

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380101403.5

[51] Int. Cl.

C07H 19/06 (2006.01)

C07H 19/16 (2006.01)

C07F 9/24 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1329408C

[22] 申请日 2003.10.8

[21] 申请号 200380101403.5

[30] 优先权

[32] 2002.10.15 [33] US [31] 60/418,185

[86] 国际申请 PCT/GB2003/004312 2003.10.8

[87] 国际公布 WO2004/035599 英 2004.4.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.14

[73] 专利权人 艾夫西亚生物科技公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 N·D·辛哈

[56] 参考文献

US6275725B1 2001.8.14

US5034534A 2003.1.16

审查员 杨 轶

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘维升 李连涛

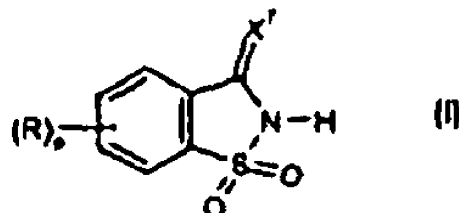
权利要求书 3 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

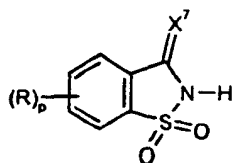
亚磷酰化方法

[57] 摘要

提供了一种在活化剂存在下用亚磷酰化试剂对醇或硫醇进行亚磷酰化作用的方法。活化剂具有式(I)结构: 其中 p 为 0 或 1-4 的整数, R 在每次出现时为取代基。优选 X^7 为 O 且 p 为 0。所使用的活化剂通常为与有机碱形成的盐络合物。优选的醇或硫醇包括核苷和低聚核苷酸。该方法特别适用于亚磷酰胺的合成。



1、一种在活化剂存在下，用亚磷酰化试剂对醇或硫醇进行亚磷酰化的方法，其特征在于，所述活化剂具有式1的结构：



其中，

p 为 0 或 1 - 4 的整数，

R 在每次出现时各自独立为卤素、取代或未取代的脂肪族基团、 $-NR^1R^2$ 、 $-OR^3$ 、 $-OC(O)R^3$ 、 $-C(O)OR^3$ 、氰基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基、 $-CHO$ 、 $-COR^3$ 、 $-NHCOR^3$ 、取代或未取代的芳烷基、卤代烷基、 $-SR^3$ ；或者两个相邻 R 基团与其所连接的碳原子一起形成饱和或不饱和六元环；

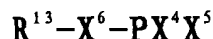
R^1 和 R^2 各自独立为 $-H$ 、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基；或与其所连接的氮原子一起形成杂环基；

R^3 为取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳基，或取代或未取代的芳烷基；

由 R 、 R^1 、 R^2 或 R^3 表示的被取代的基团的取代基选自芳基、卤代芳基、烷基、卤代烷基、脂肪族醚、芳香族醚、苄基、卤素、氰基、硝基、 $-S-$ (脂肪族基团)，和 $-S-$ (芳香族基团)，

X^7 为 O 或 S ，和

所述亚磷酰化试剂具有下列化学通式：



其中， R^{13} 表示磷保护基团， X^6 代表 O 或 S ， X^4 和 X^5 可相同或不同，代表离去基团。

2、根据权利要求 1 的方法，其中 X^7 为 O ，且 p 为 0。

3、根据权利要求 1 的方法，其中式 1 化合物以与有机碱形成盐络合物的方式使用。

4、根据权利要求 3 的方法，其中有机碱选自吡啶、3-甲基吡啶和 N -甲基咪唑。

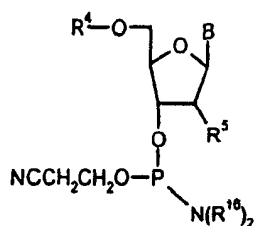
5、根据权利要求 1-4 中任一项的方法，其中醇或硫醇为包括游离羟基或硫醇基团的核苷或低聚核苷酸。

6、根据权利要求 5 的方法，其中对包括游离 3'-羟基基团的核苷进行亚磷酰化作用。

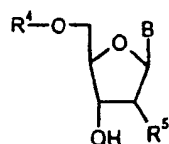
7、根据权利要求 1 的方法，其中 R^{13} 表示取代或未取代的脂肪族基团或芳烷基，或取代或未取代的芳香族基团， X^6 为 O 且 X^4 和 X^5 各自独立代表 $-NR^{14}R^{15}$ ，其中 R^{14} 和 R^{15} 各自独立代表 C_{1-6} 烷基基团，或 R^{14} 和 R^{15} 与其所连接的 N 一起形成 5-7 元环，由 R^{13} 表示的被取代的基团的取代基选自芳基、卤代芳基、烷基、卤代烷基、脂肪族醚、芳香族醚、苄基、卤素、氰基、硝基、 $-S-$ (脂肪族基团)，和 $-S-$ (芳香族基团)。

8、根据权利要求 7 的方法，其中亚磷酰化试剂选自 0- β -氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺、0- β -氰基乙基-N,N,N',N'-四甲基亚磷酰二胺、0- β -氰基乙基-N,N,N',N'-四乙基亚磷酰二胺、双(N,N-二异丙基氨基)-2-甲基三氟乙酰基氨基乙氧基膦、双(N,N-二异丙基氨基)-2-二苯甲基甲硅烷基乙氧基膦和 0- β -氰基乙基-双(N-吗啉代)亚磷酰二胺。

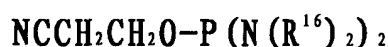
9、一种制备下式化合物的方法：



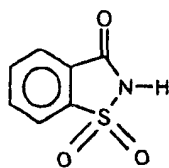
其包括：使下式化合物：



与下式化合物：



在活化剂存在下进行反应，其中活化剂包括下式化合物：



及有机碱，其中， R^4 为醇保护基团， R^5 为-H、-F、-OR⁶、-NR⁷R⁸、-SR⁹，或取代或未取代的脂肪族基团， R^6 每次出现时独立为-H、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、醇保护基团、或-(CH₂)_q-NR¹¹R¹²， R^7 和 R^8 各自独立为-H、取代或未取代的脂肪族基团，或氨基保护基团，或者 R^7 和 R^8 与其所连接的氮原子一起为杂环基， R^9 为-H、取代或未取代的脂肪族基团，或硫醇保护基团， R^{11} 和 R^{12} 各自独立为-H、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基，或氨基保护基团，或者 R^{11} 和 R^{12} 与其所连接的氮原子一起形成杂环基， q 为1-6的整数， B 为-H、天然或非天然核碱、被保护的核碱、被保护的天然或非天然核碱、杂环或被保护的杂环， R^{16} 代表C₁₋₆烷基，由 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{11} 或 R^{12} 表示的被取代的基团的取代基选自芳基、卤代芳基、烷基、卤代烷基、脂肪族醚、芳香族醚、苄基、卤素、氰基、硝基、-S-(脂肪族基团)，和-S-(芳香族基团)。

10、根据权利要求9的方法，其中 R^5 为甲基或烯丙基。

11、根据权利要求9的方法，其中 R^{16} 代表异丙基。

12、根据权利要求9的方法，其中有机碱选自吡啶、3-甲基吡啶和N-甲基咪唑。

13、根据权利要求9-12中任一项的方法，其中 R^5 为H、OMe或OCH₂CH₂OMe。

14、根据权利要求9-12中任一项的方法，其中 R^4 为酸不稳定的保护基团，且 R^5 为OR⁶，其中 R^6 为碱不稳定的保护基团或甲硅烷基保护基团。

亚磷酰化方法

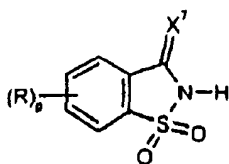
本发明涉及对醇或硫醇进行亚磷酰化 (phosphitylation) 的方法, 尤其涉及对核苷进行亚磷酰化而形成核苷亚磷酰胺的方法。

合成的低聚核苷酸是检测基因和病毒疾病的重要诊断工具。而且, 低聚核苷酸和修饰的低聚核苷酸作为抑制基因表达或蛋白质功能的治疗候选物质是很有用的。由于 FDA 已批准将低聚核苷酸类似物用于治疗细胞巨化病毒 (CMV), 而且其它几种低聚核苷酸类似物目前也正在临床进行试验, 因此大规模合成作为治疗候选物质的低聚核苷酸已变得越来越重要。每个临床试验中都需要数千克的纯化低聚核苷酸类似物。

目前用于制备低聚核苷酸的主要方法是亚磷酰胺法。对于更大量的低聚核苷酸的不断增长的需求也使亚磷酰胺化合物的需求量相应增加。通常, 亚磷酰胺化合物是在活化剂的存在下, 将核苷用亚磷酰化试剂进行亚磷酰化作用来制备。最常使用的活化剂为亲核活化剂 1H-四唑。但是, 1H-四唑为爆炸性物质, 因此用在大规模合成中可能带来危险。

为了更容易地制备诊断和治疗用途的低聚核苷酸, 则需要可促进亚磷酰化作用又不会增加副产物的非爆炸性活化剂。

根据本发明, 其提供了在活化剂存在下, 用亚磷酰化试剂对醇或硫醇进行亚磷酰化作用的方法, 其特征在于, 活化剂具有式 1 的结构:



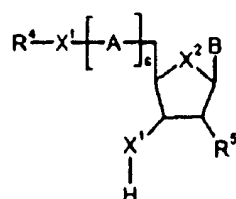
式 1 中, p 为 0 或 1-4 的整数。R 在每次出现时为取代基, 优选各自独立为卤素、取代或未取代的脂肪族基团、 $-NR^1R^2$ 、 $-OR^3$ 、 $-OC(O)R^3$ 、 $-C(O)OR^3$ 、氰基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基、 $-CHO$ 、 $-COR^3$ 、 $-NHCOR^3$ 、取代或未取代的芳烷基、卤代烷基 (如, 三氟甲基和三氯甲基), 或 $-SR^3$ 。优选, R 为卤素、取代或未取代的脂肪族基团、 $-NR^1R^2$ 、 $-OR^3$ 、 $-OC(O)R^3$ 、 $-C(O)OR^3$ 或氰基。或者, 两个相邻 R 基团与

其所连接的碳原子一起形成饱和或不饱和六元环，优选芳环。 R^1 和 R^2 各自独立为-H、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基；或与其所连接的氮原子一起形成杂环基。 R^3 为取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基。 X 为 O 或 S。优选， X 为 O。特别优选 X 为 O，且 p 为 0。

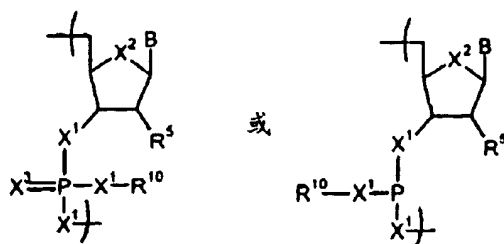
优选所使用的式 1 化合物为与有机碱形成的盐络合物。

在许多实施方案中，该醇或硫醇为含有游离羟基或硫醇基团的核苷或低聚核苷酸，而且该醇或硫醇还包括含有天然核苷戊糖和非天然核苷糖，如己糖的核苷和低聚核苷酸。当醇或硫醇为核苷或低聚核苷酸时，其通常为被保护的脱氧核糖核苷、被保护的核糖核苷、被保护的寡脱氧核糖核苷酸、被保护的寡核糖核苷酸，或具有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸部分的被保护的核苷酸，其中各个部分都包括游离的 3'-或 5'-，优选 3'-羟基或硫醇基团，且最优选为 3'-羟基基团。

可按照本发明的方法进行亚磷酰化的醇和硫醇包括式 2 的化合物：



其中，A 代表



其中， X^1 每次出现时独立为-O-或-S-。优选， X^1 每次出现时均为-O-。 X^2 每次出现时独立为-O-、-S-、-CH₂ 或 -(CH₂)₂-。优选， X^2 每次出现时均为-O-。 X^3 每次出现时独立为 O 或 S。在更优选的实施方案中， X^1 和 X^2 每次出现时各自为-O-。 R^4 为醇保护基团或硫醇保护基团。优选， R^4 为对酸不稳定的保护基团。 R^5 每次出现时独立为-H、-F、-OR⁶、-NR⁷R⁸、-SR⁹，或取代或未取代的脂肪族基团，例如甲基或烯丙基。 R^{10} 每次出

现时独立为磷保护基团，其通常为合成低聚核苷酸时使用的可裂分的磷保护基团，并优选为取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳基或取代或未取代的芳烷基，例如式 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ 的基团。 R^6 每次出现时独立为 $-\text{H}$ 、取代或未取代的脂肪族基团（如，甲基、乙基、甲氧基乙基或烯丙基）、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、醇保护基团、特别是碱-不稳定的保护基团，或甲硅烷基保护基团，或 $-(\text{CH}_2)_q-\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$ 。 R^7 和 R^8 每次出现时各自独立为 $-\text{H}$ 、取代或未取代的脂肪族基团，或氨基保护基团。或者， R^7 和 R^8 与其所连接的氮原子一起为杂环基。 R^9 每次出现时独立为 $-\text{H}$ 、取代或未取代的脂肪族基团，或硫醇保护基团。 R^{11} 和 R^{12} 各自独立为 $-\text{H}$ 、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基，或氨基保护基团。或者， R^{11} 和 R^{12} 与其所连接的氮原子一起形成杂环基。 q 为1-约6的整数。 s 为0或正整数。优选， s 为0、1或2，最优选为0。 B 各自独立为 $-\text{H}$ 、天然或非天然核碱、被保护的核碱、被保护的天然或非天然核碱、杂环或被保护的杂环。

核苷碱包括天然存在的碱，例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶，还包括经修饰的碱，例如7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮-8-氮鸟嘌呤、5-丙炔基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮-8-氮腺嘌呤、7-脱氮-6-氧嘌呤、6-氧嘌呤、3-脱氮腺苷、2-氧-5-甲基嘧啶、2-氧-4-甲硫基-5-甲基嘧啶、2-硫代羰基-4-氧-5-甲基嘧啶、4-氧-5-甲基嘧啶、2-氨基嘌呤、5-氟尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、8-氨基嘌呤、4-三唑-5-甲基胸腺嘧啶、4-三唑-5-甲基尿嘧啶和次黄嘌呤。

被保护的核苷碱是指其中的反应性碱官能团被保护起来的核苷碱。类似地，被保护的杂环是杂环中的反应性取代基被保护起来的杂环。通常，核苷碱或杂环具有可被氨基保护基团（如酰胺或氨基甲酸酯）保护起来的氨基基团。例如，腺嘌呤和胞嘧啶的氨基基团通常被苯甲酰保护基团所保护，鸟嘌呤中的氨基基团通常被异丁酰基、4-异丙基苯氧乙酰基或叔丁基苯氧乙酰基保护。但是，还可使用其它保护

方案，例如甲脒。例如，为了快速解保护，腺嘌呤和鸟嘌呤的氨基基团用苄氧乙酰基进行保护，胞嘧啶的氨基基团用异丁酰基或乙酰基进行保护。除去核碱或杂环保护基团的反应条件要取决于所用的保护基团。使用酰胺保护基团时，可用碱溶液处理低聚核苷酸来除去保护基团，该碱溶液例如为浓缩氢氧化铵溶液、正甲胺溶液或氢氧化铵中的叔丁胺溶液。

氨、羟基和硫醇保护基团对本领域熟练技术人员来说是已知的。氨保护基团的例子参见 Greene 等, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1991), John Wiley & Sons, Inc., 309-405 页，该文献所教导的全部内容引入本文作为参考。优选，将氨保护为酰胺或氨基甲酸酯。羟基保护基团的例子参见同上，10-142 页，其全部教导引入本文作为参考。可使用的保护基团的例子包括甲硅烷基，特别是三烷基，例如三(C₁₋₄烷基)甲硅烷基。优选的甲硅烷基保护基团为叔丁基二甲基甲硅烷基。优选的羟基保护基团为叔丁基二甲基甲硅烷基。硫醇保护基团的例子参见同上，277-308 页，其全部教导引入本文作为参考。

酸不稳定的保护基团是指通过使该基团与 Bronsted 或 Lewis 酸接触可将其除去的保护基团。酸不稳定的保护基团对本领域熟练技术人员来说是已知的。常用的酸不稳定保护基团的例子包括取代或未取代的三苯甲基(同上，60-62 页)、取代或未取代的四氢吡喃基团(同上，31-34 页)、取代或未取代的四氢呋喃基团(同上，36-37 页)或 pixyl 基团(同上，65 页)。通常用给电子取代基，例如烷氧基基团取代三苯甲基基团。优选的酸不稳定保护基团为取代或未取代的三苯甲基，例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基(下文中为“DMT”)。

碱不稳定的保护基团是指通过使该基团与 Bronsted 或 Lewis 碱接触可将其除去的保护基团。碱不稳定的保护基团对本领域熟练技术人员来说是已知的。常用的碱不稳定保护基团的例子包括羰基化合物，例如乙酰基、苯甲酰基和新戊酰基。

应当认识到，如果式 2 表达为给定醇的天然核苷构型(D-异构体)，则本发明同样还可用于相应的合成或非天然醇构型(L-异构体)，以及上述两种构型的混合物中。

可用于本发明方法中的亚磷酸化试剂通常具有下述化学通式：



其中, R^{13} 表示磷保护基团, 通常为合成低聚核苷酸中所用的可裂解的磷保护基团, 例如取代或未取代的脂肪族基团或芳烷基, 例如甲基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$, 并优选为式 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 的基团; 取代或未取代的芳香族基团, 例如苯基或取代的苯基, 例如 4-氯苯基、2-氯苯基、2-硝基苯基或 4-硝基苯基; X^6 代表 O 或 S, 并优选 O; X^4 和 X^5 可相同或不同, 代表离去基团, 例如卤素, 通常为溴或氯, 或 $-\text{NR}^{14}\text{R}^{15}$, 其中 R^{14} 和 R^{15} 各自独立代表烷基, 优选 C_{1-6} 烷基基团, 或 R^{14} 和 R^{15} 与其所连接的 N 一起形成 5-7 元环。通常 X^4 和 X^5 中的至少一个基团为式 $-\text{NR}^{14}\text{R}^{15}$ 的基团。最优选, X^4 和 X^5 相同, 并且尤其优选 X^4 和 X^5 都为 $-\text{N}[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]_2$ 基团。特别优选 X^6 为 O 且 R^{13} 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 。

本发明的方法尤其适用于制备亚磷酰胺, 尤其是核苷和低聚核苷酸亚磷酰胺。

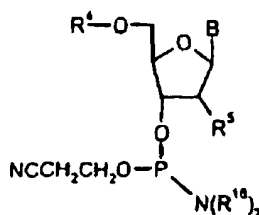
优选的亚磷酰化试剂的例子包括 0- β -氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺 (0- β -cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphorodiamidite), (通常称作 "tetraphos")、0- β -氰基乙基-N,N,N',N'-四甲基亚磷酰二胺、0- β -氰基乙基-N,N,N',N'-四乙基亚磷酰二胺、双(N,N-二异丙基氨基)-2-甲基三氟乙酰基氨基乙氧基膦、双(N,N-二异丙基氨基)-2-二苯甲基甲硅烷基乙氧基膦和 0- β -氰基乙基-双(N-吗啉代)亚磷酰二胺。

本发明的方法通常在 0℃ - 约 50℃ 的温度下进行, 优选在环境温度, 例如约 15℃ - 约 30℃ 下进行。

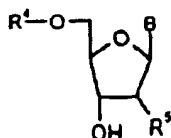
有利的是使用基本无水的反应条件。

本发明的许多实施方案是在惰性气氛, 例如氮气或氩气下进行。

根据本发明的方法可有利地用于制备核苷亚磷酰胺。因此, 本发明的优选方面包括制备下式化合物的方法:



其包括: 使下式化合物:

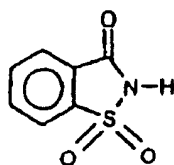


其中， R^4 如上述定义，并优选为二甲氧基三苯甲基， R^5 如上述定义；
与下式化合物：



其中， R^{16} 代表 C_{1-6} 烷基，优选为异丙基；

在活化剂存在下进行反应，其中活化剂包括下式化合物：



及有机碱。

在许多实施方案中，活化剂按照与醇的化学计量摩尔比或小于化学计量摩尔比的量使用，活化剂与醇的摩尔比为约 0.4: 1 - 1: 1，尤其优选为约 0.5: 1 - 0.75: 1。

通常，亚磷酰化试剂按照与醇的化学计量摩尔比或过量使用，亚磷酰化试剂与醇的摩尔比为约 1: 1 - 3: 1，尤其优选为约 1: 1 - 1.5: 1。

在有机碱存在下，本发明中所用的活化剂具有良好的溶解性，尤其是在亚磷酰化反应常用的有机溶剂中。活化剂和有机碱的浓度可达到活化剂在所用溶剂中的溶解度。在优选实施方案中，活化剂和有机碱的存在浓度为约 0.01M - 约 2M，例如约 0.05M - 约 0.5M。通常活化剂和有机碱的存在浓度可高达 0.25M，例如约 0.1M - 约 0.25M。在更优选的实施方案中，活化剂和有机碱的摩尔浓度相同。在某些实施方案中，有机溶剂为氯碳化合物，例如二氯甲烷。在优选的实施方案中，有机溶剂包括乙腈。另一个优选实施方案中，有机溶剂包括有机酰胺，例如二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮或 1,3-二甲基-2-咪唑啉酮。

有机碱是指 pH 为 7 时趋向于接受质子的有机化合物。优选的有机碱为仲胺、叔胺或氮杂环化合物，每种化合物均可被一个或多个取代基取代或未取代。非质子有机碱是指接受质子之前其化学结构中不具

有氢键合质子的有机碱。优选将非质子有机碱，例如叔胺和非质子氮杂环化合物与本文中描述的式 1 化合物结合使用，以改善亚磷酸化反应。

本文中描述的氮杂环化合物包括芳环上具有一个或多个氮原子的杂芳基，和非芳环体系上具有至少一个氮原子的杂脂环族基。优选，氮杂芳基化合物具有 5-或 6-元芳环，且芳环上具有 1-3 个氮原子。优选氮杂脂环基化合物为 5-或 6-元环，通常在环上包括一个或两个氮原子。优选的氮杂环化合物为有机碱。有机碱氮杂环化合物的例子包括嘧啶、1-烷基吡唑，特别是 1-(C₁₋₄ 烷基)吡唑、1-芳基吡唑、1-苄基吡唑、吡嗪、N-烷基嘌呤，特别是 N-(C₁₋₄ 烷基)嘌呤、N-芳基嘌呤、N-苄基嘌呤、N-烷基吡咯，特别是 N-(C₁₋₄ 烷基)吡咯、N-芳基吡咯、N-苄基吡咯、吡啶、N-烷基咪唑，特别是 N-(C₁₋₄ 烷基)咪唑、N-芳基咪唑，特别是 N-苄基咪唑、N-苄基咪唑、喹啉、异喹啉、喹喔啉、喹唑啉、N-烷基吲哚，特别是 N-(C₁₋₄ 烷基)吲哚、N-芳基吲哚、N-苄基吲哚、N-烷基苯并咪唑，特别是 N-(C₁₋₄ 烷基)苯并咪唑、N-芳基苯并咪唑、N-苄基苯并咪唑、三嗪、噻唑、1-烷基-7-吡啶，特别是 1-(C₁₋₄ 烷基)-7-吡啶、1-芳基-7-吡啶、1-苄基-7-吡啶、吡咯烷、吗啉、哌啶和哌嗪。特别优选的氮杂环化合物为吡啶类，例如吡啶和 3-甲基吡啶，和 N-(C₁₋₄ 烷基)咪唑，例如 N-甲基咪唑。

叔胺是指一种具有氮原子的有机碱，且其中的氮原子键合于三个碳原子上，往往键合于三个芳基上，通常为苯基，和/或烷基，通常键合于三个烷基上，该烷基包括，例如三烷基胺，例如三甲胺、三乙胺和二异丙基乙基胺。此外，叔胺还可为氮杂环基团，且其中的氮原子为非质子性。氮杂环基团类的叔胺为优选的。氮杂环叔胺的例子为 N-烷基吡咯烷、N-芳基吡咯烷、N-烷基吡咯、N-芳基吡咯、N-烷基吗啉、N-芳基吗啉、N-烷基哌啶、N-芳基哌啶、N,N-二烷基哌嗪、N,N-二芳基哌嗪、N-烷基-N-芳基哌嗪、奎宁环、1,5-二氮杂二环[4.3.0]壬-5-烯和 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯。叔胺还可为氮杂芳基化合物或氮杂杂脂环基化合物。

仲胺是指氮键合到单个氮和两个碳原子上的有机碱。通常，氮原子键合到两个烷基或芳基上，或形成氮杂环基团的一部分。仲胺化合物的例子包括二乙胺和二异丙基胺。

特别优选的有机碱包括吡啶、3-甲基吡啶和 N-甲基咪唑。

脂肪族基团、芳基、芳烷基、杂芳基、氮杂芳基和杂脂环族基的适当取代基包括芳基、卤代芳基、烷基、卤代烷基（如，三氟甲基和三氯甲基）、脂肪族醚、芳香族醚、苄基、取代的苄基、卤素，尤其是氯和氟、氰基、硝基、-S-（脂肪族或取代的脂肪族基团），和-S-（芳香族或取代的芳香族基团）。

本文中所用的脂肪族基团包括直链或支链的、完全饱和或含有一个或多个非共轭双键的 C_1-C_{18} 烃，或完全饱和或含有一个或多个非共轭双键的环状 C_3-C_{18} 烃。烷基基团为完全饱和的直链或支链 C_1-C_8 烃或 C_3-C_8 环状烃。脂肪族基团优选为烷基。

芳基基团包括碳环芳环体系（如，苯基），和稠合于一个或多个碳环芳烃的碳环芳环体系（如，萘基和蒽基），或稠合于一个或多个非芳环的芳环体系（如，1,2,3,4-四氢萘基）。

本文中所用的杂环基团包括杂芳基和杂脂环族基。本文中所用的杂芳基包括芳环上具有一个或多个选自硫、氮或氧的杂原子的芳环体系。优选，杂芳基为具有 1-4 个杂原子的 5 或 6 元环体系。本文中所用的脂肪族杂环基为非芳环体系，其优选具有 5-6 个原子并包括至少一个选自氮、氧和硫的杂原子。杂环基团的例子包括吗啉基、哌啶基、哌嗪基、硫代吗啉基、吡咯烷基、噻唑烷基、四氢 thienyl、吡丁啶基、四氢呋喃基、二氧己环基和二氧杂萘烷基（dioxepanyl）、噻吩基、吡啶基、噻二唑基、噁二唑基、引哚基、呋喃、吡咯、咪唑、吡唑、三唑、嘧啶、吡嗪、噻唑、异噻唑、异噻唑、四唑、噁二唑、苯并噻吩、苯并咪唑、引哚、四氢引哚、吡引哚、引唑、喹啉、咪唑并吡啶、嘌呤、吡咯并[2,3-d]嘧啶和吡唑并[3,4-d]嘧啶。

本文中所用的芳烷基基团是指通过烷基进行连接的芳香族取代基。优选的芳烷基包括苄基。

本文中所用的杂芳烷基基团是指通过烷基进行连接的杂芳基取代基。

通过下面实施例对本发明进行非限制性的说明。

实施例 1

按照下列步骤制备糖精的 N-甲基咪唑盐。将糖精悬浮在乙腈中，

并向悬浮液中滴加相对于糖精为 1.1 当量的 N-甲基咪唑。减压浓缩反应混合物以形成结晶盐，用醚或己烷洗涤该结晶盐以除去痕量的 N-甲基咪唑和乙腈。

实施例 2

使用 0-β-氰基乙基-N, N, N', N'-四异丙基亚磷酰胺，和作为活化剂的糖精 N-甲基咪唑盐来对一系列核苷进行亚磷酰化作用。

一般方法：

向适当尺寸的烧瓶中加入核苷 (1.5mmol)，并与 20mL 吡啶一起共沸蒸馏两次（旋转蒸发器）以干燥固体。用 Ar 吹扫烧瓶并向烧瓶中加入 15mL 乙腈。室温下搅拌混合物直至获得澄清溶液。向混合物中加入 0-β-氰基乙基-N, N, N', N'-四异丙基亚磷酰胺 (Tetrachos)，之后加入糖精的 N-甲基咪唑盐。室温下搅拌混合物，同时用 HPLC 监测反应直至结束。反应结束时，用 30mL 乙酸乙酯稀释混合物，并用 2×25mL 的碳酸氢钠饱和水溶液和 25mL 氯化钠饱和水溶液洗涤有机混合物。分离有机层并用 MgSO₄ 干燥。过滤悬浮液，并使用旋转蒸发器除去溶剂。剩余物经真空干燥得到泡沫状物。

表 1: amidite 合成结果

Tetrachos (当量)	活化剂 (当量)	核苷	Rxn 时 间 (h)	%amidite ^a (HPLC)	产率 ^b (%)
1.2	0.6	5'-DMT-N-Bz-deoxyA	7	91.9	84
1.2	0.5	5'-DMT-N-Bz-deoxyA	5	91.5	86
1.2	1.0	5'-DMT-N-Bz-deoxyA	5	89.8	87
1.2	0.5	5'-DMT-N-iBu-deoxyG	16	79.1	85
1.2	0.5	5'-DMT-N-Ac-2'-OMeC	5	89.3	85
1.2	0.6	5'-DMT-N-Bz-deoxyC	8	91.1	79
1.2	0.6	5'-DMT-2'-TBDMS-L-U	16	82.6	82
1.2	0.6	5'-DMT-N-iBu-2'-TBDMS-L-G	16	59.3	84
2.2	0.6	5'-DMT-N-iBu-2'-TBDMS-L-G	16	87.4	82

^a %amidite=粗产物中的%amidite

^b 产率 = 粗产物产率

实施例 2

向 500mL 圆底烧瓶中加入 5'-DMT-N-Bz-2'-去氧腺苷 (18.00g, 27.37mmol), 并通过加入和蒸发 (旋转蒸发器) 2×200mL 的甲苯来共沸干燥固体。剩余物真空干燥 16h。在氩气氛下将剩余物溶解在乙腈 (180mL) 中, 并加入 O-β-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺 (9.90g, 32.84mmol)。搅拌混合物 5 分钟并加入固体糖精 N-甲基咪唑盐 (3.63g, 13.69mmol)。室温下搅拌混合物, 同时用 HPLC 监测反应的进行。18h 后, 未观察到进一步反应。向反应混合物中加入乙酸乙酯 (200mL), 并用碳酸氢钠饱和水溶液 (2×150mL) 和氯化钠饱和水溶液 (150mL) 洗涤有机溶液。分离有机层并用 MgSO₄ 干燥。过滤悬浮液, 并使用旋转蒸发器除去溶剂。剩余物经真空干燥 16h 得到白色泡沫状物。

粗产率: 23.70g

HPLC: 92.5%

使用硅胶 (230g) 柱对粗产物 (23.70g) 进行色谱分离。用 30% 乙酸乙酯/含 0.5% 三乙胺的己烷装载色谱柱。用 2 倍柱体积的 30% 乙酸乙酯/己烷洗涤色谱柱。将粗产物装载在色谱柱上, 并用 2 倍柱体积的 30% 乙酸乙酯/己烷、2 倍柱体积的 40% 乙酸乙酯/己烷、2 倍柱体积的 50% 乙酸乙酯/己烷和最后的 3 倍柱体积的 70% 乙酸乙酯/己烷洗脱色谱柱。当 TLC (8: 3 的乙酸乙酯: 己烷) 检测出产物时收集馏分。将含有所希望的产物的馏分合并起来, 并使用旋转蒸发器除去馏分中的溶剂。真空干燥剩余物 16h 得到白色泡沫状物。

产率: 17.55g (75%)

HPLC: 97.5%

³¹P NMR: 99.3%