

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-502935

(P2012-502935A)

(43) 公表日 平成24年2月2日(2012.2.2)

(51) Int.Cl.
C07H 21/02 (2006.01)F1
C07H 21/02テーマコード (参考)
4C057

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2011-527195 (P2011-527195)	(71) 出願人	510149390 蘇州瑞博生物技術有限公司
(86) (22) 出願日	平成21年9月22日 (2009.9.22)		中華人民共和国江蘇省昆山市葦城南路1666号 清華科技園科技大廈508室
(85) 翻訳文提出日	平成23年3月23日 (2011.3.23)	(74) 代理人	100078732 弁理士 大谷 保
(86) 国際出願番号	PCT/CN2009/074101	(72) 発明者	席真 中華人民共和国天津市南開区衛津路94号 南開大学 元素有機研究所
(87) 国際公開番号	W02010/037326	(72) 発明者	黄金宇 中華人民共和国天津市南開区衛津路94号 南開大学 元素有機研究所
(87) 国際公開日	平成22年4月8日 (2010.4.8)	(72) 発明者	章駿斌 中華人民共和国天津市南開区衛津路94号 南開大学 元素有機研究所
(31) 優先権主張番号	200810149372.5		
(32) 優先日	平成20年9月23日 (2008.9.23)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドの合成方法

(57) 【要約】

本発明は、オリゴヌクレオチドの合成方法に関する。この方法は、縮合反応条件下で式(1)の化合物と式(2)の化合物とを液体反応溶媒中で反応させ、式(3)の化合物を得ることを含む。本発明の方法で適宜な保護基を用いて保護しようとする官能基を保護し、式(1)の化合物(OH-成分)にある連結しようとする5'末端のヒドロキシル基と式(2)の化合物(P-成分)にある連結しようとする3'末端のリン酸塩とを遊離にして、液体反応溶媒中で縮合反応を行い、OH-成分とP-成分とを連結し、DNAまたは短鎖RNAを得る。本発明の方法は、固相カラムを使用する必要がなく、液体反応溶媒中で実施できて、オリゴヌクレオチドを大規模に合成することが可能である。

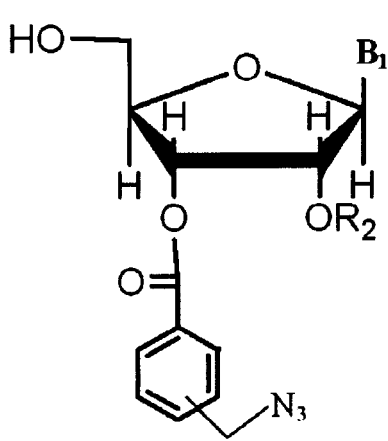
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

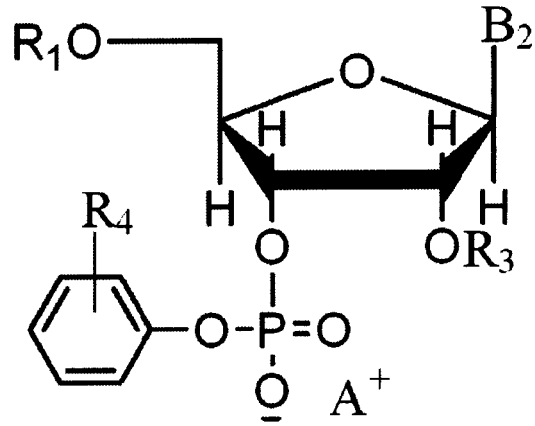
【請求項 1】

オリゴヌクレオチドの合成方法であって、縮合反応条件下で式(1)の化合物と式(2)の化合物とを液体反応溶媒中で反応させ、式(3)の化合物を得ることを含むことを特徴とするオリゴヌクレオチドの合成方法。

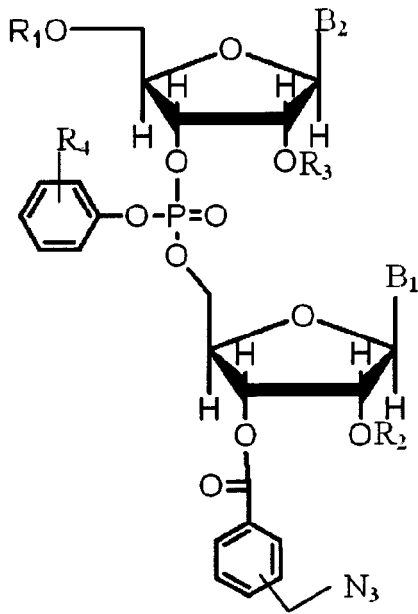
【化 1】



式(1)



式(2)



式(3)

(式中、 R_1 はジメトキシトリチル基、RNAまたはDNAであり； R_2 、 R_3 はそれぞれ立体障害型シリル系保護基であり； R_4 はハロゲン元素であり； A^+ はトリアルキルアンモニウムイオンであり； B_1 、 B_2 はそれぞれN-アシル基で誘導されたグアニン基、N-アシル基で誘導されたアデニン基、N-アシル基で誘導されたシトシン基、N-アシル基で誘導されたチミン基またはN-アシル基で誘導されたウラシル基である。)

【請求項 2】

前記縮合反応条件が、1-(2-メシチレンスルホニル)-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾールおよび/または1-(2-メシチレンスルホニル)-1,2,4-トリアゾ

10

20

30

40

50

ールを縮合剤にし、前記反応溶媒としてピリジンを用い、式(1)の化合物1モルに対して、式(2)の化合物の使用量が0.8~3モルであり、該縮合剤の使用量が2~5モルであり、該反応溶媒が5~50リットルであり、反応温度が10~50であり、反応時間が0.5~10時間であることを含む、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

【請求項3】

R₂とR₃が、それぞれtert-ブチルジメチルシリル基、ジメチルフェニルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、トリイソプロピルシリル基からなる群より選択され、R₄が塩素または臭素であり、前記トリアルキルアンモニウムイオンの各アルキル基の炭素数が1~6個であり、前記アシル基がベンゾイル、イソブチリル、アセチルからなる群より選択される、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

10

【請求項4】

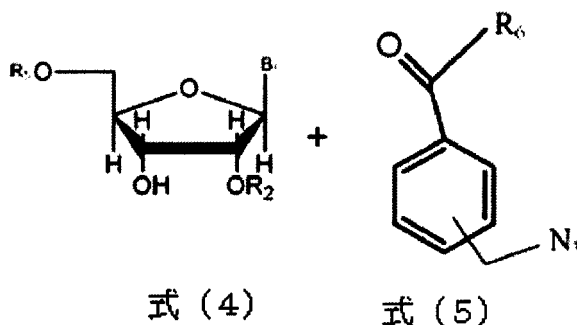
式(1)または式(3)において、-CH₂-N₃がオルト位に位置し、式(2)または式(3)において、R₄がオルト位に位置する、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

【請求項5】

式(1)の化合物が、縮合反応条件下で式(4)の化合物と式(5)の化合物とを反応させてから、5'位にあるR₅保護基を脱離することにより得られる、請求項1に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

20

【化2】



30

(式中、R₂は立体障害型シリル系保護基であり；R₅はジメトキシトリチル基であり；R₆はハロゲン元素であり；B₁はN-アシル基で誘導されたグアニン基、N-アシル基で誘導されたアデニン基、N-アシル基で誘導されたシトシン基、N-アシル基で誘導されたチミン基またはN-アシル基で誘導されたウラシル基からなる群より選択される。)

【請求項6】

前記縮合反応条件は、N-メチルイミダゾールを補助剤にし、ジクロロメタン、ピリジンからなる群より選択される少なくとも1種を反応溶媒として用い、式(4)の化合物1モルに対して、式(5)の化合物の使用量が1~5モルであり、該補助剤の使用量が1.8~3.5モルであり、該反応溶媒の使用量が20~200リットルであり、反応温度が-10~10であり、反応時間が5~100時間であることを含む、請求項5に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

40

【請求項7】

式(5)の化合物の合成方法が、

ステップ(1)：過酸化ベンゾイルの存在下で、式(9)の化合物とN-ハロゲンコハク酸イミドとを反応させ、式(10)の化合物を得るステップ

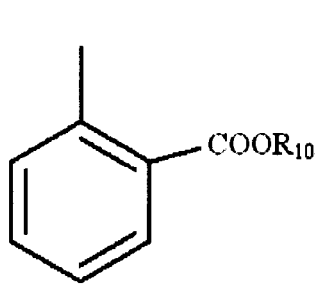
ステップ(2)：式(10)の化合物とアルカリ金属アジドとを反応させ、式(11)の化合物を得るステップ、および、

ステップ(3)：式(11)の化合物を加水分解して、アシル化して式(5)の化合物

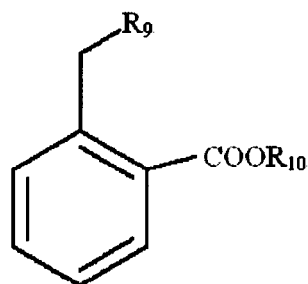
50

を得るステップ、
を含む、請求項 5 または請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

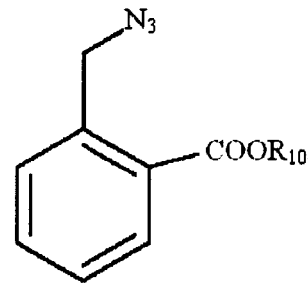
【化 3】



式 (9)



式 (10)



式 (11)

10

式中、 R_9 はハロゲン元素であり、 R_{10} は炭素数 1 ~ 4 のアルキル基である。

【請求項 8】

前記ステップ (1) において、反応溶媒が、テトラクロロメタン、トリクロロホルム、ベンゼン、トルエン、ヘプタンからなる群より選択される少なくとも 1 種であり、式 (9) の化合物 1 モルに対して、N - ハロゲンコハク酸イミドの使用量が 1 ~ 3 モルであり、過酸化ベンゾイルの使用量が 0.01 ~ 0.1 モルであり、反応溶媒の使用量が 5 ~ 20 リットルであり、反応温度が 80 ~ 120 であり、反応時間が 0.5 ~ 6 時間であり、

20

前記ステップ (2) において、反応溶媒が、エタノール、アセトン、N, N ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドからなる群より選択される少なくとも 1 種であり、式 (10) の化合物 1 モルに対して、アルカリ金属アジドの使用量が 1 ~ 3 モルであり、反応溶媒の使用量が 3 ~ 10 リットルであり、反応温度が 0 ~ 80 であり、反応時間が 2 ~ 30 時間であり、

前記ステップ (3) において、前記加水分解は式 (11) の化合物と、アルカリ金属水酸化物のアルコール水溶液との混合溶液との反応を含み、式 (11) の化合物 1 モルに対して、アルカリ金属水酸化物の使用量が 5 ~ 100 モルであり、反応温度が 0 ~ 50 であり、反応時間が 0.1 ~ 2 時間であり、前記アルコール水溶液との混合溶液におけるアルカリ金属水酸化物の濃度が 5 ~ 10 重量%である、請求項 7 に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

30

【請求項 9】

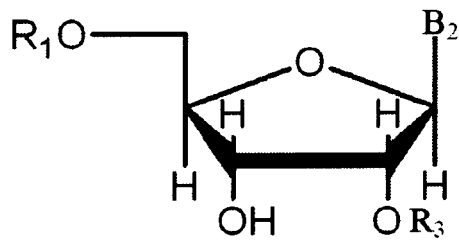
式 (2) の化合物が、触媒の存在下で、式 (6) の化合物、式 (7) の化合物とトリアルキルアミンとを反応溶媒の中で反応させことにより得られ、

該触媒が、1, 2, 4 - トリアゾール、トリエチルアミン、ピリジンからなる群より選択される少なくとも 1 種であり、

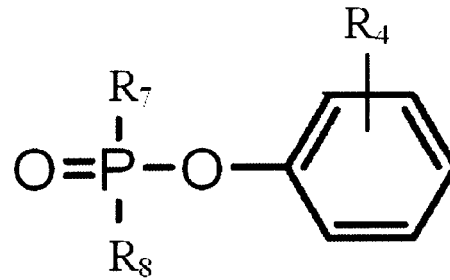
該反応溶媒はジクロロメタン、ジオキサシクロヘキサン、テトラヒドロフランからなる群より選択される少なくとも 1 種である、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

40

【化 4】



式 (6)



式 (7)

10

(式中、R₁はジメトキシトリチル基、RNAまたはDNAであり；R₃は立体障害型シリル系保護基であり；R₄、R₇およびR₈はそれぞれハロゲン元素であり；B₂はN-アシル基で誘導されたグアニン基、N-アシル基で誘導されたアデニン基、N-アシル基で誘導されたシトシン基、N-アシル基で誘導されたチミン基またはN-アシル基で誘導されたウラシル基である。)

【請求項 10】

反応温度が、-10 ~ 10 であり、反応時間が0.5 ~ 10時間であり、式(6)の化合物1モルに対して、式(7)の化合物の使用量は1 ~ 5モルであり、前記トリアルキルアミンの使用量は1 ~ 50モルであり、前記触媒の使用量は2 ~ 10モルである、請求項9に記載のオリゴヌクレオチドの合成方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチドの合成方法に関する。

【背景技術】

【0002】

オリゴヌクレオチドの基本構造ユニットはヌクレオチドであり、ヌクレオチドは塩基、ペントースとリン酸から構成される。ヌクレオチドは、RNA(リボ核酸)とDNA(デオキシリボ核酸)に分類できるが、この2種類のヌクレオチドは基本化学構造が同じで、含有するペントースのみが異なる。RNAのペントースはD-リボースであり、DNAのペントースはD-2-デオキシリボースである。塩基としては、一般的に、グアニン、アデニン等のプリン塩基、シトシン、チミン、ウラシル等のピリミジン塩基等を含む。

30

【0003】

現在広く使用されているオリゴヌクレオチドの化学合成方法は、固相合成法であり、ホスホラミダイトリエステル法とも言う。例えば、「生化学(上)(王鏡岩ら編著、第3版、高等教育出版社)520~521ページ」に固相合成に関する記載を参照することができる。全ての反応は大きくない固相カラムの中で行う。設計した通りに反応を行うようにするため、まず活性化しようとするヌクレオチドの特定する遊離の基を保護(ブロック)する。5'-OH基は、DMT(4,4'-ジメトキシトリフェニルメチル、又はジメトキシトリチル)基により保護され、塩基中のアミノ基はベンゾイル基により保護される。3'-OH基は、アミノ亜リン酸化合物を用いて活性化させる。1個目のヌクレオチドの3'-OH基は、固相(樹脂)と結合する。亜リン酸トリエステルは、その5'-OH基と活性化されたモノマー(ヌクレオチド)との間に形成される。活性化されたモノマーの5'-OH基と塩基のアミノ基は保護されているために反応には関わらない。第2ステップの反応において、亜リン酸トリエステルは、ヨウ素酸化によりリン酸エステルに転換する。第3ステップの反応において、トリクロロ酢酸を加えて成長鎖の5'-OH基の保護基DMTを脱離する。DNA鎖は、もう一つのヌクレオチドユニットにより伸長されて

40

50

、次の鎖の伸長反応に投入できる。事前に決めたシーケンス制御に従って、DNA断片の合成を完了させ、ベンゼンチオールにより5'-OH上の保護基DMTを脱離して、濃アンモニア水で処理することによってDNA断片を固相から切り出し、それから濃アンモニア水を用いて加熱条件下で塩基上の保護基を脱離して、最後に濃アンモニア水を取り除いて、真空下で蒸発させて、所定のものを得る。

【0004】

上に述べた固相合成の全工程は固相カラム中で行うために、固相カラムの量が制限されて、この方法の合成規模が小さく、収率が低く、大量合成の要求に満足できない。核酸の研究の進展に伴い、科学研究に用いるオリゴマーRNAは迅速的に増加するし、RNAを臨床上に応用することもますます増えているため、RNAを大規模に合成できる方法は非常に意義がある。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、従来のオリゴヌクレオチドの化学合成方法において合成規模が小さい欠点を克服し、オリゴヌクレオチドを大規模に合成できる合成方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

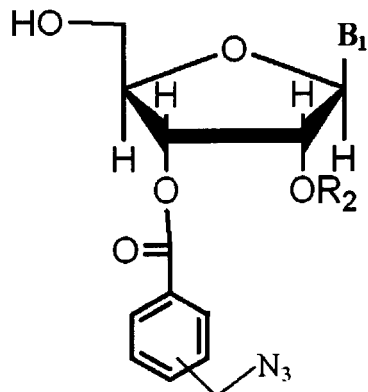
【0006】

本発明は、オリゴヌクレオチドの合成方法を提供する。この方法は、縮合反応条件下で式(1)の化合物と式(2)の化合物とを液体反応溶媒中で反応させ、式(3)の化合物を得ることを含む。

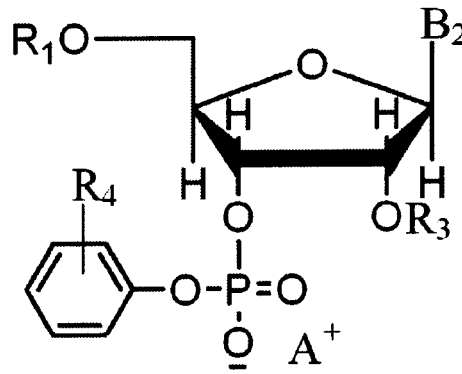
20

【0007】

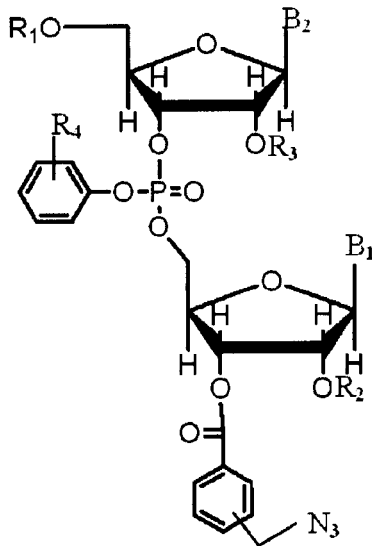
【化 1】



式 (1)



式 (2)



式 (3)

10

20

30

【 0 0 0 8 】

式中、 R_1 はDMTr (ジメトキシトリチル基)、RNAまたはDNAであり； R_2 、 R_3 はそれぞれ立体障害型シリル系保護基であり； R_4 はハロゲン元素であり； A^+ はトリアルキルアンモニウムイオンであり； B_1 、 B_2 はそれぞれN-アシル基で誘導されたグアニン基、N-アシル基で誘導されたアデニン基、N-アシル基で誘導されたシトシン基、N-アシル基で誘導されたチミン基またはN-アシル基で誘導されたウラシル基である。

【 発 明 の 効 果 】

40

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、適宜な保護基を用いて保護しようとする官能基を保護し、式(1)の化合物(OH-成分)にある連結しようとする5'末端のヒドロキシル基と式(2)の化合物(P-成分)にある連結しようとする3'末端のリン酸塩とを遊離にして、液体反応溶媒中で縮合反応を行い、OH-成分とP-成分とを連結し、新たなDNAまたは短鎖RNAが得られる。必要に応じて、このステップが完了してから、得られたDNAまたは短鎖RNAの5'末端の保護基を脱離して、新しい式(2)の化合物と縮合反応を再度行い、より長い鎖を有するものを得、このような工程を繰り返して、最後に全ての保護基を脱離して、所定の長さのオリゴヌクレオチドを得る。もしくは、新たに得られたDNAまたは短鎖RNAの3'末端にある保護基を脱離してから、3'末端のヒドロキシル基をリン

50

酸エステル化して新たな P - 成分を得て（反応式 III に示されているような反応）、新しい式（3）の化合物と縮合反応を再度行い、より長い鎖のものを得、このような工程を繰り返して、最後に全ての保護基を脱離して、所定のオリゴヌクレオチドを合成できる。本発明の方法は、固相カラムを使用する必要がなく、液体反応溶媒中で実施できて、オリゴヌクレオチドを大規模に合成することが可能である。

【発明を実施するための形態】

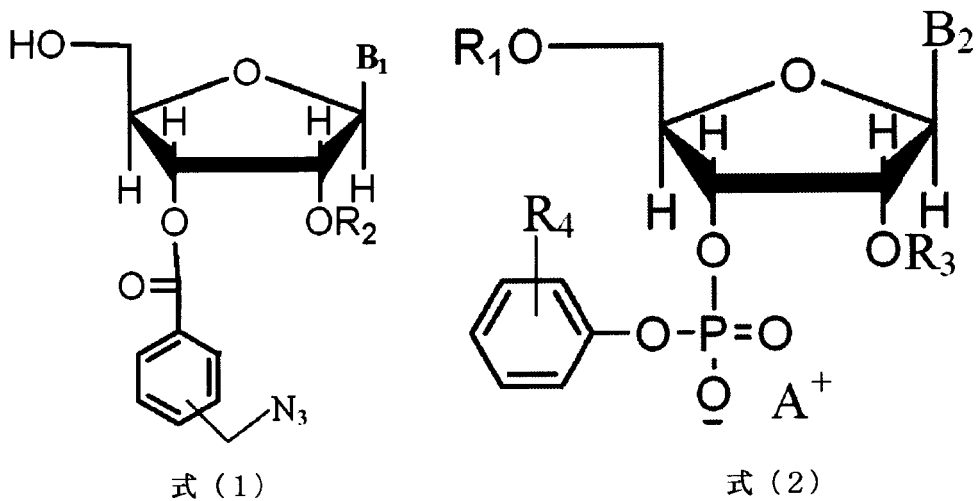
【0010】

本発明の提供するオリゴヌクレオチドの合成方法は、縮合反応条件下で式（1）の化合物と式（2）の化合物とを液体反応溶媒中で反応させ、式（3）の化合物を得ることを含む。

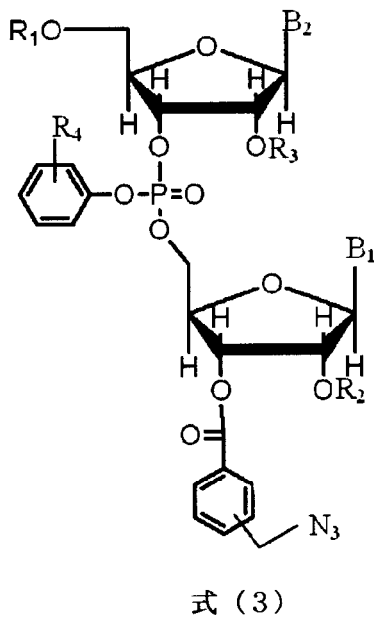
10

【0011】

【化2】



20



30

40

【0012】

式中、 R_1 はDMTr（ジメトキシトリチル基）、RNAまたはDNAであり； R_2 、 R_3 はそれぞれ立体障害型シリル系保護基であり； R_4 はハロゲン元素であり； A^+ はトリアルキルアンモニウムイオンであり； B_1 、 B_2 はそれぞれN - アシル基で誘導されたグアニン基、N - アシル基で誘導されたアデニン基、N - アシル基で誘導されたシトシン基、N

50

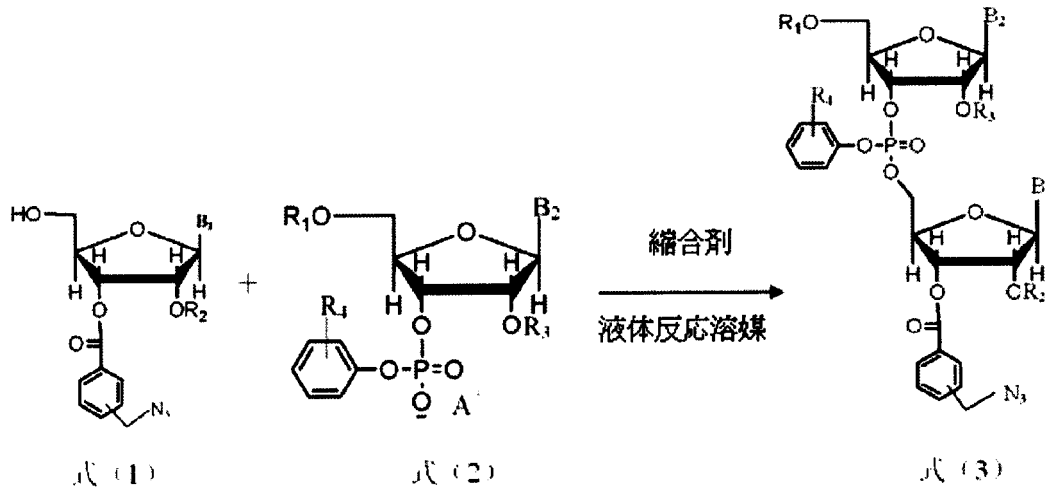
- アシル基で誘導されたチミン基または N - アシル基で誘導されたウラシル基である。

【 0 0 1 3 】

このステップは反応式 I に示すことができる。

【 0 0 1 4 】

【 化 3 】



10

20

反応式 I

【 0 0 1 5 】

前記縮合反応条件としては、以下の縮合剤、反応溶媒、反応温度、反応時間等を含むことができる。

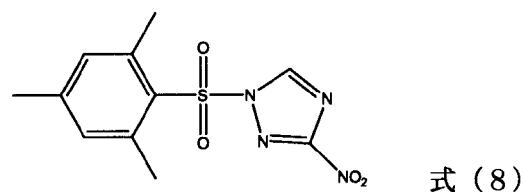
前記縮合剤としては、1 - (2 - メシチレンスルホニル) - 3 - ニトロ - 1, 2, 4 - トリアゾール (MSNT)、1 - (2 - メシチレンスルホニル) - 1, 2, 4 - トリアゾール (MSNI) からなる群より選択される少なくとも 1 種を用いることができる。

30

MSNT の構造式を式 (8) に示す。

【 0 0 1 6 】

【 化 4 】



40

【 0 0 1 7 】

前記反応溶媒としてはピリジンを用いることができる。

【 0 0 1 8 】

式 (1) の化合物 1 モルに対して、式 (2) の化合物の使用量は通常 0.8 ~ 3 モル、好ましくは 1 ~ 2 モル、より好ましくは 1 ~ 1.3 モルである。縮合剤の使用量は通常 2 ~ 5 モル、好ましくは 2.5 ~ 3 モルである。反応溶媒の使用量は通常 5 ~ 50 リットル、好ましくは 5 ~ 20 リットルである。

50

反応式 I に示されている反応温度は通常 10 ~ 50、好ましくは 20 ~ 35 である。反応時間は通常 0.5 ~ 10 時間、好ましくは 1 ~ 5 時間である。

【0019】

式(1)、式(2)、及び式(3)において、前記立体障害型シリル系保護基としては、立体障害と保護性能を有するシリル系基であれば、いかなる種類のものも用いることができるが、tert-ブチルジメチルシリル基、ジメチルフェニルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、トリイソプロピルシリル基からなる群より選択されるものが好ましく、tert-ブチルジメチルシリル基がより好ましい。

【0020】

前記ハロゲン元素としては、フッ素、塩素、臭素とヨウ素からなる群より選択することができるが、塩素または臭素が好ましく、塩素がより好ましい。

10

【0021】

前記トリアルキルアンモニウムイオンのアルキル基は、それぞれ同一でも異なってもよい。各アルキル基の炭素数としては 1 ~ 6 個のものが挙げられるが、好ましくは 1 ~ 4 個である。より好ましいアルキルの例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチルと tert-ブチルが挙げられる。ただし、これらに限定されるものではない。

【0022】

B₁、B₂のアシル基としては、炭素数 2 ~ 20 個のアシル基が挙げられるが、ベンゾイル、イソブチリル、アセチルが好ましい。

20

【0023】

式(1)または式(3)において、-CH₂-N₃の位置は、オルト位、メタ位、パラ位からなる群より選択されるが、好ましくはオルト位である。

式(2)または式(3)において、R₄の位置は、オルト位、メタ位、パラ位からなる群より選択されるが、好ましくはオルト位である。

【0024】

反応式 I の反応が完了した後、反応を終止して、生成物を分離してもよい。

反応の終止方法としては、反応溶液とトリエチルアミン炭酸水素塩 (TEAB) 水溶液とを混合し、攪拌しながら 10 ~ 90 分間保持する方法が挙げられる。トリエチルアミン炭酸水素塩水溶液の濃度としては 0.1 ~ 1 モル/リットル、トリエチルアミン炭酸水素塩水溶液と前記反応溶媒との容積比としては 0.02 ~ 0.5 とすればよい。

30

【0025】

前記分離の方法としては、終止反応後の反応溶液とジクロロメタンとを混合する工程、トリエチルアミン炭酸水素塩水溶液を加えて洗浄する工程、有機層を乾燥して、ろ過し、濃縮し、常圧カラムにより分離し、生成物を得る工程を含むことが可能である。ジクロロメタンと前記反応溶媒との容積比としては 2 ~ 20、トリエチルアミン炭酸水素塩水溶液の濃度としては 0.05 ~ 0.5 モル/リットルとすればよい。前記洗浄の回数は 1 回もしくは複数回であり、洗浄用のトリエチルアミン炭酸水素塩水溶液の総容積と前記反応溶媒の容積との比としては 2 ~ 20 とすればよい。前記乾燥、ろ過、濃縮、常圧カラム分離の操作方法は当業者間ではよく知られており、詳細についてはここでは省略する。

40

【0026】

必要に応じて、反応式 I の反応が完了した後、得られた DNA または短鎖 RNA の 5' 末端の保護基を脱離して (式 II に示されたような第 2 ステップ反応)、新たな式 (2) の化合物と縮合反応を行い、より長い鎖が得られる。このような複数ステップ反応を繰り返して行い、最後に全ての保護基を脱離して、所定の鎖を有するオリゴヌクレオチドを得ることができる。もしくは、新たに得られた DNA または短鎖 RNA の 3' 末端にある保護基を脱離してから、3' 末端のヒドロキシル基をリン酸エステル化して新たな P-成分が得られ (反応式 III に示されているような反応)、新たな式 (3) の化合物と縮合反応を再度行い、より長い鎖のものが得られる。このような複数ステップ反応を繰り返して、最後に全ての保護基を脱離して、所定合成のオリゴヌクレオチドを得ることができる。

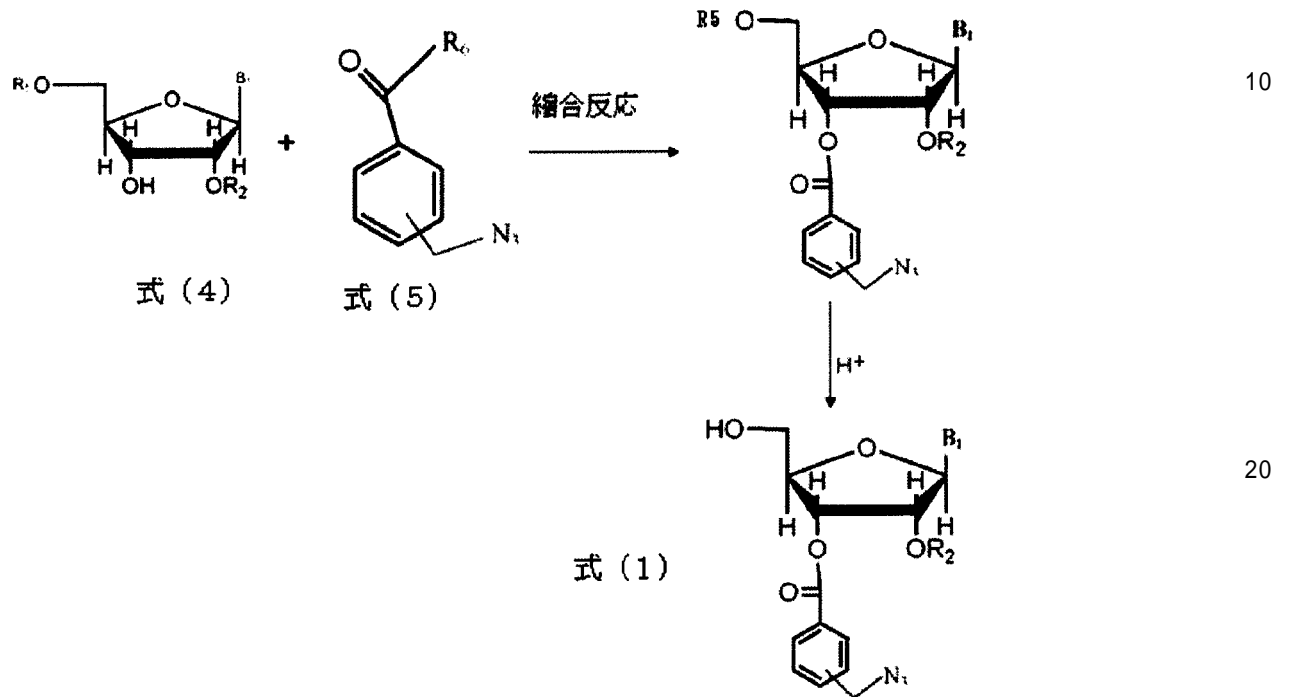
50

【0027】

本発明の方法によれば、式(1)の化合物は反応式IIに示された反応により合成できる。即ち、縮合反応条件下で式(4)の化合物と式(5)の化合物とを反応させ、5'位にあるR₅保護基を脱離する。

【0028】

【化5】



反応式 II

【0029】

式(4)と式(5)において、R₂は立体障害型シリル系保護基であり、種々の立体障害と保護性能を有するシリル系基であり、好ましくはtert-ブチルジメチルシリル基、ジメチルフェニルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、トリイソプロピルシリル基からなる群より選択され、より好ましくはtert-ブチルジメチルシリル基である。

R₅はDMTr(ジメトキシトリチル基)、RNAまたはDNAである。

R₆はハロゲン元素である。前記ハロゲン元素としては、フッ素、塩素、臭素とヨウ素からなる群より選択され、好ましくは塩素または臭素であり、より好ましくは塩素である。

B₁はN-アシル基で誘導されたグアニン基、N-アシル基で誘導されたアデニン基、N-アシル基で誘導されたシトシン基、N-アシル基で誘導されたチミン基またはN-アシル基で誘導されたウラシル基からなる群から選択される。前記アシル基としては、炭素数2~20個のアシル基が用いられ、好ましくはベンゾイル、イソブチリル、アセチルである。

【0030】

式(1)または式(4)において、-CH₂-N₃の位置は、オルト位、メタ位、パラ位からなる群より選択され、好ましくはオルト位である。

【0031】

反応式IIにおいて、前記縮合反応条件としては、N-メチルイミダゾールを補助剤にし、反応溶媒はジクロロメタン、ピリジンからなる群より選択される少なくとも1種である

ことなどを含むことができる。

【0032】

式(4)の化合物1モルに対して、式(5)の化合物の使用量は通常1~3モル、好ましくは1.5~3モルである。前記補助剤の使用量は通常1~8モル、好ましくは2~3.5モルである。反応溶媒の使用量は通常20~200リットル、好ましくは30~150リットルである。

反応温度としては、通常-10~10であり、氷浴を用いることが好ましい。反応時間としては、通常5~100時間、好ましくは10~60時間である。

【0033】

反応式IIの反応が完了した後、反応を終止して、縮合反応生成物を分離してもよい。

反応の終止方法としては、反応溶液と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液とを1~20分間混合する方法が挙げられる。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と前記反応溶媒との容積比としては1~10とすればよい。

【0034】

前記分離の方法としては、終止反応後の反応溶液の有機層と水層を分ける工程、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を用いて有機層を洗浄する工程、全ての有機層を乾燥して、ろ過し、濃縮し、常圧カラムにより分離する工程を含む方法が挙げられ、これらの工程を経て、生成物が得られる。

前記洗浄の回数は、1回でも複数回でもよく、洗浄用の炭酸水素ナトリウム水溶液の総容積と前記反応溶媒の容積との比としては1~20とすればよい。前記乾燥、ろ過、濃縮、常圧カラム分離の操作方法は、当業者間では知られており、詳細についてはここでは省略する。

【0035】

5'位のR₅保護基を脱離する方法としては、攪拌しながら縮合反応生成物とギ酸をクロロホルムの中、10~50で5~60分間反応させ、反応後有機層とギ酸層とを直接に分層し、ギ酸層はジクロロメタンを用いて抽出し、全ての有機層を乾燥して、ろ過し、濃縮し、常圧カラムにより分離する工程を含む方法が挙げられ、これらの工程を経て、生成物が得られる。

前記抽出の回数は、1回もしくは複数回でもよく、抽出用のジクロロメタンの総容積とギ酸の容積との比としては1~20とすればよい。前記乾燥、ろ過、濃縮、常圧カラム分離の操作方法は、当業者間ではよく知られており、詳細についてはここでは省略する。ギ酸の使用量としては、前記縮合反応生成物1モルに対して10~50リットル用いればよい。

【0036】

5'位のR₅保護基を脱離する方法としては、攪拌しながら縮合反応生成物とパラトルエンスルホン酸1%、トリクロロ酢酸3~5%、トリフルオロ酢酸3~5%のジクロロメタン溶液とを1~60分間反応させる方法が挙げられる。ここで、前記有機酸の当量数は反応計量数の5~20倍である。その後、反応後飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、有機層を分離し、有機層を乾燥して、ろ過し、濃縮し、常圧カラムにより分離する工程を含むことで、生成物が得られる。前記乾燥、ろ過、濃縮、常圧カラム分離の操作方法は、当業者間では知られており、詳細についてはここでは省略する。

【0037】

3'位にある保護基を脱離する方法としては、攪拌しながら縮合反応生成物とトリフェニルホスフィンまたはメチルジフェニルホスフィンとを水10%のジオキサシクロヘキサンの中、10~50で一夜反応させ、反応後溶媒を蒸留で除去して、常圧カラムにより分離する方法が挙げられ、これにより生成物が得られる。縮合反応生成物1モルに対してトリフェニルホスフィンまたはメチルジフェニルホスフィンの使用量としては3~5モルとすればよく、ジオキサシクロヘキサンの使用量は50~150リットルとすればよい。前記蒸留、常圧カラム分離の操作方法は、当業者間ではよく知られており、詳細についてはここでは省略する。

10

20

30

40

50

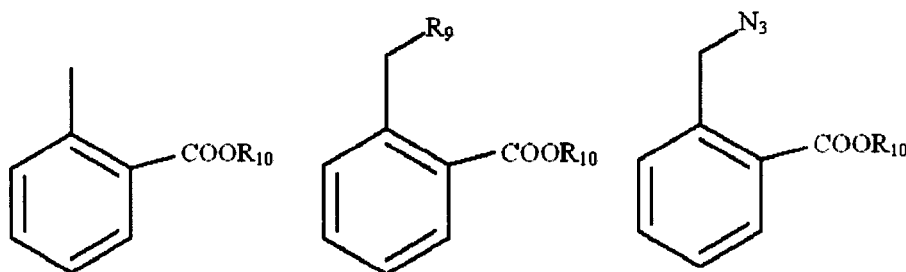
【0038】

式(5)の化合物の合成方法は、以下に示されているステップを含むことができる。
 ステップ(1)：過酸化ベンゾイルの存在下で、式(9)の化合物とN-ハロゲンコハク酸イミドとを反応させ、式(10)の化合物を得る；
 ステップ(2)：式(10)の化合物とアルカリ金属アジドとを反応させ、式(11)の化合物を得る；
 ステップ(3)：式(11)の化合物を加水分解して、アシル化して式(5)の化合物を得る。

【0039】

【化6】

10



式(9)

式(10)

式(11)

20

【0040】

式中、 R_9 はハロゲン元素であり、 R_{10} は炭素数が1~4のアルキル基である。

【0041】

上記ステップ(1)において、反応溶媒はテトラクロロメタン、トリクロロホルム、ベンゼン、トルエン、ヘプタンからなる群より選択される少なくとも1種とすることができる。式(9)の化合物1モルに対して、N-ハロゲンコハク酸イミドの使用量は通常1~3モル、好ましくは1~1.2モルであり、過酸化ベンゾイルの使用量は通常0.01~0.1モル、好ましくは0.1~0.2モルであり、反応溶媒の使用量は通常5~20リットル、好ましくは6~10リットルであり、反応温度は通常80~120、好ましくは90~110であり、反応時間は通常0.5~6時間、好ましくは1~3時間である。

30

【0042】

上記ステップ(2)において、反応溶媒はエタノール、アセトン、N,Nジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドからなる群より選択される少なくとも1種とすることができる。式(10)の化合物1モルに対して、アルカリ金属アジドの使用量は通常1~3モル、好ましくは1.5~2モルであり、反応溶媒の使用量は通常3~10リットル、好ましくは6~8リットルであり、反応温度は通常0~80、好ましくは25~35であり、反応時間は2~30時間である。

40

【0043】

上記ステップ(3)において、前記加水分解は式(11)の化合物と、アルカリ金属水酸化物のアルコール水溶液との混合溶液(容積比=1:1)との反応を含んでもよい。式(10)の化合物1モルに対して、アルカリ金属水酸化物の使用量は通常5~100モル、好ましくは10~20モルであり、反応温度は通常0~50、好ましくは25~35であり、反応時間は通常0.1~2時間、好ましくは0.25~1時間である。前記アルコール-水混合溶液におけるアルカリ金属水酸化物の濃度は5~10重量%としてもよい。

【0044】

50

。

【0048】

式(3)または式(7)において、 R_4 の位置は、オルト位、メタ位、パラ位からなる群より選択され、好ましくはオルト位である。

【0049】

反応式IIIに示されている反応の反応条件としては、反応温度は、通常 -10 ~ 10、好ましくは氷浴が用いられる。反応は2つステップに分けて行われ、第1ステップの反応時間は、通常0.5 ~ 10時間、好ましくは1 ~ 3時間である。

【0050】

式(6)の化合物1モルに対して、式(7)の化合物の使用量は通常1 ~ 5モル、好ましくは1.5 ~ 3モルであり、トリアルキルアミンの使用量は通常1 ~ 50モル、好ましくは3 ~ 20モルであり、触媒の使用量は通常2 ~ 10モル、好ましくは2 ~ 6モルであり、前記反応溶媒の使用量は通常5 ~ 200リットル、好ましくは10 ~ 100リットルである。

10

【0051】

第1ステップの反応が完了後、反応溶液とトリエチルアミン炭酸水素塩の水溶液とを混合し、攪拌しながら10 ~ 90分間保持してもよい。トリエチルアミン炭酸水素塩の水溶液の濃度は0.1 ~ 1モル/リットルであり、トリエチルアミン炭酸水素塩の水溶液と前記反応溶媒との容積比は0.2 ~ 2である。それから有機層と水層とを分けて、トリエチルアミン炭酸水素塩の水溶液を用いて有機層を洗浄し、全ての有機層を乾燥して、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して、生成物が得られる。洗浄用のトリエチルアミン炭酸水素塩水溶液の濃度は0.1 ~ 1モル/リットルであり、洗浄は1回または複数回であってもよい。洗浄用のトリエチルアミン炭酸水素塩水溶液と前記反応溶媒との容積比は0.5 ~ 5としてもよい。

20

【実施例】

【0052】

以下、実験例で本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

。

【0053】

実施例に用いる原材料およびその入手方法を以下に示す。

30

第1ヌクレオチド(A)：式(6)に示された化合物であり、保護されたアデニンオリゴヌクレオチド。式中、 B_2 はN-ベンゾイルアデニンであり、 R_1 はDMTrであり、 R_3 はtert-ブチルジメチルシリル基である。上海吉瑪製薬技術有限公司(Shanghai GenePharma Co., Ltd.)より購入する。

第2ヌクレオチド(A)：式(4)に示された化合物であり、保護されたアデニンオリゴヌクレオチド。式中、 B_1 はN-ベンゾイルアデニンであり、 R_5 はDMTrであり、 R_2 はtert-ブチルジメチルシリル基である。上海吉瑪製薬技術有限公司(Shanghai GenePharma Co., Ltd.)より購入する。

第3ヌクレオチド(C)：式(6)に示された化合物であり、保護されたシトシンオリゴヌクレオチド。式中、 B_2 はN-ベンゾイルアシトシンであり、 R_1 はDMTrであり、 R_3 はtert-ブチルジメチルシリル基である。上海吉瑪製薬技術有限公司(Shanghai GenePharma Co., Ltd.)より購入する。

40

第4ヌクレオチド(G)：式(4)に示された化合物であり、保護されたグアニンオリゴヌクレオチド。式中、 B_1 はN-ベンゾイルアグアニンであり、 R_5 はDMTrであり、 R_2 はtert-ブチルジメチルシリル基である。上海吉瑪製薬技術有限公司(Shanghai GenePharma Co., Ltd.)より購入する。

第5ヌクレオチド(G)：式(6)に示された化合物であり、保護されたグアニンオリゴヌクレオチド。式中、 B_2 はN-ベンゾイルアグアニンであり、 R_1 はDMTrであり、 R_3 はtert-ブチルジメチルシリル基である。上海吉瑪製薬技術有限公司(Shanghai GenePharma Co., Ltd.)より購入する。

50

第6ヌクレオチド(U)：式(4)に示された化合物であり、保護されたウラシルオリゴヌクレオチド。式中、 B_1 はウラシルであり、 R_5 はDMTrであり、 R_2 はtert-ブチルジメチルシリル基である。上海吉瑪製薬技術有限公司(Shanghai GenePharma Co., Ltd.)より購入する。

第7ヌクレオチド(U)：式(6)に示された化合物であり、保護されたウラシルオリゴヌクレオチド。式中、 B_2 はウラシルであり、 R_1 はDMTrであり、 R_3 はtert-ブチルジメチルシリル基である。上海吉瑪製薬技術有限公司(Shanghai GenePharma Co., Ltd.)より購入する。

トリエチルアミン：天津市北方天医試薬工場より購入する。

1, 2, 4-トリアゾール：アルファ・エイサー社(Alfa Aesar)より購入する。

10

2-クロロフェニルジクロロホスファイト：式(7)の化合物。式中、 R_4 、 R_7 と R_8 はいずれも塩素であり、 R_4 はメタ位である。アルファ・エイサー社(Alfa Aesar)より購入する。

2-アジドメチルベンゾイルクロライド：式(5)の化合物。式中、 R_6 は塩素であり、 R_4 はメタ位である。合成実施例6で合成する。

MSNT：式(8)の化合物。シグマアルドリッチ社(Sigma Aldrich)より購入する。

【0054】

合成実施例1

20

本合成実施例は、式(3)化合物の原料、即ち式(2)化合物(P-成分)を合成する。

250mlの丸底フラスコに、1, 2, 4-トリアゾール(2.76g、40mmol)とトリエチルアミン(10.1g、100mmol)を加えて、ジクロロメタン(15ml)で溶解させる。氷浴下で2-クロロフェニルジクロロホスファイト(4.91g、20mmol)のジクロロメタン溶液10mlを滴下して、それから第1ヌクレオチド(7.87g、10mmol)のジクロロメタン溶液35mlを滴下する。氷浴下で2.5時間攪拌後、1M濃度のTEAB(35ml)を加えて、さらに0.5時間攪拌する。1M濃度のTEAB(20ml×3)で3回抽出する。全ての有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、エバポレーターで溶媒を除去して生成物(10.78g、収率100%)を得る。 ^{31}P NMR(CDCl₃, 121M) -6.09. ESI-MS, M⁻976.2926。この収率は、第1ヌクレオチドより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

30

【0055】

合成実施例2

本合成実施例は、式(3)化合物の原料、即ち式(1)化合物(OH-成分)を合成する。

250mlの丸底フラスコに、N-イミダゾール(2.08g、25mmol)とジクロロメタン(15ml)を加える。氷浴下で2-アジドメチルベンゾイルクロライド(4.18g、20mmol)のジクロロメタン溶液15mlを滴下して、それから第2ヌクレオチド(7.87g、10mmol)のジクロロメタン溶液40mlを滴下して、氷浴下で反応を40時間保持する。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(100ml)を加えて反応を終止する。分液後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(100ml×2)で2回洗浄する。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(8.21g、収率86.8%)を得る。この収率は、第2ヌクレオチドより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

40

上で得た生成物(8.21g、8.67mmol)をクロロホルム(170ml)に溶解させ、高速攪拌下(攪拌速度：500~1000回転数/分)で、ギ酸(170ml)を加えて、室温で30分間反応する。直接分液し、ギ酸層をジクロロメタン(170ml×3)で3回抽出し、合併後、水(170ml×3)で3回、0.1M濃度のTEAB(

50

170 ml × 1) で1回洗浄する。全ての有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(4.78 g、収率85.5%)を得る。この収率は、第2ヌクレオチドより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。¹H NMR (CDCl₃, 300 M) (-0.32, 3H, 1CH₃), (-0.00, 3H, 1CH₃), (-0.77, 9H, 3CH₃), 1.89 (s, 1H), 4.01 - 4.28 (dd, 2H, CH₂), 4.99 (s, 2H, CH₂), 5.42 - 5.46 (t, 1H), 5.88, 5.90 (d, 1H), 6.09, 6.12 (d, 1H), 6.26 (d, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.58 - 7.79 (m, 5H), 8.16 - 8.31 (m, 4H), 8.98 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), ESI-MS: (M + Na)⁺ 667.2419。

10

【0056】

合成実施例3

第1ヌクレオチドの代わりに第3ヌクレオチドを用いて、合成実施例1と同様な方法で合成する。

【0057】

合成実施例4

第2ヌクレオチドの代わりに第4ヌクレオチドを用いて、合成実施例2と同様な方法で合成する。

【0058】

合成実施例5

第1ヌクレオチドの代わりに第5ヌクレオチドを用いて、合成実施例1と同様な方法で合成する。

20

【0059】

合成実施例6

第1ヌクレオチドの代わりに第7ヌクレオチドを用いて、合成実施例1と同様な方法で合成する。

【0060】

合成実施例7

第2ヌクレオチドの代わりに第6ヌクレオチドを用いて、合成実施例2と同様な方法で合成する。

30

【0061】

合成実施例8

第2ヌクレオチドの代わりに第3ヌクレオチドを用いて、合成実施例2と同様な方法で合成する。

【0062】

合成実施例9

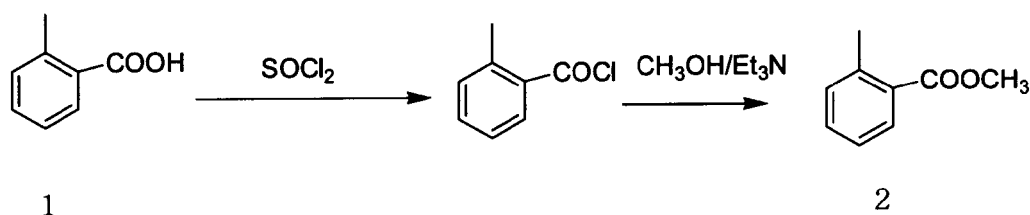
本合成実施例は式(5)の化合物を合成する。

(1) 還流冷却装置を装備した250 mlの丸底フラスコに、化合物1(10.0 g)を加えてから、塩化チオニル(80 ml)を加えて、加熱還流して、90 で攪拌しながら5時間反応する。還流冷却装置を蒸留装置に換えて、溶媒である塩化チオニルを蒸留で除去する。冷却後、メタノール(60 ml)を加えて、室温で攪拌しながらトリエチルアミン(15 ml)を滴下する。滴下後、室温でさらに30分間攪拌反応する。エバポレーターで過量のメタノールとトリエチルアミンを除去して、酢酸エチル(50 ml)を加え、水で2回、飽和食塩水で1回洗浄する。エステル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を除去した後、化合物2(9.7 g、収率88.2%)を得る。

40

【0063】

【化8】



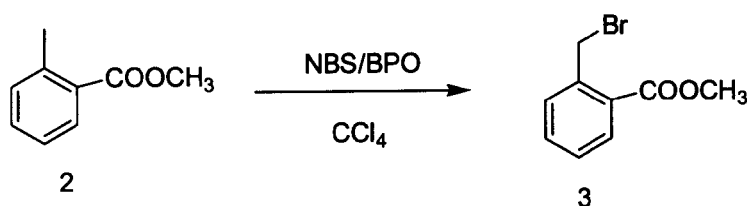
10

【0064】

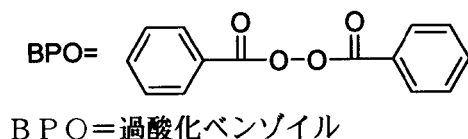
(2) 250 ml の丸底フラスコに、化合物 2 (1.50 g、10 mmol) を加え、テトラクロロメタン (80 ml) に溶解後、NBS (1.98 g、11 mmol) と BPO (0.48 g、0.2 mmol) とを加えて、1.5 時間加熱還流して反応する。ろ過して浮いた不溶物を除去してから、溶媒を蒸留で除去して、化合物 3 を得る。反応は定量的である。

【0065】

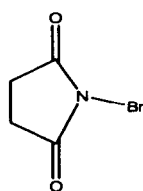
【化9】



20



30



NBS = N-ブロモスクシンイミド

【0066】

(3) 25 ml の丸底フラスコに、化合物 3 (916 mg、4 mmol) を加え、エタノール (20 ml) に溶解後、アジ化ナトリウム (520 mg、8 mmol) を加えて、室温で 2 時間攪拌して反応する。エバポレーターでエタノールを除去してから、酢酸エチルを加えて溶解させ、水、飽和食塩水で順次に洗浄する。有機層はエバポレーターで溶媒を除去した後、5% の水酸化ナトリウム溶液 (メタノール / 水 (容積比) = 1 / 1) (40 ml) を加え、室温で 30 分間攪拌し、エバポレーターでメタノールを除去する。2.5 M 濃度の塩酸を用いて pH 値を約 1 になるように調製し、ジクロロメタンで 4 回抽出する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を除去し、化合物 5 を得る。シクロヘキサンより化合物 5 を再結晶し、白色結晶を得る。

40

化合物 5 の核磁気共鳴分光法分析結果：

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 M) 4.89 (s, 2H, CH_2)、7.43 - 7.47

50

り計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0072】

(2) OH[CpG]AZMBの合成

25 mlの丸底フラスコに、ステップ(1)で得たDMTr[CpG]AZMB(800 mg、0.54 mmol)をトリクロホルム(7.5 ml)に溶解し、高速攪拌しながらギ酸(7.5 ml)を添加し、室温で30分間攪拌し反応する。直接分液し、ギ酸層をジクロロメタン(5 ml × 3)で3回抽出し、合併後、水(5 ml × 3)で3回、0.1 M濃度のTEAB(10 ml × 1)で1回洗浄する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(500 mg、収率79.1%)を得る。この収率は、DMTr[CpG]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【0073】

(3) DMTr[AA]AZMBの合成

100 mlの丸底フラスコに、合成実施例2の生成物(1.39 g、2.16 mmol)と合成実施例1の生成物(3.03 g、2.81 mmol)とを加え、無水ピリジン(22 ml)を加えて溶解し、MSNT(計1.80 g、6.05 mmol)を3回に分けて添加し、室温で2時間攪拌する。1 MのTEABを添加して0.5時間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(150 ml)に入れ、0.1 MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(3.08 g、収率87.9%)を得る。この収率は、合成実施例2より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

20

【0074】

(4) OH[AA]AZMBの合成

25 mlの丸底フラスコに、ステップ(3)で得たDMTr[AA]AZMB(3.08 g、1.92 mmol)を1%濃度の4-トルエンシルホニルクロリド溶液(100 ml)に溶解し、室温で30分間攪拌し反応する。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和して有機層を分液し、ジクロロメタンで水層を2回抽出し、有機層を合併する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(2.45 g、収率98.8%)を得る。この収率は、DMTr[AA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

30

【0075】

(5) DMTr[GAA]AZMB

100 mlの丸底フラスコに、ステップ(4)で得たOH[AA]AZMB(2.45 g、1.88 mmol)と合成実施例5の生成物(2.39 g、2.26 mmol)とを加え、無水ピリジン(19 ml)を加えて溶解し、MSNT(計1.56 g、5.26 mmol)を3回に分けて添加し、室温で2時間攪拌する。1 MのTEAB(2 ml)を添加して0.5時間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(200 ml)に入れ、0.1 MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(4.068 g、収率96.0%)を得る。この収率は、OH[AA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

40

【0076】

(6) OH[GAA]AZMBの合成

250 mlの丸底フラスコに、ステップ(5)で得たDMTr[GAA]AZMB(4.068 g、1.81 mmol)をトリクロホルム(50 ml)に溶解し、高速攪拌しながらギ酸(50 ml)を添加し、室温で30分間攪拌し反応する。直接分液し、ギ酸層をジクロロメタンで3回抽出し、合併後、水で3回、0.1 M濃度のTEABで1回洗浄する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(2.66 g、収率75.6%)を得る。この収率は、DMTr[GAA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0077】

(7) DMTr[AGAA]AZMBの合成

50

100 ml の丸底フラスコに、ステップ(6)で得た生成物OH[GAA]AZMB(1.48 g、0.76 mmol)と合成実施例1の生成物(1.08 g、1.00 mmol)とを加え、無水ピリジン(8 ml)を加えて溶解し、MSNT(計632 mg、2.13 mmol)を3回に分けて添加し、室温で4時間攪拌する。1MのTEAB(1.5 ml)を添加して0.5時間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(500 ml)に入れ、0.1MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して粗生成物(2.21 g)を得る。

【0078】

(8) DMTr[AGAA]OHの合成

100 ml の丸底フラスコに、ステップ(7)で得たDMTr[AGAA]AZMB(2.21 g、0.76 mmol)をジオキサシクロヘキサンと水の混合溶媒(比率:9/1)(2.6 g)を加えて溶解し、トリフェニルホスフィン(796 mg、3.04 mmol)を添加し、室温で24時間攪拌する。エバポレーターで溶媒を除去した後、常圧カラム分離して粗生成物(2.1 g)を得る。

10

【0079】(9) DMTr[AGAA]PO⁻の合成

100 ml の丸底フラスコに、1,2,4-トリアゾール(420 mg、6.08 mmol)とトリエチルアミン(768 mg、7.60 mmol)を加え、ジクロロメタン(7 ml)で溶解し、氷浴下で2-クロロフェニルジクロロホスファイト(560 mg、2.28 mmol)のジクロロメタン溶液(3 ml)を滴下し、さらにステップ(8)で得たDMTr[AGAA]OH(2.1 g、0.76 mmol)のジクロロメタン溶液(2.5 ml)を滴下し、氷塩浴で2.5時間攪拌する。TEAB(3 ml)を添加して反応を終止する。0.1MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(1.31 g)を得る。ステップ(7)~(9)の総収率は56.7%である。

20

【0080】

(10) DMTr[CGAA]AZMBの合成

100 ml の丸底フラスコに、ステップ(6)で得た生成物OH[GAA]AZMB(1.12 g、0.58 mmol)と合成実施例3の生成物(746 mg、0.75 mmol)とを加え、無水ピリジン(6 ml)を加えて溶解し、MSNT(計482 mg、1.62 mmol)を3回に分けて添加し、室温で4時間攪拌する。1MのTEAB(1.5 ml)を添加して0.5時間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(60 ml)に入れ、0.1MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して粗生成物(1.63 g)を得る。

30

【0081】

(11) DMTr[CGAA]OHの合成

100 ml の丸底フラスコに、ステップ(10)で得たDMTr[CGAA]AZMB(1.60 g、0.57 mmol)をジオキサシクロヘキサンと水の混合溶媒(比率:9/1)(1.6 g)を加えて溶解し、トリフェニルホスフィン(595 mg、2.27 mmol)を添加し、室温で24時間攪拌する。エバポレーターで溶媒を除去した後、常圧カラム分離して粗生成物(1.5 g)を得る。

40

【0082】(12) DMTr[CGAA]PO⁻の合成

25 ml の丸底フラスコに、1,2,4-トリアゾール(315 mg、4.56 mmol)とトリエチルアミン(576 mg、5.70 mmol)を加え、ジクロロメタン(5 ml)で溶解し、氷浴下で2-クロロフェニルジクロロホスファイト(420 mg、1.71 mmol)のジクロロメタン溶液(2 ml)を滴下し、さらにステップ(11)で得たDMTr[CGAA]OH(1.5 g、0.57 mmol)のジクロロメタン溶液(2 ml)を滴下し、氷塩浴で2.5時間攪拌する。TEAB(1.5 ml)を添加して反応を終止する。0.1MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃

50

縮し、常圧カラム分離して生成物 (1 . 1 2 g) を得る。ステップ (1 0) ~ (1 2) の総収率は 6 1 . 9 % である。

【 0 0 8 3 】

(1 3) DMT_r[AGAACG]AZMBの合成

2 5 m l の丸底フラスコに、ステップ (2) で得た生成物OH[GCG]AZMB (4 8 0 m g 、 0 . 4 1 m m o l) と合成実施例 9 で得た生成物DMT_r[AGAA]PO⁻ (1 . 2 0 m g 、 0 . 4 0 m m o l) とを加え、無水ピリジン (8 m l) を加えて溶解し、MSNT (3 3 3 m g 、 1 . 1 2 m m o l) を 3 回に分けて添加し、室温で 2 . 5 時間攪拌する。1 M の T E A B (1 m l) を添加して 0 . 5 時間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン (6 0 m l) に入れ、0 . 1 M の T E A B で 3 回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (1 . 2 1 g 、 収率 7 3 . 4 %) を得る。

10

【 0 0 8 4 】

(1 4) DMT_r[AGAACG]OHの合成

1 0 0 m l の丸底フラスコに、ステップ (1 3) で得たDMT_r[AGAACG]AZMB (1 . 2 1 g 、 0 . 2 9 m m o l) をトリクロホルム (1 0 m l) に溶解し、高速攪拌しながらギ酸 (1 0 m l) を添加し、室温で 3 0 分間攪拌し反応する。直接分液し、ギ酸層をジクロロメタンで 3 回抽出し、合併後、水で 3 回、0 . 1 M 濃度の T E A B で 1 回洗浄する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (8 6 3 m g 、 収率 7 8 . 6 %) を得る。

20

【 0 0 8 5 】

(1 5) DMT_r[CGAAAGAACG]AZMBの合成

2 5 m l の丸底フラスコに、ステップ (1 4) で得たOH[AGAACG]AZMB (8 4 0 m g 、 0 . 2 2 m m o l) とステップ (1 2) で得た生成物DMT_r[CGAA]PO⁻ (7 8 6 m g 、 0 . 2 6 m m o l) とを加え、無水ピリジン (5 m l) を加えて溶解し、MSNT (計 1 8 4 m g 、 0 . 6 2 m m o l) を 3 回に分けて添加し、室温で 4 時間攪拌する。1 M の T E A B (1 m l) を添加して 0 . 5 時間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン (6 0 m l) に入れ、0 . 1 M の T E A B で 3 回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (1 . 2 0 g 、 収率 8 2 . 4 %) を得る。M A I D I (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法) - T O F M S (飛行時間型質量分析法) : 6 5 6 0 . 7 8 7 。

30

【 0 0 8 6 】

実施例 2

本実施例はオリゴヌクレオチドを合成する。

合成ターゲット : 5' -CGAAAGAACG-3'

【 0 0 8 7 】

(1) 4 - ニトロベンズアルデヒドオキシム (4 6 m g 、 0 . 2 8 m m o l) とテトラメチルグアニジン (3 2 m g 、 0 . 2 8 m m o l) とをジオキサシクロヘキサンと水との混合溶液 (0 . 6 m l) に溶解し、均一に混合後、実施例 1 で得たDMT_r[CGAAAGAACG]AZMB (1 3 m g 、 2 μ m o l) を添加し、室温で 3 0 時間反応する。このステップはホスフィンにある保護基を脱離する工程である。

40

【 0 0 8 8 】

(2) 上記ステップ (1) で得た反応液は、4 0 °C で真空遠心乾燥を行った後、2 5 ~ 2 8 % 濃度の濃アンモニア水 (5 m l) を加え、5 0 °C で 1 2 時間反応する。このステップは塩基と 3 ' 末端の保護基を脱離する工程である。

【 0 0 8 9 】

(3) 上記ステップ (2) で得た反応液は、4 0 °C で真空遠心乾燥を行った後、8 0 % 濃度の酢酸 (1 m l) を加え、室温で 3 0 分間反応して、再度遠心乾燥を行い、残留物を水 (2 m l) に溶解し、酢酸エチル (2 m l) で洗浄して、- 8 0 °C での真空冷凍乾燥により粉末を得る。このステップは 5 ' 末端の保護基を脱離する工程である。

50

【0090】

(4) 上記ステップ(3)で得た冷凍乾燥粉末を1 M濃度のフッ化テトラブチルアンモニウム(TBAF)のテトラヒドロフラン溶液(1 ml)に溶解し、37 °Cで一晩反応させる。このステップは2'末端の保護基を脱離する工程である。反応完了した反応液に同容積の水でクエンチングし、40 °Cで真空遠心乾燥を行いテトラヒドロフランを除去し、残留物はsephadexG25カラムにより脱塩し、波長260 nmの紫外光を吸収する生成物を収集し、保護基を脱離したオリゴヌクレオチド5'-CGAAAGAACG-3'の水溶液を得る。-80 °Cでの真空冷凍乾燥により白色粉末を得る。MAIDI-TOF MS: 3233.67。

【0091】

実施例3

本実施例はオリゴヌクレオチドを合成する。

合成ターゲット: 保護されたRNA

DMTr[UGCGGUUGAUGUGAGGUCCUU]AZMB、およびDMTr[GGAACCUCACAUCAACGCGCAUU]AZMB

【0092】

(1) OH[CG]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、合成実施例3の生成物(4.433 g、4.2 mmol)と合成実施例4の生成物(2.194 g、3.5 mmol)とを加え、無水ピリジン(30 ml)を加えて溶解し、MSNT(2.911 g、9.8 mmol)を添加し、室温で2時間攪拌する。0.1 MのTEAB(4 ml)を添加して10分間攪拌して反応を終止する。エバポレーターで溶媒を除去した後、得たものをジクロロメタン(50 ml)に入れ、0.1 MのTEAB(20 ml × 3)で3回洗浄し、5%濃度のHYPERLINK "<http://jp.exportpages.com/product/1025501275/1.htm>" シュウ酸でpH3に調整し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、ろ過液50 mlを得る。そのろ過液を250 mlの丸底フラスコに移し、6%濃度のトリフルオロ酢酸(50 ml)をゆっくり添加し、室温で5分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加え、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(20 ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率78%)を得る。この収率は、合成実施例4より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0093】

(2) OH[GG]AZMBの合成

合成実施例5の生成物(4.471 g、4.2 mmol)、合成実施例4の生成物(2.194 g、3.5 mmol)、無水ピリジン(20 ml)と0.1 MのTEAB(3 ml)を使用する以外は、上記ステップ(1)と同様な方法でOH[GG]AZMBを合成する。生成物の収率が67.1%である。この収率は、合成実施例4より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0094】

(3) OH[AU]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、合成実施例1の生成物(4.534 g、4.2 mmol)と合成実施例7の生成物(1.811 g、3.5 mmol)とを加え、無水ピリジン(20 ml)を加えて溶解し、MSNT(計2.911 g、9.8 mmol)を数回に分けて添加し、室温で2時間攪拌する。1 MのTEAB(10 ml)を添加して10分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン(100 ml)に溶解し、1 MのTEAB(20 ml × 3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(45 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(45 ml)をゆっくり添加し、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で5分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加え、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(20 ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率81.1%)を得る。この収率は、合成実施例7よ

10

20

30

40

50

り計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0095】

(4) OH[UU]AZMBの合成

250 mlの丸底フラスコに、合成実施例6の生成物(10.0 g、10.5 mmol)と合成実施例7の生成物(4.53 g、8.75 mmol)とを加え、無水ピリジン(45 ml)を加えて溶解し、MSNT(計7.28 g、24.5 mmol)を数回に分けて添加し、室温で2時間攪拌する。1 MのTEAB(50 ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン(300 ml)に溶解し、1 MのTEAB(20 ml × 3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(100 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(100 ml)をゆっくり加える。室温で5分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(50 ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率73%)を得る。この収率は、合成実施例7より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【0096】

(5) OH[CA]AZMBの合成

500 mlの丸底フラスコに、合成実施例3の生成物(31.66 g、30 mmol)と合成実施例2の生成物(16.12 g、25 mmol)とを加え、無水ピリジン(150 ml)を加えて溶解し、MSNT(計20.79 g、70 mmol)を数回に分けて添加し、室温で2時間攪拌する。1 MのTEAB(100 ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン(600 ml)に溶解し、1 MのTEAB(20 ml × 3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(370 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(370 ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で5分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率72%)を得る。この収率は、合成実施例2より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

20

30

【0097】

(6) OH[CC]AZMBの合成

合成実施例3の生成物(12.25 g、11.6 mmol)、合成実施例8の生成物(6.0 g、9.67 mmol)、無水ピリジン(50 ml)とMSNT(8.01 g、27.1 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(4)と同様な方法でOH[CC]AZMBを合成する。生成物の収率は83%である。この収率は、合成実施例8より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0098】

(7) OH[GC]AZMBの合成

250 mlの丸底フラスコに、合成実施例5の生成物(18.47 g、17.4 mmol)と合成実施例8の生成物(9.0 g、14.5 mmol)とを加え、無水ピリジン(72 ml)を加えて溶解し、MSNT(計12.0 g、40.6 mmol)を数回に分けて添加し、室温で2時間攪拌する。1 MのTEAB(80 ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン(300 ml)に溶解し、1 MのTEAB(20 ml × 3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(150 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(150 ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で10分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽

40

50

和炭酸水素ナトリウムの水溶液 (120 ml) で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率63.8%) を得る。この収率は、合成実施例8より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0099】

(8) OH[UG]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、合成実施例6の生成物 (5.14 g、5.4 mmol) と合成実施例4の生成物 (2.82 g、4.5 mmol) とを加え、無水ピリジン (30 ml) を加えて溶解し、MSNT (計3.74 g、12.6 mmol) を数回に分けて添加し、室温で2時間攪拌する。1MのTEAB (10 ml) を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (150 ml) に溶解し、1MのTEAB (20 ml × 3) で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン (45 ml) に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸 (450 ml) をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で5分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液 (300 ml) で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率78%) を得る。この収率は、合成実施例4より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【0100】

(9) DMTr[GG]AZMBの合成

100 mlの丸底フラスコに、合成実施例5の生成物 (7.64 g、7.2 mmol) と合成実施例4の生成物 (3.76 g、6 mmol) とを加え、無水ピリジン (35 ml) を加えて溶解し、MSNT (計5.0 g、16.8 mmol) を3回に分けて添加し、室温で2.5時間攪拌する。1MのTEAB (10 ml) を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (200 ml) に入れ、1MのTEAB (20 ml × 3) で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率81%) を得る。この収率は、合成実施例4より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

20

【0101】

(10) DMTr[UGC]AZMBの合成

250 mlの丸底フラスコに、合成実施例6の生成物 (7.67 g、9.10 mmol) と上記ステップ(7)で得たOH[GC]AZMB (7.77 g、6.17 mmol) とを加え、無水ピリジン (40 ml) を加えて溶解し、MSNT (計5.13 g、17.3 mmol) を3回に分けて添加し、室温で3.5時間攪拌する。1MのTEAB (10 ml) を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (150 ml) に入れ、1MのTEAB (20 ml × 3) で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率73%) を得る。この収率は、OH[GC]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

30

【0102】

(11) DMTr[UCA]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、合成実施例6の生成物 (8.67 g、9.10 mmol) と上記ステップ(5)で得たOH[CA]AZMB (8.95 g、7.0 mmol) とを加え、無水ピリジン (50 ml) を加えて溶解し、MSNT (計5.82 g、19.6 mmol) を3回に分けて添加し、室温で4時間攪拌する。1MのTEAB (10 ml) を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (100 ml) に入れ、1MのTEAB (20 ml × 3) で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率77%) を得る。この収率は、OH[CA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

40

【0103】

(12) DMTr[ACG]AZMBの合成

50

合成実施例 1 の生成物 (2 . 6 7 g 、 2 . 4 7 m m o l) 、 上記ステップ (1) で得た OH[CG]AZMB (2 . 4 0 g 、 1 . 9 0 m m o l) 、 無水ピリジン (1 5 m l) と M S N T (1 . 5 8 g 、 5 . 3 2 m m o l) を使用する以外は、上記ステップ (1 1) と同様な方法で DMTr[ACG]AZMB を合成する。生成物の収率が 7 8 % である。この収率は、OH[CG]AZMB より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【 0 1 0 4 】

(1 3) DMTr[GUU]AZMB の合成

1 0 0 m l の丸底フラスコに、合成実施例 5 の生成物 (4 . 3 0 g 、 4 . 0 5 m m o l) と上記ステップ (4) で得た OH[UU]AZMB (3 . 1 5 、 3 . 0 m m o l) とを加え、無水ピリジン (2 0 m l) を加えて溶解し、M S N T (計 2 . 5 0 g 、 8 . 4 0 m m o l) を 3 回に分けて添加し、室温で 2 . 5 時間攪拌する。1 M の T E A B (1 0 m l) を添加して 2 0 分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (1 0 0 m l) に入れ、1 M の T E A B (3 0 m l × 3) で 3 回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率 7 9 %) を得る。この収率は、OH[UU]AZMB より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【 0 1 0 5 】

(1 4) DMTr[GUG]AZMB の合成

1 0 0 m l の丸底フラスコに、合成実施例 5 の生成物 (4 . 2 9 g 、 4 . 0 4 m m o l) と上記ステップ (8) で得た OH[UG]AZMB (3 . 6 0 、 3 . 1 1 m m o l) とを加え、無水ピリジン (2 0 m l) を加えて溶解し、M S N T (計 2 . 5 9 g 、 8 . 7 1 m m o l) を 3 回に分けて添加し、室温で 3 . 5 時間攪拌する。1 M の T E A B (1 0 m l) を添加して 2 0 分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (1 0 0 m l) に入れ、1 M の T E A B (2 0 m l × 3) で 3 回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率 6 7 %) を得る。この収率は、OH[U G]AZMB より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

20

【 0 1 0 6 】

(1 5) OH[ACC]AZMB の合成

1 0 0 m l の丸底フラスコに、合成実施例 1 の生成物 (5 . 6 2 g 、 5 . 2 0 m m o l) と上記ステップ (6) で得た OH[CC]AZMB (5 . 4 g 、 4 . 3 3 m m o l) とを加え、無水ピリジン (2 2 m l) を加えて溶解し、M S N T (計 3 . 5 9 g 、 1 2 . 1 m m o l) を数回に分けて添加し、室温で 3 時間攪拌する。1 M の T E A B (1 0 m l) を添加して 2 0 分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (1 5 0 m l) に溶解し、1 M の T E A B (2 0 m l × 3) で 3 回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン (1 0 0 m l) に溶解し、攪拌しながら 6 % 濃度のトリフルオロ酢酸 (1 0 0 m l) をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を 3 % にする。室温で 3 0 分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液 (8 0 m l) で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率 5 2 %) を得る。この収率は、OH[CC]AZMB より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

30

40

【 0 1 0 7 】

(1 6) OH[GCA]AZMB の合成

1 0 0 m l の丸底フラスコに、合成実施例 5 の生成物 (4 . 0 0 g 、 3 . 7 7 m m o l) と上記ステップ (5) で得た OH[CA]AZMB (4 . 2 g 、 3 . 2 8 m m o l) とを加え、無水ピリジン (2 0 m l) を加えて溶解し、M S N T (計 2 . 7 3 g 、 9 . 1 8 m m o l) を数回に分けて添加し、室温で 3 時間攪拌する。1 M の T E A B (1 0 m l) を添加して 2 0 分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン (1 5 0 m l) に溶解し、1 M の T E A B (2 0 m l × 3) で 3 回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタ

50

ン(35 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(35 ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で30分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(25 ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率68%)を得る。この収率は、OH[CA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0108】

(17) OH[UCC]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、合成実施例6の生成物(3.59 g、3.77 mmol)と上記ステップ(6)で得たOH[CC]AZMB(2.42 g、2.90 mmol)とを加え、無水ピリジン(20 ml)を加えて溶解し、MSNT(計2.41 g、8.12 mmol)を数回に分けて添加し、室温で5時間攪拌する。1MのTEAB(10 ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン(100 ml)に溶解し、1MのTEAB(20 ml × 3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(40 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(40 ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で30分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(30 ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率64.1%)を得る。この収率は、OH[CC]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

20

【0109】

(18) OH[ACG]AZMBの合成

上記ステップ(12)で得たDMTr[ACG]AZMBをジクロロメタン(20 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(20 ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で10分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(15 ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(2.0 g、収率55%)を得る。この収率は、OH[CG]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

30

【0110】

(19) OH[GAU]AZMBの合成

100 mlの丸底フラスコに、合成実施例5の生成物(3.82 g、3.69 mmol)と上記ステップ(3)で得たOH[AU]AZMB(3.30 g、2.80 mmol)とを加え、無水ピリジン(20 ml)を加えて溶解し、MSNT(計2.33 g、7.84 mmol)を3回に分けて添加し、室温で4時間攪拌する。1MのTEAB(5 ml)を添加して30分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(100 ml)に入れ、1MのTEAB(20 ml × 3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(40 ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(40 ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で30分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(30 ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率63%)を得る。この収率は、OH[AU]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

40

【0111】

(20) OH[AGG]AZMBの合成

100 mlの丸底フラスコに、合成実施例1の生成物(3.30 g、3.10 mmol)

50

)と上記ステップ(2)で得たOH[GG]AZMB(2.98g、2.35mmol)とを加え、無水ピリジン(15ml)を加えて溶解し、MSNT(計1.96g、6.6mmol)を数回に分けて添加し、室温で2.5時間攪拌する。1MのTEAB(10ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(150ml)に入れ、1MのTEAB(20ml×3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(25ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(25ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で30分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(20ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率69%)を得る。この収率は、OH[GG]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【0112】**(21) OH[AACC]AZMBの合成**

100mlの丸底フラスコに、合成実施例1の生成物(3.24g、3.00mmol)と上記ステップ(15)で得たOH[ACC]AZMB(4.31g、2.25mmol)とを加え、無水ピリジン(15ml)を加えて溶解し、MSNT(計1.87g、6.30mmol)を数回に分けて添加し、室温で3時間攪拌する。1MのTEAB(10ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(100ml)に入れ、1MのTEAB(20ml×3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して反応生成物を得る。その反応生成物をジクロロメタン(50ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸(50ml)をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を3%にする。室温で30分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液(40ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率50%)を得る。この収率は、OH[ACC]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

20

【0113】**(22) DMTr[CGCA]AZMBの合成**

100mlの丸底フラスコに、合成実施例3の生成物(3.04g、2.88mmol)と上記ステップ(16)で得たOH[GCA]AZMB(4.25g、2.21mmol)とを加え、無水ピリジン(15ml)を加えて溶解し、MSNT(計1.84g、6.19mmol)を3回に分けて添加し、室温で3.5時間攪拌する。1MのTEAB(10ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(100ml)に入れ、1MのTEAB(50ml×3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率76%)を得る。この収率は、OH[GCA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

30

40

【0114】**(23) DMTr[UCC]AZMBの合成**

50mlの丸底フラスコに、合成実施例6の生成物(2.43g、2.55mmol)と上記ステップ(17)で得たOH[UCC]AZMB(3.50g、1.96mmol)とを加え、無水ピリジン(15ml)を加えて溶解し、MSNT(計1.63g、5.49mmol)を3回に分けて添加し、室温で4時間攪拌する。1MのTEAB(10ml)を添加して20分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(100ml)に入れ、1MのTEAB(20ml×3)で3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率78%)を得る。この収率は、OH[UCC]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

50

【0115】

(24) DMTr[GG]OHの合成

500 mlの丸底フラスコに、上記ステップ(9)で得たDMTr[GG]AZMB(7.55 g、4.81 mmol)とトリフェニルホスフィン(5.04 g、19.2 mmol)を加え、ジオキサシクロヘキサン/水(容積比=9/1)(240 ml)を加えて溶解し、室温で8時間攪拌反応する。溶媒除去後、分取精製装置のフラッシュクロマトグラフィー(テレダイン・イスコ社(Teledyne Isco, Inc.)のCombiFlash Companion/TS)を用いて分離し、トリフェニルホスフィンオキシドを含有した3'保護基脱離の粗生成物を得て、乾燥しておく。

【0116】

(25) DMTr[GG]PO⁻の合成

100 mlの丸底フラスコに、1,2,4-トリアゾール(1.50 g、22.1 mmol)と再蒸留のトリエチルアミン(3.58 g、35.4 mmol)を加え、無水ジクロロメタン(16.6 ml)で溶解し、氷浴下で2-クロロフェニルジクロロホスファイト(2.17 g、8.8 mmol)の無水ジクロロメタン(8.8 ml)溶液を滴下し、1時間攪拌してから、氷浴を氷塩浴に切り替え、温度を-10~-5に制御し、さらに前記ステップ(24)で得たDMTr[GG]OHの無水ジクロロメタン(13.3 ml)溶液を滴下し、氷塩浴で4時間攪拌する。1MのTEAB(20 ml)を添加し、0.5時間攪拌して反応を終止する。分液で有機層を得て、1MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率:60%)を得る。この収率は、DMTr[GG]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0117】

(26) DMTr[UCA]OHの合成

前記ステップ(11)で得たDMTr[UCA]AZMB(11.3 g、4.69 mmol)、トリフェニルホスフィン(4.96 g、18.7 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(24)と同様な方法でDMTr[UCA]OHを合成する。

【0118】

(27) DMTr[UCA]PO⁻の合成

無水ジクロロメタン(19.5 ml)に溶解した1,2,4-トリアゾール(1.77 g、26.0 mmol)と再蒸留のトリエチルアミン(4.21 g、41.7 mmol)、2-クロロフェニルジクロロホスファイト(2.56 g、10.4 mmol)の無水ジクロロメタン(10.5 ml)溶液、および前記ステップ(26)で得たDMTr[UCA]OHの無水ジクロロメタン(15.6 ml)溶液を使用する以外は、上記ステップ(25)と同様な方法でDMTr[UCA]PO⁻を合成する(収率:79%)。この収率は、DMTr[UCA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0119】

(28) DMTr[UGC]OHの合成

前記ステップ(10)で得たDMTr[UGC]AZMB(10.6 g、4.42 mmol)、トリフェニルホスフィン(4.63 g、17.7 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(24)と同様な方法でDMTr[UGC]OHを合成する。

【0120】

(29) DMTr[UGC]PO⁻の合成

無水ジクロロメタン(19.4 ml)に溶解した1,2,4-トリアゾール(1.76 g、25.9 mmol)と再蒸留のトリエチルアミン(4.18 g、41.4 mmol)、2-クロロフェニルジクロロホスファイト(2.54 g、10.3 mmol)の無水ジクロロメタン(10.4 ml)溶液、および前記ステップ(28)で得たDMTr[UGC]OHの無水ジクロロメタン(15.5 ml)溶液を使用する以外は、上記ステップ(25)と同様な方法でDMTr[UGC]PO⁻を合成する(収率:71%)。この収率は、DMTr[UGC]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

(3 0) DMTr[GUU]OHの合成

前記ステップ(1 3)で得たDMTr[GUU]AZMB(5 . 4 1 g、2 . 3 6 m m o l)、トリフェニルホスフィン(2 . 4 7 g、9 . 4 3 m m o l)とジオキサシクロヘキサン/水(容積比 = 9 / 1)(1 2 0 m l)を使用する以外は、上記ステップ(2 4)と同様な方法でDMTr[GUU]OHを合成する。

【 0 1 2 2 】

(3 1) DMTr[GUU]PO⁻の合成

無水ジクロロメタン(9 . 8 m l)に溶解した1, 2, 4-トリアゾール(8 9 1 m g、1 3 . 1 m m o l)と再蒸留のトリエチルアミン(2 . 1 2 g、2 1 . 0 m m o l)、2-クロロフェニルジクロロホスファイト(2 . 5 4 g、1 0 . 3 m m o l)の無水ジクロロメタン(5 . 2 m l)溶液、および前記ステップ(3 0)で得たDMTr[GUU]OHの無水ジクロロメタン(7 . 9 m l)溶液を使用する以外は、上記ステップ(2 5)と同様な方法でDMTr[UGC]PO⁻を合成する(収率: 6 4%)。この収率は、DMTr[GUU]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【 0 1 2 3 】

(3 2) DMTr[GUG]OHの合成

前記ステップ(1 4)で得たDMTr[GUG]AZMB(4 . 4 0 g、1 . 8 3 m m o l)、トリフェニルホスフィン(1 . 9 2 g、7 . 3 3 m m o l)とジオキサシクロヘキサン/水(容積比 = 9 / 1)(9 0 0 m l)を使用する以外は、上記ステップ(2 4)と同様な方法でDMTr[GUG]OHを合成する。

20

【 0 1 2 4 】

(3 3) DMTr[GUG]PO⁻の合成

無水ジクロロメタン(6 . 8 m l)に溶解した1, 2, 4-トリアゾール(6 2 2 m g、9 . 1 5 m m o l)と再蒸留のトリエチルアミン(1 . 4 8 g、1 4 . 7 m m o l)、2-クロロフェニルジクロロホスファイト(8 9 8 m g、3 . 6 6 m m o l)の無水ジクロロメタン(3 . 6 m l)溶液、および前記ステップ(3 2)で得たDMTr[GUG]OHの無水ジクロロメタン(5 . 5 m l)溶液を使用する以外は、上記ステップ(2 5)と同様な方法でDMTr[UGC]PO⁻を合成する(収率: 6 4%)。この収率は、DMTr[GUG]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

30

【 0 1 2 5 】

(3 4) DMTr[CGCA]OHの合成

前記ステップ(2 2)で得たDMTr[CGCA]AZMB(4 . 7 7 g、1 . 6 7 m m o l)とトリフェニルホスフィン(1 . 7 4 g、6 . 6 6 m m o l)を使用する以外は、上記ステップ(2 4)と同様な方法でDMTr[CGCA]OHを合成する。

【 0 1 2 6 】

(3 5) DMTr[CGCA]PO⁻の合成

無水ジクロロメタン(1 0 . 0 m l)に溶解した1, 2, 4-トリアゾール(6 0 4 m g、8 . 8 8 m m o l)と再蒸留のトリエチルアミン(1 . 6 2 g、1 6 . 0 m m o l)、2-クロロフェニルジクロロホスファイト(8 7 3 m g、3 . 5 5 m m o l)の無水ジクロロメタン(3 . 5 m l)溶液、および前記ステップ(3 4)で得たDMTr[CGCA]OHの無水ジクロロメタン(5 . 4 m l)溶液を使用する以外は、上記ステップ(2 5)と同様な方法でDMTr[CGCA]PO⁻を合成する(収率: 6 4%)。この収率は、DMTr[CGCA]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

40

【 0 1 2 7 】

(3 6) DMTr[UUCC]OHの合成

前記ステップ(2 3)で得たDMTr[UUCC]AZMB(3 . 8 5 g、1 . 1 9 m m o l)、トリフェニルホスフィン(1 . 2 5 g、4 . 7 7 m m o l)とジオキサシクロヘキサン/水(容積比 = 9 / 1)(6 0 m l)を使用する以外は、上記ステップ(2 4)と同様な方法でDMTr[UUCC]OHを合成する。

50

【0128】

(37) DMTr[UUCC]PO⁻の合成

無水ジクロロメタン(9.8 ml)に溶解した1,2,4-トリアゾール(891 mg、13.1 mmol)と再蒸留のトリエチルアミン(2.12 g、21.0 mmol)、2-クロロフェニルジクロロホスファイト(1.29 g、5.25 mmol)の無水ジクロロメタン(5.2 ml)溶液、および前記ステップ(36)で得たDMTr[UUCC]OHの無水ジクロロメタン(5.5 ml)溶液を使用する以外は、上記ステップ(25)と同様な方法でDMTr[UUCC]PO⁻を合成する(収率:86%)。この収率は、DMTr[UUCC]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

【0129】

(38) DMTr[GGAACC]AZMBの合成

100 mlの丸底フラスコに、上記ステップ(25)で得たDMTr[GG]PO⁻(2.74 g、2.15 mmol)と上記ステップ(21)で得たHO[AACC]AZMB(2.70 g、1.05 mmol)とを加え、無水ピリジン(10 ml)を加えて溶解し、MSNT(計0.873 g、2.94 mmol)を数回に分けて添加し、室温で3時間攪拌する。1MのTEAB(1 ml)を添加して25分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン(100 ml)に入れ、1MのTEABで3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率48%)を得る。

【0130】

(39) DMTr[UCACA]AZMBの合成

上記ステップ(27)で得たDMTr[UCA]PO⁻(4.84 g、2.16 mmol)、上記ステップ(5)で得たHO[CA]AZMB(2.01 g、1.57 mmol)、無水ピリジン(15 ml)およびMSNT(計1.31 g、4.40 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(38)と同様な方法でDMTr[UCACA]PO⁻を合成する(収率:66%)。

【0131】

(40) DMTr[UCAACG]AZMBの合成

上記ステップ(27)で得たDMTr[UCA]PO⁻(4.56 g、2.03 mmol)、上記ステップ(20)で得たHO[ACG]AZMB(2.70 g、1.41 mmol)、無水ピリジン(15 ml)およびMSNT(計1.17 g、3.95 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(38)と同様な方法でDMTr[UCAACG]AZMBを合成する(収率:60%)。

【0132】

(41) DMTr[CGCAUU]AZMBの合成

上記ステップ(35)で得たDMTr[CGCA]PO⁻(3.20 g、1.07 mmol)、上記ステップ(4)で得たHO[UU]AZMB(1.05 g、1.00 mmol)、無水ピリジン(10 ml)およびMSNT(計832 mg、2.80 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(38)と同様な方法でDMTr[CGCAUU]AZMBを合成する(収率:87%)。

【0133】

(42) DMTr[UGCGC]AZMBの合成

上記ステップ(29)で得たDMTr[UGC]PO⁻(7.00 g、3.14 mmol)、上記ステップ(7)で得たHO[GC]AZMB(3.10 g、2.46 mmol)、無水ピリジン(25 ml)およびMSNT(計2.05 g、6.89 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(38)と同様な方法でDMTr[UGCGC]AZMBを合成する(収率:78%)。

【0134】

(43) DMTr[GUUGAU]AZMBの合成

上記ステップ(31)で得たDMTr[GUU]PO⁻(3.20 g、1.51 mmol)、上記ステップ(19)で得たHO[GUA]AZMB(2.30 g、1.27 mmol)、無水ピリジン(12 ml)およびMSNT(計1.06 g、3.56 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(38)と同様な方法でDMTr[GUUGAU]AZMBを合成する(収率:74%)。

【0135】

(44) DMTr[GUGAGG]AZMBの合成

10

20

30

40

50

上記ステップ(33)で得たDMTr[GUG]PO⁻(2.60g、1.16mmol)、上記ステップ(18)で得たHO[AGG]AZMB(1.90g、0.99mmol)、無水ピリジン(10ml)およびMSNT(計832mg、2.80mmol)を使用する以外は、上記ステップ(38)と同様な方法でDMTr[GUGAGG]AZMBを合成する(収率:74%)。

【0136】

(45) DMTr[UCCU]AZMBの合成

上記ステップ(37)で得たDMTr[UCC]PO⁻(2.80g、1.02mmol)、上記ステップ(4)で得たHO[UU]AZMB(0.94g、0.90mmol)、無水ピリジン(10ml)およびMSNT(計748mg、2.52mmol)を使用する以外は、上記ステップ(38)と同様な方法でDMTr[UCCU]AZMBを合成する(収率:82%)。

10

【0137】

(46) HO[UCACA]AZMBの合成

上記ステップ(39)で得たDMTr[UCACA]AZMB(3.80g、1.03mmol)をジクロロメタン(15ml)に溶解し、攪拌しながら6%濃度のトリフルオロ酢酸をゆっくりに加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を4%にする。室温で30分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(15ml)で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率84%)を得る。

【0138】

(47) HO[CGCAU]AZMBの合成

上記ステップ(41)で得たDMTr[CGCAU]AZMB(3.80g、0.97mmol)を使用する以外は、上記ステップ(46)と同様な方法でHO[CGCAU]AZMBを合成する(収率:58%)。

20

【0139】

(48) HO[GUUGAU]AZMBの合成

上記ステップ(43)で得たDMTr[GUUGAU]AZMB(3.50g、0.94mmol)を使用する以外は、上記ステップ(46)と同様な方法でHO[GUUGAU]AZMBを合成する(収率:58%)。

【0140】

(49) HO[UCCU]AZMBの合成

上記ステップ(45)で得たDMTr[UCCU]AZMB(2.90g、0.79mmol)を使用する以外は、上記ステップ(46)と同様な方法でHO[UCCU]AZMBを合成する(収率:87%)。

30

【0141】

(50) DMTr[GGAACC]PO⁻の合成

100mlの丸底フラスコに、上記ステップ(38)で得たDMTr[GGAACC]AZMB(2.20g、0.50mmol)とトリフェニルホスフィン(524mg、2.00mmol)を加え、ジオキサシクロヘキサン/水(容積比=9/1)(25ml)を加えて溶解し、室温で18時間攪拌反応する。エバポレーターで溶媒を除去した後、分取精製装置のフラッシュクロマトグラフィー(テレダイン・イスコ社(Teledyne Isco, Inc.)のCombiFlash Companion/TS)1MのTEAB(10ml)を用いて分離し、トリフェニルホスフィンオキsidを含む3'保護基脱離の粗生成物を得て、乾燥しておく。

40

100mlの丸底フラスコに、1,2,4-トリアゾール(170mg、2.50mmol)と再蒸留のトリエチルアミン(454mg、4.50mmol)を加え、無水ジクロロメタン(1.5ml)で溶解し、氷浴下で2-クロロフェニルジクロロホスファイト(246mg、1.0mmol)の無水ジクロロメタン(1.0ml)溶液を滴下し、1時間攪拌してから、氷浴を氷塩浴に切り替え、温度を-10~-5に制御し、さらに上のステップで得たDMTr[GGAACC]OHの無水ジクロロメタン溶液を滴下し、氷塩浴で4時間攪拌する。1MのTEAB(10ml)を添加し、0.5時間攪拌して反応を終止する

50

。分液で有機層を得て、1 MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物（二つステップの総収率：54%）を得る。

【0142】

(51) DMTr[UCAACG]PO⁻の合成

上記ステップ(40)で得たDMTr[UCAACG]AZMB(3.60 g、0.94 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(50)と同様な方法でDMTr[UCAACG]PO⁻を合成する（二つステップの総収率：66%）。

【0143】

(52) DMTr[UGCGC]PO⁻の合成

上記ステップ(42)で得たDMTr[UGCGC]AZMB(6.40 g、1.90 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(50)と同様な方法でDMTr[UGCGC]PO⁻を合成する（二つステップの総収率：70%）。

10

【0144】

(53) DMTr[GUGAGG]PO⁻の合成

上記ステップ(44)で得たDMTr[GUGAGG]AZMB(3.00 g、0.75 mmol)を使用する以外は、上記ステップ(50)と同様な方法でDMTr[GUGAGG]PO⁻を合成する（二つステップの総収率：41%）。

【0145】

(54) DMTr[GGAACCUCACA]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、上記ステップ(50)で得たDMTr[GGAACC]PO⁻(1.2 g、0.26 mmol)と上記ステップ(46)で得たHO[UCACA]AZMB(0.85 g、0.25 mmol)とを加え、無水ピリジン(5 ml)を加えて溶解し、MSNT(計208 mg、0.70 mmol)を数回に分けて添加し、室温で8時間攪拌する。1 MのTEAB(1 ml)を添加して25分間攪拌して反応を終止する。ジクロロメタン(約50 ml)に入れ、1 MのTEABで3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(1.40 g、収率71%)を得る。

20

【0146】

(55) DMTr[UGCGCGUUGAU]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、上記ステップ(52)で得たDMTr[UGCGC]PO⁻(2.52 g、0.72 mmol)と上記ステップ(48)で得たHO[GUUGAU]AZMB(2.5 g、0.71 mmol)とを加え、無水ピリジン(8 ml)を加えて溶解し、MSNT(計500 mg、1.68 mmol)を数回に分けて添加し、室温で8時間攪拌する。1 MのTEAB(1 ml)を添加して25分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(約50 ml)に入れ、1 MのTEABで3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率49%)を得る。

30

【0147】

(56) DMTr[UCAACGCGCAUU]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、上記ステップ(51)で得たDMTr[UCAACG]PO⁻(2.43 g、0.60 mmol)と上記ステップ(47)で得たHO[CGCAUU]AZMB(1.85 g、0.51 mmol)とを加え、無水ピリジン(8 ml)を加えて溶解し、MSNT(計424 mg、1.43 mmol)を数回に分けて添加し、室温で8時間攪拌する。1 MのTEAB(1 ml)を添加して25分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(約50 ml)に入れ、1 MのTEABで3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物を得て、後続の反応ステップに用いる。

40

【0148】

(57) DMTr[GUGAGGUCCUU]AZMBの合成

50 mlの丸底フラスコに、上記ステップ(53)で得たDMTr[GUGAGG]PO⁻(1.40 g、0.30 mmol)と上記ステップ(49)で得たHO[UCCUU]AZMB(1.24 g、0

50

． 37 mmol) とを加え、無水ピリジン (6 ml) を加えて溶解し、MSNT (計 249 mg、0.84 mmol) を数回に分けて添加し、室温で 8 時間攪拌する。1 M の TEAB (1 ml) を添加して 25 分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン (約 50 ml) に入れ、1 M の TEAB で 3 回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物を得て、後続の反応ステップに用いる。

【0149】

(58) HO[UCAACGCGCAUU]AZMB の合成

上記ステップ (56) で得た DMT_r[UCAACGCGCAUU]AZMB をジクロロメタン (10 ml) に溶解し、攪拌しながら 6% 濃度のトリフルオロ酢酸をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を 4% にする。室温で 30 分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率 53%) を得る。この収率は、HO[CGCAUU]AZMB より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【0150】

(59) HO[GUGAGGUCCUU]AZMB の合成

上記ステップ (57) で得た DMT_r[GUGAGGUCCUU]AZMB をジクロロメタン (10 ml) に溶解し、攪拌しながら 6% 濃度のトリフルオロ酢酸をゆっくり加え、最終系においてトリフルオロ酢酸の濃度を 4% にする。室温で 30 分間攪拌してから、飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液を加えて中和し、分液により有機層を得る。有機層を飽和炭酸水素ナトリウムの水溶液で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率 54%) を得る。この収率は、HO[UCCUU]AZMB より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

20

【0151】

(60) DMT_r[GGAACCUCACA]PO⁻ の合成

100 ml の丸底フラスコに、上記ステップ (54) で得た DMT_r[GGAACCUCACA]AZMB (1.40 g、0.18 mmol) とトリフェニルホスフィン (200 mg、0.76 mmol) とを加え、ジオキサシクロヘキサン/水 (容積比 = 9/1) (10 ml) を加えて溶解し、室温で 28 時間攪拌反応する。エバポレーターで溶媒を除去した後、分取精製装置のフラッシュクロマトグラフィーを用いて分離し、トリフェニルホスフィンオキシドを含有した 3' 保護基脱離の粗生成物 (1.2 g) を得て、乾燥しておく。

30

25 ml の丸底フラスコに、1, 2, 4-トリアゾール (65 mg、0.96 mmol) と再蒸留のトリエチルアミン (162 mg、1.60 mmol) とを加え、無水ジクロロメタン (0.5 ml) で溶解し、氷浴下で 2-クロロフェニルジクロロホスファイト (98 mg、0.4 mmol) の無水ジクロロメタン (0.5 ml) 溶液を滴下し、1 時間攪拌してから、氷浴を氷塩浴に切り替え、温度を -10 ~ -5 に制御し、さらに上述のステップで得た DMT_r[GGAACCUCACA]OH の無水ジクロロメタン溶液を滴下し、氷塩浴で 5.5 時間攪拌する。1 M の TEAB (3 ml) を添加し、1 時間攪拌して反応を終止する。分液で有機層を得て、1 M の TEAB で 3 回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物 (収率: 43%) を得る。この収率は、DMT_r[GGAACCUCACA]AZMB より計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

40

【0152】

(61) DMT_r[UGCGGUUGAU]PO⁻ の合成

100 ml の丸底フラスコに、上記ステップ (55) で得た DMT_r[UGCGGUUGAU]AZMB (1.95 g、0.28 mmol) とトリフェニルホスフィン (350 mg、1.34 mmol) とを加え、ジオキサシクロヘキサン/水 (容積比 = 9/1) (10 ml) を加えて溶解し、室温で 28 時間攪拌反応する。エバポレーターで溶媒を除去した後、分取精製装置のフラッシュクロマトグラフィーを用いて分離し、トリフェニルホスフィンオキシドを

50

含有した3'保護基脱離の粗生成物(1.45g)を得て、乾燥しておく。

100mlの丸底フラスコに、1,2,4-トリアゾール(90mg、1.32mmol)と再蒸留のトリエチルアミン(224mg、2.22mmol)とを加え、無水ジクロロメタン(1.0ml)で溶解し、氷浴下で2-クロロフェニルジクロロホスファイト(137mg、0.56mmol)の無水ジクロロメタン(0.5ml)溶液を滴下し、1時間攪拌してから、氷浴を氷塩浴に切り替え、温度を-10~-5に制御し、さらに上のステップで得たDMTr[UGCGCGUUGAU]OHの無水ジクロロメタン溶液を滴下し、氷塩浴で5.5時間攪拌する。1MのTEAB(3ml)を添加し、1時間攪拌して反応を終止する。分液で有機層を得て、1MのTEABで3回洗浄し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物(収率:34.4%)を得る。この収率は、DMTr[UGCGCGUUGAU]AZMBより計算した理論収量に対して、実際に得た生成物の重量比率である。

10

【0153】

(62) DMTr[GGAACCUCACAUCAACGCGCAUU]AZMBの合成

25mlの丸底フラスコに、上記ステップ(60)で得たDMTr[GGAACCUCACA]PO⁻(560mg、70mmol)と上記ステップ(58)で得たHO[UCAACGCGCAUU]AZMB(500mg、70mmol)とを加え、無水ピリジン(1.5ml)を加えて溶解し、MSNT(計62mg、0.21mmol)を数回に分けて添加し、室温で8時間攪拌する。1MのTEAB(1ml)を添加して25分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(約50ml)に入れ、1MのTEABで3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物を得る(収率:96%)

20

【0154】

(63) DMTr[UGCGCGUUGAUGUGAGGUUCCUU]AZMBの合成

25mlの丸底フラスコに、上記ステップ(61)で得たDMTr[UGCGCGUUGAU]PO⁻(560mg、79μmol)と上記ステップ(59)で得たHO[GUGAGGUUCCUU]AZMB(600mg、79μmol)とを加え、無水ピリジン(1.5ml)を加えて溶解し、MSNT(計70mg、0.24mmol)を数回に分けて添加し、室温で8時間攪拌する。1MのTEAB(1ml)を添加して25分間攪拌して反応を終止する。反応液をジクロロメタン(約50ml)に入れ、1MのTEABで3回洗浄し、分液で得た有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、濃縮し、常圧カラム分離して生成物を得る(収率:88%)

30

【0155】

実施例4

本実施例はオリゴヌクレオチドを合成する。

合成ターゲット:

5'-GGAACCUCACAUCAACGCGCAUU-3'、および5'-UGCGCGUUGAUGUGAGGUUCCUU-3'

DMTr[CGAAAGAACG]AZMBの代わりに、DMTr[GGAACCUCACAUCAACGCGCAUU]AZMBまたはDMTr[UGCGCGUUGAUGUGAGGUUCCUU]AZMBを用いて、実施例2と同様な方法で保護基を脱離する。

測定により、合成されたオリゴヌクレオチドの配列は設計された配列と一致する。

40

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2009/074101		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
C07H21/00(2006.01)i				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
IPC: C07H21/-				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, REG CAPLUS, oligonucleotide, condensation, solid support, structure search according to the formulae (1), (2) and (3)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	CN101133073A (GIRINDUS AG) 27 Feb. 2008 (27.02.2008) , see the whole document	1-10		
A	CN1409719A (AVECIA LTD) 09 Apr. 2003 (09.04.2003) , see the whole document	1-10		
A	CN1245809A (SHANGHAI BIO-CHEM INST CHINESE ACAD SCI) 01 Mar. 2000 (01.03.2000) , see the whole document	1-10		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 12 Dec. 2009(12.12.2009)		Date of mailing of the international search report 31 Dec. 2009 (31.12.2009)		
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer YANG Yi Telephone No. (86-10)62086352		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2009/074101

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date		
CN101133073 A	27.08.2008	CA2599259A	14.09.2006		
		AU2006221999A	14.09.2006		
		WO2006094963A	14.09.2006		
		MX2007010764A	07.11.2007		
		KR20070110309A	16.11.2007		
		EP1858909A	28.11.2007		
		JP2008532946T	21.08.2008		
		RU2007136716A	10.04.2009		
		CN1409719A	09.04.2003	WO0127126A	19.04.2001
				CA2386867A	19.04.2001
AU7803500A	23.04.2001				
EP1224193A	24.07.2002				
JP2003517467T	27.05.2003				
CN1245809A	01.03.2000	CN1093135C	23.10.2002		

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2009/074101
A. 主题的分类		
C07H21/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07H21/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, REG, CAPLUS, 寡核苷酸, 缩合, 固相, oligonucleotide, condensation, solid support, 根据式(1)、(2)和(3)进行了结构检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101133073A (集润德斯股份公司) 27.2 月 2008 (27.02.2008), 参见全文	1-10
A	CN1409719A (艾夫西亚有限公司) 09.4 月 2003 (09.04.2003), 参见全文	1-10
A	CN1245809A (中国科学院上海生物化学研究所) 01.3 月 2000 (01.03.2000), 参见全文	1-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“&” 同族专利的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 12.12 月 2009(12.12.2009)		国际检索报告邮寄日期 31.12 月 2009 (31.12.2009)
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 杨轶 电话号码: (86-10) 62086352

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2009/074101			
检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期		
CN101133073A	27.08.2008	CA2599259A	14.09.2006		
		AU2006221999A	14.09.2006		
		WO2006094963A	14.09.2006		
		MX2007010764A	07.11.2007		
		KR20070110309A	16.11.2007		
		EP1858909A	28.11.2007		
		JP2008532946T	21.08.2008		
		RU2007136716A	10.04.2009		
		CN1409719A	09.04.2003	WO0127126A	19.04.2001
				CA2386867A	19.04.2001
AU7803500A	23.04.2001				
EP1224193A	24.07.2002				
CN1245809A	01.03.2000	JP2003517467T	27.05.2003		
		CN1093135C	23.10.2002		

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C057 AA19 AA21 CC03 DD03 MM02