



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I853845 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：108138215

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 23 日

(51)Int. Cl. : C07H1/06 (2006.01)

C07H21/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/10/24 歐洲專利局

18202335.8

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士(72)發明人：李爾 爵爾格 LILL, JOERG (DE)；史雷多傑維克 菲利波 SLADOJEVICH, FILIPPO
(IT)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2006/108599A2

期刊 Krotz et al., "Controlled Detritylation of Antisense
Oligonucleotides", Organic Process Research & Development, 2003,
7, pp 47-52.

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：0 共 18 頁

(54)名稱

純化寡核苷酸的方法

(57)摘要

本發明係關於一種純化寡核苷酸的新穎方法，該方法包含藉由用酸性緩衝溶液切向流過濾來移除該寡核苷酸之 5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定 5'羥基保護基。該方法需要較少步驟且允許較高度的自動化。

The invention relates to a new process for the purification of oligonucleotides which comprises the removal of the acid labile 5'hydroxy protecting group at the 5'-O-oligonucleotide terminus of the oligonucleotide by way of tangential flow filtration with an acidic buffer solution. The process requires less steps and allows a higher degree of automation.



I853845

【發明摘要】

【中文發明名稱】

純化寡核苷酸的方法

【英文發明名稱】

PROCESS FOR THE PURIFICATION OF OLIGONUCLEOTIDES

【中文】

本發明係關於一種純化寡核苷酸的新穎方法，該方法包含藉由用酸性緩衝溶液切向流過濾來移除該寡核苷酸之 5'-*O*-寡核苷酸端的酸不穩定 5'羟基保護基。該方法需要較少步驟且允許較高度的自動化。

【英文】

The invention relates to a new process for the purification of oligonucleotides which comprises the removal of the acid labile 5'hydroxy protecting group at the 5'- *O*-oligonucleotide terminus of the oligonucleotide by way of tangential flow filtration with an acidic buffer solution. The process requires less steps and allows a higher degree of automation.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

純化寡核苷酸的方法

【英文發明名稱】

PROCESS FOR THE PURIFICATION OF OLIGONUCLEOTIDES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種純化寡核苷酸的新穎方法，該方法包含藉由用酸性緩衝溶液切向流過濾來移除該寡核苷酸之5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基。

【先前技術】

【0002】 通常經由固相合成製備之寡核苷酸在其自樹脂裂解之後仍含有大量雜質。對於具有15至20個單體單元長度之標準單體，API純度最多在70%至80%的範圍內。對於經化學修飾之單體或對於較長序列，API含量通常甚至更低。

【0003】 已研發出選擇性分離方法以製備滿足治療應用之規範的高純度寡核苷酸。

【0004】 在一個方法中，寡核苷酸在其自樹脂裂解之後保留有5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基。此基團之疏水性允許用於純化之層析技術的有效應用。

【0005】 常用策略為使粗寡核苷酸通過以下步驟(例如Krotz等人，Organic Process Research & Development 2003, 7, 47-52)

a) 逆相層析

b) 濃縮及去鹽，

- c) 移除溶液中之酸不穩定5'羥基保護基及
- d) 進一步濃縮及去鹽。

【0006】 發現此已知方法因單個操作步驟a)至d)之數目而需要相當長的操作時間。

【發明內容】

【實施方式】

【0007】 本發明之目標為減少步驟數，實現更高度的自動化且藉此較少總體操作時間。

【0008】 發現本發明之目標可藉由如上文所概述之純化寡核苷酸的新穎方法來達成。

【0009】 闡述以下定義以說明且定義用於描述本發明之不同術語之意義及範疇。

【0010】 術語酸不穩定5'羥基保護基定義為可藉由合適酸裂解且具有疏水性特徵之保護基。

【0011】 典型的酸不穩定5'羥基保護係選自4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、三苯甲基、9-苯基-二苯并呋喃-9-基、9-(對甲苯基)-二苯并呋喃-9-基，或選自第三丁基二甲基矽基，較佳地選自4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基或三苯甲基，或甚至更佳地選自4,4'-二甲氧基三苯甲基。

【0012】 如本文中所使用之術語寡核苷酸定義為熟習此項技術者一般將其理解為包含兩個或更多個共價鍵聯之核苷酸的分子。為用作治療上有價值的寡核苷酸，寡核苷酸通常合成長度為10至40個核苷酸，較佳地10至25個核苷酸。

【0013】寡核苷酸可由視情況經修飾之DNA、RNA或LNA核苷單體或其組合組成。

【0014】LNA核苷單體為包含核苷酸之核糖環之C2'與C4'之間的連接子基團(稱作雙基團或橋接基團)的經修飾之核苷。此等核苷在文獻中亦稱為橋接核酸或雙環核酸(BNA)。

【0015】如本文中所使用之視情況經修飾係指與當量DNA或RNA或LNA核苷相比，藉由引入一或多個糖部分或核鹼基部分之修飾而經修飾的核苷。在一較佳實施例中，經修飾之核苷包含經修飾之糖部分，且可例如包含一或多個2'經取代之核苷及/或一或多個LNA核苷。術語經修飾之核苷亦可在本文中與術語「核苷類似物」或經修飾之「單元」或經修飾之「單體」互換使用。

【0016】DNA、RNA或LNA核苷通常藉由將兩個核苷共價偶合在一起的磷酸二酯(P=O)及/或硫代磷酸酯(P=S)核苷間鍵來連接。

【0017】因此，在一些寡核苷酸中，所有核苷間鍵可由磷酸二酯(P=O)組成，在其他寡核苷酸中，所有核苷間鍵可由硫代磷酸酯(P=S)組成或在又其他寡核苷酸中，核苷間鍵之序列改變且包含核苷間磷酸二酯(P=O)及硫代磷酸酯(P=S)兩者。

【0018】核鹼基部分可藉由每一對應核鹼基之字母代碼(例如A、T、G、C或U)指示，其中各字母可視情況包括當量功能的經修飾核鹼基。舉例而言，在例示性寡核苷酸中，核鹼基部分對於LNA核苷用大寫字母A、T、G及^{Me}C (5-甲基胞嘧啶)描述且對於DNA核苷用較小字母a、t、g、c及^{Me}C描述。經修飾核鹼基包括(但不限於)攜帶保護基之核鹼基，例如第三丁基苯氧基乙醯基、苯氧基乙醯基、苯甲醯基、乙醯基、異丁醯基

或二甲基亞胺甲基胺基(參見Wikipedia，Phosphoramidit-Synthese，2016年3月24日之<https://de.wikipedia.org/wiki/Phosphoramidit-Synthese>)。

【0019】 較佳地寡核苷酸由視情況經修飾之DNA、RNA或LNA核苷單體或其組合組成且長度為10至40個，較佳地10至25個核苷酸。

【0020】 寡核苷酸合成之原理為此項技術中所熟知(參見例如，Oligonucleotide synthesis；Wikipedia(免費的百科全書)；2016年3月15日之https://en.wikipedia.org/wiki/Oligonucleotide_synthesis)。

【0021】 現如今的較大規模寡核苷酸合成係使用電腦控制的合成器自動地進行。

【0022】 通常，寡核苷酸合成為固相合成，其中組裝之寡核苷酸經由其3'-端羥基共價鍵結至固體載體材料且在鏈組裝之整個過程中仍與其附接。合適載體為可商購之巨孔聚苯乙烯載體，如來自GE Healthcare之引子載體5G或來自Kinovate之NitroPhase®HL載體。

【0023】 寡核苷酸合成原則上係將核苷酸殘基逐步地添加至生長鏈之5'-端直至組裝成所需序列。

【0024】 通常，各添加稱為合成週期且原則上由化學反應組成

a₁) 使固體載體上之受保護羥基去保護(deblocking)，

a₂) 將第一個核苷呈活化亞磷醯胺(phosphoramidite)與固體載體上之游離羥基偶合，

a₃) 氧化或硫化各別P-連接之核苷以形成各別磷酸二酯(P=O)或各別硫代磷酸酯(P=S)；

a₄) 視情況封端固體載體上之任何未反應羥基；

a₅) 使附接至固體載體之第一個核苷之5'羥基去保護；

a₆) 將第二個核苷呈活化亞磷醯胺偶合以形成各別P-連接之二聚體；

a₇) 氧化或硫化各別P-連接之二核苷以形成各別磷酸二酯(P=O)或各別硫代磷酸酯(P=S)；

a₈) 視情況封端任何未反應的5'羟基；

a₉) 重複先前步驟a₅至a₈直至組裝成所需序列。

【0025】後續自樹脂裂解可藉由濃氨水來執行。磷酸酯及核苷酸鹼基上之保護基亦在此裂解程序內移除。

【0026】裂解後的粗寡核苷酸保留有5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羟基保護基。

【0027】方法之特徵在於藉由用酸性緩衝溶液切向流過濾移除寡核苷酸之5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羟基保護基。

【0028】術語酸不穩定5'羟基保護基在上文定義為可藉由合適酸裂解且具有疏水性特徵之保護基。

【0029】典型的酸不穩定5'羟基保護係選自4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、三苯甲基、9-苯基-二苯并呋喃-9-基、9-(對甲苯基)-二苯并呋喃-9-基，或選自第三丁基二甲基矽基，較佳地選自4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基或三苯甲基，或甚至更佳地選自4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMT)。

【0030】酸性緩衝液為弱酸及其共軛鹼之水溶液，該水溶液用質子酸酸化以使pH得到適宜在所需範圍內。

【0031】典型的酸性緩衝液為由作為弱酸之乙酸或檸檬酸及其作為共軛鹼之鈉鹽組成的乙酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液。

【0032】 用於酸化酸性緩衝液之質子酸可選自無機酸水溶液，諸如鹽酸、磷酸、硫酸或硝酸，但通常選自鹽酸水溶液。

【0033】 所需pH範圍理想地在2至6之間，較佳地在2.5至4.0之間，甚至更佳在2.8與3.5之間。

【0034】 酸性緩衝溶液亦可含有呈5% (V)至50% (V)之量，較佳地呈20% (V)至40% (V)之量的極性質子或極性非質子有機溶劑。

【0035】 合適的極性質子性溶劑為初級脂族醇，諸如甲醇、乙醇或異丙醇，較佳地乙醇。

【0036】 合適的極性非質子性溶劑為乙腈、二甲亞砜或N-甲基-2-吡咯啉酮，但較佳地為乙腈。

【0037】 在一較佳實施例中，酸緩衝液為乙酸鹽緩衝液，其用鹽酸水溶液酸化至pH在2.8至3.5範圍內且隨後用乙醇稀釋以形成含有35% (V)至45% (V)乙醇之緩衝溶液。

【0038】 乙酸鹽濃度可選擇在10 mmol/l至1 mol/l範圍內，較佳地在50 mmol/l至250 mmol/l範圍內。

【0039】 切向流過濾之特徵在於進料在相對於滲透側之正壓下通過過濾膜(沿切線方向)。小於膜孔徑之一部分材料作為滲透液或過濾物通過膜；其他所有事物作為滯留物經保留於膜之進料側。

【0040】 合適膜可例如自Merck Millipore以商標名Pellicon™或自Sartorius以商標名Hydrosart™購得。

【0041】 本發明之方法適當地藉由分子量截止值(MWCO) $\leq$ 5kDA，較佳地 $\leq$ 2.5 kDA，更佳地為0.5至2.5 kDA，甚至更佳地為1.8至2.2 kDA的膜來工作。

【0042】 切向流過濾在0.5至10.0巴，更佳地1.0至4巴，甚至更佳地1.5至2.0巴之跨膜壓力下進行。

【0043】 描述每單位區域之流速的通量通常選擇在5至50 l/h×m²範圍內，較佳地在9至15 l/h×m²範圍內。

【0044】 酸性緩衝溶液中之寡核苷酸含量經選擇在1.0 mg/l與100.0 mg/l之間，較佳地在5.0 mg/l與50.0 mg/l之間。

【0045】 在本發明之另一實施例中，方法進一步包含以下在移除寡核苷酸之5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基之後開始的步驟：

- 中和步驟，其包含經由切向流過濾用鹼中和所得滯留物；及
- 去鹽步驟，其包含洗滌自經由切向流過濾用水或水與極性質子或極性非質子有機溶劑之混合物中和步驟獲得的滯留物；及
- 視情況冷凍乾燥自去鹽步驟獲得之滯留物。

【0046】 用於中和滯留物之合適鹼為無機鹼水溶液，諸如鹼金屬氫氧化物水溶液，如氫氧化鈉水溶液；或鹼性緩衝液。

【0047】 後續洗過濾物可用水或者水與極性質子有機溶劑之混合物進行，該極性質子有機溶劑選自一級脂族醇，諸如甲醇、乙醇或異丙醇，較佳地乙醇。

【0048】 通常，去鹽步驟以梯度進行，亦即以水與極性質子有機溶劑之混合物開始且以水結束。

【0049】 混合物中水與極性質子有機溶劑之體積比通常在1:1與6:1之間，較佳地4:1至3:2。

【0050】 中和以及去鹽步驟期間之切向流過濾的參數，亦即跨膜壓力、滲透流速及膜類型通常與包含移除酸不穩定5'羥基保護基之先前步驟

所述的參數相對應。

【0051】 在去鹽步驟之後，獲得之滯留物可經凍乾步驟或進一步純化，諸如自寡核苷酸移除殘餘溶劑。

【0052】 在最佳實施例中，該方法之特徵在於

- 藉由用酸性緩衝溶液切向流過濾移除寡核苷酸之5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基
- 中和步驟，其包含經由切向流過濾用鹼中和所得滯留物；及
- 去鹽步驟，其包含洗滌經由切向流過濾用水或者水與極性質子或極性非質子有機溶劑之混合物之中和步驟獲得的滯留物；及
- 視情況冷凍乾燥去鹽步驟獲得之滯留物。

【0053】 去保護步驟、中和步驟及去鹽步驟為連續的切向流過濾步驟，可自動化且藉由同一軟體控制設備進行，而不需要任何操作人員介入。

【0054】 如上文所概述，寡核苷酸於樹脂上形成之後通常用濃氨水自樹脂裂解。除寡核苷酸之5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基之外，磷酸酯及核苷酸鹼基上之保護基亦在此裂解程序內移除。

【0055】 在一個較佳實施例中，該方法進一步包含以下步驟，其在移除寡核苷酸之5'-O-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基之前進行。此先前步驟旨在移除所欲寡核苷酸之較短長度(非5'保護)截斷物。

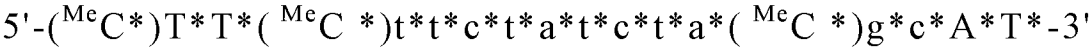
- 自樹脂裂解及磷酸酯去保護之後獲得的粗寡核苷酸的逆相高效液相層析或陰離子交換層析。

【0056】 陰離子交換層析係基於樣本溶液之帶電荷離子與所採用緩衝介質的競爭性相互作用。其可藉由習知可商購的陰離子交換樹脂，較佳

地具有三甲銨官能化之彼等樹脂來進行。此等相材料可獲自例如GE Healthcare, Tosoh Bioscience, Bio-Rad或Merck。具體良好結果已藉由購自Tosoh Bioscience之陰離子交換樹脂TSKgel Super Q-5PW (QAE)來實現。

【0057】 逆相層析可藉由傳統的可商購相材料，通常C8或C18相材料(諸如作為固定相之經改質矽膠吸附劑)及諸如乙腈之合適有機溶劑以及(若適用)緩衝液來進行。合適的經改質矽膠型相材料可選自Kromasil™C18、Kromasil™C8、YMC Triart C18及YMC Triart C8。

【0058】 藉由說明，寡核苷酸可選自由以下組成之群：



其中*表示硫代磷酸酯橋接基團；A、G、T及^{Me}C (5-甲基胞嘧啶)為LNA核苷單體且a、t、c、g為DNA核苷單體。

【0059】 本文所揭示之化合物具有以下核鹼基序列SEQ ID NO.1：
cttctctatctacgcat'

【0060】

實例

縮寫：

ACN = 乙腈

Ac₂O = 乙酸酐

CV = 管柱體積

DAC = 二氯乙酸

DCM = 二氯甲烷

DMT = 4,4'-二甲氧基三苯甲基

EtOH = 乙醇

NaOAc = 乙酸鈉

NMI = N-甲基咪唑

【0061】

實例1

a. 合成5'-(^{Me}C*)T*T*(^{Me}C*)t*t*c*t*a*t*c*t*a*(^{Me}C*)g*c*A*T*-3'

【0062】 標題化合物使用ÄKTA oligopilot-100以1.9 mmol規模合成為「DMT-on」。合成參數在表1中給出。

表1：ÄKTA OP-100在合成參數

方法步驟	參數	設定點
偶合	LNA-C亞醯胺(amidite)之濃度	0.2 M DCM/ACN 1:1
	其他亞醯胺之濃度	0.2 M ACN
	與載體當量之亞醯胺	1.5當量
	活化劑	BTT
	活化劑濃度	0.3 M於ACN中
	活化劑溶液之體積%	65%
	再循環時間	10.0 min (LNA) 7.5 min (DNA)
	偶合洗滌流速	24 mL/min
	偶合洗滌體積	12 mL
硫醇化	試劑	黃原膠氫化物
	濃度	0.1 M於ACN/吡啶1:1中
	體積	2 CV
	再循環或流動通過	流動通過
	推注流速	17 mL/min
	推注體積	1 CV
	ACN洗滌體積	8.5 mL
合成管柱	規模	1.9 mmol
	載體	NittoPhase UnyLinker
	載體重量	4.6 g
	載體負載量	0.417 mmol/g

	管柱直徑	44 mm
	管柱體積	48 mL
去三苯甲基化 (Detritylation)	試劑	3% DCA
	控制模式	UV
	UV監測	350 nm
	去三苯甲基化流速	400 cm/h
	ACN洗滌	96 mL
	ACN洗滌流速	7巴
	ACN洗滌	96 mL
	ACN洗滌流速	15巴
封端	試劑	封端劑A：20% v/v NMI於ACN中 封端劑B：30% v/v二甲基吡啶(lutidine)、20% v/v Ac ₂ O於ACN中
	填充體積	96 mL (1:1 封端劑A/封端劑B)
	填充流速	120 mL/min
	接觸時間	0.8 min
	ACN推注/洗滌體積	216 mL
	ACN推注/洗滌體積	144 mL
合成後洗滌	洗滌溶劑	ACN
	洗滌體積	288 mL
	洗滌時間	3分鐘
合成後DEA洗滌 (在管柱上及在合成器上)	溶液	20% v/v於ACN中
	流動通過或再循環	流動通過
	體積	235 mL
	接觸時間	30分鐘
最終管柱洗滌	洗滌溶劑	ACN
	洗滌體積	288 mL
	洗滌時間	3分鐘

【0063】

b. 自固體載體之裂解及RP-HPLC純化

粗材料自樹脂裂解且藉由將無水樹脂溶解於30%氨水溶液(190 mL)

中及在65℃下攪拌5 h來去保護。固體載體經過濾出且水溶液藉由旋轉蒸發濃縮至大約60 mL。溶液進一步用H₂O稀釋至最終容積100 mL且添加固體Na₂CO₃以得到50 mM Na₂CO₃溶液(124 mg/mL粗寡核苷酸含量)。一部分粗材料(80 mL)藉由RP-HPLC根據表2中之參數來純化。

表2：RP-HPLC純化參數。

方法參數	設定點		
管柱類型	YMC Triart C18製備型		
管柱溫度	23℃		
進料溶液組成	124 mg/mL總寡核苷酸含量於50 mM Na ₂ CO ₃ 中		
進料溶液之總體積	80 mL		
每一注射之體積	4 mL		
溶離溶劑A	50 mM Na ₂ CO ₃		
溶離溶劑B	ACN		
梯度	時間(min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
	3	85	15
	15	75	25
	17	75	25
	17.10	10	90
	20	10	90
	20.10	95	5
	26	95	5
溶離份大小	48 mL		

【0064】

c. 藉由切向流過濾之DMT去保護、去鹽及濃縮

合併來自RP純化之溶離份以得到2.5 L (2 mg/mL寡核苷酸)且用H₂O稀釋至最終體積4.2 L。在配備有兩個2 kD截止值Hydrosart Sartocn卡匣(0.1m²)之ÄKTA交叉流動機器上處理材料以觸發DMT去保護、濃縮及切向流過濾。程序參數經詳細描述於表3中。

表3：ÄKTA交叉流動程序之詳細參數。

方法步驟	步驟細節
1. 濃縮	4.2 L濃縮至0.2 L
2. EtOH稀釋液	用80 mL EtOH稀釋
3. 去保護	用5.5 L去保護緩衝液[NaOAc 100 mM，用HCl酸化至pH 3 + 40% EtOH]切向流過濾 寡核苷酸含量：18mg/l 跨膜壓力：1.5巴 滲透流速：20 ml/min 通量：12L/h×m ² 總時間：4.8小時
4. 中和	用130 mL 0.1 M NaOH切向流過濾 跨膜壓力：1.5巴 滲透流速：20 ml/min。 通量:12L/h×m ² 總時間：6分鐘
5. 去鹽	用3.0 L H ₂ O/EtOH (4:1)切向流過濾 總時間：2.4 hours 小時(H ₂ O/EtOH 4/1) 跨膜壓力：1.5巴 滲透流速：20 mL/min。

【0065】 在沖洗之後獲得之溶液經凍乾以得到4.00 g標題產物(基於合成規模之總產率為42%，UV純度為88%)。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司(F.Hoffmann- La Roche AG)

<120> 純化寡核苷酸的方法

<130> P35110

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> 寡核苷酸序列

<400> 1

cttctctatc tacgcat

17

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種純化寡核苷酸的方法，其包含藉由用酸性緩衝溶液切向流過濾來移除該寡核苷酸之5'-*O*-寡核苷酸端的酸不穩定5'羟基保護基。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該酸不穩定5'羟基保護基係選自4,4'-二甲氧基三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、三苯甲基、9-苯基-二苯并呋喃(xanthen)-9-基、9-(對-甲苯基)-二苯并呋喃-9-基，或選自第三丁基二甲基矽基。

【請求項3】

如請求項2之方法，其中該酸不穩定5'羟基保護基為4,4'-二甲氧基三苯甲基。

【請求項4】

如請求項1或2之方法，其中該酸性緩衝溶液之pH在2至6範圍內。

【請求項5】

如請求項4之方法，其中該酸性緩衝溶液之pH在2.5至4.0範圍內。

【請求項6】

如請求項1或2之方法，其中該酸性緩衝液為弱酸及其共軛鹼之水溶液，該水溶液用質子酸酸化以使pH在所需範圍內。

【請求項7】

如請求項6之方法，其中該酸性緩衝液為乙酸鹽緩衝液且該質子酸為鹽酸。

【請求項8】

如請求項1或2之方法，其中該酸性緩衝溶液另外含有極性質子或極性非質子有機溶劑。

【請求項9】

如請求項1或2之方法，其中該切向流過濾在0.5至10.0巴之跨膜壓力下進行。

【請求項10】

如請求項1或2之方法，其中該切向流過濾以5與50 l/h×m²之間的通量率進行。

【請求項11】

如請求項1或2之方法，其中該切向流過濾以具有分子量截止值(MWCO) ≤ 5kDA的膜進行。

【請求項12】

如請求項1或2之方法，其中在該酸性緩衝溶液中該寡核苷酸含量係選擇在1.0 mg/l與100.0 mg/l之間。

【請求項13】

如請求項1或2之方法，其中該方法進一步包含以下步驟，其在移除該寡核苷酸之5'-*O*-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基之後進行

- a. 中和步驟，其包含經由切向流過濾用鹼中和所得滯留物；及
- b. 去鹽步驟，其包含洗滌經由切向流過濾用水或者水與極性質子或極性非質子有機溶劑之混合物中和獲得之滯留物；及
- c. 視情況冷凍乾燥該去鹽步驟獲得之滯留物。

【請求項14】

如請求項1或2之方法，其中該方法進一步包含以下步驟，其在移除

該寡核苷酸之5'-*O*-寡核苷酸端的酸不穩定5'羥基保護基之前進行

a. 自樹脂裂解及磷酸酯去保護後獲得的粗寡核苷酸的逆相高效液相層析或陰離子交換層析。

【請求項15】

如請求項1或2之方法，其中該寡核苷酸係由視情況經修飾之DNA、RNA或LNA核苷單體或其組合組成，且長度為10至40個核苷酸。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中該寡核苷酸係由視情況經修飾之DNA、RNA或LNA核苷單體或其組合組成，且長度為10至25個核苷酸。