



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102596983 B

(45) 授权公告日 2016.06.15

(21) 申请号 201080049279.2

(22) 申请日 2010.10.19

(30) 优先权数据

2009-248979 2009.10.29 JP

2010-023209 2010.02.04 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/068409 2010.10.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/052436 JA 2011.05.05

(73) 专利权人 国立大学法人大阪大学

地址 日本大阪府

(72) 发明人 小比贺聪 张功幸 儿玉哲也

矢原爱子 西田胜

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 龙淳

(51) Int. Cl.

C07H 19/06(2006.01)

A61K 31/712(2006.01)

C07H 19/16(2006.01)

C07H 21/00(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2005/021570 A1, 2005.03.10, 全文.

WO 99/60855 A1, 1999.12.02, 全文.

George A. Patani, et al. "Bioisosterism: a rational approach in drug design".

《Chemical Reviews》. 1996, 第 96 卷 (第 8 期), 第 3156 页表 23, 第 3170 页表 48.

Masaru Nishida, et al. "Synthesis and chemical properties of a novel 2', 4'-bridged nucleic acid analogue with a seven-membered cyclic carbamate structure". 《Nucleic Acids Symposium Series》. 2007, 第 51 卷 (第 1 期), 第 157-158 页.

Aiko Yahara, et al. "Synthesis and properties of a novel 2', 4'-BNA bearing a urea bridged structure". 《Nucleic Acids Symposium Series》. 2009, 第 53 卷 (第 1 期), 第 11-12 页.

审查员 沈芳

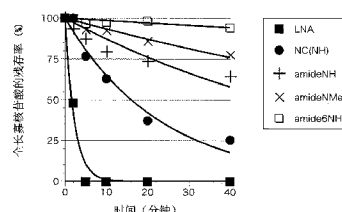
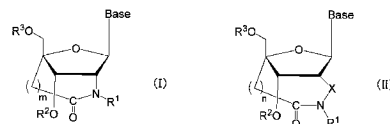
权利要求书2页 说明书48页 附图1页

(54) 发明名称

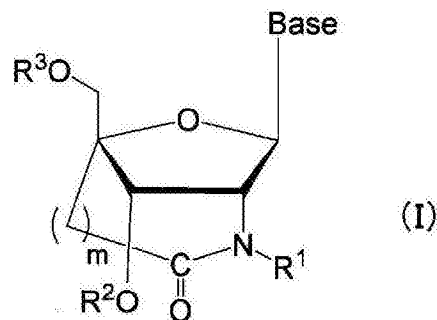
交联型人工核苷和核苷酸

(57) 摘要

提供能够高效地控制特定基因表达的反义用的新型分子。本发明的新型人工核苷,如式(I)、(II)所示,在2',4'-BNA/LNA的交联结构中导入有酰胺键。包含该2',4'-交联型人工核苷酸的寡核苷酸具有相当于公知的2',4'-BNA/LNA的对单链RNA的结合亲和性、和超过LNA的核酸酶抗性。特别是因为上述寡核苷酸对单链RNA,还具有比S-oligo对单链RNA更强的结合亲和性,所以被期待应用于核酸药物。



1. 一种化合物或其盐,由以下的式I表示:



式中,Base表示可以具有1个以上选自 α 群中的任意取代基的嘌呤-9-基或2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基,其中,该 α 群包括羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、碳数为1至6的直链烷基、碳数为1至6的直链烷氧基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、碳数为1至6的直链烷硫基、氨基、碳数为1至6的直链烷基氨基、由核酸合成的保护基所保护的氨基和卤原子;

R^1 表示可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基;

R^2 和 R^3 分别独立,表示氢原子、核酸合成的羟基的保护基、可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基、具有可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的酰基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的甲硅烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的磷酸基、由核酸合成的保护基所保护的磷酸基、 $-P(R^4)R^5$,式中, R^4 和 R^5 分别独立,表示羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、氨基、碳数为1至5的烷氧基、碳数为1至5的烷硫基、碳数为1至6的氰基烷氧基、或由碳数为1至6的烷基所取代的氨基;

m 为0至2的整数。

2. 如权利要求1所述的化合物或其盐,其特征在于:

在所述式I中,所述Base为6-氨基嘌呤-9-基、2,6-二氨基嘌呤-9-基、2-氨基-6-氯嘌呤-9-基、2-氨基-6-氟嘌呤-9-基、2-氨基-6-溴嘌呤-9-基、2-氨基-6-羟基嘌呤-9-基、6-氨基-2-甲氧基嘌呤-9-基、6-氨基-2-氯嘌呤-9-基、6-氨基-2-氟嘌呤-9-基、2,6-二甲氧基嘌呤-9-基、2,6-二氯嘌呤-9-基、6-巯基嘌呤-9-基、2-氧代-4-氨基-1,2-二氢嘧啶-1-基、4-氨基-2-氧代-5-氟-1,2-二氢嘧啶-1-基、4-氨基-2-氧代-5-氯-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-甲氧基-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-巯基-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-羟基-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基、或4-氨基-5-甲基-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基。

3. 如权利要求1或2所述的化合物或其盐,其特征在于:

在所述式I中,所述 R^1 为甲基、乙基、正丙基、异丙基或苯基。

4. 如权利要求1所述的化合物或其盐,其特征在于:

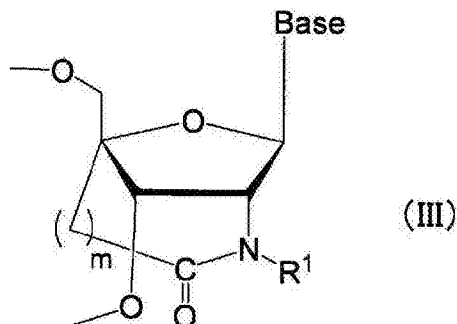
在所述式I中,所述 m 为0。

5. 如权利要求1所述的化合物或其盐,其特征在于:

在所述式I中,所述Base为2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基。

6.一种寡核苷酸或其药理学上可接受的盐,其特征在于:

含有至少1个式III所示的核苷结构:



式中,Base表示可以具有1个以上选自 α 群中的任意取代基的嘌呤-9-基或2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基,其中,该 α 群包括羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、碳数为1至6的直链烷基、碳数为1至6的直链烷氧基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、碳数为1至6的直链烷硫基、氨基、碳数为1至6的直链烷基氨基、由核酸合成的保护基所保护的氨基和卤原子;

R^1 表示可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基;

m 为0至2的整数。

交联型人工核苷和核苷酸

技术领域

[0001] 本发明涉及新型交联型人工核苷和核苷酸。更详细地涉及具有对单链RNA的高结合亲和性和对核酸酶的高抗性的交联型人工核苷和核苷酸。

背景技术

[0002] 作为通过核酸药物的疾病治疗法,有反义法、反义基因法、适配子、siRNA等。其中,反义法是从外部导入与疾病相关的mRNA互补的寡核苷酸(反义链),使双链形成,从而阻碍病原RNA的翻译过程,进行疾病治疗或预防的方法。siRNA也与此类似,通过在生物体中投与的双链RNA,阻碍从mRNA向蛋白质的翻译。另一方面,反义基因法通过从外部导入对应于转录病原RNA的DNA部位的三链形成寡核苷酸,抑制从DNA向RNA的转录。另外,因为适配子是短核酸分子(寡核苷酸),所以通过与作为疾病原因的蛋白质等生物体成分结合而发挥功能。

[0003] 作为这样的核酸药物的原料,开发出了各种人工核酸,但还不存在最理想的分子。例如,作为目前为止所开发出来的核酸药物的原料,有S-oligo(硫代磷酸酯)、2',4'-BNA(交联核酸:bridged nucleic acid)/LNA(锁核酸:locked nucleic acid)(参照专利文献1~3和非专利文献1~4)等。作为对巨细胞病毒的反义医药品,S-oligo已经在美国上市。虽然S-oligo具有高的核酸酶抗性,但是有向靶核酸链的结合亲和性低的难点,有进行改进的必要。目前为止所开发的2',4'-BNA/LNA向靶核酸链的结合亲和性都高,是作为今后的核酸药物的原料最为期待的分子。但是,对核酸酶的抗性不够,在生物体内稳定性方面存在改善的余地。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:国际公开第98/39352号

[0007] 专利文献2:国际公开第2005/021570号

[0008] 专利文献3:国际公开第2003/068795号

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:C.Wahlestedt等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2000年,97卷,10号,5633-5638页

[0011] 非专利文献2:Y.Hari等,Bioorg.Med.Chem.14卷,2006年,1029-1038页

[0012] 非专利文献3:K.Miyashita等,Chem.Comm.,2007年,3765-3767页

[0013] 非专利文献4:S.M.A.Rahman等,J.Am.Chem.Soc.,2008年,130卷,14号,4886-4896页

[0014] 非专利文献5:M.Kuwahara等,Nucleic Acids Res.,2008年,36卷,13号,4257-4265页

[0015] 非专利文献6:S.Obika等,Bioorg.Med.Chem.,2001年,9卷,1001-1011页

发明内容

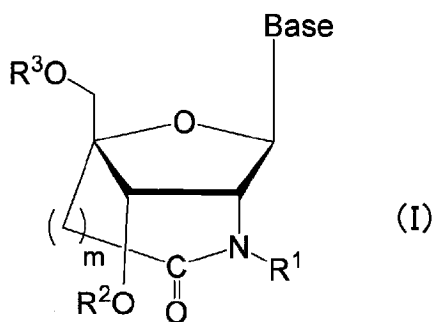
[0016] 发明所要解决的课题

[0017] 期望创制出反义用新型分子,该分子在生物体内不易受到来自核酸酶的分解,具有对靶mRNA的高结合亲和性和特异性,能够高效控制特定基因的表达。

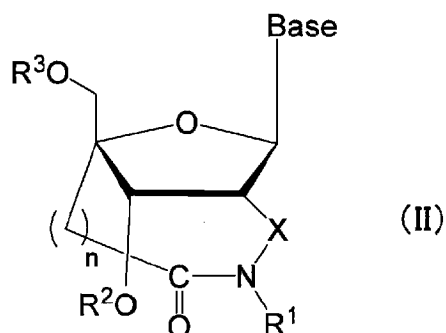
[0018] 用于解决课题的方法

[0019] 本发明者们发现通过在2',4'-BNA/LNA的交联结构中导入酰胺键,就能够提供同时具有优异的对单链RNA的结合亲和性和核酸酶抗性的新的交联型人工核酸,从而完成了本发明。

[0020] 本发明提供以下的式I或式II所示的化合物及其盐:



[0021]



[0022] (式中,Base表示可以具有1个以上选自 α 群中的任意取代基的嘌呤-9-基或2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基,其中,该 α 群包括羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、碳数为1至6的直链烷基、碳数为1至6的直链烷氧基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、碳数为1至6的直链烷硫基、氨基、碳数为1至6的直链烷基氨基、由核酸合成的保护基所保护的氨基、和卤原子;

[0023] R^1 表示氢原子、可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基、具有可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基、或核酸合成的氨基的保护基;

[0024] R^2 和 R^3 分别独立,表示氢原子、核酸合成的羟基的保护基、可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基、具有可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的酰基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的甲硅烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的磷酸基、由核酸合成的保护基所保护的磷酸基、 $-P(R^4)R^5$ [式中, R^4 和 R^5 分别独立,表示羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟

基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、氨基、碳数为1至5的烷氧基、碳数为1至5的烷硫基、碳数为1至6的氰基烷氧基、或由碳数为1至6的烷基所取代的氨基]；

[0025] X表示氧原子、硫原子、氨基或亚甲基；

[0026] m为0至2的整数；而且，

[0027] n为0至1的整数)。

[0028] 在1个实施方式中，在上述式I或式II中，上述Base为6-氨基嘌呤-9-基、2,6-二氨基嘌呤-9-基、2-氨基-6-氯嘌呤-9-基、2-氨基-6-氟嘌呤-9-基、2-氨基-6-溴嘌呤-9-基、2-氨基-6-羟基嘌呤-9-基、6-氨基-2-甲氧基嘌呤-9-基、6-氨基-2-氯嘌呤-9-基、6-氨基-2-氟嘌呤-9-基、2,6-二甲氧基嘌呤-9-基、2,6-二氯嘌呤-9-基、6-巯基嘌呤-9-基、2-氧代-4-氨基-1,2-二氢嘧啶-1-基、4-氨基-2-氧代-5-氟-1,2-二氢嘧啶-1-基、4-氨基-2-氧代-5-氯-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-甲氧基-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-巯基-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-羟基-1,2-二氢嘧啶-1-基(尿嘧啶基)、2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胸腺嘧啶基)或4-氨基-5-甲基-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基。

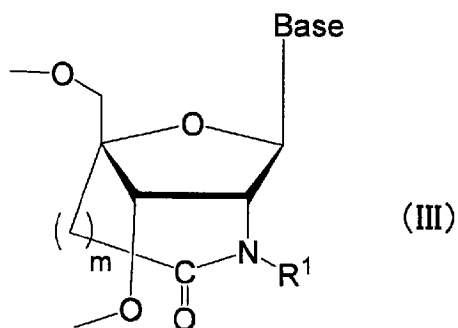
[0029] 在1个实施方式中，在上述式I或式II中，上述R¹表示氢原子、甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基或苄基。

[0030] 在1个实施方式中，在上述式I中，上述m为0。

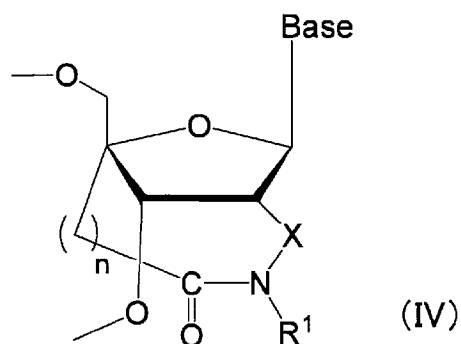
[0031] 在1个实施方式中，在上述式II中，上述n为0。

[0032] 在1个实施方式中，在上述式I或式II中，上述Base为2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胸腺嘧啶基)。

[0033] 另外，本发明提供含有至少1个以下式III或式IV所示的核苷结构的寡核苷酸或其药理学上可接受的盐：



[0034]



[0035] (式中,Base表示可以具有1个以上选自α群中的任意取代基的嘌呤-9-基或2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基,其中,该α群包括羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、碳数为

1至6的直链烷基、碳数为1至6的直链烷氧基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、碳数为1至6的直链烷硫基、氨基、碳数为1至6的直链烷基氨基、由核酸合成的保护基所保护的氨基、和卤原子；

[0036] R^1 表示氢原子、可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基、具有可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基、或核酸合成的氨基的保护基；

[0037] X表示氧原子、硫原子、氨基或亚甲基；

[0038] m为0至2的整数；而且，

[0039] n为0至1的整数）。

[0040] 发明的效果

[0041] 根据本发明，可以提供新型2',4'-交联型人工核苷和核苷酸。包含该2',4'-交联型人工核苷酸的寡核苷酸具有相当于公知的2',4'-BNA/LNA的对单链RNA的结合亲和性和超过LNA的核酸酶抗性。特别对单链RNA，因为还具有比S-oligo对单链RNA更强的结合亲和性，所以被期待应用于核酸药物。

附图说明

[0042] 图1是表示由核酸外切酶分解各种寡核苷酸时的寡核苷酸残存率的经时变化的曲线图。

具体实施方式

[0043] 首先，定义本说明书中所使用的用语。

[0044] 在本说明书中，用语“碳数为1至6的直链烷基”指的是碳数为1~6的任意直链烷基，具体是指甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基或正己基。

[0045] 在本说明书中，用语“碳数为1至6的直链烷氧基”包含具有碳数为1~6的任意直链烷基的烷氧基。例如，可以列举甲氧基、乙氧基、正丙氧基等。

[0046] 在本说明书中，用语“碳数为1至6的直链烷硫基”包含具有碳数为1~6的任意直链烷基的烷硫基。例如，可以列举甲硫基、乙硫基、正丙硫基等。

[0047] 在本说明书中，用语“碳数为1至6的直链烷基氨基”包含具有1个或2个具有碳数为1~6的任意直链烷基的烷基氨基的烷基氨基。例如，可以列举甲基氨基、二甲基氨基、乙基氨基、甲基乙基氨基、二乙基氨基等。

[0048] 在本说明书中，用语“可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基”包含碳数为1~7的任意直链烷基、碳数为3~7的任意支链烷基和碳数为3~7的任意环状烷基。有时也简单称为“低级烷基”。例如，作为碳数为1~7的任意直链烷基，可以列举甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基和正庚基，作为碳数为3~7的任意支链烷基，可以列举异丙基、异丁基、叔丁基、异戊基等，而且，作为碳数为3~7的任意环状烷基，可以列举环丁基、环戊基、环己基等。

[0049] 在本说明书中，用语“可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基”包含碳数为2~7的任意直链烯基、碳数为3~7的任意支链烯基和碳数为3~7的任意环状烯基。有时也简单

称为“低级烯基”。例如,作为碳数为2~7的任意直链烯基,可以列举乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-己烯基等,作为碳数为3~7的任意支链烯基,可以列举异丙烯基、1-甲基-1-丙烯基、1-甲基-2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、1-甲基-2-丁烯基等,然后,作为碳数为3~7的任意环状烯基,可以列举环丁烯基、环戊烯基、环己烯基等。

[0050] 在本说明书中,用语“可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基”包含的是在仅由烃构成的碳数为6~12的任意的芳香族烃和环结构中包含杂原子(氮原子、氧原子或硫原子)的碳数为3~12的任意杂环芳香族化合物。作为仅由烃构成的碳数为6~12的芳香族烃,可以列举苯基、萘基、茚基、蒽基等,而且,作为环结构中包含杂原子的碳数为3~12的任意杂环芳香族化合物,可以列举吡啶基、吡咯基、喹啉基、吲哚基、咪唑基、呋喃基、噻吩基等。

[0051] 在本说明书中,作为用语“具有可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基”的例子,可以列举苄基、苯乙基、萘甲基、3-苯基丙基、2-苯基丙基、4-苯基丁基、2-苯基丁基、吡啶基甲基、吲哚基甲基、呋喃基甲基、噻吩基甲基、吡咯基甲基、2-吡啶基乙基、1-吡啶基乙基、3-噻吩基丙基等。

[0052] 在本说明书中,作为用语“酰基”的例子,可以列举脂肪族酰基和芳香族酰基。具体而言,作为脂肪族酰基的例子,可以列举甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基(pentanoyl)、三甲基乙酰基、戊酰基(Valeryl)、异戊酰基、辛酰基、壬酰基、癸酰基、3-甲基壬酰基、8-甲基壬酰基、3-乙基辛酰基、3,7-二甲基辛酰基、十一碳酰基、十二碳酰基、十三碳酰基、十四碳酰基、十五碳酰基、十六碳酰基、1-甲基十五碳酰基、14-甲基十五碳酰基、13,13-二甲基十四碳酰基、十七碳酰基、15-甲基十六碳酰基、十八碳酰基、1-甲基十七碳酰基、十九碳酰基、二十碳酰基、二十一碳酰基之类的烷基碳酰基;琥珀酰基、戊二酰基、己二酰基之类的羧基化烷基碳酰基;氯乙酰基、二氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基之类的卤代低级烷基碳酰基;甲氧基乙酰基之类的低级烷氧基低级烷基碳酰基;(E)-2-甲基-2-丁烯酰基之类的不饱和烷基碳酰基。另外,作为芳香族酰基的例子,可以列举苯甲酰基、 α -萘甲酰基、 β -萘甲酰基之类的芳基碳酰基;2-溴苯甲酰基、4-氯苯甲酰基之类的卤代芳基碳酰基;2,4,6-三甲基苯甲酰基、4-甲苯酰基之类的低级烷基化芳基碳酰基;4-对甲氧基苯甲酰基之类的低级烷氧基化芳基碳酰基;2-羧基苯甲酰基、3-羧基苯甲酰基、4-羧基苯甲酰基之类的羧基化芳基碳酰基;4-硝基苯甲酰基、2-硝基苯甲酰基之类的硝基化芳基碳酰基;2-(甲氧基碳酰基)苯甲酰基之类的低级烷氧基碳酰基化芳基碳酰基;4-苯基苯甲酰基之类的芳基化碳酰基等。优选的是甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、三甲基乙酰基、苯甲酰基。

[0053] 在本说明书中,作为用语“甲硅烷基”的例子,可以列举三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、异丙基二甲基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、甲基二异丙基甲硅烷基、甲基二叔丁基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基之类的三低级烷基甲硅烷基;二苯基甲基甲硅烷基、丁基二苯基丁基甲硅烷基、二苯基异丙基甲硅烷基、苯基二异丙基甲硅烷基之类的由1~2个芳基所取代的三低级烷基甲硅烷基等。优选的是三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基,更优选的是三甲基甲硅烷基。

[0054] 在本说明书中,作为用语“卤原子”,例如,可以列举氟原子、氯原子、溴原子或碘原

子。优选的是氟原子或氯原子。

[0055] 在本说明书中,用语“核酸合成的氨基的保护基”、“核酸合成的羟基的保护基”、“由核酸合成的保护基所保护的羟基”、“由核酸合成的保护基所保护的磷酸基”、“由核酸合成的保护基所保护的巯基”的“保护基”,只要是在核酸合成时稳定,可以保护氨基、羟基、磷酸基或巯基的基团,就没有特别限制。具体而言,指的是在酸性或中性条件下稳定,可以通过氢解、水解、电解和光解之类的化学方法开裂的保护基。作为这样的保护基,例如,可以列举低级烷基、低级烯基、酰基、四氢吡喃基或四氢噻喃基、四氢呋喃基或四氢硫代呋喃基、甲硅烷基、低级烷氧基甲基、低级烷氧基化低级烷氧基甲基、卤代低级烷氧基甲基、低级烷氧基化乙基、卤化乙基、由1~3个芳基所取代的甲基、“由芳基环被低级烷基、低级烷氧基、卤原子或氰基取代的1~3个芳基所取代的甲基”、低级烷氧基碳酰基、“由卤原子、低级烷氧基或硝基所取代的芳基”、“由卤原子或三低级烷基甲硅烷基所取代低级烷氧基碳酰基”、烯氧基碳酰基、“芳基环可以被低级烷氧基或硝基取代的芳烷氧基碳酰基”等。

[0056] 更具体而言,作为四氢吡喃基或四氢噻喃基,可以列举四氢吡喃-2-基、3-溴四氢吡喃-2-基、4-甲氧基四氢吡喃-4-基、四氢噻喃-4-基、4-甲氧基四氢噻喃-4-基等。作为四氢呋喃基或四氢硫代呋喃基,可以列举四氢呋喃-2-基、四氢硫代呋喃-2-基。作为低级烷氧基甲基,可以列举甲氧基甲基、1,1-二甲基-1-甲氧基甲基、乙氧基甲基、丙氧基甲基、异丙氧基甲基、丁氧基甲基、叔丁氧基甲基等。作为低级烷氧基化低级烷氧基甲基,可以列举2-甲氧基乙氧基甲基等。作为卤代低级烷氧基甲基,可以列举2,2,2-三氯乙氧基甲基、双(2-氯乙氧基)甲基等。作为低级烷氧基化乙基,可以列举1-乙氧基乙基、1-(异丙氧基)乙基等。作为卤化乙基,可以列举2,2,2-三氯乙基等。作为由1~3个芳基所取代的甲基,可以列举苄基、 α -萘基甲基、 β -萘基甲基、二苯基甲基、三苯基甲基、 α -萘基二苯基甲基、9-蒽甲基等。作为“由芳基环被低级烷基、低级烷氧基、卤原子或氰基取代的1~3个芳基所取代的甲基”,可以列举4-甲基苄基、2,4,6-三甲基苄基、3,4,5-三甲基苄基、4-甲氧基苄基、4-甲氧基苯基二苯基甲基、4,4'-二甲氧基三苯基甲基、2-硝基苄基、4-硝基苄基、4-氯苄基、4-溴苄基、4-氰基苄基等。作为低级烷氧基碳酰基,可以列举甲氧基碳酰基、乙氧基碳酰基、叔丁氧基碳酰基、异丁氧基碳酰基等。作为“由卤原子、低级烷氧基或硝基所取代的芳基”,可以列举4-氯苯基、2-氯苯基、4-甲氧基苯基、4-硝基苯基、2,4-二硝基苯基等。作为“由卤原子或三低级烷基甲硅烷基所取代的低级烷氧基碳酰基”,可以列举2,2,2-三氯乙氧基碳酰基、2-三甲基甲硅烷基乙氧基碳酰基等。作为烯氧基碳酰基,可以列举乙烯氧基碳酰基、芳氧基碳酰基等。作为“芳基环可以被低级烷氧基或硝基取代的芳烷氧基碳酰基”,可以列举苄氧基碳酰基、4-甲氧基苄氧基碳酰基、3,4-二甲氧基苄氧基碳酰基、2-硝基苄氧基碳酰基、4-硝基苄氧基碳酰基等。

[0057] 作为“核酸合成的羟基的保护基”,优选的是脂肪族酰基、芳香族酰基、由1~3个芳基所取代的甲基、“由芳基环被低级烷基、低级烷氧基、卤原子或氰基取代的1~3个芳基所取代的甲基”或甲硅烷基,更优选的是乙酰基、苯甲酰基、苄基、对甲氧基苯甲酰基、二甲氧基三苯基甲基、一甲氧基三苯基甲基或叔丁基二苯基甲硅烷基。作为“由核酸合成的保护基所保护的羟基”的保护基,优选的是脂肪族酰基、芳香族酰基、“由1~3个芳基所取代的甲基”、“由卤原子、低级烷氧基或硝基所取代的芳基”、低级烷基或低级烯基,更优选的是苯甲酰基、苄基、2-氯苯基、4-氯苯基或2-丙烯基。作为“核酸合成的氨基的保护基”,优选的是酰

基,更优选的是苯甲酰基。作为“由核酸合成的保护基所保护的磷酸基”的“保护基”,优选的是低级烷基、由氰基所取代的低级烷基、芳烷基、“芳基环被硝基或卤原子取代的芳烷基”或“由低级烷基、卤原子或硝基所取代的芳基”,更优选的是2-氰基乙基、2,2,2-三氯乙基、苄基、2-氯苯基或4-氯苯基。作为“由核酸合成的保护基所保护的巯基”的“保护基”,优选的是脂肪族酰基或芳香族酰基,更优选的是苯甲酰基。

[0058] 在本说明书中,在 $-P(R^4)R^5$ [式中, R^4 和 R^5 分别独立,表示羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、氨基、碳数为1至5的烷氧基、碳数为1至5的烷硫基、碳数为1至6的氰基烷氧基、或由碳数为1至6的烷基所取代的氨基]所示的基团中, R^4 能够作为 OR^{4a} 而且 R^5 能够作为 NR^{5a} 表示的基团,称为“亚磷酰胺基”。作为亚磷酰胺基,优选列举 $-P(OC_2H_4CN)(N(iPr)_2)$ 所示的基团或 $-P(OCH_3)(N(iPr)_2)$ 所示的基团。其中, iPr 表示异丙基。

[0059] 在本说明书中,用语“人工核苷”和“核苷类似物”指的是嘌呤或嘧啶碱基与糖结合得到的“核苷”中的非天然型核苷,以及嘌呤和嘧啶以外的可以与嘌呤或嘧啶碱基代用的芳香族杂环和芳香族烃环,与糖结合得到的核苷类似物。

[0060] 在本说明书中,用语“人工寡核苷酸”和“寡核苷酸类似物”指的是以磷酸二酯键结合2~50个相同或不同的“核苷”或“核苷类似物”得到的“寡核苷酸”的非天然型衍生物。作为那样的类似物,优选列举糖部分被修饰的糖衍生物;磷酸二酯部分被硫代酯化的硫代酯衍生物;末端的磷酸部分被酯化的酯体;嘌呤碱基上的氨基被酰胺化 的酰胺体,更优选列举糖部分被修饰的糖衍生物。

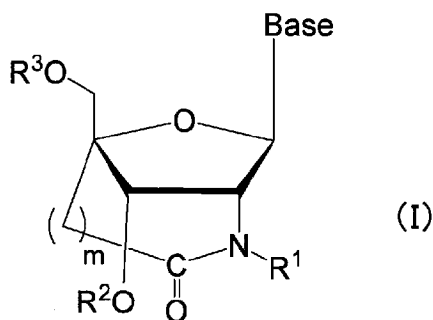
[0061] 在本说明书中,所谓用语“其盐”指的是本发明的式I或式II所示的化合物的盐。作为那样的盐,能够优选列举钠盐、钾盐、锂盐之类的碱金属盐,钙盐、镁盐之类的碱土金属盐,铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等的金属盐;铵盐之类的无机盐、叔辛基胺盐、二苄基胺盐、吗啉盐、葡糖胺盐、苄基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基苄乙基胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟基甲基)氨基甲烷盐之类的有机盐等的胺盐;氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸之类的卤原子化氢酸盐、硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等的无机酸盐;甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐之类的低级烷烃磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐之类的芳基磺酸盐、乙酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等的有机酸盐;以及甘氨酸盐、赖氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐之类的氨基酸盐。

[0062] 在本说明书中,作为用语“其药理学上可接受的盐”,指的是具有至少1个本发明的式III或式IV所示的核苷结构的寡核苷酸类似物的盐。作为那样的盐,能够优选列举钠盐、钾盐、锂盐之类的碱金属盐,钙盐、镁盐之类的碱土金属盐,铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等的金属盐;铵盐之类的无机盐、叔辛基胺盐、二苄基胺盐、吗啉盐、葡糖胺盐、苄基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基苄乙基胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟基甲基)氨基甲烷盐之类的有机盐等的胺盐;氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸之类的卤原子化氢酸盐、硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐、磷酸盐等的无机酸盐;甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐、乙磺酸盐之类的低级烷烃磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐之类的芳基磺酸

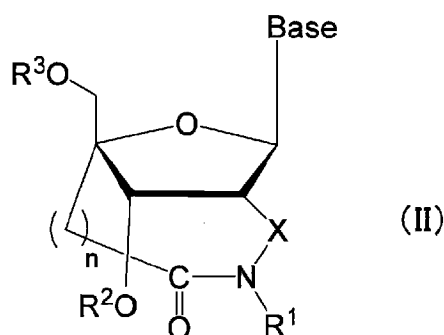
盐、乙酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐、马来酸盐等的有机酸盐；以及甘氨酸盐、赖氨酸盐、精氨酸盐、鸟氨酸盐、谷氨酸盐、天冬氨酸盐之类的氨基酸盐。

[0063] 以下,详细说明本发明。

[0064] 本发明的2',4'-交联型人工核苷和核苷酸或其盐具有以下的式I或式II所示的结构:



[0065]



[0066] (式中,Base表示可以具有1个以上选自 α 群中的任意取代基的嘌呤-9-基或2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基,其中,该 α 群包括羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、碳数为1至6的直链烷基、碳数为1至6的直链烷氧基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、碳数为1至6的直链烷硫基、氨基、碳数为1至6的直链烷基氨基、由核酸合成的保护基所保护的氨基、和卤原子;

[0067] R^1 表示氢原子、可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基、具有可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基、或核酸合成的氨基的保护基;

[0068] R^2 和 R^3 分别独立,表示氢原子、核酸合成的羟基的保护基、可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基、具有可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的酰基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的甲硅烷基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基的磷酸基、由核酸合成的保护基所保护的磷酸基、 $-P(R^4)R^5$ [式中, R^4 和 R^5 分别独立,表示羟基、由核酸合成的保护基所保护的羟基、巯基、由核酸合成的保护基所保护的巯基、氨基、碳数为1至5的烷氧基、碳数为1至5的烷硫基、碳数为1至6的氰基烷氧基、或由碳数为1至6的烷基所取代的氨基];

[0069] X表示氧原子、硫原子、氨基或亚甲基；

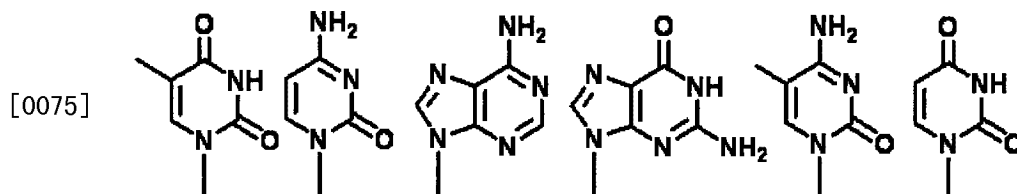
[0070] m为0至2的整数；而且，

[0071] n为0至1的整数)。

[0072] 在上述式I或式II中,Base为嘌呤碱基(即,嘌呤-9-基)或嘧啶碱基(即,2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基)。这些碱基可以具有1个以上选自包括羟基、碳数为1至6的直链烷基、碳数为1至6的直链烷氧基、巯基、碳数为1至6的直链烷硫基、氨基、碳数为1至6的直链烷基氨基和卤原子的 α 群中的任意的取代基。

[0073] 作为上述碱基(Base)的具体例子,可以列举6-氨基嘌呤-9-基(腺嘌呤基)、2,6-二氨基嘌呤-9-基、2-氨基-6-氯嘌呤-9-基、2-氨基-6-氟嘌呤-9-基、2-氨基-6-溴嘌呤-9-基、2-氨基-6-羟基嘌呤-9-基(鸟嘌呤基)、6-氨基-2-甲氧基嘌呤-9-基、6-氨基-2-氯嘌呤-9-基、6-氨基-2-氟嘌呤-9-基、2,6-二甲氧基嘌呤-9-基、2,6-二氯嘌呤-9-基、6-巯基嘌呤-9-基、2-氧代-4-氨基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胞嘧啶基)、4-氨基-2-氧代-5-氟-1,2-二氢嘧啶-1-基、4-氨基-2-氧代-5-氯-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-甲氧基-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-巯基-1,2-二氢嘧啶-1-基、2-氧代-4-羟基-1,2-二氢嘧啶-1-基(尿嘧啶基)、2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胸腺嘧啶基)和4-氨基-5-甲基-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基。

[0074] 其中,从向核酸药物导入的观点出发,Base优选为分别由以下结构式:



[0076] 表示的2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胸腺嘧啶基)、2-氧代-4-氨基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胞嘧啶基)、6-氨基嘌呤-9-基(腺嘌呤基)、2-氨基-6-羟基嘌呤-9-基(鸟嘌呤基)、4-氨基-5-甲基-2-氧代-1,2-二氢嘧啶-1-基和2-氧代-4-羟基-1,2-二氢嘧啶-1-基(尿嘧啶基),特别优选为2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胸腺嘧啶基)。另外,在寡核苷酸合成时,优选羟基被保护基保护。

[0077] 在上述式I或式II中, R^1 为氢原子、可以形成支链或环的碳数为1至7的烷基、可以形成支链或环的碳数为2至7的烯基、可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基、或具有可以具有1个以上选自该 α 群中的任意取代基而且可以包含杂原子的碳数为3至12的芳基部分的芳烷基。更优选 R^1 为氢原子、甲基、乙基、正丙基、异丙基、苯基或苄基,更加优选 R^1 为氢原子或甲基。

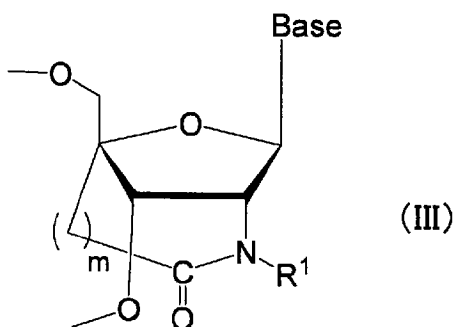
[0078] 在上述式I或式II中,m为0至2的整数;而且,n为0至1的整数。即,包含2'位、3'位、4'位和交联部分的环为5元环~7元环。

[0079] 在上述式II中,X为氧原子、硫原子、氨基或亚甲基。优选X为氧原子或氨基。另外,在X为氨基或亚甲基时,也可以被低级烷基取代。

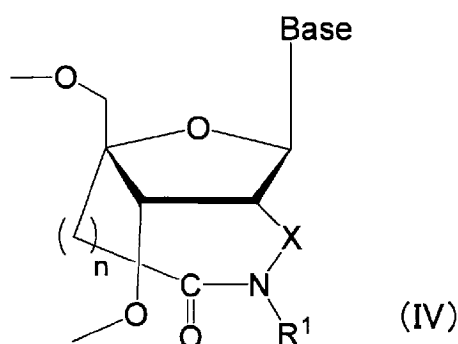
[0080] 本发明的新型2',4'-交联型人工核苷,在现有的2',4'-BNA/LNA的交联结构中导入有酰胺键。具体而言,在糖部分的2'位的氨基和从4'位伸出的碳酰基之间形成酰胺键。这样,因为具有结构上摇摆少且亲水性优异的酰胺键,所以核苷的糖部分结构由交联被固定化。

[0081] 从本发明的2',4'-交联型人工核苷,能够容易配制2',4'-交联型人工核苷酸。例如,三磷酸化可以按照非专利文献5中记载的方法容易地进行。

[0082] 本发明的寡核苷酸或其药理学上可接受的盐,含有至少1个以下的式III或式IV所示的核苷结构:



[0083]



[0084] (式中,Base、R¹、X、m和n,与上述式I与式II所定义的相同)。

[0085] 本发明的寡核苷酸在任意位置上具有至少1个上述核苷结构。其位置和数量没有特别限定,可以根据目的适当设计。

[0086] 含有这样的核苷结构的寡核苷酸类似物(反义分子),因为如上所述具有由酰胺键固定的结构,所以对于各种核苷酶都难以被分解,在向生物体投与后,能够长时间在生物体内存在。例如,与mRNA形成稳定的双链,阻碍作为病因的蛋白质的生物合成,或者在与基因组中的双链DNA之间形成三链,阻碍向mRNA的转录。另外,也可以抑制感染病毒的增殖。另外,由于具有酰胺键,所以也可以期待高的生物体适应性,而且还能够期待作为用于识别蛋白质等生物体成分的适配子的功能。

[0087] 从这些内容,使用本发明的2',4'-交联型人工核苷所合成的寡核苷酸类似物,可以期待作为以抗肿瘤剂、抗病毒剂为代表的、阻碍特定基因的机能而治疗疾病的医药品(反义分子)的有用性。

[0088] 特别在反义法中,必须具有对互补正义链RNA的结合亲和性和对生物体内DNA分解酶的抗性这两者。一般而言已知核酸在单链状态下,糖部分的结构不断在近似于DNA双链的形态、和近似于DNA-RNA双链或近似于RNA双链的形态之间摇摆。在单链核酸与互补的RNA链形成双链时,其糖部分结构被固定。因此,在本发明的2',4'-交联型人工核苷中,因为糖部分被预先固定在形成双链时的状态,所以容易与目标RNA链形成双链,能够稳定地存在。另外,还已知核酸双链通过被称为水分子网络的、像链一样连接的水合水而稳定化。在本发明的2',4'-交联型人工核苷中,因为具有酰胺键,所以可以在糖部分交联中赋予亲水性,进

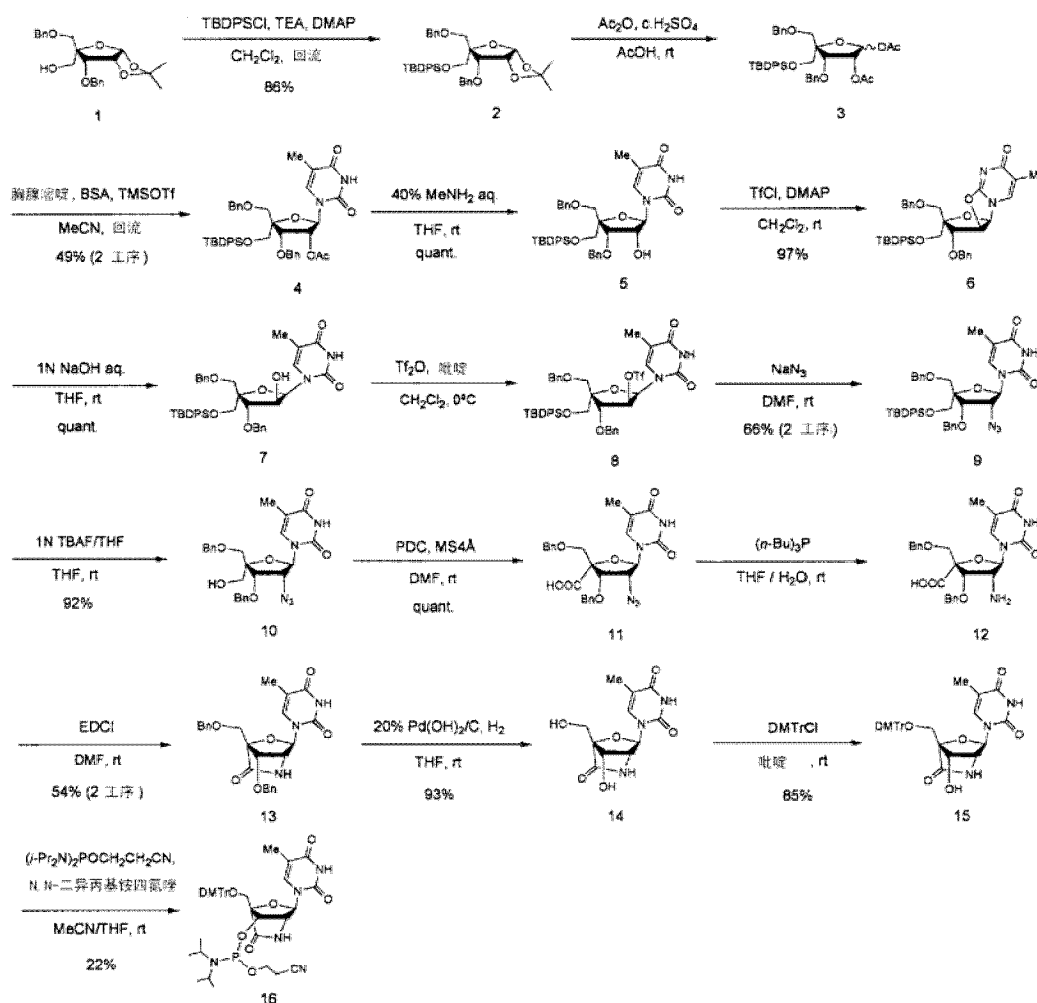
一步被稳定化。还可以认为糖部分交联的酰胺键的存在,难以被生物体酶识别,极大地有助于核酸酶抗性。

[0089] 本发明的寡核苷酸类似物,例如,能够配合赋形剂、粘合剂、防腐剂、抗氧化剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂等医药制剂技术领域一般所使用的辅助剂,制成非口服制剂或脂质体制剂。另外,例如能够配合在该技术领域一般所使用的医药用载体,配制液剂、霜剂、软膏剂等局部用的制剂。

[0090] 实施例

[0091] 以下,基于实施例,更详细地说明本发明的2',4'-交联型人工核苷及其类似物的合成。

[0092] (实施例1)核苷类似物:2'-氨基-3'-O-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦]-5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-N,4'-C-氧代亚甲基胸苷(化合物16:amideNH)的合成



[0094] (1)化合物2的合成

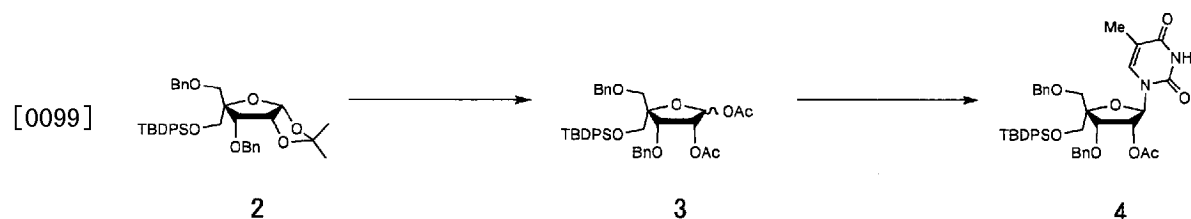


[0096] 在氮气流下,在化合物1(14.7g,36.8mmol)的二氯甲烷溶液(80mL)中加入三乙胺(15.1mL,110mmol),冰冷却下加入二甲基氨基吡啶(0.90g,7.36mmol)、叔丁基二苯基氯硅

烷(15.1mL, 58.9mmol)进行回流。另外, 化合物1可以按照Koshkin, A.A.等, Tetrahedron, 1998年, 54卷, pp. 3607-3630和Singh, S.K.等, Chem. Commun., 1998年, pp. 455-456配制。20小时后加入水, 由二氯甲烷萃取后, 以水和饱和食盐水清洗有机层, 由无水硫酸钠干燥。以硅胶柱色谱(正己烷: 乙酸乙酯=9:1(v/v))纯化得到的粗产物, 作为油状物质得到化合物2(20.4g, 收率85.9%)。

[0097] 得到的化合物2的物性数据如下: $[\alpha]_D^{25} +84.8$ (c 1.00, CHCl₃); IR(KBr): 1457, 1372, 1105, 1025 cm⁻¹; ¹H-NMR(270MHz, CDCl₃): δ 1.03(9H, s), 1.29(6H, s), 3.62, 3.73(2H, AB, J=10.5Hz), 4.03, 4.08(2H, AB, J=11.3Hz), 4.20(1H, d, J=5.1Hz), 4.45, 4.55(2H, AB, J=11.9Hz), 4.49, 4.66(2H, AB, J=12.2Hz), 4.58(1H, dd, J=5.1Hz, 4.1Hz), 5.76(1H, d, J=4.1Hz), 7.21-7.70(20H, m); ¹³C-NMR(75.45MHz, CDCl₃): δ 19.9, 26.9, 27.2, 27.5, 65.3, 72.6, 73.0, 74.2, 78.8, 80.2, 88.2, 104.8, 113.8, 128.2, 128.2, 128.3, 128.3, 128.8, 128.9, 130.1, 133.9, 134.1, 135.4, 136.3, 136.4, 138.5, 138.7; MS(FAB): m/z 661(MNa⁺): 计算值C₃₉H₄₆O₆Si: C, 73.32; H, 7.26, 实测值C, 73.44; H, 7.32。

[0098] (2) 化合物4的合成

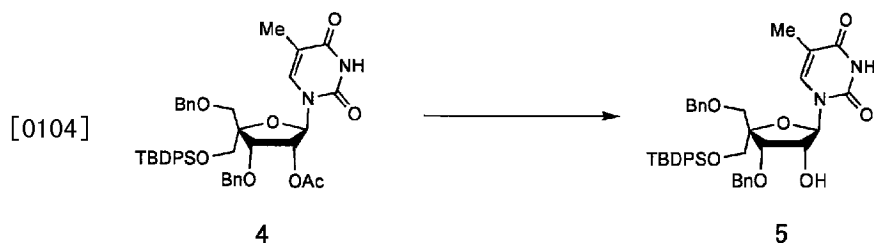


[0100] 在上述(1)中得到的化合物2(1.00g, 1.57mmol)的0.1%(v/v)浓硫酸乙酸溶液(1.11mL)中加入无水硫酸(1.78mL, 18.8mmol)搅拌。3.5小时后, 在饱和碳酸氢钠水中加入反应液, 由乙酸乙酯萃取, 以水和饱和食盐水清洗有机层后, 由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后, 作为油状物质得到化合物3的粗产物(1.07g), 在后述的胸腺嘧啶导入中使用。

[0101] 在氮气流下, 在化合物3的粗产物的乙腈溶液(5mL)中加入胸腺嘧啶(297mg, 2.36mmol), 在40℃的油浴中使其溶解后, 在室温(rt)加入N,O-双三甲基硅烷基乙酰胺(1.34mL, 5.50mmol)、三氟甲磺酸三甲基硅酯(0.28mL, 1.57mmol), 回流搅拌1小时。加入饱和碳酸氢钠水, 由乙酸乙酯萃取, 以水和饱和食盐水清洗有机层后, 由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后, 以硅胶柱色谱(正己烷: 乙酸乙酯=10:1→1:1(v/v))纯化得到的粗产物, 作为白色无定形物得到化合物4(367mg, 收率49%(2工序))。

[0102] 得到的化合物4的物性数据如下: 熔点: 55~59℃; $[\alpha]_D^{24} -11.7$ (c 0.800, CHCl₃); IR(KBr): 1747, 1693, 1232, 1113 cm⁻¹; ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃): δ 1.04(9H, s), 1.52(3H, s), 1.96(3H, s), 3.71, 3.76(2H, AB, J=10.5Hz), 3.69, 3.94, (2H, AB, J=10.8Hz), 4.41(1H, d, J=6.0Hz), 4.54, 4.58(2H, AB, J=12.6Hz), 4.54, 4.58(2H, AB, J=12.6Hz), 5.38(1H, t, J=6.0Hz), 6.16(1H, d, J=6.0Hz), 7.18-7.63(20H, m), 7.87(1H, s); ¹³C-NMR(75.45MHz, CDCl₃): δ 12.0, 19.2, 20.6, 26.9, 63.8, 72.2, 73.7, 74.6, 74.9, 77.7, 85.5, 87.9, 111.3, 127.6, 127.7, 127.7, 127.8, 128.1, 128.3, 128.6, 129.7, 129.9, 132.6, 132.9, 135.5, 135.7, 135.7, 137.2, 137.5, 150.4, 163.6, 170.2; MS(FAB): m/z 749(MH⁺), 计算值C₄₃H₄₈N₂O₈Si: C, 68.96; H, 6.46; N, 3.74. 实测值C, 68.92; H, 6.45; N, 3.74。

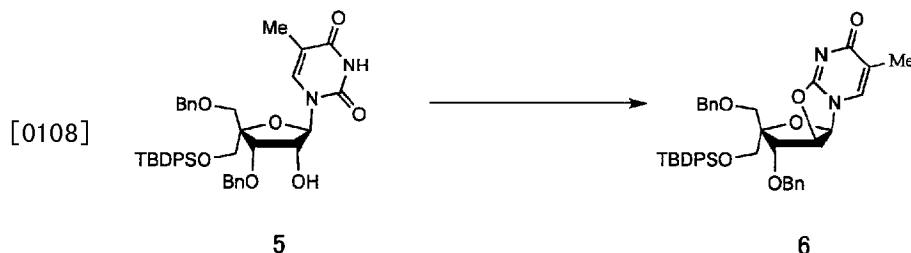
[0103] (3) 化合物5的合成



[0105] 在上述(2)中得到的化合物4(326mg, 0.435mmol)的四氢呋喃溶液(2.4mL)中加入40%(v/v)甲胺溶液(1.1mL, 13mmol)。在室温搅拌30分钟。蒸馏除去溶剂后,由乙酸乙酯萃取,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,以快速柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=1:1(v/v))纯化得到的粗产物,作为白色无定形物得到化合物5(312mg, 收率100%)。

[0106] 得到的化合物5的物性数据如下:熔点:61~63℃; $[\alpha]_D^{25}$ -12.2(c0.750, CHCl₃); IR (KBr): 3403, 3175, 1688, 1468, 1272, 1113cm⁻¹; ¹H-NMR(270MHz, CDCl₃): δ1.06(9H, s), 1.60(3H, s), 3.54, 3.63(2H, AB, J=10.5Hz), 3.64(1H, d, J=10.8Hz), 3.73, 3.83(2H, AB, J=10.5Hz), 4.31(1H, d, J=4.9Hz), 4.41(1H, ddd, J=4.9Hz, 4.9Hz, 10.8Hz), 4.50(2H, s), 4.67, 4.73(2H, AB, J=11.1Hz), 5.95(1H, d, J=4.9Hz), 7.21-7.66(20H, m), 8.12(1H, s); ¹³C-NMR(67.80MHz, CDCl₃): δ12.1, 19.1, 26.8, 64.2, 72.2, 73.8, 74.2, 74.5, 77.2, 78.5, 88.1, 90.9, 110.9, 127.7, 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.6, 130.0, 132.2, 132.2, 135.6, 135.7, 136.5, 137.2, 150.3, 163.4; MS(FAB): m/z 707(MH⁺). 计算值 C₄₁H₄₆N₂O₇Si: C, 69.66; H, 6.56; N, 3.96. 实测值C, 69.59; H, 6.59; N, 3.93。

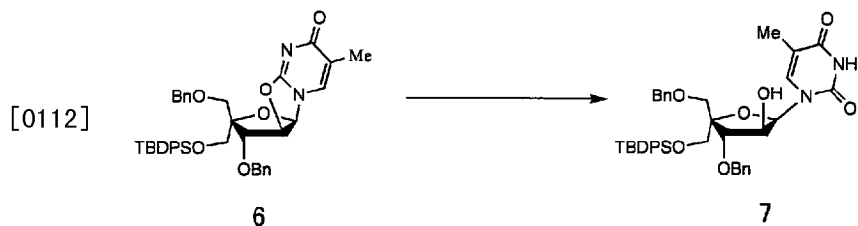
[0107] (4)化合物6的合成



[0109] 在氮气流下,在上述(3)中得到的化合物5(262mg, 0.37mmol)的二氯甲烷溶液(7mL)中加入二甲基氨基吡啶(181mg, 1.48mmol)。冰冷却下加入三氟甲磺酰氯(0.12mL, 1.11mmol),缓慢设为室温条件后,搅拌1小时。加入饱和碳酸氢钠水,由二氯甲烷萃取,以饱和食盐水清洗有机层后,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,作为白色无定形物得到化合物6(248mg, 收率97%)。

[0110] 得到的化合物6的物性数据如下:熔点:51~54℃; $[\alpha]_D^{26}$ -33.5(c1.000, CHCl₃); IR (KBr): 1667, 1650, 1563, 1482, 1112cm⁻¹; ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃): δ1.03(9H, s), 1.99(3H, s), 3.29, 3.34(2H, AB, J=10.8Hz), 3.68, 3.82(2H, AB, J=10.5Hz), 4.31(1H, d, J=3.9Hz), 4.32, 4.38(2H, AB, J=12Hz), 4.60, 4.81(2H, AB, J=11.4Hz), 5.50(1H, dd, J=6.3, 3.9Hz), 6.23(1H, d, J=6.3Hz), 7.08-7.66(21H, m); ¹³C-NMR(75.45MHz, CDCl₃): δ14.0, 18.9, 26.7, 64.0, 69.4, 73.4, 84.0, 87.1, 88.7, 89.9, 119.0, 127.4, 127.6, 127.7, 127.8, 128.1, 128.3, 128.4, 128.5, 129.8, 129.8, 130.1, 131.9, 132.3, 135.3, 135.5, 136.4, 137.0, 159.2, 172.3; MS(FAB): m/z 689(MH⁺), 计算值C₄₁H₄₄N₂O₆Si: C, 71.48; H, 6.44; N, 4.07. 实测值C, 71.38; H, 6.49; N, 4.08。

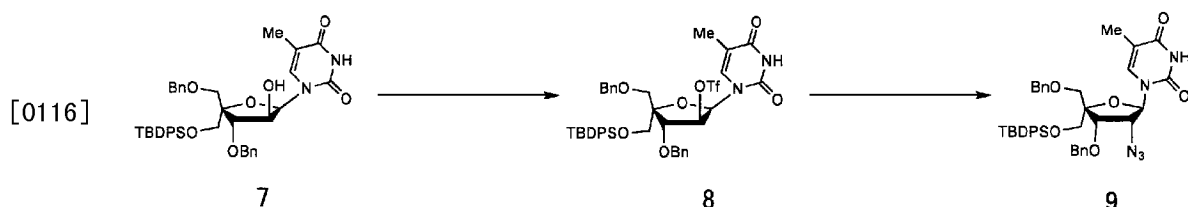
[0111] (5)化合物7的合成



[0113] 在上述(4)中得到的化合物6(510mg, 0.74mmol)的四氢呋喃溶液(11mL)中加入1N氢氧化钠水溶液(1.90mL),在室温搅拌11.5小时。以氯化铵水溶液中和后,蒸馏除去溶剂,由二氯甲烷萃取,以饱和碳酸氢钠水清洗后,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,以快速柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=1:1(v/v))纯化得到的粗产物,作为白色无定形物得到化合物7(524mg, 收率100%)。

[0114] 得到的化合物7的物性数据如下:熔点:67~70℃; $[\alpha]_D^{26} + 24.5$ (c0.840, CHCl₃); IR (KBr): 3347, 3184, 1690, 1471 cm⁻¹; ¹H-NMR (270MHz, CDCl₃): δ 1.02 (9H, s), 1.65 (3H, s), 3.48, 3.70 (2H, AB, J=10.3Hz), 3.50 (1H, d, J=7.0Hz), 3.62, 3.76 (2H, AB, J=10.8Hz), 4.22 (1H, d, J=7.0Hz), 4.51, 4.78 (2H, AB, J=7.6Hz), 4.54 (1H, d, J=11.6Hz), 4.69 (1H, ddd, J=5.1, 7.0, 7.6Hz), 6.15 (1H, d, J=5.1Hz), 7.29-7.64 (20H, m), 8.10 (1H, s); ¹³C-NMR (67.80MHz, CDCl₃): δ 12.0, 18.8, 26.5, 63.9, 69.7, 72.6, 73.6, 75.3, 81.9, 85.3, 85.5, 109.5, 127.5, 127.6, 127.8, 128.0, 128.2, 128.5, 129.5, 129.6, 132.4, 135.4, 135.5, 136.8, 137.2, 137.9, 151.1, 164.3; MS (FAB): m/z 707 (MH⁺), 计算值C₄₁H₄₆N₂O₇Si: C, 69.66; H, 6.56; N, 3.96. 实测值C, 69.42; H, 6.54; N, 3.97。

[0115] (6)化合物9的合成



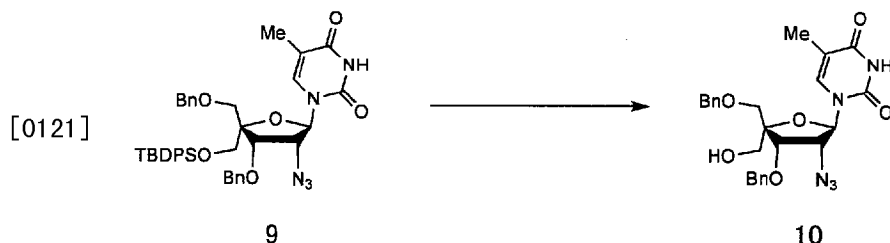
[0117] 在氮气流下,在上述(5)中得到的化合物7(2.86g, 4.10mmol)的二氯甲烷溶液(40mL)中,冰冷却下加入吡啶(1.65mL, 20.5mmol)、三氟甲磺酸酐(1.37mL, 8.20mmol),冰冷却条件下搅拌1小时。加入水使酸酐分解后,由二氯甲烷萃取,由无水硫酸钠干燥有机层。蒸馏除去溶剂后,得到的粗产物作为淡黄色油状物质得到,以快速柱色谱(己烷:乙酸乙酯=3:1(v/v)→2:1(v/v))简易纯化,作为淡黄色无定形物得到化合物8的粗产物。

[0118] 接着,在氮气流下,在化合物8(1.96g, 2.34mmol)的二甲基甲酰胺溶液(80mL)中加入叠氮化钠(0.23g, 3.60mmol)进行搅拌。48 小时后,蒸馏除去溶剂,加入水,由二氯甲烷萃取,以饱和食盐水清洗有机层后,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,以快速柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=3:1)纯化得到的粗产物,作为白色无定形物得到化合物9(1.71g, 收率66% (2工序))。

[0119] 得到的化合物9的物性数据如下:熔点:53~56℃; $[\alpha]_D^{27} - 32.7$ (c0.840, CHCl₃); IR (KBr): 3175, 2109, 1686, 1268, 1111 cm⁻¹; ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ 0.99 (9H, s), 1.58 (3H, s), 3.63, 3.69 (2H, AB, J=10.5Hz), 3.69, 3.91 (2H, AB, J=10.5Hz), 3.91 (1H, dd, J=7.2Hz, 5.4Hz), 4.23 (1H, d, J=5.4Hz), 4.47, 4.53 (2H, AB, J=11.4Hz), 4.57, 4.75 (2H, AB, J=

11.4Hz), 6.03(1H, d, $J=7.2$ Hz), 7.23–7.60(20H, m), 8.70(1H, s); ^{13}C -NMR(75.45MHz, CDCl_3): δ 12.1, 19.1, 26.9, 64.0, 64.6, 72.4, 73.8, 74.6, 79.5, 85.2, 87.9, 111.3, 127.7, 127.7, 127.8, 128.0, 128.2, 128.4, 128.7, 129.7, 129.9, 132.5, 132.8, 135.1, 135.5, 135.7, 136.8, 136.9, 150.2, 163.4; MS(FAB): m/z 732(MH^+), 计算值 $\text{C}_{41}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}$: C, 67.28; H, 6.20; N, 9.57. 实测值C, 67.25; H, 6.27; N, 9.45。

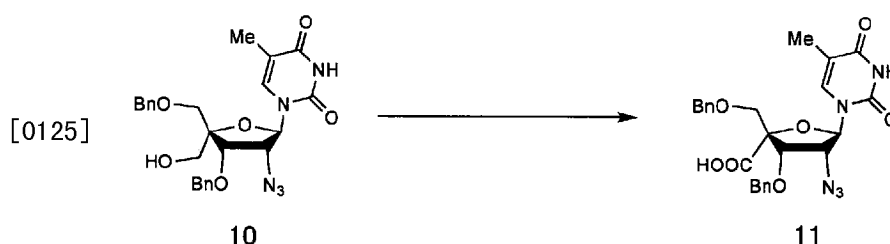
[0120] (7)化合物10的合成



[0122] 在氮气流下,在上述(6)中得到的化合物9(1.10g, 1.50mmol)的四氢呋喃溶液(30mL)中加入1N四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(2.20mL, 2.20mmol),搅拌12.5小时。蒸馏除去溶剂后,依次加入水和乙酸乙酯,由无水硫酸钠干燥有机层。蒸馏除去溶剂后,以快速柱色谱(己烷:乙酸乙酯=10:1(v/v)→仅为乙酸乙酯)纯化粗产物,作为白色无定形物得到化合物10(682.2mg, 收率92%)。

[0123] 得到的化合物10的物性数据如下:熔点:41~45°C; $[\alpha]_D^{25}+13.3$ (c0.950, CHCl_3); IR(KBr): 3435, 2113, 1694, 1459, 1268, 1097 cm^{-1} ; ^1H -NMR(300MHz, CDCl_3): δ 1.63(3H, s), 2.09(1H, br), 3.73(1H, s), 4.04(1H, t, $J=6.3$ Hz), 4.39(1H, d, $J=6.3$ Hz), 4.51, 4.55(2H, AB, $J=10.2$ Hz), 4.56, 4.91(2H, AB, $J=11.4$ Hz), 6.18(1H, d, $J=6.3$ Hz), 7.26–7.44 (10H, m), 8.50(1H, s); ^{13}C -NMR(75.45Hz, CDCl_3): δ 12.2, 63.4, 64.9, 71.8, 73.8, 74.8, 79.4, 86.4, 87.5, 111.5, 127.7, 128.2, 128.2, 128.6, 128.7, 128.8, 135.2, 136.5, 137.0, 150.3, 163.5; MS(FAB): m/z 494(MH^+), 高分辨率MS(FAB): 计算值 $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_6$ (MH^+): 494.2040. 实测值 494.2045。

[0124] (8)化合物11的合成

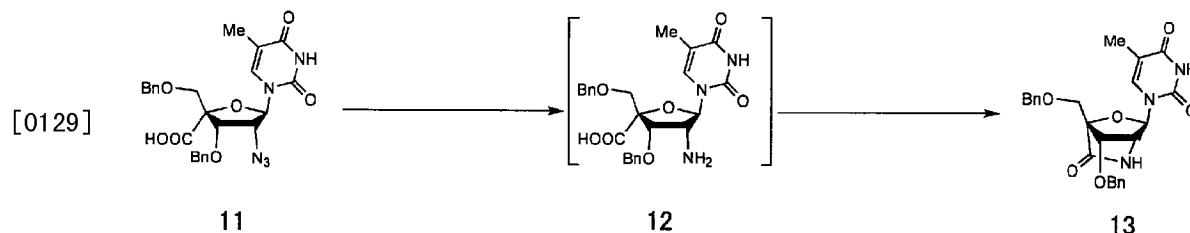


[0126] 在氮气流下,在上述(7)中得到的化合物10(0.20g, 0.40mmol)的二甲基甲酰胺溶液(3.1mL)中,依次加入粉末分子筛 $4\text{\AA}$ (0.31g)和重铬酸吡啶鎓(1.50g, 4.00mmol),室温条件下搅拌。4.5小时后,加入水搅拌数分钟后,加入乙酸(2mL)再搅拌1小时。以乙酸乙酯稀释后,以硅藻土过滤,由乙酸乙酯萃取。以0.4M草酸水溶液(30mL)和0.3M草酸铵水溶液(30mL)清洗有机层后,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,作为淡黄色固体得到化合物11(0.20g, 收率100%)。

[0127] 得到的化合物11的物性数据如下: ^1H -NMR(300MHz, CDCl_3): δ 1.64(3H, s), 3.83(1H, dd, $J=8.4, 5.4$ Hz), 3.84, 4.12(2H, AB, $J=10.5$ Hz), 4.45(1H, d, $J=5.4$ Hz), 4.59, 4.65(2H, AB, $J=11.4$ Hz), 4.75, 4.82(2H, AB, $J=10.5$ Hz), 5.89(1H, br), 6.54(1H, d, $J=8.4$ Hz),

7.28-7.44(10H,m), 7.99(1H,s), 9.31(1H,br); MS(FAB): m/z 508(MH^+), 高分辨率MS(FAB): 计算值 $C_{25}H_{25}N_5O_7(MH^+)$: 508.1832. 实测值508.1825。

[0128] (9)化合物13的合成

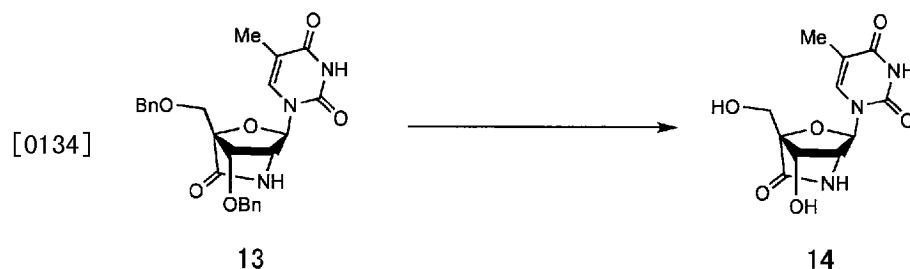


[0130] 在水:四氢呋喃=1:3的混合溶液(5mL)中溶解在上述(8)中得到的化合物11(389.7mg, 0.77mmol), 加入三丁基膦(0.96mL, 3.85mmol), 室温下搅拌。3.5小时后, 将蒸馏除去了溶剂的残余物溶解在甲醇中, 以己烷清洗。蒸馏除去溶剂后, 作为油状物质得到化合物12的粗产物(380mg), 在后述的闭环反应中使用。

[0131] 在氮气流下, 在化合物12的DMF溶液(11mL)中, 冰冷却下加入1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(221mg, 1.16mmol), 室温下搅拌21.5小时。蒸馏除去溶剂后, 由乙酸乙酯萃取, 由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后, 以柱色谱(己烷:乙酸乙酯=5:1(v/v)→仅为乙酸乙酯)纯化粗产物, 作为油状物质得到化合物13(191.3mg, 收率54%(2工序))。

[0132] 得到的化合物13的物性数据如下: $[\alpha]_D^{25} +62.1$ (c 0.400, $CHCl_3$); IR(KBr): 3186, 1692, 1469, 1455, 1272, 1112 cm^{-1} ; 1H -NMR(300MHz, $CDCl_3$): δ 1.61(3H, s), 3.96, 4.11(2H, AB, $J=11.4$ Hz), 4.13(1H, s), 4.22(1H, s), 4.56(2H, s), 4.60, 4.67(2H, AB, $J=11.4$ Hz), 5.45(1H, s), 6.58(1H, br), 7.21-7.56(10H, m), 7.57(1H, s), 9.24(1H, br); ^{13}C -NMR(67.80Hz, $CDCl_3$): 12.3, 58.4, 63.0, 72.4, 74.0, 78.3, 86.2, 86.6, 110.9, 127.8, 127.8, 128.1, 128.3, 128.5, 128.6, 135.1, 136.2, 137.4, 142.0, 150.5, 163.8, 174.3; MS(FAB): m/z 464(MH^+)。

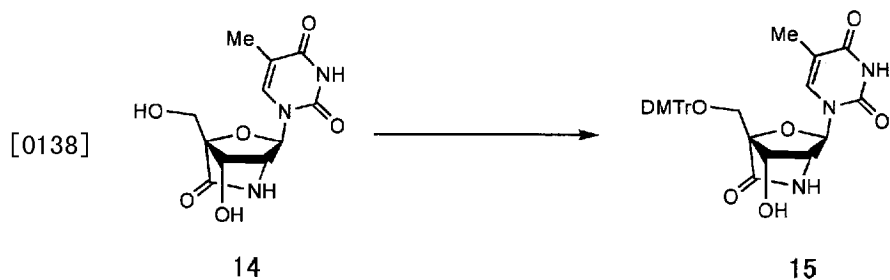
[0133] (10)化合物14的合成



[0135] 在氮气流下, 在上述(9)中得到的化合物13(101mg, 0.22mmol)的四氢呋喃溶液(2.2mL)中加入20%(v/v)氢氧化钡碳(100mg), 氢气流下搅拌3小时。进行趁热过滤, 以温甲醇(150mL)清洗后, 蒸馏除去溶剂, 得到粗产物。以甲醇进行再结晶, 作为白色固体得到化合物14(57.2mg, 收率93%)。

[0136] 得到的化合物14的物性数据如下: $[\alpha]_D^{25} +31.6$ (c 0.700, CH_3OH); IR(KBr): 3255, 2925, 2852, 1692, 1466, 1231, 1065 cm^{-1} ; 1H -NMR(300MHz, CD_3OD): δ 1.89(3H, s), 3.88, 4.04(2H, AB, $J=12.9$ Hz), 4.12(1H, s), 4.30(1H, s), 5.38(1H, s), 7.86(1H, s)。

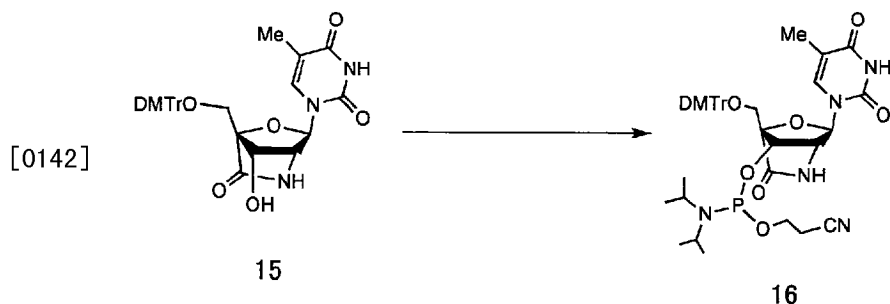
[0137] (11)化合物15的合成



[0139] 在氮气流下,在上述(10)中得到的化合物14(27.3mg,0.10mmol)的无水吡啶溶液(0.8mL)中加入4,4'-二甲氧基氯化三苯甲烷(48.8mg,0.14mmol),搅拌3小时。加入饱和碳酸氢钠水搅拌数分钟,蒸馏除去溶剂后,以饱和碳酸氢钠水/乙酸乙酯萃取,回收有机层,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,以快速柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=10:1(v/v)→仅为乙酸乙酯)纯化粗产物,作为白色泡状物质,得到化合物15(47.6mg,收率85%)。

[0140] 得到的化合物15的物性数据如下:熔点:79~81℃;IR(KBr):3342,3063,2928,1690,1509,1270,1253,1177,1035 cm^{-1} ; ^1H -NMR(300MHz, CDCl_3): δ 1.66(3H,s),3.61,3.92(2H,AB,J=12.8Hz),3.78(6H,s),4.26(1H,s),4.46(1H,s),5.42(1H,s),6.86-7.45(13H,m),7.78(1H,s);MS(FAB):m/z 586(MH^+)。

[0141] (12)化合物16的合成



[0143] 在氮气流下,在上述(11)中得到的化合物15(100mg,0.17mmol)的无水乙腈-四氢呋喃溶液(3:1(v/v))(2.0mL)中加入N,N-二异丙基铵四氮唑(22.2mg,0.13mmol)和2-氰基乙基N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(54.0 μL ,0.17mmol)进行搅拌。1.5小时后,加入饱和碳酸氢钠水,搅拌数分钟后,以水/乙酸乙酯萃取,回收有机层,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,以快速柱色谱(二氯甲烷:甲醇:三乙胺=50:1:1(v/v/v))纯化,得到粗产物。在二氯甲烷中溶解得到的粗产物,通过向正己烷中的添加进行再沉淀,作为白色粉体得到化合物16(29.4mg,收率22%)。

[0144] 得到的化合物16的物性数据如下:熔点:110~112℃(CH_2Cl_2); ^{31}P -NMR(202.35MHz, CDCl_3): δ 149.74,150.12;MS(FAB):m/z 786(MH^+),高分辨率MS(FAB):计算值 $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_9(\text{MH}^+)$:786.3268.实测值786.3266。

[0145] (实施例2)寡核苷酸类似物的合成和纯化

[0146] 由ExpediteTM8909(ABI公司生产),以0.2 μmol 量级合成含有在上述实施例1中得到的化合物16的10mer的寡核苷酸类似物(化合物17~20:在以下的表1中表示)。其中,省略在标准的亚磷酰胺步骤中的加帽工序。另外,化合物16(亚酰胺单元)溶解在四氢呋喃中使用。另外,在表1中,化合物16记为X。亚酰胺单元(化合物16)与5'-末端羟基的偶合时间从1.5分钟(标准条件)延长为20分钟。以0.05M碳酸钾的甲醇溶液处理5'-末端被DMTr基保护且被固

相支持的寡核苷酸类似物,以5%(w/v)盐酸中和处理后,蒸馏除去溶剂。将得到的粗产物由凝胶过滤柱NAPTM10Column(GE Health Care公司生产)粗纯化后,由反相HPLC(SHIMADZU LC-10AT_{vp},SHIMADZU SPD-10A_{vp},SHIMADZU CTO-10_{vp},作为分离柱使用WatersXTerra(注册商标)(10mm×50mm))进行纯化。

[0147] 合成的寡核苷酸类似物(化合物17~20)的纯度,由反相HPLC(WatersXTerra(注册商标)MS C₁₈ 2.5μm,4.6mm×50mm)确认(条件:0.1M三乙基乙酸铵缓冲液(pH7.0)中,以1mL/分钟30分钟的7→13%(v/v)乙腈的梯度)。另外,分子量由MALDI-TOF-MASS测定而确定。在表1中表示结果。

[0148] [表1]

	寡核苷酸	MALDI-TOF-MASS	
		计算值 (M-H ⁻)	实测值 (M-H ⁻)
[0149]	5'-TTTTTXXXXT-3' (化合物17)	3019.97	3020.35
	5'-TTTXXTTTTT-3' (化合物18)	3059.98	3058.99
	5'-TTTXXTXXTT-3' (化合物19)	3099.99	3098.99
	5'-TTTTTTTTXT-3' (化合物20)	3019.97	3019.32

[0150] 另外,为了比较,含有天然型寡核苷酸(化合物21)的寡核苷酸(在以下的表2中表示)和含有公知的2',4'-BNA/LNA(5-甲基-2'-O,4'-C-亚甲基尿苷:按照非专利文献6合成)的寡核苷酸类似物(化合物22~24:在以下的表2中表示)也按照标准的亚磷酰胺步骤同样合成纯化。另外,在表2中,2',4'-BNA/LNA记为Y。

[0151] (实施例3)熔解温度(T_m)的测定

[0152] 将作为上述实施例2中合成的寡核苷酸链的化合物17~19(反义链)与正义链21~24(3'-AAAAAAAAA-5')退火处理后,通过测定T_m值,调查反义链的形成杂交链的能力。T_m值是指双链核酸的50%解离温度,该值越高,核酸双链具有越高的结合力。

[0153] 以沸腾水浴加热包含100mM NaCl、10mM磷酸钠缓冲液(pH7.2)、4μm反义链和4μm正义链的样品溶液(130μL)后,用10小时冷却到室温。为了防止在分光光度计(岛津制作所,UV-1650PC)的比色皿内结露,通入氮气流,将样品溶液缓慢冷却到5℃,再在10℃保持20分钟后,开始测定。使温度以每分钟升0.5℃的方式上升到85℃,以0.1℃的间隔测定在260nm的紫外部分吸收。此外,为了防止由温度上升产生浓度变化,使用带盖的比色皿。在表2中表示结果。

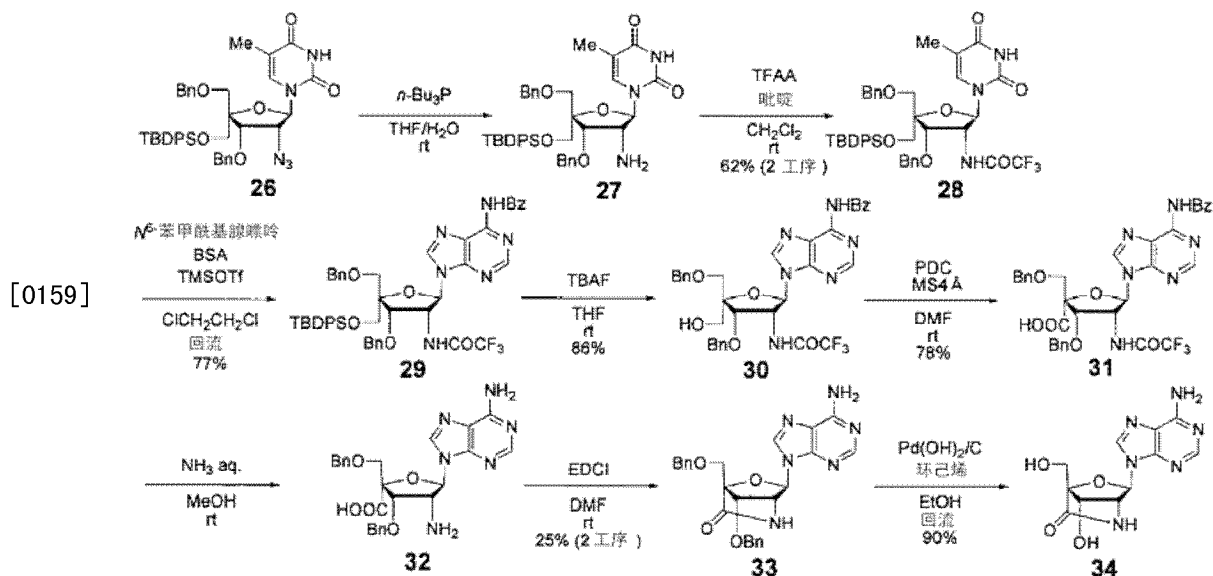
[0154] [表2]

	反义链	正义链			
		RNA 互补链		DNA 互补链	
		T _m (°C)	ΔT _m /mod.(°C)	T _m (°C)	ΔT _m /mod.(°C)
[0155]	5'-TTTTTTTTTT-3' (化合物21)	18.8		22.9	
	5'-TTTTYTTTT-3' (化合物22)	25.5	+6.7	23.9	+1.3
	5'-TTTTXTTTTT-3' (化合物17)	24.9	+6.2	22.0	-0.9
	5'-TTYTYTTTT-3' (化合物23)	35.1	+8.2	29.7	+3.4
	5'-TTXTXTTTTT-3' (化合物18)	33.7	+7.5	24.4	+0.8
	5'-TTYTYTYTT-3' (化合物24)	41.5	+7.6	36.6	+4.6
	5'-TTXTXTXTT-3' (化合物19)	41.7	+7.7	32.2	+3.1

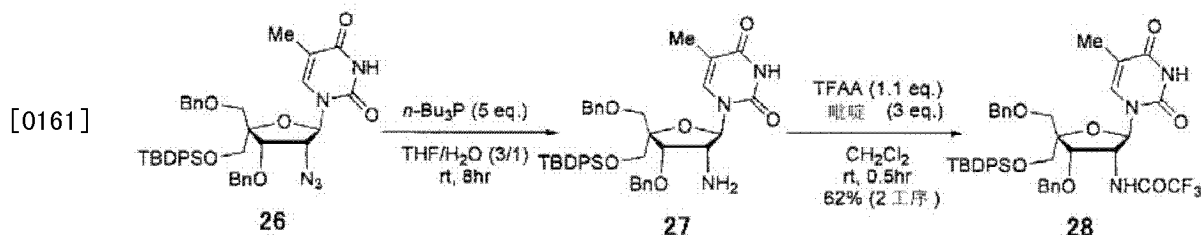
[0156] $\Delta T_m/\text{mod.} = \Delta T_m/\text{单位修饰}$

[0157] 从表2可知,相比于对单链DNA的亲合性,本发明的寡核苷酸类似物对单链RNA的亲合性高,该亲合性与公知的2',4'-BNA/LNA相同。另外,向寡核苷酸中的人工核酸导入比例越高,越可以观察到T_m值的上升。因此,可以认为本发明的核苷酸类似物与2',4'-BNA/LNA同样,在适合于反义法的寡核苷酸的合成中是有用的。

[0158] (实施例4)核苷类似物:2'-氨基-2'-去氧-2'-N,4'-C-氧代亚甲基腺苷(化合物34)的合成



[0160] (1)化合物28的合成



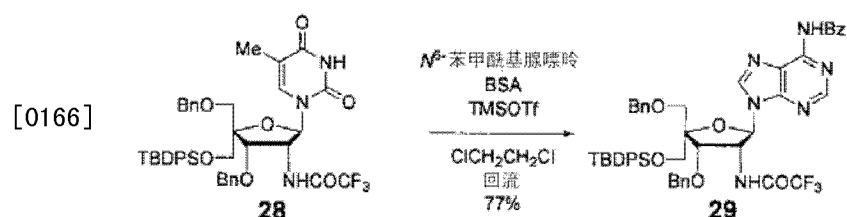
[0162] 在氮气流下,在水:四氢呋喃=1:3(v/v)的溶液(4.5mL)中溶解化合物26(500mg,

0.68mmol),加入三丁基膦(0.85mL,3.42mmol),在室温搅拌8小时。蒸馏除去溶剂后,在甲醇中溶解残渣,以己烷清洗。蒸馏除去溶剂后,作为油状物质得到粗产物27,以柱色谱(己烷:乙酸乙酯=5:1→2:1(v/v))简易纯化后,在后述反应中使用。

[0163] 在氮气流下,在粗产物27的二氯甲烷溶液(6mL)中加入吡啶(0.16mL,2.05mmol)。冰冷却后,加入三氟乙酸酐(0.10mL,0.75mL),搅拌0.5小时。加入水,由二氯甲烷萃取,以碳酸氢钠水清洗后,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(己烷:乙酸乙酯=5:1→2:1(v/v))纯化得到的粗产物,作为白色泡状物质得到化合物28(341.4mg,收率62%(2工序))。

[0164] 得到的化合物28的物性数据如下:IR(KBr):3185,2961,1713,1211,1158,1094 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 1.04(9H,s),1.59(3H,s),3.54,3.78(2H,AB,J=10Hz),3.65,4.02(2H,AB,J=10.5Hz),4.28(1H,d,J=5.5Hz),4.55,4.71(2H,AB,J=11Hz),4.58,4.63(2H,AB,J=12Hz),4.94(1H,dd,J=5.5Hz,8Hz),6.22(1H,d,J=8Hz),7.19-7.84(20H,m),8.68(1H,s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100.53MHz, CDCl_3): δ 12.1,19.1,27.0,55.9,63.7,73.0,75.4,79.6,85.0,88.2,112.1,115.4,127.7,127.8,128.1,128.1,128.2,128.5,128.7,129.8,151.1,157.8,163.9;MS(FAB):m/z 802(MH^+),高分辨率MS(FAB):计算值 $\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}$ (MH):802.3135.实测值802.3143。

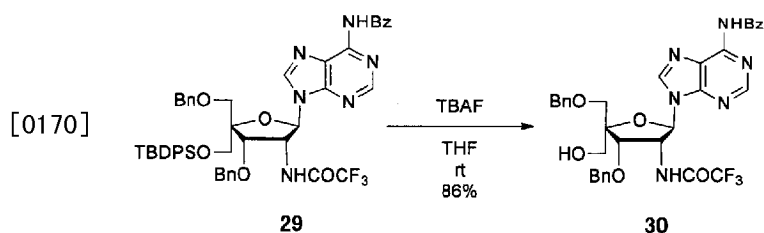
[0165] (2)化合物29的合成



[0167] 在氮气流下,在上述(1)中得到的化合物28(103mg,0.13mmol)的二氯乙烷溶液(2.5mL)中加入 N^6 -苯甲酰基腺嘌呤(80.4mg,0.34mmol)和N,O-双三甲硅基乙酰胺(246 μL ,1.01mmol),加热搅拌到透明。将反应液返回到常温,加入三氟甲磺酸三甲基硅酯(16.3 μL ,0.09mmol),回流搅拌3.5小时。接着,加入饱和碳酸氢钠水,由二氯甲烷萃取,以水然后以碳酸氢钠水清洗有机层后,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,以柱色谱(己烷:乙酸乙酯=5:1→3:1(v/v))纯化得到的粗产物,作为白色泡状物质得到化合物29(90.3mg,收率77%)。

[0168] 得到的化合物29的物性数据如下:IR(KBr):3402,3246,3068,2931,2858,1722,1638,1218,1105 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 1.06(9H,s),3.54,3.83(2H,AB,J=10Hz),3.78,4.10(2H,AB,J=11Hz),4.44(1H,d,J=6Hz),4.51,4.66(2H,AB,J=11.5Hz),4.54,4.76(2H,AB,J=11Hz),5.29(1H,dd,J=6Hz,7.5Hz),6.11(1H,d,J=7.5Hz),7.16-8.02(25H,m),8.26(1H,s),8.70(1H,s); $^{13}\text{C-NMR}$ (100.53MHz, CDCl_3): δ 19.1,26.9,56.4,63.4,72.0,73.8,75.5,79.7,86.1,89.1,122.9,127.8,128.0,128.2,128.3,128.6,128.7,128.8,129.9,130.0,132.3,132.6,132.6,133.6,135.5,135.7,136.3,136.9,141.1,149.5,151.7,152.6,157.1,164.6;MS(FAB):m/z 915(MH^+),高分辨率MS(FAB):计算值 $\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_6\text{Si}$ (MH):915.3513.实测值915.3537。

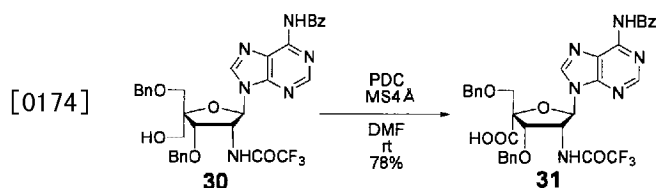
[0169] (3)化合物30的合成



[0171] 在氮气流下,在上述(2)中得到的化合物29(40mg,0.044mmol)的四氢呋喃溶液(1.0mL)中加入氟化四正丁基铵(1M四氢呋喃溶液,49 μ L,0.049mmol),在室温搅拌15分钟。蒸馏除去溶剂后,加入水,由乙酸乙酯萃取3次。以饱和食盐水清洗有机层后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂后,以柱色谱(2g,正己烷:乙酸乙酯=2:1 $\rightarrow$ 2:3)纯化得到的粗产物,作为白色泡状物质得到化合物30(25.5mg,收率 86%)。

[0172] 得到的化合物30的物性数据如下: $[\alpha]_D^{26}-15.9$ (c 1.00,CHCl₃);IR(KBr):3395,2928,3271,1722,1613,1216,1184cm⁻¹; ¹H-NMR(300MHz,CDCl₃): δ 1.60(1H,s),3.24(1H,s),3.40,3.47(2H,AB,J=10Hz),3.78,3.91(2H,AB,J=11.5Hz),4.33(2H,s),4.52,4.62(2H,AB,J=11.5Hz),4.89(1H,d,J=6.0Hz),5.41(1H,d,J=6.0Hz),6.33(1H,s),7.12-7.71(13H,m),8.02(2H,d,J=7.5Hz),8.25(1H,s),8.68(1H,s),9.44(1H,s);MS(FAB):m/z 677(MH⁺),高分辨率MS(FAB):计算值C₃₄H₃₂F₃N₆O₆(MH):677.2335.实测值677.2349。

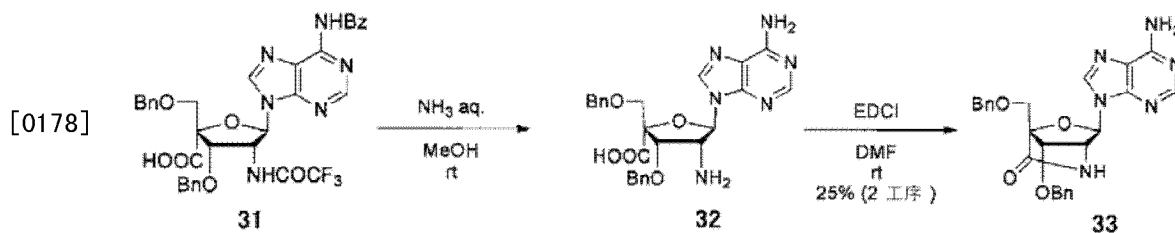
[0173] (4)化合物31的合成



[0175] 在氮气流下,在二甲基甲酰胺(1.5mL)中溶解在上述(3)中得到的化合物30(213mg,0.315mmol),加入重铬酸吡啶啉(872mg,3.15mmol)、300mg分子筛 4 $\text{\AA}$,在室温搅拌17小时。加入水,再加入乙酸(1.5mL)搅拌后,以乙酸乙酯稀释,进行硅藻土过滤。由乙酸乙酯萃取,以草酸缓冲液清洗有机层后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,作为白色固体得到粗产物31(169mg,收率78%)。

[0176] 得到的化合物31的物性数据如下: $[\alpha]_D^{25}-43.8$ (c 1.000,CHCl₃);IR(KBr):3256,3061,2923,2871,1725,1613,1584,1218,1173cm⁻¹; ¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ 3.76,3.97(2H,AB,J=10.6Hz),4.41,4.60(2H,AB,J=11.4Hz),4.44,4.54(2H,AB,J=12.0Hz),4.63(1H,d,J=6.5Hz),5.19(1H,dd,J=6.5Hz,8.7Hz),6.40(1H,d,J=6.5Hz),7.17-7.58(13H,m),7.99(2H,d,J=7.8Hz),8.37(1H,s),8.56(1H,s),9.57(1H,s); ¹³C-NMR(100.53MHz,CDCl₃): δ 55.8,70.4,73.8,75.3,78.7,87.7,90.4,116.7,122.6,127.9,128.2,128.4,128.6,128.7,133.0,135.8,136.6,141.9,149.5,151.8,157.4,165.2。

[0177] (5)化合物33的合成

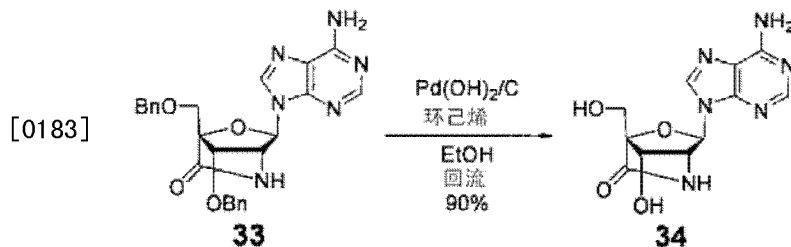


[0179] 在氮气流下,在甲醇(15mL)中溶解在上述(4)中得到的化合物31(1.09g, 1.58mmol),加入28%(v/v)氨水(10mL),在室温搅拌19小时。蒸馏除去溶剂后,以乙酸乙酯/水萃取,回收水层,蒸馏除去溶剂。将得到的粉末状粗产物32与乙腈共沸后,在后述的反应中使用。

[0180] 在二甲基甲酰胺(20mL)中溶解粗产物32(766mg, 1.56mmol),加入1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(299mg, 1.87mmol),在室温搅拌16小时。蒸馏除去溶剂后,由乙酸乙酯萃取,由无水硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂后,以柱色谱(氯仿:甲醇=20:1(v/v))纯化得到的粗产物,作为白色固体得到化合物33(185mg, 收率25%(2工序))。

[0181] 得到的化合物33的物性数据如下:¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): δ3.94, 4.07(2H, AB, J=12Hz), 4.31(1H, s), 4.43, 4.54(2H, AB, J=12Hz), 4.48(1H, s), 4.63, 4.72(2H, AB, J=12Hz), 5.61(2H, s), 5.85(1H, s), 6.01(1H, s), 7.00-7.52(10H, m), 8.15(1H, s), 8.32(1H, s)。

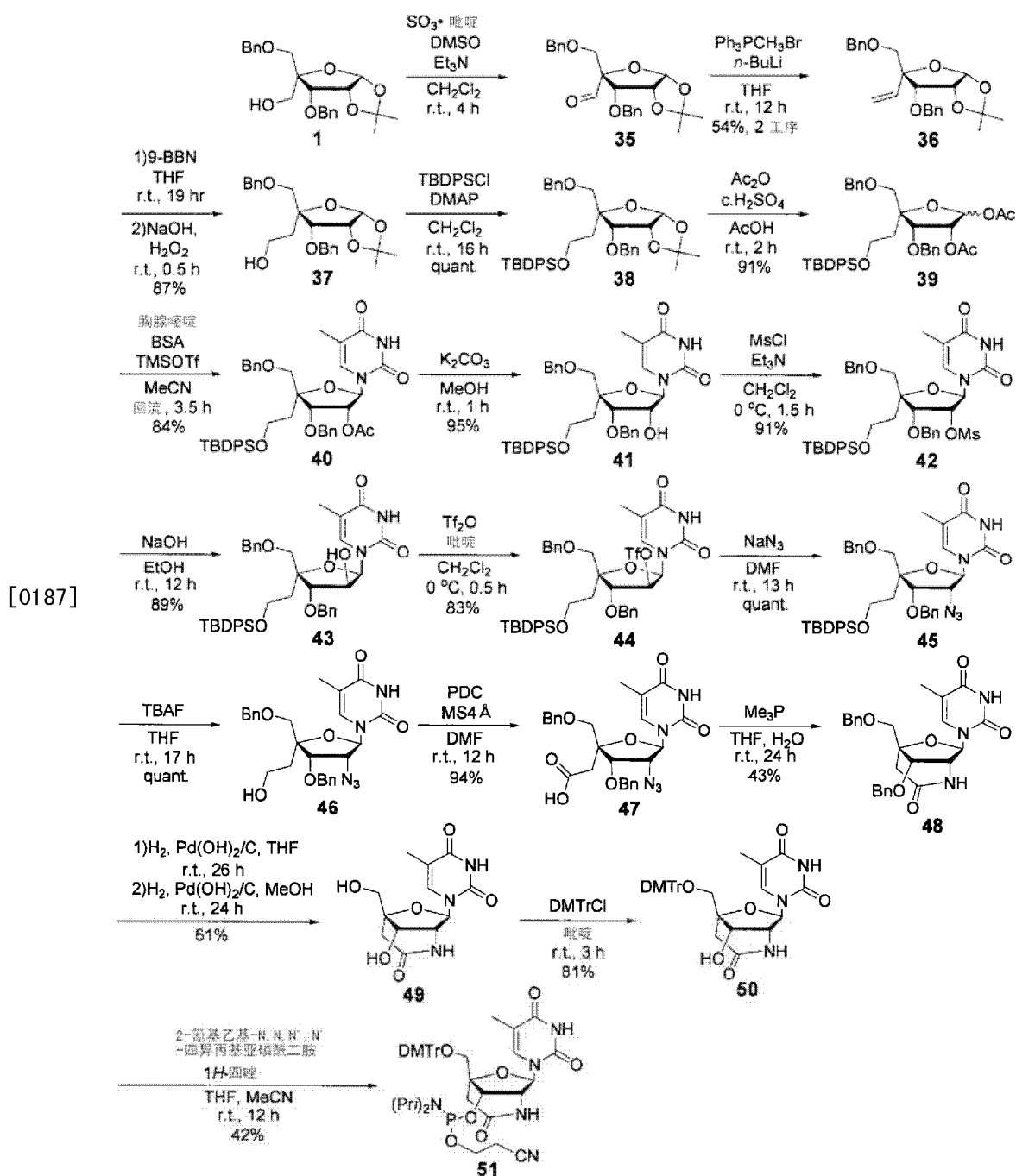
[0182] (6)化合物34的合成



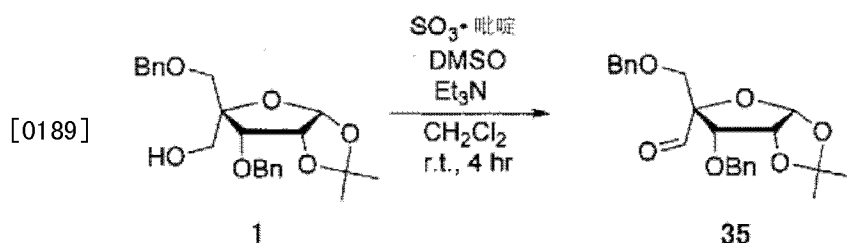
[0184] 在氮气流下,在乙醇(1mL)中溶解在上述(5)中得到的化合物33(33.6mg, 0.071mmol),加入20%氢氧化钡碳(33mg)、环己烯(1mL),氮气流下加热回流4小时。自然过滤反应液,以温甲醇清洗后,蒸馏除去溶剂。以柱色谱(氯仿:甲醇=10:1)纯化得到的粗产物,作为白色固体得到化合物34(18.7mg, 收率90%)。

[0185] 得到的化合物34的物性数据如下:¹H-NMR(400MHz, CD₃OD): δ3.82, 3.98(2H, AB, J=12Hz), 4.34(1H, s), 4.40(1H, s), 5.76(1H, s), 8.12(1H, s), 8.26(1H, s)。

[0186] (实施例5)核苷类似物:2'-氨基-3'-O-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦]-5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-N,4'-C-氧代亚乙基胸苷(化合物51:amide6NH)的合成



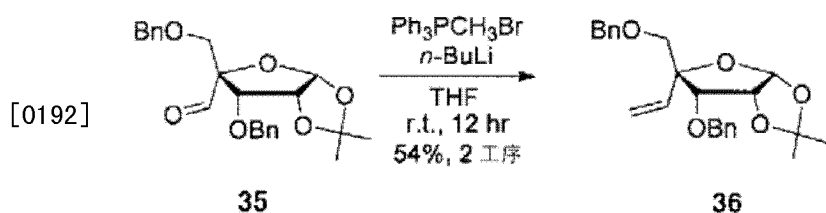
[0188] (1) 化合物35的合成



[0190] 在氮气流下,在化合物1(6.03g,15.1mmol)的无水二氯甲烷溶液(150mL)中加入二甲基亚砷(13.0mL,181mmol)、三乙胺(8.50mL,60.2mmol)和三氧化硫吡啶络合物(9.60g,60.2mmol),在室温搅拌4小时。在反应液中加入水骤冷,以二乙醚稀释萃取3次。回收有机层,以水清洗3次有机层,接着以饱和食盐水清洗1次有机层后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除

去溶剂,得到化合物35的粗产物(4.29g)。

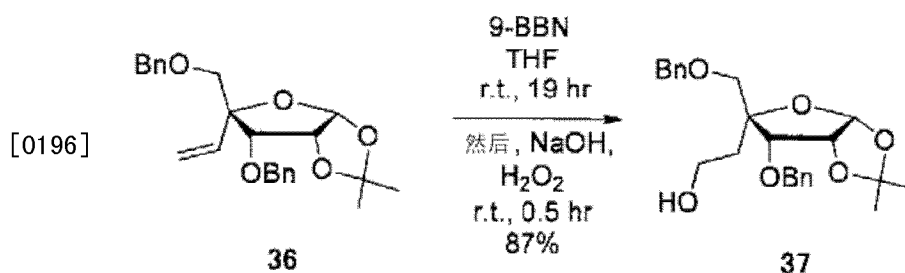
[0191] (2)化合物36的合成



[0193] 在氮气流下,在甲基三苯基溴化磷(11.5g,32.3mmol)的无水四氢呋喃悬浊液(30mL)中,在0℃滴加正丁基锂(1.6M的正己烷溶液,27.0mL,43.1mmol),在室温搅拌1小时。在反应液中滴加在上述(1)中得到的化合物35的粗产物的无水四氢呋喃溶液(100mL),在室温搅拌12小时。加入氯化铵水溶液骤冷,以二乙醚萃取3次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(150g,正己烷:乙酸乙酯=5:1(v/v))纯化得到的粗产物(8.91g),作为无色油状物质、得到化合物36(3.22g,收率54%(2工序))。

[0194] 得到的化合物36的物性数据如下:¹H-NMR(400MHz,CDCl₃):δ1.27(s,3H),1.51(s,3H),3.30,3.32(AB,J=12.5Hz,2H),4.24(d,J=5.0Hz,1H),4.50,4.39(AB,J=12.5Hz,2H),4.55-4.59(m,2H),4.75(AB,J=12.5Hz,1H),5.23(d,J=11.0Hz,1H),5.51(d,J=17.5Hz,1H),5.75(d,J=4.0Hz,1H),6.18(dd,J=11.0,17.5Hz,1H),7.20-7.38(m,10H)。

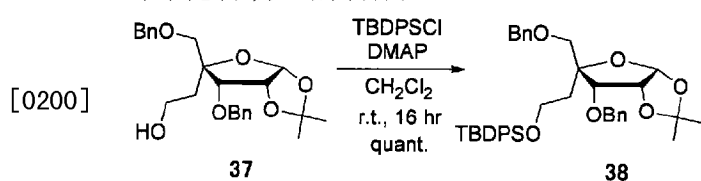
[0195] (3)化合物37的合成



[0197] 在氮气流下,在上述(2)中得到的化合物36(4.36g,11.0mmol)的无水四氢呋喃溶液(150mL)中滴加硼二环壬烷(0.5M四氢呋喃溶液,66mL,33.0mmol),在室温搅拌19小时。在反应液中加入水骤冷,加入氢氧化钠水溶液(3M,23.0mL,70.4mmol)、35%(v/v)过氧化氢水(6.0mL,70.4mmol),在室温搅拌0.5小时。反应结束后,由乙酸乙酯萃取3次,回收有机层,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(100g,正己烷:乙酸乙酯=3:1(v/v))纯化得到的粗产物(7.43g),作为无色油状物质得到化合物37(3.96g,收率87%)。

[0198] 得到的化合物37的物性数据如下:¹H-NMR(400MHz,CDCl₃):δ1.32(s,3H),1.64(s,3H),1.77(ddd,J=4.0,6.5,15.5Hz,1H),2.50(ddd,J=4.0,8.5,15.5Hz,1H),2.85(s,1H),3.29,3.53(AB,J=10.0Hz,2H),3.72-3.85(m,2H),4.11(d,J=5.5Hz,1H),4.42,4.50(AB,J=12.5Hz,2H),4.53,4.76(AB,J=12.0Hz,2H),4.64(dd,J=4.0,5.5Hz,1H),5.76(d,J=4.0Hz,1H),7.23-7.33(m,10H)。

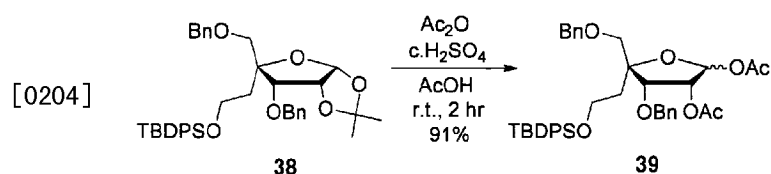
[0199] (4)化合物38的合成



[0201] 在氮气流下,在上述(3)中得到的化合物37(3.96g,9.56mmol)的二氯甲烷溶液(100mL)中加入N,N-二甲基-4-氨基吡啶(350mg,2.87mmol)和三乙胺(4.0mL,28.7mmol),在0℃滴加叔丁基二苯基氯硅烷(4.0mL,15.3mmol),在室温搅拌反应液16小时。在反应液中加入水骤冷,由二氯甲烷萃取3次,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(200g,正己烷:乙酸乙酯=10:1(v/v))纯化得到的粗产物(8.82g),作为无色油状物质得到化合物38(6.28g,定量(quant.))。

[0202] 得到的化合物38的物性数据如下: $[\alpha]_D^{25}+16.3$ (c 1.00,CHCl₃);IR(KBr):3068,3031,2932,2857,1454,1428,1382,1209cm⁻¹;¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ 0.99(s,9H),1.28(s,3H),1.53(s,3H),1.85(ddd,J=7.0,8.0,14.5Hz,1H),2.43(ddd,J=5.0,6.5,14.5Hz,1H),3.28,3.69(AB,J=10.5Hz,2H),3.83-3.94(AB,m,2H),4.20(d,J=5.5Hz,2H),4.33,4.46(AB,J=12.5Hz,2H),4.58(dd,J=3.5,5.5Hz,1H),4.52,4.73(AB,J=12.5Hz,2H),5.74(d,J=3.5Hz,1H),7.17-7.68(m,20H);¹³C-NMR(100MHz,CDCl₃): δ 19.2,26.3,26.7,26.9,35.0,59.9,68.1,72.5,73.5,78.0,79.4,86.8,104.3,113.1,127.7,127.7,127.7,127.9,127.9,128.4,128.4,129.6,134.0,134.0,135.7,138.2,138.3;MS(FAB):m/z 675(M+Na⁺),高分辨率MS(FAB):计算值C₄₀H₄₈O₆SiNa(M+Na⁺):675.3118.实测值:675.3115。

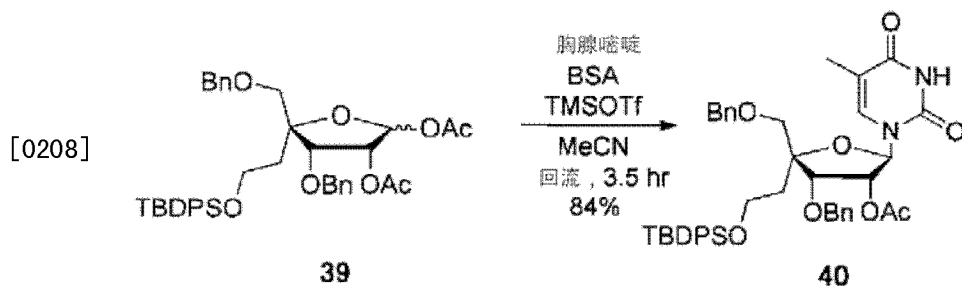
[0203] (5)化合物39的合成



[0205] 在氮气流下,在上述(4)中得到的化合物38(5.86g,8.98mmol)的乙酸溶液(30mL)中滴加乙酸酐(10mL,108mmol)、0.1%(w/v)硫酸(4.0mL,乙酸溶液),在室温搅拌2小时。0℃在反应液中加入饱和碳酸氢钠水骤冷,由乙酸乙酯萃取3次。以饱和碳酸氢钠水清洗有机层1次,以水清洗有机层1次,接着以饱和食盐水清洗有机层1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(200g,正己烷:乙酸乙酯=5:1(v/v))纯化得到的粗产物(6.18g),作为无色油状物质得到化合物39(5.67g,收率91%)。

[0206] 得到的化合物39的物性数据如下: $[\alpha]_D^{24}-16.3$ (c 1.00,CHCl₃);IR(KBr):3069,3031,2931,2857,1748,1428,1369,1219cm⁻¹;¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ 1.01(s,9H),1.82(s,3H),1.92(s,3H),1.96-2.13(m,2H),3.37,3.49(AB,J=10.0Hz,2H),3.79-3.92(m,2H),4.34-4.42(m,3H),4.45,4.56(AB,J=12.0Hz,2H),5.27(d,J=5.5Hz,1H),6.01(s,1H),7.20-7.67(m,20H);¹³C-NMR(100MHz,CDCl₃): δ 19.2,20.7,21.1,26.9,35.9,59.9,73.3,73.6,74.8,78.2,86.8,97.8,127.5,127.6,127.7,127.8,127.9,128.4,128.5,129.6,134.0,134.0,135.7,138.0,138.3,169.5,169.8;MS(FAB):m/z 719(M+Na⁺),高分辨率MS(FAB):计算值C₄₁H₄₈O₈SiNa(M+Na⁺):719.3016.实测值:719.2999。

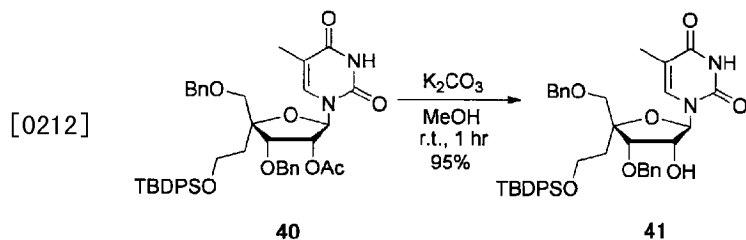
[0207] (6)化合物40的合成



[0209] 在氮气流下,在上述(5)中得到的化合物39(5.57g,8.00mmol)的无水乙腈溶液(20mL)中加入胸腺嘧啶(1.41g,11.2mmol),滴加N,O-双三甲硅基乙酰胺(6.8mL,28.0mmol),加热回流1.5小时。将反应液冷却到室温,在0℃滴加三氟甲磺酸三甲基硅酯(1.9mL,10.4mmol),加热回流3.5小时。0℃在反应液中加入饱和碳酸氢钠水骤冷,以乙酸乙酯稀释萃取3次。以水清洗有机层1次,接着以饱和食盐水清洗有机层1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(150g,正己烷:乙酸乙酯=3:2(v/v))纯化得到的粗产物(5.71g),作为白色泡状物质得到化合物40(5.14g,收率84%)。

[0210] 得到的化合物40的物性数据如下:熔点45-48℃; $[\alpha]_D^{25} + 10.2$ (c1.00, CHCl₃); IR (KBr): 3172, 3068, 2930, 2857, 1747, 1693, 1470, 1372, 1234 cm⁻¹; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.01(s, 9H), 1.48(s, 3H), 1.76-1.83(m, 1H), 2.04(s, 3H), 2.03-2.11(m, 1H), 3.41, 3.89(AB, J=10.5Hz, 2H), 3.71-3.83(m, 2H), 4.35(d, J=6.5Hz, 1H), 4.39, 4.44(AB, J=9.5Hz, 2H), 4.38, 4.57(AB, J=11.5Hz, 2H), 5.35(dd, J=5.0, 6.5Hz, 1H), 6.08(d, J=5.0Hz, 1H), 7.20-7.41(m, 16H), 7.49(s, 1H), 7.60-7.65(m, 4H), 7.83(s, 1H); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 12.1, 19.2, 20.9, 27.0, 35.2, 59.4, 73.2, 73.5, 74.4, 75.4, 77.6, 86.2, 87.5, 111.3, 127.7, 127.8, 128.0, 128.1, 128.6, 128.7, 129.8, 133.6, 133.6, 135.6, 135.8, 137.5, 137.6, 150.4, 163.7, 170.2。

[0211] (7)化合物41的合成

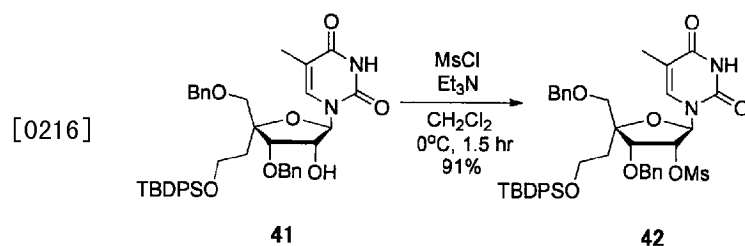


[0213] 在上述(6)中得到的化合物40(5.04g,6.61mmol)的甲醇溶液(10mL)中加入碳酸钾(450mg,3.30mmol),在室温搅拌1小时。减压蒸馏除去溶剂,加入水,由乙酸乙酯萃取3次。以饱和食盐水清洗有机层1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(100g,正己烷:乙酸乙酯=4:3(v/v))纯化得到的粗产物(4.76g),作为白色泡状物质得到化合物41(4.54g,收率95%)。

[0214] 得到的化合物41的物性数据如下:熔点62-64℃; $[\alpha]_D^{26} - 10.3$ (c1.00, CHCl₃); IR (KBr): 3423, 3179, 3066, 2928, 2856, 1695, 1471, 1428, 1270 cm⁻¹; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.06(s, 9H), 1.56(s, 3H), 1.77(ddd, J=6.5, 8.0, 14.5Hz, 1H), 2.14(dt, J=5.0, 14.5Hz, 1H), 2.83(d, J=8.0Hz, 1H), 3.45, 3.85(AB, J=10.5Hz, 2H), 3.73-3.88(AB, m, 2H), 3.85(d, J=10.5Hz, 1H), 4.14(d, J=6.0Hz, 1H), 4.30(m, 1H), 4.46, 4.49(AB, J=12.0Hz, 2H), 4.56, 4.63(AB, J=11.0Hz, 2H), 5.82(d, J=6.0Hz, 1H), 7.22-7.65(m, 21H), 8.12(s, 1H); ¹³C-NMR

(100MHz, CDCl_3): δ 12.2, 19.2, 27.0, 35.5, 59.5, 73.6, 74.2, 74.7, 75.2, 79.5, 87.2, 88.6, 111.1, 127.6, 127.8, 127.8, 128.1, 128.2, 128.4, 128.7, 128.7, 129.8, 129.8, 133.6, 135.6, 136.0, 137.2, 137.5, 150.9, 163.8。

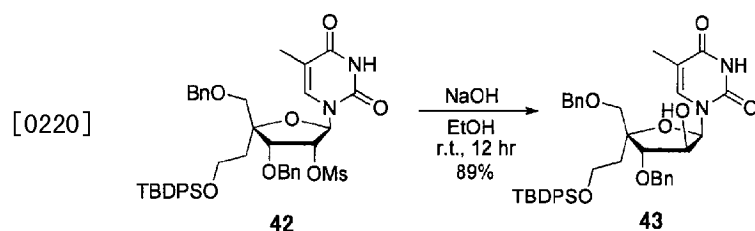
[0215] (8)化合物42的合成



[0217] 在氮气流下,在上述(7)中得到的化合物41(3.26g, 4.52mmol)的无水二氯甲烷溶液(40mL)中加入三乙胺(6.3mL, 45.2mmol)和甲磺酰氯(0.7mL, 9.04mmol),在0℃搅拌1.5小时。在0℃加入饱和碳酸氢钠水骤冷,由二氯甲烷萃取3次。以水清洗有机层1次,接着以饱和食盐水清洗有机层1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(100g, 正己烷:乙酸乙酯=4:3(v/v))纯化得到的粗产物(3.80g),作为白色泡状物质得到化合物42(3.29g, 收率91%)。

[0218] 得到的化合物42的物性数据如下:熔点57-62℃; $[\alpha]_D^{22} + 214.8$ (c1.00, CHCl_3); IR (KBr): 3168, 3068, 3031, 2932, 2857, 1694, 1471, 1361, 1178 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.02(s, 9H), 1.44(s, 3H), 1.85(ddd, $J=6.5, 8.0, 14.5\text{Hz}$, 1H), 2.10(dt, $J=5.0, 14.5\text{Hz}$, 1H), 3.07(s, 3H), 3.44, 3.95(AB, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 3.70-3.86(m, 2H), 4.33(d, $J=5.0\text{Hz}$, 2H), 4.37, 4.42(AB, $J=12.0\text{Hz}$, 2H), 4.45, 4.83(AB, $J=12.0\text{Hz}$, 2H), 5.26(dd, $J=3.0, 5.0\text{Hz}$, 1H), 6.01(d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H), 7.18-7.63(m, 21H), 8.29(s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3): δ 11.9, 19.1, 26.8, 35.1, 38.8, 59.1, 72.6, 73.4, 73.8, 75.7, 80.3, 86.7, 87.8, 111.2, 127.6, 127.6, 127.7, 128.1, 128.3, 128.4, 128.6, 129.7, 129.7, 133.3, 133.4, 135.3, 135.5, 137.1, 137.2, 150.5, 163.5。

[0219] (9)化合物43的合成

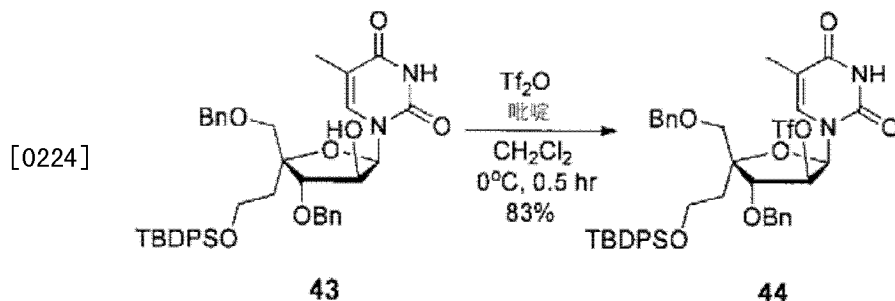


[0221] 在上述(8)中得到的化合物42(3.16g, 3.95mmol)的乙醇溶液(40mL)中滴加氢氧化钠水溶液(1M, 12mL, 12.0mmol),在室温搅拌12小时。加入氯化铵水溶液骤冷,由乙酸乙酯萃取3次。以水清洗1次,接着以饱和食盐水清洗1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(100g, 正己烷:乙酸乙酯=1:1(v/v))纯化得到的粗产物(2.72g),作为白色泡状物质得到化合物43(2.55g, 收率89%)。

[0222] 得到的化合物43的物性数据如下:熔点56-58℃; $[\alpha]_D^{26} + 43.5$ (c1.00, CHCl_3); IR (KBr): 3357, 3181, 3068, 3031, 2929, 2856, 1695, 1472, 1428, 1281 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.02(s, 9H), 1.71(d, $J=1.5\text{Hz}$, 3H), 1.83-1.98(m, 2H), 3.55, 3.94(AB, $J=10.5\text{Hz}$, 2H), 3.70-3.86(m, 2H), 3.96(d, $J=9.0\text{Hz}$, 1H), 4.06(d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H), 4.28(ddd,

$J=3.0, 4.0, 9.0\text{Hz}, 1\text{H}$), $4.45, 4.70(\text{AB}, J=12.0\text{Hz}, 2\text{H})$, $4.49, 4.53(\text{AB}, J=11.5\text{Hz}, 2\text{H})$, $5.93(\text{d}, J=4.0\text{Hz}, 1\text{H})$, $7.22-7.63(\text{m}, 20\text{H})$, $7.48(\text{d}, J=1.5\text{Hz}, 1\text{H})$, $8.02(\text{s}, 1\text{H})$; $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): $\delta 12.4, 19.2, 27.0, 35.3, 59.7, 72.8, 73.1, 73.8, 74.8, 83.9, 84.8, 85.2, 109.4, 127.8, 128.0, 128.1, 128.5, 128.8, 129.9, 133.6, 135.6, 136.8, 137.5, 137.7, 150.8, 164.1$ 。

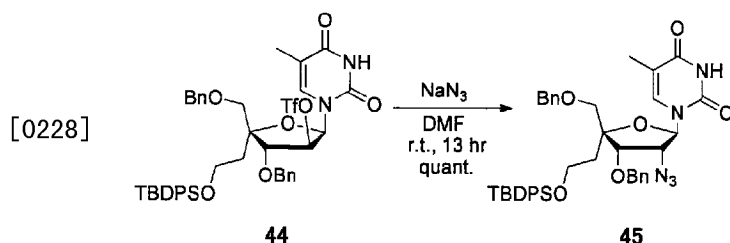
[0223] (10)化合物44的合成



[0225] 在氮气流下,在上述(9)中得到的化合物43(2.07g, 2.87mmol)的无水二氯甲烷溶液(30mL)中加入无水吡啶(1.9mL, 17.2mmol),在0℃滴加三氟甲磺酸酐(1.4mL, 8.60mmol),搅拌0.5小时。0℃在反应液中加入饱和碳酸氢钠水骤冷,由二氯甲烷萃取3次。以水清洗1次,接着以饱和食盐水清洗1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(100g, 正己烷:乙酸乙酯=2:1)纯化得到的粗产物(2.56g),作为白色泡状物质得到化合物44(2.03g, 收率83%)。

[0226] 得到的化合物44的物性数据如下:熔点37-40℃; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 37.1 (c 1.00, \text{CHCl}_3)$; IR (KBr): 3190, 3069, 2930, 2858, 1695, 1455, 1426, 1245, 1215, 1143 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): $\delta 1.02(\text{s}, 9\text{H})$, $1.68(\text{s}, 3\text{H})$, $1.81-1.94(\text{m}, 2\text{H})$, $3.36, 3.69(\text{AB}, J=10.5\text{Hz}, 2\text{H})$, $3.72-3.86(\text{m}, 2\text{H})$, $4.38, 4.43(\text{AB}, J=12.0\text{Hz}, 2\text{H})$, $4.48, 4.72(\text{AB}, J=11.5\text{Hz}, 2\text{H})$, $4.57(\text{d}, J=4.5\text{Hz}, 1\text{H})$, $5.35(\text{t}, J=4.5\text{Hz}, 1\text{H})$, $6.20(\text{d}, J=4.5\text{Hz}, 1\text{H})$, $7.19-7.63(\text{m}, 21\text{H})$, $8.81(\text{s}, 1\text{H})$; $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): $\delta 12.4, 19.2, 26.9, 34.2, 59.2, 71.4, 73.5, 73.7, 80.7, 81.7, 84.6, 87.7, 111.1, 127.8, 128.1, 128.2, 128.5, 128.7, 129.9, 129.9, 133.5, 135.6, 136.7, 137.3, 150.1, 163.4$; MS(FAB): m/z 853 ($\text{M}+\text{H}^+$), 高分辨率MS(FAB): 计算值 $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_9\text{F}_3\text{Si}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 853.2802. 实测值: 853.2813。

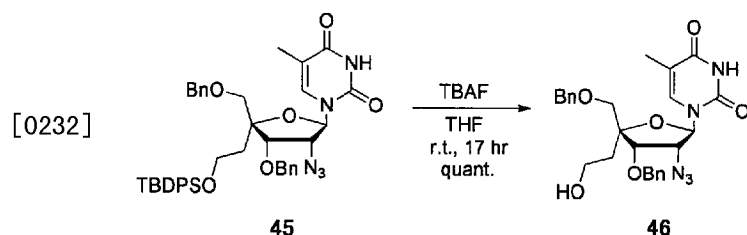
[0227] (11)化合物45的合成



[0229] 在氮气流下,在上述(10)中得到的化合物44(2.03g, 2.38mmol)的无水N,N-二甲基甲酰胺溶液(20mL)中加入叠氮化钠(464mg, 7.14mmol),在室温搅拌13小时。在反应液中加入水,以二乙醚萃取3次,接着以饱和食盐水清洗1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(150g, 正己烷:乙酸乙酯=2:1(v/v))纯化得到的粗产物(2.20g),作为白色泡状物质得到化合物45(1.80g, 定量)。

[0230] 得到的化合物45的物性数据如下:熔点46-49℃; $[\alpha]_D^{25} -5.1$ (c 1.00, CHCl₃); IR (KBr): 3179, 3068, 2929, 2857, 2109, 1694, 1470, 1428, 1268 cm⁻¹; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.02(s, 9H), 1.56(s, 3H), 1.77(ddd, J=6.5, 8.0, 14.5Hz, 1H), 2.15(dt, J=5.0, 14.5Hz, 1H), 3.44, 3.91(AB, J=11.0Hz, 2H), 3.70-3.85(m, 2H), 3.97(t, J=6.0Hz, 1H), 4.28(d, J=6.0Hz, 1H), 4.42, 4.48(AB, J=11.5Hz, 2H), 4.48, 4.78(AB, J=11.5Hz, 2H), 5.99(d, J=6.0Hz, 1H), 7.20-7.63(m, 20H), 7.49(s, 1H), 8.66(s, 1H); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 12.2, 19.2, 27.0, 35.4, 59.4, 65.3, 73.6, 73.6, 74.4, 79.2, 86.1, 87.7, 111.2, 127.7, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6, 128.8, 129.8, 128.9, 133.6, 135.4, 135.7, 137.0, 137.3, 150.3, 163.6; MS(FAB): m/z 746(M+H⁺), 高分辨率MS(FAB): 计算值C₄₂H₄₈N₅O₆Si (M+H⁺): 746.3374. 实测值: 746.3404.

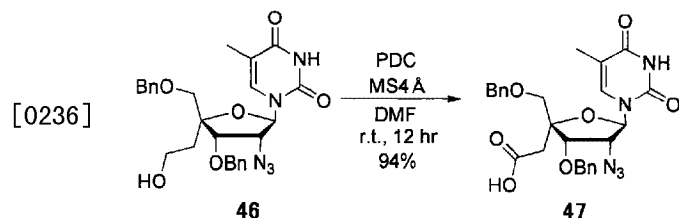
[0231] (12)化合物46的合成



[0233] 在氮气流下,在上述(11)中得到的化合物45(1.78g, 2.39mmol)的无水四氢呋喃溶液(20mL)中滴加四正丁基氟化铵(1M四氢呋喃溶液, 2.6mL, 2.60mmol),在室温搅拌17小时。在反应液中加入水,由乙酸乙酯萃取3次,以饱和食盐水清洗有机层1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(75g,正己烷:乙酸乙酯=1:1(v/v))纯化得到的粗产物(2.20g),作为白色泡状物质得到化合物46(1.22g, 定量)。

[0234] 得到的化合物46的物性数据如下:熔点45-50℃; $[\alpha]_D^{25} +10.2$ (c 1.00, CHCl₃); IR (KBr): 3441, 3181, 3063, 2927, 2108, 1693, 1469, 1455, 1267 cm⁻¹; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.56(s, 3H), 1.66(br, 1H), 1.76(dt, J=6.0, 15.0Hz, 1H), 2.21(dt, J=6.0, 15.0Hz, 1H), 3.44, 3.82(AB, J=10.5Hz, 2H), 3.75(t, J=6.0Hz, 2H), 4.04(t, J=6.0Hz, 1H), 4.30(d, J=6.0Hz, 1H), 4.47, 4.53(AB, J=11.5Hz, 2H), 4.55, 4.83(AB, J=12.0Hz, 2H), 6.10(d, J=6.0Hz, 1H), 7.22-7.38(m, 10H), 7.44(s, 1H), 8.34(s, 1H); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 12.2, 34.9, 58.3, 65.0, 73.4, 73.8, 74.6, 79.6, 86.4, 87.9, 111.5, 127.8, 128.2, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 135.4, 136.9, 137.1, 150.5, 163.8; MS(FAB): m/z 508(M+H⁺), 高分辨率MS(FAB): 计算值C₂₆H₃₀N₅O₆ (M+H⁺): 508.2196. 实测值: 508.2204.

[0235] (13)化合物47的合成

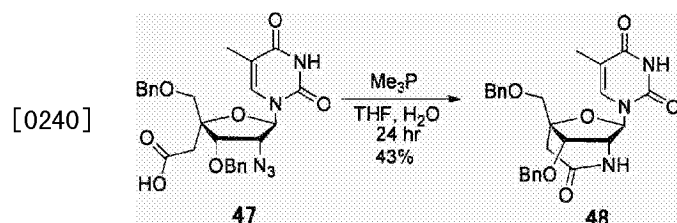


[0237] 在氮气流下,在上述(12)中得到的化合物46(1.22g, 2.40mmol)的N,N-二甲基甲酰胺溶液(20mL)中加入粉末状的分子筛 4Å(3.0g)和重铬酸吡啶鎓(10.9g, 28.8mmol),在室温搅拌12小时。在反应液中加入乙酸(5.0mL)和水,以乙酸乙酯稀释,硅藻土过滤。由乙酸乙

酯萃取滤液3次,以草酸水溶液(0.4M,200mL)清洗有机层1次,以草酸铵水溶液(0.2M,200mL)清洗有机层1次,接着以饱和食盐水1次清洗有机层后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(75g,正己烷:乙酸乙酯:乙酸=50:50:1(v/v/v))纯化得到的粗产物(3.20g),作为白色泡状物质得到化合物47(1.18g,收率94%)。

[0238] 得到的化合物47的物性数据如下:熔点78–81℃; $[\alpha]_D^{25} -29.4$ (c1.00, CHCl₃); IR (KBr): 3510, 3179, 3033, 2929, 2108, 1705, 1470, 1455, 1269, 1213 cm⁻¹; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.56(s, 3H), 2.71, 2.88(AB, J=16.5Hz, 2H), 3.77, 3.94(AB, J=10.0Hz, 2H), 3.99(dd, J=5.5, 7.0Hz, 2H), 4.37(d, J=5.5Hz, 1H), 4.53, 4.61(AB, J=10.5Hz, 2H), 4.49, 4.88(AB, J=11.0Hz, 2H), 6.22(d, J=7.0Hz, 1H), 7.20–7.48(m, 11H), 9.65(s, 1H); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 12.1, 38.0, 65.0, 73.8, 74.0, 75.3, 80.3, 85.3, 86.4, 111.7, 127.8, 128.1, 128.2, 128.5, 128.5, 128.9, 135.6, 136.8, 137.0, 150.1, 164.4, 175.1; MS(FAB): m/z 522(M+H⁺), 高分辨率MS(FAB): 计算值C₂₆H₂₈N₅O₇(M+H⁺): 522.1989. 实测值: 522.1979。

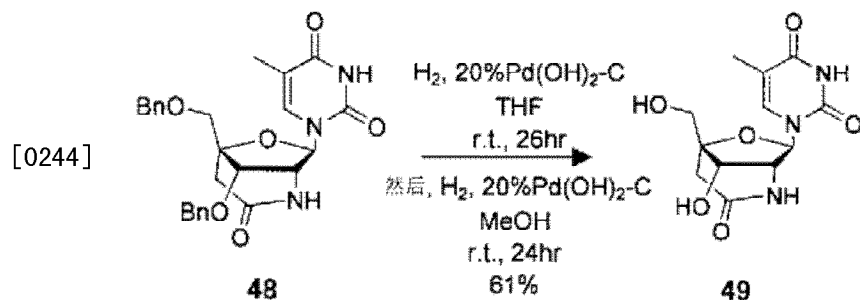
[0239] (14)化合物48的合成



[0241] 在上述(13)中得到的化合物47(241mg, 0.462mmol)的四氢呋喃/水(5:1(v/v))溶液(241mg, 0.462mmol, 6mL)中滴加三甲基磷(1M甲苯溶液, 0.55mL, 0.550mmol),在室温搅拌24小时。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(10g,氯仿:甲醇=30:1(v/v))纯化得到的粗产物(293mg),作为白色粉末得到化合物48(106mg,收率43%)。

[0242] 得到的化合物48的物性数据如下:熔点112–114℃; $[\alpha]_D^{21} +78.9$ (c1.00, CHCl₃); IR (KBr): 3500, 3169, 3063, 2927, 1684, 1454, 1367, 1273, 1211 cm⁻¹; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.36(d, J=1.0Hz, 3H), 2.40, 2.57(AB, J=18.0Hz, 2H), 3.58, 3.72(AB, J=11.0Hz, 2H), 4.05(dd, J=3.5, 5.5Hz, 2H), 4.24(d, J=3.5Hz, 1H), 4.54, 4.58(AB, J=11.5Hz, 2H), 4.51, 4.65(AB, J=11.5Hz, 2H), 5.76(s, 1H), 6.86(br, 1H), 7.24–7.35(m, 10H), 7.92(d, J=1.0Hz, 1H), 9.40(br, 1H); ¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃): δ 11.9, 38.6, 55.7, 68.7, 70.6, 71.9, 73.6, 83.8, 90.1, 109.6, 127.5, 127.9, 128.0, 128.2, 128.4, 128.7, 135.5, 137.0, 137.1, 150.7, 164.2, 169.6; MS(FAB): m/z 478(M+H⁺), 高分辨率MS(FAB): 计算值C₂₆H₂₈N₃O₆(M+H⁺): 478.1978. 实测值: 478.1983。

[0243] (15)化合物49的合成

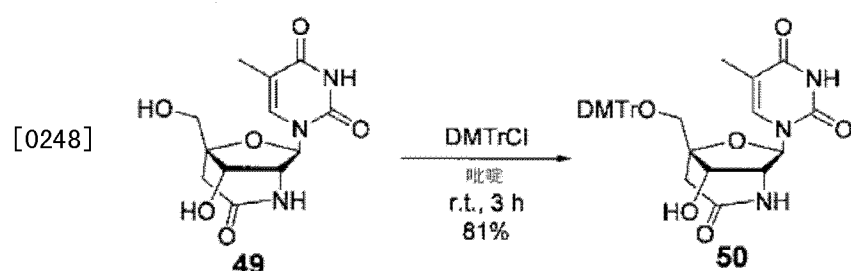


[0245] 在氮气流下,在上述(14)中得到的化合物48(50mg, 0.105mmol)的四氢呋喃溶液

(2mL)中加入20%(v/v)氢氧化钡碳(50mg),氢气气流下,在室温搅拌26小时。由折叠滤纸过滤后,以甲醇清洗后,蒸馏除去溶剂。加入甲醇(2mL)和20%(v/v)氢氧化钡碳(50mg),再在氢气气流下搅拌24小时。由折叠滤纸过滤后,以甲醇清洗后,蒸馏除去溶剂。以甲醇进行再结晶,作为白色固体,得到化合物49(19.1mg,收率61%)。

[0246] 得到的化合物49的物性数据如下: $[\alpha]_D^{23}+36.5$ (c 0.200, CH₃OH); IR(KBr): 3449, 3318, 3175, 3060, 2926, 2819, 1707, 1651, 1469, 1386, 1272, 1215 cm⁻¹; ¹H-NMR(300MHz, CD₃OD): δ 1.86(d, J=1.0Hz, 3H), 2.29, 2.46(AB, J=18.0Hz, 2H), 3.69, 3.75(AB, J=12.5Hz, 2H), 3.83(d, J=4.0Hz, 1H), 4.34(d, J=4.0Hz, 1H), 5.69(s, 1H), 8.36(d, J=1.0Hz, 1H); ¹³C-NMR(100.53MHz, CD₃OD): δ 12.5, 38.8, 60.0, 61.8, 64.4, 86.0, 91.0, 110.1, 137.8, 152.1, 166.6, 173.3; MS(FAB): m/z 298(M+H⁺), 高分辨率MS(FAB): 计算值C₂₆H₂₈N₃O₆(M+H⁺): 298.1039. 实测值: 298.1044。

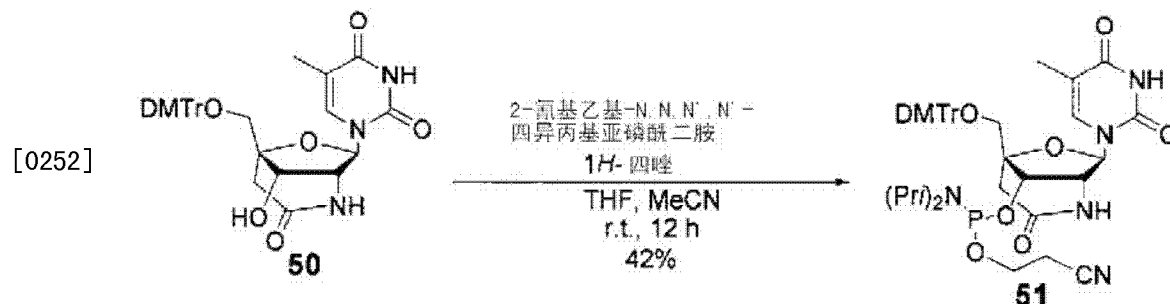
[0247] (16)化合物50的合成



[0249] 在氮气流下,在上述(15)中得到的化合物49(28mg, 0.094mmol)的无水吡啶溶液(2mL)中,在0℃加入4,4'-二甲氧基氯化三苯甲烷(95.7mg, 0.283mmol),在室温搅拌3小时。0℃在反应液中加入饱和碳酸氢钠水骤冷,由二氯甲烷萃取3次。以饱和食盐水清洗有机层1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(5.0g, 氯仿:甲醇=20:1)纯化得到的粗产物(159mg),作为白色泡状固体得到化合物50(45.9mg, 收率81%)。

[0250] 得到的化合物50的物性数据如下: $[\alpha]_D^{23}+80.7$ (c 1.00, CHCl₃); IR(KBr): 3562, 3341, 3062, 2933, 2838, 1704, 1657, 1608, 1509, 1465, 1253 cm⁻¹; ¹H-NMR(400MHz, CD₃OD): δ 1.21(d, J=1.0Hz, 3H), 2.42(s, 2H), 3.36(s, 2H), 3.77(s, 6H), 3.93(d, J=4.0Hz, 1H), 4.56(d, J=4.0Hz, 1H), 5.67(s, 1H), 6.86-7.48(m, 13H), 7.90(d, J=1.0Hz, 1H); ¹³C-NMR(100MHz, CD₃OD): δ 12.26, 39.34, 55.72, 59.80, 64.27, 65.71, 79.46, 85.55, 88.07, 91.72, 110.64, 114.27, 128.20, 129.02, 129.46, 131.46, 136.40, 136.61, 136.90, 145.76, 152.01, 160.36, 166.56, 173.01; MS(FAB): m/z 600(M+H⁺), 高分辨率MS(FAB): 计算值C₂₆H₂₈N₃O₆(M+H⁺): 600.2346. 实测值: 600.2347。

[0251] (17)化合物51的合成



[0253] 在氮气流下,在上述(16)中得到的化合物50(72mg,0.120mmol)的无水四氢呋喃/乙腈(3:1(v/v))溶液(2.0mL)中加入1H-四唑(10.1mg,0.144mmol),加入2-氰乙基-N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(46μL,0.14mmol),在室温搅拌12小时。在0℃在反应液中加入饱和碳酸氢钠水进行骤冷,由二氯甲烷萃取3次。以饱和碳酸氢钠水清洗1次有机层,以饱和食盐水清洗1次有机层后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(3.0g,氯仿:甲醇=20:1)纯化得到的粗产物(99mg),得到粗产物(70.2mg,73%)。在二氯甲烷中溶解得到的粗产物,通过添加到正己烷中进行再沉淀,作为白色固体得到化合物51(40.1mg,收率42%)。

[0254] 得到的化合物51的物性数据如下:³¹P-NMR(161.83MHz,CHCl₃):δ149.13,150.91;MS(FAB):m/z 800(M+H⁺),高分辨率MS(FAB):计算值C₂₆H₂₈N₃O₆(M+H⁺):800.3424.实测值:800.3406。

[0255] (实施例6)寡核苷酸类似物的合成和纯化

[0256] 由ExpediteTM8909(ABI公司生产),以0.2μmol量级合成含有在上述实施例5中得到的化合物51的10mer的寡核苷酸类似物(化合物52~55:在以下的表3中表示)。但是,省略在标准的亚磷酰胺步骤中的加帽工序。另外,化合物51(亚酰胺体(amidite)单元)溶解在四氢呋喃中使用。另外,在表3中,化合物51表示为X。亚酰胺体单元(化合物51)与5'-末端羟基的偶合时间从1.5分钟(标准条件)延长为30分钟。以0.05M碳酸钾的甲醇溶液处理5'-末端被DMTr基保护且被固相支持的寡核苷酸类似物,以5%(w/v)盐酸中和处理后,蒸馏除去溶剂。将得到的粗产物由凝胶过滤柱NAPTM10Column(GE Health Care公司生产)粗纯化后,由反相HPLC(SHIMADZU LC-10AT_{vp},SHIMADZU SPD-10AT_{vp},SHIMADZU CTO-10AT_{vp},作为分离柱使用WatersXBridgeTM0ST C₁₈2.5μm(10mm×50mm))纯化。

[0257] 合成的寡核苷酸类似物(化合物52~55)的纯度,由反相HPLC(WatersXBridgeTMShield RP182.5μm(4.6mm×50mm)确认(条件:0.1M三乙基乙酸铵缓冲液(pH7.0)中,以1mL/分钟的30分钟的7→13%(v/v)乙腈的梯度)。另外,分子量由MALDI-TOF-MASS测定决定。在表3中表示结果。

[0258] [表3]

	寡核苷酸	MALDI-TOF-MASS	
		计算值 (M-H ⁻)	实测值 (M-H ⁻)
[0259]	5'-TTTTTXXXXT-3' (化合物52)	3034.00	3033.71
	5'-TTTXXTTTTT-3' (化合物53)	3089.03	3088.89
	5'-TTTXXTXXTT-3' (化合物54)	3144.07	3145.94
	5'-TTTTTTTTXT-3' (化合物55)	3034.00	3035.17

[0260] (实施例7)熔解温度(T_m)的测定

[0261] 退火处理上述实施例5中合成的作为寡核苷酸链的化合物52~54(反义链)与正义链(3'-AAAAAAAAA-5')后,通过测定T_m值,调查反义链的杂交链形成能力。

[0262] 以沸腾水浴加热包含100mM NaCl、10mM磷酸钠缓冲液(pH7.2)、4μM反义链和4μM正义链的样品溶液(130μL)后,以10小时冷却到室温。为了防止在分光光度计(Shimadzu,UV-1650PC)的比色皿室内结露而通入氮气流,将样品溶液缓慢冷却到5℃,再在10℃保持20分

钟后,开始测定。使温度以每分钟升0.5℃的方式上升到85℃,以0.1℃间隔地测定在260nm处的紫外部分吸收。另外,为了防止由温度上升产生浓度变化,比色皿使用带盖的比色皿。在表4中表示结果。

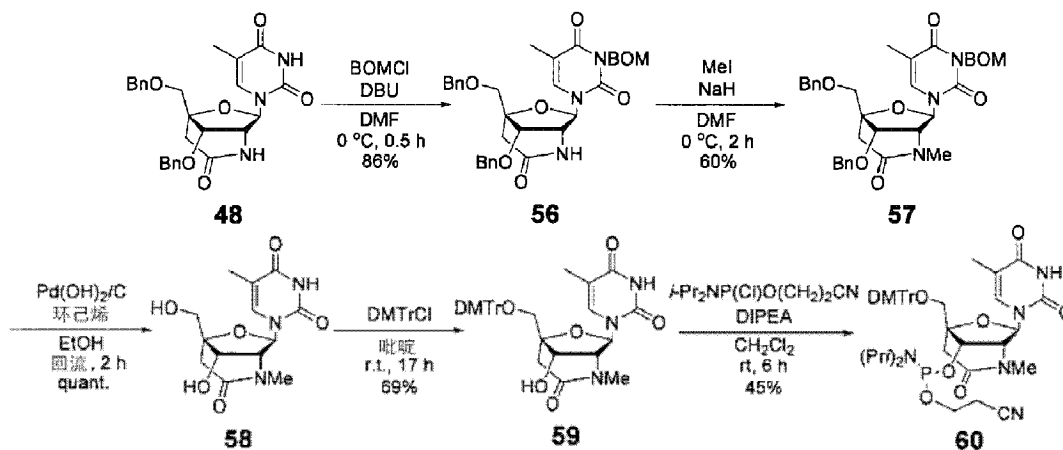
[0263] [表4]

反义链	正义链			
	RNA互补链		DNA互补链	
	T _m (°C)	ΔT _m /mod.(°C)	T _m (°C)	ΔT _m /mod.(°C)
[0264] 5'-TTTTTTTTTT-3' (化合物21)	19		20.9	
5'-TTTTXTTTT-3' (化合物52)	19.2	+0.2	15.7	-5.2
5'-TTTXTXTTTT-3' (化合物53)	28.3	+4.7	19.5	-0.7
5'-TTTXTXTXTT-3' (化合物54)	33.3	+4.4	26.9	+2.0

[0265] $\Delta T_m/\text{mod.} = \Delta T_m/\text{单位修饰}$

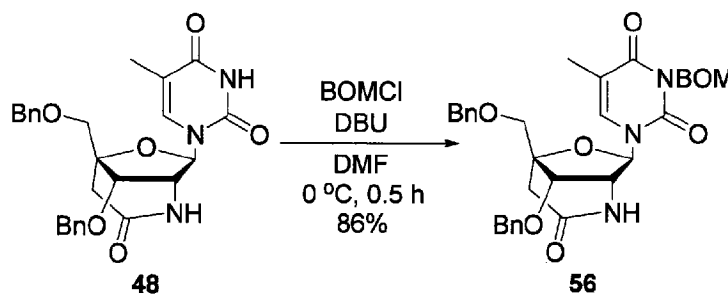
[0266] 从表4可知,相比于对单链DNA的亲合性,本发明的寡核苷酸类似物对单链RNA的亲合性高,可见人工核酸向寡核苷酸的导入比例越高,越可以观测到T_m值的上升。因此,可以认为本发明的核苷酸类似物在适合于反义法的寡核苷酸合成中有用。

[0267] (实施例8)核苷类似物:N2'-甲基-2'-氨基-3'-O-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)磷]-5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-N,4'-C-氧代亚乙基胸苷(化合物60;amide6NMe)的合成



[0268]

(1) 化合物 56 的合成

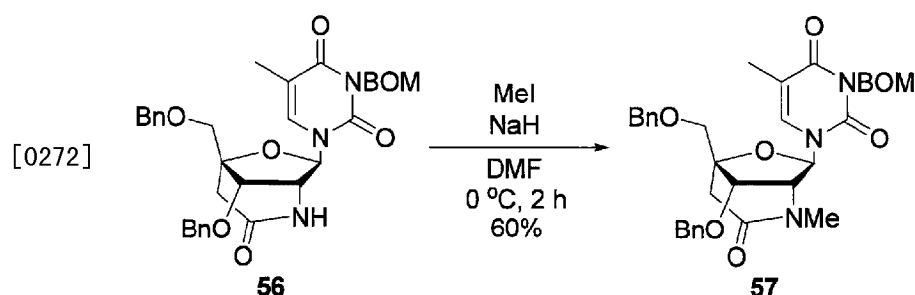


[0269] 在氮气流下,在化合物48(94mg,0.197mmol)的无水N,N-二甲基甲酰胺溶液(2.0mL)中,在0℃加入1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(0.12mL,0.79mmol)和苄基氯甲基醚(55μL,0.39mmol),搅拌0.5小时。在0℃在反应液中加入饱和碳酸氢钠水进行骤冷,

由乙酸乙酯萃取3次。以水清洗有机层1次,以饱和食盐水清洗有机层后1次,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(5.0g,正己烷:乙酸乙酯=1:1)纯化得到的粗产物(112mg),作为白色泡状固体得到化合物56(101mg,收率86%)。

[0270] 得到的化合物56的物性数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.43(d, $J=1.0\text{Hz}$, 3H), 2.45, 2.60(AB, $J=17.5\text{Hz}$, 2H), 3.59, 3.76(AB, $J=10.5\text{Hz}$, 2H), 3.96(dd, $J=4.0$, 5.5Hz, 1H), 4.19(d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 4.51, 4.63(AB, $J=11.0\text{Hz}$, 2H), 4.55, 4.60(AB, $J=11.0\text{Hz}$, 2H), 4.69(s, 2H), 5.43, 5.46(AB, $J=9.5\text{Hz}$, 2H), 5.74(s, 1H), 6.15(d, $J=5.5\text{Hz}$, 1H), 7.25-7.38(m, 15H), 7.92(d, $J=1.0\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 12.53, 38.68, 56.09, 70.27, 70.57, 72.27, 72.37, 73.69, 83.76, 90.53, 109.48, 127.55, 127.64, 127.71, 127.91, 128.30, 128.34, 128.58, 128.73, 133.97, 136.59, 136.88, 137.82, 150.79, 163.29, 169.26。

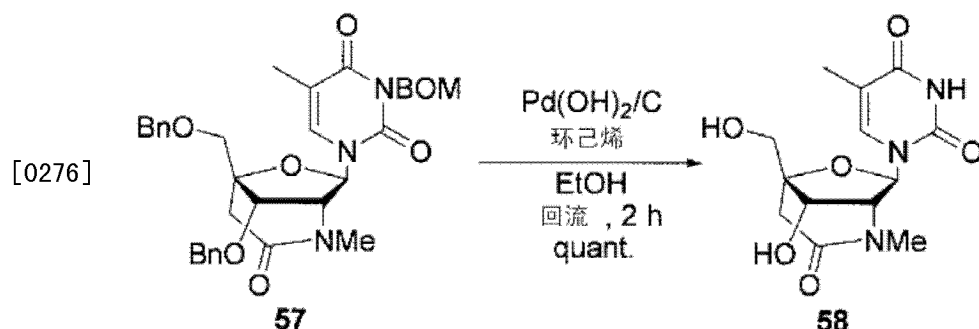
[0271] (2)化合物57的合成



[0273] 在氮气流下,在上述(1)中得到的化合物56(130mg, 0.218mmol)的无水N,N-二甲基甲酰胺溶液(2.0mL)中,在0℃加入氢氧化钠(10.4mg, 0.260mmol),搅拌0.5小时后,在0℃加入甲基碘(68 μL , 1.1mmol)搅拌2小时。在0℃在反应液中加入水骤冷,以二乙醚萃取3次。以饱和食盐水清洗有机层1次后,以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂,以硅胶柱色谱(5.0g,正己烷:乙酸乙酯=3:2)纯化得到的粗产物(139mg),作为白色泡状固体得到化合物57(79.6mg,收率60%)。

[0274] 得到的化合物57的物性数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.45(d, $J=1.0\text{Hz}$, 3H), 2.42, 2.60(AB, $J=17.0\text{Hz}$, 2H), 3.07(s, 3H), 3.68, 3.74(AB, $J=12.0\text{Hz}$, 2H), 3.82(d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 4.16(d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 4.55, 4.60(AB, $J=11.0\text{Hz}$, 2H), 4.70(s, 2H), 5.43, 5.47(AB, $J=9.5\text{Hz}$, 2H), 4.56(s, 2H), 5.66(s, 1H), 7.23-7.39(m, 15H), 7.91(d, $J=1.0\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 12.55, 34.17, 38.77, 63.11, 68.51, 70.20, 71.19, 72.27, 72.72, 73.64, 84.24, 88.87, 109.38, 127.52, 127.66, 127.70, 127.89, 128.27, 128.30, 128.32, 128.62, 128.69, 133.93, 136.69, 136.92, 137.81, 150.68, 163.35, 167.29。

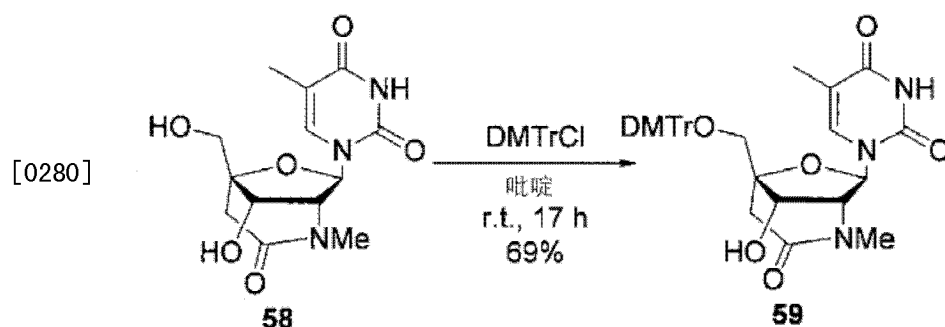
[0275] (3)化合物58的合成



[0277] 在20%氢氧化钡碳(91.0mg)的乙醇悬浊液(2.0mL)中加入在上述(2)中得到的化合物57(79.6mg, 0.130mmol)的乙醇溶液(8.0mL)和环己烯(1.3mL, 13mmol), 加热回流2小时。将氢氧化钡碳由折叠滤纸过滤后, 减压蒸馏除去溶剂, 以硅胶柱色谱(2.0g, 氯仿: 甲醇=10:1)纯化得到的粗产物, 作为白色粉末得到化合物58(40.8mg, 定量)。

[0278] 得到的化合物58物性数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 1.77(d, $J=1.0\text{Hz}$, 3H), 2.21, 2.39(AB, $J=18.0\text{Hz}$, 2H), 3.02(s, 3H), 3.57, 3.64(AB, $J=12.5\text{Hz}$, 2H), 3.80(d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 4.23(d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 5.60(s, 1H), 8.18(d, $J=1.0\text{Hz}$, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD_3OD): δ 12.54, 34.92, 39.01, 61.62, 64.88, 67.70, 86.54, 89.34, 110.21, 137.46, 152.07, 166.63, 170.82。

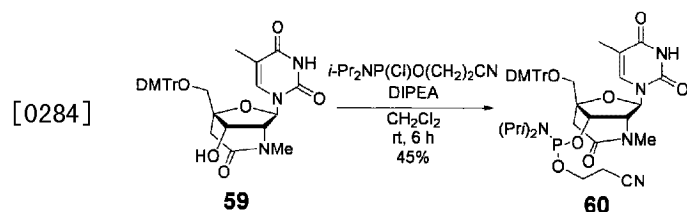
[0279] (4)化合物59的合成



[0281] 在氮气流下, 在无水吡啶(2.0mL)中溶解在上述(3)中得到的化合物58(26.8mg, 0.0861mmol), 在0℃加入4,4'-二甲氧基氯化三苯甲烷(175mg, 0.567mmol), 在室温搅拌17小时。在0℃, 在反应液中加入饱和碳酸氢钠水骤冷, 由二氯甲烷萃取3次。以饱和食盐水清洗有机层1次后, 以硫酸钠干燥。减压蒸馏除去溶剂, 以硅胶柱色谱(5.0g, 氯仿: 甲醇=25:1)纯化得到的粗产物(320mg), 作为白色泡状固体得到化合物59(36.6mg, 收率69%)。

[0282] 得到的化合物59的物性数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.29(s, 3H), 2.44, 2.53(AB, $J=17.5\text{Hz}$, 2H), 3.08(s, 3H), 3.33, 3.37(AB, $J=12.0\text{Hz}$, 6H), 3.75(s, 3H), 3.76(s, 3H), 3.94(d, $J=3.5\text{Hz}$, 1H), 4.49(d, $J=3.5\text{Hz}$, 1H), 5.61(s, 1H), 6.80-7.41(m, 14H), 7.90(s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 11.91, 34.51, 38.54, 55.20, 62.87, 65.43, 65.98, 84.96, 86.88, 88.60, 110.39, 111.34, 127.20, 128.07, 130.10, 134.92, 135.08, 144.05, 152.35, 158.69, 164.37, 168.32。

[0283] (5)化合物60的合成

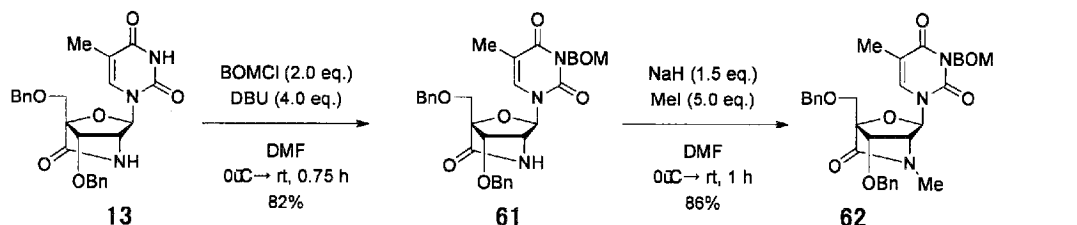


[0285] 以吡啶、甲苯将在上述(4)中得到的化合物59(116mg, 0.189mmol)共沸后, 在氮气流下制成无水二氯甲烷溶液(1.9mL), 加入N-乙基异丙基胺(0.20mL, 1.13mmol)。然后, 在0℃加入2-氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰二胺(85 μL , 0.378mmol), 在室温搅拌6小时。加入饱和碳酸氢钠水, 搅拌片刻后, 由乙酸乙酯萃取, 以水、饱和食盐水清洗有机层后, 以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂, 以柱色谱(氯仿: 甲醇: 三乙胺=30:1:0.05)纯化得到的粗产物, 得到

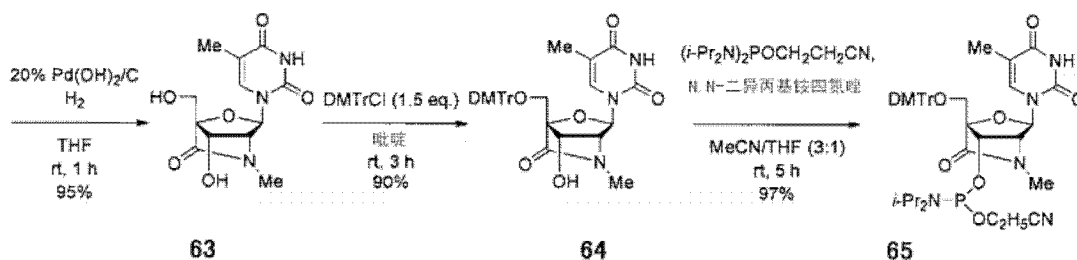
白色泡状固体。在二氯甲烷中溶解得到的白色泡状固体,通过添加在正己烷中进行再沉淀,作为白色粉体得到化合物60(70mg,收率45%)。

[0286] 得到的化合物60的物性数据如下: ^{131}P -NMR(161.83MHz, CDCl_3): δ 148.84, 149.97。

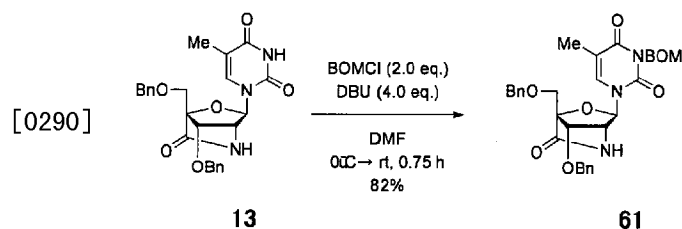
[0287] (实施例9)核苷类似物:N2'-甲基-2'-氨基-3'-O-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)磷]-5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-N,4'-C-氧代亚甲基胸苷(化合物65:amideNMe)的合成



[0288]



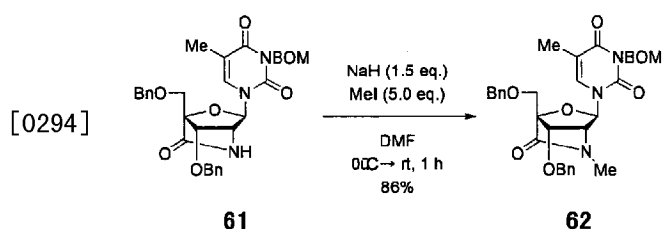
[0289] (1)化合物61的合成



[0291] 在氮气流下,在N,N-二甲基甲酰胺(0.7mL)中溶解化合物13(30mg,0.065mmol),冰冷却下加入1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(38.6 μL ,0.259mmol),搅拌15分钟后,加入苄基氯甲基醚(17.7 μL ,0.129mmol),冰冷却下搅拌30分钟。加入甲醇,搅拌后,蒸馏除去溶剂,以乙酸乙酯稀释。加入水,由乙酸乙酯萃取后,以饱和食盐水清洗有机层,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=3:1 $\rightarrow$ 1:1)纯化得到的粗产物,作为白色泡状固体得到化合物61(31mg,收率82%)。

[0292] 得到的化合物61的物性数据如下: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 61.6$ (c 0.700, CHCl_3 , 26 $^{\circ}\text{C}$). ^1H -NMR(400MHz, CDCl_3): δ 1.62(3H, s), 3.95, 4.10(2H, AB, J=12Hz), 4.11(1H, s), 4.22(1H, s), 4.52, 4.56(2H, AB, J=13.5Hz), 4.59, 4.64(2H, AB, J=11Hz), 4.72, 4.69(2H, AB, J=13Hz), 5.43(1H, s), 5.43, 5.48(2H, AB, J=9.5Hz), 7.54-7.20(15H, m), 7.54(1H, s). ^{13}C -NMR(100.53MHz, CDCl_3): δ 12.92, 58.47, 63.06, 70.26, 72.31, 72.42, 73.98, 78.72, 86.37, 86.58, 109.99, 127.68, 127.72, 127.75, 128.09, 128.29, 128.31, 128.52, 128.54, 133.93, 136.27, 137.40, 137.76, 150.63, 163.15, 172.57。

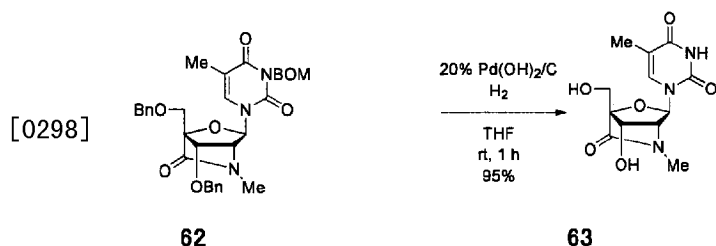
[0293] (2)化合物62的合成



[0295] 在氮气流下,在N,N-二甲基甲酰胺(0.5mL)中溶解在上述(1)中得到的化合物61(30mg,0.051mmol),冰冷却下加入氢化钠,搅拌30分钟。冰冷却下加入甲基碘(15.9 μ L,0.255mmol),边搅拌边使温度缓慢上升到室温。30分钟后,加入水搅拌10分钟后,由乙酸乙酯萃取。以饱和食盐水清洗有机层后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=3:1 $\rightarrow$ 1:1)纯化得到的粗产物,作为白色泡状固体得到化合物62(26.1mg,收率86%)。

[0296] 得到的化合物62的物性数据如下:[α]_D+39.0(c 0.350,CHCl₃,23 $^{\circ}$ C).¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ 1.65(3H,s),2.96(3H,s),3.95,4.10(2H,AB,J=11.5Hz),4.01(1H,s),4.06(1H,s),4.50,4.59(2H,AB,J=12Hz),4.59,4.63(2H,AB,J=11Hz),4.70(2H,s),5.40(1H,s),5.44,5.48(2H,AB,J=9.5Hz),7.19-7.39(15H,m),7.52(1H,s).¹³C-NMR(100.53MHz,CDCl₃): δ 12.92,28.39,63.23,64.52,70.24,72.26,72.54,73.84,78.06,84.42,87.09,109.94,127.58,127.62,127.65,127.70,127.99,128.24,128.27,128.48,128.50,133.78,136.39,137.41,137.72,150.52,163.09,170.93。

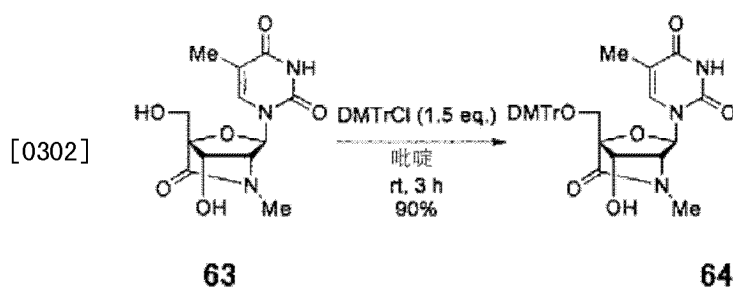
[0297] (3)化合物63的合成



[0299] 在氮气流下,在四氢呋喃(2mL)中溶解在上述(2)中得到的化合物62(130mg,0.218mmol),加入20%氢氧化钯碳(130mg),氢气气流下室温搅拌1小时。自然过滤反应液,以温甲醇清洗后,蒸馏除去溶剂。以柱色谱(氯仿:甲醇=10:1)纯化得到的粗产物,作为白色固体得到化合物63(61.7mg,收率95%)。

[0300] 得到的化合物63的物性数据如下:[α]_D+63.7(c 0.900,CHCl₃,26 $^{\circ}$ C).¹H-NMR(400MHz,DMSO-D₆): δ 1.77(3H,s),2.88(3H,s),3.67,3.84(2H,AB,J=12.5Hz),4.03(1H,s),4.12(1H,s),5.28(1H,s),5.38(1H,s),5.90(1H,s),7.73(1H,s),11.44(1H,s).¹³C-NMR(100.53MHz,CD₃OD): δ 12.64,28.65,55.75,68.53,72.85,85.48,89.99,110.93,137.24,151.96,166.45,174.14。

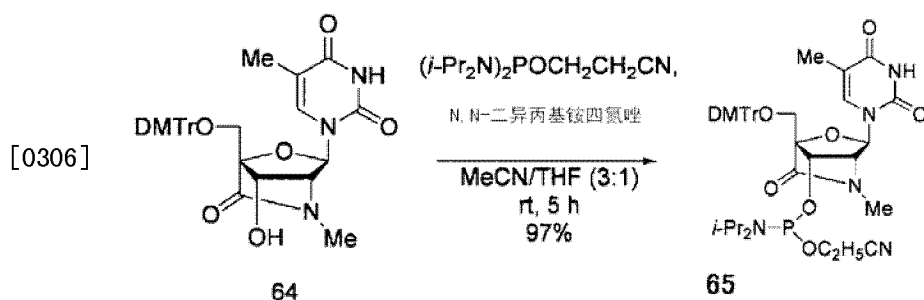
[0301] (4)化合物64的合成



[0303] 在氮气流下,在无水吡啶(2mL)中溶解以吡啶共沸的在上述(3)中得到的化合物63(61.7mg,0.208mmol),加入4,4'-二甲氧基氯化三苯甲烷(106mg,0.311mmol),在室温搅拌3小时。加入饱和碳酸氢钠水,搅拌片刻后,由乙酸乙酯萃取,以水、饱和食盐水清洗有机层后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(氯仿:甲醇:三乙胺=20:1:0.05)纯化得到的粗产物,作为白色泡状固体得到化合物64(113mg,收率90%)。

[0304] 得到的化合物63的物性数据如下: $[\alpha]_D^{+2.0}$ (c 0.300, CHCl_3 , 25°C). $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.66(3H,s),2.97(3H,s),3.62,3.90(2H,AB,J=12.5Hz),3.77(6H,s),4.13(1H,s),4.42(1H,s),5.40(1H,s),6.82-6.85(4H,m),7.21-7.34(7H,m),7.43(2H,d,J=8Hz),7.77(1H,s),9.45(1H,s)。

[0305] (5)化合物65的合成



[0307] 在氮气流下,在无水乙腈/四氢呋喃(3:1)(23mL)中溶解以吡啶、甲苯共沸的上述(4)中得到的化合物64(1.18g,1.97mmol),加入N,N'-二异丙基铵四氮唑(253mg,1.48mmol)、2-氰乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(752 μ L,2.37mmol),室温下搅拌5小时。加入饱和碳酸氢钠水,搅拌片刻后,由乙酸乙酯萃取,以水、饱和食盐水清洗有机层后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(氯仿:甲醇:三乙胺=30:1:0.05)纯化得到的粗产物,得到白色泡状固体。在二氯甲烷中溶解得到的白色泡状固体,通过添加在正己烷中进行再沉淀,作为白色粉体得到化合物65(1.53g,收率97%)。

[0308] 得到的化合物65的物性数据如下: $^{31}\text{P-NMR}$ (161.83MHz, CDCl_3): δ 150.43,150.59。

[0309] (实施例10)寡核苷酸类似物的合成和纯化

[0310] 由ExpediteTM8909(ABI公司生产),以0.2 μ mol量级合成含有在上述实施例9中得到的化合物65的10mer寡核苷酸类似物(化合物66~69:在以下的表5中表示)。另外,化合物65(亚酰胺体单元)溶解在乙腈中使用。另外,在表5中,化合物65标记为X。亚酰胺体单元(化合物65)与5'-末端羟基的偶合时间从1.5分钟(标准条件)延长为5分钟。以饱和氨水处理5'-末端被DMTr基保护且被固相支持的寡核苷酸类似物,以5%(w/v)盐酸中和处理后,蒸馏除去溶剂。将得到的粗产物由凝胶过滤柱NAPTM10Column(GE Health Care公司生产)粗纯化后,由反相HPLC(SHIMADZU LC-10AT_{vp},SHIMADZU SPD-10AT_{vp},SHIMADZU CTO-10AT_{vp},作为分

离柱,使用WatersXBridge™OST C₁₈2.5μm(10mm×50mm))纯化。

[0311] 合成的寡核苷酸类似物(化合物66~69)的纯度,由反相HPLC(WatersXBridge™Shield RP182.5μm、(4.6mm×50mm))确认(条件:0.1M三乙基乙酸铵缓冲液(pH7.0)中,以1mL/分钟的30分钟的7→13%(v/v)乙腈的梯度)。另外,分子量由MALDI-TOF-MASS测定来决定。在表5中表示结果。

[0312] [表5]

	寡核苷酸	MALDI-TOF-MASS	
		计算值 (M-H ⁻)	实测值 (M-H ⁻)
[0313]	5'-TTTTTXXXXT-3' (化合物 66)	3034.00	3034.33
	5'-TTTXXTTTTT-3' (化合物 67)	3089.03	3089.46
	5'-TTTXXTXXTT-3' (化合物 68)	3144.07	3144.55
	5'-TTTTTTTTXT-3' (化合物 69)	3034.00	3034.29

[0314] (实施例11)熔解温度(T_m)的测定

[0315] 退火处理上述实施例10中合成的作为寡核苷酸链的化合物66~68(反义链)与正义链(3'-AAAAAAAAA-5')后,通过测定T_m值,调查反义链的杂交链形成能力。

[0316] 以沸腾水浴加热包含100mM NaCl、10mM磷酸钠缓冲液(pH7.2)、4μM反义链和4μM正义链的样品溶液(130μL)后,以10小时冷却到室温。为了防止在分光光度计(Shimadzu,UV-1650PC)的比色皿室内结露而通入氮气流,将样品溶液缓慢冷却到5℃,再在10℃保持20分钟后,开始测定。使温度以每分钟升0.5℃的方式上升到85℃,以0.1℃间隔地测定在260nm处的紫外部分吸收。另外,为了防止由温度上升产生浓度变化,比色皿使用带盖的比色皿。在表6中表示结果。

[0317] [表6]

[0318]

反义链	正义链			
	RNA互补链		DNA互补链	
	T _m (°C)	ΔT _m /mod.(°C)	T _m (°C)	ΔT _m /mod.(°C)
5'-TTTTTTTTTT-3' (化合物 21)	18.5		21.2	
5'-TTTTTXXXXT-3' (化合物 66)	24.0	+5.5	21.0	-0.2
5'-TTTXXTTTTT-3' (化合物 67)	33.7	+7.6	21.6	+0.2
5'-TTTXXTXXTT-3' (化合物 68)	39.7	+7.1	25.7	+1.5

[0319] $\Delta T_m/\text{mod.} = \Delta T_m/\text{单位修饰}$

[0320] 从表6可知,相比于对单链DNA的亲合性,本发明的寡核苷酸类似物对单链RNA的亲合性高,可见人工核酸向寡核苷酸的导入比例越高,越可以观察到T_m值的上升。因此,可以认为本发明的核苷酸类似物与2',4'-BNA/LNA同样在适合于反义法的寡核苷酸合成中有

用。

[0321] (实施例12)核酸酶抗性的评价

[0322] 关于在上述实施例2中合成的化合物20(amideNH)、在实施例6中合成的化合物55(amide6NH)和在实施例10中合成的化合物69(amideNMe)的各寡核苷酸,研究寡核苷酸相对于从3'侧分解的核酸外切酶的抗性。将现有的2',4'-BNA/LNA和NC(NH)(2',4'-BNANC(NH):交联结构中可以包含氮原子的不是酰胺的结构)作为对照。

[0323] 将含有750pmol寡核苷酸的缓冲液溶液(65μL)在37℃保持5分钟后,混合含有0.175mg/mL蛇毒磷酸二酯酶(*Crotalus admanteus* venom phosphodiesterase(CAVP):Pharmacia Biotech公司)的缓冲液溶液(35μL)。由HPLC(SHIMADZU LC-20AD、SPD-20A、CTO-20A、SIL-20AC,作为分析柱使用Waters×Bridge™ Shield RP182.5μm(4.6mm×50mm))经时地测定寡核苷酸的分解。使用的缓冲液组成(最终浓度)为50mM TrisHCl(pH8.0)、10mM MgCl₂,测定前充分脱气。HPLC的定量条件如下所示。

[0324] [HPLC定量条件]

[0325] 流动相:A液0.1M三乙基乙酸铵缓冲液、pH7.0

[0326] B液0.1M三乙基乙酸铵缓冲液:乙腈=1:1(v/v)、pH7.0

[0327] 梯度:5→11.4%(v/v)B液(16分钟)

[0328] 使用的柱:Waters×Bridge™ Shield RP18 2.5μm(4.6mm×50mm)

[0329] 流速:0.8mL/分钟

[0330] 柱温:50℃

[0331] 检测:UV(268nm)

[0332] 在图1中表示结果。图1中,“残存寡核苷酸(%)”表示相对于0时刻的未分解寡核苷酸(10mer),测定时刻的未分解寡核苷酸(10mer)的残存率。

[0333] 从图1可知,化合物20(amideNH)、化合物55(amide6NH)和化合物69(amideNMe)具有大大超出包含现有的2',4'-BNA/LNA的寡核苷酸的酶抗性。

[0334] (实施例13)寡核苷酸在血清(FBS)中的稳定性评价

[0335] 在10μL的25%FBS中混合1nmol的寡核苷酸(5'-(XTXTXTXTXT)-3',按照实施例10方法在序列中的X处导入实施例9中得到的化合物65),再加入灭菌水,将总量配制为25μL。将该溶液在37℃保温规定时间后,每确定时间各量取5μL,加热到90℃后,冰冷却,使FBS中的核酸分解酶失活。该样品在由HPLC解析之前保存在-80℃。为了进行HPLC解析,加入灭菌水,将总量调整为200μL,由HPLC(SHIMADZU LC-20AD、SPD-20A、CTO-20A、SIL-20AC)经时地测定寡核苷酸的分解。使用的缓冲液组成(最终浓度)为50mM TrisHCl(pH8.0)、10mM MgCl₂,测定前充分脱气。另外,为了比较研究,关于X为天然DNA-T的序列和X为LNA-T的序列也以同样的操作进行实验。

[0336] [HPLC定量条件]

[0337] 流动相:A液0.1M三乙基乙酸铵缓冲液、pH7.0

[0338] B液0.1M三乙基乙酸铵缓冲液:乙腈=1:1、pH7.0

[0339] 梯度:10→26%(v/v)B液(16分钟)

[0340] 使用的柱:Waters×Bridge™ Shield RP18 2.5μm(4.6mm×50mm)

[0341] 流速:0.8mL/分钟

[0342] 柱温:50℃

[0343] 检出:UV(268nm)

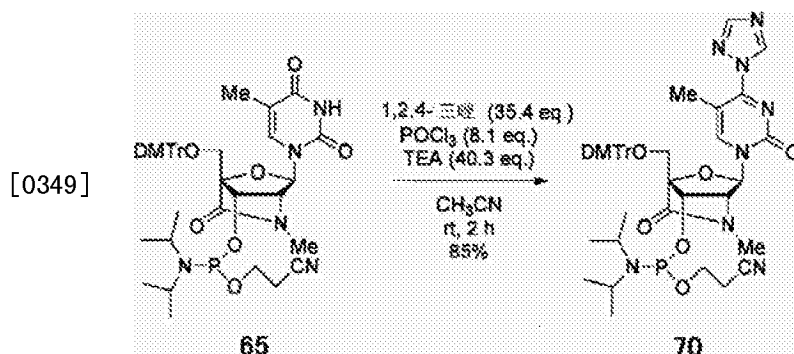
[0344] 在表7中表示结果。表7中,“残存寡核苷酸(%)”表示相对于0时刻的未分解寡核苷酸(10mer),测定时刻的未分解寡核苷酸(10mer)的残存率。

[0345] [表7]

	残存寡核苷酸 (%)			
[0346]	时间 (分钟)	X=DNA-T	X=LNA-T	X=化合物 65
	30	40	3	88
	60	15	2	63

[0347] 从表7可知,相比于由天然DNA构成的寡核苷酸和LNA修饰过的寡核苷酸,导入了本发明化合物65的寡核苷酸在血清中的稳定性远远提高,可以期待在体内(in vivo)的优异效果。

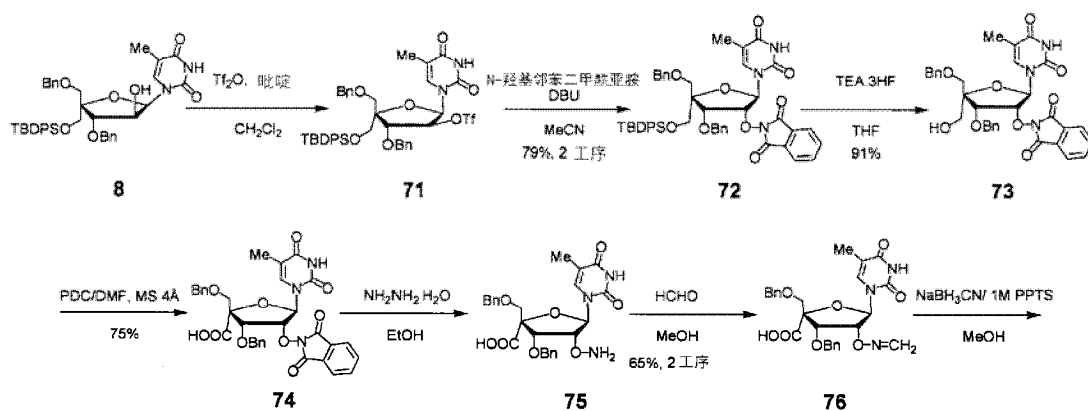
[0348] (实施例14)核苷类似物:N2'-甲基-2'-氨基-3'-O-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦]-5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-N,4'-C-氧代亚甲基-4-(1,2,4-三唑-1-基)胸苷(化合物70:胸苷类似物的三唑体、5-甲基胞嘧啶类似物等价体)的合成



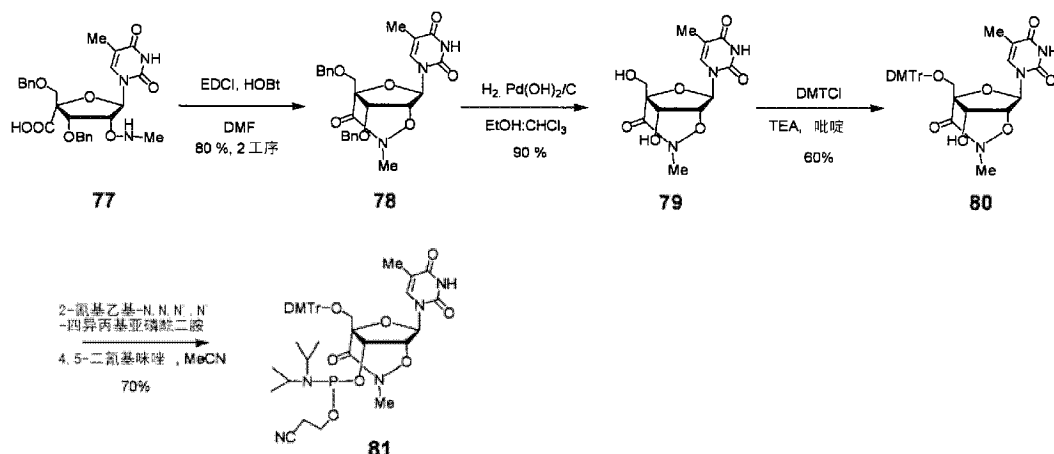
[0350] 在氮气流下,在无水乙腈(10mL)中溶解以吡啶、甲苯共沸的1,2,4-三唑(306mg, 4.43mmol),冰冷却下加入磷酰氯(94μL, 1.01mmol),剧烈搅拌10分钟。接着,加入三乙胺(700μL, 5.04mmol),剧烈搅拌1小时。冰冷却下,在无水乙腈(2mL)中溶解化合物65(100mg, 0.125mmol),在反应液中加入,室温剧烈搅拌2小时。加入饱和碳酸氢钠水,搅拌后,由乙酸乙酯萃取,以水、饱和食盐水清洗有机层后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=1:1)纯化得到的粗产物,作为白色泡状固体得到化合物70(90.4mg, 收率85%)。

[0351] 得到的化合物70的物性数据如下:³¹P-NMR(161.83MHz, CDCl₃):δ150.9, 149.6。

[0352] (实施例15)核苷类似物:N-甲基-3'-O-[2-氰基乙氧基(二异丙基氨基)膦]-5'-O-二甲氧基三苯甲基-2'-O,4'-C-氨基氧代亚甲基-5-甲基尿苷(化合物81:amideNC-NMe)的合成

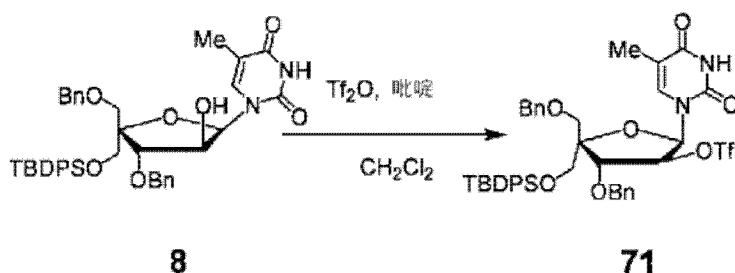


[0353]



[0354] (1) 化合物71的合成

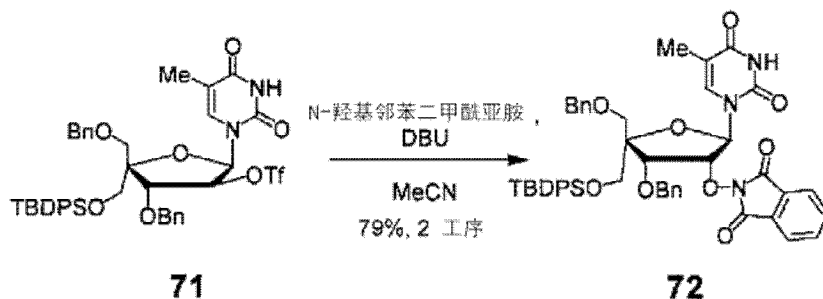
[0355]



[0356] 在化合物8(3mg, 4.24mmol)的二氯甲烷溶液(15mL)中,在0℃混合吡啶(1.5mL, 8.48mmol)和三氟甲磺酸酐(0.7mL, 2.828mmol),冰冷却下搅拌40分钟。加入冰冷却水,由二氯甲烷萃取,以水、饱和食盐水清洗有机层后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,在后述的反应中使用得到的化合物71(4.64g)。

[0357] (2) 化合物72的合成

[0358]

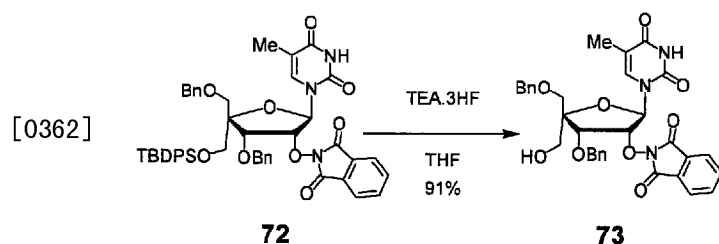


[0359] 在上述(1)中得到的化合物71的乙腈溶液(20mL)中加入N-羟基邻苯二甲酰亚胺(4.5mg, 27.66mmol)和1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(4.2mL, 27.66mmol),在室温搅

拌24小时。以二氯甲烷稀释,加入水后,由二氯甲烷萃取。以水和饱和食盐水清洗后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=2:1)纯化得到的粗产物,作为白色泡状固体得到化合物72(2.88g,收率79%(2工序))。

[0360] 得到的化合物72的物性数据如下: $[\alpha]_D^{25}=+43.0$ (c 1.00,CHCl₃);IR $\nu_{\max}$ (KBr): 3188,3067,2934,2862,1791,1730,1692,1465,1427,1421,1366,1267,1189,1106,973cm⁻¹; ¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ 1.08(9H,s),1.38(3H,s),3.65(1H,d,J=10.4Hz),4.02(1H,d,J=11.6Hz),4.09(1H,d,J=10.4Hz),4.22(1H,d,J=11.6Hz),4.48(1H,d,J=11.2Hz),4.52(1H,d,J=5.2Hz),4.55(1H,d,J=11.2Hz),4.73(1H,d,J=11.2Hz),4.85(1H,dd,J=3.2Hz,2.8Hz),5.13(1H,d,J=11.2Hz),6.40(1H,d,J=3.2Hz),7.16-7.86(26H,m)。

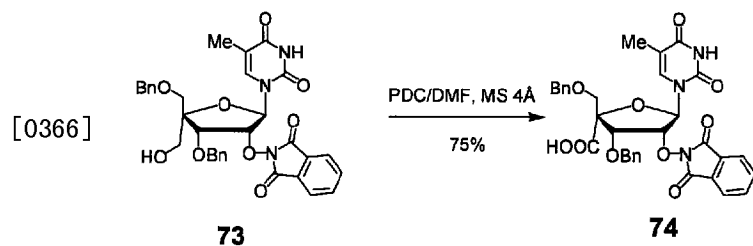
[0361] (3)化合物73的合成



[0363] 在上述(2)中得到的化合物72(2.88g,3.38mmol)的四氢呋喃溶液(15mL)中加入三乙胺三氢氟酸盐(5.6mL,33.8mmol),在70℃回流18小时。冰冷却下,在反应液中加入冰冷却水,由乙酸乙酯萃取,以饱和碳酸氢钠水和饱和食盐水清洗后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=1:1)纯化得到的粗产物,作为白色泡状固体得到化合物73(1.89g,收率91%)。

[0364] 得到的化合物73的物性数据如下: $[\alpha]_D^{25}=+39.1$ (c 1.00,CHCl₃);IR $\nu_{\max}$ (KBr): 3504,3181,3062,2881,1789,1733,1689,1466,1375,1272,1187,1105,1057,974cm⁻¹; ¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): δ 1.36(3H,s),3.84(1H,d,J=10.4Hz),3.92(1H,d,J=7.2Hz),3.96(1H,d,J=10.4Hz),4.12(1H,d,J=7.2Hz),4.49(1H,d,J=11.2Hz),4.54(1H,d,J=11.2Hz),4.63(1H,d,J=6Hz),4.74(1H,d,J=12Hz),4.93(1H,dd,J=6Hz,1.6Hz),5.16(1H,d,J=11.6Hz),6.35(1H,d,J=1.2Hz),7.15-7.87(15H,m),7.92(1H,br s)。

[0365] (4)化合物74的合成

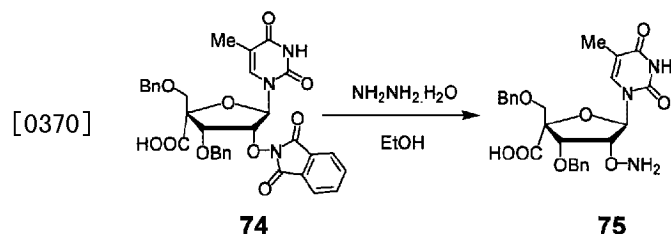


[0367] 在上述(3)中得到的化合物73的N,N-二甲基甲酰胺溶液(20mL)中加入分子筛 4Å(2g),搅拌10分钟。在反应液中加入重铬酸吡啶鎓(11.6g,30.8mmol),在室温搅拌16小时。在反应液中加入冰冷却水、乙酸(2mL)进行搅拌。由乙酸乙酯萃取产物,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=1:1→乙酸乙酯:甲醇=10:1)纯化,作为白色泡状固体得到化合物74(1.44g,收率75%)。

[0368] 得到的化合物74的物性数据如下: $[\alpha]_D^{26}=+23.9$ (c 1.00,CHCl₃);IR $\nu_{\max}$ (KBr):

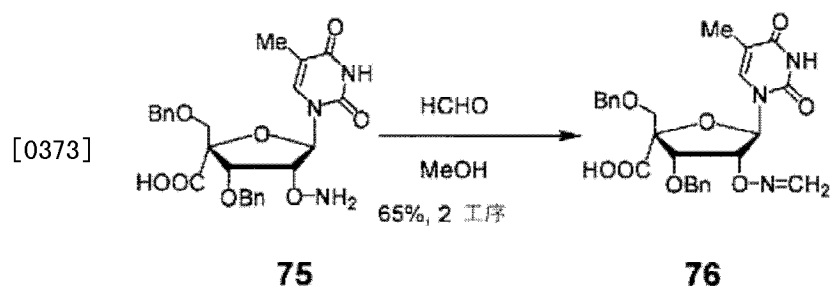
3178, 3066, 3032, 2873, 1790, 1736, 1468, 1376, 1275, 1187, 1125, 967 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.59(3H, s), 3.90(1H, d, $J=10.4\text{Hz}$), 4.11(1H, d, $J=10.4\text{Hz}$), 4.59(1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.63(1H, d, $J=11.6\text{Hz}$), 4.68(1H, d, $J=4.4\text{Hz}$), 4.91(1H, d, $J=11.2\text{Hz}$), 5.05(1H, t, $J=5.6\text{Hz}$), 5.27(1H, d, $J=11.2\text{Hz}$), 6.70(1H, d, $J=6.4\text{Hz}$), 7.32–7.86(16H, m), 8.75(1H, br s)。

[0369] (5) 化合物75的合成



[0371] 在上述(4)中得到的化合物74(400mg, 0.636mmol)的乙醇溶液(2mL)中加入肼一水合物(0.04mL, 1.02mmol), 在室温搅拌10分钟。将反应液蒸馏除去溶剂, 加入乙酸乙酯。过滤残渣, 由乙酸乙酯萃取滤液, 以水和饱和食盐水清洗后, 蒸馏除去溶剂, 在后述的反应中使用得到的化合物75(380mg)。

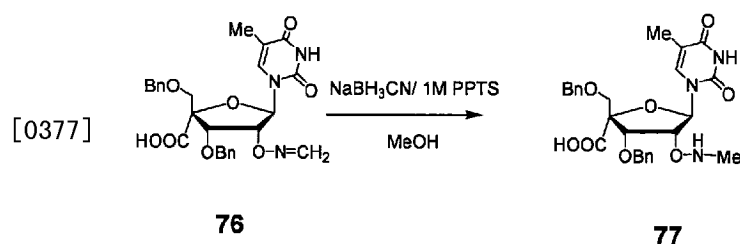
[0372] (6) 化合物76的合成



[0374] 在上述(5)中得到的化合物75(380mg, 0.763mmol)的甲醇溶液(5mL)中加入甲醛(37wt%在水中, 0.08mL, 0.840mmol)。在室温搅拌反应液2小时后, 蒸馏除去溶剂。加入水, 由乙酸乙酯萃取, 以水和饱和食盐水清洗后, 以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂, 以柱色谱(正己烷: 乙酸乙酯=1:1→1:2)纯化, 作为白色固体得到化合物76(250mg, 收率65%(2工序))。

[0375] 得到的化合物76的物性数据如下: $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -29.3$ (c 1.00, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr): 3172, 3064, 2944, 2872, 1699, 1469, 1366, 1274, 1127, 1070, 916 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ_{H} 1.56(3H, s), 3.84(1H, d, $J=10.4\text{Hz}$), 4.14(1H, d, $J=10.4\text{Hz}$), 4.64–4.79(6H, m), 5.11(1H, dd, $J=4.6\text{Hz}$, 3.2Hz), 6.59(1H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 7.28–7.64(11H, m)。

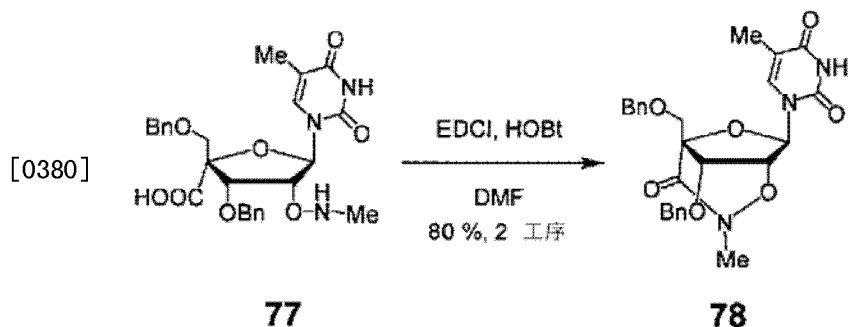
[0376] (7) 化合物77的合成



[0378] 在上述(6)中得到的化合物76(250mg, 0.491mmol)的甲醇溶液中加入对甲苯磺酸吡啶鎓(1M, 4.9mL, 4.91mmol)、氰基硼氢化钠(62mg, 0.982mmol), 在0℃搅拌10小时。将反应液升温到室温, 再搅拌2小时。蒸馏除去溶剂, 以乙酸乙酯稀释得到的产物, 以水和饱和食盐水

水清洗后,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,在后述的反应中使用得到的化合物77(235mg)。

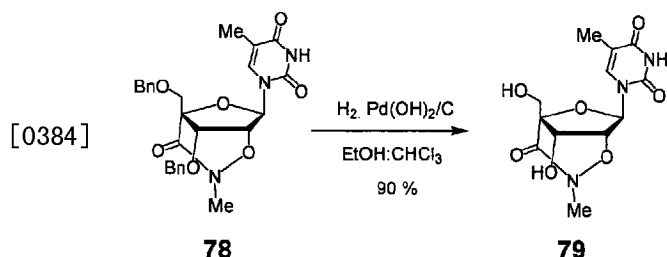
[0379] (8)化合物78的合成



[0381] 在上述(7)中得到的化合物77(235mg,0.459mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(4mL)溶液中加入1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(105.5mg,0.551mmol)和1-羟基苯并三唑(74.5mg,0.551mmol),在室温搅拌1日。加入水,由乙酸乙酯萃取,以水和饱和食盐水清洗,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=4:1→1:1)纯化得到的粗产物,作为白色固体得到化合物78(190mg,收率80%(2工序))。

[0382] 得到的化合物78的物性数据如下: $[\alpha]_D^{26}=+62.3(c\ 1.00,CHCl_3)$;IR $\nu_{max}(KBr)$: 3164,3029,2926,2878,1698,1456,1392,1362,1274,1215,1155,1094,1065,983 cm^{-1} ; 1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ_H 1.42(3H,s),3.25(3H,s),3.95(1H,d,J=11.6Hz),4.25(1H,d,J=11.6Hz),4.34(1H,d,J=3.2Hz),4.56(1H,d,J=10.8Hz),4.59-4.64(3H,m),4.73(1H,d,J=10.8Hz),6.08(1H,s),7.23-7.37(10H,m),7.62(1H,d,J=1.6Hz)。

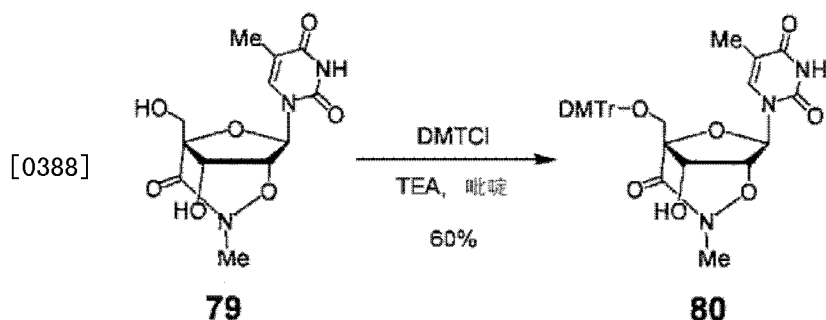
[0383] (9)化合物79的合成



[0385] 在上述(8)中得到的化合物78(190mg,0.385mmol)的乙醇:氯仿=5:1(5mL)溶液中加入氢氧化钡碳(190mg),进行搅拌。将反应容器内以氢气置换数次,在氢气气流下,在室温搅拌一晚。过滤溶液后,以柱色谱(正己烷:乙酸乙酯=1:1→仅为乙酸乙酯)纯化得到的粗产物,作为白色固体得到化合物79(105mg,收率90%)。

[0386] 得到的化合物79的物性数据如下: $[\alpha]_D^{26}=+14.9(c\ 1.00,CHCl_3)$;IR $\nu_{max}(KBr)$: 3444,3226,3070,2941,1678,1469,1412,1281,1199,1078,988 cm^{-1} ; 1H -NMR(400MHz, CD_3OD): δ_H 1.88(3H,s),3.25(3H,s),3.90(1H,d,J=12.8Hz),4.22(1H,d,J=12.8Hz),4.55(1H,J=3.6Hz),4.73(1H,J=3.6Hz),6.08(1H,s),7.98(1H,d,J=1.2Hz)。

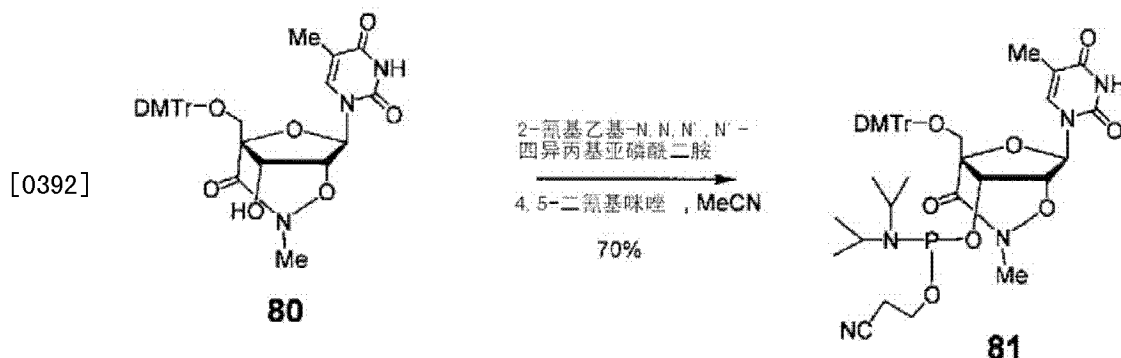
[0387] (10)化合物80的合成



[0389] 在上述(9)得到的化合物79(50mg, 0.159mmol)的吡啶溶液(3mL)中加入4,4'-二甲氧基氯化三苯甲烷(65mg, 0.191mmol)和三乙胺(0.1mL, 0.795mmol),在室温搅拌8小时。冰冷却下,加入饱和碳酸氢钠水,由乙酸乙酯萃取。以水、饱和食盐水清洗有机层,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(添加1%三乙胺的正己烷:乙酸乙酯=2:1→仅为乙酸乙酯)纯化得到的粗产物,作为淡黄色固体得到化合物80(58mg, 收率60%)。

[0390] 得到的化合物80的物性数据如下: $[\alpha]_D^{28} = -21.1$ (c 1.00, CHCl_3); IR ν_{max} (KBr): 3339, 3189, 3062, 2926, 2850, 1693, 1608, 1509, 1464, 1395, 1253, 1177, 1080, 1033, 978 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.41 (3H, s), 3.22 (3H, s), 3.72 (1H, d, $J=12\text{Hz}$), 3.78 (6H, s), 3.97 (1H, d, $J=12\text{Hz}$), 4.69 (1H, d, $J=3.6\text{Hz}$), 4.72 (1H, d, $J=3.6\text{Hz}$), 6.05 (1H, s), 6.82–6.85 (4H, m), 7.25–7.42 (9H, m), 7.67 (1H, s)。

[0391] (11)化合物81的合成



[0393] 在上述(36)中得到的化合物80(50mg, 0.08mmol)的无水乙腈溶液中,加入2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(0.04mL, 0.138mmol)和4,5-二氰基咪唑(9.5mg, 0.08mmol),在室温搅拌7小时。反应后,加入饱和碳酸氢钠水,由乙酸乙酯萃取。以水和饱和食盐水清洗有机层,以硫酸钠干燥。蒸馏除去溶剂,以柱色谱(添加1%三乙胺的正己烷:乙酸乙酯=2:1→1:1)纯化得到的粗产物,作为白色固体得到化合物81(46mg, 70%)

[0394] 得到的化合物81的物性数据如下: $^{31}\text{P-NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 151.23, 151.82。

[0395] (实施例16)寡核苷酸类似物的合成和纯化

[0396] 由ExpediteTM8909(ABI公司生产),以0.2 μmol 量级合成含有在上述实施例15中得到的化合物81(亚酰胺体)的10mer的寡核苷酸类似物(化合物82~85:在以下的表8中表示)。合成由标准的亚磷酰胺步骤进行,亚酰胺体81溶解在乙腈中使用。另外,在表8中,化合物81表示为X。亚酰胺体单元(化合物81)与5'-末端羟基的偶合时间从1.5分钟(标准条件)延长为30分钟。以0.05M碳酸钾的甲醇溶液处理5'-末端被DMTr基保护且被固相支持的寡核苷酸类似物,以1.0MTEAA(三乙胺-乙酸)中和处理后,蒸馏除去溶剂。将得到的粗产物由凝

胶过滤柱NAPTM10Column(GE Health Care公司生产)粗纯化后,由反相HPLC(SHIMADZU LC-10AT_{vp},SHIMADZU SPD-10AT_{vp},SHIMADZU CTO-10AT_{vp},作为分离柱使用WatersXBridgeTMOST C₁₈2.5 μ m(10mm $\times$ 50mm))纯化。

[0397] 合成的寡核苷酸类似物(化合物82~85)的纯度,由反相HPLC(WatersXBridgeTM Shield RP182.5 μ m(4.6mm $\times$ 50mm))确认。(条件:0.1M三乙基乙酸铵缓冲液(pH7.0)中,以1mL/分钟的30分钟的5 $\rightarrow$ 14%(v/v)乙腈的梯度)。另外,分子量由MALDI-TOF-MASS测定决定。在表8中表示结果。

[0398] [表8]

	寡核苷酸	MALDI-TOF-MASS	
		计算值 (M-H ⁻)	实测值 (M-H ⁻)
[0399]	5'-TTTTTXXXXT-3' (化合物 82)	3048.50	3049.40
	5'-TTTXXTTTTT-3' (化合物 83)	3119.51	3120.71
	5'-TTTXXTXXTT-3' (化合物 84)	3190.10	3191.50
	5'-TTTTTTTTXT-3' (化合物 85)	3048.50	3049.21

[0400] (实施例17)溶解温度(T_m)的测定

[0401] 退火处理上述实施例16中合成的作为寡核苷酸链的化合物82~84(反义链)与正义链(3'-AAAAAAAAA-5')后,通过测定T_m值,调查反义链的杂交链形成能力。

[0402] 以沸腾水浴加热包含100mM NaCl、10mM磷酸钠缓冲液(pH7.2)、4 μ M反义链和4 μ M正义链的样品溶液(130 μ L)后,以10小时冷却到 室温。为了防止在分光光度计(Shimadzu,UV-1650PC)的比色皿室内结露而通入氮气流,将样品溶液缓慢冷却到5℃,再在10℃保持20分钟后,开始测定。使温度以每分钟升0.5℃的方式上升到85℃,以0.1℃的间隔测定在260nm处的紫外部分吸收。另外,为了防止由温度上升产生浓度变化,比色皿使用带盖的比色皿。在表9中表示结果。

[0403] [表9]

	反义链	正义链			
		RNA互补链		DNA互补链	
		T _m (°C)	Δ T _m /mod.(°C)	T _m (°C)	Δ T _m /mod.(°C)
[0404]	5'-TTTTTTTTTT-3' (化合物 21)	18.2		19.7	
	5'-TTTTTXXXXT-3' (化合物 82)	19.8	+3.3	11.5	-7.3
	5'-TTTXXTTTTT-3' (化合物 83)	25.0	+3.4	14.6	-2.5
	5'-TTTXXTXXTT-3' (化合物 84)	29.1	+3.6	22.7	+1.0

[0405] Δ T_m/mod. = Δ T_m/单位修饰

[0406] 从表9可知,相比于对单链DNA的亲合性,本发明的寡核苷酸类似物对单链RNA的亲合性高,可见人工核酸向寡核苷酸的导入比例越多,越可以观察到T_m值的上升。因此,可以

认为本发明的核苷酸类似物,在适合于反义法的寡核苷酸合成中 useful。

[0407] 工业上的可利用性

[0408] 根据本发明,提供具有包含酰胺键的交联的新型2',4'-交联型人工核苷和核苷酸。包含该2',4'-交联型人工核苷酸的寡核苷酸具有相当于公知的2',4'-BNA/LNA的对单链RNA的结合亲和性和超出LNA的核酸酶抗性。特别因为对单链RNA,具有比S-oligo对单链RNA更强的结合亲和性,所以被期待应用于核酸药物。

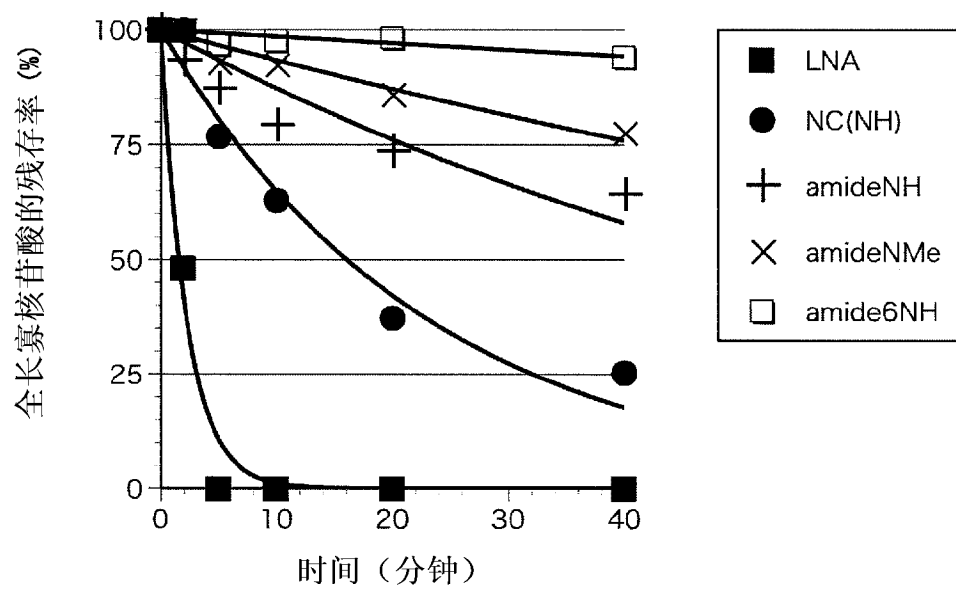


图1