



(43) 申请公布日 2022.04.15

G01N 27/26 (2006.01)

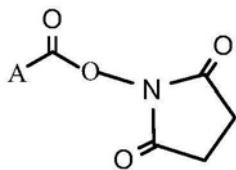
C12Q 1/6806 (2018.01)

权利要求书3页 说明书15页 附图2页

CC1(C)C(=O)N(C1)C(=O)OC(=O)A

其中, $Z =$

1. 一种二茂铁衍生物, 其特征在于, 结构式如下:



式中, $A = Z-(CH_2)_p$, $p = 1 \sim 6$;

或 $Z-(CH_2CH_2O)_q$, $q = 2 \sim 6$;

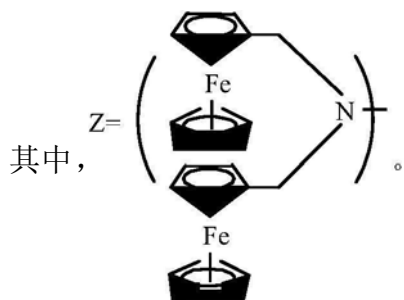
或 $Z-(CH_2)_r$, $r \geq 1$;

或 $Z-F-O$ (where F is a ferrocene unit) $-F-D$, $D = (CH_2)_s$ 或 $(CH_2CH_2O)_t$, $s = 1 \sim 6$, $t = 1 \sim 6$; $F = (CH_2)_w$, $w = 1 \sim 6$;

或

$Z-T-O$ (where T is a ferrocene unit) $-T-Z$ (where Z is a ferrocene unit) $-T-E$, $E = (CH_2)_u$ 或 $(CH_2CH_2O)_v$, $u = 1 \sim 6$, $v = 1 \sim 6$; $T = (CH_2)_y$, $y = 1 \sim 6$;

6; 中的至少一种;



其中,

2. 根据权利要求1所述的二茂铁衍生物, 其特征在于, 包括二价二茂铁衍生物、四价二茂铁衍生物、八价二茂铁衍生物或十四价二茂铁衍生物中的至少一种。

3. 权利要求2所述二茂铁衍生物的合成方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

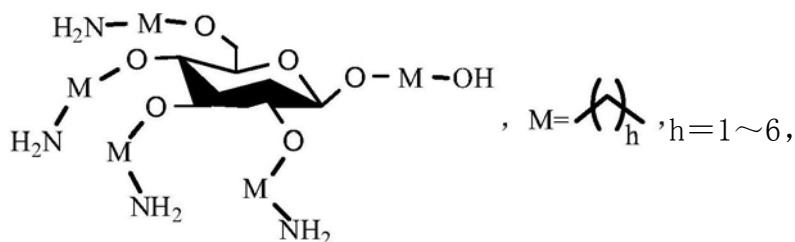
S1: 取氨基供体与二茂铁基醛类物质反应形成二茂铁中间体;

S2: 将步骤S1所述二茂铁中间体与N-琥珀酰亚胺基碳酸酯反应形成二茂铁衍生物;

在二价二茂铁衍生物的合成方法中, 所述氨基供体为氨基醇, 所述二茂铁中间体为双二茂铁胺基醇, 所述二茂铁衍生物为双二茂铁胺基醇琥珀酰亚胺酯;

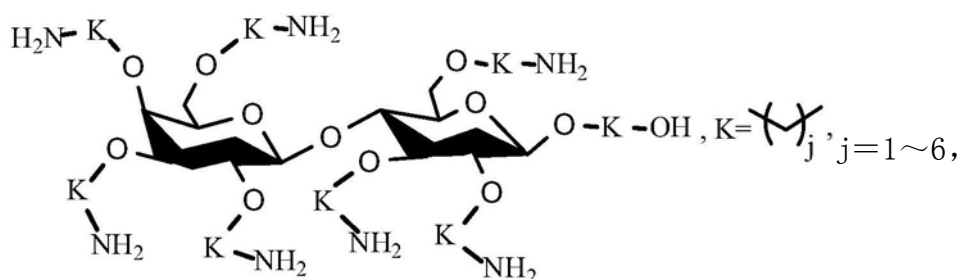
在四价二茂铁衍生物的合成方法中, 所述氨基供体为二氨基-酸, 所述二茂铁中间体为二-双二茂铁胺基酸, 所述二茂铁衍生物为二-双二茂铁胺基酸琥珀酰亚胺酯;

在八价二茂铁衍生物的合成方法中,所述氨基供体为四-O-胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,结构式如下



所述二茂铁中间体为四-O-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,所述二茂铁衍生物为四-O-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇琥珀酰亚胺酯;

在十四价二茂铁衍生物的合成方法中,所述氨基供体为四-O-胺基-β-D-吡喃半乳糖基-0-三-O-胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,结构式如下



所述二茂铁中间体为四-O-双二茂铁胺基-β-D-吡喃半乳糖基-0-三-O-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,所述二茂铁衍生物为四-O-双二茂铁胺基-β-D-吡喃半乳糖基-0-三-O-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇琥珀酰亚胺酯。

4. 根据权利要求3所述的合成方法,其特征在于,所述氨基醇包括氨基甲醇,氨基乙醇,氨基丙醇,氨基丁醇,氨基戊醇,氨基己醇或聚乙二醇类链状氨基醇中的至少一种;优选地,所述聚乙二醇类链状氨基醇的通式为 $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_k - \text{H}$,其中 $k = 2 \sim 6$ 。

5. 根据权利要求3所述的合成方法,其特征在于,所述二茂铁基醛类物质包括二茂铁甲醛或二茂铁二甲醛中的至少一种。

6. 根据权利要求3所述的合成方法,其特征在于,所述N-琥珀酰亚胺基碳酸酯包括N, N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯,环戊基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯或苄基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯中的至少一种。

7. 根据权利要求3所述的合成方法,其特征在于,所述二氨基-酸包括二氨基丙酸、二氨基丁酸、二氨基戊酸或二氨基己酸中的至少一种。

8. 权利要求1~2任一项所述的二茂铁衍生物在修饰寡核苷酸分子中的应用。

9. 寡核苷酸分子,其特征在于,所述寡核苷酸分子上修饰有权利要求1~2任一项所述的二茂铁衍生物。

10. 寡核苷酸分子的修饰方法,其特征在于,包括以下步骤:

提供寡核苷酸分子,所述寡核苷酸分子的至少一个核苷酸修饰有氨基;

将所述寡核苷酸分子与权利要求1~2任一项所述的二茂铁衍生物混合反应,使所述二茂铁衍生物修饰到所述寡核苷酸分子上。

11. 权利要求9所述的寡核苷酸分子或按照权利要求9所述的修饰方法得到的寡核苷酸

分子在电化学检测、基因检测中的应用。

一种二茂铁衍生物及其合成方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于有机化学合成领域，具体涉及一种二茂铁衍生物及其合成方法和应用。

背景技术

[0002] 二茂铁又称为二环戊二烯基铁，是由两个环戊二烯阴离子与一个亚铁离子形成的一种“三明治”夹心状的化合物。二茂铁特殊的夹心结构使其具有突出的芳香性，它不易发生加成反应和还原反应，而特别容易发生亲电取代反应，合成出含有二茂铁基功能基团的衍生物，而且反应活性远远高于苯。

[0003] 基于二茂铁及其衍生物具有的低毒性、独特的电化学活性和光化学特性、特殊氧化还原性以及优越的稳定性，二茂铁衍生物可用于修饰电极、功能材料、生物材料的制备及修饰一些小分子。

[0004] 核酸作为生物体重要的遗传物质，是以核苷酸为基本单位合成的。核苷酸经常会被修饰形成修饰核苷酸，修饰核苷酸的合成及其掺入核酸序列为改变核苷酸的化学性质提供了许多可能性，大大拓宽了核苷酸的实际应用领域，如应用于基因检测、多聚酶链式反应(PCR)及微阵列等生物技术领域；修饰基团可作为标记分子用于荧光、电化学检测。然而，单一标记的修饰核苷酸产生的信号较弱，需要在较高的浓度下才能被检测元件识别，限制了检测灵敏度的提升。

[0005] 二茂铁衍生物由于其优异的化学性能，可用于修饰核苷酸，对核苷酸进行标记。相关技术公开的二茂铁衍生物，在标记核苷酸的应用中前景较好，但只能修饰核苷酸的5'端，这对于提高检测信号和灵敏度仍有一定限制。因此，寻找一种能标记核苷酸，并能提高检测信号强度和灵敏度的二茂铁衍生物具有重要的意义。

发明内容

[0006] 本发明旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此，本发明提出一种二茂铁衍生物，多个所述二茂铁衍生物可以同时结合在寡核苷酸分子上，对寡核苷酸分子进行标记。

[0007] 本发明还提出一种上述二茂铁衍生物的合成方法。

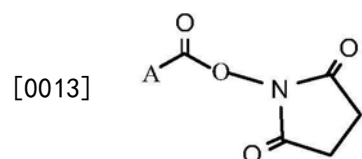
[0008] 本发明还提出上述二茂铁衍生物在修饰寡核苷酸分子中的应用。

[0009] 本发明还提出修饰有上述二茂铁衍生物的寡核苷酸分子。

[0010] 本发明还提出上述二茂铁衍生物对寡核苷酸分子的修饰方法。

[0011] 本发明还提出修饰有上述二茂铁衍生物的寡核苷酸分子的应用。

[0012] 根据本发明的一个方面，提出了一种二茂铁衍生物，结构式如下：



[0014] 式中, $A = Z \left(\text{---} \right)_p$, $p=1 \sim 6$;

或 $Z \left(\text{---} \right)_q$, $q=2 \sim 6$;

或 $Z \left(\text{---} \right)_r$, $r \geq 1$;

或

[0015] $Z \text{---} F \text{---} O \text{---} \text{---} O \text{---} F \text{---} D$, $D = \left(\text{---} \right)_s$ 或 $\left(\text{---} \right)_t O$, $s=1 \sim 6, t=1 \sim 6$; $F = \left(\text{---} \right)_w$, $w=1 \sim 6$;

或

$Z \text{---} T \text{---} O \text{---} \text{---} O \text{---} T \text{---} Z$, $E = \left(\text{---} \right)_u$ 或 $\left(\text{---} \right)_v O$, $u=1 \sim 6, v=1 \sim 6$; $T = \left(\text{---} \right)_y$, $y=1 \sim 6$;

[0016] 中的至少一种;

[0017] 其中, $Z = \left(\text{---} \right)_N$ 。

[0018] 根据本发明的一种优选的实施方式,至少具有以下有益效果:

[0019] 1. 本发明中所述的二茂铁衍生物可作为一种核苷酸修饰单体,这是因为其含有琥珀酰亚胺酯,这种基团可连接在各类带有脂肪类氨基位点的寡核苷酸分子上,实现对寡核苷酸分子的修饰。

[0020] 2. 由于二茂铁基的存在,赋予二茂铁衍生物很好的电化学活性,当用在电化学检测中可有效提高检测信号的强度和灵敏度。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,所述二茂铁衍生物包括二价二茂铁衍生物、四价二茂铁衍生物、八价二茂铁衍生物或十四价二茂铁衍生物中的至少一种。

[0022] 根据本发明的第二个方面,提出了一种所述二茂铁衍生物的合成方法,包括以下步骤:

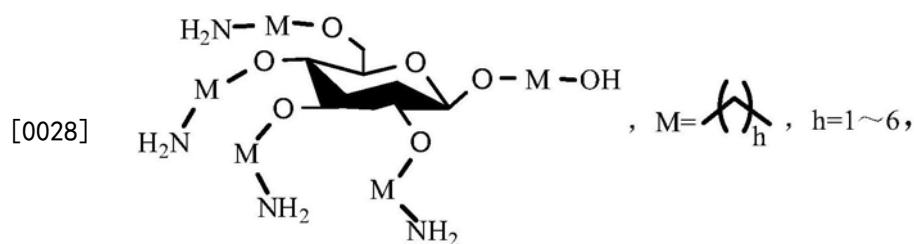
[0023] S1: 取氨基供体与二茂铁基醛类物质反应形成二茂铁中间体;

[0024] S2: 将步骤S1所述二茂铁中间体与N-琥珀酰亚胺基碳酸酯反应形成二茂铁衍生物;

[0025] 在所述二价二茂铁衍生物的合成方法中,所述氨基供体为氨基醇,所述二茂铁中间体为双二茂铁胺基醇,所述二茂铁衍生物为双二茂铁胺基醇琥珀酰亚胺酯;

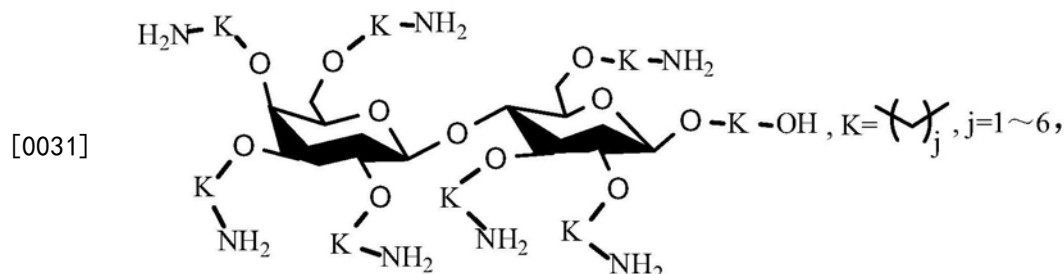
[0026] 在所述四价二茂铁衍生物的合成方法中,所述氨基供体为二氨基-酸,所述二茂铁中间体为二-双二茂铁胺基酸,所述二茂铁衍生物为二-双二茂铁胺基酸琥珀酰亚胺酯;

[0027] 在所述八价二茂铁衍生物的合成方法中,所述氨基供体为四-0-胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,结构式如下



[0029] 所述二茂铁中间体为四-0-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,所述二茂铁衍生物为四-0-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇琥珀酰亚胺酯;

[0030] 在所述十四价二茂铁衍生物的合成方法中,所述氨基供体为四-0-胺基-β-D-吡喃半乳糖基-0-三-0-胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,结构式如下



[0032] 所述二茂铁中间体为四-0-双二茂铁胺基-β-D-吡喃半乳糖基-0-三-0-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇,所述二茂铁衍生物为四-0-双二茂铁胺基-β-D-吡喃半乳糖基-0-三-0-双二茂铁胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷醇琥珀酰亚胺酯。

[0033] 根据本发明的一种优选的实施方式,至少具有以下有益效果:

[0034] 本发明中的合成方法既可以通过两步化学反应制得二价二茂铁衍生物,也可以巧妙应用类赖氨酸化合物为骨架构建合成四价二茂铁衍生物,或应用葡萄糖为骨架构建合成八价二茂铁衍生物,或应用乳糖为骨架构建合成十四价二茂铁衍生物。这种二茂铁衍生物中的琥珀酰亚胺酯可修饰在寡核苷酸分子的氨基上,这种修饰可以是在核苷酸的不同位置,可进行多点修饰,反应条件温和,后处理、纯化简单。

[0035] 在本发明的一些实施方式中,所述氨基醇包括氨基甲醇,氨基乙醇,氨基丙醇,氨基丁醇,氨基戊醇,氨基己醇或聚乙二醇类链状氨基醇中的至少一种。

[0036] 优选地,所述聚乙二醇类链状氨基醇的通式为 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_k-\text{H}$,其中k=2~6。

[0037] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述氨基醇包括6-氨基-1-己醇。

[0038] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述二氨基-酸包括二氨基丙酸、二氨基丁酸、二氨基戊酸或二氨基己酸中的至少一种。

[0039] 在本发明的一些实施方式中,所述二茂铁基醛类物质包括二茂铁甲醛或二茂铁二甲醛中的至少一种。

[0040] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述二茂铁基醛类物质包括二茂铁甲醛。

[0041] 在本发明的一些实施方式中,步骤S1所述氨基供体需溶解于有机溶剂中。

[0042] 在本发明的一些实施方式中,所述有机溶剂包括无水四氢呋喃或甲基四氢呋喃中的至少一种。

[0043] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述有机溶剂包括无水四氢呋喃。

[0044] 在本发明的一些实施方式中,步骤S1还需加入催化剂,所述催化剂包括硼氢化试剂。

[0045] 在本发明的一些实施方式中,所述催化剂包括硼氢化钠,三乙酰氧基硼氢化钠,氰基硼氢化钠,或醋酸硼氢化钠中的至少一种。

[0046] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述催化剂包括三乙酰氧基硼氢化钠。

[0047] 在本发明的一些实施方式中,步骤S1的反应在室温进行,发生醛胺缩合反应。

[0048] 在本发明的一些实施方式中,所述N-琥珀酰亚胺基碳酸酯包括N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯,环戊基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯或苄基-N-琥珀酰亚胺基碳酸酯中的至少一种。

[0049] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述N-琥珀酰亚胺基碳酸酯包括N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯。

[0050] 在本发明的一些实施方式中,步骤S2所述二茂铁中间体需溶解于氯代烷溶剂中,所述氯代溶剂包括无水二氯甲烷或氯仿中的至少一种。

[0051] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述氯代烷溶剂包括无水二氯甲烷。

[0052] 在本发明的一些优选的实施方式中,步骤S2中还需加入催化剂,所述催化剂包括三乙胺。

[0053] 在本发明的一些实施方式中,步骤S2的反应在室温进行,发生酯化反应。

[0054] 根据本发明的第三个方面,提出了所述二茂铁衍生物在修饰寡核苷酸分子中的应用。

[0055] 根据本发明的一种优选的实施方式,至少具有以下有益效果:

[0056] 本发明所述二茂铁衍生物的琥珀酰亚胺酯通过修饰在不同位点核苷酸的氨基上,实现对寡核苷酸分子的多重标记。

[0057] 根据本发明的第四个方面,提出了一种寡核苷酸分子,所述寡核苷酸分子上修饰有所述二茂铁衍生物。

[0058] 在本发明的一些实施方式中,所述寡核苷酸分子的5'端至少修饰有1个所述二茂铁衍生物。

[0059] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子的5'端至少修饰有2个所述二茂铁衍生物。

[0060] 在本发明的一些更优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子的5'端修饰有多个所述二茂铁衍生物。

[0061] 在本发明的一些实施方式中,所述寡核苷酸分子的3'端至少修饰有1个所述二茂铁衍生物。

[0062] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子的3'端至少修饰有2个所述二茂铁衍生物。

[0063] 在本发明的一些更优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子的3'端修饰有多个所述二茂铁衍生物。

[0064] 在本发明的一些实施方式中,所述寡核苷酸分子的中间部分至少修饰有1个所述二茂铁衍生物。

[0065] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子的中间部分至少修饰有2个所述二茂铁衍生物。

[0066] 在本发明的一些更优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子的中间部分修饰有多个所述二茂铁衍生物。

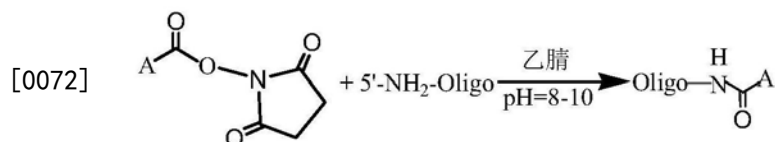
[0067] 在本发明的一些更优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子修饰有多个所述二茂铁衍生物。

[0068] 根据本发明的第五个方面,提出了一种寡核苷酸分子的修饰方法,包括以下步骤:

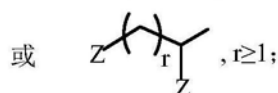
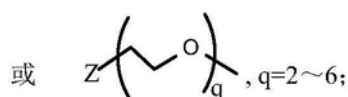
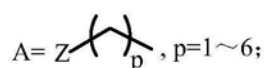
[0069] 提供寡核苷酸分子,所述寡核苷酸分子的至少一个核苷酸修饰有氨基;

[0070] 将所述寡核苷酸分子与所述二茂铁衍生物混合反应,使所述二茂铁衍生物修饰到所述寡核苷酸分子上。

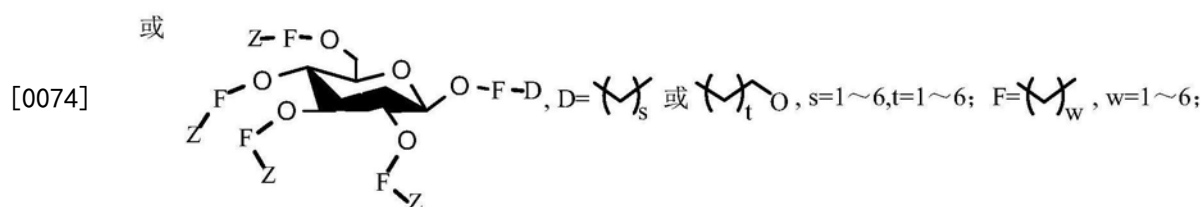
[0071] 在本发明的一些实施方式中,所述寡核苷酸分子5'端的修饰方法,具体反应式为:



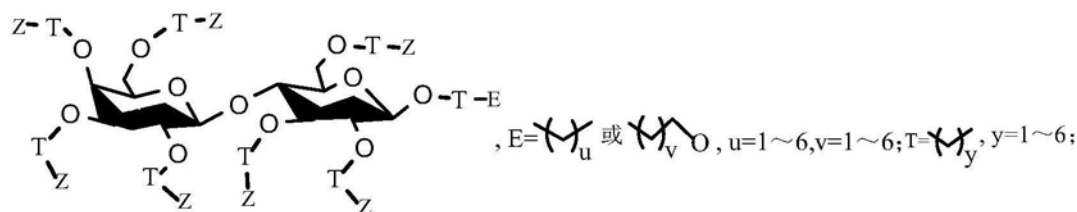
[0073] 式中,oligo为不同的核苷酸序列;



或

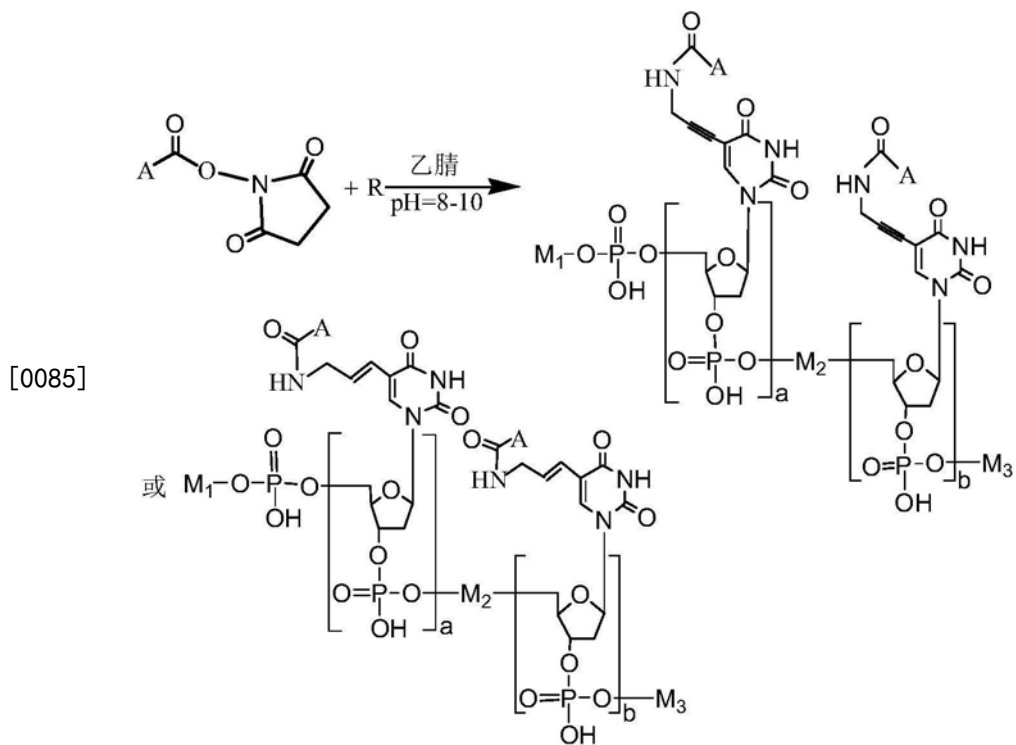


或

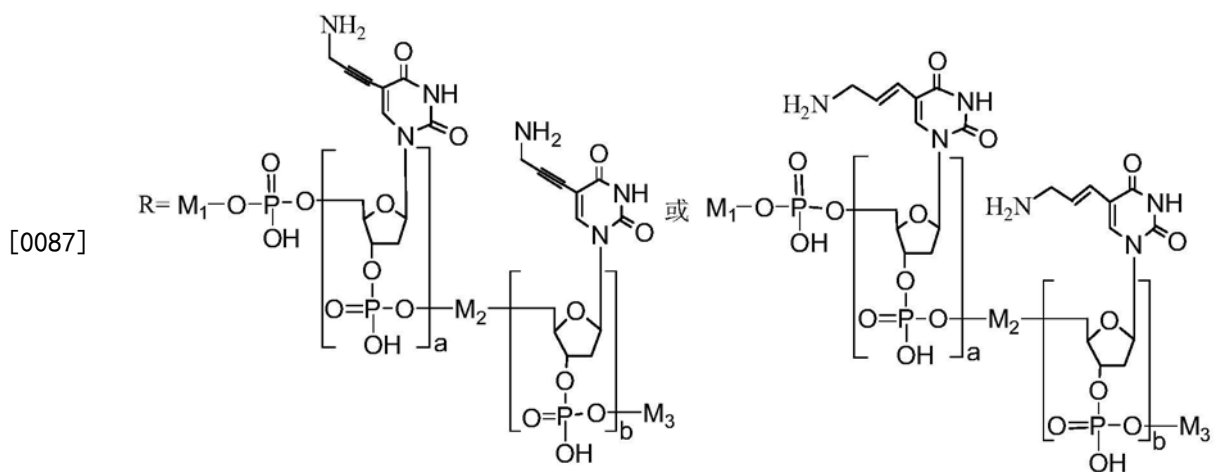


[0075] 中的至少一种;

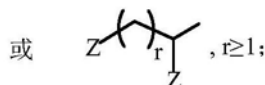
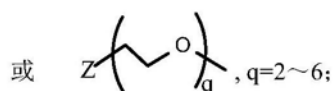
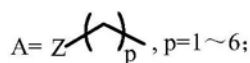
式为：



[0086] 式中，

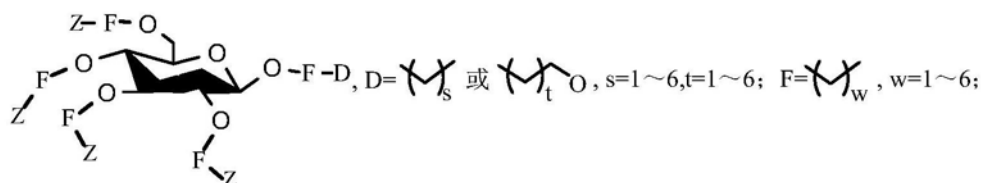


[0088] M1, M2和M3为不同的核苷酸序列; $a \geq 0$; $b \geq 1$;

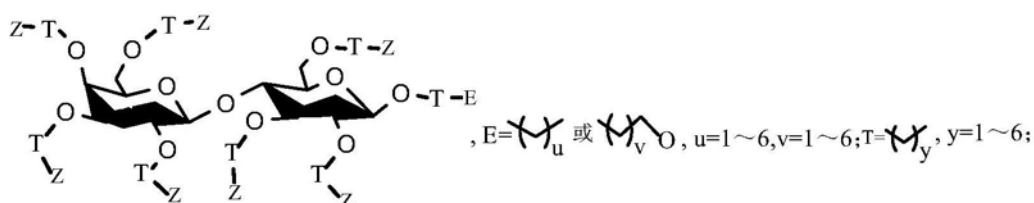


或

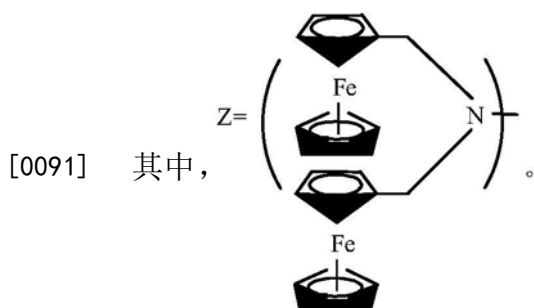
[0089]



或



[0090] 中的至少一种;



[0092] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述寡核苷酸分子与所述二茂铁衍生物混合前,先溶解于pH=9的缓冲液中。

[0093] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述二茂铁衍生物先溶解于乙腈中,再与所述寡核苷酸分子混合进行反应,完成对所述寡核苷酸分子的修饰。

[0094] 根据本发明的第六个方面,提出了所述寡核苷酸分子在电化学检测、基因检测中的应用。

[0095] 所述寡核苷酸分子经所述二茂铁衍生物修饰后,所述寡核苷酸分子上带有二茂铁基团,所述二茂铁基团具有良好的电化学活性,因此将所述寡核苷酸分子用于所述电化学检测和所述基因检测中,可有效提高检测灵敏度和信号强度。

附图说明

[0096] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步的说明,其中:

[0097] 图1为本发明制备的二茂铁衍生物的化学结构图;

[0098] 图2为本发明实施例5制备寡核苷酸1的反应体系在1h时的高效液相监测结果图;

[0099] 图3为本发明实施例5制备的寡核苷酸1的电喷雾电离质量 (ESI Mass) 图。

具体实施方式

[0100] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0101] 本发明的描述中,除非另有明确的限定,溶解、修饰、标记等词语应做广义理解,所属技术领域技术人员可以结合技术方案的具体内容合理确定上述词语在本发明中的具体含义。

[0102] 本发明的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”等的描述意指结合该实施例描述的具体试剂、方法或材料包含于本发明的至少一个实施例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例。而且,描述的具体试剂、方法或材料可以在任何一个或多个实施例中以合适的方式结合。

[0103] 实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到的试剂和材料。

[0104] 实施例1

[0105] 本实施例制备了一种二价二茂铁衍生物,具体过程为:

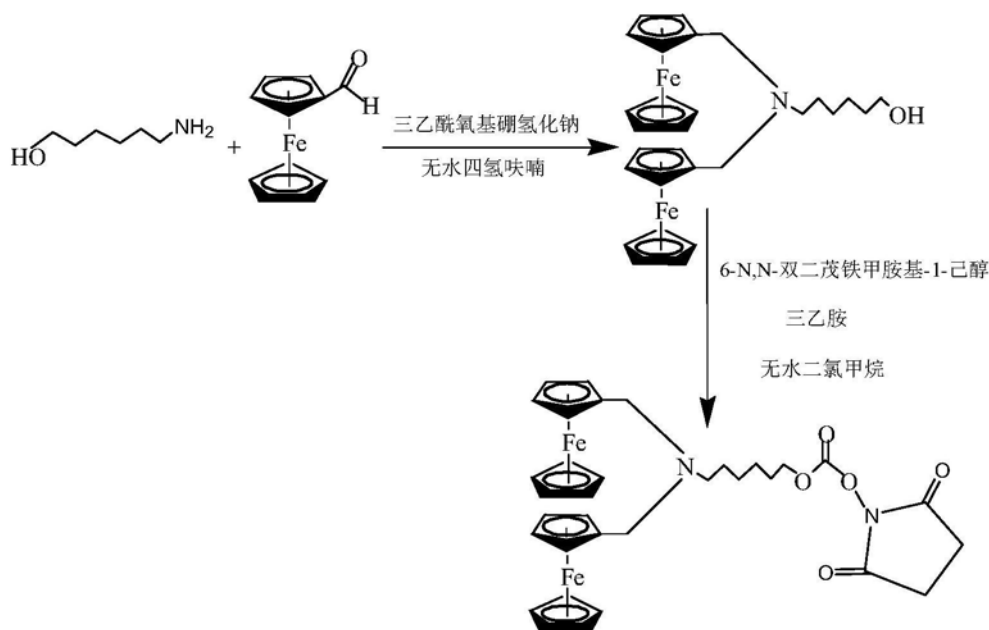
[0106] (1)取6-氨基-1-己醇0.5g (4.27mmol) 溶解于25mL无水四氢呋喃中,室温条件下加入二茂铁甲醛2.1g (9.81mmol, 2.31eq) 搅拌,再取三乙酰氧基硼氢化钠2.3g (10.90mmol, 2.5eq) 分批次加入体系,反应过夜。经薄层色谱法(TLC)检测反应完全后,用30mL饱和碳酸钠溶液淬灭,50mL乙酸乙酯萃取,然后依次用20mL饱和食盐水和高纯水淬洗,有机相经无水硫酸钠干燥后,浓缩,拌样柱层析得到6-N,N-双二茂铁甲胺基-1-己醇(深棕色固体)1.8g,产率为85%。

[0107] 6-N,N-双二茂铁甲胺基-1-己醇的结构经核磁氢谱验证的参数为:¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ4.22 (s, 4H, Cp), 4.15 (s, 4H, Cp), 4.10 (s, 10H, Cp), 3.61 (t, J=6.5Hz, 2H, CH₂), 3.50 (s, 4H, CH₂), 2.82 (dd, J=14.2, 7.0Hz, 2H), 2.38-2.26 (m, 2H), 1.52 (dd, J=14.2, 6.9Hz, 4H), 1.35-1.19 (m, 6H)。

[0108] (2)取步骤(1)得到的6-N,N-双二茂铁甲胺基-1-己醇0.5g,溶解于10mL无水二氯甲烷,室温搅拌,然后依次加入N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC) 300mg (1.2eq), 三乙胺(TEA) 295mg (3eq), 室温反应2h,经TLC检测反应完全后,直接向反应体系加入适量硅胶拌样,减压蒸干,柱层析(硅胶需要用三乙胺碱化)得到6-N,N-双二茂铁甲胺基-1-己醇-0-琥珀酰亚胺酯0.5g,产率为78%。

[0109] 上述二价二茂铁衍生物的合成路线可表示为:

[0110]



[0111] 实施例2

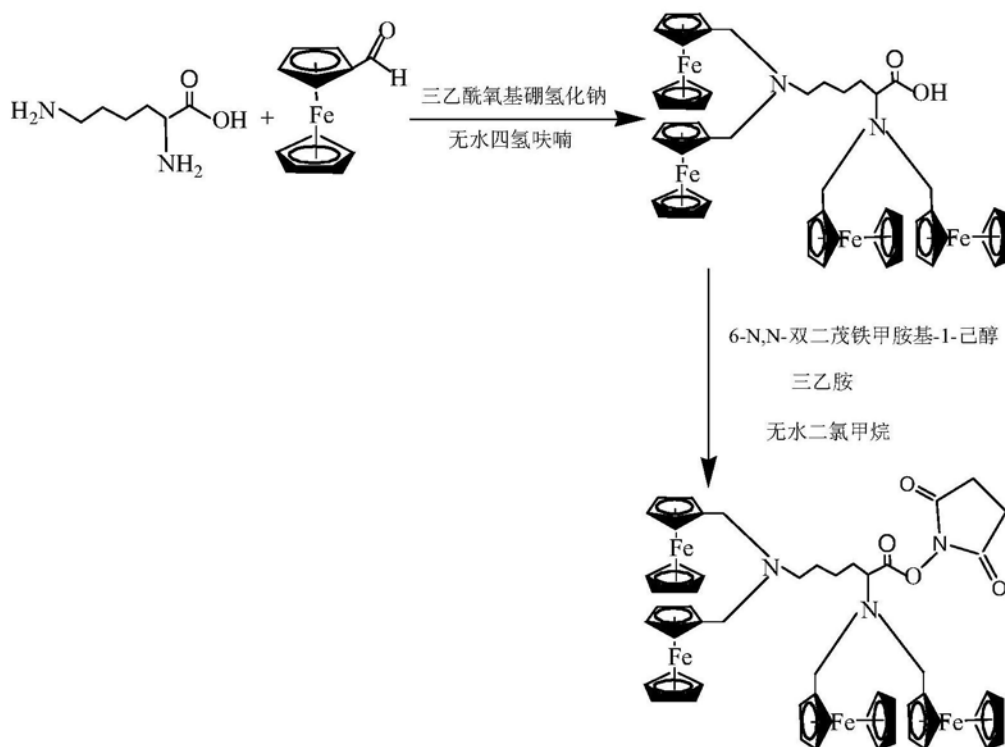
[0112] 本实施例制备了一种四价二茂铁衍生物,具体过程为:

[0113] (1) 取L-赖氨酸0.5g (3.42mmol) 溶解于25mL无水四氢呋喃中,室温条件下加入二茂铁甲醛3.37g (15.73mmol, 4.6eq) 搅拌,再取三乙氧基硼氢化钠3.62g (17.10mmol, 5eq) 分批次加入体系,反应过夜。经薄层色谱法(TLC)检测反应完全后,用30mL饱和碳酸钠溶液淬灭,50mL乙酸乙酯萃取,然后依次用20mL饱和食盐水和高纯水淬洗,有机相经无水硫酸钠干燥后,浓缩,拌样柱层析得到2,6-N,N-二-双二茂铁甲胺基己酸(深棕色固体) 2.7g,产率为84%。

[0114] (2) 取步骤(1)得到的2,6-N,N-二-双二茂铁甲胺基己酸0.5g,溶解于10mL无水二氯甲烷,室温搅拌,然后依次加入N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC) 164mg (1.2eq),三乙胺(TEA) 162mg (3eq),室温反应2h,经TLC检测反应完全后,直接向反应体系加入适量硅胶拌样,减压蒸干,柱层析(硅胶需要用三乙胺碱化)得到2,6-N,N-二-双二茂铁甲胺基-1-己酸-O-琥珀酰亚胺酯0.5g,产率为90%。

[0115] 上述四价二茂铁衍生物的合成路线可表示为:

[0116]



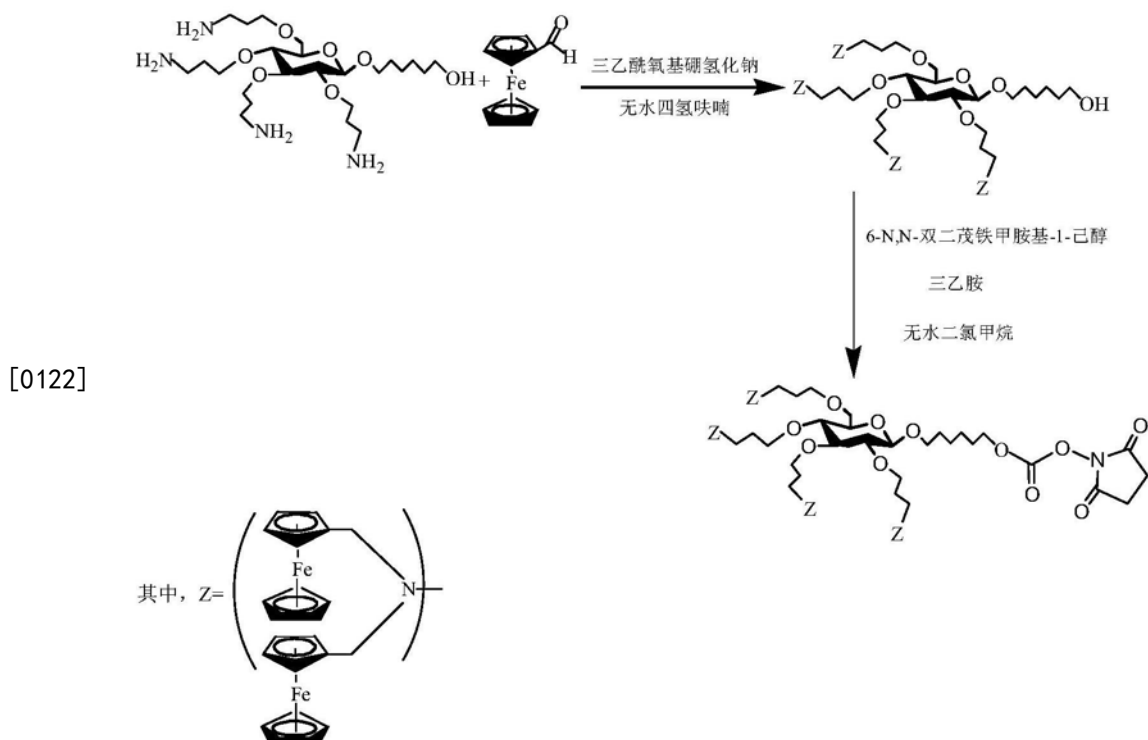
[0117] 实施例3

[0118] 本实施例制备了一种八价二茂铁衍生物,具体过程为:

[0119] (1) 取6-羟基己基-2,3,4,6-四-O-丙胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷0.5g (983μmol) 溶解于25mL无水四氢呋喃中,室温条件下加入二茂铁甲醛1.94g (9.4mmol, 9.2eq) 搅拌,再取三乙酰氧基硼氢化钠2.1g (9.83mmol, 10eq) 分批次加入体系,反应过夜。经薄层色谱法 (TLC) 检测反应完全后,用30mL饱和碳酸钠溶液淬灭,50mL乙酸乙酯萃取,然后依次用20mL饱和食盐水和高纯水淬洗,有机相经无水硫酸钠干燥后,浓缩,拌样柱层析得到6-羟基己基-2,3,4,6-N,N,N,N-四-双二茂铁-O-丙胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷(深棕色固体) 1.5g,产率为73%。

[0120] (2) 取步骤(1)得到的6-羟基己基-2,3,4,6-N,N,N,N-四-双二茂铁-O-丙胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷0.5g,溶解于10mL无水二氯甲烷,室温搅拌,然后依次加入N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC) 74mg (1.2eq), 三乙胺(TEA) 73mg (3eq), 室温反应2h,经TLC检测反应完全后,直接向反应体系加入适量硅胶拌样,减压蒸干,柱层析(硅胶需要用三乙胺碱化)得到6-己醇-O-琥珀酰亚胺酯-1-己基-2,3,4,6-N,N,N,N-四-双二茂铁-O-丙胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷(淡黄色油状物) 0.45g,产率为84%。

[0121] 上述八价二茂铁衍生物的合成路线可表示为:



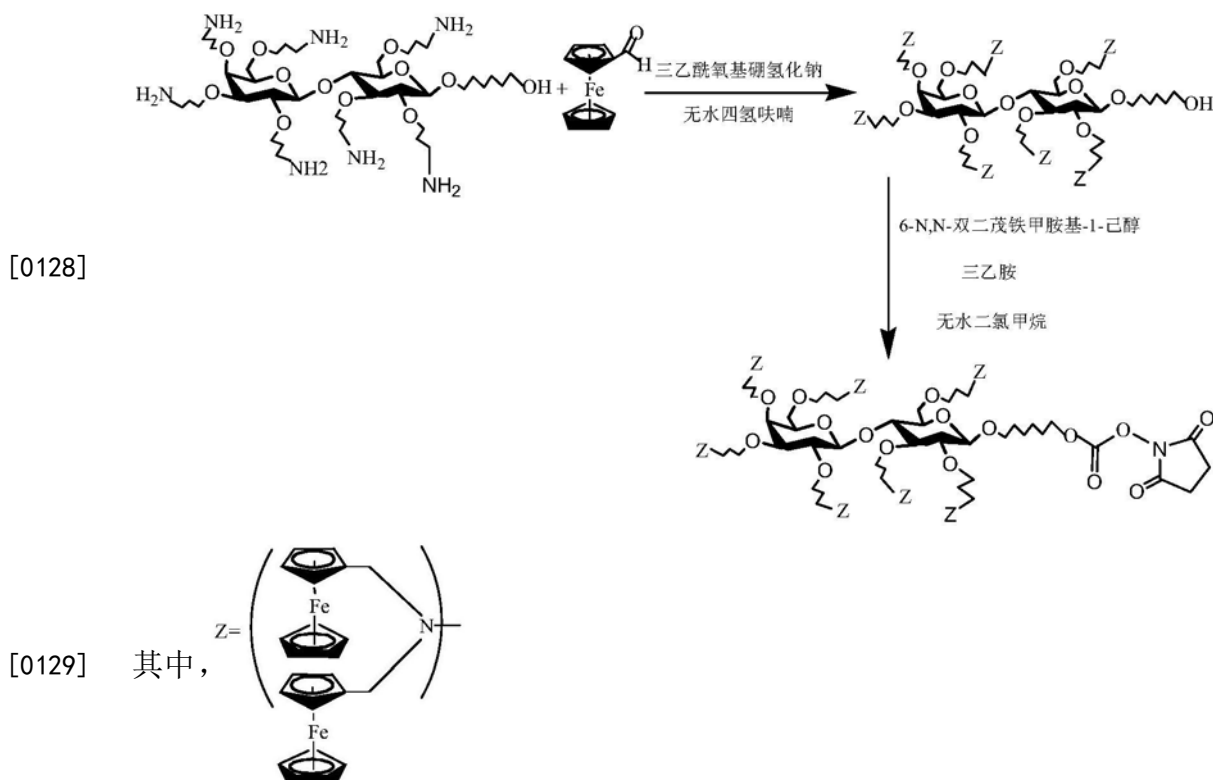
[0123] 实施例4

[0124] 本实施例制备了一种十四价二茂铁衍生物,具体过程为:

[0125] (1) 取6-羟基己基-2,3,6-三-O-丙胺基-4-O-(2,3,4,6-四-O-丙胺基-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷0.5g (594μmol) 溶解于25mL无水四氢呋喃中,室温条件下加入二茂铁甲醛2.03g (9.5mmol, 16eq) 搅拌,再取三乙酰氧基硼氢化钠2.3g (10.7mmol, 18eq) 分批次加入体系,反应过夜。经薄层色谱法(TLC)检测反应完全后,用30mL饱和碳酸钠溶液淬灭,50mL乙酸乙酯萃取,然后依次用20mL饱和食盐水和高纯水淬洗,有机相经无水硫酸钠干燥后,浓缩,拌样柱层析得到6-羟基己基-2,3,6-N,N,N-三-双二茂铁-O-丙胺基-4-O-(2,3,4,6-N,N,N,N-四-双二茂铁-O-丙胺基-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷(深棕色固体)1.5g,产率为70%。

[0126] (2) 取步骤(1)得到的6-羟基己基-2,3,6-N,N,N-三-双二茂铁-O-丙胺基-4-O-(2,3,4,6-N,N,N,N-四-双二茂铁-O-丙胺基-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷0.5g,溶解于10mL无水二氯甲烷,室温搅拌,然后依次加入N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC) 43mg (1.2eq),三乙胺(TEA) 42mg (3eq),室温反应2h,经TLC检测反应完全后,直接向反应体系加入适量硅胶拌样,减压蒸干,柱层析(硅胶需要用三乙胺碱化)得到6-己醇-O-琥珀酰亚胺酯-1-己基-2,3,6-N,N,N-三-双二茂铁-O-丙胺基-4-O-(2,3,4,6-N,N,N,N-四-双二茂铁-O-丙胺基-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷(淡黄色油状物)0.42g,产率为80%。

[0127] 上述十四价二茂铁衍生物的合成路线可表示为:



[0130] 实施例5

[0131] 本实施例制备了一种寡核苷酸1,为寡核苷酸分子5'端的氨基被修饰,具体过程为:

[0132] 取30mg氨基修饰的寡核苷酸5'-NH₂-Oligo(Oligo片段为5'-NH₂-CAAGCGGATACACCAGGATTG-3')溶于1mL pH=9的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,再取10mg(大大过量)6-N,N-双二茂铁甲胺基-1-己醇-0-琥珀酰亚胺酯溶于1mL乙腈并加入缓冲液体系中,室温搅拌1h,经高效液相色谱法(HPLC)检测到了原料寡核苷酸5'-NH₂-Oligo的液相出峰位置(图2),表明该原料寡核苷酸未反应完全;

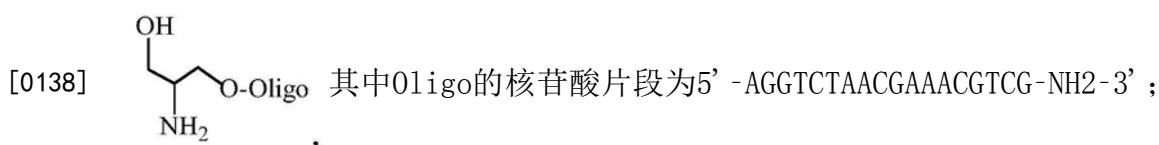
[0133] 继续反应1h后,液相检测出峰位置的峰消失,此时寡核苷酸5'-NH₂-Oligo反应完全,停止反应,继续进行高压制备液相色谱分离:色谱柱选用Agela Technologies的Durashell C18(L),5μm,150Å,30x250mm,洗脱剂有机相为色谱乙腈,梯度为20%乙腈-90%乙腈,水相为0.1M的三乙胺-碳酸(TEAB)缓冲液,时间30min,产品出峰位置在12.2min。

[0134] 最后得到15mg寡核苷酸1,产率为45%;使用线性离子阱质谱仪测得电喷雾电离质量为7182.1(图3),分子量为7182.69。

[0135] 实施例6

[0136] 本实施例制备了一种寡核苷酸2,为寡核苷酸分子3'端的氨基被修饰,具体过程为:

[0137] 取30mg氨基修饰的寡核苷酸



[0139] 将寡核苷酸溶于1mL pH=9的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,再取10mg(大大过量)6-

N,N-双二茂铁甲胺基-1-己醇-0-琥珀酰亚胺酯溶于1mL乙腈并加入缓冲液体系中,室温搅拌,直至经高效液相色谱法(HPLC)检测反应完全,停止反应,继续进行高压制备液相色谱分离:色谱柱选用Agela Technologies的Durasshell C18(L),5 μ m,150Å,30x250mm,洗脱剂有机相为色谱乙腈,梯度为20%乙腈-90%乙腈,水相为0.1M的三乙胺-碳酸(TEAB)缓冲液,时间30min。

[0140] 实施例7

[0141] 本实施例制备了一种寡核苷酸3,为寡核苷酸分子中间部分的氨基被修饰,具体过程为:

[0142] 取30mg氨基修饰的寡核苷酸R,R的核苷酸片段为5'-ATAGACGCC-NH₂-CCGACTAAA-NH₂-CTCCGCAGAGCT-3',将寡核苷酸R溶于1mL pH=9的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,再取10mg(大大过量)6-N,N-双二茂铁甲胺基-1-己醇-0-琥珀酰亚胺酯溶于1mL乙腈并加入缓冲液体系中,室温搅拌,直至经高效液相色谱法(HPLC)检测反应完全,停止反应,继续进行高压制备液相色谱分离:色谱柱选用Agela Technologies的Durasshell C18(L),5 μ m,150Å,30x250mm,洗脱剂有机相为色谱乙腈,梯度为20%乙腈-90%乙腈,水相为0.1M的三乙胺-碳酸(TEAB)缓冲液,时间30min。

[0143] 实施例8

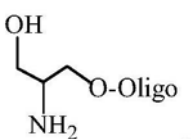
[0144] 本实施例制备了一种寡核苷酸4,为寡核苷酸分子5'端的氨基被修饰,具体过程为:

[0145] 取30mg氨基修饰的寡核苷酸5'-NH₂-Oligo(Oligo片段为5'-NH₂-CAAGCGGATACACCAGGATTG-3'),将寡核苷酸5'-NH₂-Oligo溶于1mL pH=9的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,再取10mg(大大过量)2,6-N,N-二-双二茂铁甲胺基-1-己酸-0-琥珀酰亚胺酯溶于1mL乙腈并加入缓冲液体系中,室温搅拌,直至经高效液相色谱法(HPLC)检测反应完全,停止反应,继续进行高压制备液相色谱分离:色谱柱选用Agela Technologies的Durasshell C18(L),5 μ m,150Å,30x250mm,洗脱剂有机相为色谱乙腈,梯度为20%乙腈-90%乙腈,水相为0.1M的三乙胺-碳酸(TEAB)缓冲液,时间30min。

[0146] 实施例9

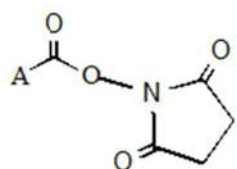
[0147] 本实施例制备了一种寡核苷酸5,为寡核苷酸分子3'端的氨基被修饰,具体过程为:

[0148] 取30mg氨基修饰的寡核苷酸

[0149]  其中Oligo的核苷酸片段为5'-AGGTCTAACGAAACGTCG-NH₂-3';

[0150] 将寡核苷酸溶于1mL pH=9的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,再取10mg(大大过量)6-己醇-0-琥珀酰亚胺酯-1-己基-2,3,4,6-N,N,N,N-四-双二茂铁-0-丙胺基-β-D-吡喃葡萄糖苷溶于1mL乙腈并加入缓冲液体系中,室温搅拌,直至经高效液相色谱法(HPLC)检测反应完全,停止反应,继续进行高压制备液相色谱分离:色谱柱选用Agela Technologies的Durasshell C18(L),5 μ m,150Å,30x250mm,洗脱剂有机相为色谱乙腈,梯度为20%乙腈-90%乙腈,水相为0.1M的三乙胺-碳酸(TEAB)缓冲液,时间30min。

[0151] 上面结合附图对本发明实施例作了详细说明,但是本发明不限于上述实施例,在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明宗旨的前提下作出各种变化。此外,在不冲突的情况下,本发明的实施例及实施例中的特征可以相互组合。



式中, $A = Z-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $p=1\sim6$;

或 $Z-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $q=2\sim6$;

或 $Z-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $r\geq1$;

或 $D = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 或 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $s=1\sim6, t=1\sim6$; $F = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $w=1\sim6$;

或 $E = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 或 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, $u=1\sim6, v=1\sim6$; $T = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $y=1\sim6$;

中的至少一种;

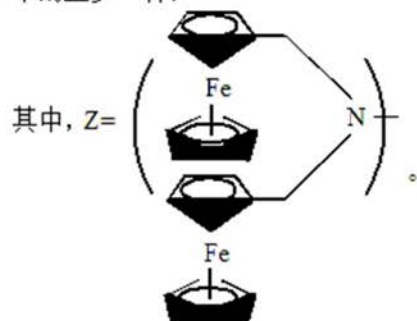


图1

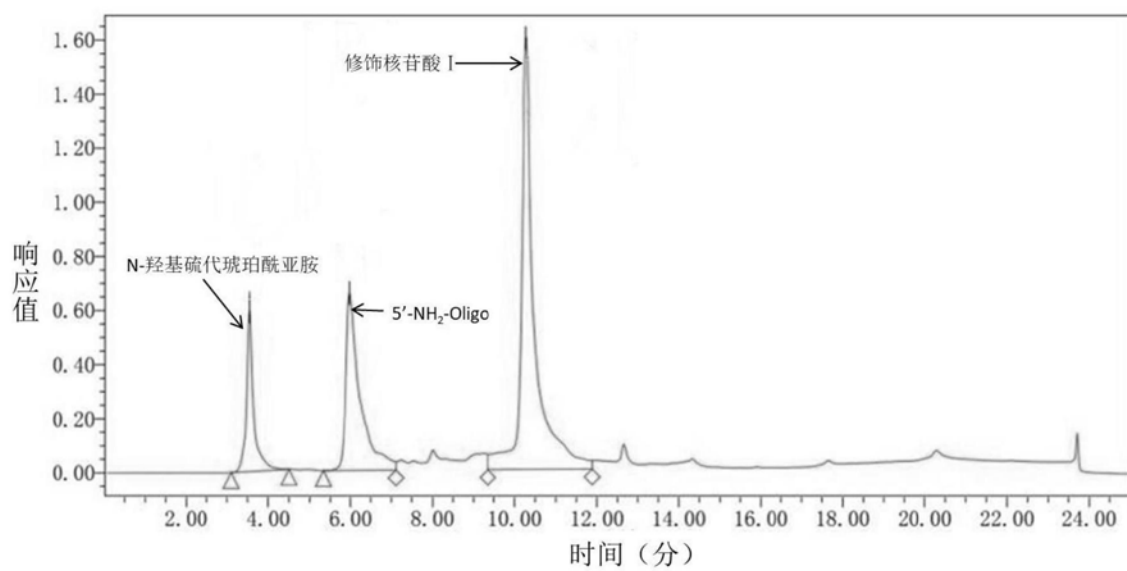


图2

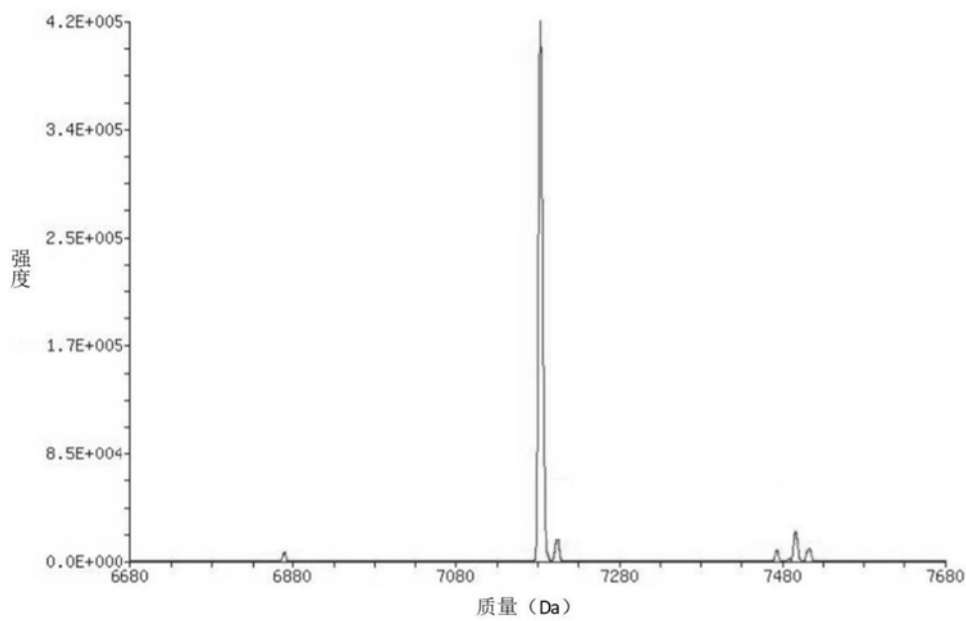


图3