



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01818122.8

[43] 公开日 2004 年 1 月 28 日

[11] 公开号 CN 1471537A

[22] 申请日 2001.9.6 [21] 申请号 01818122.8

[30] 优先权

[32] 2000.9.7 [33] US [31] 60/230,685

[86] 国际申请 PCT/GB01/03973 2001.9.6

[87] 国际公布 WO02/20543 英 2002.3.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.28

[71] 申请人 艾夫西亚生物科技公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 N·辛哈

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 刘 玥

权利要求书 28 页 说明书 27 页 序列表 1 页
附图 9 页

[54] 发明名称 用于低聚核苷酸合成的合成子

[57] 摘要

本发明涉及亚磷酰胺化合物,尤其是三价磷多聚体,使用三价磷多聚体制备低聚核苷酸的方法,以及制备三价磷多聚体的方法。此外,本发明还涉及用三价磷多聚体衍生形成的一种固体载体及其制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种亚磷酰胺化合物, 其中含有由一个或多个核苷间磷原子连结的二个或多个核苷部分, 该核苷间磷原子是磷(III)原子。

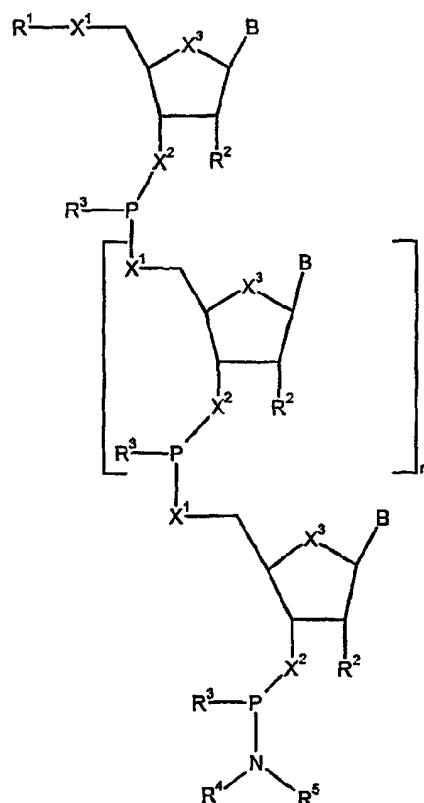
2. 权利要求1的亚磷酰胺化合物, 其中含有一个与带有亚磷酰胺部分的核苷部分的3'-位键合的亚磷酰亚胺部分。

3. 权利要求1和2中任一项的亚磷酰胺化合物, 其中亚磷酰胺部分是式 $-X^1-PR^3NR^4R^5$ 基团, R^3 代表 β -氟基乙氧基或 β -氟基乙硫基, R^3 和 R^4 代表异丙基。

4. 前述权利要求任一项的亚磷酰胺化合物, 其中核苷间磷(III)原子构成一个亚磷酸三酯基团。

5. 权利要求4的亚磷酰胺化合物, 其中亚磷酸三酯基团将带有亚磷酰胺部分的一个核苷部分的5'-位与第二个核苷部分的3'-位连接。

6. 以下结构式代表的三价磷多聚体或其立体异构物:

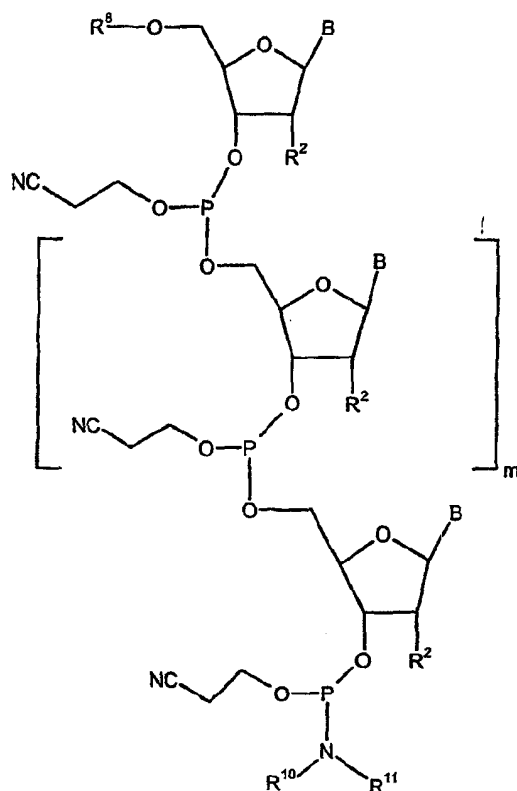


15

其中:

各 X^1 独立地是 -O- 或 -S-;

- 各 X^2 独立地是 -O-、-S- 或 -NR-;
- 各 X^3 独立地是 -O-、-S-、-CH₂- 或 -(CH₂)₂-;
- R^1 是一个保护基团;
- 各 R^2 独立地是 -H、-F、-NHR⁶、-CH₂R⁶ 或 -OR⁶;
- 5 各 R^3 独立地是 -OCH₂CH₂CN, -SCH₂CH₂CN, 取代或未取代的脂族基团, -OR⁷ 或 -SR⁷;
- R^4 和 R^5 各自独立地是取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳族基团, 取代或未取代的芳烷基; 或者
- R^4 和 R^5 与它们所键合的氮一起形成一个杂环烷基或杂芳基;
- 10 R 是 -H, 取代或未取代的烷基, 取代或未取代的芳基, 或是一个胺保护基;
- R^6 是 -H, 取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 取代或未取代的芳烷基, 或是一个保护基;
- R^7 是取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 或是取代
- 15 或未取代的芳烷基;
- 各 B 独立地是 H 或者是被保护或未被保护的核苷碱基; 和
- n 是 0 或正整数。
7. 权利要求 6 的三价磷多聚体, 其中各 X^1 、 X^2 和 X^3 是 -O-。
8. 权利要求 6 或 7 的三价磷多聚体, 其中 R^3 是 -OCH₂CH₂CN 或
- 20 -SCH₂CH₂CN。
9. 权利要求 6、7 或 8 的三价磷多聚体, 其中 R^1 是酸不稳定性保护基。
10. 权利要求 6、7、8 或 9 的三价磷多聚体, 其中 R^2 是 -H。
11. 权利要求 6、7、8 或 9 的三价磷多聚体, 其中 R^2 是 -OR⁶, R^6
- 25 是甲基、-CH₂CH₂OMe 或一个羟基保护基。
12. 以下结构式的三价磷多聚体或其立体异构体:



其中：

R^2 是 $-H$ 或 $-OR^6$;

5 R^6 是-H, 取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 取代或未取代的芳烷基, 或是一个醇保护基;

R^8 是取代或未取代的三苯甲基;

R¹⁰ 和 R¹¹ 各自独立地是取代或未取代的脂族基团；

各 B 独立地是 H，或是保护或未保护的核苷碱基；和

10 m 是 0 或 1。

13. 权利要求 12 的多聚体, 其中:

R^8 是 4,4'-二甲氧基三苯甲基;

R^2 是-H;

R^{10} 和 R^{11} 是异丙基。

15 14. 权利要求 12 的多聚体, 其中:

R⁸ 是 4,4'-二甲氧基三苯甲基;

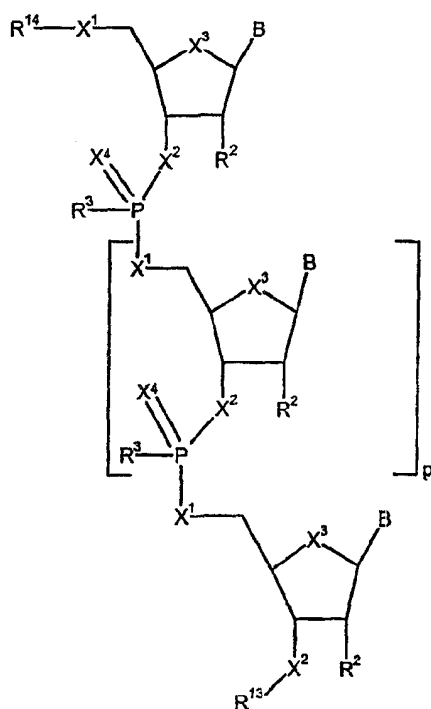
R^2 是 $-OR^6$;

R^{10} 和 R^{11} 是异丙基; 和

R^6 是甲基, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMe}$, 叔丁基二甲基甲硅烷基, 四氢吡喃基, 4-甲氧基四氢吡喃基或 Fpmp.

15. 制备以下结构式表示的低聚核苷酸或其立体异构物的方法:

5



其中:

各 X^1 独立地是 $-\text{O}-$ 或 $-\text{S}-$;

各 X^2 独立地是 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 或 $-\text{NR}-$;

10 各 X^3 独立地是 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 或 $-(\text{CH}_2)_2-$;

各 X^4 独立地是 $=\text{O}$ 或 $=\text{S}$;

R 是 $-\text{H}$, 取代或未取代的烷基, 取代或未取代的芳基, 或是一个胺保护基;

各 R^2 独立地是 $-\text{H}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{NHR}^6$ 、 $-\text{CH}_2\text{R}^6$ 或 $-\text{OR}^6$;

15 R^6 是 $-\text{H}$, 取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 取代或未取代的芳烷基, 或是一个保护基;

各 R^3 独立地是 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, 取代或未取代的脂族基团, $-\text{OR}^7$ 或 $-\text{SR}^7$;

R^7 是取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 或是取代或未取代的芳烷基;

R^{13} 是一个醇保护基, 胺保护基, 硫醇保护基, 式- Y^2 - L - Y^1 基团, 式- Y^2 - L - Y^2 - R^{15} 基团, 或是固体载体;

5 R^{14} 是-H 或保护基;

各 B 独立地是 H 或是被保护或未保护的核苷碱基;

p 是正整数;

Y^1 是酯基或羧酸基;

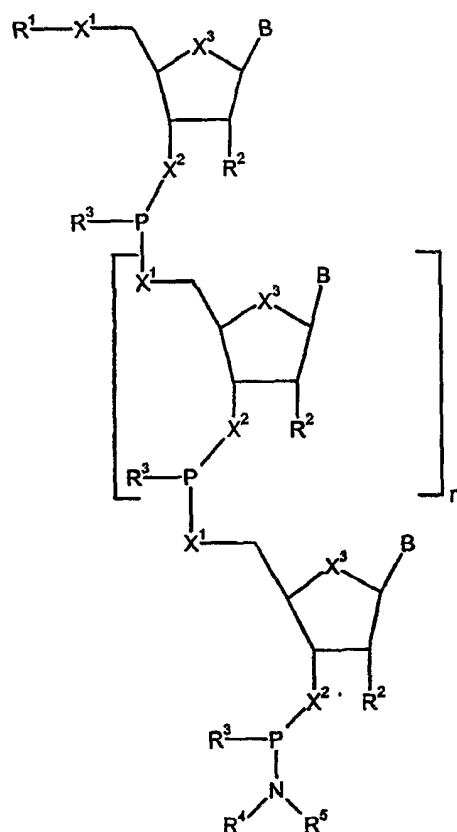
Y^2 是一个单键, $-C(O)-$, $-C(O)NR^{17}$, $-C(O)O-$, $-NR^{17}-$ 或 $-O-$;

10 L 是一个取代或未取代的脂族基团, 或是取代或未取代的芳基;

R^{17} 是-H, 取代或未取代的脂族基团, 或是取代或未取代的芳基;

所述方法包括以下步骤:

a) 将以下结构式代表的三价磷多聚体或其立体异构物:



15

其中:

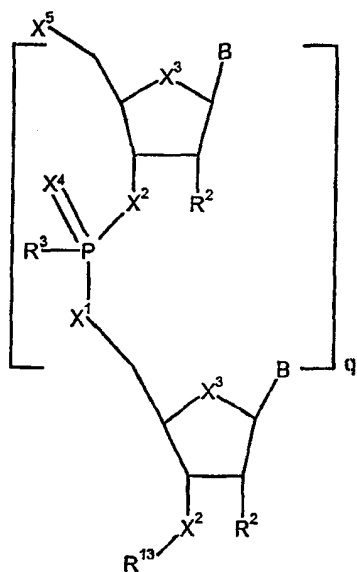
R^1 是一个保护基;

R^4 和 R^5 各自独立地是取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 取代或未取代的芳烷基; 或者

R⁴和R⁵与它们所连接的氮一起形成一个杂环烷基或杂芳基;

n 是 0 或正整数,

5 与以下结构式代表的 5'-去保护的核苷或低聚核苷酸, 或其立体异构物, 进行偶合:

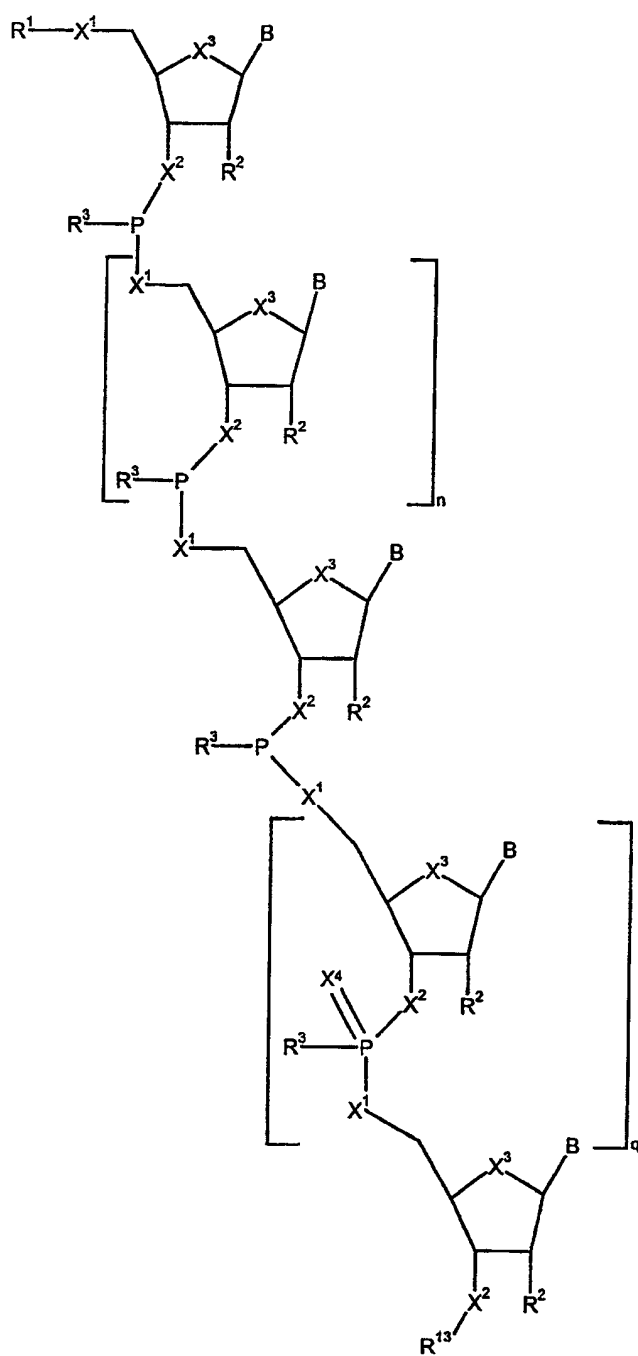


其中：

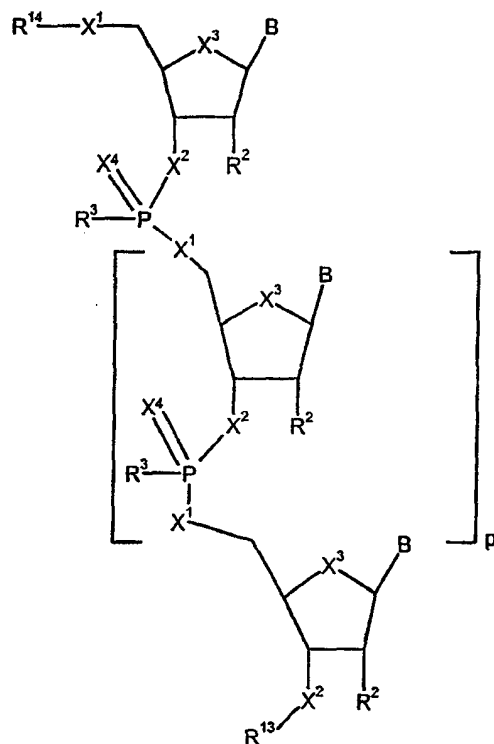
10 X^5 是 -OH 或 -SH;

q 是 0 或正整数;

形成以下结构式表示的第一中间体或其立体异构物:



b) 将第一中间体内的三价磷基团氧化或硫化，形成以下结构式表示的第二中间体或其立体异构物：



c) 任选地将步骤 a) 中未与三价磷多聚体反应的 X^5 基团封端；
 d) 处理第二中间体以除掉 R^1 ，形成 5'-去保护的低聚核苷酸；和
 e) 任选地重复步骤 a) 至 d) 一或多次，其中最终步骤是步骤 c) 或 d)，由此制备低聚核苷酸。

16. 权利要求 15 的方法，其中 R^{13} 是固体载体。

17. 权利要求 16 的方法，其中还包括使低聚核苷酸产物与固体载体分开的步骤。

18. 权利要求 15、16 或 17 的方法，其中还包括将低聚核苷酸的核苷酸碱基去保护。

19. 权利要求 15 的方法，其中 X^2 是 $-O-$ ， R^{13} 是一个醇保护基。

20. 权利要求 19 的方法，其中还包括由低聚核苷酸产物中除掉 R^{13} 保护基的步骤。

21. 权利要求 15、16、17、18、19 或 20 的方法，其中 R^1 是未取代的三苯甲基、一烷氧基三苯甲基、二烷氧基三苯甲基、三烷氧基三苯甲基、四氢吡喃基或 9-苯基咕吨基。

22. 权利要求 21 的方法，其中利用选自二氯乙酸的二氯甲烷溶液和三氟乙酸的二氯甲烷溶液的一种酸除掉 R^1 。

23. 权利要求 15 至 21 的任一项的方法, 其中各 R^3 是 $-OCH_2CH_2CN$ 或 $-SCH_2CH_2CN$ 。

24. 权利要求 23 的方法, 其中还包括用碱处理低聚核苷酸, 由 $-OCH_2CH_2CN$ 或 $-SCH_2CH_2CN$ 中除去 $-CH_2CH_2CN$ 。

5 25. 权利要求 24 的方法, 其中核苷酸碱基是在用碱处理低聚核苷酸期间去保护。

26. 权利要求 15 至 25 中任一项的方法, 其中用含 I_2 和水的溶液处理第一中间体, 将三价磷基团氧化。

10 27. 权利要求 15 至 25 中任一项的方法, 其中用 3-氨基-[1,2,4]-二噻唑-5-硫酮或 3H-苯并二噻茂-3-酮 1,1-二氧化物处理第一中间体, 将三价磷基团硫化。

28. 权利要求 15 至 25 中任一项的方法, 其中步骤 a)、b)、c)和 d) 进行一次以上的循环, 制备的低聚核苷酸是嵌合的低聚核苷酸。

15 29. 权利要求 15 至 26 中任一项的方法, 其中制备的低聚核苷酸是一种磷酸酯。

30. 权利要求 15 至 27 中任一项的方法, 其中制备的低聚核苷酸是硫代磷酸酯。

31. 权利要求 15 至 30 中任一项的方法, 其中制备的低聚核苷酸具有最多达 50 个核苷酸碱基。

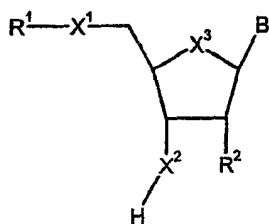
20 32. 一种制备下式表示的三价磷多聚体或其立体异构物的方法:

R^7 是取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 或是取代或未取代的芳烷基;

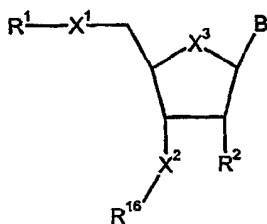
各 B 独立地是 H 或者是被保护或未被保护的核苷碱基; 和

n 是 0 或正整数, 该方法包括以下步骤:

- 5 a) 将以下结构式表示的核苷或其立体异构物的 3'-取代基保护:



由此形成以下结构式表示的第一中间体或其立体异构物:



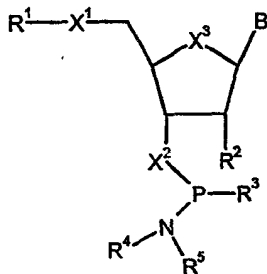
10

其中 R^{16} 是与 R^1 相正交的保护基;

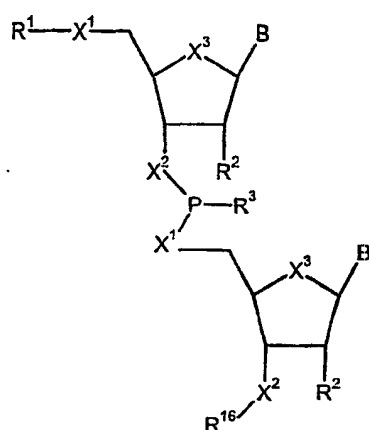
- b) 处理该第一中间体以除去 R^1 , 从而形成 5'-去保护的核苷;

c) 使 5'-去保护的核苷在偶合催化剂存在下与以下结构式表示的化合物或其立体异构物反应:

15

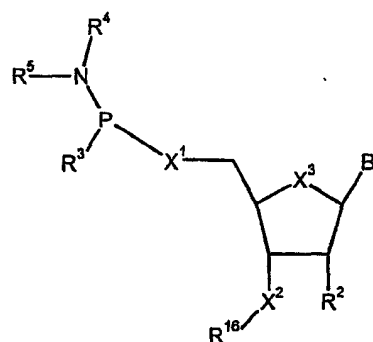


从而形成以下结构式表示的二聚体或其立体异构物:

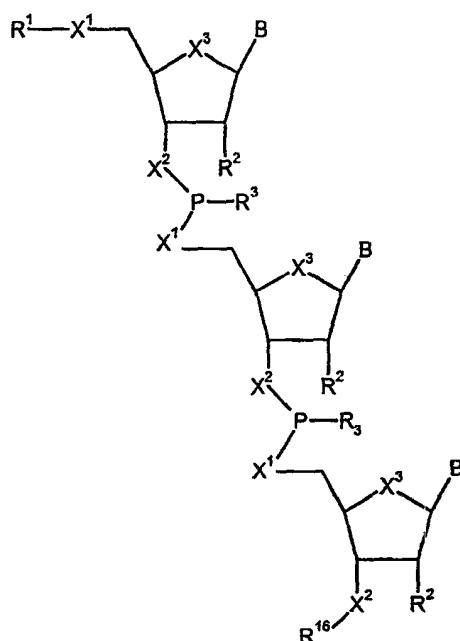


d) 处理该 3',5'-保护的多聚体以除掉 R^{16} ，从而形成 3'-去保护的二聚体；

- 5 e) 任选地使 3'-去保护的二聚体与下述结构式表示的化合物或其立体异构物在偶合催化剂存在下反应：



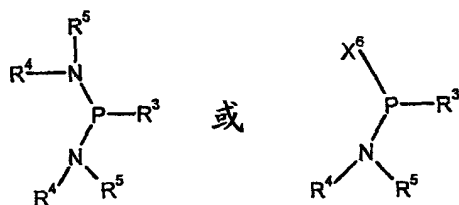
从而形成以下结构式表示的 3',5'-保护的三聚体或其立体异构物：



f) 任选地重复步骤 e) 和 f) 一次或多次, 由此形成 3',5'-保护的多聚体;

5 g) 处理该 3',5'-保护的多聚体以除掉 R^{16} , 从而形成 3'-去保护的多聚体;

h) 使 3'-去保护的多聚体与以下结构式之一表示的三价磷化合物反应, 形成三价磷多聚体:



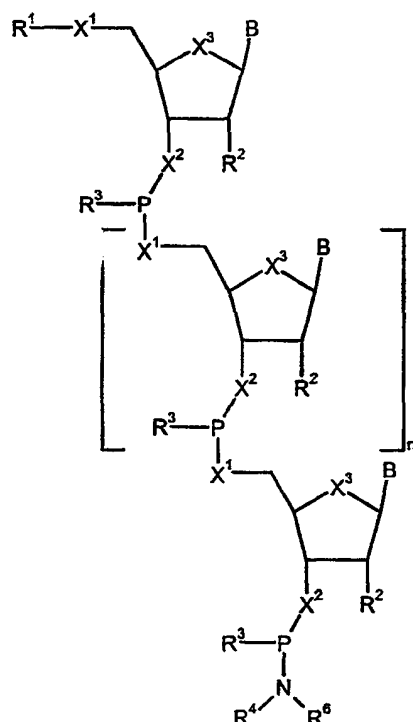
10

其中 X^6 是卤素。

33. 权利要求 32 的方法, 其中偶合催化剂是四唑或 S-乙硫基四唑。

34. 权利要求 32 或 33 的方法, 其中 R^{16} 是乙酰丙酰基, 并且通过在吡啶/乙酸中用水合肼处理 3',5'-保护的多聚体将其除去。

15 35. 制备以下结构式表示的三价磷多聚体或其立体异构物的方法:



其中：

各 X^1 独立地是 -O- 或 -S-；

5 各 X^2 独立地是 -O-、-S- 或 -NR-；

各 X^3 独立地是 -O-、-S-、-CH₂- 或 -(CH₂)₂-；

R^1 是一个保护基团；

各 R^2 独立地是 -H、-F、-NHR⁶、-CH₂R⁶ 或 -OR⁶；

10 各 R^3 独立地是 -OCH₂CH₂CN，-SCH₂CH₂CN，取代或未取代的脂族基团，-OR⁷ 或 -SR⁷；

R^4 和 R^5 各自独立地是取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳族基团，取代或未取代的芳烷基；或者

R^4 和 R^5 与它们所键合的氮一起形成一个杂环烷基或杂芳基；

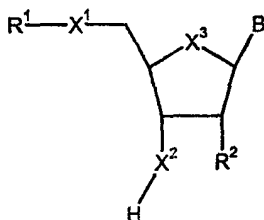
15 R 是 -H，取代或未取代的烷基，取代或未取代的芳基，或是一个胺保护基；

R^6 是 -H，取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳基，取代或未取代的芳烷基，或是一个保护基；

R^7 是取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳基，或是取代或未取代的芳烷基；

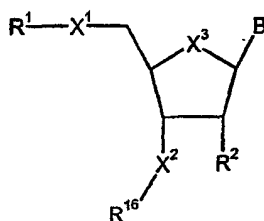
各 B 独立地是 H 或者是被保护或未被保护的核苷碱基；和
n 是 0 或正整数该方法包括以下步骤：

a) 将以下结构式表示的核苷或其立体异构物的 3'-取代基保护：



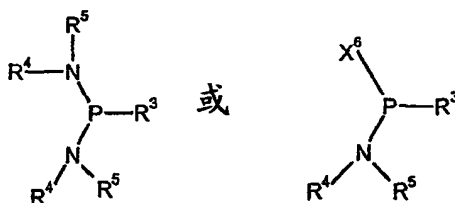
5

由此形成以下结构式表示的第一中间体或其立体异构物：



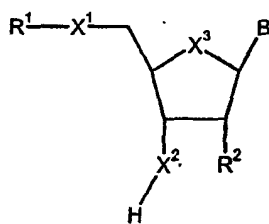
其中 R¹⁶ 是与 R¹ 相正交的保护基；

- 10 b) 处理该第一中间体以除去 R¹，从而形成 5'-去保护的核苷；
c) 使 5'-去保护的核苷与以下结构式之一代表的三价磷化合物反应：

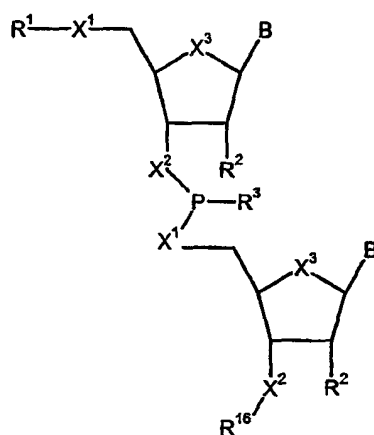


- 15 其中 X⁶ 是卤素，由此形成 5'-亚磷酰胺；

d) 使 5'-亚磷酰胺在偶合催化剂存在下与以下结构式代表的化合物或其立体异构物反应：



由此形成由以下结构式代表的 3',5'-保护的二聚体或其立体异构物:

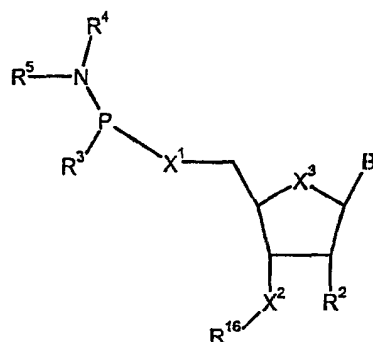


5

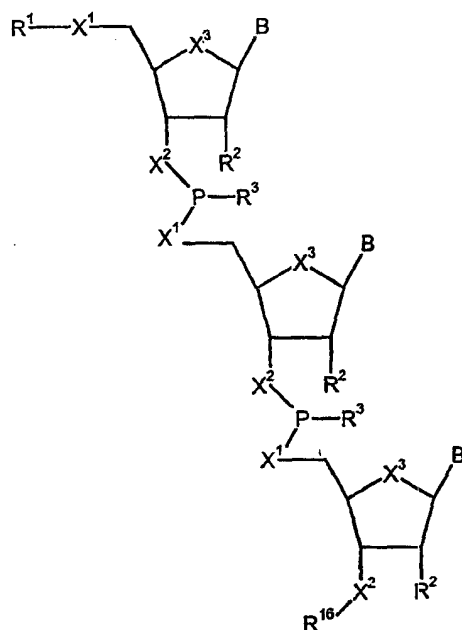
e) 处理该 3',5'-保护的二聚体以除去 R^{16} , 形成 3'-去保护的二聚体;

f) 任选地使 3'-去保护的二聚体在偶合催化剂存在下与以下结构式代表的化合物或其立体异构物反应:

10



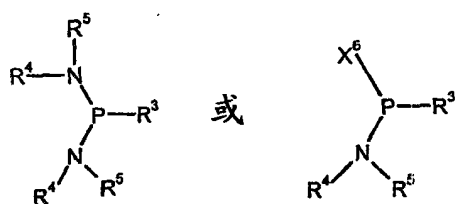
由此形成以下结构式代表的 3',5'-保护的三聚体或其立体异构物:



g) 任选地重复步骤 e)和 f)一次或多次, 由此形成 3',5'-保护的多聚体;

5 h) 处理该 3',5'-保护的多聚体以除去 R^{16} , 形成 3'-去保护的多聚体;

i) 使 3'-去保护的多聚体与以下结构式之一表示的三价磷化合物反应:



10

其中 X^6 是卤素, 结果形成三价磷多聚体。

36. 权利要求 35 的方法, 其中偶合催化剂是四唑或 S-乙硫基四唑。

37. 权利要求 30 或 36 的方法, 其中 R^{16} 是乙酰丙酰基, 并通过在吡啶/乙酸中用水合肼处理该 3',5'-保护的多聚体将其去除。

15 38. 以下结构式代表的一种三价磷多聚体衍生的固体载体:

R^{15} 是一个固体载体。

39. 权利要求 38 的固体载体, 其中各 X^1 、 X^2 和 X^3 是 -O-。

40. 权利要求 38 或 39 的固体载体, 其中 R^3 是 $-OCH_2CH_2CN$ 。

41. 权利要求 38、39 或 40 的固体载体, 其中 R^1 是酸不稳定性保

5 护基。

42. 权利要求 41 的固体载体, 其中 R^1 是 4,4'-二甲氧基三苯甲基。

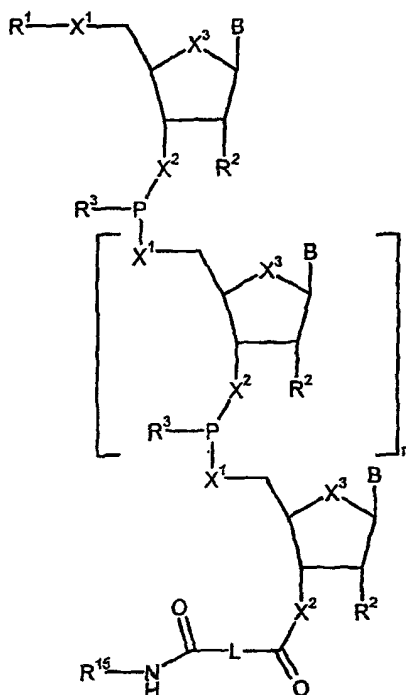
43. 权利要求 38、39、40、41 或 42 的固体载体, 其中 R^2 是 -H。

44. 权利要求 38、39、40、41 或 42 的固体载体, 其中 R^2 是 $-OR^6$, R^6 是一个羟基保护基。

10 45. 权利要求 38 至 44 中任一项的固体载体, 其中 L 是 $-CH_2CH_2-$ 。

46. 权利要求 38 至 45 中任一项的固体载体, 其中 R^{15} 包括孔可控的玻璃、聚苯乙烯或微孔聚酰胺。

47. 一种制备以下结构式代表的多聚体衍生的固体载体的方法:



15

其中:

各 X^1 独立地是 -O- 或 -S-;

各 X^2 独立地是 -O-、-S- 或 -NR-;

各 X^3 独立地是 -O-、-S-、 $-CH_2-$ 或 $-(CH_2)_2-$;

R^1 是一个保护基;

各 R^2 独立地是 $-H$ 、 $-F$ 、 $-NHR^6$ 、 $-CH_2R^6$ 或 $-OR^6$;

各 R^3 独立地是 $-OCH_2CH_2CN$ 、 $-SCH_2CH_2CN$ ，取代或未取代的脂族基团， $-OR^7$ 或 $-SR^7$;

5 R 是 $-H$ ，取代或未取代的烷基，取代或未取代的芳基，或是一个胺保护基;

R^6 是 $-H$ ，取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳基，取代或未取代的芳烷基，或是一个保护基;

10 R^7 是取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳族基团，或是取代或未取代的芳烷基;

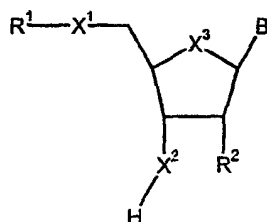
各 B 独立地是 H 或是被保护或未保护的核苷碱基;

L 是取代或未取代的脂族基团，或是取代或未取代的芳基;

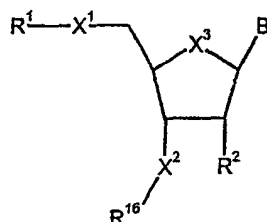
n 是 0 或正整数;

R^{15} 是一个固体载体，该方法的步骤包括:

15 a) 将以下结构式表示的核苷或其立体异构物的 3'-取代基保护:



由此形成以下结构式表示的第一中间体或其立体异构物:

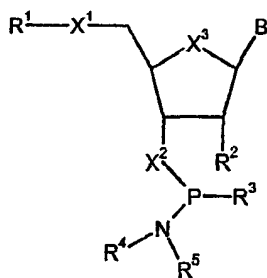


20

其中 R^{16} 是与 R^1 相正交的保护基;

b) 处理该第一中间体以除去 R^1 ，从而形成 5'-去保护的核苷;

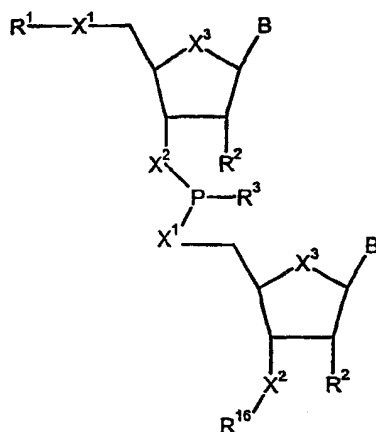
c) 使 5'-去保护的核苷在偶合催化剂存在下与以下结构式表示的化合物或其立体异构物反应:



其中:

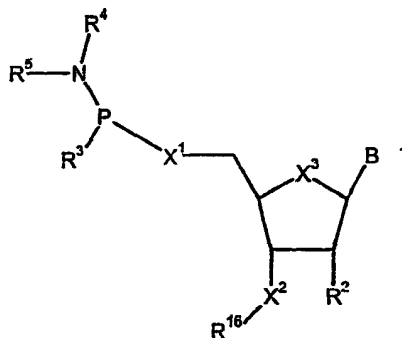
R^4 和 R^5 各自独立地是取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 取代或未取代的芳烷基; 或者

R^4 和 R^5 与它们所结合的氮一起形成一个杂环烷基或杂芳基, 从而形成以下结构式代表的二聚体或其立体异构物:

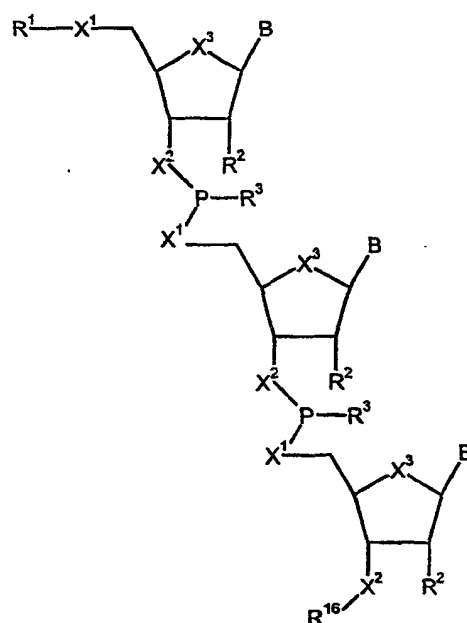


d) 处理该 3',5'-保护的多聚体以除掉 R^{16} , 从而形成 3'-去保护的二聚体;

e) 任选地使 3'-去保护的二聚体与下述结构式表示的化合物或其立体异构物在偶合催化剂存在下反应:



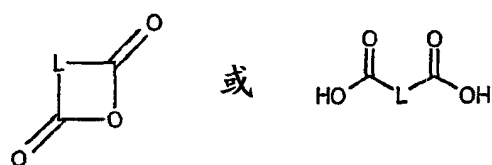
从而形成以下结构式表示的 3',5'-保护的三聚体或其立体异构物:



f) 任选地重复步骤 e) 和 f) 一次或多次, 由此形成 3',5'-保护的多聚体;

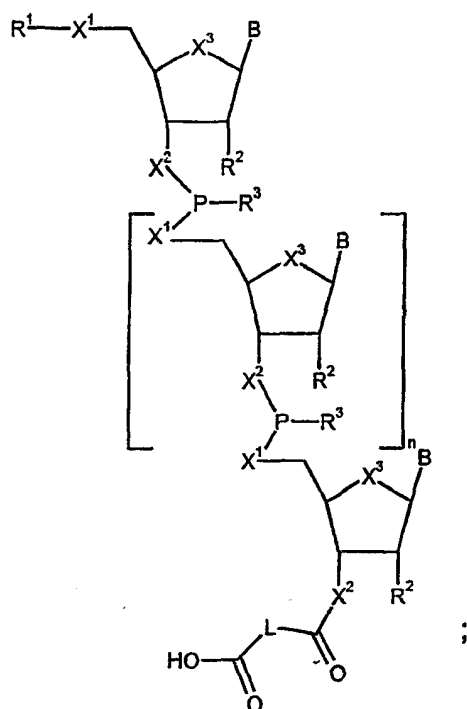
g) 处理该 3',5'-保护的多聚体以除掉 R^{16} , 从而形成 3'-去保护的多聚体;

h) 使该 3'-去保护的多聚体在碱存在下与以下一种化合物反应:



10

由此形成以下结构式代表的固体载体承载试剂或其立体异构物:

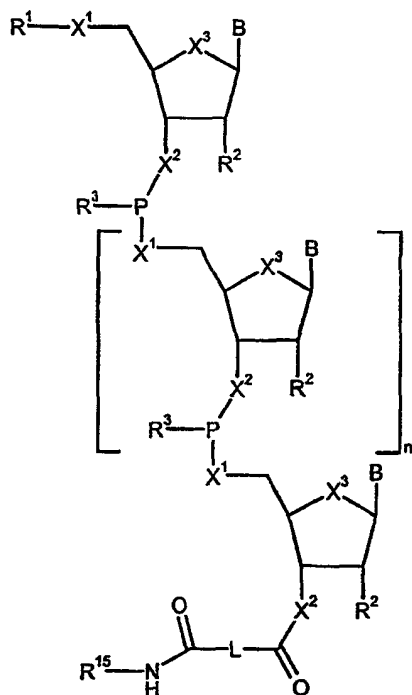


i) 使该固体载体承载试剂与用伯胺或仲胺基官能化的固体载体在碱和取代或未取代的二脂基碳化二亚胺存在下反应，由此制得该多聚体衍生的固体载体。

48. 权利要求 47 的方法，其中的步骤还包括步骤 f) 中形成的固体载体承载试剂与对硝基苯酚在碱和取代或未取代的二脂基碳化二亚胺存在下反应，从而形成活化的固体载体承载试剂。

49. 权利要求 48 的方法，其中取代或未取代的碳化二亚胺是二环己基碳化二亚胺或二异丙基碳化二亚胺。

50. 一种制备以下结构式代表的多聚体衍生的固体载体或其立体异构物的方法：



其中：

各 X^1 独立地是 -O- 或 -S-；

5 各 X^2 独立地是 -O-、-S- 或 -NR-；

各 X^3 独立地是 -O-、-S-、-CH₂- 或 -(CH₂)₂-；

R^1 是一个保护基；

各 R^2 独立地是 -H、-F、-NHR⁶、-CH₂R⁶ 或 -OR⁶；

10 各 R^3 独立地是 -OCH₂CH₂CN，-SCH₂CH₂CN，取代或未取代的脂族基团，-OR⁷ 或 -SR⁷；

R 是 -H，取代或未取代的烷基，取代或未取代的芳基，或是一个胺保护基；

R^6 是 -H，取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳基，取代或未取代的芳烷基，或是一个保护基；

15 R^7 是取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳族基团，或是取代或未取代的芳烷基；

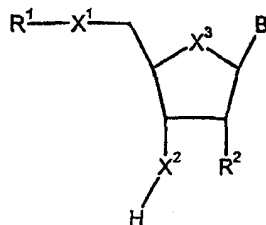
各 B 独立地是 H 或是被保护或未保护的核苷碱基；

L 是取代或未取代的脂族基团，或是取代或未取代的芳基；

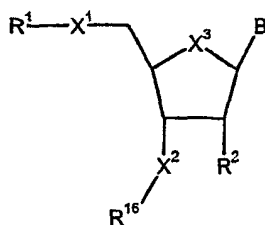
n 是 0 或正整数；

R^{15} 是一个固体载体, 该方法的步骤包括:

a) 将以下结构式代表的核苷或其立体异构物的 3'-取代基保护:



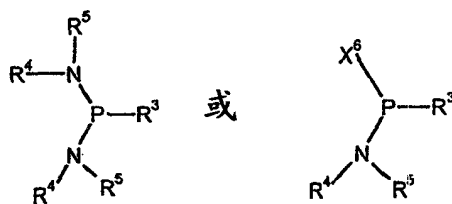
5 由此形成以下结构式代表的第一中间体或其立体异构物:



其中 R^{16} 是一个与 R^1 相正交的保护基;

b) 用酸处理第一中间体以除去 R^1 , 从而形成 5'-去保护的核苷;

10 c) 5'-去保护的核苷与以下结构式之一表示的三价磷化合物反应:



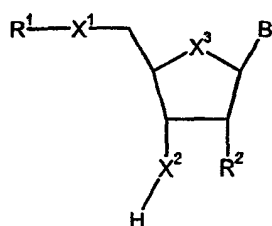
其中:

X^6 是卤素, 由此形成 5'-亚磷酰胺;

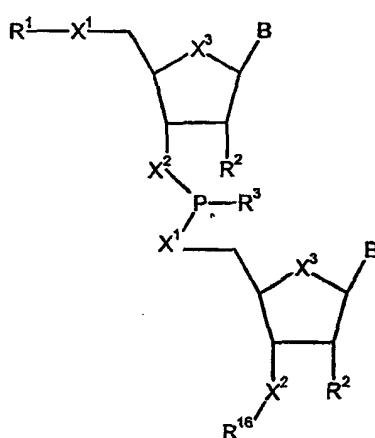
15 R^4 和 R^5 各自独立地是取代或未取代的脂族基团, 取代或未取代的芳基, 取代或未取代的芳烷基; 或者

R^4 和 R^5 与它们所结合的氮一起形成一个杂环烷基或杂芳基;

d) 5'-亚磷酰胺在偶合催化剂存在下与以下结构式代表的化合物或其立体异构物反应:



由此形成以下结构式代表的 3',5'-保护的二聚体或其立体异构物:

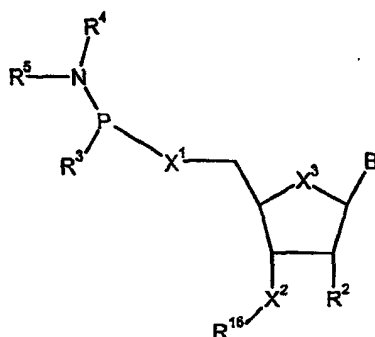


5

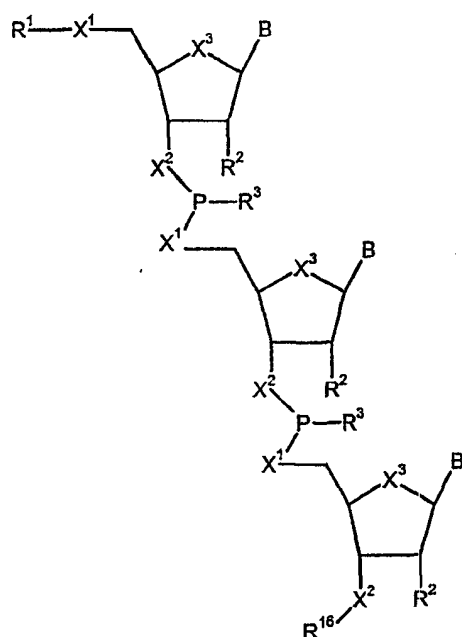
e) 处理该 3',5'-保护的二聚体以除去 R^{16} , 从而形成 3'-去保护的二聚体;

f) 任选地使 3'-去保护的二聚体在偶合催化剂存在下与以下结构式代表的化合物或其立体异构物反应:

10



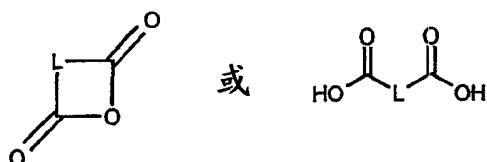
由此形成以下结构式代表的 3',5'-保护的三聚体或其立体异构物:



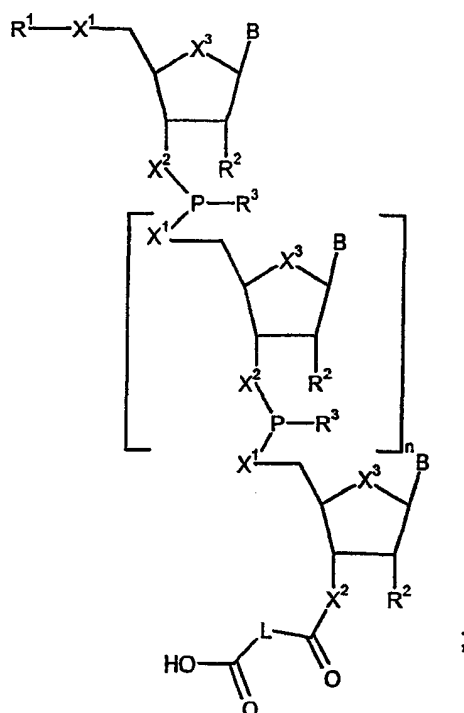
g) 任选地重复步骤 e)和 f)一或多次, 由此形成 3',5'-保护的多聚体;

5 h) 处理该 3',5'-保护的多聚体以除去 R^{16} , 从而形成 3'-去保护的多聚体;

i) 使 3'-去保护的多聚体在碱存在下与以下一种化合物反应:



10 由此形成以下结构式表示的固体载体承载试剂或其立体异构物:



j) 该固体载体承载试剂与用伯胺或仲胺官能基官能化的固体载体在碱和取代或未取代的二脂基碳化二亚胺存在下反应，由此制得多聚体衍生的固体载体。

51. 权利要求 50 的方法，其中的步骤还包括使步骤 h) 中形成的固体载体承载试剂与对硝基苯酚在碱和取代或未取代的二脂基碳化二亚胺反应，由此形成活化的固体载体承载试剂。

52. 权利要求 51 的方法，其中取代的或未取代的二脂基碳化二亚胺是二环己基碳化二亚胺或二异丙基碳化二亚胺。

53. 权利要求 1-5 中任一项的亚磷酰胺化合物对于合成低聚核苷酸的应用。

54. 权利要求 6-14 中任一项的三价磷多聚体对于合成低聚核苷酸的应用。

55. 权利要求 38-46 中任一项的三价磷多聚体衍生的固体载体对于合成低聚核苷酸的应用。

用于低聚核苷酸合成的合成子

发明背景

5 合成的低聚核苷酸在诊断领域对于检测遗传性和病毒性疾病是重要的。此外，自从美国食品和药物管理局批准一种低聚核苷酸类似物用于治疗巨细胞病毒（CMV）以来，大规模合成用于反义疗法和相关疗法的低聚核苷酸已变得日益重要，几种其它的低聚核苷酸目前正在临床试验。每项临床试验需要千克数量级的纯化的低聚核苷酸类似物。

10 已经发现，在核苷酸之间含改性键，例如硫代磷酸酯键或硫代磷酸酯键与磷酸二酯键的组合（嵌合式低聚核苷酸）的低聚核苷酸类似物，在反义疗法应用中比只含磷酸二酯键的低聚核苷酸更有用，因为它们更能耐受体内的降解。通常，低聚核苷酸类似物是以每次加上一个核苷酸单体的方式合成的，直到完成所要求的序列。每个核苷酸的加入都需要一个最少有三个反应步骤的循环：一个偶合步骤，一个氧化或硫化步骤，以及一个 5'-去保护步骤。一般还在氧化或硫化步骤之后进行一个封端步骤。因此，一个有 21 个碱基的低聚核苷酸的合成需要 20 次循环或 60-80 个反应（取决于每次循环后是否进行封端步骤）。
15 因为每个反应步骤的产率一般小于 100%，所以以高产率合成长的低聚核苷酸是困难的，而且，利用目前的技术来合成具有约 150 个以上核苷酸碱基的低聚核苷酸，即使不是不可能，也是非常困难的。另外，大数目的反应步骤耗费大量的试剂，使得合成更为昂贵。为了以高产率得到较长的低聚核苷酸和/或降低用于合成低聚核苷酸的试剂花费，
20 最好是减少为合成低聚核苷酸所需的反应步骤数目。

25 曾提出使用二聚或三聚体以增加产率和获得较长的合成低聚核苷酸的可能性。然而，目前使用的二聚体和三聚体带有已被氧化形成磷酸二酯键或硫化形成硫代磷酸酯键的磷键。因此，这些结构单元不如单体结构单元通用，使用相同的单体结构单元可以形成具有或是磷酸二酯主链，或硫代磷酸酯主链，或磷酸二酯与硫代磷酸酯组合主链的低聚核苷酸。
30 合成之后通常要将低聚核苷酸与合成期间产生的杂质分离。一

般，这些杂质包括反应试剂、副产物和失败序列。失败序列是其中一个或多个偶合步骤失败的情况下产生的低聚核苷酸，因此，失败序列比期望的长度要短一个或多个核苷酸。失败序列一般用离子交换色谱法去除。然而，只比期望长度短一个核苷酸的失败序列（即，N-1物种）
5 难以去除，因为它与预期产物的结构类似性使其与产物低聚核苷酸具有相似的色谱迁移度。N-2 和 N-3 失败序列更容易与预期产物分离，因为它们在结构上的差别足以使其具有与产物低聚核苷酸显著不同的色谱迁移度。因此，为了提高所要的低聚核苷酸的产率和纯度，希望有一种不产生 N-1 失败序列的合成方法。

10 必须改进低聚核苷酸和低聚核苷酸类似物的合成方法，以便以治疗应用所需的数量和质量制备这些化合物。此外，以适用的产率合成较长低聚核苷酸的能力可以扩展它们在治疗和重组体领域的应用。

发明概要

本发明涉及一种三价磷多聚体，应用三价磷多聚体制备低聚核苷酸的方法，和制备三价磷多聚体的方法。此外，本发明还涉及一种由
15 三价磷多聚体衍生形成的固体载体及其制备方法。

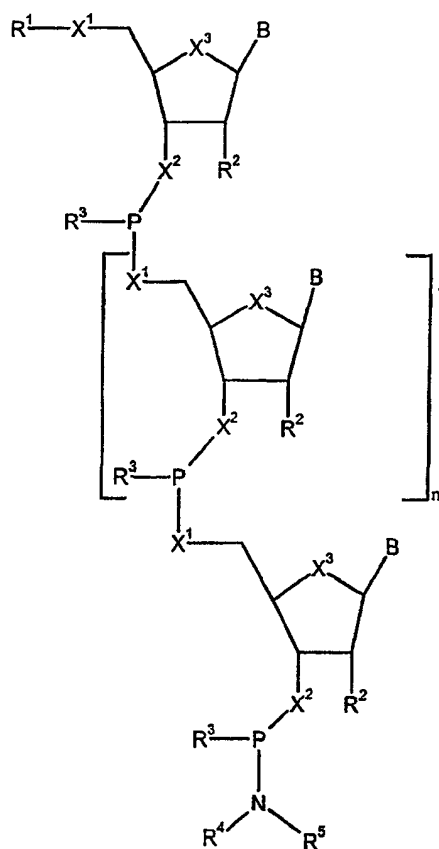
本发明的一个方面提供了一种亚磷酰胺化合物，其中含有通过一个或多个核苷间磷原子连接的两个或多个核苷部分，该核苷间磷原子是磷（III）原子。

20 亚磷酰胺化合物包含一个亚磷酰胺部分，它可以结合到带有该亚磷酰胺部分的核苷部分的 5'位或者最好是 3'位上。亚磷酰胺部分优选是式- $X^1-PR^3NR^4R^5$ 基团，其中 R^3 、 R^4 和 R^5 定义如下。

核苷部分可以是 d-或 L-核苷，但在很多实施方案中是 d-核苷。该核苷可以是无碱基的，但在很多实施方案中含有核碱基。通常，这些
25 核碱基用本领域已知的合适的保护基保护。

核苷磷（III）原子优选含亚磷酸三酯基团。在很多实施方案中，亚磷酸三酯基团将携带亚磷酰胺部分的核苷部分的 5'-位和第二个核苷部分的 3'-位连接。最好是，该亚磷酸三酯基团含有一个 β -氰基乙氧基或 β -氰基乙硫基部分。

30 在另一方面，本发明提供了可用结构式 I 表示的一种三价磷多聚体或其立体异构物：

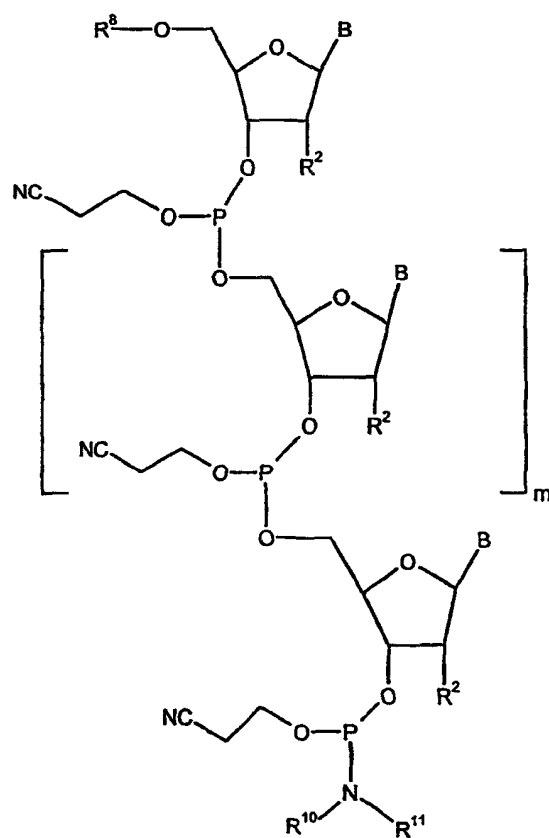


I.

- 在结构式 I 中，各 X^1 独立地是 -O- 或 -S-。各 X^2 独立地是 -O-、-S- 或 -NR-。各 X^3 独立地是 -O-、-S-、-CH₂-，或 -(CH₂)₂-。在一项优选的实施方案中，各 X^1 、 X^2 和 X^3 是 -O-。 R^1 是保护基团，优选是酸不稳定的保护基团或三烷基甲硅烷基，例如叔丁基二甲基甲硅烷基或三异丙基甲硅烷基。在一项更优选的实施方案中， R^1 是取代的或未取代的三苯甲基，9-(苯基)吡啶基（以后称作“pixyl”）或四氢吡喃基（以后称作“THP”）。在一项更为优选的实施方案中， R^1 是一个未被取代的三苯甲基、一烷氧基三苯甲基、二烷氧基三苯甲基、三烷氧基三苯甲基、THP 或 9-苯基吡啶基。最好是， R^1 是 4,4'-二甲氧基三苯甲基。各 R^2 独立地是 -H、-F、-NHR⁶、-CH₂R⁶ 或 -OR⁶。各 R^3 独立地是 -OCH₂CH₂CN，-SCH₂CH₂CN，取代或未被取代的脂族基团，取代或未被取代的芳族基团，或基团 -OR⁷ 或 -SR⁷。优选各 R^3 独立地是 -OCH₂CH₂CN、-SCH₂CH₂CN、4-氟基丁-2-烯硫基、4-氟基丁-2-烯氧基、烯丙基硫基、烯丙基氧基、2-丁烯硫基或 2-丁烯氧基。 R^4 和 R^5 各自独

- 立地为取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳族基团，取代或未取代的芳烷基；或者 R^4 和 R^5 与它们所结合的氮原子一起形成一个杂环烷基或杂芳基，其中杂环烷基或杂芳基优选是 5 或 6 元环。优选 R^4 和 R^5 各为异丙基。R 是 -H，取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳族基团，或是胺保护基。 R^6 是 -H，取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳族基团，取代或未取代的芳烷基，或是一个保护基团，例如醇保护基，如叔丁基二甲基甲硅烷基，或是胺保护基。 R^7 是取代或未取代的脂族基团，取代或未取代的芳族基团，取代或未取代的芳烷基，THP，4-甲氧基四氢吡喃基或 2-氟苯基甲氧基哌啶-4-基。在一项具体的实施方案中， R^7 是邻氯苯基或对氯苯基。各 B 独立地是一个被保护或未被保护的核苷碱基，或者当存在一个或多个无碱基部分时，可以代表 H。 n 是 0 或正整数。当本发明的三价磷多聚体被用来在固体载体上合成低聚核苷酸时， n 优选是 0 至 2。当在溶液中使用三价磷多聚体合成低聚核苷酸时， n 优选是 0 至 10。在某些实施方案中， R^2 代表一个 C-烯丙基。最好是， R^2 代表 H、O 或 OCH_2CH_2OMe 。

在一项实施方案中，该三价磷多聚体可以用结构式 II 或其立体异构物表示：

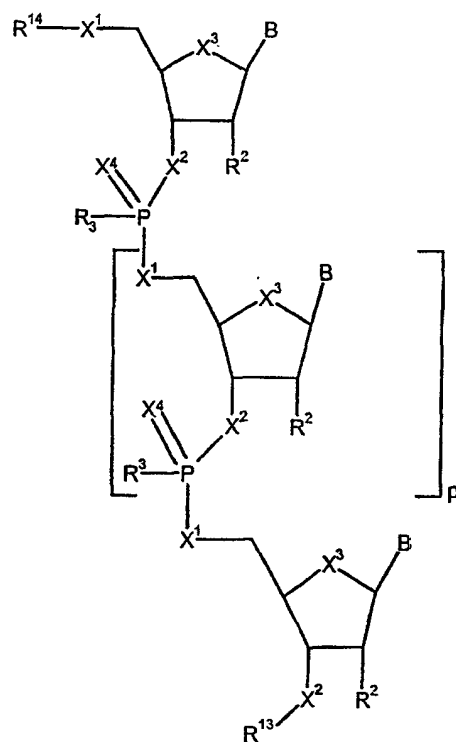


II.

在结构式 II 中，B 和 R^2 的定义与式 I 中相同。 R^8 是一个取代或未被取代的三苯甲基，例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基。 R^{10} 和 R^{11} 独立地各为取代或未被取代的脂族基团。各 R^{10} 和 R^{11} 优选为异丙基。m 是 0 或

5 1。

结构式 I 表示的三价磷多聚体可以用来制备结构式 III 表示的低聚核苷酸或其立体异构物：

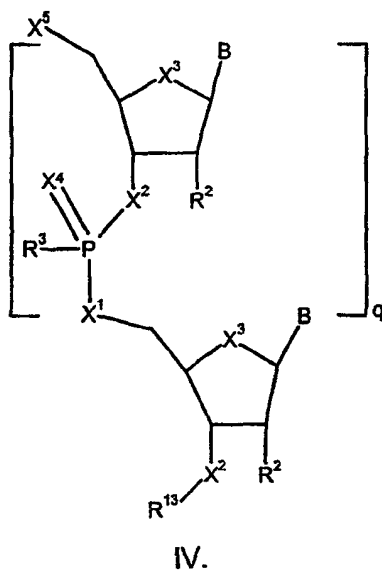


III.

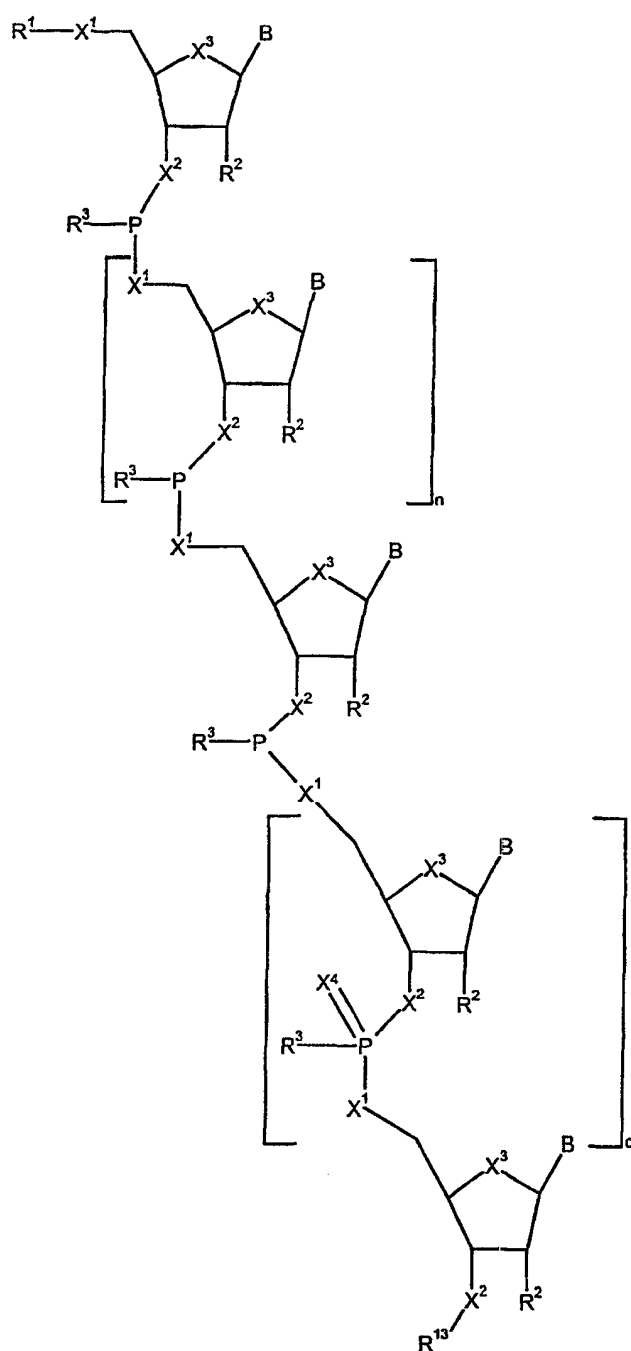
在结构式 III 中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^2 、 R^3 和 B 的定义同结构式 I。各 X^4 独立地是 $=O$ 或 $=S$ 。 R^{13} 是羟基保护基，硫羟基保护基，胺保护基，式 $-Y^2-L-Y^1$ 基团，一种固体载体或基团 $-Y^2-L-Y^2-R^{15}$ 。 Y^1 是可以与胺、硫羟基或羟基反应的官能基。优选 Y^1 是酯基或羧酸基团。各 Y^2 独立地是单键， $-C(O)-$ ， $-C(O)NR^{17}-$ ， $-C(O)O-$ ， $-NR^{17}-$ 或 $-O-$ 。 L 是一个连接基团，优选是取代或未被取代的脂族基团，或是取代或未被取代的芳族基团。更优选的是， L 是亚乙基。 R^{17} 是 $-H$ ，取代或未被取代的脂族基团，或是取代或未被取代的芳族基团。 R^{15} 是适合固相低聚核苷酸合成的固相载体，例如孔可控的玻璃，聚苯乙烯，微孔聚酰胺，例如聚二甲基丙烯酰胺，聚乙二醇包覆的聚苯乙烯，以及载在聚苯乙烯上的聚乙二醇，例如以 Tentagel 的商品名称销售的那些固体载体。 R^{14} 是 $-H$ 或保护基团。当 R^{14} 是保护基团时，优选是酸不稳定性保护基团，叔丁基二甲基甲硅烷基或三异丙基甲硅烷基。 P 是一个正整数。在一项实施方案中，用三价磷多聚体合成的低聚核苷酸是一种磷酸酯，因此只有磷酸酯键（即，核苷酸间磷只与氧键合）。在另一实施方案中，合成的低聚核苷酸是硫代磷酸酯，因此只有硫代磷酸酯键（各核苷酸间的磷与至少一个 S ，最好是只与一个 S 键合）。在又一实施方案中，合

成的低聚核苷酸是嵌合的低聚核苷酸，它同时含有磷酸酯和硫代磷酸酯核苷酸间连键。

在制备由结构式 III 表示的低聚核苷酸的方法中，结构式 I 表示的三价磷多聚体偶合到结构式 IV 表示的 5'-去保护的核苷酸或核苷或其立体异构物上：

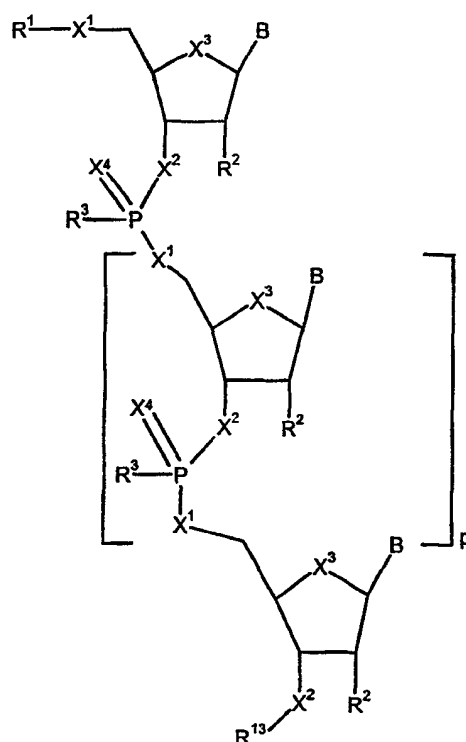


在结构式 IV 中, X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 R^2 、 R^3 、 R^{13} 和 B 的定义同上。 X^5 是 -OH 或 -SH。q 是 0 或正整数。该偶合反应形成由结构式 V 表示的第一中间体或其立体异构物:



V.

在结构式 V 中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^{13} 、 B 、 n 和 q 的定义同上。第一中间体的三价磷基团随后被氧化或硫化，形成结构式 VI 表示的第二中间体或其立体异构物：



VI.

在结构式 VI 中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^{13} 、 X^1 、 X^2 、 X^3 、 X^4 、B 和 P 的定义同上。在反应混合物中留下的任何用结构式 IV 表示的 5'-去保护的核苷或核苷酸，可以任选地用试剂处理将未反应的 X^5 基团封端。随后

5 处理此第二中间体以除去 R^1 。如果 R^1 是一个酸不稳定性保护基，则用酸处理第二中间体以去掉 R^1 。如果 R^1 是三烷基甲硅烷基，例如叔丁基二甲基甲硅烷基或三异丙基甲硅烷基，则第二中间体可以用氟离子处理以去掉 R^1 。通常，叔丁基二甲基甲硅烷基和三异丙基甲硅烷基通过用氟化四丁铵在 THF 中的溶液处理来去掉。除去叔丁基二甲基甲硅烷基的方法可以在 Greene 等的有机合成中的保护基团 (Protective

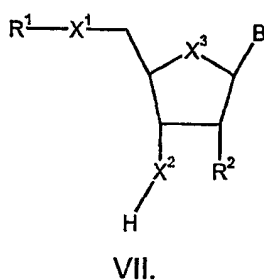
10 Groups in Organic Synthesis, 1991, John Wiley & Sons, Inc.) 一书的 77-83 页查到，其中的说明在本申请中全文引用作为参考。以上的反应步骤或反应循环可以重复一次或多次，以形成所要长度的低聚核苷酸。在希望得到其中的 5'-端基被保护的的低聚核苷酸产物时，如果进行

15 封端步骤，则反应循环的最终步骤可以是该封端步骤；如果不进行封端步骤，则反应的最终步骤可以是氧化或硫化步骤。或者是，如果希望得到不带 5'-保护基的低聚核苷酸，反应循环的最后步骤可以是 R^1

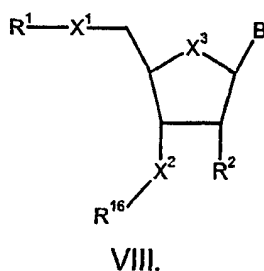
的去除。

本发明还涉及一种制备结构式 I 代表的三价磷多聚体或其立体异构物的方法。该方法包括将结构式 VII 表示的核苷或其立体异构物的 3'-取代基进行保护：

5

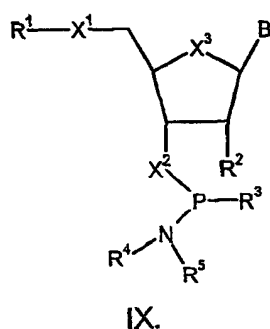


形成由结构式 VIII 表示的第一中间体或其立体异构物：



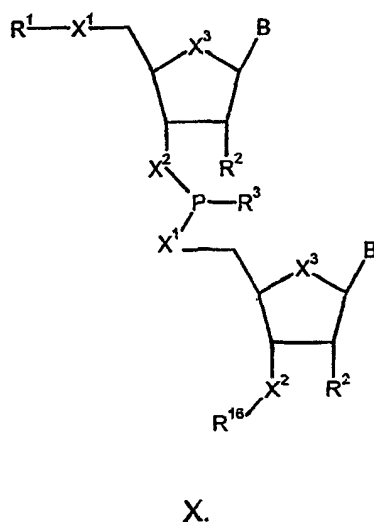
- 10 在结构式 VII 和 VIII 中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^1 和 B 同以上定义。在结构式 VIII 中， R^{16} 是一个与 R^1 正交的保护基团。因此， R^1 是一个可以在 R^{16} 存在下除掉，而在 R^{16} 处不发生反应的保护基团。 R^{16} 则是可以在 R^1 存在下除掉，而在 R^1 处不发生反应的保护基团。优选 R^{16} 是一个乙酰丙酰基或 3-苯甲酰丙酰基。结构式 VIII 代表的第一中间体随后进行
- 15 处理，除掉 R^1 以得到 5'-去保护的核苷。当 R^1 是一个酸不稳定性保护基团时，第一中间体用酸处理以除掉该酸不稳定性保护基。当 R^1 是三烷基甲硅烷基保护基时，第一中间体一般是用氟离子处理以除掉 R^1 。使 5'-去保护的核苷在偶合催化剂存在下与由结构式 IX 表示的化合物或其立体异构物反应：

20



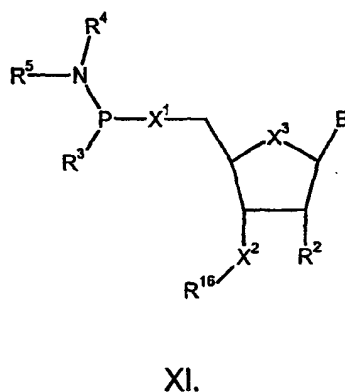
在结构式 IX 中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 B 的定义同上。反应形成的 3',5'-保护的二聚体可以用结构式 X 或其立体异构物表示：

5

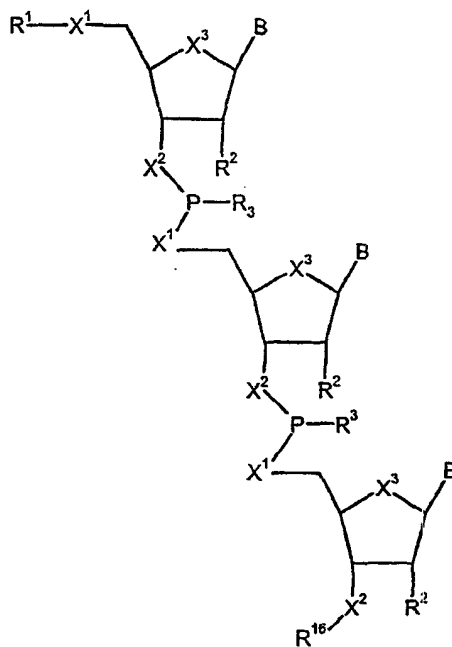


在结构式 X 中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^{16} 和 B 的定义同上。对 3',5'-保护的二聚体进行处理以除掉 R^{16} ，形成 3'-去保护的二聚体。该 3'-去保护的二聚体可任选地在偶合催化剂存在下与结构式 XI 表示的化合物或其立体异构物反应：

10



在结构式 XI 中, X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^{16} 和 B 的定义同前。
反应的产物是结构式 XII 表示的 3',5'-保护的三聚体或其立体异构物:

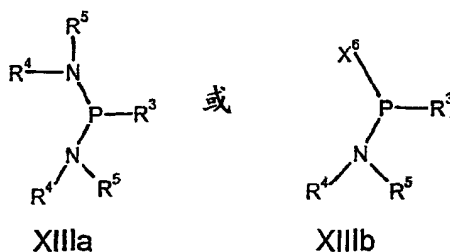


XII.

5 在结构式 XII 中, X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^{16} 和 B 的定义同上。

任选地, 该 3',5'-保护的三聚体可经过处理除掉 R^{16} , 形成 3'-去保护的三聚体, 它可以在偶合催化剂存在下与式 XI 代表的化合物反应一次或多次, 形成 3',5'-保护的多聚体。该 3',5'-保护的多聚体随后经处理除掉 R^{16} , 形成 3'-去保护的多聚体。该 3'-去保护的多聚体与式 VIIIa

10 或 XIIIb 表示的三价磷化合物反应:

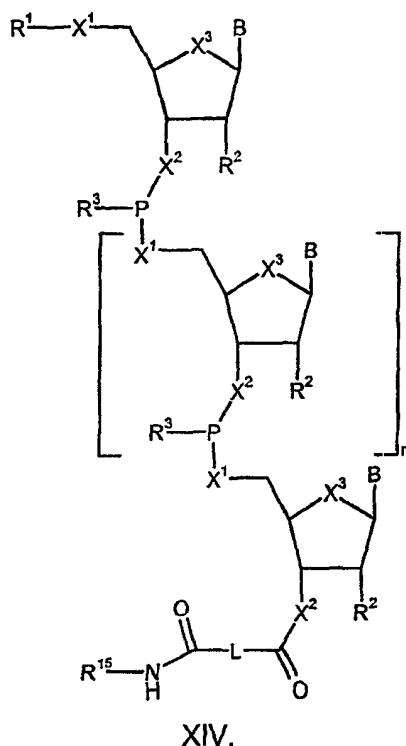


形成结构式 I 代表的三价磷多聚体。在结构式 XIIIa 和 XIIIb 中, R^3 、 R^4 和 R^5 的定义同上。 X^6 是卤素, 优选是氯或溴。

15 或者, 结构式 I 代表的三价磷多聚体或其立体异构物可以通过将结构式 VII 代表的核苷或其立体异构物的 3'-取代基加以保护, 形成结构

式 VIII 代表的第一中间体或其立体异构物。处理该第一中间体以除掉 R^1 , 从而形成 5'-去保护的核苷。使 5'-去保护的核苷与式 XIIIa 或 XIIIb 表示的三价磷化合物反应, 形成结构式 XI 表示的 5'-亚磷酰胺或其立体异构物。该 5'-亚磷酰胺在偶合催化剂存在下与结构式 VII 代表的化合物或其立体异构物反应, 形成结构式 X 代表的 3',5'-保护的二聚体或其立体异构物。处理该 3',5'-保护的二聚体以除掉 R^{16} , 形成 3'-去保护的二聚体。可以任选地使 3'-去保护的二聚体在偶合催化剂存在下与结构式 XI 代表的化合物或其立体异构物反应, 形成结构式 XII 表示的 3',5'-保护的三聚体或其立体异构物。可任选地重复 R^{16} 的去除及偶合步骤一次或多次, 以便形成 3',5'-保护的多聚体。由 3',5'-保护的多聚体中除掉 R^{16} , 形成 3'-去保护的多聚体, 它与结构式 XIIIa 或 XIIIb 中之一代表的三价磷化合物反应, 形成结构式 I 代表的三价磷多聚体或其立体异构物。

本发明的另一实施方案是一种三价磷多聚体衍生的固体载体及其制备方法。该三价磷多聚体衍生的固体载体可以用结构式 XIV 或其立体异构物表示:

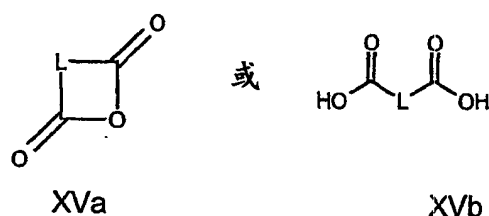


在结构式 XIV 中, X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^{15} 、B、L 和 n 的

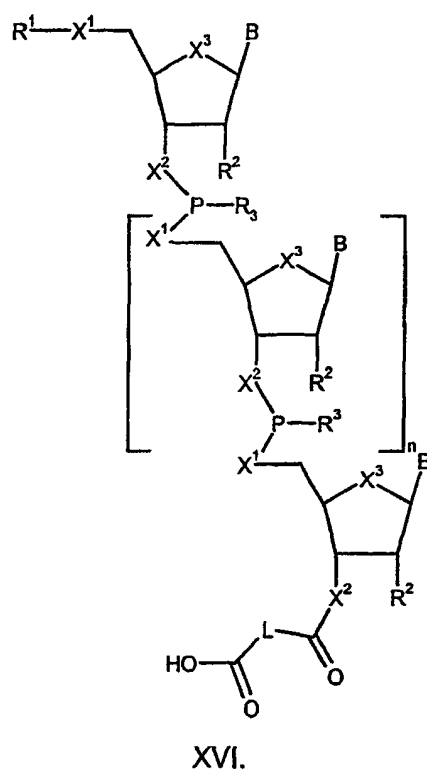
定义同上。

制备结构式 XIV 表示的三价磷多聚体衍生的固体载体的方法包括用上述方法之一制备 3'-去保护的多聚体。使该 3'-去保护的多聚体在碱存在下与结构式 XVa 或 XVb 表示的化合物反应：

5



形成由结构式 XVI 表示的固体载体承载试剂或其立体异构物：



10 在结构式 XVa、XVb 和 XVI 中，L 的定义同上。在结构式 XVI 中， X^1 、 X^2 、 X^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 和 B 的定义同上。使固体载体承载试剂与衍生带有伯胺或仲胺官能基的固体载体在碱和取代的或未取代的二脂基碳化二亚胺存在下反应，形成结构式 XIV 表示的三价磷多聚体衍生的固体载体。

15 在某些实施方案中，结构式 I 至 XII、XIV 和 XVI 的化合物的立体

异构物相应于其中糖部分是与图示的 d 型立体异构物相反的 L 型立体异构物的结构式。

因为本发明的多聚体具有三价磷键，所以可由该三价磷多聚体合成嵌合的低聚核苷酸（即，兼有磷酸二酯和硫代磷酸酯键的低聚核苷酸）。用三价磷多聚体合成低聚核苷酸预期会提高所要产物的产率，因为这比使用单体合成低聚核苷酸时需要较少的反应步骤。因此，使用本发明的三价磷多聚体预期比采用现有技术更有利于合成较长的低聚核苷酸。此外，采用本发明的多聚体能节省试剂，因为与用单体进行合成指定长度的低聚核苷酸相比，需要的反应步骤要少一半甚至更多。最后，因为用多聚体合成低聚核苷酸时不大可能产生 N-1 副产物，所以更容易将所要的低聚核苷酸与失败序列分离。因此，由于纯化期间产物损失较少，可以制得纯度和产率更高的所要产物。

附图简述

图 1 是三价磷多聚体的合成流程图。

图 2 是用于三价磷多聚体合成的另一种合成流程图。

图 3 表示在实施例 2 中制备的 2'-O-甲基二聚体。

图 4 表示用来制备实施例中合成的一种磷酸二酯和两种硫代磷酸酯的两种二聚体。

图 5 是使用三价磷二聚体合成实施例 4 中合成的低聚核苷酸的合成流程图。应该知道，为了得到所期望的序列，所示的与固体载体结合的胸苷部分可以用另外的核苷部分代替。

发明详述

本发明所用的脂族基团，包括完全饱和的或含一个或多个非芳族双键的直链或支链 C_1 - C_{18} 烃基，或者完全饱和的或含一个或多个非共轭双键的 C_3 - C_{18} 环烃基。低级烷基是完全饱和的直链或支链 C_1 - C_8 烃基或 C_3 - C_8 环烃基。脂族基团优选是低级烷基。

芳族基团包括碳环芳香环系（例如苯基）和与一个或多个碳环芳环或非芳环稠合的碳环芳香环系（例如，萘基、蒽基和 1,2,3,4-四氢萘基）。

本文所说的杂芳基团，包括杂芳基环系（例如噻吩基、吡啶基、吡唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、吲唑基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、嘧啶基、吡嗪基、噻唑基、异噁唑基、异噻

唑基、四唑基或噁二唑基)和其中一个碳环芳香环、碳环非芳香环、杂芳环或杂环烷基环与一个或多个其它的杂芳环稠合形成的杂芳环系(例如,苯并噻吩基、苯并咪唑、吲哚、四氢吲哚、氮杂吲哚、吲唑、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)。

5 本文所说的芳烷基是通过一个优选有 1 至约 6 个碳原子的脂族基与某一部分相连的芳族取代基。

这里所说的杂环烷基是一个非芳香环系,它优选有 5-6 个原子,并包括至少一个杂原子,例如氮、氧或硫。杂环烷基的实例包括吗啉、哌啶和哌嗪等。

10 脂族基团、芳族基团、芳烷基、杂芳基和杂环烷基的合适取代基包括芳基、卤化芳基、低级烷基、卤代低级烷基(例如三氟甲基和三氯甲基)、-O-(脂基或取代的脂族基)、-O-(芳基或取代的芳基)、苄基、取代的苄基、卤素、氰基、硝基、-S-(脂族基或取代的脂族基)和-S-(芳基或取代的芳基)。

15 胺、醇和硫醇保护基是本领域技术人员已知的。关于胺保护基的实例见 Greene 等, 有机合成中的保护基(Protective Groups in Organic Synthesis (1991), John Wiley & Sons, Inc.)一书的 309-405 页,该部分内容在本申请中全文引用作为参考。最好是将胺作为酰胺或氨基甲酸酯来保护。关于醇保护基的实例见同书的 10-142 页,该部分的内容在本
20 申请中全文引用作为参考。优选的醇保护基是叔丁基二甲基甲硅烷基。关于硫醇保护基的实例见同书的 277-308 页,该部分的内容在本申请中全文引用作为参考。

酸不稳定性保护基是可以利用与 Bronsted 酸或 Lewis 酸接触将其除掉的保护基。酸不稳定性保护基是本领域技术人员已知的。常见的
25 酸不稳定性保护基的实例包括取代或未取代的三苯甲基(同书的 60-62 页),取代的或未取代的四氢吡喃基(同书的 31-34 页),取代的或未取代的四氢呋喃基(同书的 36-37 页)或 9-苯基咕吨基(同书的 65 页)。优选的酸不稳定性保护基是取代的或未取代的三苯甲基,例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基(以后称作“DMT”)。三苯甲基优选被给电子基团
30 如烷氧基取代。

核苷碱基包括天然存在的碱基,例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶,以及改性碱基,例如 7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮-8-氮

- 杂鸟嘌呤、5-丙炔基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮-6-氧代嘌呤、6-氧代嘌呤、3-脱氮腺苷、2-氮代-5-甲基嘧啶、2-氧代-4-甲硫基-5-甲基嘧啶、2-硫羰基-4-氧代-5-甲基嘧啶、4-氧代-5-甲基嘧啶、2-氨基嘌呤、5-氟尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、
- 5 8-氨基嘌呤、4-三唑-5-甲基胸腺嘧啶和 4-三唑-5-甲基尿嘧啶。

被保护的核苷碱基是其中碱基的活性官能基被保护的核苷碱基。通常，核苷碱基具有能用胺保护基保护，例如通过形成酰胺或氨基甲酸酯加以保护的胺基。例如，腺嘌呤和胞嘧啶的胺基通常用苯甲酰保护基保护，而鸟嘌呤的胺基一般用异丁酰基、乙酰基或叔丁基苯氧基

10 乙酰基保护。然而，也可以使用其它的保护方案。例如，为了快速去保护，腺嘌呤和鸟嘌呤的胺基用苯氧乙酰基保护，而胞嘧啶的胺基用异丁酰基保护。当低聚核苷酸是用带有被保护的核苷酸碱基的本发明多聚体合成时，除去保护基的条件将取决于所用的保护基。当使用酰胺基形式保护的氨基时，可以用碱溶液，例如浓氨水溶液、正甲胺溶

15 液或叔丁胺/氢氧化铵溶液，处理该低聚核苷酸来除掉。

在这一节中提到的结构式应理解为在适当时包括相应的立体异构物。

结构式 I 或 II 代表的三价磷多聚体可以用来制备结构式 III 代表的低聚核苷酸。使用三价磷多聚体比使用单体的优越性在于需要的反应步骤

20 较少。因此可以合成更长的低聚核苷酸。预期用三价磷多聚体可以合成多于 150 个核苷酸碱基的低聚核苷酸。本发明的这种多聚体也可以用来合成较短的低聚核苷酸，例如含最多约 50 个碱基，如 8-35 个碱基的低聚核苷酸。

低聚核苷酸的合成可以在溶液中进行，或是在固体载体上进行。

25 当在溶液中合成时， R^{13} 是一个醇、胺或硫醇保护基。在合成了低聚核苷酸之后，可以除掉该醇、胺或硫醇保护基。当低聚核苷酸是在固体载体上合成时， R^{13} 代表固体载体或 $-Y^2-L-Y^2-R^{15}$ 。一般，使用三价磷多聚体在溶液相或固相中合成低聚核苷酸是以类似于由单体合成低聚核苷酸所发展的方法进行的，只是当使用多聚体时，偶合步骤常常比

30 用单体时要长约 25%-75%。使用三价磷多聚体进行低聚核苷酸的溶液相和固相合成的典型条件的实例陈述如下。

制备低聚核苷酸的第一步包括使三价磷多聚体与结构式 IV 表示的

5'-去保护的核苷或核苷酸偶合。在偶合反应期间，核苷或核苷酸的 5'-去保护基团与多聚体通过置换-NR₄R₅ 基团发生反应。当在溶液中合成时，该 5'-去保护的核苷酸的浓度常为约 0.02-2M，多聚体的浓度优选为 5'-去保护的核苷或核苷酸的约 1.1-2 当量。常常加入相当于 5'-去保护的核苷的约 2.5-5.0 当量的亲核偶合催化剂，例如四唑、S-乙硫基四唑、二氰基咪唑或吡啶𨾏盐（如氯化吡啶𨾏），以促进偶合反应。反应时间通常为约 20 分至约 60 分。

制备低聚核苷酸的第二步包括将低聚核苷酸的三价磷基团氧化或硫化。在这一步中，已偶合到 5'-去保护的核苷上的三价磷基团，以及在 5'-去保护的核苷或核苷酸与多聚体之间新形成的三价磷键，被氧化或硫化。

在溶液相合成中，氧化反应通常是用氧化剂处理低聚核苷酸来进行，例如在水存在下用 I₂，或在有机溶剂中用过氧化物（如叔丁基过氧化氢）。当用 I₂ 和水时，氧化溶液一般含约 1.1-1.8 当量的 I₂，并有碱和痕量水存在。反应在非质子极性溶剂（如 THF）中进行，溶液中加入有碱（例如叔烷基胺）和约 1% 的水。非质子溶剂与碱之比约为 4:1 至约 1:4（体积比）。在约 5-20 分钟后，将反应混合物倒入亚硫酸氢钠水溶液中以消除多余的碘，然后萃取到有机溶剂中。

或者是，可以用本领域技术人员已知的用于低聚核苷酸合成的任何硫转移试剂将三价磷基团硫化。硫转移试剂的实例包括 3H-苯并二噻茂-3-酮 1,1-二氧化物（也称作“Beaucage 试剂”），二苯甲酰四硫，苯基乙酰二硫化物，二硫化 N,N,N',N'-四乙基秋兰姆，3-氨基-[1,2,4]-二噻唑-5-硫酮（参见美国专利 6,096,881，其全部内容在这里引用作为参考），或元素硫。低聚核苷酸用以上试剂硫化的反应条件实例可以在 Beaucage 等，Tetrahedron(1993)，49:6123 中查到，该文献的内容在这里全文引用作为参考。3-氨基-[1,2,4]-二噻唑-5-硫酮是优选的硫转移试剂。通常，使低聚核苷酸与浓度约为 0.04-0.2M 的 3-氨基-[1,2,4]-二噻唑-5-硫酮在有机溶剂（如吡啶/乙腈，1:9 w/w）中的溶液接触。硫化反应在约 30 秒至约 2 分钟内结束。

在低聚核苷酸氧化或硫化之后，通常将未反应的 5'-去保护的核苷封端以使其在随后的偶合步骤中不能反应。将失败序列封端使得它们更容易与全长度的低聚核苷酸产物分离。任何能与亲核的 5'-端基（即，

-OH、-SH 或-NH₂) 反应并阻止它与三价磷多聚体反应的试剂均可用作封端剂。通常是在碱存在下使用酸酐，例如乙酸酐或异丁酸酐，或酰氯，例如乙酰氯或异丁酰氯，作为封端剂。

在封端反应完成后，除掉用 R¹ 表示的 5'-保护基。当 R₁ 是酸不稳定性保护基时，用酸处理低聚核苷酸将 R¹ 去除。优选 5'-保护基是三苯甲基，例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基。当 5'-保护基是三苯甲基时，可以用二氯乙酸或三氯乙酸在有机溶剂（如二氯甲烷）中的溶液处理低聚核苷酸将其去除。一旦除去了 5'-保护基，则可以任选地将反应循环（即，偶合步骤，氧化或硫化步骤，封端步骤（任选的）和去保护步骤）重复一次或多次，以得到所要长度的低聚核苷酸。

磷酸低聚核苷酸可以通过将三价磷基团氧化并选择核苷酸间磷保护基（例如 R³ 表示的基团），使得在核苷酸间基团去保护后形成磷酸酯基来制备。例如，将 β-氰基乙氧基保护的三价磷氧化后用碱法去保护，会形成磷酸酯基团。

硫代磷酸低聚核苷酸可以通过将三价磷基团硫化或氧化，并选择核苷酸间磷保护基（例如 R³ 表示的基团）使得在核苷酸间基团去保护后形成硫代磷酸酯基来制备。例如，β-氰基乙硫基保护的三价磷氧化后用无水碱性去保护，会形成硫代磷酸酯基团。

嵌合的低聚核苷酸的制备可以是将三价磷基团在一次或多次反应循环中氧化并将该三价磷基团在一次或多次另外的反应循环中硫化，同时适当选择核苷酸间磷保护基（例如 R³ 表示的基团），以形成所要求的磷酸酯或硫代磷酸酯连键。或者是，嵌合的低聚核苷酸可以通过选择多聚体来制备，该多聚体中一些核苷酸间保护基在去保护时形成硫代磷酸酯连键，例如 β-氰基乙硫基保护基，另一些核苷酸间保护基在去保护时形成磷酸酯键，例如 β-氰基乙氧基保护基。在这种方法里，在每次反应循环的偶合步骤后都将低聚核苷酸氧化。

当希望得到其中的 5'-端基是被保护的低聚核苷酸产物时，如果进行封端，则反应循环的最后一步可以是封端步骤；如果不进行封端，则反应的最后一步可以是氧化或硫化步骤。如果所要的是 5'-去保护的
低聚核苷酸，则反应循环可以以去保护步骤结束。通常，如果低聚核苷酸是要用反相高效液相色谱法（HPLC）纯化，则 5'-保护的
低聚核苷酸是所要的产物。如果低聚核苷酸要用离子交换色谱法纯化，则 5'-

去保护的底聚核苷酸通常是所要的产物。

用三价磷多聚体固相合成底聚核苷酸通常采用与溶液相合成相同的反应循环和试剂。但是，5'-去保护的核苷或核苷酸是承载在固相载体上，承载量常为每克载体约 50-100 μmol 。在偶合步骤中，向固相载体加入浓度通常为约 0.01-1M、优选约 0.1M 的三价磷在有机溶剂（例如乙腈）中的溶液。经常在临近偶合反应之前或之中，在含有多聚体的溶液中混合浓度约为 1.5mmol 至 1.5M 的亲核偶合催化剂的溶液。然后使结合了 5'-去保护的核苷或核苷酸的载体与该混合物接触约 2-10 分钟，优选约 5 分钟。

如果三价磷连键要在偶合反应完成后氧化，则使固体载体与氧化剂，例如与 I_2 /水混合物或与过氧化物（如叔丁基过氧化氢）在有机溶剂（如 THF，乙腈或甲苯）中接触。 I_2 和水的混合物是优选的氧化剂。当使用 I_2 和水的混合物时，也可以有其它的与水混溶的有机溶剂存在。通常，与含三价磷核苷酸间连键的底聚核苷酸结合的固体载体可以与 I_2 在水、与水混溶的非质子溶剂和碱的溶剂混合物中的溶液接触。一个典型的氧化溶液是约 0.05-1.5M 的 I_2 在（2:80:20）的水/四氢呋喃/二甲基吡啶中的溶液。固体载体一般用 I_2 溶液处理约 30 秒至 1.5 分。

或者是，固体载体可以与硫转移试剂在有机溶剂中的溶液接触，使三价磷基团硫化。例如，固相载体可以与 3H-苯并二噻茂-3-酮-1,1-二氧化物在有机溶剂（如乙腈）中的溶液（约 0.05-0.2M）接触约 30 秒至 1 分钟。

在固相法底聚核苷酸合成中，固体载体可任选地与偶合剂溶液接触约 30 秒至 1 分钟。在封端步骤之后，通过将固体载体与酸溶液接触约 1-3 分钟完成去保护步骤。此反应循环可以重复一或多次，直到合成出所要长度的底聚核苷酸。象溶液相合成一样，当反应循环以封端步骤或者氧化或硫化步骤结束时，得到的是 5'-保护的底聚核苷酸。当反应循环是以去保护步骤结尾时，得到的是 5'-去保护的底聚核苷酸。

当固相合成完成时，可以用标准方法从固体载体上除掉底聚核苷酸。通常，用浓氢氧化铵溶液在 25-60 $^{\circ}\text{C}$ 处理固体载体约 0.5 小时至约 16 小时或更长时间，这取决于该底聚核苷酸序列以及是否希望在这一步骤中除掉核碱基保护基。

三聚磷多聚体可以用两种不同的方法制备。在第一种方法中（此方法的一个实例见图1），将结构式VII表示的核苷进行保护，形成结构式VIII代表的第一中间体。该保护基优选是乙酰丙酰保护基或3-苯甲酰丙酰保护基。乙酰丙酰保护基可以用几种不同的方法加到核苷上（参见Greene等，有机合成中的保护基（protective Groups in Organic Synthesis），1991, John Wiley & Sons, Inc., 第97页，该部分内容在本申请中全文引用作为参考）。一种优选的用乙酰丙酰基或3-苯甲酰丙酰保护基保护核苷的方法是在吡啶中用乙酰丙酸酐或3-苯甲酰丙酸酐处理核苷约16-24小时。或者是，可以用乙酰丙酸或3-苯甲酰丙酸及二环己基碳化二亚胺在二氯甲烷和吡啶溶液中处理核苷，加上乙酰丙酰或3-苯甲酰丙酰保护基。

第一中间体随后经处理除掉 R_1 ，形成5'-去保护的核苷。除掉三苯甲基的方法列在Greene等的有机合成中的保护基（1991, John Wiley & Sons, Inc.）一书的60-62页，该部分内容在这里全文引用作为参考。除掉四氢吡喃基保护基的方法（p.31-34）和除掉四氢呋喃基保护基的方法（p.36-37）可以在Greene等的有机合成中的保护基（1991, John Wiley & Sons, Inc.）一书中查到，该部分内容在这里全文引用作为参考。三苯甲基优选使用80%（v/v）的乙酸水溶液处理第一中间体约7小时，或用约2%的三氟乙酸或二氯乙酸的二氯甲烷溶液处理约15分钟来去掉。

5'-去保护的核苷随后可以与结构式IX表示的亚磷酰胺偶合，形成结构式X表示的二聚体。此偶合反应通常在干燥的反应条件下于有机溶剂中进行。反应物的浓度一般为约0.05-0.5M。反应混合物中还存在着一种偶合催化剂，例如H-四唑或S-乙硫基四唑，数量常为5'-去保护的核苷的约2-6当量。偶合反应一般进行约2-16小时。

然后处理该3',5'-保护的二聚体以除掉 R^{16} ，形成3'-去保护的二聚体。当 R^{16} 是乙酰丙酰保护基时，可以用Greene等在有机合成中的保护基团（1991, John Wiley & Sons, Inc.）一书p.97中所述的方法除掉，该部分内容在这里全文引用作为参考。最好是，通过将3',5'-保护的二聚体与胼在比例为约4:1至1:4（体积比）的吡啶/乙酸中的约0.05-1M溶液接触约15分钟至1小时来除掉乙酰丙酰或3-苯甲酰丙酰保护基。

3'-去保护的二聚体可任选地在偶合催化剂存在下与结构式XI代表

的化合物反应。此偶合反应在干燥反应条件下于有机溶剂中进行。3'-去保护的二聚体和结构式 XI 代表的化合物的浓度约为 0.05-0.5M。还存在一种偶合催化剂，例如 H-四唑或 S-乙硫基四唑，其数量约相当于 3'-去保护二聚体的 2-6 当量。反应产物是结构式 XII 代表的 3',5'-保护的三聚体。

R^{16} 去保护反应和偶合反应可任选地用 3',5'-被保护的三聚体作为起始物重复一次或多次，形成 3',5'-被保护的多聚体。

然后处理 3',5'-被保护的多聚体以除掉 R^{16} ，形成 3'-去保护的多聚体。

该 3'-去保护的多聚体与磷酸化试剂反应，形成结构式 I 表示的三价磷多聚体。将结构式 XIII_a 或 XIII_b 表示的磷酸化试剂慢慢加到 3'-去保护的多聚体在有机溶剂（例如二氯甲烷、乙腈或 THF）中的无水溶液中。当磷酸化试剂是结构式 XIII_b 代表的化合物时，还向反应混合物中加入一种质子惰性有机碱，例如三乙胺或二异丙基乙胺。磷酸化试剂常过量使用，约为多聚体的 1.1-1.5 当量。反应可进行约 4-24 小时。反应完成后，可以任选地向反应混合物中加入正辛醇以便与任何留下的磷酸化试剂反应。优选该多聚体是二聚体（两个核苷酸碱基）或三聚体（三个核苷酸碱基）。

在制备三价磷多聚体的第二种方法（作为实例见图 2）中，结构式 VII 代表的核苷碱基用与 R^1 相正交的保护基 R^{16} 保护，形成结构式 VIII 表示的第一中间体。优选 R^{16} 是乙酰丙酰或 3-苯甲酰丙酰保护基。按照与制备三价磷多聚体的第一种方法相同的方式处理第一中间体以除去 R^1 。将用此反应序列形成的 5'-去保护的核苷用结构式 XIII_a 或 XIII_b 代表的磷酸化试剂处理，形成结构式 XI 表示的 5'-亚磷酰胺核苷。5'-磷酸化条件与对于形成三价磷多聚体的第一种方法所述的 3'-磷酸化条件相同。然后使 5'-亚磷酰胺在偶合催化剂存在下与结构式 VII 表示的化合物偶合，形成结构式 X 表示的 3',5'-保护的二聚体。偶合反应的反应条件与第一种形成多聚体的方法中的偶合反应相同。如上所述地处理 3',5'-保护的二聚体以除掉 R^{16} ，形成 3'-去保护的二聚体。同样如上所述，该 3'-去保护的二聚体可任选地在偶合催化剂存在下与结构式 XI 代表的化合物反应，形成结构式 XII 代表的 3',5'-保护的三聚体。3'-去保护反应和偶合反应可以任选地重复一次或多次以形成 3',5'-被保护的

多聚体。由 3',5'-保护的多聚体中除去 R^{16} 以形成 3'-去保护的多聚体，将 3'-去保护的多聚体如上所述地磷酸化，形成结构式 I 表示的三价磷多聚体。

5 衍生形成的带有结构式 XII 代表的三价磷多聚体的固体载体可以制备如下：使按上述方法形成的 3'-去保护的多聚体与结构式 XV_a 或 XV_b 代表的化合物反应，形成固体载体承载试剂。当 3'-去保护的多聚体与结构式 XV_a 表示的化合物反应时，反应在碱（例如吡啶）存在下进行。当 3'-去保护的多聚体与结构式 XV_b 表示的化合物反应时，在反应混合物中还应存在相当于结构式 XV_b 化合物至少约 1 当量的二脂基
10 碳化二亚胺。固体载体承载试剂可通过与能将末端羧酸转化为活性酯的化合物反应进行活化。能与末端羧酸反应形成活性酯的化合物实例包括对硝基苯酚，邻、对位二硝基苯酚、咪唑和 N-羟基琥珀酰胺。在与对硝基苯酚或邻、对二硝基苯酚形成活性酯的反应中，反应混合物中还应有脂基碳化二亚胺存在。

15 该固体载体承载试剂或活化的固体载体承载试剂可以用来衍生形成胺官能化的固体载体。固体载体上的胺官能基可以是伯胺或叔胺。使胺官能化的载体与活化的固体载体承载试剂在碱性溶液中反应，形成衍生的固体载体。反应条件的实例可参见美国专利 5,668,268，其内容在这里全文引用作为参考。或者是，使胺官能化的固体载体与未活
20 化的承载试剂在二脂基碳化二亚胺存在下于碱性溶液中接触以使固体载体衍生转化。反应条件的实例参见美国专利 5,668,268 和 4,812,512，其内容在这里全文引用作为参考。优选的二脂基碳化二亚胺是二环己基碳化二亚胺和二异丙基碳化二亚胺。

实施例

25 亚磷酰胺二聚体是用实施例 1 和 2 中所述步骤制备。实施例 3 中描述了制备亚磷酰胺三聚体的方法。带有磷酸二酯和/或硫代磷酸酯键的低聚核苷酸是用实施例 4 中详述的方法制备。在实施例 1-4 中，除非另外指明，所有的份数和百分数均为重量。

实施例 1（见图 1）

30 A. 2'-脱氧-N⁴-苯甲酰-3'-O-乙酰丙酰胞苷的合成：

标题化合物由市售的 2'-脱氧-N⁴-苯甲酰-5'-O-DMT-胞苷制备。将 2'-脱氧-N⁴-苯甲酰-5'-O-DMT-胞苷在室温下用乙酰丙酸酐（1.5 当量）

于无水吡啶中处理 5 小时, 得到 2'-脱氧-N⁴-苯甲酰-3'-O-乙酰丙酰-5'-O-DMT-胞苷。将其在室温下于 80% (V/V) 的乙酸水溶液处理 1.5 小时除掉 5'-O-DMT 保护基, 得到 2'-脱氧-N⁴-苯甲酰-3'-O-乙酰丙酰胞苷。将这样得到的产物用硅胶柱色谱法纯化。

5 B. 2'-脱氧-5'-O-DMT-N²-异丁酰鸟苷-3'-O-P-(OCH₂CH₂CN)-5'-O-N⁴-苯甲酰-2'-脱氧胞苷-3-O-乙酰丙酸酯:

将步骤 A 中合成的 N⁴-苯甲酰-2'-脱氧胞苷-3'-乙酰丙酸酯 (8.58g, 20mmol) 和四唑 (0.56g, 80mmol) 在减压下与无水甲苯共蒸发, 然后溶在无水乙腈 (100ml) 中。向此溶液中加入市售的 N²-异丁酰-10 5'-O-DMT-2'-脱氧鸟苷-3'-O-亚磷酸胺 (16.0g, 19mmol), 并将该溶液在室温和氩气下搅拌 4 小时。将溶液浓缩成粘稠体, 然后溶在用氩气饱和的乙酸乙酯中。该溶液依次用冷的碳酸氢钠溶液和冷水洗。用无水硫酸钠干燥后, 将溶液减压浓缩成浅黄色泡沫体。将产物用柱色谱法纯化, 得到完全保护的二聚核苷亚磷酸三酯 (19.5g), 用 MR 进行
15 鉴定。

C. 2'-脱氧-5'-O-DMT-N²-异丁酰鸟苷-3'-O-P-(OCH₂CH₂CN)-5'-O-N⁴-苯甲酰-2'-脱氧胞苷-3'-OH 的合成:

将步骤 B 中合成的全保护的二核苷亚磷酸三酯 (17.5g, 15mmol) 用胼在吡啶/乙酸 (4:1, V/V) 中的 0.5M 溶液 (100mL) 于室温下处理
20 30 分钟。向该溶液中加入吡啶 (100mL), 将混合物减压浓缩。产物溶在二氯甲烷 (500mL) 中, 然后仔细地依次用碳酸氢钠溶液 (2 × 300mL) 和水 (300mL) 洗。有机层用无水硫酸钠干燥。将溶液过滤并减压浓缩, 得到固体泡沫, 将其用硅胶包谱法纯化, 得到所要的产物 (13.4g, 83.4%)。

25 D. 2'-脱氧-5'-O-DMT-N²-异丁酰鸟苷-3'-O-P-(OCH₂CH₂CN)-5'-O-N⁴-苯甲酰-2'-脱氧胞苷-3'-O-β-氰乙基-(N,N-二异丙基氨基)亚磷酸胺的合成:

将步骤 C 中合成的 5'-O-DMT-N²-异丁酰-2'-脱氧鸟苷-3'-O-P-(OCH₂CH₂CN)-5'-O-N⁴-苯甲酰-2'-脱氧胞苷-3-OH (12.5g, 11.7mmol) 利用在减压下与乙腈共蒸发进行干燥。将干燥过的物质溶在蒸馏过的二
30 氯甲烷中。用注射器向该溶液中加入二 (N,N-二异丙基氨基)-β-氰基乙氧基胼 (4.5g, 15mmol), 并加入固体的 S-乙硫基四唑 (1.6g,

12.5mmol)。室温下搅拌 16 小时后，加入 500L 正辛醇，将溶液再搅拌 2 小时。将反应混合物浓缩成粘稠的液体，溶于乙酸乙酯 (500ml) 中，然后依次用碳酸氢钠溶液和氯化钠溶液洗。将该乙酸乙酯溶液用无水硫酸钠干燥，然后浓缩成固体。该粗产物用硅胶柱色谱法纯化，
5 得到所要的二聚体亚磷酰胺 (12.8g, 86.2%)。

实施例 2

A. 2'-脱氧-2'-O-甲基-3'-O-乙酰丙酰尿苷的合成:

将 2'-脱氧-2'-O-甲基-5'-O-二甲氧基三苯甲基尿苷 (11.2g, 20mmol) 利用与吡啶 (3×100ml) 共蒸发进行干燥，然后溶在无水吡啶 (150ml) 中。加入乙酰丙酸酐 (6.5g, 30mmol) 和 N,N-二甲基氨基吡啶 (0.1g, 催化数量)，将溶液在室温下搅拌 5 小时。当用薄层色谱法检测溶液中不再残留起始物时，将溶液蒸发至粘稠物体后溶于乙酸乙酯中。该乙酸乙酯溶液依次用碳酸氢钠溶液和氯化钠溶液洗。乙酸乙酯层用硫酸钠干燥，然后浓缩成泡沫体，得到 2'-脱氧-2'-O-甲基-3'-
10 O-乙酰丙酰-5'-O-二甲氧基三苯甲基尿苷，用质子 NMR 鉴定。该物质不经纯化直接用于下一步骤。

然后将 2'-脱氧-2'-O-甲基-3'-O-乙酰丙酰-5'-O-二甲氧基三苯甲基尿苷 (14.0g) 在室温下用 80% (v/v) 乙酸水溶液 (500ml) 处理 1.5 小时。向此溶液中加入吡啶 (400ml)，然后将混合物减压浓缩成粘稠液体。此粘稠物用乙醚研制，得到胶状固体，将其用硅胶柱色谱法纯化，以甲醇百分含量渐增的乙酸乙酯洗脱。收集所要的级分并浓缩成固体，从二氯甲烷和乙醚混合物中结晶出 2'-脱氧-2'-O-甲基-3'-O-乙酰
20 丙酰尿苷。产物用质子 NMR 鉴定。

B. 2'-脱氧-2'-O-甲基-5'-O-DMT-尿苷-3'-O-P-(OCH₂CH₂CN)-5'-O-
25 尿苷-2'-脱氧-2'-O-甲基-3'-O-乙酰丙酸酯的合成 (偶合反应):

将步骤 A 中合成的 2'-脱氧-2'-O-甲基-3'-O-乙酰丙酰尿苷 (5.0g, 14.0mmol) 和四唑溶在无水乙腈中并在减压下共蒸发。将干燥的物质用高真空泵抽气 1 小时，然后溶在乙腈 (70ml) 中。向该溶液中加入 2'-脱氧-2'-O-甲基-5'-O-DMT-尿苷-3'-亚磷酰胺 (9.5g, 12.5mmol)，将
30 反应混合物于室温下搅拌 16 小时。减压除掉有机溶剂，残余物溶在已用氩气饱和的乙酸乙酯中。该溶液依次用碳酸氢钠和氯化钠溶液洗。有机层用无水硫酸钠干燥，然后减压浓缩。粗产物用硅胶色谱法纯化，

用甲醇百分含量渐增的乙酸乙酯洗脱。将所要的级分收集合并，浓缩得到 9.5g 全保护的二聚体。最后用质子和磷 NMR 法鉴定产物。

C. 2'-脱氧-2'-O-甲基-5'-O-DMT-尿苷-3'-O-P-(OCH₂CH₂CN)-5'-O-尿苷-2'-脱氧-2'-O-甲基的合成（去除 3'-O-乙酰丙酰基团）：

- 5 将步骤 B 中合成的全保护的二核苷亚磷酸三酯（8.0g, 8.75mmol）在室温下用水合肼在吡啶：乙酸（4:1）中的溶液（0.5M, 50ml）处理 30 分钟。向该溶液中加入吡啶（50ml），然后将该混合物浓缩至粘稠液体。将其溶在氯仿中，用碳酸氢钠溶液和水洗。氯仿萃取液用硫酸钠干燥，随后蒸发至干。将这样得到的粗产物用硅胶柱色谱法纯化，
10 得到 3'-去保护的二聚体（6.5g, 8.0mmol），用质子和磷 NMR 进行鉴定。

D. 2'-脱氧-2'-O-甲基-5'-DMT-尿苷-3'-O-P-(OCH₂CH₂CN)-5'-O-尿苷-2'-脱氧-2'-O-甲基-3'-O-β-氰乙基-(N,N-二异丙基氨基)亚磷酰胺（二聚核苷亚磷酰胺合成子）的合成

- 15 将步骤 C 中合成的 3'-去保护的二核苷亚磷酸三酯（6.1g, 7.46mmol）通过在减压下与无水乙腈共蒸发进行干燥。干燥过的物质溶于新蒸馏和干燥的二氯甲烷（50ml）中。向此溶液中加入磷酸化试剂二（N,N-二异丙基氨基）-β-氰基乙氧基膦（3.4ml, 11.2mmol），随后加入 S-乙硫基四唑（0.75g, 6.0mmol），将反应混合物在室温下搅拌
20 16 小时。向反应混合物中加入正辛醇（0.13mL）以便与多余的磷酸化试剂反应，将反应混合物再搅拌 2 小时。最后，将反应混合物用 5% 的二异丙基乙胺的氯仿溶液（v/v, 350ml）稀释，立即用碳酸氢钠溶液（2 × 150ml）和氯化钠溶液（150ml）洗。氯仿层用硫酸钠干燥，随后浓缩成固体。该二聚体亚磷酰胺产物（见图 3）用 0.1%(v/v)的二异丙基
25 乙胺/乙酸乙酯以硅胶色谱法纯化。得到 6.5g 所要的级分，P-NMR 鉴定纯度为 98%。

实施例 3：三聚体亚磷酰胺的合成：

- 三聚体亚磷酰胺可以采用与实施例 1B 或 2B 中给出的类似反应条件，通过亚磷酰胺二聚核苷（例如实施例 1D 或 2D 中形成的化合物）
30 与 5'-羟基-2'-脱氧-3'-O-乙酰丙酰核苷或 5'-羟基-2'-O-保护的-3'-O-乙酰丙酰核苷在 4.0 当量四唑存在下于乙腈中反应来制备。三聚核苷的 3'-末端的乙酰丙酰基可以利用肼的吡啶/乙酸溶液，采用与实施例 1C 或

2C 中给出的类似反应条件除掉。经纯化后，带有 2 个亚磷酸三酯连键的 3'-去保护的三聚核苷可以采用与实施例 1D 或 2D 中给出的类似反应条件，用二(N,N-二异丙基氨基)- β -氰基乙氧基膦和 S-乙硫基四唑进行磷酸化，得到带有 2 个亚磷酸三酯连键的三聚核苷的亚磷酰胺。

- 5 实施例 4：兼有磷酸二酯键和硫代磷酸酯键的低聚核苷酸的合成（见图 5）：

低聚核苷酸的合成是在 DNA 合成仪 8909 Expedite (Applied Biosystems) 上进行。遵照标准的亚磷酰胺化学合成方案，但稍作修改。具有亚磷酸三酯键的亚磷酰胺二聚核苷在乙腈中的浓度为 0.1M。合成
10 中用的二聚体示于图 4 中。使用二聚体亚磷酰胺进行链加长反应时的偶合时间比单体亚磷酰胺的要长 50%。偶合反应后，亚磷酸三酯键或是用碘溶液转化成稳定的磷酸三酯，或是用 Beaucage 试剂转化成稳定的硫代磷酸酯。每次合成都进行 10 次反应循环以形成具有 21 个核苷酸碱基的低聚核苷酸。制备了 1 个具有序列 ACACACACACACACACACT
15 (SEQ ID No 1) 的磷酸酯 21 聚体和 2 个具有序列 ACACACACACACACACACT (SEQ ID No 1) 和 GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
(SEQ ID No. 2) 的硫代磷酸酯 21 聚体。合成结束后，在 50℃ 用浓氢氧化铵处理连接着全保护的低聚核苷酸链的固相载体，以便释放该链并去除 β -氰乙基保护基和核苷碱基保护基。粗制的低聚核苷酸用离子交换
20 HPLC 法分析。色谱图上的主峰是所要的产物。在具有硫代磷酸化的二酯键的低聚核苷酸的情形，粗产物还用 P-NMR 分析。谱图给出了硫代磷酸二酯的特征化学位移，看不到磷酸二酯键的化学位移。

等同物

- 25 本发明已参照其优选的实施方案作了具体的说明和描述，但本领域技术人员将会理解，在不偏离由所附权利要求包括的本发明范围的情况下，可以进行各种形式和细节的变化。

<110> 艾夫西亚生物科技公司

<120> 用于合成低聚核苷酸的合成子

<130> SMC 60437/WO

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 实施例 4 中制备的序列

<400> 1

acacacacac acacacacac t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 实施例 4 中制备的序列

<400> 2

gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt t

21

图1: 合成三价磷多聚体的方法1 (DMT=4, 4'-二甲氧基三苯甲基;
 C^{Bz} = 苯甲酰保护的胞嘧啶, G^{iBu} = 异丁酰保护的鸟嘌呤).

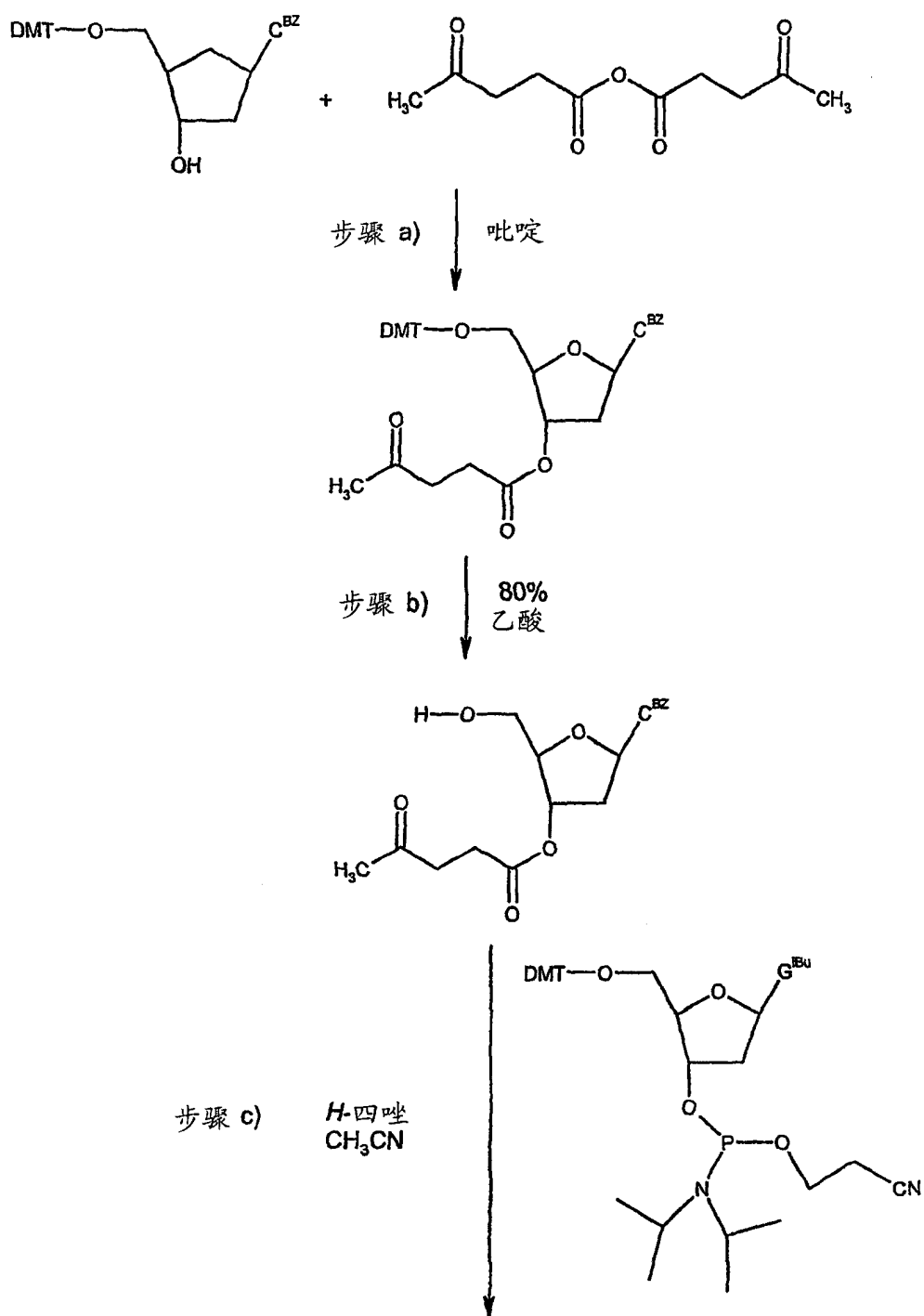


图 1

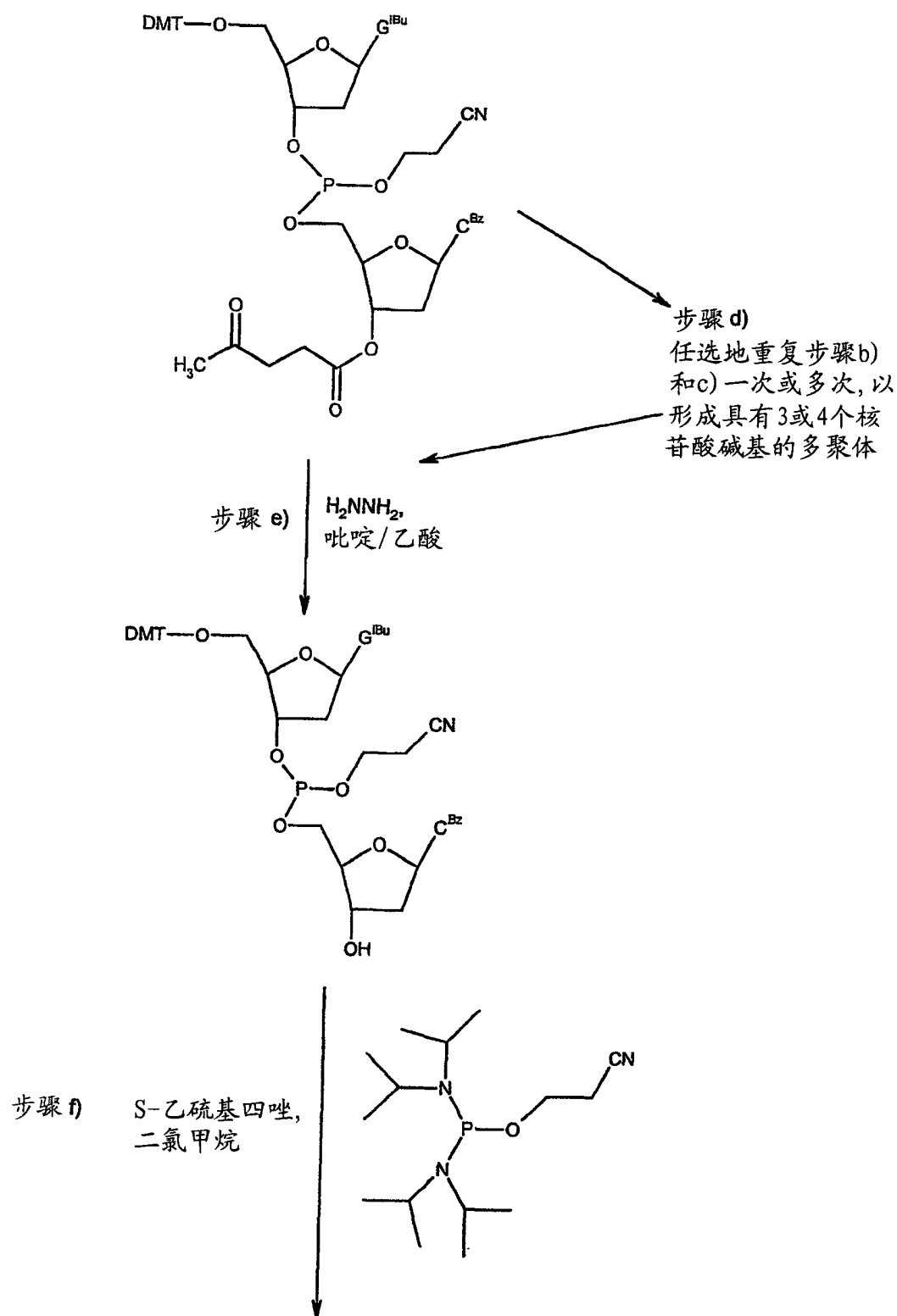
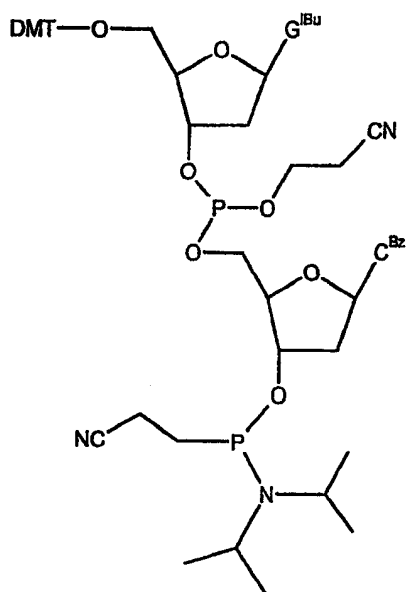


图 1 (续)



三价磷二聚体

图 1(续)

图2: 合成三价磷多聚体的方法2 (DMT=4, 4'-二甲氧基三苯甲基;

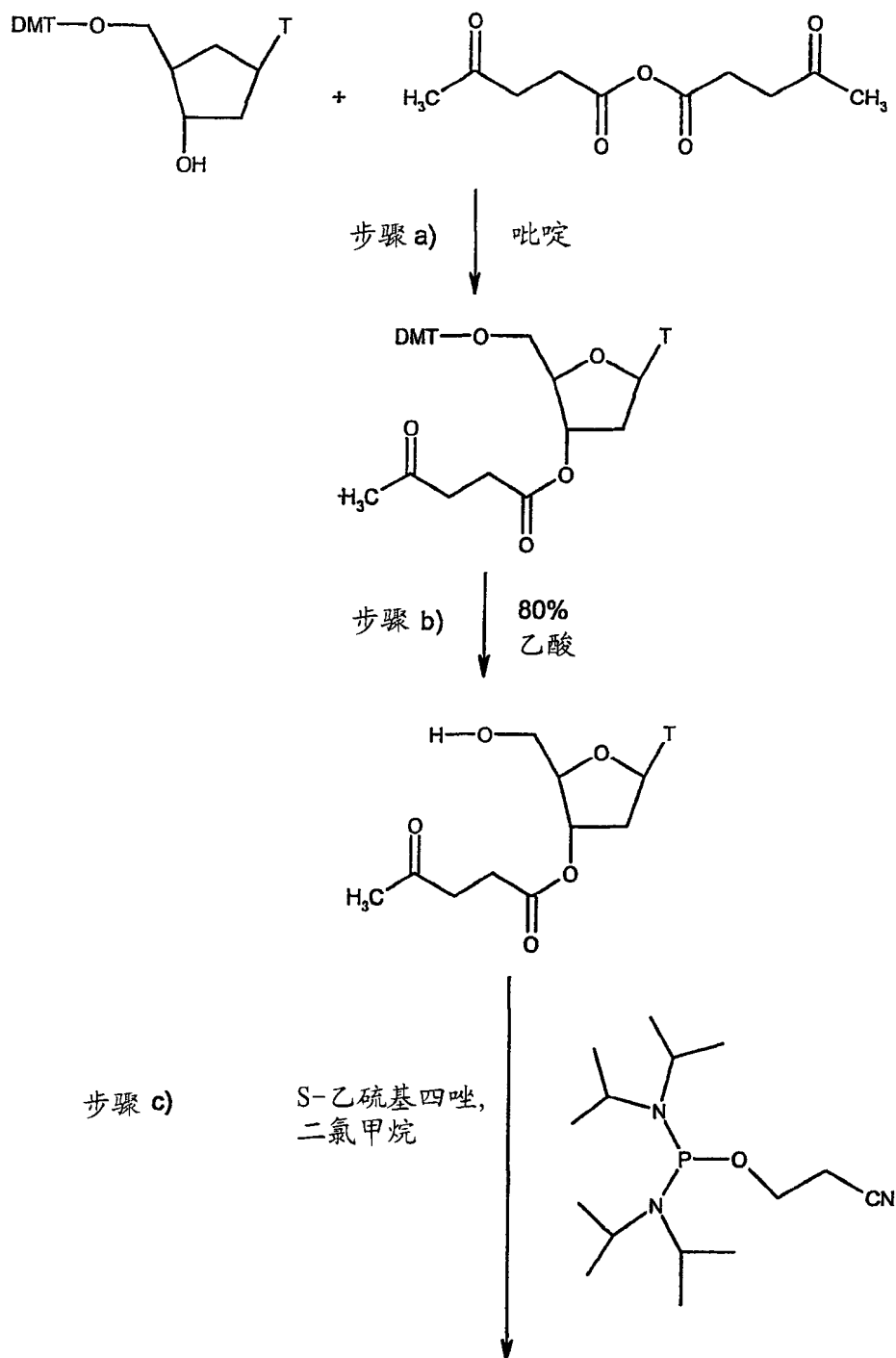
T=胸腺嘧啶, G^{Bu} = 异丁酰保护的鸟嘌呤)

图 2

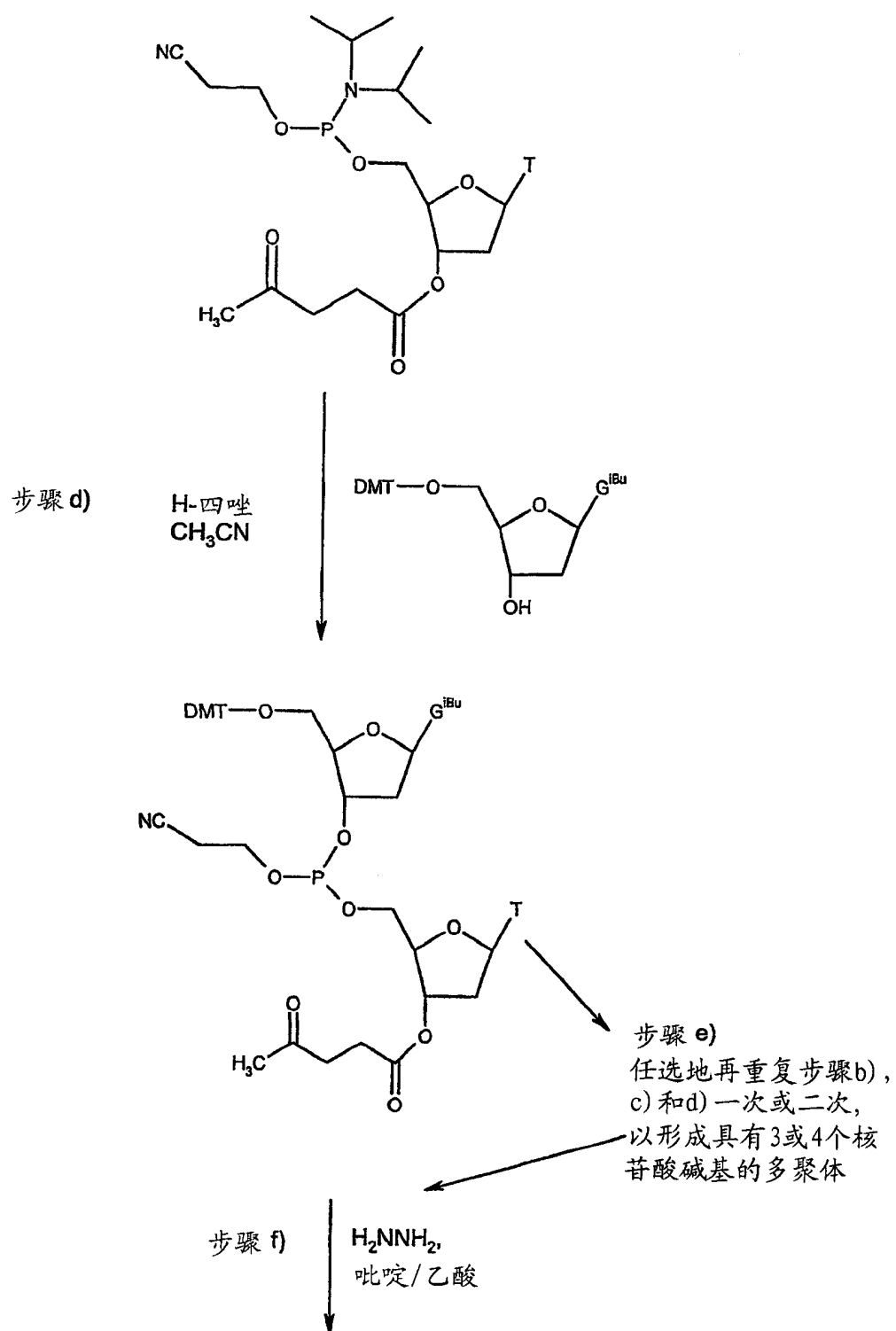


图 2 (续)

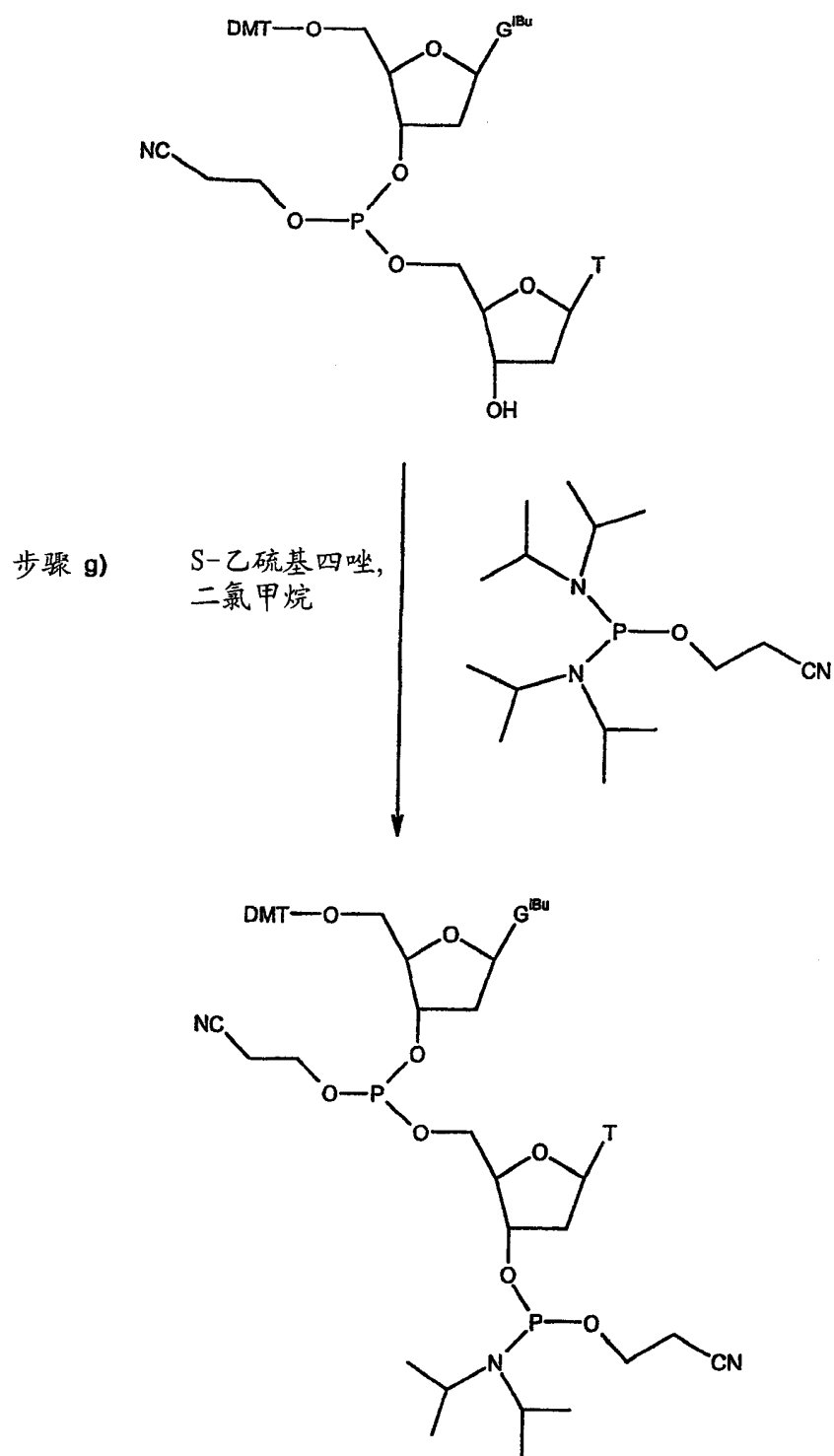


图 2(续)

图3: 实施例2中制备的2'-O-甲基二聚体

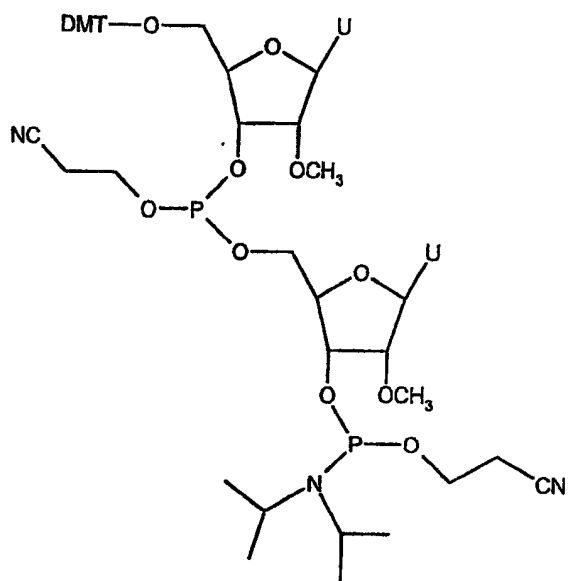


图 3

图4: 用于合成实施例4中低聚核苷酸的二聚体

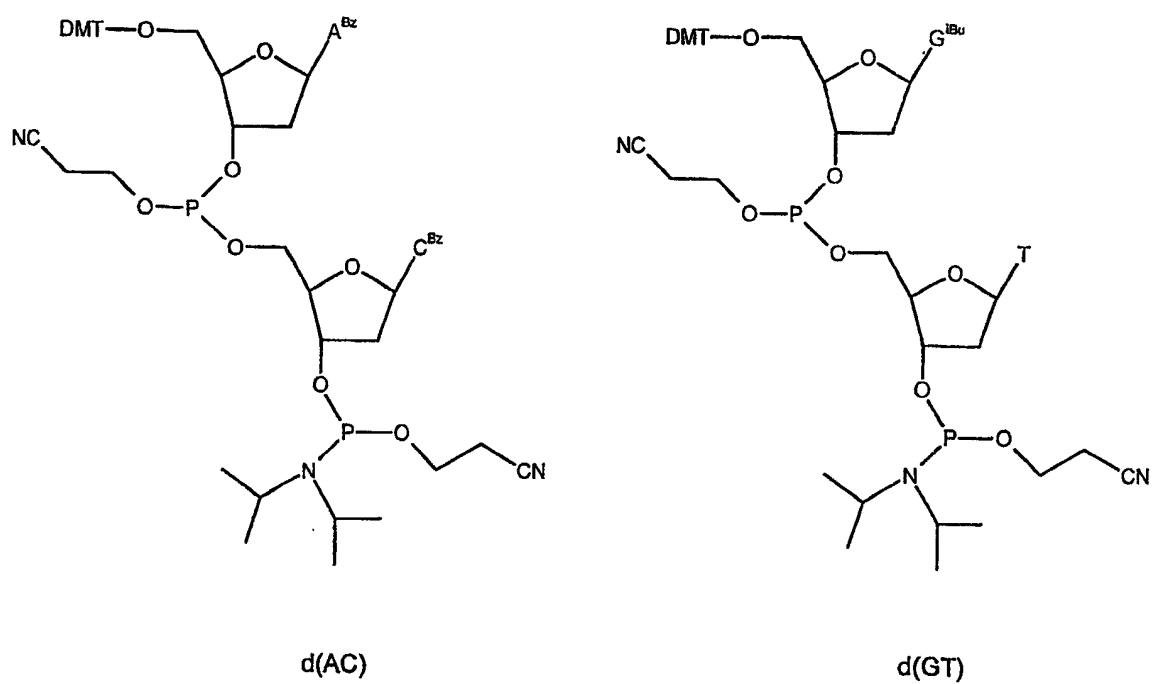


图 4

图5: 使用三价磷二聚体合成低聚核苷酸

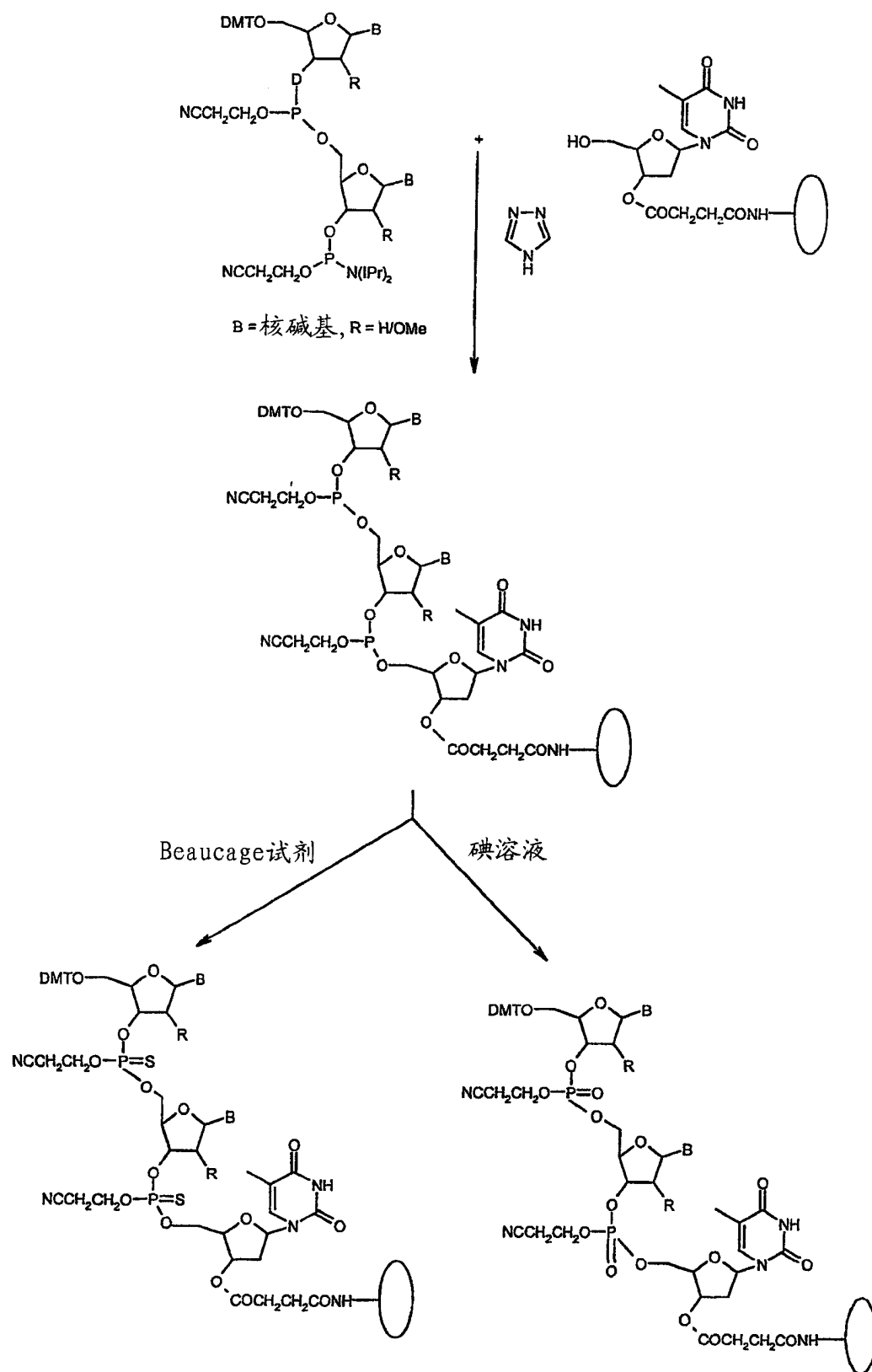


图 5