(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118488959 A
(43)申请公布日 2024.08.13

(21)申请号 202280086091.8
(22)申请日 2022.12.27
(30)优先权数据
2021-212132 2021.12.27 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/048385 2022.12.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/127918 JA 2023.07.06
(71)申请人 日本新药株式会社
地址 日本
(72)发明人 野形真树 柴佳伸 下冈巧弥 横井健斗
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
C07F 9/6533(2006.01)
C07H 21/04(2006.01)

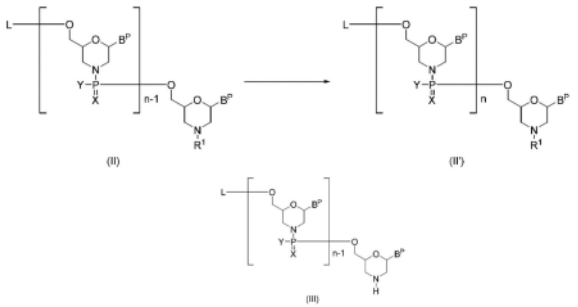
权利要求书8页 说明书44页

(54)发明名称

低聚核酸化合物的制造方法

(57)摘要

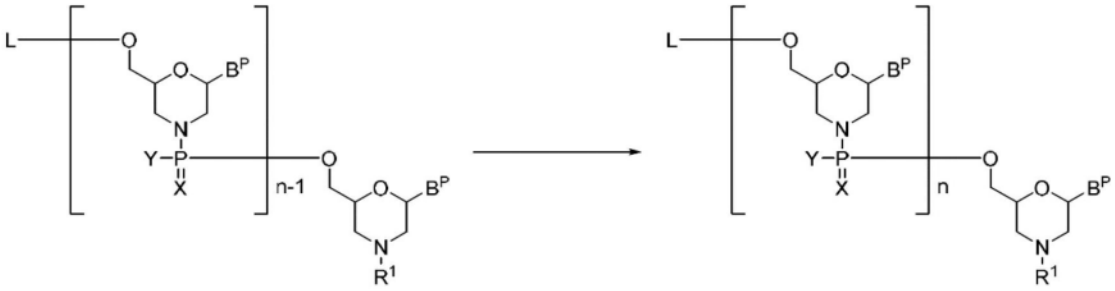
本发明涉及吗啉基核酸低聚物的制造方法，在下式所示的吗啉基核酸低聚物的延伸反应中包括下述工序:将式(II)的化合物用含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物(式中的各符号如说明书中所定义)。



CN 118488959 A

1.一种吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,在吗啉基核酸低聚物的延伸反应中包括下述工序:将式(II)的化合物用含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物,

所述吗啉基核酸低聚物的延伸反应为:



(II)　　(II')

式中,

B^P独立地为任选被保护的核酸碱基;

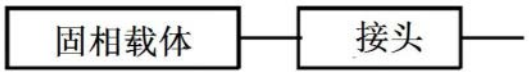
R^1为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

X为O或S;

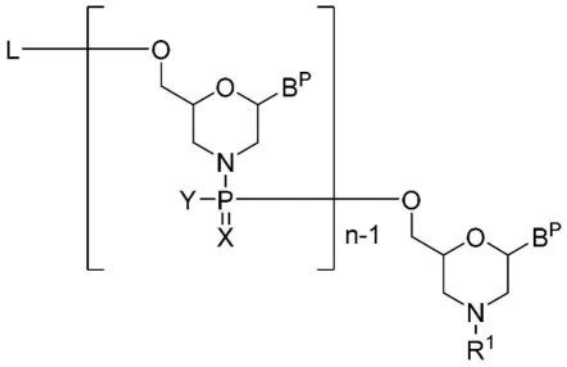
Y为二烷基氨基或烷氧基;

n为处于1～99的范围内的任意整数,优选为处于15～30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18～28的范围内的任意整数;

L为氢、酰基或式(IV)所示的基团,

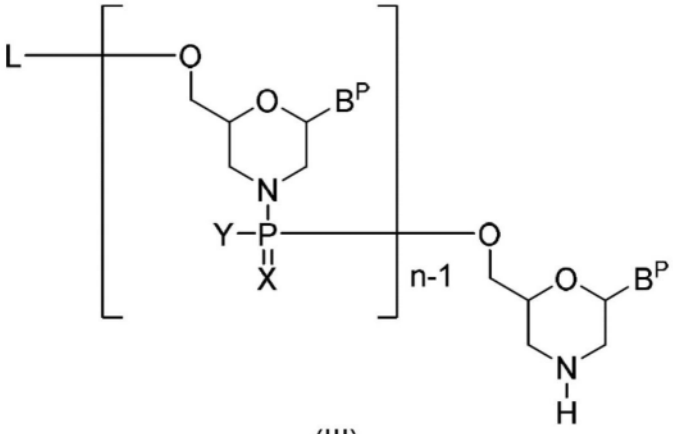


(IV)



(II)

式(II)中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述,

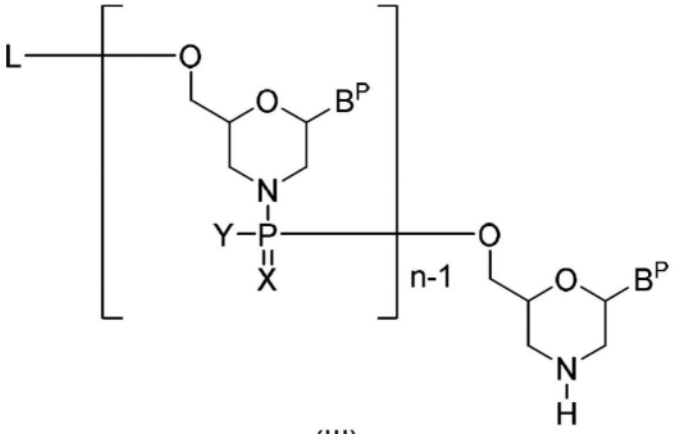


(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述。

2.根据权利要求1所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

将式(III)的化合物用含有碱、醇类及卤素溶剂的溶液进行处理,

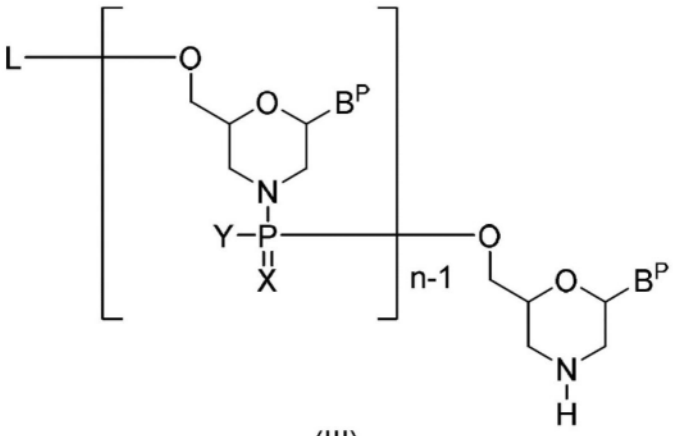


(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述。

3.根据权利要求1或2所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

将式(III)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理,

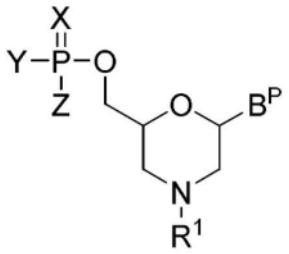


(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述。

4.根据权利要求1~3中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

将式(VIII)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理,

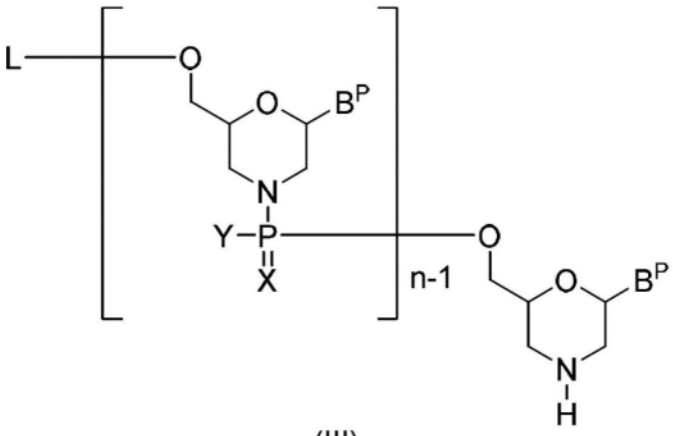


(VIII)

式(VIII)中,B^P、X、Y及R^1如上所述,Z为卤素。

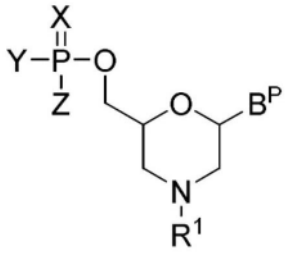
5.根据权利要求1～4中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

在有机胺的存在下使式(III)的化合物和式(VIII)的化合物反应而形成式(II')的化合物,



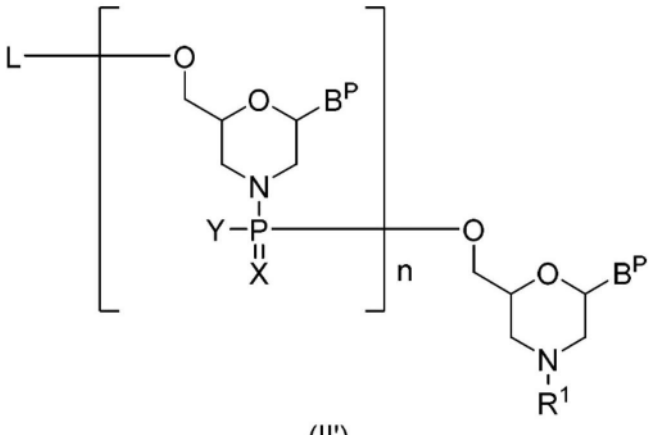
(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述,



(VIII)

式(VIII)中,X、Y、Z、B^P及R^1如上所述,

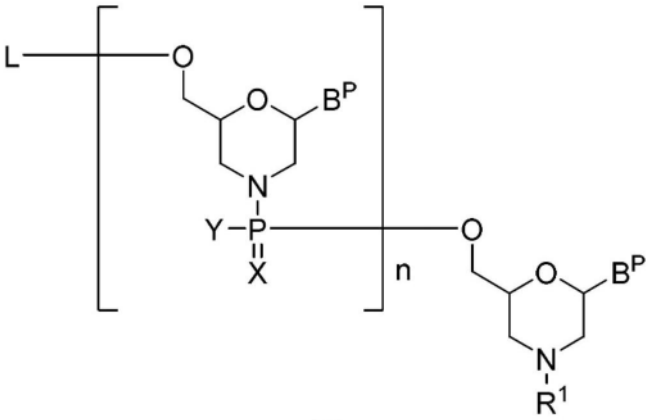


(II')

式(II')中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

将式(II')的化合物用含有醇类和/或卤素溶剂的溶液进行处理,



(II')

式(II')中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述。

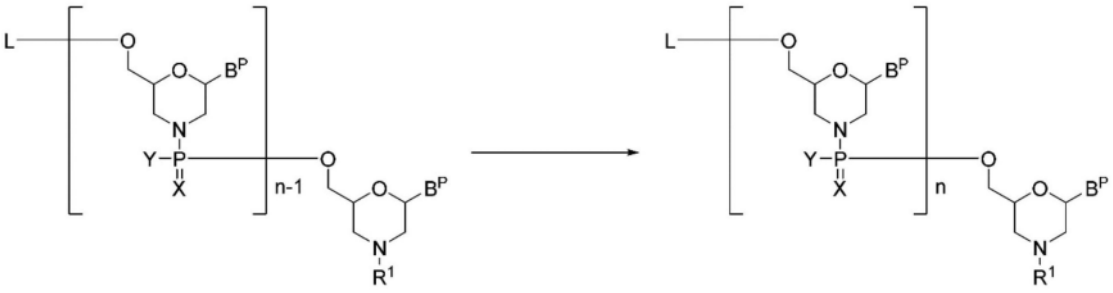
7.一种吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,在吗啉基核酸低聚物的延伸反应中包括下述工序:

将式(II)的化合物用含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物的工序;

将式(III)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理的工序;并且

将式(VIII)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理的工序,

所述吗啉基核酸低聚物的延伸反应为:



(II) (II')

式中,

B^P独立地为任选被保护的核酸碱基;

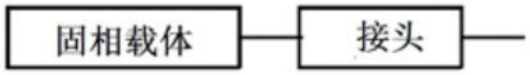
R^1为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

X为O或S;

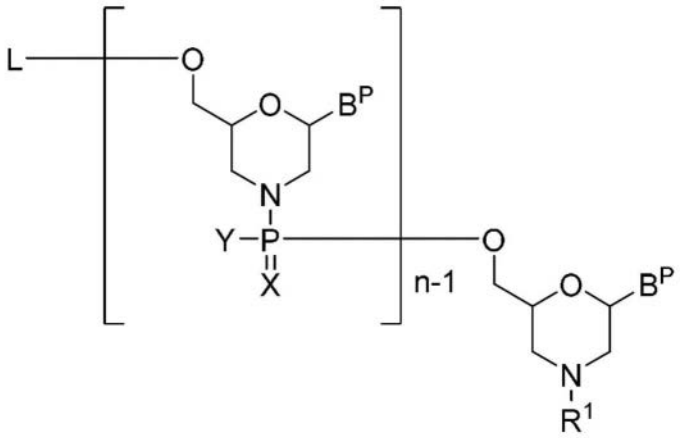
Y为二烷基氨基或烷氧基;

n为处于1～99的范围内的任意整数,优选为处于15～30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18～28的范围内的任意整数;

L为氢、酰基或式(IV)所示的基团,

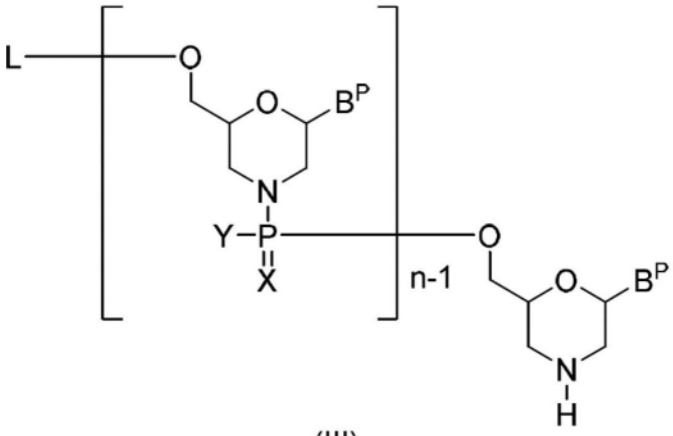


(IV)



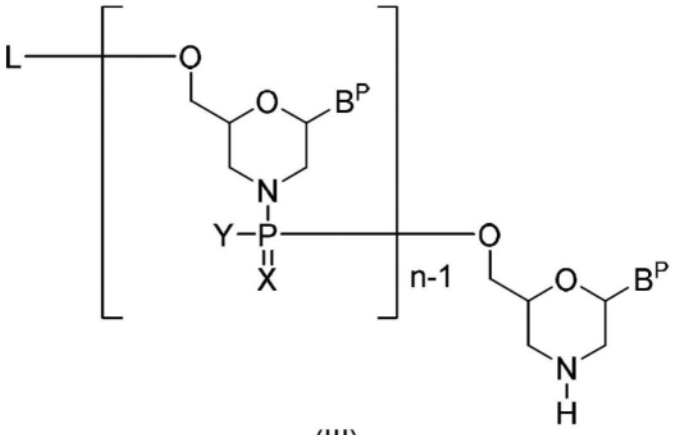
(II)

式(II)中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述,



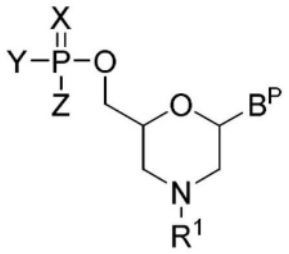
(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述,



(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述,



(VIII)

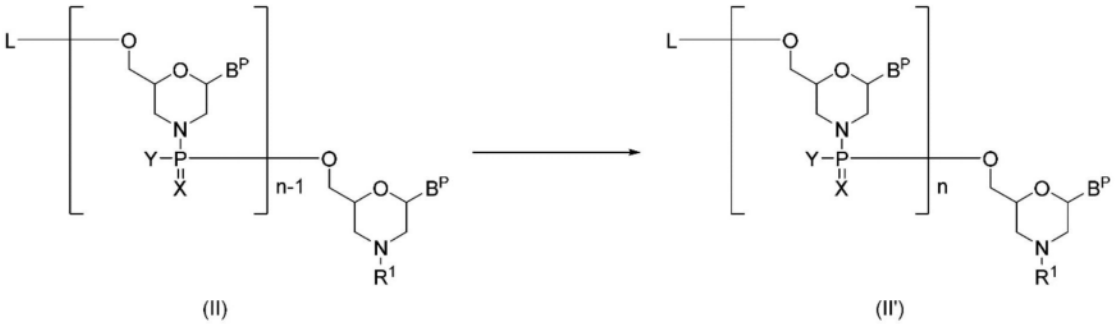
式(VIII)中,B^P、X、Y、Z及R^1如上所述。

8.一种吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,在吗啉基核酸低聚物的延伸反应中包括下述工序:

将式(II)的化合物用含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物的工序;

对于式(III)的化合物、式(VIII)的化合物,用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理的工序,

所述吗啉基核酸低聚物的延伸反应为:



(II) (II')

式中,

B^P独立地为任选被保护的核酸碱基;

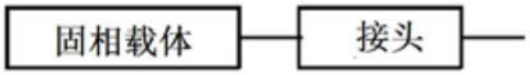
R^1为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

X为O或S;

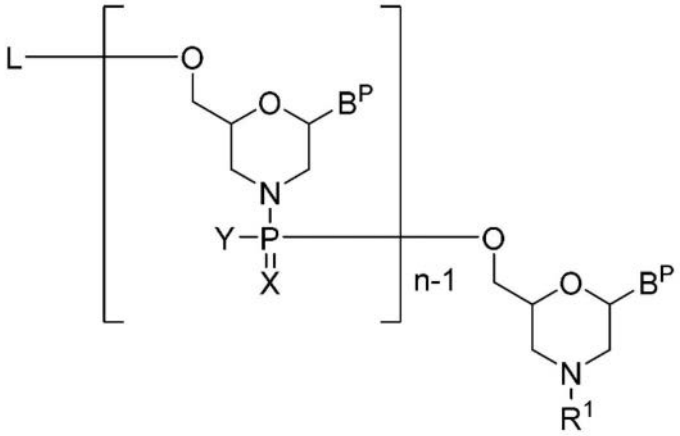
Y为二烷基氨基或烷氧基;

n为处于1~99的范围内的任意整数,优选为处于15~30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18~28的范围内的任意整数;

L为氢、酰基或式(IV)所示的基团,

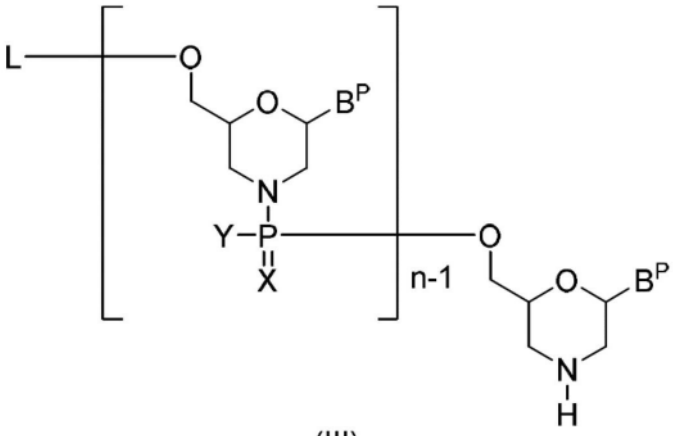


(IV)



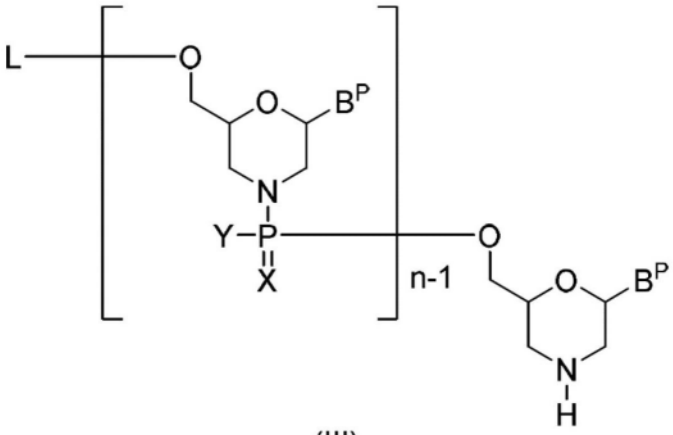
(II)

式(II)中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述,



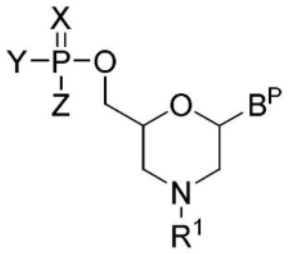
(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述,



(III)

式(III)中,L、B^P、X、Y及n如上所述,



(VIII)

式(VIII)中,B^P、X、Y、Z及R^1如上所述。

9.根据权利要求1～8中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,所述含有酸及捕捉剂的溶液为含有三氟乙酸及三异丙基硅烷的溶液。

10.根据权利要求1～9中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,所述含有酸及捕捉剂的溶液为含有三氟乙酸、三乙基胺、三异丙基硅烷、2,2,2-三氟乙醇及二氯甲烷的溶液。

11.根据权利要求1～9中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,所述含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液为N-乙基吗啉及1,3-二甲基-2-咪唑啉酮。

12.根据权利要求1～11中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,所述固相载体为溶胀性聚苯乙烯、非溶胀性聚苯乙烯、PEG链结合型聚苯乙烯、可控微孔玻璃、草酰化-可控微孔玻璃、TentaGel支撑体-氨基聚乙二醇衍生物化支撑体或Poros-聚苯乙烯/二乙烯基苯的共聚物。

13.根据权利要求1～12中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,所述接头为短链亚烷基、长链亚烷基、氨基-短链亚烷基、氨基-长链亚烷基、二酰基短链亚烷基(例如琥珀酰基)、二酰基长链亚烷基或二亚烷基磺酰基。

低聚核酸化合物的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新的低聚核酸化合物的制造方法。

背景技术

[0002] 作为低聚核酸化合物的制造方法,已知有固相法和液相法。固相法是一边使固相载体所负载的底物与包含反应试剂的溶液接触、一边使核酸延伸的非均相体系的反应方法。固相法使用利用带过滤器的反应容器、并且在容器内进行反应的所谓间歇法(例如,参照非专利文献1、专利文献1。)。另外,还已知核酸自动合成机(例如DNA、RNA合成仪)之类的、将固相载体装入柱中并向该柱中通入包含反应试剂的溶液而进行反应的模拟流动合成法。

[0003] 另一方面,液相法是在包含底物和反应试剂这两者的溶液中进行反应而使核酸延伸的均相体系的反应方法。液相法也使用在容器内进行反应的间歇法(例如,参照专利文献2、专利文献3。)

[0004] 在固相法、液相法、间歇法、模拟流动合成法中的任一方法中,低聚核酸化合物的化学合成方法均是通过反复多次进行“脱保护”反应和“缩合”反应而使核酸逐渐延伸的,所述“脱保护”反应是除去核酸化合物上的氧原子或氨基的保护基的反应,所述“缩合”反应是使脱保护后可进行反应的氧原子或氮原子与磷原子形成键的反应。

[0005] 将低聚核酸化合物用作药品原料时,要求低聚核酸化合物为高纯度,因此,在延伸反应的各工序中,需要抑制副产物的生成且提高反应效率及反应速度,但是由于受到可使用的溶剂、试剂的限制而较为困难。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:国际公开公报第1991/09033A1

[0009] 专利文献2:国际公开公报第2014/077292A1

[0010] 专利文献3:国际公开公报第2013/122236A1

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Acc.Chem.Res.,Vol.24,278-284,1991

发明内容

[0013] 发明要解决的问题

[0014] 低聚核酸化合物的延伸反应中,由于反复进行脱保护反应和缩合反应,因此会生成复杂的杂质。本发明的目的在于,确定对低聚核酸化合物的纯度造成影响的杂质,提供可控制该杂质的生成的新的制造方法。

[0015] 用于解决问题的方案

[0016] 本发明人们通过对低聚核酸化合物的延伸反应中缩合前的反应原料及中间体的处理进行深入研究,从而发现了高效地进行脱保护反应及缩合反应、进而通过缩合反应的前处理而产生的杂质会对低聚核酸化合物的纯度造成影响,至此完成了本发明。

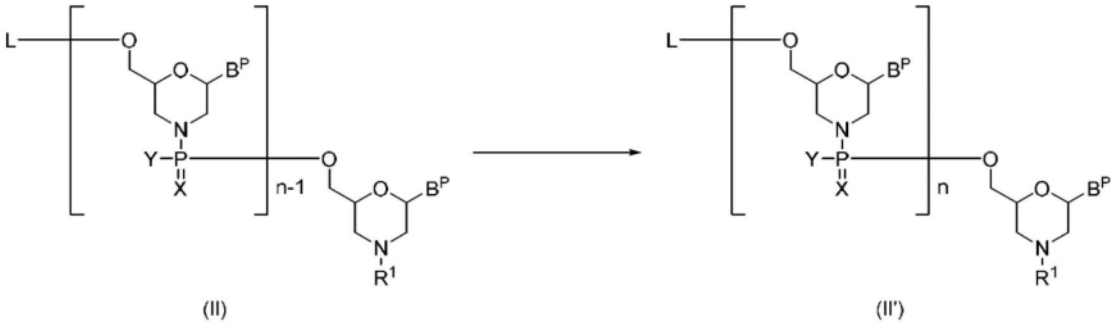
[0017] 即,本发明涉及以下。

[0018] <1>

[0019] 一种吗啉基核酸低聚物的制造方法,在吗啉基核酸低聚物的延伸反应中包括下述工序:

[0020] 将式(II)的化合物用含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物,

[0021] 所述吗啉基核酸低聚物的延伸反应为:

[0022] 

[0023] [式中,

[0024] B^P独立地为任选被保护的核酸碱基;

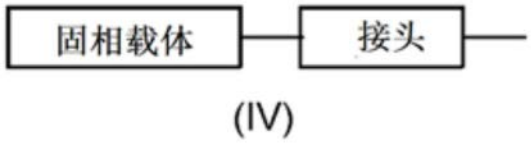
[0025] R^1为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

[0026] X为O或S;

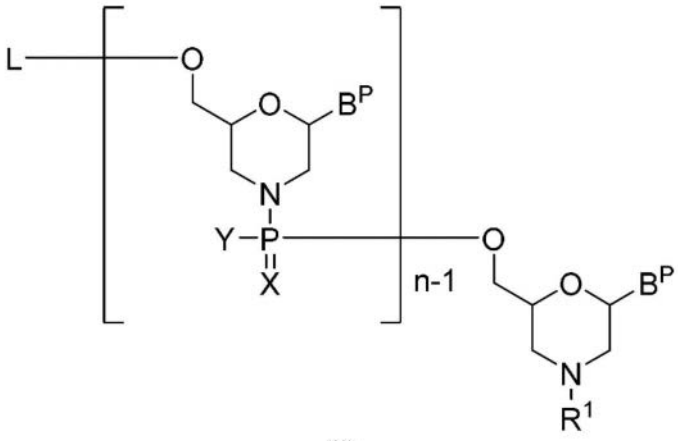
[0027] Y为二烷基氨基或烷氧基;

[0028] n为处于1~99的范围内的任意整数,优选为处于15~30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18~28的范围内的任意整数;

[0029] L为氢、酰基或式(IV)所示的基团,

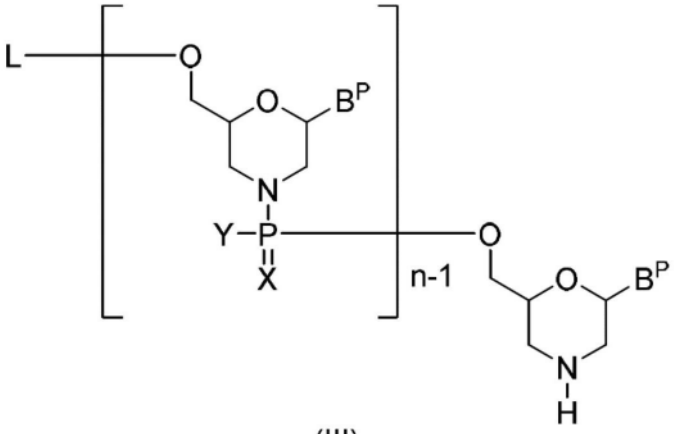


(IV)

[0030] 

(II)

[0031] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0032] 

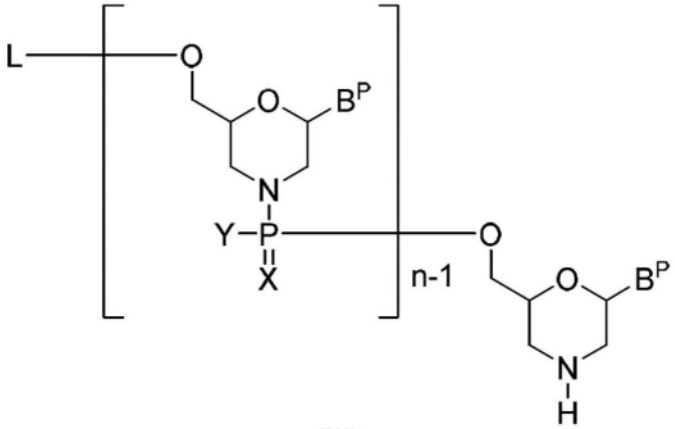
(III)

[0033] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0034] <2>

[0035] 根据<1>所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

[0036] 将式(III)的化合物用含有碱、醇类及卤素溶剂的溶液进行处理,

[0037] 

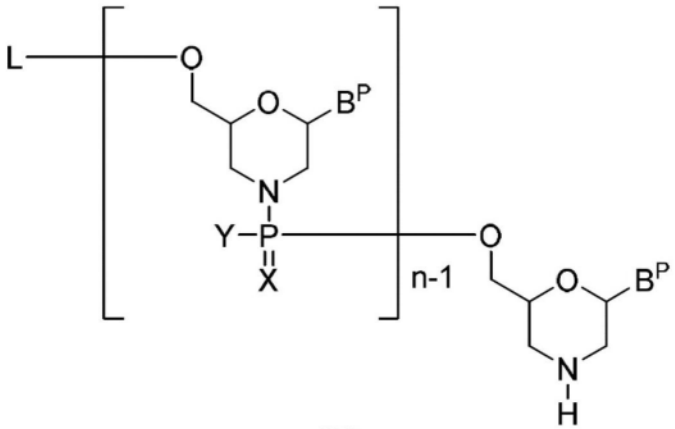
(III)

[0038] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0039] <3>

[0040] 根据<1>或<2>所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

[0041] 将式(III)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理,

[0042] 

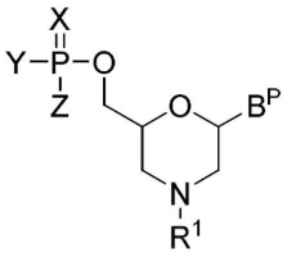
(III)

[0043] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0044] <4>

[0045] 根据<1>～<3>中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

[0046] 将式(VIII)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理,

[0047] 

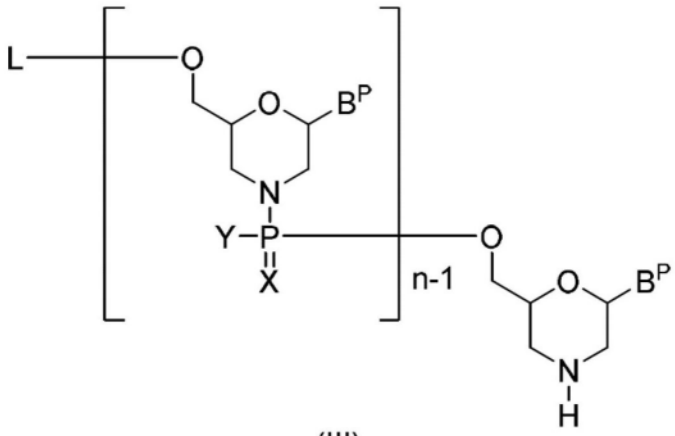
(VIII)

[0048] [式中,B^P、X、Y及R^1如上所述,Z为卤素(例如氯、溴、碘)]。

[0049] <5>

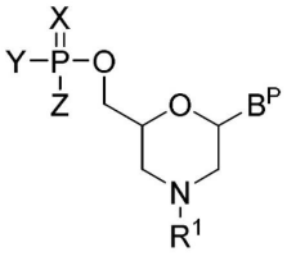
[0050] 根据<1>～<4>中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

[0051] 在有机胺的存在下使式(III)的化合物和式(VIII)的化合物反应而形成式(II')的化合物,

[0052] 

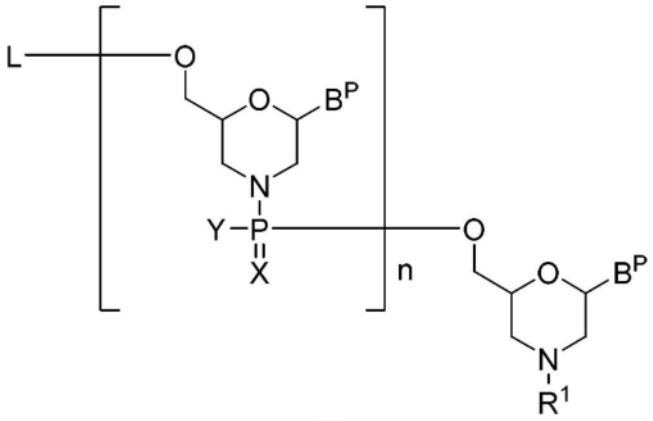
(III)

[0053] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0054] 

(VIII)

[0055] [式中,X、Y、Z、B^P及R^1如上所述]

[0056] 

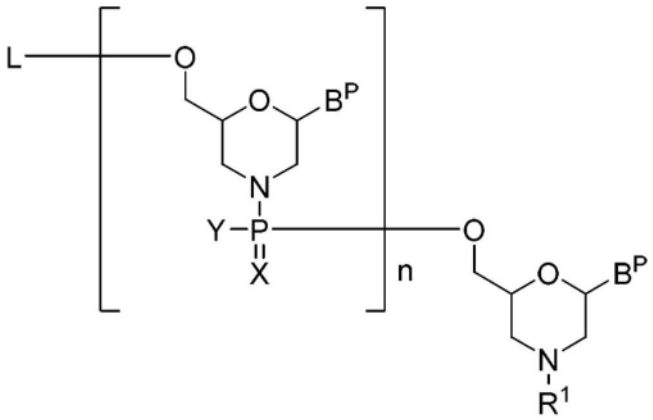
(II')

[0057] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0058] <6>

[0059] 根据<1>~<5>中任一项所述的制造方法,其中,还包括下述工序:

[0060] 将式(II')的化合物用含有醇类和/或卤素溶剂的溶液进行处理,

[0061] 

(II')

[0062] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0063] <7>

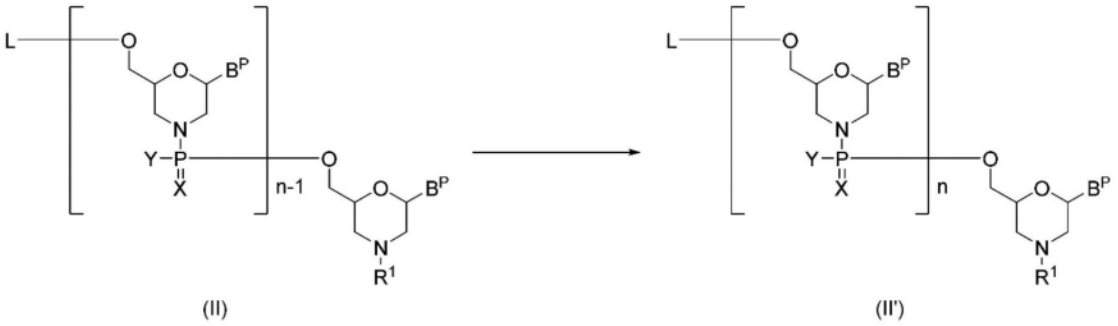
[0064] 一种吗啉基核酸低聚物的制造方法,在吗啉基核酸低聚物的延伸反应中包括下述工序:

[0065] 将式(II)的化合物用含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物的工序;

[0066] 将式(III)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理的工序;并且

[0067] 将式(VIII)的化合物用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理的工序,

[0068] 所述吗啉基核酸低聚物的延伸反应为:

[0069] 

(II) (II')

[0070] [式中,

[0071] B^P独立地为任选被保护的核酸碱基;

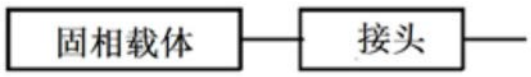
[0072] R^1为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

[0073] X为O或S;

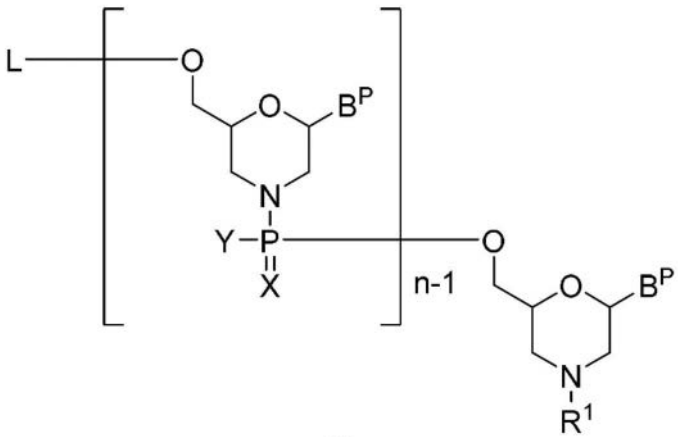
[0074] Y为二烷基氨基或烷氧基;

[0075] n为处于1～99的范围内的任意整数,优选为处于15～30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18～28的范围内的任意整数;

[0076] L为氢、酰基或式(IV)所示的基团,

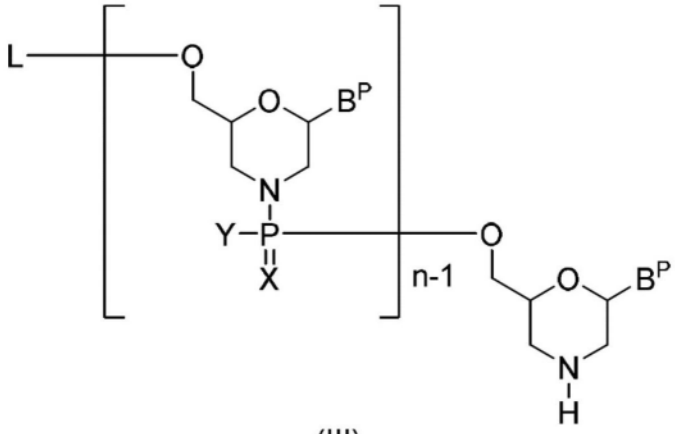


(IV)]

[0077] 

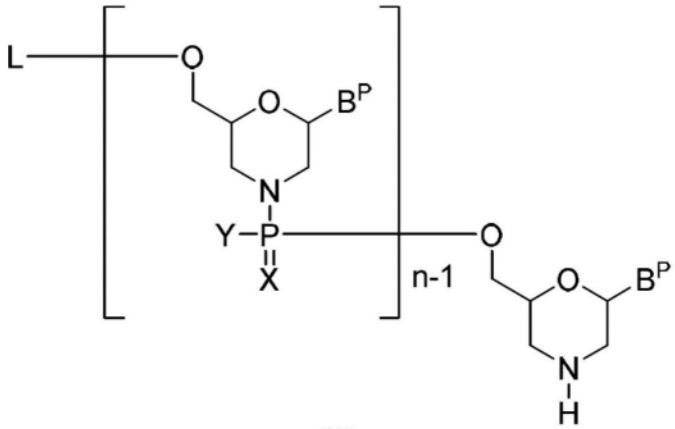
(II)

[0078] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0079] 

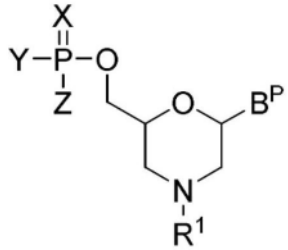
(III)

[0080] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0081] 

(III)

[0082] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0083] 

(VIII)

[0084] [式中,B^P、X、Y、Z及R^1如上所述]。

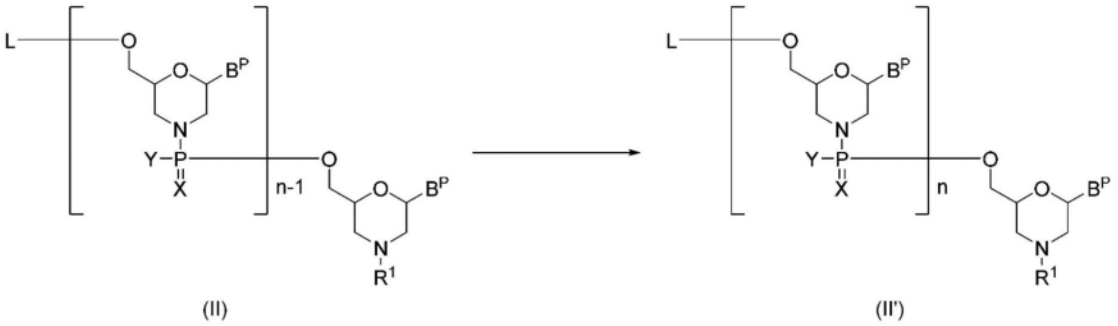
[0085] <8>

[0086] 一种吗啉基核酸低聚物的制造方法,在吗啉基核酸低聚物的延伸反应中包括下述工序:

[0087] 将式(II)的化合物用含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物的工序;

[0088] 对于式(III)的化合物、式(VIII)的化合物,用含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理的工序,

[0089] 所述吗啉基核酸低聚物的延伸反应为:

[0090] 

[0091] [式中,

[0092] B^P独立地为任选被保护的核酸碱基;

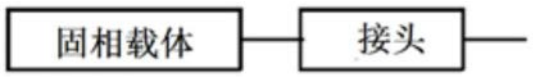
[0093] R^1为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

[0094] X为O或S;

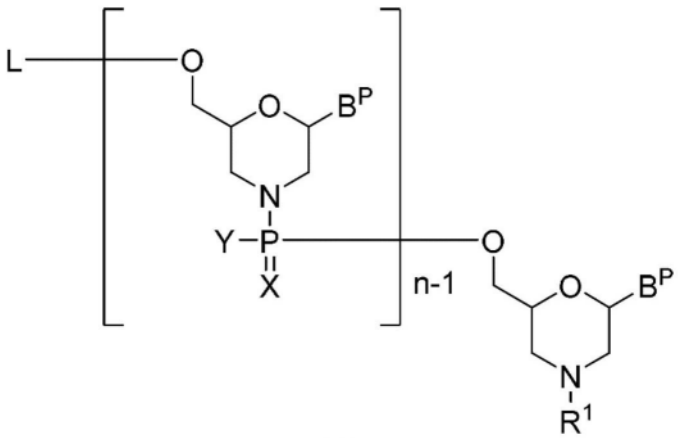
[0095] Y为二烷基氨基或烷氧基;

[0096] n为处于1～99的范围内的任意整数,优选为处于15～30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18～28的范围内的任意整数;

[0097] L为氢、酰基或式(IV)所示的基团,

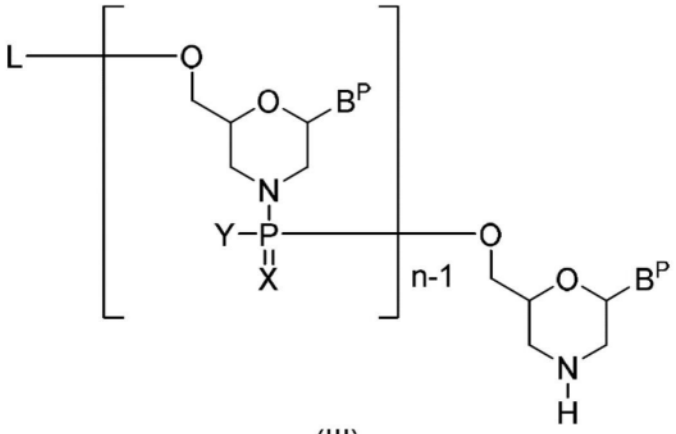
[0098] 

(IV)]

[0099] 

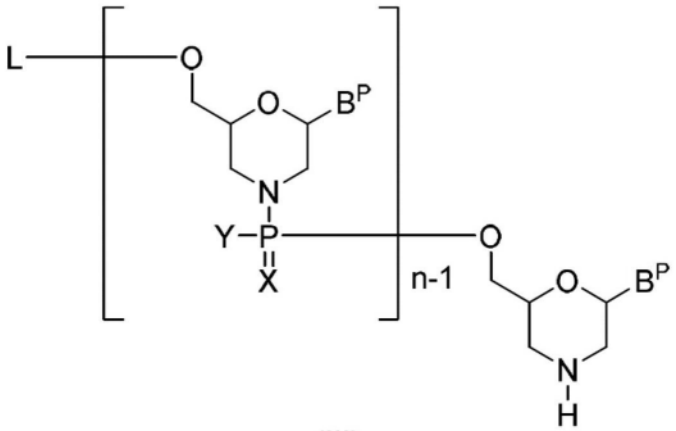
(II)

[0100] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0101] 

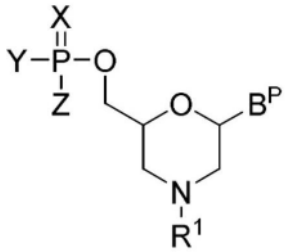
(III)

[0102] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0103] 

(III)

[0104] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0105] 

(VIII)

[0106] [式中,B^P、X、Y、Z及R^1如上所述]。

[0107] <9>

[0108] 根据<1>~<8>中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,上述含有酸及捕捉剂的溶液为含有三氟乙酸及三异丙基硅烷的溶液。

[0109] <10>

[0110] 根据<1>~<9>中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,上述含有酸及捕捉剂的溶液为含有三氟乙酸、三乙基胺、三异丙基硅烷、2,2,2-三氟乙醇及二氯甲烷的溶液。

[0111] <11>

[0112] 根据<1>~<9>中任一项所述的吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,上述含

有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液为N-乙基吗啉及1,3-二甲基-2-咪唑啉酮。

[0113] ＜12＞

[0114] 根据＜1＞～＜11＞中任一项所述的制造方法,其中,上述固相载体为溶胀性聚苯乙烯、非溶胀性聚苯乙烯、PEG链结合型聚苯乙烯、可控微孔玻璃、草酰化-可控微孔玻璃、TentaGel支撑体-氨基聚乙二醇衍生物化支撑体或Poros-聚苯乙烯/二乙烯基苯的共聚物。

[0115] ＜13＞

[0116] 根据＜1＞～＜12＞中任一项所述的制造方法,其中,上述接头为短链亚烷基、长链亚烷基、氨基-短链亚烷基、氨基-长链亚烷基、二酰基短链亚烷基(例如琥珀酰基)、二酰基长链亚烷基或二亚烷基磺酰基。

[0117] 发明的效果

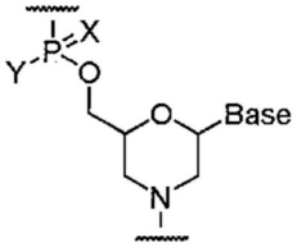
[0118] 本发明可以经济、高收率、高纯度地制造吗啉基核酸低聚物。

具体实施方式

[0119] 以下对本发明的详细情况进行说明。

[0120] ＜吗啉基核酸低聚物＞

[0121] 作为本发明的一个方式,吗啉基核酸低聚物是以式:

[0122] 

[0123] [式中,Base表示核酸碱基,X、Y如上所述]

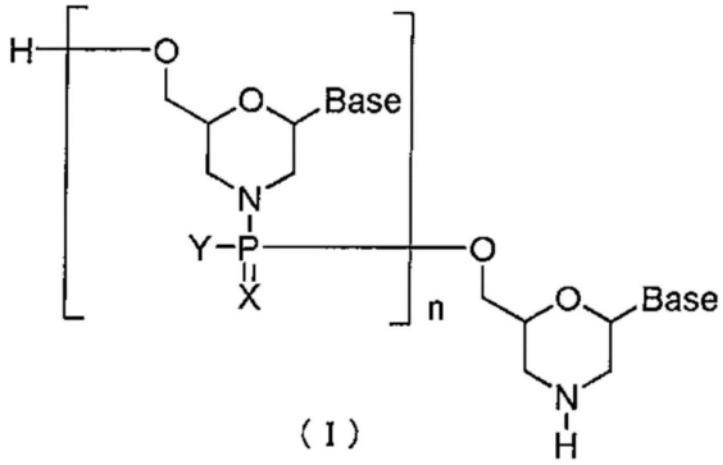
[0124] 所示的基团为结构单元的低聚物。

[0125] ＜核酸碱基＞

[0126] 本发明的一个方式中,“核酸碱基”可列举例如腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶或它们的修饰碱基。作为所述修饰碱基,可列举例如假尿嘧啶、3-甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、5-烷基胞嘧啶(例如5-甲基胞嘧啶)、5-烷基尿嘧啶(例如5-乙基尿嘧啶)、5-卤代尿嘧啶(例如,5-溴尿嘧啶、5-氟尿嘧啶)、6-氮杂嘧啶、6-烷基嘧啶(例如,6-甲基尿嘧啶)、2-硫代尿嘧啶、4-硫代尿嘧啶、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5’-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、1-甲基腺嘌呤、1-甲基次黄嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、N^6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲基羰基甲基尿嘧啶、5-甲基氧基尿嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、2-甲硫基-N^6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸、2-硫代胞嘧啶、嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、异鸟嘌呤、吲哚、咪唑、黄嘌呤,但是不限于这些。其中,Base所涉及的核酸碱基的氨基或羟基任选被保护。

[0127] ＜吗啉基核酸低聚物的制造方法＞

[0128] 本发明的一个方式为式(I)的吗啉基核酸低聚物(以下称为吗啉基核酸低聚物(I)。)的制造方法,

[0129] 

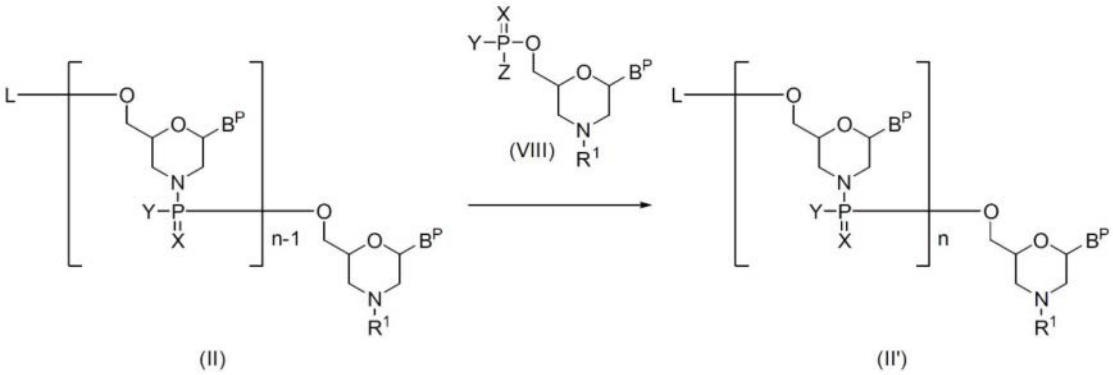
(I)

[0130] [式中,

[0131] Base、X、Y与上述含义相同;

[0132] n为处于1～99的范围内的任意整数,优选为处于15～30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18～28的范围内的任意整数]。

[0133] 本发明的一个方式为吗啉基核酸低聚物的制造方法,其包括使式(II)的化合物与式(VIII)的化合物反应而得到式(II')的化合物的吗啉基核酸低聚物的延伸反应,

[0134] 

(II) (VIII) (II')

[0135] [式中,

[0136] B^P独立地为任选被保护的核酸碱基;

[0137] R^1为三苯甲基、单甲氧基三苯甲基或二甲氧基三苯甲基;

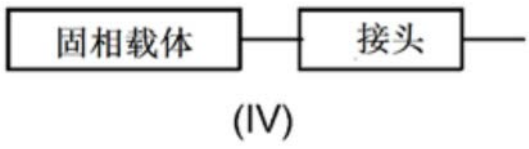
[0138] X为O或S;

[0139] Y为OH、低级烷氧基、单低级烷基氨基或二低级烷基氨基;

[0140] Z为卤素(例如氯、溴、碘);

[0141] n为处于1～99的范围内的任意整数,优选为处于15～30的范围内的任意整数,进一步优选为处于18～28的范围内的任意整数;

[0142] L为氢、酰基或式(IV)所示的基团,

[0143] 

(IV)

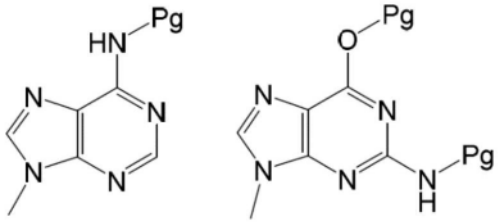
]。

[0144] 本发明的一个方式中,任选被保护的核酸碱基包括例如未被保护的“核酸碱基”及被保护的“核酸碱基”这两者,可列举例如氨基和/或羟基未被保护或被保护的腺嘌呤、鸟嘌

呤、次黄嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶等。

[0145] 本发明的一个方式中,氨基的保护基只要为可用作核酸的保护基的基团则没有特别限制,具体而言,可列举例如苯甲酰基、4-甲氧基苯甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、苯基乙酰基、苯氧基乙酰基、4-叔丁基苯氧基乙酰基、4-异丙基苯氧基乙酰基、(二甲基氨基)亚甲基。作为氨基的保护基,优选苯甲酰基、乙酰基、苯氧基乙酰基、4-叔丁基苯氧基乙酰基。作为羟基的保护基,可列举例如2-氰乙基、4-硝基苯乙基、苯磺酰基乙基、甲磺酰基乙基、三甲基甲硅烷基乙基、任选在可取代的任意位置被1～5个吸电子基团取代的苯基、二苯基氨甲酰基、二甲基氨甲酰基、二乙基氨甲酰基、甲基苯基氨甲酰基、1-吡咯烷基氨甲酰基、吗啉基氨甲酰基、4-(叔丁基羧基)苄基、4-[(二甲基氨基)羧基]苄基、4-(苯基羧基)苄基(例如,参照国际公开公报第2009/064471A1。)。作为羟基的保护基,优选2-氰乙基、4-硝基苯乙基、4-(叔丁基羧基)苄基。鸟嘌呤的6位羟基的保护基优选2-氰乙基。

[0146] 本发明的一个方式中,被保护的核酸碱基可列举例如下式的基团:

[0147] 

[0148] [式中,Pg表示保护基]。

[0149] 本发明的一个方式中,被保护的核酸碱基可列举例如氨基被苯甲酰基保护的腺嘌呤(A^{Bz})、氨基被苯甲酰基保护的胞嘧啶(C^{Bz})、羟基被2-氰基乙基保护且氨基被苯氧基乙酰基保护的鸟嘌呤(G^{CE})等,但是不限于这些。

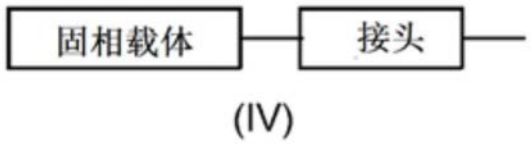
[0150] 本发明的一个方式中,固相载体只要是例如可用于核酸的固相反应的载体则没有特别限制,理想的是例如:(i)几乎不溶于吗啉基核酸低聚物的合成中可使用的试剂(例如二氯甲烷、乙腈、N-乙基吗啉、N,N-二异丙基乙基胺、N-甲基咪唑、吡啶、乙酸酐、2,6-二甲基吡啶、2,4-二甲基吡啶、三氟乙酸);(ii)相对于吗啉基核酸衍生物的合成中可使用的试剂而言化学上稳定;(iii)可进行化学修饰;(iv)可装填所期望的吗啉基核酸衍生物;(v)具有足以耐受处理中所施加的高压的强度,(vi)为一定的粒径范围和分布。

[0151] 本发明的一个方式中,固相载体可列举例如:溶胀性聚苯乙烯(例如氨基甲基聚苯乙烯树脂1%二乙烯基苯交联(200～400目)(2.4～3.0mmol/g)(东京化成公司制)、氨基甲基化聚苯乙烯树脂·HCl[二乙烯基苯1%,100～200目](PEPTIDE INSTITUTE,INC.制)、氨基甲基化树脂[聚苯乙烯1%二乙烯基苯共聚物,200-400目](渡边化学工业公司制))、非溶胀性聚苯乙烯(例如Primer Support(GE Healthcare公司制))、PEG链结合型聚苯乙烯(例如NH2-PEG树脂(渡边化学工业公司制)、TentaGel resin)、可控微孔玻璃(controlled pore glass;CPG)(例如CPG公司制)、草酰化-可控微孔玻璃(例如,参照Alul等,Nucleic

Acids Research,Vol.19,1527(1991))、TentaGel支撑体-氨基聚乙二醇衍生物化支撑体(例如,参照Wright等,Tetrahedron Letters,Vol.34,3373(1993))、Poros-聚苯乙烯/二乙烯基苯的共聚物。

[0152] 本发明的一个方式中,接头可以使用用于连结核酸、吗啉基核酸衍生物的公知接头,可列举例如短链亚烷基、长链亚烷基、氨基-短链亚烷基、氨基-长链亚烷基、二酰基短链亚烷基(例如琥珀酰基)、二酰基长链亚烷基、二亚烷基磺酰基,优选可列举3-氨基丙基、琥珀酰基、2,2'-二乙醇磺酰基、长链烷基氨基(LCAA)。

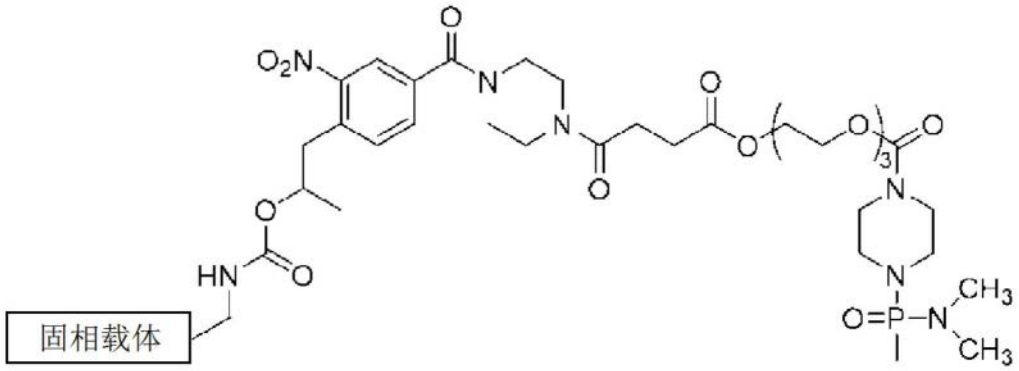
[0153] 本发明的一个方式中,L是式(IV)所示的基团,可以是式(IV-1)所示的基团或式(IV-2)所示的基团。



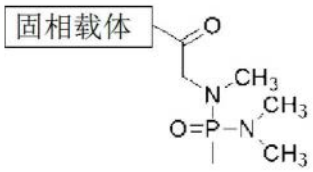
(IV)

式(IV-1):

[0154]

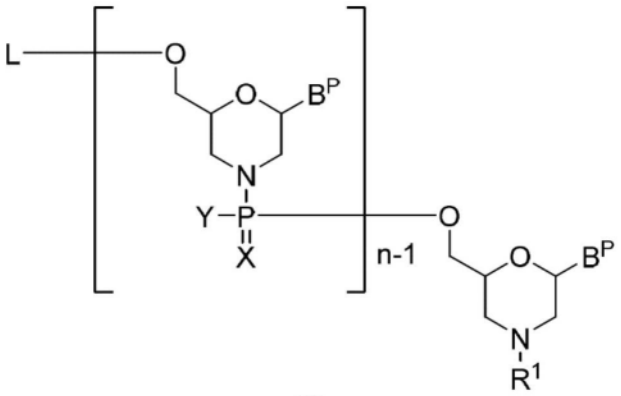


式(IV-2):



。

[0155] 本发明的一个方式中,式(II)的化合物可以用该技术领域中公知的方法来制备(例如,参照WO2012/043730)。

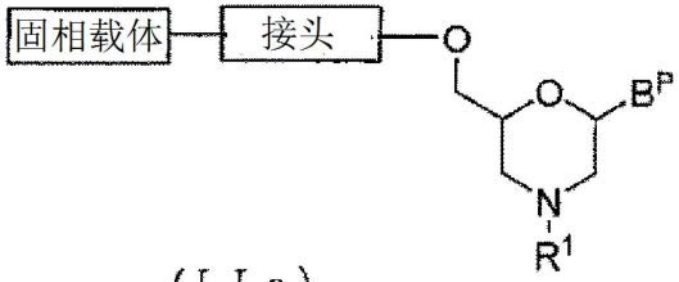
[0156] 

(II)

[0157] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0158] ＜与固相、接头的结合＞

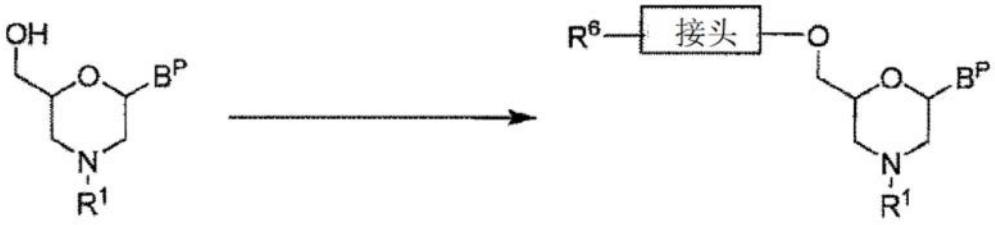
[0159] 作为本发明的一个方式,可以包括化合物(II)中n为1、L为式(IV)所示的基团的式(IIa)的化合物(以下称为化合物(IIa)。)的制造工序,

[0160] 

(IIa)

[0161] [式中,B^P、R^1、接头、固相载体如上所述]。

[0162] 作为本发明的一个方式,可以包括下述工序:通过使酰基化剂作用于式(V)的化合物来制造式(VI)的化合物(以下称为化合物(VI)。),

[0163] 

(V) (VI)

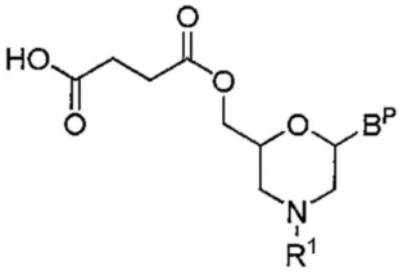
[0164] [式中,

[0165] B^P及R^1与上述含义相同,接头为二酰基短链亚烷基(例如琥珀酰基)、二酰基长链亚烷基、短链亚烷基、长链亚烷基或二亚烷基磺酰基,

[0166] R^6为羟基、卤素或氨基]。

[0167] 本工序可以通过以化合物(V)为起始原料并通过公知的接头导入反应来实施。

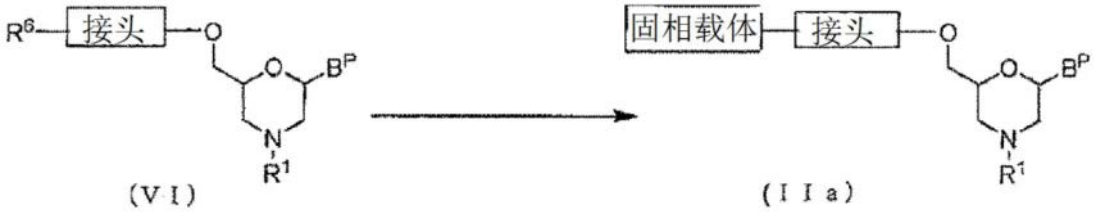
[0168] 作为本发明的一个方式,可以包括下述工序:通过使用化合物(V)和琥珀酸酐实施作为酯化反应而周知的方法,来制造式(VIa)的化合物,

[0169] 

(VIIa)

[0170] [式中,B^P、R^1如上所述]。

[0171] 作为本发明的一个方式,可以包括下述工序:使缩合剂等作用于化合物(VI),从而与固相载体反应而制造化合物(IIa),

[0172] 

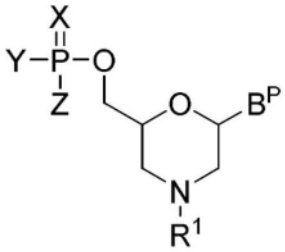
(VI) (IIa)

[0173] [式中,B^P、R^6、R^1、接头、固相载体如上所述]。

[0174] 本工序可以使用化合物(VI)和固相载体通过作为缩合反应而周知的方法来制造。

[0175] <原料>

[0176] 本发明的一个方式中,式(VIII)的化合物可以使用市售品或通过该技术领域公知的方法制备而使用,

[0177] 

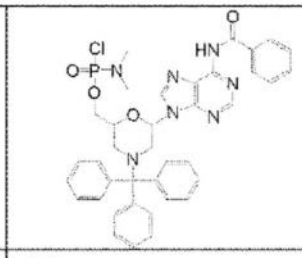
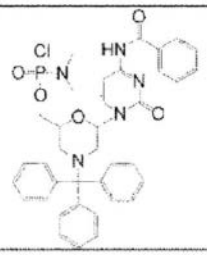
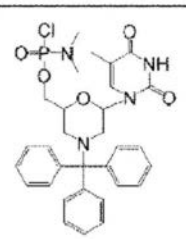
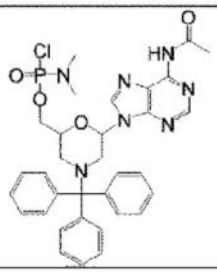
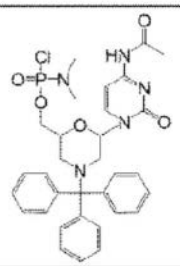
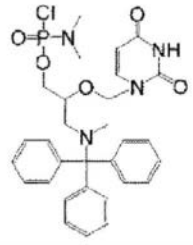
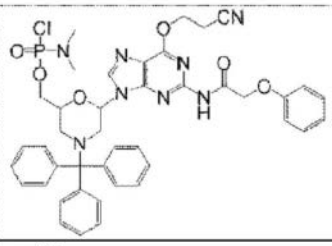
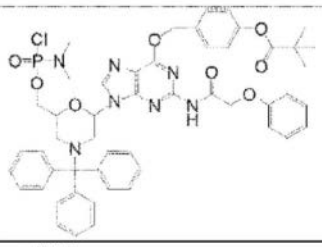
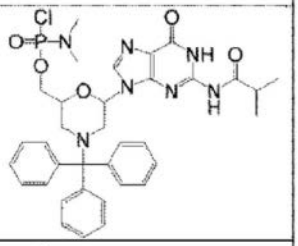
(VIII)

[0178] [式中,B^P、X、Y、Z及R^1如上所述]。

[0179] 本发明的一个方式中,式(VIII)的化合物可列举例如下述的表1中记载的化合物。

[0180] 【表1】

[0181]

结构式			
简称	A^p	C^p	T^p
结构式			
简称	A^a	C^a	U^p
结构式			
简称	G^{CE}	G^{POB}	G^i

[0182] 本发明的一个方式为吗啉基核酸低聚物的制造方法,在上述延伸反应中包括选自由下述工序组成的组中的至少一个工序:

[0183] <(1)脱保护工序前的清洗工序>、

[0184] <(2)脱保护工序>、

[0185] <(3)中和工序>、

[0186] <(4)中和工序后的清洗工序>、

[0187] <(5)缩合前的清洗工序>、

[0188] <(6)缩合工序>、

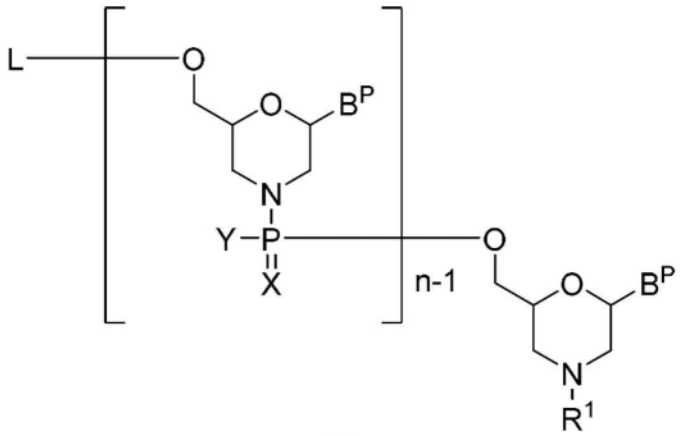
[0189] <(7)缩合工序后的清洗工序1>、及

[0190] <(8)缩合工序后的清洗工序2>。

[0191] 以下对(1)~(8)的工序进行说明。

[0192] <(1)脱保护工序前的清洗工序>

[0193] 本工序包括:将式(II)的化合物用(1)含有醇类和/或卤素溶剂的溶液进行处理,

[0194] 

(II)

[0195] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0196] ＜(1)的溶液＞

[0197] 一个实施方式中,上述工序(1)的溶液只要含有醇类和/或卤素溶剂则没有特别限定,可以使用例如选自由2,2,2-三氟乙醇、二氟乙醇、氯仿、二氯甲烷组成的组中的至少一种,可以优选使用2,2,2-三氟乙醇及二氯甲烷。

[0198] ＜(1)的溶液＞

[0199] 一个实施方式中,上述工序(1)的溶液中,可以相对于卤素溶剂以例如体积比0.01倍～100倍、优选0.1倍～2倍(v/v)使用醇类。

[0200] ＜(1)的溶液的用量＞

[0201] 一个实施方式中,上述工序(1)的溶液的用量没有特别限定,例如相对于化合物(II)1g以重量比计在例如1倍量～1000倍量的范围内,优选在2倍量～100倍量的范围内。

[0202] ＜(1)的处理时间＞

[0203] 一个实施方式中,上述工序(1)的时间没有特别限定,例如为0.1分钟～24小时、优选为1分钟～5小时、进一步优选为3分钟～1小时。

[0204] ＜(1)的处理温度＞

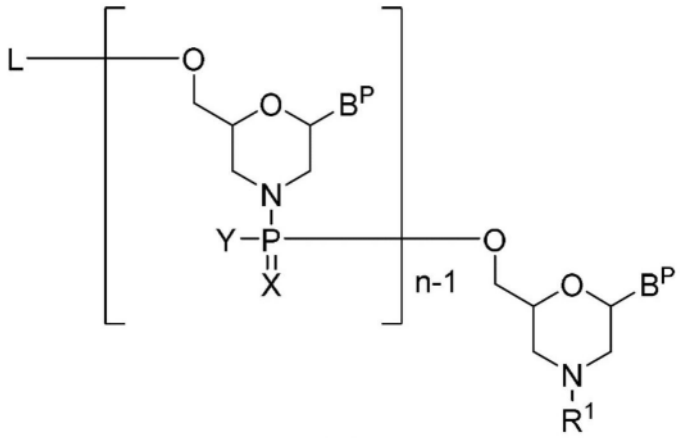
[0205] 一个实施方式中,上述工序(1)的温度没有特别限定,例如为0℃～40℃、优选为10℃～35℃、进一步优选为15℃～30℃。

[0206] ＜工序(1)的次数＞

[0207] 一个实施方式中,上述工序(1)的次数没有特别限定,例如为1～10次,优选为1～5次。

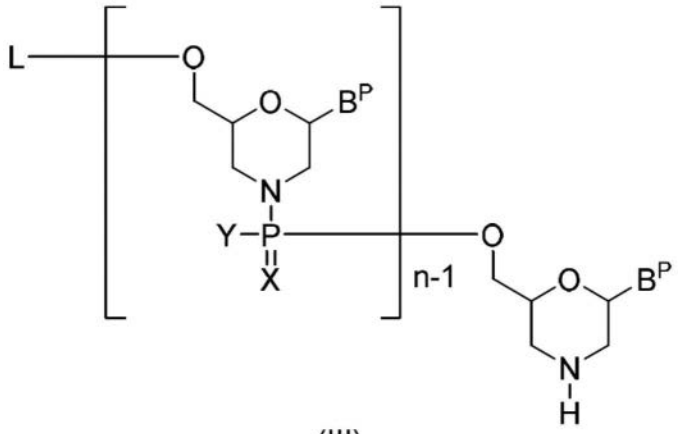
[0208] ＜(2)脱保护工序＞

[0209] 本工序包括下述工序:将式(II)的化合物用(2)含有酸及捕捉剂的溶液进行处理,从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物,

[0210] 

(II)

[0211] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0212] 

(III)

[0213] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0214] ＜(2)的酸＞

[0215] 一个实施方式中,酸可列举例如盐酸、三氟乙酸、二氯乙酸或三氯乙酸,优选为三氟乙酸。

[0216] ＜(2)的酸的用量＞

[0217] 一个实施方式中,酸的用量例如相对于化合物(II)1摩尔以摩尔比计在1倍量～500倍量的范围内,优选在2倍量～100倍量的范围内。

[0218] ＜(2)的酸的浓度＞

[0219] 一个实施方式中,酸也可以按照成为0.1%～30%的范围内的浓度的方式用合适的溶剂稀释而使用。

[0220] ＜稀释(2)的酸的溶剂＞

[0221] 一个实施方式中,使用的溶剂只要不参与反应则没有特别限定,可列举例如二氯甲烷、甲苯、乙腈、醇类(乙醇、异丙醇、2,2,2-三氟乙醇等)、水或这些的混合物。

[0222] ＜(2)的有机胺＞

[0223] 一个实施方式中,可以与上述酸一起使用“有机胺”。作为有机胺,没有特别限定,可列举例如三乙基胺、N,N-二异丙基乙基胺、N-乙基吗啉、吡啶等,优选为三乙基胺。

[0224] ＜(2)的有机胺的用量＞

[0225] 一个实施方式中,有机胺的用量例如相对于酸1摩尔以摩尔比计在0.01倍量～10

倍量的范围内,优选在0.1倍量～2倍量的范围内。

[0226] ＜(2)的酸与有机胺的比＞

[0227] 一个实施方式中,使用酸与有机胺的盐或混合物时,可列举例如三氟乙酸与三乙基胺的盐或混合物,可列举例如相对于三氟乙酸1.2当量混合有三乙基胺1当量的物质。

[0228] ＜(2)的捕捉剂＞

[0229] 一个实施方式中,捕捉剂例如为选自由醇类(可列举例如甲醇、乙醇、2,2,2-三氟乙醇)、硫醇类(巯基乙醇、二硫苏糖醇、巯基琥珀酸)、有机硅化合物(可列举例如三异丙基硅烷、三乙基硅烷、三甲基硅烷)及芳香族化合物(可列举例如1-羟基苯并三唑、吡咯、吲哚、茚香醚及硫代茚香醚)组成的组中的至少一种,优选为有机硅化合物。

[0230] ＜(2)的捕捉剂＞

[0231] 一个实施方式中,捕捉剂例如为选自由甲醇、乙醇、巯基乙醇、2,2,2-三氟乙醇、三异丙基硅烷、三乙基硅烷、三甲基硅烷、1-羟基苯并三唑、吡咯、吲哚、茚香醚及硫代茚香醚组成的组中的至少一种,优选为选自由三异丙基硅烷及乙醇组成的组中的一种,进一步优选为三异丙基硅烷。

[0232] ＜(2)的捕捉剂的用量＞

[0233] 一个实施方式中,捕捉剂的用量例如相对于化合物(II)1摩尔以摩尔比计在例如0.1倍量～1000倍量的范围内,优选在0.5倍量～100倍量的范围内,进一步优选在1倍～20倍量的范围内。

[0234] ＜(2)的反应时间＞

[0235] 一个实施方式中,反应时间例如在0.1分钟～24小时的范围内,优选在1分钟～3小时的范围内。

[0236] ＜(2)的反应温度＞

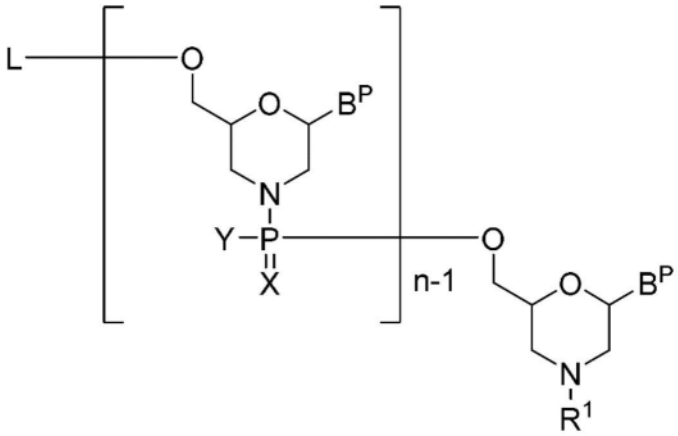
[0237] 一个实施方式中,反应温度优选在例如0℃～40℃的范围内,更优选在10℃～35℃的范围内,进一步优选在15℃～30℃的范围内。

[0238] ＜工序(2)的次数＞

[0239] 一个实施方式中,上述工序(2)的次数没有特别限定,例如为1～10次,优选为1～8次。

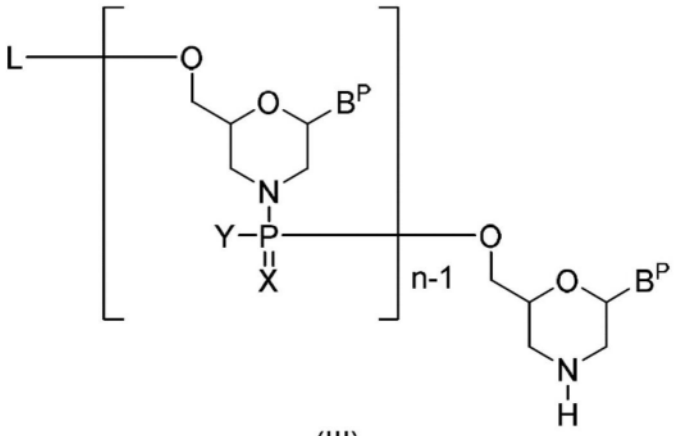
[0240] ＜(1)脱保护前的清洗和(2)脱保护的连续反应＞

[0241] 本发明的一个实施方式中,可以将式(II)的化合物用(1)含有醇类和/或卤素溶剂的溶液进行处理,接着,用(2)含有酸及捕捉剂的溶液进行处理而除去R^1,形成式(III)的化合物,

[0242] 

(II)

[0243] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0244] 

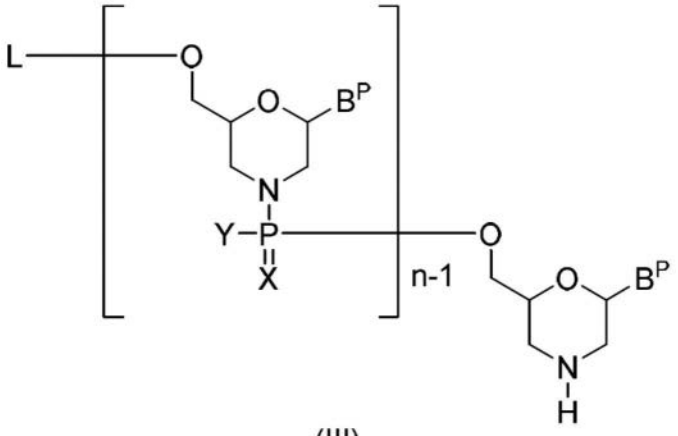
(III)

[0245] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0246] 工序(1)及(2)如上述记载那样可以适当组合。

[0247] <(3)中和工序>

[0248] 本工序包括:将式(III)的化合物用(3)含有碱及溶剂(醇类及卤素溶剂)的溶液进行处理,

[0249] 

(III)

[0250] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0251] <(3)的碱>

[0252] 一个实施方式中,碱只要不会对保护基造成影响则没有特别限定,可列举例如三乙基胺、N,N-二异丙基乙基胺、吡啶等,优选为N,N-二异丙基乙基胺。

[0253] ＜(3)的碱的用量＞

[0254] 一个实施方式中,碱的用量可以以成为0.1%(v/v)～30%(v/v)的范围内的浓度的方式用合适的溶剂稀释而使用。

[0255] ＜(3)的溶液的用量＞

[0256] 一个实施方式中,上述工序(3)的溶液的用量没有特别限定,例如相对于化合物(III)1g以重量比计在例如1倍量～1000倍量的范围内,优选在2倍量～100倍量的范围内。

[0257] ＜(3)的溶剂＞

[0258] 一个实施方式中,溶剂为选自由醇类、卤素溶剂、极性溶剂、醚系溶剂及这些的混合物组成的组中的至少一种,优选为醇类及卤素溶剂的混合物。

[0259] 一个实施方式中,醇类为乙醇、异丙醇、2,2,2-三氟乙醇等,优选为异丙醇。

[0260] 一个实施方式中,卤素溶剂为氯仿、二氯甲烷、四氯乙烷及四氯乙烯等,优选为二氯甲烷。

[0261] 一个实施方式中,极性溶剂为乙腈、二甲基亚砜等。

[0262] 一个实施方式中,醚系溶剂为四氢呋喃、环戊基甲基醚等。

[0263] ＜(3)的反应时间＞

[0264] 一个实施方式中,反应时间根据使用的碱的种类、反应温度而不同,例如在0.1分钟～24小时的范围内,优选在1分钟～5小时的范围内。

[0265] ＜(3)的反应温度＞

[0266] 一个实施方式中,反应温度例如优选在0℃～40℃的范围内,更优选在1℃～35℃的范围内,进一步优选在3℃～20℃的范围内。

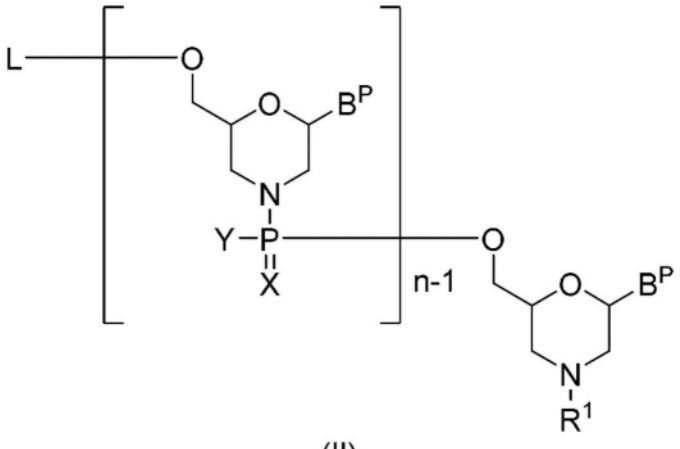
[0267] ＜工序(3)的次数＞

[0268] 一个实施方式中,上述工序(3)的次数没有特别限定,例如为1～10次,优选为1～5次。

[0269] ＜(2)脱保护和(3)中和的连续反应＞

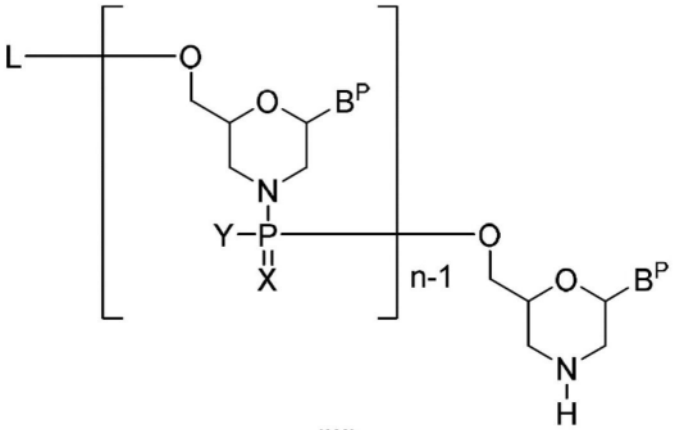
[0270] 本发明的一个实施方式中,可以将式(II)的化合物用(2)含有酸及捕捉剂的溶液进行处理而除去R^1,形成式(III)的化合物,接着将式(III)的化合物用(3)含有碱及溶剂(醇类及卤素溶剂)的溶液进行处理,

[0271]



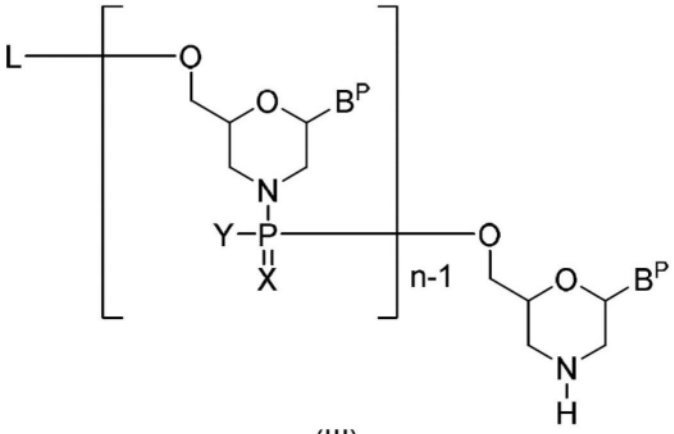
(II)

[0272] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0273] 

(III)

[0274] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0275] 

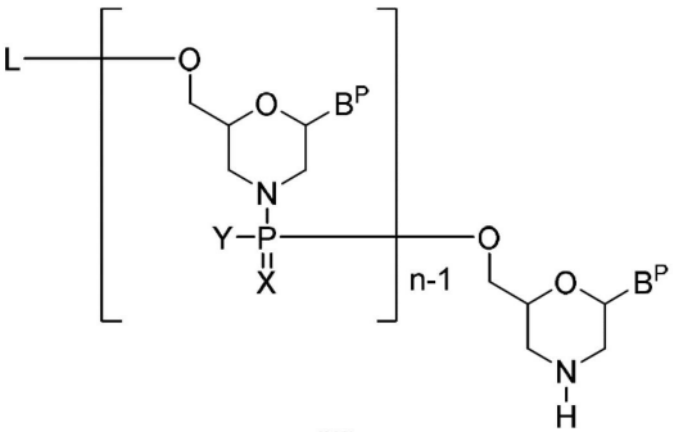
(III)

[0276] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0277] 工序(2)及(3)如上述记载那样可以适当组合。

[0278] <(4)中和工序后的清洗工序>

[0279] 本工序包括:将式(III)的化合物用(4)含有卤素溶剂的溶液进行处理,

[0280] 

(III)

[0281] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0282] <(4)的溶液>

[0283] 一个实施方式中,上述工序(4)的溶液只要含有卤素溶剂则没有特别限定,例如,

可以使用选自由氯仿、二氯甲烷、四氯乙烷及四氯乙烯组成的组中的至少一种，优选为二氯甲烷。

[0284] ＜(4)的溶液的用量＞

[0285] 一个实施方式中，上述工序(4)的溶液的用量没有特别限定，例如相对于化合物(III)1g以重量比计在1倍量～1000倍量的范围内，优选在2倍量～100倍量的范围内。

[0286] ＜(4)的处理时间＞

[0287] 一个实施方式中，上述工序(4)的时间没有特别限定，例如为0.1分钟～2小时、优选为1分钟～60分钟、进一步优选为3分钟～30分钟。

[0288] ＜(4)的处理温度＞

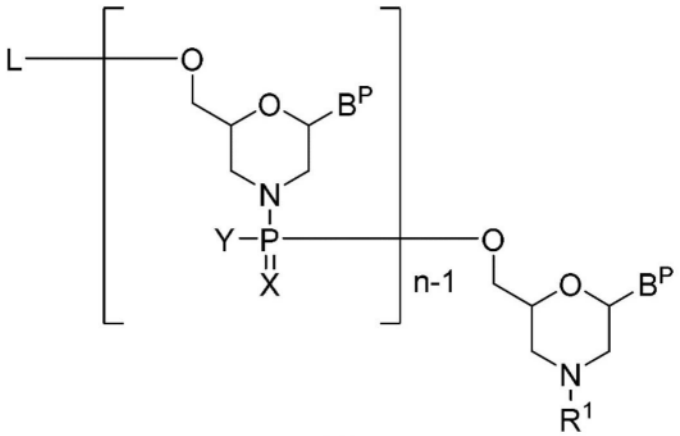
[0289] 一个实施方式中，上述工序(4)的温度没有特别限定，例如为0℃～35℃、优选为10℃～30℃、进一步优选为15℃～25℃。

[0290] ＜工序(4)的次数＞

[0291] 一个实施方式中，上述工序(4)的次数没有特别限定，例如为1～10次，优选为1～5次。

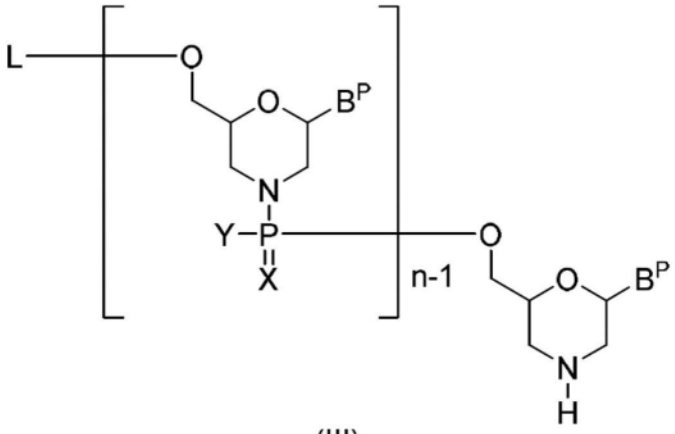
[0292] ＜(2)脱保护、(3)中和、(4)中和后的清洗的连续反应＞

[0293] 本发明的一个实施方式中，可以将式(II)的化合物用(2)含有酸及捕捉剂的溶液进行处理，从式(II)的化合物中除去R^1而形成式(III)的化合物，接着，将式(III)的化合物用(3)含有碱及溶剂(醇类及卤素溶剂)的溶液进行处理，再用(4)含有卤素溶剂的溶液进行处理，

[0294] 

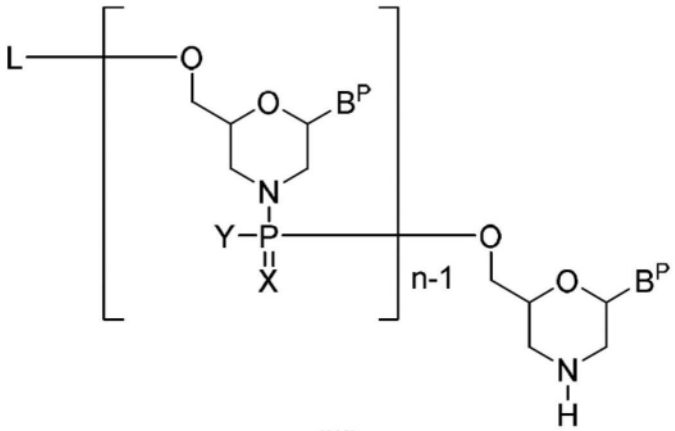
(II)

[0295] [式中，L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0296] 

(III)

[0297] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]

[0298] 

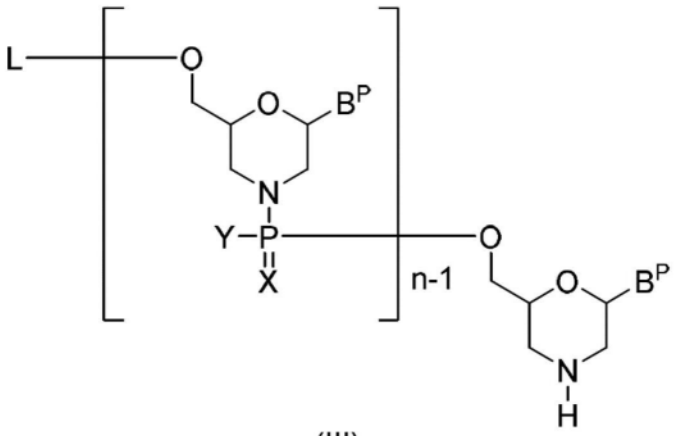
(III)

[0299] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0300] 工序(1)、(2)、(3)如上述记载那样可以适当组合。

[0301] ＜(5)缩合前的清洗工序＞

[0302] 本工序包括:将式(III)的化合物用(5)含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理,

[0303] 

(III)

[0304] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]。

[0305] ＜(5)的有机胺＞

[0306] 作为一个实施方式,有机胺例如为选自由N,N-二异丙基乙基胺、三乙基胺及N-乙

基吗啉组成的组中的至少一种,优选为N-乙基吗啉。

[0307] ＜(5)的有机胺的用量＞

[0308] 作为一个实施方式,作为有机胺的用量,相对于上述式(III)化合物1摩尔以摩尔比计在例如1倍量～1000倍量的范围内,优选在1倍量～100倍量的范围内。

[0309] ＜(5)的非质子性极性溶剂＞

[0310] 作为一个实施方式,非质子性极性溶剂例如为选自由1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺、四氢呋喃或这些的混合物组成的组中的至少一种,优选为1,3-二甲基-2-咪唑啉酮。

[0311] ＜(5)的非质子性极性溶剂的用量＞

[0312] 作为一个实施方式,作为非质子性极性溶剂的用量,例如相对于有机胺以体积比计在1倍量～1000倍量(v/v)的范围内,优选在3倍量～100倍量的范围内。

[0313] ＜(5)的溶液的用量＞

[0314] 一个实施方式中,上述工序(5)的溶液的用量没有特别限定,例如相对于化合物(II)1g以重量比计在例如0.5倍量～100倍量的范围内,优选在1倍量～50倍量的范围内。

[0315] ＜(5)的处理时间＞

[0316] 作为一个实施方式,反应时间根据使用的有机胺的种类、反应温度而不同,通常在0.1分钟～2小时的范围内,优选在1分钟～60分的范围内。

[0317] ＜(5)的处理温度＞

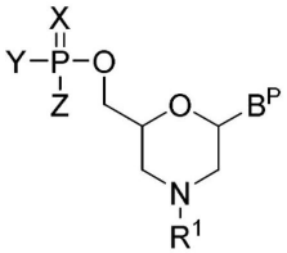
[0318] 作为一个实施方式,反应温度例如优选在0℃～100℃的范围内,更优选在10℃～50℃的范围内。

[0319] ＜工序(5)的次数＞

[0320] 一个实施方式中,上述工序(5)的次数没有特别限定,例如为1～10次,优选为1～5次。

[0321] ＜(6)缩合工序＞

[0322] 本工序包括:将式(VIII)的化合物用(6)含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理、例如溶解于含有有机胺及非质子性极性溶剂的混合溶液,

[0323] 

(VIII)

[0324] [式中,B^P、X、Y、Z及R^1如上所述]。

[0325] ＜(6)的有机胺＞

[0326] 作为一个实施方式,有机胺例如为选自由N,N-二异丙基乙基胺、三乙基胺及N-乙基吗啉组成的组中的至少一种,优选为N-乙基吗啉。

[0327] ＜(6)的有机胺的用量＞

[0328] 作为一个实施方式,作为有机胺的用量,例如相对于上述式(VIII)化合物1摩尔以

摩尔比计在0.1倍量～1000倍量的范围内,优选在1倍量～100倍量的范围内。

[0329] ＜(6)的非质子性极性溶剂＞

[0330] 作为一个实施方式,非质子性极性溶剂例如为选自由1,3-二甲基-2-咪唑啉酮、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺、四氢呋喃或这些的混合物组成的组中的至少一种,优选为1,3-二甲基-2-咪唑啉酮。

[0331] ＜(6)的非质子性极性溶剂的用量＞

[0332] 作为一个实施方式,作为非质子性极性溶剂的用量,例如相对于有机胺以体积比计在1倍量～1000倍量(v/v)的范围内,优选在3倍量～100倍量的范围内。

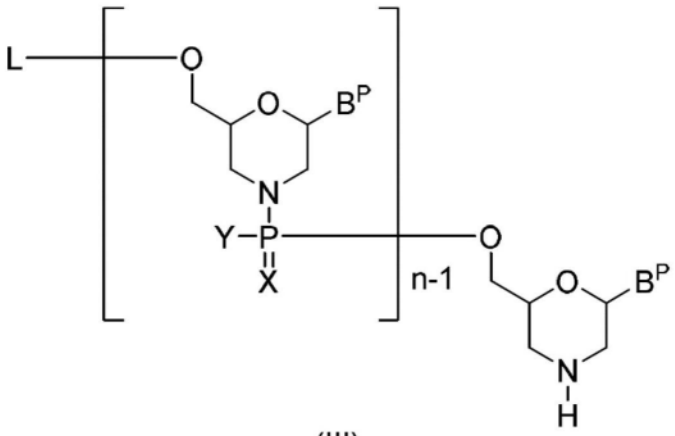
[0333] ＜(6)的处理时间＞

[0334] 作为一个实施方式,处理时间根据使用的有机胺的种类、反应温度而不同,通常在0.1分钟～48小时的范围内,优选在1分钟～24小时的范围内。

[0335] ＜(6)的处理温度＞

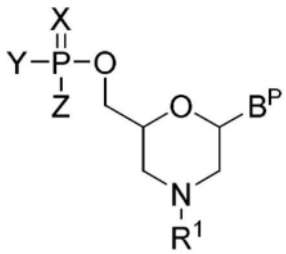
[0336] 作为一个实施方式,处理温度例如优选在0℃～50℃的范围内,更优选在10℃～40℃的范围内。

[0337] 本工序还包括:在有机胺的存在下使式(III)的化合物和式(VIII)的化合物反应而形成式(II")的化合物,

[0338] 

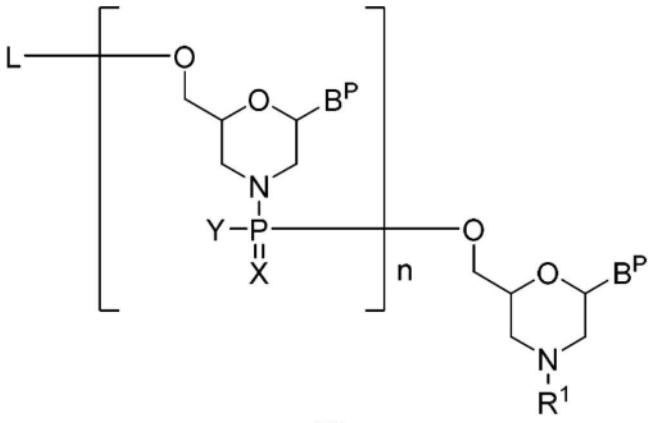
(III)

[0339] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0340] 

(VIII)

[0341] [式中,X、Y、Z、B^P及R^1如上所述]

[0342] 

(II')

[0343] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0344] 作为一个实施方式,上述式(VIII)的化合物例如相对于上述式(III)的化合物1摩尔以摩尔比计在1倍量～10倍量的范围内,优选在1倍量～5倍量的范围内。

[0345] 作为一个实施方式,有机胺例如为选自由N,N-二异丙基乙基胺、三乙基胺及N-乙基吗啉组成的组中的至少一种,优选为N-乙基吗啉。

[0346] 作为一个实施方式,作为有机胺的用量,例如相对于上述式(VIII)化合物1摩尔以摩尔比计在0.1倍量～1000倍量的范围内,优选在1倍量～100倍量的范围内。

[0347] 作为一个实施方式,反应时间根据使用的有机胺的种类、反应温度而不同,通常在10分钟～48小时的范围内,优选在30分钟～24小时的范围内。

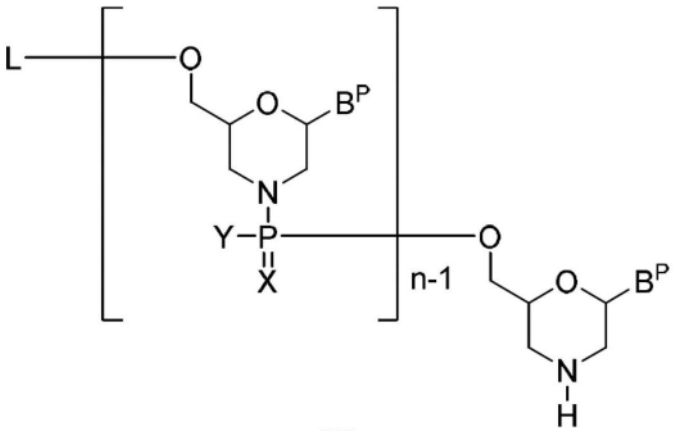
[0348] 作为一个实施方式,反应温度例如优选在0℃～100℃的范围内,更优选在10℃～50℃的范围内。

[0349] ＜工序(6)的次数＞

[0350] 一个实施方式中,上述工序(6)的次数没有特别限定,例如为1～3次,优选为1次。

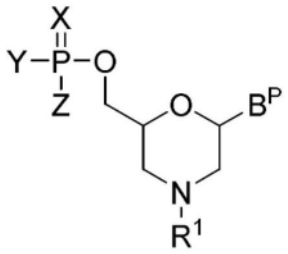
[0351] ＜清洗、前处理、缩合的连续反应＞

[0352] 本发明的一个实施方式中,可以将式(III)的化合物用(5)含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理,并且将式(VIII)的化合物用(6)含有有机胺及非质子性极性溶剂的溶液进行处理,之后在有机胺的存在下使式(III)的化合物与式(VIII)的化合物反应而形成式(II')的化合物,

[0353] 

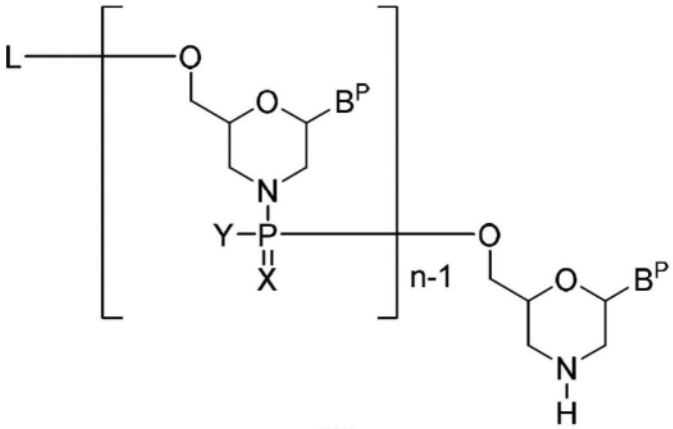
(III)

[0354] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0355] 

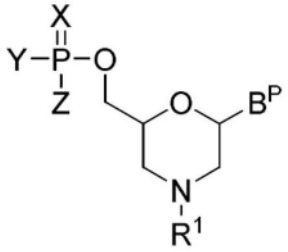
(VIII)

[0356] [式中,B^P、X、Y、Z及R^1如上所述]

[0357] 

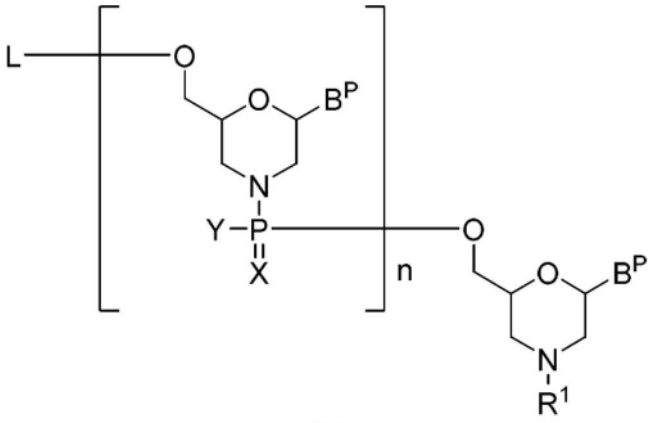
(III)

[0358] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0359] 

(VIII)

[0360] [式中,X、Y、Z、B^P及R^1如上所述]

[0361] 

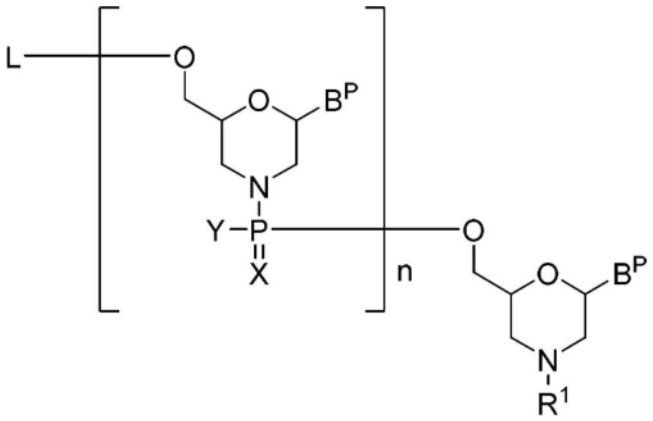
(II')

[0362] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0363] 工序(5)、(6)如上所述可以适当组合。

[0364] <(7)缩合工序后的清洗工序1>

[0365] 本工序包括:将式(II')的化合物用(7)含有卤素溶剂的溶液进行处理,

[0366] 

(II')

[0367] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0368] <(7)的溶液>

[0369] 一个实施方式中,上述工序(7)的清洗剂只要含有卤素溶剂则没有特别限定,例如,可以使用选自由氯仿、二氯甲烷、四氯乙烷及四氯乙烯组成的组中的至少一种,优选为二氯甲烷。

[0370] <(7)的溶液的用量>

[0371] 一个实施方式中,上述工序(7)的清洗剂的用量没有特别限定,例如,相对于化合物(II')1g以重量比计在例如1倍量~1000倍量的范围内,优选在2倍量~100倍量的范围内。

[0372] <(7)的处理时间>

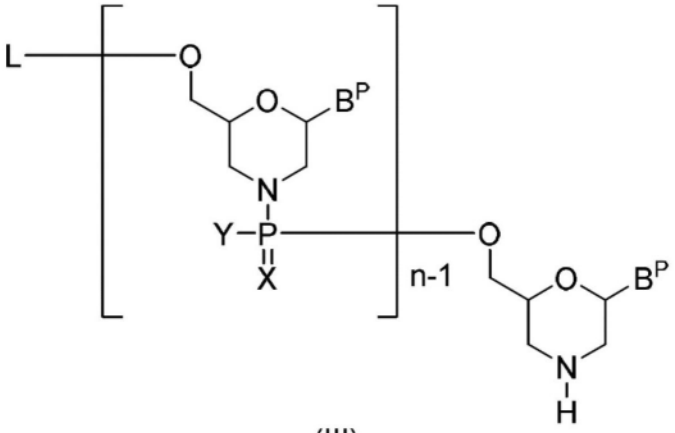
[0373] 一个实施方式中,上述工序(7)的时间没有特别限定,例如为0.1分钟~24小时、优选为1分钟~5小时、进一步优选为3分钟~1小时。

[0374] <(7)的处理温度>

[0375] 一个实施方式中,上述工序(7)的温度没有特别限定,例如为0℃~40℃、优选为10℃~35℃、进一步优选为15℃~30℃。

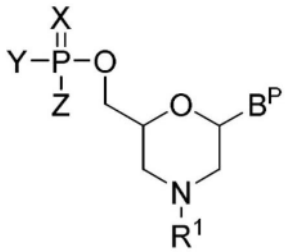
[0376] <缩合、缩合后的清洗的连续反应>

[0377] 本发明的一个实施方式中,可以在有机胺的存在下使(6)式(III)的化合物与式(VIII)的化合物反应而形成式(II')的化合物,接着用(7)含有卤素溶剂的溶液进行处理。

[0378] 

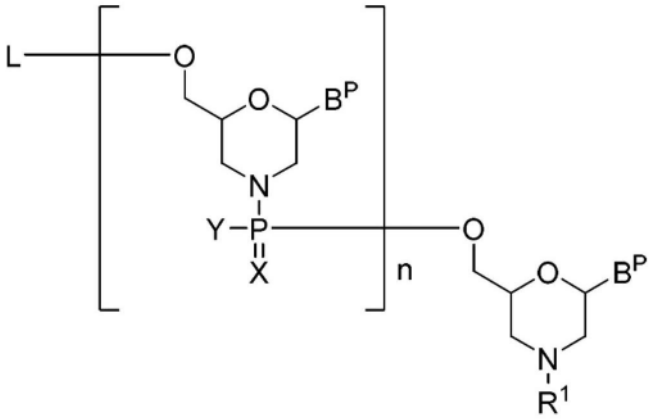
(III)

[0379] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0380] 

(VIII)

[0381] [式中,X、Y、Z、B^P及R^1如上所述]

[0382] 

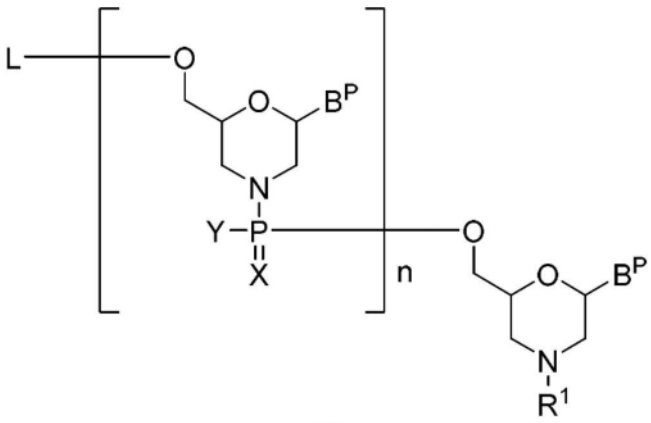
(II')

[0383] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0384] 工序(6)、(7)如上所述可以适当组合。

[0385] <(8)缩合工序后的清洗工序2>

[0386] 本工序包括:将式(II')的化合物用(8)含有醇类和/或卤素溶剂的溶液进行处理,

[0387] 

(II')

[0388] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0389] <(8)的溶液>

[0390] 一个实施方式中,上述工序(8)的溶液只要含有醇类和/或卤素溶剂则没有特别限定,可以使用例如选自由2,2,2-三氟乙醇、二氟乙醇、氯仿、二氯甲烷组成的组中的至少一种,可以优选使用2,2,2-三氟乙醇及二氯甲烷。

[0391] <(1)的溶液>

[0392] 一个实施方式中,上述工序(8)的溶液中,可以相对于卤素溶剂以例如0.01倍～100倍、优选0.1倍～2倍(v/v)来使用醇类。

[0393] ＜(1)的溶液的用量＞

[0394] 一个实施方式中,上述工序(8)的溶液的用量没有特别限定,例如相对于化合物(II')1g以重量比计在例如1倍量～1000倍量的范围内,优选在2倍量～100倍量的范围内。

[0395] ＜(8)的处理时间＞

[0396] 一个实施方式中,上述工序(8)的时间没有特别限定,例如为0.1分钟～24小时、优选为1分钟～5小时、进一步优选为3分钟～1小时。

[0397] ＜(8)的处理温度＞

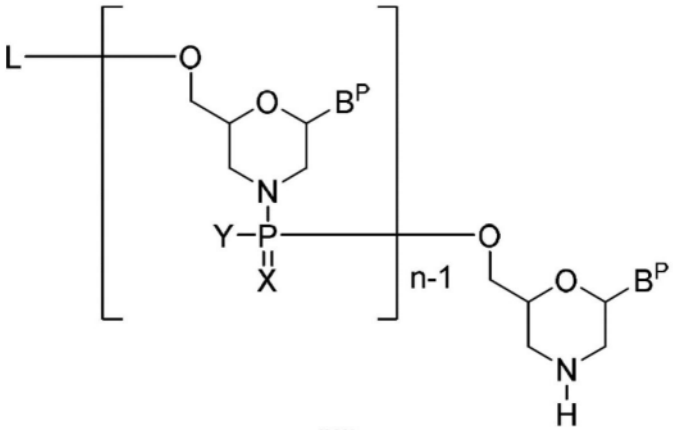
[0398] 一个实施方式中,上述工序(8)的温度没有特别限定,例如为0℃～40℃、优选为10℃～35℃、进一步优选为15℃～30℃。

[0399] ＜工序(8)的次数＞

[0400] 一个实施方式中,上述工序(8)的次数没有特别限定,例如为1～10次,优选为1～5次。

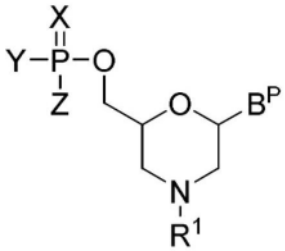
[0401] ＜缩合、缩合后的清洗、连续反应＞

[0402] 本发明的一个实施方式中,可以使(6)式(III)的化合物与式(VIII)的化合物反应而形成式(II')的化合物,接着用(7)含有卤素溶剂的溶液进行处理,进而用(8)含有醇类和/或卤素溶剂的溶液进行处理,

[0403] 

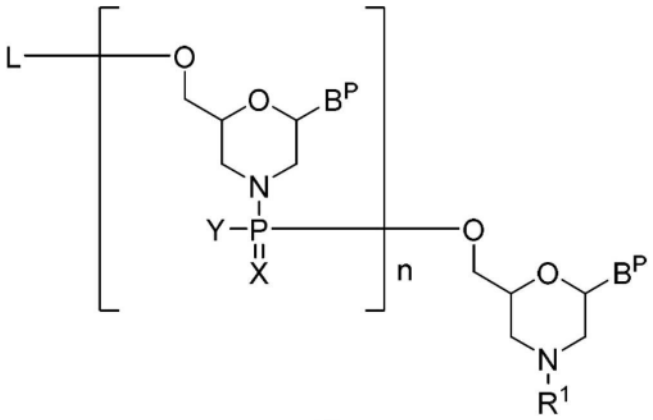
(III)

[0404] [式中,L、B^P、X、Y及n如上所述]

[0405] 

(VIII)

[0406] [式中,X、Y、Z、B^P及R^1如上所述]

[0407] 

(II')

[0408] [式中,L、B^P、X、Y、R^1及n如上所述]。

[0409] 工序(6)、(7)、(8)如上所述可以适当组合。

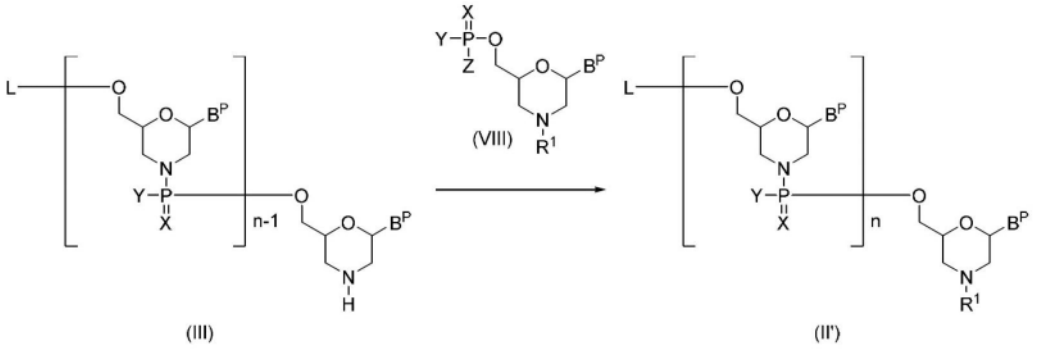
[0410] 本发明的一个方式为吗啉基核酸低聚物的制造方法,其中,接着上述延伸反应而包括选自:

[0411] <(A)保护基的除去工序>、

[0412] <(B)吗啉基氮的保护基的除去工序>及

[0413] <(C)纯化工序>中的至少一个工序,

[0414] 所述延伸反应为:

[0415] 

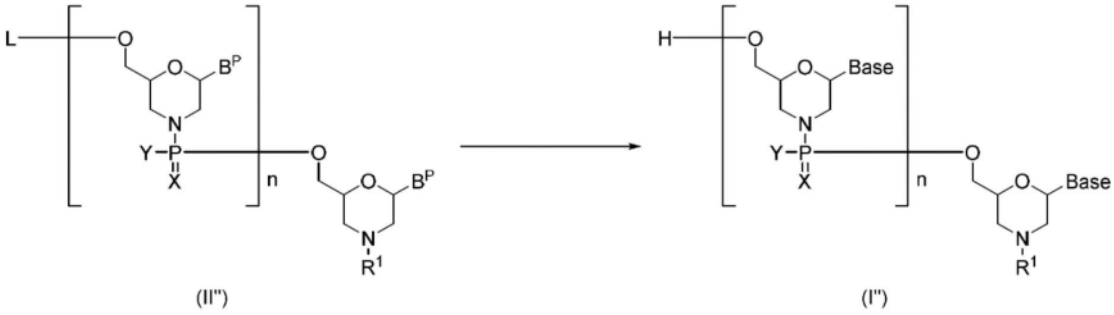
(III) (VIII) (II')

。

[0416] 以下对工序(A)~(C)进行说明。

[0417] <(A-1)保护基的除去工序>

[0418] 作为一个实施方式,本工序包括由式(II")的化合物得到式(I")的化合物的工序,

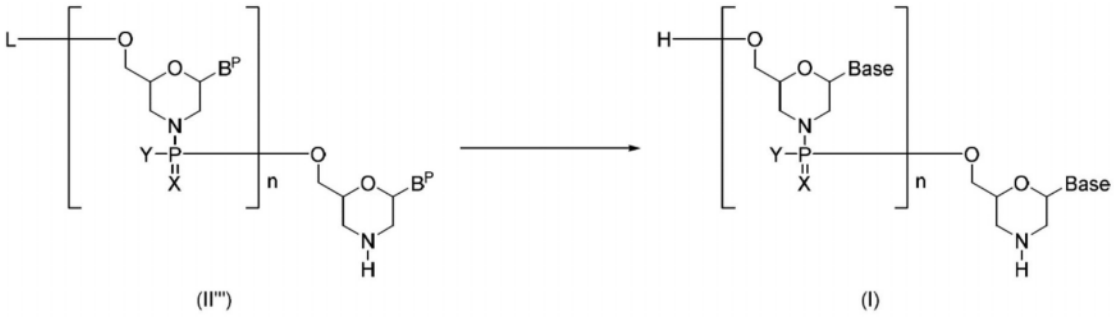
[0419] 

(II") (I")

[0420] [式中,Base、B^P、R^1、L、n、X、Y如上所述]。

[0421] <(A-2)保护基的除去工序>

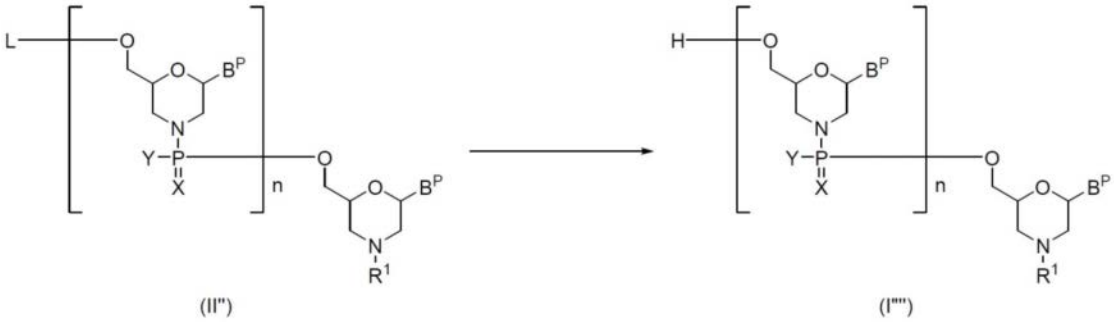
[0422] 作为一个实施方式,本工序包括由式(II"')的化合物得到式(I)的化合物的工序,

[0423] 

[0424] [式中,Base、B^P、R^1、L、n、X、Y如上所述]。

[0425] <(A-3)保护基的除去工序>

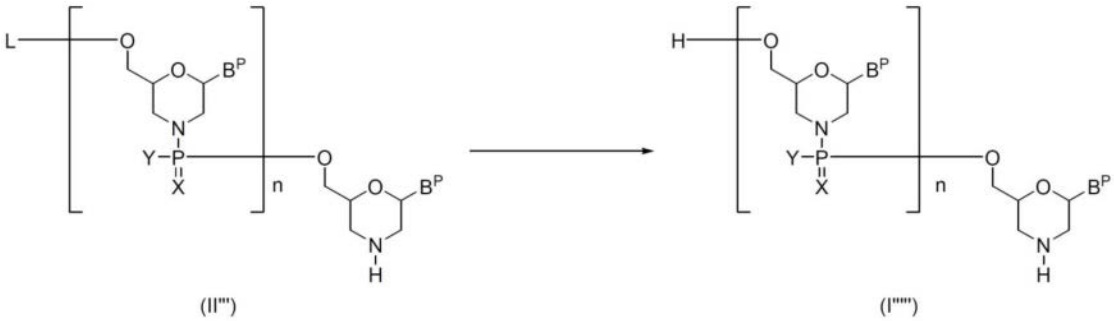
[0426] 作为一个实施方式,本工序包括由式(II")的化合物得到式(I"")的化合物的工序,

[0427] 

[0428] [式中,B^P、R^1、L、n、X、Y如上所述]。

[0429] <(A-4)保护基的除去工序>

[0430] 作为一个实施方式,本工序包括由式(II"')的化合物得到式(I""')的化合物的工序,

[0431] 

[0432] [式中,B^P、R^1、L、n、X、Y如上所述]。

[0433] 作为一个实施方式,通过对式(II")的化合物中的L及式(II")的化合物中的任选被保护的核酸碱基的保护基、以及式(II"')的化合物中的L及式(II"')的化合物中的任选被保护的核酸碱基的保护基实施与固相载体、接头、保护基的种类或性质相应的脱保护处理,由此可制造目标化合物。例如,可以按照"Green's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS,第4版、2006年"中记载的脱保护方法来除去化合物所具有的全部保护基。根据需要,该目标化合物可以供于进一步的化学结构变换。

[0434] 作为一个实施方式,通过对式(II")的化合物中的L以及式(II"')的化合物中的L实施与固相载体、接头的种类或性质相应的脱保护处理,由此可以制造目标化合物。

[0435] 进而,通过对式(I"")的化合物中的B^P及R^1、以及式(I""')的化合物中的B^P实施与

保护基的种类或性质相应的脱保护处理,可以制造目标化合物。

[0436] 例如,可以按照本说明书记载的方法、"Green's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS,第4版、2006年"记载的脱保护方法来除去化合物所具有的全部保护基。根据需要,可以将该目标化合物供于进一步的化学结构变换。

[0437] 作为一个实施方式,例如,可以通过用(1)氨水、(2)氨水/乙醇或(3)甲基胺-甲醇溶液/水的混合溶液进行处理,优选用(2)氨水/乙醇的混合溶液进行处理,来除去式(II")的化合物中的L及式(II")的化合物中的任选被保护的核酸碱基的保护基;以及式(II"')的化合物中的L及式(II"')的化合物中的任选被保护的核酸碱基的保护基。

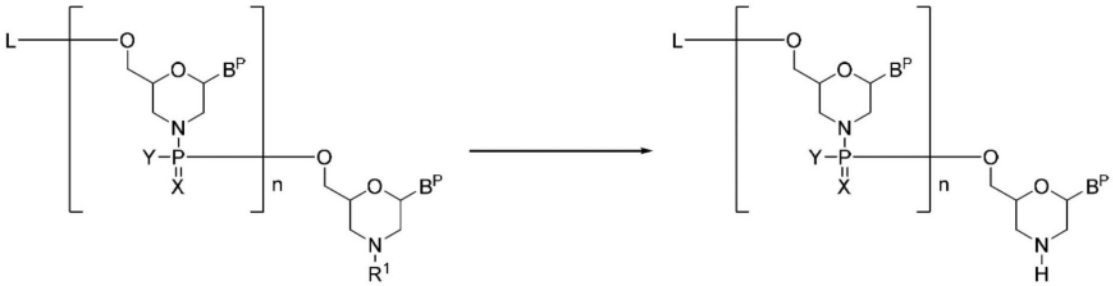
[0438] 作为一个实施方式,作为(1)氨水、(2)氨水/乙醇或(3)甲基胺-甲醇溶液/水的混合溶液的用量,例如,相对于式(II")的化合物1g或式(II"')的化合物1g,例如以重量比计在1倍量~1000倍量的范围内,优选在3倍量~100的范围内。

[0439] 作为一个实施方式,反应时间根据反应温度等而不同,在10分钟~120小时的范围内,优选在30分钟~72小时的范围内,更优选在5小时~48小时的范围内。

[0440] 作为一个实施方式,反应温度例如在5℃~100℃的范围内,优选在10℃~70℃的范围内,更优选在15℃~50℃的范围内。

[0441] <(B-1)吗啉基氮的保护基的除去工序>

[0442] 作为一个实施方式,本工序包括下述工序:由式(II')的化合物除去式(II')的化合物中的R^1而得到式(II"')的化合物,

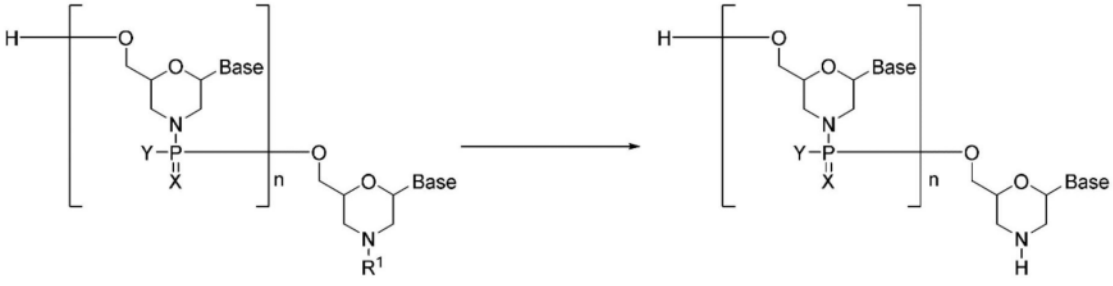
[0443] 

(II') (II"')

[0444] [式中,B^P、L、n、R^1、X、Y如上所述。]。

[0445] <(B-2)吗啉基氮的保护基的除去工序>

[0446] 作为一个实施方式,本工序包括下述工序:由式(I')的化合物中除去式(I')的化合物中的R^1而得到式(I)的化合物,

[0447] 

(I') (I)

[0448] [式中,Base、X、Y、n、R^1如上所述。]。

[0449] 作为一个实施方式,由式(II')的化合物除去式(II')的化合物中的R^1而得到式(II"')的化合物的工序;及由式(I')的化合物除去式(I')的化合物中的R^1而得到式(I)的

化合物的工序可以应用上述(1)～(4)的工序所使用的条件。

[0450] ＜(11)纯化工序＞

[0451] 作为一个实施方式,本工序包括从反应混合物中通过单独地或组合地使用常规分离纯化手段来分离吗啉基核酸低聚物(I),所述常规分离纯化手段例如为萃取、浓缩、中和、过滤、离心分离、沉淀、重结晶、C_1至C_{18}的反相柱色谱、阳离子交换柱色谱、阴离子交换柱色谱、凝胶过滤柱色谱、高效液相色谱、透析、超滤等手段(例如,参照国际公开公报第1991/09033A1。)。

[0452] 作为一个实施方式,使用反相色谱来纯化期望的化合物时,作为洗脱溶剂,可以使用例如20mM的三乙基胺/乙酸缓冲液与乙腈的混合溶液。

[0453] 作为一个实施方式,使用离子交换色谱来纯化期望的化合物时,可以使用例如1M的食盐水与10mM的氢氧化钠水溶液的混合溶液、或50mM的磷酸缓冲液的0.3M的食盐水。

[0454] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括＜(2)脱保护工序＞。

[0455] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括＜(2)脱保护工序＞及＜(3)中和工序＞。

[0456] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括＜(2)脱保护工序＞、＜(3)中和工序＞及＜(4)中和工序后的清洗工序＞。

[0457] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括＜(5)缩合前的清洗工序＞及＜(6)缩合工序＞。

[0458] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括＜(5)缩合前的清洗工序＞、＜(6)缩合工序＞、以及＜(7)缩合工序后的清洗工序1＞和/或＜(8)缩合工序后的清洗工序2＞。

[0459] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括＜(2)脱保护工序＞、＜(5)缩合前的清洗工序＞及＜(6)缩合工序＞。

[0460] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括＜(2)脱保护工序＞、＜(3)中和工序＞、＜(5)缩合前的清洗工序＞及＜(6)缩合工序＞。

[0461] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括:

[0462] ＜(1)脱保护工序前的清洗工序＞、

[0463] ＜(2)脱保护工序＞、

[0464] ＜(3)中和工序＞、

[0465] ＜(4)中和工序后的清洗工序＞、

[0466] ＜(5)缩合前的清洗工序＞、

[0467] ＜(6)缩合工序＞、

[0468] ＜(7)缩合工序后的清洗工序1＞及

[0469] ＜(8)缩合工序后的清洗工序2＞。

[0470] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法不包括＜(5)缩合前的清洗工序＞。

[0471] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法包括:

[0472] ＜(1)脱保护工序前的清洗工序＞、

[0473] ＜(2)脱保护工序＞、

[0474] ＜(3)中和工序＞、

[0475] ＜(4)中和工序后的清洗工序＞、

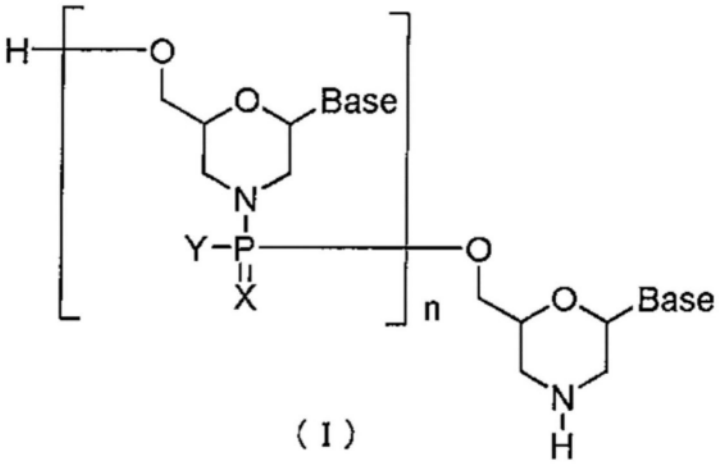
[0476] ＜(6)缩合工序＞、

[0477] ＜(7)缩合工序后的清洗工序1＞、及

[0478] ＜(8)缩合工序后的清洗工序2＞。

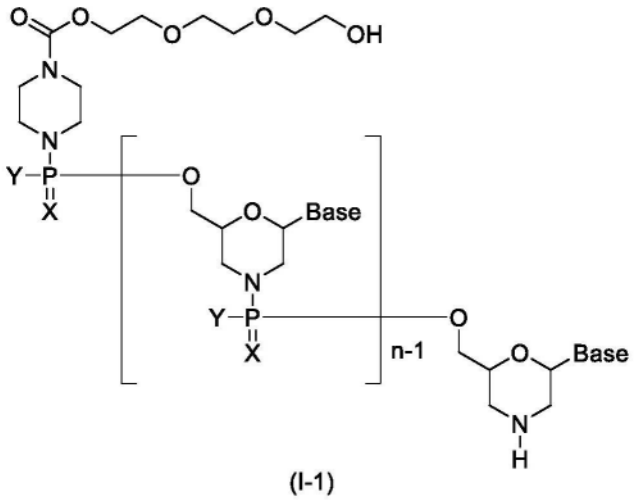
[0479] 本发明的一个方式中,本发明的制造方法根据情况不包括＜加帽工序＞。

[0480] 根据本发明的吗啉基核酸低聚物的制造方法,可以得到式(I)的吗啉基核酸低聚物、式(I-1)的吗啉基核酸低聚物、例如或者式(I-2)的吗啉基核酸低聚物。

[0481] 

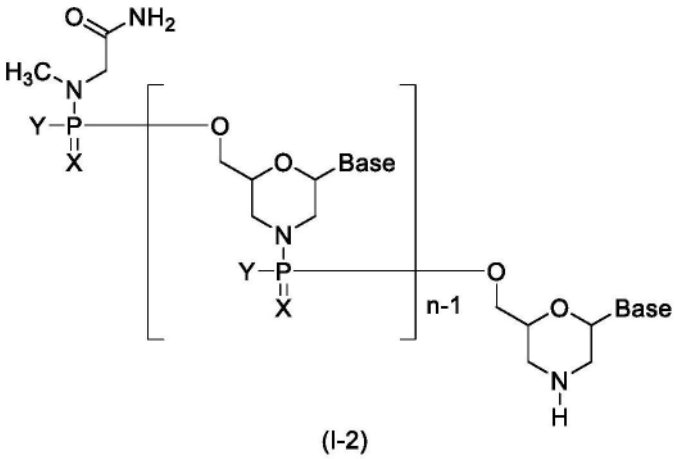
(I)

[0482] [式中,Base、X、Y、n如上所述]

[0483] 

(I-1)

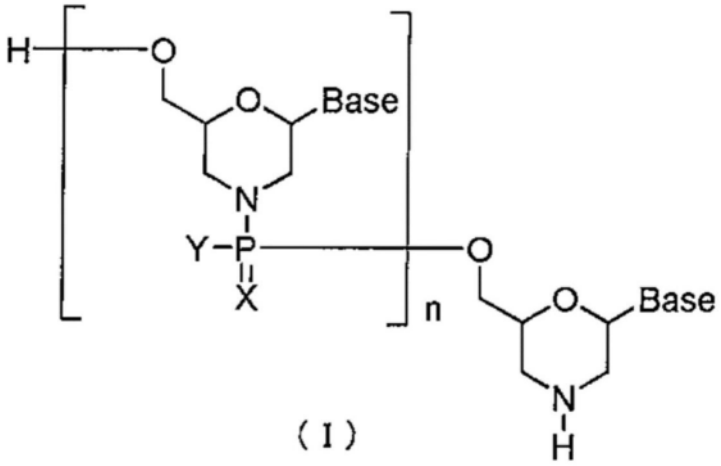
[0484] [式中,Base、X、Y、n如上所述]

[0485] 

(I-2)

[0486] [式中,Base、X、Y、n如上所述]。

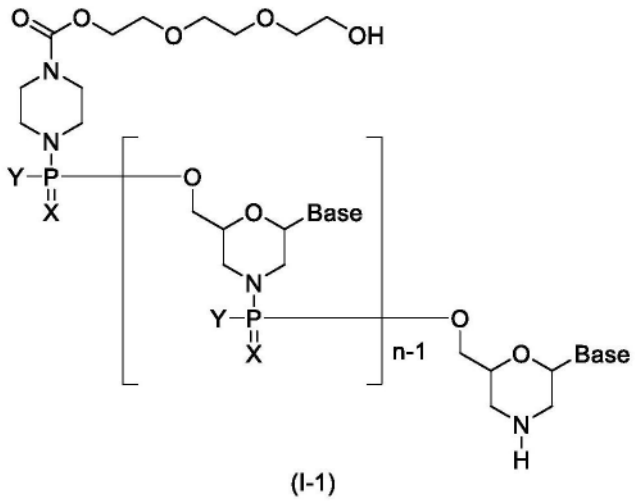
[0487] 本发明的一个方式中,式(I)的吗啉基核酸低聚物例如为记载于国际公开公报(WO2012/029986、WO2013/100190、WO2015/137409、WO2015/194520、WO2017/047707、WO2021/132591、WO2021/172498等)或基于该国际公开公报的记载本领域技术人员可认识到的磷酸二酰胺吗啉低聚物(PMO),优选为可跳过选自由人抗肌萎缩蛋白基因的第51、53、45、55、44及50号外显子组成的组中的至少一者的磷酸二酰胺吗啉低聚物(PMO),具体而言,可列举Viltepso(参照WO2012/029986;CAS登录号:2055732-84-6)

[0488] 

(I)

[0489] [式中,Base、X、Y、n如上所述]。

[0490] 本发明的一个方式中,式(I-1)的吗啉基核酸低聚物例如为记载于国际公开公报(WO2001/083740、WO2006/000057、WO 2010/048586、WO2010/050801、WO2011/057350、WO2014/144978、WO2014/153240等)或基于该国际公开公报的记载本领域技术人员可认识到的磷酸二酰胺吗啉低聚物(PMO),优选为可跳过选自由人抗肌萎缩蛋白基因的第251、53、45、55、44及50号的外显子组成的组中的至少一者的磷酸二酰胺吗啉低聚物(PMO),具体而言,可列举依特力生(Eteplirsen)(参照WO2006/000057、WO2010/050801、WO2014/144978;CAS登录号:1173755-55-9)、戈罗迪生(Golodirsen)(参照WO2001/083740、WO2006/000057;CAS登录号:1422959-91-8)、卡西姆生(Casimersen)(参照WO2001/083740、WO2006/000057、WO2011/057350;CAS登录号:1422958-19-7),

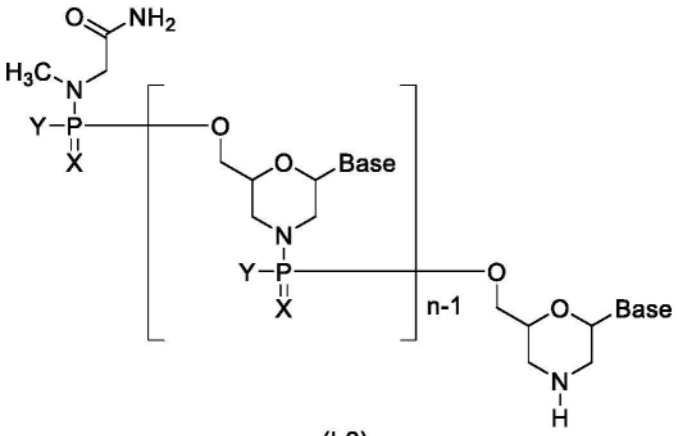
[0491] 

(I-1)

[0492] [式中,Base、X、Y、n如上所述]。

[0493] 本发明的一个方式中,作为通过本发明的制造方法得到的吗啉基核酸低聚物,可列举式(I-2)的吗啉基核酸低聚物,

[0494]



(I-2)

[0495] [式中,Base、X、Y、n如上所述]。

[0496] 【实施例】

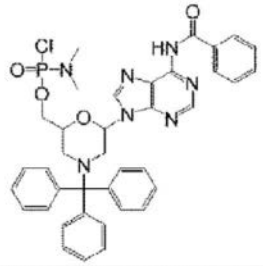
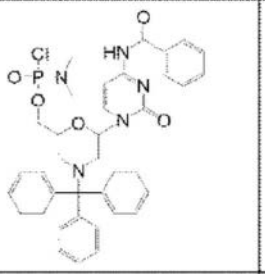
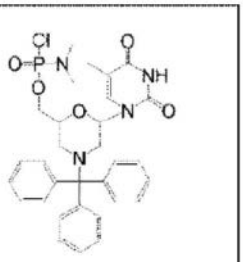
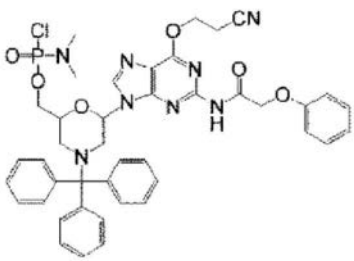
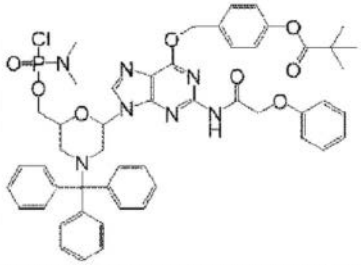
[0497] 参考例1:吗啉基单体化合物

[0498] 将吗啉基单体化合物的结构式和简称示于表2。A^p、C^p、T^p可使用市售品或通过该技术领域通常使用的方法来制备(参照WO2008/008113)。G^{CE}及G^{POB}可通过该技术领域通常使用的方法来制备(参照WO2012/043730、WO2009/064471)。

[0499] 【表2】

[0500] 吗啉基单体化合物

[0501]

结构式			
简称	A^p	C^p	T^p
结构式			
简称	G^{CE}	G^{POB}	

[0502] 参考例2:4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸的制备

[0503] 4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸通过该技术领域中通常使用的方法制备(参照WO2012/043730)。

[0504] 参考例3:负载于氨基甲基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代

嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸的制备

[0505] 将氨基甲基聚苯乙烯树脂(渡边化学工业公司制)10.0g添加到吡啶130mL中,添加参考例2中制备的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸12.1g、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐17.3g及4-DMAP 2.7g,用吡啶10mL冲洗。接着,添加三乙基胺15.3mL及吡啶20mL,在室温下搅拌1天。反应后滤取树脂。将得到的树脂依次用吡啶、二氯甲烷、甲醇、四氢呋喃清洗。向得到的树脂中添加四氢呋喃125mL、2,6-二甲基吡啶15.6mL、苯甲酰氯12.7g,在室温下搅拌1小时。滤取树脂,依次用四氢呋喃、甲醇、二氯甲烷清洗,减压干燥,得到13.6g的标记化合物。

[0506] 关于该目标物的负载量,通过用公知方法测定409nm处的UV吸光度来确定每1g树脂的三苯甲基的摩尔量。树脂的负载量为550μmol/g。

[0507] UV测定条件

[0508] 机器:U-2910(日立制作所)

[0509] 溶剂:甲磺酸

[0510] 波长:409nm

[0511] ε值:45000

[0512] 实施例1:低聚物的制备

[0513] 碱基序列为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'的吗啉基核酸低聚物的合成

[0514] 1.延伸反应

[0515] 将负载于氨基甲基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸(参考例3)3.0g(1.7mmol)移入反应槽,开始表3的合成循环。需要说明的是,延伸反应合成循环次数定义为与要合成的链长对应的数。为了使吗啉基核酸低聚物的碱基序列成为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3',在各缩合工序中,相对于前一个延伸反应合成循环中得到的低聚物,以1.3~2.2摩尔当量来使用吗啉基单体化合物。

[0516] 【表3】

[0517] 延伸反应合成循环的详细情况(实施例1)

[0518]

步骤	工序	试剂(溶液)	工序重复次数	时间/工序
1	清洗	清洗溶液1	1次	5分钟
2	脱保护	脱保护溶液1	4~7次	5分钟
3	中和	中和溶液1	3次	5分钟
4	清洗	清洗溶液2	2次	5分钟
5	清洗	清洗溶液3	2次	5分钟
6	缩合	缩合溶液1 (吗啉基单体化合物+前处理液1)	1次	6小时~18小时
7	清洗	清洗溶液2	1次	5分钟
8	清洗	清洗溶液1	2次	5分钟

[0519] 作为清洗溶液1,使用30%2,2,2-三氟乙醇(TFE)/二氯甲烷(DCM)(在DCM中以30%含有TFE)。

[0520] 作为清洗溶液2,使用DCM。

[0521] 作为清洗溶液3,使用后述的前处理液1。

[0522] 作为脱保护溶液1,使用将三氟乙酸(1.2当量)与三乙基胺(1当量)的混合物以成为5%(w/v)的方式用含有1%(v/v)的三异丙基硅烷(TIPS)和20%(v/v)的TFE的DCM溶液溶解而得的溶液。

[0523] 作为中和溶液1,使用异丙醇(IPA)/N,N-二异丙基乙基胺(DIPEA)/DCM(353:75:1065(v/v)的比例)。

[0524] 作为前处理液1,使用含有N-乙基吗啉(NEM)的1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMI)的混合物(DMI中的5～6%NEM溶液(v/v))。

[0525] 作为吗啉基单体化合物,使用表1记载的A^{p}、C^{p}、T^{p}及G^{CE}。将吗啉基单体化合物溶解于前处理液1,制备前处理液1中的0.10～0.14M吗啉基单体化合物溶液(缩合溶液1),作为缩合溶液1来使用。

[0526] ＜碱基序列为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTG-3'的18mer的制备中的步骤5～7＞

[0527] 步骤5

[0528] 在步骤4之后,对于反应容器中的负载有碱基序列为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGT-3'的17mer的低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂,添加清洗溶液3(DMI中的5.3%NEM溶液(v/v))25mL,搅拌5分钟,然后将反应容器中的溶液排出。接着,向反应容器中添加25mL清洗溶液3,搅拌5分钟,将溶液排出。

[0529] 步骤6

[0530] 在步骤5之后,向反应容器中添加缩合溶液1(前处理液1中的0.12MG^{CE}溶液)25mL,然后搅拌18小时。

[0531] 步骤7

[0532] 在步骤6之后,将反应容器中的溶液排出。接着,向反应容器中添加50mL清洗溶液2,搅拌5分钟,然后将反应容器中的溶液排出。

[0533] 2.干燥工序

[0534] 将负载有上述所合成的吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂用DCM清洗2次,从反应容器中回收,在60℃下减压干燥6小时。得到负载有吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂14.6g。

[0535] 实施例2

[0536] 1.延伸反应

[0537] 将负载于氨基甲基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸(通过与参考例3相同的方法合成)3.0g(1.5mmol)移入反应槽,开始表4的合成循环。需要说明的是,延伸反应合成循环数定义为与要合成的链长对应的数。为了使吗啉基核酸低聚物的碱基序列成为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3',在各缩合工序中,相对于前一个延伸反应合成循环中得到的低聚物,以1.3～2.2摩尔当量使用吗啉基单体化合物。

[0538] 实施例2中,代替实施例1的步骤5,将反应器进行氮气置换。具体而言,在步骤4之后,在进行排液之后将氮气气球安装在过滤式反应器的过滤器下部,打开旋塞,实施2次氮气通气。

[0539] 【表4】

[0540] 延伸反应合成循环的详细情况(实施例2)

[0541]

步骤	工序	试剂(溶液)	工序重复次数	时间/工序
1	清洗	清洗溶液1	1次	5分钟
2	脱保护	脱保护溶液1	4～7次	5分钟
3	中和	中和溶液1	3次	5分钟
4	清洗	清洗溶液2	2次	5分钟
5	缩合	缩合溶液2	1次	3小时～6小时
6	清洗	清洗溶液2	1次	5分钟
7	加帽	加帽溶液1	1次	10分钟
8	清洗	清洗溶液2	1次	5分钟
9	清洗	清洗溶液1	2次	5分钟

[0542] 作为清洗溶液1,使用30％2,2,2-三氟乙醇(TFE)/二氯甲烷(DCM)(在DCM中以30％含有TFE)。

[0543] 作为清洗溶液2,使用DCM。

[0544] 作为脱保护溶液1,使用将三氟乙酸(1.2当量)和三乙基胺(1当量)的混合物以成为5％(w/v)的方式用含有1％(v/v)的三异丙基硅烷(TIPS)和20％(v/v)的TFE的DCM溶液溶解而得的溶液。

[0545] 作为中和溶液1,使用异丙醇(IPA)/N,N-二异丙基乙基胺(DIPEA)/DCM(353:75:1065(v/v)的比例)。

[0546] 作为吗啉基单体化合物,使用表1记载的A^{p}、C^{p}、T^{p}及G^{CE}。将吗啉基单体化合物溶解于DMI中的5～6％DIPEA溶液(v/v),制备0.10～0.13M吗啉基单体化合物溶液(缩合溶液2),作为缩合溶液2来使用。

[0547] 作为加帽溶液1,使用乙酸酐/DIPEA/DCM的混合物(0.5:1.25:98.25(v/v)的比例)。

[0548] <碱基序列为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTG-3'的18mer的制备中的步骤2～7>

[0549] 步骤2

[0550] 在步骤1之后,对于反应容器中的负载有碱基序列为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGT-3'且末端被三苯甲基保护的17mer的低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂,添加45mL脱保护溶液1,搅拌5分钟,然后将反应容器中的溶液排出。将该工序再重复5次。

[0551] 步骤3

[0552] 在步骤2之后,向反应容器中加入50mL中和溶液1,搅拌5分钟,然后将反应容器中的溶液排出。将该工序再重复2次。

[0553] 步骤4

[0554] 在步骤3之后,向反应容器中加入50mL清洗溶液2,搅拌5分钟,然后将反应容器中的溶液排出。将该工序再重复1次。

[0555] 步骤5

[0556] 在步骤4之后,对反应容器进行氮气置换后,添加缩合溶液2(DMI中的5.3％DIPEA溶液(v/v)中的0.12M G^{CE}溶液)25mL,并且搅拌6小时。

[0557] 步骤6

[0558] 在步骤5之后,将反应容器中的溶液排出。接着,向反应容器中添加50mL清洗溶液2,搅拌5分钟,然后将溶液排出。

[0559] 步骤7

[0560] 在步骤6之后,将反应容器中的溶液排出。接着,向反应容器中添加50mL加帽溶液1,搅拌10分钟,然后将溶液排出。

[0561] 2.干燥工序

[0562] 将负载有上述合成的吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂用DCM清洗3次,从反应容器中回收,在60℃下减压干燥6小时。得到负载有吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂11.7g。

[0563] 比较例1:低聚物的制备

[0564] 碱基序列为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'的吗啉基核酸低聚物的合成

[0565] 1.延伸反应

[0566] 将通过与参考例2相同的方法制备的、负载于氨基甲基聚苯乙烯树脂的4-{[(2S,6R)-6-(4-苯甲酰胺-2-氧代嘧啶-1-基)-4-三苯甲基吗啉-2-基]甲氧基}-4-氧代丁酸(树脂的负载量为458μmol/g)50g(23mmol)移入反应槽,开始表5的合成循环。为了使吗啉基核酸低聚物的碱基序列成为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3',在各缩合工序中,相对于前一个延伸反应合成循环中得到的低聚物,以2.0~3.0摩尔当量来使用吗啉基单体化合物。

[0567] 【表5】

[0568] 延伸反应合成循环的详细情况(比较例1)

[0569]

步骤	工序	试剂(溶液)	工序重复次数	时间/工序
1	脱保护	脱保护溶液2	3~8次	5分钟
2	中和	中和溶液2	4~5次	2分钟
3	清洗	清洗溶液2	3次	1分钟
4	清洗	清洗溶液4	1次	5分钟
5	缩合	缩合溶液2 (吗啉基单体化合物+前处理液2)	1次	3小时~8小时
6	清洗	清洗溶液2	3次	1分钟
7*	加帽	加帽溶液	2次	3分钟
8	清洗	清洗溶液2	3次	1分钟

[0570] *末次延伸又应合成循环中不实施加帽工序

[0571] 作为清洗溶液2,使用DCM。

[0572] 作为清洗溶液4,使用后述的前处理液2。

[0573] 作为脱保护溶液2,使用将三氟乙酸(2当量)和三乙基胺(1当量)的混合物以成为3%(w/v)的方式用含有1%(v/v)的乙醇和10%(v/v)的TFE的DCM溶液溶解而得的溶液。

[0574] 作为中和溶液2,使用IPA/DIPEA/DCM(25:5:70(v/v)的比例)。

[0575] 作为前处理液2,使用DIPEA/DMI的混合物(10:90(v/v)的比例)。

[0576] 作为吗啉基单体化合物,使用表1记载的A^p、C^p、T^p及G^{CE}。将吗啉基单体化合物溶解于前处理液2,制备前处理液2中的0.16M吗啉基单体化合物溶液(缩合溶液2),并且作为缩

合溶液2来使用。

[0577] 作为加帽溶液,使用乙酸酐/2,6-二甲基吡啶/DCM的混合物(20:30:50(v/v)的比例)。

[0578] 2.干燥工序

[0579] 将负载有上述合成的吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂从反应容器中回收,在室温下减压干燥2天。得到负载有吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂258.0g。

[0580] 试验例1实施例1及实施例2中制备的吗啉基核酸低聚物与比较例1中制备的吗啉基核酸低聚物的比较

[0581] 对于负载有通过延伸反应合成碱基序列为5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'的吗啉基核酸低聚物并干燥而得到的实施例1及比较例1的吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂,分别将各约30mg放入反应容器,加入0.75mL脱保护溶液1,在室温下反应40分钟。除去脱保护溶液1,将树脂用中和溶液1及二氯甲烷清洗,在室温下减压干燥。向干燥后的树脂中添加28%氨水-乙醇(4/1),在室温下搅拌17小时。将上清液稀释,供于HPLC(C18离子对分析),测定该未纯化的混合物中的吗啉基核酸低聚物的纯度。

[0582] 通过将实施例1及实施例2中制备的吗啉基核酸低聚物与比较例1中制备的吗啉基核酸低聚物进行比较,确认通过实施例1及2的制造方法提高了吗啉基核酸低聚物的纯度。

[0583] 【表6】

[0584] 吗啉基低聚物的纯度

[0585]

	吗啉基核酸低聚物的纯度
实施例1	68.5%
实施例2	62.9%
比较例1	57.5%

[0586] 试验例2实施例1中制备的吗啉基核酸低聚物与比较例1中制备的吗啉基核酸低聚物的缩合反应收率的比较

[0587] 在实施了实施例1的1.延伸反应的各延伸循环后,采集少量的负载有吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂,添加40%甲基胺-甲醇溶液/水混合液,在65℃下反应10分钟而从树脂中切出。同样地,在实施了比较例1的1.延伸反应的各延伸循环后,采集少量的负载有吗啉基核酸低聚物的氨基甲基聚苯乙烯树脂,添加28%氨水-乙醇混合液,在55℃下反应过夜而从树脂切出。将各上清液稀释,供于HPLC(C18离子对分析),按照下述计算缩合反应收率。

[0588] 缩合反应收率(%)=100-原材料*的峰面积值÷(原材料的峰面积值+缩合反应后的主峰面积值)

[0589] *原材料是指:末端不具有三苯甲基、链长比通过缩合反应而得到的链长少1个残基的吗啉基核酸低聚物。

[0590] 实施例1相较于比较例1而言改善了缩合反应收率。

[0591] <简称>

[0592] TFE:2,2,2-三氟乙醇

[0593] DCM:二氯甲烷

[0594] TFA:三氟乙酸

[0595] TEA:三乙基胺

[0596] TIPS:三异丙基硅烷

[0597] IPA:异丙醇

[0598] DIPEA:N,N-二异丙基乙基胺

[0599] NEM:N-乙基吗啉

[0600] DMI:1,3-二甲基-2-咪唑啉酮