(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119948043 A
(43)申请公布日 2025.05.06

(21)申请号 202380064746.6
(22)申请日 2023.07.14
(30)优先权数据
2022-172158 2022.10.27 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/026108 2023.07.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/089953 JA 2024.05.02
(71)申请人 住友化学株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 田中雄树
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 杨宏军 田川婷
(51)Int.Cl.
C07H 21/02(2006.01)
C07H 1/00(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)

权利要求书5页 说明书28页
序列表（电子公布） 附图1页

(54)发明名称

寡核苷酸的制造方法

(57)摘要

本发明提供寡核苷酸的制造方法、以及寡核苷酸中的N-1mer的含量比为一定量以下的寡核苷酸，所述寡核苷酸的制造方法是基于固相合成法的寡核苷酸的制造方法，包括使5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸、与酸在硫醇的存在下反应从而除去5’端的羟基的保护基的工序。

CN 119948043 A

1.寡核苷酸的制造方法,其是基于固相合成法的寡核苷酸的制造方法,

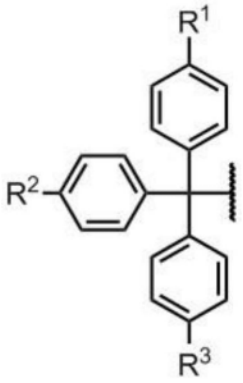
所述制造方法包括使5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸、与酸在硫醇的存在下反应从而除去5’端的羟基的保护基的工序。

2.如权利要求1所述的制造方法,其中,所述硫醇为C2-C20烷基硫醇或C4-C8环烷基硫醇。

3.如权利要求1或2中任一项所述的制造方法,其中,所述硫醇为1-十二烷硫醇或环已硫醇。

4.如权利要求1～3中任一项所述的制造方法,其中,所述5’端的羟基的保护基为下式表示的保护基,

[化学式1]



式中,R^1、R^2及R^3相同或彼此不同,各自独立地表示氢或烷氧基。

5.如权利要求1～4中任一项所述的制造方法,其中,所述5’端的羟基的保护基为4,4’-二甲氧基三苯甲基(DMTr基)。

6.如权利要求1～5中任一项所述的制造方法,其中,所述酸为三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、盐酸、乙酸或对甲苯磺酸。

7.如权利要求1～5中任一项所述的制造方法,其中,所述酸为二氯乙酸。

8.如权利要求7所述的制造方法,其中,所述酸为在具有比二氯乙酸更低的沸点的非质子性非活性溶剂的共存下的二氯乙酸。

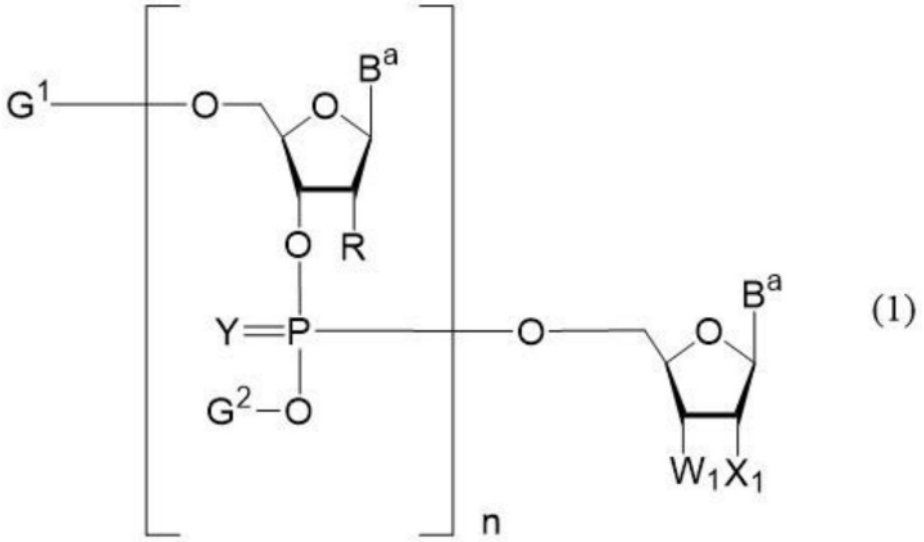
9.如权利要求8所述的制造方法,其中,所述具有比二氯乙酸更低的沸点的非质子性非活性溶剂为选自二氯甲烷、乙腈或芳香族有机溶剂中的任一种以上的溶剂。

10.如权利要求9所述的制造方法,其中,所述芳香族有机溶剂为甲苯。

11.如权利要求7所述的制造方法,其中,所述二氯乙酸是甲醛相对于二氯乙酸而言的摩尔比为81×10^{-5}以下、并且二氯乙酸酐相对于二氯乙酸而言的摩尔比为20×10^{-5}以下的二氯乙酸。

12.如权利要求1～11中任一项所述的制造方法,其中,5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸为式(1)表示的寡核苷酸,

[化学式2]



(1)

式(1)中,

G^1表示羟基的保护基,

G^2表示羟基的保护基,

B^a相同或彼此不同,各自独立地表示可被保护基保护的核酸碱基,

R相同或彼此不同,各自独立地表示经保护的羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基或OQ'基,

Q'相同或彼此不同,各自独立地表示与核糖的4'位的碳原子键合的亚甲基、与核糖的4'位的碳原子键合的亚乙基、或与核糖的4'位的碳原子键合的乙叉基,

Y相同或彼此不同,各自独立地表示氧原子或硫原子,

n表示1~300中的任一整数,

W_1表示OZ基,并且X_1表示R基,或者,

W_1表示OV基,并且X_1表示OZ基,

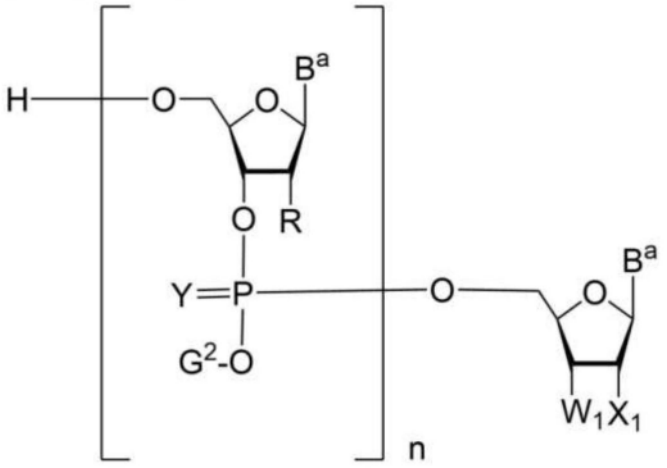
V表示羟基的保护基,

Z为具有由固相载体及连接基团组成的结构的基团;

并且,n为2以上的整数时,式(1)表示的核酸分子可以在各核苷酸之间组入非核苷酸接头;

5'端的羟基的保护基被除去的核苷酸为式(2)表示的寡核苷酸,

[化学式3]



(2)

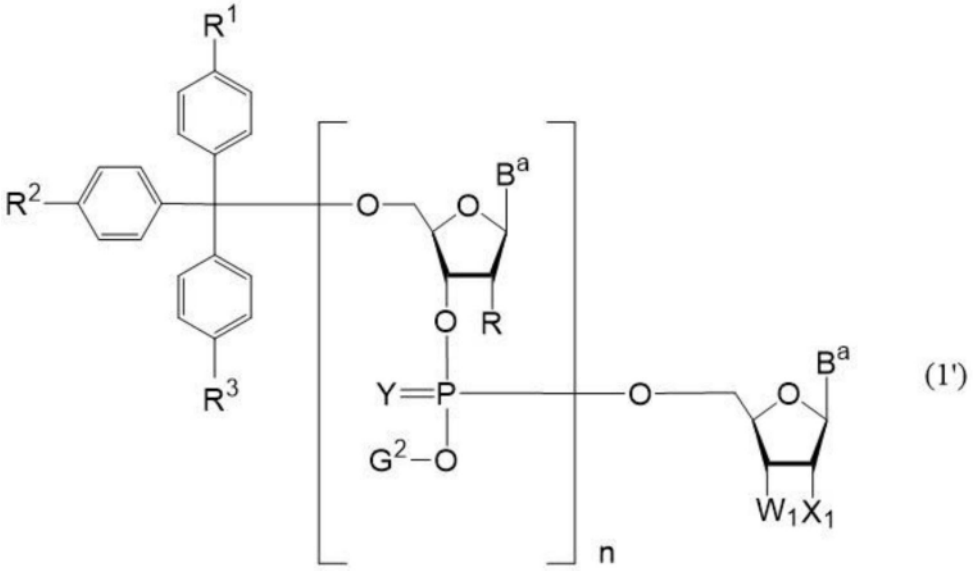
式(2)中,

G^2、B^a、R、Y、X_1、W_1及n与前述相同,并且,

可以以式(1)中所定义的方式,在核苷酸之间组入非核苷酸接头。

13.如权利要求12所述的制造方法,其中,5'端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸为式(1')表示的寡核苷酸,

[化学式4]



(1')

式(1')中,

G^2、B^a、R、Y、X_1、W_1及n与前述相同,并且,

R^1、R^2及R^3相同或彼此不同,各自独立地表示氢原子或烷氧基。

14.如权利要求13所述的制造方法,其中,R^1及R^2为甲氧基,R^3为氢原子。

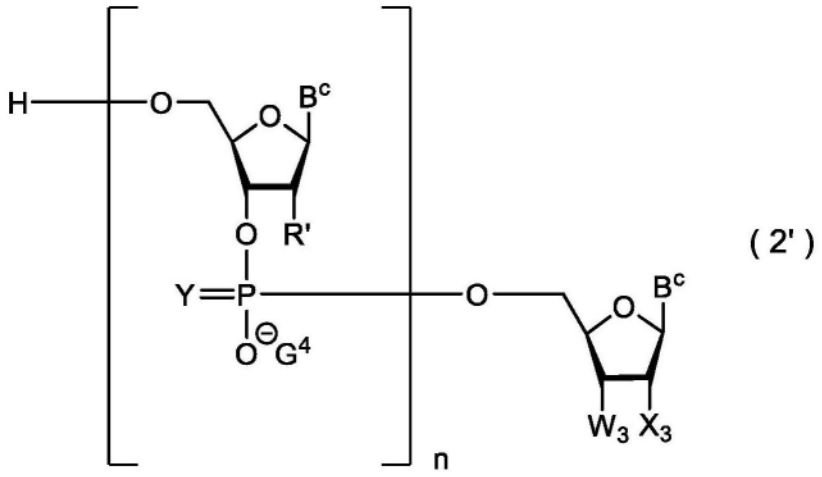
15.式(2')表示的寡核苷酸的制造方法,所述制造方法包括:

权利要求12所述的工序;

进一步从该工序中生成的式(2)表示的寡核苷酸中除去Z表示的基团的工序;以及

将羟基及核酸碱基的保护基除去的工序,

[化学式5]



(2')

式(2')中,

Y及n与前述相同,

B^c相同或彼此不同,各自独立地表示核酸碱基,

G^4相同或彼此不同,各自独立地表示氢离子、碱金属离子、铵离子、烷基铵离子、或羟基烷基铵离子,

R'相同或彼此不同,各自独立地表示羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基或OQ'基,

Q'与前述相同,并且,

X_3及W_3各自独立地表示羟基,或者

X_3表示R'基,且W_3表示羟基;并且,

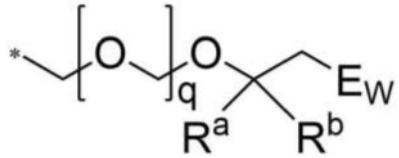
可以以式(1)中所定义的方式,在核苷酸之间组入非核苷酸接头。

16.如权利要求12~15中任一项所述的制造方法,其中,寡核苷酸为包含核糖核酸(RNA)的寡核苷酸。

17.如权利要求12所述的制造方法,其中,寡核苷酸为包含核糖核酸(RNA)的寡核苷酸,其核糖的2'位的羟基的保护基为式(6)表示的保护基,

式(6):

[化学式6]



(6)

式(6)中,

q表示0~5中的任一整数,

R^a及R^b相同或彼此不同,各自独立地表示甲基、乙基或氢原子,

*标记表示与源自核糖的2'位的羟基的氧原子的键合点,并且,

E_W表示吸电子基团。

18.如权利要求17所述的制造方法,其中,q为0或1,R^a及R^b相同或彼此不同,各自独立地为甲基或氢原子,并且E_w为氰基。

19.如权利要求12~18中任一项所述的制造方法,其中,n为1~200中的任一整数。

20.如权利要求1～19中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为100mer以上的寡核苷酸。

21.如权利要求1～20中任一项所述的制造方法,其中,所述硫醇相对于所述5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸而言的使用量的摩尔比为1以上。

22.如权利要求1～21中任一项所述的制造方法,其中,所述硫醇相对于所述酸而言的使用量的摩尔比为1～100。

23.寡核苷酸,其中,寡核苷酸的链长为50mer以上,且寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于5.8%。

寡核苷酸的制造方法

技术领域

[0001] 本专利申请主张基于日本专利申请2022-172158号(2022年10月27日提出申请)的巴黎公约下的优先权及利益,通过引用至此,上述申请记载的全部内容并入本说明书中。

[0002] 本发明涉及利用固相合成中的亚磷酰胺法的寡核苷酸的制造方法,其中使用硫醇化合物作为阳离子清除剂。

背景技术

[0003] 近年来,对核酸分子在医疗领域的应用的兴趣不断高涨。例如,可举出反义核酸、适配体、核酶、及siRNA等诱导RNA干扰(RNAi)的核酸等,它们被称为核酸药物。

[0004] 寡核苷酸的合成可利用亚磷酰胺法(以下,称为"酰胺(amidite)法")制造,在该合成法中,包括对5'端的羟基的保护基进行脱保护的工序。该工序通过使5'端的羟基被保护的寡核苷酸与酸反应来实施。该反应是5'端的羟基的保护基以阳离子的形式脱离的平衡反应,为可逆反应。

[0005] 在液相合成中,随着前述脱保护反应的进行,经脱保护的保护基的阳离子(例如,4,4'-二甲氧基三苯甲基阳离子)在体系中增多,妨碍该脱离反应的平衡反应的进行。因此,为了使反应进行,已知使用阳离子清除剂的方法(参见专利文献1)。

[0006] 另一方面,已知在固相合成中,在合成操作方面,上述阳离子不滞留在体系中而是被排出至体系外,因此平衡反应顺利地进行,不会出现前述液相合成那样的问题(参见非专利文献1)。可见在固相合成中通常无需使用阳离子清除剂。目前为止,报道了在固相合成中使用三乙基硅烷作为阳离子清除剂来实施脱保护反应的方法(参见专利文献2)。但是,该方法中的三乙基硅烷的阳离子清除剂的效果不充分。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2012/157723号

[0010] 专利文献2:美国专利第5,510,476号

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:J.Am.Chem.Society.,2020,142,16610

发明内容

[0013] 发明所要解决的课题

[0014] 本发明的目的在于提供寡核苷酸的制造方法,其是使用固相合成中的亚磷酰胺法的寡核苷酸的制造方法,其中,5'端的羟基的脱保护反应高效地进行,所合成的寡核苷酸的收率及纯度提高。本发明的目的还在于提供寡核苷酸中的N-1mer的含量比显著低的寡核苷酸。

[0015] 用于解决课题的手段

[0016] 本申请的发明人为了实现上述目的而反复深入研究,结果发现,通过使用硫醇化

合物作为阳离子清除剂,从而5’羟基的保护基的脱保护反应高效地进行,所得到的寡核苷酸的收率及纯度提高。结果,本发明提供一种寡核苷酸的制造方法以及寡核苷酸中的N-1mer的含量比为一定量以下的寡核苷酸,所述制造方法是基于固相合成法的寡核苷酸的制造方法,包括使5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸、与酸在硫醇的存在下反应从而除去5’端的羟基的工序。

[0017] 本发明包括以下的方式,但不限于这些。

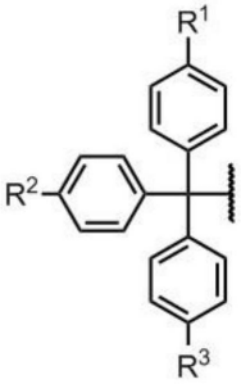
[0018] [1]寡核苷酸的制造方法(以下,称为“本发明的制造方法”),其是基于固相合成法的寡核苷酸的制造方法,包括使5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸、与酸在硫醇的存在下反应,从而除去5’端的羟基的保护基的工序。

[0019] [2]如[1]所述的制造方法,其中,前述硫醇为C2-C20烷基硫醇或C4-C8环烷基硫醇。

[0020] [3]如[1]或[2]中任一项所述的制造方法,其中,前述硫醇为1-十二烷硫醇或环己硫醇。

[0021] [4]如[1]~[3]中任一项所述的制造方法,其中,前述5’端的羟基的保护基为下式表示的保护基,

[0022] [化学式1]

[0023] 

[0024] (式中,R^1、R^2及R^3相同或彼此不同,各自独立地表示氢或烷氧基。)。

[0025] [5]如[1]~[4]中任一项所述的制造方法,其中,前述5’端的羟基的保护基为4,4’-二甲氧基三苯甲基(DMTr基)。

[0026] [6]如[1]~[5]中任一项所述的制造方法,其中,前述酸为三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、盐酸、乙酸或对甲苯磺酸。

[0027] [7]如[1]~[5]中任一项所述的制造方法,其中,前述酸为二氯乙酸。

[0028] [8]如[7]所述的制造方法,其中,前述酸为在具有比二氯乙酸更低的沸点的非质子性非活性溶剂的共存下的二氯乙酸。

[0029] [9]如[8]所述的制造方法,其中,前述具有比二氯乙酸更低的沸点的非质子性非活性溶剂为选自二氯甲烷、乙腈或芳香族有机溶剂中的任一种以上的溶剂。

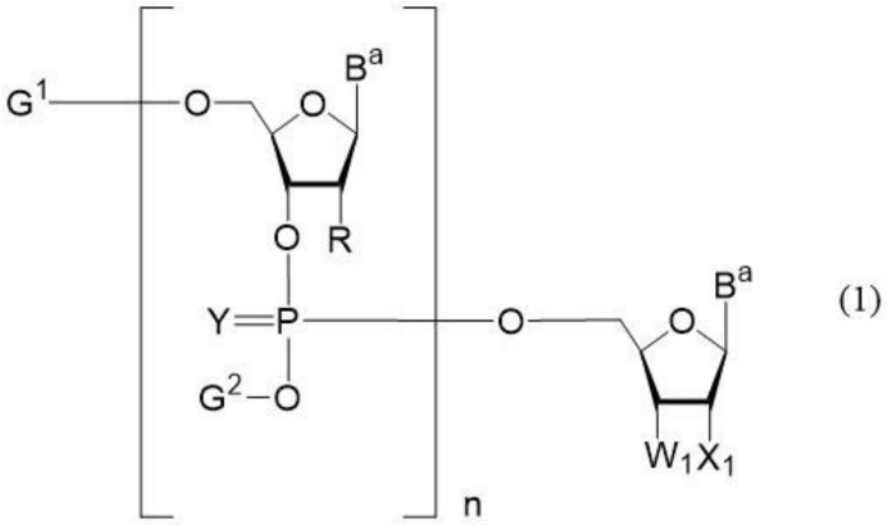
[0030] [10]如[9]所述的制造方法,其中,前述芳香族有机溶剂为甲苯。

[0031] [11]如[7]所述的制造方法,其中,前述二氯乙酸是甲醛相对于二氯乙酸而言的摩尔比为81×10^{-5}以下、并且二氯乙酸酐相对于二氯乙酸而言的摩尔比为20×10^{-5}以下的二氯乙酸。

[0032] [12]如[1]~[11]中任一项所述的制造方法,其中,5’端的羟基被能够在酸性条件

下除去的保护基保护的寡核苷酸为式(1)表示的寡核苷酸，

[0033] [化学式2]

[0034] 

(1)

[0035] (式中，

[0036] G^1表示羟基的保护基，

[0037] G^2表示羟基的保护基，

[0038] B^a相同或彼此不同，各自独立地表示可被保护基保护的核酸碱基，

[0039] R相同或彼此不同，各自独立地表示经保护的羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基或OQ'基，

[0040] Q'相同或彼此不同，各自独立地表示与核糖的4'位的碳原子键合的亚甲基、与核糖的4'位的碳原子键合的亚乙基、或与核糖的4'位的碳原子键合的乙叉基，

[0041] Y相同或彼此不同，各自独立地表示氧原子或硫原子，

[0042] n表示1～300中的任一整数，

[0043] W_1表示OZ基，并且X_1表示R基，或者，

[0044] W_1表示OV基，并且X_1表示OZ基，

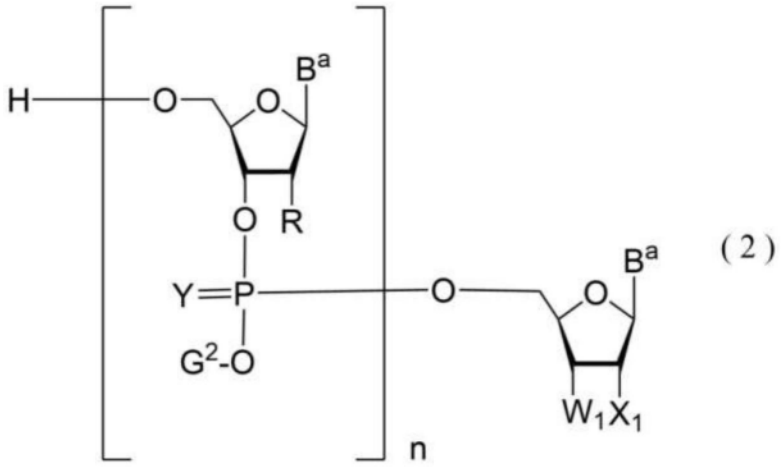
[0045] V表示羟基的保护基，

[0046] Z为具有由固相载体及连接基团组成的结构的基团。

[0047] 并且，n为2以上的整数时，式(1)表示的核酸分子可以在各核苷酸之间组入非核苷酸接头。)

[0048] 5'端的羟基的保护基被除去的核苷酸为式(2)表示的寡核苷酸，

[0049] [化学式3]

[0050] 

(2)

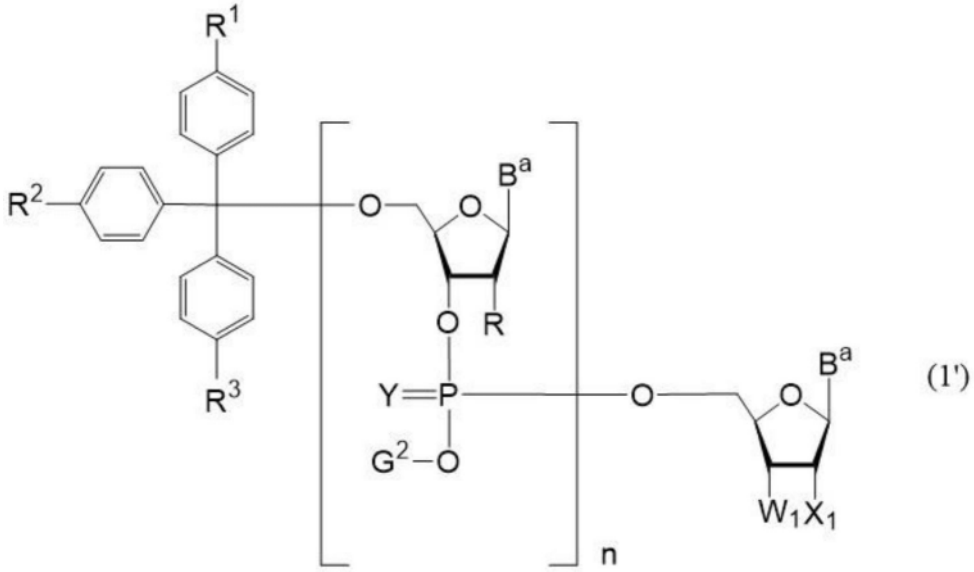
[0051] (式中,

[0052] G^2、B^a、R、Y、X_1、W_1及n与前述相同,并且,

[0053] 可以以式(1)中所定义的方式,在核苷酸之间组入非核苷酸接头。)。

[0054] [13]如[12]所述的制造方法,其中,5'端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸为式(1')表示的寡核苷酸,

[0055] [化学式4]

[0056] 

(1')

[0057] (式中,

[0058] G^2、B^a、R、Y、X_1、W_1及n与前述相同,并且,

[0059] R^1、R^2及R^3相同或彼此不同,各自独立地表示氢原子或烷氧基。)。

[0060] [14]如[13]所述的制造方法,其中,R^1及R^2为甲氧基,R^3为氢原子。

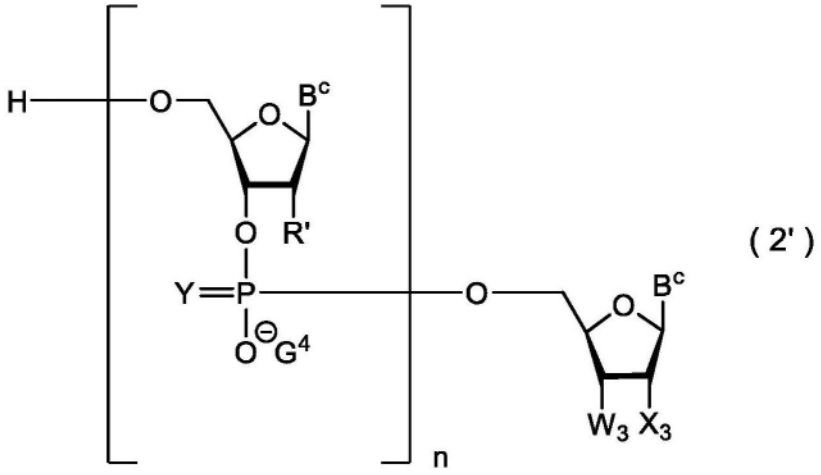
[0061] [15]式(2')表示的寡核苷酸的制造方法,所述制造方法包括:

[0062] [12]所述的工序;

[0063] 进一步从该工序中生成的式(2)表示的寡核苷酸中除去Z表示的基团的工序;以及,

[0064] 将羟基及核酸碱基的保护基除去的工序,

[0065] [化学式5]

[0066] 

(2')

[0067] (式中,

[0068] Y及n与前述相同,

[0069] B^c相同或彼此不同,各自独立地表示核酸碱基,

[0070] G^4相同或彼此不同,各自独立地表示氢离子、碱金属离子、铵离子、烷基铵离子或羟基烷基铵离子,

[0071] R'相同或彼此不同,各自独立地表示羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基或OQ'基,

[0072] Q'与前述相同,并且,

[0073] X_3及W_3各自独立地表示羟基,或者

[0074] X_3表示R'基,且W_3表示羟基。并且,

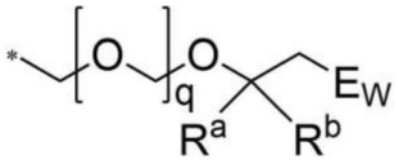
[0075] 可以以式(1)中所定义的方式,在核苷酸之间组入非核苷酸接头。)。

[0076] [16]如[12]~[15]中任一项所述的制造方法,其中,寡核苷酸为包含核糖核酸(RNA)的寡核苷酸。

[0077] [17]如[12]所述的制造方法,其中,寡核苷酸为包含核糖核酸(RNA)的寡核苷酸,其核糖的2'位的羟基的保护基为式(6)表示的保护基。

[0078] 式(6):

[0079] [化学式6]

[0080] 

(6)

[0081] (式中,

[0082] q表示0~5中的任一整数,

[0083] R^a及R^b相同或彼此不同,各自独立地表示甲基、乙基或氢原子,

[0084] *标记表示与源自核糖的2'位的羟基的氧原子的键合点,并且,

[0085] E_W表示吸电子基团。)

[0086] [18]如[17]所述的制造方法,其中,q为0或1,R^a及R^b相同或彼此不同,各自独立地为甲基或氢原子,并且E_w为氰基。

[0087] [19]如[12]~[18]中任一项所述的制造方法,其中,n为1~200中的任一整数。

[0088] [20]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为100mer以上的寡核苷酸。

[0089] [20-1]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为20mer以上的寡核苷酸。

[0090] [20-2]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为40mer以上的寡核苷酸。

[0091] [20-3]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为60mer以上的寡核苷酸。

[0092] [20-4]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为80mer以上的寡核苷酸。

[0093] [20-5]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为150mer以上的寡核苷酸。

[0094] [20-6]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为200mer以下的寡核苷酸。

[0095] [20-7]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为250mer以下的寡核苷酸。

[0096] [20-8]如[1]～[19]中任一项所述的制造方法,其中,所得到的寡核苷酸为300mer以下的寡核苷酸。

[0097] [21]如[1]～[20]中任一项所述的制造方法,其中,前述硫醇相对于前述5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸而言的使用量的摩尔比为1以上。

[0098] [22]如[1]～[21]中任一项所述的制造方法,其中,前述硫醇相对于前述酸而言的使用量的摩尔比为1～100。

[0099] [23]寡核苷酸,其中,寡核苷酸的链长为50mer以上,且寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于5.8%。

[0100] 发明效果

[0101] 本发明提供寡核苷酸的制造方法,其特征在于,通过使用硫醇化合物作为阳离子清除剂,从而5’羟基的保护基的脱保护反应高效地进行。利用本发明的制造方法,能够期待所制造的寡核苷酸的收率及纯度的提高。

附图说明

[0102] [图1]图1为示出由式(1)表示的核酸分子制造式(5)表示的核酸分子的典型例的路线A。图中,作为G^1,只要是能够用二氯乙酸除去的作为羟基的保护基发挥功能的基团即可,能够没有特别限制地使用,可以广泛地使用酰胺化合物中使用的已知的保护基。另外,G^3相同或彼此不同,各自独立地表示烷基,或者也可以2个G^3彼此键合而形成环状结构。作为G^3,相同或彼此不同,各自独立地为烷基,例如优选为甲基、乙基、丙基或异丙基,更优选两者为异丙基。其他符号与前述相同。

具体实施方式

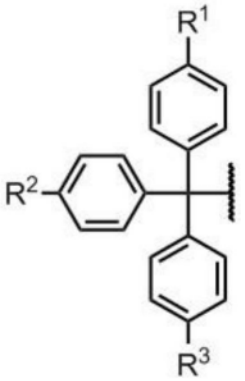
[0103] 根据本发明的1个实施方式,本发明涉及寡核苷酸的制造方法,其是基于固相合成

法的寡核苷酸的制造方法,包括使5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸、与酸在硫醇的存在下反应从而除去5’端的羟基的保护基的工序。

[0104] 本说明书中使用的所谓术语“5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸”,称为包含下述核苷酸的寡核苷酸,所述核苷酸是核苷酸分子的结构的5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的核苷酸。本说明书中,有时也将“寡核苷酸”称为“核酸寡聚物”,以及将“核苷酸”称为“核酸分子”。

[0105] 所谓术语“5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基~ ~”,只要为通常已知的保护基,则没有特别限定。作为具体的保护基,例如,可举出下式表示的基团,

[0106] [化学式7]

[0107] 

[0108] (式中,R^1、R^2及R^3相同或彼此不同,各自独立地表示氢或烷氧基。),

[0109] 只要是能够以阳离子的形式脱离的基团,则没有特别限定。

[0110] 在上式表示的保护基中,R^1、R^2及R^3优选1个为氢、剩余的2个为相同或彼此不同(优选相同)的烷氧基,作为烷氧基,特别优选为甲氧基。

[0111] 具体的,作为优选的保护基,例如,可举出选自4,4’-二甲氧基三苯甲基(DMTr基)、4-单甲氧基三苯甲基、或4,4’,4”-三甲氧基三苯甲基中的基团。特别优选为4,4’-二甲氧基三苯甲基(DMTr基)。

[0112] 作为本说明书中使用的术语“硫醇”,具体而言,例如,可举出C2-C20烷基硫醇或C4-C8环烷基硫醇。作为C2-C20烷基硫醇,例如,可举出乙硫醇、1-丙硫醇、2-丙硫醇、1-丁硫醇、2-丁硫醇、2-甲基-1-丙硫醇(异丁基硫醇)、2-甲基-2-丙硫醇(叔丁基硫醇)、1-戊硫醇、1-己硫醇、1-庚硫醇、1-辛硫醇、1-壬硫醇、1-癸硫醇、1-十一烷硫醇、1-十二烷硫醇、叔十二烷硫醇、1-十四烷硫醇、1-十五烷硫醇、1-十六烷硫醇、1-十八烷硫醇、1-二十烷硫醇。作为C4-C8环烷基硫醇,例如,可举出环丁硫醇、环戊硫醇、环己硫醇、环庚硫醇、环辛硫醇。作为硫醇,优选可举出1-十二烷硫醇及环己硫醇。

[0113] 前述硫醇相对于反应底物即前述5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸而言的使用量的摩尔比为1以上,但不限于此。另外,前述硫醇相对于前述酸而言的使用量的摩尔比为1~100,但不限于此。

[0114] 术语“酸”是指在亚磷酰胺法中用于除去上述保护基的酸,具体而言,例如,可举出三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、盐酸、乙酸及对甲苯磺酸,但不限于这些。特别优选为二氯乙酸。

[0115] 就所使用的二氯乙酸而言,优选使用高纯度的二氯乙酸。高纯度的二氯乙酸是指二氯乙酸中包含的杂质的含量为一定量以下的二氯乙酸。作为杂质,可举出二氯乙酸的制

造方法的过程中使用的甲醛及二氯乙酸酐中的两者或一者。

[0116] 例如,甲醛相对于二氯乙酸而言的摩尔比为81×10^{-5}以下,优选为41×10^{-5}以下,更优选为81×10^{-6}以下。另外,二氯乙酸酐相对于二氯乙酸而言的摩尔比为20×10^{-5}以下,优选为10×10^{-5}以下,更优选为50×10^{-6}以下。

[0117] 根据所使用的二氯乙酸的实施方式,优选使用甲醛相对于二氯乙酸而言的摩尔比为前述的比率以下、及/或二氯乙酸酐相对于二氯乙酸而言的摩尔比为前述的比率以下的二氯乙酸。

[0118] 前述二氯乙酸可以通过以包含在非质子性非活性溶剂中的液体形态(例如溶液、混悬液或乳浊液)、或者在反应体系中另行加入上述非活性溶剂等从而在非活性溶剂的共存下使用,所述非质子性非活性溶剂是在二氯乙酸的制造及纯化的方法中使用的、具有比二氯乙酸更低的沸点的非质子性非活性溶剂;。

[0119] 作为前述具有比二氯乙酸更低的沸点的非质子性非活性溶剂,例如,可举出具有181℃以下的沸点的非质子性非活性溶剂,具体而言,可举出二氯甲烷、乙腈及芳香族有机溶剂,但不限于这些。作为芳香族有机溶剂,例如,可举出甲苯、二甲苯、单氯苯及邻二氯苯,优选可举出甲苯。上述溶剂的使用量没有特别限定,典型地,相对于二氯乙酸而言,例如为0.5重量倍~20重量倍左右。

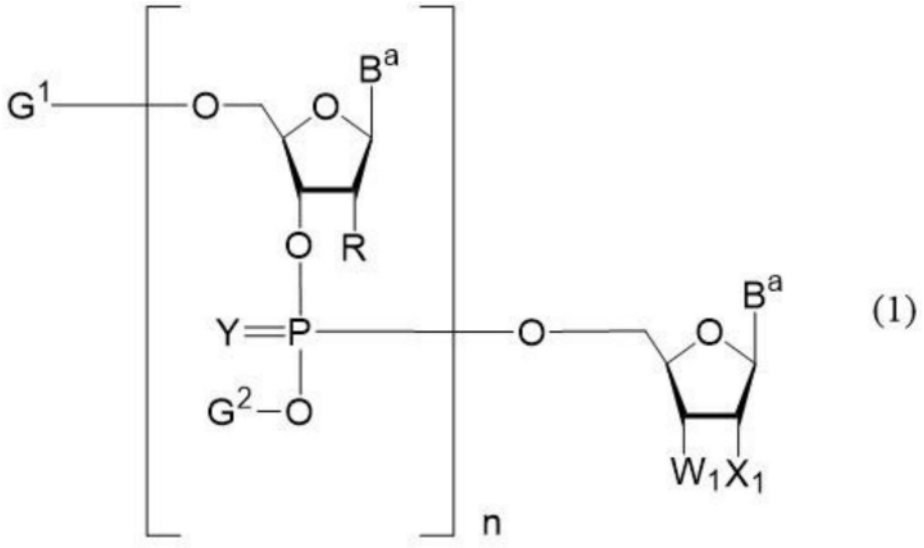
[0120] 另外,在用于上述脱保护反应的包含二氯乙酸的反应体系中,在上述具有比二氯乙酸更低的沸点的非质子性非活性溶剂的共存下,可以适当地加入具有比二氯乙酸更低的沸点的选自由脂肪族醇、脂肪族胺及水组成的组中的一种化合物。

[0121] 作为具有比二氯乙酸更低的沸点的脂肪族醇及脂肪族胺,例如,可示例C1-C6的脂肪族醇及C1-C6的脂肪族胺化合物。作为C1-C6的脂肪族醇的例子,例如,可示例甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇、叔丁醇、正戊醇、正己醇等。作为具有比二氯乙酸更低的沸点的脂肪族胺,可示例C1-C6的脂肪族胺化合物。具体而言,可示例甲胺、乙胺、正丙胺、异丙胺、正丁胺、异丁胺、叔丁胺、正戊胺、正己胺等。

[0122] 就前述脂肪族醇、前述脂肪族胺及水或它们的混合物的使用量而言,只要是对使二氯乙酸酐降低至前述所期望的范围内而言有效的量即可,没有特别限定。

[0123] 作为本说明书中使用的术语“5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸”的具体例,可举出式(1)表示的寡核苷酸:

[0124] [化学式8]

[0125] 

(1)

（式中，

[0126] G^1表示羟基的保护基，

[0127] G^2表示羟基的保护基，

[0128] B^a相同或彼此不同，各自独立地表示可被保护基保护的核酸碱基，

[0129] R相同或彼此不同，各自独立地表示经保护的羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基或OQ’基，

[0130] Q’相同或彼此不同，各自独立地表示与核糖的4’位的碳原子键合的亚甲基、与核糖的4’位的碳原子键合的亚乙基、或与核糖的4’位的碳原子键合的乙叉基，

[0131] Y相同或彼此不同，各自独立地表示氧原子或硫原子，

[0132] n表示1～300中的任一整数，

[0133] W_1表示OZ基，并且X_1表示R基，或者，

[0134] W_1表示OV基，并且X_1表示OZ基，

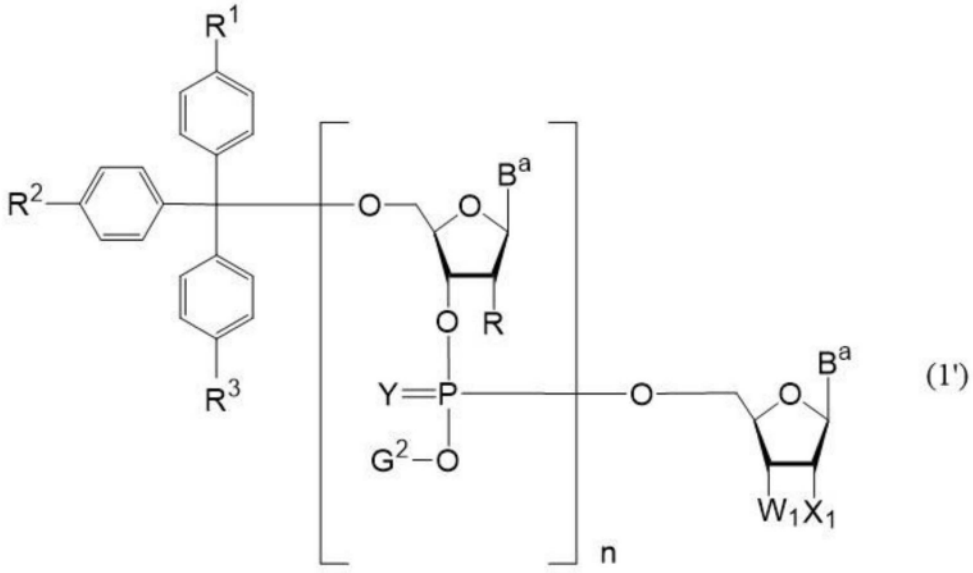
[0135] V表示羟基的保护基，

[0136] Z为具有由固相载体及连接基团组成的结构的基团。

[0137] 并且，n为2以上的整数时，式(1)表示的核酸分子可以在各核苷酸之间组入非核苷酸接头。)。

[0138] 根据本发明的更优选实施方式，5’端的羟基被能够在酸性条件下除去的保护基保护的寡核苷酸可举出式(1’)表示的寡核苷酸：

[0139] [化学式9]

[0140] 

(1')

[0141] (式中,

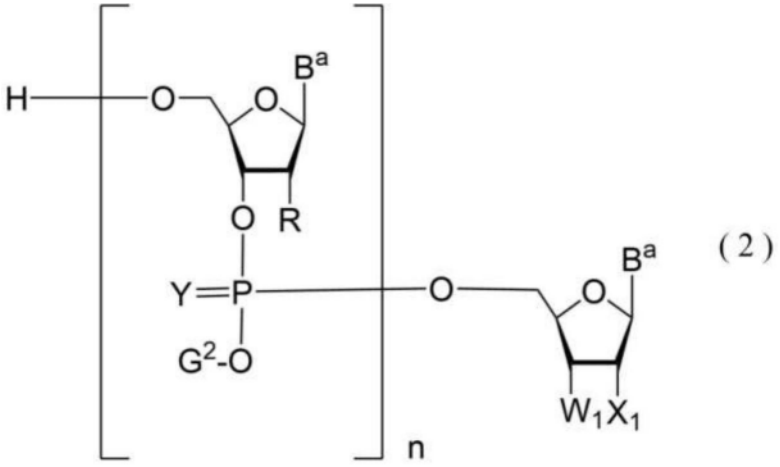
[0142] G^2、B^a、R、Y、X_1、W_1及n与前述相同,并且,

[0143] R^1、R^2及R^3相同或彼此不同,各自独立地表示氢原子或烷氧基。)。

[0144] 根据本发明的更进一步优选实施方式,上述式(1')中,R^1、R^2及R^3表示氢原子。

[0145] 另外,根据本发明的实施方式,5'端的羟基的保护基被除去的核苷酸可举出式(2)表示的寡核苷酸:

[0146] [化学式10]

[0147] 

(2)

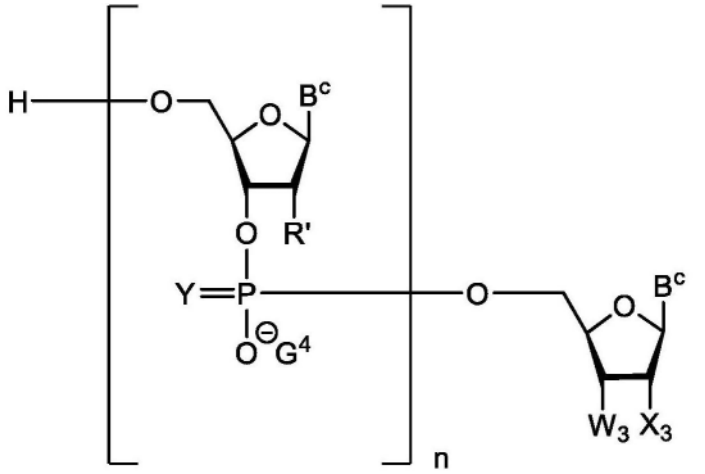
[0148] (式中,

[0149] G^2、B^a、R、Y、X_1、W_1及n与前述相同,并且,

[0150] 可以以式(1)中所定义的方式,在核苷酸之间组入非核苷酸接头。)。

[0151] 另外,就5'端的羟基的保护基被除去的核苷酸而言,根据本发明的优选实施方式,5'端的羟基的保护基被除去的核苷酸可举出式(2')表示的寡核苷酸:

[0152] [化学式11]

[0153] 

(2')

[0154] (式中,

[0155] Y及n与前述相同,

[0156] B^c相同或彼此不同,各自独立地表示核酸碱基,

[0157] G^4相同或彼此不同,各自独立地表示氢离子、碱金属离子、铵离子、烷基铵离子或羟基烷基铵离子,

[0158] R'相同或彼此不同,各自独立地表示羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基或OQ'基,

[0159] Q'与前述相同,并且,

[0160] X_3及W_3各自独立地表示羟基,或者

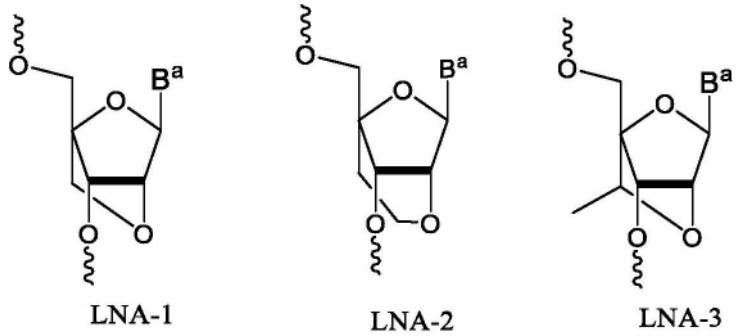
[0161] X_3表示R'基,并且W_3表示羟基。并且,

[0162] 可以以式(1)中所定义的方式,在核苷酸之间组入非核苷酸接头。)。

[0163] 作为核酸分子的5'位的羟基的保护基,可示例下述G^1或G^5表示的基团。作为5'位的羟基被保护的寡核苷酸,可示例前述式(1)(或包括(1'))表示的寡核苷酸。作为使前述酸(例如二氯乙酸)与硫醇反应而生成的核苷酸,可示例前述式(2)(或包括(2'))表示的寡核苷酸。

[0164] 前述式(1)及(2)中,作为呈现Q'所示的、相同或彼此不同且各自独立地与核糖的4'位的碳原子键合的亚甲基、与核糖的4'位的碳原子键合的亚乙基、或与核糖的4'位的碳原子键合的乙叉基的化合物,具体而言可举出下述式(7)的LNA-1、LNA-2、或LNA-3表示的结构。

[0165] [化学式12]

[0166] 

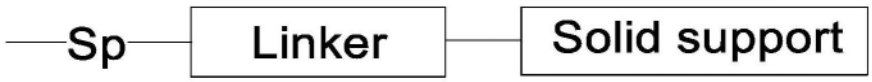
(7)

LNA-1 LNA-2 LNA-3

[0167] (式中,B^a表示可以被保护的核酸碱基。)

[0168] 作为Z表示的、具有由固相载体、及将固相载体与核酸分子的3’端的核糖的2’位或3’位的羟基的氧原子连接的连接基团组成的结构的基团，更具体而言，可举出下述式(8)表示的结构。

[0169] [化学式13]

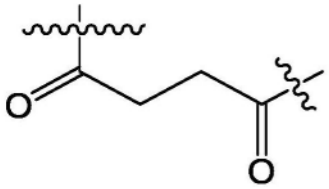
[0170] 

(8)

[0171] 式(8)中，Sp表示间隔基。

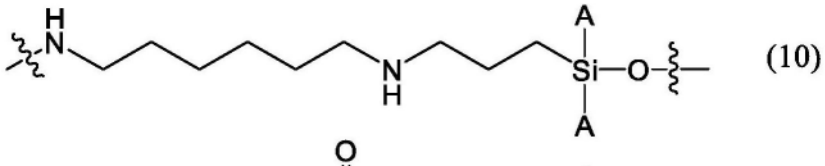
[0172] 作为间隔基(Sp)，例如，可示例具有下述式(9)所示的结构式的基团。

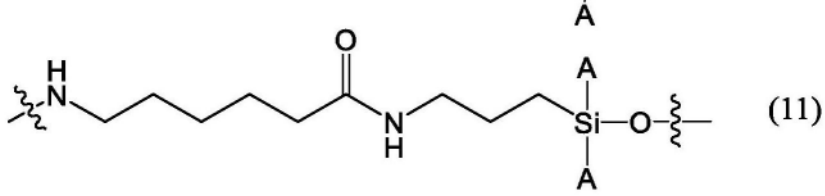
[0173] [化学式14]

[0174] 
(9)

[0175] 接头(Linker)例如可以为下述式(10)所示的结构，或者也可以是式(10)的结构中不具有六亚甲基氨基部分的结构即氨基丙基键合于Si的结构。或者，接头(Linker)也可以是下述式(11)所示的结构。

[0176] [化学式15]


(10)

[0177] 
(11)

[0178] (式中，

[0179] A可以为羟基、烷氧基或烷基中的任一者。作为烷氧基，例如可举出甲氧基及乙氧基。作为烷基，例如可举出甲基、乙基、异丙基、正丙基。Si表示与载体表面的羟基的氧键合。)

[0180] 作为固相载体(Solid support)，可举出无机多孔质载体、有机系树脂载体等。无机多孔质载体例如可举出可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass:CPG)。有机系树脂载体例如可举出从聚苯乙烯形成的载体。

[0181] 作为本发明中使用的核酸分子内所含的核苷(核糖、及脱氧核糖)，可示例DNA、RNA、2’-O-MOE(2’-O-甲氧基乙基)、2’-O-Me、2’-F RNA、及前述的LNA，前述核苷不限于这些。

[0182] 就利用固相合成法进行的寡核苷酸(核酸寡聚物)的合成方法而言，包括在前述硫醇的存在下通过酸(例如，三氯乙酸)进行的5’端的羟基的保护基的脱保护工序，典型地包括以下的工序。

[0183] (1)对介由接头键合于固相载体的羟基经保护的核苷的5’位的羟基进行脱保护的工序；

[0184] (2)使前述工序中生成的5’位的羟基与亚磷酰胺化合物进行偶联反应而得到亚磷酸三酯化合物的工序;

[0185] (3)使前述工序中生成的亚磷酸三酯氧化转化为磷酸三酯而制造延伸的核酸寡聚物的工序;或者转化为硫代磷酸三酯的任意工序;

[0186] (4)反复进行任意次数的下述一系列反应的循环,在固相载体上合成核酸寡聚物的工序,所述一系列反应的循环由前述工序(1)~(3)、即:生成的核酸寡聚物的5’位的羟基的脱保护工序、5’位的羟基与酰胺化合物的偶联工序、以及生成的亚磷酸三酯的氧化工序构成,和

[0187] (5)将工序(4)中生成的固相载体上的核酸寡聚物供于切出及脱保护的工序,使其从固相载体游离,制造除去了保护基的核酸寡聚物的工序。其中,在前述核酸寡聚物的合成方法中,继工序(2)或(3)之后,可以包括对未进行与亚磷酰胺化合物的偶联反应的5’位的羟基进行加帽的工序,也可以在构成工序(4)的一系列反应的循环中的任意工序之间附加加帽工序。

[0188] 更具体而言,前述(5)的工序通过下述方式实施:将工序(4)中生成的固相载体上的核酸寡聚物按以下的工序(5-1)及(5-2)的反应顺序实施,接着供于工序(5-3)的反应。此处,工序(5-1)的反应的实施可以为任意的,工序(5-2)的反应的实施也可以使用日本专利第4705716号公报中记载的方法。结果,能够制造从固相载体游离的核酸寡聚物中除去了保护基的核酸寡聚物、或者5’端的羟基被保护的核酸寡聚物。

[0189] (5-1)对核酸寡聚物的5’端的羟基的保护基进行脱保护的反应;

[0190] (5-2)从固相载体上切出核酸寡聚物并使其游离的反应;以及

[0191] (5-3)对构成核酸寡聚物的核糖的2’位或3’端的3’位的羟基的保护基进行脱保护的反应。

[0192] 将前述工序(1)至(5)的路线示于图1。图1所示的工序(1)或工序(4)中的脱保护反应使用前述的二氯乙酸及硫醇化合物来实施。路线A中的化学式中的取代基的定义与前述定义相同。

[0193] 对于前述式(1)的核酸寡聚物,可以进一步利用酰胺法使用核苷酸型或非核苷酸型的接头仅延伸任意的链长,并用于前述式(3)表示的核酸寡聚物的制造。也可以从前述式(3)的键合于固相载体的核酸寡聚物中仅切出核酸寡聚物,进一步进行脱保护,得到前述式(5)表示的核酸寡聚物。以下,对各式中的取代基进行进一步详细说明。

[0194] B^a表示的可被保护基保护的核酸碱基及B^c表示的核酸碱基没有特别限定。作为该核酸碱基,可举出腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶、及1-甲基假尿嘧啶等。另外,该核酸碱基可以被取代基取代。作为这样的取代基,例如,可举出氟基、氯基、溴基、碘基这样的卤原子、乙酰基这样的酰基、甲基、乙基这样的烷基、苄基这样的芳烷基、甲氧基这样的烷氧基、甲氧基乙基这样的烷氧基烷基、氰基乙基这样的氰基烷基、羟基、羟基烷基、酰氧基甲基、氨基、单烷基氨基、二烷基氨基、羧基、氰基、及硝基等、以及它们中的两种以上的取代基的组合。

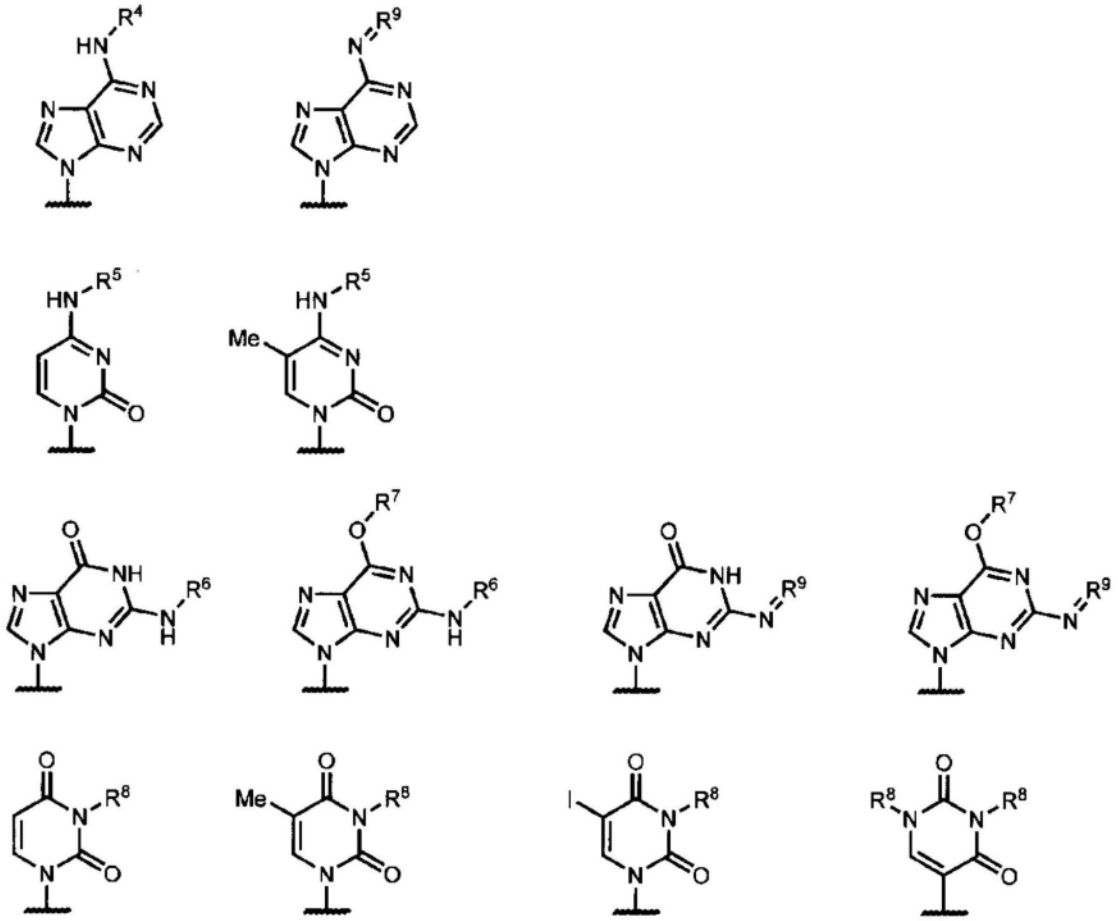
[0195] 作为B^a表示的可被保护基保护的核酸碱基的保护基,没有特别限定,可以使用已知的核酸化学中使用的保护基,作为这样的保护基,例如,可举出苯甲酰基、4-甲氧基苯甲酰基、4-甲基苯甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、苯乙酰基、苯氧基乙酰基、4-叔

丁基苯氧基乙酰基、4-异丙基苯氧基乙酰基、及(二甲基氨基)亚甲基等、以及它们中的两种以上的保护基的组合。

[0196] 更具体而言,B^a表示以下任一者所示的基团。

[0197] [化学式16]

[0198]



[0199] (上述式中,

[0200] R^4表示氢原子、甲基、苯氧基乙酰基、4-叔丁基苯氧基乙酰基、4-异丙基苯氧基乙酰基、苯乙酰基、乙酰基或苯甲酰基,

[0201] R^5表示氢原子、乙酰基、异丁酰基或苯甲酰基,

[0202] R^6表示氢原子、苯氧基乙酰基、4-叔丁基苯氧基乙酰基、4-异丙基苯氧基乙酰基、苯乙酰基、乙酰基或异丁酰基,

[0203] R^7表示2-氰基乙基,

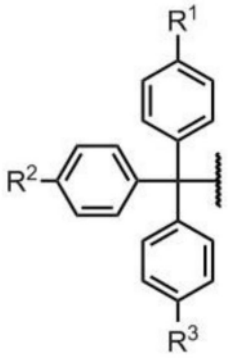
[0204] R^8表示氢原子、甲基、苯甲酰基、4-甲氧基苯甲酰基或4-甲基苯甲酰基,并且,

[0205] R^9表示二甲基氨基亚甲基。)。

[0206] 作为B^c,更具体而言,可举出从上述B^a的具体例中除去保护基而得到的基团。

[0207] 图1中的G^1及G^5(相当于本说明书中记载的式(I)中定义的G^1)优选为以下的基团。

[0208] [化学式17]

[0209] 

[0210] (式中,

[0211] R^1、R^2及R^3相同或彼此不同,各自独立地表示氢原子或烷氧基。)

[0212] R^1、R^2及R^3优选1个为氢原子、剩余的2个为相同或彼此不同(优选相同)的烷氧基,作为烷氧基,特别优选甲氧基。更优选G^5为4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr基)。

[0213] 作为G^2,只要能够作为羟基的保护基发挥功能,就能够没有特别限制地使用,可广泛地使用酰胺化合物中使用的已知的保护基。作为G^2,例如,可举出烷基、链烯基、炔基、环烷基、卤代烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烯基、环烷基烷基、环基烷基(cyclylalkyl group)、羟基烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、杂环基链烯基、杂环基烷基、杂芳烷基、甲硅烷基、甲硅烷氧基烷基、单烷基甲硅烷基、二烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷基、单烷基甲硅烷氧基烷基、二烷基甲硅烷氧基烷基或三烷基甲硅烷氧基烷基等,它们可以被1个以上的吸电子基团取代。

[0214] G^2优选为经吸电子基团(E_W)取代的烷基。作为该吸电子基团,例如,可举出氰基、硝基、烷基磺酰基、卤原子、芳基磺酰基、三卤代甲基及三烷基氨基等,优选为氰基。

[0215] 作为G^2,特别优选以下的基团。

[0216] [化学式18]

[0217] 

[0218] 前述R^1、R^2、R^3及G^2的定义中的烷基可以为直链状或者支链状中的任意,优选为碳原子数1~12的烷基,更优选为碳原子数1~6的烷基。作为具体的烷基例,例如,可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基及己基。构成前述取代基的定义中的烷氧基的烷基部分具有与此处的烷基的定义相同的定义。

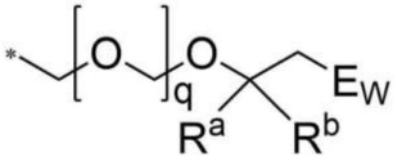
[0219] 另外,本发明的方法中,酰胺化合物可以以游离的状态或盐的状态使用。作为酰胺化合物的盐,可举出碱加成盐或酸加成盐,没有特别限制。作为碱加成盐,具体而言,可举出钠盐、镁盐、钾盐、钙盐、铝盐等与无机碱形成的盐;与甲胺、乙胺、乙醇胺等有机碱形成的盐;与赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸等碱性氨基酸形成的盐;及铵盐。作为酸加成盐,具体而言,可举出与盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸;甲酸、乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、苹果酸、酒石酸、富马酸、琥珀酸、乳酸、马来酸、柠檬酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、乙磺酸等有机酸;及天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸形成的酸加成盐。酰胺化合物也包括盐、水合物、溶剂化物及多晶型等形态。

[0220] R优选表示经保护的羟基。R表示经保护的羟基时的保护基、或V表示的羟基的保护

基只要能够用于酰胺法即可,例如,可以使用2'-叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS基)、2'-双(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE基)、2'-(三异丙基甲硅烷氧基)甲基(TOM基)、2'-(2-氰基乙氧基)乙基(CEE基)、2'-(2-氰基乙氧基)甲基(CEM基)(国际公开第2006/022323号中记载)、2'-对甲苯磺酰基乙氧基甲基(TEM基)、2'-EMM基(国际公开第2013/027843号中记载)、及2'-PMM基(国际公开第2019/208571号中记载)。V优选为2'-叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS基)。另外,利用本发明的方法制造的核酸分子为核糖核酸(RNA)的情况等核酸分子内包含核糖的情况下,作为该核糖的2'位的羟基的保护基,可示例前述式(6)表示的保护基作为优选的保护基。进一步优选示例具有氰基作为E_W表示的吸电子基团的式(12)表示的保护基。

[0221] 式(6):

[0222] [化学式19]

[0223] 

(6)

[0224] (式中,

[0225] q表示0~5中的任一整数,

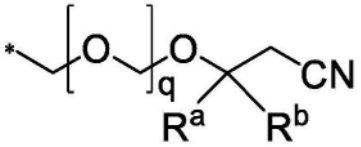
[0226] R^a及R^b相同或彼此不同,各自独立地表示甲基、乙基或氢原子,

[0227] *标记表示与源自核糖的2'位的羟基的氧原子的键合点,并且,

[0228] E_W表示吸电子基团。)。

[0229] 式(12):

[0230] [化学式20]

[0231] 

(12)

[0232] (式中,

[0233] q、R^a及R^b与前述式(6)中的定义为相同的定义。)。

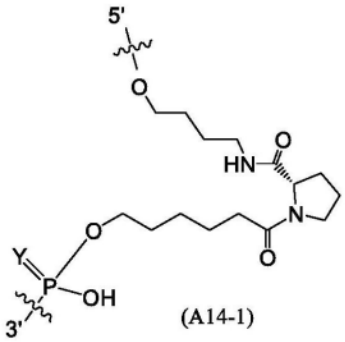
[0234] 进一步优选地,在式(12)表示的基团中,可示例q为1、R^a及R^b同时为氢原子的基团、以及q为1、R^a或R^b中的任一者为甲基、另一者为氢原子的基团。

[0235] 式(6)(包括式(12))表示的保护基例如可按照国际公开第2013/027843号公报及国际公开第2019/208571号公报的记载来合成,能够将具有该保护基的酰胺化合物用于核酸化合物的制造。

[0236] 核酸的延伸反应使用图1的路线A中记载的式(13)表示的酰胺化合物。

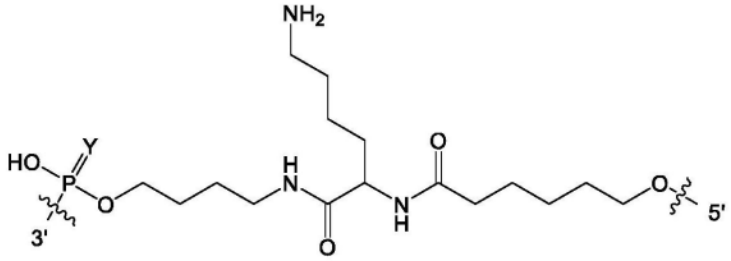
[0237] 作为非核苷酸接头,可示例由氨基酸骨架形成的接头(例如,由国际公开2006/022323号或国际公开2013/027843号中记载的氨基酸骨架形成的接头)。具体而言,作为非限定性例子,例如,可示例由式(A14-1)或(A14-2)或(A14-3)(例如,国际公开第2019/074110号公报中记载)表示的接头。在这些接头以外,还可示例国际公开第2012/005368号公报、国际公开第2018/182008号公报或国际公开第2019/074110号公报中记载的接头。

[0238] [化学式21]



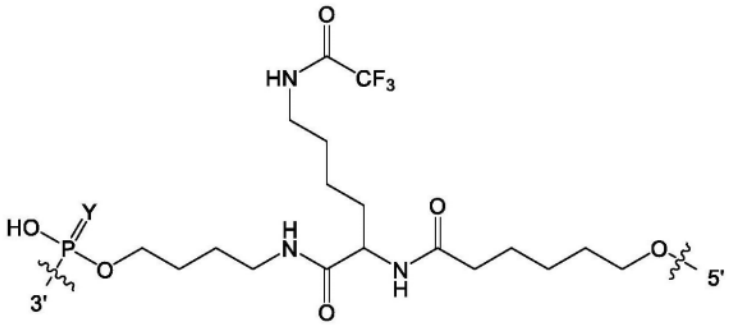
(A14-1)

,



(A14-2)

[0239]



(A14-3)

[0240] (式中,Y与前述相同。)

[0241] 式(13)中的R基及式(5)中的R'基为羟基以外的取代基的核苷酸及酰胺也可以由利用日本专利第3745226号公报等中记载的已知的方法、国际公开第2001/053528号或日本特开2014-221817号公报及这些文献中引用的已知的方法合成的核苷进行制造,此外,能够使用可作为市售品购入的物质,依照后述的实施例中记载的方法或利用对这些方法加以适当变更而得的方法进行制造。

[0242] G^4表示氢原子、碱金属离子、铵离子、烷基铵离子、或羟基烷基铵离子。作为碱金属离子,例如,可举出钠离子、及锂离子。另外,关于烷基铵离子,作为具体的烷基的例子,例如,可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基及己基,更具体而言,例如,可举出二乙基铵离子、三乙基铵离子、四丁基铵离子、己基铵离子及二丁基铵离子等。另外,关于羟基烷基铵离子,作为具体的羟基烷基部分的例子,例如,可举出羟基甲基、羟基乙基、羟基正丙基、羟基异丙基、羟基正丁基及三羟基甲基,作为更具体的羟基烷基铵离子的例子,可举出三羟基甲基铵离子等。G^4优选表示氢原子。

[0243] G^5表示氢原子、或前述羟基的保护基,表示保护基的情况下,G^1也表示相同的保护基。G^5在经脱保护的情况下为氢原子,此时的核苷酸化合物也再被供于一系列的核酸延伸反应的工序。

[0244] Y优选为氧原子。

[0245] 就W_1及X_1而言,优选W_1表示OZ基,并且X_1表示R基。

[0246] 就W_2及X_2而言,优选W_2表示羟基,并且X_2表示R基。

[0247] W_3及X_3优选分别各自独立地表示羟基。

[0248] R'优选为羟基。

[0249] 对于基于前述工序(1)至(5)的酰胺法的核酸寡聚物的合成而言,图1的路线中的工序(1)或工序(5)中的、本发明涉及的脱保护工序以外,可以按照通常已知的方法(例如,

前述的日本专利第5157168号公报或日本专利第5554881号公报中记载的方法)进行核酸延伸反应。以下,对各工序进行说明。

[0250] (核酸延伸反应)

[0251] 本说明书中,所谓“核酸延伸反应”,是指介由磷酸二酯键使核苷酸依次键合,由此使寡核苷酸延伸的反应。核酸延伸反应可以按照通常的亚磷酰胺法的步骤进行。核酸延伸反应也可以使用采用亚磷酰胺法的核酸自动合成装置等来进行。

[0252] 核酸分子的链长(N)例如可以为20mer以上(即,n≥19)、40mer以上(即,n≥39)、50mer以上(即,n≥49)、60mer以上(即,n≥59)、80mer以上(即,n≥79)、100mer以上(即,n≥99)、200mer以上(即,n≥199)、2～300mer(即,1≤n≤299)、2～250mer(即,1≤n≤249)、2～200mer(即,1≤n≤199)、10～300mer(即,9≤n≤299)、10～250mer(即,9≤n≤249)、10～200mer(即,9≤n≤199)、10～150mer(即,9≤n≤149)、15～300mer(即,14≤n≤299)、15～250mer(即,14≤n≤249)、15～200mer(即,14≤n≤199)、15～150mer(即,14≤n≤149)、15～110mer(即,14≤n≤109)。

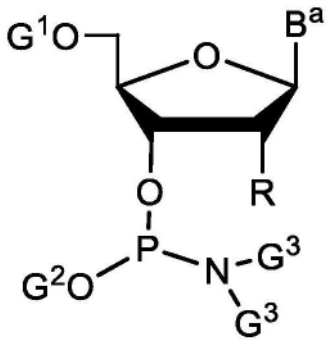
[0253] 工序(1)的脱保护工序是对担载于固相载体上的寡核苷酸链末端的5’羟基的保护基进行脱保护的工序。作为通常的保护基,可使用4,4’-二甲氧基三苯甲基(DMTr基)、4-单甲氧基三苯甲基、4,4’,4”-三甲氧基三苯甲基。脱保护可以使用酸来进行。作为脱保护用的酸,例如,可举出三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、盐酸、乙酸及对甲苯磺酸等。

[0254] 工序(2)的缩合工序是使图1的路线A中记载的下述式(13)表示的核苷亚磷酰胺与通过前述脱保护工序进行了脱保护的寡核苷酸链末端的5’羟基键合的反应。需要说明的是,作为核酸延伸中使用的亚磷酰胺,可示例式(13)、国际公开2013/027843号的实施例2中记载的尿苷EMM酰胺、实施例3中记载的胞苷EMM酰胺、实施例4中记载的腺苷EMM酰胺、及实施例5中记载的鸟苷EMM酰胺、国际公开第2019/208571号记载的尿苷PMM酰胺、胞苷PMM酰胺、腺苷PMM酰胺、及鸟苷PMM酰胺。另外,作为其他可使用的亚磷酰胺,可举出2’-OMe、2’-F、2’-O-叔丁基二甲基甲硅烷基、2’-O-甲氧基乙基、2’-双(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE基)、2’-(三异丙基甲硅烷氧基)甲基(TOM基)、2’-(2-氰基乙氧基)乙基(CEE基)、2’-(2-氰基乙氧基)甲基(CEM基)、2’-对甲苯磺酰基乙氧基甲基(TEM基)、2’-H、及2’-氟-2’-脱氧-β-D-阿拉伯呋喃糖基等。作为前述核苷亚磷酰胺,使用5’羟基被保护基(例如DMTr基)保护的核苷亚磷酰胺。缩合工序可以使用将前述核苷亚磷酰胺活化的活化剂或缩合剂来进行。作为活化剂或缩合剂,例如,可举出5-苄基硫基-1H-四氮唑(BTT)(也称为5-苄基巯基-1H-四氮唑)、1H-四氮唑、4,5-二氰基咪唑(DCI)、5-乙基硫基-1H-四氮唑(ETT)、N-甲基苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(N-MeBIT)、苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(BIT)、N-苯基咪唑鎓三氟甲磺酸盐(N-PHIMT)、咪唑鎓三氟甲磺酸盐(IMT)、5-硝基苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(NBT)、1-羟基苯并三唑(HOBT)或5-(双-3,5-三氟甲基苯基)-1H-四氮唑等。

[0255] 图1的路线A中记载的式(13)表示的核苷亚磷酰胺(以下,称为酰胺)如下所示。

[0256] 下式表示的化合物:

[0257] [化学式22]

[0258] 

(13)

[0259] (式中,

[0260] G^1、G^2、G^3、B^a及R与前文相同。)。

[0261] 在缩合工序之后,可以适当对未反应的5'羟基进行加帽。加帽可以使用乙酸酐-四氢呋喃溶液、或苯氧基乙酸酐/N-甲基咪唑溶液等已知的加帽溶液来进行。

[0262] 工序(3)的氧化工序是将通过前述缩合工序形成的亚磷酸基转化为磷酸基或硫代磷酸基的工序。本工序是使用氧化剂将3价的磷转化为5价的磷的反应,可以通过使氧化剂与担载于固相载体的寡核酸衍生物反应来实施。

[0263] 在将亚磷酸基转化为磷酸基的情况下,作为"氧化剂",例如,可以使用碘。该氧化剂可以以成为0.005～2M的浓度的方式制备而使用。作为氧化的氧源,可以使用水,作为使反应进行的碱,可以使用吡啶、N-甲基咪唑(NMI)、N-甲基吗啉或三乙胺等。另外,作为溶剂,只要不参与反应即可,没有特别限定,可举出乙腈、四氢呋喃(THF)或它们的任意比例的混合溶剂。例如,可以使用碘/水/吡啶/乙腈、或碘/水/吡啶或碘/水/吡啶/NMI、或碘/水/吡啶/THF。反应温度优选为5℃～50℃。反应时间通常为1分钟～30分钟是适当的。相对于担载于固相载体上的化合物1mol而言,所使用的试剂的量优选为1～100mol,更优选为1～10mol。

[0264] 将亚磷酸三酯基转化为硫代磷酸三酯基的情况下,作为"氧化剂",例如,可以使用硫、3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(Beaucage试剂)、3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(ADTT)、5-苯基-3H-1,2,4-二噻唑-3-酮(POS)、[(N,N-二甲基氨基次甲基)氨基]-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮(DDTT)、及苯乙酰二硫化物(PADS)。该氧化剂可以以成为0.001～2M的浓度的方式用适当的溶剂稀释后使用。作为反应中使用的溶剂,只要不参与反应即可,没有特别限定,例如,可举出二氯甲烷、乙腈、吡啶或它们的任意比例的混合溶剂。氧化工序可以在前述加帽操作之后进行,反之也可以在氧化工序之后进行加帽操作,其顺序没有限定。

[0265] 工序(5-1)中,对于在延伸的最后引入的核苷酸的5'位的羟基的保护基,可以在从后述的固相载体上切出及保护基的脱保护之后,用于以5'位的羟基的保护基为标签的柱纯化,也可以在柱纯化后对5'位的羟基的保护基进行脱保护。

[0266] 工序(5-2)中,对磷酸保护基进行脱保护的工序在具有所期望的序列的核酸的合成完成之后,使胺化合物发挥作用,以对磷酸部分的保护基进行脱保护。作为胺化合物,例如,可举出日本专利第4705716号公报中记载的二乙胺等。

[0267] 对于工序(5-2)中的在固相载体上延伸至所期望的链长的核酸分子从固相载体的切出而言,通常使用浓氨水作为切出剂来实施。

[0268] 进一步使用氨或胺化合物等,例如,从固相载体上切断寡核苷酸链并进行回收。作为胺化合物,例如,可举出甲胺、乙胺、异丙胺、乙二胺或二乙胺等。

[0269] 工序(5-3)中,工序(5-2)中从固相载体切出的核酸寡聚物(4)的核糖的2'位或3'位的羟基的保护基可以按照国际公开第2006/022323号、国际公开第2013/027843号、或国际公开第2019/208571号中记载的方法除去,从而得到经脱保护的核酸分子(5)。

[0270] 作为使用本发明的制造方法可制造的核酸寡聚物(寡核苷酸),可举出核酸寡聚物内包含的核苷是RNA、DNA、以及具有2'-O-MOE、2'-O-Me、2'-F的RNA、及LNA的核酸分子,但不限于这些。例如,可举出Xiulong,Shen等著、Nucleic Acids Research,2018,Vol.46,No.46,1584-1600、及Daniel O'Reilly等著、Nucleic Acids Research,2019,Vol.47,No.2,546-558中记载的各种核苷的例子。由本发明的方法制造的核酸寡聚物优选为核糖核酸(RNA)。更优选地,可举出由本发明的方法制造的核酸寡聚物为核糖核酸(RNA)、且该核糖的2'位的羟基的保护基为式(6)表示的保护基的核酸寡聚物。

[0271] 通过使用本发明的制造方法,作为一个方式,能够制造寡核苷酸中的核苷酸缺失体(也记为N-1mer)的含量减少的寡核苷酸。

[0272] 此处,在寡核苷酸中,将相对于寡核苷酸中的全长体(FLP(Full Length Product))而言的N-1mer的含量、即把寡核苷酸中的全长体(FLP)的含量设为100%时的N-1mer的含量(%)定义为"N-1mer含量比"。

[0273] 作为寡核苷酸中的N-1mer的含量比,具体而言,可示例小于5.8%、5.7%以下、5.5%以下、5%以下、4.5%以下、4%以下、3.5%以下、3%以下、2.5%以下、2.3%以下、2.3%、2.1%以下、2.1%,另外,可示例大于0%、0.001%以上、0.01%以上、0.1%以上,但不限于这些。

[0274] 作为具体的寡核苷酸,具体可示例以下的寡核苷酸,但不限于这些。

[0275] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于5.8%的寡核苷酸。

[0276] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.7%以下的寡核苷酸。

[0277] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.5%以下的寡核苷酸。

[0278] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5%以下的寡核苷酸。

[0279] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4.5%以下的寡核苷酸。

[0280] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4%以下的寡核苷酸。

[0281] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3.5%以下的寡核苷酸。

[0282] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3%以下的寡核苷酸。

[0283] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.5%以下的寡核苷酸。

[0284] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.3%以下的寡核苷酸。

[0285] 寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.1%以下的寡核苷酸。

[0286] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于5.8%的寡核苷酸。

[0287] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.7%以下的寡核苷酸。

[0288] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.5%以下的寡核苷酸。

[0289] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5%以下的寡核苷酸。

[0290] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4.5%以下的寡核苷酸。

[0291] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4%以下的寡核苷酸。

[0292] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3.5%以下的寡核苷酸。

[0293] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3%以下的寡核苷酸。

[0294] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.5%以下的寡核苷酸。

[0295] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.3%以下的寡核苷酸。

[0296] 寡核苷酸的链长为50mer以上、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.1%以下的寡核苷酸。

[0297] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于5.8%的寡核苷酸。

[0298] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.7%以下的寡核苷酸。

[0299] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.5%以下的寡核苷酸。

[0300] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5%以下的寡核苷酸。

[0301] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4.5%以下的寡核苷酸。

[0302] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4%以下的寡核苷酸。

[0303] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3.5%以下的寡核苷酸。

[0304] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3%以下的寡核苷酸。

[0305] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.5%以下的寡核苷酸。

[0306] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.3%以下的寡核苷酸。

[0307] 寡核苷酸的链长为50mer以上200mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.1%以下的寡核苷酸。

[0308] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于

5.8%的寡核苷酸。

[0309] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.7%以下的寡核苷酸。

[0310] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.5%以下的寡核苷酸。

[0311] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5%以下的寡核苷酸。

[0312] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4.5%以下的寡核苷酸。

[0313] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4%以下的寡核苷酸。

[0314] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3.5%以下的寡核苷酸。

[0315] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3%以下的寡核苷酸。

[0316] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.5%以下的寡核苷酸。

[0317] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.3%以下的寡核苷酸。

[0318] 寡核苷酸的链长为50mer以上250mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.1%以下的寡核苷酸。

[0319] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于5.8%的寡核苷酸。

[0320] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.7%以下的寡核苷酸。

[0321] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.5%以下的寡核苷酸。

[0322] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5%以下的寡核苷酸。

[0323] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4.5%以下的寡核苷酸。

[0324] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4%以下的寡核苷酸。

[0325] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3.5%以下的寡核苷酸。

[0326] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3%以下的寡核苷酸。

[0327] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.5%以下的寡核苷酸。

[0328] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.3%以下的寡核苷酸。

[0329] 寡核苷酸的链长为50mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.1%以下的寡核苷酸。

[0330] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比小于5.8%的寡核苷酸。

[0331] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.7%以下的寡核苷酸。

[0332] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5.5%以下的寡核苷酸。

[0333] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为5%以下的寡核苷酸。

[0334] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4.5%以下的寡核苷酸。

[0335] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为4%以下的寡核苷酸。

[0336] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3.5%以下的寡核苷酸。

[0337] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为3%以下的寡核苷酸。

[0338] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.5%以下的寡核苷酸。

[0339] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.3%以下的寡核苷酸。

[0340] 寡核苷酸的链长为100mer以上300mer以下、且寡核苷酸中的N-1mer的含量比为2.1%以下的寡核苷酸。

[0341] 对于本发明的制造方法中可使用的核酸分子的典型例而言,在实施例中记载的例子之外,还示出下述例子,但不限于这些。

[0342] 以下,序列的说明中,U表示尿苷,C表示胞苷,A表示腺苷,另外G表示鸟苷。

[0343] 可举出国际公开第2019/060442号公报中记载的、具有下述的序列(A)及(B)的核酸分子。

[0344] 序列(A):5'-AUGGAAUmACUCUUGGUUmACdTdT-3'(按照ST.25标准)(5'-ATGGAATmACTCTTGGTTmACdTdT-3'(按照ST.26标准))(反义)(序列号1)21mer

[0345] 序列(B):5'-GUmAACmCmAAGAGUmAUmUmCmCmAUmd TdT-3'(按照ST.25标准)(5'-GTmAACmCmAAGAGTmATmTmC mCmATmdTdT-3'(按照ST.26标准))(正义)(序列号2)21mer

[0346] 序列(A)及(B)中,Um表示2'-O-甲基尿苷(ST.25标准),Tm表示2'-O-甲基尿苷(ST.26标准),Cm表示2'-O-甲基胞苷,另外dT表示胸苷。本说明书中,只要没有特别说明,序列中的缩写适用于ST.25标准及ST.26标准这两者。

[0347] 可举出Daniel O'Reilly等著、Nucleic Acids Research,2019,Vol.47,No.2,

546-558中记载的核酸分子(参见553页)。作为典型例,可举出具有下述的序列(C)的核酸分子。

[0348] 序列(C):5'-AGAGCCAGCCUUCUUAUUGUUUUAGAGCU AUGCUGU-3'(按照ST.25标准)(5'-AGAGCCAGCCTTCTTATT GTTTTAGAGCTATGCTGT-3'(按照ST.26标准))(序列号3)36mer

[0349] 可举出Nucleic Acids Research,2019,Vol.47,No.2:547中记载的、具有下述的序列(D)的核酸分子。

[0350] 序列(D):5'-ACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3'(按照ST.25标准)(5'-ACAGCATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT-3'(按照ST.26标准))(序列号4)67mer

[0351] 可举出日本特表2015-523856号公报的173页中记载的、具有下述的序列(E)的核酸分子。

[0352] 序列(E):5'-GUUUUCCCUUUUCAAAGAAAUCUCCUGGGCACCUAUCUUCUUAGGUGCCCUCCCUUGUUUAAACCUGACCAGUUAACCGGCUGGUUAGGUUUUU-3'(按照ST.25标准)(5'-GTTTTCCCTTTTCAAAGAAATCTCCTGGGCACCTATCTTCTTAGGTGCCCTCCCTTGTTTAAACCTGACCAGTTAACCGGCTGGTTAGGTTTT-3'(按照ST.26标准))(序列号5)94mer

[0353] 可举出日本特表2017-537626号公报中记载的核酸分子。作为典型例,可举出具有下述的序列(F)、(G)、(H)及(J)的核酸分子。

[0354] 序列(F):5'-AGUCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3'(按照ST.25标准)(5'-AGTCCTCATCTCCCTCAAGCGTTTTAGAGCTAGTAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTT-3'(按照ST.26标准))(序列号6)100mer

[0355] 序列(G):5'-GCAGAUGUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU-3'(按照ST.25标准)(5'-GCAGATGTAGTGTTTCCACAGTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT-3'(按照ST.26标准))(序列号7)113mer

[0356] 序列(H):5'-dAdGdTdCdCdTdCdAdTdCdTdCdCdCdTdCdAd AdGdCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU-3'(按照ST.25标准)(5'-dAdGdTdCdCdTd CdAdTdCdTdCdCdCdTdCdAdAdGdCGTTTAAGAGCTATGCTGGTAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT-3'(按照ST.26标准))(序列号8)113mer

[0357] 序列(H)中,dT表示胸苷,dC表示2'-脱氧胞苷,dA表示2'-脱氧腺苷,另外dG表示2'-脱氧鸟苷。

[0358] 序列(J):5'-AmsGmsUmsCCUCAUCUCCCUCAAGCGUUUA AGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUmsUmsUmsU-3'(按照ST.25标准)(5'-AmsGmsTmsCCTCATCT CCCTCAAGCGTTTAAGAGCTATGCTGGTAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTmsTmsTmsT-3'(按照ST.26标准))(序列号9)113mer

[0359] 序列(J)中,Um表示2'-O-甲基尿苷(ST.25标准),Tm表示2'-O-甲基尿苷(ST.26标准),Am表示2'-O-甲基腺苷,Gm表示2'-O-甲基鸟苷,另外s表示硫代磷酸酯修饰。

[0360] 实施例

[0361] 以下,通过实施例更详细地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0362] 测定方法

[0363] 首先,以下示出以下的试验中使用的各种测定方法。

[0364] (测定方法1:寡核苷酸中的FLP纯度及N-1mer含量的测定)

[0365] 寡核苷酸纯度使用HPLC来测定。FLP是指全长的目标物质(Full Length Product,全长体)。

[0366] 将HPLC测定条件示于下述表1。

[0367] [表1]

[0368] 表1

[0369]

柱	DNAPac™ PA200 4×250mm
流速	1.0 mL/min
检测波长	260nm
流动相A	25mM Tris-HCl缓冲液(pH=8.0), 10% CH_3CN, 6M 尿素水
流动相B	500mM $NaClO_4$, 25mM Tris-HCl缓冲液 (pH=8.0), 10% CH_3CN, 6M 尿素水
梯度条件	Bconc. 20%(0min)-60%(60min)-90% (60.01min)-90%(65min)-20%(65.01min)-20%(80min)
柱温	80℃
注入量	10μL

[0370] N-1mer含量是指通过利用本测定方法1对所得到的寡核苷酸进行分析而求出的、所得到的寡核苷酸中的N-1mer的含量(面积百分率)。FLP纯度是指通过利用前述测定方法1对所得到的寡核苷酸进行分析而求出的、所得到的寡核苷酸中的FLP的含量(面积百分率)。

[0371] (测定方法2:寡核苷酸收量的测定)

[0372] 测定前述粗产物的OD_{260}。OD_{260}表示1mL溶液(pH=7.5)中的每10mm光程的UV260nm的吸光度。通常,就RNA而言,已知1OD_{260}=40μg,因此可基于前述OD_{260}的测定值算出收量。

[0373] 寡核苷酸的固相合成

[0374] 序列(I):

[0375] 5'-UmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUm UmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUm-3'(按照ST.25标准)

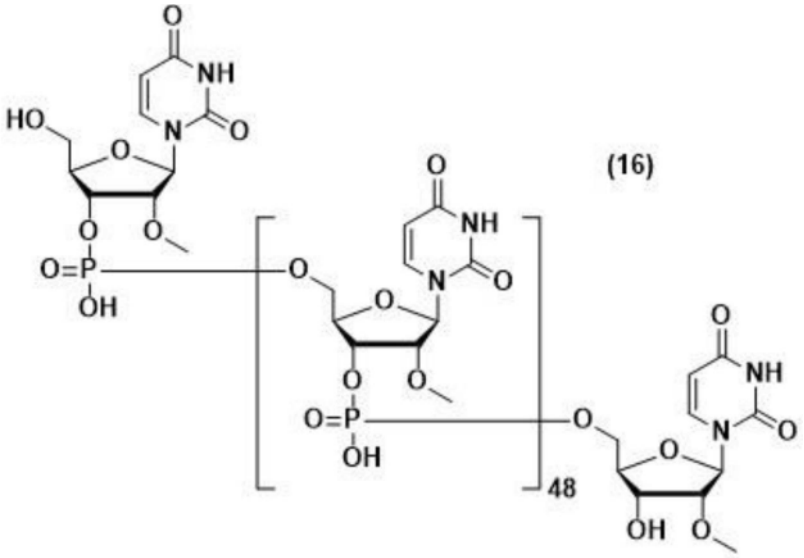
[0376] (5'-TmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmT mTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTmTm-3'(按照ST.26标准))

[0377] (序列号10)50mer

[0378] 序列(I)中,Um表示2'-O-甲基尿苷(ST.25标准),Tm表示2'-O-甲基尿苷(ST.26标准)。本说明书中,只要没有特别说明,序列中的缩写适用于ST.25标准及ST.26标准这两者。

[0379] 前述序列(I)表示以下的结构式(16)。

[0380] [化学式23]

[0381] 

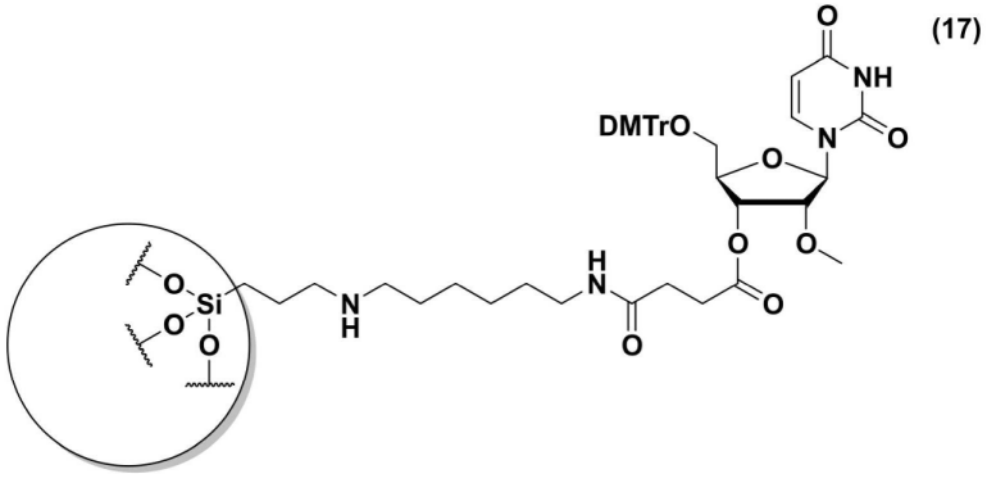
(16)

[0382] 作为固相载体,使用可控多孔玻璃(CPG),作为核酸合成仪,使用NTS M-4MX-E(NIHON TECHNO SERVICE CO.LTD制),利用亚磷酰胺固相合成法,从3'侧朝向5'侧合成由前述序列(I)构成的寡核苷酸。就合成而言,以约1μmol规模实施。另外,合成中,使用式(18)表示的2'-OMe-U酰胺,作为脱保护溶液,使用高纯度二氯乙酸甲苯溶液,作为缩合剂,使用5-苄基硫基-1H-四氮唑溶液,作为氧化剂使用碘溶液,作为加帽溶液,使用苯氧基乙酸酐溶液和N-甲基咪唑溶液。

[0383] 接着,示出由本发明的制法制造的寡核苷酸的具体的制造例。此处,在下述的实施例中由本发明的制法制造的寡核苷酸为具有前述序列号10所示的序列(I)的寡核苷酸。

[0384] 另外,以下的实施例及比较例中记载的担载有2'-OMe-U衍生物的CPG是指下述式(17)所示的化合物。其中,式(17)中图示的圆圈示意性地示出了CPG。

[0385] [化学式24]

[0386] 

(17)

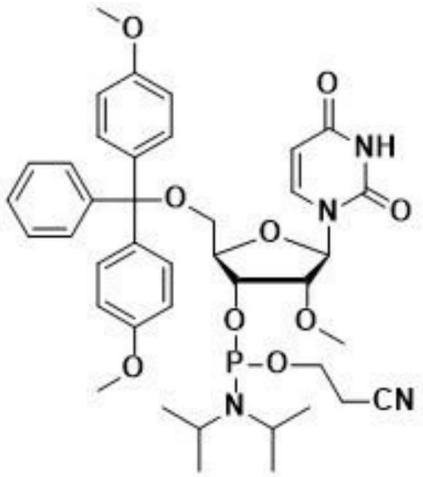
[0387] 实施例1

[0388] 使用担载有1.01μmol的2'-OMe-U衍生物的可控多孔玻璃(CPG)、和式(18)表示的2'-OMe-U酰胺,利用NTS M-4MX-E(NIHON TECHNO SERVICE CO.LTD制),从3'侧朝向5'侧自动合成序列(I)所示的寡核苷酸。自动合成的步骤中,首先,将脱保护溶液(1-十二烷硫醇:二氯乙酸:甲苯=0.5:3.0:96.5)送液至CPG,对5'位的三苯甲基保护基进行脱保护。接着,将2'-OMe-U酰胺和作为缩合剂的5-苄基巯基-1H-四氮唑送液至CPG,使5'位的羟基进行偶

联反应。接着,将包含50mM碘的氧化溶液进行送液,将亚磷酸基转化为磷酸基。接着,作为加帽溶液,使用0.1M苯氧基乙酸酐乙腈溶液和10%N-甲基咪唑/10%2,6-二甲基吡啶乙腈溶液,对未进行偶联的反应点实施加帽。进一步将这些工序合计重复49次后,用脱保护溶液(1-十二烷硫醇/二氯乙酸/甲苯=0.5/3.0/96.5)对5'端的碱基中的保护基(DMTr基)进行脱保护,在CPG载体上合成序列(I)所示的序列的寡核苷酸。然后,针对担载有1.01μmol量的寡核苷酸的CPG载体,流入28%氨水750μL和乙醇250μL,将混合物于40℃保温4小时,由此使寡核苷酸从固相载体游离。然后,通过过滤将固相载体除去,利用减压干燥将氨水和乙醇除去,以干燥固体的形态得到所期望的寡核苷酸。针对所得到的产物,利用前述测定方法1中记载的方法,测定寡核苷酸的纯度,结果N-1mer的含量为1.5%,FLP的纯度为71.3%。另外,利用前述测定方法2中记载的方法测定寡核苷酸的收量,结果收量为12.6mg,若换算为每担载有1.00μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG的收量,为12.5mg。将结果示于表2。

[0389] 式(18)表示的2'-OMe-U酰胺为以下的结构。

[0390] [化学式25]

[0391] 

(18)

[0392] 实施例2

[0393] 在实施例1的方法中,作为脱保护溶液,使用环己硫醇/二氯乙酸/甲苯=0.5/3.0/96.5,除此以外,利用同样的方法得到序列(I)的寡核苷酸。利用前述测定方法1中记载的方法,测定寡核苷酸的纯度,结果N-1mer的含量为1.6%,FLP的纯度为70.4%。另外,利用前述测定方法2中记载的方法,测定寡核苷酸的收量,结果收量为12.6mg,若换算成每担载有1.00μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG的收量,为12.5mg。将结果示于表2。

[0394] 比较例1

[0395] 在实施例1的方法中,使用担载有1.00μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG、和作为脱保护溶液的二氯乙酸/甲苯=3.0/97.0,除此以外,利用同样的方法得到序列(I)的寡核苷酸。利用前述测定方法1中记载的方法,测定寡核苷酸的纯度,结果N-1mer的含量为4.9%,FLP的纯度为62.8%。另外,利用前述测定方法2中记载的方法,测定寡核苷酸的收量,结果收量为12.2mg。将结果示于表2。

[0396] 比较例2

[0397] 在实施例1的方法中,使用担载有0.96μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG、和作为脱保护溶液的三乙基硅烷/二氯乙酸/甲苯=3.0/3.0/94.0,除此以外,利用同样的方法得到序列(I)的寡核苷酸。利用前述测定方法1中记载的方法,测定寡核苷酸的纯度,结果N-1mer的

含量为3.8%,FLP的纯度为65.7%。另外,利用前述测定方法2中记载的方法,测定寡核苷酸的收量,结果收量为11.7mg,若换算成每担载有1.00μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG的收量,为12.2mg。将结果示于表2。

[0398] 比较例3

[0399] 在实施例1的方法中,使用担载有1.03μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG、和作为脱保护溶液的甲醇/二氯乙酸/甲苯=0.5/3.0/96.5,除此以外,利用同样的方法得到序列(I)的寡核苷酸。利用前述测定方法1中记载的方法,测定寡核苷酸的纯度,结果N-1mer的含量为9.6%,FLP的纯度为63.5%。另外,利用前述测定方法2中记载的方法,测定寡核苷酸的收量,结果收量为12.7mg,若换算成每担载有1.00μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG的收量,为12.3mg。将结果示于表2。

[0400] 比较例4

[0401] 在实施例1的方法中,使用担载有1.04μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG、和作为脱保护溶液的异丙醇/二氯乙酸/甲苯=0.5/3.0/96.5,除此以外,利用同样的方法得到序列(I)的寡核苷酸。利用前述测定方法1中记载的方法,测定寡核苷酸的纯度,结果N-1mer的含量为12.5%,FLP的纯度为59.2%。另外,利用前述测定方法2中记载的方法,测定寡核苷酸的收量,结果收量为12.4mg,若换算成每担载有1.00μmol的2'-OMe-U衍生物的CPG的收量,为11.9mg。将结果示于表2。

[0402] 将实施例1、2及比较例1~4的结果示于表2。

[0403] [表2]

[0404] 表2

[0405]

	阳离子清除剂	收量 (mg/μmol)	N-1 mer 含量(%)	FLP 纯度(%)	N-1 mer/ FLP(%)
实施例1	1-十二烷硫醇	12.5	1.5	71.3	2.1
实施例2	环己硫醇	12.5	1.6	70.4	2.3
比较例1	—	12.2	4.9	62.8	7.8
比较例2	三乙基硅烷	12.2	3.8	65.7	5.8
比较例3	甲醇	12.3	9.6	63.5	15.1
比较例4	异丙醇	11.9	12.5	59.2	21.1

[0406] 在表2中,所谓N-1mer含量,是指通过利用前述测定方法1对所得到的寡核苷酸进行分析而求出的、所得到的寡核苷酸中的N-1mer的含量(面积百分率)。另外,所谓FLP纯度,是指通过利用前述测定方法1对所得到的寡核苷酸进行分析而求出的、所得到的寡核苷酸中的FLP的含量(面积百分率)。所谓"N-1mer/FLP",是指将所得到的寡核苷酸中的FLP的含量设为100%时的、N-1mer的含量比,由下式求出。

[0407] "N-1mer/FLP"(%)=N-1mer含量/FLP纯度×100

[0408] 产业上的可利用性

[0409] 本发明提供使用硫醇化合物作为阳离子清除剂的高效的5'羟基的保护基的脱保护反应。另外,能够期待按照寡核苷酸的制造方法制造的寡核苷酸的收率及纯度的提高。

[0410] 序列表自由文本

[0411] 序列表的序列号1~10表示按照本发明的寡核苷酸的制造方法制造的寡核苷酸的碱基序列。

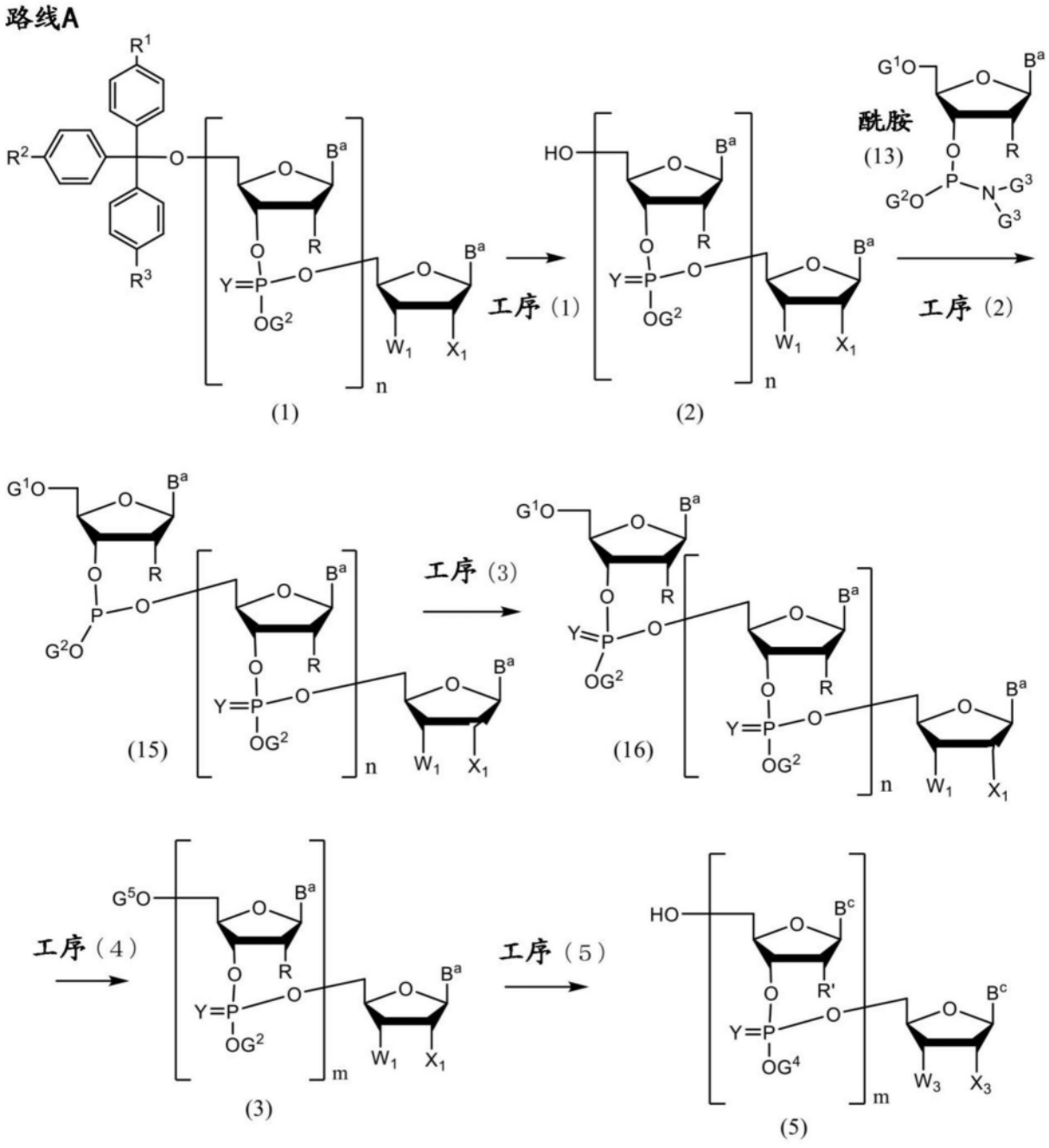


图1