

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02817156. X

[51] Int. Cl.

C07H 21/00 (2006.01)

C07D 275/06 (2006.01)

C07D 213/18 (2006.01)

C07D 233/58 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 11 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100430411C

[22] 申请日 2002.7.1 [21] 申请号 02817156. X

[30] 优先权

[32] 2001. 7. 3 [33] US [31] 60/302,717

[86] 国际申请 PCT/GB2002/003029 2002.7.1

[87] 国际公布 WO2003/004512 英 2003.1.16

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.1

[73] 专利权人 艾夫西亚生物科技公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 N·斯哈 W·E·泽达利斯

G·K·米兰达

[56] 参考文献

US3325475A 1967.6.13

US4683233A 1987.7.28

JP480226828A 1973.9.29

EP0061434A 1982.9.29

US757650A 1956.9.19

EP0274023A 1988.7.13

WO9962922A 1999.12.9

US5034534A 1991.7.23

new ring systems. abramovitch. tetrahedron,  
Vol. 52 No. 9. 1996

reactions of 2 - monosubstituted. j. m. helv.  
chim. acta. , Vol. 75 . 1992

synthesis and properties. moriguchi. j. org.  
chem. , Vol. 65 . 2000

审查员 王 颖

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

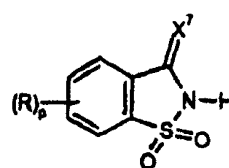
权利要求书 11 页 说明书 23 页

[54] 发明名称

用于寡核苷酸合成的活化剂

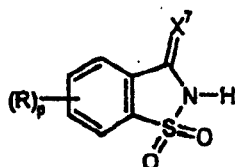
[57] 摘要

提供了一种采用亚磷酰胺化学合成寡核苷酸的方法。所述方法使用作为活化剂的 1, 1 - 二氧代 - 1, 2 - 二氢 - 1 λ<sup>6</sup> - 苯并 [d] 异噻唑 - 3 - 酮, 最好是在有机碱存在下使用。所述 1, 1 - 二氧代 - 1, 2 - 二氢 - 1 λ<sup>6</sup> - 苯并 [d] 异噻唑 - 3 - 酮由以下结构式(I)表示: 其中 p 为 0 或 1 - 4 的整数; X<sup>7</sup> 为 O 或 S; R 在每次出现时为取代基, 优选各自独立地为卤代基、取代或未取代的脂族基、-NR<sup>11</sup> R<sup>12</sup>、-OR<sup>13</sup>、-OC(O)R<sup>13</sup>、-C(O)OR<sup>13</sup> 或氰基; 或者两个相邻 R 基团与结合它们的碳原子一起形成一个六元饱和或不饱和环; R<sup>11</sup> 和 R<sup>12</sup> 各自独立地为 -H、取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、或取代或未取代的芳烷基; 且 R<sup>13</sup> 为取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、或取代或未取代的芳烷基。优选的有机碱为吡啶、3 - 甲基吡啶或 N - 甲基咪唑。



(I)

1. 一种采用亚磷酰胺化学合成寡核苷酸的方法，所述方法包括在偶联剂存在下，使具有游离羟基或巯基的核苷或新生寡核苷酸和核苷亚磷酰胺进行偶联，其中所述偶联剂为由以下结构式表示的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮：



其中：

p 为 0 或 1-4 的整数；

X<sup>7</sup> 为 O 或 S；且

R 在每次出现时为选自以下的取代基：卤代基、脂族基、-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-OR<sup>13</sup>、-OC(O)R<sup>13</sup>、-C(O)OR<sup>13</sup>、氰基、芳基、杂环基、-CHO、-COR<sup>13</sup>、-NHCOR<sup>13</sup>、芳烷基、或-SR<sup>13</sup>；或者两个相邻 R 基团与结合它们的碳原子一起形成一个六元饱和或不饱和环；其中：

R<sup>11</sup> 和 R<sup>12</sup> 各自独立地为-H、脂族基、芳基、芳烷基；或者与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基；且

R<sup>13</sup> 为脂族基、芳基、或者芳烷基；

并且其中所述脂族基、芳基、杂环基和芳烷基是未取代的或者被以下基团所取代：芳基、卤化芳基、烷基、卤化烷基、脂族醚、芳族醚、苄基、卤素、氰基、硝基、-S-脂族基和-S-芳基。

2. 权利要求 1 的方法，其中在所述偶联反应期间，有机碱与所述偶联剂同时存在。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述有机碱是胺。

4. 权利要求 3 的方法，其中所述胺是叔胺。

5. 权利要求 4 的方法, 其中所述叔胺选自三烷基胺、N-烷基吡咯烷、N-芳基吡咯烷、N-烷基吡咯、N-芳基吡咯、N-烷基吗啉、N-芳基吗啉、N-烷基哌啶、N-芳基哌啶、N,N-二烷基哌嗪、N,N-二芳基哌嗪、N-烷基-N-芳基哌嗪、奎宁环以及 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7 烯。

6. 权利要求 3 的方法, 其中所述胺为氮杂杂环化合物。

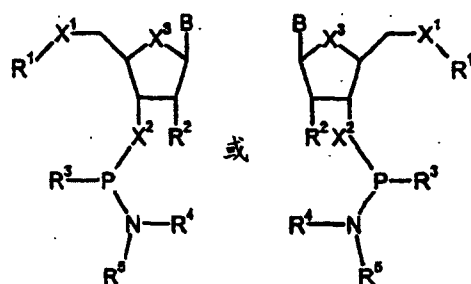
7. 权利要求 6 的方法, 其中所述氮杂杂环化合物选自嘧啶、1-烷基吡唑、1-芳基吡唑、吡嗪、N-烷基嘌呤、N-芳基嘌呤、N-烷基吡咯、N-芳基吡咯、吡啶、N-烷基咪唑、N-芳基咪唑、喹啉、异喹啉、喹喔啉、喹唑啉、N-烷基吲哚、N-芳基吲哚、N-烷基苯并咪唑、N-芳基苯并咪唑、三嗪、噻唑、1-烷基-7-氮杂吲哚、1-芳基-7-氮杂吲哚、吡咯烷、吗啉、哌啶以及哌嗪。

8. 权利要求 7 的方法, 其中所述氮杂杂环化合物为吡啶、3-甲基吡啶或 N-甲基咪唑。

9. 权利要求 1 的方法, 其中所述核苷亚磷酰胺是单体。

10. 权利要求 1 的方法, 其中所述核苷亚磷酰胺是二聚体。

11. 权利要求 9 的方法, 其中所述亚磷酰胺是由以下结构式之一表示的 3'-亚磷酰胺:



其中:

每个 X<sup>1</sup> 独立地为 -O- 或 -S-;

每个 X<sup>2</sup> 独立地为 -O-、-S- 或 -NR<sup>14</sup>-;

每个 X<sup>3</sup> 独立地为 -O-、-S-、-CH<sub>2</sub>- 或 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-;

R<sup>1</sup> 为羟基保护基或巯基保护基;

$R^2$  为-H、脂族基、-F、-OR<sup>6</sup>、-NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>或-SR<sup>9</sup>;

$R^3$  为-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN、-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN、脂族基、-OR<sup>10</sup>、-SR<sup>10</sup>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>、-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 或 -S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>;

$R^4$  和  $R^5$  各自独立地为脂族基、芳基、芳烷基; 或

$R^4$  和  $R^5$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基; 且

$R^6$  为-H、脂族基、芳基、芳烷基、羟基保护基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NR<sup>18</sup>R<sup>19</sup>;

$R^7$  和  $R^8$  各自独立地为 H、脂族基、或胺保护基; 或

$R^7$  和  $R^8$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基; 且

$R^9$  为 H、脂族基、或巯基保护基;

$R^{10}$  在每次出现时独立地为脂族基、芳基、或者芳烷基,

$R^{14}$  为-H、烷基、芳基或芳烷基;

$R^{18}$  和  $R^{19}$  各自独立地为-H、芳基、杂芳基、脂族基、芳烷基、杂芳烷基、或胺保护基; 或

$R^{18}$  和  $R^{19}$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基; 且

$q$  为 1 至 6 的整数; 且

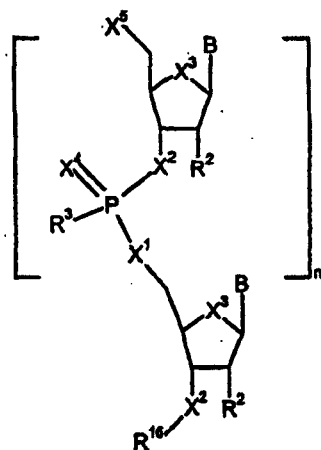
每个 B 独立地为-H、天然或非天然的核苷碱基、受保护的天然或非天然的核苷碱基、杂环或受保护的杂环;

并且其中所述脂族基、芳基、杂环基和芳烷基是未取代的或者被以下基团所取代: 芳基、卤化芳基、烷基、卤化烷基、脂族醚、芳族醚、苄基、卤素、氰基、硝基、-S-脂族基和-S-芳基。

12. 一种权利要求 1 的方法, 其中  $X^7$  为 O 且  $p$  为 0。

13. 一种权利要求 1 的方法, 其中 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮与核苷亚磷酰胺的摩尔比在 0.2:1 至 5:1 的范围内。

14. 一种使 N 聚体寡核苷酸或核苷与核苷亚磷酰胺缩合的方法, 所述 N 聚体寡核苷酸或核苷由以下结构式表示:



其中:

每个  $X^1$  独立地为 -O- 或 -S-;

每个  $X^2$  独立地为 -O-、-S- 或  $-NR^{14}-$ ;

每个  $X^3$  独立地为 -O-、-S-、 $-\text{CH}_2-$  或  $-(\text{CH}_2)_2-$ ;

每个  $X^4$  独立地为 -O- 或 -S-;

$X^5$  为 -OH 或 -SH;

每个  $R^2$  独立地为 -H、脂族基、-F、 $-\text{OR}^6$ 、 $-\text{NR}^7\text{R}^8$  或  $-\text{SR}^9$ ;

每个  $R^3$  独立地为  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 、 $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ 、脂族基、 $-\text{OR}^{10}$ 、 $-\text{SR}^{10}$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_3$  或  $-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ ;

每个  $R^6$  独立地为 H、脂族基、芳基、芳烷基、羟基保护基或  $(\text{CH}_2)_q-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ ;

$R^7$  和  $R^8$  各自独立地为 H、脂族基、或胺保护基; 或

$R^7$  和  $R^8$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基; 且

$R^9$  为 H、脂族基、或巯基保护基;

$R^{10}$  在每次出现时独立地为脂族基、芳基、或者芳烷基,

每个  $R^{14}$  为 -H、烷基、芳基或芳烷基;

$R^{16}$  为羟基保护基、巯基保护基、氨基保护基、 $-(\text{CH}_2)_q-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ 、固体支持体或与固体支持体连接的可切割连接基团;

$R^{18}$  和  $R^{19}$  各自独立地为 -H、芳基、杂芳基、脂族基、芳烷基、

杂芳烷基、或胺保护基；或

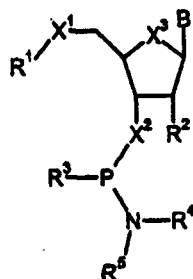
$R^{18}$  和  $R^{19}$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基；且

$q$  为 1 至 6 的整数；

每个  $B$  独立地为  $-H$ 、天然或非天然的核苷碱基、受保护的天然或非天然的核苷碱基、杂环或受保护的杂环；且

$n$  为零或正整数；

而所述核苷亚磷酰胺由下式表示：



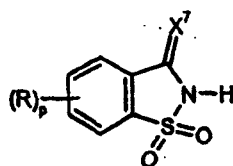
其中  $R^2$ 、 $R^3$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$  和  $B$  如上定义：

$R^1$  为羟基保护基或巯基保护基；且

$R^4$  和  $R^5$  各自独立地为脂族基、芳基、芳烷基；或

$R^4$  和  $R^5$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基；

所述方法包括使所述寡核苷酸或核苷与所述核苷亚磷酰胺和由以下结构式表示的 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮接触的步骤：



其中：

$p$  为 0 或 1-4 的整数；

$X^7$  为 O 和 S；

$R$  在每次出现时为选自以下的取代基：卤代基、脂族基、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-OR^{13}$ 、 $-OC(O)R^{13}$ 、 $-C(O)OR^{13}$ 、氰基、芳基、杂环基、 $-CHO$ 、 $-COR^{13}$ 、 $-NHCOR^{13}$ 、芳烷基、或  $-SR^{13}$ ；或者两个相邻  $R$

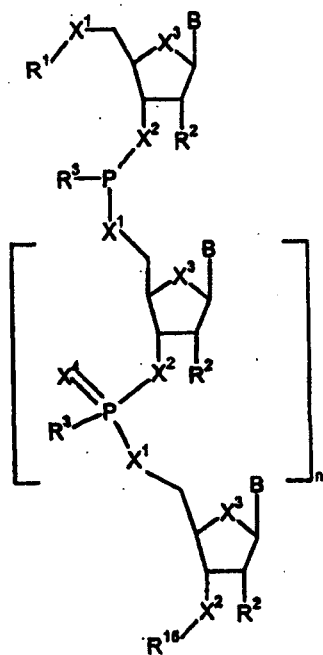
基团与结合它们的碳原子一起形成一个六元饱和或不饱和环；其中：

$R^{11}$  和  $R^{12}$  各自独立地为-H、脂族基、芳基、芳烷基；或者与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基；且

$R^{13}$  为脂族基、芳基、或者芳烷基；

并且其中所述脂族基、芳基、杂环基和芳烷基是未取代的或者被以下基团所取代：芳基、卤化芳基、烷基、卤化烷基、脂族醚、芳族醚、苄基、卤素、氰基、硝基、-S-脂族基和-S-芳基；

由此形成由以下结构式表示的具有 5'-末端三价磷键的(n+1)寡核苷酸：



其中  $n$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$  和  $B$  如上定义。

15. 权利要求 14 的方法，其中当使所述寡核苷酸或核苷与所述亚磷酰胺和所述 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮接触时，存在有机碱。

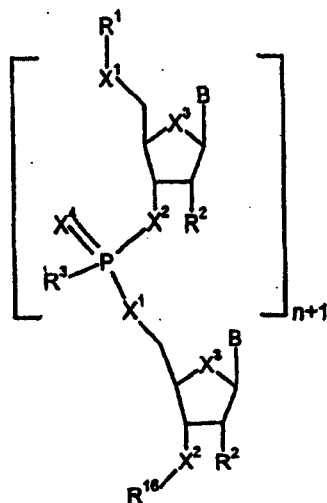
16. 权利要求 15 的方法，其中所述有机碱和所述 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮的浓度为 0.01 M 至 2 M。

17. 权利要求 14 的方法，其中 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]

异噻唑-3-酮与核苷亚磷酰胺的摩尔比在 0.2:1 至 5:1 的范围内。

18. 权利要求 14 的方法，所述方法还包括下述步骤：

a) 使所述具有 5'-末端三价磷键的(n+1)寡核苷酸与氧化剂或硫化剂接触，由此形成由以下结构式表示的具有五价磷骨架的寡核苷酸：



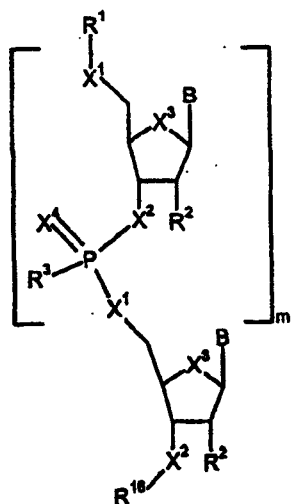
b) 任选通过使所述  $X^5$  基团与酰基氯或酸酐反应而封闭没有与所述亚磷酰胺反应的  $X^5$  基团；

c) 通过使所述具有五价磷骨架的(n+1)寡核苷酸与除去  $R^1$  的试剂反应，而使所述(n+1)寡核苷酸去保护；

d) 任选重复所述偶联步骤、氧化步骤或硫化步骤、所述封闭步骤和去保护步骤一次或多次；

其中 n、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$  和 B 如权利要求 15 中所定义。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述氧化步骤或硫化步骤是最后的步骤并且所述寡核苷酸由下面的结构式表示：

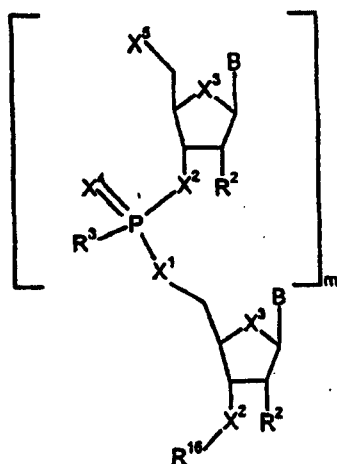


其中:

$m$  为大于  $n$  的整数;

其中  $n$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$  和  $B$  如权利要求 15 中所定义。

20. 权利要求 18 的方法, 其中所述去保护步骤是最后的步骤并且所制备的寡核苷酸由下面的结构式表示:



其中:

$m$  为大于  $n$  的整数;

其中  $n$ 、 $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$  和  $B$  如权利要求 15 中所定义。

21. 一种权利要求 18 的方法, 其中  $R^{16}$  为一种与固体支持体连接的可切割连接基团。

22. 权利要求 18 的方法，其中：

a) 所述寡核苷酸在每个偶联步骤之后被氧化，并且所述寡核苷酸为磷酸二酯寡核苷酸；

b) 所述寡核苷酸在每个偶联步骤之后被硫化，并且所制备的寡核苷酸为硫代磷酸酯寡核苷酸；或

c) 所述寡核苷酸在至少一个偶联步骤之后被氧化以及在至少一个偶联步骤之后被硫化，并且所制备的寡核苷酸为嵌合寡核苷酸。

23. 一种权利要求 18 的方法，其中  $X^7$  为 O 且 p 为 0。

24. 一种权利要求 19 或 18 的方法，其中所述寡核苷酸随后进行纯化。

25. 一种用于合成寡核苷酸的方法，所述方法包括在活化剂存在下，使核苷亚磷酰胺与包含游离羟基的核苷或新生寡核苷酸进行偶联，其中所述活化剂包含 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和 N-烷基咪唑的混合物。

26. 一种权利要求 25 的方法，其中所述核苷亚磷酰胺为核苷 3'-亚磷酰胺，而所述核苷或新生寡核苷酸包含 5'-羟基。

27. 一种权利要求 25 的方法，其中所述 N-烷基咪唑是 N-甲基咪唑。

28. 一种权利要求 27 的方法，其中所述亚磷酰胺包含式- $P(OCH_2CH_2CN)N(CH(CH_3)_2)_2$  部分。

29. 一种权利要求 25 的方法，其中所述 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和所述 N-烷基咪唑的浓度各为 0.1M 至 0.25M。

30. 一种权利要求 25 的方法，其中 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮与 N-烷基咪唑的摩尔比为 1:1 至 1:1.5:1。

31. 一种权利要求 25 的方法，其中 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮与亚磷酰胺的摩尔比为 0.5:1 至 2:1。

32. 一种用于合成寡核苷酸的方法，所述方法包括：

a) 在 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮的叔胺盐存在

下,使 5'-受保护的核苷亚磷酰胺与包含游离羟基的并且通过一种可切割连接基团与固体支持体连接的核苷或新生寡核苷酸进行偶联,由此形成亚磷酸三酯;

b) 使所述亚磷酸三酯氧化或硫化,产生 5'-受保护的磷酸三酯或硫代磷酸三酯;

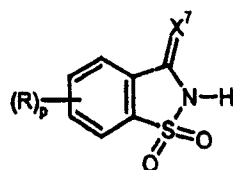
c) 任选地通过与封闭剂反应而封闭未反应的羟基;

d) 除去所述 5'-受保护的磷酸三酯或硫代磷酸三酯的所述 5'-保护基,形成 5'-羟基;

e) 重复步骤 a)至 d)一次或多次,直到装配出所需的寡核苷酸;

f) 将所述寡核苷酸去保护,从所述固体支持体上切下所述寡核苷酸并且纯化所述寡核苷酸。

33. 一种盐络合物,所述盐络合物包含 N-烷基咪唑和由以下结构式表示的 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮:



其中:

p 为 0 或 1-4 的整数;

X<sup>7</sup> 为 O 或 S; 且

R 在每次出现时为选自以下的取代基: 卤代基、脂族基、-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-OR<sup>13</sup>、-OC(O)R<sup>13</sup>、-C(O)OR<sup>13</sup>、氰基、芳基、杂环基、-CHO、-COR<sup>13</sup>、-NHCOR<sup>13</sup>、芳烷基、或-SR<sup>13</sup>; 或者两个相邻 R 基团与结合它们的碳原子一起形成一个六元饱和或不饱和环; 其中:

R<sup>11</sup> 和 R<sup>12</sup> 各自独立地为-H、脂族基、芳基、芳烷基; 或者与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基; 且

R<sup>13</sup> 为脂族基、芳基、或者芳烷基;

并且其中所述脂族基、芳基、杂环基和芳烷基是未取代的或者

被以下基团所取代：芳基、卤化芳基、烷基、卤化烷基、脂族醚、芳族醚、苄基、卤素、氰基、硝基、-S-脂族基和-S-芳基。

34. 一种权利要求 33 的盐络合物，其中  $p$  为 0， $X^7$  为 O 且所述 N-烷基咪唑为 N-甲基咪唑。

## 用于寡核苷酸合成的活化剂

### 发明背景

合成寡核苷酸是用于检测遗传性疾病和病毒性疾病的重要诊断工具。另外，寡核苷酸和修饰寡核苷酸作为抑制基因表达或蛋白质功能的治疗候选物是有价值的。大规模合成用作治疗候选物的寡核苷酸已变得越来越重要，由于FDA批准了用于治疗巨细胞病毒(CMV)的寡核苷酸类似物和几种其它寡核苷酸类似物目前正在进行临床试验。每个临床试验需要数千克量的纯化寡核苷酸类似物。

采用亚磷酰胺方法制备寡核苷酸涉及核苷亚磷酰胺与核苷或新生寡核苷酸的缩合作用。缩合反应(在本文也称为偶联反应)需要促进所述反应的活化剂(或者称为偶联剂)。最常用的活化剂是亲核活化剂1H-四唑。然而，1H-四唑具有爆炸性，因此，将其用于大规模合成中可能有危险。

1H-四唑为弱酸，在第一步活化期间，它使亚磷酰胺的三价磷质子化。然后，四唑阴离子在较慢的第二个步骤期间取代亚磷酰胺的二烷基胺基团(例如N,N-二异丙胺)，形成随后与核苷或新生寡核苷酸的5'-伯醇基团快速反应的四唑基中间体。当将空间位阻亚磷酰胺例如叔丁基-二甲基甲硅烷基保护的核糖核苷亚磷酰胺或2'-O-甲基核苷亚磷酰胺用于寡核苷酸合成时，通常需要可供选择的活化剂来提高所述偶联反应的速率。可供选择的活化剂例如5-乙硫基-1H-四唑、5-(对硝基苯基)-1H-四唑和苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐的酸性通常比四唑的酸性强，因此加速三价磷质子化的速率，由此增加缩合速率。

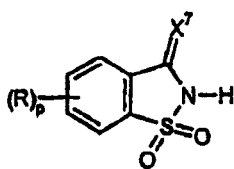
然而，由于四唑、5-乙硫基-1H-四唑、5-(对硝基苯基)-1H-四唑和苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐为酸性，因此它们可以引起通常为酸不稳定基团的亚磷酰胺单体的5'-羟基保护基的过早去保护。过早去保

护可以产生比所需产物长一个碱基的寡核苷酸杂质(在本文称为“N+1杂质”),并且该杂质难以与所需产物分开。RNA合成和大规模合成一般所需的较长偶联时间导致亚磷酰胺的过早去保护增加。

因此,需要促进核苷亚磷酰胺与核苷或新生寡核苷酸的缩合作用并且可以使用不增加副产物的非爆炸性活化剂,以便更快地制备可用于诊断和治疗的寡核苷酸。

## 发明概述

发现了 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮会促进核苷亚磷酰胺和核苷单体或新生寡核苷酸的缩合作用。所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮可以由以下结构式 I 表示:



I.

在结构式 I 中, p 为 0 或 1-4 的整数。R 在每次出现时为取代基, 优选各自独立地为卤代基、取代或未取代的脂族基、-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-OR<sup>13</sup>、-OC(O)R<sup>13</sup>、-C(O)OR<sup>13</sup>、氰基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基、-CHO、-COR<sup>13</sup>、-NHCOR<sup>13</sup>、取代或未取代的芳烷基、卤化烷基(例如三氟甲基和三氯甲基)或-SR<sup>13</sup>。优选 R 为卤代基、取代或未取代的脂族基、-NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>、-OR<sup>13</sup>、-OC(O)R<sup>13</sup>、-C(O)OR<sup>13</sup> 或氰基。或者两个相邻 R 基团与结合它们的碳原子一起形成一个六元饱和或不饱和环。优选所形成的六元环为芳环。R<sup>11</sup> 和 R<sup>12</sup> 各自独立地为-H、取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基; 或者与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基。R<sup>13</sup> 为取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基或者取代或未取代的芳烷基。X<sup>7</sup> 为 O 或 S。优选 X<sup>7</sup> 为 O。特别优选的是 X<sup>7</sup> 为 O 且 p 为 0。

在一个优选的实施方案中, 所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]

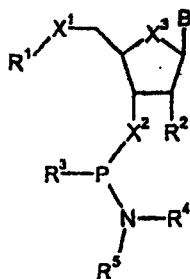
异噻唑-3-酮和有机碱的盐络合物可以用来有效地促进核苷亚磷酰胺与核苷单体或新生寡核苷酸的缩合作用。因此，本发明的一个实施方案是由结构式 I 表示的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和有机碱的盐络合物。

在有机碱存在下，1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮具有良好的溶解性，尤其是在通常用于寡核苷酸合成的有机溶剂中。因此，本发明的另一个实施方案是一种包括有机溶剂、有机碱和由结构式 I 表示的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮在内的活化剂溶液。所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和有机碱在所述活化剂溶液中的浓度最高可以达到所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮在有关溶剂中的溶解度。在一个优选的实施方案中，所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和有机碱的浓度在约 0.01M 至约 2M 例如约 0.05M 至约 0.5M 的范围内。通常，所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和有机碱的浓度至多为 0.25M，例如约 0.1 M 至约 0.25M。在一个更优选的实施方案中，所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和有机碱的摩尔浓度相同。在一个优选的实施方案中，所述有机溶剂包含乙腈。在另一个优选的实施方案中，所述有机溶剂包含诸如二甲基甲酰胺、1-甲基-2-吡咯烷酮或 1,3-二甲基-2-咪唑啉酮之类的有机酰胺。

在另一个实施方案中，可以用亚磷酰胺化学合成寡核苷酸，其中偶联剂为由结构式 I 表示的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮。所述偶联剂促进具有游离羟基或巯基的核苷或新生寡核苷酸和亚磷酰胺之间的缩合作用。在一个优选的实施方案中，在所述偶联反应期间，有机碱与所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮同时存在。在一个更优选的实施方案中，所述有机碱的摩尔浓度与所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮的摩尔浓度相同。

所述核苷亚磷酰胺可以是单体或寡聚体，例如二聚体或三聚体。

如果所述核苷亚磷酰胺是单体，则它可以由以下结构式 IIa 表示：



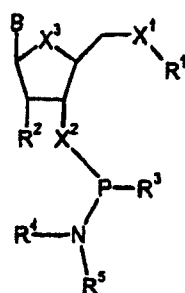
IIa.

在结构式 IIa 中， $X^1$  在每次出现时独立地为 -O- 或 -S-。优选  $X^1$  在每次出现时为 -O-。 $X^2$  在每次出现时独立地为 -O-、-S- 或 -NR-。优选  $X^2$  在每次出现时为 -O-。 $X^3$  在每次出现时独立地为 -O-、-S-、-CH<sub>2</sub>- 或 -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-。优选  $X^3$  在每次出现时为 -O-。在一个更优选的实施方案中， $X^1$ 、 $X^2$  和  $X^3$  在每次出现时都为 -O-。 $R^1$  为羟基保护基或巯基保护基。优选  $R^1$  为酸不稳定保护基。 $R^2$  在每次出现时独立地为 -H、-F、-OR<sup>6</sup>、-NR<sup>7</sup>R<sup>8</sup>、-SR<sup>9</sup> 或者取代或未取代的脂族基例如甲基或烯丙基。 $R^3$  在每次出现时独立地为 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN、-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN、取代或未取代的脂族基、-OR<sup>10</sup>、-SR<sup>10</sup>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>、-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 或 -S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>。 $R^4$  和  $R^5$  各自独立地为取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基。或者， $R^4$  和  $R^5$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基。 $R^6$  在每次出现时独立地为 -H、取代或未取代的脂族基(例如甲基、乙基、甲氧基乙基或烯丙基)、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、羟基保护基或 -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-NR<sup>18</sup>R<sup>19</sup>。 $R^7$  和  $R^8$  在每次出现时独立地为 -H、取代或未取代的脂族基、或胺保护基。或者， $R^7$  和  $R^8$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基。 $R^9$  在每次出现时独立地为 -H、取代或未取代的脂族基、或巯基保护基。 $R^{10}$  在每次出现时独立地为取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的芳烷基。 $R^{18}$  和  $R^{19}$  各自独立地为 -H、取代或未取代的芳基、取代

或未取代的杂芳基、取代或未取代的脂族基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳烷基、或胺保护基。或者， $R^{18}$  和  $R^{19}$  与结合它们的氮原子一起形成一个杂环基。 $q$  为 1 至约 6 的整数。 $B$  为 -H、天然或非天然的核苷碱基、受保护的核苷碱基、受保护的天然或非天然的核苷碱基、杂环或受保护的杂环。

在另一个实施方案中，所述亚磷酰胺可以是寡聚体，例如二聚体或三聚体。在寡核苷酸的亚磷酰胺合成中，制备和使用核苷亚磷酰胺二聚体和三聚体的方法公开于国际专利申请号 PCT/GB01/03973，所述专利申请的全部内容通过引用结合到本文中。

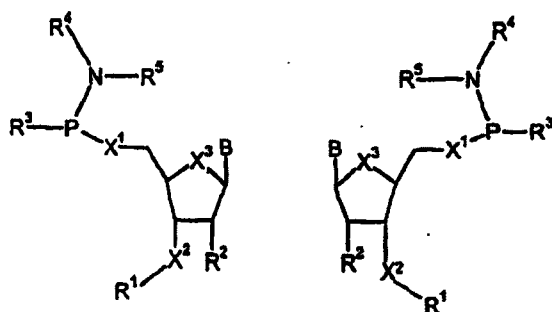
所述核苷亚磷酰胺的糖部分可以或者具有 D 构型，如在天然存在的 DNA 和 RNA 中以及在结构式 IIa 中；或者它可以具有 L 构型。结构式 IIb 代表 L-核苷亚磷酰胺：



IIb

在结构式 IIb 中， $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和  $B$  如上定义。

在另一个实施方案中，所述核苷亚磷酰胺的亚磷酰胺基团可以与糖环的 5'-位结合。在该实施方案中，所述核苷亚磷酰胺可以由以下结构式 IIIa 和 IIIb 表示：

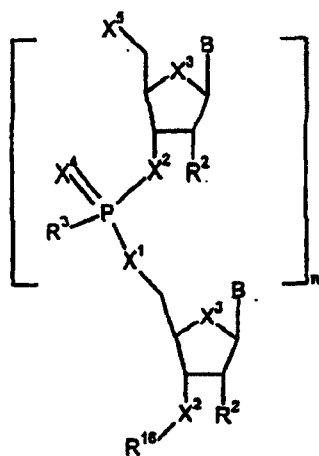


IIIa

IIIb

在结构式 IIIa 和 IIIb 中,  $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和 B 如上定义。

在另一个实施方案中, 所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮可以用来促进新生 n 聚体(n-mer)寡核苷酸(即具有 n 个核苷碱基的寡核苷酸)和核苷亚磷酰胺的缩合作用, 以形成(n+1)聚体寡核苷酸。所述核苷亚磷酰胺最好可以由结构式 IIa 表示。所述新生寡核苷酸可以由以下结构式 IV 表示:

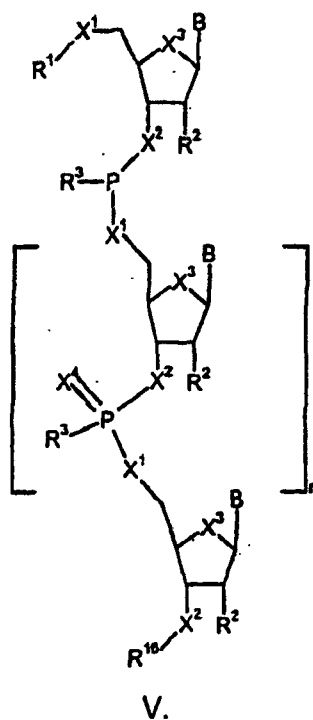


#### IV.

在结构式 IV 中,  $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和 B 如上定义。每个  $X^4$  在每次出现时独立地为 O 或 S。  $X^5$  在每次出现时独立地为 -OH 或 -SH。优选  $X^5$  为 -OH。  $R^{16}$  为羟基保护基、巯基保护基、氨基保护基、 $-(CH_2)_q-NR^{18}R^{19}$ 、固体支持体或与固体支持体连接的可切割连接基团, 例如式  $-Y^2-L-Y^2-R^{15}$  的基团。  $Y^2$  在每次出现时独立地为单键、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NR^{17}$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-NR^{17}$  或  $-O-$ 。 L 为连接基团, 所述连接基团优选为取代或未取代的脂族基、或者取代或未取代的芳基。更优选 L 为亚乙基。  $R^{17}$  为 -H、取代或未取代的脂族基、或者取代或未取代的芳基。  $R^{15}$  为适合于本领域技术人员已知的固相寡核苷酸合成的任何固体支持体。合适固体支持体的实例包括控制孔径的玻璃、聚苯乙烯、微孔聚酰胺例如聚(二甲基丙烯酰胺)和用聚乙烯涂敷的聚苯乙烯。在许多实施方案中,  $R^{16}$  代表与固体支持体连接的可切割连接基

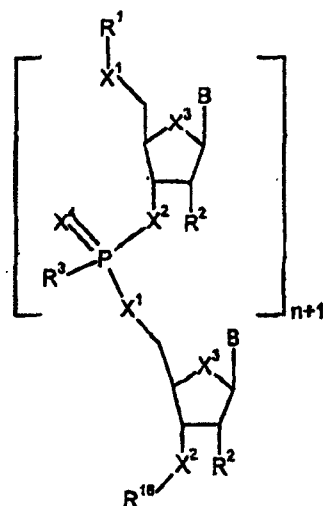
团,例如琥珀酰连接基团或乙二酸一酰基连接基团。 $n$ 为零或正整数。

使所述新生寡核苷酸与所述亚磷酰胺和由结构式 I 表示的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮接触。在一个优选的实施方案中,当所述新生寡核苷酸与所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮接触时,也存在有机碱。更优选所述有机碱的摩尔浓度与所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮的摩尔浓度相同。所述新生寡核苷酸与所述亚磷酰胺反应,形成由以下结构式 V 表示的具有 5'-末端三价磷键的 $(n+1)$ 寡核苷酸:



在结构式 V 中,  $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$ 、 $B$  和  $n$  如上定义。

然后,可以使由结构式 V 表示的寡核苷酸与氧化剂或硫化剂接触,形成由以下结构式 VI 表示的具有五价磷骨架的寡核苷酸:



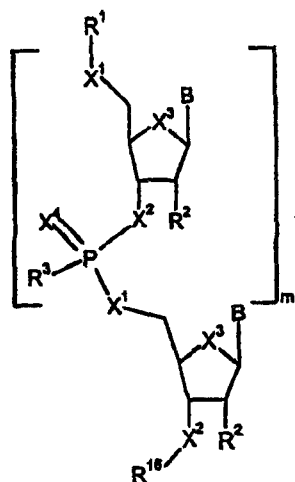
VI.

在结构式 VI 中,  $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$ 、 $B$  和  $n$  如上定义。

在使所述  $(n+1)$  寡核苷酸氧化或硫化后, 不与所述亚磷酰胺反应的  $X^5$  基团可以通过本领域已知的常规封闭技术进行封闭。例如, 在碱存在下, 未反应的  $X^5$  基团可以与酰基氯或酸酐反应。通常,  $X^5$  基团被吡啶溶液中的乙酰氯或乙酸酐封闭。

在所述氧化步骤或硫化步骤后或者在所述封闭步骤后, 可以通过使所述  $(n+1)$  寡核苷酸与一种用来除去  $R^1$  的试剂反应, 而使所述  $(n+1)$  寡核苷酸去保护。如果  $R^1$  为酸不稳定保护基, 则用酸处理所述  $(n+1)$  寡核苷酸, 以除去  $R^1$ 。如果  $R^1$  为三烷基甲硅烷基例如叔丁基二甲基甲硅烷基或三异丙基甲硅烷基, 则所述  $(n+1)$  寡核苷酸可以用氟离子处理, 以除去  $R^1$ 。通常, 叔丁基二甲基甲硅烷基和三异丙基甲硅烷基通过用氟化四丁基铵的 THF 溶液处理或者用氟化氢和共轭碱例如  $(C_2H_5)_3N \cdot 3HF$  处理而除去。除去叔丁基二甲基甲硅烷基的方法可以在 Greene 等, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1991), John Wiley & Sons, Inc., 第 77-83 页中找到, 所述文献的内容通过引用全部结合到本文中。上述反应步骤或反应循环可以重复一次或多次, 以形成所需长度的寡核苷酸。如果希望获得其中 5'-末端基团被保护的寡核苷

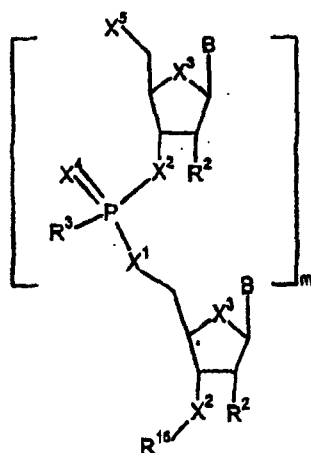
酸产物，则反应循环的最后一步可以是所述封闭步骤(如果进行封闭步骤的话)，或者反应的最后一步可以是氧化步骤或硫化步骤(如果不进行封闭步骤的话)。如果所述氧化步骤或硫化步骤或封闭步骤是最后一步，则所述寡核苷酸可以由以下结构式 VII 表示：



VII.

在结构式 VII 中， $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$  和 B 如上定义。 $m$  为整数。

另一方面，如果希望获得没有 5'-保护基的寡核苷酸，则反应循环的最后一步可以是除去  $R^1$  的步骤。如果除去  $R^1$  是最后的反应步骤，则所述寡核苷酸可以由以下结构式 VIII 表示：



VIII.

在结构式 VIII 中， $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^{16}$ 、B 和  $m$

如上定义。

可以通过本发明方法产生的寡核苷酸去保护，并且适当的时候，采用本领域关于特定保护基和/或固体支持体的已知方法，从固体支持体上切下所述寡核苷酸。

在有机碱存在下，1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮以至少与四唑同样的效率促进亚磷酰胺的缩合反应。然而，当使用1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮来代替四唑时，几乎不产生不想要的副产物。另外，本发明的络合物为非爆炸性的，因此比使用四唑更安全，在寡核苷酸的大规模合成中尤其如此。

### 发明详述

本文所用的脂族基包括为全饱和的或者含有一个或多个非共轭双键的直链或支链  $C_1$ - $C_{18}$  烃、或者为全饱和的或者含有一个或多个非共轭双键的  $C_3$ - $C_{18}$  环烃。烷基是为全饱和的直链或支链  $C_1$ - $C_8$  烃或者  $C_3$ - $C_8$  环烃。脂族基最好是烷基。

芳基包括碳环芳环体系(例如苯基)和与一个或多个碳环芳环体系稠合的碳环芳环体系(例如萘基和蒽基)或者与一个或多个非芳环稠合的芳环体系(例如1,2,3,4-四氢萘基)。

本文所用的杂环基包括杂芳基和杂脂环基。本文所用的杂芳基包括在所述芳环中具有一个或多个选自硫原子、氮原子或氧原子的杂原子的芳环体系。最好是，杂芳基为具有1-4个杂原子的五元或六元环体系。本文所用的杂脂环基为最好具有5个或6个原子并且包括至少一个选自氮原子、氧原子和硫原子的杂原子的非芳环体系。杂环基的实例包括吗啉基、哌啶基、哌嗪基、硫代吗啉基、吡咯烷基、噻唑烷基、四氢噻吩基、氮杂环丁烷基、四氢呋喃基、二噁烷基和二噁环烷基(dioxepanyl)、噻吩基、吡啶基、噻二唑基、噁二唑基、吲唑基、呋喃、吡咯、咪唑、吡唑、三唑、嘧啶、吡嗪、噻唑、异噻唑、异噻唑、四唑、噁二唑、苯并(b)噻吩基、苯并咪唑、吲哚、

四氢吲哚、氮杂吲哚、吲唑、喹啉、咪唑并吡啶、嘌呤、吡咯并[2,3-d]嘧啶和吡唑并[2,3-d]嘧啶。

本文所用的氮杂杂环化合物包括在所述芳环中具有一个或多个氮原子的杂芳基和在所述非芳环体系中具有至少一个氮原子的杂脂环基。氮杂杂芳基化合物最好是在所述芳环中含有 1-3 个氮原子的五元或六元芳环。氮杂杂脂环基化合物最好是在所述环中通常包含一个或两个氮原子的五元环或六元环。优选的氮杂杂环化合物是有机碱。为有机碱的氮杂杂环化合物的实例包括嘧啶、1-烷基吡唑、尤其是 1-(C<sub>1-4</sub> 烷基)吡唑、1-芳基吡唑、1-苄基吡唑、吡嗪、N-烷基嘌呤、尤其是 N-(C<sub>1-4</sub> 烷基)嘌呤、N-芳基嘌呤、N-苄基嘌呤、N-烷基吡咯、尤其是 N-(C<sub>1-4</sub> 烷基)吡咯、N-芳基吡咯、N-苄基吡咯、吡啶、N-烷基咪唑、尤其是 N-(C<sub>1-4</sub> 烷基)咪唑、N-芳基咪唑、尤其是 N-苄基咪唑、N-苄基咪唑、喹啉、异喹啉、喹喔啉、喹唑啉、N-烷基吲哚、尤其是 N-(C<sub>1-4</sub> 烷基)吲哚、N-芳基吲哚、N-苄基吲哚、N-烷基苯并咪唑、尤其是 N-(C<sub>1-4</sub> 烷基)苯并咪唑、N-芳基苯并咪唑、N-苄基苯并咪唑、三嗪、噻唑、1-烷基-7-氮杂吲哚、尤其是 1-(C<sub>1-4</sub> 烷基)-7-氮杂吲哚、1-芳基-7-氮杂吲哚、1-苄基-7-氮杂吲哚、吡咯烷、吗啉、哌啶和哌嗪。尤其优选的氮杂杂环化合物为吡啶(例如吡啶和 3-甲基吡啶)和 N-(C<sub>1-4</sub> 烷基)咪唑(例如 N-甲基咪唑)。

本文所用的芳烷基是与烷基部分结合的芳基取代基。优选的芳烷基包括苄基。

本文所用的杂芳烷基是与烷基部分结合的杂芳基取代基。

有机碱是在 pH 7 时有接受质子倾向的有机化合物。优选的有机碱是仲胺、叔胺或氮杂杂环化合物，其中每个可以被一个或多个取代基取代或者是未取代的。非质子有机碱是在其化学结构中在接受质子之前没有氢键键合质子的有机碱。最好是将诸如叔胺和非质子氮杂杂环化合物之类的非质子有机碱连同本文中描述的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮一起使用，以促进缩合反应。

叔胺是具有 1 个氮原子的有机碱，该氮原子与 3 个碳原子键合，通常与 3 个芳基(通常为苯基)键合和/或与烷基键合，通常与 3 个烷基键合；所述叔胺包括例如三烷基胺，例如三甲胺、三乙胺和二异丙基乙胺。另外，叔胺可以是氮杂杂环基，其中所述氮原子为非质子的。优选为氮杂杂环基的叔胺。氮杂杂环基叔胺的实例为 N-烷基吡咯烷、N-芳基吡咯烷、N-烷基吡咯、N-芳基吡咯、N-烷基吗啉、N-芳基吗啉、N-烷基哌啶、N-芳基哌啶、N,N-二烷基哌嗪、N,N-二芳基哌嗪、N-烷基-N-芳基-哌嗪、奎宁环和 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯。叔胺也可以是氮杂杂芳基化合物或氮杂杂脂环基化合物。

仲胺是包含 1 个与 1 个氢原子和 2 个碳原子键合的氮原子的有机碱。通常，所述氮原子与 2 个烷基或芳基键合或者形成氮杂杂环基的一部分。仲胺化合物的实例包括二乙胺和二异丙胺。

脂族基、芳基、芳烷基、杂芳基、氮杂杂芳基和杂脂环基的合适取代基包括芳基、卤化芳基、烷基、卤化烷基(例如三氟甲基和三氯甲基)、脂族醚、芳族醚、苄基、取代的苄基、卤素、特别是氯代基和氟代基、氰基、硝基、-S-(脂族基或取代的脂族基)和-S-(芳基或取代的芳基)。

胺保护基、羟基保护基和巯基保护基是本领域技术人员已知的。有关胺保护基的实例参见 Greene 等, *Protective Groups in Organic Synthesis* (1991), John Wiley & Sons, Inc., 第 309-405 页，所述文献的内容通过引用全部结合到本文中。胺最好被保护成酰胺或氨基甲酸酯。有关羟基保护基的实例参见上文，第 10-142 页，所述文献的内容通过引用全部结合到本文中。一种优选的羟基保护基是叔丁基二甲基甲硅烷基。有关巯基保护基的实例参见上文，第 277-308 页，所述文献的内容通过引用全部结合到本文中。

酸不稳定保护基是可以通过使所述保护基与布朗斯台德酸(Bronsted acid)或路易斯酸(Lewis acid)接触而除去的保护基。酸不稳定保护基是本领域技术人员已知的。常用的酸不稳定保护基的实例

包括取代或未取代的三苯甲基(出处同上, 第 60-62 页)、取代或未取代的四氢吡喃基(出处同上, 第 31-34 页)、取代或未取代的四氢呋喃基(出处同上, 第 36-37 页)或 pixyl (出处同上, 第 65 页)。三苯甲基通常被给电子取代基例如烷氧基取代。一个优选的酸不稳定保护基是取代或未取代的三苯甲基, 例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基(在下文称为“DMT”)。

核苷碱基包括天然存在的碱基, 例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以及修饰碱基例如 7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮-8-氮鸟嘌呤、5-丙炔基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮-8-氮腺嘌呤、7-脱氮-6-氧鸟嘌呤、6-氧鸟嘌呤、3-脱氮腺苷、2-氧代-5-甲基嘧啶、2-氧代-4-甲硫基-5-甲基嘧啶、2-硫代羰基-4-氧代-5-甲基嘧啶、4-氧代-5-甲基嘧啶、2-氨基-嘌呤、5-氟尿嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、8-氨基嘌呤、4-三唑并-5-甲基胸腺嘧啶和 4-三唑并-5-甲基尿嘧啶。

受保护的核苷碱基是其中所述碱基的反应性官能团被保护的核苷碱基。同样, 受保护的杂环是其中所述杂环的反应性取代基被保护的杂环。通常, 核苷碱基或杂环具有可以被胺保护基例如酰胺或氨基甲酸酯保护的胺基。例如, 腺嘌呤和胞嘧啶的胺基通常被苯甲酰基保护基保护, 而鸟嘌呤的胺基通常被异丁酰基、乙酰基或叔丁基苯氧基乙酰基保护。然而, 可以使用其它保护方案。例如, 对于快速去保护, 腺嘌呤和鸟嘌呤的胺基被苯氧基乙酰基保护, 而胞嘧啶的胺基被异丁酰基或乙酰基保护。用于除去所述核苷碱基或杂环的保护基的条件将取决于所用的保护基。如果使用酰胺保护基, 则可以通过用碱性溶液处理所述寡核苷酸而除去所述酰胺保护基, 所述碱性溶液例如浓的氢氧化铵溶液、正甲基胺溶液或叔丁胺的氢氧化铵溶液。

本文所用的术语“寡核苷酸”包括天然存在的寡核苷酸, 例如 2'-脱氧核糖核酸(在下文称为“DNA”)和核糖核酸(在下文称为“RNA”)

以及含有修饰糖部分、修饰磷酸酯部分或修饰核苷碱基部分的核酸。糖部分的修饰包括用己糖环、环戊基环或环己基环取代核糖环。或者，天然存在的核酸的 D-核糖环可以被 L-核糖环取代，或者天然存在的核酸的  $\beta$ -端基异构体可以被  $\alpha$ -端基异构体取代。所述寡核苷酸也可以包含一个或多个脱碱基部分。修饰磷酸酯部分包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸甲酯、磷酸甲酯和氨基磷酸酯。这样的核酸类似物是本领域技术人员已知的。可以制备包含两种或两种以上前述部分的混合物的寡核苷酸，例如包含脱氧核糖核苷和核糖核苷的混合物的寡核苷酸，特别是包含脱氧核糖核苷和 2'-O-取代核糖核苷例如 2'-O-甲基核糖核苷或 2'-O-甲氧基乙基核糖核苷的混合物的寡核苷酸。包含核苷混合物的寡核苷酸的实例包括核酶。

嵌合寡核苷酸是既含有磷酸二酯键又含有硫代磷酸酯键的寡核苷酸。

合成寡核苷酸优选具有 2 个至约 100 个核苷碱基。合成寡核苷酸更优选具有 2 个至约 75 个核苷碱基。目前有治疗价值的许多合成寡核苷酸包含 8-40 个核苷碱基。

所述寡核苷酸的合成可以在溶液中或者在固体支持体上进行。如果所述合成在溶液中进行，则  $R^{16}$  为羟基保护基、胺保护基或巯基保护基。在合成所述寡核苷酸之后，可以将所述羟基保护基、胺保护基或巯基保护基除去。如果在固体支持体上合成所述寡核苷酸，则  $R^{16}$  代表固体支持体，或者最好是代表与固体支持体连接的可切割连接基团，例如式  $-Y_2-L-Y_2-R^{15}$  的基团。一般而言，使用 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮化合物来代替四唑进行寡核苷酸的溶液相合成或固相合成，以促进新生寡核苷酸和亚磷酰胺单体的缩合作用，该方法与开发出的用四唑作为活性剂来合成寡核苷酸的方法类似。下面描述使用促进所述缩合反应的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮化合物进行溶液相合成和固相合成寡核苷酸的典型条件的实例。

制备所述寡核苷酸的第一步包括使核苷亚磷酰胺例如由结构式 IIa 表示的亚磷酰胺与具有游离羟基或巯基的核苷或新生寡核苷酸例如由结构式 IV 表示的 5-受保护的核苷或新生寡核苷酸进行偶联。在所述偶联反应期间,所述核苷或新生寡核苷酸的羟基或巯基通过取代所述-NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup> 基团与所述核苷亚磷酰胺反应。如果所述合成在溶液中进行,则所述核苷或新生寡核苷酸的浓度通常为约 0.001 M 至约 1.0 M,优选所述核苷或新生寡核苷酸的浓度约 0.025 M 至约 0.5 M。所述核苷亚磷酰胺的浓度优选相对于所述核苷或新生寡核苷酸而言约 1.1 当量至约 2 当量。加入相对于所述核苷或新生寡核苷酸而言约 0.5 当量、常常约 2.5 当量至约 5.0 当量的 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮,以促进所述缩合反应。最好是以与有机碱的盐络合物形式加入所述 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮,所述盐络合物例如吡啶鎓盐、3-甲基吡啶鎓盐或 N-甲基咪唑鎓盐。反应时间通常约 20 分钟至约 60 分钟,形成具有一个末端三价磷键的(n+1)新生寡核苷酸,例如由结构式 V 表示的新生寡核苷酸。

制备寡核苷酸的第二步包括使所述新生寡核苷酸的末端三价磷基团氧化或硫化。在溶液相合成中,常常在有机溶剂中的水或过氧化物例如叔丁基过氧化氢的存在下,通过用氧化剂例如 I<sub>2</sub> 处理所述寡核苷酸,来进行所述氧化反应。如果使用 I<sub>2</sub> 和水,则通常在碱存在下,所述氧化溶液含有约 1.1 当量至约 1.8 当量的 I<sub>2</sub> 和痕量的水。所述反应在非质子极性溶剂例如 THF 和碱例如叔烷基胺以及 1%水中进行。非质子溶剂与碱之比约 4:1 (体积/体积)至约 1:4 (体积/体积)。大约 5 分钟至约 20 分钟之后,将反应混合物倾至亚硫酸氢钠水溶液中,以猝灭过量的碘,然后萃取到有机溶剂中。

或者,可以采用寡核苷酸合成领域的技术人员已知的任何硫转移试剂,使所述末端三价磷基团硫化。硫转移试剂的实例包括 3H-苯并二硫酚-3-酮 1,1-二氧化物(也称为“Beaucage 试剂”)、二苯甲酰四硫化物、苯乙酰二硫化物、N,N,N',N'-二硫化四乙基秋兰姆、元素硫

和 3-氨基-[1,2,4]二噻唑-5-硫酮(参见美国专利第 6,096,881 号, 所述专利的全部内容通过引用结合到本文中)。采用上述试剂硫化寡核苷酸的反应条件可以在 Beaucage 等, *Tetrahedron* (1993), 49:6123 中找到, 所述文献的内容通过引用全部结合到本文中。3-氨基-[1,2,4]二噻唑-5-硫酮是一种优选的硫转移试剂。一般而言, 使寡核苷酸与 3-氨基-[1,2,4]二噻唑-5-硫酮的有机溶剂溶液接触, 所述有机溶液例如吡啶/乙腈(1:9)混合物或吡啶, 浓度约 0.05 M 至约 0.2 M。硫化反应一般在约 30 秒至约 2 分钟内完成。

在使所述寡核苷酸氧化或硫化之后, 可以将任何未反应的游离羟基或巯基封闭, 致使它们在后续偶联步骤中不能反应。封闭未反应的序列则使它们这些序列能更容易地与全长寡核苷酸产物分离。任何将与羟基或巯基反应并且阻止其与亚磷酰胺反应的试剂都可以用作封闭试剂。通常, 在碱存在下, 用酸酐例如乙酸酐或异丁酸酐或者酰基氯例如乙酰氯或异丁酰氯作为封闭剂。

在封闭反应完成后, 除去  $R^1$  保护基。如果  $R^1$  为酸不稳定保护基, 则  $R^1$  通过用酸处理所述寡核苷酸而除去。 $R^1$  最好为三苯甲基, 例如 4,4'-二甲氧基三苯甲基。如果  $R^1$  是三苯甲基, 则它可以通过用含二氯乙酸或三氯乙酸的有机溶剂溶液例如二氯甲烷或甲苯溶液处理所述寡核苷酸而除去。一旦  $R^1$  保护基已被除去, 则所述反应循环(即偶联步骤、氧化步骤或硫化步骤、封闭步骤(任选的)和去保护步骤)可以任选地重复一次或多次, 以获得所需长度的寡核苷酸。

可以通过使所述末端三价磷基团在一个或多个反应循环中氧化并且使所述末端三价磷基团在一个或多个不同的反应循环中硫化, 来制备嵌合寡核苷酸。或者, 可以通过选择亚磷酰胺单体, 来制备嵌合寡核苷酸, 其中  $R^3$  基团中的某些基团为受保护的羟基例如  $-OCH_2CH_2CN$  以及  $R^3$  基团中的某些基团为受保护的巯基例如  $-SCH_2CH_2CN$ 。在该方法中, 所述寡核苷酸在每个反应循环中在所述偶联步骤之后被氧化。

如果希望获得其中  $R^1$  基团仍保留的寡核苷酸产物, 则所述反应循环的最后一步可以是所述封闭步骤(如果进行封闭步骤的话), 或者所述反应的最后一步可以是氧化步骤或硫化步骤(如果不进行封闭步骤的话)。如果需要  $R^1$  去保护寡核苷酸, 则所述反应循环可以终止于所述去保护步骤。通常, 如果所述寡核苷酸必须通过反相高效液相色谱(HPLC)纯化, 则  $R^1$  受保护的寡核苷酸是所需的产物。如果所述寡核苷酸必须通过离子交换色谱或电泳纯化, 则  $R^1$  去保护寡核苷酸通常是所需的产物。

利用 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮且最好是有机碱来促进核苷亚磷酸胺与支持体结合的具有游离羟基或巯基的核苷或新生寡核苷酸的缩合作用的寡核苷酸固相合成, 总的来讲采用与所述溶液相合成相同的反应循环和试剂。通常, 首先将所述核苷加载在最适合所用特定树脂的固相支持体上。例如加载可以是每克支持体约 50  $\mu\text{mole}$  至约 700  $\mu\text{mole}$ 。在所述缩合步骤中, 使浓度通常约 0.01 M 至约 1 M、优选约 0.1 M 的核苷亚磷酸胺在有机溶剂例如乙腈的溶液中与所述支持体结合的核苷反应, 形成具有末端三价磷键的新生寡核苷酸。如果使用由结构式 IIa 或 IIb 表示的核苷亚磷酸胺, 则在所述偶联反应完成之后, 所述新生寡核苷酸将具有 5'-末端三价磷键。如果使用由结构式 IIIa 或 IIIb 表示的核苷亚磷酸胺, 则在所述偶联反应完成之后, 所述新生寡核苷酸将具有 3'-末端三价磷键。所用的核苷亚磷酸胺最好可以由结构式 IIa 表示。通常, 使浓度约 0.015M 至约 1.5 M、常常约 0.05M 至约 0.5M、优选 0.1M 至 0.25M 的 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮的溶液与含有所述亚磷酸胺单体的溶液恰好在所述缩合反应之前或期间混合。最好是, 有机碱在所述溶液中的浓度为约 0.015M 至约 1.5 M、常常约 0.05M 至约 0.5M、优选 0.1M 至 0.25 M。最好是, 所述有机碱的摩尔浓度与所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮的摩尔浓度相同。可以以与核苷亚磷酸胺的摩尔比为催化性即亚化学计量的摩尔

比或者以为化学计量或高于化学计量的摩尔比来使用 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮。在许多实施方案中, 1,1-二氧代-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮与核苷亚磷酰胺的摩尔比在约 0.2:1 至 5:1、常常 0.25:1 至 4:1、优选约 0.3:1 至 2:1、例如约 1:1 的范围内。然后, 使所述支持体结合的 5'-去保护核苷与所述混合物接触约 2 分钟至约 10 分钟, 优选接触约 5 分钟。

如果所述末端三价磷键在所述偶联反应完成之后必须被氧化, 则使含有所述新生寡核苷酸的固体支持体与氧化剂例如  $I_2$  和水的混合物或者过氧化物例如叔丁基过氧化氢在有机溶剂例如乙腈或甲苯中接触。 $I_2$  和  $H_2O$  的混合物是一种优选的氧化剂。如果使用  $I_2$  和水的混合物, 则也可以存在其它水可混溶的有机溶剂。通常, 可以使含有三价磷核苷酸间键的固体支持体结合的寡核苷酸与水、非质子溶剂、水可混溶溶剂和碱的溶剂混合物中的  $I_2$  溶液接触。典型氧化溶液的一个实例为约 0.05 M 至约 1.5 M  $I_2$  的(2:80:20)水/四氢呋喃/二甲基吡啶(体积/体积/体积)溶液。所述固体支持体通常用所述  $I_2$  溶液处理 30 秒至约 1.5 分钟。

或者, 可以使所述固体支持体结合的新生寡核苷酸与有机溶剂中的硫转移试剂溶液接触, 以使所述三价磷基团硫化。例如, 可以使所述支持体结合的寡核苷酸与有机溶剂例如乙腈或吡啶中的 3-氨基-[1,2,4]二噻唑-5-硫酮(约 0.05M-0.2M)溶液接触约 30 秒至约 2 分钟。

在固相寡核苷酸合成中, 可以任选地使所述固体支持体结合的新生寡核苷酸与所述封闭剂溶液接触约 30 秒至约 1 分钟。在所述封闭步骤之后, 通过使所述支持体结合的寡核苷酸与酸性溶液接触约 1 分钟至约 3 分钟, 完成去保护步骤。所述反应循环可以任选重复一次或多次, 直到合成了所需长度的寡核苷酸为止。正是在所述溶液相合成期间, 当反应循环终止于所述封闭步骤或氧化步骤或硫化步骤时, 获得  $R^1$  受保护的寡核苷酸。如果所述反应循环终止于所述去

保护步骤，则获得  $R^1$  去保护的寡核苷酸。

当完成所述固相合成时，可以通过标准方法，从所述固体支持体上切下所述寡核苷酸。一般而言，根据寡核苷酸序列以及是否希望在该步骤期间除去所述核苷碱基保护基，所述固体支持体用浓的氢氧化铵溶液于 25°C-60°C 处理约 0.5 小时至约 16 小时或更长时间。通过本领域已知的方法，例如离子交换色谱、反相色谱和从合适溶剂沉淀的一种或多种方法，便利地纯化所述寡核苷酸。也可使用通过例如超滤来进一步加工所述产物。

本发明的一个特别优选的方面包括用于寡核苷酸合成的方法，所述方法包括在活化剂存在下，使核苷亚磷酸胺、优选核苷 3'-亚磷酸胺与具有游离羟基、优选游离 5'-羟基的核苷或新生寡核苷酸进行偶联，其中所述活化剂包含 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和 N-烷基咪唑、优选 N-甲基咪唑的混合物。

在该特别优选的实施方案中，所述亚磷酸胺通常包含式- $P(OCH_2CH_2CN)N(CH(CH_3)_2)_2$  的一部分。通常，在该实施方案中，所述 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和 N-烷基咪唑的浓度各为 0.1-0.25M，并且 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮与 N-烷基咪唑的摩尔比优选为约 1:1 至约 1:1.5:1，最优选 1:1。在该特别优选的实施方案中，1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮与亚磷酸胺的摩尔比优选为 0.5:1 至 2:1。

通过下面的实施例说明本发明，但不并限于此。

### 实施例 1: 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮和吡啶的盐络合物的制备

将 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮悬浮于乙腈溶液中，向该悬浮液中滴加相对于所述 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-酮的 1.1 当量的吡啶。该溶液在加入结束时变得透明，且从该溶液中析出为细晶材料的 1,1-二氧化-1,2-二氢-1 $\lambda^6$ -苯并[d]异噻唑-3-

酮和吡啶的盐络合物。用乙醚或己烷洗涤该晶体，以除去痕量的吡啶和乙腈。<sup>1</sup>H NMR (DMSO)的化学位移(ppm): 8.8 (2H, s), 8.2 (1H, q), 8.0 (1H, q)和 7.6-7.9 (6H, m)。

#### 实施例 2: 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮和 3-甲基吡啶的盐络合物的制备

1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮和 3-甲基吡啶的盐络合物以与实施例 1 相同的方法制备。<sup>1</sup>H NMR (DMSO)的化学位移(ppm): 8.8 (1H, s), 8.72 (1H, d), 8.27 (1H, d), 8.0 (2H, d), 7.77-7.93 (6H, m)和 2.45 (3H, s)。

#### 实施例 3: 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮和 N-甲基咪唑的盐络合物的制备

将 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮悬浮于乙腈溶液中，向该悬浮液中滴加相对于所述 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮的 1.1 当量的 N-甲基咪唑。减压浓缩反应混合物，形成结晶盐，用乙醚或己烷洗涤该结晶盐，以除去痕量的 N-甲基咪唑和乙腈。<sup>1</sup>H NMR (DMSO)的化学位移(ppm): 13.9 (1H, s), 9.03 (1H, s), 7.59-7.75 (6H, m)和 3.88 (3H, s)。

#### 实施例 4: 用 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮和有机碱的盐络合物合成脱氧核糖-寡核苷酸

在 DNA 合成仪 Oligo Pilot II (Amersham Pharmacia Biotech)上进行所述寡核苷酸的合成。用稍加修改的标准亚磷酰胺化学进行所述合成。亚磷酰胺单体在乙腈溶液中的浓度为 0.1 M。在缩合步骤期间，用 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮和吡啶、3-甲基吡啶或 N-甲基咪唑的盐络合物来代替四唑作为活化剂。所述盐络合物在乙腈溶液中的浓度为 0.25 M。使用 1,1-二氧代-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮盐络合物进行链延伸所用的偶联时间类似于四唑作为活化

剂时所用的偶联时间。在缩合步骤之后，或者用碘溶液使亚磷酸三酯键转化成稳定的磷酸三酯，或者用 Beaucage 试剂或 3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮使其转化成稳定的硫代磷酸三酯。合成结束时，将与全保护的寡核苷酸连接的固体支持体用 10%叔丁胺的浓氢氧化铵溶液于 50℃处理 16-20 小时，以便释放所述寡核苷酸并除去β-氰基乙基保护基和核苷碱基保护基。通过离子交换 HPLC、毛细管电泳和 MALDI-TOF 质谱法分析所述粗制寡核苷酸，并将其与用四唑作为活化剂制备的寡核苷酸进行比较。表 1 描述了合成硫代磷酸酯寡核苷酸序列 5' TCT-CCC-AGC-GTG-CGC-CAT 3' (SEQ ID NO 1)所用的条件，而表 2 描述了由不同合成所获得的结果。表 1 和表 2 中举例说明的盐络合物是 1,1-二氧化-1,2-二氢-1λ<sup>6</sup>-苯并[d]异噻唑-3-酮和 N-甲基咪唑。

表 1: 用于合成 SEQ ID NO 1 的合成参数

| 固体支持体  | 合成规模     | 活化剂  | 酰胺化物 (Amidite) 的摩尔当量 | 活化剂与酰胺化物之比 | 硫化剂的当量 |
|--------|----------|------|----------------------|------------|--------|
| CPG-微珠 | 746μmole | 四唑   | 2.0 当量               | 4.3        | 3.2    |
| CPG-微珠 | 737μmole | 盐络合物 | 2.0 当量               | 4.0        | 3.3    |
| CPG-微珠 | 737μmole | 盐络合物 | 1.5 当量               | 3.3        | 3.3    |
| 刚性 PS  | 626μmole | 盐络合物 | 2.0 当量               | 4.0        | 3.8    |
| 刚性 PS  | 600μmole | 四唑   | 2.0 当量               | 4.3        | 4.0    |

表 2: SEQ ID NO 1 的分析和结果

| 固体支持体                                       | 规模             | 活化剂  | 酰胺化物的摩尔当量 | 总 OD 单位 | FLP (CGE) | FLP (HPLC) | 分子量  |
|---------------------------------------------|----------------|------|-----------|---------|-----------|------------|------|
| CPG 微珠                                      | 746 $\mu$ mole | 四唑   | 2.0 当量    | 84504   | 74%       | 77%        | 5688 |
| CPG 微珠                                      | 737 $\mu$ mole | 盐络合物 | 2.0 当量    | 82134   | 77%       | 79%        | 5687 |
| CPG 微珠                                      | 737 $\mu$ mole | 盐络合物 | 1.5 当量    | 82320   | 77%       | 79%        | 5689 |
| 刚性 PS                                       | 626 $\mu$ mole | 盐络合物 | 2.0 当量    | 80712   | 76%       | 76%        | 5686 |
| 刚性 PS                                       | 600 $\mu$ mole | 四唑   | 2.0 当量    | 75006   | 73%       | 71%        | 5687 |
| FLP = 全长产物, CGE = 毛细管凝胶电泳, HPLC = 离子交换 HPLC |                |      |           |         |           |            |      |

尽管参照本发明的优选实施方案具体说明和描述了本发明,但是本领域技术人员将会知道,在不偏离所附权利要求书所包括的本发明范围的情况下,可以对此中的形式和细节进行各种变化。

## 序 列 表

- <110> Avecia Biotechnology, Inc. et al  
<120> 寡核苷酸在固相支持体上的固定化  
<130> SMC 60474-WO  
<160> 1  
<170> PatentIn version 3.1
- <210> 1  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 实施例 4 中制备的序列
- <400> 1  
tctcccagcg tgcgccat