



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111909197 A

(43) 申请公布日 2020.11.10

(21) 申请号 202010639823.4

(22) 申请日 2020.07.06

(71) 申请人 深圳清华大学研究院

地址 518000 广东省深圳市南山区科技园
高新南七道19号清华研究院

申请人 安序源生物科技(深圳)有限公司

(72) 发明人 秦龙 杨照亮 何筠 田晖

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 张建珍

(51) Int.Cl.

C07F 9/09 (2006.01)

C07H 1/04 (2006.01)

C07H 19/10 (2006.01)

C07H 19/207 (2006.01)

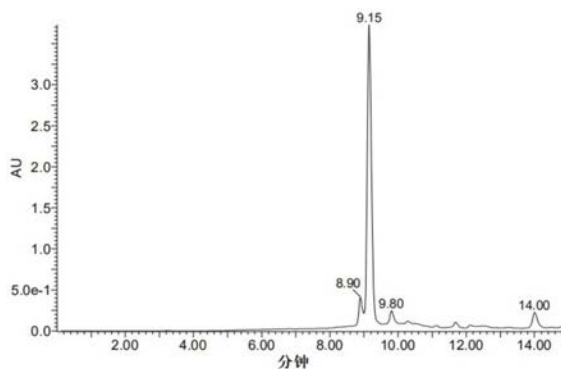
权利要求书2页 说明书11页 附图11页

(54) 发明名称

一种三磷酸化合物和脱氧核苷酸的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种三磷酸化合物和脱氧核苷酸的制备方法。本发明的三磷酸化合物制备方法通过用四氢呋喃替代磷酸三甲酯/磷酸三乙酯、三正丙基胺替代三正丁基胺、乙腈替代N,N-二甲基甲酰胺,具有产率大、副产物少、溶剂易去除、无毒安全等优点。本发明的脱氧核苷酸方法通过用吗啉-二甲基甲酰胺溶液替代三乙胺溶液来脱除-Fmoc基团,大幅缩短了反应时间,减少了副产物的生成,提高了产率。



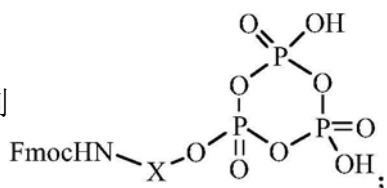
1. 一种三磷酸化合物的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将茆甲氧羰酰氯和 $\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{OH}$ 分散在溶剂中, X 为 $\text{C}_2\sim\text{C}_9$ 的亚烷基,再加入 Na_2CO_3 溶液,常温反应,萃取,析晶,得到 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$;

2) 将三氯氧磷和 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 分散在四氢呋喃中, $30\sim 50^\circ\text{C}$ 反应,得到

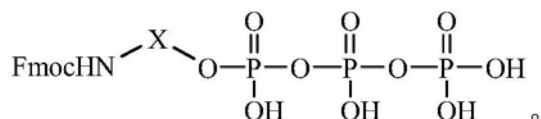
$$\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(\text{Cl})_2$$

3) 将焦磷酸三正丙基铵盐的乙腈溶液和三正丙基胺加入步骤2)的反应液中,室温反应,得到



4) 将三乙胺-碳酸缓冲液加入步骤3)的反应液中,室温反应,浓缩,得到三磷酸化合物粗品;

5) 通过反相高效液相色谱对三磷酸化合物粗品进行纯化,得到三磷酸化合物



2. 根据权利要求1所述的三磷酸化合物的制备方法,其特征在于:步骤1)所述茆甲氧羰酰氯、 $\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{OH}$ 的摩尔比为 $(1.1\sim 1.5):1$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的三磷酸化合物的制备方法,其特征在于:步骤1)所述溶剂为1,4-二氧六环、乙腈、二甲基甲酰胺、二氯甲烷中的至少一种。


4. 根据权利要求1所述的三磷酸化合物的制备方法,其特征在于:步骤2)所述三氯氧磷、 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 的摩尔比为 $(1.2\sim 2.1):1$ 。

5. 根据权利要求1或4所述的三磷酸化合物的制备方法,其特征在于:步骤2)所述 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 、步骤3)所述焦磷酸三正丙基铵盐的摩尔比为 $1:(5\sim 8)$ 。

6. 根据权利要求1或4所述的三磷酸化合物的制备方法,其特征在于:步骤2)所述 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 、步骤3)所述三正丙基胺的摩尔比为 $1:(5\sim 8)$ 。

7. 一种脱氧核苷酸的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2$ 和 N,N'-羰基二咪唑分散在溶剂中, X 为 $\text{C}_2\sim\text{C}_9$ 的

亚烷基, 室温反应, 再加入甲醇, 室温反应, 得到 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{N}$  ;

2) 将 2'-脱氧核苷-5'-多磷酸酯的三正丁基铵盐溶于溶剂后加入步骤1) 的反应液中,

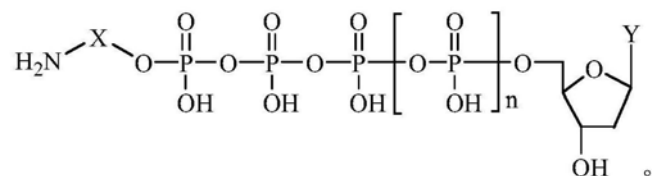
再加入 MgCl_2 , 室温反应, 旋蒸, 得到 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\left[\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})\right]_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{Y})-\text{CH}_2-\text{OH}$ Y 为 A、

G、C、T 四种碱基中的一种, n 为 1~4 的自然数;

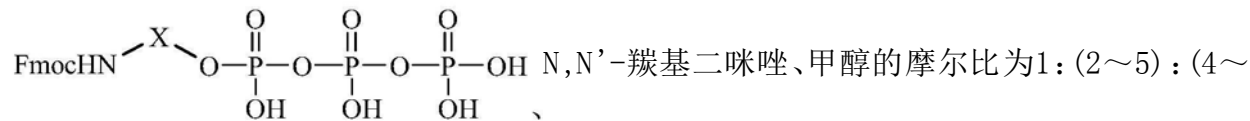
3) 将 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\left[\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})\right]_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{Y})-\text{CH}_2-\text{OH}$ 加入吗啉-二甲基甲酰胺溶

液中, 室温反应, 浓缩, 得到脱氧核苷酸粗品;

4) 通过反相高效液相色谱对脱氧核苷酸粗品进行纯化, 得到脱氧核苷酸



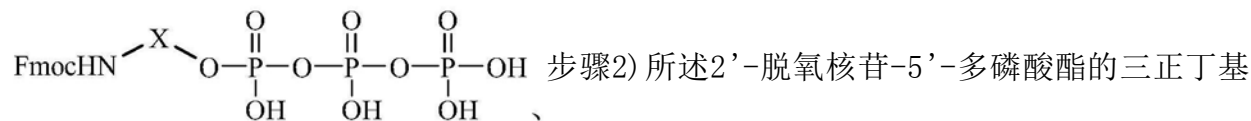
8. 根据权利要求7所述的脱氧核苷酸的制备方法, 其特征在于: 步骤1) 所述



7)。

9. 根据权利要求7或8所述的脱氧核苷酸的制备方法, 其特征在于: 步骤1) 所述溶剂为二甲基甲酰胺、乙腈、二甲基亚砷中的至少一种。

10. 根据权利要求7或8所述的脱氧核苷酸的制备方法, 其特征在于: 步骤1) 所述



铵盐、步骤2) 所述 MgCl_2 的摩尔比为 1: (1.1~1.5): (8~20)。

一种三磷酸化合物和脱氧核苷酸的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种三磷酸化合物和脱氧核苷酸的制备方法,属于有机合成技术领域。

背景技术

[0002] 末端脱氧核苷酸转移酶是一种无需模板的DNA聚合酶,用于催化脱氧核苷酸结合到DNA分子的3'羟基端,在人类和动物的免疫反应形成过程中起重要作用。2'-脱氧核苷-5'-三磷酸是末端脱氧核苷酸转移酶的天然底物,不过有研究发现是否存在核苷片段并不影响三磷酸酯作为底物的性质,即三磷酸类化合物可以替代2'-脱氧核苷-5'-三磷酸用作某些末端脱氧核苷酸转移酶(例如:小牛胸腺末端脱氧核苷酸转移酶)的底物。然而,文献报道的三磷酸类化合物合成方法普遍的反应收率仅有7%~12%,且还需要使用三正丁基胺这种一类剧毒品,所以无法大规模推广应用。

[0003] 核苷酸是一类由嘌呤碱或嘧啶碱、核糖或脱氧核糖以及磷酸三种物质组成的化合物。核苷酸最常见的修饰手段是在5位标记荧光染料分子或者在7位碱基上修饰一些可用于检测的基团,用于各种基因组学,包括DNA标记和测序,而7位碱基上修饰的分子在与DNA聚合酶发生作用后,这些带标记核苷酸就会插入延伸的DNA链当中,导致新的DNA结构发生变化。近些年,研究人员在研究单分子测序时发现5位修饰亦可用于DNA测序,而此类修饰一般是延伸5位磷酸酯键并甩出一个容易与一些标记分子连接的官能团,例如-NH₂等,因此这类化合物的合成研究对单分子测序至关重要,其多样性能够增加单分子测序底物筛选的样本量,为优化筛选测序底物提供更多的可能性。然而,文献报道的通过三磷酸类化合物合成核苷酸的方法普遍存在目标产物收率较低、副产物多、制备周期长、溶剂难去除等问题,无法大规模推广应用。

[0004] 因此,有必要开发一种收率更高、更加安全的三磷酸化合物合成方法,并进一步利用三磷酸化合物来合成脱氧核苷酸。

发明内容

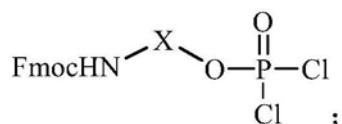
[0005] 本发明的目的在于提供一种三磷酸化合物和脱氧核苷酸的制备方法。

[0006] 本发明所采取的技术方案是:

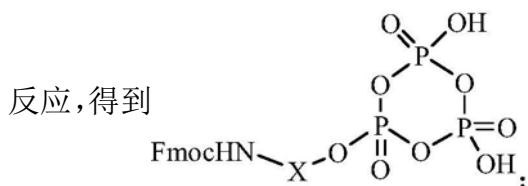
[0007] 一种三磷酸化合物的制备方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 将苄氧羰酰氯和 $\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{OH}$ 分散在溶剂中, X 为 C₂~C₉ 的亚烷基,再加入 Na₂CO₃ 溶液,常温反应,萃取,析晶,得到 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$;

[0009] 2) 将三氯氧磷和 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 分散在四氢呋喃中, 30~50℃ 反应,得到

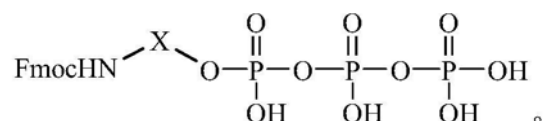


[0010] 3) 将焦磷酸三正丙基铵盐的乙腈溶液和三正丙基胺加入步骤2) 的反应液中, 室温



[0011] 4) 将三乙胺-碳酸缓冲液加入步骤3) 的反应液中, 室温反应, 浓缩, 得到三磷酸化合物粗品;

[0012] 5) 通过反相高效液相色谱对三磷酸化合物粗品进行纯化, 得到三磷酸化合物



[0013] 优选的, 步骤1) 所述苄氧羰酰氯、 $\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{OH}$ 的摩尔比为 (1.1~1.5):1。

[0014] 优选的, 步骤1) 所述溶剂为1,4-二氧六环、乙腈、二甲基甲酰胺、二氯甲烷中的至少一种。

[0015] 优选的, 步骤1) 所述 Na_2CO_3 溶液的质量分数为5%~15%。

[0016] 优选的, 步骤1) 所述反应的时间为10~15h。

[0017] 优选的, 步骤2) 所述三氯氧磷、 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 的摩尔比为 (1.2~2.1):1。

[0018] 优选的, 步骤2) 所述反应的时间为3~5h。

[0019] 优选的, 步骤2) 所述 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 、步骤3) 所述焦磷酸三正丙基铵盐的摩尔比为1:(5~8)。

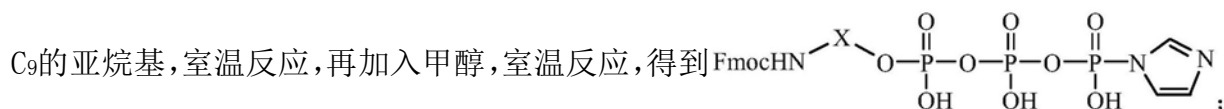
[0020] 优选的, 步骤2) 所述 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 、步骤3) 所述三正丙基胺的摩尔比为1:(5~8)。

[0021] 优选的, 步骤3) 所述反应的时间为1~2h。

[0022] 优选的, 步骤4) 所述反应的时间为20~50h。

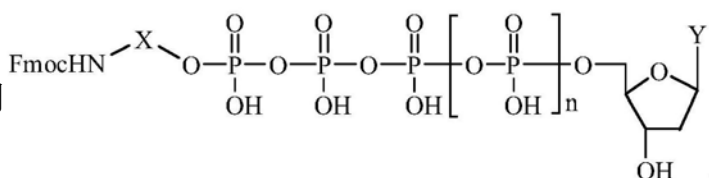
[0023] 一种脱氧核苷酸的制备方法, 包括以下步骤:

[0024] 1) 将 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2-\text{OH}$ 和N,N'-羰基二咪唑分散在溶剂中, X为 $\text{C}_2\sim$

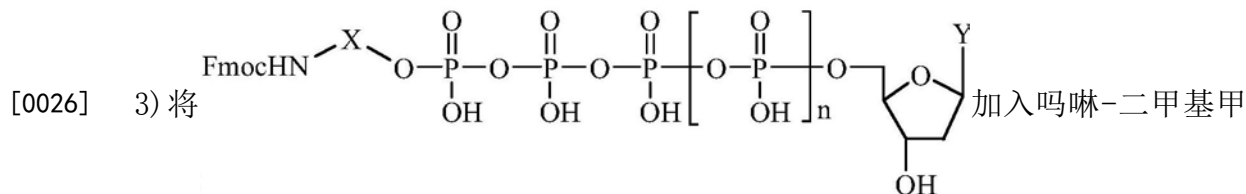


[0025] 2) 将2'-脱氧核苷-5'-多磷酸酯的三正丁基铵盐溶于溶剂后加入步骤1) 的反应液

中,再加入 MgCl_2 ,室温反应,旋蒸,得到

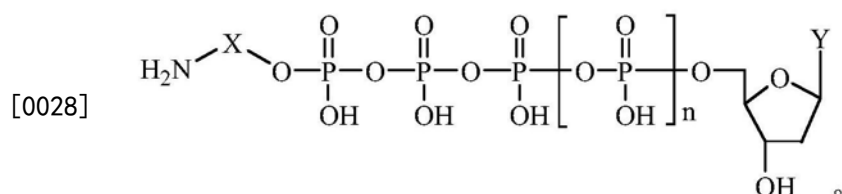


Y为A、G、C、T四种碱基中的一种,n为1~4的自然数;



酰胺溶液中,室温反应,浓缩,得到脱氧核苷酸粗品;

[0027] 4) 通过反相高效液相色谱对脱氧核苷酸粗品进行纯化,得到脱氧核苷酸



[0029] 优选的,步骤1)所述 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{OH}$ N,N'-羰基二咪唑、甲

醇的摩尔比为1:(2~5):(4~7)。

[0030] 优选的,步骤1)所述溶剂为二甲基甲酰胺、乙腈、二甲基亚砷中的至少一种。

[0031] 优选的,步骤1)中第一次反应的时间为3~5h,第二次反应的时间为20~40min。

[0032] 优选的,步骤1)所述 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{OH}$ 步骤2)所述2'-脱氧核

苷-5'-多磷酸酯的三正丁基铵盐、步骤2)所述 MgCl_2 的摩尔比为1:(1.1~1.5):(8~20)。

[0033] 优选的,步骤2)所述反应的时间为10~20h。

[0034] 优选的,步骤3)所述反应的时间为2~3h。

[0035] 本发明的有益效果是:本发明的三磷酸化合物制备方法具有产率高、副产物少、溶剂易去除、无毒安全等优点,由该三磷酸化合物制备脱氧核苷酸的方法具有反应时间短、副产物少、产率高等优点,均适合进行大规模推广应用。

[0036] 具体来说:

[0037] 1) 本发明的三磷酸化合物制备方法的收率大于40%,约为传统方法的4倍,本发明的脱氧核苷酸制备方法的收率大于80%,而传统方法低于60%;

[0038] 2) 本发明用四氢呋喃替代磷酸三甲酯/磷酸三乙酯作为溶剂进行三氯氧磷和 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{OH}$ 的反应,有效减少了二磷酸甲酯化副产物的生成,最终提高了三磷酸化合物的产率;

[0039] 3) 本发明用三正丙基胺替代三正丁基胺(一类剧毒品)与 $\text{FmocHN}-\text{X}-\text{O}-\text{P}(\text{Cl})_2$ 反

应,更加安全;

[0040] 4) 本发明用乙腈替代N,N-二甲基甲酰胺来分散焦磷酸三正丙基铵盐,反应结束后溶剂更加容易去除;

[0041] 5) 本发明用吗啉-二甲基甲酰胺溶液替代三乙胺溶液来脱除-Fmoc基团,大幅缩短了反应时间,减少了副产物的生成,提高了脱氧核苷酸的产率。

附图说明

[0042] 图1为实施例1步骤4) 中的三磷酸化合物粗品的液相色谱图。

[0043] 图2为实施例1中的N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸的核磁共振氢谱图。

[0044] 图3为实施例1中的N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸的核磁共振磷谱图。

[0045] 图4为实施例1中的dA6P-NH₂-Nucleotides的核磁共振氢谱图。

[0046] 图5为实施例1中的dA6P-NH₂-Nucleotides的核磁共振磷谱图。

[0047] 图6为实施例2中的dA4P-NH₂-Nucleotides的核磁共振氢谱图。

[0048] 图7为实施例2中的dA4P-NH₂-Nucleotides的核磁共振磷谱图。

[0049] 图8为实施例3中的dT4P-NH₂-Nucleotides的核磁共振氢谱图。

[0050] 图9为实施例3中的dT4P-NH₂-Nucleotides的核磁共振磷谱图。

[0051] 图10为实施例4中的N-(9-苄基甲氧羰基)-2-氨基乙基三磷酸的核磁共振氢谱图。

[0052] 图11为实施例4中的N-(9-苄基甲氧羰基)-2-氨基乙基三磷酸的核磁共振磷谱图。

[0053] 图12为对比例步骤4) 中的三磷酸化合物粗品的液相色谱图。

具体实施方式

[0054] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的解释和说明。

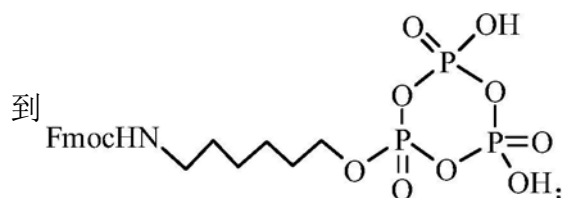
[0055] 实施例1:

[0056] N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸的合成:

[0057] 1) 将5.3g的苄基甲氧羰氯溶于40mL的1,4-二氧六环,在0℃下加入2g的6-氨基-1-己醇,充分溶解,再缓慢加入20mL浓度10%的Na₂CO₃溶液,25℃反应12h,用甲醇-二氯甲烷(甲醇、二氯甲烷体积比1:19)萃取产物,合并有机相,在旋转蒸发仪上旋干溶剂,用混合溶剂(由二氯甲烷、乙酸乙酯和石油醚按照体积比1:3:6组成)打浆,得到 $\text{FmocHN}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (产率:98%);

[0058] 2) 将1g的 $\text{FmocHN}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 加入10mL的无水乙腈,用旋转蒸发仪减压蒸干,再重复一次操作,除去化合物中的水分,再将0.9034g的三氯氧磷溶于10mL的四氢呋喃,再在35℃下将 $\text{FmocHN}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 分批加入,搅拌4h,得到 $\text{FmocHN}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{P}(\text{Cl})_2$;

[0059] 3) 将焦磷酸三正丙基铵盐和三正丙基胺加入步骤2) 的反应液中,25℃反应1h,得



[0060] 4) 将50mL浓度0.1mol/L的三乙胺-碳酸缓冲液加入步骤3)的反应液中,调节pH至7.5左右,25℃反应48h,浓缩,得到三磷酸化合物粗品;

[0061] 5) 通过反相高效液相色谱对三磷酸化合物粗品进行纯化,得到N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸(产率:42%);

[0062] 通过反相高效液相色谱对三磷酸化合物粗品进行纯化的具体操作为:

[0063] a) 将三磷酸化合物粗品溶解在甲醇中,再用滤膜过滤;

[0064] b) 采用反相高效液相色谱对滤液进行纯化,色谱柱规格为C₁₈(Innova1 ODS-2 50×250mm,5μm),流动相A为0.1mol/L的三乙胺-碳酸缓冲液,流动相B为甲醇,将色谱柱用流动相B:62%平衡后,用流动相B:62%~75%梯度洗脱,收集纯化后的化合物,冻干。

[0065] 性能测试:

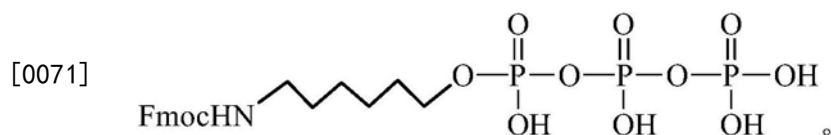
[0066] 步骤4)中的三磷酸化合物粗品的液相色谱图如图1所示。

[0067] N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸的核磁共振氢谱图如图2所示,核磁共振磷谱图如图3所示,解谱分析如下:

[0068] ¹H NMR (D₂O, 400MHz): δ=7.47 (s, 2H), 7.30 (s, 2H), 7.14-7.08 (m, 4H), 4.08 (s, 2H), 3.81-3.73 (m, 3H), 2.71 (s, 2H), 1.37-0.71 (m, 8H)。

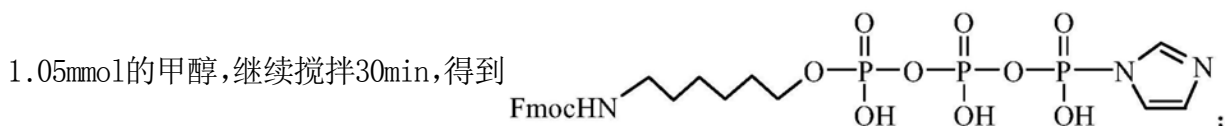
[0069] ³¹P NMR (D₂O): δ=-11.0 (m, 2P), -23.6 (t, 1P)。

[0070] N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸的结构式:

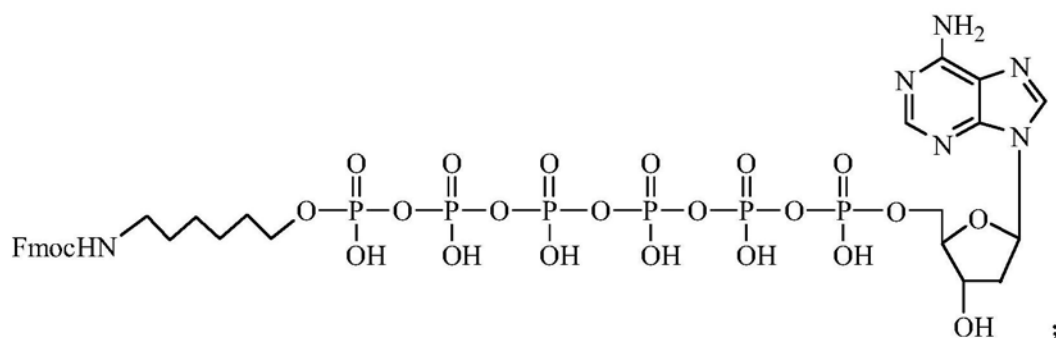


[0072] dA6P-NH₂-Nucleotides的合成:

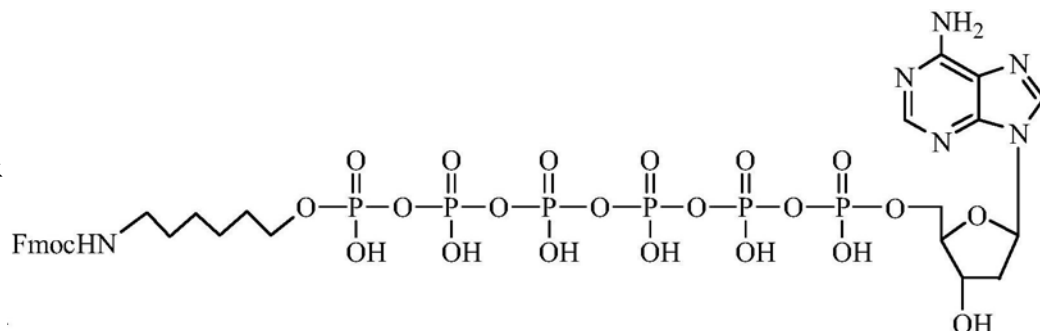
[0073] 1) 将0.1g的N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸加入10mL的无水乙腈,用旋转蒸发仪减压蒸干,再重复一次操作,除去化合物中的水分,再将N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸溶于3mL的二甲基甲酰胺,再加入0.7mmol的N,N'-羰基二咪唑,25℃搅拌4h,再加入



[0074] 2) 将0.193mmol的2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的三正丁基铵盐溶于5mL的二甲基甲酰胺后加入步骤1)的反应液中,再加入1.75mmol的MgCl₂,25℃搅拌18h,旋蒸,得到



[0075] 3) 将



加入吗啉-二甲基甲酰胺溶液(吗啉、二甲基甲酰胺的体积比为3:7)中,25℃搅拌2h,浓缩,得到脱氧核苷酸粗品;

[0076] 4) 通过中压制备色谱对脱氧核苷酸粗品进行初步分离纯化,产物出峰位置为2min左右,梯度条件为:0~100甲醇,15min,再通过反相高效液相色谱对初步分离纯化的产品进行进一步纯化,流动相用0.1mol/L的三乙胺-碳酸缓冲液/乙腈,制备柱填料为反向C₁₈,制备梯度3%~15%,产品出峰位置为20min左右,得到脱氧核苷酸dA6P-NH₂-Nucleotides(产率:83%)。

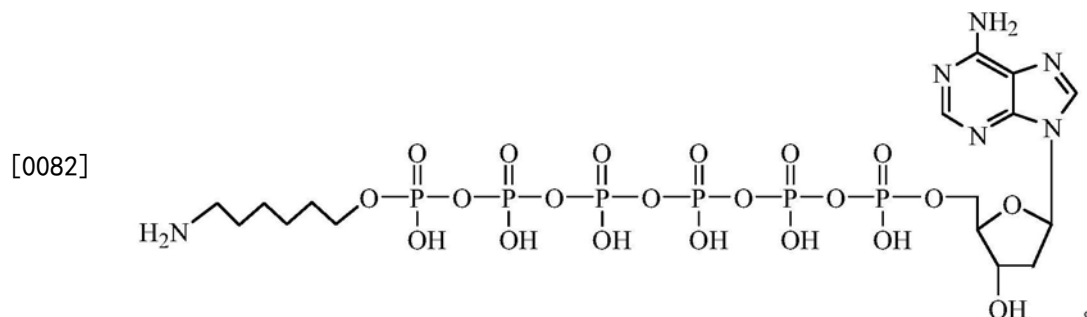
[0077] 性能测试:

[0078] dA6P-NH₂-Nucleotides的核磁共振氢谱图如图4所示,核磁共振磷谱图如图5所示,解谱分析如下:

[0079] ¹H NMR (D₂O, 400MHz): δ=8.37 (s, 1H), 8.12 (s, H), 6.39 (t, H), 4.17-4.44-4.00 (m, 3H), 3.85 (t, 2H), 2.69 (m, H), 2.46 (m, H), 1.53 (m, 4H), 1.53 (m, H), 1.29 (m, 4H)。

[0080] ³¹P NMR (D₂O): δ=-10.91 (bs, P), -10.45 (bs, P), -23.35 (bm, 4P)。

[0081] dA6P-NH₂-Nucleotides的结构式:

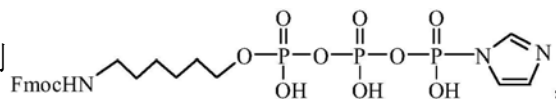


[0083] 实施例2:

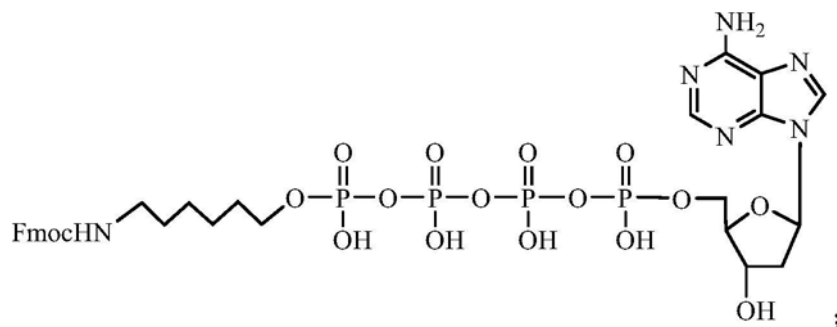
[0084] dA4P-NH₂-Nucleotides的合成:

[0085] 1) 将0.1g的N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸加入10mL的无水乙腈,用旋

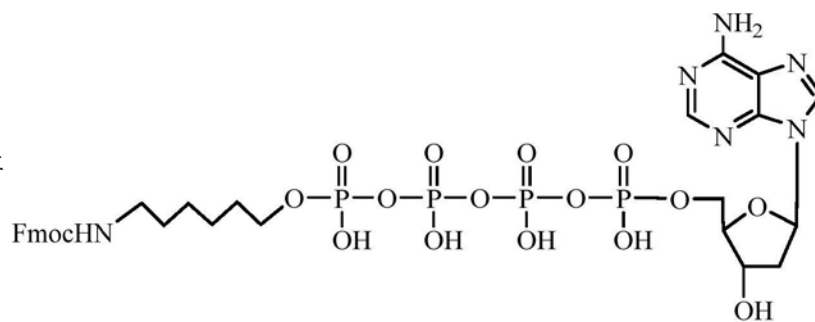
转蒸发仪减压蒸干,再重复一次操作,除去化合物中的水分,再将N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸溶于3mL的二甲基甲酰胺,再加入0.7mmol的N,N'-羰基二咪唑,25℃搅拌4h,再加入1.05mmol的甲醇,继续搅拌30min,得到



[0086] 2) 将0.193mmol的2'-脱氧腺苷-5'-单磷酸酯的三正丁基铵盐溶于5mL的二甲基甲酰胺后加入步骤1)的反应液中,再加入1.75mmol的MgCl₂,25℃搅拌18h,旋蒸,得到



[0087] 3) 将



加入吗啉-二甲

基甲酰胺溶液(吗啉、二甲基甲酰胺的体积比为3:7)中,25℃搅拌2h,浓缩,得到脱氧核苷酸粗品;

[0088] 4) 通过中压制备色谱对脱氧核苷酸粗品进行初步分离纯化(操作同实施例1),再通过反相高效液相色谱对初步分离纯化的产品进行进一步纯化(操作同实施例1),得到脱氧核苷酸dA4P-NH₂-Nucleotides(产率:85%)。

[0089] 性能测试:

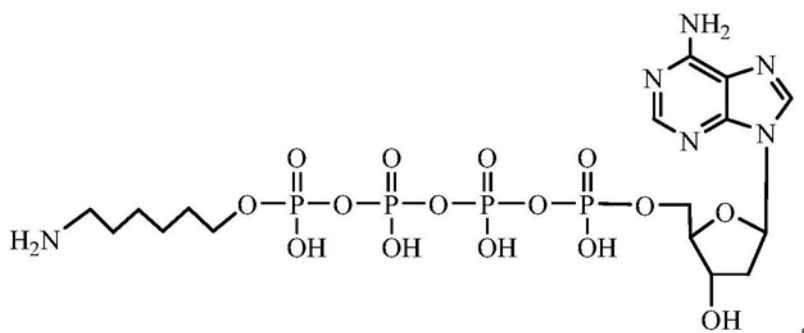
[0090] dA4P-NH₂-Nucleotides的核磁共振氢谱图如图6所示,核磁共振磷谱图如图7所示,解谱分析如下:

[0091] ¹H NMR (D₂O, 400MHz): δ=8.36 (s, 1H), 8.11 (s, H), 6.39 (t, H), 4.21-4.08 (m, 3H), 3.85 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.73 (m, H), 2.51 (m, H), 1.53 (m, 4H), 1.53 (m, H), 1.29 (m, 4H)。

[0092] ³¹P NMR (D₂O): δ=-10.84 (bs, P), -11.49 (bs, P), -21.98 (bm, 2P)。

[0093] dA4P-NH₂-Nucleotides的结构式:

[0094]



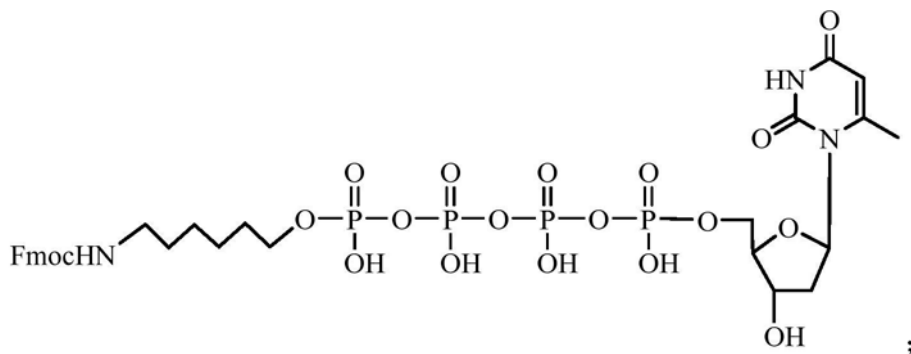
[0095] 实施例3:

[0096] dT4P-NH₂-Nucleotides的合成:

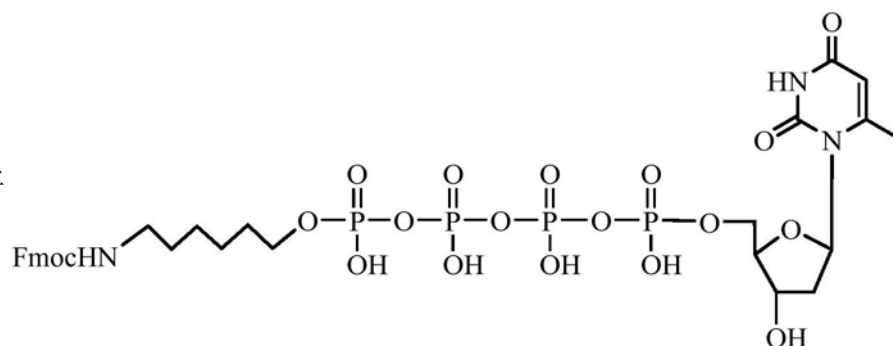
[0097] 1) 将0.1g的N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸加入10mL的无水乙腈,用旋转蒸发仪减压蒸干,再重复一次操作,除去化合物中的水分,再将N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸溶于3mL的二甲基甲酰胺,再加入0.7mmol的N,N'-羰基二咪唑,25℃搅拌4h,再加入

1.05mmol的甲醇,继续搅拌30min,得到

[0098] 2) 将0.193mmol的2'-脱氧胸苷-5'-单磷酸酯的三正丁基铵盐溶于5mL的二甲基甲酰胺后加入步骤1)的反应液中,再加入1.75mmol的MgCl₂,25℃搅拌18h,旋蒸,得到



[0099] 3) 将



加入吗啉-

二甲基甲酰胺溶液(吗啉、二甲基甲酰胺的体积比为3:7)中,25℃搅拌2h,浓缩,得到脱氧核苷酸粗品;

[0100] 4) 通过中压制备色谱对脱氧核苷酸粗品进行初步分离纯化(操作同实施例1),再通过反相高效液相色谱对初步分离纯化的产品进行进一步纯化(操作同实施例1),得到脱氧核苷酸dT4P-NH₂-Nucleotides(产率:80%)。

[0101] 性能测试:

[0116] b) 采用反相高效液相色谱对滤液进行纯化, 色谱柱规格为C₁₈ (Innova1 ODS-2 50 × 250mm, 5μm), 流动相A为0.1mol/L的三乙胺-碳酸缓冲液, 流动相B为甲醇, 将色谱柱用流动相B:62%平衡后, 用流动相B:62%~75%梯度洗脱, 收集纯化后的化合物, 冻干。

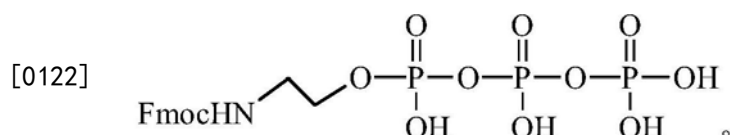
[0117] 性能测试:

[0118] N-(9-苄基甲氧羰基)-2-氨基乙基三磷酸的核磁共振氢谱图如图10所示, 核磁共振磷谱图如图11所示, 解谱分析如下:

[0119] ¹H NMR (D₂O, 400MHz): δ=7.82 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.62 (d, J=7.4Hz, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.38-7.31 (m, 2H), 4.39 (d, J=6.0Hz, 2H), 4.22 (d, J=5.6Hz, 1H), 3.89 (d, J=5.7Hz, 2H), 3.26 (d, J=5.8Hz, 2H)。


[0120] ³¹P NMR (D₂O): δ=-9.88 (m, 1P), -10.97 (m, 1P), -23.06 (t, 1P)。


[0121] N-(9-苄基甲氧羰基)-2-氨基乙基三磷酸的结构式:

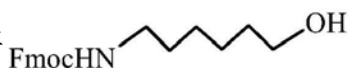
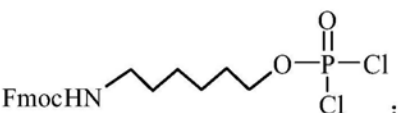


[0123] 对比例:

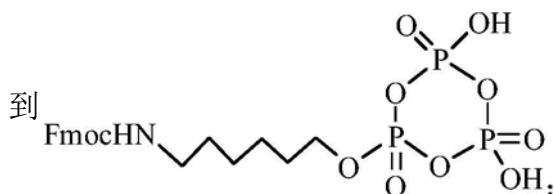
[0124] N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸的合成:

[0125] 1) 将5.3g的苄基甲氧羰氯溶于40mL的1,4-二氧六环, 在0℃下加入2g的6-氨基-1-己醇, 充分溶解, 再缓慢加入20mL浓度10%的Na₂CO₃溶液, 25℃反应12h, 用甲醇-二氯甲烷(甲醇、二氯甲烷体积比1:19)萃取产物, 合并有机相, 在旋转蒸发仪上旋干溶剂, 用混合溶剂(由二氯甲烷、乙酸乙酯和石油醚按照体积比1:3:6组成)打浆, 得到 

[0126] 2) 将1g的  加入10mL的无水乙腈, 用旋转蒸发仪减压蒸干, 再重复一次操作, 除去化合物中的水分, 再将0.9034g的三氯氧磷溶于10mL的磷酸三甲酯, 再

在35℃下将  分批加入, 搅拌4h, 得到 

[0127] 3) 将焦磷酸三正丙基铵盐和三正丙基胺加入步骤2)的反应液中, 25℃反应1h, 得



[0128] 4) 将50mL浓度0.1mol/L的三乙胺-碳酸缓冲液加入步骤3)的反应液中, 调节pH至7.5左右, 25℃反应48h, 浓缩, 得到三磷酸化合物粗品;

[0129] 5) 通过反相高效液相色谱对三磷酸化合物粗品进行纯化(操作同实施例1), 得到N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸(产率:29%)。

[0130] 性能测试:

[0131] 步骤4)中的三磷酸化合物粗品的液相色谱图如图12所示。

[0132] 由图1可知:步骤2)中以四氢呋喃为溶剂, 液相色谱图中9.15min为N-(9-苄基甲氧

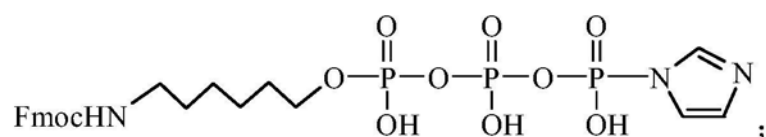
羰基)-6-氨基己基三磷酸,8.90min为五磷酸副产物。

[0133] 由图12可知:步骤2)中以磷酸三甲酯为溶剂,液相色谱图中9.13min为N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸,8.87min为五磷酸副产物,11.1min为二磷酸二甲酯副产物。

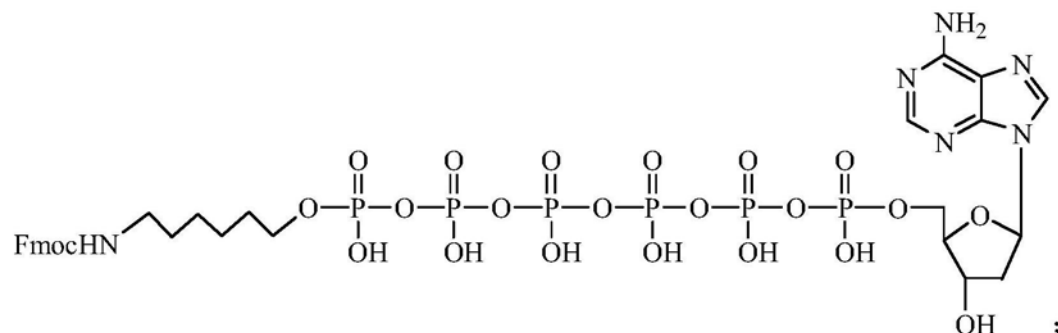
[0134] 由此可见,步骤2)中以四氢呋喃为溶剂可以显著降低制备得到的三磷酸产品的杂质含量,进而可以提高三磷酸产品的产率。

[0135] dA6P-NH₂-Nucleotides的合成:

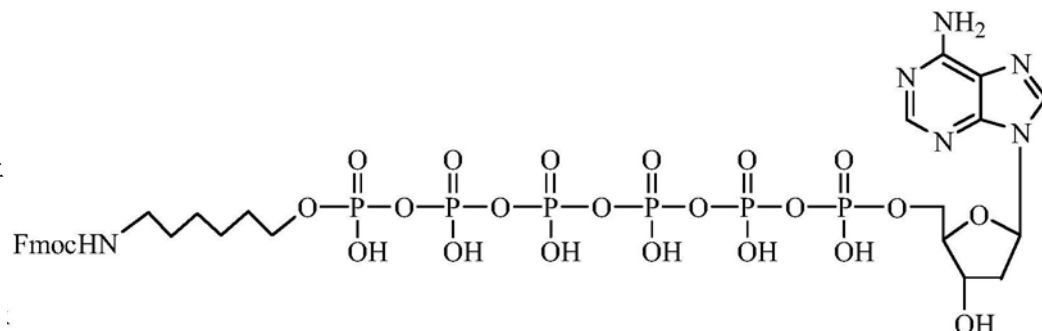
[0136] 1) 将0.1g的N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸加入10mL的无水乙腈,用旋转蒸发仪减压蒸干,再重复一次操作,除去化合物中的水分,再将N-(9-苄基甲氧羰基)-6-氨基己基三磷酸溶于3mL的二甲基甲酰胺,再加入0.7mmol的N,N'-羰基二咪唑,25℃搅拌4h,再加入1.05mmol的甲醇,继续搅拌30min,得到



[0137] 2) 将0.193mmol的2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸酯的三正丁基铵盐溶于5mL的二甲基甲酰胺后加入步骤1)的反应液中,再加入1.75mmol的MgCl₂,25℃搅拌18h,旋蒸,得到



[0138] 3) 将



加入质量分数10%的三乙胺溶液中,25℃搅拌18h,浓缩,得到脱氧核苷酸粗品;

[0139] 4) 通过中压制备色谱对脱氧核苷酸粗品进行初步分离纯化(操作同实施例1),再通过反相高效液相色谱对初步分离纯化的产品进行进一步纯化(操作同实施例1),得到脱氧核苷酸dA6P-NH₂-Nucleotides(产率:55%)。

[0140] 由此可见,步骤3)中采用吗啉-二甲基甲酰胺溶液替代三乙胺溶液可以大幅缩短反应时间,且可以大幅提高产物收率。

[0141] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

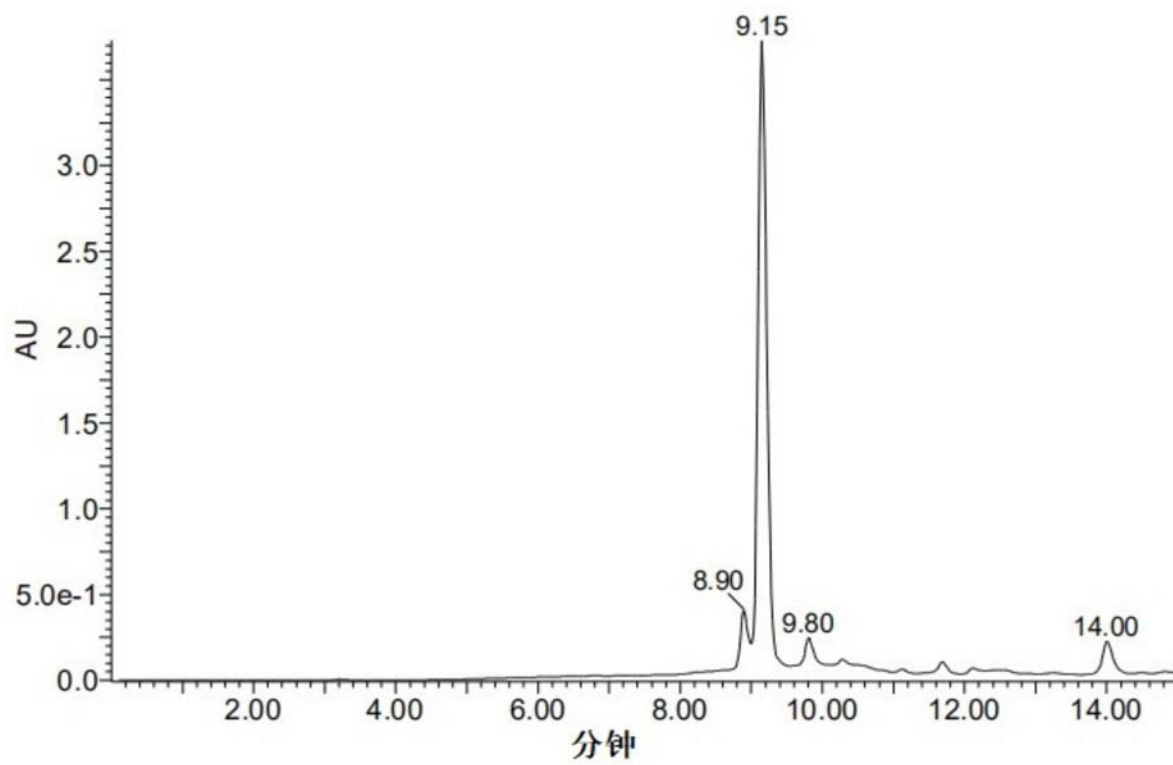


图1

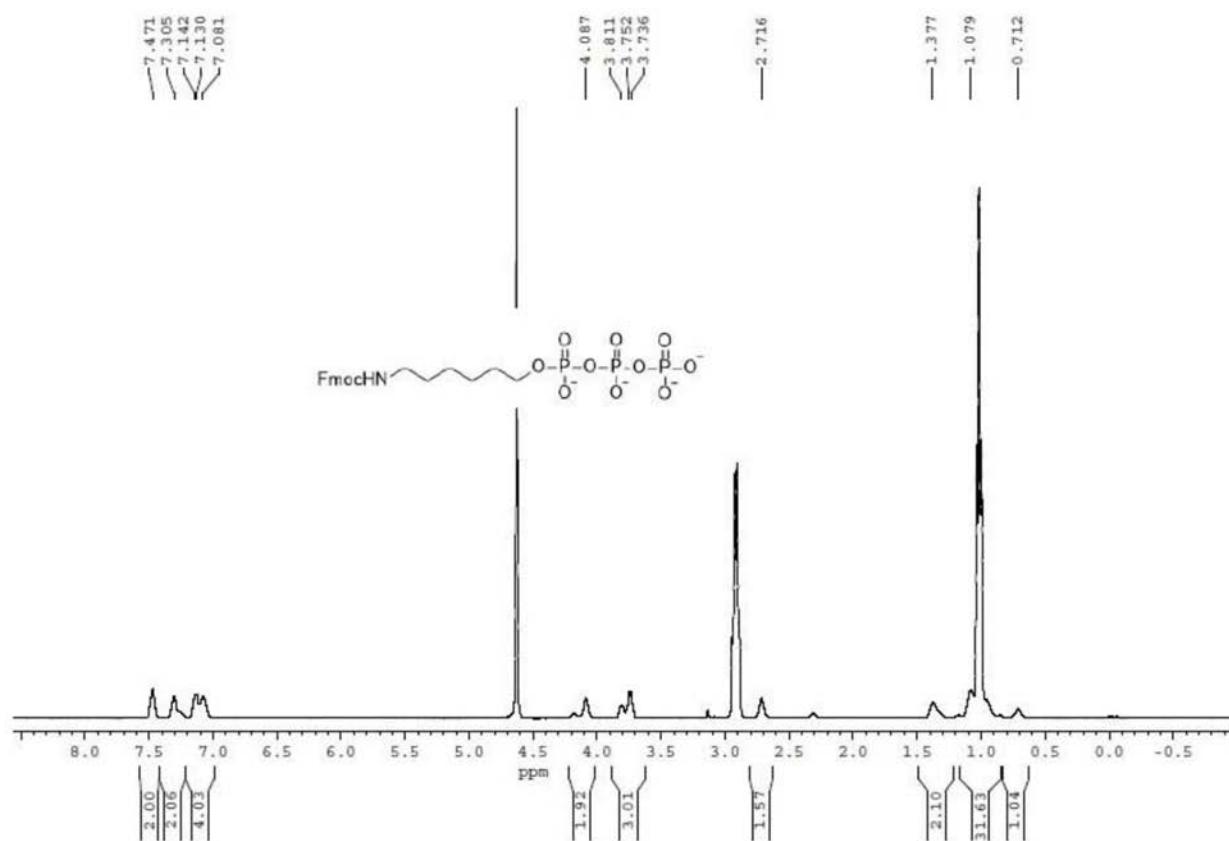


图2

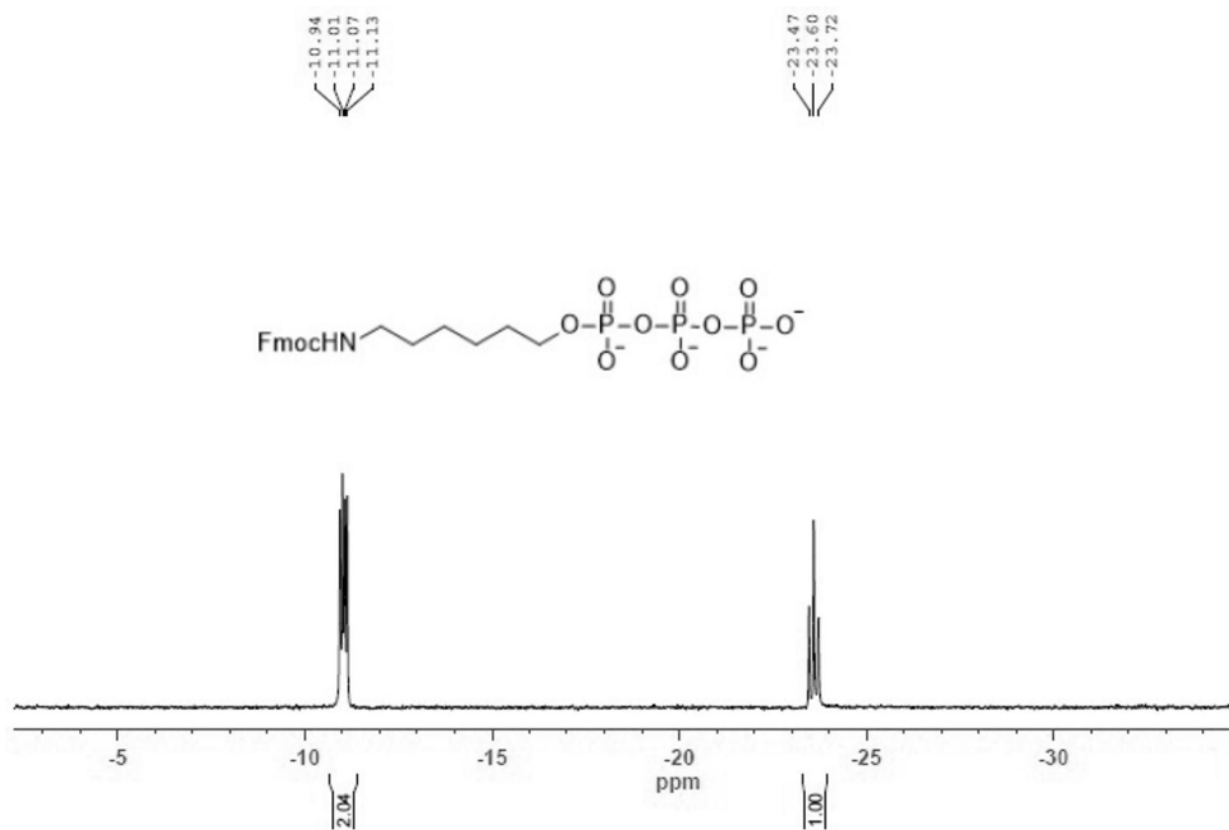


图3

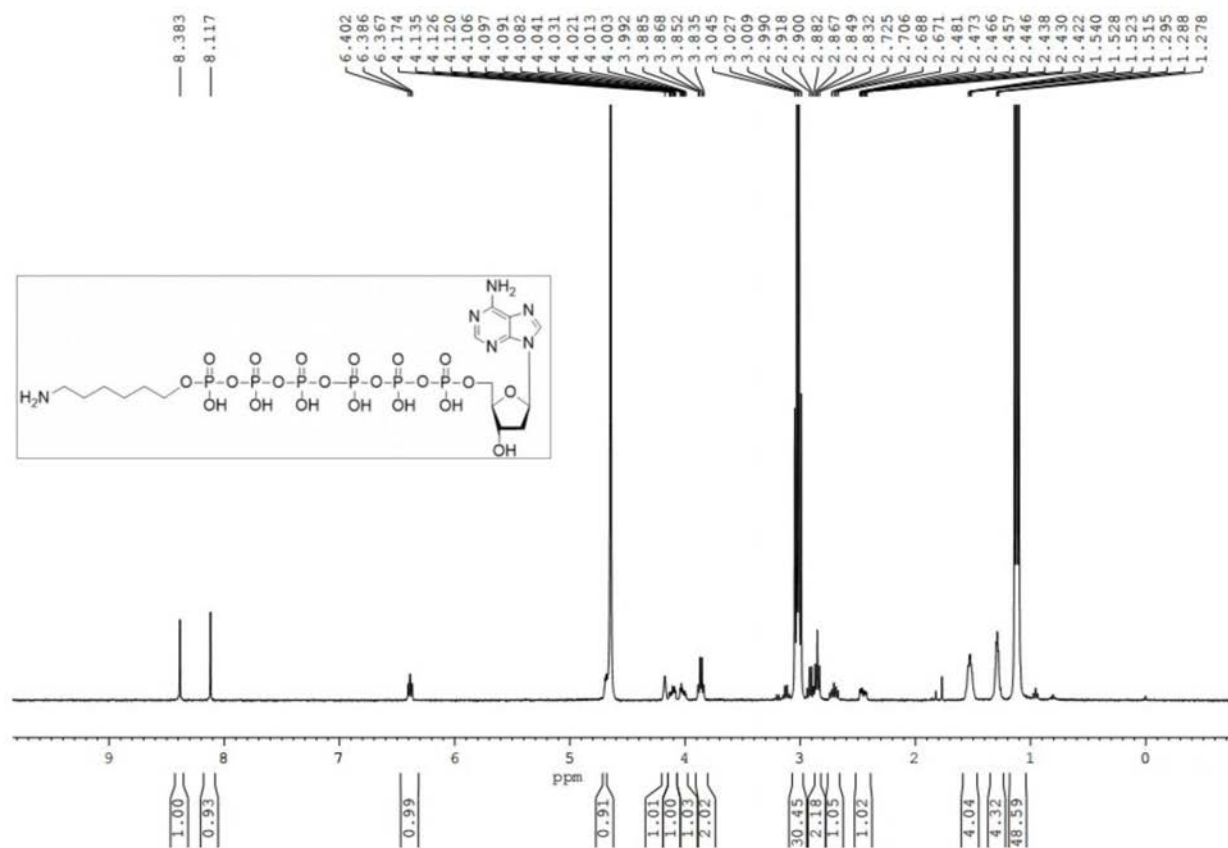


图4

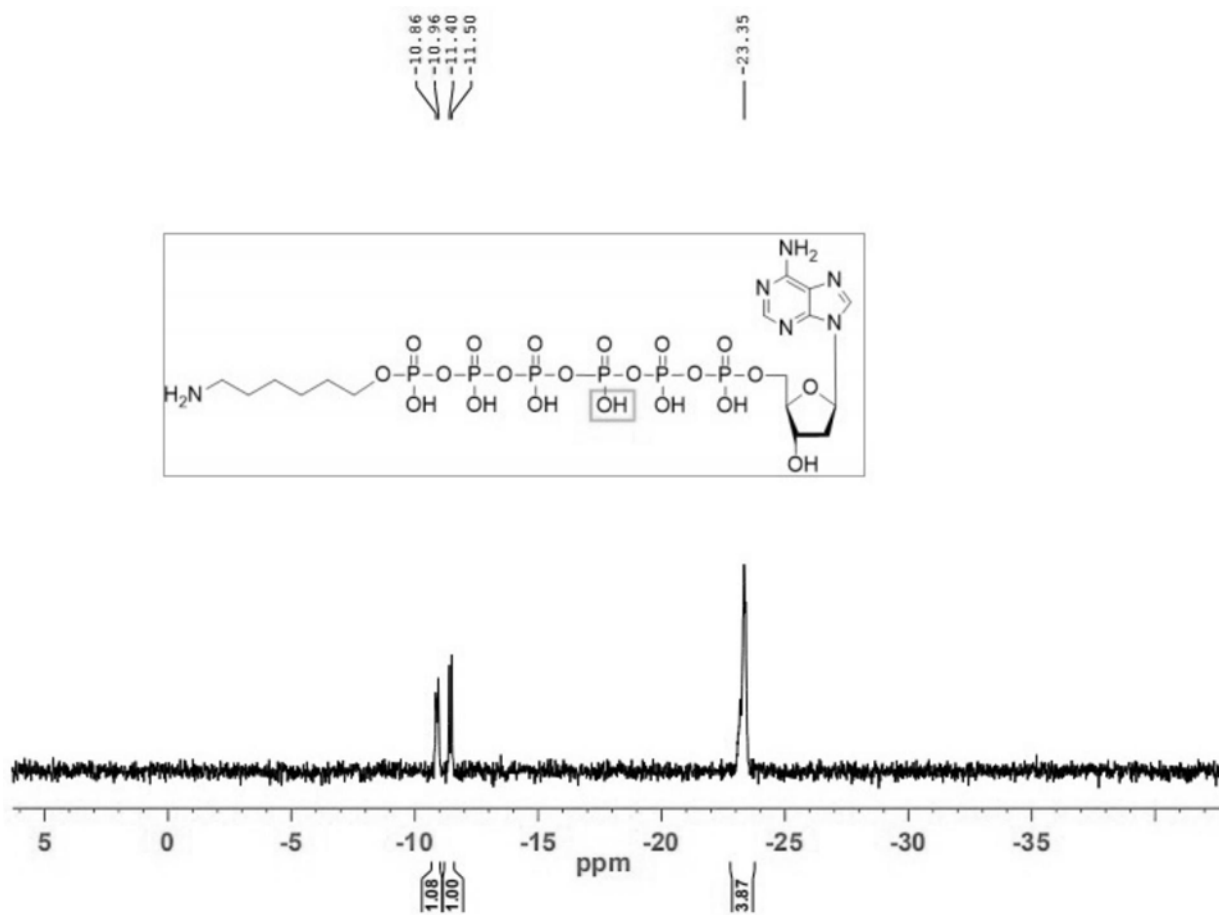


图5

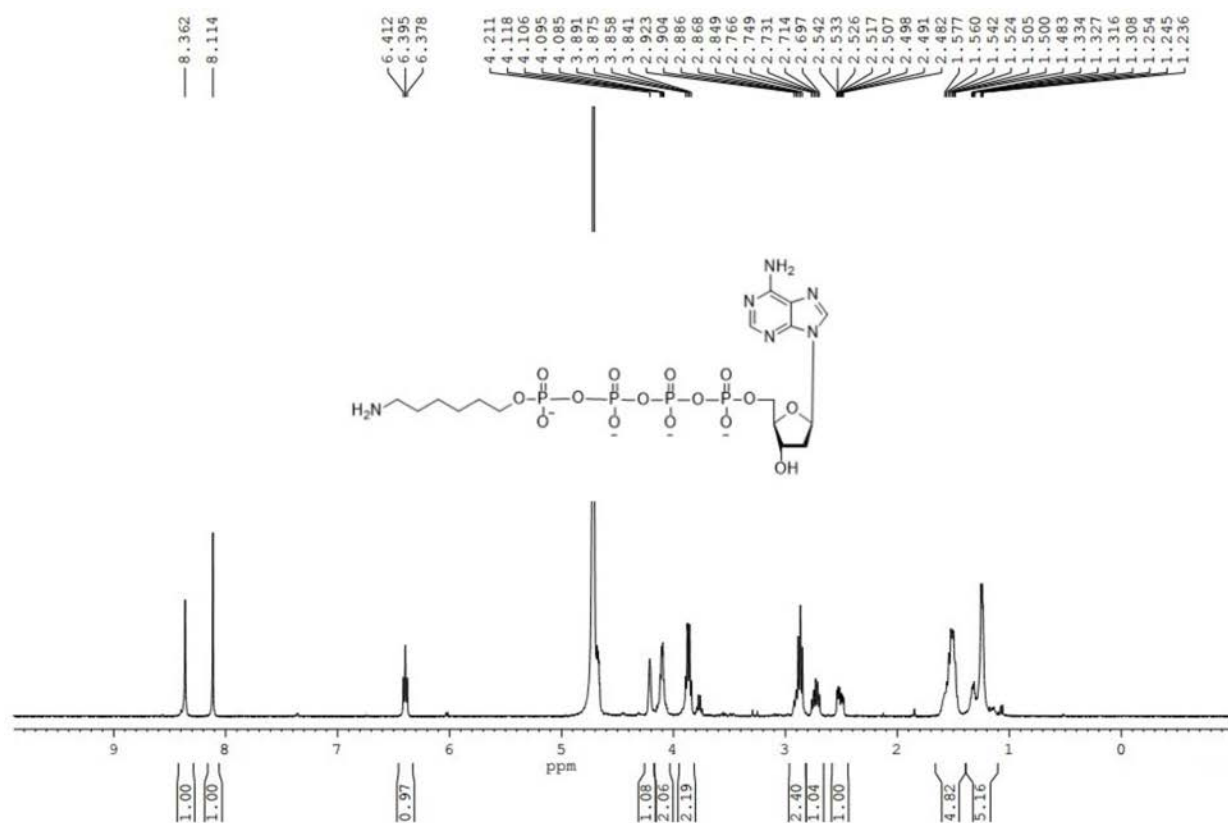


图6

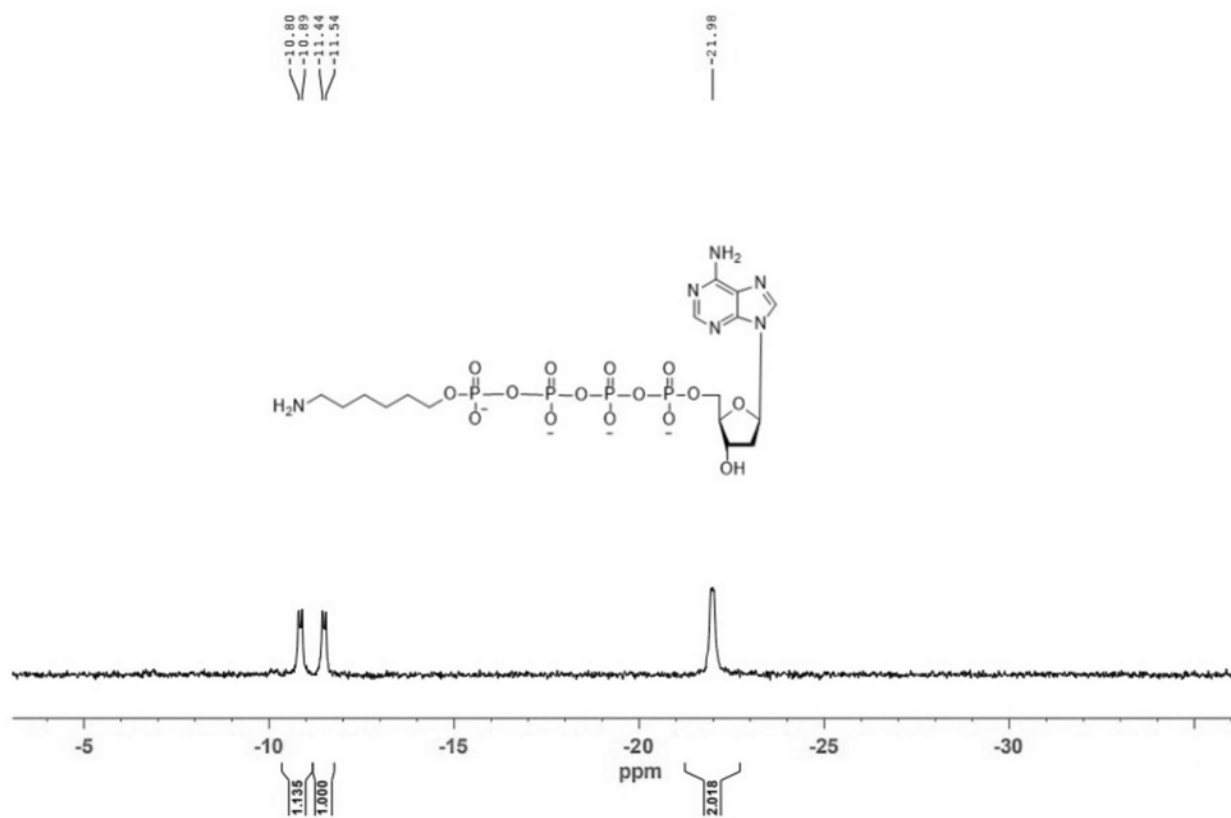


图7

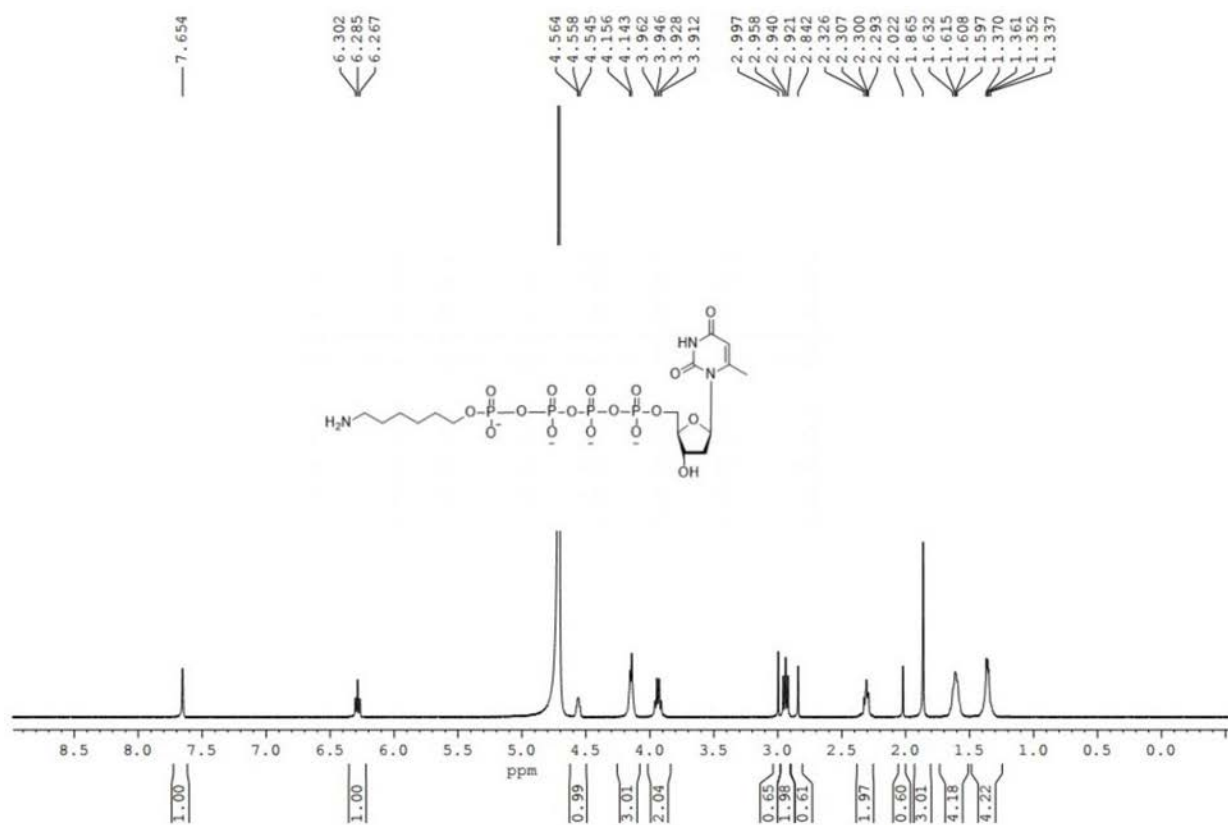


图8

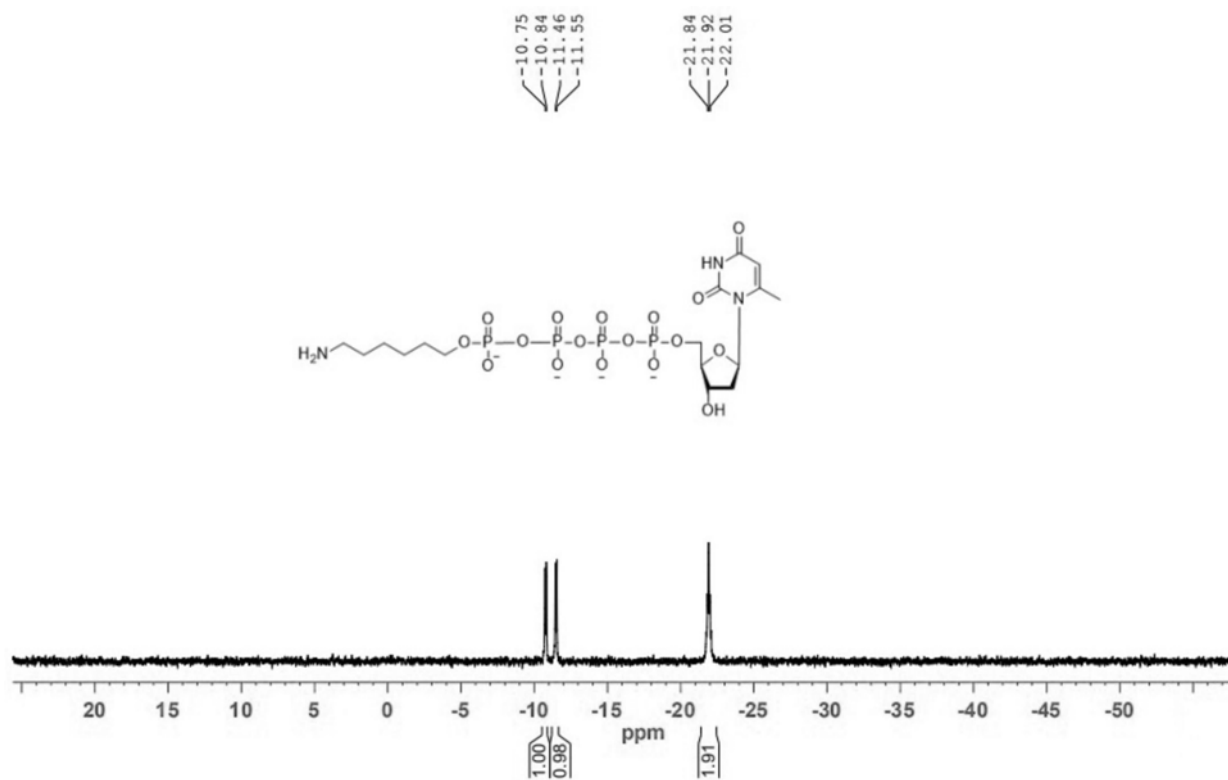


图9

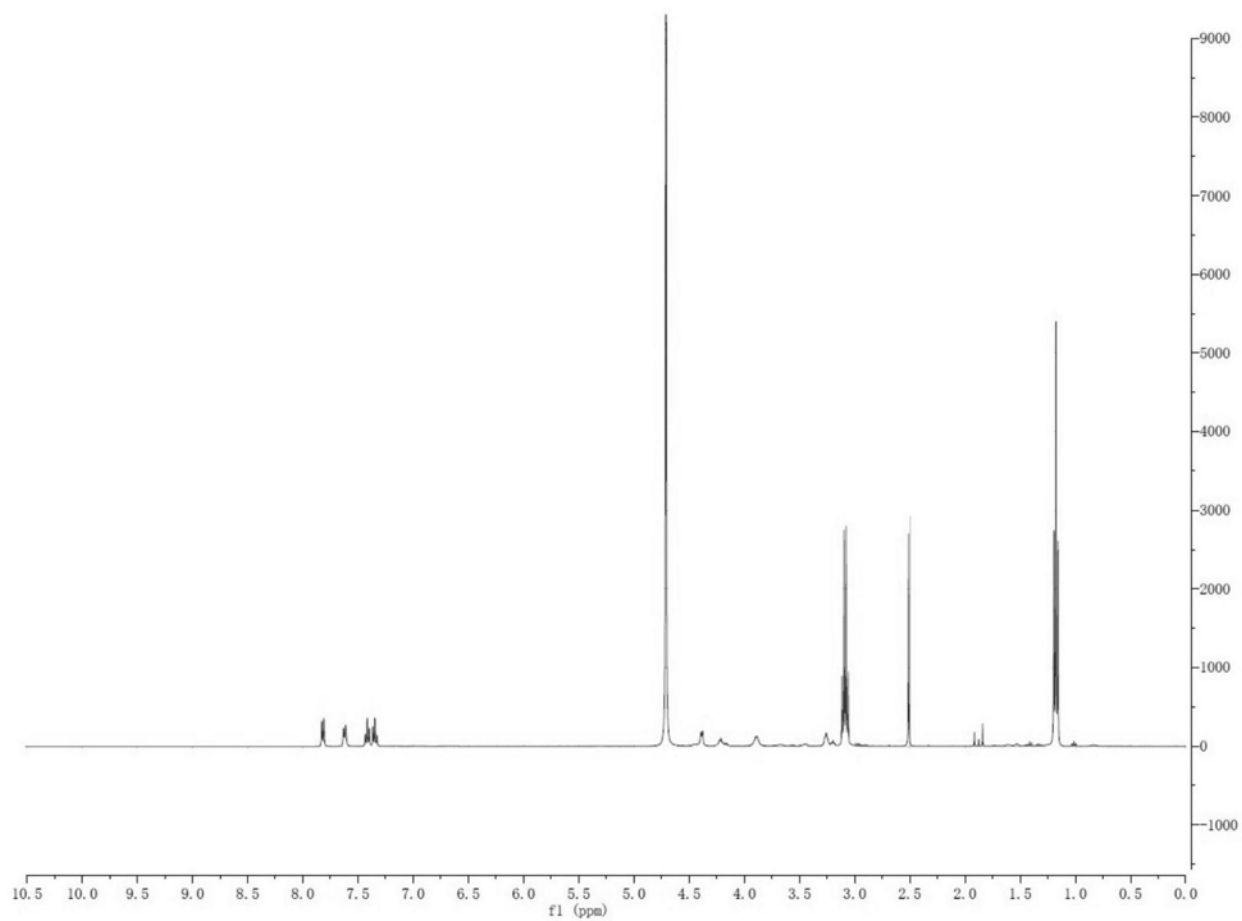


图10

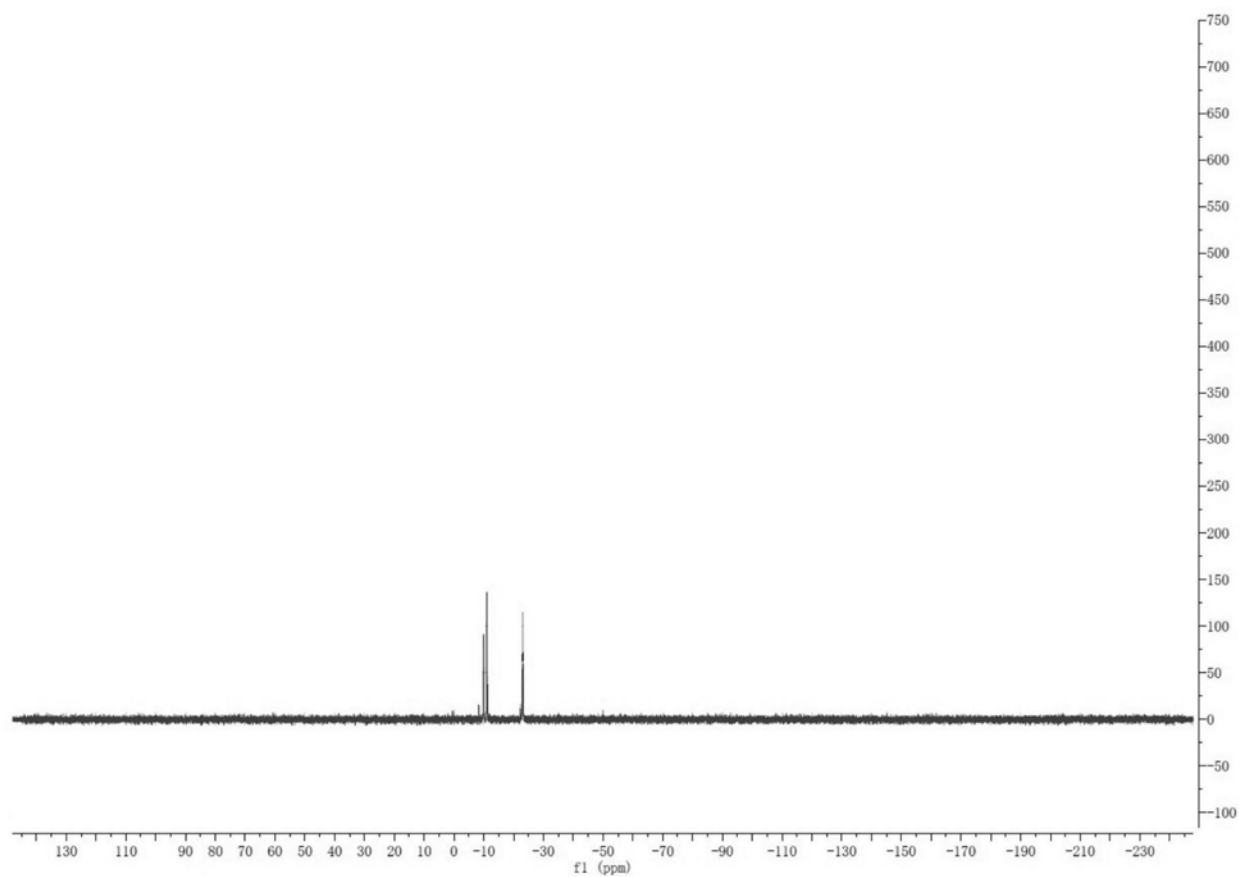


图11

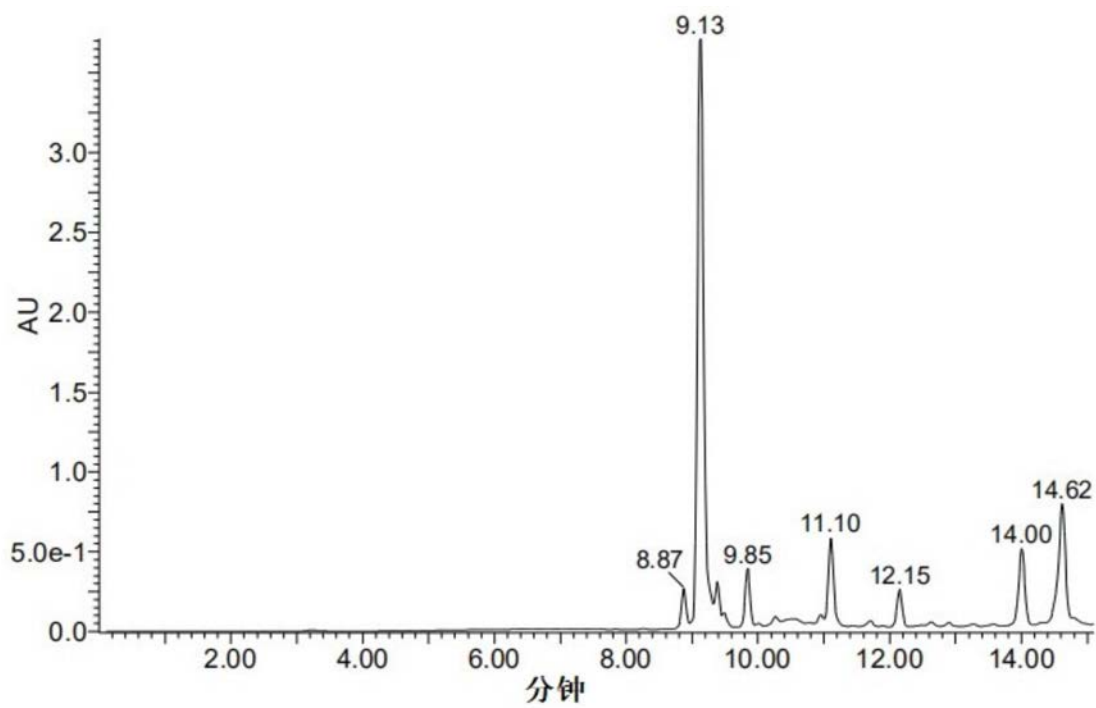


图12