

Synthesis of C4'-CF₃- α -L-Deoxythymidine Phosphoramidite

Yifei Zhou, Zhiguo Yan*

Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan Institute of Technology, Wuhan Hubei

Email: *samanyan@163.com

Received: Mar. 7th, 2019; accepted: Mar. 21st, 2019; published: Mar. 28th, 2019

Abstract

Chemical modification is an essential approach to make antisense oligonucleotides drug-like molecules. In this paper, we report the synthesis of C4'-CF₃- α -L-deoxythymidine phosphoramidite. The synthesis started from the known compound 1, which was efficiently transformed to benzylation protected C4'-CF₃- β -L-deoxythymidine 5a and C4'-CF₃- α -L-deoxythymidine 5b in four steps. Debenzylation of 5b using PdCl₂/H₂ afforded C4'-CF₃- α -L-deoxythymidine 6. Based on 1D ¹H, ¹³C, ¹⁹F and 2D NOESY NMR spectra, the structures of 5a, 5b and 6 were unambiguously characterized. Compound 6 was converted to the phosphoramidite in two routine reaction steps, and the structure of target product 8 was confirmed by ¹H NMR spectrum, ³¹P NMR spectrum, and ESI-MS high resolution mass spectrometry.

Keywords

Chemical Modification, Antisense Oligonucleotides, Synthesis, C4'-CF₃- α -L-Deoxythymidine

C4'-CF₃- α -L-脱氧胸苷亚磷酰胺单体的合成

周逸飞, 闫志国*

武汉工程大学绿色化工过程省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉

Email: *samanyan@163.com

收稿日期: 2019年3月7日; 录用日期: 2019年3月21日; 发布日期: 2019年3月28日

摘要

化学修饰是改善反义核酸成药性的重要手段。在本文的研究中, 采用化学合成的方法, 以已知的化合物

*通讯作者。

(S)-1,3-二(苄氧基)-4-(1,3-二噻烷-2-基)丁-2-酮为原料, 经过4步反应, 得到苄基保护的C4'-CF₃-β-L-脱氧胸苷5a和C4'-CF₃-α-L-脱氧胸苷5b。然后通过氯化钡催化氢化脱除5b的苄基保护基, 制得C4'-CF₃-α-L-脱氧胸苷6。通过核磁共振¹H谱、¹³C谱、¹⁹F谱和二维NOESY谱, 确认了5a, 5b和6的结构以及C4'和C1'的构型。经过两步常规反应, 将6转化为C4'-CF₃-α-L-脱氧胸苷亚磷酰胺8, 并使用¹H谱, ³¹P谱, ESI-MS高分辨率质谱确定了最终目标产物8的结构正确性。

关键词

化学修饰, 反义核酸, 合成, C4'-CF₃-α-L-脱氧胸苷

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

反义核酸[1]是指能够与靶 RNA (多为 mRNA)碱基互补配对, 引起基因沉默的寡聚 DNA 片段。反义核酸通过 Watson-Crick 碱基配对规则与靶标 mRNA 结合形成 RNA-DNA 杂交双链[2], RNase H 酶能够识别这种杂交双链, 并特异性裂解 mRNA 链, 达到抑制或封闭靶标 mRNA 表达的目的[3]。由于反义核酸能靶向性调控基因表达, 因此被看作是一类有前景的药物。天然的反义核酸成药主要有这样几大障碍: 一是难以进入细胞[4], 二是易被核酸酶降解[5], 三是可能引起潜在的免疫刺激反应[6]。化学修饰是改善反义核酸成药性的重要手段。三氟甲基是已知脂溶性最强的基团, 在反义核酸链中引入三氟甲基基团有可能明显改善反义核酸的细胞通透性和抗核酸酶稳定性[7]。在本文的研究中, 按照如图 1 所示的合成路线成功合成了 C4'-CF₃-α-L-脱氧胸苷亚磷酰胺单体, 为后续通过固相合成方法的将其引入到反义核酸链中, 研究其生化性质和成药性质打下了基础。

2. 实验部分

2.1. 实验药品与仪器

2.1.1. 实验药品

原料(S)-1,3-二(苄氧基)-4-(1,3-二噻烷-2-基)丁-2-酮通过已知路线[8]自己合成制备。CH₂Cl₂, 石油醚, 乙酸乙酯, 无水甲醇, 吡啶, NaCl, NaHCO₃, MgSO₄, NaOH, Na₂S₂O₃, 以上从天津市河东区广达服务部购买; 醋酸酐, 从天津市化学试剂供销公司购买; 乙腈(99.9%超干溶剂, 带分子筛), 2-碘酰基苯甲酸, 草酰氯, 二甲基亚砷, 硅藻土, 以上从百灵威公司购买; 胸腺嘧啶, 从 Sharing Technologies Co., Let 购买; 三乙胺, 四氢呋喃, 从北京华威锐科化工有限公司购买; Dess-Martin 氧化剂, CF₃SiMe₃, 氯化钡, N-溴代琥珀酰亚胺, 三甲硅烷基三氟甲磺酸酯, 4,4'-双甲氧基-三苯甲基-氯, N,N-二异丙基乙胺, 以上从北京伊诺凯科技有限公司购买; 四正丁基氟化铵, 从希恩思奥普德科技有限公司购买; N,O-双(三甲基甲硅烷基)-乙酰胺, 从塞墨飞实验室仪器销售中心购买; 2-氰乙基 N,N-二异丙基-氯代亚磷酰胺, 从芜湖华仁科技有限公司购买; 氢气, 氩气从百思达气体有限公司购买; 柱层析硅胶为青岛海洋公司生产的 300~400 目硅胶。

2.1.2. 实验仪器

核磁由 Bruker 公司 AVANCE 400 超导核磁共振谱仪测定; 液相分析在 waters 公司的 2695 高效液相

色谱分析仪上进行; 质谱由 waters 公司的 Xevo G2-XS Q-TOF 质谱仪测定。

2.2. 实验方法

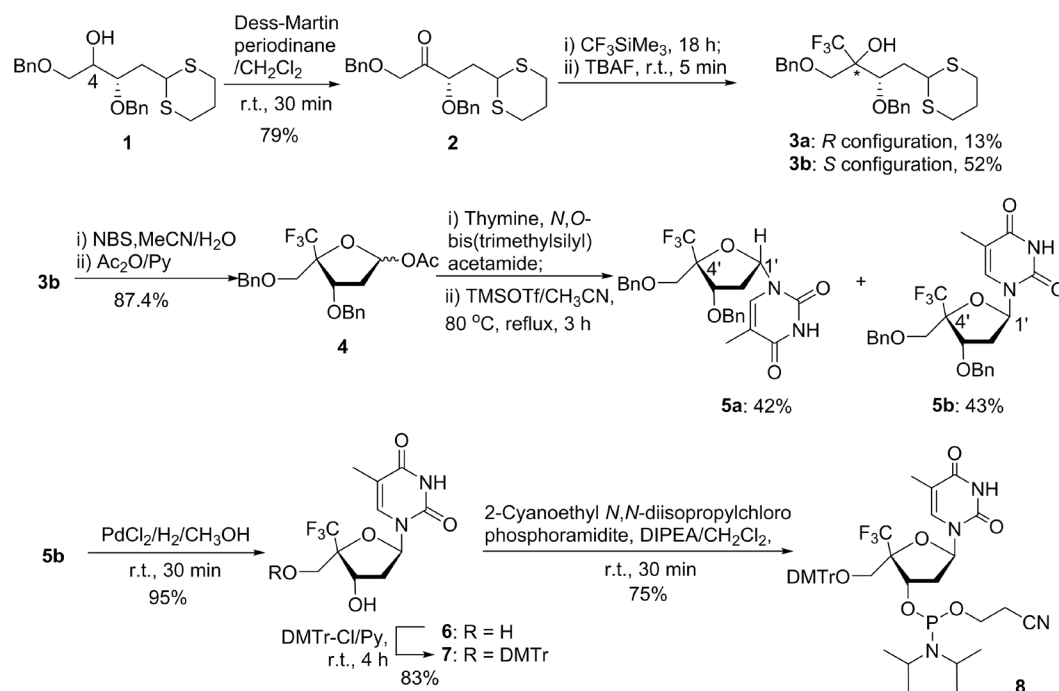


Figure 1. Synthetic route of C4'-CF₃-α-L-deoxythymidine phosphoramidite

图 1. C4'-CF₃-α-L-脱氧胸苷亚磷酰胺单体的合成路线图

化合物 **2** 的合成。室温下将化合物 **1** 1 g (2.7 mmol, 1 eq) 溶于 11 mL 无水 CH₂Cl₂, 加入 Dess-Martin 1.38 g (3.2 mmol, 1.2 eq) 室温反应 1 h, TLC 监测反应结束后, 加入 20 mL (1:4) 的饱和 Na₂S₂O₃ 溶液和饱和 NaHCO₃ 溶液萃灭反应, CH₂Cl₂ 萃取, 无水 MgSO₄ 干燥有机相, 减压旋干溶剂。得到的粗产物采用柱层析 (PE/EA = 15/1 – 13/1 – 10/1) 分离, 得到淡黄色固体 **2** 858 mg ($R_f = 0.52$, PE/EA = 5:1), 产率 79%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.31 (m, 10H, -(C₆H₅)₂), 4.57 (m, 2H), 4.50 (m, 2H), 4.41 (d, $J = 18.0$ Hz, 1H), 4.30 (m, 1H), 4.26 (d, $J = 18.2$ Hz, 1H), 4.07 (dd, $J = 6.1$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 2.74 (m, 4H), 2.22 (m, 2H), 1.94 (m, 2H)。¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 208.3, 137.2, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1, 128.0, 80.2, 73.4, 73.2, 72.9, 42.1, 37.3, 29.0, 28.7, 25.8. HRMS (ESI-TOF) m/z : [M + H]⁺ Calcd for C₂₂H₂₇O₃S₂ 403.1402; Found 403.1387.

化合物 **3b** 的合成。Ar 保护, 室温下将化合物 **2** 192.3 mg (0.50 mmol, 1 eq) 溶于 3.7 mL THF, 然后缓慢滴加 CF₃SiMe₃ 220 μ L (1.49 mmol, 3 eq), 于 15 °C 反应 18 h, TLC 监测反应物全部转化成中间产物后, 加入 497 μ L 四丁基氟化铵溶液 (1 M in THF, 1 eq), 反应 5 min, TLC 监测中间产物全部转化成目标产物后, 1 mL CH₃OH 萃灭反应, 旋走 THF 和 CH₃OH, CH₂Cl₂ 萃取产物, 无水 MgSO₄ 干燥有机相, 减压旋干溶剂。得到的粗产物采用柱层析 (PE/EA = 60/1 – 30/1 – 20/1 – 15/1) 分离, 得到淡黄色固体 **3a** 31 mg ($R_f = 0.32$, PE/EA = 10/1), 产率 52% 和 **3b** 122 mg ($R_f = 0.30$, PE/EA = 10/1), 产率 52%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.37 – 7.30 (m, 10H, -(C₆H₅)₂), 4.85 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J = 12.2$ Hz, $J = 14.0$ Hz, 2H), 4.27 – 4.24 (m, 1H), 4.00 (dd, $J = 3.5$ Hz, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.80 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.60 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.48 (s, 1H), 2.83 – 2.71 (m, 3H), 2.64 – 2.57 (m, 1H), 2.12 – 2.03 (m, 2H), 1.93

- 1.81 (m, 2H). ^{13}C NMR(100.6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 138.2, 137.1, 128.6, 128.5, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 125.4 (q, $J = 287.8$ Hz, $-\text{CF}_3$), 76.96 (q, $J = 25.5$ Hz, $-(\text{CF}_3)\text{C}$), 75.8, 75.5, 73.8, 67.8, 43.3, 35.8, 30.0, 29.2, 25.9. HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{O}_3\text{S}_2$ 473.1432. **3b**: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.32 (m, 10H, $-(\text{C}_6\text{H}_5)_2$), 4.66 (dd, $J = 11.3$ Hz, $J = 15.4$ Hz, 2H), 4.56 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.26 (dd, $J = 3.1$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J = 10.3$ Hz, $J = 36.1$ Hz, 2H), 3.52 (s, 1H), 2.72 (m, 4H), 2.23 (m, 1H), 2.02 (m, 2H), 1.84 (m, 1H). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 138.1, 137.1, 128.6, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.8, 127.6, 126.1 (q, $J = 287.2$ Hz, $-\text{CF}_3$), 76.5, 75.8 (q, $J = 26.09$ Hz, $-(\text{CF}_3)\text{C}$), 74.6, 73.9, 67.3, 44.0, 36.8, 30.1, 29.6, 25.9. HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{O}_3\text{S}_2$ 473.1432; Found 473.1458.

化合物 **4** 的合成。配制 6 mL 80% 的 CH_3CN 溶液, 将 NBS 980 mg (5.5 mmol, 6 eq) 溶解, 总共取 5 mL CH_3CN 溶解化合物 **3b** 431.7 mg (0.91 mmol, 1 eq)。Ar 保护下于 5°C 将溶解的 **3b** 逐滴滴加到 NBS 中, 反应 10 min, TLC 监测反应结束后, 6 mL 饱和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液淬灭反应, 减压旋走 CH_3CN 。加入 CH_2Cl_2 萃取, 用饱和 NaHCO_3 溶液洗涤有机相, 最后用饱和 NaCl 溶液洗涤有机相, 无水 MgSO_4 干燥, 减压旋干溶剂。将得到的粗产物与无水吡啶共旋两次, 于室温下溶于 10 mL 无水吡啶中, 将反应体系转移到 0°C , 向反应体系中逐滴滴加 Ac_2O 0.33 mL (3.45 mmol, 11 eq)。滴加完成后, 室温下反应 2 h, TLC 监测反应结束后, 旋走吡啶, 加入 4 mL 饱和 NaHCO_3 溶液淬灭反应, CH_2Cl_2 萃取, 无水 MgSO_4 干燥有机相。减压旋干溶剂, 得到的粗产物采用柱层析分离(PE/EA = 40/1 - 20/1 - 10/1), 最后得到白色固体 **4** 338 mg ($R_f = 0.42$, PE/EA = 10/1), 产率 87.4%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.36 - 7.32 (m, 10H, $-(\text{C}_6\text{H}_5)_2$), 6.36 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H1'), 4.67 - 4.53 (m, 5H, $-(\text{CH}_2)_2$, H3'), 3.86 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H5'), 3.73 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H5''), 2.53-2.46 (ddd, $J = 5.4$ Hz, $J = 9.7$ Hz, $J = 15.1$ Hz, 1H, H2'), 2.29 - 2.24 (m, 1H, H2''), 2.02 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)。 ^{13}C NMR(100.6 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 169.8, 137.9, 137.4, 128.5, 128.4, 128.0, 127.6, 127.5, 124.5 (q, $J = 284.3$ Hz, $-\text{CF}_3$), 96.5, 86.0 (q, $J = 28.2$ Hz, $-(\text{CF}_3)\text{C}$), 77.7, 74.0, 73.3, 67.4, 38.1, 21.0. HRMS (ESI-TOF) m/z : $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NaO}_5$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ cal. 447.1395; found, 447.1380.

化合物 **5a** 和 **5b** 的合成。Ar 保护下, 取胸腺嘧啶 2.6 g (20.8 mmol, 1.5 eq) 加入到 40 mL 无水 CH_3CN 中, 于 80°C 油浴回流条件下, 将 N_2O -双(三甲基硅基)乙酰胺 10.7 mL (41.6 mmol, 3 eq) 加入到反应体系中反应 1 h, 当白色固体完全溶解后, 将化合物 **4** 5.88 g (13.9 mmol, 1 eq) 用 20 mL 无水 CH_3CN 溶解后滴加到反应体系中, 最后将 TMSOTf 12.67 mL (69.3 mmol, 5 eq) 滴加到反应体系中, 于 80°C 回流反应 2 h, TLC 监测反应结束后, 减压旋干 CH_3CN , 将反应体系用饱和 NaHCO_3 溶液淬灭, CH_2Cl_2 萃取, 饱和 NaCl 溶液洗涤有机相, 无水 MgSO_4 干燥。减压旋干溶剂, 得到的粗产物采用柱层析分离(PE/EA = 2/1 - 1/1), 得到目标产物 **5b** 2.93 g ($R_f = 0.31$, PE/EA = 4/1), 产率 43% 和另一个非对应异构体 **5a** 2.86 g ($R_f = 0.29$, PE/EA = 4/1), 产率 42%。**5a**: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.33 - 8.98 (m, 1H, $-\text{NH}$), 7.35 - 7.25 (m, 10H, $-(\text{C}_6\text{H}_5)_2$), 7.09 (s, 1H, H6), 6.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H1'), 4.64 - 4.55 (m, 4H, $-(\text{CH}_2)_2$), 4.48 (dd, $J = 4.3$ Hz, $J = 6.4$ Hz, 1H, H3'), 3.91 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H5'), 3.83 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H5''), 2.68 - 2.62 (m, 1H, H2'), 2.24 - 2.17 (m, 1H, H2''), 1.92 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)。 ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 163.7, 150.3, 137.5, 136.9, 134.8, 128.6, 128.4, 128.2, 127.8, 127.7, 127.6, 124.5 (q, $J = 285.4$ Hz, $-\text{CF}_3$), 111.8, 83.6 (q, $J = 28.2$ Hz, $-(\text{CF}_3)\text{C}$), 85.8, 78.1, 74.0, 73.1, 67.6, 37.8, 12.7. HRMS (ESI-TOF) m/z : $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ cal. 491.1794; found, 491.1828. **5b**: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 10.21 - 9.48 (m, 1H, $-\text{NH}$), 7.73 (s, 1H, H6), 7.43 - 7.36 (m, 10H, $-(\text{C}_6\text{H}_5)_2$), 6.40 (dd, $J = 6.2$ Hz, $J = 8.3$ Hz, 1H, H1'), 4.74 - 4.58 (m, 4H, $-(\text{CH}_2)_2$), 4.51 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H3'), 3.97 (t, $J = 10.8$ Hz, 2H, H5', H5''), 2.68 - 2.62 (m, 1H, H2'), 2.31 - 2.24 (m, 1H, H2''), 1.55 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)。 ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 164.0, 150.7, 137.3, 137.0, 135.8, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2,

127.9, 127.8, 124.6 (q, $J = 285.2$ Hz, $-\underline{\text{CF}}_3$), 111.9, 85.2 (q, $J = 27.5$ Hz, $-(\text{CF}_3)\underline{\text{C}}$), 82.9, 77.6, 74.1, 73.5, 67.3, 37.6, 12.1. HRMS (ESI-TOF) m/z : $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ cal. 491.1794; found, 491.1828.

化合物 **6** 的合成。H₂ 保护下, 取化合物 **5b** 1.58 g (3.2 mmol, 1 eq) 溶于 20 mL 无水 CH₃OH 中, 加入 PdCl₂ 2.1 g 搅拌反应 2 h, TLC 监测反应结束后, 使用硅藻土抽滤, 除去不溶固体, 减压旋干 CH₃OH。得到白色固体粗产物采用柱层析分离(PE/EA = 2/1-1/1-1/1.5-1/3), 得到白色固体 **6** 945 mg ($R_f = 0.4$, PE/EA = 1/3), 产率 95%。¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) 7.32 (s, 1H, H₆), 6.36 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_{1'}), 4.88 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, H_{3'}), 3.95 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H_{5'}), 3.84 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H_{5''}), 2.58 – 2.44 (m, 2H, H_{2'}, H_{2''}), 1.80 (s, 3H, -CH₃)。 ¹³C NMR (100.6 MHz, D₂O): δ (ppm) 166.2, 151.7, 136.8, 124.5 (q, $J = 284.4$ Hz, $-\underline{\text{CF}}_3$), 111.8, 86.4 (q, $J = 26.5$ Hz, $-(\text{CF}_3)\underline{\text{C}}$), 85.3, 70.7, 59.3, 37.9, 11.5。 ¹⁹F NMR (376 MHz, *d*₆-DMSO): δ (ppm) -77.03. HRMS (ESI-TOF) m/z : $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{NaO}_5$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ cal. 333.0674; found, 333.0661.

化合物 **7** 的合成。Ar 气保护下, 将化合物 **6** 850 mg (2.74 mmol, 1 eq) 溶于 10 mL 无水吡啶中, 加入 DMTr-Cl 928 mg (3.01 mmol, 1.1 eq), 常温搅拌反应 4 h, TLC 监测反应结束后, 加入 3 mL 甲醇淬灭反应, 旋干体系, 得到的粗产物采用柱层析分离(PE/EA = 2/1 – 1/1 – 1/1.5 – 1/3, 加入 1% 三乙胺), 最后得到白色固体 **7** 1.39 g ($R_f = 0.46$, PE/EA = 1/1), 产率 83%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.51 (m, 1H, -NH), 7.43 – 7.31 (m, 9H, ArH), 7.14 (s, 1H, H₆), 6.87 – 6.85 (m, 4H, ArH), 6.57 (dd, $J = 6.5$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{1'}), 4.78 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, H_{3'}), 3.78 (s, 6H, (-OCH₃)₂), 3.68 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H_{5'}), 3.43 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H_{5''}), 2.49 – 2.45 (m, 1H, H_{2'}), 2.27 – 2.20 (m, 1H, H_{2''}), 1.92 (s, 3H, -CH₃)。 ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.7, 158.9, 150.5, 143.6, 134.3, 129.8, 128.2, 127.7, 127.3, 124.8 (q, $J = 284.4$ Hz, $-\underline{\text{CF}}_3$), 113.6, 112.1, 87.8, 86.9 (q, $J = 26.9$ Hz, $-(\text{CF}_3)\underline{\text{C}}$), 85.5, 72.6, 55.2, 39.7, 12.8. HRMS (ESI-TOF) m/z : $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_2\text{NaO}_7$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ cal. 635.1981; found, 635.2054.

化合物 **8** 的合成。Ar 气保护下, 将化合物 **7** 1.4 g (2.28 mmol, 1 eq) 溶于 15 mL 无水 CH₂Cl₂ 中, 加入 DIPEA 3 mL (18.28 mmol, 8 eq), 常温搅拌 3 min 后, 加入 N,N-二异丙基氯代亚磷酸胺 2 mL (4.57 mmol, 4 eq), 常温搅拌反应 30 min。TLC 监测反应结束后, 加入 2 mL 甲醇淬灭反应, 减压旋干体系。将得到的粗产物采用快速柱层析分离(PE/EA = 1/1, 加入 1% 的三乙胺), 得到粗产物 1.58 g, 将粗产物溶于 2 mL CH₂Cl₂ 中, 分别滴加到 4 个装有 10 mL 正己烷的样品瓶中沉淀, 得到白色晶状固体 **8** 1.38 g, 产率 75%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.49 – 7.20 (m, 9H, ArH), 7.17 (s, 1H, H₆), 6.86 – 6.84 (m, 4H, ArH), 6.52 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H_{1'}), 4.83 – 4.78 (m, 1H, H_{3'}), 3.77 (s, 6H, (-OCH₃)₂), 3.53 – 3.47 (m, 5H), 3.09 (s, 1H), 2.68 – 2.62 (m, 1H, H_{2'}), 2.54 – 2.52 (m, 1H, H_{2''}), 2.38 – 2.35 (m, 3H), 1.96 (s, 3H, -CH₃), 1.06 – 1.04 (d, 12H, (-CH₃)₄)。 ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ : 150.781 (s, 1P)。 HRMS (ESI-TOF) m/z : $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{F}_3\text{N}_4\text{NaO}_8\text{P}$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ cal. 835.3060, found, 835.3058; $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_8\text{P}$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ cal. 813.3240, found, 813.3243.

3. 结果与讨论

3.1. 反应路线的优化

本路线从已知的化合物 **1** [8] 出发, 在对化合物 **1** 进行羟基氧化成羰基这一步, 尝试了如图 2 所示的一些氧化反应。1) Swern 氧化: 反应利用二甲亚砜(DMSO)做氧化剂和有机碱(如三乙胺)在低温下与草酰氯协同作用将一级醇或二级醇氧化成醛或酮。由于 Swern 氧化反应条件严苛, 得到的目标产物 **2** 的产率太低。2) 二碘酰基苯甲酸氧化: 反应以乙腈为溶剂, 反应温度 80℃, 回流的条件下反应 2 小时, 原料消失, 无目标产物出现, 可能原因是反应条件剧烈, 二碘酰基苯甲酸显酸性, 使化合物 **1** 的结构不稳定而被破坏。3) Dess-Martin 氧化: 由于 Dess-Martin 氧化反应条件温和, 在常温中就能进行。经过多次改进,

发现当原料的投料为 1 g 左右, Dess-Martin 为 1.2 eq 时, 产率达到 79%。

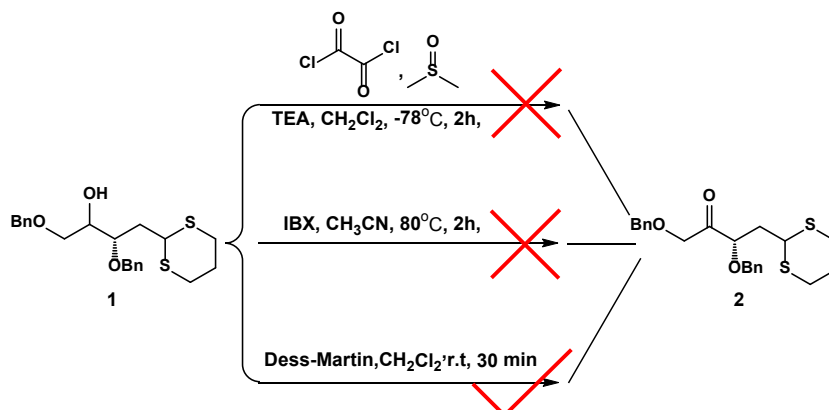


Figure 2. Optimization of the reaction route for the synthesis of compound 2
图 2. 化合物 2 合成的反应路线优化

在将化合物 **1** 的 C4'-羟基氧化成酮后, 使用 CF_3SiMe_3 引入三氟甲基, 然后用 TBAF 处理, 得到一对非对映异构体 **3a** 和 **3b**, 为了提高反应的选择性, 经过不断地尝试, 最终发现当原料, CF_3SiMe_3 和四丁基氟化铵当量比为 1:3:1 时, 且反应温度控制恒温在 15°C 时, 反应的选择性能达到 4:1。其中主要的异构体 **3b** 经过两步化学反应得到一对非对映异构体 **5a** 和 **5b**。在 MeOH 中将化合物 **5b** 在 PdCl_2/H_2 催化作用下脱除两个苄基保护基, 得到 C4'- CF_3 - α -L 修饰的脱氧胸苷 **6**, 产率 95%。最后通过对 **6** 的 5'-OH 使用 DMTr 保护和 3'-OH 与 2-氰乙基 N,N-二异丙基氯代亚磷酰胺反应, 得到最终目标化合物 **8**。

3.2. 非对映异构体 **5a**, **5b** 和化合物 **6** 的核磁数据分析

3.2.1. 非对映异构体 **5a**, **5b** 的核磁数据分析

通过 ^1H 谱, ^{13}C 谱归属重要的 H 峰和 C 峰。然后通过 2D NOESY 实验(图 3, 图 4), 发现非对映异构体 **5b** 的 H3'和 H6 有 NOE 效应, H3'和 H5'没有 NOE 效应, 说明 H3'与 H6 空间距离相近, 与 H5'空间距离相远。H3'空间位置已知, 位于糖环面上, 所以碱基与 H3'共面, 位于糖环面上, H5'与 H3'异面, 位于糖环面下, 证明了 **5b** 为目标化合物 C4'- CF_3 - α -L 脱氧胸苷。而 **5a** 的 H3'与 H1'有 NOE 效应, 与 H6 和 H5'没有 NOE 效应。说明 H1'与 H3'共面, 位于糖环面上。H6 和 H5'与 H3'异面, 说明 **5a** 的碱基位于糖环面下, 所以 **5a** 为 C4'- CF_3 - β -L 脱氧胸苷, 是 **5b** 的非对映异构体。

3.2.2. 化合物 **6** 的核磁数据分析

为了进一步验证非对映异构体 **5b** 是需要的目标化合物, 将 **5b** 的 3'和 5'的保护基团苄基在 PdCl_2/H_2 催化作用下脱除, 得到化合物 **6**, 通过 NOESY 谱图(图 5), 发现 H3'与 H6 有 NOE 效应, H3'与 H5'和 H1'没有 NOE 效应, 证明了化合物 **6** 也是 C4'- CF_3 - α -L 脱氧胸苷。同时 ^{19}F 谱图显示, 在 -75 到 -80 ppm 之间出现了 F 原子的特征峰(图 6), 也证明了化合物 **6** 是目标中间产物。

3.3. 目标化合物 **8** 的表征

首先通过 ESI-TOF 高分辨质谱对化合物 **8** 的相对分子质量进行表征(图 7), 化合物 **8** 加上 H^+ 离子和 Na^+ 离子的相对分子质量的理论值分别是 813.3240 和 835.3060, 实际测试得到的化合物 **8** 加上 Na^+ 离子相对分子质量是 813.3243 和 835.3058, 与理论值吻合。

然后通过对化合物 **8** 核磁谱解数据分析, 发现化合物 **8** 的氢原子个数与氢谱中氢原子个数刚好是一

致的。最后通过对化合物 **8** 进行 ^{31}P 谱的分析, 发现在 150.781 ppm 处出现一个单峰(图 8), 与三价 P 原子的理论核磁出峰位置相一致, 证明化合物 **8** 就是最终的目标化合物。

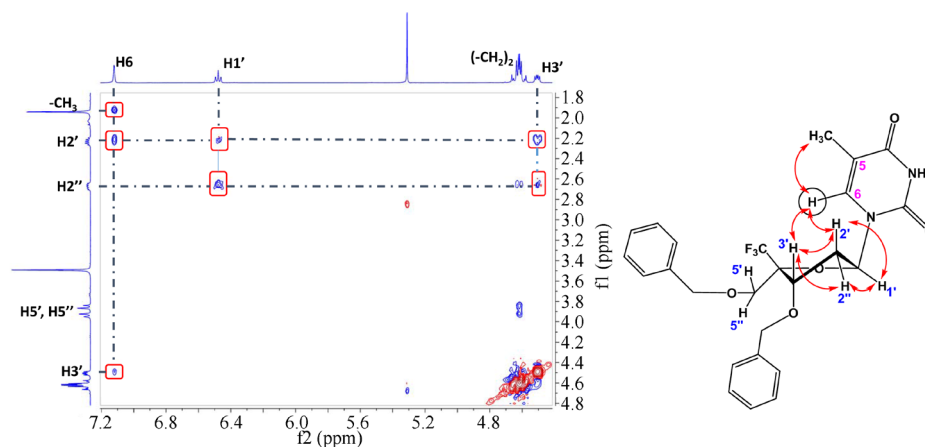


Figure 3. The NOESY spectrum of compound **5b**

图 3. 化合物 **5b** 的 NOESY 谱图

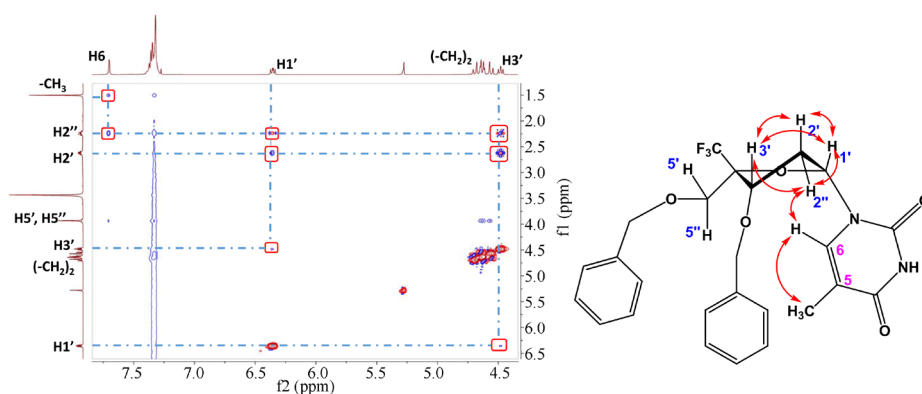


Figure 4. The NOESY spectrum of compound **5a**

图 4. 化合物 **5a** 的 NOESY 谱图

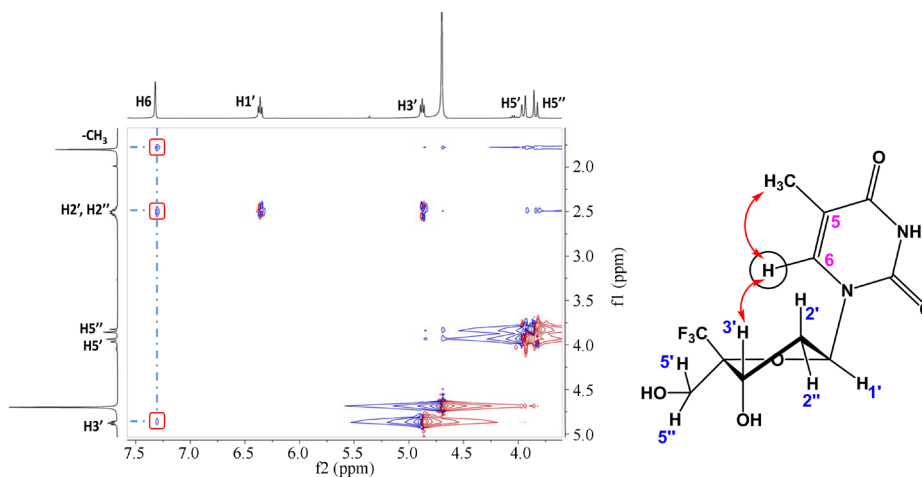


Figure 5. The NOESY spectrum of compound **6**

图 5. 化合物 **6** 的 NOESY 谱图

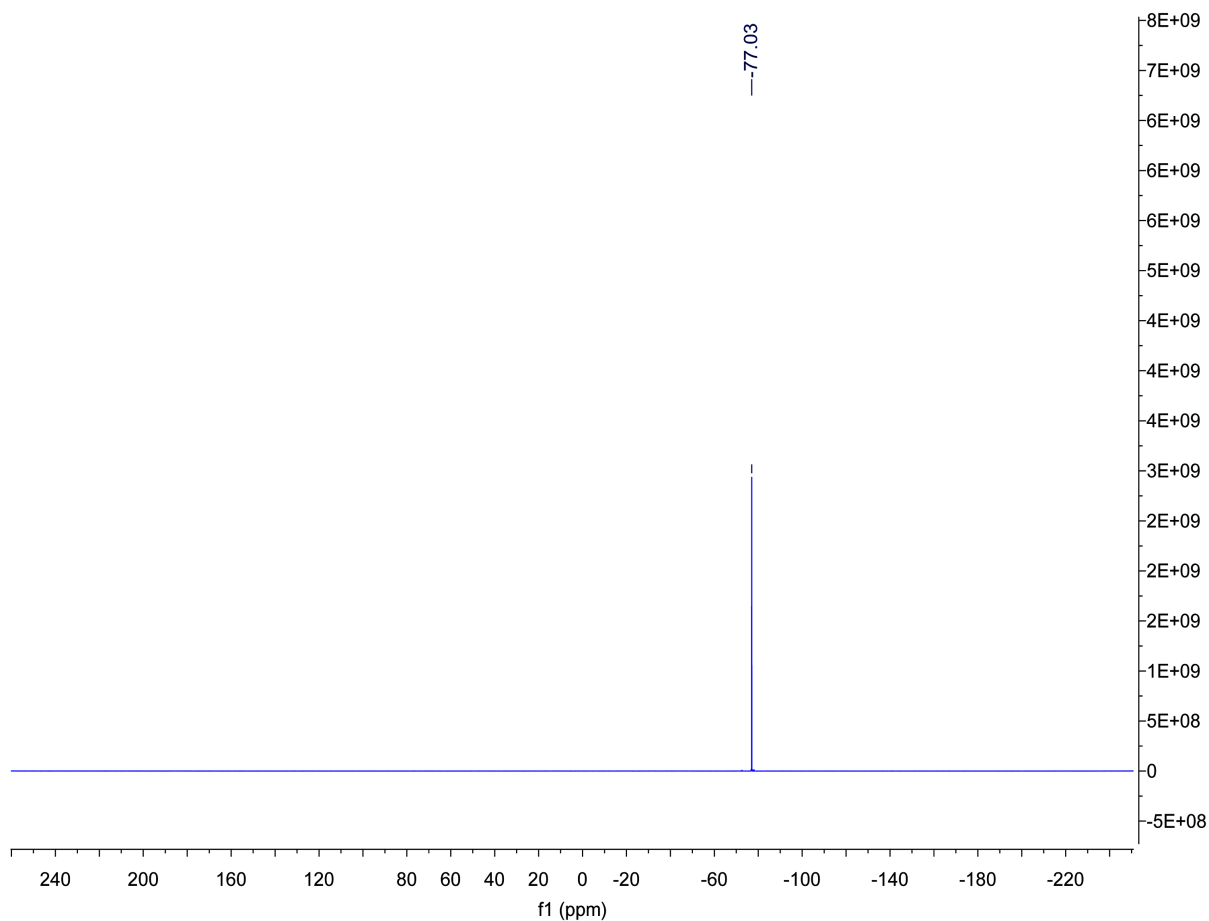


Figure 6. ^{19}F NMR spectrum of compound 6
图 6. 化合物 6 的 ^{19}F NMR 谱图

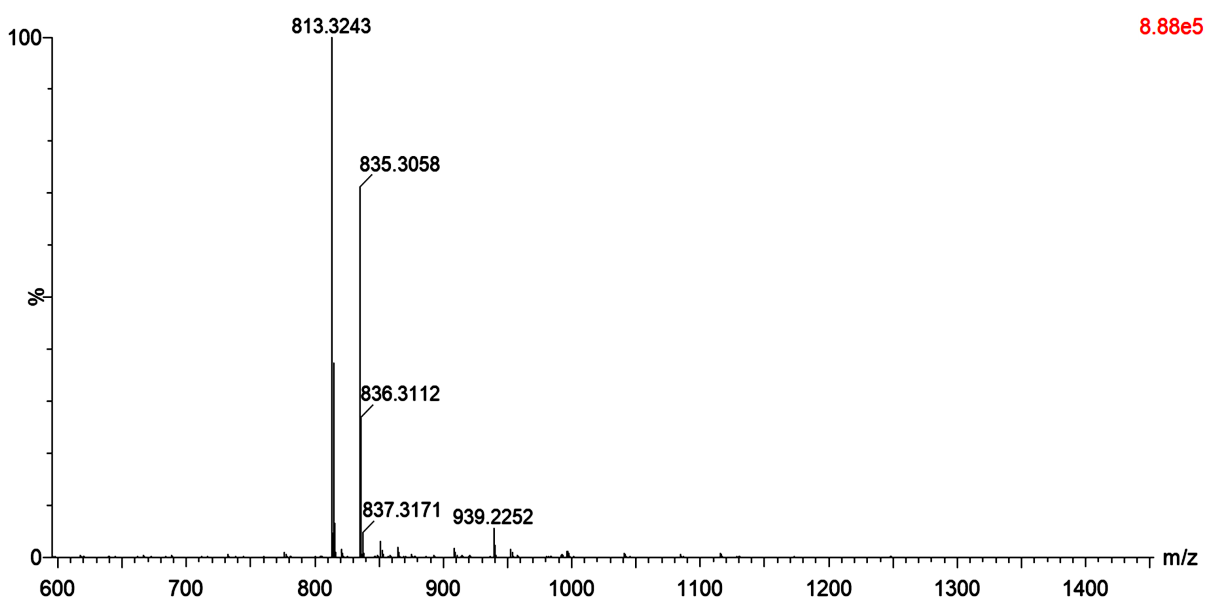


Figure 7. ESI-MS of Compound 8
图 7. 化合物 8 的 ESI-MS 图

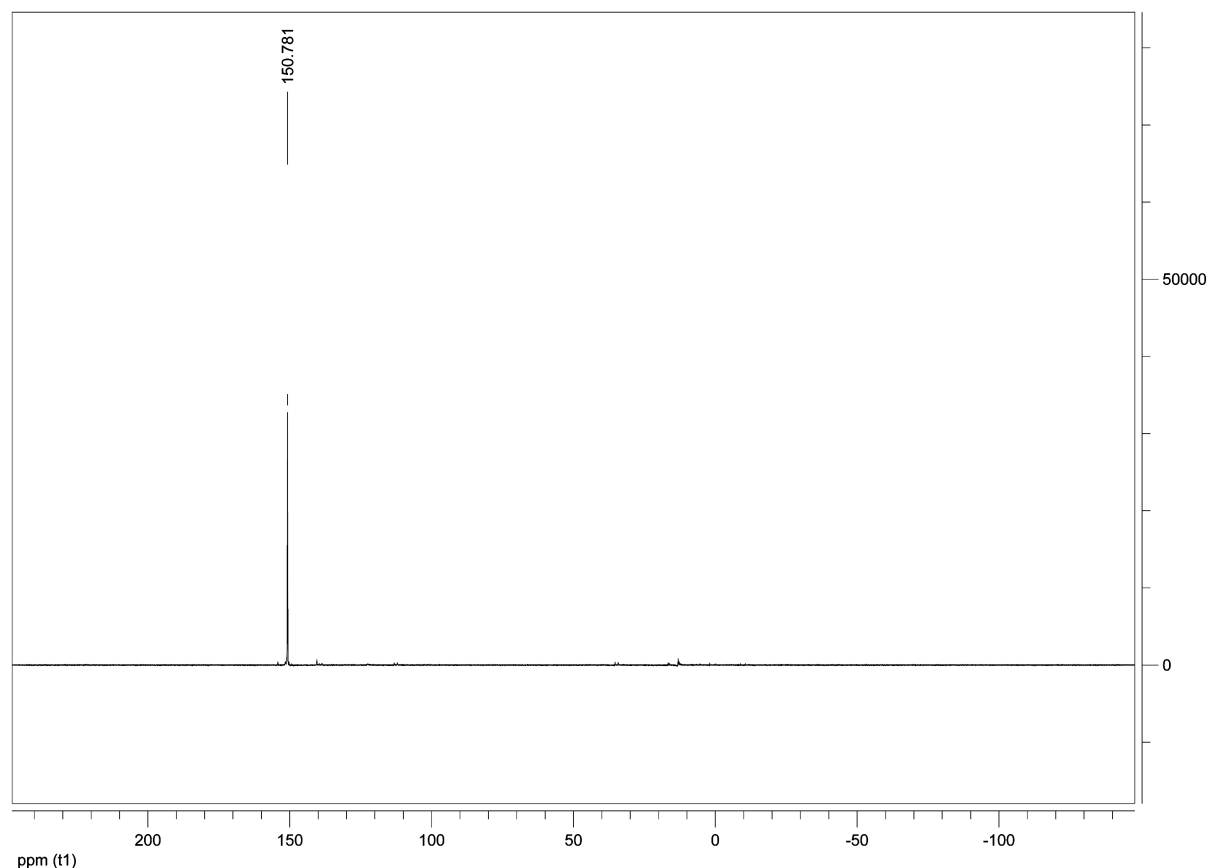


Figure 8. ^{31}P NMR spectrum of compound **8**

图 8. 化合物 **8** 的 ^{31}P NMR 谱图

4. 结论

本文研究了以 1,3-二(苯氧基)-4-(1,3-二噻烷-2-基)丁-2-酮为原料, 通过 7 步反应得到了目标化合物 **8**, 该合成路线原料易得, 通过优化条件, 能使非对应异构体 **3b** 和 **3a** 具有 4:1 的反应选择性, 且主要产物是所需要的目标中间产物。通过 NOESY 谱图对非对映异构体 **5a**, **5b** 和化合物 **6** 进行结构鉴定, 能够确定 **5b** 和 **6** 为 C4'-CF₃- α -L-脱氧胸苷, 最后通过 ^1H NMR, ^{31}P NMR 和 ESI-MS 高分辨液相质谱对 **8** 进行了结构鉴定, 能确认化合物 **8** 是所需要的最终目标产物。

参考文献

- [1] Deleavey, G.F. and Damha, M.J. (2012) Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing. *Chemistry & Biology*, **19**, 937-954. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.011>
- [2] Lima, W.F., Rose, J.B., Nichols, J.G., Wu, H.J., Migawa, M.T., Wyrzykiewicz, T.K., Siwkowski, A.M. and Crooke, S.T. (2007) Human RNase H1 Discriminates between Subtle Variations in the Structure of the Heteroduplex Substrate. *Molecular Pharmacology*, **71**, 83-91. <https://doi.org/10.1124/mol.106.025015>
- [3] Cerritelli, S.M. and Crouch, R.J. (2009) Ribonuclease H: The Enzymes in Eukaryotes. *The FEBS Journal*, **276**, 1494-1505. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06908.x>
- [4] Juliano, R.L. (2016) The Delivery of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, **44**, 6518-6548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw236>
- [5] Huang, L. and Liu, Y. (2011) *In Vivo* Delivery of RNAi with Lipid-Based Nanoparticles. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **13**, 507-530. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124709>

-
- [6] Klinman, D.M., Ae-Kyung, Y., Beaucage, S.L. and Conover, J. (1996) CpG Motifs Present in Bacterial DNA Rapidly Induce Lymphocytes to Secrete Interleukin 6, Interleukin 12, and Interferon γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 2879-2883. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2879>
- [7] Godeau, G., Arnion, H., Brun, C., Staedel, C. and Barthélémy, P. (2010) Fluorocarbon Oligonucleotide Conjugates for Nucleic Acids Delivery. *MedChemComm*, **1**, 76-78. <https://doi.org/10.1039/c0md00054j>
- [8] Sakai, T., Matsushita, S., Arakawa, S., Kawai, A. and Mori, Y. (2014) Synthetic Study of Gymnocin-A: Synthesis of the ABC Ring Fragment. *Tetrahedron Letters*, **55**, 6557-6560. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.10.014>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8844, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: hjctet@hanspub.org