



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년05월02일  
(11) 등록번호 10-1617472  
(24) 등록일자 2016년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07D 473/18 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)  
C07D 413/04 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-7009620  
(22) 출원일자(국제) 2008년11월14일  
심사청구일자 2013년10월11일  
(85) 번역문제출일자 2010년04월30일  
(65) 공개번호 10-2010-0090681  
(43) 공개일자 2010년08월16일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/012804  
(87) 국제공개번호 WO 2009/064471  
국제공개일자 2009년05월22일  
(30) 우선권주장  
60/988,192 2007년11월15일 미국(US)  
60/988,200 2007년11월15일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US5185444 A  
ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT,  
1997, 7권, 페이지 187-195  
US20070135333 A1

(73) 특허권자  
사렘타 쉐리퓨틱스 인코퍼레이티드  
미국 워싱턴주 98021, 보셀, 스위트 101, 3450 몬  
테 빌라 파크웨이  
(72) 발명자  
폭스, 크리스티나, 메리 조세핀  
미국 오리건 97333, 코발리스, 스타우트 레인  
30587  
리베스, 매튜, 데일  
미국 오리건 97322, 앨버니, 옛지몬트 스트리트  
에스이 2325  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 31 항

심사관 : 최승희

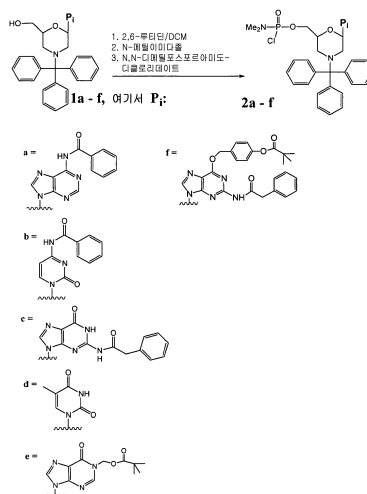
(54) 발명의 명칭 모르폴리노 올리고머의 합성 방법

(57) 요약

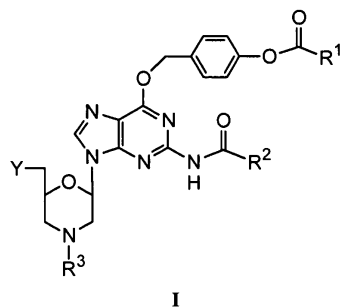
하기 화학식 I의 모르폴리노 화합물이 제공된다:

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



화학식 I



상기 화학식 I에서, R<sup>1</sup>은 저급 알킬, 디(저급 알킬)아미노 및 페닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되고; R<sup>2</sup>는 저급 알킬, 모노사이클릭 아릴메틸 및 모노사이클릭(아릴옥시)메틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되며; R<sup>3</sup>은 트리아릴메틸 및 수소로 이루어진 그룹 중에서 선택되고; Y는 보호되거나 보호되지 않은 하이드록실 또는 아미노 그룹; 클로로포스포르아미데이트 그룹; 및 추가의 모르폴리노 화합물 또는 모르폴리노 올리고머의 환 질소에 결합된 포스포디아미데이트로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 당해 화합물은 이중 보호된 모르폴리노 구아닌(MoG) 단량체를 포함한다. 또한, 모르폴리노 올리고머의 합성시 이의 용도, 및 각각의 단량체 커플링 단계에서 보호된 모르폴리노 환 질소의 탈보호에 관한, 모르폴리노 올리고머의 추가로 개선된 합성 과정이 기술되어 있다.

(72) 발명자

웰러, 드위트, 디.

미국 오리건 97330, 코발리스, 앤. 더블유. 앨름우드 드라이브 3323

리, 용후

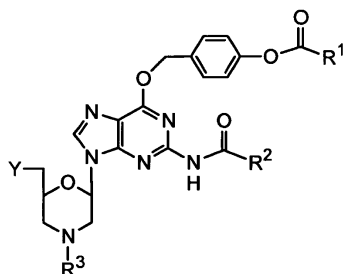
미국 오리건 97330, 코발리스, 앤. 더블유. 이스타뷰 씨클 2418

## 명세서

## 청구범위

### 청구항 1

하기 화학식으로 표시되는 모르폴리노 화합물:



상기 화학식에서,

$R^1$ 은 저급 알킬, 디(저급 알킬)아미노 및 페닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

$R^2$ 은 저급 알킬, 모노사이클릭 아릴메틸 및 모노사이클릭(아릴옥시)메틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;

$R^3$ 은 트리아릴메틸 및 수소로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

Y는 보호되거나 보호되지 않은 하이드록실 또는 아미노 그룹, 클로로포스포르아미데이트 그룹, 추가의 모르폴리노 화합물의 모르폴리노 환 질소와의 포스포로디아미데이트 연결, 모르폴리노 올리고머의 모르폴리노 소단위의 모르폴리노 환 질소와의 포스포로디아미데이트 연결, 및 교체 지지체와의 연결로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

여기서 상기 저급 알킬은 탄소수 1 내지 6의 알킬 라디칼임.

### 청구항 2

제1항에 있어서, Y가 보호되거나 보호되지 않은 하이드록실 그룹 및 클로로포스포르아미데이트 그룹으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 화합물.

### 청구항 3

제2항에 있어서, Y가 트리아릴실릴-보호된 하이드록실 또는 보호되지 않은 하이드록실 그룹인 화합물.

### 청구항 4

제2항에 있어서, Y가  $-O-P(=O)-N(CH_3)_2Cl$  형태의 클로로포스포르아미데이트 그룹인 화합물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,  $R^3$ 가 트리틸(트리페닐메틸), 4-메톡시트리틸, 4-메틸트리틸, 4,4'-디메틸트리틸 및 4,4',4"-트리메틸트리틸 중에서 선택되는 화합물.

### 청구항 6

제1항에 있어서,  $R^1$ 이 저급 알킬이고, 상기 저급 알킬은 탄소수 1 내지 6의 알킬 라디칼인, 화합물.

### 청구항 7

제6항에 있어서,  $R^1$ 이  $-C(CH_3)_3$ 인 화합물.

### 청구항 8

제1항에 있어서,  $R^2$ 가 벤질 또는  $-CH(CH_3)_2$ 인 화합물.

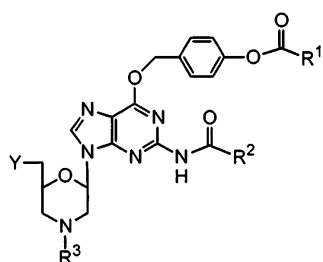
### 청구항 9

(a) 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소를 갖는 고체-상-지지된 모르폴리노 소단위 단량체를 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소 및 5'-엑소사이클릭 탄소상에 활성화된 포스포르아미데이트 그룹을 갖는 제1 모르폴리노 소단위 단량체와 반응시켜, 상기의 5'-엑소사이클릭 탄소와 상기의 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소 사이에 포스포로디아미데이트 연결을 형성시키는 단계;

(b) 상기의 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소를 탈보호시켜, 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소를 포함하는 산물을 형성시키는 단계; 및

(c) 단계 (b)의 상기 산물과, 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소 및 5'-엑소사이클릭 탄소상에 활성화된 포스포르아미데이트 그룹을 포함하는 추가의 모르폴리노 소단위 단량체를 반응시켜, 상기 추가의 모르폴리노 소단위 단량체의 5'-엑소사이클릭 탄소와 단계 (b)의 산물의 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소 사이에 포스포로디아미데이트 연결을 형성시키는 단계를 포함하며;

여기서, 상기의 제1 모르폴리노 소단위 단량체, 고체-상-지지된 모르폴리노 소단위 단량체 또는 추가의 모르폴리노 소단위 단량체 중 적어도 하나는 하기 화학식의 이중 보호된 구아닌 모르폴리노 화합물인, 모르폴리노 올리고머의 합성 방법:



상기 화학식에서

$R^1$ 은 저급 알킬, 디(저급 알킬)아미노 및 페닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

$R^2$ 는 저급 알킬, 모노사이클릭 아릴메틸 및 모노사이클릭(아릴옥시)메틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;

상기 고체-상-지지된 모르폴리노 소단위 단량체에서  $R^3$ 는 수소이고, 상기 제1 모르폴리노 소단위 단량체 및 추가의 모르폴리노 소단위 단량체에서  $R^3$ 는 트리아릴메틸이며;

상기 고체-상-지지된 모르폴리노 소단위 단량체에서 Y는 고체 지지체와의 연결이며, 상기 제1 모르폴리노 소단위 단량체 및 추가의 모르폴리노 소단위 단량체에서 Y는 클로로포스포르아미데이트 그룹이고;

여기서 상기 저급 알킬은 탄소수 1 내지 6의 알킬 라디칼임.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 단계 (b) 및 (c)를 1회 이상 반복하는 단계 (d)를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 11

제9항에 있어서, 상기 클로로포스포르아미데이트 그룹은  $-O-P(=O)-N(CH_3)_2Cl$ 의 형태인 방법.

### 청구항 12

제9항 또는 제10항에 있어서, 트리아릴메틸은 트리틸(트리페닐메틸), 4-메톡시트리틸, 4-메틸트리틸, 4,4'-디메

틸트리틸 및 4,4',4"-트리메틸트리틸 중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 13

제9항 또는 제10항에 있어서,  $R^1$ 이 저급 알킬이고, 상기 저급 알킬은 탄소수 1 내지 6의 알킬 라디칼인 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,  $R^1$ 이  $-C(CH_3)_3$ 인 방법.

#### 청구항 15

제9항 또는 제10항에 있어서,  $R^2$ 가 벤질 또는  $-CH(CH_3)_2$ 인 방법.

#### 청구항 16

제9항에 있어서, 상기 단계 (b)의 탈보호가 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소를 트리플루오로에탄올-함유 용매 중에 헤테로사이클릭 아민 염을 포함하는 시약 용액에 노출시킴을 포함하며, 여기서, 상기 염은 이의 양성자화된 형태에서 pKa의 범위가 1 내지 4인 헤테로사이클릭 아민과, 설펜산, 트리플루오로아세트산 및 염산 중에서 선택된 산과의 염인 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 염이 3-클로로피리디늄 메탄설포네이트(CPM) 및 4-시아노피리디늄 트리플루오로아세테이트(CYTFA) 중에서 선택되는 방법.

#### 청구항 18

제16항에 있어서, 상기 용매가 디클로로메탄 및 트리플루오로에탄올을 90:10 내지 25:75 범위의 용적 비로 포함하는 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 용적 비가 80:20인 방법.

#### 청구항 20

(a) 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소를 갖는 고체 상-지지된 모르폴리노 소단위 단량체를, 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소 및 5'-엑소사이클릭 탄소 상에 활성화된 포스포라미데이트 그룹을 갖는 제1 모르폴리노 소단위 단량체와 반응시켜, 상기의 5'-엑소사이클릭 탄소와 상기의 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소 사이에 포스포로디아미데이트 연결을 형성시키는 단계; 및

(b) 상기의 보호된 모르폴리노 환 질소를 탈보호시켜, 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소를 포함하는 산물을 형성시키는 단계를 포함하며;

여기서, 상기의 탈보호는 상기의 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소를 트리플루오로에탄올-함유 용매 중에 헤테로사이클릭 아민 염을 포함하는 시약 용액에 노출시킴을 포함하며, 여기서, 상기 염은, 이의 양성자화된 형태에서 pKa의 범위가 1 내지 4인 헤테로사이클릭 아민과, 설펜산, 트리플루오로아세트산 및 염산 중에서 선택된 산과의 염인, 모르폴리노 올리고머의 합성 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 방법은

(c) 단계 (b)의 상기 산물과, 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소 및 5'-엑소사이클릭 탄소상에 활성화된 포스포라미데이트 그룹을 포함하는 추가의 모르폴리노 소단위 단량체를 반응시켜, 상기 추가의 모르폴리노 소단위 단량체의 5'-엑소사이클릭 탄소와 단계 (b)의 산물의 보호되지 않은 모르폴리노 환 질소 사이에 포스포로디아미데이트 연결을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

## 청구항 22

제21항에 있어서, 단계 (b) 및 (c)를 1회 이상 반복하는 단계 (d)를 추가로 포함하는, 방법.

## 청구항 23

제20항에 있어서, 상기 헤테로사이클릭 아민이 전자 제거 그룹-치환된 피리딘, 티아졸, 피리다진, 피라졸, 트리아졸 및 이들의 전자 제거 그룹-치환된 유도체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

## 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 헤테로사이클릭 아민이 전자 제거 그룹-치환된 피리딘인 방법.

## 청구항 25

제23항에 있어서, 상기 전자 제거 그룹이 할로젠, 시아노, 알데하이드, 케토, 카복시에스테르 및 카복사미드로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

## 청구항 26

제24항에 있어서, 상기 헤테로사이클릭 아민이 클로로- 또는 시아노-치환된 피리딘인 방법.

## 청구항 27

제20항에 있어서, 상기 염이 알킬설포네이트, (플루오로알킬)설포네이트 및 p-톨루엔설포네이트로부터 선택되는 설포산의 염, 또는 트리플루오로아세테이트인 방법.

## 청구항 28

제20항에 있어서, 상기 헤테로사이클릭 아민 염이 3-클로로피리디늄 메탄설포네이트(CPM) 및 4-시아노피리디늄 트리플루오로아세테이트(CYTFA) 중에서 선택되는 방법.

## 청구항 29

제20항에 있어서, 상기 용매가 디클로로메탄 및 트리플루오로에탄올을 90:10 내지 25:75 범위의 용적 비로 포함하는 방법.

## 청구항 30

제29항에 있어서, 상기 용적 비가 80:20인 방법.

## 청구항 31

제20항에 있어서, 상기 트리아릴메틸이 트리틸(트리페닐메틸), 4-메톡시트리틸, 4-메틸트리틸, 4,4'-디메틸트리틸 및 4,4',4"-트리메틸트리틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001]

본 발명은 모르폴리노 소단위(subunit) 단량체의 커플링에 의해 포스포로디아미데이트-결합된 모르폴리노 올리고머를 합성하는 방법, 및 특히 각각의 커플링 단계에서 보호된 모르폴리노 환 질소를 탈보호시키기 위한 개선된 과정, 및 구아닌 염기의 N2 및 O6/N1 그룹 둘다에서 보호된 구아닌 모르폴리노(MoG) 소단위의 용도에 관한 것이다. 이러한 변형법을 사용하여 합성한 모르폴리노 올리고머는 일보호된 구아닌 소단위 및/또는 통상의 환 질소 탈보호 과정을 사용하여 합성한 것들과 비교하여 보다 높은 순도 및 수율로 수득된다.

## 배경 기술

[0002]

포스포로디아미데이트-결합된 모르폴리노 올리고머, 또는 PMO는 상보적인 RNA에 강력하게 및 서열-특이적으로

결합하는 핵산 유사체이며 단백질 합성 및 이에 따른 유전자 발현을 조절하는데 유용하다. 이들 올리고머는 모르폴리노 골격 시스템에 의해 지지되는 염기-쌍 인식 잔기(헤테로사이클릭 염기)로 구성된다. 이러한 올리고머를 합성하는데 사용하기 위한 모르폴리노 소단위는 용이하게 이용가능하고 저렴한 전구체인, 상응하는 리보뉴클레오사이드로부터 용이하게 제조할 수 있다(참조: 예를 들면, Summerton and Weller, 1993, 1997).

[0003] 통상의 올리고뉴클레오타이드 합성에서와 같은, 이러한 합성 동안, 헤테로사이클릭 염기상의 작용 그룹은 합성 변환에서 간섭을 방지하기 위해 통상적으로 차폐된다. 예를 들어, N-트리틸화된 모르폴리노 단량체의 활성화(1a-f; 도 1)는 5'-하이드록실을 적합한 포스포르아미도 디클로리데이트와 반응시켜 활성화된 소단위 2a-f를 형성시키는 것을 포함한다. 대규모(50-100 같은 반응기)에서, 조 활성화된 소단위는 일반적으로 높은 수준의 부-생성물로 오염된다. 크로마토그래피 정제 후, 활성화된 소단위는 A, C, I, T, U 및 이들의 보호된 형태에 대해 약 50% 수율로 분리되나, 활성화된 단일 보호된 G 소단위에 대해서는 단지 약 5% 수율로 분리되는데, 이는, 탈보호된 O6 산소의 존재에 기인한 것으로 여겨진다.

[0004] O6-보호되지 않은 구아닌 소단위는 또한 올리고머 단계에서 부 반응을 유발한다. 예를 들어, O6 산소는 커플링 단계 동안 활성화된 소단위와 반응하여 O6-포스포릴화된 중 또는 유도체 중을 형성할 수 있으며, 암모니아를 사용한 염기 보호 그룹의 최종 분해 동안, 암모니아는 C6에서 반응하여 이들 중을 대체하여 디아미노퓨린 유도체를 생성한다. 이러한 불순물은 크로마토그래피로 제거하기 어려워서, 수율에 있어 큰 손실을 유발한다.

[0005] 통상의 올리고뉴클레오타이드 합성시 보호되지 않은 구아닌 O6 위치의 부 반응을 감소시키기 위한 각종의 보호도식이 당해 분야에 제안되어 왔다(참조: 예를 들면, Gough et al. 1979; Reese et al. 1981, 1984; Jones et al. 1982A, 1982B). 그러나, 이들 프로토콜은 PMO 합성에 적용되는 경우 크게 성공적이지 않았다. 따라서, PMO 합성, 특히 G 모르폴리노 소단위의 사용시 수율 및 순도를 증가시키기 위한 개선된 방법이 고려되고 있다.

[0006] 모르폴리노 소단위의 모르폴리노 질소는 또한 통상적으로 트리틸 또는 치환된 트리틸 종에 의해 사용 전에 보호된다. 올리고머 합성 동안, 당해 그룹은 각각의 주기 동안에 제거되어 다음 소단위가 도입되도록 허용해야 한다. 보호 그룹을 완전히 제거하는 것의 실패는 바람직한 올리고머 생성물을 오염시키는 N-1 결실 서열을 초래한다.

[0007] 트리틸 그룹은 산을 사용하여 통상적으로 제거하며, PMO 합성에 사용된 탈보호 시약은 전통적으로 카복실산이었다(참조: Summerton et al. 1993, 1997). 그러나, 포스포로디아미데이트 그룹은 또한 산에 대해 민감하며, 탈트리틸화에 유용한 카복실산은 또한 도 1에 나타난 바와 같이, 아미데이트 종에 대한 포스포로디아미데이트 결합의 가수분해를 촉진할 수 있어, 보다 과도하게 골격이 분해될 가능성이 있다. 예를 들면, 20% 아세트니트릴/DCM중 시아노아세트산은 효과적인 탈보호 시약이지만, PMO 생성물내 포스포로디아미데이트 결합의 유의적인(5-10%) 가수분해를 유발하는 것으로 밝혀졌다.

[0008] 카복실산은 또한 커플링 반응 전에 합성 지지체 수지로부터 완전히 제거되어야 하나; 3'-아세틸화된 종을 함유하는 트렁케이트된(truncated) 올리고머로 이루어진 부-생성물이 형성된다.

[0009] 이러한 이유들로 인해, PMO 합성에서 모르폴리노 질소 탈보호를 위한 개선된 시약이 요구되고 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) Ravikumar, V. et al, 미국 특허 제5,510,476호.  
(특허문헌 0002) Summerton, J.E. 및 Weller, D.D. (1993) 미국 특허 제5,185,444호.  
(특허문헌 0003) Summerton, J.E. 및 Weller, D.D., 미국 특허 제5,185,444호(1993).

### 비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Albert, A., Physical Methods in Heterocyclic Chemistry, Vol. I, A. R. Katritzky, Ed., Academic Press, pp 44 (1963).

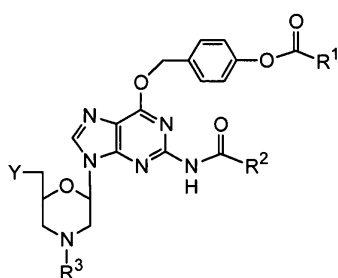
- (비특허문헌 0002) Fisher, A., Galloway, W.J., and Vaughan, J., J. Chem. Soc. 3591 (1964).
- (비특허문헌 0003) Garrison, A.W. and Boozer, C.E., J. Am. Chem. Soc. 90(13):3486-3494 (1968).
- (비특허문헌 0004) Gough et al. (1979) Nucleic Acids Research 7:1955-1964.
- (비특허문헌 0005) Hata et al. (1983) Tetrahedron Lett. 24:2775-2778.
- (비특허문헌 0006) Jones et al. (1982A) Tetrahedron Lett. 23:2253-2256.
- (비특허문헌 0007) Jones et al. (1982B) Tetrahedron Lett. 23:2257-2260.
- (비특허문헌 0008) Mitsunobu, O. (1981) Synthesis 1: 1-28.
- (비특허문헌 0009) Reese et al. (1981) Tetrahedron Lett. 22:4755-4758.
- (비특허문헌 0010) Reese et al. (1984) J. Chem.Soc, Perkin Trans. I1263-1270.
- (비특허문헌 0011) Rogne, O., J. Chem. Soc. 727 (1970).
- (비특허문헌 0012) Summerton, J.E. and Weller, D.D., Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 7(3): 187-195 (1997).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0012] 하나의 측면에서, 본 발명은 화학식 I을 포함하는 모르폴리노 화합물을 제공한다:

[0013] [화학식 I]



I

[0014]

[0015] 상기 화학식 I에서,

[0016]  $R^1$ 은 저급 알킬, 디(저급 알킬)아미노 및 페닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0017]  $R^2$ 는 저급 알킬, 모노사이클릭 아릴메틸 및 모노사이클릭(아릴옥시)메틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;

[0018]  $R^3$ 은 트리아릴메틸 및 수소로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0019] Y는 보호되거나 보호되지 않은 하이드록실 또는 아미노 그룹; 클로로포스포르아미데이트 그룹; 및 추가의 모르폴리노 화합물 또는 모르폴리노 올리고머의 환 질소에 결합된 포스포로디아미데이트로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0020] 선택된 양태에서, Y는 보호되거나 보호되지 않은 하이드록실 그룹 및 클로로포스포르아미데이트 그룹, 예를 들면,  $-O-P(=O)-N(CH_3)_2Cl$  형태의 클로로포스포르아미데이트 그룹으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. Y가 보호된 하이드록실 그룹인 경우, 이는 바람직하게는 트리알킬실릴-보호된 하이드록실 그룹이다.

[0021] 그룹  $R^3$ 는 바람직하게는 트리틸(트리페닐메틸), 4-메톡시트리틸, 4-메틸트리틸, 4,4'-디메틸트리틸, 및 4,4',4''-트리메틸트리틸 중에서 선택된다. 그룹  $R^1$ 은 바람직하게는 저급 알킬, 특히  $C_1$ - $C_4$  알킬, 및 가장 특히



$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$  (3급-부틸)이다. 그룹  $\text{R}^2$ 는 바람직하게는 벤질 및  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  (이소프로필) 중에서 선택된다.

[0022] 관련 양태에서, 본 발명은 모르폴리노 올리고머를 합성하는 개선된 방법을 제공하며, 당해 방법은:

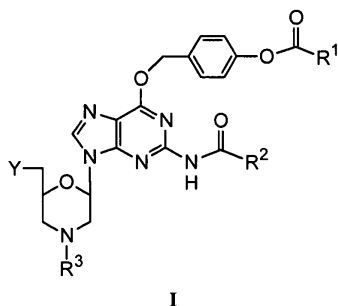
[0023] (a) 보호되지 않은 환 질소를 갖는 고체-상-지지된 모르폴리노 소단위를 5'-엑소사이클릭 탄소상에 트리아릴메틸-보호된 환 질소 및 활성화된 포스포르아미데이트 그룹을 갖는 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체와 반응시켜, 5'-엑소사이클릭 탄소와 상기의 보호되지 않은 환 질소사이에 포스포로디아미데이트 결합을 형성시키는 단계;

[0024] (b) 상기의 보호된 환 질소를 탈보호시켜, 보호되지 않은 환 질소를 형성시키는 단계; 및

[0025] (c) 단계 (a) 및 (b)를 추가의 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체를 사용하여 1회 이상 반복하는 단계를 포함하며;

[0026] 여기서, 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체중 적어도 하나는 화학식 I의 이중 보호된 구아닌 모르폴리노 화합물이다:

[0027] [화학식 I]



[0028] I  
[0029] 상기 화학식 I에서

[0030]  $\text{R}^1$ 은 저급 알킬, 디(저급 알킬)아미노 및 페닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0031]  $\text{R}^2$ 는 저급 알킬, 모노사이클릭 아릴메틸 및 모노사이클릭(아릴옥시)메틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;

[0032]  $\text{R}^3$ 은 트리아릴메틸 및 수소로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0033] Y는 클로로포스포르아미데이트 그룹이다.

[0034] 상기 화학식에 나타난 변수의 선택된 양태는 위에서 기술한 것들을 포함한다.

[0035] 추가의 측면에서, 본 발명은 모르폴리노 올리고머를 합성하는 개선된 방법을 제공하며, 당해 방법은:

[0036] (a) 보호되지 않은 환 질소를 갖는 고체-상-지지된 모르폴리노 소단위를 5'-엑소사이클릭 탄소 상에 트리아릴메틸-보호된 환 질소 및 활성화된 포스포르아미데이트 그룹을 갖는 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체와 반응시켜, 5'-엑소사이클릭 탄소와 보호되지 않은 환 질소사이에 포스포로디아미데이트 결합을 형성시키는 단계;

[0037] (b) 상기의 보호된 환 질소를 탈보호시켜, 보호되지 않은 환 질소를 형성시키는 단계; 및

[0038] (c) 상기의 단계 (a) 및 (b)를 추가의 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체를 사용하여 1회 이상 반복하는 단계를 포함하며;

[0039] 여기서, 상기 탈보호는 트리아릴메틸-보호된 환 질소를 트리플루오로에탄올-함유 용매 중에 헤테로사이클릭 아민 염을 포함하는 시약 용액에 노출시킴을 포함하며, 여기서, 상기 염은 이의 양성자화된 형태에서 pKa의 범위가 1 내지 4인 헤테로사이클릭 아민과, 설펡산, 트리플루오로아세트산 및 염산 중에서 선택된 산과의 염이다.

[0040] 헤테로사이클릭 아민은 바람직하게는 전자 제거 그룹-치환된 피리딘, 티아졸, 피리다진, 피라졸, 트리아졸 및 이들의 전자 제거 그룹-치환된 유도체로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 이러한 전자 제거 그룹(EWG)는 할로젠, 시아노, 알데하이드, 케토, 카복시에스테르 및 카복사미드를 포함한다.

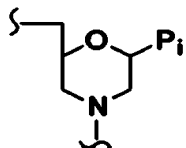
[0041] 바람직하게는, 헤테로사이클릭 아민은 클로로- 또는 시아노-치환된 피리딘과 같은 전자제거 그룹-치환된 피리딘

이다. 아민 염은 바람직하게는 알킬설포네이트, (플루오로알킬)설포네이트 또는 p-톨루엔설포네이트와 같은 설포산의 염, 또는 트리플루오로아세테이트이다. 선택된 양태에서, 염은 3-클로로피리디늄 메탄설포네이트(CPM) 및 4-시아노피리디늄 트리플루오로아세테이트(CYTFA) 중에서 선택된다.

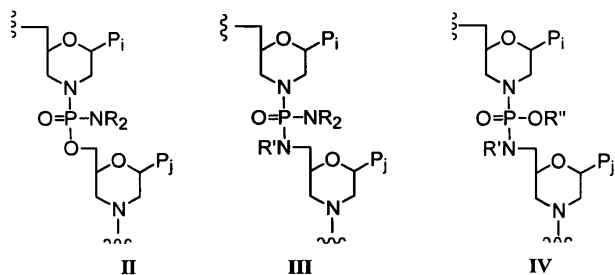
- [0042] TFE-함유 용매는 바람직하게는 디클로로메탄 및 트리플루오로에탄올을 약 90:10 내지 25:75 범위의 용적 비, 및 보다 바람직하게는 약 80:20 DCM:TFE의 용적 비로 포함한다.
- [0043] 트리아릴메틸 보호 그룹은 트리틸(트리페닐메틸), 4-메톡시트리틸, 4-메틸트리틸, 4,4'-디메틸트리틸 및 4,4',4"-트리메틸트리틸로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- [0044] 본원에 기술된 변형법 및 개선법을 조합하여 상기 단계 (a) 내지 (c)를 수행하며, 여기서:
- [0045] (i) 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체 중 적어도 하나는 위에 설정된 바와 같은 화학식 I의 이중 보호된 구아닌 모르폴리노 화합물이고;
- [0046] (ii) 보호된 환 질소의 탈보호는 트리아릴메틸-보호된 환 질소를 트리플루오로에탄올-함유 용매 속에 헤테로사이클릭 아민 염을 포함하는 시약 용액에 노출시킴을 포함하며, 여기서, 상기 염은, 이의 양성자화된 형태에서 pKa의 범위가 1 내지 4의 범위인 헤테로사이클릭 아민과, 설포산, 트리플루오로아세트산 및 염산 중에서 선택된 산의 염이다.
- [0047] 통상적으로, 합성은 또한 표준 과정에 따라, 고체 상으로부터 모르폴리노 올리고머를 분해하고 염기를 탈보호함을 포함한다.
- [0048] 본 발명의 이러한 및 다른 목적 및 특징은, 본 발명의 다음의 상세한 설명을 첨부된 도면과 함께 관독하는 경우 보다 명백해질 것이다.

## 과제의 해결 수단

- [0049] I. 정의
- [0050] 본원에 사용된 것으로서, 하기 용어들은 달리 나타내지 않는 한, 다음 의미들을 갖는다:
- [0051] "모르폴리노 올리고머"는 통상의 폴리뉴클레오타이드에 수소 결합할 수 있는 염기를 지지하는 골격을 갖는 중합체 분자를 말하며, 여기서, 중합체는 펜토즈 당 골격 잔기, 및 보다 상세하게는 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드의 대표적인 포스포디에스테르 결합에 의해 결합된 리보즈 골격을 결여하지만, 대신 환 질소를 따라 커플링을 갖는 환 질소를 함유한다. 바람직한 모르폴리노 올리고머는, 올리고머내에서 바람직하게는 (티오)포스포로디아미데이트 결합에 의해 함께 결합되어 하나의 소단위의 모르폴리노 질소를 인접한 소단위의 5' 엑소사이클릭 탄소에 연결시키는, 하기 나타낸 바와 같은 "모르폴리노 소단위" 구조로 구성된다. 각각의 소단위는 염기-특이적인 수소 결합에 의해 폴리뉴클레오타이드내 염기에 결합하기에 효과적인 퓨린 또는 피리미딘 염기-쌍 잔기 Pi를 포함한다.



- [0052]
- [0053] 모르폴리노 올리고머는 예를 들면, 공동-소유의 미국 특허 제5,698,685호, 제5,217,866호, 제5,142,047호, 제5,034,506호, 제5,166,315호, 제5,185,444호, 제5,521,063호, 및 제5,506,337호에 상세히 기술되어 있으며, 이들 모두는 본원에 참조로 인용되어 있다.
- [0054] "포스포로디아미데이트" 그룹은 2개의 부착된 산소 원자 및 2개의 부착된 질소 원자를 갖는 인을 포함하며, 본원에서 또한 하나의 부착된 산소 원자 및 3개의 부착된 질소 원자를 갖는 인으로 언급될 수 있다. 본원에 기술된 올리고머의 소단위내 결합에서, 하나의 질소는 골격 외에 대한 통상적인 펜던트(pendant)이며, 두번째 질소는 하기 화학식 II에 나타낸 바와 같이, 모르폴리노 환 구조내 환 질소이다. 달리는 또는 추가로, 질소는 하기 화학식 III 및 IV에 나타낸 바와 같이, 5'-엑소사이클릭 탄소에 존재할 수 있다.



[0055]

[0056]

티오포스포로디아미데이트 결합에서, 하나의 산소 원자, 통상적으로 본원에 기술된 올리고머내 골격에 대한 산소 펜던트는 황으로 대체된다.

[0057]

"고체-상-지지된 모르폴리노 소단위"는 본원에 기술된 바와 같은 고체-상 단계별 합성에 의해 모르폴리노 올리고머내로 도입된 제1 또는 어떠한 후속적인 모르폴리노 소단위 단량체일 수 있다. 당해 소단위는 고체 지지체에, 또는 고체 지지체 상의 성장하는 올리고머 쇄에, 이의 5' 엑소사이클릭 탄소를 통해 부착된다. "염기-보호된"은 모르폴리노 소단위 상의 염기-쌍 그룹, 예를 들면, 퓨린 또는 피리미딘 염기를 단계별 올리고머 합성 동안 염기-쌍 그룹의 반응 또는 간섭을 예방하는데 적합한 보호그룹으로 보호함을 말한다.

[0058]

"활성화된 포스포르아미데이트 그룹"은 통상적으로 올리고머내 궁극적인 포스포르아미데이트 결합에 요구되는 질소에서 치환을 갖는, 클로로포스포르아미데이트 그룹이다. 예에는 (디메틸아미노)클로로포스포르아미데이트, 즉,  $-O-P(=O)(NMe_2)Cl$ 이 있다.

[0059]

본원에 사용된 것으로서, 용어 "하전된", "하전되지 않은", "양이온성" 및 "음이온성"은 중성 근처의 pH, 예를 들면, 약 6 내지 8에서 화학 잔기의 우세한 상태를 말한다. 바람직하게는, 당해 용어는 생리학적 pH, 예를 들면, 약 7.4에서 화학 잔기의 우세한 상태를 말한다.

[0060]

"저급 알킬"은 메틸, 에틸, n-부틸, i-부틸, t-부틸, 이소아밀, n-펜틸 및 이소펜틸로 예시되는 바와 같은, 탄소수 1 내지 6의 알킬 라디칼을 말한다. 선택된 양태에서, "저급 알킬" 그룹은 1 내지 4개의 탄소 원자, 또는 1 및 2개의 탄소 원자를 가지며, 예를 들면, 메틸 또는 에틸이다. 유사하게, "저급 알케닐"은 알릴 및 부테닐에 의해 예시되는 바와 같이, 탄소수 2 내지 6, 바람직하게는 3 또는 4인 알케닐 라디칼을 말한다.

[0061]

"간섭하지 않는" 치환체는 본원에 기술한 것으로서 안티센스 올리고머가 이의 의도된 표적에 결합하는 능력에 역으로 영향을 미치지 않는 것이다. 이러한 치환체는 작고 바람직하게는 메틸, 에틸, 메톡시, 에톡시, 하이드록시 또는 플루오로와 같은 비-극성 그룹을 포함한다.

[0062]

## II. PMO 합성시 염기 보호

[0063]

모르폴리노 화학의 특수한 챌린지(challenge)로 인하여, 염기 보호 그룹은 몇개의 조건들을 충족하여야 한다. 보호 그룹은 헤테로사이클릭 잔기 상에 용이하게 도입된 후 소단위 활성화 및 정제 조건, 및 고체상 합성에 안정하여야 한다. 보호 그룹은 성장하는 쇄의 모르폴리노 아민 잔기와 반응성이 아니어야 하며, 활성화된 모르폴리노 소단위가 성장하는 올리고머 쇄와 명백하게 커플링하도록 하여야 한다. 보호 그룹은 바람직하게는 암모니아에 의해, 새로운 분순물의 도입없이 제거되어야 한다. 최종적으로, 이는 활성화 전에 크로마토그래피 정제에 대한 요구도를 피하기 위하여, 결정 소단위 유도체를 생성하여야 한다.

[0064]

하기 및 비교 실시예에 기술된 바와 같이, 핵산 합성에 사용된 것으로서, 이중 보호된 구아노신에 대해 문헌에 보고된 보호 그룹은 이러한 기준을 적절히 충족하지 못하였다. 따라서, 새로운 보호 방법이 모르폴리노 G 소단위에 요구되었다. 하기 기술한 바와 같이, 06에서 4-(피발로일옥시)벤질옥시 그룹의 사용은 상기 기준 모두를 충족하는 것으로 밝혀졌다.

[0065]

## A. 06 보호 그룹들: 비교 데이터

[0066]

### A1. 4-니트로벤질 에테르(NPE)

- [0067] 당해 유도체는 도 2(참조: Mitsunobu 1981) 또는 도 3(참조: Jones et al. 1982B)에 나타난 바와 같이 제조하였다. 조 06 보호된 소단위가 충분한 수율로 제조될 수 있다고 해도, 화합물은 용이하게 결정이 아니며, 대-규모 생산에 바람직하지 않은, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해서만 적절히 정제될 수 있다. 과도한 범위의 재슬러리화 및/또는 재결정화 조건을 시험한 후, 부톡시에탄올-함유 용매 조합물이 약간의 난이도로 물질을 결정화할 수 있음이 밝혀졌다. 그러나, 과도한 부톡시에탄올은 용매화물로서 유사하게 결정화된 화합물과 같이, 최종 생성물로부터 제거될 수 없었다. 과도한 알코올성 용매의 존재는 활성화 반응시 허용되지 않을 수 있다.
- [0068] NPE 그룹은  $\beta$ -제거 메커니즘을 통해 강력한 염기로 분해된다. 이러한 조건들은 반응성인 부-생성물 4-니트로스티렌을 생성하는 경향이 있으며, 이는 이후에 올리고머상에서 반응성 부위와 반응할 수 있다. 각종의 스캐비닝제(scavenging agent)(예: 티올 및 1,3-디카보닐 화합물)가 올리고머에 의한 부-생성물의 트래핑(trapping)을 방지하기 위한 시도로 탈보호 혼합물내에 도입되었으나, 어느 것도 이러한 내부 회복 문제를 제거하는데 있어 완전하게 성공적이지 않았다. 심지어 정제 후에도, 당해 소단위로 제조한 올리고머는 황색 색조를 가졌다.
- [0069] A2. 페닐설폰닐에틸(PSE) 및 메틸설폰닐에틸(MSE)
- [0070] 당해 그룹들은, 도 4에 나타난 바와 같이, 상응하는 2-티오에탄올 유도체(참조: Jones et al. 1982A, 1982B)를 통해 도입되었다. 그러나, 어떠한 성공적인 결정화 과정도 수득되는 소단위에 대해 발견할 수 없었다.
- [0071] 상기 NPE 그룹과 유사하게, 이들 그룹들은  $\beta$ -제거 메커니즘을 통해 분해된다. 올리고머내로 도입된 후, 이들 유도체는 NPE 그룹으로 관측되는 동일한 문제, 즉, 탈보호동안 형성된 반응성 알켄 부-생성물의 내부 회복을 제공하였다.
- [0072] A3. 트리메틸실릴에틸 에테르
- [0073] 존슨스(참조: Jones et al. 1982B)에 의해 보고된 바와 같이, 06-TMSE-개질된 모르폴리노 구아닌 소단위는 도 5에 나타난 바와 같이 제조하였으나, 이는 올리고머 합성 동안 안정하지 않았다. 당해 소단위로 제조된 올리고머는 06-탈보호된 G 소단위로부터 제조된 것들과 유사한 부-생성물의 범위를 나타내었다.
- [0074] A4. 페닐 에테르
- [0075] 06-페닐 치환된 모르폴리노 구아닌 소단위(도 6)을 리즈(Reese) 등의 문헌[참조: Reese et al. (1981, 1984)]의 과정에 따라 제조하였다. 당해 유도체들은 치환되지 않은 페닐, 2,5-디클로로페닐, 펜타플루오로페닐 및 3-플루오로페닐을 포함하였다. 이러한 소단위는 PMO내로 도입될 수 있으나, 2-니트로벤즈알데하이드 옥심 및 강염기와 같은 통상의 시약을 사용한 탈보호는 올리고머의 분해없이 완전하게 수행될 수 없었다.
- [0076] A5. 카바메이트
- [0077] 몇몇 06-카바메이트 유도체를 문헌[참조: Hata et al. 1983]의 과정에 따라 합성하였다(도 7). 올리고머 합성시 이들 유도체의 사용은 사용된 유도체에 따라 다양한 결과를 가져온다. 디페닐 카바모일 유사체와 같은 보다 불안정한 종의 경우, 성장하는 쇠의 3'-질소에 대한 보호 그룹의 이동이 고체 상 합성의 커플링 단계동안 주목되었으며, 3'-디페닐카바모일 잔기를 함유하는 트렁케이트된 올리고머를 생성하였다. 또한, 06-카바메이트는 암모니아와의 2개의 가능한 반응 부위를 갖는다. 디페닐카바모일 그룹과 같은 보다 반응성인 잔기가 카보닐에서 비교적 선택적인 공격을 제공한다고 해도, 보다 안정한 디메틸 및 피롤리딘 카바메이트는 디아미노퓨린으로 전환되면서, C6 위치에서 암모니아의 현저하게 경쟁적인 반응을 나타내었다.
- [0078] B. 4-(피발로일옥시)벤질옥시 보호 그룹
- [0079] 4-(피발로일옥시)벤질옥시 알코올(도 8, 4a)이 효과적인 고-수율 합성을 통해 모르폴리노 구아닌 소단위내로 도입되었다. 활성화 전에 소단위(도 1 및 8에서 화합물 1f)가 합성되어 크로마토그래피 정제없이 대규모로 재생적으로 분리될 수 있으며, 이는 각종 용매(예: THF/물, THF/헵탄, 아세토니트릴, 각종 에스테르/탄화수소 혼합물)로부터 결정화될 수 있다. 당해 소단위의 10개 배치를 50 내지 200 gallon 규모(배치 크기: 화합물 1c의 8 내지 27 kg)로 순도(HPLC에 의한)가 97.6% 내지 99.2%인 평균 65% 수율의 생성물이 수득되었다.
- [0080] 소단위는 모노-보호된 G보다 훨씬 더 명백하게 활성화된 소단위로 전환(즉, 5'-클로로포스포르아미데이트 화합물로 전환)되며, 이는 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 보다 용이하게 정제될 수 있다. 규모에서, 화합물 1f로부터 화합물 2f(도 1)로의 전체 수율은 대략 50%이다.
- [0081] POB 보호 그룹을 N2 및 모르폴리노 환 질소에 대한 보호 그룹의 다른 조합으로 사용할 수 있다. 적합한 N2 보호 그룹은 페닐아세틸(도 8에 나열한 바와 같음) 및 아세틸, 프로피오닐, 이소부틸릴 및 페녹시아세틸을 포함한

다. 커플링 단계사이에 모르폴리노 환 질소 보호에 적합한 트리틸 종은 치환되지 않은 트리틸, 4-메틸-, 4,4'-디메틸-, 및 4,4',4''-트리메틸트리틸 및 4-메톡시트리틸을 포함한다.

[0082] 다른 아실 보호 그룹을 또한 POB 그룹의 페놀 잔기에 대한 피발로일대신 사용할 수 있다. 적합한 대체제는 N,N-디메틸카바모일 및 벤조일을 포함한다.

[0083] PMO 합성 동안, 위에서 논의한 06-카바메이트에 대해 일반적인 부반응인, 피발로일 그룹이 완전한 길이의 PMO의 보다 작은 단편의 3'-말단에 부착되어 있는 생성물은 관측되지 않는다. 유일하게 주목되는 검출된 부 생성물은 탈보호 부-생성물 키는 메티드와의 반응으로부터 생성되는, 페놀성 잔기를 함유하는 PMO였다. 그러나, 당해 부-생성물은 암모니아성 탈보호 용액의 충분한 희석에 의해 미량의 수준으로 감소될 수 있다. 또한, 이는 강력한 음이온 교환 크로마토그래피에 사용된 중합체성 수지에 대한 페놀성 잔기의 강력한 결합으로 인해 용이하게 제거된다. 일반적으로, 정제된 PMO의 전체 수율은 표 1에서 관측되는 바와 같이, 크게 증가한다.

[0084] POB 보호된 구아닌 그룹에 의해 발전된 PMO 생산에 있어서의 개선은 정제에 이은 PMO 고체상 합성시 가장 명백하며, 여기서, 디아미노퓨린 및 관련된 부생성물을 제거하는데 있어서의 곤란성은 강력한 음이온 교환(SAX) 크로마토그래피 동안 심각한 손실을 초래할 수 있다. 예를 들면, CPM 및 MPG(모노-보호된 구아닌 소단위, 2c)를 사용하여 제조된 AVI-4126에 대한 조 순도는 68 내지 73% 범위 이내이며, 이는 PMO의 대략 58% 조 수율로 계산된다. 트리틸-온(on) 및 트리틸-오프(off) 정제 동안, 순수한 생성물을 수득하기 위하여 현저한 물질이 손실되며, 크로마토그래피로부터의 전체적인 회수율은 52%이다. CYTFA 및 DPG(디-보호된 구아닌 소단위)를 사용하여 제조한 AVI-4126의 경우, 조 순도는 질량 분광법에 의해 비교가능한 N-1 수준인, 70 내지 75%이며(이는, CYTFA 및 CPM 시약의 탈트리틸화 효율이 거의 동일함을 나타낸다) 조 수율은 약 61%이다. 그러나, 통상의 정제 방법의 적용으로 조 혼합물로부터 PMO가 80% 회수된다.

표 1

PMO AVI-	서열 번호:	서열	탈트리틸화 시약 <sup>1</sup>	구아닌 단량체	규모 <sup>2</sup>	수율
4126	1	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	CAA	2c	54 g <sup>3</sup>	18%
4557	2	CTGGGATGAGAGCCATCACT	CAA	2c	24 g <sup>4</sup>	18%
"	"	"	CAA	2c	48 g <sup>5</sup>	15%
4126	1	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	CPM	2c	25 g	25%
"	"	"	CPM	2c	25 g	27%
"	"	"	CPM	2c	25 g	30%
4020	3	CTTAGTCATCGAGATCTTCGTG	CPM	2c	30 g	32%
4126	1	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	CYTFA	2f	25 g	49%
4065	4	GTGCTCATGGTGCACGGTC <sup>6</sup>	CYTFA	2f	120 g	46%
"	"	"	CYTFA	2f	120 g	49%
"	"	"	CYTFA	2f	120 g	50%

[0085]

[0086] 합성은 표에 나타난 변형을 사용하여, 공동-소유의 미국 특허원 제11/801,885호에 기술된 방법에 따라 수행하였다: 참조: 하기 실시예 3 내지 6. 모든 PMO는 5'-"테일"을 가지며 3'-말단에서 치환되어있지 않다.

[0087] <sup>1</sup>CAA = 20% 아세토니트릴/DCM(v/v)의 혼합물 중 11% 시아노아세트산(w/w);

[0088] CPM = 20% 트리플루오로에탄올/DCM(v/v)중 2% 3-클로로피리디늄 메탄설포네이트(w/v) 및 0.9% 에탄올(v/v); CYTFA = 20% 트리플루오로에탄올/DCM(v/v)중 2% 3-시아노피리디늄 트리플루오로아세테이트(w/v) 및 0.9% 에탄올(v/v).

[0089] <sup>2</sup>규모는 그람으로 나타난 출발 수지의 중량이다. 수지 로딩은 480 내지 520  $\mu$ moles/g이다.

[0090] <sup>3</sup>4x12g 및 1x8g의 조합된 배출량이 수행됨.

[0091] <sup>4</sup>2x12g의 조합된 배출량이 수행됨.



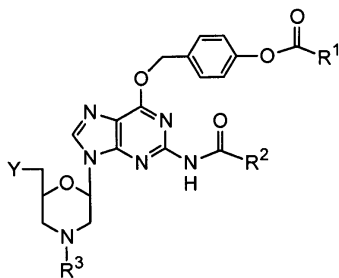
[0092] <sup>5</sup> 4x12g의 조합된 배출량이 수행됨.

[0093] <sup>6</sup> 최종 C 소단위의 첨가는 활성화된 모르폴리노 C 소단위와 4-메톡시트리틸 보호를 사용하여 모르폴리노 질소 상에서 수행하였다.

[0094] 따라서, 본 발명의 이중 보호된 MoG 단량체는 선행 분야의 방법, 및 특히 모노 보호된 MoG 단량체, 또는 본 발명이 아닌 다른 보호된 MoG 단량체를 사용하는 경우에 관측된 정제 수율과 비교하여 증가된 정제 수율로 모르폴리노 올리고머를 합성하는 방법을 제공한다. 특히, 당해 방법은 바람직하게는 본 발명이 아닌 MoG 단량체를 사용하여 수득된 것보다 감소된 수준의 디아미노퓨린 중을 생성한다.

### [0095] III. 이중 보호된 구아닌 모르폴리노 소단위

[0096] 본 발명의 이중 보호된 구아닌(DPG) 모르폴리노 소단위는 화학식의 구조를 갖는다:



[0097]

[0098] 상기 화학식에서,

[0099]  $R^1$ 은 저급 알킬, 디(저급 알킬)아미노 및 페닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0100]  $R^2$ 는 저급 알킬, 모노사이클릭 아릴메틸 및 모노사이클릭(아릴옥시)메틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;

[0101]  $R^3$ 은 트리아릴메틸 및 수소로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0102] Y는 보호되거나 보호되지 않은 하이드록실 또는 아미노 그룹; 클로로포스포르아미데이트 그룹; 및 추가의 모르폴리노 화합물 또는 모르폴리노 올리고머의 환 질소에 결합된 포스포로디아미데이트로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0103] 선택된 양태에서, Y는 보호되거나 보호되지 않은 하이드록실 그룹(예비-활성화된 단량체에서와 같이) 및 클로로포스포르아미데이트 그룹(활성화된 단량체에서와 같이)이다. 하이드록실 그룹에 대한 바람직한 보호 그룹은 3급-부틸디메틸실릴(TBDMS)과 같은 트리알킬실릴 그룹을 포함한다.

[0104] Y가 추가의 모르폴리노 화합물의 환 질소에 결합된 포스포로디아미데이트, 또는 모르폴리노 올리고머에 결합된 포스포로디아미데이트인 양태는 염기 탈보호 전, 모르폴리노 올리고머 합성동안 형성된 중을 말한다.

[0105] 하기 논의한 바와 같이, 클로로포스포르아미데이트 그룹(활성화된 단량체내) 상의 치환체는 목적한 특수 포스포로디아미데이트 결합에 따라 변할 수 있다.

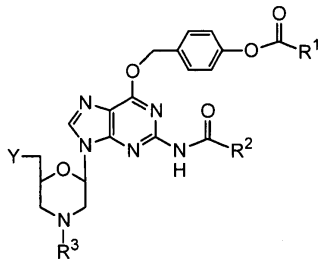
[0106] 본 발명은 또한 상응하게는, 모르폴리노 올리고머를 합성하는 방법을 제공하며, 당해 방법은:

[0107] (a) 보호되지 않은 환 질소를 갖는 고체-상-지지된 모르폴리노 소단위를 5'-엑소사이클릭 탄소상에 트리아릴메틸-보호된 환 질소 및 활성화된 포스포르아미데이트 그룹을 갖는 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체와 반응시켜, 5'-엑소사이클릭 탄소와 상기의 보호되지 않은 환 질소사이에 포스포로디아미데이트 결합을 형성시키는 단계;

[0108] (b) 상기의 보호된 환 질소를 탈보호시켜, 보호되지 않은 환 질소를 형성시키는 단계; 및

[0109] (c) 단계 (a) 및 (b)를 추가의 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체를 사용하여 1회 이상 반복하는 단계를 포함하며;

[0110] 여기서, 염기-보호된 모르폴리노 소단위 단량체중 적어도 하나는 하기 화학식의 이중 보호된 구아닌 모르폴리노 화합물이다:



[0111]

[0112] 상기 화학식에서

[0113]  $R^1$ 은 저급 알킬, 디(저급 알킬)아미노 및 페닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0114]  $R^2$ 는 저급 알킬, 모노사이클릭 아릴메틸 및 모노사이클릭(아릴옥시)메틸로 이루어진 그룹 중에서 선택되며;

[0115]  $R^3$ 은 트리아릴메틸 및 수소로 이루어진 그룹 중에서 선택되고;

[0116] Y는 클로로포스포르아미데이트 그룹이다.

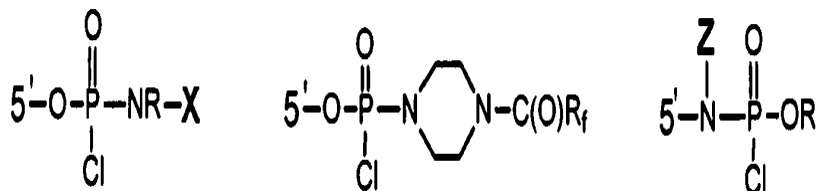
[0117] 모르폴리노 환 질소( $R^3$ )에 대한 바람직한 트리아릴메틸 보호 그룹은 트리틸(트리페닐메틸), 4-메톡시트리틸, 4-메틸트리틸, 4,4'-디메틸트리틸 및 4,4',4'-트리메틸트리틸을 포함한다.

[0118] 06 보호 그룹 상의  $R^1$  치환체는 바람직하게는 4-(피발로일옥시)벤질옥시(POB) 그룹에서와 같이,  $C_1-C_4$  알킬, 특히- $C(CH_3)_3$ (3급-부틸)이다. 그러나,  $R^1$ 은 또한 디메틸아미노와 같은 디(저급 알킬)아미노, 또는 페닐일 수 있다.

[0119] 위에서 주목한 바와 같이, "활성화된" 단량체에서 클로로포스포르아미데이트 그룹 Y의 치환은 목적인 포스포로 디아미데이트 결합의 구조에 따라 변한다. "표준"의 하전되지 않은 PMO 결합 5'-O-P(=O)(-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)-3'(상기 화학식 II에서 나타난 바와 같음, 여기서, R은 메틸이다)의 제조를 위해, 클로로포스포르아미데이트 그룹 Y는 5'-O-P(=O)Cl-NR<sub>2</sub>(참조: 예를 들면, 도 8의 화합물 2f)이다.

[0120] 본원에 참조로 인용된 것으로서, 2007년 5월 10일자로 출원된 USSN 제11/801,885호의 공동-소유의 출원에 기술된 바와 같이, 유리한 특성은 양이온성 및 중성 소단위내 결합을 갖는 PMO를 제조함으로써 획득할 수 있다. 이러한 올리고머에서, 2개의 연속적인 모르폴리노 환 구조사이의 적어도 하나의 소단위내 결합은 펜던트 양이온성 그룹을 함유한다. 펜던트 그룹은 중성 또는 중성-근처(예를 들면, 생리학적) pH에서 양성 전하를 지닐 수 있는 인접한 질소 원자를 지닌다.

[0121] 이러한 결합을 제조하기 위해, 본 발명의 소단위 단량체내 클로로포스포르아미데이트 그룹 Y는 다음 구조 중 하나를 가질 수 있다:



[0122]

[0123] 상기 구조에서,

[0124] R은 메틸 또는 에틸과 같은 저급 알킬이고;

[0125] X는 -R<sup>4</sup>-NHC(=O)R<sub>f</sub>(여기서, R<sup>4</sup>는 2가 알킬 또는 올리고 PEG이고, R<sub>f</sub>는 완전히 또는 부분 불소화된 메틸, 에틸 또는 이소프로필이다)이며;

[0126] Z는 위에서 정의한 바와 같은 X 또는 저급 알킬이다. Z-함유 그룹은 5'-아민 함유 결합을 생성함을 주목한다.

[0127] 용어 "올리고 PEG"는  $-(CH_2-CH_2-O)_n-CH_2-CH_2-$ (여기서, n은 통상적으로 1 내지 3이다)이고, "2가 알킬"은 통상적으로  $C_2$  내지  $C_8$  알킬이다.

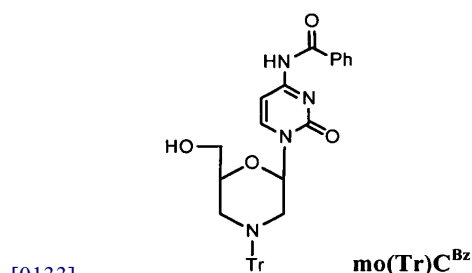
[0128] 이러한 활성화된 클로로포스포르아미데이트 그룹을 가진 단량체를 사용한 올리고머의 제조에 이어서,  $C(=O)R_f$  보호 그룹을 말단 질소 원자로부터 제거하며, 이는 추가로 개질화되어 예를 들면, 공동-소유의 출원 USSN 제 11/801,885호에 기술된 바와 같은, 말단 구아니디닐 그룹을 형성할 수 있다.

[0129]

[0130] IV. PMO 합성시 모르폴리노 환 질소의 탈보호를 위한 개선된 조건

[0131] 위에서 주목한 바와 같이, PMO 합성시 트리틸과 같은 트리아릴메틸 그룹에 의해 통상적으로 보호되는, 모르폴리노 환 질소의 탈보호는 각각의 단계에서 N-1 결실 중을 최소화하기에 충분하도록 완료되어야 한다. 그러나, 본 발명의 지지에서 연구들은, 당해 목적을 위해 선행 분야에서 사용된 시약이 바람직하지 않은 양의 골격 가수분해(참조: 도 1) 및 봉해를 유발하였음을 나타내었다. 따라서, 이러한 가수분해를 동시에 최소화한 효과적인 탈보호 시약이 고려되었다.

[0132] 단순한 검정을 사용하여 N-보호된 모르폴리노 소단위의 탈보호(통상적으로 탈트리틸화)시 각종 시약의 효능을 시험하였다. 모델 화합물, 즉, 하기 나타낸 트리틸화된  $moC^{Bz}$ (즉, 벤조일-보호된 사이토신 모르폴리노) 소단위는 시험될 탈트리틸화 용액 속에 용해된다. 다양한 실험(예를 들면, 1, 2, 4분)에서, 분취량을 쥘칭하고 모르폴리노 질소 탈보호의 완료를 위해 TLC 또는 HPLC로 분석하였다. 일반적으로, 고체상 PMO 합성 동안 효과적인 탈트리틸화의 예측을 위해, 당해 모델 반응이 실온에서 약 2분 내에 완료되어야 한다.



[0133]

[0134] 당해 검정 및 추가의 실험을 사용하여, 트리플루오로에탄올(TFE) 및 디클로로메탄(DCM)의 혼합물 중 강산의 각종 피리디늄 염이 고체상 PMO 합성 동안 모르폴리노 질소로부터 트리아릴메틸 보호 그룹, 예를 들면, 트리틸 그룹을 제거하는데 탁월한 촉매임이 측정되었다.

[0135] 최소량의 TFE(~10% v/v 또는 그 이상)이 피리디늄 염의 충분한 반응 속도 및 가용화를 위해 바람직하다. TFE 단독은 미가공 폴리스티렌을 팽윤시키지 않으므로, DCM(디클로로메탄)과의 혼합물이, 특히 PMO 합성의 초기 주기에서 바람직하다. 바람직한 용매 조성물은 10 내지 75% TFE를 포함한다.

[0136] TFE 용매의 사용은 PDA 분해 및 탈트리틸화의 메커니즘을 차별화하는데 초점을 맞추으로써, 상기 기술한 아미데이트 형성(가수분해) 및 포스포로디아미데이트(PDA) 분해에 걸쳐 탈트리틸화 반응의 선택성을 향상시키는 것으로 여겨진다. TFE는 강력한 수소 결합 용매이며 용액 속에서 친핵체의 반응성을 감소시키므로; P-N 결합 분해에 필수적인 인 상에서의 공격을 저하시키는 것으로 여겨진다. TFE는 또한 SN1 유형 가용매분해 반응을 촉진한다. TFE와의 아민 탈트리틸화 반응의 가용매분해 특성은 탈트리틸화 반응 혼합물의 황색 색상 및 탈메톡시트리틸화 반응 혼합물의 오렌지 색상에 의해 입증된다. 따라서, TFE 농도의 증가는 PDA 결합에서 친핵성 공격을 제어하고 탈트리틸화를 촉진하는 것으로 여겨진다.

[0137] 치환되지 않은 피리디늄 염은 최적 탈보호에 충분히 산성이 아니지만, 전자 제거 그룹(EWG)(예: 할로젠, 카보닐, 시아노)을 함유하는 피리디늄 중의 사용은 보호 그룹의 신속한 분해를 허용한다. 일반적으로 TFE:DCM 용매 중 이러한 염의 적어도 2%(w/v)가 신속한 탈트리틸화에 충분하다. 피리디늄 염의 바람직한 수준은 2 내지 10%(w/v)이다.

[0138] 피리디늄 염을 형성하는데 유용한 산은 메탄설폰산, 트리플루오로메탄설폰산 및 p-톨루엔설폰산과 같은 설폰산, 트리플루오로아세트산 및 염산을 포함한다. 비록 카복실산이라고 해도, 트리플루오로아세트산은 커플링 반응



동안 존재하는 경우 성장하는 PMO 쇠를 캡핑하지 않으며, 이의 카복실레이트는 아미데이트 형성을 촉진하기에 충분히 친핵성이 아니다. 트리플루오로아세트산 및 특히 메탄설폰산이 특히 바람직하다.

[0139] 피리디늄 염을 형성하는데 유용한 피리딘은 할로젠 치환된 피리딘, 특히 저렴한 클로로피리딘을 포함하며, 이들 중 3-클로로피리딘이 바람직하고, 시아노피리딘, 이 경우 4-시아노피리딘이 바람직하다. 3- 및 4-시아노피리딘은 용이하게 이용가능하고, 저렴한 대량 화학물질이다. 일반적으로, 염의 효능은 피리디늄 종의 pKa와 역으로 관련된다. 전자 제거 그룹을 가진 피리딘은, pKa가 약 1 내지 4의 범위이다(참조: Fisher et al. 1964, Rogne 1970).

[0140] 또한 니코틴산 유도체(예를 들면, 에틸 니코티네이트 및 니코틴아미드) 및 이들의 케톤 및 알데하이드 동일종이 유용하다. 그러나, 일반적으로, 이들은 시아노피리디늄 염보다 덜 강력한 시약이다.

[0141] 피리딘 외에 헤테로사이클의 염이 기술한 조건하에서 선택적인 탈트리틸화 시약으로서 작용할 수 있으며, 단, 양성자화된 형태의 pKa가 본 발명의 치환된 피리딘의 것과 유사함은 인지될 것이다. 예들은 문헌(예를 들면, Albert 1963)에서 발견된 헤테로사이클에 대한 pKa의 많은 표들에서 찾을 수 있다. 예에는 티아졸(pKa 2.53), 피리다진(pKa 2.33), 피라졸(pKa 2.47), 트리아졸(pKa 2.30), 및 이의 치환된 유도체, 특히 위에서 기술한 바와 같은 EWG로 치환된 유도체가 포함된다.

[0142] 2개의 특히 바람직한 염은 3-클로로피리디늄 메탄설포네이트(CPM) 및 4-시아노피리디늄 트리플루오로아세테이트(CYTFA)이고, 탈트리틸화 시약의 특히 바람직한 양태는 0.9% 에탄올(v/v)을 함유하는 20% 트리플루오로에탄올/DCM(v/v) 중 CPM 또는 CYTFA의 2%(w/v) 용액을 포함한다. 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 이들 시약의 사용은 통상의 시아노아세트산 시약보다 수율에 있어 현저한 증가를 초래한다.

[0143] 보다 산성인 CYTFA는 CPM보다 약간 더 효율적인 것으로 밝혀졌다. 그러나, 표에서 CPM 및 CYTFA 시약사이의 수율에 있어서의 많은 증가는 이중 보호된 구아닌 단량체(DPG)의 용도에 기여할 수 있으며, 여기서, 06 위치는 공동-소유되고 현재 출원된 "이중 보호된 구아닌 모르폴리노 소단위를 사용한 모르폴리노 올리고머의 개선된 합성"이라는 명칭의 가특허원에 기술된 바와 같이, 4-(피발로일옥시)벤질옥시 그룹으로 보호된다. 일반적으로, DPG 단량체의 사용은 디아미노퓨린-함유 부 생성물의 양을 감소시키는 반면, 개선된 탈트리틸화 시약은 가수분해된 골격 또는 트렁케이트된 부 생성물의 양을 감소시킨다.

[0144] 따라서, 이러한 변형은 선행 분야의 방법과 비교하여, 골격내 포스포로디아미데이트 결합의 감소된 가수분해, 및 바람직하게는 N-1 결실 종의 감소되거나 동일한 수준과 함께 모르폴리노 올리고머를 합성하는 방법을 제공한다. 다른 측면에서, 본 발명은, 시아노아세트산이 탈보호제 시약으로서 사용되는 경우 관측된 것과 비교하여 모르폴리노 올리고머의 골격내 포스포로디아미데이트 결합의 감소된 가수분해와 함께, 모르폴리노 올리고머의 합성 동안 트리아릴메틸-보호된 모르폴리노 환 질소의 탈보호 방법을 제공한다. 바람직하게는, 당해 방법은, 또한 시아노아세트산이 탈보호 시약으로 사용되는 경우 관측되는 것보다 감소되거나 동일한 수준의 N-1 결실 종을 제공한다.

[0145] 유용한 추가의 변형은 생성물에 대한 반응 평형을 이동시키기 위한, 티올과 같은 트리틸 트래핑제(trapping agent)의 사용이다. 티올 트래핑제의 사용은 핵산 합성에 사용되어 왔다(참조: Ravikumar et al., 미국 특허 제5,510,476호). 머캅토에탄올은 이러한 목적을 위해 유용한 용이하게 이용가능하고 저렴한 제제이다. 하이드록실 그룹의 존재는 벤질머캅탄과 같은 단순한 티올이 동일하게 잘 수행하므로, 트래핑에 중요하지는 않다. 에탄올 및 부탄올과 같은 알코올 및 심지어 물 또한 트리틸 양이온의 트래핑제로서 제공된다.

## 도면의 간단한 설명

[0146] 도 1은 활성화된 모르폴리노 소단위의 형성을 도시한 것이다.

도 2는 이중 보호된 모르폴리노 G 소단위(DPG) 유도체에 대한 형성 경로를 도시한 것이며, 여기서, N2 위치는 페닐아세틸화되고 06 위치는 4-니트로벤에틸(NPE) 그룹으로 보호된다.

도 3은 이중 보호된 모르폴리노 G 소단위(DPG) 유도체에 대한 대체 형성 경로를 도시한 것이며, 여기서, N2 위치는 페닐아세틸화되고 06 위치는 4-니트로벤에틸(NPE) 그룹으로 보호된다.

도 4는 DPG 유도체의 형성을 도시한 것이며, 여기서, N2 위치는 페닐아세틸화되고 06 위치는 페닐설폰에틸(PSE) 또는 메틸설폰에틸(MSE) 그룹으로 보호된다.

도 5는 DPG 유도체의 형성을 도시킨 것이며, 여기서, N2 위치는 페닐아세틸화되고 06 위치는 트리메틸실릴에틸(TMSE) 그룹으로 보호된다.

도 6은 DPG 유도체의 형성을 도시킨 것이며, 여기서, N2 위치는 페닐아세틸화되고 06 위치는 일련의 아릴 유도체로 보호된다.

도 7은 DPG 유도체의 형성을 도시킨 것이며, 여기서, N2 위치는 페닐아세틸화되고 06 위치는 일련의 카바모일 유도체로 보호된다.

도 8은 DPG 유도체의 형성을 도시킨 것이며, 여기서, N2 위치는 페닐아세틸화되고 06 위치는 4-(피발로일옥시)벤질옥시(POB) 그룹으로 보호된다.

도 9는 포스포로디아미데이트-결합된 모르폴리노 올리고머(PMO)를 카복실산으로 처리할 때 발생할 수 있는 부반응에서 포스포로디아미데이트(PDA) 결합의 포스포르아미데이트(아미데이트) 결합으로의 전환을 도시킨다.

도 10은 티올의 처리에 의해 올리고머의 용이한 방출을 허용하는, 모르폴리노 올리고머의 단계별 제조를 위해 사용된 합성 수지의 변형시 사용하기 위한, 디설파이드 앵커(anchor)의 제조를 도시킨 것이다.

도 11은 합성 안티센스 올리고머의 수 용해도를 증가시키는 트리에틸렌 글리콜 함유 잔기("테일")의 제조를 도시킨 것이다.

도 12는 모르폴리노 올리고머의 고체 상 합성에 유용한 수지의 제조를 도시킨 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0147] 실시예

[0148] 실시예 1: N2-PhAc, 06-POB 이중 보호된 모르폴리노 G(DPG) 소단위의 합성(참조: 도 8)

[0149] 화합물 3의 제조(35 kg의 화합물 1c로 개시): 100G 반응기에 화합물 1c(35 kg; 1.0 eq), 이미다졸(5.0 kg; 1.3 eq) 및 디클로로메탄(279 kg)을 충전시킨다. 당해 배치를 3℃로 냉각시킨다. 50G 반응기를 3℃로 냉각시키고 t-부틸클로로디메틸실란(10.1 kg; 1.2 eq) 및 디클로로메탄(93 kg)을 충전시킨다. 50G 반응기내 용액을 100G 반응기로 이전시키고, 당해 배치를 20℃로 조절한다. 반응이 완료되면(1 내지 3 시간), 메탄올(1.8 kg; 1.0 eq)을 100G 반응기에 충전한다. 30분 후, 100G 반응기내 용액을 pH 3 시트레이트 완충액(고체 NaOH로 pH 3으로 조절한 1M 시트르산 376 kg)을 함유하는 200G 반응기에 충전시킨다. 당해 배치를 30분 동안 진탕시키고, 층을 분리한다. 저급 유기 층을 pH 3 시트레이트 완충액으로 1회 이상 세척하고, 염수 용액(2.5% NaCl/물(w:w) 287 kg)으로 1회 세척한다. 수득되는 유기 용액을 <35℃에서 배치의 카를 피셔 분석(Karl Fischer analysis)이 < 0.05% 물을 나타낼 때까지 증류시킨다. 용액을 100G 반응기 속에서 3℃로 냉각시키고 화합물 4의 제조시 직접 사용한다.

[0150] 화합물 4의 제조: 화합물 3의 용액을 함유하는 100G 반응기에 트리에틸아민(6.8 kg; 1.2 eq), 4-디메틸아미노피리딘(0.68 kg; 0.1 eq), 및 트리아소프로필렌벤질설폰일 클로라이드(18.6 kg; 1.1 eq)를 충전한다. 당해 배치를 20℃로 가온한다. 반응이 완료된 후(3 내지 9시간), 용액을 pH 4.5 포스페이트 완충액(1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 228 kg)을 함유하는 200G 반응기에 충전시킨다. 당해 배치를 30분 동안 진탕시키고, 층을 분리한다. 저급 유기 층을 염수(2.5% NaCl/물(w:w) 212 kg)로 세척한다. 수득되는 유기 용액을 배치의 카를 피셔 분석이 < 0.01% 물을 나타낼 때까지 <35℃에서 증류시킨다. 당해 용액을 100G 반응기 속에서 3℃로 냉각시키고 화합물 5의 제조시 직접 사용한다.

[0151] 화합물 4a의 제조(4-하이드록시알데하이드 60 kg으로 개시): 750G 반응기에 4-하이드록시벤즈알데하이드(60 kg; 1.0 eq), 톨루엔(260 kg), 및 1-메틸이미다졸(8.1 kg; 0.2 eq)을 충전시킨다. 당해 용액에 물(400 kg)중 중탄산칼륨(100 kg; 2.0 eq)에 이어 트리메틸아세틸 클로라이드(83 kg; 1.4 eq)를 충전시킨다. 당해 2-상 혼합물을 20℃에서 진탕시킨다. 반응이 완료되면(1 내지 5시간), 메탄올(15.7 kg; 1.0 eq)을 배치에 충전시킨다. 당해 배치를 20℃에서 1시간 동안 진탕시킨다. 층을 분리한다. 상부 유기 층에 물(200 kg)을 충전시킨다. 당해 배치를 30분 동안 진탕시키고 층을 분리한다. 상부 유기 층에 pH 4.5 포스페이트 완충액(242 kg의 물 중 16.5 kg의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)을 충전시킨다. 배치를 30분 동안 진탕시키고, 층을 분리한다. 상부 유기 층에 물(200 kg)을 충전시킨다. 당해 배치를 30분 동안 진탕시키고, 층을 분리한다. 상부 유기 층을 진공하에 <30℃에서 증류시켜 200 L의 배치 용적을 달성한다. THF(70 kg)를 배치에 충전시키고, 배치를 Pd/C(9.6 kg; 0.004 eq; 5% Pd/C,

50% 습윤 존슨 매트형(Johnson Matthey Type) A405028-5 또는 A570129-5)를 함유하는 500G 반응기로 이전시킨다. 반응기를 초기에 50rpm에서 진탕시키면서 5 psi H<sub>2</sub>로 가압시킨다. 압력 및 진탕 속도를 반응이 진행되면서 서서히 증가시켜, 최대 25 psi H<sub>2</sub> 및 90 rpm이 되도록 한다. 반응이 완료되면(8 내지 48시간), 뱃치를 셀라이트의 패드에 이어 0.1 마이크론 인라인 여과기(inline filter)를 통해 여과한다. 셀라이트를 톨루엔(20 kg)으로 세정한다. 당해 뱃치에 pH 6.5 포스페이트 완충액 용액(2.7 kg의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 2.3kg의 인산칼륨, 이염기성, 200 kg의 물 중 트리하이드레이트)를 충전시킨다. 당해 뱃치를 30분 동안 진탕시키고, 층을 분리한다. 상부 유기 층을 진공하에 <30℃에서 증류시켜 140 L의 뱃치 용적을 달성한다. 톨루엔(126 kg)을 뱃치에 충전시키고, 뱃치를 진공하에 <30℃에서 증류시켜 140 L의 뱃치 용적을 달성한다. 당해 뱃치를 20℃로 조절하고 n-헵탄(821 kg) 및 0℃에서 유지시킨 화합물 4a의 씨드 결정(100 grams)을 함유하는 500G 반응기로 이전시킨다. 당해 뱃치를 0℃에서 1 내지 2시간 동안 유지시킨다. 씨드 결정(100 grams)의 두번째 일부분을 가하고, 뱃치를 0℃에서 1 내지 2시간 동안 유지한다. 화합물 4a를 여과로 분리한다. 수율 = 4-하이드록시벤즈알데하이드로부터 70 - 80%.

[0152] 페놀 잔기가 피발레이트 에스테르 대신 이의 N,N-디메틸카바메이트로 보호되어 있는 유도체를 화합물 4a와 유사한 조건하에서 제조한다. 4-하이드록시벤즈알데하이드 및 디메틸카바모일 클로라이드사이의 반응의 완료를 가속화하기 위하여, 반응을 환류하는 디클로로메탄 속에서 염기로서 N-메틸이미다졸 및 촉매로서 0.2 eq DMAP의 존재하에 수행한다.

[0153] 화합물 5의 제조: 화합물 4의 용액을 함유하는 100G 반응기에 N-메틸피롤리딘(9.5 kg; 23 kg의 디클로로메탄 속에 용해된 2.0 eq)을 충전한다. 10분 후, 화합물 4a(14.0 kg; 1.2 eq)를 가한 후, 1,8-디아자비사이클로[5.4.0]운데크-7-엔(10.2 kg; 23 kg의 디클로로메탄 중 1.2 eq)를 가한다. 당해 뱃치를 20℃로 가온시킨다. 반응이 완료되면(1 내지 9 시간), 용액을 327 kg의 디클로로메탄으로 희석시키고 pH 4.5 포스페이트 완충액(334 kg의 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)을 함유하는 200G 반응기에 충전시킨다. 당해 뱃치를 30분 동안 진탕시키고 층을 분리한다. 저급 유기 층을 pH 4.5 포스페이트 완충액(111 kg의 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)으로 1회 이상 세척한 후, 염수(212 kg의 2.5% NaCl/물(w:w))로 1회 세척한다. 수득되는 유기 용액을 < 35℃에서 뱃치의 카를 피서 분석이 < 0.05% 물을 나타낼 때까지 증류시킨다. 당해 용액을 화합물 1f의 제조시 직접 사용한다.

[0154] 화합물 1f의 제조: 화합물 5의 용액을 함유하는 100G 반응기에 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드(18.0 kg; 2.0 eq)를 충전시킨다. 당해 뱃치를 20℃에서 진탕시킨다. 반응이 완료되면(4 내지 20시간), 당해 뱃치를 200G 반응기에 충전시킨다. 200G 반응기에 NaHCO<sub>3</sub> 용액(230 kg의 5%(w:w) 용액)을 충전시킨다. 당해 뱃치를 30분 동안 진탕시키고, 층을 분리한다. 저급 유기 층을 NaHCO<sub>3</sub> 용액(230 kg의 5%(w:w) 용액)으로 1회 이상 세척한 후, pH 6.5 포스페이트 완충액(215 kg의 물 중 9.3 kg의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 14.0 kg의 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)으로 1회 세척한다. 수득되는 유기 용액은 THF로 용매교환한다(뱃치 중 <1 중량%의 DCM을 달성하기 위해). 당해 용액을 THF(124 kg)로 희석시키고 60℃로 가열한다. 물(LOE 분석을 기준으로 용액 중 화합물 1f kg당 8 kg; 60℃로 예비-가열 시킴)을 THF 용액에 서서히 충전시킨다. 당해 용액을 3℃로 서서히 냉각시키고 >4시간 동안 유지한다. 조 화합물 1f를 여과로 분리한다. 조 물질을 THF(342 kg) 속에 재용해하고 60℃로 가열한다. 물(315 kg; 60℃로 예비-가열됨)을 THF 용액에 서서히 충전시킨다. 당해 용액을 3℃로 냉각시키고 >4시간 동안 유지시킨다. 화합물 1f를 여과로 분리한다. 제2의 재결정화를 수행하여 경우에 따라 화합물 1f를 추가로 정제할 수 있다. 수율 = 화합물 1c로부터 53 내지 73%.

[0155] 화합물 2f의 제조(12 kg의 화합물 1f로 개시): 50G 반응기에 화합물 1f(12 kg; 1.0 eq), 디클로로메탄(159 kg), 2,6-루티딘(2.5 kg; 1.6 eq) 및 1-메틸이미다졸(0.36 kg; 0.3 eq)을 충전시킨다. 당해 용액을 증류시켜 뱃치 용적이 69 L가 되도록 하고, 5℃로 냉각시킨다. N,N-디메틸포스포라미도디클로리데이트(3.8 kg; 1.6 eq)를 뱃치에 충전시킨다. 당해 뱃치를 20℃로 조절한다. 반응이 완료되면(6 내지 16시간), 톨루엔(78 kg)을 뱃치에 충전시킨다. 수득되는 혼합물을 25℃에서 증발시켜 126 L의 뱃치 용적을 달성하고(뱃치의 GC 분석은 30 내지 45 중량%의 DCM을 나타내어야 한다), pH 3 시트레이트 완충액(15.4 kg의 시트르산 일수화물, 1.4 kg의 NaOH, 80 kg의 물)을 함유하는 100G 반응기에 이전시킨다. 당해 뱃치를 10분 동안 진탕시키고, 층을 분리한다. 저급 수성 층을 버린다. 상부 유기 층을 황산나트륨(8.0 kg)을 함유하는 50G 반응기에 이전시킨다. 당해 뱃치를 30분 동안 진탕시키고, 황산나트륨 배출 케이크를 여과로 제거한다. 황산나트륨 케이크를 디클로로메탄(16 kg)으로 세정한다. 수득되는 생성물 용액을 50G 반응기 속에서 증류시켜 뱃치 용적이 53 L가 되도록 한다(뱃치의 GC 분석은 11 내지 15 중량%의 DCM을 나타내어야 한다). 100G 반응기에 헵탄(238 kg)을 충전시킨

다. 50G 반응기중 뱃치를 100G 반응기에 2시간에 걸쳐 이전시킨다. 이전 말기에, 뱃치를 20℃에서 4 내지 16 시간 동안 유지시킨다. 조 화합물 6을 여과로 수집한다. 조 물질을 100G 반응기에 이전시킨다. 조 고체에 톨루엔(16 kg) 및 헵탄(50 kg)의 용액을 가한다. 당해 혼합물을 3시간 동안 진탕시키고 여과한다. 재슬러리를 1 회 이상 반복한다. 조 화합물 2f의 수율 = 화합물 1f로부터 80%.

[0156] 실리카 겔 크로마토그래피에 의한 화합물 2f의 정제(~ 6.5 kg의 조 화합물로 개시) 2f): 조 화합물 2f의 "강도"는 HPLC 순도 및 휘발성에 대한 조 물질의 중량을 교정하여 계산한다. 당해 정제 단계를 위해, 5.75 kg의 물질(강도에 상응)을 50 cm 크로마토그래피 컬럼 상에서 주입당 사용한다. 50 cm 크로마토그래피 컬럼을 헵탄/실리카 겔(51.8 kg의 실리카 겔)의 슬러리로 패킹한다. 조 물질을 컬럼상에 디클로로메탄/2,6-루티딘(15 kg의 디클로로메탄, 0.16 kg의 2,6-루티딘) 중 용액으로서 로딩한다. 생성물을 4-메틸-2-펜타논(MIBK)/헵탄/2,6-루티딘의 2개-단계 구배(제1 단계는 827 L의 39:61 MIBK:헵탄(w:w)과 0.06% 2,6-루티딘(w:w)이고; 제2 단계는 1343 L의 73:27 MIBK:헵탄(w:w)과 0.06% 2,6-루티딘(w:w)이다)로 용출시킨다. 입증된 분획 수거물을 박-층 증발을 통해 농축시켜 농도가 150 g/L이 되도록 한다. 당해 농축된 수거물을 6 용적의 헵탄상에 침전시킨다. 정제된 화합물 2f를 여과로 분리한다. 정제된 화합물 2f의 수율 = 화합물 1f로부터 50%; 조 화합물 2f로부터 65%.

[0157] 실시예 2. CYTFA 피리디늄 염 탈트리틸화 용액의 제조

[0158] 디클로로메탄(790 mL)중 4-시아노피리딘(10.1 g; 1.055 eq)의 용액에 트리플루오로아세트산(10.5 g; 1.0 eq)에 이어 2,2,2-트리플루오로에탄올(198 mL) 및 에탄올(10 mL)을 가하고 용액을 10 내지 30분 동안 교반한다.

[0159] 실시예 3: 디설파이드 앵커의 제조(참조: 도 10)

[0160] N-트리틸 피페라진, 석시네이트 염(NTP)의 제조: 톨루엔/메탄올(5:1 톨루엔/메탄올(v:v); 5 mL/g의 피페라진) 중 피페라진(10 eq)의 냉각된 용액에 톨루엔(5 mL/g의 트리틸 클로라이드)중 트리페닐메틸(트리틸) 클로라이드(1.0 eq)의 용액을 서서히 가하였다. 반응이 완료되면(1 내지 2시간), 당해 용액을 물로 4회 세척하였다. 수득되는 유기 용액에 석신산의 수용액(1.1 eq; 13 mL 물/석신산 g)을 가하였다. 당해 혼합물을 90분 동안 교반하고, 고체 생성물을 여과로 수집하였다. 조 NTP를 아세톤중 2개의 재슬러리로 정제하였다. 수율 = 70%.

[0161] 대칭 디설파이드 7의 제조: 1,1'-카보닐디이미다졸(CDI)(12.402 g; 2.2 eq.)을 디클로로메탄(5.25 mL/g) 속에 현탁시키고 빙욕상에서 냉각시켰다. 하이드록시에틸 디설파이드 6(5.36 g; 1 eq.)을 디클로로메탄(10 mL/g) 및 테트라하이드로푸란(1 mL/g) 속에 용해하였다. 디올 용액을 CDI에 서서히 가함으로써 혼합물의 온도를 반응 동안 4 °C 이하로 유지시켰다. 반응이 완료되면(1회 첨가가 완료되면), 탈이온수(93.8 μL, 0.15 eq.)를 가하여 반응을 퀸칭시켰다. 독립적으로, N-트리틸 피페라진, 석시네이트 염(NTP)(32.59 g; 2.1 eq.)을 톨루엔(8 mL/g의 NTP), 디클로로메탄(2 mL/g의 NTP), 및 메탄올(2 mL/g의 NTP) 속에 용해시켰다. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(22.09 g; 4.6 eq.)를 탈이온수(10 mL/g) 속에 용해시켰다. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 NTP 용액에 가하고; 혼합물을 교반한 후 2개 층으로 분리하였다. 혼합한 유기 층을 증류시켜 90 그램을 제거하고; 수득되는 물 소적을 분리하고 아세톤(8 mL/g의 NTP)을 유기 층에 가하였다. CDI 활성화된 디설파이드 디올의 용액을 유리 염기의 용액에 가하고 225 mL로 농축시켰다. 아세톤(10 mL/g의 NTP)을 가하고 혼합물을 225 mL로 농축시켰다. 혼합물을 가열하여 환류시키면 고체가 용액으로부터 결정화되기 시작하였다. 완료시, 반응 혼합물을 냉각시키고, 고체(7)을 여과로 분리하였다. 수율: 27.92 g; 93.1%(중량계 검정을 기준으로).

[0162] 디설파이드 알코올 8의 제조: 화합물 7(36.00 g; 32.1 mmol; 1 eq.)을 아세톤(2.8 mL/g의 화합물 7) 속에 현탁시켰다. 하이드록시에틸 디설파이드(78.51 mL; 20 eq.)에 이어 아세톤(1.7 mL/g의 화합물 7)을 가하였다. 5% NaOH/메탄올(2.85 mL; 0.1 eq.)을 가하고; 혼합물의 pH는 pH 페이퍼에 의하면 10이었다. 트리페닐포스핀(8.42 g; 1 eq.)에 이어 아세톤(1.1 mL/g의 화합물 7)을 가하였다. 모든 고체가 용액으로 된 후 생성물을 결정화되기 시작하였다. 16시간 후, 반응 혼합물을 아세트산(2.4 g; 0.2 eq.)으로 중화시켰다. 조 생성물을 여과로 분리하였다. 조 고체 8를 아세톤 재슬러리를 2회 환류시키는 것에 적용시켰다(5 mL/g의 화합물 7).

[0163] 여과 후 조 생성물을 디클로로메탄(7.25 mL/g의 화합물 7) 속에 현탁시켰다. 당해 혼합물을 선명한 용액이 형성될 때까지 가열하였다(35 °C). 당해 용액을 동 용적의 탈이온수로 5회 추출하고 최종 유기 층을 155 mL로 농축시켰다. 디클로로메탄을 가하고(4.3 mL/g의 화합물 7), 용액을 다시 155 mL로 농축시켰다. CDI(9.17 g;



1.1 eq.)를 가하고 혼합물을 실온에서 교반하였다. 반응이 완료되면(~20분), 반응 혼합물을 동 용적의 탈이온수로 2회 세척한 후, 에틸벤젠(2.1 mL/g의 화합물 7)을 가하였다. 당해 용액을 65.2 g로 농축시키고, 용액 중 디클로로메탄을 0.17%로 감소시키고, 병육상에서 슬러리화하여 생성물을 결정화하였다. 생성물 9를 여과로 분리하였다. 수율: 44%.

[0164] 실시예 4: 트리에틸렌 글리콜 테일(참조: 도 11)

[0165] 트리틸 피페라진 페닐 카바메이트 10의 제조: 디클로로메탄(6 mL/g의 NTP)중 NTP의 냉각된 현탁액에 물(4 mL/g의 탄산칼륨) 중 탄산칼륨(3.2 eq)의 용액을 가하였다. 당해 2-상 혼합물에 디클로로메탄(2 g/g의 페닐 클로로포르메이트)중 페닐 클로로포르메이트(1.03 eq)의 용액을 서서히 가하였다. 반응 혼합물을 20 °C로 가온하였다. 반응이 완료되면(1 내지 2시간), 층을 분리하였다. 유기 층을 물로 세척하고, 무수 탄산칼륨위에서 건조시켰다. 생성물 10을 아세토니트릴로부터 결정화로 분리하였다. 수율 = 80%.

[0166] 카바메이트 알코올 11의 제조: 나트륨 수소화물(1.2 eq)을 1-메틸-2-피롤리디논(32 mL/g의 나트륨 수소화물) 속에 현탁시켰다. 당해 현탁액에 트리에틸렌 글리콜(10.0 eq) 및 화합물 10(1.0 eq)을 가하였다. 수득되는 슬러리를 95 °C로 가열하였다. 반응이 완료되면(1 내지 2시간), 혼합물을 20°C로 냉각시켰다. 당해 혼합물에 30% 디클로로메탄/메틸 3급-부틸 에테르(v:v) 및 물을 가하였다. 생성물 함유 유기 층을 수성 NaOH, 수성 석신산 및 포화된 수성 염화나트륨으로 완전히 세척하였다. 생성물 11을 디클로로메탄/메틸 3급-부틸 에테르/헵탄으로부터 결정화시켜 분리하였다. 수율 = 90%.

[0167] 테일 산 12의 제조: 테트라하이드로푸란(7 mL/g의 화합물 11) 중 화합물 11의 용액에 석신산 무수물(2.0 eq) 및 DMAP(0.5 eq)를 가하였다. 혼합물을 50 °C로 가열하였다. 반응이 완료되면(5 시간), 혼합물을 20°C로 냉각하고 수성 NaHCO<sub>3</sub>로 pH 8.5로 조절하였다. 메틸 3급-부틸 에테르를 가하고 생성물을 수성층으로 추출하였다. 디클로로메탄을 가하고 혼합물을 수성 시트르산으로 pH 3으로 조절하였다. 생성물-함유 유기 층을 pH=3 시트레이트 완충액 및 포화된 수성 염화나트륨의 혼합물로 세척하였다. 화합물 12의 당해 DCM 용액을 분리하지 않고 화합물 13의 제조에 사용하였다.

[0168] 화합물 13의 제조: 화합물 12의 용액에 N-하이드록시-5-노르보르넨-2,3-디카복실산 이미드(HONB)(1.02 eq), 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)(0.34 eq)에 이어, 1-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(EDC)(1.1 eq)를 가하였다. 혼합물을 55°C로 가열하였다. 반응이 완료되면(4 내지 5시간), 혼합물을 20°C로 냉각하고 1:1의 0.2 M 시트르산/염수 및 염수로 완전히 세척하였다. 디클로로메탄 용액은 아세톤에 이어 N,N-디메틸포름아미드로 용매 교환하였고, 생성물을 아세톤/N,N-디메틸포름아미드로부터 포화된 수성 염화나트륨으로 침전시켜 분리하였다. 조 생성물을 물 속에서 수회 재슬러리화하여 잔류 N,N-디메틸포름아미드 및 염을 제거하였다. 수율 = 화합물 11로부터의 화합물 13 70%. 활성화된 "테일"의 디설파이드 앵커-수지상으로의 도입은 NMP 속에서 고체 상 합성 동안 소단위의 혼입에 사용된 과정으로 수행하였다.

[0169] 실시예 5: 모르폴리노 올리고머의 합성을 위한 고체 지지체의 제조

[0170] 실시예 5a: 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지의 제조

[0171] 당해 과정은 조악한 기공성(40 내지 60 μm) 유리 프리트, 오버헤드 교반기(overhead stirrer), 및 프리트 또는 진공 추출을 통해 N<sub>2</sub>가 버블링되도록 하는 3-방식 테플론 정지콕(Teflon stopcock)이 장착된 실란화된, 저켓 펩타이드 용기(jacketed peptide vessel)[미국 뉴저지주 소재의 켐글라스(ChemGlass)에서 통상적으로 제조] 속에서 수행하였다. 온도 조절은 반응 용기 속에서 수욕을 순환시켜 달성하였다.

[0172] 다음 과정에서 수지 처리/세척 단계는 2개의 염기성 작업으로 이루어진다: 수지 유동화 및 용매/용액 추출. 수지 유동화의 경우, 스톱콕을 위치시켜 프리트를 통해 N<sub>2</sub>가 유동하도록 하고 특수화된 수지 처리/세척물을 반응기에 가하여 수지에 침투하여 완전히 습윤되도록 하였다. 이후에, 혼합을 개시하고 수지 슬러리를 규정 시간 동안 혼합하였다. 용매/용액 추출의 경우, 혼합 및 N<sub>2</sub> 유동을 중지시키고 진공 펌프를 개시한 후 스톱콕을 위치시켜 수지 처리/세척물을 배출시켜 버렸다. 모든 수지 처리/세척 용적은 달리 나타내지 않는 한 15 mL/g의 수지이었다.

- [0173] 실란화된, 저켓 펩타이드 용기 속의 아미노메틸폴리스티렌 수지(100 내지 200 메쉬; ~1.0 mmol/g의  $N_2$  치환; 75 g, 1 eq, 제조원: 폴리머 랩스(Polymer Labs), 영국 소재, 파트 #1464-X799)에 1-메틸-2-피롤리디논(NMP; 20 ml/g의 수지)를 가하고 수지를 1 내지 2시간 동안 혼합하여 팽윤되도록 하였다. 팽윤된 용매를 배출한 후, 수지를 디클로로메탄(2 x 1 내지 2분), 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민(2 x 3 내지 4분) 및 디클로로메탄(2 x 1 내지 2분)의 용액으로 세척하였다. 최종 세척물을 배출한 후, 수지를 1-메틸-2-피롤리디논(0.17 M; 15 mL/g의 수지, -2.5 eq) 중 디설파이드 앵커 9의 용액으로 유동화하고 수지/시약 혼합물을 45°C에서 60시간 동안 가열하였다. 반응이 완료되면, 가열을 중지하고 앵커 용액을 배출하고 수지를 1-메틸-2-피롤리디논(4 x 3 내지 4분) 및 디클로로메탄(6 x 1 내지 2분)으로 세척하였다. 수지를 디클로로메탄 중 10%(v/v)의 디에틸 디카보네이트의 용액(16 mL/g; 2 x 5 내지 6분)에 이어 디클로로메탄(6 x 1 내지 2분)으로 세척하였다. 수지 14를  $N_2$  스트림하에서 1 내지 3시간 동안 및 이어 진공하에 일정 중량( $\pm 2\%$ )으로 건조시켰다. 수율: 원 수지 중량의 110 내지 150%.
- [0174] 실시예 5b: 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지의 로딩의 측정
- [0175] 수지(다수의 잠재적으로 유용한 반응성 부위)의 로딩은 수지 그램당 트리페닐메틸(트리틸) 그룹의 수에 대해 분광계 검정으로 측정한다.
- [0176] 공지된 중량의 건조된 수지( $25 \pm 3$  mg)을 실린화된 25 ml 용적 플라스크에 이전시키고 디클로로메탄 중 2%(v/v) 트리플루오로아세트산 ~5 mL를 가하였다. 성분들을 온화하게 와동시켜 혼합한 후 30분 동안 정치시켰다. 용적을 디클로로메탄중 추가의 2%(v/v) 트리플루오로아세트산을 사용하여 25 mL가 되도록 한다. 양성 교체 피펫을 사용하여, 분취량의 트리틸-함유 용액(500  $\mu$ L)을 10 mL 용적 플라스크에 이전시키고 용적을 메탄설폰산을 사용하여 10 mL가 되도록 한다.
- [0177] 최종 용액중 트리틸 양이온 성분을 431.7 nm에서 UV 흡광도로 측정하고 수지 로딩을 적절한 용적, 희석, 흡광계수( $\epsilon$ :  $41 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) 및 수지 중량을 사용하여 수지 그램당 트리틸 그룹( $\mu\text{mol/g}$ )으로 계산하였다. 당해 검정을 3회 수행하고 평균 로딩을 계산하였다.
- [0178] 당해 실시예에서 수지 로딩 과정은 약 500  $\mu\text{mol/g}$ 의 로딩을 갖는 수지를 제공할 것이다. 300 내지 400( $\mu\text{mol/g}$ )의 로딩이, 디설파이드 앵커 혼입 단계를 실온에서 24시간 수행하는 경우, 수득되었다.
- [0179] 실시예 5c: 테일 로딩(참조: 도 12)
- [0180] 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지의 제조의 경우와 동일한 셋업 및 용적을 사용하여, 테일을 분자내로 도입시킬 수 있다. 커플링 단계의 경우, 4-에틸모르폴린(NEM, 0.4 M)을 함유하는 NMP 중 화합물 13(0.2 M)의 용액을 디설파이드 앵커 용액대신 사용하였다. 45 °C에서 2시간 후, 수지 15를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회 및 DCM으로 1회 세척하였다. 당해 수지에 벤조산 무수물(0.4 M) 및 NEM(0.4 M)의 용액을 가하였다. 25분 후, 반응기 저켓을 실온으로 냉각시키고, 수지를 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민으로 2회 및 DCM으로 8회 세척하였다. 수지 15를 여과하고 고 진공하에 건조시켰다. 수지 15에 대한 로딩은 테일 로딩에 사용된 원 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지 14의 로딩인 것으로 정의된다.
- [0181] 실시예 6: 모르폴리노 올리고머의 합성
- [0182] 실시예 6a: 고체상 합성
- [0183] 보호된 올리고머를 아미노메틸폴리스티렌-디설파이드 수지(~500  $\mu\text{mol/g}$ 의 로딩) 상에서 10 g 규모(개시 수지 중량)로 고체 상 올리고머 합성에 의해 수동으로 제조하였다. 사용된 용액은 다음과 같다:
- [0184] 탈트리틸화 용액: CAA = 20% 아세트니트릴/DCM(v/v)의 혼합물 중 11% 시아노아세트산(w/w);
- [0185] CPM = 20% 트리플루오로에탄올/DCM(v/v) 중 2% 3-클로로피리디늄 메탄설폰네이트(w/v) 및 0.9% 에탄올(v/v);
- [0186] CYTFA = 20% 트리플루오로에탄올/DCM(v/v) 중 2% 3-시아노피리디늄 트리플루오로아세테이트(w/v) 및 0.9% 에탄

올(v/v).

[0187] 중화 용액: 25% 이소프로판올/디클로로메탄 중 5% 디이소프로필에틸아민;

[0188] 냉각 용액: 0.165 M(화합물 2f(DPG), 화합물 2c, 및 화합물 2d 또는 기타 T 소단위의 경우) 또는 0.18 M(화합물 2a 및 화합물 2b 또는 기타 A/C 소단위의 경우)의 활성화된 모르폴리노 소단위 및 1,3-디메틸이미다졸리디논(DMI)중 0.4M의 N-에틸모르폴린.

[0189] 활성화된 MPG(2c)[참조: Summerton et al. (1993)]에서와 같이 제조하였다.

[0190] 수지를 합성 반응기에 이전시킨 후 및 합성 주기를 개시하기 전에, 1-메틸-2-피롤리디논(NMP, 20 mL/g의 수지)를 가하고 1 내지 2시간 동안 정치되도록 하였다. 디클로로메탄(10 mL/g의 수지)으로 2회 세척한 후, 다음 합성 주기를 각각의 주기에서 목적인 염기 및 목적인 결합 유형의 활성화된 모르폴리노 소단위의 적절한 커플링 용액을 첨가하며 사용하여 적절한 서열을 수득하였다.

표 2

[0191]

단계	용적(mL/g의 출발 수지)*	시간(분)
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
탈트리틸화 A	10-30	2-3
탈트리틸화 A	10-30	2-3
탈트리틸화 A	10-30	2-3
탈트리틸화 A	10-30	2-3
탈트리틸화 A	10-30	2-3
탈트리틸화 A	10-30	2-3
중화 A	10-30	3-4
중화 A	10-30	3-4
중화 A	10-30	3-4
중화 A	10-30	3-4
DCM	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
커플링	7-12**	90
중화 A	10-30	1-2
중화 A	10-30	1-2
중화 A	10-30	1-2
중화 A	10-30	1-2
DCM	10-30	1-2
* 세척 용적은 수지 팽윤을 고려하여 증가되어 있다; 용적은 각각의 주기에서 실제 수지 용적 g당 10mL이다.		
** 커플링 용적은 양호한 혼합을 유지하기에 충분하며 수지 팽윤을 고려하여 증가되어 있다.		

[0192] 최종 소단위를 도입한 후, 최종 주기(메톡시트리틸화)를 DMI중 0.32 M 4-메톡시트리페닐메틸 클로라이드 및 0.4 M N-에틸모르폴린을 사용하여 수행하였다. 메톡시트리틸화 후, 수지를 NMP로 8회 세척한 후 NMP(27 mL/g의 출발 수지) 중 0.1 M 1,4-디티오프레이톨(DTT) 및 0.73M 트리에틸아민으로 이루어진 분해 용액으로 30분 동안 처리하였다. 보호된 올리고머 용액을 수집한 후, 수지(용적에 있어 현저히 감소됨)를 분해 용액의 2개의 추가의 일부분으로 세척(13 mL/g의 출발 수지로 각각 15분 동안)하고 세척물을 대량의 용액과 합하였다. 테플론 플러그(Teflon plug)[미국 뉴저지주 소재의 에이스 글라스(Ace Glass)에서 제조]가 장착된 적절한 크기의 가압 용기 속의 보호된 올리고머 용액에 농축된 수성 암모니아(106 mL/g의 출발 수지, -20℃로 앞서 냉각시킴)를 가하고, 용기를 밀봉하고, 성분들을 와동하여 혼합하였다. 용기를 45℃ 오븐 속에 16 내지 20시간 동안 두어 염기 및 골격 보호 그룹을 제거하였다.

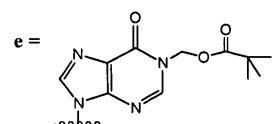
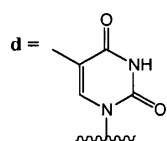
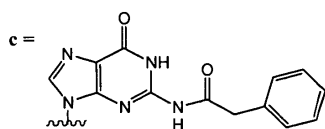
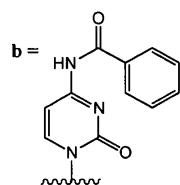
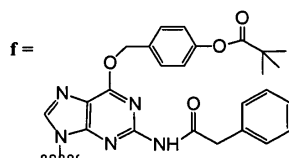
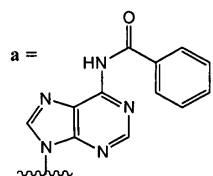
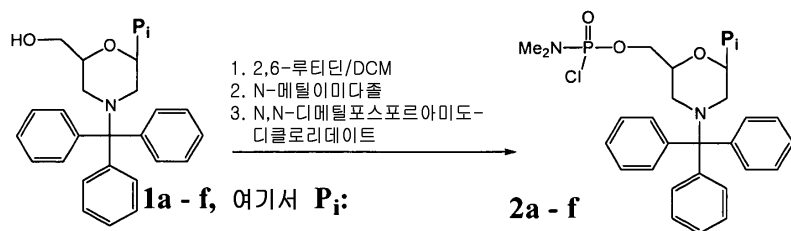
[0193] 암모니아분해에 이어, 조 올리고머 용액을 실온으로 냉각한 후 PLBC 3kd 재생 셀룰로즈 막(Millipore)을 사용하여 0.28% 수성 암모니아에 대해 한외여과시켜 이온 교환 크로마토그래피 전에 용매 및 소 분자를 제거하였다.

- [0194] 실시예 6b: 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 모르폴리노 올리고머의 정제
- [0195] 한외여과로부터 수득된 조 올리고머 용액을 pH 11-11.5로 조절하고 토요펄 슈퍼(ToyoPearl Super)-Q 650S 음이온 교환 수지[제조원: 도쇼 바이오사이언스(Tosoh Bioscience)]의 컬럼상에 로딩하였다. 메톡시트리틸화된 올리고머를 17 컬럼 용적(완충액 A: 10 mM 수산화나트륨; 완충액 B: 10mM 수산화나트륨 중 1M 염화나트륨) 위에서 5 내지 35% B의 구배로 용출시키고 허용되는 순도(음이온 교환 HPLC 및 질량 스펙트럼)의 분획을 수거하였다.
- [0196] 실시예 6c: 모르폴리노 올리고머의 탈메톡시트리틸화
- [0197] 음이온 교환 크로마토그래피로부터의 혼주된 분획에 아세트니트릴(10 용적%)에 이어 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 가하여 pH를 3으로 조절하였다. 용액을 45분 동안 혼합한 후 농축된 수성 암모니아를 사용하여 pH 7로 중화하였다. 올리고머 용액을 PLBC 3kd 재생 셀룰로즈 막(Millipore)을 사용하여 20 mM 나트륨 아세테이트에 대해 한외여과하여 양이온 교환 크로마토그래피 전에 완충액을 교환하였다.
- [0198] 실시예 6d: 양이온 교환 크로마토그래피에 의한 모르폴리노 올리고머의 정제
- [0199] 올리고머 용액을 아세트산으로 pH 4.5로 조절하고 소스(Source) 30S 양이온 교환 수지[제조원: 지이 헬스케어(GE Healthcare)]의 컬럼 상에 로딩하였다. 올리고머를 17 컬럼 용적(완충액 A: 20 mM 나트륨 아세테이트, 25% 아세트니트릴, pH 4.5; 완충액 B: 0.5 M 염화나트륨, 20 mM 나트륨 아세테이트, 25% 아세트니트릴, pH 4.5) 위에서 0 내지 35% B의 구배로 용출시키고 허용가능한 순도(양이온 교환 HPLC 및 질량 스펙트럼)의 분획을 수거하였다.

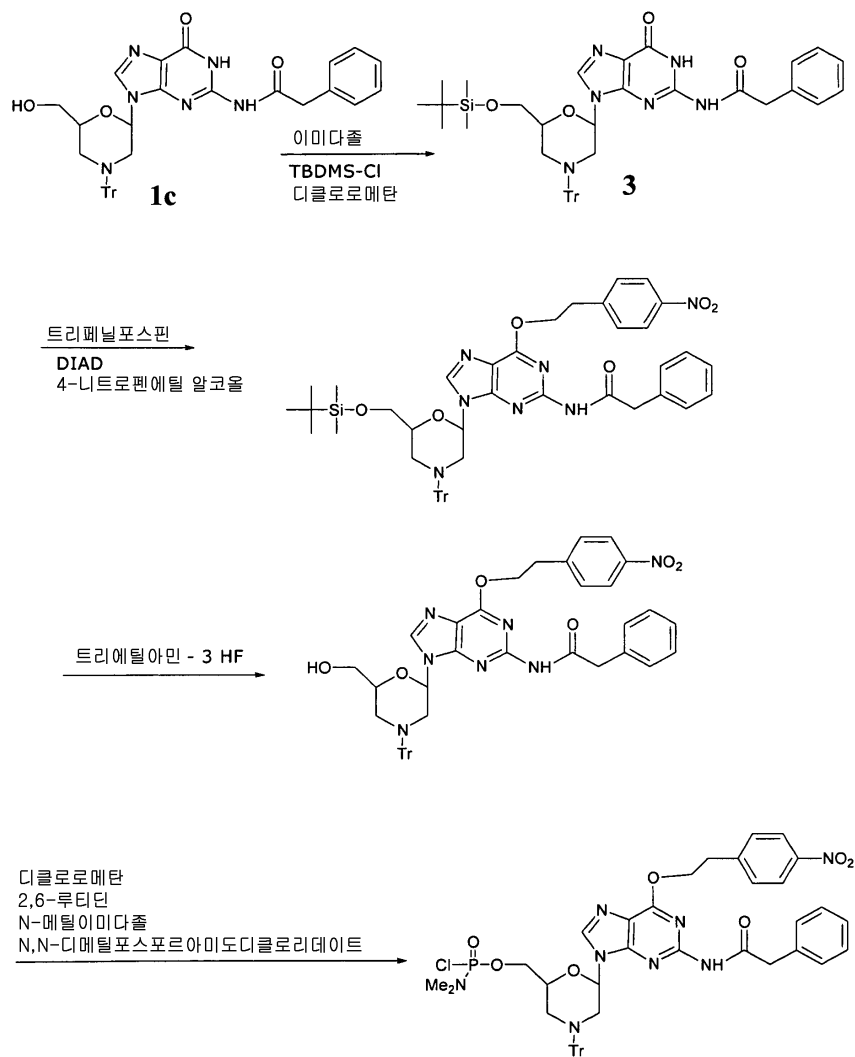


도면

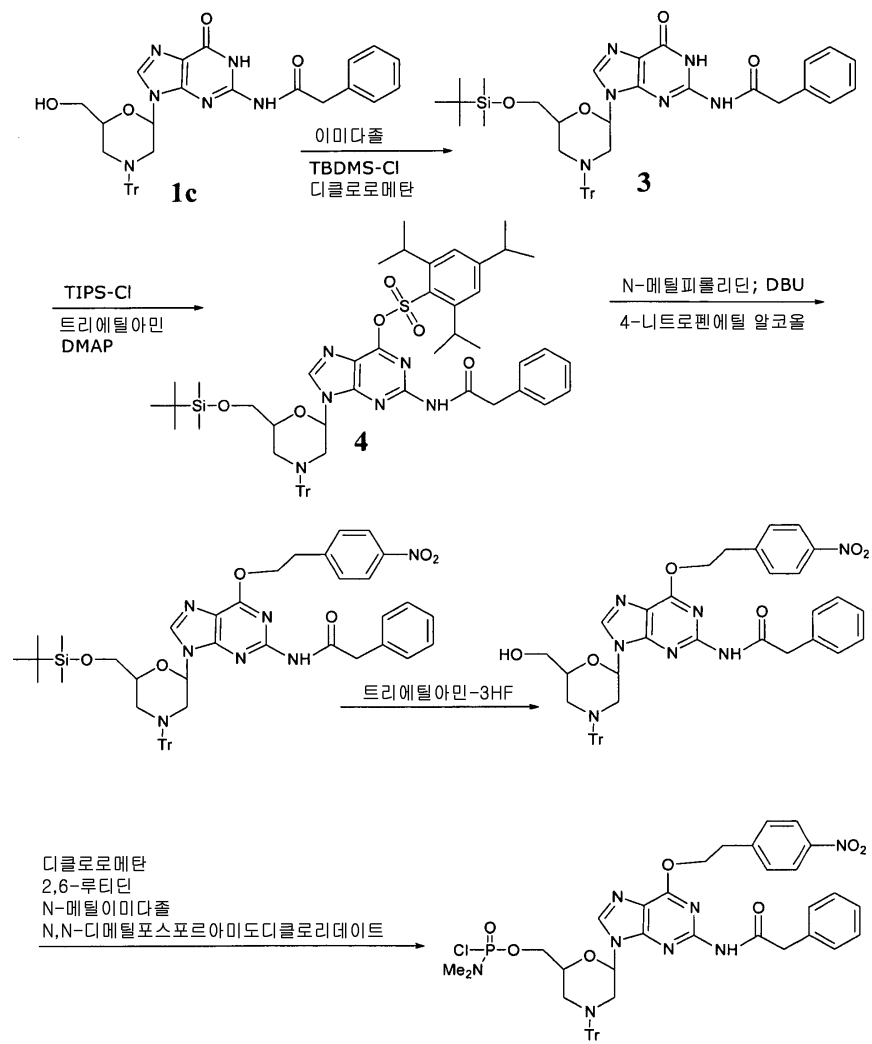
도면1



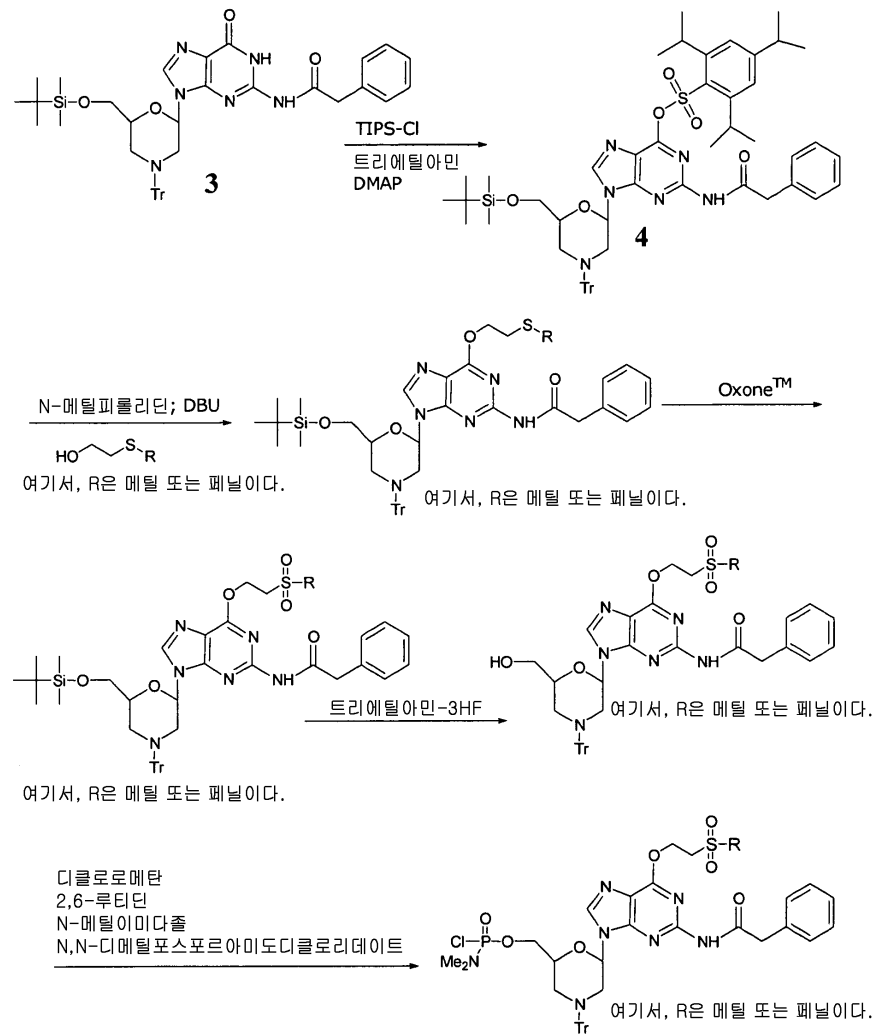
도면2



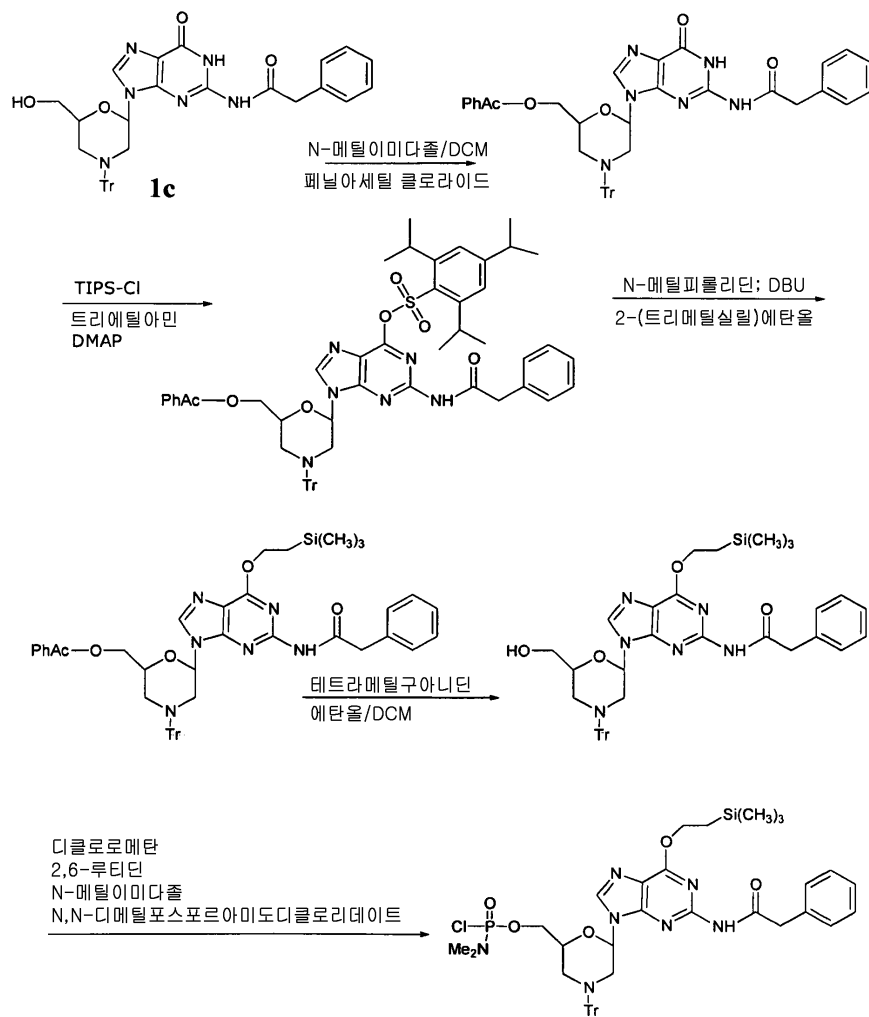
도면3



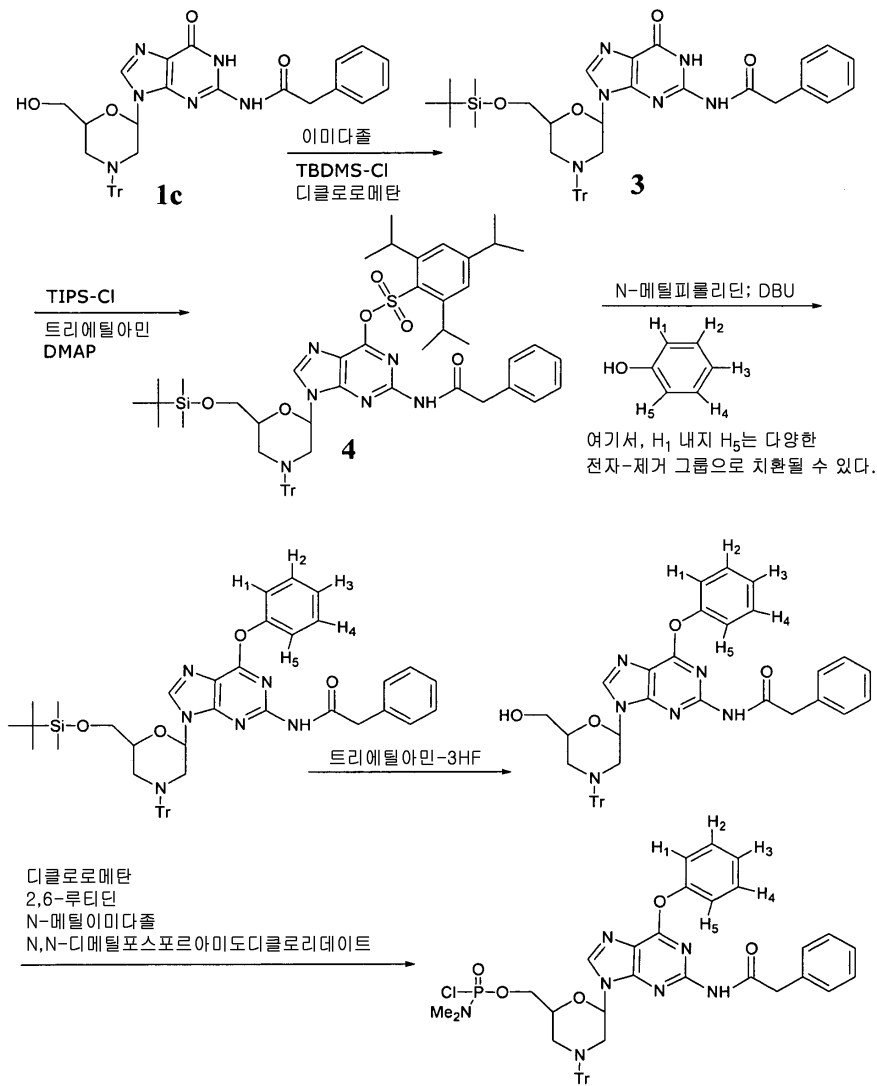
도면4



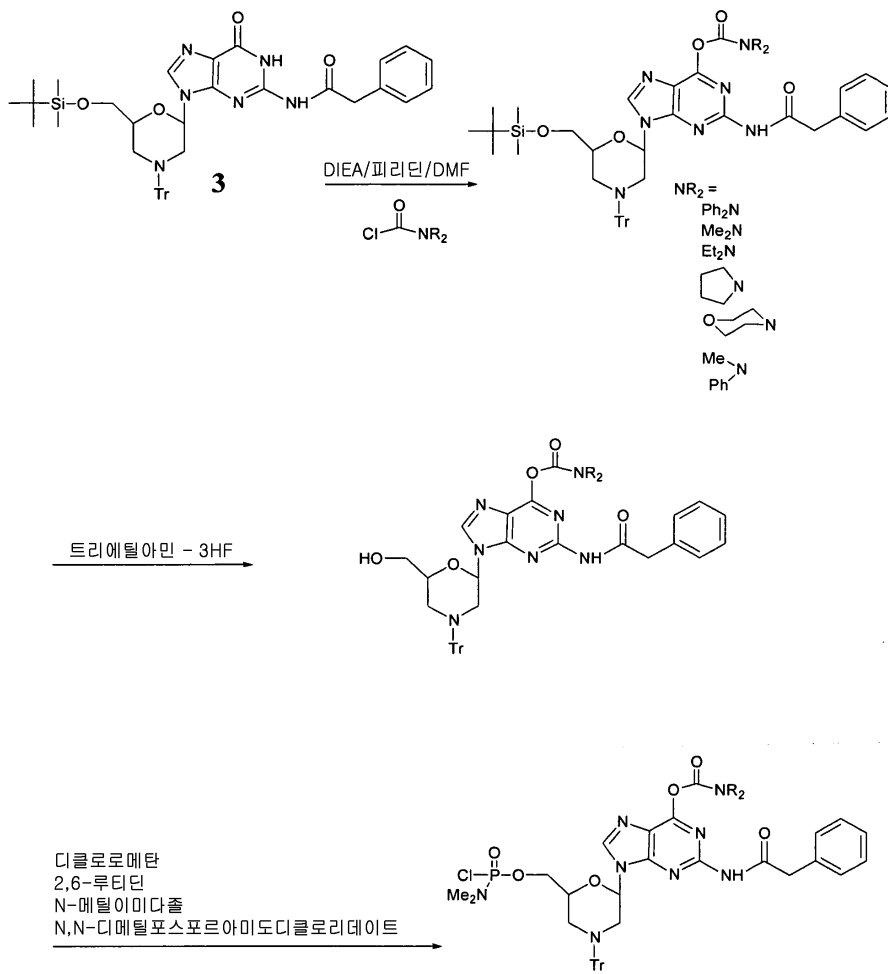
도면5



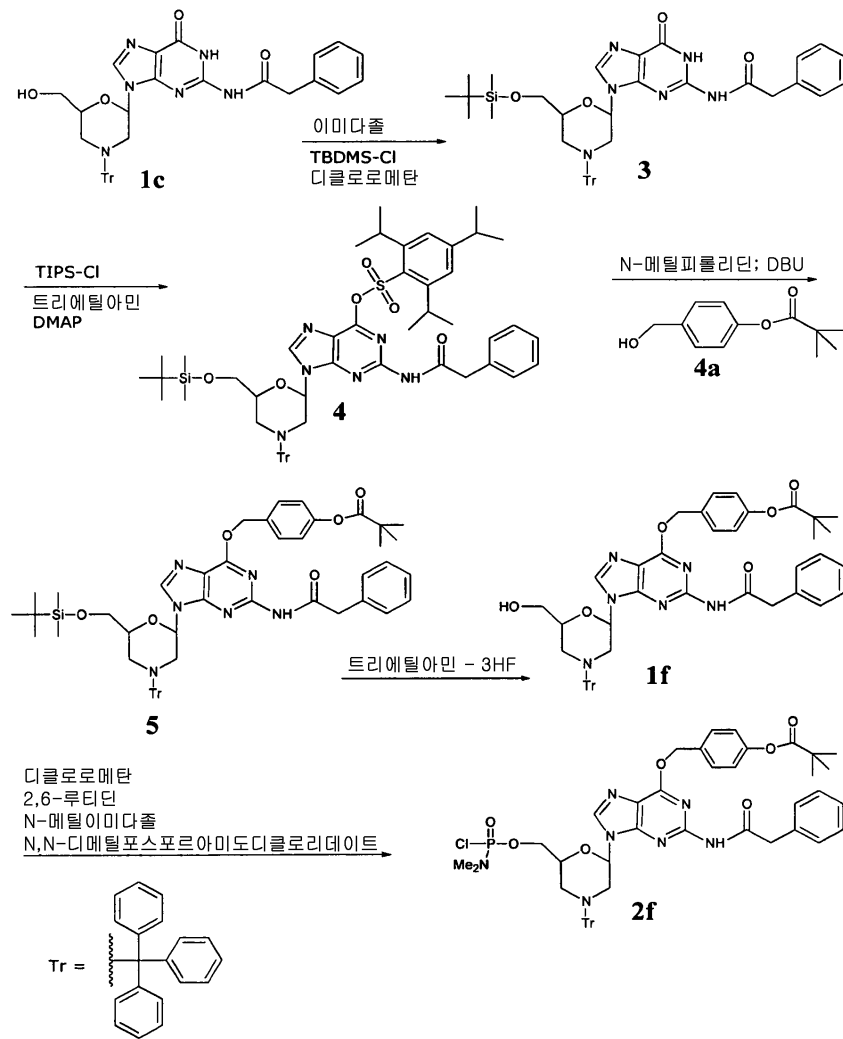
도면6



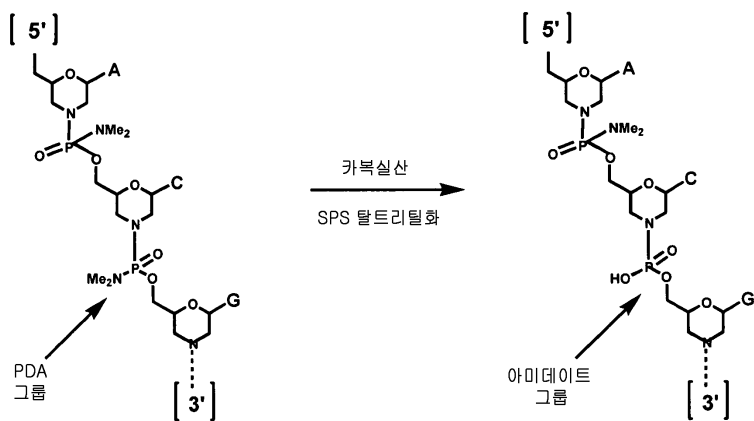
도면7



도면8

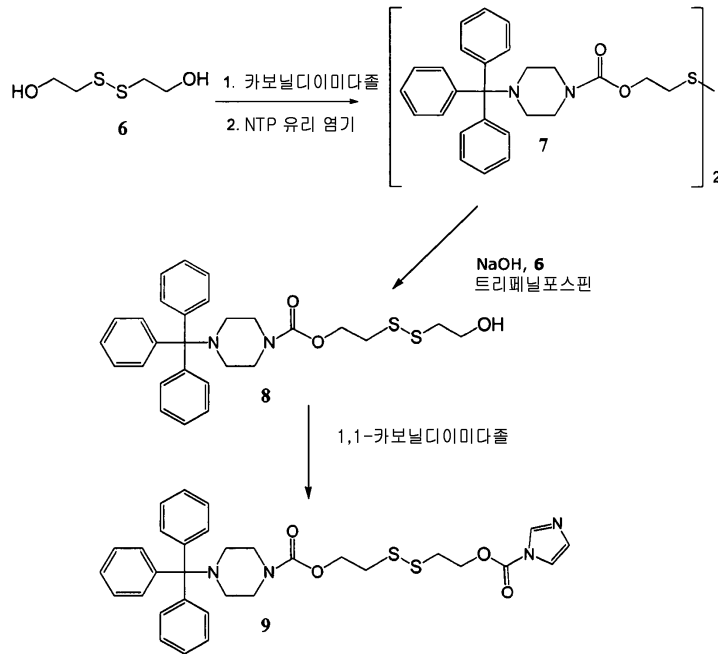


도면9

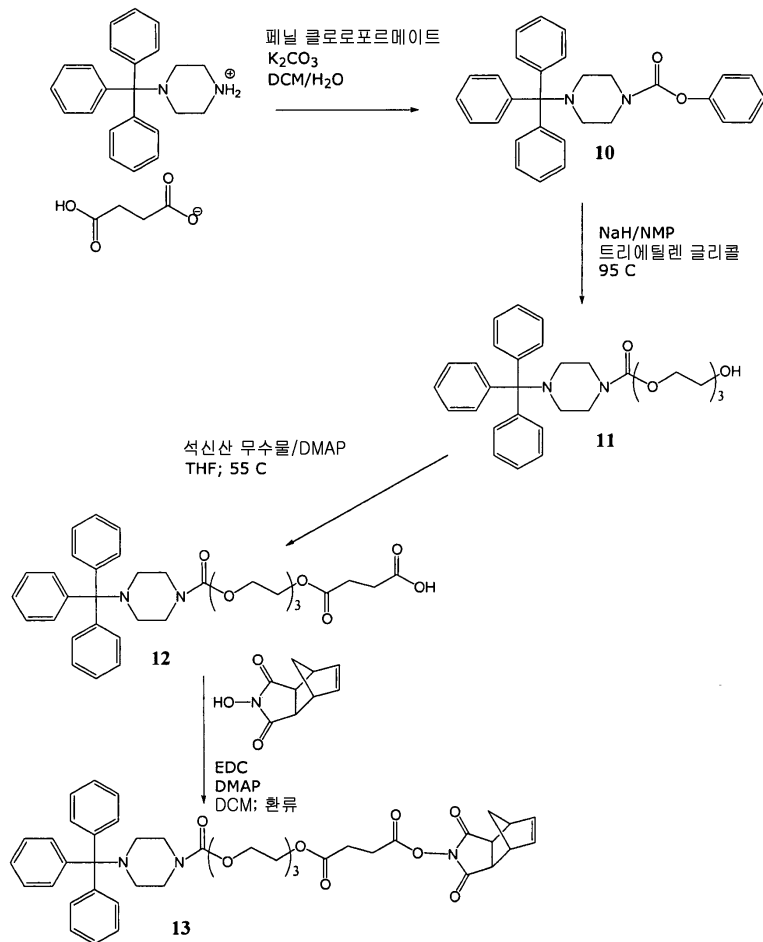




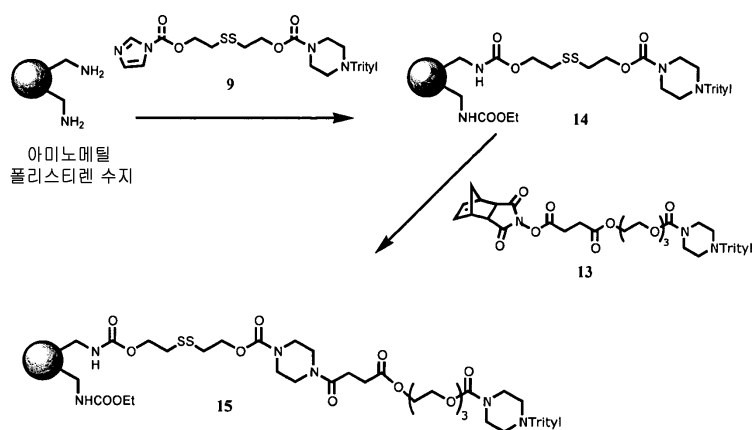
도면10



도면11



도면12



서열 목록

<110> AVI BIOPHARMA, INC.

<120> Method of Synthesis of Morpholino Oligomers

<130> IPA100224

<150> US 60/988,200

<151> 2007-11-15

<150> US 60/988,192

<151> 2007-11-15

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligomer

<400> 1

acgttgaggg gcatcgtcgc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligomer

<400> 2

ctgggatgag agccatcact

20

<210>	3	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic oligomer	
<400>	3	
cttagtcatc gagatcttcg tg		22
<210>	4	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic oligomer	
<400>	4	
gtgctcatgg tgcacggtc		19