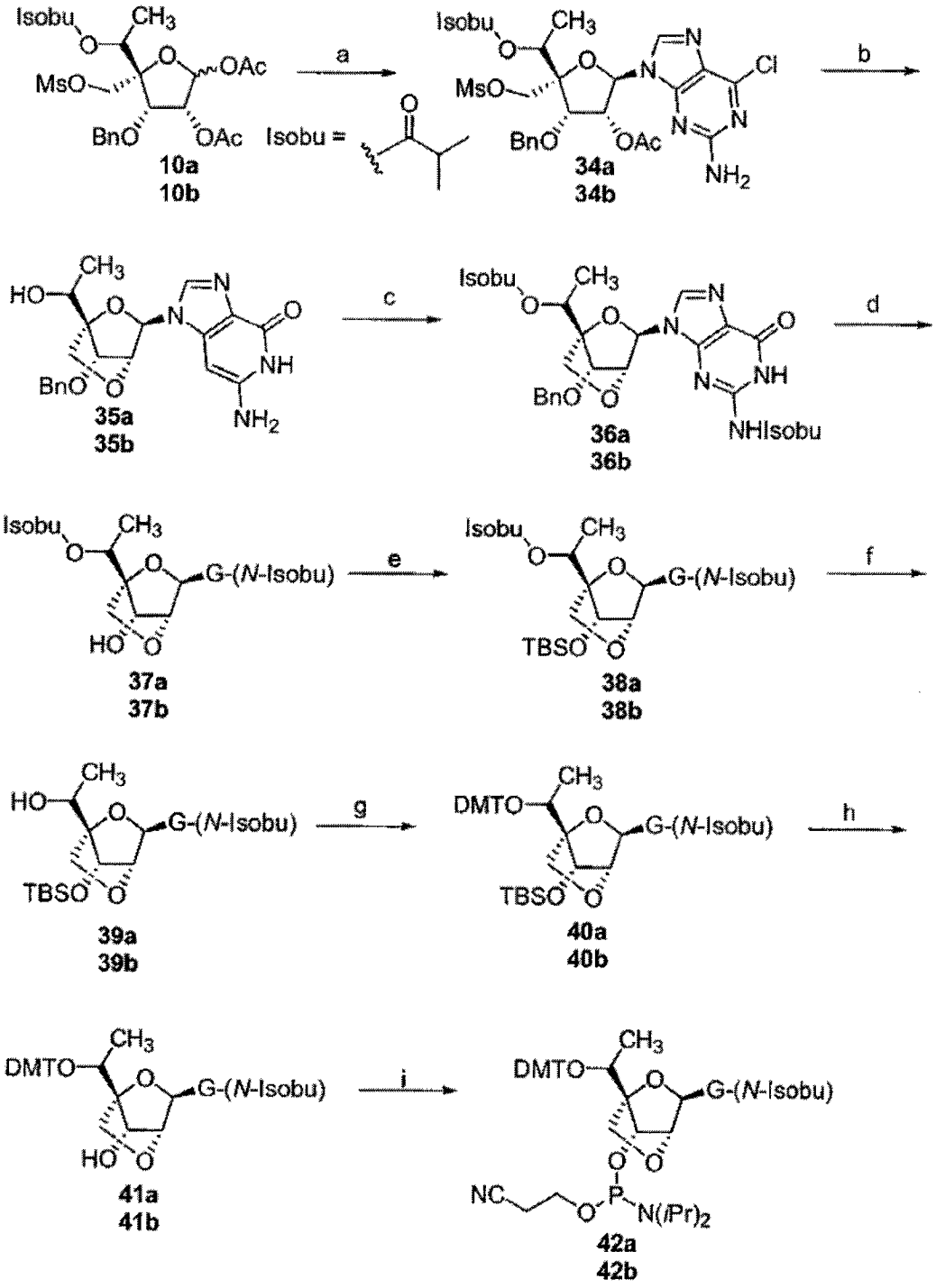
[0232] 在回流的二氯乙烷中以 6-N-Bz- 腺嘌呤、BSA 和 TMSOTf 通过化合物 10b 的

Vorbruggen 反应制备化合物 25b。将 25b 与氢氧化钠在二噁烷 / 水中继续反应，然后以苯甲酰氯再保护 4- 氨基基团得到核苷化合物 26b。通过所示的以化合物 11b 制备化合物 19b 的相同步骤由核苷化合物 26b 制备亚磷酰胺，化合物 33b。

[0233] 实施例 7

[0234] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基（二异丙基氨基）膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ -二甲氧三苯甲基）氧基 - 乙基]-3-(2-N- 异丁酰鸟嘌呤 -9- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷，化合物 42a 的制备

[0235]



[0236] 路线 4(a)2- 氨基 -6- 氯嘌呤，BSA，TMSOTf，DCE，回流；(b)3- 羟基丙腈，NaH，THF，

4h ;(c) 异丁酸酐,DMAP,吡啶 ;(d)Pd/C,H_2 气球 ;(e)TBSCl,咪唑,DMF,室温 ;(f)K_2CO_3,MeOH,室温,16h(g)DMTCl,2,6- 二甲基吡啶,吡啶,45℃,48h(h)$Et_3N.3HF$, Et_3N, THF,室温,48h(i)$(iPr_2)NPO(CHs)_2CN$,NMI,四唑,DMF

[0237] 在回流的二氯乙烷中以 2- 氨基 -6- 氯嘌呤、BSA 和 TMSOTf 通过化合物 10a 的 Vorbruggen 反应制备化合物 34a。核苷 34a 与 3- 羟基丙腈和氢化钠的反应提供了环化的核苷 35a。通过所示的以化合物 11a 制备化合物 19a 的相同步骤由核苷化合物 35a 制备亚磷酰胺,化合物 42a。

[0238] 实施例 8

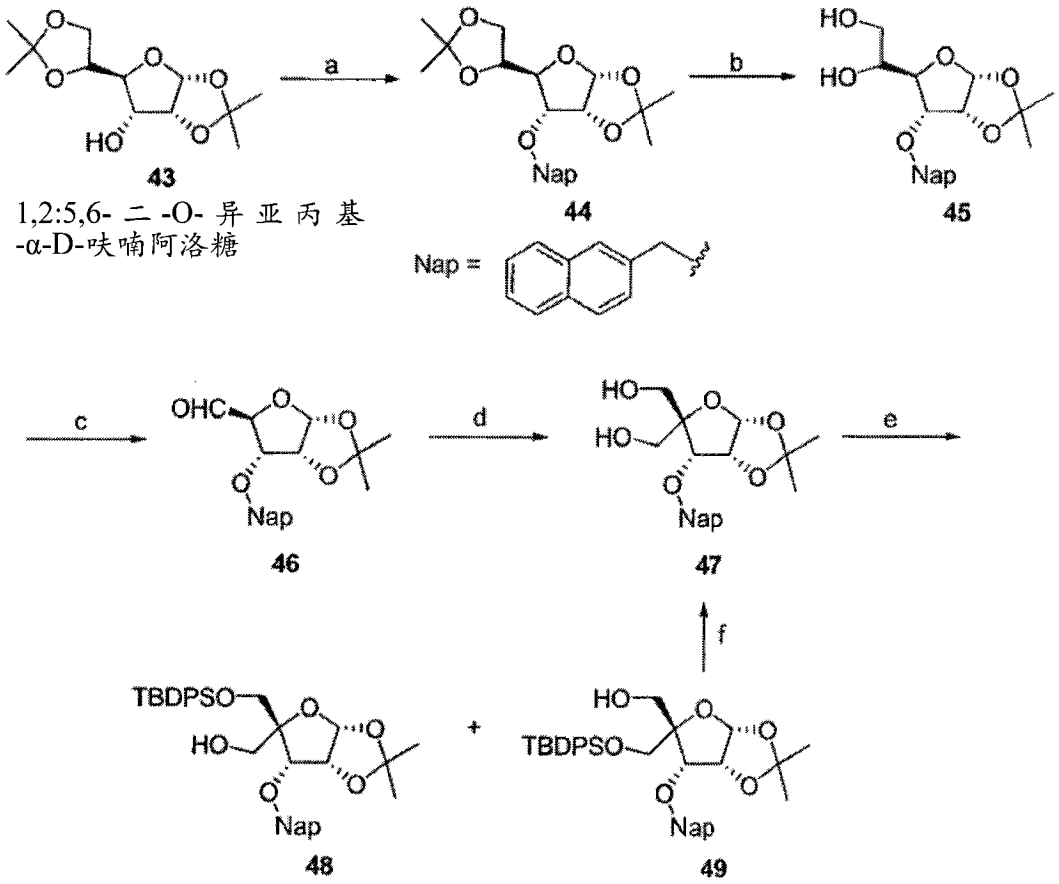
[0239] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(R)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 - 乙基]-3-(2-N- 异丁酰鸟嘌呤 -9- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷,化合物 42b 的制备 (路线 4)

[0240] 在回流的二氯乙烷中以 2- 氨基 -6- 氯嘌呤、BSA 和 TMSOTf 通过化合物 10b 的 Vorbruggen 反应制备化合物 34b。核苷 34b 与 3- 羟基丙腈和氢化钠的反应提供了环化的核苷 35b。通过所示的以化合物 11b 制备化合物 19b 的相同步骤由核苷化合物 35b 制备亚磷酰胺,化合物 42b。

[0241] 实施例 9

[0242] 化合物 48 的制备

[0243]



[0244] 路线 5(a)NapBr, NaH, DMF(b)AcOH, H_2O(c)$NaIO_4$, 二噁烷,水 (d)HCHO, NaOH, 水, THF(e)TBDPSCl, Et_3N, CH_2Cl_2(f)TBAF, THF

[0245] A) 化合物 44 的制备

[0246] 在三口烧瓶 (500mL) 中将市售的 1,2 ;5,6- 二 -O- 异亚丙基 - α -D- 呋喃阿洛糖，化合物 43，(135g，519.0mmol) 和 2-(溴甲基)- 萘 (126g，570.0mmol) 溶解于 DMF(500mL)，并在冰浴中冷却该反应物。将氢化钠 (60％ w/w，29g，727.0mmol) 小心添加 (每 10 分钟 6g) 至反应中，在添加完成后再行搅拌 60 分钟。此时，TLC 分析显示不再有起始的糖 43。将该反应物小心注入碎冰中 (约 500g)，并剧烈搅拌所得的浆液直至所有的冰融化。通过过滤收集所得的白色固体，并悬浮于水中。使用机械搅拌器剧烈搅拌该悬浮液 30 分 钟，然后过滤采集该固体，并悬浮于己烷中。剧烈搅拌该悬浮液 30 分钟，然后过滤收集该固体，空气干燥 4-6 小时，然后以 P_2O_5 高真空干燥 16 小时，得到供白色固体状的化合物 44(206.0g，99％)。^1H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ :7.85(m,4H)，7.48(m,3H)，5.74(s,1H)，4.92(d,1H，J ＝ 11.7)，4.75(d,1H，J ＝ 11.6)，4.58(m,1H)，4.36(m,1H)，4.15(m,1H)，4.03-3.86(m,3H)，1.61(s,3H)，1.36(s,9H)。

[0247] B) 化合物 45 的制备

[0248] 将化合物 44(200.0g，0.5 摩尔) 分成小份加入乙酸 (2.2L) 和水 (740mL) 的溶液中。将反应物在室温下搅拌 16 小时，随后的 TLC 分析 (30％ EtOAc/ 己烷) 显示了 44 的完全消耗。然后减压浓缩该反应物直至去除大部分乙酸。将剩余溶液注入搅拌中的 EtOAc(1L) 和水 (1L) 的混合物。然后向上述混合物添加固体 KOH 直至该水层呈强碱性 (pH ＞ 12)。然后分离有机层，以饱和重碳酸钠溶液、盐水洗涤有机相，干燥 (Na_2SO_4)，过滤并减压浓缩得到黄色泡沫状的化合物 45，其可在不作任何纯化下使用。

[0249] C) 化合物 46 的制备

[0250] 将 $NaIO_4$(107.0g) 的水 (3L) 溶液在 40 分钟内添加至搅拌 (机械搅拌器) 中的化合物 45(由前文得到的粗品) 的二噁烷溶液 (1.5L) 中。60 分钟后将该反应混合物注入 EtOAc(1.5L)，分离有机层，以水 (1L)、盐水 (1L) 洗涤，干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩得到黄色油状的化合物 46，其可在不作任何纯化下使用。

[0251] D) 化合物 47 的制备

[0252] 将化合物 46(由前面获得的粗品) 溶解于 THF(500mL) 和 H_2O(500mL) 的混合物中，并将反应物在冰浴中冷却。将 2N NaOH(600mL) 和甲醛 (250 mL，37％水溶液) 添加至该反应物，继续在室温下搅拌 3 天。然后将该反应物注入 EtOAc(1L)，并以水 (1L)、盐水 (1L) 洗涤，减压蒸发至剩余约 200mL 的 EtOAc(该过程中形成白色沉淀)。将己烷 (300mL) 添加至该沉淀物，并将该混合物放置 16 小时，然后过滤收集白色固体，以己烷洗涤，通过 P_2O_5 真空干燥得到白色固体状的化合物 47(124g，由 44 为 66％)。^1H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ :7.85(m,4H)，7.48(m,3H)，5.75(d,1H，J ＝ 3.9)，4.96(d,1H.J ＝ 11.8)，4.75(d,1H，J ＝ 11.8)，4.66(m,1H)，4.26(d,1H，J ＝ 5.2)，3.95(m,2H)，3.79(m,1H)，3.63(m,1H)，2.39(m,1H,OH)，1.66(s,3H)，1.34(s,3H)。

[0253] E) 化合物 48 和 49 的制备

[0254] 将叔丁基二苯基氯硅烷 (305.0mmol，84.0mL) 添加至搅拌中的化合物 47(278.0mmol，100.0g) 和三乙胺 (305mmol，43.0mL) 的冷 (0℃) 二氯甲烷溶液 (600mL) 中。添加完成后，将反应加热至室温，并继续搅拌 16 小时。将 MeOH(50mL) 加入反应物 (以去除过量的 TBDPSCl)，并在室温下继续搅拌 2 小时。然后以氯仿稀释该反应物，并以 10％ HCl、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机层，干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩得到稠油。将己烷 (150mL 加入该

油，对该混合物超声直至得到溶液。现在向溶液中加入少量 6（之前通过色谱分离）。放置 16 小时后，再向该厚浆液添加己烷，并过滤收集固体。然后将该固体重悬浮于己烷，并剧烈搅拌 30 分钟。过滤收集该固体以在高真空干燥 16 小时后提供 6(80.5g，48％）。合并滤出液，并减压浓缩。将所得的油重新溶解于最小量的己烷，并通过硅填料（以溶于己烷的 20％ EtOAc 洗脱）。合并还有产物 6 的组分，浓缩并如上文结晶得到白色固体状的第二批 6(20g，12％）。用溶于己烷的 50％ EtOAc 进一步洗脱该硅胶填料得到稠油状的纯化合物 48(40.0g，24％）。此外还分离得到稠油状的 48 和 49（约 15g，9％）的 混合物。二醇 48 ；^{1}H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ ：7.83(m，4H)，7.56(m，7H)，7.30(m，6H)，5.80(s，1H)，4.97(d，1H，J ＝ 11.4)，4.70(m，2H)，4.46(m，1H)，3.92-3.66(m，4H)，2.39(m，1H，OH)，1.67(s，3H)，1.37(s，3H)，0.92(s，9H)．二醇 7 ；^{1}H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ ：7.9-7.3(m，17H)，5.71(d，1H，J ＝ 3.9)，4.86(d，1H，J ＝ 12.2)，4.74(d，1H，J ＝ 12.2)，4.56(m，1H)，4.22(d，1H，J ＝ 11.1)，4.18(m，1H)，4.07(d，1H，J ＝ 11.1)，4.02(dd，1H，J ＝ 4.2，12.0)，3.64(dd，1H，J ＝ 9.4，11.9)，1.89(m，1H)，1.25(s，6H)，1.05(s，9H)。

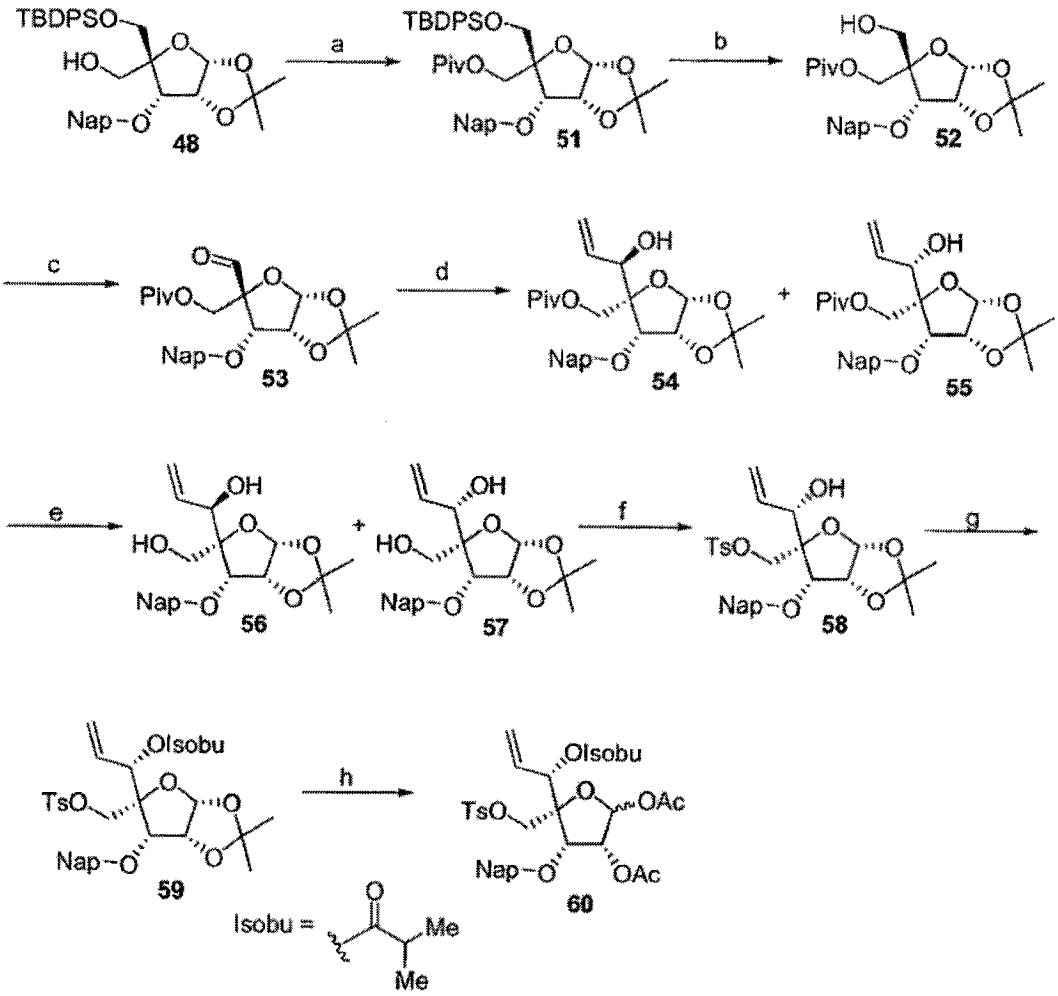
[0255] F) 由化合物 49 回收化合物 47

[0256] 将四丁基氟化铵（70mL 溶于 THF 的 1M 溶液）添加入搅拌中的二醇 49(62.7mmol，37.5g) 的冷（0℃）THF 溶液（250mL）中，然后使反应物逐渐升温至室温。继续搅拌 72 小时后，将反应物真空浓缩，并将残留物倾倒在碎冰中。以额外的 THF(3 倍）洗涤该烧瓶，并加入上述悬浮液。倾析去除上清液，将底部的固体加入搅拌中的己烷（200mL）和水（200mL）的混合物。搅拌 2 小时后，过滤收集该絮状固体，以额外的水和己烷洗涤并高真空干燥，得到白色固体状的化合物 47(20g，89％）。

[0257] 实施例 10

[0258] 化合物 60 的制备

[0259]



[0260] 路线 6(a) 新戊酰氯,DIPEA,DMAP,CH_2Cl_2(b)70% HF/ 吡啶,THF(c) 草酰氯,DMAP,Et_3N,CH_2Cl_2(d) 乙烯基溴化镁,THF(e)NaOH,MeOH,水 (f)TsCl,吡啶 (g) 异丁酰基氯,DIPEA,DMAP,CH_2Cl_2

[0261] A) 化合物 51 的制备

[0262] 将新戊酰氯 (25mmol,3.0mL) 逐滴加入化合物 48(16.7mmol,10.0g)、二异丙基乙胺 (25.0mmol,4.4mL) 和二甲基氨甲基吡啶 (2.5mmol,0.30g) 的冷 (0℃) 二氯甲烷溶液 (35mL) 中。室温搅拌 16 小时后,以氯仿稀释反应物,以 5% HCl、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩得到粗品化合物 51,其可在不作进一步纯化下使用。

[0263] B) 化合物 52 的制备

[0264] 将 70% HF/ 吡啶 (4.2mL) 加入粗品 51(来自上文) 的冷 (0℃) 溶液中。在室温下搅拌 16 小时后再向反应添加 70% HF/ 吡啶 (2.5mL)。再在室温下搅拌 2 天后,向该反应物小心添加三乙胺 (7.5mL)。搅拌 1 小时后,以 $NaHCO_3$ 小心终止该反应,直至 pH ＞ 10。以 EtOAc 稀释反应物,并以盐水进一步洗涤有机层,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。柱层析 (SiO_2,以溶于己烷的 25 至 40% EtOAc 洗脱) 纯化得到油状的化合物 52(7.01g,由化合物 48 为 95%)。

[0265] C) 化合物 53 的制备

[0266] 将 DMSO(3.30mL,46.7mmol) 加入到草酰氯 (23.3mmol,2.0mL) 的二氯甲烷 (120mL) 冷 (-78℃) 溶液中。搅拌 30 分钟后,通过插管向反应物添加溶于二氯甲烷 (30mL) 的化合物 52(15.6mmol,6.91g) 中。在 -78℃下搅拌 45 分钟后,添加三乙胺 (70.0mmol,9.60mL) 并

使反应物升温至0℃。此时的TLC分析显示没有起始物质化合物52，因此以氯仿稀释反应物，以10％ HCl、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤有机相，干燥(Na_2SO_4)并浓缩得到化合物53，其可在不作进一步纯化下使用。

[0267] D)化合物54和55的制备

[0268] 将乙烯基溴化镁(溶于THF的1M溶液，31.1mL)缓慢加入到化合物53的冷(-78℃)THF溶液(120mL)中。-78℃下搅拌2小时后，以饱和NH_4Cl终止反应，并以EtOAc稀释反应物。以10％ HCl、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤该有机层，干燥(Na_2SO_4)并浓缩得到化合物54和化合物55的混合物，其可在不作进一步纯化下使用。

[0269] E)化合物56和57的制备

[0270] 将NaOH(4M，12.5mL)溶液添加入到化合物54和化合物55的二噁烷/甲醇(30mL/10mL)溶液中。室温搅拌4小时后，减压蒸发溶剂，并将残留物溶解于EtOAc。然后以水，盐水洗涤有机相，干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2，以溶于己烷的33至40％ EtOAc洗脱)纯化得到油状的化合物57(2.42g，由53为40％)。提高洗脱液(溶于己烷的60％ EtOAc)的极性得到化合物56(0.82g，由化合物53为14％)。57 ^1H NMR(300MHz，$CDCl_3$)δ：7.94-7.73(m，4H)，7.60-7.46(m，3H)，6.04-5.85(m，1H)，5.69(d，1H，J＝3.6)，5.36(d，1H，J＝17.3)，5.24(d，1H，J＝10.6)，4.97(d，1H，J＝11.7)，4.74(d，1H，J＝11.7)，4.59(m，1H)，4.33(m，2H)，4.19(d，1H，J＝11.9)，3.85(d，1H，J＝11.9)，1.65(s，3H)，1.34(s，3H)。

[0271] F)化合物58的制备

[0272] 将甲苯磺酰氯(9.3nmol，1.77g)加入到化合物57(2.43g，6.29mmol)的冷(0℃)吡啶溶液(12.6mL)中。在0℃下搅拌8小时后，用水终止该反应并以EtOAc稀释。依次以5％ HCl、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤有机层，干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2，以溶于己烷的15％至25％的EtOAc洗脱)纯化得到白色固体状的化合物58(2.58g，76％)。同样分离未反应的57(0.39g，16％)。

[0273] G)化合物59的制备

[0274] 将异丁酰氯(6.9mmol，0.73mL)加入到化合物58(4.6mmol，2.48g)、二异丙基乙胺(6.9mmol，0.88mL)和二甲基氨甲基吡啶(0.68g，83mg)的冷(0℃)二氯甲烷溶液(9mL)中。在0℃下2小时后，向该反应物添加额外的异丁酰氯(6.9mmol，0.73mL)和二异丙基乙胺(6.9mmol，0.88mL)。在0℃下另外2小时后，向该反应物添加额外的异丁酰氯(6.9mmol，0.73mL)和二异 丙基乙胺(6.9mmol，0.88mL)，在0℃下搅拌该反应物16小时。小心向反应中添加水以去除任意未反应的酰基氯，并在室温下继续搅拌1小时。然后以氯仿稀释该反应物，并以5％ HCl、饱和$NaHCO_3$、盐水洗涤有机层，干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2，以溶于己烷的25％ EtOAc洗脱)纯化提供油状的化合物59(2.2g，83％)。在纯化后还可分离未反应的58(0.31g，13％)。

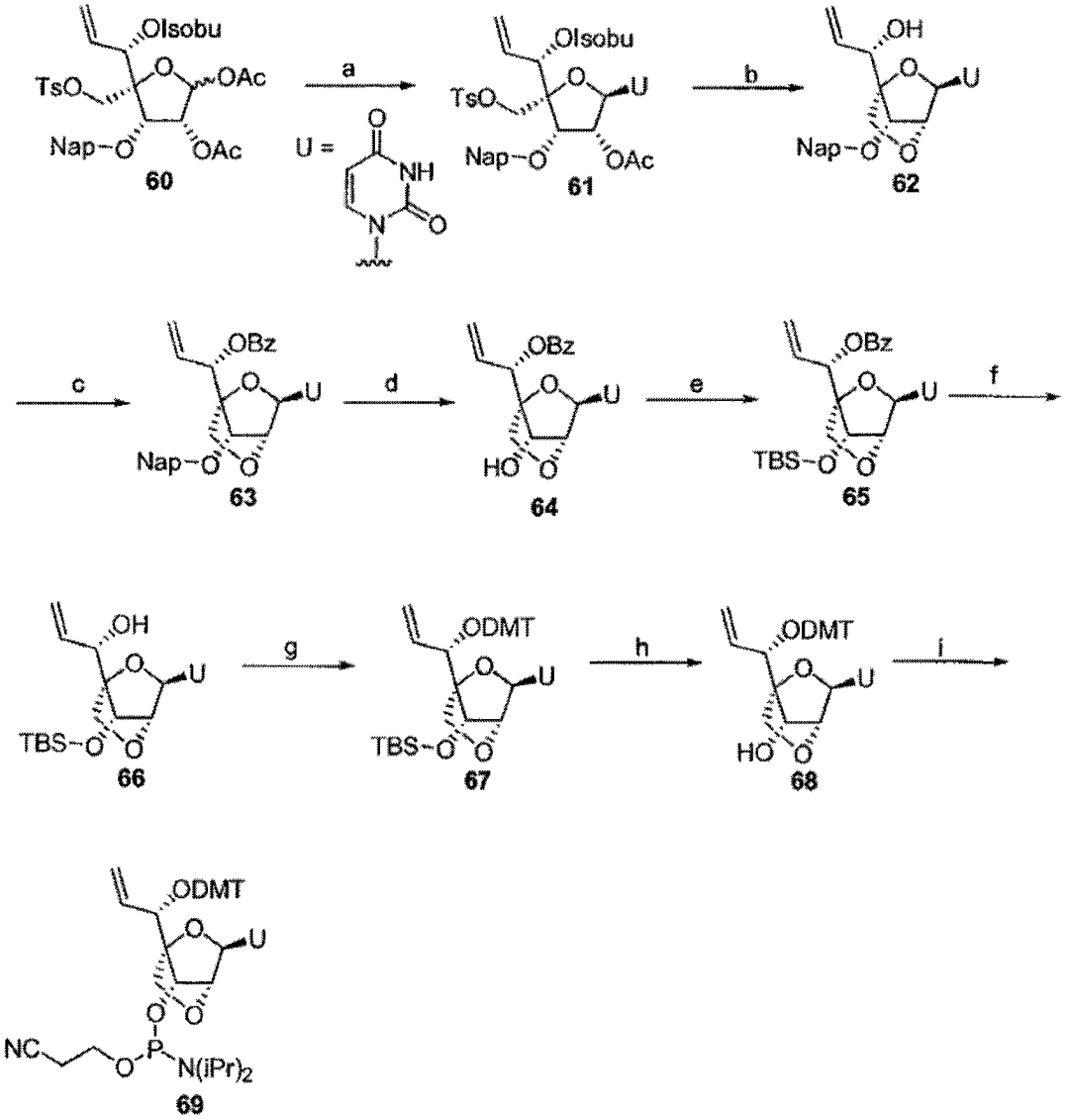
[0275] H)化合物60的制备

[0276] 将浓硫酸(3-4滴)加入到溶于醋酸(11mL)和乙酸酐(3mL)的化合物59(3.6mmol，2.20g)的溶液中。室温搅拌2小时后，在旋转蒸发仪中(不加热)高真空下去除溶剂，并将残留物溶解于EtOAc。然后以饱和$NaHCO_3$、盐水小心洗涤有机相，干燥(Na_2SO_4)并浓缩得到化合物60，其在高真空下以P_2O_5干燥，并可在不作任何纯化下使用。60LCMS：M+23计算值：677.2，测得值：677.1；LC保留时间为2.05分钟。

[0277] 实施例 11

[0278] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 -(3- 丙烯基)]-3-(尿嘧啶 -1- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷 (69) 的制备

[0279]



[0280] 路线 7(a) 尿嘧啶,BSA,TMSOTf,CH_3CN(b)NaOH,二噁烷,水 (c)BzCl,吡啶 (d)DDQ,CH_2Cl_2,水 (e)TBSCl,咪唑,DMF(f)t-$BuNH_2$ 或氨水 (g)DMTCl,吡啶,2,6- 二甲基吡啶 (h)$Et_3N.3HF$,Et_3N,THF(i)$(JPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$,四唑,NMI,DMF

[0281] A) 化合物 61 的制备

[0282] 将 N,O- 双 - 三甲硅烷酰胺 (18.0mmol,4.4mL) 加入到化合物 60(3.6mmol,由前面得到的粗产品) 和尿嘧啶 (7.2mmol,0.81g) 的乙腈悬浮液 (18 mL) 中,将悬浮液温和加热 (使用空气加热枪) 直至得到溶液。在冰浴中冷却该反应物,并将 TMSOTf(7.2mmol,1.3mL) 添加至反应。添加完成后,去除冰浴并将反应物回流 2 小时,然后将其冷却至室温,以 EtOAc 稀释并以饱和 $NaHCO_3$ 溶液小心终止。以盐水进一步洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩得到化合物 61,其可在不作任何纯化下使用。

[0283] B) 化合物 62 的制备

[0284] 将NaOH(2M,7.2mL)溶液添加至粗品化合物61(由前面得到)的冷(0℃)二噁烷溶液(10mL)中。0℃下 2 小时后,向反应中添加额外的NaOH(2M,10mL)。室温下搅拌 16 小时后,以 5% HCl(pH 4-5)酸化反应物,以EtOAc稀释,并以水、盐水洗涤有机相,干燥(Na_2SO_4)并浓缩。形成白色沉淀,用醚小心洗涤,高真空干燥得到核苷化合物 62(0.97g,64%)。通过柱层析(SiO_2,以溶于氯仿的25%丙酮洗脱)得到额外数量的部分纯化化合物62(0.10g,7%)。

[0285] C) 化合物 63 的制备

[0286] 向化合物62(2.0mmol,0.85g)的吡啶溶液(4mL)添加苯甲酸酐(2.8mmol,0.64g)。在室温下搅拌 6 小时后,用水终止该反应并以 EtOAc 稀释。以饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机层,干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2,以溶于己烷的 50% EtOAc 洗脱)纯化得到白色固体状的化合物 63(1.069g,定量)。

[0287] D) 化合物 64 的制备

[0288] 向溶于二氯甲烷(19mL)和水(1mL)的化合物 64(1.9mmol,1.0g)的溶液中添加DDQ(3.8mmol,0.86g)。室温搅拌 24 小时后将反应物减压浓缩。将残留物溶解于 EtOAc,并以水、10%亚硫酸氢钠、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗 涤有机层,干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2,以溶于己烷的 75%的 EtOAc 洗脱)纯化得到化合物 64(0.74g,定量)。

[0289] E) 化合物 65 的制备

[0290] 将 TBSCl(5.8mmol,0.87g)添加至化合物 64(1.9mmol,0.75g)和咪唑(11.6mmol,0.79g)的 DMF 溶液(5mL)中。室温下搅拌 16 小时后,以 EtOAc 稀释反应物,并以水、盐水洗涤有机相,干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2,溶于己烷的 50% EtOAc)纯化提供白色泡沫状的化合物 65(0.89g,94%)。

[0291] F) 化合物 66 的制备

[0292] 将化合物 65(1.6mmol,0.8mmol)溶解于氨的甲醇溶液(7M,25mL)中。在密封容器中 45℃下加热 4 天后,减压去除溶剂。柱层析(SiO_2,溶于氯仿的 2 至 4%的甲醇)纯化得到白色固体状的化合物 66(0.65g,定量)。66 ^{1}HNMR(300MHz,$CDCl_3$) δ :8.57(s,br,1H),7.84(d,1H,J = 8.2),6.10-5.96(m,1H),5.74(d,1H,J = 8.2),5.64(s,1H),5.41-5.44(m,2H),4.35(m,1H),4.26(s,1H),4.13(s,1H),3.95(d,1H,J = 7.8),3.66(d,1H,J = 7.8),2.04(d,1H,J = 4.3),0.90(s,9H),0.11(s,3H),0.10(s,3H)。

[0293] G) 化合物 67 的制备

[0294] 将化合物 66(0.25mmol,0.1g)、DMTCl(0.63mmol,0.21g)和 2,6-二甲基吡啶(0.63mmol,73μL)的吡啶溶液在 45℃下加热 10 天。将反应物冷却至室温并以 EtOAc 稀释。以饱和重碳酸钠、盐水洗涤有机层,干燥(Na_2SO_4)并减压浓缩。柱层析(SiO_2,以溶于己烷的 15%至 45%的 EtOAc 洗脱)纯化得到白色固体状的化合物 67(0.16g,93%)。67 ^{1}H NMR(300MHz, $CDCl_3$) δ :8.92(s, br,1H),8.26(d,1H, J = 8.2),7.53-7.24(m,9H),6.97-6.78(m,4H),6.08-5.88(m,1H),5.73(s,1H),5.68(d,1H, J = 8.2),4.83(s,1H, J = 11.0),4.58 (d,1H,J = 17.3),4.37(s,1H),4.04(d,1H,J = 9.5),3.84(s,6H,3.78,m,1H,部分重叠),3.55(d,1H,J = 7.9),0.83(s,9H),0.11(s,3H),0.00(s,3H)。

[0295] H) 化合物 68 的制备

[0296] 向化合物 67(0.22mmol,0.15g) 和三乙胺 (0.54mmol,75μL) 的 THF 溶液 (2mL) 中添加三乙胺三氢氟酸盐 (1.3mmol,0.21mL)。室温下搅拌 2 天后,以 EtOAc 稀释反应物,并以饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤有机相,干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。LCMS :M+23 ;计算值 :607.2,测得值 :607.2 ;LC 保留时间为 3.51 分钟。

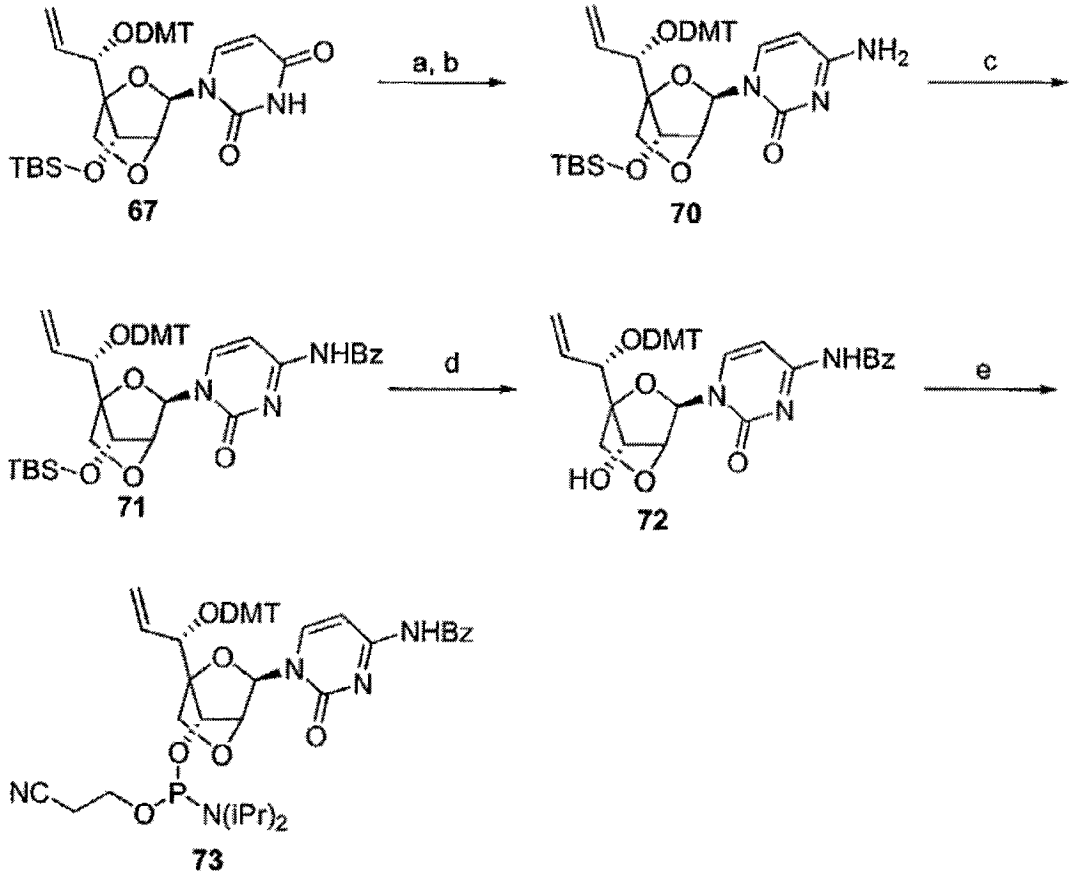
[0297] I) 化合物 69 的制备

[0298] 亚磷酰胺化合物 69 可参照实施例 1 中由化合物 18a 制备亚磷酰胺 19a 的步骤由化合物 68 制备得到。

[0299] 实施例 12

[0300] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 -(3- 丙烯基)]-3-(4-N- 苯甲酰基 - 胞嘧啶 -1- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷 (73) 的制备

[0301]



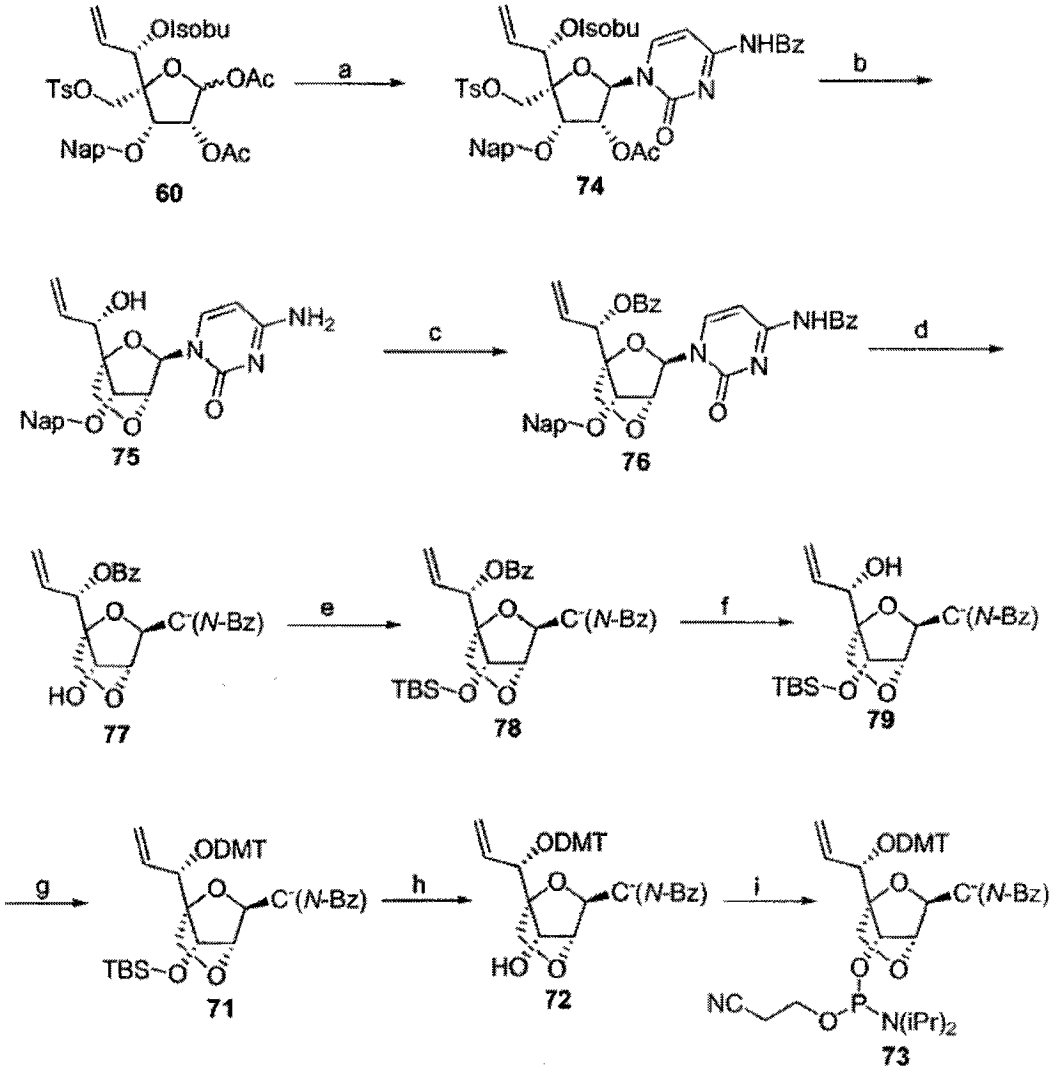
[0302] 路线 8(a)$POCl_3$,1,2,4- 三唑,Et_3N,CH_3CN(b) 氨水 (c)Bz_2O,DMF(d)$Et_3N.3HF$,Et_3N,THF(e)$(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$,四唑,NMI,DMF

[0303] 亚磷酰胺 73 可参照实施例 3 中由化合物 17a 制备亚磷酰胺 24a 的相同的一般步骤由化合物 67 制备得到。

[0304] 实施例 13

[0305] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基)- 膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 -(3- 丙烯基)]-3-(4-N- 苯甲酰基 - 胞嘧啶 -1- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷 (73) 的制备的替代途径

[0306]



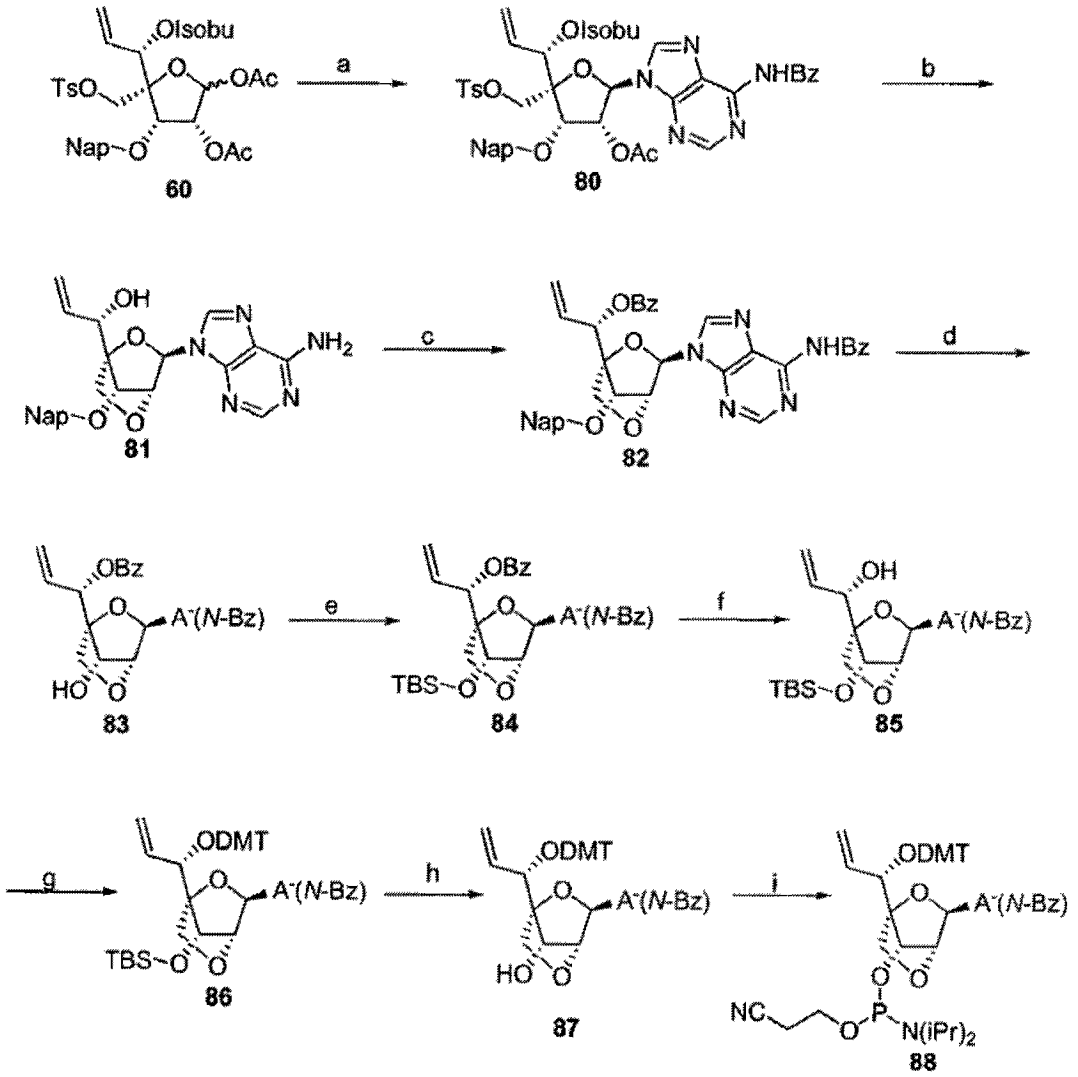
[0307] 路线 9(a)N- 苯甲酰基 - 胞嘧啶,BSA,TMSOTf(b)NaOH,MeOH,水 (c)BzCl,吡啶 (d)DDQ,CH_2CI_2,水 (e)TBSCl,咪唑,DMF(f)t-$BuNH_2$ 或氨水 (g)DMTCl,2,6- 二甲基吡啶,吡啶 (h)$Et_3N.3HF$,Et_3N,THF(i)$(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$,四唑,NMI,DMF

[0308] 化合物 73 可参照实施例 11 中由化合物 60 制备亚磷酰胺化合物 69 的相同的一般步骤制备得到。化合物 60 与 N- 苯甲酰基 - 胞嘧啶、BSA 和 TMSOTf 在回流乙腈中进行 Vorbrugen 反应提供核苷化合物 74。以 NaOH 水溶液处理 74 可引起环化形成化合物 75。以溶于吡啶的 BzCl 保护 5′ - 羟基 基团和环外胺得到化合物 76。进一步处理化合物 76 为亚磷酰胺化合物 71 的步骤类似于所述的由化合物 63 制备亚磷酰胺化合物 69 的制备步骤。

[0309] 实施例 14

[0310] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 -(3- 丙烯基)]-3-(6-N- 苯甲酰基腺嘌呤 -9- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷 (88) 的制备

[0311]



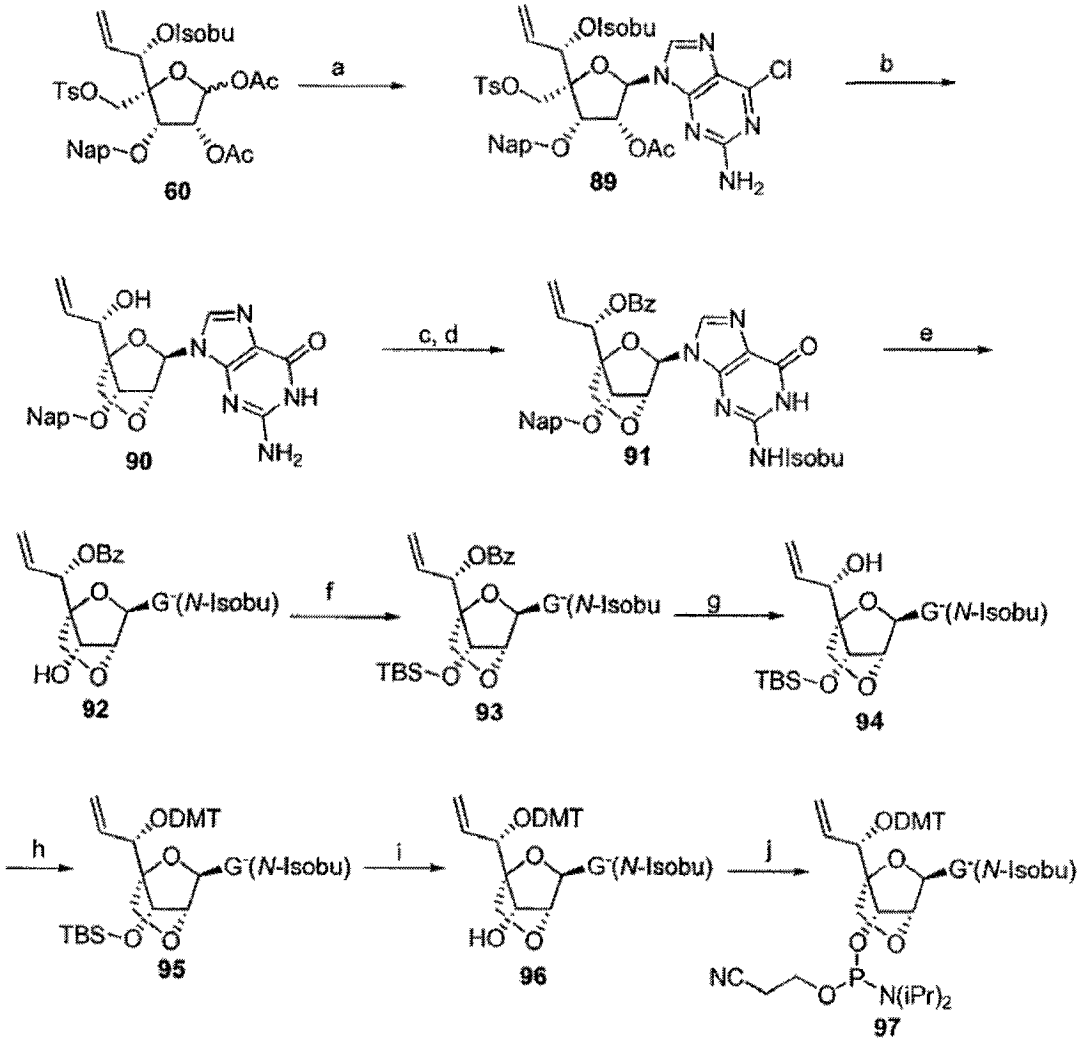
[0312] 路线 10(a)N- 苯甲酰基 - 腺嘌呤,BSA,TMSOTf(b)NaOH,MeOH,水 (c)BzCl,吡啶 (d) DDQ, CH_2Cl_2,水 (e)TBSCl,咪唑, DMF(f)t-$BuNH_2$ 或氨水 (g) DMTCl,2,6- 二甲基吡啶,吡啶 (h)$Et_3N.3HF$, Et_3N, THF(i)$(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$,四唑, NMI, DMF

[0313] 化合物 88 可参照实施例 11 中由化合物 60 制备亚磷酰胺化合物 69 的相同的一般步骤制备得到。化合物 60 与 N- 苯甲酰基 - 腺嘌呤、BSA 和 TMSOTf 在回流二氯乙烷中进行 Vorbrugen 反应提供核苷化合物 80。以 NaOH 水溶液处理 80 可引起环化形成化合物 81。以溶于吡啶的 BzCl 保护 5′ - 羟基基团和环外胺得到化合物 82。进一步处理化合物 82 为亚磷酰胺化合物 88 的步骤类似于所述的由化合物 63 制备亚磷酰胺化合物 69 的制备步骤。

[0314] 实施例 15

[0315] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基 (二异丙基氨基) 膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ - 二甲氧三苯甲基) 氧基 -(3- 丙烯基)]-3-(2-N- 异丁酰鸟嘌呤 -9- 基)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷 (97) 的制备

[0316]



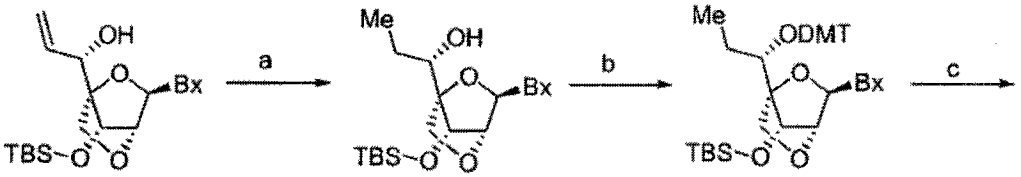
[0317] 路线 11(a)2- 氨基 -6- 氯嘌呤,BSA,TMSOTf(b)3- 羟基丙腈,NaH,THF(c)TMSCl,吡啶,异丁酰氯,(d)BzCl,吡啶 (e)DDQ,CH_2Cl_2,水 (f)TBSCl,咪唑,DMF(g)t-$BuNH_2$ 或氨水 (h)DMTCl,2,6- 二甲基吡啶,吡啶 (i)$Et_3N.3HF$,Et_3N,THF(j)$(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$,四唑,NMI,DMF

[0318] 化合物 97 可参照实施例 11 中由化合物 60 制备亚磷酰胺化合物 69 的相同的一般步骤制备得到。化合物 60 与 2- 氨基 -6- 氯嘌呤、BSA 和 TMSOTf 在回流二氯乙烷中进行 Vorbrugen 反应提供核苷化合物 89。以 3- 羟基丙腈和氢化钠处理 89 可引起环化形成化合物 90。瞬时将 5′ 羟基基团保护为三甲硅烷醚后以异丁酰氯保护环外氨基基团。在水检查条件下对三甲硅烷醚脱 保护,然后将 5′ 羟基基团保护为苯酸酯(苯甲酰基氯,吡啶)得到化合物 91。将化合物 91 进一步处理为亚磷酰胺化合物 97 的步骤类似于所述的由化合物 63 制备亚磷酰胺化合物 69 的步骤。

[0319] 实施例 16

[0320] (1R,3R,4R,7S)-7-[2- 氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦氧基]-1-[1-(S)-(4,4′ -二甲氧三苯甲基)氧基 -(3- 丙基)]-3-(选择的碱基,任选地被保护)-2,5- 二氧杂 - 双环 [2.2.1] 庚烷 (110-113) 的制备

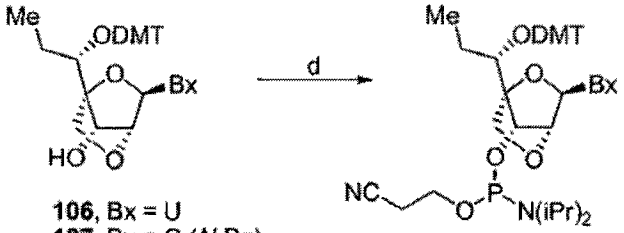
[0321]



66, Bx = U
79, Bx = C-(*N*-Bz)
85, Bx = A-(*N*-Bz)
94, Bx = G-(*N*-Isobu)

98, Bx = U
99, Bx = C-(*N*-Bz)
100, Bx = A-(*N*-Bz)
101, Bx = G-(*N*-Isobu)

102, Bx = U
103, Bx = C-(*N*-Bz)
104, Bx = A-(*N*-Bz)
105, Bx = G-(*N*-Isobu)



106, Bx = U
107, Bx = C-(*N*-Bz)
108, Bx = A-(*N*-Bz)
109, Bx = G-(*N*-Isobu)

110, Bx = U
111, Bx = C-(*N*-Bz)
112, Bx = A-(*N*-Bz)
113, Bx = G-(*N*-Isobu)

[0322] 路线 12(a)Pd/C，H_2 气球 (b)DMTCl，2,6- 二甲基吡啶，吡啶 (c)$Et_3N.3HF$，Et_3N，THF(d)$(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$，四唑，NMI，DMF

[0323] A) 化合物 98 的制备

[0324] 将活性炭上的钯 (5mg) 和溶于 MeOH(2mL) 的化合物 66(0.25mmol，0.10g) 的混合物以氢气球氢化。1 小时后，以硅藻土过滤该反应物，并以 EtOAc 洗涤滤床。减压蒸发溶剂得到 98，其在高真空下进一步干燥并在不经纯化下使用。

[0325] B) 化合物 102 的制备

[0326] 将化合物 98(0.25mmol，0.1g)、DMTCl(0.63mmol，0.21g) 和 2,6- 二甲基吡啶 (0.63mmol，73μL) 的吡啶溶液在 45℃下加热 7 天。将反应物冷却至室温并以 EtOAc 稀释。以饱和重碳酸钠、盐水洗涤有机层，干燥 (Na_2SO_4) 并减压浓缩。柱层析 (SiO_2，以溶于己烷的 15％至 45％的 EtOAc 洗脱）纯化得到白色固体状的化合物 102(0.10g，58％）。102(^1H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ :9.1(s，br，1H)，8.26(d，1H，J ＝ 8.2)，7.42-7.20(m，9H)，6.84-6.78(m，4H)，5.69(s，1H)，5.66(d，1H，重叠)，4.33(s，1H)，4.32(s，1H)，3.85(d，1H，J ＝ 7.5)，3.8(s，6H)，3.75(d，1H，J ＝ 7.5)，3.42(d，1H，J ＝ 8.2)，1.65(m，1H)，1.47(m，1H)，0.79(s，9H)，0.25(t，3H，J ＝ 7.5)，0.02(s，3H)，-0.18(s，3H)。

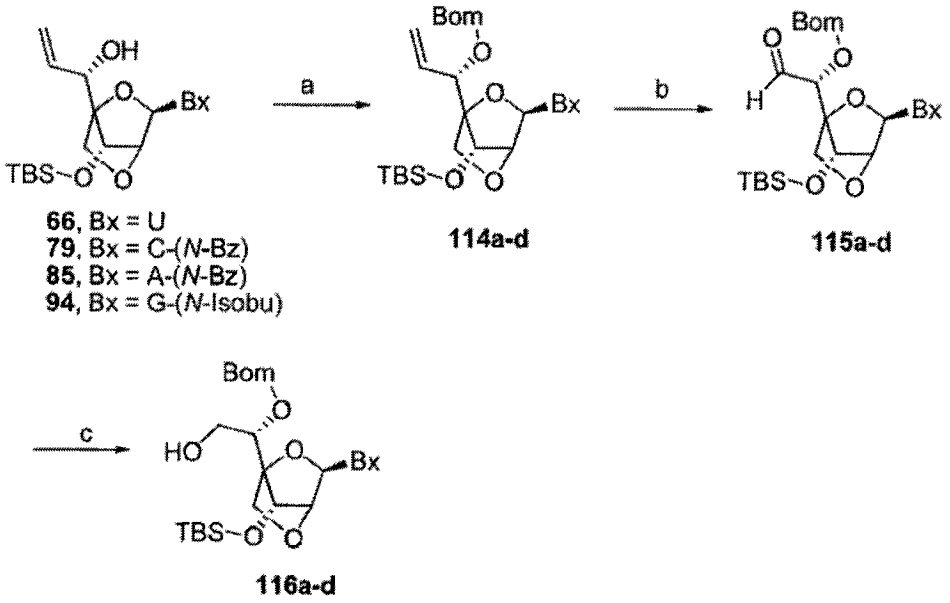
[0327] C) 化合物 110 的制备

[0328] 亚磷酰胺化合物 110 可参照实施例 1 中由化合物 17a 制备亚磷酰胺化合物 19a 的相同的一般步骤由化合物 102 制备得到。亚磷酰胺化合物 111-113 可由核苷化合物 79、85 和 94 制备得到。使用碳上的钯和氢对该双键氢化以分别提供化合物 98-101。将 5′ 羟基基团保护为二甲氧三苯甲醚，然后去除甲硅烷基保护基团，并通过亚磷酰化反应得到亚磷酰胺化合物 110-113。

[0329] 实施例 17

[0330] 化合物 116a，116b，116c 和 116d 的制备

[0331]



66, Bx = U
79, Bx = C-(*N*-Bz)
85, Bx = A-(*N*-Bz)
94, Bx = G-(*N*-Isobu)

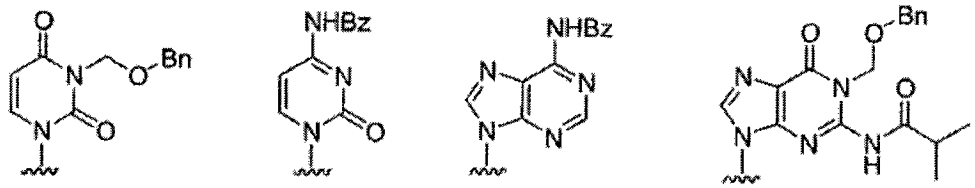
114a-d

115a-d

116a-d

[0332] a, Bx = U-3-(N-Bom) b, Bx = C-(N-Bz) c, Bx = A-(N-Bz) d, Bx = G-3-(N-Bom)-4-(N-Isobu)

[0333]



[0334] 路线 13(a)NaH, BomCl, DMF(b)OsO_4, $NaIO_4$, 二噁烷, 水 (c)$NaBH_4$, MeOH

[0335] A) 化合物 114a 的制备

[0336] 将氢化钠 (60%, 1.0mmol, 40mg) 加入到化合物 66(0.25mmol, 0.10g) 和苄氧基甲基氯 (BomCl, 0.75mmol, 0.1mL) 的冷 (0℃) DMF 溶液 (1mL) 中。1 小时后, 以水终止反应, 并以 EtOAc 稀释。然后以水、盐水洗涤有机相, 干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。柱层析 (SiO_2, 溶于己烷的 30% EtOAc) 纯化该残留物得到白色固体状的化合物 114a(0.15g, 93%)。

[0337] B) 化合物 115a 的制备

[0338] 将四氧化锇 (2.5% 溶于异丙醇, 0.12mL) 的溶液添加至化合物 114a(0.17g, 0.11g)、高碘酸钠 (0.70mmol, 0.15g) 和 2-6- 二甲基吡啶 (0.12mL) 溶于二噁烷 (2mL) 和水 (0.5mL) 的混合物中。室温搅拌 36 小时后, 以 EtoAC 稀释反应物, 以水、10% 硫代硫酸钠、盐水洗涤有机相, 干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩得到粗品化合物 115a, 其可在不作进一步纯化下使用。

[0339] C) 化合物 116a 的制备

[0340] 将硼氢化钠 (25mg) 添加至粗品化合物 115a(由前面得到) 的 MeOH 溶液 (1mL) 中。室温下搅拌 1 小时后, 以 EtOAc 稀释反应物, 并以 10% HCl、饱和重碳酸钠、盐水洗涤有机相, 干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。柱层析 (SiO_2, 以溶于己烷的 50% EtOAc 洗脱) 纯化残留物得到油状的化合物 116a(73mg, 由 115a 为 65%)。116a(^1H NMR(300MHz, $CDCl_3$) δ :7.69(d, 1H, J = 8.2), 7.49-7.24(m, 10H), 5.77(d, 1H, J = 8.2), 5.61(s, 1H), 5.47(m, 2H), 4.98(d, 1H, J = 6.9), 4.84(d, 1H, J = 6.9), 4.80(d, 1H, J = 11.8), 4.69(s, 2H), 4.66(d, 1H, J = 11.8), 4.29(s, 1H), 4.03(s, 1H), 3.96-3.79(m, 3H), 3.67(m, 1H), 3.22(m, 1H), 0.87(s, 9H),

0.07(s,3H),0.04(s,3H)。

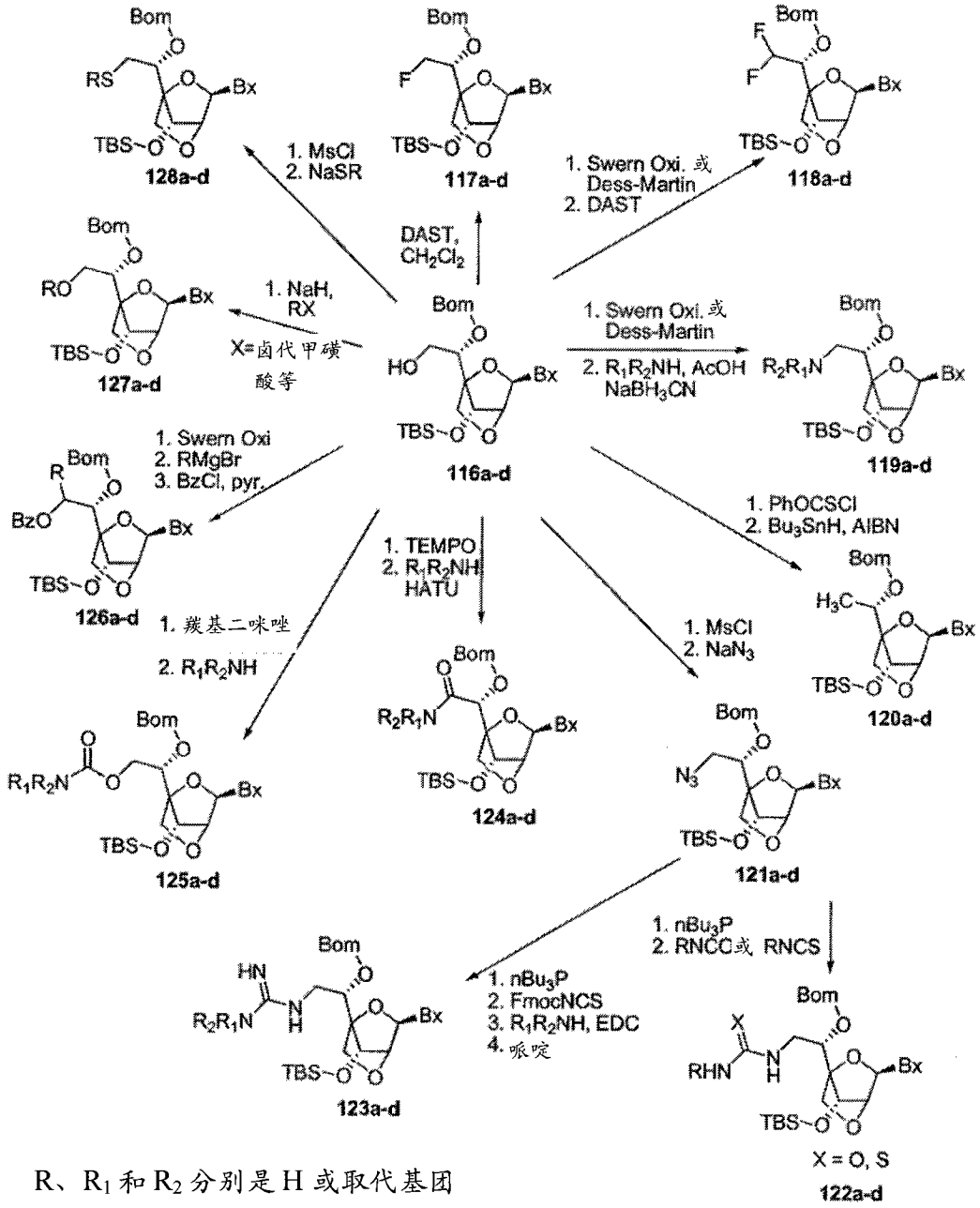
[0341] D)化合物116b-d的制备

[0342] 将化合物79、85和94与苄氧基甲基氯和氢化钠反应分别提供核苷化合物114b-d。断裂四氧化锇的双键得到醛化合物115b-d。使用硼氢化钠进一步还原醛官能团以分别提供化合物116b-d。

[0343] 实施例18

[0344] 核苷117a-d至128a-d的制备

[0345]



R、R_1和R_2分别是H或取代基团

[0346] A)化合物127a(R = Me)的制备

[0347] 将氢化钠(60%,0.23mmol,9mg)加入化合物116a(0.11mmol,73mg)和碘甲烷(0.57mmol,40μL)的冷(0℃)DMF溶液(0.25mL)。在0℃下搅拌1小时后,用水终止该反应并以EtOAc稀释。然后以盐水洗涤有机相,干燥(Na_2SO_4)并浓缩。柱层析(SiO_2,以溶

于己烷的 20％至 40％ EtOAc 洗脱）纯化 得到油状的化合物 127a(27mg,37％)。127a(^{1}H NMR(300MHz, $CDCl_3$) δ :7.79(d,1H, J = 8.2),7.45-7.28(m,10H),5.74(d,1H, J = 8.2),5.62(s,1H),5.48(m,2H),4.90(m,2H),4.74(d,1H,J = 11.9),4.69(s,1H),4.60(s,1H,J = 11.9),4.29(s,1H),4.04(s,1H),4.04(m,1H,重叠),3.99(d,1H, J = 8.3),3.84(d,1H, J = 8.2),3.72-3.48(m,2H),3.35(s,3H),0.87(s,9H),0.07(s,3H),0.04(s,3H)。

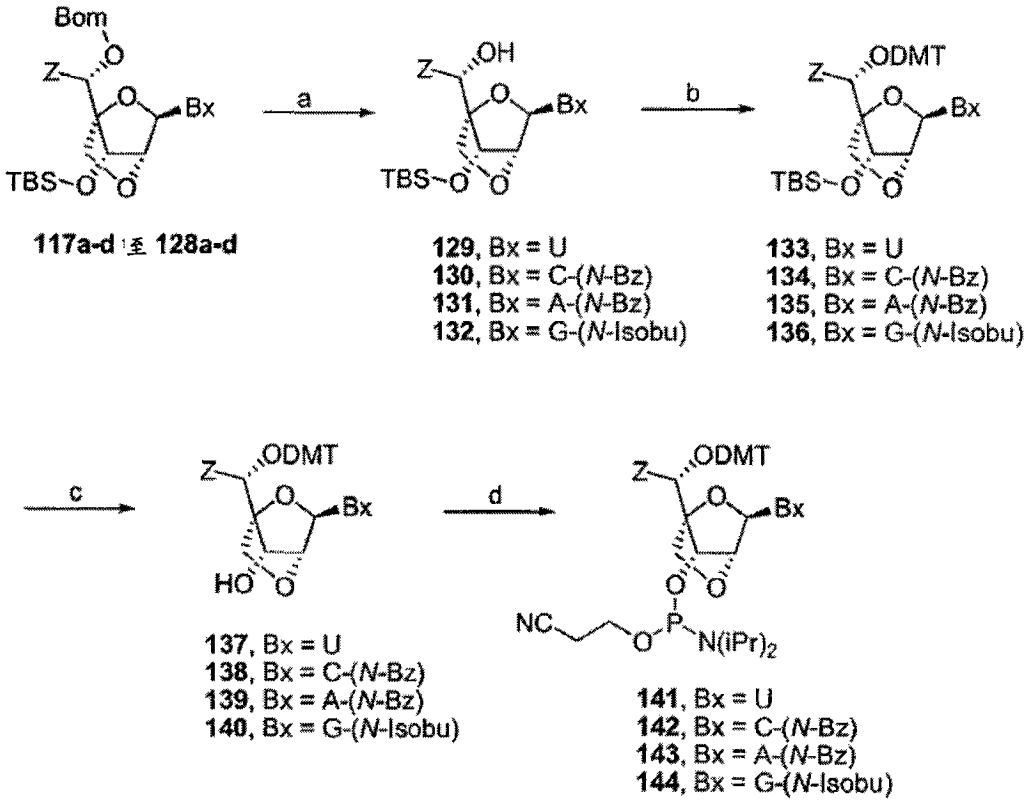
[0348] B) 化合物 117a-d 至 123a-d 的制备

[0349] 通过用氟化剂（例如 DAST）以二氯甲烷为溶剂处理化合物 116a-d 来制备化合物 117a-d。化合物 118a-d 可通过首先以 Dess-Martin 高价碘或在 Swern 条件下氧化化合物 116a-d 的伯羟基基团然后以 DAST 处理所得的醛制备得到。化合物 119a-d 可通过首先以 Dess-Martin 高价碘或在 Swern 条件下氧化化合物 116a-d 的伯羟基然后在冰醋酸和还原剂（例如,硼氢化氰钠）存在下以伯或仲胺还原胺化所得的醛制备得到。化合物 120a-d 可通过将化合物 116a-d 的羟基基团转化为硫代碳酸脂衍生物后通过采用 nBu_3SnH 的自由基脱氧步骤制备得到。化合物 121a-d 可通过先将化合物 116a-d 的羟基基团转化为离去基团（甲磺酸、甲苯磺酸、卤化物）然后以过量的叠氮化钠加热制备得到。化合物 124a-d 可通过先将化合物 116a-d 的伯醇氧化为羧酸,然后在 HATU 或任意其它肽偶合剂的存在下与胺反应制备得到。化合物 125a-b 可通过用羰基二咪唑活化化合物 116a-d 的羟基基团后与胺反应制备得到。化合物 126a-d 可通过在 Swern 或 Dess-Martin 条件下氧化化合物 116a-d 的伯醇,然后与适当的有机金属试剂反应制备得到。化合物 127b-d(127a 在部分 A 制备得到,R = CH_3) 可通过以适当的碱基将化合物 116b-d 的羟基基团去质子化后,以烷基化试剂去除阴离子后制备得到。化合物 128a-d 可通过将 化合物 116a-d 的羟基基团转化为离去基团后以硫醇亲核体置换制备得到。化合物 122a-d 可通过还原化合物 121a-d 的叠氮基团后与异氰酸酯或异硫氰酸酯反应制备得到。化合物 123a-d 可通过还原化合物 121a-d 的叠氮基团并与 FmocNCS 反应提供活化的硫脲制备得到。fmoc 活化硫醇在 EDC 存在下进一步与胺反应可提供取代的胍。去除 fmoc 保护基团可释放化合物 123a-d。

[0350] 实施例 19

[0351] 亚磷酰胺 141-144 的制备

[0352]



[0353] 路线 15(a)Pd/C，H_2(b)DMTCl，2,6- 二甲基吡啶，吡啶 (c)$Et_3N.3HF$，Et_3N，THF(d)$(iPr_2N)_2POCH_2CH_2CN$，四唑，NMI，DMF

[0354] A) 化合物 129 的制备 (Z = CH_2OMe)

[0355] 将活性炭载钯 (3mg) 和溶于 MeOH(1mL) 的化合物 127a(0.04mmol，27mg) 的混合物以氢气球氢化。24 小时后，以硅藻土过滤该反应物，并以 EtOAc 洗涤滤床。减压蒸发溶剂，并将残留物溶解于 MeOH(1mL) 和三乙胺 (2 滴) 中。室温搅拌 2 小时后，减压去除溶剂得到 129。129(^1H NMR(300MHz，$CDCl_3$) δ ：7.89(d，1H，J = 8.2)，5.75(d，1H，J = 8.2)，5.63(s，1H)，4.22(s，1H)，4.17(s，1H)，4.08(m，1H)，3.98(d，1H，J = 7.6)，3.71(d，1H，J = 7.6)，3.60(t，1H，J = 9.1)，3.44(s，3H)，3.42(m，1H，重叠)，0.88(s，9H)，0.10(s，3H)，0.09(s，3H)。

[0356] B) 化合物 141 的制备

[0357] 化合物 129 可参照实施例 1 中由化合物 16a 制备亚磷酰胺化合物 19a 的相同的一般步骤转化为亚磷酰胺化合物 141。

[0358] C) 化合物 142-144 的制备

[0359] 化合物 130-132 可采用碳载催化性钯和氢气氢化苄氧基甲基保护基团后制备得到。将 5′ 羟基基团保护为二甲氧三苯甲醚，然后去除甲硅烷基保护基团，并通过亚磷酰化反应提供亚磷酰胺化合物 142-144。

[0360] 实施例 20

[0361] 核苷亚磷酰胺的合成

[0362] 核苷亚磷酰胺可参照此处和本领域 (例如但不限于美国专利 6,426,220 和 PCT 公开 WO 02/36743) 所述的方法进行制备。

[0363] 实施例 21

[0364] 寡核苷酸和寡核苷的合成

[0365] 如本发明所述的低聚化合物可通过公知的固相合成技术进行常规制备。进行该种合成的设备已由多家销售商出售，例如，Applied Biosystems(Foster City,CA)。本领域已知的任何其它该类合成方法均可附加地或替代性地采用。使用类似技术制备寡核苷酸如硫代磷酸酯和烷基化衍生物是众所周知的。

[0366] 寡核苷酸：未取代和取代的磷酸二酯 (P = O) 寡核苷酸可用被碘氧化的标准亚磷酰胺化学产品在自动 DNA 合成仪 (Applied Biosystems model 394) 上合成得到。

[0367] 除以下区别外硫代磷酸酯 (P = S) 的合成类似于磷酸二酯寡核苷酸：采用溶于乙腈的 10％ w/v 的 3，H-1,2- 苯并二硫醇 -3- 酮 1,1- 二氧化物溶液进行硫杂化以氧化亚磷酸键合。该硫杂化反应步骤的时间提高至 180 秒并继以常规的带帽步骤。从 CPG 柱裂解之后在 55℃下于浓缩氢化铵中 (12-16 小时) 去封闭，然后以 > 3 体积的乙醇从 1M NH_4OAc 溶液中沉淀回收寡核苷酸。亚磷酸寡核苷酸可参照美国专利 5,508,270 的描述进行制备。

[0368] 烷基磷酸酯寡核苷酸可参照美国专利 4,469,863 的描述进行制备。

[0369] 3′ - 脱氧 -3′ - 亚甲基磷酸酯寡核苷酸可参照美国专利 5,610,289 或 5,625,050 的描述进行制备。

[0370] 亚磷酰胺寡核苷酸可参照美国专利 5,256,775 或 5,366,878 的描述进行制备。

[0371] 烷基硫代磷酸酯寡核苷酸可参照公布的 PCT 申请 PCT/US94/00902 和 PCT/US93/06976(分别公开为 WO 94/17093 和 WO 94/02499) 的描述进行制备。

[0372] 3′ - 脱氧 -3′ - 氨基磷酰胺酯寡核苷酸可参照美国专利 5,476,925 的描述进行制备。

[0373] 磷酸三酯寡核苷酸可参照美国专利 5,023,243 的描述进行制备。

[0374] 硼烷磷酸酯寡核苷酸可参照美国专利 5,130,302 和 5,177,198 的描述进行制备。

[0375] 寡核苷酸：亚甲基甲亚胺基连接的寡核苷 (还被认为是 MMI 连接的寡核苷)，亚甲基二甲基肼连接的寡核苷 (还被认为是 MDH 连接的寡核苷)，和亚甲基羰基氨基连接的寡核苷 (还被认为是酰胺 -3 连接的寡核苷)，和亚甲基氨基羰基连接的寡核苷 (还被认为是酰胺 -4 连接的寡核苷)，以及具有例如替代的 MMI 和 P = O 或 P = S 键合的混合骨架低聚化合物可参照美国专利 5,378,825、5,386,023、5,489,677、5,602,240 和 5,610,289 的描述进行制备。

[0376] 甲缩醛和硫甲缩醛连接的寡核苷可参照美国专利 5,264,562 和 5,264,564 的描述进行制备。

[0377] 乙撑氧连接的寡核苷可参照美国专利 5,223,618 的描述进行制备。

[0378] 实施例 22

[0379] 寡核苷分离

[0380] 从可控孔玻璃固相载体上裂解之后在 55℃下的浓缩氢化铵中去封闭 12-16 小时，以大于 3 体积的乙醇从 1M NH_4OAc 溶液中沉淀回收寡核苷酸或核苷。合成的寡核苷酸可通过电喷雾质谱 (分子量测定) 和毛细管凝胶电泳进行分析。在合成中获得的硫代磷酸酯和磷酸二酯键合的相对数量可通过正确的分子量相对 -16amu 产品 (+/-32+/-48) 的比例进行确定。在某些研究中寡核苷酸通过 HPLC 进行纯化，例如 Chiang 等人，J.Biol.Chem.1991，266， 18162--18171 的描述。HPLC- 纯化材料所得的结果通常类似于从非 -HPLC 纯化材料

获得的结果。

[0381] 实施例 23

[0382] 寡核苷酸合成 -96 孔板形式

[0383] 寡核苷酸可通过固相 P(III) 亚磷酰胺化学产品在能够在 96- 孔形式中同时装配 96 个序列的自动化合成仪中合成得到。磷酸二酯核苷酸间键合可通过碘水溶液氧化得到。硫代磷酸酯核苷酸间键合可通过溶于无水乙腈的 3，H-1,2 苯并二硫醇 -3- 酮 1,1- 二氧化物 (Beaucage 试剂）硫化得到。标准的碱基保护的 β - 氰乙基 - 二异丙基亚磷酰胺可从销售商（例如 PE-AppliedBiosystems,Foster City,CA,或 Pharmacia,Piscataway,NJ) 处购得。非标准核苷可参照标准和专利方法进行合成。它们作为碱基保护的 β - 氰乙基二异丙基亚磷酰胺进行使用。

[0384] 寡核苷酸从载体上裂解之后在加热后的温度 (55-60℃）下的浓缩 NH_4OH 中去保护 12-16 小时，并在真空下干燥所释放的产品。将干燥的产品重新悬浮于无菌水中提供主平板，所有的分析和测试平板样本均通过机械移液器由该主平板稀释得到。

[0385] 实施例 24

[0386] 采用 96- 孔板形式进行寡核苷酸分析

[0387] 各微孔中的寡核苷酸浓度可通过稀释样本和 UV 吸收光谱测定。单个产品的全长完整性可在 96- 孔形式 (Beckman P/ACE™ MDQ) 中或针对单独制备的样本在商用毛细管电泳设备（例如，Beckman P/ACE™ 5000，ABI 270) 上通过毛细管电泳 (CE) 进行评价。碱基和骨架组成可采用电喷雾质谱对低聚化合物进行质谱分析确定。所有的测试平板均从主平板中采用单和多道机械移液器稀释得到。如果平板上至少 85％的低聚化合物具有至少 85％全长，则可认为该平板可接受。

[0388] 实施例 25

[0389] 细胞培养和寡核苷酸处理

[0390] 低聚化合物对目标核酸表达的作用可在任意细胞中进行测试，只要该目标核酸以可检测的水平存在。这可通过例如 PCR 或 Northern 印迹分析等方法常规测定。来自多种组织和物种的细胞系可从美国典型菌种保藏中心 (ATCC，Manassas，VA) 获得。

[0391] 下列提供的细胞类型仅是为了说明的目的，也可常规地采用其它细胞类型，只要所述目标在所选的细胞型中得到表达。这可通过本领域常规的方法例如 Northern 印迹分析、核酸核酶保护测定法或 PR-PCR 等进行简便的测定。

[0392] b.END 细胞：小鼠脑内皮细胞系 b.END 由 Max Plank 研究所的 WernerRisau 博士提供。细胞常规地培养在添加了 10％胎牛血清 (Invitrogen LifeTechnologies，Carlsbad，CA) 的高糖 DMEM 中 (Invitrogen Life Technologies，Carlsbad，CA)。通过胰蛋白酶化进行常规的细胞传代，并在汇合度达到约 90％时稀释。将细胞以大约 3000 细胞 / 微孔的密度接种至 96- 孔板 (Falcon-Primaria #353872，BD Biosciences，Bedford，MA)，从而用于包括但不限于低聚化合物转染实验。

[0393] 涉及用低聚化合物处理细胞的实验：

[0394] 当细胞达到适当的汇合度时，采用所述的转染方法用低聚化合物对其进行处理。

[0395] LIPOFECTIN™

[0396] 当细胞达到 65-75％汇合度时，用寡核苷酸对其进行处理。将寡核苷酸与

LIPOFECTIN™(Invitrogen Life Technologies,Carlsbad,CA) 在 Opti-MEM™-1 减血清培养基 (Invitrogen Life Technologies,Carlsbad,CA) 中混合,以实现寡核苷酸的目标浓度,且 LIPOFECTIN™ 的浓度为每 100nM 寡核苷酸 2.5μg/mL 或 3μg/mL。将该转染混合物在室温下孵育约 0.5 小时。细胞生长于 96- 孔板时,以 100μL OPTI-MEM™-1 洗涤微孔一次,然后以 130μL 的转染混合物处理。类似地,生长于 24- 孔板或其它标准组织培养板中的细胞可使用适当体积的培养基和寡核苷酸进行处理。重复两次或三次处理细胞并取得数值。在 37℃下处理约 4-7 小时后,以新鲜培养基替换含转染混合物的培养基。寡核苷酸处理后 16-24 小时采集细胞。

[0397] 本领域已知的其它适用转染试剂包括但不限于 :CYTOFECTIN™、LIPOFECTAMINE™、OLIGOFECTAMINE™ 和 FUGENE™。本领域已知的其它适用的转染方法包括但不限于电穿孔。

[0398] 实施例 26

[0399] 寡核苷酸抑制目标表达的分析

[0400] 目标表达的反义调节可通过本领域已知的多种方法进行测定。例如,目标 mRNA 水平可通过,例如,Northern 印迹分析、竞争性聚合酶链式反应 (PCR) 或实时 PCR 进行定量。目前采用实时定量 PCR 是理想的。可对总细胞 RNA 或 poly(A)+mRNA 进行 RNA 分析。本发明的一种 RNA 分析方 法采用了此处其它实施例中描述的总细胞 RNA。RNA 分离的方法已为本领域公知。Northern 印迹分析通常是本领域的常规方法。实时定量 (PCR) 通过来自 PE-Applied Biosystems,Foster City,CA 的 ABI PRISM™ 7600、7700 或 7900 序列检测系统并参照生产商说明得以便利地实现。

[0401] 目标的蛋白水平可通过本领域公知的多种方法进行定量,例如免疫沉淀、Western 印迹分析 (免疫印迹)、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或荧光激活细胞分类 (FACS)。针对目标的抗体可从多种来源例如抗体的 MSRS 目录 (AerieCorporation,Birmingham,MI) 中鉴定并获得,或者可通过本领域公知的常规单克隆或多克隆抗体生成方法制备得到。制备多克隆抗血清的方法可参见,例如,Ausubel,F.M. 等人,Current Protocols in Molecular Biology,Volume 2,pp.11.12.1-11.12.9,John Wiley & Sons,Inc.,1997。单克隆抗体的制备可参见,例如,Ausubel,F.M. 等人,Current Protocols in Molecular Biology,Volume2,pp.11.4.1-11.11.5,John Wiley & Sons,Inc.,1997。

[0402] 免疫沉淀法是本领域的标准方法,并可参见例如,Ausubel,F.M. 等人,Current Protocols in Molecular Biology,Volume 2,pp.10.16.1-10.16.11,JohnWiley & Sons,Inc.,1998。Western 印迹 (免疫印迹) 分析是本领域的标准方法,并可参见例如,Ausubel,F.M. 等人,Current Protocols in Molecular Biology,Volume 2,pp.10.16.1-10.80.21,John Wiley & Sons,Inc.,1997。酶联免疫吸附测定 (ELISA) 是本领域的标准方法,并可参见例如,Ausubel,F.M. 等人,Current Protocols in Molecular Biology,Volume 2,pp.11.4.1-11.2.22,JohnWiley & Sons,Inc.,1991。

[0403] 实施例 27

[0404] 目标抑制剂的表型测定和体内研究的设计

[0405] 表型测定

[0406] 一旦目标抑制剂通过此处披露的方法进行鉴定,则该低聚化合物可进一步在一个或多个表型测定中进行考察,其中每个测定具有预示对特定疾病状态或症状进行治疗的效

力的可检测终点。

[0407] 表型测定，其中适用的试剂盒和试剂已为本领域技术人员公知，并在此处用于考察目标与健康和疾病的作用和/或关联。代表性的表型测定（可从多个销售商中购得）包括测定细胞活性，细胞毒性，扩增或细胞存活的测定 (Molecular Probes, Eugene 或 PerkinElmer, Boston, MA)，基于蛋白的测定包括酶法测定 (Panvera, LLC, Madison, WI ;BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ ;Oncogene Research Products, San Diego, CA)，细胞调节，信号转导，炎症，氧化过程以及凋亡 (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI)，甘油三酸酯积累 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)，血管生成测定，管道形成测定，细胞因子和激素测定以及代谢测定 (Chemicon International Inc., Temecula, CA ;Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。

[0408] 在一个非限制性范例中，用体外研究鉴定的目标抑制剂和对照化合物以通过上述方法测定的最佳浓度处理经测定适于特定表型测定的细胞（即选择用于乳腺癌研究的 MCF-7 细胞，用于肥胖研究的脂肪细胞）。在处理末期，通过一种或多种特别针对该测定的方法分析处理的和未处理的细胞以确定表型结果和终点。

[0409] 表型终点包括细胞形态随时间或处理剂量的变化以及如蛋白、脂质、核酸、激素、糖或金属等细胞成分的变化。细胞状态（包括 pH、细胞周期阶段、细胞对生物指示剂的摄取和排除）的测量通常是目标终点。

[0410] 对处理后的细胞中一种或多种基因表达的测量同样可用作目标抑制剂的效力或功效的指示。可同时检测处理的和未处理的细胞中的标志基因或怀疑与特定疾病状态、症状或表型有关的基因。

[0411] 体内研究

[0412] 此处所述的体内研究中的个体对象为温血脊椎动物，包括人。

[0413] 实施例 28

[0414] RNA 分离

[0415] Poly(A)+mRNA 分离

[0416] Poly(A)+mRNA 可参照 Miura 等人，(Clin. Chem., 1996, 42, 1758-1764) 分离。其它的 poly(A)+mRNA 分离方法为本领域的常规方法。简言之，对于生长于 96- 孔板的细胞，去除生长培养基并分别以 200μL 冷 PBS 洗涤每个微孔。向每个微孔添加 60μL 裂解缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mMEDTA, 0.5M NaCl, 0.5% NP-40, 20mM 氧钒 - 核糖核苷复合物)，轻柔摇动平板并在室温下孵育五分钟。将 55μL 裂解产物转移至涂覆了寡聚 d(T) 的 96- 孔板 (AGCT Inc., Irvine CA) 中。将平板在室温下孵育 60 分钟，以 200μL 洗涤缓冲液 (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 0.3M NaCl) 洗涤 3 次。末次洗涤后，以纸巾吸去过量的洗涤缓冲液，然后空气干燥 5 分钟。将预热至 70℃的 60μL 洗脱缓冲液 (5mM Tris-HCl pH 7.6) 添加至各微孔，将平板在 90℃热板上孵育 5 分钟，然后将洗脱物转移至新鲜的 96- 孔板。

[0417] 生长于 100mm 或其它标准平板的细胞也可采用适当体积的所有溶液进行类似处理。

[0418] 总 RNA 分离

[0419] 总 RNA 可采用由 Qiagen Inc. (Valencia, CA) 购得的 RNEASY 96™ 试剂盒和缓冲液

并参照生产商的推荐方法进行分离。简言之，对于生长于96-孔板的细胞，去除生长培养基并分别以200μL冷PBS洗涤每个微孔。向每个微孔添加150μL缓冲液RLT并将平板剧烈摇动20秒。将150μL的70％乙醇添加至各微孔，然后通过三次上下吸液混合内含物。随后将样本转移至装配了废物采集盘并连接至真空源的QIAVAC™集流腔中所连接的RNEASY 96™孔板上。抽真空1分钟。将500μL缓冲液RW1添加至RNEASY 96™板的各微孔中并孵育15分钟，再次抽真空1分钟。再次将500μL缓冲液RW1添加至RNEASY 96™板的各微孔中并再次抽真空2分钟。然后将1mL的缓冲液RPE添加至RNEASY 96™板的各微孔中并抽真空90秒钟。重复用缓冲RPE洗涤，再次吸真空3分钟。然后从QIAVAC™集流腔取走平板并用纸巾吸干。重新将平板连接至装配了含1.2mL采集管的采集管架的QIAVAC™集流腔。然后通过向各微孔中移取140μL无RNAse的水，孵育1分钟，抽真空3分钟洗脱RNA。

[0420] 重复移液和洗脱步骤可通过QIAGEN Bio-Robot 9604(Qiagen，Inc.，Valencia CA)自动完成。简言之，溶解培养平板上的细胞之后，将平板转移至进行移液、DNAse处理和洗脱步骤的机械平台上。

[0421] 实施例29

[0422] 目标mRNA水平的实时定量PCR分析

[0423] 目标mRNA水平可采用ABI PRISM™ 7600、7700或7900序列检测系统(PE-Applied Biosystems，Foster City，CA)并参照生产商的说明通过实时定量PCR实现定量。这是一个闭管、非凝胶式荧光检测系统，其允许对聚合 酶链式反应(PCR)产物进行实时高通量定量。与扩增产物在PCR完成后定量的标准PCR不同，在实时定量PCR中的产物在其积累时定量。这一点可通过在PCR反应中包含特异性地在正向和反向PCR引物之间退火的寡核苷酸探针以及包含两个荧光燃料得以实现。报告染料（例如，FAM或JOE，来自PE-Applied Biosystems，Foster City，CA，Operon Technologies Inc.，Alameda，CA或Integrated DNA Technologies Inc.，Coralville，IA)被连接至探针的5′端而淬火染料（例如，TAMRA，来自PE-Applied Biosystems，FosterCity，CA，Operon Technologies Inc.，Alameda，CA或Integrated DNATechnologies Inc.，Coralville，IA)被连接至探针的3′端。当探针和染料完整时，报告染料的发射被3′端淬火染料接近而猝熄。在扩增过程中，探针退火至目标序列可生成能被Taq聚合酶的5′－核酸外切酶活性裂解的底物。在PCR扩增周期的延伸阶段，Taq聚合酶对探针的裂解从探针的剩余部分（并从而由淬火部分）释放了报告染料，从而生成了序列特异性荧光信号。在每一个周期中，附加的报告染料分子从其相应的探针中裂解，并可通过整合在ABIPRISM™序列检测系统中的激光镜头定期监测荧光强度。在每一个测定中，一系列包含来自未处理对照样本的mRNA系列稀释物平行反应可生成标准曲线，它可用于对测试样本的进行反义寡核苷酸处理后的抑制百分比进行定量。

[0424] 在定量PCR分析之前，通过GAPDH扩增反应评价对被测定的目标基因具有特异性的引物－探针组的“多重”能力。在复用过程中，在单个样本中同时扩增目标基因和内标基因GAPDH。在该分析中，从未处理细胞中分离的mRNA被系列稀释。各稀释物可在仅对GAPDH、仅对基因（“单重”）或对两者（多重）具有特异性针的引物－探针组的存在下扩增。PCR扩增之后，可 同时从单重和多重样本生成作为稀释函数的GAPDH和目标mRNA信号的标准曲线。如果从多重样本中生成的GAPDH和目标信号的斜率和相关系数均小于从单重样本所得相应数值的10％之内，则该对目标具有特异性的引物－探针组可认为具有多重性。其它

PCR 方法已为本领域所知。

[0425] RT 和 PCR 试剂可从 Invitrogen Life Technologies(Carlsbad,CA) 获得。RT,实时 PCR 可通过向含有 30μL 总 RNA 溶液 (20-200ng) 的 96- 孔板添加 20μL PCR 混合物 (2.5× 无 $MgCl_2$PCR 缓冲液,6.6mM $MgCl_2$, dATP、dCTP、dCTP 和 dGTP 各 375μM,正向引物和反向引物各 375nM,125nM 探针,4 单位 RNA 酶抑制剂,1.25 单位 PLATINUM ® Taq,5 单位 MuLV 逆转录酶以及 2.5×ROX 染料) 得以实现。RT 反应可通过在 48℃下孵育 30 分钟得以实现。在 95℃下孵育 10 分钟以激活 PLATINUM ® Taq,进行 40 个周期的两步 PCR 法如下进行 :95℃下进行 15 秒 (变性) 后在 60℃下进行 1.5 分钟 (退火 / 延伸)。

[0426] 通过 RT 得到基因目标量,通过 GAPDH(一种表达恒定的基因) 表达水平或通过以 RIBOGREEN™(Molecular Probes,Inc.Eugene,OR) 定量总 RNA 来归一化实时 PCR。GAPDH 表达可通过与目标、多重同时或单独运行用实时 RT-PCR 进行定量。总 RNA 可采用 RiboGreen™ RNA 定量试剂 (MolecularProbes, Inc.Eugene, OR) 进行定量。通过 RIBOGREEN™ 进行 RNA 定量的方法可参见 Jones,L.J.,等人,(Analytical Biochemistry,1998,265,368-374)。

[0427] 在该测定中,170μL 的 RIBOGREEN™ 工作试剂 (RIBOGREEN™ 试剂以 1 ∶ 350 稀释于 10mM Tris-HCl,1mM EDTA,pH 7.5) 以移液管移入含有 30μL 纯化细胞 RNA 的 96- 孔板。该平板在激发 485nm 和发射 530nm 下以 CytoFluor 4000(PE Applied Biosystems) 读取。

[0428] 实施例 30

[0429] 目标特异性引物和探针

[0430] 探针和引物可采用公开的序列信息设计成与目标序列杂交。

[0431] 例如,对于人 PTEN,可通过公开的序列信息 (GENBANK™ 登记号 U92436.1, SEQ ID NO :1) 设计下列引物 - 探针组 :

[0432] 正向引物 :AATGGCTAAGTGAAGATGACAATCAT(SEQ ID NO :2)

[0433] 反向引物 :TGCACATATCATTACACCAGTTCGT(SEQ ID NO :3)

[0434] 以及 PCR 探针 :

[0435] FAM-TTGCAGCAATTCACTGTAAAGCTGGAAAGG-TAMRA(SEQID NO :4),其中 FAM 为荧光染料而 TAMRA 为淬火染料。

[0436] 实施例 31

[0437] 目标蛋白水平的 Western 印迹分析

[0438] Western 印迹分析 (免疫印迹分析) 可采用标准方法进行。在寡核苷酸处理后 16-20 小时采集细胞,以 PBS 洗涤一次,悬浮于 Laemmli 缓冲液 (100μl/ 微孔),煮沸 5 分钟并上样至 16% SDS-PAGE 凝胶。在 150V 下跑胶 1.5 小时,并转移到膜上进行 western 印迹。采用适当的针对目标的一抗,以及针对该一抗的放射标记或荧光标记的二抗。采用 PHOSPHORIMAGER™(Molecular Dynamics,Sunnyvale CA) 显示条带。

[0439] 实施例 32

[0440] 用 SVPD 处理过的 5′ -(S) 和 (R)-CH_3-BNA 修饰的低聚体的核酸酶稳定性

[0441] 5′ -CH_3-BNA 修饰的低聚体的核酸酶稳定性可采用蛇毒磷酸二酯酶 (SVPD) 进行测定。各低聚体制备为含有以下成分的 500μL 混合物 :5μL100μM 低聚体 ;溶于 SVPD 缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.5,8mM $MgCl_2$) 的 50μL0.5 单位 /mL 磷酸二酯酶,其最终浓度 0.05 单位 /mL ;445μL SVP 缓冲液。将样本在 37℃下于水浴中孵育。在第 1 和 2 天添加新

鲜的酶，并在第 0、1、2 和 4 天取等份 (100μL)。在等份取出后立即添加 EDTA 以终止酶活性。在 IP HPLC/MS 上分析样本。

[0442] SEQ ID NO. 组成 (5'-3') 第 4 日的全长%

[0443] /ISIS NO.

[0444] 05/392747 C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$ ＞ 80

[0445] 05/392746 C_RU_RTAGCACTGGCC$_RU_R$ ＞ 80

[0446] 05/392745 C_1U_1TAGCACTGGCC$_1U_1$ 40-50

[0447] 05/392753 C_eU_eTAGCACTGGCC$_eU_e$ 30-40

[0448] 所有的核苷间键合为磷酸二酯，下标 S 和 R 表示同样具有 4′ -CH_2-O-2′ 桥基团的 5′ -CH_3-BNA 核苷的 5′ 碳原子处的构型。下标 e 表示 2′ -O-MOE 核苷，而下标 1 表示 4′ -CH_2-O-2′ 修饰的核苷。含有 5- 甲基取代的 BNA 的化合物 (392746 和 392747) 比含有未取代 BNA 的化合物 (392745) 具有明显的提高。

[0449] 组成% 组成% 组成%

[0450] SEQ ID NO. 24 小时 48 小时 96 小时

[0451] /ISIS NO.

[0452] 05/392747 100% 86% 82%

[0453] 05/392746 100% 90% 84%.

[0454] 05/392745 67% 56% 48%

[0455] 05/392753 58% 46% 36%

[0456] 实施例 33

[0457] 以 SVPD 处理过的 5′ -(S)-CH_3 和 2′ -O-MOE 修饰的低聚体的核酸酶稳定性

[0458] 5′ -CH_3-BNA 修饰的低聚体的核酸酶稳定性可采用蛇毒磷酸二酯酶 (SVPD) 进行测定。各低聚体制备为含有以下成分的 90μL 混合物：5μL 低聚体 (2μL 5μM 低聚体和 3μL 5′ ^{32}P- 标记的低聚体)，75μL H_2O，以及 10μL10X 缓冲液 (500mM Tris-HCl，700mM NaCl，以及 140mM $MgCl_2$，pH 8.6)。在 0 分钟，从上述制备的低聚体样本取出 9μL 并添加至 10μL 终止缓冲液 (6.67M 尿素，16.67% 甲酰胺和 83.3mM EDTA) 中然后添加 1μL H_2O 并在 100℃下加热 2.5 至 3 分钟。通过添加 9μL SVPD(0.5 单位 /mL) 启动测定。最终的酶浓度为 0.05 单位 /mL。将每等份的 10μL 低聚体动力学溶液添加至 10μL 终止缓冲液并按如上所述热灭活。取 1、3、9、27、80、240 和 1290 分钟为动力学时间点。通过 12% 丙烯酰胺 PAGE 在 45 瓦特 / 凝胶下跑 2 小时分析样本。

[0459] SEQ ID NO. 组成 (5'-3') 修饰

[0460] /ISIS NO.

[0461] 06/395421 TTTTTTTTTTT$_eT_e$ 2′ -O-MOE

[0462] 07/395423 TTTTTTTTTTU$_1U_1$ 4′ -CH_2-O-2′

[0463] 07/395427 TTTTTTTTTTU$_SU_S$ 5′ -(S)-CH_3BNA

[0464] 06/7157 TTTTTTTTTTTT 未修饰的 (2′ -H)

[0465] 所有的核苷间键合为磷酸二酯，下标 S 表示同样具有 4′ -CH_2-O-2′ 桥基团的 5′ -CH_3-BNA 核苷的 5′ 碳原子处的构型，下标 e 表示 2′ -O-MOE 核苷，而下标 1 表示 4′ -CH_2-O-2′ BNA。所有的非下标 T 为 2′ -H。该 5- 甲基取代的 含 BNA 化合物 (395427)

比未取代的含 BNA 化合物 (395423) 和含 MOE 化合物 (395421) 具有明显的提高。

[0466] SEQ ID NO. 组成% 组成% 组成% 组成% 组成%

[0467] ISIS No. 3 分钟 27 分钟 80 分钟 240 分钟 1290 分钟

[0468] 06/395421 68.7 27.9 17.2 11.6 9.0

[0469] 07/395423 32.6 4.7 2.5 2.2 2.2

[0470] 07/395427 100.0 91.6 86.6 76.0 61.1

[0471] 06/7157 5.2 1.2 2.0 1.7 0.9.

[0472] 实施例 34

[0473] 靶向 PTEN 的 5′ -(S)-CH_3-BNA 和 5′ -(R)-CH_3-BNA 2-10-2 带间隙低聚体 :体外研究

[0474] 如本发明所述,合成低聚化合物并在一定剂量范围内检测其减少 PTEN 表达的能力。采用此处所述的方法以 0.3125、0.0625、1.25、2.5、5、10 或 20nM 浓度的 5′ -CH_3-BNA 修饰的低聚体处理 b.END 细胞。如此处其它实施例所述,PTEN 的表达水平可通过实时 PCR 测定并对 RIBOGREEN™ 归一化。下文列表显示了在 20nM 的药物浓度下 PTEN mRNA 相对未处理的对照细胞的下降百分比 (% UTC)。所得的剂量 - 响应曲线可用于测定如下所示的 392747 的 IC50。在 pH 7 的 100mM 磷酸盐缓冲液,0.1mM EDTA 中 260nm 下使用 4μM 5′ -CH_3-BNA 修饰的低聚体和 4μM 互补 RNA 测定温度。

[0475] SEQ ID NO. 组成 (5’-3’) % UTC IC_{50} 温度℃

[0476] /ISIS NO.

[0477] 05/392746 C_RU_RTAGCACTGGCC$_RU_R$ 75 47.3

[0478] 05/392747 C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$ 28 8.6 57.0

[0479] 所有的核苷间键合为硫代磷酸酯,下标 R 和 S 表示同样具有 4′ -CH_2-O-2′ 桥基团的 5′ -CH_3-BNA 核苷的 5′ 碳原子处的构型。

[0480] 实施例 35

[0481] 靶向 PTEN 的 5′ -(S)-CH_3-BNA 和 5′ -(R)-CH_3-BNA 2-10-2 带间隙低聚体 :体内研究

[0482] 在 3 周中每周两次向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory,BarHarbor,ME) 注射剂量为 0.5 或 2μmol/kg 的靶向 PTEN 的修饰的低聚体 (5-(S) 或 5-(R))。在最后一次施用后 48 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (% UTC)。

[0483] SEQ ID NO. 组成 (5’-3’) 剂量 % UTC

[0484] /ISIS NO. (μmol/kg)

[0485] 盐水 100

[0486] 05/392746 C_RU_RTAGCACTGGCC$_RU_R$ 2.0 56

[0487] 05/392746 C_RU_RTAGCACTGGCC$_RU_R$ 0.5 71

[0488] 05/392747 C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$ 2.0 28

[0489] 05/392747 C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$ 0.5 91

[0490] 所有的核苷间键合为硫代磷酸酯,下标 R 和 S 表示同样具有 4′ -CH_2-O-2′ 桥基团的 5′ -CH_3-BNA 核苷的 5′ 碳原子处的构型。

[0491] 实施例 36

[0492] 靶向 PTEN 的 5′ -(S)-CH_3-BNA 2-10-2 带间隙低聚体 :体内研究

[0493] 在向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 注射剂量为 1、2、4 或 8 μmol/kg 的靶向 PTEN 的 5′ -(S)-CH_3-BNA 修饰的低聚体一 次。在施用后 72 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (% UTC)。

[0494] SEQ ID NO.	组成 (5’-3’)	剂量	% UTC
[0495] /ISIS NO.		(μmol/kg)	
[0496] 盐水			100
[0497] 05/392747	C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$	1	92
[0498] 05/392747	C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$	2	65
[0499] 05/392747	C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$	4	33
[0500] 05/392747	C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$	8	13

[0501] 所有的核苷间键合为硫代磷酸酯,下标 S 表示同样具有 4′ -CH_2-O-2′ 桥基团的 5′ -CH_3-BNA 核苷的 5′ 碳原子处的构型。

[0502] 实施例 37

[0503] 在三周、多剂量体内研究中靶向 PTEN 的 5′ -(S)-CH_3-BNA 和 2′ -O-MOE 带间隙低聚体

[0504] 在三周中每周两次向六周大的 Balb/c 小鼠 (Jackson Laboratory, BarHarbor, ME) 注射剂量为 3.2、1.0、0.32 或 0.1 μmol/kg(以下仅显示了 3.2 和 1 μmol/kg 的数据) 的靶向 PTEN 的 5-(S)-CH_3-BNA(2-10-2,14-mer)、4′ -CH_2-O-2′ -BNA(2-10-2,14-mer) 和 2′ -O-MOE(5-10-5,20-mer) 修饰的低聚体 (6-(S) 或 6-(R))。在最后一次施用后 48 小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时 PCR 对 mRNA 水平定量,从而与未处理对照水平进行比较 (% UTC)。处死后测定血浆化学和肝重。

[0505] SEQ ID NO.	组成 (5’-3’)	剂量	% UTC	ALT
[0506] /ISIS NO.		(μmol/kg)		
[0507] 盐水				
[0508] 05/392747	C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$	3.2	15	17.5
[0509] 05/392747	C_SU_STAGCACTGGCC$_SU_S$	1	53	21.3
[0510] 08/392063	$^{Me}C_1T_1$TAGCACTGGC$^{Me}C_1T_1$	3.2	4.2	279.3
[0511] 08/392063	$^{Me}C_1T_1$TAGCACTGGC$^{Me}C_1T_1$	1	26	41.0
[0512] 09/116847	$^{Me}C_eT_eG_e{}^{Me}C_eT_e$AG^{Me}C^{Me}CT^{Me}C	1	53	41.3
[0513]	TGGAT$_eT_eT_eG_eA_e$			

[0514] 所有的的核苷间键合为硫代磷酸酯,下标 S 表示同样具有 4′ -CH_2-O-2′ 桥基团的 5′ -CH_3-BNA 核苷的 5′ 碳原子处的构型,下标 1 表示 4′ -CH_2-O-2′ BNA,下标 e 表示 2′ -O-MOE 核苷,且 ^{Me}C 表示 5′ - 甲基胞嘧啶核苷。在研究的最高点,含 4′ -CH_2-O-2′ BNA(392063) 的低聚体的高剂量组 (3.2 μmol/Kg 剂量组) 的动物显示了明显升高的肝重 (相对盐水为 153%)。与之相反,含 5-(S)-CH_3BNA(392747,3.2 μmol/Kg 剂量组) 低聚体的肝重为盐水组的 121%。含 2′ -O-MOE(116847,1.0 μmol/Kg 剂量组) 低

聚体的肝重为盐水组的116%。该实施例证明了5′ -(S)-CH_3-BNA修饰允许设计出ALT水平相对4′ -CH2-O-2′ BNA修饰的化合物有显著提升的反义低聚体。

[0515] 实施例38

[0516] 靶向PTEN的5′ (S)-Me-BNA和4′ -CH_2-O-2′ BNA 2-10-2带间隙低聚体:体内研究

[0517] 向六周大的Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)注射剂量为2.5、5、10或20μmol/kg(仅显示了5和10μmol/kg的数据)的靶向PTEN的修饰的5′ -(S)-CH_3(396569)、4′ -CH_2-O-2′ BNA 2-10-2带间隙低聚体一次。在施用后66小时处死小鼠。将肝组织匀浆化。

[0518] SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成(5’-3’)	剂量(μmol/kg)	ALT
[0519]			
[0520] 盐水			41.3
[0521] 10/396569	$U_SC_SATGGCTGCAGC_SU_S$	10	111.0
[0522] 10/396569	$U_SC_SATGGCTGCAGC_SU_S$	5	54.0
[0523] 11/392056	$T_1{}^{Me}C_1ATGGCTGCAG{}^{Me}C_1T_1$	10	925.0
[0524] 11/392056	$T_1{}^{Me}C_1ATGGCTGCAG{}^{Me}C_1T_1$	5	373.0

[0525] 所有的的核苷间键合为硫代磷酸酯,下标S表示同样具有4′ -CH_2-O-2′桥基团的5′ -CH_3-BNA核苷的5′碳原子处的构型,下标1表示4’-CH_2-O-2’核苷且^{Me}C表示5’-甲基胞嘧啶核苷。

[0526] 对于上述寡核苷,一种(Isis No.392056)在5′碳原子处不包含手性的核苷,而396569则包含该核苷。396569包含5′ (S)-Me单体,且与在5′位不具有取代基的392056相比,在肝脏具有明显更小的毒性。

[0527] 实施例39

[0528] 靶向PTEN的5′ (S)-Me-BNA、2′ -O-MOE和4′ -CH_2-O-2′ BNA 2-14-2带间隙低聚体:体内研究

[0529] 在向六周大的Balb/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)注射剂量为2或10μmol/kg的靶向PTEN的5′ -CH_3-BNA修饰低聚体一次。在施用后72小时处死小鼠。将肝组织匀浆化并按照此处所述通过实时PCR对mRNA水平定量,从而与未处理对照水平进行比较(% UTC)。

[0530] SEQ ID NO. /ISIS NO.	组成(5’-3’)	修饰
[0531]		
[0532] 12/394420	$^{Me}C_eT_eGCTAGCCTCTGGATT_eT_e$	2′ -O-MOE
[0533] 12/394425	$^{Me}C_1T_1GCTAGCCTCTGGATT_1T_1$	4′ -CH_2-O-2′ BNA
[0534] 13/400521	$C_SU_SGCTAGCCTCTGGATU_SU_S$	5’-(S)-CH_3

[0535] ISIS NO.	剂量(μmol/kg)	% UTC	ALT
[0536]			
[0537] 盐水		100%	38.5
[0538] 394420	2	79%	30.3
[0539] 394420	10	26%	49.3

[0540]	394425	2	11%	41.2
[0541]	394425	10	2.1%	2453.2
[0542]	400521	2	21.4%	36.7
[0543]	400521	10	3.8%	152

[0544] 所有的的核苷间键合为硫代磷酸酯，下标 R 和 S 表示同样具有 4′ -CH_2-O-2′ 桥基团的 5′ -CH_3-BNA 核苷的 5′ 碳原子处的构型，下标 e 表示 2′ -O-MOE 核苷，下标 l 表示 4′ -CH_2-O-2′ 核苷而 ^{Me}C 表示 5′ - 甲基胞嘧啶核苷。

[0545] 在高剂量组 (10 微摩尔 /Kg) 下，含 5′ (S)-Me 修饰的寡核苷 400521 基本与 394425 等效。然而，与 394425(2453.2) 相比，400521 的 ALT 提升较小 (152)，这清楚地表明 5′ 位取代可产生很大提高了的疗效指数。