

[接上页]

(30) 优先权数据

61/602,373 2012.02.23 US

(72) 发明人 N·马利卡尔琼纳·雷迪

罗伯特·亚历山大·东加

(51) Int. Cl.

C07D 233/60 (2006.01)

C07F 9/54 (2006.01)

C07H 19/02 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C40B 70/00 (2006.01)

C40B 80/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Matthew Hassler,等.RNA synthesis via dimer and trimer phosphoramidite block coupling.《Tetrahedron Letters》.2011,第52卷(第20期),第2576页方案1,第2577页方案2、3、4及表1.

Matthew Hassler,等.RNA synthesis via dimer and trimer phosphoramidite block

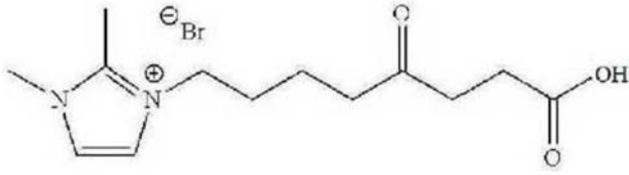
coupling.《Tetrahedron Letters》.2011,第52卷(第20期),第2576页方案1,第2577页方案2、3、4及表1.

Hariharan Venkatesan,等.Improved Utility of Photolabile Solid Phase Synthesis Supports for the Synthesis of Oligonucleotides Containing 3-Hydroxyl Termini.《J. Org. Chem.》.1996,第61卷(第2期),第525页左栏及化合物3.

Sigrid Buhler,等.New Types of Very Efficient Photolabile Protecting Groups Based upon the [2-(2-Nitrophenyl)propoxy] carbonyl (NPPOC) Moiety.《HELVETICA CHIMICA ACTA》.2004,第87卷(第3期),第628页.

Anna Leisvuori,等.4-Oxoheptanedioic acid: an orthogonal linker for solid-phase synthesis of base-sensitive oligonucleotides.《Tetrahedron Letters》.2008,第49卷(第26期),第4120页方案1及左栏第2段.

1. 一种离子标记接头,选自以下所组成的组:



。

用于合成寡核糖核苷酸的离子标记

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求对2012年2月23日提交的美国临时申请号61/602373和 2011年8月23日提交的国际PCT申请号PCT/CA2011/000950的优先权,上述两者的全部内容以引用方式结合于本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及寡核苷酸的化学合成,尤其是寡核糖核苷酸,尤其是溶液相合成(solution phase synthesis)。

背景技术

[0004] 对于合成寡核苷酸的需求呈指数增长,这是因为基因组测序、功能基因组学、和基于PCR的检测方法消耗大量的DNA寡核苷酸。另外,目前正在进行临床试验的基于新DNA和RNA的治疗平台(如反义和siRNA基因沉默策略)的潜在成功可以导致对于短合成DNA和RNA分子的前所未有的需求。

[0005] 作为潜在疗法的RNA干扰(RNAi)是治疗人疾病的一种全新的方式 [Manoharan, Curr.Opin.Chem.Biol.8,570-579(2004)]。然而,在RNAi技术的发展中,实现靶向组织和细胞递送、体内稳定、和RNA的成本有效的大规模合成是显著的瓶颈。基于主流RNAi的疗法的现实正在迅速来临而对于这些化合物的大规模的需求可能很快就会超过制造商的能力。因此,需要开发这样的合成策略,其使得能够快速、高纯度和/或成本有效地大规模合成RNA寡聚物。

[0006] 目前用于DNA和RNA合成的方法依靠在固体载体上逐步添加单体亚磷酸胺单元 [Caruthers,M.H.et al.Methods in Enzymology154,287-313 (1987);Alvarado-Urbina,G.et al.Science214,270-274(1981)]。从3'-端至5'-端的链延伸是优选的,其是通过将具有3'-磷(III)基团(以其活化形式)的核苷单元偶联于另一核苷单元的自由5'-羟基来实现。作为固相载体,可以使用500至1000Å可控孔度玻璃(CPG,controlled pore glass)载体或有机聚合物载体,如primer聚苯乙烯载体PS200。链延伸开始于借助于有机酸来切割5'-O-二甲氧基三苯甲基,因而释放亲核性5'-羟基。然后,在有活化剂存在的情况下,允许将此末端亲核体偶联于受保护的核苷3'-O-亚磷酸胺单体。在RNA合成的情况下,需要2'-羟基的适当保护。在称作'帽化(capping)'的过程中乙酰化任何未反应的5'-羟基。最常用的用于此目的的基团是乙酰酯。因此,借助于乙酸酐的'帽化'会酯化任何未反应的5'-羟基并停止副产物的积累。然后,新产生的亚磷酸三酯3',5'-键被氧化以提供所期望的和更加稳定的磷酸三酯。重复上述过程直到获得具有所期望长度和序列的寡聚物。自固体载体切割寡聚物以及从糖、磷酸酯和核碱基(nucleobase)除去保护基团,从而提供所期望的目标寡聚物,其然后通过离子交换高压液相层析(HPLC)、离子对反相HPLC、或聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离自较短的失败序列。然后通过质谱分析来表征全长寡聚物。其时,可以在DNA微阵列或"基因芯片"上并行地合成大量的DNA寡聚物 [Ramsay G., Nature

Biotechnology16,40-44(1998)]。

[0007] 相同的迭代法(iterative method)可以应用于在溶液中DNA和RNA 寡核苷酸的合成,例如如最近由Donga等描述的,其中利用离子型可溶性载体[例如,Donga,R.A.et al., J.Org.Chem.71,7907-7910(2006);Donga, R.A.et al.,Can.J.Chem.85,274-282(2007)]。离子型可溶性载体的使用便于,相对于在寡核苷酸合成循环中使用的所有其它试剂,选择性沉淀增长的寡核苷酸。

[0008] 到目前为止,已经有许多尝试来设计保护基团和方法,其实施为构建高质量寡核糖核苷酸所需要的条件[关于评论,参见Beaucage,S.L.Curr. Opin.Drug Discov.Devel.11,203-16(2008);Reese,C.B.Organic & Biomolecular Chemistry3,3851-3868(2005)]。事实上,多年来,RNA合成一直被视为远比DNA合成更复杂,这是因为难以发现相容的2'-保护基团,其(a)提供较高的逐步偶联产率,(b)在整个链装配中是稳定的,以及(c)在合成结束时可以被选择性地除去,而没有发生磷酸二酯键异构化或降解。

[0009] 最广泛使用的2'-保护基团是2'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)[Ogilvie,K.K.et al.Tetrahedron Letters15,2861-2867(1974)]。在有氟离子存在的情况下,在RNA链装配结束时,除去此保护基团。其它基于甲硅烷基醚的保护基团(描述用于核苷的保护)是三异丙基甲硅烷基(TIPS)、甲基二异丙基甲硅烷基(MDIPS)、环状烷基甲硅烷基和其它甲硅烷基基团[Ogilvie,K.K.et al.J.of Carbohydrates,Nucleosides,Nucleotides3,197-227(1976);Damha M.J,Ogilvie K.K.(1993),Oligoribonucleotide synthesis:the silyl-phosphoramidite method.In:Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties,Methods in Molecular Biology(Agrawal S,ed.) Vol.20.Totowa,NJ:The Humana Press Inc.pp.81-114]。其中,TIPS保护已被描述主要用于5'-O-单甲氧基三苯甲基N2-异丁酰基鸟苷衍生物,这是因为通过硅胶层析可以更容易地彼此分离2'和3'-O-TIPS异构体[Damha M.J,Ogilvie K.K.(1993), Oligoribonucleotide synthesis:the silyl-phosphoramidite method.In:Protocols for Oligonucleotides and Analogs:Synthesis and Properties,Methods in Molecular Biology(Agrawal S, ed.) Vol.20.Totowa,NJ:The Humana Press Inc.pp.81-114;Damha,M.J.et al.Tetrahedron Letters45,6739-6742(1992)]。相对于TIPS、TBDPS和其它体积较大的甲硅烷基醚,TBDMS基团的较小的空间体积将有利于TBDMS保护基团,相比于用于RNA合成的其它保护基团,其已得到最广泛使用。借助于亚磷酰胺缩合程序偶联的2'-O-TBDMS单体已允许寡核糖核苷酸的高效合成[Ogilvie,K.K.et al. Proc.Natl.Acad.Science(USA),85,5764-5768(1988);Usman,N.et al.J. Am.Chem.Soc.109,7845-7854(1987)]。

[0010] 用于2'-羟基的保护的甲硅烷基醚的潜在缺点在于,在质子溶剂、亲核性催化剂、或碱性条件的影响下,它们被广泛承认的经历2'至3'异构化的能力。例如,在有甲醇、咪唑、吡啶/水、或氨水存在的情况下,TBDMS基团从O2'迁移至O3'位置(反之亦然),从而产生核苷O2'和O3'甲硅烷基区域异构体(位置异构体,regioisomer)的混合物[Ogilvie,K.K.and Entwistle, D.W.Carbohydrate Res.89,203-210(1981);Ogilvie,K.K.(1983) Proceedings of the5th International Round Table on Nucleosides,Nucleotides and Their Biological Applications,(Rideout,J.L.et al.eds.),Academic, London, pp.209-256);Damha M.J,Ogilvie K.K.(1993),Oligoribonucleotide synthesis:the

silyl-phosphoramidite method. In: *Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties, Methods in Molecular Biology* (Agrawal S, ed.) Vol. 20. Totowa, NJ: The Humana Press Inc. pp. 81-114].

[0011] 甲硅烷基异构化是其它O-甲硅烷基醚保护基团的特征。在甲醇中,尿苷和7-去氮鸟苷的O-TIPS衍生物也经历异构化,虽然比它们的O-TBDMS对应物更缓慢[Ogilvie, K.K. et al. *J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides* 3, 197-227 (1976); Seela, F. and Mersmann, K., *Helvetica Chimica Acta*, 76, 1435-1449 (1993)]. 在乙醇氨水条件下,5'-O-单甲氧基三苯甲基-N²-异丁酰基-2'-O-TIPS鸟苷经历异构化以产生可以通过层析加以分离的2'/3'-TIPS区域异构体的混合物。这提供了一种方法来将更多的不需要的3'-异构体转化(回收利用)成更有用的2'-异构体[Damha M. J., Ogilvie K. K. (1993), *Oligoribonucleotide synthesis: the silyl-phosphoramidite method. In: Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties, Methods in Molecular Biology* (Agrawal S, ed.) Vol. 20. Totowa, NJ: The Humana Press Inc. pp. 81-114].

[0012] 在非质子溶剂中,2'-O-甲硅烷基基团通常并不迁移到O^{3'}。当严格遵守这些条件时,可以以区域异构体纯形式来制备2'-O-甲硅烷基化核糖核苷-3'-O-亚磷酰胺衍生物[Milecki, J. et al. *Nucleosides & Nucleotides*, 8, 463-474 (1989); Scaringe, S. A. et al. *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433-5341 (1990)]. 这显然是重要的要求,因为甚至微量3'-O-甲硅烷基区域异构体的存在将影响所期望的RNA序列的质量和生物活性。

[0013] 用于2'-羟基位置的许多其它保护基团已用于RNA的合成[评论于 Beaucage, S. L. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11, 203-16 (2008); Reese, C. B. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3, 3851-3868 (2005)]. 已报道,利用包含2'-三异丙基甲硅氧基甲基(TOM)基团、2'-缩醛-乙酰丙酰基基团(2'-acetal-levulinyl)、和2'-O-二(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE)基团的单体来进行RNA合成会产生更高的偶联效率,这是因为这些保护基团表现出比2'-TBDMS基团更低的位阻[对于比较研究,参见Lackey, J. G. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 8496-8502 (2009)]. 如同TBDMS基团,利用氟化物来除去TOM保护基团。

[0014] 在所有情况下,寡核糖核苷酸的合成是复杂的多步骤过程,其需要寡核苷酸链的装配:通常开始自单体亚磷酰胺结构单元(例如,5'-O-二甲氧基三苯甲基-N-受保护的-2'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基-核苷-3'-O-亚磷酰胺),碱基不稳定的核碱基保护基团(例如,苯甲酰基、异丁酰基、乙酰基、苯氧基乙酰基、乙酰丙酰基等)的去保护,切割自载体(例如,玻璃珠或聚苯乙烯),接着除去2'-羟基保护基团。

[0015] 寡核糖核苷酸嵌段(block)的生成是更加困难的,这是由于2'-羟基的存在以及需要保护它,因此此研究路线远远落后于DNA嵌段的研究。然而,已有一些报告,其描述了通过嵌段偶联缩合反应来合成RNA。Ikehara 和同事利用磷酸三酯方法来偶联RNA三聚体和四聚体,以在若干天以后产生30%的产率[Ohtsuka, E. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 8210 (1978)]. Werstiuk和Nielsen报道了,RNA四聚体和RNA五聚体的偶联,从而在16天以后提供产率为50%的所期望的九核苷酸(nonanucleotide) RNA序列[Werstiuk, E. S., Neilson, T. *Can. J. Chem.* 54, 2689 (1976)]. Van Boom和同事,在3.5天的反应中,缩合RNA四聚体和RNA十聚体,产率为58%[van Boom, J. H. et al. *Trav. Chim. Pays-Bas*, 97, 73 (1978)]. Ogilvie

和同事描述了 5'-O-单甲氧基三苯甲基-2'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基-3'-O-乙酰丙酰基核糖核苷单体的合成以及它们在十六碳尿苷酸 (hexadecauridylic acid) 的装配中的应用,其中经由二氯亚磷酸酯 (phosphodichloridite) 程序 [Nemer, M.J., and Ogilvie, K.K., *Can. J. Chem.* 58, 1389-1397 (1980)]。

[0016] 几乎只利用单体亚磷酰胺合成子 (合成单元, synthon) 来进行固相 RNA 合成。鉴于亚磷酰胺化学反应的效率,非常希望将嵌段 (二聚体和三聚体) 亚磷酰胺用于 RNA 合成,因为在链装配期间在每个步骤中它们将允许较长的链延伸,从而显著缩短合成所需要的时间。

[0017] 然而,虽然,通过允许洗去过量试剂,固体支持合成克服了纯化的限制,但就规模而言它可能是非常受限制的。虽然,真实的是,以千克规模产生寡核苷酸的目前大规模的方法采用固相方式,但对于这种类型的制备的机械要求是非常专业和昂贵的。因此,大规模合成的理想方法是在溶液中进行。在克服这种限制的尝试中,已开发了各种各样的基于可溶性聚合物的载体 [Gravert, D.J., Janda, K.D. *Chem. Rev.* 97, 489-509 (1997)]。然而,这些聚合物遭受它们自身的局限性如不良的加载、不利的原子经济性、以及依赖于温度循环来溶剂化/沉淀可溶性载体。已报道一些独特的全氟化“载体”,其共价连接于所期望的分子并因此附着于长链氟碳衍生的二氧化硅。通过全氟化溶剂,可以选择性地除去它们。这是一种非常有效的方法,但需要许多专门的和昂贵的材料 [Horvath, I.T., Rabai, J. *Science*, 266, 72-75. (1994); Studer, A. et al., *Science*, 275, 823-826, (1997)]。

[0018] 因此,还期望,具有用于溶液相 RNA 合成的改进的方法。

发明内容

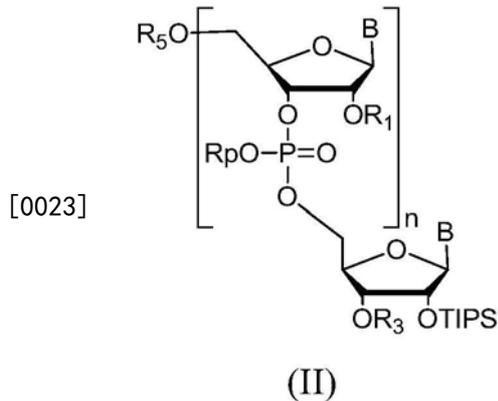
[0019] 本文描述了方法,用于合成嵌段聚体 (blockmer) (二聚体、三聚体、四聚体等) 核糖核苷酸,通过嵌段偶联反应 (block coupling reaction), 其应用于 RNA 的合成。这些结构单元允许在 RNA 合成的每个偶联阶段中较长的链延伸,从而显著减少在目标 RNA 寡聚物的合成中所需要的步骤的总数。另外,本文披露的嵌段偶联策略产生粗制 RNA 寡聚物,其更容易分离自较短的失败序列 (failure sequence)。通过 UpU、ApA、和 UpUpU 嵌段的合成,以及它们在寡核糖核苷酸链的装配中的应用 (借助于亚磷酰胺偶联方法), 来说明上述程序。所披露的化合物和方法有利于 siRNA 制造的两个关键方面: 速率, 和目标寡聚物的纯度。

[0020] 在另一个方面, 本文描述了方法, 用于合成嵌段聚体 (二聚体、三聚体、四聚体等) 脱氧核糖核苷酸, 通过嵌段偶联反应, 其应用于 DNA 的合成。这些结构单元允许在 DNA 合成的每个偶联阶段中较长的链延伸, 从而显著减少在目标 DNA 寡聚物的合成中所需要的步骤的总数。另外, 本文披露的嵌段偶联策略产生粗制 DNA 寡聚物, 其更容易分离自较短的失败序列。

[0021] 本文提供了方法, 用于合成离子标记接头 (ionically tagged linker), 其用于但不限于合成寡核糖核苷酸、寡脱氧核糖核苷酸、寡肽和寡糖, 在有所有其它标准保护基团存在的情况下, 其可以被正交 (orthogonally) 切割。本文提供的标记接头组合使得可以在溶液中生长寡核苷酸, 其中利用逐步迭代偶联 (stepwise iterative coupling), 并采用标记的离子特性, 来选择性地沉淀在每个步骤中增长的寡核苷酸, 以除去偶联试剂和反应物。标记接头使得能够在合成中的任何点从溶液除去合成的寡核苷酸, 以产生自由 3'-O-羟基、2'-TIPS 受保护的寡聚物, 而没有 2'-O-甲硅烷基保护基团的任何异构化。这可以用于但不

限于,将寡聚物(二聚体、三聚体、四聚体等)转化成嵌段-亚磷酰胺。这些结构单元使得在RNA或DNA合成的每个偶联阶段中获得较长的链延伸,从而显著减少在目标RNA或DNA寡聚物的合成所需要的步骤的总数。另外,嵌段偶联策略产生粗制RNA或DNA寡聚物,其容易分离自在合成过程中产生的较短的、不希望的序列。还设想,在一些实施方式中,标记接头可以用来代替标准酯保护基团,以提供温和的切割替代选择(alternative)以及一种方式,其用来选择性地沉淀所期望的分子并避免使用昂贵和耗时的层析法。

[0022] 在一个方面,提供了化学式(II)的化合物:



[0024] 其中

[0025] n是1至19的整数;

[0026] R₁是保护基团;

[0027] R₃选自H、保护基团、或 $\begin{matrix} \text{N(R)}_2 \\ | \\ \text{P} \\ | \\ \text{OR}_p \end{matrix}$;

[0028] R₅选自H、或保护基团;

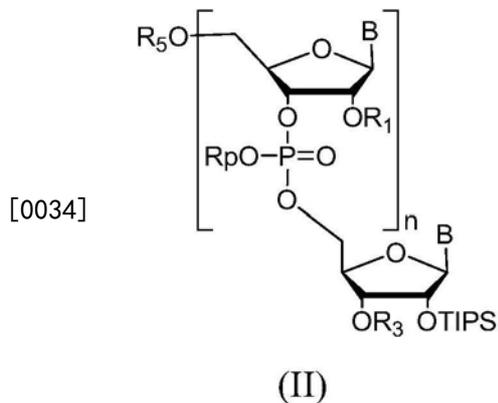
[0029] R_p是保护基团;

[0030] R是低级烷基,或N(R)₂部分是环状烷基胺(环烷基胺,cyclic alkylamine)、或取代的环状烷基胺,优选吗啉;

[0031] B是含氮碱基;

[0032] 其中每个B、R₁和R_p分别地可以是相同或不同于任何其它B、R₁和R_p。

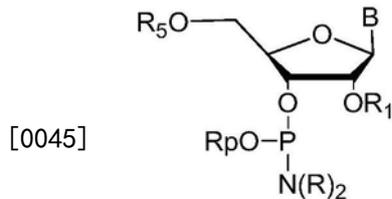
[0033] 在另一个方面,提供了用于制备化学式(II)的化合物的方法:



[0035] 其中

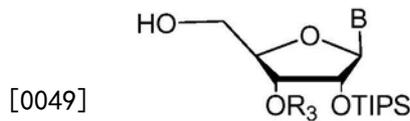
[0036] n选自1、2、或3;

- [0037] R_1 是保护基团；
 [0038] R_3 选自H或保护基团；
 [0039] R_5 是保护基团；
 [0040] R_p 是保护基团；
 [0041] B是含氮碱基；
 [0042] 其中每个B、 R_1 和 R_p 分别地可以是相同或不同于任何其它B、 R_1 和 R_p ；
 [0043] 上述方法包括以下步骤：
 [0044] a) 缩合化学式(III)的亚磷酰胺：



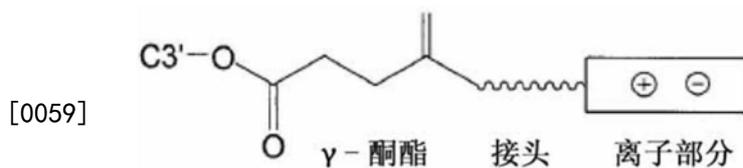
(III)

- [0046] 其中B、 R_1 、 R_5 、和 R_p 是如上所定义；以及
 [0047] R是低级烷基，或N(R)₂部分是环状烷基胺、或取代的环状烷基胺，优选吗啉；
 [0048] 和化学式(IV)的核苷：



(IV)

- [0050] 其中B和 R_3 是如上所定义；以及
 [0051] b) 氧化步骤(a)的产物，以产生化学式(II)的化合物，其中n是1，以及B、 R_1 、 R_3 、 R_5 、和 R_p 是如上所定义；以及
 [0052] c) 当n>1时，上述方法进一步包括：
 [0053] (i) 脱保护先前步骤的产物的末端-OR₅基团，以形成自由5' -OH基团；
 [0054] (ii) 缩合步骤(i)的产物和化学式(III)的亚磷酰胺，其中B、 R_1 、 R_5 、 R_p 和R是如上所定义，以及每个B、 R_1 、 R_5 、 R_p 和R分别地可以是相同或不同于任何其它B、 R_1 、 R_5 、 R_p 和R；
 [0055] (iii) 氧化步骤(ii)的产物；
 [0056] (iv) 重复步骤(i) - (iii) n-2次；
 [0057] 以形成化学式(II)的化合物。
 [0058] 在一个方面，本文提供了离子标记接头(离子标签接头, ionic tag linker)，其包含 γ 酮酯(gamma ketoester, γ 酮酸酯)部分、离子部分和接头。在一种实施方式中，离子标记接头具有化学式(K)的结构：

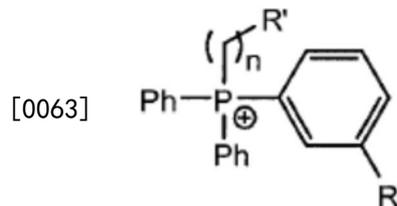


(K)。

[0060] 接头可以是,例如,烷基、乙二醇或官能化烷基。在一些实施方式中,烷基是C1至C6烷基。离子部分可以是,例如,咪唑鎓或磷基团。在一些实施方式中,离子部分包含卤化物,例如离子部分可以包含Br⁻、Cl⁻或I⁻。

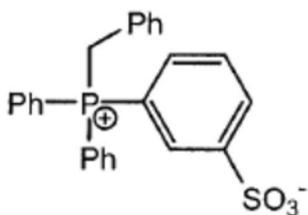
[0061] 应当理解的是,在本发明的离子标记接头中的离子部分可以包含任何盐,如但不限于磷盐、咪唑鎓盐等。许多盐是在本领域中已知的并且是在熟练的技术人员的能力范围内。进一步的非限制性实例包括有机盐,其包含含有季氮的杂环或取代杂环有机阳离子、含有季磷杂环或取代杂环有机阳离子、或含有三价铈的杂环或取代杂环有机阳离子;以及阴离子,其平衡在有机阳离子上的电荷。在一种更具体的实施方式中,有机阳离子选自由N-取代的吡啶和1,3-二取代的咪唑组成的组。平衡在有机阳离子上的电荷的阴离子可以选自由Cl⁻、Br⁻、BF₄⁻、PF₆⁻、SbF₆⁻、CuCl₂⁻、I⁻和AlCl₄⁻组成的组。其它适宜的阴离子也可以被使用并且是在熟练的技术人员的能力范围内。

[0062] 在一种实施方式中,在本发明的离子标记接头中的离子部分是化学式 I 的两性离子磷盐:

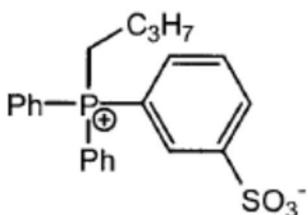
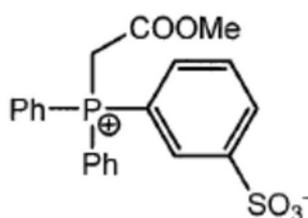
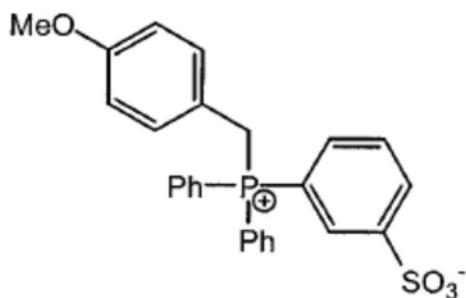


[0064] 化学式I

[0065] 其中n是0或1;R是H或SO₃⁻;R'选自由C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、C₃-C₁₀环烷基、苯基、取代的苯基、苄基和C₁-C₁₀烷氧基羰基组成的组;当n是0时,R'是CX₃;以及X选自由F、Cl、Br和I组成的组。例如,两性离子磷盐可以具有以下结构:

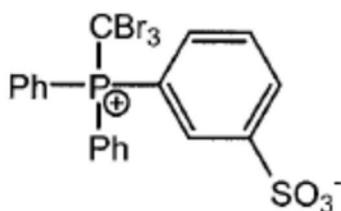


[0066]



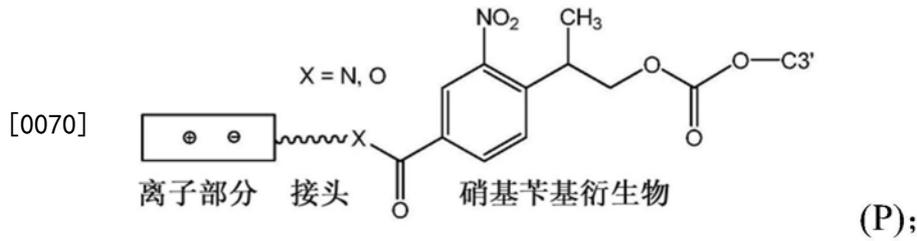
或

[0067]



[0068] 在一种实施方式中， γ 酮酯部分是借助于胼可切割的 (cleavable)。

[0069] 在另一个方面，本文提供了离子标记接头，其包含光不稳定部分 (photolabile moiety)、离子部分和接头。光不稳定部分可以是，例如，硝基苄基衍生物。在一种实施方式中，离子标记接头具有化学式 (P) 的结构：

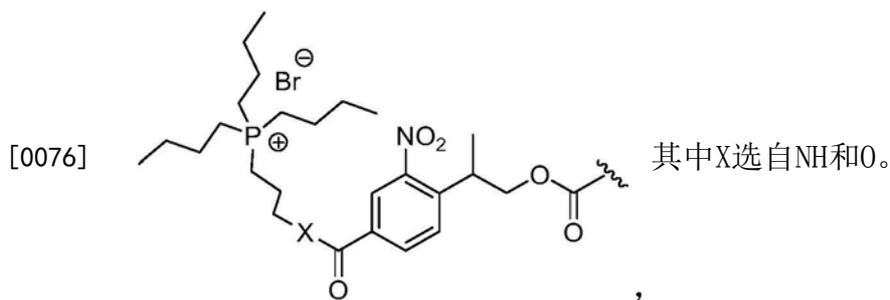
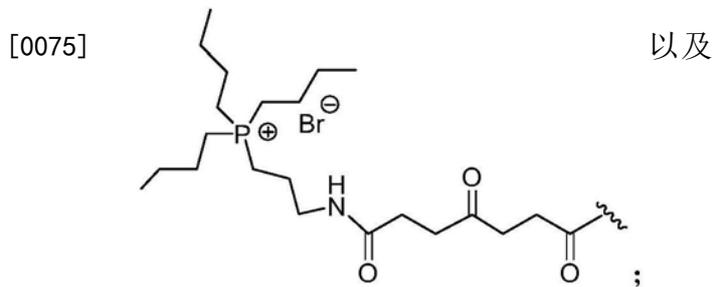
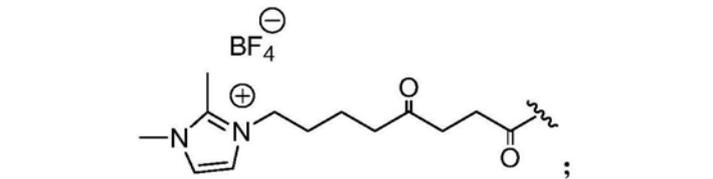


[0071] 其中X是N或O。

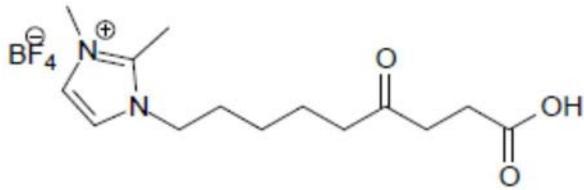
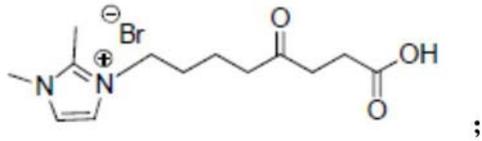
[0072] 接头可以是烷基、乙二醇或官能化烷基。在一些实施方式中,烷基是 C1至C6烷基。离子部分可以是咪唑鎓或磷基团。在一种实施方式中,光不稳定部分是通过光解可切割的。

[0073] 在一些实施方式中,本文提供的离子标记接头是正交可切割的。在进一步的实施方式中,将离子标记接头连接于寡核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸的末端3'-羟基。在并不切割其它寡核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸保护基团的条件下,离子标记接头可以是选择性地可切割的。在并不引起例如末端寡核糖核苷酸2'-O-甲硅烷基保护基团的异构化的条件下,离子标记接头还可以是可切割的。

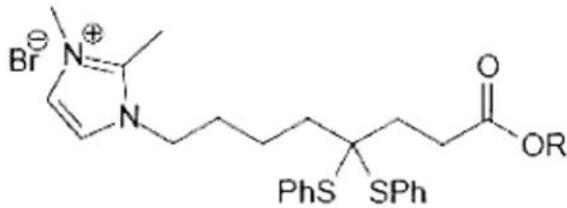
[0074] 在一种实施方式中,离子标记接头选自:



[0077] 在另一种实施方式中,离子标记接头选自:



[0078]

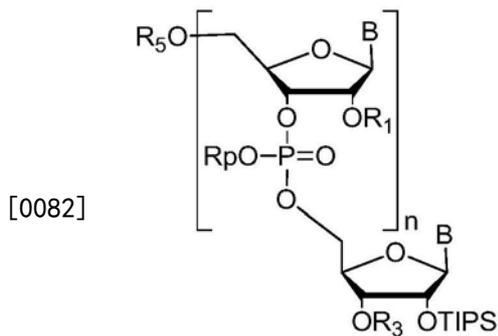


;

[0079] 化合物(17);化合物(25);化合物(32);化合物(43);化合物(55);化合物(57);化合物(23);化合物(56);化合物(54);化合物(76);化合物(7);化合物(8);化合物(9);化合物(15);化合物(16);化合物(19);化合物(70);化合物(80);化合物(82);以及化合物(10)。

[0080] 在一种实施方式中,离子标记接头包含二乙氧基或二噻吩基(dithiophenyl,二硫苯基)。在一种具体实施方式中,离子标记接头包含二噻吩基和磷盐。在另一种实施方式中,离子标记接头包含二噻吩基和咪唑鎓盐。在又一种实施方式中,离子标记接头包含二乙氧基和磷盐。在一种进一步的实施方式中,离子标记接头包含二乙氧基和咪唑鎓盐。

[0081] 在另一个方面,本文提供了化学式(II)的化合物:



[0082]

(II)

[0083] 其中:

[0084] n是1至19的整数;

[0085] R₁是保护基团;

[0086] R_3 选自H、保护基团、 $\xi-P\begin{matrix} N(R)_2 \\ OR_p \end{matrix}$ 以及本文提供的离子标记接头；

[0087] R_5 选自H、和保护基团；

[0088] R_p 是保护基团；

[0089] R是低级烷基，或N(R)₂部分是环状烷基胺或取代的环状烷基胺，优选吗啉；以及

[0090] B是含氮碱基；

[0091] 其中每个B、 R_1 和 R_p 分别地可以是相同或不同于任何其它B、 R_1 和 R_p 。

[0092] 在一种实施方式中，n是1、2、或3。在另一种实施方式中， R_3 是 $\xi-P\begin{matrix} N(iPr)_2 \\ OR_p \end{matrix}$ 以及 R_5 是

保护基团。在又一种实施方式中， R_3 是 $\xi-P\begin{matrix} N(R)_2 \\ OR_p \end{matrix}$ ； R_5 选自DMTr或MMTr； R_p 选自甲基(Me)、2-氰

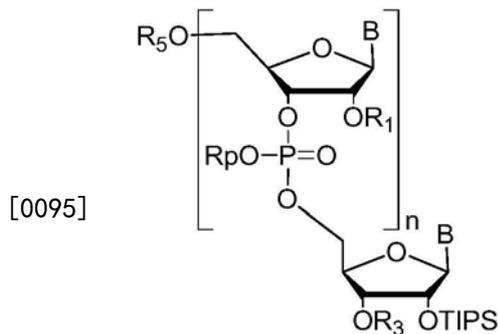
基乙基(CNEt)、邻氯苯基(o-ClPh)、和对氯苯基(p-ClPh)；R选自异丙基、甲基、和乙基；以及B是在至少一个氮上受到合适的N-保护基团保护的核碱基。在又一种实施方式中，R是异丙基。在另一种实施方式中，N-保护基团选自乙酰丙酰基(levulinyI)、乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、9-苄基甲氧基羰基、苯氧基乙酰基、二甲基甲脒、和N,N-二苯基氨基甲酸酯。

[0093] 在一些实施方式中， R_3 被本文提供的离子标记接头取代。在实施方式中， R_3 是

$\xi-P\begin{matrix} N(R)_2 \\ OR_p \end{matrix}$ 或保护基团，并且可以或不能被本文提供的离子标记接头取代。在另一种实施方式

中，保护基团是乙酰丙酰基(Lev)，或是本文提供的离子标记接头，例如，包含 γ 酮酯部分的离子标记接头或包含光不稳定部分的离子标记接头。

[0094] 在另一个方面，本文提供了用于制备本文披露的化合物的方法。在一种实施方式中，化合物具有以下结构：



(II)

[0096] 其中：

[0097] n选自1、2、和3；

[0098] R_1 是保护基团；

[0099] R_3 选自H、保护基团和本文提供的离子标记接头；

[0100] R_5 是保护基团；

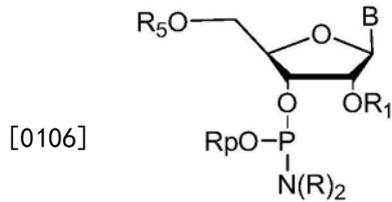
[0101] R_p 是保护基团；以及

[0102] B是含氮碱基 (base) ;

[0103] 其中每个B、R₁和R_p分别地可以是相同或不同于任何其它B、R₁和 R_p;

[0104] 以及方法包括以下步骤:

[0105] a) 缩合化学式 (III) 的亚磷酰胺:

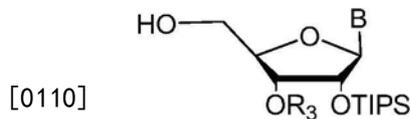


(III)

[0107] 其中B、R₁、R₅、和R_p是如上所定义;以及

[0108] R是低级烷基,或N(R)₂部分是环状烷基胺、或取代的环状烷基胺,优选吗啉;

[0109] 和化学式 (IV) 的核苷:



(IV)

[0111] 其中B和R₃是如上所定义;以及

[0112] b) 氧化步骤 (a) 的产物,以产生化学式 (II) 的化合物,其中n是1;以及B、R₁、R₃、R₅、和R_p是如上所定义;以及

[0113] c) 当n>1时,上述方法进一步包括:

[0114] (i) 脱保护先前步骤的产物的末端-OR₅基团,以形成自由5' -OH基团;

[0115] (ii) 缩合步骤 (i) 的产物和化学式 (III) 的亚磷酰胺,其中B、R₁、R₅、R_p和R是如上所定义,以及每个B、R₁、R₅、R_p和R分别地可以是相同或不同于任何其它B、R₁、R₅、R_p和R;

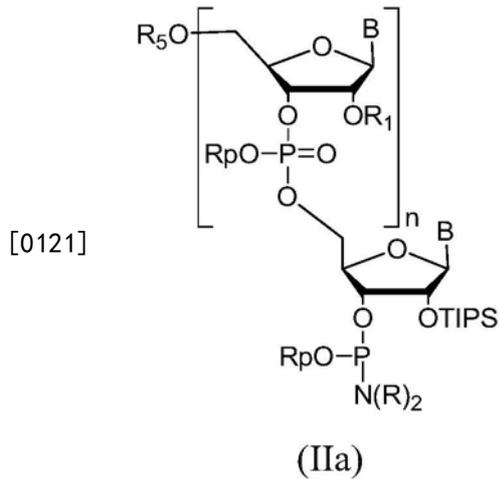
[0116] (iii) 氧化步骤 (ii) 的产物;以及

[0117] (iv) 重复步骤 (i) - (iii) n-2次;

[0118] 以形成化学式 (II) 的化合物。

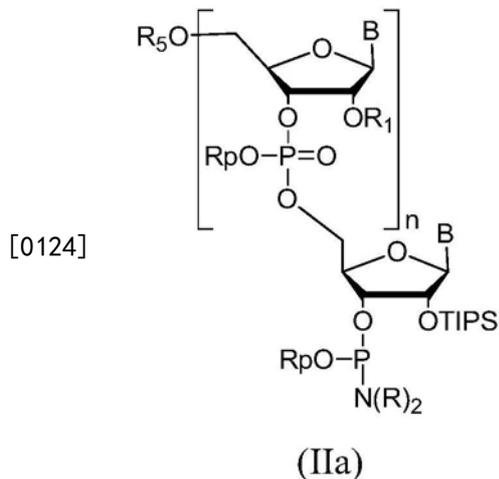
[0119] 在一种实施方式中,R₃是H。在另一种实施方式中,R₃是保护基团,以及上述方法进一步包括:d) 除去R₃保护基团。在一种实施方式中,保护基团是乙酰丙酰基 (Lev) 基团。在另一种实施方式中,保护基团是本文提供的离子标记接头。

[0120] 在其它实施方式中,本发明的方法进一步包括亚磷酰化 (phosphitylation) 步骤 (b) 或 (c) 的产物以形成化学式 (IIa) 的化合物:



[0122] 其中n、B、R₁、R₅、R_p和R是如上所定义。

[0123] 方法还可以包括亚磷酰化步骤(d)的产物以形成化学式(IIa)的化合物:



[0125] 其中n、B、R₁、R₅、R_p和R是如上所定义。

[0126] 在一种实施方式中, R₁是TBDMS; R₅选自DMTr和MMTr; R_p选自甲基(Me)、2-氰基乙基(CNEt)、邻氯苯基(o-ClPh)、和对氯苯基(p-ClPh); R选自异丙基、甲基、和乙基; 以及B是在至少一个氮上受到合适的N-保护基团保护的核碱基, 其中N-保护基团选自乙酰丙酰基、乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、9-苄基甲氧基羰基、苯氧基乙酰基、二甲基甲脒、和N,N-二苯基氨基甲酸酯。

[0127] 在另外的方面, 本文提供了用于合成寡聚物的方法, 该方法包括: (a) 将本文提供的离子标记接头连接于第一单体单元; (b) 在提供包含2至30个单体单元的寡聚物的反应条件下, 使第一单体单元接触至少一种另外的单体单元; 以及(c) 从寡聚物切割离子标记接头以提供自由寡聚物(free oligomer)。在一种实施方式中, 寡聚物是寡肽、寡糖或寡核苷酸。在一种具体实施方式中, 寡核苷酸是寡核糖核苷酸。在另一种实施方式中, 寡核苷酸是寡脱氧核糖核苷酸。

[0128] 在一种实施方式中, 提供了用于合成寡核糖核苷酸的方法, 该方法包括: (a) 将本文提供的离子标记接头连接于第一核糖核苷(在末端3'-羟基处); (b) 在提供包含2至30个核糖核苷的寡核糖核苷酸的反应条件下, 使第一核糖核苷接触至少一种另外的核糖核苷; 以及(c) 从寡核糖核苷酸切割离子标记接头以提供自由寡核糖核苷酸。

[0129] 在一些实施方式中,本文提供的方法进一步包括在从寡聚物、寡核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸切割离子标记接头以前分离寡聚物、寡核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸的步骤。例如,基于离子标记接头的离子特性,可以通过沉淀来分离寡聚物、寡核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸。

[0130] 在另一个方面,本文提供了核糖核苷,其具有连接在它的3'-羟基处的本文提供的离子标记接头。

[0131] 在又一个方面,本文提供了脱氧核糖核苷,其具有连接在它的3'-羟基处的本文提供的离子标记接头。

附图说明

[0132] 图1示出在 CD_3CN 中化合物(30)(4P-非对映体)的 ^{31}P -NMR谱。

具体实施方式

[0133] 本发明一般地涉及寡核苷酸合成的领域,并且提供了用于合成RNA和DNA的组合物和方法。在一些实施方式中,提供了新二聚体和三聚体嵌段(单元,block),用于在固体载体上合成RNA或DNA寡核苷酸。在另一种实施方式中,提供了四聚体嵌段。在又一种实施方式中,提供了较大的嵌段聚体(例如,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20聚体)。在另外的方面,提供了用于液相合成的离子标记和用于寡聚物(例如,寡肽、寡糖、寡核苷酸,尤其是RNA寡核苷酸,以及还有DNA寡核苷酸)的液相或溶液相合成的方法。

[0134] 在标准寡核苷酸合成循环中,链延伸开始于通过有机酸(例如TFA)来选择性地切割5'-O-二甲氧基三苯甲基(DMT)基团,从而释放自由5'-羟基。然后,在有活化剂存在的情况下,允许这种末端亲核体偶联于受保护的核苷3'-O-亚磷酸酯单体。在RNA合成的情况下,需要适当保护2'-羟基以防止副反应。在称作‘帽化’的过程中,乙酰化任何未反应的5'-羟基以防止短聚体的延长。最常见的帽化策略采用乙酸酐以产生乙酰酯“帽”。因此,‘帽化’酯化任何未反应的5'-羟基,并防止副产物的积累。然后氧化新产生的亚磷酸三酯3',5'-键以产生更加稳定的磷酸三酯。重复此过程直到获得具有所期望的长度和序列的寡聚物。从固体载体切割寡聚物,并从糖、磷酸酯和核碱基除去所有保护基团,从而提供所期望的目标寡聚物,然后,通过离子交换高效液相层析(HPLC)、离子对反相HPLC、或聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),其纯化自不需要的较短序列。然后,通过质谱分析来表征全长寡聚物。对于高通量合成应用,可以在DNA和RNA微阵列或“基因芯片”上并行地合成非常大量的DNA或RNA寡聚物[Ramsay G., Nature Biotechnology 16, 40-44 (1998)],虽然这些方法目前限于皮摩尔规模[Sriram Kosuri et al. Nature Biotechnology, 28, 1295-1299 (2010)]。

[0135] 不同于TBDMS基团,在有弱碱基或含水极性质子溶剂存在的情况下,ACE和TOM保护基团未显示迁移到邻位羟基。虽然均克服了TBDMS基团具有的异构化问题,但仅ACE保护基团正交(orthogonal)(相对于切割)于在标准核糖核苷保护中使用的所有其它保护基团。这是在RNA合成中所高度期望的性能。TOM保护基团,如同大多数甲硅烷基保护基团,是氟化物不稳定的,而缓冲在吡啶乙酸中的水合肼将选择性地除去缩醛乙酰丙酰基酯(缩醛乙酰丙基酯,acetal levuliny l ester)(ALE)保护基团的 γ -酮酸酯,而没有切割在标准寡核糖核苷酸合成中使用的二甲氧基三苯甲基、N-苯甲酰基、甲氧基-磷酸酯或甲硅烷基保护基团。

[0136] 最近,我们已经表明,2'-O-TIPS保护基团可以用来作为2'-O-TBDMS 的替代。这便于利用缓冲水合肼来切割3'-羟基保护基团、乙酰丙酰基、或ALE,而没有2'-TIPS的异构化。当切割在核糖核苷酸二聚体和三聚体嵌段上的3'-羟基保护基团时,这先前被确定为是TBDMS基团抑制的 (prohibitive),因为发现发生异构化,以及一种区域异构体与其它区域异构体的分离是不可能的。用TOM保护基团可以实现相同效果,但TIPS-氯化物的成本和可用性使得它成为较好的选择。这导致异构纯“嵌段”核糖核苷酸亚磷酰胺的生产和它们在固体支持的寡合成中的应用,从而导致较高的总产率、较少的偶联步骤、和简化的纯化协议(如本文所描述的)。

[0137] 通过允许洗去过量试剂,固体支持合成克服了纯化的限制。不幸的是,就规模而言,它可能是非常受限的。虽然,真实的是,以千克规模产生寡核苷酸的目前大规模的方法采用固相方式,但用于这种类型的制造的机械要求是非常专业和昂贵的。因此,大规模合成的理想方法是在溶液中。借助于使用离子型可溶性载体,其首先由Tak-Hang Chan描述用于碳水化合物和肽的合成[Chan, T-H. et al. *J. Org. Chem.*, 70, 3251-3255 (2005); Chan, T-H. et al. *Acc. Chem. Res.* 39:897-908 (2006)],来实现对基于聚合物的可溶性载体的改进。相比于基于聚合物的替代品,可以在室温下在标准的市售溶剂中沉淀可溶性离子标记。它们涉及简单的、惰性的、容易获得的离子物种,并且它们并不遭受低负载和较差的原子经济性(如在传统的可溶性载体的情况下所看到的)。当纯化化合物时,就成本和时间而言,这种产物分离的方法因而是有利的,因为它可以避免使用传统上用来纯化有机化合物的层析法。离子标记分子可以打开曾经被认为是极其昂贵的(由于纯化成本)合成途径。

[0138] 利用代替传统的固体载体的离子标记,在固体载体上DNA和RNA 寡核苷酸合成的类似的迭代方法最近已在溶液中应用[Donga, R.A. et al., *J. Org. Chem.* 71, 7907-7910 (2006); Donga, R.A. et al., *Can. J. Chem.* 85, 274-282 (2007)]。离子型可溶性载体的使用允许,相对于在寡核苷酸合成循环中使用的所有其它试剂,选择性沉淀增长的寡核苷酸,从而显著简化中间纯化步骤。相对于试剂,产物的这种选择性沉淀可以用于各种各样的反应,并且已经表明可有效地作为层析法的替代方法。这可以是有利的,尤其是在大规模工业生产的情况下,其中层析法可以是极其昂贵的 [Chan, T-H. et al. *J. Org. Chem.*, 70, 3251-3255 (2005); Chan, T-H. et al. *Acc. Chem. Res.* 39:897-908 (2006)]。

[0139] 因此,我们设法结合溶液相寡核苷酸合成的过程,其中利用可溶性离子标记方式,以产生嵌段核苷酸,例如,核糖核苷酸,亚磷酰胺,尤其是克服固相合成(其可以是漫长和令人厌烦的)的至少一些或所有限制。

[0140] 传统上,自由3'-羟基已被保护/连接到固体载体,其中借助于酯键并通过琥珀酰接头至长链烷基胺,其衍生到固体载体。在DNA、RNA、肽或寡糖的迭代逐步合成中,这将保持为共价结合的。在合成结束时,通过氨解,切割此共价键,其同时切割在整个分子中的其它保护基团(氰基乙基和环外胺碱基(exocyclic amine base)保护基团,用于DNA和RNA)。在DNA和肽合成的情况下释放完全脱保护分子,或在RNA和一些寡糖的情况下释放部分脱保护分子[Beaucage, S.L.; Herdewijn, P. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 47:13.0-13.4 (2011)]。当期望最终分子的完全去保护时这种多切割事件具有很大的效用,但当所期望的分子必须保留它的保护基团用于进一步修饰或寡聚化后转化时则可能是麻烦的。

[0141] 现已开发各种各样的不同接头,用于将核苷连接于它们的固体载体。尤其是多功

能接头,Uny-linker™,得到广泛使用,这是因为在自动化寡核苷酸合成以前它并不需要核苷衍生化到载体。其它替代物包括由Pon和同事开发的Q-接头[Pon,R.T.,Yu,S.Nucleic Acids Research 25,3629-3635 (1997)]和基于硅的接头,其是通过氟化物源并经由吡啶-HF加以切割 [Boehm T.L.,Showalter,H.D.H.,J.Org.Chem.,616498-6499 (1996)]。另外,已报道基于硝基苯基的各种各样的光不稳定接头并用于许多敏感应用 [Anderson,E.,et al.Nucleosides,Nucleotides and Nucleic Acids,22,1403— 1406 (2003);Pirrung,M.C.et al.Org Lett,3,1105-1108 (2001);Pfeiderer,W. et al.Nucleosides and Nucleotides,17,1987-1996 (1998)]。

[0142] 可以除去在3'-羟基处代替传统酯的乙酰丙酰基并连同2'-TIPS保护基团而没有异构化,从而允许在链延伸以后的化学修饰[Hassler,M.H.et al. Tett Lett,52,2575-2578 (2011);Nemer,M.J,and Ogilvie,K.K.,Can.J.Chem. 58,1389-1397 (1980)]。乙酰丙酰基具有和传统酯相同的稳定性,但可以通过使用缓冲胼的温和处理加以切割。这种方法相容于在DNA和RNA合成中使用的所有保护基团、以及在经典合成有机化学中使用的许多保护基团。例外是具有未受保护的酮官能团的任何分子,因为胼将容易起反应以形成脎。在乙酰丙酰基保护基团的切割机制中这是基本的。不幸的是,用乙酰丙酰基代替3'-O-琥珀酰接头的问题在于,它不再可连接于固体载体。为了克服此问题,乙酰丙酰基样接头将必须加以化学修饰以安装允许偶联于离子标记的官能团。

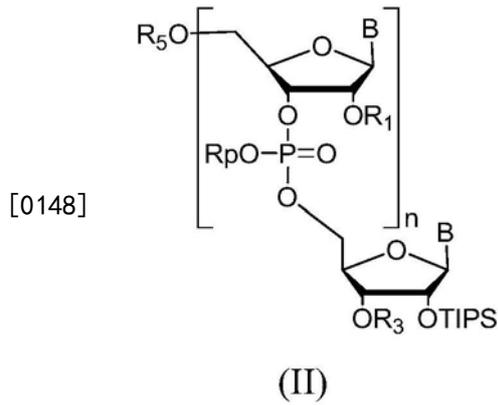
[0143] 在所有以前开发的接头中,光不稳定接头似乎提供了最温和的条件。然而,先前并没有开发光不稳定接头并用来从3'-末端位置释放寡核糖核苷酸,以及表明会保留区域异构体纯度。高度期望并且本文提供了这样的接头。可以偶联于固体载体的NPPOC型光不稳定接头提供了部分酯化的寡核糖核苷酸[Johnsson,R.et al.,Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 21,3721-3725, (2011)]。

[0144] 试图合成后修饰寡核苷酸的那些人对于利用在温和条件下被切割的接头的选项将是特别感兴趣的。据我们所知,没有光不稳定的或乙酰丙酰基样接头(levulinyl-like linker)先前得到开发并用于DNA和RNA合成,其在有传统的寡核糖核苷酸保护基团存在的情况下是可切割的,并且当从末端3'-羟基切割接头时其并不引起末端2'-O-甲硅烷基保护基团的异构化。

[0145] 本文提供了方法,其结合溶液相寡核苷酸合成的过程,其中利用可溶性离子标记方式以产生嵌段核糖核苷酸亚磷酰胺。本文提供的方法还适用于寡脱氧核糖核苷酸(寡DNA)合成。例如,本文提供了方法,其结合溶液相寡核苷酸合成的过程,其中利用可溶性离子标记方式,以产生嵌段脱氧核糖核苷酸亚磷酰胺。

[0146] 因此,在本文中我们报道了新型接头,其可以连接于离子标记和核苷的3'-羟基,并具有切割的能力而没有同时去保护任何其它保护基团,也不引起2'-甲硅烷基异构化到3'-位置。在一种实施方式中,本文提供了离子标记接头。

[0147] 在一种实施方式中,提供了化学式(II)的化合物:



[0149] 其中

[0150] n是1至19的整数；

[0151] R₁是保护基团；

[0152] R₃选自H、保护基团、和 $\xi - \text{P} \begin{matrix} \text{N}(\text{R})_2 \\ \text{OR}_p \end{matrix}$ ；

[0153] R₅选自H、和保护基团；

[0154] R_p是保护基团；

[0155] R是低级烷基，或N(R)₂部分是环状烷基胺、或取代的环状烷基胺，优选吗啉；

[0156] B是含氮碱基；

[0157] 其中每个B、R₁和R_p分别地可以是相同或不同于任何其它B、R₁和R_p。

[0158] 在另一种实施方式中，n选自1、2、和3。

[0159] 在另一种实施方式中，R₃是 $\xi - \text{P} \begin{matrix} \text{N}(\text{iPr})_2 \\ \text{OR}_p \end{matrix}$ 以及R₅是保护基团。

[0160] 在另一种实施方式中：

[0161] R₃是 $\xi - \text{P} \begin{matrix} \text{N}(\text{R})_2 \\ \text{OR}_p \end{matrix}$ ，

[0162] R_p选自甲基 (Me)、2-氰基乙基 (CNEt)、邻氯苯基 (o-ClPh)、和对氯苯基 (p-ClPh)，优选甲基，以及

[0163] R选自异丙基、甲基、和乙基，优选异丙基。

[0164] 在另一种实施方式中：

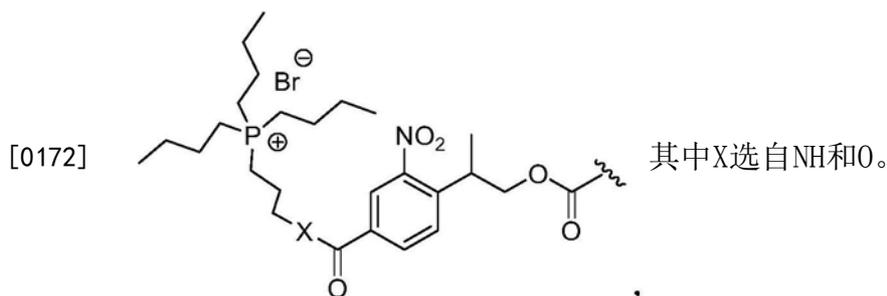
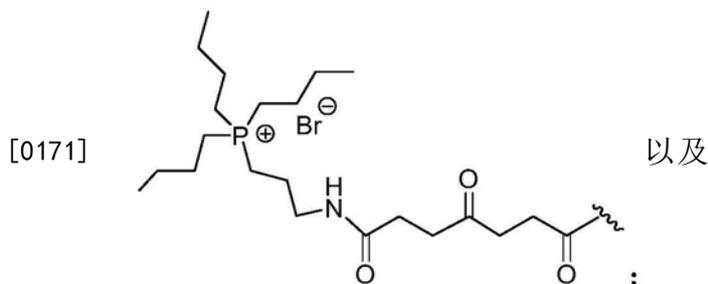
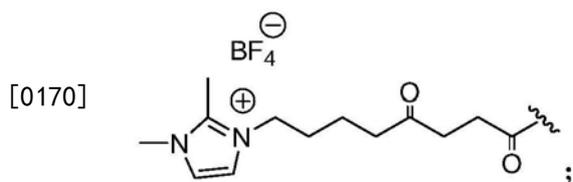
[0165] R₁是TBDMS；

[0166] R₅选自DMTr和MMTr，优选DMTr；以及

[0167] B是在至少一个氮上受到合适的N-保护基团保护的核碱基。

[0168] 在另一种实施方式中，合适的N-保护基团选自乙酰丙酰基、乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、9-苄基甲氧基羰基、苯氧基乙酰基、二甲基甲脒、和N,N-二苯基氨基甲酸酯。

[0169] 在另一种实施方式中，R₃是保护基团。在又一种实施方式中，保护基团是乙酰丙酰基 (Lev)。在又一种实施方式中，保护基团是离子标记接头。在另一种实施方式中，离子标记接头选自：



[0173] 如在本文中所使用的,术语“低级烷基”是指包含1至6个碳原子的无环(acyclic)、直链或支链烷基。优选的低级烷基包括,例如,异丙基、甲基、和乙基。

[0174] 可以通过本领域技术人员已知的各种各样的保护基团来保护本文披露的化合物的官能团。在常规的化学意义上,“保护基团”用来指这样的基团,其可逆地使得在所期望反应的规定条件下官能团不起反应。一些保护基团是本领域技术人员众所周知的。保护/去保护过程以及各种保护基团的实例描述于Wuts and Greene, 2006, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley-Interscience, New York, NY。可以使用本领域技术人员已知的任何适宜的保护基团。在所期望的反应以后,可以除去保护基团以去保护受保护的官能团。在并不降解相当大比例的待合成分子的条件,所有保护基团应是可除去的(因此,不稳定的)。相比于保护基团,“封端基团(capping group)”永久结合于分子的链段以防止上述链段的任何进一步化学转化。应当指出的是,受到保护基团保护的官能团可以是或不是称作保护基团的部分。

[0175] 例如,用于以上化学式(II)的化合物和以下各种化合物的R₁的可能的保护基团包括:

[0176] 1. 氟化物不稳定的保护基团,包括:叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)、三异丙氧基甲基(TOM)、氰基乙基甲基(CEM)、2-(4-甲磺酰基)乙氧基甲基(TEM)。

[0177] 2. 酸不稳定基团,包括:缩醛基团(acetal group): 2'-O-二(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE)原酸酯; 1-(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基(Fmp); 1-(4-氯苯基)-4-乙氧基哌啶-4-基(Cpep); 4-(N-二氯乙酰基-N-甲基氨基)苄氧基甲基(4-MABOM); 三苯甲基醚基团,包括二甲氧基三苯甲基(DMTr)和单甲氧基三苯甲基(MMTr)。

[0178] 3. 还原不稳定基团, 包括: 2-叔丁基二硫代甲基 (DTM); 烯丙基。

[0179] 4. 碱基不稳定基团 (base labile group), 包括: 乙酰丙酰基 (Lev) 和缩醛乙酰丙酰基 (ALE)。

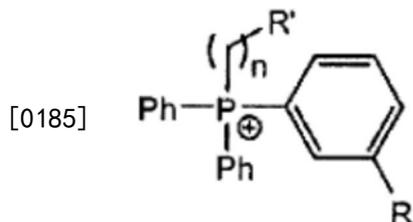
[0180] 5. 光不稳定基团, 包括: 光不稳定基团, 包括硝基苄基基团 (包括 2'-硝基苄基基团如 2-(2-硝基苯基) 丙氧基羰基 (NPPOC)、 α -甲基硝基胡椒氧基羰基 (MeNPOC) 和它们的衍生物 (包括噻吨酮-硝基苄基基团共轭物) 以及 5'-O-二甲氧基苯偶姻碳酸酯基团 (DMBOC)。

[0181] 用于以上化学式 (II) 的化合物和以下各种化合物中的 R_5 的可能的保护基团包括 9-苯基咕吨基 (9-phenylxanthyl) (pixyl 或 Px) 和它的衍生物、MMTr、和 DMTr。优选地, 当选项 1、3、4、和 5 用作用于 R_1 的保护基团时 (如上文所述), 这些保护基团用于 R_5 。

[0182] 如所示用于以上化学式 (II) 的化合物和以下各种化合物的 R_p 基团可以是甲基 (Me)、2-氰基乙基 (CNet)、对硝基苯基乙基 (NPE)、以及对和邻氯苯基 (p-或 o-ClPh)。

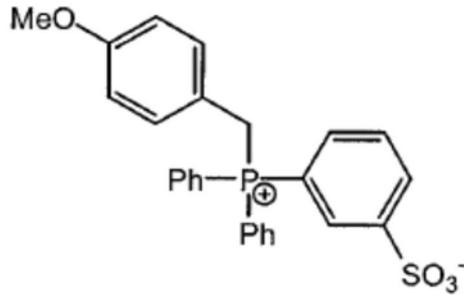
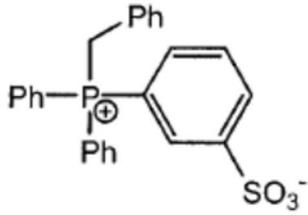
[0183] 用于 3'-羟基位置的可能的保护基团 (用于化学式 (II) 的化合物和用于下述各种化合物的 R_3) 包括乙酰丙酰基、和离子保护基团, 还被称为离子标记接头。适宜的离子标记是本领域技术人员已知的。这些离子标记可以包括那些离子标记, 它们描述于 PCT 申请公开号 W02006/096963 (Chan, T.-H. et al.), 其全部内容以引用方式加入本文。适宜的离子标记可以包括, 例如, 咪唑鎓和磷离子部分, 其具有选自烷基接头、乙二醇接头等的接头。

[0184] 在一种实施方式中, 离子标记是磷离子标记, 其包含化学式 I 的两性离子磷盐:

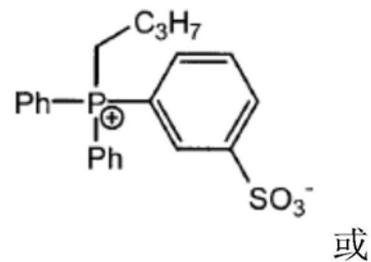
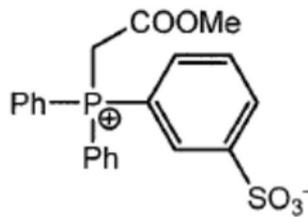


[0186] 化学式 I

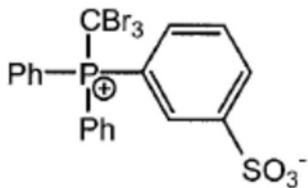
[0187] 其中: n 是 0 或 1; R 是 H 或 SO_3^- ; R' 选自由 C_1-C_{10} 烷基、 C_2-C_{10} 烯基、 C_2-C_{10} 炔基、 C_3-C_{10} 环烷基、苯基、取代的苯基、苄基和 C_1-C_{10} 烷氧基羰基组成的组; 当 n 是 0 时 R' 是 CX_3 ; 以及 X 选自由 F、Cl、Br 和 I 组成的组。在另一种实施方式中, 化学式 I 的两性离子磷盐是:



[0188]



或

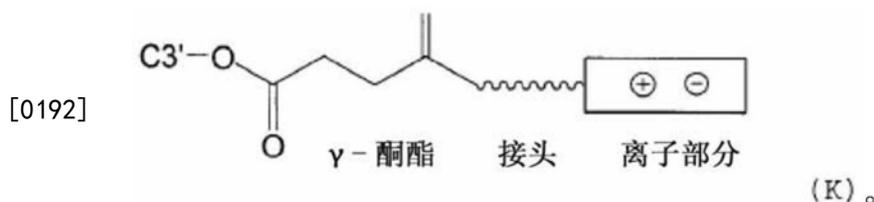


[0189]

。

[0190] 可以包括在本发明的离子标记中的这些和其它两性离子磷盐描述于,例如,国际PCT申请公开号W02010/012096,其全部内容以引用方式结合于本文。

[0191] 在一种实施方式中,保护基团是正交可切割的离子标记接头。例如,在一种实施方式中,保护基团可以是正交可切割的离子标记接头(K),其包含 γ 酮酯部分、离子部分和接头:



[0193] 在另一种实施方式中,保护基团是正交可切割的离子标记接头(P),其包含光不稳定部分,例如,硝基苄基衍生物,以及离子部分和接头:



[0195] (K)和(P)均包含离子部分,用于基于沉淀的纯化,如描述于Chan,T.-H. et al.的PCT申请公开号W02006/096963,其全部内容以引用方式加入本文。通过接头,最简单地短烷基链或官能化烷基链(具有一个或多个碳原子),在(K)和(P)中的离子部分分别连接于 γ -酮酯或光不稳定部分。用胼来选择性地切割 γ -酮部分,而通过光解来切割(P),硝基苄基衍生物,从而释放3' OH基团,用于进一步官能化。本发明提供了方法,用于切割(K)和(P),以及亚磷酸化未阻断3' OH,以提供用于寡核苷酸合成的亚酰胺嵌段。

[0196] 在以上化学式(II)的化合物中和在以下描述的化合物中的实体(entity)B是含氮碱基,优选地碱基或受保护的碱基(本文中还称为“核碱基”)。上述碱基优选为嘌呤或嘧啶碱基或其类似物。类似物包括二氨基嘌呤和它的衍生物、肌苷和它的衍生物、烷基化嘌呤或嘧啶、酰基化嘌呤或嘧啶、以及巯基化嘌呤或嘧啶。更具体的类似物包括,例如,1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6-异戊基腺嘌呤、2-甲巯基-N6-异戊基腺嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、2-硫代胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、4-乙酰基胞嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤等。“受保护的碱基”是在至少一个氮上受到任何合适的N-保护基团的保护,包括乙酰丙酰基、乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、9-苄基甲氧基羰基、苯氧基乙酰基、二甲基甲脒、N,N-二苯基氨基甲酸酯等。优选地,选择上述碱基以致化学式(II)的化合物是腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、或尿嘧啶(U)的衍生物。在一种实施方式中,在化合物是脱氧核糖核苷酸的情况下,选择上述碱基以致化学式(II)的化合物是腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、或胸腺嘧啶(T)的衍生物。

[0197] 相关于本发明的实施的各个方面披露于PCT国际申请公开号W0 2009/064115 (Samchully Pharm.Co.,Ltd.);Kumar,G.and Poonian,M.S.J. Org.Chem.,49,4905-4912 (1984);Nemer,M.J,and Ogilvie,K.K.,Can.J. Chem.58,1389-1397 (1980)。在S.Beaucage,Curr.Opin.Drug Discov.Devel. 11,203-261 (2008)]的综述中已总结了在RNA合成方面的最近进展。

[0198] 先前报道的二聚体和三聚体亚磷酸胺合成子的使用指向RNA寡聚物的合成,其涉及在固体载体上仅在第一偶联反应中上述二聚体或三聚体单元的使用(W02009/064115)。在一个上述二聚体单元的偶联以后,接下来的步骤涉及单体亚磷酸胺单元的独有偶联

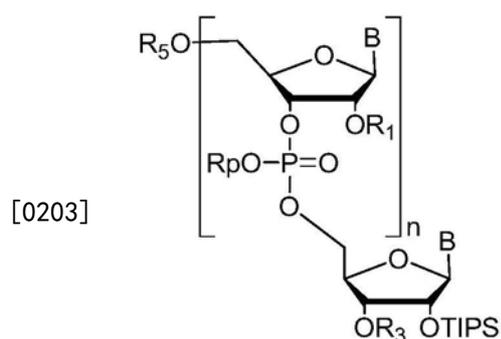
(exclusive coupling)直到产生所期望的长度(W02009/064115)。这阻碍“各种二聚体”用于RNA合成,因为这将需要“长期的合成和高生产成本”。该公开进一步强调,它“仅在第一偶联步骤中只采用一种二聚体或三聚体物质,然后在随后的步骤中采用常见的廉价的单体单元,其使得能够进行核苷酸寡聚物的低成本、高纯度生产”。

[0199] 相比于上述公开,可以仅仅使用或连同单体单元一起使用目前描述的 RNA二聚体和三聚体。除在溶液相RNA合成中的应用之外,它们的应用还可以被扩展到在常规固体载体(如可控孔度玻璃和聚苯乙烯)上的RNA的常规合成。在这种情况下,通过若干嵌段偶联来装配RNA链,在合成以后切割和释放自载体,然后得到的合成的RNA用于物理化学或生物学研究。存在若干衍生物,其可以被包含用于上述嵌段偶联反应[参见以下的结构(30)、(47)和(50)]。在上述结构的3'-端处的2'-TIPS保护基团提供用于RNA合成的独特的5'-DMTr3'-亚磷酰胺二聚体和三聚体合成子。在一些实施方式中,本文提供的方法适用于溶液相DNA合成以及在常规固体载体上的DNA的常规合成。

[0200] 此外,本文描述的2'-TIPS保护的二聚体和三聚体合成子提供了相对于先前报道的2'-TBDMS3'-亚磷酰胺二聚体合成子的若干明显的优势(W02009/064115)。本发明人已经发现,TIPS的使用会完全消除2'至3'-异构化,其发生于在先前报道的合成子中存在的2'-TBDMS保护基团(WO 2009/064115);事实上,本公开教导,当按照如描述于W02009/064115的合成过程时,并不以纯形式来分离2'-TBDMS二聚体合成子,而是作为2'+3'-TBDMS区域异构体的混合物,在所提供的规范下,其难以(如果不是不可能的)分离。

[0201] 在一种实施方式中,本文描述的方法以高产率提供异构纯二聚体和三聚体合成子。在另一种实施方式中,本文提供的方法导致高保真度RNA合成。当在溶液或固相中偶联时,上述二聚体和三聚体合成子允许在RNA合成的每个偶联阶段中较长链延伸,从而显著减少在目标RNA寡聚物的合成中所需要的步骤的总数,进而减少它们暴露于酸性环境。另外,二聚体和三聚体合成途径提供粗制RNA寡聚物,其通常更容易分离自失败偶联的产物。因此,二聚体和三聚体嵌段方式潜在地有利于siRNA制造的关键方面:合成的速率和纯化,以及所期望的全长RNA链的完整性。

[0202] 在另一种实施方式中,提供了用于制备化学式(II)的化合物的方法:



(II)

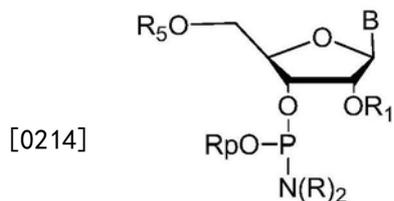
[0204] 其中

[0205] n选自1、2、或3;

[0206] R₁是保护基团;

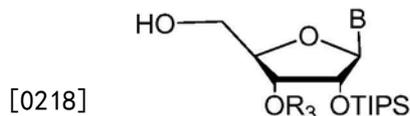
[0207] R₃选自H、保护基团和离子标记接头;

- [0208] R_5 是保护基团；
 [0209] R_p 是保护基团；
 [0210] B是含氮碱基；
 [0211] 其中每个B、 R_1 和 R_p 分别地可以是相同或不同于任何其它B、 R_1 和 R_p ；
 [0212] 上述方法包括以下步骤：
 [0213] a) 缩合化学式(III)的亚磷酰胺：



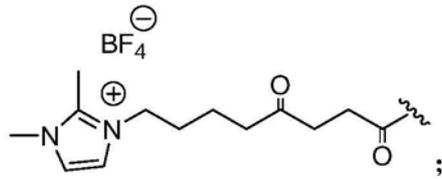
(III)

- [0215] 其中B、 R_1 、 R_5 、和 R_p 是如上所定义；以及
 [0216] R是低级烷基，或N(R)₂部分是环状烷基胺、或取代的环状烷基胺，优选吗啉；
 [0217] 和化学式(IV)的核苷：



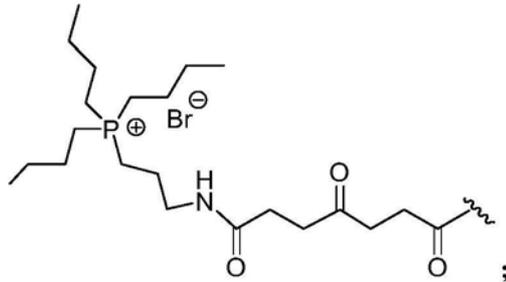
(IV)

- [0219] 其中B和 R_3 是如上所定义；以及
 [0220] b) 氧化步骤(a)的产物以产生化学式(II)的化合物，其中n是1，以及 B、 R_1 、 R_3 、 R_5 、和 R_p 是如上所定义；以及
 [0221] c) 在n>1的情况下，上述方法进一步包括：
 [0222] (i) 脱保护先前步骤的产物的末端-OR₅基团以形成自由5' -OH基团；
 [0223] (ii) 缩合步骤(i)的产物和化学式(III)的亚磷酰胺，其中B、 R_1 、 R_5 、 R_p 和R是如上所定义，以及每个B、 R_1 、 R_5 、 R_p 和R分别地可以是相同或不同于任何其它B、 R_1 、 R_5 、 R_p 和R；
 [0224] (iii) 氧化步骤(ii)的产物；以及
 [0225] (iv) 重复步骤(i) - (iii) n-2次；
 [0226] 以形成化学式(II)的化合物。
 [0227] 在一种实施方式中， R_3 是H。
 [0228] 在另一种实施方式中， R_3 是保护基团，以及上述方法进一步包括除去 R_3 保护基团。
 [0229] 在上述方法的另一种实施方式中， R_3 保护基团是乙酰丙酰基(Lev)基团。在上述方法的又一种实施方式中， R_3 保护基团是离子标记接头。在上述方法的又一种实施方式中，离子标记接头选自：



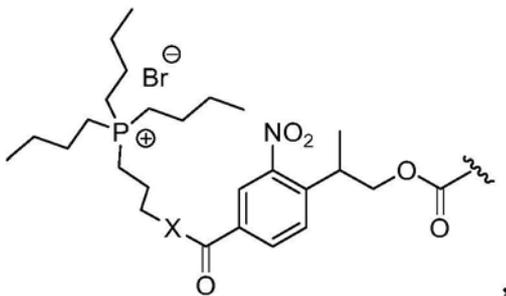
[0230]

以及



[0231]

其中X选自NH和O。



[0232] 在另一种实施方式中,当 R_3 是 $\begin{matrix} N(R)_2 \\ | \\ P \\ | \\ OR_p \end{matrix}$ 时, R选自低级烷基,或N(R)₂部分是环状烷基胺、或取代的环状烷基胺,优选吗啉。

[0233] 在上述方法的另一种实施方式中:

[0234] R_1 是TBDMS;

[0235] R_5 选自DMTr和MMTr;

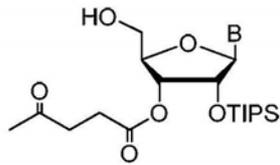
[0236] R_p 选自甲基(Me)、2-氰基乙基(CNEt)、邻氯苯基(o-ClPh)、和对氯苯基(p-ClPh);

[0237] R选自异丙基、甲基、和乙基;以及

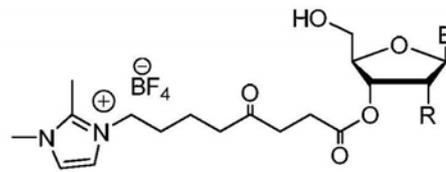
[0238] B是在至少一个氮上受到合适的N-保护基团保护的核碱基,

[0239] 其中N-保护基团选自乙酰丙酰基、乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、9-苄基甲氧基羰基、苯氧基乙酰基、二甲基甲脒、和N,N-二苯基氨基甲酸酯。

[0240] 在上述方法的另一种实施方式中, R_5 是DMTr, R_p 是甲基,以及R是iPr。



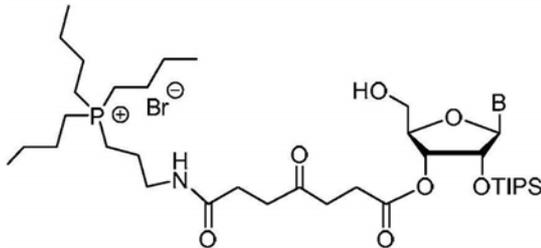
(15), B = Ura



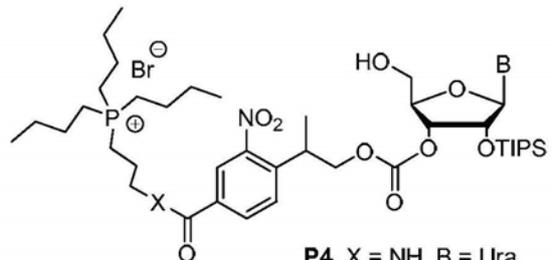
K1, R = H, B = Thy

K2, R = OTIPS, B = Ura

[0241]



K3, B = Ura

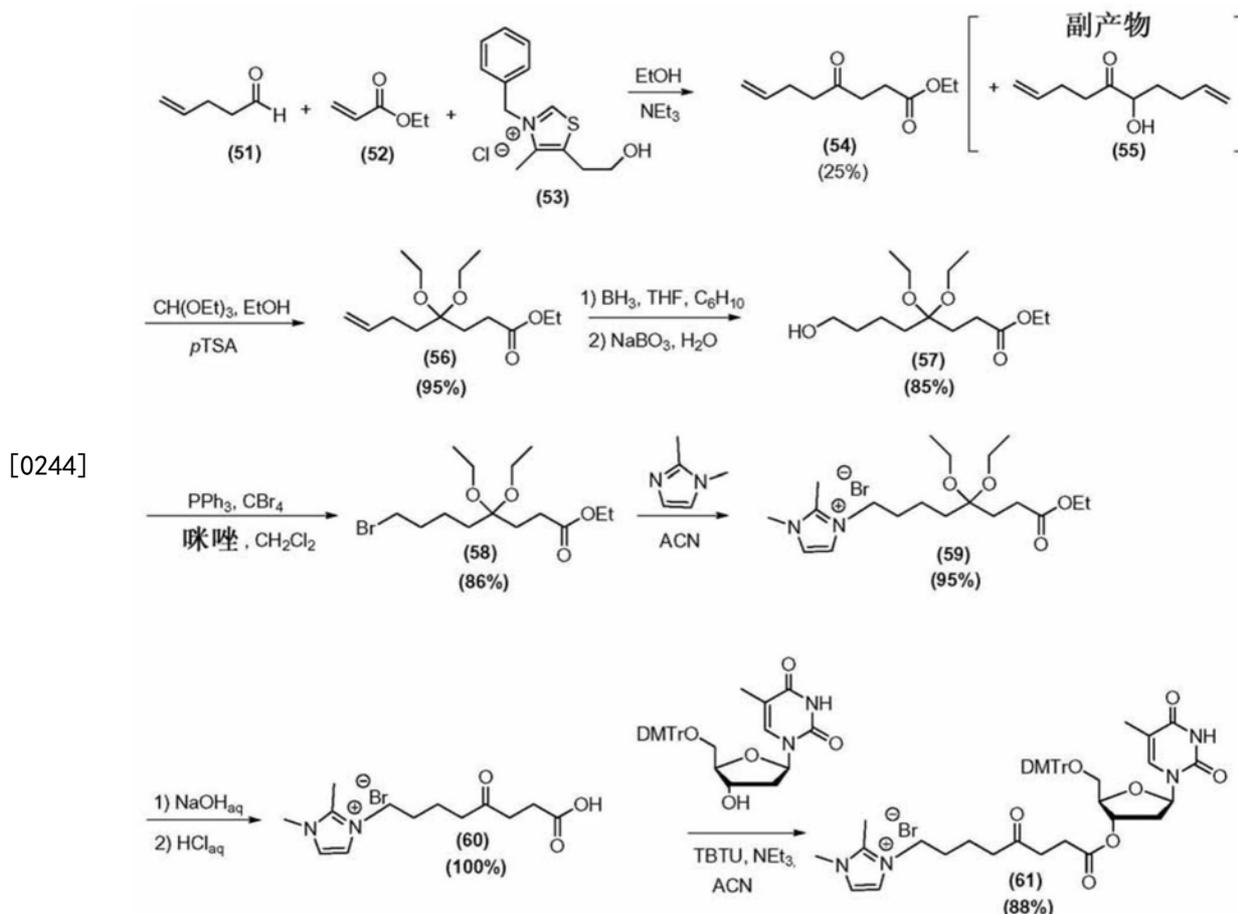


P4, X = NH, B = Ura

P5, X = O, B = Ura

[0242] 离子标记接头的合成和它们的借助于核苷的酯化的非限制性实例示于方案8和9中。核苷K1、K2和K3的离子标记接头，像乙酰丙酰基基团，需要最温和的切割条件的组的一种，以从在RNA合成中使用的其它保护基团选择性地除去，即，在吡啶和乙酸溶液中借助于水合肼的简单处理。此外，它们的离子特性允许基于沉淀来纯化核苷（例如化合物(61)或(62)，方案8-9)，或如果需要的话，源自上述离子标记核苷的二和三核苷酸。方案8示出用来合成具有肼可切割的 γ 酮酯标记的2'-脱氧核苷的方法，其促进经由沉淀步骤的分离。

[0243] 方案8. 正交 γ -酮酸标记(60)的合成以及它的借助于保护的2'-脱氧核苷的衍生化。



[0245] 在选择性除去标记以后,通过本文描述的程序,可以将核苷(或二聚体或三聚体嵌段)转化成3'-亚磷酰胺衍生物,其可以用于嵌段缩聚。

[0246] 若干方法可以用来获得所需要的 γ -酮酸(60)。例如,方案8采用Stetter 反应作为第一步骤[(51)+(52)→(54)],在有弱碱基存在的情况下利用催化量的噻唑鎓盐,例如,(53),将醛类转化成亲核体的反应(Stetter,H. *Angewandte Chemie, International Edition in English*15:639-47(1976))。因此,4-戊烯醛(51),连接于终止于烯烃的脂族链的醛,被激活为亲核体,并允许经历迈克尔加成(Michael addition),其中利用丙烯酸乙酯(52)作为亲电体。将基质(substrate)与噻唑鎓盐(53)混合并溶解于乙醇。加热反应混合物并在温和回流它以后,通过添加三乙胺来引发反应。在18小时以后除去溶剂,然后使获得的材料经受二氯甲烷/盐水提取,接着快速层析。在为纯化研究的所有溶剂体系中,连同偶姻副产物,(55),一起共洗脱所期望的产物,(54)。产率大约是25%(如通过混合物的¹H-NMR分析所估计的),然而,可以容易获得足够的材料以继续合成,其中在随后的步骤以后杂质(55)变成易于分离的。在合成途径中接下来的步骤是保护酮(54)作为缩醛[即,(56)]。发现回流4小时足够使此反应达到完成并且以90-95%产率获得所期望的产物(56)。产物(56)易于分离自在前面步骤中产生的偶姻副产物(55),其在缩醛形成反应中似乎没有经历任何转化。通过TLC、LR-MS 和NMR来确认(56)的特性和纯度。

[0247] 借助于手中的(in hand) γ -缩醛酯,(56),接下来的步骤(方案8)是末端烯烃的硼氢化。这是利用原位产生的二环己基硼氢化物试剂来实现。在0℃下将适量的环己烯加入硼烷-THF并允许反应一小时,然后将(56)加入得到的浆料并允许在室温下反应进行2小时。通

过添加含水过硼酸钠,一种温和的氧化剂(其留下完整的酯),来实现中间体硼烷的氧化,然后继续反应另外2小时。然后用乙酸乙酯提取反应混合物,并通过快速柱层析来纯化产物(57),从而提供产率为80-85%的无色液体,同时还回收15-20%的(56)。这种反应从未达到进一步超过85%的转化,甚至在更长反应时间或相对于基质产生的硼氢化物试剂的量增加的情况下。

[0248] 然后使伯醇(57)与在DCM中的三苯膦和四溴甲烷混合以产生末端溴化物(terminal bromide)(58)。干净地进行反应,但在水处理以后,发生缩醛切割,其可能是由于过量试剂的水解而形成氢溴酸。在有咪唑(其中和产生的任何氢溴酸)存在的情况下,再次进行反应,并在快速层析以后获得产率为79-86%的所期望的产物(58)。随后与乙腈中的1,2-二甲基咪唑的缩合导致产率为95%或更大的离子标记接头(59)。

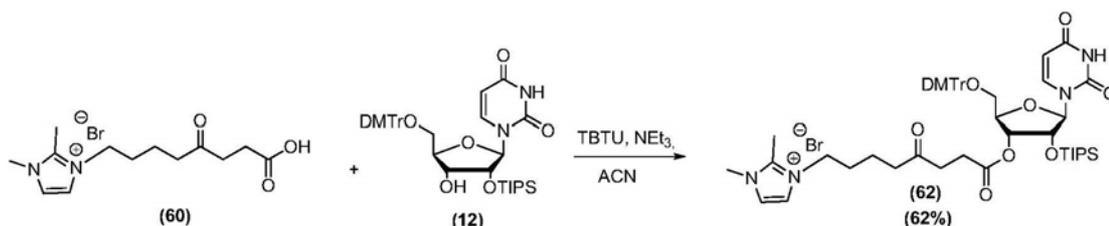
[0249] 在合成(方案8)中的最后步骤涉及缩醛和酯的切割、离子部分的阴离子置换、以及最后衍生化为核苷。起初含水酸用来实现去保护,接着阴离子置换(metathesis),但如此衍生的材料迅速分解。随后,经由两步骤过程,进行去保护,首先是酯(59)的碱基介导的切割(base mediated cleavage),接着是有限酸化,以质子化羧酸和切割缩醛。因此将受保护的材料(59)溶解于含水氢氧化钠并允许反应16-18小时,接着添加含水浓HCl以使溶液达到约pH1,并最后在减压下干燥。通过将产生的固体悬浮在乙腈/二氯甲烷中并滤去不溶性物质来除去过量盐。获得的产物(60),通过TLC、LR-MS 和NMR,似乎是纯的,但可能仍然包含少量的氯化钠,借助于这些技术其可能不能被检测到。在此时的阴离子置换还导致得到的产物的显著分解,如在酸介导的去保护中。溴化物盐(60)在长期贮存以后是稳定的,然而,发现以预期方式与核苷偶联。事实上,利用O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU)作为偶联剂会同时实现偶联和阴离子交换,其中通过LR-MS,定量地进行的偶联以及阴离子交换被确认为缺乏溴离子和存在四氟硼酸盐(以负模式(negative mode))。在长期贮存以后,这种产物(61)也是稳定的。

[0250] 借助于在手中的衍生的核苷(61),研究了正交 γ -酮酯离子标记接头自核苷的切割特性并相比于乙酰丙酰基酯保护基团的那些切割特性,其如上所述已用来产生寡聚物结构单元并且已知容易被除去而没有影响在分子中的任何其它保护基团。在所研究的条件下,乙酰丙酰基酯切割的速率快于离子标记接头的速率,半衰期分别约为0.76和2.82分钟,其对应于在刚过5分钟内乙酰丙酰基酯的完全切割,而标记的充分切割则需要几乎20分钟。然而,即使在所研究的条件下,标记切割比乙酰丙酰基酯更缓慢,但用于通过胍来切割3'-羟基保护的乙酰丙酰基酯的正常反应时间是20分钟,并且在这段时间在任何其它保护基团中没有观测到降解。这表明,离子标记接头适合于所要求的任务,因此它也是用来产生寡聚物结构单元的可行途径。

[0251] 利用用于5'-O-DMTr-胸苷的衍生化的相同条件,标记也与5'-O-DMTr-2'-O-TIPS尿苷核苷(12)缩合(方案9)。偶联核糖核苷的¹H-NMR并未显示任何2'-3'甲硅烷基异构化。

[0252] 方案9.借助于核糖核苷(12), γ 酮酸离子标记接头(60)的衍生化。

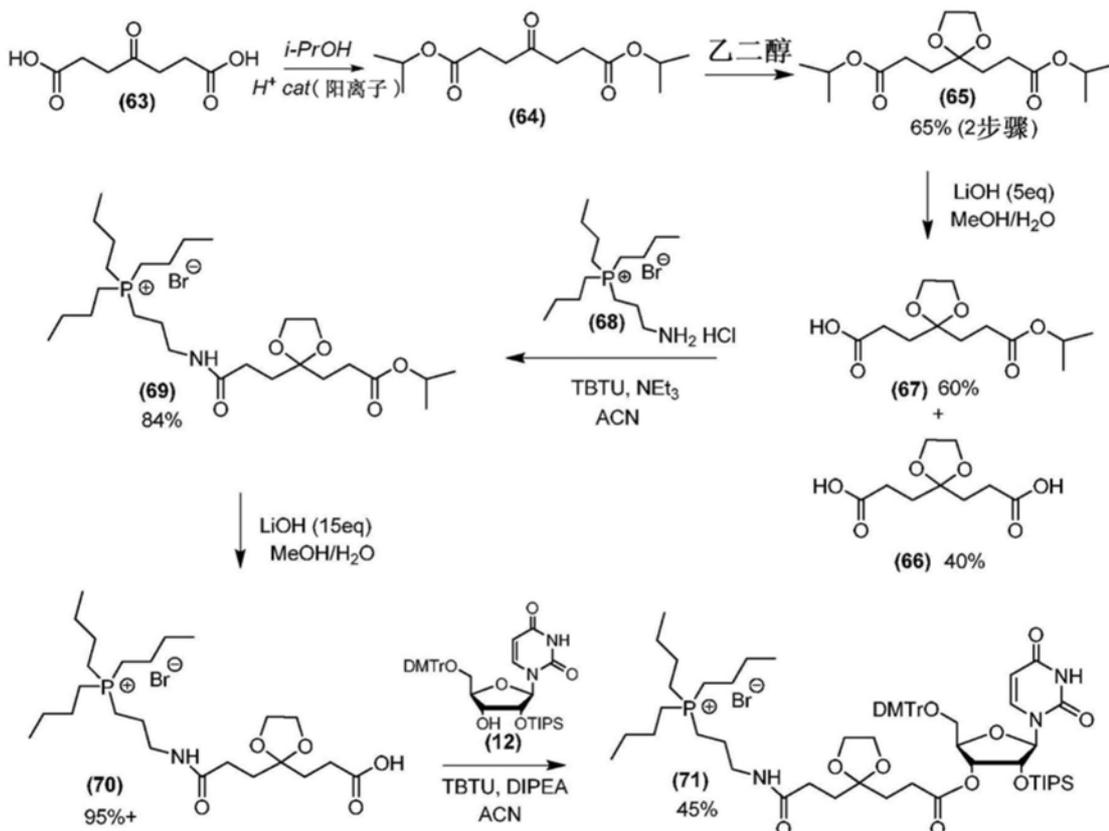
[0253]



[0254] 作为 γ -酮酯接头60的替代,开发了源自酮庚二酸(ketopemilic acid)的新型接头(方案10)。

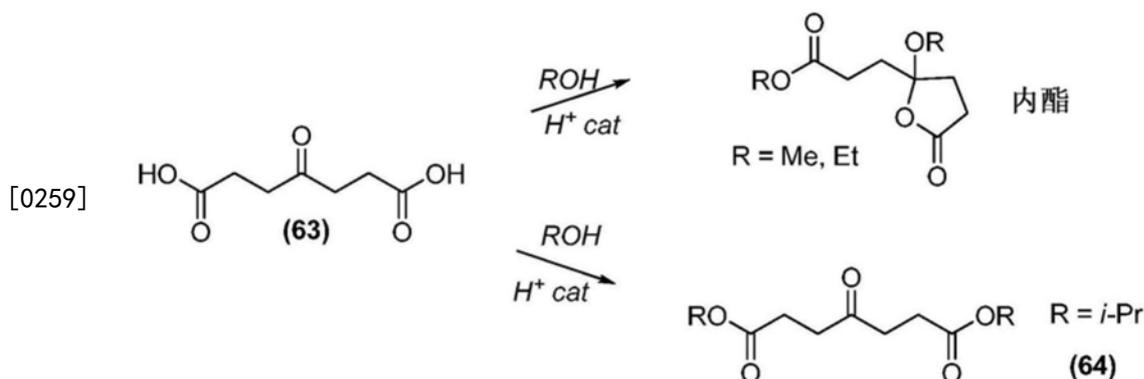
[0255] 方案10:正交 γ -酮酸标记(70)的合成及其借助于受保护核糖核苷的衍生化。

[0256]



[0257] 它的合成开始于用异丙醇和催化对甲苯磺酸来处理酮庚二酸(63),其中利用迪安-斯达克榻分水器(Dean-Stark trap),以酯化两个末端羧酸部分,从而提供(64)。在此反应中甲醇和乙醇(而不是异丙醇)的使用导致内酯形成,作为主要产物,而不是所期望的二酯(64)。

[0258] 方案11:酯化途径(63)取决于醇的烷基的体积(bulkiness)。



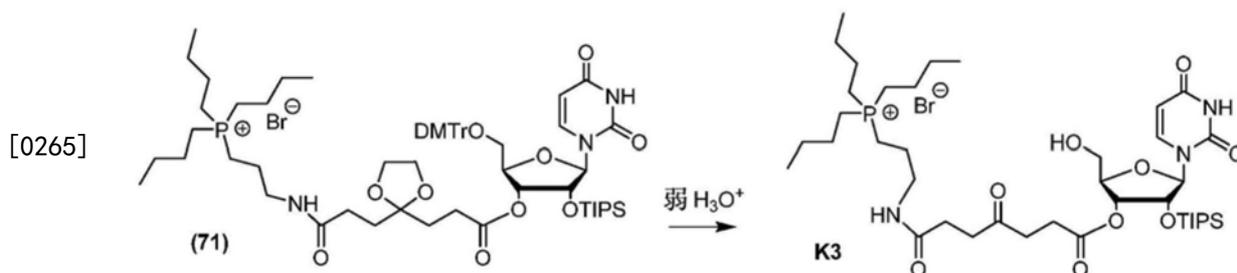
[0260] 分离二异丙酯 (64), 然后在迪安-斯达克榻分水器中, 通过回流, 与乙二醇和催化对甲苯磺酸吡啶鎓盐反应过夜, 以形成环缩酮 (65), 经两个步骤产率为65%。使用乙二醇来直接形成环缩酮和乙二醇酯 (glycol ester) 的尝试导致不期望的内酯衍生物 (方案11), 因此需要以两个单独的步骤来进行酯化和缩醛形成。

[0261] 将环缩酮二酯 (65) 接收 (take up) 在甲醇中并将5当量的含水氢氧化锂加入反应, 以相对于两种优先水解一种酯, 从而产生化合物 (66) 和 (67) 的混合物, 其被分离, 产率分别为40和60%。在乙腈中并在室温下, 利用 TBTU和DIPEA来将磷离子标记 (68) 偶联于环缩酮单酯 (67) 6小时, 从而提供产率为84%的化合物 (69)。在分离以后, 通过在MeOH/水中的LiOH来水解异丙酯, 以提供几乎定量产率的化合物 (70)。如果在一种替代方法中, 在每个步骤以后, 并不分离二异丙酯 (64) 和 (65), 则可以设想, 可以在一个罐中实现 (63) 到 (66) 或 (67) 的转化。

[0262] 另外, 一种替代方式可以是, 将化合物 (65) 选择性地水解成二酸 (66), 然后将这种物质与一个当量的磷标记 (68) 偶联, 从而潜在地增加总产率并减少过程一个步骤。

[0263] 然后, 利用标准偶联条件, 并借助于TBTU和DIPEA, 将离子标记接头 (70) 共轭于核糖核苷 (12) 的3'-羟基, 以在4小时内提供中等产率为45%的化合物 (71)。设想, (71) 的弱酸水解将提供K3 (方案12)。

[0264] 方案12. (71) 的弱酸水解。

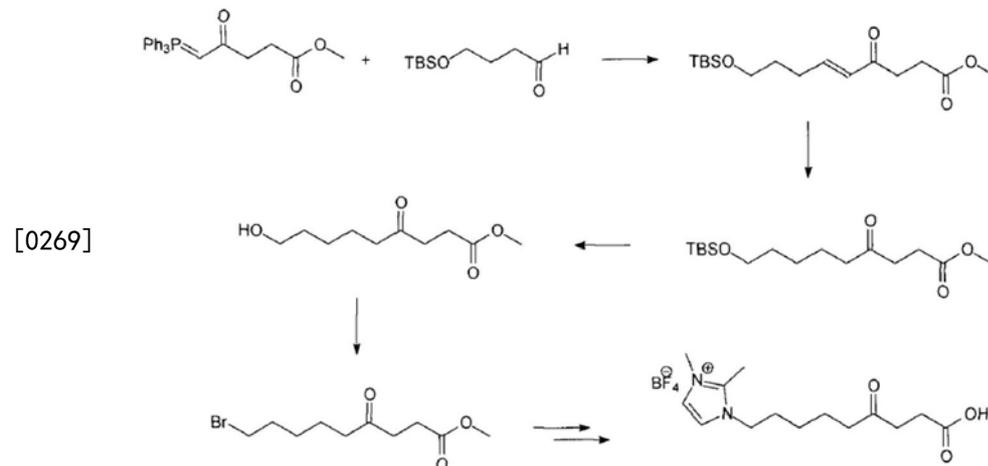


[0266] 核苷K3的离子标记接头需要用于除去的温和的切割条件, 即, 用在吡啶和乙酸溶液中的水合肼加以处理。已经显示, 这些条件相容于在RNA合成中采用的保护基团。此外, 标记的离子特性允许核苷的基于沉淀的纯化, 如针对化合物 (71) 所进行的, 或如果需要的话, 源自 (71) 的二和三核苷酸的基于沉淀的纯化。

[0267] 可替换地, 鉴于包含 γ -酮酯的标记是正交可切割的, 所以至类似分子的若干其它途径也是可能的。至类似分子的一种方式示于方案13, 并开拓了5-溴乙酰丙酰基衍生内鎓盐 (ylid) 来将接头连接于 γ -酮酯部分, 如方案 13所示 [Ronald, R.C.; Wheeler,

C.J.Journal of Organic Chemistry48:138-9 (1983)].这也将利用许多转化,其已经显示用于在方案8中所示的Stetter 方式。确实,甚至可能的是,在单步骤中,借助于这种方式,来连接标记,这是因为可以容易制备包含离子部分和醛的化合物。

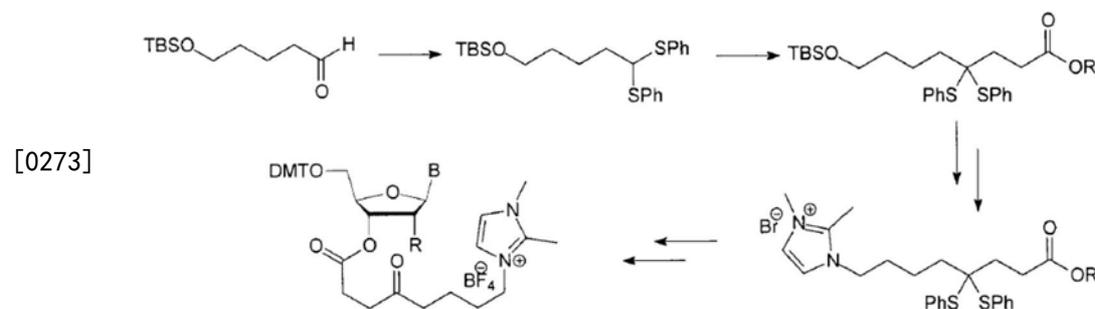
[0268] 方案13:离子标记 γ -酮酸的合成的5-溴乙酰丙酰基衍生磷内鎓盐 (phosphonium ylid) 方式。



[0270] 产生的烯烃的氢化将可能是必要的,这是因为它将共轭 (conjugate) 于酮并且在标记的切割期间这种共轭体系将可能更慢地与肼反应。可以理解的是,其它离子标记可以替换所示的二甲基咪唑鎓标记,如那些标记,其描述于Chan, T. -H. et al. 的PCT申请公开号W02006/096963,其全部内容以引用方式加入本文。适宜的离子标记可以包括,例如,磷离子标记。

[0271] 到相同基质的另一种可能的方法将是使用比Stetter方式更加传统的 Umpolung 反应,其中采用源自相同醛类的二噻烷作为亲核体 (方案方案 14)。

[0272] 方案14:二噻烷Umpolung方式。

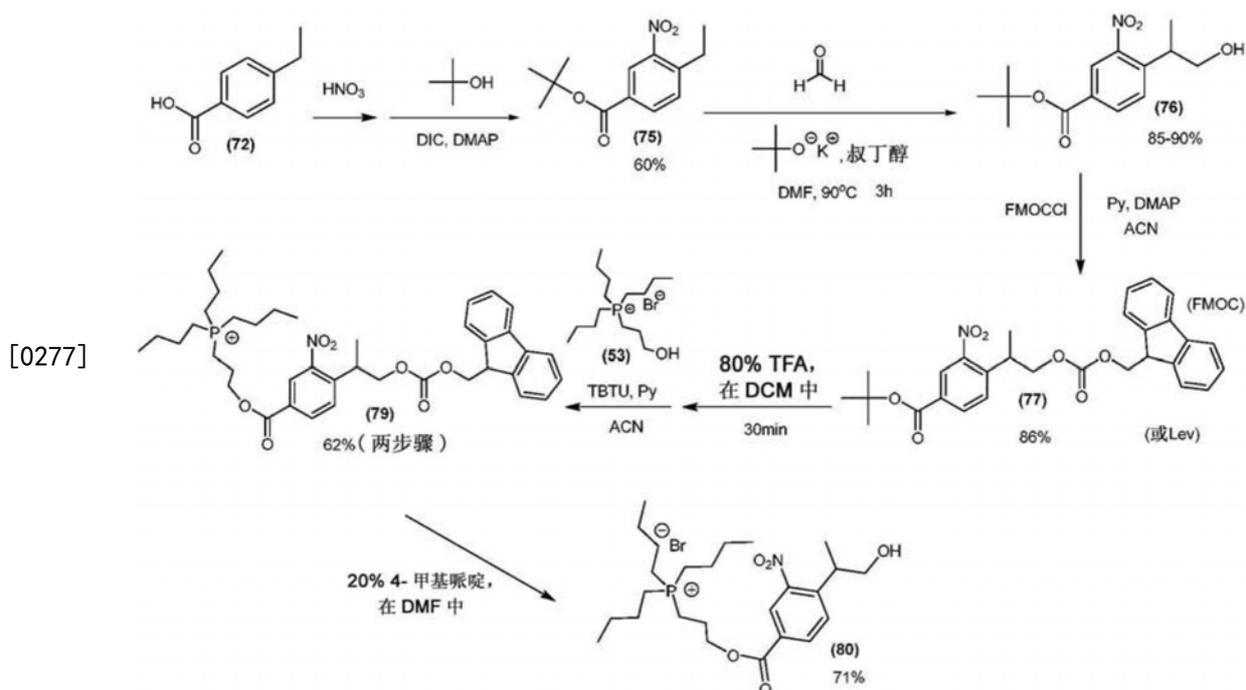


[0274] 可以使用相同的迈克尔受体并且这种方式将消除在Stetter反应中观测到的竞争的自缩合反应[方案8,产物(55)].二噻烷还将作为用于大部分反应的酮保护基团并且对于用来除去甲硅烷基醚(TBMS)的氟化物处理将可能是稳定的。这种方式还将使用本文描述的许多转化,虽然二噻烷切割以释放酮的时间可能要求是在离子部分的安装以前(如果用于这种切割的试剂证明难以分离自所期望的产物)。在这种情况下,可以在碳-碳键形成以后立即切割二噻烷,然后可以安装缩醛。

[0275] 对于以上所述的正交乙酰丙酰基接头的一种替代是光可切割的接头,其可以在所有标准核糖核苷酸保护基团存在的情况下被除去。这便于使用非常温和的条件来在阻滞剂(blocker)的合成期间的任何时间暴露3'-羟基。与2'-TIPS保护基团联合,没有甲硅烷基

迁移风险,从而便于生产区域异构体纯嵌段聚体,其可以容易被转化成亚磷酰胺。NPPOC样衍生物(80)的合成开始于由Pfleiderer报道的若干短而精巧的步骤[Pfleiderer, W. et al. Helvetica Chimica Acta, 87:620 (2004)]。

[0276] 方案15:对光不稳定离子标记接头(80)的合成。



[0278] 将发烟硝酸冷却至 -10°C ,然后经30分钟将4-乙基苯甲酸(72)加入静置溶液(sitting solution),接着允许搅拌30分钟。在碎冰上骤冷混合物并收集3-硝基-4-乙基苯甲酸(73)的固体沉淀物,然后用乙酸乙酯和己烷加以结晶,获得良好的产率(95%)。在标准条件下,利用DCC和DMAP,并借助于叔丁醇,来形成叔丁酯。

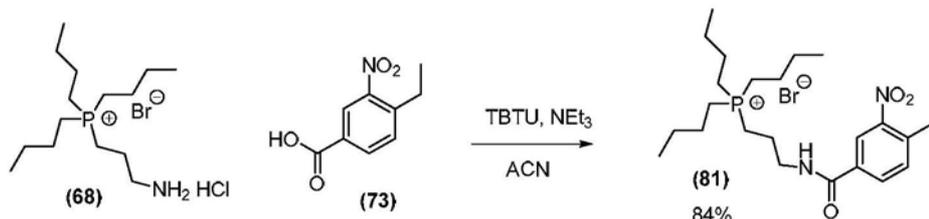
[0279] 如由Pfleiderer描述的来形成2-取代的丙-1-醇衍生物,其中通过在 90°C 下用在非质子双极性溶剂(如DMF或DMSO)中的对甲醛和催化量的叔丁醇钾来处理叔丁酯3小时[Pfleiderer, W. et al. Helvetica Chimica Acta, 87:620 (2004)]。然后骤冷反应并用1M HCl中和至pH7,从而产生85-90%的所期望的产物(76)。然后用Fmoc-Cl(77),一种酸稳定的保护基团,来保护新形成的伯羟基。这允许用在DCM中的80%TFA来切割叔丁酯而没有伯羟基的去保护。如果没有Fmoc保护,将发生新形成的羧基的脱水,从而形成丙烯衍生物。同样,在Fmoc的安装以后,必要的是,化合物并不长期暴露于阳光或钨丝灯光,因为这种化合物将经历光解切割(依据分子的设计)。

[0280] 然后借助于在ACN中的TBTU将新形成的游离酸与磷离子标记(53)偶联并包装在铝箔中8小时,其提供65%的中等产率的标记物质(79),通过柱层析,其可以容易分离自任何原材料。接着,在标准条件下,通过用在DMF中的20%的4-甲基吡啶处理2小时来除去Fmoc基团,从而产生良好产率的化合物(80)。虽然在伯醇处没有保护基团可以被除去,但这种化合物在任何时候都应保持在黑暗中。这是由于以下事实:观测到,随着时间的推移,一些降解确实发生,虽然远远慢于当Fmoc存在时的情况。

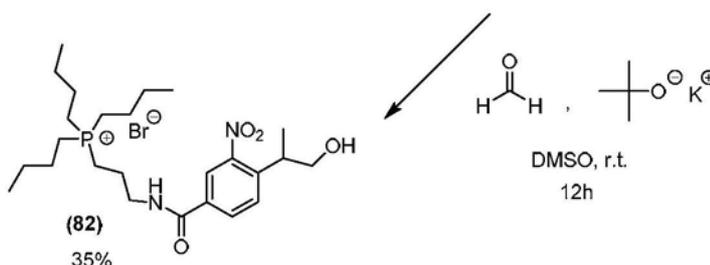
[0281] 光不稳定接头的先前合成是稍微有点长并且需要使用昂贵的瞬态保护基团(transient protecting group),Fmoc。在缩短合成的尝试中,我们能够避免羧酸部分的保

护、去保护、和再保护,同时增加总产率。这是通过直接共轭修饰的磷离子标记(68)(其包含代替羟基的伯胺)来完成,从而在化合物(81)中产生酰胺键(方案16)。这是如针对(80)的合成(方案15)所描述的来实现,其中利用TBTU和三乙胺作为偶联试剂,从而产生率为35%(未优化)的(82)。

[0282] 方案16:对光不稳定的离子标记接头(82)的短合成



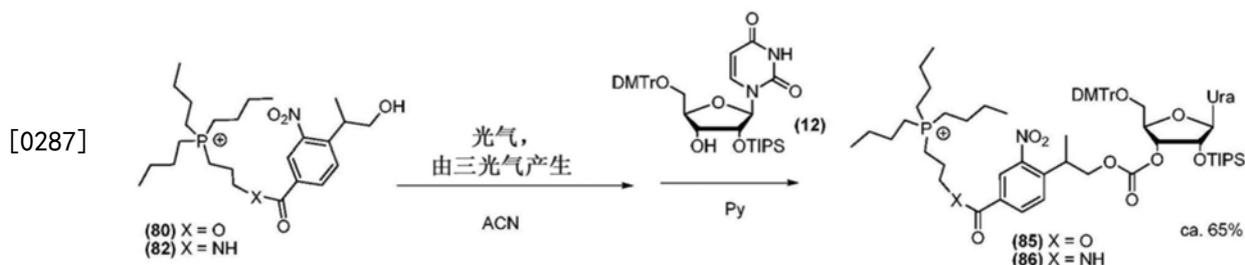
[0283]



[0284] 在另一种实施方式中,提供了用于将离子标记接头(82)连接于核糖核苷的方法,从而提供结构单元(85)或(86),其用于进一步加工进入寡核苷酸。用于进行共轭作用的一般方法示于方案16,并且涉及离子标记接头的光气化(phosgenation),接着它连接于核苷的3'-羟基。

[0285] 因此,(80)或(82)的光气化是通过来自Eckert, H. Auerweck, J. Org. Process Res. Dev. 14:1501-1505, (2010)的改良程序加以进行,并概述于方案17。用于从三光气和菲啉(phenanthridine)产生光气的详细的实验程序描述于实验部分(实施例)。

[0286] 方案17:核苷(12)与对光不稳定的离子标记接头的共轭作用。



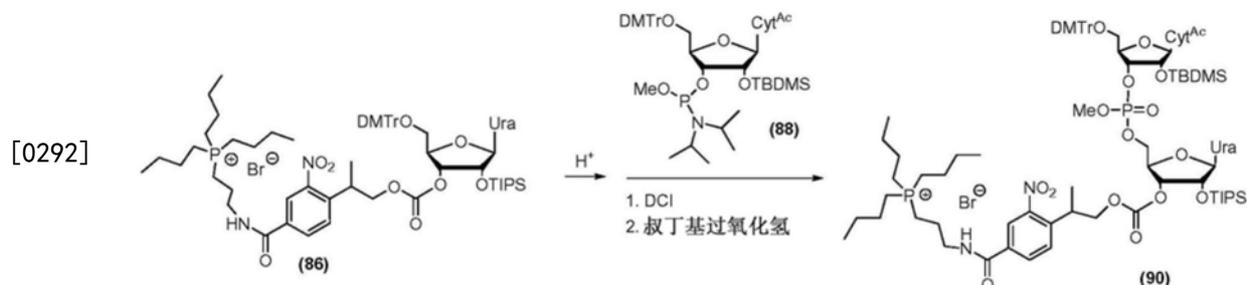
[0288] 将核苷(12)在乙腈中的溶液直接加入DIPEA和上述产生的光气的混合物,并允许在室温下搅拌8小时。在添加乙酸乙酯以后,用饱和 NaHCO_3 和盐水洗涤混合物,然后在MTBE中沉淀以除去过量(未反应的)核苷和DIPEA。通过柱层析并在DCM:MeOH中进一步纯化得到的沉淀物。

[0289] 核苷如(86)具有若干应用。它们可以作为原材料,用于合成二聚体或三聚体或更大的寡核苷酸,其仅需要用于分离的沉淀步骤,其中借助于在3'-端处的极性离子标记接头。在已合成所期望的长度以后,可以切割3'-标记和所有保护基团,从而产生自由(未受保护的)寡核苷酸。可替换地,由于可以选择性地切割3'-离子标记而没有去封闭(deblock)在杂环碱基或糖-磷酸酯主链上的所有其它保护基团,所以它提供了一种新颖方式来制备

包含3'-羟基的受保护的寡核苷酸嵌段,其可以被进一步加工成3'-亚磷酰胺衍生物。

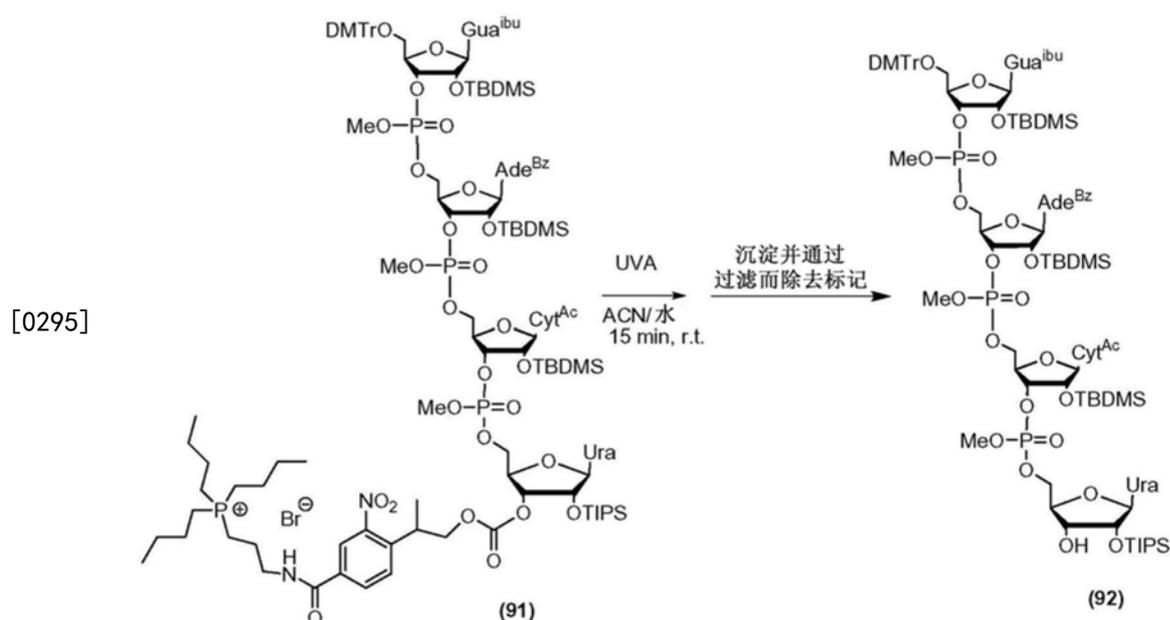
[0290] 以开始于核苷(86)的四核苷酸rAGCU的合成来举例说明这些过程(方案18和19)。在黑暗中进行反应,其中用铝箔裹住反应烧瓶以避免它的离子光不稳定标记的早期切割(premature cleavage)。

[0291] 方案18:自核苷(86)来合成离子标记rCpU(90)。



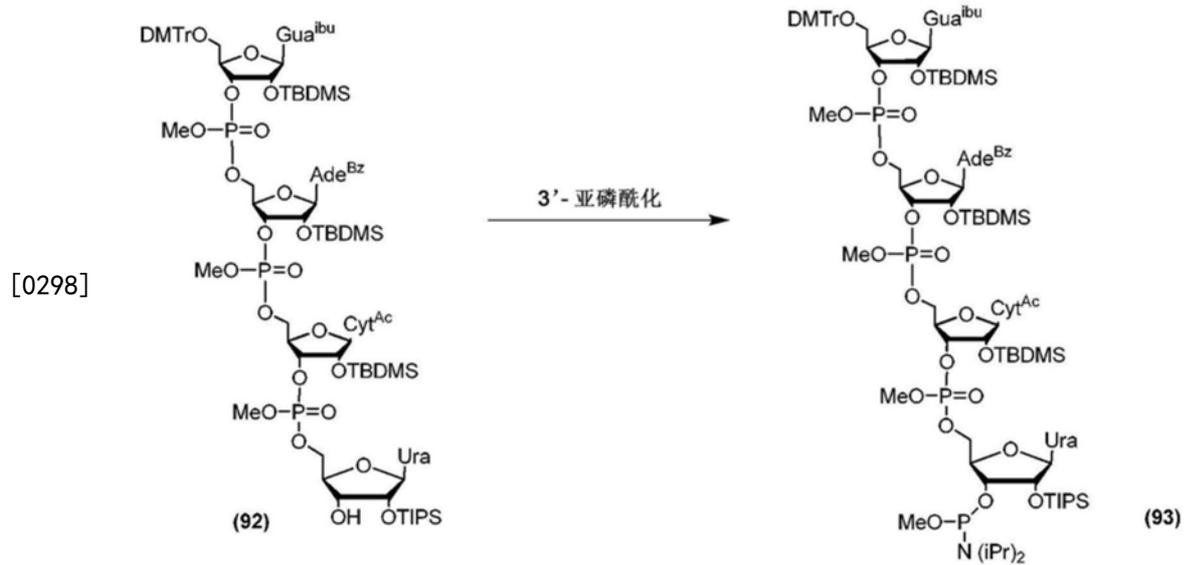
[0293] 通过添加在DCM中的3%三氟乙酸并允许搅拌混合物5分钟来脱三苯甲基化(detritylate)3'-标记尿苷(86)。甲醇的添加会确保三苯甲基阳离子的骤冷,从而防止5'-羟基的再三苯甲基化(re-tritylation)。然后在MTBE中沉淀粗产物以除去DMTrOMe、和/或DMTrOH。然后经赛力特硅藻土(celite)来过滤化合物,收集在DCM中并通过柱层析加以再纯化,从而提供产率为95%的P4。在有4,5-二氰基咪唑(DCI)存在的情况下,通过与rC亚磷酰胺单体(88)偶联来自P4合成二聚体rCpU(90),并允许在室温下搅拌得到的溶液3小时。添加10当量叔丁醇以骤冷过量亚磷酰胺,接着10当量的叔丁基过氧化氢(1mL的在癸烷中的6M溶液)以将核苷酸间亚磷酸三酯氧化成更加稳定的磷酸三酯。然后将反应浓缩成油,接收在最少量的二氯甲烷(DCM)中,并在MTBE中沉淀以除去所有过量试剂。如果通过TLC检测到任何骤冷亚磷酰胺的存在,则重复沉淀过程。分离标记的rCU二聚体(90),产率为95%(0.63g)。如上所述,重复上述过程,其中利用适当的亚磷酰胺,直到获得四聚体(92)。在实验部分(实施例)中提供了全部实验程序和表征。

[0294] 方案19:从四聚体(91)选择性地光切割正交磷标记,从而提供受保护的DMTr-rGACU-3'OH(92)。



[0296] 将四聚体 (91) 溶解于 1mL 湿 ACN (1200ppm 的 H_2O)，然后转移到石英比色杯。将比色杯放置在搅拌的光反应器内。反应在 15 分钟内完成 (TLC 分析)。将混合物浓缩至约一半容积，并通过借助于甲基叔丁基醚 (MTBE) 的沉淀来除去切割标记。在 MTBE 溶液中发现所期望的四聚体，在浓缩溶液至干燥以后其被收集。分离的产率是 95% (92mg)。(92) 的亚磷酰化 (phosphitylation)，如先前描述的，可以提供 3'-亚磷酰胺衍生物 (93)，其适用于经由嵌段偶联的 RNA 合成。

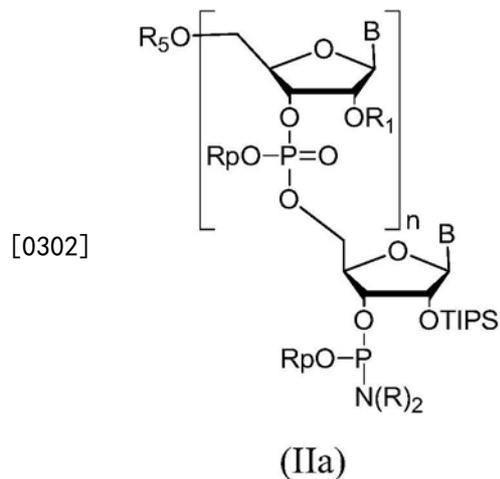
[0297] 方案 20: 四聚体亚磷酰胺衍生物的合成。



[0299] 寡核苷酸合成

[0300] 在另一种实施方式中，提供了用于制备 N 聚体寡核苷酸的方法，所述方法包括：

[0301] a) 缩合化学式 (IIa) 的亚磷酰胺 (phosphoramidite)：



[0303] 其中

[0304] n 是 0 至 19 的整数；

[0305] R_1 是保护基团；

[0306] R_5 是保护基团；

[0307] R_p 是保护基团；

[0308] R 是低级烷基，或 $N(R)_2$ 部分是环状烷基胺、或取代的环状烷基胺，优选吗啉；

[0309] B是含氮碱基；

[0310] 其中每个B、 R_1 和 R_p 分别地可以是相同或不同于任何其它B、 R_1 和 R_p ；

[0311] 和

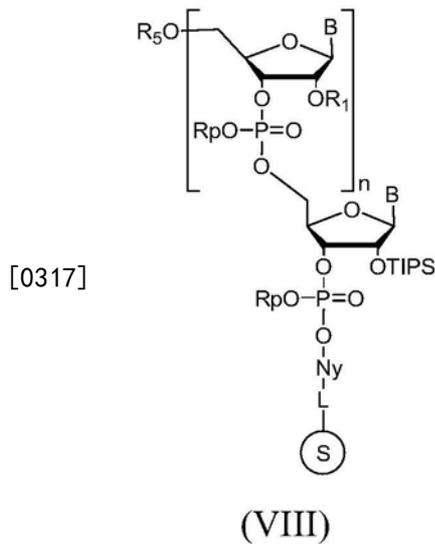
[0312] (a') 官能化接头L,其结合于载体 \textcircled{S} ,

[0313] 其中 \textcircled{S} 选自固体载体或离子载体,或

[0314] (b') 化学式 $(5'\text{-OH})\text{N}-\text{L}-\textcircled{S}$ 的化合物

[0315] 其中 $(5'\text{-OH})\text{N}$ 是核苷/寡核苷酸链,其经由官能化接头L结合于固体载体或离子载体,并具有自由5' -OH基团；

[0316] b) 氧化步骤 (a) 的产物以形成化学式 (VIII) 的化合物：



[0318] 其中

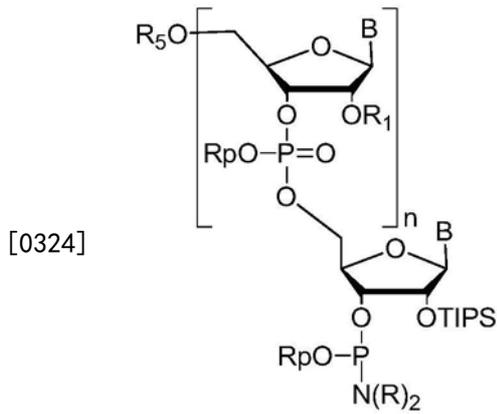
[0319] y是0或1；

[0320] n、B、 R_1 、 R_5 、 R_p 、 \textcircled{S} 、L、和N是如上所定义；以及

[0321] c) 可选地，

[0322] (i) 脱保护先前步骤的产物的末端5' -OR₅基团以形成自由5' -OH基团；

[0323] (ii) 缩合步骤 (i) 的产物和化学式 (IIa) 的亚磷酰胺



(IIa)

[0325] 其中n、B、R₁、R₅、R_p和R是如上所定义,以及每个n、B、R₁、R₅、R_p和R分别地可以是相同或不同于任何其它n、B、R₁、R₅、R_p和R;

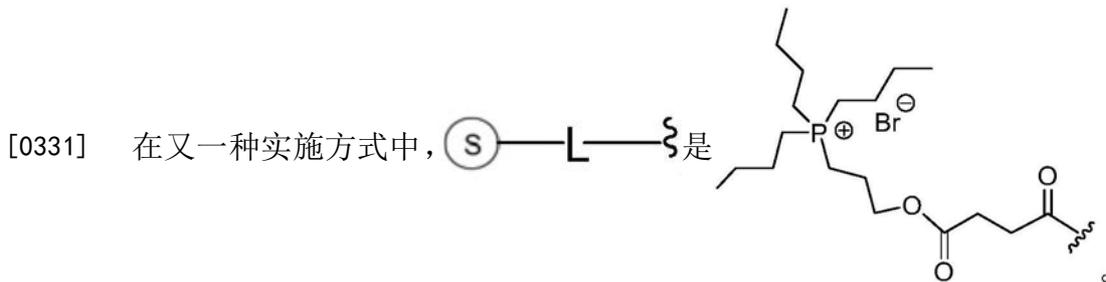
[0326] (iii) 氧化步骤(ii)的产物;以及

[0327] (iv) 可选地重复步骤(i) - (iii);

[0328] 前提条件是,如果y是0,则步骤(c)不是可选的;

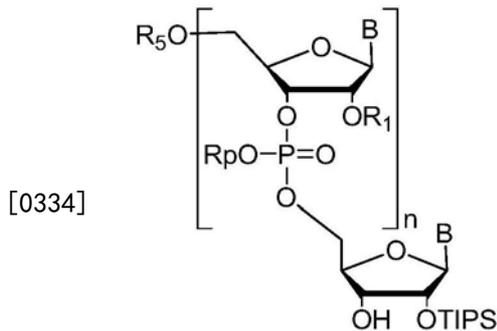
[0329] 以形成结合的N聚体寡核苷酸。

[0330] 在另一种实施方式中,y是1以及N是核苷。



[0332] 在又一种实施方式中,提供了用于制备N聚体寡核苷酸的方法,所述方法包括:

[0333] a) 缩合化学式(IIb)的化合物;



(IIb)

[0335] 其中

[0336] n是0至19的整数;

[0337] R₁是保护基团;

[0338] R₅是保护基团;

[0339] R_p 是保护基团；

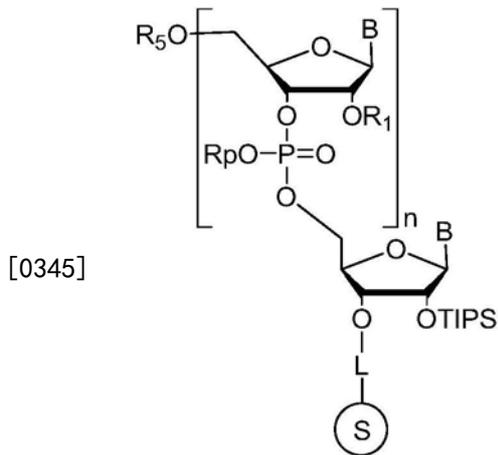
[0340] B 是含氮碱基；

[0341] 其中每个 B、 R_1 和 R_p 分别地可以是相同或不同于任何其它 B、 R_1 和 R_p ；

[0342] 和

[0343] 官能化接头 L，其结合于离子载体 \textcircled{S} ，

[0344] b) 氧化步骤 (a) 的产物以形成化学式 (IX) 的化合物：



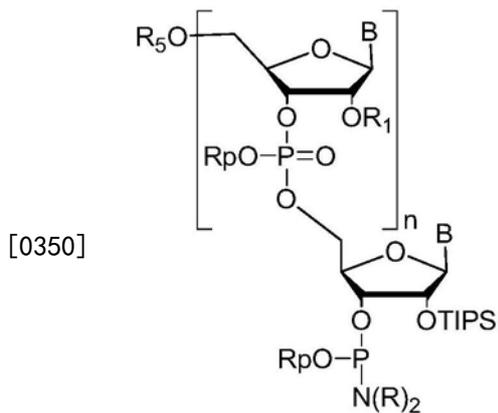
(IX)

[0346] 其中

[0347] n 、B、 R_1 、 R_5 、 R_p 、 \textcircled{S} 和 L 是如上所定义；以及

[0348] c) (i) 脱保护先前步骤的产物的末端 5' - OR_5 基团以形成自由 5' -OH 基团；

[0349] (ii) 缩合步骤 (i) 的产物和化学式 (IIa) 的亚磷酰胺



(IIa)

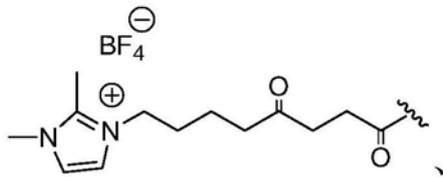
[0351] 其中 n 、B、 R_1 、 R_5 、和 R_p 是如上所定义，以及 R 是低级烷基，或 $N(R)_2$ 部分是环状烷基胺、或取代的环状烷基胺，优选吗啉；其中每个 n 、B、 R_1 、 R_5 、和 R_p 分别地可以是相同或不同于任何其它 n 、B、 R_1 、 R_5 、和 R_p ；

[0352] (iii) 氧化步骤 (ii) 的产物；以及

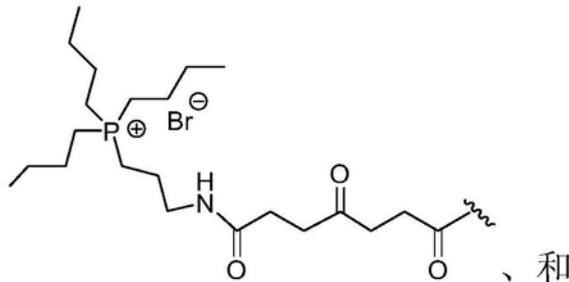
[0353] (iv) 可选地重复步骤 (i) - (iii)；

- [0354] 以形成结合的N聚体寡核苷酸。
- [0355] 在上述方法的另一种实施方式中,n选自0、1、2、或3。
- [0356] 在上述方法的又一种实施方式中:
- [0357] R_1 是TBDMS;
- [0358] R_5 选自DMTr和MMTr;
- [0359] R_p 选自甲基(Me)、2-氰基乙基(CNEt)、邻氯苯基(o-ClPh)、和对氯苯基(p-ClPh);
- [0360] R选自异丙基、甲基、和乙基;以及
- [0361] B是在至少一个氮上受到合适的N-保护基团保护的核碱基,
- [0362] 其中N-保护基团选自乙酰丙酰基、乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、9-苄基甲氧基羰基、苯氧基乙酰基、二甲基甲脒、和N,N-二苯基氨基甲酸酯。
- [0363] 在上述方法的又一种实施方式中:
- [0364] R_5 是DMTr;
- [0365] R_p 是甲基;以及
- [0366] R是iPr。
- [0367] 在上述方法的另一种实施方式中,上述方法进一步包括完全脱保护结合的N聚体寡核苷酸以产生自由N聚体寡核苷酸。在上述方法的另一种实施方式中,N聚体寡核苷酸具有4-100个核糖核苷酸的长度。在上述方法的又一种实施方式中,N聚体寡核苷酸具有4-100个脱氧核糖核苷酸的长度。

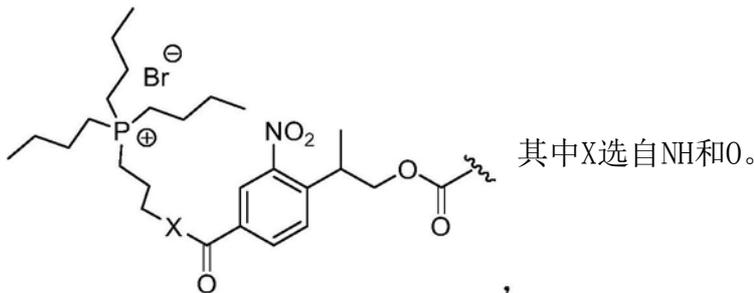
- [0368] 在上述方法的另一种实施方式中, $\textcircled{S}-L-\textcircled{S}$ 选自:



[0369]



[0370]



- [0371] 在又一种实施方式中,提供了通过上述方法制备的寡核苷酸。在一种实施方式中,通过上述方法制备的寡核苷酸是寡核糖核苷酸。在另一种实施方式中,通过上述方法制备

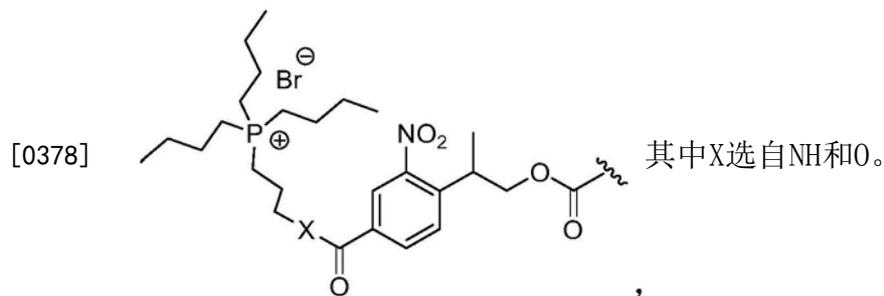
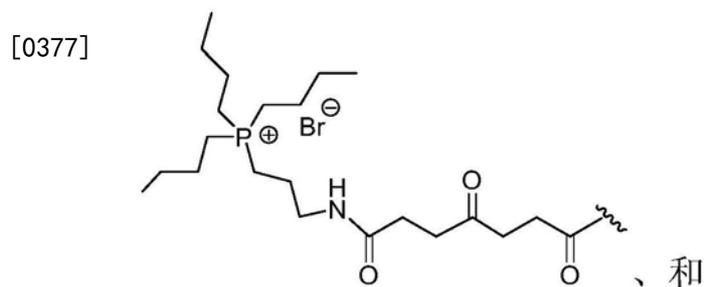
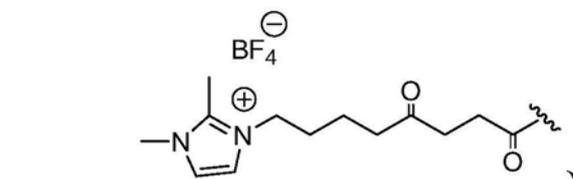
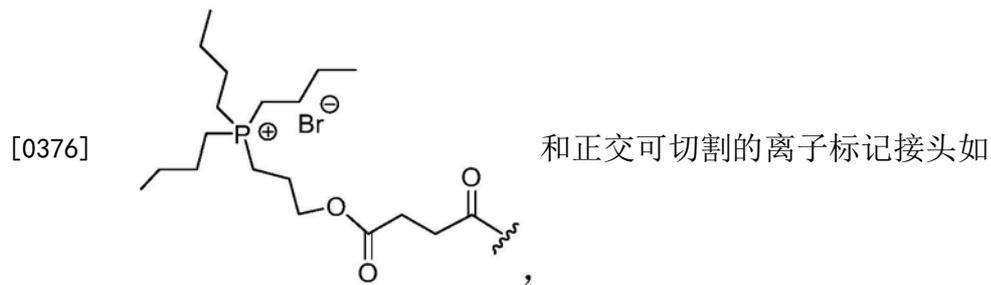
的寡核苷酸是寡脱氧核糖核苷酸。

[0372] 用于上述方法的适宜的固体载体是本领域技术人员已知的并且可以包括可控孔度玻璃 (CPG) 或长链烷基胺 CPG (LCAA-CPG)、聚苯乙烯、聚乙烯等。

[0373] 适宜的离子载体也是本领域技术人员已知的。它们可以包括那些离子载体,其描述于 Chan, T.-H. et al. 的 PCT 申请公开号 W02006/096963, 其全部内容以引用方式加入本文。适宜的离子载体可以包括, 例如, 咪唑鎓和磷离子盐。

[0374] 通常将官能化接头 (在化学式 (VIII) 和 (IX) 中的 “L”) 连接于固体/离子载体以隔开寡聚物和载体的表面, 以及适宜的接头是本领域技术人员已知的。连同 CPG (受控孔度玻璃) 和高度交联聚苯乙烯 (PS) 固体载体一起使用的最常见的接头是长链烷基胺, 其被琥珀酰、草酰、氢醌-0,0'-二乙酸进一步官能化 ('Q-接头'), 或通用接头如那些接头, 其描述于美国专利号 6,770,754、欧洲专利号 1404695、Guzaev, A.P. et al. J. Am. Chem. Soc., 125, 2380-2381 (2003)。关于接头的其它选项披露于 Pon, R.T. et al. Nucleic Acids Research, 25, 3629-3635 (1997), 其全部内容以引用方式加入本文。

[0375] 如上文所述, 部分 $\text{S} \text{---} \text{L} \text{---} \text{Q}$ 可以选自



[0379] 通过十核苷酸,5'-rUUAUUAA-dTT-3',的溶液相合成,以及尿苷和混合尿苷/腺苷成分的寡核苷酸的固相合成,来测试本文描述的二聚体和三聚体合成子的效用。通过先前合成的二聚体亚酰胺嵌段UpU (30) 和ApA (47) (示于方案1和6) 与连接于新型四烷基磷离子标记的dTpdT二聚体(方案21) 偶联来构建十聚体。

[0380] 在一种实施方式中,本发明涉及在溶液中利用本文提供的可切割的离子标记接头来合成寡聚物的方法,上述寡聚物包括但不限于寡肽、寡糖和寡核苷酸(例如,寡核糖核苷酸、寡脱氧核糖核苷酸)。在一种进一步的实施方式中,本发明涉及用于化学合成寡聚物(包括但不限于寡肽、寡糖和寡核苷酸)的离子标记接头,离子标记接头在并不切割其它寡聚物保护基团条件下可以被切割。在一种实施方式中,离子标记接头是正交可切割的。本发明的离子标记接头相容于通常用于有机合成的各种合成方法。更具体地说,离子标记接头相容于通常用于合成寡聚物的各种合成方法,上述寡聚物包括但不限于寡肽、寡糖和寡核苷酸(例如,寡核糖核苷酸、寡脱氧核糖核苷酸)。此外,特别地但不排他地在寡核糖核苷酸合成的情况下,离子标记接头不得诱导其它保护基团的异构化(当被切割时)。此外,离子标记接头的可溶性,在一种实施方式中,并不受到增长的寡肽、寡糖或寡核苷酸链的影响,以致分离和纯化程序变得过于复杂。在一种实施方式中,分离和纯化程序被简化(利用本发明的离子标记接头),并且可以涉及用水溶剂和/或有机溶剂进行的洗涤步骤。

[0381] 在本发明的一种实施方式中,在本发明的离子标记接头中的离子部分是有机盐,其包含杂环或取代的杂环含季氮有机阳离子以及平衡在有机阳离子上的电荷的阴离子。在另一种实施方式中,有机阳离子选自由N-取代的吡啶和1,3-二取代的咪唑组成的组以及阴离子选自由Cl、Br、BF₄、PF₆、SbF₆、CuCl₂、和AlCl₄组成的组。其它离子部分在本领域中是已知的,并且是在熟练的技术人员的能力范围内。此外,在熟练的技术人员的能力范围内的是,阴离子还可以是有机阴离子,其非限制性实例包括 CH₃CO₂、CF₃CO₂、CH₃SO₄、和CF₃SO₂。

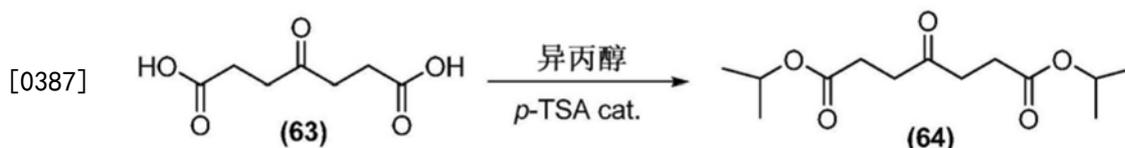
[0382] 在一种实施方式中,连接于离子标记接头的基质(反应物)可溶于极性有机溶剂并且可以经历液相反应。在完成反应和溶剂蒸发以后,可以通过离子标记接头并不可溶于其中的较少极性的有机溶剂来除去过量试剂。可以通过沉淀或通过用水溶液洗涤来除去无机试剂和/或副产物。可以重复反应的顺序以产生更复杂的结构。最后,产物可以被分开,然后,通过有机溶剂提取,分离自离子标记接头。预期连接于离子标记接头的基质在很大程度上保留它们的反应性,即类似于基于传统溶液的反应。容易监测反应的进展并通过标准光谱技术加以分析。

[0383] 在一些实施方式中,简单地通过沉淀连接的离子标记接头来纯化产物。

[0384] 总而言之,本发明描述了一种可行途径,用于合成区域异构体纯二聚体和三聚体RNA亚磷酰胺,其以类似效率并作为单体亚磷酰胺单元进行偶联。上述方法会增加目标寡核糖核苷酸序列的总产率(通过减少为链装配所需要的偶联步骤的数目)并且有可能显著简化RNA序列的最终纯化。本发明还表明,在链装配的最后阶段中,连同单体合成子一起,二聚体和三聚体合成子可以用于溶液或固相,从而提供n-2或n-3失败序列(failure sequence),其更容易被解析(resolve)。二聚体和三聚体亚酰胺嵌段可能会发现可应用于siRNA药物的大规模溶液(或固)相合成。应当理解的是,本文提供的方法还适用于DNA合成。

[0385] 另外,本文描述了得到离子标记接头的支持的用来合成寡肽、寡糖和寡核苷酸的新型溶液相方法。提供了用于大规模溶液相合成的离子标记接头和方法。

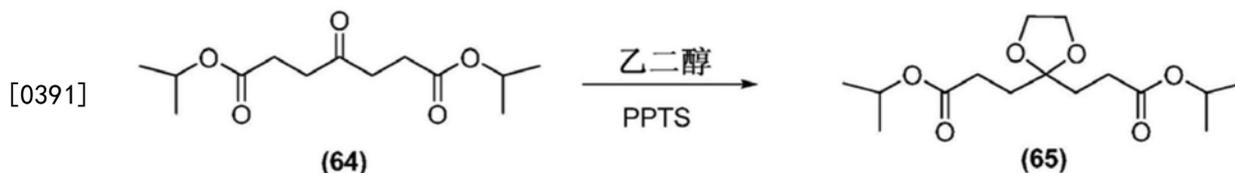
[0386] 实施例



[0388] 4-氧代庚二酸二异丙酯 (diisopropyl 4-oxoheptanedioate) (64)

[0389] 将4-酮庚二酸 (63) (10g, 57.4mmol; 购买自Sigma-Aldrich) 悬浮在50 mL异丙醇和50mL苯中。将催化量的对甲苯磺酸加入混合物并利用迪安-斯达克榻分水器来达到回流以除去产生的水。在烧瓶中在容积已减少至大约50mL以后, 添加另外50mL的50:50苯:异丙醇并进一步减少至大约 30ml。然后将混合物接收在乙酸乙酯中并用NaHCO₃ (x3) 提取, 接着用盐水提取一次。用MgSO₄干燥有机层并浓缩至干燥, 从而产生纯 (64): 14.2 g (95%)。

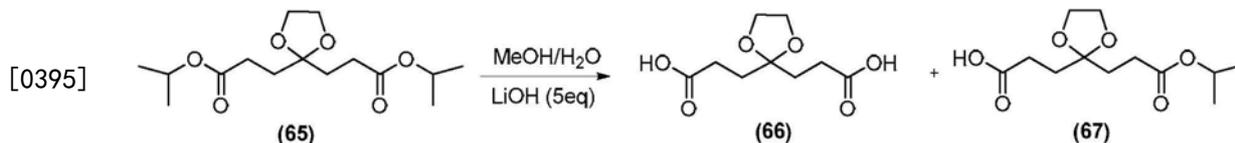
[0390] ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δppm 1.06 (d, J=6.45Hz, 12H) 2.39 (t, J=7.00Hz, 1H) 2.60 (t, J=6.70Hz, 4H) 4.72-4.89 (m, 2H) ¹³C NMR (75 MHz, 氯仿-d) δppm 21.57 (s, 1C) 28.13 (s, 3C) 28.13 (s, 3C) 36.92 (s, 3C) 67.66 (s, 1C) 171.90 (s, 2C) 206.82 (s, 1C) C₁₃H₂₂O₅Na¹⁺ 低分辨率ESI-MS 计算为: 258.14, 发现为: 281.21。



[0392] 3,3'-(1,3-二氧戊环-2,2'-二基)二丙酸二异丙酯 (65)

[0393] 用5当量的乙二醇 (0.58mL, 10.5mmol)、90mL无水甲苯和催化量的对甲苯磺酸吡啶鎓盐来溶剂化化合物 (64) (0.55g, 2.1mmol)。在140°C下回流此混合物 (更换甲苯3次) 并最后允许反应回流过夜。然后蒸馏混合物至大约30mL, 去除加热 (停止加热) 并用DCM稀释以及用饱和NaHCO₃提取 (x2), 然后用水提取 (x3), 以除去任何过量的乙二醇。通过柱层析 (DCM: MeOH, 100:0→95:5) 来纯化产物。分离的产量: 0.41g (65%)。

[0394] ¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) δppm 1.05 (d, J=6.36Hz, 12H) 1.78 (t, J=7.58Hz, 15H) 2.16 (t, J=7.58Hz, 15H) 3.76 (s, 15H) 4.82 (dt, J=12.53, 6.33Hz, 8H) ¹³C NMR (126MHz, 氯仿-d) δppm 21.59 (s, 1C) 29.02 (s, 1C) 32.07 (s, 1C) 64.94 (s, 1C) 67.23 (s, 1C) 67.26 (s, 1C) 109.84 (s, 1C) 172.56 (s, 1C) C₁₅H₂₆O₆Na¹⁺ 低分辨率ESI-MS 计算为: 302.17, 发现为: 325.0。



[0396] 3-(2-(3-羟基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酸 (66) 和 3-(2-(3-异丙氧基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酸 (67)。

[0397] 将化合物 (65) (1.3g, 4.3vmmol) 溶剂化 (溶解, solvate) 于2.5mL的 MeOH, 对其添加在2.5mL水中的5当量LiOH (0.51g, 21.5mmol)。允许搅拌此混合物6小时直到所有原材料被消耗。通过添加在MeOH中的1M HCl, 使溶液达到中性。

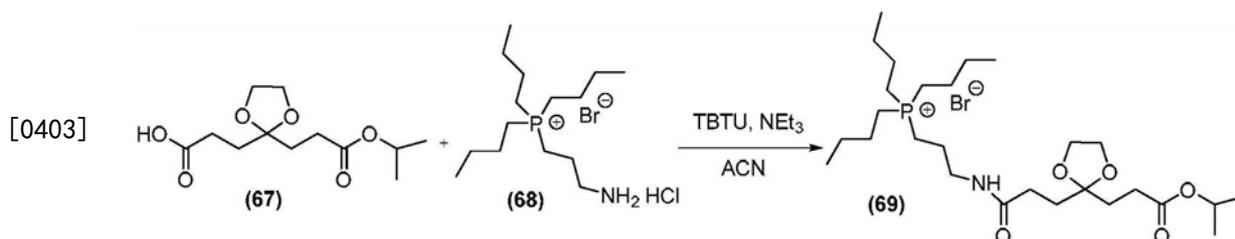
[0398] 通过柱层析 (DCM: MeOH, 100:0→90:10) 来纯化此混合物。(66) 的分离的产量为 0.35g (40%)。(67) 的产量为 0.68g (60%)。

[0399] (66)

[0400] ^1H NMR (300MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 1.94 (t, $J=8.20\text{Hz}$, 4H) 2.33 (t, $J=7.30\text{Hz}$, 15H) 3.94 (s, 26H) ^{13}C NMR (75MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 28.19 (s, 1C) 31.82 (s, 1C) 64.77 (s, 1C) 109.81 (s, 1C) 175.90 (s, 1C) $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_6\text{Li}^-$ 低分辨率ESI-MS计算为:218.07, 发现为:224.12。

[0401] (67)

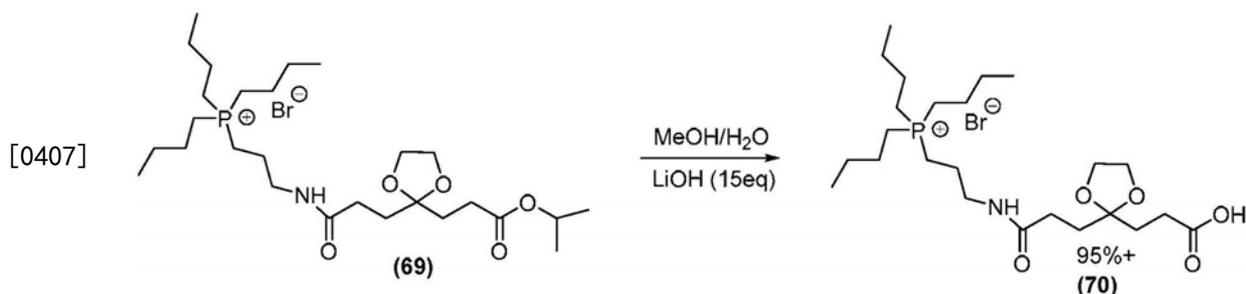
[0402] ^1H NMR (500MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 1.22 (d, $J=6.36\text{Hz}$, 6H) 1.87- 2.03 (m, 4H) 2.23- 2.34 (m, 4H) 3.55 (m, $J=5.14\text{Hz}$, 3H) 3.67 (m, $J=5.14\text{Hz}$, 3H) 4.89-5.00 (m, 2H) ^{13}C NMR (126MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 7.75 (s, 1C) 20.72 (s, 1C) 28.80 (s, 1C) 31.81 (s, 1C) 60.87 (s, 1C) 62.94 (s, 1C) 67.60 (s, 1C) 72.13 (s, 1C) 109.92 (s, 1C) 173.40 (s, 1C) 176.73 (s, 1C) $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6^-$ 低分辨率ESI-MS计算为:260.12, 发现为:259.03。



[0404] 三丁基(3-(3-(2-(3-异丙氧基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酰氨基)丙基)溴化磷(69)

[0405] 将化合物(67) (0.3g, 1.1mmol) 溶剂化于1.5mL的ACN, 接着 TBTU (0.39g, 1.2mmol)、2.5当量三乙胺(0.38ml) 和磷离子标记(68) (0.45g, 1.2mmol)。允许搅拌此混合物4小时直到原材料(67) 被完全消耗。用乙酸乙酯稀释反应混合物, 用5% NaHCO_3 x2 提取并用盐水提取一次。干燥有机层和浓缩并通过柱层析(DCM:MeOH 100:0 \rightarrow 95:5) 加以纯化。分离的产量为0.54g (84%)。

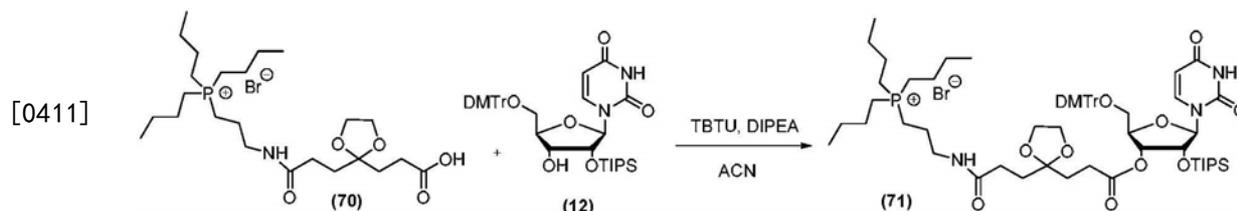
[0406] ^1H NMR (300MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.91 (t, $J=6.74\text{Hz}$, 9H) 1.06 (d, $J=6.45\text{Hz}$, 6H) 1.25 (s, 6H) 1.38-1.59 (m, 11H) 1.80-1.95 (m, 7H) 2.15- 2.30 (m, 9H) 2.18 (t, $J=7.03\text{Hz}$, 8H) 3.28-3.44 (m, 2H) 3.84 (br. s., 5H) 3.94 (s, 6H) 4.72-4.89 (m, 1H) $\text{C}_{27}\text{H}_{53}\text{NO}_6\text{P}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为: 502.36, 发现为:502.36。



[0408] 三丁基(3-(3-(2-(3-羟基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酰氨基)丙基)溴化磷(70)

[0409] 将化合物(69) (0.25g, 0.4mmol) 溶剂化于2.5mL的MeOH, 对其添加在mL水中的10当量LiOH (0.1g, 4mmol)。允许搅拌此混合物3小时直到所有原材料被消耗。通过添加在MeOH中的1M HCl, 使溶液达到中性。通过柱层析(DCM:MeOH, 100:0 \rightarrow 90:10) 来纯化此混合物。(70) 的分离的产量为0.20g (95%)。

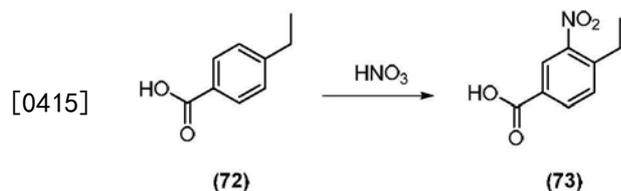
[0410] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.91 (t, $J=6.74\text{Hz}$, 9H) 1.25 (s, 6H) 1.38-1.59 (m, 11H) 1.96-2.05 (m, 7H) 2.15-2.30 (m, 9H) 2.40 (t, $J=7.03\text{ Hz}$, 8H) 3.28-3.44 (m, 2H) 3.84 (br. s., 5H) 3.94 (s, 6H) $\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{NO}_5\text{P}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:460.31, 发现为:460.30。



[0412] 5'-DMTr-2'-TIPS-3'-[三丁基(3-(3-(2-(2-羧乙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酰氨基)丙基)溴化磷] (71)

[0413] 向化合物 (70) (0.2g, 0.37mmol) 在ACN (1mL) 中的溶液添加 TBTU (0.19g, 0.6mmol)、三乙胺 (0.5mL) 和化合物 (12) (0.42g, 0.6mmol)。允许搅拌得到的混合物12小时直到原材料 (70) 被完全消耗。用乙酸乙酯稀释反应混合物, 用5% NaHCO_3 x2提取并用盐水提取一次。干燥有机层并浓缩, 接收在最少量的DCM (沉淀在100mL的MTBE中) 中, 经 **Celite**® 过滤。(71) 的分离的产量为0.20g (45%)。

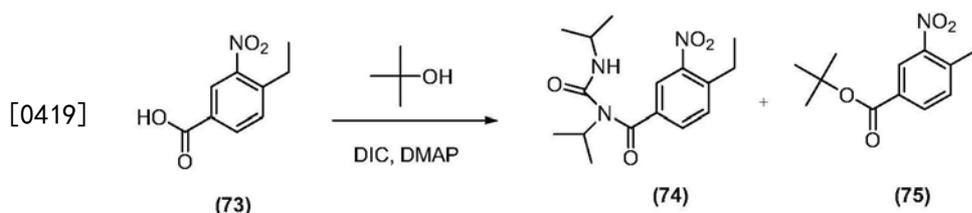
[0414] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) ppm 0.91 (t, $J=6.74\text{Hz}$, 9H) 1.02-1.59 (m, 38H) 1.96-2.05 (m, 7H) 2.15-2.30 (m, 9H) 2.40 (t, $J=7.03\text{Hz}$, 8H) 3.37-3.40 (m, 4H) 3.78-3.94 (br. m, 17H) 4.15 (d, $J=2.77\text{Hz}$, 1H) 4.63-4.67 (m, 1H) 5.31 (dd, $J=5.14, 2.96\text{Hz}$, 1H) 5.40-5.46 (m, 1H) 5.42 (s, 1H) 5.99 (d, $J=6.32\text{Hz}$, 1H) 6.87-6.93 (m, 4H) 7.27-7.37 (m, 7H) 7.41-7.45 (m, 2H) 7.75 (d, $J=8.30\text{Hz}$, 1H) $\text{C}_{63}\text{H}_{95}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{PSi}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:1144.64, 发现为:1144.7。



[0416] 3-硝基-4-乙基-苯甲酸 (73)

[0417] 在搅拌下, 将发烟硝酸 (90%) (150mL) 冷却至 -10°C 并经30分钟将4-乙基苯甲酸 (72) (30g, 0.2摩尔; Sigma-Aldrich) 直接缓慢加入静置溶液 (1.33 mmol/mL) 的 (72) 至发烟硝酸)。然后, 在添加完成以后, 允许搅拌混合物30分钟。然后将混合物倒在大约600g碎冰上以骤冷反应。产物形成白色沉淀物 (ppt), 其可以经烧结玻璃漏斗加以过滤。通过用水洗涤产物来融化过量冰。然后从乙酸乙酯/己烷再结晶样品。进行两轮结晶。产量为37.2 g (95%)。

[0418] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 1.33 (t, $J=7.58\text{Hz}$, 3H) 2.99 (q, $J=7.58\text{Hz}$, 2H) 7.52 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H) 8.23 (dd, $J=8.07, 1.71\text{Hz}$, 1H) 8.58 (d, $J=1.71\text{Hz}$, 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 14.62 (s, 1C) 26.38 (s, 1C) 126.37 (s, 1C) 128.29 (s, 1C) 131.67 (s, 1C) 133.87 (s, 1C) 144.85 (s, 1C) 149.36 (s, 1C) 170.40 (s, 1C) $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_4\text{Na}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:195.05, 发现为:218.2。



[0420] 3-硝基-4-乙基-苯甲酸叔丁酯 (75)

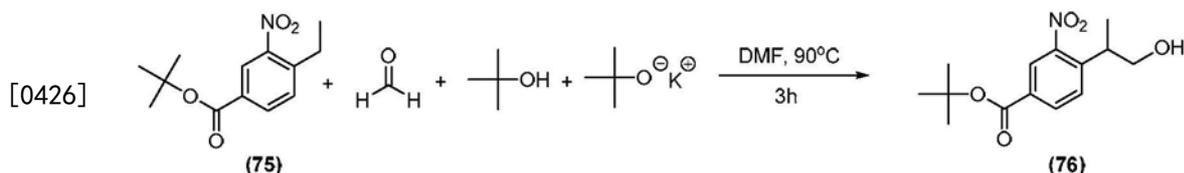
[0421] 将化合物 (73) (19.65g, 0.10 摩尔) 溶剂化于 500ml 的 THF (0.2M), 接着 1.15 当量 (10.14g, 0.15 摩尔) 二异丙基碳二亚胺。允许搅拌此混合物 5 分钟, 接着 1.5 当量叔丁醇 (17.9mL) 和催化量的 4-(二甲基氨基)-吡啶。在反应完成以前允许搅拌混合物 60 小时。用二乙醚稀释反应并过滤以除去二异丙基脒 (DIU), 然后浓缩至干燥。将混合物溶剂化于乙酸乙酯并用 5% NaHCO₃ 提取。通过柱层析 (溶剂体系: 己烷:DCM 100:0→0:100) 来从 (74) 分离产物。(75) 的产量为 15.1g (60%); (74) 的产率为 30%。

[0422] (74)

[0423] ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δppm 0.94 (d, J=6.45Hz, 6H) 1.26 (t, J=7.47Hz, 3H) 1.39 (d, J=6.74Hz, 6H) 2.91 (q, J=7.33Hz, 2H) 3.80 (dq, J=13.88, 6.70Hz, 1H) 4.44 (quin, J=6.74Hz, 1H) 6.49 (d, J=7.91Hz, 1H) 7.40 (d, J=8.20Hz, 1H) 7.67 (dd, J=7.91, 1.76Hz, 1H) 8.02 (d, J=1.76Hz, 1H) ¹³C NMR (75MHz, 氯仿-d) δppm 14.80 (s, 1C) 20.75 (s, 1C) 22.04 (s, 1C) 26.12 (s, 1C) 42.96 (s, 1C) 49.54 (s, 1C) 76.63 (s, 1C) 77.05 (s, 1C) 77.48 (s, 1C) 123.13 (s, 1C) 130.76 (s, 1C) 131.52 (s, 1C) 135.78 (s, 1C) 141.49 (s, 1C) 148.95 (s, 1C) 153.60 (s, 1C) 168.67 (s, 1C) C₁₆H₂₃N₃O₄Na⁺ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 321.16, 发现为: 344.23。

[0424] (75)

[0425] ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δppm 1.26 (t, J=7.47Hz, 3H) 1.57 (s, 11H) 2.91 (q, J=7.33Hz, 2H) 7.40 (d, J=7.91Hz, 1H) 8.08 (dd, J=7.91, 1.47Hz, 1H) 8.38 (d, J=1.47Hz, 1H) ¹³C NMR (75MHz, 氯仿-d) δppm 14.70 (s, 1C) 26.18 (s, 1C) 28.05 (s, 1C) 76.64 (s, 1C) 77.06 (s, 1C) 77.49 (s, 1C) 82.13 (s, 1C) 125.42 (s, 1C) 131.12 (s, 1C) 131.18 (s, 1C) 133.23 (s, 1C) 143.00 (s, 1C) 149.12 (s, 1C) 163.56 (s, 1C) C₁₃H₁₇NO₄Na⁺ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 251.11, 发现为: 274.32。

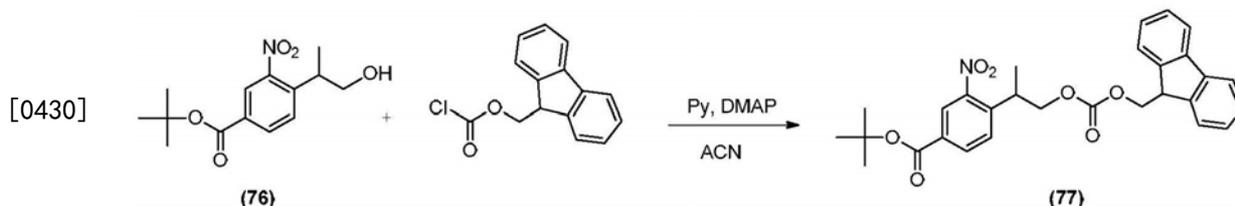


[0427] 4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酸叔丁酯 (76)

[0428] 将化合物 (75) (10.5g, 41.7mmol) 溶剂化于 19mL 的 DMF (2.2M), 对其添加 1.5 当量 (1.88g) 多聚甲醛, 接着叔丁醇钾 (0.12 当量, 0.56g) 在叔丁醇 (5.7mL) 中的溶液。在被升高至 90°C, 时间为 3 小时以前, 允许在室温下搅拌此混合物 10 分钟。然后, 通过添加 1M HCl, 将混合物酸化至中性 (通过 pH 计加以监测)。然后用饱和 NaCl 和乙酸乙酯 (x2) 稀释此混合物。通过柱层析 (DCM: 乙酸乙酯 100:0→90:10) 来纯化化合物 (76)。产量为 9.4 g (85%)。

[0429] ¹H NMR (400MHz, 乙腈-d₃) δppm 1.41 (d, J=7.03Hz, 3H) 3.80 (sxt, J=6.88Hz, 1H)

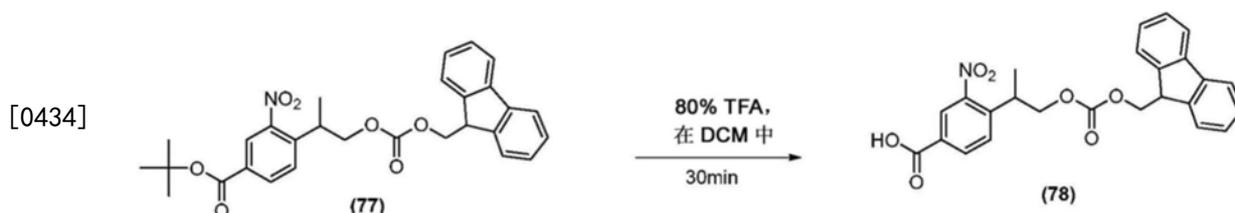
4.49-4.67 (m, 2H) 7.40 (d, $J=7.91\text{Hz}$, 1H) 8.08 (dd, $J=7.91, 1.47\text{Hz}$, 1H) 8.38 (d, $J=1.47\text{Hz}$, 1H) ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 17.35 (s, 1C) 27.96 (s, 1C) 36.57 (s, 1C) 67.01 (s, 1C) 82.27 (s, 1C) 124.77 (s, 1C) 128.50 (s, 1C) 131.04 (s, 1C) 131.06 (s, 1C) 132.81 (s, 1C) 142.62 (s, 1C) 150.41 (s, 1C) 163.58 (s, 1C) $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Na}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 281.12, 发现为: 304.02。



[0431] 4-(1-(F-moc)丙-2-基)-3-硝基苯甲酸叔丁酯 (77)

[0432] 连同吡啶 (x3) 一起来共蒸发化合物 (76) (5.38g, 20.2mmol) 并溶剂化于 97mL 的 ACN (0.2M) 和 2 当量吡啶 (3.13mL, 38.7mmol)。将 Fmoc-Cl (5.0g, 19.33mmol) 直接加入溶液并允许在黑暗中 (用铝箔覆盖) 搅拌 16 小时。反应进行到完成 (通过 TLC)。用 5% 氯化铵提取 (x3) 溶液并用盐水提取一次, 然后通过柱层析 (Hex/EtAc 100:0 \rightarrow 75:25) 加以纯化。分离的产量为 8.19g (86%)。

[0433] ^1H NMR (500MHz, 乙腈- d_3) δ_{ppm} 1.30 (d, $J=7.09\text{Hz}$, 3H) 1.60 (s, 9 H) 3.65 (sxt, $J=6.94\text{Hz}$, 1H) 4.19 (t, $J=6.24\text{Hz}$, 1H) 4.23-4.34 (m, 2H) 4.39-4.53 (m, 2H) 7.27-7.34 (m, 2H) 7.41 (t, $J=7.46\text{Hz}$, 2H) 7.53 (d, $J=7.34\text{Hz}$, 2H) 7.62 (d, $J=8.31\text{Hz}$, 1H) 7.80 (d, $J=7.58\text{Hz}$, 2H) 8.13 (dd, $J=8.19, 1.59\text{Hz}$, 1H) 8.28 (d, $J=1.71\text{Hz}$, 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 乙腈- d_3) δ_{ppm} 0.10 (s, 1C) 0.06 (s, 1C) 0.23 (s, 1C) 0.40 (s, 1C) 0.56 (s, 1C) 0.73 (s, 1C) 0.89 (s, 1C) 16.83 (s, 1C) 27.30 (s, 1C) 27.32 (s, 1C) 33.47 (s, 1C) 46.64 (s, 1C) 68.89 (s, 1C) 70.90 (s, 1C) 82.13 (s, 1C) 117.34 (s, 1C) 120.06 (s, 1C) 124.56 (s, 1C) 124.87 (s, 1C) 124.90 (s, 1C) 127.17 (s, 1C) 127.18 (s, 1C) 127.81 (s, 1C) 127.83 (s, 1C) 128.87 (s, 1C) 131.72 (s, 1C) 132.75 (s, 1C) 141.03 (s, 1C) 141.17 (s, 1C) 143.50 (s, 1C) 143.55 (s, 1C) 150.42 (s, 1C) 154.54 (s, 1C) 163.26 (s, 1C) $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}_7\text{Na}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 503.19, 发现为: 526.41。

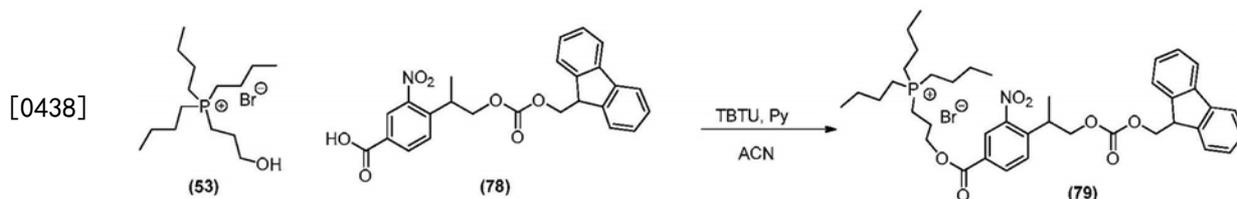


[0435] 4-(1-(Fmoc)丙-2-基)-3-硝基苯甲酸 (78)

[0436] 将化合物 (77) (8.9g, 17.7mmol) 直接溶剂化于在 DCM (50mL) 中的 80% TFA 溶液并允许搅拌 30 分钟, 直到所有原材料已被消耗。然后用旋转蒸发器将样品蒸发至干燥, 并通过柱层析 (Hex/EtAc 100:0 \rightarrow 60:40) 加以纯化。分离的产量为 6.09g (77%)。

[0437] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 1.43 (d, $J=6.85\text{Hz}$, 3H) 3.86 (sxt, $J=6.80\text{Hz}$, 1H) 4.32-4.46 (m, 4H) 7.28-7.36 (m, 2H) 7.41 (t, $J=7.58\text{Hz}$, 2 H) 7.57 (dd, $J=6.97, 4.52\text{Hz}$, 2H) 7.65 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H) 7.76 (d, $J=7.34\text{Hz}$, 2H) 8.29 (dd, $J=8.07, 1.71\text{Hz}$, 1H) 8.53 (d, $J=$

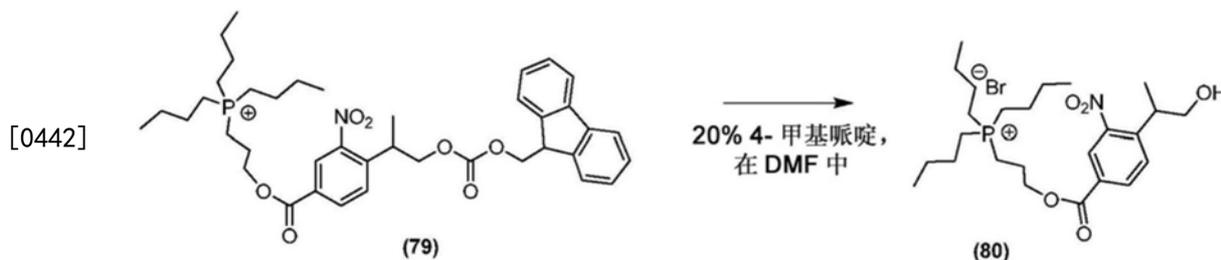
1.71Hz, 1H) 11.69 (br. s., 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 17.58 (s, 1C) 33.71 (s, 1C) 46.62 (s, 1C) 70.08 (s, 1C) 71.14 (s, 1C) 76.80 (s, 1C) 77.05 (s, 1C) 77.31 (s, 1C) 120.06 (s, 1C) 125.10 (s, 1C) 125.11 (s, 1C) 126.16 (s, 1C) 127.16 (s, 1C) 127.17 (s, 1C) 127.91 (s, 1C) 127.93 (s, 1C) 128.87 (s, 1C) 129.00 (s, 1C) 133.71 (s, 1C) 141.26 (s, 1C) 141.27 (s, 1C) 142.82 (s, 1C) 143.14 (s, 1C) 143.20 (s, 1C) 150.39 (s, 1C) 155.00 (s, 1C) 169.79 (s, 1C) $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{NO}_7$ $^{1-}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 447.13, 发现为: 446.0。



[0439] 磷标记4-(1-(Fmoc)丙-2-基)-3-硝基苯甲酸酯(盐)(79)

[0440] 将化合物(78) (3.726g, 8.33mmol) 溶剂化于一半溶剂 (ACN:Py, 28 mL:1.25mL), 对其添加磷标记(53) (3.86g, 9.16mmol) 在另一半溶剂中的溶液, 接着直接用TBTU (4.0g, 12.5mmol)。允许搅拌溶液过夜并在早晨时反应完成(12小时), 接着被浓缩至一半溶剂容积, 然后用乙酸乙酯和5%NaHCO₃ (x3) 提取, 并用盐水提取一次。用MgSO₄ 干燥有机层并浓缩至干燥。然后在500mL的MTBE中沉淀化合物以除去过量吡啶和TBTU副产物。过滤沉淀的白色粘性物(goo) 并经 Celite[®] 加以收集, 然后通过柱层析 (DCM:MeOH 100:0→92:8) 加以纯化。(79) 的分离的产量为5.52g (86%)。

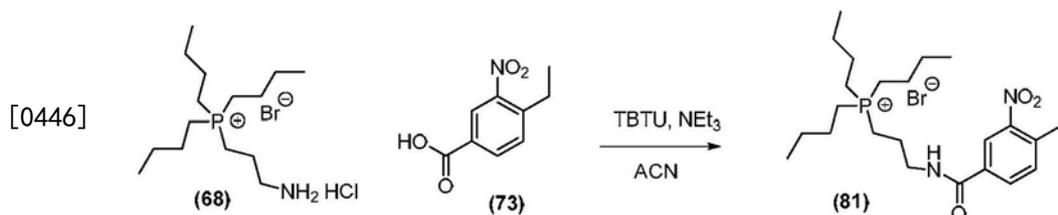
[0441] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.81-0.99 (m, 8H) 1.35 (d, J=7.03 Hz, 3H) 1.38-1.61 (m, 11H) 1.99-2.38 (m, 8H) 2.66 (br. s., 2H) 3.54-3.83 (m, 3H) 4.10-4.41 (m, 5H) 7.21-7.44 (m, 4H) 7.57 (dd, J=10.11, 8.06 Hz, 3H) 7.72 (d, J=7.33Hz, 2H) 8.55 (d, J=1.76Hz, 1H) 8.70 (dd, J=8.20, 1.76Hz, 1H) ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 13.35 (s, 1C) 17.68 (s, 1C) 18.59 (s, 1C) 19.22 (s, 1C) 23.55 (s, 1C) 23.62 (s, 1C) 23.81 (s, 1C) 24.01 (s, 1C) 33.40 (s, 1C) 46.62 (s, 1C) 69.91 (s, 1C) 71.36 (s, 1C) 76.67 (s, 1C) 77.09 (s, 1C) 77.52 (s, 1C) 119.96 (s, 1C) 124.31 (s, 1C) 125.21 (s, 1C) 127.18 (s, 1C) 127.83 (s, 1C) 128.61 (s, 1C) 131.93 (s, 1C) 133.41 (s, 1C) 139.59 (s, 1C) 141.19 (s, 1C) 143.27 (s, 1C) 143.33 (s, 1C) 150.18 (s, 1C) 154.87 (s, 1C) 165.19 (s, 1C) ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 35.07 (s, 1 P) $\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{NO}_7\text{P}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 690.30, 发现为: 690.35。



[0443] 磷标记4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酸酯(盐)(80)

[0444] 向化合物(79) (6.408g, 9.29mmol) 添加4-甲基吡啶在DMF (20ml) 中的 20% 溶液。在2小时以后, 反应完成(通过TLC) 并蒸发溶液至干燥, 然后接收在DCM中并在500ml的MTBE中沉淀以产生3.09g的(80) (71%)。

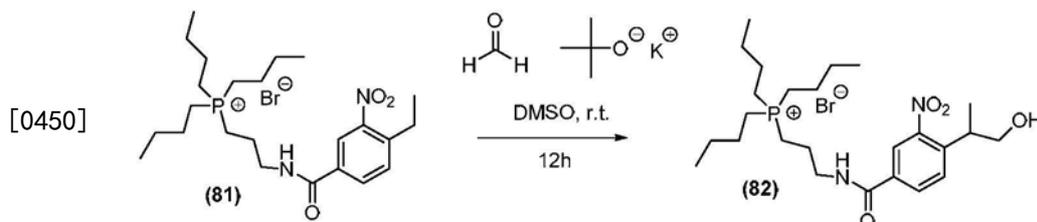
[0445] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.91 (t, $J=7.03\text{Hz}$, 11H) 1.26 (d, $J=7.03\text{Hz}$, 3H) 1.38-1.59 (m, 13H) 1.98 (d, $J=7.03\text{Hz}$, 2H) 2.11-2.28 (m, 7H) 2.36-2.51 (m, 2H) 3.40-3.59 (m, 3H) 3.64-3.82 (m, 2H) 7.51 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.22 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.26 (s, 1H) $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{P}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 468.28, 发现为: 468.28。



[0447] 三丁基(3-(4-乙基-3-硝基苯甲酰氨基)丙基)溴化磷(81)

[0448] 向3-硝基-4-乙基-苯甲酸(73) (3.15g, 16.1mmol) 和二异丙基乙胺(4当量, 11.25ml) 在ACN(30mL) 中的溶液添加化合物(68) (1.3当量, 20.9mmol) 和TBTU(1.3当量, 6.74g, 20.9mmol)。允许搅拌此混合物12小时。将暗棕色溶液浓缩至粘性油, 并接收在DCM中, 然后在500ml的MTBE 中沉淀。收集固体并通过硅胶柱层析(DCM:MeOH, 100:0 \rightarrow 85:15) 加以再纯化, 洗脱为非常暗的黄色油。分离的产量为7.07g (84%)。

[0449] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.90 (t, $J=6.97\text{Hz}$, 9H) 1.24 (t, $J=7.46\text{Hz}$, 3H) 1.35-1.56 (m, 12H) 1.96 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 2H) 2.05-2.19 (m, 7H) 2.25-2.38 (m, 2H) 2.78 (s, 2H) 2.87 (q, $J=7.34\text{Hz}$, 2H) 3.60 (q, $J=5.79\text{Hz}$, 2H) 7.40 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H) 7.78 (t, $J=5.50\text{Hz}$, 1H) 8.07 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H) 8.37 (s, 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 13.21 (s, 1C) 14.61 (s, 1C) 18.17 (s, 1C) 18.56 (s, 1C) 23.33 (s, 1C) 23.37 (s, 1C) 23.76 (s, 1C) 23.88 (s, 1C) 25.97 (s, 1C) 38.57 (s, 1C) 76.77 (s, 1C) 77.02 (s, 1C) 77.28 (s, 1C) 123.82 (s, 1C) 131.09 (s, 1C) 131.47 (s, 1C) 132.89 (s, 1C) 141.77 (s, 1C) 149.21 (s, 1C) 165.48 (s, 1C) $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为: 437.29, 发现为: 437.30。

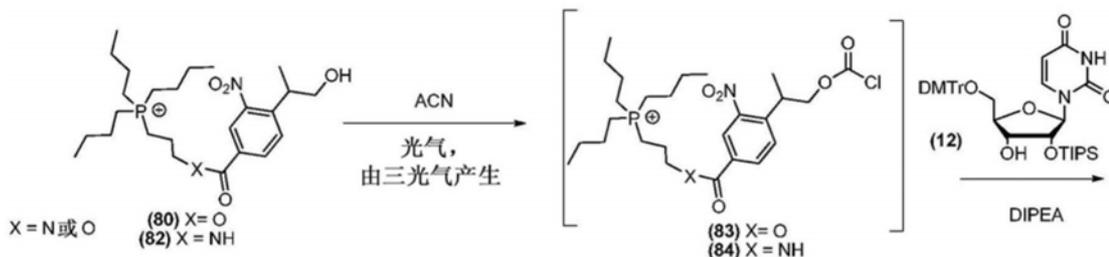


[0451] 三丁基(3-(4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酰氨基)丙基)溴化磷(82)

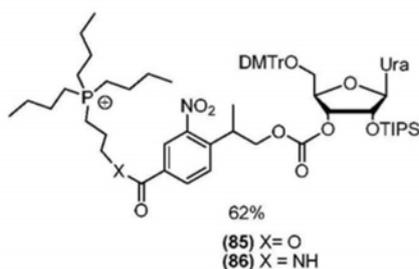
[0452] 向化合物(81) (3.56g, 6.89mmol) 在无水DMSO (13.8mL) 中的溶液添加对甲醛(2.1当量, 0.43g, 14.4mmol)。声处理此混合物20分钟直到所有对甲醛溶解。用1.5当量叔丁醇钾(1.16g, 10.3mmol) 处理得到的混合物。反应立即变成暗紫色。允许在室温下搅拌反应12小时。通过MS, 来监测反应, 其示出原材料的消失。用在MeOH中的1M HCl来处理反应以使它达到中性, 此时, 在二乙醚中, 然后在DCM中沉淀反应。此最后的沉淀步骤分离产物和未反应的对甲醛。通过反相层析来纯化产物, 其中利用在水(pH7):ACN80:20 \rightarrow 20:80中的100mM TEAA缓冲液。分离的产量为1.3g (35%)。

[0453] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.84-0.98 (m, 9H) 1.26 (d, $J=7.03\text{Hz}$, 3H) 1.38-1.59 (m, 11H) 1.98 (d, $J=5.86\text{Hz}$, 2H) 2.09-2.27 (m, 6H) 2.34-2.50 (m, 2H) 3.39-3.49 (m, 1H) 3.53 (d, $J=5.47\text{Hz}$, 2H) 3.64-3.81 (m, 2H) 7.51 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.22 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H)

8.26 (s, 1H) 8.45 (br. s., 1H) ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ ppm 13.38 (s, 1C) 17.65 (s, 1C) 18.43 (s, 1C) 19.05 (s, 1C) 23.61 (s, 1C) 23.68 (s, 1C) 23.78 (s, 1C) 23.99 (s, 1C) 36.68 (s, 1C) 50.06 (s, 1C) 66.17 (s, 1C) 76.69 (s, 1C) 77.11 (s, 1C) 77.54 (s, 1C) 124.73 (s, 1C) 128.38 (s, 1C) 129.42 (s, 1C) 133.08 (s, 1C) 144.51 (s, 1C) 150.43 (s, 1C) 164.33 (s, 1C) ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm 35.07 (s, 1P) $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS 计算为: 467.30, 发现为: 467.31。



[0454]



[0455] 5'-DMTr-2'-TIPS-3'-(三丁基(3-(4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酰氨基)丙基)溴化磷)-尿苷 (86)

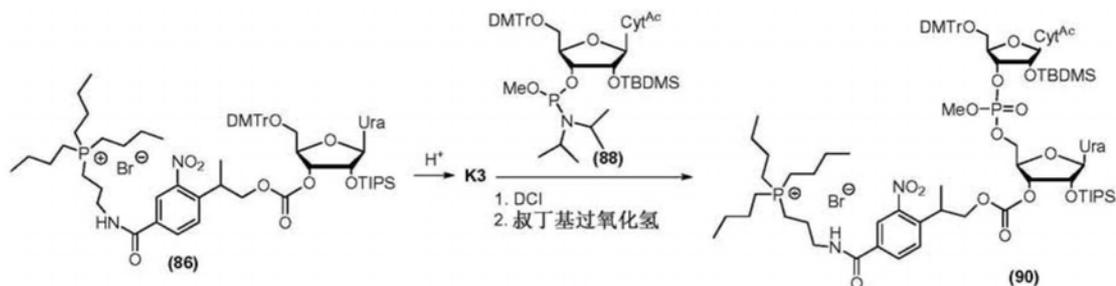
[0456] 将包含三光气和菲啶的两颈烧瓶连接于蒸馏头(distillation head)和冷凝器。将冷凝器的接收端连接于氨收集器(ammonia trap)并用干冰/丙酮浴加以冷却以冷凝产生的光气。将氨收集器的底部连接于具有搅拌棒的三颈圆底烧瓶,其还通过干冰/丙酮浴加以冷却。通过新鲜的隔片(包裹有Teflon带)来密封圆底的所有开口颈。用连接于聚乙烯管和两个起泡器(bubbler)(串联)的20G针刺穿三颈烧瓶的一个颈;第一起泡器是空的而第二起泡器则包含矿物油。聚乙烯管用来将第二起泡器连接于9英寸20G针,其被完全插入氢氧化钠在甲醇中的饱和溶液。将第二针和管插入甲醇氢氧化钠的隔片,其作为向上进入通风橱的排气孔。加热三光气(1.87g, 6.33mmol)和催化(cat.)菲啶至90°C,此时,三光气熔化并溶剂化菲啶催化剂,从而促进光气气体的放出。在30分钟以后,所有三光气被消耗并且光气已开始接收烧瓶中冷凝。此时,通过在两颈烧瓶上的隔片穿刺氩气的气球,从而推动任何光气气体到冷凝器并骤冷溶液。在光气已停止冷凝以后,将(80)(1.06g, 1.9mmol)的乙腈溶液逐滴加入至搅拌光气,然后在10分钟以后从干冰/丙酮浴除去。在室温下,搅拌反应2小时。接着,使氩气通过整个装置并且还起泡通过反应混合物而进入甲醇氢氧化钠以除去和骤冷过量光气。注意:首先使用来自气球的非常低的流量以确保光气被骤冷。在除去所有光气以后,将DIPEA(4mL)加入混合物以骤冷在与光气和化合物(82)的反应中产生的HCl。

[0457] 将核苷(12)(1当量, 1.35g, 1.9mmol)在ACN(3mL)中的溶液直接加入上述混合物,并允许在室温下搅拌得到的溶液8小时。用乙酸乙酯稀释溶液,用饱和 NaHCO_3 (x3)提取并用盐水提取一次。在300mL的MTBE中沉淀混合物以除去过量核苷和DIPEA。然后通过柱层析(DCM:MeOH 100:0→90:10)来纯化得到的沉淀物,以提供1.32g的(86)(产率为62%)。

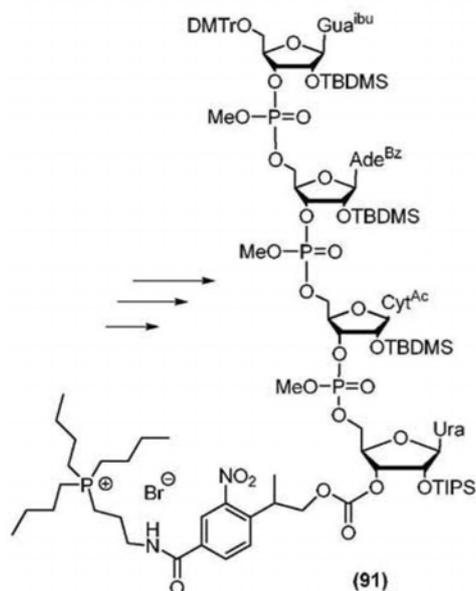
[0458] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.82-1.16 (m, 34H) 1.34 (dd, $J=6.89, 2.20\text{Hz}$, 3H)

1.38-1.63 (m, 15H) 2.05 (br. s., 2H) 2.11-2.31 (m, 12 H) 2.67 (br. s., 1H) 3.39-3.53 (m, 1H) 3.57-3.72 (m, 3H) 3.78 (s, 7H) 4.08 - 4.38 (m, 2H) 4.59-4.69 (m, 1H) 5.16-5.33 (m, 2H) 5.63-5.76 (m, 1H) 6.00 (dd, $J=5.27, 2.05\text{Hz}$, 1H) 6.81 (dd, $J=8.79, 1.47\text{Hz}$, 4H) 7.15 (d, $J=8.79\text{Hz}$, 1H) 7.18-7.41 (m, 10H) 7.56 (d, $J=7.91\text{Hz}$, 1H) 7.88 (dd, $J=8.20, 1.76\text{Hz}$, 1H) 8.53 (d, $J=7.91\text{Hz}$, 1H) 8.67 (t, $J=8.94\text{Hz}$, 2H) 9.64 (br. s., 1H) $\text{C}_{65}\text{H}_{92}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{PSi}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:1195.61, 发现为:1195.60。

[0459] 四聚体rGACU自核苷(86)的离子标记合成



[0460]



[0461] 在黑暗中进行反应,其中通过用铝箔裹住反应烧瓶。

[0462] 5'-OH-2'-TIPS-3'-(三丁基(3-(4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酰氨基)丙基)溴化磷)-尿苷(K3)

[0463] 将3'-标记尿苷(86)(0.49g, 0.38mmol)溶解于在DCM中的3%TFA并在添加甲醇以骤冷三苯甲基阳离子以前允许搅拌5分钟。然后将反应浓缩成油,并接收在最少量的DCM中,然后在MTBE中沉淀,以除去二甲氧基三苯甲醇。经赛力特硅藻土过滤上述化合物,收集在DCM中,并通过柱层析(DCM:MeOH, 100:0→90:10%)加以纯化。K3的分离产量为0.37 g (95%)。

[0464] ^1H NMR (500MHz, 乙腈- d_3) δ ppm 0.87-1.12 (m, 15H) 1.38 (dd, $J=6.97, 3.55\text{Hz}$, 1H) 1.42-1.61 (m, 6H) 1.96 (dt, $J=4.89, 2.45\text{Hz}$, 1H) 1.98 - 2.07 (m, 1H) 2.07-2.17 (m, 3H) 2.22-2.33 (m, 1H) 3.49 (br. s., 1H) 3.66 - 3.79 (m, 1H) 4.13 (dd, $J=13.45, 1.96\text{Hz}$, 1H) 4.30-4.46 (m, 2H) 4.57- 4.66 (m, 1H) 5.03 (ddd, $J=10.82, 5.07, 1.71\text{Hz}$, 1H) 5.70 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H)

5.85 (dd, J=6.97, 4.28Hz, 1H) 7.73-7.83 (m, 1H) 8.27 (d, J=8.31Hz, 1H) 8.39 (t, J=1.71Hz, 1H) 9.17 (br. s., 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 乙腈- d_3) δ ppm-0.16 (s, 1C) 0.17 (s, 1C) 0.34 (s, 1C) 0.36 (s, 1C) 0.50 (s, 1C) 0.52 (s, 1C) 0.54 (s, 1C) 0.67 (s, 1C) 0.83 (s, 1C) 11.91 (s, 1C) 11.93 (s, 1C) 12.57 (s, 1C) 15.13 (s, 1C) 15.52 (s, 1C) 16.93 (s, 1C) 16.99 (s, 1C) 17.00 (s, 1C) 17.01 (s, 1C) 17.11 (s, 1C) 17.69 (s, 1C) 18.07 (s, 1C) 20.64 (s, 1C) 20.67 (s, 1C) 22.84 (s, 1C) 22.88 (s, 1C) 23.45 (s, 1C) 23.57 (s, 1C) 33.49 (s, 1C) 33.64 (s, 1C) 61.34 (s, 1C) 61.37 (s, 1C) 64.62 (s, 1C) 64.76 (s, 1C) 71.11 (s, 1C) 71.31 (s, 1C) 73.49 (s, 1C) 76.99 (s, 1C) 77.10 (s, 1C) 82.99 (s, 1C) 87.73 (s, 1C) 87.76 (s, 1C) 102.64 (s, 1C) 102.66 (s, 1C) 117.32 (s, 1C) 124.83 (s, 1C) 124.86 (s, 1C) 129.10 (s, 1C) 129.32 (s, 1C) 129.84 (s, 1C) 129.85 (s, 1C) 133.06 (s, 1C) 133.08 (s, 1C) 140.43 (s, 1C) 140.46 (s, 1C) 141.68 (s, 1C) 141.82 (s, 1C) 150.41 (s, 1C) 150.53 (s, 1C) 150.81 (s, 1C) 150.83 (s, 1C) 154.10 (s, 1C) 154.15 (s, 1C) 162.65 (s, 1C) 164.03 (s, 1C) 164.04 (s, 1C) $\text{C}_{44}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{PSi}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS 计算为:893.48, 发现为: 893.50。

[0465] rCpU (90) 的合成。在放置在高真空下以前,通过用旋转蒸发器两次共蒸发无水甲苯:DCM来干燥化合物K3 (0.37g, 0.38mmol)。将K3溶解于15 ml的ACN,其包含2当量DCI (0.982g, 8.32mmol)。之后立即添加亚磷酰胺 (88) (0.51g, 0.57mmol),并允许在室温下搅拌得到的溶液3小时。MS分析表明,反应完成(不存在原材料K3)。添加10当量叔丁醇以骤冷过量亚磷酰胺,接着10当量叔丁基过氧化氢(1mL的在癸烷中的6M溶液),并允许搅拌得到的混合物20分钟,直到所有亚磷酸三酯被转化成磷酸酯,如通过MS加以监测的。然后浓缩反应成油,接收在最少量的DCM中,并在MTBE中沉淀,以除去所有过量试剂。如果通过TLC检测到任何骤冷亚磷酰胺的存在,则重复沉淀过程。分离标记的二聚体 (90),产率为 95% (0.63g)。 $\text{C}_{63}\text{H}_{122}\text{N}_7\text{O}_{21}\text{P}_2\text{Si}_2^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:1670.77,发现为:1670.73。

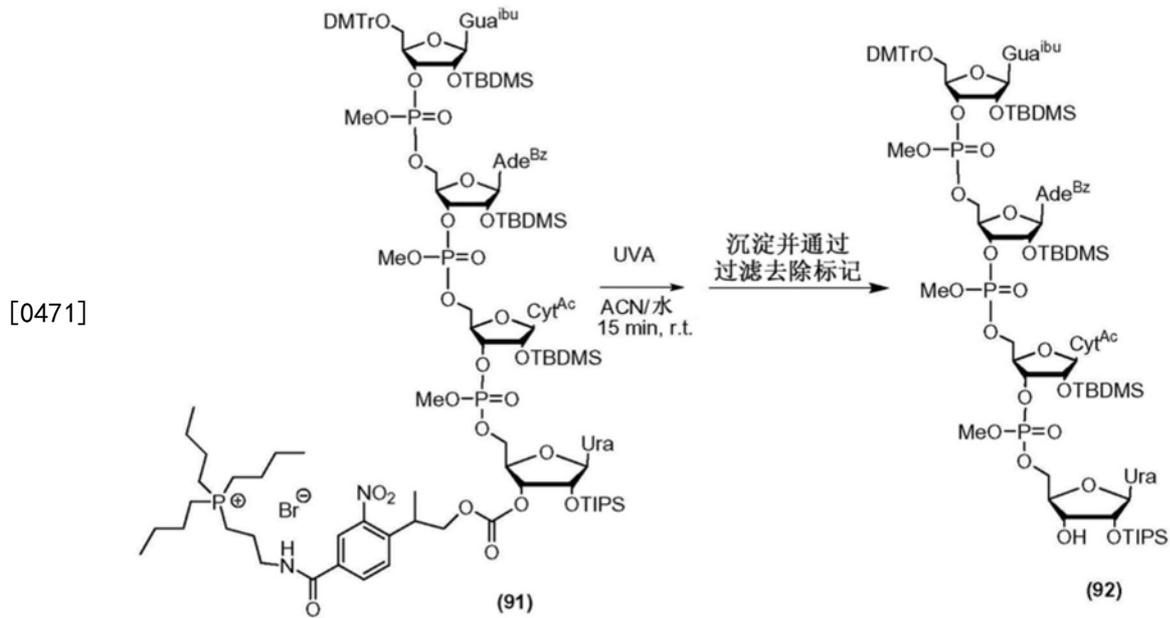
[0466] 如上所述,重复上述过程,其中利用适当的亚磷酰胺,直到获得四聚体 (92)。表征分离的中间体(数据示于以下表1)。

[0467] 表1 .DMTr-rGACU-标记和中间体的表征

步骤	化合物 5'→3'	计算的质量 (m/z)	发现的质量(m/z)
1	DMTr-rCU-标记 (a)	1654.77	1654.71
2	DMTr-rCU-标记 (b) (90)	1670.77	1670.73
3	HO-rCU-标记	1368.63	1368.59
[0468] 4	DMTr-rACU-标记 (a)	2215.95	1119.46 ($\text{M}^+ + \text{Na}^+$)/2
5	DMTr-rACU-标记 (b)	2231.95	1127.44 ($\text{M}^+ + \text{Na}^+$)/2
6	HO-rACU-标记	1929.82	1929.80
7	DMTr-rGACU-标记 (a)	2645.06	1334.11 ($\text{M}^+ + \text{Na}^+$)/2
8	DMTr-rGACU-标记 (b)(91)	2661.05	1341.94 ($\text{M}^+ + \text{Na}^+$)/2

[0469] 标记=光不稳定磷标记

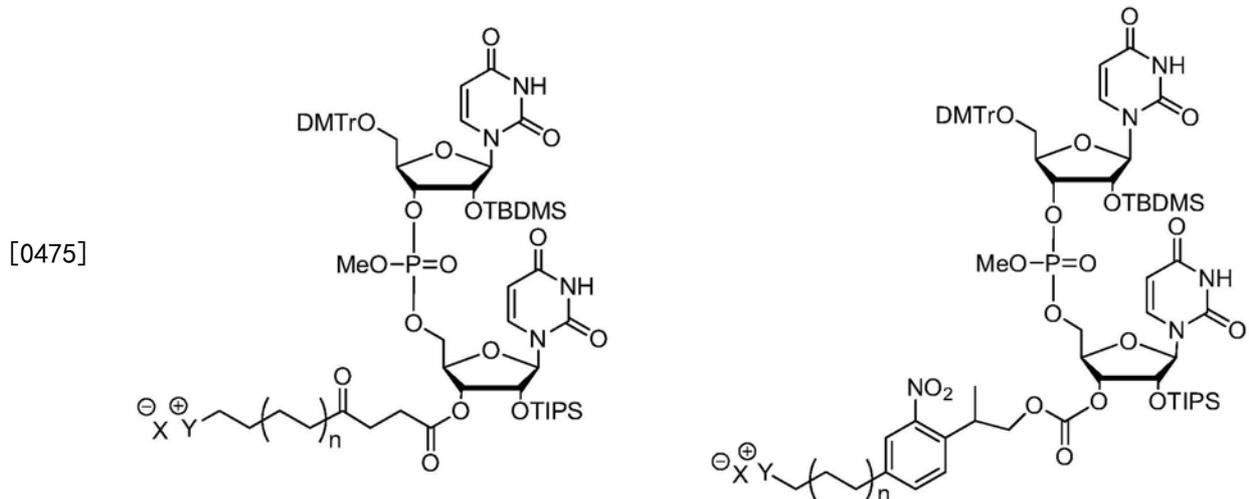
[0470] (a) = 亚磷酸三酯; (b) = 磷酸三酯。



[0472] 从四聚体 (91) 光切割正交磷标记, 从而提供受保护的 DMTr-rGACU-3'OH (92)

[0473] 将四聚体 (91) (0.120g, 0.042mmol) 溶解于 1mL 湿 ACN (1200ppm 的 H_2O), 并转移到包括小搅拌棒的石英比色杯 (没有磨砂侧)。在搅拌下, 将比色杯放置在光反应器内 15 分钟。反应似乎完成 (TLC 分析)。将混合物浓缩至约一半体积并在 MTBE (25mL) 中沉淀切割的标记, 然后过滤以提供白色粉末。在 MTBE 溶液中发现所期望的四聚体, 在浓缩溶液至干燥以后, 其被收集。分离的产量为 0.092g, 0.00403mmol (95%)。

[0474] 进一步的实施例。用于液相合成的离子标记的合成。



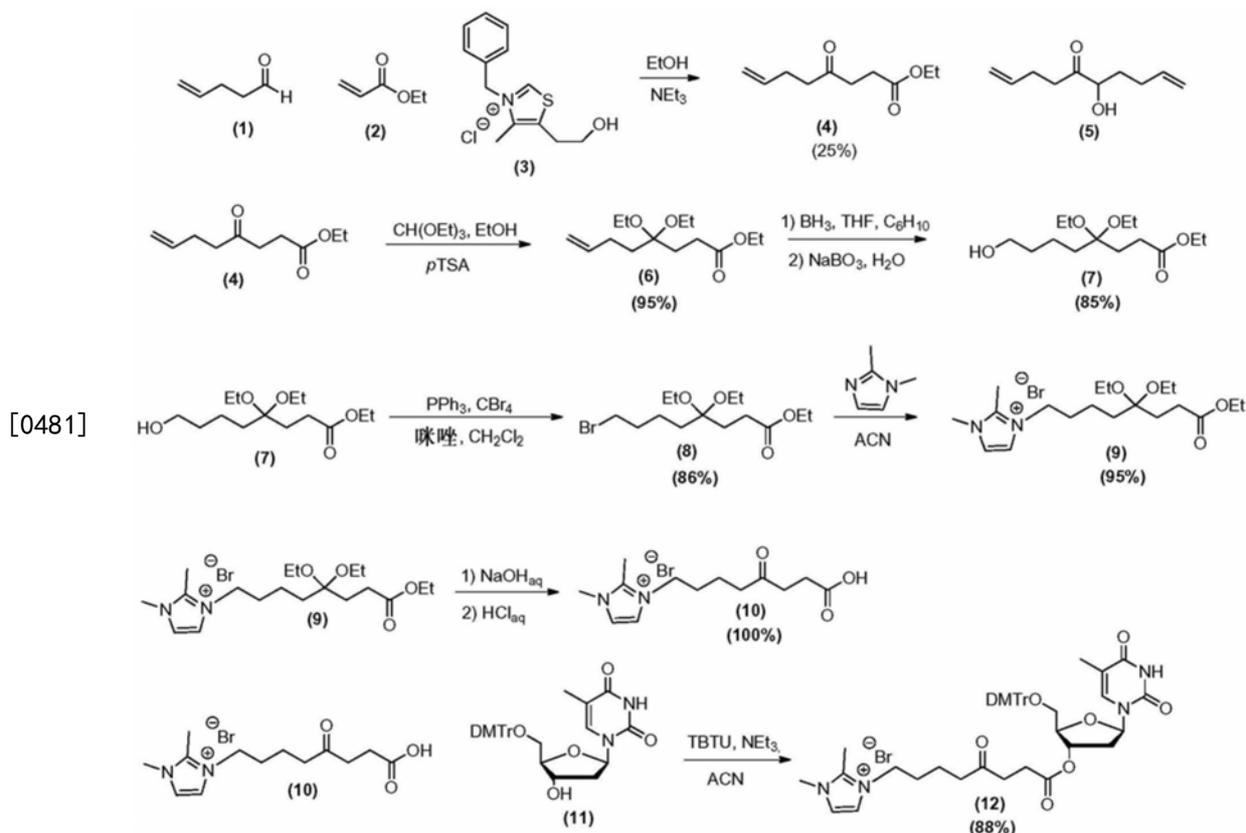
[0476] 其中:

[0477] Y 是任何阳离子原子 (cationic atom) 或有机分子;

[0478] X 是任何阴离子原子 (anionic atom) 或有机分子; 以及

[0479] n 是 0 至 10 的任何整数。

[0480] 方案 1



[0482] 若干方法可以用来获得所期望的 γ -酮酸(10)。例如,方案1采用Stetter 反应作为第一步骤[(1) + (2) \rightarrow (4)], 一种反应,在有弱碱存在的情况下,并利用催化量的噻唑鎓盐,例如(3),其将醛类转化成亲核体(Stetter,H. *Angewandte Chemie, International Edition in English*15:639-47 (1976))。因此,4-戊烯醛(1),一种醛,其连接于终止于烯烃的脂族链,被激活为亲核体,并允许经历迈克尔加成,其中利用丙烯酸乙酯(2)作为亲电体。将基质(底物,substrate)与噻唑鎓盐(3)混合并溶解于乙醇。加热反应混合物并在它被温和和回流以后,通过添加三乙胺来引发反应。在18小时以后,除去溶剂并使获得的材料经受二氯甲烷/盐水提取,接着快速层析。在为纯化研究的所有溶剂体系中,连同偶姻副产物(5)一起来共洗脱所期望的产物(4)。产率大约是25%(如通过混合物的¹H-NMR分析所估计的),然而,可以容易获得足够的材料以继续合成,其中在随后的步骤以后杂质(5)变成易于分离的。在合成途径中的接下来的步骤是保护酮(4)作为缩醛[即,(6)]。发现回流4小时足够使此反应达到完成并以90-95%的产率获得所期望的产物(6)。产物(6)易于分离自在前面步骤中产生的偶姻副产物(5),在缩醛形成反应中其似乎没有经历任何转化。通过TLC、LR-MS和NMR确认了(6)的特性和纯度。

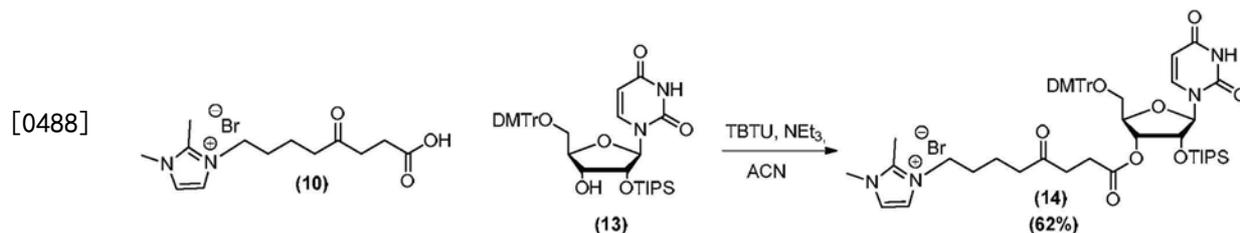
[0483] 借助于在手中的 γ -缩醛酯(6),接下来的步骤(方案22)是末端烯烃的硼氢化。这是利用原位产生的二环己基硼氢化物试剂来实现。在0℃下,将适量的环己烯加入硼烷-THF并允许反应1小时,然后将(6)加入产生的浆料,并允许在室温下反应继续进行2小时。通过添加含水过硼酸钠,一种温和氧化剂,其留下完整的酯,来实现中间体硼烷的氧化,并且继续反应另外2小时。然后用乙酸乙酯提取反应混合物并通过快速柱层析来纯化产物(7),从而提供产率为80-85%的无色液体,其中还回收15-20%的(6)。此反应从来没有达到超过85%的转化,即使使用更长的反应时间或增加量的产生的硼氢化物(相对于基质)。

[0484] 然后伯醇 (7) 与三苯膦和四溴甲烷 (在DCM中) 混合以产生末端溴化物 (8)。上述反应干净地进行,但在水性处理以后,发生缩醛切割,这可能是由于因过量试剂的水解而形成氢溴酸。在有咪唑 (其中和产生的任何氢溴酸) 存在的情况下再次进行上述反应,并在快速层析以后,获得产率为 79-86%的所期望的产物 (8)。随后在乙腈中与1,2-二甲基咪唑的缩合导致产率为95%或更大的离子标记 (9)。

[0485] 在合成 (方案1) 中的最后步骤涉及缩醛和酯的切割以及离子部分的阴离子置换,并且最后衍生化到核苷。起初,含水酸用来进行去保护,接着阴离子置换,但由此衍生的材料迅速分解。随后,通过两步骤过程进行去保护,首先是碱基介导的酯 (9) 的切割,接着是有限的酸化,以质子化羧酸并切割缩醛。因此,将受保护的物质 (9) 溶解于含水氢氧化钠并允许反应 16-18小时,接着添加含水浓HCl,以使溶液达到大约pH1并最后在减压下干燥。通过将产生的固体悬浮在乙腈/二氯甲烷中并滤出不溶性物质来除去过量盐。获得的产物 (10) 似乎是纯的 (通过TLC、LR-MS和NMR),但可能仍包含少量的氯化钠,借助于这些技术,其可能检测不到。此时阴离子置换还导致得到的产物的显著分解,如在酸介导的去保护中。在长期贮存以后,溴化物盐 (10) 是稳定的,然而,发现其以预期方式与核苷偶联。事实上,利用O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯 (TBTU) 作为偶联剂,同时实现了偶联和阴离子交换,其中偶联定量地继续进行并且通过LR-MS,阴离子交换被确认为缺乏溴离子和存在四氟硼酸盐 (以负模式)。在长期贮存以后这种产物 (12) 也是稳定的。

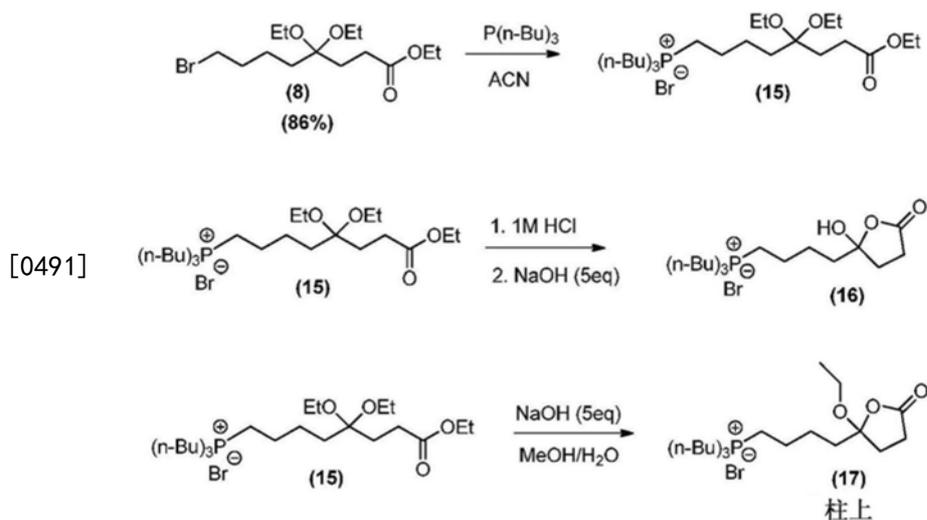
[0486] 借助于在手中的衍生的核苷 (12),研究了正交 γ -酮酯离子标记自核苷的切割特性并且相比于乙酰丙酰基酯保护基团的那些切割特性,如上所述,上述保护基团已用来产生寡聚物结构单元并且已知容易被除去而没有影响在分子中的任何其它保护基团。在所研究的条件下,乙酰丙酰基酯切割的速率快于离子标记的切割速率,分别具有大约0.76和2.82分钟的半衰期,其对应于乙酰丙酰基酯的完全切割刚刚超过5分钟,而标记则需要几乎20分钟来实现完全切割。然而,即使在所研究的条件下标记切割远慢于乙酰丙酰基酯,但用于通过胍来切割3'-羟基受保护的乙酰丙酰基酯的正常反应时间是20分钟并且在这段时间内没有观测到任何其它保护基团的降解。这表明,上述离子标记适合于所要求的任务,因而也是用来产生寡聚物结构单元的可行途径。

[0487] 方案2



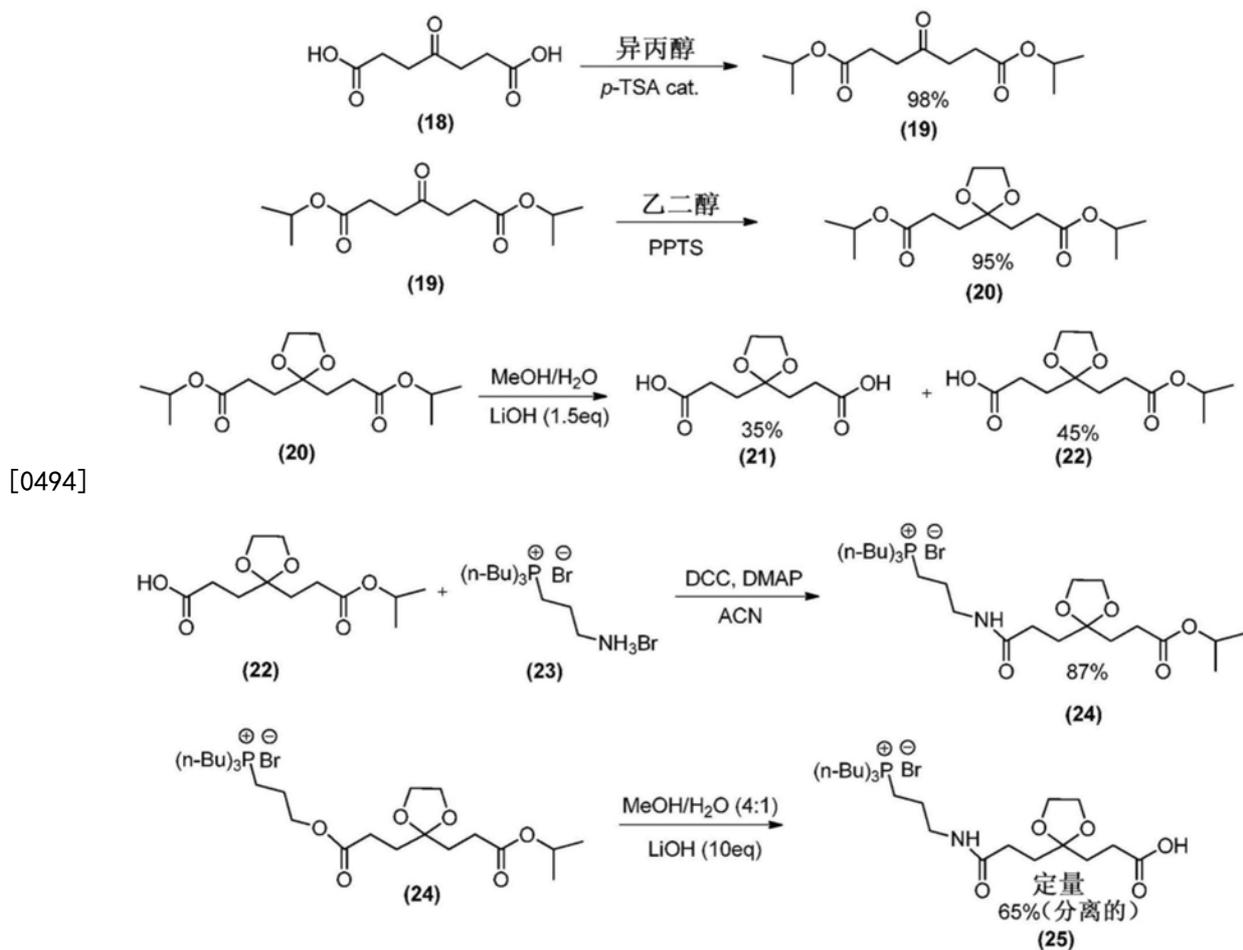
[0489] 利用用于衍生化5'-O-DMTr-胸苷的相同条件,上述标记还与 5'-O-DMTr-2'-O-TIPS尿苷核苷 (13) 缩合 (方案2)。偶联核糖核苷的¹H-NMR 并未显示任何2'-3' 甲硅烷基异构化。

[0490] 方案3



[0492] 为了安装可替代的离子标记来代替在方案1中概述的咪唑鎓标记,在 65°C下用 1.5当量三丁基磷简单处理烷基溴 (8) 6小时,从而定量地产生磷标记化合物 (15),其是通过在甲基叔丁基醚中的沉淀被分离。不幸的是,在方案1中使用的同时缩酮和酯水解的相同程序导致不期望的环状半内酯 (16),并且如果仅上述酯被除去和纯化,则化合物 (17) 被分离。在任何一种情况下,如描述于方案2中的共轭作用于核苷 (13) 的尝试(利用TBTU 和DCC) 证明是困难的,仅产生5-10%的所期望的核苷共轭物。

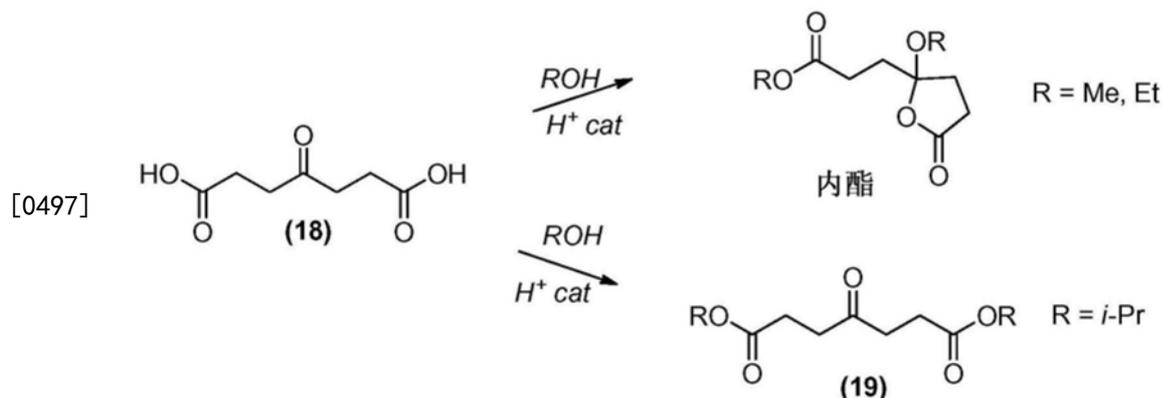
[0493] 方案23



[0494]

[0495] 在以上所述的途径中使用的二乙基缩酮衍生物是太不稳定的并且允许分子间环化,从而抑制与核苷的任何偶联。因此,1,3-二氧戊环衍生物用作更稳定的衍生物。合成(方案23)开始于用异丙醇和催化对甲苯磺酸来处理酮庚二酸(18),其中利用迪安-斯达克榻分水器,以酯化两个末端羧酸部分,从而提供产率为98%的(19)。在此反应中甲醇和乙醇(而不是异丙醇)的使用导致内酯形成,作为主要产物,而不是所期望的二酯(19)。

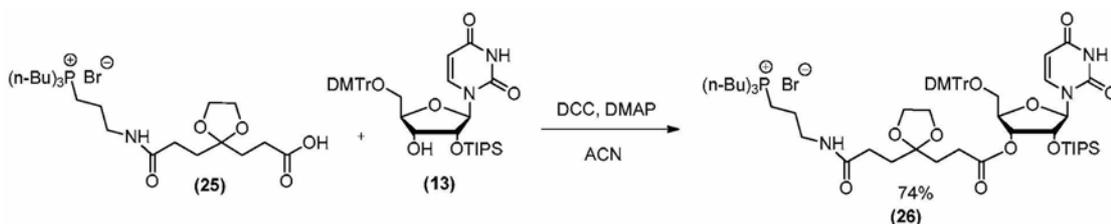
[0496] 方案4:酯化途径(19)取决于醇的烷基的体积(bulkiness)。



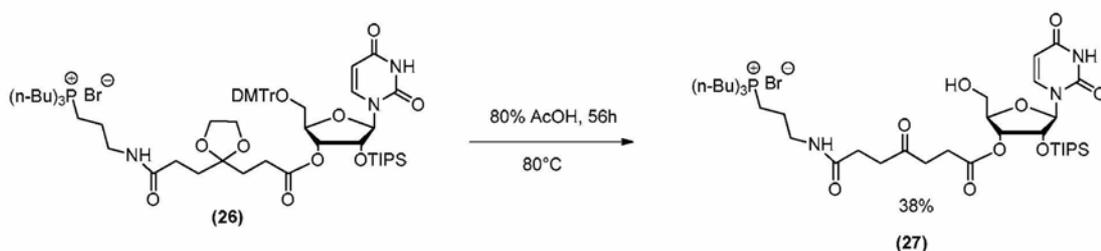
[0498] 分离二异丙酯(19),然后通过回流在迪安-斯达克榻分水器中与乙二醇和催化对甲苯磺酸吡啶鎓盐反应过夜,以形成环缩酮(20),经两个步骤的产率为65%。使用乙二醇来直接形成环缩酮和乙二醇酯的尝试导致不期望的内酯衍生物(方案3),因此需要以两个单独的步骤进行酯化和缩醛形成。

[0499] 将环缩酮二酯(20)接收在甲醇中并将4当量的含水氢氧化锂加入反应以相对于两种酯优先水解一种酯,从而提供化合物(21)和(22)的混合物,其被分离,产率分别为35%和45%。在室温下,利用在吡啶/乙腈混合物(50:50)中的DCC和DMAP,时间为6小时,来将磷离子标记(23)偶联于环缩酮单酯(22),从而提供产率为84%的磷标记化合物(24)。在分离以后,通过在MeOH/水中的LiOH来水解异丙酯,以提供几乎定量产率的化合物(25)。在柱层析(MeOH/DCM \rightarrow 10%,在1%AcOH中)以后,产率降低到65%,这可能是由于磷标记与二氧化硅(silica)的亲合力所致。

[0500] 方案5



[0501]

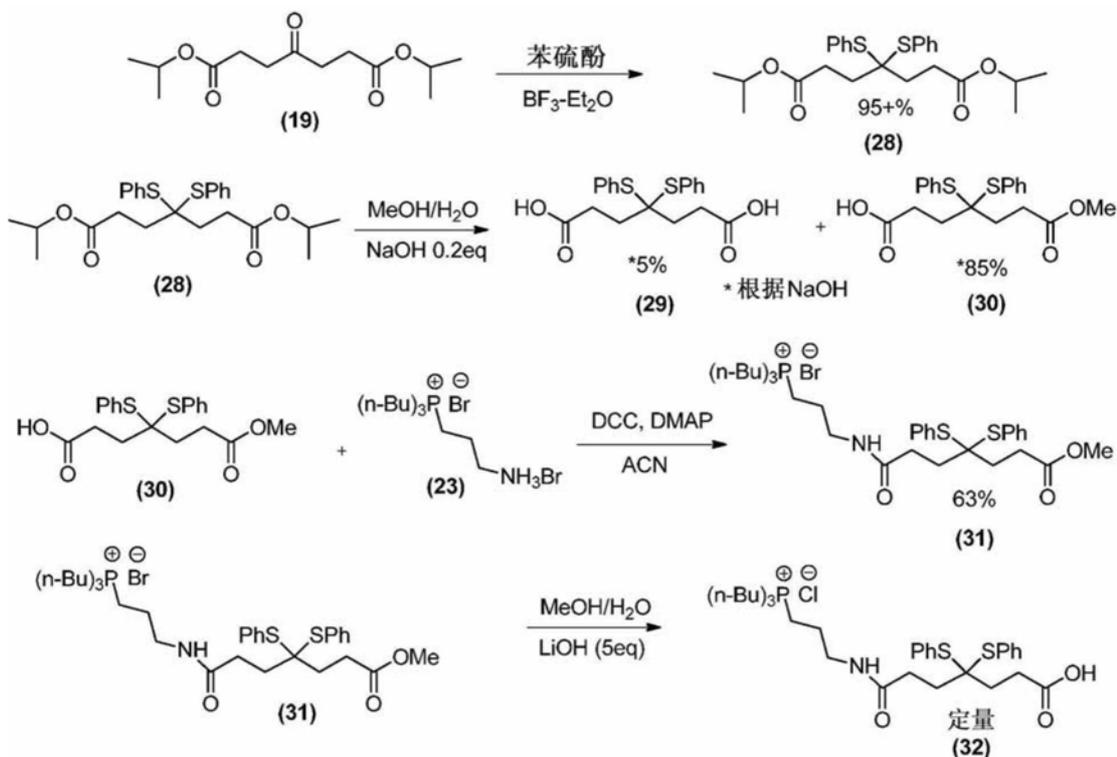


[0502] 将离子标记物质 (25) 和NaBr接收在甲醇中以交换先前在硅胶纯化过程中已交换的任何乙酸根离子。如果略过此步骤,则在与化合物 (13) 的反应以后会形成显著量的乙酰化核苷。然后,利用标准偶联条件并借助于 DCC和DMAP,将离子标记 (25) 共轭于核糖核苷 (13) 的3'-羟基,以在4小时内提供中等产率 (74%) 的化合物 (26)。

[0503] 在80°C下,通过用在水中的80%AcOH或在50:50丙酮:水中的5当量的对甲苯磺酸吡啶鎓盐处理4天以上,来除去环缩酮。经过这段时间,除去了大多数的缩酮;不幸的是,在这些条件下也显著除去TIPS基团。用饱和碳酸氢钠来中和反应混合物并用盐水碳酸氢盐混合物加以提取,然后进行上柱以产生38%的脱三苯甲基化合物 (27)。

[0504] 为了克服一些上述的限制,酮缩硫醇用来代替传统的环状二氧戊环方式,如方案6所示。用三氟化硼醚合物 (boron trifluoride etherate) 来处理苯硫酚和化合物 (19) 以提供产率为92%的化合物 (28)。接着,通过在MeOH/水 (4:1) 中并在0°C下经30分钟借助于逐滴的0.2当量的NaOH来处理 (28) 从而单水解化合物。允许在0°C下搅拌反应30分钟,然后除去冰浴,并允许溶液升温至室温。浓缩反应混合物以除去甲醇和部分水。向溶液添加乙酸乙酯和1M HCl以分离显著量的原材料和所期望的产物,化合物 (30),产率为85% (参照添加的NaOH)。在此合成途径中进行HCl后处理 (workup) 的能力是相对于先前使用无环和环缩酮的显著改善,因为酮缩硫醇显著更耐酸性条件。然后在DCC、DMAP在吡啶:乙腈 (50:50) 中的标准偶联条件下,将磷离子标记共轭于化合物 (30),以提供良好的产率 (87%) 的化合物 (31)。接着,用在甲醇/水中的5当量的NaOH来水解化合物 (31) 的酯,以在乙酸乙酯中HCl提取以后提供几乎定量产率的化合物 (32)。

[0505] 方案6

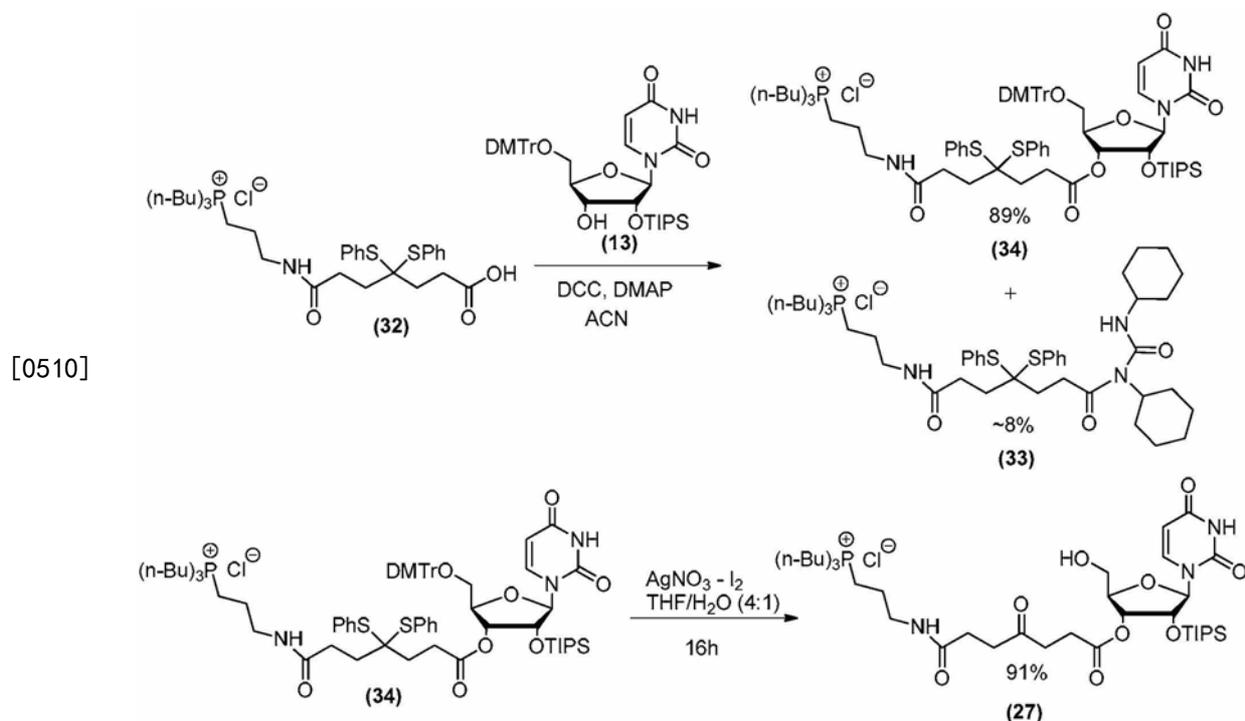


[0507] *参照NaOH

[0508] 借助于在手中的化合物 (32),并再次借助于使用DCC和DMAP,来实现核苷共轭作用,以提供中等产率的核苷共轭物 (34)。不幸的是,存在显著量的形成的副产物 (33),其不

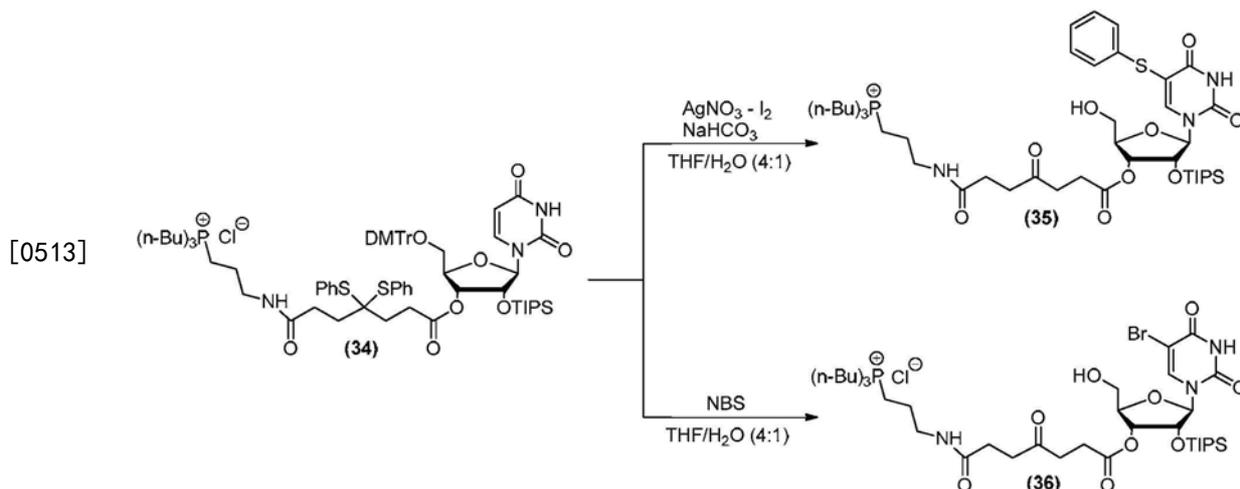
可能通过硅胶柱层析加以完全分离。通过添加更多DMAP、和使用其它偶联试剂,如TBTU、HATU和CMPPI,来减少其形成的尝试证明是不成功的。羧基到酰基氯的转化可以是有用的替代方法。

[0509] 方案7



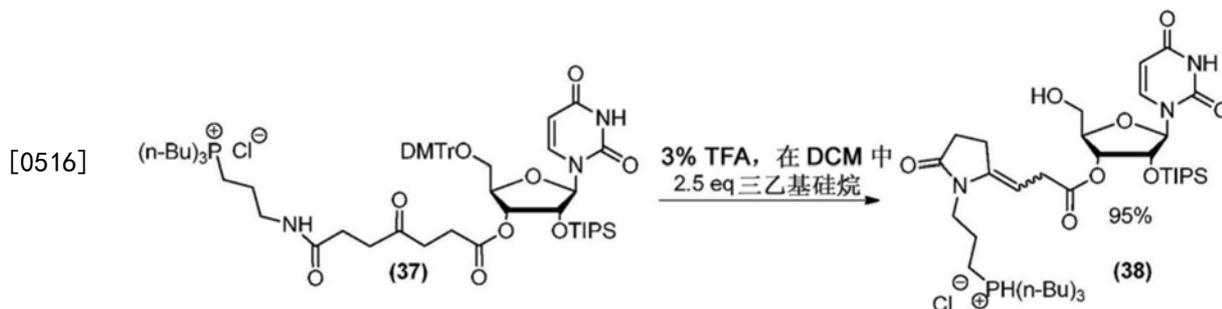
[0511] 然后通过用硝酸银和分子碘(在80%THF/水中)来处理化合物(34)以除去酮缩硫醇,从而导致三苯甲基化和脱三苯甲基化物质的混合物。当在有碳酸氢钠存在的情况下尝试相同反应时,观测到一种非常不同的产物。在这种情况下,通过碘与C-5的亲电加成,接着苯硫酚的取代,形成中等产率的C-5苯硫基衍生物(35)。在另一种去保护策略中,NBS用作溴离子的来源以切割酮缩硫醇。然而,相反地,发生C-5位置的溴化以产生(36),作为主要产物。在硝酸银/碘方法中使用可力丁(collidine)来代替碳酸氢钠会减少C-5苯硫基衍生物的形成到几乎没有。最小化在C-5处的改变的另一种有效的方法涉及稀释(34)的溶液,同时增加使用的硝酸银和碘的量。任何碱基的缺乏产生三苯甲基化和脱三苯甲基化物质的混合物,其经历完全脱三苯甲基化,以提供(27)(方案7)。

[0512] 方案22

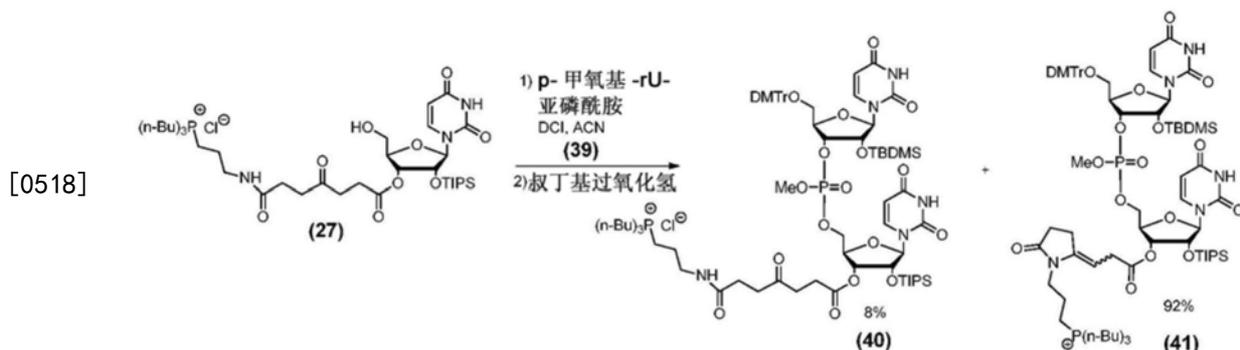


[0514] 获得来自硫缩醛的可力丁处理的硝酸银-碘水解的物质,化合物(37) 方案24,然后用在DCM中的3%TFA加以处理,其中使用2.5当量的三乙基硅烷来骤冷三苯甲基阳离子10分钟,然后添加20mL甲苯,接着用旋转蒸发器浓缩。然后将样品接收在丙酮中并沉淀自甲基叔丁基醚(MTBE),从而产生率为95%的不期望的化合物(38)。这可能是由于通过一起浓缩TFA和甲苯所产生的脱水条件。在没有甲苯浓缩而是直接沉淀进入MTBE的情况下,重复上述实验。获得类似的结果:60%的化合物(38),其余部分是所期望的产物(27)。

[0515] 方案24



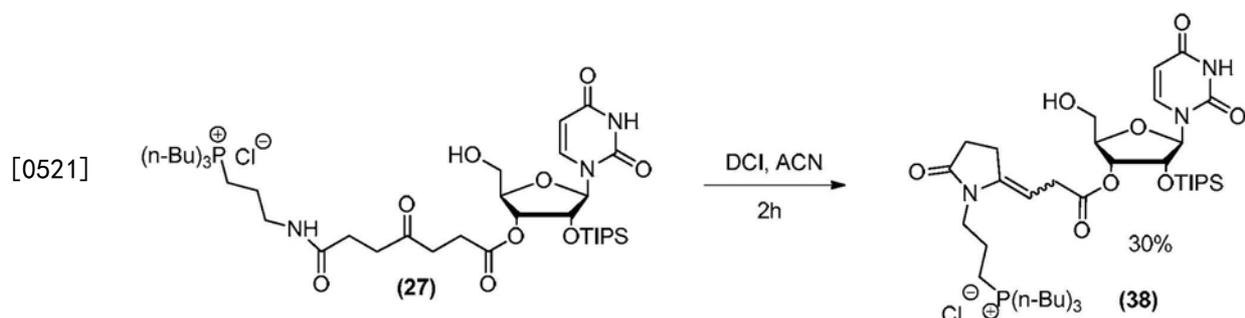
[0517] 方案25



[0519] 将在没有碱的情况下源自酮缩硫醇的水解的化合物(27),其还除去三苯甲基保护基团,偶联于对甲氧基-rU-亚磷酰胺(39),接着氧化以主要产生不期望的二聚体核苷酸(41),方案25。通过MS来监测反应,并且明显地看到,在整个反应过程中,不期望的化合物(41)的形成随时间而增加。为了进一步确定在化合物(38)和(41)中看到的烯胺酯(enamino ester)的形成的原因,用在无水ACN中的DCI来处理化合物(27)并随着时间的推移通过MS来

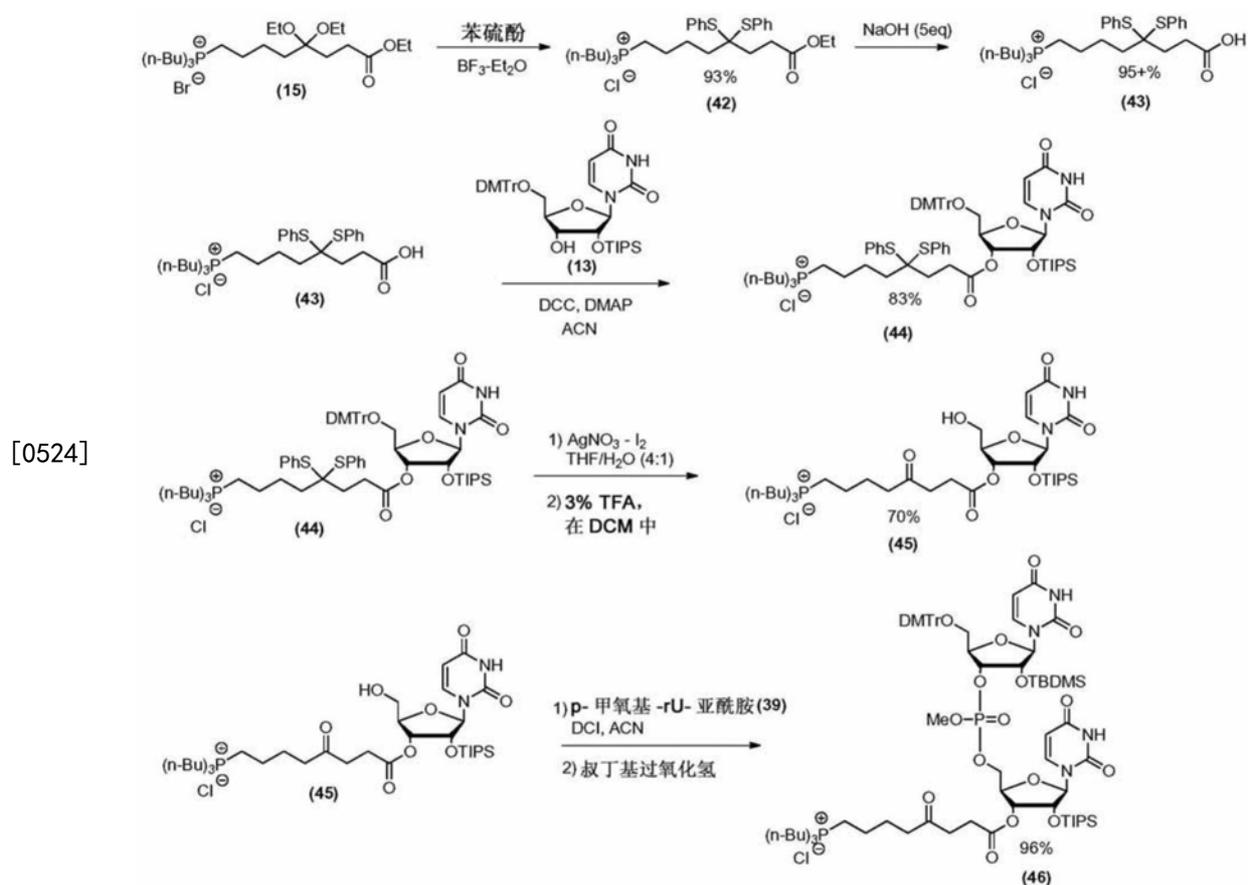
加以监测。很明显,在2小时以后,DCI的酸度足以促进不期望的环状烯胺产物 (38) 的形成。

[0520] 方案26



[0522] 用缓冲在吡啶乙酸 (3:2) 中的0.5M水合肼来处理在方案25中的化合物 (40) 和 (41) 的不可分离的混合物,从而释放8%的异构纯的所期望的UpU 二聚体 (47)。

[0523] 方案27

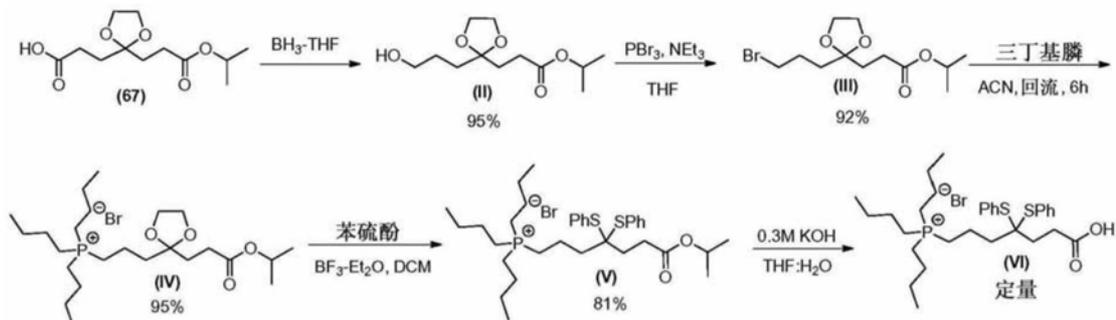


[0525] 鉴于无环和环状缩醛是用于在核苷共轭物上的酮保护基团的低劣选择以及酮基- γ 酰胺不相容于标准亚磷酰胺偶联,所以尝试了一种替代合成途径,方案27。获得最初来自方案3的化合物 (15),并用酮缩硫醇来代替缩酮,其中通过用苯硫酚和三氟化硼醚合物加以处理,从而产生良好产率 (94%) 的化合物 (42)。通过氢氧化钠,容易地和定量地水解酯,并通过1M HCl提取来分离化合物 (43)。不同于先前的尝试,缩酮仍然存在并且没有观测到环化。偶联于核苷 (13),如先前在方案7中所描述的而实现,伴随着相同的问题:显著的DCC失败产物。尽管这种较小的限制,但在没有优化的情况下继续合成途径。通过硝酸银/碘 (在80% THF-水中),接着脱三苯甲基化,来除去硫缩醛,以产生良好产率的化合物 (45)。将亚磷

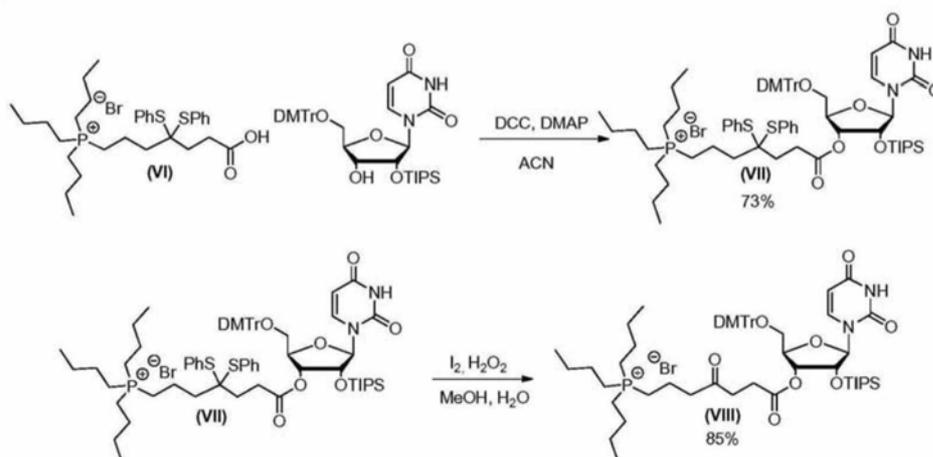
酰胺 (39) 偶联于 (45) 的自由5'-羟基4小时,并在反应完成以后,如通过MS 所监测的,用叔丁醇处理样品以偶联任何过量的亚磷酰胺并在MTBE中沉淀。然后在DCM中溶剂化样品,接着氧化以产生率为96%的化合物46。

[0526] 用于产生离子标记的单体的一种替代方法示于以下方案27B。

[0527] 方案27B



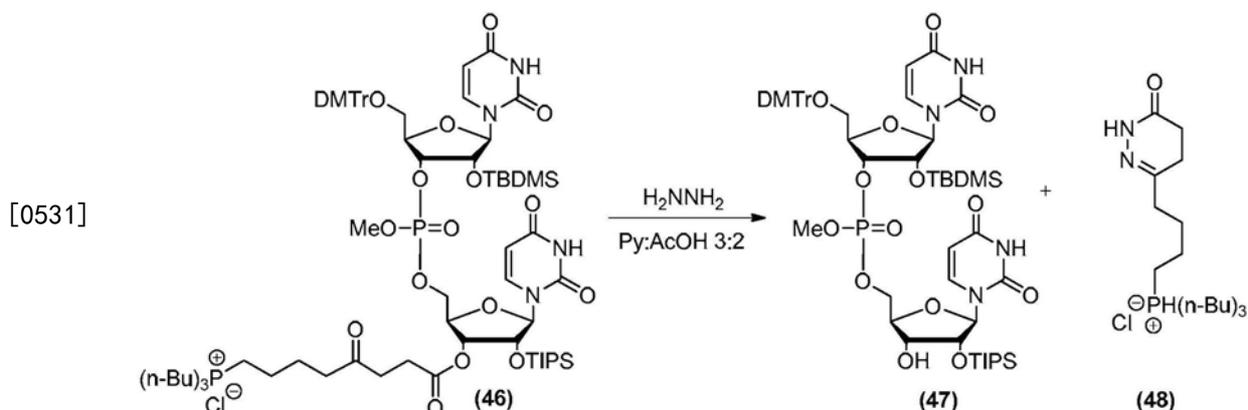
[0528]



[0529] 将化合物 (67) 溶解于无水THF并通过搅拌在冰浴中冷却至0℃。向此溶液,经15分钟,滴加硼烷-THF,此时,除去冰浴并在室温下搅拌溶液 2小时以上直至反应完全。将混合物再次冷却至0℃并添加甲醇以骤冷。然后将混合物浓缩至干燥并用甲醇再一次处理以确保除去所有硼酸三甲酯。通过柱层析来纯化此混合物以产生95+%的所期望的伯羟基缩酮酯 (II)。然后将化合物 (II) 溶解于无水DCM和三乙胺,冷却至0℃并经10分钟滴加三溴化磷,然后允许搅拌1小时直至反应完全,如通过TLC所确定的。用乙酸乙酯稀释混合物,然后用饱和碳酸氢钠提取两次以及用盐水提取一次,接着通过柱层析加以纯化,从而提供良好产率 (92%) 的烷基溴。用最少量的乙腈来溶解化合物 (III),对其经10分钟滴加三丁基磷。然后回流这种放热反应6小时,浓缩,用最少的丙酮稀释,并研碎从而剧烈搅拌己烷。使己烷层通过 **Celite®** 过滤器并丢弃,在过滤器上和烧瓶中的剩余粘性物是具有定量产率的纯磷标记化合物 (IV)。接着,用更加稳定的和更容易除去的酮缩硫醇来代替缩酮,其中在室温下通过在有分子筛存在的情况下用苯硫酚和硼烷三氟化物醚合物 (borane trifluoride etherate) 加以处理6小时。这导致在通过柱层析的纯化以后产率为81%的化合物 (V)。用在50:50水THF混合物中的0.2M氢氧化钾溶液进行酯水解。通过添加 1M HCl和氯化钠来骤冷此反应,并用乙酸乙酯进行提取。然后用盐水洗涤有机层三次以除去任何过量的HCl,干燥并浓缩,从而提供纯酸,化合物 (VI)。利用标准DCC条件,将核苷 (13) 偶联于化合物 (VI),从而提供中等产率 (73%) 的3' 标记接头核苷 (VII)。最后,在非常温和的条件下,通过用

20mol% 的分子碘并在甲醇、水和过氧化氢的溶液中进行处理来除去酮缩硫醇。通过用硫代亚硫酸钠的10%溶液进行骤冷、用乙酸乙酯进行提取以及短硅胶柱,可以容易纯化这种混合物,从而提供良好产率(85%) 的去保护的单体(VIII)。

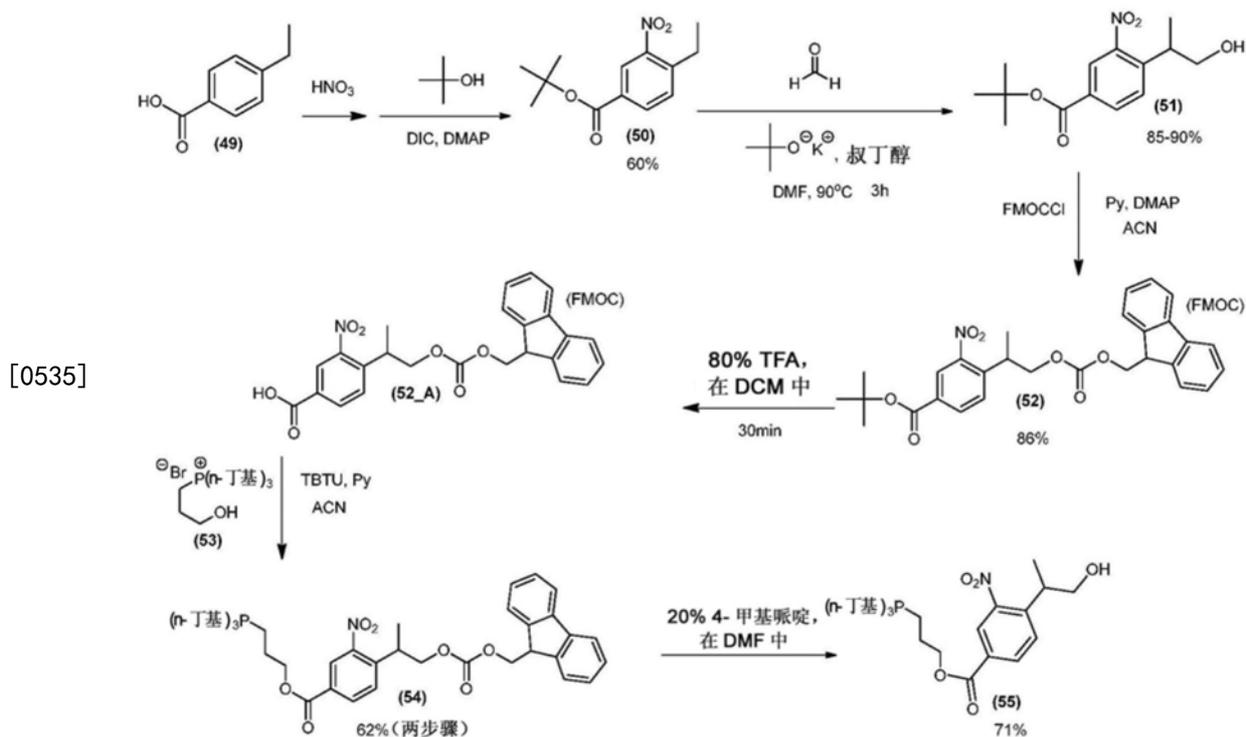
[0530] 方案28



[0532] 最后,用水合肼(0.5M,在吡啶:乙酸3:2中)来处理具有3'-标记接头的二聚体核苷酸(46),从而产生几乎定量产率的二聚体核苷酸,以及预期的接头切割产物(如通过MS所观测到的)。二聚体核苷酸是异构纯的,如通过磷NMR所确认的。

[0533] 对于以上所述的正交乙酰丙酰基接头的一种替代是光可切割的接头,其可以在所有标准核糖核苷酸保护基团存在的情况下被除去。这便于在阻滞剂的合成过程中的任何时间使用非常温和的条件来暴露3'-羟基。连同2'-TIPS保护基团一起,没有甲硅烷基迁移的风险,从而便于生产区域异构体纯嵌段聚体,其可以容易地被转化成亚磷酰胺。NPPOC衍生物(55)的合成开始于由Pfleiderer报道的若干短而精巧的步骤[Pfleiderer, W. et al. Helvetica Chimica Acta, 87:620 (2004)]。

[0534] 方案29:对光不稳定的离子标记(55)的合成



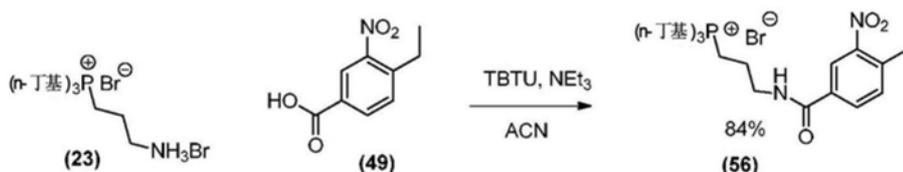
[0536] 将发烟硝酸冷却至 -10°C 并经30分钟将4-乙基苯甲酸(49)加入静置溶液,然后允许搅拌30分钟。在碎冰上骤冷混合物并收集3-硝基-4-乙基-苯甲酸(50)的固体沉淀物,然后用乙酸乙酯和己烷加以结晶,具有良好产率(95%)。在标准条件下,利用DCC和DMAP并借助于叔丁醇来形成叔丁酯。

[0537] 如由Pfleiderer所描述的,通过在 90°C 下用对甲醛和催化量的叔丁醇钾(在非质子双极性溶剂中,如DMF或DMSO)来处理叔丁酯3小时以形成2-取代的丙-1-醇衍生物[Pfleiderer,W.et al.Helvetica Chimica Acta, 87:620(2004)]。然后骤冷反应并用1M HCl来中和至pH7,从而产生85-90%的所期望的产物(51)。然后用Fmoc-Cl(52),一种酸稳定的保护基团,来保护新形成的伯羟基。这便于用在DCM中的80%TFA来切割叔丁酯而没有去保护伯羟基。在没有Fmoc保护的情况下,将发生新形成的羟基的脱水,从而形成丙烯衍生物。同样,在安装Fmoc以后,必要的是,化合物并不长期暴露于阳光或钨丝灯光(tungsten light),因为依据分子设计,这种化合物将经历光解切割。

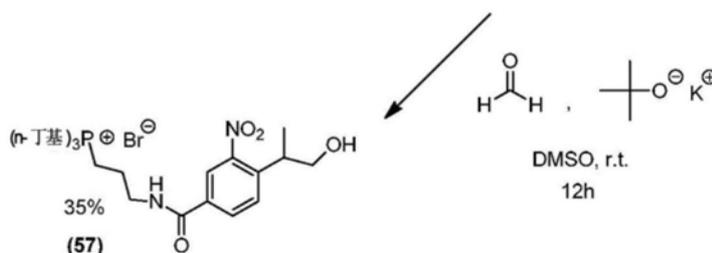
[0538] 然后,借助于在ACN中的TBTU并包装在铝箔中8小时,将新形成的游离酸偶联于磷离子标记(53),这提供中等产率(65%)的标记物质(54),通过柱层析,其可以容易地分离自任何原材料。接着,在标准条件下,通过用在DMF中的20%的4-甲基哌啶进行处理2小时来除去Fmoc基团,从而产生良好产率的化合物(55)。虽然在伯醇处没有保护基团可以被除去,但这种化合物在任何时候都应保持在黑暗中。这是由于以下事实:观测到,随着时间的推移,一些降解确实发生,虽然远远慢于当Fmoc存在时的情况。

[0539] 光不稳定接头的先前合成是稍微有点长并需要使用昂贵的瞬态保护基团,Fmoc。在缩短合成的尝试中,我们能够避免羧酸部分的保护、去保护和再保护,同时增加总产率。这是通过直接共轭修饰的磷离子标记(23),其包含代替羟基的伯胺,在化合物(56)中产生酰胺键,来完成(方案30)。这是如针对(55)的合成(方案29)所描述的来实现,其中利用TBTU和三乙胺作为偶联试剂,从而产生产率为35%的(57)(未优化)。

[0540] 方案30:对光不稳定的离子标记(57)的短合成



[0541]

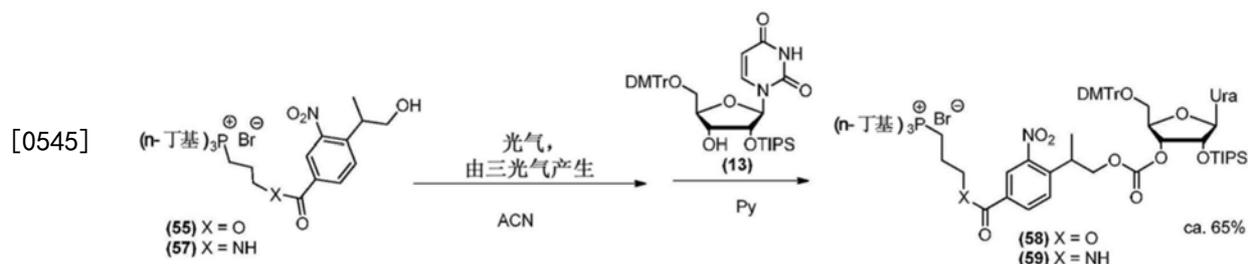


[0542] 在另一种实施方式中,提供了用于将离子标记(57)连接于核糖核苷的方法,从而提供结构单元(58)或(59),其用于进一步加工进入寡核苷酸。用于进行共轭作用的一般方法示于方案31,并且涉及离子标记的光气化,接着它连接于核苷的3'-羟基。

[0543] 因此,通过来自Eckert,H.Auerweck,J.Org.Process Res.Dev.14: 1501-1505,(2010)并概述于方案32中的改良程序来进行(55)或(57)的光气化。本文描述了用于自三光

气和菲啉来产生光气的详细的实验程序。

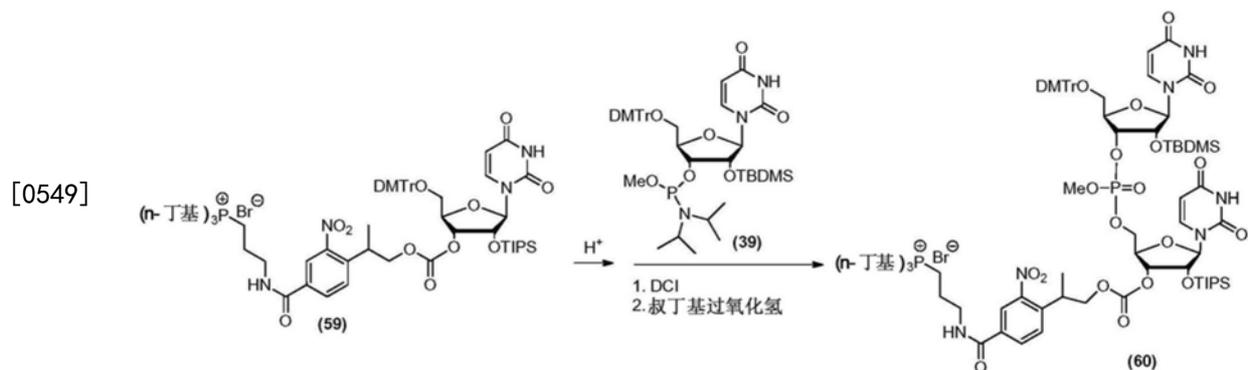
[0544] 方案31:核苷(13)与对光不稳定的离子标记的共轭作用



[0546] 将核苷(13)在乙腈中的溶液直接加入DIPEA和氯酸盐(chloro carbonate) (产生自上述产生的光气反应)的混合物,并允许在室温下搅拌 8小时。在添加乙酸乙酯以后,用饱和 NaHCO_3 和盐水洗涤混合物,并在 MTBE中沉淀以除去过量(未反应的)核苷和DIPEA。通过柱层析(DCM:MeOH)来进一步纯化得到的沉淀物。

[0547] 核苷如(59)具有若干应用。它们可以作为原材料,用于合成二聚体或三聚体或更大寡核苷酸,其仅需要用于分离的沉淀步骤,其中借助于在3'-端处的极性离子标记。在已合成所期望的长度以后,可以切割3'-标记和所有保护基团,从而产生自由(未受保护的)寡核苷酸。可替换地,由于可以选择性地切割3'-离子标记而没有去封闭在杂环碱基或糖-磷酸酯主链上的所有其它保护基团,所以它提供了新颖方式来制备受保护的包含3'-羟基的寡核苷酸嵌段,其可以被进一步加工成3'-亚磷酸胺衍生物。

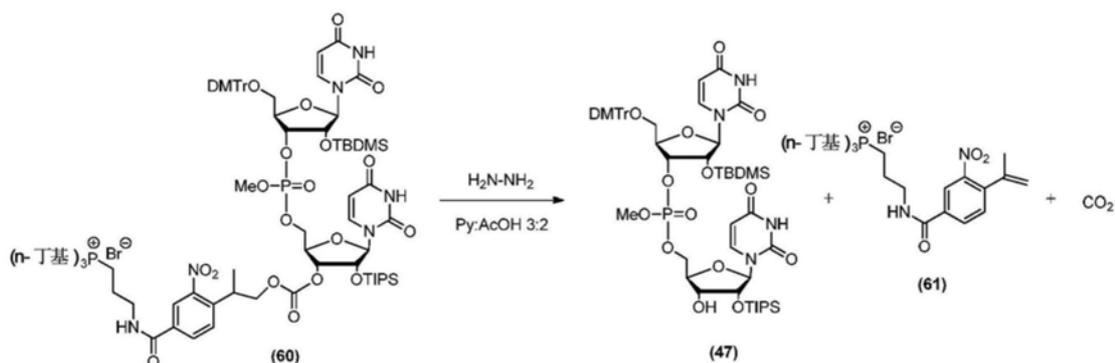
[0548] 方案32. 离子标记rUpU(60)自核苷(59)的合成。



[0550] 通过添加在DCM中的3%三氟乙酸和三乙基硅烷,并允许搅拌混合物5分钟,来脱三苯甲基化3'-NPPOC-标记尿苷(86)。甲醇的添加会确保骤冷三苯甲基阳离子,并防止5'-羟基的再三苯甲基化。然后在MTBE中沉淀粗产物以除去DMTrOMe、和/或DMTrOH。然后经赛力特硅藻土来过滤化合物,收集在DCM中并通过柱层析加以再纯化,从而提供95%的产率。在有4,5-二氧基咪唑(DCI)存在的条件下,通过偶联于rU亚磷酸胺单体(39)来合成二聚体rUpU(60),然后允许在室温下搅拌得到的溶液3小时。添加10当量的叔丁醇以骤冷过量亚磷酸胺,接着10当量的叔丁基过氧化氢(1mL的在癸烷中的6M溶液)以将核苷酸间亚磷酸三酯氧化成更加稳定的磷酸三酯。然后将反应浓缩成油,接收在最少量的二氯甲烷(DCM)中,并在MTBE中沉淀,以除去所有过量试剂。如果通过TLC检测到任何骤冷亚磷酸胺的存在,则重复沉淀过程。分离标记的rUpU二聚体(60),产率为95%。

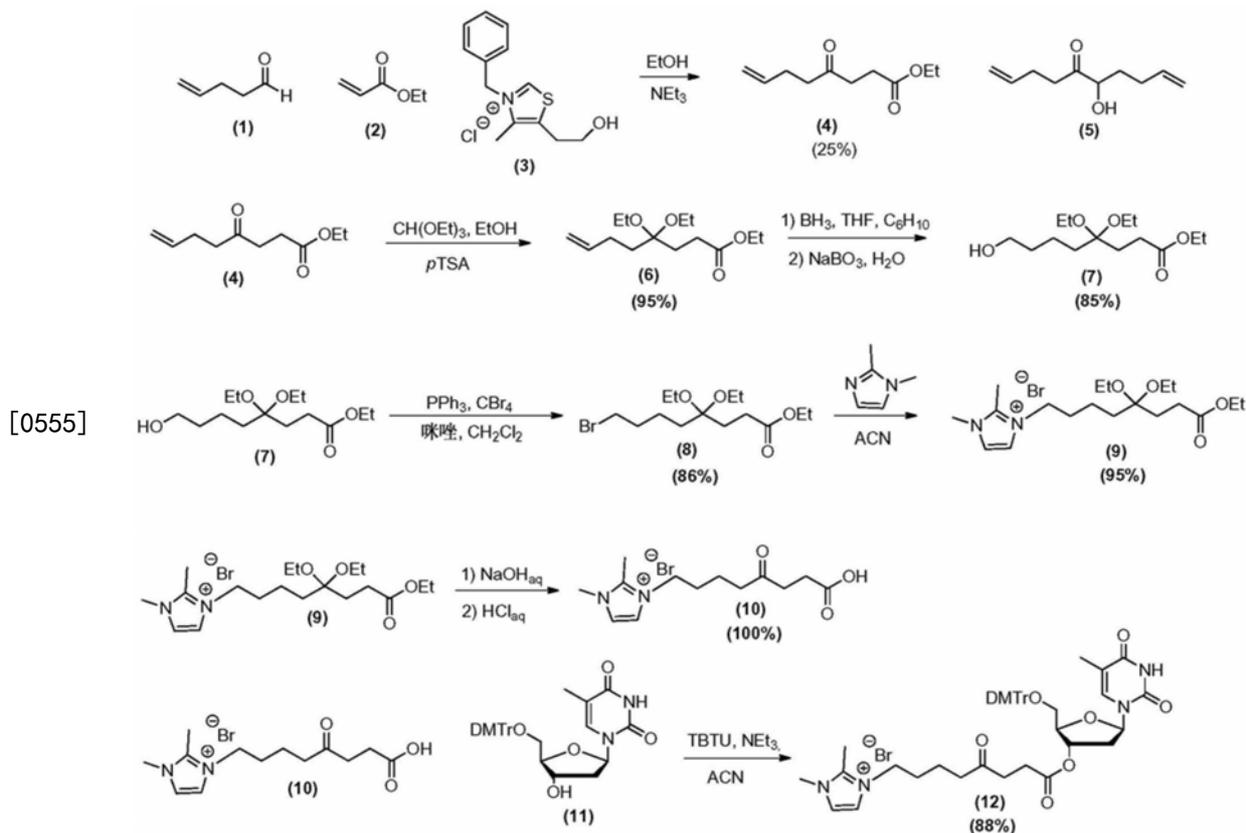
[0551] 方案33

[0552]



[0553] 在50ml Pyrex圆底烧瓶中,将二聚体(60)溶解于湿ACN(3200ppm的 H_2O)。将烧瓶放置在配备有UVB灯泡的光反应器内并在搅拌下和在0.01M的浓度下反应35分钟。将混合物浓缩至约3ml并通过借助于甲基叔丁基醚(MTBE)的沉淀来除去切割的标记。在MTBE溶液中发现所期望的二聚体,在浓缩溶液至干燥以后其被收集。分离的产率是95%。

[0554] 正交可切割标记的实验合成。



[0556] 4-氧代辛-7-烯酸乙酯(54)

[0557] 将4-戊烯醛(1)(3.8g,45mmol)与3-苄基-5-(2-羟乙基)-4-甲基噻唑氯化物((3),2.45g,9.1mmol)和丙烯酸乙酯((2),9.0g,90mmol)混合并溶解于22mL无水乙醇。加热反应混合物至回流,然后添加三乙胺(7.6mL)以开始反应。回流反应混合物18小时,然后冷却至室温。在减压下除去乙醇,然后将反应混合物悬浮于二氯甲烷并用盐水提取。经硫酸镁来干燥有机层并在减压下除去溶剂。通过快速柱层析并利用己烷/乙酸乙酯梯度洗脱体系来纯化产物以产生(4)(3.96g,与(5)混合,产率为约25%),作为浅黄色油。 1H NMR(300MHz,乙腈- d_3) δ =5.99-5.73(m,1H,具有偶姻杂质),5.15-5.05(m,2H),5.04-4.93(偶姻杂质),

4.15-4.06 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 2.76- 2.67 (m, 2H, 具有偶姻杂质), 2.67-2.60 (偶姻杂质), 2.55-2.48 (m, 2H, 具有偶姻杂质), 2.35-2.26 (m, 2H), 2.20-2.17 (偶姻杂质), 2.16-2.12 (m, 2H), 1.99-1.94 (偶姻杂质), 1.21 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 207.10, 发现为: 207.31。

[0558] 4,4-二乙氧基辛-7-烯酸乙酯 (56)

[0559] 将化合物 (4) (2.0g, 作为与 (5) 的混合物, 大约 5.7mmol) 溶解于原甲酸乙酯和乙醇 (6mL) 的 1:1v/v 混合物并与催化量的 pTSA (0.1g) 混合。然后回流反应混合物 4 小时, 然后将它冷却至 0°C。然后连同二乙醚 (20mL) 一起添加饱和含水碳酸氢钠 (20mL)。用二乙醚提取水相几次, 然后用盐水冲洗合并有机层并经硫酸镁干燥。在减压下除去溶剂, 然后通过快速柱层析并利用己烷/乙酸乙酯梯度体系来纯化产物, 以产生 (6) (1.36g, 产率为 92%), 作为无色油。 ^1H NMR (500MHz, DMSO-d_6) $\delta=5.85-5.73$ (m, 1H), 5.05-4.88 (m, 2H), 4.03 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.32 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 4H), 2.20 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 1.97-1.88 (m, 2H), 1.79 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 1.53 (t, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 1.16 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.06 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 6H), ^{13}C NMR (75MHz, 乙腈- d_3) $\delta=173.0, 138.5, 113.8, 102.0, 60.1, 55.0, 32.3, 28.7, 28.3, 27.8, 14.6, 13.6$, $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{Na}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 281.17, 发现为: 281.13。

[0560] 4,4-二乙氧基-8-羟基辛酸乙酯 (7)

[0561] 将硼烷在 THF (2.4mL, 2.4mmol) 中的 1M 溶液冷却至 0°C 并向它滴加 0.47mL 环己烯 (4.6mmol)。在 0°C 下搅拌反应 1 小时并向得到的白色浆料添加化合物 (6) (0.51g, 2.0mmol)。允许反应温热至室温并搅拌 2 小时。在此时间后, 添加过硼酸钠四水合物 (1.07g, 7.0mmol) 和 2.4mL 水。再搅拌反应 2 小时, 然后用乙酸乙酯提取反应混合物几次。经硫酸镁干燥合并有机层并在减压下除去溶剂。利用二氯甲烷/甲醇梯度洗脱体系来纯化产物以产生 (7) (0.45g, 产率为 81%), 作为无色油。还回收原材料 (6)。 ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) $\delta=4.33$ (t, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 4.02 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.31 (q, $J=7.3\text{Hz}$, 4H), 2.18 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 1.76 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 1.46-1.41 (m, 2H), 1.40-1.31 (m, 2H), 1.25-1.19 (m, 2H), 1.16 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.05 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 6H), ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) $\delta=173.1, 102.4, 61.0, 60.3, 55.0, 33.2, 33.0, 29.0, 28.5, 20.2, 15.7, 14.5$, $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 299.18, 发现为: 299.19。

[0562] 8-溴-4,4-二乙氧基辛酸乙酯 (8)

[0563] 将化合物 (7) (0.50g, 1.8mmol) 与三苯膦 (0.80g, 3.0mmol) 和咪唑 (0.20g, 2.9mmol) 混合并溶解于 18mL 二氯甲烷。将溶液冷却至 0°C 并缓慢添加四溴化碳 (0.85g, 2.6mmol) 在二氯甲烷 (1.5mL) 中的溶液。允许反应混合物温热至室温并搅拌 1 小时。然后通过添加饱和含水亚硫酸钠来骤冷反应并用二氯甲烷提取。经硫酸钠干燥合并有机层并在减压下除去溶剂。通过快速柱层析并借助于己烷/乙酸乙酯梯度洗脱体系来纯化产物以产生 (58) (0.49g, 产率为 81%), 作为无色油。 ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) $\delta=4.04$ (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.54 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 3.32 (q, $J=6.9\text{Hz}$, 4H), 2.22 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 1.83-1.74 (m, 4H), 1.47 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.35- 1.25 (m, 2H), 1.18 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.07 (t, $J=6.9\text{Hz}$), ^{13}C NMR (126MHz, 乙腈- d_3) $\delta=173.0, 102.1, 60.1, 55.0, 34.2, 32.5, 32.1, 28.8, 28.4, 22.0, 14.7, 13.5$, $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{BrO}_4\text{Na}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 361.10, 发现为: 361.11。

[0564] 4,4-二乙氧基-8-(2,3-二甲基-1H-咪唑-1-基)辛酸乙酯溴化物 (9)

[0565] 将化合物(58)(0.31g,0.90mmol)溶解于5mL乙腈并与1,2-二甲基咪唑(0.13g,1.3mmol)混合。将反应升温至50℃并搅拌过夜。然后将反应混合物冷却至室温,然后在减压下除去溶剂。用二乙醚冲洗得到的油几次,然后使化合物再次经受减压。这产生(9)(0.38g,产率为95%),作为无色油。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ=7.63(d,J=2.2Hz,1H),7.60(d,J=2.2Hz,1H),4.09(t,J=7.2Hz,2H),4.04(q,J=7.2Hz,2H),3.73(s,3H),3.31(q,J=6.9Hz,4H),2.56(s,3H),2.20(t,J=8.1Hz,2H),1.76(t,J=8.1Hz,2H),1.71-1.63(m,2H),1.49(t,J=7.6Hz,2H),1.24-1.19(m,2H),1.16(t,J=7.2Hz,3H),1.05(t,J=6.9Hz,6H),¹³C NMR(126MHz,DMSO-d₆) δ=173.6,122.8,121.3,102.5,60.7,55.6,48.6,35.3,33.2,29.9,29.3,28.8,20.8,15.2,14.1,9.7,C₁₉H₃₅N₂O₄¹⁺低分辨率ESI-MS计算为:355.26,发现为:355.28。

[0566] 8-(2,3-二甲基-1H-咪唑-1-基)-4-氧代辛酸溴化物(10)

[0567] 将化合物(9)(0.44g,1.0mmol)与1M含水氢氧化钠(5mL)混合并搅拌过夜。然后通过添加浓HCl水溶液将溶液酸化至pH1。然后用二乙醚冲洗水溶液,接着在减压下除去水。将产生的固体溶解于最少的冷丙酮和二氯甲烷,并通过过滤来除去任何未溶解物质。然后在减压下除去溶剂以产生(10)(0.34g,产率>100%),作为灰白色固体,可能与少量的氯化钠混合。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ=7.63(d,J=2.1Hz,1H),7.61(d,J=2.1Hz,1H),4.09(t,J=7.3Hz,2H),3.73(s,3H),2.61(t,J=6.3Hz,2H),2.56(s,3H),2.49(t,J=7.3Hz,2H),2.37(t,J=6.3Hz,2H),1.65(m,2H),1.43(m,2H),¹³C NMR(126MHz,乙腈-d₃) δ=208.9,173.4,122.3,120.9,48.0,41.0,36.7,34.8,28.6,27.7,19.9,9.2,C₁₃H₂₁N₂O₃¹⁺高分辨率ESI-MS需要为:253.15467,发现为:253.15459。

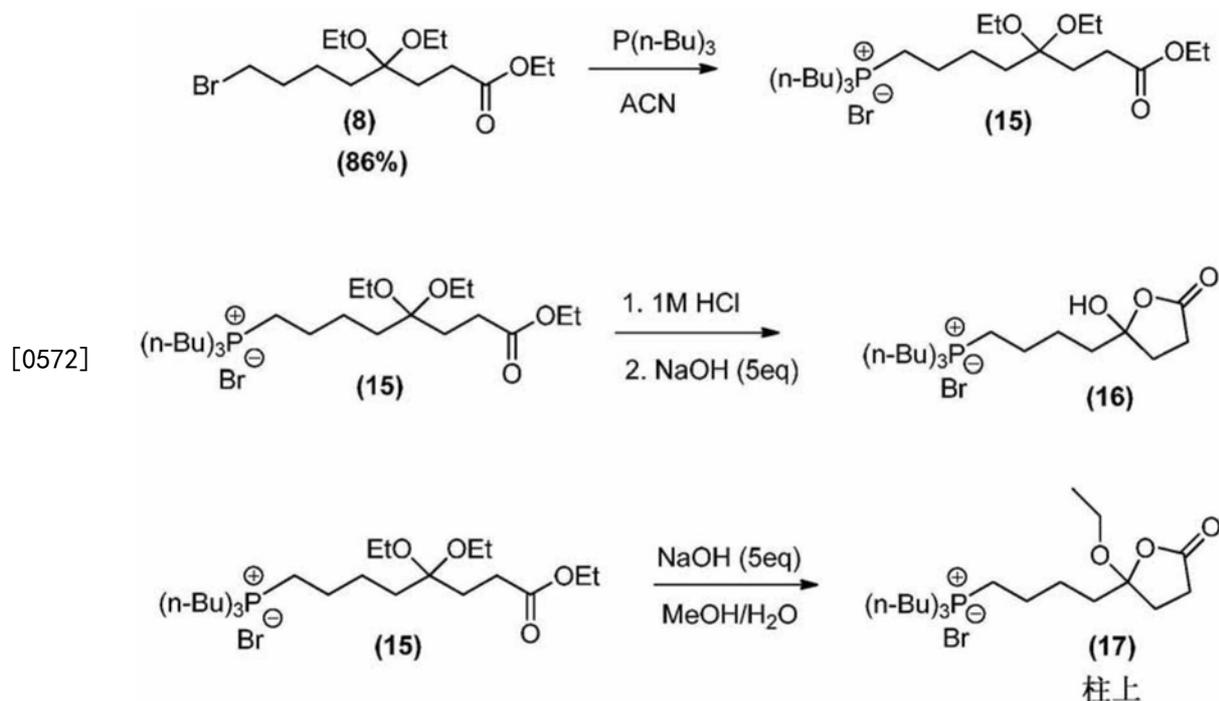
[0568] 用核苷来衍生化(10)的一般程序。

[0569] 将化合物(10)(0.4mmol)溶解于15%v/v DMF/乙腈并与DCC(0.6 mmol)、DMAP(0.2mmol)、和所期望的5'-DMTr-dT或5'-DMTr2'-TIPS rU(13)(0.5mmol)混合。搅拌反应混合物过夜,然后沉淀自MTBE。通过过滤来除去得到的固体并通过将它溶解于乙腈来回收自过滤器。在减压下除去溶剂并将产生的固体接收在二氯甲烷中,然后用稀含水四氟硼酸钠洗涤,以实现离子置换。经硫酸镁来干燥有机相,并在减压下除去溶剂。然后将得到的固体溶解于乙腈并且溶液沉淀自MTBE,接着过滤和回收在乙腈中。然后在减压下除去溶剂以产生所期望的标记的核苷,产率为80-90%。

[0570] (12)¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ=11.37(s,1H),7.59(d,J=2.1 Hz,1H),7.57(d,J=2.1Hz,1H),7.49(s,1H),7.39-7.36(m,2H),7.34-7.30(m,2H),7.29(t,J=7.1Hz,2H),7.25-7.19(m,5H),6.90-6.85(m,4H),6.17(dd,J=5.9Hz,1H),5.25(d,J=6.3Hz,1H),4.08(t,J=7.1Hz,2H),4.01(dd,J=3.5Hz,1H),3.72(s,6H),3.71(s,3H),3.33-3.27(m,1H,和H₂O),3.22-3.17(dd,J=7.2,3.3Hz,1H),2.69(t,J=6.1Hz,2H),2.60(s,3H),2.55-2.44(m,8H,和DMSO),2.53(dd,J=8.1,5.4Hz,1H),1.72-1.61(m,2H),1.48-1.42(m,2H),C₄₄H₅₁N₄O₉¹⁺高分辨率ESI-MS需要为:779.36506,发现为:779.36526。

[0571] (14)¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ=11.47(s,1H,H3),8.22-8.16(m,1H,DMT),7.72-7.70(br.s,1H,H6),7.69-7.68(m,1H,标记CH=CH),7.63-7.60(m,1H,标记CH=CH),7.60-7.58(m,2H,DMTr),7.58-7.56(m,2H,DMTr),7.36-7.27(m,2H,DMT),7.26-7.18(m,2H,DMT),6.91-6.84(m,4H,DMTr),5.87(d,J=6.8Hz,1H,H1'),5.49(dd,J=2.0,5.9Hz,1H,

H5), 5.16 (t, J=2.3Hz, 1H, H3'), 4.64 (t, J=6.2Hz, 1H, H2'), 4.06 (t, J=7.4Hz, 2H, NCH₂), 3.73 (s, 6H, DMT OCH₃), 3.70 (s, 3H, 标记NCH₃), 3.29-3.15 (m, 水和H5' & 5''), 2.70 (t, J=6.7Hz, 2H, 标记 CH₂CH₂COO), 2.63-2.58 (m, 3H, 标记CH₃CN₂), 2.55 (m, DMSO和标记 CH₂CH₂COO以及标记NCH₂CH₂CH₂CH₂), 2.54-2.45 (m, 5H), 1.73-1.61 (m, 标记NCH₂CH₂CH₂CH₂和10%杂质), 1.49-1.35 (m, 标记, NCH₂CH₂CH₂CH₂和10%杂质), 1.28-1.13 (m, 杂质), 0.99-0.90 (m, 9H), C₅₂H₆₉N₄O₁₀Si¹⁺高分辨率ESI-MS需要为:937.47775, 发现为:937.47680。



[0573] 三丁基(5,5,8-三乙氧基-8-氧代辛基)溴化磷(15)

[0574] 将烷基溴(8)(3.8g, 11.2mmol)溶剂化于22.4mL无水ACN,向其添加1.5当量的三丁基磷(3.4g, 16.8mmol),并在50℃下搅拌8小时。然后用旋转蒸发器将反应混合物浓缩至干燥,然后在己烷中沉淀,以提供纯磷标记物质(15),产率为93%,5.64g。

[0575] ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δppm 0.76-0.91 (m, 16H) 0.95-1.07 (m, 10H) 1.08-1.19 (m, 6H) 1.27-1.58 (m, 33H) 1.71-1.89 (m, 3H) 2.07-2.21 (m, 4H) 2.22-2.49 (m, 15H) 3.18-3.39 (m, 8H) 3.88-4.08 (m, 2H)

[0576] ³¹P NMR (81MHz, 氯仿-d) δppm 49.63 (s, 1P)

[0577] 三丁基(4-(2-羟基-5-氧代四氢呋喃-2-基)丁基)溴化磷(16)

[0578] 将化合物(15)(0.2g, 0.37mmol)溶剂化于最少甲醇,大约3mL,向其添加3mL的5M HCl并允许搅拌20分钟,此时,通过TLC观测到反应已完成。然后通过添加3mL的5M NaOH来中和反应,接着添加大约5当量(75mg, 1.9mmol)的额外NaOH,并允许搅拌另外30分钟。通过MS来监测反应,其显示原材料的完全消耗。然后用1M HCl来中和反应,接收在乙酸乙酯和摇动酸化盐水中以除去所有过量盐,并用盐水进行两次以除去任何过量的HCl。用硫酸镁干燥乙酸乙酯并浓缩至干燥。产生化合物(16),产率为88%,176mg。

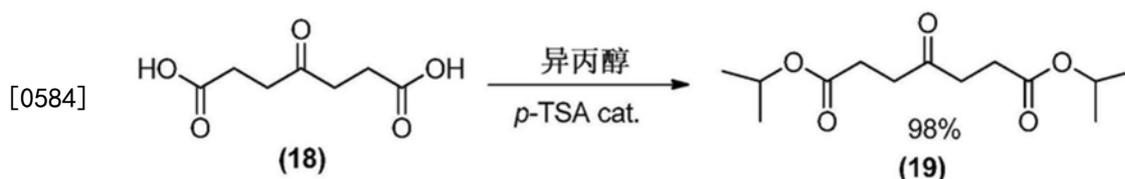
[0579] ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δppm 0.78-0.97 (m, 9H) 1.45 (br. s., 17H) 1.87 (br. s., 1H) 1.97-2.07 (m, 1H) 2.13 (m, J=9.38, 6.74Hz, 1H) 2.28 (br. s., 8H) 2.38-2.72 (m, 2H) 3.40-3.57 (m, 1H)

[0580] 三丁基(4-(2-乙氧基-5-氧代四氢呋喃-2-基)丁基)溴化磷(17)

[0581] 将化合物(15) (0.25g, 0.46mmol) 溶剂化于最少量的甲醇(1.5mL), 并用大约5当量(80mg, 2.1mmol)的NaOH加以处理, 然后允许在室温下搅拌1小时。中和反应混合物至pH8, 然后浓缩至干燥。然后使混合物通过硅胶柱(具有1%乙酸和10%MeOH-DCM)以除去所有盐并产生产物的酸形式。产生74%的化合物(17)。

[0582] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.78-0.97 (m, 9H) 1.07 (t, $J=7.00$ Hz, 4H) 1.45 (br. s., 17H) 1.87 (br. s., 1H) 1.97-2.07 (m, 1H) 2.13 (m, $J=9.38, 6.74\text{Hz}$, 1H) 2.28 (br. s., 8H) 2.38-2.72 (m, 2H) 3.23-3.39 (m, 2H) 3.40-3.57 (m, 1H)

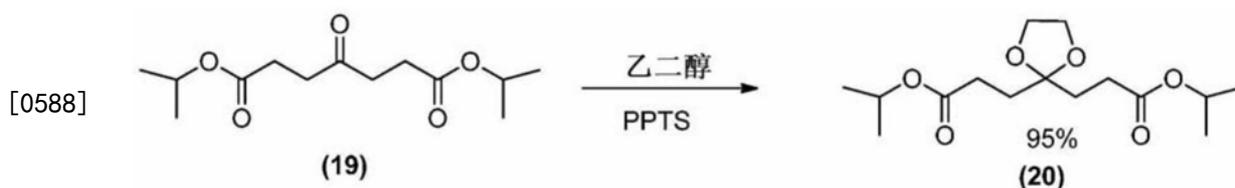
[0583] ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 13.41 (s, 1C) 15.28 (s, 1C) 18.38 (s, 1C) 19.02 (s, 1C) 23.55 (s, 1C) 23.61 (s, 1C) 23.69 (s, 1C) 23.77 (s, 1C) 23.97 (s, 1C) 28.70 (s, 1C) 31.54 (s, 1C) 32.59 (s, 1C) 35.21 (s, 1C) 42.36 (s, 1C) 55.17 (s, 1C) 57.98 (s, 1C) 102.33 (s, 1C) 110.85 (s, 1C) 176.42 (s, 1C) 177.15 (s, 1C)



[0585] 4-氧代庚二酸二异丙酯(19)

[0586] 将4-酮庚二酸(18) (10g, 57.4mmol; 购买自Sigma-Aldrich) 悬浮于50 mL异丙醇和50mL苯。将催化量的对甲苯磺酸加入混合物并利用迪安-斯达克榻水器来达到回流, 以除去产生的水。在烧瓶中在体积已减少到大约50mL以后, 添加另外50mL的50:50苯:异丙醇, 并进一步减少到大约30ml。然后将混合物接收在乙酸乙酯中并用 NaHCO_3 (x3) 提取, 接着用盐水提取一次。用 MgSO_4 干燥有机层并浓缩至干燥, 以产生纯(19): 14.2 g (95%)。

[0587] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 1.06 (d, $J=6.45\text{Hz}$, 12H) 2.39 (t, $J=7.00\text{Hz}$, 1H) 2.60 (t, $J=6.70\text{Hz}$, 4H) 4.72-4.89 (m, 2H) ^{13}C NMR (75 MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 21.57 (s, 1C) 28.13 (s, 3C) 28.13 (s, 3C) 36.92 (s, 3C) 67.66 (s, 1C) 171.90 (s, 2C) 206.82 (s, 1C) $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS 计算为: 258.14, 发现为: 281.21。

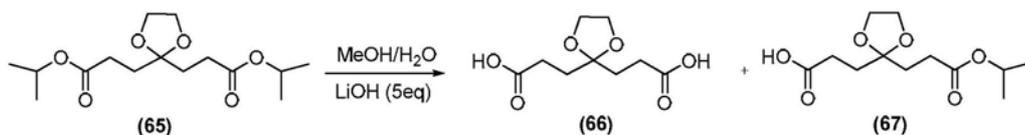


[0589] 3,3'-(1,3-二氧戊环-2,2-二基)二丙酸二异丙酯(20)

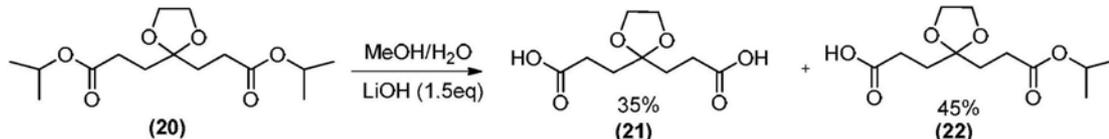
[0590] 用5当量乙二醇(0.58mL, 10.5mmol)、90mL无水甲苯和催化量的对甲苯磺酸吡啶盐来溶剂化化合物(19) (0.55g, 2.1mmol)。在140°C下回流此混合物, 其中更换甲苯3次, 并最后允许反应回流过夜。然后蒸馏混合物至大约30mL, 停止加热并用DCM稀释, 然后用饱和 NaHCO_3 (x2) 接着是水(x3)加以提取, 以除去任何过量的乙二醇。通过柱层析(DCM:MeOH, 100:0→95:5)来纯化产物。分离的产量为0.41g (65%)。

[0591] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 1.05 (d, $J=6.36\text{Hz}$, 12H) 1.78 (t, $J=7.58\text{Hz}$, 15H) 2.16 (t, $J=7.58\text{Hz}$, 15H) 3.76 (s, 15H) 4.82 (dt, $J=12.53, 6.33\text{Hz}$, 8H) ^{13}C NMR (126MHz, 氯

仿-d) δ_{ppm} 21.59 (s, 1C) 29.02 (s, 1C) 32.07 (s, 1C) 64.94 (s, 1C) 67.23 (s, 1C) 67.26 (s, 1C) 109.84 (s, 1C) 172.56 (s, 1C) $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{Na}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:302.17, 发现为: 325.0。



[0592]



[0593] 3-(2-(3-羟基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酸(21)和3-(2-(3-异丙氧基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酸(22)。

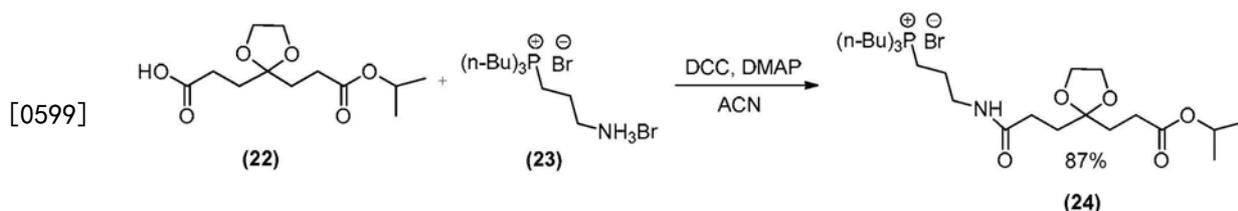
[0594] 将化合物(20)(2.1g, 6.9mmol)溶剂化于20mL的MeOH,向其添加在5mL水中的1.5当量LiOH(0.51g, 21.5mmol)。允许搅拌此混合物2小时直到所有原材料被消耗。通过添加1M HCl来使溶液达到中性。通过柱层析(DCM:MeOH, 具有1% AcOH, 100:0→90:10)来纯化此混合物。(21)的分离的产量为0.53g(35%)。(22)的产量为0.81g(45%)。

[0595] (21)

[0596] ^1H NMR(300MHz, 甲醇- d_4) δ_{ppm} 1.94 (t, $J=8.20\text{Hz}$, 4H) 2.33 (t, $J=7.30\text{Hz}$, 15H) 3.94 (s, 26H) ^{13}C NMR(75MHz, 甲醇- d_4) δ_{ppm} 28.19 (s, 1C) 31.82 (s, 1C) 64.77 (s, 1C) 109.81 (s, 1C) 175.90 (s, 1C) $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_6\text{Li}^{1-}$ 低分辨率ESI-MS计算为:218.07, 发现为:224.12。

[0597] (22)

[0598] ^1H NMR(500MHz, 甲醇- d_4) δ_{ppm} 1.22 (d, $J=6.36\text{Hz}$, 6H) 1.87- 2.03 (m, 4H) 2.23- 2.34 (m, 4H) 3.55 (m, $J=5.14\text{Hz}$, 3H) 3.67 (m, $J=5.14\text{Hz}$, 3H) 4.89-5.00 (m, 2H) ^{13}C NMR(126MHz, 甲醇- d_4) δ_{ppm} 7.75 (s, 1C) 20.72 (s, 1C) 28.80 (s, 1C) 31.81 (s, 1C) 60.87 (s, 1C) 62.94 (s, 1C) 67.60 (s, 1C) 72.13 (s, 1C) 109.92 (s, 1C) 173.40 (s, 1C) 176.73 (s, 1C) $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6^{1-}$ 低分辨率ESI-MS计算为:260.12, 发现为:259.03。

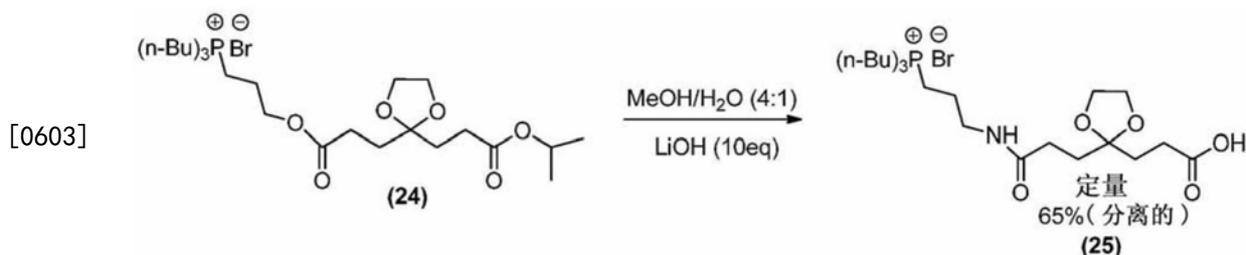


[0600] 三丁基(3-(3-(2-(3-异丙氧基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酰氨基)丙基)溴化磷(24)

[0601] 将化合物(22)(0.3g, 1.1mmol)溶剂化于1.5mL的ACN,接着是TBTU(0.39g, 1.2mmol)、2.5当量三乙胺(0.38ml)和磷离子标记(23)(0.45g, 1.2mmol)。允许搅拌此混合物4小时直到原材料(22)被完全消耗。用乙酸乙酯稀释反应混合物并用5% $\text{NaHCO}_3 \times 2$ 提取以及用盐水提取一次。干燥有机层并浓缩,然后通过柱层析(DCM:MeOH 100:0→95:5)加以纯化。分离的产量为0.54g(84%)。

[0602] ^1H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.91 (t, $J=6.74\text{Hz}$, 9H) 1.06 (d, $J=6.45\text{Hz}$, 6H) 1.25 (s, 6H) 1.38-1.59 (m, 11H) 1.80-1.95 (m, 7H) 2.15- 2.30 (m, 9H) 2.18 (t, $J=7.03\text{Hz}$, 8H)

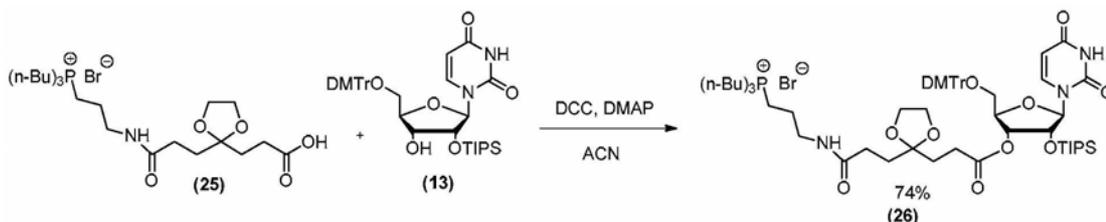
3.28-3.44 (m, 2H) 3.84 (br. s., 5H) 3.94 (s, 6H) 4.72-4.89 (m, 1H) $C_{27}H_{53}NO_6P^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为: 502.36, 发现为: 502.36。



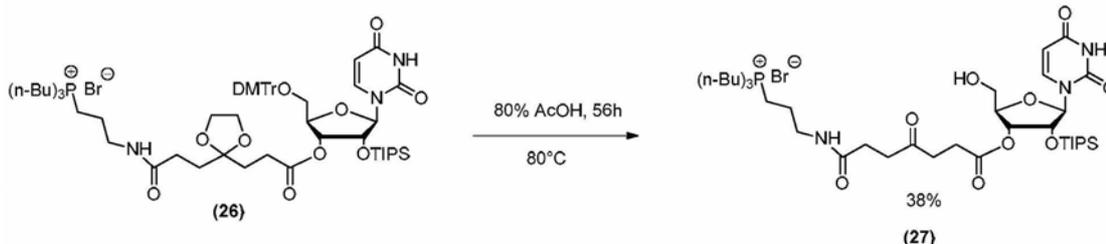
[0604] 三丁基(3-(3-(2-(3-羟基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酰氨基)丙基)溴化磷(25)

[0605] 将化合物(24) (0.25g, 0.4mmol) 溶剂化于2.5mL的MeOH, 向其添加在mL水中的10当量LiOH(0.1g, 4mmol)。允许搅拌此混合物3小时直到所有原材料被消耗。通过添加在MeOH中的1M HCl来使溶液达到中性。通过柱层析(DCM:MeOH, 具有1% AcOH, 100:0→90:10)来纯化此混合物。(25)的分离的产量为0.20g (95%)。

[0606] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.91 (t, $J=6.74\text{Hz}$, 9H) 1.25 (s, 6H) 1.38-1.59 (m, 11H) 1.96-2.05 (m, 7H) 2.15-2.30 (m, 9H) 2.40 (t, $J=7.03\text{ Hz}$, 8H) 3.28-3.44 (m, 2H) 3.84 (br. s., 5H) 3.94 (s, 6H) $C_{24}H_{47}NO_5P^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为: 460.31, 发现为: 460.30。



[0607]



[0608] 5'-DMTr-2'-TIPS-3'-[三丁基(3-(3-(2-(2-羧乙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酰氨基)丙基)溴化磷](26)

[0609] 向化合物(25) (0.2g, 0.37mmol) 在ACN(1mL)中的溶液添加 TBTU(0.19g, 0.6mmol)、三乙胺(0.5mL)和化合物(13) (0.42g, 0.6mmol)。允许搅拌得到的混合物12小时, 直到原材料(25)被完全消耗。用乙酸乙酯稀释反应混合物并用5% $\text{NaHCO}_3 \times 2$ 提取以及用盐水提取一次。干燥有机层并浓缩, 接收在最少量的DCM中, 并在100ml的MTBE中沉淀, 经 Celite[®] 过滤。(26)的分离的产量为0.20g (45%)。

[0610] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.91 (t, $J=6.74\text{Hz}$, 9H) 1.02- 1.59 (m, 38H) 1.96-2.05 (m, 7H) 2.15-2.30 (m, 9H) 2.40 (t, $J=7.03\text{Hz}$, 8 H) 3.37-3.40 (m, 4H) 3.78-3.94 (br. m, 17H) 4.15 (d, $J=2.77\text{Hz}$, 1H) 4.63 -4.67 (m, 1H) 5.31 (dd, $J=5.14, 2.96\text{Hz}$, 1H) 5.40-5.46 (m, 1H) 5.42 (s, 1 H) 5.99 (d, $J=6.32\text{Hz}$, 1H) 6.87-6.93 (m, 4H) 7.27-7.37 (m, 7H) 7.41- 7.45

(m, 2H) 7.75 (d, J=8.30Hz, 1H) $C_{63}H_{95}N_3O_{12}PSi^{+1}$ 低分辨率ESI-MS计算为:1144.64, 发现为:1144.7。

[0611] 2'-TIPS-3'-[(三丁基(3-(7-氧基-4,7-二氧庚烷酰氨基)丙基)氯化磷]尿苷(27)

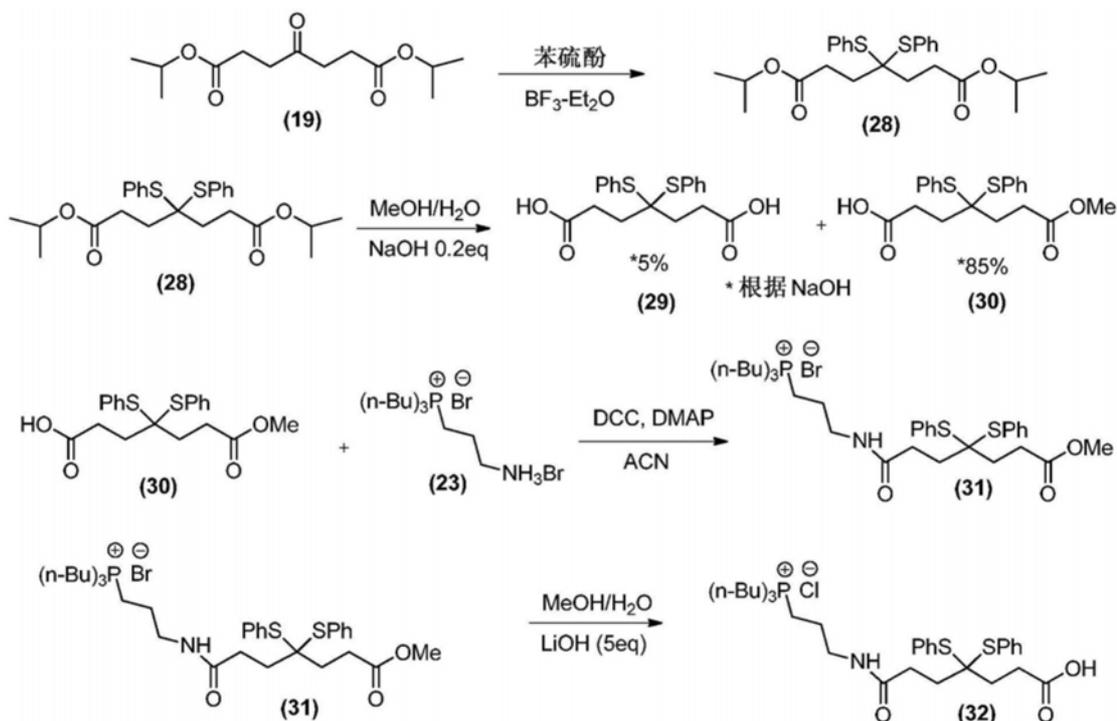
[0612] 用在水中的15ml的80%乙酸来溶剂化化合物(26) (0.228g, 0.199 mmol), 并首先允许在室温下搅拌6小时, 其显示几乎没有损失缩酮, 但完全丧失三苯甲基。然后加热反应至50°C, 时间为12小时, 其显示缩酮的约25%丧失。然后将反应放置在80°C下40小时, 其显示原材料的几乎完全消耗。用DCM稀释混合物并用3部分的饱和 $NaHCO_3$ 提取。用 $MgSO_4$ 干燥有机层并浓缩至干燥。然后将粗混合物溶剂化于最少量的DCM中并在MTBE中沉淀, 以除去三苯甲基和一些切割的TIPS。然后经 Celite© 过滤化合物并借助于DCM加以收集。然后需通过柱层析(0-15%MeOH, 在 DCM中) 来纯化得到的混合物, 从而提供中等产率(62%, 0.108g)的化合物27。

[0613] 1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.90-1.13 (m, 37H) 1.39-1.52 (m, 17H) 1.78-1.87 (m, 2H) 1.90-1.95 (m, 1H) 2.00-2.03 (m, 1H) 2.06-2.25 (m, 11H) 2.27-2.34 (m, 5H) 2.44-2.60 (m, 4H) 2.73-2.80 (m, 2H) 3.37 (d, J=5.47Hz, 1H) 3.68-3.92 (m, 3H) 4.16-4.22 (m, 1H) 4.64-4.72 (m, 1H) 5.01-5.13 (m, 1H) 5.62-5.72 (m, 1H) 5.78 (dd, J=7.62, 4.49Hz, 1 H) 8.07 (d, J=7.82Hz, 1H) 8.23 (d, J=8.21Hz, 1H) 8.70-9.11 (m, 1H)

[0614] ^{13}C NMR (101MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 12.05 (s, 1C) 12.16 (s, 1C) 13.37 (s, 1C) 17.66 (s, 1C) 17.67 (s, 1C) 17.75 (s, 1C) 17.77 (s, 1C) 17.79 (s, 1C) 17.85 (s, 1C) 18.25 (s, 1C) 18.73 (s, 1C) 21.25 (s, 1C) 23.44 (s, 1C) 23.50 (s, 1C) 23.55 (s, 1C) 23.80 (s, 1C) 23.94 (s, 1C) 125.81 (s, 1C) 128.58 (s, 1C) 139.39 (s, 1C) 143.40 (s, 1C) 183.06 (s, 1C) 207.78 (s, 1C)

[0615] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 33.29 (s, 1P) 33.36 (s, 1P) 33.42 (s, 1P) 33.51 (s, 1P) 33.72 (s, 1P) 33.78 (s, 1P)

[0616] $C_{40}H_{73}N_3O_9PSi^{+1}$ 低分辨率ESI-MS计算为:798.48, 发现为:798.51



[0617]

[0618] 4,4'-二(苯硫基)庚二酸二异丙酯 (28)

[0619] 将化合物 (19) (4.69g, 18.1mmol) 溶剂化于 36.3mL 的 DCM (0.5M), 接着是 4.83mL, 2.6 当量苯硫酚 (5.203g, 47.2mmol)。在冰浴中将此混合物冷却至 0°C , 然后加以处理, 在搅拌下滴加 5.75mL 三氟化硼醚合物 ($\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{Et})_2$) (6.44g, 45.4mmol)。搅拌此混合物并允许慢慢地升温至室温过夜。在 10 小时以后, 将混合物冷却至 0°C 并将浓 NaHCO_3 小心地加入溶液, 从而骤冷三氟化硼, 接着 DCM 以进行稀释。用饱和碳酸氢钠提取混合物 $\times 3$, 用 MgSO_4 干燥, 浓缩至干燥。通过柱层析 (0 \rightarrow 20% 己烷: 乙酸乙酯), 化合物纯化自过量苯硫酚, 从而产生定量转化。

[0620] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.21 (d, $J=6.64\text{Hz}$, 12H) 1.78- 2.03 (m, 4H) 2.58- 2.84 (m, 4H) 4.96 (dt, $J=12.60, 6.40\text{Hz}$, 2H) 7.30-7.45 (m, 6H) 7.62 (d, $J=6.64\text{Hz}$, 4H)

[0621] ^{13}C NMR (101MHz, 氯仿-d) δ ppm 21.82 (s, 1C) 30.20 (s, 1C) 32.87 (s, 1C) 67.80 (s, 1C) 128.80 (s, 1C) 129.38 (s, 1C) 130.55 (s, 1C) 136.83 (s, 1C) 172.42 (s, 1C)

[0622] $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{S}_2$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 460.17, 发现为: 483.23。

[0623] 4,4'-二(苯硫基)庚二酸 (29) 和 7-异丙氧基-7-氧代-4,4'-二(苯硫基)庚酸 (30)

[0624] 将化合物 28 (6.43g, 14.0mmol) 溶剂化于甲醇: 水 (4:1, 200ml) 并在冰浴中冷却至 0°C 。将 0.2 当量 NaOH (0.11g, 2.8mmol) 溶剂化于 10mL 的 H_2O 并逐滴加入上述溶液。允许此混合物反应 12 小时, 然后浓缩以除去显著量的甲醇, 然后添加 1M HCl , 接着乙酸乙酯, 并用 1M HCl 提取 $\times 2$ 。用 MgSO_4 干燥有机层, 浓缩至干燥, 从而产生化合物的非常复杂的混合物。在通过柱层析 (0 \rightarrow 30% 己烷: 乙酸乙酯, 具有 1% AcOH) 纯化每个斑点以后, 确定了, 并没有除去所有甲醇和所有 HCl , 这是因为在结束时没有进行任何盐水洗涤, 并观测到异丙酯到甲酯的显著的酯交换。在这种扩大过程中单酯产物 (30) 被完全转化成甲酯产物 (产率为 85%)。

[0625] (29)

[0626] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 1.45-2.01 (m, 4H) 2.50-2.64 (m, 4H) 7.35-7.49 (m,

6H) 7.52-7.65 (m, 4H) 12.19 (s, 2H)

[0627] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ_{ppm} 29.62 (s, 1C) 32.78 (s, 1C) 38.81 (s, 1C) 68.19 (s, 1C) 129.54 (s, 1C) 130.05 (s, 1C) 130.44 (s, 1C) 136.77 (s, 1C) 174.01 (s, 1C) 178.31 (s, 1C)

[0628] $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{S}_2$ 低分辨率ESI-MS计算为:376.08, 发现为:399.21

[0629] (30)

[0630] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 1.82-2.04 (m, 4H) 2.64-2.84 (m, 4H) 3.65 (s, 3H) 7.28-7.45 (m, 6H) 7.54-7.67 (m, 4H)

[0631] ^{13}C NMR (101MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 29.61 (s, 1C) 29.70 (s, 1C) 32.65 (s, 1C) 32.93 (s, 1C) 51.86 (s, 1C) 66.90 (s, 1C) 128.96 (s, 1C) 129.54 (s, 1C) 130.30 (s, 1C) 136.75 (s, 1C) 173.46 (s, 1C) 179.34 (s, 1C) 183.06 (s, 1C)

[0632] $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}_2$ 低分辨率ESI-MS计算为:390.1, 发现为:413.12

[0633] 三丁基(3-(7-甲氧基-7-氧代-4,4-二(苯硫基)庚烷酰氨基)丙基)溴化磷(31)

[0634] 将化合物(30) (0.5g, 1.28mmol)、1.5当量DCC (0.396g, 1.92mmol) 溶剂化于5mL的ACN。将1.15当量的磷标记(23) (0.62g, 1.47mmol) 溶剂化于2mL无水吡啶并直接加入上述溶液, 接着催化量的DMAP。允许搅拌反应6小时直至反应完全(通过MS)。将反应接收于乙酸乙酯中并用氯化铵提取 $\times 2$ 以及用盐水提取一次。用硫酸镁干燥有机层并浓缩至干燥。通过柱层析来纯化混合物以除去过量标记(0 \rightarrow 15%MeOH:DCM)并在此过程中在柱上丢失显著量的物质, 从而产生63%, 0.54g。

[0635] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.85-1.05 (m, 9H) 1.36-1.63 (m, 13H) 1.80-2.04 (m, 7H) 2.17-2.35 (m, 6H) 2.58-2.81 (m, 6H) 3.30-3.46 (m, 2H) 3.60 (s, 3H) 7.28-7.40 (m, 6H) 7.59-7.76 (m, 4H) 8.51 (t, $J=5.27\text{Hz}$, 1H)

[0636] ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 13.44 (s, 1C) 13.46 (s, 1C) 16.92 (s, 1C) 17.57 (s, 1C) 18.59 (s, 1C) 19.22 (s, 1C) 21.27 (s, 1C) 21.33 (s, 1C) 23.63 (s, 1C) 23.69 (s, 1C) 23.88 (s, 1C) 24.08 (s, 1C) 29.66 (s, 1C) 30.95 (s, 1C) 31.33 (s, 1C) 32.82 (s, 1C) 33.40 (s, 1C) 39.16 (s, 1C) 39.36 (s, 1C) 51.62 (s, 1C) 67.92 (s, 1C) 128.75 (s, 1C) 129.14 (s, 1C) 130.82 (s, 1C) 136.91 (s, 1C) 173.24 (s, 1C) 173.57 (s, 1C)

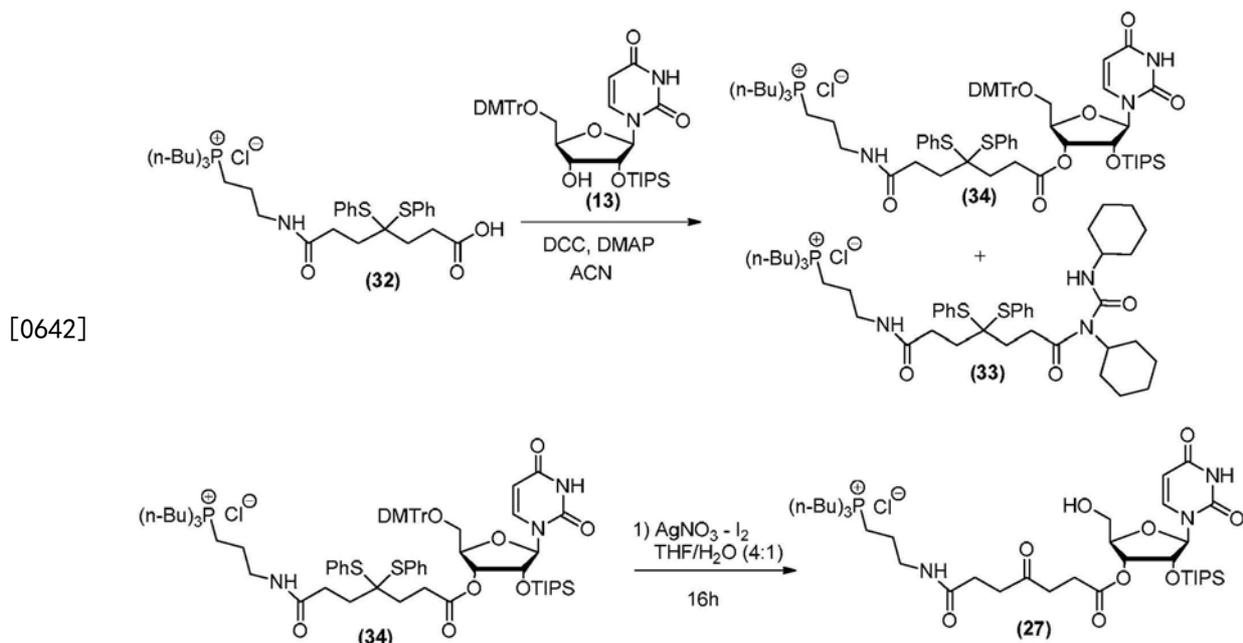
[0637] $\text{C}_{35}\text{H}_{55}\text{NO}_3\text{PS}_2^+$ 低分辨率ESI-MS计算为:632.92, 发现为:632.91

[0638] 三丁基(3-(6-羧基-4,4-二(苯硫基)己酰氨基)丙基)氯化磷(32)

[0639] 将化合物(31) (0.5g, 0.75mmol) 溶剂化于8mL的MeOH, 向其添加在2mL水中的5当量NaOH (0.15g, 3.7mmol)。允许搅拌此混合物3小时直到所有原材料被消耗。通过添加1M HCl来使溶液达到中性。通过HCl提取, 接着盐水提取 $\times 3$ 来纯化此混合物, 干燥并浓缩。定量回收。

[0640] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.98 (t, $J=6.59\text{Hz}$, 9H) 1.52 (br. s., 13H) 1.88 (d, $J=9.67\text{Hz}$, 3H) 2.01 (d, $J=4.10\text{Hz}$, 4H) 2.08-2.25 (m, 7H) 2.49-2.64 (m, 4H) 2.68 (t, $J=6.59\text{Hz}$, 2H) 3.39 (d, $J=4.40\text{Hz}$, 2H) 7.12-7.21 (m, 3H) 7.30-7.41 (m, 6H) 7.65-7.79 (m, 4H) 8.00 (br. s., 1H)

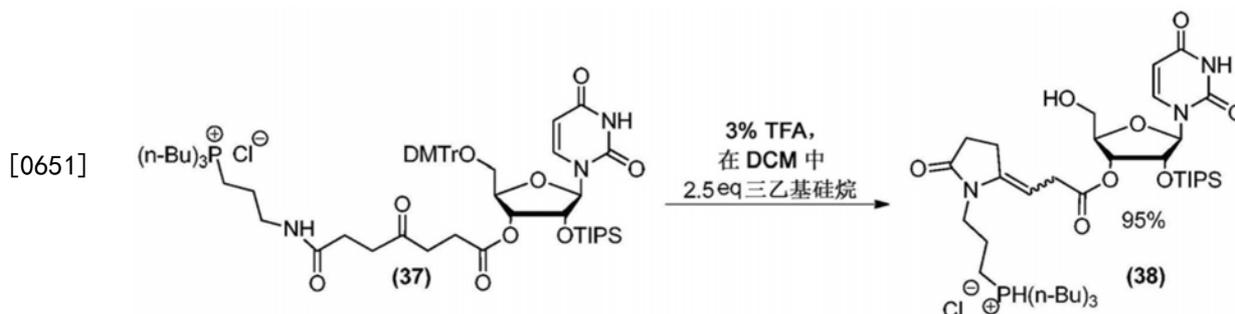
[0641] $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{NO}_3\text{PS}_2^+$ 低分辨率ESI-MS计算为:618.32, 发现为:618.32



(27)

[0649] 将化合物 (34) (0.51g, 0.38mmol) 溶剂化于3.8ml的THF:水8:2混合物, 向其添加1.5当量硝酸银 (96mg, 0.57mmol)。形成混浊的白色沉淀物。然后添加分子碘 (48mg, 0.38mmol)。允许搅拌此混合物16小时直到所有原材料被消耗。然后, 经Celite[®], 自沉淀的银碘过滤样品并用ACN洗涤。然后浓缩样品, 再悬浮在DCM中, 并在MTBE中沉淀, 从而产生纯化化合物 (27), 产率为91%。

[0650] -关于NMR数据, 参见 (27) 的先前合成。

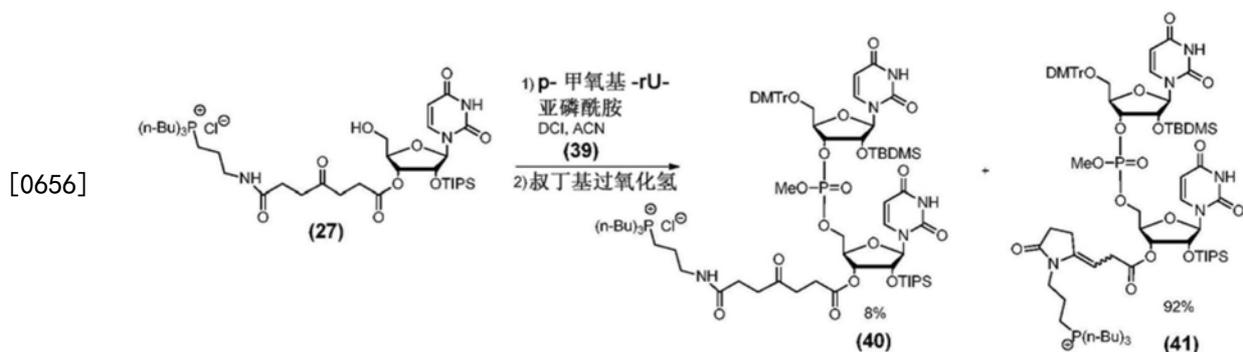


[0652] 将化合物 (37) (0.12g, 0.105mmol) 溶剂化/与10mL的在DCM中的3% TFA溶液直接反应, 接着2.5当量的三乙基硅烷, 以骤冷三苯甲基阳离子。在添加4mL甲醇以前允许搅拌此反应10分钟, 以进一步骤冷三苯甲基阳离子。这以后是20mL甲苯, 然后浓缩混合物至干燥, 接收在DCM中并在MTBE中沉淀, 从而产生产率为95%的化合物 (38) (62mg, 0.1mmol)。

[0653] ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δppm 0.78-1.14 (m, 43H) 1.47 (br. s., 18H) 1.66-1.94 (m, 3H) 1.97-2.86 (m, 20H) 2.99-3.23 (m, 1H) 3.34 (br. s., 1H) 3.52-4.01 (m, 3H) 4.16 (br. s., 1H) 4.60-4.80 (m, 1H) 4.93 (br. s., 1H) 5.04-5.24 (m, 1H) 5.72 (br. s., 2H) 7.70 (d, J=7.91Hz, 1H) 7.96-8.28 (m, 2H) 9.20 (br. s., 1H)

[0654] ¹³C NMR (75MHz, 氯仿-d) δppm 12.01 (s, 1C) 12.03 (s, 1C) 12.42 (s, 1C) 13.24 (s, 1C) 16.69 (s, 1C) 17.58 (s, 1C) 17.68 (s, 1C) 17.70 (s, 1C) 18.06 (s, 1C) 18.14 (s, 1C) 18.69 (s, 1C) 18.78 (s, 1C) 21.32 (s, 1C) 23.27 (s, 1C) 23.33 (s, 1C) 23.71 (s, 1C) 23.91 (s, 1C) 26.89 (s, 1C) 28.18 (s, 1C) 28.44 (s, 1C) 29.49 (s, 1C) 32.14 (s, 1C) 36.84 (s, 1C) 37.34 (s, 1C) 61.24 (s, 1C) 73.45 (s, 1C) 73.66 (s, 1C) 74.04 (s, 1C) 83.52 (s, 1C) 88.78 (s, 1C) 89.46 (s, 1C) 92.69 (s, 1C) 102.60 (s, 1C) 114.66 (s, 1C) 118.55 (s, 1C) 125.79 (s, 1C) 127.98 (s, 1C) 128.61 (s, 1C) 133.49 (s, 1C) 133.90 (s, 1C) 141.68 (s, 1C) 141.79 (s, 1C) 150.96 (s, 1C) 163.71 (s, 1C) 163.83 (s, 1C) 170.93 (s, 1C) 171.95 (s, 1C) 172.99 (s, 1C) 176.18 (s, 1C) 207.81 (s, 1C)

[0655] C₄₀H₇₁N₃O₈PSi+低分辨率ESI-MS计算为:780.47, 发现为:780.58

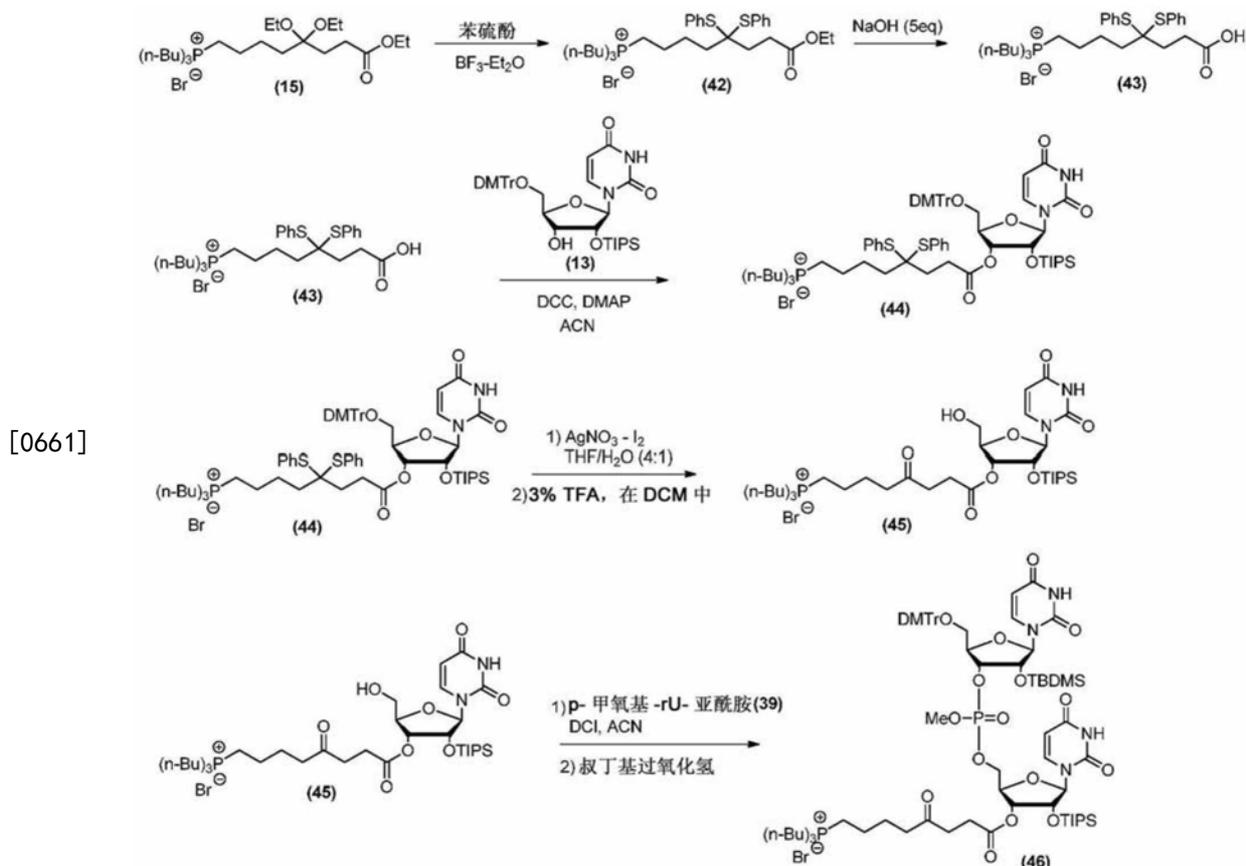


[0657] 化合物41和42混合物

[0658] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.07-0.16 (m, 8H) 0.83-1.05 (m, 62H) 1.09-1.28 (m, 9H) 1.33 (d, $J=6.15\text{Hz}$, 18H) 1.47 (br. s., 20H) 1.91 (br. s., 4H) 2.14 (br. s., 11H) 2.21-2.38 (m, 6H) 2.52 (br. s., 2H) 2.64 (br. s., 2H) 3.14 (br. s., 1H) 3.21 (s, 1H) 3.27-3.41 (m, 4H) 3.48 (d, $J=7.91\text{ Hz}$, 3H) 3.66 (s, 3H) 3.62 (s, 3H) 3.78 (d, $J=5.57\text{Hz}$, 12H) 3.89 (s, 2H) 4.17-4.35 (m, 4H) 4.50 (br. s., 3H) 4.89 (br. s., 1H) 5.13-5.24 (m, 2H) 5.92-6.03 (m, 2H) 6.77-6.87 (m, 6H) 7.13-7.36 (m, 26H) 7.51 (d, $J=7.91\text{ Hz}$, 1H) 7.69-7.74 (m, 2H) 7.80-7.88 (m, 2H)

[0659] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm -0.91 (s, 1P) -0.36 (s, 1P) 33.91 (s, 1P) 33.96 (s, 1P)

[0660] $\text{C}_{77}\text{H}_{116}\text{N}_5\text{O}_{18}\text{P}_2\text{Si}_2$ +低分辨率ESI-MS计算为:1516.73,发现为:1516.62



[0662] 三丁基(8-乙氧基-8-氧代-5,5-二(苯硫基)辛基)溴化磷(42)

[0663] 用6mL的DCM来溶剂化化合物(15) (0.82g, 1.51mmol) 和3当量苯硫酚(0.38mL,

3.0mmol),并在冰浴中冷却至0℃。然后经10分钟滴加三氟化硼醚合物(0.46mL,4.53mmol)。允许在0℃下搅拌混合物30分钟,然后允许慢慢地升温至室温,时间为4小时。然后再次将混合物冷却至0℃并用饱和碳酸氢钠来骤冷,然后用DCM提取×3。合并有机层,干燥,并浓缩至干燥。然后通过层析(0→5%DCM-MeOH)来纯化混合物,从而提供良好产率(93%)的纯(42)。

[0664] ^1H NMR(400MHz,氯仿-d) δ_{ppm} 0.96(t, $J=7.03\text{Hz}$, 9H) 1.19- 1.28(m, 3H) 1.33-1.60(m, 17H) 1.73-1.85(m, 2H) 1.87-1.98(m, 2H) 2.26-2.38(m, 2H) 2.39-2.52(m, 7H) 2.63-2.75(m, 2H) 4.09(q, $J=7.29\text{Hz}$, 2H) 7.24-7.28(m, 2H) 7.30-7.42(m, 5H) 7.63(dd, $J=7.42$, 1.95Hz, 3 H)

[0665] ^{13}C NMR(101MHz,氯仿-d) δ_{ppm} 13.44(s, 1C) 14.10(s, 1C) 18.59(s, 1C) 19.06(s, 1C) 23.68(s, 1C) 23.73(s, 1C) 23.79(s, 1C) 23.94(s, 1C) 29.77(s, 1C) 32.86(s, 1C) 36.85(s, 1C) 60.46(s, 1C) 67.75(s, 1C) 128.77(s, 1C) 129.04(s, 1C) 129.23(s, 1C) 130.77(s, 1C) 136.42(s, 1C) 172.75(s, 1C)

[0666] 三丁基(7-羧基-5,5-二(苯硫基)庚基)溴化磷(43)

[0667] 用5mL的甲醇:水的4:1混合物来溶剂化化合物(42)(0.75g,1.2mmol)并加入5当量NaOH(0.24g,6mmol),然后允许搅拌2小时。用饱和碳酸氢钠来骤冷反应,然后浓缩以除去甲醇。然后将混合物接收在乙酸乙酯中,用1M HCl提取一次并用盐水提取三次。用硫酸镁干燥有机层并浓缩至干燥,从而产生几乎定量产率的化合物(43)。

[0668] ^1H NMR(400MHz,氯仿-d) δ_{ppm} 0.85-1.05(m, 9H) 1.19-1.42(m, 4H) 1.45(br. s., 11H) 1.58(br. s., 2H) 1.75(br. s., 2H) 1.94(t, $J=7.23\text{Hz}$, 2H) 2.02(d, $J=1.17\text{Hz}$, 1H) 2.11-2.27(m, 8H) 2.75(t, $J=7.42\text{Hz}$, 2H) 7.18-7.37(m, 7H) 7.65(d, $J=7.82\text{Hz}$, 4H)

[0669] ^{13}C NMR(75MHz,氯仿-d) δ_{ppm} 13.41(s, 1C) 18.19(s, 1C) 18.82(s, 1C) 23.44(s, 1C) 23.50(s, 1C) 23.74(s, 1C) 23.93(s, 1C) 68.37(s, 1C) 76.81(s, 1C) 77.24(s, 1C) 77.66(s, 1C) 128.77(s, 1C) 129.15(s, 1C) 131.08(s, 1C) 136.38(s, 1C) 174.83(s, 1C)

[0670] 5'-DMTr-2'-TIPS-3'-[三丁基(7-氧基-5,5-二(苯硫基)庚基)溴化磷]尿苷(44)

[0671] 将化合物(43)(0.59g,0.99mmol)和1.5当量DCC(0.30g,1.48mmol)溶剂化于9.5mL的ACN中。向上述溶液添加1.5当量核苷(13)(1.03g,1.48mmol),接着亚化学计量的量的DMAP。允许搅拌反应6小时直到所有原材料被消耗(通过MS加以监测)。用乙酸乙酯稀释样品并用氯化铵提取×2以及用盐水提取一次。用硫酸镁干燥有机层并浓缩至干燥。然后在MTBE-己烷50:50中沉淀混合物以除去任何未反应的DCC,然后通过柱层析(0→10% MeOH-DCM)加以纯化,从而提供产率为83%的化合物(44)(1.05g,0.82mmol)。

[0672] ^1H NMR(400MHz,氯仿-d) δ_{ppm} 0.94-1.18(m, 39H) 1.32-1.60(m, 23H) 1.64-1.72(m, 3H) 1.74-1.84(m, 3H) 1.90-2.17(m, 15H) 2.76-2.84(m, 2H) 3.42-3.51(m, 3H) 3.79(d, $J=0.78\text{Hz}$, 7H) 4.10-4.15(m, 2H) 4.67-4.71(m, 1H) 5.26-5.30(m, 1H) 5.40(dd, $J=5.08$, 2.74Hz, 1H) 6.10(d, $J=6.25\text{Hz}$, 1H) 6.81-6.85(m, 5H) 7.21-7.38(m, 23H) 7.60-7.68(m, 5H) 7.88(d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.61(s, 1H)

[0673] ^{13}C NMR(75MHz,氯仿-d) δ_{ppm} 12.13(s, 1C) 13.38(s, 1C) 17.68(s, 1C) 17.85(s, 1C) 18.01(s, 1C) 18.64(s, 1C) 23.45(s, 1C) 23.52(s, 1C) 23.76(s, 1C) 23.96(s, 1C) 25.02(s, 1C) 25.65(s, 1C) 33.86(s, 1C) 55.27(s, 1C) 67.41(s, 1C) 76.69(s, 1C) 77.11(s, 1C) 77.53(s, 1C) 87.57(s, 1C) 113.33(s, 1C) 113.36(s, 1C) 128.05(s, 1C) 129.00(s, 1C) 129.43(s,

1C) 130.02 (s, 1C) 130.15 (s, 1C) 130.71 (s, 1C) 130.74 (s, 1C) 134.75 (s, 1C) 134.93 (s, 1C) 136.52 (s, 1C) 144.09 (s, 1C) 150.66 (s, 1C) 158.74 (s, 1C) 158.78 (s, 1C) 163.29 (s, 1C) 172.20 (s, 1C)

[0674] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 32.73 (s, 1P)

[0675] 2'-TIPS-3'-[三丁基(7-氧基-5,5-二(苯硫基)庚基)溴化磷]尿苷(45)

[0676] 将化合物(44) (0.76g, 0.59mmol) 溶剂化于8ml的THF:水8:2混合物中, 向其添加1.5当量硝酸银(150mg, 0.89mmol)。形成混浊的白色沉淀物。然后添加分子碘(75mg, 0.59mmol)。允许搅拌此混合物16小时直到所有原材料被消耗。然后经 Celite[®] 自沉淀的银碘过滤样品并用ACN洗涤。然后浓缩样品, 重悬浮在DCM中, 并在MTBE中沉淀, 从而产生率为70%的纯化合物(45), 0.326g。

[0677] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.91-1.10 (m, 11H) 1.44-1.57 (m, 5H) 1.63 (dd, J=15.90, 8.07Hz, 1H) 1.78 (dd, J=14.06, 6.97Hz, 1H) 2.29-2.40 (m, 3H) 2.41-2.53 (m, 1H) 2.56-2.85 (m, 3H) 3.76-3.92 (m, 1 H) 3.98 (s, 1H) 4.11-4.19 (m, 1H) 4.70-4.78 (m, 1H) 5.18 (dd, J=4.89, 3.42Hz, 1H) 5.75 (d, J=8.07Hz, 1H) 5.81 (d, J=5.62Hz, 1H) 8.00 (d, J=8.31Hz, 1H) 8.67 (br. s., 1H)

[0678] ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 11.93 (s, 1C) 11.96 (s, 1C) 11.98 (s, 1C) 13.37 (s, 1C) 17.50 (s, 1C) 17.52 (s, 1C) 17.54 (s, 1C) 17.57 (s, 1C) 17.58 (s, 1C) 17.60 (s, 1C) 17.62 (s, 1C) 17.65 (s, 1C) 17.66 (s, 1C) 17.67 (s, 1C) 17.69 (s, 1C) 17.71 (s, 1C) 17.72 (s, 1C) 17.78 (s, 1C) 17.80 (s, 1C) 18.59 (s, 1C) 18.77 (s, 1C) 18.97 (s, 1C) 19.15 (s, 1C) 20.80 (s, 1C) 20.84 (s, 1C) 23.54 (s, 1C) 23.57 (s, 1C) 23.77 (s, 1C) 23.88 (s, 1C) 24.35 (s, 1C) 24.47 (s, 1C) 28.00 (s, 1C) 30.88 (s, 1C) 36.93 (s, 1C) 41.11 (s, 1C) 61.25 (s, 1C) 73.72 (s, 1C) 73.96 (s, 1C) 83.72 (s, 1C) 88.91 (s, 1C) 102.72 (s, 1C) 141.92 (s, 1C) 150.83 (s, 1C) 163.77 (s, 1C) 171.98 (s, 1C) 208.11 (s, 1C)

[0679] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 33.08 (s, 1P)

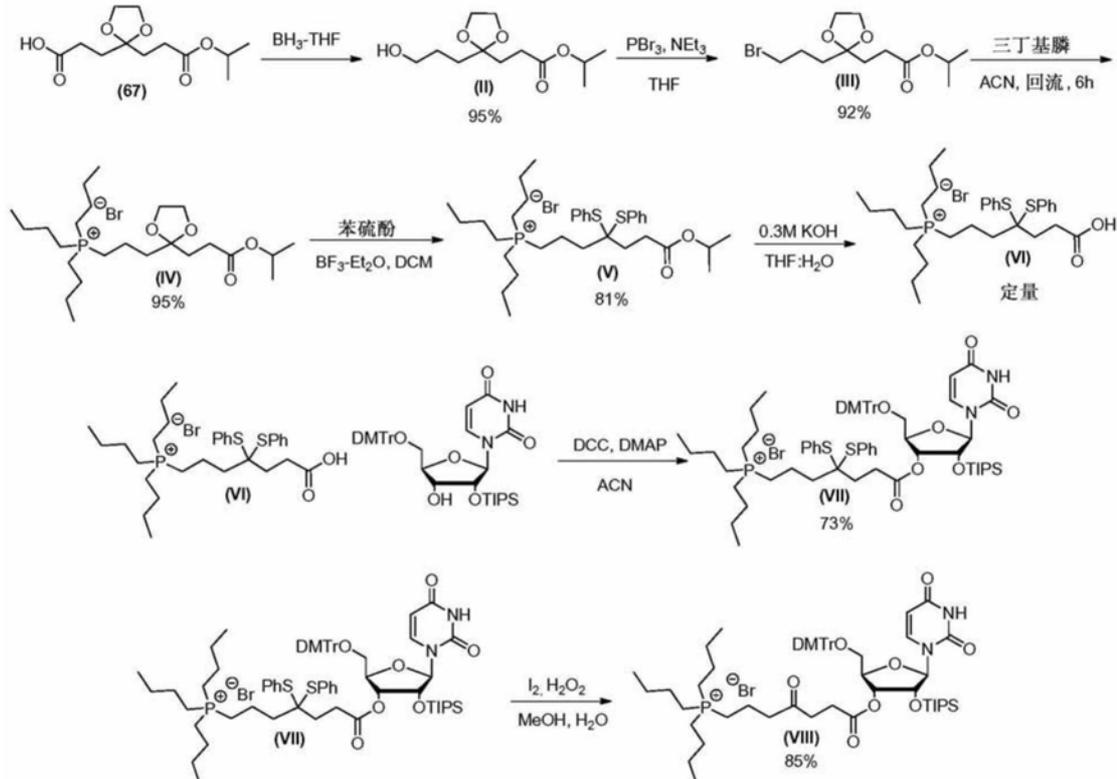
[0680] [5'-DMTr-2' TBDMS-尿苷]-[3'-p(OMe)-5']-[2'-TIPS-3'-(三丁基(7-氧基-, 5-二(苯硫基)庚基)溴化磷)-尿苷(46)

[0681] 将化合物(45) (0.326g, 0.42mmol) 溶剂化于4.2mL无水ACN中。向此混合物添加1.5当量亚磷酰胺(39) (0.52g, 0.63mmol) 和1.6当量DCI (82 mg, 0.69mmol)。在室温下搅拌此混合物6小时, 此时, MS显示原材料的完全消耗。然后将0.5mL叔丁醇加入混合物以与过量亚磷酰胺起反应并使得它更加可溶于MTBE混合物。然后将混合物沉淀进入MTBE:己烷 50:50, 以除去过量亚磷酰胺和丁醇。将固体沉淀物溶剂化于DCM中并用0.5mL的在癸烷中的叔丁基过氧化氢(5M)加以处理, 以氧化核苷酸间磷酸酯。然后将混合物沉淀进入MTBE以除去过量过氧化物、癸烷、DCI、和可能保留的残余亚磷酰胺。这提供产率为96%的纯(46)。

[0682] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} -0.05-0.20 (m, 7H) 0.86 (s, 15 H) 0.89-1.02 (m, 35H) 1.10-1.29 (m, 8H) 1.35 (d, J=6.15Hz, 16H) 1.48 (br. s., 16H) 1.74 (br. s., 2H) 2.19 (br. s., 10H) 2.60 (d, J=14.07Hz, 4H) 2.66-2.77 (m, 1H) 3.20 (s, 1H) 3.27-3.41 (m, 3H) 3.46 (br. s., 2H) 3.52-3.71 (m, 2H) 3.71-3.80 (m, 7H) 3.89 (s, 1H) 4.05 (br. s., 1H) 4.13 (br. s., 1H) 4.43-4.56 (m, 2H) 5.06-5.22 (m, 2H) 5.60-5.77 (m, 1H) 5.82-6.05 (m, 2 H) 6.76-6.87 (m, 5H) 7.17-7.38 (m, 16H) 7.41-7.58 (m, 2H) 7.72-7.98 (m, 2H)

[0683] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} -1.07 (s, 1P) -0.30 (s, 1P) 33.31 (s, 1P) 33.35 (s, 1P)

[0684] $\text{C}_{75}\text{H}_{115}\text{N}_4\text{O}_{18}\text{P}_2\text{Si}_2$ +低分辨率ESI-MS计算为:1477.72,发现为: 1477.62。



[0686] 3-(2-(3-羟基丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酸异丙酯 (II)。

[0687] 将化合物 (67) (0.334g, 1.35mmol) 溶解于13.5mL以形成0.1M溶液。将此混合物冷却至0°C并滴加在THF中的1M硼烷 (1.75mL, 1.75mmol)。在氢气的剧烈释放减退以后,除去冰浴,并允许搅拌反应2小时直至反应完全,如TLC所示。通过首先冷却溶液回降到0°C并缓慢添加甲醇直到氢气释放减退 (subside),来骤冷混合物。然后浓缩粗反应混合物至干燥,再一次接收在甲醇中并再次浓缩以确保除去硼酸三甲酯。通过柱层析 (100%己烷至50:50己烷:乙酸乙酯)来纯化混合物,从而产生纯伯羟基 (95%, 0.315g)。

[0688] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 1.11 (d, $J=6.11\text{Hz}$, 6H) 1.46-1.68 (m, 6H) 1.82-1.94 (m, 3H) 2.17-2.32 (m, 3H) 3.43-3.61 (m, 2H) 3.84 (s, 4H) 4.88 (dt, $J=12.53, 6.33\text{Hz}$, 1H)

[0689] ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 21.67 (s, 1C) 26.85 (s, 1C) 29.14 (s, 1C) 29.69 (s, 1C) 31.90 (s, 1C) 33.68 (s, 1C) 62.46 (s, 1C) 64.91 (s, 1C) 67.52 (s, 1C) 110.69 (s, 1C) 173.07 (s, 1C)

[0690] 3-(2-(3-溴丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙酸异丙酯 (III)

[0691] 将化合物 (II) (0.32g, 1.58mmol) 溶解于10mL的DCM和2mL的三乙胺,并在冰浴中冷却至0°。向此溶液,经10分钟,滴加 PBr_3 (0.225mL, 2.37 mmol)并允许在零摄氏度下搅拌1小时直至反应完全 (通过TLC)。用饱和碳酸氢钠骤冷反应,用乙酸乙酯稀释并用盐水提取两次。干燥有机层,浓缩,然后通过短硅胶塞 (short silica plug)并借助于70:30己烷:乙酸乙酯加以纯化,以产生0.45g, 1.455mmol的化合物 (III)。

[0692] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ = 5.01-4.87 (m, 1H), 3.97-3.82 (m, 4 H), 3.36 (t, J = 6.7Hz, 2H), 2.33-2.20 (m, 2H), 1.96-1.82 (m, 4H), 1.73- 1.64 (m, 2H), 1.16 (d, J = 6.4Hz, 6H)

[0693] ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ ppm 21.75 (s, 1C) 27.20 (s, 1C) 29.12 (s, 1C) 32.11 (s, 1C) 33.85 (s, 1C) 35.69 (s, 1C) 64.95-65.08 (s, 1C) 67.47 (s, 1C) 110.26 (s, 1C) 172.81 (s, 1C)

[0694] 三丁基(3-(2-(3-异丙氧基-3-氧代丙基)-1,3-二氧戊环-2-基)丙基)溴化磷(IV)

[0695] 用4mL的CAN来溶解化合物(III) (0.33g, 1.06mmol)。向此混合物直接添加三丁基磷(0.53ml, 2.12mmol)并加热至80℃。允许对其搅拌6小时。浓缩混合物并用丙酮稀释,然后研碎进入250mL己烷。过滤沉淀物并丢弃己烷。再一次重复此过程并且产生的粘性物是具有几乎定量产率的纯的离子标记化合物(IV) (0.54g, 1.05mmol)。

[0696] ^1H NMR (氯仿-d, 200MHz): δ = 4.91 (quin, J = 6.3Hz, 1H), 3.97-3.82 (s, 4H), 2.56-2.72 (m, 2H), 2.23-2.55 (m, 10H), 1.66-1.99 (m, 6H), 1.35 -1.61 (m, 16H), 1.08-1.26 (m, 7H), 0.80-1.02ppm (m, 12H)

[0697] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm 32.96 (s, 82P)

[0698] 三丁基(7-异丙氧基-7-氧代-4,4-二(苯硫基)庚基)溴化磷(V)

[0699] 将化合物(IV) (0.156g, 0.30mmol) 溶解于8mL无水DCM和5当量苯硫酚(0.193mL, 1.52mmol), 接着5当量三氟化硼醚合物(0.157mL, 1.52 mmol)和大约1克粉碎的3Å分子筛。搅拌此混合物12小时, 此时, 经 Celite® 来过滤反应以除去分子筛。在收集烧瓶中是40mL的饱和碳酸氢钠。将双相混合物转移到分液漏斗(seperatory funnel)并用碳酸氢盐提取三次以及用盐水提取一次。干燥有机层并浓缩, 通过在己烷/MTBE 75:25中的沉淀来纯化产生的油, 从而导致回收产率为81%的纯化合物(V) (0.162 g, 0.24mmol)。

[0700] ^1H NMR (200MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.80-1.02 (m, 12H) 1.08-1.26 (m, 7H) 1.35-1.61 (m, 16H) 1.66-1.99 (m, 6H) 2.23-2.55 (m, 10H) 2.56- 2.72 (m, 2H) 4.91 (quin, J = 6.25Hz, 1H) 7.30-7.43 (m, 5H) 7.52-7.62 (m, 4H)

[0701] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm 33.29 (s, 1P)

[0702] 三丁基(6-羧基-4,4-二(苯硫基)己基)溴化磷(VI)

[0703] 将化合物(V) (0.75g, 1.19mmol) 首先溶解于3mL的THF, 然后用30 mL的在水: THF 50:50中的KOH的0.2M溶液加以处理。允许剧烈搅拌混合物1小时, 直到水解完成(通过TLC)。通过添加20mL的1M HCl和过量的NaCl来酸化混合物。用乙酸乙酯稀释有机层并用盐水提取三次, 干燥并浓缩至干燥。这提供具有定量产率的纯标记酸(VI)。

[0704] ^1H NMR 400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.82-1.02 (m, 9H) 1.28-1.51 (m, 12H) 1.58 (br. s., 2H) 1.75 (br. s., 2H) 1.94 (t, J = 7.23Hz, 2H) 2.10-2.32 (m, 8H) 2.75 (t, J = 7.42Hz, 2H) 7.27-7.37 (m, 6H) 7.65 (d, J = 7.82Hz, 4H)

[0705] ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ ppm 13.41 (s, 1C) 18.19 (s, 1C) 18.82 (s, 1C) 21.44 (s, 1C) 23.44 (s, 1C) 23.50 (s, 1C) 23.74 (s, 1C) 23.93 (s, 1C) 30.10 (s, 1C) 32.76 (s, 1C) 36.32 (s, 1C) 68.37 (s, 1C) 128.76 (s, 1C) 129.14 (s, 1C) 131.08 (s, 1C) 136.38 (s, 1C) 174.83 (s, 1C)

[0706] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm 32.89 (s, 1P)

[0707] 5'-DMTr-2'-TIPS-3'-[三丁基(7-氧基-4,4-二(苯硫基)己基)溴化磷]尿苷

(VII)

[0708] 将化合物(VI) (0.294g, 0.49mmol) 和1.5当量DCC (0.14g, 0.76mmol) 溶解于9.5mL的ACN中。向上述溶液, 添加1.5当量核苷(13) (0.54g, 0.76 mmol), 接着亚化学计量的量的DMAP。允许搅拌反应6小时直到所有原材料被消耗(通过MS加以监测)。用乙酸乙酯稀释样品并用氯化铵提取×2 以及用盐水提取一次。用硫酸镁干燥有机层并浓缩至干燥。然后在MTBE- 己烷50:50中沉淀混合物以除去任何未反应的DCC, 接着通过柱层析(0.2 mL10% MeOH-DCM) 加以纯化, 从而提供产率为82%的化合物(VII) (0.48g, 0.40mmol)。

[0709] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.94-1.18 (m, 39H) 1.32-1.60 (m, 21H) 1.64-1.72 (m, 3H) 1.74-1.84 (m, 3H) 1.90-2.17 (m, 15H) 2.76- 2.84 (m, 2H) 3.42-3.51 (m, 3H) 3.79 (d, $J=0.78\text{Hz}$, 7H) 4.10-4.15 (m, 2H) 4.67-4.71 (m, 1H) 5.26-5.30 (m, 1H) 5.40 (dd, $J=5.08$, 2.74Hz, 1H) 6.10 (d, $J=6.25\text{Hz}$, 1H) 6.81-6.85 (m, 5H) 7.21-7.38 (m, 23H) 7.60-7.68 (m, 5H) 7.88 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.61 (s, 1H)

[0710] ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 12.13 (s, 1C) 13.38 (s, 1C) 17.68 (s, 1C) 17.85 (s, 1C) 18.01 (s, 1C) 18.64 (s, 1C) 23.45 (s, 1C) 23.52 (s, 1C) 23.76 (s, 1C) 23.96 (s, 1C) 25.02 (s, 1C) 25.65 (s, 1C) 33.86 (s, 1C) 55.27 (s, 1C) 67.41 (s, 1C) 76.69 (s, 1C) 77.11 (s, 1C) 77.53 (s, 1C) 87.57 (s, 1C) 113.33 (s, 1C) 113.36 (s, 1C) 128.05 (s, 1C) 129.00 (s, 1C) 129.43 (s, 1C) 130.02 (s, 1C) 130.15 (s, 1C) 130.71 (s, 1C) 130.74 (s, 1C) 134.75 (s, 1C) 134.93 (s, 1C) 136.52 (s, 1C) 144.09 (s, 1C) 150.66 (s, 1C) 158.74 (s, 1C) 158.78 (s, 1C) 163.29 (s, 1C) 172.20 (s, 1C)

[0711] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 32.73 (s, 1P)

[0712] 低分辨率MS, m/z 计算为: 1231.6, 发现为: 1231.5

[0713] 2'-TIPS-3'-[三丁基(6-氧基-4-氧代己基) 溴化磷] 尿苷(VIII)

[0714] 将化合物(VII) (1.44g, 1.1mmol) 溶解于10ml的MeOH: 水8:2混合物, 向其添加20mol% 分子碘(0.06g, 0.22mmol)。紧接着是4当量的30%过氧化氢(0.5mL, 4.4mmol)。允许搅拌此混合物2小时直到所有原材料被消耗。用乙酸乙酯首先稀释此混合物, 然后通过用硫代亚硫酸钠的10%溶液提取, 接着用盐水提取三次来加以骤冷。虽然可以通过单独沉淀来纯化化合物, 但运行柱以确保最高纯度。这提供良好产率(85%)的去保护的单体(VIII)。如果不使用柱层析, 此反应确实会产生更高结果。1.03g。

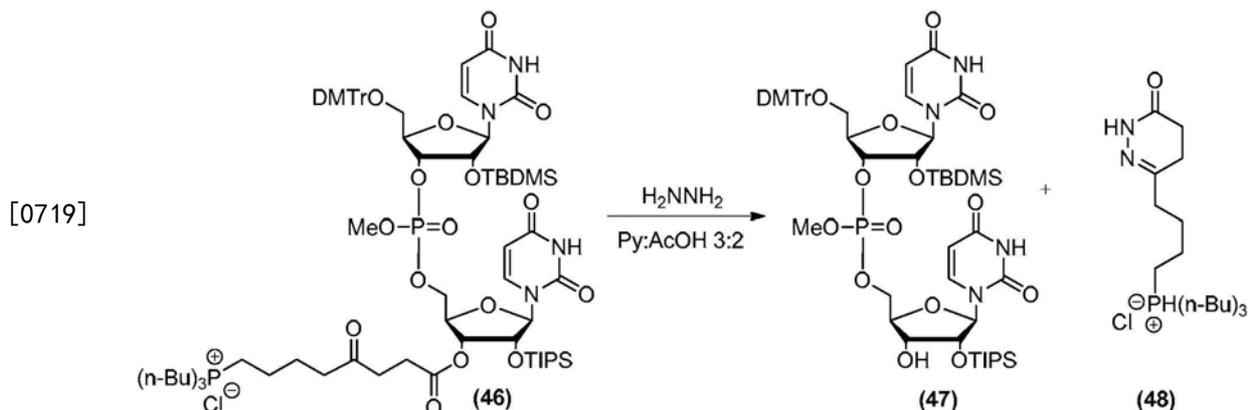
[0715] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.91-1.10 (m, 11H) 1.44-1.57 (m, 5H) 1.63 (dd, $J=15.90$, 8.07Hz, 1H) 1.78 (dd, $J=14.06$, 6.97Hz, 1H) 2.29- 2.40 (m, 3H) 2.41-2.53 (m, 1H) 2.56-2.85 (m, 3H) 3.76-3.92 (m, 1H) 3.98 (s, 1H) 4.11-4.19 (m, 1H) 4.70-4.78 (m, 1H) 5.18 (dd, $J=4.89$, 3.42 Hz, 1H) 5.75 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H) 5.81 (d, $J=5.62\text{Hz}$, 1H) 8.00 (d, $J=8.31\text{Hz}$, 1H) 8.67 (br. s., 1H)

[0716] ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 11.93 (s, 1C) 11.96 (s, 1C) 11.98 (s, 1C) 13.37 (s, 1C) 17.50 (s, 1C) 17.52 (s, 1C) 17.54 (s, 1C) 17.57 (s, 1C) 17.58 (s, 1C) 17.60 (s, 1C) 17.62 (s, 1C) 17.65 (s, 1C) 17.66 (s, 1C) 17.67 (s, 1C) 17.69 (s, 1C) 17.71 (s, 1C) 17.72 (s, 1C) 17.78 (s, 1C) 17.80 (s, 1C) 18.59 (s, 1C) 18.77 (s, 1C) 18.97 (s, 1C) 19.15 (s, 1C) 20.80 (s, 1C) 20.84 (s, 1C) 23.54 (s, 1C) 23.57 (s, 1C) 23.77 (s, 1C) 23.88 (s, 1C) 24.35 (s, 1C) 24.47 (s, 1C) 28.00 (s, 1C) 30.88 (s, 1C) 36.93 (s, 1C) 41.11 (s, 1C) 61.25 (s, 1C) 73.72 (s, 1C)

73.96 (s, 1C) 83.72 (s, 1C) 88.91 (s, 1C) 102.72 (s, 1C) 141.92 (s, 1C) 150.83 (s, 1C) 163.77 (s, 1C) 171.98 (s, 1C) 208.11 (s, 1C)

[0717] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 33.08 (s, 1P)

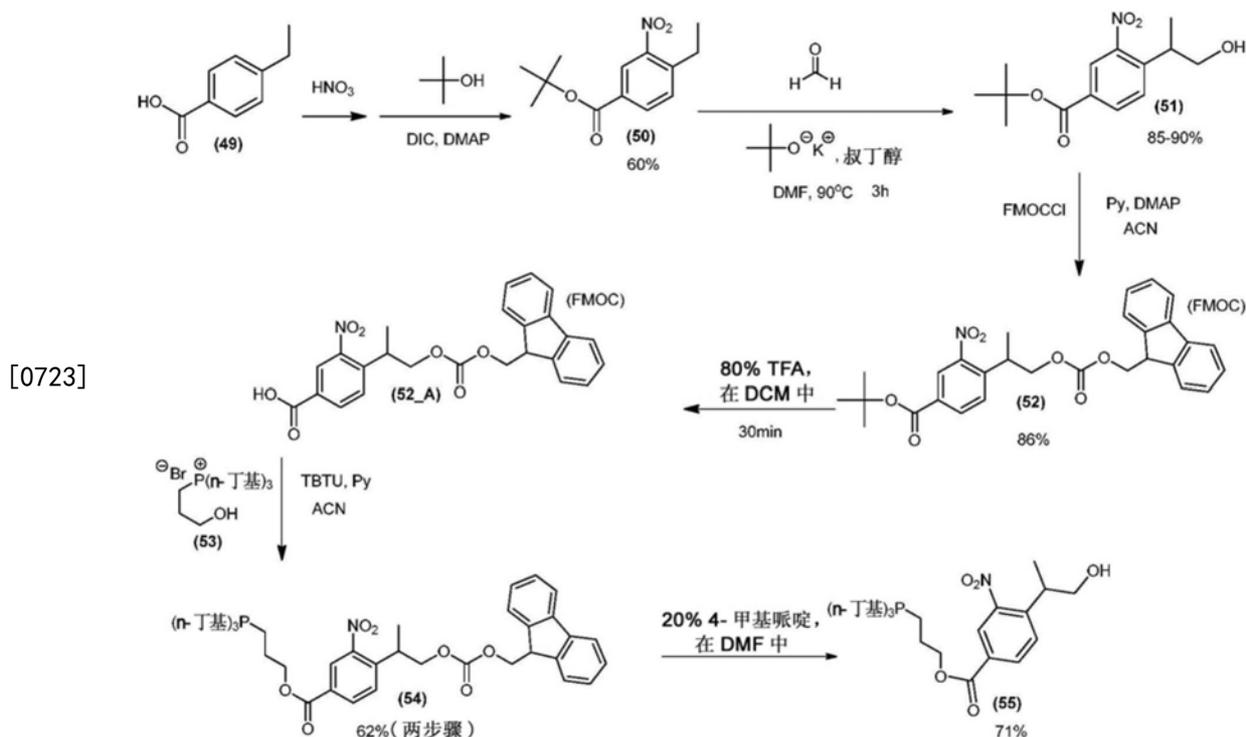
[0718] 低分辨率MS, m/z 计算为: 1029.6, 发现为: 1029.5



[0720] 将化合物 (46) (0.12g, 0.08mmol) 溶剂化于最少量的ACN, 大约1ml, 然后用在吡啶: 乙酸 (3:2) 中的10当量的0.5M水合肼溶液 (40mg, 0.8mmol) 加以处理, 接着允许搅拌15分钟。通过MS来监测反应进展以证实原材料的消耗。此时, 将10当量的2,4-戊二酮加入溶液以骤冷任何过量的肼 (80 mg, 0.8mmol)。然后用乙酸乙酯稀释反应, 并首先用饱和氯化铵溶液提取, 然后用5%的氯化铵溶液提取 $\times 2$, 接着用盐水提取一次。干燥有机层并浓缩。然后将混合物接收在最少量的DCM中并在MTBE/己烷混合物的75/25 混合物中沉淀。滤去油状沉淀物并浓缩醚层至干燥。然后通过柱层析 (0 \rightarrow 75%乙酸乙酯:己烷) 来纯化粗浓缩物, 从而产生率为84% (76mg) 的异构纯 (47)。

[0721] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.09-0.15 (m, 6H) 0.87-1.20 (m, 40H) 1.94-2.00 (m, 1H) 2.10-2.20 (m, 2H) 3.44 (br. s., 3H) 3.67-3.79 (m, 12H) 4.04-4.23 (m, 5H) 4.28-4.35 (m, 2H) 4.38-4.48 (m, 2H) 4.81-4.90 (m, 1H) 5.38 (d, J=8.21Hz, 1H) 5.64 (d, J=8.20Hz, 1H) 5.81-5.91 (m, 2H) 6.90 (d, J=7.91Hz, 5H) 7.24-7.37 (m, 9H) 7.41-7.52 (m, 4H) 7.71 (dd, J=8.20, 2.64Hz, 1H) 9.62 (br. s., 1H)

[0722] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.58 (s, 1P) 0.83 (s, 1P)。



[0724] 3-硝基-4-乙基-苯甲酸 (49_A)

[0725] 在搅拌下将发烟硝酸 (90%) (150ml) 冷却至 -10°C , 然后经30分钟将 4-乙基苯甲酸 (49) (30g, 0.2摩尔; Sigma-Aldrich) 缓慢直接加入静置溶液 (1.33mmol/ml的 (49), 相对于发烟硝酸)。然后在添加完成以后允许搅拌混合物30分钟。然后将混合物倒在大约600g碎冰上以骤冷反应。产物形成白色沉淀物, 其可以经烧结玻璃漏斗加以过滤。通过用水洗涤产物来融化过量冰。然后样品再结晶自乙酸乙酯/己烷。进行两轮结晶。产量为37.2 g (95%)。

[0726] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.33 (t, $J=7.58\text{Hz}$, 3H) 2.99 (q, $J=7.58\text{Hz}$, 2H) 7.52 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 1H) 8.23 (dd, $J=8.07, 1.71\text{Hz}$, 1H) 8.58 (d, $J=1.71\text{Hz}$, 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ ppm 14.62 (s, 1C) 26.38 (s, 1C) 126.37 (s, 1C) 128.29 (s, 1C) 131.67 (s, 1C) 133.87 (s, 1C) 144.85 (s, 1C) 149.36 (s, 1C) 170.40 (s, 1C) $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_4\text{Na}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为: 195.05, 发现为: 218.2。

[0727] 3-硝基-4-乙基-苯甲酸叔丁酯 (50)

[0728] 将化合物 (49_A) (19.65g, 0.10摩尔) 溶剂化于500ml的THF (0.2M), 接着1.15当量 (10.14g, 0.15摩尔) 的二异丙基碳二亚胺。允许搅拌此混合物5分钟, 接着1.5当量叔丁醇 (17.9mL) 和催化量的4-(二甲基氨基)-吡啶。在反应完成以前, 允许搅拌混合物60小时。用二乙醚稀释反应并过滤以除去二异丙基脒 (DIU), 然后浓缩至干燥。将混合物溶剂化于乙酸乙酯并用5% NaHCO_3 提取。通过柱层析 (溶剂体系: 己烷:DCM 100:0 \rightarrow 0:100), 产物分离自 (74)。(50) 的产量为15.1g (60%)。

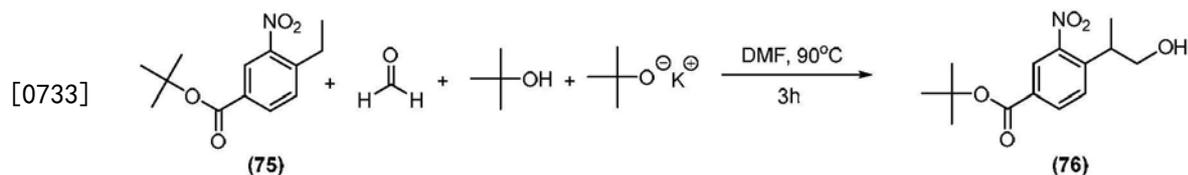
[0729] (50)

[0730] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.26 (t, $J=7.47\text{Hz}$, 3H) 1.57 (s, 11 H) 2.91 (q, $J=7.33\text{Hz}$, 2H) 7.40 (d, $J=7.91\text{Hz}$, 1H) 8.08 (dd, $J=7.91, 1.47\text{Hz}$, 1H) 8.38 (d, $J=1.47\text{Hz}$, 1H) ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ ppm 14.70 (s, 1 C) 26.18 (s, 1C) 28.05 (s, 1C) 76.64 (s, 1C) 77.06 (s, 1C) 77.49 (s, 1C) 82.13 (s, 1C) 125.42 (s, 1C) 131.12 (s, 1C) 131.18 (s, 1C) 133.23 (s, 1C)

143.00 (s, 1C) 149.12 (s, 1C) 163.56 (s, 1C) $C_{13}H_{17}NO_4Na^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 251.11, 发现为: 274.32。

[0731] (DCC失败产物)

[0732] 1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.94 (d, $J=6.45Hz$, 6H) 1.26 (t, $J=7.47Hz$, 3H) 1.39 (d, $J=6.74Hz$, 6H) 2.91 (q, $J=7.33Hz$, 2H) 3.80 (dq, $J=13.88, 6.70Hz$, 1H) 4.44 (quin, $J=6.74Hz$, 1H) 6.49 (d, $J=7.91Hz$, 1H) 7.40 (d, $J=8.20Hz$, 1H) 7.67 (dd, $J=7.91, 1.76Hz$, 1H) 8.02 (d, $J=1.76Hz$, 1H) ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 14.80 (s, 1C) 20.75 (s, 1C) 22.04 (s, 1C) 26.12 (s, 1C) 42.96 (s, 1C) 49.54 (s, 1C) 76.63 (s, 1C) 77.05 (s, 1C) 77.48 (s, 1C) 123.13 (s, 1C) 130.76 (s, 1C) 131.52 (s, 1C) 135.78 (s, 1C) 141.49 (s, 1C) 148.95 (s, 1C) 153.60 (s, 1C) 168.67 (s, 1C) $C_{16}H_{23}N_3O_4Na^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 321.16, 发现为: 344.23。



[0734] 4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酸叔丁酯 (51)

[0735] 将化合物 (750) (10.5g, 41.7mmol) 溶剂化于 19mL 的 DMF (2.2M), 向其添加 1.5 当量 (1.88g) 多聚甲醛, 接着叔丁醇钾 (0.12 当量, 0.56g) 在叔丁醇 (5.7mL) 中的溶液。在被升高至 90°C 时间为 3 小时以前, 允许在室温下搅拌此混合物 10 分钟。然后通过添加 1M HCl 来将混合物酸化至中性 (通过 pH 计加以监测)。然后用饱和 NaCl 和乙酸乙酯 (x2) 来稀释此混合物。通过柱层析 (DCM: 乙酸乙酯 100:0 → 90:10) 来纯化化合物 (51)。产量为 9.4g (85%)。

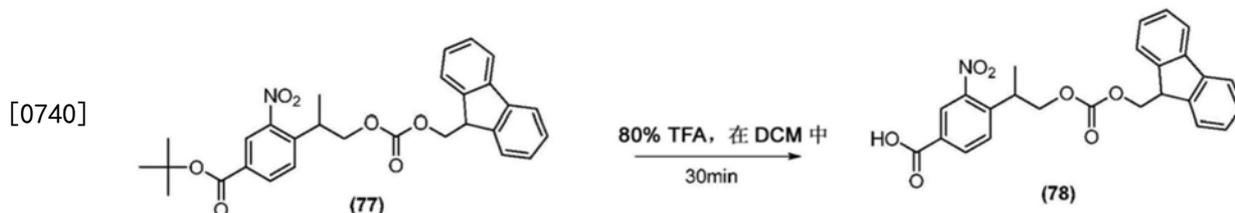
[0736] 1H NMR (400MHz, 乙腈- d_3) δ_{ppm} 1.41 (d, $J=7.03Hz$, 3H) 3.80 (sxt, $J=6.88Hz$, 1H) 4.49-4.67 (m, 2H) 7.40 (d, $J=7.91Hz$, 1H) 8.08 (dd, $J=7.91, 1.47Hz$, 1H) 8.38 (d, $J=1.47Hz$, 1H) ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 17.35 (s, 1C) 27.96 (s, 1C) 36.57 (s, 1C) 67.01 (s, 1C) 82.27 (s, 1C) 124.77 (s, 1C) 128.50 (s, 1C) 131.04 (s, 1C) 131.06 (s, 1C) 132.81 (s, 1C) 142.62 (s, 1C) 150.41 (s, 1C) 163.58 (s, 1C) $C_{14}H_{19}NO_5Na^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 281.12, 发现为: 304.02。

[0737] 4-(1-(F-moc)丙-2-基)-3-硝基苯甲酸叔丁酯 (52)

[0738] 和吡啶 (x3) 一起共蒸发化合物 (51) (5.38g, 20.2mmol) 并溶剂化于 97 mL 的 ACN (0.2M) 和 2 当量吡啶 (3.13mL, 38.7mmol)。将 Fmoc-Cl (5.0g, 19.33mmol) 直接加入溶液并允许在黑暗中 (用铝箔覆盖) 搅拌 16 小时。反应进行到完全 (通过 TLC)。用 5% 氯化铵提取 (x3) 溶液, 并用盐水提取一次, 然后通过柱层析 (Hex/EtAc 100:0 → 75:25) 加以纯化。分离的产量为 8.19g (86%)。

[0739] 1H NMR (500MHz, 乙腈- d_3) δ_{ppm} 1.30 (d, $J=7.09Hz$, 3H) 1.60 (s, 9H) 3.65 (sxt, $J=6.94Hz$, 1H) 4.19 (t, $J=6.24Hz$, 1H) 4.23-4.34 (m, 2H) 4.39-4.53 (m, 2H) 7.27-7.34 (m, 2H) 7.41 (t, $J=7.46Hz$, 2H) 7.53 (d, $J=7.34Hz$, 2H) 7.62 (d, $J=8.31Hz$, 1H) 7.80 (d, $J=7.58Hz$, 2H) 8.13 (dd, $J=8.19, 1.59Hz$, 1H) 8.28 (d, $J=1.71Hz$, 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 乙腈- d_3) δ_{ppm} 0.10 (s, 1C) 0.06 (s, 1C) 0.23 (s, 1C) 0.40 (s, 1C) 0.56 (s, 1C) 0.73 (s, 1C) 0.89 (s, 1C) 16.83 (s, 1C) 27.30 (s, 1C) 27.32 (s, 1C) 33.47 (s, 1C) 46.64 (s, 1C) 68.89 (s, 1C) 70.90

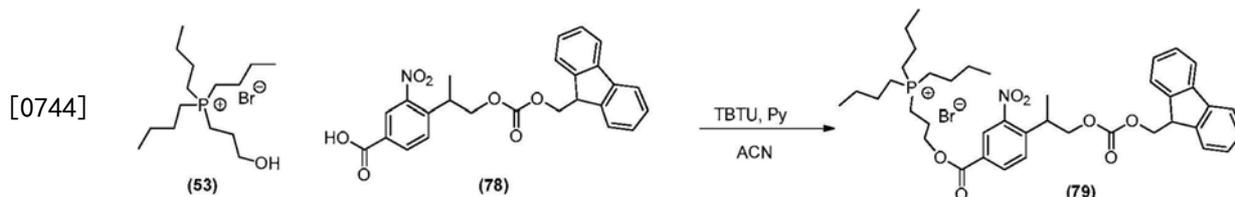
(s, 1C) 82.13 (s, 1C) 117.34 (s, 1C) 120.06 (s, 1C) 124.56 (s, 1C) 124.87 (s, 1C) 124.90 (s, 1C) 127.17 (s, 1C) 127.18 (s, 1C) 127.81 (s, 1C) 127.83 (s, 1C) 128.87 (s, 1C) 131.72 (s, 1C) 132.75 (s, 1C) 141.03 (s, 1C) 141.17 (s, 1C) 143.50 (s, 1C) 143.55 (s, 1C) 150.42 (s, 1C) 154.54 (s, 1C) 163.26 (s, 1C) $C_{29}H_{29}NO_7Na^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 503.19, 发现为: 526.41。



[0741] 4-(1-(Fmoc)丙-2-基)-3-硝基苯甲酸 (52_A)

[0742] 将化合物 (52) (8.9g, 17.7mmol) 直接溶剂化于 80% TFA 在 DCM (50 mL) 中的溶液并允许搅拌 30 分钟, 直到所有原材料已被消耗。然后用旋转蒸发器将样品蒸发至干燥并通过柱层析 (Hex/EtAc 100:0→60:40) 加以纯化。分离的产量为 6.09g (77%)。

[0743] 1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.43 (d, $J=6.85$ Hz, 3H) 3.86 (sxt, $J=6.80$ Hz, 1H) 4.32-4.46 (m, 4H) 7.28-7.36 (m, 2H) 7.41 (t, $J=7.58$ Hz, 2H) 7.57 (dd, $J=6.97, 4.52$ Hz, 2H) 7.65 (d, $J=8.07$ Hz, 1H) 7.76 (d, $J=7.34$ Hz, 2H) 8.29 (dd, $J=8.07, 1.71$ Hz, 1H) 8.53 (d, $J=1.71$ Hz, 1H) 11.69 (br. s., 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ ppm 17.58 (s, 1C) 33.71 (s, 1C) 46.62 (s, 1C) 70.08 (s, 1C) 71.14 (s, 1C) 76.80 (s, 1C) 77.05 (s, 1C) 77.31 (s, 1C) 120.06 (s, 1C) 125.10 (s, 1C) 125.11 (s, 1C) 126.16 (s, 1C) 127.16 (s, 1C) 127.17 (s, 1C) 127.91 (s, 1C) 127.93 (s, 1C) 128.87 (s, 1C) 129.00 (s, 1C) 133.71 (s, 1C) 141.26 (s, 1C) 141.27 (s, 1C) 142.82 (s, 1C) 143.14 (s, 1C) 143.20 (s, 1C) 150.39 (s, 1C) 155.00 (s, 1C) 169.79 (s, 1C) $C_{25}H_{20}NO_7^{1-}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 447.13, 发现为: 446.0。

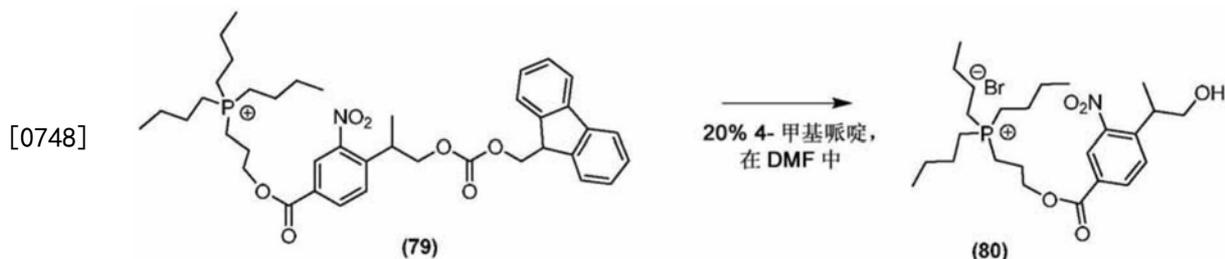


[0745] 磷标记 4-(1-(Fmoc)丙-2-基)-3-硝基苯甲酸酯 (54)

[0746] 将化合物 (52_A) (3.726g, 8.33mmol) 溶剂化于一半溶剂 (ACN:Py, 28 mL:1.25mL), 向其添加磷标记 (53) (3.86g, 9.16mmol) 在另一半溶剂中的溶液, 接着直接是 TBTU (4.0g, 12.5mmol)。允许搅拌溶液过夜以及在早晨时反应完成 (12 小时), 并被浓缩至一半溶剂提及, 然后用乙酸乙酯和 5% $NaHCO_3$ (x3) 提取以及用盐水提取一次。用 $MgSO_4$ 干燥有机层并浓缩至干燥。然后在 500mL 的 MTBE 中沉淀化合物以除去过量吡啶和 TBTU 副产物。过滤沉淀的白色粘性物并经 **Celite**© 加以收集, 然后通过柱层析 (DCM:MeOH 100:0→92:8) 加以纯化。(54) 的分离的产量为 5.52g (86%)。

[0747] 1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.81-0.99 (m, 8H) 1.35 (d, $J=7.03$ Hz, 3H) 1.38-1.61 (m, 11H) 1.99-2.38 (m, 8H) 2.66 (br. s., 2H) 3.54-3.83 (m, 3H) 4.10-4.41 (m, 5H) 7.21-7.44 (m, 4H) 7.57 (dd, $J=10.11, 8.06$ Hz, 3H) 7.72 (d, $J=7.33$ Hz, 2H) 8.55 (d, $J=1.76$ Hz,

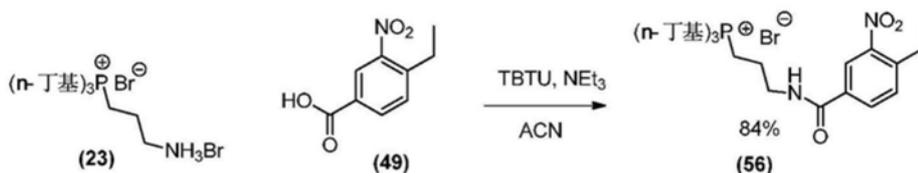
^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.91 (t, $J=7.03\text{Hz}$, 11H) 1.26 (d, $J=7.03\text{Hz}$, 3H) 1.38-1.59 (m, 13H) 1.98 (d, $J=7.03\text{Hz}$, 2H) 2.11-2.28 (m, 7H) 2.36-2.51 (m, 2H) 3.40-3.59 (m, 3H) 3.64-3.82 (m, 2H) 7.51 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.22 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.26 (s, 1H) $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{P}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 468.28, 发现为: 468.28。



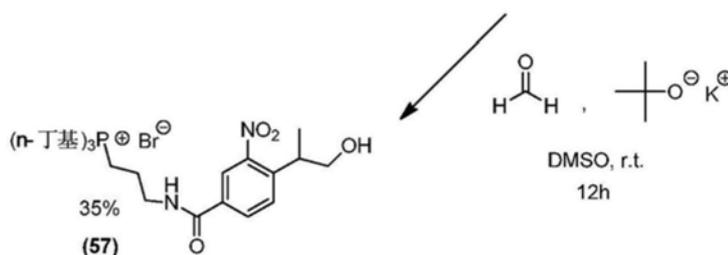
[0749] 磷标记4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酸酯 (55)

[0750] 向化合物 (54) (6.408g, 9.29mmol) 添加4-甲基吡啶在DMF (20ml) 中的 20% 溶液。在2小时以后反应完成 (通过TLC), 蒸发溶液至干燥, 然后接收在DCM中并在500ml的MTBE中沉淀, 以产生3.09g的 (55) (71%)。

[0751] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.91 (t, $J=7.03\text{Hz}$, 11H) 1.26 (d, $J=7.03\text{Hz}$, 3H) 1.38-1.59 (m, 13H) 1.98 (d, $J=7.03\text{Hz}$, 2H) 2.11-2.28 (m, 7H) 2.36-2.51 (m, 2H) 3.40-3.59 (m, 3H) 3.64-3.82 (m, 2H) 7.51 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.22 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 8.26 (s, 1H) $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_5\text{P}^{1+}$ 低分辨率 ESI-MS 计算为: 468.28, 发现为: 468.28。



[0752]

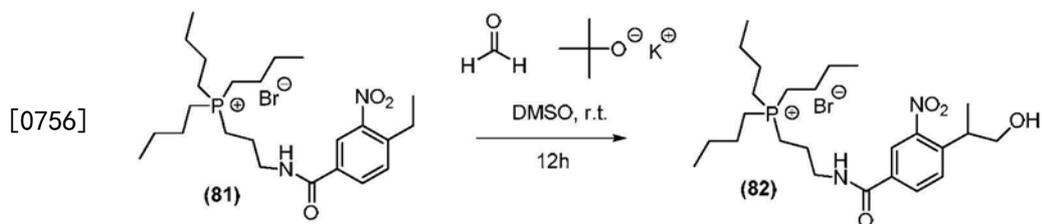


[0753] 三丁基(3-(4-乙基-3-硝基苯甲酰氨基)丙基)溴化磷 (56)

[0754] 向3-硝基-4-乙基-苯甲酸 (49) (3.15g, 16.1mmol) 和二异丙基乙胺 (4当量, 11.25ml) 在ACN (30mL) 中的溶液添加化合物 (23) (1.3当量, 20.9mmol) 和TBTU (1.3当量, 6.74g, 20.9mmol)。允许搅拌此混合物12小时。将暗棕色溶液浓缩至粘性油, 并接收在DCM中, 然后在500ml的MTBE 中沉淀。收集固体并通过硅胶柱层析 (DCM:MeOH, 100:0→85:15) 加以再纯化, 洗脱为非常暗的黄色油。分离的产量为7.07g (84%)。

[0755] ^1H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ_{ppm} 0.90 (t, $J=6.97\text{Hz}$, 9H) 1.24 (t, $J=7.46\text{Hz}$, 3H) 1.35-1.56 (m, 12H) 1.96 (d, $J=8.07\text{Hz}$, 2H) 2.05-2.19 (m, 7H) 2.25-2.38 (m, 2H) 2.78 (s, 2H)

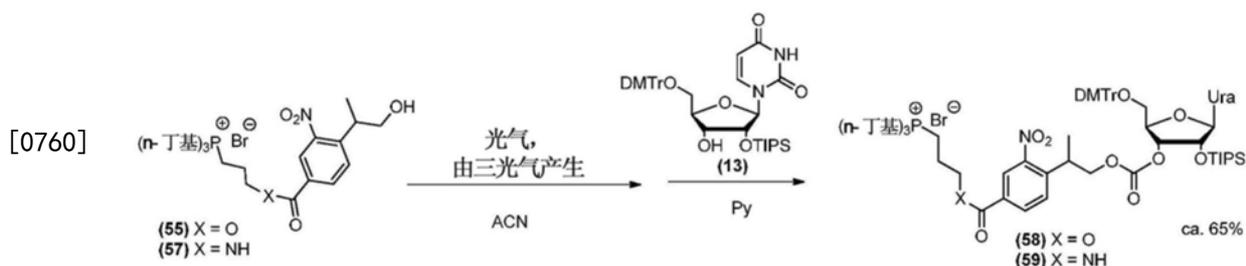
2.87 (q, J=7.34Hz, 2H) 3.60 (q, J=5.79 Hz, 2H) 7.40 (d, J=8.07Hz, 1H) 7.78 (t, J=5.50Hz, 1H) 8.07 (d, J=8.07Hz, 1H) 8.37 (s, 1H) ^{13}C NMR (126MHz, 氯仿-d) δ ppm 13.21 (s, 1C) 14.61 (s, 1C) 18.17 (s, 1C) 18.56 (s, 1C) 23.33 (s, 1C) 23.37 (s, 1C) 23.76 (s, 1C) 23.88 (s, 1C) 25.97 (s, 1C) 38.57 (s, 1C) 76.77 (s, 1C) 77.02 (s, 1C) 77.28 (s, 1C) 123.82 (s, 1C) 131.09 (s, 1C) 131.47 (s, 1C) 132.89 (s, 1C) 141.77 (s, 1C) 149.21 (s, 1C) 165.48 (s, 1C) $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:437.29, 发现为:437.30。



[0757] 三丁基(3-(4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酰氨基)丙基)溴化磷(57)

[0758] 向化合物(56)(3.56g, 6.89mmol)在无水DMSO(13.8mL)中的溶液添加对甲醛(2.1当量, 0.43g, 14.4mmol)。声处理此混合物20分钟直到所有对甲醛均溶解。用1.5当量叔丁醇钾(1.16g, 10.3mmol)来处理得到的混合物。反应立即变成暗紫色。允许在室温下搅拌反应12小时。通过MS来监测反应, 其显示原材料的消失。用在MeOH中的1M HCl来处理反应, 以达到中性, 此时, 在二乙醚中, 然后在DCM中沉淀反应。最后的沉淀步骤分离产物和未反应的对甲醛。通过反相层析(使用在水(pH7):ACN 80:20→20:80中的100mM TEAA缓冲液)来纯化产物。分离的产量为1.3g(35%)。

[0759] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.84-0.98 (m, 9H) 1.26 (d, J=7.03 Hz, 3H) 1.38-1.59 (m, 11H) 1.98 (d, J=5.86Hz, 2H) 2.09-2.27 (m, 6H) 2.34-2.50 (m, 2H) 3.39-3.49 (m, 1H) 3.53 (d, J=5.47Hz, 2H) 3.64-3.81 (m, 2H) 7.51 (d, J=8.21Hz, 1H) 8.22 (d, J=8.21Hz, 1H) 8.26 (s, 1H) 8.45 (br. s., 1H) ^{13}C NMR (75MHz, 氯仿-d) δ ppm 13.38 (s, 1C) 17.65 (s, 1C) 18.43 (s, 1C) 19.05 (s, 1C) 23.61 (s, 1C) 23.68 (s, 1C) 23.78 (s, 1C) 23.99 (s, 1C) 36.68 (s, 1C) 50.06 (s, 1C) 66.17 (s, 1C) 76.69 (s, 1C) 77.11 (s, 1C) 77.54 (s, 1C) 124.73 (s, 1C) 128.38 (s, 1C) 129.42 (s, 1C) 133.08 (s, 1C) 144.51 (s, 1C) 150.43 (s, 1C) 164.33 (s, 1C) ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm 35.07 (s, 1P) $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}^{1+}$ 低分辨率ESI-MS计算为:467.30, 发现为:467.31。



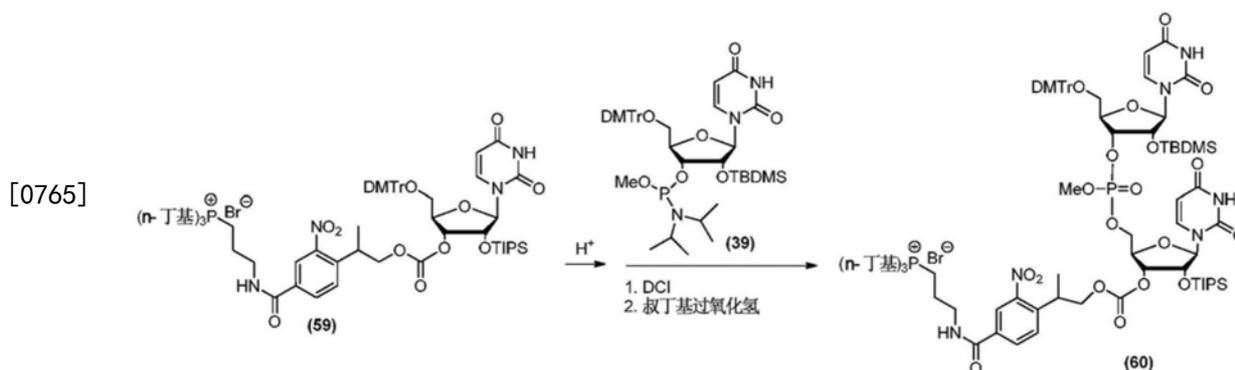
[0761] 5'-DMTr-2'-TIPS-3'-(三丁基(3-(4-(1-羟基丙-2-基)-3-硝基苯甲酰氨基)丙基)溴化磷)-尿苷(59)

[0762] 将包含三光气和菲啶的两颈烧瓶连接于蒸馏头和冷凝器。将冷凝器的接收端连接于氨收集器并通过干冰/丙酮浴加以冷却以冷凝产生的光气。将氨收集器的底部连接于三颈圆底烧瓶, 其具有同样通过干冰/丙酮浴加以冷却的搅拌棒。通过新鲜的隔片(包裹有Teflon带)来密封圆底的所有开口颈。借助于20G针, 其连接于聚乙烯管和两个起泡器(串

联),来穿刺三颈烧瓶的一个颈;第一个是空的而第二个则含有矿物油。聚乙烯管用来将第二起泡器连接于9英寸20G针,其被完全插入氢氧化钠在甲醇中的饱和溶液。第二针和管被插入甲醇氢氧化钠的隔片,其作为向上进入通风橱的排气孔。加热三光气(1.87g, 6.33mmol)和催化菲啉至90°C,此时,三光气熔化和溶剂化菲啉催化剂,从而促进光气气体的放出。在30分钟以后,所有三光气被消耗并且光气已开始接收烧瓶中缩合。此时,通过在两颈烧瓶上的隔片,穿刺氩气的气球,从而将任何光气气体推动到冷凝器并骤冷溶液。在光气已停止缩合以后,将(57)(1.06g, 1.9mmol)的乙腈溶液逐滴加入搅拌光气,然后在10分钟以后,从干冰/丙酮浴除去。在室温下,搅拌反应2小时。接着,使氩气越过整个装置并且还起泡通过反应混合物而进入甲醇氢氧化钠以除去和骤冷过量光气。注意:首先使用来自气球的非常低的流量,以确保光气被骤冷。在除去所有光气以后,将DIPEA(4mL)加入混合物以骤冷在与光气和化合物(57)的反应中产生的HCl。

[0763] 将核苷(13)(1当量, 1.35g, 1.9mmol)在ACN(3mL)中的溶液直接加入上述混合物,并允许在室温下搅拌得到的溶液8小时。用乙酸乙酯稀释溶液并用饱和NaHCO₃(x3)提取以及用盐水提取一次。在300mL的MTBE中沉淀混合物以除去过量核苷和DIPEA。然后通过柱层析(DCM:MeOH 100:0→90:10)来纯化得到的沉淀物以提供1.32g的(59)(产率为62%)。

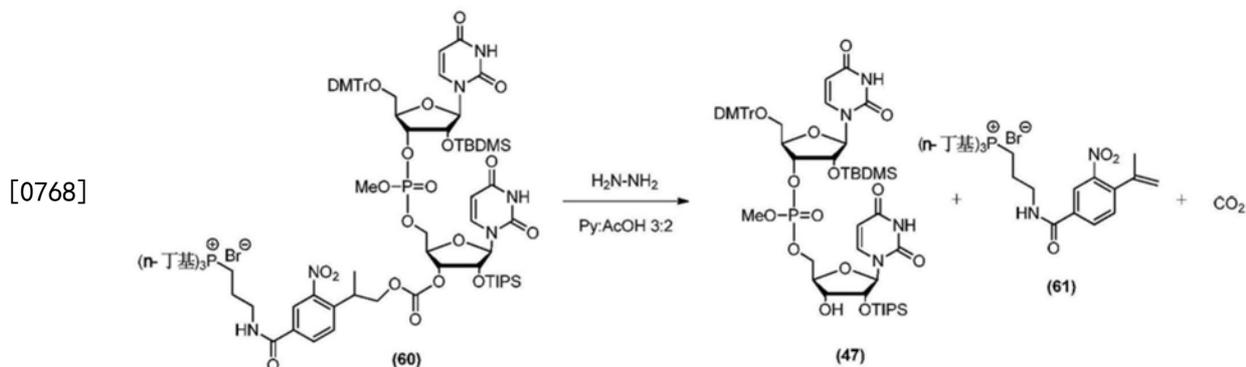
[0764] ¹H NMR(300MHz, 氯仿-d) δppm 0.82-1.16(m, 34H) 1.34(dd, J=6.89, 2.20Hz, 3H) 1.38-1.63(m, 15H) 2.05(br. s., 2H) 2.11-2.31(m, 12 H) 2.67(br. s., 1H) 3.39-3.53(m, 1H) 3.57-3.72(m, 3H) 3.78(s, 7H) 4.08-4.38(m, 2H) 4.59-4.69(m, 1H) 5.16-5.33(m, 2H) 5.63-5.76(m, 1H) 6.00(dd, J=5.27, 2.05Hz, 1H) 6.81(dd, J=8.79, 1.47Hz, 4H) 7.15(d, J=8.79 Hz, 1H) 7.18-7.41(m, 10H) 7.56(d, J=7.91Hz, 1H) 7.88(dd, J=8.20, 1.76 Hz, 1H) 8.53(d, J=7.91Hz, 1H) 8.67(t, J=8.94Hz, 2H) 9.64(br. s., 1H) C₆₅H₉₂N₄O₁₃PSi¹⁺低分辨率ESI-MS计算为:1195.61,发现为:1195.60。



[0766] 用10mL的在DCM中的3% TFA,接着0.5mL三乙基硅烷,来处理化合物(59)(316mg, 0.29mmol)。允许搅拌此混合物10分钟,接着5mL的MeOH以进一步骤冷三苯甲基阳离子。然后用20mL甲苯稀释此混合物并浓缩至几乎干燥。然后将混合物接收在丙酮中并在MTBE中沉淀,过滤并溶剂化于DCM,然后浓缩至干燥。再一次重复上述过程以确保不存在三苯甲基物质。然后和甲苯一起共蒸发混合物至干燥。向此混合物,添加1.5当量DCI(52mg, 0.44mmol)并添加1.5当量亚磷酰胺(39)(362mg, 0.44mmol),最后用3mL的ACN加以溶剂化。允许搅拌此混合物4小时直到所有原材料被消耗,如通过MS所监测的。然后用1mL叔丁醇来处理混合物以与任何过量的亚磷酰胺起反应。在MTBE:己烷(75:25)中直接沉淀此混合物以除去所有过量试剂。将沉淀物溶剂化于DCM并用1mL的在癸烷中的叔丁基过氧化氢加以处

理,然后允许搅拌20分钟,直到所有原材料被氧化,如通过MS所监测的。然后在MTBE中沉淀此混合物,从而产生率为91%的化合物纯(60)。

[0767] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm -0.93 (s, 1P) -0.90 (s, 1P) -0.36 (s, 1 P) -0.31 (s, 1P) 34.20 (s, 1P)



[0769] 用UVB处理化合物(60)20分钟,溶剂化于湿ACN中,在通过柱层析(0 \rightarrow 75%乙酸乙酯/己烷)加以纯化以后,产生率为92%的纯化合物(47)。

[0770] ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.09-0.15 (m, 6H) 0.87-1.20 (m, 40H) 1.94-2.00 (m, 1H) 2.10-2.20 (m, 2H) 3.44 (br. s., 3H) 3.67-3.79 (m, 12H) 4.04-4.23 (m, 5H) 4.28-4.35 (m, 2H) 4.38-4.48 (m, 2H) 4.81-4.90 (m, 1H) 5.38 (d, $J=8.21\text{Hz}$, 1H) 5.64 (d, $J=8.20\text{Hz}$, 1H) 5.81-5.91 (m, 2H) 6.90 (d, $J=7.91\text{Hz}$, 5H) 7.24-7.37 (m, 9H) 7.41-7.52 (m, 4H) 7.71 (dd, $J=8.20, 2.64\text{Hz}$, 1H) 9.62 (br. s., 1H)

[0771] ^{31}P NMR (81MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.58 (s, 1P) 0.83 (s, 1P)。

[0772] 虽然已连同其具体实施方式一起描述了本发明,但应当理解的是,一般来说,遵循本发明的原理,它能够进一步改进并且其应用旨在涵盖本发明的任何变化、应用、或调整(adaptation),且其包括这样一些本发明的偏离(departure),如落在了本发明所属领域的公知或惯常实践中以及其可适用于之前描述的主要特征,并且落在所附权利要求的范围之内。

[0773] 除非另有定义或上下文另有明确规定,在本文中使用的所有技术和科学术语具有如本发明所属领域的技术人员通常理解相同意义。应当理解的是,类似于或等同于本文描述的任何方法和材料可以用于本发明的实施或测试。

[0774] 本文引用的所有文件和参考文献的全部内容以引用方式结合于本文。

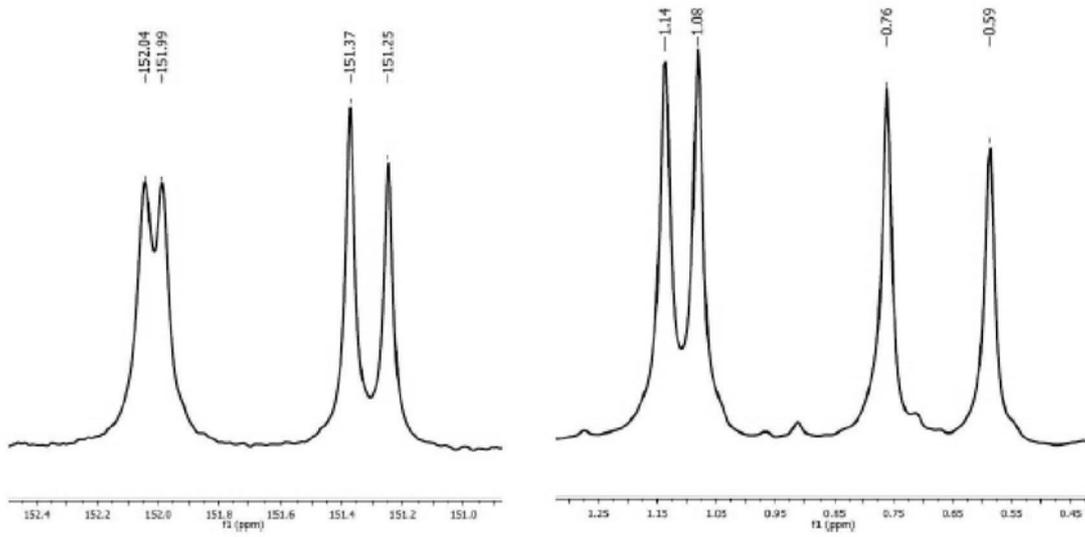


图1