

86年5月26日 修正  
補充

323284

|      |                             |
|------|-----------------------------|
| 申請日期 | 82.3.12                     |
| 案號   | 82101835                    |
| 類別   | C07H 19/02, 4/02 Int. Cl. 6 |

A4  
C4  
公 告 本

(以上各欄由本局填註)

323284

## 發 明 專 利 說 明 書

### 新 型

|             |               |  |
|-------------|---------------|--|
| 一、發明<br>名稱  | 中 文           | 核苷之製備方法                                    |
|             | 英 文           | Process for the preparation of nucleosides |
| 二、發明<br>創作人 | 姓 名           | 渥夫岡·玻里博士                                   |
|             | 國 籍           | 德國   |
|             | 住、居所          | 德國，費堡瓦特燒分7800，花角街1號                        |
| 三、申請人       | 姓 名<br>(名稱)   | 諾華股份有限公司                                   |
|             | 國 籍           | 瑞士   |
|             | 住、居所<br>(事務所) | 瑞士，4058巴塞爾，黑森林巷215號                        |
|             | 代 表 人<br>姓 名  | 威諾·華德愛格<br>尼寇·克可                           |

裝 訂 線

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS) A4規格 (210×297公釐)

323284

(由本局填寫)

|        |
|--------|
| 承辦人代碼： |
| 大類：    |
| IPC分類： |

A6  
B6

本案已向：

瑞士 國(地區) 申請專利，申請日期：1992.3.23 案號：906/92-3 ， 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

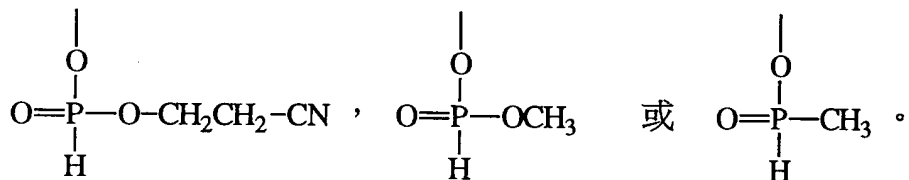
裝  
訂  
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明( )

本發明有關一個製備天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸之方法(用至少兩個相同或相異之此種核苷單體)。

序列已定之許多核苷酸現在都是利用亞磷酸三酯製程來合成。在本方法中，一個寡核苷酸之合成是由其3'端開始逐步進行至5'之方向。合成之第一步是將3'端之核苷酸(其在5'羥基和(如有必要之話)在其核苷鹼基上帶有一個保護基)鍵結到一個化學惰性之固相上。在5'之羥基上之保護基隨後被除去。接著將其與一個有適當保護之核苷之3'-胺基磷酸酯反應產生一內核苷酸鍵結，即所形成之亞磷酸三酯其後被氧化成所要之核苷酸間之鍵。下一個合成循環是開始於去除固定在固相上之二核苷酸之5'-端保護基。重覆此合成循環直到寡核苷酸鍵結到固相為止。合成之最後步驟是除去在核苷鹼基、羥基和核苷酸間鍵上之保護基(Caruthers, M.H., Science 230: 281 - 285, 1985)。依據所使用之胺基磷酸酯種類，典型上，合成時所使用之核苷或寡核苷酸應含有如下列化學式之基



這個合成方法所遭遇到之問題是在胺基磷酸酯與固定在固相上之核苷或寡核苷酸之自由羥基間之縮合反應。在  
→ 這個反應步驟中，必須不容許水份之存在。然而即使是使用絕對溶劑亦無法完全保證不含任何水份。由於溶劑中之水份無法完全去除，因此在固相寡核苷酸合成之耦合步驟

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

中大量核苷胺基磷酸酯被轉化成核苷胺基磷酸酯水解產物，例如核苷乙基磷酸氫酯。然而上面最後提及之這個化合物並不參與耦合反應。雖然如此，爲了得到高耦合產率，仍然必須使用大過量之胺基磷酸酯。在現代之DNA合成器中，相對於固定在固相上之羥基化合物使用量，要使用高到2到20倍過量之核苷胺基磷酸酯。反應後，核苷酸間之鍵結最大產率爲所使用之胺基磷酸酯之20%。最少有80%之核苷會以核苷胺基磷酸酯水解產物之型態被丟棄。這個問題並不能經由改良所用之設備而完全獲得解決，例如使用特殊之計量裝置（參照 *Chemische Rundschau* Nr. 37, Seite 11 (1992)）。

柏令格 (Bohringer, M.P., doctoral thesis of the Eidgenossische Technische Hochschule, ETH No. 9377, 1991) 將一個核苷相似體之甲基胺基磷酸酯水解產物與氫氧化鈉溶液反應，得到包含一個自由羥基之核苷相似體。然而，在他所使用之反應條件下，核苷鹼基上之保護基會被除去。

由 Predvoditelev 等人 (Predvoditelev, D.A., Tyrganova, M.A., Nifant'ev, E.E., Rogovin, Z.A., *Zh. Prikl. Khim.* 40: 171 - 177, 1967)，Nifnt'ev 等人 (Nfnt'ev, E.E., Predvoditelev, D.A., Fursendo, I.V., *Zh. Obsh. Khim.* 51: 2435 - 2441, 1981)，Troev 和 Simeonov (Troev, K., Simeonov, M., *Phosphorus and Sulfur* 19: 363 - 367, 1984) 和 Westheimer 等人 (Westheimer, F.H., Huang, S., Covitz, F., *J. Am. Chem. Soc.* 110: 181 - 185, 1988) 所提出有關於非核苷酸二烷基亞磷酸酯之轉酯化反應中都有一個共同缺點，即當應用於受保護之核苷時，核鹼

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

基之保護基會輕易地被除去。在這些方法中，因為熱分解反應之緣故（例如保護基之熱去除，特別是去三苯甲基化），反應中所需之高溫妨礙這些方法廣泛應用。

另外一個方法是用四苯甲氧基鈦之路易士酸催化轉酯化，這個反應在40°C下進行72小時後，可得到中等產率，而鈦酸鹽水解之敏感度是其特別之缺點(Froneman, M., Modro, T.A., Synthesis 201 - 204, 1991)。

令人驚訝之是，本發明提供一個方法可將核苷磷酸氫酯或核苷亞磷酸氫酯轉化成帶有一個自由羥基之核苷，而所形成之自由羥基會帶有磷酸氫根或亞磷酸氫根官能。在本發明之方法中，磷酸氫根或亞磷酸氫根官能以選擇性高於其中醯基保護基選擇性地轉移到一個醇上。在所給予之反應條件下，即使經過了許多天，這種去除之選擇性依然很高使得核苷鹼基之保護基不會被去除。更進一步說，這個方法可以得到高產率。本新穎方法將可在第一次就回收過量之核苷（產生於人工或自動化寡核苷酸耦合反應）。

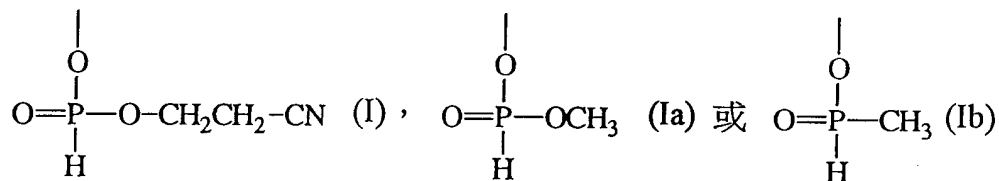
本發明特別提供一種製備天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸之方法，該方法係由至少兩個這樣的核苷及／或核苷相似體，其在鹼性分子含有一未被取代或已取代之核苷基B自由基及一化學式為 $R_1-O-$ 之被保護羥基（式中之 $R_1$ 為保護基），或其直接鍵結到一羥基之氧原子上或經由一連接基鍵結到一固相撐體上，由核苷單體或由在鹼性分子上，除了上述自由基外，還附加一式I、Ia或Ib

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

## 五、發明說明 ( )



基之寡核苷酸，使該核苷或寡核苷酸與一過量之脂醇、環脂醇、芳脂醇或含1-30個碳原子之芳醇、含2-50個碳原子之多元醇或聚合多元醇，在有或無惰性溶劑存在下，在至少一催化量之無機鹼或有機氮鹼（該鹼之pK值為4-10者）存在下反應，將式I、Ia或Ib之基轉化成羥基-OH而製備。

化學式I、Ia或Ib之官能基可以接在核苷或寡核苷酸之3'-或5'-位置，而R<sub>1</sub>O-官能基或固相撐體被接在5'-或3'-位置。化學式I之官能基較適合接在5'-位置，化學式Ib之官能基較適合接在3'-位置，而化學式Ia之官能基則接在3'-或5'-位置。

用於連接核苷酸鍵結並且適用於本發明方法之大多數較適合帶有一個第二OH基之核苷、核苷相似體或寡核苷酸已經知道並且被詳細描述，例如參考Townsend之文獻(Townsend, L.B., Hrsg., Chemistry of Nucleosides and Nucleotides 1, Plenum Press, New York, 1988)或其可由已知之方法製備而得。一般而言，它們可以是一個被-O-或-S-打斷之開鏈C結構或一個環烴或一個具有一個核鹼基B之O-或S-雜環結構。

典型上，開鏈碳結構可能含有3到12個碳原子，而較適合是含有3到6個碳原子。環烴或雜環結構可以是含有3到12（較適合者為3到8，而最適合為4或5）個碳原子之單環系。它們也可以是含有5到16（較適合為8到16）個碳原子之雙環或三環系。這些結構可進一步包含取代基，典型上為被保護之OH基。

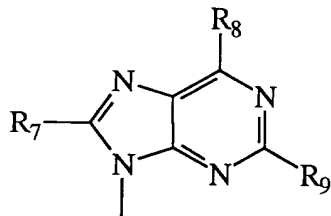
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

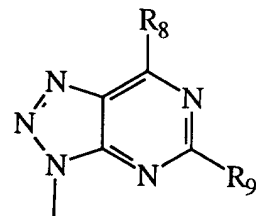
訂

## 五、發明說明 ( )

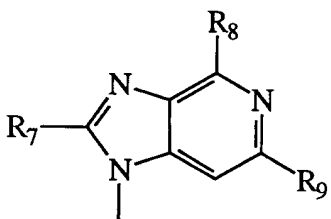
若核鹼基 B 是一個嘌呤殘基或其相似體，則它可能是一個如化學式 II、IIa、IIb、IIc、IId 或 IIe 之自由基



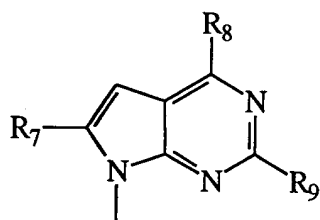
(II),



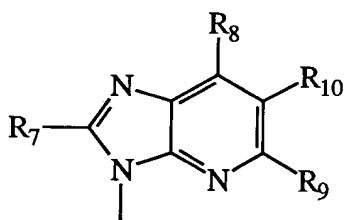
(IIa),



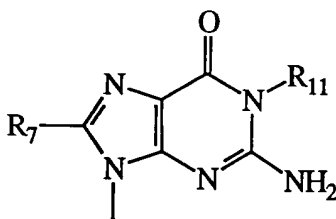
(IIb),



(IIc),



(IId),



(IIe),

其中 R<sub>7</sub> 是 H、Cl、Br、NH<sub>2</sub> 或 OH，而 R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub> 和 R<sub>10</sub> 是各自獨立之 H、OH、SH、NH<sub>2</sub>、NHNH<sub>2</sub>、NHOH、含 1 至 12 個碳原子之 NHO-烷基、F、Cl、Br、烷基或羥烷基或胺烷基或含 1 至 12 個碳原子之烷硫基，其中羥基和胺基可不被取代或被一個保護基或苯基、苯甲基、含 1 至 20 個碳原子之第一胺基或含 2 至 30 個碳原子之第二胺基所取代，而 R<sub>11</sub> 是 H 或 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 烷基。

較適宜之第一胺基包含 1 至 12 個碳原子，而最適宜者包含 1 至 6 個碳原子，較適宜之第二胺基包含 2 至 12 個碳原子，而最適宜者包含 2 至 6 個碳原子。

烷基、烷氧基、烷硫基、羥烷基和胺烷基（較適宜之碳原子數為 1 至 6 個）中具有代表性者例如為甲基、乙基和丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

一基和十二基等之異構物，和相當之烷氧基、烷硫基、羧烷基和胺烷基。烷基、烷氧基、烷硫基、羧烷基和胺烷基最適宜者為包含1至4個碳原子。較適宜之烷基、烷氧基、烷硫基、羧烷基和胺烷基為甲基、乙基、正-及異丙基、正-、異-及第三丁基、甲氧基、乙氧基、甲硫基和乙硫基、胺甲基、胺乙基、羧甲基和羧乙基。

第一胺基和第二胺基典型上，可以是如化學式  $R_{14}R_{15}N$  之自由基，其中  $R_{14}$  是 H 或具有如  $R_{15}$  之意義，但不相干，而  $R_{15}$  是烷基、胺烷基或羧烷基（含有1至20，較適宜者為1至12，最適宜者為1至6個碳原子）；羧烷基或碳烷氧烷基、含有2至8個碳原子之碳烷氧基且其烷基部份含有1至6，較適宜者為1至4個碳原子；烯基含有2至20，較適宜者為2至12，而最適宜者為2至6個碳原子；苯基、單或二- $(C_1-C_4$  烷基苯基或  $C_1-C_4$  烷氧基) 苯基、苯甲基、單或二- $(C_1-C_4$  烷基苯甲基或  $C_1-C_4$  烷氧基) 苯甲基；或 1,2-、1,3- 或 1,4-咪唑基- $C_1-C_6$  烷基，或  $R_{14}$  及  $R_{15}$  合在一起為四或五亞甲基、3-氧雜-1,5-亞戊基、 $-CH_2-NR_{16}-CH_2CH_2-$  或  $-CH_2CH_2-NR_{16}-CH_2CH_2-$ ，其中  $R_{16}$  是 H 或  $C_1-C_4$  烷基。胺烷基中之胺基可以被一個或兩個  $C_1-C_4$  烷基或  $C_1-C_4$  羧烷基所取代。羧烷基中之羧基可以與  $C_1-C_4$  烷基反應而被醚化。

在前面已例舉了烷基之實例。有代表性之胺烷基實例為胺甲基、胺乙基、1-胺丙-2-基或-3-基、1-胺-丁-2-基或-3-基或-4-基、N-甲基-或N,N-二甲基-或N-乙基-或N,N-二乙基-或N-2-羧乙基-或N,N-二-2-羧乙基胺甲基或-胺乙基或-胺丙基或-胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



### 五、發明說明 ( )

丁基。羧烷基之實例為羧甲基、1-羧-乙-2-基、1-羧-丙-2-或-3-基、1-羧-丁-2-基、-3-基或-4-基。羧烷基之實例為羧甲基、羧乙基、羧丙基和羧丁基；而碳烷氧烷基之實例為該碳烷氧烷基，其與甲基或乙基反應而被酯化。烯基典型上為烯丙基、丁-1-烯-3-基或-4-基、戊-3-或-4-烯-1-基或-2-基、己-3-或-4-或-5-烯-1-基或-2-基。烷苯基、烷氧苯基和烷苯甲基典型實例為甲苯基、二甲苯基、乙苯基、二乙苯基、甲苯甲基、二甲苯甲基、乙苯甲基、二乙苯甲基、甲氧苯基、二甲氧苯基、乙氧苯基、二乙氧苯基、甲氧苯甲基、二甲氧苯甲基、乙氧苯甲基、二乙氧苯甲基。咪唑烷基（其中之烷基部份較適宜含有2至4個碳原子者）典型上為1,2-、1,3-或1,4-咪唑-乙基或-正丙基或-正丁基。R<sub>16</sub>較適宜為H、甲基或乙基。

第一胺基和第二胺基較適宜之例子為甲胺基、乙胺基、二甲胺基、二乙胺基、烯丙胺基、單或二-(1-羧烯-2-基)胺基、苯胺基和苯甲胺基、乙醯胺基和苯甲醯胺基。

在本發明之較適宜之具體實施例中，R<sub>7</sub>是氫。本發明在另外較適宜之具體實施例中，R<sub>10</sub>是氫。本發明在更適宜之具體實施例中，R<sub>8</sub>和R<sub>9</sub>是互不相干之H、F、Cl、Br、OH、SH、NH<sub>2</sub>、NHOH、NHNH<sub>2</sub>、甲胺基、二甲胺基、苯甲醯胺基、甲氧基、乙氧基和甲硫基。

嘌呤系列之相似體之代表實例，除了嘌呤以外，還有腺嘌呤、N-甲基腺嘌呤、N-苯甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲硫基腺嘌呤、2-胺基腺嘌呤、3-碳基腺嘌呤、7-碳基腺嘌呤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

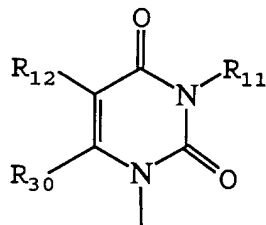
訂

線

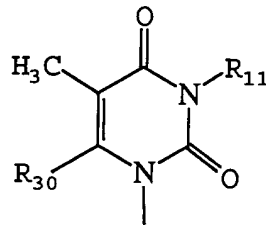
## 五、發明說明 ( )

呤、1-碳基腺嘌呤、6-羥基嘌呤、2-胺基-6-氯嘌呤、2-胺基-6-甲硫基嘌呤、2-胺基-6-羥基嘌呤、3-碳基-6-氯嘌呤、鳥嘌呤、2-甲基鳥嘌呤。其中，腺嘌呤、2-胺基腺嘌呤和鳥嘌呤是特別適宜者。

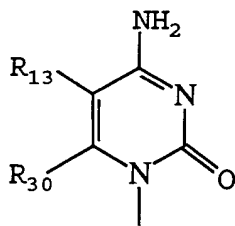
若核鹼基是一個嘧啶自由基相似體，則該自由基較適宜是一個如化學式 III、IIIa 和 IIIb 之尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶，



(III),



(IIIa),



(IIIb),

其中， $R_{11}$  是 H 或  $C_1-C_4$  烷基， $R_{12}$ 、 $R_{13}$  和  $R_{30}$  為各自獨立和前面已提過之  $R_8$  有相同之意義（包括較適宜之意義），化學式 IIIb 中之  $NH_2$  基上之氫原子可以被  $C_1-C_6$  烷基或苯甲醯基及化學式 III、IIIa 和 IIIb 之自由基之二氫衍生物所取代。較適宜之  $R_{12}$  是 H、 $C_1-C_6$  烷基或羥烷基、F、Cl、Br、 $NH_2$ 、苯甲醯胺基、單或二- $C_1-C_6$  烷胺基，而  $R_{13}$  較適宜是 H、 $C_1-C_6$  烷基或  $C_1-C_6$  烷氧基或  $C_1-C_6$  羥烷基、F、Cl、Br、 $NH_2$ 、苯甲醯胺基、單或二- $C_1-C_6$  烷胺基。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( )

$R_{11}$  較適宜是 H 或甲基。 $R_{12}$  較適宜是 H、F、Cl、Br、 $NH_2$ 、 $NHCH_3$ 、 $N(CH_3)_2$  或  $C_1$ - $C_4$  烷基。 $R_{13}$  較適宜是 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基，特別是甲基、或  $NH_2$ 、 $NHCH_3$  或  $(CH_3)_2N$ 。

嘧啶相似體之代表實例為尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-溴嘧啶、二氫尿嘧啶、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、3-甲基胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶。

在本發明之範圍內，保護基之定義和化學上常見之保護基之定義一樣。此種保護基之典型例子為  $C_1$ - $C_8$  烷基；單或二環  $C_7$ - $C_{12}$  芳烷基；單或二環  $C_7$ - $C_{12}$  芳烷氧基；單或二環  $C_7$ - $C_{12}$  鹵芳烷基；二苯基甲基；被 1 至 4 個甲基或甲氧基所取代之二苯基甲基；三苯基甲基；被 1 至 6 個甲基或甲氧基或 1 至 3 個第三丁基所取代之三苯基甲基；被苯基或萘基所取代之吡基； $-Si(R_4)(R_5)(R_6)$ ，其中  $(R_4)$ 、 $(R_5)$  和  $(R_6)$  是互不相干之  $C_1$ - $C_{20}$  烷基、苯甲基或苯基； $R-C(O)-$ ，其中 R 是  $C_1$ - $C_6$  烷基、苯甲基、被甲基、甲氧基或鹵素所取代之苯甲基， $C_1$ - $C_{12}$  烷氧基、被苄基所取代之  $C_1$ - $C_{12}$  烷氧基、苯氧基、被甲基、甲氧基或鹵素所取代之苯氧基；苯甲氧基或被甲基、甲氧基或鹵素所取代之苯甲氧基； $R_{17}-SO_2-$ ，其中  $R_{17}$  是  $C_1$ - $C_{12}$  烷基、 $C_5$ - $C_6$  環烷基、苯基、被  $C_1$ - $C_{12}$  烷基或鹵素所取代之苯基、苯甲基或被  $C_1$ - $C_{12}$  烷基或鹵素所取代之苯甲基； $C_1$ - $C_{12}$  烷氧乙醯基或苯氧乙醯基（未被取代或可被一個或超過一個之相同或不同之官能基所取代者，這些官能基係由包括直鏈或有支

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

鏈之  $C_1-C_6$  烷基、 $C_1-C_6$  鹵烷基、鹵素、 $C_1-C_6$  烷氧基、 $C_1-C_6$  烷硫基、硝基和氰基之一組中選出者)。

$C_1-C_8$  烷基典型實例為甲基、乙基、正-和異丙基、正-、異-和第三丁基；單環  $C_7-C_{12}$  芳烷基典型上為苯甲基、甲苯甲基、二甲苯甲基；單或二環  $C_7-C_{12}$  芳烷氧基典型上為甲氧苯甲基、二甲氧苯甲基；單或二環  $C_7-C_{12}$  鹵烷基之實例為溴苯甲基；被取代之二苯基甲基典型上為二(甲苯基)甲基、二(二甲苯基)甲基、二(甲氧苯基)甲基和二(二甲氧苯基)甲基；被取代之三苯基甲基典型上為三(甲苯基)甲基、三(二甲苯基)甲基、三(甲氧苯基)甲基、三(二甲氧苯基)甲基、單甲氧三苯基甲基、二甲氧三苯基甲基和三-對第三丁基苯基甲基；矽烷基典型上為三苯矽烷基、三甲矽烷基、三乙矽烷基、三正丙矽烷基、異丙基二甲矽烷基、第三丁基二甲矽烷基、第三丁基二苯矽烷基、正辛基二甲矽烷基、(1,1,2,2-四甲基乙基)二甲矽烷基； $R-C(O)-$  官能基之實例為乙醯基、三氟乙醯基、丙醯基、丁醯基、戊醯基、己醯基、苯甲醯基、甲苯甲醯基、甲氧苯甲醯基、氯苯甲醯基、溴苯甲醯基、甲氧-、乙氧羰基、正-或異丙氧羰基或正-、異-或第三丁氧羰基或苯氧羰基、苯甲氧羰基、甲-或甲氧-或氯苯氧羰基或氯苯甲氧羰基或 9-芴基甲氧羰基； $R_{17}-SO_2-$  官能基典型上為甲基苯磺基、乙基苯磺基、丙基苯磺基、丁基苯磺基、苯基苯磺基、苯甲基苯磺基、對溴苯磺基、對甲氧基苯磺基和對甲基苯磺基；烷氧乙醯基和苯氧乙醯基典型上為甲氧乙醯

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

基、乙氧乙醯基、苯氧乙醯基、(對甲苯氧基)乙醯基、(對第三丁苯氧基)乙醯基。脞保護基也常被使用在核鹼基上。

核苷和寡核苷酸能夠以共價鍵方式，經由一個連接基鍵結到一個固體撐體上。適合之撐體典型上為矽膠、精密孔玻璃、聚苯乙烯、聚丙醯胺、聚胺甲酸酯、聚烯、三聚氰胺、聚醯胺、聚酯、聚醚、聚醇、環糊精、纖維素和醚化或醯化之纖維衍生物、肝糖、澱粉、殼糖和聚葡萄糖。視所選用之撐體而定，連接基可以為二羧酸、二胺甲酸酯或烷氧矽烷基胺甲酸酯。

本發明之方法可以在一個附加之溶劑下進行。若沒有附加之溶劑，本新穎方法中所使用之液態醇、多元醇或聚合多元醇即是溶劑。適宜之附加溶劑之條件為在反應槽中不會和醇、多元醇或聚合多元醇競爭。它們可以單獨使用或至少與兩種溶劑混合在一起使用。在多元醇之例子中，可以使用溶劑或溶解化劑（使得由於多元醇之膨脹，醇可用於方法中）。這種溶劑之具代表性例子可從由醚、鹵化烴、羧醯胺、內醯胺、亞砒、砒、芳烴、腈、脂烴和環脂烴所組成之族群中選取，而較適宜者是醚、鹵化烴、腈、羧醯胺和內醯胺。在本發明之範圍內，溶解化劑適合使用鹽類，典型上為醋酸銨和碳酸氫銨。

特別適宜之醚為二丁醚、四氫呋喃、二噁烷、乙二醇二乙醚和二甲醚、二甘醇二甲醚、二甘醇二乙醚或三甘醇二甲醚，較適宜者是四氫呋喃、甲基第三丁基醚、二丁

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

醚、二異丙醚或二噁烷。特別適合之鹵化烴是二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、1,1,1-三氯乙烷和1,1,2,2-四氯乙烷。

有用之醯胺為N-烷化或N-二烷化醯胺。典型上為N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二乙基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、四甲脲和六甲基磷酸三醯胺。

較適宜之內醯胺可由 $\gamma$ -丁內醯胺、 $\epsilon$ -己內醯胺、N-甲吡咯啉酮、N-乙醯吡咯啉酮和N-甲基己內醯胺所組成之族群中選取。在本發明之範圍內，更進一步適合之溶劑包括二甲亞砷、二甲砷、二乙砷、三亞甲砷、四亞甲砷、苯、有取代基之苯（較適宜者是氯苯、鄰二氯苯、1,2,4-三氯苯、硝苯、甲苯和二甲苯、乙腈、丙腈、苯甲腈、苯乙腈、戊烷、石油醚、己烷、環己烷和甲基環己烷）。

在本發明之方法中所使用之脂醇、環脂醇、芳脂醇或芳醇、多元醇或聚合多元醇都是被當作受體。

一個含1至20個碳原子之烷醇是適合被使用的，較適宜者是含1至12個碳原子，而最適宜者是含1至6個碳原子之烷醇，典型上一個有代表性之群體是由甲醇、乙醇、正-和異丙醇、正-、異-和第三丁醇、戊醇、己醇、乙二醇、二甘醇單甲醚和單乙醚所組成。在本發明之方法中，一個較適宜之醇類副族群包括C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷醇。特別適宜之醇是甲醇。

另外，含有5至12（較適宜為5至8）個環碳原子之帶有烷基取代基之環烷醇也是適合使用之醇類。典型上可由環戊醇、環己醇、甲基環己醇、環庚醇和環辛醇所組成之族群中選取。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

錄

## 五、發明說明( )

更進一步適合之受體之實例為含有7至30(較適宜為7至20)個碳原子之芳脂醇(較適宜從由未被取代或被烷基或烷氧基所取代之苯甲基醇和β-苯乙醇所組成之族群中選取);含有6至30(較適宜為6至12)個碳原子之芳醇(較適宜從由酚和未被取代或被烷基或烷氧基取代之萘酚所組成之族群中選取);含有2至20個碳原子之多元醇(較適宜從由乙二醇、丙二醇、丁二醇、戊二醇、己二醇、環己二醇、二羥基甲基環己醇、二甘醇、三甘醇、多甘醇、三羥甲基丙烷、異戊四醇、二異戊四醇、甘油和醣類所組成之族群中選取);聚合多元醇(較適宜從由聚乙烯醇、聚醣和羥烷基聚丙烯酸酯和聚甲基丙烯酸酯所組成之族群中選取)。烷基和烷氧基取代基較適宜含有1至4個碳原子。

在本發明之範圍內，醣類受體，典型上是指單醣和寡醣類，例如單、雙、三、四和五醣類。在本發明之較適宜之具體實施例中，單醣和寡醣類為醛醣或酮醣。在本發明之特別適宜之具體實施例中，單醣類為醛戊醣、醛己醣、酮戊醣或酮己醣。

典型上醛戊醣為D-核糖、D-阿拉伯糖、D-木糖、D-來蘇糖；醛己醣典型上為D-阿洛糖、D-阿卓糖、D-葡萄糖、D-甘露糖、D-異葡萄糖、D-艾杜糖、D-半乳糖或D-太洛糖；酮戊醣為D-核酮糖、D-木酮糖；酮己糖為D-阿洛酮糖、D-果糖、D-山梨糖或D-塔格糖。

雙醣類典型上為繭糖、麥芽糖、異麥芽糖、纖維雙糖、龍膽貳糖、蔗糖或乳糖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

三醣類典型上為棉子糖。

多醣類典型上為纖維素、澱粉、聚葡萄糖、肝糖、聚果糖、菊糖、聚甘露糖、聚木糖和聚阿拉伯糖。

在本發明之方法中所使用之無機鹼較適宜由鹼金屬氧化物、重金屬氧化物和氫氧化物（較適宜者是 $\text{SiO}_2$ 或鹼鋁）所組成之族群中選取。

更進一步適合之無機鹼必須為在親核催化反應之條件下可與其進行轉酯反應，而且它們可能是一個緩衝系中之成份。它們較適合為金屬或銨之氟化物、金屬或銨之醛肟酸鹽、酮肟酸鹽、羥肟酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、磷酸鹽、焦硫酸鹽、磺胺酸鹽、亞硝酸鹽、硝酸鹽和碲鹽，為可溶解於醇類或反應混合物中者。較適宜之金屬是指鹼金屬離子，例如 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 和 $\text{Cs}^+$ 。金屬之醛肟酸鹽、酮肟酸鹽、羥肟酸鹽、磺胺酸鹽、碲鹽和磷酸鹽可包含氫原子或 $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷基或未被取代之苯基或被鹵素、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷氧基、氰基或硝苯基所取代之苯基。氟化銨較適宜為四( $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷基)氟化銨，典型上為四(正丁基)氟化銨·HF。更進一步之實例為 $\text{CsF}$ 、 $\text{KF}$ 、 $\text{CH}_3\text{-C(O)-NH-O}^-$ 和 $\text{Mg}(\text{CF}_3\text{CO})_2$ 。研究結果發現將這些親核鹼和有機氮鹼以催化量放在一起使用是特別有用的。

特別有用之有機氮鹼為由芳胺、芳族N-雜環和N- $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷基嗎啉所組成之族群中選取者。典型上代表性之化合物為咪唑、吡啶、N-甲基嗎啉、苯胺和鄰苯二胺與聚乙烯吡啶。在本發明之方法中鹼之使用量可從一個催化量到較高

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



## 五、發明說明( )

之量，典型上可高到相當量或過量。在本發明之範圍內，一個催化量之定義是（以1莫耳核苷或寡核苷酸為準）介於0.01至20%莫耳之間，較適宜者是介於0.1至10%莫耳之間，更適宜者是介於0.1至5%莫耳之間。

在本發明之方法中，每莫耳當量化學式I之官能基，較適宜使用不低於100莫耳當量且高至1000莫耳當量或更高過量受體之經基。

本新穎方法之反應速率可藉由路易士酸之添加而顯著地加快，基於1莫耳之核苷或寡核苷酸，路易士酸之用量為0.01至20%莫耳，較適宜者是0.1至10%莫耳，最適宜者是0.1至5%莫耳。這個高反應速率是本方法之一大優點。較適合使用之路易士酸為金屬鹽類(LiCl)、硼酸鹽或有機金屬錯合物。在本新穎方法中，將有機氮鹼、親核無機鹼和路易士酸一起使用是特別有利的，可得到一高選擇性。

反應在溫度範圍-20°C至+55°C間進行，較適宜之範圍是15°C至35°C，且最適宜之溫度為室溫。

反應時，可適當地將一個含有化學式I、Ia和Ib自由基之核苷或寡核苷酸加入由醇和鹼所組成之溶液或混合物中，並且讓其反應完全。為了單離所需之化合物，任何不溶解之成份可利用過濾之方式除去，然後溶劑亦被除去。殘留物可藉由傳統方法加以純化，例如結晶或層析法。在本新穎方法之特別有利之具體實施例中，從寡核苷酸合成過程所產生之廢液直接流入一由醇和鹼所組成之溶液或混合物中，以便回收大過量使用之核苷酸成份。在這個方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

中，將一個含有化學式 I、Ia 或 Ib 自由基之化合物之廢液流回反應溶液或混合物中，而廢液中之酸成份會被反應一開始即存在於溶液或混合物中之大量過量之鹼所中和。在反應期間，鹼之濃度會降低，而有必要之話，可以再補充。這些酸成份較可能為四唑或其它會影響亞磷酸三酯法中核苷酸縮合反應之酸類。

對於反應混合物之處理，所形成之亞磷酸酯可以用傳統氧化劑（例如  $I_2/H_2O$  / 吡啶或  $S_8$  / 吡啶）加以處理而再得到相當之磷酸酯或硫磷酸酯。將反應溶液蒸發後，將不再有逆反應會發生，而所要之產物常常以萃取法分離而得，且避免使用層析法。

研究結果發現，使用萃取法時，可用檸檬酸鹽緩衝溶液（pH 約 3-4）有效地去除有機氮鹼，例如咪唑。當在水溶液介質中處理時，可得到幾乎完全之分離及良好之相分離。

在本新穎方法之一個特別具體實施例中，若含有一個 H-磷酸根或 H-亞磷酸根之核苷或寡核苷酸附著在一個固相撐體上，並且在一有機氮鹼存在下被反應時，氰乙醇即被當成一個受體使用。在本方法之具體實施例中，一個雙氰乙基亞磷酸酯或氰乙基甲基亞磷酸酯會形成，而其與一弱鹼性之聚合離子交換劑會進行不可逆反應。由於鹽之形成，反應所得之磷化合物仍然連接在離子交換劑上而形成鹽類，在此同時所形成之丙烯腈會被離子交換劑所吸附住。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

本方法之具體實施例可避免在轉酯化期間逆反應之發生，特別是避免使用大量過量之受體。

本發明可以下列實例更詳細地說明。在實例2、5及7中所使用之流出液可以下述方法得到：

從一固相寡核苷酸合成反應器中產生之廢液可依照 Gao 等人 (Gao, H., Gaffney, B.L., Jones, R.A., Tetrahedron Lett., 1991) 之方法收集。從反應器中流出之廢液，將核苷分離後即直接個別流進一個 50 毫升之甲醇/乙腈(2:1)溶液中。

**實施 1：**從二甲氧三苯甲基胸苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯製備 5'-二甲氧三苯甲基胸苷

在 20 - 30°C 下，將 270 毫克 (3.86 毫莫耳) 四唑和 9 微升 (0.5 毫莫耳) 水加入一 4 毫升乙腈溶液 (含有 360 毫克 (0.48 毫莫耳) 二甲氧三苯甲基胸苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯) 中。5 分鐘後，胺基磷酸酯水解完成而得到 5'-二甲氧基三苯甲基胸苷-3'-氰乙基磷酸氫酯。

將 4 毫升甲醇和 350 毫克咪唑加入此溶液中。24 小時後，利用真空蒸發法將反應溶液加以濃縮。將所得到之白至微黃色固體溶入 50 毫升二氯甲烷。

使用 50 毫升水和 50 毫升碳酸氫鈉溶液萃取後，將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。鹽和任何殘留之咪唑以過濾方式去除。利用蒸發法將粗產物濃縮並且利用急驟層析法 (Still, W.C., Kahn, M., Mitra, A., J. Org. Chem. 43:2923, 1978) 加以分離。將產物部份合併在一起濃縮後，溶入 50 毫升二氯甲烷中，然

## 五、發明說明 ( )

後用50毫升之1M碳酸氫三乙銨溶液萃取。將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用過濾方式除去鹽並且在真空狀態下將其濃縮至1毫升。加入200毫升正戊烷後將溶液冷卻到 $-20^{\circ}\text{C}$ 後，沉澱即可完成。利用過濾方式將沉澱物分離出來後，用50毫升正戊烷清洗後在真空狀態下，放在 $\text{P}_4\text{O}_{10}/\text{KOH}$ 上予以乾燥。所得到之產物即為5'-二甲氧三苯甲基胸苷（5'-二甲氧三苯甲基胸苷：431毫克，純度82.5%（乾基））。

實例2：從廢液（得自一寡核苷酸合成反應器）製備5'-二甲氧三苯甲基胸苷

在 $20-30^{\circ}\text{C}$ 下，將含有0.24毫莫耳5'-二甲氧三苯甲基胸苷-3'-基- $\beta$ -氰乙基磷酸酯之100毫升廢液（得自一DNA合成反應器）流進50毫升含有1克咪唑之甲醇溶液中。反應一週後，將反應溶液在真空狀態下予以乾燥而得到白至微黃色之固體，再溶入100毫升二氯甲烷中。經三次100毫升之1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$  (pH 5.5) 溶液萃取後，所有收集之水相再用50毫升二氯甲烷予以萃取。將所有有機相合併，二次用100毫升碳酸氫鈉飽和水溶液加以萃取。碳酸氫鈉相再用50毫升二氯甲烷加以萃取後，收集所有之有機相。將合併之有機相在硫酸鈉上予以乾燥。隨後在5毫升苯中進行再結晶，並且將溶液冷卻至 $-20^{\circ}\text{C}$ 以便再結晶完全。加入50毫升正己烷後繼續在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下再結晶20小時。利用過濾方式將產物分離出來後用50毫升正己烷清洗，然後在真空狀態下，放在 $\text{P}_4\text{O}_{10}/\text{KOH}$ 上予以乾燥。得到之產物即為5'-二甲氧三苯甲基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明( )

胸苷 (5'-二甲氧三苯甲基胸苷：131毫克，純度99%乾燥固體中，含有100%核苷酸間耦合(在合成器中))。

實例3：從2-異丁基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧鳥苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯製備2-異丁基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧鳥苷

在20 - 30°C下，將350毫克(5毫莫耳)四唑和18微升(1毫莫耳)水加入8毫升含有839毫克(1毫莫耳)2-異丁基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧鳥苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯之乙腈溶液中。5分鐘後，胺基磷酸酯水解完成而得到5'-二甲氧三苯甲基鳥苷-3'-氰乙基磷酸氫酯。

將4毫升甲醇和350毫克咪唑加入此溶液中。24小時後，利用真空蒸發法將反應溶液加以濃縮。將所得到之白至微黃色固體溶入50毫升二氯甲烷中。

使用50毫升水和50毫升碳酸氫鈉溶液萃取後，將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。鹽和任何殘留之咪唑以過濾方式去除。利用蒸發法將粗產物濃縮並且利用急驟層析法加以分離。將產物部份收集在一起濃縮後溶入50毫升二氯甲烷中，然後用50毫升之1M碳酸氫三乙銨溶液萃取。將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用過濾方式除去鹽並且在真空狀態下將其濃縮至1毫升。在室溫下，將濃縮後之產物溶液放入50毫升正戊烷中予以沉澱。加入450毫升正戊烷後將溶液冷卻到-20°C後，沉澱即可完成。利用過濾方式將沉澱物分離出來後，用100毫升正戊烷清洗後在真空狀態下，放在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( )

$P_4O_{10}/KOH$ 上予以乾燥。所得到之產物即為2-異丁基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧鳥苷 (2-異丁基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧鳥苷：577毫克，純度90.3% (乾基))。

實例4：從6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯製備6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷

在20 - 30°C下，將350毫克 (5毫莫耳) 四唑和18微升 (1毫莫耳) 水加入8毫升含有857毫克 (1毫莫耳) 6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯之乙腈溶液中。5分鐘後，胺基磷酸酯水解完成而得到5'-二甲氧三苯甲基腺苷-3'-氰乙基磷酸氫酯。

將4毫升甲醇和350毫克咪唑加入此溶液中。24小時後，利用真空蒸發法將反應溶液加以濃縮。將所得到之白至微黃色固體溶入50毫升二氯甲烷中。

使用50毫升水和50毫升碳酸氫鈉溶液萃取後，將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。鹽和任何殘留之咪唑以過濾方式去除。利用蒸發法將粗產物濃縮並且利用急驟層析法加以分離。將產物部份收集在一起濃縮後溶入50毫升二氯甲烷中，然後用50毫升之1M碳酸氫三乙銨溶液萃取。將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用過濾方式除去鹽並且在真空狀態下將其濃縮至1毫升。在室溫下，將濃縮後之產物溶液放入50毫升正戊烷中予以沉澱。加入450毫升正戊烷後將溶液冷卻到-20°C後，沉澱即可完成。利用過濾方式將沉澱物分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( )

離出來後，用100毫升正戊烷清洗後在真空狀態下，放在 $P_4O_{10}/KOH$ 上予以乾燥。所得到之產物即為6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷（6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷：562毫克，純度85.5%（乾基））。

實例5：從廢液（得自一寡核苷酸合成反應器）製備6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷

在20-30°C下，將含有0.82毫莫耳6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷-3'-基-β-氰乙基磷酸酯之300毫升廢液（得自一DNA合成反應器）流進50毫升含有1克咪唑之甲醇溶液中。反應一週後，將反應溶液在真空狀態下予以乾燥而得到白至微黃色之固體，再溶入100毫升二氯甲烷中。利用三次100毫升之1M  $NaH_2PO_4/NaHPO_4$  (pH 5.5) 溶液萃取後，所有收集之水相再用50毫升二氯甲烷予以萃取。將有機相收集後用二次100毫升碳酸氫鈉飽和水溶液加以萃取。碳酸氫鈉相再用50毫升二氯甲烷加以萃取後，收集所有之有機相。將收集之有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用蒸發法將粗產物濃縮並且利用急驟層析法加以分離。將產物部份收集在一起濃縮後溶入50毫升二氯甲烷中，然後用50毫升之1M碳酸氫三乙銨溶液萃取。將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用過濾方式除去鹽並且在真空狀態下將其濃縮至1毫升。在室溫下，將濃縮後之產物溶液放入50毫升正戊烷中予以沉澱。加入200毫升正戊烷後將溶液冷卻到-20°C後，沉澱即可完成。利用過濾方式將沉澱物分離出來後，用50毫升正戊

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明( )

烷清洗後在真空狀態下，放在 $P_4O_{10}/KOH$ 上予以乾燥。所得之產物即為6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷(6-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷：380毫克，純度75.5%乾燥固體，含有100%核苷酸間耦合(在合成器中))。

實例6：從4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯製備4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷

在20-30°C下，將350毫克(5毫莫耳)四唑和18微升(1毫莫耳)水加入8毫升含有833毫克(1毫莫耳)4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷-3'-基-β-氰乙基二異丙基胺基磷酸酯之乙醇溶液中。5分鐘後，胺基磷酸酯水解完成而得到4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基胞苷-3'-氰乙基磷酸氫酯。

將4毫升甲醇和350毫克咪唑加入此溶液中。24小時後，利用真空蒸發法將反應溶液加以濃縮。所得到之白至微黃色固體溶入50毫升二氯甲烷中。

使用50毫升水和50毫升碳酸氫鈉溶液萃取後，將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。鹽和任何殘留之咪唑以過濾方式去除。利用蒸發法將粗產物濃縮並且利用急驟層析法加以分離。將產物部份收集在一起濃縮後溶入50毫升二氯甲烷中，然後用50毫升之1M碳酸氫三乙銨溶液萃取。將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用過濾方式除去鹽並且在真空狀態下將其濃縮至1毫升。在室溫下，將濃縮後之產物溶液放

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



## 五、發明說明 ( )

入 50 毫升正戊烷中予以沉澱。加入 450 毫升正戊烷後將溶液冷卻到  $-20^{\circ}\text{C}$  後，沉澱即可完成。利用過濾方式將沉澱物分離出來後，用 100 毫升正戊烷清洗後在真空狀態下，放在  $\text{P}_4\text{O}_{10}/\text{KOH}$  上予以乾燥。所得到之產物即為 4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷 (4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷：527 毫克，純度 83.2% (乾基))。

**實例 7：**從廢液 (得自一寡核苷酸合成反應器) 製備 4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷

在  $20 - 30^{\circ}\text{C}$  下，將含有 0.27 毫莫耳 4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧腺苷-3'-基- $\beta$ -氰乙基磷酸酯之 100 毫升廢液 (得自一 DNA 合成反應器) 流進 50 毫升含有 1 克咪唑之甲醇溶液中。反應一週後，將反應溶液在真空狀態下予以乾燥而得到白至微黃色之固體，再溶入 100 毫升二氯甲烷中。利用三次 100 毫升之  $1\text{M NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$  (pH 5.5) 溶液萃取後，所有收集之水相再用 50 毫升二氯甲烷予以萃取。將有機相收集後用二次 100 毫升碳酸氫鈉飽和水溶液加以萃取。碳酸氫鈉相再用 50 毫升二氯甲烷加以萃取後，收集所有之有機相。將收集之有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用蒸發法將粗產物濃縮並且利用急驟層析法加以分離。將產物部份收集在一起濃縮後溶入 50 毫升二氯甲烷中，然後用 50 毫升之  $1\text{M}$  碳酸氫三乙銨溶液萃取。將有機相在硫酸鈉上予以乾燥。利用過濾方式除去鹽並且在真空狀態下將其濃縮至 1 毫升。在室溫下，將濃縮後之產物溶液放入 50 毫升正戊烷中予以沉

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

澱。加入200毫升正戊烷後將溶液冷卻到 $-20^{\circ}\text{C}$ 後，沉澱即可完成。利用過濾方式將沉澱物分離出來後，用50毫升正戊烷清洗後在真空狀態下，放在 $\text{P}_4\text{O}_{10}/\text{KOH}$ 上予以乾燥。所得之產物即為4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷(4-苯甲醯基-5'-二甲氧三苯甲基-2'-去氧胞苷：163毫克，純度91.5%乾燥固體，含有100%核苷酸間耦合(在合成器中))。

實例8：從廢液(得自一寡核苷酸合成反應器)製備N-甲基-N-(5'-二甲氧三苯甲基-3'-去氧胸苷-3'-基)-(5'-去氧胸苷-5'-基)乙醯胺

將含有160毫克N-甲基-N-(5'-二甲氧三苯甲基-3'-去氧胸苷-3'-基)-(3'-氰乙基-H-磷醯基-5'-去氧胸苷-5'-基)乙醯胺之5毫升廢液(得自一DNA合成反應器)流進50毫升含有1克咪唑之甲醇溶液中。在 $20-25^{\circ}\text{C}$ 下，持續反應3天後，用5毫升水將反應混合物稀釋。然後將包含30克碘、20毫升水、200毫升吡啶及750毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中，溶液加入之量必須足夠使得碘之棕色至少能保留5分鐘。然後利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成微黃色之固體，再溶入一由100毫升之40%  $\text{NaHSO}_3$  水溶液及50毫升乙酸乙酯所組成之乳液中。利用萃取法將水相分離出來後，再經二次50毫升碳酸氫鈉水溶液萃取有機相。將萃取後之水相收集起來，再用10毫升乙酸乙酯萃取一次。將萃取後之有機相收集起來，再用二次50毫升之1M  $\text{MgSO}_4$  水溶液萃取之。然後在2克乾之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

硫酸鈉上予以乾燥。將鹽類過濾出來後，在真空狀態下將濾液濃縮至乾燥為止。將乾燥後之固體溶入5毫升CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/甲醇(9:1)溶液後，利用矽膠管柱予以層析分離。將產物部份收集後，在高真空狀態下予以乾燥。最後之產物，N-甲基-N-(5'-二甲氧三苯甲基-3'-去氧胸苷-3'-基)-(5'-去氧胸苷-5'-基)乙醯胺以白色泡沫之形式沉澱出來，產量為40毫克(為理論值之31%)。

<sup>1</sup>H-NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 標準 = TMS, d [ppm]): 8.8: 2s, NH; 7.7: s, 1H, H<sup>6</sup>; 7.45 - 7.2: DMTr; 7.09: s, 1H, H<sup>6</sup>; 6.82: 2m, 4H, DMTr; 6.33: t, 1H, 1'; 6.15: t, 1H, 1'; 5.26 - 4.95: m, 1H, 3' at NRCH<sub>3</sub>, 二種轉動異構物 3:1; 4.25 - 4: m, 2H; 3.75: s, 6H, DMTr; 3.63, 3.4, 3.25: 3m, 4H; 2.9, 2.85: 2s, 3H, CH<sub>3</sub> of NRCH<sub>3</sub>, 二種轉動異構物: 3:1; 2.65 - 2: m; 1.88: 2H, 1.8: 1H, 2s, CH<sub>3</sub><sup>5</sup>, 2 rotamers: 3:1; 1.5: 1H, 1.45: 2H, 2s, CH<sub>3</sub><sup>5</sup>, 二種轉動異構物: 1:3。

實例9: 從廢液(得自一寡核苷酸合成反應器)製備5'-二甲氧三苯甲基-N<sup>6</sup>-三甲基乙醯基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)-腺苷

將含有160毫克N-甲基-N-(5'-二甲氧三苯甲基-3'-去氧胸苷-3'-基)-(3'-氰乙基-H-磷醯基-5'-去氧胸苷-5'-基)乙醯胺之5毫升廢液(得自一DNA合成反應器)流進50毫升含有1克咪唑之甲醇溶液中。在20-25°C下，持續反應3天後，用5毫升水將反應混合物稀釋。然後將包含30克碘、20毫升水、200毫升吡啶及750毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中，溶液加入之量必須足夠使得碘之棕色至少能保留5分鐘。然後利用真空

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

蒸發法將反應混合物濃縮成微黃色之固體，再溶入一由100毫升之40% NaHSO<sub>3</sub>水溶液及50毫升乙酸乙酯所組成之乳液中。利用萃取法將水相分離出來後，再經二次50毫升碳酸氫鈉水溶液萃取有機相。將萃取後之水相收集起來，再用10毫升乙酸乙酯萃取一次。將萃取後之有機相收集起來，再用二次50毫升之1M MgSO<sub>4</sub>水溶液萃取之。然後在2克乾之硫酸鈉上予以乾燥。將鹽類過濾出來後，在真空狀態下將濾液濃縮至乾燥為止可得到320克之粗產物。將乾燥後之固體溶入5毫升CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/甲醇(9:1)溶液後，利用矽膠管柱予以層析分離。將產物部份收集後，在高真空狀態下予以乾燥。最後之產物5'-二甲氧三苯甲基-N<sup>6</sup>-三甲基乙醯基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)-腺苷會以黃色油之形式沉澱出來，產量為223毫克(為理論值之58%)。

<sup>1</sup>H-NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 標準 = TMS, δ [ppm]): 8.69: s, 1H, 腺嘌呤; 8.48: s, 1H, 腺嘌呤; 8.2: s, 1H, 腺嘌呤; 7.5 - 7.2: m, 9H, DMTr; 7.12 - 6.88: m, 4H, 2-氟苯基; 6.83: 2m, 4H, DMTr; 6.25: d, 1H, 1'; 5.35: m; 4.43: m, 1H; 4.3: m, 1H; 3.76: s, 6H; 3.5, 3.38; 2m, 2H, 5'; 3.15: m, 1H, Fpmp; 2.96: m, 2H; Fpmp; 2.78: s, 3H, CH<sub>3</sub> of Fpmp, m, 1H, FPMP; 2.15 - 1.75: m, 4H, Fpmp; 1.4: 9H: piv。

**實例 10**：從5'-二甲氧三苯甲基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)尿苷-3'-基氰乙基二異丙基胺基磷酸酯水解產物製備5'-二甲氧三苯甲基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)尿苷；與甲

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

紅

## 五、發明說明 ( )

醇及KF進行轉酯化反應；在操作時， $I_2/H_2O$ 當作驟冷溶液而無 $I_2$ 受體

將10毫升含有0.138毫莫耳5'-二甲氧三苯甲基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)尿苷-3'-基-氰乙基-H-磷酸酯和0.694毫莫耳四唑之乙腈溶液加入50毫升之0.1M KF之甲醇溶液中。在20-25°C下，反應在2天內完成。用5毫升水稀釋反應混合物。然後將一含有30克碘、20毫升水、200毫升吡啶及750毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中，溶液加入之量必須足夠使得碘之棕色至少能保留5分鐘。然後利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成微黃色之固體，再溶入一由50毫升水及50毫升乙酸乙酯混合成之乳液中。收集所有之有機相並且用四次50毫升水萃取之。收集所有之水相並且再一次用10毫升乙酸乙酯萃取之。收集所有之有機相，用50毫升NaCl飽和溶液萃取後，在2克乾之硫酸鈉上乾燥之。利用過濾方式將鹽去除並將濾液予以濃縮。將固體溶入5-10毫升乙酸乙酯中，然後慢慢地將溶液流進200毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用50毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在 $P_4O_{10}/KOH$ 上乾燥24小時，即可得到67.7毫克（理論值之69%）之5'-二甲氧三苯甲基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)尿苷（理論值之75%）。

$^1H-NMR$ : ( $CDCl_3$ , 標準 = TMS,  $\delta$  [ppm]): 7.75: d, 1H,  $H^6$ ; 7.45 - 7.15: m, 9H, DMTr; 7.1 - 6.75: m, 4H, Fpmp, 2m, 4H, DMTr; 6.15: d, 1H, 1'; 5.2: d, 1H,  $H^5$ ; 4.74: m, 1H, 2'; 4.33: m, 1H, 3'; 4.15: m, 1H, 4'; 3.76: s, 6H, DMTr; 3.38: m, 2H, 5'; 3.12: s, 3H,  $CH_3$  of Fpmp; 3.2 - 2.8: m, 4H, Fpmp; 2.15 - 1.8: m, 4H。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

實例 11：從 5'-二甲氧三苯甲基-N<sup>4</sup>-苯甲醯基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)胞苷-3'-基氰乙基二異丙基胺基磷酸酯水解產物製備 5'-二甲氧三苯甲基-N<sup>4</sup>-苯甲醯基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)胞苷

將 10 毫升含有 0.129 毫莫耳 5'-二甲氧三苯甲基-N<sup>4</sup>-苯甲醯基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)胞苷-3'-基-氰乙基-H-磷酸酯和 0.645 毫莫耳四唑之乙腈溶液加入 50 毫升之 0.1M KF 之甲醇溶液中。在 20 - 25°C 下，反應在 2 天內完成。用 5 毫升水稀釋反應混合物。然後將一含有 30 克碘、20 毫升水、200 毫升吡啶及 750 毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中，溶液加入之量必須足夠使得碘之棕色至少能保留 5 分鐘。利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成微黃色之固體，再溶入一由 50 毫升水及 50 毫升乙酸乙酯混合成之乳液中。收集所有之有機相並且用四次 50 毫升水萃取之。收集所有之水相並且再一次用 10 毫升乙酸乙酯萃取之。收集所有之有機相，用 50 毫升 NaCl 飽和溶液萃取後，在 2 克乾之硫酸鈉上乾燥之。利用過濾方式將鹽去除並將濾液予以濃縮。將固體溶入 5 - 10 毫升乙酸乙酯中，然後慢慢地將溶液流進 200 毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用 50 毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在 P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>/KOH 上乾燥 24 小時，即可得到 83 毫克（理論值之 69%）之 5'-二甲氧三苯甲基-N<sup>4</sup>-苯甲醯基-2'-(1-(2-氟苯基)-4-甲氧六氫吡啶-4-基)胞苷（理論值之 80%）。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( )

$^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 標準 = TMS, d [ppm]): 8.28: d, 1H; 7.82: d, 2H, Bz; 7.6 - 7.23: m, 14H, Bz, DMTr; C; 7.03 - 6.77: d, 4H, DMTr, 2d, 4H, Fpmp; 4.66: 6, 1H, 1'; 4.38: 6, 1H, 2'; 4.17: m, 1H, 3', 3.74: s, 6H, DMTr; 3.48: m, 2H, 5'; 3.25 - 2.85: s, 3H,  $\text{CH}_3$ , Fpmp, m, 4H, Fpmp; 2.18 - 1.95: m, 4H, Fpmp。  $^{19}\text{F-NMR}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , 標準 = TFA, d [ppm]): -123.5。

實例 12: 從 5'-二甲氧三苯甲基- $\text{N}^4$ -(4-第三丁苯氧乙醯基-2'-去氧胞苷-3'-基氰乙基二異丙基胺基磷酸酯水解產物製備 5'-二甲氧三苯甲基- $\text{N}^4$ -(4-第三丁苯氧乙醯基-2'-去氧胞苷

將 4 毫升含有 200 毫克 5'-二甲氧三苯甲基- $\text{N}^4$ -(4-第三丁苯氧乙醯基-2'-去氧胞苷 (得自 5'-二甲氧三苯甲基- $\text{N}^4$ -(4-第三丁苯氧乙醯基-2'-去氧胞苷-3'-基氰乙基-H-磷酸酯水解產物) 和 2 毫莫耳四唑之乙醇溶液加入 40 毫升之 0.2M KF 之甲醇溶液中。在 20 - 25°C 下，去亞磷醯化反應在 4 小時內完成。在反應混合物中加入 1 毫升吡啶後再加入 50 毫克硫。在 20 - 25°C 下，將反應混合物攪拌 60 分鐘，過濾，然後倒入 100 毫升水中。所形成之乳液用三次 30 毫升乙酸乙酯萃取之。收集所有之有機相，用 50 毫升 NaCl 飽和溶液萃取之，然後放在 2 克乾之硫酸鈉上乾燥。利用過濾方式將鹽去除並在真空狀態下將濾液濃縮至全乾。將固體溶入 10 毫升乙酸乙酯中，然後慢慢地將溶液流進 300 毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用 50 毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在  $\text{P}_4\text{O}_{10}/\text{KOH}$  上乾燥 24 小時，即可得到

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

112.8 毫克 (理論值之 72.1%) 之 5'-二甲氧三苯甲基-N<sup>4</sup>-(4-第三丁苯氧乙醯基)-2'-去氧胞苷。

實例 13：在裝有 I<sub>2</sub>/水之驟冷器中，伴隨檸檬酸緩衝劑，與咪唑之轉酯化反應：從廢液 (得自一寡核苷酸合成器) 製備 5'-二甲氧三苯甲基-(3-N-三氟乙醯基胺丙基)-2'-去氧尿苷

將 5 毫升含有 120 毫克 5'-二甲氧三苯甲基-(3-N-三氟乙醯基胺丙基)-2'-去氧尿苷-3'-基氰乙基-H-磷酸酯之廢液 (得自一 DNA 合成器中) 流進 80 毫升甲醇溶液 (每 50 毫升甲醇中含有 1 克咪唑) 中。在 20 - 25°C 下，讓反應持續進行 3 天。用 8 毫升水稀釋反應混合物。然後將一含有 30 克碘、20 毫升水、200 毫升吡啶和 750 毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中。溶液加入量必須使得碘之棕色能維持至少 5 分鐘。利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成一微黃色固體，而後溶入由 50 毫升 pH: 3-4 之緩衝劑和 40 毫升乙酸乙酯混合成之乳液中。緩衝劑之成份為：每升水溶液中含有 24 克 NaOH、117 克檸檬酸和 35 克氯化鈉。將含有咪唑之水相分離出來，然後用二次 50 毫升緩衝劑再將有機相萃取一次。然後所得之有機相再先後用碳酸氫鈉飽和水溶液及 50 毫升氯化鈉飽和溶液萃取之。將所得之有機相放在 2 克乾之硫酸鈉上乾燥之。利用過濾方式將鹽去除並將濾液予以濃縮。將固體溶入 5 - 10 毫升乙酸乙酯中，然後慢慢地將溶液流進 250 毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用 50 毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在 P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>/KOH 上乾燥 24 小時，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



## 五、發明說明 ( )

即可得 80 毫克 (理論值之 86%) 5'-二甲氧三苯甲基-(3-N-三氟乙醯基胺丙基)-2'-去氧尿苷。

<sup>1</sup>H-NMR: (CDCl<sub>3</sub>, 標準 = TMS, d [ppm]): 7.45 - 6.9: m, 9H, DMTr; 6.73: 2m, 4H, DMTr; 6.48: 6, 1H, 1'; 4.56: m, 1H, 3'; 4.04: m, 1H, 4'; 3.7: s, 6H, DMTr; 3.5 - 3.4: 2m, 3.35 - 3.25: 2m, 2H, 5'; 2.97: s, 2H, NH<sub>2</sub>; 2.47 - 2.37: m, 1H, 2'; 2.35 - 2.2: m, 1H, 2'; 1.82: m, 1H; 1.6: m, 1H; 1.45 - 1.15: m, 4H, 胺丙基。

實例 14: 從廢液 (得自一寡核苷酸合成器) 製備 5'-二甲氧三苯甲基-5-(丙炔-1-基)-2'-去氧尿苷

將 5 毫升含有 250 毫克 (5'-二甲氧三苯甲基-5-(丙炔-1-基)-2'-去氧尿苷-3'-基)-氰乙基-H-磷酸酯之廢液 (得自一 DNA 合成器中) 流進 67 毫升甲醇溶液 (每 50 毫升甲醇中含有 1 克咪唑) 中。在 20 - 25°C 下, 讓反應持續進行 3 天。用 8 毫升水稀釋反應混合物。然後將一含有 30 克碘、20 毫升水、200 毫升吡啶和 750 毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中。溶液加入量必須使得碘之棕色能維持至少 5 分鐘。利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成一微黃色固體, 而後溶入由 50 毫升 pH: 3-4 之緩衝劑和 40 毫升乙酸乙酯混合成之乳液中。緩衝劑之成份為: 每升水溶液中含有 24 克 NaOH、117 克檸檬酸和 35 克氯化鈉。將含有咪唑之水相分離出來, 然後用二次 50 毫升緩衝劑再將有機相萃取一次。然後所得之有機相再先後用碳酸氫鈉飽和水溶液及 50 毫升氯化鈉飽和溶液萃取之。將所得之有機相放在 2 克乾之硫酸鈉上乾燥之。利用過濾方式將鹽去除並將濾液予以濃縮。將固體溶入 5 - 10 毫升乙酸乙酯

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS) A4 規格 (210×297 公釐)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

中，然後慢慢地將溶液流進250毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用50毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在 $P_4O_{10}/KOH$ 上乾燥24小時，即可得125毫克（理論值之68%）5'-二甲氧三苯甲基-5-(丙炔-1-基)-2'-去氧尿苷。

$^1H-NMR$ : ( $CDCl_3$ , 標準 = TMS,  $\delta$  [ppm]): 7.95: s, 1H, NH; 7.4 - 7.15: m, 10H, DMTr; 6.78: 2s, 4H, DMTr; 6.24: t, 1H, 1'; 4.5: m, 3'; 4.06: m, 4'; 3.75: s, 6H, DMTr; 3.28: m, 2H, 5'; 2.43: m, 1H, 2'; 2.22: m, 1H, 2'; 1.61: s, 3H, 丙炔基之 $CH_3$ 。

實例 15: 從廢液（得自一寡核苷酸合成器）製備5'-二甲氧三苯甲基-5-(3-三氟胺丙炔-1-基)-2'-去氧尿苷

將5毫升含有200毫克5'-二甲氧三苯甲基-5-(3-三氟胺丙炔-1-基)-2'-去氧尿苷-3'-基氰乙基-H-磷酸酯之廢液（得自一DNA合成器中）流進78毫升甲醇溶液（每50毫升甲醇中含有1克咪唑）中。在20-25°C下，讓反應持續進行3天。用7.8毫升水稀釋反應混合物。然後將一含有30克碘、20毫升水、200毫升吡啶和750毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中。溶液加入量必須使得碘之棕色能維持至少5分鐘。利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成一微黃色固體，而後溶入由50毫升pH: 3-4之緩衝劑和40毫升乙酸乙酯混合成之乳液中。緩衝劑之成份為：每升水溶液中含有24克NaOH、117克檸檬酸和35克氯化鈉。將含有咪唑之水相分離出來，然後用二次50毫升緩衝劑再將有機相萃取一次。然後所得之有機相再先後

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

用碳酸氫鈉飽和水溶液及50毫升氯化鈉飽和溶液萃取之。將所得之有機相放在2克乾之硫酸鈉上乾燥之。利用過濾方式將鹽去除並將濾液予以濃縮。將固體溶入5-10毫升乙酸乙酯中，然後慢慢地將溶液流進250毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用50毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在 $P_4O_{10}/KOH$ 上乾燥24小時，即可得113毫克（理論值之73%）5'-二甲氧三苯甲基-5-(3-三氟乙醯胺丙炔-1-基)-2'-去氧尿苷。

$^1H-NMR$ : ( $CDCl_3$ , 標準 = TMS,  $\delta$  [ppm]): 8.15: s, 1H, NH; 7.4 - 7.15: 10H, DMTr,  $H^6$ ; 6.26: t, 1H, 1'; 4.53: m, 1H, 3'; 3.97: m, 2H, 5'; 3.73: s, 6H, DMTr; 3.3: m, 2H, 丙炔基之  $CH_3$ ; 2.48: m, 1H, 2'; 2.25: m, 1H, 2'。

實例 16：從廢液（得自一寡核苷酸合成器）製備 N-(5'-二甲氧三苯甲基-3'-去氧胸苷-3'-基)-N-丙基-(5'-去氧胸苷-5'-基)乙醯胺

將5毫升含有200毫克 N-(5'-二甲氧三苯甲基-3'-去氧胸苷-3'-基)-N-丙基-(5'-去氧胸苷-3'-基)乙基-H-膦醯-5'-基)乙醯胺之廢液（得自一DNA合成器中）流進78毫升甲醇溶液（每50毫升甲醇中含有1克咪唑）中。在20-25°C下，讓反應持續進行3天。用7.8毫升水稀釋反應混合物。然後將一含有30克碘、20毫升水、200毫升吡啶和750毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中。溶液加入量必須使得碘之棕色能維持至少5分鐘。利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成一微黃色固體，而後溶入由50毫升pH: 3-4之緩衝劑和40毫升乙酸乙酯混合成之乳液中。緩衝劑之成份為：每升水溶液中含有24克

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

NaOH、117克檸檬酸和35克氯化鈉。將含有咪唑之水相分離出來，然後用二次50毫升緩衝劑再將有機相萃取一次。然後所得之有機相再先後用碳酸氫鈉飽和水溶液及50毫升氯化鈉飽和溶液萃取之。將所得之有機相放在2克乾之硫酸鈉上乾燥之。利用過濾方式將鹽去除並將濾液予以濃縮。將固體溶入5-10毫升乙酸乙酯中，然後慢慢地將溶液流進600毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用50毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在 $P_4O_{10}/KOH$ 上乾燥24小時，即可得107毫克（理論值之66%）N-(5'-二甲氧三苯甲基-3'-去氧胸苷-3'-基)-N-丙基-(5'-去氧胸苷-5'-基)乙醯胺。

$^1H-NMR$ : ( $CDCl_3$ , 標準 = TMS,  $\delta$  [ppm]): 7.65: s, 1H,  $H^6$ ; 7.4 - 7.15: m, 9H, DMTr; 7.1: s, 1H,  $H^6$ ; 6.77: 2s, 4H, DMTr; 6.53: t, 1H, 1'; 6.13: t, 1H, 1'; 4.28: m, 1H, 3'; 4.1: m, 2H, 3', 4'; 3.72: s, 6H, DMTr, M, 1H; 3.52: m, 4', 1H; 3.5: d, 1H; 3.15 - 2.85: m, 3H, 5', 乙醯胺之 $CH_2$ ; 2.56: m, 1H, 2'; 2.45 - 2.25: m, 3H, 2', 丙基之 $CH_2$ ; 2.2 - 2.1: 2H, 2'; 1.83: s, 3H,  $CH_3^5$ ; 1.45: s, 3H,  $CH_3^5$ ; 1.22: m, 2H, 丙基之 $CH_2$ ; 0.73: t, 3H, 丙基之 $CH_3$ 。

**實例 17**：從廢液（得自一寡核苷酸合成器）製備 5'-二甲氧三苯甲基-2'-丙基-5-甲尿苷

將 5 毫升含有 400 毫克 (5'-二甲氧三苯甲基-2'-丙基-5-甲尿苷)-3'-氰乙基-N,N-二異丙基胺基磷酸酯之廢液（得自一 DNA 合成器中）流進 100 毫升甲醇溶液（每 50 毫升甲醇中含有 1 克咪唑）中。在 20 - 25°C 下，讓反應持續進行 7 天。用 20 毫

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

升水稀釋反應混合物。然後將一含有30克碘、20毫升水、200毫升吡啶和750毫升四氫呋喃之溶液加入反應混合物中。溶液加入量必須使得碘之棕色能維持至少5分鐘。利用真空蒸發法將反應混合物濃縮成一微黃色固體，而後溶入由50毫升pH: 3-4之緩衝劑和40毫升乙酸乙酯混合成之乳液中。緩衝劑之成份為：每升水溶液中含有24克NaOH、117克檸檬酸和35克氯化鈉。將含有咪唑之水相分離出來，然後用二次50毫升緩衝劑再將有機相萃取一次。然後所得之有機相再先後用碳酸氫鈉飽和水溶液及50毫升氯化鈉飽和溶液萃取之。將所得之有機相放在2克乾之硫酸鈉上乾燥之。利用過濾方式將鹽去除並將濾液予以濃縮。將固體溶入5-10毫升乙酸乙酯中，然後慢慢地將溶液流進600毫升正戊烷中。產物以白色非結晶狀沉澱出來。將沉澱物過濾後，用50毫升正戊烷清洗，然後在真空狀態下，在 $P_4O_{10}/KOH$ 上乾燥24小時，即可得258毫克（理論值之86%）黃色油狀之5'-二甲氧三苯甲基-2'-丙基-5-甲尿甘。

$^1H-NMR$ : ( $CDCl_3$ , 標準 = TMS,  $\delta$  [ppm]): 8.45: s, 1H, NH; 7.57: s, 1H, H<sup>6</sup>; 7.45 - 7.15: m, 9H, DMTr; 6.75: 2s, 4H, DMTr; 5.9: d, 1H, 1'; 4.38: m, 1H, 3'; 4.0: m, 1H, 4'; 3.95: m, 1H, 2'; 3.72: s, 6H, DMTr; 3.8 - 3.4: m, 2H, 丙基; 3.6 - 3.3: 4m, 2H, 5'; 1.56: m, 2H, 丙基; 1.88: t, 3H, 丙基。

**實例 18**：亞磷酸酯在一聚合物上之轉酯化反應（以甲醇為受體）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

在 20 - 30°C 下，將 685 毫克控制孔玻璃 (CPG) (其與胸苷-5'-氰乙基-H-膦酸酯衍生而得，且載負著核苷，密度為 36 毫莫耳/克) 與 10 毫升含有 2% N-甲基嗎啉之甲醇溶液反應。核苷經由一琥珀醯基以共價鍵方式鍵結在控制孔玻璃上之 3'-羥基。一小時後，137 毫克之固體樣品從反應混合物中取出。撐體用四次 2 毫升乙腈清洗後，與含有 30 克碘、20 毫升水、200 毫升吡啶及 750 毫升四氫呋喃之溶液反應一小時。所得之固體依序用十次 2 毫升乙腈及十次 2 毫升乙醚清洗。將撐體乾燥後，在 55 - 60°C 下，用一濃氨水溶液加以處理，然後將固體 (已無核苷存在) 過濾掉。濾液先凍乾並且溶入 0.1M, pH 7 之乙酸三乙銨中，然後用 HPLC 分析其成份。結果檢測出一個含有 5'-胸苷-單磷酸酯、胸苷和胸苷-5'-甲基磷酸酯之混合物。胸苷-5'-單磷酸酯是由碘氧化及氨解反應後之抽出物所產生的。胸苷-5'-甲基磷酸酯是在氧化及水解反應操作中，由胸苷-5-甲基-H-膦酸酯在去亞磷醯基化過程中之一個中間體所產生的。胸苷是在琥珀醯基連接基皂化後，由與聚合物鍵結之胸苷在去亞磷醯基化後之產物中所產生的。剩下之撐體再進行 36 小時上述之氧化及氨解反應條件。胸苷全然在撐體之濾液中得到，總產率約為 80%。

實例 19：亞磷酸酯在一聚合物上之轉酯化反應 (以氰乙醇為受體)

在 20 - 30°C 下，將 139 毫克控制孔玻璃 (CPG) (其與胸苷-5'-氰乙基-H-膦酸酯衍生而得，且載負著核苷，密度為 36 毫莫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

耳／克) 與 10 毫升含有 10% N-甲基嗎啉之氰乙醇溶液反應。核甘經由一琥珀醯基以共價鍵方式鍵結在控制孔玻璃上之 3'-羥基。100 分鐘後，撐體用四次 2 毫升乙腈清洗後，與含有 30 克碘、20 毫升水、200 毫升吡啶及 750 毫升四氫呋喃之溶液反應一小時。所得之固體依序用十次 2 毫升乙腈及十次 2 毫升乙醚清洗。將撐體乾燥後，在 55 - 60°C 下，用一濃氨水溶液加以處理，然後將固體 (已無核甘存在) 過濾掉。濾液先凍乾並且溶入 0.1M, pH 7 之乙酸三乙銨中，然後用 HPLC 分析其成份。結果檢測出一個含有 5'-胸甘-單磷酸酯和胸甘之混合物 (比例為 3:97)。胸甘-5'-單磷酸酯是由碘氧化及氨解反應後之抽出物所產生的。胸甘是在琥珀醯基連接基皂化後，由與聚合物鍵結之胸甘在去亞磷醯基化後之產物中所產生的。總產率約為 80%。

**實例 20：**亞磷酸酯在一聚合物上之轉酯化反應 (在二-三氟醋酸鎂存在下，以甲醇為受體)

在 20 - 30°C 下，將 139 毫克控制孔玻璃 (CPG) (其與胸甘-5'-氰乙基-H-膦酸酯衍生而得，且載負著核甘，密度為 36 毫莫耳／克) 與 10 毫升含有 0.1M  $Mg(OTf)_2$  之 N-甲咪唑／甲醇 (1:9) 溶液反應。核甘經由一琥珀醯基以共價鍵方式鍵結在控制孔玻璃上之 3'-羥基。30 分鐘後，撐體用四次 2 毫升乙腈清洗後，與含有 30 克碘、20 毫升水、200 毫升吡啶及 750 毫升四氫呋喃之溶液反應一小時。所得之固體依序用十次 2 毫升乙腈及十次 2 毫升乙醚清洗。將撐體乾燥後，在 55 - 60°C 下，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( )

用一濃氨水溶液加以處理，然後將固體（已無核苷存在）過濾掉。濾液先凍乾並且溶入 0.1M, pH 7 之乙酸三乙銨中，然後用 HPLC 分析其成份。結果檢測出一個含有胸苷和胸苷-5'-甲基磷酸酯之混合物。胸苷-5'-甲基磷酸酯是在碘氧化及水解反應操作中，由胸苷-5-甲基-H-磷酸酯在去亞磷醯基化過程中之一個中間體所產生的。胸苷是在琥珀醯基連接基皂化後，由與聚合物鍵結之胸苷在去亞磷醯基化後之產物中所產生的。胸苷與胸苷-5'-甲基磷酸酯之比例為 97:3。總產率約為 80%。

實例 21：亞磷酸酯在一聚合物上之轉酯化反應（在氯化鋰存在下，以氰乙醇為受體）

在 20 - 30°C 下，將 139 毫克控制孔玻璃 (CPG)（其與胸苷-5'-氰乙基-H-磷酸酯衍生而得，且載負著核苷，密度為 36 毫莫耳 / 克）與 10 毫升含有 0.1M LiCl 之 N-甲嗎啉 / 氰乙醇 (1:9) 溶液反應。核苷經由一琥珀醯基以共價鍵方式鍵結在控制孔玻璃上之 3'-羥基。30 分鐘後，撐體用四次 2 毫升乙腈清洗後，與含有 30 克碘、20 毫升水、200 毫升吡啶及 750 毫升四氫呋喃之溶液反應一小時。所得之固體依序用十次 2 毫升乙腈及十次 2 毫升乙醚清洗。將撐體乾燥後，在 55 - 60°C 下，用一濃氨水溶液加以處理，然後將固體（已無核苷存在）過濾掉。濾液先凍乾並且溶入 0.1M, pH 7 之乙酸三乙銨中，然後用 HPLC 分析其成份。結果檢測出一個含有胸苷和胸苷-5'-磷酸酯之混合物。胸苷-5'-磷酸酯是在碘氧化及氨解反應操

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線



## 五、發明說明( )

作中，由胸苷-5-甲基-H-磷酸酯在去亞磷醯基化過程中之一個中間體所產生的。胸苷是在琥珀醯基連接基皂化後，由與聚合物鍵結之胸苷在去亞磷醯基化後之產物中所產生的。胸苷與胸苷-5'-磷酸酯之比例為98:2。總產率約為80%。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

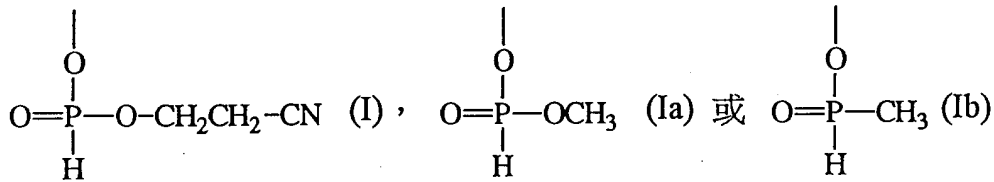
裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 核苷之製備方法 )

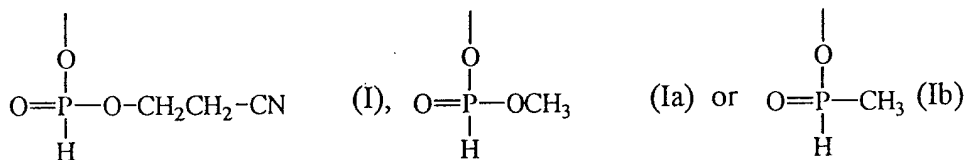
一種製備天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸之方法，該方法係由至少兩個這樣的核苷及／或核苷相似體，其在鹼性分子含有一未被取代或已取代之核鹼基B自由基及一化學式為R<sub>1</sub>-O-之被保護羥基（式中之R<sub>1</sub>為保護基），或其直接鍵結到一羥基之氧原子上或經由一連接基鍵結到一固相撐體上，由核苷單體或由在鹼性分子上，除了上述自由基外，還附加一式I、Ia或Ib



基之寡核苷酸，使該核苷或寡核苷酸與一過量之脂醇、環脂醇、芳脂醇或含1-30個碳原子之芳醇、含2-50個碳原子之多元醇或聚合多元醇，在有或無惰性溶劑存在下，在至少一催化量之無機鹼或有機氮鹼（該鹼之pK值為4-10者）存在下反應，將式I、Ia或Ib之基轉化成羥基-OH而製備。

英文發明摘要 (發明之名稱： Process for the preparation of nucleosides )

A process for the preparation of natural or synthetic nucleosides, nucleoside analogs or oligonucleotides from at least two such nucleosides and/or nucleoside analogs whose basic molecule contains an unsubstituted or substituted radical of a nucleic base B and a protected hydroxyl group of formula R<sub>1</sub>-O- wherein R<sub>1</sub> is a protective group, or which are linked to the oxygen atom of a hydroxyl group direct or to a solid support through a linking group, from nucleoside monomers or from oligonucleotides to the basic molecule of which, in addition to said radicals, a group of formula I, Ia or Ia

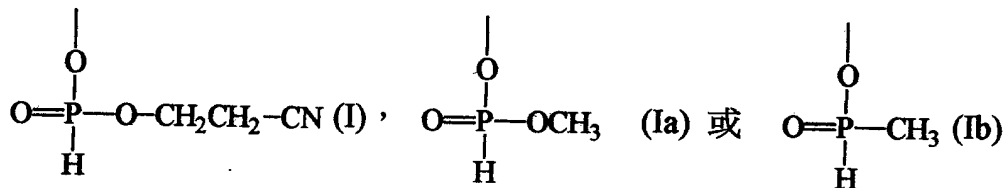


is attached, by converting the group of formula I, Ia or Ib into a hydroxyl group -OH by reacting the nucleosides or oligonucleotides, in the absence or presence of an inert organic solvent, with an excess of an aliphatic, cycloaliphatic araliphatic or aromatic alcohol containing 1 to 30 carbon atoms, a polyol containing 2 to 50 carbon atoms or a polymeric polyol, in the presence of at least a catalytic amount of an inorganic base or of an organic nitrogen base, which has a pK value of 4 to 10.

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 六、申請專利範圍

1. 一種製備天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸之方法（該寡核苷酸含至少兩天然或合成之核苷及／或核苷相似體，該天然或合成之核苷或核苷相似體之鹼性分子含一未被取代或被取代之一核鹼基B之自由基，該天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸在5'-位或在3'-位帶有一式R<sub>1</sub>-O-之保護基）其中R<sub>1</sub>為一保護基，在其它位置為一自由羥基，或該天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸係經由一羥基上之氧原子（位於5'-位或3'-位）直接或經由一連結基鍵結在一固體撐體上，並在其它位置帶有一自由羥基），該方法包括將式(I)、(Ia)或(Ib)，



之基（式(I)、(Ia)或(Ib)之基係附在天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸之3'-位而在5'-位有一式R<sub>1</sub>-O-之保護之羥基，其中R<sub>1</sub>為一保護基，或一固體撐體，或式(I)、(Ia)或(Ib)之基附在天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸之5'-位而在3'-位有一式R<sub>1</sub>-O-之保護之羥基，其中R<sub>1</sub>為一保護基，或一固體撐體）轉化成一羥基-OH，該轉化反應係利用天然或合成之核苷、核苷相似體或寡核苷酸（帶有式(I)、(Ia)或(Ib)之基者）在有或無自醚、鹵化烴、腓、羧醯胺及內醯胺一組中選出之惰性溶劑存在下，與至少100莫耳當量且高達1000莫耳當量過量之醇（選自含1-20個碳原子之烷醇、含5-12個碳原子之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

錄

## 六、申請專利範圍

環烷醇、含7-30個碳原子之芳脂醇及含6-30個碳原子之芳醇)之羥基(每莫耳當量之式(I)、(Ia)或(Ib)之基)反應,反應係在至少一催化量之無機鹼或有機氮鹼存在下(無機鹼係選自鹼性金屬氧化物、重金屬氧化物及氫氧化物、金屬氟化物及氟化銨,有機氮鹼之pK值為4-10,且係選自芳胺、芳族N-雜環及N-烷基嗎啉,鹼之催化量在0.01至20%莫耳範圍內),在-20°C至+55°C之溫度範圍內進行。

2. 如申請專利範圍第1項之方法,其中之溶劑為四氫呋喃或二噁烷。
3. 如申請專利範圍第1項之方法,其中之溶劑係由乙腈、丙腈、苯甲腈及苯乙腈組成之一組中選取者。
4. 如申請專利範圍第1項之方法,其中反應係在15°C至35°C之溫度範圍內進行。
5. 如申請專利範圍第4項之方法,其中反應係在室溫下進行。
6. 如申請專利範圍第1項之方法,其中之醇係含1至20個碳原子之烷醇。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 六、申請專利範圍

7. 如申請專利範圍第6項之方法，其中之醇係含1至6個碳原子之烷醇。
8. 如申請專利範圍第6項之方法，其中之醇係由甲醇、乙醇、正-及異丙醇、正-、異-及第三丁醇、戊醇、己醇、乙二醇、二甘醇單甲-及單乙醚組成之一組中選取者。
9. 如申請專利範圍第7項之方法，其中之醇係含1至4個碳原子之烷醇。
10. 如申請專利範圍第8項之方法，其中之醇為甲醇。
11. 如申請專利範圍第1項之方法，其中之醇係含5至8個碳原子之環烷醇。
12. 如申請專利範圍第11項之方法，其中之醇係由環戊醇、環己醇、甲基環己醇、環庚醇及環辛醇組成之一組中選取者。
13. 如申請專利範圍第1項之方法，其中之醇係含7至20個碳原子之芳脂醇。
14. 如申請專利範圍第13項之方法，其中之醇是由未被取代或被烷基或烷氧基取代之苯甲醇及 $\beta$ -苯乙醇組成之一組中選取者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 六、申請專利範圍

15. 如申請專利範圍第1項之方法，其中之醇係含6至12個碳原子之芳醇。
16. 如申請專利範圍第15項之方法，其中之醇係由酚、萘酚及未被取代或被烷基或烷氧基取代之酚或萘酚組成之一組中選取者。
17. 如申請專利範圍第1項之方法，其中之無機鹼係由鹼性氧化鋁、鹼性二氧化矽及氟化鉀(KF)組成之一組中選取者。
18. 如申請專利範圍第1項之方法，其中之有機氮鹼是由咪唑、吡啶、聚乙烯吡啶、N-甲基嗎啉、苯胺及鄰二胺基苯組成之一組中選取者。
19. 如申請專利範圍第1項之方法，其中使用親核性催化反應之額外催化量之無機鹼。
20. 如申請專利範圍第1項之方法，其中使用額外催化量之路易士酸。
21. 如申請專利範圍第1項之方法，其中之醇為氟乙醇。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線