



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103588839 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201310484701. 2

(22) 申请日 2009. 06. 11

(30) 优先权数据

61/060, 795 2008. 06. 11 US

61/184, 779 2009. 06. 05 US

(62) 分案原申请数据

200980131339. 2 2009. 06. 11

(71) 申请人 激光基因公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 弗拉迪斯拉夫·A·利托什

梅根·N·赫什 布赖恩·P·斯图皮

吴卫东 迈克尔·L·梅茨克

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

C07H 19/14 (2006. 01)

权利要求书8页 说明书167页 附图5页

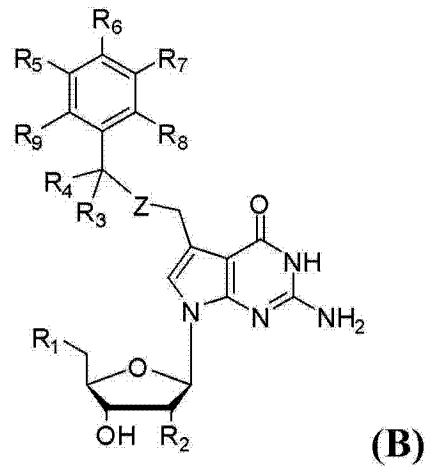
(54) 发明名称

核苷酸和核苷以及将其用于 DNA 测序的方法

(57) 摘要

本发明总体而言涉及标记和未标记的可切割终止性基团以及用于 DNA 测序和其他类型 DNA 分析的方法。更具体地,本发明部分涉及带有可化学切割、可光切割、可酶切割或非可光切割基团的核苷酸和核苷,以及将其用于 DNA 测序的方法及其在生物医学研究中的应用。

1. 下式的化合物或其盐、酯、水合物、溶剂化物、互变异构体、前药或光学异构体：



其中：

Z 为 -O-、-S-、-NH-、-OC(O)O-、-NHC(O)O-、-OC(O)NH- 或 -NHC(O)NH-；

R₁ 为羟基、一磷酸、二磷酸、三磷酸或 α-硫代三磷酸基；

R₂ 为氢或羟基；

R₃ 和 R₄ 各自独立为：

氢、羟基、卤素或氨基；或

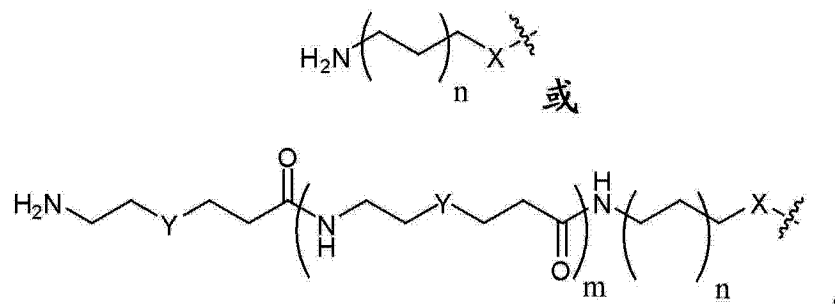
烷基 (C_{≤12})、烯基 (C_{≤12})、炔基 (C_{≤12})、芳基 (C_{≤12})、芳烷基 (C_{≤12})、杂芳基 (C_{≤12})、杂芳烷基 (C_{≤12})、烷氧基 (C_{≤12})、芳氧基 (C_{≤12})、芳烷氧基 (C_{≤12})、杂芳氧基 (C_{≤12})、杂芳烷氧基 (C_{≤12})、烷基氨基 (C_{≤12})、二烷基氨基 (C_{≤12})、芳基氨基 (C_{≤12})、芳烷基氨基 (C_{≤12})，或任何这些基团的取代形式；或

R₅、R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 各自独立为：

氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基或巯基；

烷基 (C_{≤12})、烯基 (C_{≤12})、炔基 (C_{≤12})、芳基 (C_{≤12})、芳烷基 (C_{≤12})、杂芳基 (C_{≤12})、杂芳烷基 (C_{≤12})、酰基 (C_{≤12})、烷氧基 (C_{≤12})、烯氧基 (C_{≤12})、炔氧基 (C_{≤12})、芳氧基 (C_{≤12})、芳烷氧基 (C_{≤12})、杂芳氧基 (C_{≤12})、杂芳烷氧基 (C_{≤12})、酰氧基 (C_{≤12})、烷基氨基 (C_{≤12})、二烷基氨基 (C_{≤12})、烷氧基氨基 (C_{≤12})、烯基氨基 (C_{≤12})、炔基氨基 (C_{≤12})、芳基氨基 (C_{≤12})、芳烷基氨基 (C_{≤12})、杂芳基氨基 (C_{≤12})、杂芳烷基氨基 (C_{≤12})、烷基磺酰氨基 (C_{≤12})、酰氨基 (C_{≤12})、烷硫基 (C_{≤12})、烯硫基 (C_{≤12})、炔硫基 (C_{≤12})、芳硫基 (C_{≤12})、芳烷硫基 (C_{≤12})、杂芳硫基 (C_{≤12})、杂芳烷硫基 (C_{≤12})、酰硫基 (C_{≤12})、硫代酰基 (C_{≤12})、烷基磺酰基 (C_{≤12})、芳基磺酰基 (C_{≤12})、烷基铵 (C_{≤12})、烷基脒 (C_{≤12})、烷基甲硅烷基 (C_{≤12})，或任何这些基团的取代形式；

下式的基团：



其中

X 为

-O-、-S- 或 -NH- ;或

烷撑_(C≤2)、烯撑_(C≤2)、炔撑_(C≤12)、芳撑_(C≤12)、杂芳撑_(C≤12), 或任何这些基团的取代形式;

Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C≤12) 或取代烷撑_(C≤12) ;

n 为 0 至 12 的整数 ;并且

m 为 0 至 12 的整数 ;或

- 接头 - 报告基团。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 Z 为 -O-。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任一项的化合物, 其中 R₁ 为羟基。

4. 根据权利要求 1 至 2 中任一项的化合物, 其中 R₁ 为三磷酸基。

5. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₂ 为氢。

6. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₃ 为氢。

7. 权利要求 1 的化合物, 其中 R₃ 为烷基_(C≤8)。

8. 权利要求 7 的化合物, 其中 R₃ 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。

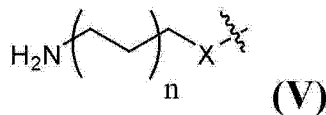
9. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₄ 为氢。

10. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₅ 为氢。

11. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₅ 为氰基。

12. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₆ 为氢。

13. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₆ 为下式的基团 :



其中

X 为

-O-、-S- 或 -NH- ;或

烷撑_(C≤12)、烯撑_(C≤12)、炔撑_(C≤12)、芳撑_(C≤12)、杂芳撑_(C≤12), 或任何这些基团的取代形式 ;并且

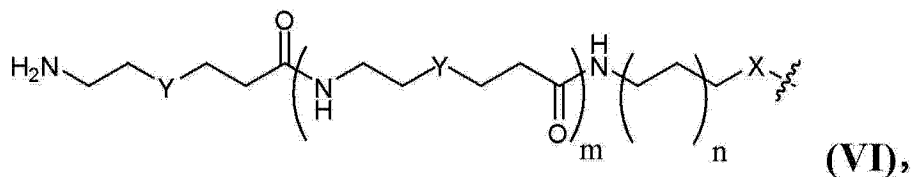
n 为 0 至 12 的整数。

14. 权利要求 13 的化合物, 其中 X 为炔撑_(C2-8)。

15. 权利要求 14 的化合物, 其中 X 为 -C≡C-。

16. 根据权利要求 13 的化合物, 其中 n 为 0。

17. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R₆ 为下式的基团 :



其中

X 为

-O-、-S- 或 -NH- ;或

烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；

n 为 0 至 12 的整数；并且

m 为 0 至 12 的整数。

18. 权利要求 17 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

19. 权利要求 18 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

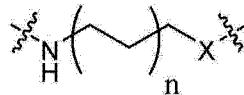
20. 根据权利要求 17 的化合物，其中 Y 为 -CH₂-。

21. 根据权利要求 17 的化合物，其中 n 为 0。

22. 根据权利要求 17 的化合物，其中 m 为 0。

23. 根据权利要求 1 的化合物，其中 R₆ 为 -接头-报告基团。

24. 权利要求 23 的化合物，其中所述接头为：



其中

X 为

-O-、-S- 或 -NH- ;或

烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；并且

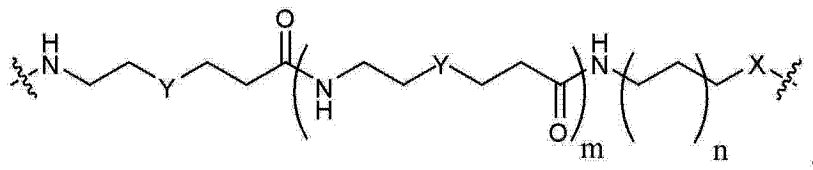
n 为 0 至 12 的整数。

25. 权利要求 24 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

26. 权利要求 25 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

27. 根据权利要求 24 的化合物，其中 n 为 0。

28. 权利要求 23 的化合物，其中所述接头为：



其中

X 为

-O-、-S- 或 -NH- ;或

烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

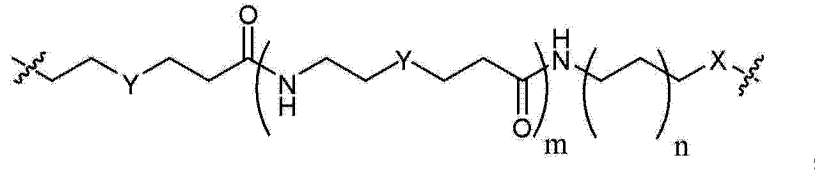
Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；

n 为 0 至 12 的整数；并且

m 为 0 至 12 的整数。

29. 权利要求 28 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

30. 权利要求 29 的化合物,其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
31. 根据权利要求 28 的化合物,其中 Y 为 $-CH_2-$ 。
32. 根据权利要求 28 的化合物,其中 n 为 0。
33. 根据权利要求 28 的化合物,其中 m 为 0。
34. 权利要求 23 的化合物,其中所述接头为:



其中

X 为

$-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$;或

烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$),或任何这些基团的取代形式;

Y 为 $-O-$ 、 $-NH-$ 、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$);

n 为 0 至 12 的整数;并且

m 为 0 至 12 的整数。

35. 权利要求 34 的化合物,其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。

36. 权利要求 35 的化合物,其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。

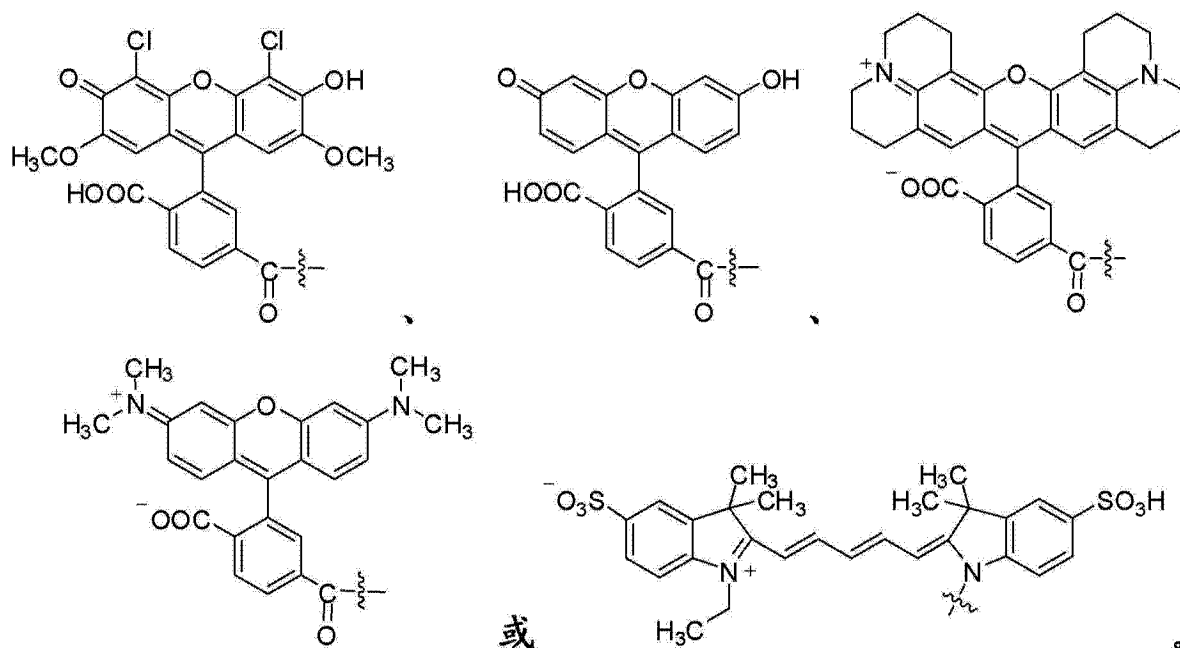
37. 根据权利要求 34 的化合物,其中 Y 为 $-CH_2-$ 。

38. 根据权利要求 34 的化合物,其中 n 为 0。

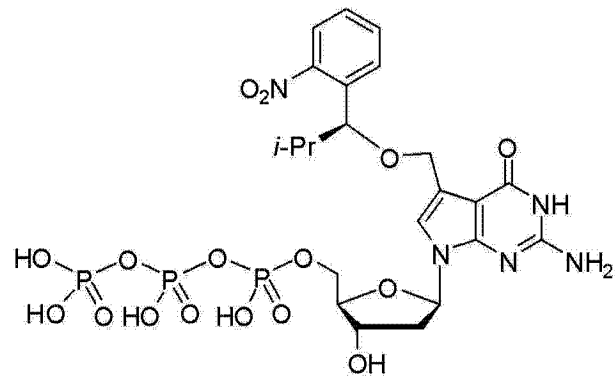
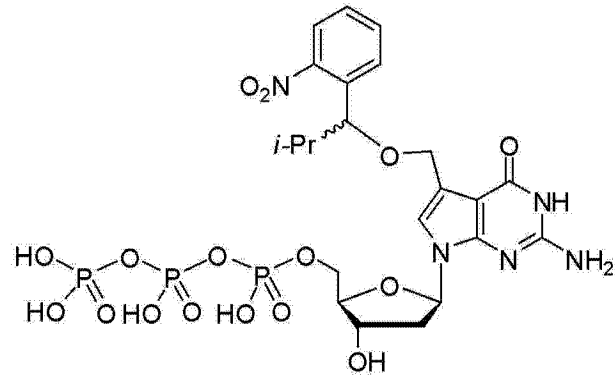
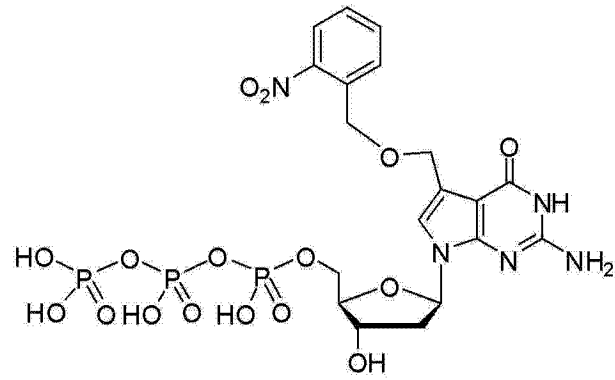
39. 根据权利要求 34 的化合物,其中 m 为 0。

40. 根据权利要求 23 的化合物,其中所述报告基团是基于染料的报告基团,其中所述染料为咕吨、荧光素、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白、**ALEXA FLUOR® 350**、**ALEXA FLUOR® 405**、**ALEXA FLUOR® 430**、**ALEXA FLUOR® 488**、**ALEXA FLUOR® 514**、**ALEXA FLUOR® 532**、**ALEXA FLUOR® 546**、**ALEXA FLUOR® 555**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 594**、**ALEXA FLUOR® 610**、**ALEXA FLUOR® 633**、**ALEXA FLUOR® 647**、**ALEXA FLUOR® 660**、**ALEXA FLUOR® 680**、**ALEXA FLUOR® 700**、**ALEXA FLUOR® 750**,或方酸菁染料。

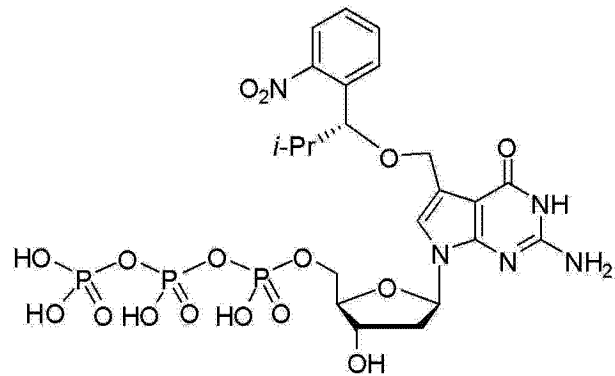
41. 根据权利要求 23 的化合物,其中所述报告基团为:



42. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R_7 为氢。
43. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R_8 为氢。
44. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R_8 为硝基。
45. 权利要求 1 的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 8$)。
46. 权利要求 45 的化合物,其中 R_8 为甲基。
47. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R_9 为氢。
48. 根据权利要求 1 的化合物,其中 R_9 为硝基。
49. 权利要求 1 的化合物,其中 R_9 为烷基 ($C \leq 8$)。
50. 权利要求 49 的化合物,其中 R_9 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。
51. 权利要求 1 的化合物,其中 R_9 为芳基 ($C \leq 8$)。
52. 权利要求 51 的化合物,其中 R_9 为苯基。
53. 权利要求 1 的化合物,进一步定义为:

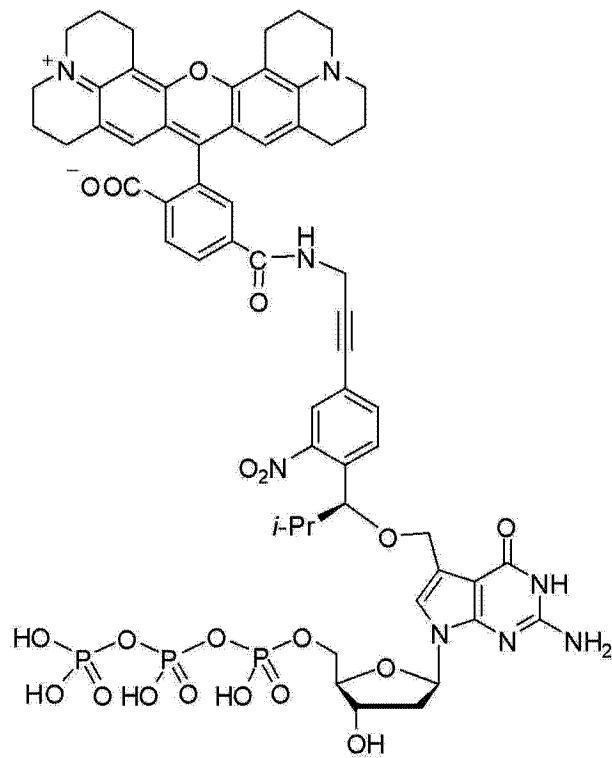
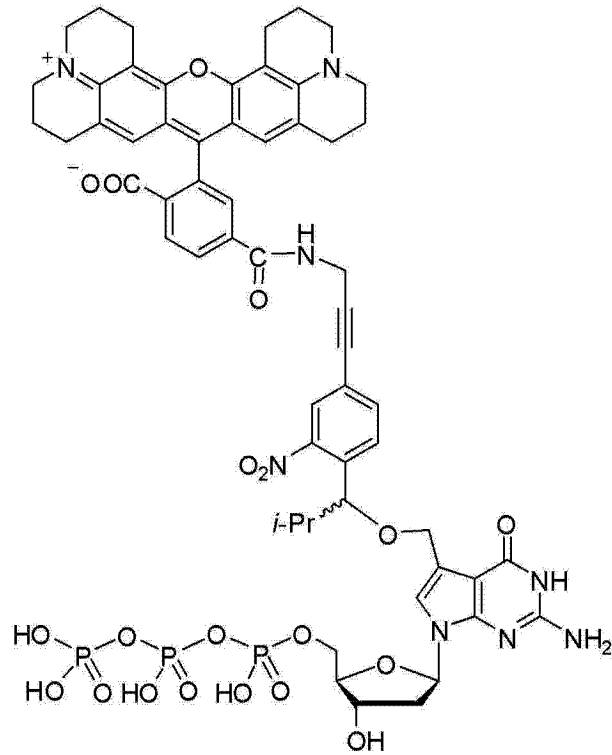


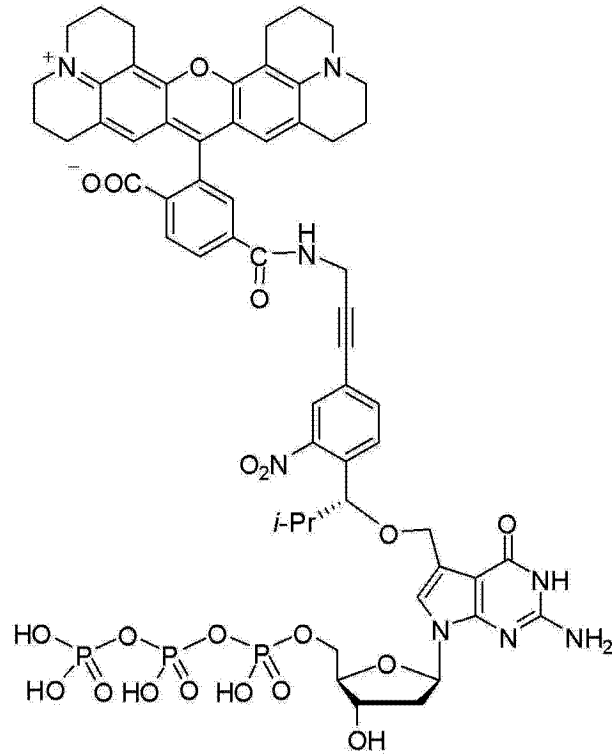
或



或任何上述式的盐形式。

54. 权利要求 1 的化合物,进一步定义为:





或任何上述式的盐形式。

核苷酸和核苷以及将其用于 DNA 测序的方法

[0001] 本申请是申请日为 2009 年 6 月 11 日的申请号为 200980131339.2 (PCT 申请号: PCT / US2009 / 047071)、发明名称为“核苷酸和核苷以及将其用于 DNA 测序的方法”的分案申请。

[0002] 本申请要求美国临时专利申请 No. 61 / 060, 795 和 61 / 184, 779 (分别于 2008 年 6 月 11 日和 2009 年 6 月 5 日提交) 的优先权, 其全部内容通过参考而并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体而言涉及用于 DNA 测序和其他类型 DNA 分析的组合物和方法。更特别地, 本发明部分涉及带有可化学切割、可光切割、可酶切割或非可光切割基团的核苷酸和核苷, 以及将其用于多种 DNA 测序法中的方法及其在生物医学研究中的应用。

背景技术

[0004] 快速 DNA 测序的方法已经成为分析人群中疾病和突变并开发疗法的需求。通常观察到的人类序列变异形式为单核苷酸多态性 (SNP) (其在基因组序列约每 300 至 1000 个碱基对中发生 1 处) 和结构变体 (structural variant, SV) 包括块的替换、插入 / 缺失、倒位、区段重复, 以及拷贝数变体。结构变体可占有所有变异事件的 22%, 比 SNP 导致的变体碱基更多 (Levy 等 2007, 通过参考并入本文)。这一发现与 Scherer、Hurles 及其同事用基于微阵列方法分析 270 名个体所得结论一致 (Redon 等 2006, 通过参考并入本文)。基于人类基因组全序列, 正努力通过 SNP 作图或直接关联来鉴定与常见疾病背后的遗传联系。致力于快速、高通量且低成本 DNA 测序的技术发展将加速对遗传信息 (如 SNP) 的理解和其在应用医学中的使用。

[0005] 一般地, 10% 至 15% 的 SNP 会通过改变特定的氨基酸残基而影响蛋白质功能, 通过改变剪接机制而影响基因的正确加工, 或是通过改变调节机制而影响基因或蛋白质的正常表达水平。SV 还可在人类生物学和疾病中发挥重要作用 (Iafrate 等 2004; Sebat 等 2004, Tuzun 等 2005, Stranger 等 2007, 通过参考并入本文)。人们设想, 对信息性 SNP 和 SV 的鉴定会导致对遗传性疾病更准确的诊断, 对风险易感性更好的预后, 或是对组织中偶发突变的鉴定。个体 SNP 和 SV 谱的一个应用将是通过预防性药物治疗来显著地推迟疾病的发生或发展。此外, 药物代谢基因的 SNP 和 SV 谱可用于制定特定的用药方案, 以提供更安全和更有效的结果。为实现这些远大的目标, 基因组测序将进入有潜力对大部分人口进行部分测序的再测序阶段, 这将涉及对分布在整个人类基因组中的特定区域进行并行测序, 以获得给定复杂疾病的 SNP 和 SV 谱。

[0006] 大多数常见疾病中内在的序列变异很可能涉及多个 SNP、SV 及其多种组合, 它们散布于相关基因中并以低频率存在。因此, 相比于仅以已知 SNP 为靶标的技术, 采用从头测序策略的 DNA 测序技术更有可能检测和 / 或发现这些罕见的、广泛分布的变体。

[0007] 传统上, DNA 测序通过“Sanger”或“双脱氧”法来实现, 所述方法涉及通过用 DNA 聚合酶掺入 2', 3'-双脱氧核苷酸 (ddNTP) 对 DNA 合成进行链终止 (Sanger 等 1997, 通过参

考并入本文)。该反应还包括天然的 2'-脱氧核苷酸 (dNTP), 其通过 DNA 合成而延伸 DNA 链。在合适的平衡下, 链延伸与链终止的竞争导致产生一系列嵌套 DNA 片段, 它们均匀地分布于数千个碱基中, 并且随着碱基对的增加而大小不同。使用电泳通过其相应大小来解析所述嵌套 DNA 片段。测序反应中 dNTP / ddNTP 的比值决定了链终止的频率, 因此决定被终止链的长度分布。然后通过之前附着在四种 DNA 碱基 (即 A、C、G 和 T) 上的四种不同荧光团来检测片段, 所述荧光团在适当的激光源照射时发出相应颜色的荧光。如今, Sanger 测序是通过直接 PCR 测序 (Gibbs 等 1989, 通过参考并入本文) 或基因组测序 (Hunkapiller 等 1991, 国际人类基因组测序联盟, 2001, 通过参考并入本文) 发现 SNP 的最广泛应用的方法。

[0008] 下一代测序 (next-generation sequencing, NGS) 技术的优势包括能够便宜地产生庞大的数据容量, 在一些情况下每次仪器运行读出超过一亿短序列。许多这些方法被统称为合成测序 (sequencing-by-synthesis, SBS), 这不能清晰地描述不同的 DNA 测序机制 (Metzker 2005, 通过参考并入本文)。这里, DNA 聚合酶依赖性策略被分为循环可逆终止 (cyclic reversible termination, CRT)、单核苷酸添加 (single nucleotide addition, SNA, 如焦磷酸测序) 和实时测序。用 DNA 连接酶替代 DNA 聚合酶的方法被称为连接测序 (sequencing-by-ligation, SBL)。

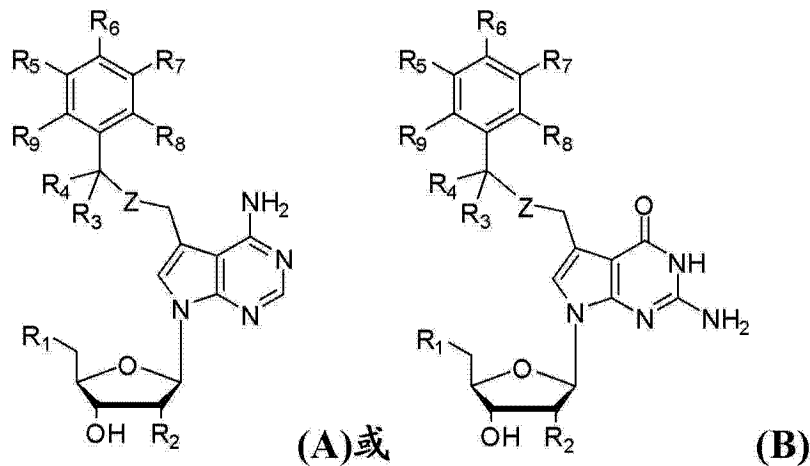
[0009] 非常需要开发有可能应用于多个研究领域 (包括比较基因组学和进化学、法医学、流行病学以及用于诊断和治疗的应用医学) 的新型测序技术。现有的测序技术对于在人类序列变异研究中的广泛应用来说常常过于昂贵、费力和费时。基因组中心的费用基于每 1,000 个 Q_{20} 碱基所需美元来计算, 一般可分为设备、人力、试剂和材料以及管理费用等几类。如今, 这些中心的运行费用为每 1,000 个 Q_{20} 碱基不到 1 美元, 其中至少有 50% 的支出是由 DNA 测序设备这一项产生的。新型检测方法的开发、设备小型化、微流体分离技术以及每次运行的测试数量的增加将最有可能对降低成本产生最大的影响。

发明内容

[0010] 在一些方面中, 本公开内容提供了可用于在高通量测序反应中对基因组信息进行高效测序的新的化合物和组合物。在另一方面中, 还提供了可高效且经济地提供基因组信息的试剂和试剂组合。在另一些方面中, 本发明还提供了用于诊断方法和用于针对个体开发靶向疗法的试剂文库和阵列。

[0011] 在一些方面中, 本公开内容提供了可用于 DNA 测序的新化合物。例如, 在一些实施方案中, 本发明提供了下式的化合物或其盐、酯、水合物、溶剂化物、互变异构体、前药或光学异构体:

[0012]



[0013] 其中：

[0014] Z 为 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-OC(O)O-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-OC(O)NH-$ 或 $-NHC(O)NH-$ ；

[0015] R_1 为羟基、一磷酸、二磷酸、三磷酸或多磷酸基；

[0016] R_2 为氢或羟基；

[0017] R_3 和 R_4 各自独立为：

[0018] 氢、羟基、卤素或氨基；或

[0019] 烷基 ($C \leq 12$)、烯基 ($C \leq 12$)、炔基 ($C \leq 12$)、芳基 ($C \leq 12$)、芳烷基 ($C \leq 12$)、杂芳基 ($C \leq 12$)、杂芳烷基 ($C \leq 12$)、烷氧基 ($C \leq 12$)、芳氧基 ($C \leq 12$)、芳烷氧基 ($C \leq 12$)、杂芳氧基 ($C \leq 12$)、杂芳烷氧基 ($C \leq 12$)、烷基氨基 ($C \leq 12$)、二烷基氨基 ($C \leq 12$)、芳基氨基 ($C \leq 12$)、芳烷基氨基 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；

[0020] 或

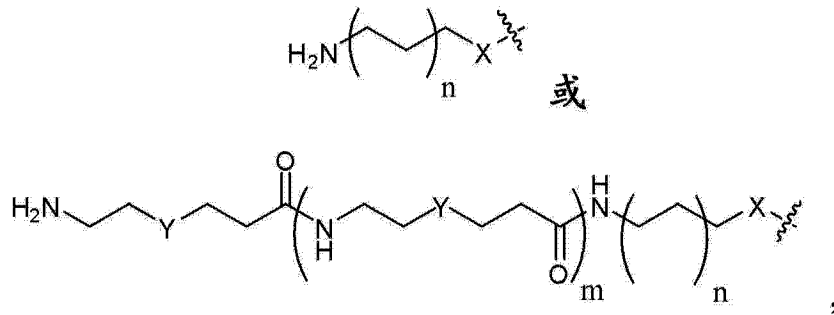
[0021] R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 各自独立为：

[0022] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基或巯基；

[0023] 烷基 ($C \leq 12$)、烯基 ($C \leq 12$)、炔基 ($C \leq 12$)、芳基 ($C \leq 12$)、芳烷基 ($C \leq 12$)、杂芳基 ($C \leq 12$)、杂芳烷基 ($C \leq 12$)、酰基 ($C \leq 12$)、烷氧基 ($C \leq 12$)、烯氧基 ($C \leq 12$)、炔氧基 ($C \leq 12$)、芳氧基 ($C \leq 12$)、芳烷氧基 ($C \leq 12$)、杂芳氧基 ($C \leq 12$)、杂芳烷氧基 ($C \leq 12$)、酰氧基 ($C \leq 12$)、烷基氨基 ($C \leq 12$)、二烷基氨基 ($C \leq 12$)、烷氧基氨基 ($C \leq 12$)、烯基氨基 ($C \leq 12$)、炔基氨基 ($C \leq 12$)、芳基氨基 ($C \leq 12$)、芳烷基氨基 ($C \leq 12$)、杂芳基氨基 ($C \leq 12$)、杂芳烷基氨基 ($C \leq 12$)、烷基磺酰氨基 ($C \leq 12$)、酰胺基 ($C \leq 12$)、烷硫基 ($C \leq 12$)、烯硫基 ($C \leq 12$)、炔硫基 ($C \leq 12$)、芳硫基 ($C \leq 12$)、芳烷硫基 ($C \leq 12$)、杂芳硫基 ($C \leq 12$)、杂芳烷硫基 ($C \leq 12$)、酰硫基 ($C \leq 12$)、硫代酰基 ($C \leq 12$)、烷基磺酰基 ($C \leq 12$)、芳基磺酰基 ($C \leq 12$)、烷基铵 ($C \leq 12$)、烷基脲 ($C \leq 12$)、烷基甲硅烷基 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；

[0024] 下式的基团：

[0025]



[0026] 其中

[0027] X 为

[0028] -O-、-S- 或 -NH- ;或

[0029] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；

[0030] Y 为 -O-、-NH-、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$) ；

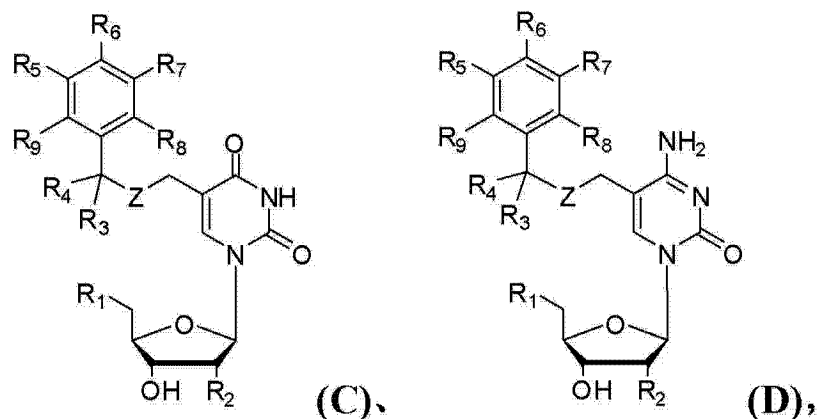
[0031] n 为 0 至 12 的整数；并且

[0032] m 为 0 至 12 的整数；或

[0033] - 接头 - 报告基团。

[0034] 在一些方面中，本发明提供了下式的化合物或其盐、酯、水合物、溶剂化物、互变异构体、前药或光学异构体：

[0035]



[0036] 其中：

[0037] Z 为 -O-、-S-、-NH-、-OC(O)O-、-NHC(O)O-、-OC(O)NH- 或 -NHC(O)NH- ；

[0038] R₁ 为羟基、一磷酸、二磷酸、三磷酸或多磷酸基；

[0039] R₂ 为氢或羟基；

[0040] R₃ 和 R₄ 各自独立为：

[0041] 氢、羟基、卤素或氨基；或

[0042] 烷基 ($C \leq 12$)、烯基 ($C \leq 12$)、炔基 ($C \leq 12$)、芳基 ($C \leq 12$)、芳烷基 ($C \leq 12$)、杂芳基 ($C \leq 12$)、杂芳烷基 ($C \leq 12$)、烷氧基 ($C \leq 12$)、芳氧基 ($C \leq 12$)、芳烷氧基 ($C \leq 12$)、杂芳氧基 ($C \leq 12$)、杂芳烷氧基 ($C \leq 12$)、烷基氨基 ($C \leq 12$)、二烷基氨基 ($C \leq 12$)、芳基氨基 ($C \leq 12$)、芳烷基氨基 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；

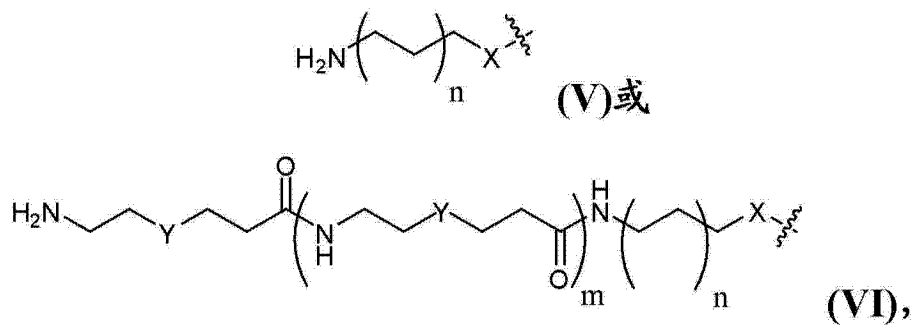
[0043] R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 各自独立为：

[0044] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基或巯基；或

[0045] 烷基 ($C \leq 12$)、烯基 ($C \leq 12$)、炔基 ($C \leq 12$)、芳基 ($C \leq 12$)、芳烷基 ($C \leq 12$)、杂芳基 ($C \leq 12$)、杂芳烷基 ($C \leq 12$)、酰基 ($C \leq 12$)、烷氧基 ($C \leq 12$)、烯氧基 ($C \leq 12$)、炔氧基 ($C \leq 12$)、芳氧基 ($C \leq 12$)、芳烷氧基 ($C \leq 12$)、杂芳氧基 ($C \leq 12$)、杂芳烷氧基 ($C \leq 12$)、酰氧基 ($C \leq 12$)、烷基氨基 ($C \leq 12$)、二烷基氨基 ($C \leq 12$)、烷氧基氨基 ($C \leq 12$)、烯基氨基 ($C \leq 12$)、炔基氨基 ($C \leq 12$)、芳基氨基 ($C \leq 12$)、芳烷基氨基 ($C \leq 12$)、杂芳基氨基 ($C \leq 12$)、杂芳烷基氨基 ($C \leq 12$)、烷基磺酰氨基 ($C \leq 12$)、酰胺基 ($C \leq 12$)、烷硫基 ($C \leq 12$)、烯硫基 ($C \leq 12$)、炔硫基 ($C \leq 12$)、芳硫基 ($C \leq 12$)、芳烷基硫基 ($C \leq 12$)、杂芳硫基 ($C \leq 12$)、杂芳烷基硫基 ($C \leq 12$)、酰硫基 ($C \leq 12$)、硫代酰基 ($C \leq 12$)、烷基磺酰基 ($C \leq 12$)、芳基磺酰基 ($C \leq 12$)、烷基铵 ($C \leq 12$)、烷基脲 ($C \leq 12$)、烷基甲硅烷基 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；或

[0046] 下式的基团：

[0047]



[0048] 其中

[0049] X 为

[0050] -O-、-S- 或 -NH-；或

[0051] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；

[0052] Y 为 -O-、-NH-、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$)；

[0053] n 为 0 至 12 的整数；并且

[0054] m 为 0 至 12 的整数；或

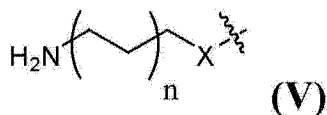
[0055] - 接头 - 报告基团；并且

[0056] R_9 为烷基 ($C \leq 12$)、芳基 ($C \leq 12$) 或任何这些基团的取代形式。

[0057] 在一些实施方案中，所述化合物被进一步定义为式 A 的化合物。在一些实施方案中，所述化合物为式 B。在一些实施方案中，所述化合物被进一步定义为式 C 的化合物。在一些实施方案中，所述化合物为式 D。在一些实施方案中，Z 为 -O-。在一些实施方案中， R_1 为羟基。在一些实施方案中， R_1 为一磷酸基。在一些实施方案中， R_1 为二磷酸基。在一些实施方案中， R_1 为三磷酸基。在一些实施方案中， R_1 为多磷酸基。在一些实施方案中， R_2 为氢。在一些实施方案中， R_2 为羟基。在一些实施方案中， R_3 为氢。在一些实施方案中， R_3 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。在一些实施方案中， R_3 为烷基 ($C \leq 8$)。在一些实施方案中， R_3 为烷基 ($C \leq 6$)。在一些实施方案中， R_3 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。在一些实施方案中， R_3 为甲基。在一些实施方案中， R_3 为烷基 (C_{2-6})。在一些实施方案中， R_3 为烷基 (C_{3-5})。在一些实施方案中， R_3 为异丙基。在一些实施方案中， R_3 为叔丁基。在一些实施方案中， R_4 为氢。在一些实施方案中， R_4 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。在一些实施方案中， R_4 为烷基

($C \leq 8$)。在一些实施方案中, R_4 为烷基 ($C \leq 6$)。在一些实施方案中, R_4 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。在一些实施方案中, R_4 为甲基。在一些实施方案中, R_4 为烷基 (C_{2-6})。在一些实施方案中, R_4 为烷基 (C_{3-5})。在一些实施方案中, R_4 为异丙基。在一些实施方案中, R_4 为叔丁基。在一些实施方案中, R_5 为氢。在一些实施方案中, R_5 为氰基。在一些实施方案中, R_5 为烷氧基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。在一些实施方案中, R_5 为烷氧基 ($C \leq 8$)。在一些实施方案中, R_5 为烷氧基 ($C \leq 6$)。在一些实施方案中, R_5 为烷氧基 ($C \leq 3$)。在一些实施方案中, R_5 为甲氧基。在一些实施方案中, R_5 为下式的基团:

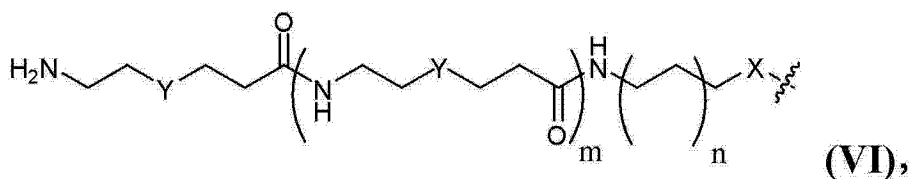
[0058]



[0059] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH- ;或烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; 并且 n 为 0 至 12 的整数。

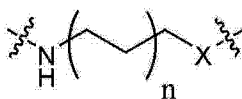
[0060] 在一些实施方案中, X 为炔撑 ($C \leq 12$)。在一些实施方案中, X 为炔撑 (C_{2-8})。在一些实施方案中, X 为 $-C \equiv C-$ 。在一些实施方案中, n 为 0。在一些实施方案中, R_5 为下式的基团:

[0061]



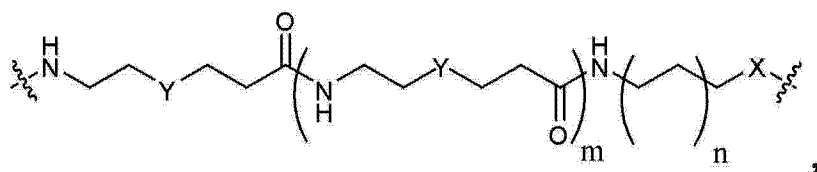
[0062] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH- ;或烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; Y 为 -O-、-NH-、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$); n 为 0 至 12 的整数; 并且 m 为 0 至 12 的整数。在一些实施方案中, X 为炔撑 ($C \leq 12$)。在一些实施方案中, X 为炔撑 (C_{2-8})。在一些实施方案中, X 为 $-C \equiv C-$ 。在一些实施方案中, Y 为 $-CH_2-$ 。在一些实施方案中, n 为 0。在一些实施方案中, m 为 0。在一些实施方案中, R_6 为 -接头- 报告基团。在一些实施方案中, 所述接头为:

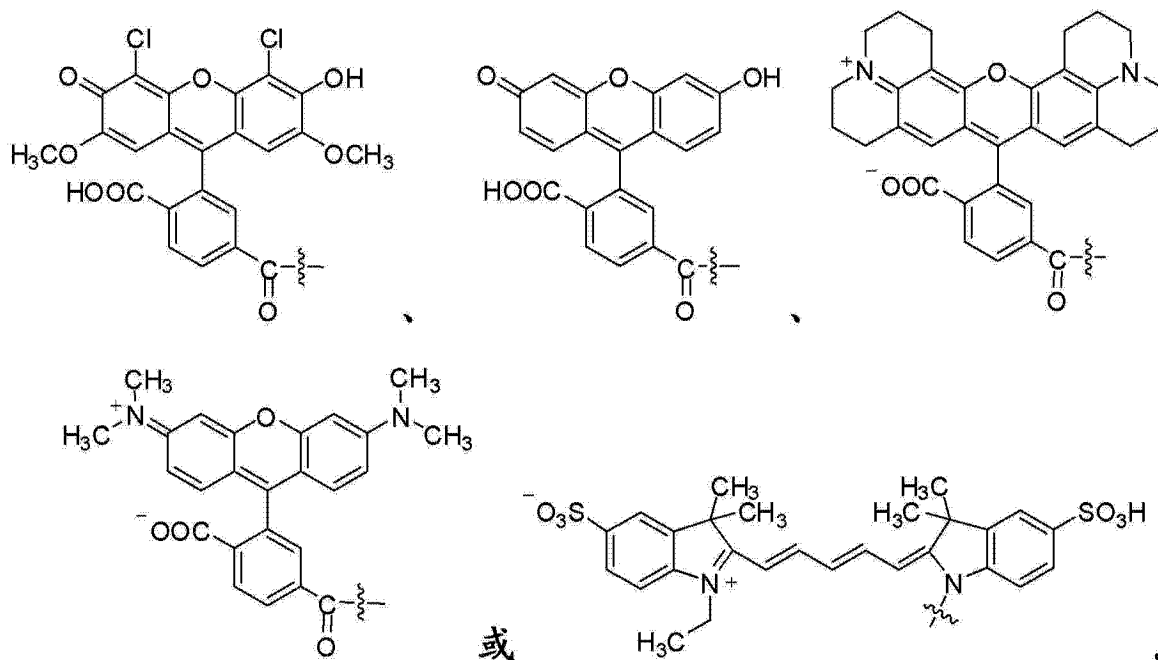
[0063]



[0064] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH- ;或烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; 并且 n 为 0 至 12 的整数。在一些实施方案中, X 为炔撑 ($C \leq 12$)。在一些实施方案中, X 为炔撑 (C_{2-8})。在一些实施方案中, X 为 $-C \equiv C-$ 。在一些实施方案中, n 为 0。在一些实施方案中, 所述接头为:

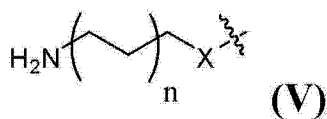
[0065]





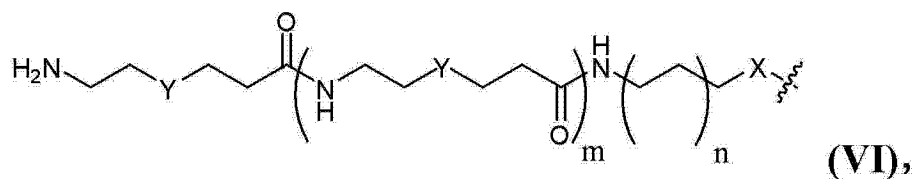
[0070] 在一些实施方案中, R_6 为氢。在一些实施方案中, R_6 为烷氧基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。在一些实施方案中, R_6 为烷氧基 ($C \leq 8$)。在一些实施方案中, R_6 为烷氧基 ($C \leq 6$)。在一些实施方案中, R_6 为烷氧基 ($C \leq 3$)。在一些实施方案中, R_6 为甲氧基。在一些实施方案中, R_6 为下式的基团:

[0071]



[0072] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH-; 或烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; 并且 n 为 0 至 12 的整数。在一些实施方案中, X 为炔撑 ($C \leq 12$)。在一些实施方案中, X 为炔撑 (C_{2-8})。在一些实施方案中, X 为 $-C \equiv C-$ 。在一些实施方案中, n 为 0。在一些实施方案中, R_6 为下式的基团:

[0073]



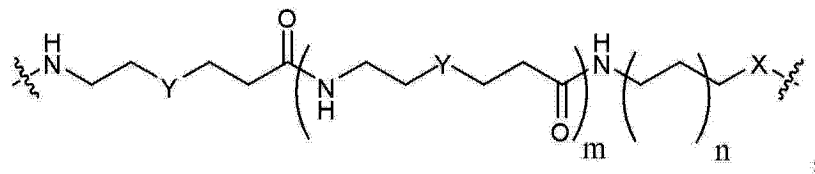
[0074] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH-; 或烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; Y 为 -O-、-NH-、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$); n 为 0 至 12 的整数; 并且 m 为 0 至 12 的整数。在一些实施方案中, X 为炔撑 ($C \leq 12$)。在一些实施方案中, X 为炔撑 (C_{2-8})。在一些实施方案中, X 为 $-C \equiv C-$ 。在一些实施方案中, Y 为 $-CH_2-$ 。在一些实施方案中, n 为 0。在一些实施方案中, m 为 0。在一些实施方案中, R_6 为 -接头- 报告基团。在一些实施方案中, 所述接头为:

[0075]



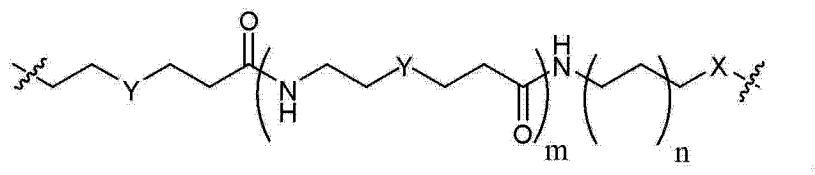
[0076] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH-；或烷撑_(C≤12)、烯撑_(C≤12)、炔撑_(C≤12)、芳撑_(C≤12)、杂芳撑_(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；并且 n 为 0 至 12 的整数。在一些实施方案中，X 为炔撑_(C≤12)。在一些实施方案中，X 为炔撑_(C2-8)。在一些实施方案中，X 为 -C≡C-。在一些实施方案中，n 为 0。在一些实施方案中，所述接头为：

[0077]



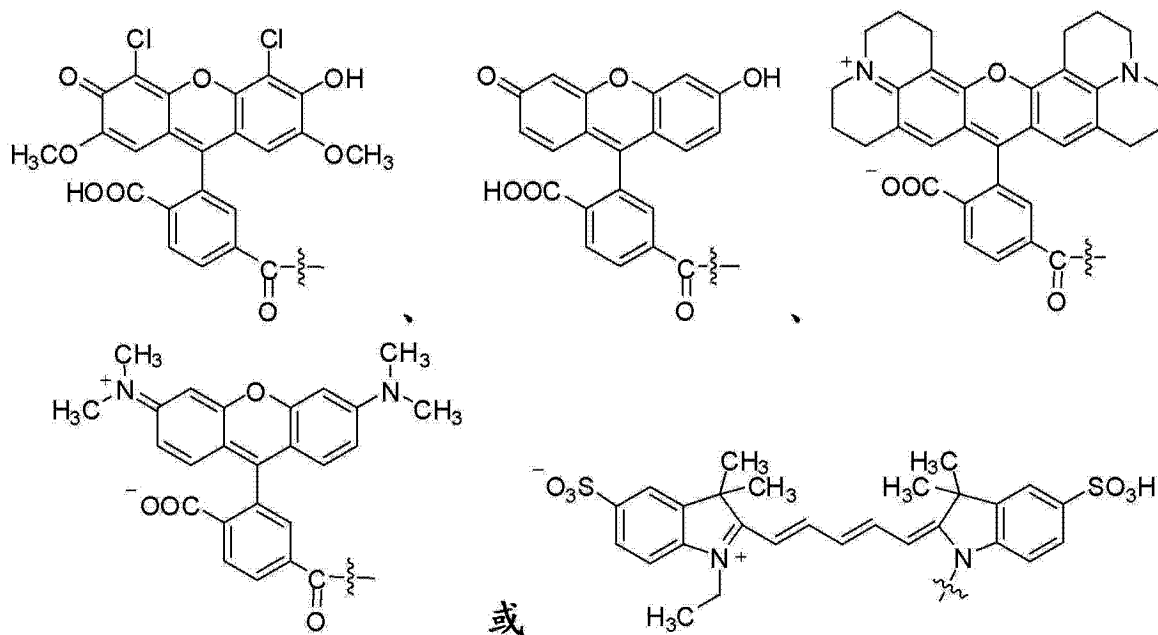
[0078] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH-；或烷撑_(C≤12)、烯撑_(C≤12)、炔撑_(C≤12)、芳撑_(C≤12)、杂芳撑_(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C≤12) 或取代烷撑_(C≤12)；n 为 0 至 12 的整数；并且 m 为 0 至 12 的整数。在一些实施方案中，X 为炔撑_(C≤12)。在一些实施方案中，X 为炔撑_(C2-8)。在一些实施方案中，X 为 -C≡C-。在一些实施方案中，Y 为 -CH₂-。在一些实施方案中，n 为 0。在一些实施方案中，m 为 0。在一些实施方案中，所述接头为：

[0079]



[0080] 其中 X 为 -O-、-S- 或 -NH-；或烷撑_(C≤12)、烯撑_(C≤12)、炔撑_(C≤12)、芳撑_(C≤12)、杂芳撑_(C≤12)，或任何这些基团的取代形式；Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C≤12) 或取代烷撑_(C≤12)；n 为 0 至 12 的整数；并且 m 为 0 至 12 的整数。在一些实施方案中，X 为炔撑_(C≤12)。在一些实施方案中，X 为炔撑_(C2-8)。在一些实施方案中，X 为 -C≡C-。在一些实施方案中，Y 为 -CH₂-。在一些实施方案中 n 为 0。在一些实施方案中 m 为 0。在一些实施方案中，所述报告基团是基于染料的，其中所述染料为咕吨、荧光素、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、苝、酞菁、藻胆蛋白、**ALEXA FLUOR® 350**、**ALEXA FLUOR® 405**、**ALEXA FLUOR® 430**、**ALEXA FLUOR® 488**、**ALEXA FLUOR® 514**、**ALEXA FLUOR® 532**、**ALEXA FLUOR® 546**、**ALEXA FLUOR® 555**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 594**、**ALEXA FLUOR® 610**、**ALEXA FLUOR® 633**、**ALEXA FLUOR® 647**、**ALEXA FLUOR® 660**、**ALEXA FLUOR® 680**、**ALEXA FLUOR® 700**、**ALEXA FLUOR® 750**，或方酸菁染料。在一些实施方案中，所述报告基团为：

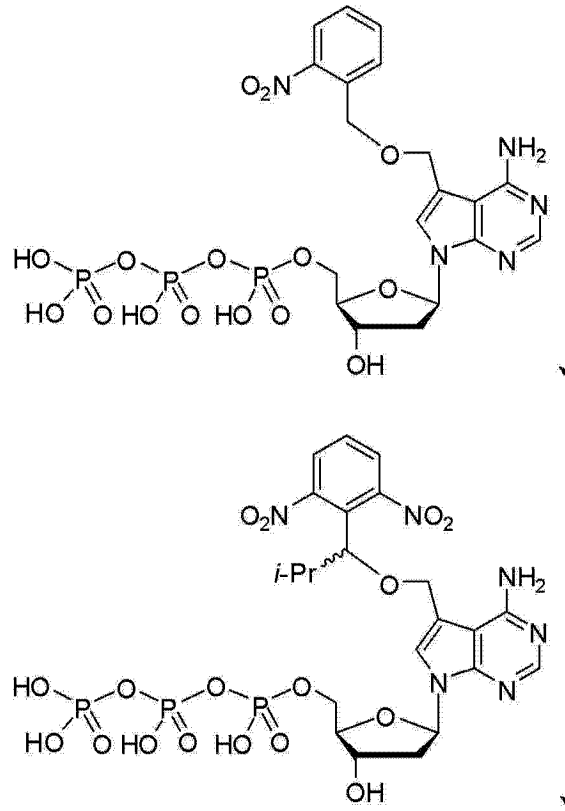
[0081]



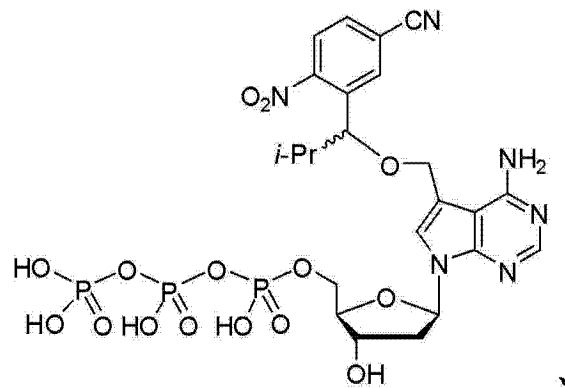
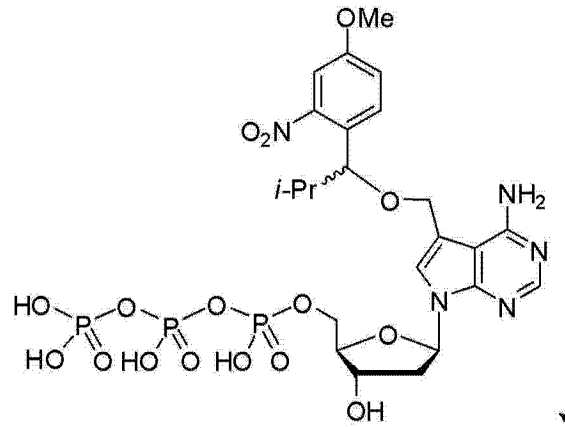
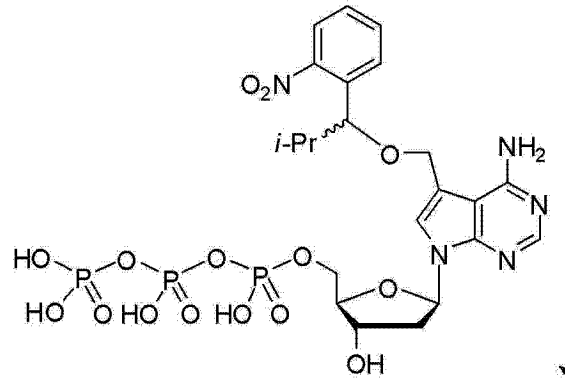
[0082] 在一些实施方案中, R_7 为氢。在一些实施方案中, R_8 为氢。在一些实施方案中, R_8 为硝基。在一些实施方案中, R_8 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。在一些实施方案中, R_8 为烷基 ($C \leq 8$)。在一些实施方案中, R_8 为烷基 ($C \leq 6$)。在一些实施方案中, R_8 为烷基 ($C \leq 3$)。在一些实施方案中, R_8 为甲基。在一些实施方案中, R_9 为氢。在一些实施方案中, R_9 为硝基。在一些实施方案中, R_9 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。在一些实施方案中, R_9 为烷基 ($C \leq 8$)。在一些实施方案中, R_9 为烷基 ($C \leq 6$)。在一些实施方案中, R_9 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。在一些实施方案中, R_9 为甲基。在一些实施方案中, R_9 为烷基 (C_{2-6})。在一些实施方案中, R_9 为烷基 (C_{3-5})。在一些实施方案中, R_9 为异丙基。在一些实施方案中, R_9 为叔丁基。在一些实施方案中, R_9 为芳基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。在一些实施方案中, R_9 为芳基 ($C \leq 8$)。在一些实施方案中, R_9 为苯基。

[0083] 在一些实施方案中, 本发明提供了下式的化合物:

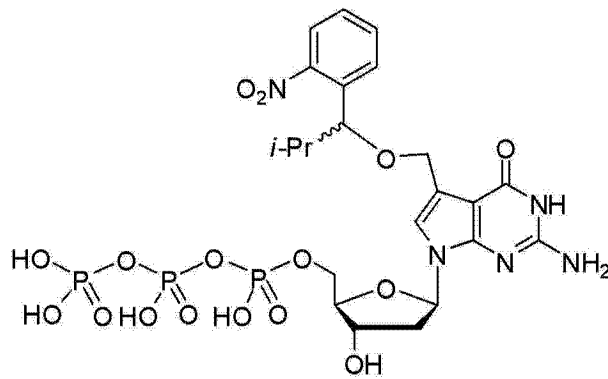
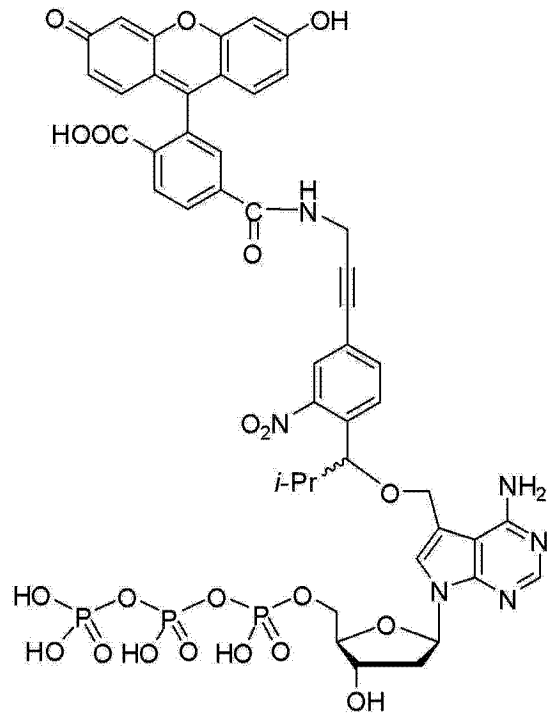
[0084]



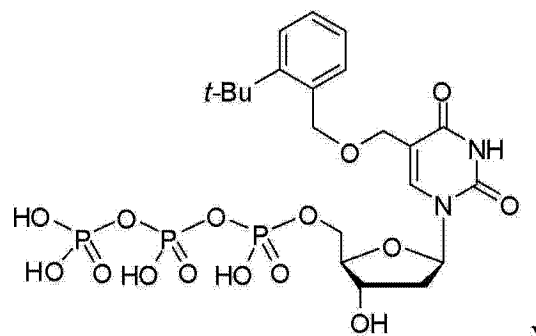
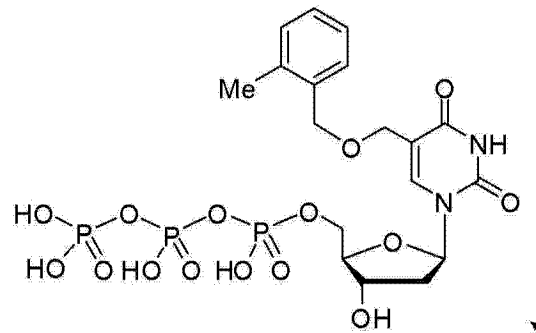
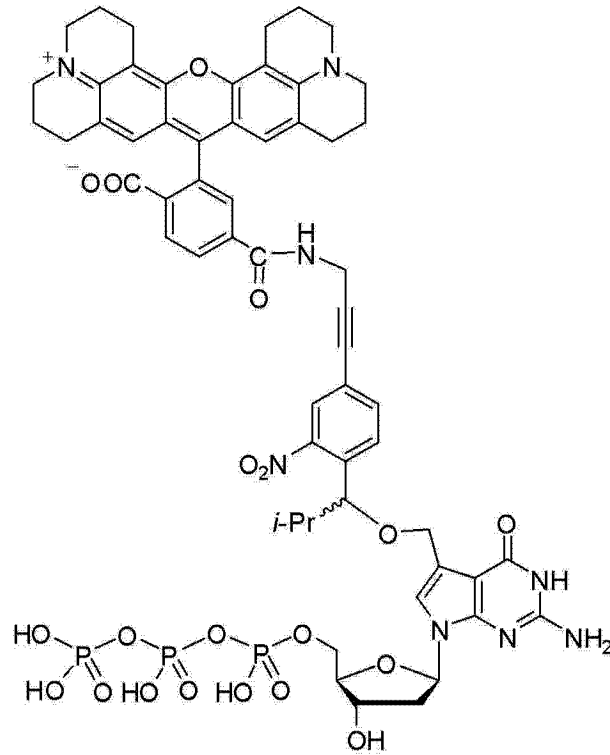
[0085]



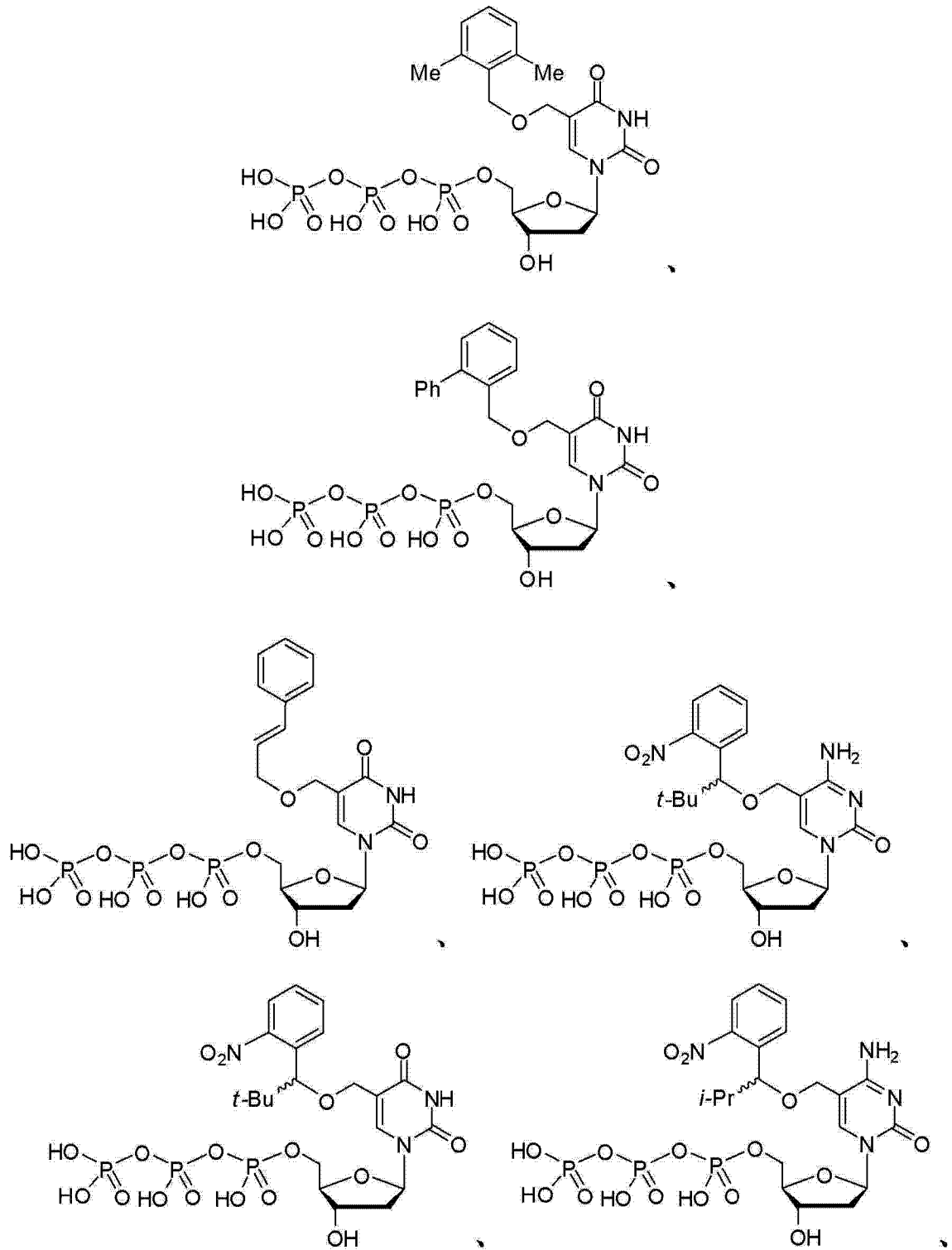
[0086]



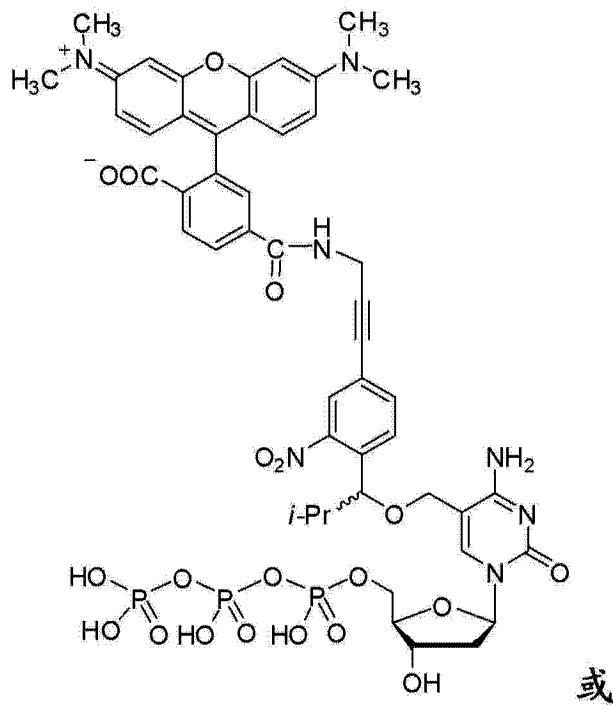
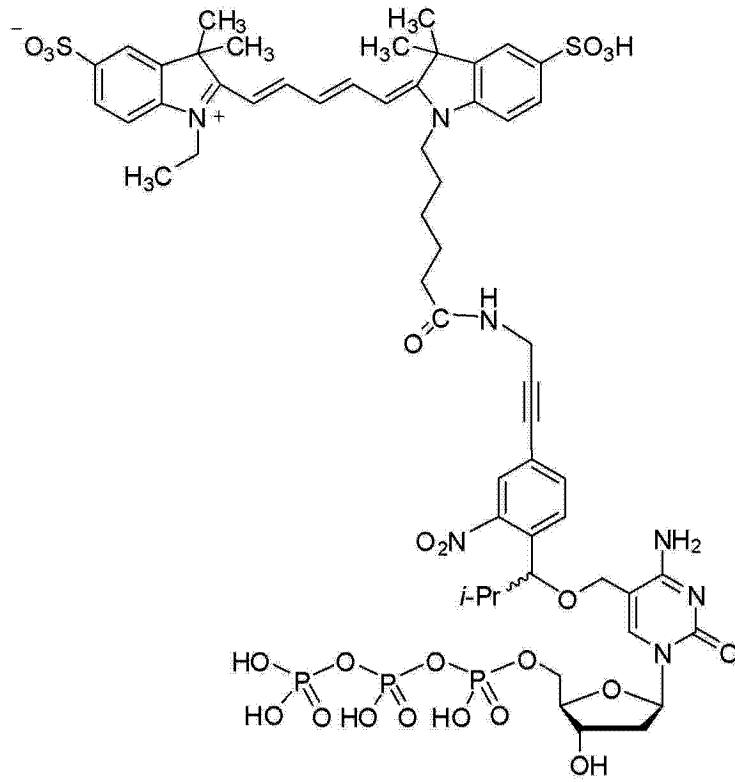
[0087]



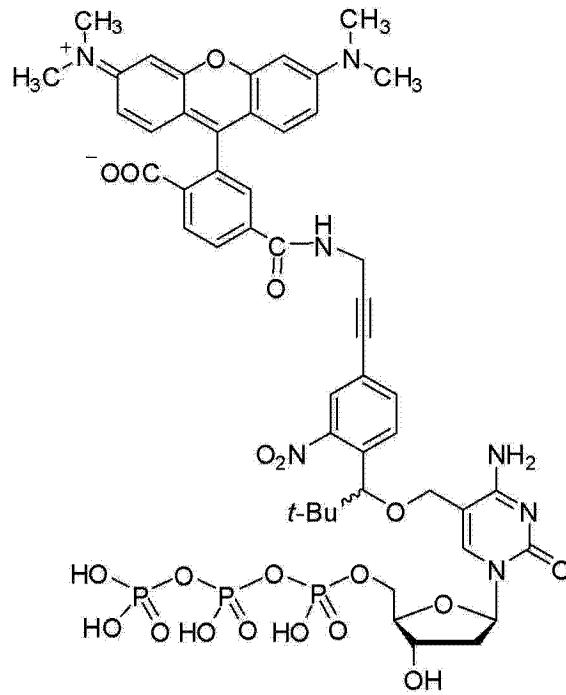
[0088]



[0089]

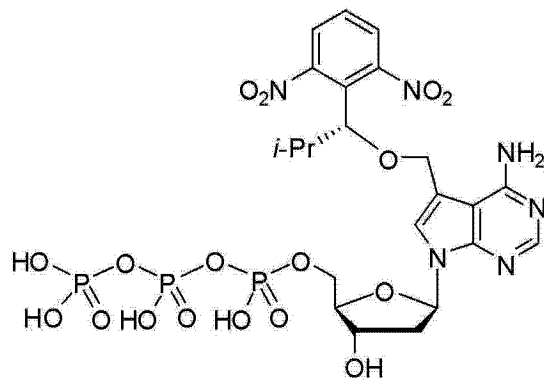
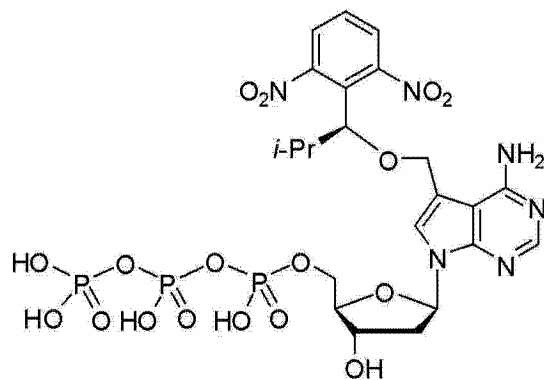


[0090]

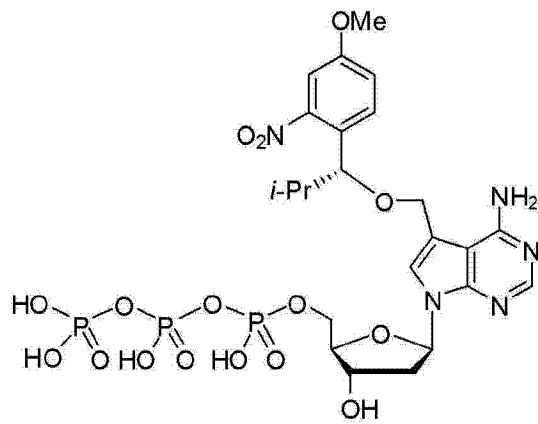
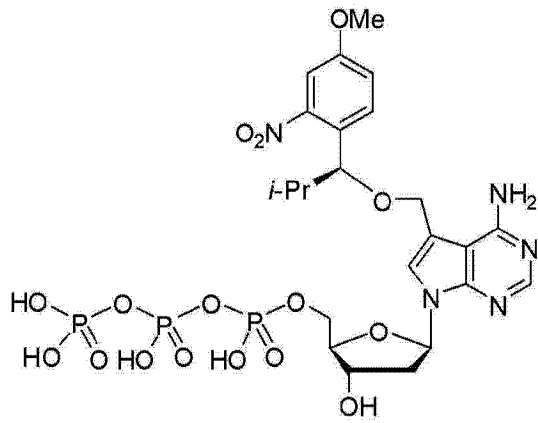
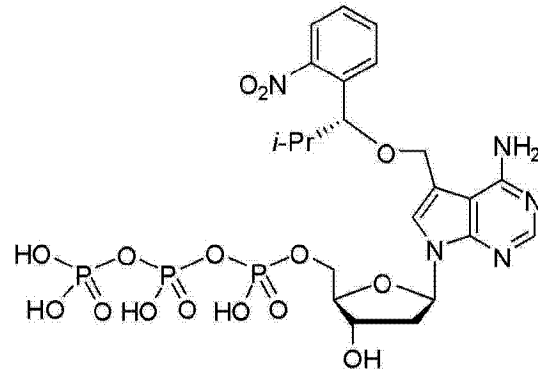
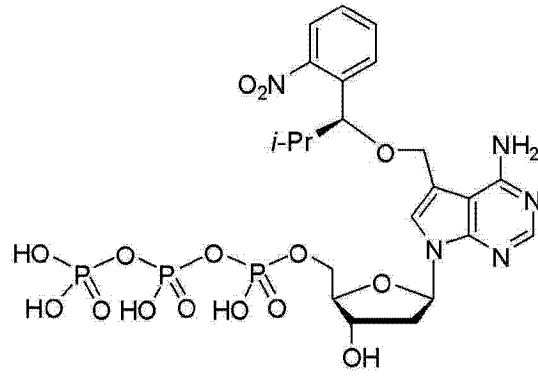


[0091] 在一些实施方案中,所述化合物为上式的盐。在一些实施方案中,所述化合物为在 α -碳原子上具有立构中心的任何上式或其盐的 α -碳原子为R:S50:50的非对映体混合物。在一些实施方案中,所述化合物主要为基本不含其它光学异构体的一种非对映体。例如,在一些实施方案中,本发明提供了基本不含其它光学异构体的任何以下非对映体或其盐:

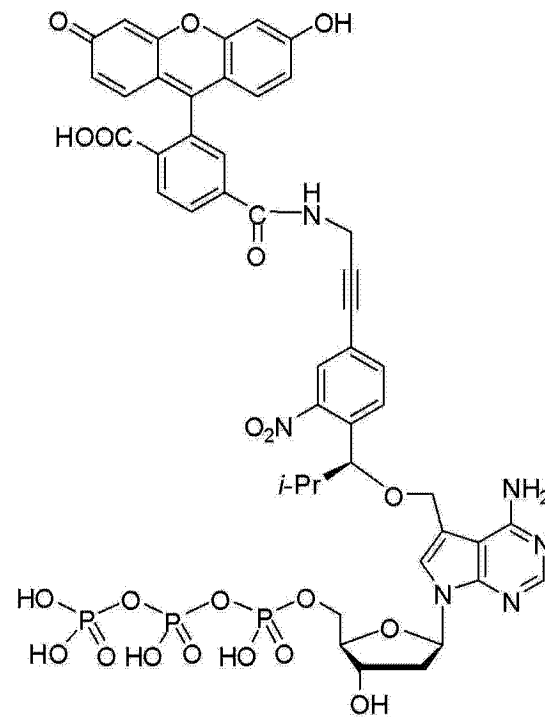
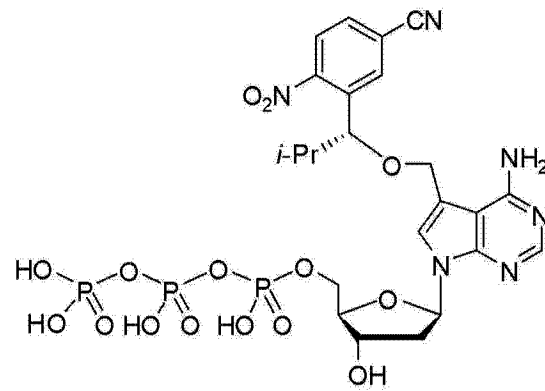
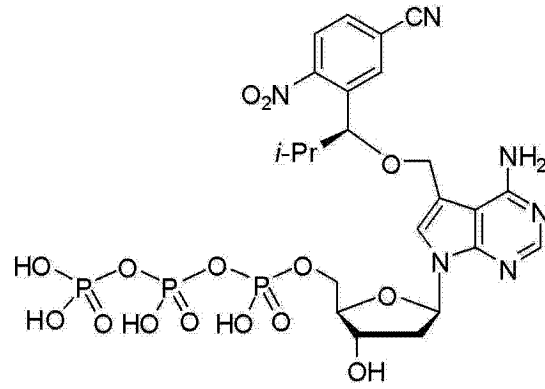
[0092]



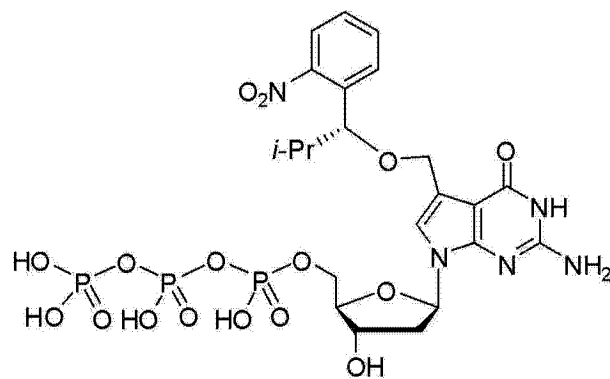
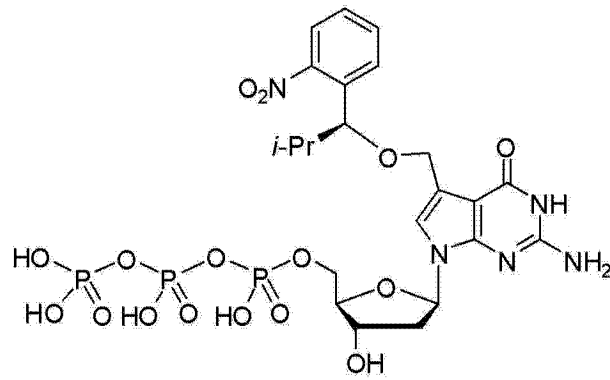
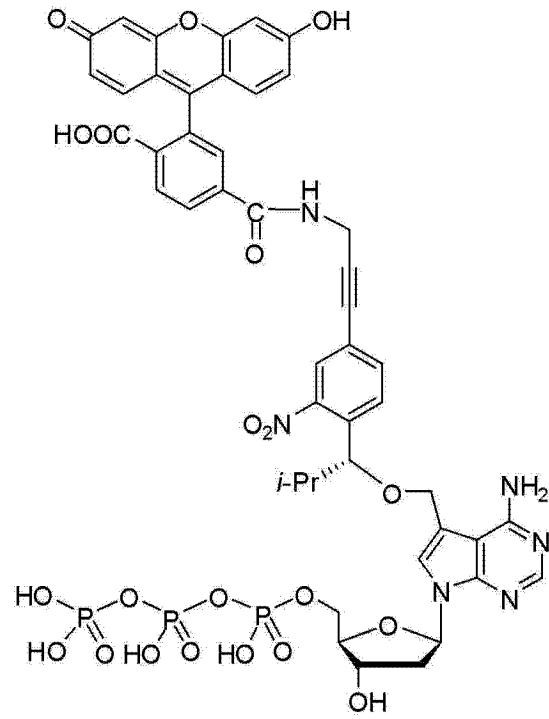
[0093]



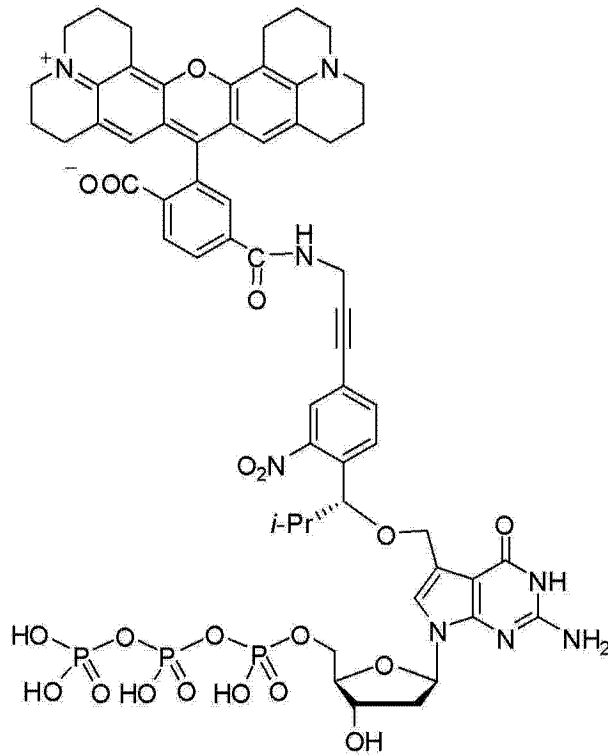
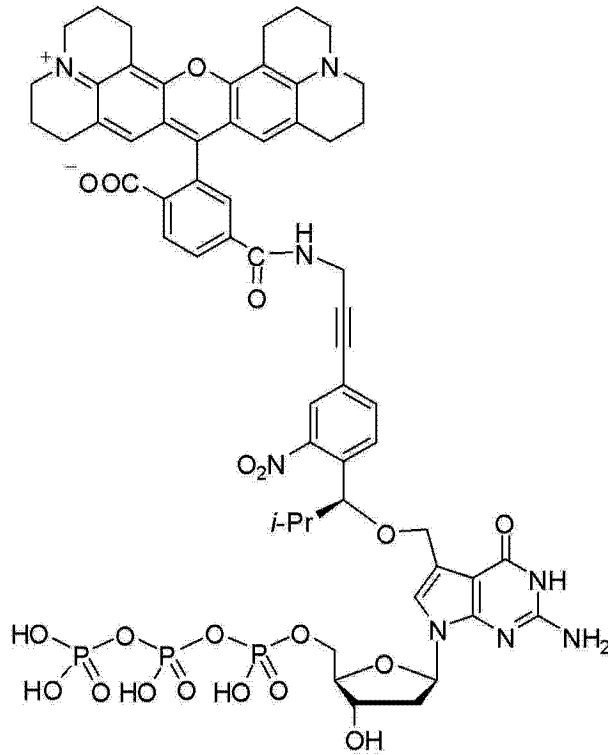
[0094]



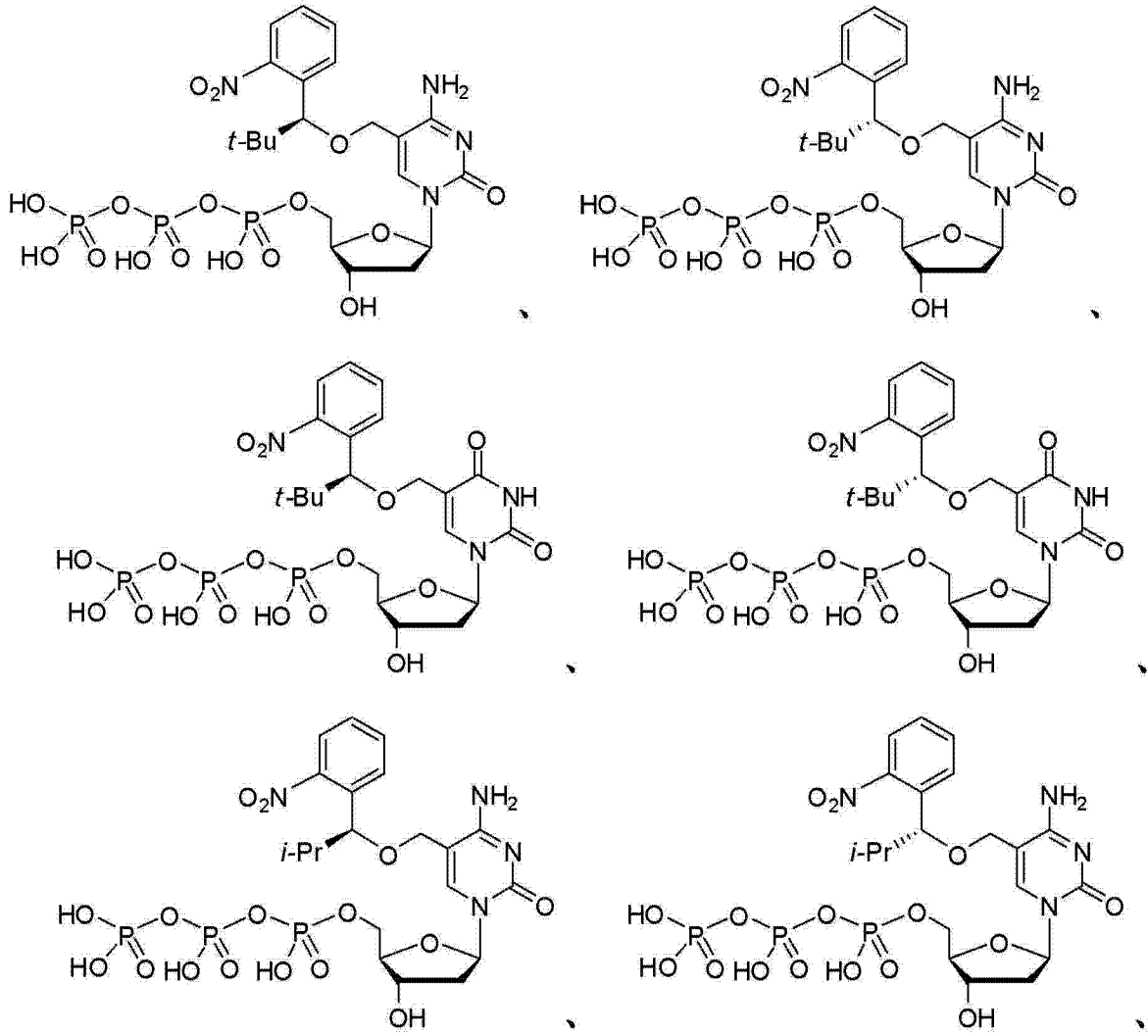
[0095]



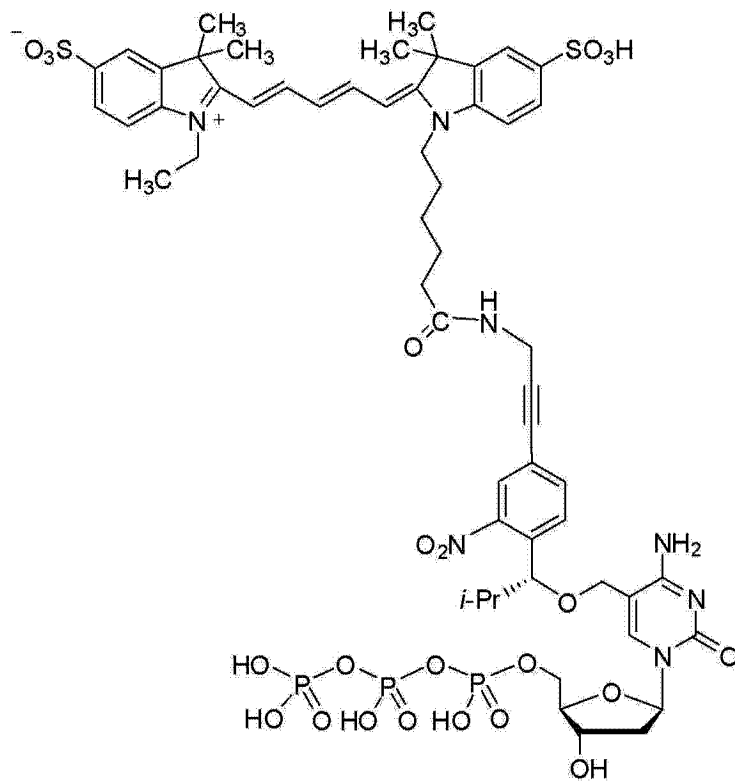
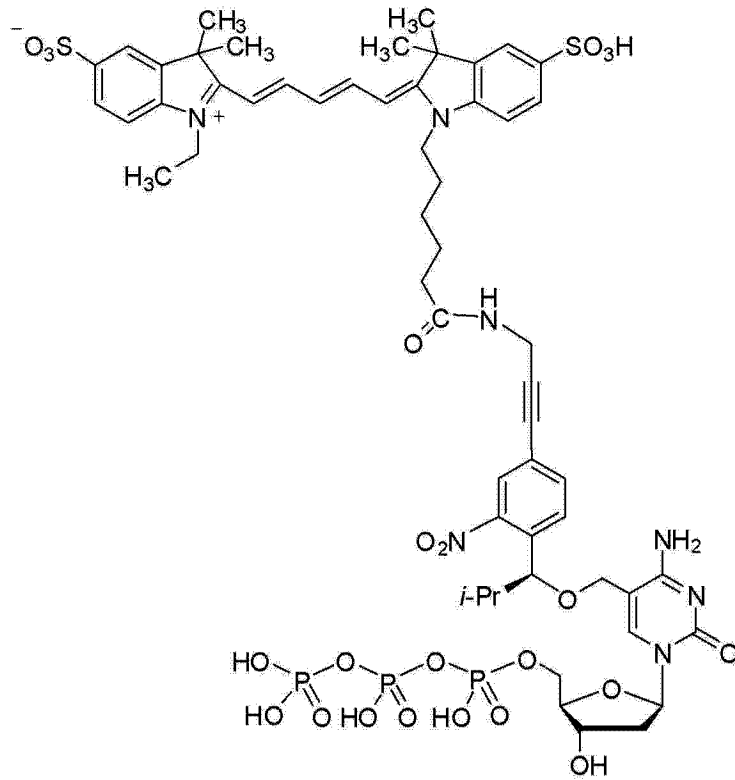
[0096]



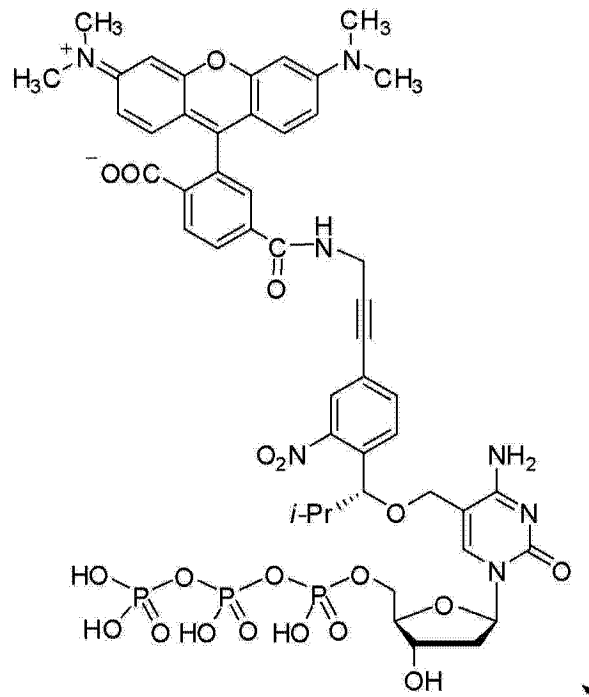
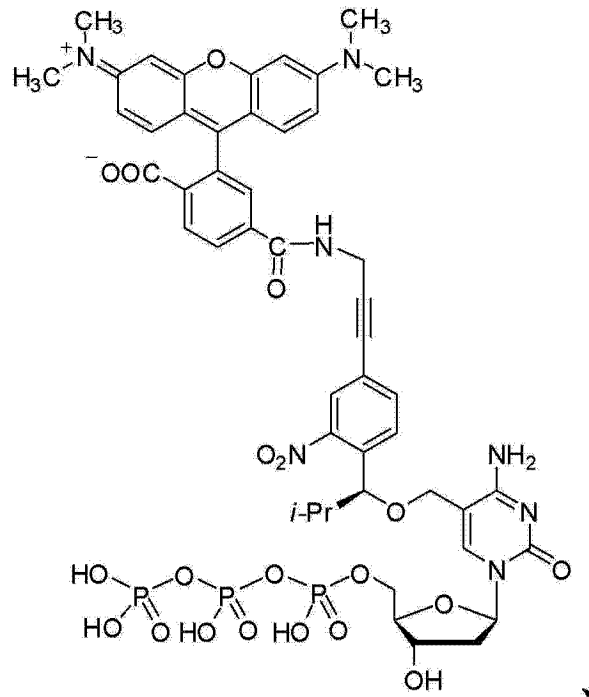
[0097]



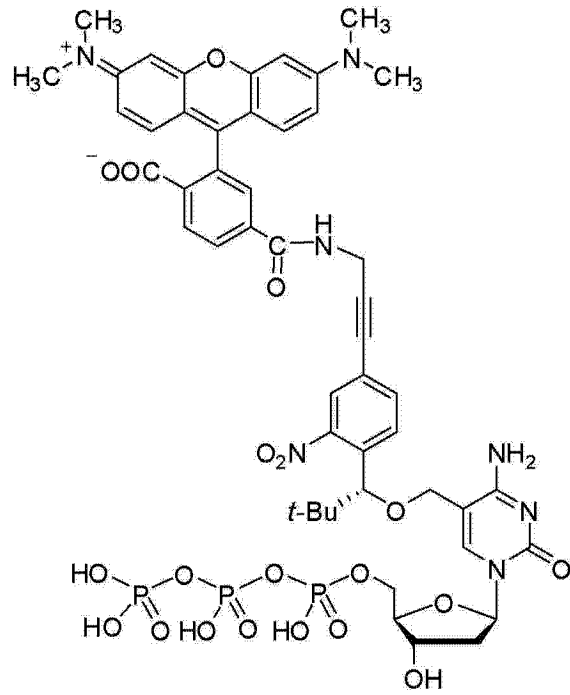
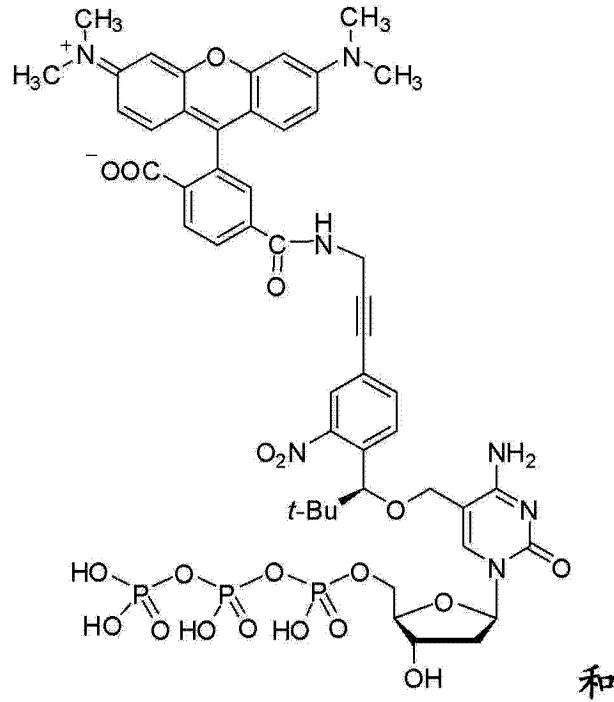
[0098]



[0099]



[0100]



[0101] 在一些实施方案中,任何上式或非对映体的盐含有一价阳离子。在一些实施方案中,所述一价阳离子为锂。在一些实施方案中,所述一价阳离子为钠。在一些实施方案中,所述一价阳离子为钾。在一些实施方案中,所述盐含有二价阳离子。在一些实施方案中,所述二价阳离子为钙、镁或锰(II)。在一些实施方案中,所述盐含有选自铵、三正丁基铵和 $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+$ 的阳离子。

[0102] 在另一方面中,本发明提供了一种对靶标核酸进行测序的方法,包括如下步骤:

[0103] (i) 使引物的5'末端附着于固体表面;

[0104] (ii) 使靶标核酸与所述附着于固体表面的引物杂交;

[0105] (iii) 添加根据权利要求 1-293 中任一项的化合物,前提是在存在多于一种碱基类型的情况下,每种碱基被附着于不同的报告基团上;

[0106] (iv) 向引物/靶标核酸杂交复合物中加入核酸复制酶,以将步骤 (iii) 所述组合物掺入延伸中的引物链中,其中所掺入的步骤 (iii) 所述组合物以约 70%至约 100%的效率终止聚合酶反应;

[0107] (v) 清洗固体表面以除去未掺入的组分;

[0108] (vi) 检测掺入的报告基团,以鉴定所掺入的步骤 (iii) 所述组合物。

[0109] (vii) 进行切割步骤以除去终止性结构部分,产生带有天然碱基的已延伸引物;

[0110] (viii) 清洗固体表面以除去被切下的终止性基团;和

[0111] (ix) 重复步骤 (iii) 至 (viii) 一次或多次,以鉴定靶标核酸中的多个碱基。

[0112] 另一方面,本发明提供了一种对靶标核酸进行测序的方法,包括如下步骤:

[0113] (i) 使靶标核酸的 5' 末端附着于固体表面;

[0114] (ii) 使引物与所述附着于固体表面的靶标核酸杂交;

[0115] (iii) 添加根据权利要求 1-293 中任一项的化合物,前提是在存在多于一种碱基类型的情况下,每种碱基被附着于不同的报告基团上;

[0116] (iv) 向引物/靶标核酸杂交复合物中添加核酸复制酶,以将步骤 (iii) 所述组合物掺入延伸中的引物链中,其中所掺入的步骤 (iii) 所述组合物以约 70%至约 100%的效率终止聚合酶反应;

[0117] (v) 清洗固体表面以除去未掺入的组分;

[0118] (vi) 检测掺入的报告基团,以鉴定所掺入的步骤 (iii) 所述组合物。

[0119] (vii) 任选地加入一种或多种化合物,以使未延伸的引物永久性加帽;

[0120] (viii) 进行切割步骤以除去终止性结构部分,产生带有天然碱基的已延伸引物;

[0121] (ix) 清洗固体表面以除去被切下的终止性基团;和

[0122] (x) 重复步骤 (iii) 至 (ix) 一次或多次,以鉴定靶标核酸中的多个碱基。

[0123] 在一些实施方案中,所述化合物由核酸复制酶掺入,所述酶为 DNA 聚合酶。在一些实施方案中,所述 DNA 聚合酶选自: Taq DNA 聚合酶、Klenow(exo-)DNA 聚合酶、Bst DNA 聚合酶、**VENT®** (exo-)DNA 聚合酶(克隆自 *Thermococcus litoralis* 的 DNA 聚合酶 A, 含有 D141A 和 E143A 突变)、Pfu(exo-)DNA 聚合酶和 DEEPVENT™(exo-)DNA 聚合酶(克隆自 *Pyrococcus* 物种 GB-D 的 DNA 聚合酶 A, 含有 D141A 和 E143A 突变)。在一些实施方案中,所述 DNA 聚合酶选自: **AMPLITAQ®** DNA 聚合酶、FS(含有 G46D 和 F667Y 突变的 Taq DNA 聚合酶)、THERMOSE QUENASE™ DNA 聚合酶(含有 F667Y 突变的 Taq DNA 聚合酶)、THERMOSEQUENASE™ II DNA 聚合酶(THERMOSEQUENASE™ DNA 聚合酶与嗜酸热原体(*T. acidophilum*) 焦磷酸酶的混合物)、THERMINATOR™ DNA 聚合酶(克隆自 *Thermococcus* 物种 9° N-7 的 DNA 聚合酶 A, 含有 D141A、E143A 和 A485L 突变)、THERMINATOR™ II DNA 聚合酶(含有额外的 Y409V 突变的 THERMINATOR™ DNA 聚合酶)和 **VENT®** (exo-)A488L DNA 聚合酶(含有 A488L 突变的 **VENT®** (exo-)DNA 聚合酶)。在一些实施方案中,对所述终止性结构部分的切割为化学切割、光切割、电化学切割或酶切割。在一些实施方案中,所述化学切割使用催化剂或化学计量试剂(stoichiometric reagent)进行。在一些实施

方案中,所述催化剂为均相或非均相。在一些实施方案中,所述非均相催化剂包含钯。在一些实施方案中,所述均相催化剂包含钯。在一些实施方案中,85%至100%的所述可光切割终止性结构部分通过光切割而被去除。在一些实施方案中,所述光切割使用300nm至400nm波长的光进行。在一些实施方案中,85%至100%的所述可光切割终止性结构部分通过光切割而被去除。在一些实施方案中,本发明提供了一种利用本文所述化合物进行Sanger测序或Sanger型测序的方法。在一些实施方案中,本发明提供了一种利用本文所述化合物进行焦磷酸测序(pyrosequencing)或焦磷酸型测序(pyrosequencing-type sequencing)的方法。

[0124] 本发明所提供化合物的非限制性实例包括根据如下式所示的化合物。在某些实施方案中,这些化合物基本上不含其它光学异构体。

[0125]

WW#	化学名	非对映体
1p129	<i>N</i> ⁶ -(2-硝基苄基)-2'-dATP	
2p108	<i>O</i> ⁶ -(2-硝基苄基)-2'-dGTP	
2p143	<i>O</i> ⁶ -(α -甲基-2-硝基苄基)-2'-dGTP	混合物
2p148	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dUTP	混合物
3p006	<i>N</i> ⁶ -(α -甲基-2-硝基苄基)-2'-dATP	混合物
3p063	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dUTP	单一
3p065	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dCTP	单一
3p075	5-(α -叔丁基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dUTP	单一
3p085	5-(α -叔丁基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dCTP	单一
4p135	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dCTP-接头	单一
5p085	<i>C</i> ⁷ -(2-硝基苄氧基)甲基-2'-dATP	
5p098-ds1	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dATP (ds1)	单一
5p098-ds2	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dATP (ds2)	单一
5p107	<i>C</i> ⁷ -(2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP	
5p111	5-(α -异丙基-苄氧基)甲基-2'-dUTP	混合物
5p127	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dATP-6-FAM	单一
5p130-LP 2	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dATP-6-CR110	单一
5p143	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP	混合物
5p143-ds1	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP (ds1)	单一
5p143-ds2	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP (ds2)	单一
5p145	5-(苄氧基)甲基-2'-dUTP	

[0126]

WW#	化学名	非对映体
5p147	5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-dUTP	
5p149	5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-dUTP	
6p005	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dUTP-5-R6G	单一
6p008	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dUTP-6-JOE	单一
6p010	5-(2-苯基苄氧基)甲基-2'-dUTP	
6p015	5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-dUTP	
6p017	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dCTP-Cy5	单一
6p024	5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-dUTP	
6p034	C ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP-6-ROX	单一
6p036	C ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP-dTAMRA-1	单一
6p044	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dUTP-6-ROX	单一
6p057-ds1	C ⁷ -(α -异丙基-2,6-二硝基苄氧基)甲基-2'-dATP (ds1)	单一
6p057-ds2	C ⁷ -(α -异丙基-2,6-二硝基苄氧基)甲基-2'-dATP (ds2)	单一
6p063	N ⁶ -(α -异丙基-2-硝基苄基)-2'-dATP	单一
6p071	C ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP-alexa-fluor-530	单一
6p073	C ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP-6-JOE	单一
6p087-ds1	C ⁷ -(α -异丙基-4-甲氧基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dATP (ds1)	单一
6p087-ds2	C ⁷ -(α -异丙基-4-甲氧基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dATP (ds2)	单一
6p094	5-(α -异丙基-2-硝基苄氧基)甲基-2'-dUTP-6-FAM	单一

[0127] 本公开内容的其它目标、特征和优点将从下列详细描述中变得显而易见。然而,应该理解,详细描述和具体实施例尽管表明了本发明的具体实施方案,但仅用于举例说明目的,因为从该详细说明中,本发明精神和范畴内的多种变化和修饰对于本领域技术人员而言是十分明显的。需要注意的是,将某个具体化合物归为某一特定通式并不意味着它不能归于另一通式。

附图说明

[0128] 以下附图构成本公开内容的一部分,以进一步阐明本发明的某些方面。通过参考这些附图之一并结合对本文具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0129] 图 1. 掺入测定:分析天然 dCTP 与修饰的 dCTP 类似物在带有互补碱基“G”的模板上的掺入。

[0130] 图 2. (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基(1S)-苧烷酸酯的 X-射线晶体学数据: $C_{20}H_{25}NO_6$, $M=375.41$, 无色板, $0.26 \times 0.24 \times 0.10 \text{mm}^3$, 正交晶系, 空间群 $P2_12_1(N0.19)$, $a=11.9268(15)$, $b=11.9812(14)$, $c=13.5488(16) \text{Å}$, $V=1936.1(4) \text{Å}^3$, $Z=4$, $D_c=1.288 \text{g/cm}^3$, $F_{000}=800$, MWPC 平面检测器, CuK α 发射光, $\lambda=1.54178 \text{Å}$, $T=110(2) \text{K}$, $2\theta_{\text{max}}=120.0^\circ$, 收集 22896 个反射, 2665 个独立反射(unique reflection) ($R_{\text{int}}=0.0462$)。最终 $G_{\text{ooF}}=1.009$, $R1=0.0219$, $wR2=0.0554$, R 指数基于 2629 个 $I>2\sigma(I)$ 的反射(用 F^2 校正), 245 个参数, 0 限制。应用 L_p 和吸收校正, $\mu=0.787 \text{mm}^{-1}$ 。绝对结构参数 $=0.09(5)$ 。

[0131] 图 3. (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基(1S)-苧烷酸酯的 X-射线晶体学数据: $C_{20}H_{24}INO_6$ 的晶体数据: $C_{20}H_{24}INO_6$, $M=501.30$, 无色板, $0.30 \times 0.20 \times 0.20 \text{mm}^3$, 单斜晶系, 空间群 $P2_1(N0.4)$, $a=7.5810(15)$, $b=12.446(3)$, $c=11.722(3) \text{Å}$, $\beta=107.613(10)^\circ$, $V=1054.2(4) \text{Å}^3$, $Z=2$, $D_c=1.579 \text{g/cm}^3$, $F_{000}=504$, CCD 平面检测器, MoK α 发射光, $\lambda=0.71073 \text{Å}$, $T=110(2) \text{K}$, $2\theta_{\text{max}}=50.0^\circ$, 收集 24239 个反射, 3558 个独立反射 ($R_{\text{int}}=0.0302$)。最终 $G_{\text{ooF}}=1.010$, $R1=0.0123$, $wR2=0.0316$, R 指数基于 3520 个 $I>2\sigma(I)$ 的反射(用 F^2 校正), 253 个参数, 3 个限制。应用 L_p 和吸收校正, $\mu=1.554 \text{mm}^{-1}$ 。绝对结构参数 $=0.020(9)$ 。






[0132] 图 4. 5-苄氧基甲基-2'-脱氧尿苷氢解作用的 HPLC 堆栈轨迹(stack trace)。

[0133] 图 5. 5-(1-苯基-2-甲基丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷氢解作用的 HPLC 堆栈轨迹。

[0134] 发明详述

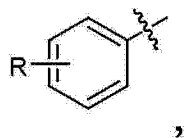
[0135] I. 定义

[0136] 当用于化学基团的情况下,“氢”意为 -H,“羟基”意为 -OH,“氧代”意为 =O,“卤代”独立地意为 -F、-Cl、-Br 或 -I,“氨基”意为 -NH₂(见下文中含有术语氨基的基团定义,例如烷基氨基),“羟氨基”意为 -NHOH,“硝基”意为 -NO₂,“亚氨基”意为 =NH(见下文中含有术语亚氨基的基团定义,例如烷基亚氨基),“氰基”意为 -CN,“叠氨基”意为 -N₃,在一价情况下“磷酸基”意为 -OP(O)(OH)₂ 或其去质子化形式,在二价情况下“磷酸基”意为 -OP(O)(OH)O⁻ 或其去质子化形式,“巯基”意为 -SH,“硫代”意为 =S,“硫醚”意为 -S-,“磺酰氨基”意为 -NHS(O)₂- (见下文中含有术语磺酰氨基的基团定义,例如烷基磺酰氨基),“磺酰基”意为 -S(O)₂- (见下文中含有术语磺酰基的基团定义,例如烷基磺酰基),“亚磺酰基”意为 -S(O)- (见下文中含有术语亚磺酰基的基团定义,例如烷基亚磺酰基),“甲硅烷基”意为 -SiH₃(见下文中含有术语甲硅烷基的基团定义,例如烷基甲硅烷基)。

[0137] 符号“-”意为单键，“=”意为双键，“≡”意为三键。符号“”代表单键或双键。符号“”在绘制成垂直穿过化学键时表示所述基团的连接点。需要注意的是，通常仅对较大基团以此种方式标出连接点，以帮助读者快速并毫无疑问地辨别连接点。符号“”意为单键，其中附着于楔形粗端的基团“突出于页面上”。符号“”意为单键，其中附着于楔形粗端的基团“深入页面下”。符号“”意为以下情况下的单键：构象（例如，R 或 S）未知、几何学情况（例如，E 或 Z）未知，或者化合物以构象或几何异构体混合物存在（例如，50% / 50%混合）。

[0138] 当基团“R”被描绘成环系统上的“非固定基团”，如下式中：

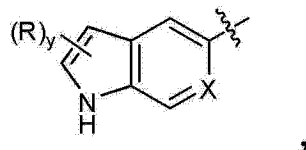
[0139]



[0140] 则 R 可取代连接于任一环原子上的任一氢原子，包括已绘出、暗指的或明确定义的氢，只要形成稳定结构即可。

[0141] 当基团“R”被描绘成稠环系统上的“非固定基团”，如下式中：

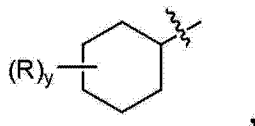
[0142]



[0143] 则除非明确指出为其它情况，否则 R 可取代连接于稠环中任一环的任一环原子上的任一氢原子。可被取代的氢包括已绘出的氢（如上式中连接于氮的氢）、暗指的氢（如上式中未标明但会理解到其存在的氢）、明确定义的氢，以及其存在依赖于某个环原子的认定的可选的氢（例如当 X 为 -CH- 时与基团 X 连接的氢），只要形成稳定结构即可。在所述实例中，R 可位于稠环系统的 5 元或 6 元环上。在上式中，括号内基团“R”后面的下标“y”代表数字变量。除非特别规定，否则该变量可以为 0、1、2，或任一大于 2 的整数，仅受限于环或环系统上最大可取代氢原子数。

[0144] 当 y 为 2 且“(R)_y”被描述成环系统上的非固定基团时，其中所述环系统带有一个或多个具有两个可取代氢的环原子，例如饱和的环碳原子，如下式的实例：

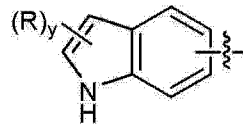
[0145]



[0146] 则两个 R 基团各自可位于相同或不同的环原子上。例如，当 R 为甲基且两个 R 基团都连接于同一个环原子上时，即产生偕二甲基基团。在情况允许时，两个 R 基团可合起来形成一个二价基团，比如以下进一步被定义的二价基团之一。当这样的二价基团附着于同一个环原子上，将会形成螺环结构。

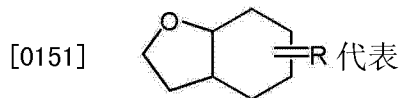
[0147] 当连接点被描述为“非固定”，如下式中：

[0148]

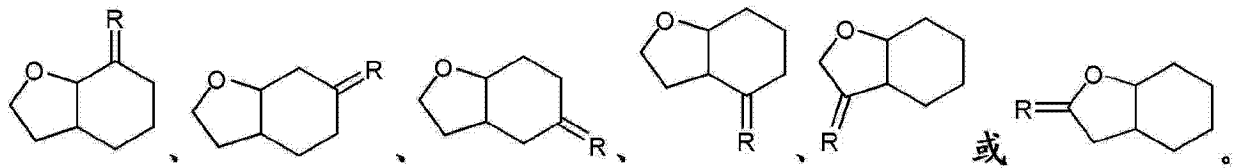


[0149] 则除非特别规定,否则连接点可取代稠环之一的任何环原子上的任何可取代氢原子。

[0150] 在双键 R 基团(如氧代、亚氨基、硫代、亚烷基等)的情况下,连接于一个环原子上的任何暗指的或明示的氢原子对可被 R 基团取代。此概念例证如下:




[0152]



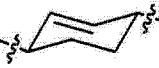
[0153] 对如下基团,其后括号内的下标进一步对该基团进行如下定义:“(C_n)”定义了所述基团中碳原子的确切数目(n)。“(C_{≤n})”定义了能够存在于基团中的最大碳原子数目(n),在此情况下碳原子数至少为1,或是对目的基团而言尽可能地小。例如,可以理解,在基团“烯基_(c_{≤8})”中最小碳原子数为2。例如“烷氧基_(c_{≤10})”意为含有1-10个碳原子(如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,或是源于其中的任意区间(如3-10个碳原子)的那些烷氧基。(C_{n-n'})定义了基团内碳原子的最小(n)和最大(n')数目。同样地,“烷基_(c₂₋₁₀)”指定了含有2-10个碳原子(如2、3、4、5、6、7、8、9或10,或是源于其中的任意区间(如3-10个碳原子)的那些烷基基团。

[0154] 术语“烷基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指非芳香一价基团,其以饱和碳原子作为连接点,直链或支链、成环、环状或非环状结构,无碳-碳双键或三键,且除碳和氢外无其它原子。基团-CH₃(甲基)、-CH₂CH₃(乙基)、-CH₂CH₂CH₃(正丙基)、-CH(CH₃)₂(异丙基)、-CH(CH₂)₂(环丙基)、-CH₂CH₂CH₂CH₃(正丁基)、-CH(CH₃)CH₂CH₃(仲丁基)、-CH₂CH(CH₃)₂(异丁基)、-C(CH₃)₃(叔丁基)、-CH₂C(CH₃)₃(新戊基)、环丁基、环戊基、环己基和环己基甲基为烷基基团的非限定实例。术语“取代烷基”指非芳香一价基团,其以饱和碳原子为连接点,直链或支链、成环、环状或非环状结构,无碳-碳双键或三键,且至少一个原子独立地选自N、O、F、Cl、Br、I、Si、P和S。以下基团为取代烷基的非限定实例:-CH₂OH、-CH₂Cl、-CH₂Br、-CH₂SH、-CF₃、-CH₂CN、-CH₂C(O)H、-CH₂C(O)OH、-CH₂C(O)OCH₃、-CH₂C(O)NH₂、-CH₂C(O)NHCH₃、-CH₂C(O)CH₃、-CH₂OCH₃、-CH₂OCH₂CF₃、-CH₂OC(O)CH₃、-CH₂NH₂、-CH₂NHCH₃、-CH₂N(CH₃)₂、-CH₂CH₂Cl、-CH₂CH₂OH、-CH₂CF₃、-CH₂CH₂OC(O)CH₃、-CH₂CH₂NHCO₂C(CH₃)₃和-CH₂Si(CH₃)₃。

[0155] 术语“烷撑”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指非芳香二价基团,其中所述烷撑基团连接两个σ键,以一个或两个饱和碳原子作为连接点,直链或支链、成环、环状或非环状结构,无碳-碳双键或三键,且除碳和氢外无其它原子。基团-CH₂-(亚甲基)、-CH₂CH₂-

—、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 和  为烷撑基团的非限定实例。术语“取代烷撑”指非芳香一价基团，其中所述烷撑基团连接两个 σ 键，以一个或两个饱和碳原子作为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，无碳-碳双键或三键，且至少一个原子独立地选自 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S。以下基团为取代烷撑基团的非限定实例： $-\text{CH}(\text{F})-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{Cl})-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})-$ 、 $-\text{CH}(\text{OCH}_3)-$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{Cl})-$ 。

[0156] 术语“烯基”在不与修饰语“取代的”共同使用时，指一价基团，其以非芳香碳原子为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，至少有一个非芳香碳-碳双键，无碳-碳三键，且除碳和氢外无其它原子。烯基基团的非限定实例包括： $-\text{CH}=\text{CH}_2$ （乙烯基）、 $-\text{CH}=\text{CHC}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ （烯丙基）、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$ 和 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_5$ 。术语“取代烯基”指一价基团，其以非芳香碳原子为连接点，至少有一个非芳香碳-碳双键，无碳-碳三键，直链或支链、成环、环状或非环状结构，且至少一个原子独立地选自 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S。基团 $-\text{CH}=\text{CHF}$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCl}$ 和 $-\text{CH}=\text{CHBr}$ 为取代烯基基团的非限定实例。

[0157] 术语“烯撑”在不与修饰语“取代的”共同使用时指非芳香二价基团，其中所述烯撑基团连接两个 σ 键，以两个碳原子为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，至少有一个非芳香碳-碳双键，无碳-碳三键，且除碳和氢外无其它原子。基团 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 和  是烯撑基团的非限定实例。术语“取代烯撑”指非芳香二价基团，其中所述烯撑基团连接两个 σ 键，以两个碳原子为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，至少有一个非芳香碳-碳双键，无碳-碳三键，且至少一个原子独立地选自于 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S。以下基团为取代烯撑基团的非限定实例： $-\text{CF}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}(\text{OH})=\text{CH}-$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{Cl})-$ 。

[0158] 术语“炔基”在不与修饰语“取代的”共同使用时，指一价基团，其以非芳香碳原子为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，至少有一个碳-碳三键，且除碳和氢外无其它原子。基团 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CC}_6\text{H}_5$ 和 $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ 为炔基基团的非限定实例。术语“取代炔基”指一价基团，其以非芳香碳原子为连接点，至少有一个碳-碳三键，直链或支链、成环、环状或非环状结构，且至少一个原子独立地选自于 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S。基团 $-\text{C}\equiv\text{CSi}(\text{CH}_3)_3$ 为取代炔基基团的非限定实例。

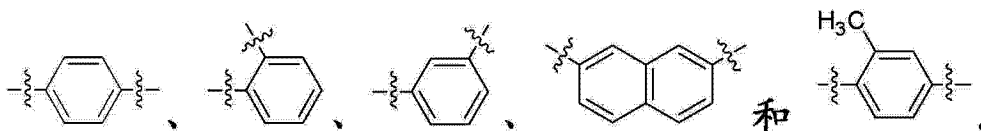
[0159] 术语“炔撑”在不与修饰语“取代的”共同使用时指非芳香二价基团，其中所述炔撑基团连接两个 σ 键，以两个碳原子为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，至少有一个碳-碳三键，且除碳和氢外无其它原子。基团 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{CCH}_2-$ 和 $-\text{C}\equiv\text{CCH}(\text{CH}_3)-$ 是炔撑基团的非限定实例。术语“取代炔撑”指非芳香二价基团，其中所述炔撑基团连接两个 σ 键，以两个碳原子为连接点，直链或支链、成环、环状或非环状结构，至少有一个碳-碳三键，且至少一个原子独立地选自于 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S。基团 $-\text{C}\equiv\text{CCFH}-$ 和 $-\text{C}\equiv\text{CHCH}(\text{Cl})-$ 为取代炔撑基团的非限定实例。

[0160] 术语“芳基”在不与修饰语“取代的”共同使用时，指以芳香碳原子为连接点的一价基团，所述碳原子构成一个或多个六元芳环结构（其中环原子均为碳）的一部分，并且其中所述一价基团除碳和氢外不包含其它原子。芳基基团的非限定实例包括苯基 (Ph)、甲基苯基、二甲基苯基、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_3$ （乙基苯基）、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ （丙基苯基）、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}$

${}_{6}\text{H}_4\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ (甲基乙基苯基)、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CH}_2$ (乙烯基苯基)、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CH}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ 、萘基,以及源自于联苯基的一价基团。术语“取代芳基”指以芳香碳原子为连接点的一价基团,所述碳原子构成一个或多个六元芳环结构(其中环原子均为碳)的一部分,并且其中所述一价基团还包含至少一个独立地选自以下的原子:N、O、F、Cl、Br、I、Si、P和S。取代芳基基团的非限定实例包括基团: $-\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{I}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CN}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CHO}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CHO}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CONH}_2$ 、 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CONHCH}_3$ 和 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ 。

[0161] 术语“芳撑”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指二价基团,其中所述芳撑基团连接两个 σ 键,以两个芳香碳原子为连接点,所述碳原子构成一个或多个六元芳环结构(其中环原子均为碳)的一部分,并且其中所述一价基团除碳和氢外不包含其它原子。芳撑基团的非限定实例包括:

[0162]



[0163] 术语“取代芳撑”指二价基团,其中所述芳撑基团连接两个 σ 键,以两个芳香碳原子为连接点,所述碳原子构成一个或多个六元芳香环结构(其中环原子均为碳)的一部分,并且其中所述一价基团还包含至少一个独立地选自于N、O、F、Cl、Br、I、Si、P和S的原子。

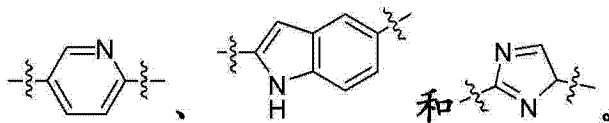
[0164] 术语“芳烷基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指-烷撑-芳基这一一价基团,其中术语烷撑和芳基各自的使用方式与上文提供的定义一致。芳烷基的非限定实例为:苯甲基(苄基,Bn)、1-苯基-乙基、2-苯基-乙基、苈基和2,3-二氢苈基,前提是苈基和2,3-二氢苈基是芳烷基中仅有的在每种情况下连接点为饱和碳原子之一的实例。当术语“芳烷基”与修饰语“取代的”共同使用时,烷撑和芳基之一或之二被取代。取代芳烷基的非限定实例为:(3-氯苯基)-甲基、2-氧代-2-苯基-乙基(苯基羰基甲基)、2-氯-2-苯基-乙基、苯并二氢吡喃基(当连接点为饱和碳原子之一时),以及四氢喹啉基(当连接点为饱和碳原子之一时)。

[0165] 术语“杂芳基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指以芳香的碳原子或氮原子为连接点的一价基团,所述碳原子或氮原子构成芳环结构(其中环原子中至少有一个为氮、氧或硫)的一部分,并且其中所述一价基团除碳、氢、芳香氮、芳香氧和芳香硫外不包含其它原子。芳基基团的非限定实例包括吡啶基、咪唑基、咪唑并咪唑基、咪唑并吡啶基、咪唑并吡啶基、咪唑并嘧啶基、吡啶基、indazolinylyl、甲基吡啶基、噁唑基、苯基咪唑基、吡啶基、吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、喹啉基、喹啉基、喹噁啉基、四氢喹啉基、噻吩基、三嗪基、吡咯并吡啶基、吡咯并嘧啶基、吡咯并吡嗪基、吡咯并三嗪基、吡咯并咪唑基、苯并吡喃基(当连接点为芳香原子之一时)和苯并二氢吡喃基(当连接点为芳香原子之一时)。术语“取代杂芳基”指以芳香性碳原子或氮原子为连接点的一价基团,所述碳原子或氮原子构成芳香环结构(其中环原子中至少有一个是氮、氧或硫)的一部分,并且其中所述一价基团还包含至少一个独立地选自于非芳香氮、非芳香氧、非芳香硫、F、Cl、Br、I、Si和P的原子。

[0166] 术语“杂芳撑”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指二价基团,其中所述杂芳撑

基团连接两个 σ 键,以芳香的碳原子或氮原子为连接点,所述碳原子或氮原子构成一个或多个芳香环结构(其中环原子中至少有一个为氮、氧或硫)的一部分,并且其中所述二价基团除碳、氢、芳香氮、芳香氧和芳香硫外不包含其它原子。杂芳撑基团的非限定实例包括:

[0167]



[0168] 术语“取代杂芳撑”指二价基团,其中所述杂芳撑基团连接两个 σ 键,以芳香碳原子或氮原子为连接点,所述碳原子或氮原子构成一个或多个六元芳香环结构(其中环原子中至少有一个为氮、氧或硫)的一部分,并且其中所述二价基团还包含至少一个独立地选自于非芳香氮、非芳香氧、非芳香硫、F、Cl、Br、I、Si 和 P 的原子。

[0169] 术语“杂芳烷基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指 - 烷撑 - 杂芳基这一价基团,其中术语烷撑和杂芳基各自的使用方式与上文提供的定义一致。芳烷基的非限定性实例包括:吡啶甲基和噻吩甲基。当术语“杂芳烷基”与修饰语“取代的”共同使用时,烷撑和杂芳基之一或之二被取代。

[0170] 术语“酰基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指以羰基碳原子为连接点的一价基团,其进一步含有直链或支链、成环、环状或非环状结构,并除了羰基基团中的氧原子外仅由碳和氢原子组成。基团 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (乙酰基, Ac)、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{COC}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2$ 和 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 为酰基基团的非限定实例。术语“酰基”因此包括但不限于有时被称为“烷基羰基”和“芳基羰基”的基团。术语“取代酰基”指以羰基碳原子为连接点的一价基团,进一步含有直链或支链、成环、环状或非环状结构,并除了羰基基团中的氧原子外至少含有一个独立地选自于 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S 的原子。基团 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ (羧基)、 $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ (甲基羧基)、 $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ (氨基甲酰基)、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CONHCH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CONHCH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CONHCH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CO}$ - 吡啶基、 $-\text{CO}$ - 咪唑基和 $-\text{C}(\text{O})\text{N}_3$ 为取代酰基基团的非限定实例。术语“取代酰基”包括但不限于“杂芳基碳基”基团。

[0171] 术语“亚烷基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指二价基团 $=\text{CRR}'$,其中所述亚烷基基团连接一个 σ 键和一个 π 键,其中 R 和 R' 独立地为氢、烷基,或者 R 和 R' 合起来代表烷撑基。亚烷基基团的非限定实例包括: $=\text{CH}_2$ 、 $=\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 和 $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 。术语“取代亚烷基”指基团 $=\text{CRR}'$,其中所述亚烷基基团连接一个 σ 键和一个 π 键,其中 R 和 R' 独立地为氢、烷基、取代烷基,或者 R 和 R' 合起来代表取代烷撑基,前提是 R 和 R' 之一为取代烷基或 R 和 R' 合起来代表取代烷撑基。

[0172] 术语“烷氧基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-\text{OR}$,其中 R 为烷基,该术语定义如上。烷氧基基团的非限定实例包括: $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{OCH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{O}$ - 环戊基和 $-\text{O}$ - 环己基。术语“取代烷氧基”指基团 $-\text{OR}$,其中 R 为取代烷基,该术语定义如上。例如, $-\text{OCH}_2\text{CF}_3$ 即为取代烷氧基基团。

[0173] 同样地,术语“烯氧基”、“炔氧基”、“芳氧基”、“芳烷氧基”、“杂芳氧基”、“杂芳烷氧基”和“酰氧基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-\text{OR}$ 的基团,其中 R 分别

为烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和酰基,这些术语定义如上。当术语烯氧基、炔氧基、芳氧基、芳烷氧基和酰氧基中任一个被“取代的”修饰时,其指基团 $-OR$,其中 R 分别为取代的烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和酰基。

[0174] 术语“烷基氨基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-NHR$,其中 R 为烷基,该术语定义如上。烷基氨基基团的非限定实例包括 $-NHCH_3$ 、 $-NHCH_2CH_3$ 、 $-NHCH_2CH_2CH_3$ 、 $-NHCH(CH_3)_2$ 、 $-NHCH(CH_2)_2$ 、 $-NHCH_2CH_2CH_2CH_3$ 、 $-NHCH(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-NHCH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-NHC(CH_3)_3$ 、 $-NH$ -环戊基和 $-NH$ -环己基。术语“取代烷基氨基”指基团 $-NHR$,其中 R 为取代烷基,该术语定义如上。例如, $-NHCH_2CF_3$ 即为取代烷基氨基。

[0175] 术语“二烷基氨基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-NRR'$,其中 R 和 R' 可以是相同或不同的烷基基团,或者 R 和 R' 可以合起来代表含有两个或更多饱和碳原子(其中至少有两个与氮原子相连)的烷撑。二烷基氨基基团的非限定实例包括: $-NHC(CH_3)_3$ 、 $-N(CH_3)CH_2CH_3$ 、 $-N(CH_2CH_3)_2$ 、 N -吡咯烷基和 N -哌啶基。术语“取代二烷基氨基”指基团 $-NRR'$,其中 R 和 R' 可以是相同或不同的取代烷基基团, R 和 R' 中其一为烷基而另一个为取代烷基,或者 R 和 R' 可以合起来代表含有两个或更多饱和碳原子(其中至少有两个与氮原子相连)的取代烷撑。

[0176] 术语“烷氧基氨基”、“烯基氨基”、“炔基氨基”、“芳基氨基”、“芳烷基氨基”、“杂芳基氨基”、“杂芳烷基氨基”和“烷基磺酰基氨基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-NHR$ 的基团,其中 R 分别为烷氧基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和烷基磺酰基,这些术语定义如上。芳基氨基基团的一个非限定实例为 $-NHC_6H_5$ 。当术语烷氧基氨基、烯基氨基、炔基氨基、芳基氨基、芳烷基氨基、杂芳基氨基、杂芳烷基氨基和烷基磺酰基氨基中任何一个被“取代的”修饰时,其指基团 $-NHR$,其中 R 分别为取代的烷氧基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和烷基磺酰基。

[0177] 术语“酰胺基”(酰基氨基)在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-NHR$,其中 R 为酰基,该术语定义如上。酰胺基的一个非限定实例为 $-NHC(O)CH_3$ 。当术语氨基与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-NHR$ 的基团,其中 R 为取代酰基,该术语定义如上。基团 $-NHC(O)OCH_3$ 和 $-NHC(O)NHCH_3$ 为取代酰胺基团的非限定实例。

[0178] 术语“烷基亚氨基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $=NR$,其中所述烷基亚氨基基团连接一个 σ 键和一个 π 键,其中 R 为烷基,该术语定义如上。烷基亚氨基基团的非限定实例包括 $=NCH_3$ 、 $=NCH_2CH_3$ 和 $=N$ -环己基。术语“取代烷基亚氨基”指基团 $=NR$,其中所述烷基亚氨基基团连接一个 σ 键和一个 π 键,其中 R 为取代烷基,该术语定义如上。例如, $=NCH_2CF_3$ 即为取代烷基亚氨基基团。

[0179] 同样地,术语“烯基亚胺基”、“炔基亚氨基”、“芳基亚氨基”、“芳烷基亚氨基”、“杂芳基亚氨基”、“杂芳烷基亚氨基”和“酰基亚氨基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $=NR$ 的基团,其中所述烷基亚胺基基团连接一个 σ 键和一个 π 键,其中 R 分别为烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和酰基,这些术语定义如上。当术语烯基亚胺基、炔基亚胺基、芳基亚胺基、芳烷基亚胺基、杂芳基亚胺基、杂芳烷基亚胺基和酰基亚胺基中任一个被“取代的”修饰时,其指基团 $=NR$,其中所述烷基亚胺基基团连接一个 σ 键和一个 π 键,其中 R 分别为取代的烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和酰基。

[0180] 术语“氟代烷基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指用一个或多个氟取代了

氢的烷基,该术语定义如上。基团 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CF}_2\text{H}$ 、 $-\text{CF}_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 为氟代烷基基团的非限定实例。术语“取代的氟代烷基”指带有饱和碳原子作为连接点、直链或支链、成环、环状或非环状结构、至少一个氟原子、无碳-碳双键或三键且至少一个原子独立地选自于 N、O、Cl、Br、I、Si、P 和 S 的非芳香一价基团。以下基团是取代氟代烷基的非限定实例： $-\text{CFHOH}$ 。

[0181] 术语“烷基磷酸”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})(\text{OR})$,其中 R 为烷基,该术语定义如上。烷基磷酸基团的非限定实例包括 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})(\text{OMe})$ 和 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})(\text{OEt})$ 。术语“取代烷基磷酸”指基团 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})(\text{OR})$,其中 R 为烷基,该术语定义如上。

[0182] 术语“二烷基磷酸”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR})(\text{OR}')$,其中 R 和 R' 可以是相同或不同的烷基基团,或者 R 和 R' 可以合起来代表含有两个或多个饱和碳原子(其中至少两个碳原子通过氧原子与磷原子相连)的烷撑。二烷基磷酸基团的非限定实例包括 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OMe})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})(\text{OMe})$ 和 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2$ 。术语“取代的二烷基磷酸”指 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR})(\text{OR}')$,其中 R 和 R' 可以是相同或不同的取代烷基基团,R 或 R' 可以一个为烷基另一个为取代烷基,或者 R 和 R' 可以合起来代表含有两个或更多个饱和碳原子(其中至少两个碳原子通过氧原子与磷原子连接)的取代烷撑。

[0183] 术语“烷硫基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-\text{SR}$,其中 R 为烷基,该术语定义如上。烷硫基的非限定实例包括 $-\text{SCH}_3$ 、 $-\text{SCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{SCH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SCH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{S}$ -环戊基和 $-\text{S}$ -环己基。术语“取代烷硫基”指基团 $-\text{SR}$,其中 R 为取代烷基,该术语定义如上。例如, $-\text{SCH}_2\text{CF}_3$ 即为取代烷硫基基团。

[0184] 同样地,术语“烯硫基”、“炔硫基”、“芳硫基”、“芳烷硫基”、“杂芳硫基”、“杂芳烷硫基”和“酰硫基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-\text{SR}$ 的基团,其中 R 分别为烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和酰基,这些术语定义如上。当术语烯硫基、炔硫基、芳硫基、芳烷硫基、杂芳硫基、杂芳烷硫基和酰硫基中任一个被“取代的”修饰时,其指基团 $-\text{SR}$,其中 R 分别为取代的烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基和酰基。

[0185] 术语“硫代酰基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指一价基团,其以硫羰基基团为连接点,进一步具有直链或支链、成环、环状或非环状结构,除羰基硫以外不含其它非碳非氢原子。基团 $-\text{CHS}$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)_2$ 和 $-\text{C}(\text{S})\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 为硫代酰基基团的非限定实例。术语“硫代酰基”因此包括但不限于有时称为“烷基硫羰基”和“芳基硫羰基”的基团。术语“取代硫代酰基”指以碳原子连接点的基团,所述碳原子是硫羰基基团的一部分,进一步具有直链或支链、成环、环状或非环状结构,此外除羰基基团中的硫原子外含有至少一个独立地选自于 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S 的原子。基团 $-\text{C}(\text{S})\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{O}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{OCH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{OC}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{OCH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{NH}_2$ 和 $-\text{C}(\text{S})\text{NHCH}_3$ 为取代硫代酰基基团的非限定实例。术语“取代硫代酰基”包括但不限于“杂芳基硫羰基”基团。

[0186] 术语“烷基磺酰基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$,其中 R 为烷基,该术语定义如上。烷基磺酰基基团的非限定实例包括： $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2$ -环戊基和 $-\text{S}(\text{O})_2$ -环己基。术语“取代烷基磺酰基”指基团 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$,其中 R 为取代烷基,该术语定义如上。例如, $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ 即

为取代烷基磺酰基基团。

[0187] 同样地,术语“烯基磺酰基”、“炔基磺酰基”、“芳基磺酰基”、“芳烷基磺酰基”、“杂芳基磺酰基”和“杂芳烷基磺酰基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-S(O)_2R$ 的基团,其中R分别为烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳烷基,这些术语定义如上。当术语烯基磺酰基、炔基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基、杂芳基磺酰基和杂芳烷基磺酰基中任一个被“取代的”修饰时,其指基团 $-S(O)_2R$,其中R分别为取代的烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳烷基。

[0188] 术语“烷基亚磺酰基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-S(O)R$,其中R为烷基,该术语定义如上。烷基亚磺酰基基团的非限定实例包括: $-S(O)CH_3$ 、 $-S(O)CH_2CH_3$ 、 $-S(O)CH_2CH_2CH_3$ 、 $-S(O)CH(CH_3)_2$ 、 $-S(O)CH(CH_2)_2$ 、 $-S(O)$ -环戊基和 $-S(O)$ -环己基。术语“取代的烷基亚磺酰基”指基团 $-S(O)R$,其中R为取代烷基,该术语定义如上。例如, $-S(O)CH_2CF_3$ 即为取代烷基亚磺酰基基团。

[0189] 同样地,术语“烯基亚磺酰基”、“炔基亚磺酰基”、“芳基亚磺酰基”、“芳烷基亚磺酰基”、“杂芳基亚磺酰基”和“杂芳烷基亚磺酰基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-S(O)R$ 的基团,其中R分别为烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳烷基,这些术语定义如上。当术语烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、芳烷基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基和杂芳烷基亚磺酰基中任一个被“取代的”修饰时,其指基团 $-S(O)R$,其中R分别为取代的烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳烷基。

[0190] 术语“烷基铵”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-NH_2R^+$ 、 $-NHRR'^+$ 或 $-NRR'R''^+$ 的基团,其中R、R'和R''是相同或不同的烷基基团,或R、R'和R''中任何两个组合在一起代表烷撑。烷基铵阳离子基团的非限定实例包括: $-NH_2(CH_3)^+$ 、 $-NH_2(CH_2CH_3)^+$ 、 $-NH_2(CH_2CH_2CH_3)^+$ 、 $-NH(CH_3)_2^+$ 、 $-NH(CH_2CH_3)_2^+$ 、 $-NH(CH_2CH_2CH_3)_2^+$ 、 $-N(CH_3)_3^+$ 、 $-N(CH_3)(CH_2CH_3)_2^+$ 、 $-N(CH_3)_2(CH_2CH_3)^+$ 、 $-NH_2C(CH_3)_3^+$ 、 $-NH$ (环戊基) $_2^+$ 和 $-NH_2$ (环己基) $^+$ 。术语“取代烷基铵”指 $-NH_2R^+$ 、 $-NHRR'^+$ 或 $-NRR'R''^+$,其中R、R'和R''中至少有一个为取代烷基,或者R、R'和R''中的两个可合起来代表取代烷撑。当R、R'和R''中多于一个为取代烷基时,它们可以相同也可以不同。任何R、R'和R''在既不是取代烷基也不是取代烷撑时,其可以是烷基(相同或不同的),或是合起来代表带有两个或多个碳原子(其中至少有两个与式中所示氮原子相连)的烷撑。







[0191] 术语“烷基铵”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指基团 $-SRR'^+$,其中R和R'可以是相同或不同的烷基基团,或者R和R'可合起来代表烷撑。烷基铵的非限定实例包括: $-SH(CH_3)^+$ 、 $-SH(CH_2CH_3)^+$ 、 $-SH(CH_2CH_2CH_3)^+$ 、 $-S(CH_3)_2^+$ 、 $-S(CH_2CH_3)_2^+$ 、 $-S(CH_2CH_2CH_3)_2^+$ 、 $-SH$ (环戊基) $^+$ 和 $-SH$ (环己基) $^+$ 。术语“取代烷基铵”指基团 $-SRR'^+$,其中R和R'可以是相同或不同的取代烷基基团,R或R'可一个为烷基另一个为取代烷基,或是R和R'可合起来代表取代烷撑。例如, $-SH(CH_2CF_3)^+$ 即为取代烷基铵基团。

[0192] 术语“烷基甲硅烷基”在不与修饰语“取代的”共同使用时,指定义为 $-SiH_2R$ 、 $-SiHRR'$ 或 $-SiRR'R''$ 的一价基团,其中R、R'和R''可以是相同或不同的烷基基团,或R、R'和R''中任意二者组合可合起来代表烷撑。基团 $-SiH_2CH_3$ 、 $-SiH(CH_3)_2$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 和 $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ 为非取代烷基甲硅烷基的非限定实例。术语“取代的烷基甲硅烷基”指 $-SiH_2R$ 、 $-SiHRR'$ 或 $-SiRR'R''$,其中R、R'和R''中

至少有一个为取代烷基,或者 R、R' 和 R'' 中的两个合起来代表取代烷撑。当 R、R' 和 R'' 中多于一个为取代烷基时,它们可以相同也可以不同。任何 R、R' 和 R'' 在既不是取代烷基也不是取代烷撑时,其可以是烷基(相同或不同的)或是合起来代表带有两个或多个饱和碳原子(其中至少有两个与硅原子相连)的烷撑。

[0193] 此外,组成本发明化合物的原子旨在包括该原子的所有同位素形式。本文使用的同位素包括原子数相同但质量数不同的那些原子。例如但不限于,氢的同位素包括氕和氘,碳的同位素包括 ^{13}C 和 ^{14}C 。同样地,本发明化合物中一个或多个碳原子可替换成硅原子。此外,本发明化合物中一个或多个氧原子可替换成硫或硒原子。

[0194] 带有虚线键的式所代表的化合物旨在包括任选地具有 0、1 或多个双键的式。因

此,例如结构  包括结构 、、、 和 。

[0195] 本领域技术人员会理解,这些环原子均不能形成多于一个双键。

[0196] 本申请所示结构中原子的任何未定义化合价默认代表结合于原子上的氢原子。

[0197] 本文所用“手性助剂”指可移除的手性基团,其能够影响反应的立体选择性。本领域技术人员熟悉此类化合物,并且它们中的大多数是市售的。

[0198] 本文所用术语“核苷酸碱基”、“核碱基”或简称“碱基”指通常可见于核酸中的一类取代或未取代的含氮母体杂芳环,以及其天然的、取代的、修饰的或工程化的变体或类似物。在一个典型实施方案中,核碱基能够与合适的互补核碱基形成 Watson-Crick 和 / 或 Hoogsteen 氢键。示例性核碱基包括但不限于:

[0199] 嘌呤,如 2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、腺嘌呤(A)、亚乙烯基腺嘌呤、 N^6 - Δ^2 -异戊烯基腺嘌呤(6iA)、 N^6 - Δ^2 -异戊烯基-2-甲基硫腺嘌呤(2ms6iA)、 N^6 -甲基腺嘌呤、鸟嘌呤(G)、异鸟嘌呤、 N^2 -二甲基鸟嘌呤(dmG)、7-甲基鸟嘌呤(7mG)、2-硫代嘧啶、6-硫鸟嘌呤(6sG)、次黄嘌呤和 O^6 -甲基鸟嘌呤;

[0200] 7-脱氮嘌呤,如 7-脱氮腺嘌呤(7-脱氮-A)、7-脱氮鸟嘌呤(7-脱氮-G)、7-脱氮-7-羟甲基腺嘌呤、7-脱氮-7-氨基腺嘌呤和 7-脱氮-7-羟甲基鸟嘌呤;

[0201] 嘧啶,如胞嘧啶(C)、5-丙炔基胞嘧啶、异胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶(HOMeC)、5-氨基甲基胞嘧啶、胸腺嘧啶(T)、4-硫代胸腺嘧啶(4sT)、5,6-二氢胸腺嘧啶、 O_4 -甲基胸腺嘧啶、尿嘧啶(U)、4-硫尿嘧啶(4sU)、5-羟甲基尿嘧啶(HOMeU)、5-氨基甲基尿嘧啶和 5,6-二氢尿嘧啶(二氢尿嘧啶;D)

[0202] 咪唑,如硝基咪唑和 4-甲基咪唑;吡咯类如硝基吡咯;水粉蕈素;碱基(Y)等等。

[0203] 其它的示例性核碱基可在 Lehninger, 2005 中找到,该文献及其引用的文献通过引用并入本文。

[0204] 本文所用术语“核苷”指包含与五碳糖结合之核碱基的糖基胺,所述五碳糖通常为核糖或脱氧核糖。其实例包括但不限于:胞苷、2'-脱氧胞苷、5-羟甲基胞苷、2-脱氧-5-羟甲基胞苷、5-氨基甲基胞苷、2-脱氧-5-氨基甲基胞苷、尿苷、2'-脱氧尿苷、5-羟甲基尿苷、2'-脱氧-5-羟甲基尿苷、5-氨基甲基尿苷、2'-脱氧-5-氨基甲基尿苷、腺苷、2'-脱氧腺苷、7-脱氮-7-羟甲基腺苷、2-脱氧-7-脱氮-7-羟甲基腺苷、7-脱氮-7-氨基甲基腺苷、2'-脱氧-7-脱氮-7-氨基甲基腺苷、鸟苷、2'-脱氧鸟苷、7-脱氮-7-羟甲基鸟苷、2'-脱氧-7-脱氮-7-羟甲基、7-脱氮-7-氨基甲基鸟苷、2-脱氧-7-脱氮-7-氨基甲基鸟苷、胸苷

和 2, - 脱氧胸苷。

[0205] “核苷酸”由具有一个、两个、三个或更多磷酸基团的核苷组成,所述磷酸基团呈链状与核苷上的五碳糖结合。

[0206] 除非明确指出,否则“接头”指一个或多个二价基团(连接组分),其功能是作为两个其它基团之间的共价结合分子桥。接头可包括一个或多个连接组分以及一种或多种类型连接组分。示例性连接组分包括: $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_n-$ (其中 n 为 0、1 或 2)、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{O}-$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}^-)\text{O}-$ 、烷撑、烯撑、炔撑、芳撑、杂芳撑,或其组合。一些接头具有悬垂式侧链或悬垂式官能团(或两者兼备)。此类悬垂式结构部分的实例为亲水性修饰物,例如增溶基团如 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{SO}_3^-$ 。在一些实施方案中,接头可将报告基团与另一结构部分连接起来,如化学、光化学或酶学反应基团(例如可切割或不可切割的终止性结构部分)。在另一些实施方案中,接头将报告基团连接到生物和非生物组分上,如核碱基、核苷或核苷酸。在另一些实施方案中,接头将化学反应基团连接到核碱基、核苷或核苷酸上。由接头与报告基团相键合而形成的结构部分可命名为 $-\text{L}-$ 报告基团。取决于诸如所连接分子和链合成方法所用条件等因素,可以改变接头的长度和组成,以优化特性,如稳定性、长度、FRET 效率、对特定化学物质的抗性和/或温度参数;并具有足够的立体选择性或大小,以将标签有效连接到核苷酸上,从而使生成的缀合物可用于优化聚合反应。接头可通过标准化学技术运用,并包括但不限于:用于将标签连接至核苷酸的胺类接头(参见如 Hobbs&Trainor, U. S. Patent No. 5, 151, 507, 通过参考并入本文);用于将标签有效连接到核苷酸的通常包含伯胺或仲胺的接头;以及加入核苷酸碱基中的刚性碳氢化合物臂(参见如 Service, 1998, 通过参考并入本文)。用于将报告基团连接至碱基分子的一些示例性连接方法由美国专利 4, 439, 356 和 5, 188, 934、欧洲专利申请序列号 87310256. 0、国际专利申请序列号 PCT / US90 / 05565 以及 Barone 等 2001 提供,其各自通过参考并入本文。

[0207] “可切割接头”为具有一个或多个可切割基团的接头,所述可切割基团可因某反应或条件而断裂。术语“可切割基团”指允许一部分被释放的结构部分,例如荧光或发荧光的结构部分。此类切割通常为化学、光化学或酶介导的切割。示例性可酶切割基团包括磷酸或肽序列。

[0208] 在权利要求和/或说明书中与术语“包含”共同使用时,无数量词修饰的名词可指“一个/种”,但也具有“一个/种或多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义。

[0209] 在本申请全文中,术语“约”用于表示该值包括测定该值所用设备、方法的固有误差,或是研究受试者中所存在的偏差。

[0210] 术语“包含”、“具有”和“包括”为开放式连接动词。一个或多个这些动物的任意形式或时态也为开放式。例如,“包含”、“具有”或“包括”一个或多个步骤的任何方法并不限于仅具有所述的一个或多个步骤,还涵盖了其它未列出的步骤。

[0211] 说明书和/或权利要求中所用的术语“有效的”,意为能够实现想要的、预期的或计划得到的结果。

[0212] 术语“水合物”在作为化合物的修饰语使用时,意为此化合物中每个化合物分子带有少于一个(如半水合物)、一个(如一水合物)或多于一个(如二水合物)水分子,比如所述化合物的固体形式。

[0213] 本文所用术语“ IC_{50} ”指（但不限于）核苷酸类似物在掺入引物-模板复合物时产生等摩尔数底物和产物时的核苷酸类似物浓度，和/或可定义为（但不限于）通过测定化合物掺入一半引物-模板复合物时的浓度来测量的掺入效率。

[0214] 本文所用术语“寡核苷酸”指 2 至 200 个共价连接核苷酸的 DNA 片段。

[0215] 本文所用术语“模板”指用作 DNA 合成（掺入）互补链的寡核苷酸。

[0216] 本文所用术语“引物”指与用于起始 DNA 合成（掺入）的模板链上的互补序列杂交的寡核苷酸。

[0217] 从科技意义上说，本文所用术语“掺入”指与模板链形成互补碱基配对并通过聚合酶与引物链形成共价键的核苷酸或核苷酸类似物。引物-模板复合物从起始引物链开始延伸一个或多个碱基。

[0218] 本文所用术语“切割”指终止性基团通过光切割、化学切割、酶切割等而被移除。

[0219] 本文所用术语“掺入循环”指通过聚合酶掺入核苷酸或核苷酸类似物、检测和鉴定所述核苷酸或核苷酸类似物，以及在核苷酸类似物情况下切割所述类似物的终止性基团。

[0220] 本文所用术语“错误掺入”指与模板链形成非互补碱基配对并通过聚合酶与引物形成共价键的核苷酸或核苷酸类似物。引物-模板复合物从起始引物链开始延伸一个或多个碱基。

[0221] 本文所用术语“区别”指核苷酸或核苷酸类似物通过聚合酶错误掺入与掺入之间的 IC_{50} 浓度差异。

[0222] 本文所述术语“终止”指掺入核苷酸或核苷酸类似物，其与模板形成互补或非互补碱基配对并通过聚合酶与引物形成共价键。引物-模板复合物在任一给定掺入循环中仅从起始引物链延伸一个碱基。

[0223] 本文所用术语“ DT_{50} ”指切割引物-模板复合体中所掺入碱基类似物的 50% 所需的时间量。

[0224] 本文所用术语“类似物”可理解为这样的底物，其结构中不包含与“给定化合物”相同的基本碳骨架和碳功能，但能够通过掺入一个或多个适当的替换（例如将碳替换成杂原子）而模拟给定化合物。

[0225] 第一化合物的“异构体”为独立的化合物，其中每种分子包含与第一化合物相同的原子组成，但这些原子在三维构型上不同。

[0226] 本文所用术语“患者”或“受试者”指活的哺乳动物生物，例如人、猴、牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠或其转基因物种。在某些实施方案中，患者或受试者为灵长类。人类受试者的非限定实例包括成年人、青少年、婴幼儿和胎儿。

[0227] 在用于化合物、组合物、方法或装置时，“可药用”意为总体上安全、无毒，没有生物方面或其它方面不期望状况，包括可用于兽医用途以及人类制药用途。

[0228] 本文所用术语“主要为一种对映体”意为化合物含有至少约 85% 的一种对映体，或更优选地至少约 90% 的一种对映体，或者甚至更优选地至少约 95% 的一种对映体，或者甚至更优选地至少约 99% 的一种对映体。类似地，短语“基本不合其它光学异构体”意为组合物含有至多约 15% 的另一种对映体或非对映体，更优选地至多约 10% 的另一种对映体或非对映体，更优选地至多约 5% 的另一种对映体或非对映体，更优选地至多约 1% 的另一种

对映体或非对映体。

[0229] “预防”包括：(1) 抑制疾病在受试者或患者中发病，所述受试者或患者可具有患病风险和 / 或易于患病但尚未经历或表现该疾病的任何或所有病理或症状；和 / 或 (2) 减缓疾病在受试者或患者中病理或症状的发生，所述受试者或患者具有患病风险和 / 或易于患病但尚未经历或表现该疾病的任何或所有病理或症状。

[0230] 术语“饱和的”在指原子时意为该原子仅通过单键与其它原子相连。

[0231] “立体异构体”或“光学异构体”是给定化合物的异构体，其中同样的原子与同样的其它原子成键，但这些原子的三维构型不同。“对映体”是给定化合物的互为镜像的立体异构体，如左手与右手。“非对映体”是给定化合物的非对映的立体异构体。

[0232] 本发明考虑，对于任何尚未对立体化学情况进行定义的立构中心或手性轴而言，该立构中心或手性轴可以其 R 型或 S 型存在，或以 R 型与 S 型的混合物存在，包括外消旋的和非外消旋的混合物。

[0233] “治疗有效量”或“药物有效量”意为在向受试者或患者施用以治疗疾病时足以对该疾病实现这种治疗的量。

[0234] “治疗”包括：(1) 抑制受试者或患者所患疾病，所述受试者或患者正经历或表现出该疾病的病理或症状（例如，阻止病理和 / 或症状的进一步发展），(2) 改善受试者或患者所患疾病，所述受试者或患者正经历或表现出该疾病的病理或症状（例如，使病理和 / 或症状逆转），和 / 或 (3) 实现受试者或患者所患疾病的任何可测量的减轻，所述受试者或患者正经历或表现出该疾病的病理或症状。

[0235] 本文所用术语“水溶性”意为化合物在水中溶解程度至少为 0.010 摩尔 / 升，或根据之前的文献归类为可溶。

[0236] 以上定义代替通过引用并入本文的任何参考文献中的任何冲突的定义。然而，对某些术语进行定义这一事实不应该被认为是表示任何未定义的术语就是不确定的。相反，相信所有使用的术语都明确描绘了本发明，以使普通技术人员能够领会本发明的范畴并实践。

[0237] II. 合成方法

[0238] 本发明的化合物可通过实施例部分概述的方法制得。这些方法可被本领域技术人员应用有机化学原理和技术进行进一步改进和优化。此类原理和技术在例如 March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure (2007) 一书有教导，通过引用并入本文。

[0239] III. 生物功能和切割速率

[0240] 如本公开内容中某些方面所示，2-硝基苄基中 α -碳取代及其立体化学情况影响了 3' 未封闭的碱基修饰的 dNTP 反应的生物功能和切割速率。

[0241] 在一个实施方案中，样品组分允许测定 SNP。该方法可用于信息性 SNP 的高通量鉴定。SNP 可直接得自基因组 DNA 材料、PCR 扩增的材料或者克隆 DNA 材料，并可以用单核苷酸引物延伸法进行测定。单核苷酸引物延伸法可包括使用单种未标记 dNTP、单种标记 dNTP、单种 3'-修饰 dNTP、单种碱基修饰 3'-dNTP、单种 α -硫代 dNTP 或单种标记的 2', 3'-双脱氧核苷酸。迷你测序法可包括使用单种未标记 dNTP、单种标记 dNTP、单种 3'-修饰 dNTP、单种碱基修饰 2'-dNTP、单种 α -硫代 dNTP 或单种标记的 2', 3'-双脱氧核苷酸。SNP 可

直接得自基因组 DNA 材料、PCR 扩增的材料或者克隆的 DNA 材料。

[0242] 本公开内容还提供了可用于快速 DNA 测序技术的核苷酸和核苷化合物及其盐、酯和磷酸形式。所述化合物任选地为核糖核苷三磷酸 (NTP) 和脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 的形式。所述核苷酸和核苷化合物在一些情况下包括用报告基团 (如荧光染料) 标记的可光切割基团。所述核苷酸和核苷化合物包括设计用于终止 DNA 合成并快速切割的可光移除保护基, 以使这些单体可用于并行处理的快速测序。此类用荧光染料标记的可快速切割基团在核苷酸和核苷化合物中的存在能够增强并行的 DNA 大寡聚物的测序速度和准确性, 以允许例如快速全基因组测序以及鉴定多态性和其它有价值的遗传信息。

[0243] 在某些方面中, 本发明涉及这样的化合物, 其中核苷的碱基共价附着有 2- 硝基苄基, 并且该 2- 硝基苄基的 α - 碳位置上任选地被一个烷基或芳基取代, 如本文所述。在某些实例中, 所述核苷的碱基共价附着有 2- 硝基苄基, 并且该 2- 硝基苄基任选地被一个或多个电子供体或吸电子基团取代, 如本文所述。2- 硝基苄基可被官能化, 以增强终止特性以及光催化去保护速率。即使在核糖的 3'-OH 未被封闭时, 附着有核碱基的 2- 硝基苄基和 α - 碳被取代的 2- 硝基苄基的终止特性也能发挥。这些 3'-OH 未封闭的终止剂可被许多市售 DNA 聚合酶良好地接受, 这代表了其优于 3'-OH 封闭的终止剂关键优点。 α - 碳被取代的 2- 硝基苄基也可以被衍生以包括选定的荧光染料或其它报告基团。

[0244] A. 核苷酸和核苷化合物及其在 DNA 测序中的应用

[0245] 提供了可用于 DNA 测序技术的核苷酸和核苷化合物。本发明的一个方面涉及使用一种有前景的测序方法——循环可逆终止 (cyclic reversible termination, CRT)。CRT 是一种检测多个模板上同步化的单碱基添加的方法。该方法与 Sanger 法 (Metzker, 2005, 通过引用并入本文) 的区别在于其能够不需要凝胶电泳而进行, 而这正是该领域发展的主要瓶颈。不过, 像 Sanger 测序一样, 更长的阅读长度转化成了覆盖全基因组所需的更少的测序试验。CRT 循环通常包括三个步骤: 掺入、成像和去保护。对这一程序, 循环效率、循环时间和灵敏度是重要的因素。循环效率取决于去保护和掺入效率, 并决定了 CRT 的阅读长度。CRT 循环时间是掺入、成像和去保护时间的总和。对全基因组测序的快速 CRT 而言, 可使用本文公开的核苷酸和核苷化合物, 其能够显示快速且高效的去保护特性。这些化合物可用直接附着于 2- 硝基苄基上的报告基团 (如荧光染料) 进行标记, 提供诸如具有相似去保护特性的荧光可逆终止剂。尚难以达到长 CRT 阅读的目标, 因为可逆终止剂通常不是市售 DNA 聚合酶的好底物。本发明的修饰核苷酸类似物可用于通过提供使用市售 DNA 聚合酶时掺入与天然核苷酸一样好或更好的底物来改进该项技术。

[0246] 当用于基因组 DNA 时, 所述化合物可以用于 CRT, 以直接从基因组 DNA 读出。片段化的基因组 DNA 可与包含覆盖所选染色体的引发位点的高密度寡核苷酸芯片杂交。各引发序列以 CRT 法的估计阅读长度分隔开。在碱基添加之间, 荧光成像仪能够同时对整个高密度芯片成像, 标志者速度和灵敏度的显著提高。在特定的实施方案中, 附着于 2- 硝基苄基基团或本文所述其衍生物的荧光基团被 UV 照射移除, 释放出 2- 硝基苄基基团以备下一轮碱基添加之用。约 500 个 CRT 循环之后, 可将完整且连续的基因组序列信息与参照人类基因组进行比较, 以确定个体样品中序列变异的程度和类型。表现出更高掺入和去保护效率的可逆终止剂通常将实现更高的循环效率, 并由此实现更长的阅读长度。

[0247] CRT 效率由公式 $(RL)^{C_{eff}}=0.5$ 定义, 其中 RI 为碱基的阅读长度, C_{eff} 为总循环效

率。换句话说,90%的总循环效率能够达到7碱基的阅读长度,99%的总循环效率能够达到70碱基的阅读长度,99.9%的总循环效率能够达到700碱基的阅读长度。本发明化合物的掺入效率可为类似天然核苷掺入的约70%至约100%。优选地,掺入效率将为约85%至约100%。光切割效率将优选地为约85%至约100%。此外,掺入本发明化合物后核酸延伸的终止将为约90%至约100%。一个实施方案中的核苷酸和核苷化合物的循环效率至少为80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%。

[0248] 本发明的另一方面涉及使用焦磷酸测序,该方法为非电泳的生物发光方法,通过一系列酶反应将无机焦磷酸(PPi)成比例转化成可见光来测量其释放量(Ronaghi等1998,通过引用并入本文)。与其它利用修饰核苷酸终止DNA合成的测序方法不同,焦磷酸测序试验通过以有限量单次添加dNTP来操作DNA聚合酶。随后DNA聚合酶在掺入互补dNTP后延伸引物并暂停。在配给循环中再次加入下一种互补dNTP后重新起始DNA合成。光峰值的顺序和强度以流程图形式记录,揭示内在的DNA序列。对多至六个核苷酸的均聚物重复而言,添加的dNTP数与光信号成正比。大于六个核苷酸的均聚物重复可导致插入错误,这是焦磷酸测序中最常见的错误类型。本发明的修饰核苷酸类似物可通过对均聚物重复(尤其是长度大于六个核苷酸的那些)进行精确测序来改进该项技术。

[0249] 本发明的另一方面涉及使用Sanger测序,尤其是在杂合子检测中。尽管已有很大进步,但用于精确杂合子检测的双脱氧-BigDye终止法测序化学法仍需要改进。通常认为原始数据中均匀的峰高分布会使碱基读取和杂合子检测更为可靠和准确。Sanger测序中的终止模式主要归因于DNA聚合酶的序列依赖性偏好掺入,其能够选择性地掺入天然核苷酸而非修饰核苷酸(Metzker等1998,通过引用并入本文)。这些掺入偏好效应在染料-终止剂化学法中比在染料-引物化学法中更为显著。这可归因于附着于终止核苷酸的大荧光染料结构的作用,使酶活性比天然底物至少降低10倍。因此,降低DNA聚合酶针对染料标记终止剂的偏好掺入效应可导致改进的杂合体检测。本发明修饰核苷酸类似物可通过与天然核苷酸一样或更好地掺入(并由此消除Sanger测序中的掺入偏好)来改进此项技术。

[0250] 本发明的另一方面涉及使用克隆扩增的模板和单一DNA分子模板。NGS技术的前沿可被分为两大阵营:从单一DNA分子中克隆扩增的模板,以及单一DNA分子模板。本领域公知,DNA可固定在固体表面上,通过将引物附着至所述表面并使所述引物与靶标核酸杂交(Southern&Cummins,1998,美国专利申请序列号5,770,367,Harris等2008,通过引用并入本文),或是通过克隆扩增将靶标核酸附着在所述表面上并使引物与所述靶标核酸杂交(Dressman等2003,Margulies等2005,通过引用并入本文)。两种固定方法中的任一种均可用于本发明中,以备随后结合DNA聚合酶以启动CRT法或焦磷酸测序法。

[0251] 为使CRT终止剂正确发挥功能,保护基必须在温和条件下被有效切除。保护基的移除通常涉及用强酸或强碱处理、催化或化学还原,或是这些方法的组合。这些条件可能对DNA聚合酶、核苷酸、寡核苷酸-引物模板或是固体支持物有反应性,导致不理想的结果。光化学保护基的使用是苛性化学处理的一种有吸引力的替代方案,并可以非介入方式使用。

[0252] 多种可光移除保护基已经用于肽、多糖和核苷酸的合成,包括但不限于:2-硝基苄基、苄氧羰基、3-硝基苄基、苯甲酰甲基(phenacyl)、3,5-二甲氧基苯甲酰基、2,4-二硝

基苯磺酰基,及其相应衍生物 (Pillai,1980,通过引用并入本文)。其中,光敏性 2- 硝基苄基保护基已成功应用于二核糖核苷合成中核糖核苷的 2, -OH(Ohtsuka 等 1974,通过引用并入本文)、自动化核酶合成中核糖亚磷酸胺的 2, -OH(Chaulk&MacMillan,1998,通过引用并入本文)、Affymetrix 化学的寡核苷酸合成中亚磷酸胺的 3' -OH(Pease 等 1994,通过引用并入本文),以及 DNA 测序应用中的 3, -OH 基团 (Metzker 等 1994,通过引用并入本文)。在去保护条件下 (紫外光 >300nm),2- 硝基苄基基团能够有效地被切除而不影响嘧啶或嘌呤碱基 (Pease 等 1994 和 Bartholomew&Broom1975,通过引用并入本文)。

[0253] 在一个方面中,本发明涉及使用可化学切割的可逆终止剂。例如,苄基保护基已由于其稳定性和易于通过催化氢解而温和且选择性地保护而广泛应用于有机合成 (Green&Wuts1999,通过引用并入本文)。氢解作用可在中性条件下进行,这在处理含有磷酸酐键的核苷时是有利的,因为核苷二磷酸 (尤其是核苷三磷酸) 在酸性条件下降解 (Wu 等 2004, Johnson 等 2004,通过引用并入本文)。除使用传统钯催化剂进行氢解之外,还已有报道通过使用钯纳米微粒的氢解从固体支持之化合物上来移除苄基保护基 (Kanie 等 2000,通过引用并入本文) 以及在微流体装置上用固定的钯催化剂进行加氢作用 (Kobayashi 等 2004,通过引用并入本文) 来移除苄基保护基。

[0254] B. 聚合酶测定

[0255] 利用“聚合酶终点测定”测试天然和修饰的核苷酸的掺入效率 (Wu 等 2007,通过引用并入本文)。该测定检测匹配和错配模板碱基的掺入效率。通过检测化合物掺入一半引物-模板复合物时的浓度 (IC_{50}) 来测定掺入效率。用递增的化合物浓度进行滴定,以生成可用于确定 IC_{50} 的曲线。

[0256] 模板 DNA 序列将根据待测化合物来进行选择。例如,在测定掺入效率时,模板序列中引物后的第一个研究碱基为该化合物的互补碱基,而在测定错配区分特性时则为三种错配碱基之一。

[0257] 对退火反应,将 DNA 聚合酶 (如 THERMINATOR™ DNA 聚合酶,每次反应 0.25 单位, New England Biolabs)、 $1\times$ Thermopol 缓冲液和已知浓度的天然或修饰核苷酸加入每个 $10\mu L$ 反应中, $75^{\circ}C$ 下孵育 10 分钟,冰上冷却,并用 $10\mu L$ 终止液 (98% 甲酰胺, $10mM Na_2EDTA$, $pH=8.0$, $25mg/ml$ 葡聚糖蓝) 猝灭。将终止后的反应物加热至 $75^{\circ}C$ 保持 30 秒以使 DNA 变性,随后置于冰上。将延伸产物在 10% Long Ranger (Lonza) 聚丙烯酰胺凝胶上用 ABI377 型 DNA 测序仪进行分析。更多细节见下述实施例 1。

[0258] 图 1 比较了用 THERMINATOR™ DNA 聚合酶时本文所述核苷酸与天然核苷酸的掺入。例如,化合物 3p065 (5-(0- 异丙基 -2- 硝基苄氧基甲基 -2' -dCTP) 在比其天然类似物更低浓度时 ($IC_{50}=1.1\pm 0.1nM$ 和 $3.0\pm 0.6nM$) 达到 50% 的掺入率。用染料标记的化合物也被 THERMINATOR™ DNA 聚合酶有效掺入,例如化合物 6p038 / 6p0175-(α - 异丙基 -2- 硝基苄氧基) 甲基 -2' -dCTP-Cy5 的 $IC_{50}=5.1\pm 1.4nM$ 。表 A 显示了许多本文所述修饰核苷酸类似物的 IC_{50} 浓度。

[0259] 表 A. α - 碳取代对错配区分的影响

[0260]

WW#	化学名	非对映体	掺入的 IC ₅₀
1p129	<i>N</i> ⁶ -(2-硝基苄基)-2'-dATP		2.5 ± 0.3 nM
2p043	5-(α -甲基-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP	混合物	1.7 ± 0.2 nM
2p108	<i>O</i> ⁶ -(2-硝基苄基)-2'-dGTP		4.0 ± 0.7 nM
2p143	<i>O</i> ⁶ -(α -甲基-2-硝基苄基)-2'-dGTP	混合物	10 ± 0.0 nM
2p148	5-(α -异丙基-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP	混合物	2.3 ± 0.1 nM
3p006	<i>N</i> ⁶ -(α -甲基-2-硝基苄基)-2'-dATP	混合物	8.5 ± 1.8 nM
3p063	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP	单一	2.0 nM
3p065	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dCTP	单一	1.1 ± 0.1 nM
3p075	5-(α -叔丁基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP	单一	3.0 nM
3p085	5-(α -叔丁基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dCTP	单一	2.0 nM
5p085	<i>C</i> ⁷ -(2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP		3.6 ± 0.3 nM
5p098-ds1	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP (ds1)	单一	6.7 ± 0.8 nM
5p098-ds2	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP (ds2)	单一	5.7 ± 1.1 nM
5p107	<i>C</i> ⁷ -(2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dGTP		1.5 ± 0.3 nM
5p111	5-(α -异丙基-苄基-氧甲基)-2'-dUTP	混合物	0.8 nM
5p127	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP-6-FAM	单一	6.4 ± 1.0 nM
5p130-LP 2	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP-6-CR110	单一	15 ± 3 nM
5p143-ds1	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dGTP (ds1)	单一	1.2 ± 0.2 nM
5p143-ds2	<i>C</i> ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dGTP (ds2)	单一	1.3 ± 0.3 nM
5p145	5-苄基-氧甲基-2'-dUTP		1.4 nM
5p147	5-(2-甲基-苄基-氧甲基)-2'-dUTP		1.4 nM
5p149	5-(2-异丙基-苄基-氧甲基)-2'-dUTP		1.4 nM
6p005	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP-5-R6G	单一	15 ± 1 nM
6p008	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP-6-JOE	单一	9.0 ± 1.4 nM
6p010	5-(2-苄基-苄基-氧甲基)-2'-dUTP		1.4 nM
6p015	5-(2,6-二甲基-苄基-氧甲基)-2'-dUTP		1.4 nM
6p017	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dCTP-Cy5	单一	4.8 ± 1.9 nM
6p024	5-(2-叔丁基-苄基-氧甲基)-2'-dUTP		0.7 nM

[0261]

WW#	化学名	非对映体	掺入的 IC ₅₀
6p028/5p127	C ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP-6-FAM	单一	6.4 \pm 1.0 nM
6p034	C ⁷ -(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dGTP-6-ROX	单一	7.4 \pm 0.1 nM
6p038/6p017	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dCTP-Cy5	单一	5.1 \pm 1.4 nM
6p044	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP-6-ROX	单一	18 \pm 1 nM
6p057-ds1	C ⁷ -(α -异丙基-2,6-二硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP (ds1)	单一	5.2 \pm 0.2 nM
6p057-ds2	C ⁷ -(α -异丙基-2,6-二硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP (ds2)	单一	5.8 \pm 1.1 nM
6p063	N ⁶ -(α -异丙基-2-硝基苄基)-2'-dATP	单一	12 \pm 1 nM
6p075/6p008	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP-6-JOE	单一	9.0 \pm 1.4 nM
6p087-ds1	C ⁷ -(α -异丙基-4-甲氧基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP (ds1)	单一	15 \pm 1 nM
6p087-ds2	C ⁷ -(α -异丙基-4-甲氧基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dATP (ds2)	单一	18 \pm 3 nM
6p094	5-(α -异丙基-2-硝基苄基-氧甲基)-2'-dUTP-6-FAM	单一	8.1 \pm 0.2 nM

[0262] C. 错配区分

[0263] 已有报道,2-硝基苄基中 α -碳上的取代可提高切割反应速率 (Reichmanis 等 1985, Cameron&Frechet1991, Hasan 等 1997, 通过引用并入本文)。不受理论约束,本文所示结果提出,2-硝基苄基中 α -碳上的取代还能够影响 3'-未封闭核苷三磷酸的 DNA 合成终止,并提高对错配掺入的区分。此外,基于以下更详细讨论的结果,发现 2-硝基苄基中 α -碳上取代的立体化学情况可对错配区分程度和切割反应速率产生显著影响。

[0264] 表 1 显示了 α -碳发生取代的两种非对映体“ds1”和“ds2”及其前体的比较。错配/匹配比值代表聚合酶区分正确掺入的匹配模板碱基和错配碱基的能力。当错配/匹配比值大于或等于 100 (两个数量级) 时认为区分充分。表 1 显示了天然 dGTP 与 C⁷-羟甲基 dGTP 类似物 5p107、5p143-ds1 和 5p143-ds2 的区分。天然 dGTP 和 C⁷-(2-硝基苄氧基)甲基-2'-dGTP (5p107) 显示出的错配/匹配比例范围分别为 10 至 360 和 10 至 250,其中两种低于 100 倍的阈值。然而,用异丙基取代 α -亚甲基碳导致对所有错配模板碱基均显著更高的区分比值。与 5p143-ds2 相比,5p143-ds1 表现出高的错配区分比值。这些数据提供的证据表明, α -异丙基的立体化学情况可影响对错配掺入的区分程度。在 C⁷-羟甲基 dATP 类似物中观察到相似的趋势。对表 1 所示化合物而言,2-硝基苄基中 α -碳上的取代以立体特异性方式提高了对错配的区分。

[0265] 表 1 : α -碳取代对错配区分度的影响

互补碱基	错配/匹配比值 (10^2)			
	dGTP	5p107	5p143-ds1	5p143-ds2
[0266] "C"	N/A	N/A	N/A	N/A
"T"	0.1	0.1	5	2.5
"A"	3.6	2.5	>830	>770
"G"	0.2	0.4	>21	>7.7

[0267] dGTP= 天然 dGTP

[0268] 5p107=C7-(2- 硝基苄氧基) 甲基 -2' -dGTP

[0269] 5p143=C7-(α -异丙基- 2 -硝基苄氧基) 甲基- 2' - dGTP

[0270] D. 终止

[0271] 不受理论约束,发现至少两个通常影响单体掺入后 DNA 合成终止的因素 :a) 2- 硝基苄基中 α - 碳的取代,和 b) 苄基环上 2 位的取代。表 2 显示了利用“加权”分析多种取代的影响,其通过用自动凝胶电泳对引物延伸产物进行定量来测定。1.0 的加权和代表单体掺入后完全终止,而大于 1.0 的值表明掺入超出 +1 位(例如核苷酸通读)。为使终止测定标准化,使用给定化合物 IC_{50} 值的 $25\times$ 浓度。该测定如上文对聚合酶终点测定所述进行,只是所用模板为均聚物重复,由此允许给定核苷酸化合物的多重掺入。在此实施例中,将修饰的 dUTP 类似物与天然 dTTP 进行比较,其在 IC_{50} 值的 $25\times$ 浓度下延伸了均聚物重复模板的全长,并错误掺入了第 11 个碱基(加权和=11)。化合物 3p085(2- 硝基苄基氧甲基 -2' -dUTP) 显示了加权和为 3.7 ± 0.1 的终止。 α - 碳被甲基取代(2p043) 进一步提高了终止,将加权和降低至 1.7 ± 0.1 。 α - 异丙基的取代(2p148) 实现了完全终止,显示了 1.0 的加权和数值。不过,互补碱基的 IC_{50} 值并未提高,表明更大的异丙基取代对终止具有有利影响,但不降低其掺入效率。

[0272]

表2: 2-硝基苄基环上 α 碳的取代和苄基环上2位的取代均影响化合物的终止特性

化合物名	取代	调整的IC ₅₀ 浓度 (nM)	平均加权和±SD		
			1x IC ₅₀	5x IC ₅₀	25x IC ₅₀
dTTP	(天然 dTTP)	2.1	0.68	3.0	12.2
2p043	α -甲基-5-(2-硝基苄基)	1.7	0.53 ± 0.06	1.1 ± 0.0	1.7 ± 0.1
2p148	α -异丙基-5-(2-硝基苄基)	2.1	0.59 ± 0.02	0.99 ± 0.01	1.0 ± 0.01
5p111	α -异丙基-5-苄基	0.8	0.44 ± 0.02	0.96 ± 0.01	1.1 ± 0.03
5p145	5-苄基	1.4	0.43 ± 0.1	1.3 ± 0.3	2.9 ± 0.4
5p147	5-(2-甲基苄基)	1.4	0.51 ± 0.1	1.5 ± 0.3	2.6 ± 0.4
5p149	5-(2-异丙基苄基)	1.4	0.53 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.2 ± 0.2
6p010	5-(2-苄基苄基)	1.4	0.46 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.3
6p015	5-(2,6-二甲基苄基)	1.4	0.56 ± 0.1	1.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1
6p024	5-(2-叔丁基苄基)	0.7	0.44 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.1

[0273] 苄基环上2-位的取代也可影响这些修饰核苷酸的终止特性。例如,从此位置上移除硝基(化合物 5p111)使 α -异丙基取代类似物的加权和数值增加至1.1。用2位上的

多种取代基合成了许多 dUTP 类似物,并表征了 α -碳上不存在异丙基时的终止特性。表 2 显示了取代基大小和形状的逐渐提高和终止特性增强的总体趋势,比较 $25 \times IC_{50}$ 浓度下的 5p145 (WS=2.9) 和 6p010 (WS=1.7)。

[0274] E. UV 切割速率

[0275] 在类似物掺入引物链时以 365nm 紫外光对终止性的取代 2-硝基苄基进行切割,这允许进行下一个掺入循环。不受理论约束,发现至少两个因素通常影响 UV 裂解掺入的核苷酸类似物的速率:a) 2-硝基苄基中 α -碳取代的立体化学情况,和 b) 苄基环上的取代。匹配模板上的掺入如上所述用 $1 \mu M$ 浓度进行,以延伸引物链。每个掺入实验使用 10 支相同的管,其后加入 NaN_3 至终浓度为 50mM。使用 Wu 等 (2007,通过引用并入本文) 所述 UV 去保护基装置,使延伸引物的反应物与 365nm 接触不同时间点,并用 AB377 型 DNA 测序仪进行分析。将定量数据以产物形成对曝光时间绘制直线图,计算核苷酸类似物有一半被切除时的时间点,作为 DT_{50} 值。如表 3 所示,立体化学情况影响了 C^7 -羟甲基-dATP 类似物 5p098-ds1 和 -ds2、6p057-ds1 和 -ds2 以及 6p087-ds1 和 -ds2 的 UV 切割速率。例如,基于这些实例,相比于 ds1 类似物,ds2 类似物显示出更快的切割速率(如更低的 DT_{50} 值)。此外,苄基环上 4 位甲氧基的取代进一步提高了 UV 切割的速率,虽然只针对 ds2 类似物(例如 5p098-ds2 的 DT_{50} 值为 3.3 秒,而 6p087-ds2 的为 1.9 秒)。基于表 3 所总结的实例,2-硝基苄基环中 α -碳的取代以立体特异性方式提高了 UV 切割。

[0276] 表 3:2-硝基苄基环衍生物的 UV 切割速率

化合物	取代	DT_{50} (秒)
5p098-ds1	α -异丙基-2-	7.5 ± 0.8
5p098-ds2	硝基苄基	3.3 ± 0.2
6p057-ds1	α -异丙基-2,6-	7.3 ± 1.2
6p057-ds2	硝基苄基	4.8 ± 0.5
6p087-ds1	α -异丙基-2-	8.8 ± 0.6
6p087-ds2	硝基苄基-4-甲氧基	1.9 ± 0.1

[0277] F. 化学切割

[0278] 在一个方面中,本发明涉及使用可化学切割的可逆终止剂。例如,苄基保护基已由于其稳定性和易于通过催化氢解而温和且选择性地保护而广泛应用于有机合成 (Green&Wuts1999,通过引用并入本文)。氢解作用可在中性条件下进行,这在处理含有磷酸酐键的核苷时是有利的,因为核苷二磷酸(尤其是核苷三磷酸)在酸性条件下降解 (Wu 等 2004, Johnson 等 2004,通过引用并入本文)。除使用传统钯催化剂进行氢解之外,还已有报道通过使用钯纳米微粒的氢解从固体支持之化合物上来移除苄基保护基 (Kanie 等 2000,通过引用并入本文) 以及在微流体装置上用固定的钯催化剂进行加氢作用 (Kobayashi 等 2004,通过引用并入本文) 来移除苄基保护基。化学可逆切割结果的实例见于下文中实施例 10,包括用催化氢解来切割 5-苄基氧甲基-dU。

[0280] IV. 实施例

[0281] 包括了实施例以展示本发明的优选实施方案。本领域技术人员会理解,下文实施

例中所公开的技术代表了发明人所发现在本发明实施中良好应用的技术,因此可以认为构成了其实施的优选模式。然而,基于本公开内容,本领域技术人员会理解,可对所公开的具体实施方案做出许多修改,同时仍然能够得到同样或相似的结果,而不背离本发明的精神和范畴。

[0282] 实施例 1- 方法与材料

[0283] 聚合酶测定。用“聚合酶终点测定”来测试天然和修饰核苷酸的掺入效率。(Wu 等 2007, 通过引用并入本文)。该测定检测匹配与错配模板碱基的掺入效率。通过测定化合物掺入一半引物-模板复合物时的浓度 (IC_{50}) 来衡量掺入效率。用递增的化合物浓度进行滴定,以产生可用于确定 IC_{50} 的曲线。

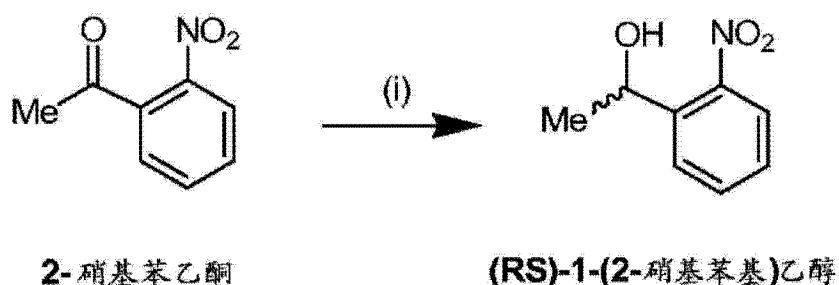
[0284] 该测定通过首先将 5nM BODIPY-FL 标记引物与 40nM 模板 DNA 在 $1\times$ Thermopol 缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH8.8; 10mM $(NH_4)_2SO_4$; 10mM KCl; 2mM $MgSO_4$; 0.1% Triton X-100, New England BioLabs) 中退火来进行。用于完成引物退火的温度循环为 $80^\circ C$ 30 秒, $57^\circ C$ 30 秒,然后冷却至 $4^\circ C$ 。模板 DNA 序列将根据待测化合物来进行选择。例如,在测定掺入效率时,模板序列中引物后的第一个研究碱基为化合物的互补碱基,而在测定错配区分特性时则为三种错配碱基之一。

[0285] 对退火反应,将 DNA 聚合酶 (如 THERMINATOR™ DNA 聚合酶,每次反应 0.25 单位, New England Biolabs)、 $1\times$ Thermopol 缓冲液和已知浓度的天然或修饰核苷酸加入 $10\ \mu L$ 反应物中, $75^\circ C$ 下孵育 10 分钟,冰上冷却,并用 $10\ \mu L$ 终止液 (98% 甲酰胺, 10mM Na_2EDTA , pH=8.0, 25mg / ml 葡聚糖蓝) 猝灭。将终止后的反应物加热至 $75^\circ C$ 保持 30 秒以使 DNA 变性,随后置于冰上。将延伸产物在 10% Long Ranger (Lonza) 聚丙烯酰胺凝胶上用 ABI377 型 DNA 测序仪进行分析。定量数据显示为产物形成对化合物浓度的线性-对数曲线,并用 KaleidaGrap 软件 (Synergy Software) 计算 IC_{50} 。

[0286] 实施例 2— α - 取代的 2- 硝基苄基醇类的合成

[0287] (RS)-1-(2- 硝基苄基) 乙醇的合成

[0288]

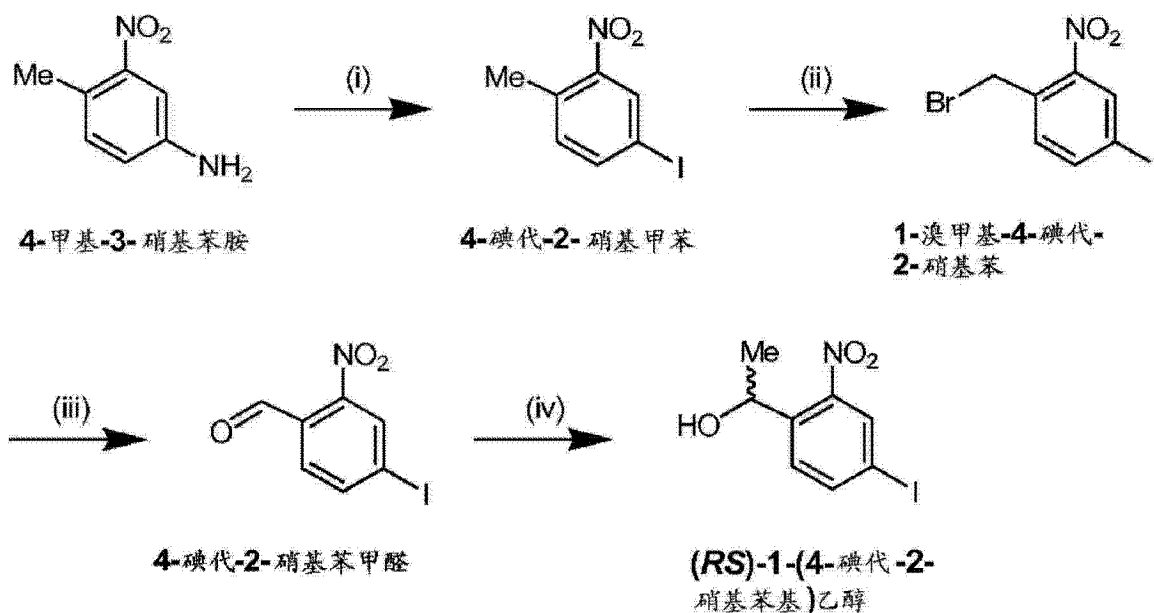


[0289] 方案 1. (i) $NaBH_4$, MeOH, 1, 4- 二氧六环, 室温, 100%

[0290] (RS)-1-(2- 硝基苄基) 乙醇: 向 2- 硝基苯乙酮 (1.0g, 6.06mmol) 的甲醇 (9mL) 和 1, 4- 二氧己烷 (6mL) 溶液中加入分成小部分的硼氢化钠 (0.69g, 18.16mmol) (Dong 等 2005, 通过引用并入本文)。将混合物在室温下搅拌 30 分钟, 然后真空浓缩。残留物用乙酰乙酸 (50mL) 稀释, 并用水 (10mL) 和盐水 (10mL) 清洗。有机相经 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩以产生外消旋的 (RS)-1-(2- 硝基苄基) 乙醇 (1.02g, 100%)。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 7.90 (m, 1H, Ph-H), 7.84 (m, 1H, Ph-H), 7.66 (m, 1H, Ph-H), 7.44 (m, 1H, Ph-H), 5.42 (m, 1H, Ph-CH), 2.33 (d, 1H, $J=3.5$ Hz, OH) 1.58 (d, 3H, $J=5.1$ Hz, CH_3)。

[0291] (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)乙醇的合成

[0292]



[0293] 方案 2. (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)乙醇的合成:(i) NaNO_2 , H_2SO_4 , 零下 2°C ; 然后 NaI , 100°C , 82%; (ii) NBS , 过氧化苯甲酰, CCl_4 , 回流, 45%; (iii) DMSO , NaHCO_3 , 86°C , 61%; (iv) Me_2Zn , $\text{Ti}(\text{O}i\text{-Pr})_4$, CH_2Cl_2 , 甲苯, 0°C , 48%。

[0294] 4-碘代-2-硝基甲苯:向在冰水浴中冷却的 4-甲基-3-硝基苯胺 (4.30g, 28.26mmol) 的水 (40mL) 悬液中小心地加入 98%硫酸 (1.89mL) (Herm 等 2002, 通过参考并入本文)。在冰水浴中加入氯化钠以使温度降至零下 2°C , 并以使反应温度不超过 0°C 的速率加入 NaNO_2 (2.15g, 31.10mmol) 的水 (10mL) 溶液。添加完成后, 在零下 2°C 时搅拌混合液 45 分钟。然后将该重氮化合物溶液小心地 (分成小部分) 加入 NaI (12.89g, 86mmol) 的沸腾溶液 (警示:有剧烈气体释放!)。加完后, 使反应混合物冷却至室温并以亚甲基氯 (50mL) 萃取四次。将合并的有机相用饱和 NaHCO_3 (40mL) 和水 (40mL) 清洗, 用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩。残留物用硅胶层析纯化以产生 4-碘代-2-硝基甲苯 (6.07g, 82%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.28 (d, 1H, $J=1.8\text{Hz}$, Ph-H), 7.81 (dd, 1H, $J=2.2$ 和 8.1Hz , Ph-H), 7.09 (d, 1H, $J=8.1\text{Hz}$, Ph-H), 2.55 (s, 3H, CH_3)。

[0295] 1-溴甲基-4-碘代-2-硝基苯:向 4-碘代-2-硝基甲苯 (4.63g, 17.60mmol) 的 CCl_4 (60mL) 溶液中加入 NBS (5.45g, 30.62mmol) 和过氧化苯甲酰 (75% aq, 200mg, 0.85mmol)。将混合物加热回流过夜, 然后冷却至室温, 真空浓缩, 并用柱层析法纯化以产生 1-溴甲基-4-碘代-2-硝基苯 (2.71g, 45%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.35 (d, 1H, $J=1.8\text{Hz}$, Ph-H), 7.93 (dd, 1H, $J=1.8$ 和 8.1Hz , Ph-H), 7.30 (d, 1H, $J=8.1\text{Hz}$, Ph-H), 4.76 (s, 2H, PhCH_2)。

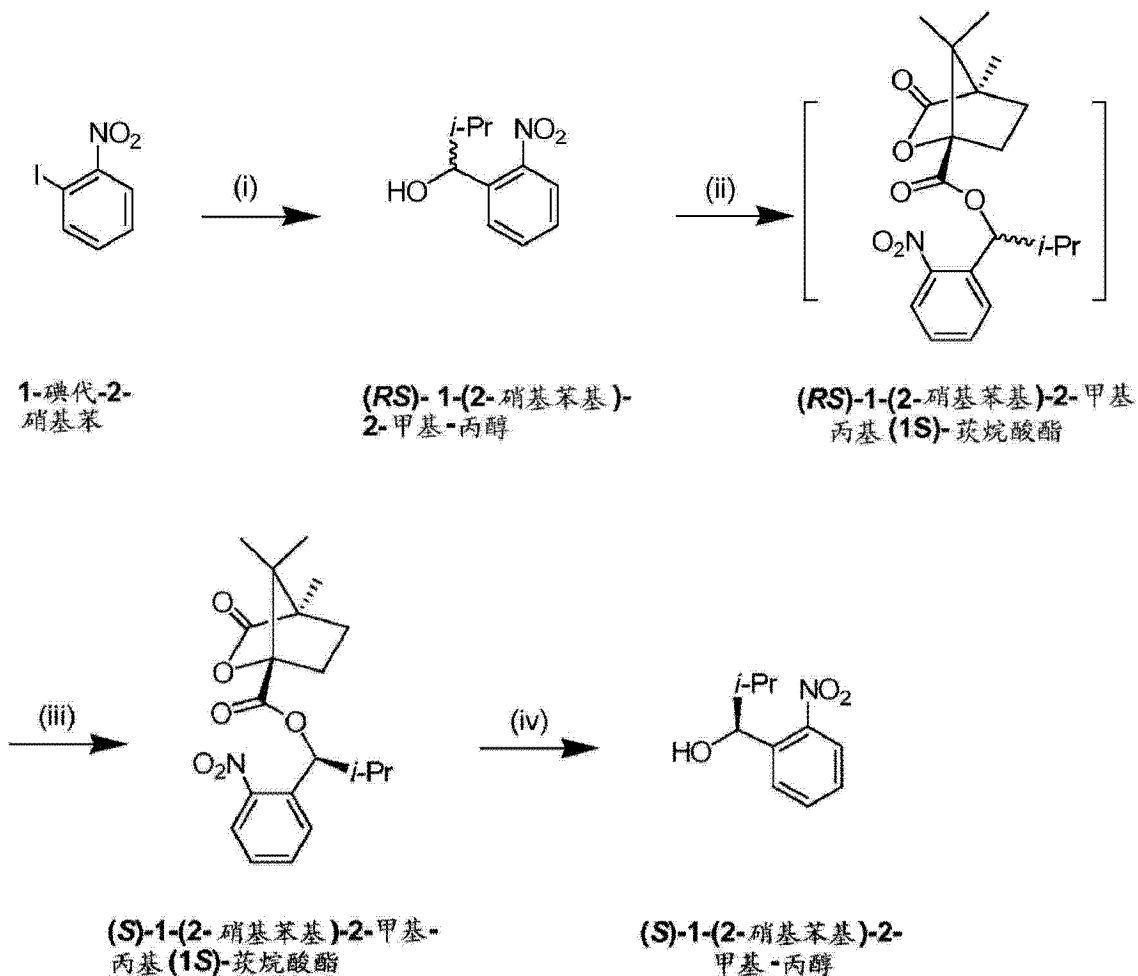
[0296] 4-碘代-2-硝基苯甲醛:将 NaHCO_3 (3.32g, 39.48mmol) 加入 1-溴甲基-4-碘代-2-硝基苯 (2.25g, 6.58mmol) 的无水 DMSO (150mL) 溶液中。将混合物在氮气气氛中在 86°C 下搅拌 19 个小时, 然后冷却至室温, 用水 (300mL) 稀释, 以亚甲基氯萃取四次 (250mL)。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩, 并用硅胶层析法纯化以产生 4-碘代-2-硝基苯甲醛 (1.11g, 61%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 10.38 (d, 1H, $J=1.6\text{Hz}$, CHO), 8.45 (d,

1H, J=1.5Hz, Ph-H), 8.15 (dd, 1H, J=1.5 和 8.0Hz, Ph-H), 7.67 (d, 1H, J=8.1Hz, Ph-H); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 187.28 (CH), 143.18 (CH), 133.29 (CH), 130.67 (CH), 130.28 (C), 109.60 (C), 99.78 (C)。

[0297] (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)乙醇: 将钛酸异丙酯 (1.2mL, 4.04mmol) 在氮气气氛下溶解在无水二氯甲烷中 (8mL)。将该溶液冷却至 0°C 后逐滴加入二甲基锌 (2M 甲苯溶液, 8.67mL, 17.34mmol)。所得混合物在 0°C 下搅拌 45 分钟后加入 4-碘代-2-硝基苯甲醛 (800mg, 2.89mmol)。所得混合物在 0°C 下搅拌 36 小时, 然后用 1M HCl 猝灭 (警示: 有剧烈气体释放!), 并用乙醚 (50mL) 萃取三次。合并的有机相用水 (50mL)、饱和 NaHCO₃ 溶液 (50mL) 和卤水 (50mL) 清洗, 用 Na₂SO₄ 干燥, 真空浓缩, 并用柱层析法纯化以产生外消旋的 (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)乙醇 (408mg, 48%)。¹HMMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.21 (dd, 1H, J=1.8 和 5.3Hz, Ph-H), 7.96 (m, 1H, Ph-H), 7.58 (d, 1H, J=8.3Hz, Ph-H), 5.38 (q, 1H, J=6.1Hz, Ph-CH), 2.34 (br s, 1H, OH), 1.54 (d, 3H, J=6.1Hz, CH₃); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 147.98 (C), 142.49 (CH), 140.68 (C), 132.77 (CH), 131.31 (CH), 91.60 (C), 65.40 (CH), 24.28 (CH₃)。

[0298] (RS)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇和 (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成

[0299]



[0300] 方案 3. (RS)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇和 (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲

基-1-丙醇的合成:(i)PhMgCl, i-PrCHO, THF(无水),零下40°C至室温,99%;(ii)(1S)-苧烷酰氯,吡啶(无水),室温;(iii)甲醇中重结晶;(iv)K₂CO₃ / MeOH,回流,97%。

[0301] (RS)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇:在氮气氛围下向冷却至零下40°C的1-碘代-2-硝基苯(1.12g, 4.5mmol)的无水THF(15mL)溶液中以使温度不超过零下35°C的速率逐滴加入氯化苯镁溶液(2M THF溶液, 2.4mL, 4.8mmol)。加完后在零下40°C搅拌混合液5分钟,然后加入异丁醛(0.545mL, 6.0mmol)。将所得混合物逐渐温热至室温,用饱和氯化铵(6mL)猝灭,倒入水(80mL)中,并用乙酸乙酯(100mL)萃取三次。合并的有机相用卤水(80mL)清洗,过Na₂SO₄干燥,并真空浓缩。残留物用硅胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的外消旋(RS)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(0.876g, 99%)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.84(dd, 1H, J=1.2和8.2Hz, Ph-H), 7.73(dd, 1H, J=1.4和7.9Hz, Ph-H), 7.61(m, 1H, Ph-H), 7.39(m, 1H, Ph-H), 5.03(dd, 1H, J=4.5和5.8Hz, Ph-CH), 2.42(d, 1H, J=4.5Hz, OH), 2.02(m, 1H, CH), 0.95(d, 3H, J=6.7Hz, CH₃), 0.89(d, 3H, J=6.8Hz, CH₃); ¹³CNMR(100MHz, CDCl₃): δ 148.48(C), 138.91(C), 132.95(CH), 128.85(CH), 127.95(CH), 124.21(CH), 73.79(CH), 34.30(CH), 19.66(CH₃), 17.01(CH₃)。

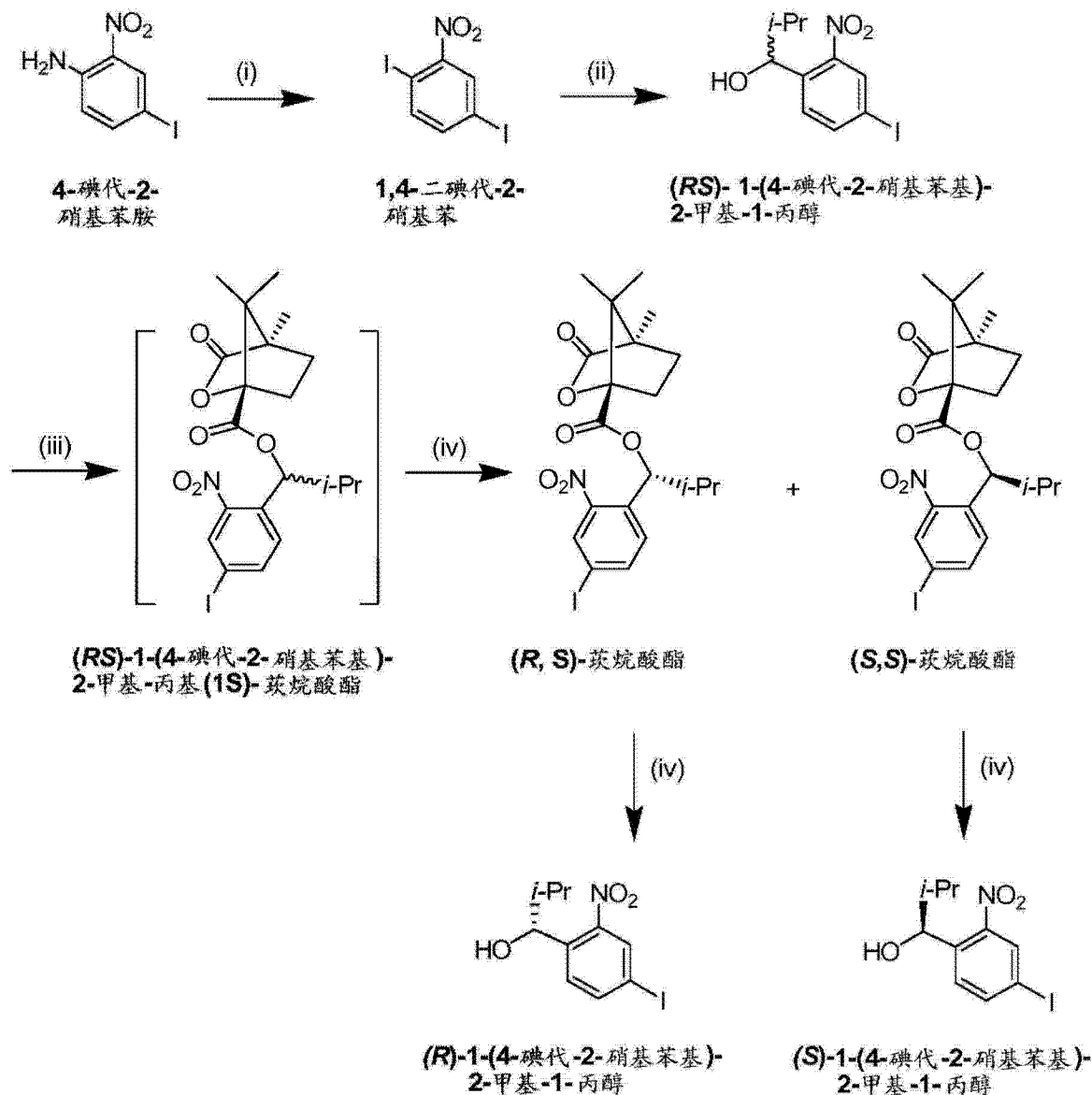
[0302] (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙基(1S)-苧烷酸酯:向(RS)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基(2.18g, 11.2mmol)的无水吡啶(10mL)溶液中加入(1S)-苧烷酰氯(2.63g, 12.2mmol)。所得混合物在室温下氮气气氛中搅拌18小时,然后真空浓缩以提供粗制(RS)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基(1S)-苧烷酸酯(非对映体的1:1混合物)。将该苧烷酸酯溶于沸腾的甲醇(100mL)中,所得溶液冷却至室温,放置过夜。过滤收集形成的晶体,在沸腾的甲醇(80mL)中再溶解,所得溶液冷却至室温,放置过夜。过滤收集形成的晶体以提供纯的(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基(1S)-苧烷酸酯(0.76g, 36%)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.99(dd, 1H, J=1.8和7.8Hz, Ph-H), 7.63(m, 2H, Ph-H), 7.45(m, 1H, Ph-H), 6.33(d, 1H, J=6.0Hz, Ph-CH), 2.32(m, 2H), 1.91(m, 2H), 1.67(m, 1H), 1.12(s, 3H, CH₃), 1.05(s, 3H, CH₃), 1.03(d, 3H, J=6.8Hz, CH₃), 1.00(s, 3H, CH₃), 0.99(d, 3H, J=6.8Hz, CH₃)。

[0303] (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙基(1S)-苧烷酸酯的X-射线晶体学数据: C₂₀H₂₅NO₆, M=375.41, 无色板, 0.26×0.24×0.10mm³, 正交晶系, 空间群P2₁2₁2₁(No. 19), a=11.9268(15), b=11.9812(14), c= **13.5488(16) Å**, **V=1936.1(4) Å³**, Z=4, D_c=1.288g/cm³, F₀₀₀=800, MWPC平面检测器, CuKz发射光, **λ=1.54178 Å**, T=110(2)K, 2θ_{max}=120.0°, 收集22896个反射, 2665个独立反射(R_{int}=0.0462)。最终GooF=1.009, R1=0.0219, wR2=0.0554, R指数基于2629个I>2sigma(I)的反射(用F²校正), 245个参数, 0限制。应用Lp和吸收校正, μ=0.787mm⁻¹。绝对结构参数=0.09(5)(Flack1983, 通过引用并入本文)。见图2。

[0304] (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇:将(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙基(1S)-苧烷酸酯(0.717g, 1.90mmol)溶于热的甲醇(40mL)中,并加入K₂CO₃(0.380g, 2.74mmol)。所得混合物加热回流1小时,然后冷却,真空浓缩,并用乙醚稀释(100mL)。将有机相用水(20mL)清洗,过无水Na₂SO₄干燥,并用硅胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇(0.360g, 97%)。¹H NMR与外消旋醇相同。

[0305] (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇、(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇和 (S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成

[0306]



[0307] 方案 4. (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇、(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇和 (S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成。(i) NaNO_2 , AcOH , H_2SO_4 , 零下 5-0 $^\circ\text{C}$; NaI , 100 $^\circ\text{C}$, 99%; (ii) PhMgCl , $i\text{-PrCHO}$, THF(无水), 零下 40 $^\circ\text{C}$ 至室温, 80%; (iii) (1S)-苄烷酰氯, DMAP, CH_2Cl_2 (无水), 室温, 84%; (iv) 甲醇或异丙醇中重结晶; (v) K_2CO_3 , MeOH, 回流, 100%。

[0308] 1,4-二碘代-2-硝基苯: 将 4-碘代-2-硝基苯胺 (6.60g, 0.025mol) 悬于水 (19mL) 和冰乙酸 (17.5mL) 中 (Sapountzis 等 2005, 通过引用并入本文)。所得混合物冷却至 0 $^\circ\text{C}$, 小心地加入硫酸 (17.5mL, 0.328mol)。所得混合物冷却至零下 5 $^\circ\text{C}$, 以使温度不超过 0 $^\circ\text{C}$ 的速度逐滴加入 NaNO_2 (1.90g, 0.028mol) 的水 (7.5mL) 溶液。加完后搅拌混合物 30 分钟, 分成小部分加入沸腾的碘化钠 (22.33g, 0.149mol) 的水 (7.5mL) 溶液中 (警示: 有剧烈气体释放!)。所得混合物在 60 $^\circ\text{C}$ 下保持 1 小时, 然后冷却至室温, 随后加入乙醚 (500mL)。

分离醚溶液,用水(150mL)清洗两次,再用饱和 NaHCO₃(150mL)清洗一次。所得溶液经由 Na₂SO₄干燥并真空浓缩成固体,再从乙醇中重结晶以产生 1,4-二碘代-2-硝基苯(9.30g,99%)。¹HNMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.15(d,1H,J=2.0Hz),7.75(d,1H,J=8.3Hz),7.56(dd,1H,J=8.3和2.0Hz)。

[0309] (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇:在氮气气氛中,在零下40℃下向1,4-二碘代-2-硝基苯(2.24g,6.0mmol)的无水THF(20mL)溶液中,以使温度不超过零下35℃的速度逐滴加入溴化苯镁(2M THF溶液,3.2mL,6.4mmol)。加完后,搅拌混合物5分钟,然后加入异丁醛(0.726mL,8.0mmol)。所得混合物逐渐温热至室温,用饱和NH₄Cl(8mL)猝灭,然后倒入水(100mL)中。所得混合物用乙酸乙酯(150mL)萃取三次,将合并的有机相用卤水(100mL)清洗,经由Na₂SO₄干燥,真空浓缩并用硅胶凝胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的外消旋(RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(1.54g,80%)。¹HNMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.18(d,1H,J=1.7Hz,Ph-H),7.93(dd,1H,J=1.7和8.3Hz,Ph-H),7.50(d,1H,J=8.3Hz,Ph-H),5.04(m,1H,Ph-CH),2.17(d,1H,J=4.4Hz,OH),1.98(m,1H,CH),0.93(d,3H,J=4.4Hz,CH₃),0.92(d,3H,J=4.4Hz,CH₃);¹³CNMR(100MHz,CDCl₃): δ 148.62(C),141.81(CH),138.57(C),132.72(CH),130.49(CH),91.51(C),73.48(CH),34.22(CH),19.62(CH₃),16.71(CH₃)。

[0310] (R)-和(S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙基(1S)-苧烷酸盐:在氮气气氛中将(1S)-苧烷酰氯(0.89g,4.09mmol)加入(RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(1.10g,3.41mmol)和DMAP(0.50g,4.09mmol)的无水二氯甲烷(30mL)溶液中。所得混合物在室温下搅拌1.5小时后真空浓缩。残留物用硅胶柱层析纯化得到(RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基(1S)-苧烷酸酯(1.44g,84%,非对映体的1:1混合物)的固体,将所得固体溶于沸腾的甲醇(70mL)中,留置于室温过夜。将形成的晶体过滤产生纯的(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(1S)-苧烷酸酯(0.465g,65%)。蒸发母液,将所得残留物溶于沸腾的异丙醇(40mL),留置于室温过夜。将形成的晶体过滤并从沸腾的异丙醇(20mL)中重结晶以产生纯的(S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(1S)-苧烷酸酯(0.288g,40%)。(R,S)-苧烷酸酯的¹HNMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.30(d,1H,J=1.8Hz,Ph-H),7.92(dd,1H,J=1.8和8.3Hz,Ph-H),7.56(d,1H,J=8.3Hz,Ph-H),6.27(d,1H,J=6.8Hz,Ph-CH),2.40(m,1H),2.23(m,1H),2.06(m,1H),1.92(m,1H),1.72(m,1H),1.11(s,3H,CH₃),1.03(d,J=6.8Hz,3H,CH₃),1.02(s,1H,CH₃),0.98(d,J=6.8Hz,3H,CH₃),0.82(s,3H,CH₃);(R,S)-苧烷酸酯的¹³CNMR(100MHz,CDCl₃): δ 178.21(C),166.92(C),148.67(C),142.07(CH),134.80(C),133.34(CH),129.73(CH),92.59(C),90.75(C),76.07(CH),54.79(C),54.34(C),33.27(CH),31.03(CH₂),28.88(CH₂),19.07(CH₃),17.40(CH₃),16.70(CH₃),16.66(CH₃),9.61(CH₃)。

[0311] (S,S)-苧烷酸酯的¹HNMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.30(d,1H,J=1.8Hz,Ph-H),7.94(dd,1H,J=1.8和8.3Hz,Ph-H),7.35(d,1H,J=8.3Hz,Ph-H),6.23(d,1H,J=6.1Hz,Ph-CH),2.34(m,1H),2.24(m,1H),1.91(m,2H),1.67(m,1H),1.13(s,3H,CH₃),1.04(s,3H,CH₃),1.02(d,3H,J=5.2Hz,CH₃),1.00(s,3H,CH₃),0.98(d,3H,J=5.6Hz,CH₃);(S,S)-苧烷酸酯的¹³CNMR(100MHz,CDCl₃): δ 178.28(C),167.03(C),148.67(C),142.27(CH),134.90(C),133.28(CH),129.59(CH),91.60(C),91.06(C),76.21(CH),54.91(C),54.40(C),

33.16 (CH), 30.75 (CH₂), 28.83 (CH₂), 19.14 (CH₃), 17.41 (CH₃), 16.97 (CH₃), 16.65 (CH₃), 9.70 (CH₃)。

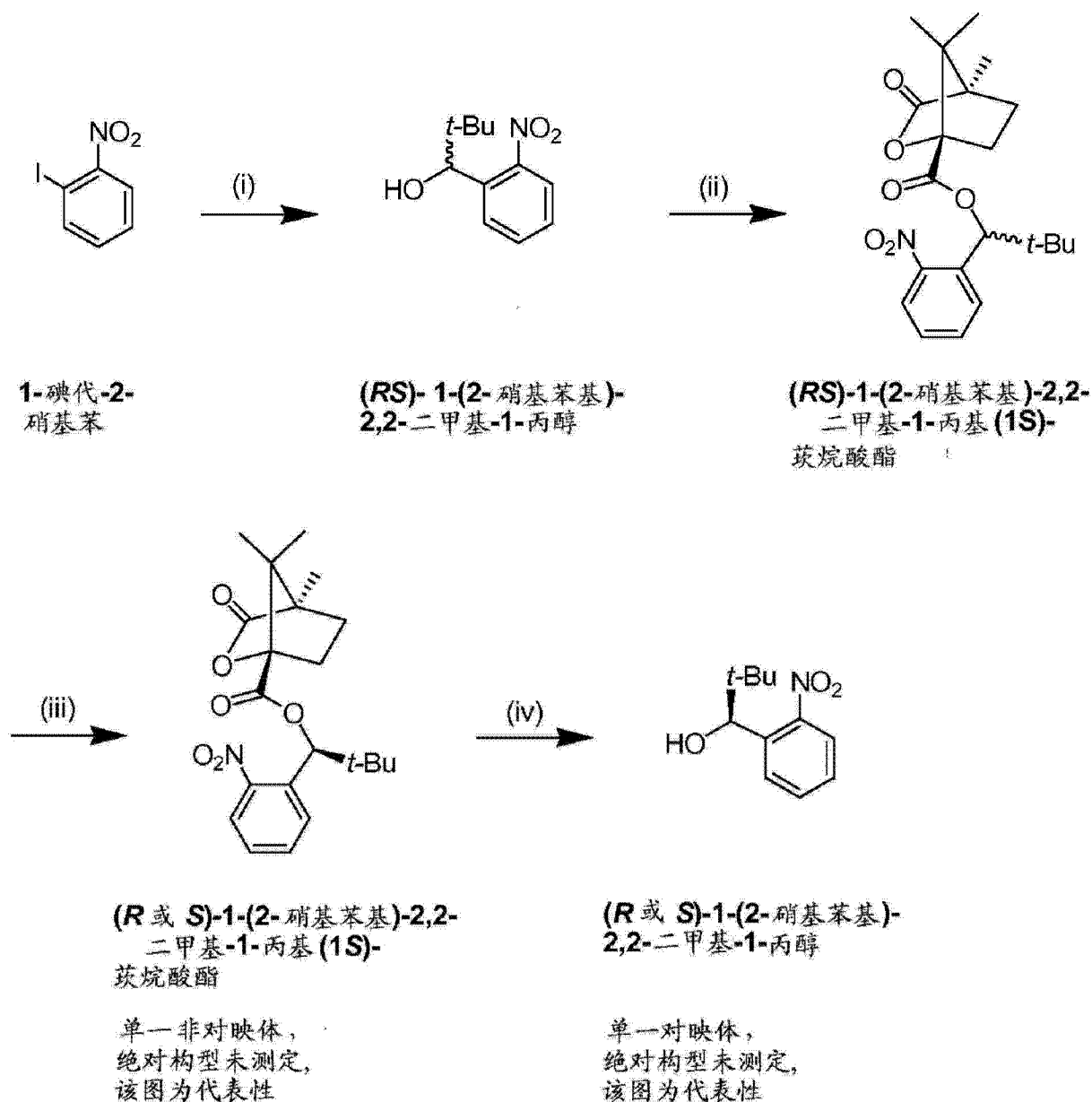
[0312] (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯的 X-射线晶体学数据: $lg_{01}a$ 晶体数据: $C_{20}H_{24}INO_6$, $M=501.30$, 无色板, $0.30 \times 0.20 \times 0.20 \text{ mm}^3$, 单斜晶系, 空间群 $P2_1$ (No. 4), $a=7.5810(15)$, $b=12.446(3)$, $c = \mathbf{11.722(3) \text{ \AA}}$, $\beta = 107.613(10)^\circ$, $V = \mathbf{1054.2(4) \text{ \AA}^3}$, $Z=2$, $D_c=1.579 \text{ g / cm}^3$, $F_{000}=504$, CCD 面探测器, MoK α 发射光, $\lambda = \mathbf{0.71073 \text{ \AA}}$, $T=110(2) \text{ K}$, $2\theta_{\text{max}}=50.0^\circ$, 收集 24239 个反射, 3558 个独立反射 ($R_{\text{int}}=0.0302$)。最终 $G_{\text{ooF}}=1.010$, $R1=0.0123$, $wR2=0.0316$, R 指数基于 3520 个 $i > 2\sigma(I)$ 的反射 (用 F^2 校正), 253 个参数, 3 个限制。应用 L_p 和吸收校正, $\mu = 1.554 \text{ mm}^{-1}$ 。绝对结构参数 = 0.020(9) (Flack1983 通过引用并入本文)。见图 3。

[0313] (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇: 将 (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (0.41g, 0.82mmol) 溶于热的甲醇 (60mL) 中, 并加入 K_2CO_3 (0.22g, 1.58mmol)。所得混合物加热回流 1 小时, 冷却至室温并真空浓缩。所得残留物用硅胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的 (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇 (0.262g, 100%)。 $^1\text{H NMR}$ 与外消旋醇相同。

[0314] (S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇: 将 (S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (0.288g, 0.57mmol) 溶于热的甲醇 (40mL), 并加入 K_2CO_3 (0.15g, 1.1mmol)。所得混合物加热回流 1 小时, 冷却至室温并真空浓缩。所得残留物用硅胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的 (S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇 (0.184g, 100%)。 $^1\text{H NMR}$ 与外消旋醇相同。

[0315] (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和 (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成

[0316]



[0317] 方案 5. (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和 (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成。(i) PhMgCl , $t\text{-BuCHO}$, THF (无水), 零下 40°C 至室温, 72%; (ii) (1S)-萘烷酰氯, 吡啶 (无水), 室温, 81%; (iii) 从甲醇中重结晶; (iv) K_2CO_3 , MeOH, 回流, 92%.

[0318] (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇: 在氮气气氛中, 将 1-碘代-2-硝基苯 (3.0g, 12mmol) 的无水 THF (30mL) 溶液冷却至零下 40°C , 然后以使温度不超过零下 35°C 的速度逐滴加入氯化苯镁 (2M in THF, 7.2mL, 14.5mmol)。所得混合物在零下 40°C 搅拌 20 分钟后, 逐滴加入三甲基乙醛 (1.85mL, 16.8mmol), 所得混合物在零下 40°C 再搅拌 30 分钟。所得混合物逐渐温热至室温, 以饱和氯化铵 (60mL) 猝灭, 倒入水 (60mL) 中, 并用乙酸乙酯萃取三次 (每次 60mL)。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩。所得残留物用硅胶柱层析纯化以产生黄色固体状 (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇 (1.82g, 12%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.82 (d, 1H, $J=6.4\text{Hz}$, Ph-H), 7.76 (d, 1H, $J=6.4\text{Hz}$, Ph-H), 7.61 (t, 1H, $J=6.4\text{Hz}$, Ph-H), 7.39 (t, 1H, $J=6.4\text{Hz}$, Ph-H), 5.39 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$, Ph-CH), 2.14 (d, 1H,

$J=3.2\text{Hz}$, OH), 0.89 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)。

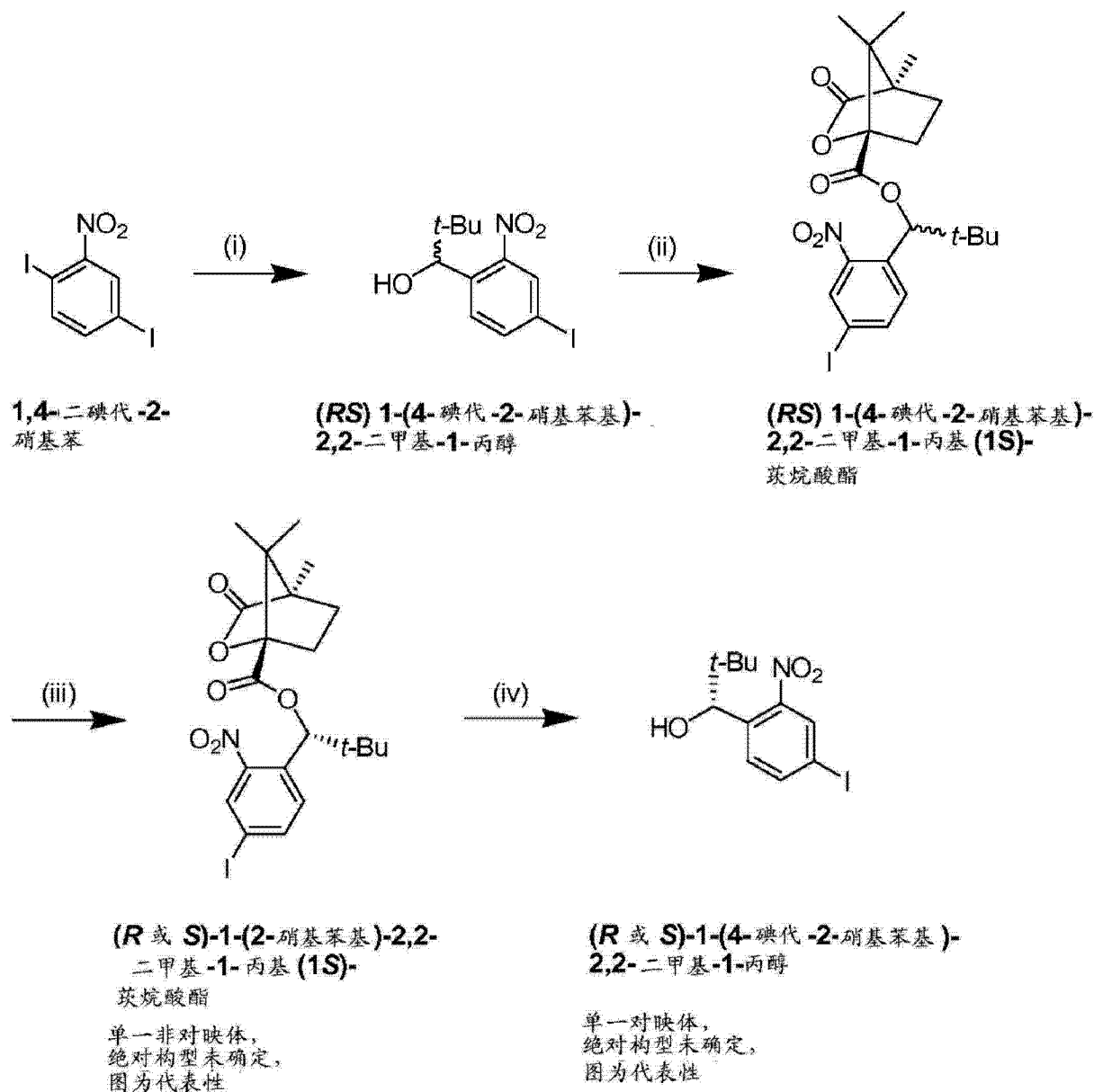
[0319] (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯:在氮气气氛中,将 (1S)-苧烷酰氯 (3.37g, 15.6mmol) 加入 (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇 (2.71g, 13mmol) 和 DMAP (80mg, 0.65mmol) 的无水吡啶 (50mL) 溶液中。所得混合物在室温搅拌 24 小时。真空除去溶剂,所得残留物溶于乙酸乙酯 (50mL),用 0.5M HCl (20mL) 洗两次后用饱和 NaHCO_3 溶液 (20mL) 清洗。有机相经由 Na_2SO_4 干燥,真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生黄色固体状 (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (4.11g, 81%, 非对映体的 1:1 混合物)。非对映体的 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.91 (m, 1H, Ph-H), 7.62 (m, 2H, Ph-H), 7.46 (m, 1H, Ph-H), 6.66 和 6.62 (2s, 1H, Ph-CH), 2.38 (m, 1H), 2.10—1.9 (m, 2H), 1.71 (m, 1H), 1.13, 1.11, 1.08, 1.04, 1.03, 0.87 (6s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 0.97 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)。

[0320] (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯:将 (RS)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (4.57g) 从甲醇中重结晶,得到纯的单一非对映体 (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (0.79g, 35%)。该单一非对映体苧烷酸酯的绝对构型未确定。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.91 (dd, 1H, $J=0.8$ 和 8.0Hz , Ph-H), 7.61 (m, 2H, Ph-H), 7.46 (m, 1H, Ph-H), 6.62 (s, 1H, Ph-CH), 2.35 (m, 1H), 1.93 (m, 2H), 1.69 (m, 1H), 1.13, 1.08 和 1.02 (3s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 0.96 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)。

[0321] (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇:将单一非对映体 (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (658mg, 1.68mmol) 和 K_2CO_3 (241mg, 1.74mmol) 的甲醇 (23mL) 溶液加热回流 30 分钟。加入水 (5mL),所得溶液用 1M HCl 中和至 pH7。真空除去溶剂,所得残留物放入乙酸乙酯 (20mL) 和水 (10mL) 的混合物中。分离出有机相,经由无水 Na_2SO_4 干燥,真空浓缩并用硅胶柱层析以产生淡黄色油状的单一对映体 (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇 (325mg, 92%)。 $^1\text{H NMR}$ 与外消旋醇相同。所得单一非对映体醇类的绝对构型未确定。

[0322] (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和 (R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成

[0323]



[0324] 方案6. (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇和(R或S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇的合成. (i) PhMgCl , $t\text{-BuCHO}$, THF(无水), 零下 40°C 至室温, 81%; (ii) (1S)-莰烷酰氯, DMAP, CH_2Cl_2 (无水), 室温, 88%; (iii) 从甲醇中重结晶; (iv) K_2CO_3 , MeOH, 回流, 98%。

[0325] (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇: 在氮气气氛中将1,4-二碘代-2-硝基苯(3.0g, 8.0mmol)的无水THF(20mL)溶液冷却至零下 40°C , 然后以使温度不超过零下 35°C 的速度逐滴加入氯化苯镁溶液(2M THF溶液, 4.8mL, 9.6mmol)。加完后将所得混合物搅拌10分钟, 然后加入三甲基乙醛(1.2mL, 11.2mmol), 所得混合物在零下 40°C 搅拌30分钟。将所得混合物逐渐温热至室温, 以饱和氯化铵(60mL)猝灭, 倒入水(120mL)中, 并用乙酸乙酯(每次60mL)萃取两次。将合并的有机相用水(60mL)清洗, 经由 Na_2SO_4 干燥, 并真空浓缩。所得残留物用硅胶柱层析纯化以产生褐色油状的外消旋(RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(2.17g, 81%)。 ^1HMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.04(d, 1H, $J=1.6\text{Hz}$, Ph-H), 7.88(dd, 1H, $J=1.6$ 和 8.4Hz , Ph-H), 7.51(d,

1H, $J=8.4\text{Hz}$, Ph-H), 5.28 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$, Ph-CH), 2.29 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$, OH), 0.85 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 149.87 (C), 141.0 (CH), 136.2 (C), 132.3 (CH), 131.63 (CH), 91.85 (C), 74.33 (CH), 36.81 (C), 25.6 (CH_3).

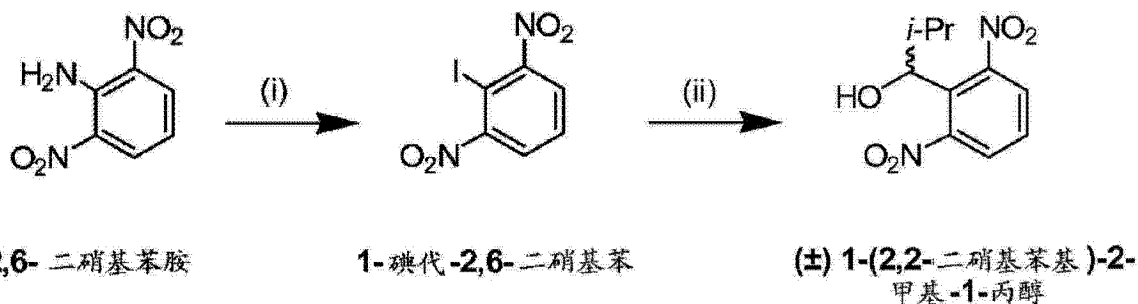
[0326] (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯:在氮气气氛中,将 (1S)-苧烷酰氯 (1.68g, 7.77mmol) 加入 (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇 (2.17g, 6.47mmol) 和 DMAP (1.18g, 9.7mmol) 的无水二氯甲烷 (50mL) 溶液中。所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用饱和 NaHCO_3 溶液 (60mL) 和水 (60mL) 清洗。有机相经由 Na_2SO_4 干燥,真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生白色固体状 (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (2.94g, 88%, 非对映体的 1:1 混合物)。非对映体的 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.23 (m, 1H, Ph-H), 7.90 (m, 1H, Ph-H), 7.31 (m, 1H, Ph-H), 6.56 和 6.51 (2s, 1H, Ph-CH), 2.38 (m, 1H), 2.07—1.9 (m, 2H), 1.69 (m, 1H), 1.13, 1.11, 1.07, 1.04, 1.02, 0.87 (6s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 0.96 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)。

[0327] (R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯:将 (RS)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (2.07g) 溶于沸腾的甲醇 (100mL) 中,留置于室温两天。将形成的晶体过滤,以产生纯的单一非对映体 (R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (0.409g, 39%)。所得单一非对映体苧烷酸酯的绝对构型未确定。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.23 (d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$, Ph-H), 7.89 (dd, 2H, $J=2.0$ 和 8.4Hz , Ph-H), 7.30 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, Ph-H), 6.56 (s, 1H, Ph-CH), 2.42 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.94 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.11, 1.04 和 0.87 (3s, 9H, $\text{CH}_3 \times 3$), 0.95 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)。

[0328] (R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇:将单一非对映体 (R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙基 (1S)-苧烷酸酯 (409mg, 0.79mmol) 和 K_2CO_3 (110mg, 0.8mmol) 的甲醇 (15mL) 溶液加热回流 30 分钟。加入水 (5mL), 所得溶液用 1M HCl 中和至 pH7。真空移除溶剂,将所得残留物放入乙酸乙酯 (30mL) 和水 (10mL) 的混合物中。分离出有机相,经由无水 Na_2SO_4 干燥,真空浓缩,并用硅胶柱层析以产生淡黄色油状的单一对映体 (R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇 (260mg, 98%)。 ^1H NMR 与外消旋醇相同。所得单一对映体苧烷酸酯的绝对构型未确定。

[0329] (±)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成

[0330]



[0331] 方案 7. 外消旋 1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成. (i) 亚硝酸异戊酯, 二碘甲烷, 105°C , 52%; (ii) PhMgBr , 无水 THF, 零下 45°C ; 然后 $i\text{-PrCHO}$, 纯化, 30%。

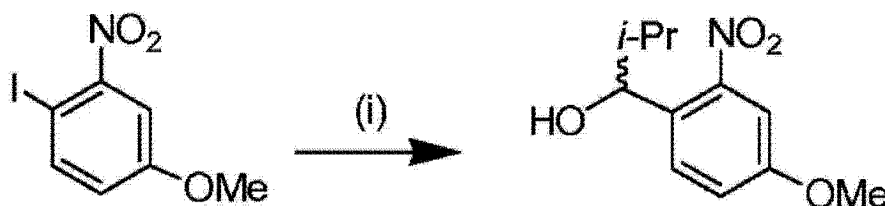
[0332] 1-碘代-2,2-二硝基苯:向二碘甲烷 (24mL, 0.297mol) 中的 2,6-二硝基苯胺

(4.00g, 0.021mol) 分散体中加入亚硝酸异戊酯 (15mL, 0.112mol) (Smith 等, 1990, 通过引用并入本文)。所得混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后在 105°C 下加热 8 小时。高真空除去过量的二碘甲烷。所得残留物用乙酰乙酸 (10mL) 稀释。加入二氧化硅 (ca30mL, 筛目 **230-400 Å**) ; 所得混合物真空浓缩并用柱层析纯化以产生 1-碘代-2,6-二硝基苯 (3.21g, 52%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃) : δ 7.84 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.67 (t, 1H, J=8.0Hz)。

[0333] (±)-1-(2,2-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇: 在氮气气氛中向零下 53°C (干冰-异丙醇浴) 冷却的 1-碘代-2,6-二硝基苯 (1.55g, 5.27mmol) 的无水四氢呋喃 (18mL) 溶液中, 以保持温度为零下 45°C 或更低的速度加入溴化苯镁 (2M 溶于 THF, 3.16mL, 6.32mmol)。加完后搅拌所得混合物 5 分钟, 然后加入异丁醛 (0.957mL, 10.54mmol)。所得混合物逐渐温热至室温, 然后用 NH₄Cl (5mL) 猝灭, 倒入水 (50mL) / 二氯甲烷 (100mL) 中。分离有机相; 将水相层用二氯甲烷萃取 3 次 (每次 50mL)。合并有机萃取物, 用水 (20mL) 清洗, 经由无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压浓缩, 并用硅胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的外消旋 (RS)-1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇 (0.375g, 30%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃) : δ 7.82 (d, 2H, J=8.0Hz, Ph-H), 7.59 (t, 1H, J=8.0Hz, Ph-H), 4.84 (dd, 1H, J=7.6 和 9.2Hz, Ph-CH), 2.87 (d, 1H, J=7.6Hz, OH), 2.18 (m, 1H, CHCH(CH₃)₂), 1.12 (d, 3H, J=6.4Hz, CH₃), 0.77 (d, 3H, J=6.8Hz, CH₃); ¹³CMMR (100MHz, CDCl₃) : δ 150.82 (C), 130.62 (C), 129.31 (CH), 127.30 (CH), 74.52 (CH), 34.19 (CH), 19.84 (CH₃), 19.14 (CH₃)。

[0334] (±)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成

[0335]



4-碘代-3-硝基苯甲醚

(±) 1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇

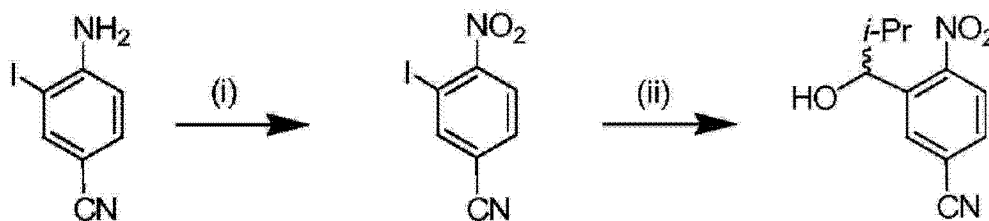
[0336] 方案 8. 1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇够合成。(i) PhMgCl, 无水 THF, 零下 40°C; 然后 i-PrCHO, 纯化, 67%。

[0337] (±)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇: 在氮气气氛中, 向冷却至零下 45°C (干冰-异丙醇浴) 的 4-碘代-2-硝基苯甲醚 (2.79g, 10.00mmol) 的无水四氢呋喃 (20mL) 溶液中, 以使温度保持为零下 40°C 或更低的速度加入溴化苯镁 (2M 溶于 THF, 6mL, 6.32mmol)。加完后搅拌所得混合物 5 分钟, 然后加入异丁醛 (1.816mL, 20.00mmol)。使所得混合物逐渐温热至室温, 然后用 NH₄Cl (5mL) 猝灭, 倒入水 (30mL) / 二氯甲烷 (100mL) 中。分离有机相; 水相层用二氯甲烷萃取 3 次 (每次 50mL)。合并有机萃取物经由无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压浓缩, 并用硅胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的外消旋 (RS)-1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇 (1.502g, 30%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃) : δ 7.62 (ABd, 1H, J=8.8Hz, Ph-H), 7.34 (d, 1H, J=2.6Hz, Ph-H), 7.15 (dd, 1H, J=2.6 和 8.8Hz, Ph-H), 4.91 (m,

1H, Ph-CH), 3.86 (s, 3H, MeO), 2.45 (br s, 1H, OH), 2.00 (m, 1H, CHCH(CH₃)₂), 0.97 (d, 3H, J=6.7Hz, CH₃), 0.86 (d, 3H, J=6.9Hz, CH₃); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 158.76 (C), 149.07 (C), 130.79 (C), 129.88 (CH), 119.62 (CH), 108.66 (CH), 73.75 (CH), 55.81 (CH₃), 34.27 (CH), 19.59 (CH₃), 17.36 (CH₃).

[0338] (±)-1-(5-氰基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成

[0339]



4-氨基-3-碘代苯甲腈

3-碘代-4-硝基苯甲腈

(±)-1-(5-氰基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇

[0340] 方案 9. 外消旋 1-(5-氰基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇的合成. (i) NaNO₂ / H₂SO₄, 0°C, 1 小时, 然后 NaNO₂ / CuSO₄, 100°C, 35%; (ii) PhMgCl, 无水 THF, 零下 40°C; 然后 i-PrCHO, 纯化, 30%。

[0341] 3-碘代-4-硝基苯甲腈: 向冷却至 0°C (冰-水-NaCl 浴) 的 4-氨基-3-碘代苯 (2.44g, 10.00mmol) 在硫酸水溶液中 (2M, 50mL) 的悬液中, 以使反应混合物温度不超过 0°C 的速度加入亚硝酸钠 (1.656g, 24.00mmol) 的水 (6mL) 溶液。加完后搅拌所得混合物 1 小时 (或至澄清), 然后分次转移至热的亚硝酸钠 (13.8g, 200mmol) 和 CuSO₄·5H₂O (0.12g, 0.05mmol) 溶液中。(警示: 剧烈气体释放!) 转移完成后, 将所得混合物回流搅拌 30 分钟, 然后冷却至室温, 并用二氯甲烷萃取三次 (每次 100mL)。将合并的萃取物经由 Na₂SO₄ 干燥, 减压浓缩, 与二氧化硅 (ca30mL, 筛目 **230-400 Å**) 混合, 并以柱层析纯化以产生 3-碘代-4-硝基苯甲腈 (0.95g, 35%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d, 1H, J=1.9Hz), 7.99 (d, 1H, J=8.2Hz), 7.29 (dd, 1H, 8.2 和 1.9Hz, 1H); ¹³CMR (100MHz, CDCl₃): δ 141.76 (CH), 139.93 (CH), 131.66 (CH), 116.65 (C), 114.78 (CN), 113.15 (C), 108.62 (C)。

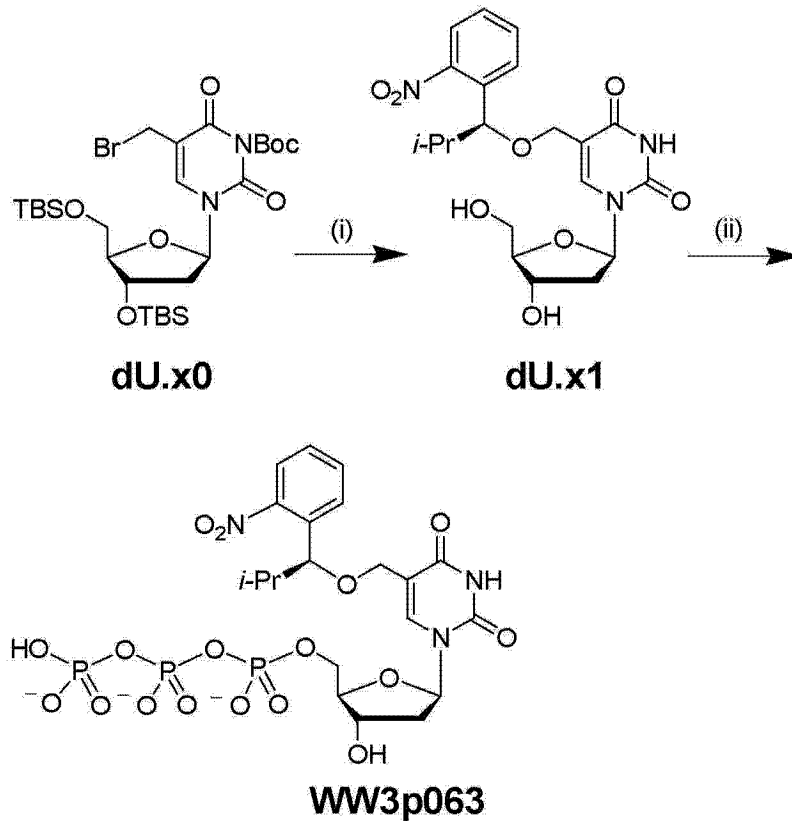
[0342] (±)-1-(5-氰基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇: 在氮气气氛中, 向零下 45°C (干冰-异丙醇浴) 冷却的 3-碘代-4-硝基苯甲腈 (314mg, 1.14mmol) 的无水四氢呋喃 (5.5mL) 溶液中, 以使温度保持为零下 40°C 或更低的速度加入溴化苯镁 (2M 溶于 THF, 3.16mL, 6.32mmol)。加完后搅拌所得混合物 5 分钟, 然后加入异丁醛 (0.957mL, 10.54mmol)。使所得混合物逐渐温热至室温, 然后用 NH₄Cl (2mL) 猝灭, 倒入水 (50mL) 1 二氯甲烷 (50mL) 中。分离有机相; 水相层用二氯甲烷萃取 3 次 (每次 25mL)。将合并的有机萃取物经由无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压浓缩, 并用硅胶柱层析纯化以产生淡黄色油状的外消旋 (RS)-1-(5-氰基-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇 (57mg, 23%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.93 (d, 1H, J=8.1Hz, Ph-H), 7.74 (s, 1H, Ph-H), 7.21 (d, 1H, J=8.1Hz, Ph-H), 4.72 (d, 1H, J=3.6Hz, Ph-CH), 2.33 (br s, 1H, OH), 2.03 (m, 1H, CHCH(CH₃)₂), 1.04 (d, 3H, J=6.8Hz, CH₃), 0.89 (d, 3H, J=6.6Hz, CH₃); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 147.78 (C), 140.25 (CH), 131.40 (CH), 131.24 (CH), 118.36 (C), 112.27 (CN), 103.82 (C), 80.80 (CH), 33.56 (CH), 19.70 (CH₃),

15. 62 (CH₃)。

[0343] 实施例 3- 带有 α -异丙基的脱氧尿苷和脱氧胞苷类似物的合成

[0344] 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0345]



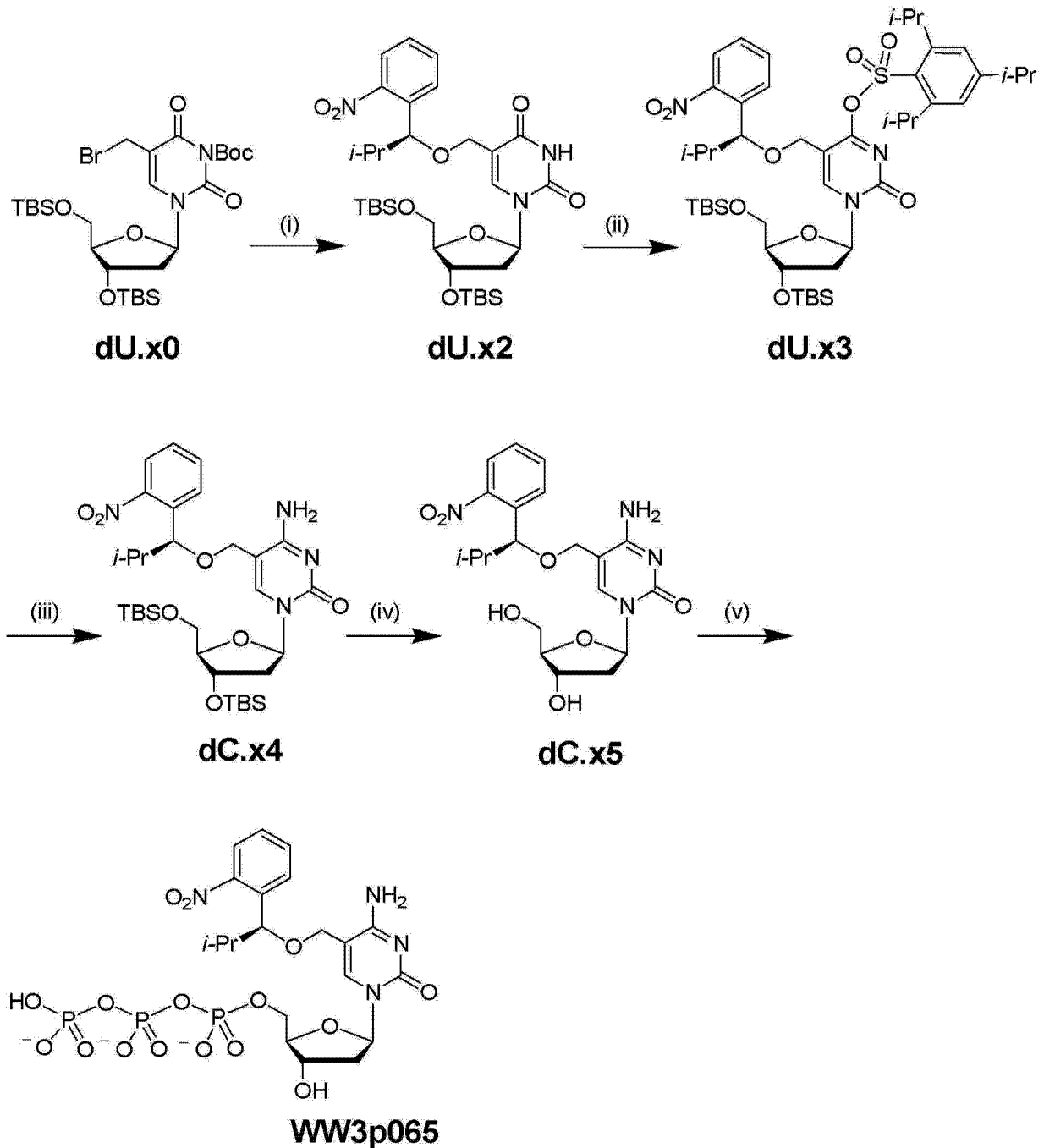
[0346] 方案 10. 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成。(i) (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇, neat 法, 108-112°C, 4%; (ii) POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃P=O, 0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

[0347] 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.x1): 将化合物 dU.x0 (250mg, 0.385mmol) 和 (S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇 (300mg, 1.54mmol) 在氮气气氛中用 neat 法在 105-110°C 下加热 30 分钟。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯中, 并用硅胶层析纯化以产生 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 dU.x1 (6mg, 4%)。从反应中还得到了 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (39mg, 18%) 和 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (36mg, 14%)。dU.x1 的 ¹HNMR (100MHz, CD₃OD): δ 7.96 (s, 1H, H-6), 7.88 (d, 1H, J=8.3Hz, Ph-H), 7.74 (dd, 1H, J=1.5 和 7.6Hz, Ph-H), 7.68 (m, 1H, Ph-H), 7.49 (m, 1H, Ph-H), 6.25 (dd, 1H, J=6.4 和 7.8Hz, H-1'), 4.77 (d, 1H, J=6.0Hz, Ph-CH), 4.39 (m, 1H, H-3'), 4.17 (AB d, 1H, J=12.3Hz, 5-CH₂a), 4.07 (AB d, 1H, J=12.3Hz, 5-CH₂b), 3.92 (m, 1H, H-4'), 3.77 (AB dd, 1H, J=3.4 和 12.1Hz, H-5' a), 3.71 (AB dd, 1H, J=3.8 和 12.1Hz, H-5' b), 2.24 (m, 2H, H-2'), 1.95 (m, 1H, CH), 0.94 (d, 3H, J=6.7Hz, CH₃), 0.85 (d, 3H, J=6.9Hz, CH₃)。

[0348] 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 (WW3p063) :0℃下将 POCl₃ (4 μL, 0.045mmol) 加入化合物 d U. x1 (14mg, 0.03mmol) 和质子海绵 (13mg, 0.06mmol) 的三甲基磷酸 (0.3mL) 溶液中, 搅拌 1 小时。加入额外的 POCl₃ (4 μL, 0.045mmol), 再搅拌所得混合物 3 小时。加入三正丁基焦磷酸铵 (72mg, 0.15mmol) 和三正丁胺 (30 μL) 的无水 DMF (0.3mL) 溶液。搅拌 5 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 5mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后冷冻干燥。将所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 用阴离子交换层析在 Q Sepharose FF 柱 (2.5×20cm) 上用 NH₄HCO₃ 线性梯度 (240 分钟内从 50mM 至 500mM) 以 4.5mL/min 的流速纯化。合并含有三磷酸的级分, 冻干以产生白色蓬松固体状 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 ww3p063 (10mg, 46%)。¹HNMR (400MHz, D₂O) : δ 7.88 (dd, 1H, J=1.2 和 6.4Hz, Ph-H), 7.66 (m, 1H, Ph-H), 7.58 (dd, 1H, J=1.2 和 6.4Hz, Ph-H), 7.56 (s, 1H, H-6), 7.46 (dt, 1H, J=1.2 和 6.4Hz, Ph-H), 6.09 (t, 1H, J=5.6Hz, H-1'), 4.46 (m, 1H, H-3'), 4.39 (AB d, 1H, J=10Hz, 5-CH₂a), 4.23 (ABd, 1H, J=10Hz, 5-CH₂b), 4.20—4.12 (m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.29 (m, 1H, H-2' a), 2.2 (m, 1H, H-2' b), 1.94 (m, 1H, CH), 0.97 (d, 3H, J=5.6Hz, CH₃), 0.74 (d, 3H, J=5.6Hz, CH₃)。 ³¹PNMR (162MHz, D₂O) : δ -5.06 (d, J=16.2Hz), -10.55 (d, J=16.2Hz), -20.9 (t, J=16.2Hz)。

[0349] 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸的合成

[0350]



[0351] 方案 11.5-[*S*]-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸盐合成。(i) *S*-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇, neat 法, 108-112°C, 14%; (ii) 2,4,6-三异丙基苯磺酰氯, DAMP, Et₃N, CH₂Cl₂ (无水), 室温, 42%; (iii) NH₃ (0.5M 溶于 1,4-二氧六环), 85-90°C, 61%; (iv) *n*-Bu₄NF, THF, 室温, 96%; (v) POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃P=O, 0°C; (*n*-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, *n*-Bu₃N, DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

[0352] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[*S*]-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.x2): 在氮气气氛中将化合物 dU.x0 (250mg, 0.385mmol) 和 *S*-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇 (300mg, 1.54mmol) 用 neat 法在 105-110°C 下加热 30 分钟。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯中, 并用硅胶层析纯化以产生 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[*S*]-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙

氧基] 甲基-2'-脱氧尿苷 dU. x2 (36mg, 14%)。从反应中还得到了 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧尿苷 (39mg, 18%) 和 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧尿苷 (6mg, 4%)。dU. x2 的 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 8.76 (s, 1H, NH), 7.84 (dd, 1H, J=1.1 和 8.1Hz, Ph-H), 7.73 (dd, 1H, J=1.3 和 7.9Hz, Ph-H), 7.66 (m, 1H, Ph-H), 7.59 (s, 1H, H-6), 7.42 (m, 1H, Ph-H), 6.29 (dd, 1H, J=5.9 和 7.8Hz, H-1'), 4.78 (d, 1H, J=6.2Hz, Ph-CH), 4.42 (m, 1H, H-3'), 4.18 (AB d, 1H, J=12.0Hz, 5-CH₂a), 4.04 (AB d, 1H, J=12.0Hz, 5-CH₂b), 3.94 (m, 1H, H-4'), 3.77 (m, 2H, H-5'), 2.30 (m, 1H, H-2' a), 2.05 (m, 1H, H-2' b), 1.96 (m, 1H, CH), 0.92 (d, 3H, J=6.7Hz, CH₃), 0.90 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.89 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.84 (d, 3H, J=6.9Hz, CH₃), 0.10 (s, 3H, CH₃Si), 0.09 (s, 3H, CH₃Si), 0.08 (s, 3H, CH₃Si), 0.07 (s, 3H, CH₃Si); dU. x2 的 $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3) : δ 162.39 (C), 150.01 (C), 149.47 (C), 138.33 (CH), 136.78 (C), 132.88 (CH), 129.24 (CH), 124.08 (CH), 111.48 (C), 87.84 (CH), 85.16 (CH), 81.33 (CH), 72.35 (CH), 64.50 (CH₂), 63.09 (CH₂), 40.95 (CH₂), 34.91 (CH), 25.94 (C(CH₃)₃), 25.76 (C(CH₃)₃), 19.28 (CH₃), 18.41 (C), 18.02 (C), 17.90 (CH₃), -4.66 (CH₃), -4.82 (CH₃), -5.32 (CH₃), -5.41 (CH₃)。

[0353] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基] 甲基-O⁴-(2,4,6-三异丙基苯磺酰)-2'-脱氧尿苷 (dU. x3): 在氮气气氛中向化合物 dU. x2 (90mg, 0.136mmol)、DMAP (17mg, 0.140mmol) 和三乙胺 (0.172mL, 1.224mmol) 的无水二氯甲烷 (6mL) 溶液中加入 2,4,6-三异丙基丙基苯磺酰氯 (1.57g, 5.19mmol)。将所得混合物在室温下搅拌 17 个小时, 然后真空浓缩并用柱层析纯化以提供 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基] 甲基-O⁴-(2,4,6-三异丙基苯磺酰)-2'-脱氧尿苷 dU. x3 (54mg, 42%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 8.07 (s, 1H, H-6), 7.86 (m, 1H, Ph-H), 7.71 (m, 1H, Ph-H), 7.46 (m, 1H, Ph-H), 7.16 (s, 2H, Ph-H), 6.09 (t, 1H, J=6.4Hz, H-1'), 4.79 (d, 1H, J=6.2Hz, Ph-CH), 4.34 (m, 1H, H-3'), 4.12 (m, 4H), 3.97 (m, 1H, H-4'), 3.80 (ABdd, 1H, J=3.4 和 11.2Hz, H-5' a), 3.80 (AB dd, 1H, J=3.6 和 11.2Hz, H-5' b), 2.89 (m, 1H, CH), 2.51 (m, 1H, H-2' a), 1.96 (m, 2H), 1.29 和 1.21 (d, 12H, J=6.7Hz, CH₃×4), 1.25 (d, 6H, J=7.0Hz, CH₃×2), 0.99 (d, 3H, J=6.7Hz, CH₃), 0.87 (2s, 18H, (CH₃)₃CSi), 0.84 (d, 3H, J=6.9Hz, CH₃), 0.07 (s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.06 (s, 6H, (CH₃)₂Si)。

[0354] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧胞苷 (dC. x4): 向化合物 dU. x3 (47mg, 0.051mmol) 的无水 1,4-二氧六环 (3mL) 溶液中加入氨 (3mL, 0.5M 溶于二氧六环, 1.50mmol) 溶液。将所得混合物转移至密封管中并在 85-90°C 下加热 1.5 小时。将所得混合物冷却至室温, 真空浓缩并硅胶柱层析纯化以产生 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧胞苷 dC. x4 (20mg, 61%) 的蜡状固体。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.81 (d, 1H, J=8.1Hz, Ph-H), 7.66 (m, 2H, Ph-H), 7.51 (s, 1H, H-6), 7.45 (m, 1H, Ph-H), 6.64 和 5.81 (2br. s, 2H, NH₂), 6.28 (t, 1H, J=6.5Hz, H-1'), 4.70 (d, 1H, J=6.8Hz, Ph-CH), 4.32 (m, 1H, H-3'), 4.20 (AB d, 1H, J=12.6Hz, 5-CH₂a), 4.07 (AB d, 1H, J=12.6Hz, 5-CH₂b), 3.89 (m, 1H, H-4'), 3.77 (ABdd, 1H, J=3.5 和 11.2Hz, H-5' a), 3.69 (AB dd, 1H, J=3.4 和 11.2Hz, H-5' b), 2.42 (m, 1H, H-2' a), 1.99 (m, 2H, H-2' b 和 CH), 0.98 (d, 3H, J=6.6Hz, CH₃),

0.88 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.80 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.78 (d, 3H, J=7.0Hz, CH₃), 0.07 (s, 3H, CH₃Si), 0.06 (s, 3H, CH₃Si), -0.01 (s, 3H, CH₃Si), -0.04 (s, 3H, CH₃Si)。

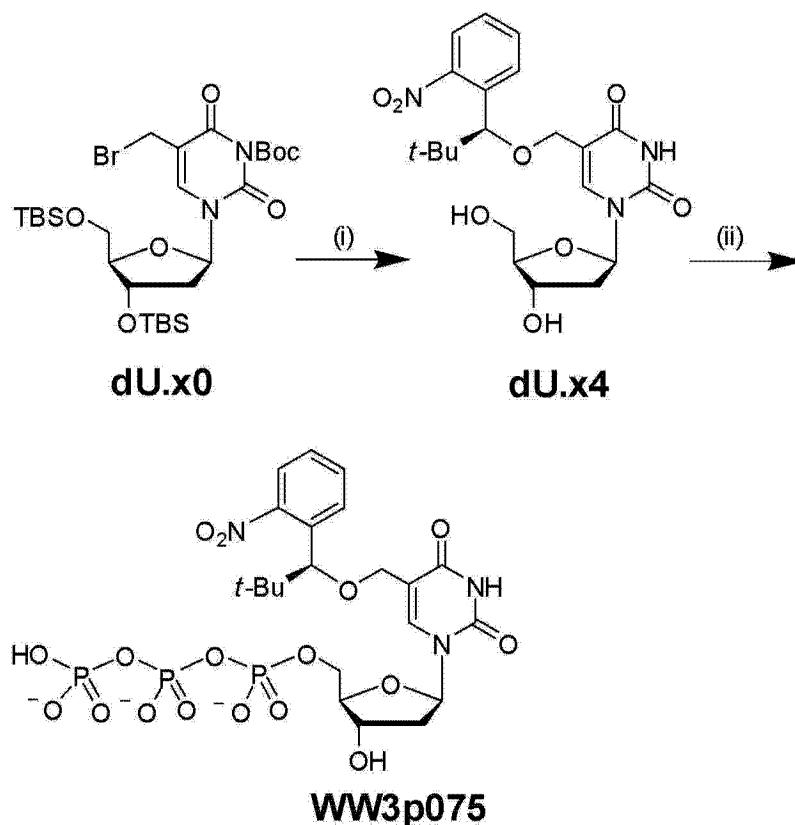
[0355] 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷 (dCx5) : 向化合物 dC.x4 (16mg, 0.024mmol) 的 THF (1mL) 溶液中加入三水合四正丁基氟化铵 (31mg, 0.096mmol) 的 THF (2mL) 溶液。将所得混合物在室温下搅拌 30 分钟, 真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷 dC.x5 (10mg, 96%) 的蜡状固体。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.95 (m, 1H, Ph-H), 7.76 (m, 1H, Ph-H), 7.64 (m, 1H, Ph-H), 7.63 (s, 1H, H-6), 7.56 (d, 1H, J=8.3Hz, Ph-H), 7.39 和 6.66 (2br. s, 2H, 可交换 D₂O, NH₂), 6.13 (m, 1H, H-1'), 5.20 (d, 1H, J=4.1Hz, 可交换 D₂O, 3'-OH), 4.85 (t, 1H, J=5.4Hz, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.67 (d, 1H, J=6.0Hz, Ph-CH), 4.17 (m, 1H, H-3'), 4.10 (AB d, 1H, J=12.2Hz, 5-CH₂a), 3.99 (AB d, 1H, J=12.2Hz, 5-CH₂b), 3.74 (m, 1H, H-4'), 3.49 (m, 2H, H-5'), 2.08 (m, 1H, H-2'a), 1.91 (m, 2H, H-2'b 和 CH), 0.88 (d, 3H, J=6.7Hz, CH₃), 0.77 (d, 3H, J=6.9Hz, CH₃); ¹³CNMR (100MHz, CD₃OD) : δ 166.57 (C), 158.14 (C), 151.46 (C), 142.74 (CH), 137.30 (C), 134.29 (CH), 130.28 (CH), 129.91 (CH), 125.32 (CH), 104.64 (C), 89.00 (CH), 87.57 (CH), 81.04 (CH), 72.13 (CH), 66.42 (CH₂), 62.87 (CH₂), 42.22 (CH₂), 36.30 (CH), 19.64 (CH₃), 18.56 (CH₃)。

[0356] 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-磷酸 (WW3p065) : 0 °C 下将 POCl₃ (3 μL, .034mmol) 加入化合物 d U.x5 (10mg, 0.023mmol) 和质子海绵 (10mg, 0.046mmol) 的三甲基焦磷酸 (0.3mL) 溶液中, 搅拌 2 小时。加入额外的 POCl₃ (3 μL, 0.034mmol), 将所得混合物再搅拌 1 小时。加入三正丁基焦磷酸铵 (55mg, 0.115mmol) 和三正丁胺 (30 μL) 的无水 DMF (0.25mL) 溶液。搅拌 5 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 5mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后冷冻干燥。所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 并用阴离子交换层析在 Q Sepharose FF 柱 (2.5×20cm) 上用 NH₄HCO₃ 的线性梯度 (240 分钟内从 50mM 至 500mM) 以 4.5mL / min 的流速纯化。合并含有三磷酸的级分, 冷冻干燥以产生白色蓬松固体状 5-[(S)-1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 ww3p065 (16mg, 96%)。¹HNMR (400MHz, D₂O) : δ 7.85 (dd, 1H, J=1.2 和 8.4Hz, Ph-H), 7.65 (m, 3H, Ph-H 和 H6), 7.49 (dt, 1H, J=1.6 和 8.4Hz, Ph-H), 6.05 (t, J=6.4Hz, 1H, H-1'), 4.54 (AB d, 1H, J=13.6Hz, 5-CH₂a), 4.46 (m, 1H, H-3'), 4.44 (AB d, 1H, J=13.6Hz, 5-CH₂b), 4.18 (m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.39 (m, 1H, H-2'a), 2.2 (m, 1H, H-2'b), 2.01 (m, 1H, CH), 1.06 (d, 3H, J=6.4Hz, CH₃), 0.73 (d, 3H, J=7.2Hz, CH₃); 非对映体的 ³¹PNMR (162MHz, D₂O) : δ -5.25 (d, J=21.0Hz), -10.79 (d, J=19.44Hz), -21.14 (t, J=21.0Hz)。

[0357] 实施例 4- 带有 α-叔丁基的脱氧尿苷和脱氧胞苷类似物的合成

[0358] 5-[(R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0359]



[0360] 方案 12.5-[*R*或 S]-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成。(i) (*R*或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇, neat 法, 108-115°C, 4%; (ii) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

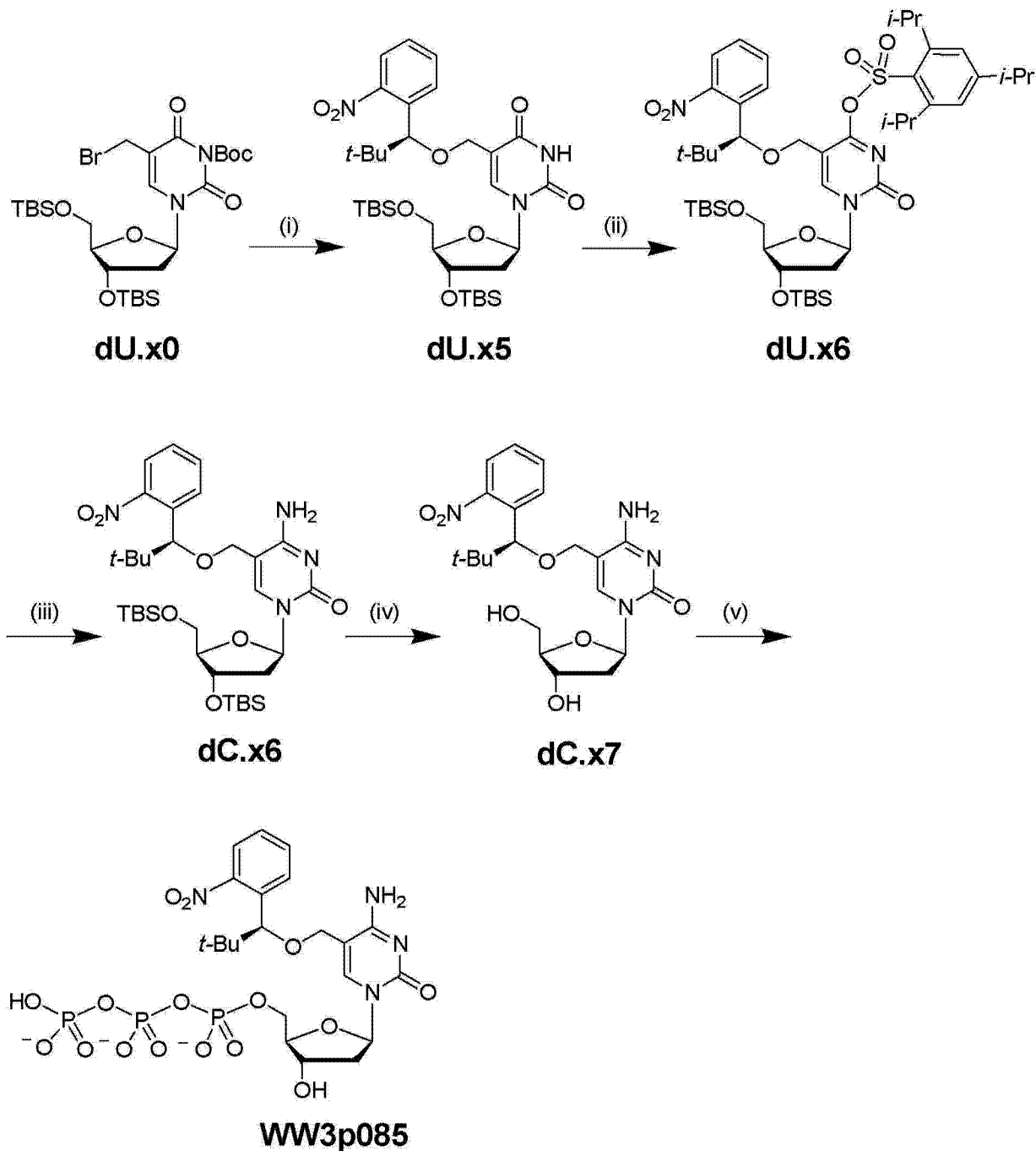
[0361] 5-[*R*或 S]-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.x4): 在氮气气氛中, 将化合物 dU.x0 (520mg, 0.802mmol) 和纯对映体 (*R*或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇 (580mg, 2.77mmol) 用 neat 法在 108-115°C 下加热一小时。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯, 并用硅胶层析纯化以产生 5-[*R*或 S]-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.x4) (16mg, 4%)。从反应中还得到了 (3'或5')-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[*R*或 S]-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (78mg, 17%) 和 3',5'-0-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[*R*或 S]-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (115mg, 21%)。dU.x4 的 $^1\text{H NMR}$ (100MHz, CS_3OD): δ 7.84 (s, 1H, H-6), 7.68 (dd, 1H, $J=1.2$ 和 8.1Hz, Ph-H), 7.64 (dd, 1H, $J=1.4$ 和 7.9Hz, Ph-H), 7.53 (m, 1H, Ph-H), 7.36 (m, 1H, Ph-H), 6.13 (t, 1H, $J=7.2$ Hz, H-1'), 4.84 (s, 1H, Ph-CH), 4.26 (m, 1H, H-3'), 4.13 (AB d, 1H, $J=12.4$ Hz, 5- CH_2a), 3.96 (AB d, 1H, $J=12.4$ Hz, 5- CH_2b), 3.78 (m, 1H, H-4'), 3.60 (m, 2H, H-5'), 2.12 (m, 2H, H-2'), 0.69 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$)。

[0362] 5-[*R*或 S]-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 (WW3p075): 0°C 下将 POCl_3 (5 μL , 0.053mmol) 加入化合物 dU.x4 (16mg, 0.035mmol) 和质子海绵 (15mg, 0.07mmol) 的三甲基磷酸 (0.3mL) 溶液中, 搅拌 2 小时。另加入 POCl_3 (3 μL , 0.032mmol), 将所得混合物再搅拌 1 小时。加入三正丁基焦磷酸铵 (83mg,

0.175mmol) 和三正丁铵 (35 μ L) 的无水 DMF (0.35mL) 溶液。搅拌 5 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 5mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后冷冻干燥。将所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 并用阴离子交换层析在 Q Sepharose FF 柱 (2.5 \times 20cm) 上用 NH_4HCO_3 的线性梯度 (240 分钟内从 50mM 至 500mM) 以 4.5mL/min 的流速纯化。合并含有三磷酸的级分, 冻干以产生白色蓬松固体状 5-[(R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基] 甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 ww3p075 (14mg, 53%)。 ^1H NMR (400MHz, D_2O) : δ 7.83 (d, 1H, J=8.8Hz, Ph-H), 7.63 (m, 3H, Ph-H 和 H-6), 7.47 (m, 1H, Ph-H), 6.08 (t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 4.46 (m, 1H, H-3'), 4.41 (AB d, 1H, J=8.4Hz, 5- CH_2a), 4.32 (AB d, 1H, J=8.8Hz, 5- CH_2b), 4.20—4.11 (m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.24 (m, 2H, H-2'), 0.79 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$) ; ^{31}P NMR (162MHz, D_2O) : δ -5.11 (d, J=19.4Hz), -10.55 (d, J=19.4Hz), -20.9 (t, J=19.4Hz)。

[0363] 5-[(R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基] 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸的合成

[0364]



[0365] 方案 13.5-[(R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸的合成。(i) (S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇, neat 法, 108-115°C, 21%; (ii) 2,4,6-三异丙基苯磺酰氯 (TPSCl), DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂ (无水), 室温, 31%; (iii) NH₃ (0.5M, 4-二氧六环溶液), 85-90°C, 61%; (iv) n-Bu₄NF, THF, 室温, 96%; (v) POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃PO, 0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1M HNEt₃HCO₃。

[0366] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.x5): 在氮气气氛中将化合物 dU.x0 (520mg, 0.802mmol) 和纯对映体 (R 或 S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇 (580mg, 2.77mmol) 用 neat 法在 108-115°C 下加热 1 小时。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯中, 并用硅胶层析纯化以产生 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R

或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 dU. x5(115mg, 21%)。从反应中还可得到(3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(78mg, 17%)和5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(16mg, 4%)。dU. x5的¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.97(s, 1H, NH), 7.76(d, 2H, J=8.0Hz, Ph-H), 7.60(m, 2H, Ph-H和H-6), 7.41(s, 1H, Ph-H), 6.29(dd, 1H, J=6.0和7.6Hz, H-1'), 4.97(s, 1H, Ph-CH), 4.42(m, 1H, H-3'), 4.28(AB d, 1H, J=12.0Hz, 5-CH₂a), 4.06(AB d, 1H, J=12.0Hz, 5-CH₂b), 3.92(m, 1H, H-4'), 3.76(m, 2H, H-5'), 2.30(m, 1H, H-2'a), 2.05(m, 1H, H-2'b), 0.95(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.90(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.83(s, 9H, (CH₃)₃C), 0.12(s, 3H, CH₃Si), 0.09(s, 3H, CH₃Si), 0.07(s, 3H, CH₃Si), 0.06(s, 3H, CH₃Si); dU. x5的¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): δ 162.52(C), 150.82(C), 150.15(C), 138.50(CH), 134.19(C), 132.01(CH), 130.11(CH), 128.14(CH), 123.81(CH), 111.45(C), 87.70(CH), 84.98(CH), 81.44(CH), 72.19(CH), 64.60(CH₂), 62.95(CH₂), 40.85(CH₂), 36.51(C), 25.94((CH₃)₃C), 25.91((CH₃)₃C), 25.78(C(CH₃)₃), 18.39(C), 18.00(C), -4.66(CH₃), -4.84(CH₃), -5.35(CH₃), -5.42(CH₃)。

[0367] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 dU. x6(47mg, 31%)。向dU. x5(110mg, 0.16mmol)、DMAP(20mg, 0.17mmol)和三乙胺(63 μL, 0.45mmol)的无水二氯甲烷(3mL)溶液中加入2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(61mg, 0.20mmol)。将所得混合物在氮气气氛中室温搅拌36小时。然后真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 dU. x6(47mg, 31%)。¹H NMR(500MHz, CDCl₃): δ 8.08(s, 1H, H-6), 7.80(dd, 1H, J=1.2和8.0Hz, Ph-H), 7.78(dd, 1H, J=1.6和8.0Hz, Ph-H), 7.67(m, 1H, Ph-H), 7.46(m, 1H, Ph-H), 7.20(s, 2H, Ph-H), 6.09(t, 1H, J=6.4Hz, H-1'), 4.98(s, 1H, Ph-CH), 4.35(m, 1H, H-3'), 4.25(AB d, 1H, J=11.6Hz, 5-CH₂a), 4.11(AB d, 1H, J=11.6Hz, 5-CH₂b), 3.97(m, 1H, H-4'), 3.79(dd, 1H, J=3.6和11.6Hz, H-5'a), 3.74(dd, 1H, J=11.6和3.6Hz, H-5'b), 2.90(m, 1H, CH), 2.50(m, 2H, H-2'), 1.98(m, 2H, CH), 1.31-1.22(m, 18H, (CH₂)₂CH×3), 0.88(2s, 18H, (CH₃)₃CSi×2), 0.87(s, 9H, (CH₃)₃C), 0.07(s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.06(s, 6H, (CH₃)₂Si); ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): δ 166.03(C), 154.39(C), 153.52(C), 151.09(C), 150.94(C), 144.77(CH), 133.60(C), 132.43(CH), 131.07(C), 130.12(CH), 128.24(CH), 123.05(CH), 123.81(CH), 104.64(C), 88.39(CH), 87.42(CH), 82.45(CH), 71.93(CH), 64.41(CH₂), 62.78(CH₂), 42.09(CH₂), 36.54(C), 34.26(CH), 29.60(CH), 25.92((CH)₃C), 25.82((CH₃)₃C), 25.74((CH₃)₃C), 24.62(CH₃), 24.34(CH₃), 23.48(CH₃), 18.40(C), 17.99(C), -4.62(CH₃), -4.92(CH₃), -5.37(CH₃), -5.34(CH₃)。

[0368] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷 dC. x6(31mg, 91%)。向化合物dU. x6(47mg, 0.050mmol)的无水1,4-二氧六环(2mL)溶液中加入氨溶液(2mL, 0.5M溶于二氧六环)。将所得混合物转移至密封管中,在92℃下加热10小时。将所得混合物冷却至室温,真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷 dC. x6(31mg, 91%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 7.67(m,

3H, Ph-H), 7.53 (s, 1H, H-6), 7.45 (m, 1H, Ph-H), 6.30 (t, 1H, J=6.6Hz, H-1'), 5.72 (br s, 2H, NH₂), 4.88 (s, 1H, Ph-CH), 4.32 (m, 1H, H-3'), 4.28 (AB d, 1H, J=12.8Hz, 5-CH₂a), 4.08 (AB d, 1H, J=12.8Hz, 5-CH₂b), 3.87 (m, 1H, H-4'), 3.74 (dd, 1H, J=3.6 和 14.8Hz, H-5' a), 3.66 (dd, 1H, J=3.6 和 11.3Hz, H-5' b), 2.41 (m, 1H, H-2' a), 2.03 (m, 1H, H-2' b), 0.90 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.87 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.83 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.09 (2s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.06 (2s, 6H, (CH₃)₂Si); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 165.16 (C), 155.52 (C), 151.31 (C), 140.63 (CH), 133.31 (C), 132.04 (CH), 129.53 (CH), 128.56 (CH), 123.76 (CH), 101.89 (C), 87.39 (CH), 85.72 (CH), 81.24 (CH), 71.59 (CH), 66.55 (CH₂), 62.68 (CH₂), 41.65 (CH₂), 36.20 (C), 25.92 ((CH₃)₃C), 25.82 ((CH₃)₃C), 25.75 ((CH₃)₃C), 18.23 (C), 17.97 (C), -4.64 (CH₃), -4.94 (CH₃), -5.47 (CH₃), -5.53 (CH₃)。

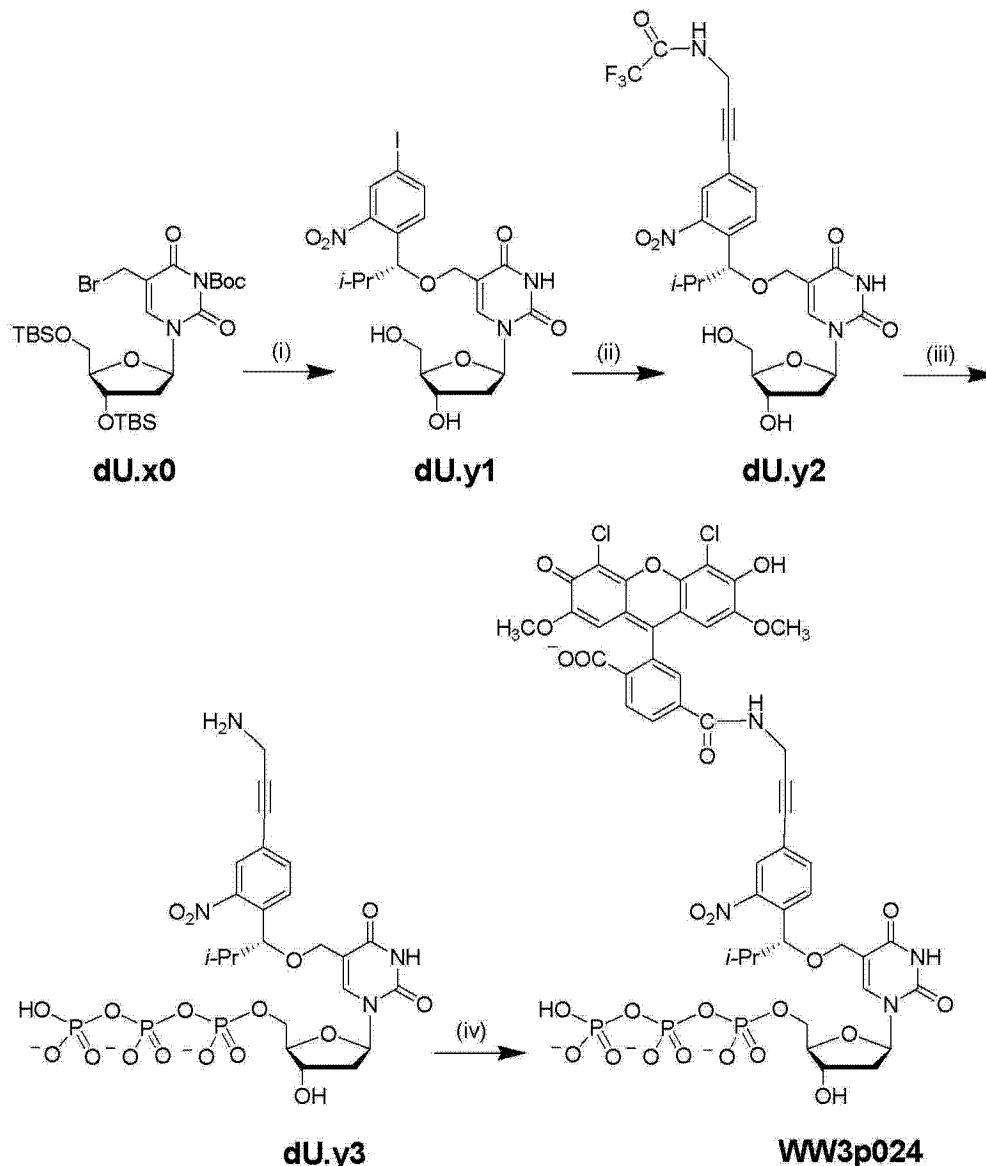
[0369] 5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷 (dC.x7): 将三水合正丁基氟化铵 (28mg, 0.09mmol) 的 THF (1mL) 溶液加入化合物 dC.x6 (20mg, 0.03mmol) 的 THF (2mL) 溶液中。将所得混合物在室温下搅拌 30 分钟。然后真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生 5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷 dC.x7 (11mg, 82%)。¹HNMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.87 (s, 1H, H-6), 7.82 (dd, 1H, J=1.2 和 8.4Hz, Ph-H), 7.76 (dd, 1H, J=1.6 和 8.0Hz, Ph-H), 7.68 (m, 1H, Ph-H), 7.51 (m, 1H, Ph-H), 6.23 (t, 1H, J=6.6Hz, H-1'), 4.94 (s, 1H, Ph-CH), 4.44 (AB d, 1H, J=13.2Hz, 5-CH₂a), 4.34 (m, 1H, H-3'), 4.11 (AB d, 1H, J=13.2Hz, 5-CH₂b), 3.88 (m, 1H, H-4'), 3.71 (dd, 1H, J=3.2 和 12.0Hz, H-5' a), 3.63 (dd, 1H, J=4.0 和 12.0Hz, H-5' b), 2.35 (m, 1H, H-2' a), 2.14 (m, 1H, H-2' b), 0.80 (s, 9H, (CH₃)₃C); ¹³CNMR (100MHz, CD₃OD): δ 166.65 (C), 158.22 (C), 152.66 (C), 143.25 (CH), 134.69 (C), 133.42 (CH), 131.19 (CH), 129.96 (CH), 125.30 (CH), 104.49 (C), 88.94 (CH), 87.46 (CH), 81.44 (CH), 72.20 (CH), 66.33 (CH₂), 62.88 (CH₂), 42.11 (CH₂), 37.34 (C), 26.44 ((CH₃)₃C)。

[0370] 5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 (WW3p085): 在 0°C 下将 POCl₃ (3.5 μL, 0.038mmol) 加入化合物 dU.x7 (11mg, 0.025mmol) 和质子海绵 (10.5mg, 0.049mmol) 的三甲基磷酸 (0.3mL) 溶液中, 搅拌 2 小时。另加入 POCl₃ (3.5 μL, 0.038mmol), 所得混合物再搅拌 1、时。加入三正丁基焦磷酸铵 (59mg, 0.125mmol) 和三正丁胺 (30 μL) 的无水 DMF (0.25mL) 溶液。搅拌 5 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 5mL)。将反应物在室温下搅拌 1、时, 然后冷冻干燥。所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 并用阴离子交换层析在 Q Sepharose FF 柱 (2.5×20cm) 上用 NH₄HCO₃ 的线性梯度 (240 分钟内从 50mM 至 500mM) 以 4.5mL / min 的流速纯化。合并含有三磷酸的级分, 冻干以得到白色蓬松固体状 5-[(R或S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 WW3p085 (12mg, 65%)。¹HNMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.81 (d, 1H, J=8.0Hz, Ph-H), 7.65 (m, 3H, Ph-H 和 H-6), 7.45 (t, 1H, J=8.0Hz, Ph-H), 6.03 (t, 1H, J=6.4Hz, H-1'), 4.52 (AB d, 1H, J=13.6Hz, 5-CH₂a), 4.46 (d, 1H, J=13.6Hz, 5-CH₂b), 4.41 (m, 1H, H-3'), 4.12 (m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.35 (m, 1H, H-2' a), 2.17 (m, 1H, H-2' b), 0.82 (s, 9H, (CH₃)₃C); 非对映体的 ³¹PNMR (162MHz, D₂O): δ -5.15 (d, J=21.0Hz), -10.64 (d, J=19.44Hz), -21.0 (t, J=21.0Hz)。

[0371] 实施例 5- 带有 α-异丙基的附着有染料的脱氧尿苷和脱氧胞苷类似物的合成

[0372] 6-JOE 标记的 5-[(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0373]



[0374] 方案 14. 6-JOE 标记的 5-[(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成。(i) (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇, neat 法, 108-112°C, 9%; (ii) N-炔丙基三氟乙酰胺, Pd(PPh₃)₄(0), CuI, Et₃N, DMF (无水), 86%; (iii) POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃PO, 0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1M HNEt₃HCO₃; NH₄OH; (iv) 6-JOE-SE, 0.1M Na₂CO₃ / NaHCO₃ 缓冲液 (pH9.2)。

[0375] 5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.y1): 在氮气气氛中将化合物 dU.x0 (775mg, 1.19mmol) 和纯对映体 (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇 (1.22g, 3.80mmol) 用 neat 法在 108-112°C 下加热 45 分钟。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯中, 并用硅胶层析纯化以产生 5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.y1) (60mg, 9%)。从反应中还得到了 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R)-1-(4-碘

代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(90mg,11%)和3',5'-O-双-(叔丁基二甲基硅烷基)-5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(194mg,21%)。dU.y1的¹HNMR(400MHz,CD₃CD):δ 8.23(d,1H,J=1.7Hz,Ph-H),8.03(dd,J=8.4和1.7Hz,1H,Ph-H),8.00(s,1H,H-6),7.50(d,1H,J=8.4Hz,Ph-H),6.26(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),4.69(d,1H,J=5.8Hz,PhCH),4.40(m,1H,H-3'),4.13(AB d,J=11.8Hz,1H,5-CH₂a),4.08(AB d,J=11.8Hz,1H,5-CH₂b),3.93(m,1H,H-4'),3.79(dd,J=12.0和3.3Hz,1H,H-5'a),3.73(dd,J=12.0和3.6Hz,1H,H-5'b),2.26(m,1H,H-2'a),2.19(m,1H,H-2'b),1.93(m,1H,CH(CH₃)₃),0.93(d,J=6.4Hz,3H,CH₃),0.87(d,J=6.8Hz,3H,CH₃)。

[0376] 5-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(dU.y2):将化合物dU.y1(60mg,0.11mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺(48mg,0.32mmol)、四-(三苯基膦)-钯(0)(12mg,0.01mmol)、CuI(4mg,0.02mmol)和Et₃N(30μL,0.21mmol)的无水DMF(5mL)溶液在室温下搅拌4.5小时。加入甲醇(4mL)和二氯甲烷(4mL),然后加入碳酸氢钠(49mg,0.58mmol)。将所得混合物再搅拌1小时,然后真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生5-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷dU.y2(54mg,86%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆):δ 11.33(s,1H,可交换D₂O,3-NH),10.12(br t,J=4.8Hz,1H,可交换D₂O,CH₂NHTFA),7.98(d,1H,J=1.5Hz,Ph-H),7.85(s,1H,H-6),7.74(dd,J=8.2和1.5Hz,1H,Ph-H),7.64(d,1H,J=8.2Hz,Ph-H),6.13(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),5.24(d,J=4.2Hz,1H,可交换D₂O,3'-OH),4.96(t,J=5.2Hz,1H,可交换D₂O,5'-OH),4.61(d,1H,J=5.5Hz,PhCH),4.30(d,2H,J=4.8Hz,CH₂NHTFA),4.22(m,1H,H-3'),3.97(s,2H,5-CH₂a和5-CH₂b),3.76(m,1H,H-4'),3.56(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.06(m,2H,H-2'a和H-2'b),1.88(m,1H,CH(CH₃)₃),0.83(d,J=6.7Hz,3H,CH₃),0.80(d,J=6.8Hz,3H,CH₃);¹³CNMR(100MHz,CD₃OD):δ 163.59(C),157.22(C),150.67(C),149.23(C),139.78(CH),137.05(C),135.21(CH),129.48(CH),126.63(CH),122.76(C),110.89(C),87.60(CH),85.70(C),85.14(CH),87.96(CH),80.27(C),70.86(CH),64.34(CH₂),61.44(CH₂),39.96(CH₂),34.62(CH),29.07(CH₂),18.30(CH₃),16.44(CH₃)。

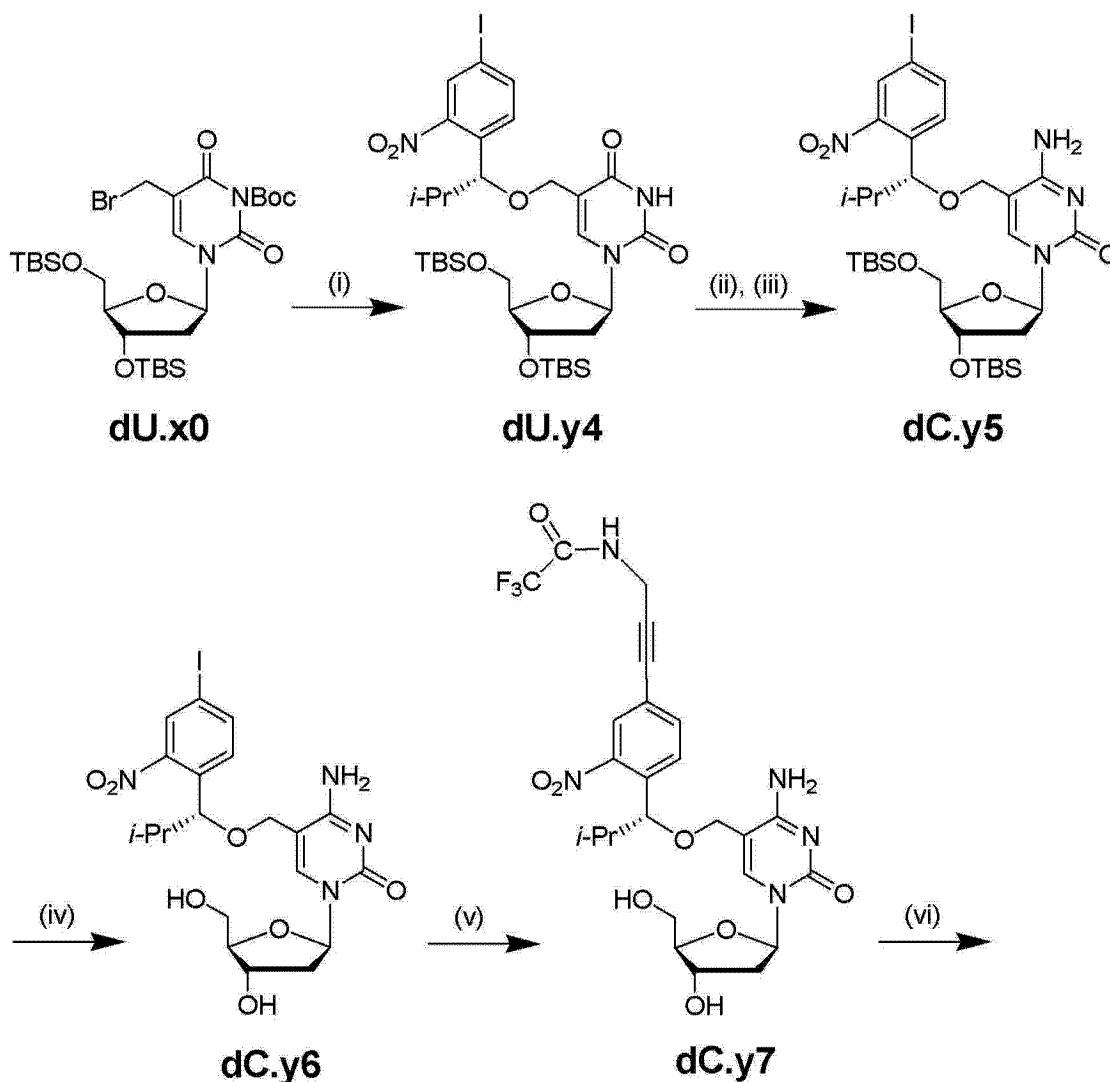
[0377] 5-[(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸(dU.y3):0℃下将POCl₃(6μL,0.06mmol)加入化合物dU.y2(18mg,0.03mmol)和质子海绵(13mg,0.06mmol)的三甲基磷酸(0.3mL)溶液中,搅拌2小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(73mg,0.15mmol)和三正丁胺(30μL)的无水DMF(0.3mL)的溶液。搅拌5分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;5mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后冷冻干燥。所得残留物溶于水(5mL),过滤,并将部分溶液用反相HPLC以Perkin Elmer OD-300C₁₈柱(4.6×250mm)纯化,以产生5-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸。流动相:A,溶于水(pH7.0)的100mM三乙基乙酸钠(TEAA);B,溶于水/CH₃CN(30:70)的100mM TEAA。随后在室温下用浓氨水(27%)处理纯化的三磷酸2小时以产生5-[(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸dU.y3。¹HNMR(400MHz,D₂O):δ 8.01(s,1H,Ph-H),7.76(d,1H,J=6.9Hz,Ph-H),7.62(m,2H,H-6和Ph-H),6.17(t,1H,J=6.4Hz,H-1'),4.55(m,1H,H-3'),4.39和4.29(2d,2H,J=6.4Hz,CH₂),

4.17(m, 3H, H-4' 和 H-5'), 3.74(s, 2H, CH₂), 2.28(m, 2H, H-2'), 2.00(m, 1H, CH), 0.79(m, 3H, CH₃); ³¹P NMR(162MHz, D₂O): δ -5.40(d, J=19.4Hz), -10.75(d, J=19.4Hz), -21.23(t, J=19.4Hz)。

[0378] 6-JOE 标记的 5-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸(WW3p024): 将 6-JOE-SE(0.625mg, 1 μmol) 的无水 DMSO(25 μL) 溶液加入三磷酸 dU.y3(0.31 μmol) 的 Na₂CO₃ / NaHCO₃ 缓冲液(0.1M, pH9.2; 180 μL) 中, 在室温下孵育 1 小时。将反应物通过反相 HPLC 用 Perkin Elmer OD-300C₁₈ 柱(4.6×250mm) 纯化, 以产生 6-JOE 标记的三磷酸 ww3p024。流动相:A, 100mM TEAA 溶于水(pH7.0); B, 100mM TEAA 溶于水 / CH₃CN(30:70)。ww3p024 特征在于其能够被 DNA 聚合酶掺入并可由光去保护。

[0379] Cy5 标记的 5-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸的合成

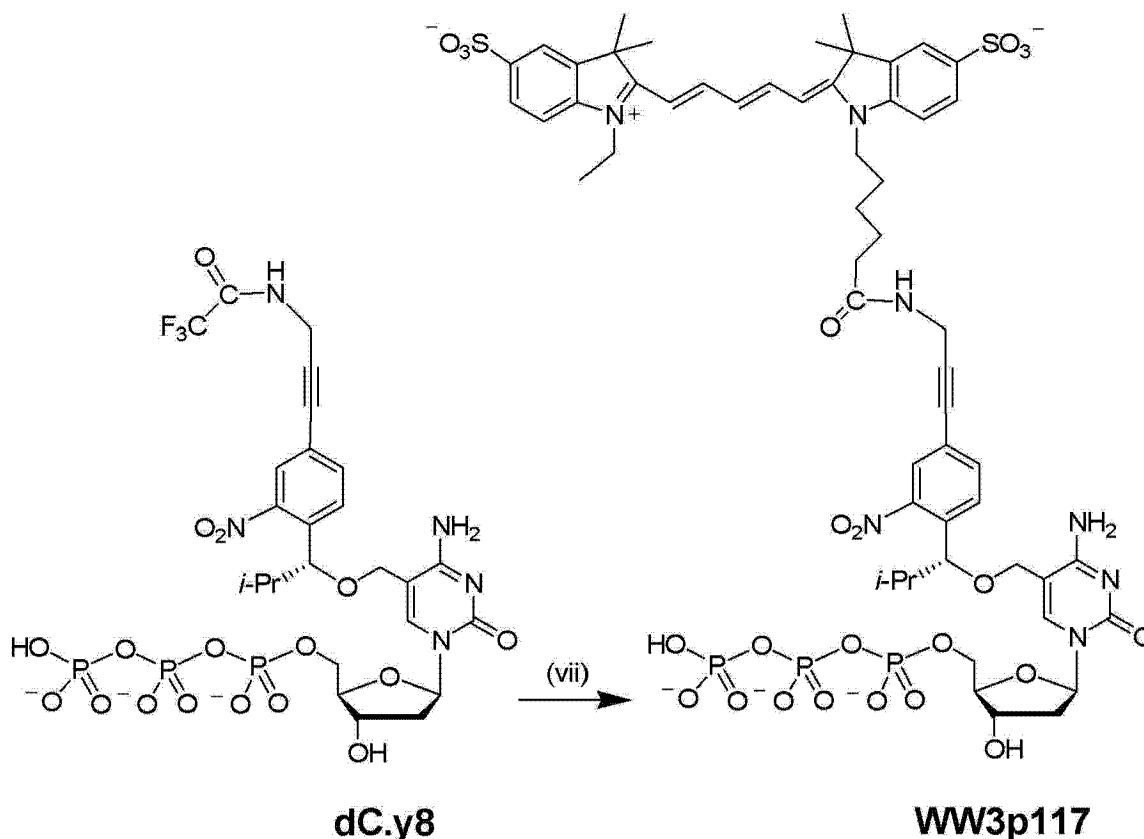
[0380]



[0381] 方案 15. Cy5 标记的 5-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸的合成. (i) (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇, neat 法, 108-112°C, 21%; (ii) TPSCl, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂(无水),

室温 ;(iii)NH₃, 1,4- 二氧六环, 92—94℃, 两步法 :76% ;(iv)n-Bu₄NF, THF, 室温, 80% ;(v) 正丙炔基三氟乙酰胺, Pd(PPh₃)₄(0), CuI, Et₃N, DMF(无水), 99% ;(vi)POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃PO, 0℃ ;(n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF ;1M HNEt₃HCO₃ ;NH₄OH ;

[0382]



[0383] 方案 16. (vii) Cy5mono NHS, 0. 1M Na₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液, pH9. 2。

[0384] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(dU. y4) :在氮气气氛中将化合物dU. x0(775mg, 1. 19mmol)和纯对映体(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-1-丙醇(1. 22g, 3. 80mmol)用neat法在108-112℃下加热45分钟。将所得混合物冷却至室温,溶于尽可能少的乙酸乙酯,并用硅胶层析纯化以产生3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷dU. y4(194mg, 21%)。从反应中还得到了(3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(90mg, 11%)和5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(60mg, 9%)。dU. y4的¹HNMR(400MHz, CDCl₃) : δ 8. 43(s, 1H, 3-NH), 8. 18(d, 1H, J=1. 6Hz, Ph-H), 7. 96(dd, J=8. 3和 1. 6Hz, 1H, Ph-H), 7. 65(s, 1H, H-6), 7. 47(d, 1H, J=8. 3Hz, Ph-H), 6. 29(dd, 1H, J=7. 8和 5. 8Hz, H-1'), 4. 74(d, 1H, J=5. 8Hz, PhCH), 4. 39(m, 1H, H-3'), 4. 14(AB d, J=11. 6Hz, 1H, 5-CH₂a), 3. 98(AB d, J=11. 6Hz, 1H, 5-CH₂b), 3. 97(m, 1H, H-4'), 3. 78(m, 2H, H-5' a和 H-5' b), 2. 31(m, 1H, H-2' a), 1. 99(m, 1H, H-2' b), 1. 91(m, 1H, CH(CH₃)₃), 0. 92(d, J=6. 7Hz, 3H, CH₃), 0. 90(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0. 98(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0. 86(d, J=6. 9Hz, 3H, CH₃), 0. 09(s, 3H, CH₃Si), 0. 08(s, 3H, CH₃Si), 0. 07(s, 3H, CH₃Si), 0. 04(s, 3H, CH₃Si) ;dU. y4的¹³C NMR(100MHz, CDCl₃) : δ 162. 20(C), 149. 83(C),

149.69 (C), 141.89 (CH), 138.68 (CH), 136.56 (C), 132.63 (CH), 130.94 (CH), 111.19 (C), 91.84 (C), 88.00 (CH), 85.41 (CH), 80.99 (CH), 72.40 (CH), 64.46 (CH₂), 63.18 (CH₂), 41.22 (CH₂), 34.74 (CH), 25.93 (C(CH₃)₃), 25.75 (C(CH₃)₃), 19.29 (CH₃), 18.40 (C), 18.00 (C), 17.49 (CH₃), -4.64 (CH₃), -4.81 (CH₃), -5.37 (2CH₃)。

[0385] 3',5-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷(dC.y5):向化合物dU.y4(0.256g,0.32mmol)、DMAP(23mg,0.21mmol)和三乙胺(1.138mL,8.10mmol)的无水二氯甲烷(14mL)溶液中加入2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(1.57g,5.19mmol)。将所得混合物在氮气气氛中室温下搅拌16小时,然后真空浓缩。加入氨(0.5M二氧六环溶液,24mL,12.0mmol),将所得混合物转移至密封管,并在92-94℃下加热4小时。将所得混合物减压浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生3',5-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷dC.y5(192mg,76%)。¹HNMR(400MHz,CDCl₃) δ 8.13(d,1H,J=1.6Hz,Ph-H),7.95(dd,J=8.3和1.6Hz,1H,Ph-H),7.59(s,1H,H-6),7.38(d,1H,J=8.3Hz,Ph-H),6.28(t,1H,J=6.5Hz,H-1'),6.02(br,2H,4-NH₂),4.63(d,1H,J=6.6Hz,PhCH),4.32(m,1H,H-3'),4.19(AB d,J=12.5Hz,1H,5-CH₂a),4.04(AB d,J=12.5Hz,1H,5-CH₂b),3.93(m,1H,H-4'),3.81(AB dd,J=11.3和3.0Hz,1H,H-5'a),3.72(AB dd,J=11.3和2.8Hz,1H,H-5'b),2.43(m,1H,H-2'a),1.92(m,2H,H-2'b和CH(CH₃)₃),0.96(d,J=6.6Hz,3H,CH₃),0.82(d,J=6.9Hz,3H,CH₃),0.89(s,9H,(CH₃)₃CSi),0.80(s,9H,(CH₃)₃CSi),0.06(s,3H,CH₃Si),0.05(s,3H,CH₃Si),-0.02(s,3H,CH₃Si),-0.04(s,3H,CH₃Si);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ 165.02(C),152.93(C),150.09(C),141.92(CH),140.37(CH),135.53(C),132.55(CH),130.35(CH),101.50(C),92.35(C),87.76(CH),86.26(CH),80.33(CH),71.98(CH),66.92(CH₂),62.84(CH₂),42.14(CH₂),34.75(CH),25.89(C(CH₃)₃),25.77(C(CH₃)₃),19.01(CH₃),18.30(C),18.15(CH₃),18.00(C),-4.57(CH₃),-4.87(CH₃),-5.43(CH₃),-5.49(CH₃)。

[0386] 5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷dC.y6:将三水合四正丁基氟化铵(112mg,0.36mmol)的THF(2mL)溶液加入化合物dC.y5(192mg,0.24mmol)的THF(8mL)溶液中。将所得混合物在室温下搅拌45分钟,然后真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生5-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷dC.y6(110mg,80%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 8.26(d,1H,J=1.7Hz,Ph-H),8.07(dd,J=8.3和1.7Hz,1H,Ph-H),7.70(s,1H,H-6),7.38(d,1H,J=8.3Hz,Ph-H),7.32和6.59(2br.s,2H,D₂O可交换,4-NH₂),6.11(dd,1H,J=7.2和6.1Hz,H-1'),5.19(d,J=4.2Hz,1H,D₂O可交换,3'-OH),4.88(t,J=5.4Hz,1H,D₂O可交换,5'-OH),4.58(d,1H,J=6.0Hz,PhCH),4.19(m,1H,H-3'),4.07(AB d,J=12.2Hz,1H,5-CH₂a),4.02(AB d,J=12.2Hz,1H,5-CH₂b),3.75(m,1H,H-4'),3.51(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.09(m,1H,H-2'a),1.90(m,2H,H-2'b和CH(CH₃)₃),0.87(d,J=6.7Hz,3H,CH₃),0.78(d,J=6.8Hz,3H,CH₃);¹³CNMR(100MHz,CD₃OD): δ 166.48(C),158.09(C),151.27(C),143.22(CH),142.77(CH),137.32(C),133.80(CH),132.20(CH),104.72(C),93.10(C),89.08(CH),87.73(CH),81.82(CH),72.05(CH),67.22(CH₂),62.82(CH₂),42.21(CH₂),36.20(CH),19.62(CH₃),18.41(CH₃)。

[0387] 5-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧

基} 甲基-2'-脱氧胞苷 (dC. y7) :将化合物 dC. y6 (110mg, 0.20mmol)、N- 炔丙基三氟乙酰胺 (88mg, 0.59mmol)、四(三苯基膦) 钯 (0) (23mg, 0.02mmol)、CuI (7mg, 0.04mmol) 和 Et₃N (0.11mL, 0.78mmol) 的无水 DMF (4mL) 溶液在室温下搅拌 4.5 小时。加入甲醇 (4mL) 和二氯甲烷 (4mL), 然后加入碳酸氢钠 (90mg, 1.07mmol)。将所得混合物再搅拌 1 小时, 然后真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生 5-{(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷 dC. y7 (112mg, 99%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ 10.12 (br t, 1H, 可交换 D₂O, CH₂NHTFA), 7.98 (d, 1H, J=1.6Hz, Ph-H), 7.76 (dd, J=8.2 和 1.7Hz, 1H, Ph-H), 7.73 (s, 1H, H-6), 7.62 (d, 1H, J=8.2Hz, Ph-H), 7.33 和 6.60 (2br. s, 2H, 可交换 D₂O, 4-NH₂), 6.11 (t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 5.19 (d, J=4.2Hz, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 4.89 (t, J=5.4Hz, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.64 (d, 1H, J=5.9Hz, PhCH), 4.31 (d, 2H, J=5.2Hz, CH₂NHTFA), 4.19 (m, 1H, H-3'), 4.09 (AB d, J=12.1Hz, 1H, 5-CH₂a), 4.03 (AB d, J=12.1Hz, 1H, 5-CH₂b), 3.75 (m, 1H, H-4'), 3.52 (m, 2H, H-5'a 和 H-5'b), 2.08 (m, 1H, H-2'a), 1.91 (m, 2H, H-2'b 和 CH(CH₃)₃), 0.87 (d, J=6.7Hz, 3H, CH₃), 0.79 (d, J=6.8Hz, 3H, CH₃) : ¹³CNMR (100MHz, CD₃OD) : δ 164.83 (C), 157.51 (C), 157.14 (C), 156.45 (C), 149.25 (C), 141.23 (CH), 136.46 (C), 135.39 (CH), 129.39 (C), 126.64 (CH), 122.98 (C), 117.43 (C), 114.58 (C), 87.54 (CH), 86.22 (CH), 86.02 (C), 80.34 (C), 80.27 (CH), 70.53 (CH), 65.75 (CH₂), 61.28 (CH₂), 40.60 (CH₂), 34.73 (CH), 29.16 (CH₂), 18.15 (CH₃), 16.96 (CH₃)。HRMS :对 C₂₅H₂₉F₃N₅O₈ [MH⁺] :计算值 584.1968 实测值 584.1926。

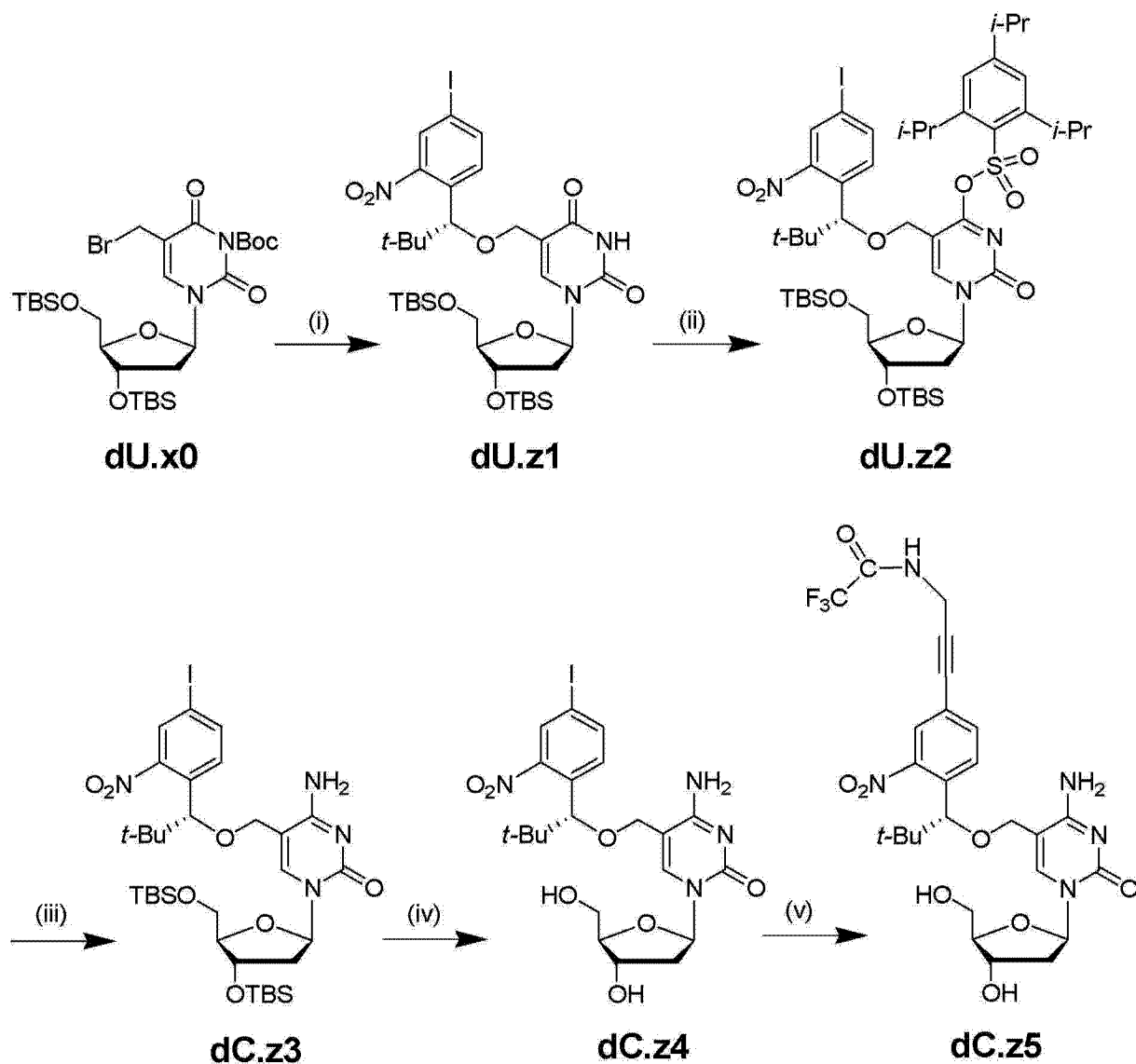
[0388] 5-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 (dC. y8) :0 °C 下将 POCl₃ (6 μ L, 0.06mmol) 加入化合物 dC. y7 (19mg, 0.03mmol) 和质子海绵 (14mg, 0.06mmol) 的三甲基磷酸 (0.3mL) 溶液中, 搅拌 2 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (76mg, 0.16mmol) 和三正丁胺 (32 μ L) 的无水 DMF (0.32mL) 溶液。搅拌 5 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5 ;5mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 并在 25 °C 真空浓缩。所得残留物溶于水 (2mL), 过滤, 并通过反相 HPLC 用 Perkin Elmer OD-300C₁₈ 柱 (4.6 × 250mm) 纯化, 以产生 5-{(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸。流动相 :A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水 (pH7.0) ;B, 100mM TEAA 溶于水 / CH₃CN (30 :70)。随后用浓氨水 (27%) 在室温下处理纯化的三磷酸酯 2 小时以产生 5-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 dC. y8。

[0389] Cy5 标记的 5-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 (WW3p117) :将 Cy5mono NHS (1mg, 1.26 μ mol) 的无水 DMSO (40 μ L) 溶液加入三磷酸 dC. y8 (0.31 μ mol) 的 Na₂CO₃ / NaHCO₃ 缓冲液 (0.1M, pH9.2 ;100 μ L) 中, 留置于室温 1 小时。将反应物通过反相 HPLC 用 Perkin Elmer OD-300C₁₈ 柱 (4.6 × 250mm) 纯化, 以产生 Cy5 标记的三磷酸 ww3p117。流动相 :A, 100mM TEAA 溶于水 (pH7.0) ;B, 100mM TEAA 溶于水 / CH₃CN (30 :70)。

[0390] 实施例 6- 带有 α-叔丁基的附着有染料的脱氧尿苷和脱氧胞苷类似物的合成

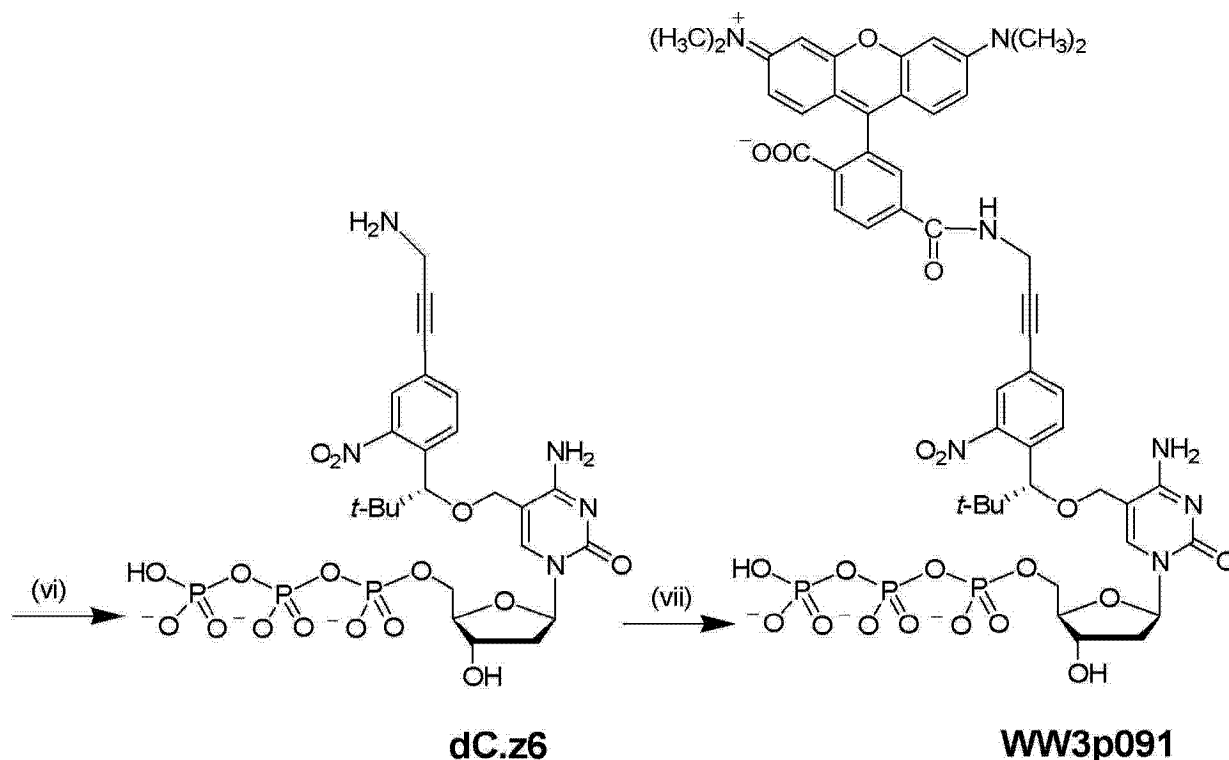
[0391] 6-TAMRA 标记 5-{(R 或 S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2, 2-二甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸的合成

[0392]



[0393] 方案 17.6-TAMRA 标记的 5-[(R 或 S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸的合成。(i) 纯对映体 (R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇, neat 法, 108-115°C, 28%; (ii) TPSCl, DMAP, CH_2Cl_2 (无水), 室温, 54%; (iii) NH_3 , 1,4-二氧六环, 96°C, 65%; (iv) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, 室温, 73%; (v) N-炔丙基三氟乙酰胺, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4(0)$, CuI , Et_3N , DMF (无水), 85%;

[0394]



[0395] 方案 18. (vi) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C ; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$; NH_4OH ; (vii) 6-TAMRA—SE, $0.1\text{MNa}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ 缓冲液, pH9.2。

[0396] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[R或S]-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(dU.z1):在氮气气氛中将化合物dU.x0(688mg,1.06mmol)和纯对映体(R或S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(889mg,2.65mmol)的溶液用neat法在 $108\text{--}115^\circ\text{C}$ 下加热1小时。将所得混合物冷却至室温,溶于尽可能少的乙酸乙酯,并用硅胶层析纯化以产生3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[R或S]-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]-基-2'-脱氧尿苷dU.z1(236mg,28%)。从反应中还得到了(3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[R或S]-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(20mg,3%)和5-[R或S]-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(49mg,8%)。dU.z1的 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.86(s, 1H, 3-NH), 8.08(d, 1H, $J=1.8\text{Hz}$, Ph-H), 7.94(dd, $J=8.4$ 和 1.7Hz , 1H, Ph-H), 7.68(s, 1H, H-6), 7.47(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, Ph-H), 6.29(dd, 1H, $J=7.8$ 和 5.8Hz , H-1'), 4.91(s, 1H, PhCH), 4.39(m, 1H, H-3'), 4.23(AB d, $J=11.8\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2a), 4.01(AB d, $J=11.8\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2b), 3.98(m, 1H, H-4'), 3.78(m, 2H, H-5'a和H-5'b), 2.31(m, 1H, H-2'a), 1.99(m, 1H, H-2'b), 1.91(m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_3$), 0.90(s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.89(s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.82(s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CC}$), 0.09(2s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0.08(s, 3H, CH_3Si), 0.06(s, 3H, CH_3Si); dU.z1的 ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3): δ 162.41(C), 150.98(C), 150.00(C), 141.60(CH), 138.58(CH), 133.83(C), 132.26(CH), 131.89(CH), 111.16(C), 92.05(C), 88.03(CH), 85.49(CH), 81.62(CH), 72.46(CH), 64.64(CH_2), 63.22(CH_2), 41.22(CH_2), 36.55(C), 25.92($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.75($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.70($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.38(C), 18.00(C), -4.64(CH_3Si), -4.81(CH_3Si), -5.39($2(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)。

[0397] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷(dU.z2):将2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(1.57g,5.19mmol)加入化合物dU.z1(0.236g,0.29mmol)、DMAP(38mg,0.32mmol)和三乙胺(0.465mL,3.31mmol)的无水二氯甲烷(10mL)溶液中。将所得混合物在氮气气氛中室温搅拌24小时,然后真空浓缩并用硅胶层析纯化,以产生3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧尿苷dU.z2(169mg,54%)。¹H NMR(500MHz,CDCl₃): δ 8.18(s,1H,H-6),8.10(d,J=1.8Hz,1H,Ph-H),7.98(dd,J=8.3和1.8Hz,1H,Ph-H),7.63(d,J=8.3Hz,1H,Ph-H),7.20(s,2H,OSO₂Ph-H),6.10(t,J=6.3Hz,1H,H-1'),4.91(s,1H,PhCH(t-Bu)O),4.30(m,1H,H-3'),4.23(m,3H,5-CH₂a和OSO₂Ph(o-CH(CH₃)₂)₂),4.01(m,2H,H-4'和5-CH₂b),3.85(AB dd,J=11.4和3.3Hz,1H,H-5'a),3.74(AB dd,J=11.4和2.8Hz,1H,H-5'b),2.90(sep,J=6.9Hz,1H,OSO₂Ph(p-CH(CH₃)₂)),2.53(m,1H,H-2'a),1.94(m,1H,H-2'b),1.29(d,J=6.9Hz,6H,OSO₂Ph(p-CH(CH₃)₂)),1.26(d,J=7.2Hz,12H,OSO₂Ph(o-CH(CH₃)₂)₂),0.87(s,18H,(CH₃)₃CSi),0.85(s,9H,(CH₃)₃CC),0.06和0.05(2s,12H,2(CH₃)₂Si);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ 166.01(C),154.43(C),153.54(C),151.21(C),151.08(C),145.07(CH),141.49(CH),133.16(C),132.32(CH),131.76(CH),131.15(C),124.08(CH),104.64(C),92.25(C),88.60(CH),87.83(CH),82.48(CH),71.83(CH),64.33(CH₂),62.75(CH₂),42.31(CH₂),36.51(C),34.26(CH),29.68(CH),25.91(C(CH₃)₃),25.73(C(CH₃)₃),24.51(C(CH₃)₃),23.52(CH₃),23.45(CH₃),18.37(C),17.98(C),-4.57(CH₃),-4.91(CH₃),-5.34(CH₃),-5.39(CH₃)。

[0398] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷(dC.z3):将氨(0.5M溶于二氧六环,4mL,2.0mmol)加入化合物dU.z2(169mg,0.158mmol)中,将所得混合物转移至密封管内,在96°C下加热16小时。冷却至室温后,将所得混合物减压浓缩并用硅胶柱层析纯化,以提供3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-[(R或S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷dC.z3(83mg,65%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ 8.04(d,1H,J=1.6Hz,Ph-H),7.92(dd,J=8.3和1.6Hz,1H,Ph-H),7.66(s,1H,H-6),7.42(d,1H,J=8.3Hz,Ph-H),6.29(t,1H,J=6.7Hz,H-1'),4.81(s,1H,PhCH),4.32(m,1H,H-3'),4.28(AB d,J=12.9Hz,1H,5-CH₂a),4.04(AB d,J=12.9Hz,1H,5-CH₂b),3.96(m,1H,H-4'),3.79(AB dd,J=11.2和3.2Hz,1H,H-5'a),3.72(AB dd,J=11.2和2.8Hz,1H,H-5'b),2.42(m,1H,H-2'a),1.90(m,1H,H-2'b),0.88(s,9H,(CH₃)₃CSi),0.81(s,9H,(CH₃)₃CSi),0.80(s,9H,(CH₃)₃CC),0.07(s,3H,CH₃Si),0.06(s,3H,CH₃Si),-0.05(s,6H,(CH₃)₂Si);¹³C NMR(100MHz,CDCl₃): δ 165.23(C),155.63(C),151.24(C),141.01(CH),140.65(CH),133.29(C),132.26(CH),131.35(CH),101.59(C),92.38(C),87.80(CH),86.29(CH),81.00(CH),72.17(CH),66.80(CH₂),62.92(CH₂),42.10(CH₂),36.27(C),25.82(C(CH₃)₃),25.80(C(CH₃)₃),25.77(C(CH₃)₃),18.27(C),17.99(C),-4.58(CH₃),-4.85(CH₃),-5.47(CH₃),-5.53(CH₃)。

[0399] 5-[(R或S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧

胞苷 (dC. z4) :将三水合四正丁基氟化铵 (81mg, 0.26mmol) 的 THF(2mL) 溶液加入化合物 dC. z3(82mg, 0.10mmol) 的 THF(3mL) 溶液中。将所得混合物在室温搅拌 1 小时, 然后真空浓缩并用硅胶层析纯化以产生 5-[(R 或 S)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧胞苷 dC. z4(43mg, 73%)。¹HNMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 8.23(d, 1H, J=1.6Hz, Ph-H), 8.06(dd, J=8.4 和 1.6Hz, 1H, Ph-H), 7.73(s, 1H, H-6), 7.38(d, 1H, J=8.4Hz, Ph-H), 7.37 和 6.64(2br. s, 2H, 可交换 D₂O, 4-NH₂), 6.10(t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 5.20(d, J=4.0Hz, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 4.88(t, J=5.2Hz, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.76(s, 1H, PhCH), 4.19(m, 1H, H-3'), 4.10(s, 1H, 5-CH₂a 和 5-CH₂b), 3.75(m, 1H, H-4'), 3.51(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.08(m, 1H, H-2' a), 1.93(m, 1H, H-2' b), 0.76(s, 9H, (CH₃)₃C)。

[0400] 5-[(R 或 S)-1-(4-{3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基}-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧胞苷 (dC. z5) :将化合物 dC. z4(40mg, 0.069mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺 (32mg, 0.208mmol)、CuI(3mg, 0.014mmol)、Et₃N(0.01mL, 0.138mmol) 和四(三苯基膦)-钯(0)(8mg, 0.007mmol) 的无水 DMF(3mL) 溶液在室温下搅拌 4.5 小时。加入甲醇(3mL) 和二氯甲烷(3mL), 然后加入碳酸氢钠(32mg, 0.380mmol)。搅拌所得混合物 15 分钟, 然后真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生 5-[(R 或 S)-1-(4-{3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基}-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧胞苷 dC. z5(35mg, 85%)。¹HNMR(400MHz, DMSO-d₆) : δ 10.13(br t, 1H, 可交换 D₂O, NHTFA), 7.94(d, 1H, J=1.6Hz, Ph-H), 7.75(m, 2H, Ph-H 和 H-6), 7.63(d, 1H, J=8.2Hz, Ph-H), 7.34 和 6.66(2br. s, 2H, 可交换 D₂O, 4-NH₂), 6.10(t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 5.20(d, J=4.2Hz, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 4.89(t, J=5.4Hz, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.82(s, 1H, PhCH), 4.31(d, 2H, J=5.4Hz, CH₂NHTFA), 4.19(m, 1H, H-3'), 4.14(AB d, J=12.5Hz, 1H, 5-CH₂a), 4.10(AB d, J=12.5Hz, 1H, 5-CH₂b), 3.75(m, 1H, H-4'), 3.51(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.08(m, 1H, H-2' a), 1.93(m, 1H, H-2' b), 0.76(s, 9H, (CH₃)₃C) ; ¹³CNMR(100MHz, CD₃OD) : δ 164.83(C), 151.51(C), 157.14(C), 156.45(C), 150.34(C), 141.65(CH), 134.48(CH), 133.91(C), 130.26(CH), 126.50(CH), 123.01(C), 87.55(CH), 86.28(CH), 86.08(C), 80.77(CH), 80.17(C), 70.623(CH), 65.74(CH₂), 61.33(CH₂), 40.51(CH₂), 36.19(C), 29.09(CH₂), 24.83((CH₃)₃C)。

[0401] 5-[(R 或 S)-1-(4-{3-氨基-1-丙炔基}-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基] 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 (dC. z6) :0°C 下将 POCl₃(2.5 μL, 0.027mmol) 加入化合物 dC. z5(11mg, 0.018mmol) 和质子海绵(8mg, 0.036mmol) 的三甲基磷酸(0.3mL) 溶液中, 搅拌 2 小时。以 1 小时间隔再加入 POCl₃ 两次(2.5 μL, 0.027mmol)。加入双-三正丁基焦磷酸铵(43mg, 0.09mmol) 和三正丁胺(20 μL) 的无水 DMF(0.2mL)。搅拌 5 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M, pH7.5; 5mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后在 25°C 真空浓缩。将所得残留物溶于水(5mL), 过滤, 将部分混合物通过反相 HPLC 用 Perkin Elmer OD-300C₁₈ 柱(4.6×250mm) 纯化, 以产生 5-{(R 或 S)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸。流动相 :A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水 (pH7.0) ;B, 100mM TEAA 溶于水 / CH₃CN(30 :70)。然后用浓氨水 (27%) 在室温下处理纯化的三磷酸酯 2 小时, 以产生 5-{(R 或 S)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2,2-二甲基-丙氧基} 甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 dC. z6。¹HNMR(400MHz, CD₃OD) δ 8.01(s, 1H, H-6), 7.84(d, 1H, J=8.0Hz, Ph-H), 7.67(d, 1H, J=8.0Hz,

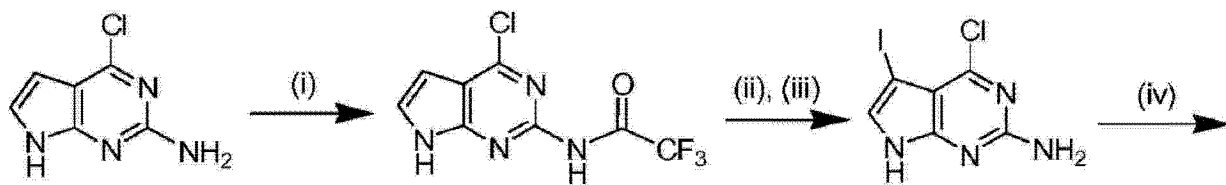
Ph-H), 7.51 (m, 1H, Ph-H), 6.11 (t, 1H, J=6.4Hz, H-1'), 4.54 (AB d, 1H, J=13.6Hz, 5-CH₂a), 4.49 (m, 1H, H-3'), 4.35 (d, 1H, J=13.6Hz, 5-CH₂b), 4.15—3.81 (m, 4H, H-4', H-5' 和 CH₂), 2.31 (m, 1H, H-2' a), 2.12 (m, 1H, H-2' b), 0.81 (s, 9H, (CH₃)₃C); 非对映体的 ³¹P NMR (162MHz, D₂O): δ -5.20 (d, J=19.4Hz), -10.77 (d, J=19.4Hz), -20.96 (t, J=19.4Hz)。

[0402] 6-TAMRA 标记的 5-[(R 或 S)-1-(4-{3-氨基-1-丙炔基}-2-硝基苯基)-2,2-二甲基-丙氧基]甲基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸 (WW3p091): 将 Cy5monoNHS (0.65mg, 1.23 μmol) 的无水 DMSO (26 μL) 溶液加入三磷酸 dC.z6 (0.386 μmol) 的 Na₂CO₃ / NaHCO₃ 缓冲液 (0.1M, pH9.2; 200 μL) 中, 留置于室温 1 小时。将反应物通过反相 HPLC 用 Perkin Elmer OD-300C₁₈ 柱 (4.6×250mm) 纯化以产生 6-TAMRA 标记的三磷酸 WW3p091。流动相: A, 100mM TEAA 溶于水 (pH7.0); B, 100mM TEAA 溶于水 / CH₃CN (30:70)。

[0403] 实施例 7—7-脱氮鸟苷类似物的合成

[0404] 7-(2-硝基苯氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸的合成

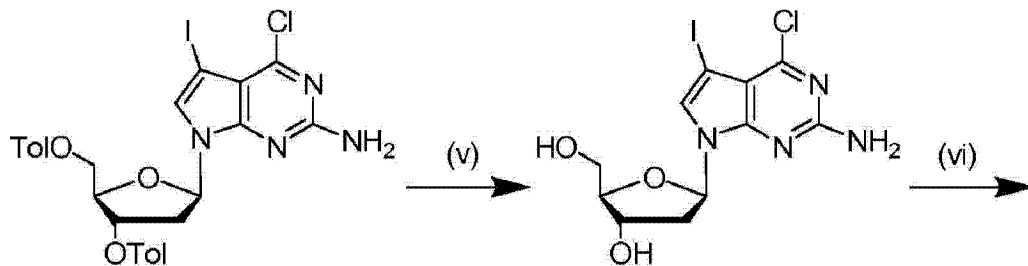
[0405]



2-氨基-6-氯-
7-脱氮嘌呤

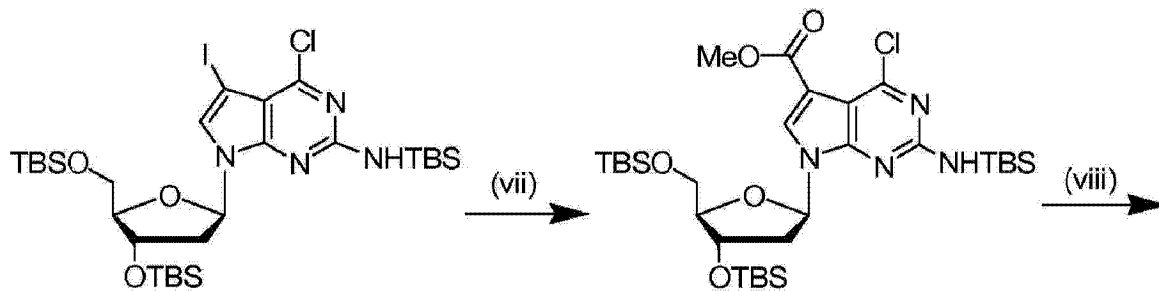
dG.22

dG.23



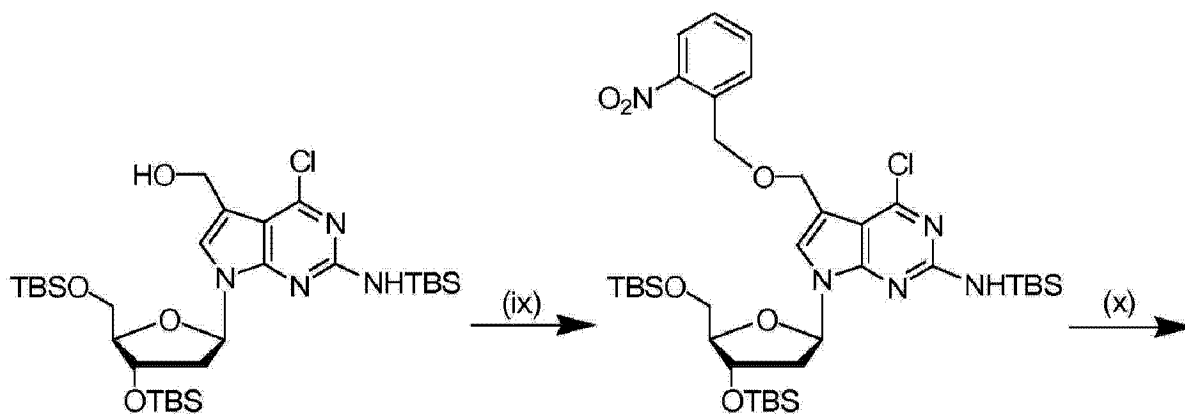
dG.24

dG.25



dG.26

dG.27

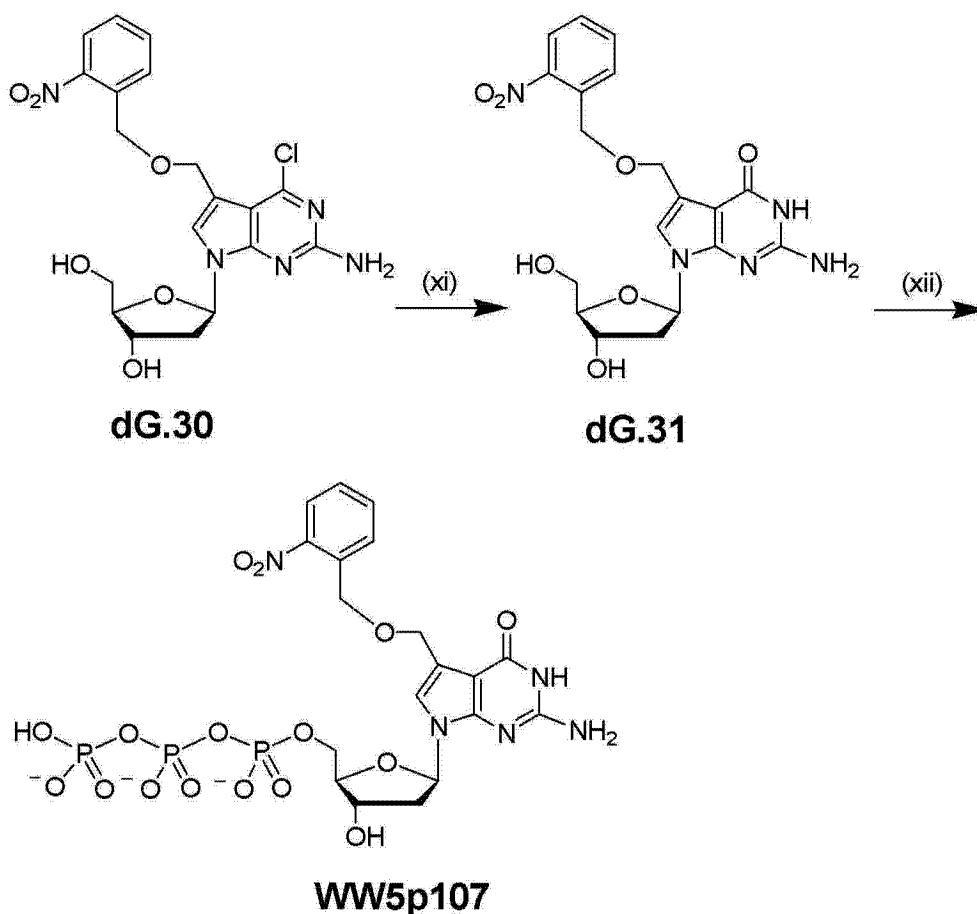


dG.28

dG.29

[0406] 方案 19.7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸的合成。
(i) TFAA, 吡啶 (无水), 室温, 91%; (ii) NIS, CH_2Cl_2 (无水), 室温; (iii) NH_3 , MeOH, 室温, 59%; (iv) 2-脱氧-3,5-O-二(对甲苯酰)- α -D-呋喃核糖基氯, TDA-1, KOH, MeCN (无水), 室温, 80%; (v) NH_3 , MeOH, 室温, 80%; (vi) TBSCl, 咪唑, DMF (无水), 室温, 56%; (vii) CO , $\text{PdCl}_2[\text{PhCN}]_2$, MeOH / 1,4-二氧六环, 50°C, 90%; (viii) LiBH_4 , MeOH, THF, 回流, 68%;

(ix) 2-硝基苄基溴, $n\text{-Bu}_4\text{NBr}$, CH_2Cl_2 / aq. NaOH , 室温, 48% ; (x) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, 95% ;
[0407]



[0408] 方案 20. (xi) DABCO , H_3O , 回流, 30% ; (xii) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C ;
 $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF ; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

[0409] 6-氯-2-(三氟乙酰基)氨基-7-脱氮嘌呤 (dG. 22) : 依据 Seela 和 Peng (2006, 通过引用并入本文) 所述程序合成化合物 dG. 22。向 2-氨基-6-氯-7-脱氮嘌呤 (2.00g, 11.86mmol) 的无水吡啶 (15mL) 溶液中加入 15 分钟加入三氟醋酸酐 (2.18mL, 15.54mmol)。将所得溶液在室温下搅拌 3 小时, 真空浓缩并与水 (2mL) 共蒸发两次。然后将所得物质过滤, 用冷水清洗, 真空下经由 KOH 干燥以产生琥珀色固体状 6-氯-2-(三氟乙酰基)氨基-7-脱氮嘌呤 dG. 22 (2.86g, 91%)。

[0410] 2-氨基-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 (dG. 23) : 依据 Seela 和 Peng (2006, 通过引用并入本文) 所述程序合成化合物 dG. 23。向化合物 dG. 22 (2.86g, 10.81mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (51mL) 悬液中加入 N -碘代琥珀酰亚胺 (2.68g, 11.89mmol)。将所得混合物在室温下避光搅拌 2 小时。然后将反应物用 322mL CH_2Cl_2 稀释并过滤; 然后将沉淀溶于 7N NH_3 的甲醇溶液 (41mL), 在室温下搅拌 3 小时。过滤所得固体, 真空干燥以产生琥珀色固体状 2-氨基-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 dG. 23 (1.86g, 59%)。

[0411] 2-氨基-6-氯-9-[β -D-3',5'-O-二(对甲苯酰)-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-碘代-7-脱氮嘌呤 (dG. 24) : 向 KOH (1.38g, 22.16mmol) 和三(3,6-氧杂庚基)胺 (0.26mL, 0.80mmol) 的无水乙腈 (76mL) 溶液中加入化合物 dG. 23 (1.86g, 6.33mmol)。所得混合物搅拌 5 分钟后, 用 15 分钟加入 2-脱氧-3,5-O-二(对甲苯酰)-(α -D-核呋喃糖基氯 (3.20g,

8.23mmol)。将反应物在室温下搅拌 30 分钟后过滤,所得沉淀物用乙腈 (75mL) 清洗。将合并的过滤液真空浓缩,并用硅胶层析纯化以产生白色泡沫状 2-氨基-6-氯-9-[β-D-3',5'-O-二(对甲苯酰)-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-碘代-7-脱氮嘌呤 dG. 24(3.29g,80%)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.05(m, 4H, Ph-H), 7.39(s, 1H, H-8), 7.37(m, 4H, Ph-H), 6.66(dd, 1H, J=8.0 和 6.0Hz, H-1'), 5.83(m, 1H, H-3'), 5.24(bs, 2H, 2-NH₂), 4.85(dd, 1H, H-5' a), 4.74(dd, 1H, H-5' b), 4.68(m, 1H, H-4'), 2.88(m, 1H, H-2' a), 2.76(m, 1H, H-2' b), 2.54(s, 3H, Ph-CH₃), 2.53(s, 3H, Ph-CH₃)。

[0412] 2-氨基-6-氯-9-(3-D-2'-脱氧呋喃核糖基)-7-碘代-7-脱氮嘌呤 (dG. 25):将化合物 dG. 24(3.29g, 5.09mmol) 溶于 7N NH₃ 的甲醇溶液 (153mL) 中,在室温下搅拌 32 小时。将所得混合物真空浓缩,并用硅胶层析纯化以产生白色泡沫状 2-氨基-6-氯-9-(β-D-2'-脱氧呋喃核糖基)-7-碘代-7-脱氮嘌呤 dG. 25(1.66g,80% yield)。¹HNMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 7.60(s, 1H, H-8), 6.87(bs, 2H, 2-NH₂), 6.40(dd, 1H, J=8.0 和 6.0Hz, H-1'), 5.25(d, 1H, 3'-OH), 4.93(t, 1H, 5'-OH), 4.30(m, 1H, H-3'), 3.78(m, 1H, H-4'), 3.51(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.40(m, 1H, H-2' a), 2.13(m, 1H, H-2' b)。

[0413] 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 (dG. 26):从无水吡啶中蒸发出化合物 dG. 25(0.29g, 0.70mmol) 三次(每次 3mL),然后溶于无水 DMF(5mL)。加入叔丁基二甲基甲硅烷基氯 (1.27g, 8.43mmol) 和咪唑 (1.15g, 16.86mmol),将所得混合物在 40℃ 下搅拌 42 小时(每六小时另加叔丁基二甲基甲硅烷基氯 (0.64g, 4.22mmol) 和咪唑 (0.57g, 8.43mmol))。将反应物真空浓缩并用硅胶层析纯化,以产生白色泡沫状 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 dG. 26(0.30g, 56% 产率)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.35(s, 1H, H-8), 6.53(t, 1H, J=6.0Hz, H-1'), 4.70(s, 1H, 2-NH), 4.47(m, 1H, H-3'), 3.97(m, 1H, H-4'), 3.78(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.23(m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.98(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.95(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.90(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.29(2s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.13(2s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.09(s, 6H, (CH₃)₂Si)。

[0414] 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基-二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-甲氧羰基-7-脱氮嘌呤 (dG. 27):将 dG. 26(105mg, 0.139mmol) 溶液溶于无水 1,4-二氧六环 (6mL)。加入无水甲醇 (6mL) 和三乙胺 (0.04mL),将所得混合物在一氧化碳气氛下搅拌 10 分钟,然后加入二(苄腈)二氯钼(II)。将反应物在一氧化碳气氛下 50℃ 搅拌 48 小时,然后真空浓缩。将所得残留物用硅胶层析纯化以产生粘稠油状 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-甲氧羰基-7-脱氮嘌呤 dG. 27(112mg, 90%)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.92(s, 1H, H-8), 6.57(dd, 1H, J=8.0 和 6.0Hz, H-1'), 4.78(s, 1H, 2-NH), 4.49(m, 1H, H-3'), 4.02(m, 1H, H-4'), 3.85(s, 3H, CH₃), 3.81(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.25(m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.98(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.93(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.92(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.31(s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.13(2s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.11(s, 6H, (CH₃)₂Si); ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): δ 163.04(C), 160.06(C), 154.46(C), 153.04(C), 129.81(CH), 107.79(C), 107.51(C), 87.86(CH), 84.05(CH), 72.73(CH), 63.21(CH₂),

51.26 (CH₃), 42.21 (CH₂), 26.48 (CH₃), 25.96 (CH₃), 25.72 (CH₃), 18.42 (C), 18.03 (C), 17.59 (C), -4.73 (CH₃), -4.80 (CH₃), -5.49 (CH₃), -5.57 (CH₃)。

[0415] 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-羟基甲基-7-脱氮嘌呤(dG.28):向 dG.27(52mg, 0.076mmol) 的无水 THF(3mL) 溶液中加入硼氢化锂(0.007g, 0.305mmol), 然后加入甲醇(0.05mL)。将反应混合物加热回流 1 小时。冷却后, 将反应混合物用二氯甲烷(100mL) 稀释, 以水(10mL) 猝灭; 分离有机层, 用卤水洗两遍(每次 10mL), 经由无水硫酸钠干燥, 并真空浓缩。将所得残留物用硅胶层析纯化以产生粘稠油状 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-羟基甲基-7-脱氮嘌呤 dG.28(0.12g, 45%)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.16(s, 1H, H-8), 6.56(t, 1H, J=6.4Hz, H-1'), 4.79(AB d, J=13.6Hz, 7-CH₂a), 4.75(AB d, J=13.6Hz, 7-CH₂b), 4.70(s, 1H, 2-NH), 4.50(m, 1H, H-3'), 3.96(m, 1H, H-4'), 3.76(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.23(m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.98(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.94(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.92(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.30(s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.29(s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.11(s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.10(s, 6H, (CH₃)₂Si); ¹³CNMR(100MHz, CDCl₃): δ 160.07(C), 154.29(C), 151.23(C), 120.92(CH), 115.65(C), 108.44(C), 87.26(CH), 83.21(CH), 72.50(CH), 63.28(CH₂), 57.15(CH₂), 42.33(CH₂), 26.55(CH₃), 25.97(CH₃), 25.73(CH₃), 18.42(C), 17.93(C), 17.61(C), -4.71(CH₃), -4.75(CH₃), -5.34(CH₃), -5.47(CH₃)。

[0416] 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤(dG.29):向化合物 dG.28(150mg, 0.23mmol) 的 CH₂Cl₂(3mL) 溶液中加入 n-Bu₄NBr(37mg, 0.12mmol)、2-硝基苄基溴(148mg, 0.68mmol) 和 1M NaOH 溶液(3mL)。将反应混合物在暗处室温下剧烈搅拌两天。分离有机层, 经由 Na₂SO₄ 干燥, 真空浓缩, 并用硅胶层析纯化以产生粘稠油状 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤 dG.29(87mg, 48%)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.06(dd, 1H, J=8.0 和 1.2Hz, Ph-H), 7.87(d, 1H, J=7.2Hz, Ph-H), 7.61(dt, 1H, J=7.6 和 1.2Hz, Ph-H), 7.43(m, 1H, Ph-H), 7.20(s, 1H, H-8), 6.56(dd, 1H, J=7.6 和 6.0Hz, H-1'), 4.99(s, 2H, PhCH₂), 4.83(AB d, 1H, J=11.4Hz, 7-CH₂a), 4.75(AB d, 1H, J=11.4Hz, 7-CH₂b), 4.67(s, 1H, 2-NH), 4.50(m, 1H, H-3'), 3.96(m, 1H, H-4'), 3.77(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.25(m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.98(s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.92(s, 18H, (CH₃)₃CSi), 0.30(s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.29(s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.09(m, 12H, (CH₃)₂Si); ¹³CNMR(100MHz, CDCl₃): δ 159.94(C), 154.18(C), 151.78(C), 147.16(C), 135.23(C), 133.6(CH), 129.0(CH), 127.75(CH), 124.49(CH), 121.85(CH), 112.17(C), 108.74(C), 87.24(CH), 83.22(CH), 72.50(CH), 68.48(CH₂), 65.04(CH₂), 63.27(CH₂), 41.31(CH₂), 26.52(CH₃), 25.93(CH₃), 25.7(CH₃), 18.36(C), 17.89(C), 17.56(C), -4.75(CH₃), -4.81(CH₃), -5.39(CH₃), -5.52(CH₃)。

[0417] 2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤(dG030):在 0°C 下将 n-Bu₄NF(123mg, 0.39mmol) 的 THF(2mL) 溶液逐滴加入化合物 dG.29(105mg, 0.13mmol) 的 THF(3mL) 溶液中。将反应混合物在 0°C 下搅拌 1 小时, 然

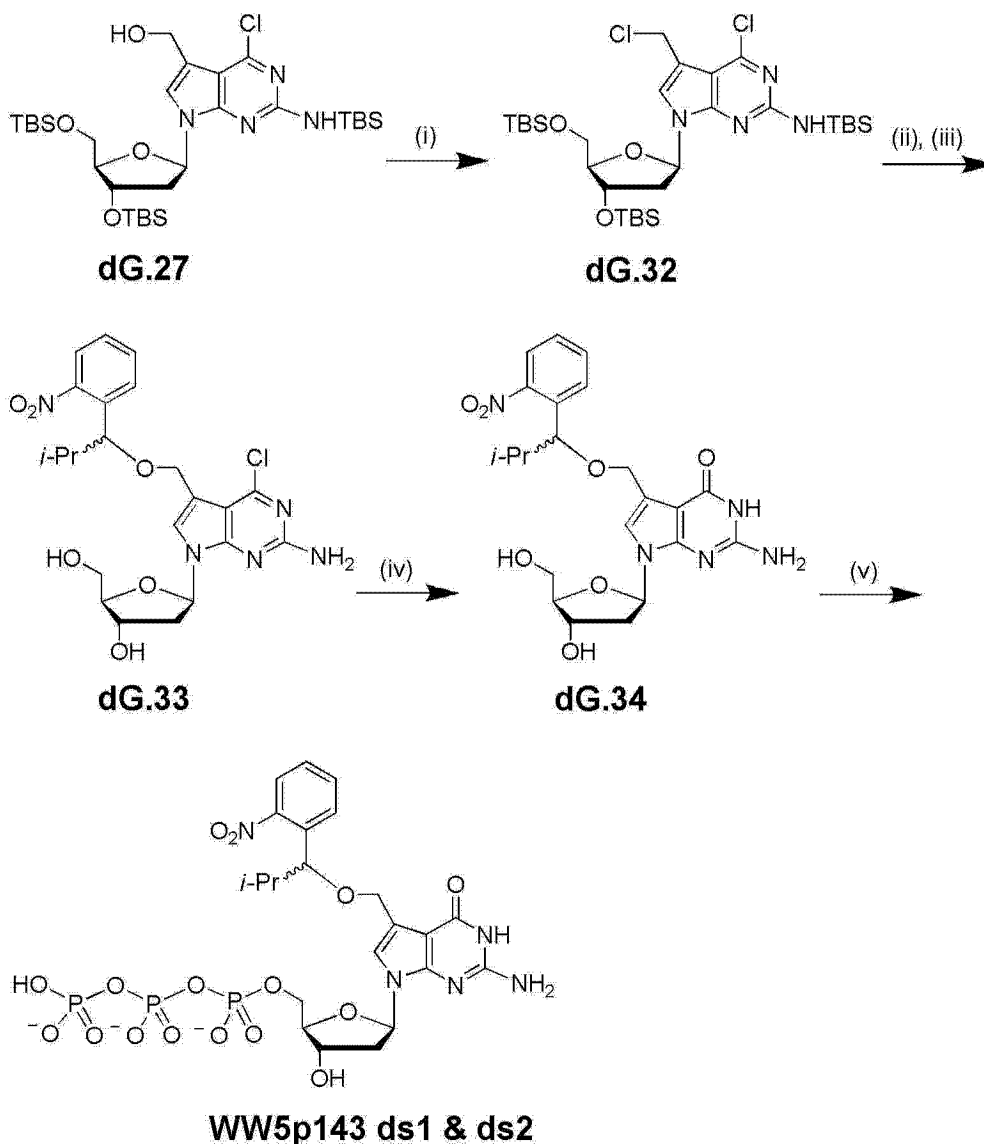
后在室温下搅拌 2 小时。将所得反应物真空浓缩并用硅胶层析纯化以产生黄色泡沫状 2-氨基-6-氯-9-[β -D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤 dG. 30 (57mg, 95%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , 8.02 (m, 1H, Ph-H), 7.74 (m, 2H, Ph-H), 7.55 (m, 1H, Ph-H), 7.41 (s, 1H, H-8), 6.73 (s, 2H, 可交换 D₂O, NH₂), 6.41 (dd, 1H, J=8.4 和 6.0Hz, H-1'), 5.26 (d, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 4.91 (t, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.88 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.66 (dd, 2H, J=11.6Hz, 7-CH₂), 4.31 (m, 1H, H-3'), 3.78 (m, 1H, H-4'), 3.50 (m, 2H, H-5'), 2.38 (m, 1H, H-2' a), 2.15 (m, 1H, H-2' b)。

[0418] 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷 (dG. 31): 在氮气气氛中将 dG. 29 (38mg, 0.084mmol) 和 1,4-二氮杂双环 [2.2.2] 辛烷 (11mg, 0.1mmol) 的水 (4mL) 混合物加热回流 4 小时。真空除去水, 将所得残留物从甲醇中蒸发 3 次 (每次 3mL), 并用硅胶层析纯化以产生 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷 dG. 31 (11mg, 30%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 10.4 (s, 1H, 可交换 D₂O, N-H), 8.03 (dd, 1H, J=8.4 和 0.8Hz, Ph-H), 7.83 (d, 1H, J=7.6Hz, Ph-H), 7.73 (m, 1H, Ph-H), 7.55 (m, 1H, Ph-H), 6.92 (s, 1H, H-8), 6.28 (m, 1H, H-1'), 6.26 (bs, 2H, 可交换 D₂O, NH₂), 5.21 (d, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 4.89 (t, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.88 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.60 (dd, 2H, 7-CH₂), 4.28 (m, 1H, H-3'), 3.74 (m, 1H, H-4'), 3.48 (m, 2H, H-5'), 2.32 (m, 1H, H-2' a), 2.08 (m, 1H, H-2' b)。

[0419] 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸 (wW5p107): 将 POCl₃ (5 μ L, 0.05mmol) 加入化合物 dG. 31 (11mg, 0.025mmol) 的三甲基磷酸 (0.3mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0°C 下搅拌 2 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (118mg, 0.25mmol) 和三正丁胺 (50 μ L) 的无水 DMF (0.5mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 5mL)。将所得反应物在室温下搅拌 1 小时然后真空浓缩。将所得残留物溶于水 (10mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 Q Sepharose FF 柱 (2.5 \times 10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈 / 75% TEAB (1.5M) 的线性梯度以 4.5ml / min 速度纯化。合并含有三磷酸的级分, 冻干以产生 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸 WW5p107, 进一步通过反相 HPLC 用 Perkin Elmer Aquapore OD-300 柱 (7 μ m, 250 \times 4.6mm) 进行纯化。流动相: A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水; B, 100mM TEAA 溶于水 / CH₃CN (30:70)。

[0420] 7-[1-(2-硝基苄基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸的合成

[0421]



[0422] 方案 21.7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸的合成。(i) PPh_3 / CH_2Cl_2 (无水), K_2CO_3 , 回流, 46% ; (ii) 1-(2-硝基苯基)-2-甲基丙醇 (外消旋), neat 法, 真空, 124°C ; (iii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, 两步 7% ; (iv) DABCO, H_2O , 回流, 29% ; (v) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C ; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF ; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

[0423] 9-[$\beta\text{-D-}3',5'\text{-O-}$ 双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-氯代甲基-7-脱氮嘌呤 (dG.32) ; 向 dG.27 (1.22g, 1.84mmol) 的四氯化碳 (24mL, 从 CaH_2 新鲜蒸馏制备) 溶液中加入碳酸钾 (1.00g, 7.36mmol) 和三苯基膦 (1.20g, 4.60mmol)。将反应物回流搅拌 24 小时。将所得混合物真空浓缩并用硅胶层析纯化, 以产生泡沫状 9-[$\beta\text{-D-}3',5'\text{-O-}$ 双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基)氨基-6-氯-7-氯代甲基-7-脱氮嘌呤 dG.32 (0.54g, 43%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : δ 7.16 (s, 1H, H-8), 6.54 (dd, 1H, $J=8.0$ 和 6.0Hz, H-1'), 4.78 (AB d, $J=11.4\text{Hz}$, 7- CH_2a), 4.68 (AB d, $J=11.4\text{Hz}$, 7- CH_2b), 4.64 (s, 1H, 2-NH), 4.47 (m, 1H, H-3'), 3.94 (m, 1H, H-4'), 3.73 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.20 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.98 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.91 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.90 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$),

0.28(2s,6H, (CH₃)₂Si), 0.09(2s,6H, (CH₃)₂Si), 0.07(2s,6H, (CH₃)₂Si); ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): δ 159.85(C), 154.16(C), 151.82(C), 121.86(CH), 112.80(C), 108.94(C), 87.23(CH), 83.17(CH), 72.58(CH), 63.35(CH₂), 41.24(CH₂), 29.72(CH₂), 26.57(CH₃), 25.97(CH₃), 25.74(CH₃), 18.38(C), 17.93(C), 17.62(C), -4.71(CH₃), -4.74(CH₃), -4.76(CH₃), -5.37(CH₃), -5.49(CH₃)。

[0424] 2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤(dG.33): 化合物 dG.32(0.82g, 1.21mmol) 和 1-(2-硝基苯基)-2-甲基丙醇(2.36g, 12.10mmol) 溶于无水二氯甲烷(10mL)。真空除去溶剂, 将所得残留物在 124℃ 真空加热 22 小时, 然后溶于乙酸乙酯并用硅胶层析纯化, 以产生粗制 9-[β-D-3', 5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-氨基-6-氯-7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤。然后将该中间产物溶于四氢呋喃(14mL) 并用三水合四正丁基氟化铵(0.954g, 3.03mmol) 处理。30 分钟后, 将所得混合物蒸发并通过柱层析纯化, 以产生 9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-2-氨基-6-氯-7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dG.33(41mg, 7%, 非对映体的 1:1 混合物)。非对映体的 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD): δ 7.82 和 7.79(2dd, J=8.0 和 1.2Hz, 1H, Ph-H), 7.72(dt, J=8.0 和 1.6Hz, 1H, Ph-H), 7.60(m, 1H, Ph-H), 7.41(m, 1H, Ph-H), 7.17 和 7.14(2s, 1H, H-8), 6.41(m, 1H, H-1'), 4.71(t, 1H, J=6.8Hz Ph-CH), 4.48(m, 2H, 7-CH₂ 和 H-3'), 3.94(m, 1H, H-4'), 3.71(m, 2H, H-5'), 2.53(m, 1H, H-2' a), 2.27(m, 1H, H-2' b), 1.92(oct, J=6.8Hz, 1H, CHCH(CH₃)₂), 0.96 和 0.94(2d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.80 和 0.76(2d, J=6.8Hz, 3H, CH₃); 非对映体的 ¹³C NMR(100MHz, CD₃OD): δ 160.65(C), 155.83 和 155.78(C), 153.54 和 153.45(C), 151.39 和 151.12(C), 138.42 和 138.27(C), 133.89 和 133.77(CH), 130.66 和 130.56(CH), 129.44 和 129.36(CH), 125.66 和 125.29(CH), 124.97 和 124.88(CH), 113.67 和 113.39(C), 110.08(C), 88.81 和 88.78(CH), 85.52 和 85.27(CH), 81.60 和 81.87(CH), 73.08(CH), 64.71 和 64.18(CH₂), 63.84 和 63.78(CH₂), 41.00 和 40.86(CH₂), 36.31 和 36.28(CH), 19.77 和 19.73(CH₃), 18.58 和 18.52(CH₃)。

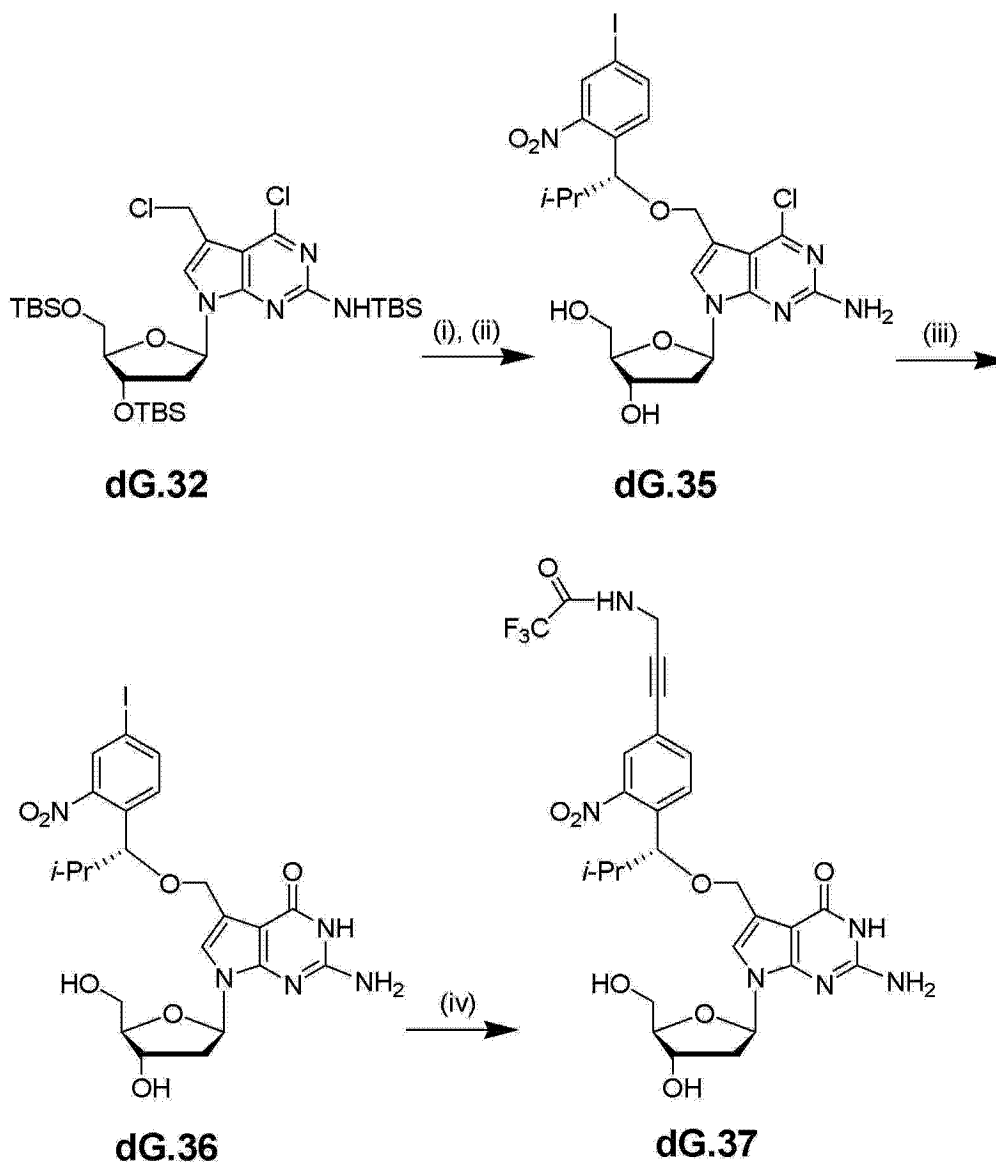
[0425] 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷(dG.34). 在氮气气氛中将 dG.33(54mg, 0.11mmol) 和 1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(25mg, 0.22mmol) 的水(5mL) 溶液混合物加热回流 3 小时。真空除去水, 将所得残留物从甲醇中蒸发 3 次(每次 5mL), 并用硅胶层析纯化以产生 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷 dG.34(15mg, 29%, 非对映体的 1:1 混合物)。非对映体的 ¹H NMR(400MHz, CD₃OD): δ 7.82(m, 1H, Ph-H), 7.76(m, 1H, Ph-H), 7.60(m, 1H, Ph-H), 7.42(m, 1H, Ph-H), 6.81 和 6.78(2s, 1H, H-8), 6.28(m, 1H, H-1'), 4.79(m, 1H, Ph-CH), 4.50(m, 3H, 7-CH₂ 和 H-3'), 3.92(m, 1H, H-4'), 3.71(m, 2H, H-5'), 2.48(m, 1H, H-2' a), 2.22(m, 1H, H-2' b), 1.92(m, 1H, CH), 0.93(m, 3H, CH₃), 0.83(m, 3H, CH₃)。

[0426] 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸(WW5p143ds1 & ds2): 在氮气气氛中将 POCl₃(6_μL, 0.064mmol) 加入化合物 dG.34(15mg, 0.032mmol) 的三甲基磷酸(0.4mL) 溶液中, 并将反应物在 0℃ 下搅拌 5 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(285mg, 0.6mmol) 和三正丁胺(120_μL) 的无水 DMF(1.2mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温搅拌 1 小时然

后真空浓缩。所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 Q Sepharose FF 柱 (2.5×10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈 / 75% TEAB (1.5M) 的线性梯度以 4.5ml / min 速度纯化。合并含有三磷酸的级分, 冻干以产生 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基] 甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5', -三磷酸 WW5p143 的两种非对映体的混合物, 通过反相 HPLC 用 Perkin Elmer Aquapore OD-300 柱 (7 μm, 250×4.6mm) 分离以产生单一的非对映体 WW5p143_ds1 (快速洗脱) 和 WW5p143_ds2 (慢速洗脱)。流动相: A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水; B, 100mM TEAA 溶于水 / CH₃CN (30 : 70)。

[0427] 6-ROX 标记的 7-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基} 甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸的合成

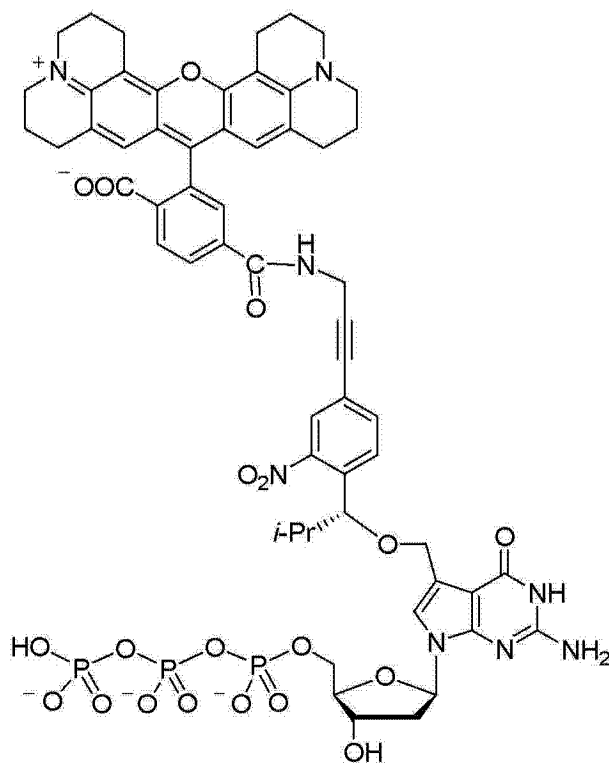
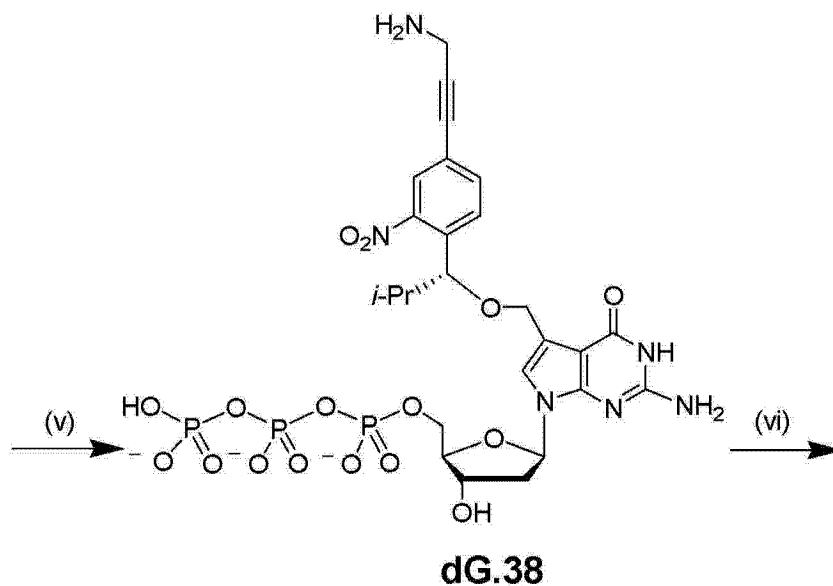
[0428]



[0429] 方案 22. 6-ROX 标记的 7-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基} 甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸的合成. (i) (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基丙醇, neat 法, 真空, 124°C; (ii) n-Bu₄NF, THF, 两步 13%; (iii) DABCO, H₂O, 回流, 4 小时, 23%; (iv) N-炔丙基三氟乙酰胺, Pd(PPh₃)₄(0), CuI, Et₃N, 无水 DMF (无水),

4 小时, 50% ;

[0430]



[0431] 方案 23. (v) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C ; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{M HNEt}_3\text{HCO}_3$; (vi) 6-ROX-SE, $0.1\text{M Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ 缓冲液 (pH9.2), 1 小时。

[0432] 2-氨基-6-氯-9-[β -D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 (dG.35): 将化合物 dG.32 (0.62g, 0.914mmol) 和 (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基丙醇 (3.52g, 10.97mmol) 溶于无水二氯甲烷 (10mL)。真空除去溶剂, 将所得残留物在 122°C 真空加热 16 小时, 然后溶于乙酸乙酯, 并用硅胶层析纯化以产生溶于四氢呋喃 (15mL) 的粗制 2-氨基-6-氯-9-[β -D-3',

5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤。将该中间产物用三水合四正丁基氟化铵(0.72g, 2.28mmol)处理。30分钟后,将所得混合物蒸发并用柱层析纯化,以产生2-氨基-6-氯-9-[β-D-2'-脱氧呋喃核糖基]-7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dG. 35(74mg, 13%)。¹HNMR(400MHz, CD₃OD): δ 8.09(d, J=1.2Hz, 1H, Ph-H), 7.86(dd, J=8.0和1.2Hz, 1H, Ph-H), 7.43(d, J=8.0Hz, 1H, Ph-H), 7.14(s, 1H, H-8), 6.38(dd, J=8.0和6.0Hz, 1H, H-1'), 4.65(d, J=6.4Hz, 1H, Ph-CH), 4.57(ABd, J=12.4, 1H, 7-CH₂a), 4.48(m, 1H, H-3'), 4.47(ABd, J=12.4, 1H, 7-CH₂b), 3.95(m, 1H, H-4'), 3.76(ABdd, J=12.0和3.6Hz, 1H, H-5'a), 3.70(ABdd, J=12.0和3.6Hz, 1H, H-5'b), 2.52(m, 1H, H-2'a), 2.26(m, 1H, H-2'b), 1.89(oct, J=6.8Hz, 1H, CHCB(CH₃)₂), 0.94(d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.79(2d, J=6.8Hz, 3H, CH₃); ¹³CNMR(100MHz, CD₃OD): δ 159.09(C), 151.52(C), 151.95(C), 149.53(C), 141.20(CH), 136.91(C), 131.91(CH), 130.96(CH), 124.03(CH), 111.96(C), 108.59(C), 90.84(C), 87.29(CH), 83.97(CH), 79.92(CH), 71.62(CH), 63.44(CH₂), 62.36(CH₂), 39.31(CH₂), 34.63(CH), 18.22(CH₃), 16.95(CH₃)。

[0433] 7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷(dG. 36):在氮气气氛中将化合物 dG. 35(72mg, 0.12mmol)和1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷(52mg, 0.46mmol)的水(5mL)溶液加热回流4小时。真空除去水分,将所得残留物从甲醇中蒸发三次(每次5mL),并用硅胶层析纯化,以产生7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷 dG. 36(16mg, 23%)。¹HNMR(400MHz, CD₃OD): δ 8.12(d, J=1.6Hz, 1H, Ph-H), 7.86(dd, J=8.4和1.6Hz, 1H, Ph-H), 7.50(d, J=8.4Hz, 1H, Ph-H), 6.80(s, 1H, H-8), 6.28(dd, J=8.0和6.0Hz, 1H, H-1'), 4.74(d, J=5.6Hz, 1H, Ph-CH), 4.55(ABd, J=12.0, 1H, 7-CH₂a), 4.48(ABd, J=12.0, 1H, 7-CH₂b), 4.44(m, 1H, H-3'), 3.92(m, 1H, H-4'), 3.75(ABdd, J=12.0和4.0Hz, 1H, H-5'a), 3.69(ABdd, J=12.0和4.0Hz, 1H, H-5'b), 2.46(m, 1H, H-2'a), 2.23(m, 1H, H-2'b), 1.91(m, 1H, CH), 0.93(d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.86(2d, J=6.8Hz, 3H, CH₃)。

[0434] 7-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷(dG. 37):将化合物 dG. 36(15mg, 0.025mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺(11mg, 0.075mmol)、四-(三苯基膦)-钼(0)(3mg, 0.0025mmol)、CuI(1mg, 0.005mmol)和Et₃N(7μL, 0.050mmol)的无水DMF(1.5mL)溶液在室温下搅拌4小时。将所得混合物真空浓缩并用硅胶柱层析纯化,以产生7-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷 dG. 37(15mg, 99%)的蜡状固体。¹HNMR(400MHz, CD₃OD): δ 7.88(d, J=1.6Hz, 1H, Ph-H), 7.75(d, J=8.0Hz, 1H, Ph-H), 7.45(dd, J=8.0和1.6Hz, 1H, Ph-H), 6.83(s, 1H, H-8), 6.30(dd, J=8.4和6.4Hz, 1H, H-1'), 4.80(d, J=6.4Hz, 1H, Ph-CH), 4.56(ABd, J=12.0, 1H, 7-CH₂a), 4.50(ABd, J=12.0, 1H, 7-CH₂b), 4.47(m, 1H, H-3'), 4.35(s, 1H, CH₂N), 3.94(m, 1H, H-4'), 3.77(ABdd, J=12.0和4.0Hz, 1H, H-5'a), 3.71(ABdd, J=12.0和4.0Hz, 1H, H-5'b), 2.49(m, 1H, H-2'a), 2.23(m, 1H, H-2'b), 1.93(m, 1H, CH), 0.95(d, J=6.4Hz, 3H, CH₃), 0.87(d, J=6.4Hz, 3H, CH₃); ¹³CNMR(100MHz, CD₃OD): δ 161.61(C), 154.02(C), 152.67(C), 150.49(C), 142.69(C), 139.77(C), 136.37(CH), 131.37(CH), 127.90(CH), 123.71(C), 119.34(CH), 117.19(C), 116.42(C),

88.69 (CH), 86.89 (C), 85.58 (CH), 81.93 (C), 81.42 (CH), 71.19 (CH), 65.42 (CH₂), 63.97 (CH₂), 41.12 (CH₂), 36.16 (CH), 30.63 (CH₂), 19.93 (CH₃), 18.00 (CH₂)。

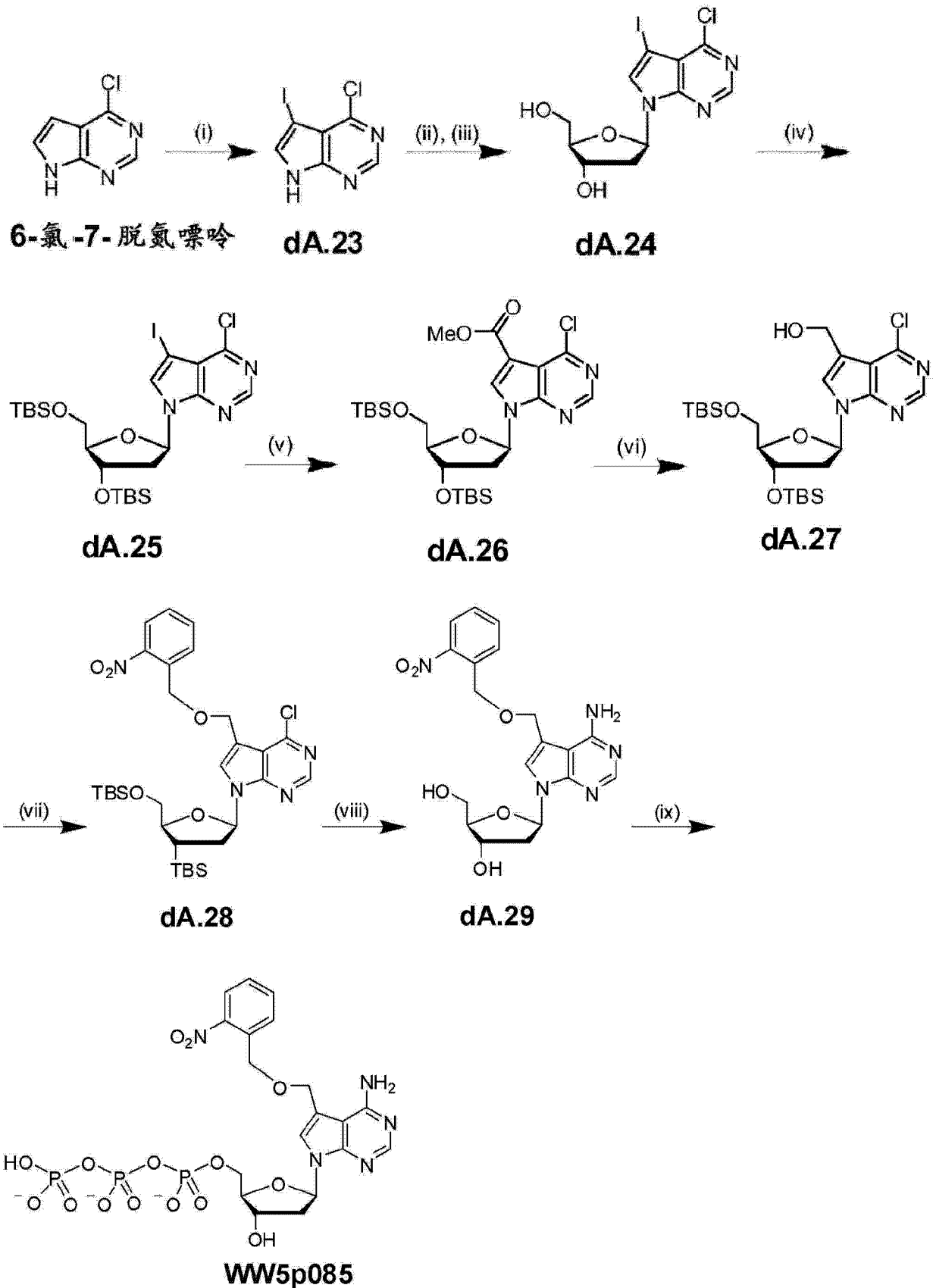
[0435] 7-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸(dG.38):将 POCl₃(7 μL, 0.076mmol) 加入化合物 dG.37(12mg, 0.019mmol) 和质子海绵(8mg, 0.038mmol) 的三甲基磷酸(0.3mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0℃ 搅拌 4 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(237mg, 0.5mmol) 和三正丁胺(100 μL) 的无水 DMF(1mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时然后真空浓缩。所得残留物溶于水(5mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱(2.5×10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈/75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈/75% TEAB(1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸的级分并冷冻干燥。所得残留物溶于水(5mL) 并用浓氨水(2mL, 27%) 在室温下处理 1 小时以产生 7-((R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸 dG.38, 通过反相 HPLC 用 PerkinElmerAquaporeOD-300 柱(7 μm, 250×4.6mm) 纯化。流动相:A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水; B, 100mM TEAA 溶于水/CH₃CN(30:70)。

[0436] 6-ROX 标记的 7-{(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷-5'-三磷酸(WW6p034): 将 6-ROX-SE(3.5mg, 5.54 μmol) 的无水 DMSO(280 μL) 溶液加入三磷酸 dG.38(0.85 μmol) 的 Na₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液(0.1M, pH9.2, 800 μL) 中。所得混合物留置于室温 1 小时。将染料标记的三磷酸酯首先通过阴离子交换 HPLC 用 PerkinElmerAx-300 柱(7 μm, 250×4.6mm) 纯化。流动相:A, 25%CH₃CN/75%0.1MTEAB; B, 25%CH₃CN/75%1.5MTEAB。将产物进一步通过反相 HPLC 用 PerkinElmerOD-300 柱(7 μm, 4.6×250mm) 纯化以产生 6-ROX 标记三磷酸 WW6p034。流动相:A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水 (pH7.0); B, 100mM TEAA 溶于水/CH₃CN(30:70)。

[0437] 实施例 8-7-脱氮腺苷类似物的合成

[0438] 7-(2-硝基苯氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成

[0439]



[0440] 方案 24. 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成. (i) NIS, CH_2Cl_2 (无水), 室温, 52%; (ii) 2-脱氧-3,5-二氧-(对甲苯酰)- α -D-呋喃核糖基氯, TDA-1, KOH, MeCN (无水), 室温; (iii) NH_3 , MeOH, 室温, 47%; (iv) TBSCl, 咪唑, DMF (无

水), 室温, 51%; (v) CO, PdCl₂[PhCN]₂, MeOH/1,4-二氧六环, 50 °C, 99%; (vi) LiBH₄, MeOH, THF, 45%; (vii) 2-硝基苄基溴, n-Bu₄NBr, CH₂Cl₂/aq. NaOH, 室温, 50%; (viii) n-Bu₄NF, THF; NH₃, 1,4-二氧六环/MeOH, 90-100 °C, 91%; (ix) POCl₃, (MeO)₃P=O, 零下 40 °C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1MHNEt₃HCO₃。

[0441] 6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 (dA. 23); 依据 Ju 等 (2006, 通过引用并入本文) 所述程序合成化合物 dA. 23。向 6-氯-7-脱氮嘌呤 (1.00g, 6.51mmol) 的无水 CH₂Cl₂ (55mL) 悬液中加入 N-碘代琥珀酰亚胺 (1.70g, 7.56mmol)。将反应物在室温下避光搅拌 2 小时。然后真空浓缩反应物。所得物质从热甲醇中重结晶, 以产生 6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 dA. 23 (0.94g, 52%)。

[0442] 9-(β-D-2'-脱氧呋喃核糖基)-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 (dA. 24); 依据 Ju 等 92006, 通过引用并入本文) 所述程序合成化合物 dA. 24。向 KOH (0.52g, 8.29mmol) 和三 (3,6-二氧杂庚基) 胺 (0.07mL, 0.22mmol) 的 56mL 无水乙腈悬液中加入化合物 dA. 23 (0.93g, 3.32mmol)。将反应物在室温下搅拌 5 分钟, 然后用 15 分钟加入 2-脱氧-3,5-二氧-(对甲苯酰)-α-D-呋喃核糖基氯 (1.38g, 3.55mmol)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后过滤并用热丙酮 (50mL) 清洗。将滤液真空浓缩, 将所得物质的一半溶于 7NNH₃ 的甲醇溶液 (40mL) 中, 在室温下搅拌 16 小时。然后将反应物真空浓缩并用硅胶层析纯化, 以产生白色泡沫状 9-(β-D-2'-脱氧呋喃核糖基)-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 dA. 24 (0.31g, 47%)。

[0443] 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 (dA. 25): 将化合物 dA. 24 (0.30g, 0.76mmol) 从无水吡啶 (2mL) 中蒸发三次, 溶于无水 DMF (5mL)。加入叔丁基二甲基甲硅烷基氯 (0.34g, 2.28mmol) 和咪唑 (0.31g, 4.55mmol), 所得混合物在室温下搅拌 16 小时。将反应物真空浓缩并用硅胶层析纯化, 以产生白色泡沫状 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-碘代-7-脱氮嘌呤 dA. 25 (0.24g, 51%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.61 (s, 1H, H-2), 7.81 (s, 1H, H-8), 6.74 (t, 1H, J=6.4Hz, H-1'), 4.56 (m, 1H, H-4'), 4.01 (m, 1H, H-3'), 3.87 (dd, 1H, H-5' a), 3.79 (dd, 1H, H-5' b), 2.39 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.96 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.91 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.18 (2s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.15 (s, 6H, (CH₃)₂Si); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 152.50 (C), 150.80 (CH), 150.48 (C), 131.94 (CH), 117.33 (C), 87.92 (CH), 84.16 (CH), 72.20 (CH), 63.01 (CH₂), 51.98 (C), 42.08 (CH₂), 26.07 (CH₃), 25.77 (CH₃), 18.51 (C), 18.05 (C), -4.63 (CH₃), -4.78 (CH₃), -5.25 (CH₃), -5.39 (CH₃)。

[0444] 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-甲氧羰基-7-脱氮嘌呤 (dA. 26): 向 dA. 25 (1.3g, 2.1mmol) 的无水 1,4-二氧六环 (30mL) 和无水甲醇 (25mL) 溶液中加入三乙胺 (0.58mL)。在 CO 气氛中搅拌 10 分钟后, 加入双(苄腈)二氯钼 (II)。将反应物在 CO 气氛中 50 °C 下搅拌 48 小时, 然后真空浓缩。所得残留物用硅胶层析纯化以产生粘稠油状 9-[β-D-3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-甲氧羰基-7-脱氮嘌呤 dA. 26 (1.15g, 99%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.69 (s, 1H, H-2), 8.31 (s, 1H, H-8), 6.77 (t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 4.58 (m, 1H, H-4'), 4.06 (m, 1H, H-3'), 3.90 (s, 3H, CH₃O), 3.87 (dd, 1H, H-5' a), 3.81 (dd, 1H, H-5' b), 2.42 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.93 (s, 18H, (CH₃)₃CSi), 0.13 (s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.12 (s, 6H, (CH₃)₂Si); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 162.46 (C), 153.12 (C), 152.07 (C),

151.35 (CH), 133.27 (CH), 115.27 (C), 107.65 (C), 88.23 (CH), 84.52 (CH), 72.46 (CH), 63.06 (CH₂), 51.55 (CH₃), 42.15 (CH₂), 25.99 (CH₃), 25.77 (CH₃), 18.45 (C), 18.03 (C), -4.64 (CH₃), -4.78 (CH₃), -5.49 (CH₃), -5.55 (CH₃)。

[0445] 9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-羟基甲基-7-脱氮嘌呤 (dA.27): 向 dA.26 (0.28g, 0.50mmol) 的无水 THF (4mL) 溶液中加入硼氢化锂 (0.044g, 2.01mmol), 然后加入甲醇 (0.1mL)。将反应混合物在室温下搅拌 10 分钟, 然后加热回流 45 分钟。冷却后, 将反应混合物用二氯甲烷 (20ml) 稀释并用水 (2mL) 猝灭。分离有机层, 用卤水清洗两次 (每次 5mL), 经由无水硫酸钠干燥, 并真空浓缩。所得残留物用硅胶层析纯化以产生白色泡沫状 9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-羟基甲基-7-脱氮嘌呤 dA.27 (0.12g, 45%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.62 (s, 1H, H-8), 7.61 (s, 1H, H-2), 6.75 (dd, 1H, J=6.0 和 7.2Hz, H-1'), 4.96 (ABd, 1H, J=11.6Hz, 7-CH₂a), 4.91 (ABd, 1H, J=11.6Hz, 7-CH₂b), 4.57 (m, 1H, H-4'), 4.00 (m, 1H, H-3'), 3.80 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.44 (m, 1H, H-2' a), 2.04 (m, 1H, H-2' b), 0.91 (2s, 18H, (CH₃)₃CSi), 0.11 (2s, 12H, (CH₃)₂Si); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 151.84 (C), 151.37 (C), 150.98 (CH), 125.33 (CH), 115.97 (C), 115.48 (C), 87.67 (CH), 83.73 (CH), 72.28 (CH), 63.07 (CH₂), 56.89 (CH₂), 41.42 (CH₂), 25.98 (CH₃), 25.79 (CH₃), 18.45 (C), 18.03 (C), -4.64 (CH₃), -4.76 (CH₃), -5.35 (CH₃), -5.47 (CH₃)。

[0446] 9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤 (dA.28): 向 dA.27 (30mg, 0.057mmol) 的 CH₂Cl₂ (2mL) 溶液中加入 n-Bu₄NBr (9mg, 0.029mmol)、2-硝基苄基溴 (37mg, 0.17mmol) 和 1MNaOH 溶液 (2mL)。将反应混合物在室温下暗处剧烈搅拌 48 小时。分离有机层, 经由 Na₂SO₄ 干燥, 真空浓缩, 并用硅胶层析纯化, 以产生粘稠油状 9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮嘌呤 dA.28 (19mg, 50%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.63 (s, 1H, H-2), 8.06 (dd, 1H, J=8.4 和 1.2Hz, Ph-H), 7.84 (d, 1H, J=7.6Hz, Ph-H), 7.64 (s, 1H, H-8), 7.62 (m, 1H, Ph-H), 7.43 (t, 1H, Ph-H), 6.75 (dd, 1H, J=7.2 和 6.0Hz, H-1'), 5.03s, 2H, PhCH₂), 4.95 (ABd, 1H, J=12.0Hz, 7-CH₂a), 4.88 (ABd, 1H, J=12.0Hz, 7-CH₂b), 4.59 (m, 1H, H-4'), 4.00 (m, 1H, H-3'), 3.80 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.48 (m, 1H, H-2' a), 2.37 (m, 1H, H-2' b), 0.92 (2s, 18H, (CH₃)₃CSi), 0.11 (s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.10 (s, 6H, (CH₃)₂Si)。

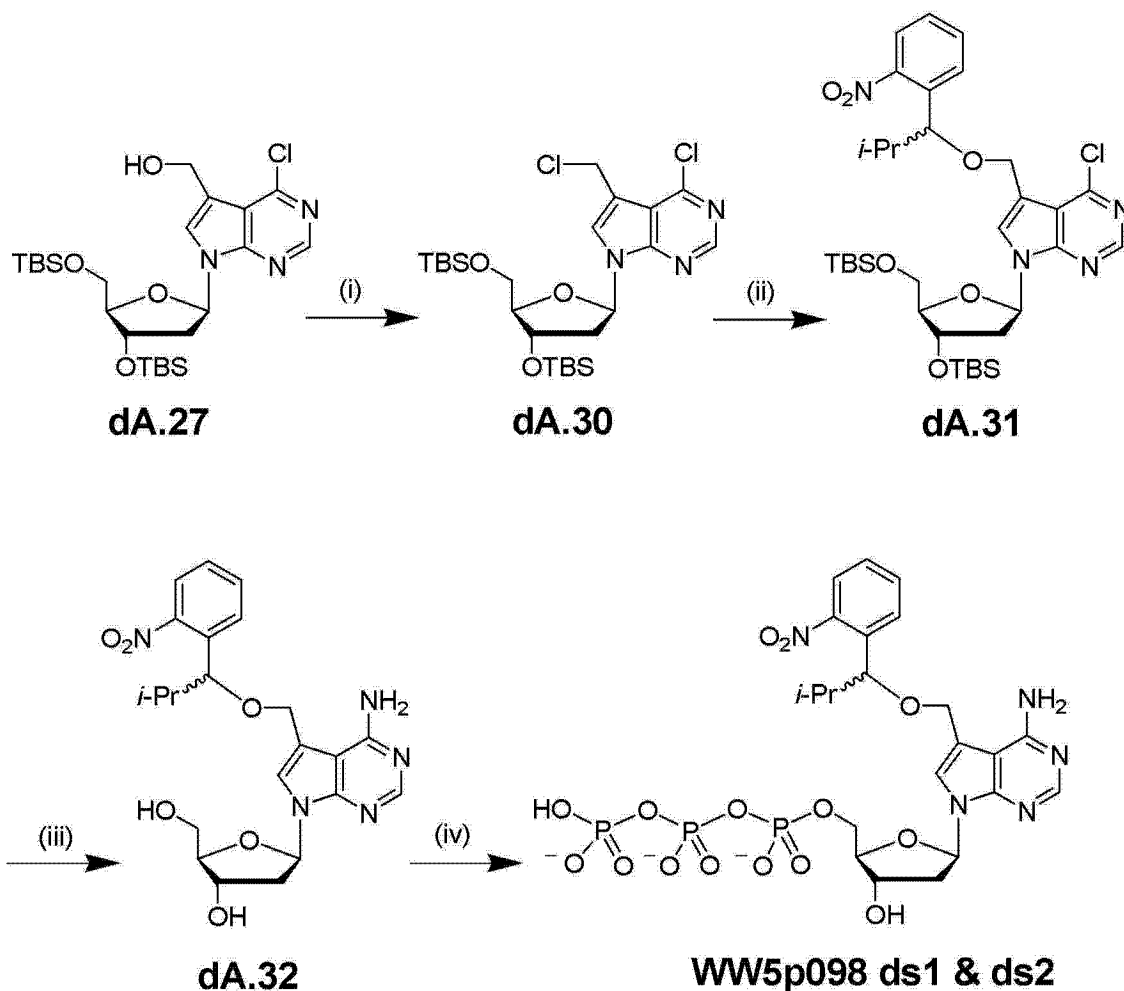
[0447] 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 (dA.29): 0℃下将 n-Bu₄NF (17mg, 0.054mmol) 的 THF (1mL) 溶液加入 dA.28 (18mg, 0.027mmol) 的 THF (1mL) 溶液中。将反应混合物逐渐温热至室温, 搅拌 2 小时。将所得混合物真空浓缩, 然后将残留物溶于 1,4-二氧六环 (2mL), 随后加入甲醇 (4mL) 中的 7NNH₃。将所得混合物转移至密封管内, 在 90-100℃下搅拌 16 小时, 然后冷却, 真空浓缩, 所得残留物用硅胶层析纯化, 以产生白色泡沫状 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 dA.29 (10mg, 91%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 8.08 (s, 1H, H-2), 8.06 (m, 1H, Ph-H), 7.75 (m, 2H, Ph-H), 7.58 (m, 1H, Ph-H), 7.42 (s, 1H, H-8), 6.64 (bs, 2H, 可交换 D₂O, 6-NH₂), 6.48 (dd, 1H, J=2.0 和 6.0Hz, H-1'), 5.25 (d, 1H, J=4.0Hz, 可交换 D₂O, 3'-OH), 5.08 (t, 1H, J=5.6Hz, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.90 (s, 2H, PhCH₂), 4.75 (ABdd, 2H, 7-CH₂), 4.33 (m, 1H, H-3'), 3.81 (m, 1H, H-4'), 3.54 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2

. 47 (m, 1H, H-2' a), 2. 15 (m, 1H, H-2' b)。

[0448] 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 (WW5p085) :零下 40 °C 下将 POCl_3 (2.6 μL , 0.028mmol) 加入 dA. 29 (6mg, 0.014mmol) 和质子海绵 (6mg, 0.028mmol) 的三甲基磷酸 (0.25mL) 溶液中, 搅拌 4 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (66mg, 0.14mmol) 和三正丁胺 (28 μL) 的无水 DMF (0.28mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 1mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水 (2mL), 过滤, 并通过反相 HPLC 用 PerkinElmerOD-300C₁₈ 柱 (7 μm , 4.6 \times 250mm) 纯化, 以产生 7-(2-硝基苄氧基)甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 WW5p085。流动相 :A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水 (pH7.0); B, 100mMTEAA 溶于水 / CH_3CN (30:70)。

[0449] 7-[1-(2-硝基苄基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成

[0450]



[0451] 方案 25. 7-[1-(2-硝基苄基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成。(i) TsCl , DMAP, CH_2Cl_2 (无水), 室温, 39%; (ii) 1-(2-硝基苄基)-2-甲基-丙醇 (外消旋), neat 法, 真空, 105°C, 54%; (iii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF; NH_3 , 1,4-二氧六环 / MeOH, 90-100°C, 76%; (iv) POCl_3 , $(\text{MeO})_3\text{P}$, 零下 40°C 至 0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; 1M $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

[0452] 9-[β -D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-氯代甲基-7-脱氮嘌呤(dA.30):向 dA.27(0.257g,0.485mmol)的二氯甲烷(12mL,新从CaH₂中蒸馏)溶液中加入4-N,N-二甲基氨基吡啶(0.148g,1.213mmol)和甲苯磺酰氯(0.111g,0.583mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,然后真空浓缩。所得残留物用硅胶层析纯化,以产生粘稠油状9-[β -D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-氯代甲基-7-脱氮嘌呤 dA.30(0.103g,26%)。¹HNMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.64(s,1H,H-2),7.72(s,1H,H-8),6.73(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),4.95(ABd,J=12.4Hz,7-CH₂a),4.91(ABd,J=12.0Hz,7-CH₂b),4.58(m,1H,H-3'),4.00(m,1H,H-4'),3.82(m,2H,-5'a和H-5'b),2.41(m,2H,H-2'a和H-2'b),0.95(s,,(CH₃)₃CSi),0.93(s,9H,(CH₃)₃CSi),0.12(s,6H,(CH₃)₂Si),,0.11(s,6H,(CH₃)₂Si);¹³CNMR(100MHz,CDCl₃): δ 151.78(C),151.56(C),1151.26(CH),126.68(CH),112.15(C),115.54(C),87.78((CH),83.97(CH),72.17(CH),62.98(CH₂),41.72(CH₂),37.56((CH₂)),,25.99(CH₃),25.78(CH₃),18.45(C),18.03(C),-4.63(CH₃),,-4.78(CH₃),,-5.35(CH₃),-5.45(CH₃)。

[0453] 9-[β -D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤(dA.31):将化合物 dA.30(54mg,0.1mmol)和1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇(191mg,0.978mmol)溶于无水二氯甲烷(10mL)。真空除去溶剂,所得残留物真空加热1小时,然后溶于乙酸乙酯并用硅胶层析纯化,以产生9-[β -D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dA.31(38mg,54%,非对映体的1:1混合物)。非对映体的¹HNMR(400MHz,CDCl₃): δ 8.60和8.59(2s,1H,H-2),7.83(m,1H,Ph-H),7.79(m,1H,Ph-H),7.56(m,1H,Ph-H),7.48和7.47(2s,1H,H-8),7.38(m,1H,Ph-H),6.70(m,1H,H-1'),4.81(m,1H,Ph-CH),4.70(m,1H,7-CH₂a),4.58(m,2H,7-CH₂b和H-3'),3.99(m,1H,H-4'),3.78(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.48(m,1H,H-2'a),2.35(m,1H,H-2'b),1.96(m,1H,CH),0.98和0.96(2d,3H,CH₃),0.93(2s,9H,(CH₃)₃CSi),0.89(2s,9H,(CH₃)₃CSi),0.82和0.78(2d,3H,CH₃),0.12(2s,6H,(CH₃)₂Si),0.08和0.07(2s,3H,(CH₃)₂Si),0.06和0.05(2s,3H,(CH₃)₂Si);非对映体的¹³CNMR(100MHz,CDCl₃): δ 152.60和152.47(C),150.84(CH),150.28和150.21(C),149.56和149.47(C),148.01(C),137.22和137.08(C),132.70和132.68(CH),129.15和129.13(CH),127.97(CH),126.65和126.29(CH),123.85和123.79(CH),112.36和112.07(C),87.63和87.59(CH),83.71和83.68(CH),81.92和81.08(CH),72.40和72.28(CH),63.50(CH₂),63.15和63.03(CH₂),41.07和41.00(CH₂),35.08和35.05(CH),19.20和19.11(CH₃),18.42和18.40(C),18.18和18.05(CH₃),-4.67和-4.76(CH₃Si),-4.78(CH₃Si),-5.35(CH₃Si),-5.47和-5.51(CH₃Si)。

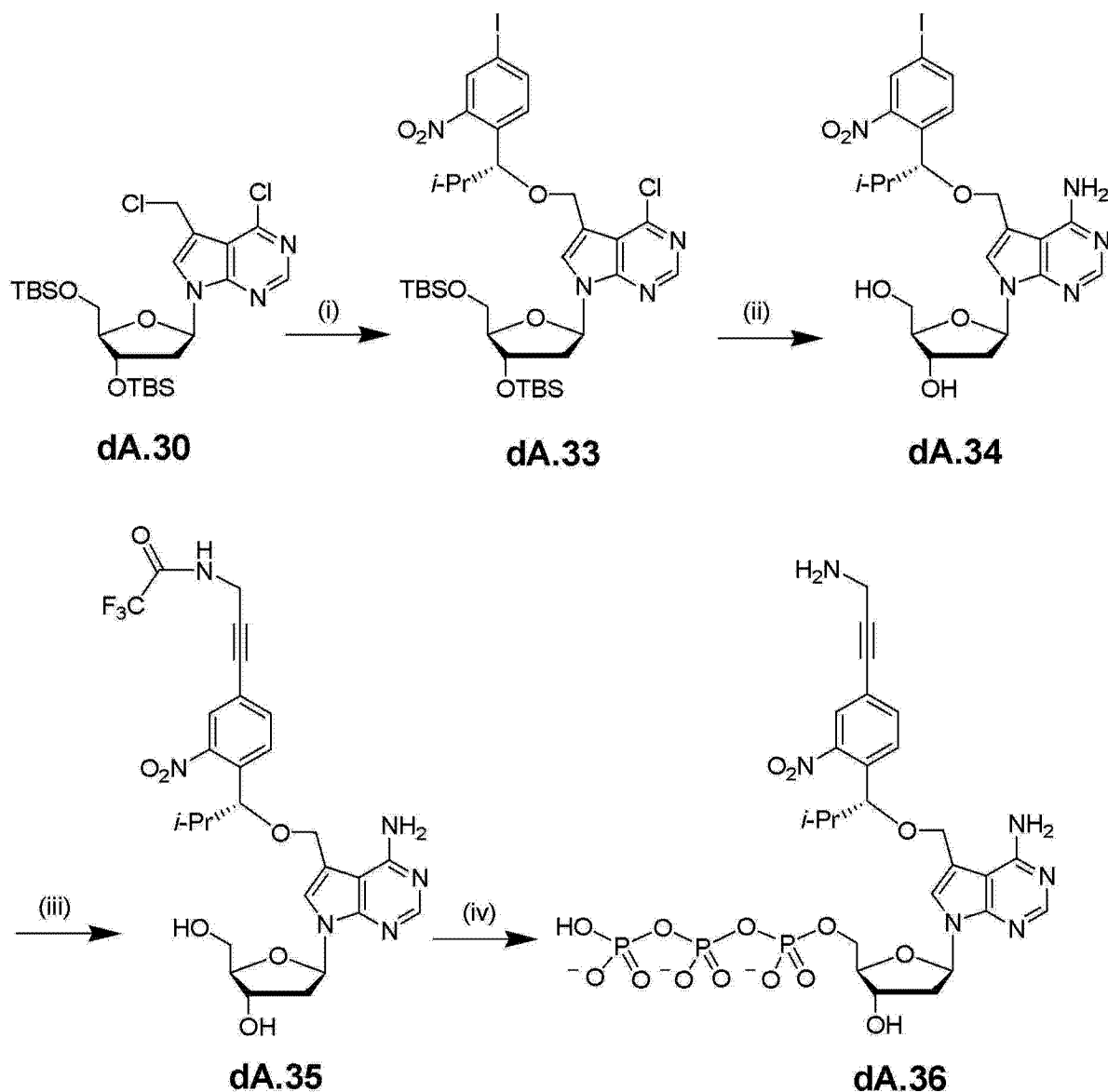
[0454] 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷(dA.32):0°C下将n-Bu₄NF(44mg,0.140mmol)的THF(2mL)溶液加入dA.31(38mg,0.053mmol)的THF(2mL)溶液中。将反应物逐渐温热至室温,搅拌2小时。所得混合物真空浓缩,溶于1,4-二氧六环(4mL),随后加入7NNH₃的甲醇溶液(8mL)。所得混合物转移至密封管,在90-100°C下搅拌24小时,然后冷却,真空浓缩,所得残留物用硅胶层析纯化,以产生粘稠油状7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 dA.32(19mg,76%,非对映体的1:1混合

物)。非对映体的 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) : δ 8.06 和 8.04 (2s, 1H, H-2), 7.90 (m, 1H, Ph-H), 7.67 (m, 2H, Ph-H), 7.56 (m, 2H, Ph-H), 7.19 和 7.16 (2s, 1H, H-8), 6.63 (bs, 2H, 可交换 D_2O , 6-NH $_2$), 6.39 (m, 1H, H-1'), 5.23 (m, 1H, 可交换 D_2O , 3'-OH), 5.00 (m, 1H, 可交换 D_2O , 5'-OH), 4.72 (2d, 1H, Ph-CH), 4.45 (s, 2H, 7-CH $_2$), 4.30 (m, 1H, H-3'), 3.77 (m, 1H, H-4'), 3.49 (m, 2H, H-5'a 和 H-5'b), 2.40 (m, 1H, H-2'a), 2.12 (m, 1H, H-2'b), 1.94 (m, 1H, CH), 0.87 (m, 3H, CH $_3$), 0.74 (m, 3H, CH $_3$); 非对映体的 $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CD $_3$ OD) : δ 157.76 (C), 151.08 (CH), 149.92 和 149.57 (C), 148.01 (C), 135.99 和 135.92 (C), 132.51 和 132.41 (CH), 128.89 (CH), 128.20 和 128.15 (CH), 123.49 和 123.43 (CH), 122.32 和 121.97 (CH), 111.86 (C), 103.02 (C), 87.65 和 87.59 (CH), 85.25 和 85.00 (CH), 80.29 和 79.60 (CH), 71.73 (CH), 63.97 和 69.92 (CH $_2$), 63.49 和 62.41 (CH $_2$), 39.95 和 39.77 (CH $_2$), 34.55 和 34.51 (CH), 18.09 (CH $_3$), 17.16 (CH $_3$)。

[0455] 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 (WW5p098da1 & ds2) : 将 POCl_3 (8 μL , 0.083mmol) 加入化合物 dA.32 (19mg, 0.041mmol) 的三甲基磷酸 (0.4mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中零下 40°C 搅拌 2 小时。另加 POCl_3 (8 μL , 0.083mmol), 将反应物在 0°C 下再搅拌 3 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (97mg, 0.2mmol) 和三正丁胺 (40 μL) 的无水 DMF (0.4mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。反应物在室温下搅拌 1 小时然后真空浓缩。所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱 (2.5 \times 10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 0.1M 三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 至 25% 乙腈 / 75% 1.5M TEAB 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸的级分, 冻干以产生 7-[1-(2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 WW5p098 的两种非对映体混合物, 再通过反相 HPLC 用 PerkinElmer AquaporeOD-300 柱 (7 μm , 250 \times 4.6mm) 分离以产生单一非对映体 WW5p098ds1 (快速洗脱) 和 WW5p098ds2 (慢速洗脱)。流动相 : A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水 ; B, 100mM TEAA 溶于水 / CH $_3$ CN (30:70)。

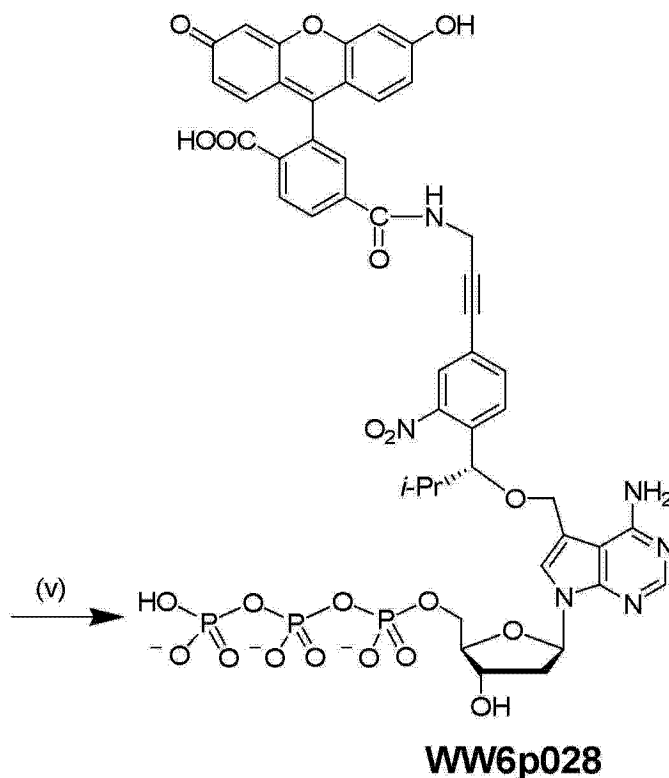
[0456] 6-FAM 标记的 7-{{R}}-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2', -脱氧腺苷-5', -三磷酸的合成

[0457]



[0458] 方案 26. 6-FAM 标记的 7-(9R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基}甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成 (i) (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇, neat 法, 真空, 108°C, 47%; (ii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF; NH_3 , 1,4-二氧六环/MeOH, 90-100°C, 82%; (iii) N-炔丙基三氟乙酰胺, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4(0)$, CuI, Et_3N , 无水 DMF, 99%; (iv) POCl_3 , $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{MHNEt}_3\text{HCO}_3$;

[0459]



[0460] 方案 27. (v)6-FAM-SE, 0.1MNa₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液 (pH9.2)。

[0461] 9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 (dA.33)。将化合物 dA.30 (80mg, 0.147mmol) 和纯对映体 (R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇 (518mg, 1.163mmol) 溶于无水二氯甲烷 (10mL)。真空除去溶剂, 所得残留物真空加热 1 小时, 然后溶于乙酸乙酯并用硅胶层析纯化, 以产生 9-[β-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dA.33 (57mg, 47%)。¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.60 (s, 1H, H-2), 8.12 (d, J=2.0Hz, 1H, Ph-H), 7.87 (dd, J=8.4 和 1.6Hz, 1H, Ph-H), 7.47 (d, J=8.0Hz, 1H, Ph-H), 7.47 (s, 1H, H-8), 6.71 (dd, J=7.6 和 6.0Hz, 1H, H-1'), 4.76 (d, J=6.4Hz, 1H, Ph-CH), 4.70 (Add, J=11.6Hz, 1H, 7-CH₂a), 4.58 (m, 2H, 7-CH₂b 和 H-3'), 4.00 (m, 1H, H-4'), 3.79 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.45 (m, 1H, H-2' a), 2.36 (m, 1H, H-2' b), 1.93 (sep, J=6.8Hz, 1H, CHCH(CH₃)₂), 0.98 (d, J=6.4Hz, 3H, CH₃), 0.93 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.91 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.82 (d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.126 (s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.123 (s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.09 (s, 3H, (CH₃)₂Si), 0.06 (s, 3H, (CH₃)₂Si); ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 151.81 (C), 151.76 (C), 150.93 (CH), 149.79 (C), 141.63 (CH), 137.04 (C), 132.34 (CH), 130.85 (CH), 126.41 (CH), 116.17 (C), 112.06 (C), 91.57 (C), 87.65 (CH), 83.77 (CH), 80.68 (CH), 72.41 (CH), 63.58 (CH₂), 63.15 (CH₂), 41.07 (CH₂), 34.95 (CH), 25.96 (C(CH₃)₃), 25.80 (C(CH₃)₃), 19.13 (CH₃), 18.42 (C), 18.05 (CH₃), -4.63 (CH₃), -4.78 (CH₃), -5.35 (CH₃), -5.45 (CH₃)。

[0462] 7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 (dA.34): 0℃下将 n-Bu₄NF (58mg, 0.182mmol) 的 THF (2mL) 溶液加入 dA.33 (57mg, 0.069mmol) 的 THF (2mL) 溶液中。将反应物逐渐温热至室温, 搅拌 2 小时。将所得混合物真

空浓缩,溶于1,4-二氧六环(5mL),然后加入7NNH₃的甲醇溶液(16mL)。将所得混合物转移至密封管,在90-100℃下搅拌24小时,然后冷却,真空浓缩,所得残留物用硅胶层析纯化以产生7-[(R)-1-(4-碘代-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷dA.34(33mg,82%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆):δ8.22(d,J=1.6Hz,1H,Ph-H),8.04(s,1H,H-2),8.00(dd,J=8.4和1.6Hz,1H,Ph-H),7.39(d,J=8.4Hz,2H,Ph-H),7.19(s,1H,H-8),6.60(bs,2H,可交换D₂O,6-NH₂),6.40(dd,J=8.4和6.0Hz,1H,H-'),5.24(d,J=4.0Hz,1H,可交换D₂O,3'-OH),5.00(d,J=5.2Hz,1H,可交换D₂O,5'-OH),4.64(d,J=6.0Hz,1H,Ph-CH),4.45(ABdd,2H,7-CH₂),4.29(m,1H,H-3'),3.78(m,1H,H-4'),3.47(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.40(m,1H,H-2'a),2.11(m,1H,H-2'b),1.92(m,1H,CH),0.87(d,J=6.4Hz,3H,CH₃),0.76(d,J=6.8Hz,3H,CH₃);¹³CNMR(100MHz,CD₃OD):δ164.68(C),151.12(CH),150.12(C),149.84(C),141.38(CH),136.09(C),131.94(CH),130.66(CH),122.15(CH),111.79(C),103.09(C),91.16(C),87.63(CH),85.12(CH),80.31(CH),71.80(CH),63.36(CH₂),62.53(CH₂),39.76(CH₂),34.41(CH),18.00(CH₃),17.20(CH₃)。

[0463] 7-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷(dA.35):将化合物dA.34(33mg,0.056mmol)、N-炔丙基三氟乙酰胺(25mg,0.168mmol)、四-(三苯基膦)-钼(0)(7mg,0.0065mmol)、CuI(2mg,0.0112mmol)和Et₃N(16μL,0.050mmol)的无水DMF(3mL)溶液在室温下搅拌4小时。将所得混合物真空浓缩并用硅胶柱层析纯化以产生蜡状固体7-[(R)-1-[4-(3-三氟乙酰胺基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷dA.35(34mg,99%)。¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆):δ10.11(brt,1H,可交换D₂O,NHTFA),8.12(brs,1H,H-2),7.94(d,J=1.6Hz,1H,Ph-H),7.71(ABdd,J=8.0和1.6Hz,1H,Ph-H),7.62(ABd,J=8.4Hz,2H,Ph-H),7.28(s,1H,H-8),6.95(bs,2H,可交换D₂O,6-NH₂),6.42(dd,J=8.0和6.0Hz,1H,H-1'),5.25(brs,1H,可交换D₂O,3'-OH),4.98(brs,1H,可交换D₂O,5'-OH),4.60(d,J=6.0Hz,1H,ph-CH),4.51(ABdd,J=12.8Hz,1H,7-CH₂a),4.45(ABdd,J=12.4Hz,1H,7-CH₂b),4.30(m,3H,CH₂NH和H-3'),3.78(m,1H,H-4'),3.47(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.39(m,1H,H-2'a),2.14(m,1H,H-2'b),1.95(m,1H,CH),0.88(d,J=6.8Hz,3H,CH₃),0.76(d,J=6.8Hz,3H,CH₃);¹³CNMR(100MHz,CD₃OD):δ157.62(C),151.15(CH),150.05(C),149.47(C),136.64(C),135.03(CH),129.34(CH),126.31(CH),122.68(C),122.14(CH),115.02(C),111.84(C),87.59(CH),85.83(C),85.01(CH),80.28(CH),80.13(C),81.42(CH),71.74(CH),64.28(CH₂),62.49(CH₂),39.73(CH₂),34.50(CH),29.07(CH₂),18.03(CH₃),17.18(CH₃)。

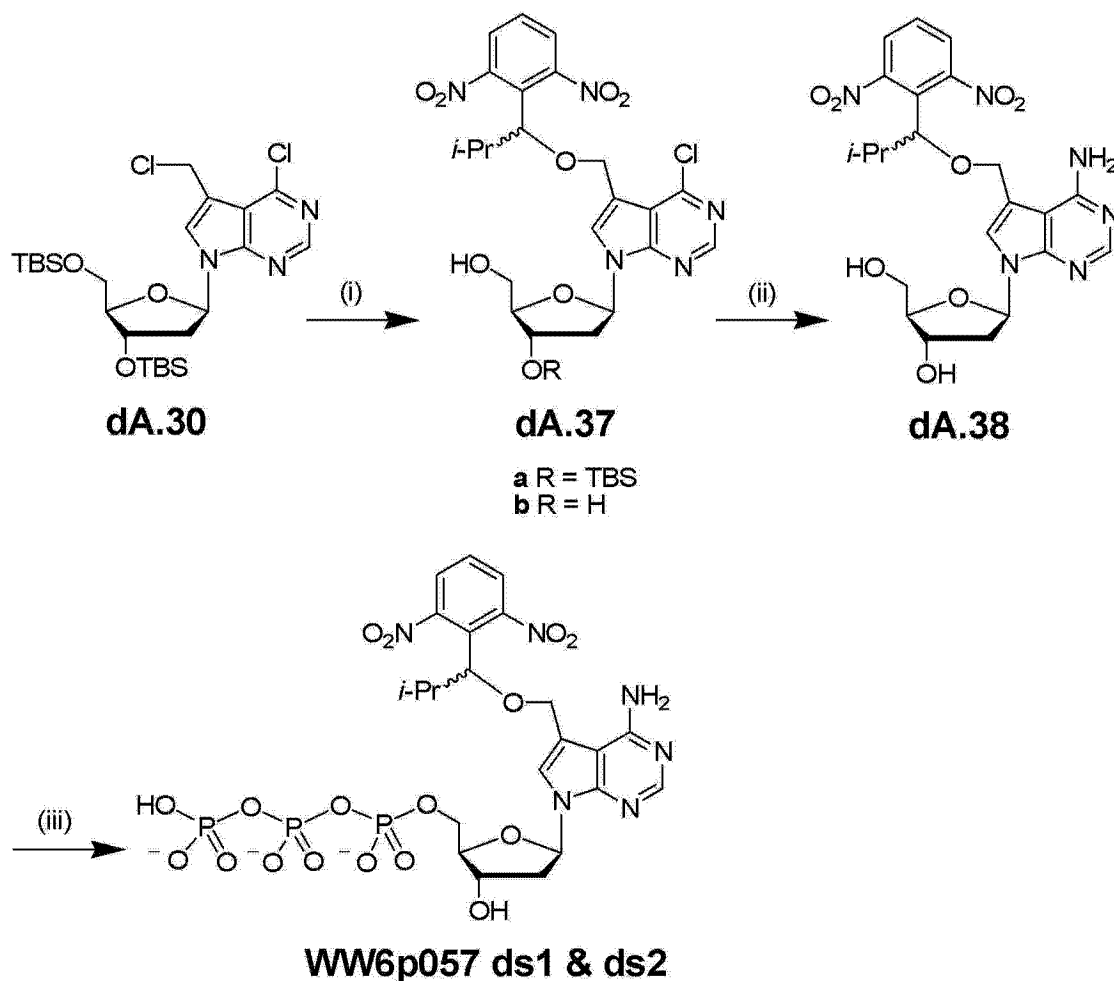
[0464] 7-[(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸(dA.36):将POCl₃(8μL,0.089mmol)加入化合物dA.35(27mg,0.045mmol)和质子海绵(19mg,0.089mmol)的三甲基磷酸(0.4mL)溶液中,将反应物在氮气气氛中0℃下搅拌2小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(285mg,0.6mmol)和三正丁胺(120μL)的无水DMF(1.2mL)溶液。搅拌30分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将所得残留物溶于水(10mL),过滤,并通过阴离子交换层析用QSepharoseFF柱(2.5×10cm)用240分钟内从25%乙腈/75%0.1M三乙基碳酸氢铵(TEAB)至25%乙腈/75%1.5MTEAB的线性梯度以4.5ml/

min 速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冷冻干燥。将所得残留物溶于水 (5mL) 并用浓氨水 (2mL, 27%) 在室温处理 1 小时, 以产生 7-[(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 dA. 36, 再通过反相 HPLC 用 PerkinElmer AquaporeOD-300 柱 (7 μ m, 250 \times 4.6mm) 纯化。流动相: A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水; B, 100mMTEAA 溶于水 /CH₃CN(30:70)。

[0465] 6-FAM 标记的 7-[(R)-1-[4-(3-氨基-1-丙炔基)-2-硝基苯基]-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 (WW6p028): 将 6-FAM-SE (4mg, 8.4 μ mol) 的无水 DMSO (80 μ L) 溶液加入三磷酸 dA. 36 (2.6 μ mol) 的 Na₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液 (0.1M, pH9.2, 1.6mL) 中。将所得混合物留置于室温 1 小时。染料标记的三磷酸首先通过阴离子交换 HPLC 用 PerkinElmerAX-300 柱 (7 μ m, 250 \times 4.6mm) 纯化。流动相: A, 25%CH₃CN/75%0.1MTEAB; B, 25%CH₃CN/75%1.5MTEAB。产物进一步通过反相 HPLC 用 PerkinElmerOD-300 柱 (7 μ m, 4.6 \times 250mm) 纯化以产生 6-FAM 标记的三磷酸 WW6p028。流动相: A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水 (pH7.0); B, 100mMTEAA 溶于水 /CH₂CN(30:70)。

[0466] 7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成

[0467]



[0468] 方案 28. 7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成. (i) 1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙醇 (外消旋), neat 法,

真空, 108 °C, 33%(dA. 37a) 和 11%(da. 37b); (ii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF; NH_3 31, 4-二氧六环 /MeOH, 90-100 °C, 86%; (iv) POCl_3 , $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0 °C; $n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{MHNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

[0469] 9-[β -D-3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 (dA. 37a) 和 9-[β -D-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 (dA. 37b): 将化合物 dA. 30 (109mg, 0.201mmol) 和 1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙醇 (448mg, 1.863mmol) 溶于无水二氯甲烷 (10mL)。真空除去溶剂, 所得残留物在 108 °C 真空加热 30 分钟, 然后溶于乙酸乙酯并用硅胶层析纯化, 以产生 9-[β -D-3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dA. 37a (42mg, 33%, 非对映体的 1:1 混合物) 和 9-[β -D-2'-脱氧呋喃核糖基]-6-氯-7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dA. 37b (13mg, 11%, 非对映体的 1:1 混合物)。dA. 37a (非对映体的 1:1 混合物) 的 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.59 (s, 1H, H-2), 7.78 (m, 2H, Ph-H), 7.63 (m, 1H, Ph-H), 7.38 (s, 1H, H-8), 6.39 (m, 1H, H-1'), 5.01 (2brs, 1H, 5'-OH), 4.72 (m, 4H, Ph-CH, 7- CH_2 , 和 H-3'), 4.11 (m, 1H, H-4'), 3.91 (ABd, 1H, H-5'a), 3.85 (m, 1H, H-5'b), 2.96 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.40 (m, 2H, H-2'), 1.08 (m, 3H, CH_3), 0.91 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.78 (2d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H, CH_3), 0.13 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$);

[0470] dA. 37a (非对映体的 1:1 混合物) 的 ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 152.60 和 152.47 (C), 150.92 和 150.66 (C), 150.47 和 150.28 (C), 151.84 (CH), 150.28 和 150.21 (C), 129.72 和 129.69 (CH), 129.18 (CH), 128.77 (C), 128.63 和 128.54 (CH), 126.69 (CH), 117.57 和 117.29 (C), 110.84 和 110.59 (C), 89.39 和 89.18 (CH), 88.70 和 88.80 (CH), 82.00 和 81.84 (CH), 73.47 和 73.35 (CH), 64.56 和 64.34 (CH_2), 63.10 和 63.05 (CH_2), 41.12 (CH_2), 34.86 (CH), 25.81 ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}$), 19.13 (CH_3), 18.36 (CH_3), 18.08 (C), -4.67 (CH_3Si), -4.76 (CH_3Si)。

[0471] dA. 37b (非对映体的 1:1 混合物) 的 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 8.57 和 8.56 (2s, 1H, H-2), 7.96 (m, 2H, Ph-H), 7.45 (m, 2H, Ph-H 和 H-8), 6.39 (m, 1H, H-1'), 4.78 (m, 2H, Ph-CH, 7- CH_2a), 4.56 (m, 2H, 7- CH_2b 和 H-3'), 4.02 (m, 1H, H-4'), 3.78 (m, 2H, H-5'), 2.62 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.44 (m, 1H, H-2'a), 2.30 (m, 1H, H-2'b), 1.02 和 0.95 (2d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H, CH_3), 0.71 和 0.69 (2d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H, CH_3)。

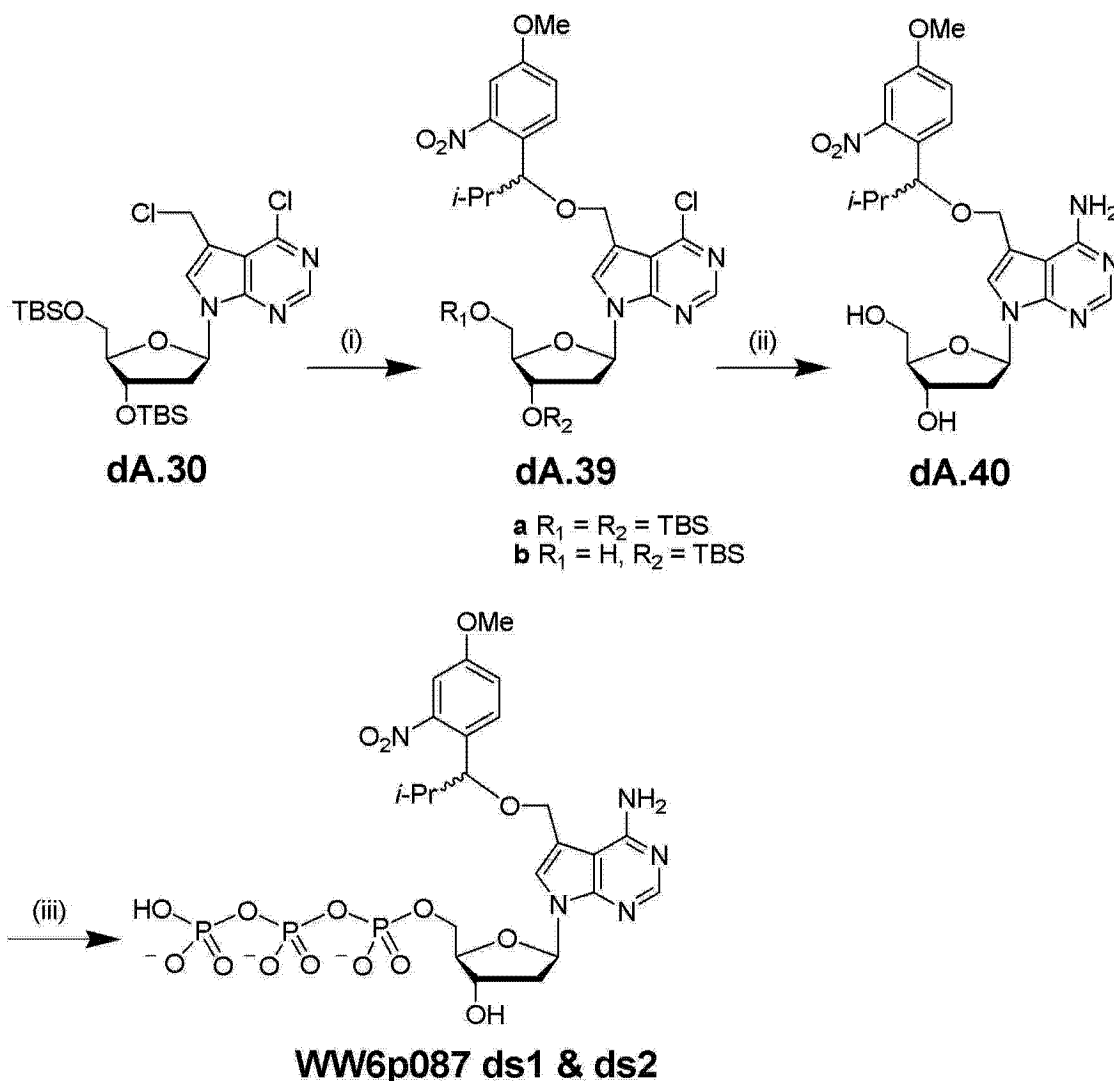
[0472] 7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 (dA. 38): 0 °C 下将 $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ (44mg, 0.140mmol) 的 THF (2mL) 溶液加入 dA. 37a (42mg, 0.066mmol) 的 THF (5mL) 溶液中。将反应物逐渐温热至室温, 搅拌 2 小时。将所得混合物真空浓缩, 加入 dA. 37b (12mg, 0.022mmol) 的 1,4-二氧六环 (4mL) 溶液, 随后加入 7NNH₃ 的甲醇溶液 (18mL)。将所得混合物转移至密封管, 在 90-100 °C 下搅拌 36 小时, 然后冷却, 真空浓缩, 将残留物用硅胶层析纯化以产生粘稠油状 7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 dA. 38 (38mg, 86%, 非对映体的 1:1 混合物)。非对映体的 ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 8.17 (m, 1H, Ph-H), 8.07 和 8.06 (2s, 1H, H-2), 7.85 (m, 1H, Ph-H), 7.69 (m, 1H, Ph-H), 7.20 和 7.18 (2s, 1H, H-8), 6.57 (bs, 2H, 可交换 D_2O , 6-NH₂), 6.46 (m, 1H, H-1'), 5.26 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H, 可交换 D_2O , 3'-OH), 5.01 (m, 1H, 可

交换 $D_2O, 5' -OH$), 4.60 (m, 2H, Ph-CH 和 7- CH_2a), 4.29 (m, 1H, 7- CH_2b), 4.13 (m, 1H, H-3'), 3.80 (m, 1H, H-4'), 3.51 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.49 (m, 1H, $CH(CH_3)_3$), 2.16 (m, 1H, H-2' a 和 H-2' b), 0.91 (m, 3H, CH_3), 0.65 (m, 3H, CH_3); 非对映体的 ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD): δ 157.73 (C), 151.33 和 151.18 (CH), 150.39 (C), 150.22 (C), 130.45 和 130.49 (CH), 127.25 和 127.13 (C), 126.90 (CH), 128.20 和 128.15 (CH), 123.45 和 123.32 (CH), 110.32 和 110.23 (CH), 103.03 和 102.75 (C), 87.74 和 87.58 (CH), 85.43 和 84.73 (CH), 79.94 和 79.37 (CH), 71.88 和 71.64 (CH), 64.08 和 63.71 (CH_2), 62.67 和 62.32 (CH_2), 40.95 和 39.82 (CH_2), 34.24 和 34.16 (CH), 19.63 (CH_3), 17.49 (CH_3). ToF-MS (ESI): 对分子离子 $C_{22}H_{27}N_6O_8[M+H]^+$, 质量计算值为 503.1890, 质量观测值为 503.2029。

[0473] 7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 (WW6p057ds1 & ds2): 将 $POCl_3$ (11 μ L, 0.12mmol) 加入化合物 dA.38 (30mg, 0.06mmol) 的三甲基磷酸 (0.4mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 $0^\circ C$ 下搅拌 4 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (285mg, 0.6mmol) 和三正丁胺 (120 μ L) 的无水 DMF (1.2mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水 (10mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱 (2.5 \times 20cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 /75%0.1M 三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 至 25% 乙腈 /75%1.5MTEAB 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干以产生 7-[1-(2,6-二硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 WW6p057 的两种非对映体混合物, 再通过反相 HPLC 用 PerkinElmerAquaporeOD-300 柱 (7 μ m, 250 \times 4.6mm) 分离以产生单一非对映体 WW6p057ds1 (快速洗脱) 和 WW6p057ds2 (慢速洗脱)。流动相: A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水; B, 100mMTEAA 溶于水 / CH_3CN (30:70)。

[0474] 7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成

[0475]



[0476] 方案 29. 7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸的合成。(i) 1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇(外消旋), neat 法, 真空, 108°C, 33%(dA. 39a) 和 21%(da. 39b); (ii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF; NH_3 , 1, 4-二氧六环/MeOH, 90-100°C, 61%; (iv) POCl_3 , $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{MHNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

[0477] 9-[$\beta\text{-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基}$]-6-氯-7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤(dA. 39a) 和 9-[$\beta\text{-D-3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基}$]-6-氯-7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤(dA. 39b): 将化合物 dA. 30(103mg, 0.19mmol) 和 1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙醇(428mg, 1.90mmol) 溶于无水二氯甲烷(3mL)中。真空除去溶剂, 将残留物在 108°C 真空加热 30 分钟, 然后溶于乙酸乙酯并用硅胶层析纯化, 以产生 9-[$\beta\text{-D-3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基}$]-6-氯-7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dA. 39a(46mg, 33%, 非对映体的 1:1 混合物) 和 9-[$\beta\text{-D-3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧呋喃核糖基}$]-6-氯-7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮嘌呤 dA. 39b(25mg, 21%, 非对映体的 1:1 混合物)。dA. 39a(非对映体的 1:1 混合物) 的 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.60 和 8.59(2s, 1H, H-2), 7.64 和 7.62(2d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H,

Ph-H), 7.47 和 7.45 (2s, 1H, H-8), 7.32 (m, 1H, Ph-H), 7.12 (m, 1H, Ph-H), 6.71 (m, 1H, H-1'), 4.62 (m, 4H, Ph-CH, 7-CH₂, 和 H-3'), 3.99 (m, 1H, H-4'), 3.87 和 3.86 (2s, 3H, MeO), 3.70 (ABd, 1H, H-5' a 和 H-5' b), 2.50 (m, 1H, H-2' a), 2.35 (m, 1H, H-2' a), 1.93 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1.00 和 0.97 (2d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.93 和 0.92 (2s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.91 和 0.89 (2s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.80 和 0.76 (2d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.12 和 0.10 (2s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.08, 0.07, 0.06 和 0.05 (4s, 6H, (CH₃)₂Si); dA. 39a (非对映体的 1:1 混合物) 的 ¹³CNMR (100MHz, CDCl₃): δ 158.82 (C), 151.82 和 151.46 (C), 151.32 和 151.16 (C), 150.85 (CH), 150.27 和 150.08 (C), 130.16 (CH), 128.95 和 129.80 (C), 126.56 和 126.22 (CH), 119.60 (CH), 112.49 和 122.22 (C), 108.21 和 108.14 (CH), 87.64 和 87.58 (CH), 83.69 (CH), 80.68 和 79.98 (CH), 72.42 和 72.27 (CH), 63.26 和 63.17 (CH₂), 63.03 和 62.80 (CH₂), 55.80 (CH₃), 41.04 (CH₂), 35.08 (CH), 25.95 ((CH₃)₃Si), 25.80 ((CH₃)₃Si), 25.66 ((CH₃)₃Si), 19.12 和 19.05 (CH₃), 18.42 (CH₃), 18.05 (C), -3.75 (CH₃Si), -4.66 和 -4.76 (CH₃Si), -5.36 (CH₃Si), -5.46 和 -5.50 (CH₃Si)。

[0478] dA. 39b (非对映体的 1:1 混合物) ¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.59 和 8.57 (2s, 1H, H-2), 7.62 和 7.60 (2d, J=6.4Hz, 1H, Ph-H), 7.33 和 7.32 (2d, J=2.4Hz, 1H, Ph-H), 7.30 和 7.29 (2s, 1H, H-8), 7.14 和 7.10 (2dd, J=8.8, 2.4Hz, 1H, Ph-H), 6.28 (m, 1H, H-1'), 5.06 (brt, 1H, 5'-OH), 4.64 (m, 4H, Ph-CH, 7-CH₂, 和 H-3'), 4.11 (m, 1H, H-4'), 3.94 (ABd, J=10.8Hz, 1H, H-5' a), 3.87 和 3.85 (2s, 3H, MeO), 3.76 (m, 1H, H-5' b), 2.93 (m, 1H, H-2' a), 2.25 (m, 1H, H-2' b), 1.96 (sep, J=6.4Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 0.95 (m, 3H, CH₃), 0.94 (s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.80 (m, 3H, CH₃), 0.13 (s, 6H, (CH₃)₂Si)。

[0479] 7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 (dA. 40): 0 °C 下将 n-Bu₄NF (68mg, 0.217mmol) 的 THF (2mL) 溶液加入 dA. 39a (46mg, 0.063mmol) 和 dA. 39b (25mg, 0.040mmol) 的 THF (8mL) 溶液中。将反应物逐渐温热至室温, 搅拌 30 分钟。将所得混合物真空浓缩, 溶于 1,4-二氧六环 (8mL), 随后加入甲醇 (24mL) 中的 7NNH₃。将所得混合物转移至密封管, 在 90-100 °C 下搅拌 16 小时, 然后冷却, 真空浓缩, 残留物用硅胶层析纯化以产生粘稠油状 7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷 dA. 40 (38mg, 61%, 非对映体的 1:1 混合物)。非对映体的 ¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 8.06 和 8.05 (2s, 1H, H-2), 7.57 和 7.54 (2d, J=8.8Hz, 1H, Ph-H), 7.47 和 7.44 (2d, J=2.6Hz, 1H, Ph-H), 7.33 和 7.27 (2dd, J=8.8, 2.6Hz, 1H, Ph-H), 7.18 和 7.15 (2s, 1H, H-8), 6.63 (bs, 2H, 可交换 D₂O, 6-NH₂), 6.43 (m, 1H, H-1'), 5.24 (m, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 5.03 (m, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.55 (m, 2H, Ph-CH, 7-CH₂a), 4.30 (m, 2H, 7-CH₂b 和 H-3'), 3.86 和 3.84 (2s, 3H, MeO), 3.78 (m, 1H, H-4'), 3.48 (m, 2H, H-5'), 2.45 (m, 1H, H-2' a), 2.12 (m, 1H, H-2' b), 1.93 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 0.88 (m, 3H, CH₃), 0.74 和 0.71 (2d, J=6.8Hz, 3H, CH₃); 非对映体的 ¹³CNMR (100MHz, CD₃OD): δ 158.46 和 158.40 (C), 158.40 (C), 150.28 和 150.25 (CH), 149.97 和 149.78 (C), 149.28 (C), 129.19 和 129.16 (CH), 126.69 和 126.56 (C), 121.36 和 121.02 (CH), 118.11 和 117.99 (CH), 111.20 和 110.95 (C), 107.27 和 107.20 (CH), 102.40 和 102.36 (C), 86.87 和 86.83 (CH), 84.42 和 84.25 (CH), 79.47 和 78.73 (CH), 70.97 (CH), 63.00 和 62.46 (CH₂), 61.73 和 61.64 (CH₂), 54.30 (CH₃), 39.16 和 38.99 (CH₂), 33.71 和 33.68 (CH), 17.29 (CH₃), 16.71 和 16.66 (CH₂)。ToF-MS (ESI): 对分子

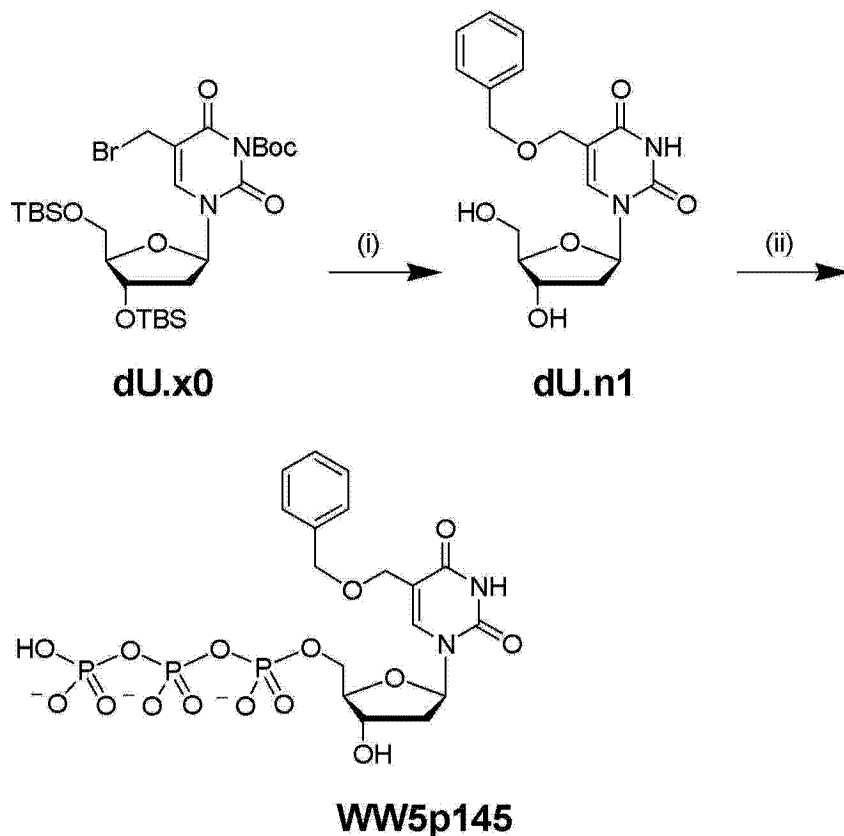
离子 $C_{23}H_{30}N_5O_7[M+H]^+$, 质量计算值为 488.2145, 质量观测值为 488.2466。

[0480] 7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 (WW6p087ds1 & ds2): 将 $POCl_3$ (11 μ L, 0.12mmol) 加入化合物 dA.40 (28mg, 0.06mmol) 的三甲基磷酸 (0.35mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0 $^{\circ}$ C 下搅拌 2 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (237mg, 0.5mmol) 和三正丁胺 (100 μ L) 的无水 DMF (1.0mL) 溶液。搅拌 10 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水 (10mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱 (2.5 \times 20cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 0.1M 三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 至 25% 乙腈 / 75% 1.5M TEAB 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干, 以产生 7-[1-(4-甲氧基-2-硝基苯基)-2-甲基-丙氧基]甲基-7-脱氮-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸 WW6p087 的两种非对映体混合物, 再通过反相 HPLC 用 PerkinElmer AquaporeOD-300 柱 (7 μ m, 250 \times 4.6mm) 分离以产生单一非对映体 WW6p087ds1 (快速洗脱) 和 WW6p087ds2 (慢速洗脱)。流动相: A, 100mM 三乙基乙酸铵 (TEAA) 溶于水; B, 100mM TEAA 溶于水 / CH_3CN (30:70)。

[0481] 实施例 9- 可化学切割的类似物的合成

[0482] 5-(苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0483]



[0484] 方案 30. 5-(苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成. (D 苄醇, neat 法, 112 $^{\circ}$ C, 44%; (ii) $POCl_3$, 质子海绵, $(MeO)_3PO$, 0 $^{\circ}$ C; $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, $n-Bu_3N$, DMF; 1M $HNEt_3HCO_3$ 。

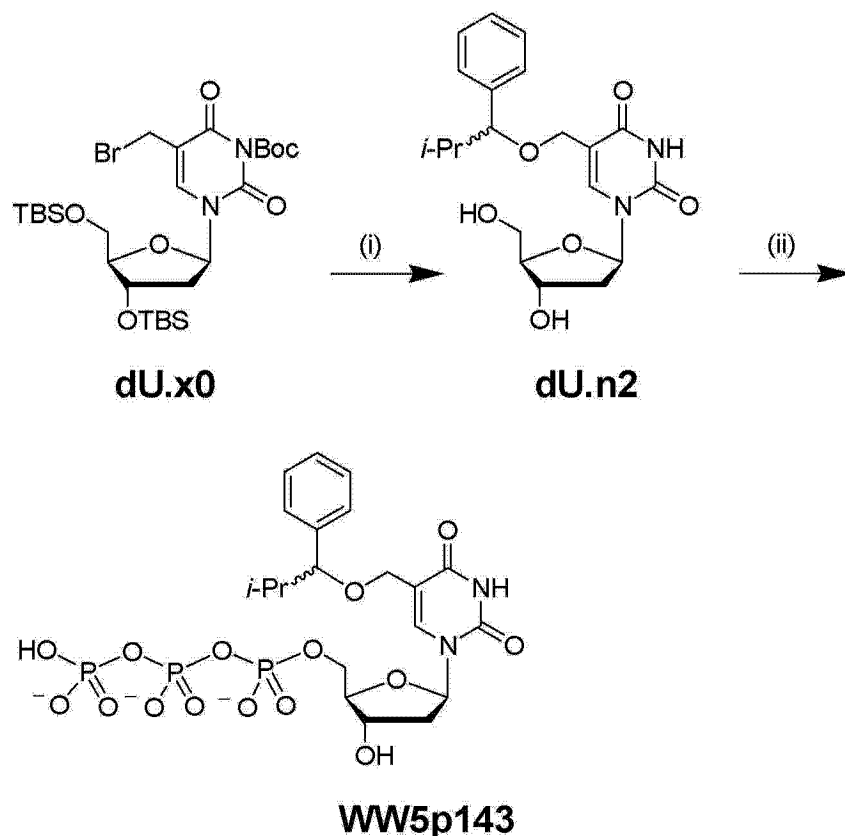
[0485] 5-(苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n1): 在氮气气氛中将化合物 dU.x0 (381mg,

0.586mmol) 和苯甲醇 (634mg, 5.864mmol) 用 neat 法在 112°C 加热 30 分钟。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的二氯甲烷中, 并用硅胶层析纯化, 以产生 5-(苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷 dU.n1 (89mg, 44%)。需要注意的是, dU.n1 是已知的 (例如, 参见 Mel'nik 等 1991, 通过引用并入本文), 但是是通过与本文所报告不同的方法获得的。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ 11.40 (s, 1H, 可交换 D₂O, 3-NH), 7.94 (s, 1H, H-6), 7.30 (m, 5H, Ph-H), 6.17 (t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 5.26 (d, J=4.2Hz, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 5.04 (t, J=5.2Hz, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.49 (s, 2H, PhCH₂), 4.24 (m, 1H, H-3'), 4.17 (m, 2H, 5-CH₂a 和 5-CH₂b), 3.79 (m, 1H, H-4'), 3.57 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.10 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b); ¹³CNMR (100MHz, CD₃OD) : δ 165.29 (C), 152.24 (C), 141.23 (CH), 139.62 (C), 129.52 (CH), 129.05 (CH), 128.84 (CH), 112.44 (C), 89.04 (CH), 86.73 (CH), 73.69 (CH₂), 72.27 (CH), 65.95 (CH₂), 62.92 (CH₂), 41.50 (CH₂)。

[0486] 5-(苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷 -5'- 三磷酸 (WW5p145) : 将 POCl₃ (8 μ L, 0.086mmol) 加入化合物 dU.n1 (15mg, 0.043mmol) 和质子海绵 (18mg, 0.086mmol) 的三甲基磷酸 (0.35mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0°C 搅拌 2 小时。加入双 - 三正丁基焦磷酸铵 (237mg, 0.5mmol) 和三正丁胺 (100 μ L) 的无水 DMF (1mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱 (2.5×10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 /75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈 /75% TEAB (1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干以产生 5-(苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧 - 尿苷 -5'- 三磷酸 WW5p145。¹HNMR (400MHz, D₂O) : δ 7.82 (s, 1H, H-6), 7.26 (m, 5H, Ph-H), 6.14 (t, J=6.8Hz, 1H, H-1'), 4.51 (m, 1H, H-3'), 4.5 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.31 (2d, 2H, 5-CH₂), 4.08 (m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.21 (m, 2H, H-2'); ³¹PNMR (162Hz, D₂O) : δ -9.79 (d, J=19.4Hz), -11.67 (d, J=21.0Hz), -23.13 (t, J=21.0Hz)。

[0487] 5-(1- 苄基 -2- 甲基 - 丙氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷 -5'- 三磷酸的合成

[0488]



[0489] 方案 31.5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成。(i) 2-甲基-1-苯基-1-丙醇, neat 法, 108-114°C, 12%; (ii) POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃P=O, 0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1MHNEt₃HCO₃。

[0490] 5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n2): 在氮气气氛下将化合物 dU.x0 (0.331g, 0.51mmol) 和 2-甲基-1-苯基-1-丙醇 (1.238g, 8.24mmol) 用 neat 法在 108-114°C 下加热 1 小时。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯, 并用硅胶层析纯化以产生 5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n2 (26mg, 12%, 非对映体的 1:1 混合物)。从反应中还得到了 3', 5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (77mg, 24%, 非对映体的 1:1 混合物) 和 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (46mg, 18%, 非对映体的 1:1 混合物)。dU.n2 (非对映体的 1:1 混合物) 的 ¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 11.31 (brs, 1H, D₂O 可交换, 3-NH), 7.77 (2s, 1H, H-6), 7.29 (m, 5H, Ph-H), 6.14 (m, 1H, H-1'), 5.25 (d, J=4.4Hz, 1H, 可交换 D₂O, 3'-OH), 4.98 (m, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.00 (m, 1H, PhCH), 3.91 (m, 2H, 5-CH₂a 和 5-CH₂b), 3.77 (m, 1H, H-4'), 3.54 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.06 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 1.83 (m, 2H, CH(CH₃)₂), 0.88 (d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.66 (d, J=6.8Hz, 3H, CH₃)。

[0491] 3', 5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (非对映体的 1:1 混合物) 的 ¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 9.07 和 9.06 (2s, 1H, 3-NH), 7.95 和 7.53 (2s, 1H, H-6), 7.29 (m, 5H, Ph-H), 6.29 (m, 1H, H-1'), 4.24 (m, 1H, H-3'), 4.03 (m, 4H, 5-CH₂a, 5-CH₂b, PhCH, 和 H-4'), 3.77 (ABdd, J=11.2 和 3.4Hz, 1H, H-5' a), 3.75 (ABdd, J=11.2 和 4.4Hz, 1H, H-5' b), 2.29 (m, 1H, H-2' a), 1.98 (m, 1H,

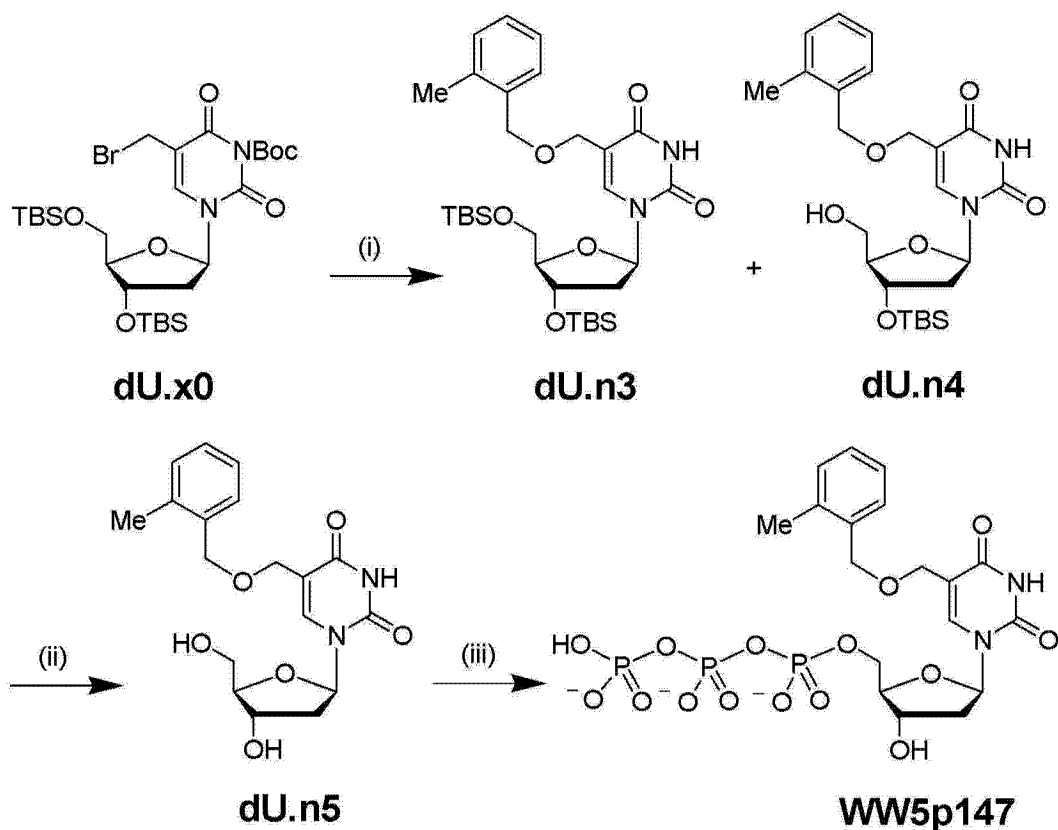
H-2' b), 1.04 和 1.01 (2d, J=6.4 和 6.8Hz, 3H, CH₃), 0.90 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.89 和 0.88 (2s, 9H, (CH₃)₃C), 0.74 和 0.73 (2d, J=6.8 和 6.4Hz, 3H, CH₃), 0.10 和 0.09 (2s, 6H, CH₃Si), 0.08 和 0.07 (2s, 3H, CH₃Si), 0.06 和 0.05 (2s, 3H, (CH₃)₂Si); 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷(非对映体的 1:1 混合物)的 ¹³CNMR(100MHz, CDCl₃): δ 162.51 (C), 150.20 和 150.15 (C), 140.83 和 140.79 (C), 137.28 和 137.19 (CH), 128.15 和 128.11 (CH), 127.54 (CH), 127.45 (CH), 112.41 (C), 88.40 和 88.31 (CH), 87.83 和 87.78 (CH), 85.38 和 85.30 (CH), 72.49 和 72.41 (CH), 63.64 和 63.57 (CH₂), 663.22 (CH₂), 40.79 (CH₂), 34.82 和 34.79 (CH), 25.93 和 25.92 (C(CH₃)₃), 25.76 和 25.72 (C(CH₃)₃), 19.20 和 19.17 (CH₃), 19.00 (CH₃), 18.38 (C), 18.00 (C), -4.65 (CH₃), -4.80 (CH₃), -5.35 和 -5.38 (CH₃), -5.40 和 -5.44 (CH₃)。

[0492] (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷(非对映体的 1:1 混合物)的 ¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 9.09 (s, 1H, 3-NH), 7.61 (s, 1H, H-6), 7.28 (m, 5H, Ph-H), 6.18 (m, 1H, H-1'), 4.51 (m, 1H, H-3'), 4.09 (s, 2H, 5-CH₂a, 5-CH₂b), 3.98 (d, J=7.2Hz, 1H, PhCH), 3.93 (m, 1H, H-4'), 3.90 (m, 1H, H-5' a), 3.73 (m, 1H, H-5' b), 2.50 (br, 1H, 3' - 或 5' -OH), 2.30 (m, 1H, H-2' a), 1.98 (m, 2H, H-2' b 和 CH(CH₃)₂), 1.01 (d, J=6.4Hz, 3H, CH₃), 0.91 (s, 9H, (CH₃)₃C), 0.74 (d, J=6.8Hz, 3H, CH₃), 0.10 (s, 3H, CH₃Si), 0.07 和 0.06 (2s, 3H, CH₃Si)。

[0493] 5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸(WW5p143): 将 POCl₃(6 μL, 0.063mmol) 加入化合物 dU.n2(15mg, 0.032mmol) 和质子海绵(14mg, 0.063mmol) 的三甲基磷酸(0.4mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0℃ 下搅拌 2 小时。另加两次 POCl₂(6 μL, 0.063mmol), 间隔 1 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(285mg, 0.6mmol) 和三正丁胺(120 μL) 的无水 DMF(1.2mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水(5mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱(2.5×10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈/75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈/75% TEAB(1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干以产生 5-(1-苯基-2-甲基-丙氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 WW5p143(非对映体的 1:1 混合物); ³¹PNMR(162Hz, D₂O): δ -10.88 (m), -11.33 (m), -23.08 (m)。

[0494] 5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0495]



[0496] 方案 32. 5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成. (i) 2-甲基苯甲醇, neat 法, 110°C; (ii) *n*-Bu₄NF, THF, 室温, 38%; (iii) POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃PO, 0°C; (*n*-Bu₃NH)₂H₃P₃O₇, *n*-Bu₃N, DMF; 1MHNEt₃HCO₃.

[0497] 3'-5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (**dU.n3**) 和 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (**dU.n4**): 在氮气气氛中将化合物 **dU.x0** (0.438g, 0.67mmol) 和 2-甲基苯甲醇 (0.823g, 6.74mmol) 用 neat 法在 110°C 加热 45 分钟. 将所得混合物冷却至室温并用硅胶层析纯化, 以产生 3', 5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 **dU.n3** (20mg, 5%) 和 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 **dU.n4** (43mg, 14%). **dU.n3** 的 ¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.42 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, H-6), 7.30 (m, 1H, Ph-H), 7.18 (m, 3H, Ph-H), 6.28 (t, 1H, H-1'), 4.59 (2d, 2H, Ph-CH₂), 4.38 (m, 1H, H-3'), 4.27 (2d, 2H, 5-CH₂), 3.94 (m, 1H, H-4'), 3.75 (m, 2H, H-5'), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.26 (m, 1H, H-2' a), 2.0 (m, 1H, H-2' b), 0.89 和 0.90 (2s, 18H, (CH₃)₃CSi), 0.09 和 0.08 (2s, 6H, (CH₃)₂Si), 0.07 和 0.06 (2s, 6H, (CH₃)₂Si); **dU.n4** 的 ¹HNMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H, NH), 7.73 (s, 1H, H-6), 7.33 (m, 1H, Ph-H), 7.22 (m, 3H, Ph-H), 6.16 (t, 1H, J=6.4Hz, H-1'), 4.6 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.46 (m, 1H, H-3'), 4.34 (2d, 2H, 5-CH₂), 3.92 (m, 1H, H-4'), 3.81 (m, 1H, H-5' a), 3.67 (m, 1H, H-5' b), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.30 (m, 1H, H-2' a), 2.24 (m, 1H, H-2' b), 0.89 (1s, 9H, (CH₃)₃CSi), 0.07 (2s, 6H, (CH₃)₂Si).

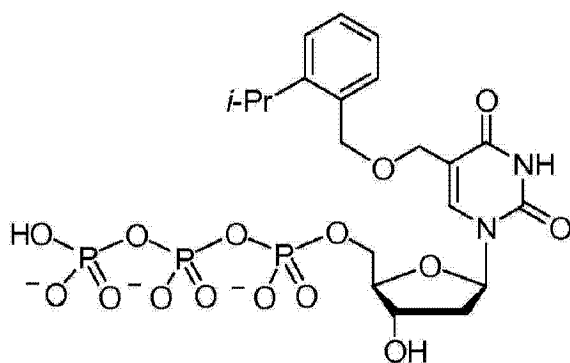
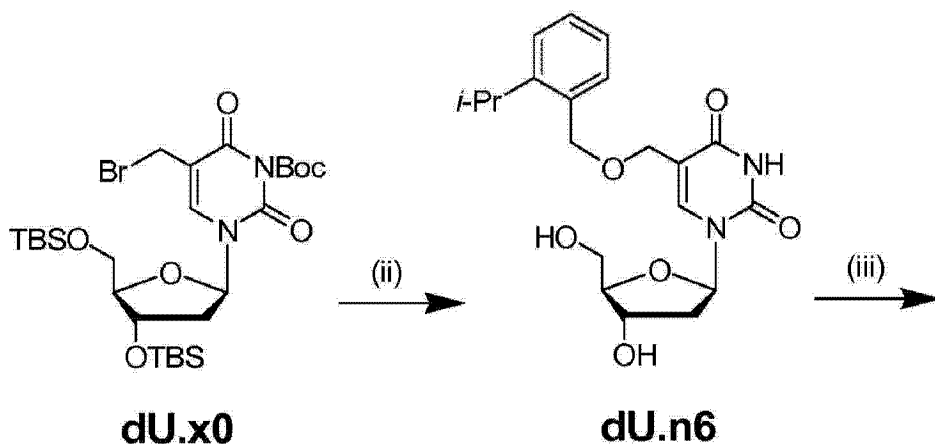
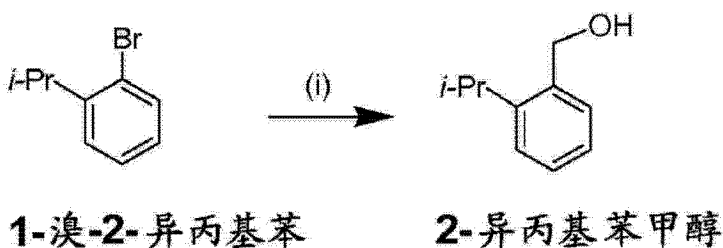
[0498] 5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (**dU.n5**): 在室温下将化合物 **dU.n3** (20mg, 0.034mmol) 的 THF (2mL) 溶液用 *n*-Bu₄NF (32mg, 0.1mmol) 处理 3 小时. 另将化合物 **dU.n4** (43mg, 0.09mmol) 的 THF (4mL) 溶液也用 *n*-Bu₄NF (64mg, 0.2mmol) 在室温下处理 3

小时。合并两反应混合物,真空浓缩,并用硅胶柱层析纯化以产生 5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU. n5 (17mg, 38%)。¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 11.38 (s, 1H, 可交换 D₂O, NH), 7.93 (s, 1H, H-6), 7.29 (m, 1H, Ph-H), 7.15 (m, 3H, Ph-H), 6.15 (t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 5.24 (d, J=4.4Hz, 1H, 可交换 D₂O, 3z-OH), 5.02 (t, 1H, J=5.2Hz, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.46 (s, 2H, Ph-CH₂), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.16 (2d, 2H, 5-CH₂), 3.77 (m, 1H, H-4'), 3.55 (m, 2H, H-5'), 2.24 (s, 1H, CH₃), 2.08 (m, 2H, H-2')。

[0499] 5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 (WW47): 将 POCl₃ (8 μL, 0.083mmol) 加入化合物 dU. n5 (15mg, 0.041mmol) 和质子海绵 (18mg, 0.083mmol) 的三甲磷酸 (0.35mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0℃ 下搅拌 2 小时。另加 POCl₃ (4 μL, 0.041mmol), 将所得混合物再在 0℃ 下搅拌 2 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (237mg, 0.5mmol) 和三正丁胺 (100 μL) 的无水 DMF (1mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水 (5mL), 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱 (2.5×10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈 / 75% TEAB (1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干以产生 5-(2-甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 WW5p147。¹HNMR (400MHz, D₂O): δ 7.96 (s, 1H, H-6), 7.32 (m, 1H, Ph-H), 7.24 (m, 3H, Ph-H), 6.28 (t, J=6.8Hz, 1H, H-1'), 4.63 (m, 3H, Ph-CH₂ 和 H-3'), 4.43 (2d, 2H, 5-CH₂), 4.20 (m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.36 (m, 2H, H-2'), 2.31 (s, 3H, CH₃); ³¹PNMR (162Hz, D₂O): δ -7.29 (m), -10.66 (d, J=17.8Hz), -21.4 (m)。

[0500] 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0501]



[0502] 方案 33. 5-(2-异丙基苯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成. (i) $n\text{-BuLi}$, 甲醛, 零下 78°C , 59%; (ii) 2-异丙基苯甲醇, neat 法, $110\text{--}112^\circ\text{C}$, 12%; (iii) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{P}_0$, 0°C ; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{MHNEt}_3\text{HCO}_3$.

[0503] 2-异丙基苯甲醇: 在氮气气氛中向 1-溴-2-异丙基苯 (2.50g, 12.56mmol) 的无水 THF (40mL) 溶液中加入 2,2'-联吡啶 (约 2mg) (Zhi 等 2003, 通过引用并入本文)。将所得混合物在零下 78°C 冷却, 通过注射器在 10 分钟内逐滴加入正丁基锂溶液 (5.52mL, 2.5M 溶于己烷, 13.82mmol)。加完后, 搅拌所得混合物 30 分钟, 然后温热至零下 30°C , 使甲醛 (通过 1.77g 多聚甲醛在 160°C 加热产生) 流经溶液直至深红色完全消失。所得混合物用饱和氯化铵 (5mL) 猝灭, 然后倒入卤水 (15mL)。分离有机层; 将水相层用二氯甲烷萃取两次 (每次 20mL); 将合并的萃取物经由无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 并用硅胶层析纯化以产生油状的 2-异丙基苯甲醇 (1.11g, 59%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.30 (m, 3H, Ph-H), 7.18 (m, 3H, Ph-H), 4.75 (s, 2H, CH_2OH), 3.27 (sep, $J=6.6\text{Hz}$, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.53 (s, 1H, CH_2OH), 1.26 (d, $J=6.6\text{Hz}$,

1H, CH(CH₃)₂)。

[0504] 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷(dU.n6):在氮气气氛中将化合物dU.x0(0.331g,0.51mmol)和2-异丙基苯甲醇(1.238g,8.24mmol)用neat法在110-112℃下加热1.5小时。将所得混合物冷却至室温,溶于乙酸乙酯,并用硅胶层析纯化以产生5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷dU.n6(33mg,t2%)。从反应中还可得到3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷(134mg,29%)和(3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷(98mg,26%)。dU.n6的¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆):δ 11.41(s,1H,D₂O可交换,NH),7.94(s,1H,H-6),7.29(m,3H,Ph-H),7.14(m,1H,Ph-H),6.16(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),5.26(t,J=4.4Hz,1H,可交换D₂O,5'-OH),5.03(t,J=5.2Hz,1H,可交换D₂O,5'-OH),4.51(s,2H,CH₂O),4.24(m,1H,H-3'),4.18(ABd,J=12.7Hz,1H,5-CH₂a),4.15(ABd,J=12.7Hz,1H,5-CH₂b),3.78(m,1H,H-4'),3.56(m,2H,H-5'a和H-5'b),3.15(sep,J=6.8Hz,1H,CH(CH₃)₂),2.09(m,2H,H-2'a和H-2'b),1.15(d,J=6.8Hz,6H,CH(CH₃)₂);dU.n6的¹³CNMR(100MHz,CD₃OD):δ 163.77(C),150.77(C),147.85(C),139.85(CH),134.29(C),129.41(CH),128.19(CH),125.19(CH),125.03(CH),110.97(C),87.56(CH),85.22(CH),70.85(CH),70.35(CH₂),64.29(CH₂),61.47(CH₂),40.01(CH₂),28.39(CH),23.09(CH₃)。

[0505] 3'-5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的¹HNMR(400MHz,CDCl₃):δ 9.60(s,1H,3-NH),7.64(s,1H,H-6),7.28(m,3H,Ph-H),7.28(dt,J=7.1和1.8Hz,1H,Ph-H),6.29(dd,J=7.7和5.9Hz,1H,H-1'),4.64(s,2H,CH₂O),4.38(m,1H,H-3'),4.31(ABd,J=12.7Hz,1H,5-CH₂a),4.27(ABd,J=12.7Hz,1H,5-CH₂b),3.93(m,1H,H-4'),3.74(m,2H,H-5'a和H-5'b),3.24(sep,J=6.8Hz,1H,CH(CH₃)₂),2.28(m,1H,H-2'a),2.00(m,1H,H-2'b),1.23(d,J=6.8Hz,6H,CH(CH₃)₂),0.89(s,9H,(CH₃)₃C),0.88(s,9H,(CH₃)₃C),0.09(s,3H,CH₃Si),0.07(s,3H,CH₃Si),0.06(s,3H,CH₃Si),0.05(s,3H,CH₃Si);3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的¹³CNMR(100MHz,CDCl₃):δ 162.94(C),150.29(C),147.74(C),138.11(CH),134.27(C),129.41(CH),128.40(CH),125.54(CH),125.38(CH),111.90(C),87.81(CH),85.28(CH),72.24(CH),71.08(CH₂),64.44(CH₂),62.99(CH₂),41.08(CH₂),28.63(CH),25.92(C(CH₃)₃),25.74(C(CH₃)₃),23.99(CH₃),18.36(C),17.98(C),-4.67(CH₃),-4.84(CH₃),-5.44(CH₃),-5.52(CH₃)。

[0506] (3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆):δ 11.42(s,1H,可交换D₂O,NH),7.89(s,1H,H-6),7.28(m,3H,Ph-H),7.12(m,1H,Ph-H),6.14(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),5.07(t,J=5.2Hz,1H,可交换D₂O,5'-OH),4.51(s,2H,CH₂O),4.41(m,1H,H-3'),4.31(ABd,J=12.7Hz,1H,5-CH₂a),4.15(ABd,J=12.7Hz,1H,5-CH₂b),3.76(m,1H,H-4'),3.56(m,2H,H-5'a和H-5'b),3.14(sep,J=6.8Hz,1H,CH(CH₃)₂),2.16(m,1H,H-2'a),2.09(m,1H,H-2'b),1.14(d,J=6.8Hz,6H,CH(CH₃)₂),0.86(s,9H,(CH₃)₃C),0.06(s,6H,(CH₃)₂Si);(3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的¹³CNMR(100MHz,CDCl₃):δ 162.77(C),150.30(C),147.76(C),138.79(CH),134.26(C),129.32(CH),128.54(CH),125.60(CH),125.48(CH),111.92(C),87.77(CH),87.14(CH),71.72(CH),

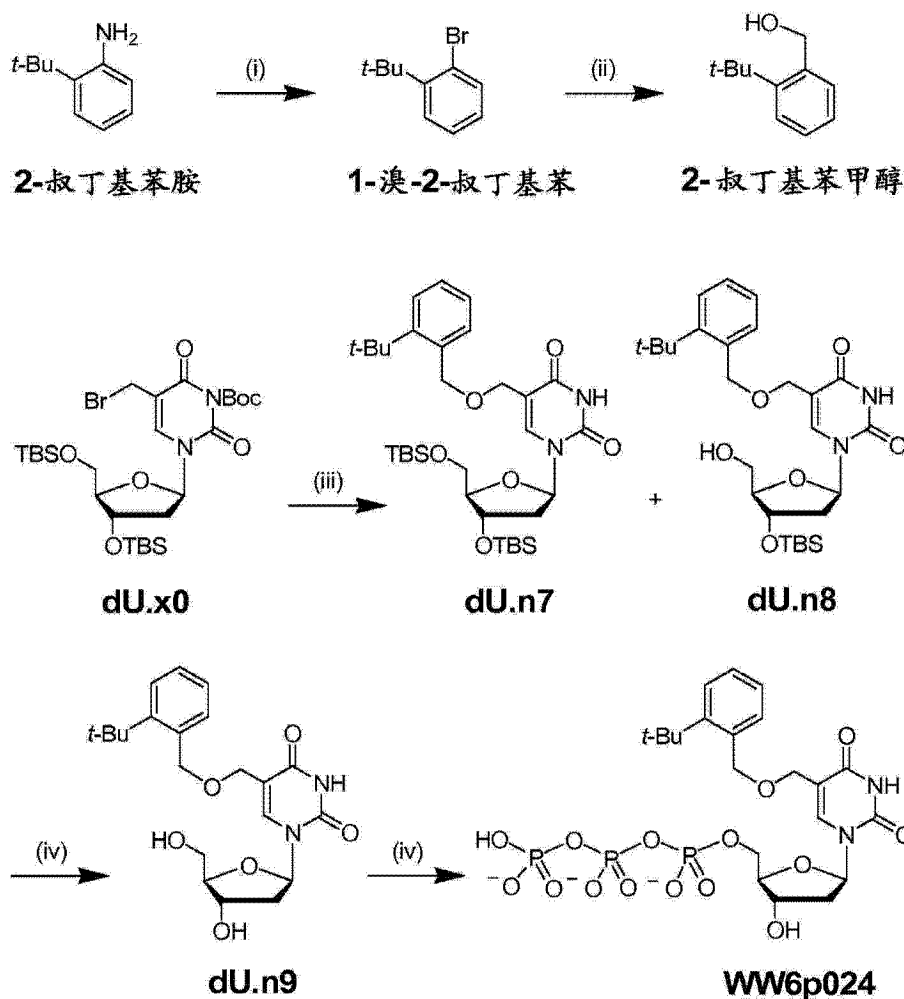
71.03 (CH₂), 64.40 (CH₂), 61.98 (CH₂), 40.68 (CH₂), 28.68 (CH), 25.71 (C(CH₃)₃), 23.99 (CH₃), 17.93 (C), -4.73 (CH₃), -4.88 (CH₃)。

[0507] 将化合物 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (134mg, 0.22mmol) 和 (3'或5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (98mg, 0.19mmol) 溶于 THF (5mL), 加入三水合四正丁基氟化铵 (323mg, 1.05mmol) 的 THF (2mL) 溶液。将所得混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩并用硅胶层析纯化以产生 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n6 (108mg, 67%)。

[0508] 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 (WW5p149): 将 POCl₃ (15 μL, 0.164mmol) 加入化合物 dU.n6 (32mg, 0.082mmol) 和质子海绵 (35mg, 0.164mmol) 的三甲基磷酸 (0.5mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0°C 下搅拌 2 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (356mg, 0.75mmol) 和三正丁胺 (150 μL) 的无水 DMF (1.5mL)。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水 (5mL) 和乙腈 (5mL) 的混合物, 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱 (2.5×10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈 / 75% TEAB (1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干以产生 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 WW5p149。¹HNMR (400MHz, D₂O): δ 7.98 (s, 1H, H-6), 7.36 (m, 3H, Ph-H), 7.21 (m, 1H, Ph-H), 6.27 (t, J=6.8Hz, 1H, H-1'), 4.64 (m, 3H, Ph-CH₂ 和 H-3'), 4.43 (ABd, 1H, J=12Hz, 5-CH₂a), 4.39 (ABd, 1H, J=12Hz, 5-CH₂b), 4.25 (m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.34 (m, 2H, H-'), 1.15 (d, 3H, J=6.8Hz, CH₃); ³¹PNMR (162Hz, D₂O): δ -5.5 (d, J=21.0Hz), -10.5 (d, J=19.4Hz), -20.94 (t, J=21.0Hz)。

[0509] 5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0510]



[0511] 方案 34. 5-(2-叔丁基苯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成. (i) NaNO_2 , HBr , $5-10^\circ\text{C}$, 然后 $\text{Cu}(0)$, 50°C , 27%; (ii) $n\text{-BuLi}$, 甲醛, 零下 78°C , 75%; (iii) 2-叔丁基苯甲醇, neat 法, $115-118^\circ\text{C}$; (iv) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, 室温, 70%; (v) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C ; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{MHNEt}_3\text{HCO}_3$.

[0512] 1-溴-2-叔丁基苯: 将 2-叔丁基苯胺 (7.46g, 50mmol) 的氢溴酸 (40%w/w, 15mL) 溶液在 $< 5^\circ\text{C}$ (冰/盐浴) 下冷却, 以使温度不超过 10°C 的速度加入溶于 10mL 水的 7.55g (0.11mol) 亚硝酸钠溶液 (约需添加 2 小时)。重氮化作用完成后, 加入 0.20g 铜粉 (警示: 溶液回流须小心, 因为有剧烈气体释放!)。当剧烈的氮气释放消退时, 将体系在 50°C 下保持 30 分钟, 然后用 80mL 水稀释并用乙醚萃取两次 (每次 100mL)。将有机层用 10%KOH 溶液清洗; 经由 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩, 并用硅胶层析法纯化。所得产物进一步在 85°C (3mmHg) 下蒸馏以产生 1-溴-2-叔丁基苯 (2.88g, 27%)。 $^1\text{HNMR}$ (400Mhz, CDCl_3): δ 7.58 (m, 1H, Ph-H), 7.45 (m, 1H, Ph-H), 7.24 (m, 1H, Ph-H), 7.02 (m, 1H, Ph-H), 1.51 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)。

[0513] 2-叔丁基苯甲醇: 在氮气气氛中向 1-溴-2-叔丁基苯 (2.88g, 13.51mmol) 的无水 THF (45mL) 溶液中加入 2,2'-联吡啶 (约 10mg)。将所得混合物在零下 78°C 冷却, 在 10 分钟内用注射器逐滴加入 n -正丁基锂 (2.5M 溶于己烷, 5.94mL, 14.86mmol)。加完后, 搅拌所得混合物 30 分钟, 然后加热至零下 30°C , 使甲醛 (通过 1.91g 多聚甲醛在 160°C 加热产生) 流经溶液直至深红色完全消失。所得混合物用饱和氯化铵溶液 (5mL) 猝灭, 然后倒入

二氯甲烷 (100mL) 和水 (50mL) 的混合物中。分离有机相, 将水相用二氯甲烷 (20mL) 萃取两次。将合并的有机相萃取物经由无水 Na_2SO_4 干燥, 真空浓缩, 并用硅胶层析纯化以产生油状的 2-叔丁基苯甲醇 (1.67g, 75%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.50 (m, 1H, Ph-H), 7.41 (m, 1H, Ph-H), 7.24 (m, 2H, Ph-H), 4.93 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 2H, CH_2OH), 1.54 (br, 1H, CH_2OH), 1.43 (s, 1H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)。

[0514] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n7) 和 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n8): 在氮气气氛中将化合物 dU.x0 (230mg, 0.36mmol) 和 2-叔丁基苯甲醇 (0.49g, 3.60mmol) 用 neat 法在 118-122°C 下加热 1 小时。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯, 并用硅胶层析纯化以产生 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n7 (32mg, 17%) 和 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n8 (28mg, 19%)。dU.n7 的 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 9.28 (s, 1H, 3-NH), 7.77 (s, 1H, H-6), 7.43 (m, 2H, Ph-H), 7.25 (m, 2H, Ph-H), 6.16 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 1H, H-1'), 4.84 (ABd, $J=11.2\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2a), 4.81 (ABd, $J=11.2\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2b), 4.40 (m, 1H, H-3'), 4.36 (s, 2H, CH_2O), 3.91 (m, 1H, H-4'), 3.76 (ABd, $J=12.0\text{Hz}$, 1H, H-5' a), 3.64 (ABd, $J=12.0\text{Hz}$, 1H, H-5' b), 2.27 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.89 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.88 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.09 (s, 3H, CH_3Si), 0.07 (s, 3H, CH_3Si), 0.06 (s, 3H, CH_3Si), 0.05 (s, 3H, CH_3Si); dU.n8 的 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 11.42 (s, 1H, 可交换 D_2O , MH), 7.93 (s, 1H, H-6), 7.42 (m, 1H, Ph-H), 7.35 (m, 1H, Ph-H), 7.18 (m, 2H, Ph-H), 6.15 (t, 1H, $J=6.8\text{Hz}$, H-1'), 5.08 (t, $J=5.2\text{Hz}$, 1H, 可交换 D_2O , 5'-OH), 4.66 (s, 2H, CH_2O), 4.41 (m, 1H, H-3'), 4.26 (ABd, $J=11.6\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2a), 4.21 (ABd, $J=11.6\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2b), 3.78 (m, 1H, H-4'), 3.56 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.18 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 1.34 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0.85 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$), 0.07 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)。

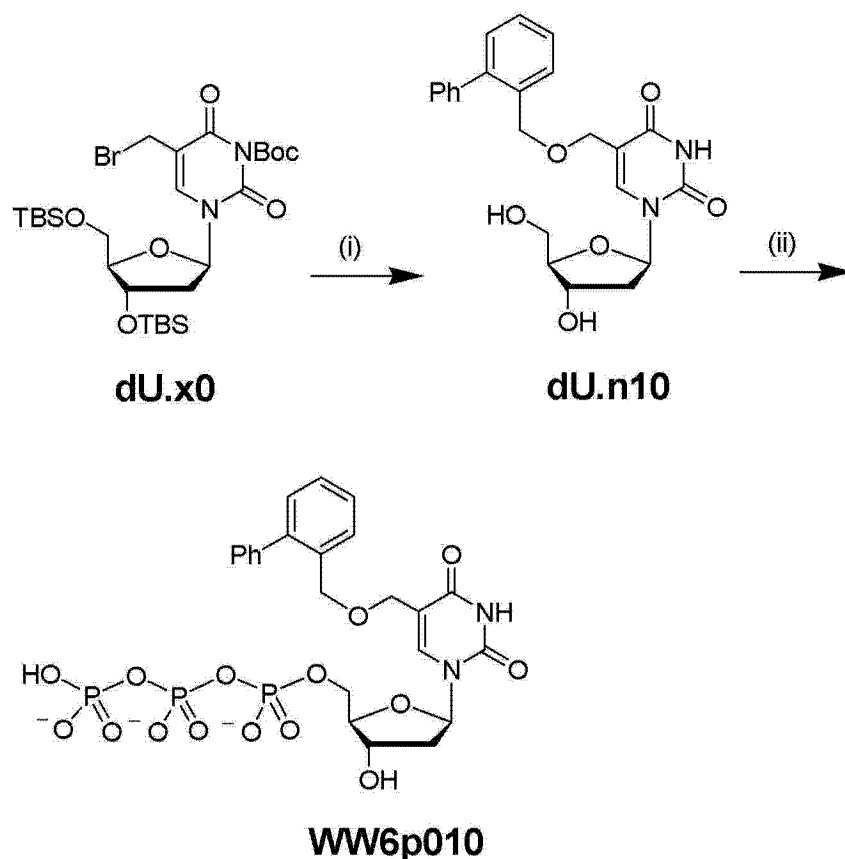
[0515] 5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n9): 将化合物 dU.n7 (32mg, 0.050mmol) 和 dU.n8 (27mg, 0.052mmol) 溶于 THF (4mL) 中, 加入三水合四正丁基氟化铵 (65mg, 0.204mmol) 的 THF (2mL) 溶液。将所得混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩并用硅胶层析纯化以产生 5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n9 (108mg, 67%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 8.10 (s, 1H, H-6), 7.46 (m, 1H, Ph-H), 7.39 (m, 1H, Ph-H), 7.20 (m, 1H, Ph-H), 6.28 (t, 1H, $J=6.6\text{Hz}$, H-1'), 4.79 (s, 2H, CH_2O), 4.37 (m, 3H, 5- CH_2a , 5- CH_2b , 和 H-3'), 3.92 (m, 1H, H-4'), 3.76 (ABdd, $J=12.4$ 和 3.2Hz , 1H, H-5' a), 3.70 (ABdd, $J=12.4$ 和 3.6Hz , 1H, H-5' a, H-5' b), 2.22 (m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 1.39 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$)。

[0516] 5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 (WW6p024): 将 POCl_3 (10 μL , 0.11mmol) 加入化合物 dU.n9 (30mg, 0.074mmol) 和质子海绵 (32mg, 0.15mmol) 的三甲基磷酸 (0.4mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0°C 下搅拌 2 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵 (285mg, 0.6mmol) 和三正丁胺 (120 μL) 的无水 DMF (1.2mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水 (5mL) 和乙腈 (5mL) 的混合物, 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharose FF 柱 (2.5 \times 10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈 / 75% TEAB (1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并

含有三磷酸酯的级分并冻干以产生 5-(2-叔丁基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 WW6p024。¹HNMR(400MHz, D₂O) : δ 7.89(s, 1H, H-6), 7.34(d, 1H, J=1.6Hz, Ph-H), 7.32(d, 1H, J=2.0Hz, Ph-H), 7.15(m, 2H, Ph-H), 6.17(t, J=6.8Hz, 1H, H-1'), 4.64(2d, 2H, Ph-CH₂), 4.48(m, 1H, H-3'), 4.32(2d, 2H, 5-CH₂), 4.04(m, 3H, H-4' 和 H-5'), 2.23(m, 2H, H-2'), 1.20(s, 9H, C(CH₃)₃); ³¹PNMR(162Hz, D₂O) : δ -11.76(m), -12.41(d, J=19.4Hz), -24.0(t, J=19.4Hz)。

[0517] 5-(2-苄基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0518]



[0519] 方案 35. 5-(2-苄基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成 (i) 2-二苯基甲醇, neat 法, 118-122°C, 15%; (ii) POCl₃, 质子海绵, (MeO)₃PO, 0°C; (n-Bu₃NH)₂H₂P₂O₇, n-Bu₃N, DMF; 1MHNEt₃HCO₃。

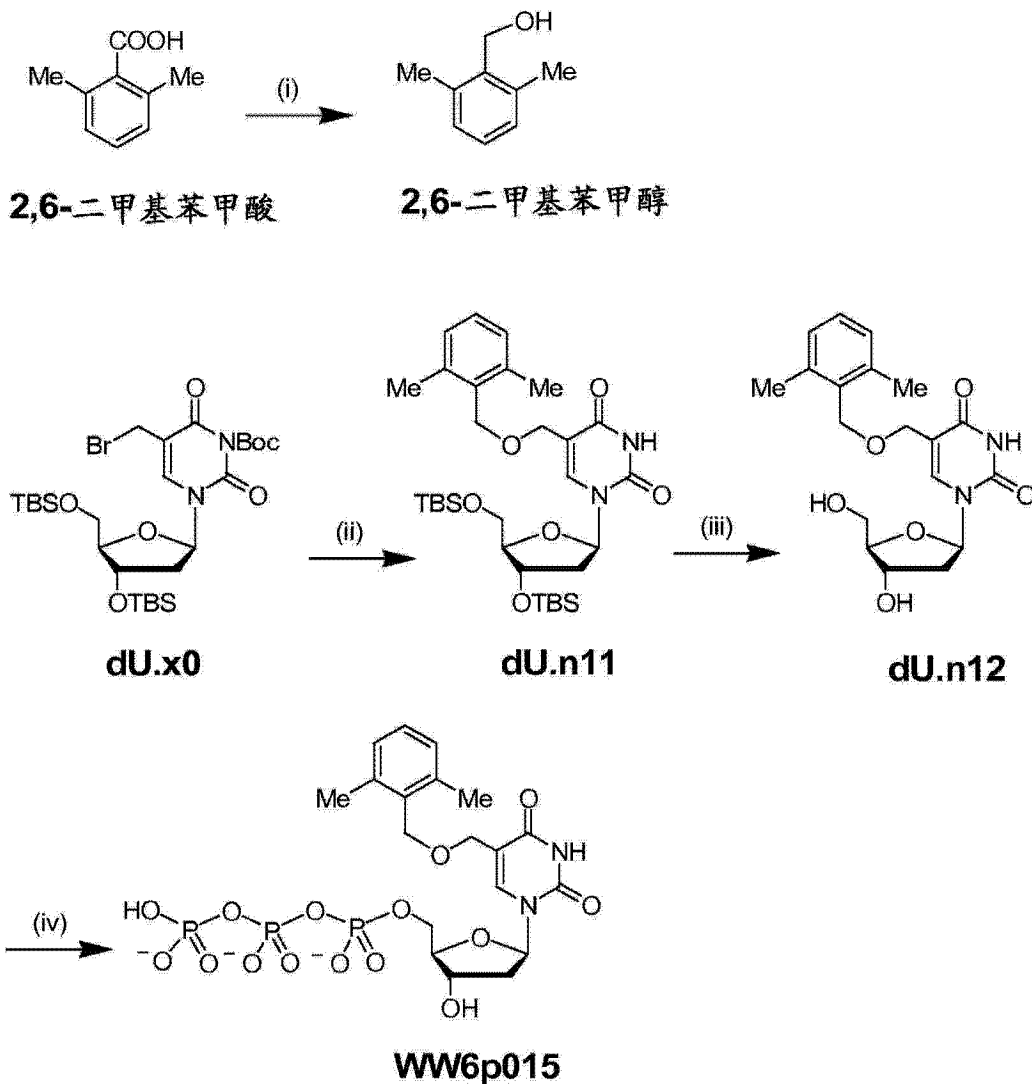
[0520] 5-(2-苄基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n10): 化合物 dU.x0(0.916g, 1.41mmol) 和 2-二苯基甲醇 (2.596g, 14.10mmol) 用 neat 法在 118-122°C 下加热 1.5 小时在氮气气氛中。将所得混合物冷却至室温, 溶于乙酸乙酯, 并用硅胶层析纯化以产生 5-(2-苄基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n10(87mg, 15%)。从反应中还得到了 3', 5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-苄基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (134mg, 19%) 和 (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-苄基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (263mg, 36%)。dU.n10 的 ¹H^WMR(400MHz, DMSO-d₆) : δ 11.40(s, 1H, 可交换 D₂O, NH), 7.91(s, 1H, H-6), 7.39(m, 9H, Ph-H), 6.14(t, 1H, J=6.8Hz, H-1'), 5.25(t, J=4.4Hz, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 5.02(t, J=5.2Hz, 1H, 可交换 D₂O, 5'-OH), 4.33(s, 2H, CH₂O), 4.21(m, 1H, H-3'), 4.15(ABd, J=11.6Hz, 1H, 5-CH₂a), 4.08(ABd, J=12.7Hz, 1H, 5-CH₂b), 3.78(m, 1H, H-4'),

3.55(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.05(m, 2H, H-2' a 和 H-2' b); 3', 5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-苯基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.75(s, 1H, 3-NH), 7.63(s, 1H, H-6), 7.37(m, 9H, Ph-H), 6.29(dd, $J=7.6$ 和 6.0Hz , 1H, H-1'), 4.49(s, 2H, CH_2O), 4.39(m, 1H, H-3'), 4.24(ABd, $J=12.7\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2a), 4.19(ABd, $J=12.7\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2b), 3.96(m, 1H, H-4'), 3.76(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.28(m, 1H, H-2' a), 2.03(m, 1H, H-2' b), 0.91(s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0.89(s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0.09(s, 3H, CH_3Si), 0.06(s, 3H, CH_3Si), 0.05(s, 3H, CH_3Si), 0.02(s, 3H, CH_3Si); (3' 或 5')-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2-苯基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, DMSO-d_6): δ 11.42(s, 1H, D_2O 可交换, NH), 7.86(s, 1H, H-6), 7.39(m, 9H, Ph-H), 6.13(t, 1H, $J=6.8\text{Hz}$, H-1'), 5.08(t, $J=5.2\text{Hz}$, 1H, 可交换 D_2O , 5'-OH), 4.39(m, 1H, H-3'), 4.33(s, 2H, CH_2O), 4.15(ABd, $J=11.6\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2a), 4.09(ABd, $J=11.6\text{Hz}$, 1H, 5- CH_2b), 3.77(m, 1H, H-4'), 3.54(m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.08(m, 2H, H-2' a 和 H-2' b), 0.87(s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0.07(2s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$)。

[0521] 5-(2-苯基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸(WW6p010): 将 POCl_3 (9 μL , 0.1mmol) 加入化合物 dU.n10(28mg, 0.066mmol) 和质子海绵(28mg, 0.13mmol) 的三甲基磷酸(0.4mL) 溶液中, 将反应物在氮气气氛中 0°C 下搅拌 2 小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(285mg, 0.6mmol) 和三正丁胺(120 μL) 的无水 DMF(1.2mL) 溶液。搅拌 30 分钟后, 加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M, pH7.5; 10mL)。将反应物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩。将所得残留物溶于水(6mL) 和乙腈(4mL) 的混合物, 过滤, 并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱(2.5 \times 10cm) 用 240 分钟内从 25% 乙腈/75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈/75% TEAB(1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。合并含有三磷酸的级分并冻干以产生 5-(2-苯基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 WW6p010。 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, D_2O): δ 7.77(s, 1H, H-6), 7.56(m, 1H, Ph-H), 7.44(m, 2H, Ph-H), 7.39(m, 3H, Ph-H), 7.27(m, 3H, Ph-H), 6.25(t, $J=6.8\text{Hz}$, 1H, H-1'), 4.62(m, 1H, H-3'), 4.41(ABd, 1H, $J=11.2\text{Hz}$, 5- CH_2a), 4.36(ABd, 1H, $J=12\text{Hz}$, 5- CH_2b), 4.24(m, 1H, H-4'), 4.17(m, 2H, H-5'), 2.30(m, 2H, H-2'); $^{31}\text{PNMR}$ (162Hz, D_2O): δ -5.59(d, $J=19.4\text{Hz}$), -10.6(d, $J=19.4\text{Hz}$), -21.04(t, $J=19.4\text{Hz}$)。

[0522] 5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成

[0523]



[0524] 方案 36.5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成:(i) $\text{BH}_3(\text{SMe}_2)$, THF, 回流, 51%; (ii) 2,6-二甲基苯甲醇, neat 法, $118-122^\circ\text{C}$, 80%; (iii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, 室温, 67%; (iv) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C ; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{MHNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

[0525] 2,6-二甲基苯甲醇:依据 Beaulieu 等 (2000, 通过引用并入本文) 所述程序制备 2,6-二甲基苯甲醇, 但是不成功, 因此使用了不同的还原剂。在氮气气氛中向 2,6-二甲基苯甲酸 (1.00g, 6.65mmol) 的无水 THF (10mL) 悬液中小心地加入 $\text{BH}_3(\text{SMe}_2)$ 的 THF 溶液。将所得混合物加热回流 16 小时, 然后用饱和氯化铵 (5mL) 和 2M HCl (10mL) 猝灭 (警示: 有剧烈气体释放!)。分离有机层; 将水相层用乙酸乙酯萃取 3 次 (每次 45mL); 将合并的萃取物用饱和碳酸氢钠清洗两次 (每次 20mL), 经由无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 并用硅胶层析纯化以产生白色固体 2,6-二甲基苯甲醇 (0.50g, 51%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.08 (m, 3H, Ph-H), 4.70 (s, 2H, Ph- CH_2), 4.05 (brs, 1H, OH), 2.40 (s, 6H, CH_3)。

[0526] 3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n11): 在氮气气氛中将化合物 dU.x0 (230mg, 0.36mmol) 和 2,6-二甲基苯甲醇 (0.49g, 3.60mmol) 用 neat 法在 $118-122^\circ\text{C}$ 加热 1 小时。将所得混合物冷却至室温, 溶于可能少的乙酸乙酯中, 并用硅胶层析纯化以产生 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷

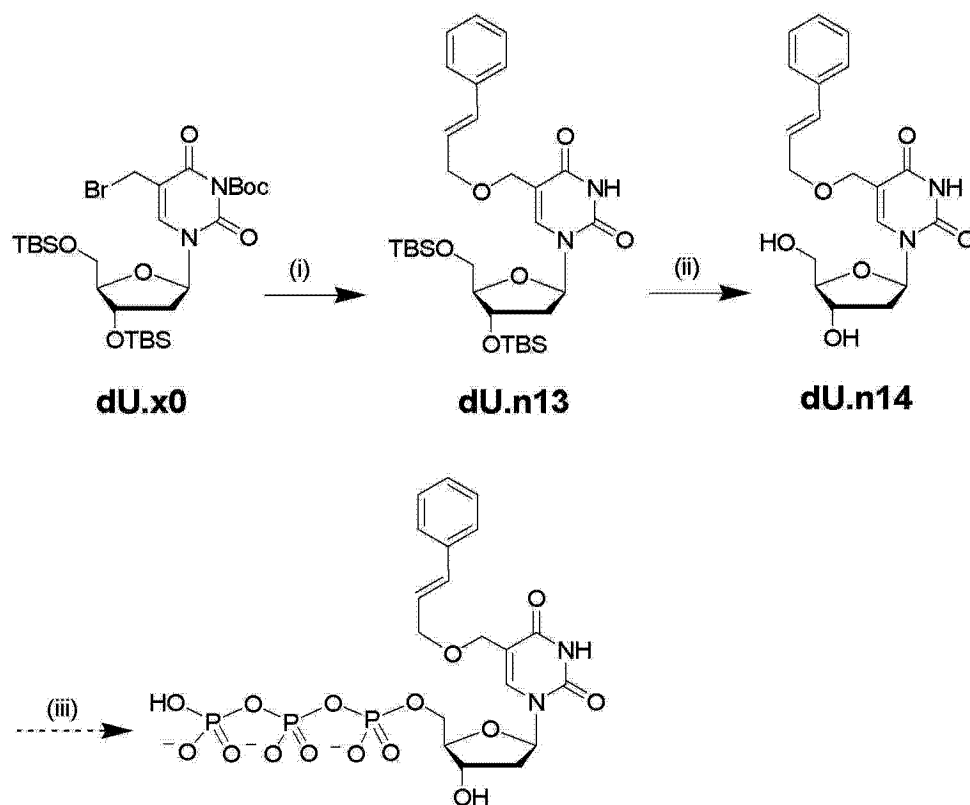
基)-5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n11(170mg,80%)。¹HNMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.94(s,1H,3-NH),7.63(s,1H,H-6),7.07(m,3H,Ph-H),6.28(dd,J=7.6和5.6Hz,1H,H-1'),4.63(s,2H,CH₂O),4.38(m,1H,H-3'),4.32(ABd,J=11.6Hz,1H,5-CH₂a),4.27(ABd,J=11.6Hz,1H,5-CH₂b),3.92(m,1H,H-4'),3.74(m,2H,H-5'a和H-5'b),2.39(s,6H,2CH₃),2.24(m,1H,H-2'a),2.00(m,1H,H-2'b),0.90(s,9H,(CH₃)₃C),0.89(s,9H,(CH₃)₃C),0.11(s,3H,CH₃Si),0.09(s,3H,CH₃Si),0.08(s,3H,CH₃Si),0.06(s,3H,CH₃Si)。

[0527] 5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷(dU.n12):向化合物 dU.n11(131mg,0.22mmol)的THF(4mL)溶液中加入三水合四正丁基氟化铵(171mg,0.54mmol)的THF(2mL)溶液。将所得混合物在室温下搅拌30分钟,然后真空浓缩并用硅胶层析纯化以产生5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n12(108mg,67%)。¹HNMR(400MHz,CD₃OD): δ 8.08(s,1H,H-6),7.02(m,3H,Ph-H),6.26(t,1H,J=6.8Hz,H-1'),4.61(s,2H,CH₂O),4.38(m,1H,H-3'),4.33(ABd,J=11.6Hz,1H,5-CH₂a),4.15(ABd,J=11.6Hz,1H,5-CH₂b),3.91(m,1H,H-4'),3.77(ABdd,J=12.0和3.2Hz,1H,H-5'a),3.70(ABdd,J=12.0和3.6Hz,1H,H-5'a,H-5'b),2.36(s,6H,CH₃),2.24(m,2H,H-2'a和H-2'b);¹³CNMR(100MHz,CD₃OD): δ 163.80(C),150.76(C),140.85(CH),137.81(C),133.73(C),127.81(CH),127.72(CH),110.82(C),87.56(CH),85.22(CH),70.74(CH),66.33(CH₂),64.47(CH₂),61.38(CH₂),40.02(CH₂),18.36(CH₃)。

[0528] 5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸(WW6p015):将POCl₃(11μL,0.12mmol)加入化合物 dU.n12(30mg,0.08mmol)和质子海绵(34mg,0.16mmol)的三甲基磷酸(0.4mL)溶液中,将反应物在氮气气氛中0℃下搅拌2小时。加入双-三正丁基焦磷酸铵(285mg,0.5mmol)和三正丁胺(120μL)的无水DMF(1.2mL)。搅拌30分钟后,加入三乙基碳酸氢铵缓冲液(1M,pH7.5;10mL)。将反应物在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩。将所得残留物溶于水(5mL)和乙腈(5mL)的混合物中,过滤,并通过阴离子交换层析用QSepharoseFF柱(2.5×10cm)用240分钟内从25%乙腈/75%三乙基碳酸氢铵(TEAB,0.1M)至25%乙腈/75%TEAB(1.5M)的线性梯度以4.5ml/min速度纯化。合并含有三磷酸酯的级分并冻干以产生5-(2,6-二甲基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸WW6p015。¹HNMR(400MHz,D₂O): δ 8.0(s,1H,H-6),7.16(m,1H,Ph-H),7.07(m,3H,Ph-H),6.30(t,1H,J=7.2Hz,H-1'),4.64(m,3H,Ph-CH₂和H-3'),4.47(ABd,1H,J=7.2Hz,5-CH₂a),4.40(ABd,1H,J=7.2Hz,5-CH₂b),4.20(m,3H,H-4'和H-5'),2.38(m,2H,H-2'),2.33(s,6H,CH₃);³¹PNMR(162Hz,D₂O): δ -8.94(d,J=19.4Hz),-10.78(d,J=19.4Hz),-22.08(d,J=19.4Hz)。

[0529] 5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的合成以及对其5'-三磷酸的反应

[0530]



[0531] 方案 37.5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸的合成。(i) 肉桂醇, neat 法, 104°C, 36%; (ii) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, 室温, 76%; (iii) POCl_3 , 质子海绵, $(\text{MeO})_3\text{PO}$, 0°C; $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{-Bu}_3\text{N}$, DMF; $1\text{MHNEt}_3\text{HCO}_3$ 。

[0532] 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n13): 在氮气气氛中将化合物 dU.x0 (500mg, 0.77mmol) 和肉桂醇 (331mg, 2.17mmol) 用 neat 法在 104°C 加热 1 小时。将所得混合物冷却至室温, 溶于尽可能少的乙酸乙酯中, 并用硅胶层析纯化以产生 3',5'-O-双-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n13 (169mg, 36%)。 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.32 (s, 3-NH), 7.68 (s, 1H, H-6), 7.31 (m, 5H, Ph-H), 6.64 (d, $J=16.0\text{Hz}$, 1H, =CH), 6.28 (m, 2H, H-1' 和 =CH), 4.40 (m, 1H, H-3'), 4.28 (m, 2H, 5- CH_2a 和 5- CH_2b), 4.23 (m, 2H, CH_2O), 3.94 (m, 1H, H-4'), 3.80 (ABdd, $J=H.2$ 和 3.2Hz, 1H, H-5'a), 3.75 (ABdd, $J=11.2$ 和 3.2Hz, 1H, H-5'b), 2.27 (m, 1H, H*2'a), 2.01 (m, 1H, H-2'b), 0.90 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0.88 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0.08 (s, 3H, CH_3Si), 0.07 (s, 3H, CH_3Si), 0.05 (2S, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$); $^{13}\text{CMMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 162.56 (C), 150.04 (C), 138.34 (CH), 136.58 (C), 133.06 (CH), 128.54 (CH), 127.76 (CH), 126.55 (CH), 125.60 (CH), 111.80 (C), 87.92 (CH), 85.28 (CH), 72.27 (CH), 71.67 (CH_2), 64.40 (CH_2), 62.99 (CH_2), 41.24 (CH_2), 25.96 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.76 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.42 (C), 18.01 (C), -4.65 (CH_3), -4.82 (CH_3), -5.40 (CH_3), -5.50 (CH_3)。

[0533] 5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (dU.n14): 向化合物 dU.n13 (138mg, 0.23mmol) 的 THF (2mL) 溶液中加入三水合四正丁基氟化铵 (321mg, 0.73mmol) 的 THF (2mL) 溶液。将所得混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后真空浓缩并用硅胶层析纯化以产生蜡状固体 5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 dU.n14 (65mg, 76%)。 $^1\text{HNMR}$ (400MHz, DMSO-d_6): δ 11.39 (brs, 1H, 可交换 D_2O , MH), 7.93 (s, 1H, H-6), 7.44 (m, 2H,

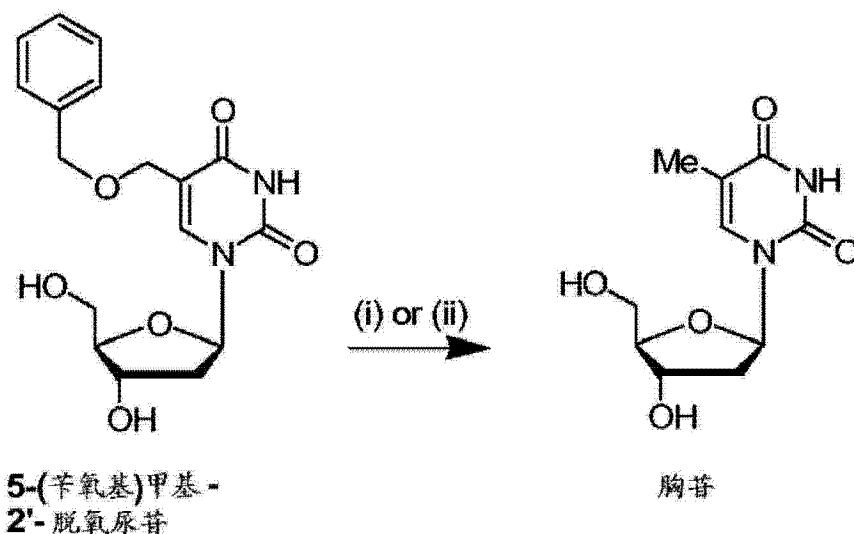
Ph-H), 7.32 (m, 2H, Ph-H), 7.23 (m, 1H, Ph-H), 6.64 (d, $J=16.0\text{Hz}$, 1H, =CH), 6.34 (dt, $J=16.0$ 和 5.7Hz , 1H, =CH), 6.16 (t, 1H, $J=6.7\text{Hz}$, H-1'), 5.24 (d, $J=3.9\text{Hz}$, 1H, 可交换 D_2O , 3'-OH), 5.04 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 1H, 可交换 D_2O , 5'-OH), 4.22 (m, 1H, H-3'), 4.18 (s, 2H, 5- CH_2a 和 5- CH_2b), 4.11 (d, $J=5.7\text{Hz}$, 2H, CH_2), 3.77 (m, 1H, H-4'), 3.57 (m, 2H, H-5' a 和 H-5' b), 2.09 (dd, $J=6.5$ 和 4.9Hz , 2H, H-2' a 和 H-2' b)。

[0534] 5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸:该化合物尚未制得,但可由下述方法或其改良法合成:可将 POCl_3 (9 μL , 0.1mmol) 加入化合物 dU.n14 (28mg, 0.066mmol) 和质子海绵 (28mg, 0.13mmol) 的三甲基磷酸 (0.4mL) 溶液中,然后在氮气气氛中将反应物在 0°C 下搅拌 2 小时。然后可加入双-三正丁基焦磷酸铵 (285mg, 0.6mmol) 和三正丁胺 (120 μL) 的无水 DMF (1.2mL) 溶液。搅拌 30 分钟后,可加入三乙基碳酸氢铵缓冲液 (1M, pH7.5; 10mL)。然后将反应物在室温下搅拌 1 小时后真空浓缩。然后将所得残留物溶于水 (6mL) 和乙腈 (4mL) 的混合物中,过滤,并通过阴离子交换层析用 QSepharoseFF 柱 ($2.5 \times 10\text{cm}$) 用 240 分钟内从 25% 乙腈 / 75% 三乙基碳酸氢铵 (TEAB, 0.1M) 至 25% 乙腈 / 75% TEAB (1.5M) 的线性梯度以 4.5ml/min 速度纯化。然后可合并含有三磷酸酯的级分,冻干以产生 5-(3-苯基-2-丙烯氧基)甲基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸 WW6p014。

[0535] 实施例 10-dU 类似物的化学切割产物

[0536] 5-(苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的化学切割

[0537]



[0538] 方案 38. 5-(苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的化学切割。(i) H_2 , Pd/C, 乙醇, 30 分钟, 88%; (ii) H_2 , Na_2PdCl_4 , 无水乙醇, 20 分钟。

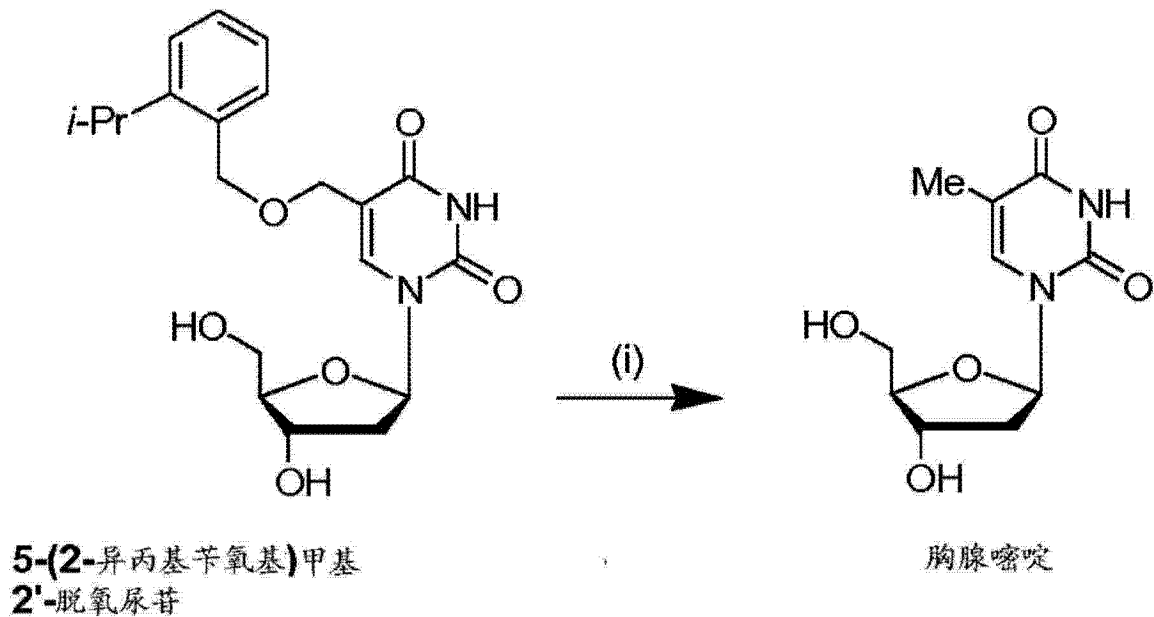
[0539] 使用非均相钯催化剂进行化学切割:在氮气气氛中向 5-(苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (29mg, 0.082mmol) 的无水乙醇 (2mL) 溶液中加入 10mg 附着于活性碳 (10wt. %, 10mg) 上的 10mg 钯 (警示:易燃物!确保在无氧环境下操作)。用氢气冲刷所得混合物,在室温下搅拌 30 分钟,每 5 分钟通过 TLC 监测一次。将所得混合物过滤,减压浓缩,并真空干燥以产生胸苷 (18mg, 88%),其通过与真实样品进行比较来鉴定 (TLC 和 ^1H NMR)。

[0540] 使用均相钯催化剂进行化学切割:在氮气气氛中向 5-(苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷 (3.48mg, 0.01mmol) 的无水乙醇溶液 (0.1mL) 中加入四氯钯酸钠 (II) (0.6mg, 0.002mmol) 的无水乙醇溶液 (0.9mL)。用氢气冲刷所得混合物,在室温下搅拌,每 5 分钟通

过 TLC 监测一次。20 分钟后 TLC 指示起始物质完全消失。通过用 TLC 与真实样品进行比较而将惟一的切割产物鉴定为胸苷。

[0541] 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的化学切割

[0542]

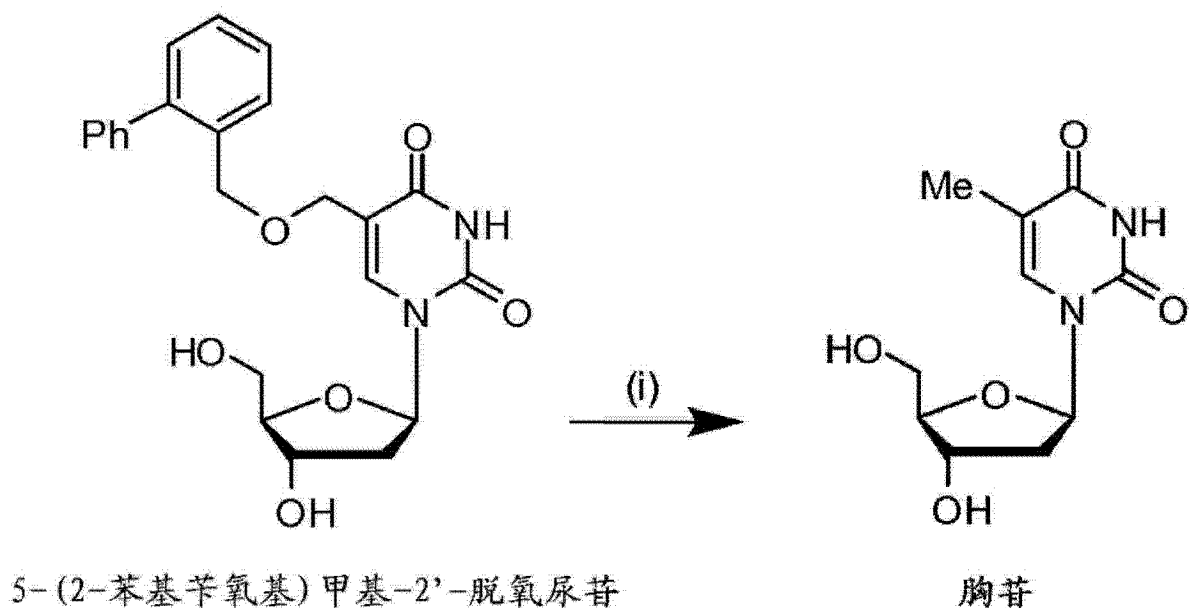


[0543] 方案 39. 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的化学切割 (i) H_2 , Pd/C, 乙醇, 5 分钟。

[0544] 使用非进行钯催化剂进行化学切割: 在氮气气氛中向 5-(2-异丙基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的无水乙醇 (10mM, 1mL) 溶液中加入附着于活性碳的钯 (10wt. %, 2mg) (警示: 易燃固体! 确保在无氧环境下操作)。用氢气冲刷所得混合物, 在室温下搅拌 5 分钟, 通过 TLC 每 1 分钟监测一次。5 分钟后 TLC 指示起始物质完全消失。通过用 TLC 与真实样品进行比较而将惟一的切割产物鉴定为胸苷。

[0545] 5-(2-苯基苄氧基)甲基-2'-脱氧尿苷的化学裂解

[0546]

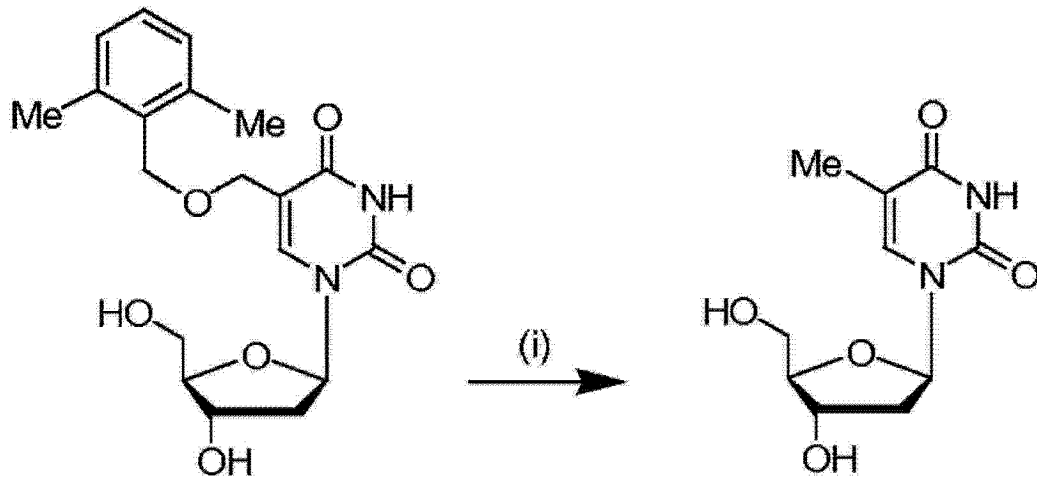


[0547] 方案 40. 5-(2- 苯基苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷的化学切割. (i) H_2 , Pd/C, 乙醇, 5 分钟。

[0548] 使用非进行钯催化剂进行化学切割: 在氮气气氛中向 5-(2- 苯基苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷的无水乙醇 (10mM, 1mL) 溶液中加入附着于活性碳的钯 (10wt. %, 2mg) (警示: 易燃固体! 确保在无氧环境下操作)。用氢气冲刷所得混合物, 在室温下搅拌 5 分钟, 通过 TLC 每 1 分钟监测一次。5 分钟后 TLC 指示起始物质完全消失。通过用 TLC 与真实样品进行比较而将唯一的切割产物鉴定为胸苷。

[0549] 5-(2,6- 二甲基苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷的化学切割

[0550]



5-(2,6-二甲基苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷

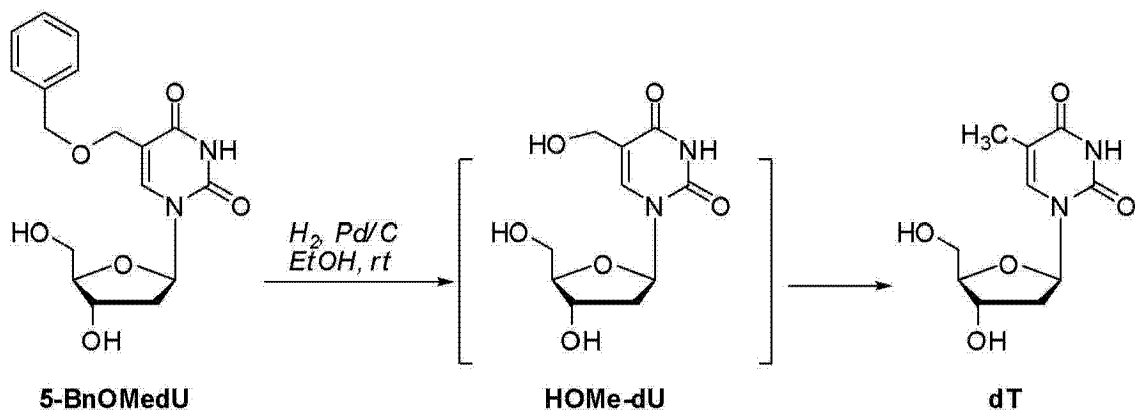
胸苷

[0551] 方案 41. 5-(2,6- 二甲基苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷的化学切割. (i) H_2 , Pd/C, 乙醇, 5 分钟。

[0552] 使用进行钯催化剂进行化学切割: 在氮气气氛中向 5-(2,6- 二甲基苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷的无水乙醇 (10mM, 1mL) 溶液中加入附着于活性碳的钯 (10wt. %, 2mg) (警示: 易燃固体! 确保在无氧环境下操作)。用氢气冲刷所得混合物, 在室温下搅拌 5 分钟, 通过 TLC 每 1 分钟监测一次。5 分钟后 TLC 指示起始物质完全消失。通过用 TLC 与真实样品进行比较而将唯一的切割产物鉴定为胸苷。

[0553] 5-(苄氧基) 甲基 -2'- 脱氧 - 尿苷的化学切割

[0554]



5-BnOMedU

HOMe-dU

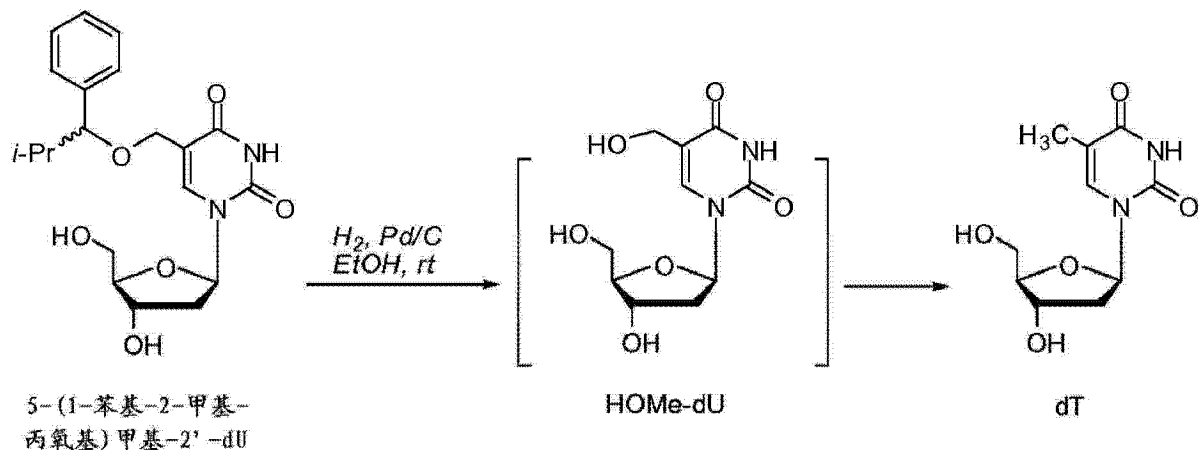
dT

[0555] 方案 42. 5- 苄氧基甲基 -2'- 脱氧尿苷的催化氢解

[0556] 向 5- 苄氧基 -2'- 脱氧尿苷 (10mg) 的乙醇 (1mL) 溶液中加入 Pd/C(10%, 10mg), 搅拌所得混合物 5 分钟。通过气囊向体系内引入氢气, 并将反应混合物在室温下搅拌。在不同时间间隔点从反应混合物中取出等分试样 (5 μ L), 通过薄层层析和 HPLC 进行分析。室温下 10 分钟后可观察到完全切割成胸苷 (方案 42 和图 4)。裂解的中间产物被鉴定为由于首先移除苄基而产生的 5- 羟基甲基 -dU, HOMe-dU 进一步被还原成胸苷。

[0557] 使用催化氢解切割 5-(1- 苄基 -2- 甲基 - 丙氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷: 向 5-(1- 苄基 -2- 甲基 - 丙氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷 (13mg) 的乙醇 (3mL) 溶液中加入 Pd/C(10%, 15mg), 搅拌所得混合物 5 分钟。通过气囊向体系内引入氢气, 并将反应混合物在室温下搅拌。在不同时间间隔点从反应混合物中取出等分试样 (5 μ L), 通过薄层层析和 HPLC 进行分析。室温下 240 分钟后可观察到完全切割成胸苷 (方案 43 和 FIG. 5)。α- 异丙基取代的 5- 苄氧基甲基 -dU 切割缓慢, 可能是由于化合物结合到催化剂表面时取代基的位阻造成的。因此, 5- 苄氧基甲基尿苷类似物在对于该化合物的终止和区分特性具有重要性的 α- 碳发生取代时化学切割速率大大下降。不受理论约束, 苄基环 2 位而非 α- 位的取代也能够影响终止特性 (见表 2), 这提供了切割更快的核苷酸。

[0558]



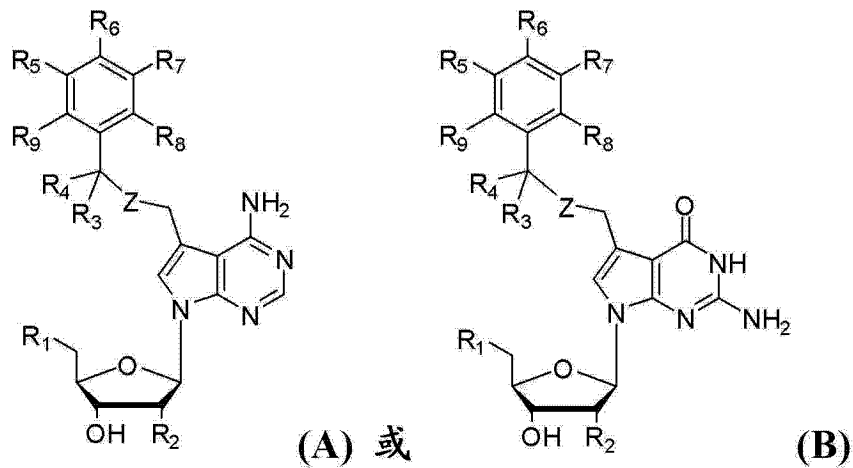
[0559] 方案 43. 5-(1- 苄基 -2- 甲基 - 丙氧基) 甲基 -2'- 脱氧尿苷的催化氢解

[0560] 基于本公开内容, 能够实施本文所公开并要求保护的所有方法而无需过度实验。尽管通过优选实施方案描述了本发明的化合物和方法, 但对于本领域技术人员来说很明显的是, 可对本文所述方法的方法、步骤或步骤顺序进行修改, 而不背离本发明的构思、精神和范围。更具体地, 很显然, 可将本文所述试剂替换成某些在化学和物理方面相关的试剂, 而得到相同或相似的结果。对于本领域技术人员而言显而易见的所有这些相似的取代和修改均认为是在所附权利要求书所限定的本发明的精神、改进和内容之内。

[0561] 本发明还涉及以下项目:

[0562] 1. 下式的化合物或其盐、酯、水合物、溶剂化物、互变异构体、前药或光学异构体:

[0563]



(A) 或

(B)

[0564] 其中：

[0565] Z 为 -O-、-S-、-NH-、-OC(O)O-、-NHC(O)O-、-OC(O)NH- 或 -NHC(O)NH-；

[0566] R₁ 为羟基、一磷酸、二磷酸、三磷酸或多磷酸基[0567] R₂ 为氢或羟基；[0568] R₃ 和 R₄ 各自独立为：

[0569] 氢、羟基、卤素或氨基；或

[0570] 烷基 (C ≤ 12)、烯基 (C ≤ 12)、炔基 (C ≤ 12)、芳基 (C ≤ 12)、芳烷基 (C ≤ 12)、杂芳基 (C ≤ 12)、杂芳烷基 (C ≤ 12)、烷氧基 (C ≤ 12)、芳氧基 (C ≤ 12)、芳烷氧基 (C ≤ 12)、杂芳氧基 (C ≤ 12)、杂芳烷氧基 (C ≤ 12)、烷基氨基 (C ≤ 12)、二烷基氨基 (C ≤ 12)、芳基氨基 (C ≤ 12)、芳烷基氨基 (C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；或

[0571] R₅、R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 各自独立为：

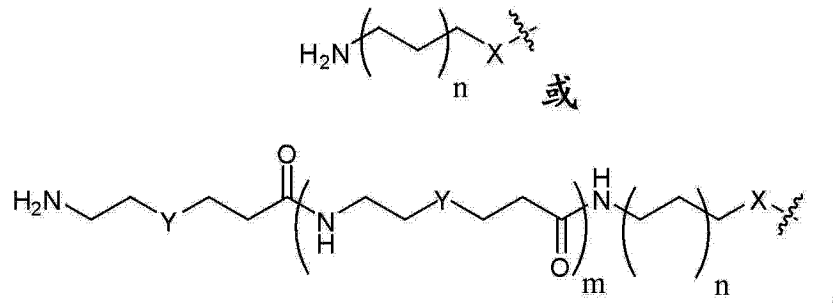
[0572] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基或巯基；

[0573] 烷基 (C ≤ 12)、烯基 (C ≤ 2)、炔基 (C ≤ 12)、芳基 (C ≤ 12)、芳烷基 (C ≤ 12)、杂芳基 (C ≤ 12)、杂芳烷基 (C ≤ 12)、酰基 (C ≤ 12)、烷氧基 (C ≤ 12)、烯氧基 (C ≤ 12)、炔氧基 (C ≤ 12)、芳氧基 (C ≤ 12)、芳烷氧基 (C ≤ 12)、杂芳氧基 (C ≤ 12)、杂芳烷氧基 (C ≤ 12)、酰氧基 (C ≤ 12)、烷基氨基 (C ≤ 12)、二烷基氨基 (C ≤ 12)、烷氧基氨基 (C ≤ 12)、烯基氨基 (C ≤ 12)、炔基氨基 (C ≤ 12)、芳基氨基 (C ≤ 12)、芳烷基氨基 (C ≤ 12)、杂芳基氨基 (C ≤ 12)、杂芳烷基氨基 (C ≤ 12)、烷基磺酰氨基 (C ≤ 12)、酰氨基 (C ≤ 12)、烷硫基 (C ≤ 12)、烯硫基 (C ≤ 12)、炔硫基 (C ≤ 12)、芳硫基 (C ≤ 12)、芳烷硫基 (C ≤ 12)、杂芳硫基 (C ≤ 12)、杂芳烷硫基 (C ≤ 12)、酰硫基 (C ≤ 12)、硫代酰基 (C ≤ 12)、烷基磺酰基 (C ≤ 12)、芳基磺酰基 (C ≤ 12)、烷基铵 (C ≤ 12)、烷基铈 (C ≤ 12)、烷基甲硅烷基 (C ≤ 12)，或任何这些

[0574] 基团的取代形式；

[0575] 下式的基团：

[0576]



[0577] 其中

[0578] X 为

[0579] -O-、-S- 或 -NH-；或

[0580] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；

[0581] Y 为 -O-、-NH-、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$)；

[0582] n 为 0 至 12 的整数；并且

[0583] m 为 0 至 12 的整数；或

[0584] -接头-报告基团。

[0585] 2. 权利要求 1 的化合物，其进一步定义为式 A 的化合物。

[0586] 3. 权利要求 1 的化合物，其进一步定义为式 B 的化合物。

[0587] 4. 根据权利要求 1-3 中任一项的化合物，其中 Z 为 -O-。

[0588] 5. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 R_1 为羟基。

[0589] 6. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 R_1 为一磷酸基。

[0590] 7. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 R_1 为二磷酸基。

[0591] 8. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 R_1 为三磷酸基。

[0592] 9. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物，其中 R_1 为多磷酸基。

[0593] 10. 根据权利要求 1-9 中任一项的化合物，其中 R_2 为氢。

[0594] 11. 根据权利要求 1-9 中任一项的化合物，其中 R_2 为羟基。

[0595] 12. 根据权利要求 1-11 中任一项的化合物，其中 R_2 为氢。

[0596] 13. 根据权利要求 1-11 中任一项的化合物，其中 R_3 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。

[0597] 14. 权利要求 13 的化合物，其中 R_3 为烷基 ($C \leq 8$)。

[0598] 15. 权利要求 14 的化合物，其中 R_3 为烷基 ($C \leq 6$)。

[0599] 16. 权利要求 15 的化合物，其中 R_3 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。

[0600] 17. 权利要求 16 的化合物，其中 R_3 为甲基。

[0601] 18. 权利要求 15 的化合物，其中 R_3 为烷基 (C_{2-6})。

[0602] 19. 权利要求 18 的化合物，其中 R_3 为烷基 (C_{3-5})。

[0603] 20. 权利要求 19 的化合物，其中 R_3 为异丙基。

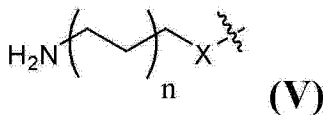
[0604] 21. 权利要求 19 的化合物，其中 R_3 为叔丁基。

[0605] 22. 根据权利要求 1-21 中任一项的化合物，其中 R_4 为氢。

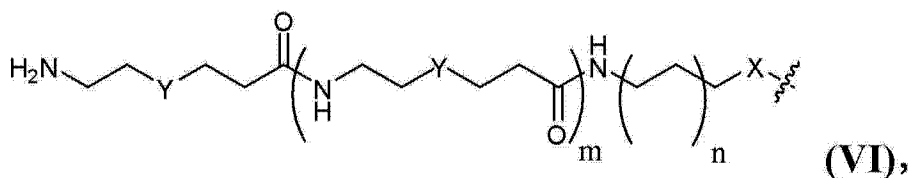
[0606] 23. 根据权利要求 1-21 中任一项的化合物，其中 R_4 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。

[0607] 24. 权利要求 23 的化合物，其中 R_4 为烷基 ($C \leq 8$)。

- [0608] 25. 权利要求 24 的化合物, 其中 R_4 为烷基 ($C \leq 6$)。
- [0609] 26. 权利要求 25 的化合物, 其中 R_4 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。
- [0610] 27. 权利要求 26 的化合物, 其中 R_4 为甲基。
- [0611] 28. 权利要求 25 的化合物, 其中 R_4 为烷基 (C_{2-6})。
- [0612] 29. 权利要求 28 的化合物, 其中 R_4 为烷基 (C_{3-5})。
- [0613] 30. 权利要求 29 的化合物, 其中 R_4 为异丙基。
- [0614] 31. 权利要求 29 的化合物, 其中 R_4 为叔丁基。
- [0615] 32. 根据权利要求 1-31 中任一项的化合物, 其中 R_5 为氢。
- [0616] 33. 根据权利要求 1-31 中任一项的化合物, 其中 R_5 为氰基。
- [0617] 34. 根据权利要求 1-31 中任一项的化合物, 其中 R_5 为烷氧基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。
- [0618] 35. 权利要求 34 的化合物, 其中 R_4 为烷氧基 ($C \leq 8$)。
- [0619] 36. 权利要求 35 的化合物, 其中 R_5 为烷氧基 ($C \leq 6$)。
- [0620] 37. 权利要求 36 的化合物, 其中 R_5 为烷氧基 ($C \leq 3$)。
- [0621] 38. 权利要求 37 的化合物, 其中 R_5 为甲氧基。
- [0622] 39. 根据权利要求 1-31 中任一项的化合物, 其中 R_5 为下式的基团:
- [0623]



- [0624] 其中
- [0625] X 为
- [0626] -O-、-S- 或 -NH-; 或
- [0627] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; 并且
- [0628] n 为 0 至 12 的整数。
- [0629] 40. 权利要求 39 的化合物, 其中 X 为炔撑 ($C \leq 12$)。
- [0630] 41. 权利要求 40 的化合物, 其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。
- [0631] 42. 权利要求 41 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
- [0632] 43. 根据权利要求 39-42 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。
- [0633] 44. 根据权利要求 1-31 中任一项的化合物, 其中 R_5 为下式的基团:
- [0634]

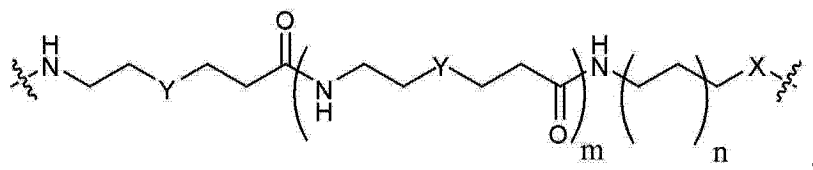


- [0635] 其中
- [0636] X 为
- [0637] -O-、-S- 或 -NH-; 或
- [0638] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任

- [0639] 何这些基团的取代形式；并且
- [0640] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；
- [0641] n 为 0 至 12 的整数；并且
- [0642] m 为 0 至 12 的整数。
- [0643] 45. 权利要求 44 的化合物，其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。
- [0644] 46. 权利要求 45 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。
- [0645] 47. 权利要求 46 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。
- [0646] 48. 根据权利要求 44-47 中任一项的化合物，其中 Y 为 -CH₂-。
- [0647] 49. 根据权利要求 44-48 中任一项的化合物，其中 n 为 0。
- [0648] 50. 根据权利要求 44-49 中任一项的化合物，其中 m 为 0。
- [0649] 51. 根据权利要求 1-32 中任一项的化合物，其中 R₆ 为 -接头-报告基团。
- [0650] 52. 权利要求 51 的化合物，其中所述接头为：
- [0651]

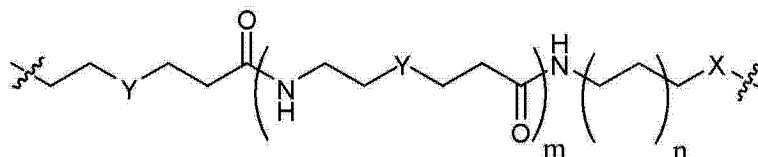


- [0652] 其中
- [0653] X 为
- [0654] -O-、-S- 或 -NH-；或
- [0655] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任
- [0656] 何这些基团的取代形式；并且
- [0657] n 为 0 至 12 的整数。
- [0658] 53. 权利要求 52 的化合物，其中 x 为炔撑_(C ≤ 12)。
- [0659] 54. 权利要求 53 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。
- [0660] 55. 权利要求 54 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。
- [0661] 56. 根据权利要求 52-55 中任一项的化合物，其中 n 为 0。
- [0662] 57. 权利要求 51 的化合物，其中所述接头为：
- [0663]

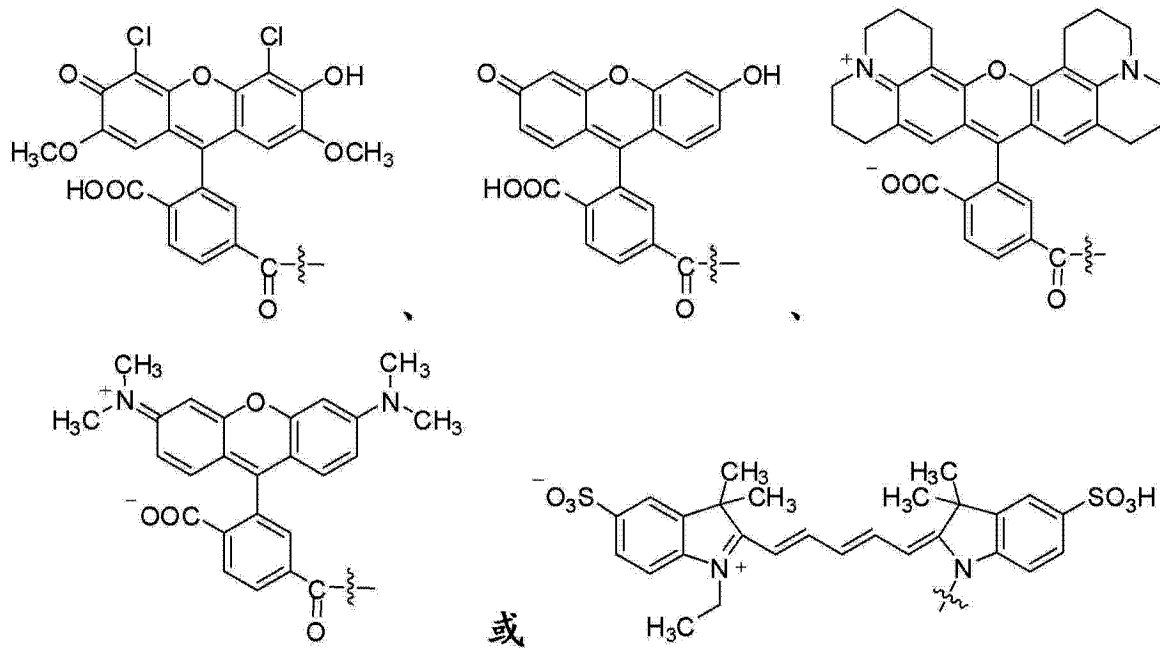


- [0664] 其中
- [0665] X 为
- [0666] -O-、-S- 或 -NH-；或
- [0667] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任
- [0668] 何这些基团的取代形式；
- [0669] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；
- [0670] n 为 0 至 12 的整数；并且
- [0671] m 为 0 至 12 的整数。

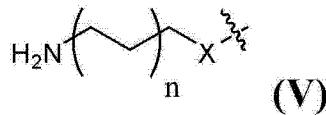
- [0672] 58. 权利要求 57 的化合物, 其中 X 为炔撑 ($C \leq 12$)。
- [0673] 59. 权利要求 58 的化合物, 其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。
- [0674] 60. 权利要求 59 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
- [0675] 61. 根据权利要求 57-60 中任一项的化合物, 其中 Y 为 $-CH_2-$ 。
- [0676] 62. 根据权利要求 57-61 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。
- [0677] 63. 根据权利要求 57-62 中任一项的化合物, 其中 m 为 0。
- [0678] 64. 权利要求 51 的化合物, 其中所述接头为:
- [0679]



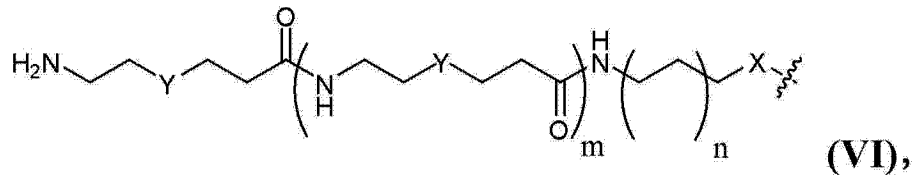
- [0680] 其中
- [0681] X 为
- [0682] $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$; 或
- [0683] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任
- [0684] 何这些基团的取代形式;
- [0685] Y 为 $-O-$ 、 $-NH-$ 、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$);
- [0686] n 为 0 至 12 的整数; 并且
- [0687] m 为 0 至 12 的整数。
- [0688] 65. 权利要求 64 的化合物, 其中 X 为炔撑 ($C \leq 12$)。
- [0689] 66. 权利要求 65 的化合物, 其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。
- [0690] 67. 权利要求 66 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
- [0691] 68. 根据权利要求 64-67 中任一项的化合物, 其中 Y 为 $-CH_2-$ 。
- [0692] 69. 根据权利要求 64-68 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。
- [0693] 70. 根据权利要求 64-69 中任一项的化合物, 其中 m 为 0。
- [0694] 71. 根据权利要求 51-70 中任一项的化合物, 其中所述报告基团是基于染料的报告基团, 其中所述染料为咕吨、荧光素、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白、**ALEXA FLUOR® 350**、**ALEXA FLUOR® 405**、**ALEXA FLUOR® 430**、**ALEXA FLUOR® 488**、**ALEXA FLUOR® 514**、**ALEXA FLUOR® 532**、**ALEXA FLUOR® 546**、**ALEXA FLUOR® 555**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 594**、**ALEXA FLUOR® 610**、**ALEXA FLUOR® 633**、**ALEXA FLUOR® 647**、**ALEXA FLUOR® 660**、**ALEXA FLUOR® 680**、**ALEXA FLUOR® 700**、**ALEXA FLUOR® 750**, 或方酸菁染料。
- [0695] 72. 根据权利要求 51-70 中任一项的化合物, 其中所述报告基团为:
- [0696]



- [0697] 73. 根据权利要求 1-72 中任一项的化合物, 其中 R₆ 为氢。
- [0698] 74. 根据权利要求 1-72 中任一项的化合物, 其中 R₆ 为烷氧基 (C_{≤12}) 或其取代形式。
- [0699] 75. 权利要求 74 的化合物, 其中 R₆ 为烷氧基 (C_{≤8})。
- [0700] 76. 权利要求 75 的化合物, 其中 R₆ 为烷氧基 (C_{≤6})。
- [0701] 77. 权利要求 76 的化合物, 其中 R₆ 为烷氧基 (C_{≤3})。
- [0702] 78. 权利要求 77 的化合物, 其中 R₆ 为甲氧基。
- [0703] 79. 根据权利要求 1-72 中任一项的化合物, 其中 R₆ 为下式的基团:
- [0704]



- [0705] 其中
- [0706] X 为
- [0707] -O-, -S- 或 -NH-; 或
- [0708] 烷撑 (C_{≤12})、烯撑 (C_{≤12})、炔撑 (C_{≤12})、芳撑 (C_{≤12})、杂芳撑 (C_{≤12}), 或任何这些基团的取代形式; 并且
- [0709] n 为 0 至 12 的整数。
- [0710] 80. 权利要求 79 的化合物, 其中 X 为炔撑 (C_{≤12})。
- [0711] 81. 权利要求 80 的化合物, 其中 X 为炔撑 (C₂₋₈)。
- [0712] 82. 权利要求 81 的化合物, 其中 X 为 -C≡C-。
- [0713] 83. 根据权利要求 79-82 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。
- [0714] 84. 根据权利要求 1-72 中任一项的化合物, 其中 R₆ 为下式的基团:
- [0715]



[0716] 其中

[0717] X 为

[0718] -O-、-S- 或 -NH-；或

[0719] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

[0720] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；

[0721] n 为 0 至 12 的整数；并且

[0722] m 为 0 至 12 的整数。

[0723] 85. 权利要求 84 的化合物，其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。

[0724] 86. 权利要求 85 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

[0725] 87. 权利要求 86 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

[0726] 88. 根据权利要求 84-87 中任一项的化合物，其中 Y 为 -CH₂-。

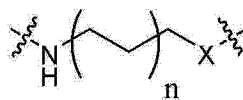
[0727] 89. 根据权利要求 84-88 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

[0728] 90. 根据权利要求 84-89 中任一项的化合物，其中 m 为 0。

[0729] 91. 根据权利要求 1-72 中任一项的化合物，其中 R₆ 为 -接头-报告基团。

[0730] 92. 权利要求 91 的化合物，其中所述接头为：

[0731]



[0732] 其中

[0733] X 为

[0734] -O-、-S- 或 -NH-；或

[0735] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；并且

[0736] n 为 0 至 12 的整数。

[0737] 93. 权利要求 92 的化合物，其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。

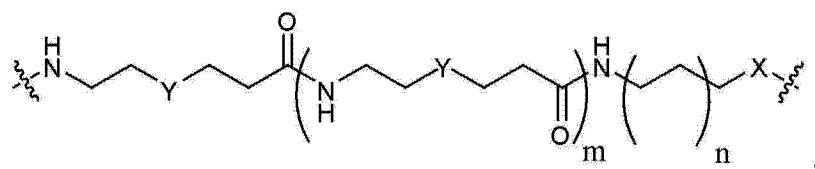
[0738] 94. 权利要求 93 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

[0739] 95. 权利要求 94 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

[0740] 96. 根据权利要求 92-95 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

[0741] 97. 权利要求 91 的化合物，其中所述接头为：

[0742]



[0743] 其中

[0744] X 为

[0745] -O-、-S- 或 -NH-；或

[0746] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

[0747] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；

[0748] n 为 0 至 12 的整数；并且

[0749] m 为 0 至 12 的整数。

[0750] 98. 权利要求 97 的化合物，其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。

[0751] 99. 权利要求 98 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

[0752] 100. 权利要求 99 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

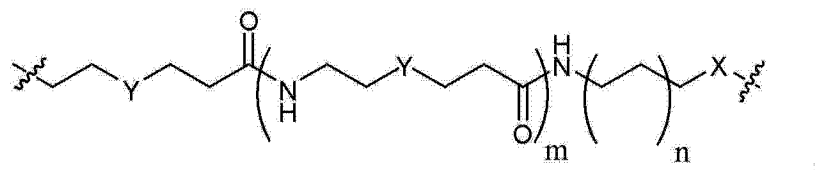
[0753] 101. 根据权利要求 97-100 中任一项的化合物，其中 Y 为 -CH₂-。

[0754] 102. 根据权利要求 97-101 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

[0755] 103. 根据权利要求 97-102 中任一项的化合物，其中 m 为 0。

[0756] 104. 权利要求 91 的化合物，其中所述接头为：

[0757]



[0758] 其中

[0759] X 为

[0760] -O-、-S- 或 -NH-；或

[0761] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

[0762] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；

[0763] n 为 0 至 12 的整数；并且

[0764] m 为 0 至 12 的整数。

[0765] 105. 权利要求 104 的化合物，其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。

[0766] 106. 权利要求 105 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

[0767] 107. 权利要求 106 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

[0768] 108. 根据权利要求 104-107 中任一项的化合物，其中 Y 为 -CH₂-。

[0769] 109. 根据权利要求 104-108 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

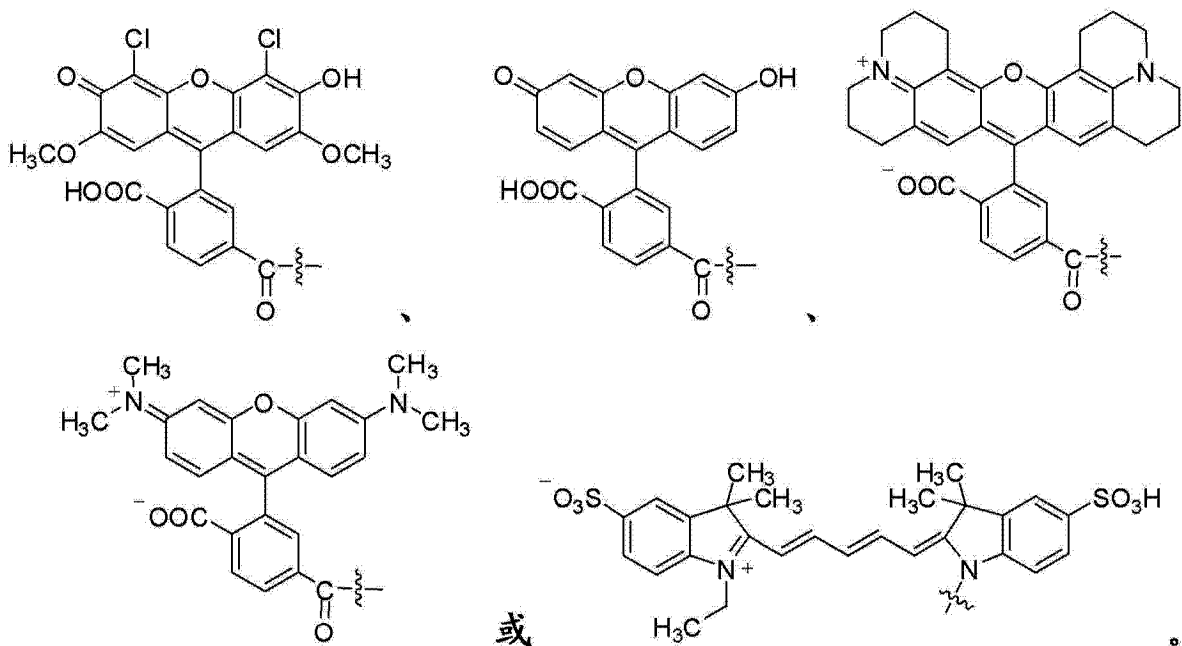
[0770] 110. 根据权利要求 104-109 中任一项的化合物，其中 m 为 0。

[0771] 111. 根据权利要求 91-110 中任一项的化合物，其中所述报告基团是基于染料

的报告基团,其中所述染料为咕吨、荧光素、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白、ALEXA FLUOR® 350、ALEXA FLUOR® 405、ALEXA FLUOR® 430、ALEXA FLUOR® 488、ALEXA FLUOR® 514、ALEXA FLUOR® 532、ALEXA FLUOR® 546、ALEXA FLUOR® 555、ALEXA FLUOR® 568、ALEXA FLUOR® 568、ALEXA FLUOR® 594、ALEXA FLUOR® 610、ALEXA FLUOR® 633、ALEXA FLUOR® 647、ALEXA FLUOR® 660、ALEXA FLUOR® 680、ALEXA FLUOR® 700、ALEXA FLUOR® 750,或方酸菁染料。

[0772] n2. 根据权利要求 91-110 中任一项的化合物,其中所述报告基团为:

[0773]



[0774] 113. 根据权利要求 1-112 中任一项的化合物,其中 R_7 为氢。

[0775] 114. 根据权利要求 1-113 中任一项的化合物,其中 R_8 为氢。

[0776] 115. 根据权利要求 1-113 中任一项的化合物,其中 R_8 为硝基。

[0777] 116. 根据权利要求 1-113 中任一项的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。

[0778] 117. 权利要求 116 的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 8$)。

[0779] 118. 权利要求 117 的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 6$)。

[0780] 119. 权利要求 118 的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 3$)。

[0781] 120. 权利要求 119 的化合物,其中 R_8 为甲基。

[0782] 121. 根据权利要求 1-120 中任一项的化合物,其中 R_9 为氢。

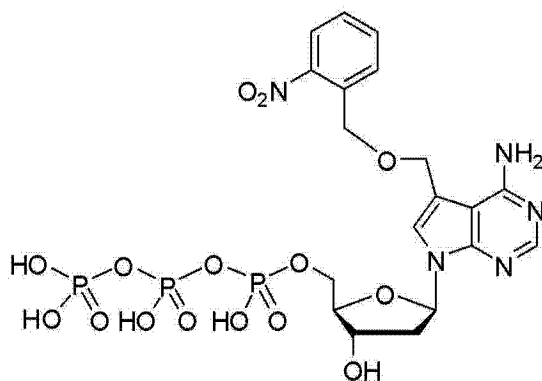
[0783] 122. 根据权利要求 1-120 中任一项的化合物,其中 R_9 为硝基。

[0784] 123. 根据权利要求 1-120 中任一项的化合物,其中 R_9 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。

[0785] 124. 权利要求 123 的化合物,其中 R_9 为烷基 ($C \leq 8$)。

[0786] 125. 权利要求 124 的化合物,其中 R_9 为烷基 ($C \leq 6$)。

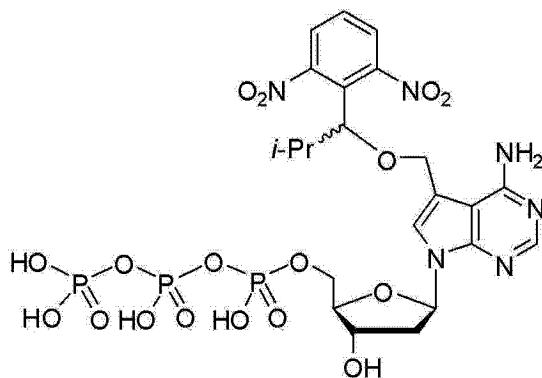
- [0787] 126. 权利要求 125 的化合物, 其中 R_9 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。
- [0788] 127. 权利要求 126 的化合物, 其中 R_9 为甲基。
- [0789] 128. 权利要求 125 的化合物, 其中 R_9 为烷基 (C_{2-6})。
- [0790] 129. 权利要求 128 的化合物, 其中 R_9 为烷基 (C_{3-5})。
- [0791] 130. 权利要求 129 的化合物, 其中 R_9 为异丙基。
- [0792] 131. 权利要求 129 的化合物, 其中 R_9 为叔丁基。
- [0793] 132. 根据权利要求 1-120 中任一项的化合物, 其中 R_9 为芳基 ($C_{\leq 12}$) 或其取代形式。
- [0794] 133. 权利要求 132 的化合物, 其中 R_9 为芳基 ($C_{\leq 8}$)。
- [0795] 134. 权利要求 133 的化合物, 其中 R_9 为苯基。
- [0796] 135. 权利要求 2 的化合物, 进一步定义为:
- [0797]



[0798] 或其盐。

[0799] 136. 权利要求 2 的化合物, 进一步定义为:

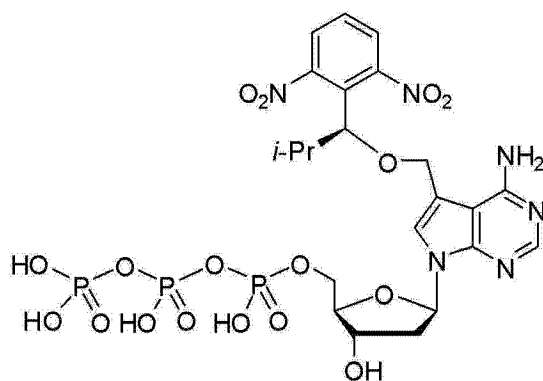
[0800]



[0801] 或其盐。

[0802] 137. 权利要求 136 的化合物, 进一步定义为:

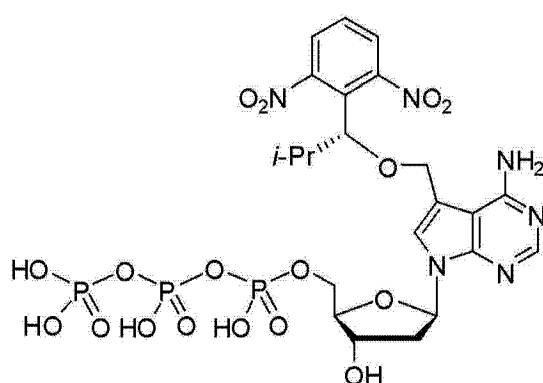
[0803]



[0804] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0805] 138. 权利要求 136 的化合物,进一步定义为:

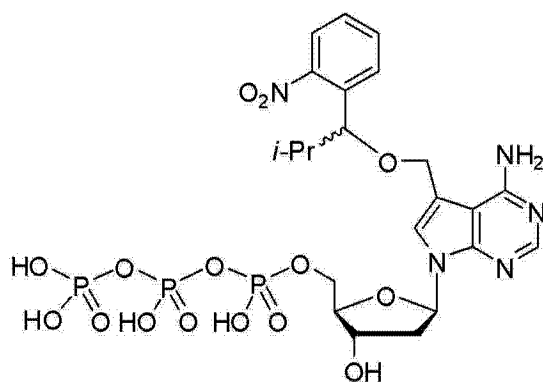
[0806]



[0807] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0808] 139. 权利要求 2 的化合物,进一步定义为:

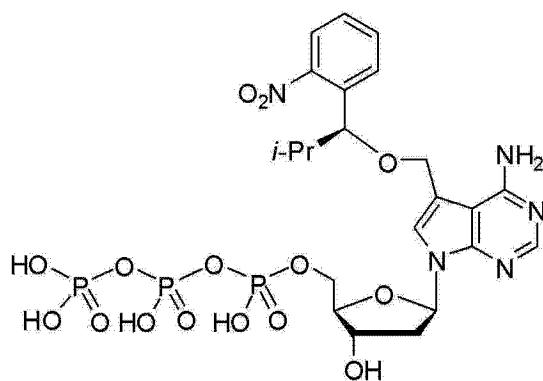
[0809]



[0810] 或其盐。

[0811] 140. 权利要求 139 的化合物,进一步定义为:

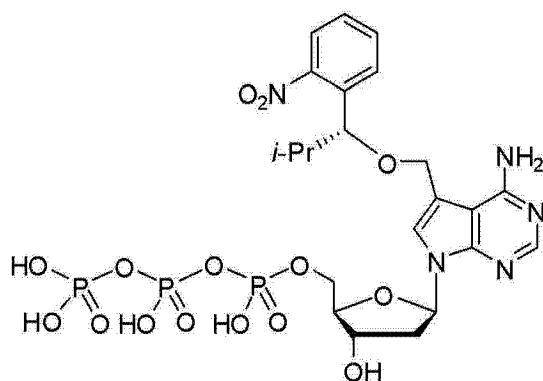
[0812]



[0813] 或其盐, 并且基本不含其他光学异构体。

[0814] 141. 权利要求 139 的化合物, 进一步定义为:

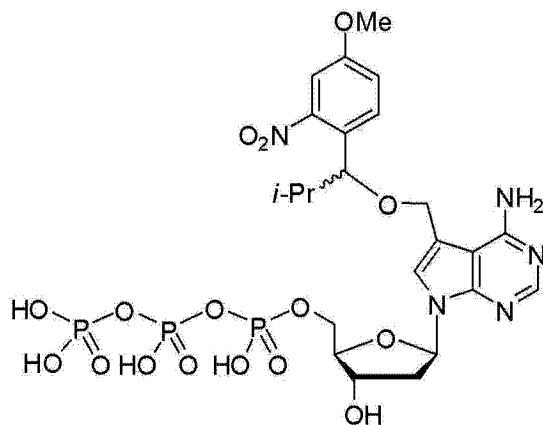
[0815]



[0816] 或其盐, 并且基本不含其他光学异构体。

[0817] 142. 权利要求 2 的化合物, 进一步定义为:

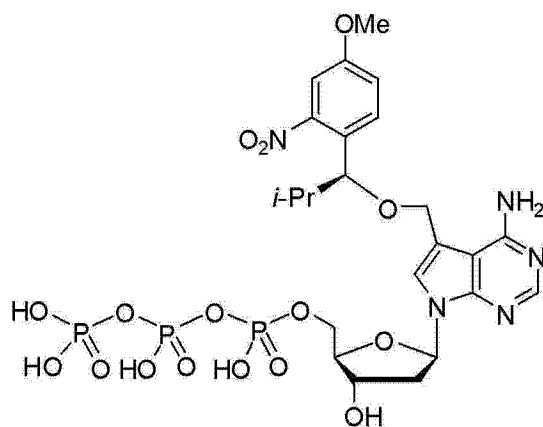
[0818]



[0819] 或其盐。

[0820] 143. 权利要求 142 的化合物, 进一步定义为:

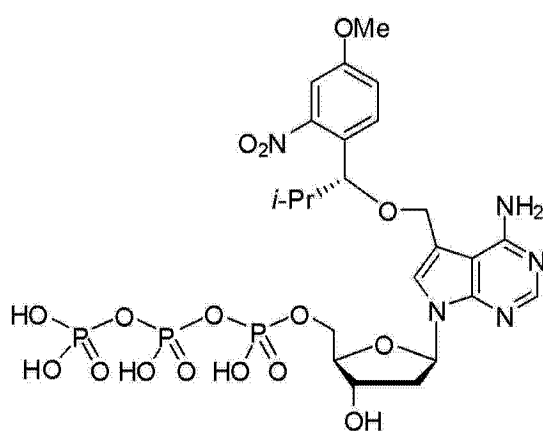
[0821]



[0822] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0823] 144. 权利要求 142 的化合物,进一步定义为:

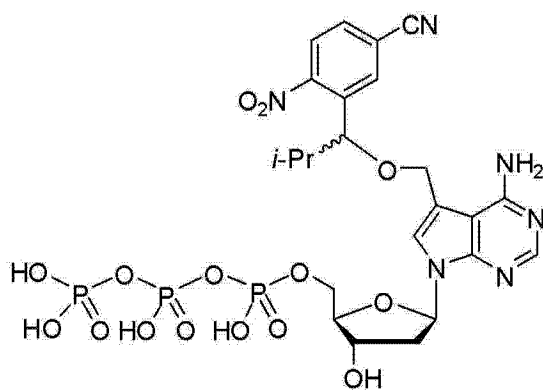
[0824]



[0825] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0826] 145. 权利要求 2 的化合物,进一步定义为:

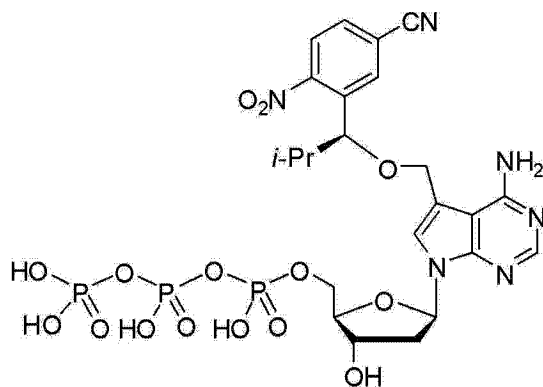
[0827]



[0828] 或其盐。

[0829] 146. 权利要求 145 的化合物,进一步定义为:

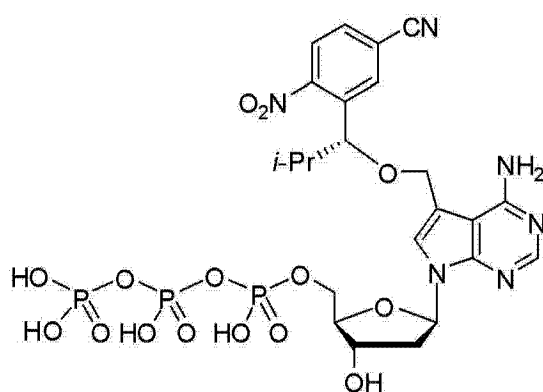
[0830]



[0831] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0832] 147. 权利要求 145 的化合物,进一步定义为:

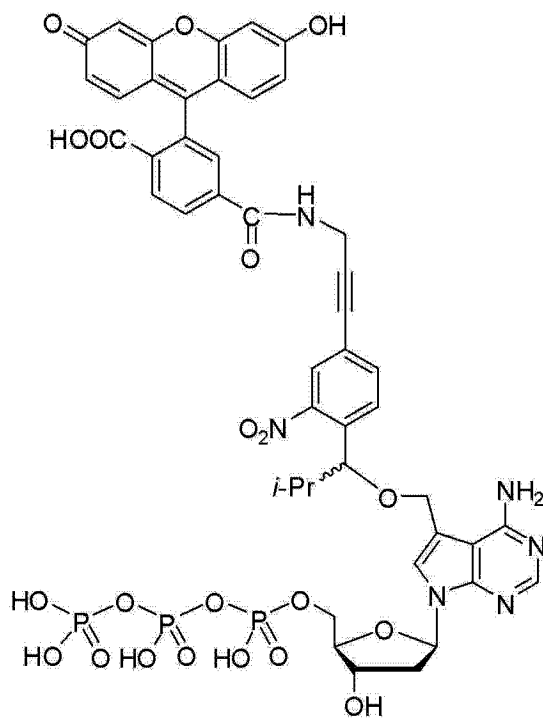
[0833]



[0834] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0835] 148. 权利要求 2 的化合物,进一步定义为:

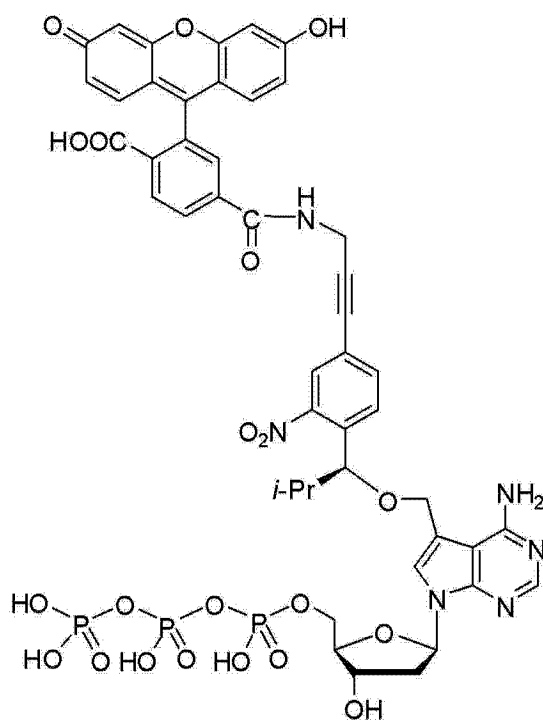
[0836]



[0837] 或其盐。

[0838] 149. 权利要求 148 的化合物,进一步定义为:

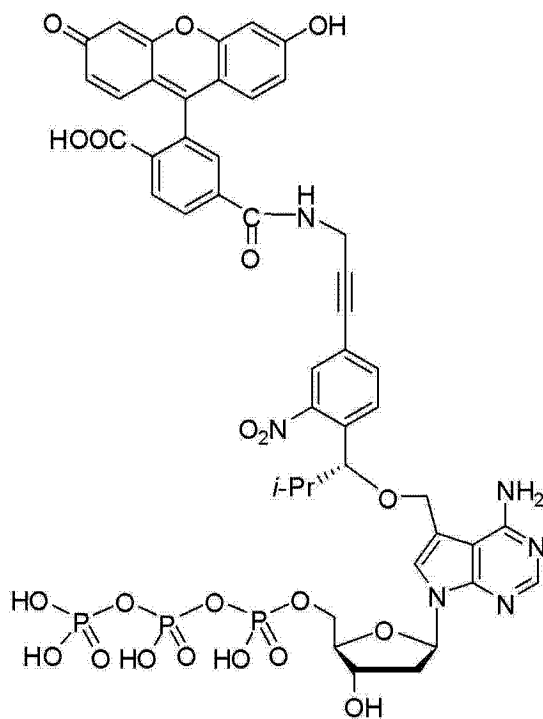
[0839]



[0840] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0841] 150. 权利要求 148 的化合物,进一步定义为:

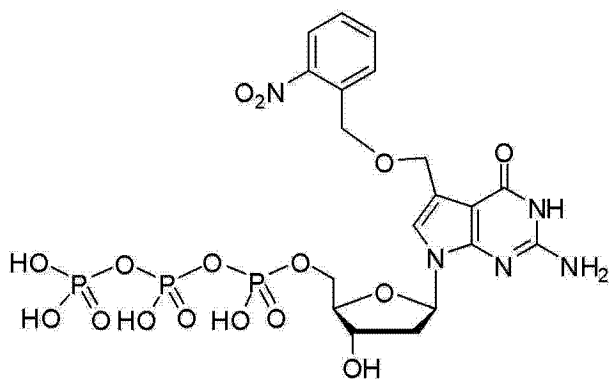
[0842]



[0843] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0844] 151. 权利要求 3 的化合物,进一步定义为:

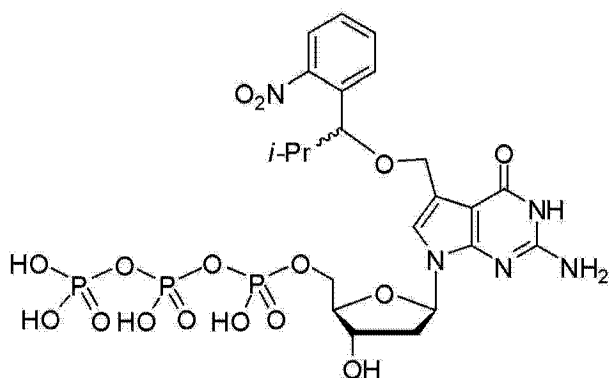
[0845]



[0846] 或其盐。

[0847] 152. 权利要求 3 的化合物,进一步定义为:

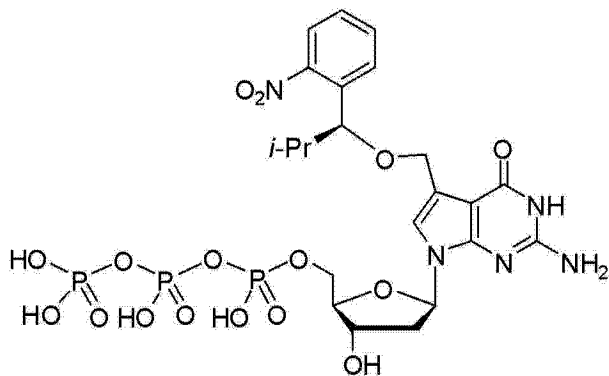
[0848]



[0849] 或其盐。

[0850] 153. 权利要求 152 的化合物,进一步定义为:

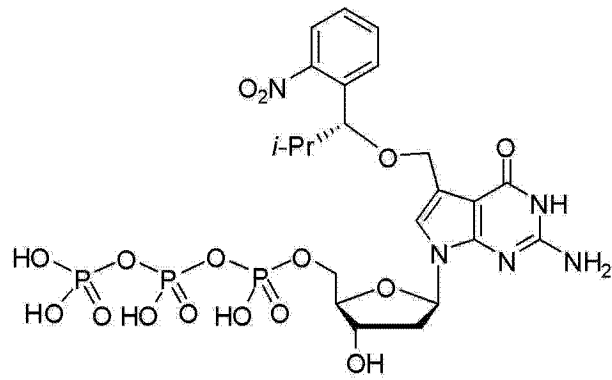
[0851]



[0852] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0853] 154. 权利要求 152 的化合物,进一步定义为:

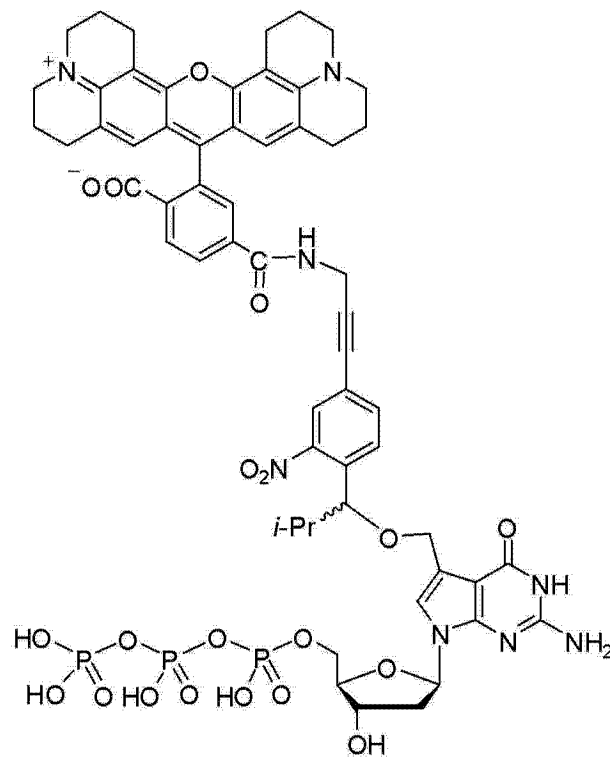
[0854]



[0855] 或其盐, 并且基本不含其他光学异构体。

[0856] 155. 权利要求 3 的化合物, 进一步定义为:

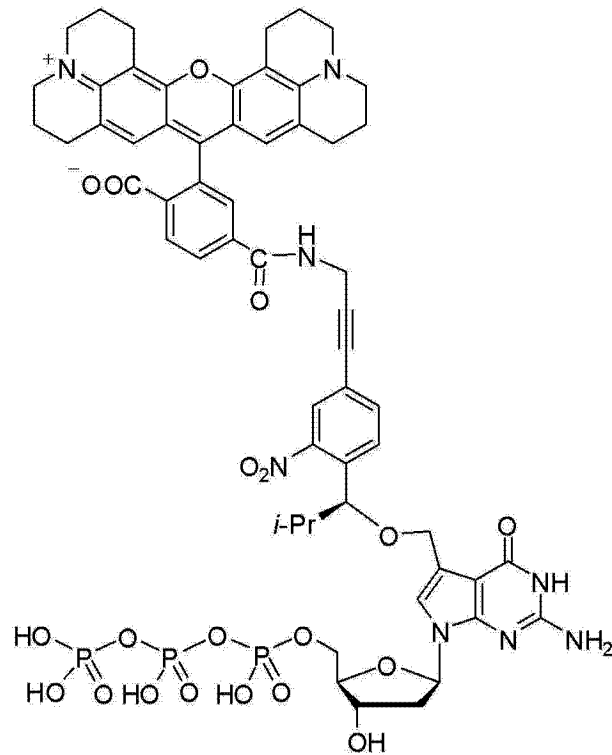
[0857]



[0858] 或其盐。

[0859] 156. 权利要求 155 的化合物, 进一步定义为:

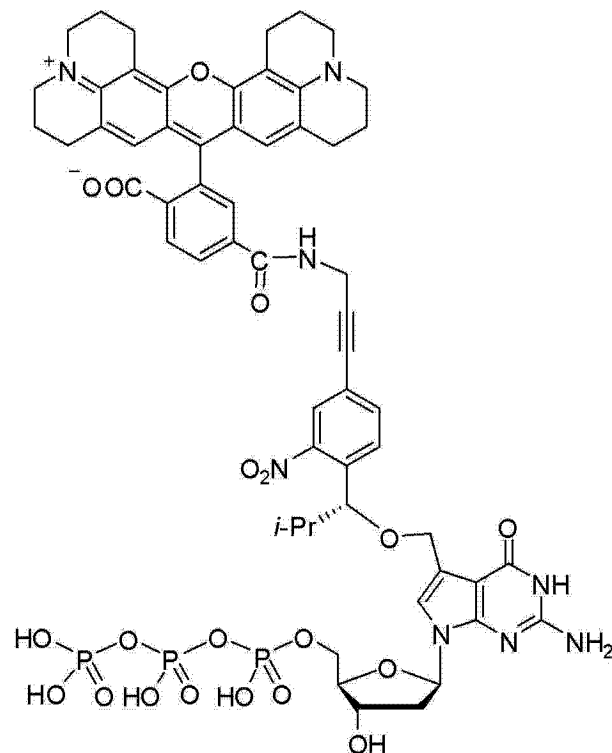
[0860]



[0861] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0862] 157. 权利要求 155 的化合物,进一步定义为:

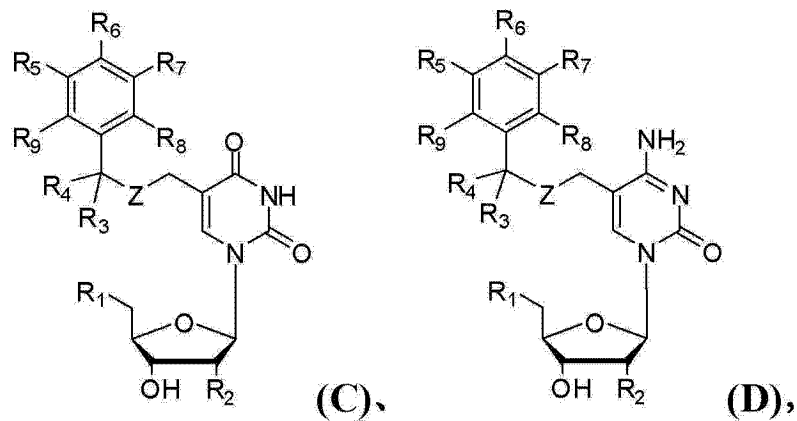
[0863]



[0864] 或其盐,并且基本不含其他光学异构体。

[0865] 158. 下式的化合物或其盐、酯、水合物、溶剂化物、互变异构体、前药或光学异构体:

[0866]



[0867] 其中：

[0868] Z 为 -O-、-S-、-NH-、-OC(O)O-、-NHC(O)O-、-OC(O)NH- 或 -NHC(O)NH-；

[0869] R₁ 为羟基、一磷酸、二磷酸、三磷酸或多磷酸基基；

[0870] R₂ 为氢或羟基；

[0871] R₃ 和 R₄ 各自独立为：

[0872] 氢、羟基、卤素或氨基；或

[0873] 烷基 (C ≤ 12)、烯基 (C ≤ 12)、炔基 (C ≤ 12)、芳基 (C ≤ 12)、芳烷基 (C ≤ 12)、杂芳基 (C ≤ 12)、杂芳烷基 (C ≤ 12)、烷氧基 (C ≤ 12)、芳氧基 (C ≤ 12)、芳烷氧基 (C ≤ 12)、杂芳氧基 (C ≤ 12)、杂芳烷氧基 (C ≤ 12)、烷基氨基 (C ≤ 12)、一烷基氨基 (C ≤ 12)、芳基氨基 (C ≤ 12)、芳烷基氨基 (C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

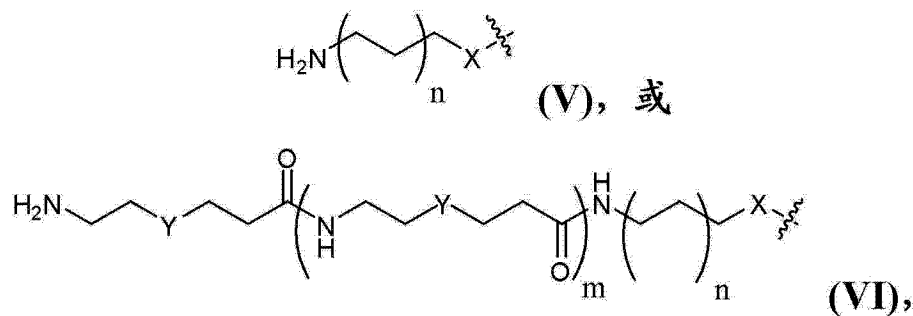
[0874] R₅、R₆、R₇ 和 R₈ 各自独立为：

[0875] 氢、羟基、卤素、氨基、硝基、氰基或巯基；或

[0876] 烷基 (C ≤ 12)、烯基 (C ≤ 12)、炔基 (C ≤ 12)、芳基 (C ≤ 12)、芳烷基 (C ≤ 12)、杂芳基 (C ≤ 12)、杂芳烷基 (C ≤ 12)、酰基 (C ≤ 12)、烷氧基 (C ≤ 12)、烯氧基 (C ≤ 12)、炔氧基 (C ≤ 12)、芳氧基 (C ≤ 12)、芳烷氧基 (C ≤ 12)、杂芳氧基 (C ≤ 12)、杂芳烷氧基 (C ≤ 12)、酰氧基 (C ≤ 12)、烷基氨基 (C ≤ 12)、二烷基氨基 (C ≤ 12)、烷氧基氨基 (C ≤ 12)、烯基氨基 (C ≤ 12)、炔基氨基 (C ≤ 12)、芳基氨基 (C ≤ 12)、芳烷基氨基 (C ≤ 12)、杂芳基氨基 (C ≤ 12)、杂芳烷基氨基 (C ≤ 12)、烷基磺酰氨基 (C ≤ 12)、酰胺基 (C ≤ 12)、烷硫基 (C ≤ 12)、烯硫基 (C ≤ 12)、炔硫基 (C ≤ 12)、芳硫基 (C ≤ 12)、芳烷硫基 (C ≤ 12)、杂芳硫基 (C ≤ 12)、杂芳烷硫基 (C ≤ 12)、酰硫基 (C ≤ 12)、硫代酰基 (C ≤ 12)、烷基磺酰基 (C ≤ 12)、芳基磺酰基 (C ≤ 12)、烷基铵 (C ≤ 12)、烷基铈 (C ≤ 12)、烷基甲硅烷基 (C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

[0877] 下式的基团：

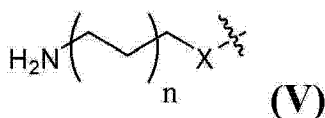
[0878]



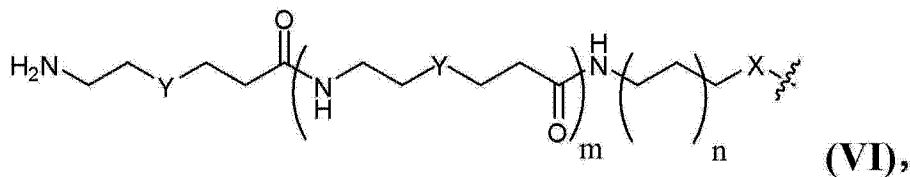
[0879] 其中

- [0880] X 为
- [0881] -O-、-S- 或 -NH-；或
- [0882] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；
- [0883] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；
- [0884] n 为 0 至 12 的整数；并且
- [0885] m 为 0 至 12 的整数；或
- [0886] -接头-报告基团；并且
- [0887] R₉ 为烷基_(C ≤ 12)、芳基_(C ≤ 12) 或任何这些基团的取代形式。
- [0888] 159. 权利要求 158 的化合物，其进一步定义为式 C 的化合物。
- [0889] 160. 权利要求 158 的化合物，其进一步定义为式 D 的化合物。
- [0890] 161. 根据权利要求 158-160 中任一项的化合物，其中 2 为 -O-。
- [0891] 162. 根据权利要求 158-161 中任一项的化合物，其中 R₁ 为羟基。
- [0892] 163. 根据权利要求 158-161 中任一项的化合物，其中 R₁ 为一磷酸基。
- [0893] 164. 根据权利要求 158-161 中任一项的化合物，其中 R₁ 为二磷酸基。
- [0894] 165. 根据权利要求 158-161 中任一项的化合物，其中 R₁ 为三磷酸基。
- [0895] 166. 根据权利要求 158-161 中任一项的化合物，其中 R₁ 为多磷酸基。
- [0896] 167. 根据权利要求 158-166 中任一项的化合物，其中 R₂ 为氢。
- [0897] 168. 根据权利要求 158-166 中任一项的化合物，其中 R₂ 为羟基。
- [0898] 169. 根据权利要求 158-168 中任一项的化合物，其中 R₃ 为氢。
- [0899] 170. 根据权利要求 158-168 中任一项的化合物，其中 R₃ 为烷基_(C ≤ 12) 或其取代形式。
- [0900] 171. 权利要求 170 的化合物，其中 R₃ 为烷基_(C ≤ 8)。
- [0901] 172. 权利要求 171 的化合物，其中 R₃ 为烷基_(C ≤ 6)。
- [0902] 173. 权利要求 172 的化合物，其中 R₃ 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。
- [0903] 174. 权利要求 173 的化合物，其中 R₃ 为甲基。
- [0904] 175. 权利要求 172 的化合物，其中 R₃ 为烷基_(C2-6)。
- [0905] 176. 权利要求 175 的化合物，其中 R₃ 为烷基_(C3-5)。
- [0906] 177. 权利要求 176 的化合物，其中 R₃ 为异丙基。
- [0907] 178. 权利要求 176 的化合物，其中 R₃ 为叔丁基。
- [0908] 179. 根据权利要求 158-178 中任一项的化合物，其中 R₄ 为氢。
- [0909] 180. 根据权利要求 158-178 中任一项的化合物，其中 R₄ 为烷基_(C ≤ 12) 或其取代形式。
- [0910] 181. 权利要求 180 的化合物，其中 R₄ 为烷基_(C ≤ 8)。
- [0911] 182. 权利要求 181 的化合物，其中 R₄ 为烷基_(C ≤ 6)。
- [0912] 183. 权利要求 182 的化合物，其中 R₄ 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。
- [0913] 184. 权利要求 183 的化合物，其中 R₄ 为甲基。
- [0914] 185. 权利要求 182 的化合物，其中 R₄ 为烷基_(C2-6)。
- [0915] 186. 权利要求 185 的化合物，其中 R₄ 为烷基_(C3-5)。

- [0916] 187. 权利要求 186 的化合物, 其中 R_4 为异丙基。
 [0917] 188. 权利要求 186 的化合物, 其中 R_4 为叔丁基。
 [0918] 189. 根据权利要求 158-188 中任一项的化合物, 其中 R_5 为氢。
 [0919] 190. 根据权利要求 158-188 中任一项的化合物, 其中 R_5 为氰基。
 [0920] 191. 根据权利要求 158-188 中任一项的化合物, 其中 R_5 为烷氧基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。
 [0921] 192. 权利要求 191 的化合物, 其中 R_5 为烷氧基 ($C \leq 8$)。
 [0922] 193. 权利要求 192 的化合物, 其中 R_5 为烷氧基 ($C \leq 6$)。
 [0923] 194. 权利要求 193 的化合物, 其中 R_5 为烷氧基 ($C \leq 3$)。
 [0924] 195. 权利要求 194 的化合物, 其中 R_5 为甲氧基。
 [0925] 196. 根据权利要求 158-188 中任一项的化合物, 其中 R_5 为下式的基团:
 [0926]

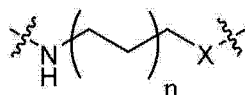


- [0927] 其中
 [0928] X 为
 [0929] -O-、-S- 或 -NH-; 或
 [0930] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; 并且
 [0931] n 为 0 至 12 的整数。
 [0932] 197. 权利要求 196 的化合物, 其中 x 为炔撑 ($C \leq 12$)。
 [0933] 198. 权利要求 197 的化合物, 其中 x 为炔撑 (C_{2-8})。
 [0934] 199. 权利要求 198 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
 [0935] 200. 根据权利要求 196-199 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。
 [0936] 201. 根据权利要求 158-188 中任一项的化合物, 其中 R_5 为下式的基团:
 [0937]

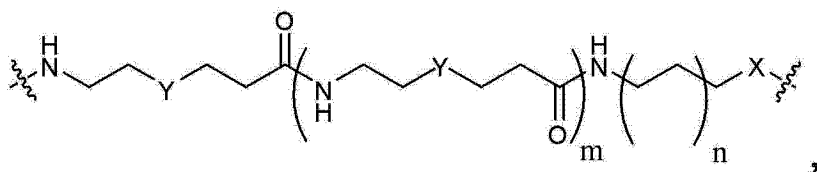


- [0938] 其中
 [0939] X 为
 [0940] -O-、-S- 或 -NH-; 或
 [0941] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式;
 [0942] Y 为 -O-、-NH-、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$);
 [0943] n 为 0 至 12 的整数; 并且
 [0944] m 为 0 至 12 的整数。

- [0945] 202. 权利要求 201 的化合物, 其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。
- [0946] 203. 权利要求 202 的化合物, 其中 X 为炔撑_(C2-8)。
- [0947] 204. 权利要求 203 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
- [0948] 205. 根据权利要求 201-204 中任一项的化合物, 其中 Y 为 $-CH_2-$ 。
- [0949] 206. 根据权利要求 201-205 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。
- [0950] 207. 根据权利要求 201-206 中任一项的化合物, 其中 m 为 0。
- [0951] 208. 根据权利要求 158-189 中任一项的化合物, 其中 R₆ 为 -接头-报告基团。
- [0952] 209. 根据权利要求 208 的化合物, 其中所述接头为:
- [0953]



- [0954] 其中
- [0955] x 为
- [0956] $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$; 或
- [0957] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12), 或任何这些基团的取代形式; 并且
- [0958] n 为 0 至 12 的整数。
- [0959] 210. 权利要求 209 的化合物, 其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。
- [0960] 211. 权利要求 210 的化合物, 其中 X 为炔撑_(C2-8)。
- [0961] 212. 权利要求 211 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
- [0962] 213. 根据权利要求 209-212 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。
- [0963] 214. 权利要求 208 的化合物, 其中所述接头为:
- [0964]



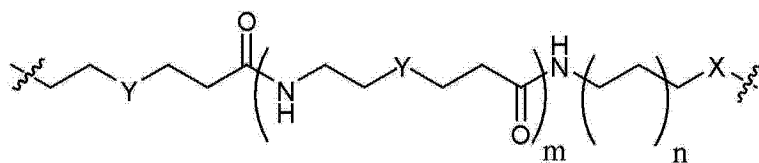
- [0965] 其中
- [0966] X 为
- [0967] $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$; 或
- [0968] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12), 或任何这些基团的取代形式;
- [0969] Y 为 $-O-$ 、 $-NH-$ 、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12);
- [0970] n 为 0 至 12 的整数; 并且
- [0971] m 为 0 至 12 的整数。
- [0972] 215. 权利要求 214 的化合物, 其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。
- [0973] 216. 权利要求 215 的化合物, 其中 X 为炔撑_(C2-8)。
- [0974] 217. 权利要求 216 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
- [0975] 218. 根据权利要求 214-217 中任一项的化合物, 其中 Y 为 $-CH_2-$ 。

[0976] 219. 根据权利要求 214-218 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。

[0977] 220. 根据权利要求 214-219 中任一项的化合物, 其中 m 为 0。

[0978] 221. 权利要求 208 的化合物, 其中所述接头为:

[0979]



[0980] 其中

[0981] X 为

[0982] -O-, -S- 或 -NH-; 或

[0983] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式;

[0984] Y 为 -O-, -NH-, 烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$);

[0985] n 为 0 至 12 的整数; 并且

[0986] m 为 0 至 12 的整数。

[0987] 222. 权利要求 221 的化合物, 其中 X 为炔撑 ($C \leq 12$)。

[0988] 223. 权利要求 222 的化合物, 其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。

[0989] 224. 权利要求 223 的化合物, 其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。

[0990] 225. 根据权利要求 221-224 中任一项的化合物, 其中 Y 为 $-CH_2-$ 。

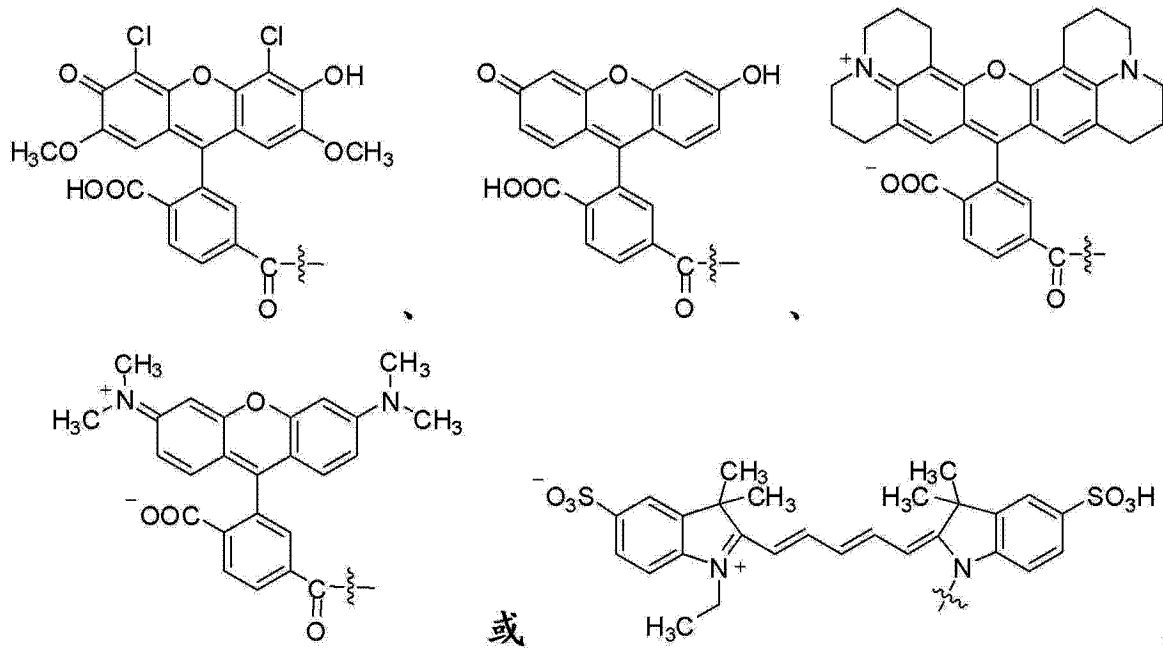
[0991] 226. 根据权利要求 221-225 中任一项的化合物, 其中 n 为 0。

[0992] 227. 根据权利要求 221-226 中任一项的化合物, 其中 m 为 0。

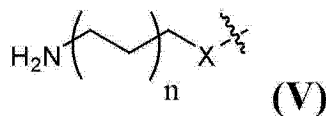
[0993] 228. 根据权利要求 208-227 中任一项的化合物, 其中所述报告基团是基于染料的报告基团, 其中所述染料为咕吨、荧光素、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白、**ALEXA FLUOR® 350**、**ALEXA FLUOR® 405**、**ALEXA FLUOR® 430**、**ALEXA FLUOR® 488**、**ALEXA FLUOR® 514**、**ALEXA FLUOR® 532**、**ALEXA FLUOR® 546**、**ALEXA FLUOR® 555**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 568**、**ALEXA FLUOR® 594**、**ALEXA FLUOR® 610**、**ALEXA FLUOR® 633**、**ALEXA FLUOR® 647**、**ALEXA FLUOR® 660**、**ALEXA FLUOR® 680**、**ALEXA FLUOR® 700**、**ALEXA FLUOR® 750**, 或方酸菁染料。

[0994] 229. 根据权利要求 208-227 中任一项的化合物, 其中所述报告基团为:

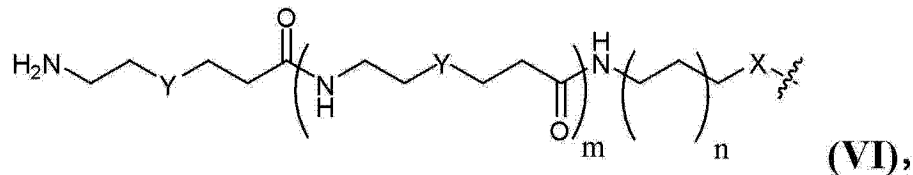
[0995]



- [0996] 230. 根据权利要求 158-229 中任一项的化合物,其中 R_6 为氢。
- [0997] 231. 根据权利要求 158-229 中任一项的化合物,其中 R_6 为烷氧基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。
- [0998] 232. 权利要求 231 的化合物,其中 R_6 为烷氧基 ($C \leq 8$)。
- [0999] 233. 权利要求 232 的化合物,其中 R_6 为烷氧基 ($C \leq 6$)。
- [1000] 234. 权利要求 233 的化合物,其中 R_6 为烷氧基 ($C \leq 3$)。
- [1001] 235. 权利要求 234 的化合物,其中 R_6 为甲氧基。
- [1002] 236. 根据权利要求 158-229 中任一项的化合物,其中 R_6 为下式的基团:
- [1003]



- [1004] 其中
- [1005] X 为
- [1006] -O-、-S- 或 -NH-; 或
- [1007] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$), 或任何这些基团的取代形式; 并且
- [1008] n 为 0 至 12 的整数。
- [1009] 237. 权利要求 236 的化合物,其中 x 为炔撑 ($C \leq 12$)。
- [1010] 238. 权利要求 237 的化合物,其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。
- [1011] 239. 权利要求 238 的化合物,其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。
- [1012] 240. 根据权利要求 236-239 中任一项的化合物,其中 n 为 0。
- [1013] 241. 根据权利要求 158-229 中任一项的化合物,其中 R_6 为下式的基团:
- [1014]



[1015] 其中

[1016] X 为

[1017] -O-、-S- 或 -NH-；或

[1018] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；

[1019] Y 为 -O-、-NH-、烷撑 ($C \leq 12$) 或取代烷撑 ($C \leq 12$)；

[1020] n 为 0 至 12 的整数；并且

[1021] m 为 0 至 12 的整数。

[1022] 242. 权利要求 241 的化合物，其中 X 为炔撑 ($C \leq 12$)。

[1023] 243. 权利要求 242 的化合物，其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。

[1024] 244. 权利要求 243 的化合物，其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。

[1025] 245. 根据权利要求 241-244 中任一项的化合物，其中 Y 为 $-CH_2-$ 。

[1026] 246. 根据权利要求 241-245 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

[1027] 247. 根据权利要求 241-246 中任一项的化合物，其中 m 为 0。

[1028] 248. 根据权利要求 158-229 中任一项的化合物，其中 R_6 为 -接头-报告基团。

[1029] 249. 权利要求 248 的化合物，其中所述接头为：

[1030]



[1031] 其中

[1032] X 为

[1033] -O-、-S- 或 -NH-；或

[1034] 烷撑 ($C \leq 12$)、烯撑 ($C \leq 12$)、炔撑 ($C \leq 12$)、芳撑 ($C \leq 12$)、杂芳撑 ($C \leq 12$)，或任何这些基团的取代形式；并且

[1035] n 为 0 至 12 的整数。

[1036] 250. 权利要求 249 的化合物，其中 X 为炔撑 ($C \leq 12$)。

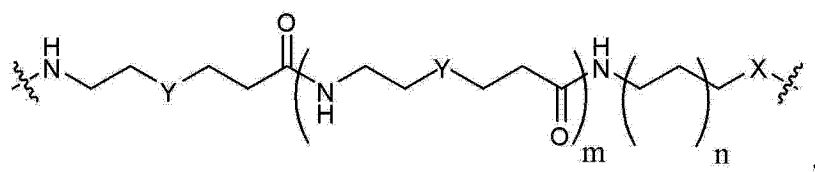
[1037] 251. 权利要求 250 的化合物，其中 X 为炔撑 (C_{2-8})。

[1038] 252. 权利要求 251 的化合物，其中 X 为 $-C \equiv C-$ 。

[1039] 253. 根据权利要求 249-252 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

[1040] 254. 根据权利要求 248 的化合物，其中所述接头为

[1041]



[1042] 其中

[1043] X 为

[1044] -O-、-S- 或 -NH-；或

[1045] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

[1046] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；

[1047] n 为 0 至 12 的整数；并且

[1048] m 为 0 至 12 的整数。

[1049] 255. 权利要求 254 的化合物，其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。

[1050] 256. 权利要求 255 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

[1051] 257. 权利要求 256 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

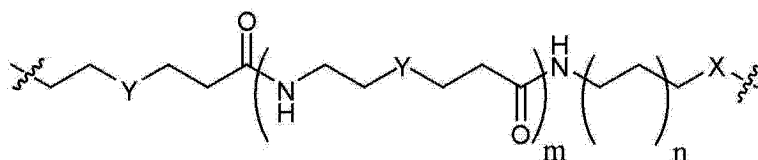
[1052] 258. 根据权利要求 254-257 中任一项的化合物，其中 Y 为 -CH₂-。

[1053] 259. 根据权利要求 254-258 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

[1054] 260. 根据权利要求 254-259 中任一项的化合物，其中 m 为 0。

[1055] 261. 根据权利要求 248 的化合物，其中所述接头为：

[1056]



[1057] 其中

[1058] X 为

[1059] -O-、-S- 或 -NH-；或

[1060] 烷撑_(C ≤ 12)、烯撑_(C ≤ 12)、炔撑_(C ≤ 12)、芳撑_(C ≤ 12)、杂芳撑_(C ≤ 12)，或任何这些基团的取代形式；

[1061] Y 为 -O-、-NH-、烷撑_(C ≤ 12) 或取代烷撑_(C ≤ 12)；

[1062] n 为 0 至 12 的整数；并且

[1063] m 为 0 至 12 的整数。

[1064] 262. 权利要求 261 的化合物，其中 X 为炔撑_(C ≤ 12)。

[1065] 263. 权利要求 262 的化合物，其中 X 为炔撑_(C2-8)。

[1066] 264. 权利要求 263 的化合物，其中 X 为 -C ≡ C-。

[1067] 265. 根据权利要求 261-264 中任一项的化合物，其中 Y 为 -CH₂-。

[1068] 266. 根据权利要求 261-265 中任一项的化合物，其中 n 为 0。

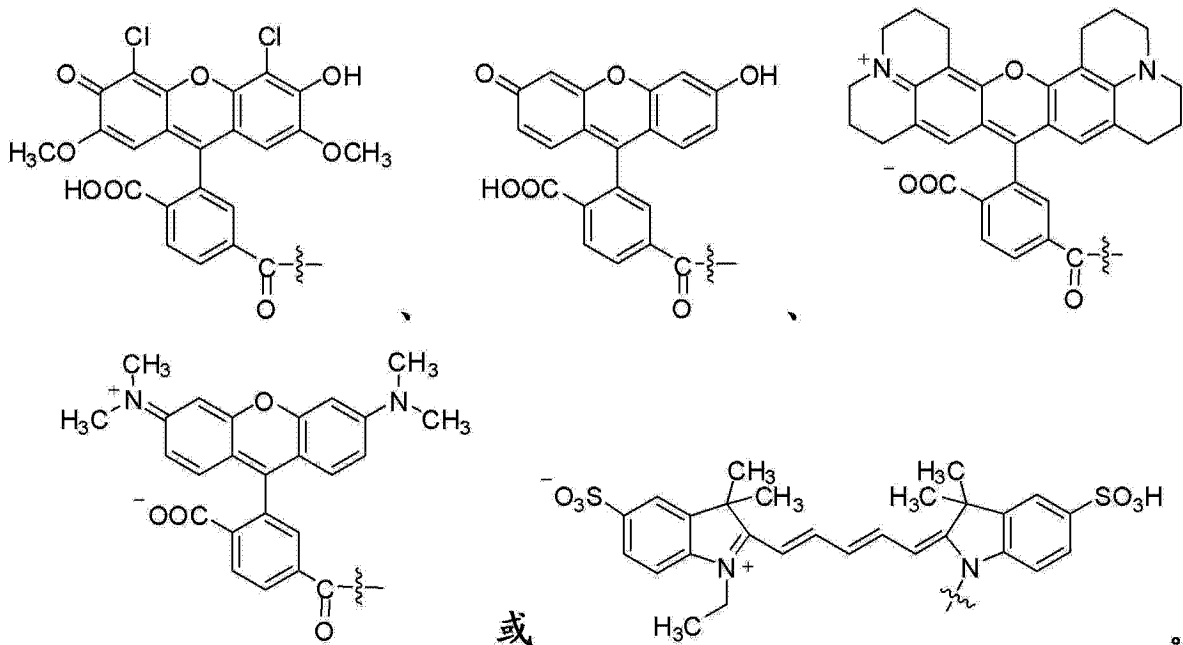
[1069] 267. 根据权利要求 261-266 中任一项的化合物，其中 m 为 0。

[1070] 268. 根据权利要求 248-267 中任一项的化合物，其中所述报告基团是基于染料的报告基团，其中所述染料为咕吨、荧光素、罗丹明、BODIPY、花菁、香豆素、芘、酞菁、藻胆蛋白、**ALEXA FLUOR® 350**、**ALEXA FLUOR® 405**、**ALEXA FLUOR® 430**、**ALEXA FLUOR® 488**、**ALEXA FLUOR® 514**、**ALEXA FLUOR®**

532、ALEXA FLUOR® 546、ALEXA FLUOR® 555、ALEXA FLUOR® 568、ALEXA FLUOR® 568、ALEXA FLUOR® 594、ALEXA FLUOR® 610、ALEXA FLUOR® 633、ALEXA FLUOR® 647、ALEXA FLUOR® 660、ALEXA FLUOR® 680、ALEXA FLUOR® 700、ALEXA FLUOR® 750,或方酸菁染料。

[1071] 269. 根据权利要求 248-267 中任一项的化合物,其中所述报告基因为:

[1072]



[1073] 270. 根据权利要求 158-269 中任一项的化合物,其中 R_7 为氢。

[1074] 271. 根据权利要求 158-270 中任一项的化合物,其中 R_8 为氢。

[1075] 272. 根据权利要求 158-270 中任一项的化合物,其中 R_8 为硝基。

[1076] 273. 根据权利要求 158-270 中任一项的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。

[1077] 274. 权利要求 273 的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 8$)。

[1078] 275. 权利要求 274 的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 6$)。

[1079] 276. 权利要求 275 的化合物,其中 R_8 为烷基 ($C \leq 3$)。

[1080] 277. 权利要求 276 的化合物,其中 R_8 为甲基。

[1081] 278. 根据权利要求 158-277 中任一项的化合物,其中 R_9 不是氢。

[1082] 279. 根据权利要求 158-277 中任一项的化合物,其中 R_9 为硝基。

[1083] 280. 根据权利要求 158-277 中任一项的化合物,其中 R_9 为烷基 ($C \leq 12$) 或其取代形式。

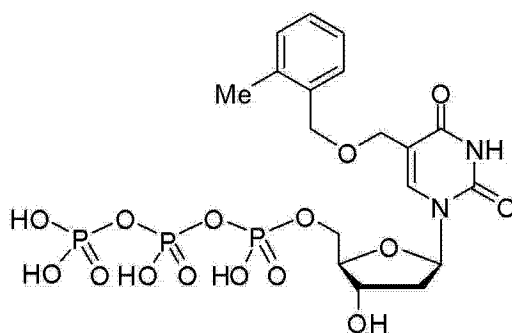
[1084] 281. 权利要求 280 的化合物,其中 R_9 为烷基 ($C \leq 8$)。

[1085] 282. 权利要求 281 的化合物,其中 R_9 为烷基 ($C \leq 6$)。

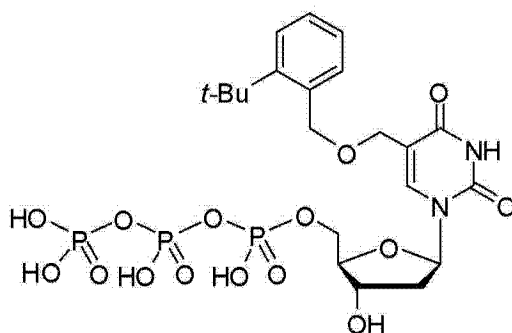
[1086] 283. 权利要求 282 的化合物,其中 R_9 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。

[1087] 284. 权利要求 283 的化合物,其中 R_9 为甲基。

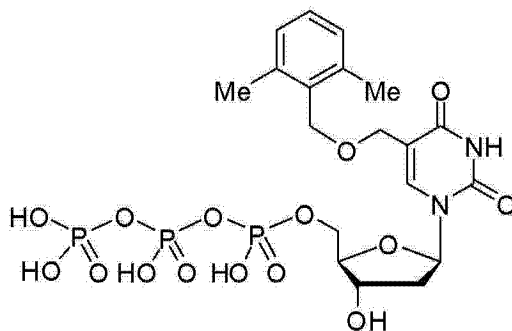
- [1088] 285. 权利要求 282 的化合物, 其中 R_9 为烷基 (C_{2-6})。
- [1089] 286. 权利要求 285 的化合物, 其中 R_9 为烷基 (C_{3-5})。
- [1090] 287. 权利要求 286 的化合物, 其中 R_9 为异丙基。
- [1091] 288. 权利要求 286 的化合物, 其中 R_9 为叔丁基。
- [1092] 289. 根据权利要求 158-277 中任一项的化合物, 其中 R_9 为芳基 ($C_{\leq 12}$) 或其取代形式。
- [1093] 290. 权利要求 289 的化合物, 其中 R_9 为芳基 ($C_{\leq 8}$)。
- [1094] 291. 权利要求 290 的化合物, 其中 R_9 为苯基。
- [1095] 292. 权利要求 158 的化合物, 进一步定义为:
- [1096]



- [1097] 或其盐。
- [1098] 293. 权利要求 158 的化合物, 进一步定义为:
- [1099]



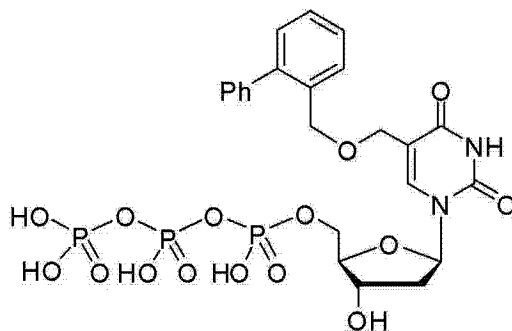
- [1100] 或其盐。
- [1101] 294. 权利要求 158 的化合物, 进一步定义为:
- [1102]



- [1103] 或其盐。

[1104] 295. 权利要求 158 的化合物,进一步定义为:

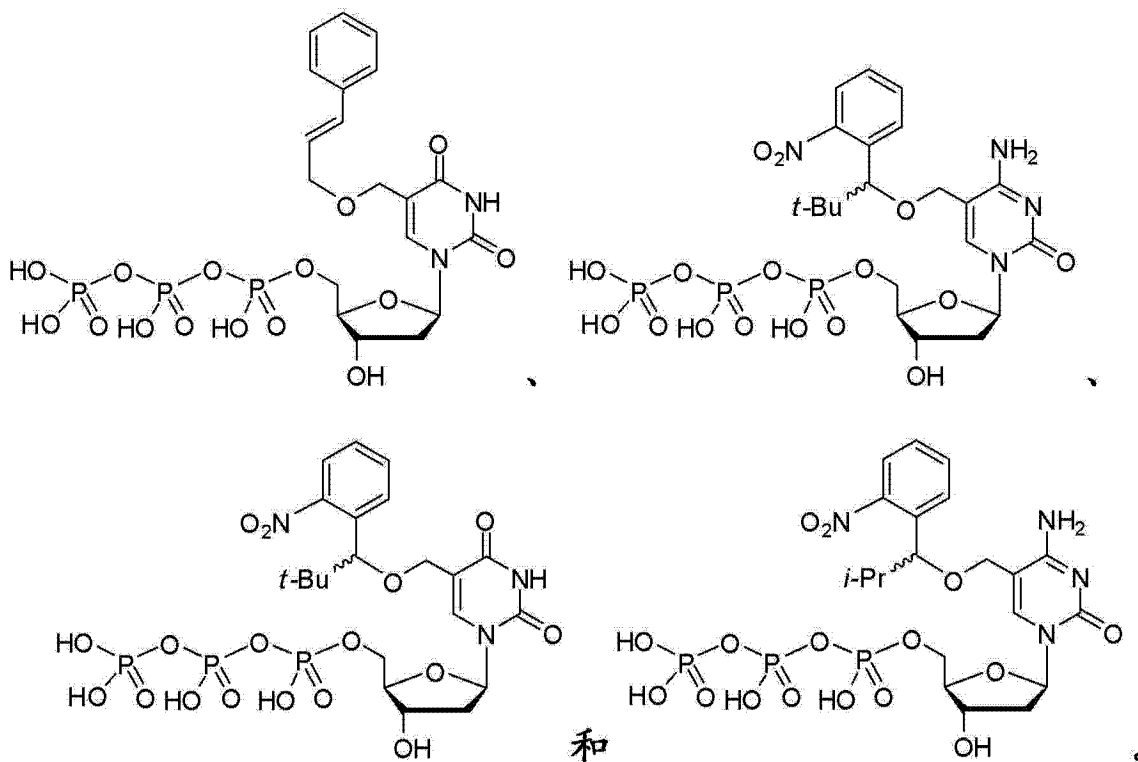
[1105]



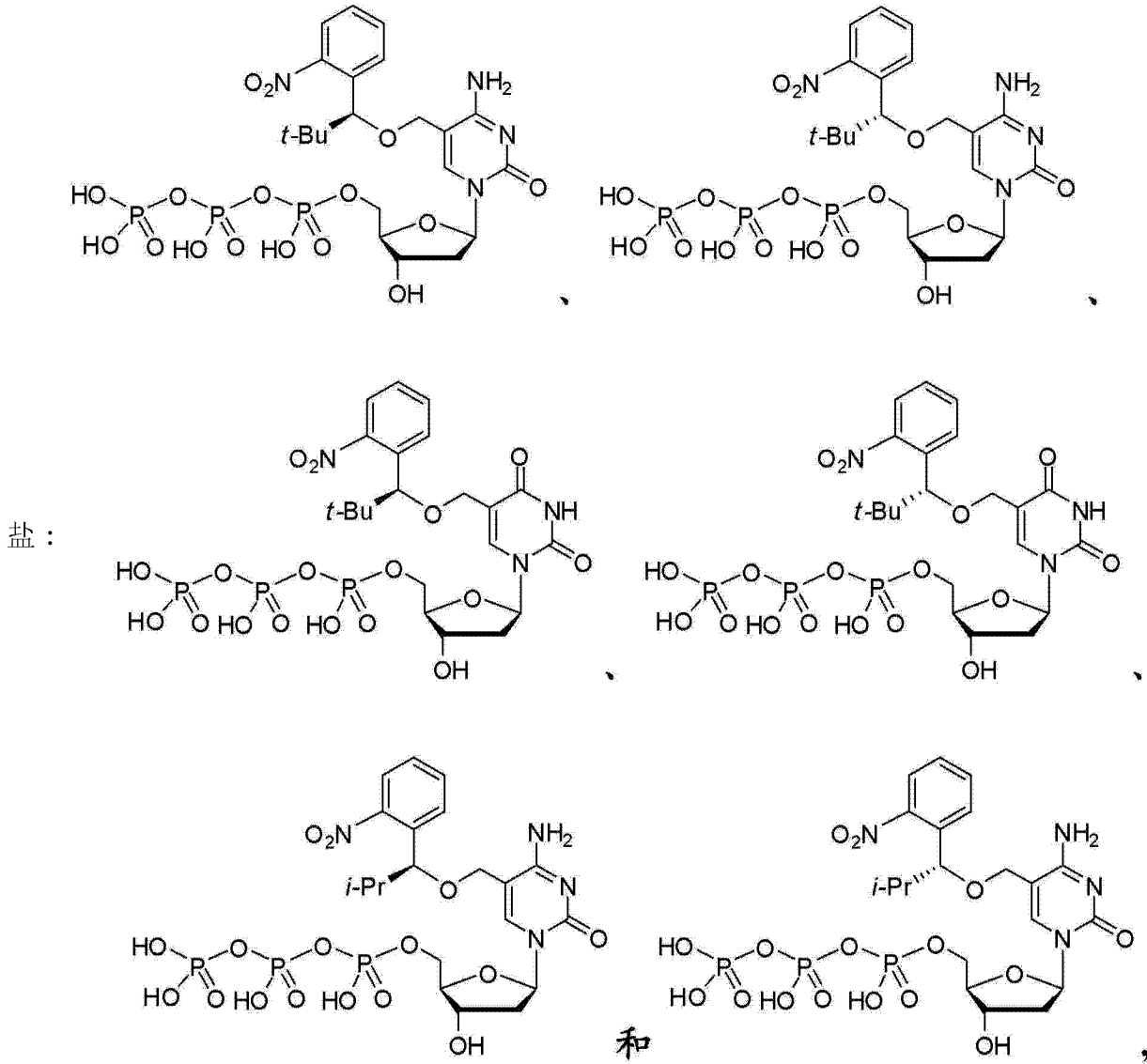
[1106] 或其盐。

[1107] 296. 选自下式的化合物或其盐:

[1108]

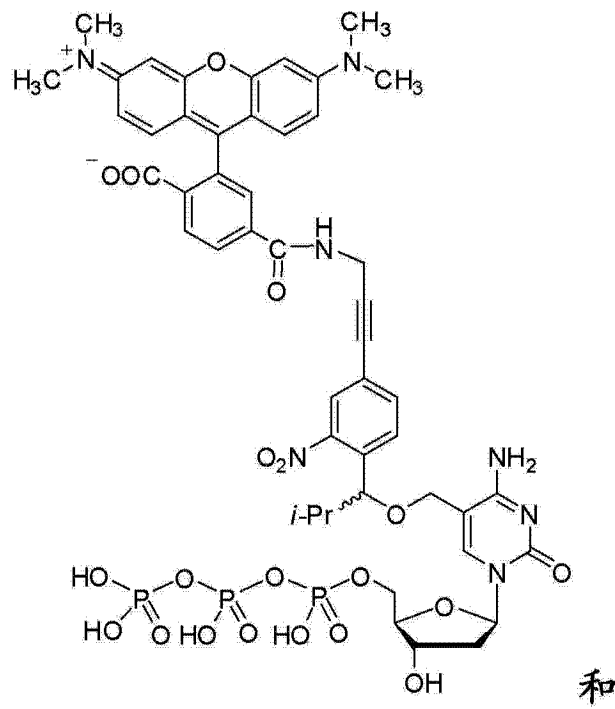
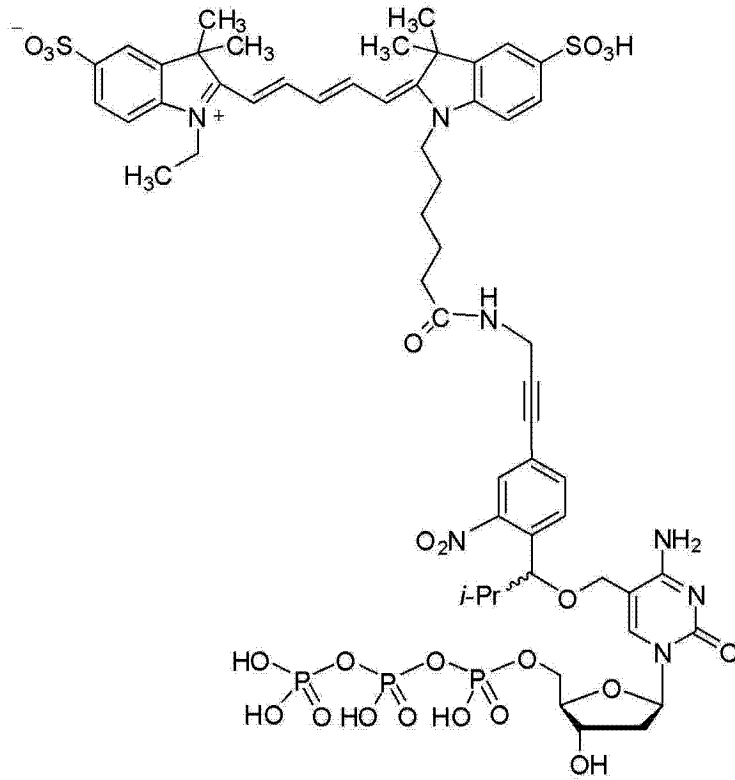


[1109] 297. 权利要求 296 的化合物,进一步定义为选自以下的非对映体或任何这些非对映体的

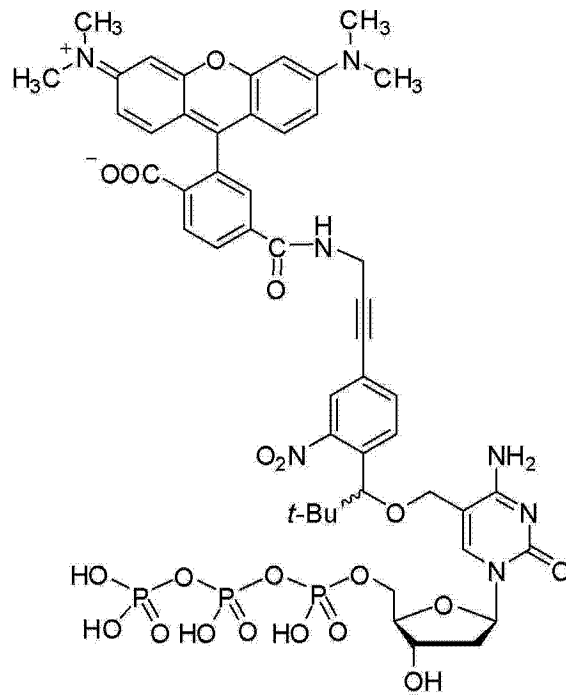


[1110] 其中所述化合物基本不含其他光学异构体。298. 选自下式的化合物或其盐：

[1111]

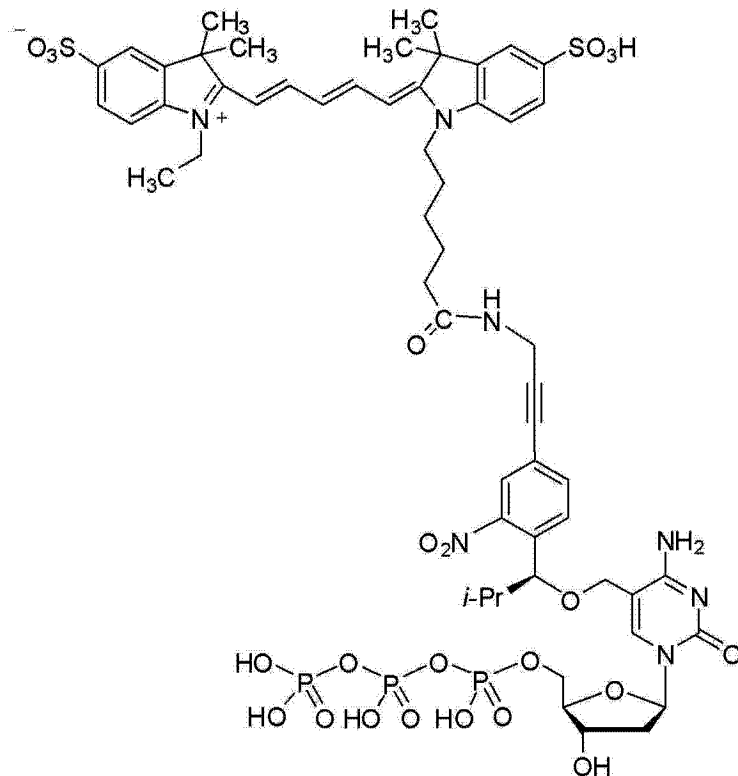


[1112]

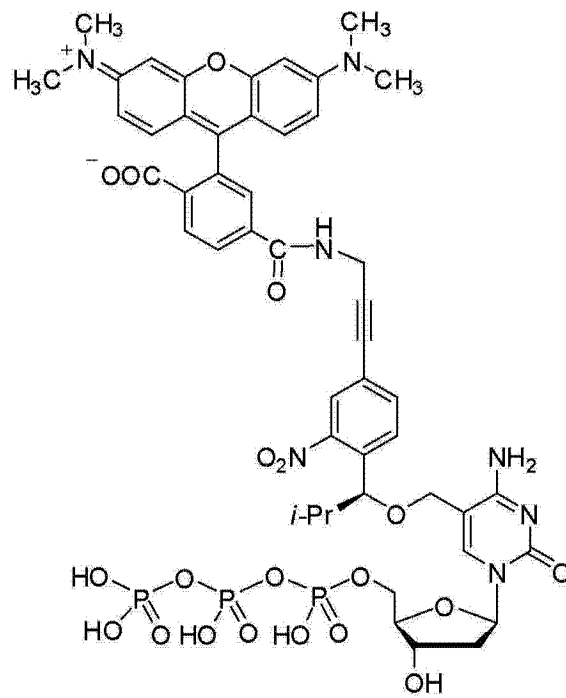
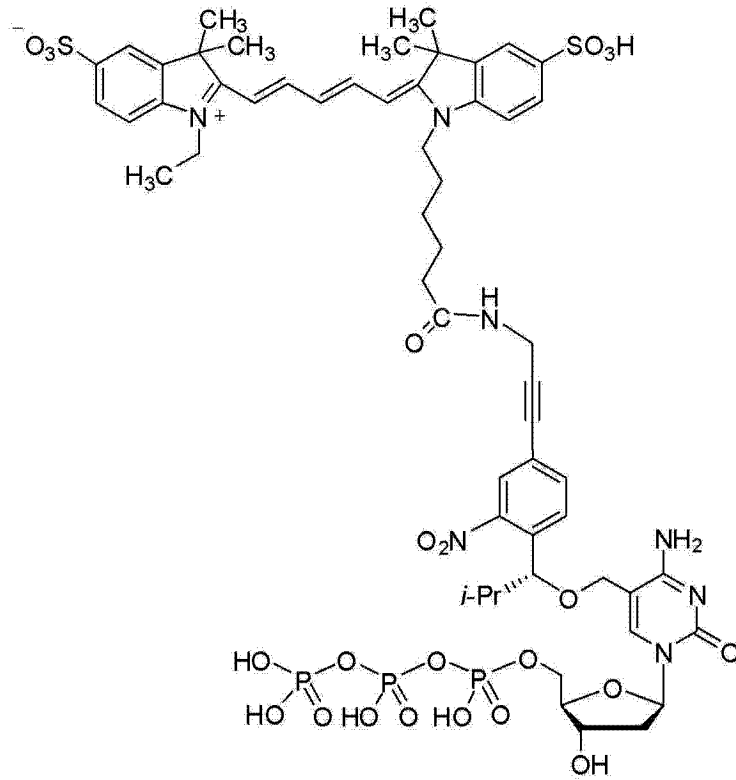


[1113] 299. 权利要求 298 的化合物,进一步定义为选自以下的非对映体或任何这些非对映体的盐:

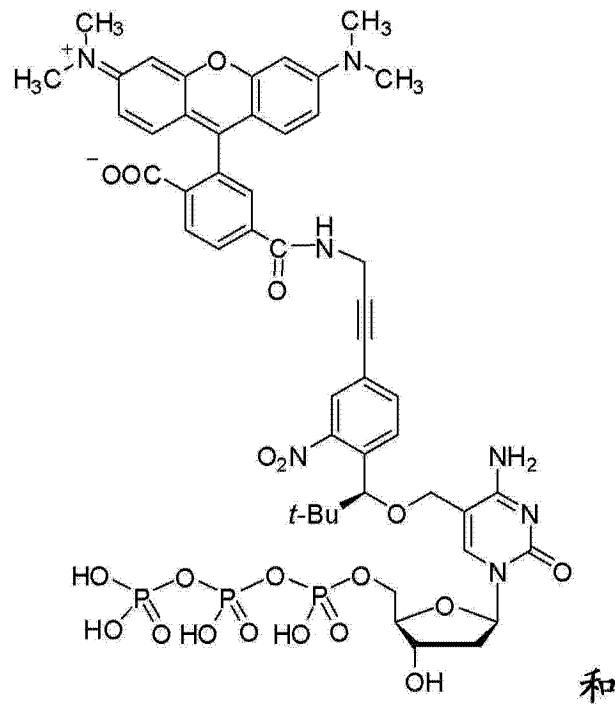
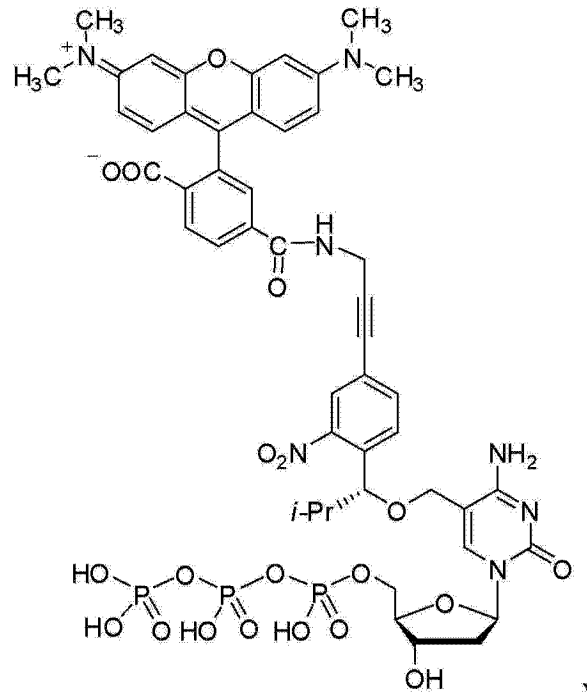
[1114]



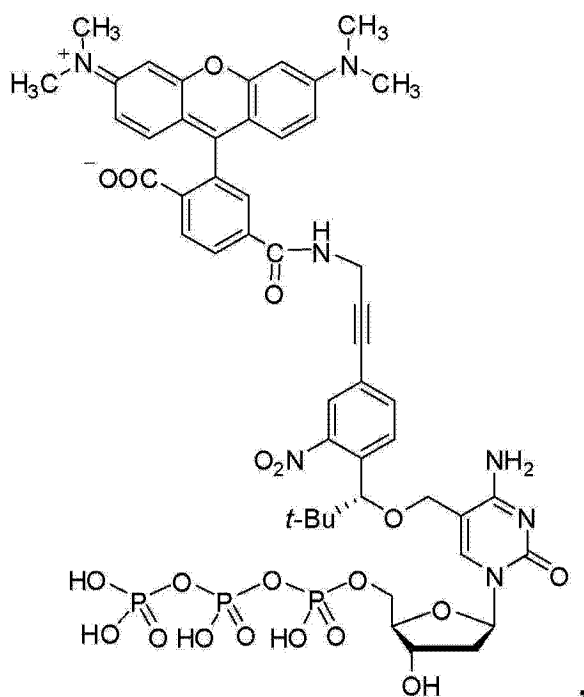
[1115]



[1116]



[1117]



- [1118] 其中所述化合物基本不合其他光学异构体。
- [1119] 300. 根据权利要求 1-299 中任一项的化合物,其中所述化合物为盐。
- [1120] 301. 权利要求 300 的化合物,其中所述盐包含一价阳离子。
- [1121] 302. 权利要求 301 的化合物,其中所述一价阳离子为锂。
- [1122] 303. 权利要求 301 的化合物,其中所述一价阳离子为钠。
- [1123] 304. 权利要求 301 的化合物,其中所述一价阳离子为钾。
- [1124] 305. 权利要求 300 的化合物,其中所述盐包含二价阳离子。
- [1125] 306. 权利要求 305 的化合物,其中所述二价阳离子为钙、镁或锰 (II)。
- [1126] 307. 权利要求 300 的化合物,其中所述盐包含选自铵、三正丁基铵和 $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_3^+$ 的阳离子。
- [1127] 308. 一种对靶标核酸进行测序的方法,其包括如下步骤:
- [1128] (i) 使引物的 5' 端附着于固体表面;
- [1129] (ii) 使靶标核酸与所述附着于固体表面的引物杂交;
- [1130] (iii) 添加根据权利要求 1-307 中任一项的化合物,前提是在存在多于一种碱基类型时,每种碱基被附着于不同的报告基团上;
- [1131] (iv) 向引物/靶标核酸杂交复合物中添加核酸复制酶,以将步骤 (iii) 所述组合物掺入延伸中的引物链中,其中所掺入的步骤 (iii) 所述组合物以约 70% 至约 100% 的效率终止聚合酶反应;
- [1132] (v) 清洗所述固体表面以除去未掺入的组分;
- [1133] (vi) 检测所掺入的报告基团,以鉴定所掺入的步骤 (iii) 所述组合物。
- [1134] (vii) 进行切割步骤,以除去终止性结构部分,产生具有天然碱基的已延伸引物;
- [1135] (viii) 清洗所述固体表面以除去被切下的终止性基团;和
- [1136] (ix) 重复步骤 (iii) 至 (viii) 一次或多次,以鉴定靶标核酸中的多个碱基。
- [1137] 309. 一种对靶标核酸进行测序的方法,其包括如下步骤:

- [1138] (i) 使靶标核酸的 5' 端附着于固体表面；
- [1139] (ii) 使引物与所述附着于固体表面的靶标核酸杂交；
- [1140] (iii) 添加根据权利要求 1-307 中任一项的化合物，前提是在存在多于一种碱基类型时，每种碱基被附着于不同的报告基团上；
- [1141] (iv) 向引物 / 靶标核酸杂交复合物中加入核酸复制酶，以将步骤 (iii) 所述组合物掺入延伸的引物链中，其中所掺入的步骤 (iii) 所述组合物以约 70% 至约 100% 的效率终止聚合酶反应；
- [1142] (v) 清洗所述固体表面以除去未掺入的组分；
- [1143] (vi) 检测所掺入的报告基团，以鉴定所掺入的步骤 (iii) 所述组合物；
- [1144] (vii) 任选地加入一种或多种化合物以使未延伸的引物永久加帽；
- [1145] (viii) 进行切割步骤以除去终止性结构部分，产生带有天然碱基的延伸引物；
- [1146] (ix) 清洗所述固体表面以除去被切下的终止性基团；和
- [1147] (x) 重复步骤 (iii) 至 (ix) 一次或多次，以鉴定靶标核酸中的多个碱基。
- [1148] 310. 根据权利要求 308 或 309 中任一项的方法，其中所述化合物由核酸复制酶掺入，所述酶为 DNA 聚合酶。
- [1149] 311. 权利要求 310 的方法，其中所述 DNA 聚合酶选自：Taq DNA 聚合酶、Klenow(exo-)DNA 聚合酶、Bst DNA 聚合酶、**VENT®** (exo-)DNA 聚合酶（克隆自 *Thermococcus litoralis* 的 DNA 聚合酶 A，含有 D141A 和 E143A 突变）、Pfu(exo-)DNA 聚合酶和 DEEPVENT™(exo-)DNA 聚合酶（克隆自 *Pyrococcus* 物种 GB-D 的 DNA 聚合酶 A，含有 D141A 和 E143A 突变）。
- [1150] 312. 权利要求 310 的方法，其中所述 DNA 聚合酶选自：**AMPLITAQ®** DNA 聚合酶、FS(含有 G46D 和 F667Y 突变的 TaqDNA 聚合酶)、THERMOSEQUENASETMDNA 聚合酶（含有 F667Y 突变的 TaqDNA 聚合酶）、THERMOSEQUENASETMIIDNA 聚合酶（THERMOSEQUENASETMDNA 聚合酶与 *T. acidophilum* 焦磷酸酶的混合物）、THERMINATOR™DNA 聚合酶（克隆自 *Thermococcus* 物种 9° N-7 的 DNA 聚合酶 A，含有 D141A、E143A 和 A485L 突变）、THERMINATOR™IIDNA 聚合酶（额外含有 Y409V 突变的 THERMINATOR™DNA 聚合酶）和 **VENT®** (exo-)A488LDNA 聚合酶（含有 A488L 突变的 **VENT®** (exo-)DNA 聚合酶）。
- [1151] 313. 根据权利要求 308-312 中任一项的方法，其中对所述终止性结构部分的切割为化学切割、光切割、电化学切割或酶切割。
- [1152] 314. 权利要求 313 的方法，其中所述化学切割使用催化剂或化学计量试剂进行。
- [1153] 315. 权利要求 314 的方法，其中所述催化剂是均相或非均相的。
- [1154] 316. 权利要求 315 的方法，其中所述非均相催化剂包含钯。
- [1155] 317. 权利要求 315 的方法，其中所述均相催化剂包含钯。
- [1156] 318. 权利要求 315-317 中任一项的方法，其中 85% 至 100% 的可光切割终止性结构部分通过光切割而被去除。
- [1157] 319. 权利要求 314 的方法，其中使用波长为 30nm 至 400nm 的光进行所述光切割。
- [1158] 320. 权利要求 319 的方法，其中 85% 至 100% 的可光切割终止性结构部分通过光切割而被去除。

- [1159] 321. 使用根据权利要求 1-307 中任一项所述化合物进行 Sanger 测序或 Sanger 型测序的方法。
- [1160] 322. 使用根据权利要求 1-307 中任一项所述化合物进行焦磷酸测序或焦磷酸型测序的方法。
- [1161] 参考文献
- [1162] 以下参考文献以及附录中列出的参考文献均以引用方式明确并入本文,其程度为它们对本文所述内容提供补充性的示例性方法或其他细节。
- [1163] 美国专利 4,439,356
- [1164] 美国专利 5,151,507
- [1165] 美国专利 5,188,934
- [1166] 美国专利 5,770,367
- [1167] Barone et al., *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 20:1141-1145, 2001.
- [1168] Bartholomew and Broom, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 38, 1975.
- [1169] Beaulieu et al., *J. Med. Chem.*, 43:1094-1108, 2000.
- [1170] Cameron and Frechet, *J. Am. Chem. Soc.*, 113:4303-4313, 1991.
- [1171] Chaulk and MacMillan, *Nucleic Acids Res.*, 26:3173-3178, 1998.
- [1172] Dong et al., *Org. Lett.*, 7:1043-1045, 2005.
- [1173] Dressman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:8817-8822, 2003.
- [1174] European Patent Appln. 87310256. 0
- [1175] Flack, *Acta Cryst.*, A39:876-881, 1983.
- [1176] Green and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed. Wiley, NY, 1999.
- [1177] Harris et al., *Science*, 320:106-109, 2008.
- [1178] Hasan et al., *Tetrahedron*, 53:4247-4264, 1997.
- [1179] Hermet al., *Chem. Eur. J.*, 8:1485-1499, 2002.
- [1180] Hunkapiller et al., *Science*, 254:59-67, 1991.
- [1181] Iafrate et al., *Nature Genet.*, 36:949-951, 2004.
- [1182] International Human Genome Sequencing Consortium., *Nature*, 409:860-921, 2001.
- [1183] Johnson et al., *Org. Lett.*, 6:4643-46, 2004.
- [1184] Ju et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:19635-40, 2006.
- [1185] Kanie et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39:4545-4547, 2000.
- [1186] Kobayashi et al., *Science*, 304:1305-1308, 2004.
- [1187] Lehninger, In: *Principles of Biochemistry*, 273-305, W. H. Freeman and Co., NY, 2005.
- [1188] LeVy et al., *PLoS Biol.*, 5:e254, 2007.
- [1189] March's *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 2007.

- [1190] Margulies et al, Nature, 437 :376—380, 2005.
- [1191] Mel'niketal., Bioorganicheskaya Khimiya, 17 :1101—1110, 1991.
- [1192] Metzker etal., Biotechniques, 25 :446—462, 1998.
- [1193] Metzker etal., NucleicAcidsRes., 22 :4259-4267, 1994.
- [1194] Metzker, GenomeRes., 15 :1767-1776, 2005.
- [1195] Ohtsukaetal., NucleicAcidsRes., 1 :1351—1357, 1974.
- [1196] PCT Appln. PCT / US90 / 05565
- [1197] Pease etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 :5022-5026, 1994.
- [1198] Pillai, Synthesis, 1-26, 1980.
- [1199] Redon etal., Nature, 444 :444-454, 2006.
- [1200] Reichmanisetal., J. Polymet Sci., 23 :1-8, 1985.
- [1201] Ronaghi etal., Science, 281 :363—365, 1998.
- [1202] Sanger etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 :5463—5467, 1997.
- [1203] Sapountzis etal., J. Org. Chem., 70 :2445—2454, 2005.
- [1204] Sebatetal., Science, 305 :525-528, 2004.
- [1205] Seela and Peng, J. Org. Chem., 71 :81-90, 2006.
- [1206] Service, Science, 282 :1020-1021, 1998.
- [1207] Smith etal., J. Org. Chem., 55 :2543—2545, 1990.
- [1208] Stranger etal., Science, 315 :848-853, 2007.
- [1209] Tuzun etal., Nature Genet., 37 :727—732, 2005.
- [1210] Wu etal., NucleicAcidsRes., 35 :6339—6349. 2007.
- [1211] Wu etal., Org. Lett., 6 :2257—2260, 2004.
- [1212] Zhi etal., J. Med. Chem., 46 :4104—4112, 2003.

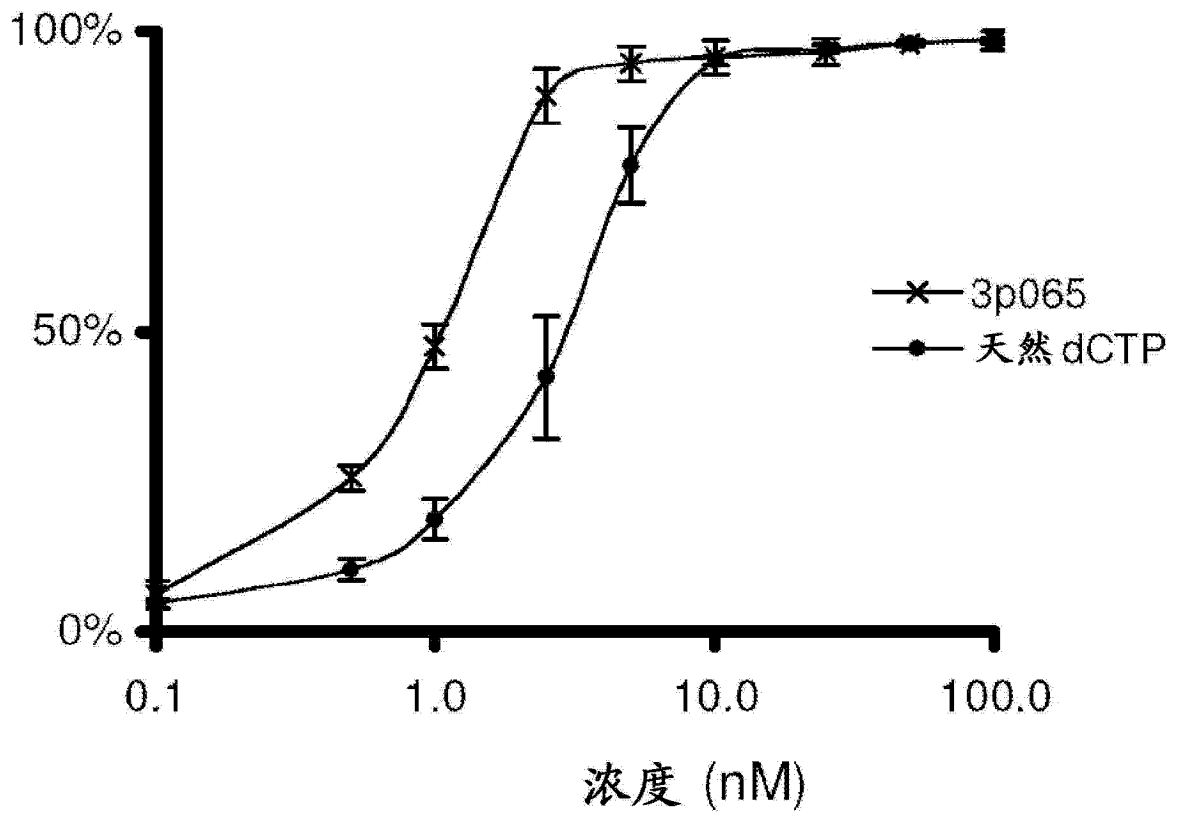


图 1

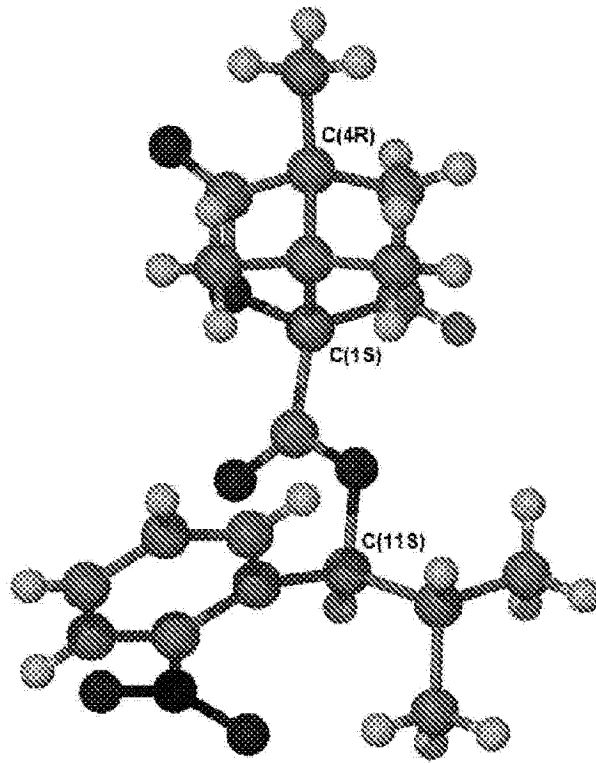


图 2

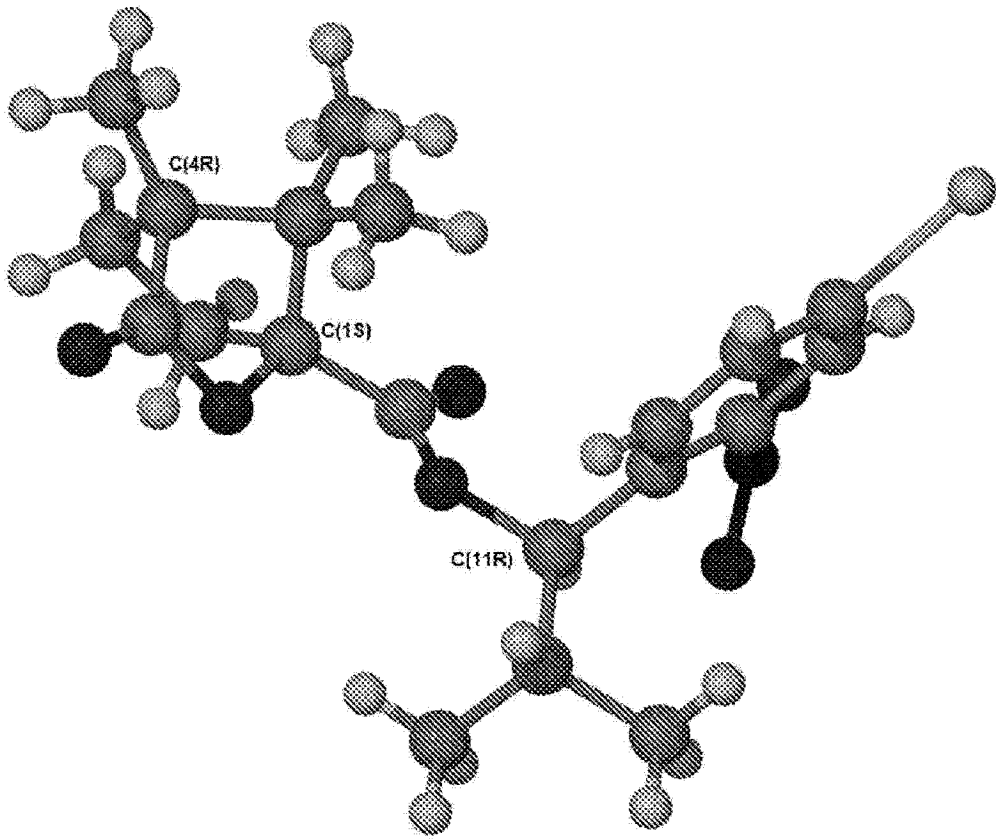
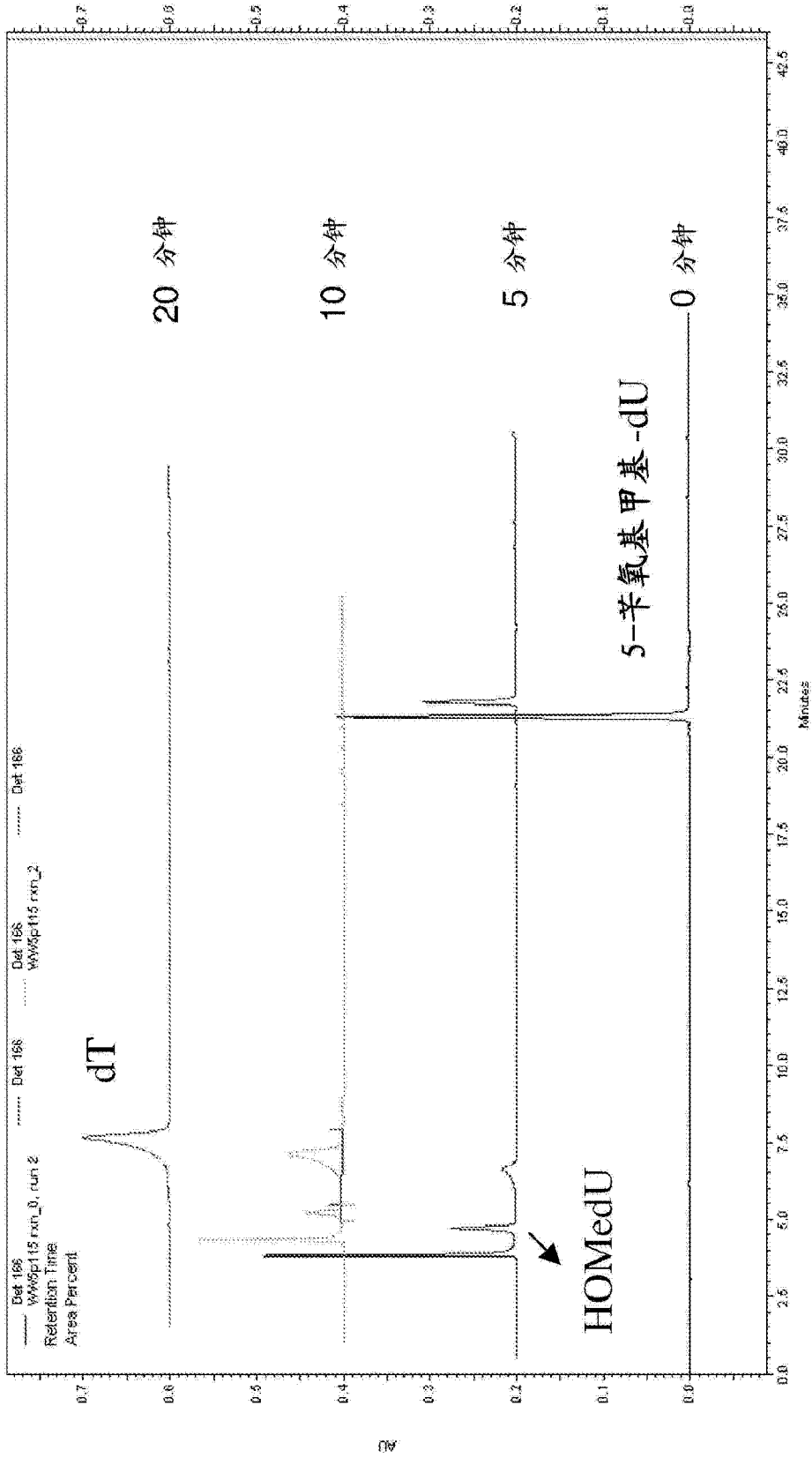


图 3



AU

图 4

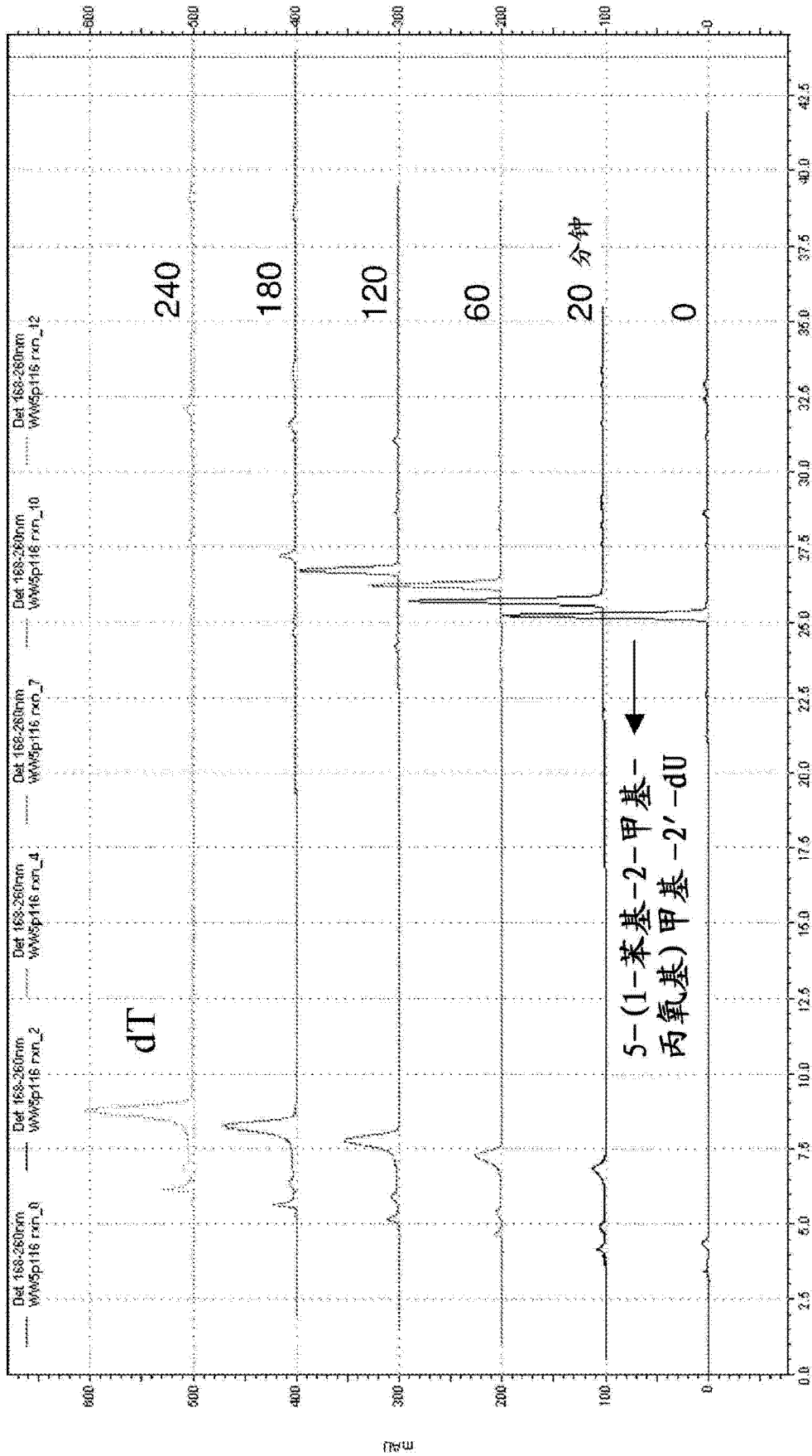


图 5