



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101821280 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 23

(21) 申请号 200880111630. 9

(22) 申请日 2008. 10. 13

(30) 优先权数据

60/980, 063 2007. 10. 15 US

12/224, 953 2008. 10. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 04. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/079678 2008. 10. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/052034 EN 2009. 04. 23

(73) 专利权人 霍尼韦尔国际公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 S·罗伦茨 J·普日比特

K·斯诺布尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 段晓玲 林毅斌

(51) Int. Cl.

C07H 21/04(2006. 01)

C07H 21/00(2006. 01)

(56) 对比文件

无. Custom Oligonucleotide Synthesis. 《Custom Oligonucleotide Synthesis》. 2003, 第 1-7 页.

审查员 李伟

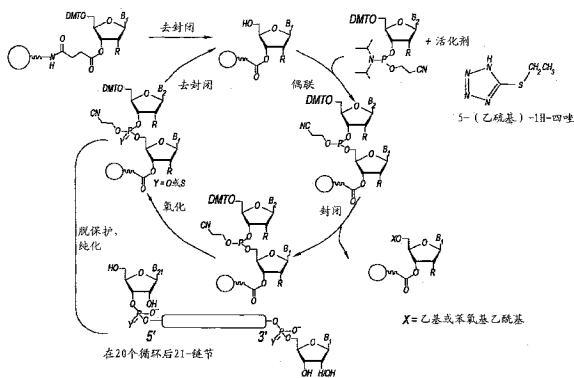
权利要求书1页 说明书4页 附图9页

(54) 发明名称

利用不含 1, 3, 5- 三甲基六氢 -1, 3, 5- 三嗪的 N- 甲基咪唑作为加帽试剂合成寡核苷酸或硫代磷酸寡核苷酸的方法

(57) 摘要

根据本发明, 这里提供了一种制备寡核苷酸或硫代磷酸寡核苷酸的方法。所述方法包括以下步骤: (a) 提供一定量的封闭的核苷酸; (b) 将上述封闭的核苷酸去封闭, 形成未封闭的核苷酸; (c) 活化去封闭的核苷酸; (d) 使去封闭的核苷酸与亚磷酰胺偶联形成亚磷酸酯寡聚物; (e) 通过与一定量的乙酸酐和一定量的基本不含 1, 3, 5- 三甲基六氢 -1, 3, 5- 三嗪的 N- 甲基咪唑反应, 将未偶联的去封闭的核苷酸加帽; (f) 将亚磷酸酯寡聚物氧化形成寡核苷酸或将亚磷酸酯寡聚物硫化形成硫代磷酸寡核苷酸; 和 (g) 可选地重复步骤 (b) 至 (f)。本发明还提供一种加帽核苷酸的方法。



1. 一种制备寡核苷酸的方法,该方法包括如下步骤:
 - (a) 提供一定量的封闭的核苷酸;
 - (b) 将所述封闭的核苷酸去封闭以形成去封闭的核苷酸;
 - (c) 活化所述去封闭的核苷酸;
 - (d) 将所述去封闭的核苷酸与亚磷酰胺反应形成亚磷酸酯寡聚物;
 - (e) 将任何未反应的去封闭的核苷酸与乙酸酐和基本不含 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪的 N-甲基咪唑反应;其中 N-甲基咪唑具有基于 N-甲基咪唑的重量 10ppm 或更少含量的 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪;
 - (f) 将亚磷酸酯寡聚物氧化形成寡核苷酸;和
 - (g) 任选地重复步骤 (b) 至 (f)。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述去封闭是与二氯乙酸在甲苯或二氯甲烷中的反应。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述寡核苷酸是硫代磷酸寡核苷酸。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 (f) 的反应包括用在水和吡啶中的碘氧化所述的亚磷酸酯寡聚物。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中重复步骤 (b) 至 (f) 直至得到所需的寡核苷酸长度。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述的封闭的核苷酸选自杂环核酸碱基。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中封闭的核苷酸是通过共价键连接到载体上的。
8. 加帽核苷酸的方法,该方法包括以下步骤:将具有羟基位点的核苷酸与乙酸酐和基本不含 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪的 N-甲基咪唑反应,其中所述 N-甲基咪唑具有基于所述 N-甲基咪唑的重量 10ppm 或更少含量的 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪。

利用不含 1, 3, 5- 三甲基六氢 -1, 3, 5- 三嗪的 N- 甲基咪唑 作为加帽试剂合成寡核苷酸或硫代磷酸寡核苷酸的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于 2007 年 10 月 15 日的美国临时申请 60/980,063 的优先权,其在此引入作为参考。

背景技术

[0003] 1. 发明领域

[0004] 本发明涉及利用基本不含 1, 3, 5- 三甲基六氢 -1, 3, 5- 三嗪的 N- 甲基咪唑作为加帽试剂合成寡核苷酸或硫代磷酸寡核苷酸的方法。

[0005] 2. 有关技术的描述

[0006] 寡聚核苷酸和硫代寡聚核苷酸是通过核苷酸偶联反应来合成的。该合成方法通常包括如下步骤:(a) 去封闭 (deblocking), (b) 活化 / 偶联, (c) 加帽 (capping), 和 (d) 氧化 (对于寡核苷酸的情况) 或硫化 (对于硫代磷酸寡核苷酸的情况)。上述循环可根据需要偶联的碱基的数量而依次重复多次。

[0007] 加帽步骤通常是在 N- 甲基咪唑和乙酸酐的存在下进行的。在一些利用 N- 甲基咪唑合成寡核苷酸的反应中,发现了一些具有不需要的加合物的寡核苷酸的形成。观察到所述加合物使寡核苷酸的分子量增加 85 道尔顿。

[0008] 因此,需要合成寡核苷酸或硫代磷酸寡核苷酸的方法,其中由该最终产物基本不含不需要的加合物。

[0009] 3. 发明概述

[0010] 根据本发明,这里提供了制备寡核苷酸或硫代磷酸寡核苷酸的方法。所述方法包括以下步骤:(a) 提供一些封闭的 (blocked) 核苷酸;(b) 将该封闭的核苷酸去封闭,以形成未封闭的核苷酸;(c) 活化去封闭的核苷酸;(d) 使去封闭的核苷酸与亚磷酸胺偶联形成亚磷酸酯寡聚物;(e) 通过与一定量的乙酸酐和一定量的基本不含 1, 3, 5- 三甲基六氢 -1, 3, 5- 三嗪的 N- 甲基咪唑反应,将未偶联的去封闭的核苷酸加帽;(f) 将亚磷酸酯寡聚物氧化形成寡核苷酸或将亚磷酸酯寡聚物硫化形成硫代磷酸寡核苷酸;和 (g) 可选地重复步骤 (b) 至 (f)。

[0011] 进一步地根据本发明,这里提供了封闭具有羟基位点的核苷酸的方法。所述方法含有使核苷酸与一定量的乙酸酐和一定量的基本不含 1, 3, 5- 三甲基六氢 -1, 3, 5- 三嗪的 N- 甲基咪唑反应的步骤。

附图说明

[0012] 附图 1 表示本发明的制备方法的实施方式的循环过程。

[0013] 附图 2 表示本发明的方法的去封闭步骤。

[0014] 附图 3 表示本发明的方法的活化和偶联步骤。缩写“CPG”表示可控孔径玻璃 (controlled pore glass)。

[0015] 附图 4 表示本发明的方法的加帽步骤。

[0016] 附图 5 表示 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪的 ^1H NMR 谱图。

[0017] 附图 6 和 7 表示通过 GCMS 色谱获得的工业级 N- 甲基咪唑的杂质分布图。

[0018] 附图 8 至 10 表示 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪的 GCMS 峰。

[0019] 附图 11 表示 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪与其希夫碱 (Schiff base) 间的平衡。

[0020] 附图 12 表示形成寡核苷酸加合物的过程。

[0021] 发明详述

[0022] 已经确定寡核苷酸产物中的不需要的加合物来源于 N- 甲基咪唑中的杂质, 所述 N- 甲基咪唑是合成过程中使用的一种加帽试剂。已经发现在一些工业级的 N- 甲基咪唑中的杂质是 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪和 / 或其希夫碱、N- 亚甲基甲胺。在 N- 甲基咪唑中这两种杂质通常处于平衡状态。为了简便和便于参考起见, 将这两种杂质统称为 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪。所述三嗪在 N- 甲基咪唑中的含量高达约 40 至约 70ppm (份 / 每百万重量份)。N- 甲基咪唑中的三嗪可通过分析技术鉴别, 所述分析技术例如气相色谱质谱 (GCMS) 和质子 NMR。

[0023] 在本发明的方法中, N- 甲基咪唑的不纯问题是通过寻找基本不含三嗪的工业级 N- 甲基咪唑来解决的。优选地, 以 N- 甲基咪唑的重量为基准, 所述 N- 甲基咪唑具有约为 10ppm 或更少的三嗪。最优选地, N- 甲基咪唑具有大约 1ppm 或更少的三嗪。

[0024] 在本方法的第一步中, 提供封闭的核苷酸。最初使用的封闭的核苷酸优选以共价键键接到载体例如二氧化硅或聚合物上的形式提供。所述封闭的核苷酸可以任意 (variously) 地衍生自和选自可用的杂环核酸碱基。

[0025] 将所述封闭的核苷酸去封闭以形成未封闭的核苷酸。在本发明的一个实施方式中, 去封闭优选在甲苯或二氯甲烷存在下通过与一定量的二氯乙酸反应来进行。

[0026] 接着将所述去封闭的核苷酸活化以便于与亚磷酰胺偶联。活化是通过与活化剂接触来进行的。

[0027] 活化后, 所述去封闭的核苷酸与亚磷酰胺偶联, 即反应, 以形成亚磷酸酯寡聚物。所述亚磷酰胺任意选自所有可用的亚磷酰胺。有用的寡核苷酸形成中, 偶联步骤优选重复直至得到需要的寡核苷酸长度为止。

[0028] 典型地, 在偶联步骤中, 只有一部分去封闭的核苷酸与亚磷酰胺反应。未反应的核苷酸必须进行加帽。加帽是通过将未反应的核苷酸与一定量的乙酸酐和一定量的基本不含 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪的 N- 甲基咪唑反应进行的。加帽的寡核苷酸不再适用于后续的核苷酸加成 (addition)。

[0029] 加帽后, 将所述亚磷酸酯寡聚物氧化或硫化。在本方法的一个实施方式中, 所述亚磷酸酯寡聚物通过与碘在水和吡啶的存在下反应进行氧化。

[0030] 有关制备寡核苷酸的方法的另外文献参见美国专利 No. 7, 169, 916 B2, 其在此引入作为参考。

[0031] 本发明的特征将通过下面的实施例作更明显的阐述, 但其不应理解为对本发明的限制。

实施例

[0032] 实施例 1:

[0033] 硫代磷酸寡核苷酸可以根据本发明所述的方法,在利用基本不含 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪的 N-甲基咪唑的加帽试剂合成得到。

[0034] 以附图 2 为参考,第一种碱基,连接到 CPG 固体载体上的胞苷核苷酸,起初是惰性的,因为所有的活性位点都被保护了。在加入另一种碱基前,保护 5'-羟基的二甲氧基三苯甲基 (DMT) 基团必须被脱除掉(去封闭步骤)。3%的 DCA 在 DCM 中(或在甲苯中)的溶液的加入脱除 DMT 基团,并使 5'-羟基基团成为反应位点。

[0035] 另一种碱基单体直到其被活化后(活化步骤)方可加入。活化是通过向柱中加入活化剂,如例如 5-乙硫基四唑这样的四唑类活化剂来实现的。前一种碱基的活泼 5'-羟基基团与新的活化的磷结合从而使两种碱基松散地连接在一起。这样形成不稳定的亚磷酸键接。然后,用乙腈冲洗反应柱以除去任何多余的活化剂、未反应的亚磷酸酯以及副产物。附图 3 中描述有 4 个 DMT-保护的核苷酸(亚磷酸酯)。

[0036] 如附图 4 所示,任何未反应的第一种碱基均通过用 NMI 加帽(加帽步骤)。这些未反应的碱基在整个合成循环中不再有用。左侧的碱基(已经连接在固体载体上)未与活化步骤中的碱基结合。未反应的 5'-羟基通过乙酰化而被封闭,不能参与进一步反应。

[0037] 在活化步骤中,另一类需要的碱基被加入到先前的碱基中,从而形成了不稳定的亚磷酸酯键接。为了使这个键接更稳定,将在水中的稀释的碘和吡啶的氧化溶液加入到反应柱中。不稳定的亚磷酸酯键接被氧化形成更稳定的磷酸酯键接(氧化步骤)。

[0038] 附图 5 描述了从 Sigma Aldrich (SIAL.COM) 网站上得到的 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪的 ¹H NMR 谱图。附图 8 至 10 表示 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪的 GCMS 图。下表 1 列出了 1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪的 GCMS 确定峰。

[0039] 表 1

[0040]

保留时间 (min)	峰 ID
8.3	水
9.5	乙亚胺 (N-亚甲基甲胺)
25.4	乙二醇
27.0	N-甲基甲酰胺
27.3	2-甲基-1-丁醇
27.4	N-甲基甲酰胺
28.7	1-戊醇
36.1	NMI
38.8	1,4-二甲基咪唑
39.5	1,3,5-三甲基六氢-1,3,5-三嗪
41.2	2-辛醇
42.4	1,2-二甲基咪唑
43.0	1-甲基-2-哌啶酮
43.7	2-甲基-2,4-戊二胺
45.0	1,3-二甲基-2-(1-甲基乙基)环戊烯
48.1	六氢-1-甲基-1H-氮杂-2-酮

[0041] 附图 6 描述了显示有 NMI 中的总离子数的 GCMS 色谱图。附图 7 描述了显示有经过放大的总离子数以使杂质的峰可见的 GCMS 色谱图。上述数据是在 Shimadzu GCMS 2010

上采集到的。

[0042] 附图 11 描述了 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪与其希夫碱之间的平衡表示式。该表示式来自于 Infrared and NMR Spectroscopic Studies of Hexhydro-1,3,5-Trialkyltriazines, *Chemia Stosowana* (1973), 17 (3), 359-66。

[0043] 附图 12 描述了 1,3,5- 三甲基六氢 -1,3,5- 三嗪的寡聚产物。

[0044] 实施例 2：

[0045] 根据前述步骤、利用表 2 和 3 中所示的成分合成 DNA。

[0046] 表 2

[0047]

• 脱三苯甲基化	- 去封闭溶液
• 偶联	- 活化剂溶液
• 加帽	- 加帽 A & B
• 氧化	- 氧化溶液
• 脱除	- 氨水 (室温)
• 去保护	- 氨水 (65°C)
• 纯化	- HPLC (缓冲溶液)

[0048] 表 3

[0049]

试剂	配方
脱三苯甲基化溶液	3.0% 的二氯乙酸在二氯甲烷中的溶液 (v/v)
脱三苯甲基化溶液	3.0% 的二氯乙酸在甲苯中的溶液 (v/v)
ETT 活化剂	0.25M 的 5- 乙硫基 -1H- 四唑 (ETT) 在乙腈中的溶液
BMI 活化剂	具有 0.5% 的 NMI 的 0.3M BMT 在乙腈中的溶液
氧化溶液	0.05M 的碘在 90% 吡啶和 10% 水中 (v/v)
加帽 A 溶液	20% N- 甲基咪唑和 80% 乙腈 (v/v)
加帽 B 溶液	20% 乙酸酐, 30% 2,6- 二甲基吡啶和 50% 乙腈 (v/v/v)
脱除丙烯腈	20% 二乙基胺在乙腈中的溶液 (v/v)

[0050]

[0051] 应当认识到以上描述只是为了阐述本发明。在不背离本发明的情况下, 本领域技术人员可以做出各种选择和修改。因此, 本发明意在包含所有这些落入附加的权利要求的范围内的选择、修改和变化。

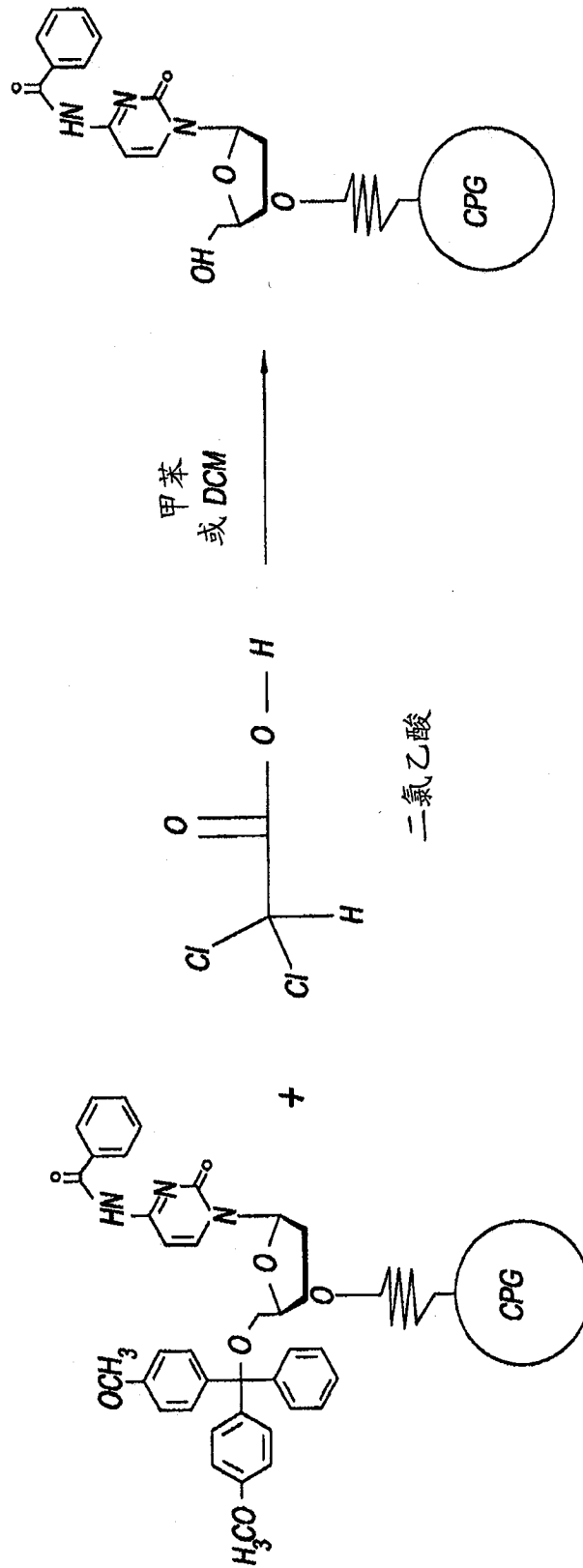


图 2

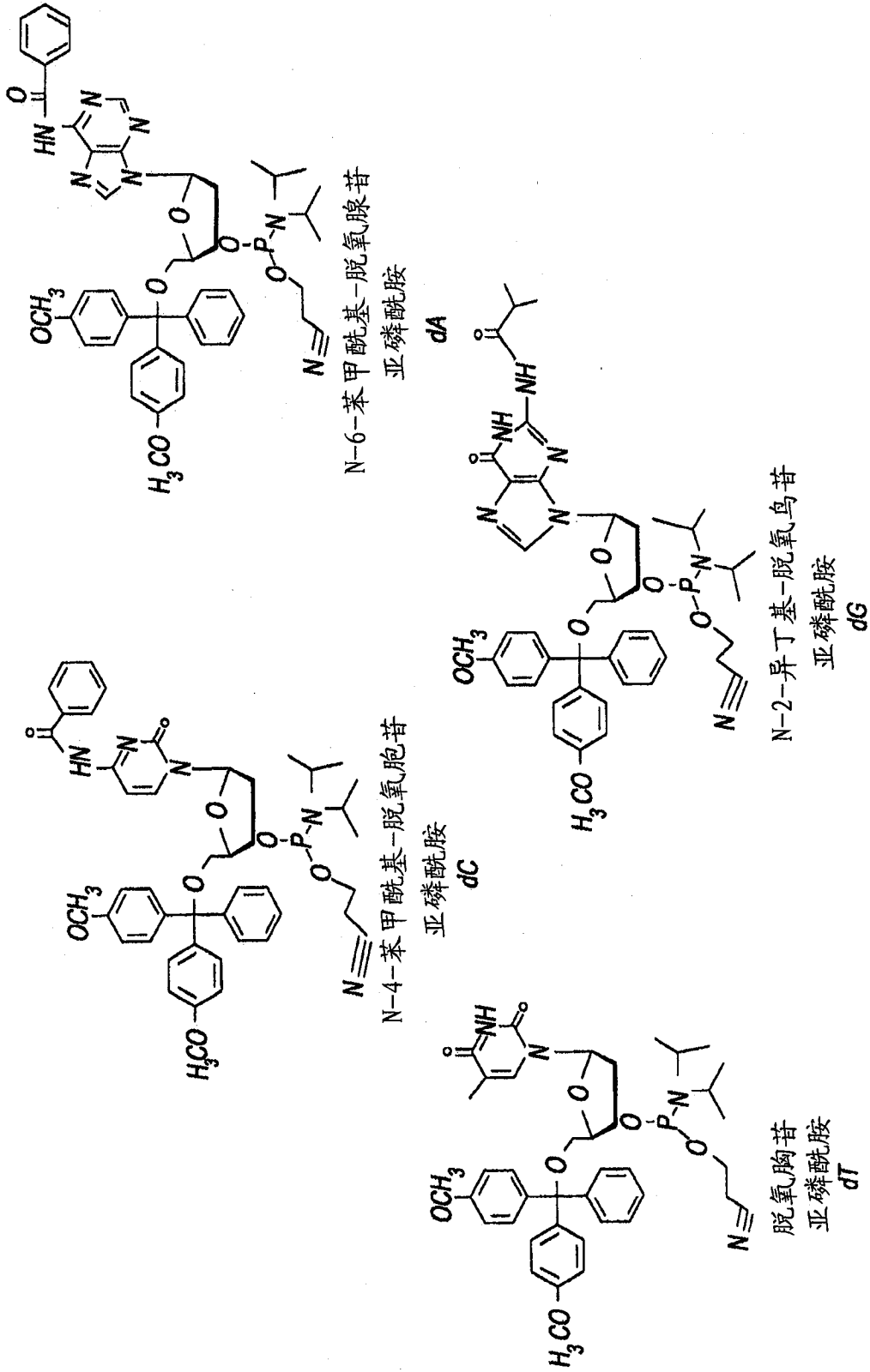


图 3

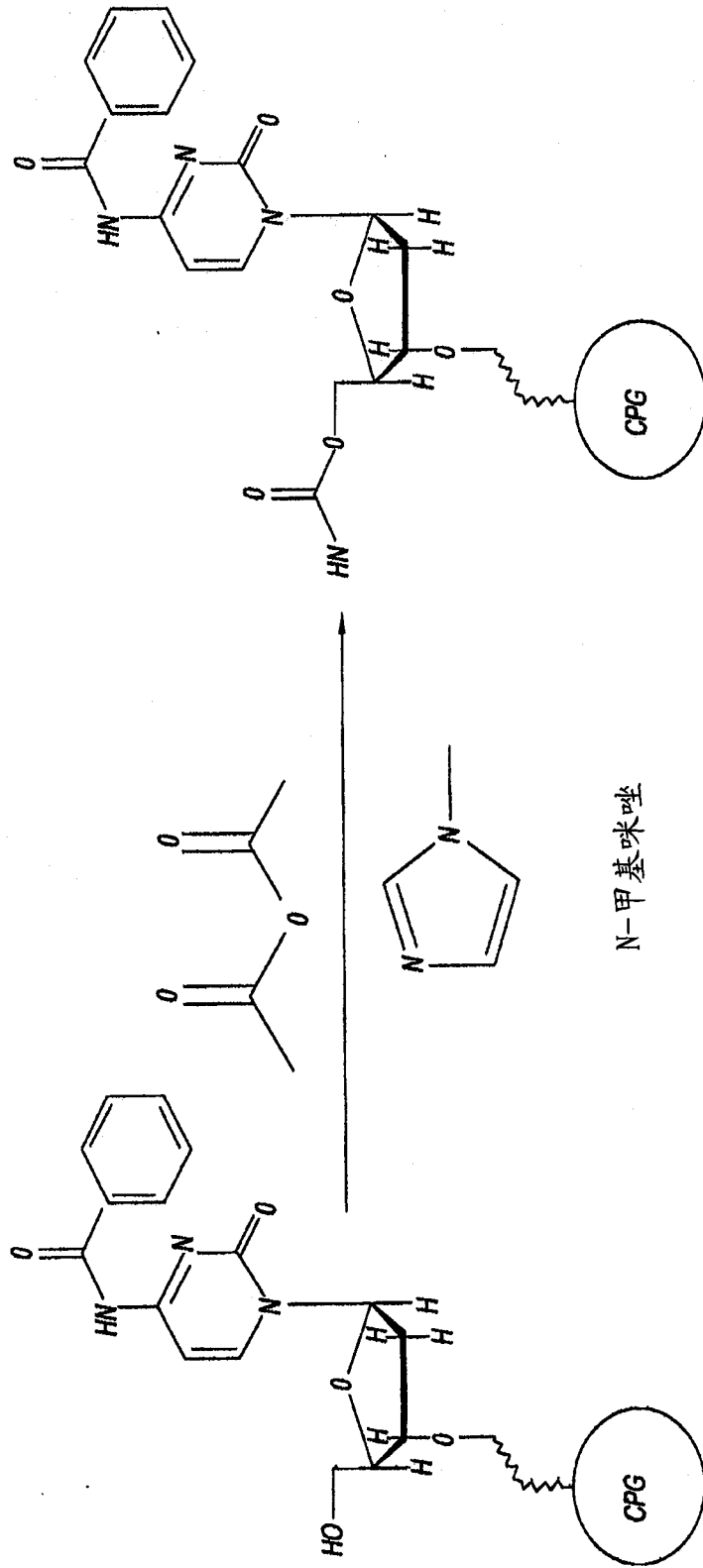


图 4

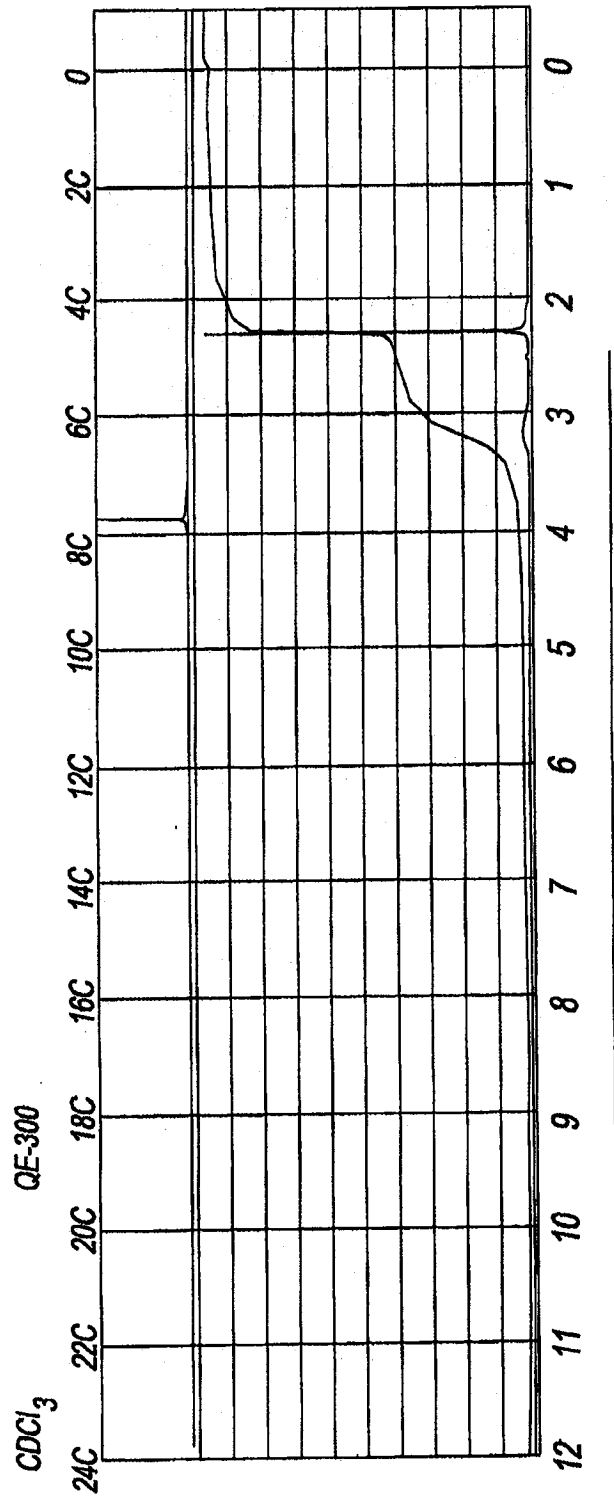


图 5

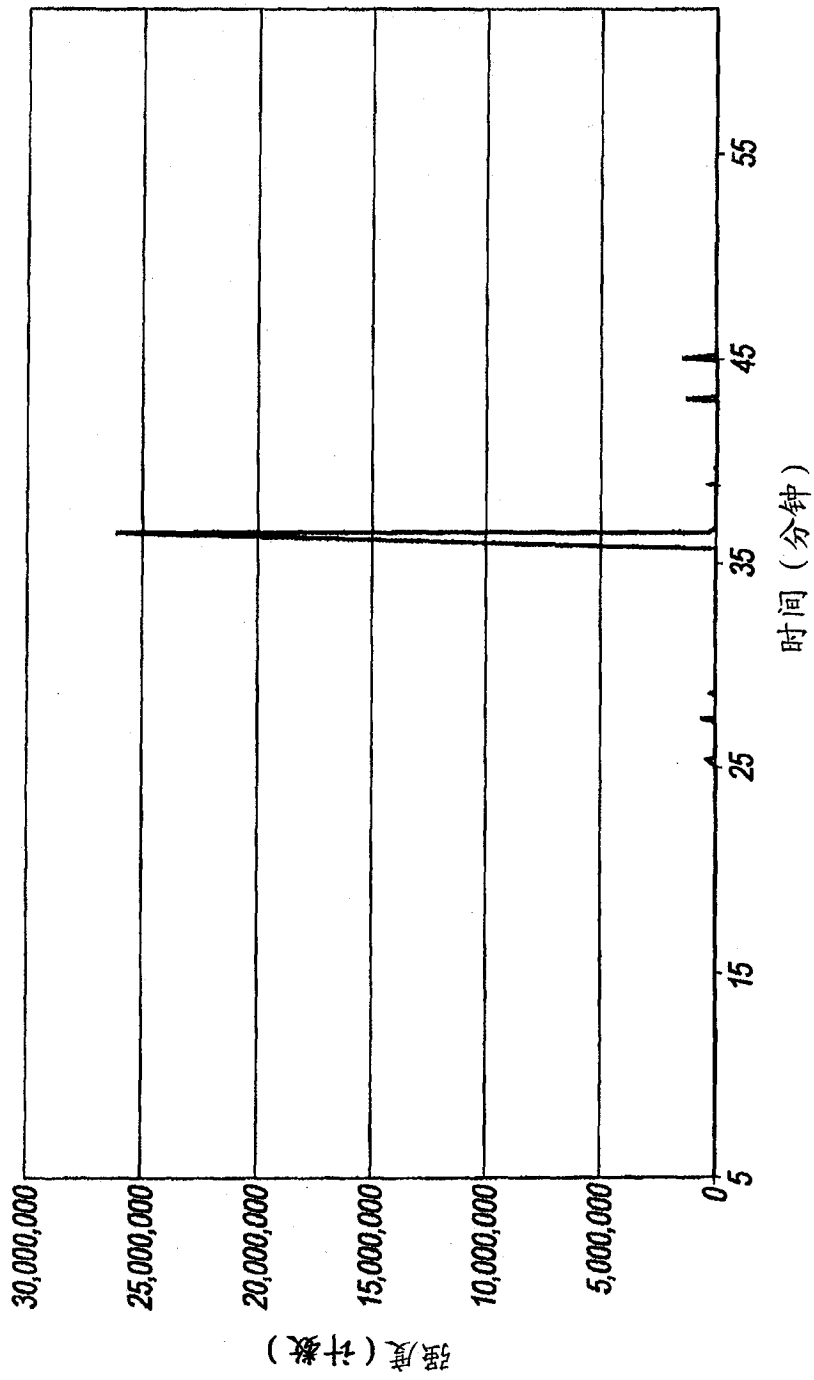


图 6

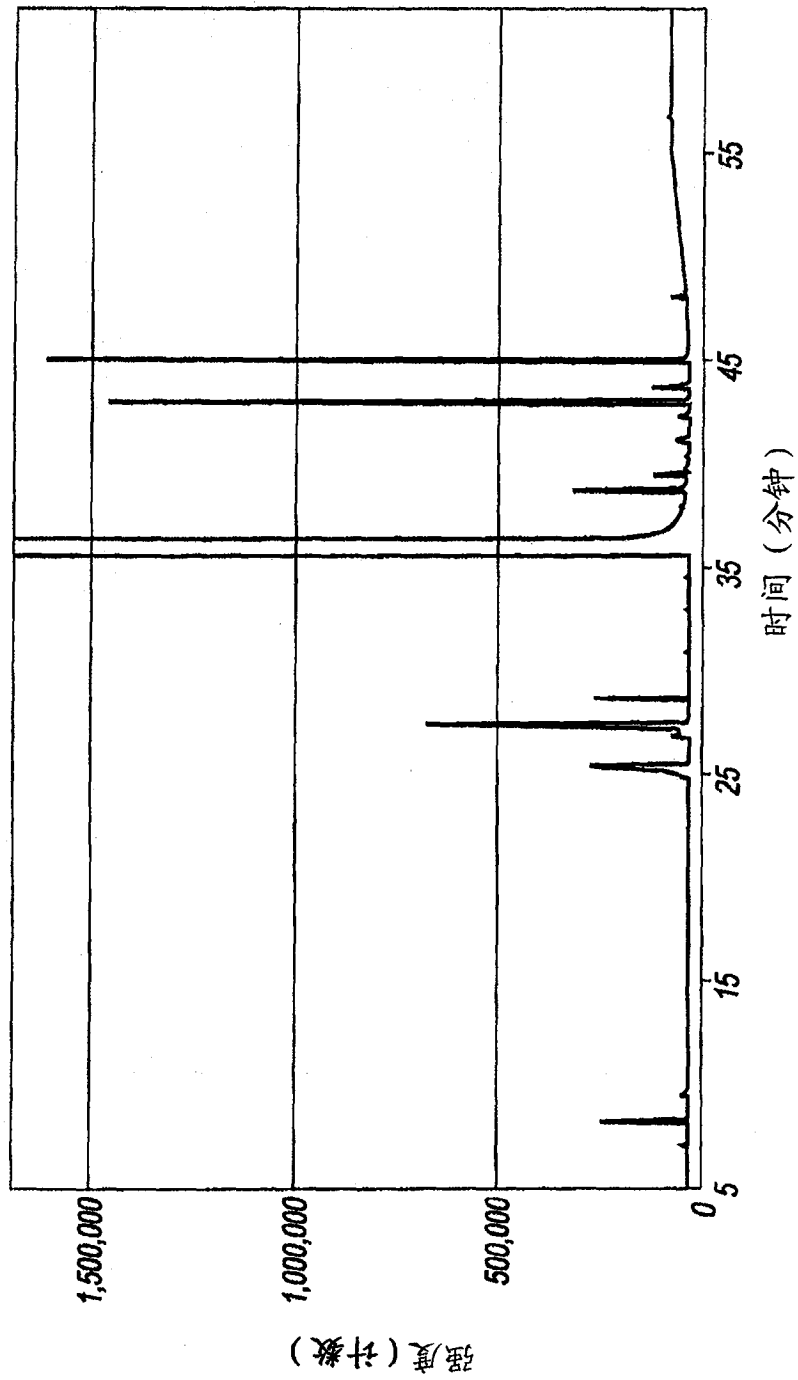


图 7

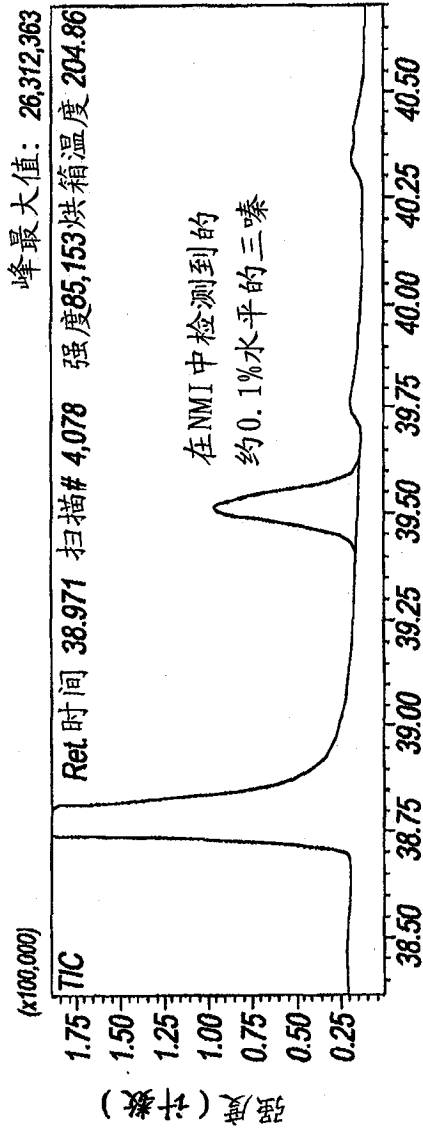


图 8

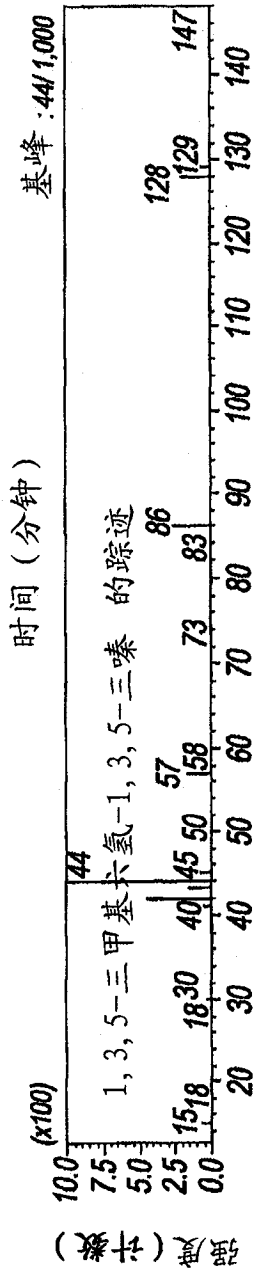


图 9

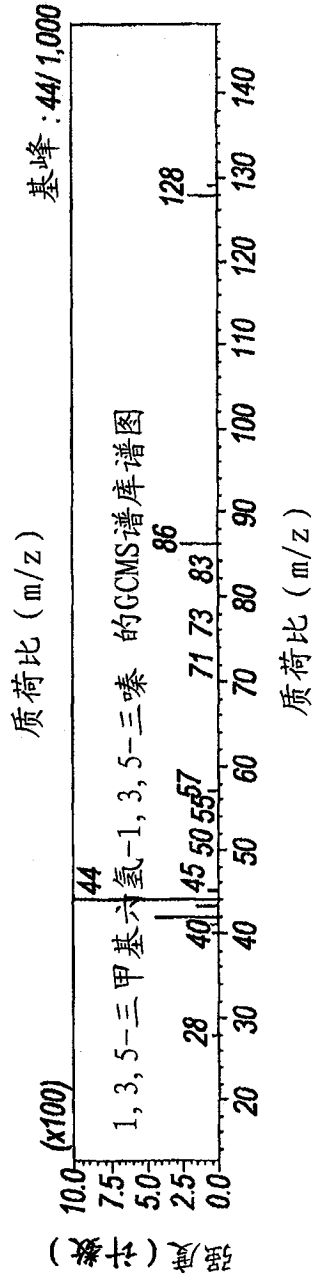


图 10

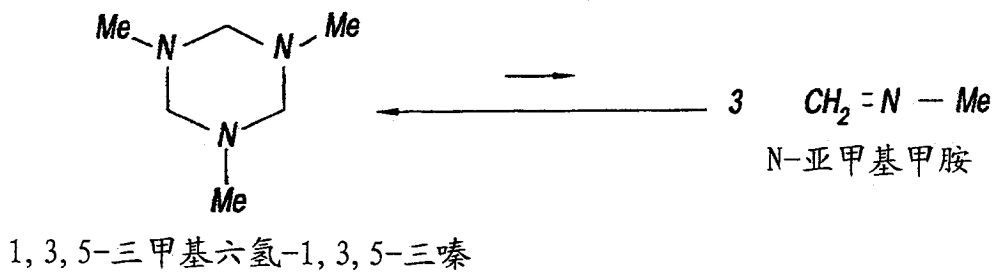


图 11

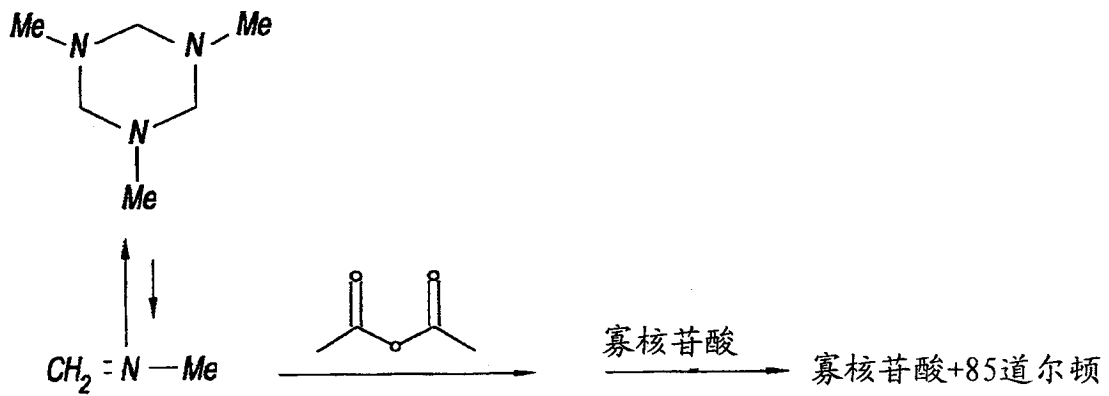


图 12