



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092173  
(43) 공개일자 2025년06월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 21/02 (2006.01) C07H 1/00 (2006.01)  
C07H 21/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07H 21/02 (2013.01)  
C07H 1/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7010625
- (22) 출원일자(국제) 2023년07월14일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2025년04월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2023/026108
- (87) 국제공개번호 WO 2024/089953  
국제공개일자 2024년05월02일
- (30) 우선권주장  
JP-P-2022-172158 2022년10월27일 일본(JP)

- (71) 출원인  
스미토모 가가꾸 가부시끼가이샤  
일본국 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 2초메 7반 1고
- (72) 발명자  
다나카 유키  
일본 오이타켄 오이타시 오아자 츠루사키 2200반  
치 스미토모 가가꾸 가부시끼가이샤 나이
- (74) 대리인  
특허법인코리아나

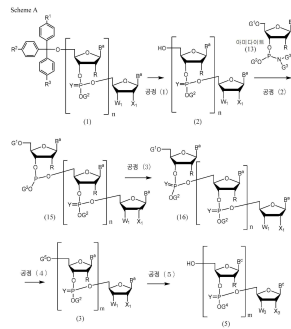
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **올리고뉴클레오티드의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은, 고상 합성법에 의한 올리고뉴클레오티드의 제조 방법으로서, 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드와, 산을, 티올의 존재하에서 반응시켜, 5' 말단의 수산기의 보호기를 제거하는 공정을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 제조 방법, 그리고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer의 함유량비가 일정량 이하인 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

*C07H 21/04* (2013.01)

*Y02P 20/55* (2020.08)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

고상 합성법에 의한 올리고뉴클레오티드의 제조 방법으로서,

5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드와, 산을, 티올의 존재하에서 반응시켜, 5' 말단의 수산기의 보호기를 제거하는 공정을 포함하는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서,

상기 티올이, C2-C20 알킬티올, 또는 C4-C8 시클로알킬티올인, 제조 방법.

**청구항 3**

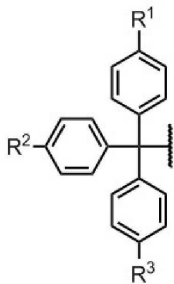
제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 티올이, 1-도데칸티올 또는 시클로헥산티올인, 제조 방법.

**청구항 4**

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 5' 말단의 수산기의 보호기가, 하기 식 :



(식 중, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup> 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고 수소 또는 알콕시기를 나타낸다.)

으로 나타내는 보호기인, 제조 방법.

**청구항 5**

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 5' 말단의 수산기의 보호기가, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기) 인, 제조 방법.

**청구항 6**

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 산이, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리클로로아세트산, 메탄술폰산, 염산, 아세트산, 또는 p-톨루엔술폰산인, 제조 방법.

**청구항 7**

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 산이, 디클로로아세트산인, 제조 방법.

**청구항 8**

제 7 항에 있어서,

상기 산이, 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매의 공존하에서의 디클로로아세트산인, 제조 방법.

**청구항 9**

제 8 항에 있어서,

상기 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매가, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 또는 방향족 유기 용매에서 선택되는 어느 1 개 이상의 용매인, 제조 방법.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서,

상기 방향족 유기 용매가, 톨루엔인, 제조 방법.

**청구항 11**

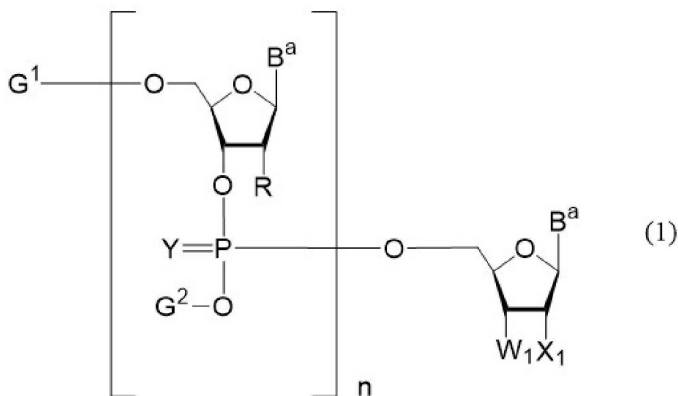
제 7 항에 있어서,

상기 디클로로아세트산이, 디클로로아세트산에 대한 포름알데히드의 몰비가  $81 \times 10^{-5}$  이하이고, 또한, 디클로로아세트산에 대한 디클로로아세트산 무수물의 몰비가  $20 \times 10^{-5}$  이하인, 디클로로아세트산인, 제조 방법.

**청구항 12**

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드가, 식 (1) :



(식 중,

$G^1$  은, 수산기의 보호기를 나타내고,

$G^2$  는, 수산기의 보호기를 나타내고,

$B^a$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타내고,

R 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 보호된 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,

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

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

n 은, 1 ~ 300 중 어느 정수를 나타내고,

W<sub>1</sub> 은, OZ 기를 나타내고, 또한, X<sub>1</sub> 은, R 기를 나타내거나, 혹은

W<sub>1</sub> 은, OV 기를 나타내고, 또한, X<sub>1</sub> 은, OZ 기를 나타내고,

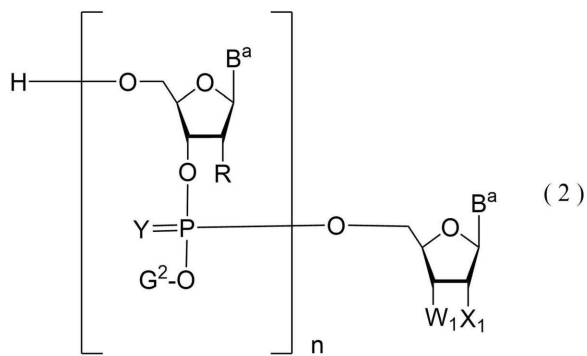
V 는, 수산기의 보호기를 나타내고,

Z 는, 고상 담체 및 연결기로 이루어지는 구조를 갖는 기이다.

그리고, n 이 2 이상의 정수일 때, 식 (1) 로 나타내는 핵산 분자는, 각각의 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

로 나타내는 올리고뉴클레오티드이고,

5' 말단의 수산기의 보호기가 제거된 뉴클레오티드가, 식 (2) :



(식 중,

G<sup>2</sup>, B<sup>a</sup>, R, Y, X<sub>1</sub>, W<sub>1</sub> 및 n 은, 상기와 같고, 그리고,

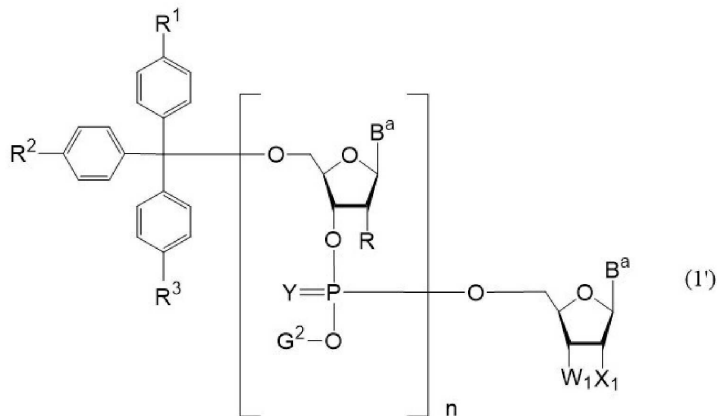
식 (1) 에 있어서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

로 나타내는 올리고뉴클레오티드인, 제조 방법.

### 청구항 13

제 12 항에 있어서,

5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드가, 식 (1') :



(식 중,

$G^2$ ,  $B^a$ ,  $R$ ,  $Y$ ,  $X_1$ ,  $W_1$  및  $n$  은, 상기와 같고, 그리고,

$R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자 또는 알콕시기를 나타낸다.)

로 나타내는 올리고뉴클레오티드인, 제조 방법.

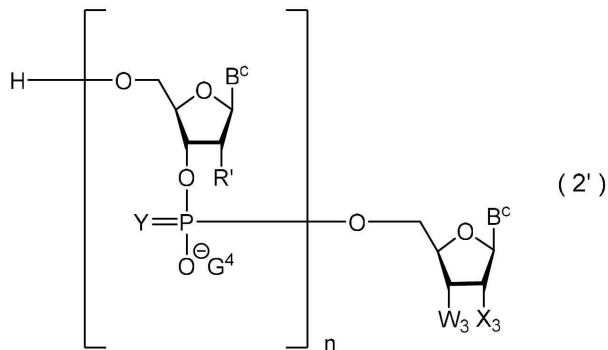
**청구항 14**

제 13 항에 있어서,

$R^1$  및  $R^2$  가 메톡시기이고,  $R^3$  이 수소 원자인, 제조 방법.

**청구항 15**

제 12 항에 기재된 공정과, 추가로, 당해 공정에서 생성되는 식 (2) 로 나타내는 올리고뉴클레오티드로부터 Z 로 나타내는 기를 제거하는 공정, 그리고 수산기 및 핵산 염기의 보호기를 제거하는 공정을 포함하는, 식 (2') :



(식 중,

$Y$  및  $n$  은, 상기와 같고,

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

$G^4$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 이온, 알칼리 금속 이온, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

$R'$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는  $OQ'$  기를 나타내고,

$Q'$  는, 상기와 같고, 그리고,

$X_3$  및  $W_3$  은 각각, 각각 독립적으로, 수산기를 나타내거나, 혹은

$X_3$  은,  $R'$  기를 나타내고, 또한,  $W_3$  은, 수산기를 나타낸다. 그리고,

식 (1) 에 있어서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

로 나타내는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

**청구항 16**

제 12 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

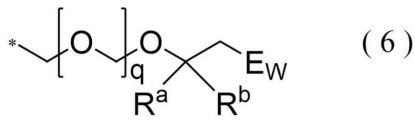
올리고뉴클레오티드가, 리보 핵산 (RNA) 을 포함하는 올리고뉴클레오티드인, 제조 방법.

**청구항 17**

제 12 항에 있어서,

올리고뉴클레오티드가, 리보 핵산 (RNA) 을 포함하는 올리고뉴클레오티드이고, 그 리보오스의 2' 위치의 수산기의 보호기가, 식 (6) 으로 나타내는 보호기인, 제조 방법.

식 (6) :



(식 중,

q 는, 0 ~ 5 중 어느 정수를 나타내고,

R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 메틸기, 에틸기 또는 수소 원자를 나타내고,

\* 표시는, 리보오스의 2' 위치의 수산기 유래의 산소 원자와의 결합점을 나타내고, 그리고,

E<sub>w</sub> 는, 전자 구인기를 나타낸다.)

### 청구항 18

제 17 항에 있어서,

q 가 0 또는 1 이고, R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 가, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 메틸기 또는 수소 원자이고, 또한, E<sub>w</sub> 가 시아노기인, 제조 방법.

### 청구항 19

제 12 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

n 이 1 ~ 200 중 어느 정수인, 제조 방법.

### 청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서,

얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 100 mer 이상의 올리고뉴클레오티드인, 제조 방법.

### 청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드에 대한 상기 티올의 사용량의 몰비가 1 이상인, 제조 방법.

### 청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 산에 대한 상기 티올의 사용량의 몰비가 1 ~ 100 인, 제조 방법.

### 청구항 23

올리고뉴클레오티드의 사슬 길이가 50 mer 이상이고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.8 % 미만인, 올리고뉴클레오티드.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001]

본 특허출원은, 일본 특허출원 2022-172158호 (2022년 10월 27일 출원) 에 기초하는 파리 조약상의 우선권 및

이익을 주장하는 것이고, 여기에 인용함으로써, 상기 출원에 기재된 내용의 전체가 본 명세서 중에 받아들여지는 것으로 한다.

[0002] 본 발명은, 티올 화합물을 카티온 스캐빈저로서 사용한, 고상 합성에 있어서의 포스포아미다이트법을 사용하는, 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

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

[0004] 올리고뉴클레오타이드의 합성은, 포스포아미다이트법 (이하, 「아미다이트법」 이라고 칭한다) 을 사용하여 제조할 수 있고, 그 합성법에 있어서는, 5' 말단의 수산기의 보호기를 탈보호하는 공정이 포함된다. 이 공정은, 5' 말단의 수산기가 보호된 올리고뉴클레오타이드를 산과 반응시킴으로써 실시된다. 이 반응은, 5' 말단의 수산기의 보호기가 카티온으로서 탈리되는 평형 반응이고, 가역적 반응이다.

[0005] 액상 합성에 있어서는, 상기 탈보호 반응의 진행과 함께, 탈보호된 보호기의 카티온 (예를 들어, 4,4'-디메톡시트리틸카티온) 이 계 중에서 증가하여, 당해 탈리 반응의 평형 반응의 진행을 저해한다. 그 때문에, 반응을 진행시키기 위해서, 카티온 스캐빈저를 사용하는 방법이 알려져 있다 (특허문헌 1 을 참조).

[0006] 한편으로, 고상 합성에서는, 합성 조작상, 이러한 카티온이 계 중에 체류하지 않고 계 외로 배출되기 때문에, 평형 반응은 원활하게 진행되어, 전술한 바와 같은 액상 합성과 같은 문제가 일어나지 않는 것이 알려져 있다 (비특허문헌 1 을 참조). 따라서, 고상 합성에서는, 일반적으로, 카티온 스캐빈저를 사용할 필요는 없다. 지금까지, 고상 합성에 있어서, 카티온 스캐빈저로서 트리에틸실란을 사용하여 탈보호 반응을 실시한 방법이 보고되어 있다 (특허문헌 2 를 참조). 그러나, 그 방법에 있어서의, 트리에틸실란의 카티온 스캐빈저의 효과는 충분하지 않았다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 국제공개 제2012/157723호  
(특허문헌 0002) 미국 특허 제5,510,476호

#### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) J. Am. Chem. Society., 2020, 142, 16610

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은, 고상 합성에 있어서의 포스포아미다이트법을 사용하는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법에 있어서, 5' 말단의 수산기의 탈보호 반응이 효율적으로 진행되어, 합성되는 올리고뉴클레오타이드의 수율 및 순도가 향상된, 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 또, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 유의하게 낮은, 올리고뉴클레오타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은, 상기 목적을 달성하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과, 카티온 스캐빈저로서, 티올 화합물을 사용함으로써, 5' 수산기의 보호기의 탈보호 반응이 효율적으로 진행되어, 얻어지는 올리고뉴클레오타이드의 수율 및 순도가 향상되는 것을 알아내었다. 그 결과, 본 발명은, 고상 합성법에 의한 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법으로서, 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오타이드와, 산을,

티올의 존재하에서 반응시켜 5' 말단의 수산기를 제거하는 공정을 포함하는, 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법, 그리고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 일정량 이하인, 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

[0011] 본 발명은, 이하의 양태를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0012] [1] 고상 합성법에 의한 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법으로서,

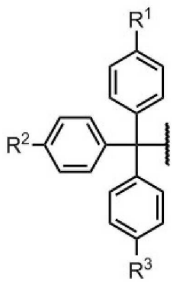
[0013] 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오타이드와, 산을, 티올의 존재하에서 반응시켜, 5' 말단의 수산기의 보호기를 제거하는 공정을 포함하는, 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법 (이하, 「본 발명의 제조 방법」 이라고 호칭한다).

[0014] [2] 상기 티올이, C2-C20 알킬티올, 또는 C4-C8 시클로알킬티올인, [1] 에 기재된 제조 방법.

[0015] [3] 상기 티올이, 1-도데칸티올 또는 시클로헥산티올인, [1] 또는 [2] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

[0016] [4] 상기 5' 말단의 수산기의 보호기가, 하기 식 :

[0017] [화학식 1]



[0018] (식 중, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup> 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고 수소 또는 알콕시기를 나타낸다.)

[0019] 로 나타내는 보호기인, [1] ~ [3] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

[0020] [5] 상기 5' 말단의 수산기의 보호기가, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기) 인, [1] ~ [4] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

[0021] [6] 상기 산이, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리클로로아세트산, 메탄술폰산, 염산, 아세트산, 또는 p-톨루엔술폰산인, [1] ~ [5] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

[0022] [7] 상기 산이 디클로로아세트산인, [1] ~ [5] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.

[0023] [8] 상기 산이, 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매의 공존하에서의 디클로로아세트산인, [7] 에 기재된 제조 방법.

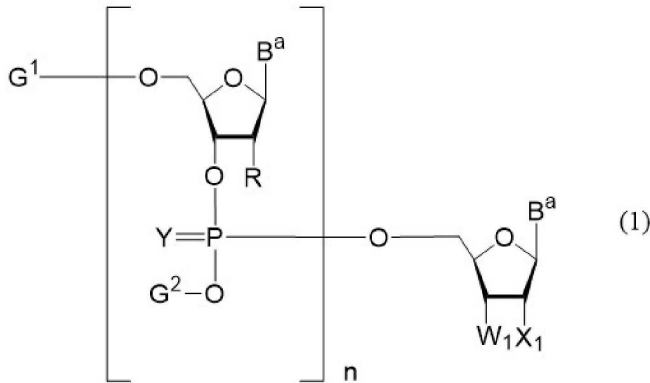
[0024] [9] 상기 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매가, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 또는 방향족 유기 용매에서 선택되는 어느 1 개 이상의 용매인, [8] 에 기재된 제조 방법.

[0025] [10] 상기 방향족 유기 용매가 톨루엔인, [9] 에 기재된 제조 방법.

[0026] [11] 상기 디클로로아세트산이, 디클로로아세트산에 대한 포름알데히드의 몰비가  $81 \times 10^{-5}$  이하이고, 또한, 디클로로아세트산에 대한 디클로로아세트산 무수물의 몰비가  $20 \times 10^{-5}$  이하인, 디클로로아세트산인, [7] 에 기재된 제조 방법.

[0027] [12] 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오타이드가, 식 (1) :

[0029] [화학식 2]



[0030]

[0031] (식 중,

[0032]  $G^1$  은, 수산기의 보호기를 나타내고,

[0033]  $G^2$  는, 수산기의 보호기를 나타내고,

[0034]  $B^a$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타내고,

[0035] R 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 보호된 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,

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

[0037] Y 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0038] n 은, 1 ~ 300 중 어느 정수를 나타내고,

[0039]  $W_1$  은, OZ 기를 나타내고, 또한,  $X_1$  은, R 기를 나타내거나, 혹은

[0040]  $W_1$  은, OV 기를 나타내고, 또한,  $X_1$  은, OZ 기를 나타내고,

[0041] V 는, 수산기의 보호기를 나타내고,

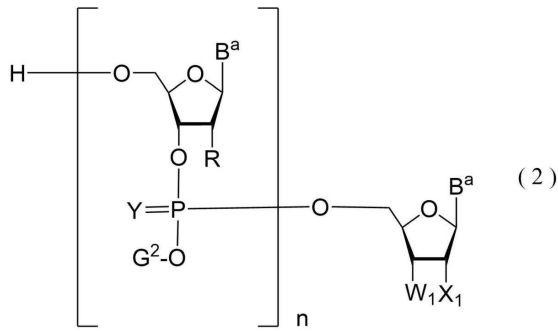
[0042] Z 는, 고상 담체 및 연결기로 이루어지는 구조를 갖는 기이다.

[0043] 그리고, n 이 2 이상의 정수일 때, 식 (1) 로 나타내는 핵산 분자는, 각각의 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

[0044] 로 나타내는 올리고뉴클레오티드이고,

[0045] 5' 말단의 수산기의 보호기가 제거된 뉴클레오티드가, 식 (2) :

[0046] [화학식 3]



[0047]

[0048] (식 중,

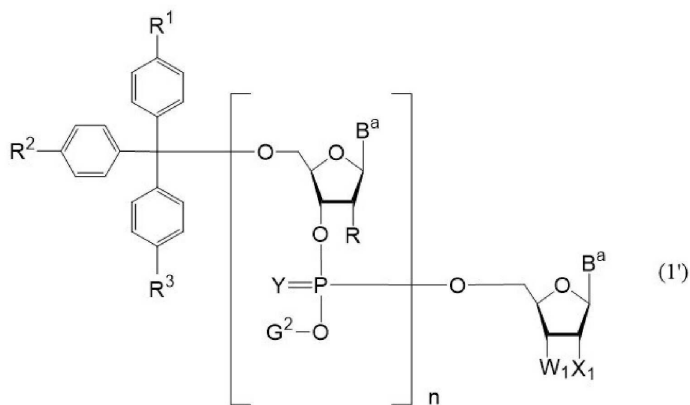
[0049]  $G^2$ ,  $B^a$ , R, Y,  $X_1$ ,  $W_1$  및 n 은, 상기와 같고, 그리고,

[0050] 식 (1) 에 있어서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

[0051] 로 나타내는 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [11] 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0052] [13] 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드가, 식 (1') :

[0053] [화학식 4]



[0054]

[0055] (식 중,

[0056]  $G^2$ ,  $B^a$ , R, Y,  $X_1$ ,  $W_1$  및 n 은, 상기와 같고, 그리고,

[0057]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자 또는 알콕시기를 나타낸다.)

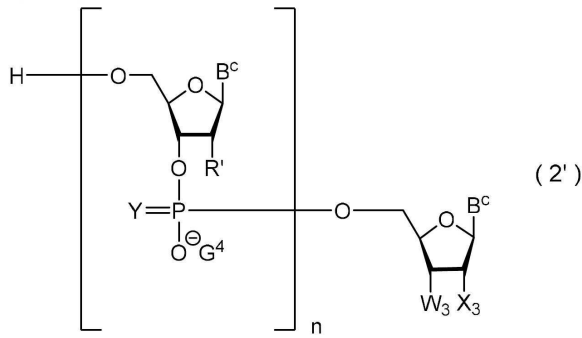
[0058] 로 나타내는 올리고뉴클레오티드인,

[0059] [12] 에 기재된 제조 방법.

[0060] [14]  $R^1$  및  $R^2$  가 메톡시기이고,  $R^3$  이 수소 원자인, [13] 에 기재된 제조 방법.

[0061] [15] [12] 에 기재된 공정과, 추가로, 당해 공정에서 생성하는 식 (2) 로 나타내는 올리고뉴클레오티드로부터 Z 로 나타내는 기를 제거하는 공정, 그리고 수산기 및 핵산 염기의 보호기를 제거하는 공정을 포함하는, 식 (2') :

[0062] [화학식 5]



[0063]

[0064] (식 중,

[0065] Y 및 n 은, 상기와 같고,

[0066] B<sup>c</sup> 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 핵산 염기를 나타내고,

[0067] G<sup>4</sup> 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 이온, 알칼리 금속 이온, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

[0068] R' 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,

[0069] Q' 는, 상기와 같고, 그리고,

[0070] X<sub>3</sub> 및 W<sub>3</sub> 은 각각, 각각 독립적으로, 수산기를 나타내거나, 혹은

[0071] X<sub>3</sub> 은, R' 기를 나타내고, 또한, W<sub>3</sub> 은, 수산기를 나타낸다. 그리고,

[0072] 식 (1) 에 있어서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

[0073] 로 나타내는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

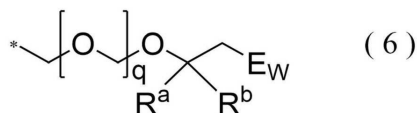
[0074] [16] 올리고뉴클레오티드가, 리보 핵산 (RNA) 을 포함하는 올리고뉴클레오티드인, [12] ~ [15] 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0075] [17] 올리고뉴클레오티드가, 리보 핵산 (RNA) 을 포함하는 올리고뉴클레오티드이고, 그 리보오스의 2' 위치의 수산기의 보호기가, 식 (6) 으로 나타내는 보호기인,

[0076] [12] 에 기재된 제조 방법.

[0077] 식 (6) :

[0078] [화학식 6]



[0079]

[0080] (식 중,

[0081] q 는, 0 ~ 5 중 어느 정수를 나타내고,

[0082] R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 메틸기, 에틸기 또는 수소 원자를 나타내고,

[0083] \* 표시는, 리보오스의 2' 위치의 수산기 유래의 산소 원자와의 결합점을 나타내고, 그리고,

[0084] E<sub>w</sub> 는, 전자 구인기를 나타낸다.)

- [0085] [18] q 가 0 또는 1 이고, R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 가, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 메틸기 또는 수소 원자이고, 또한, E<sub>n</sub> 가 시아노기인, [17] 에 기재된 제조 방법.
- [0086] [19] n 이 1 ~ 200 중 어느 정수인, [12] ~ [18] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0087] [20] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 100 mer 이상의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0088] [20-1] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 20 mer 이상의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0089] [20-2] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 40 mer 이상의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0090] [20-3] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 60 mer 이상의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0091] [20-4] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 80 mer 이상의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0092] [20-5] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 150 mer 이상의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0093] [20-6] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 200 mer 이하의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0094] [20-7] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 250 mer 이하의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0095] [20-8] 얻어지는 올리고뉴클레오티드가, 300 mer 이하의 올리고뉴클레오티드인, [1] ~ [19] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0096] [21] 상기 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드에 대한 상기 티올의 사용량의 몰비가 1 이상인, [1] ~ [20] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0097] [22] 상기 산에 대한 상기 티올의 사용량의 몰비가 1 ~ 100 인, [1] ~ [21] 중 어느 하나에 기재된 제조 방법.
- [0098] [23] 올리고뉴클레오티드의 사슬 길이가 50 mer 이상이고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.8 % 미만인, 올리고뉴클레오티드.

**발명의 효과**

[0099] 본 발명은, 카티온 스캐빈저로서 티올 화합물을 사용함으로써, 5' 수산기의 보호기의 탈보호 반응이 효율적으로 진행되는 것을 특징으로 하는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 제조 방법에 의해, 제조되는 올리고뉴클레오티드의 수율 및 순도의 향상을 기대할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0100] 도 1 은, 식 (1) 로 나타내는 핵산 분자로부터 식 (5) 로 나타내는 핵산 분자를 제조하는 전형예를 나타내는 스킴 A 이다. 도면 중, G<sup>1</sup> 로는, 디클로로아세트산으로 제거되는 수산기의 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별히 제한 없이 사용할 수 있고, 아미다이트 화합물에서 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다. 또, G<sup>3</sup> 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 알킬기를 나타내고, 혹은 2 개의 G<sup>3</sup> 은 서로 결합하여 고리형 구조를 형성하고 있어도 된다. G<sup>3</sup> 으로는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 알킬기, 예를 들어 메틸기, 에틸기, 프로필기, 또는 이소프로필기인 것이 바람직하고, 양방이 이소프로필기인 것이 보다 바람직하다. 그 밖의 기호는 상기와 같다.

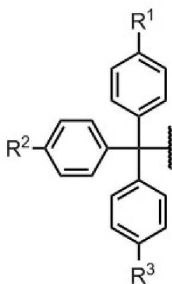
**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0101] 본 발명의 1 실시양태에 의하면, 본 발명은,  
 [0102] 고상 합성법에 의한 올리고뉴클레오티드의 제조 방법으로서,  
 [0103] 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드와, 산을, 티올의 존재하에서 반응시켜, 5' 말단의 수산기의 보호기를 제거하는 공정을 포함하는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 관한 것이다.

[0104] 본 명세서 중에서 사용하는, 용어 「5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드」란, 뉴클레오티드 분자의 구조의 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호되어 있는 뉴클레오티드를 포함하는, 올리고뉴클레오티드를 칭한다. 본 명세서에 있어서, 「올리고뉴클레오티드」를 「핵산 올리고머」와, 및 「뉴클레오티드」를 「핵산 분자」라고 칭하는 경우도 있다.

[0105] 용어 「5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기」란, 일반적으로 알려진 보호기이면, 특별히 한정되는 것은 아니다. 구체적인 보호기로는, 예를 들어, 하기 식 :

[0106] [화학식 7]



[0107] (식 중,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고 수소 또는 알콕시기를 나타낸다.)  
 [0108] 으로 나타내는 기를 들 수 있지만, 카티온으로서 탈리할 수 있는 것이면, 특별히 한정되지 않는다.

[0109] 상기 식으로 나타내는 보호기에 있어서,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$  은, 1 개가 수소이고, 나머지 2 개가 동일 또는 상이한 (동일이 바람직하다) 알콕시기인 것이 바람직하고, 알콕시기로는 메톡시기가 특히 바람직하다.

[0110] 구체적으로 바람직한 보호기로는, 예를 들어, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기), 4-모노메톡시트리틸기, 또는 4,4',4"-트리메톡시트리틸기에서 선택되는 기를 들 수 있다. 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기)가 특히 바람직하다.

[0111] 본 명세서 중에서 사용하는 용어 「티올」로는, 구체적으로는, 예를 들어, C2-C20 알킬티올, 또는 C4-C8 시클로알킬티올을 들 수 있다. C2-C20 알킬티올로는, 예를 들어, 에탄티올, 1-프로판티올, 2-프로판티올, 1-부탄티올, 2-부탄티올, 2-메틸-1-프로판티올(이소부틸메르캅탄), 2-메틸-2-프로판티올(tert-부틸메르캅탄), 1-펜탄티올, 1-헥산티올, 1-헵탄티올, 1-옥탄티올, 1-노난티올, 1-데칸티올, 1-운데칸티올, 1-도데칸티올, tert-도데칸티올, 1-테트라데칸티올, 1-펜타데칸티올, 1-헥사데칸티올, 1-옥타데칸티올, 1-에이코산티올을 들 수 있다. C4-C8 시클로알킬티올로는, 예를 들어, 시클로부탄티올, 시클로펜탄티올, 시클로헥산티올, 시클로헵탄티올, 시클로옥탄티올을 들 수 있다. 티올로는, 바람직하게는, 1-도데칸티올, 및 시클로헥산티올을 들 수 있다.

[0112] 반응 기질인, 상기 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드에 대한 상기 티올의 사용량의 몰비는, 1 이상이지만, 이들에 한정되지 않는다. 또, 상기 산에 대한, 상기 티올의 사용량의 몰비는, 1 ~ 100 이지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0113] 용어 「산」이란, 포스포아미다이트법에 있어서, 상기 보호기를 제거하는 데에 사용되는 산을 의미하고, 구체적으로는 예를 들어, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리클로로아세트산, 메탄술폰산, 염산, 아세트산, 및 p-톨루엔술폰산을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 디클로로아세트산이 특히 바람직하다.

[0114] 사용되는 디클로로아세트산은 고순도의 것을 사용하는 것이 바람직하다. 고순도의 디클로로아세트산이란, 디클로로아세트산 중에 포함되는 불순물의 함량이 일정량 이하인 것을 의미한다. 불순물로는, 디클로로아세

트산의 제조 방법의 과정에서 사용하는, 포름알데히드 및 디클로로아세트산 무수물의 양방 또는 일방을 들 수 있다.

[0117] 예를 들어, 디클로로아세트산에 대한 포름알데히드의 몰비는  $81 \times 10^{-5}$  이하이고,  $41 \times 10^{-5}$  이하가 바람직하고,  $81 \times 10^{-6}$  이하가 보다 바람직하다. 또, 디클로로아세트산에 대한 디클로로아세트산 무수물의 몰비는  $20 \times 10^{-5}$  이하이고,  $10 \times 10^{-5}$  이하가 바람직하고,  $50 \times 10^{-6}$  이하가 보다 바람직하다.

[0118] 사용하는 디클로로아세트산의 실시양태에 의하면, 디클로로아세트산에 대한 포름알데히드의 몰비가 상기의 비율 이하이고, 및/또는, 디클로로아세트산에 대한 디클로로아세트산 무수물의 몰비가 상기의 비율 이하인, 디클로로아세트산을 사용하는 것이 바람직하다.

[0119] 상기 디클로로아세트산은, 디클로로아세트산의 제조 및 정제의 방법에 사용되는, 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매 중에 포함된 액 형태 (예를 들어, 용액, 현탁액, 또는 유탁액) 이고, 또는 이러한 불활성 용매를 반응계 중에 별도로 첨가하는 등에 의해, 불활성 용매의 공존하에서 사용해도 된다.

[0120] 상기 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매로는, 예를 들어,  $181 \text{ }^\circ\text{C}$  이하의 비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매를 들 수 있고, 구체적으로는, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 방향족 유기 용매를 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 방향족 유기 용매로는, 예를 들어, 톨루엔, 자일렌, 모노클로로벤젠, 및 *o*-디클로로벤젠을 들 수 있고, 바람직하게는 톨루엔을 들 수 있다. 이러한 용매의 사용량은, 특별히 한정되지 않지만, 전형적으로는, 디클로로아세트산에 대해, 예를 들어, 0.5 중량배 ~ 20 중량배 정도이다.

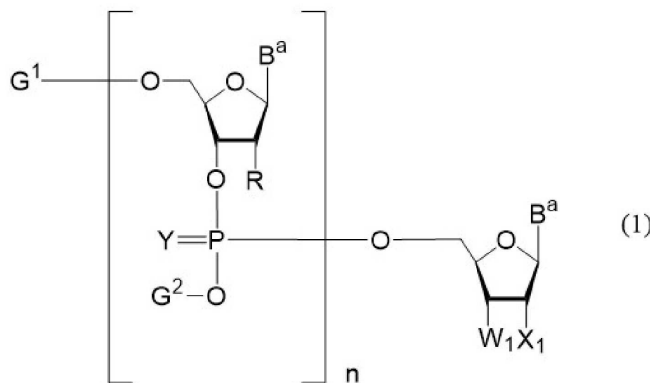
[0121] 또, 이러한 탈보호 반응을 위한 디클로로아세트산을 포함하는 반응계 중, 적절히, 상기 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 비프로톤성의 불활성 용매의 공존하, 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는, 지방족 알코올, 지방족 아민, 및 물로 이루어지는 군에서 선택되는 1 개의 화합물을 첨가해도 된다.

[0122] 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 지방족 알코올 및 지방족 아민으로는, 예를 들어, C1-C6 의 지방족 알코올 및 C1-C6 의 지방족 아민 화합물이 예시된다. C1-C6 의 지방족 알코올의 예로는, 예를 들어, 메탄올, 에탄올, *n*-프로판올, *i*-프로판올, *n*-부탄올, *i*-부탄올, *sec*-부탄올, *t*-부탄올, *n*-펜탄올, *n*-헥산올 등이 예시된다. 디클로로아세트산보다 저비점을 갖는 지방족 아민으로는, C1-C6 의 지방족 아민 화합물이 예시된다. 구체적으로는, 메틸아민, 에틸아민, *n*-프로필아민, *i*-프로필아민, *n*-부틸아민, *i*-부틸아민, *t*-부틸아민, *n*-펜틸아민, *n*-헥실아민 등이 예시된다.

[0123] 상기 지방족 알코올, 상기 지방족 아민 및 물 또는 그들의 혼합물의 사용량은, 디클로로아세트산 무수물을 상기 원하는 범위로 저감시키는 데에 유효한 양이면 되고, 특별히 한정되지 않는다.

[0124] 본 명세서 중에서 사용하는 용어 「5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오타이드」 의 구체예로는, 식 (1) :

[0125] [화학식 8]

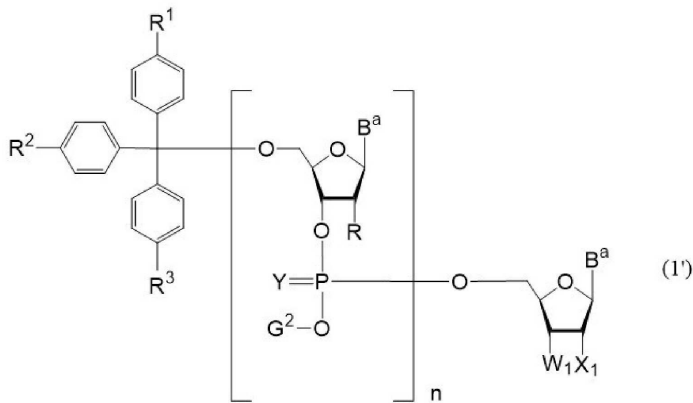


[0126]

[0127] (식 중,

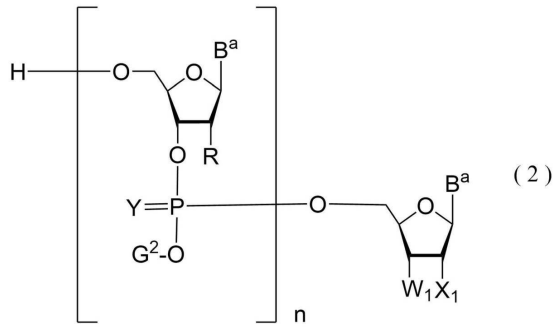
[0128]  $G^1$  은, 수산기의 보호기를 나타내고,

- [0129]  $G^2$  는, 수산기의 보호기를 나타내고,
- [0130]  $B^a$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타내고,
- [0131] R 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 보호된 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,
- [0132] Q' 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 메틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸렌기, 또는 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸리렌기를 나타내고,
- [0133] Y 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0134] n 은, 1 ~ 300 중 어느 정수를 나타내고,
- [0135]  $W_1$  은, OZ 기를 나타내고, 또한,  $X_1$  은, R 기를 나타내거나, 혹은
- [0136]  $W_1$  은, OV 기를 나타내고, 또한,  $X_1$  은, OZ 기를 나타내고,
- [0137] V 는, 수산기의 보호기를 나타내고,
- [0138] Z 는, 고상 담체 및 연결기로 이루어지는 구조를 갖는 기이다.
- [0139] 그리고, n 이 2 이상의 정수일 때, 식 (1) 로 나타내는 핵산 분자는, 각각의 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)
- [0140] 로 나타내는 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다.
- [0141] 보다 바람직한 본 발명의 실시양태에 의하면, 5' 말단의 수산기가 산성 조건하에서 제거 가능한 보호기로 보호된 올리고뉴클레오티드는, 식 (1') :
- [0142] [화학식 9]



- [0143]
- [0144] (식 중,
- [0145]  $G^2$ ,  $B^a$ , R, Y,  $X_1$ ,  $W_1$  및 n 은, 상기와 같고, 그리고,
- [0146]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자 또는 알콕시기를 나타낸다.)
- [0147] 로 나타내는 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다.
- [0148] 더욱 더 바람직한 본 발명의 실시양태에 의하면, 상기 식 (1') 중,  $R^1$ ,  $R^2$ , 및  $R^3$  은 수소 원자를 나타낸다.
- [0149] 또, 본 발명의 실시양태에 의하면, 5' 말단의 수산기의 보호기가 제거된 뉴클레오티드는, 식 (2) :

[0150] [화학식 10]



[0151]

[0152] (식 중,

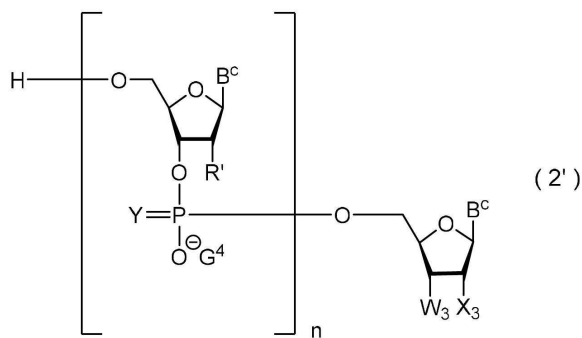
[0153]  $G^2$ ,  $B^a$ ,  $R$ ,  $Y$ ,  $X_1$ ,  $W_1$  및  $n$  은, 상기와 같고, 그리고,

[0154] 식 (1) 에 있어서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

[0155] 로 나타내는 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0156] 또, 본 발명의 바람직한 실시양태에 의하면, 5' 말단의 수산기의 보호기가 제거된 뉴클레오티드는, 5' 말단의 수산기의 보호기가 제거된 뉴클레오티드는, 식 (2') :

[0157] [화학식 11]



[0158]

[0159] (식 중,

[0160]  $Y$  및  $n$  은, 상기와 같고,

[0161]  $B^c$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 핵산 염기를 나타내고,

[0162]  $G^4$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 이온, 알칼리 금속 이온, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

[0163]  $R'$  는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는  $QQ'$  기를 나타내고,

[0164]  $Q'$  는, 상기와 같고, 그리고,

[0165]  $X_3$  및  $W_3$  은 각각, 각각 독립적으로, 수산기를 나타내거나, 혹은

[0166]  $X_3$  은,  $R'$  기를 나타내고, 또한,  $W_3$  은, 수산기를 나타낸다. 그리고,

[0167] 식 (1) 에 있어서 정의된 바와 같이, 뉴클레오티드 사이에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 된다.)

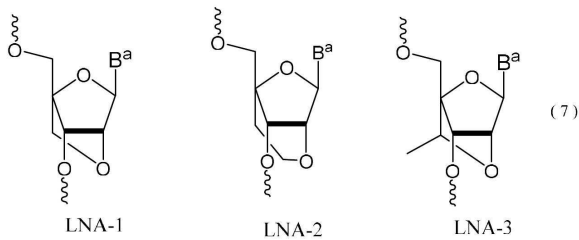
[0168] 로 나타내는, 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다.

[0169] 핵산 분자의 5' 위치의 수산기의 보호기로는, 하기  $G^1$  또는  $G^5$  로 나타내는 기가 예시된다. 5' 위치의 수산

기가 보호된 올리고뉴클레오티드로는, 상기 식 (1) (또는 (1')) 를 포함한다) 로 나타내는 올리고뉴클레오티드가 예시된다. 상기 산 (예를 들어 디클로로아세트산) 및 티올을 반응시켜 생성하는 뉴클레오티드로는, 상기 식 (2) (또는 (2')) 를 포함한다) 로 나타내는 올리고뉴클레오티드가 예시된다.

[0170] 상기 식 (1) 및 (2) 에 있어서, Q' 로 나타내는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 메틸렌기, 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸렌기, 또는 리보오스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합하고 있는 에틸리렌기를 나타내는 화합물로서, 구체적으로는 하기 식 (7) 의 LNA-1, LNA-2, 또는 LNA-3 으로 나타내는 구조를 들 수 있다.

[0171] [화학식 12]

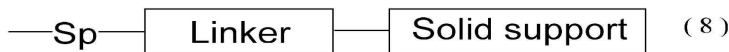


[0172]

(식 중, B<sup>a</sup> 는, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기를 나타낸다.)

[0174] Z 로 나타내는, 고상 담체, 및 고상 담체와 핵산 분자의 3' 말단의 리보오스의 2' 위치 혹은 3' 위치의 수산기의 산소 원자를 연결하는 연결기로 이루어지는 구조를 갖는 기로는, 보다 구체적으로는, 하기 식 (8) 로 나타내는 구조를 들 수 있다.

[0175] [화학식 13]

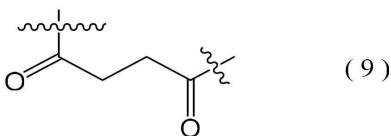


[0176]

식 (8) 에 있어서, Sp 는, 스페이서를 나타낸다.

[0178] 스페이서 (Sp) 로는, 예를 들어, 하기 식 (9) 에 나타내는 구조식을 갖는 것이 예시된다.

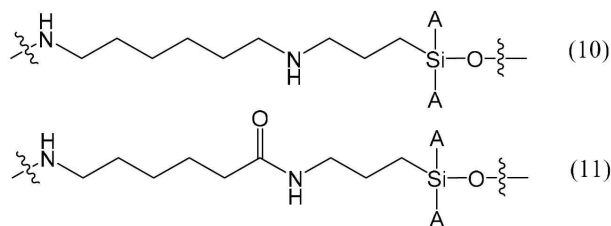
[0179] [화학식 14]



[0180]

[0181] Linker 는, 예를 들어, 하기 식 (10) 에 나타내는 구조여도 되고, 또는 식 (10) 의 구조에 있어서 헥사메틸렌아미노기 부분을 갖지 않는 구조로서, 아미노프로필기가 Si 에 결합한 구조여도 된다. 또는 Linker 는 하기 식 (11) 로 나타내는 구조여도 된다.

[0182] [화학식 15]



[0183]

(식 중,

[0185] A 는, 수산기, 알콕시기, 또는 알킬기 중 어느 것이어도 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.)

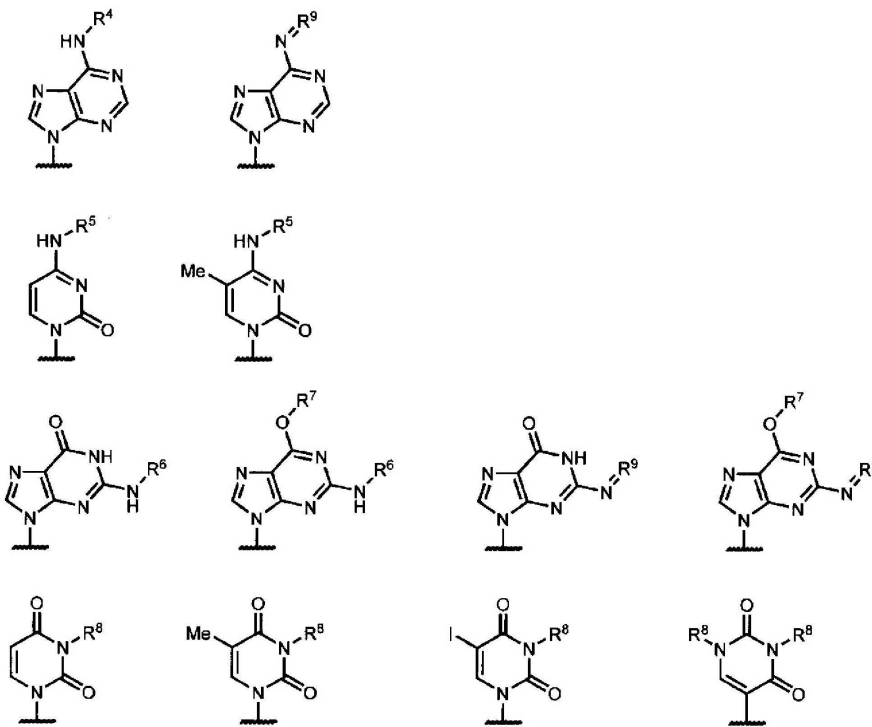
- [0186] Solid support 로는, 무기 다공질 담체나 유기계 수지 담체 등을 들 수 있다. 무기 다공질 담체에는, 예를 들어, Controlled Pore Glass (CPG) 를 들 수 있다. 유기계 수지 담체에는, 예를 들어, 폴리스티렌으로 이루어지는 담체를 들 수 있다.
- [0187] 본 발명에서 사용되는 핵산 분자 내에 포함되는 뉴클레오시드 (리보오스, 및 데옥시리보오스) 로는, DNA, RNA, 2'-O-MOE(2'-O-메톡시에틸), 2'-O-Me, 2'-F RNA, 및 상기의 LNA 가 예시되지만, 상기 뉴클레오시드는, 이들에 한정되지 않는다.
- [0188] 전술한 티올의 존재하에서 산 (예를 들어, 트리클로로아세트산) 에 의한 5' 말단의 수산기의 보호기의 탈보호 공정을 포함하는, 고상 합성법에 의한 올리고뉴클레오티드 (핵산 올리고머) 의 합성 방법은, 전형적으로는, 이하의 공정을 포함한다.
- [0189] (1) 고상 담체에 링커를 개재하여 결합하고 있는 수산기가 보호된 뉴클레오시드의 5' 위치의 수산기를 탈보호하는 공정,
- [0190] (2) 상기 공정에서 생성된 5' 위치의 수산기를 포스포아미다이트 화합물과 커플링 반응시켜 아인산트리에스테르 화합물을 얻는 공정,
- [0191] (3) 상기 공정에서 생성된 아인산트리에스테르를 산화시켜 인산트리에스테르로 변환하여 신장한 핵산 올리고머를 제조하는 공정, 혹은, 티오인산트리에스테르로 변환하는 임의의 공정,
- [0192] (4) 상기 공정 (1) ~ (3), 즉, 생성된 핵산 올리고머의 5' 위치의 수산기의 탈보호 공정, 5' 위치의 수산기와 아미다이트 화합물의 커플링 공정, 및 생성된 아인산트리에스테르의 산화 공정으로 구성되는 일련의 반응의 사이클을, 임의의 횟수 반복하여, 고상 담체 상에 핵산 올리고머를 합성하는 공정, 및
- [0193] (5) 공정 (4) 에서 생성된 고상 담체 상의 핵산 올리고머를, 절출 (切出) 및 탈보호하는 공정에 제공하고, 고상 담체로부터 유리시켜, 보호기가 제거된 핵산 올리고머를 제조하는 공정. 단, 상기 핵산 올리고머의 합성 방법에 있어서는, 공정 (2) 또는 (3) 에 이어서, 포스포아미다이트 화합물과의 커플링 반응이 진행되지 않았던 5' 위치의 수산기를 캡핑하는 공정을 포함하고 있어도 되고, 공정 (4) 를 구성하는 일련의 반응의 사이클 중 어느 공정 사이에 캡핑 공정이 부가되어 있어도 된다.
- [0194] 상기 (5) 의 공정은, 보다 구체적으로는, 공정 (4) 에서 생성된 고상 담체 상의 핵산 올리고머를, 이하의 공정 (5-1) 및 (5-2) 의 반응의 순서로 실시하고, 이어서 공정 (5-3) 의 반응에 제공함으로써 실시된다. 여기서 공정 (5-1) 의 반응의 실시는, 임의여도 되고, 공정 (5-2) 의 반응의 실시는, 일본 특허 제4705716호에 기재된 방법을 사용해도 된다. 그 결과, 고상 담체로부터 유리된 핵산 올리고머로부터 보호기가 제거된 핵산 올리고머, 혹은, 5' 말단의 수산기가 보호된 핵산 올리고머를 제조할 수 있다.
- [0195] (5-1) 핵산 올리고머의 5' 말단의 수산기의 보호기를 탈보호하는 반응,
- [0196] (5-2) 핵산 올리고머를 고상 담체로부터 잘출하여 유리시키는 반응, 및
- [0197] (5-3) 핵산 올리고머를 구성하는 리보오스의 2' 위치 혹은 3' 말단의 3' 위치의 수산기의 보호기를 탈보호하는 반응.
- [0198] 상기 공정 (1) 내지 (5) 의 스킴을 도 1 에 나타낸다. 도 1 에 나타내는 공정 (1) 또는 공정 (4) 에 있어서의 탈보호 반응이, 상기의 디클로로아세트산 및 티올 화합물을 사용하여 실시된다. 스킴 A 에 있어서의 화학식 중의 치환기의 정의는 상기 정의와 같다.
- [0199] 상기 식 (1) 의 핵산 올리고머는, 추가로 아미다이트법에 의해 뉴클레오티드형 또는 비뉴클레오티드형의 링커를 사용하여 임의의 사슬 길이만큼 신장하여, 상기 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 제조에 사용할 수 있다. 상기 식 (3) 의 고상 담체에 결합한 핵산 올리고머로부터 핵산 올리고머만을 절출하고, 또한 탈보호하여 상기 식 (5) 로 나타내는 핵산 올리고머를 얻을 수도 있다. 이하, 각 식 중의 치환기에 대해 더욱 상세하게 설명한다.
- [0200] B<sup>a</sup> 로 나타내는 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산 염기 및 B<sup>c</sup> 로 나타내는 핵산 염기는, 특별히 한정되지 않는다. 당해 핵산 염기로는, 아데닌, 시토신, 구아닌, 우라실, 티민, 5-메틸시토신, 슈도우라실, 및 1-메틸 슈도우라실 등을 들 수 있다. 또, 당해 핵산 염기는, 치환기에 의해 치환되어 있어도 된다. 그러한 치

환기로는, 예를 들어, 플루오르거나 클로르거나 브로모거나 요오드기와 같은 할로젠 원자, 아세틸기와 같은 아실기, 메틸기나 에틸기와 같은 알킬기, 벤질기와 같은 아릴알킬기, 메톡시기와 같은 알콕시기, 메톡시에틸기와 같은 알콕시알킬기, 시아노에틸기와 같은 시아노알킬기, 하이드록시기, 하이드록시알킬기, 아실옥시메틸기, 아미노기, 모노알킬아미노기, 디알킬아미노기, 카르복시기, 시아노기, 및 니트로기 등, 그리고 그들의 2 종류 이상의 치환기의 조합을 들 수 있다.

[0201] B<sup>a</sup> 로 나타내는 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산 염기의 보호기로는, 특별히 한정되지 않고, 공지된 핵산 화학에서 사용되는 보호기를 사용할 수 있고, 그러한 보호기로는, 예를 들어, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기, 4-메틸벤조일기, 아세틸기, 프로피오닐기, 부틸릴기, 이소부틸릴기, 페닐아세틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 및 (디메틸아미노)메틸렌기 등, 그리고 그들의 2 종류 이상의 보호기의 조합을 들 수 있다.

[0202] B<sup>a</sup> 는, 보다 구체적으로는,

[0203] [화학식 16]



[0204]

[0205] (상기 식 중,

[0206] R<sup>4</sup> 는, 수소 원자, 메틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0207] R<sup>5</sup> 는, 수소 원자, 아세틸기, 이소부틸릴기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0208] R<sup>6</sup> 은, 수소 원자, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 이소부틸릴기를 나타내고,

[0209] R<sup>7</sup> 은, 2-시아노에틸기를 나타내고,

[0210] R<sup>8</sup> 은, 수소 원자, 메틸기, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기 또는 4-메틸벤조일기를 나타내고, 그리고,

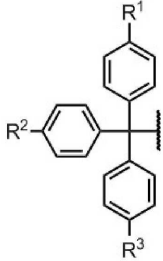
[0211] R<sup>9</sup> 는, 디메틸아미노메틸렌기를 나타낸다.)

[0212] 중 어느 것으로 나타내는 기를 나타낸다.

[0213] B<sup>c</sup> 로는, 보다 구체적으로는, 상기 B<sup>a</sup> 의 구체예로부터 보호기를 제거한 기를 들 수 있다.

[0214] 도 1 중의 G<sup>1</sup> 및 G<sup>5</sup> (본 명세서에 기재하는 식 (I) 중에 정의되는 G<sup>1</sup> 에 상당) 은, 바람직하게는, 이하의 기이다.

[0215] [화학식 17]



[0216]

[0217] (식 중,

[0218] R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup> 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자 또는 알콕시기를 나타낸다.)

[0219] R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup> 은, 1 개가 수소 원자이고, 나머지 2 개가 동일 또는 상이한 (동일이 바람직하다) 알콕시인 것이 바람직하고, 알콕시기로는 메톡시가 특히 바람직하다. 보다 바람직하게는, G<sup>5</sup> 는, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기) 이다.

[0220] G<sup>2</sup> 로는, 수산기의 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별히 제한 없이 사용할 수 있고, 아마다이트 화합물에서 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다. G<sup>2</sup> 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.

[0221] G<sup>2</sup> 는, 바람직하게는, 전자 구인기 (E<sub>w</sub>) 로 치환된 알킬기이다. 당해 전자 구인기로는, 예를 들어, 시아노기, 니트로기, 알킬술폰닐기, 할로젠 원자, 아릴술폰닐기, 트리할로메틸기, 및 트리알킬아미노기 등을 들 수 있고, 바람직하게는 시아노기이다.

[0222] G<sup>2</sup> 로는, 특히 바람직한 것은, 이하의 기이다.

[0223] [화학식 18]



[0224]

[0225] 상기 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> 및 G<sup>2</sup> 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, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, n-펜틸기, 이소펜틸기, 및 헥실기를 들 수 있다. 상기 치환기의 정의에 있어서의 알콕시기를 구성하는 알킬기 부분은, 여기서의 알킬기의 정의와 동일한 정의를 갖는다.

[0226] 또, 본 발명의 방법에 있어서, 아마다이트 화합물은, 프리의 상태 또는 염의 상태로 사용할 수 있다. 아마다이트 화합물의 염으로는, 염기 부가염 또는 산 부가염을 들 수 있지만, 특별히 제한되지 않는다. 염기 부가염으로는, 구체적으로는, 나트륨염, 마그네슘염, 칼륨염, 칼슘염, 알루미늄염 등의 무기 염기와 염 ; 메틸아민, 에틸아민, 에탄올아민 등의 유기 염기와 염 ; 리신, 오르니틴, 아르기닌 등의 염기성 아미노산과의 염 ; 및 암모늄염을 들 수 있다. 산 부가염으로는, 구체적으로는, 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산,

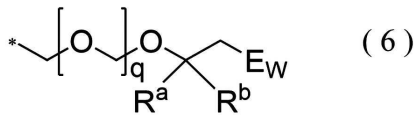
질산, 인산 등의 광산 ; 포름산, 아세트산, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 말산, 타르타르산, 푸마르산, 숙신산, 락트산, 말레산, 시트르산, 메탄술폰산, 트리플루오로메탄술폰산, 에탄술폰산 등의 유기산 ; 및 아스파르트산, 글루탐산 등의 산성 아미노산과의 산 부가염을 들 수 있다. 아미다이트 화합물에는, 염, 수화물, 용매화물, 및 결정 다형 등의 형태도 포함된다.

[0227] R 은, 바람직하게는, 보호된 수산기를 나타낸다. R 이 보호된 수산기를 나타낼 때의 보호기, 또는 V 로 나타내는 수산기의 보호기는, 아미다이트법에 있어서 사용할 수 있는 것이면 되고, 예를 들어, 2'-tert-부틸디메틸실릴 (TBS) 기, 2'-비스(2-아세톡시에톡시)메틸 (ACE) 기, 2'-(트리이소프로필실록시)메틸 (TOM) 기, 2'-(2-시아노에톡시)에틸 (CEE) 기, 2'-(2-시아노에톡시)메틸 (CEM) 기 (국제공개 제2006/022323호에 기재), 2'-파라-톨루일술폰포일에톡시메틸 (TEM) 기, 2'-EMM 기 (국제공개 제2013/027843 호에 기재), 및 2'-PMM 기 (국제공개 제2019/208571호에 기재) 를 사용할 수 있다. V 는, 바람직하게는, 2'-tert-부틸디메틸실릴 (TBS) 기이다.

또, 본 발명의 방법에서 제조되는 핵산 분자가 리보 핵산 (RNA) 인 경우 등, 핵산 분자 내에 리보오스가 포함되는 경우, 그 리보오스의 2' 위치의 수산기의 보호기로서, 상기 식 (6) 으로 나타내는 보호기가 바람직한 보호기로서 예시된다. 더욱 바람직하게는, E<sub>w</sub> 로 나타내는 전자 구인기로서 시아노기를 갖는 식 (12) 로 나타내는 보호기가 예시된다.

[0228] 식 (6) :

[0229] [화학식 19]



[0230]

[0231] (식 중,

[0232] q 는, 0 ~ 5 중 어느 정수를 나타내고,

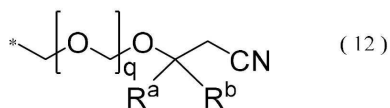
[0233] R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 메틸기, 에틸기 또는 수소 원자를 나타내고,

[0234] \* 표시는, 리보오스의 2' 위치의 수산기 유래의 산소 원자와의 결합점을 나타내고, 그리고,

[0235] E<sub>w</sub> 는, 전자 구인기를 나타낸다.).

[0236] 식 (12) :

[0237] [화학식 20]



[0238]

[0239] (식 중,

[0240] q, R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 는, 상기 식 (6) 에 있어서의 정의와 동일한 의미이다.).

[0241] 더욱 바람직하게는, 식 (12) 로 나타내는 기에 있어서, q 가 1 이고, R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 가 동시에 수소 원자인 기, 및 q 가 1 이고, R<sup>a</sup> 혹은 R<sup>b</sup> 중 어느 일방이 메틸기이고, 다른 일방이 수소 원자인 기가 예시된다.

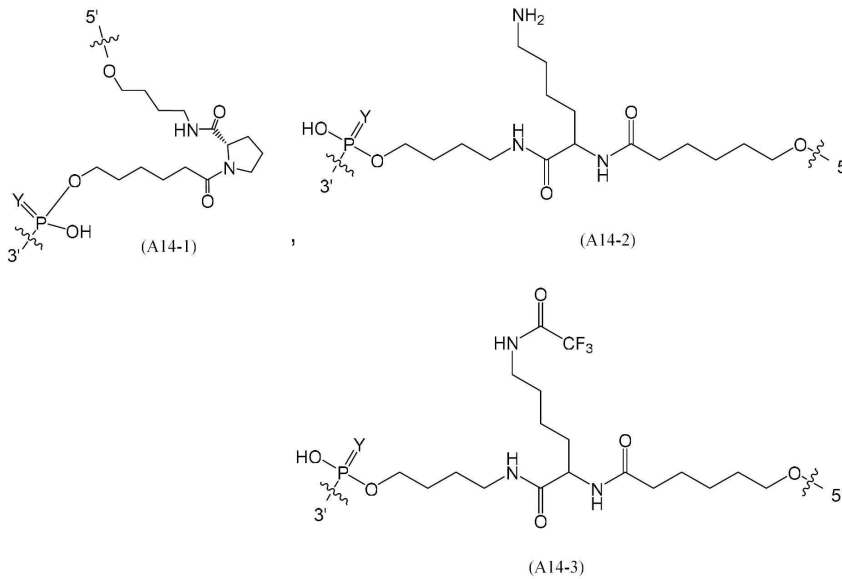
[0242] 식 (6) (식 (12) 를 포함한다) 으로 나타내는 보호기는, 예를 들어 국제공개 제2013/027843호 및 국제공개 제2019/208571호의 기재에 따라서 합성할 수 있고, 이러한 보호기를 갖는 아미다이트 화합물을 핵산 화합물의 제조에 사용할 수 있다.

[0243] 핵산의 신장 반응에는, 도 1 의 스킴 A 에 기재된 식 (13) 으로 나타내는 아미다이트 화합물이 사용된다.

[0244] 비뉴클레오티드 링커로는, 아미노산 골격으로 이루어지는 링커 (예를 들어, 국제공개 2006/022323호 또는 국제공개 2013/027843호에 기재된 아미노산 골격으로 이루어지는 링커) 가 예시된다. 구체적으로는, 비한정적인 예로서 예를 들어, 식 (A14-1) 혹은 (A14-2) 혹은 (A14-3) (예를 들어, 국제공개 제2019/074110호에 기재) 으

로 나타내는 링커가 예시된다. 이들 링커 이외에 국제공개 제2012/005368호, 국제공개 제2018/182008호 또는 국제공개 제2019/074110호에 기재된 링커가 예시된다.

[0245] [화학식 21]



[0246]

[0247] (식 중, Y 는, 상기와 동일하다.)

[0248] 식 (13) 에 있어서의 R 기 및 식 (5) 에 있어서의 R' 기가, 수산기 이외의 치환기인 뉴클레오타이드 및 아미다이트는, 일본 특허 제3745226호 등에 기재된 공지된 방법, 국제공개 제2001/053528호 혹은 일본 공개특허공보 2014-221817호 및 그것들에 인용되는 공지된 방법으로 합성되는 뉴클레오시드로부터 제조할 수도 있고, 나아가서는, 시판품으로서 입수 가능한 것을 사용하여, 후술하는 실시예에 기재된 방법에 준거하여 또는 이들의 방법으로 적절히 변경을 가한 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0249] G<sup>4</sup> 는, 수소 원자, 알칼리 금속 이온, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타낸다. 알칼리 금속 이온으로는, 예를 들어, 나트륨 이온, 및 리튬 이온을 들 수 있다. 또, 알킬암모늄 이온으로서, 구체적인 알킬기의 예로는, 예를 들어, 메틸기, 에틸기, n-프로필기, 이소프로필기, n-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, n-펜틸기, 이소펜틸기, 및 헥실기를 들 수 있지만, 보다 구체적으로는, 예를 들어, 디에틸암모늄 이온, 트리에틸암모늄 이온, 테트라부틸암모늄 이온, 헥실암모늄 이온, 및 디부틸암모늄 이온 등을 들 수 있다. 또, 하이드록시알킬암모늄 이온으로서, 구체적인 하이드록시알킬 부분의 예로는, 예를 들어, 하이드록시메틸, 하이드록시에틸, 하이드록시-n-프로필, 하이드록시이소프로필, 하이드록시-n-부틸, 및 트리스하이드록시메틸을 들 수 있지만, 보다 구체적인 하이드록시알킬암모늄 이온의 예로는, 트리스하이드록시메틸암모늄 이온 등을 들 수 있다. G<sup>4</sup> 는, 바람직하게는, 수소 원자를 나타낸다.

[0250] G<sup>5</sup> 는, 수소 원자, 또는 상기 수산기의 보호기를 나타내고, 보호기를 나타내는 경우에는 G<sup>1</sup> 도 동일한 보호기를 나타낸다. G<sup>5</sup> 는 탈보호된 경우에는 수소 원자이지만, 그 경우의 뉴클레오타이드 화합물도 또한, 일련의 핵산 신장 반응의 공정에 제공된다.

[0251] Y 는, 바람직하게는, 산소 원자이다.

[0252] W<sub>1</sub> 및 X<sub>1</sub> 은, 바람직하게는, W<sub>1</sub> 이 OZ 기를 나타내고, 또한, X<sub>1</sub> 이 R 기를 나타낸다.

[0253] W<sub>2</sub> 및 X<sub>2</sub> 는, 바람직하게는, W<sub>2</sub> 가 수산기를 나타내고, 또한, X<sub>2</sub> 가 R 기를 나타낸다.

[0254] W<sub>3</sub> 및 X<sub>3</sub> 은, 바람직하게는 각각, 각각 독립적으로, 수산기를 나타낸다.

[0255] R' 는, 바람직하게는, 수산기이다.

[0256] 상기 공정 (1) 내지 (5) 의 아미다이트법에 의한 핵산 올리고머의 합성은, 도 1 의 스킴 중의 공정 (1) 또는 공

정 (5) 에 있어서의, 본 발명에 관련되는 탈보호 공정 이외에는, 일반적으로 공지된 방법 (예를 들어, 상기의 일본 특허 제5157168호 또는 일본 특허 제5554881호에 기재된 방법) 에 따라서, 핵산 신장 반응을 실시할 수 있다. 이하, 각 공정에 대해 설명한다.

[0257] (핵산 신장 반응)

[0258] 본 명세서에 있어서, 「핵산 신장 반응」 이란, 포스포디에스테르 결합을 개재하여, 뉴클레오티드를 순차 결합 시킴으로써, 올리고뉴클레오티드를 신장시키는 반응을 의미한다. 핵산 신장 반응은, 일반적인 포스포아미다이트법의 순서에 따라 실시할 수 있다. 핵산 신장 반응은, 포스포아미다이트법을 채용하는 핵산 자동 합성 장치 등을 사용하여 실시해도 된다.

[0259] 핵산 분자의 사슬 길이 (N) 는, 예를 들어, 20 mer 이상 (즉,  $n \geq 19$ ), 40 mer 이상 (즉,  $n \geq 39$ ), 50 mer 이상 (즉,  $n \geq 49$ ), 60 mer 이상 (즉,  $n \geq 59$ ), 80 mer 이상 (즉,  $n \geq 79$ ), 100 mer 이상 (즉,  $n \geq 99$ ), 200 mer 이상 (즉,  $n \geq 199$ ), 2 ~ 300 mer (즉,  $1 \leq n \leq 299$ ), 2 ~ 250 mer (즉,  $1 \leq n \leq 249$ ), 2 ~ 200 mer (즉,  $1 \leq n \leq 199$ ), 10 ~ 300 mer (즉,  $9 \leq n \leq 299$ ), 10 ~ 250 mer (즉,  $9 \leq n \leq 249$ ), 10 ~ 200 mer (즉,  $9 \leq n \leq 199$ ), 10 ~ 150 mer (즉,  $9 \leq n \leq 149$ ), 15 ~ 300 mer (즉,  $14 \leq n \leq 299$ ), 15 ~ 250 mer (즉,  $14 \leq n \leq 249$ ), 15 ~ 200 mer (즉,  $14 \leq n \leq 199$ ), 15 ~ 150 mer (즉,  $14 \leq n \leq 149$ ), 15 ~ 110 mer (즉,  $14 \leq n \leq 109$ ) 이어도 된다.

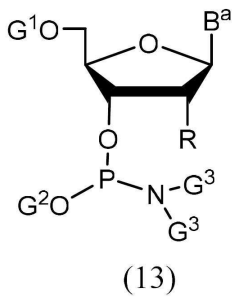
[0260] 공정 (1) 의 탈보호 공정은, 고상 담체 상에 담지된 올리고뉴클레오티드 사슬 말단의 5' 수산기의 보호기를 탈보호하는 공정이다. 일반적인 보호기로는, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기) 나 4-모노메톡시트리틸기, 4,4',4"-트리메톡시트리틸기가 사용된다. 탈보호는, 산을 사용하여 실시할 수 있다. 탈보호용의 산으로는, 예를 들어, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리클로로아세트산, 메탄술폰산, 염산, 아세트산, 및 p-톨루엔술폰산 등을 들 수 있다.

[0261] 공정 (2) 의 축합 공정은, 상기 탈보호 공정에 의해 탈보호한 올리고뉴클레오티드 사슬 말단의 5' 수산기에 대해, 도 1 의 스킴 A 에 기재된 하기 식 (13) 으로 나타내는 뉴클레오시드포스포아미다이트를 결합시키는 반응이다. 또한, 핵산 신장에 사용하는 포스포아미다이트로는, 식 (13), 국제공개 2013/027843호의 실시예 2 에 기재된 우리던 EMM 아미다이트, 실시예 3 에 기재된 시티던 EMM 아미다이트, 실시예 4 에 기재된 아데노신 EMM 아미다이트, 및 실시예 5 에 기재된 구아노신 EMM 아미다이트, 국제공개 제2019/208571호 기재된 우리던 PMM 아미다이트, 시티던 PMM 아미다이트, 아데노신 PMM 아미다이트, 및 구아노신 PMM 아미다이트가 예시된다. 또, 그 밖에 사용 가능한 포스포아미다이트로서, 2'-OMe, 2'-F, 2'-O-tert-부틸디메틸실릴기, 2'-O-메톡시에틸기, 2'-비스(2-아세톡시에톡시)메틸 (ACE) 기, 2'-(트리이소프로필실록시)메틸 (TOM) 기, 2'-(2-시아노에톡시)에틸 (CEE) 기, 2'-(2-시아노에톡시)메틸 (CEM) 기, 2'-파라-톨루일술폰닐에톡시메틸 (TEM) 기, 2'-H, 및 2'-플루오로-2'-데옥시-β-D-아라비노푸라노실기 등을 들 수 있다. 상기 뉴클레오시드포스포아미다이트로는, 5' 수산기가 보호기 (예, DMTr 기) 로 보호된 것을 사용한다. 축합 공정은, 상기 뉴클레오시드포스포아미다이트를 활성화하는 활성화제 또는 축합제를 사용하여 실시할 수 있다. 활성화제 또는 축합제로는, 예를 들어, 5-벤질티오-1H-테트라졸 (BTT) (5-벤질메르캅토-1H-테트라졸이라고도 칭한다), 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.

[0262] 도 1 의 스킴 A 에 기재된 식 (13) 으로 나타내는 뉴클레오시드포스포아미다이트 (이하, 아미다이트라고 호칭한다) 란, 이하와 같다.

[0263] 식 :

[0264] [화학식 22]



[0265]

[0266] (식 중,

[0267]  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $B^a$ , 및  $R$  은, 상기와 같다.) 으로 나타내는 화합물.

[0268] 축합 공정 후에는, 적절히, 미반응의 5' 수산기를 캡핑해도 된다. 캡핑은, 무수 아세트산-테트라하이드로푸란 용액, 또는 페녹시아세트산 무수물/N-메틸이미다졸 용액 등의 공지된 캡핑 용액을 사용하여 실시할 수 있다.

[0269] 공정 (3) 의 산화 공정은, 상기 축합 공정에 의해 형성된 아인산기를 인산기 또는 티오인산기로 변환하는 공정이다. 본 공정은, 3 개의 인으로부터 5 개의 인에 산화제를 사용하여 변환하는 반응이고, 고상 담체에 담지되어 있는 올리고 핵산 유도체에 산화제를 반응시킴으로써 실시할 수 있다.

[0270] 아인산기를 인산기로 변환하는 경우에는, 「산화제」 로서, 예를 들어, 요오드를 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.005 ~ 2 M 의 농도가 되도록 조절하여 사용할 수 있다. 산화의 산소원으로는 물을 사용할 수 있고, 반응을 진행시키는 염기로는 피리딘, N-메틸이미다졸 (NMI), N-메틸모르폴린, 또는 트리에틸아민 등을 사용할 수 있다. 또, 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 아세트니트릴, 테트라하이드로푸란 (THF) 또는 이들 임의의 비율의 혼합 용매를 들 수 있다. 예를 들어, 요오드/물/피리딘/아세트니트릴, 혹은 요오드/물/피리딘 혹은 요오드/물/피리딘/NMI, 혹은 요오드/물/피리딘/THF 를 사용할 수 있다. 반응 온도는, 5 °C ~ 50 °C 가 바람직하다. 반응 시간은, 통상적으로 1 분 ~ 30 분이 적당하다. 사용하는 시약의 양은 고상 담체에 담지되어 있는 화합물 1 mol 에 대하여 1 ~ 100 mol 이 바람직하고, 보다 바람직하게는 1 ~ 10 mol 이다.

[0271] 아인산트리에스테르기를 티오인산트리에스테르기로 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), 및 페닐아세틸디술파이드 (PADS) 를 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.001 ~ 2 M 의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용할 수 있다. 반응에 사용하는 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 디클로로메탄, 아세트니트릴, 피리딘 또는 이들 임의의 비율의 혼합 용매를 들 수 있다. 산화 공정은, 상기 캡핑 조작 후에 실시해도 되고, 반대로, 산화 공정 후에 캡핑 조작을 실시해도 되고, 이 순서는 한정되지 않는다.

[0272] 공정 (5-1) 에 있어서, 신장의 마지막에 도입한 뉴클레오타이드의 5' 위치의 수산기의 보호기는, 후술하는 고상 담체로부터의 절출 및 보호기의 탈보호 후, 5' 위치의 수산기의 보호기를 태그로 하는 칼럼 정제를 위해서 사용해도 되고, 칼럼 정제 후, 5' 위치의 수산기의 보호기를 탈보호해도 된다.

[0273] 공정 (5-2) 에 있어서, 인산 보호기를 탈보호하는 공정은, 원하는 서열을 갖는 핵산의 합성이 완료된 후에는, 인산 부분의 보호기를 탈보호하기 위해서 아민 화합물을 작용시킨다. 아민 화합물로는, 예를 들어, 일본 특허 제4705716호에 기재되는 디에틸아민 등을 들 수 있다.

[0274] 공정 (5-2) 에 있어서의, 고상 담체 상에서 원하는 사슬 길이로 신장한 핵산 분자의, 고상 담체로부터의 절출은, 통상적으로, 절출체로서 농암모니아수를 사용하여 실시된다.

[0275] 또한 암모니아 또는 아민 화합물 등을 사용하여, 예를 들어, 고상 담체로부터 올리고뉴클레오타이드 사슬을 절단하여 회수한다. 아민 화합물로는, 예를 들어, 메틸아민, 에틸아민, 이소프로필아민, 에틸렌디아민, 또는 디에틸아민 등을 들 수 있다.

- [0276] 공정 (5-3) 에 있어서, 공정 (5-2) 에 있어서 고상 담체로부터 절출된 핵산 올리고머 (4) 의 리보오스의 2' 위치 혹은 3' 위치의 수산기의 보호기는, 국제공개 제2006/022323호, 국제공개 제2013/027843호, 또는 국제공개 제2019/208571호에 기재된 방법에 따라서 제거할 수 있어, 탈보호한 핵산 분자 (5) 를 얻을 수 있다.
- [0277] 본 발명의 제조 방법을 사용하여 제조 가능한 핵산 올리고머 (올리고뉴클레오티드) 로는, 핵산 올리고머 내에 포함되는 뉴클레오시드가, RNA, DNA, 그리고 2'-O-MOE, 2'-O-Me, 2'-F 를 갖는 RNA, 및 LNA 인 핵산 분자를 들 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 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. 바람직하게는, 본 발명의 방법으로 제조되는 핵산 올리고머는 리보 핵산 (RNA) 이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 방법으로 제조되는 핵산 올리고머가 리보 핵산 (RNA) 이고, 그 리보오스의 2' 위치의 수산기의 보호기가 식 (6) 으로 나타내는 보호기인, 핵산 올리고머를 들 수 있다.
- [0278] 본 발명의 제조 방법을 사용함으로써, 하나의 양태로서, 올리고뉴클레오티드 중의 뉴클레오티드 결손체 (N-1 mer 이라고도 기재한다) 의 함유량이 저감된 올리고뉴클레오티드를 제조할 수 있다.
- [0279] 여기서, 올리고뉴클레오티드에 있어서, 올리고뉴클레오티드 중의 완전 사슬 길이체 (FLP (Full Length Product)) 에 대한 N-1 mer 의 함유량, 즉, 올리고뉴클레오티드 중의 완전 사슬 길이체 (FLP) 의 함량을 100 % 로 했을 때의, N-1 mer 의 함유량 (%) 을 「N-1 mer 함유량비」 로 정의한다.
- [0280] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비로는, 구체적으로는, 5.8 % 미만, 5.7 % 이하, 5.5 % 이하, 5 % 이하, 4.5 % 이하, 4 % 이하, 3.5 % 이하, 3 % 이하, 2.5 % 이하, 2.3 % 이하, 2.3 %, 2.1 % 이하, 2.1 % 가 예시되고, 또, 0 % 초과, 0.001 % 이상, 0.01 % 이상, 0.1 % 이상이 예시되지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0281] 구체적인 올리고뉴클레오티드로는, 구체적으로는 이하의 것이 예시되지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0282] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.8 % 미만인, 올리고뉴클레오티드.
- [0283] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.7 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0284] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0285] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0286] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 4.5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0287] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 4 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0288] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 3.5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0289] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 3 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0290] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 2.5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0291] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 2.3 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0292] 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 2.1 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0293] 올리고뉴클레오티드의 사슬 길이가 50 mer 이상이고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.8 % 미만인, 올리고뉴클레오티드.
- [0294] 올리고뉴클레오티드의 사슬 길이가 50 mer 이상이고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.7 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0295] 올리고뉴클레오티드의 사슬 길이가 50 mer 이상이고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5.5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0296] 올리고뉴클레오티드의 사슬 길이가 50 mer 이상이고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.
- [0297] 올리고뉴클레오티드의 사슬 길이가 50 mer 이상이고, 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer 의 함유량비가 4.5 % 이하인, 올리고뉴클레오티드.





- [0340] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 5 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0341] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 4.5 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0342] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 4 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0343] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 3.5 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0344] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 3 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0345] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 2.5 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0346] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 2.3 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0347] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이가 100 mer 이상 300 mer 이하이고, 올리고뉴클레오타이드 중의 N-1 mer 의 함유량이 2.1 % 이하인, 올리고뉴클레오타이드.
- [0348] 본 발명의 제조 방법에 있어서 사용 가능한 핵산 분자의 전형적인 예를, 실시예에 기재된 예에 더하여 하기의 예를 나타내지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0349] 이하, 서열의 설명 중, U 는 우리딘을, C 는 시티딘을, A 는 아데노신을, 또 G 는 구아노신을 나타낸다.
- [0350] 국제공개 제2019/060442호에 기재되어 있는, 하기의 서열 (A) 및 (B) 를 갖는 핵산 분자를 들 수 있다.
- [0351] 서열 (A) : 5'-AUGGAAUmACUCUUGGUUmAcdTdT-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-ATGGAATmACTCTTGGTTmACdTdT-3' (ST.26 형식에 준한다)) (Antisense) (서열 번호 1) 21 mer
- [0352] 서열 (B) : 5'-GUmAACmCmAAGAGUmAUmUmCmCmAUmdTdT-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-GTmAACmCmAAGAGTmATmTmCmCmA TmdTdT-3' (ST.26 형식에 준한다)) (Sense) (서열 번호 2) 21 mer
- [0353] 서열 (A) 및 (B) 중, Um 은 2'-O-메틸우리딘 (ST.25 형식) 을, Tm 은 2'-O-메틸우리딘 (ST.26 형식) 을, Cm 은 2'-O-메틸시티딘을, 또 dT 는 티미딘을 나타낸다. 본 명세서 중, 특별히 언급하지 않는 한, 서열에 있어서 의 약호는 ST.25 형식 및 ST.26 형식의 양방에 적용한다.
- [0354] Daniel O'Reilly 들 저, Nucleic Acids Research, 2019, Vol.47, No.2, 546-558 에 기재되어 있는 핵산 분자 (553 페이지 참조) 를 들 수 있다. 전형예로서, 하기의 서열 (C) 를 갖는 핵산 분자를 들 수 있다.
- [0355] 서열 (C) : 5'-AGAGCCAGCCUUCUUAUUGUUUAGAGCUAUGCUGU-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-AGAGCCAGCCTTCTATTGTTTTAGAGCTATGCTGT-3' (ST.26 형식에 준한다)) (서열 번호 3) 36 mer
- [0356] Nucleic Acids Research, 2019, Vol.47, No.2 : 547 에 기재되어 있는, 하기의 서열 (D) 를 갖는 핵산 분자를 들 수 있다.
- [0357] 서열 (D) : 5'-ACAGCAUAGCAAGUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-ACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTATCAACTGAAAAAGTGGCACCAGTCCGGTGCT-3' (ST.26 형식에 준한다)) (서열 번호 4) 67 mer
- [0358] 일본 공표특허공보 2015-523856호, 173페이지에 기재되어 있는, 하기의 서열 (E) 를 갖는 핵산 분자를 들 수 있다.
- [0359] 서열 (E) : 5'-GUUUUCCUUUUCAAAGAAAUCUCCUGGGCACCUAUUCUUCUAGGUGCCUCCUUGUUUAAACCGACCAGUUAACCGGCUGGUUAGGUUUUU-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-GTTTTCCCTTTTCAAAGAAATCTCCTGGGCACCTATCTTCTTAGGTGCCCTCCCTTGTTTAAACCTGACCAGTTAACCGGCTGGTTAGGTTTT-3'

(ST.26 형식에 준한다)) (서열 번호 5) 94 mer

[0360] 일본 공표특허공보 2017-537626호에 기재되어 있는 핵산 분자를 들 수 있다. 전형예로서, 하기의 서열 (F), (G), (H), 및 (J) 를 갖는 핵산 분자를 들 수 있다.

[0361] 서열 (F) : 5'-  
AGUCCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-  
3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-  
AGTCCTCATCTCCCTCAAGCGTTTTAGAGCTAGTAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT-  
3' (ST.26 형식에 준한다)) (서열 번호 6) 100 mer

[0362] 서열 (G) : 5'-  
GCAGAUGUAGUGUUUCCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG  
GUGCUUUUUU-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-  
GCAGATGTAGTGTTCACAGTTAAGAGCTATGCTGGAACAGCATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG  
GTGCTTTTTTT-3' (ST.26 형식에 준한다)) (서열 번호 7) 113 mer

[0363] 서열 (H) : 5'-  
dAdGdTdCdCdTdCdAdTdCdCdCdTdCdCdAdAdGdCGUUUAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU  
GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-  
dAdGdTdCdCdTdCdAdTdCdCdCdTdCdCdAdAdGdCGTTAAGAGCTATGCTGGTAACAGCATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTT  
GAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT-3' (ST.26 형식에 준한다)) (서열 번호 8) 113 mer

[0364] 서열 (H) 중, dT 는 티미딘을, dC 는 2'-데옥시시티딘을, dA 는 2'-데옥시아데노신을, 또 dG 는 2'-데옥시구아노신을 나타낸다.

[0365] 서열 (J) : 5'-  
AmsGmsUmsCCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC  
GAGUCGGUGCUUUUmsUmsUmsU-3' (ST.25 형식에 준한다) (5'-  
AmsGmsTmsCCTCATCTCCCTCAAGCGTTAAGAGCTATGCTGGTAACAGCATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACC  
GAGTCGGTGCTTTTmsTmsTmsT-3' (ST.26 형식에 준한다)) (서열 번호 9) 113 mer

[0366] 서열 (J) 중, Um 은 2'-O-메틸우리딘 (ST.25 형식) 을, Tm 은 2'-O-메틸우리딘 (ST.26 형식) 을, Am 은 2'-O-메틸아데노신을, Gm 은 2'-O-메틸구아노신을, 또 s 는 포스포로티오에이트 수식을 나타낸다.

[0367] 실시예

[0368] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0369] 측정 방법

[0370] 먼저, 이하의 시험에서 사용한 각종 측정 방법을 이하에 나타낸다.

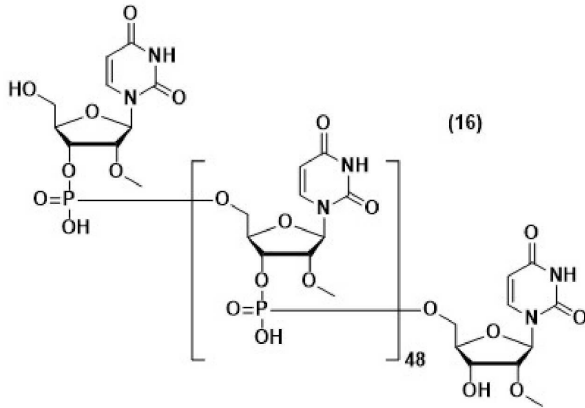
[0371] (측정 방법 1 : 올리고뉴클레오티드 중의 FLP 순도 및 N-1 mer 함량의 측정)

[0372] 올리고뉴클레오티드 순도는, HPLC 를 사용하여 측정하였다. FLP 란, 완전 사슬 길이인 목적 물질 (Full Length Product) 을 의미한다.

[0373] HPLC 측정 조건을 하기 표 1 에 나타낸다.



[0385] [화학식 23]



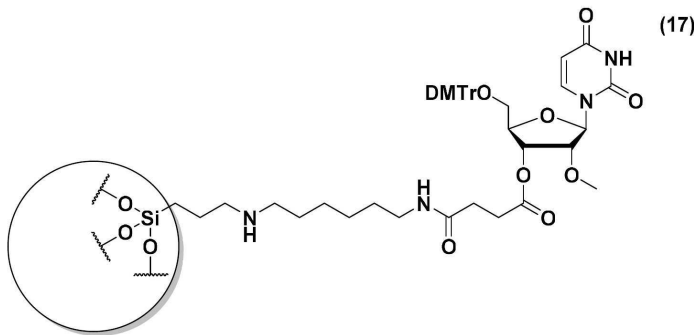
[0386]

[0387] 고상 담체로서, Controlled Pore Glass (CPG) 를 사용하고, 핵산 합성기로서 NTS M-4MX-E (일본 테크노 서비스 사 제조) 를 사용하여, 포스포아미다이트 고상 합성법에 의해, 상기 서열 (I) 로 이루어지는 올리고뉴클레오티드를 3' 측으로부터 5' 측을 향하여 합성하였다. 합성은, 약 1  $\mu\text{mol}$  스케일로 실시하였다. 또, 합성에는, 식 (18) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 사용하고, 디블로킹 용액으로서 고순도 디클로로아세트산톨루엔 용액을 사용하고, 축합제로서 5-벤질티오-1H-테트라졸 용액을 사용하고, 산화제로서 요오드 용액을 사용하고, 캡핑 용액으로서 페녹시아세트산 무수물 용액과 N-메틸이미다졸 용액을 사용하였다.

[0388] 다음으로, 본 발명의 제법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드의 구체적인 제조예를 나타낸다. 여기서, 하기의 실시예에 있어서 본 발명의 제법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드는, 상기 서열 번호 10 으로 나타내는 서열 (I) 을 갖는 올리고뉴클레오티드이다.

[0389] 또, 이하의 실시예 및 비교예 중에 기재하는 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 는, 하기 식 (17) 에 나타내는 화합물을 의미한다. 단, 식 (17) 에 있어서 도시된 쉼표는, CPG 를 모식적으로 나타내는 것이다.

[0390] [화학식 24]



[0391]

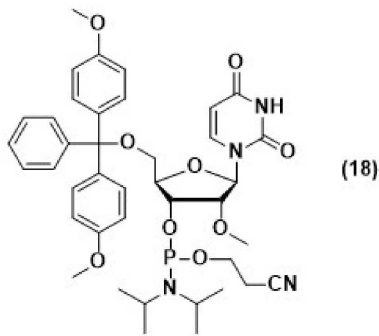
[0392] 실시예 1

[0393] 1.01  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 Controlled Pore Glass (CPG) 와, 식 (18) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 NTS M-4MX-E (일본 테크노 서비스사 제조) 에 의해, 3' 측으로부터 5' 측을 향하여 자동 합성하였다. 자동 합성의 순서는, 먼저, 디블로킹 용액 (1-도데칸티올 : 디클로로아세트산 : 톨루엔 = 0.5 : 3.0 : 96.5) 을 CPG 에 송액하고, 5' 위치의 트리틸 보호기를 탈보호하였다. 계속해서, 2'-OMe-U 아미다이트와 축합제로서 5-벤질메르캅토-1H-테트라졸을 CPG 에 송액하고, 5' 위치의 수산기에 커플링 반응을 진행시켰다. 계속해서, 50 mM 요오드를 포함하는 산화 용액을 송액하고, 아인산기를 인산기로 변환하였다. 계속해서, 캡핑 용액으로서 0.1 M 페녹시아세트산 무수물 아세토니트릴 용액과 10 % N-메틸이미다졸/10 % 2,6-루티딘아세트니트릴 용액을 사용하여, 커플링이 진행하지 않았던 반응점에 캡핑을 실시하였다. 또한 이들 공정을 합계 49 회 반복한 후, 5' 말단의 염기에 있어서의 보호기 (DMTr 기) 를 디블로킹 용액 (1-도데칸티올/디클로로아세트산/톨루엔 = 0.5/3.0/96.5) 으로 탈보호하고, 서열 (I) 에 나타내는 서열의 올리고뉴클레오티드를 CPG 담체 상에 합성하였다. 그 후에, 1.01  $\mu\text{mol}$  분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체에 대해, 28 % 암모니아수 750  $\mu\text{L}$  과 에탄올 250  $\mu\text{L}$  를 유입하고, 혼합물

을 40 °C 에서 4 시간 보온함으로써 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시켰다. 그 후, 고상 담체를 여과에 의해 제거하고, 감압 건조에 의해 암모니아수와 에탄올을 제거하여, 원하는 올리고뉴클레오타이드를 건조체로서 얻었다. 얻어진 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정된 결과, N-1 mer 의 함량은 1.5 % 이고, FLP 의 순도는 71.3 % 였다. 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정된 결과, 수량은 12.6 mg 이고, 1.00 μmol 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 당의 수량으로 환산하면 12.5 mg 이었다. 결과를 표 2 에 나타낸다.

[0394] 식 (18) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트는, 이하의 구조이다.

[0395] [화학식 25]



[0396]

[0397] 실시예 2

[0398] 실시예 1 의 방법에 있어서, 디블로킹 용액으로서, 시클로헥산티올/디클로로아세트산/톨루엔 = 0.5/3.0/96.5 를 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오타이드를 얻었다. 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정된 결과, N-1 mer 의 함량은 1.6 % 이고, FLP 의 순도는 70.4 % 였다. 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정된 결과, 수량은 12.6 mg 이고, 1.00 μmol 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 당의 수량으로 환산하면 12.5 mg 이었다. 결과를 표 2 에 나타낸다.

[0399] 비교예 1

[0400] 실시예 1 의 방법에 있어서, 1.00 μmol 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 와, 디블로킹 용액으로서, 디클로로아세트산/톨루엔 = 3.0/97.0 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오타이드를 얻었다. 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정된 결과, N-1 mer 의 함량은 4.9 % 이고, FLP 의 순도는 62.8 % 였다. 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정된 결과, 수량은 12.2 mg 이었다. 결과를 표 2 에 나타낸다.

[0401] 비교예 2

[0402] 실시예 1 의 방법에 있어서, 0.96 μmol 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 와, 디블로킹 용액으로서, 트리에틸실란/디클로로아세트산/톨루엔 = 3.0/3.0/94.0 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오타이드를 얻었다. 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정된 결과, N-1 mer 의 함량은 3.8 % 이고, FLP 의 순도는 65.7 % 였다. 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정된 결과, 수량은 11.7 mg 이고, 1.00 μmol 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 당의 수량으로 환산하면 12.2 mg 이었다. 결과를 표 2 에 나타낸다.

[0403] 비교예 3

[0404] 실시예 1 의 방법에 있어서, 1.03 μmol 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 와, 디블로킹 용액으로서, 메탄올/디클로로아세트산/톨루엔 = 0.5/3.0/96.5 를 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오타이드를 얻었다. 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정된 결과, N-1 mer 의 함량은 9.6 % 이고, FLP 의 순도는 63.5 % 였다. 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정된 결과, 수량은 12.7 mg 이고, 1.00 μmol 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 당의 수량으로 환산하면 12.3 mg 이었다. 결과를 표 2 에 나타낸다.

[0405] 비교예 4

[0406] 실시예 1의 방법에 있어서, 1.04  $\mu\text{mol}$ 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG와, 디블로킹 용액으로서, 이소프로필알코올/디클로로아세트산/톨루엔 = 0.5/3.0/96.5를 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I)의 올리고뉴클레오티드를 얻었다. 상기 측정 방법 1에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정된 결과, N-1 mer의 함량은 12.5%이고, FLP의 순도는 59.2%였다. 또, 상기 측정 방법 2에 기재된 방법을 사용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정된 결과, 수량은 12.4 mg이고, 1.00  $\mu\text{mol}$ 의 2'-OMe-U 유도체를 담지한 CPG 당의 수량으로 환산하면 11.9 mg이었다. 결과를 표 2에 나타낸다.

[0407] 실시예 1, 2, 및 비교예 1 ~ 4의 결과를, 표 2에 나타낸다.

표 2

	카티온 스캐빈저	수량 (mg/ $\mu\text{mol}$ )	N-1 mer 함량 (%)	FLP 순도 (%)	N-1 mer/ FLP (%)
실시예 1	1-도데칸티올	12.5	1.5	71.3	2.1
실시예 2	시클로헥산티올	12.5	1.6	70.4	2.3
비교예 1	—	12.2	4.9	62.8	7.8
비교예 2	트리에틸실란	12.2	3.8	65.7	5.8
비교예 3	메탄올	12.3	9.6	63.5	15.1
비교예 4	이소프로판올	11.9	12.5	59.2	21.1

[0408]

[0409] 표 2에 있어서, N-1 mer 함량이란, 얻어진 올리고뉴클레오티드를 상기 측정 방법 1로 분석함으로써 구한, 얻어진 올리고뉴클레오티드 중의 N-1 mer의 함량(면적 백분율)을 의미한다. 또, FLP 순도란, 얻어진 올리고뉴클레오티드를 상기 측정 방법 1로 분석함으로써 구한, 얻어진 올리고뉴클레오티드 중의 FLP의 함량(면적 백분율)을 의미한다. 「N-1 mer/FLP」란, 얻어진 올리고뉴클레오티드 중의 FLP의 함량을 100%로 했을 때의, N-1 mer의 함유량비를 의미하고, 다음 식으로 구해진다.

[0410] 「N-1 mer/FLP」 (%) = N-1 mer 함량/FLP 순도  $\times$  100

[0411] 산업상 이용가능성

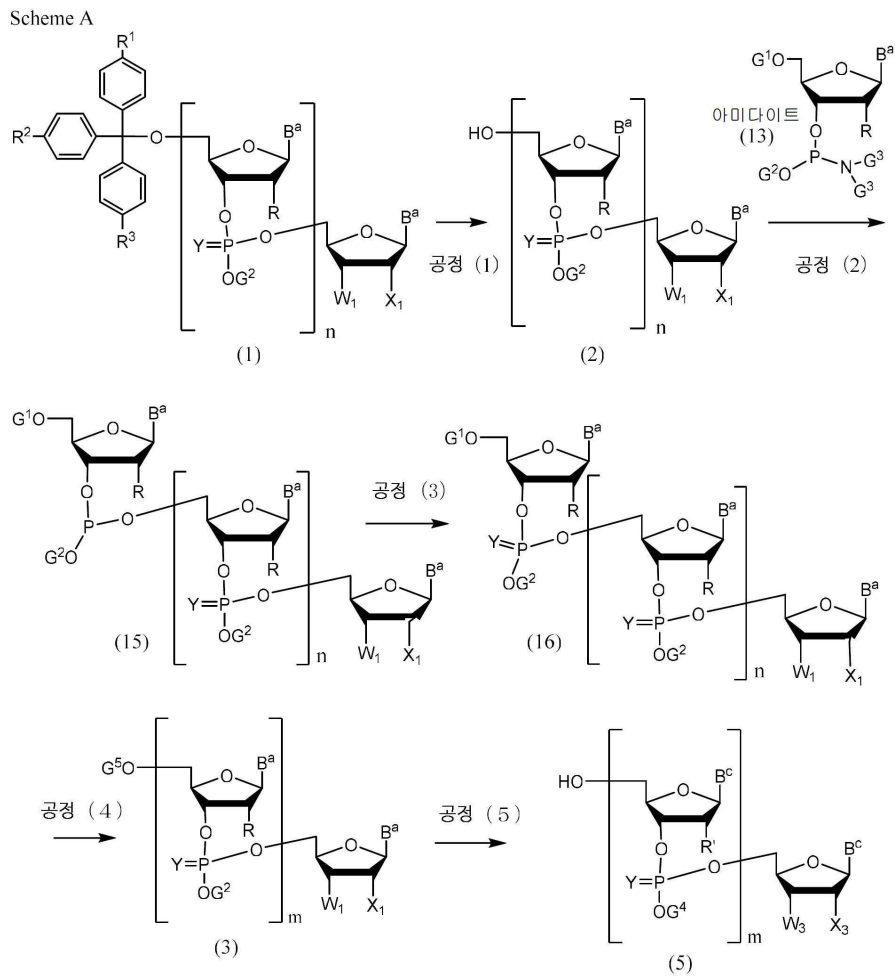
[0412] 본 발명은, 카티온 스캐빈저로서 티올 화합물을 사용한, 효율적인 5' 수산기의 보호기의 탈보호 반응을 제공한다. 또, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 따라서 제조되는 올리고뉴클레오티드의 수율 및 순도의 향상을 기대할 수 있다.

[0413] 서열표 프리 텍스트

[0414] 서열표의 서열 번호 1 ~ 10은, 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 따라서 제조되는 올리고뉴클레오티드의 염기 서열을 나타낸다.

도면

도면1



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.