



(21) 申請案號：101149607 (22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 24 日

(51) Int. Cl. : C07H21/00 (2006.01) C07D233/58 (2006.01)

C07D233/64 (2006.01) C40B50/08 (2006.01)

(71) 申請人：高雄醫學大學 (中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72) 發明人：王子斌 WANG, TZU PIN (TW)；柯霓蒨 KO, NI CHIEN (TW)；蘇郁智 SU, YU CHIH (TW)

(74) 代理人：葉大慧

(56) 參考文獻：

TW 201229511

Ghosh et. al., "Use of Maleimide-Thiol Coupling Chemistry for Efficient Syntheses of Oligonucleotide-Enzyme Conjugate Hybridization Probes", *Bioconjugate Chem*, 1990, 1, 71-76.

審查人員：陳成寶

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：12 共 42 頁

(54) 名稱

核酸共軛物的液相合成法

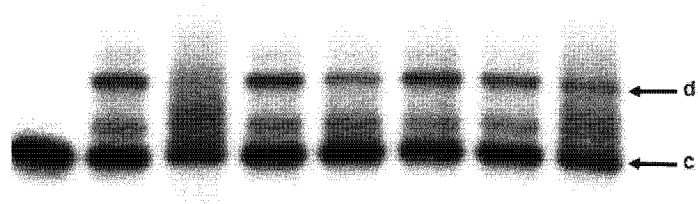
LIQUID PHASE SYNTHESIS OF A NUCLEIC ACID CONJUGATE

(57) 摘要

本發明揭示之核酸共軛物的合成法，其包含下列步驟：於第一緩衝液存在下，核酸與選自於由 4(5)-羥基甲基咪唑、2-乙基咪唑、2-乙基-4-甲基咪唑、4(5)-甲基咪唑、2-甲基咪唑及 4-甲基-5-咪唑甲醇鹽酸鹽所組成之咪唑衍生物群組進行第一反應，使咪唑衍生物鍵結於核酸 5' 端，而得到 5'-咪唑衍生物-核酸；以及於第二緩衝液存在下，5'-咪唑衍生物-核酸與親核劑進行第二反應，使親核劑取代 5'-咪唑衍生物-核酸中的咪唑衍生物鍵結於 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5' 端，而得到 5'-親核劑-核酸。

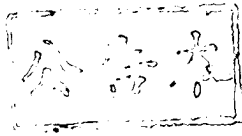
A synthesis method of a nucleic acid conjugate includes the following steps: reacting a nucleic acid and an imidazole derivative selected from a group consisting of 4(5)-hydroxymethyl imidazole, 2-ethylimidazole, 2-ethyl-4-methyl imidazole, 4(5)-methyl imidazole, 2-methyl imidazole, and 4-methyl-5-imidazolemethanol hydrochloride in the presence of a first buffer to form a 5'-imidazole derivative-nucleic acid conjugate in which the imidazole derivative is covalently linked to 5' end of the nucleic acid; and reacting the 5'-imidazole derivative-nucleic acid and a nucleophile in the presence of a second buffer to form a 5'-nucleophile-nucleic acid conjugate in which the nucleophile is substituted for the imidazole derivative and covalently linked to 5' end of the nucleic acid.

咪唑/咪唑衍生物	N/A	Imidazole	1	2	3	4	5	6
DNA共軛物產率(%)	N/A	27	21	26	18	28	26	22



第4圖





# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：101149607

※ 申請日：101.12.24

※IPC 分類：C07H 21/00 (2006.01)

C07D 233/58 (2006.01)

C07D 233/64 (2006.01)

C40B 50/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

核酸共軛物的液相合成法

LIQUID PHASE SYNTHESIS OF A NUCLEIC ACID CONJUGATE

二、中文發明摘要：

本發明揭示之核酸共軛物的合成法，其包含下列步驟：於第一緩衝液存在下，核酸與選自於由 4(5)-羥基甲基咪唑、2-乙基咪唑、2-乙基-4-甲基咪唑、4(5)-甲基咪唑、2-甲基咪唑及 4-甲基-5-咪唑甲醇鹽酸鹽所組成之咪唑衍生物群組進行第一反應，使咪唑衍生物鍵結於核酸 5'端，而得到 5'-咪唑衍生物-核酸；以及於第二緩衝液存在下，5'-咪唑衍生物-核酸與親核劑進行第二反應，使親核劑取代 5'-咪唑衍生物-核酸中的咪唑衍生物鍵結於 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5'端，而得到 5'-親核劑-核酸。

### 三、英文發明摘要：

A synthesis method of a nucleic acid conjugate includes the following steps: reacting a nucleic acid and an imidazole derivative selected from a group consisting of 4(5)-hydroxymethyl imidazole, 2-ethylimidazole, 2-ethyl-4-methyl imidazole, 4(5)-methyl imidazole, 2-methyl imidazole, and 4-methyl-5-imidazolemethanol hydrochloride in the presence of a first buffer to form a 5'-imidazole derivative-nucleic acid conjugate in which the imidazole derivative is covalently linked to 5' end of the nucleic acid; and reacting the 5'-imidazole derivative-nucleic acid and a nucleophile in the presence of a second buffer to form a 5'-nucleophile-nucleic acid conjugate in which the nucleophile is substituted for the imidazole derivative and covalently linked to 5' end of the nucleic acid.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( 4 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明攸關一種核酸共軛物的合成技術，且特別係關於一種核酸共軛物的液相合成法。

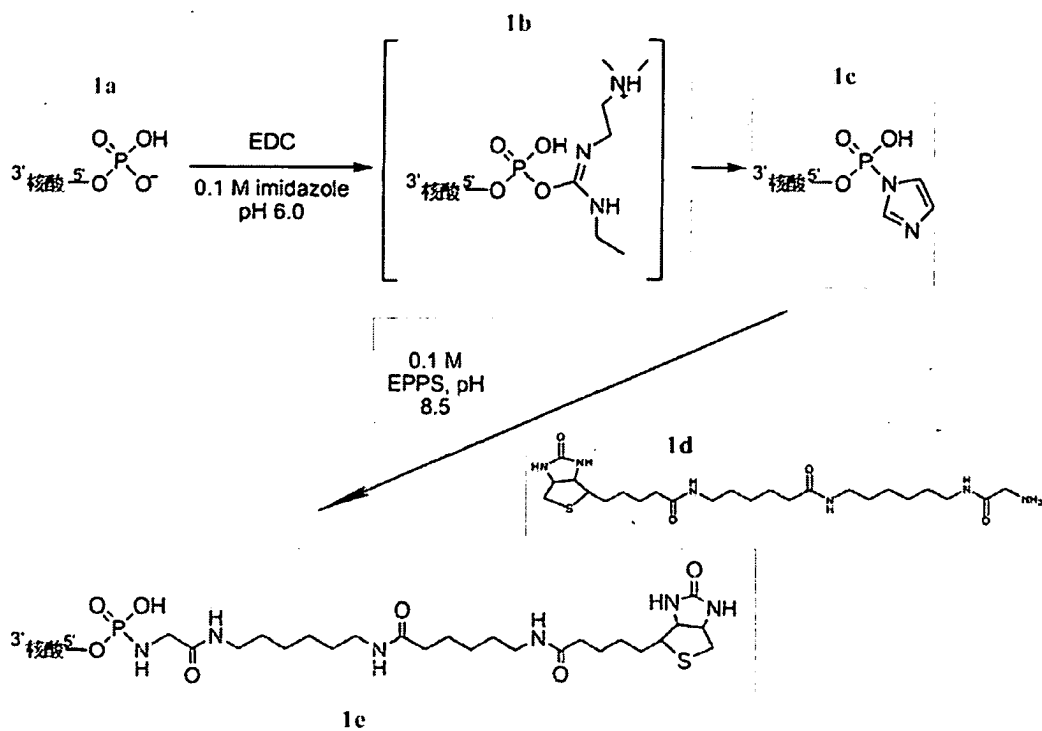
### 【先前技術】

核酸是由多個核苷酸以磷酸雙酯鍵（phosphodiester bond）連接組成的巨分子，並可參與生物體內遺傳訊息的儲存、表現及傳遞，因此核酸已廣泛地應用於臨床或研究上。

為因應這些應用的需求，核酸經常有目的地連接一特殊分子。舉例而言，核酸作為基因篩選的探針時，其共價鍵結像是螢光素醯胺（fluorescein amidite, FAM）等可被偵測的標誌分子，且連同標誌分子送至體內後，利用標誌分子對體內的目標基因定性或定量。又舉例而言，核酸作為治療疾病或預防細菌感染的藥物時，其共價鍵結像是 Tat、Antennapedia 或 CyLop-1 等穿膜胜肽（cell-penetrating peptide, CPP），且於連同穿膜胜肽送至體內時，利用穿膜胜肽提升個體對核酸的攝取。

目前，將核酸連接分子的技術主要是採用化學合成法。如 2007 年 A. Grandas 等人提出的固相合成法，係先將一胜肽組裝於一固體基質（solid substrate），再將一核酸鍵結胜肽的自由羥基。但是，A. Grandas 等人提出的方法有高製造成本的問題，因而無法普及。本發明人之一於 2010 年 7 月提出一種液相合成法，係利用磷酸醯胺反應（phosphoramidation）將一胜肽鍵結至一核酸 5'端（請參閱中華民國發明專利公開號第 201229511 號、Bioconjugate Chem. 21; 1642-1655）。此方法如流程 1 所示。於 pH 6.0 的溶

液中，一核酸 1a 的 5' 端先與 1-(3-二甲基氨基丙基)-1-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (1-(3-dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC) 反應，而形成一中間物 1b。於同樣條件下，中間物 1b 再與咪唑反應，而形成一磷酸咪唑化合物 1c。最後，於 pH 8.5 的溶液中，磷酸咪唑化合物 1c 與一親核劑 1d 反應，以形成一核酸共軛物 1e。此方法的製造成本雖然比 A. Grandas 等人提出的方法低，但其問題在於得到之核酸共軛物的產率低，因此同樣無法普及。



流程 1

### 【發明內容】

本發明係針對本發明人之一於 2010 年 7 月提出之液相合成法做出的改良。經改良後，本發明提出一種新穎之核酸共軛物的液相合成法，而其製得的核酸共軛物不僅具有高產率，更具有生物功能。

於是，本發明之一構想提供一種核酸共軛物的合成法，其包括以下步

驟：於一第一緩衝液存在下，一核酸與一選自於由 4(5)-羥基甲基咪唑 (4(5)-hydroxymethyl imidazole)、2-乙基咪唑 (2-ethylimidazole)、2-乙基-4-甲基咪唑 (2-ethyl-4-methyl imidazole)、4(5)-甲基咪唑 (4(5)-methyl imidazole)、2-甲基咪唑 (2-methyl imidazole) 及 4-甲基-5-咪唑甲醇鹽酸鹽 (4-methyl-5-imidazolemethanol hydrochloride) 所組成之咪唑衍生物群組進行第一反應，使咪唑衍生物鍵結於核酸 5'端，而得到一 5'-咪唑衍生物-核酸；以及於一第二緩衝液存在下，5'-咪唑衍生物-核酸與一親核劑進行第二反應，使親核劑取代 5'-咪唑衍生物-核酸中的咪唑衍生物鍵結於 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5'端，而得到一 5'-親核劑-核酸。

根據本發明之構想，核酸可為去氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA)。

根據本發明之構想，第一緩衝液至少包含 EDC，而核酸為 DNA 時，第一緩衝液不含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質 (co-solute)；核酸為 RNA 時，第一緩衝液含前述之共溶質。

根據本發明之構想，第一反應是於室溫下進行。

根據本發明之構想，親核劑至少具有一-NH<sub>2</sub>基，並以一由-NH<sub>2</sub>基形成的-NH-鍵鍵結於 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5'端，而親核劑的例子可以為胜肽、蛋白質、螢光標記或其他核酸標定化合物。

根據本發明之構想，第二緩衝液至少包含乙二胺四乙酸(EDTA)及 4-(2-羥基乙基)哌嗪-1-丙磺酸 (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-propanesulfonic acid, EPPS)，而核酸為 DNA 時，第二緩衝液不含選自尿素、Tween 20、

Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質；核酸為 RNA 時，第二緩衝液含前述之共溶質。

根據本發明之構想，第二反應是於 41-55°C 下進行。

本發明之另一構想提供一種核酸共軛物的合成法，其包括以下步驟：於一第一緩衝液存在下，一核酸與一選自於由 4(5)-羥基甲基咪唑、2-乙基咪唑、2-乙基-4-甲基咪唑、4(5)-甲基咪唑、2-甲基咪唑及 4-甲基-5-咪唑甲醇鹽酸鹽所組成之咪唑衍生物群組進行第一反應，使咪唑衍生物鍵結於核酸 5'端，而得到一 5'-咪唑衍生物-核酸；於一第二緩衝液存在下，5'-咪唑衍生物-核酸與一親核劑進行第二反應，使親核劑取代 5'-咪唑衍生物-核酸中的咪唑衍生物鍵結於 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5'端，而得到一 5'-親核劑-核酸；於一第三緩衝液存在下，5'-親核劑-核酸與 N-順丁烯二醯基胺基酸丁二醯亞胺酯 (N-maleoyl amino acid succinimidyl ester, AMAS) 進行第三反應，使 AMAS 鍵結於 5'-親核劑-核酸中的親核劑，而得到一 5'-AMAS-親核劑-核酸；以及於一第四緩衝液存在下，5'-AMAS-親核劑-核酸與一有半胱胺酸的胜肽進行第四反應，使胜肽藉由其半胱胺酸與 5'-AMAS-親核劑-核酸中之 AMAS 的馬來醯亞胺基團 (maleimide group) 作用並鍵結於 5'-AMAS-親核劑-核酸中的 AMAS，而得到一 5'-胜肽-AMAS-親核劑-核酸。

根據本發明之構想，核酸可為 DNA 或 RNA。

根據本發明之構想，第一緩衝液至少包含 EDC，而核酸為 DNA 時，第一緩衝液不含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質；核酸為 RNA 時，第一緩衝液含前述之共溶質。

根據本發明之構想，第一反應是於室溫下進行。

根據本發明之構想，親核劑至少具有一-NH<sub>2</sub>基，並以一由-NH<sub>2</sub>基形成的-NH-鍵鍵結於 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5'端，而親核劑的例子可以為胜肽、蛋白質、螢光標記或其他核酸標定化合物。

根據本發明之構想，第二緩衝液至少包含 EDTA 及 EPPS，而核酸為 DNA 時，第二緩衝液不含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質；核酸為 RNA 時，第二緩衝液含前述之共溶質。

根據本發明之構想，第二反應是於 41-55°C 下進行。

根據本發明之構想，第三緩衝液至少包含 EPPS。

根據本發明之構想，第三反應是於室溫下進行。

根據本發明之構想，第四緩衝液至少包含 EPPS。

根據本發明之構想，第四反應是於室溫下進行。

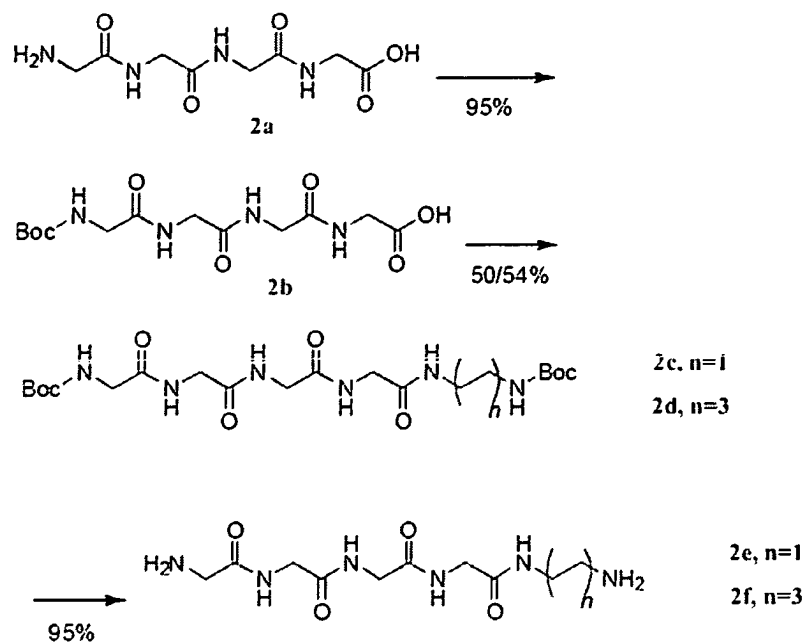
綜上所述，本發明提出的方法係利用咪唑衍生物替代咪唑，如此一來，提升了核酸共軛物的產率。此外，經生物測試後，此些方法得到的核酸共軛物具有生物活性。

### 【實施方式】

為讓本發明上述及/或其他目的、功效、特徵能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，作詳細說明。

#### 【實施例 1：四聚甘胺酸之二胺基衍生物的合成】





## 流程 2

{2-[2-(2-第三-丁氧基羰基胺基-乙醯基胺基)-乙醯基胺基]-乙醯基胺基}-乙酸  
 ( {2-[2-(2-tert-butoxycarbonylamino-acetylamino)-acetylamino]-acetylamino}-acetic acid)

化合物 2b 的製備如流程 2 所示。取 50 毫克四聚甘胺酸 2a 溶解於 16 毫升二氧化二仲乙基/氫氧化鈉/水 (4 : 2 : 2) 溶液，待其完全溶解後，緩緩加入 355 毫克二-第三-丁基二碳酸酯(di-tert-butylidicarbonate)，反應 2 小時。反應結束後，以減壓濃縮機去除混合液中的溶劑，而得到白色粉體產物 2b。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.32 (t, 1H, Gly<sup>4</sup>-NH), 8.26 (t, 1H, Gly<sup>3</sup>-NH), 7.33 (t, 1H, Gly<sup>2</sup>-NH), 7.05 (t, 1H, Gly<sup>1</sup>-NH), 3.74 (d, 2H, Gly<sup>4α</sup>-H), 3.68 (d, 2H, Gly<sup>3α</sup>-H), 3.59 (d, 2H, Gly<sup>2α</sup>-H), 3.32 (d, 2H, Gly<sup>1α</sup>-H), 1.37 [s, 9H, CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]. <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 171.2, 169.9, 169.3, 167.7, 155.9, 79.2, 78.2, 43.8, 43.4, 42.3, 42.1, 28.2. HRMS (ESI) calculated for C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Na, [M+Na]<sup>+</sup> 369.1386 (calcd.), 369.1388 (found)。

[[[[(2-第三-丁氧基羰基胺基-乙基胺基甲醯基)-甲基]-胺基甲醯基]-甲基]-  
胺基甲醯基]-甲基]-胺基甲醯基)-甲基]-胺基甲酸-第三-丁酯

( [[[[[(2-tert-butoxycarbonylamino-ethylcarbamoyl)-methyl]-carbamoyl]-  
-methyl)-carbamoyl]-methyl]-carbamoyl)-methyl]-carbamic acid tert-butyl  
ester)

化合物2c的製備如流程2所示。取70毫克化合物2b溶解於20毫升二甲基甲醯胺 (dimethylformamide, DMF)，待其完全溶解後，放入冰浴中。再加入40毫克EDC及60毫克N-羥基苯並三唑 (N-hydroxybenzotriazole, HOBT) 至得到的混合液，反應15分鐘。接著，加入溶於5毫升DMF的單-第三-丁氧基羰基-乙二胺 (80毫克, mono-*t*-Boc-ethylenediamine) 及N,N-二異丙基乙胺 (0.035毫升, N,N-diisopropylethylamine, DIPEA) 至混合液，於室溫下攪拌6小時。反應結束後，以減壓濃縮機移除得到之混合物中的DMF，再以矽膠管柱層析法加以純化，沖提液比例為二氯甲烷：甲醇=3：1。純化得到的產物，而得到淡黃色固體產物2c。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.17 (t, 1H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 8.10-8.04 (m, 2H, Gly<sup>1</sup>-NH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 7.80 (t, 1H, Gly<sup>4</sup>-NH), 6.99 (t, 1H, Gly<sup>3</sup>-NH), 6.80 (t, 1H, Gly<sup>2</sup>-NH), 3.74 (t, 4H, Gly<sup>4α</sup>-H, Gly<sup>1α</sup>-H), 3.66 (d, 2H, Gly<sup>3α</sup>-H), 3.58 (d, 2H, Gly<sup>2α</sup>-H), 3.08 (q, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 2.98 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 1.37 [d, 18H, CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]. <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 169.9, 169.4, 169.0, 168.8, 155.8, 155.6, 78.2, 77.7, 48.6, 43.3., 42.1, 42.1, 42.0, 40.1, 28.2, 28.2. HRMS (ESI) calculated for C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Na, [M+Na]<sup>+</sup> 511.2492 (calcd.), 511.2490 (found)。

[6-(2-{2-[2-(2-第三-丁氧基羰基胺基)-乙醯基胺基]-乙醯基胺基}-乙醯基胺基)-己基]-胺基甲酸-第三-丁酯

( [6-(2-{2-[2-(2-tert-Butoxycarbonylamino-acetylamino)-acetylamino]-acetylamino}-acetylamino)-hexyl]-carbamic acid tert-butyl ester)

化合物2d的製備如流程2所示。取70毫克化合物2b溶解於20毫升DMF，待其完全溶解後，放入冰浴中。再加入110毫克EDC及78毫克HOBt至得到的混合液，反應15分鐘。接著，加入溶於5毫升DMF的單-第三-丁氧基羰基-己二胺（80毫克，mono-*t*-Boc-hexanediamine）及DIPEA（0.1毫升）至混合液，於室溫下攪拌6小時。反應結束後，以減壓濃縮機移除得到之混合物中的DMF，再以矽膠管柱層析法加以純化，沖提液比例為二氯甲烷：甲醇=9：1。純化得到的產物，而得到淡黃色固體產物2d。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.16 (t, 1H, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 8.04-8.08 [m, 2H, Gly<sup>4</sup>-NH, NHCO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 7.70 (t, 1H, Gly<sup>3</sup>-NH), 7.00 (t, 1H, Gly<sup>1</sup>-NH), 6.75 (t, 1H, Gly<sup>2</sup>-NH), 3.75 (d, 2H, Gly<sup>1α</sup>-H), 3.72 (d, 2H, Gly<sup>4α</sup>-H), 3.65 (d, 2H, Gly<sup>3α</sup>-H), 3.58 (d, 2H, Gly<sup>2α</sup>-H), 3.03 (q, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 2.88 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 1.37 [d, 22H, CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]. 1.21-1.23 (m, 4H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 169.9, 169.4, 169.0, 168.4, 155.9, 155.6, 78.2, 77.3, 43.3, 42.2., 42.1, 42.0, 38.9, 38.5, 29.5, 29.1, 28.3, 28.2, 26.1, 26.0. HRMS (ESI) calculated for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Na, [M+Na]<sup>+</sup> 567.3118 (calcd.), 567.3115 (found)。

2-氨基-N-{{{[(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-甲基]-氨基甲酰基}-甲基)-氨基甲酰基}-甲基}-乙酰胺

(2-amino-N-{{{[(2-amino-ethylcarbamoyl)-methyl]-carbamoyl}-methyl]-carbamoyl}-methyl}-acetamide)

化合物2e的製備如流程2所示。取50毫克化合物2c溶於4毫升三氟乙酸/二氯甲烷（1：1）溶液，並於0°C下攪拌反應1小時，再於室溫下反應1

小時。待反應結束後，以減壓濃縮機移除得到之混合液中的三氟乙酸，得到的產物再以氯仿、乙醚清洗，之後再以減壓濃縮機移除產物中的乙醚，而得到黃色油狀三氟乙酸鹽。將三氟乙酸鹽溶解於 5 毫升二氯甲烷/甲醇 (1:1) 溶液，再加入 0.14 毫克Amberlyst A21 並搖晃反應 30 分鐘。反應結束後，將得到之混合物中的Amberlyst A21 過濾移除，並以減壓濃縮機移除混合物中的液體，而得到白色固體產物 2e。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.65 (t, 1H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 8.32 (t, 1H, Gly<sup>4</sup>-NH), 8.17 (t, 1H, Gly<sup>3</sup>-NH), 8.06 (t, 1H, Gly<sup>2</sup>-NH), 7.80-8.02 (br, 4H, Gly<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.85 (d, 2H, Gly<sup>4α</sup>-H), 3.77 (d, 2H, Gly<sup>3α</sup>-H), 3.71 (d, 2H, Gly<sup>2α</sup>-H), 3.62 (s, 2H, Gly<sup>1α</sup>-H), 3.30 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.85 (q, 2H, NHCH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 169.6, 169.1, 168.8, 166.4, 42.0, 42.0, 42.0, 39.0, 38.5, 36.3. HRMS (ESI) calculated for C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, [M+H]<sup>+</sup> 289.1624 (calcd.), 289.1626 (found)。

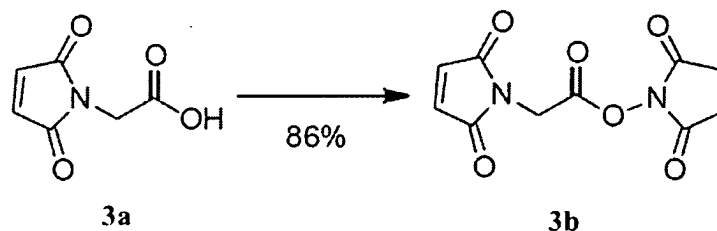
**2-胺基-N-{{{[(6-胺基-己基胺基甲醯基)-甲基]-胺基甲醯基}-甲基)-胺基甲醯基]-甲基}-乙醯胺**

**(2-amino-N-{{{[(6-amino-hexylcarbamoyl)-methyl]-carbamoyl}-methyl]-carbamoyl}-methyl}-acetamide)**

化合物2f的製備如流程2所示。取60毫克化合物2d溶於4毫升三氟乙酸/二氯甲烷 (1:1) 溶液，並於0°C下攪拌反應1小時，再於室溫下反應1小時。待反應結束後，以減壓濃縮機移除得到之混合液中的三氟乙酸，產物再以氯仿、乙醚清洗，之後再以減壓濃縮機移除產物中的乙醚，而得到褐色油狀三氟乙酸鹽。將三氟乙酸鹽溶解於5毫升二氯甲烷/甲醇 (1:1) 溶液，再加入0.14毫克Amberlyst A21並搖晃反應30分鐘。反應結束後，將得到之混合物中的Amberlyst A21過濾移除，並以減壓濃縮機移除混合物中的液體，而

得到白色固體產物 2f。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.68 (t, 1H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 8.33 (t, 1H, Gly<sup>4</sup>-NH), 8.13 (t, 1H, Gly<sup>3</sup>-NH), 7.84-8.08 (br, 4H, Gly<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 7.79 (t, 1H, Gly<sup>2</sup>-NH), 3.84 (d, 2H, Gly<sup>4a</sup>-H), 3.75 (d, 2H, Gly<sup>3a</sup>-H), 3.66 (d, 2H, Gly<sup>2a</sup>-H), 3.62 (s, 2H, Gly<sup>1a</sup>-H), 3.04 (q, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.76 (t, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 1.18-1.60 (m, 8H, CH<sub>2</sub>)。 <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 169.0, 168.9, 168.5, 166.5, 42.1, 42.5, 42.0, 40.2, 38.8, 38.4, 28.9, 27.0, 25.8, 25.5。 HRMS (ESI) calculated for C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, [M+H]<sup>+</sup> 345.2250 (calcd.), 345.2251 (found)。

### 【實施例 2：AMAS 的合成】

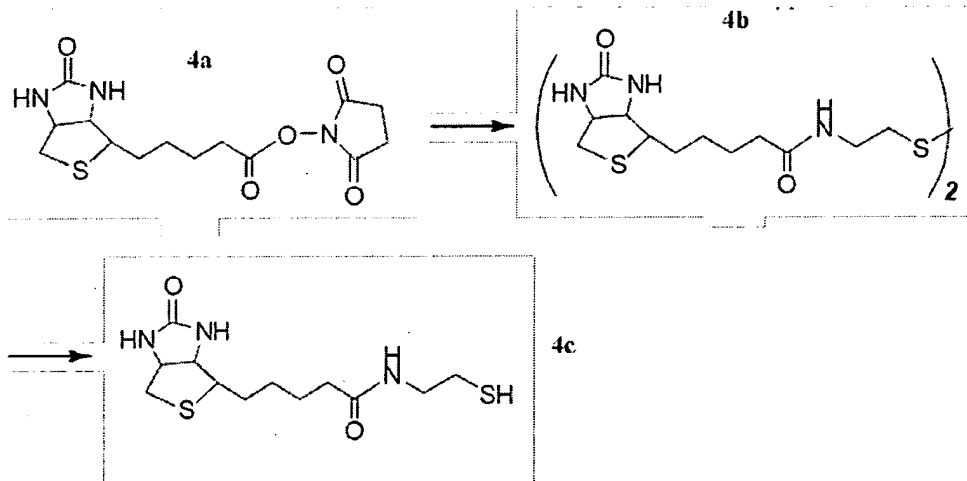


流程 3

化合物 3b 的製備如流程 3 所示。取 69 毫克 (2,5-二氧-2,5-二氫-吡咯-1-基)-乙酸 3a ((2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-acetic acid) 及 103 毫克 N-羥基琥珀酰亞胺 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 溶解於 10 毫升三氟乙酸，並於攪拌同時，逐滴加入溶於 10 毫升三氟乙酸的 184 毫克 N,N'-二環己基碳二亞胺 (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)。於室溫下反應至隔夜後，加入約 3 滴冰醋酸至得到的混合液，攪拌 1 小時，再過濾混合液以移除其上清液。以減壓濃縮機濃縮得到的濾液，產物先以乙醇清洗二次，並於攪拌同時，再懸浮於 30 毫升 2-丙醇，接著過濾取出產物的上清液。以丙醇清洗得到的固體，並經乾燥，而得到白色產物 3b。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.20 (s, 2H, CHCH), 4.73 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.81 (s, 4H,

CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 169.7, 169.7, 164.4, 135.1, 36.3, 25.4.  
HRMS (ESI) calculated for C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na, [M+Na]<sup>+</sup> 275.0280 (calcd.),  
275.0279 (found)。

**【實施例 3：含氫硫基之生物素衍生物的合成】**



流程4

5-(2-氧基-六氫-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基)-戊酸(2-{2-[5-(2-氧基-六氫-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基)-戊醯基胺基]-乙基二巰基}-乙基)-醯胺

( 5-(2-oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoic acid  
(2-{2-[5-(2-oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoylamino]-ethyldisulfanyl}-ethyl)-amide)

化合物4b的製備如流程4所示。取0.19克5-(2-氧基-六氫-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基)-戊酸 2,5-二氧基-吡咯烷-1-基酯 4a ( 5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester) 溶解在7毫升熱DMF中，待其完全溶解後，將得到的混合液回溫至室溫，加入1毫升含胱胺二鹽酸鹽(0.068克)及三乙胺(0.14克)的DMF溶液。於反應至隔夜後，以減壓濃縮機移除得到之產物中的DMF。得到的固體以20毫升異丙醇加熱回溶，待得到的溶液回到室

溫後，將溶液置於4°C下，並靜置至隔夜析出沉澱物。以異丙醇清洗沉澱物，而得到產物4b。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO) δ: 8.01 (s, 2H, CONH), 6.54 (s, 2H, CONH), 6.39 (s, 2H, CONH), 4.31 (t, 2H, CHN), 4.15 (t, 2H, CHN), 3.11 (dd, 2H, CHS), 2.85 (d, 2H, CHHS), 2.78 (t, 4H, CH<sub>2</sub>S), 2.58 (d, 2H, CHHS), 2.09 (t, 4H, CH<sub>2</sub>CO), 1.31-1.61 (m, 12H). <sup>13</sup>C-NMR (100.67 MHz) (DMSO) δ: 172.26, 162.74, 61.04, 59.21, 55.43, 41.10, 37.88, 37.31, 35.15, 28.11, 25.23. HRMS (ESI) calculated for C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S<sub>4</sub>Na, [M+Na]<sup>+</sup> 627.1891 (calcd.), 627.1893 (found)。

### ● 5-(2-氧基-六氫-噻吩[3,4-d]咪唑-4-基)-戊酸(2-巰基-乙基)-醯胺

( 5-(2-oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoic acid  
(2-mercapto-ethyl)-amide)

化合物4c的製備如流程4所示。將0.14克化合物4b溶在8毫升熱DMF中，其完全溶解後，將得到的混合液回溫至室溫，並加入0.11克DL-二硫蘇糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT) 及0.002克三乙胺。於反應1小時後，加入0.11克DTT至得到的反應產物，並再反應2小時。以減壓濃縮機乾燥得到的產物，得到的固體以20毫升二氯甲烷清洗三次，並經減壓濃縮後，而得到產物4c。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) (DMSO) δ: 7.98 (s, 1H, CONH), 6.45 (s, 1H, CONH), 6.38 (s, 1H, CONH), 4.32 (t, 1H, CHN), 4.14 (t, 1H, CHN), 3.19 (t, 2H, CH<sub>2</sub>SH), 3.11 (dd, 1H, CHS), 2.83 (d, 1H, CHHS), 2.58 (d, 1H, CHHS), 2.37 (t, 1H, SH), 1.32-1.61 (m, 6H). <sup>13</sup>C-NMR (100.67 MHz) (DMSO) δ: 172.38, 162.81, 61.07, 59.23, 55.44, 42.04, 35.14, 28.21, 28.03, 25.25, 23.52. HRMS (FAB) calculated for C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub>SNa, [M+Na]<sup>+</sup> 439.5112 (calcd.), 439.1865 (found)。

### ● 【實施例 4：核酸的製備及標記】

GMP-primed TW17 RNA是自行利用T7 RNA聚合酶(T7 RNA polymerase)合成，GMP-primed TW17<sub>1-17</sub> RNA是購自Bioneer(大田，南韓)，3' primer DNA是購自百力生物科技股份有限公司(台灣)，而其序列請見檢附的序列表。為利用urea-PAGE分析，此些核酸於核酸共軛物的製備前先標記上P<sup>32</sup>於其5'端上；另為利用流式細胞儀分析及螢光顯微鏡分析，此些核酸於核酸共軛物的製備前先標記上螢光標記於其5'端上。

### 【實施例 5：共溶質對核酸共軛物產率的影響】

#### 核酸為RNA

先將0.32 nmol GMP-primed TW17 RNA溶於4微升緩衝液(pH 6.0)，而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC、0.1 M 咪唑及10-32.4%共溶質，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-咪唑-RNA，再溶於5.5微升緩衝液(pH 7.5)，且此緩衝液的成分有2 mM EDTA、100 mM EPPS及10-32.4%共溶質，並加入1微升化合物1d(187.2 mM，溶於DMF)，於41°C下反應3小時。反應得到的5'-化合物1d-RNA(下文，以「RNA共軛物」稱之)經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以8% urea-PAGE分析RNA共軛物。

如第1圖所示，此些緩衝液含15% Triton X-100時，得到的RNA共軛物產率最高。

#### 核酸為DNA

先將0.32 nmol 3' primer DNA溶於4微升緩衝液(pH 6.0)，而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC、0.1 M 咪唑及10-32.4%共溶質，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-咪唑-DNA，再溶於5.5微升緩衝液



(pH 7.5)，且此緩衝液的成分有2 mM EDTA、100 mM EPPS及10-32.4% 共溶質，並加入1微升化合物1d (187.2 mM，溶於DMF)，於45°C下反應3小時。反應得到的5'-化合物1d-DNA (下文，以「DNA共軛物」稱之) 經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以20% urea-PAGE分析DNA共軛物。

如第2圖所示，此些緩衝液不含共溶質時，得到的DNA共軛物產率最高。

### 【實施例 6：咪唑衍生物對核酸共軛物產率的影響】

#### ● 核酸為RNA

先將0.32 nmol GMP-primed TW17 RNA溶於4微升緩衝液 (pH 6.0)，而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC、15% Triton X-100及0.1 M咪唑或咪唑衍生物，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-咪唑-RNA或5'-咪唑衍生物-RNA，再溶於5.5微升緩衝液 (pH 7.5)，且此緩衝液的成分有2 mM EDTA、100 mM EPPS及15% Triton X-100，並加入1微升化合物1d (187.2 mM，溶於DMF)，於41°C下反應3小時。反應得到的5'-化合物1d-RNA (下文，以「RNA共軛物」稱之) 經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以8% urea-PAGE分析RNA共軛物。

如第3圖所示，使用4(5)-甲基咪唑時，得到的RNA共軛物產率最高，此現象我們推估是此咪唑衍生物的親核力及立體障礙所造成的。

#### ● 核酸為DNA

先將0.32 nmol 3' primer DNA溶於4微升緩衝液 (pH 6.0)，而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC及0.1 M咪唑或咪唑衍生物，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-咪唑-DNA或5'-咪唑衍生物-DNA，再溶

於5.5微升緩衝液 (pH 7.5) ，且此緩衝液的成分有2 mM EDTA及100 mM EPPS，並加入1微升化合物1d (187.2 mM，溶於DMF) ，於45°C下反應3小時。反應得到的5'-化合物1d-DNA (下文，以「DNA共軛物」稱之) 經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以20% urea-PAGE分析DNA共軛物。

如第4圖所示，使用4(5)-甲基咪唑時，得到的DNA共軛物產率最高，此現象我們推估是此咪唑衍生物的親核力及立體障礙所造成的。

#### **【實施例7：反應溫度對核酸共軛物產率的影響】**

先將0.32 nmol 3' primer DNA溶於4微升緩衝液 (pH 6.0) ，而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC及0.1 M 4(5)-甲基咪唑，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-4(5)-甲基咪唑-DNA，再溶於5.5微升緩衝液 (pH 7.5) ，且此緩衝液的成分有2 mM EDTA及100 mM EPPS，並加入1微升化合物1d (187.2 mM，溶於DMF) ，於45-60°C下反應3小時。反應得到的5'-化合物1d-DNA (下文，以「DNA共軛物」稱之) 經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以20% urea-PAGE分析DNA共軛物。

如第5圖所示，反應溫度為55°C時，得到的DNA共軛物產率最高。另一方面，根據Bioconjugate Chem. 21; 1642-1655的實驗結果，已證實反應溫度為41°C時，得到的RNA共軛物產率最高。

#### **【實施例8：親核劑對核酸共軛物產率的影響】**

##### **核酸為RNA**

先將0.32 nmol GMP-primed TW17 RNA溶於4微升緩衝液 (pH 6.0) ，而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC、15% Triton X-100及0.1 M 4(5)-甲基咪

唑，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-4(5)-甲基咪唑-RNA，再溶於5.5微升緩衝液（pH 7.5），且此緩衝液的成分有2 mM EDTA、100 mM EPPS及15% Triton X-100，並加入1微升親核劑（187.2 mM，溶於DMF），於41°C下反應3小時。反應得到的5'-親核劑-RNA（下文，以「RNA共軛物」稱之）經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以8% urea-PAGE分析RNA共軛物。

如第6圖所示，使用化合物2e及2f時，得到的RNA共軛物產率最高，此現象我們推估是化合物2e及2f之多親核基團所造成的。

#### 核酸為DNA

先將0.32 nmol 3' primer DNA溶於4微升緩衝液（pH 6.0），而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC及0.1 M 4(5)-甲基咪唑，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-4(5)-甲基咪唑-DNA，再溶於5.5微升緩衝液（pH 7.5），且此緩衝液的成分有2 mM EDTA及100 mM EPPS，並加入1微升親核劑（187.2 mM，溶於DMF），於55°C下反應3小時。反應得到的5'-親核劑-DNA（下文，以「DNA共軛物」稱之）經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以20% urea-PAGE分析DNA共軛物。

如第7圖所示，使用化合物2e及2f時，得到的DNA共軛物產率最高，此現象我們推估是化合物2e及2f之多親核基團所造成的。

#### 【實施例 9：核酸共軛物的合成】

#### 核酸為RNA

本實驗是依實施例5-8之結論而設計的。首先，將0.32 nmol GMP-primed TW17 RNA溶於4微升緩衝液（pH 6.0），而此緩衝液的成分有1.0425 M

EDC、15% Triton X-100及0.1 M 4(5)-甲基咪唑，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-4(5)-甲基咪唑-RNA，再溶於5.5微升緩衝液（pH 7.5），且此緩衝液的成分有5 mM EDTA、600 mM EPPS及15% Triton X-100，並加入1微升Tat<sub>48-57</sub>胜肽（20 mM，溶於水），於41°C下反應3小時。反應得到的5'-Tat<sub>48-57</sub>-RNA（下文，以「RNA共軛物」稱之）經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以8% urea-PAGE分析RNA共軛物。

### 核酸為DNA

本實驗是依實施例5-8之結論而設計的。首先，將0.32 nmol 3' primer DNA溶於4微升緩衝液（pH 6.0），而此緩衝液的成分有1.0425 M EDC及0.1 M 4(5)-甲基咪唑，並於室溫下靜置反應90分鐘。接著，用酒精純化得到的5'-4(5)-甲基咪唑-DNA，再溶於5.5微升緩衝液（pH 8.0），且此緩衝液的成分有5 mM EDTA及600 mM EPPS，並加入1微升Tat<sub>48-57</sub>胜肽（20 mM，溶於水），於55°C下反應3小時。反應得到的5'-Tat<sub>48-57</sub>-DNA（下文，以「DNA共軛物」稱之）經酒精沉澱後，回溶於5% Triton X-100中。最後，以20% urea-PAGE分析DNA共軛物。

如第8圖所示，得到的RNA共軛物或DNA共軛物具有介於47-75%的產率。

### 【實施例 10：核酸共軛物的合成】

#### 5'-脒胺-DNA

先將 0.32 nmol 3' primer DNA 溶於 4 微升緩衝液（pH 6.0），而此緩衝液的成分有 1.3 M EDC 及 0.1 M 4(5)-甲基咪唑，並於室溫下靜置反應 90 分鐘。用酒精純化得到的 5'-4(5)-甲基咪唑-DNA，再溶於 27.5 微升緩衝液（pH

8.0)，且此緩衝液的成分有 5 mM EDTA 及 600 mM EPPS，並加入 5 微升胱胺 (187.2 mM，溶於水)，於 55°C 下反應 3 小時。反應得到的 5'-胱胺-DNA 經酒精沉澱後，回溶於 5% Triton X-100 中，並以 20% urea-PAGE 分析之。

如第 9 圖所示，得到的 5'-胱胺-DNA 具有約 72% 的產率。

#### 5'-化合物 4a-胱胺-DNA

先將 900 pmol 5'-胱胺-3' primer DNA 溶於 22.5 微升緩衝液 (pH 7.3)，而此緩衝液的成分有 600 mM EPPS，並加入不同濃度 (0.01-1 M) 的 9 微升化合物 4a，之後用錫箔紙包好，於室溫下搖晃反應 90 分鐘。反應得到的 5'-化合物 4a-胱胺-3' primer DNA 經酒精沉澱後，回溶於 5% Triton X-100 中，並以 20% urea-PAGE 分析之。

如第 9 圖所示，當化合物 4a 與 DNA 的莫耳比為 1,000 : 1 時，得到的 5'-化合物 4a-胱胺-DNA 產率最高。依此，我們推估後續使用的 AMAS 與核酸的莫耳比以 1,000 : 1 為適當。

#### 5'-化合物 4c-AMAS-胱胺-DNA

先將 900 pmol 5'-AMAS-胱胺-3' primer DNA 溶於 50 微升緩衝液 (pH 7.3)，而此緩衝液的成分有 600 mM EPPS，並加入不同濃度 (36-3600  $\mu$ M) 的 50 微升化合物 4c，於室溫下搖晃反應 16 小時。反應得到的 5'-化合物 4c-AMAS-胱胺-3' primer DNA 經酒精沉澱後，回溶於 5% Triton X-100 中，並以 20% urea-PAGE 分析之。

如第 9 圖所示，當化合物 4c 與 DNA 的莫耳比為 20 : 1 時，得到的 5'-化合物 4c-AMAS-胱胺-3' primer DNA 產率最高。依此，我們推估後續使用之有半胱胺酸的胜肽與核酸的莫耳以 20 : 1 為適當。

**【實施例 11：核酸共軛物的合成】****核酸為 RNA**

本實驗是依實施例 10 之結論而設計的。先將 0.22 nmol 5'-朮胺-TW17<sub>1-17</sub> RNA 溶於 5.55 微升緩衝液 (pH 7.3)，而此緩衝液的成分有 600 mM EPPS，並加入 2.2 微升 AMAS (10 mM，溶於二甲基亞砷)，之後用錫箔紙包好，於室溫下搖晃反應 90 分鐘。反應得到的 5'-AMAS-朮胺-TW17<sub>1-17</sub> RNA 經酒精沉澱後，回溶於 50 微升緩衝液 (pH 7.3)，而此緩衝液的成分有 600 mM EPPS，並加入 50 微升 EcCPP-3 朮肽 (88 μM，溶於焦碳酸乙二酯)，於室溫下搖晃反應 16 小時。反應得到的 5'-EcCPP-3-AMAS-朮胺-TW17<sub>1-17</sub> RNA 經酒精沉澱後，回溶於 5% Triton X-100 中，並以 20% urea-PAGE 分析之。

**核酸為 DNA**

本實驗是依實施例 10 之結論而設計的。先將 900 pmol 5'-朮胺-3' primer DNA 溶於 22.5 微升緩衝液 (pH 7.3)，而此緩衝液的成分有 600 mM EPPS，並加入 90 微升 AMAS (10 mM，溶於二甲基亞砷)，之後用錫箔紙包好，於室溫下搖晃反應 90 分鐘。反應得到的 5'-AMAS-朮胺-3' primer DNA 經酒精沉澱後，回溶於 50 微升緩衝液 (pH 7.3)，而此緩衝液的成分有 600 mM EPPS，並加入 50 微升 EcCPP-3 朮肽 (360 μM，溶於焦碳酸乙二酯)，於室溫下搖晃反應 16 小時。反應得到的 5'-EcCPP-3-AMAS-朮胺-3' primer DNA 經酒精沉澱後，回溶於 5% Triton X-100 中，並以 20% urea-PAGE 分析之。

如第 10 圖所示，得到的 5'-EcCPP-3-AMAS-朮胺-核酸具有約 59-75% 的產率。

值得提出的是，本實施例的優點在於：(1) 過去文獻已知含雙硫鍵的物質較容易被攝入細胞，因此透過 5'-EcCPP-3-AMAS-胱胺-核酸之胱胺的雙硫鍵有助於其攝入細胞；(2) 5'-EcCPP-3-AMAS-胱胺-核酸的雙硫鍵於細胞內容易還原斷裂，因而有助於細胞內釋放核酸；(3) 相較於實施例 9 提出的方法，本實施例提出之方法使用的胜肽相對於核酸的比例相對地低。

#### 【實施例 12：細胞毒性分析】

本實驗係利用 MTT (3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 分析法觀察實施例 9 的 5'-Tat<sub>48-57</sub>-3' primer DNA 對細胞存活的影響。如第 11 圖所示，以高濃度 5'-Tat<sub>48-57</sub>-3' primer DNA 處理人類 A549 細胞 24 小時後，我們發現其對 A549 細胞仍無明顯的細胞毒性。

#### 【實施例 12：ex vivo 細胞攝入分析】

本實驗係利用流式細胞儀及螢光顯微鏡觀察實施例 9 之 5'-Tat<sub>48-57</sub>-3' primer DNA 對細胞攝入的影響。如第 12 圖所示，以 5 $\mu$ M 5'-Tat<sub>48-57</sub>-3' primer DNA 處理人類 A549 細胞 24 小時後，我們發現其已成功地攝入 A549 細胞內。

上述實施例僅例示說明本發明之原理及功效，而非用於限制本發明。任何熟於此項技藝之人士均可在不違背本發明之技術原理及精神的情況下，對上述實施例進行修改與變化。因此，本發明之權利保護範圍應如後述之申請專利範圍所列者。

#### 【圖式簡單說明】

第 1 圖係 8% urea-PAGE 的分析結果，以說明不同共溶質對 RNA 共軛物產率的影響；其中，數字 1：尿素；數字 2：Tween 20；數字 3：Triton X-100；數字 4：PEG 6000；數字 5：PEG 8000；數字 6：丙三醇；箭頭 a：RNA；

箭頭 b：5'-化合物 1d-RNA。

第 2 圖係 20% urea-PAGE 的分析結果，以說明不同共溶質對 DNA 共軛物產率的影響；其中，實心方塊：尿素；三角：Tween 20；空心圓：Triton X-100；橢圓：PEG 6000；實心圓：PEG 8000；空心方塊：丙三醇。

第 3 圖係 8% urea-PAGE 的分析結果，以說明不同咪唑衍生物對 RNA 共軛物產率的影響；其中，數字 1：4(5)-羥基甲基咪唑；數字 2：2-乙基咪唑；數字 3：2-乙基-4-甲基咪唑；數字 4：4(5)-甲基咪唑；數字 5：2-甲基咪唑；數字 6：4-甲基-5-咪唑甲醇鹽酸鹽；箭頭 a：RNA；箭頭 b：5'-化合物 1d-RNA。

第 4 圖係 20% urea-PAGE 的分析結果，以說明不同咪唑衍生物對 DNA 共軛物產率的影響；其中，數字 1：4(5)-羥基甲基咪唑；數字 2：2-乙基咪唑；數字 3：2-乙基-4-甲基咪唑；數字 4：4(5)-甲基咪唑；數字 5：2-甲基咪唑；數字 6：4-甲基-5-咪唑甲醇鹽酸鹽；箭頭 c：DNA；箭頭 d：5'-化合物 1d-DNA。

第 5 圖係 20% urea-PAGE 的分析結果，以說明不同反應溫度對 DNA 共軛物產率的影響；其中，箭頭 a：DNA；箭頭 b：5'-化合物 1d-DNA。

第 6 圖係 8% urea-PAGE 的分析結果，以說明不同親核劑對 RNA 共軛物產率的影響；其中，數字 1：化合物 1d；數字 2：化合物 2a；數字 3：化合物 2e；數字 4：化合物 2f；箭頭 a：RNA；箭頭 b：5'-化合物 2a-RNA；箭頭 c：5'-化合物 6a 或 6b-RNA；箭頭 d：5'-化合物 1d-RNA。

第 7 圖係 20% urea-PAGE 的分析結果，以說明不同親核劑對 DNA 共軛物產率的影響；其中，數字 1：化合物 1d；數字 2：化合物 2a；數字 3：



化合物 2e；數字 4：化合物 2f；箭頭 e：DNA；箭頭 f：5'-化合物 2a-DNA；  
箭頭 g：5'-化合物 6a 或 6b-DNA；箭頭 h：5'-化合物 1d-DNA。

第 8 圖係urea-PAGE的分析結果，以說明核酸共軛物的產率；其中，箭頭a：DNA；箭頭b：5'-Tat<sub>48-57</sub>-DNA；箭頭c：RNA；箭頭d：5'-Tat<sub>48-57</sub>-RNA。

第 9 圖係 20% urea-PAGE 的分析結果，以分別說明胱胺、AMAS 及有半胱胺酸的胜肽相對於 DNA 之莫耳比對核酸共軛物產率的影響；其中，箭頭 a：DNA；箭頭 b：5'-胱胺-DNA；箭頭 c：5'-化合物 4a-胱胺-DNA；箭頭 d：5'-化合物 4c-AMAS-胱胺-DNA。

第 10 圖係 20% urea-PAGE 的分析結果，以分別說明核酸共軛物的產率；其中，箭頭 e：DNA 或 RNA；箭頭 f：5'-胱胺-DNA 或 RNA；箭頭 g：5'-EcCPP-3-AMAS-胱胺-DNA；箭頭 h：5'-EcCPP-3-AMAS-胱胺-RNA。

第 11 圖係MTT分析法的結果，以說明 核酸共軛物 對細胞存活的影響。

第 12 圖係流式細胞儀及螢光顯微鏡的分析結果，以說明核酸共軛物 對細胞攝入的影響。

#### 【主要元件符號說明】

無

## 序列表

&lt;110&gt; 高雄醫學大學

&lt;120&gt; 核酸共軛物的液相合成法

&lt;160&gt; 5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; GMP-primed TW17 RNA

&lt;400&gt; 1

gggaucguca gugcauugag aagugcagug ucuugcgcug gguucgagcg guccguggug 60  
 cuggcccggg gguaucccca aggggua 87

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> GMP-primed TW17<sub>1-17</sub> RNA

&lt;400&gt; 2

gggaucguca gugcauu 17

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 3' primer DNA

&lt;400&gt; 3

tacccttg ggataccacc 20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人類免疫缺陷病毒

&lt;220&gt;

<223> Tat<sub>48-57</sub>

&lt;400&gt; 4

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210>5  
<211>11  
<212>PRT  
<213>人工序列  
<220>  
<223>EcCPP-3  
<400>5  
Cys Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys  
1                    5                                    10



## 七、申請專利範圍：

### 1、一種核酸共軛物的合成法，係包括：

於一第一緩衝液存在下，一核酸與一咪唑衍生物進行第一反應，使該咪唑衍生物鍵結於該核酸 5'端，而得到一 5'-咪唑衍生物-核酸；其中，該第一緩衝液至少包含 1-(3-二甲基氨基丙基)-1-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (1-(3-dimethylaminopropyl)-1-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)，而該咪唑衍生物為 4(5)-甲基咪唑 (4(5)-methyl imidazole)；以及

於一第二緩衝液存在下，該 5'-咪唑衍生物-核酸與一親核劑進行第二反應，使該親核劑取代該 5'-咪唑衍生物-核酸中的咪唑衍生物鍵結於該 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5'端，而得到一 5'-親核劑-核酸；其中，該第二緩衝液至少包含乙二胺四乙酸 (EDTA) 及 4-(2-羥基乙基)哌嗪-1-丙磺酸 (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-propanesulfonic acid, EPPS)，而該親核劑至少具有一-NH<sub>2</sub>基，並以一由該-NH<sub>2</sub>基形成的-NH-鍵鍵結於該 5'-咪唑衍生物-核酸中的核酸 5'端。

2、如申請專利範圍第 1 項所述之合成法，其中該核酸為去氧核糖核酸 (DNA) 時，該第一緩衝液不含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質；該核酸為核糖核酸 (RNA) 時，該第一緩衝液含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質。

3、如申請專利範圍第 1 項所述之合成法，其中該核酸為 DNA 時，該第二緩衝液不含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質；該核酸為 RNA 時，該第二緩衝液含選自尿素、Tween 20、

Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質。

4、如申請專利範圍第 1 項所述之合成法，其中該親核劑係為胜肽、蛋白質或螢光標記。

5、如申請專利範圍第 4 項所述之合成法，其中該核酸係為 DNA。

6、如申請專利範圍第 5 項所述之合成法，其中該第一緩衝液不含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質，且該第二緩衝液不含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質。

7、如申請專利範圍第 4 項所述之合成法，其中該核酸係為 RNA。

8、如申請專利範圍第 7 項所述之合成法，其中該第一緩衝液含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質，而該第二緩衝液含選自尿素、Tween 20、Triton X-100、PEG 6000、PEG 8000 或丙三醇的共溶質。

9、一種核酸共軛物的合成法，係包括：

於一第三緩衝液存在下，如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項所述的 5'-親核劑-核酸與 N-順丁烯二醯基胺基酸丁二醯亞胺酯 (N-maleoyl amino acid succinimidyl ester, AMAS) 進行第三反應，使該 AMAS 鍵結於該 5'-親核劑-核酸中的親核劑，而得到一 5'-AMAS-親核劑-核酸；其中，該第三緩衝液至少包含 EPPS；以及

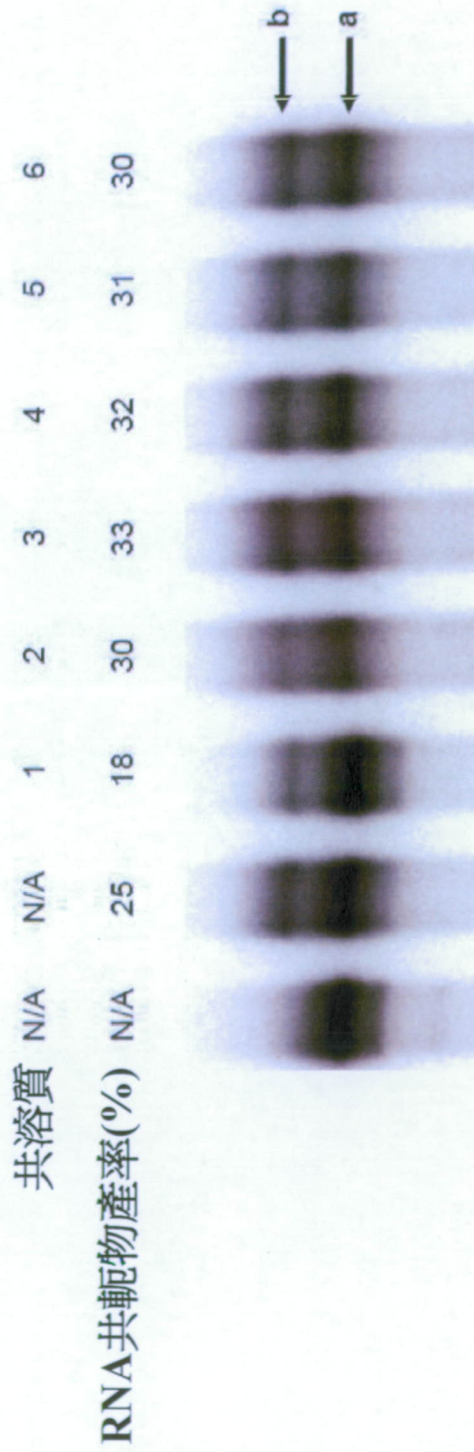
於一第四緩衝液存在下，該 5'-AMAS-親核劑-核酸與一有半胱胺酸的胜肽進行第四反應，使該胜肽藉由其半胱胺酸與該 5'-AMAS-親核劑-核酸中之 AMAS 的馬來醯亞胺基團 (maleimide group) 作用並鍵結於該

5'-AMAS-親核劑-核酸中的 AMAS，而得到一 5'-胜肽-AMAS-親核劑-核酸；其中，該第四緩衝液至少包含 EPPS。

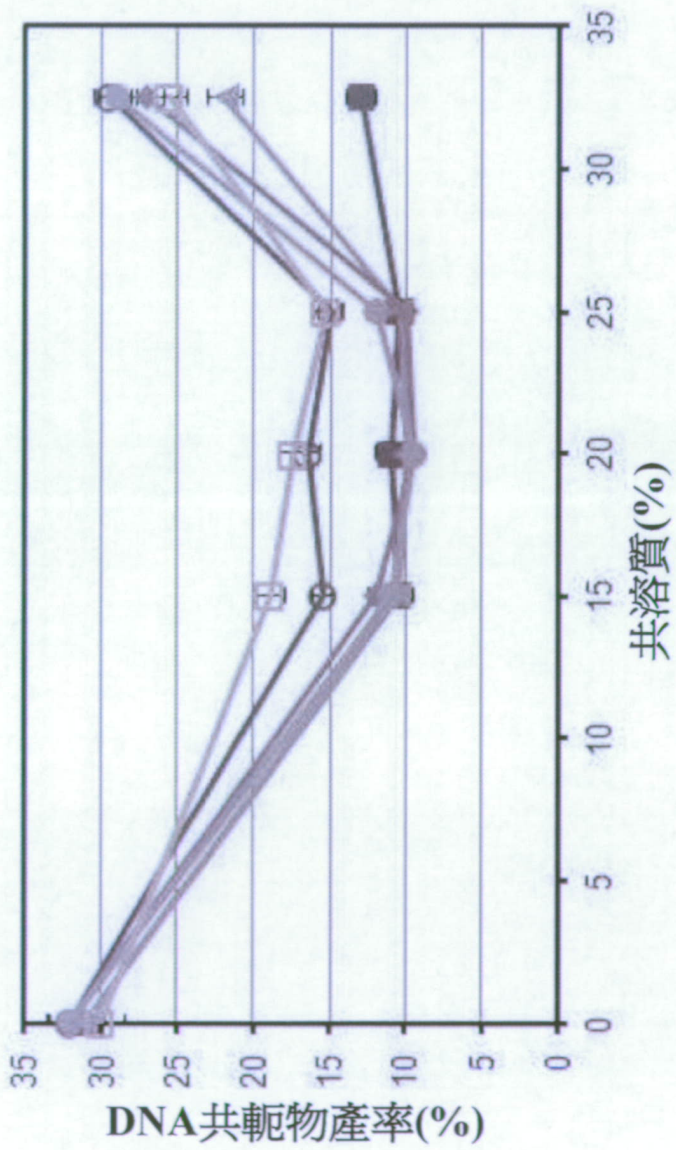
八、圖式：

如次頁

公告本

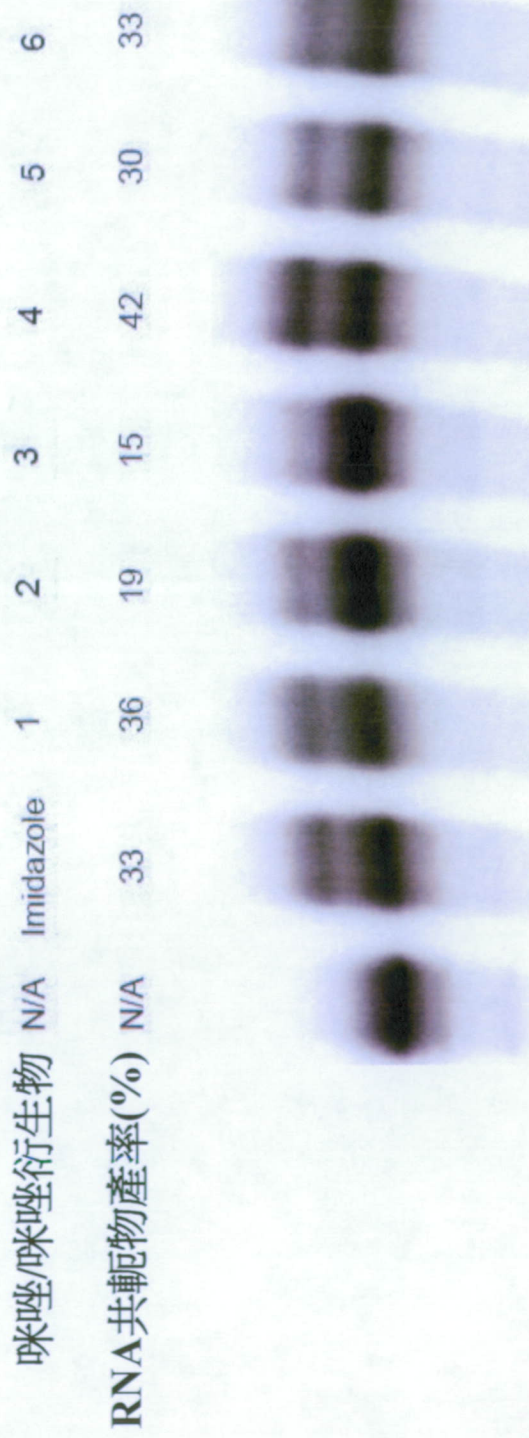


第1圖

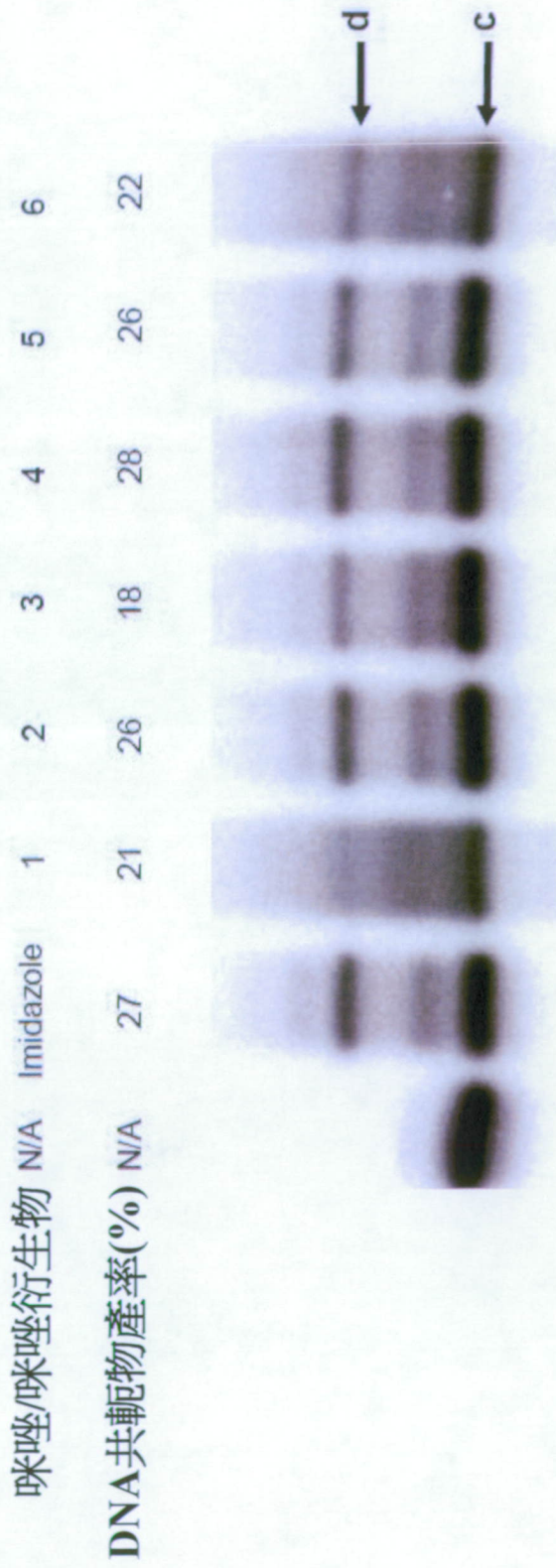


第2圖





第3圖

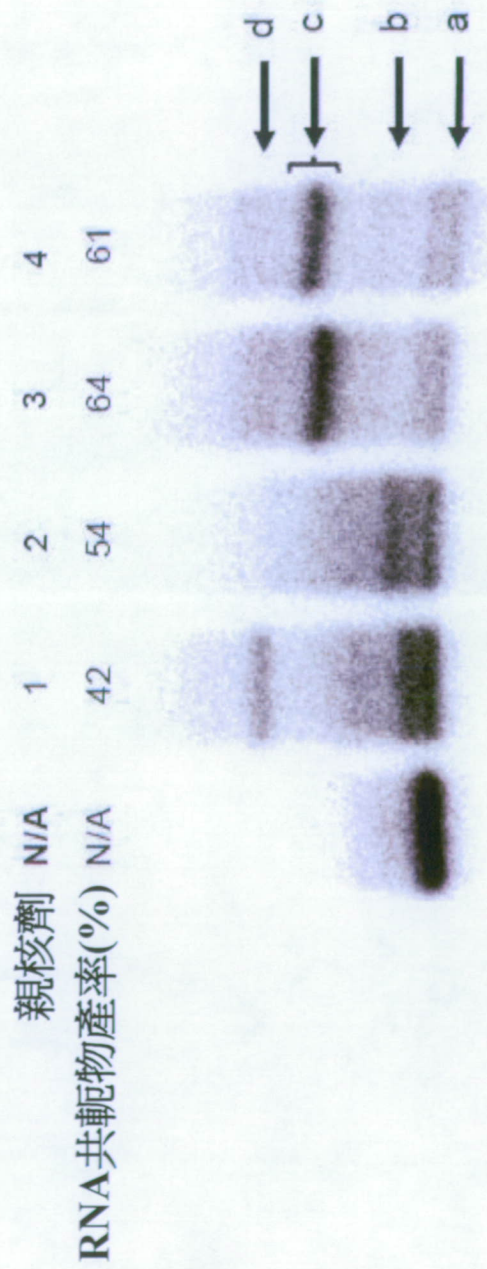


第4圖

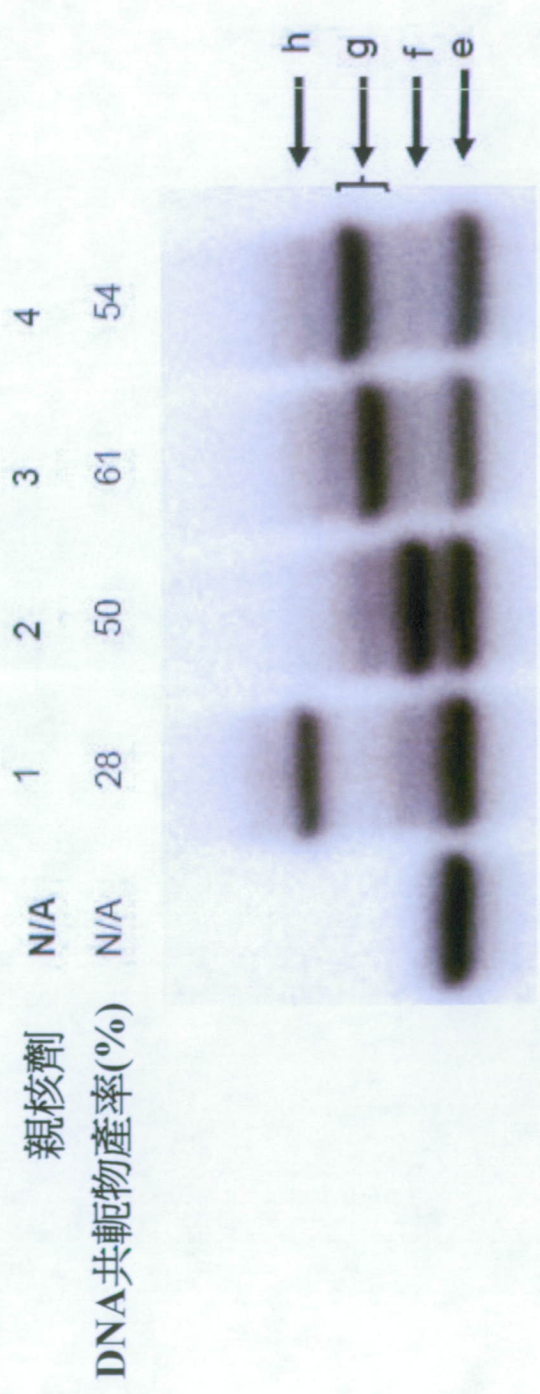


第5圖

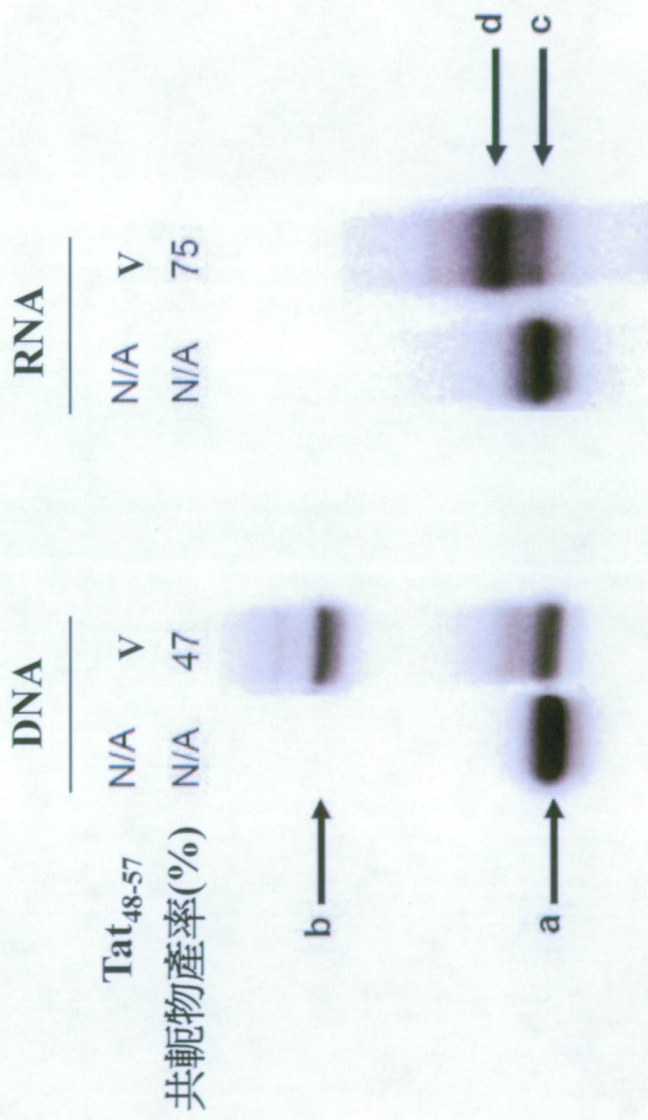




第6圖



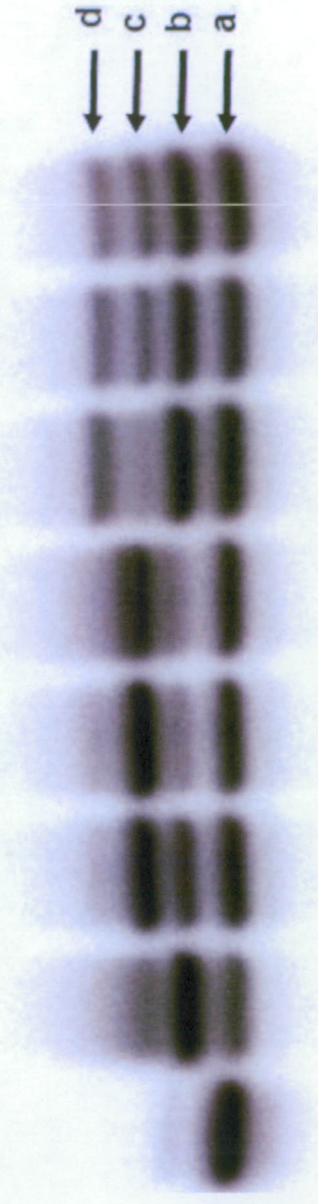
第7圖



第8圖

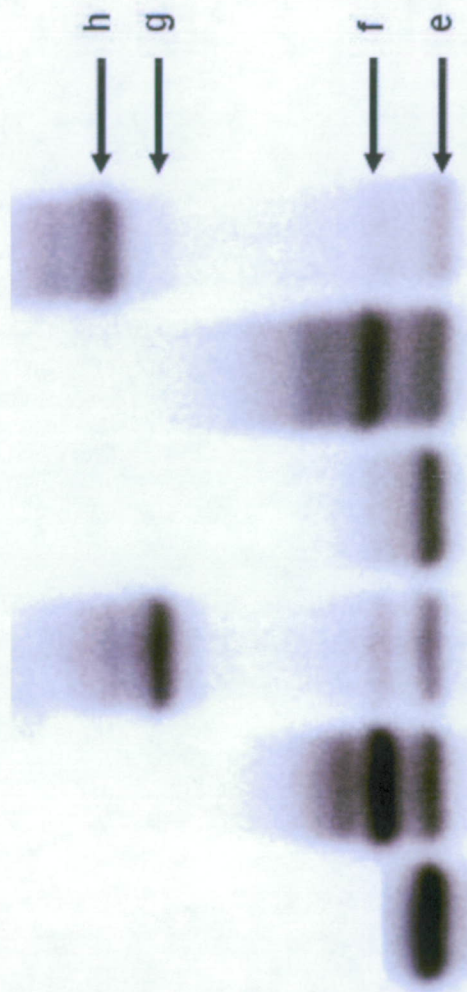


反應物	N/A	Cystamine	化合物4a			化合物4c		
反應物相對於DNA的莫耳比	N/A	589	100	1,000	10,000	4	20	40
DNA共軛物產率(%)	N/A	72	44	55	46	19	35	33



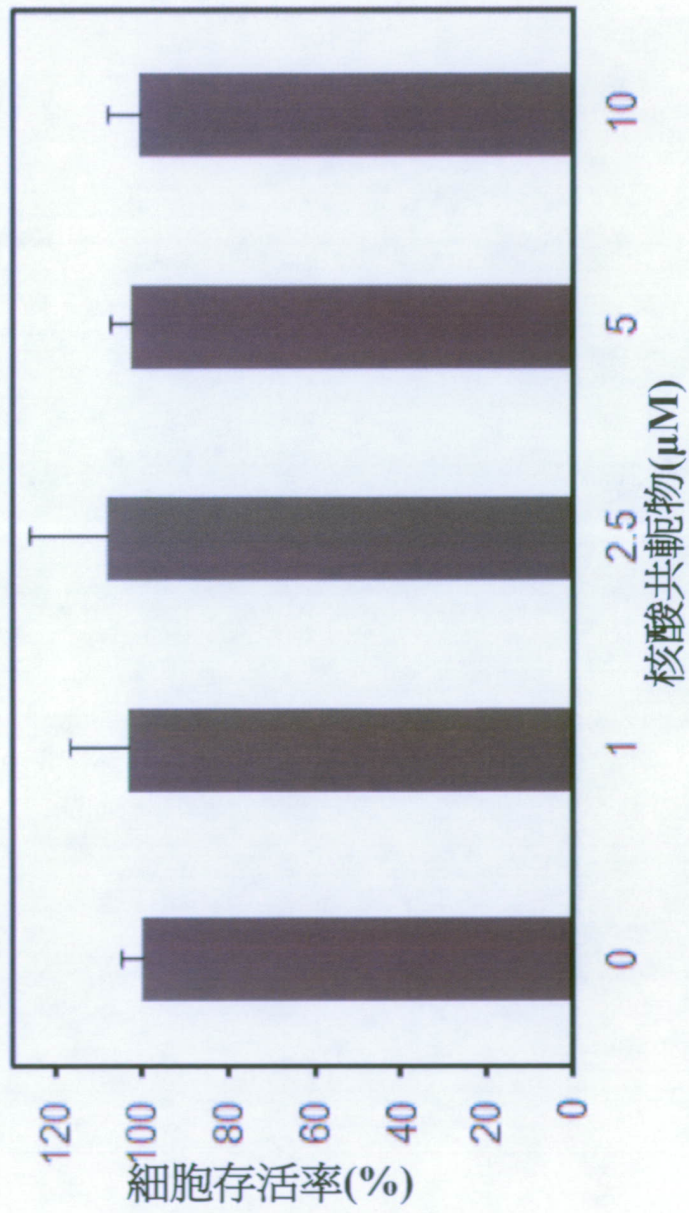
第9圖

	DNA			RNA		
EcCPP-3	N/A	N/A	V	N/A	N/A	V
AMAS	N/A	N/A	V	N/A	N/A	V
朊胺	N/A	V	V	N/A	V	V
共軛物產率(%)	N/A	72	59	N/A	60	75

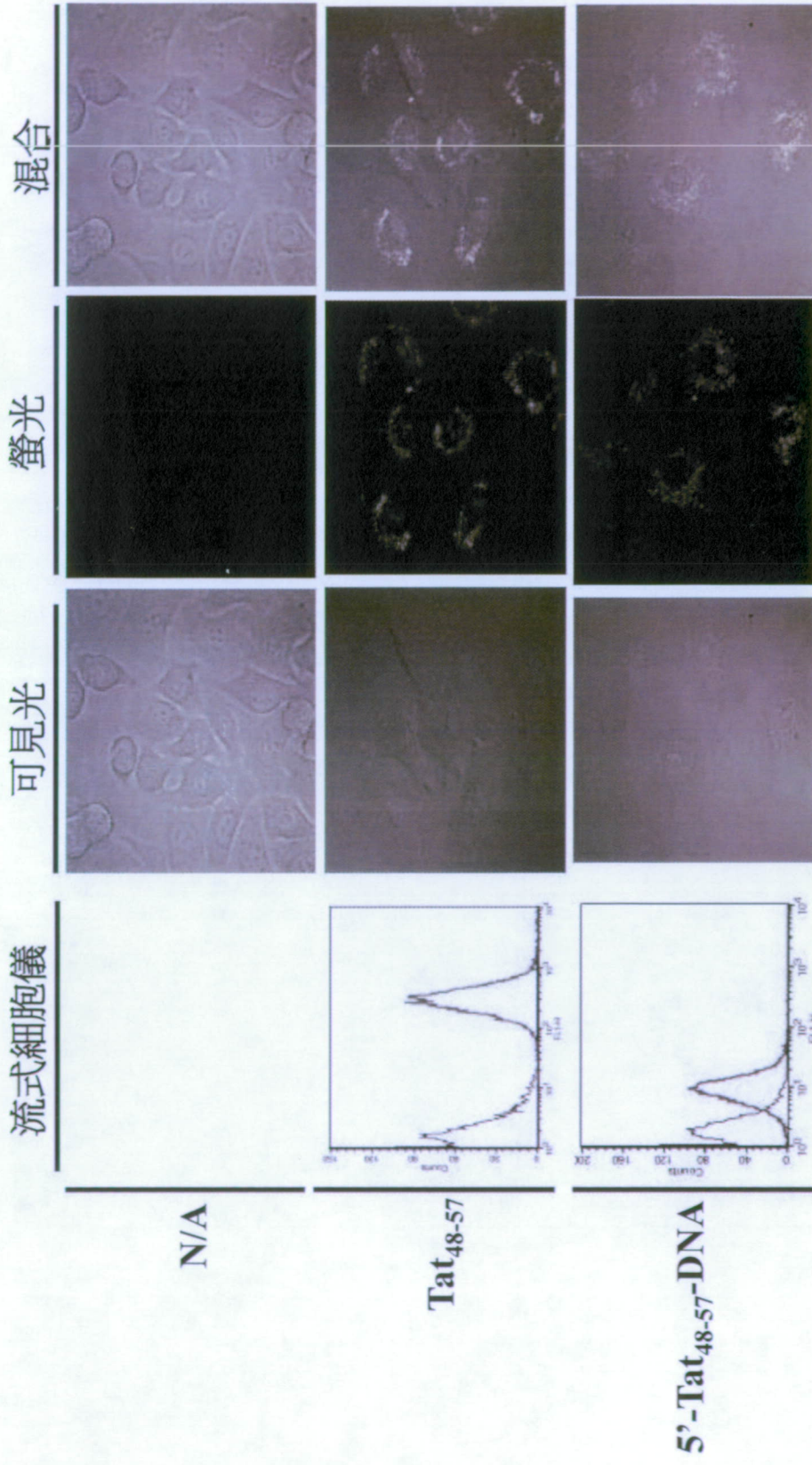


第10圖





第11圖



第12圖