



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117222647 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 12

(21) 申请号 202280030016.X

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2022.03.22

专利代理师 邹宗亮

(30) 优先权数据

63/164,363 2021.03.22 US

(51) Int.Cl.

C07D 487/02 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/021287 2022.03.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/204102 EN 2022.09.29

(71) 申请人 金斯瑞美国公司

地址 美国新泽西州

申请人 定制阵列公司

(72) 发明人 M·W·里德 C·H·吴 J·库珀

R·O·德姆西

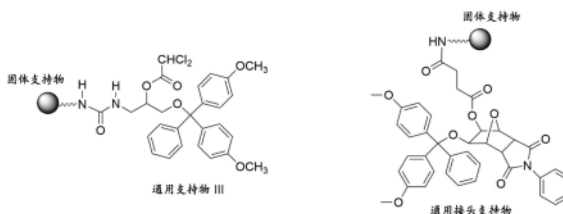
权利要求书9页 说明书23页 附图15页

(54) 发明名称

用于DNA合成的通用接头试剂

(57) 摘要

本文提供了利用通用接头亚磷酰胺进行寡核苷酸合成的方法和组合物。描述了用于电化学DNA合成的方法和试剂,其中DNA合成使用受控孔玻璃(CPG)固体支持物并在经铂涂覆的电极上进行。通用接头可用作单柱PCR引物合成中的间隔物以在切割后产生具有游离3'-羟基末端的2条链。这些方法和组合物利用固体支持物系统来合成寡核苷酸,其中该支持物具有铂电极和通用接头,任选地其中该铂电极涂覆有胺。这些方法和组合物进一步描述了通用接头亚磷酰胺的用途,并且铂电极涂覆有单糖或二糖。



1. 一种用于合成寡核苷酸的固体支持物系统,其中所述支持物包含平面表面和通用接头,其中所述通用接头与所述平面表面偶联。

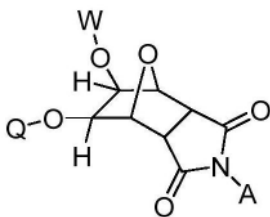
2. 如权利要求1所述的固体支持物系统,其中在附接所述通用接头之前,用胺涂覆所述平面表面。

3. 如权利要求1或2所述的固体支持物系统,其中所述平面表面涂覆有羧酸。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的固体支持物系统,其中所述平面表面包含硅、钛或铂。

5. 如权利要求1所述的固体支持物系统,其包含式(I)、(III)或(IV),任选地,其中通过使所述平面表面与具有式(II)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)或其组合的化合物反应而使所述通用接头偶联至所述平面表面,

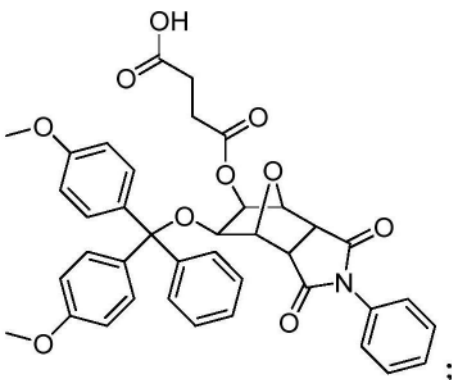
(a) 式(I):



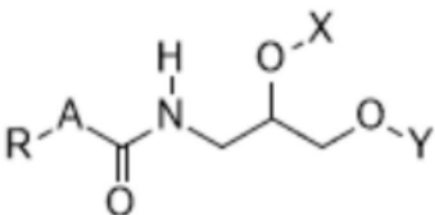
其中,当A是附接至经涂覆的铂电极的包含取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团的连接部分时,W或Q中的一个是在碱性或中性条件下可裂解的封闭基团,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团;或者

其中,当A是H、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团时,Q或W中的一个是在碱性或中性条件下可裂解的接头部分,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团;

(b) 式(II):



(c) 式(III):



其中

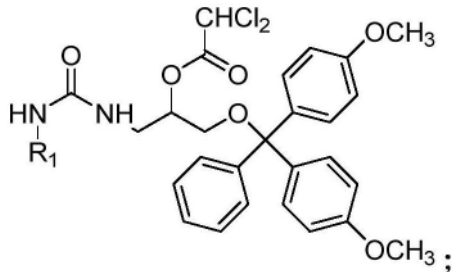
R是附接至铂电极或其他基础材料的烷基、芳基、杂烷基或杂芳基；

A是NH、O、S、烷基或芳基；

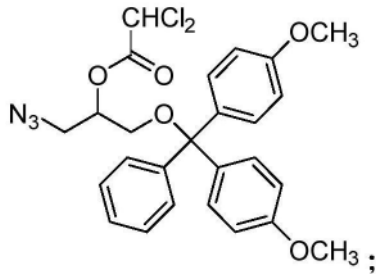
X是酰基、芳酰基或甲硅烷基；并且

Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团；

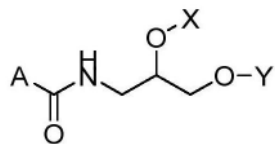
(d) 式 (IV) :



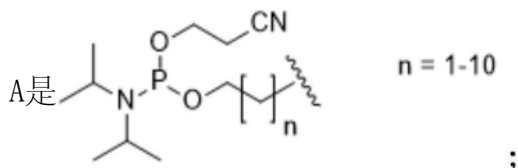
R₁是附接至铂电极或其他基础材料的烷基、芳基、杂烷基或杂芳基 (e) 式 (V) :



(f) 式 (VI) :



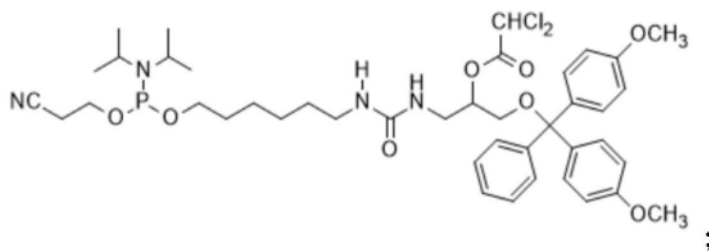
其中



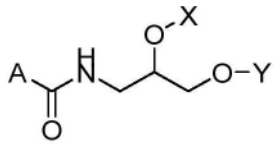
X是酰基、芳酰基或甲硅烷基；并且

Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团；

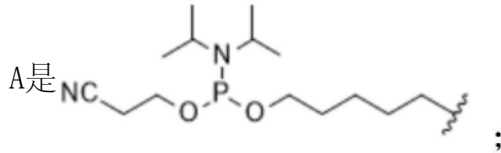
(g) 式 (VII) :



(h) 式 (VIII) :



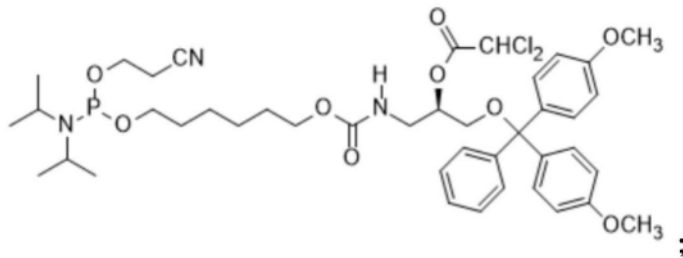
其中



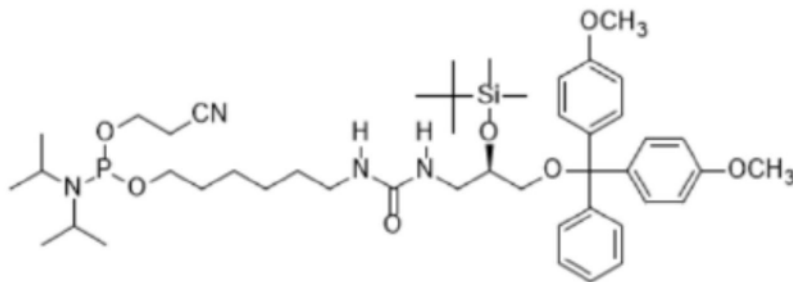
X是酰基、芳酰基或甲硅烷基；并且

Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团；

(i) 式 (IX) :



(j) 式 (X) :



6. 如权利要求5所述的固体支持物系统,其中所述化合物具有式(II)、(IV)、(V)、(VII)、(IX)、(X)、或其组合。

7. 如权利要求6所述的固体支持物系统,其中所述化合物具有式(VII)、(IX)或(X)。

8. 如权利要求1-4中任一项所述的固体支持物系统,其中所述平面表面涂覆有单糖或二糖。

9. 如权利要求8所述的固体支持物系统,其中所述单糖选自由以下组成的组:阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、脱氧核糖、赤藓糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、阿洛酮糖、L-鼠李糖、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、D-山梨醇、山梨糖、木酮糖、塔格糖、塔洛糖、苏糖、木酮糖和木糖,并且所述二糖选自由以下组成的组:蔗糖、直链淀粉、纤维二糖、乳糖、麦芽糖、蜜二糖、异麦芽酮糖和海藻糖。

10. 一种用于合成寡核苷酸的方法,所述方法包括:

- (a) 提供具有平面表面的电极装置;
- (b) 使所述表面与通用接头偶联;以及
- (c) 合成所述寡核苷酸。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述方法进一步包括以下步骤:将羧酸经电化学沉

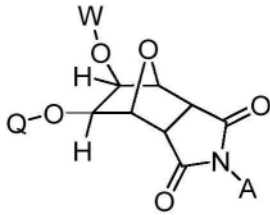
积,以减少到所述平面表面上的羧酸。

12. 如权利要求10或11所述的方法,其中所述方法进一步包括将胺涂层沉积到激活的羧酸上。

13. 如权利要求10所述的方法,其中所述平面表面包含硅、钛或铂。

14. 如权利要求10所述的方法,其中所述电极装置包含式(I)、(III)或(IV),任选地,其中通过使所述平面表面与具有式(II)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)或其组合的化合物反应而使所述通用接头偶联至所述平面表面,

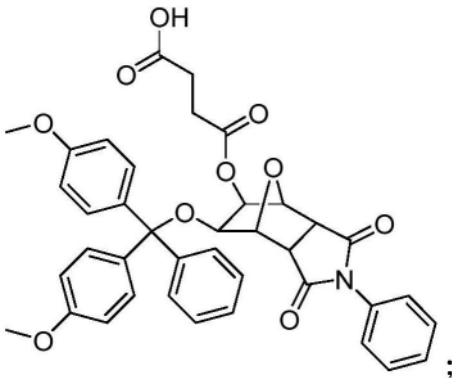
(a) 式(I):



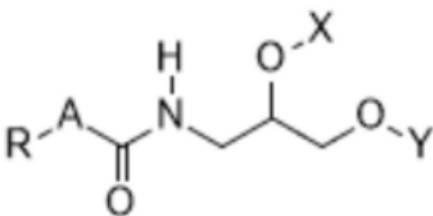
其中,当A是附接至经涂覆的铂电极的包含取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团的连接部分时,W或Q中的一个是在碱性或中性条件下可裂解的封闭基团,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团;或者

其中,当A是H、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团时,Q或W中的一个附接至经涂覆的铂电极的、在碱性或中性条件下可裂解的接头部分,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团;

(b) 式(II):



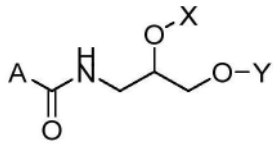
(c) 式(III):



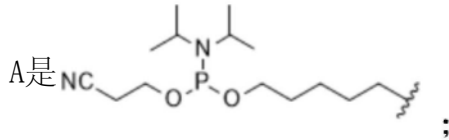
其中

R是附接至铂电极或其他基础材料的烷基、芳基、杂烷基或杂芳基;

A是NH、O、S、烷基或芳基;



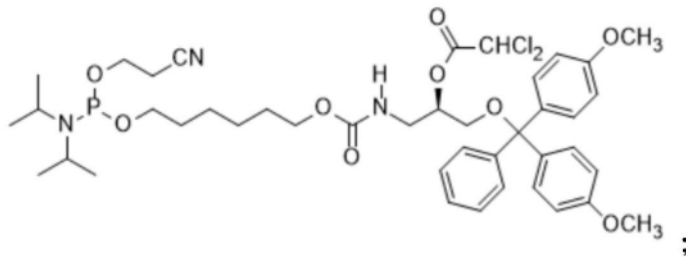
其中



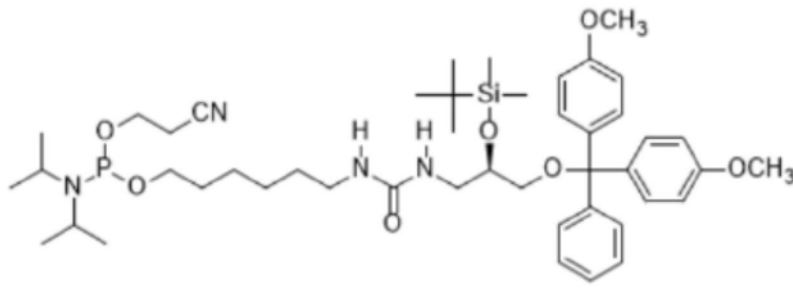
X是酰基、芳酰基或甲硅烷基；并且

Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团；

(i) 式 (IX) :



(j) 式 (X) :



15. 如权利要求14所述的方法,其中所述化合物选自式 (II)、(IV)、(V)、(VII)、(IX)、(X)、及其组合。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述化合物选自式 (VII)、(IX) 和 (X)。

17. 如权利要求10所述的方法,其中所述平面表面涂覆有单糖或二糖。

18. 一种用于合成寡核苷酸引物对的方法,所述方法包括:

提供包含第一通用接头的固体支持物,所述第一通用接头固定在所述固体支持物的表面上;

进行第一亚磷酰胺DNA合成以生成第一寡核苷酸引物,其中所述第一寡核苷酸引物的3'端附接至所述第一通用接头;

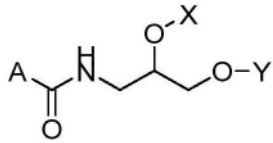
使第二通用接头偶联至所述第一寡核苷酸引物的5'端;

进行第二亚磷酰胺DNA合成以生成第二寡核苷酸引物,其中所述第二寡核苷酸引物的3'端附接至所述第二通用接头;以及

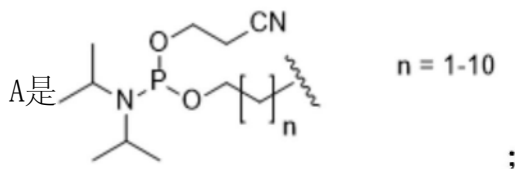
使所述固体支持物与释放剂接触,从而从所述固体支持物释放所述第一寡核苷酸引物和所述第二寡核苷酸引物,其中释放的第一寡核苷酸引物和释放的第二寡核苷酸引物中的每一个包含3'-羟基基团。

19. 如权利要求18所述的方法,其中通过使所述固体支持物与具有下式的第一化合物反应而使所述第一通用接头固定至所述固体支持物:

(a) 式 (VI) :



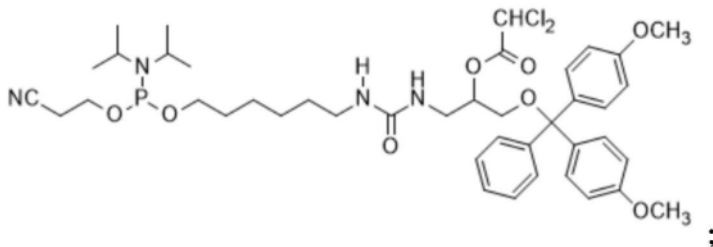
其中



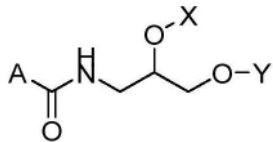
X是酰基、芳酰基或甲硅烷基;并且

Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团;

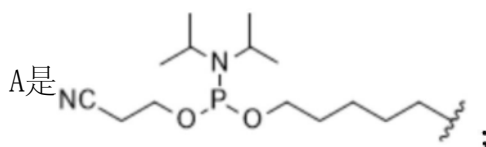
(b) 式 (VII) :



(c) 式 (VIII) :



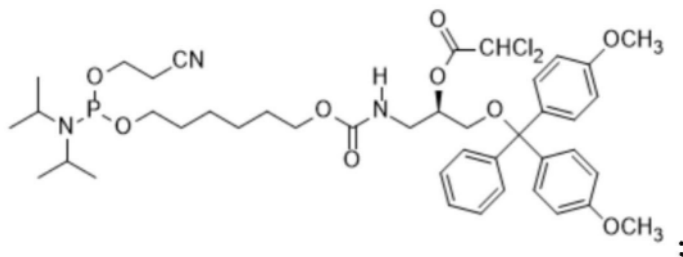
其中



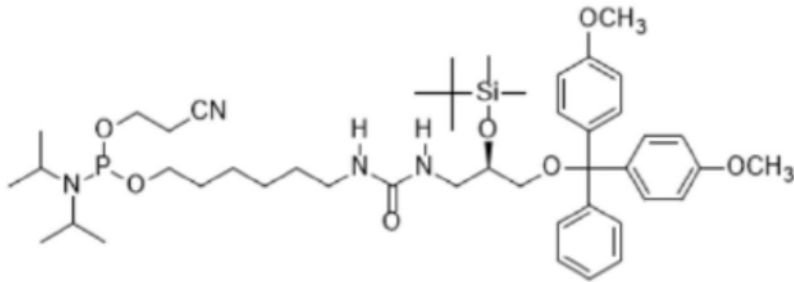
X是酰基、芳酰基或甲硅烷基;并且

Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团;

(d) 式 (IX) :



(e) 式 (X) :



;

或其组合。

20. 如权利要求18或19所述的方法,其中所述第一化合物具有式(VII)、(IX)或(X)。

21. 如权利要求18-20中任一项所述的方法,其中通过使所述第一寡核苷酸引物与具有式(VII)、(IX)或(X)的第二化合物反应而使所述第二通用接头附接至所述第一寡核苷酸引物。

22. 如权利要求18-21中任一项所述的方法,其中所述释放剂包含4M甲胺/MeOH或TEA:3HF。

23. 如权利要求18-22中任一项所述的方法,所述方法进一步包括用AMA(1:1,37%氢氧化铵:40%甲胺)从所述释放的第一寡核苷酸引物和所述释放的第二寡核苷酸引物去除保护基团。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述释放的第一寡核苷酸引物和所述释放的第二寡核苷酸引物的长度大致相同。

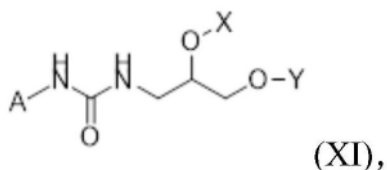
25. 如权利要求24所述的方法,其中所述释放的第一寡核苷酸引物和所述释放的第二寡核苷酸引物的浓度比率为约1:1。

26. 如权利要求18-25中任一项所述的方法,其中所述方法在单柱中进行。

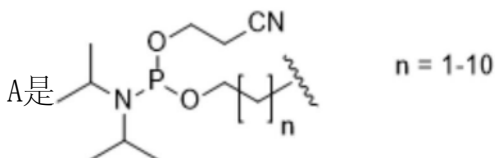
27. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述化合物具有式(X)。

28. 如权利要求18-26中任一项所述的方法,其中所述第一化合物和所述第二化合物具有式(X)。

29. 一种具有式(XI)的化合物,



其中



X是酰基、芳酰基或甲硅烷基,并且

Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团。

30. 如权利要求29所述的化合物,其中n是5。

31. 如权利要求29或30所述的化合物,其中X是甲硅烷基。

32. 如权利要求29-31中任一项所述的化合物,其中所述甲硅烷基是三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、或三异丙基甲硅烷基。

33. 如权利要求32所述的化合物,其中所述甲硅烷基是叔丁基二甲基甲硅烷基。

34. 如权利要求29-33中任一项所述的化合物,其中Y是二甲氧基三苯甲基基团。

35. 如权利要求29所述的化合物,其包括(R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-2,2,3,3-四甲基-8-氧代-4-氧杂-7,9-二氮杂-3-硅杂十五烷-15-基2-氰基乙基二异丙基亚磷酰胺。

36. 一种用于合成寡核苷酸的方法,所述方法包括:

(a) 提供如权利要求1-9中任一项所述的固体支持物系统;

(b) 使所述表面与通用接头偶联;以及

(c) 合成所述寡核苷酸。

37. 如权利要求4所述的固体支持物系统,其中所述钛包括氮化钛。

38. 如权利要求13所述的方法,其中所述钛包括氮化钛。

39. 如权利要求1-9所述的固体支持物系统,其中所述平面表面包含由至少一种介电体分隔的多个铂电极。

40. 如权利要求39所述的固体支持物系统,其中所述至少一种介电体选自由氮氧化硅、氮化硅、二氧化硅和正硅酸四乙酯 (TEOS) 组成的组。

41. 如权利要求10-17所述的方法,其中所述平面表面包含由至少一种介电体分隔的多个铂电极。

42. 如权利要求41所述的固体支持物系统,其中所述至少一种介电体选自由氮氧化硅、氮化硅、二氧化硅和正硅酸四乙酯 (TEOS) 组成的组。

用于DNA合成的通用接头试剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是根据《专利合作条约》的国际申请,要求于2021年3月22日提交的美国临时专利申请号63/164,363的优先权,该美国临时专利申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明提供了一种电极阵列,用于通过通用接头技术与具有经涂覆的电极(例如铂电极)的固体支持物装置的组合来电化学合成寡聚体。

背景技术

[0004] DNA微阵列领域的快速发展催生了许多用于合成制备DNA的方法。这样的方法包括点样预合成的寡核苷酸、使用掩膜或无掩膜技术的光刻、通过打印试剂的原位合成、以及使用保护性基团的电化学去封闭在电极微阵列上的原位平行合成。寡核苷酸微阵列合成的综述由例如Gao等人,Biopolymers 2004,73:579提供。1991年报告了使用光掩膜技术合成制备肽阵列。该方法于2000年扩展至包括使用光生酸的可寻址掩膜(addressable masking)技术和/或与用于去封闭的光敏剂的组合。使用光不稳定去封闭的肽微阵列合成的综述由以下提供:Pellois等人,J. Comb. Chem. 2000,2:355以及Fodor等人,Science,1991,251:767。点样预合成的肽或分离的蛋白质已用于产生肽阵列。蛋白质或肽阵列的综述由以下提供:Cahill和Nordhoff,Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 2003,83:177。由于使用四种不同的固体支持物(或更多)来制备3'-未修饰的寡核苷酸的劳动密集性,可在DNA合成中使用通用支持物。

[0005] 两种不同类型的通用接头(UL)可商购。两种类型的接头都具有邻二醇结构,这些结构被单独保护为酸敏感性4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)基团(用于寡聚体的延伸)和碱敏感性酰基基团(用于脱保护期间寡聚体的释放)。第一种类型的接头(通用支持物III, USIII)通过用无水氨处理而释放(Azhayev,2001,Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids,20(4-7):539-50;Yagodkin,2011,Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids,30(7-8):475-89),并且描述于例如美国专利号6,770,754中。第二种类型的UL(UNYLINKER™或UNYSUPPORT™)用氨水(Guzaev,2003)或无水甲胺气体(美国专利7,202,264)释放。已经描述了在CMOS(互补金属氧化物半导体)型电极阵列上的电化学平行DNA合成(Maurer等人,2006,PLoS One.2006年12月20日;1(1):e34;美国专利号10,525,436)。在该应用中,在DNA合成之前,在每个铂电极上用吸收的多孔反应层涂覆CMOS芯片表面。DNA合成起始于多孔层上的羟基基团。DNA合成后,将寡聚体留在芯片上,或者将寡聚体从芯片表面切割。吸收的多孔涂层的一个问题是释放寡聚体的切割时间长。切割时间长减缓了DNA合成的产生,并可能影响DNA的质量。释放的寡聚体可能仍然具有连接至3'-末端的、吸收的经涂覆分子。DNA链的3'-修饰对于一些应用(如PCR引物)是一个问题,因为3'-修饰阻断聚合酶延伸。电极上吸收的涂层的另一个问题是DNA合成期间或者当用于多种杂交测定时的降解。

[0006] 本发明通过提供用于利用具有通用接头的改善的固体支持介质合成寡核苷酸的

方法来解决这些挑战。

发明内容

[0007] 本文提供了利用经涂覆电极上的或作为单柱PCR引物合成中的间隔物的通用接头进行寡核苷酸合成的方法和组合物。

[0008] 在一个实施例中,这些方法和组合物可以包含用于寡核苷酸合成的固体支持物系统,其中支持物包含铂电极和通用接头。在多个实施例中,首先用取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团(例如,聚苄基醇基团)、取代或未取代的杂芳基基团、取代或未取代的杂环基团涂覆铂电极以允许DNA合成开始。经醇涂覆的电极进一步用可裂解的通用接头功能化,以允许在合成和脱保护后释放DNA。在本披露的一些实施例中,固体支持物可以在经涂覆的表面包括铂电极和分隔各铂电极的介电体(绝缘体)。介电体可以是选自氮氧化硅、氮化硅、二氧化硅和正硅酸四乙酯(TEOS)组成的组中的至少一种。

[0009] 在实施例中,用于合成寡核苷酸的方法可以包括使用本文所述的组合物。

[0010] 在一方面,本披露可以涉及用于合成寡核苷酸的固体支持物系统,其中支持物可以包括平面表面和通用接头,其中该通用接头可以偶联(附接或连接)至该平面表面。

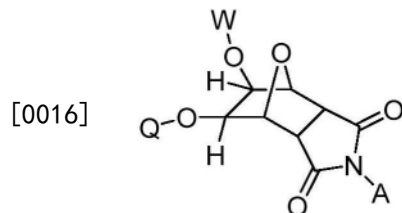
[0011] 在另一方面,在附接通用接头之前,可以用胺涂覆平面表面。

[0012] 在另一方面,可以用羧酸涂覆平面表面。

[0013] 在另一方面,平面表面可以是硅、钛或铂。

[0014] 在另一方面,固体支持物系统可含有式(I)、(III)或(IV),任选地,其中可通过使平面表面与具有式(II)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)或其组合的化合物反应而使通用接头偶联至该平面表面,

[0015] (a) 式(I):

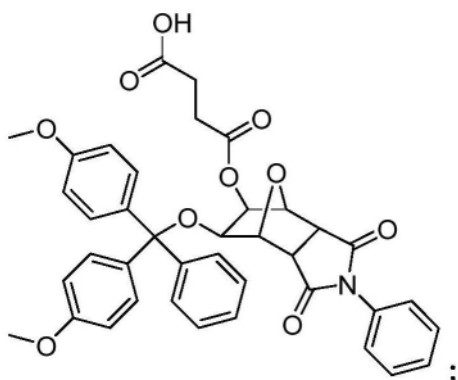


[0017] 其中,当A是附接至经涂覆的铂电极的包含取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团的连接部分时,W或Q中的一个是在碱性或中性条件下可裂解的封闭基团,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团;或者

[0018] 其中,当A是H、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团时,Q或W中的一个是在碱性或中性条件下可裂解的接头部分,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团;

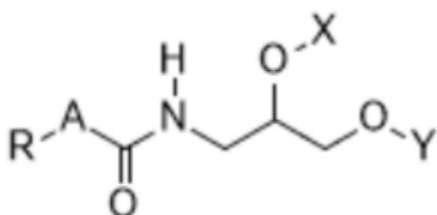
[0019] (b) 式(II):

[0020]



[0021] (c) 式 (III) :

[0022]



[0023] 其中

[0024] R是附接至铂电极或其他基础材料的烷基、芳基、杂烷基或杂芳基；

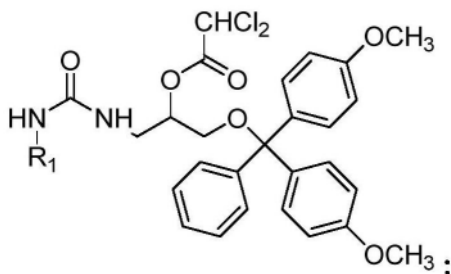
[0025] A是NH、O、S、烷基或芳基；

[0026] X是酰基、芳酰基或甲硅烷基；并且

[0027] Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团；

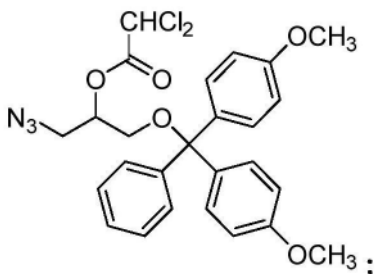
[0028] (d) 式 (IV) :

[0029]

[0030] R₁是附接至铂电极或其他基础材料的烷基、芳基、杂烷基或杂芳基

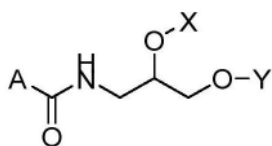
[0031] (e) 式 (V) :

[0032]

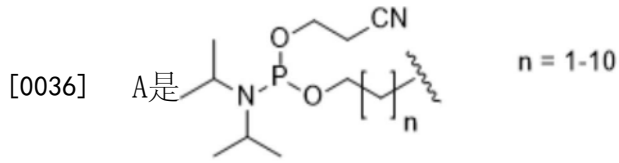


[0033] (f) 式 (VI) :

[0034]



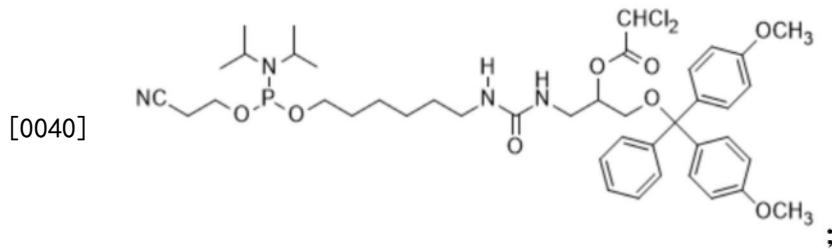
[0035] 其中



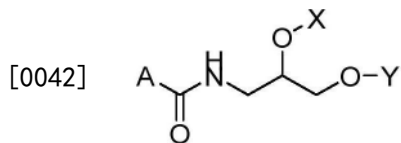
[0037] X是酰基、芳酰基或甲硅烷基；并且

[0038] Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团；

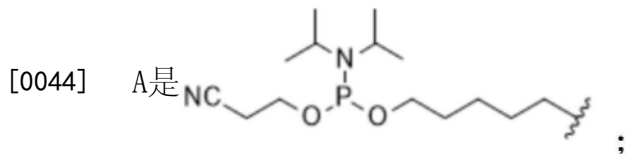
[0039] (g) 式 (VII) :



[0041] (h) 式 (VIII) :



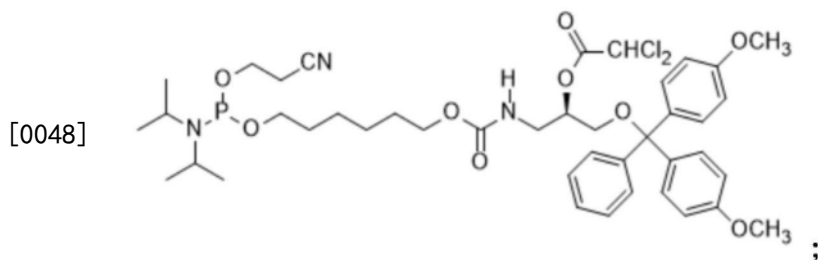
[0043] 其中



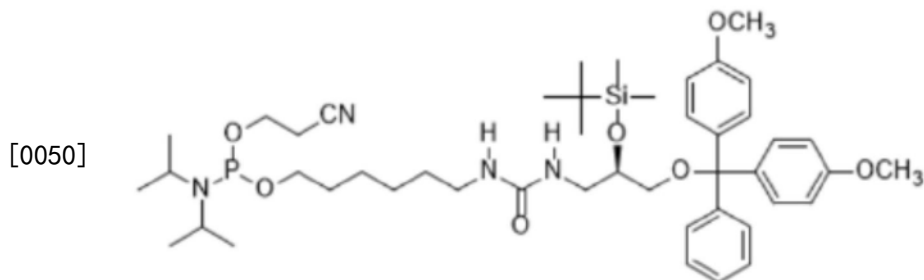
[0045] X是酰基、芳酰基或甲硅烷基；并且

[0046] Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团；

[0047] (i) 式 (IX) :

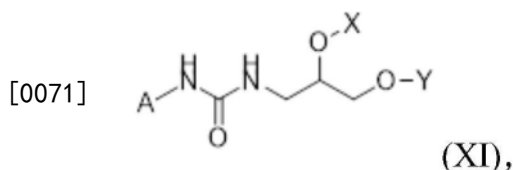


[0049] (j) 式 (X) :

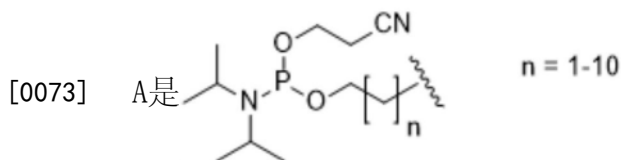


- [0051] 在另一方面,化合物可以具有式(II)、(IV)、(V)、(VII)、(IX)、(X)、或其组合。
- [0052] 在另一方面,化合物可以具有式(VII)、(IX)或(X)。
- [0053] 在另一方面,可以用单糖或二糖涂覆平面表面。
- [0054] 在另一方面,单糖可以选自由以下组成的组:阿洛糖、阿卓糖、阿拉伯糖、脱氧核糖、赤藓糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、古洛糖、艾杜糖、来苏糖、甘露糖、阿洛酮糖、L-鼠李糖、核糖、核酮糖、景天庚酮糖、D-山梨醇、山梨糖、木酮糖(sylulose)、塔格糖、塔洛糖、苏糖、木酮糖(xylulose)和木糖,并且二糖选自由以下组成的组:蔗糖、直链淀粉、纤维二糖、乳糖、麦芽糖、蜜二糖、异麦芽酮糖和海藻糖。
- [0055] 在一方面,本披露可以涉及一种用于合成寡核苷酸的方法,该方法包括:(a)提供具有平面表面的电极装置;(b)使所述表面与通用接头偶联;以及(c)合成该寡核苷酸。
- [0056] 在另一方面,该方法可以进一步包括以下步骤:将羧酸经电化学沉积,以减少到所述平面表面上的羧酸。
- [0057] 在另一方面,该方法可以进一步包括将胺涂层沉积到激活的羧酸上。
- [0058] 在另一方面,平面表面可以含有硅、钛或铂。
- [0059] 在另一方面,固体支持物系统可含有式(I)、(III)或(IV),任选地,其中可通过使平面表面与具有式(II)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)或其组合的化合物反应而使通用接头偶联至该平面表面。
- [0060] 在一方面,本披露可以涉及一种用于合成寡核苷酸引物对的方法,该方法包括提供包含第一通用接头的固体支持物,该第一通用接头固定在该固体支持物的表面上;进行第一亚磷酰胺DNA合成以生成第一寡核苷酸引物,其中该第一寡核苷酸引物的3'端附接至该第一通用接头;使第二通用接头偶联至该第一寡核苷酸引物的5'端;进行第二亚磷酰胺DNA合成以生成第二寡核苷酸引物,其中该第二寡核苷酸引物的3'端附接至该第二通用接头;以及使该固体支持物与释放剂接触,从而从该固体支持物释放该第一寡核苷酸引物和该第二寡核苷酸引物,其中释放的第一寡核苷酸引物和释放的第二寡核苷酸引物中的每一个含有3'-羟基基团。
- [0061] 在另一方面,可以通过使固体支持物与具有式(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)或其组合的第一化合物反应而使第一通用接头固定至该固体支持物。
- [0062] 在另一方面,第一化合物具有式(VII)、(IX)或(X)。
- [0063] 在另一方面,可以通过使第一寡核苷酸引物与具有式(VII)、(IX)或(X)的第二化合物反应而使第二通用接头附接至该第一寡核苷酸引物。
- [0064] 在另一方面,释放剂可以包括4M甲胺/MeOH或TEA:3HF。
- [0065] 在另一方面,该方法可以进一步包括用AMA(1:1,37%氢氧化铵:40%甲胺)从释放的第一寡核苷酸引物和释放的第二寡核苷酸引物去除保护基团。
- [0066] 在另一方面,释放的第一寡核苷酸引物和释放的第二寡核苷酸引物的长度可以大致相同。
- [0067] 在另一方面,释放的第一寡核苷酸引物和释放的第二寡核苷酸引物的浓度比率可以是约1:1。
- [0068] 在另一方面,该方法可以在单柱中进行。
- [0069] 在另一方面,化合物可以具有式(X)。

[0070] 在另一方面,本披露可以涉及一种具有式 (XI) 的化合物,



[0072] 其中



[0074] X是酰基、芳酰基或甲硅烷基,并且

[0075] Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团。

[0076] 在另一方面,n可以是5。

[0077] 在另一方面,X可以是甲硅烷基。

[0078] 在另一方面,甲硅烷基可以是三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、或三异丙基甲硅烷基。

[0079] 在另一方面,甲硅烷基可以是叔丁基二甲基甲硅烷基。

[0080] 在另一方面,Y可以是二甲氧基三苯甲基基团。

[0081] 在另一方面,化合物可以包括(R)-5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-2,2,3,3-四甲基-8-氧代-4-氧杂-7,9-二氮杂-3-硅杂十五烷-15-基2-氰基乙基二异丙基亚磷酰胺。

[0082] 在另一方面,本披露可以涉及一种用于合成寡核苷酸的方法,该方法包括:(a)提供本披露的固体支持物系统;(b)使所述表面与通用接头偶联;以及(c)合成该寡核苷酸。

[0083] 在另一方面,钛可以包括氮化钛。

[0084] 在另一方面,平面表面可以包括由至少一种介电体分隔的多个铂电极。

[0085] 在另一方面,该至少一种介电体可以选自由氮氧化硅、氮化硅、二氧化硅和正硅酸四乙酯 (TEOS) 组成的组。

附图说明

[0086] 图1显示了通用支持物结构的比较。在每种情况下,DNA合成起始于接头结构中的二甲氧基三苯甲基基团(DMT)。碱处理释放具有未修饰的3'-羟基末端的寡核苷酸。

[0087] 图2展示了合成寡核苷酸的释放与固定。用在甲醇中的无水氨处理快速切割氯乙酰基基团,而用氟化物离子处理切割甲硅烷基保护基团。所致去磷酸化释放寡聚体。用在ACN中的叔丁胺处理快速切割氰基乙基基团并将寡聚体固定至表面。

[0088] 图3显示了UNYLINKER™酸与经胺涂覆的固体支持物的反应。UNYLINKER™结构是用在刚性环系统同一侧上的邻羟基基团“预组织的”。当碱敏感性琥珀酸酯连接被水解时,3'-羟基寡核苷酸的去磷酸化和释放非常迅速。

[0089] 图4显示了一种用于合成接头胺3的方法。新颖的(R)异构体易于制备,并用作每种通用接头亚磷酰胺(ULP)的合成子。

[0090] 图5显示了一种用于合成ULP 1的方法。首先制备6-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)己基氨基甲酸4-硝基苯基酯,并将其偶联至接头胺3以产生尿素键。二氯乙酰化后,用四丁基氟化铵(TBAF)选择性去除TBDMS基团,随后进行亚磷酰化以得到亚磷酰胺。

[0091] 图6显示了一种用于合成ULP 2的方法。结构类似于ULP 1,但氨基甲酸酯键是通过使TBDPS保护的1,6-己二醇与氯甲酸对硝基苯基酯反应并偶联至接头胺3而产生的。二氯乙酰化后,用TBAF选择性去除TBDPS基团,随后进行亚磷酰化以得到亚磷酰胺。

[0092] 图7显示了一种用于合成ULP 3的方法。结构类似于ULP 1,但使用甲硅烷基保护基团(TBDMS)而不是二氯乙酰基保护基团。

[0093] 图8显示了使用新颖的对硝基苯基(PNP)酯合成DMT-CPG的方法。对硝基苯基(PNP)酯将经胺涂覆的表面转化为DMT保护的醇表面。该方法1步得到稳定的尿素键(无EDC偶联)。氨基己醇提供另外的长接头。可以在DNA合成之前精确测量DMT CPG的负载量。

[0094] 图9显示了使用DMT-CPG测定来评价通用接头的偶联效率和切割效率。

[0095] 图10中图显示了如何使用2个引物(正向和反向)来将dsDNA扩增区(扩增子)“括起来”。PCR引物必须具有未修饰的3'-端,否则在聚合酶链反应期间它们将不会通过Taq聚合酶延伸。

[0096] 图11代表了PCR引物对的同时DNA合成。用在引物序列之间的通用接头亚磷酰胺间隔物如常合成DNA。脱保护得到具有未修饰的3'-OH的引物的1:1混合物。引物1具有残余的5'-UL片段,这不会影响PCR的性能。

[0097] 图12显示了如通过分光光度测定确定的在22°C (+/-0.2°C)下在1.6% (v/v) TEA:3HF/MeOH中从CPG-UL3-BHQ1切割BHQ1的动力学。

具体实施方式

[0098] 在进一步描述本主题披露之前,应当理解,本披露不限于下面描述的本披露的特定实施例,因为这些特定实施例可以变化并且仍然落入所附权利要求书的范围内。还应理解的是,所采用的术语是出于描述特定实施例的目的,而非旨在限制。相反,本披露的范围将由所附权利要求书来确立。

[0099] 本披露的优点可以包括例如(1)通过使用甲硅烷基基团保护通用接头的仲羟基基团来改善寡核苷酸产率,(2)仲羟基碳处的单个异构体允许更容易地进行通用接头亚磷酰胺的化学分析,因为可以存在更少的亚磷酰胺试剂的异构形式,(3)通过在通用接头中使用“预组织”的邻同氧官能化基团来改善切割,以及(4)通过在单次操作中自动合成并纯化引物对的1:1混合物来减少劳动。

[0100] 随着高通量DNA合成器的引入,通用固体支持物的相关性似乎比以往任何时候都更重要。常规的合成支持物含有接头,有第一碱基附接至这些接头。例如,合成寡脱氧核糖核苷酸需要四种(A、T、G、C)固体支持物。相比之下,通用固体支持物含有通用接头,这些接头上不附接第一碱基。因此,通用固体支持物可以允许对所有合成使用一种支持物。因此,通用接头可以(1)消除对核苷-接头-支持物清单的需求,(2)将正确的核苷-接头-支持物类型选择中的出错概率最小化,(3)在高通量合成器中的核苷-接头-支持物阵列的生成中,缩短时间并消除可能的错误,以及(4)当给定的支持物常规上可能不提供含有用于任何选择的核苷(A、T、G、C)的3'-OH末端的寡核苷酸时,允许制备该选项。

[0101] 本文提供了一种在DNA合成电极上合成3'-未修饰的寡核苷酸的改善的方法。3'-未修饰的寡核苷酸的合成大幅简化,改善了合成的寡核苷酸的质量和切割效率。此处所述的用于DNA合成的试剂含有可应用于经涂覆的电极表面的通用接头。

[0102] 两种不同类型的通用接头(参见例如,图1)已经商业化并由Glen Research (Sterling,VA)销售。两种类型的接头都具有邻二醇结构,这些结构被单独保护为酸敏感性DMT基团(用于寡聚体的延伸)和碱敏感性酰基基团(用于脱保护期间寡聚体的释放)。在每种情况下,DNA合成起始于接头结构中的二甲氧基三苯甲基基团(DMT)。碱处理释放具有未修饰的3'-羟基末端的寡核苷酸(参见图2)。

[0103] 组合物和方法包括使用包含经涂覆的铂电极的通用接头固体支持物结构,其中经涂覆的表面偶联至通用接头。对于具有通用支持物III的结构的接头,用在甲醇中的无水氨对仲羟基上的二氯乙酰基基团的脱保护释放出3'-未修饰的核酸链,用于进一步脱保护和纯化。二氯乙酰基基团对碱反应性强,但氨水脱保护也能快速地从磷酸酯切割氰基乙基保护基团,并得到较低产率的从电极表面释放的合成寡核苷酸。也可以用叔丁胺或DBU选择性地去除氰基乙基,以将合成寡核苷酸链固定至固体支持物。

[0104] 尽管仲羟基基团上的二氯乙酰基保护基团在通用支持物III中显示出良好的性能,但氰基乙基基团的竞争水解导致产率低。例如,“通用接头亚磷酰胺”已描述于文献中(参见Yagodkin,2009)。他们使用了更稳定的2,4-二氯乙酰基保护基团,并显示出比使用二氯乙酰基保护基团低15%-25%的释放的寡核苷酸的产率。在本文中,我们披露了甲硅烷基基团(例如像TBDMS或TBDPS)可用于保护仲羟基基团。该基团可以用氟化物离子(例如像TBAF或TREAT HF)去除,从而防止氰基乙基基团的竞争水解,并得到更高产量的释放的寡核苷酸。

[0105] 通用接头可以具有构象刚性且化学稳定的桥头环氧原子,该原子携带锁定在同向上的4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)和琥珀酰基基团(Ravikumar等人,Org.Process Res.Dev.2008,12,3,399-410)。邻同氧官能化基团的几何结构允许在标准氨水脱保护条件下快速且干净的切割。如图3中显示,该结构是用在刚性环系统同一侧上的邻羟基基团“预组织的”。当碱敏感性琥珀酸酯连接被水解时,发生3'-羟基寡核苷酸的去磷酸化和释放。

[0106] 本文所述的方法和系统包含固体支持物系统,该固体支持物系统包含经涂覆的铂电极与通用接头分子的组合,该接头分子基于UNYLINKER™或UNYSUPPORT™系统,在本文中由式(II)表示,并用氨水(Guzaev,2003,J Am Chem Soc,125(9):2380-1)或无水甲胺气体(美国专利7,202,264)释放,将这些参考文献中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

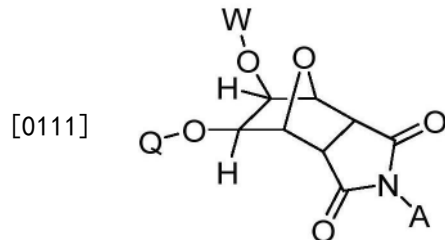
[0107] 合成其中的通用接头的方法可参见例如Guzaev,2003和Yagodkin,2011,将每一个文献通过引用以其全文并入本文,特别是关于制造通用接头分子的方法。

[0108] 在一个实施例中,基于通用支持物III系统的接头起始于3-氨基-1,2-丙二醇的纯(R)或(S)-异构体,如图4中显示。先前的接头系统合成使用化合物的外消旋混合物(粘性糖浆,739mm Hg下bp 264-265),而纯异构体是固体(mp 54°C-56°C)。诸位发明人使用了成本极低的(R)异构体作为合成所需接头的起始材料。仲羟基碳上的单个立体异构体简化了合成通用接头亚磷酰胺所需的许多中间体的下游合成。例如,本文所述的通用接头亚磷酰胺是2种非对映异构体的混合物,而先前的努力产生了4种非对映异构体的混合物。尽管一些物理性质不同,但是对于3'-OH未修饰的寡核苷酸的释放,单个异构体通用接头与混合的异

构体表现相同,并且我们要求同时保护单个异构体和混合的异构体结构。

[0109] 在一个实施例中,本文提供的方法和系统包括固体支持物系统,该固体支持物系统包含经涂覆的铂电极与基于通用支持物III系统的通用接头分子的组合。合成其中的通用接头的方法可参见例如Azhayev, 2001和Yagodkin, 2011,将每一个文献通过引用并入本文,并且特别是关于制造通用接头分子的方法。如上所指出,他们使用混合的立体异构体,但是对单个异构体,化学制备是相似的。

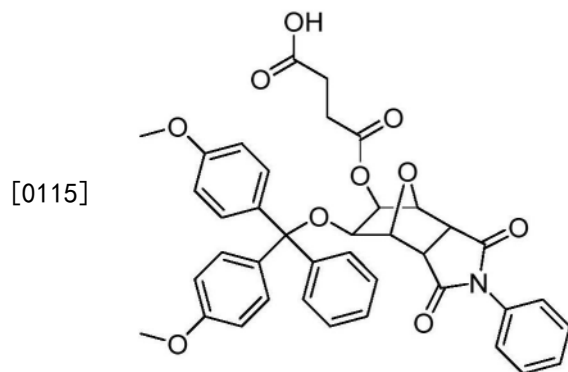
[0110] 在一个实施例中,固体支持物系统包含式(I)所示的通用接头:



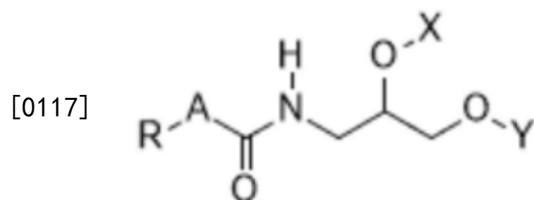
[0112] 其中,当A是附接至经涂覆的铂电极的包含取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团的连接部分时,W或Q中的一个是在碱性或中性条件下可裂解的封闭基团,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团;或者

[0113] 其中,当A是H、取代或未取代的脂肪族基团、取代或未取代的脂肪族醚、取代或未取代的杂烷基基团、取代或未取代的芳香族基团、取代或未取代的杂环基团时,Q或W中的一个附接至经涂覆的铂电极的、在碱性或中性条件下可裂解的接头部分,而W或Q中的另一个是H、或在酸性条件下可裂解的封闭基团。

[0114] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(II)所示的通用接头:



[0116] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(III)所示的通用接头(混合的异构体和单个异构体):



[0118] 其中

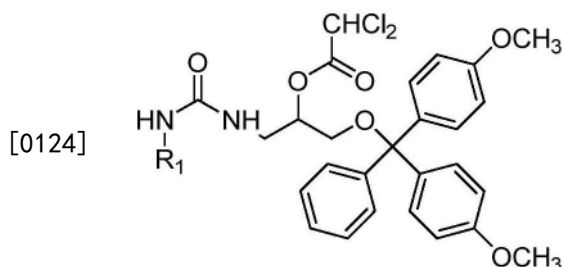
[0119] R是附接至铂电极或其他基础材料的烷基、芳基、杂烷基或杂芳基;

[0120] A是NH、O、S、烷基或芳基;

[0121] X是酰基、芳酰基或甲硅烷基;并且

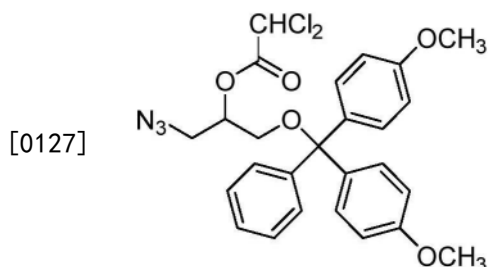
[0122] Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性条件下可去除的保护基团。

[0123] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(IV)所示的通用接头(混合的立体异构体和单个立体异构体):



[0125] R₁是附接至铂电极或其他基础材料的烷基、芳基、杂烷基或杂芳基。

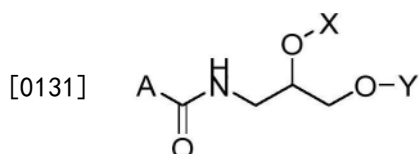
[0126] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(V)所示的通用接头分子(混合的立体异构体和单个立体异构体):



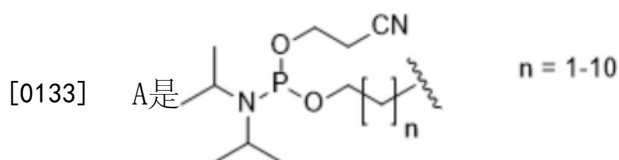
[0128] 在该实施例中,用叠氮化物处理含有胺的固体支持物以形成尿素键(参见图2)。该方法已成功用于USIII的合成(Yagodkin 2011)。在固定期间,二氯乙酰基保护基团可能会脱落,而已公布的方案在用于DNA合成之前,用1,1'-羰基二咪唑(CDI)激活的二氯乙酸重新封端。

[0129] 在本文的其他实施例中,通用接头是亚磷酰胺。

[0130] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(VI)所示的通用接头(混合的立体异构体和单个立体异构体):



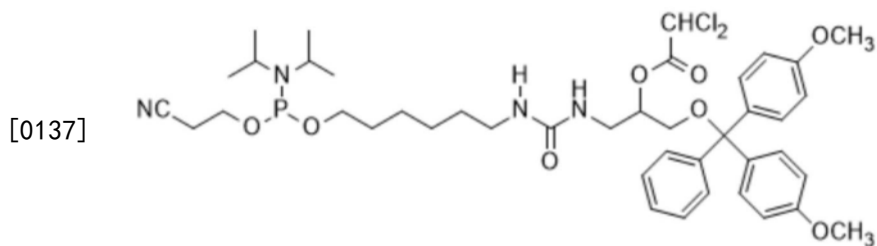
[0132] 其中



[0134] X是酰基、芳酰基或甲硅烷基;并且

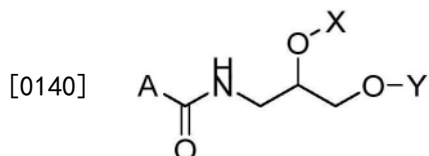
[0135] Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团。

[0136] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(VII)所示的通用接头(混合的立体异构体和单个立体异构体)。合成描述于图5中。

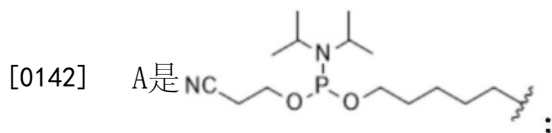


[0138] 在本文的其他实施例中,通用接头是亚磷酰胺。

[0139] 在一个实施例中,固体支持物系统包含式(VIII)所示的通用接头(混合的立体异构体和单个立体异构体):



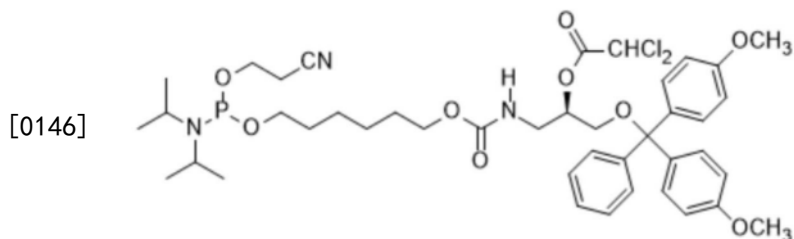
[0141] 其中



[0143] X是酰基、芳酰基或甲硅烷基;并且

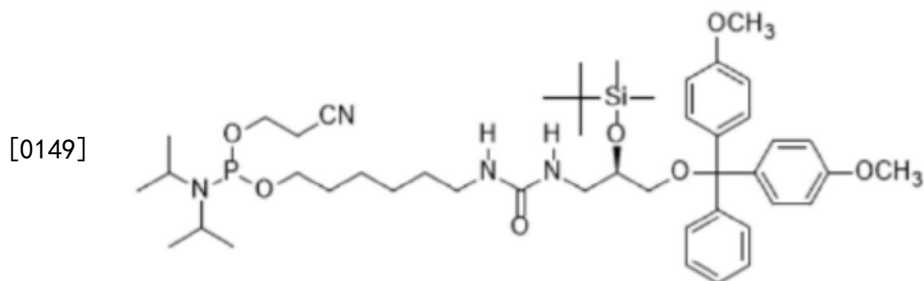
[0144] Y是二甲氧基三苯甲基基团、或在酸性或中性条件下可去除的保护基团。

[0145] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(IX)所示的通用接头(混合的立体异构体和单个立体异构体):



[0147] 上述接头结构显示了先前未曾报告的在脂肪族接头与保护的氨基丙二醇结构之间的氨基甲酸酯键。合成描述于图6中。

[0148] 在另一实施例中,固体支持物系统包含式(X)所示的通用接头(混合的立体异构体和单个立体异构体)。合成描述于图7中。



[0150] 本文所述的脂肪族基团可以具有约1至约10个碳、约1至约8个碳、约2至约6个碳,并且可以是饱和的或不饱和的。合适的脂肪族基团包括但不限于甲烷、乙炔、乙烯、乙烷、丙炔、丙烯、丙烷、1,2-丁二烯、1-丁炔、1-丁烯、丁烷、正戊基、壬基、或其组合。

[0151] 本文所述的低级烷基基团可以具有1至6个碳。例如,低级烷基基团包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基或正己基基团。

[0152] 本文所述的芳香族有机基团可以是环状碳链,可替代地根据Hückel规则定义。芳香族有机基团包括但不限于苯、苯基基团、苯胺、苯乙酮、苯甲醛、苯甲酸、苯腈、苯乙烯、邻二甲苯、或其组合。

[0153] 本文所述的低级醇基团可以是可溶于水的醇,例如甲醇、乙醇和丙醇。

[0154] 本文所述的杂芳香族基团可以是含有作为环状共轭 π 系统的一部分的杂原子(例如O、N、S)的芳香族化合物。

[0155] 本文所述的杂环基团可以是取代的或未取代的,可以是具有至少两种不同类型的原子的环状基团。杂环基团通常包含碳和氮、硫或氧,并且可以是3、4、5、6、7或8元环。饱和杂环基团的实例包括但不限于氮杂环丙烷、环氧乙烷、硫杂环丙烷、氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、吡咯烷(pyrrolide)、氧杂环戊烷、硫杂环戊烷、哌啶、氧杂环己烷、硫杂环己烷、氮杂环庚烷、氧杂环庚烷、硫杂环庚烷、氮杂环辛烷、氧杂环辛烷、硫杂环辛烷、氮杂环壬烷、氧杂环壬烷和硫杂环壬烷。不饱和杂环基团的实例包括但不限于氮杂环丙烯、氧杂环丙烯、硫杂环丙烯、氮杂环丁二烯、氧杂环丁二烯(ozete)、硫杂环丁烯(thiete)、吡咯、咪喃、噻吩、吡啶、吡喃、噻喃、氮杂卓、氧杂卓、硫杂卓、吡辛因、氧杂环辛三烯(oxocine)、硫杂环辛三烯(thiocine)、偶氮宁(azonine)、氧杂环壬四烯(oxonine)和硫堇(thionine)。

[0156] 本文所述的核苷基部分可以通过从核苷分子中损失-OH形成的基团。核苷分子包括但不限于胞苷、尿苷、腺苷、鸟苷、胸苷和肌苷。

[0157] 寡核苷酸基团可以是短DNA或RNA链。例如,长度为1-250个核苷酸(或核糖核苷酸)。

[0158] 本文提供了用于在固体支持物介质上合成寡核苷酸的方法。如本文件中所用,术语“寡核苷酸”具有其常规含义。一个非限制性方面,术语“寡核苷酸”通用于多聚脱氧核苷酸(含有2-脱氧-D-核糖)、多聚核糖核苷酸(含有D-核糖)、为嘌呤或嘧啶碱基的N-糖苷的任何其他类型的多聚核苷酸,以及含有非核苷酸主链的其他聚合物,前提是这些聚合物含有构象允许碱基配对和碱基堆叠的核碱基,如见于DNA和RNA中。应理解,如本文所用,术语“核苷”和“核苷酸”将包括那些不仅含有已知的嘌呤和嘧啶碱基,而且含有修饰的嘌呤和嘧啶碱以及已修饰的其他杂环碱基的部分(这些部分有时统称为“嘌呤和嘧啶碱基及其类似物”)。这样的修饰包括甲基化嘌呤或嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶等。本文的方法和组合物利用通用接头将寡核苷酸附接至固体支持物,其中非核苷接头附接至固体支持物材料。该方法允许使用相同的固体支持物,而与待合成的寡核苷酸的序列无关。

[0159] 描述了新颖的通用接头亚磷酰胺(ULP)试剂,该试剂可应用于经涂覆的铂电极以允许合成3'-未修饰的核酸链。如本文所体现,ULP的实例如式(VII)、(VIII)、(IX)和(X)所示,并且可以使用本文所述的方法制备。通用接头亚磷酰胺与由例如Caruthers等人(美国专利号4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679和5,132,418)披露的标准核苷酸亚磷酰胺相关,其中每一个文献的全部内容通过引用并入本文。

[0160] ULP结构中二氯乙酸(DCA)保护基团的敏感性可能导致合成困难。例如,如美国专利8,779,194(通过引用以其全文并入本文)中所述的使接头叠氮化物(式V)偶联至1-氨基-6-己醇以产生尿素键的初始尝试未成功,因为DCA基团无法在偶联条件下存在。如本文所

述,诸位发明人发现甲硅烷基基团(如叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS))可以用于在早期步骤中保护伯醇基团,并且可以在转化为亚磷酰胺之前在最后的反应步骤中用氟化物试剂(如水性四丁基氟化铵(TBAF))去除。该方法得到了高产率并且允许合成靶ULP,如在图5中显示。

[0161] 尽管1-氨基-6-己醇主要由于可商购性而被用于图5中所述的过程中,但是该过程不限于该接头。可以使用任何合适的接头。在反应性亚磷酰胺(在伯羟基基团处)与氨基丙二醇触发剂(DMT保护的)之间的接头中可以存在其他烷基长度和结构。例如,接头中可以存在芳基或杂芳基基团,只要这些基团在DNA合成偶联循环中没有反应性。在图6和7中描述的其他ULP中,在亚酰胺基团与氨基丙二醇触发剂之间的接头的选择同样是可调节的。

[0162] 在图5中显示的合成过程期间选择使用TBDMS来保护伯羟基基团,因为其可以通过用氟化物试剂(像TBAF)处理来去除。可以使用其他甲硅烷基保护基团(例如,TBDPS)来代替TBDMS。类似地,其他氟化物脱保护试剂是可用的并且可以用来代替TBAF。在任何情况下,甲硅烷基保护基团的去除必须不影响酸敏感性DMT基团和碱敏感性DCA基团。可以使用其他羟基保护基团(像例如苄基),并在温和的氢化条件下将其去除。在图6和7中描述的其他ULP中,伯羟基基团上的保护基团的选择同样是可调节的。

[0163] 在一个实施例中,希望的亚磷酰胺选自图5中显示的式。

[0164] 在一个实施例中,提供了一种产生ULP(如根据式(VII)的ULP)的方法,其中1-氨基-6-己醇与氯甲酸对硝基苯基酯(4-NPC)反应,并且伯醇进一步用TBDMS保护。然后将所得的化合物偶联至接头胺3(结构显示在图4中)以得到TBDMS保护的尿素。氨基丙二醇接头胺3的S-异构体或外消旋混合物也可以使用,并且可能具有与R-异构体相当的环化和切割速率。对于S-异构体化合物,仅化合物的旋光性是相反的,并且外消旋化合物不具有光学活性。在任何情况下,需要尿素、酰胺或氨基甲酸酯质子的存在以在DCA触发剂水解后促进图2中所述的重排。DCA酯可以例如通过用如早前(Yagodkin 2011)所述的羰基二咪唑激活而形成。引入DCA酯的其他方法是可能的,但我们发现CDI方法是方便的,并且在合理的规模上得到了良好的产率。最后,用TBAF去除TBDMS基团,并将醇亚磷酰化以得到希望的亚磷酰胺(例如,ULP 1)。根据该实施例的用于产生ULP 1的示例性过程显示在图5中。

[0165] 在另一实施例中,提供了一种产生ULP(如根据式(IX)的ULP)的方法,其中首先制备TBDPS保护的1,6-己二醇,并将其用氯甲酸对硝基苯基酯(4-NPC)激活。然后使所得的化合物与接头胺3偶联以得到TBDPS保护的氨基甲酸酯。氨基丙二醇接头胺3的S-异构体或外消旋混合物也可以使用,并且可能具有与R-异构体相当的环化和切割速率。DCA酯可以例如通过用羰基二咪唑激活而形成,但其他方法是可能的。最后,用TBAF去除TBDPS基团,并将醇亚磷酰化以得到希望的亚磷酰胺(例如,ULP 2)。根据该实施例的用于产生ULP 2的示例性过程显示在图6中。

[0166] 在另一实施例中,提供了一种产生ULP(如根据式(X)的ULP)的方法,其中使用氟化物触发的甲硅烷基保护基团而不是碱引发的DCA保护基团来制备ULP(例如,ULP3)。根据该实施例,合成起始于(R)氨基丙二醇,如图4中显示,但使用TBDMS-C1来保护仲羟基基团(3个步骤的产率为66%)。然后用氢氧化铵去除三氟乙酰胺保护基团。胺与氯甲酸对硝基苯基酯(4-NPC)激活的6-氨基己醇的反应产生尿素键。将伯醇直接亚磷酰化以得到希望的亚磷酰胺(例如,ULP 3)。根据该实施例的用于产生ULP 3的示例性过程显示在图7中。

[0167] 任何适用于寡核苷酸合成的支持物材料都可以用于本发明。例如,固体支持物可以是珠粒、颗粒、板材、浸杆、棒、膜、过滤器、纤维(例如,光学或玻璃的)、半导体装置或任何其他合适的形式。另外的合适的固体支持物包含如下材料,这些材料包括但不限于硼硅酸盐玻璃、琼脂糖、琼脂糖凝胶、磁珠、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、膜、二氧化硅、半导体材料、硅、有机聚合物、陶瓷、玻璃、金属、塑性聚碳酸酯、聚碳酸酯、聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮和钠钙玻璃。基质体可以呈珠粒、盒、柱、圆柱体、圆盘、皿(例如,玻璃皿、皮氏培养皿(PETRI dish))、纤维、薄膜、过滤器、微量滴定板(例如,96孔微量滴定板)、多刃杆、网、丸粒、板、环、棒、辊、板材、玻片、杆、托盘、管或小瓶的形式。基质可以是单个离散体(例如,单个管、单个珠粒)、任何数目的多个基质体(例如,10根管的架、几个珠粒)、或其组合(例如,托盘包含多个微量滴定板、填充有珠粒的柱、填充有珠粒的微量滴定板)。

[0168] 固体支持物材料的材料组成可以是任何合适的材料,如聚合物或基于二氧化硅的支持物材料。特别的实例包括塑料、尼龙、玻璃、二氧化硅、金属、金属合金、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、交联葡聚糖、及其组合。

[0169] 固体支持物

[0170] 在一方面,用于寡核苷酸合成的支持物材料可以包含扁平(平面)电极。取决于凹槽电极的取向,扁平电极产生发散场或均匀场。可以用电极的面对彼此的凹槽侧对扁平电极定向,以产生用于电细胞融合的发散场。可替代地,可以用面对彼此的扁平侧对其定向,从而为电穿孔提供均匀场。

[0171] 扁平电极可以是包含多个单元和表面的稠密电极阵列,其中该多个单元中的每个单元包括阳极和周向阴极,其中阳极中的每一个是可单独寻址的电极,并且其中多孔反应层被吸附到表面。

[0172] 可以使用标准CMOS技术来制造电极阵列装置。该装置利用环状有源电极和连续周向对电极的交替阵列。在CMOS工艺中,使用铝布线和电极制造半导体硅晶片,然后通过溅射另一金属进行“后加工”。在某些实施例中,金属是铂。

[0173] 另一形式是用排列成行和列的环状电极制成标准电极阵列装置,该电极阵列的每个“单元”被线分隔。单元包括电极和独立地以电子方式单独访问每个电极所需的相关电路。在某些实施例中,可用将分隔每个单元的线升至电极阵列的表面(其中电极具有表面暴露),并作为阵列范围的对电极网发挥作用,其各个电极在每个电化学生成步骤中接通。

[0174] 寡核苷酸合成可以在包含多个单独可寻址的铂电极的支持物介质上进行。可以使用芳基重氮盐涂覆电极。芳基重氮盐由通式 $R-Ar-N_2^+X^-$ 表示,其中R可以是任何有机基团,如烷基或芳基,并且X是无机或有机阴离子,如卤素或四氟硼酸盐。术语“卤素”表示氯、氟、溴或碘。在一个实施例中,可以使用氨基苯基乙酸(APA)的重氮盐和电化学还原(也称为电沉积或电接枝)将羧酸涂层施加到电极表面。已经描述了向金电极涂苯乙醇基团用于DNA合成的类似化学(Levrie, 2018, Jpn. J. Appl. Physics, 04FM01, 其通过引用以其全文并入本文)。

[0175] 寡核苷酸合成

[0176] 寡核苷酸的标准合成方法在本领域中是已知的(例如,美国专利号5,750,666、6,111,086、6,008,400和5,889,136),其中每一个通过引用以其全文并入本文。

[0177] 支持物结合的寡核苷酸合成依赖于将核苷酸依序添加至生长链的一端。在本发明

中,使本文所述的通用接头反应到固体表面支持物(例如用胺涂覆的铂)上用于寡核苷酸合成。典型地,使第一核苷(在存在的任何环外胺官能团上具有保护基团)附接至固体支持物介质,并逐步添加激活的亚磷酸酯化合物(其也拥有适当的保护基团)以延长生长的寡核苷酸。用于固相合成的另外的方法可参见Caruthers美国专利号4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679和5,132,418,以及Koster美国专利号4,725,677,其中每一个文献的全部内容通过引用并入。

[0178] 通过向选择的电极施加足够的电势,在选择的电极处产生能够从分子上的化学官能团中电化学去除保护基团的电化学试剂。当由电极产生的化学试剂起作用以从选择的分子中脱保护或去除例如酸或碱不稳定的保护基团时,在选择的分子处发生根据本发明的保护基团的去除或“脱保护”。甲硅烷基保护基团可以用氟化物离子源脱保护。因此,在一些实施例中,化学试剂是氟化物试剂。合适的氟化物试剂的实例包括但不限于四丁基氟化铵(TBAF)、吡啶(HF)_x、三乙胺三氟化氢(TREAT HF)、氢氟酸、三(二甲基氨基)二氟三甲基硅酸铈(TASF)和氟化铵。

[0179] 在本发明的一个实施例中,根据本发明提供了单体核苷酸的末端或接头分子(即,将例如单体或核苷酸与基质“连接”的分子),其由通过电化学产生的试剂可去除的保护基团保护。使一个或多个保护基团暴露于在电极处电化学产生的试剂,并从第一选择区域中的单体、核苷酸或接头分子中将其去除以暴露反应性官能团。然后使基质与第一单体或预形成的分子接触,该第一单体或预形成的分子与暴露的一个或多个官能团键合。该第一单体或预形成的分子还可以拥有通过电化学产生的试剂可去除的至少一个保护的化学官能团。

[0180] 如本文所用,术语“保护基团”(或“封闭基团”)是指本领域已知的不稳定的化学部分,其用于在合成程序期间保护羟基、氨基或巯基基团免于不希望的反应。如本领域已知的保护基团总体描述于T.H.Greene和P.G.M.Wuts,1999,Protective Groups in Organic Synthesis,第3版,John Wiley&Sons,New York。羟基保护基团的实例包括但不限于苄基氧基羰基、4-硝基苄基氧基羰基、4-溴苄基氧基羰基、4-甲氧基苄基氧基羰基、甲氧基羰基、叔丁氧基羰基(BOC)、异丙氧基羰基、二苯基甲氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基、2-糠基氧基羰基、烯丙基氧基羰基(Alloc)、乙酰基(Ac)、甲酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、甲氧基乙酰基、苯氧基乙酰基、苯甲酰基(Bz)、甲基、叔丁基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、1,1-二甲基-2-丙烯基、3-甲基-3-丁烯基、烯丙基、苄基(Bn)、对甲氧基苄基二苯基甲基、三苯基甲基(三苯甲基)、4,4'-二甲氧基三苯基甲基(DMT)、取代或未取代的9-(9-苄基)咕吨基(pixyl)、四氢呋喃基、甲氧基甲基、甲基硫基甲基、苄基氧基甲基、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、甲磺酰基、对甲苯磺酰基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、和三异丙基甲硅烷基。在一些实施例中,保护基团是DMT。

[0181] 在一些实施例中,羟基保护基团是甲硅烷基保护基团。甲硅烷基保护基团的实例包括但不限于2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基、2-三甲基甲硅烷基乙基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、三甲基甲硅烷基(TMS)、三乙基甲硅烷基(TES)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)、异丙基二甲基甲硅烷基(IPDMS)、二乙基异丙基甲硅烷基(DEIPS)、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)、四异丙基二亚硅氧烷基(TIPDS)、二叔丁基亚甲硅

烷基 (DTBS)、和叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS)。

[0182] 然后可以以相同的方式使单体或预形成的分子脱保护以得到第二组反应性化学官能团。随后使第二单体或预形成的分子与基质接触以与第二组暴露的官能团键合,该第二单体或预形成的分子也可以拥有通过电化学产生的试剂可去除的至少一个保护基团。可以在合成过程期间的任何时间点将任何未反应的官能团任选地封端。脱保护和键合步骤可以在基质上于该位点处依次重复,直到获得具有希望的序列和长度的聚合物或寡核苷酸。

[0183] 键合有一个或多个拥有至少一个保护的化学官能团的分子的基质可以靠近电极阵列,该阵列与缓冲或清除溶液接触。在向阵列中的选择的电极施加足以产生能够对保护的化学官能团进行脱保护的电化学试剂的电势之后,对靠近这些选择的电极的分子进行脱保护以暴露反应性官能团,从而使它们准备好用于键合。然后使单体溶液或预形成的分子(如蛋白质、核酸、多糖和卟啉)的溶液与基质表面接触,并且这些单体或预形成的分子与脱保护的化学官能团键合。

[0184] 本文所述的方法可进一步包括使所述单体-官能化支持物介质与封端剂反应;以及任选地用氧化剂处理所述单体-官能化支持物介质。

[0185] 寡核苷酸合成后,可以从固体支持物介质中释放寡核苷酸或将寡核苷酸固定到固体支持物介质上。这些方法可以包括如下步骤:用有效从支持物介质、优选地从附接至支持物介质的接头切割寡核苷酸的试剂处理寡核苷酸。在一些这样的实施例中,用有效切割寡核苷酸的试剂处理寡核苷酸去除存在于寡核苷酸上的保护基团。在一些实施例中,切割的寡核苷酸在切割位点处具有3'未修饰的末端羟基基团。在多个实施例中,用无水氨处理固体支持物介质,处理的时间足以切割寡核苷酸。

[0186] 然后通过本领域已知的程序,例如通过尺寸排阻色谱、高效液相色谱(例如,反相HPLC)、差异沉淀法等制备切割的寡核苷酸。在根据本发明的一些实施例中,从固体支持物介质切割寡核苷酸,同时5'-OH保护基团仍保留在最终的核苷上。然后使该所谓的DMT化(或三苯甲基化(trityl-on))寡核苷酸经受色谱法,之后通过在有机酸中处理去除DMT基团,之后对寡核苷酸进行脱盐并将其进一步纯化以形成最终产物。

[0187] 在一些实施例中,固定的寡核苷酸可以由本文所述的通用支持物接头系统制备。首先用叔丁胺在乙腈中的20%溶液将寡核苷酸结合的支持物结构处理1小时(Chang和Horn,1999,Nucleosides and Nucleotides,2006,pp 1205-6),以去除氰基乙基基团和丙烯腈副产物。所得的磷酸二酯是稳定的,并且当用氨水或AMA(1:1,37%氢氧化铵:40%甲胺)处理水解二氯乙酸酯基团时,其不切割(参见例如图3)。在保护基团的切割完成后,洗涤芯片,并且寡核苷酸保持固定在电极上。

[0188] 寡核苷酸的用途

[0189] 本文提供的方法和组合物可用于基因组编辑文库(如CRISPR gRNA筛选文库和shRNA筛选文库)、靶向测序(如杂交捕获或分子倒置探针(MIP)、诱变文库、用于原位杂交应用的寡核苷酸的产生、以及用于DNA数据存储的寡核苷酸池的产生。

[0190] 自动化DNA合成的常见应用是用于产生PCR引物。PCR使用一对定制引物指导DNA在被扩增序列的相对端朝向彼此延伸。这些引物的长度典型地为18至24个碱基,并且应仅编码被扩增序列的特定上游和下游位点,如图10中显示。

[0191] 如图11中显示,本文所述的通用接头亚磷酰胺可用于在单个合成柱中制备2个引

物。如图11中显示,ULP在引物1与引物2DNA序列之间引入间隔物。在“脱三苯甲基(trityl-off)”DNA合成后,可以用4M氨/MeOH处理固体支持物。如常用3'-羟基基团从固体支持物释放引物1序列。同时切割通用接头间隔物以得到具有3'-羟基基团的引物2序列。用氨水或AMA去除保护基团产生引物1和引物2的1:1混合物。蒸发留下引物的1:1混合物以及污染的失效序列和去除的保护基团。

[0192] 通常,通过去除寡聚体上的5'-三苯甲基基团并使用凝胶过滤柱简单地“脱盐”来纯化PCR引物。凝胶过滤是基于分子大小分离混合物的组分,并且是用于寡核苷酸纯化的最简单的色谱形式之一。切割的保护基团和短截短序列保留在凝胶基体中,而较大的寡核苷酸分子快速洗脱通过凝胶过滤柱。由于引物1和引物2的长度大致相同,它们以相同的部分洗脱。使用2种寡聚体的组合消光系数通过260nm吸光度确定引物的1:1混合物的浓度。1:1混合物可以直接用于PCR,而不必分别溶解2种寡聚体、确定每种引物的浓度、计算每种引物的体积以实现1:1的混合物、吸移并混合所需的体积、以及重新干燥该混合物。因此,通过自动合成两种引物的1:1混合物并在单次操作中纯化,节省了大量的劳动。

[0193] 使用亚磷酸胺,可以在固体支持物基质的表面上在分步反应过程中通常以3'至5'方向合成DNA合成化学分子,并且该分步反应过程由以下组成:(1)脱三苯甲基步骤,以从之前添加的核苷中去除保护基团,(2)下一个核苷与生长的DNA寡聚体偶联,(3)氧化,以将亚磷酸三酯中间体转化为更稳定的磷酸三酯,(4)不可逆地将任何未反应的5'羟基基团封端。不受理论的束缚,将未反应的5'羟基基团封端通过避免在随后的循环中从这样的3'羟基基团继续聚合可以帮助防止合成的序列相对于预选择的核酸序列有缺失。可以重复该循环以添加下一个碱基。固体支持物可以包含多种单元,如珠粒,包括但不限于高度多孔的聚合物珠粒;玻璃或二氧化硅珠粒,包括但不限于熔融二氧化硅(无定形纯二氧化硅)、石英(结晶纯二氧化硅)、金属(钛,例如氮化钛或铂)、或本文所述或在其他方面为本领域已知的可装入合成试剂被递送的腔或柱中的其他任何其他合适的珠粒。使用微流体方法,本文所述的方法、装置和组合物可用于对核酸合成方法进行规模化。

[0194] 脱三苯甲基的寡核苷酸合成是指在偶联和氧化步骤期间使用保护靶寡核苷酸的5'-羟基基团的5'-O'三苯甲基基团。合成完成后,可以用酸从靶寡核苷酸(例如,“脱三苯甲基序列”)切割三苯甲基基团。

[0195] 酸性条件可包括约1至约6.9、约2至约6.9、约3至约6.9、约4至约6.9、约5至约6.9、和约6至约6.9的pH。

[0196] 中性条件可包括约6.9至约7、约7、约7至约7.1、约7至约7.2、约7至约7.3、约7至约7.4、和约7至约7.5的pH。

[0197] 定义

[0198] “亚磷酸胺”(RO)₂PNR₂是指亚磷酸二酯的单酰胺。亚磷酸胺的特点可包括其对弱酸(例如,三乙基氯化铵或1H-四唑)催化的亲核体的高反应性。在这些反应中,进入的亲核体可以替换NR₂部分。

[0199] “脂肪族”是指不含有任何类型的环以及环状烃基团(如果它们不具有芳香性)的开链烃基团,无论是直链还是支链。

[0200] “脂肪族醚”是指分子中醚基团上没有芳基基团的醚。

[0201] “芳香族”是指单环和多环芳香族烃基团。

[0202] “酰基”是指通过从含氧酸(包括无机酸)去除一个或多个羟基基团而衍生的部分。它可以含有双键键合的氧原子和烷基基团(R-C=O)。

[0203] “芳酰基”是指任何衍生自芳香族羧酸的单价基团R-CO-。

[0204] “邻二醇”是指占据邻位的两个羟基基团,即它们附接至相邻的原子。

[0205] “烷基”是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链烃基,其不含有不饱和度,具有一至十二个碳原子(优选一至八个碳原子或一至六个碳原子),并且通过单键附接至分子的其余部分,例如甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)等。

[0206] “杂烷基”是指由以下基团中的一个或多个取代的烷基基团:烷基、烯基、卤代、卤代烷基、氰基、芳基、环烷基、杂环基、杂芳基、 $-OR^{14}$ 、 $-OC(O)R^{14}$ 、 $-N(R^{14})_2$ 、 $-C(O)R^{14}$ 、 $-C(O)OR^{14}$ 、 $-C(O)N(R^{14})_2$ 、 $-N(R^{14})C(O)OR^{16}$ 、 $-N(R^{14})C(O)R^{16}$ 、 $-N(R^{14})(S(O)_tR^{16})$ (其中t是1至2)、 $-S(O)_tOR^{16}$ 、 $-SR^{16}$ (其中t是1至2)、 $-S(O)_tR^{16}$ (其中t是0至2)、以及 $-S(O)_tN(R^{14})_2$ (其中t是1至2),其中每个 R^{14} 独立地为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基;并且每个 R^{16} 是烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基或杂芳基烷基。

[0207] “芳基”是指仅由氢和碳组成并含有六至十九个碳原子(优选六至十个碳原子)的芳香族单环或多环烃环系统,其中该环系统可以是部分饱和的。芳基基团包括但不限于如苄基、苯基和萘基等基团。除非说明书中另有特别说明,否则术语“芳基”或前缀“芳(ar-)”(如在“芳烷基”中)意指包括任选地被一个或多个选自由以下组成的组的取代基取代的芳基基团:烷基、烯基、炔基、卤代、卤代烷基、氰基、硝基、芳基、芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、 $-R^{15}-OR^{14}$ 、 $-R^{15}-OC(O)R^{14}$ 、 $-R^{15}-N(R^{14})_2$ 、 $-R^{15}-C(O)R^{14}$ 、 $-R^{15}-C(O)OR^{14}$ 、 $-R^{15}-C(O)N(R^{14})_2$ 、 $-R^{15}-N(R^{14})C(O)OR^{16}$ 、 $-R^{15}-N(R^{14})C(O)R^{16}$ 、 $-R^{15}-N(R^{14})(S(O)_tR^{16})$ (其中t是1至2)、 $-R^{15}-S(O)_tOR^{16}$ (其中t是1至2)、 $-R^{15}-SR^{16}$ 、 $-R^{15}-S(O)_tR^{16}$ (其中t是0至2)、以及 $-R^{15}-S(O)_tN(R^{14})_2$ (其中t是1至2),其中每个 R^{14} 独立地为氢、烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、或杂芳基烷基;每个 R^{15} 独立地为直接键或直链或支链的亚烷基或亚烯基链;并且每个 R^{16} 是烷基、卤代烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基、或杂芳基烷基。

[0208] “杂环基”是指稳定的3至18元非芳香族环基团,其由碳原子和一至五个选自由氮、氧和硫组成的组的杂原子组成。出于本发明的目的,杂环基基团可以是单环、双环或三环系统,其可以包括稠合或桥接的环系统,其可以是部分不饱和的;并且杂环基基团中的氮、碳或硫原子可以任选地被氧化;氮原子可以任选地被烷基化/取代;并且杂环基基团可以是部分或完全饱和的。这样的杂环基基团的实例包括但不限于二氧杂环戊基、十氢异喹啉基、咪唑基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异恶唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢化异吲哚基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧化吡咯烷基、恶唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三噻烷基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、硫代吗啉基、1-氧代-硫代吗啉基和1,1-二氧代-硫代吗啉基、高哌啶基、高哌嗪基和奎宁环基。除非说明书中另有特别说明,否则术语“杂环基”意指包括如上所定义的任选地被一个或多个选自由以下组成的组的取代基取代的杂环基团:烷基、烯基、卤代、卤代烷基、氰基、氧代、硫代、芳基、

醇中的1.6% (v/v) TEA:3HF (对于ULP3) 从电极表面切割通用接头结构。可替代地,如在图2中对ULP1和ULP3显示的,可以使用在乙腈 (ACN) 中的20%叔丁胺或10%1,8-二氮杂双环(5.4.0)十一碳-7-烯 (DBU) 将通用接头固定至表面。

[0214] 用在甲醇中的无水氨处理ULP1和ULP 2快速切割二氯乙酰基基团,并且去磷酸化释放寡聚体。用TEA:3HF处理ULP3切割TMDMS保护基团,这也导致去磷酸化和寡聚体释放。用在ACN中的叔丁胺或DBU处理ULP1、ULP2和ULP3快速切割氰基乙基基团并将寡核苷酸固定至表面。

[0215] 从支持物释放寡核苷酸后,将溶液从固体支持物中去除,并在螺帽管中与氨水(37%)或AMA(1:1,37%氢氧化铵:40%甲胺)组合。加热后,将完全脱保护的寡核苷酸在真空中干燥并使用标准方法纯化。

[0216] 对于固定的寡核苷酸,首先用叔丁胺在乙腈中的20%溶液将固体支持物处理1小时(参见例如,Chang和Horn,1999,Nucleosides and Nucleotides,2006,pp 1205-6),以去除氰基乙基基团和丙烯腈副产物。所得的磷酸二酯是稳定的,并且当用氨水或AMA处理水解二氯乙酸酯基团时,其不切割。在保护基团的切割完成后,洗涤固体支持物,并且寡核苷酸保持固定在电极上。

[0217] 实例2:接头胺3(R)异构体

[0218] 使用修改的用于外消旋混合物的公布程序,将接头胺3(图4)分离为单个立体异构体(参见例如,Azhayev,2001)。(R)-3-氨基-1,2-丙二醇与三氟乙酸甲酯的三氟乙酰胺保护之后,在吡啶中与有限量的二甲氧基三苯甲基氯反应。由于用水容易洗去过量的三氟乙酸酯,因此产物很容易通过萃取处理分离。在氢氧化铵脱保护后,通过从己烷中沉淀去除痕量杂质以得到呈白色固体的(R)接头胺3,产率为91%。先前报告了外消旋混合物为无色糖浆。在制备接头胺3的过程中产生的中间体化合物(图4)如下所示:

[0219] 1. (R)-N-(2,3-二羟丙基)-2,2,2-三氟乙酰胺。(MW 187.12) ^1H NMR (CD_3CN)

[0220] 2. (R)-N-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-羟丙基)-2,2,2-三氟乙酰胺 (MW 489.48)

[0221] 3. (R)-1-氨基-3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)丙-2-醇 (MW 393.48)

[0222] 实例3:通用接头亚磷酰胺(尿素键)-ULP 1

[0223] ULP结构中二氯乙酸(DCA)保护基团的敏感性导致合成困难。我们发现叔丁基二甲基甲硅烷基(TBDMS)可以用于在早期步骤中保护伯醇基团,并且可以在转化为亚磷酰胺之前在最后的反应步骤中用水性四丁基氟化铵(TBAF)去除。该方法得到了高产率并且允许合成图5中显示的靶ULP。我们首先尝试了更稳定的叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS),如图6中显示。TBDPS可行,但在水性四丁基氟化铵(TBAF)中反应时间较长,使DCA发生了一些水解。

[0224] 如美国专利8,779,194中所述,我们首先尝试使接头叠氮化物(结构V)与1-氨基-6-己醇偶联以产生尿素键。然而,我们发现二氯乙酰基基团无法在偶联条件下存在。相反,我们使1-氨基-6-己醇与氯甲酸对硝基苯基酯(4-NPC)反应,并用TBDMS进一步保护伯醇。将该化合物偶联至接头胺3(结构显示在图4中)以得到TBDMS保护的尿素。通过用如早前(Yagodkin 2011)所述的羰基二咪唑激活形成了DCA酯。最后,用TBAF去除TBDMS基团,并将醇亚磷酰化以得到希望的亚磷酰胺(ULP 1)。在制备ULP1的过程中产生的中间体化合物(图5)如下所示:

- [0225] 1. 6-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)己基氨基甲酸4-硝基苯基酯
- [0226] 2. (R)-1-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-羟丙基)-3-(6-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)己基)尿素
- [0227] 3. (R)-1,1-双(4-甲氧基苯基)-16,16,17,17-四甲基-7-氧代-1-苯基-2,15-二氧杂-6,8-二氮杂-16-硅杂十八烷-4-基2,2-二氯乙酸酯
- [0228] 4. (R)-1-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-3-(3-(6-羟基己基)脲基)丙-2-基2,2-二氯乙酸酯
- [0229] 实例4:通用接头亚磷酰胺(氨基甲酸酯键)-ULP2
- [0230] 使用与实例3中所述的方案类似的方案制备具有碳酸酯结构的ULP2(参见图6)。在该实例中,首先制备TBDPS保护的1,6-己二醇,并用氯甲酸对硝基苯基酯(4-NPC)激活。使该化合物与接头胺3偶联以得到TBDMS保护的氨基甲酸酯。如常用羰基二咪唑激活形成了DCA酯。最后,用TBAF去除TBDPS基团,并将醇亚磷酰化以得到希望的亚磷酰胺(ULP2)。在制备ULP2的过程中产生的中间体化合物(图6)如下所示:
- [0231] 1. 6-(叔丁基二苯基甲硅烷基氧基)己-1-醇
- [0232] 2. 6-(叔丁基二苯基甲硅烷基氧基)己基4-硝基苯基碳酸酯
- [0233] 3. (R)-6-(叔丁基二苯基甲硅烷基氧基)己基3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-羟丙基氨基甲酸酯
- [0234] 4. (R)-1,1-双(4-甲氧基苯基)-17,17-二甲基-7-氧代-1,16,16-三苯基-2,8,15-三氧杂-6-氮杂-16-硅杂十八烷-4-基2,2-二氯乙酸酯
- [0235] 5. (R)-1-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-3-((6-羟基己基氧基)羰基氨基)丙-2-基2,2-二氯乙酸酯
- [0236] 实例5:通用接头亚磷酰胺(TBDMS保护的)-ULP3
- [0237] 使用氟化物触发的甲硅烷基保护基团而不是碱触发的DCA保护基团来制备ULP3(图7)。合成起始于(R)氨基丙二醇,如图4中显示,但使用TBDMS-C1来保护仲羟基基团(3个步骤的产率为66%)。用氢氧化铵去除三氟乙酰胺保护基团。胺与氯甲酸对硝基苯基酯(4-NPC)激活的6-氨基己醇的反应产生尿素键。在该实例中,将伯醇直接亚磷酰化以得到希望的亚磷酰胺(ULP 3)。在制备ULP3的过程中产生的中间体化合物(图7)如下所述:
- [0238] 1. (R)-N-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-羟丙基)-2,2,2-三氟乙酰胺(MW 489.48)
- [0239] 2. (R)-N-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)丙基)-2,2,2-三氟乙酰胺(MW 603.74)
- [0240] TLC(乙酸乙酯-己烷[1:5]) $R_f=0.59$;质谱(EI模式) m/z 604[M+H]⁺。
- [0241] 3. (R)-3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)丙-1-胺(MW 507.74)
- [0242] TLC(甲醇-乙酸乙酯[1:5]) $R_f=0.60$; ¹H NMR(二甲基-d₆亚砷) δ 7.63(br s), 7.31(5H, m), 7.21(4H, d, J=9.3Hz), 6.87(4H, d, J=9.3Hz), 3.94(1H, m), 3.71(6H, s), 3.08-2.81(4H, 2x m), 0.77(9H, s), 0.00(3H, s), -0.10(3H, s);质谱(EI模式) m/z 508[M+H]⁺。
- [0243] 4. (R)-1-(3-(双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)-2-(叔丁基二甲基甲硅烷基氧基)丙基)-3-(6-羟基己基)尿素(MW 650.92)

[0244] TLC(乙酸乙酯) $R_f=0.54$; ^1H NMR(二甲基- d_6 亚砷) δ 7.38-7.16(9H, m&d, $J=9.0\text{Hz}$ 针对双峰), 6.84(4H, d, $J=9.0\text{Hz}$), 5.88(1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 5.52(1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 4.29(1H, t, $J=3.0\text{Hz}$), 3.79(1H, m), 3.70(6H, s), 3.34(2H, m), 3.08(2H, m), 2.90(4H, m), 1.27(8H, m), 0.80(9H, s), 0.00(3H, s), -0.05(3H, s); 质谱(EI模式) m/z 651[M+H]⁺。

[0245] 5. (R) -5-((双(4-甲氧基苯基)(苯基)甲氧基)甲基)-2,2,3,3-四甲基-8-氧代-4-氧杂-7,9-二氮杂-3-硅杂十五烷-15-基-2-氰基乙基二异丙基亚磷酰胺(ULP3)(MW 851.14)

[0246] ^1H NMR(二甲基- d_6 亚砷) δ 7.37(2H, d, $J=6.0\text{Hz}$), 7.22(7H, d&m, $J=9.0\text{Hz}$ 针对双峰), 6.84(4H, d, $J=9.0\text{Hz}$), 5.88(1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 5.22(1H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 3.79(1H, m), 3.74-3.64(8H, m&s), 3.54(4H, m), 3.07(2H, m), 2.89(4H, m), 2.72(2H, t, $J=6.0\text{Hz}$), 1.49(2H, m), 1.26(6H, m), 1.11(12H, m), 0.80(9H, s), 0.00(3H, s), -0.05(3H, s); ^{31}P NMR(乙腈- d_3) δ 146.98; 质谱(EI模式) m/z 851[M+H]⁺。

[0247] 实例6: DMT-CPG的制备

[0248] 使用受控孔玻璃(CPG)固体支持物评价了通用接头亚磷酰胺的性能。首先,如图8中显示,制备模型支持物(DMT-CPG)。商购获得长链烷基胺CPG(LCAA-CPG)并对其进行修饰以提供每克CPG具有已知负载量的二甲氧基三苯甲基基团的固体表面。首先通过使氯甲酸对硝基苯基酯与6-氨基己醇反应制备了新颖的试剂。在胺与氯甲酸酯特异性反应后(如通过TLC所证明),在同一罐中添加DMT-氯化物以与伯醇反应。所得的DMT保护的PNP氨基甲酸酯在硅胶色谱后作为纯的产物获得。与LCAA-CPG(147 $\mu\text{mol/g}$)的进一步反应得到DMT-CPG(99 $\mu\text{mol/g}$),并将其用于ULP的进一步测定,如图9中显示。

[0249] 实例7: 评价ULP试剂的固定、偶联和切割的DMT-CPG测定

[0250] 对于ULP1和ULP3,使用DMT-CPG评价通用接头亚磷酰胺在不同切割条件下的行为,如图9中显示。例如,称出3 μmol (30mg)的CPG(DMT负载量=99 $\mu\text{mol/g}$),并将其置于具有一性玻璃料的流通DNA合成柱(Biosearch Technologies,部件号CL-1501-10)中。用5%TCA/DCM(在RT下5min)去除DMT基团。使用76mL $\text{cm}^{-1}\mu\text{mol}^{-1}$ 的消光系数,从吸光度最大值(约498nm)处的可见光谱峰记录三苯甲基阳离子的浓度。将CPG用乙腈冲洗,然后与1mL在乙腈中的0.1M ULP和0.1M DCI(二氰基咪唑)的1:1混合物偶联。5min后,用乙腈将ULP从CPG上洗涤掉,然后用在吡啶/水中的碘氧化(5min)。用5%TCA/DCM处理CPG,并测量三苯甲基阳离子的浓度,并计算ULP与CPG的偶联%。将UL-CPG用乙腈冲洗,然后与1mL的0.1M BHQ-1(Black Hole Quencher 1)DMT亚磷酰胺(Biosearch Technologies,部件号BNS-5051-50)和0.1M DCI(4,5-二氰基咪唑)的1:1混合物偶联。5min后,用乙腈将BHQ-1亚磷酰胺从CPG上洗涤掉,然后用在吡啶/水中的碘氧化(5min)。用5%TCA/DCM处理UL-BHQ-1CPG,测量三苯甲基阳离子的浓度,并计算BHQ-1与UL-CPG的偶联%。将UL-BHQ-CPG在真空中干燥(约30mg),并用于研究BHQ-1向溶液中的释放。使用34mL $\text{cm}^{-1}\mu\text{mol}^{-1}$ 的消光系数,从吸光度最大值(约534nm)处的可见光谱峰记录BHQ-1的浓度。如实例1中所述,用在无水甲醇中的4M氨处理2-3mg的UL1-BHQ-CPG或UL2-BHQ-CPG,并随时间推移测量BHQ-1释放%。以类似的方式,用在无水甲醇中的1.6%(v/v)TEA:3HF处理UL3-BHQ-CPG,并随时间推移测量BHQ-1释放%。图12显示了如通过分光光度测定确定的在22 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.2^{\circ}\text{C}$)下在1.6%(v/v)TEA:3HF/MeOH中从CPG-UL3-BHQ1切割BHQ1的动力学。

[0251] 实例8: 用通用亚磷酰胺同时合成DNA引物对

[0252] 自动化DNA合成的常见应用是用于产生PCR引物。PCR使用一对定制引物指导DNA在被扩增序列的相对端朝向彼此延伸。这些引物的长度典型地为18至24个碱基,并且必须仅编码被扩增序列的特定上游和下游位点,如图10中显示。

[0253] 需要高浓度的PCR引物,从而防止它们在阵列仪器上合成。但引物的标准DNA合成将受益于使用通用接头亚磷酰胺在单个合成柱中制备2种引物的新颖方法。如图11中显示,将UL亚磷酰胺引入为在引物1与引物2DNA序列之间的间隔物。在“脱三苯甲基”DNA合成后,用4M甲胺/MeOH处理固体支持物。如常用3'-羟基基团从固体支持物释放引物1序列。同时切割通用接头间隔物以得到具有3'-羟基基团的引物2序列。用AMA去除保护基团产生引物1和引物2的1:1混合物。AMA的蒸发留下引物的1:1混合物以及污染的失效序列和去除的保护基团。AMA需要使用乙酰基保护的dC(Ac-dC)而不是苯甲酰基保护的dC,以防止由水性甲胺进行的转酰胺。使用浓氨(55°C,1小时)或AMA(55°C,10分钟)对寡聚体进行脱保护。

[0254] 通常,通过去除寡聚体上的5'-三苯甲基基团并使用凝胶过滤柱简单地“脱盐”来纯化PCR引物。凝胶过滤是基于分子大小分离混合物的组分,并且是用于寡核苷酸纯化的最简单的色谱形式。切割的保护基团和短截短序列保留在凝胶基体中,而较大的寡核苷酸分子快速洗脱通过凝胶过滤柱。由于引物1和引物2的长度大致相同,它们以相同的部分洗脱。使用2种寡聚体的组合消光系数通过260nm吸光度确定引物的1:1混合物的浓度。终端用户可以直接在PCR中使用1:1的混合物,而不必单独确定每种引物的浓度和计算每种引物的体积。

[0255] 说明书中提到的所有出版物和专利申请都指示了本发明所属领域的技术人员的技能水平。将所有出版物和专利申请通过引用并入本文,其程度如同特别地且单独地指示将每个单独的出版物或专利申请通过引用并入一般。

[0256] 尽管出于清楚理解的目的,已经通过说明和实例对前述本发明进行了一些详细描述,但是显而易见的是,在所附的权利要求书的范围内可以实施某些变化和修改。

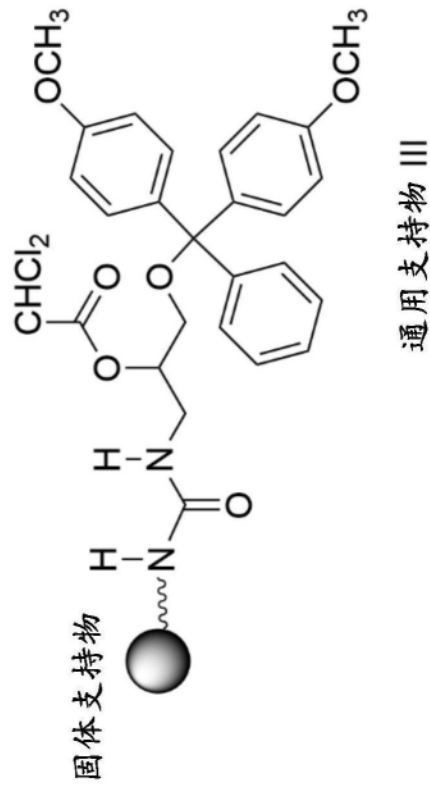
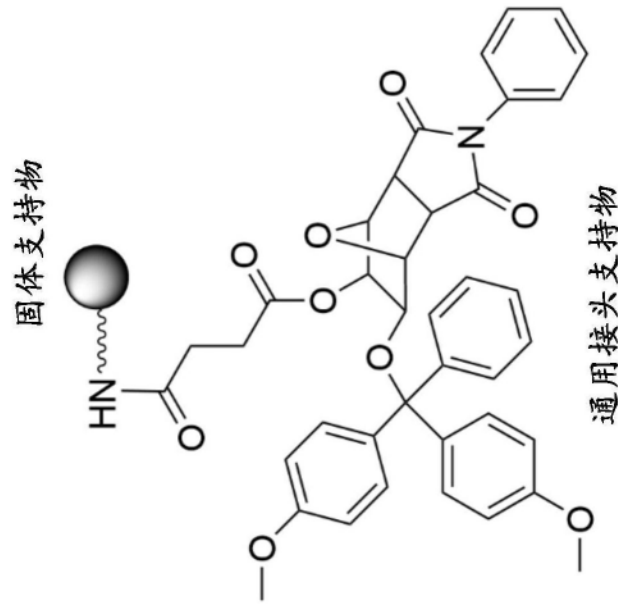


图1

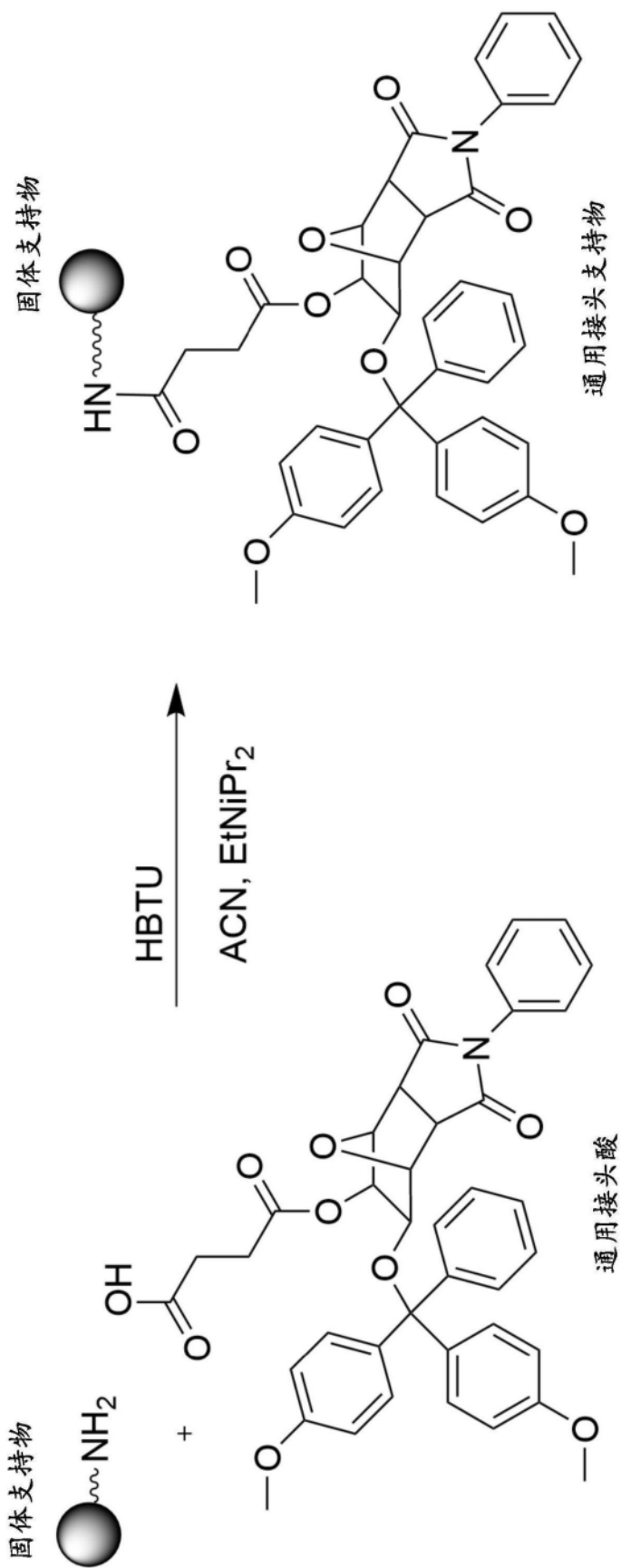
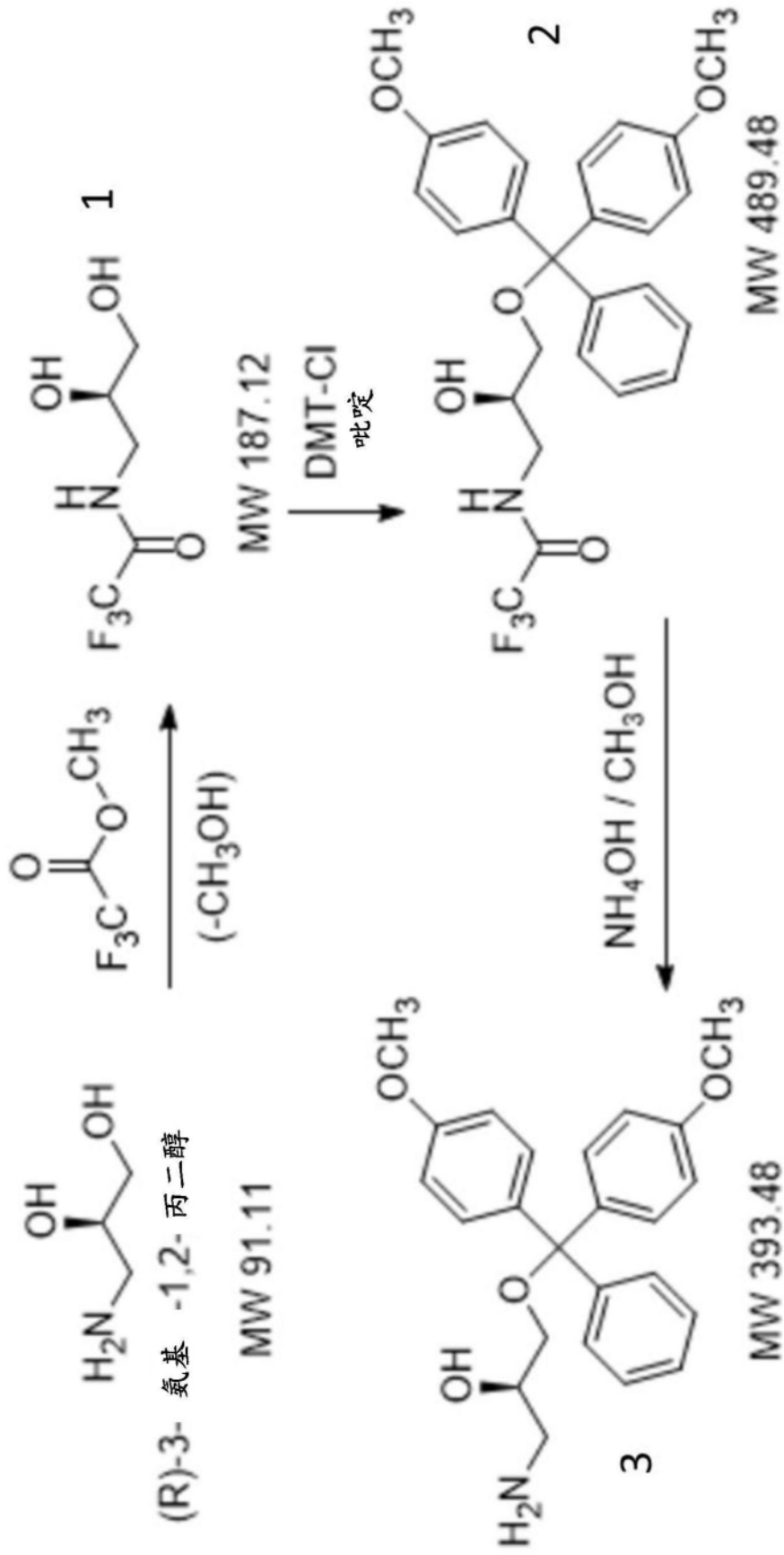


图3



接头胺 3

图4

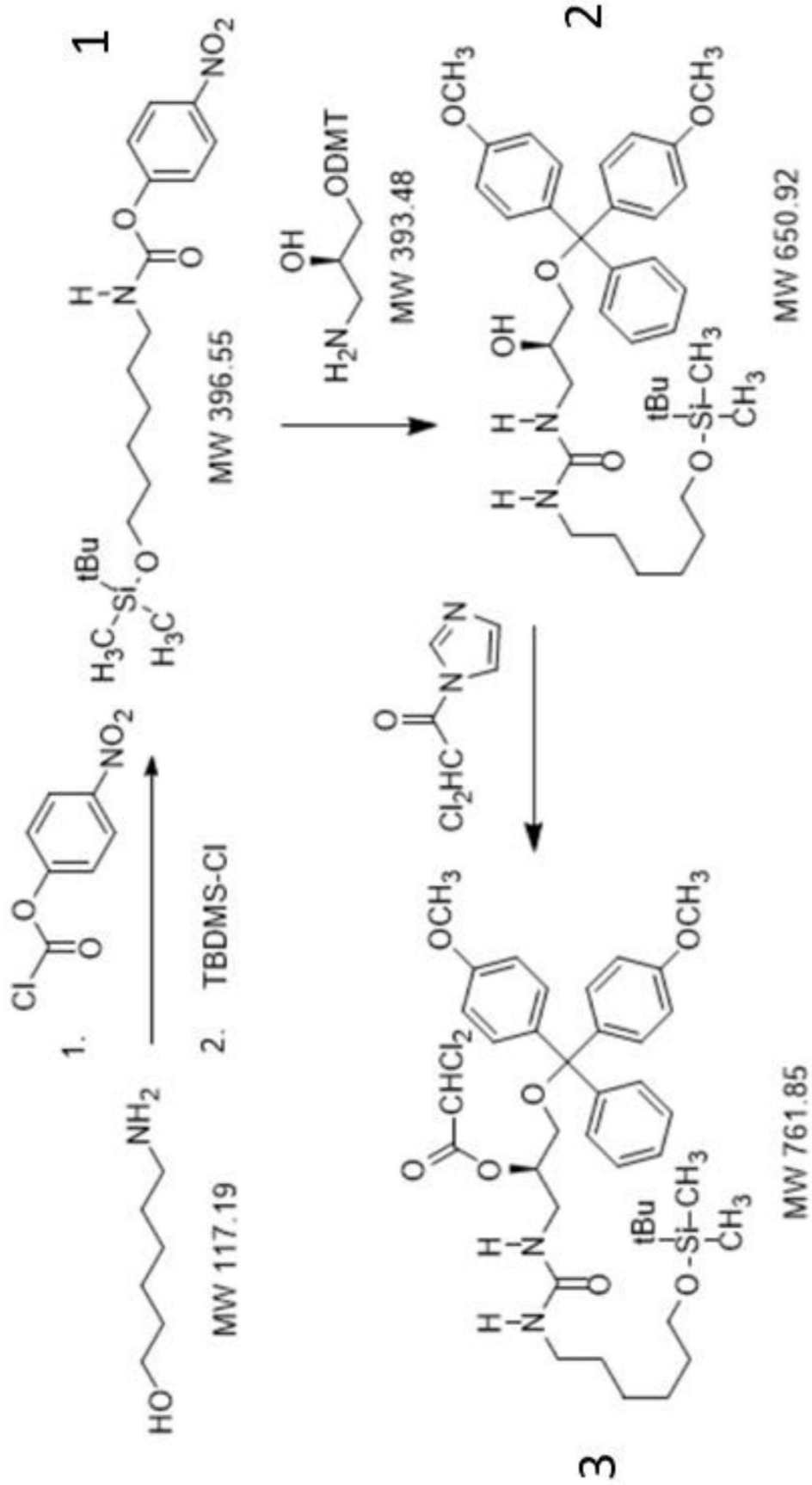


图5

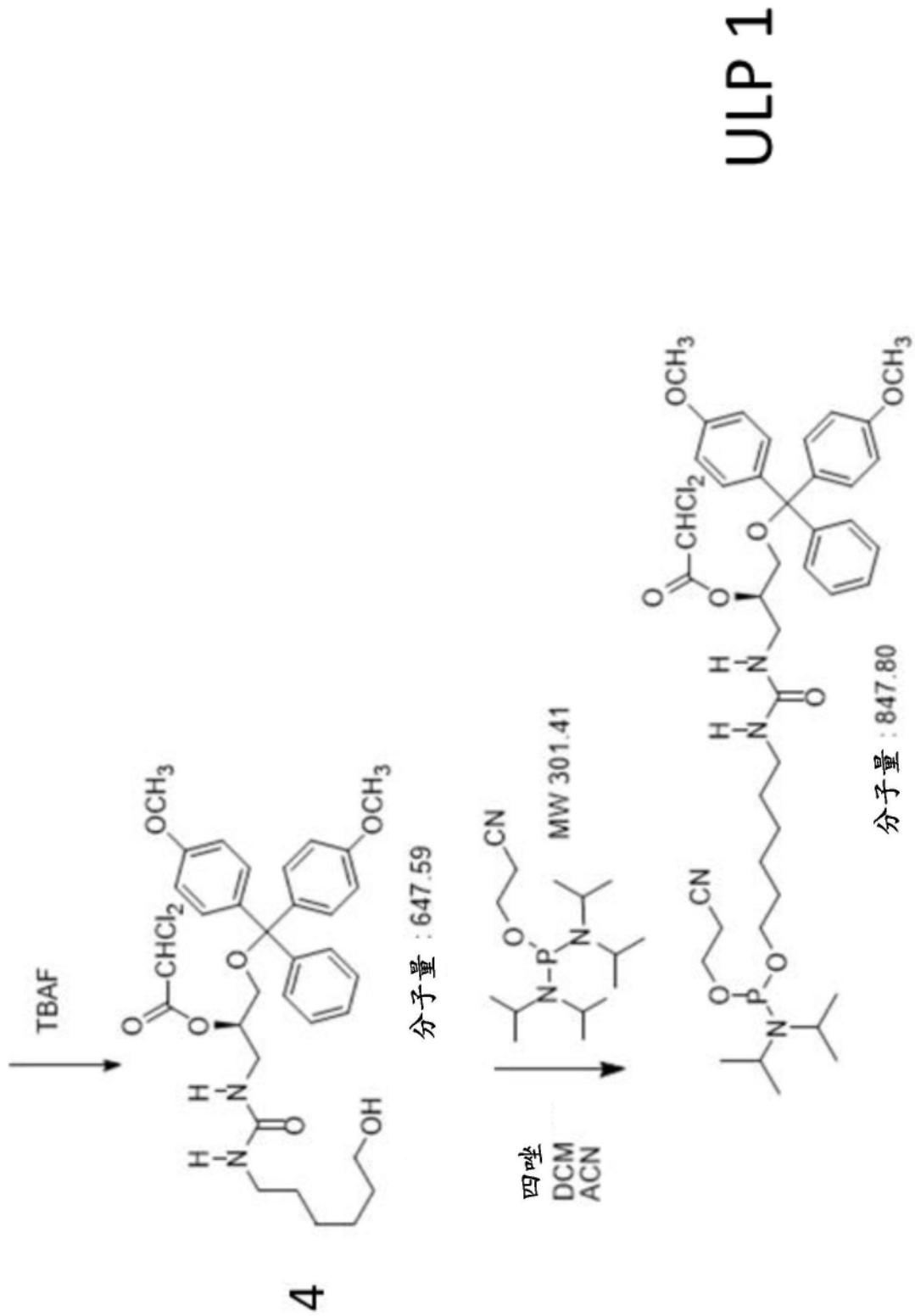


图5续

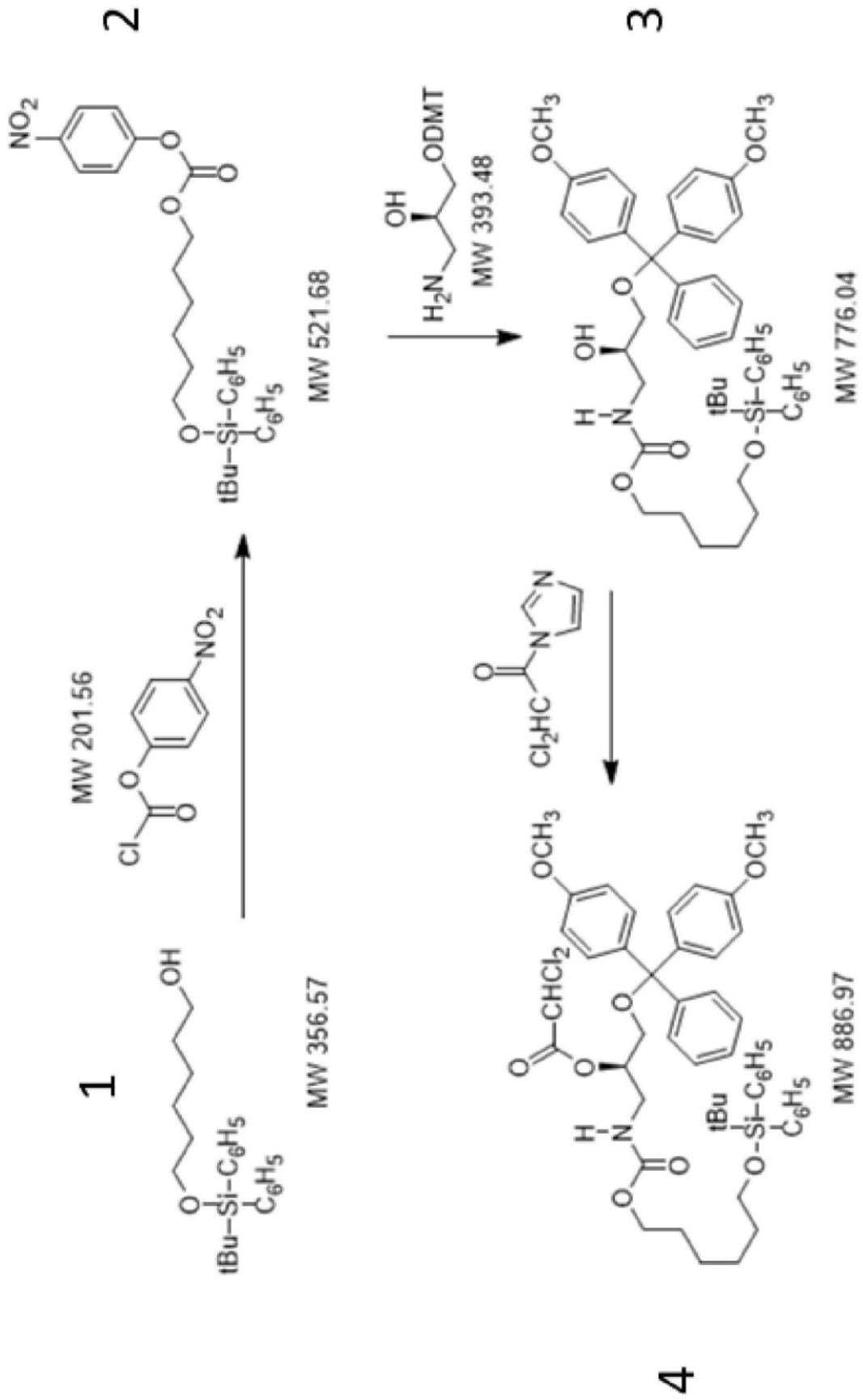


图6

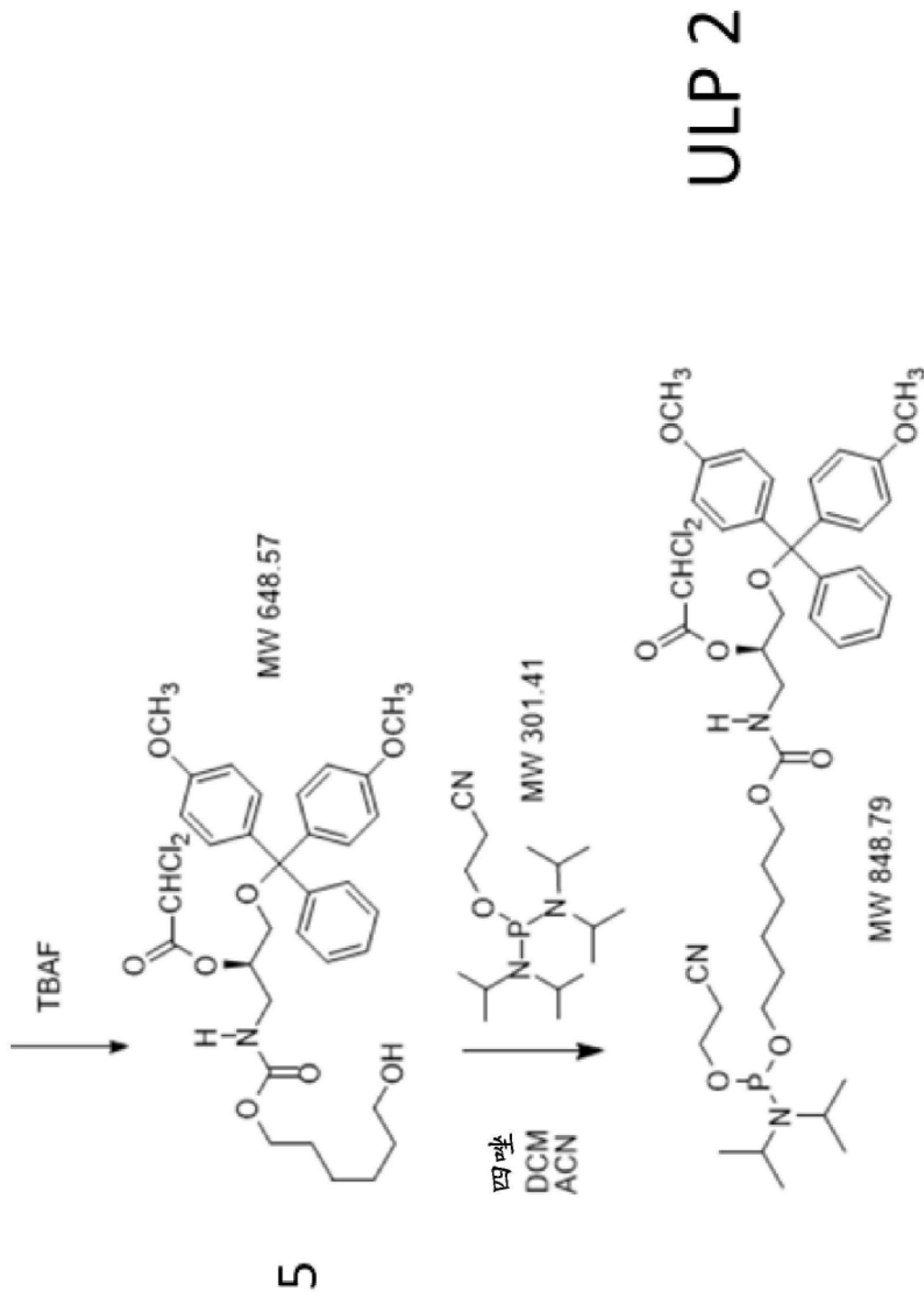


图6续

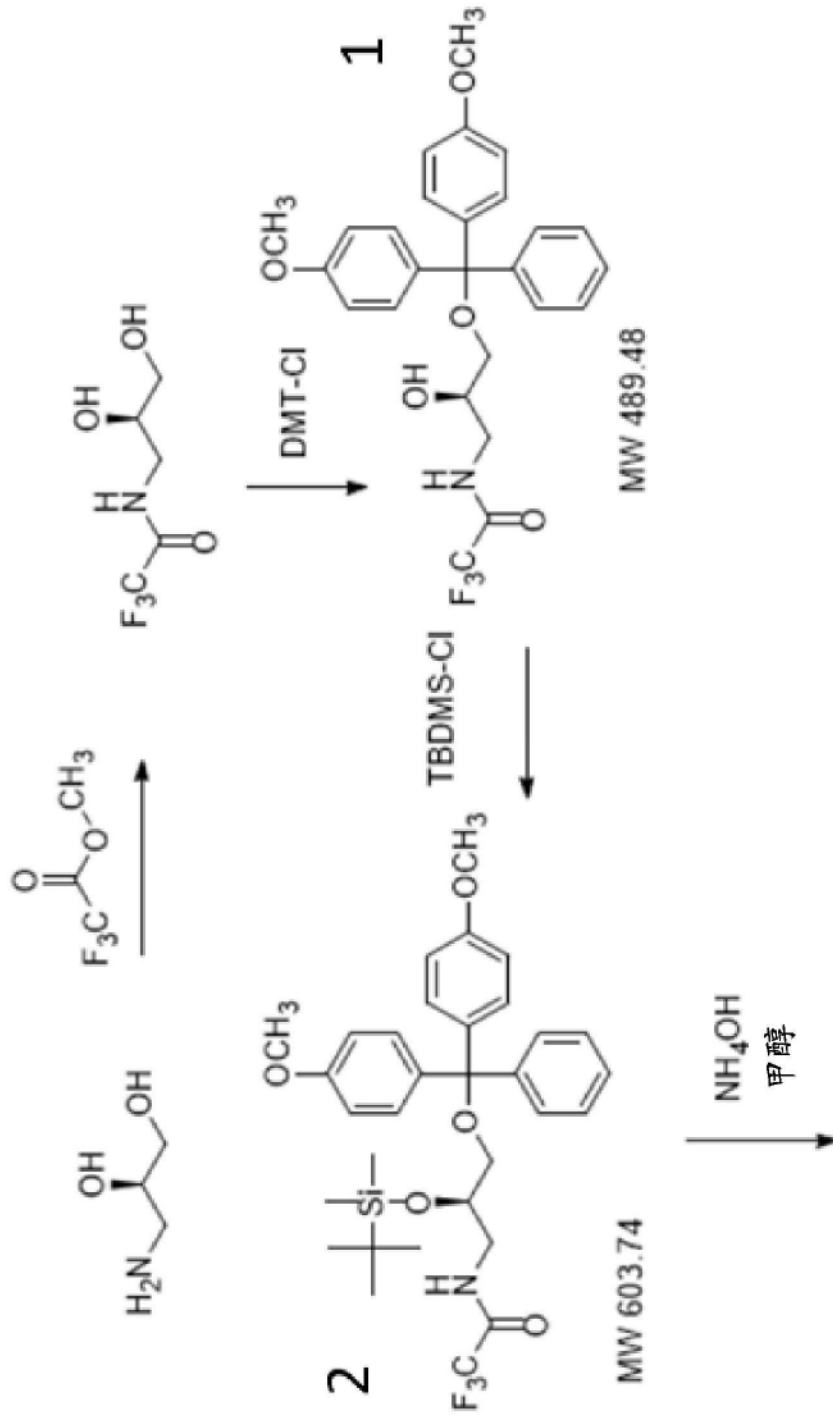


图7

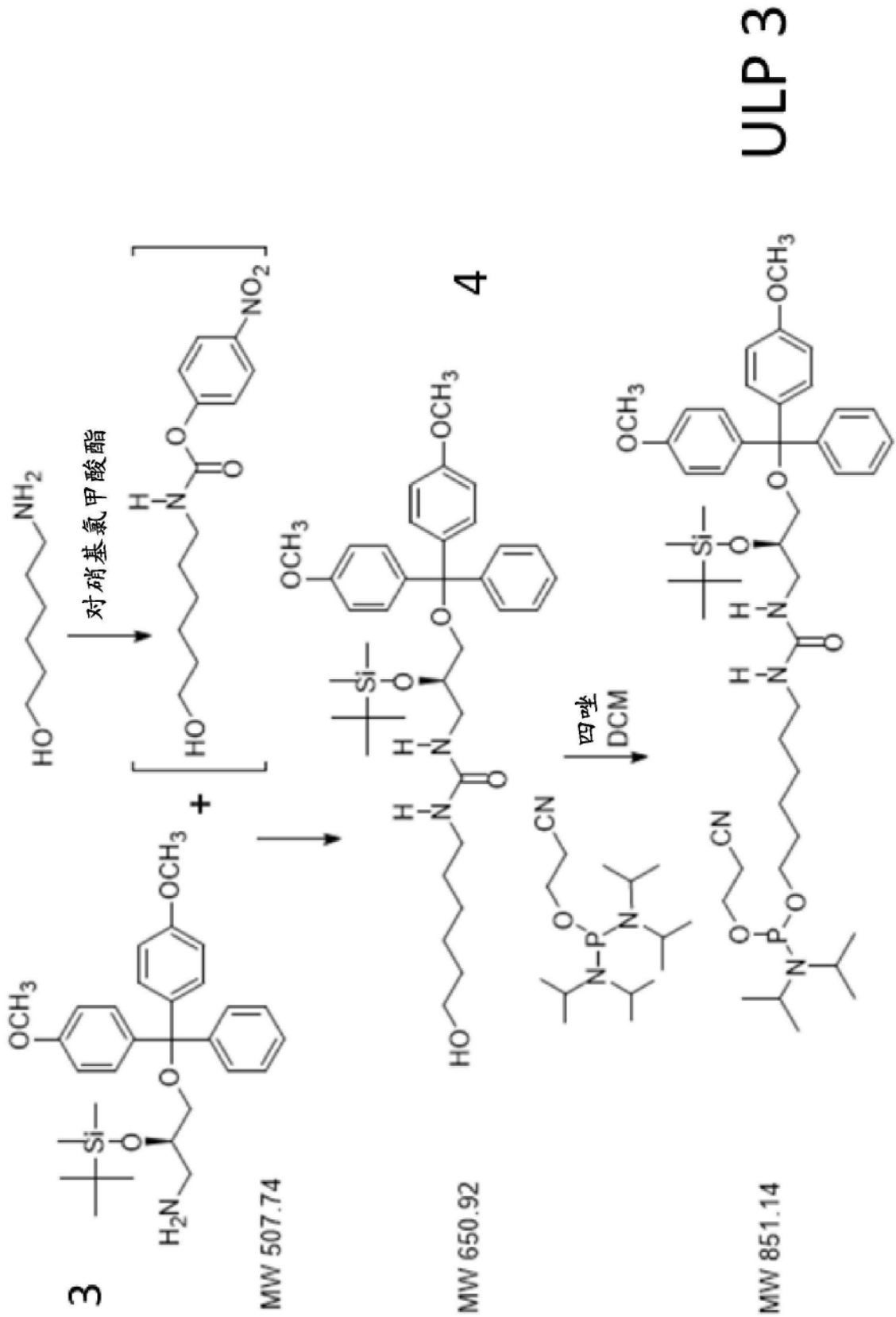


图7续

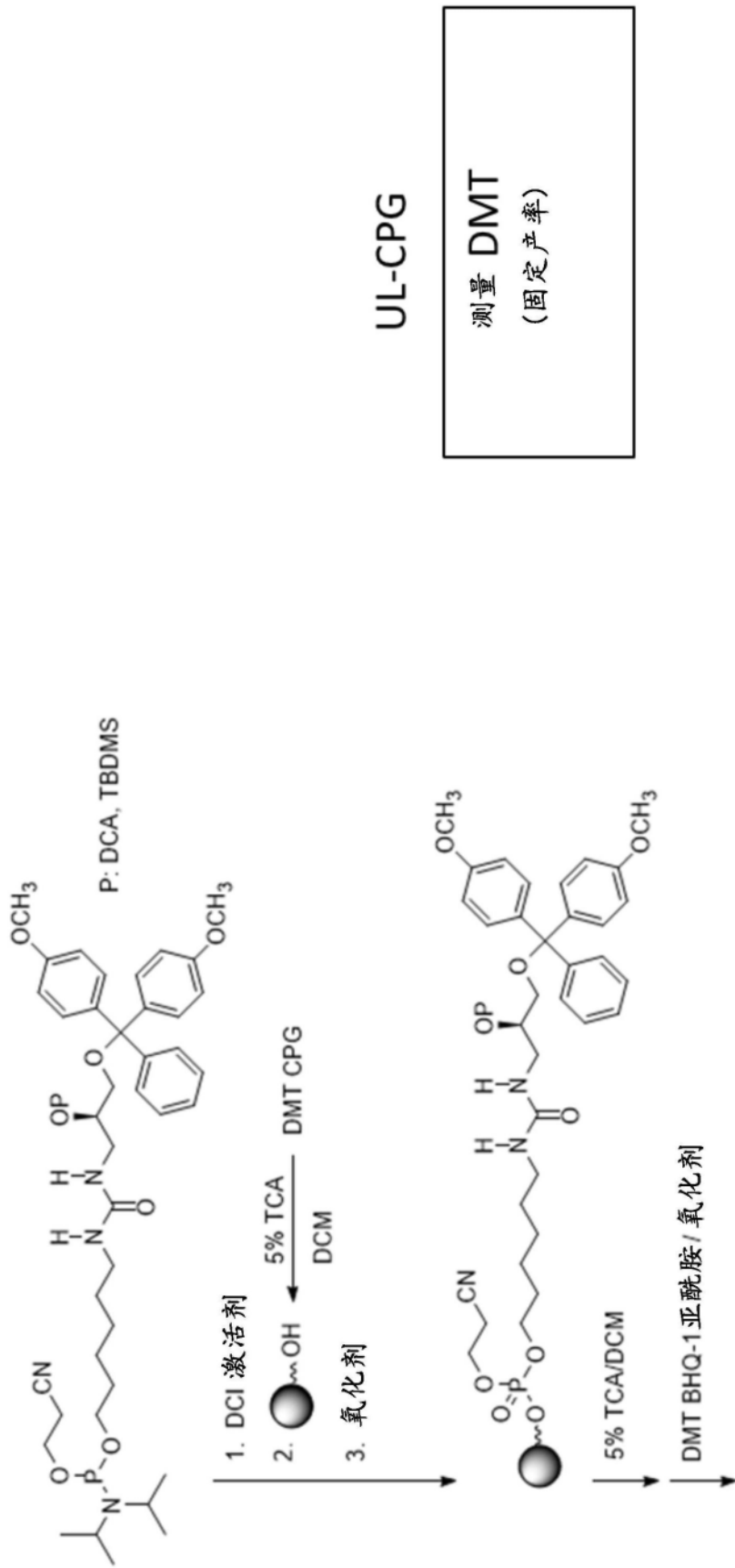


图9

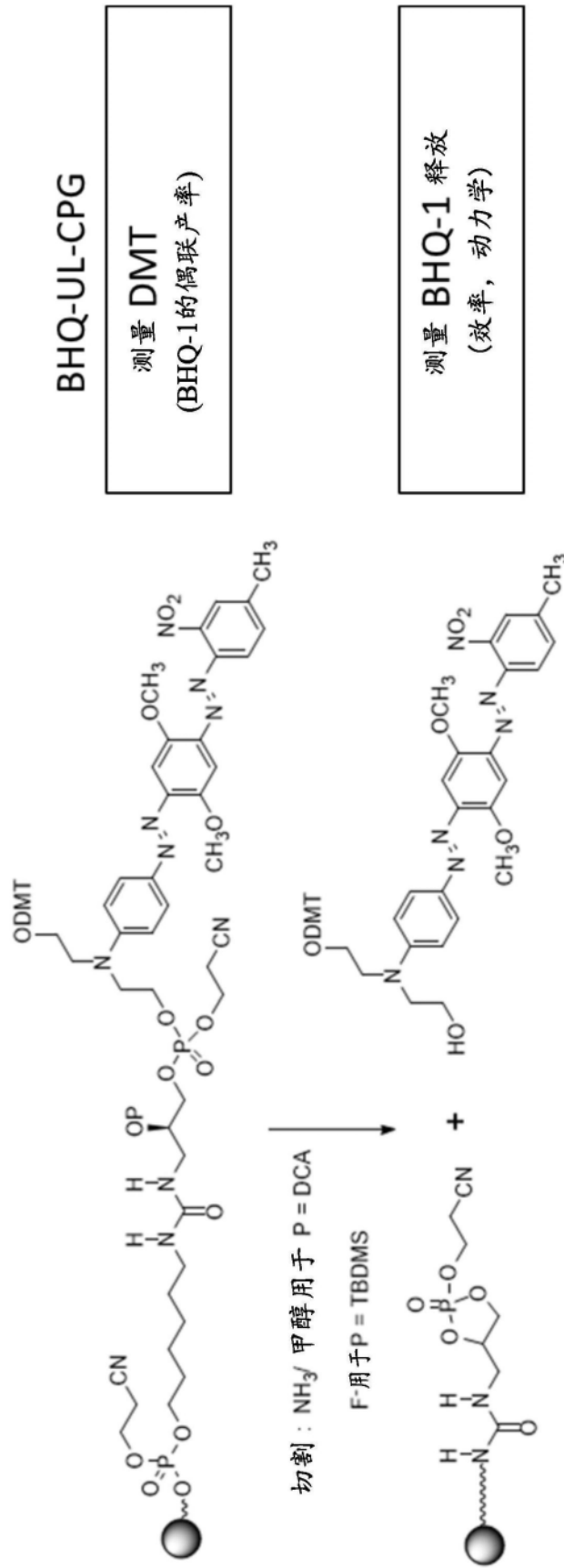


图9续

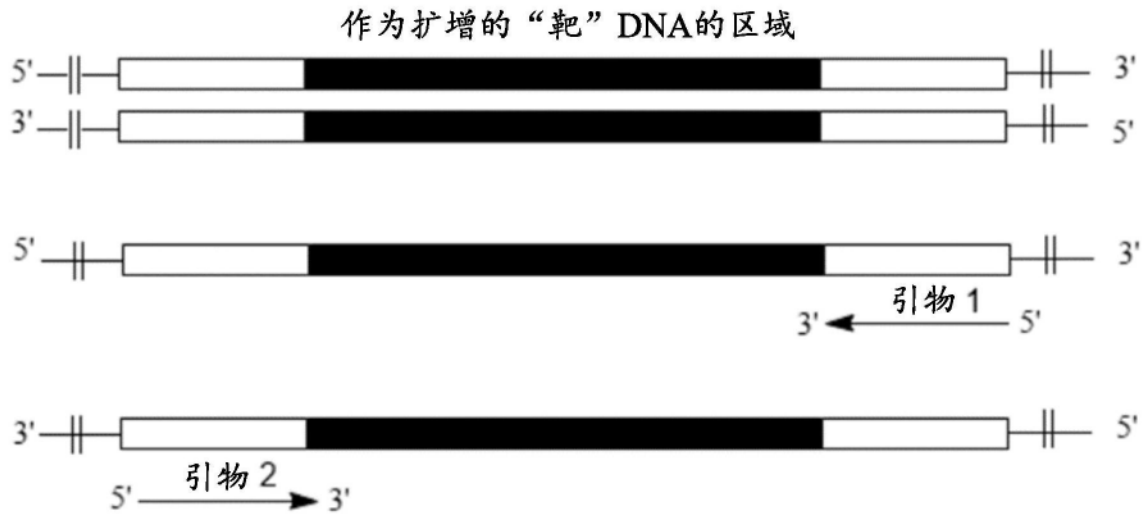


图10

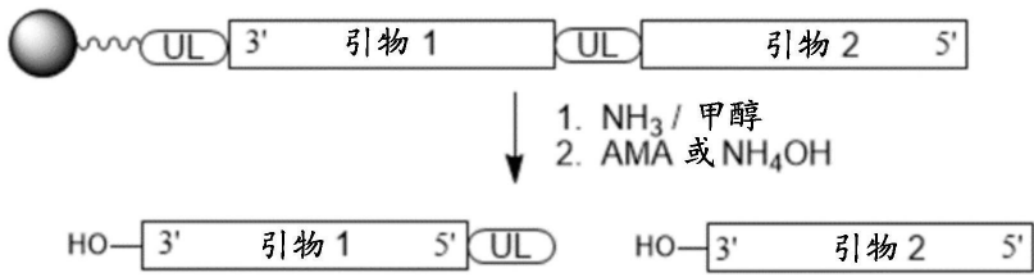


图11

分光光度测定展示在22°C (+/- 0.2°C) 下在1.6% (v/v) TEA : 3HF/MeOH中从
CPG-UL3-BHQ1切割BHQ1

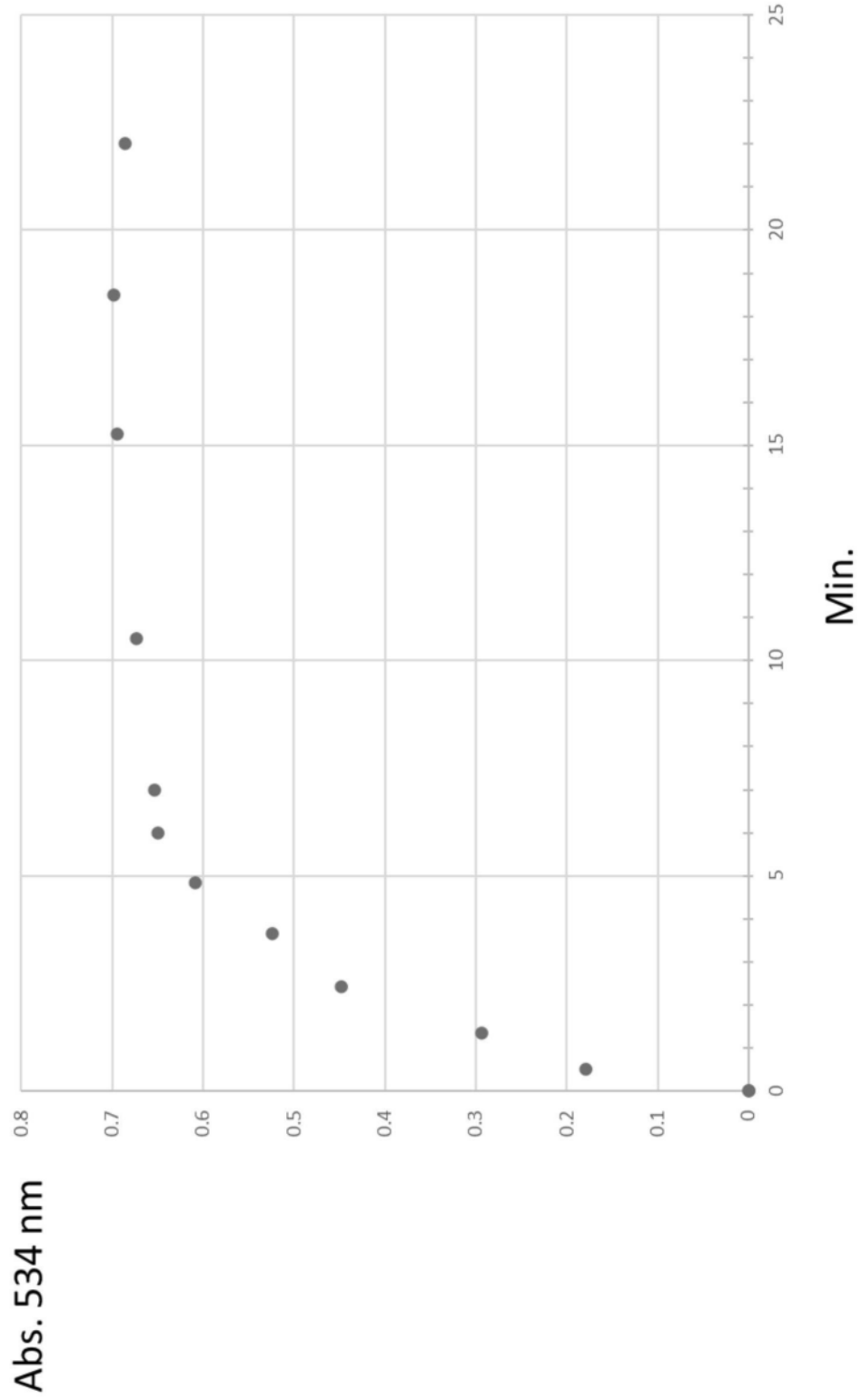


图12