



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101611048 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200780049850. 9

审查员 薛彦哲

(22) 申请日 2007. 12. 12

(30) 优先权数据

60/869, 588 2006. 12. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 07. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/087183 2007. 12. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02008/073960 EN 2008. 08. 07

(73) 专利权人 赛托斯生物技术公司

地址 瑞士施利伦

(72) 发明人 B · S · 斯普罗特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 尚继栋

(51) Int. Cl.

C07H 21/02 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 17 页

序列表 4 页

(54) 发明名称

含有高浓度鸟嘌呤单体的寡核苷酸

(57) 摘要

本发明涉及寡核苷酸合成方法,特别是含有高含量鸟嘌呤单体的寡核苷酸的合成。更具体地,本发明涉及在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酸酰胺偶联至通用支持物、第一核苷或延伸的核苷酸上的方法。本发明进一步涉及可由本发明方法获得的寡核苷酸。

1. 在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至通用支持物、第一核苷或延伸的寡核苷酸上的方法,其中所述寡核苷酸包含具有 3 个或更多个连续鸟嘌呤单体的区域,所述方法包括以下步骤:

(i) 产生一种偶联溶液,其中所述偶联溶液包含:

(a) 至少一种第一溶剂,其中所述至少一种第一溶剂是极性非质子溶剂,且所述至少一种第一溶剂不是乙腈;

(b) 活化试剂;和

(c) 所述核苷亚磷酰胺;

其中在所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度至少为 0.03M;和

(ii) 将所述偶联溶液与所述通用支持物、所述第一核苷或所述延伸的寡核苷酸进行接触。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述至少一种第一溶剂选自:

(a) 环丁矾;

(b) 1- 甲基吡咯烷-2- 酮;

(c) N, N- 二甲基乙酰胺;

(d) 四甲基脲;和

(e) 二甲基亚砷。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述至少一种第一溶剂是环丁矾。

4. 权利要求 1 的方法,其中在所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度为 0.03 至 0.30M。

5. 权利要求 1 的方法,其中在所述偶联溶液中的所述活化试剂的浓度为 0.05 至 0.90M。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述偶联溶液进一步包含第二溶剂,其中所述第二溶剂是乙腈。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述偶联溶液由下述成分组成:

(a) 所述至少一种第一溶剂中的单一一种;

(b) 所述活化试剂;

(c) 所述核苷亚磷酰胺;和

(d) 第二溶剂,其中所述第二溶剂是乙腈。

8. 权利要求 6 的方法,其中所述至少一种第一溶剂与所述第二溶剂的比率 (v/v) 在 5 : 1 和 1 : 2 之间。

9. 权利要求 6 的方法,其中所述至少一种第一溶剂与所述第二溶剂的比率 (v/v) 是 1 : 1。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述第一核苷和 / 或所述延伸的核苷酸被固定在支持物上。

11. 权利要求 1 的方法,其中所述支持物是聚苯乙烯支持物,其中所述聚苯乙烯支持物由二乙烯基苯交联。

12. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸包含至少 30% 的鸟嘌呤单体。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述活化试剂选自:

- (a) 4,5- 二氰基咪唑 ;
  - (b) 5- 乙硫基 -1H- 四唑 ;
  - (c) 5- 苄硫基 -1H- 四唑 ;和
  - (d) 5-(3,5- 二 - 三氟甲基 ) 苯基 -1H- 四唑。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述活化试剂是 4,5- 二氰基咪唑。
15. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸包含具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续鸟嘌呤单体的第一区域。
16. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸包含具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续鸟嘌呤单体的第二区域。
17. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸包含具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续鸟嘌呤单体的第一区域,其中所述寡核苷酸包含具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续鸟嘌呤单体的第二区域,且其中所述第一区域定位于所述寡核苷酸的 3' 端和其中所述第二区域定位于所述寡核苷酸的 5' 端。
18. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸包含 10 至 50 个核苷酸单体。
19. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸包含回文序列,其中所述回文序列是 GACGATCGTC (SEQ ID NO :2)。
20. 权利要求 19 的方法,其中所述回文序列在其 5' 端侧翼为至少 4 个且至多 20 个鸟嘌呤实体 ;和 / 或其中所述回文序列在其 3' 端侧翼为至少 6 个且至多 20 个鸟嘌呤实体。
21. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸包含选自下组的核苷酸序列 :
- (a) GGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO :3) ;
  - (b) GGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO :4) ;
  - (c) GGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO :5) ;
  - (d) GGGGGGGACGATCGTCGGGGGG (SEQ ID NO :6) ;
  - (e) GGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGG (SEQ ID NO :7) ;
  - (f) GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGG (SEQ ID NO :8) ;
  - (g) GGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG (SEQ ID NO :9) ;
  - (h) GGGGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGGG (SEQ ID NO :10) ;和
  - (i) GGGGGGGCGACGACGATCGTCGTCGGGGGGG (SEQ ID NO :11)。
22. 权利要求 1 的方法,其中所述寡核苷酸由 SEQ ID NO :10 组成。
23. 一种产生寡核苷酸的方法,所述方法包括权利要求 1 至 22 中任一项的方法。
24. 一种产生寡核苷酸的方法,所述方法包括 :
- (i) 将核苷亚磷酸胺偶联至第一核苷上 ;其中所述偶联包括权利要求 1 至 22 中任一项的方法 ;
  - (ii) 通过氧化步骤 (i) 的产物产生延伸的寡核苷酸 ;
  - (iii) 在脱保护后将核苷亚磷酸胺偶联至步骤 (ii) 的产物上 ;其中所述偶联包括权利要求 1 至 22 中任一项的方法 ;
  - (iv) 通过氧化步骤 (iii) 的产物产生延伸的寡核苷酸 ;和
  - (v) 重复步骤 (iii) 和 (iv) 直至所述延伸的寡核苷酸包含所述寡核苷酸的序列。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述方法进一步包括在变性条件下纯化所述寡核苷酸的步骤,其中所述变性条件的特征在于 pH 10 至 14。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述纯化通过阴离子交换层析进行。

27. 权利要求 24 的方法,其中所述寡核苷酸以相对于所述第一核苷至少 20%的摩尔产率产生。

28. 权利要求 24 的方法,其中所述寡核苷酸的纯度至少为 75%。

## 含有高浓度鸟嘌呤单体的寡核苷酸

### [0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 根据 35 U.S.C. § 119(e), 本申请要求 2006 年 12 月 12 日申请的美国临时专利申请 No. 60/869, 588 的优先权。上述申请的整个教导在此引入作为参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及寡核苷酸合成方法, 特别是含有高含量鸟嘌呤单体的寡核苷酸的合成。更具体地, 本发明涉及一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至通用支持物、第一核苷或延伸的寡核苷酸上的方法。本发明进一步涉及可由本发明的方法获得的寡核苷酸。

### 背景技术

[0004] 化学合成的 DNAs 和 RNAs (“寡核苷酸”) 及其类似物在分子生物学应用中广泛使用。寡核苷酸合成方法的使用已经有 30 多年的历史了 (参见 Agarwal 等, Nature, 227:27-34(1970)), 当今最常用的寡核苷酸合成方法是通过亚磷酰胺化学法合成 (参见 McBride 等, Tetrahedron Lett., 24:245-248(1983))。

[0005] 亚磷酰胺合成典型地起始于 3' - 最远端核苷酸, 然后通过由四个重复步骤组成的一系列循环进行, 直到 5' - 最远端连接上去。然而, 通过在适当的构象里选择第一核苷和核苷亚磷酰胺, 普通技术人员可以从 5' - 3' 方向上建立亚磷酰胺合成方法。此处公开的方法适合于两个方向的合成, 其中 3' - 5' 方向的合成通常是优选的。

[0006] 这四个步骤是脱保护、偶联、加帽和稳定化 (一般地是氧化或硫化)。在一个变化形式中, 在脱保护步骤中, 连接在受体核苷酸的戊糖 5' - 碳上的三苯甲基基团在适当的溶剂如二氯甲烷或甲苯中用三氯乙酸 (TCA) 或二氯乙酸 (DCA) 移除, 剩下反应性羟基。下一个亚磷酰胺单位在偶联步骤中添加。使用诸如四唑 (一种弱酸) 的活化剂与偶联的核苷亚磷酰胺进行反应, 形成四唑基亚磷酰胺中间物。该中间物然后与受体的羟基发生反应从而形成 5' 至 3' 的连接。四唑再生并且该过程继续进行。偶联失败会产生在 5' 端仍然具有反应性羟基的寡核苷酸。为防止这些寡核苷酸对下一循环具有反应性 (将会产生缺失了一个核苷酸的寡核苷酸), 通过用乙酰化试剂如乙酸酐与 N- 甲基咪唑的混合物进行反向加帽, 将这些寡核苷酸从进一步的合成中移除。该试剂仅与游离羟基基团反应以给寡核苷酸加帽。在氧化步骤中, 正在延长的寡核苷酸和最新加入的核苷酸之间的亚磷酸酯连接得到稳定, 典型地是在四氢呋喃 (THF) 和水中含有碘作为温和氧化剂的情况下。水作为氧的供体且碘形成具有磷连接的加合物。加合物被水分解, 留下稳定的磷三酯键。

[0007] 为缩短合成时间且产生高产率的产物, 亚磷酰胺合成已有许多重大改进。开发出的修饰的亚磷酰胺单体仍需额外的修饰来用于合成。然而, 在合成某些寡核苷酸时仍然有很多问题。一个问题就是富含鸟嘌呤 (G) 的寡聚体的合成。具有富含 G 区域的寡核苷酸在许多应用中具有很好的前景。富含 G 的寡核苷酸通常折叠成复杂的结构, 这些结构在分子生物学和医学中十分有用。已经筛选出多种折叠成紧密包装的 4 链结构的适体配子

(例如凝血酶适配子)。核酸中的富含 G 的重复部分在某些具有多种生物作用的单价或二价金属离子存在下形成这些四链体(参见 Deng 等, PNAS(2001), 98, 13665-13670; Jin 等, PNAS(1992), 89, 8832-8836; 和 Lee, Nucleic Acids Research(1990), 18, 6057-6060)。

[0008] 在 DNA 的情况下, 这些富含 G 的序列的纯化最好通过阴离子交换纯化在 pH12 下进行, 此时胸腺嘧啶和鸟嘌呤酰胺官能团被离子化而不能参与结构形成。然而, 根据连续鸟嘌呤残基的数目, 高质量的合成是困难的, 这可能是由于偶联步骤中活化的亚磷酰胺对 5' 羟基基团的难接近性。

[0009] 在达到特定长度或碱基组成后, 支持物结合的保护的富含 G 的寡聚体发生一些凝集或在乙腈中具有溶解性问题, 这可能是 5' 羟基基团的难接近性的原因。此外, 这也与合成中使用的固相支持物的性质有关。因此, 亟需防止凝集或解决溶解性问题的溶剂或溶剂混合物。

[0010] 本发明提出的方法在偶联步骤中提供了替代的溶剂, 尤其是极性非质子溶剂, 以缓解富含鸟嘌呤单体的寡聚体的凝集或溶解性问题。

## 发明内容

[0011] 本发明提出的方法在偶联步骤中提供了替代的溶剂, 尤其是极性非质子溶剂, 来缓解富含鸟嘌呤单体的寡聚体的凝集或溶解性问题。可向乙腈中加入溶剂来为寡聚体, 尤其是含有高含量鸟嘌呤残基的寡聚体, 提供更好的溶解性。

[0012] 发明详述

[0013] 本发明提出的方法在偶联步骤中提供了替代的溶剂, 尤其是极性非质子溶剂, 来缓解富含鸟嘌呤单体的寡聚体的凝集或溶解性问题。此处公开的极性非质子溶剂可单独使用, 可互相组合使用, 优选地, 与乙腈组合使用。极性非质子溶剂可加入到乙腈中来为寡聚体, 尤其是具有高含量鸟嘌呤残基的寡聚体, 提供更好的溶解性。此外, 此处公开的溶剂和溶剂混合物能够提供核苷亚磷酰胺在偶联溶液中的高溶解度, 其中优选地所述溶解度至少为 0.03M。在一个实施方式中, 在偶联步骤中将溶剂加至乙腈、单体和活化剂的混合物中。溶剂与乙腈的比率可变。亚磷酰胺单体可为常规单体或修饰的单体。在一个实施方式中, 鸟嘌呤单体可为具有酸不稳定封闭基团或亲脂性 5' -O- 封闭基团用于最终 dG 偶联的修饰的鸟嘌呤单体。在一个实施方式中, 使用的 dG 单体是具有三异丙基甲硅烷基封闭基团的 N2- 异丁酰 -2' - 脱氧鸟苷 3' -O- 亚磷酰胺。

[0014] 本发明提出的方法可用含有已知核苷单体以及修饰的核苷单体的寡核苷酸来进行。该方法可用于 DNA 合成或 RNA 合成。与常规的基于阴离子交换 HPLC 的纯化方法相比, 本发明提出的方法也能够进行较大规模的生产。

[0015] 术语“富含 G”或“富含鸟嘌呤”是指具有高浓度鸟嘌呤单体的寡核苷酸。在一个实施方式中, 鸟嘌呤残基浓度大到足以阻碍或降低寡核苷酸的溶解性的程度, 由此使合成变得困难并且降低目标产物的产率或纯度。

[0016] 术语“寡核苷酸”是指合成的 RNA 或 DNA 聚合物和它们的类似物, 并且与“寡聚体”和“核酸”可交换使用。

[0017] 确定寡核苷酸合成产率的方法和确定寡核苷酸纯度的方法在本领域众所周知。当提及本发明的方法的产率时, 该产率典型地且优选地基本如实施例 7 中所述来确定。类似

地,当提及一种寡核苷酸的纯度时,该纯度典型地且优选地基本如实施例 7 中所述来确定。

[0018] 在一个方面,本发明提供一种在合成寡核苷酸过程中偶联核苷亚磷酰胺的方法,该方法包括将活化试剂与一种或多种极性非质子溶剂组合形成偶联混合物。在一个优选的实施方式中,该极性非质子溶剂是环丁酮。在一个进一步优选的实施方式中,该极性非质子溶剂是 1- 甲基吡咯烷 -2- 酮。在一个进一步优选的实施方式中,该极性非质子溶剂是 N, N- 二甲基乙酰胺。在一个进一步优选的实施方式中,该极性非质子溶剂是四甲基脲。在一个进一步优选的实施方式中,该活化试剂和该极性非质子溶剂与乙腈组合。在一个进一步优选的实施方式中,该寡核苷酸由大于 30% 的鸟嘌呤单体组成。在一个进一步优选的实施方式中,该寡核苷酸由大于 50% 的鸟嘌呤单体组成。在一个进一步优选的实施方式中,该寡核苷酸由大于 60% 的鸟嘌呤单体组成。在一个进一步优选的实施方式中,该寡核苷酸含有一个具有 3 个或更多连续鸟嘌呤单体的区域。在一个进一步优选的实施方式中,该寡核苷酸含有一个具有 4 个或更多连续鸟嘌呤单体的区域。在一个进一步优选的实施方式中,该寡核苷酸含有一个具有 5 个或更多连续鸟嘌呤单体的区域。在一个进一步优选的实施方式中,该寡核苷酸是 SEQ ID NO :10。

[0019] 此处描述的偶联反应可用于在合成寡核苷酸过程中核苷亚磷酰胺与通用支持物的起始偶联。本领域中通常使用的此类通用支持物典型地以及优选地包含琥珀酸酯连接体。此外,此处描述的偶联反应可用于在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至第一核苷上,其中该第一核苷可为游离的,或优选地,其中该第一核苷被固定在支持物上。此外,此处描述的偶联反应可用于在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至延伸的寡核苷酸上。

[0020] 因此,在另一方面,本发明涉及一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至通用支持物、第一核苷或延伸的寡核苷酸上的方法,该方法包括以下步骤:(i) 产生一种偶联溶液,其中该偶联溶液包含:(a) 至少一种第一溶剂,其中所述至少一种第一溶剂是极性非质子溶剂,并且所述至少一种第一溶剂不是乙腈;(b) 活化试剂;和(c) 所述核苷亚磷酰胺;其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度至少是 0.03M;其中优选地所述偶联溶液中的所述活化试剂的浓度至少是 0.05M;和(ii) 将所述偶联溶液与所述通用支持物、与所述第一核苷或与所述延伸的寡核苷酸接触。在另一个方面,本发明涉及一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至第一核苷或延伸的寡核苷酸上的方法,该方法包括以下步骤:(i) 产生一种偶联溶液,其中该偶联溶液包含:(a) 至少一种第一溶剂,其中所述至少一种第一溶剂是极性非质子溶剂,并且其中所述至少一种第一溶剂不是乙腈;(b) 活化试剂;和(c) 所述核苷亚磷酰胺;其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度至少是 0.03M;其中优选地所述偶联溶液中的所述活化试剂的浓度至少是 0.05M;和(ii) 将所述偶联溶液与所述第一核苷、或与所述延伸的寡核苷酸接触。

[0021] 在一个优选的实施方式中,所述第一溶剂不是选自下组的溶剂:(a) 琥珀腈,(b) 戊二腈,(c) 己二腈,(d) 庚二腈,(e) 戊腈,(f) 苄腈,(g) 己腈。在一个进一步优选的实施方式中,所述第一溶剂不是选自下组的溶剂:(a) 二腈,(b) 单腈,(c) 甘醇二甲醚,(d) 二甘醇二甲醚,(e) 三甘醇二甲醚,(f) 磷酸三甲酯,(g) 二氯甲烷,(h) 四氢呋喃,(i) 二甲氧基乙烷,和(j) 硝基甲烷。在进一步优选的实施方式中,所述极性非质子溶剂是偶极非质子溶剂。

[0022] 在另一个方面,本发明涉及一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酸胺偶联至通用支持物、第一核苷或延伸的寡核苷酸上的方法,该方法包括以下步骤:(i)产生一种偶联溶液,其中该偶联溶液包含:(a)至少一种第一溶剂,其中所述至少一种第一溶剂是极性非质子溶剂;(b)活化试剂;和(c)所述核苷亚磷酸胺;和(d)第二溶剂,其中所述第二溶剂与所述至少一种第一溶剂中的任何一种在化学上不同,并且其中优选地所述第二溶剂是乙腈;其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酸胺的浓度至少是0.03M;和(ii)将所述偶联溶液与所述通用支持物、与所述第一核苷、或与所述延伸的寡核苷酸接触。

[0023] 在一个进一步优选的实施方式中,所述至少一种第一溶剂选自:(a)环丁砜;(b)1-甲基吡咯烷-2-酮;(c)N,N-二甲基乙酰胺;(d)四甲基脲;和(e)二甲基亚砜(DMSO);其中优选地所述至少一种第一溶剂选自:(a)环丁砜;(b)1-甲基吡咯烷-2-酮;(c)N,N-二甲基乙酰胺;和(d)四甲基脲。在一个非常优选的实施方式中,所述至少一种第一溶剂是环丁砜。

[0024] 前述任一项的方法,其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酸胺的浓度是0.03至0.3M,优选0.03至0.20M,最优选0.05至0.15M。

[0025] 在一个进一步优选的实施方式中,所述偶联溶液中所述活化试剂的浓度是0.05至0.90M,优选0.25至0.50M,最优选0.30至0.5M。在一个进一步优选的实施方式中,所述偶联溶液包含所述至少一种第一溶剂中的单一一种。

[0026] 在一个进一步优选的实施方式中,所述偶联溶液由以下组分组成:(a)所述至少一种第一溶剂中的单一一种;(b)所述活化试剂;和(c)所述核苷亚磷酸胺。

[0027] 在一个进一步优选的实施方式中,所述偶联溶液进一步包含第二溶剂,其中优选地所述第二溶剂是一种弱碱性溶剂。在一个非常优选的实施方式中,所述第二溶剂是乙腈。

[0028] 对于技术人员来说显而易见的,所述第一溶剂和/或所述第二溶剂优选地以无水的形式提供,以利于本发明的化学反应,尤其是所述核苷亚磷酸胺与所述通用支持物、所述第一核苷、或所述延伸的寡核苷酸的所述偶联。

[0029] 在一个进一步优选的实施方式中,所述偶联溶液包含或优选地由下述组分组成:(a)所述至少一种第一溶剂中的单一一种;(b)所述活化试剂;(c)所述核苷亚磷酸胺;和(d)第二溶剂,其中优选地所述第二溶剂是乙腈。

[0030] 在一个进一步优选的实施方式中,所述至少一种第一溶剂与所述第二溶剂的比率(v/v)处于5:1和1:2之间,优选地在4:1和1:2之间,更优选地在3:1和2:5之间,又更优选地在2:1和2:5之间,又更优选地在2:1和1:1之间。

[0031] 在一个进一步优选的实施方式中,所述至少一种第一溶剂与所述第二溶剂的比率(v/v)是5:1、4:1、3:1、2:1、1:1或1:2;其中优选地所述比率大约是1:1,其中更优选地该比率是1:1。

[0032] 在一个进一步优选的实施方式中,所述第一核苷和/或所述延伸的寡核苷酸被固定于支持物上,其中优选地所述支持物选自(a)聚苯乙烯支持物;和(b)二氧化硅支持物,优选可控孔度玻璃(CPG)支持物。

[0033] 在一个进一步优选的实施方式中,所述支持物是聚苯乙烯支持物,其中优选地所述聚苯乙烯支持物由二乙烯基苯交联,其中进一步优选地所述聚苯乙烯支持物的特征是具有功能性羟基基团;以及其中更进一步优选地所述聚苯乙烯支持物具有大约90 μm的平均

颗粒大小。

[0034] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含至少 30%,优选地至少 40%,更优选地至少 50%,又更优选地至少 60%,又更优选地至少 70%,最优选地至少 75% 的鸟嘌呤单体。

[0035] 在一个进一步优选的实施方式中,所述活化试剂选自:(a)4,5-二氰基咪唑(DCI);(b)5-乙硫基-1H-四唑(ETT);(c)5-苄硫基-1H-四唑(BTT);和(d)5-(3,5-二-三氟甲基)苯基-1H-四唑(活化剂 42)。在一个非常优选的实施方式中,所述活化试剂是 4,5-二氰基咪唑(DCI)。

[0036] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含一个具有 3 个或更多,优选地 4 个或更多,最优选地 5 个或更多连续鸟嘌呤单体的区域。

[0037] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含一个具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续鸟嘌呤单体的第一区域。

[0038] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含一个具有 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个连续鸟嘌呤单体的第二区域。

[0039] 在一个进一步优选的实施方式中,所述第一区域定位于所述寡核苷酸的 3' 端和 / 或其中所述第二区域定位于所述寡核苷酸的 5' 端。

[0040] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含 10 至 50 个,优选地 20 至 40 个,最优选地 30 个核苷酸单体。

[0041] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含回文序列,其中优选地所述回文序列是 GACGATCGTC(SEQ ID NO:2)。

[0042] 在一个进一步优选的实施方式中,所述回文序列的 5' 端侧翼为至少 4 个和至多 20 个,优选地至多 10 个鸟嘌呤实体(entity);和 / 或其中所述回文序列的 3' 端侧翼为至少 6 个和至多 20 个,优选地至多 10 个鸟嘌呤实体。

[0043] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含或优选地由选自下组的核苷酸序列组成:(a)GGGGACGATC GTCGGGGGG(SEQ ID NO:3);(b)GGGGGACGAT CGTCGGGGGG(SEQ ID NO:4);(c)GGGGGACGATCGTCGGGGGG(SEQ ID NO:5);(d)GGGGGGACG ATCGTCGGGG GG(SEQ ID NO:6);(e)GGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG(SEQ ID NO:7);(f)GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG(SEQ ID NO:8);(g)GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG(SEQ ID NO:9);(h)GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG(SEQ ID NO:10);和(i)GGGGGGCG ACGACGAT CGTCGTCG GGGGGG(SEQ IDNO:11)。在一个非常优选的实施方式中,所述寡核苷酸包含或优选地由 SEQ ID NO:10 组成。

[0044] 在一个进一步优选的实施方式中,所述寡核苷酸是一种脱氧核苷酸,以及其中优选地所述脱氧核苷酸只由磷酸二酯结合的单体组成。

[0045] 在另外一个方面,本发明涉及一种产生寡核苷酸的方法,所述方法包括此处所述的任何一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至通用支持物、第一核苷、或延伸的寡核苷酸上的方法。

[0046] 在另一个方面,本发明涉及一种产生寡核苷酸的方法,所述方法包括:(i)将核苷亚磷酰胺偶联至第一核苷上;其中所述偶联包括此处描述的任何一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至第一核苷上的方法;(ii)通过氧化步骤(i)的产物生成延伸的寡

核苷酸；(iii) 将核苷亚磷酰胺至步骤 (ii) 的产物上，典型地和优选地在脱保护之后；其中所述偶联包括此处描述的任何一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至延伸的寡核苷酸上的方法；(iv) 通过氧化步骤 (iii) 的产物生成延伸的寡核苷酸；和 (v) 重复步骤 (iii) 和 (iv) 直至所述延伸的寡核苷酸包含所述寡核苷酸的序列。

[0047] 在一个优选的实施方式中，所述方法进一步包括在变性条件下纯化所述寡核苷酸的步骤，其中优选地所述变性条件的特征在于 pH10 至 14，优选 pH10 至 13，更优选 pH 大约为 12，最优选为 pH12。

[0048] 在一个进一步优选的实施方式中，所述方法进一步包括在 pH10 至 14 下，优选地在 pH10 至 13 下，更优选地在 pH 大约 12 下，最优选地在 pH12 下纯化所述寡核苷酸的步骤。

[0049] 在一个进一步优选的实施方式中，所述纯化通过阴离子交换层析进行，其中优选地所述阴离子交换层析通过使用被季胺基团功能化的阴离子交换基质来进行，其中进一步优选地所述阴离子交换基质由选自聚苯乙烯和聚丙烯酸甲酯的材料组成，其中更进一步优选地所述材料是聚丙烯酸甲酯。

[0050] 在一个进一步优选的实施方式中，所述寡核苷酸以相对于所述第一核苷至少 20%，优选至少 25%，更优选至少 30%，又更优选至少 35%，最优选至少 40% 的摩尔产率产生。

[0051] 在一个进一步优选的实施方式中，所述寡核苷酸的纯度至少是 75%，优选地至少 80%，更优选地至少 85%，又更优选地至少 90%，最优选地至少 95%。

[0052] 在另外一个方面，本发明涉及偶联溶液在用于将核苷亚磷酰胺偶联至核苷或延伸的寡核苷酸上的方法中的应用，其中所述偶联溶液包含：(a) 至少一种第一溶剂，其中所述至少一种第一溶剂是极性非质子溶剂，以及其中所述至少一种第一溶剂不是乙腈；(b) 活化试剂；和 (c) 所述核苷亚磷酰胺；其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度至少是 0.03M；以及其中优选地所述偶联溶液中的所述活化试剂的浓度至少是 0.05M。在一个优选的实施方式中，所述方法的特征进一步在于此处所述的在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至第一核苷或延伸的寡核苷酸上的任一种方法的特征。

[0053] 在另外一个方面，本发明涉及一种用于在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至通用支持物、第一核苷、或延伸的核苷酸上的偶联溶液，其中所述偶联溶液包含：(a) 至少一种第一溶剂，其中所述至少一种第一溶剂是极性非质子溶剂，以及其中所述至少一种第一溶剂不是乙腈，以及其中优选地所述极性非质子溶剂不是己二腈；(b) 活化试剂；和 (c) 所述核苷亚磷酰胺；其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度至少是 0.03M；以及其中优选地所述偶联溶液中的所述活化试剂的浓度至少是 0.05M。在一个优选的实施方式中，所述方法的特征进一步在于此处公开的任一种方法的特征。在一个优选的实施方式中，所述偶联溶液的特征在于此处公开的任何一种特征及任何可能的组合。

[0054] 一个非常优选的实施方式是包含或优选地由下述组分组成的偶联溶液：(a) 单一一种第一溶剂，其中所述单一一种第一溶剂是一种极性非质子溶剂，以及其中所述单一一种第一溶剂选自：(i) 环丁酮；(ii) 1-甲基吡咯烷-2-酮；(iii) N, N-二甲基乙酰胺；(iv) 四甲基脲；和 (v) 二甲基亚砷 (DMSO)；以及其中优选地所述单一一种第一溶剂是环丁酮；(b) 活化试剂；(c) 所述核苷亚磷酰胺；和 (d) 第二溶剂，其中所述第二溶剂是乙腈；其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度至少是 0.03M；其中所述单一一种第一溶剂

与所述第二溶剂的比率 (v/v) 在 5 : 1 和 1 : 2 之间, 优选地所述比率是 1 : 1。

[0055] 在另外一个方面, 本发明涉及可由此处公开方法中的任一方法获得的寡核苷酸, 尤其是可由此处公开的任一产生寡核苷酸的方法获得的寡核苷酸。

[0056] 在一个优选的实施方式中, 所述寡核苷酸包含或优选地由选自下组的核苷酸序列组成: (a) GGGGACGATC GTCGGGGGG (SEQ ID NO :3); (b) GGGGGACGAT CGTCGGGGGG (SEQ ID NO :4); (c) GGGGGGACGA TCGTCGGGG G (SEQ ID NO :5); (d) GGGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEQ ID NO :6); (e) GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEQ ID NO :7); (f) GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEQ ID NO :8); (g) GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEQ ID NO :9); (h) GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEQ ID NO :10); 和 (i) GGGGGGCGAC GACGATCGTC GTCGGGGGGG (SEQ ID NO :11)。在一个非常优选的实施方式中, 所述寡核苷酸由 SEQ ID NO :10 组成。

[0057] 在另外一个方面, 本发明涉及包含或优选地由选自下组的核苷酸序列组成的寡核苷酸: (a) GGGGACGATC GTCGGGGGG (SEQ ID NO :3); (b) GGGGGACGAT CGTCGGGGGG (SEQ ID NO :4); (c) GGGGGGACGA TCGTCGGGG G (SEQ ID NO :5); (d) GGGGGGGACG ATCGTCGGGG GG (SEQ ID NO :6); (e) GGGGGGGGAC GATCGTCGGG GGGG (SEQ ID NO :7); (f) GGGGGGGGGA CGATCGTCGG GGGGGG (SEQ ID NO :8); (g) GGGGGGGGGG ACGATCGTCG GGGGGGGG (SEQ ID NO :9); (h) GGGGGGGGGG GACGATCGTC GGGGGGGGGG (SEQ ID NO :10); 和 (i) GGGGGGCGAC GACGATCGTC GTCGGGGGGG (SEQ ID NO :11); 其中所述寡核苷酸的纯度至少是 75%, 优选地至少 80%, 更优选地至少 85%, 又更优选地至少 90%, 最优选地至少 95%。在一个非常优选的实施方式中, 所述寡核苷酸由 SEQ ID NO :10 组成。

[0058] 此处公开的方法非常适合于寡核苷酸的大规模合成, 尤其是富含 G 的寡核苷酸, 例如, 侧翼为 poly-G 的含非甲基化 CpG 的寡核苷酸。此类化合物可用于制药应用中。例如, 它们是免疫系统的众所周知的刺激物。因此, 在另外一个方面, 本发明涉及本发明的寡核苷酸在制药和 / 或制备疫苗中的应用。

[0059] 在另外一个方面, 本发明涉及一种在合成寡核苷酸过程中将核苷亚磷酰胺偶联至通用支持物、第一核苷、或延伸的寡核苷酸上的方法, 该方法包括以下步骤: (i) 产生一种偶联溶液, 其中该偶联溶液包含: (a) 至少一种第一溶剂, 其中所述至少一种第一溶剂是极性非质子溶剂, 以及其中所述至少一种第一溶剂不是乙腈; (b) 活化试剂; 和 (c) 所述核苷亚磷酰胺; 其中所述偶联溶液中的所述核苷亚磷酰胺的浓度至少是 0.03M; 以及其中优选地所述偶联溶液中的所述活化试剂的浓度至少是 0.05M; 和 (ii) 将所述偶联溶液与所述通用支持物、与所述第一核苷、或与所述延伸的寡核苷酸接触。在一个优选的实施方式中, 所述第一溶剂不是己二腈。

[0060] 此处引用的所有参考文献, 包括出版物、专利申请和专利均引入本文作为参考, 如同每篇参考文献被单独地和具体地引入作为参考以及完整地进行阐述。

[0061] 描述本发明的上下文 (特别是在下述权利要求的上下文) 中使用的术语“一个”和“一种”和类似的用语应当理解为同时涵盖单数和复数形式, 除非此处另外指出或者根据上下文清楚地确定不是这样。除非另外指出, 术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应当理解为开放式的术语 (即, 意思是“包括, 但不限于”)。此处对数值范围的叙述只是作为个别地提到落在该范围内的每个单独数值的简略方法, 除非此处另有它指, 而且每个单独的

数值均被引入到说明书中,就像它被此处单独提到一样。此处描述的所有方法可以按照任何适当的次序进行,除非此处另外指出或由上下文清楚地看出不是这样。任何和所有实例的使用,或此处提出的示例性语言(例如,“例如”),只是用来更好地阐明本发明,而非对本发明的范围进行限制,除非另有声明。说明书中的语言均不应理解为将任何不要求保护的元素指为实施本发明的必要元素。

[0062] 此处描述了本发明优选的实施方式,包括发明人已知的本发明的最佳实施方式。在阅读了前面的描述后,本领域普通技术人员应当明了这些优选实施方式的变化。发明人预期熟练技术人员会适当地采用这些变化,并且发明人想到了将会以此处具体描述的方式之外的方式实施的发明。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括所附权利要求书所述的主题的所有变化和等同形式。此外,上述元素在其所有可能的变化中的任何组合均涵盖在本发明中,除非此处另外指出或由上下文清楚地确定不是这样。

[0063] 下述实施例进一步阐明了本发明,但是,当然不应理解为以任何形式限制其范围。

[0064] 实施例 1

[0065] 该实施例描述了经过寡聚物合成相容性测试的溶剂。下述溶剂经过了测试。

[0066] 1-甲基吡咯烷-2-酮(NMP)-MW 99.13;密度 1.032g/ml;粘度 1.67cP;偶极距 4.09D。肽合成级来自于 Fluka(目录号 69116;批号和填充码 1059178,21504055)。由 GC 测得的纯度 $\geq 99.5\%$ ,含水量 $\leq 0.02\%$ 。

[0067] N,N-二甲基乙酰胺(DMA)-MW 87.12;密度 0.942g/ml;20℃时的粘度 1.02cP;偶极距 3.79D。puriss 级来自于 Fluka(目录号 38840;批号和填充码 454936/1,40504059)。由 GC 测得的纯度 $\geq 99.5\%$ 。

[0068] 四甲基脲(TMU)-MW 116.16;密度 0.968g/ml。BioChemika 级来自于 Fluka(目录号 87849;批号和填充码 1063403,30205010)。由 GC 测得的纯度 $\geq 99.5\%$ 。使用前该材料在 4 埃分子筛上干燥 48h。

[0069] 二甲基亚砜(DMSO)-MW 78.13;密度 1.100g/ml;20℃时的粘度 1.996cP;偶极距 3.96D。经过分子筛的纯 Puriss. 来自于 Fluka(目录号 41647,批号和填充码 1073729,22404456)。由 GC 测得的纯度 $\geq 99.5\%$ ,含水量 $\leq 0.005\%$ 。

[0070] 环丁砜-MW 120.17;密度 1.293g/ml;30℃时的粘度 10.30cP;偶极距 4.8D。Puriss. 级来自于 Fluka(目录号 86148,批号和填充码 1181025,42306336)。由 GC 测得的纯度 $\geq 99.5\%$ 。使用前该材料首先在 35℃炉中液化,然后在 4 埃分子筛上干燥 48h。

[0071] 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFIP)-MW 168.04;密度 1.596g/ml。紫外光谱级来自于 Apollo Scientific(目录号 PC 0877,批号 BNOHFIP-05-14)。HFIP 是一种常用来溶解肽的极性羟基溶剂,因此包括其作为对照。

[0072] 实施例 2

[0073] 下述实施例证明了单体和 5-苄硫基四唑(BTT)在乙腈和实施例 1 的溶剂的 1:1 体积比混合物中的溶解性。

[0074] BTT(MW 192.2,含水量 $\leq 75\text{ppm}$ )由 emp Biotech GmbH(目录号 NC-0101-1K,批号 050904)公司提供。dT(MW 744.83)、dG<sup>ibu</sup>(MW 839.92)、dA<sup>bz</sup>(MW 857.93)、dC<sup>bz</sup>(MW 833.93)单体由 ProLigo 提供。乙腈(MeCN)在 25℃时具有 0.345cP 的粘度和 3.92D 的偶极距。

[0075] 将 74.5mg(100  $\mu\text{mol}$ )的 dT 单体称重后分别装进 7 个上部为螺旋帽盖的 10ml 瓶

子内。将 84mg(100  $\mu$  mol) 的 dG<sup>ibu</sup> 单体称重后分别装进 7 个上部为螺旋帽盖的 10ml 瓶子内。将 86mg(100  $\mu$  mol) 的 dA<sup>bz</sup> 单体称重后分别装进 7 个上部为螺旋帽盖的 10ml 瓶子内。将 83mg(100  $\mu$  mol) 的 dC<sup>bz</sup> 单体称重后分别装进 7 个上部为螺旋帽盖的 10ml 瓶子内。将 228mg(1.2mmol) 的 BTT 称重后分别装进 7 个上部为螺旋帽盖的 10ml 瓶子内。

[0076] 在氩气环境下于单独的干燥瓶子内通过混合 10ml 无水乙腈和 10ml 上述所列的六种不同溶剂中的一种溶剂,来制备六种不同溶剂混合物。

[0077] 向每个单独的 T 单体瓶子中加入 1ml 六种不同溶剂混合物中的一种或仅加入乙腈。迅速盖上瓶子并柔和振荡。对于 dG、dA 和 dC 单体的瓶子重复同样的步骤。所有单体在所有这 7 种溶剂混合物中相当快速地溶解(在 10min 之内, MeCN/ 环丁砜溶解略慢),浓度为 0.1M,这是在标准合成仪上使用所需的浓度。得到清澈无色的溶液。

[0078] 向每个单独的 BTT 瓶子中加入 4ml 六种溶剂混合物中的一种。除 HFIP/MeCN 的溶解外所有几乎都立刻溶解达到 0.3M 的浓度,这是 DNA 和 RNA 合成的典型标准浓度。将 BTT 加入至纯乙腈中,其溶解不象在实施例 1 的六种溶剂中溶解的那么快。需要温和的加热过程来达到在纯乙腈中的快速溶解。

[0079] 所有 4 种标准的被保护的 DNA 单体在乙腈和 NMP、DMA、TMU、DMSO 及环丁砜的 1 : 1 混合物中都能迅速溶解成 0.1M 浓度。BTT 在所有 5 种混合物中溶解成 0.3M。

[0080] 实施例 3

[0081] 下述实施例证明了单体在溶剂溶液中经过 48h 后的稳定性。为检查单体在不同溶剂混合物中的稳定性,在室温静置 48h 后,对于 28 种单体溶液各取 1  $\mu$  l 来进行硅胶 tlc 分析。显然显示出的任何可见的不稳定性意味着那种特定溶剂组合不适用于合成仪上的 DNA 合成。针对这个目的选择了含 3% 三乙胺的乙酸乙酯 /1,2- 二氯乙烷 (1 : 2v/v) 作为洗脱剂。除在 MeCN/HFIP 中的溶液(全是淡黄色,可能是由于脱三苯甲基化和降解)之外的所有单体溶液仍是无色的。用于 tlc 的铝卡上的具有荧光指示剂 254nm 的硅胶来自于 Fluka(目录号 60778,批号 503 066)。

[0082] 对于 6 种相关溶剂混合物中的各种单体观察到下述斑点。正如大致所预期的,溶剂混合物 MeCN/HFIP 导致所有 4 种单体完全降解,在 tlc 上具有多个斑点,其 R<sub>f</sub>s 从 0 至 0.21。结果列于表 1 中。

[0083] 表 1. 硅胶 tlc 分析结果

[0084]

| 溶剂   | R <sub>f</sub> -dA | R <sub>f</sub> -dG | R <sub>f</sub> -dC | R <sub>f</sub> -dT |
|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| NMP  | 0.48, 0.43         | 0.41               | 0.41               | 0.47, 0.42         |
| DMA  | 0.47, 0.43         | 0.40               | 0.43               | 0.47, 0.43         |
| TMU  | 0.49, 0.46         | 0.46               | 0.46               | 0.52, 0.49         |
| DMSO | 0.39, 0.34         | 0.35, 0.30         | 0.39, 0.34         | 0.47, 0.41         |
| 环丁砜  | 0.46               | 0.40, 0.23         | 0.42               | 0.49               |

[0085] 相对于在 NMP 和 DMA 中的值,在 TMU 的情况中 tlc 斑点具有略微增加的  $R_f$ s。在 DMSO 中  $R_f$ s 有一些降低。在大多数情况下都观测到了非对映异构体。在 NMP、DMA、TMU 和 DMSO 中也观测到了非常非常淡的杂质斑点。对于 dC<sup>bz</sup> 单体在环丁砜中的情况,观测到了淡的杂质斑点,  $R_f$  为 0.27。

[0086] 在溶液中室温 48h 后,所有 4 种标准的被保护的 DNA 单体呈现非常少的降解 / 无降解。所有 5 种混合物似乎都适合进行含有寡聚 dG 的序列的小规模合成。

[0087] 实施例 4

[0088] 下述实施例证明了当在 ABI 394DNA/RNA 合成仪 (AppliedBiosystems) 上合成富含 G 的寡核苷酸过程中用于偶联步骤时实施例 1 的溶剂的应用。选用了下述富含鸟嘌呤的寡核苷酸来合成。SEQ ID NO:1d[GGGGGGGGGG]

[0089] 表 2 给出了允许相对于纯乙腈的粘度变化的计算出的运送因数。

[0090] 表 2. 替代溶剂的流速因数

[0091]

| 溶剂        | 因数   |
|-----------|------|
| MeCN      | 1    |
| NMP/MeCN  | 1.74 |
| DMA/MeCN  | 1.33 |
| TMU/MeCN  | 1.42 |
| DMSO/MeCN | 2.61 |
| 环丁砜 /MeCN | 2.41 |

[0092] 调节 ABI 394 合成仪上的循环参数。对于 1  $\mu$ mol 规模的 DNA 合成使用第 20 号循环,其相关单体和单体 +tet 运送时间秒数列于下表内。5 种不同 1 : 1 溶剂混合物的修正运送时间也显示在表 3 中。

[0093] 表 3. ABI 394 合成仪的循环参数的调节

[0094]

| 步骤 | 功能       | MeCN | NMP | DMA | TMU | DMSO | 环丁砜 |
|----|----------|------|-----|-----|-----|------|-----|
| 9  | Tet 至废物  | 1.7  | 3.0 | 2.3 | 2.4 | 4.4  | 4.1 |
| 10 | B+tet 至柱 | 2.5  | 4.4 | 3.3 | 3.6 | 6.5  | 6.0 |
| 11 | tet 至柱   | 1.0  | 1.7 | 1.3 | 1.4 | 2.6  | 2.4 |
| 12 | B+tet 至柱 | 2.5  | 4.4 | 3.3 | 3.6 | 6.5  | 6.0 |

[0095] 在 ABI 394-08 上使用了下述合成参数。使用纯乙腈作为缩合步骤的溶剂,以及每

个 NMP、DMA、TMU、DMSO 及环丁砜与乙腈的 1 : 1 混合物,在可控孔度玻璃 (CPG) 和聚苯乙烯 (PS) 支持物上进行  $1\ \mu\text{mol}$  规模的  $(\text{dG})_{10}$  的去除三苯甲基的合成。使用了 DNA 合成循环 20,包括下面五个步骤:(1) 用 DCA 在 1,2- 二氯乙烷 (DCE) 中的 5% 溶液脱三苯甲基反应 75sec;(2) 与 0.5M DCI 加 0.1M dG 单体在适当溶剂混合物中偶联 5min;(3) 用 tac 酐 /MeCN 加帽 1min;(4) 用吡啶 / 水 (9 : 1v/v) 中的 50mM  $\text{I}_2$  氧化 1min;和 (5) 加帽 5sec。“tet 至废物”、“B+tet 至柱”和“tet 至柱”的运送时间按照上表对不同溶剂混合物进行调节。

[0096] CPG dG(tac)500A 支持物由 SAFC Proligo(产品号 G302001, bulkno. 5452, 批号 223460) 提供,且具有  $35\ \mu\text{mol/g}$  的载量。因此,28.6mg 等价于  $1\ \mu\text{mol}$ 。以  $79\ \mu\text{mol/g}$  装载的  $\text{dG}^{\text{ibu}}$  80S 聚苯乙烯支持物从 GEHealthcare 获得,订单号 17-5252-82,批号 1503095,瓶 12。12.7mg 等价于  $1\ \mu\text{mol}$ 。4,5- 二氰基咪唑 (DCI) 从 SAFC Proligo 获得(产品号 M700100,批号 231206) 提供。分子量为 118.1。0.5M 溶液为 2.95g 干燥 DCI 溶于 50ml 乙腈或其他溶剂中。 $\text{dG}^{\text{ibu}}$  单体来自于 SAFC Proligo(产品号 G 111010-01,批号 230394,瓶 17)。分子量为 839.92。5ml 0.1M 的溶液需要 420mg。由 GC 测定为 99.8% 的极干燥的二氯乙烷来自于 Acros Organics(产品编码 326840010,批号 A0208016)。用于氧化的 50mM 碘溶液来自于 Biosolve(目录号 15072402,批号 455001)。二氯乙酸 (DCA) 来自于 Fluka,目录号 35810,批号 S3631812306B 12。Cap B ACN 来自于 SAFC Proligo,目录号 LB50250,批号 16673。Cap 2 CAN 来自于 SAFC Proligo,目录号 LR50250,批号 16950。

[0097] 将 420mg 的  $\text{dG}^{\text{ibu}}$  单体置入六个单独的 ABI 10ml 亚酰胺 (amidite) 瓶的每一个中并且在  $\text{P}_2\text{O}_5$  和 KOH 块上过夜真空干燥。用氩气释放真空并将每个单体溶解于一种溶剂混合物中。称重 2.95g 等份的 DCI 至六个 250ml ABI 瓶中并真空干燥。每份 DCI 溶解于 6 种不同溶剂 (5 种混合物加 1 个纯乙腈) 之一中。

[0098] 六个 ABI 快速 (snap) 柱充填以 28.6mg dG(tac)-CPG 且 6 个柱充填以 12.7mg  $\text{dG}^{\text{ibu}}$  80S 聚苯乙烯支持物。在用于固相合成前,PS 支持物在乙腈中膨胀 10min。

[0099] 在每个合成开始前使用 ABI 启动方案,以确保所有运送管道被新鲜试剂充满。三苯甲基颜色与成功偶联相对应。

[0100] 所有 12 个支持物在密封良好的螺旋盖玻璃瓶中在 3ml 40wt. % 甲胺水溶液 (Aldrich, 目录号 42,646-6,批号 S23322-405) 中  $65^\circ\text{C}$  脱保护 2.5h。冷却后,将上清液过滤至 Falcon 试管中且每个支持物用 3ml 20% 乙醇水溶液洗涤。过滤洗涤物并且与相应的过滤物合并。样品然后在 Speedvac 中真空浓缩至大约 2ml。每个样品用纯水稀释至 5ml 的总体积。

[0101] 为确定每个样品在 260nm 的总 ODs,每个样品取  $50\ \mu\text{l}$  的小份用 1M Tris HCl 缓冲液 pH7.6 (用于分子生物学的 FlukaBioChemika Ultra 级,目录号 93314,批号和填充码 118896054605275) 稀释至 1ml。每个溶液用 1cm 光路长度的一次性比色杯 (Plastibrand, 1.5ml semi-micro, 目录号 759150) 来测量  $A_{260\text{nm}}$ 。表 4 显示了每个合成的校正的粗 ODs/ $\mu\text{mol}$ 。

[0102] 表 4. 溶剂合成的 ODs/ $\mu\text{mol}$ 。

[0103]

| 偶联溶剂      | 在 CPG 上的 ODs/ $\mu\text{mol}$ | 在 PS 上的 ODs/ $\mu\text{mol}$ |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|
| MeCN      | 93.3                          | 81.0                         |
| DMSO/MeCN | 56.1                          | 53.8                         |
| DMA/MeCN  | 77.1                          | 78.0                         |
| 环丁酮 /MeCN | 90.3                          | 65.1                         |
| NMP/MeCN  | 64.2                          | 73.4                         |
| TMU/MeCN  | 62.1                          | 75.0                         |

[0104] 然后对于所有 12 个粗合成物进行阴离子交换 HPLC 分析。每个粗合成物在 5ml 水中的 0.5ml 溶液与 0.5ml HPLC 缓冲液 A (50mM NaCl, 10mM NaOH 和 0.2mM EDTA 溶于水) 混合。将 14x 1ml 样品置于 1.5ml 短螺纹自动上样瓶 (VWR International, 目录号 548-0177, 批号 19310/20060763) 中, 上样瓶装载在 A-900 自动上样器 (GE Healthcare) 的托盘中, 该自动上样器与 Akta Explorer 10HPLC 系统 (GE Healthcare) 连接。从瓶中注射 50  $\mu\text{l}$  样品并且在 DNAPac-100 柱 (Dionex) 上于 50°C (Thermasphere 柱加热器, Phenomenex) 下进行分离, 在 25min 期间使用从 0 至 40% B 的梯度, 流速为 1ml/min, 以及在 260、280 和 295nm 处进行 UV 检测。B 缓冲液为溶于水中的 2.5M NaCl, 10mM NaOH 和 0.2mM EDTA。表 5 给出了每个溶剂混合物和每个支持物的 % 全长产物。

[0105] 表 5. 溶剂合成的 % 全长产物

[0106]

| 偶联溶剂      | CPG 上的 % 全长 | PS 上的 % 全长 |
|-----------|-------------|------------|
| MeCN      | 82.24       | 80.24      |
| DMSO/MeCN | 51.93       | 34.42      |
| DMA/MeCN  | 80.84       | 85.03      |
| 环丁酮 /MeCN | 85.61       | 76.13      |
| NMP/MeCN  | 80.75       | 78.49      |
| TMU/MeCN  | 73.00       | 80.02      |

[0107] 对于 CPG 上的 MeCN, HPLC 痕迹显示在产物峰前有 12% 的杂质和 3.5% 的 n+ 材料。峰高为 863mAU。产生文件 AutosamplerDNAPac028。对于 PS, 痕迹显示在产物峰前有 12% 的杂质和 3.3% 的 n+ 材料。峰高为 817mAU。产生文件 Autosampler DNAPac008。

[0108] 对于 CPG 上的 DMSO/MeCN, HPLC 痕迹显示大部分不完全的偶联, 具有 347mAU 的产物峰。PS 产物峰高为 215mAU。产生文件 Autosampler DNAPac009。

[0109] 对于 CPG 上的 DMA/MeCN, HPLC 痕迹显示仅有少量的不完全偶联。主峰前有 8.1% 的杂质, 均具有相当均一的强度, 以及 5.1% 的 n+ 材料。产物峰高为 725mAU。产生文件 Autosampler DNAPac003。对于 PS, 产物峰前仅有 10.4% 的杂质, 以及仅 0.4% 的 n+ 材料。产物峰高为 805mAU。产生文件 Autosampler DNAPac010。

[0110] 对于 CPG 上的环丁砜/MeCN, HPLC 痕迹仅显示非常小的失败峰 (不完全偶联) 和产物峰前的 7.2% 的杂质以及 4.6% 的 n+ 材料。产物峰高为 867mAU。产生文件 Autosampler DNAPac004。对于 PS, 仅有 0.8% n+ 材料。产物峰高为 683mAU。产生文件 AutosamplerDNAPac011。

[0111] 对于 CPG 上的 NMP/MeCN, HPLC 痕迹显示大约同等大小的全面失败, 主峰前具有 6.3% 失败, 和大约 4.8% n+ 材料。产物峰高为 639mAU。产生文件 Autosampler DNAPac005。对于 PS, 有几处明显的失败, 但仅有 0.7% n+ 材料。产物峰高为 748mAU。产生文件 Autosampler DNAPac012。

[0112] 对于 CPG 上的 TMU/MeCN, HPLC 痕迹显示产物峰前有 7% 的失败和大约 7.5% 的总 n+ 材料。产物峰高为 551mAU。产生文件 Autosampler DNAPac007。对于 PS, 在产物峰前大约有 11.8% 的失败, 与使用纯 MeCN 获得的结果非常类似。总 n+ 材料仅为 2.7%。产物峰高为 735mAU。产生文件 Autosampler DNAPac014。

[0113] 实施例 5

[0114] 下述实施例说明了在 CPG、GE 聚苯乙烯和 NittoPhase 支持物上进行的 1  $\mu$ mol 规模的 SEQ ID NO:10d[GGGGGGGGGACGATCGTCGGGGGGGGG] 合成, 其中使用纯乙腈作为缩合步骤的溶剂, 以及 DMA、环丁砜、NMP 和 TMU 与乙腈的 1 : 1 混合物中的每一种。

[0115] 除以下所述外使用实施例 4 的循环和参数。合成中包括来自于 SAFC Proligo 的 dA<sup>bz</sup> 单体 (产品号 A111010-01, 批号 228992; 分子量为 854.93; 2.5ml 的 0.1M 溶液需要 215mg)、来自于 SAFC Proligo 的 dC<sup>tac</sup> 单体 (产品号 C111020-01, 批号 229934; 分子量为 920.04; 3.25ml 的 0.1M 溶液需要 299mg); 和来自于 SAFC Proligo 的 dT 单体 (产品号 T111010-01, 批号 231062; 分子量为 744.81; 2.5ml 的 0.1M 溶液需要 186mg)。将 840mg 的 dG<sup>ibu</sup> 单体置入 5 个单独的 ABI10ml amidite 瓶的每一个中且在 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 KOH 块上真空干燥过夜。用氩气释放真空且将每个单体溶解于适当体积的一种溶剂混合物中。称重 5.9g 等份的 DCI 加于 5 个 180ml ABI 瓶的每一个中且真空干燥。每份 DCI 溶解于 5 种不同溶剂 (4 种混合物加一个纯乙腈) 的一个中。

[0116] 将 5 个 ABI 快速柱充填以大约 28.6mg dG(tac)-CPG, 5 个柱充填以大约 12.7mg dG<sup>ibu</sup> 80S 聚苯乙烯支持物, 5 个柱充填以大约 11.9mg 的 NittoPhase dG<sup>ibu</sup> 支持物。表 6 列出了确切的用量。在用于固相合成前, PS 支持物在乙腈中膨胀 10min。

[0117] 表 6. ABI 394-08 合成的柱体规格

[0118]

| dG(tac)-CPG (Proligo, bulk 5452, 批号 223460, 35 $\mu\text{mol/g}$ )柱体       |           |                           |          |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------------|----------|
| G1                                                                         | 28.8 (mg) | 1.007 ( $\mu\text{mol}$ ) | MeCN     |
| G2                                                                         | 28.7      | 1.003                     | DMA/MeCN |
| G3                                                                         | 29.4      | 1.028                     | 环丁砜/MeCN |
| G4                                                                         | 29.4      | 1.028                     | NMP/MeCN |
| G5                                                                         | 30.2      | 1.056                     | TMU/MeCN |
| dG <sup>ibu</sup> 80S (GE Healthcare, 批号 1503095, 79 $\mu\text{mol/g}$ )柱体 |           |                           |          |
| P1                                                                         | 13.3      | 1.047                     | MeCN     |
| P2                                                                         | 13.6      | 1.071                     | DMA/MeCN |
| P3                                                                         | 13.4      | 1.055                     | 环丁砜/MeCN |
| P4                                                                         | 13.5      | 1.063                     | NMP/MeCN |
| P5                                                                         | 13.2      | 1.039                     | TMU/MeCN |
| NittophaseTOS dGibu (Nitto Denko, 84 $\mu\text{mol/g}$ )柱体                 |           |                           |          |
| N1                                                                         | 13.2      | 1.109                     | MeCN     |
| N2                                                                         | 13.4      | 1.126                     | DMA/MeCN |
| N3                                                                         | 13.4      | 1.126                     | 环丁砜/MeCN |
| N4                                                                         | 12.4      | 1.042                     | NMP/MeCN |
| N5                                                                         | 13.3      | 1.118                     | TMU/MeCN |

[0119] 每次合成开始前都使用 ABI 起始方案, 以确保所有运送管道被新鲜试剂充满。合成结束后用氩气气流吹干柱体。

[0120] 小心打开柱体并将支持物转移至 4ml 带螺旋盖的玻璃瓶中并用 3ml 的 40wt. % 甲胺水溶液 (Aldrich, 目录号 42,646-6, 批号 S23322-405) 于 65°C 脱保护 2.5h。冷却后, 将上清液过滤至 Falcon 试管中且每个支持物用 2x 3ml 20% 乙醇水溶液洗涤。过滤洗涤物并且与相应的过滤物合并。将样品体积调整至 10ml 并且各取 35  $\mu\text{l}$  的小份用于阴离子交换 HPLC 分析 (样品 G4、P4、N4、G5、P5 和 N5 取 525  $\mu\text{l}$  的小份, 并且各自与 475  $\mu\text{l}$  水混合, 将溶液置于自动上样瓶中, 上样瓶然后在连接于 Akta Explorer 10HPLC 系统的自动上样器上运行)。在 4x 250mm 的分析型 DNAPac PA-100 柱 (Dionex, 产品号 043010, 批号 005-21-017, 序列号 005402) 上进行 HPLC 分析。在 40min 期间使用 0-50% B 的线性梯度, 1ml/min 的流速, 并且柱流出液在 260、280 和 295nm 处用 UV 监测。缓冲液 A 为溶于水的 50mM NaCl 和 10mM NaOH, 缓冲液 B 为溶于水的 2.5M NaCl 和 10mM NaOH。表 7 显示了通过整合每次运行中的所有峰获得的 % 全长产物。

[0121] 溶液然后在 Speedvac 中真空浓缩至干。每个样品用纯水稀释至总体积为 10ml。为确定每个样品在 260nm 处的总 ODs, 各取 30  $\mu\text{l}$  的小份用 1M Tris HCl 缓冲液 pH7.6 (用于

分子生物学的FlukaBioChemika Ultra 级, 目录号 93314, 批号及填充码 118896054605275) 稀释至 1ml。每个溶液用 1cm 光路长度的一次性比色杯 (Plastibrand, 1.5ml semi-micro, 目录号 759150) 来测量  $A_{260nm}$ 。表 7 显示了每个合成的校正的粗 ODs/ $\mu\text{mol}$ 。

[0122] 表 7. 实施例 5 的  $1\mu\text{mol}$  合成的结果。

[0123]

| 偶联溶液     |    | ODs/ $\mu\text{mol}$ | 通过阴离子交换 HPLC 的 % FLP |
|----------|----|----------------------|----------------------|
| MeCN     | G1 | 202.6                | 78.93                |
|          | P1 | 163.3                | 72.68                |
|          | N1 | 202.3                | 84.78                |
| DMA/MeCN | G2 | 135.6                | 63.78                |
|          | P2 | 151.0                | 65.96                |
|          | N2 | 194.8                | 77.09                |
| 环丁砜/MeCN | G3 | 162.7                | 76.14                |
|          | P3 | 125.8                | 55.66                |
|          | N3 | 191.2                | 87.53                |
| NMP/MeCN | G4 | 132.1                | 62.55                |
|          | P4 | 142.9                | 51.51                |
|          | N4 | 178.2                | 75.36                |
| TMU/MeCN | G5 | 74.6                 | 48.10                |
|          | P5 | 148.2                | 64.32                |
|          | N5 | 128.3                | 68.19                |

[0124] 实施例 6

[0125] 下述实施例说明了富含鸟嘌呤的寡核苷酸 G10 (SEQ ID NO :10) 的大规模合成。G10 在 OligoPilot 100 上进行合成, 其中使用充填以 NittoPhase 支持物的 OPII 柱, 该支持物以  $120\mu\text{mol/g}$  负载  $dG^{ibu}$ , 并且使用 DCI 作为缩合剂, DCI 溶于 1 : 1v/v 乙腈 / 环丁砜混合物中作为缩合步骤的溶剂。

[0126] 合成。2.4mmol 规模的去除三苯甲基的合成在 Akta OligoPilot100 合成仪上进行, 使用 20g 的 NittoPhase™  $dG^{ibu}$  支持物 (批号 195136), 其装载量为  $120\mu\text{mol/g}$ , 并且充填在 OPII 柱 (6cm 内径, GEHealthcare 编号 18-1107-60) 中, 调整柱体积为 133mL (参见下述)。使用的单体浓度 (4 倍过量) 为在乙腈 / 环丁砜 (1 : 1v/v) 中 0.27M, DCI 在乙腈 /

环丁酮 (1 : 1v/v) 中的 0.5M 溶液用作偶联剂,偶联时间为 10min。单体浓度计算如下:循环回路的体积是 5mL,使用的柱体积为 120mL(当在甲苯中膨胀时这是支持物的体积,基于 6.0mL/g),充填柱中可以获得的开放体积为  $0.7 \times 120 = 84\text{mL}$ ,因此产生 89mL 的总开放体积。这代表了活化剂加上可以加入用于偶联的亚酰胺溶液的最大体积。因为对于偶联混合物,活化剂溶液与单体溶液的比率设定在 60 : 40v/v,所以要加入的单体溶液的体积是 35.6mL 并且其中含有 9.6mmol (4 倍过量) 的单体;因此单体的浓度是 0.27M。加入用于偶联的活化剂溶液的体积是 53.4mL,其相当于 26.7mmol,产生的 DCI : 单体的比率为 2.78 : 1。在开始合成前支持物要膨胀并充填在甲苯中,然后用乙腈洗涤。

[0127] 脱保护。在合成结束后,支持物结合的寡核苷酸用二乙胺 (DEA) 在无水乙腈中的 20% 溶液处理,以去除氰乙基保护基团。

[0128] 粗产率和粗纯度:粗产率为  $187.8A_{260}$  单位 /  $\mu\text{mol}$  并且由 HPLC 确定粗纯度为 70.25%。

[0129] 纯化。下一步骤是粗 G10 的制备型阴离子交换 HPLC 纯化,在 Waters AP-5, 50x200mm 柱 (件号 WAT023322) 上运行 4 次,柱子用 TSK-GEL SuperQ-5PW 20  $\mu\text{m}$  充填至床高 18.9cm,并且使用上述制备型 HPLC 缓冲液组合物,在 82.5min 中用 10-55% B 的线性梯度以 50mL/min 洗脱。

[0130] 在上样之前调整粗 G10 溶液的 pH 至 12 并且样品再过滤一次。收集 40mL 级分并且通过分析型阴离子交换 HPLC 按照上述方法分析。仅合并经过阴离子交换 HPLC 测得分析纯度超过 85% 的级分。分析前所有峰级分立即用乙酸中和至 pH6-8。

[0131] 脱盐。来自上述的纯 G10 的合并级分 (总体积 2700mL) 在 PallCentramate 500S 台式切向流过滤 (TFF) 系统 (件号 CM500SE, commission no. C500S-2017) 上浓缩至 300mL,该系统配备有一个 1kDa Centramate Omega 介质筛选盒 (Pall, 件号 OS001C12, 序列号 36324055R), 具有  $0.093\text{m}^2$  的表面积。然后进行十三次对纯水的连续渗滤循环以去除盐和缓冲液。滞留物进一步浓缩至 200mL 的体积。

[0132] 实施例 7

[0133] 通过计算起始材料的摩尔量,使得使用的支持物的重量乘以装载量 (例如  $20\text{g} \times 120 \mu\text{mol/g} = 2.4\text{mmol}$ ), 来确定实施例 6 中所述的合成的总工艺产率。100% 的产率将是相同摩尔量的产物,考虑到产物的摩尔质量 (即,对于 SEQ ID NO:10 为 9612mg/mmol)。产率是使用产物特异性消光系数 (对于 SEQ ID NO:10,  $1\text{AU}_{260-340} = 27.8 \mu\text{g}$ , 路径长度为 1cm 时) 通过 UV 光谱法定量实际得到的相对量。实施例 6 中所述的合成的总工艺产率为 31.4%。

[0134] 产生的寡核苷酸的纯度通过 HPLC 分析来确定,在该分析中,在 25°C 的炉温下,将  $40 \mu\text{l}$  的 5 至  $100 \mu\text{M}$  产物溶液注射到 DNAPac PA-100 柱中。柱子用 75% 的缓冲液 A (20mM NaOH) 和 25% 的缓冲液 B (20mM NaOH, 1.5M NaCl, 40% 甲醇) 平衡。使用 0.75mL/min 的流速。检测波长为 260nm。注射一分钟后,开始梯度,在 4 分钟内缓冲液 B 的百分比增至 40%, 然后,在接下来的 35 分钟内缓冲液 B 的百分比增加至 55%。然后,在一分钟内缓冲液 B 的百分比增加至 100% 并保持 3 分钟,然后在 3.9 分钟内缓冲液 B 的百分比降低至 25%。纯度为相对于整个层析图上的总峰面积的主峰下的相对峰面积。设置了整合限度以进行谷对谷的整合。实施例 6 描述的合成的产物纯度为 87.75%。

[0135] 实施例 8

[0136] 寡核苷酸 G10 (SEQ ID NO :10) 的合成基本上按照实施例 5 所述来进行。对下述极性非质子溶剂与 MeCN 的混合物进行了测试并且与单独的 MeCN 进行了比较 :1.) DMA/MeCN, 2.) 环丁砜 /MeCN, 3.) NMP/MeCN, 和 4.) TMU/MeCN。实验一式两份重复 6 次, 其中每次重复时所述溶剂与 MeCN 的比率 (v/v) 从 5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1 : 1 至 1 : 2 变化。产物的产率和纯度如上所述进行测定并且进行比较。

## 序列表

<110> 综合 DNA 技术公司 (Integrated DNA Technologies, Inc.)

<120> 含有高浓度鸟嘌呤单体的寡核苷酸

<130> PA2007-17

<150> US 60/869, 588

<151> 2006-12-12

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成 G 寡核苷酸

<400> 1

ggggggggggg 10

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 回文序列

<400> 2

gacgacgacgc 10

<210> 3

<211> 19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>3

ggggacgatc gtcgggggg 19

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>4

gggggacgat cgtcgggggg 20

<210>5

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>5

ggggggacga tcgtcggggg g 21

序列表

<210>6

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>6

gggggggacg atcgtcgggg gg 22

<210>7

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>7

ggggggggac gatcgtcggg gggg 24

<210>8

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>8

ggggggggga cgatcgtcgg gggggg 26

<210>9

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>9

gggggggggg acgatcgtcg gggggggg 28

<210>10

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>10

gggggggggg gacgacgac gggggggggg 30

<210>11

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 G 的寡核苷酸

<400>11

ggggggcgac gacgacgac gtcggggggg 30