



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114555617 B

(45) 授权公告日 2024.03.08

(21) 申请号 202080072331.X	CA 2642693 A1,2007.08.30
(22) 申请日 2020.10.13	CN 101048423 A,2007.10.03
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 114555617 A	CN 101155821 A,2008.04.02
(43) 申请公布日 2022.05.27	CN 108635367 A,2018.10.12
(30) 优先权数据 2019-190698 2019.10.18 JP	CN 109311925 A,2019.02.05
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2022.04.15	CN 1723216 A,2006.01.18
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2020/038612 2020.10.13	US 2006247431 A1,2006.11.02
(87) PCT国际申请的公布数据 W02021/075423 JA 2021.04.22	US 2008139797 A1,2008.06.12
(73) 专利权人 富士胶片和光纯药株式会社 地址 日本大阪府	US 2009306358 A1,2009.12.10
(72) 发明人 菊池正峰 佐野君彦	US 2011065909 A1,2011.03.17
(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127 专利代理师 于洁 庞东成	US 2017000738 A1,2017.01.05
(51) Int.Cl. C07H 1/02 (2006.01) C07H 23/00 (2006.01)	US 2017166895 A1,2017.06.15
(56) 对比文件 JP 2007531794 A,2007.11.08	US 5218088 A,1993.06.08

Wolfgang K.-D. Brill et al..Synthesis of Deoxydinucleoside Phosphorodithioates.《J. Am. Chem. SOC.》.1991,第113卷(第10期),第3972-3980页.

Yogesh S. Sanghvi et al..Improved Process for the Preparation of Nucleosidic Phosphoramidites Using a Safer and Cheaper Activator.《Organic Process Research & Development》.2000,第4卷第175-181页.

文思远,王升启.寡核苷酸自动合成试剂的研究进展.《化学试剂》.2000,第22卷(第05期),第285-288,284页.

审查员 李雅琴

权利要求书2页 说明书22页

(54) 发明名称  
亚磷酰胺活化剂  
酯或硫代磷酸酯的合成方法。

(57) 摘要

本发明的课题在于提供一种提高5-苄硫基-1H-四唑在乙腈中的溶解性且不会降低目标物的产率/纯度的亚磷酰胺活化剂。本发明涉及一种包含 (i) 选自自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的至少一种化合物、(ii) 5-苄硫基-1H-四唑以及 (iii) 乙腈的亚磷酰胺活化剂;使用该活化剂的亚磷酰胺的活化方法及磷酸

CN 114555617 B

1. 一种亚磷酰胺活化剂,其包含:(i)选自由哌啶、吡咯烷、N-甲基哌啶及N-甲基吡咯烷组成的组中的至少一种化合物;(ii)5-苄硫基-1H-四唑;以及(iii)乙腈,其中,

所述(ii)的摩尔浓度为0.25mol/L以上,

所述(i)的哌啶的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为17.0%以上,所述(i)的吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为20.0%以上,所述(i)的N-甲基哌啶的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为13.7%以上,且所述(i)的N-甲基吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为16.0%以上。

2. 根据权利要求1所述的亚磷酰胺活化剂,其中,

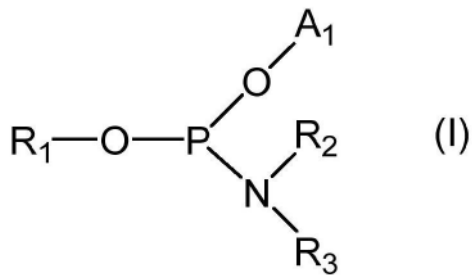
所述(i)为N-甲基哌啶或N-甲基吡咯烷。

3. 根据权利要求1所述的亚磷酰胺活化剂,其中,

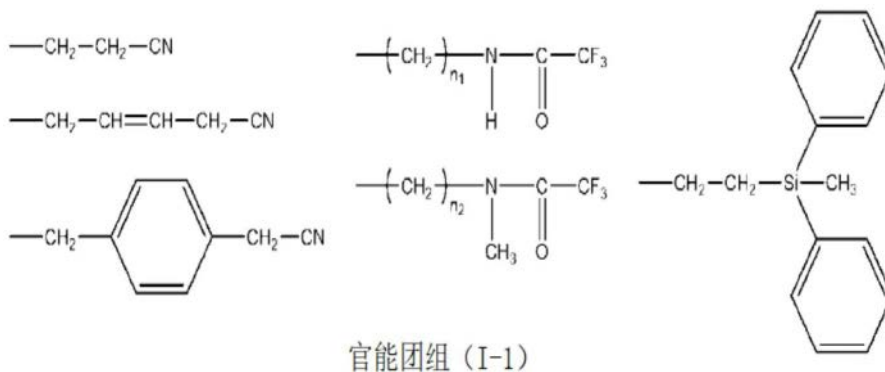
所述(i)的哌啶的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为17.0%以上,所述(i)的吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为24.0%以上,且所述(i)的N-甲基哌啶或N-甲基吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为19.3%以上。

4. 一种亚磷酰胺的活化方法,其包括使亚磷酰胺与权利要求1所述的亚磷酰胺活化剂进行反应的工序,其中,

所述亚磷酰胺为下述通式(I)所表示的化合物:



通式(I)中, $R_1$ 表示选自下述官能团组(I-1)中的基团:



官能团组(I-1)中, $n_1$ 及 $n_2$ 分别独立地表示1~6的整数,

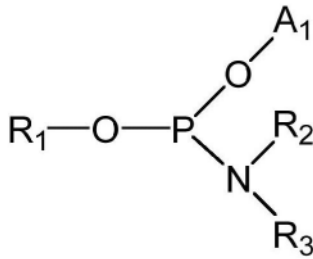
$R_2$ 及 $R_3$ 分别独立地表示碳原子数1~6的烷基, $R_2$ 与 $R_3$ 可以键合而形成5~7元环的杂环结构, $A_1$ 表示核苷。

5. 一种磷酸酯或硫代磷酸酯的合成方法,其包括:

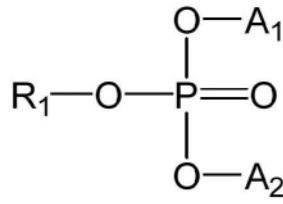
(1) 在权利要求1所述的亚磷酰胺活化剂的存在下,使亚磷酰胺与核苷或寡核苷酸进行反应而生成亚磷酸酯的工序;及

(2) 使所述亚磷酸酯进行氧化或硫化而生成磷酸酯或硫代磷酸酯的工序,其中,

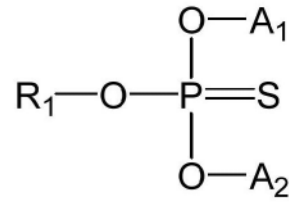
所述亚磷酰胺为下述通式(I)所表示的化合物,所述磷酸酯为下述通式(II-1)所表示的化合物,且所述硫代磷酸酯为下述通式(II-2)所表示的化合物:



(I)

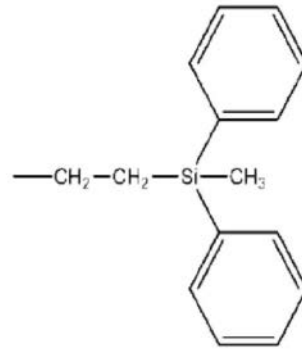
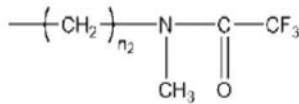
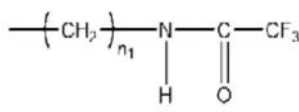
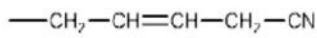
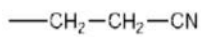


(II-1)



(II-2)

通式(I)、(II-1)及(II-2)中, $R_1$ 表示选自下述官能团组(I-1)中的基团:



官能团组(I-1)

官能团组(I-1)中, $n_1$ 及 $n_2$ 分别独立地表示1~6的整数,

$R_2$ 及 $R_3$ 分别独立地表示碳原子数1~6的烷基, $R_2$ 与 $R_3$ 可以键合而形成5~7元环的杂环结构, $A_1$ 表示核苷, $A_2$ 表示核苷或寡核苷酸。



酰胺活化剂之中,5-苄硫基-1H-四唑(BTT;也被称为5-苄基硫基-1H-四唑(BMT))被认为有用而受到关注。

[0007] 在基于亚磷酰胺法的核酸合成中,通常将乙腈用作溶剂。另一方面,上述BTT在乙腈中的溶解性差,在高浓度的BTT-乙腈溶液中,在低温下BTT的晶体会析出,担心会使核酸合成机的配管堵塞。因此,若乙腈中的BTT的浓度比较高,则尽管能够使亚磷酰胺更迅速且有效率地活化,但能够以BTT-乙腈溶液形式保存/使用的浓度限于0.25mol/L。

[0008] 因此,为了提高BTT在乙腈中的溶解性,在专利文献1中公开一种添加了N-烷基咪唑啉作为共溶剂的亚磷酰胺活化剂。

[0009] 以往技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 专利文献1:日本特表2008-530092号公报

## 发明内容

[0012] 发明要解决的技术课题

[0013] 然而,上述专利文献1中所记载的亚磷酰胺活化剂虽然通过添加N-烷基咪唑啉而BTT在乙腈中的溶解性得到提高,但存在与使用由未添加的BTT-乙腈溶液构成的亚磷酰胺活化剂的情况相比,目标物的产率/纯度下降的问题。

[0014] 本发明是鉴于这种情况而完成的,其课题在于提供一种解决如上所述的问题的优异的亚磷酰胺活化剂、以及使用该活化剂的亚磷酰胺的活化方法及磷酸酯或硫代磷酸酯的合成方法。

[0015] 用于解决技术课题的手段

[0016] 本发明人等进行深入研究的结果,发现通过将选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的至少一种化合物添加到BTT-乙腈溶液中,可获得提高BTT在乙腈中的溶解性且不会使目标物的产率/纯度下降的优异的亚磷酰胺活化剂,从而完成了本发明。

[0017] 即,本发明包含以下的发明[i]~[xi]。

[0018] [i]一种亚磷酰胺活化剂(以下,有时简称为本发明的亚磷酰胺活化剂。),其包含:(i)选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的至少一种化合物;(ii)5-苄硫基-1H-四唑;以及(iii)乙腈。

[0019] [ii]根据所述发明[i]所述的亚磷酰胺活化剂,其中,所述(i)为N-烷基哌啶或N-烷基吡咯烷。

[0020] [iii]根据所述发明[i]或[ii]所述的亚磷酰胺活化剂,其中,所述(i)为N-甲基哌啶或N-甲基吡咯烷。

[0021] [iv]根据所述发明[i]至[iii]中任一项所述的亚磷酰胺活化剂,其中,所述(ii)的摩尔浓度为0.25mol/L以上。

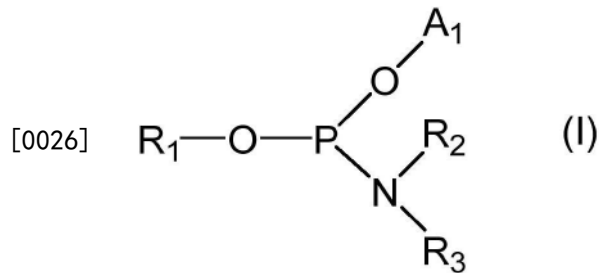
[0022] [v]根据所述发明[i]至[iv]中任一项所述的亚磷酰胺活化剂,其中,所述(i)的哌啶的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为17.0%以上,所述(i)的吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为20.0%以上,所述(i)的N-烷基哌啶的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为13.7%以上,且所述(i)的N-烷基吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的

摩尔浓度为16.0%以上。

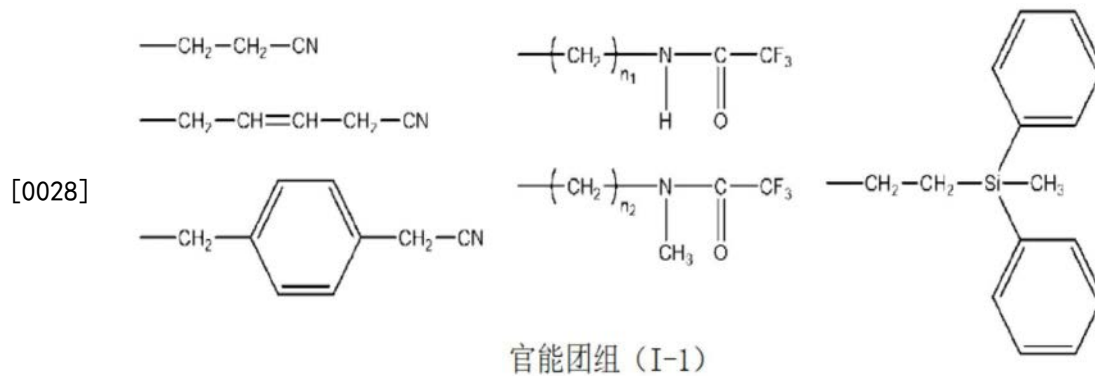
[0023] [vi]根据所述发明[i]至[v]中任一项所述的亚磷酰胺活化剂,其中,所述(i)的哌啶的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为17.0%以上,所述(i)的吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为24.0%以上,且所述(i)的N-烷基哌啶或N-烷基吡咯烷的摩尔浓度相对于所述(ii)的摩尔浓度为19.3%以上。

[0024] [vii]一种亚磷酰胺的活化方法(以下,有时简称为本发明的活化方法。),其包括:使亚磷酰胺与所述发明[i]至[vi]中任一项所述的亚磷酰胺活化剂进行反应的工序。

[0025] [viii]根据所述发明[vii]所述的活化方法,其中,所述亚磷酰胺为下述通式(I)所表示的化合物:



[0027] [通式(I)中,R<sub>1</sub>表示选自下述官能团组(I-1)中的基团:

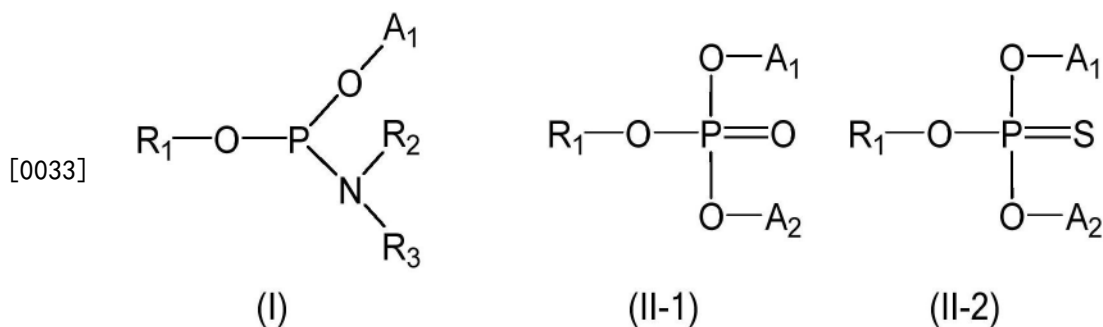


[0029] (官能团组(I-1)中,n<sub>1</sub>及n<sub>2</sub>分别独立地表示1~6的整数。),

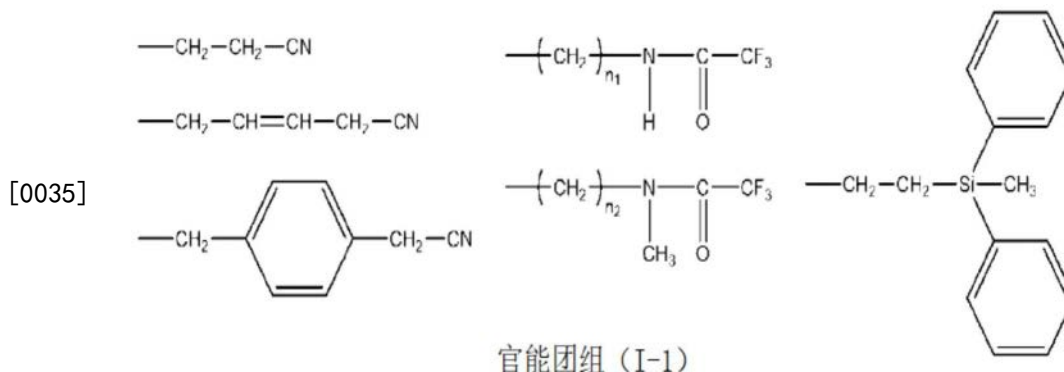
[0030] R<sub>2</sub>及R<sub>3</sub>分别独立地表示碳原子数1~6的烷基,R<sub>2</sub>与R<sub>3</sub>可以键合而形成5~7元环的杂环结构,A<sub>1</sub>表示核苷。]

[0031] [ix]一种磷酸酯或硫代磷酸酯的合成方法(以下,有时简称为本发明的合成方法。),其包括:(1)在所述发明[i]至[vi]中任一项所述的亚磷酰胺活化剂的存在下,使亚磷酰胺与核苷或寡核苷酸进行反应而生成亚磷酸酯的工序;及(2)使所述亚磷酸酯氧化或硫化而生成磷酸酯或硫代磷酸酯的工序。

[0032] [x]根据所述发明[ix]所述的合成方法,其中,所述亚磷酰胺为下述通式(I)所表示的化合物,所述磷酸酯为下述通式(II-1)所表示的化合物,且所述硫代磷酸酯为下述通式(II-2)所表示的化合物:



[0034] [通式 (I)、(II-1) 及 (II-2) 中,  $R_1$  表示选自下述官能团组 (I-1) 中的基团:



[0036] (官能团组 (I-1) 中,  $n_1$  及  $n_2$  分别独立地表示 1 ~ 6 的整数。),

[0037]  $R_2$  及  $R_3$  分别独立地表示碳原子数 1 ~ 6 的烷基,  $R_2$  与  $R_3$  可以键合而形成 5 ~ 7 元环的杂环结构,  $A_1$  表示核苷,  $A_2$  表示核苷或寡核苷酸。]

[0038] 发明效果

[0039] 通过使用本发明的亚磷酰胺活化剂, 能够有效地使亚磷酰胺活化并以高产率/纯度获得目标物。

## 具体实施方式

[0040] [本发明的亚磷酰胺活化剂]

[0041] 本发明的亚磷酰胺活化剂包含 (i) 选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及 N-烷基吡咯烷组成的组中的至少一种化合物、(ii) 5-苄硫基-1H-四唑以及 (iii) 乙腈。

[0042] 作为 (i) 的 N-烷基哌啶及 N-烷基吡咯烷中的烷基, 例如可以举出碳原子数 1 ~ 6 的烷基, 其中优选碳原子数 1 ~ 3 的烷基。并且, 该烷基可以为直链状、支链状及环状中的任一种, 优选直链状或支链状。具体而言, 例如可以举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、正戊基、异戊基、正己基、异己基等, 优选甲基、乙基、正丙基、异丙基, 尤其优选甲基。

[0043] 作为 (i) 的 N-烷基哌啶, 具体而言, 例如可以举出 N-甲基哌啶、N-乙基哌啶、N-正丙基哌啶、N-异丙基哌啶、N-正丁基哌啶、N-异丁基哌啶、N-正戊基哌啶、N-异戊基哌啶、N-正己基哌啶、N-异己基哌啶等, 优选 N-甲基哌啶、N-乙基哌啶、N-正丙基哌啶、N-异丙基哌啶, 尤其优选 N-甲基哌啶。

[0044] 作为 (i) 的 N-烷基吡咯烷, 具体而言, 例如可以举出 N-甲基吡咯烷、N-乙基吡咯烷、N-正丙基吡咯烷、N-异丙基吡咯烷、N-正丁基吡咯烷、N-异丁基吡咯烷、N-正戊基吡咯烷、N-异戊基吡咯烷、N-正己基吡咯烷、N-异己基吡咯烷等, 优选 N-甲基吡咯烷、N-乙基吡咯烷、N-正丙基吡咯烷、N-异丙基吡咯烷, 尤其优选 N-甲基吡咯烷。

[0045] (i) 可以仅单独包含哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷中的任一种,也可以组合包含两种以上。

[0046] 作为(i),优选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的任一种化合物;更优选自由哌啶、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的任一种化合物;进一步优选N-烷基哌啶或N-烷基吡咯烷;进一步优选N-甲基哌啶或N-甲基吡咯烷。

[0047] 作为(ii)的摩尔浓度的下限值,相对于本发明的亚磷酰胺活化剂的总容量,通常为0.20mol/L以上,优选0.25mol/L以上,更优选0.30mol/L以上。作为(ii)的摩尔浓度的上限值,相对于本发明的亚磷酰胺活化剂的总容量,通常为1.00mol/L以下,优选0.50mol/L以下,更优选0.40mol/L以下。

[0048] 作为(i)的哌啶的摩尔浓度的下限值,相对于(ii)的摩尔浓度,优选17.0%以上;作为上限值,相对于(ii)的摩尔浓度,通常为150%以下,优选100%以下,更优选50.0%以下。

[0049] 作为(i)的吡咯烷的摩尔浓度的下限值,相对于(ii)的摩尔浓度,优选20.0%以上,更优选24.0%以上;作为上限值,相对于(ii)的摩尔浓度,通常为150%以下,优选100%以下,更优选50.0%以下。

[0050] 作为(i)的N-烷基哌啶的摩尔浓度的下限值,相对于(ii)的摩尔浓度,优选13.7%以上,更优选19.3%以上;作为上限值,相对于(ii)的摩尔浓度,通常为150%以下,优选100%以下,更优选50.0%以下。

[0051] 作为(i)的N-烷基吡咯烷的摩尔浓度的下限值,相对于(ii)的摩尔浓度,优选16.0%以上,更优选19.3%以上;作为上限值,相对于(ii)的摩尔浓度,通常为150%以下,优选100%以下,更优选50.0%以下。

[0052] 作为本发明的亚磷酰胺活化剂,可以包含除(i)选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的至少一种化合物、(ii)5-苄硫基-1H-四唑以及(iii)乙腈以外的成分,但优选仅由该(i)、(ii)及(iii)构成的亚磷酰胺活化剂;其中,更优选仅由(i)选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的任一种化合物、(ii)0.25mol/L以上的5-苄硫基-1H-四唑以及(iii)乙腈构成的亚磷酰胺活化剂;进一步优选仅由(i)选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的任一种化合物、(ii)0.25mol/L以上的5-苄硫基-1H-四唑以及(iii)乙腈构成,(i)的哌啶的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为17.0%以上,(i)的吡咯烷的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为20.0%以上,(i)的N-烷基哌啶的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为13.7%以上,且(i)的N-烷基吡咯烷的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为16.0%以上的亚磷酰胺活化剂。其中,进一步更优选仅由(i)选自由哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷组成的组中的任一种化合物、(ii)0.30mol/L以上的5-苄硫基-1H-四唑以及(iii)乙腈构成,(i)的哌啶的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为17.0%以上,(i)的吡咯烷的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为24.0%以上,且(i)的N-烷基哌啶或N-烷基吡咯烷的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为19.3%以上的亚磷酰胺活化剂;尤其优选仅由(i)N-烷基哌啶或N-烷基吡咯烷、(ii)0.30mol/L以上的5-苄硫基-1H-四唑以及(iii)乙腈构成,(i)的N-烷基哌啶或N-烷基吡咯烷的摩尔浓度相对于(ii)的摩尔浓度为19.3%以上的亚磷酰胺活化剂。

[0053] 本发明的亚磷酰胺活化剂中的(i)哌啶、吡咯烷、N-烷基哌啶及N-烷基吡咯烷、

(ii) 5-苄硫基-1H-四唑以及 (iii) 乙腈均使用市售的或者通过本身公知的方法适当合成的即可。

[0054] 本发明的亚磷酰胺活化剂遵照本身公知的方法混合 (i)、(ii) 及 (iii) 来制备即可。具体而言, 例如, 能够通过如下处理来制备: 以成为所期望的摩尔浓度的方式适当设定 (i) 及 (ii) 的使用量, 首先混合 (i) 和 (iii), 接着混合 (ii)。

[0055] 本发明的亚磷酰胺活化剂的制备只要是不对 (i)、(ii) 及 (iii) 产生影响而能够混合的制备条件 (温度、压力、气氛等), 则没有特别限制, 例如在 15 ~ 40 °C、常压 (一个大气压)、非活性气体 (例如, 氮、氩等) 气氛下制备即可。

[0056] [本发明的活化方法]

[0057] 本发明的活化方法包括使亚磷酰胺与本发明的亚磷酰胺活化剂进行反应的工序。

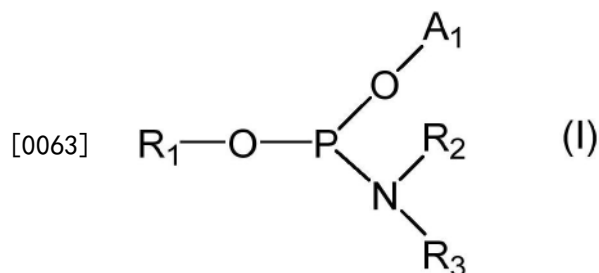
[0058] 本发明的活化方法中的亚磷酰胺是指亚磷酸二酯的单酰胺衍生物, 在本发明中, 尤其指核苷键合于该亚磷酸二酯的一个酯部分的核苷亚磷酰胺。本发明的活化方法中的亚磷酰胺只要通常在该领域中使用, 则不受特别限定, 使用市售的或者通过本身公知的方法适当合成的即可。

[0059] 本发明的活化方法中的亚磷酰胺中的核苷是由核酸碱基及糖构成的化合物, 优选 5' 位的羟基 (5'-OH 基) 被保护基保护。作为该核酸碱基, 具体而言, 例如可以举出腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶以及它们的一部分被取代/修饰的衍生物等。作为该糖, 具体而言, 例如可以举出核糖及脱氧核糖以及它们的一部分被修饰的衍生物等。作为该保护基, 可以举出乙酰基、叔丁基二苯基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、4,4'-二甲氧基三苯甲基 (4,4'-二甲氧基三苯基甲基)、4-单甲氧基三苯甲基 (4-甲氧基三苯基甲基), 优选 4,4'-二甲氧基三苯甲基。

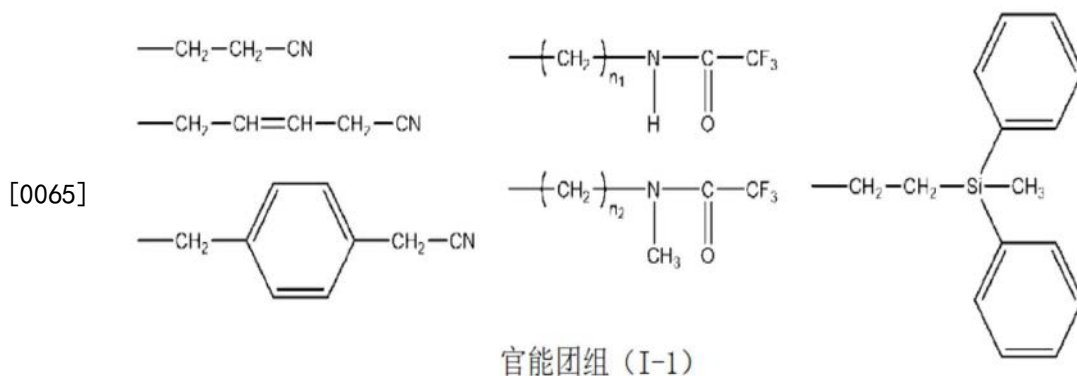
[0060] 并且, 当本发明的活化方法中的亚磷酰胺中的核苷在 2' 位具有羟基 (2'-OH 基) 时, 优选 2'-OH 基与 5'-OH 基同样被保护基保护。作为该保护基, 可以举出乙酰基、叔丁基二苯基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基硅氧基甲基、4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-单甲氧基三苯甲基, 优选叔丁基二甲基甲硅烷基。

[0061] 另外, 为了不产生副反应, 本发明的活化方法中的亚磷酰胺中的核苷优选除 5'-OH 基或 2'-OH 基以外的官能团根据需要也被保护。具体而言, 例如, 当本发明的活化方法中的亚磷酰胺中的核苷具有腺嘌呤、鸟嘌呤或胞嘧啶作为核酸碱基时, 优选该核酸碱基中的氨基被乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、4-(叔丁基) 苯甲酰基、苯氧基乙酰基等酰基保护。

[0062] 具体而言, 本发明的活化方法中的亚磷酰胺例如可以举出下述通式 (I) 所表示的化合物。



[0064] [通式 (I) 中, R<sub>1</sub> 表示选自下述官能团组 (I-1) 中的基团:



[0066] (官能团组 (I-1) 中,  $n_1$  及  $n_2$  分别独立地表示 1 ~ 6 的整数。),

[0067]  $R_2$  及  $R_3$  分别独立地表示碳原子数 1 ~ 6 的烷基,  $R_2$  与  $R_3$  可以键合而形成 5 ~ 7 元环的杂环结构,  $A_1$  表示核苷。]

[0068] 作为通式 (I) 的官能团组 (I-1) 中的  $n_1$  及  $n_2$ , 分别优选 2 ~ 5 的整数, 更优选 2。

[0069] 作为通式 (I) 的官能团组 (I-1), 尤其优选氰基乙基。

[0070] 作为通式 (I) 的  $R_2$  及  $R_3$  中的碳原子数 1 ~ 6 的烷基, 优选碳原子数 2 ~ 3 的烷基。并且, 该烷基可以为直链状、支链状及环状中的任一种, 优选支链状。具体而言, 例如可以举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、正戊基、异戊基、环戊基、正己基、异己基、环己基等, 优选乙基、正丙基、异丙基, 尤其优选异丙基。

[0071] 当通式 (I) 的  $R_2$  与  $R_3$  键合而形成 5 ~ 7 元环的杂环结构时, 该 5 ~ 7 元环的杂环结构除了与  $R_2$  及  $R_3$  键合的通式 (I) 中的氮原子以外, 还可以具有 1 个以上的杂原子。作为该 5 ~ 7 元环的杂环结构, 具体而言, 例如可以举出吡咯烷、哌啶、六亚甲基亚胺、噁唑烷、吗啉、噻唑烷、硫代吗啉等, 优选哌啶、吗啉、硫代吗啉。

[0072] 作为通式 (I) 的  $R_2$  及  $R_3$ , 优选碳原子数 2 ~ 3 的烷基, 尤其优选异丙基。并且, 通式 (I) 的  $R_2$  和  $R_3$  优选相同。

[0073] 通式 (I) 的  $A_1$  中的核苷表示与上述本发明的活化方法中的亚磷酰胺中的核苷相同的核苷。

[0074] 作为本发明的亚磷酰胺活化剂的使用量, 是本发明的亚磷酰胺活化剂中的 (ii) 5-苄硫基-1H-四唑的含量相对于亚磷酰胺 1mol 通常成为 1 ~ 20 当量的量。

[0075] 本发明的活化方法只要是亚磷酰胺与本发明的亚磷酰胺活化剂能够不延迟地进行反应的反应条件 (温度、压力、气氛等), 则没有特别限制, 例如在 10 ~ 40°C、常压、非活性气体气氛下进行即可。本发明的活化方法中的反应时间有可能根据其反应条件而变化, 因此不能一概而论, 但通常为 1 分钟 ~ 3 小时。

[0076] [本发明的合成方法]

[0077] 本发明的合成方法包括: (1) 在本发明的亚磷酰胺活化剂的存在下, 使亚磷酰胺与核苷或寡核苷酸进行反应而生成亚磷酸酯的工序; 及 (2) 使所述亚磷酸酯氧化或硫化而生成磷酸酯或硫代磷酸酯的工序。

[0078] 本发明的合成方法中的工序 (1) 中的亚磷酰胺可以举出与本发明的活化方法中的亚磷酰胺相同的亚磷酰胺, 优选的也相同。

[0079] 本发明的合成方法中的工序 (1) 中的核苷只要是在该领域中通常使用的天然或人工核苷, 则不受特别限定, 使用市售的或者通过本身公知的方法适当合成的即可。

[0080] 本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷是由核酸碱基及糖构成的化合物,优选3'位的羟基(3'-OH基)被保护基保护。作为该核酸碱基,具体而言,例如可以举出腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶及尿嘧啶以及它们的一部分被取代/修饰的衍生物等。作为该糖,具体而言,例如可以举出核糖及脱氧核糖以及它们的一部分被修饰的衍生物等。作为该保护基,可以举出乙酰基、叔丁基二苯基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-单甲氧基三苯甲基,优选叔丁基二甲基甲硅烷基。

[0081] 并且,当本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷具有2'-OH基时,优选2'-OH基与3'-OH基同样被保护基保护。作为该保护基,可以举出乙酰基、叔丁基二苯基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基硅氧基甲基、4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-单甲氧基三苯甲基,优选叔丁基二甲基甲硅烷基。

[0082] 为了不产生副反应,本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷优选除3'-OH基或2'-OH基以外的官能团根据需要也被保护。具体而言,例如,当本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷具有腺嘌呤、鸟嘌呤或胞嘧啶作为核酸碱基时,优选该核酸碱基中的氨基被乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基、4-(叔丁基)苯甲酰基、苯氧基乙酰基等酰基保护。

[0083] 本发明的合成方法中的工序(1)中的寡核苷酸只要是在该领域中通常使用的寡核苷酸,则不受特别限定,使用市售的或者通过本身公知的方法适当合成的即可。另外,该寡核苷酸中还包括硫代磷酸酯型寡核苷酸。并且,也可以将通过本发明的合成方法获得的“磷酸酯或硫代磷酸酯”的5'末端脱保护而成的用作该寡核苷酸。

[0084] 本发明的合成方法中的工序(1)中的寡核苷酸是经由磷酸二酯键或硫代磷酸酯键在3'位及5'位键合有1~50个左右核苷的寡核苷酸,优选3'末端的羟基被保护基保护。作为该核苷,可以举出除了3'-OH基未被保护以外,与上述本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷相同的核苷,优选的也相同。该寡核苷酸中的多个核苷分别可以相同,也可以不同。作为该寡核苷酸的3'末端的保护基,可以举出与上述本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷的3'-OH基的保护基相同的保护基,优选的也相同。

[0085] 本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷及寡核苷酸可以键合于固相合成用载体上。作为该固相合成用载体,只要是在该领域中通常使用的固相合成用载体,则不受特别限制,具体而言,例如可以举出多孔玻璃、多孔合成聚合物(例如,聚苯乙烯、聚丙烯酰胺等)、用该树脂涂覆了二氧化硅粒子的表面的载体等。

[0086] 作为本发明的合成方法中的工序(1)中的亚磷酰胺的使用量,相对于核苷或寡核苷酸1mol,通常为1~5当量。

[0087] 作为本发明的合成方法中的工序(1)中的本发明的亚磷酰胺活化剂的使用量,是(ii)5-苄硫基-1H-四唑的含量相对于亚磷酰胺1mol通常成为1~20当量的量。

[0088] 本发明的合成方法中的工序(1)只要是亚磷酸酯的生成反应能够无延迟地进行的反应条件(温度、压力、气氛等),则没有特别限制,例如在10~40℃、常压、非活性气体气氛下进行即可。本发明的合成方法中的工序(1)的反应时间有可能根据其反应条件而变化,因此不能一概而论,但通常为1分钟~3小时。

[0089] 本发明的合成方法中的工序(2)是利用氧化剂使作为工序(1)的产物的亚磷酸酯氧化而生成磷酸酯或者利用硫化剂使其硫化而生成硫代磷酸酯的工序。

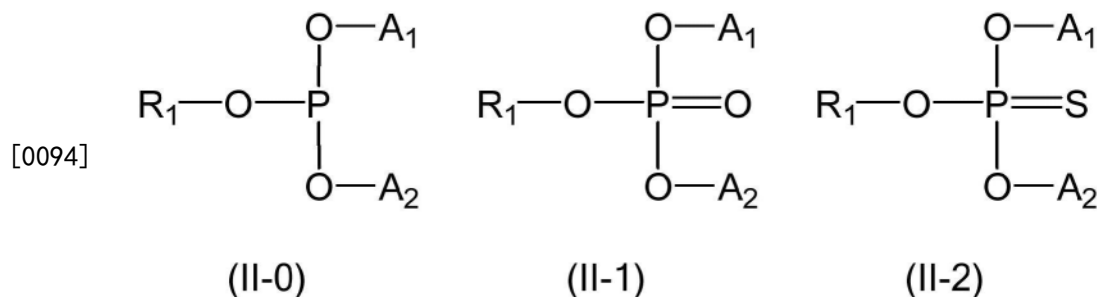
[0090] 作为该氧化剂,只要是在该领域中通常使用的氧化剂,则没有特别限制,优选含水

碘。作为具体的形态,可以举出包含水作为溶剂之一的碘溶液的形态,作为该溶剂,具体而言,例如可以举出吡啶-四氢呋喃-水的混合溶剂、吡啶-水的混合溶剂等。该碘溶液中所含的碘的浓度相对于该溶液的总容量,通常为0.02~0.10mol/L。

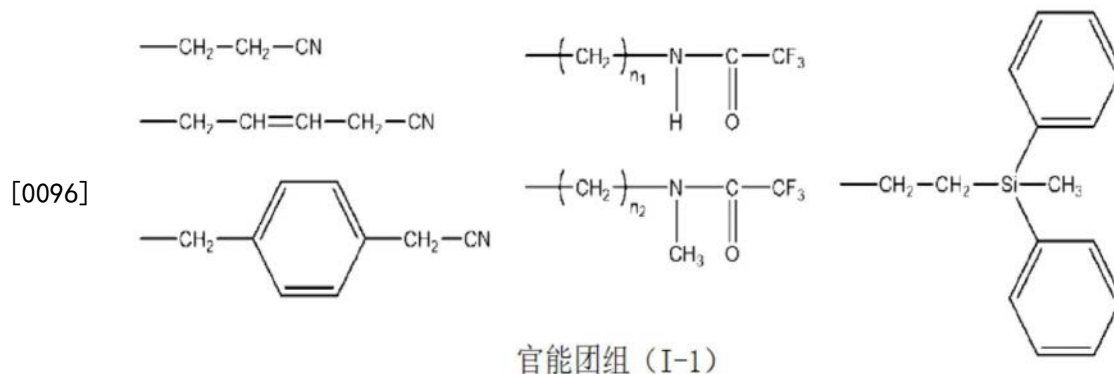
[0091] 作为该硫化剂,只要是在该领域中通常使用的硫化剂,则没有特别限制,具体而言,例如可以举出苯乙酰二硫化物(PADS)、3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(Beaucage试剂)、5-苯基-3H-1,2,4-二噻唑-3-酮(POS)、[(N,N-二甲基氨基亚甲基)氨基]-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮(DDTT)等。并且,它们可以以溶液的形态使用,具体而言,例如可以举出浓度为0.02~0.10mol/L的含POS的乙腈溶液等。

[0092] 作为该氧化剂或硫化剂的使用量,相对于亚磷酸酯1mol,通常为1~5当量。

[0093] 当本发明的合成方法中的工序(1)中的亚磷酸胺为上述通式(I)所表示的化合物时,关于作为工序(1)的产物的亚磷酸酯,具体而言,例如可以举出通式(II-0)所表示的化合物。并且,关于作为工序(2)的产物的磷酸酯,具体而言,例如可以举出下述通式(II-1)所表示的化合物,关于作为工序(2)的产物的硫代磷酸酯,具体而言,例如可以举出下述通式(II-2)所表示的化合物。



[0095] [通式(II-0)~(II-2)中,R<sub>1</sub>表示选自下述官能团组(I-1)中的基团:



[0097] (官能团组(I-1)中,n<sub>1</sub>及n<sub>2</sub>分别独立地表示1~6的整数。),

[0098] A<sub>1</sub>表示核苷,A<sub>2</sub>表示核苷或寡核苷酸。]

[0099] 作为通式(II-0)~(II-2)的官能团组(I-1),可以举出与通式(I)的官能团组(I-1)相同的官能团组,优选的也相同。

[0100] 通式(II-0)~(II-2)的A<sub>1</sub>中的核苷可以举出与本发明的活化方法中的亚磷酸胺中的核苷相同的核苷,优选的也相同。

[0101] 通式(II-0)~(II-2)的A<sub>2</sub>中的核苷可以举出与上述本发明的合成方法中的工序(1)中的核苷相同的核苷,优选的也相同。

[0102] 通式(II-0)~(II-2)的A<sub>2</sub>中的寡核苷酸可以举出与上述本发明的合成方法中的

工序(1)中的寡核苷酸相同的寡核苷酸,优选的也相同。

[0103] 本发明的合成方法中的工序(2)只要是亚磷酸酯的氧化反应或硫化反应能够不延迟地进行的反应条件(温度、压力、气氛等),则没有特别限制,例如在10~40℃、常压、非活性气体气氛下即可。本发明的合成方法中的工序(2)的反应时间有可能根据其反应条件而变化,因此不能一概而论,但通常为1分钟~3小时。

[0104] 如前所述,在核酸合成中,通常通过重复进行(A)核苷或寡核苷酸的脱保护、(B)偶联反应、(C)未反应物的加帽、(D)偶联产物的酸化或硫化反应这4道工序(反应循环)而使核酸链伸长。本发明的合成方法中的工序(1)对应于上述核酸合成中的工序(B),本发明的合成方法中的工序(2)对应于上述核酸合成中的工序(D)。因此,通过重复进行包括本发明的合成方法的反应循环,能够使核酸链伸长而获得所期望的核酸。

[0105] 上述核酸合成中的工序(A)是使用脱保护剂(deblocking agent)对核苷或寡核苷酸的5'位上的保护基进行脱保护的工序。作为该脱保护剂,只要是在该领域中通常使用的脱保护剂,则没有特别限制,使用市售的或者通过本身公知的方法适当合成的即可。具体而言,例如可以举出二氯乙酸-甲苯溶液、三氯乙酸-二氯甲烷溶液等。

[0106] 上述核酸合成中的工序(C)是使用加帽剂对上述核酸合成中的工序(B)中的未反应物进行加帽的工序。作为该加帽剂,只要是在该领域中通常使用的加帽剂,则没有特别限制,使用市售的或者通过本身公知的方法适当合成的即可。具体而言,例如可以举出乙酸酐与N-甲基咪唑的组合。它们通常以溶液的形态使用,具体而言,例如可以举出乙腈溶液、吡啶-乙腈溶液、2,6-二甲基吡啶-乙腈溶液、四氢呋喃溶液、吡啶-四氢呋喃溶液、2,6-二甲基吡啶-四氢呋喃溶液等形态。

[0107] 并且,在固相合成法的情况下,重复上述核酸合成中的工序(A)~(D)而使核酸链伸长之后,进行从固相合成用载体的目标核酸的切出及脱保护。在该工序中,通常使用氨水或甲胺溶液。作为该氨水,只要是在该领域中通常使用的氨水,则没有特别限制,使用市售的或者通过本身公知的方法适当合成的即可。具体而言,例如可以举出浓度25~28质量%的氨水溶液,也可以以甲胺水溶液-乙醇水溶液的混合溶液的形态使用。

[0108] 以下,举出实施例及比较例对本发明进行进一步具体的说明,但本发明并不受这些例子的任何限定。

[0109] 实施例

[0110] 实施例1亚磷酰胺活化剂1的制备方法

[0111] 向乙腈29.85mL中加入哌啶0.15mL(1.52mmol)并使其溶解而制备出0.5vol% (体积百分浓度: volume/volume%) 哌啶添加乙腈溶液。接着,将5-苄硫基-1H-四唑(BTT)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)1.73g(9.00mmol)用0.5vol% 哌啶添加乙腈溶液定容至30mL而制备出包含0.5vol%的哌啶的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂1。

[0112] 实施例2-4亚磷酰胺活化剂2-4的制备方法

[0113] 除了代替0.5vol% 哌啶添加乙腈溶液而使用添加了表1中所记载的各种添加剂0.5vol%的乙腈溶液以外,以与实施例1相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂2-4。

[0114] 比较例1亚磷酰胺活化剂101的制备方法

[0115] 除了代替0.5vol% 哌啶添加乙腈溶液而使用未加入添加剂的乙腈溶液以外,以与

实施例1相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂101。

[0116] 比较例2-12亚磷酰胺活化剂102-112的制备方法

[0117] 除了代替0.5vol%吡啶添加乙腈溶液而使用添加了表1中所记载的各种添加剂0.5vol%的乙腈溶液以外,以与实施例1相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂102-112。

[0118] 实验例1亚磷酰胺活化剂的保存稳定性评价1

[0119] 确认了将实施例1-4中所获得的亚磷酰胺活化剂1-4及比较例1-12中所获得的亚磷酰胺活化剂101-112分别在0~2℃下静置1周及2周之后有无沉淀(BTT的晶体有无析出)。

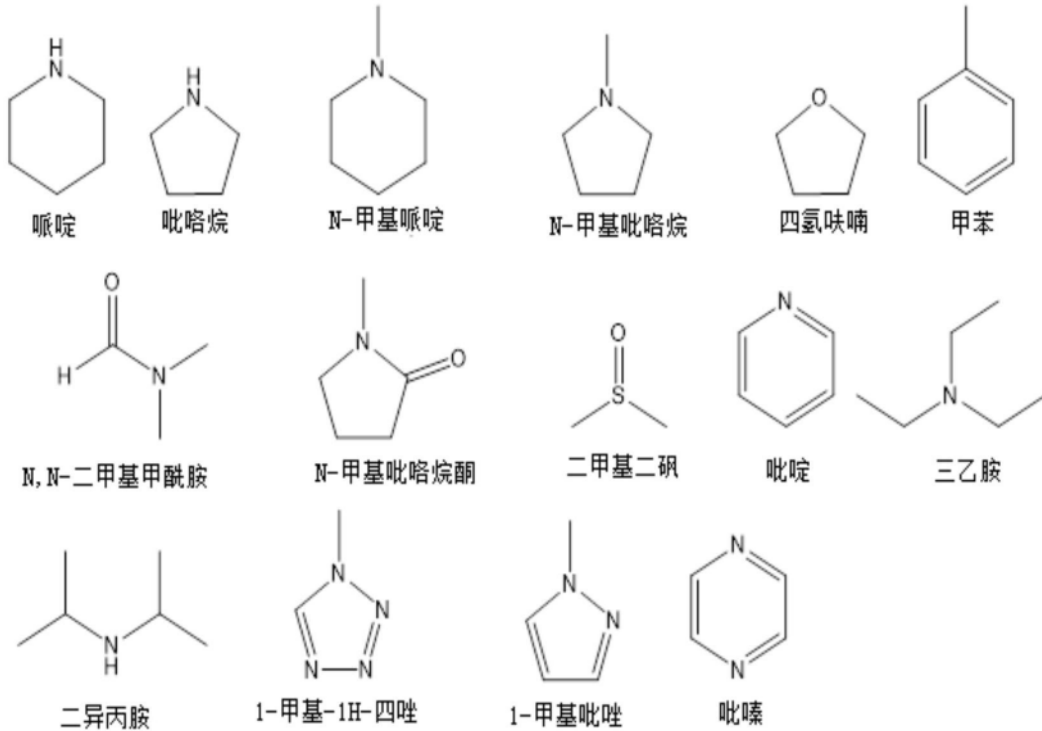
[0120] 将评价结果示于表1。并且,将添加剂的摩尔浓度(mol/L)相对于BTT的摩尔浓度(mol/L)的比例设为“相对于BTT的比例(%)”而与评价结果一并示于表1。

[0121] [表1]

	BTT的 摩尔浓度 (mol/L)	添加剂				有无沉淀	
		种类	添加量 (vol%)	摩尔浓度 (mol/L)	相对于BTT 的比例 (%)	1周 后	2周 后
实施例1: 亚磷酰胺活化剂1	0.30	哌啶	0.5	0.051	17.0	无	无
实施例2: 亚磷酰胺活化剂2	0.30	吡咯烷	0.5	0.060	20.0	无	有
实施例3: 亚磷酰胺活化剂3	0.30	N-甲基哌啶	0.5	0.041	13.7	无	有
实施例4: 亚磷酰胺活化剂4	0.30	N-甲基吡咯烷	0.5	0.048	16.0	无	有
比较例1: 亚磷酰胺活化剂 101	0.30	(无)	-	-	-	有	有
比较例2: 亚磷酰胺活化剂 102	0.30	四氢呋喃	0.5	0.061	20.3	有	有
比较例3: 亚磷酰胺活化剂 103	0.30	甲苯	0.5	0.047	15.7	有	有
比较例4: 亚磷酰胺活化剂 104	0.30	N,N-二甲基甲酰胺	0.5	0.065	21.7	有	有
比较例5: 亚磷酰胺活化剂 105	0.30	N-甲基吡咯烷酮	0.5	0.052	17.3	有	有
比较例6: 亚磷酰胺活化剂 106	0.30	二甲基亚砷	0.5	0.070	23.3	有	有
比较例7: 亚磷酰胺活化剂 107	0.30	吡啶	0.5	0.062	20.7	有	有
比较例8: 亚磷酰胺活化剂 108	0.30	三乙胺	0.5	0.036	12.0	有	有
比较例9: 亚磷酰胺活化剂 109	0.30	二异丙胺	0.5	0.035	11.7	有	有
比较例10: 亚磷酰胺活化剂 110	0.30	1-甲基-1H-四唑	0.5	0.047	15.7	有	有
比较例11: 亚磷酰胺活化剂 111	0.30	1-甲基吡唑	0.5	0.060	20.0	有	有
比较例12: 亚磷酰胺活化剂 112	0.30	吡嗪	0.5	0.049	16.3	有	有

[0122]

[0123] 另外,各亚磷酰胺活化剂中所使用的添加剂的结构如下。



[0125] 实施例5亚磷酰胺活化剂5的制备方法

[0126] 向乙腈29.70mL中加入哌啶0.30mL (3.04mmol) 并使其溶解而制备出1.0vol%哌啶添加乙腈溶液。接着,将BTT 1.73g (9.00mmol) 用1.0vol%哌啶添加乙腈溶液定容至30mL而制备出包含1.0vol%的哌啶的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂5。

[0127] 实施例6-7亚磷酰胺活化剂6-7的制备方法

[0128] 除了代替1.0vol%哌啶添加乙腈溶液而使用添加了表2中所记载的各种添加剂1.0vol%的乙腈溶液以外,以与实施例5相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂6-7。

[0129] 比较例13-15亚磷酰胺活化剂113-115的制备方法

[0130] 除了代替1.0vol%哌啶添加乙腈溶液而使用添加了表2中所记载的各种添加剂1.0vol%的乙腈溶液以外,以与实施例5相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂113-115。

[0131] 实验例2亚磷酰胺活化剂的保存稳定性评价2

[0132] 确认了将实施例5-7中所获得的亚磷酰胺活化剂5-7及比较例13-15中所获得的亚磷酰胺活化剂113-115分别在0~2℃下静置1周及2周之后有无沉淀 (BTT的晶体有无析出)。

[0133] 将评价结果示于表2。并且,将添加剂的摩尔浓度相对于BTT的摩尔浓度的比例设为“相对于BTT的比例(%)”而与评价结果一并示于表2。

[0134] [表2]

[0135]	BTT的 摩尔浓度 (mol/	添加剂			有无沉淀		
		种类	添加量 (vol%)	摩尔浓度 (mol/L)	相对于BTT 的比例	1周 后	2周 后

	L)				(%)		
[0136] 实施例5: 亚磷酰胺活化剂5	0.30	哌啶	1.0	0.101	33.7	无	无
实施例6: 亚磷酰胺活化剂6	0.30	N-甲基哌啶	1.0	0.082	27.3	无	无
实施例7: 亚磷酰胺活化剂7	0.30	N-甲基吡咯烷	1.0	0.096	32.0	无	无
比较例13: 亚磷酰胺活化剂13	0.30	N,N-二甲基甲酰胺	1.0	0.130	43.3	有	有
比较例14: 亚磷酰胺活化剂14	0.30	N-甲基吡咯烷酮	1.0	0.104	34.7	有	有
比较例15: 亚磷酰胺活化剂15	0.30	二异丙胺	1.0	0.071	23.7	有	有

[0137] 根据表1的结果可知,在各种添加剂之中,只有哌啶、吡咯烷、N-甲基哌啶及N-甲基吡咯烷不产生沉淀而能够保存1周。即,判明了哌啶、吡咯烷、N-甲基哌啶及N-甲基吡咯烷在提高BTT对乙腈的溶解性,不会使BTT的晶体析出而保存亚磷酰胺活化剂方面有效。

[0138] 此外,根据表2的结果可知,将N-甲基哌啶及N-甲基吡咯烷的添加量由0.5vol%增加至1.0vol%,其结果,2周后也不会产生沉淀而能够进行保存。因此,对N-甲基哌啶及N-甲基吡咯烷的添加量进行了详细研究。

[0139] 实施例8-13亚磷酰胺活化剂8-13的制备

[0140] 除了以N-甲基哌啶的添加量分别成为0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0vol%的方式使用N-甲基哌啶以外,以与实施例3相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂8-13。

[0141] 实施例14-19亚磷酰胺活化剂14-19的制备方法

[0142] 除了以N-甲基吡咯烷的添加量分别成为0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0vol%的方式使用N-甲基吡咯烷以外,以与实施例4相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂14-19。

[0143] 比较例16-18亚磷酰胺活化剂116-118的制备方法

[0144] 除了代替哌啶而使用N-甲基咪唑作为添加剂并以其添加量分别成为0.4、0.45、0.5vol%的方式使用N-甲基咪唑以外,以与实施例1相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂116-118。

[0145] 实验例3 0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂中的添加剂的添加量研究

[0146] 确认了将实施例8-19中所获得的亚磷酰胺活化剂8-19及比较例16-18中所获得的亚磷酰胺活化剂116-118分别在0~2℃下静置2周之后有无沉淀(BTT的晶体有无析出)。

[0147] 将评价结果示于表3。并且,将添加剂的摩尔浓度相对于BTT的摩尔浓度的比例设为“相对于BTT的比例(%)”而与评价结果一并示于表3。

[0148] [表3]

	BTT的 摩尔浓度 (mol/L)	添加剂			相对于BTT 的比例 (%)	有无沉淀 (2周 后)
		种类	添加量 (vol%)	摩尔浓度 (mol/L)		
实施例8: 亚磷酸胺活化剂8	0.30	N-甲基哌啶	0.5	0.041	13.7	有
实施例9: 亚磷酸胺活化剂9	0.30	N-甲基哌啶	0.6	0.049	16.3	有
实施例10: 亚磷酸胺活化剂10	0.30	N-甲基哌啶	0.7	0.058	19.3	无
实施例11: 亚磷酸胺活化剂11	0.30	N-甲基哌啶	0.8	0.066	22.0	无
实施例12: 亚磷酸胺活化剂12	0.30	N-甲基哌啶	0.9	0.074	24.7	无
实施例13: 亚磷酸胺活化剂13	0.30	N-甲基哌啶	1.0	0.082	27.3	无
实施例14: 亚磷酸胺活化剂14	0.30	N-甲基吡咯烷	0.5	0.048	16.0	有
实施例15: 亚磷酸胺活化剂15	0.30	N-甲基吡咯烷	0.6	0.058	19.3	无
实施例16: 亚磷酸胺活化剂16	0.30	N-甲基吡咯烷	0.7	0.067	22.3	无
实施例17: 亚磷酸胺活化剂17	0.30	N-甲基吡咯烷	0.8	0.077	25.7	无
实施例18: 亚磷酸胺活化剂18	0.30	N-甲基吡咯烷	0.9	0.087	29.0	无
实施例19: 亚磷酸胺活化剂19	0.30	N-甲基吡咯烷	1.0	0.096	32.0	无
比较例16: 亚磷酸胺活化剂16	0.30	N-甲基咪唑	0.5	0.051	17.0	有
比较例17: 亚磷酸胺活化剂17	0.30	N-甲基咪唑	0.45	0.058	19.3	无
比较例18: 亚磷酸胺活化剂18	0.30	N-甲基咪唑	0.5	0.063	21.0	无

[0149]

[0150] 实施例20亚磷酸胺活化剂20的制备方法

[0151] 将BTT 2.02g (10.5mmol) 用0.5vol%N-甲基哌啶添加乙腈溶液定容至30mL而制备出包含0.5vol%的N-甲基哌啶的0.35mol/L BTT的亚磷酸胺活化剂20。

[0152] 实施例21-25亚磷酸胺活化剂21-25的制备方法

[0153] 除了以N-甲基哌啶的添加量分别成为0.6、0.7、0.8、0.9、1.0vol%的方式使用N-甲基哌啶以外,以与实施例20相同的方式制备出亚磷酸胺活化剂21-25。

[0154] 实施例26-31亚磷酸胺活化剂26-31的制备方法

[0155] 除了代替N-甲基哌啶而使用N-甲基吡咯烷作为添加剂并以其添加量分别成为

0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0vol %的方式使用N-甲基吡咯烷以外,以与实施例20相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂26-31。

[0156] 比较例19-24亚磷酰胺活化剂119-124的制备方法

[0157] 除了代替N-甲基哌啶而使用N-甲基咪唑作为添加剂并以其添加量分别成为0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0vol %的方式使用N-甲基咪唑以外,以与实施例20相同的方式制备出亚磷酰胺活化剂119-124。

[0158] 实验例4 0.35mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂中的添加剂的添加量研究

[0159] 确认了将实施例20-31中所获得的亚磷酰胺活化剂20-31及比较例19-24中所获得的亚磷酰胺活化剂119-124分别在0~2℃下静置2周之后有无沉淀(BTT的晶体有无析出)。

[0160] 将评价结果示于表4。并且,将添加剂的摩尔浓度相对于BTT的摩尔浓度的比例设为“相对于BTT的比例(%)”而与评价结果一并示于表4。

[0161] [表4]

	BTT的 摩尔浓度 (mol/L)	添加剂				有无沉淀 (2周 后)
		种类	添加量 (vol%)	摩尔浓度 (mol/L)	相对于BTT 的比例 (%)	
实施例20: 亚磷酸胺活化剂20	0.35	N-甲基哌啶	0.5	0.041	11.7	有
实施例21: 亚磷酸胺活化剂21	0.35	N-甲基哌啶	0.6	0.049	14.0	有
实施例22: 亚磷酸胺活化剂22	0.35	N-甲基哌啶	0.7	0.058	16.6	有
实施例23: 亚磷酸胺活化剂23	0.35	N-甲基哌啶	0.8	0.066	18.9	有
实施例24: 亚磷酸胺活化剂24	0.35	N-甲基哌啶	0.9	0.074	21.1	无
实施例25: 亚磷酸胺活化剂25	0.35	N-甲基哌啶	1.0	0.082	23.4	无
实施例26: 亚磷酸胺活化剂26	0.35	N-甲基吡咯 烷	0.5	0.048	13.7	有
实施例27: 亚磷酸胺活化剂27	0.35	N-甲基吡咯 烷	0.6	0.058	16.6	有
实施例28: 亚磷酸胺活化剂28	0.35	N-甲基吡咯 烷	0.7	0.067	19.1	有
[0162] 实施例29: 亚磷酸胺活化剂29	0.35	N-甲基吡咯 烷	0.8	0.077	22.0	无
实施例30: 亚磷酸胺活化剂30	0.35	N-甲基吡咯 烷	0.9	0.087	24.9	无
实施例31: 亚磷酸胺活化剂31	0.35	N-甲基吡咯 烷	1.0	0.096	27.4	无
比较例19: 亚磷酸胺活化剂 119	0.35	N-甲基咪唑	0.5	0.063	18.0	有
比较例20: 亚磷酸胺活化剂 120	0.35	N-甲基咪唑	0.6	0.076	21.7	有
比较例21: 亚磷酸胺活化剂 121	0.35	N-甲基咪唑	0.7	0.088	25.1	无
比较例22: 亚磷酸胺活化剂 122	0.35	N-甲基咪唑	0.8	0.101	28.9	无
比较例23: 亚磷酸胺活化剂 123	0.35	N-甲基咪唑	0.9	0.114	32.6	无
比较例24: 亚磷酸胺活化剂 124	0.35	N-甲基咪唑	1.0	0.126	36.0	无

[0163] 根据表3及表4的结果判明了在0.30mol/L BTT的亚磷酸胺活化剂的情况下,通过添加N-甲基哌啶0.7vol%以上、N-甲基吡咯烷0.6vol%以上,BTT对乙腈的溶解性提高,BTT的晶体不会析出。并且,判明了在0.35mol/L BTT的亚磷酸胺活化剂的情况下,通过添加N-甲基哌啶0.9vol%以上、N-甲基吡咯烷0.8vol%以上,BTT对乙腈的溶解性提高,BTT的晶体不会析出。判明了若以添加剂相对于BTT的摩尔浓度的比例来比较有无沉淀,则在0.30mol/L BTT的亚磷酸胺活化剂的情况下,通过添加与专利文献1(日本特表2008-530092号公报)中所公开的作为添加剂的N-甲基咪唑相等量(19.3%)的N-甲基哌啶及N-甲基吡咯烷,BTT的晶体不会析出。并且,判明了在0.35mol/L BTT的亚磷酸胺活化剂的情况下,即使添加

比N-甲基咪唑少的量,BTT的晶体也不会析出。

[0164] 接着,为了评价本发明的亚磷酰胺活化剂在液相体系合成中的性能,使用在0~2℃的低温下能够保存2周的亚磷酰胺活化剂(包含0.6vol%的哌啶、0.6vol%的吡咯烷、0.8vol%的N-甲基哌啶或0.7vol%的N-甲基吡咯烷的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂),在液相体系中实施了核酸二聚体合成。同时,还进行使用包含0.5vol%的N-甲基咪唑的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂及无添加剂的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂的核酸二聚体合成,并比较了其合成结果。

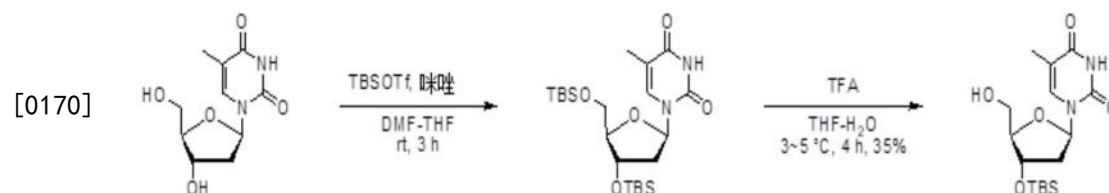
[0165] 合成例1 3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷的合成方法

[0166] 在氮气氛下将胸苷(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)25.0g(103mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)75mL及四氢呋喃(THF)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)75mL中,并冷却至5℃。然后,向所获得的溶液中加入咪唑(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)21.1g(310mmol)和三氟甲磺酸叔丁基二甲基甲硅烷酯(TBSOTf)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)68.2g(258mmol),并在室温下搅拌了3小时。反应后,在减压下去除THF之后,加入二异丙醚(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)100mL和乙酸乙酯(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)50mL、离子交换水100mL和饱和盐水100mL而进行分液,并用二异丙醚100mL与乙酸乙酯50mL的混合溶剂提取了水层。用饱和盐水200mL清洗有机层之后,加入硫酸钠进行了干燥。过滤硫酸钠之后,在减压下去除有机层,定量获得了淡黄色晶体状的3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷。

[0167] 合成例2 3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷的合成方法

[0168] 将合成例1中所获得的3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷的全量溶解于THF 194mL和离子交换水32mL中,并冷却至5℃。然后,耗时20分钟向所获得的溶液中滴加三氟乙酸(TFA)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)32mL,并在3~5℃下搅拌了4小时。用1.0mol/L氢氧化钠水溶液450mL调整pH,并用乙酸乙酯300mL提取了2次。用饱和盐水300mL清洗有机层之后,加入硫酸钠进行了干燥。过滤硫酸钠之后,在减压下去除了有机层。通过硅胶柱色谱法(二氯甲烷:甲醇=100:0~97:3)纯化所获得的粗产物,并用乙酸乙酯35mL和己烷105mL使所获得的粗体重结晶,由此获得了白色粉末状的3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷13.0g(产率35%)。

[0169] 以下示出合成例1-2的反应式。



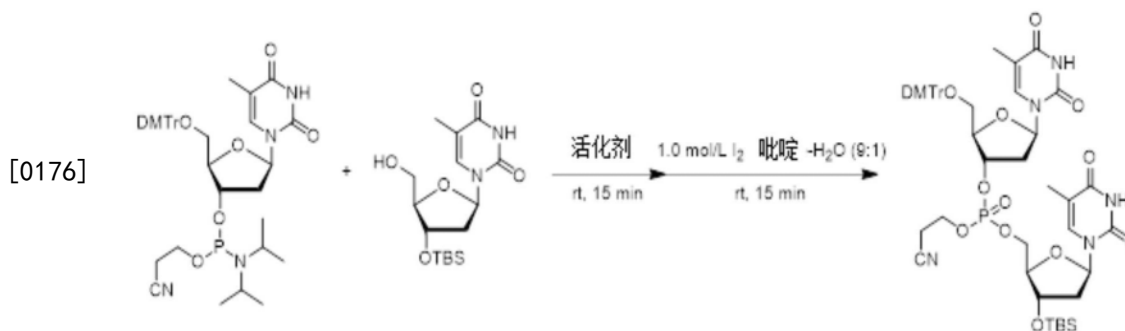
[0171] (在上述反应式中,TBS表示叔丁基二甲基甲硅烷基。)

[0172] 另外,确认到所获得的3',5'-O-双(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷的物性数据与J.Org.Chem.2016,81,3848中所记载的数据一致,3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷的物性数据与Synlett 2018,29,2437中所记载的数据一致。

[0173] 实施例32使用亚磷酰胺活化剂32的核酸二聚体的合成

[0174] 除了以将哌啶的添加量0.5vol%代替成0.6vol%的方式使用哌啶以外,以与实施例1相同的方式制备出包含0.6vol%的哌啶的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂32。接着,在氮气氛下投入5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基]亚磷酰胺(CARBOSYNTH公司制造)752mg(1.01mmol)和合成例2中所获得的3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷300mg(0.84mmol),并且加入亚磷酰胺活化剂32 6.73mL并在室温下搅拌了15分钟。然后,加入1.0mol/L含碘吡啶-水溶液(9:1)8.42mL(8.42mmol)并在室温下搅拌了15分钟。加入乙酸乙酯84mL和5质量%硫代硫酸钠水溶液84mL而进行分液,并用乙酸乙酯42mL提取了水层。用5质量%硫代硫酸钠水溶液84mL清洗有机层之后,加入硫酸钠进行了干燥。过滤硫酸钠之后,在减压下去除了有机层。测定所获得的粗产物的<sup>1</sup>H NMR之后,通过硅胶柱色谱法(己烷:乙酸乙酯=4:6,乙酸乙酯:甲醇=98:2)进行纯化,获得了淡黄色晶体状的目标核酸二聚体506mg。粗产物的NMR产率为64%,分离产率为59%。另外,NMR产率通过使用二甲基砷(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)作为内标物,以化学位移3.322ppm的积分值为基准,由目标核酸二聚体的5.093ppm的积分值计算出。

[0175] 以下示出实施例32的反应式。



[0177] (在上述反应式中,DMTr表示4,4'-二甲氧基三苯甲基,TBS表示叔丁基二甲基甲硅烷基。)

[0178] 另外,确认到所获得的核酸二聚体的物性数据与J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 15930中所记载的数据一致。

[0179] 实施例33使用亚磷酰胺活化剂33的核酸二聚体的合成

[0180] 除了代替哌啶而使用吡咯烷作为添加剂以外,以与实施例32相同的方式制备包含0.6vol%的吡咯烷的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂33,并使用其合成了核酸二聚体。

[0181] 实施例34使用亚磷酰胺活化剂11的核酸二聚体的合成

[0182] 除了代替亚磷酰胺活化剂32而使用实施例11中所获得的亚磷酰胺活化剂11以外,以与实施例32相同的方式合成了核酸二聚体。

[0183] 实施例35使用亚磷酰胺活化剂16的核酸二聚体的合成

[0184] 除了代替亚磷酰胺活化剂32而使用实施例16中所获得的亚磷酰胺活化剂16以外,以与实施例32相同的方式合成了核酸二聚体。

[0185] 比较例24使用亚磷酰胺活化剂101的核酸二聚体的合成

[0186] 除了代替亚磷酰胺活化剂32而使用比较例1中所获得的亚磷酰胺活化剂101以外,以与实施例32相同的方式合成了核酸二聚体。

[0187] 比较例25使用亚磷酰胺活化剂118的核酸二聚体的合成

[0188] 除了代替亚磷酰胺活化剂32而使用比较例18中所获得的亚磷酰胺活化剂118以

外,以与实施例32相同的方式合成了核酸二聚体。

[0189] 关于实施例32-35及比较例24-25中的根据NMR计算出的产率及硅胶柱色谱法纯化后的分离产率,示于表5。另外,在实施例33-35及比较例24-25中所获得的产物的物性数据与实施例32相同。

[0190] [表5]

	BTT的 摩尔浓度 (mol/L)	添加剂				NMR产率 (%)	分离产 率 (%)
		种类	添加量 (vol%)	摩尔浓度 (mol/L)	相对于 BTT的比 例 (%)		
实施例32: 亚磷酰胺活化剂 32	0.30	哌啶	0.6	0.061	20.3	61	57
实施例33: 亚磷酰胺活化剂 33	0.30	吡咯烷	0.6	0.072	24.0	59	55
[0191] 实施例34: 亚磷酰胺活化剂 11	0.30	N-甲基哌啶	0.8	0.066	22.0	64	59
实施例35: 亚磷酰胺活化剂 16	0.30	N-甲基吡咯 烷	0.7	0.067	22.3	65	59
比较例24: 亚磷酰胺活化剂 101	0.30	(无)	-	-	-	59	54
比较例25: 亚磷酰胺活化剂 118	0.30	N-甲基咪唑	0.5	0.063	21.0	46	45

[0192] 根据表5的结果,当使用专利文献1中所公开的含有N-甲基咪唑的亚磷酰胺活化剂时,与使用不包含添加剂的亚磷酰胺活化剂的情况相比,所获得的核酸二聚体的产率低。另一方面,判明了当使用含有哌啶、吡咯烷、N-甲基哌啶或N-甲基吡咯烷的本发明的亚磷酰胺活化剂时,以与使用不包含添加剂的亚磷酰胺活化剂的情况相等或其以上的产率进行反应,不会使产率下降。判明了当其中尤其使用含有N-甲基哌啶或N-甲基吡咯烷的本发明的亚磷酰胺活化剂时,以比使用不包含添加剂的亚磷酰胺活化剂的情况高的产率进行反应。

[0193] 因此,可知本发明的亚磷酰胺活化剂在液相体系合成中发挥具有与专利文献1中所公开的含有添加剂(N-甲基咪唑)的亚磷酰胺活化剂相等或其以上的高保存稳定性,且具有与不包含添加剂的亚磷酰胺活化剂相等或其以上的高反应产率这样的优异的效果。

[0194] 接着,为了评价本发明的亚磷酰胺活化剂在固相系合成中的性能,使用在液相体系合成中性能良好的亚磷酰胺活化剂(包含0.8vol%的N-甲基哌啶或0.7vol%的N-甲基吡咯烷的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂),在固相体系中实施了DNA寡聚物合成。同时,还进行使用包含0.5vol%的N-甲基咪唑的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂的DNA寡聚物合成,并比较了其合成结果。

[0195] 实施例36使用亚磷酰胺活化剂11的DNA寡聚物的合成

[0196] 将与1.0 $\mu$ mol相当的量的Universal support(固相合成用载体,商品名:Glen Unysupport CPG 1000,Glen Research公司制造)填充于反应柱来制备5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷-3'-[(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基]亚磷酰胺(CARBOSYNTH公司制造)的0.07M乙腈溶液及实施例11中所获得的亚磷酰胺活化剂11,并使用NTS M-2-MX DNA/RNA合成机(NIHON TECHNO SERVICE CO.,LTD.制造)合成了dT 20mer(5'-

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3')。另外,在反应剂中,作为脱保护剂使用了3质量%二氯乙酸-甲苯溶液(Sigma-Aldrich公司制造),作为加帽剂使用了Cap A试剂(N-甲基咪唑-乙腈溶液(2:8))(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)及Cap B试剂(乙酸酐-2,6-二甲基吡啶-乙腈溶液(2:3:5))(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造),作为氧化剂使用了0.05M碘溶液(吡啶-水(9:1))(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation制造)。合成后,将所获得的DNA寡核苷酸在28质量%氨水中在55℃下浸渍15小时来实施了从固相合成用载体的dT 20mer的切出和脱保护。对于所获得的dT 20mer的试样溶液,通过高效液相色谱法(HPLC)测定了纯度(测定条件:柱;Wakopak(注册商标)Ultra C18-5 4.6mm×150mm、流速;1.0mL/min、柱温度;40℃、UV检测波长;260nm、洗脱液A;0.1M乙酸三乙胺(TEAA)水溶液(pH7.0)、洗脱液B;50%乙腈0.1M TEAA水溶液(pH7.0))。

[0197] 实施例37使用亚磷酰胺活化剂16的DNA寡聚物的合成

[0198] 除了代替亚磷酰胺活化剂11而使用实施例16中所获得的亚磷酰胺活化剂16以外,与实施例36同样地合成dT 20mer,并通过HPLC测定了其纯度。

[0199] 比较例26使用亚磷酰胺活化剂118的DNA寡聚物的合成

[0200] 除了代替亚磷酰胺活化剂11而使用比较例18中所获得的亚磷酰胺活化剂118以外,与实施例36同样地合成dT 20mer,并通过HPLC测定了其纯度。

[0201] 关于实施例36及37以及比较例26中的通过HPLC测定出的dT 20mer的纯度,示于表6。

[0202] [表6]

[0203]

	BTT的 摩尔浓度 (mol/L)	添加剂				HPLC纯度 (面积%)
		种类	添加量 (vol%)	摩尔浓度 (mol/L)	相对于BTT 的比例 (%)	
实施例36: 亚磷酰胺活化剂1	0.30	N-甲基哌啶	0.8	0.066	22.0	72.3
实施例37: 亚磷酰胺活化剂16	0.30	N-甲基吡咯烷	0.7	0.067	22.3	72.9
比较例26: 亚磷酰胺活化剂18	0.30	N-甲基咪唑	0.5	0.063	21.0	72.2

[0204] 接着,使用亚磷酰胺活化剂(包含0.8vol%的N-甲基哌啶或0.7vol%的N-甲基吡咯烷的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂),在固相体系中实施了RNA寡聚物合成。同时,还进行使用包含0.5vol%的N-甲基咪唑的0.30mol/L BTT的亚磷酰胺活化剂的RNA寡聚物合成,并比较了其合成结果。

[0205] 实施例38使用亚磷酰胺活化剂11的RNA寡聚物的合成

[0206] 将与0.2μmol相当的量的Universal support(固相合成用载体,商品名:Glen Unysupport CPG 1000,Glen Research公司制造)填充于反应柱来制备5'-0-(4,4'-二甲基三苯甲基)-2'-0-(叔丁基二甲基甲硅烷基)尿苷-3'-[(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基]亚磷酰胺(Sigma-Aldrich公司制造)的0.07M乙腈溶液及实施例11中所获得的亚磷酰胺活化剂11,并使用NTS M-2-MX DNA/RNA合成机(NIHON TECHNO SERVICE CO.,LTD.制造)合成了rU 20mer(5'-UUUUUUUUUUUUUUUUUU-3')。另外,反应剂使用了与实施例36中所记载的反

应剂相同的反应剂。合成后,将所获得的RNA寡核苷酸在28质量%氨水-40质量%甲胺水溶液-70质量%乙醇水溶液(1:1:1)的混合溶剂中在60°C下浸渍3小时来实施了从固相合成用载体的rU 20mer的切出和脱保护。此外,将所获得的溶液浓缩,向其中加入二甲基亚砜50 $\mu$ L及三乙胺三氢氟酸盐(TREAT-3HF)200 $\mu$ L并在60°C下浸渍3小时来实施了叔丁基二甲基甲硅烷基的脱保护。在与实施例36相同的测定条件下,通过HPLC测定了所获得的rU 20mer的纯度。

[0207] 实施例39使用亚磷酰胺活化剂16的RNA寡聚物的合成

[0208] 除了代替亚磷酰胺活化剂11而使用实施例16中所获得的亚磷酰胺活化剂16以外,与实施例38同样地合成rU 20mer,并通过HPLC测定了其纯度。

[0209] 比较例27使用亚磷酰胺活化剂118的RNA寡聚物的合成

[0210] 除了代替亚磷酰胺活化剂11而使用比较例18中所获得的亚磷酰胺活化剂118以外,与实施例38同样地合成rU 20mer,并通过HPLC测定了其纯度。

[0211] 关于实施例38及39以及比较例27中的通过HPLC测定出的rU 20mer的纯度,示于表7。

[0212] [表7]

	BTT的 摩尔浓度 (mol/L)	添加剂			相对于BTT 的比例 (%)	HPLC纯度 (面 积%)
		种类	添加量 (vol%)	摩尔浓度 (mol/ L)		
[0213] 实施例38: 亚磷酰胺活化剂11	0.30	N-甲基哌啶	0.8	0.066	22.0	27.7
实施例39: 亚磷酰胺活化剂16	0.30	N-甲基吡咯烷	0.7	0.067	22.3	28.1
比较例27: 亚磷酰胺活化剂118	0.30	N-甲基咪唑	0.5	0.063	21.0	24.8

[0214] 根据表6及表7的结果判明了即使将含有N-甲基哌啶或N-甲基吡咯烷的本发明的亚磷酰胺活化剂用于固相系合成的情况下,也可以与使用专利文献1中所公开的含有N-甲基咪唑的亚磷酰胺活化剂的情况相等或其以上的纯度获得DNA/RNA寡聚物。

[0215] 因此,可知本发明的亚磷酰胺活化剂在固相系合成中发挥具有与专利文献1中所公开的含有添加剂(N-甲基咪唑)的亚磷酰胺活化剂相等或其以上的高保存稳定性,且可以以相等或其以上的高纯度获得目标物这样的优异的效果。