(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0074205
(43) 공개일자 2023년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07H 21/02* (2006.01) *C07H 1/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07H 21/02* (2013.01)
*C07H 1/00* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7013289
(22) 출원일자(국제) 2021년08월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년04월19일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/030423
(87) 국제공개번호 WO 2022/064908
국제공개일자 2022년03월31일
(30) 우선권주장
JP-P-2020-159460 2020년09월24일 일본(JP)

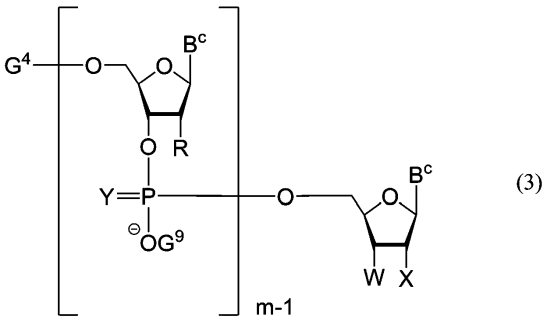
(71) 출원인
**스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤**
일본국 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 2쵸메 7반 1고
(72) 발명자
**미야가와 다쿠야**
일본 오이타켄 오이타시 오아자 츠루사키 2200반치 스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤 나이
**오쿠무라 히데키**
일본 오이타켄 오이타시 오아자 츠루사키 2200반치 스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤 나이
(74) 대리인
**특허법인코리아나**

전체 청구항 수 : 총 38 항

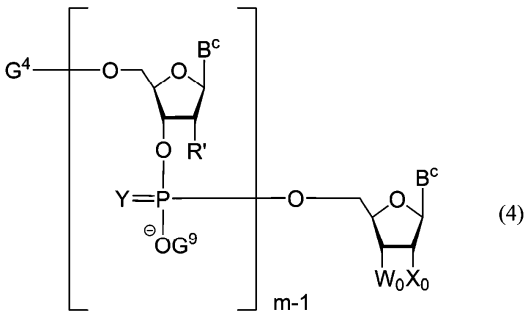
(54) 발명의 명칭 **핵산 올리고머의 제조 방법**

## (57) 요 약

본 발명은, 핵산 올리고머의 효율적인 제조 방법, 특히, 핵산 올리고머 중의 리보오스의 수산기의 보호기를 효율적으로 탈보호하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 또한, 산소 농도가 15 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머를, 불화물 이온과 접촉시키는 것을 포함하는, 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머 (식 (3) 및 식 (4) 중의 각 기의 정의는 명세서 중에 정의하는 바와 같다) 의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.




(3)




(4)

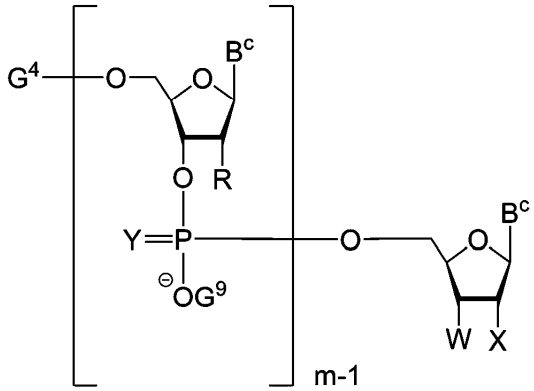
(52) CPC특허분류
*Y02P 20/55* (2020.08)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

산소 농도가 15 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서, 식 (3) :




(3)

(식 중,

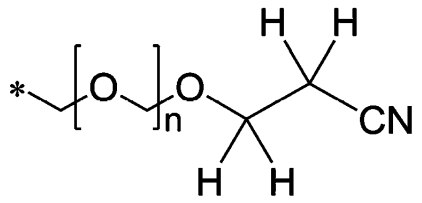
$G^4$ 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고,

$G^9$ 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

$B^c$ 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 핵산 염기를 나타내고,

R 은, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 불소 원자 또는 OQ 기를 나타내고,

Q 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 메틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸리덴기, 또는 식 (1) :




(1)

(식 중,

* 표시가 붙은 결합은, OQ 기의 산소 원자와의 결합인 것을 나타내고,

n 은 0 이상 중 어느 정수를 나타낸다.)

의 보호기를 나타내고,

Y 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

m 은, 2 이상 200 까지 중 어느 정수를 나타내고,

W 및 X 는, 하기의 (a) 또는 (b) 중 어느 것으로 정의되고,

(a) W 가 수산기일 때에는, X 는 상기 R 기와 동일한 정의이다.

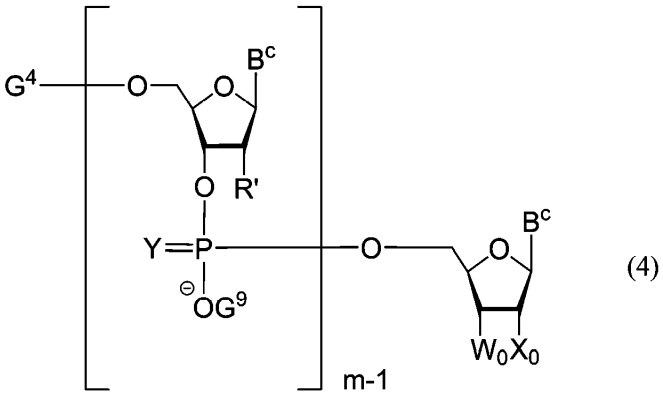
(b) X 가 수산기일 때에는, W 는 OV 기를 나타내고,

V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

단, 상기 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. 그리고

m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m - 1 > p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

로 나타내는 핵산 올리고머를, 불화물 이온과 접촉시키는 것을 특징으로 하는, 식 (4) :




(4)

(식 중, R' 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,

Q' 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 메틸렌기, 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸렌기, 또는 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸리덴기를 나타내고,

식 (4) 의 치환기 $G^4$, $G^9$, Y, $B^c$ 및 m 의 정의는, 상기 식 (3) 에 있어서의 정의와 동일하고,

$W_0$ 은, 수산기이고,

$X_0$ 은, 상기 R' 기와 동일한 정의이다.

그리고, m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m - 1 > p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

로 나타내는 핵산 올리고머의 제조 방법.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서,

식 (1) 중의 n 이 0 또는 1 인, 제조 방법.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,

식 (1) 중의 n 이 0 인, 제조 방법.

**청구항 4**

제 1 항에 있어서,

식 (1) 중의 n 이 1 인, 제조 방법.

**청구항 5**

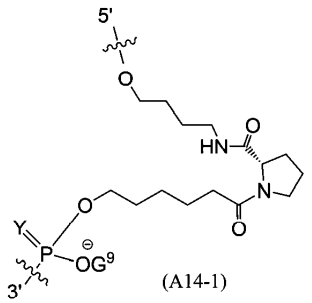
제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

비뉴클레오티드 링커가, 아미노산 골격으로 이루어지는 링커인, 제조 방법.

**청구항 6**

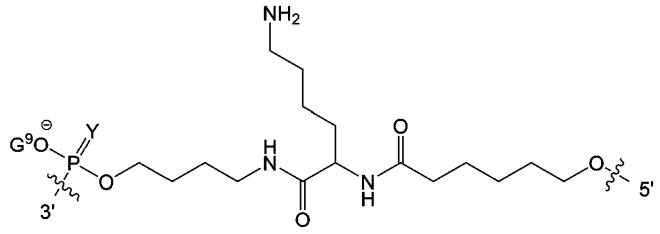
제 5 항에 있어서,

아미노산 골격으로 이루어지는 링커가, 하기 식 (A14-1), (A14-2) 또는 (A14-3) 의 구조를 갖는 링커인, 제조 방법.

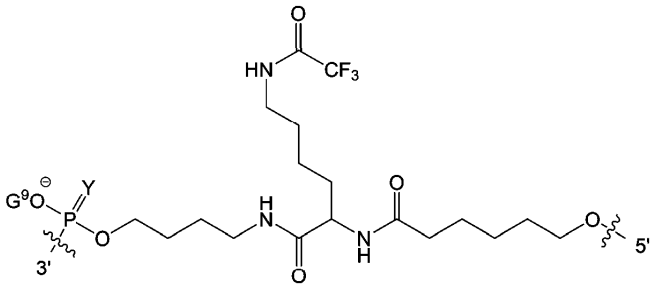


(A14-1)

,



(A14-2)



(A14-3)

(식 중, 5' 및 3' 는, 핵산 올리고머의 5' 말단측 및 3' 말단측을 각각 나타낸다.)

**청구항 7**

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

W 가 수산기이고, X 가 R 기이고, $W_0$ 이 수산기이고, 그리고 $X_0$ 이 R' 기인, 제조 방법.

**청구항 8**

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

불화물 이온원이, 불화테트라알킬암모늄인, 제조 방법.

**청구항 9**

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

불화물 이온원이, 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 인, 제조 방법.

**청구항 10**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

산소 농도가 10 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 제조 방법.

**청구항 11**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

산소 농도가 5 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 제조 방법.

**청구항 12**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

산소 농도가 4 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 제조 방법.

**청구항 13**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

산소 농도가 3 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 제조 방법.

**청구항 14**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

산소 농도가 2 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 제조 방법.

**청구항 15**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

산소 농도가 1 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 제조 방법.

**청구항 16**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

산소 농도가 0 % 인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 제조 방법.

**청구항 17**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 25 ℃ 이하인, 제조 방법.

**청구항 18**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 20 ℃ 이하인, 제조 방법.

**청구항 19**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 15 ℃ 이하인, 제조 방법.

**청구항 20**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 10 ℃ 이하인, 제조 방법.

**청구항 21**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 5 ℃ 이하인, 제조 방법.

**청구항 22**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온의 전체량과 접촉시키기 위해서 필요로 하는 시간이 30 분 이상인, 제조 방법.

**청구항 23**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온의 전체량과 접촉시키기 위해서 필요로 하는 시간이 1 시간 이상인, 제조 방법.

**청구항 24**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 10 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 25**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 20 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 26**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 30 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 27**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 40 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 28**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 50 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 29**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 60 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 30**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 70 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 31**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 80 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 32**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 90 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 33**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 95 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 34**

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 100 % 이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 35**

제 1 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 사슬 길이가 20 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 36**

제 1 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 사슬 길이가 30 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 37**

제 1 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 사슬 길이가 40 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

**청구항 38**

제 1 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서,

핵산 사슬 길이가 50 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 특허 출원은, 일본 특허출원 2020-159460호 (2020년 9월 24일 출원) 에 기초하는 파리 조약상의 우선권 및 이익을 주장하는 것으로, 여기에 인용함으로써, 상기 출원에 기재된 내용의 전체가 본 명세서 중에 받아들여지는 것으로 한다.

[0002] 본 발명은, 리보오스를 포함하는 핵산 올리고머의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 핵산 올리고머에 포함되는 리보오스의 수산기의 보호기의 탈보호 방법에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0003] 최근, 핵산 올리고머의 의료 분야에 대한 응용에 관심이 높아지고 있다. 예를 들어, 안티센스 핵산, 압타머, 리보자임, 및 siRNA 등의 RNA 간섭 (RNAi) 을 유도하는 핵산 등을 들 수 있고, 이들은 핵산 의약품이라고 불리고 있다.

[0004] 핵산 올리고머는, 고상 합성법에 의해 합성 가능하고, 고상 합성법에서는 뉴클레오시드의 포스포르아미다이트 (이하, 「아미다이트」 라고 칭한다) 가 원료로서 사용된다. 고상 담체 상에서, 핵산을 신장시켜 합성된 핵산 올리고머는, 고상 담체로부터 절출하고, 이어서, 리보오스를 포함하는 핵산 올리고머는, 리보오스의 2' 위치의 수산기의 보호기를 탈보호하여 제거하여, 목적으로 하는 핵산 올리고머가 제조되어 있다. 이와 같이 하여 합성된 핵산 올리고머의 순도는, 핵산의 고상 담체 상에서의 신장 반응 공정, 고상 담체로부터의 절출 공정, 각 보호기의 탈보호 공정 등의 다단계의 공정을 거치고 있기 때문에 반드시 만족스러운 것은 아니어서, 합성은 효율적이지는 않았다 (특허문헌 1, 2).

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국제 공개공보 제2006/022323호

(특허문헌 0002) 국제 공개공보 제2013/027843호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은, 핵산 올리고머의 효율적인 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

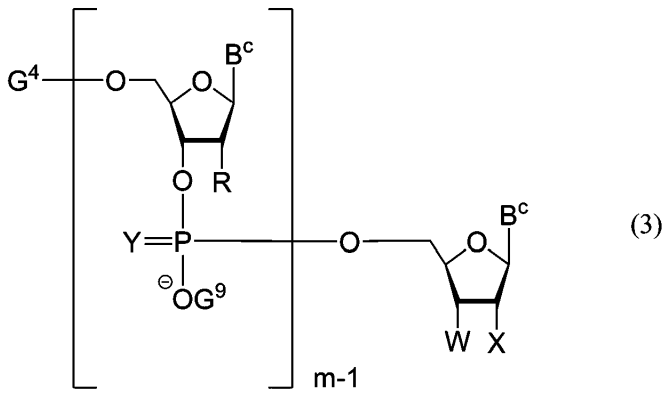
### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 상기 목적을 달성하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과, 핵산 올리고머에, 산소 농도가 일정 이하인 불활성 가스 분위기하에서, 불화물 이온을 접촉시킴으로써, 그 핵산 올리고머에 포함되는 리보오스의 수산기의 보호기를 효율적으로 탈보호할 수 있다는 지견을 얻고, 결과적으로, 핵산 올리고머의 효율적인 제조 방법을 제공할 수 있다.

[0008] 본 발명은 이들 지견에 기초하여 본 발명을 완성시킨 것으로, 이하의 양태를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0009] 1. 산소 농도가 15 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서, 식 (3) :

[0010] [화학식 1]

[0011] 


(3)

[0012] (식 중,

[0013] $G^4$ 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고,

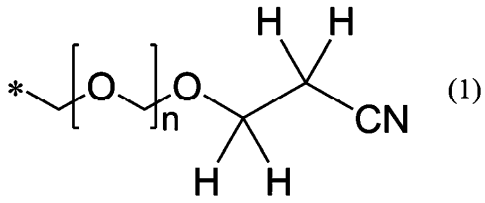
[0014] $G^9$ 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

[0015] $B^c$ 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 핵산 염기를 나타내고,

[0016] R 은, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 불소 원자 또는 OQ 기를 나타내고,

[0017] Q 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 메틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸리덴기, 또는 식 (1) :

[0018] [화학식 2]




(1)

[0019]

[0020] (식 중,

[0021] * 표시가 붙은 결합은, OQ 기의 산소 원자와의 결합인 것을 나타내고,

[0022] n 은 0 이상 중 어느 정수 (整數) 를 나타낸다.)

[0023] 의 보호기를 나타내고,

[0024] Y 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0025] m 은, 2 이상 200 까지 중 어느 정수를 나타내고,

[0026] W 및 X 는, 하기의 (a) 또는 (b) 중 어느 것으로 정의되고,

[0027] (a) W 가 수산기일 때에는, X 는 상기 R 기와 동일한 정의이다.

[0028] (b) X 가 수산기일 때에는, W 는 OV 기를 나타내고,

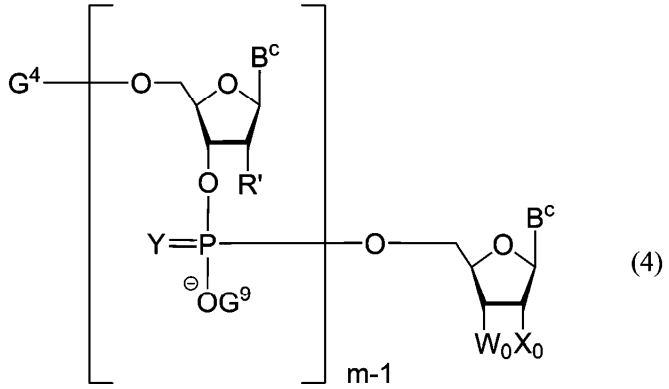
[0029] V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

[0030] 단, 상기 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. 그리고

[0031] m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m - 1 > p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

[0032] 로 나타내는 핵산 올리고머를, 불화물 이온과 접촉시키는 것을 특징으로 하는, 식 (4) :

[0033] [화학식 3]



(4)

[0034]

[0035] (식 중, R' 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,

[0036] Q' 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 메틸렌기, 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸렌기, 또는 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸리덴기를 나타내고,

[0037] 식 (4) 의 치환기 $G^4$, $G^9$, Y, $B^c$ 및 m 의 정의는, 상기 식 (3) 에 있어서의 정의와 동일하고,

[0038] $W_0$ 은, 수산기이고,

[0039] $X_0$ 은, 상기 R' 기와 동일한 정의이다.

[0040] 그리고, m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m - 1 > p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

[0041] 로 나타내는 핵산 올리고머의 제조 방법 (이하, 본 명세서 중, 「본 발명의 제조 방법」 이라고 호칭한다).

[0042] 2. 식 (1) 중의 n 이 0 또는 1 인, 전항 1 에 기재된 제조 방법.

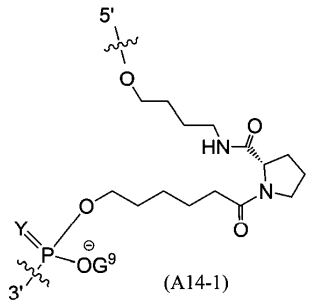
[0043] 3. 식 (1) 중의 n 이 0 인, 전항 1 에 기재된 제조 방법.

[0044] 4.식 (1) 중의 n 이 1 인, 전항 1 에 기재된 제조 방법.

[0045] 5. 비뉴클레오티드 링커가 아미노산 골격으로 이루어지는 링커인, 전항 1 ~ 4 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

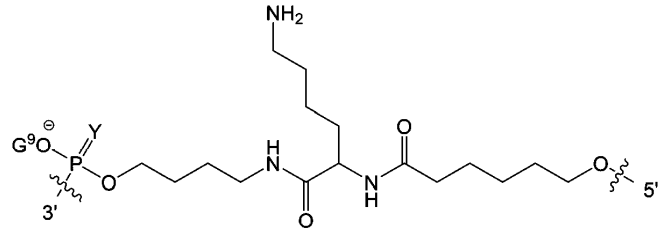
[0046] 6. 아미노산 골격으로 이루어지는 링커가, 하기 식 (A14-1), (A14-2) 또는 (A14-3) 의 구조를 갖는 링커인, 전항 5 에 기재된 제조 방법.

[0047] [화학식 4]

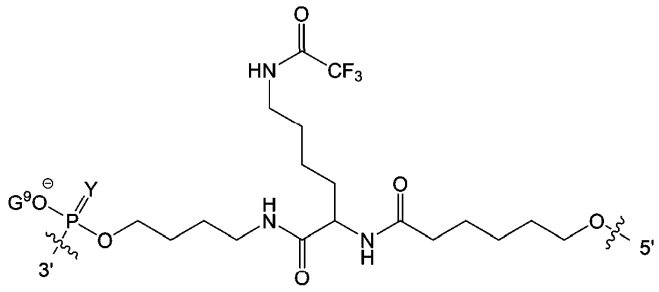


(A14-1)

,



(A14-2)



(A14-3)

[0048]

[0049] (식 중, 5' 및 3' 는, 핵산 올리고머의 5' 말단측 및 3' 말단측을 각각 나타낸다.)

[0050] 7. W 가 수산기이고, X 가 R 기이고, $W_0$ 이 수산기이고, 그리고 $X_0$ 이 R' 기인, 전항 1 ~ 6 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0051] 8. 불화물 이온원이 불화테트라알킬암모늄인, 전항 1 ~ 7 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0052] 9. 불화물 이온원이 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 인, 전항 1 ~ 8 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0053] 10. 산소 농도가 10 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0054] 11. 산소 농도가 5 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0055] 12. 산소 농도가 4 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0056] 13. 산소 농도가 3 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0057] 14. 산소 농도가 2 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0058] 15. 산소 농도가 1 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0059] 16. 산소 농도가 0 % 인 불활성 가스 분위기하에서 불화물 이온과 접촉시키는, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0060] 17. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 25 ℃ 이하인, 전항 1 ~ 16 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0061] 18. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 20 ℃ 이하인, 전항 1 ~ 16 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0062] 19. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 15 ℃ 이하인, 전항

1 ~ 16 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0063] 20. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 10 ℃ 이하인, 전항 1 ~ 16 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0064] 21. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시킬 때의 반응계 중 온도가 5 ℃ 이하인, 전항 1 ~ 16 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0065] 22.식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온의 전체량과 접촉시키기 위해서 필요로 하는 시간이 30 분 이상인, 전항 1 ~ 16 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0066] 23. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온의 전체량과 접촉시키기 위해서 필요로 하는 시간이 1 시간 이상인, 전항 1 ~ 16 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0067] 24. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 10 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0068] 25. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 20 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0069] 26. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 30 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0070] 27. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 40 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0071] 28. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 50 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0072] 29. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 60 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0073] 30. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 70 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0074] 31. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 80 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0075] 32. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 90 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0076] 33. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 95 % 이상이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0077] 34. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 100 % 이고, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인 전항 1 ~ 23 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0078] 35. 핵산 사슬 길이가 20 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 34 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0079] 36. 핵산 사슬 길이가 30 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 34 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0080] 37. 핵산 사슬 길이가 40 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 34 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0081] 38. 핵산 사슬 길이가 50 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 34 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

## *발명의 효과*

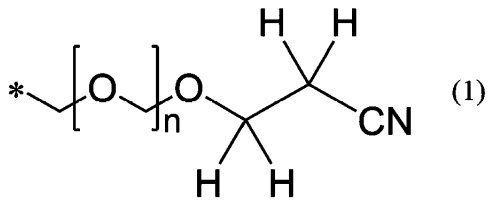
[0082] 본 발명은 효율적인 핵산 올리고머의 제조 방법을 제공한다. 제조되는 핵산 올리고머의 순도 향상을 기대할 수 있다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0083] 산소 농도가 15 % 이하인 불활성 가스 분위기하에서, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접

촉시켜, 식 (1) 의 보호기가 탈보호된 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머를 제조하는 방법에 대해 설명한다.

[0084] [화학식 5]



(1)

[0085]

[0086] 식 (1) 에 있어서, n 은, 0 이상 중 어느 정수이고, 보다 바람직하게는 0 ~ 3 의 정수, 보다 바람직하게는, 0 ~ 2 의 정수, 더욱 바람직하게는 0 또는 1, 특히 바람직하게는 1 이다.

[0087] 식 (3) 의 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. R, W 및 X 중, 식 (1) 의 비율은, 1 % 이상이어도 되고, 보다 바람직하게는 5 % 이상이고, 보다 바람직하게는 10 % 이상이고, 보다 바람직하게는 20 % 이상이고, 보다 바람직하게는 30 % 이상이고, 보다 바람직하게는 40 % 이상이고, 보다 바람직하게는 50 % 이상이고, 보다 바람직하게는 60 % 이상이고, 보다 바람직하게는 70 % 이상이고, 보다 바람직하게는 80 % 이상이고, 보다 바람직하게는 90 % 이상이고, 더욱 더 바람직하게는 95 % 이상이다. 또, 합성하는 핵산 사슬 길이는, 10 사슬 길이 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 20 사슬 길이 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 30 사슬 길이 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 40 사슬 길이 이상이 바람직하고, 더욱 더 바람직하게는, 50 사슬 길이 이상이다.

[0088] 이 식 (1) 로 나타내는 수산기의 보호기를 탈보호하는 공정에서는, 불화물 이온원으로서, 전형적으로는, 불화테트라알킬암모늄이 사용된다.

[0089] 불화테트라알킬암모늄으로는, 테트라부틸암모늄플루오라이드, 및 테트라메틸암모늄플루오라이드 등을 들 수 있다. 그 중에서도 테트라부틸암모늄플루오라이드 (TBAF) 가 보다 바람직하다.

[0090] 사용하는 불화물 이온의 양은, 통상, 제거되는 보호기 1 몰당 1 ~ 1000 몰, 바람직하게는 1 ~ 500, 보다 바람직하게는 2 ~ 200 몰, 보다 바람직하게는 4 ~ 100 몰이다.

[0091] 이 공정에서는, 통상, 반응에 불활성인 유기 용매가 사용되고, 구체적으로는, 예를 들어, 술폭사이드 용매, 니트릴 용매, 에테르 용매, 아미드 용매, 케톤 용매, 지방족 탄화수소 용매, 에스테르 용매, 방향족 용매, 또는 이들 2 종류 이상의 혼합 용매를 들 수 있고, 이들 용매 중 술폭사이드 용매가 바람직하다. 술폭사이드 용매로는, 디메틸술폭사이드 등을 들 수 있다. 니트릴 용매로는, 아세토니트릴, 및 프로피오니트릴 등을 들 수 있다. 에테르 용매로는, 테트라하이드로푸란 등을 들 수 있다. 아미드 용매로는, N-메틸-2-피롤리돈 등을 들 수 있다. 케톤 용매로는, 아세톤, 및 메틸에틸케톤 등을 들 수 있다. 지방족탄화수소 용매로는, 헥산, 및 헵탄 등을 들 수 있다. 에스테르 용매로는, 아세트산메틸, 및 아세트산에틸 등을 들 수 있다. 방향족 용매로는, 톨루엔, 및 피리딘 등을 들 수 있다. 그 중에서도, 디메틸술폭사이드 또는 디메틸술폭사이드와 아세토니트릴의 혼합 용매가 바람직하다.

[0092] 식 (1) 로 나타내는 수산기의 보호기를 탈리하는 공정에서 사용되는 시약인 불화물 이온원은, 용매에 용해 후, 통상, 탈수하여 사용한다. 탈수제로서 몰레큘러시브, 황산염 등을 들 수 있고, 바람직하게는 몰레큘러시브 4A 를 사용한다.

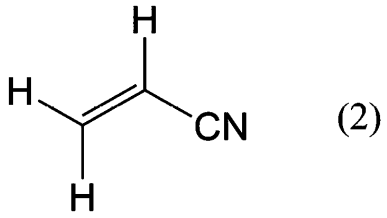
[0093] 사용하는 용매의 양은, 통상, 탈보호 공정에 제공되는 핵산 올리고머 1 몰당, 5 ~ 8,000 L, 바람직하게는 50 ~ 2,000 L, 보다 바람직하게는 100 ~ 1,600 L 이다.

[0094] 필요하다면, 본 공정에 있어서의 부생성물인 하기 식 (2) 에 나타내는 화합물과 반응하여 당해 화합물을 포착하는 화합물을 첨가할 수 있다. 그 포착하는 화합물로는, 예를 들어, 니트로알칸, 알킬아민, 아미딘, 티올, 티올 유도체 또는 이들 2 종류 이상의 혼합물을 들 수 있다. 「니트로알칸」 으로는, 예를 들어 니트로메탄을 들 수 있다. 「알킬아민」 으로는, 예를 들어, 직사슬형의 탄소수 1 ~ 6 의 알킬아민, 및 탄소수 1 ~ 8 의 고리형 아민을 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 메틸아민, 에틸아민, n-프로필아민, n-부틸아민, n-펜틸아민, n-헥실아민, 모르폴린, 및 피페리딘을 들 수 있다. 「아미딘」 으로는, 예를 들어, 벤즈아미딘, 및 포름아미딘을 들 수 있다. 「티올」 로는, 예를 들어, 직사슬형의 탄소수 1 ~ 6 의 티올을 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 메탄티올, 에탄티올, 1-프로판티올, 1-부탄티올,

1-펜탄티올, 및 1-헥산티올을 들 수 있다. 「티올 유도체」 로는, 예를 들어, 동일 또는 상이한 직사슬형의 탄소수 1 ~ 6 의 알킬티올기를 갖는 알코올 또는 에테르를 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 2-메르캅토에탄올, 4-메르캅토-1-부탄올, 6-메르캅토-1-헥산올, 메르캅토메틸에테르, 2-메르캅토에틸에테르, 3-메르캅토프로필에테르, 4-메르캅토부틸에테르, 5-메르캅토펜틸에테르, 및 6-메르캅토헥실에테르를 들 수 있다. 보다 바람직하게는 니트로메탄을 사용한다.

[0095] 식 (2) :

[0096] [화학식 6]




(2)

[0097]

[0098] 부생성물인 식 (2) 에 나타내는 화합물을 포착하는 화합물의 사용량은, 식 (1) 로 나타내는 수산기의 보호기를 탈리시키는 불화물 이온원에 대하여 0.1 ~ 100.0 몰% 로 사용할 수 있고 바람직하게는 1.0 ~ 50.0 몰%, 바람직하게는 2.0 ~ 40.0 몰%, 보다 바람직하게는 3.0 ~ 30.0 몰% 이다.

[0099] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머와 불화물 이온의 접촉 반응은, 불화물 이온을 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 첨가해도 되고, 반대로, 불화물 이온에 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머를 첨가해도 되고, 양자를 동시에 첨가해도 된다. 불화물 이온을 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 첨가하는 방법이 바람직하다.

[0100] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온의 전체량을 첨가하여 접촉시키기 위해서 필요로 하는 시간은, 5 분 이상이 바람직하고, 10 분 이상이 보다 바람직하고, 15 분 이상이 보다 바람직하고, 30 분 이상이 보다 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 시간 이상에 걸쳐 적하하는 것이다.

[0101] 이러한 첨가는, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머를 포함하는 용액의 액 표면 또는 액 중에 5 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 바람직하고, 10 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 보다 바람직하고, 15 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 보다 바람직하고, 30 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 보다 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 시간 이상에 걸쳐 적하하는 것이다.

[0102] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 첨가할 때의 양방 또는 편방의 용액의 온도는, 80 ℃ 이하여도 되고, 바람직하게는 양방 모두 40 ℃ 이하이고, 바람직하게는 양방 모두 35 ℃ 이하이고, 보다 바람직하게는 양방 모두 30 ℃ 이하이고, 보다 바람직하게는 양방 모두 25 ℃ 이하이고, 보다 바람직하게는 양방 모두 20 ℃ 이하이고, 보다 바람직하게는 양방 모두 15 ℃ 이하이고, 보다 바람직하게는 양방 모두 10 ℃ 이하이고, 더욱 더 바람직하게는 양방 모두 5 ℃ 이하이다.

[0103] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 첨가 종료 후, 1 분 이상 보온해도 되고, 바람직하게는 5 분 이상 보온이고, 보다 바람직하게는 10 분 이상 보온이고, 보다 바람직하게는 15 분 이상 보온이고, 보다 바람직하게는 30 분 이상 보온이고, 더욱 더 바람직하게는 1 시간 이상 보온이다.

[0104] 또한, 보온 후, 승온시켜도 되고, 5 ℃ 이상 80 ℃ 이하로 승온시켜도 되고, 바람직하게는 10 ℃ 이상 40 ℃ 이하로의 승온이고, 바람직하게는 10 ℃ 이상 35 ℃ 이하로의 승온이고, 바람직하게는 15 ℃ 이상 35 ℃ 이하로의 승온이고, 보다 바람직하게는 20 ℃ 이상 35 ℃ 이하로의 승온이고, 더욱 바람직하게는 25 ℃ 이상 35 ℃ 이하로의 승온이다.

[0105] 또한 승온 후, 탈보호 반응의 시간은, 사용하는 탈보호제의 종류, 반응 온도에 따라 상이하지만, 통상, 1 시간 ~ 100 시간, 바람직하게는, 1 ~ 24 시간, 보다 바람직하게는 2 ~ 12 시간, 더욱 바람직하게는 3 ~ 6 시간이다.

[0106] 또한, 불화물 이온은, 임의의 타이밍에 추가해도 된다.

[0107] 산소 농도가 15 % 이하인 불활성 가스 분위기는, 예를 들어, 상기 소정의 산소 농도 이하의 불활성 가스를 조제하여, 반응계에 공급하고, 기상 중의 산소 농도가 상기 설정 농도 범위 내인 것을 측정하고, 확인함으로써 조

정해도 된다. 구체적으로는, 반응계의 기상에 아르곤 혹은 질소 등의 고순도의 불활성 가스, 또는 산소 농도를 소정의 농도로 조정한 불활성 가스를 유통시키거나, 혹은 반응계의 기상 분위기를 상기 불활성 가스 또는 농도 조정한 불활성 가스로 치환함으로써 조정할 수 있다.

[0108] 여기서, 본 발명의 제법에서 사용하는 불활성 가스란, 질소 가스, 아르곤 가스, 헬륨 가스, 이산화탄소를 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 질소 가스 또는 아르곤 가스를 들 수 있다.

[0109] 반응계 분위기 치환 방법은, 감압 치환, 가압 치환, 플로 치환, 버블링에 의한 치환, 또는 동결 탈기에 의한 치환이어도 되고, 그 때 초음파를 가하여 가열해도 된다. 보다 바람직한 방법은, 플로 치환 및 감압 치환이다.

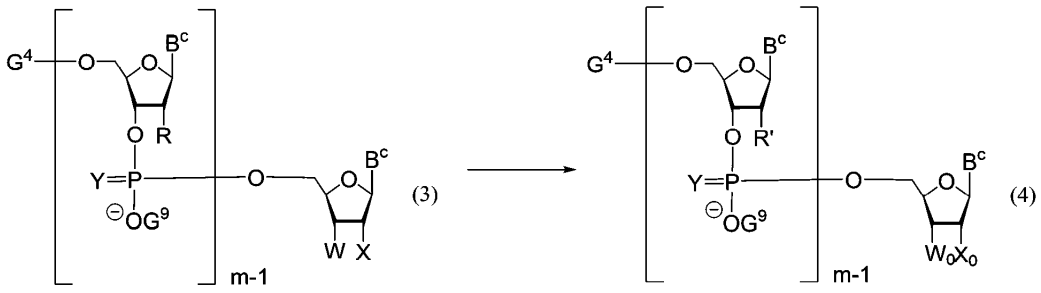
[0110] 산소 농도는, 바람직하게는 15 % 이하, 보다 바람직하게는 10 % 이하, 보다 바람직하게는 5 % 이하가 바람직하고, 보다 바람직하게는 4 % 이하가 바람직하고, 보다 바람직하게는 3 % 이하가 바람직하고, 보다 바람직하게는 2 % 이하가 바람직하고, 보다 바람직하게는 1 % 이하가 바람직하고, 더욱 더 바람직하게는 0 % 이다.

[0111] 보호기의 탈리 반응시에 반응계의 교반은 필수는 아니지만, 통상, 교반 동력 Pv 가 0.0 ~ 0.5 kW/m³ 인 범위에서 교반을 실시하고, Pv 가 0.1 ~ 0.3 kW/m³ 인 교반이 바람직하다.

[0112] 반응 후에 생성한 핵산 올리고머의 반응 혼합물로부터의 분리 정제 수단은, 통상적인 방법이 채용되고, 예를 들어, 추출, 농축, 중화, 여과, 원심 분리, 재결정, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피, 역상 칼럼 크로마토그래피, 이온 교환 칼럼 크로마토그래피, 겔 여과 칼럼 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 친수성 상호 작용 액체 크로마토그래피, 침전 (예를 들어, 에탄올, 이소프로판올, 메탄올 또는 폴리에틸렌글리콜을 사용한 핵산 올리고머의 침전), 투석, 한외 여과 등의 수단을 사용함으로써, 2' 위치 또는 3' 위치의 수산기의 보호기인 식 (1) 에 의한 보호가 탈보호된다. 정제된 핵산 올리고머를 단리할 수 있다. 단리된 핵산 올리고머는, 통상, 그 5' 말단의 수산기가 보호된 핵산 올리고머로서 얻어진다.

[0113] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머로부터 식 (1) 로 나타내는 보호기를 탈보호함으로써 하기 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머를 얻는 반응은 이하와 같다. (스킴 1).

[0114] [화학식 7]




스킴 1

[0115]

[0116] $G^4$ 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고,

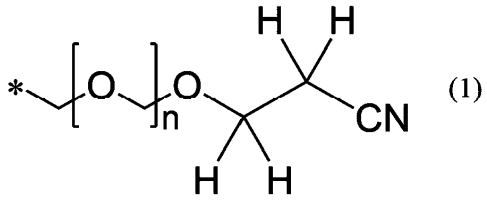
[0117] $G^9$ 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

[0118] $B^c$ 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 핵산 염기를 나타내고,

[0119] R 은, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 수소 원자, 불소 원자 또는 OQ 기를 나타내고,

[0120] Q 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 메틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸리덴기, 또는 식 (1) :

[0121] [화학식 8]



(1)

[0122]

[0123] (식 중,

[0124] * 표시가 붙은 결합은, OQ 기의 산소 원자와의 결합인 것을 나타내고,

[0125] n 은 0 이상 중 어느 정수를 나타낸다.)

[0126] 의 보호기를 나타내고,

[0127] Y 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하며, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0128] m 은, 2 이상 200 까지 중 어느 정수를 나타내고,

[0129] W 및 X 는, 하기의 (a) 또는 (b) 중 어느 것으로 정의되고,

[0130] (a) W 가 수산기일 때에는, X 는 상기 R 기와 동일한 정의이다.

[0131] (b) X 가 수산기일 때에는, W 는 OV 기를 나타내고,

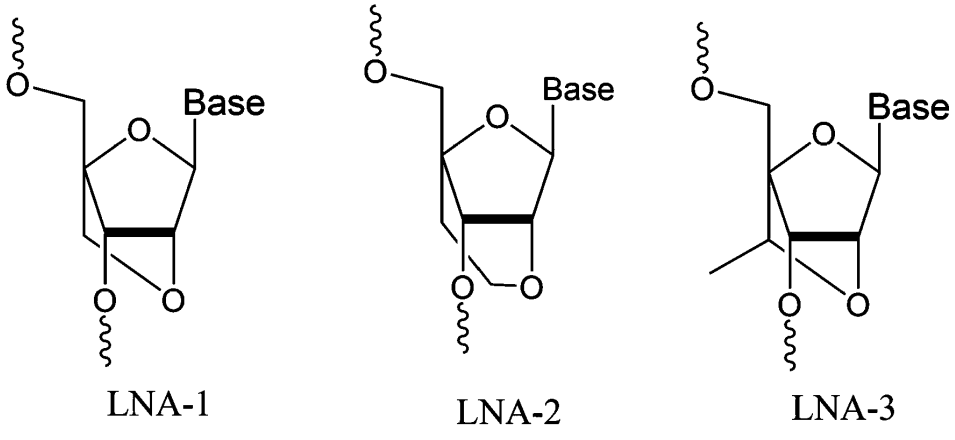
[0132] V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

[0133] 단, 상기 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. 그리고

[0134] m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m - 1 > p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

[0135] 식 (3) 또는 식 (4) 에 있어서, R 이 OQ 기를 나타내고, R' 가 OQ' 기를 나타낼 때, 리보오스의 구조는, 하기 식 (LNA-1), (LNA-2) 또는 (LNA-3) 으로 나타낸다.

[0136] [화학식 9]



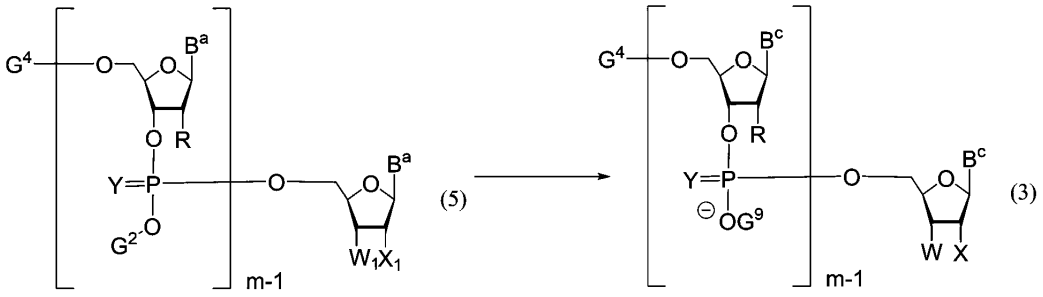

[0137]

[0138] (식 중, Base 는, 핵산 염기를 나타낸다)

[0139] 본 발명에서 사용되는 핵산 올리고머 내에 포함되는 뉴클레오시드 (리보오스, 및 디옥시리보오스) 로는, DNA, RNA, 2'-O-MOE(2'-O-메톡시에틸), 2'-O-Me, 2'-F RNA, 및 상기의 LNA 가 예시되지만, 상기 뉴클레오시드는, 이들에 한정되지 않는다.

[0140] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 예를 들어, 스킴 2 에 나타내는 바와 같이, 식 (5) 로 나타내는 고상 합성에 의해 제조되는 핵산 올리고머를 고상 담체로부터 절출하여 얻어진다.

[0141] [화학식 10]



[0142] 스킴 2

[0143] 고상 담체 상에서 합성되는 식 (5) 의 핵산 올리고머에 대해 설명한다.

[0144] 치환기 $B^a$ 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타낸다.

[0145] $G^4$ 및 Y 는, 상기의 식 (3) 에 있어서 정의된 바와 같고,

[0146] $G^2$ 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 인산의 보호기를 나타내고,

[0147] $X_1$ 이 OZ 를 나타낼 때, $W_1$ 은 OV 기를 나타내고,

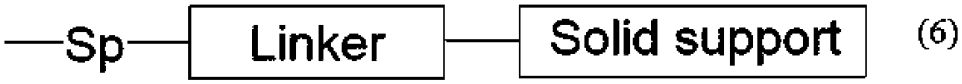
[0148] V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

[0149] $X_1$ 이 R 기를 나타낼 때, $W_1$ 은 OZ 로 나타내는 기를 나타내고,

[0150] Z 는, 고상 담체, 및 고상 담체와 핵산 올리고머의 3' 말단의 리보오스의 2' 위치 혹은 3' 위치의 수산기의 산소 원자를 연결하는 연결부로 이루어지는 기를 나타낸다.

[0151] 보다 구체적으로는, Z 는, 하기 식 (6) 으로 나타내는 구조를 나타내고,

[0152] [화학식 11]

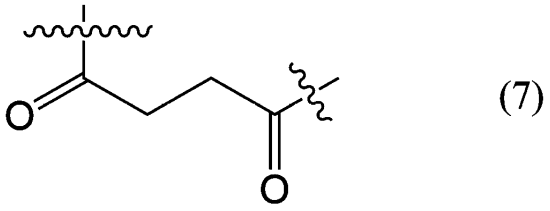


[0153]

[0154] 식 (6) 에 있어서, Sp 는 스페이서를 나타낸다.

[0155] 스페이서 (Sp) 는, 예를 들어, 하기 식 (7) 에 나타내는 구조식을 갖는 것이 예시된다.

[0156] [화학식 12]

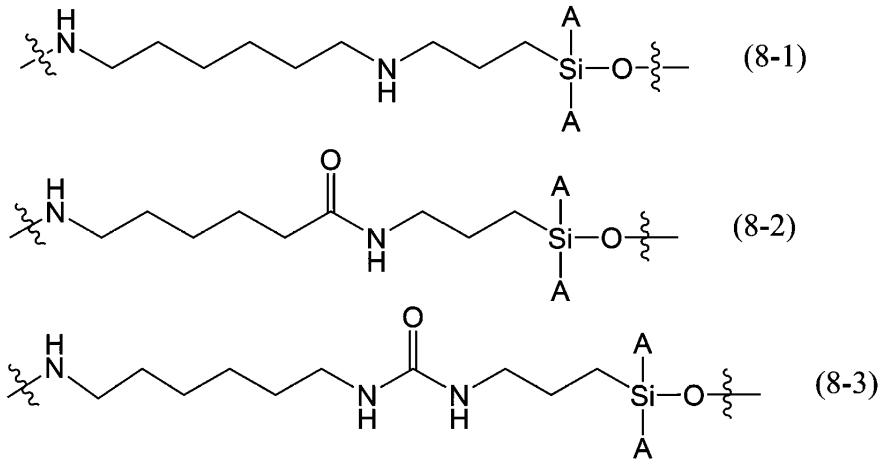


[0157]

[0158] Linker 는, 예를 들어, 하기 식 (8-1) (8-2) (8-3) (8-4) (8-5) (8-6) (8-7), (8-8) 에 나타내는 구조여도 된다.

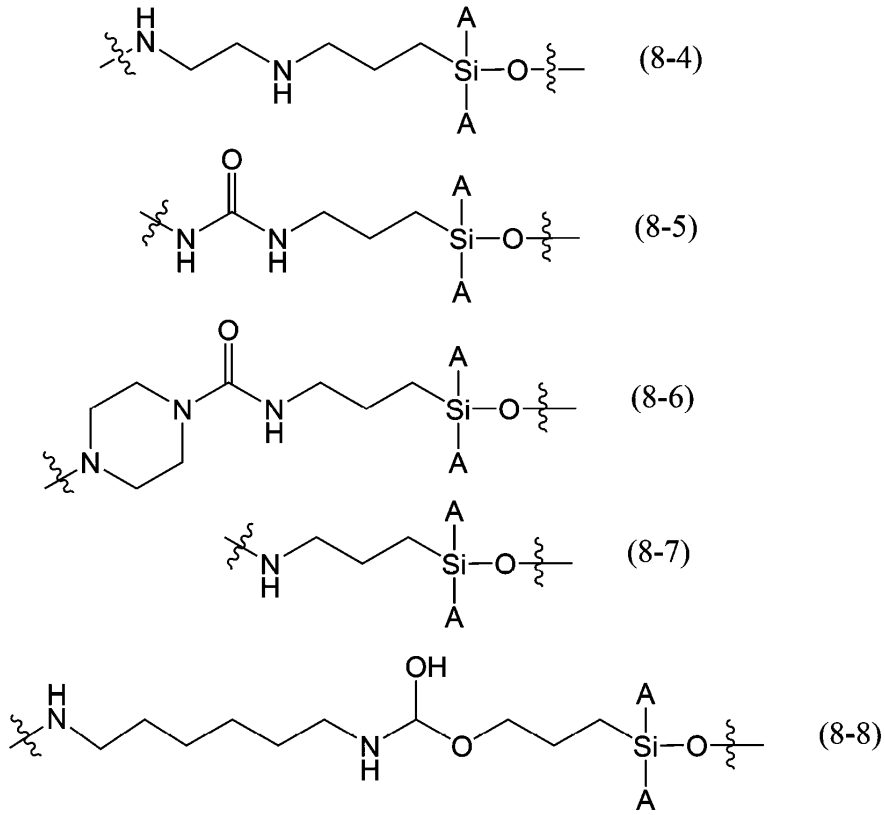
[0159] Solid support 로는, 무기 다공질 담체나 유기계 수지 담체 등을 들 수 있다. 무기 다공질 담체에는, 예를 들어, Controlled pore Glass (CPG) 및 제올라이트를 들 수 있다. 유기계 수지 담체에는, 예를 들어, 폴리스티렌으로 이루어지는 담체를 들 수 있다.

[0160] [화학식 13]




[0161]

[0162] [화학식 14]




[0163]

[0164] (식 중, A 는, 각각 독립적으로 수산기, 알콕시기, 또는 알킬기여도 된다. 알콕시기로는 예를 들어 메톡시기 및 에톡시기를 들 수 있다. 알킬기로는 예를 들어 메틸기, 에틸기, 이소프로필기, n-프로필기를 들 수 있다. Si 는, 담체 표면의 수산기의 산소와 결합하고 있는 것을 나타낸다.)

[0165] $G^4$ 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고, 보호기를 나타내는 경우에는 $G^1$ 과 동일한 보호기를 나타낸다. $G^4$ 는 탈보호된 경우에는 수소 원자이지만, 그 경우의 뉴클레오티드 화합물도 또한, 일련의 핵산 신장 반응의 공정에 제공된다.

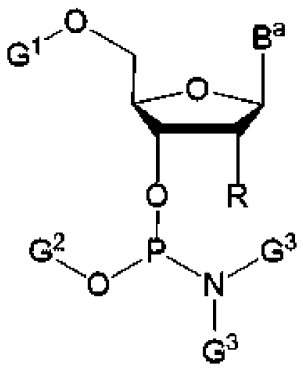
[0166] $G^9$ 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타낸다. 알킬암모늄 이온으로서, 구체적인 알킬 부분의 예로는, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 디부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 및 헥실을 들 수 있지만, 보다 구체적으로는, 예를 들어, 디에틸암모늄 이온, 트리에틸암모늄 이온, 테트라부틸암모늄 이온, 헥실암모늄 이온, 및 디부틸암모늄 이

온 등을 들 수 있다. 또, 알칼리 금속 이온으로는, 예를 들어, 나트륨 이온, 및 리튬 이온을 들 수 있다.

또, 하이드록시알킬암모늄 이온으로서 구체적인 하이드록시알킬 부분의 예로는, 예를 들어, 하이드록시메틸, 하이드록시에틸, 하이드록시-n-프로필, 하이드록시이소프로필, 하이드록시-n-부틸, 트리스하이드록시메틸을 들 수 있지만, 보다 구체적인 하이드록시알킬암모늄 이온의 예로는, 트리스하이드록시메틸암모늄 이온 등을 들 수 있다.

[0167] 상기 식 (5) 의 화합물은, 예를 들어, 하기 식 (A13) 의 아미다이트 화합물을 사용하여 아미다이트법에 의해 제조된다.

[0168] [화학식 15]



(A13)

[0169]

[0170] (식 중,

[0171] R 은, 수소 원자, 불소 원자, 또는 OQ 기를 나타내고,

[0172] Q 는, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 4'의 탄소 원자와 결합한 메틸렌기, 4'의 탄소 원자와 결합한 에틸렌기, 4'의 탄소 원자와 결합한 에틸리덴기, 또는 상기 식 (1) 로 나타내는 보호기를 나타내고,

[0173] $B^a$ 는, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타내고,

[0174] $G^1$ 은, 수산기의 보호기를 나타내고,

[0175] $G^2$ 는, 인산의 보호기를 나타내고,

[0176] $G^3$ 은, 알킬기, 또는 서로 그 말단에서 결합하여 고리형 구조를 나타낸다.)

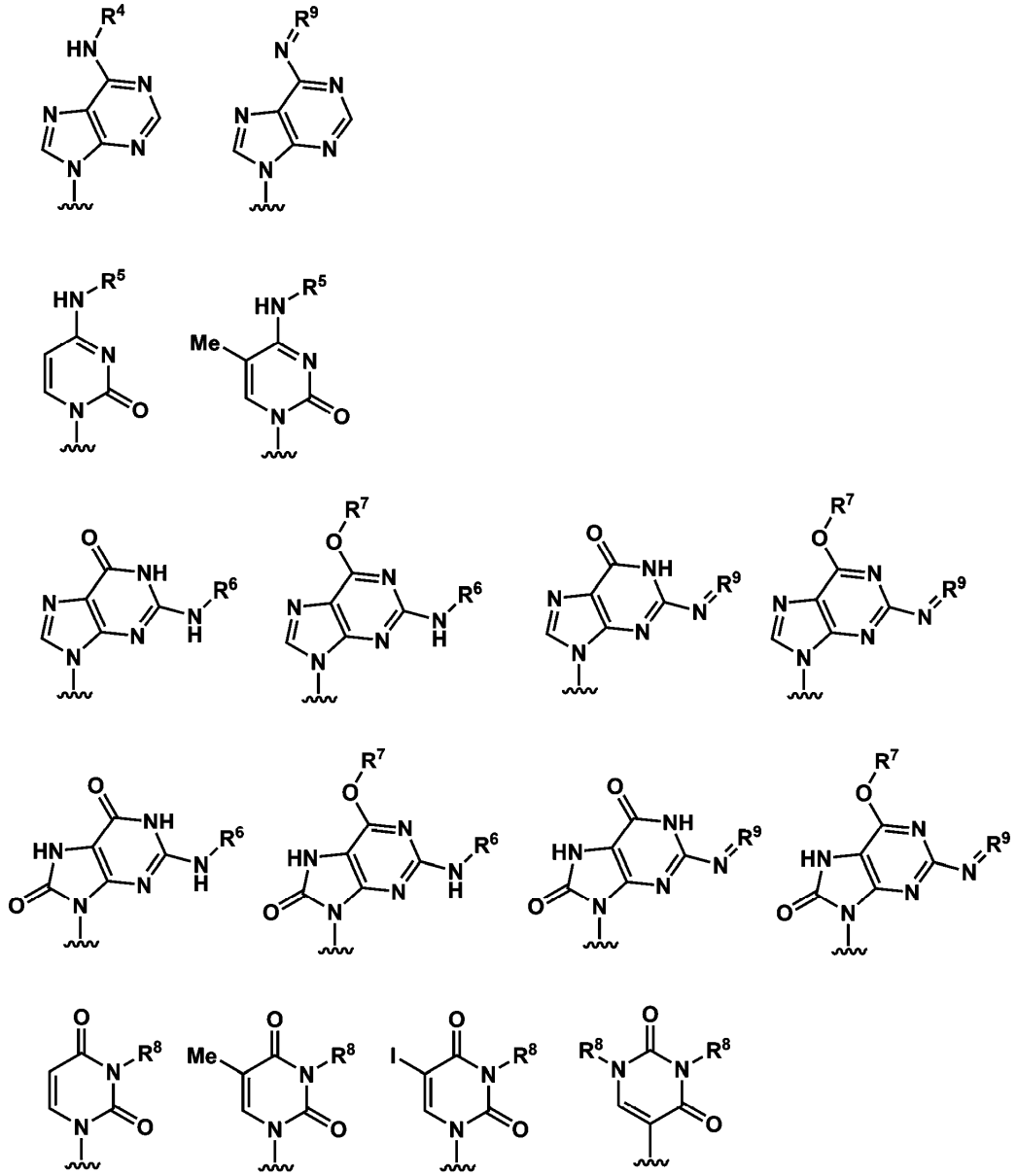
[0177] $B^a$ 는, $B^c$ 로 나타내는 핵산 염기 또는 당해 핵산 염기가 보호기로 보호된 핵산 염기를 나타낸다.

[0178] $B^a$ 에 있어서의 핵산 염기는, 특별히 한정되지 않는다. 당해 핵산 염기로는, 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민, 5-메틸시토신, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실 등을 들 수 있다. 또, 핵산 염기는, 치환기에 의해 치환되어 있어도 된다. 그러한 치환기로는, 예를 들어, 플루오로기, 클로로기, 브로모기, 및 요오드기 등의 할로겐 원자, 아세틸기 등의 아실기, 메틸기, 및 에틸기 등의 알킬기, 벤질기 등의 아릴알킬기, 메톡시기 등의 알콕시기, 메톡시에틸기 등의 알콕시알킬기, 시아노에틸기 등의 시아노알킬기, 하이드록시기, 하이드록시알킬기, 아실옥시메틸기, 아미노기, 모노알킬아미노기, 디알킬아미노기, 카르복시기, 시아노기, 및 니트로기 등, 그리고 그들 2 종류 이상의 치환기의 조합을 들 수 있다.

[0179] 핵산 염기가 고리 외에 아미노기를 갖는 경우, 당해 아미노기의 보호기로는, 특별히 한정되지 않고, 공지된 핵산 화학에서 사용되는 보호기를 사용할 수 있고, 그러한 보호기로는, 예를 들어, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기, 아세틸기, 프로피오닐기, 부티릴기, 이소부티릴기, 페닐아세틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 및 (디메틸아미노)메틸렌기 등, 그리고 그들 2 종류 이상의 보호기의 조합을 들 수 있다.

[0180] $B^a$ 는, 보다 구체적으로는,

[0181] [화학식 16]



[0182]

[0183] (상기 식 중,

[0184] $R^4$ 는, 수소 원자, 메틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0185] $R^5$ 는, 수소 원자, 아세틸기, 이소부티릴기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0186] $R^6$ 은, 수소 원자, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 이소부티릴기를 나타내고,

[0187] $R^7$ 은, 2-시아노에틸기를 나타내고,

[0188] $R^8$ 은, 수소 원자, 메틸기, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기 또는 4-메틸벤조일기를 나타내고,

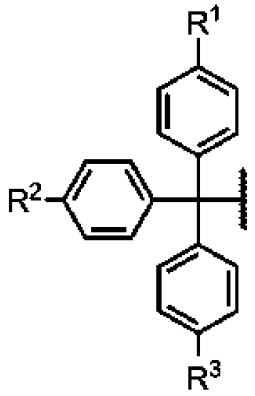
[0189] $R^9$ 는, 디메틸아미노메틸렌기를 나타낸다.)

[0190] 중 어느 것으로 나타내는 기를 나타낸다.

[0191] $G^1$ 로는, 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별히 제한 없이 사용할 수 있고, 아미다이트 화합물에서 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다.

[0192] $G^1$ 로는, 바람직하게는, 이하의 기이다.

[0193] [화학식 17]

[0194] 


[0195] (식 중, $R^1$, $R^2$ 및 $R^3$ 은 동일 또는 상이하며 수소 또는 알콕시기를 나타낸다.)

[0196] $R^1$, $R^2$ 및 $R^3$ 은, 1 개가 수소이고, 나머지 2 개가 동일 또는 상이한 (동일이 바람직하다) 알콕시기인 것이 바람직하고, 알콕시기로는 메톡시기가 특히 바람직하다.

[0197] $G^2$ 로는, 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별히 제한 없이 사용할 수 있고, 아미다이트 화합물에서 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다. $G^2$ 로는, 예를 들어, 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 시클로알킬기, 할로알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아릴알킬기, 시클로알케닐기, 시클로알킬알킬기, 시클릴알킬기, 하이드록시알킬기, 아미노알킬기, 알콕시알킬기, 헤테로시클릴알케닐기, 헤테로시클릴알킬기, 헤테로아릴알킬기, 실릴기, 실릴옥시알킬기, 모노, 디 또는 트리알킬실릴기, 모노, 디 또는 트리알킬실릴옥시알킬기 등을 들 수 있고, 이들은 1 개 이상의 전자 구인기로 치환되어 있어도 된다.

[0198] $G^2$ 는, 바람직하게는, 전자 구인기로 치환된 알킬기이다. 당해 전자 구인기로는, 예를 들어, 시아노기, 니트로기, 알킬술포닐기, 할로겐 원자, 아릴술포닐기, 트리할로메틸기, 트리알킬아미노기 등을 들 수 있고, 바람직하게는 시아노기이다.

[0199] $G^2$ 로는, 특히 바람직한 것은, 이하의 기이다.

[0200] [화학식 18]

[0201]

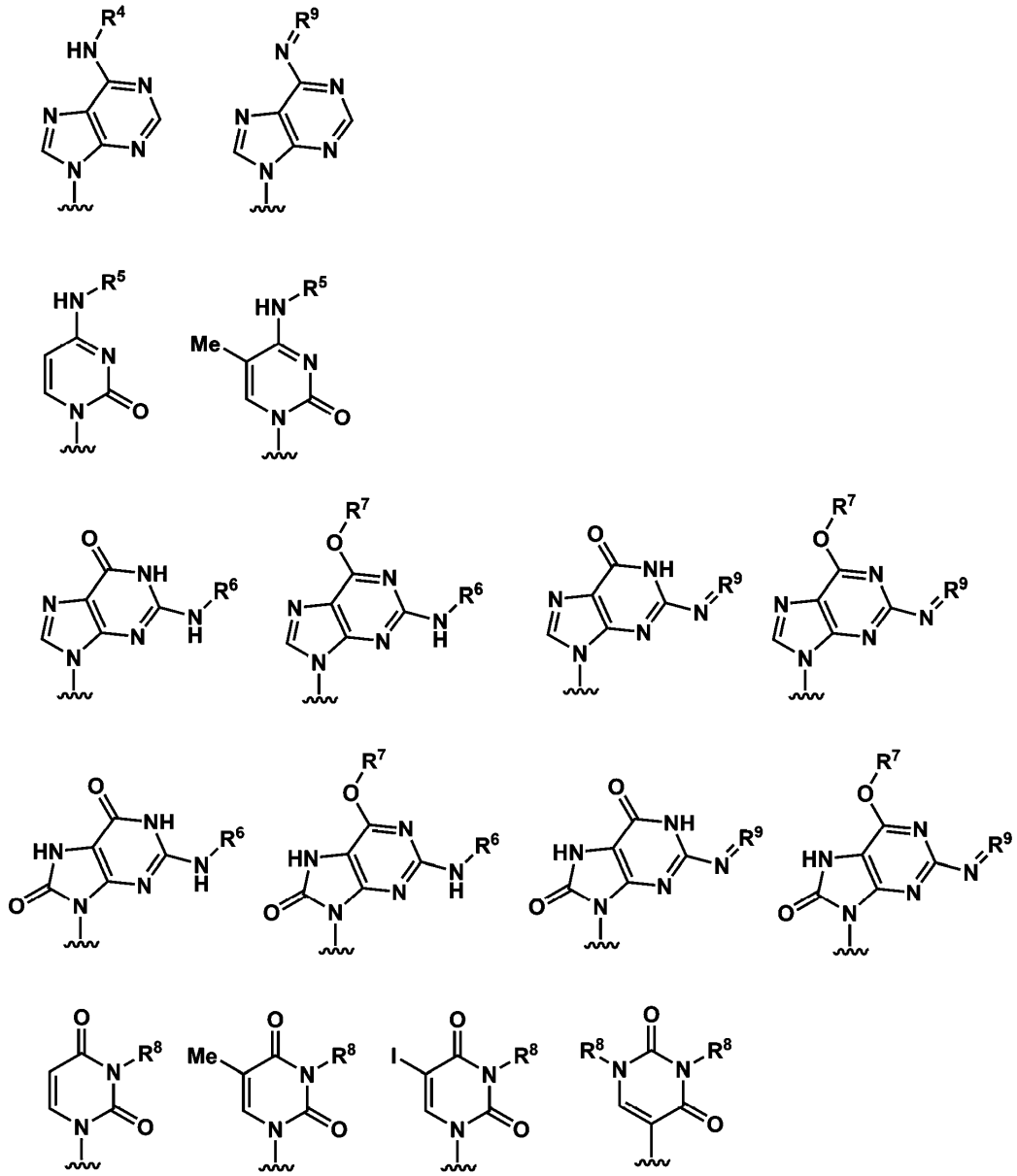

[0202] $G^3$ 은, 2 개의 $G^3$ 이 서로 결합하여 고리형 구조를 형성하고 있어도 된다. $G^3$ 으로는, 양방이 이소프로필기인 것이 바람직하다.

[0203] 상기 $R^1$, $R^2$, $R^3$ 및 $G^2$ 의 정의에 있어서의 알킬기는, 직사슬형 또는 분기 사슬형 중 어느 것이어도 되고, 바람직하게는 탄소수 1 ~ 12 의 알킬기, 보다 바람직하게는 탄소수 1 ~ 6 의 알킬기이다. 구체적인 알킬기의 예로는, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 및 헥실을 들 수 있다. 상기 정의에 있어서의 알콕시기를 구성하는 알킬기 부분은, 여기서의 알킬기의 정의와 동일한 정의를 갖는다.

[0204] 본 명세서에 있어서는, 핵산 염기란, 천연형 혹은 비천연형의 핵산 염기 골격을 갖는 기를 의미한다. 상기

핵산 염기는, 천연형 혹은 비천연형의 핵산 염기 골격이 수식된 수식체도 포함한다. $B^c$ 로 나타내는 핵산 염기로는, 보다 구체적으로는, 이하의 구조가 예시된다.

[0205] [화학식 19]



[0206]

[0207] (상기 식 중,

[0208] $R^{4'}$ 는, 수소 원자, 또는 메틸기를 나타내고,

[0209] $R^{5'}$ 는, 수소 원자, 또는 아세틸기를 나타내고,

[0210] $R^{6'}$ 는, 수소 원자를 나타내고,

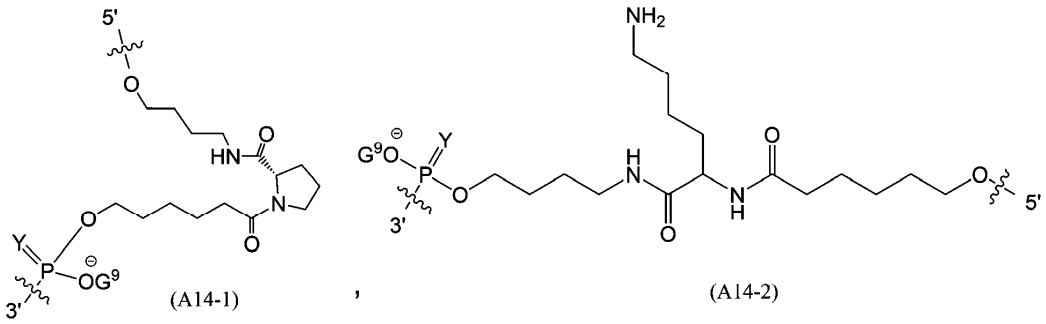
[0211] $R^{8'}$ 는, 수소 원자, 메틸기를 나타낸다.)

[0212] 식 (3) 및 식 (4) 의 핵산 올리고머의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m - 1 > p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 도입될 수 있는 비뉴클레오티드 링커에 대해 설명한다.

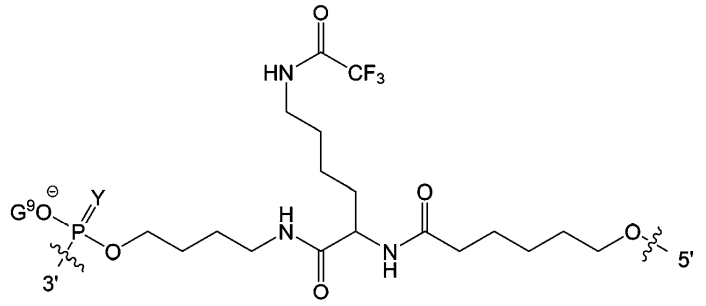
[0213] 비뉴클레오티드 링커로는, 아미노산 골격으로 이루어지는 링커 (예를 들어, 일본 특허공보 제5157168호 또는 일본 특허공보 제5554881호에 기재된 아미노산 골격으로 이루어지는 링커) 가 예시된다. 구체적으로는, 비한

정적인 예로서, 예를 들어, 식 (A14-1), (A14-2) 또는 (14-3) (예를 들어, 일본 특허공보 제5555346호 또는 일본 특허공보 제5876890호에 기재) 으로 나타내는 링커가 예시된다. 이들 링커 이외에 국제 공개 제2012/005368호, 국제 공개 제2018/182008호 또는 국제 공개 제2019/074110호에 기재된 링커가 예시된다.

[0214] [화학식 20]



(A14-1) , (A14-2)



(A14-3)

[0215]

[0216] 식 (3) 에 있어서의 R 기 및 식 (4) 에 있어서의 R' 기가, 수산기 이외의 치환기인 뉴클레오티드 및 아미다이트는, 일본 특허공보 제3745226호 등에 기재된 공지된 방법, 국제 공개 제2001/053528호 혹은 일본 공개특허공보 2014-221817호 및 그것에 인용되는 공지된 방법으로 합성되는 뉴클레오시드로부터 제조할 수도 있고, 나아가서는, 시판품으로서 입수 가능한 것을 사용하여, 후술하는 실시예에 기재된 방법에 준거하거나 또는 이들 방법에 적절히 변경을 가한 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0217] 핵산 올리고머 (이하, 올리고뉴클레오티드라고도 기재한다) 의 고상 담체로부터의 절출

[0218] 절출 공정은, 원하는 사슬 길이의 핵산 올리고머를, 절출제로서 농암모니아수를 사용하여 실시하였다.

[0219] 포스포르아미다이트법에서는, 일반적으로 공지된 방법 (예를 들어, 상기의 일본 특허공보 제5157168호 또는 일본 특허공보 제5554881호에 기재된 방법) 에 따라, 탈보호 공정, 축합 공정, 및 산화 공정의 각 공정을 반복하여 실시함으로써, 핵산 신장 반응을 실시한다.

[0220] (핵산 신장 반응)

[0221] 본 명세서에 있어서, 「핵산 신장 반응」 이란, 포스포디에스테르 결합을 개재하여, 뉴클레오티드를 순차 결합시킴으로써, 올리고뉴클레오티드를 신장시키는 반응을 의미한다. 핵산 신장 반응은, 일반적인 포스포르아미다이트법의 순서에 따라 실시할 수 있다. 핵산 신장 반응은, 포스포르아미다이트법을 채용하는 핵산 자동 합성 장치 등을 사용하여 실시해도 된다.

[0222] 핵산 올리고머의 사슬 길이는, 예를 들어, 2 ~ 200 mer 이나 10 ~ 150 mer, 15 ~ 110 mer 이어도 된다.

[0223] 5' 탈보호 공정은, 고상 담체 상에 담지되는 RNA 사슬 말단의 5' 하이드록실기의 보호기를 탈보호하는 공정이다. 일반적인 보호기로는, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기) 나 4-모노메톡시트리틸기, 4,4',4"-트리메톡시트리틸기가 사용된다. 탈보호는, 산을 사용하여 실시할 수 있다. 탈보호용의 산으로는, 예를 들어, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리클로로아세트산, 메탄술폰산, 염산, 아세트산, p-톨루엔술폰산 등을 들 수 있다.

[0224] 축합 공정은, 상기 탈보호 공정에 의해 탈보호한 올리고뉴클레오티드 사슬 말단의 5' 하이드록실기에 대해, 식 (A13) 으로 나타내는 뉴클레오시드 포스포르아미다이트를 결합시키는 반응이다. 또한, 핵산 신장에 사용하

는 포스포르아미다이트로는, 식 (A13) 또는 (A12) 으로 나타내는 아미다이트 화합물을 사용한다. 또, 그 밖에 사용 가능한 포스포르아미다이트로서, 2'-OMe, 2'-F, 2'-O-tert-부틸디메틸실릴기, 2'-O-메톡시에틸기, 2'-H, 2'-플루오로-2'-디옥시-β-D-아라비노푸라노실 등을 들 수 있다. 상기 뉴클레오시드 포스포르아미다이트로는, 5' 하이드록실기가 보호기 (예, DMTr 기) 로 보호된 것을 사용한다. 축합 공정은, 상기 뉴클레오시드 포스포르아미다이트를 활성화하는 활성화제를 사용하여 실시할 수 있다. 활성화제로는, 예를 들어, 5-벤질티오-1H-테트라졸 (BTT), 1H-테트라졸, 4,5-디시아노이미다졸 (DCI), 5-에틸티오-1H-테트라졸 (ETT), N-메틸벤즈이미다졸륨트리플레이트 (N-MeBIT), 벤즈이미다졸륨트리플레이트 (BIT), N-페닐이미다졸륨트리플레이트 (N-PhIMT), 이미다졸륨트리플레이트 (IMT), 5-니트로벤즈이미다졸륨트리플레이트 (NBT), 1-하이드록시벤조트리아졸 (HOBT) 또는 5-(비스-3,5-트리플루오로메틸페닐)-1H-테트라졸 등을 들 수 있다.

[0225] 축합 공정 후에는, 적절히, 미반응의 5' 하이드록실기를 캐핑해도 된다. 캐핑은, 무수 아세트산-테트라하이드로푸란 용액, 페녹시아세트산 무수물/N-메틸이미다졸 용액 등의 공지된 캐핑 용액을 사용하여 실시할 수 있다.

[0226] 산화 공정은, 상기 축합 공정에 의해 형성된 아인산기를 인산기 또는 티오인산기로 변환하는 공정이다. 본 공정은, 3 가의 인으로부터 5 가의 인으로 산화제를 사용하여 변환하는 반응이며, 고상 담체에 담지되어 있는 올리고 핵산 유도체에 산화제를 작용시킴으로써 실시할 수 있다.

[0227] 아인산기를 인산기로 변환하는 경우에는, 「산화제」 로서, 예를 들어, 요오드, 혹은 tert-부틸하이드로퍼옥사이드나 과산화수소 등의 과산, 혹은 (1S)-(+)-(10-camphorsulfonyl)-oxaziridine (CSO), 또는 이들 2 개 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.005 ~ 2 M 의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석시켜 사용할 수 있다. 반응에 사용하는 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 피리딘, THF, 물, 아세토니트릴 또는 이들 2 개 이상의 임의의 혼합 용매를 들 수 있다. 예를 들어, 요오드/물/피리딘/아세토니트릴, 혹은 요오드/물/피리딘, 혹은 요오드/물/피리딘/아세토니트릴/NMI, 혹은 요오드/물/피리딘/THF, 혹은 요오드/물/피리딘/THF/NMI, 혹은 CSO/아세토니트릴, 혹은 요오드/피리딘-아세트산이나 과산(tert-부틸하이드로퍼옥사이드/메틸렌클로라이드) 를 사용할 수 있다.

[0228] 아인산트리에스테르기를 티오인산기로 변환하는 경우에는, 「산화제」 로서, 예를 들어, 황, 3H-1,2-벤조디티올-3-온-1,1-디옥사이드 (Beaucage 시약), 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온 (ADTT), 5-페닐-3H-1,2,4-디티아졸-3-온 (POS), [(N,N-디메틸아미노메틸리덴)아미노]-3H-1,2,4-디티아졸린-3-티온 (DDTT), 또는 페닐아세틸디술파이드 (PADS) 를 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.01 ~ 2 M 의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석시켜 사용할 수 있다. 반응에 사용하는 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 피리딘 또는 이들 임의의 혼합 용매를 들 수 있다. 산화 공정은, 상기 캐핑 조작 후에 실시해도 되고, 반대로, 산화 공정 후에 캐핑 조작을 실시해도 되고, 이 순서는 한정되지 않는다.

[0229] 인산 보호기를 탈보호하는 공정은, 원하는 서열을 갖는 핵산의 합성이 완료된 후에는, 인산 부분의 보호기를 탈보호하기 위해서 아민류를 작용시킨다. 아민류로는, 예를 들어, 일본 특허공보 제4705716호에 기재되는 디에틸아민 등을 들 수 있다.

[0230] 신장의 마지막에 도입한 뉴클레오시드의 5' 하이드록실기의 보호기는, 후술하는 고상 담체로부터의 절출 및 보호기의 탈보호 후, 5' 보호기를 태그로 하는 칼럼 정제를 위해서 사용해도 되고, 칼럼 정제 후, 5' 하이드록실기의 보호기를 탈보호해도 된다.

[0231] 또한 암모니아수 또는 아민류 등을 사용하여, 예를 들어, 상기 스킴 2 로 나타내는 바와 같이 고상 담체로부터 올리고뉴클레오티드 사슬을 절단하여 회수한다. 아민류로는, 예를 들어, 메틸아민, 에틸아민, 프로필아민, 이소프로필아민, 에틸렌디아민, 디에틸아민 등을 들 수 있다.

[0232] 본 발명의 제조 방법을 사용하여 제조 가능한 핵산 올리고머로는, 핵산 올리고머 내에 포함되는 뉴클레오시드가, RNA, DNA, 그리고 2'-O-MOE, 2'-O-Me, 2'-F 를 갖는 RNA, 및 LNA 인 핵산 올리고머를 들 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0233] 예를 들어, Xiulong, Shen 들 저, Nucleic Acids Research, 2018, Vol.46, No.46, 1584 - 1600, 및 Daniel O'Reilly 들 저, Nucleic Acids Research, 2019, Vol.47, No.2, 546 - 558 에 기재된, 여러 가지 뉴클레오시드의 예를 들 수 있다.

[0234] 본 발명의 제조 방법에 있어서 사용 가능한 핵산 올리고머의 전형적인 예를, 실시예에 기재된 예에 더하여 하기

의 예를 나타내지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0235] 이하, 서열의 설명 중, U 는 우리딘을, C 는 시티딘을, A 는 아데노신을, 또는 G 는 구아노신을 나타낸다.

[0236] 국제 공개 제2019/060442호에 기재되어 있는, 하기의 서열 (B) 및 (C) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.

[0237] 서열 (B) : 5'-AUGGAAUmACUCUUGGUUmACdTdT-3' (Antisense) (서열 번호 3) 21 mer

[0238] 서열 (C) : 5'-GUmAACmCmAAGAGUmAUmUmCmCmAUmdTdT-3' (Sense) (서열 번호 4) 21 mer

[0239] 서열 (B) 및 (C) 중, Um 은 2'-O-메틸우리딘을, Cm 은 2'-O-메틸시티딘을, 또 dT 는 티미딘을 나타낸다.

[0240] Daniel O'Reilly 들 저, Nucleic Acids Research, 2019, Vol.47, No.2, 546 - 558 에 기재되어 있는 핵산 올리고머 (553 페이지 참조) 를 들 수 있다. 전형예로서, 하기의 서열 (D) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.

[0241] 서열 (D) : 5'-AGAGCCAGCCUUCUUAUUGUUUUAGAGCUAUGCUGU-3' (서열 번호 5) 36 mer

[0242] 일본 특허공보 제4965745호에 기재되어 있는 핵산 올리고머를 들 수 있다. 전형예로서, 하기의 서열 (E) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.

[0243] 서열 (E) : 5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-P-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3' 49 mer. CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC (서열 번호 6), GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU (서열 번호 7).

[0244] 서열 (E) 중, "P" 는, 이하의 식 (A5) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다.

[0245] Nucleic Acids Research, 2019, Vol.47, No.2 : 547 에 기재되어 있는, 하기의 서열 (F) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.

[0246] 서열 (F) : 5'-ACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3' (서열 번호 8) 67 mer

[0247] JP 2015-523856, 173 페이지에 기재되어 있는, 하기의 서열 (G) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.

[0248] 서열 (G) : 5'-GUUUUCCCUUUUCAAAGAAAUCUCCUGGGCACCUAUCUUCUUAGGUGCCCUCCCUUGUUUAAACCUGACCAGUUAACCGGCUGGUUAGGUUUUU-3' (서열 번호 9) 94 mer

[0249] JP 2017-537626 에 기재되어 있는 핵산 올리고머를 들 수 있다. 전형예로서, 하기의 서열 (F), (G), (H), (J) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.

[0250] 서열 (F) : 5'-AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3' (서열 번호 10) 100 mer

[0251] 서열 (G) : 5'-GCAGAUGUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU-3' (서열 번호 11) 113 mer

[0252] 서열 (H) : 5'-dAdGdTdCdCdTdCdAdTdCdTdCdCdCdTdCdAdAdGdCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU-3' (서열 번호 12) 113 mer

[0253] 서열 (H) 중, dT 는 티미딘을, dC 는 2'-디옥시시티딘을, dA 는 2'-디옥시아데노신을, 또 dG 는 2'-디옥시구아노신을 나타낸다.

[0254] 서열 (J) : 5'-AmsGmsUmsCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUmsUmsUmsU-3' (서열 번호 13) 113 mer

[0255] 서열 (J) 중, Um 은 2'-O-메틸우리딘을, Am 은 2'-O-메틸아데노신을, Gm 은 2'-O-메틸구아노신을, 또 s 는 포스포로티오에이트 수식을 나타낸다.

[0256] 실시예

[0257] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0258] 측정 방법

[0259] 이하의 시험에서 사용한 각 측정 방법을 이하에 나타낸다.

[0260] (측정 방법 1 : 올리고뉴클레오티드의 순도의 측정 방법)

[0261] 고상 합성 후의 올리고뉴클레오티드 미정제 생성물의 순도의 측정은, HPLC 에 의해 실시하였다. 미정제 생성물을 HPLC (파장 260 ㎚, 칼럼 ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 2.1 ㎜ × 100 ㎜, 1.7 ㎛) 에 의해 각 성분으로 분리하고, 얻어진 크로마토그램의 총면적값에 있어서의 주생성물의 면적값으로부터 올리고뉴클레오티드의 순도를 산출하였다.

[0262] HPLC 측정 조건을 하기 표 1 에 나타낸다.

표 1

[0263]

| | |
|---|---|
| 칼럼 | ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 2.1mm×100mm, 1.7μm |
| 유속 | 0.2mL/min |
| 검출 파장 | 260nm |
| 이동상 A | 100mM 헥실아민아세테이트수 (pH=7.0) |
| 이동상 B | 100mM 헥실아민아세테이트수 : 아세토니트릴=1:4(v) |
| 그레이디언트 조건 | B conc. 43%(0min)-56%(70min)-90%(70.01min)-90%(75min)<br>-43%(75.01min)-43%(90min) |
| 칼럼 온도 | 80℃ |

[0264] (측정 방법 2 : 올리고뉴클레오티드 수량의 측정)

[0265] 상기 미정제 생성물의 $OD_{260}$ 을 측정하였다. $OD_{260}$ 이란 1 mL 용액 (pH = 7.5) 에 있어서의 10 ㎜ 광로 길이당의 UV 260 ㎚ 의 흡광도를 나타낸다. 일반적으로 RNA 에서는 1 OD = 40 μg 인 것이 알려져 있으므로, 상기 $OD_{260}$ 의 측정값에 기초하여, 수량을 산출하였다. 또한, 고상 담체의 단위 체적당의 수량을 산출하였다.

실시예 1 ~ 5 및 비교예 1, 2 에 대해서는 실시예 1 의 수량에 대한 상대 수량을 구하였다.

[0266] (측정 방법 3 : 산소 농도의 측정)

[0267] 반응계의 분위기 (기상) 의 산소 농도는 IIJIMA ELECTRONICS CORP. 제조의 PACK KEEPER (Residual Oxygen Meter) 를 사용하여 측정하였다. 산소 농도 측정 전에는 공기 중 및 순질소 중 산소 농도의 측정에 의해 장치를 교정 후, 장치에 부속된 바늘을 셉텀 등으로 덮개를 덮은 플라스크 등의 용기에 찌르고, 계 중 기상 부분의 산소 농도를 측정하였다. 산소 농도의 측정값은 실시간으로 표시되고, 측정값이 안정적인 곳을 그 분위기의 산소 농도로 하였다.

[0268] (측정 방법 4 : 올리고뉴클레오티드의 효소 분해물의 측정 방법)

[0269] 고상 합성 후의 올리고뉴클레오티드 미정제 생성물의 효소 분해물의 측정은, HPLC 에 의해 실시하였다. 분해물을 HPLC (파장 260 ㎚, 칼럼 Develisil ODS-UG-5, 4.6 ㎜ × 250 ㎜, 5 ㎛) 에 의해 각 성분으로 분리하고, 얻어진 크로마토그램의 총면적값에 있어서의, 식 (A15) 에 나타내는 아데노신, 및 식 (A16) 에 나타내는 아데노신시아노에틸 부가체의 HPLC 면백값을 산출하였다. 여기서, 본 명세서 중, 이하, 「HPLC 면백값」 은 「HPLC 면적 백분율값」 을 의미한다.

[0270] HPLC 측정 조건을 하기 표 2 에 나타낸다.

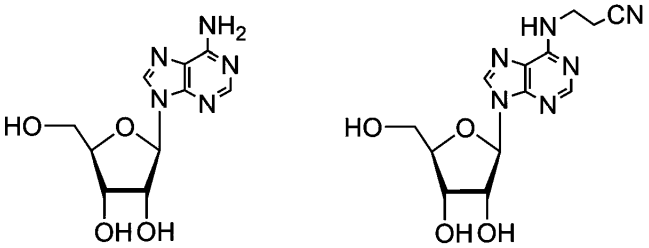
표 2

| | |
|---|---|
| 칼럼 | Develisil ODS-UG-5, 4.6mm×250mm, 5μm |
| 유속 | 1.0mL/min |
| 검출 파장 | 260nm |
| 이동상 A | 10mM 아세트산암모늄수 |
| 이동상 B | 메탄올 : 10mM 아세트산암모늄수 =1:1 (v/v) |
| 그레이디언트 조건 | B conc. 15%(0min)-15%(10min)-25%(20min)-25%(30min)<br>-40%(45min)-100%(65min)-100%(70min)<br>-15%(70.01min)-15%(80min) |
| 칼럼 온도 | 30℃ |

[0271]

[0272] 올리고머의 효소 분해에 의해 HPLC 로 검출되는 성분인 아데노신과 아데노신의 시아노에틸 부가체의 구조식을 각각 식 (A15), 식 (A16) 에 나타낸다.

[0273] [화학식 21]



(A15) , (A16)

[0274]

[0275] (효소 분해법)

[0276] 올리고뉴클레오티드의 효소 분해의 방법에 대해 이하에 나타낸다.

[0277] 0.5 mg/mL 의 농도로 조절한 올리고뉴클레오티드의 미정제 생성물 수용액 83 μL 를 2 mL 바이알에 넣은 후, 0.2 unit/μL 의 NucleaseP (페니실리움·시트리눔 (Penicillium citrinum 유래) 의 수용액 2 μL 를 첨가하고, 60 ℃ 인큐베이터 중에서 2 시간 보온하였다. 또한, Alkaline Phosphatase (Calf Intestinal 유래) 10 x Buffer 10 μL, 및 Alkaline Phosphatase (Calf Intestinal 유래) 5 μL 를 첨가하고, 56 ℃ 인큐베이터 중에서 2 시간 보온하였다.

[0278] 올리고뉴클레오티드의 효소 분해의 결과, 측정법 4 에 기재하는 HPLC 분석에 의해 검출된 식 (A15) 와 식 (A16) 의 HPLC 면백값으로부터, 올리고머 중에 함유하는 불순물인, 아데노신시아노에틸 부가체의 함량을 산출하였다. 그 산출 방법을 이하에 나타낸다.

[0279] [d] = [a] × ([a] + [b]) × 100 × [c]

[0280] 상기 식 중, [a] 는 측정법 4 에 기재하는 HPLC 분석에 의해 검출된 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 나타내고, [b] 는 측정법 4 에 기재하는 HPLC 분석에 의해 검출된 식 (A15) 의 HPLC 면백값을 나타내고, [c] 는 목적 올리고뉴클레오티드 중에 포함되는 아데노신의 개수를 나타내고, [d] 는 측정법 4 에 기재하는 HPLC 분석에 의해 검출된 식 (A15) 와 식 (A16) 의 HPLC 면백값으로부터, 올리고머 중에 함유하는 불순물인, 아데노신시아노에틸 부가체의 함량을 나타낸다.

[0281] 올리고뉴클레오티드의 고상 합성

[0282] 서열 (I) : 5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (서열 번호 1, 2) 53 mer

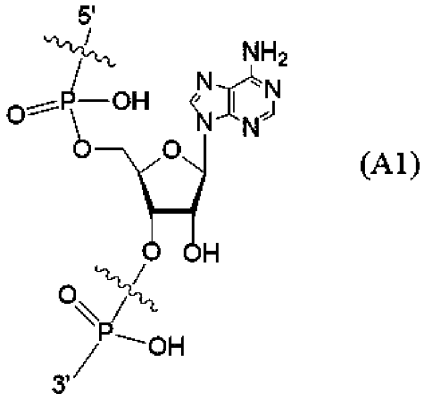
[0283] 상기 서열 (I) 에 있어서, "A" 는, 이하의 식 (A1) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. "C" 는, 이하의 식 (A2) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. "G" 는, 이하의 식 (A3) 에

있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. "U" 는, 이하의 식 (A4) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. "P" 는, 이하의 식 (A5) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. 또한, 5' 말단의 "A" 는, 이하의 식 (A6) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. 또, 3' 말단의 "G" 는, 이하의 식 (A7) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. 단, 구조식 중의 인산기는 염이어도 된다.

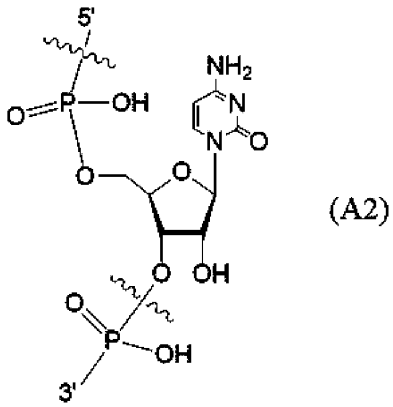
[0284] AGCAGAGUAC ACACAGCAUA UACC (서열 번호 1)

[0285] GGUAUAUGCU GUGUGUACUC UGCUUC (서열 번호 2)

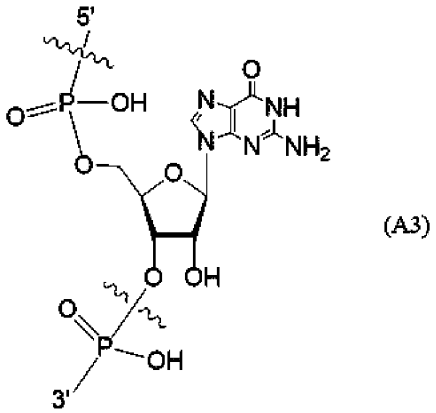
[0286] [화학식 22]

[0287] 
(A1)

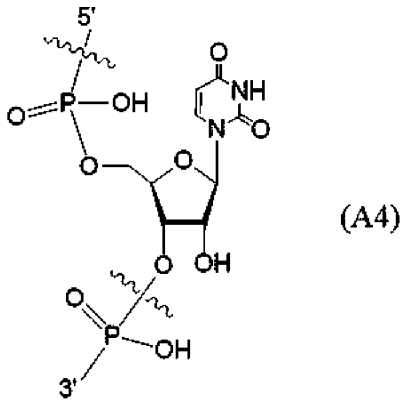
[0288] [화학식 23]

[0289] 
(A2)

[0290] [화학식 24]

[0291] 
(A3)

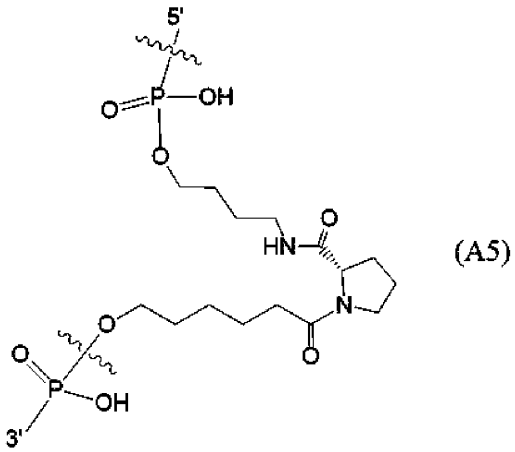
[0292] [화학식 25]



(A4)

[0293]

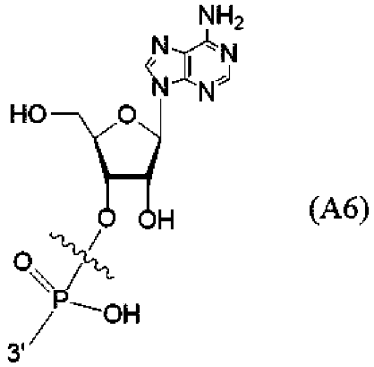
[0294] [화학식 26]



(A5)

[0295]

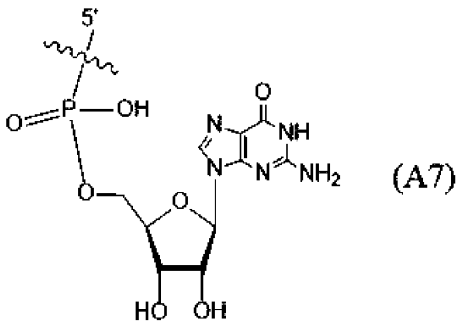
[0296] [화학식 27]



(A6)

[0297]

[0298] [화학식 28]

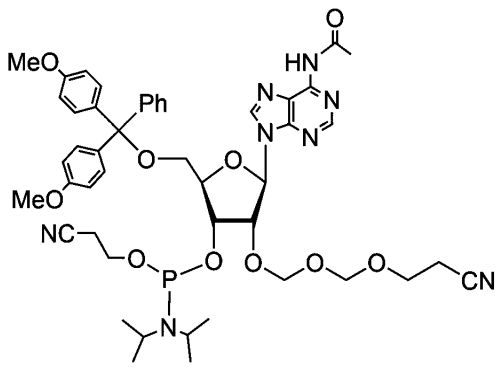


(A7)

[0299]

[0300] 고상 담체로서 컨트롤드·포어·글래스 (Controlled Pore Glass (CPG)) 를 사용하고, 핵산 합성기로서 AKTA oligopilot plus100 (GE 헬스케어사 제조) 을 사용하여, 포스포르아미다이트 고상 합성법에 의해, 상기 서열 (I) 로 이루어지는 올리고뉴클레오티드를 3' 측으로부터 5' 측을 향하여 합성하였다. 합성은 77.89 μmol 스케일로 실시하였다. 또, 합성에는, 미국 특허공개 제2012/0035246호의 실시예 2 에 기재된 우리딘 EMM 아미다이트 (A11), 실시예 3 에 기재된 시티딘 EMM 아미다이트 (A9), 실시예 4 에 기재된 아데노신 EMM 아미다이트 (A8), 실시예 5 에 기재된 구아노신 EMM 아미다이트 (A10), 및 국제 공개 제2017/188042호에 기재된 화합물 (A12), 및 일본 특허공보 제5157168호의 실시예 9 에 기재된 $N^6$-아세틸-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-O-(2-시아노에톡시메틸)아데노신 3'-O-(2-시아노에틸 N,N-디이소프로필포스포르아미다이트 (A15), 실시예 8 에 기재된 $N^2$-아세틸-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-O-(2-시아노에톡시메틸)구아노신 3'-O-(2-시아노에틸 N,N-디이소프로필포스포르아미다이트) (A17), 실시예 5 에 기재된 $N^4$-아세틸-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-O-(2-시아노에톡시메틸)시티딘 3'-O-(2-시아노에틸 N,N-디이소프로필포스포르아미다이트) (A16), 실시예 2 에 기재된 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-O-(2-시아노에톡시메틸)우리딘 3'-O-(2-시아노에틸 N,N-디이소프로필포스포르아미다이트) (A18) 을 사용하고, 디블로킹 용액으로서 고순도 트리클로로아세트산톨루엔 용액을 사용하고, 축합제로서 5-벤질메르캅토-1H-테트라졸을 사용하고, 산화제로서 요오드 용액을 사용하고, 그리고 캐핑 용액으로서 페녹시아세트산 무수물 용액과 N-메틸이미다졸 용액을 사용하였다. 핵산 신장 종료 후, 담체 상의 핵산에 디에틸아민 용액을 작용시킴으로써 인산 부분의 시아노에틸 보호기를 선택적으로 탈보호하였다.

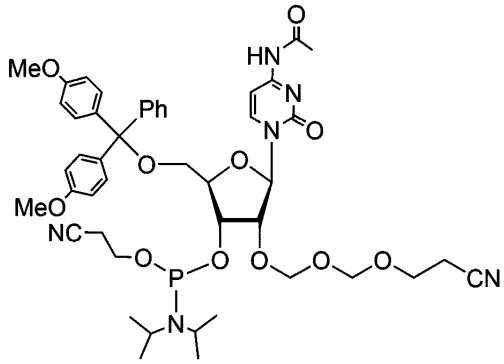
[0301] [화학식 29]




(A8)

[0302]

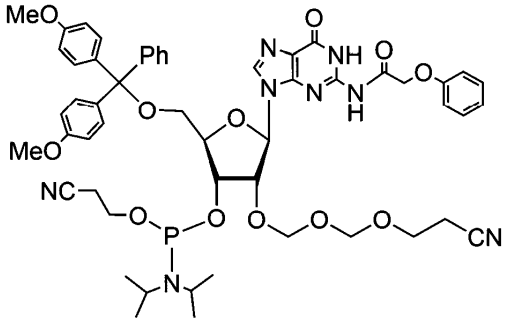
[0303] [화학식 30]




(A9)

[0304]

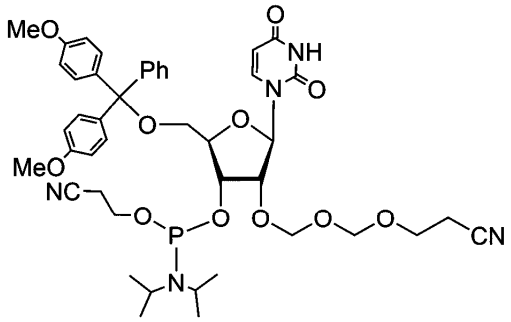
[0305] [화학식 31]



(A10)

[0306]

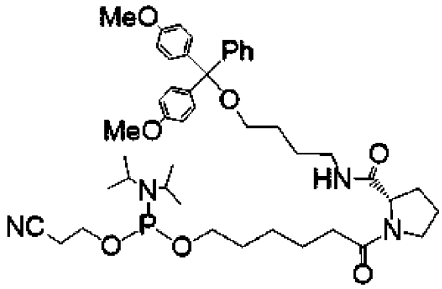
[0307] [화학식 32]



(A11)

[0308]

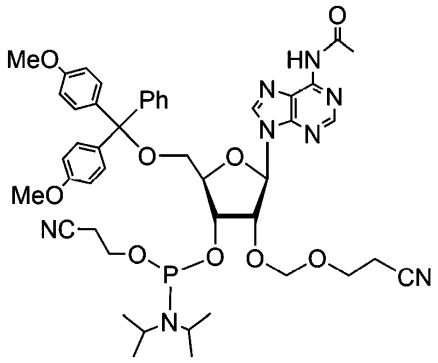
[0309] [화학식 33]



(A12)

[0310]

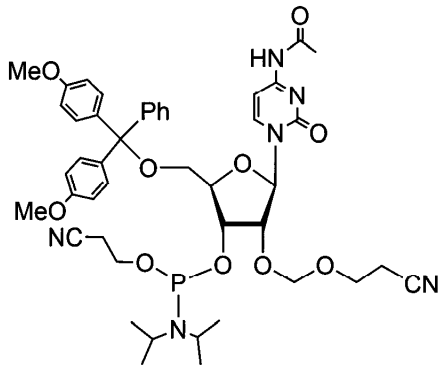
[0311] [화학식 34]



(A15)

[0312]

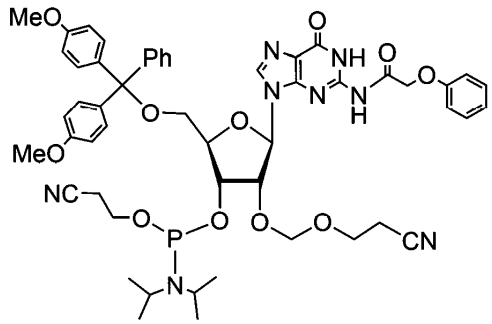
[0313] [화학식 35]



(A16)

[0314]

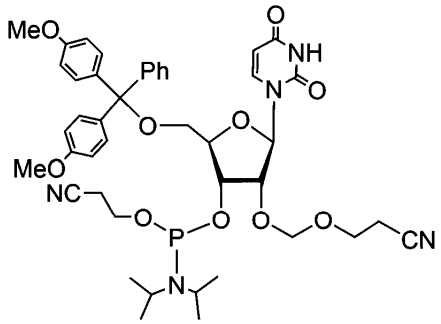
[0315] [화학식 36]



(A17)

[0316]

[0317] [화학식 37]



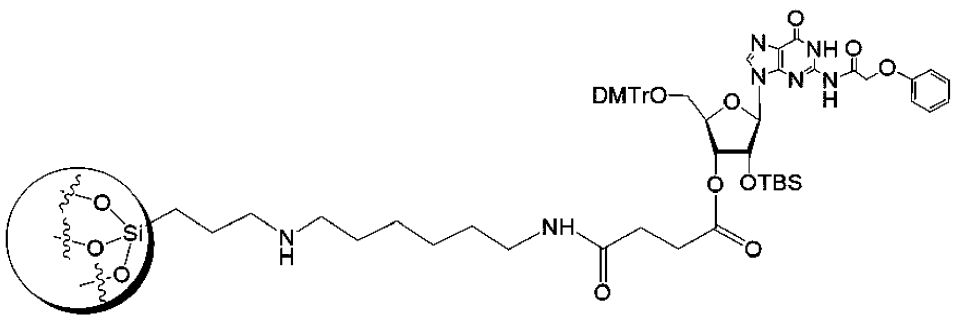
(A18)

[0318]

[0319] 다음으로, 본 발명의 제법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드 (핵산 올리고머) 의 구체적인 제조예를 나타낸다. 여기서, 하기의 실시예에 있어서 본 발명의 제법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드는, 상기 서열 번호 1 및 2 로 나타내는 서열 (I) 을 갖는 올리고뉴클레오티드이다.

[0320] 또, 이하의 실시예 및 비교예 중에 기재하는 구아노신 유도체란, 하기의 구조식으로 나타내는 화합물을 의미한다. 하기 구조식에 있어서 도시된 서클은, CPG 를 모식적으로 나타내는 것이다.

[0321] [화학식 38]



[0322]

[0323] (실시예 1)

[0324] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.53 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한, 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.13 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.0 mg, 순도는 58 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0325] (실시예 2)

[0326] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.98 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 5 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.76 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 13.2 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 8.3 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0327] (실시예 3)

[0328] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.00 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 10 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.74 g (TBAF 의 양은 보호기 1

몰당 12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 8.4 mg, 순도는 49 % 였다.

얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0329] (실시예 4)

[0330] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.00 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 15 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.9 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 8.4 mg, 순도는 46 % 였다.

얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0331] (참고예 1)

[0332] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.51 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 기상 중의 산소 농도를 측정한 결과 21 % 였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.09 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.4 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.0 mg, 순도는 45 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0333] (실시예 5)

[0334] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.53 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구

경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.13 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.5 mg, 순도는 48 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0335] (실시예 6)

[0336] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.53 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 5 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.14 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.5 mg, 순도는 46 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0337] (실시예 7)

[0338] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.50 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 10 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.14 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 13.0 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.4 mg, 순도는 45 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0339] (실시예 8)

[0340] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12)

에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.
그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.50 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 15 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.11 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.3 mg, 순도는 44 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0341] (참고예 2)

[0342] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.
그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.51 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 기상 중의 산소 농도를 측정한 결과 21 % 였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.10 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.5 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.3 mg, 순도는 43 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0343] (참고예 3)

[0344] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.
그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.51 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 기상 중의 산소 농도를 측정한 결과 21 % 였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.10 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.5 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.3 mg, 순도는 43 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재

된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0345] (실시예 9)

[0346] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 6.04 μmol 분의 용액을 용량 100 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자와 아세토니트릴 0.26 g 을 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 이 용액을 빙랭하 0 ℃ 에서 20 분 교반하고, 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 4.49 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.8 몰) 과 아세토니트릴 0.90 g 의 혼합 용액을 스터러에 의한 교반하 0 ℃ 조건에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 적하 종료 후 온도를 33 ℃ 까지 승온시키고, 혼합물을 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 52.4 mg, 순도는 58 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.1945 % 와 0.0064 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0347] (실시예 10)

[0348] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.99 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자와 아세토니트릴 0.12 g 을 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 이 용액을 빙랭하 0 ℃ 에서 20 분 교반하고, 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 후 빙랭한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.81 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 14.0 몰) 과 아세토니트릴 0.20 g 의 혼합 용액을 스터러에 의한 교반하 0 ℃ 조건에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 1 시간 0 ℃ 에서 보온 교반 후, 온도를 33 ℃ 까지 승온시키고, 혼합물을 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 8.5 mg, 순도는 58 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.1150 % 와 0.0052 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0349] (실시예 11)

[0350] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.99 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 이 용액을 10 ℃ 에서 20 분 교반하고, 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 후 10 ℃ 로 냉각시킨 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.77 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 13.2 몰) 과 아세토니트릴 0.18 g 의 혼합 용액을 스터러에 의한 교반하 10 ℃ 조건에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 1 시간 10 ℃ 에서 보온 교반 후, 온도를 33 ℃ 까지 승온시키고, 혼합물을 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 8.5 mg, 순도는 58 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.1972 % 와 0.0056 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0351] (실시예 12)

[0352] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.00 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 이 용액을 20 ℃ 에서 20 분 교반하고, 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 후 20 ℃ 로 온조한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.82 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 14.0 몰) 을 스터러에 의한 교반하 20 ℃ 조건에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 1 시간 20 ℃ 에서 보온 교반 후, 온도를 33 ℃ 까지 승온시키고, 혼합물을 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 8.2 mg, 순도는 57 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.3364 % 와 0.0246 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0353] (실시예 13)

[0354] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올

3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.03 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 이 용액을 25 ℃ 에서 20 분 교반하고, 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 후 25 ℃ 로 온조한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.77 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.8 몰) 을 스터러에 의한 교반하 25 ℃ 조건에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 1 시간 25 ℃ 에서 보온 교반 후, 온도를 33 ℃ 까지 승온시키고, 혼합물을 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 8.4 mg, 순도는 56 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.1564 % 와 0.0351 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0355] (실시예 14)

[0356] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.53 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.13 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 KDScientific 사의 시린지 펌프를 사용하여 1 시간에 걸쳐 적하하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.0 mg, 순도는 58 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.1401 % 와 0.0245 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0357] (참고예 4)

[0358] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.06 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.47 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.55 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구

경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 이 용액을 33 ℃ 에서 교반하고, 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.14 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.2 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.1927 % 와 0.1252 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0359] (실시예 15)

[0360] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 5.94 μmol 분의 용액을 용량 100 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 4.48 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 13.0 몰) 을 스터러에 의한 교반하 25 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 그 후 혼합물을 25 ℃ 에서 1 시간 보온 교반 후, 33 ℃ 로 승온시키고, 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 52.0 mg, 순도는 50 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.4413 % 와 0.0253 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0361] (참고예 5)

[0362] 77.89 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.04 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.17 g 과 에탄올 3.06 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건고시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.21 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.22 g 과 아세토니트릴 2.42 g 을 첨가한 용액으로부터, 1.53 μmol 분의 용액을 용량 50 mL, 구경 29 ㎜ 가지형 플라스크에 채취하고, 또한 거기에 직경 15 ㎜ 의 교반자를 넣은 후, 구경 29 ㎜ 의 셉텀으로 덮개를 덮어 밀폐하였다. 또한 계 내에 아르곤 봄베로부터 아르곤을 분사하는 바늘과, 분사한 아르곤을 빼내기 위한 바늘, 또한 Oxygen Meter 의 측정용 바늘을 셉텀에 찌르고, 아르곤을 플로함으로써 계 내를 아르곤으로 치환하여, 기상 중의 산소 농도를 0 % 로 하였다. 여기서, 기상 중의 산소 농도는, 상기 측정 방법 3 에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 또한 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.13 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당

12.7 몰) 을 스터러에 의한 교반하 33 ℃ 에서 올리고뉴클레오시드 용액 표면에 시린지를 사용하여 1 분 이내에 유입하고, 그 후 혼합물을 33 ℃ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 13.5 mg, 순도는 48 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다. 또한 올리고뉴클레오티드를 상기 효소 분해법에 기재된 방법을 사용하여 분해를 실시하고, 상기 측정법 4 에 기재된 방법을 사용하여, 식 (A15) 및 식 (A16) 의 HPLC 면백값을 각각 얻은 결과, 31.3067 % 와 0.0395 % 였다. 또한, 목적으로 하는 올리고뉴클레오티드 중의 아데노신의 개수가 13 이므로, 불순물 함량을 상기 계산식을 사용하여 산출하고, 표 4 에 기재한다.

[0363] 측정 결과를 하기 표 3 에 나타낸다.

표 3

| | 2' 위치 보호기 | 산소 농도 | TBAF의 첨가에 필요로 하는 시간 | TBAF첨가 종료 후의 보온 시간 | 반응 온도 | 단위 체적당의 상대 수량 | 핵산 HPLC 측정 순도 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 실시예 1 | EMM | 0 % | 1 시간 | 4 시간 | 33 ℃ | 0.96 | 58 % |
| 실시예 2 | EMM | 5 % | 1 시간 | 4 시간 | 33 ℃ | 0.95 | 54 % |
| 실시예 3 | EMM | 10 % | 1 시간 | 4 시간 | 33 ℃ | 0.95 | 49 % |
| 실시예 4 | EMM | 15 % | 1 시간 | 4 시간 | 33 ℃ | 0.96 | 46 % |
| 참고예 1 | EMM | 21 % | 1 시간 | 4 시간 | 33 ℃ | 0.97 | 45 % |
| | | | | | | | |
| 실시예 5 | CEM | 0 % | 1 분 이내 | 4 시간 | 33 ℃ | 1.00 | 48 % |
| 실시예 6 | CEM | 5 % | 1 분 이내 | 4 시간 | 33 ℃ | 1.00 | 46 % |
| 실시예 7 | CEM | 10 % | 1 분 이내 | 4 시간 | 33 ℃ | 1.01 | 45 % |
| 실시예 8 | CEM | 15 % | 1 분 이내 | 4 시간 | 33 ℃ | 1.00 | 44 % |
| 참고예 2 | CEM | 21 % | 1 시간 | 4 시간 | 33 ℃ | 1.00 | 43 % |
| 참고예 3 | CEM | 21 % | 1 분 이내 | 4 시간 | 33 ℃ | 1.00 | 43 % |

[0364]

표 4

| | 2' 위치 보호기 | 산소 농도 | TBAF의 첨가시 온도 | TBAF의 첨가에 필요로 하는 시간 | TBAF첨가 종료 후의 반응 온도 | TBAF첨가 종료 후의 보온 시간 | 단위 체적당의 상대 수량 | 핵산 HPLC 측정 순도 | 핵산 중 아데노신시아노에틸 부가체 불순물 함량 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 실시예 9 | EMM | 0 % | 0 ℃ | 1 시간 | 33 ℃ | 4 시간 | 0.98 | 58 % | 0.27 % |
| 실시예 10 | EMM | 0 % | 0 ℃ | 1 분 이내 | 0 ℃후 33 ℃ | 1 시간후 4 시간 | 0.97 | 58 % | 0.22 % |
| 실시예 11 | EMM | 0 % | 10 ℃ | 1 분 이내 | 10 ℃후 33 ℃ | 1 시간후 4 시간 | 0.97 | 58 % | 0.23 % |
| 실시예 12 | EMM | 0 % | 20 ℃ | 1 분 이내 | 20 ℃후 33 ℃ | 1 시간후 4 시간 | 0.93 | 57 % | 1.02 % |
| 실시예 13 | EMM | 0 % | 25 ℃ | 1 분 이내 | 25 ℃후 33 ℃ | 1 시간후 4 시간 | 0.92 | 56 % | 1.46 % |
| 실시예 14 | EMM | 0 % | 33 ℃ | 1 시간 | 33 ℃ | 4 시간 | 0.96 | 58 % | 1.02 % |
| 참고예 4 | EMM | 0 % | 33 ℃ | 1 분 이내 | 33 ℃ | 4 시간 | 0.97 | 54 % | 5.20 % |
| | | | | | | | | | |
| 실시예 15 | CEM | 0 % | 25 ℃ | 1 분 이내 | 25 ℃후 33 ℃ | 1 시간후 4 시간 | 0.99 | 50 % | 1.05 % |
| 참고예 5 | CEM | 0 % | 33 ℃ | 1 분 이내 | 33 ℃ | 4 시간 | 1.00 | 48 % | 1.64 % |

[0365]

[0366] 상기 표 2 에 나타낸 바와 같이, 명세서 중에 기재된 올리고뉴클레오티드에 포함되는 리보오스의 수산기의 보호

기의 탈보호 반응을, 산소 농도가 15 % 이하인 농도의 불활성 가스 분위기하에서 실시한 결과, 산소 농도가 15 % 보다 높은 농도에서 실시했을 경우와 비교하면, 그 탈보호 반응이 효율적으로 진행되고, 또한 반응계 중의 온도를 25 ℃ 이하로 하여 TBAF 와 접촉시킴으로써, 25 ℃ 이상으로 하여 TBAF 와 접촉시키는 것보다도 더욱 그 탈보호 반응이 효율적으로 진행되고, 또한 TBAF 의 첨가에 필요로 하는 시간을 30 분 이상으로 함으로써, 1 분 이하로 하는 경우보다 더욱 그 탈보호 반응이 효율적으로 진행되고, 그 결과, 생성되는 탈보호된 올리고뉴클레오티드의 순도가 높은 것을 알 수 있었다.

## *산업상 이용가능성*

[0368] 본 발명은, 효율적인 핵산 올리고머의 제조 방법을 제공한다. 핵산 올리고머의 제조 방법에 따라 제조되는 핵산 올리고머의 순도 향상을 기대할 수 있다.

[0369] **서열표 프리텍스트**

[0370] 서열표의 서열 번호 1 ~ 13 은, 본 발명의 제조 방법에 따라 제조되는 올리고뉴클레오티드의 염기 서열을 나타낸다.

## *서 열 목 록*

SEQUENCE LISTING

<110> SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED

<120> METHOD FOR PRODUCING NUCLEIC ACID OLIGOMER

<130> S44861WO01

<150> JP 2020-159460

<151> 2020-09-24

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 1

agcagaguac acacagcaua uacc 24

<210> 2

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 2

gguauaugcu gugugguacuc ugcuuc 26

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (7)..(7), (17)..(17)

<223> um

<220>

<221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> thymidine(dT)

<400> 3

auggaanacu cuuggunacn n 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (2)..(2), (12)..(12), (14)..(15), (19)..(19)

<223

> um

<220>

<221> modified_base

<222> (5)..(6), (16)..(17)

<223> cm

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> thymidine(dT)

<400> 4

gnaannaaga gnannnnann n 21

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 5

agagccagcc uucuuauugu uuuagagcua ugcugu 36

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 6

ccaugagaag uaugacaaca gcc 23

<210> 7

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 7

ggcuguuguc auacuucuca ugguu 25

<210> 8

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 8

acagcauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu 60

cggugcu 67

<210> 9

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 9

guuuucccuu uucaaagaaa ucuccugggc accuaucuuc uuaggugccc ucccuuguuu 60

aaaccugacc aguuaaccgg cugguuaggu uuuu 94

<210> 10

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 10

aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaguaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 11

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 11

gcagauguag uguuuccaca guuuaagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuuaaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 12

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1), (8)..(8), (17)..(18)

<223> thymidine(dT)

<220>

<221> modified_base

<222> (2)..(2), (19)..(19)

<223> 2'-deoxyguanosine

<220>

<221> modified_base

<222> (3)..(3), (6)..(6), (9)..(9), (11)..(11), (15)..(15)

<223> 2'-deoxythymidine

<220>

<221> modified_base

<222> (4)..(5), (7)..(7), (10)..(10), (12)..(14), (16)..(16), (20)..(20)

<223> 2'-deoxycytidine

<400> 12

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuaaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 113

<210> 13

<211> 113

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> phosphorothioate derivative of 2'-O-methyladenosine

<220>

<221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> phosphorothioate derivative of 2'-O-methylguanosine (gm)

<220>

<221> modified_base

<222> (3)..(3), (110)..(112)

<223> phosphorothioate derivative of 2'-O-methyluridine (um)

<400> 13

nnnccucauc ucccucaagc guuuaagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuaaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuun nnu 113