



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101023091 B

(45) 授权公告日 2010.12.15

(21) 申请号 200580029633.4

(22) 申请日 2005.07.11

(30) 优先权数据

0408318 2004.07.28 FR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.03.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FR2005/001786 2005.07.11

(87) PCT申请的公布数据

W02006/024722 FR 2006.03.09

(73) 专利权人 原子能总署

地址 法国巴黎

专利权人 约瑟夫傅立叶大学

(72) 发明人 安托万·欧昂 弗朗索瓦丝·维内

埃里克·德弗朗斯科

帕斯卡尔·迪米

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

公司 72003

代理人 吴小瑛

(51) Int. Cl.

C07F 9/24 (2006.01)

C07D 207/46 (2006.01)

C07C 271/08 (2006.01)

C07F 7/18 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 9739151 A1, 1997.10.23, 全文.

US 5143854 A, 1992.09.01, 全文.

余冰宾 等. 生物化学实验指导

第1版. 清华大学出版社, 2004, 72.

Montse Acedo, et.al.. N-2-(2,4-

Dinitrophenyl)ethyloxycarbonyl-Amino

Acids, NewBase Labile Protected Derivatives

Suitable for Solid-Phase Peptide

Synthesis. Tetrahedron Letters 33

34. 1992, 33(34), 4989-4992.

Kumar R. Bhushan, et.al.. Synthesis of

photolabile 2-(2-nitrophenylpropyloxycar-

bonylprotected amino acids. Tetrahedron

Letters 44 47. 2003, 44(47), 8585-8588.

审查员 朱洁

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 1 页

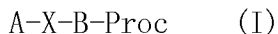
(54) 发明名称

含有光不稳定保护基团的偶联剂及其在如固相载体官能化中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种含有光不稳定保护基团的化合物, 及其作为偶联剂在固相载体官能化中的应用。本发明还涉及由所述化合物官能化的固相载体, 并涉及所述固相载体在诸如核酸分子等目标生物分子的固定中的应用。

1. 一种如下通式 (I) 的偶联剂：



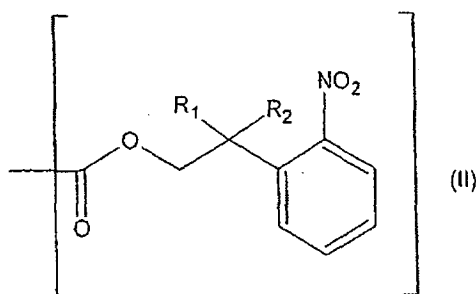
其中：

-A 表示用于与固相载体连接的官能团，所述官能团选自胺、亚磷酰胺、硅烷和活化的酯类的官能团，其中所述活化的酯类是用 N-羟基丁二酰亚胺或五氟苯酯化的羧酸官能团；

-X 表示间隔臂；

-B 是选自在光去保护后，形成 $-ONH_2$ 或 $-NH-NH_2$ 官能团的反应性官能团，所述官能团 B 被 Proc 基团保护；

-Proc 是以下通式 (II) 的光不稳定保护基团：



其中：

R_1 和 R_2 可以相同或不同，其表示氢原子或 C_1-C_4 烷基。

2. 如权利要求 1 所述的偶联剂，其特征在于所述的间隔臂 X 是不带电的疏水链或不带电的亲水链。

3. 如权利要求 2 所述的偶联剂，其特征在于所述的间隔臂 X 选自包含 1 至 13 个碳原子的饱和烃链、以及碳链包含 4 至 12 个碳原子的二醇醚。

4. 如前述任一权利要求所述的偶联剂，其特征在于互相独立的 R_1 和 R_2 表示选自甲基和乙基的烷基。

5. 如权利要求 1 所述的偶联剂，其特征在于所述的偶联剂选自下列，

其中：

i. -A 表示亚磷酰胺官能团，

-X 表示具有 6 个碳原子的饱和烃链，

-B 表示 $-ONH-$ 官能团，且

$-R_1$ 和 R_2 表示氢原子或甲基；

ii. -A 表示三 (C_1-C_4) 烷氧基硅烷，

-X 表示具有 2 至 12 个碳原子的饱和烃链，

-B 表示 $-ONH-$ 官能团，且

$-R_1$ 和 R_2 表示氢原子或甲基；

iii. -A 表示与 N-羟基丁二酰亚胺、或五氟苯酯化的羧酸官能团，

-X 表示 $-CH_2-$ ，

-B 表示 $-ONH-$ ，且

$-R_1$ 和 R_2 表示氢原子或甲基。

6. 如权利要求 5 所述的偶联剂，其特征在于所述的化合物 ii 选自其官能团 A 为三乙氧

基硅烷,且 X 是具有 3 或 11 个碳原子的饱和烃链的化合物。

7. 至少一个如权利要求 1 至 6 中任何一项所定义的通式 (I) 的偶联剂在使固相载体官能化中的应用。

8. 一种制备官能化固相载体的方法,其特征在于其包括至少一个使固相载体的至少一面与在有机溶剂中的至少一种如权利要求 1 至 6 中任何一项所定义的通式 (I) 的偶联剂的溶液接触的步骤。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于使固相载体与通式 (I) 的偶联剂溶液于 4℃ -80℃ 接触 1 至 48 小时。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的方法,其特征在于所述的固相载体选自玻璃、陶瓷、硅或塑料制成的载体,所述载体包括至少一个水合的、羟基化的、硅烷化的或氨化的表面或活化的酯类表面。

11. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于所述的载体是载玻片、平面的塑料板或具槽的塑料板、毛细管或有孔或无孔珠的形式。

12. 一种固相载体,其特征在于其含有至少一个被一种或多种如权利要求 1 至 6 中任何一项所定义的通式 (I) 的偶联剂官能化的表面。

13. 权利要求 12 所定义的至少一种固相载体的应用,其用于使目标生物分子共价固定,所述的生物分子含有与存在于所述固相载体表面的通式 (I) 的偶联剂的反应性官能团 B 互补的化学官能团,所述互补的化学官能团选自胺官能团、醇、硫醇、羧基或羰基。

14. 如权利要求 13 所述的应用,其特征在于所述目标生物分子是核酸分子。

15. 使目标生物分子固定在权利要求 12 所定义的固相载体上的方法,其特征在于所述的方法至少包括:

光去保护步骤,通过将固相载体的至少部分表面曝光,使通式 (I) 化合物的反应性官能团 B 光去保护;和

固定步骤,使通过光去保护步骤而活化的固相载体与目标生物分子溶液接触,从而使所述分子在所述固相载体上固定,所述固定通过由所述分子所带有的至少一个化学官能团形成共价键而进行;且

所述化学官能团与通式 (I) 的所述化合物的反应性官能团 B 有反应性,并任选地重复这两个步骤。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其特征在于所述的光去保护步骤只局限在官能化的固相载体表面的一部分。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的方法,其特征在于所述的固定步骤通过在通式 (I) 化合物的羟基胺官能团 B 与目标生物分子的羰基化的官能团之间形成肟键而进行。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于所述的固定步骤在 pH 4-7 的条件下进行。

19. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于所述的曝光波长为 300 至 400nm。

20. 一种固相载体,其特征在于所述的固相载体是根据权利要求 15 至 19 中任何一项所定义的方法而获得的,且所述的固相载体包括至少一面,其上固定着目标生物分子,所述的固定是通过与如权利要求 1 至 6 中任何一项所定义的通式 (I) 的偶联剂的反应性官能团 B 形成共价键而进行的。

含有光不稳定保护基团的偶联剂及其在如固相载体官能化中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含有光不稳定保护基团的偶联剂及其在固相载体官能化中的应用。本发明还涉及利用这种偶联剂官能化的固相载体,并且涉及所述固相载体在目标生物分子,特别是核酸分子的固定中的应用。

背景技术

[0002] 人们提出了各种将目标生物分子,特别是例如寡核苷酸 (ON) 之类的核酸,共价移植在固相载体上的方法。在 ON 连接的具体内容中,这些方法可分成两个主要类别:

[0003] 1. 原位合成,其为通过亚磷酰胺途径的合成原理,在固相载体上逐步构建 ON 分子。在国际申请 WO 97/39151 中经特别说明的这个方法,可以制备具有高密度 ON 的表面。另外,利用一组空白板,和光不稳定保护基团,使各种 ON 定位在载体上。然而,这种方法有不少主要的缺点。更具体而言,与载体连接的 ON 不能被表征,且很难引入带有修饰的 ON。

[0004] 2. 通过沉积或异位合成,其包括,首先,常规地制备 ON,其次,利用合适的化学反应将 ON 连接至固相载体。第二种方法的优点特别在于所用的 ON 能够在其连接至固相载体前被表征。

[0005] 在下文中将特别说明的是关于本发明的沉积合成方法。

[0006] 在现有技术中已说明了多种利用沉积的合成方法,特别是有关用于使 ON 进行定位移植 (localizing the grafting) 的各种技术。

[0007] 首先,所提及的方法可以是利用电化学途径的方法,其包括固定 (anchoring) ON,将该 ON 预先用例如吡咯基团之类的导电性基团通过吡咯残基的电聚合作用而官能化。在专利 FR2 703 359 中,特别说明了这种电化学 ON 沉积方法。尽管如此,此方法的缺陷在于需要使用导电性载体,使最终组分变得复杂。此外,在“Lab on a Chip”类组分中,各种制造步骤能够损害电极的质量,并因此损害其功能。

[0008] 其次,所提及的方法可以是光化学途径,其似乎是更令人满意的,这是由于表面及所用的化学溶液的处理 (management) 是具体化的 (externalized)。开发了两个方案:

[0009] i. 在表面和靶分子之间直接进行光移植。在此情况中,光移植的缺点在于涉及非选择性的自由基反应。

[0010] ii. 使在载体上光不稳定保护基团所保护的官能团游离,从而可其与靶 ON 随后的反应,以产生其连接。在此情况中,所用的载体通常由偶联剂官能化,该偶联剂是双官能化合物,其包括在其一末端的官能团用于与载体表面连接,以及在另一末端的官能团,其对含有互补化学官能团的靶分子有反应性,所述偶联剂的反应性官能团被光不稳定基团所保护。然而,为了竞争性,后面的方案必须满足一定的条件。以下是这些条件:

[0011] - 活化的载体与靶分子之间的反应必须迅速;此反应只能够在偶联剂的反应性官能团从其保护基团游离时发生(活化反应);

[0012] - 由此反应所得的产率必须要高;

[0013] - 用于制备偶联剂的合成方法必须简单易行, 且包括尽量少的步骤;

[0014] - 使用温和的反应条件 (例如水);

[0015] - 偶联剂与靶分子之间形成的键必须要在各种温度和 pH 的条件下稳定, 从而可非常灵活的使用由此官能化的载体。

[0016] 现在, 到目前为止所提出的各种方法似乎都不能令人满意地完全满足这些条件, 特别是由于所用的各种偶联剂的性质。

[0017] 因此, 发明人给他们自己所定的目标在于提供一种新颖的双官能偶联剂, 该偶联剂包括一个由光不稳定基团保护的反应性官能团, 其由包括很少步骤且能够在温和条件下实施的方法而容易地合成, 能够有利于使用这些偶联剂将固相载体官能化, 为了使靶生物分子随后连接在该载体上。

发明内容

[0018] 因此, 本发明的第一个主题是具有以下通式 (I) 的偶联剂:

[0019] $A-X-B-Proc$ (I)

[0020] 其中:

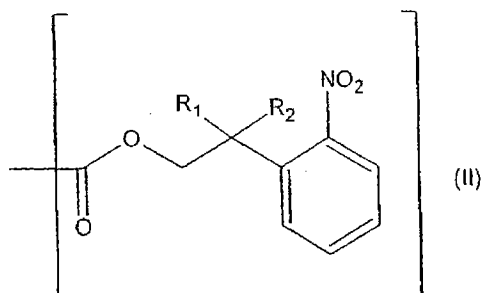
[0021] -A 表示用于与固相载体连接的官能团, 所述官能团选自胺、亚磷酰胺、硅烷和活化的酯类的官能团;

[0022] -X 表示间隔臂 (spacer arm);

[0023] -B 是选自在光去保护后形成羟基胺 ($-ONH_2$) 及其衍生物或酰肼 ($-NH-NH_2$) 及其衍生物的反应性官能团, 所述官能团 B 被 Proc 基团保护;

[0024] -Proc 是以下通式 (II) 的光不稳定保护基团:

[0025]



[0026] 其中:

[0027] R_1 和 R_2 可以相同或不同, 其表示氢原子或 C_1-C_4 烷基。

[0028] 根据本发明, 官能团 A 将根据待与通式 (I) 的偶联剂连接的载体的性质而选择。优选的活化的酯类官能团是用 N-羟基丁二酰亚胺, 或用其它本领域技术人员熟知的合适的活化剂 (例如五氟苯) 酯化的羧酸官能团。

[0029] 间隔臂 X 可以根据最终特性的需要而改变其长度和极性。例如, 其可以是不带电的疏水链 (例如饱和烃链) 或其它例如乙二醇醚的不带电的亲水链。

[0030] 根据本发明的具体优选实施方式, 间隔臂 X 选自包含 1 至 13 个碳原子的饱和烃链, 或二醇醚, 二醇醚的碳链包含 4 至 12 个碳原子, 例如三乙二醇 (TEG) 和六乙二醇 (HEG)。

[0031] 反应性官能团 B 是在光去保护后, 可与具有至少一个互补化学官能团的靶分子共价连接的官能团。此反应性官能团 B 将能够与该靶分子所具有的互补官能团, 例如胺官能

团、醇、硫醇、羧基或羰基,相互作用。互补官能团对的更详尽列举可以容易地在任何有机化学专论中查找。

[0032] 在上述通式 (II) 的保护基团中,当表示烷基,互相独立的 R_1 和 R_2 优选选自甲基或乙基;特别最优选甲基。

[0033] 在上述通式 (I) 的偶联剂中,特别优选下列偶联剂,其中:

[0034] i. -A 表示亚磷酰胺官能团,

[0035] -X 表示具有 6 个碳原子的饱和烃链,

[0036] -B 表示羟基胺官能团 (-ONH-),且

[0037] - R_1 和 R_2 表示氢原子或甲基;

[0038] ii. -A 表示三 (C_1-C_4) 烷氧基硅烷,

[0039] -X 表示具有 2 至 12 个碳原子的饱和烃链,

[0040] -B 表示羟基胺官能团 (-ONH-),且

[0041] - R_1 和 R_2 表示氢原子或甲基;

[0042] iii. -A 表示用 N-羟基丁二酰亚胺或五氟苯酯化的羧酸官能团,

[0043] -X 表示 $-CH_2-$,

[0044] -B 表示羟基胺官能团 (-ONH-),且

[0045] - R_1 和 R_2 表示氢原子或甲基;

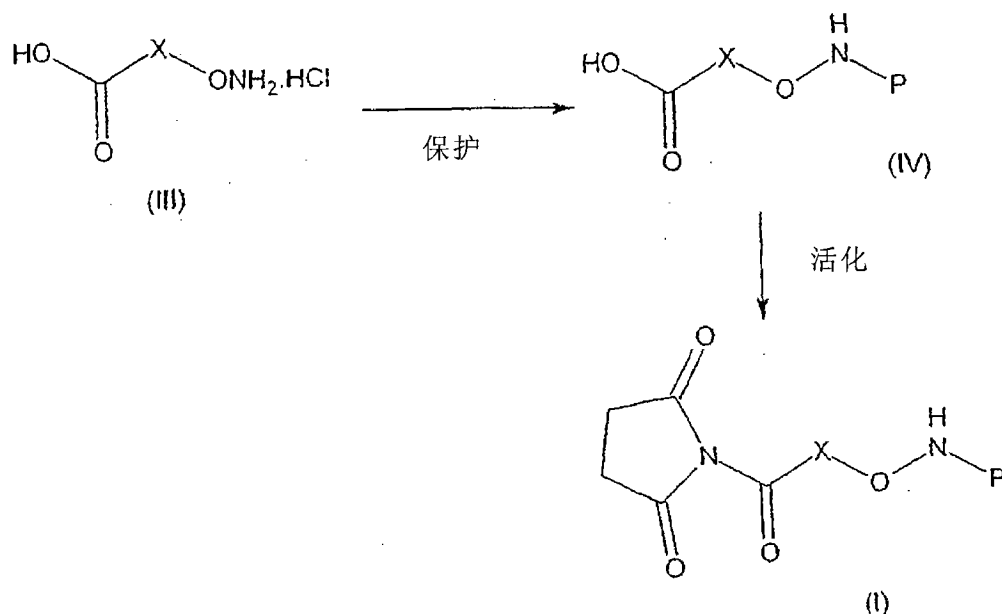
[0046] 在上述 iii) 定义的化合物中,最特别优选如下化合物,其中官能团 A 是三乙氧基硅烷, X 是含有 3 个或 11 个碳原子的饱和烃链。上述通式 (I) 的偶联剂,可以根据本领域技术人员熟知的有机合成原理,且根据官能团 A 和 B 的性质,而容易地制备。

[0047] 根据本发明的第一个实施方式,当偶联剂是通式 (I) 的化合物,其中连接官能团 A 是例如 N-羟基丁二酰亚胺形式活化的羧酸,并且官能团 B 是羟基胺官能团时,优选使用对应以下示意图 1 的制备方法:

[0048]

示意图 1

[0049]



[0050] 在此示意图中,Proc 是上述通式 (II) 所定义的光不稳定保护基团,且 X 可以是具

有与上述说明相同含义的间隔臂。

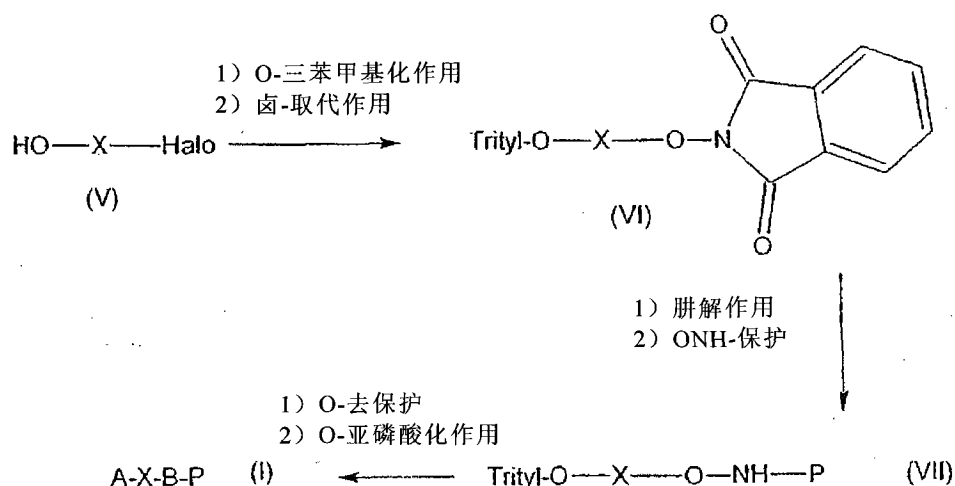
[0051] 根据此示意图,在第一步骤中,含有羧基官能团和羟基胺官能团的通式 (III) 化合物,受选自通式 (II) 的 Proc 光不稳定保护基团的保护,由此产生通式 (IV) 的化合物,然后,在第二步骤中,用 N-羟基邻苯二甲酰亚胺将通式 (IV) 化合物的羧酸官能团活化,由此产生预期的通式 (I) 化合物。

[0052] 根据本发明的第二个实施方式,当偶联剂是通式 (I) 的化合物,其中连接官能团 A 是亚磷酸胺官能团,且官能团 B 是羟基胺官能团时,优选使用对应以下示意图 2 的制备方法:

[0053]

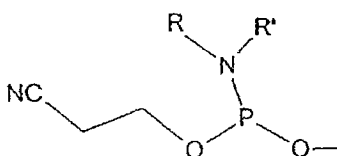
示意图 2

[0054]



[0055] 在此示意图上,X 和 Proc 具有如上述说明的相同含义,B 表示羟基胺官能团而 A 表示以下基团。

[0056]



[0057] 其中,R 和 R' 可以相同或不同,表示含有 1 个至 13 个碳原子的烷基。

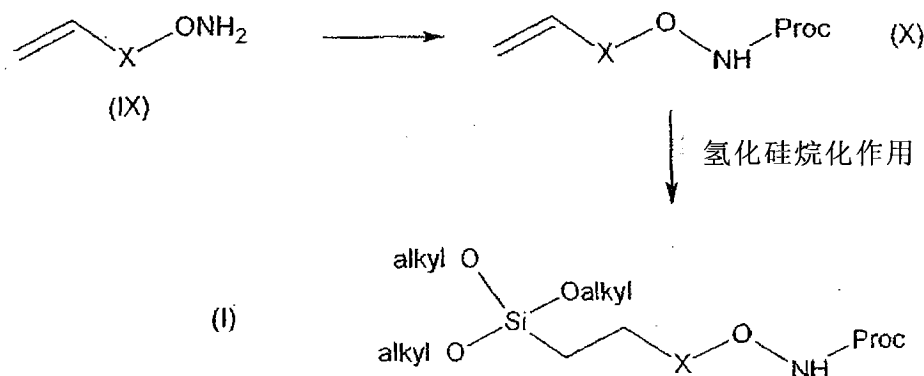
[0058] 根据此示意图,在第一步中,通式 (V) 的卤代醇 (其中 Halo 表示例如溴、氯、碘或氟的卤原子) 与 N-羟基邻苯二甲酰亚胺反应 (卤原子的亲核取代),由此获得通式 (VI) 的化合物,其在第二步中进行肼解作用,以获得游离的羟基胺官能团,其随后受选自通式 (II) 的光不稳定的 Proc 保护基团的保护,由此产生通式 (VII) 的化合物,其在第三步中,进行亚磷酸化作用 (phosphitylation),由此产生预期的通式 (I) 化合物。

[0059] 根据本发明的第三个实施方式,当偶联剂是通式 (I) 的化合物,其中连接官能团 A 是硅烷基,且官能团 B 是羟基胺官能团,优选使用对应以下示意图 3 的制备方法:

[0060]

示意图 3

[0061]



[0062] 根据此方法,通式 (IX) 的烯烃化合物的羟基胺官能团被保护,由此获得通式 (X) 的化合物,其中,X 表示间隔臂,其与上述用于说明通式 (I) 偶联剂的间隔臂具有相同含义。随后,通式 (X) 的化合物进行氢化硅烷化作用,由此产生通式 (I) 化合物,其中连接官能团 A 是三 (C₁-C₄) 烷氧基硅烷官能团。

[0063] 根据本发明的通式 (I) 的偶联剂可用于将固相载体官能化。因此,本发明的主题在于至少一种如上定义的通式 (I) 的偶联剂在固相载体官能化中的应用。

[0064] 使用通式 (I) 的偶联剂,有利于使固相载体表面能够迅速修饰上稳定层,该稳定层具有通过光去保护作用而易于得到的反应性官能团。

[0065] 因此,本发明的主题还在于一种用于制备官能化固相载体的方法,其特征在于包括至少一个使固相载体的至少一个表面与在有机溶液中的至少一种通式 (I) 的偶联剂的溶液接触的步骤。

[0066] 优选的有机溶剂选自例如三氯乙烯、二甲基甲酰胺 (DMF) 和环己烷的非极性溶剂。

[0067] 使固相载体与通式 (I) 的偶联剂溶液接触,优选在大约 4°C 至 80°C 之间的温度进行,维持大约 1 至 48 小时。

[0068] 随后,用一种或多种溶剂清洗基质,优选连续地使用反应溶剂、绝对乙醇和 / 或氯仿,随后干燥,优选使用氮。

[0069] 此方法的优点在于其可以简单地实施,且使其有可能获得具有良好密度的层。特别是有可能使其获得包括至少一表面由通式 (I) 化合物的自组装单层 (SAM) 官能化的固相载体。SAM 定义为分子的组装 (assembly),其中,分子是经排列的 (organized),其排列是由于分子链之间的相互作用,产生稳定的、单分子的并且整齐的非均向膜 (A. ULMAN, Chem. Rev., 1996, 96, 1533-1554)。当固相载体表面被根据本发明通式 (I) 的偶联剂 (其中,连接官能团 A 是硅烷类官能团) 官能化时,优选在浓度大约为 10mM 的溶液中,其溶剂例如为三氯乙烯,且当其接触是在大约 4°C 的温度下进行大约 24 小时时,特别有可能获得该 SAM。

[0070] 另外,通过实施本发明的方法所获得的表面直接呈现出大量的被光不稳定保护基团所保护的反应性官能团,容易在时间和空间上选择性地除去该保护基团,从而共价地固定目标生物分子,该生物分子包括与存在于固相载体表面的偶联剂的反应性官能团 B 互补的化学官能团。

[0071] 可以用本发明的通式 (I) 的偶联剂官能化的固相载体优选选自由玻璃、陶瓷 (氧化物类)、硅或塑料制造的载体,所述载体包括至少一个水合的、羟基化的、硅烷化的或氨化的表面、或另选的活化的酯类表面。该表面可以容易地根据现有技术熟知的技术制备。例

如,能够通过利用硅烷环氧化物的硅烷化作用制备包括羟基化表面的固相载体,其随后进行酸解,从而使表面的羟基官能团游离。

[0072] 此固相载体含有至少一个平面或非平面、平滑或结构性表面,并且可以是例如载玻片、平面塑料板或具槽的塑料板、毛细管或其它有孔或无孔珠的形式。

[0073] 如上述说明,通式(I)的偶联剂的连接官能团A,根据待与偶联剂连接的载体表面的性质选择。

[0074] 因此,当它们是含有至少一个活化的酯类表面的载体时,官能团A优选是胺类官能团;当它们是含有至少一个羟基类表面的载体时,官能团A优选是亚磷酸胺或硅烷官能团;当它们是含有至少一个氢化物类表面的载体时,官能团A优选是硅烷官能团;且当它们是含有氨化表面的载体时,官能团A优选是活化的酯官能团。

[0075] 因此,本发明的主题还有如下的固相载体,其含有至少一表面由一个或多个如上述定义的通式(I)的偶联剂官能化。

[0076] 固相载体经去保护后,能够有利地用于将目标生物分子固定,该生物分子含有与存在于所述固相载体表面的通式(I)偶联剂的反应性官能团B互补的化学官能团,并且更具体而言,该固相载体可用于共价固定例如DNA和寡核苷酸之类的核酸分子。

[0077] 因此,本发明的主题还有上述固相载体的应用,用于将目标生物分子共价固定,该生物分子包括与存在于所述固相载体表面的通式(I)偶联剂的反应性官能团B互补的化学官能团,更具体而言,通过酰胺键(肽)的形成共价固定核酸(DNA、寡核苷酸)。

[0078] 本发明的主题还有用于将目标生物分子,特别是核酸分子,固定在上述固相载体上的方法,其特征在于其至少包括第一步骤通过将固相载体的至少一部分表面曝光,使通式(I)化合物的反应性官能团B光去保护,随后使由此而活化的固相载体与目标生物分子(特别是核酸分子)溶液接触,从而使所述分子在所述固相载体上固定(通过与由所述分子所带有的至少一个化学官能团之间形成共价键,且该化学官能团与本发明的通式(I)的所述化合物的反应性官能团B有反应性),并任选地重复这两个步骤。

[0079] 更具体而言,光去保护步骤可以只局限在部分经官能化的固相载体表面上,例如通过掩模进行。

[0080] 曝光后,通式(I)偶联剂的反应性官能团B是在去保护(活化)状态,其因此产生带有游离的反应性官能团的区域,其可以捕捉溶液中任何包括如下化学官能团的分子,该化学官能团与在固相载体表面存在的所述活化反应性官能团B有反应性。

[0081] 更具体而言,固定步骤通过在通式(I)化合物的羟基胺官能团B与目标生物分子(特别是核酸分子)的羰基化官能团之间形成肟键而进行。此反应的优点在于能够在温和的条件下进行,特别是在pH 4和7之间进行。另外,所形成的键(肟)表现出很大的稳定性,且其不需要利用附加的还原步骤使其稳定。

[0082] 曝光波长优选在300nm至400nm之间。

[0083] 目标生物分子的溶液可以是简单的水溶液或这些分子在缓冲水溶液中的其它溶液。

[0084] 接触的持续时间优选在大约5至60分钟之间,并优选在大约4至60℃的温度之间进行。

[0085] 最后,本发明的主题还有如上述说明、且根据本发明通过进行固定方法而获得的

固相载体（特别是核酸芯片），即含有至少一表面，在其上固定所述目标生物分子（特别是核酸分子），该固定通过与本发明的通式 (I) 的偶联剂的反应性官能团 B 形成共价键而进行。

附图说明

[0086] 除了上述安排，本发明还包括将在以下说明的其它安排，其参考通式 (I) 的偶联剂的制备的实施例、使用根据本发明的通式 (I) 偶联剂，对毛细管类玻璃固相载体或平面固相载体进行官能化的实施例、使用这些官能化载体，将寡核苷酸固定、还说明了所附的图 1 和图 2，其中：

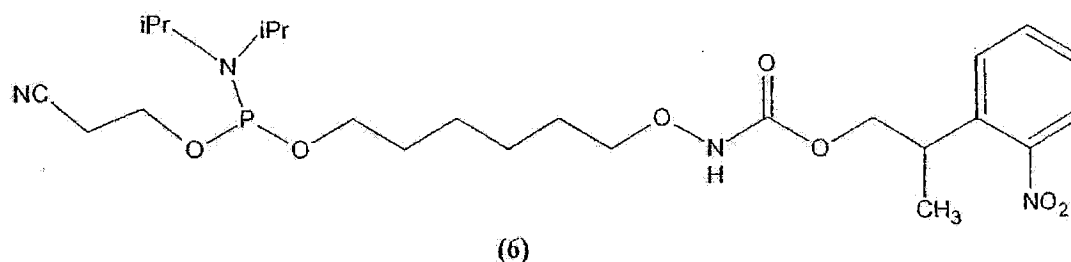
[0087] - 图 1 表示与根据本发明方法的毛细管类固相载体连接的寡核苷酸所放射的荧光的照片，用荧光团 (a/ 类毛细管) 标记的互补的寡核苷酸杂化后，与非官能化毛细管 (b/ 类毛细管) 对比；

[0088] - 图 2 表示与根据本发明方法的平面固相载体连接的寡核苷酸所放射的荧光的照片，用荧光团 (a/ 类载体) 标记的互补的寡核苷酸杂化后，与非官能化载体 (b/ 类载体) 对比。

具体实施方式

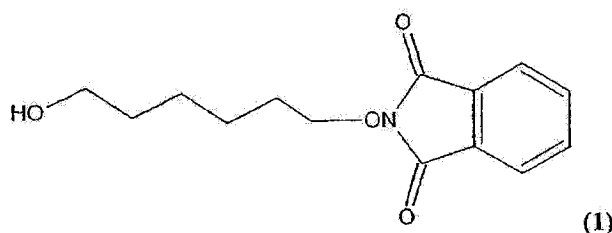
[0089] 实施例 1：根据通式 (I) 的亚磷酰胺衍生物的制备

[0090]



[0091] 1) 步骤 1：化合物 (1) 的制备：羟基胺的引入

[0092]



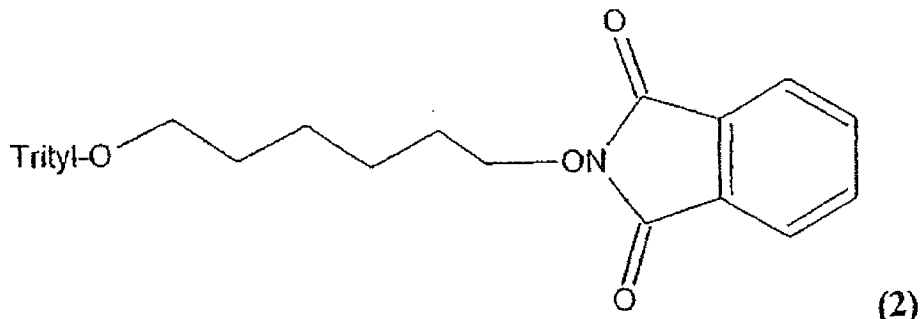
[0093] N-羟基邻苯二甲酰亚胺 (2.70g ;16.6mmol) 和碳酸钾 (4.6g ;23.6mmol) 在 150ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的溶液，在 50℃ 的温度于氩气下加热搅拌 1 小时。随后加入 6-溴代环己醇 (3g ;16.6mmol)，然后再次在 50℃ 的温度下，将该反应混合物搅拌过夜。过滤后，将溶剂在减压下蒸发。随后将 50ml 乙酸乙酯加至由此获得的残留物，并随后用 0.1N 氢氧化钠和饱和氯化钠水溶液冲洗有机相。随后用无水硫酸钠干燥该有机相，然后蒸发。获得白色粉末状的产物 (1) (3.28g ;12.5mmol ;产率 75%)，其熔点在 85 和 88℃ 之间。

[0094] 质子核磁共振光谱 (¹H-NMR) 分析，在 CDCl₃ 中以波长 200MHz 进行，结果如下：

[0095] δ ppm = 1.30-1.90 (8H, m, 4CH₂), 3.60 (2H, t, J = 13Hz, CH₂O), 4.20 (2H, t, J = 13Hz, CH₂ON), 7.70-7.90 (4H, m, Ar-H). MS (DCI, 正离子检测模式): M_{calc} -263 (C₁₄H₁₇NO₄), m/z = 281 [M+NH₄]⁺.

[0096] 2) 步骤 2: 化合物 (1) 的三苯甲基化以产生化合物 (2)

[0097]



[0098] 将三苯甲基氯 (4.2g; 15mmol) 加至从前述步骤获得的化合物 (1) (3.2g; 12.5mmol) 的 75ml 无水吡啶溶液中。在氩气下, 将该溶液于室温搅拌过夜。随后缓慢加入 5ml 甲醇, 然后在减压下将溶剂蒸走。所得的残留物随后溶解在 100ml 乙酸乙酯中, 然后以水和饱和氯化钠水溶液冲洗该有机相, 随后用无水硫酸钠干燥该有机相, 然后蒸发。以硅胶层析法纯化粗产物 (洗脱液: 二氯甲烷 / 环己烷: 75/25, v/v)。获得白色粉末状的产物 (2) (6.27g; 12.4mmol; 产率 99%), 其熔点为 106-107°C。

[0099] ¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): δ ppm = 1.30-1.90 (8H, m, 4CH₂), 3.20 (2H, t, J = 13Hz, CH₂O), 4.20 (2H, t, J = 13Hz, CH₂ON), 7.70-7.90 (4HAr, m, Ar-H- 邻苯二甲酰亚胺), 7.20-7.40 (15H, m, Ar-H- 三苯甲基)。

[0100] MS (ESI, 正离子检测模式): M_{calc} = 505 (C₃₃H₃₁NO₄), m/z = 528 [M+Na]⁺, m/z = 544 [M+K]⁺.

[0101] 3) 步骤 3: 化合物 (2) 的肼解以获得化合物 (3)

[0102]



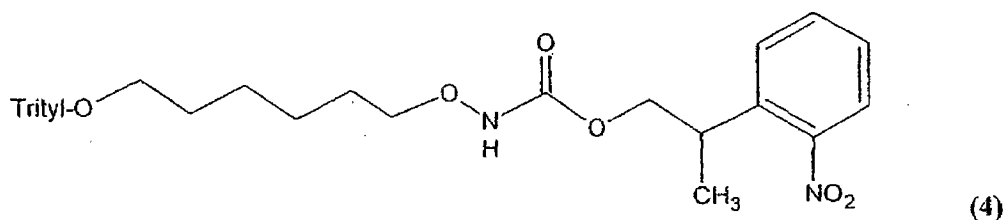
[0103] 将上述步骤 2 中获得的化合物 (2) (6.27g; 12.4mmol) 溶解在 50ml 二氯甲烷中, 并加入 780mg 肼 (24.8mmol)。所得的溶液回流 1.5 小时, 然后过滤, 并在减压下蒸发。以硅胶层析法纯化粗产物, 洗脱液为二氯甲烷, 然后再用 95/5 (v/v) 的二氯甲烷和甲醇混合物洗脱。获得油状的化合物 (3) (4.20g; 11.2mmol), 产率 90%。

[0104] ¹H-NMR (200MHz, CDCl₃): δ ppm = 1.30-1.80 (8H, m, 4CH₂), 3.10 (2H, t, J = 13Hz, CH₂O-Tri), 3.60 (2H, t, J = 13Hz, CH₂ON), 7.70-7.90 (15H, m, Ar-H- 三苯甲基)。

[0105] MS (ESI, 正离子检测模式): M_{calc} = 375 (C₂₅H₂₉NO₂), m/z = 376 [M+H]⁺, m/z = 398 [M+Na]⁺, m/z = 414 [M+K]⁺.

[0106] 4) 步骤 4: 化合物 (3) 的羟基氨的保护以获得化合物 (4)

[0107]



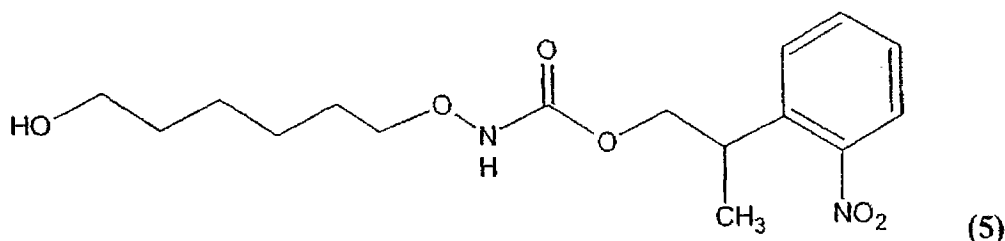
[0108] 在步骤3中制备的化合物(3)(4.20g;11.2mmol)溶解在100ml吡啶中。随后逐滴加入50ml含有5.40g(22.4mmol)2-(2-硝基苯基)丙基氯甲酯(C1-NPPOC)的二氯甲烷溶液中。在黑暗中搅拌该反应混合物1小时,然后减压蒸发。所得的残留物随后溶解在二氯甲烷中,其后,以饱和氯化钠水溶液冲洗该有机相,用无水硫酸钠干燥该有机相,然后蒸发。以硅胶层析法纯化粗产物,洗脱液二氯甲烷。获得橙色的油状产物(4)(5.80g;9.9mmol),产率89%。

[0109] $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ ppm = 1.30(3H, d, $J = 16\text{Hz}$, CH_3), 1.50–1.80(8H, m, 4CH_2), 3.0(2H, t, $J = 13\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{O-Tri}$), 3.70(2H, m, CH_2ON , 1H, m, CH), 4.20(2H, t, $J = 13\text{Hz}$, CH_2OCO), 7.10–7.50(15H, m, Ar-H-三苯甲基), 7.50–7.80(4H, m, Ar-H NPPOC). MS(ESI, 正离子检测模式): $M_{\text{calc}} = 582 (\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6)$, $m/z = 605 [\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z = 621 [\text{M}+\text{K}]^+$.

[0110] MS(ESI, 负离子检测模式): $m/z = 581 [\text{M}-\text{H}]^-$.

[0111] 5) 化合物(4)的去(除)三苯甲基作用以获得化合物(5)

[0112]

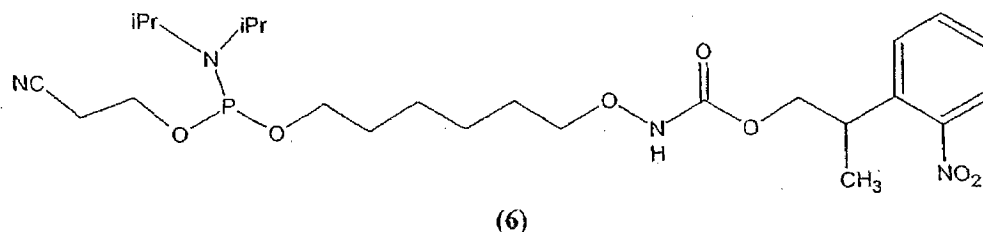


[0113] 将5.80g(9.90mmol)在前述步骤中获得的化合物(4)溶解在50ml含有20%三氟乙酸的二氯甲烷溶液中。在氩气下,将该混合物于室温搅拌3至4小时,然后蒸发。所得的残留物溶解在100ml二氯甲烷中,其后,以饱和NaCl水溶液冲洗该有机相。用无水硫酸钠干燥该有机相,然后蒸发。以硅胶层析法纯化粗产物,洗脱液为二氯甲烷,然后用95/5(v/v)的二氯甲烷和甲醇混合物。获得橙色的油状化合物(5)(3.0g;8.9mmol),产率90%。

[0114] $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ ppm = 1.30(3H, d, $J = 16\text{Hz}$, CH_3), 1.50–1.80(8H, m, 4CH_2), 3.70(2H, m, CH_2ON , 1H, m, CH), 4.30(2H, t, CH_2OCO , 2H, t, CH_2OH), 7.50–7.80(4H, m, Ar-H NPPOC). MS(DVI, 正离子检测模式): $M_{\text{calc}} = 340 (\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6)$, $m/z = 454 [\text{M}+\text{TFA}]^+$.

[0115] 6) 步骤6:化合物(5)的亚磷酸化作用以获得化合物(6)

[0116]



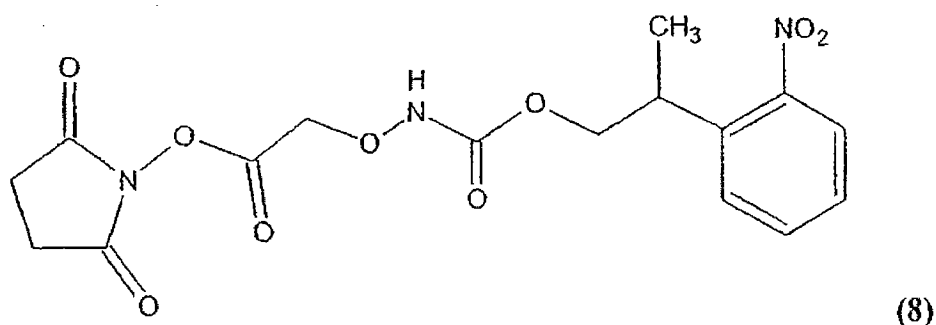
[0117] 在前述步骤中获得的化合物(5)(0.90g;2.7mmol)在氩气下溶解在15ml二氯甲烷

溶液中,然后加入二异丙基-乙胺(DIEA)(0.56ml;3.2mmol),接着加入0.72ml 2-氰乙基二异丙基氯-亚磷酸胺(3.2mmol)。将该反应混合物于室温搅拌4小时直至原料消失。然后,加入40ml二氯甲烷,其后,以饱和碳酸氢钠溶液冲洗该有机相,然后用饱和NaCl水溶液冲洗。用无水硫酸钠干燥该有机相,然后蒸发。以硅胶层析法纯化粗产物,洗脱液为二氯甲烷,然后用97/3(v/v)的二氯甲烷和甲醇混合物。获得黄色的油状化合物(6)(0.50g;1.0mmol),产率38%。

[0118] $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ ppm = 1.20-1.50(15H, m, 4CH_3), 1.50-1.85(8H, m, 4CH_2), 2.65(2H, t, CH_2CN), 3.80(2H, m, CH_2OH , 1H, m, CH , 4H, m, $2\text{CH}_2\text{OP}$), 4.30(2H, m, CH_2OCO , 2H, m, 2CHN , 7.10-7.70(4H Ar-H NPPOC). $^{31}\text{P-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ ppm = 120(2 非对映异构体)。

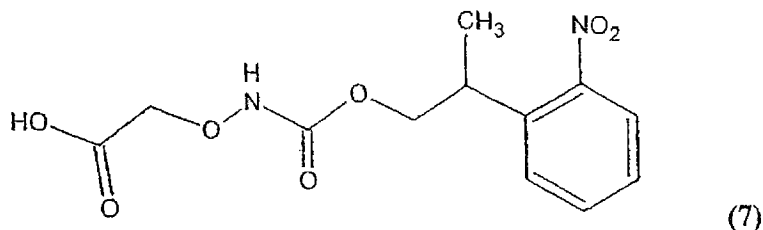
[0119] 实施例2:根据通式(I)的活化的酯衍生物(化合物8)的制备

[0120]



[0121] 1) 步骤1:前体酸(7)的制备

[0122]



[0123] 羧基甲氧基胺盐酸(1g;4.57mmol)溶解在25ml含有10%碳酸钠的水溶液中。将该溶液冷却至0℃的温度,并在搅拌下,逐滴加入20ml含有2.20g(9.1mmol)2-(2-硝基苯基)丙基氯甲酯(C1-NPPOC)的二氧杂环乙烷溶液。在室温保持搅拌2至3小时。将反应介质蒸发至干透。加入250ml水至由此获得的残留物,其后,以200ml二乙醚冲洗水相。然后,以1N盐酸溶液酸化水相至pH为3,且分别以250ml二氯甲烷萃取三次。合并所有有机相,并以无水硫酸钠干燥。以硅胶层析法纯化粗产物,洗脱液为二氯甲烷,然后用97/3(v/v)的二氯甲烷和甲醇混合物。获得白色粉末状化合物(7)(1.20g;4.0mmol),其熔点在88和92℃之间,产率90%。

[0124] $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ ppm = 1.40(3H, d, $J = 16\text{Hz}$, CH_3), 3.70(1H, m, CH), 4.30(2H, m, CH_2O) 4.40(s, 2H, COCH_2O), 7.30-7.60(4H, m, Ar-HNPPOC).

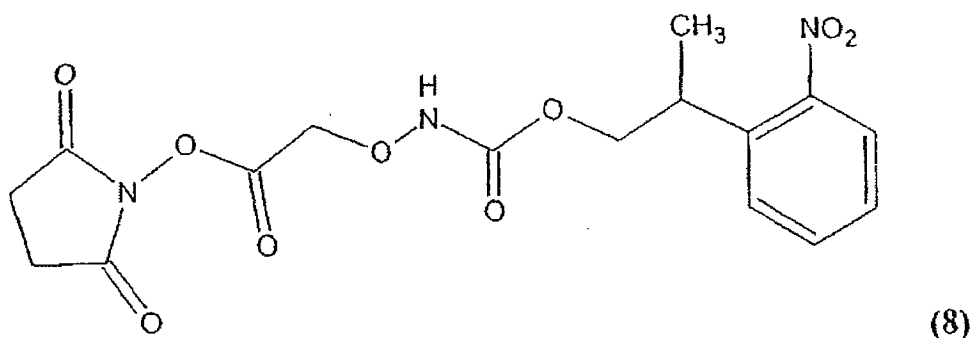
[0125] $^{13}\text{C-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ ppm = 18(CH_2), 33(CH_2), 67(CH_3), 70(CH_3), 75(CH_3), 123(quat), 137(quat), 138(quat), 133(quat), 136(CH), 151(CH), 159(CH), 172(CH), 173(CH). MS(ESI, 正离子检测模式): $M_{\text{calc}} = 298(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7)$, $m/z = 321[\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z =$

337 [M+K]⁺.

[0126] MS (ESI, 负离子检测模式) : $m/z = 297 [M-H]^-$, $m/z = 595 [2M-H]^-$.

[0127] 2) 步骤 2 : N-羟基丁二酰亚胺活化酯 (8) 的制备

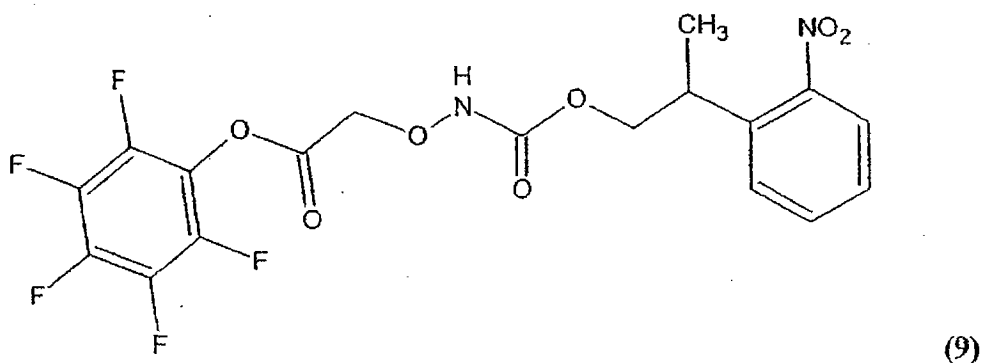
[0128]



[0129] 在前述步骤中获得的酸 (7) (1.20g ; 4.0mmol) 溶解在 15ml 无水二氯甲烷中, 然后加入二环己基碳二亚胺 (DCC) (0.82g ; 4.4mmol), 接着加入 N-羟基丁二酰亚胺 (0.457 ; 4.4mmol)。将该反应介质搅拌过夜。过滤后, 减压蒸走溶剂。以快速的硅胶层析法纯化粗产物, 洗脱液为乙酸乙酯。获得黄色粉末状化合物 (8) (1.0g ; 2.68mmol), 产率 67%。

[0130] 实施例 3 : 通过五氟苯活化的通式 (I) 的酯衍生物 (9) 的制备

[0131]



[0132] 将 500mg (1.6mmol) 在上述实施例 2 的步骤 1 中获得的化合物 (7) 溶解在 5ml 二氯甲烷, 然后加入 372mg (1.9mmol) 五氟苯酚, 接着, 逐滴加入 1ml 含有 DCC (360mg, 1.9mmol) 的二氯甲烷溶液。将该混合物搅拌 4 小时, 然后将所形成的二环尿素 (dicyclourea) (DCU) 沉淀物滤走。蒸发溶剂后, 获得油状的化合物 (9) (740mg ; 1.9mmol), 产率 100%。

[0133] ¹H-NMR (200MHz, CDCl₃) : δ ppm = 1.30 (3H, d, J = 16Hz, CH₃), 3.70 (1H, m, CH), 4.30 (2H, m, CH₂O), 4.70 (s, 2H, COCH₂O), 7.30-7.70, (4H, m, Ar-HNPPOC).

[0134] ¹⁹F-NMR (200MHz, CDCl₃) : δ ppm = -166.0 (1F, t), -164.0 (1F, d), -162.0 (1F, t), -157.0 (1F, t), -152.50 (1F, d).

[0135] 实施例 4 : 通式 (I) 的三乙氧基硅烷衍生物的制备

[0136]

CCOC(=O)OCC(C)c1ccccc1[N+](=O)[O-]

[0137] 1) 步骤 1 :N-硝基苯基-丙氧基羰基烯丙基羟基胺 (10) 的制备

[0138]

C=CCONC(=O)OCC(C)c1ccccc1[N+](=O)[O-] (10)

[0139] 将 15ml 含有 6g (27mmol) 2-(2-硝基苯基)丙基氯甲酯 (C1-NPPOC) 的二氯甲烷溶液逐滴加至 25ml 含有市售的烯丙基羟基胺 (3.250g; 29.6mmol; 1.1 当量) 经冷却至 0℃ 温度的无水吡啶中。搅拌 30 分钟后, 将溶剂蒸走, 然后与甲苯共沸。将反应的粗产物溶解在乙酸乙酯中。将有机相冲洗, 并以无水硫酸钠干燥, 然后减压蒸走溶剂。以硅胶层析法纯化粗产物, 洗脱液为 1/4 (v/v) 乙酸乙酯和己烷的混合物。获得化合物 (10) (5.76g), 产率 72%。

[0140] $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) : δ ppm = 1.40 (d, 6H, Si-CH₂-CH₃), 3.70 (q, 1H, Ar-CH-CH₃), 4.30 (m, 4H, CH₂O, OCH₂), 5.30 (dd, 2H, CH₂), 5.90 (m, 1H, CH), 7.20 (s, 1H, NH), 7.30–7.80 (m, 4H, H-Ar).

[0141] 2) 步骤 2: 氢化硅烷化作用以产生化合物 (11)

[0142] 将 20 μl Karstedt 催化剂逐滴加至含有 1.67g (5.6mmol) 在所述步骤中获得的化合物 (10) 的 8ml 三乙氧基硅烷溶液中。在 60℃ 的温度下将其搅拌过夜, 利用减压蒸馏蒸走溶剂。以硅胶层析法纯化粗产物, 洗脱液为 1/4 (v/v) 乙酸乙酯和己烷的混合物。获得预期化合物 (11) (1.33g), 产率 60%。

[0143] $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3) : δ ppm = 0.65 (m, 2H, CH_2Si), 1.20 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O}$), 1.40 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 1.70 (m, 3H, CH_2 , CH-CH_3), 3.80 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$, CH_2O), 4.30 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-CO}$), 7.30-7.80 (m, 5H, NH, H-Ar).

[0144] MS(电喷射,正离子检测模式): $M_{calc} = 444, m/e = 44.7 [M+H]^+$.

[0145] 固相载体的制备实施例是根据本发明利用通式(I)的偶联剂进行的,是毛细管形式(长度为3cm和直径为100 μm的玻璃毛细管)的。应当清楚明白,这些实施例也可以用于其它种类的载体的平面形式。

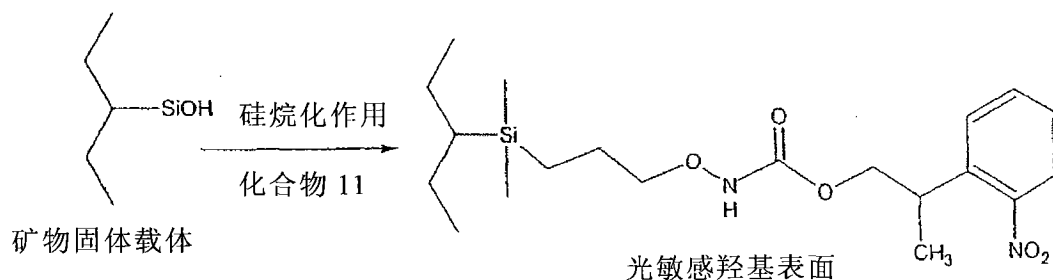
[0146] 实施例 5 :用通式 (I) 的偶联剂官能化的含有硅烷类连接官能团 A 的固相载体的
制备

[0147] 在这个实施例中,如上述实施例 4 中制备的化合物 (11) 用作通式 (I) 的偶联剂。

[0148] 通过化合物(11)官能化的固相载体是以单一步骤获得的,在这种情况下,根据以

下的反应示意图所示的矿物固相载体（玻璃毛细管）表面的硅烷化作用得到：

[0149]



[0150] 为了完成这个步骤,用含有氢氧化钠浓度为 6M 的 1/1 的水 / 乙醇混合物溶液填充毛细管,并于室温中将该溶液留在毛细管内 2 小时。

[0151] 随后彻底地用水清洗毛细管,然后用氮气干燥。

[0152] 随后,将含有化合物 (11) 浓度为 10mM 的三氯乙烯溶液填充毛细管,并将它留在室温中反应过夜。

[0153] 随后彻底地以三氯乙烯、绝对乙醇以及随后用氯仿清洗毛细管,最后用氮气干燥。

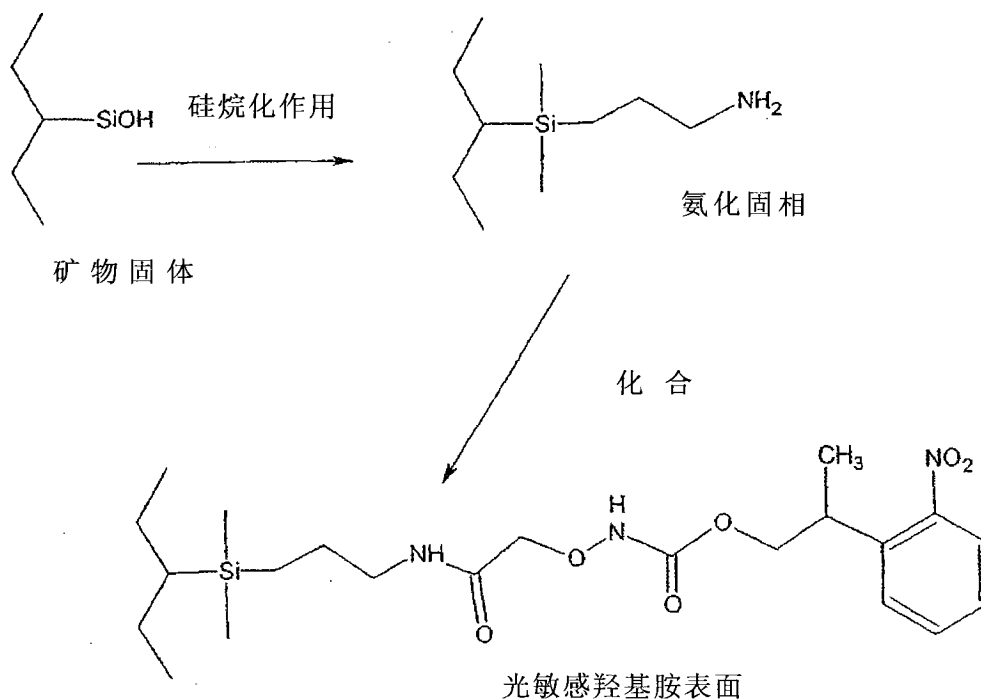
[0154] 从而获得利用一层化合物 (11) 使其内部表面官能化的 (即光敏感羟基胺表面) 玻璃毛细管。

[0155] 实施例 6:用通式 (I) 的偶联剂官能化的含有硅烷类连接官能团 A 的固相载体的制备

[0156] 在这个实施例中,如上述实施例 2 中制备的包括 NHS- 活化的酯类的连接官能团 A 的化合物 (8),用作通式 (I) 的偶联剂。

[0157] 根据以下的反应示意图,利用 NHS- 活化的酯偶联剂官能化的固相载体是以两个步骤获得的：

[0158]



[0159] 根据这些,在步骤 1 中,固相载体的矿物表面转换成含有胺官能团的表面,而且在

步骤 2 中,所述表面胺官能团与化合物 (8) 反应。

[0160] 1) 步骤 1:包括胺官能团的表面的制备

[0161] 用含有氢氧化钠浓度为 6M 的 1/1 的水 / 乙醇混合物溶液填充 (filled) 毛细管,并于室温中将该溶液留在毛细管内 2 小时。

[0162] 彻底地以水清洗毛细管,然后用氮气干燥。

[0163] 将含有 10% 三氯乙烯的 95° 乙醇溶液填充毛细管,并将该溶液留在室温中过夜。

[0164] 随后彻底地用三氯乙烯、绝对乙醇以及氯仿清洗毛细管,且最后用氮气干燥。

[0165] 获得内部表面用胺官能团覆盖的毛细管。

[0166] 2) 步骤 2:利用化合物 (8) 使载体官能化

[0167] 在上述步骤 1 获得的毛细管,以化合物 (8) 浓度为 10mM 的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液填充,并于室温中将该溶液留在毛细管内过夜。

[0168] 毛细管随后先后用 DMF 和乙醇清洗,且最后用氮气干燥。

[0169] 因此获得利用一层化合物 (8) 使其内部表面官能化的(即光敏感羟基胺表面)玻璃毛细管。

[0170] 实施例 7:官能化载体在固定目标生物分子中的应用

[0171] 在这个实施例中,于上述实施例 5 中获得的固相载体用于固定寡核苷酸 (ON)。然而,应当清楚明白,这些载体在固定其它目标生物分子的应用也是有效的。

[0172] 在寡核苷酸的例子中,这些分子的移植和对它们存在于固相载体表面的验证包括四个步骤:

[0173] i. 曝光:这是在光的作用下,能够使固相载体表面上的反应性官能团 B 局部游离的步骤。此官能团 B 将容许生物分子的移植。

[0174] ii. 固定:这本身是 ON 移植的步骤,曝光后,通过由 ON 所带有的醛官能团与在固相载体表面的光去保护的官能团 B 之间的反应而进行。

[0175] iii. 杂化:这是对所需 ON 的移植的验证步骤,利用带有荧光团的互补序列 (complementary sequence) 识别移植在固相载体表面的 ON。

[0176] iv. 使用扫描器检测荧光:这是对任何由荧光团发出的信号的处理步骤。

[0177] 1) 步骤:

[0178] 1) 曝光步骤

[0179] 将如上述实施例 5 中制备的化合物 (11) 官能化的毛细管用 1/1 的吡啶 / 水的混合物填充。

[0180] 随后对毛细管的各个已选位点曝光 5 秒,利用波长为 365nm 的紫外线 A (UVA) 辐射曝光器件,并将狭缝尺寸调节至 160 μm ,曝光强度为 4mW/mm²,所述曝光器件装备了 100W 的灯。

[0181] 随后,用水清洗毛细管,然后用氮气干燥。

[0182] 2) ON 固定步骤

[0183] 将步骤 1 所处理的毛细管在带有醛官能团的 ON 且浓度为 10 μM 的水溶液中保存,使其整体反应 30 分钟。

[0184] 随后,用水清洗毛细管,然后用 0.2% 月桂基硫酸钠溶液,以及再次用水进行清洗,并最后用氮气干燥。

[0185] 3) 杂化步骤

[0186] 用带有 CY3 荧光团的互补 ON 溶液填充上述步骤 2 中获得的其上固定了 ON 的毛细管,并在 40℃ 的温度下,使其整体反应 1 小时。

[0187] 随后,用 0.2% 柠檬酸钠溶液清洗毛细管。

[0188] 4) 读取步骤

[0189] 将上述步骤 3 中获得的其上的荧光团标记的 ON 已被杂化的毛细管放置在载玻片上,随后将其引入由 Genomic' s Solution 公司出售的荧光读取器中。

[0190] 相同的测量还在对照毛细管 (b/ 类) 上进行,对该对照毛细管进行了如上述对测试毛细管 (a/ 类) 除了使用通式 (I) 的偶联剂官能化的步骤以外的相同的处理。

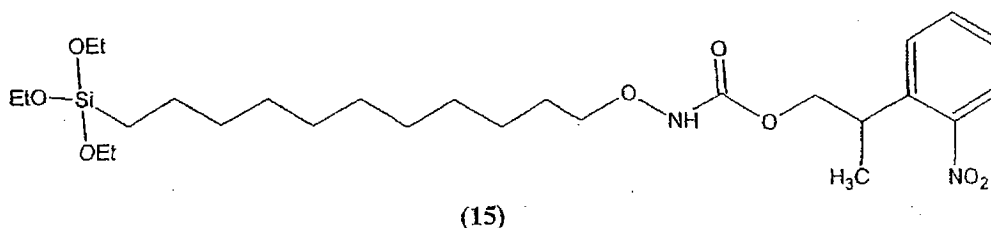
[0191] II) 结果

[0192] 获得的荧光图像在所附的图 1 中表示,其中,应注意到,只有经曝光的位点是荧光的。另外,可以看出只有本发明的通式 (I) 的偶联剂官能化的毛细管 (a/ 类载体) 含有对应于所需 ON 的光定位 (photolocalized) 固定的荧光片断,非官能化的毛细管 (b/ 类载体) 完全是非荧光的。

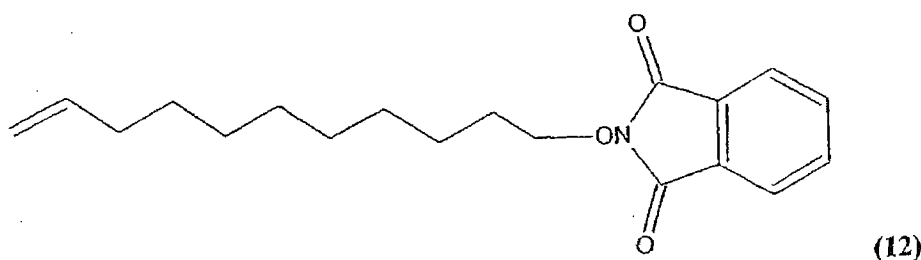
[0193] 这个实例证明了本发明的固相载体能够以具体且针对性的方式有利地用于目标分子的固定。

[0194] 实施例 8 :通式 (I) 的三乙氧基衍生物 (15) 的制备

[0195]

[0196] 1) 步骤 1 :化合物 (12) 的制备 :羟基胺的引入

[0197]



[0198] N-羟基邻苯二甲酰亚胺 (3.50g ;21mmol) 和碳酸钾 (8g ;41mmol) 的 250ml 二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液,在 50℃ 的温度于氩气下加热搅拌 1 小时。随后加入 11- 溴十一碳烯 (5.0g ;21mmol),然后再次在 50℃ 的温度下,将该反应混合物搅拌 3 小时。过滤后,将溶剂在减压下蒸发。随后将 100ml 二氯甲烷加至由此获得的残留物,并随后用 0.1N 氢氧化钠和饱和氯化钠水溶液冲洗有机相。随后用无水硫酸钠干燥该有机相,然后蒸发。获得白色粉末状的产物 (12) (6.45g ;20.4mmol ;产率 97%),其熔点在 38 至 40℃ 之间。

[0199] 质子核磁共振光谱 (¹H-NMR) 分析,在 CDCl₃ 中波长为 200MHz 中进行,结果如下 :

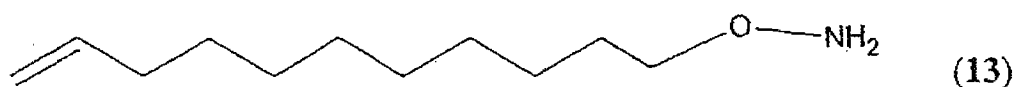
[0200] δ ppm = 1.20-1.50 (12H, m, 6CH₂) ; 1.78 (2H, m, J = 7Hz, C₂H₃CH₂CH₂CH₂) ; 2.02 (2H, m, C₂H₃CH₂CH₂) ; 4.18 (2H, t, J = 6Hz, CH₂ON) ; 4.95 (2H, m, CH₂CHCH₂) ; 5.79 (1H, m, CH₂CHCH₂) ;

7.70-7.85 (4H, m, Ar-H).

[0201] MS(ESI, 正离子检测模式): $M_{\text{calc}} = 315 (C_{19}H_{25}NO_3)$, $m/z = 338 [M+Na]^+$.

[0202] 2) 步骤 2: 化合物 (12) 的肼解作用以获得化合物 (13)

[0203]



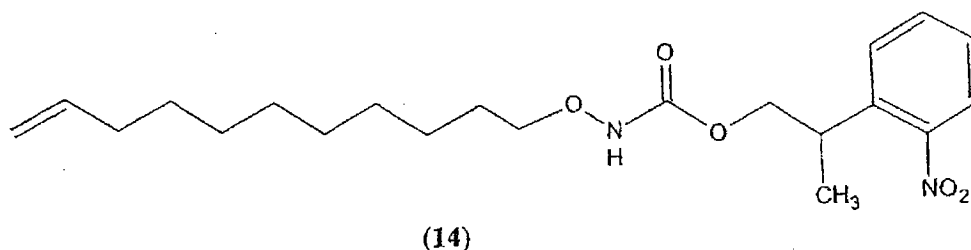
[0204] 在上述步骤 1 中获得的化合物 (12) (3.0g ; 9.64mmol) 溶解在 30ml 二氯甲烷中, 并加入 966mg 肼 (19, 3mmol)。所得的溶液回流 3 小时, 然后过滤, 并在减压下蒸发。以硅胶层析法纯化粗产物, 洗脱液为乙酸乙酯和己烷的混合物 (v/v : 1/2)。获得半透明的油状化合物 (13) (1.65g ; 8.94mmol), 产率 93%。

[0205] $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ ppm = 1.20-1.50 (12H, m, 4CH_2), 1.56 (2H, m, $\text{C}_2\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.03 (2H, q, $\text{C}_2\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.65 (2H, t, $J = 6\text{Hz}$, CH_2ON), 4.96 (2H, m, CH_2CHCH_2), 5.80 (1H, m, CH_2CHCH_2).

[0206] MS(ESI, 正离子检测模式): $M_{\text{calc}} = 185 (C_{11}H_{23}\text{NO})$, $m/z = 186 [M+H]^+$.

[0207] 3) 步骤 3: 化合物 (13) 的羟基胺的保护以获得化合物 (14)

[0208]

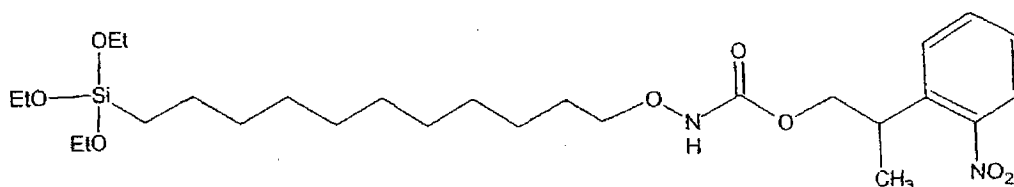


[0209] 在步骤 2 中制备的化合物 (13) (470mg ; 2.54mmol) 溶解在 2ml 吡啶中。随后逐滴地加入 3ml 含有 620mg (5.08mmol) 2-(2-硝基苯基) 丙基氯甲酯 (C1-NPPOC) 的二氯甲烷溶液中。在黑暗中搅拌该反应混合物 2 小时, 然后过滤并减压蒸发。所得的残留物随后溶解在二氯甲烷中, 其后, 先后以 10% (w/v) 碳酸钠水溶液和盐酸水溶液 (1N) 冲洗该有机相, 并最后以饱和氯化钠水溶液冲洗。用无水硫酸钠干燥该有机相, 然后蒸发。以硅胶层析法纯化粗产物, 乙酸乙酯和己烷的混合物 (v/v : 1/4)。获得橙色油状的产物 (14) (873mg ; 2.22mmol), 产率 88%。 $^1\text{H-NMR}$ (200MHz, CDCl_3): δ ppm = 1.20-1.40 (12H, m, 6CH_2), 1.35 (3H, d, $J = 7\text{Hz}$, CH_3), 1.56 (2H, m, $\text{C}_3\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.03 (2H, m, $\text{C}_2\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.65 (2H, m, CH_2ON), 1H, m, CH, 4.28 (2H, m, CH_2OCO), 4.96 (2H, m, CH_2CHCH_2), 5.80 (1H, m, CH_2CHCH_2), 7.20-7.80 (4H, m, Ar-HNPPOC).

[0210] MS(ESI, 正离子检测模式): $M_{\text{calc}} = 392 (C_{21}H_{32}N_2O_5)$, $m/z = 415 [M+Na]^+$, $m/z = 410 [M+NH_4]^+$.

[0211] 4) 步骤 4: 化合物 (14) 的氢化硅烷化作用以获得化合物 (15)

[0212]



(15)

[0213] 将根据上述步骤3的方法所获得的化合物(14)(1.28g;3.2mmol)加至由5ml三乙氧基硅烷和14μl(0.25当量)Karstedt催化剂组成的溶液中。在60℃的温度下,将该反应混合物搅拌2小时,然后将溶剂蒸走,并在真空下与DMF共沸(5至6次)。获得油状的预期产品(15)(1.49g;2.68mmol),产率83%。

[0214] ¹H-NMR(200MHz, CDCl₃): δ ppm = 0.6(2H, m, CH₂Si), 1.20-1.40(16H, m, 6CH₂, 9H 3CH₃CH₂OSi), 1.35(3H, d, J = 7Hz, CH₃), 3.65(2H, m, CH₂ON, 1H, m, CH), 4.28(2H, m, CH₂OCO), 7.20-7.80(4H, m, Ar-HNPPOC)。

[0215] MS(ESI, 正离子检测模式: M_{calc} = 556(C₂₇H₄₈N₂O₈Si), m/z = 579[M+Na]⁺。

[0216] 实施例9:用通式(I)的偶联剂官能化的含有硅烷类连接官能团A的平面固相载体的制备

[0217] 在这个实例中,在上述实施例8中所制备的化合物(15)用作通式(I)的偶联剂。

[0218] 1) 步骤1:表面的再水合(活化)

[0219] 将含有非活性SiO₂官能团的固相平面硅载体在包含氢氧化钠(1gNaOH)和由4ml水和3ml乙醇组成的溶液中浸没1小时。随后用超纯水、0.2N盐酸溶液、并最后用水清洗该载体,由此产生含有活化的SiOH官能团的表面。随后用氩气干燥该载体。

[0220] 2) 步骤2:使用化合物(15)使载体硅烷化

[0221] 由此而活化的载体在80℃且浓度为5mM的化合物(15)(7ml)的甲苯/三乙基胺(v/v:97/3)溶液中浸泡过夜。该载体随后用甲苯、乙醇清洗,最后用氩气干燥。随后将由化合物(15)官能化的载体,放置在110℃的培养箱中3小时。

[0222] 实施例10:用通式(I)偶联剂官能化的固相平面载体在目标生物分子固定中的应用

[0223] 正如上面实施例7所述,ON移植和对它们存在于固相载体表面的验证包括四个步骤:曝光、固定、杂化、最后使用扫描器检测荧光。

[0224] 1) 步骤:

[0225] 1) 步骤1:载体曝光

[0226] 根据实施例9中所述的方法由化合物(15)官能化的固相平面载体,其所涂覆的塑料掩模包括尺寸为100μm×100μm的透明点,该容许光线经过的透明点被一滴1/1(v/v)的吡啶/水混合物覆盖。由此通过掩模,利用波长为365nm且强度为4mW/mm²的紫外线A(UVA)辐射曝光器件,将整个载体表面进行15秒曝光,所述曝光器件装备了100W的灯。

[0227] 随后,用水清洗固相平面载体,然后用氩气干燥。

[0228] 2) 步骤2:ON固定

[0229] 因此,将步骤1所处理的平面载体在带有醛官能团的ON且浓度为10μM的水溶液中保存,并使其整体反应30分钟。

[0230] 随后,用水清洗载体,然后用0.2%月桂基硫酸钠溶液,以及再次用水进行清洗,并

最后用氮气干燥。

[0231] 3) 步骤 3:杂化

[0232] 用带有 CY3 荧光团的互补 ON 溶液填充步骤 2 中获得的其上固定了 ON 的固相载体,并在 40℃ 的温度下,使其整体反应 1 小时。随后,用 0.2% 柠檬酸钠溶液清洗载体。

[0233] 4) 步骤 4:读取

[0234] 将上述步骤 3 中获得的其上荧光团 - 标记的 ON 已被杂化的载体放置在载玻片上,并随后将所述载玻片引入由 Genomic' s Solution 公司出售的荧光读取器中。

[0235] 相同的测量还在对照固相平面载体 (b/ 类) 上进行,对该对照载体进行如上述对测试毛细管 (b/ 类) 除了使用化合物 (15) 官能化的步骤外的相同的处理。

[0236] II) 结果:

[0237] 获得的荧光图像在所附的图 2 中表示,其中,应注意到,只有经曝光的位点是荧光的。另外,可以看出只有本发明的偶联剂 (15) 官能化的固相平面载体 (a/ 类载体) 含有对应于所需 ON 的光定位固定的荧光点,非官能化载体 (b/ 类载体) 是完全非荧光的。

[0238] 这个实例证明了根据本发明的固相载体,能够以特异的且定位的方式有利地用于目标分子的固定。

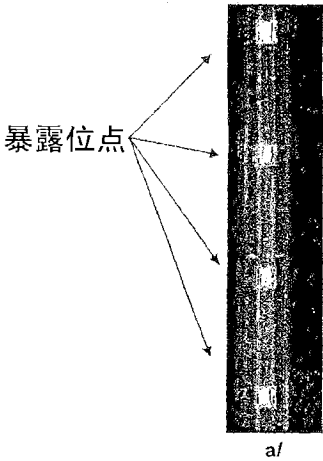


图 1

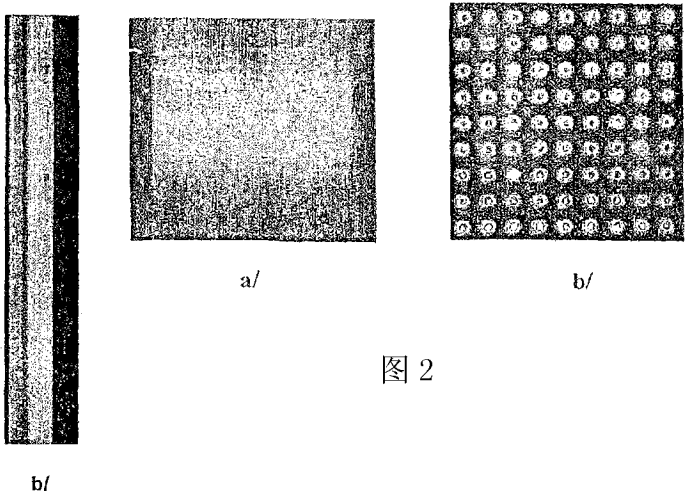


图 2