



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0162536
(43) 공개일자 2024년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) C07H 21/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C07H 21/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7034021
(22) 출원일자(국제) 2023년03월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월11일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/010891
(87) 국제공개번호 WO 2023/182274
국제공개일자 2023년09월28일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-047341 2022년03월23일 일본(JP)

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

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 올리고머의 제조 방법**

(57) 요약

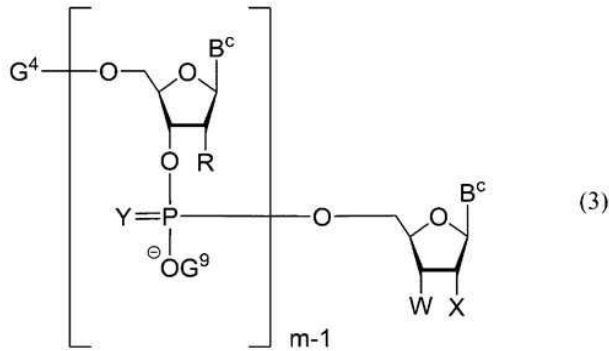
본 발명은, 핵산 올리고머의 효율적인 제조 방법, 특히, 라디칼 반응 저해제의 존재하에서, 특정한 핵산 올리고머를, 불화물 이온과 접촉시키는 것을 특징으로 하는, 핵산 올리고머의 제조 방법을 제공한다.

명세서

청구범위

청구항 1

라디칼 반응 저해제의 존재하에서, 하기 식 (3) :



(식 중,

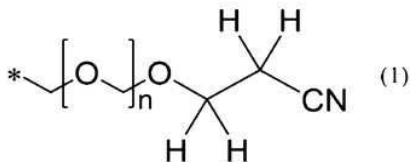
G^4 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고,

G^9 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

B^c 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 핵산염기를 나타내고,

R 은, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 불소 원자 또는 OQ 기를 나타내고,

Q 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 메틸렌기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸렌기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸리렌기, 또는 하기 식 (1) :



(식 중,

* 표시가 붙은 결합은, OQ 기의 산소 원자와의 결합인 것을 나타내고,

n 은 0 이상의 어느 정수를 나타낸다.)

의 보호기를 나타내고,

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

m 은, 2 이상 300 까지의 어느 정수를 나타내고,

W 및 X 는, 하기 (a) 또는 (b) 중 어느 것으로 정의되고,

(a) W 가 수산기일 때에는, X 는 상기 R 기와 동일한 정의이다.

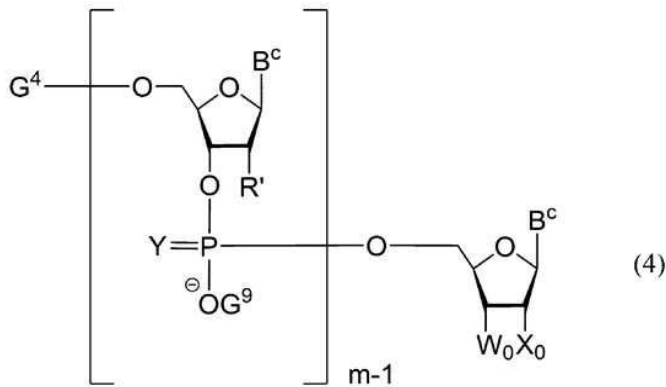
(b) X 가 수산기일 때에는, W 는 OV 기를 나타내고,

V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

단, 상기 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. 그리고

m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드의 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : $m-1 > p$ 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

으로 나타내는 핵산 올리고머를, 불화물 이온과 접촉시키는 것을 특징으로 하는, 하기 식 (4) :



(식 중, R' 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OO' 기를 나타내고,

Q' 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 메틸렌기, 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸렌기, 또는 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸리렌기를 나타내고,

식 (4) 의 치환기 G^4 , G^9 , Y , B^c 및 m 의 정의는, 상기 식 (3) 에 있어서의 정의와 동일하고,

W_0 는, 수산기이고,

X_0 는, 상기 R' 기와 동일한 정의이다.

그리고, m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드의 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : $m-1 > p$ 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

로 나타내는 핵산 올리고머의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

식 (1) 중의 n 이 0 또는 1 인, 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

식 (1) 중의 n 이 0 인, 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

식 (1) 중의 n 이 1 인, 제조 방법.

청구항 5

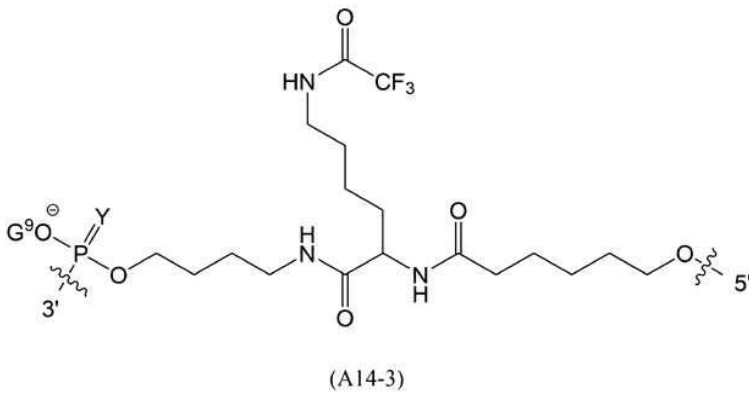
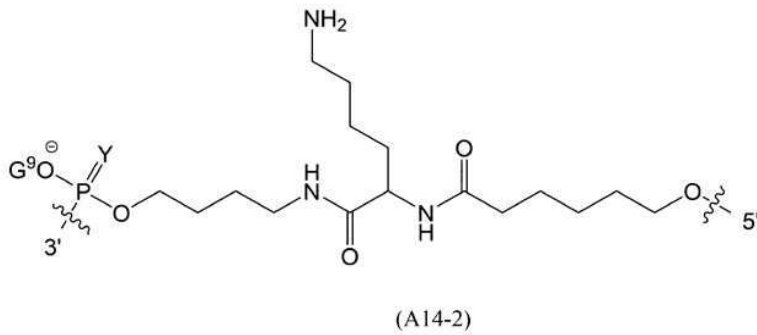
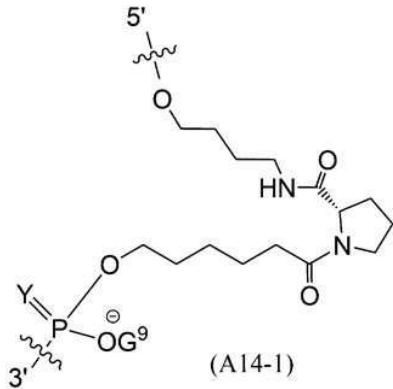
제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

비뉴클레오티드 링커가, 아미노산 골격으로 이루어지는 링커인, 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

아미노산 골격으로 이루어지는 링커가, 하기 식 (A14-1), (A14-2) 또는 (A14-3) 의 구조를 갖는 링커인, 제조 방법.



(식 중, 5' 및 3' 는, 핵산 올리고머의 5' 말단측 및 3' 말단측을 각각 나타낸다.)

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

W 가 수산기이고, X 가 R 기이며, W₀ 가 수산기이고, 그리고 X₀ 가 R' 기인, 제조 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

불화물 이온원이, 불화테트라알킬암모늄인, 제조 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

불화물 이온원이, 불화테트라-n-부틸암모늄인, 제조 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
라디칼 반응 저해제가, 라디칼 연쇄 개시 저지제, 라디칼 포착제, 또는 과산화물 분해제인, 제조 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
라디칼 반응 저해제가, 라디칼 포착제인, 제조 방법.

청구항 12

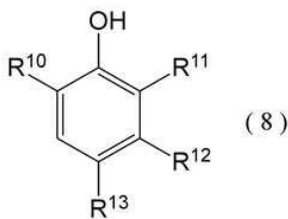
제 11 항에 있어서,
라디칼 포착제가, 페놀계 산화 방지제 또는 힌더드아민계 광 안정제인, 제조 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서,
라디칼 포착제가, 페놀계 산화 방지제인, 제조 방법.

청구항 14

제 12 항 또는 제 13 항에 있어서,
페놀계 산화 방지제가, 하기 식 (8) 로 나타내는 화합물인, 제조 방법.



(식 중, R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은, 동일 또는 상이하고, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술폰닐기 {그 사슬형 탄화수소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술폰닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있어도 된다}, $SiR^{51}R^{52}R^{53}$, 아미드기, $C(O)R^{61}$, $OC(O)R^{61}$, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, R^{51} , R^{52} 및 R^{53} 은, 동일 또는 상이하고, 알킬기, 알콕시기, 또는 수소 원자를 나타내고, R^{61} 은, 사슬형 탄화수소기를 나타낸다.)

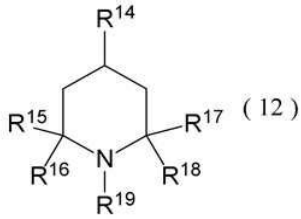
청구항 15

제 12 항에 있어서,
라디칼 포착제가, 힌더드아민계 광 안정제인, 제조 방법.

청구항 16

제 12 항, 제 14 항, 또는 제 15 항에 있어서,

힌더드아민계 광 안정제가, 하기 식 (12) 로 나타내는 화합물인, 제조 방법.



(식 중, R¹⁴ 는, OC(O)R²⁰, NHR²⁰, 또는 수소 원자를 나타내고, R¹⁹ 는, 알킬기, 알콕시기, 산소 프리 라디칼, 수 산기, 또는 수소 원자를 나타내고, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, 및 R¹⁸ 은, 동일 또는 상이하고, 알킬기 또는 수소 원자를 나타 내고, R²⁰ 은, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술폰닐기 {그 사슬형 탄화수 소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술폰닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있 어도 된다}, SiR⁵⁴R⁵⁵R⁵⁶, 아마드기, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, R⁵⁴, R⁵⁵ 및 R⁵⁶ 은, 동일 또는 상이하 고, 알킬기, 알콕시기, 또는 수소 원자를 나타낸다.)

청구항 17

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
라디칼 반응 저해제가, 과산화물 분해제인, 제조 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,
과산화물 분해제가, 인계 산화 방지제 또는 황계 산화 방지제인, 제조 방법.

청구항 19

제 17 항에 있어서,
과산화물 분해제가, 인계 산화 방지제인, 제조 방법.

청구항 20

제 17 항에 있어서,
과산화물 분해제가, 황계 산화 방지제인, 제조 방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,
라디칼 반응 저해제가, 라디칼 연쇄 개시 저지제인, 제조 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,
라디칼 연쇄 개시 저해제가, 금속 불활성화제 또는 자외선 흡수제인, 제조 방법.

청구항 23

제 21 항에 있어서,
라디칼 연쇄 개시 저해제가, 금속 불활성화제인, 제조 방법.

청구항 24

제 21 항에 있어서,

라디칼 연쇄 개시 저해제가, 자외선 흡수제인, 제조 방법.

청구항 25

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

라디칼 반응 저해제의 사용량이, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 몰수에 대해, 식 (3) 에 있어서의 R 이 식 (1) 로 나타내는 기인 수를 곱한 몰수 1 몰에 대해, 9 몰 이하인, 제조 방법.

청구항 26

제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 10 % 이상이며, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 특허출원은, 일본 특허출원 2022-047341호 (2022년 3월 23일 출원) 에 기초하는 파리 조약 상의 우선권 및 이익을 주장하는 것이고, 여기에 인용함으로써, 상기 출원에 기재된 내용의 전체가 본 명세서 내에 인용되는 것으로 한다.

[0002] 본 발명은, 리보스를 포함하는 핵산 올리고머의 제조 방법에 관한 것이며, 더욱 상세하게는, 핵산 올리고머에 포함되는 리보스의 수산기의 보호기의 탈보호 방법에 관한 것이다.

배경 기술

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

[0004] 핵산 올리고머는, 고상 합성법에 의해 합성 가능하고, 고상 합성법에서는 뉴클레오시드의 포스포르아미다이트 (이하, 「아미다이트」 라고 칭한다) 가 원료로서 사용된다. 고상 담체 상에서, 핵산을 신장시켜 합성된 핵산 올리고머는, 고상 담체로부터 잘라내고, 이어서, 리보스를 포함하는 핵산 올리고머는, 리보스의 2' 위치의 수산기의 보호기를 탈보호하여 제거하여, 목적으로 하는 핵산 올리고머가 제조되고 있다. 이와 같이 하여 합성된 핵산 올리고머의 순도는, 핵산의 고상 담체 상에서의 신장 반응 공정, 고상 담체로부터의 절출 공정, 각 보호기의 탈보호 공정 등의 다단계의 공정을 거치고 있기 때문에 반드시 만족할 만한 것은 아니고, 합성은 효율적이지 않았다 (특허문헌 1,2).

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 국제 공개공보 제2006/022323호
- (특허문헌 0002) 국제 공개공보 제2013/027843호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은, 핵산 올리고머의 효율적인 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

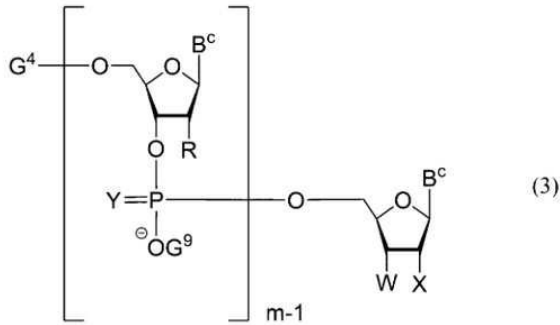
[0007] 본 발명자는, 상기 목적을 달성하고자 예의 연구를 거듭한 결과, 핵산 올리고머에, 라디칼 반응 저해제의 존재

하에서, 불화물 이온을 접촉시킴으로써, 그 핵산 올리고머에 포함되는 리보스의 수산기의 보호기를 효율적으로 탈보호할 수 있다는 지견을 얻었다. 결과적으로, 핵산 올리고머의 효율적인 제조 방법을 제공할 수 있다.

[0008] 본 발명은, 이들 지견에 기초하여 본 발명을 완성시킨 것이고, 이하의 양태를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0009] 1. 라디칼 반응 저해제의 존재하에서, 하기 식 (3) :

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] (식 중,

[0013] G^4 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고,

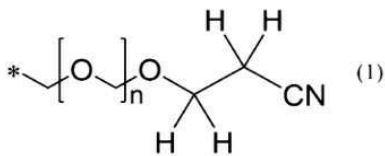
[0014] G^9 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

[0015] B^c 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 핵산염기를 나타내고,

[0016] R 은, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 불소 원자 또는 OQ 기를 나타내고,

[0017] Q 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 메틸렌기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸렌기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸리덴기, 또는 하기 식 (1) :

[0018] [화학식 2]



[0019]

[0020] (식 중,

[0021] * 표시가 붙은 결합은, OQ 기의 산소 원자와의 결합인 것을 나타내고,

[0022] n 은 0 이상의 어느 정수를 나타낸다.)

[0023] 의 보호기를 나타내고,

[0024] Y 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0025] m 은, 2 이상 300 까지의 어느 정수를 나타내고,

[0026] W 및 X 는, 하기 (a) 또는 (b) 중 어느 것으로 정의되고,

[0027] (a) W 가 수산기일 때에는, X 는 상기 R 기와 동일한 정의이다.

[0028] (b) X 가 수산기일 때에는, W 는 OV 기를 나타내고,

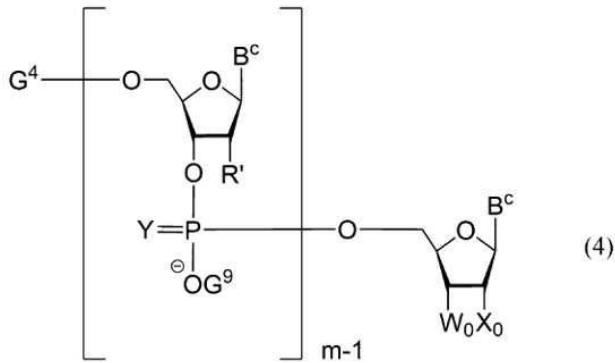
[0029] V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

[0030] 단, 상기 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. 그리고

[0031] m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드의 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m-1>p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

[0032] 으로 나타내는 핵산 올리고머를, 불화물 이온과 접촉시키는 것을 특징으로 하는, 하기 식 (4) :

[0033] [화학식 3]



[0034]

[0035] (식 중, R' 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,

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

[0037] 식 (4) 의 치환기 G⁴, G⁹, Y, B^c 및 m 의 정의는, 상기 식 (3) 에 있어서의 정의와 동일하고,

[0038] W₀ 는, 수산기이고,

[0039] X₀ 는, 상기 R' 기와 동일한 정의이다.

[0040] 그리고, m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드의 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m-1>p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)

[0041] 로 나타내는 핵산 올리고머의 제조 방법 (이하, 본 명세서 중, 「본 발명의 제조 방법」, 「본 실시형태의 제조 방법」이라고 호칭한다).

[0042] 2. 식 (1) 중의 n 이 0 또는 1 인, 전항 1 에 기재된 제조 방법.

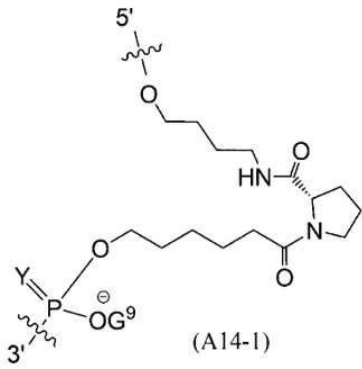
[0043] 3. 식 (1) 중의 n 이 0 인, 전항 1 에 기재된 제조 방법.

[0044] 4. 식 (1) 중의 n 이 1 인, 전항 1 에 기재된 제조 방법.

[0045] 5. 비뉴클레오티드 링커가, 아미노산 골격으로 이루어지는 링커인, 전항 1 ~ 4 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

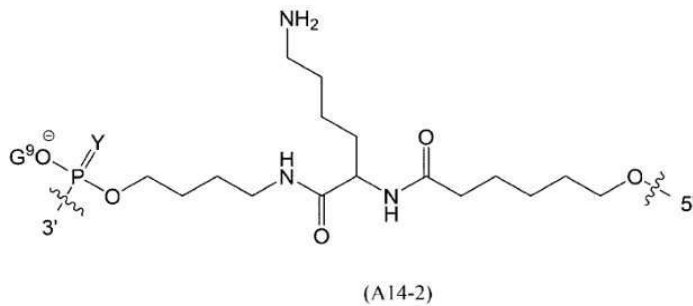
[0046] 6. 아미노산 골격으로 이루어지는 링커가, 하기 식 (A14-1), (A14-2) 또는 (A14-3) 의 구조를 갖는 링커인, 전항 5 에 기재된 제조 방법.

[0047] [화학식 4]



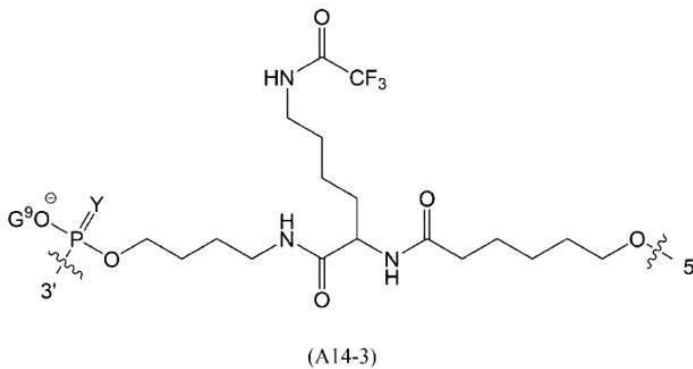
[0048]

[0049] [화학식 5]



[0050]

[0051] [화학식 6]



[0052]

[0053] (식 중, 5' 및 3' 는, 핵산 올리고머의 5' 말단측 및 3' 말단측을 각각 나타낸다.)

[0054] 7. W 가 수산기이고, X 가 R 기이며, W₀ 가 수산기이고, 그리고 X₀ 가 R' 기인, 전항 1 ~ 6 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0055] 8. 불화물 이온원이, 불화테트라알킬암모늄인, 전항 1 ~ 7 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0056] 9. 불화물 이온원이, 불화테트라-n-부틸암모늄인, 전항 1 ~ 8 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0057] 10. 라디칼 반응 저해제가, 라디칼 연쇄 개시 저지제, 라디칼 포착제, 또는 과산화물 분해제인, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

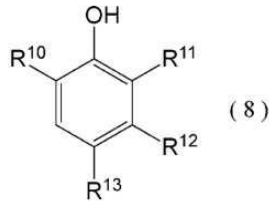
[0058] 11. 라디칼 반응 저해제가, 라디칼 포착제인, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0059] 12. 라디칼 포착제가, 페놀계 산화 방지제 또는 힌더드아민계 광 안정제인, 전항 11 에 기재된 제조 방법.

[0060] 13. 라디칼 포착제가, 페놀계 산화 방지제인, 전항 11 에 기재된 제조 방법.

[0061] 14. 페놀계 산화 방지제가, 하기 식 (8) 로 나타내는 화합물인, 전항 12 또는 13 에 기재된 제조 방법.

[0062] [화학식 7]



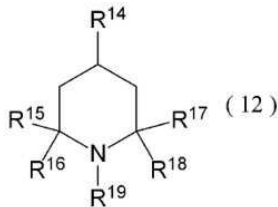
[0063]

[0064] (식 중, R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은, 동일 또는 상이하고, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술폰닐기 {그 사슬형 탄화수소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술폰닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있어도 된다}, $SiR^{51}R^{52}R^{53}$, 아마이드기, $C(O)R^{61}$, $OC(O)R^{61}$, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, R^{51} , R^{52} 및 R^{53} 은, 동일 또는 상이하고, 알킬기, 알콕시기, 또는 수소 원자를 나타내고, R^{61} 은, 사슬형 탄화수소기를 나타낸다.)

[0065] 15. 라디칼 포착제가, 힌더드아민계 광 안정제인, 전항 12 에 기재된 제조 방법.

[0066] 16. 힌더드아민계 광 안정제가, 식 (12) 로 나타내는 화합물인, 전항 12, 14, 또는 15 에 기재된 제조 방법.

[0067] [화학식 8]



[0068]

[0069] (식 중, R^{14} 는, $OC(O)R^{20}$, NHR^{20} , 또는 수소 원자를 나타내고, R^{19} 는, 알킬기, 알콕시기, 산소 프리 라디칼, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, R^{15} , R^{16} , R^{17} , 및 R^{18} 은, 동일 또는 상이하고, 알킬기 또는 수소 원자를 나타내고, R^{20} 은, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술폰닐기 {그 사슬형 탄화수소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술폰닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있어도 된다}, $SiR^{54}R^{55}R^{56}$, 아마이드기, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, R^{54} , R^{55} 및 R^{56} 은, 동일 또는 상이하고, 알킬기, 알콕시기, 또는 수소 원자를 나타낸다.)

[0070] 17. 라디칼 반응 저해제가, 과산화물 분해제인, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0071] 18. 과산화물 분해제가, 인계 산화 방지제 또는 황계 산화 방지제인, 전항 17 에 기재된 제조 방법.

[0072] 19. 과산화물 분해제가, 인계 산화 방지제인, 전항 17 에 기재된 제조 방법.

[0073] 20. 과산화물 분해제가, 황계 산화 방지제인, 전항 17 에 기재된 제조 방법.

[0074] 21. 라디칼 반응 저해제가, 라디칼 연쇄 개시 저지제인, 전항 1 ~ 9 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0075] 22. 라디칼 연쇄 개시 저해제가, 금속 불활성화제 또는 자외선 흡수제인, 전항 21 에 기재된 제조 방법.

[0076] 23. 라디칼 연쇄 개시 저해제가, 금속 불활성화제인, 전항 21 에 기재된 제조 방법.

[0077] 24. 라디칼 연쇄 개시 저해제가, 자외선 흡수제인, 전항 21 에 기재된 제조 방법.

[0078] 25. 라디칼 반응 저해제의 사용량이, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 몰수에 대해, 식 (3) 에 있어서의 R 이 식 (1) 로 나타내는 기인 수를 곱한 몰수 1 몰에 대해, 9 몰 이하인, 전항 1 ~ 24 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

[0079] 26. 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 R, W 및 X 중, 상기 식 (1) 의 보호기의 비율이 10 % 이상이며, 또한, 핵산 사슬 길이가 10 사슬 길이 이상인, 전항 1 ~ 25 중 어느 한 항에 기재된 제조 방법.

발명의 효과

[0080] 본 발명은, 효율적인 핵산 올리고머의 제조 방법을 제공한다. 제조되는 핵산 올리고머의 순도 향상을 기대할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] 본 발명을 실시하기 위한 형태로서, 실시양태를 나타내어 설명하지만, 본 발명은 이하의 양태로 한정되는 것은 아니다.

[0082] 치환기에 대해 설명한다.

[0083] 할로겐 원자란, 불소 원자, 염소 원자, 브롬 원자, 또는 요오드 원자를 의미한다. 치환기가 2 이상의 할로겐 원자 또는 치환기로 치환되어 있는 경우, 그들 할로겐 원자 또는 치환기는, 각각 동일해도 되고 상이해도 된다.

[0084] 사슬형 탄화수소기란, 알킬기, 알케닐기 또는 알키닐기를 나타낸다.

[0085] 알킬기로는, 예를 들어, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 1,1-디메틸프로필기, 1,2-디메틸프로필기, 1-에틸프로필기, 부틸기, sec-부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 및 헥실기를 들 수 있다.

[0086] 알케닐기로는, 예를 들어, 비닐기, 1-프로페닐기, 2-프로페닐기, 1-메틸-1-프로페닐기, 1-메틸-2-프로페닐기, 1,2-디메틸-1-프로페닐기, 1-에틸-2-프로페닐기, 3-부테닐기, 4-펜테닐기, 및 5-헥세닐기를 들 수 있다.

[0087] 알키닐기로는, 예를 들어, 에티닐기, 1-프로피닐기, 2-프로피닐기, 1-메틸-2-프로피닐기, 1,1-디메틸-2-프로피닐기, 1-에틸-2-프로피닐기, 2-부티닐기, 4-펜티닐기, 및 5-헥시닐기를 들 수 있다.

[0088] 알콕시기로는, 예를 들어, 메톡시기, 에톡시기, 프로폭시기, 이소프로폭시기, 부톡시기, tert-부톡시기, 펜틸옥시기, 헥실옥시기, 및 옥틸옥시기를 들 수 있다.

[0089] 알킬술폰피닐기로는, 예를 들어, 메틸술폰피닐기, 에틸술폰피닐기, 프로필술폰피닐기, 이소프로필술폰피닐기, 부틸술폰피닐기, tert-부틸술폰피닐기, 펜틸술폰피닐기, 헥실 술폰피닐기, 및 옥틸술폰피닐기를 들 수 있다.

[0090] 알케닐옥시기로는, 예를 들어, 2-프로페닐옥시기, 2-부테닐옥시기, 및 5-헥세닐옥시기를 들 수 있다.

[0091] 알키닐옥시기로는, 예를 들어, 2-프로피닐옥시기, 2-부티닐옥시기, 및 5-헥시닐옥시기를 들 수 있다.

[0092] 카르보시크릴기란, 고리 방향족 탄소 고리기 및 지환식 탄화수소기를 나타낸다.

[0093] 방향족 탄소 고리기로는, 예를 들어, 페닐기 및 나프틸기를 들 수 있다.

[0094] 지환식 탄화수소기란, 시클로알킬기, 시클로알케닐기 등을 나타낸다.

[0095] 시클로알킬기로는, 예를 들어, 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 및 시클로헵틸기를 들 수 있다.

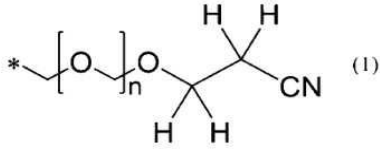
[0096] 시클로알케닐기로는, 예를 들어, 시클로프로페닐기, 시클로부테닐기, 시클로펜테닐기, 시클로헥세닐기, 및 시클로헵테닐기를 들 수 있다.

[0097] 헤테로시크릴기란, 1 이상의 헤테로 원자를 고리 구성 원자로서 갖는 고리형기를 의미하고, 방향족 복소 고리기 및 비방향족 복소 고리기를 나타낸다.

[0098] 헤테로시크릴기로는, 예를 들어, 피롤릴기, 푸릴기, 티에닐기, 피라졸릴기, 이미다졸릴기, 트리아졸릴기, 테트라졸릴기, 옥사졸릴기, 이소옥사졸릴기, 티아졸릴기, 이소티아졸릴기, 옥사디아졸릴기, 티아디아졸릴기, 피리디닐기, 피리다지닐기, 피리미디닐기, 피라지닐기, 트리아지닐기, 테트라지닐기, 피롤리디닐기, 이미다졸리디닐기, 이미다졸리디닐기, 피페리디닐기, 테트라하이드로피리미디닐기, 헥사하이드로피리미디닐기, 피페라지닐기, 옥사졸리디닐기, 이소옥사졸리디닐기, 1,3-옥사디나닐기, 모르폴리닐기, 티아졸리디닐기, 이소티아졸리디닐기, 1,3-티아디나닐기, 및 티오모르폴리닐기를 들 수 있다.

[0099] 이하, 라디칼 반응 저해제의 존재하에서, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 접촉시켜, 하기 식 (1) 의 보호기가 탈보호된 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머를 제조하는 방법에 대해 설명한다.

[0100] [화학식 9]



[0101]

[0102] 식 (1) 에 있어서, n 은, 0 이상의 어느 정수이며, 보다 바람직하게는 0 ~ 3 의 정수, 보다 바람직하게는, 0 ~ 2 의 정수, 더욱 바람직하게는 0 또는 1, 특히 바람직하게는 1 이다.

[0103] 식 (3) 의 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. R, W 및 X 중, 식 (1) 의 비율은, 1 % 이상이어도 되고, 보다 바람직하게는 5 % 이상이며, 보다 바람직하게는 10 % 이상이며, 보다 바람직하게는 20 % 이상이며, 보다 바람직하게는 30 % 이상이며, 보다 바람직하게는 40 % 이상이며, 보다 바람직하게는 50 % 이상이며, 보다 바람직하게는 60 % 이상이며, 보다 바람직하게는 70 % 이상이며, 보다 바람직하게는 80 % 이상이며, 보다 바람직하게는 90 % 이상이며, 보다 더 바람직하게는 95 % 이상이다. 또, 합성하는 헥산 사슬 길이 (염기 길이, 헥산의 중합수, 양체) 는, 10 사슬 길이 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 20 사슬 길이 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 30 사슬 길이 이상이 바람직하고, 보다 바람직하게는 40 사슬 길이 이상이 바람직하고, 보다 더 바람직하게는, 50 사슬 길이 이상이다.

[0104] 이 식 (1) 로 나타내는 보호기를 탈보호하는 공정에서는, 불화물 이온원으로서 전형적으로는, 불화테트라알킬암모늄이 사용된다.

[0105] 불화테트라알킬암모늄으로는, 테트라부틸암모늄플루오라이드, 또는 테트라메틸암모늄플루오라이드 등을 들 수 있다. 그 중에서도 테트라부틸암모늄플루오라이드 (TBAF) 가 보다 바람직하다.

[0106] 사용하는 불화물 이온의 양은, 통상, 제거되는 보호기 1 몰당 1 ~ 1000 몰, 바람직하게는 1 ~ 500, 보다 바람직하게는 2 ~ 200 몰, 보다 바람직하게는 4 ~ 100 몰이다.

[0107] 라디칼 반응 저해제로는, 예를 들어, 라디칼 연쇄 개시 저지제, 라디칼 포착제, 또는 과산화물 분해제 등을 들 수 있다.

[0108] 라디칼 연쇄 개시 저지제로는, 예를 들어, 금속 불활성화제, 자외선 흡수제, 또는 켄처 등을 들 수 있다.

[0109] 금속 불활성화제로는, 아마이드 화합물, 하이드라지드계 화합물 등을 들 수 있고, 구체적으로는, n-옥타노하이드라지드, 숙신산디하이드라지드, 2-Hydroxy-N-1H-1,2,4-triazol-3-ylbenzamide, N',N'-Bis(2-hydroxybenzoyl)dodecanedihydrazide, N,N'-Bis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyl]hydrazine, 또는 1,3,5-Triazine-2,4,6-triamine 등을 들 수 있다.

[0110] 자외선 흡수제로는, 트리아졸계 화합물, 트리아진계 화합물, 또는 벤조페논계 화합물등을 들 수 있고, 구체적으로는, 벤조페논, 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4, 6-bis(1-methyl-1-phenylethyl)phenol, 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol, 2,2'-Methylenebis[6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol], 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-p-cresol, 2-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)-6-tert-butyl-4-methylphenol, 2-(4,6-Diphenyl-1,3,5-triazin-2-yl)-5-[2-(2-ethylhexanoyloxy)ethoxy]phenol, 2,4,6-tris(2-hydroxy-4-hexyloxy-3-methylphenyl)-1,3,5-triazine, 또는 [2-hydroxy-4-(octyloxy)phenyl](phenyl)methanone 등을 들 수 있다.

[0111] 켄처로는, 유기 니켈계 화합물 등을 들 수 있다. 구체적으로는, 비스(1,2-비스(2-메톡시페닐)-1,2-에틸렌디티오라토) 니켈 착물, 라니니켈, 테트라카르보니켈, NiX₂(PR₃) [식 중, X 는 할로젠 원자를 나타내고, PR₃ 은 포스핀 배위자 (예를 들어, 트리페닐포스핀 등의 3 급 포스핀) 등을 나타낸다] 을 들 수 있다.

[0112] 라디칼 포착제로는, 페놀계 산화 방지제, 또는 힌더드아민계 광 안정제 (Hindered Amine Light Stabilizers ; HALS) 등을 들 수 있다.

[0113] 페놀계 산화 방지제로는, 힌더드페놀계 화합물, 세미힌더드페놀계 화합물, 또는 레스힌다드페놀계 화합물 등을 들 수 있다.

[0114] 페놀계 산화 방지제로는, 예를 들어, 이하의 화합물을 들 수 있지만, 일반적으로 페놀계 산화 방지제로서 사용

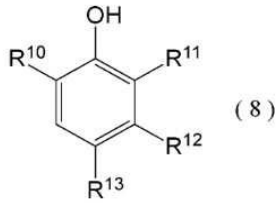
되는 것이면, 본 실시형태에 사용할 수 있다.

[0115]

하기 식 (8) 로 나타내는 화합물.

[0116]

[화학식 10]



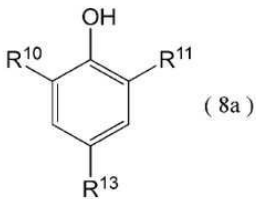
[0117]

[0118]

식 (8) 에 있어서 R¹² 가 수소 원자인 화합물은, 하기 식 (8a) 로 나타낼 수도 있다.

[0119]

[화학식 11]



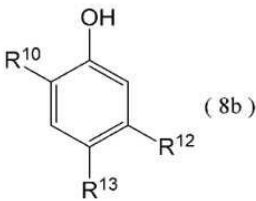
[0120]

[0121]

식 (8) 에 있어서 R¹¹ 이 수소 원자인 화합물은, 하기 식 (8b) 로 나타낼 수도 있다.

[0122]

[화학식 12]



[0123]

[0124]

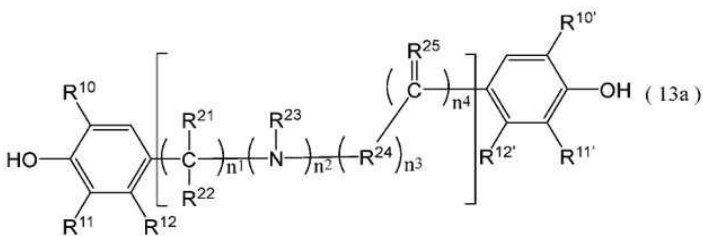
식 (8), 식 (8a) 및 식 (8b) 에 있어서, R¹⁰ 은, 바람직하게는, tert-부틸기, sec-부틸기, 또는 메틸기이고, R¹¹ 및 R¹² 는, 동일 또는 상이하고, 바람직하게는, tert-부틸기, sec-부틸기, 메틸기, 또는 수소 원자이고, R¹³ 은, 바람직하게는, tert-부틸기, sec-부틸기, 메틸기, 수산기, 또는 수소 원자이다.

[0125]

하기 식 (13a) 로 나타내는 화합물.

[0126]

[화학식 13]



[0127]

[0128]

(식 중, R¹⁰, R¹¹, R¹² 의 정의는, 식 (8) 에 있어서의 정의와 동일하고, R^{10'}, R^{11'}, R^{12'}, R²¹, R²², 및 R²³ 은, 동일 또는 상이하고, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술폰과닐기 {그 사슬형 탄화수소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술폰과닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있어도 된다}, SiR^{51, 52, 53}, 아마이드기, C(O)R⁶¹, OC(O)R⁶¹, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, R²⁴ 는 산소 원자, 황 원자, S(O), 또는 S(O)₂ 를 나타내고, R²⁵ 는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고, n¹, n², n³, 및 n⁴

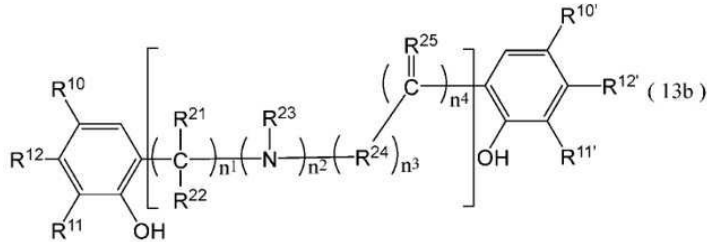
는, 각각, 임의의 0 혹은 양의 정수를 나타내고, [] 안의 $(CR^1R^2)_{n1}$, $(NR^{23})_{n2}$, $(R^{24})_{n3}$, 및 $(C=R^{25})_{n4}$ 의 나열은 임의이며, 각각이 복수 존재하는 경우, 연속하여 존재하지 않아도 된다.)

[0129]

하기 식 (13b) 로 나타내는 화합물.

[0130]

[화학식 14]



[0131]

[0132]

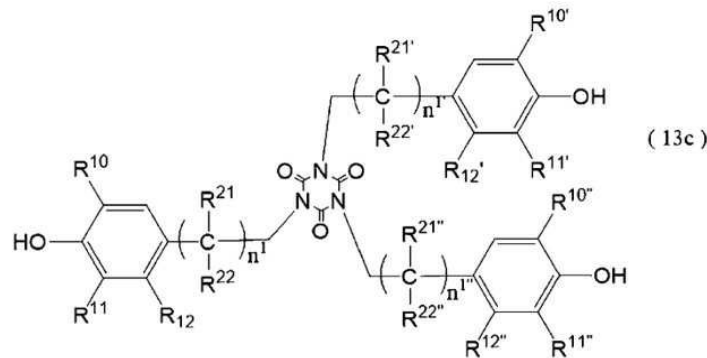
(식 중, 기호의 정의는, 식 (13a) 에 있어서의 정의와 동일하다.)

[0133]

하기 식 (13c) 로 나타내는 화합물.

[0134]

[화학식 15]



[0135]

[0136]

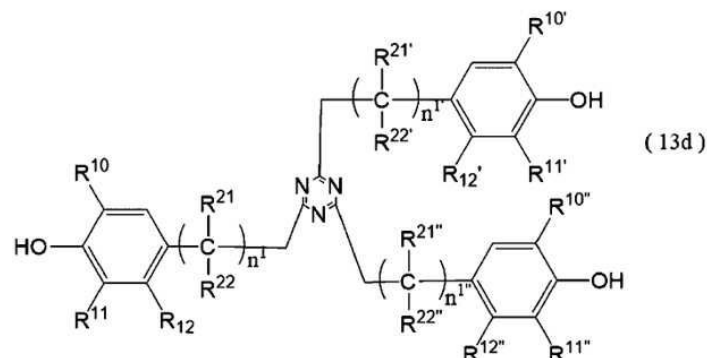
(식 중, R^{10} , R^{11} , R^{12} , $R^{10'}$, $R^{11'}$, $R^{12'}$, 및 n^1 의 정의는, 상기 식 (13a) 에 있어서의 정의와 동일하고, $R^{10''}$, $R^{11''}$, $R^{12''}$, $R^{21'}$, $R^{22'}$, $R^{21''}$, 및 $R^{22''}$ 는, 동일 또는 상이하고, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술폰과닐기 {그 사슬형 탄화수소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술폰과닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있어도 된다}, $SiR^{51}R^{52}R^{53}$, 아미드기, $C(O)R^{61}$, $OC(O)R^{61}$, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, n^1 및 $n^{1'}$ 는, 각각, 임의의 0 혹은 양의 정수를 나타낸다.)

[0137]

하기 식 (13d) 로 나타내는 화합물.

[0138]

[화학식 16]



[0139]

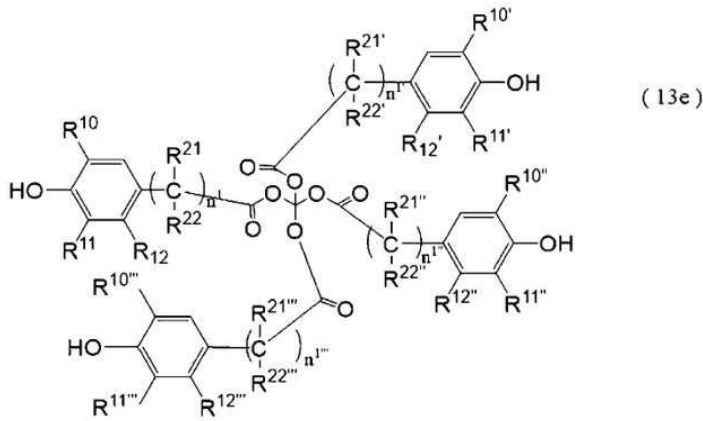
[0140]

(식 중, 기호의 정의는, 식 (13c) 에 있어서의 정의와 동일하다.)

[0141]

하기 식 (13e) 로 나타내는 화합물.

[0142] [화학식 17]



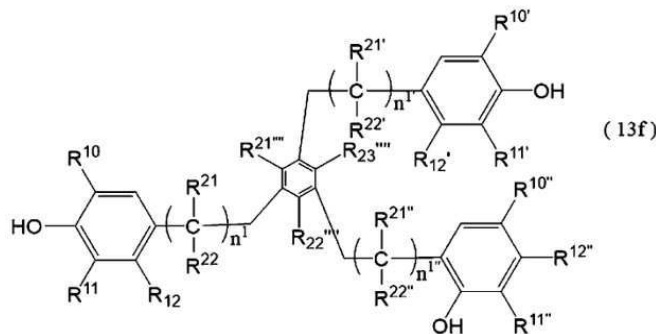
[0143]

[0144] (식 중, R^{10} , R^{11} , R^{12} , $R^{10'}$, $R^{11'}$, $R^{12'}$, $R^{10''}$, $R^{11''}$, $R^{12''}$, $R^{21'}$, $R^{22'}$, $R^{21''}$, $R^{22''}$, n^1 , $n^{1'}$, 및 $n^{1''}$ 의 정의는, 상기 식 (13c)에 있어서의 정의와 동일하고, $R^{10'''}$, $R^{11'''}$, $R^{12'''}$, $R^{21'''}$, 및 $R^{22'''}$ 는, 동일 또는 상이하고, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술파닐기 {그 사슬형 탄화수소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술파닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있어도 된다}, $SiR^{51}R^{52}R^{53}$, 아미드기, $C(O)R^{61}$, $OC(O)R^{61}$, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, $n^{1''}$ 는 임의의 0 혹은 양의 정수를 나타낸다.)

[0145]

하기 식 (13f)로 나타내는 화합물.

[0146] [화학식 18]



[0147]

[0148] (식 중, R^{10} , R^{11} , R^{12} , $R^{10'}$, $R^{11'}$, $R^{12'}$, $R^{10''}$, $R^{11''}$, $R^{12''}$, $R^{21'}$, $R^{22'}$, $R^{21''}$, $R^{22''}$, n^1 , $n^{1'}$, 및 $n^{1''}$ 의 정의는, 상기 식 (13c)에 있어서의 정의와 동일하고, $R^{21'''}$, $R^{22'''}$, 및 $R^{23'''}$ 는, 동일 또는 상이하고, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 알킬술파닐기 {그 사슬형 탄화수소기, 그 카르보시크릴기, 그 헤테로시크릴기, 그 알콕시기, 그 알킬술파닐기는, 1 이상의 치환기를 가지고 있어도 된다}, $SiR^{51}R^{52}R^{53}$, 아미드기, $C(O)R^{61}$, $OC(O)R^{61}$, 수산기, 또는 수소 원자를 나타낸다.)

[0149]

R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , $R^{10'}$, $R^{11'}$, $R^{12'}$, R^{21} , R^{22} , R^{23} , $R^{10''}$, $R^{11''}$, $R^{12''}$, $R^{21'}$, $R^{22'}$, $R^{21''}$, $R^{22''}$, $R^{10'''}$, $R^{11'''}$, $R^{12'''}$, $R^{21'''}$, $R^{22'''}$, $R^{23'''}$ 에 있어서의, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 및 알킬술파닐기가 가지고 있어도 되는 치환기로는, 예를 들어, 할로젠 원자, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 수산기, 아미노기, 알콕시기, 술파닐기, 알킬술파닐기, $SiR^{51}R^{52}R^{53}$, $O(SiR^{51}R^{52}R^{53})$, $C(O)R^{61}$, $OC(O)R^{61}$, 및 $P(O)(OR^{62})_2$ 를 들 수 있다. 여기서, R^{62} 는, 사슬형 탄화수소기를 나타낸다.

[0150]

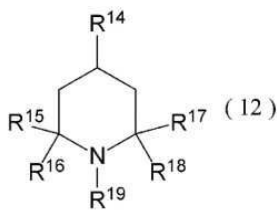
페놀계 산화 방지제로는, 구체적으로는, 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸, 4-sec-부틸-2,6-디-tert-부틸페놀, 6-tert-부틸-2,4-자일레놀, 4,6-디-tert-부틸-m-크레졸, 1,4-디하이드록시벤젠, 2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol, 4,4'-Dihydroxy-3,3',5,5'-tetraisopropylbiphenyl, 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-N'-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanoyl]propanehydrazide, Methyl3-(3,5-Di-tert-butyl-4-

hydroxyphenyl)propionate, 2,2'-Methylenebis(6-tert-butyl-4-ethylphenol), 2,2'-Methylenebis[6-(1-methylcyclohexyl)-p-cresol], 1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione, 2,5-Bis(1,1,3,3-tetramethylbutyl)hydroquinone, 2,5-Di-tert-butylhydroquinone, 4,4'-Butylidenebis(6-tert-butyl-m-cresol), 4-(Hexyloxy)-2,3,6-trimethylphenol, N,N'-(Hexane-1,6-diyl)bis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanamide], 2,2',6,6'-Tetra-tert-butyl-4,4'-dihydroxybiphenyl, 2,5-Di-tert-amylhydroquinone, 2,4-Bis[[dodecylthio)methyl]-6-methylphenol, 4-[[4,6-Bis(n-octylthio)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-2,6-di-tert-butylphenol, Galvinoxyl Free Radical, Pentaerythritol Tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate], Hexadecyl 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzoate, 4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol), 3,3',5,5'-Tetra-tert-butyl-4,4'-stilbenequinone, 2,4,6-Tris(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxybenzyl)mesitylene, 2,6-Di-tert-butyl-4-methoxyphenol, 2,2'-Methylenebis(6-cyclohexyl-p-cresol), [Oxalylbis(azanediy)]bis(ethane-2,1-diyl)Bis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propanoate], 3,6-Dihydroxybenzonorbornane, 2-Methyl-4,6-bis[(n-octylthio)methyl]phenol, 2,6-Di-tert-butylphenol, 2,4,8,10-Tetraoxaspiro[5.5]undecane-3,9-diylbis(2-methylpropane-2,1-diyl)Bis[3-[3-(tert-butyl)-4-hydroxy-5-ethylphenyl]propanoate], Diethyl 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzylphosphonate, 2,4,6-Tris(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,5-triazine, 2-tert-Butyl-6-(3-tert-butyl-2-hydroxy-5-methylbenzyl)-4-methylphenyl Acrylate, Triethylene Glycol Bis[3-(3-tert-butyl-4-hydroxy-5-methylphenyl)propionate], 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionic Acid, Stearyl 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate, 4,6-Di-tert-butylresorcinol, 1,3,5-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 4,4',4''-(1-methylpropanyl-3-ylidene)tris(6-tert-butyl-m-cresol), 6,6'-di-tert-butyl-4,4'-butylidenedi-m-cresol, Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate, Pentaerythritol tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate], 3,9-Bis{2-[3-(3-tert-butyl-4-hydroxy-5-methylphenyl)propionyloxy]-1,1-dimethylethyl}-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane, 또는 1,3,5-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylmethyl)-2,4,6-trimethylbenzene 등을 들 수 있다.

[0151] 힌더드아민계 광 안정제 (HALS) 로는, 예를 들어, 이하의 화합물을 들 수 있지만, 일반적으로 페놀계 산화 방지제로서 사용되는 것이면, 본 실시형태에 사용할 수 있다

[0152] 하기 식 (12) 로 나타내는 화합물.

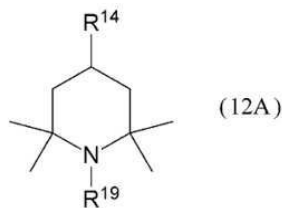
[0153] [화학식 19]



[0154] 식 (12) 에 있어서, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, 및 R¹⁸ 은, 바람직하게는 메틸기이다.

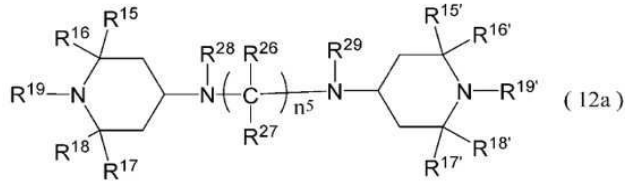
[0156] 식 (12) 에 있어서, R¹⁵, R¹⁶, R¹⁷, 및 R¹⁸ 이 메틸기인 화합물은, 하기 식 (12A) 로 나타낼 수도 있다.

[0157] [화학식 20]



[0158] 하기 식 (12a) 으로 나타내는 화합물.

[0160] [화학식 21]



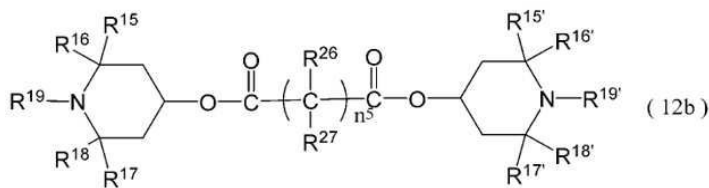
[0161]

[0162] (식 중, R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , 및 R^{19} 의 정의는, 상기 식 (12)에 있어서의 정의와 동일하고, $R^{19'}$ 는, 알킬기, 알콕시기, 산소 프리 라디칼, 수산기, 또는 수소 원자를 나타내고, $R^{15'}$, $R^{16'}$, $R^{17'}$, $R^{18'}$, R^{26} , R^{27} , R^{28} , 및 R^{29} 는, 동일 또는 상이하고, 알킬기 또는 수소 원자를 나타내고, n^5 는 임의의 0 혹은 양의 정수를 나타낸다.)

[0163]

하기 식 (12b)로 나타내는 화합물.

[0164] [화학식 22]



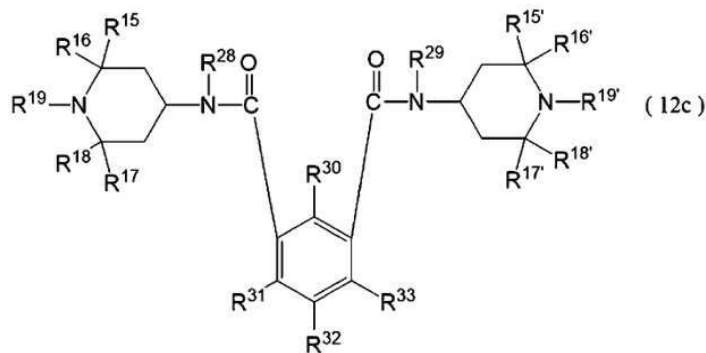
[0165]

[0166] (식 중, 기호의 정의는, 상기 식 (12a)에 있어서의 정의와 동일하다.)

[0167]

하기 식 (12c)로 나타내는 화합물.

[0168] [화학식 23]



[0169]

[0170] (식 중, R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , $R^{15'}$, $R^{16'}$, $R^{17'}$, $R^{18'}$, $R^{19'}$, R^{28} , 및 R^{29} 의 정의는, 상기 식 (12a)에 있어서의 정의와 동일하고, R^{30} , R^{31} , R^{32} , 및 R^{33} 은, 동일 또는 상이하고, 알킬기 또는 수소 원자를 나타낸다.)

[0171]

R^{20} 에 있어서의, 사슬형 탄화수소기, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 알콕시기, 및 알킬술폰과닐기가 가지고 있어도 되는 치환기로는, 예를 들어, 할로젠 원자, 카르보시크릴기, 헤테로시크릴기, 수산기, 아미노기, 알콕시기, 술폰과닐기, 알킬술폰과닐기, $SiR^{54}R^{55}R^{56}$, $O(SiR^{51}R^{52}R^{53})$, $C(O)R^{63}$, $OC(O)R^{63}$, 및 $P(O)(OR^{64})_2$ 를 들 수 있다. 여기서, R^{63} 은, 사슬형 탄화수소기를 나타내고, R^{62} 는, 사슬형 탄화수소기를 나타낸다.

[0172]

R^{15} , R^{16} , R^{17} , R^{18} , R^{19} , $R^{15'}$, $R^{16'}$, $R^{17'}$, $R^{18'}$, R^{26} , R^{27} , R^{28} , 및 R^{29} 에 있어서의 알킬기는, 치환기 (예를 들어, 알킬기, 수산기)를 가지고 있어도 되는 페닐기 등의 치환기를 가지고 있어도 된다.

[0173]

힌더드아민계 광 안정제 (HALS) 로는, 구체적으로는, 세바크산비스(2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜), 메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜, 또는 2,2,6,6-테트라메틸피페리딘1-옥실 프리 라디칼 (TEMPO 프리 라디칼), N,N'-Bis(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)hexane-1,6-diamine, 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl, Bis(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyl-1-oxyl)Sebacate, Bis(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl)Sebacate,

Bis(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyl)Sebacate, 1,2,2,6,6-Pentamethyl-4-piperidyl Methacrylate, N¹,N³-Bis(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)isophthalamide, Bis(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl)Butyl(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)malonate, 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidyl Methacrylate, Tetrakis(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl)butane-1,2,3,4-tetracarboxylate, Tetrakis(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyl)butane-1,2,3,4-tetracarboxylate, 1,2,3,4-Butanetetracarboxylic acid, tetramethyl ester, reaction products with 1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidinol and β,β,β',β'-tetramethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane-3,9-diethanol, 1,2,3,4-Butanetetracarboxylic acid, tetramethyl ester, reaction products with 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinol and β,β,β',β'-tetramethyl-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecane-3,9-diethanol, Bis(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidyl)sebacate, Bis(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyl)sebacate, Bis(1-undecanoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)carbonate, 1,2,2,6,6-Pentamethyl-4-piperidyl methacrylate, 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidyl methacrylate, reaction mass of:2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl hexadecanoate,2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl octadecanoate, 또는 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl hexadecanoate,2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl octadecanoate 등을 들 수 있다.

[0174] 과산화물 분해제로는, 인계 산화 방지제, 또는 황계 산화 방지제를 들 수 있다. 인계 산화 방지제로는, 포스핀 화합물, 또는 포스파이트 화합물 등을 들 수 있고, 구체적으로는, 트리페닐포스핀, 아인산트리페닐, 3,9-Bis(octadecyloxy)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-diphosphaspiro[5.5]undecane, 3,9-Bis(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenoxy)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-diphosphaspiro[5.5]undecane, 2,2'-Methylenebis(4,6-di-tert-butylphenyl)2-ethylhexyl phosphite, Tris(2,4-ditert-butylphenyl)phosphite, Tris(nonylphenyl)phosphite, Tetra-C12-15-alkyl(propane-2,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(phosphite), 2-Ethylhexyl diphenyl phosphite, Isodecyl diphenyl phosphite, 또는 Triisodecyl phosphite 등을 들 수 있다. 황계 산화 방지제로는, 술폰아이드계 화합물 등을 들 수 있고, 구체적으로는, 디옥타데실술폰아이드, 2,2-Bis{[3-(dodecylthio)-1-oxopropoxy]methyl}propane-1,3-diyl bis[3-(dodecylthio)propionate], 또는 Di(tridecyl)3,3'-thiodipropionate 등을 들 수 있다.

[0175] 라디칼 반응 저해제의 사용량은, 통상, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 몰수에 대해, 식 (3) 에 있어서의 R 이 식 (1) 로 나타내는 기인 수를 곱한 몰수 1 몰에 대해, 10 몰 이하, 9 몰 이하, 8 몰 이하, 6 몰 이하, 5 몰 이하, 4 몰 이하, 3 몰 이하, 2 몰 이하, 1.5 몰 이하, 1.3 몰 이하, 또는 1.1 몰 이하이며, 0.001 몰 이상, 0.01 몰 이상, 0.05 몰 이상, 0.1 몰 이상, 또는 0.5 몰 이상이며, 바람직하게는, 0.01 ~ 10 몰, 0.01 ~ 8 몰, 0.05 ~ 8 몰, 0.05 ~ 5 몰, 0.1 ~ 5 몰, 0.1 ~ 4 몰, 0.1 ~ 3 몰, 0.1 ~ 2 몰, 0.1 ~ 1.5 몰, 0.1 ~ 1.3 몰, 0.1 ~ 1.1 몰, 0.5 ~ 5 몰, 0.5 ~ 4 몰, 0.5 ~ 3 몰, 0.5 ~ 2 몰, 0.5 ~ 1.5 몰, 0.5 ~ 1.3 몰, 0.5 ~ 1.2 몰, 또는 0.5 ~ 1.1 몰이다.

[0176] 라디칼 반응 저해제가 힌더드아민계 광 안정제인 경우, 그 사용량은, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머의 몰수에 대해, 식 (3) 에 있어서의 R 이 식 (1) 로 나타내는 기인 수를 곱한 몰수 1 몰에 대해, 바람직하게는, 5 몰 이하, 4 몰 이하, 3 몰 이하, 2 몰 이하, 1.5 몰 이하, 1.3 몰 이하, 또는 1.1 몰 이하이며, 0.001 몰 이상, 0.01 몰 이상, 0.05 몰 이상, 0.1 몰 이상, 또는 0.5 몰 이상이며, 바람직하게는, 0.01 ~ 5 몰, 0.1 ~ 5 몰, 0.1 ~ 4 몰, 0.1 ~ 3 몰, 0.1 ~ 2 몰, 0.1 ~ 1.5 몰, 0.1 ~ 1.3 몰, 0.1 ~ 1.1 몰, 0.5 ~ 5 몰, 0.5 ~ 4 몰, 0.5 ~ 3 몰, 0.5 ~ 2 몰, 0.5 ~ 1.5 몰, 0.5 ~ 1.3 몰, 0.5 ~ 1.2 몰, 또는 0.5 ~ 1.1 몰이다.

[0177] 이 공정에서는, 통상, 반응에 불활성인 유기 용매가 사용되고, 구체적으로는, 예를 들어, 술폰사이드 용매, 니트릴 용매, 에테르 용매, 아마이드 용매, 케톤 용매, 지방족 탄화수소 용매, 에스테르 용매, 방향족 용매, 또는 이들의 2 종류 이상의 혼합 용매를 들 수 있고, 이들 용매 중 술폰사이드 용매가 바람직하다. 술폰사이드 용매로는, 디메틸술폰사이드 등을 들 수 있다. 니트릴 용매로는, 아세토니트릴, 또는 프로피오니트릴 등을 들 수 있다. 에테르 용매로는, 테트라하이드로푸란 등을 들 수 있다. 아마이드 용매로는, N-메틸-2-피롤리돈 등을 들 수 있다. 케톤 용매로는, 아세톤, 또는 메틸에틸케톤 등을 들 수 있다. 지방족 탄화수소 용매로는, 핵산, 또는 헵탄 등을 들 수 있다. 에스테르 용매로는, 아세트산메틸, 또는 아세트산에틸 등을 들 수 있다. 방향족 용매로는, 톨루엔, 또는 피리딘 등을 들 수 있다. 그 중에서도, 디메틸술폰사이드, 또는 디메틸술폰사이드와 아세토니트릴의 혼합 용매가 바람직하다.

[0178] 식 (1) 로 나타내는 보호기를 탈보호하는 공정에서 사용되는 시약인 불화물 이온원은, 용매에 용해 후, 통상,

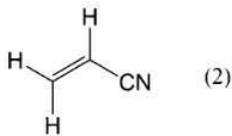
탈수하여 사용한다. 탈수제로서 몰레큘러시브, 또는 황산염 등을 들 수 있고, 바람직하게는 몰레큘러시브 4A 를 사용한다.

[0179] 사용하는 용매의 양은, 통상, 탈보호 공정에 제공되는 핵산 올리고머 1 몰당, 5 ~ 8,000 L, 바람직하게는 50 ~ 2,000 L, 보다 바람직하게는 100 ~ 1,600 L 이다.

[0180] 필요하면, 본 공정에 있어서의 부생성물인 하기 식 (2) 에 나타내는 화합물과 반응하여 당해 화합물을 포착하는 화합물을 첨가할 수 있다. 그 포착하는 화합물로는, 예를 들어, 니트로알칸, 알킬아민, 아미딘, 티올, 티올 유도체 또는 이들의 2 종류 이상의 혼합물을 들 수 있다. 「니트로알칸」으로는, 예를 들어 니트로메탄을 들 수 있다. 「알킬아민」으로는, 예를 들어, 직사슬형의 탄소수 1 ~ 6 의 알킬아민, 및 탄소수 1 ~ 8 의 고리형 아민을 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 메틸아민, 에틸아민, n-프로필아민, n-부틸아민, n-펜틸아민, n-헥실아민, 모르폴린, 또는 피페리딘 등을 들 수 있다. 「아미딘」으로는, 예를 들어, 벤즈아미딘, 또는 포름아미딘 등을 들 수 있다. 「티올」로는, 예를 들어, 직사슬형의 탄소수 1 ~ 6 의 티올을 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 메탄티올, 에탄티올, 1-프로판티올, 1-부탄티올, 1-펜탄티올, 또는 1-헥산티올 등을 들 수 있다. 「티올 유도체」로는, 예를 들어, 동일 또는 상이한 직사슬형의 탄소수 1 ~ 6 의 알킬티올기를 갖는 알코올 또는 에테르 등을 들 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 2-메르캅토에탄올, 4-메르캅토-1-부탄올, 6-메르캅토-1-헥산올, 메르캅토메틸에테르, 2-메르캅토에틸에테르, 3-메르캅토프로필에테르, 4-메르캅토부틸에테르, 5-메르캅토펜틸에테르, 또는 6-메르캅토흥실에테르 등을 들 수 있다. 보다 바람직하게는 니트로메탄을 사용한다.

[0181] 식 (2) :

[0182] [화학식 24]



[0183] 부생성물인 식 (2) 에 나타내는 화합물을 포착하는 화합물의 사용량은, 식 (1) 로 나타내는 수산기의 보호기를 탈보호하는 불화물 이온원에 대해 0.1 ~ 100.0 몰% 로 사용할 수 있고, 바람직하게는 1.0 ~ 50.0 몰%, 보다 바람직하게는 2.0 ~ 40.0 몰% 이다.

[0185] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머와 불화물 이온의 반응은, 불화물 이온을 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 첨가해도 되고, 반대로, 불화물 이온에 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머를 첨가해도 되고, 양자를 동시에 첨가해도 된다. 불화물 이온을 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 첨가하는 방법이 바람직하다.

[0186] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온의 전체량을 첨가하기 위해서 필요로 하는 시간은, 5 분 이상이 바람직하고, 10 분 이상이 보다 바람직하고, 15 분 이상이 보다 바람직하고, 30 분 이상이 보다 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 시간 이상에 걸쳐 적하하는 것이다.

[0187] 이러한 첨가는, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머를 포함하는 용액의 액 표면 또는 액 중에 5 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 바람직하고, 10 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 보다 바람직하고, 15 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 보다 바람직하고, 30 분 이상에 걸쳐 적하하는 것이 보다 바람직하고, 더욱 바람직하게는 1 시간 이상에 걸쳐 적하하는 것이다.

[0188] 라디칼 반응 저해제는, 불화물 이온을 첨가하기 전에, 반응계에 존재하는 것이 바람직하다.

[0189] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 첨가할 때의 양방 또는 편방의 용액의 온도는, 80 ℃ 이하여도 되고, 바람직하게는 양방 모두 40 ℃ 이하이며, 바람직하게는 양방 모두 35 ℃ 이하이며, 보다 바람직하게는 양방 모두 30 ℃ 이하이며, 보다 바람직하게는 양방 모두 25 ℃ 이하이며, 보다 바람직하게는 양방 모두 20 ℃ 이하이며, 보다 바람직하게는 양방 모두 15 ℃ 이하이며, 보다 바람직하게는 양방 모두 10 ℃ 이하이며, 보다 더 바람직하게는 양방 모두 5 ℃ 이하이다.

[0190] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머에 불화물 이온을 첨가 종료 후, 1 분 이상 보온해도 되고, 바람직하게는 5 분 이상 보온이며, 보다 바람직하게는 10 분 이상 보온이며, 보다 바람직하게는 15 분 이상 보온이며, 보다 바람직하게는 30 분 이상 보온이며, 보다 더 바람직하게는 1 시간 이상 보온이다.

[0191] 또한, 보온 후, 승온해도 되고, 5 °C 이상 80 °C 이하로 승온해도 되고, 바람직하게는 10 °C 이상 40 °C 이하로의 승온이고, 바람직하게는 10 °C 이상 35 °C 이하로의 승온이고, 바람직하게는 15 °C 이상 35 °C 이하로의 승온이고, 보다 바람직하게는 20 °C 이상 35 °C 이하로의 승온이고, 더욱 바람직하게는 25 °C 이상 35 °C 이하로의 승온이다.

[0192] 또한 승온 후, 탈보호 반응의 시간은, 사용하는 탈보호제의 종류, 반응 온도에 따라 달라지지만, 통상, 1 시간 ~ 100 시간, 바람직하게는, 1 ~ 24 시간, 보다 바람직하게는 2 ~ 12 시간, 더욱 바람직하게는 3 ~ 6 시간이다.

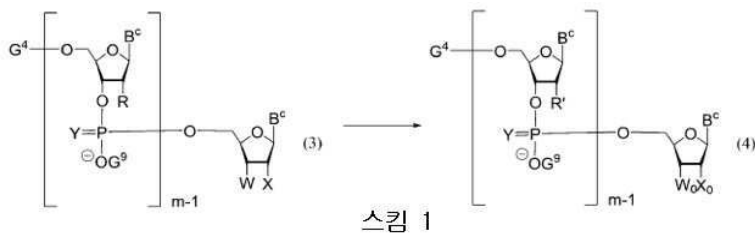
[0193] 또한, 불화물 이온은, 임의의 타이밍에 추가해도 된다.

[0194] 보호기의 탈보호 반응시에 반응계의 교반은 필수는 아니지만, 통상, 교반 동력 P_v 가 0.0 ~ 0.5 kW/m³ 인 범위에서 교반을 실시하고, P_v 가 0.1 ~ 0.3 kW/m³ 인 교반이 바람직하다.

[0195] 반응에 의해 생성된 핵산 올리고머의 반응 혼합물로부터의 분리 정제 수단은, 통상적인 방법이 채용되고, 예를 들어, 추출, 농축, 중화, 여과, 원심 분리, 재결정, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피, 역상 칼럼 크로마토그래피, 이온 교환 칼럼 크로마토그래피, 겔 여과 칼럼 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 친수성 상호 작용 액체 크로마토그래피, 어피니티 크로마토그래피, 침전 (예를 들어, 에탄올, 이소프로판올, 메탄올 혹은 폴리에틸렌글리콜을 사용한 핵산 올리고머의 침전), 투석, 또는 한외 여과 등의 수단을 사용함으로써, 정제된 핵산 올리고머를 분리할 수 있다. 분리된 핵산 올리고머는, 통상, 그 5' 말단의 수산기가 보호된 핵산 올리고머로서 얻어진다.

[0196] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머로부터 식 (1) 로 나타내는 보호기를 탈보호함으로써 하기 식 (4) 로 나타내는 핵산 올리고머를 얻는 반응은, 이하와 같다. (스킴 1).

[0197] [화학식 25]



[0198]

[0199] 여기서, 식 중의 G^4 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고,

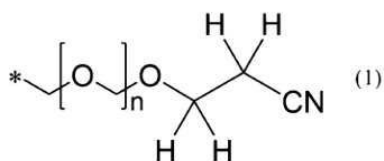
[0200] G^9 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타내고,

[0201] B^c 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 핵산염기를 나타내고,

[0202] R 은, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 불소 원자 또는 OQ 기를 나타내고,

[0203] Q 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 메틸렌기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸렌기, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸리덴기, 또는 하기 식 (1) :

[0204] [화학식 26]



[0205]

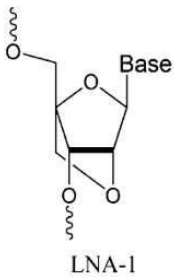
[0206] (식 중,

[0207] * 표시가 붙은 결합은, OQ 기의 산소 원자와의 결합인 것을 나타내고,

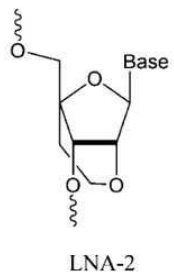
- [0208] n 은 0 이상의 어느 정수를 나타낸다.)
- [0209] 의 보호기를 나타내고,
- [0210] Y 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이하고, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0211] m 은, 2 이상 200 까지의 어느 정수를 나타내고,
- [0212] W 및 X 는, 하기 (a) 또는 (b) 중 어느 것으로 정의되고,
- [0213] (a) W 가 수산기일 때에는, X 는 상기 R 기와 동일한 정의이다.
- [0214] (b) X 가 수산기일 때에는, W 는 OV 기를 나타내고,
- [0215] V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

- [0216] 단, 상기 R, W 및 X 중 적어도 하나의 기는, 상기 식 (1) 의 보호기로 보호된 수산기를 나타낸다. 그리고
- [0217] m 이 3 이상의 정수일 때, 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 각각의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드의 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : $m-1 > p$ 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 비뉴클레오티드 링 커가 삽입되어 있어도 되는 핵산 올리고머이다.)
- [0218] 식 (3) 또는 식 (4) 에 있어서, R 이, OQ 기를 나타내고, R' 가, OQ' 기를 나타낼 때, 리보스의 구조는, 하기 식 (LNA-1), (LNA-2) 또는 (LNA-3) 으로 나타낸다.

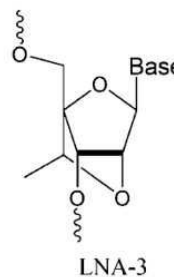
[0219] [화학식 27]



[0220] [화학식 28]



[0221] [화학식 29]

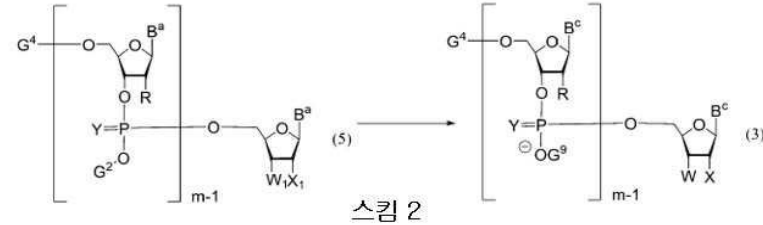


- [0224] (식 중, Base 는, 핵산염기를 나타낸다)
- [0225] 본 실시형태에서 사용되는 핵산 올리고머 내에 포함되는 뉴클레오시드 (리보스, 및 데옥시리보스) 로는, DNA,

RNA, 2'-O-MOE(2'-O-메톡시에틸), 2'-O-Me, 2'-F RNA, 또는 상기 LNA 가 예시되지만, 상기 뉴클레오시드는, 이들로 한정되지 않는다.

[0227] 식 (3) 으로 나타내는 핵산 올리고머는, 예를 들어, 하기 스킴 2 에 나타내는 바와 같이, 식 (5) 로 나타내는 고상 합성에 의해 제조되는 핵산 올리고머를 고상 담체로부터 잘라내어 얻어진다.

[0228] [화학식 30]



[0229]

[0230] 고상 담체 상에서 합성되는 식 (5) 의 핵산 올리고머에 대해 설명한다.

[0231] 치환기 B^a 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타낸다.

[0232] G⁴ 및 Y 는, 상기 식 (3) 에 있어서 정의된 바와 같고,

[0233] G² 는, 각각 독립적으로 동일 또는 상이한 인산의 보호기를 나타내고,

[0234] X₁ 이 OZ 를 나타낼 때, W₁ 은 OV 기를 나타내고,

[0235] V 는, tert-부틸디메틸실릴기, 또는 상기 식 (1) 의 기를 나타낸다.

[0236] X₁ 이 R 기를 나타낼 때, W₁ 은 OZ 로 나타내는 기를 나타내고,

[0237] Z 는, 고상 담체, 및 고상 담체와 핵산 올리고머의 3' 말단의 리보스의 2' 위치 혹은 3' 위치의 수산기의 산소 원자를 잇는 연결부로 이루어지는 기를 나타낸다.

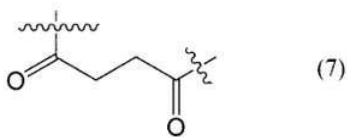
[0238] 보다 구체적으로는, Z 는, 하기 식 (6) 으로 모식적으로 나타내는 구조를 나타낸다.

[0239] -[Sp]-[Linker]-[Solid Support] ··· (6)

[0240] 여기서, 식 (6) 에 있어서, Sp 는, 스페이서를 나타낸다.

[0241] 스페이서 (Sp) 는, 예를 들어, 하기 식 (7) 에 나타내는 구조식을 갖는 것이 예시된다.

[0242] [화학식 31]

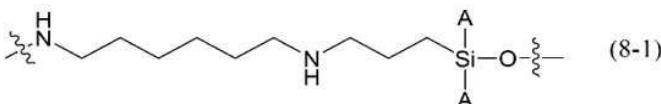


[0243]

[0244] Linker 는, 링커 (접합 구조) 가 되는 구조를 나타낸다. Linker 의 구조는, 예를 들어, 하기 식 (8-1) (8-2) (8-3) (8-4) (8-5) (8-6) (8-7) 또는 (8-8) 에 나타내는 구조여도 된다.

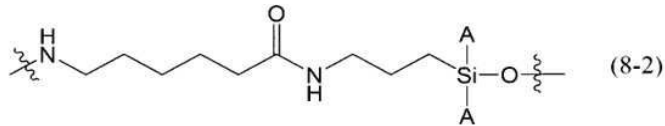
[0245] Solid support 는, 고체의 담체가 되는 구조를 나타낸다. Solid support 로는, 무기 다공질 담체나 유기계 수지 담체 등을 들 수 있다. 무기 다공질 담체에는, 예를 들어, Controlled pore Glass (CPG) 및 제올라이트를 들 수 있다. 유기계 수지 담체에는, 예를 들어, 폴리스티렌으로 이루어지는 담체를 들 수 있다.

[0246] [화학식 32]



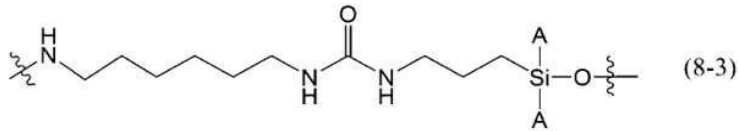
[0247]

[0248] [화학식 33]



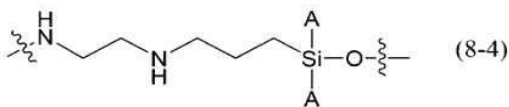
[0249]

[0250] [화학식 34]



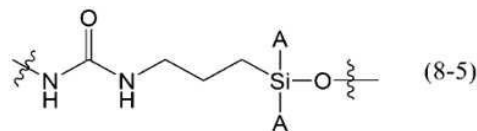
[0251]

[0252] [화학식 35]



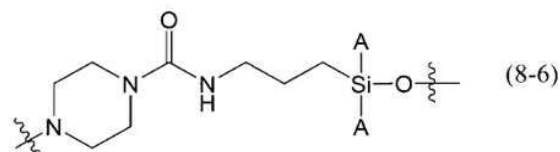
[0253]

[0254] [화학식 36]



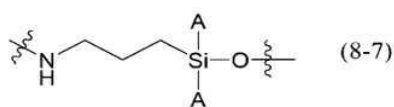
[0255]

[0256] [화학식 37]



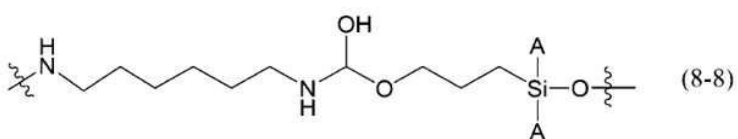
[0257]

[0258] [화학식 38]



[0259]

[0260] [화학식 39]



[0261]

[0262] (식 중, A 는, 각각 독립적으로 수산기, 알콕시기, 또는 알킬기여도 된다. 알콕시기로는 예를 들어 메톡시기 및 에톡시기를 들 수 있다. 알킬기로는 예를 들어 메틸기, 에틸기, 이소프로필기, n-프로필기를 들 수 있다. Si 는, 담체 표면의 수산기의 산소와 결합되어 있는 것을 나타낸다.)

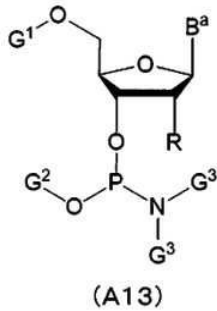
[0263] G⁴ 는, 수소 원자 또는 수산기의 보호기를 나타내고, 보호기를 나타내는 경우에는 G¹ 과 동일한 보호기를 나타낸다. G⁴ 는 탈보호된 경우에는 수소 원자이지만, 그 경우의 뉴클레오타이드 화합물도 역시, 일련의 핵산 신장 반응의 공정에 제공된다.

[0264] G⁹ 는, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 알칼리 금속 이온, 수소 이온 또는 하이드록시알킬암모늄 이온 등을 나타낸다. 알킬암모늄 이온으로서, 구체적인 알킬 부분의 예로는, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 디부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 또는 헥실 등을 들 수 있지만, 보다 구체적으로

는, 예를 들어, 디에틸암모늄 이온, 트리에틸암모늄 이온, 테트라부틸암모늄 이온, 헥실암모늄 이온, 또는 디부틸암모늄 이온 등을 들 수 있다. 또, 알칼리 금속 이온으로는, 예를 들어, 나트륨 이온, 또는 리튬 이온 등을 들 수 있다. 또, 하이드록시알킬암모늄 이온으로서, 구체적인 하이드록시알킬 부분의 예로는, 예를 들어, 하이드록시메틸, 하이드록시에틸, 하이드록시-n-프로필, 하이드록시이소프로필, 하이드록시-n-부틸, 또는 트리스하이드록시메틸 등을 들 수 있지만, 보다 구체적인 하이드록시알킬암모늄 이온의 예로는, 트리스하이드록시메틸암모늄 이온 등을 들 수 있다.

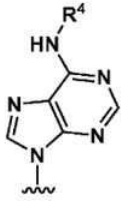
[0265] 상기 식 (5) 의 화합물은, 예를 들어, 하기 식 (A13) 의 아미다이트 화합물을 사용하여 아미다이트법에 의해 제조된다.

[0266] [화학식 40]



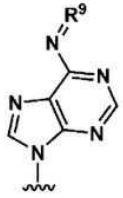
- [0267] (식 중,
- [0268] R 은, 수소 원자, 불소 원자, 또는 OQ 기를 나타내고,
- [0269] Q 는, tert-부틸디메틸실릴기, 메틸기, 2-메톡시에틸기, 4' 의 탄소 원자와 결합한 메틸렌기, 4' 의 탄소 원자와 결합한 에틸렌기, 4' 의 탄소 원자와 결합한 에틸리렌기, 또는 상기 식 (1) 로 나타내는 보호기를 나타내고,
- [0270] B^a 는, 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타내고,
- [0271] G¹ 은, 수산기의 보호기를 나타내고,
- [0272] G² 는, 인산의 보호기를 나타내고,
- [0273] G³ 은, 알킬기, 또는 서로 그 말단에서 결합하여 고리형 구조를 나타낸다.)
- [0274] B^a 는, B^c 로 나타내는 핵산염기 또는 당해 핵산염기가 보호기로 보호된 핵산염기를 나타낸다.
- [0275] B^a 에 있어서의 핵산염기는, 특별히 한정되지 않는다. 당해 핵산염기로는, 아데닌, 사이토신, 구아닌, 우라실, 티민, 5-메틸사이토신, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실 등을 들 수 있다. 또, 핵산염기는, 치환기에 의해 치환되어 있어도 된다. 그러한 치환기로는, 예를 들어, 플루오로기, 클로로기, 브로모기, 혹은 요오드기 등의 할로겐 원자, 아세틸기 등의 아실기, 메틸기, 혹은 에틸기 등의 알킬기, 벤질기 등의 아릴알킬기, 메톡시기 등의 알콕시기, 메톡시에틸기 등의 알콕시알킬기, 시아노에틸기 등의 시아노알킬기, 하이드록시기, 하이드록시알킬기, 아실옥시메틸기, 아미노기, 모노알킬아미노기, 디알킬아미노기, 카르복시기, 시아노기, 또는 니트로기 등, 그리고 그들의 2 종류 이상의 치환기의 조합을 들 수 있다.
- [0276] 핵산염기가 고리 밖에 아미노기를 갖는 경우, 당해 아미노기의 보호기로는, 특별히 한정되지 않고, 공지된 핵산 화학에서 사용되는 보호기를 사용할 수 있고, 그러한 보호기로는, 예를 들어, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기, 아세틸기, 프로피오닐기, 부티릴기, 이소부티릴기, 페닐아세틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 또는 (디메틸아미노)메틸렌기 등, 그리고 그들의 2 종류 이상의 보호기의 조합을 들 수 있다.
- [0277] B^a 는, 보다 구체적으로는,

[0279] [화학식 41]



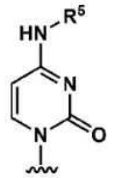
[0280]

[0281] [화학식 42]



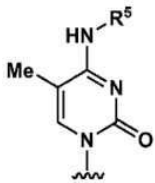
[0282]

[0283] [화학식 43]



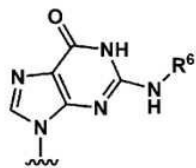
[0284]

[0285] [화학식 44]



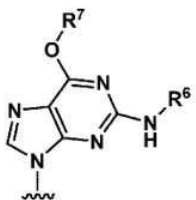
[0286]

[0287] [화학식 45]



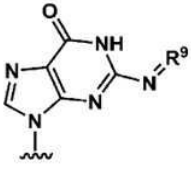
[0288]

[0289] [화학식 46]



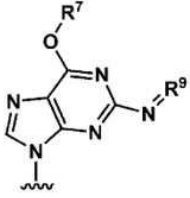
[0290]

[0291] [화학식 47]



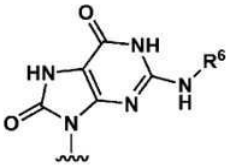
[0292]

[0293] [화학식 48]



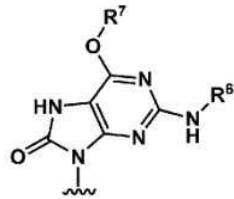
[0294]

[0295] [화학식 49]



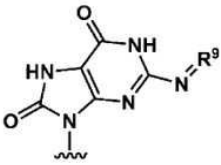
[0296]

[0297] [화학식 50]



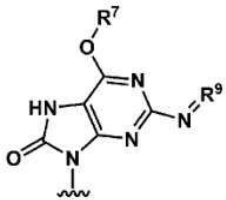
[0298]

[0299] [화학식 51]



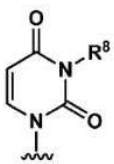
[0300]

[0301] [화학식 52]



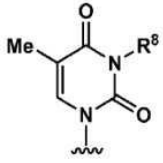
[0302]

[0303] [화학식 53]



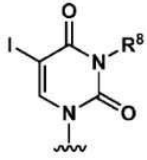
[0304]

[0305] [화학식 54]



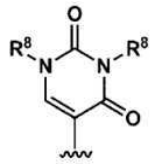
[0306]

[0307] [화학식 55]



[0308]

[0309] [화학식 56]



[0310]

[0311] (상기 식 중,

[0312] R^4 는, 수소 원자, 메틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0313] R^5 는, 수소 원자, 아세틸기, 이소부틸릴기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0314] R^6 은, 수소 원자, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 이소부틸릴기를 나타내고,

[0315] R^7 은, 2-시아노에틸기를 나타내고,

[0316] R^8 은, 수소 원자, 메틸기, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기 또는 4-메틸벤조일기를 나타내고,

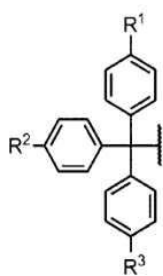
[0317] R^9 는, 디메틸아미노메틸렌기를 나타낸다.)

[0318] 중 어느 것으로 나타내는 기를 나타낸다.

[0319] G^1 로는, 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별한 제한 없이 사용할 수 있고, 아미다이트 화합물에서 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다.

[0320] G^1 로는, 바람직하게는, 이하의 기이다.

[0321] [화학식 57]



[0322]

[0323] (식 중, R^1 , R^2 및 R^3 은 동일 또는 상이하고 수소 또는 알콕시기를 나타낸다.)

[0324] R^1 , R^2 및 R^3 은, 1 개가 수소이고, 나머지의 2 개가 동일 또는 상이한 (동일한 것이 바람직하다) 알콕시기인 것이 바람직하고, 알콕시기로는 메톡시기가 특히 바람직하다.

[0325] G^2 로는, 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별한 제한 없이 사용할 수 있고, 아마다이트 화합물에서 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다. G^2 로는, 예를 들어, 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 시클로알킬기, 할로알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아릴알킬기, 시클로알케닐기, 시클로알킬알킬기, 시크릴알킬기, 하이드록시알킬기, 아미노알킬기, 알콕시알킬기, 헤테로시크릴알케닐기, 헤테로시크릴알킬기, 헤테로아릴알킬기, 실릴기, 실릴옥시알킬기, 모노, 디알킬실릴기 혹은 트리알킬실릴기, 또는, 모노알킬실릴옥시알킬기, 디알킬실릴옥시알킬기 혹은 트리알킬실릴옥시알킬기 등을 들 수 있고, 이들은 1 개 이상의 전자 구인기로 치환되어 있어도 된다.

[0326] G^2 는, 바람직하게는, 전자 구인기로 치환된 알킬기이다. 당해 전자 구인기로는, 예를 들어, 시아노기, 니트로기, 알킬술폰닐기, 할로겐 원자, 아릴술폰닐기, 트리할로메틸기, 또는 트리알킬아미노기 등을 들 수 있고, 바람직하게는 시아노기이다.

[0327] G^2 로는, 특히 바람직한 것은, 이하의 기이다.

[0328] [화학식 58]

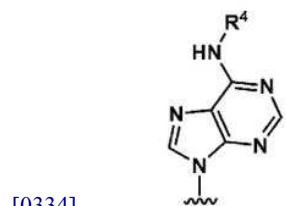


[0330] G^3 은, 2 개의 G^3 이 서로 결합하여 고리형 구조를 형성하고 있어도 된다. G^3 으로는, 양방이 이소프로필기인 것이 바람직하다.

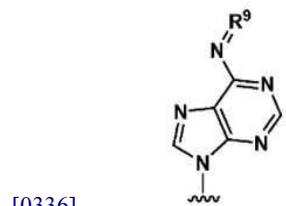
[0331] 상기 R^1 , R^2 , R^3 및 G^2 의 정의에 있어서의 알킬기는, 직사슬형 또는 분기 사슬형 중 어느 것이어도 되고, 바람직하게는 탄소수 1 ~ 12 의 알킬기, 보다 바람직하게는 탄소수 1 ~ 6 의 알킬기이다. 구체적인 알킬기의 예로는, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 또는 헥실 등을 들 수 있다. 상기 정의에 있어서의 알콕시기를 구성하는 알킬기 부분은, 여기서의 알킬기의 정의와 동일한 정의를 갖는다.

[0332] 본 명세서에 있어서는, 핵산염기란, 천연형 혹은 비천연형의 핵산염기 골격을 갖는 기를 의미한다. 상기 핵산염기는, 천연형 혹은 비천연형의 핵산염기 골격이 수식된 수식체도 포함한다. B^C 로 나타내는 핵산염기로는, 보다 구체적으로는, 이하의 구조가 예시된다.

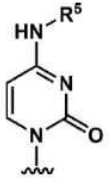
[0333] [화학식 59]



[0335] [화학식 60]

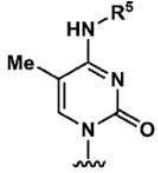


[0337] [화학식 61]



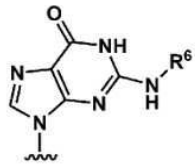
[0338]

[0339] [화학식 62]



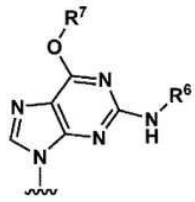
[0340]

[0341] [화학식 63]



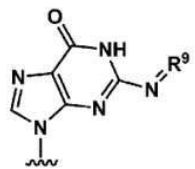
[0342]

[0343] [화학식 64]



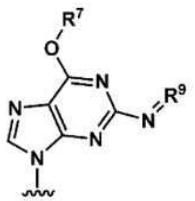
[0344]

[0345] [화학식 65]



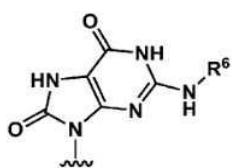
[0346]

[0347] [화학식 66]



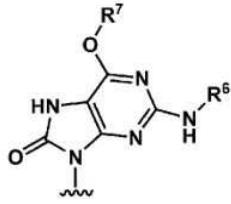
[0348]

[0349] [화학식 67]



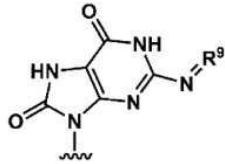
[0350]

[0351] [화학식 68]



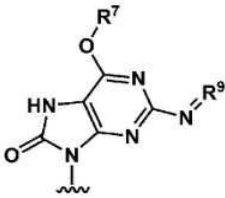
[0352]

[0353] [화학식 69]



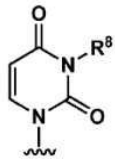
[0354]

[0355] [화학식 70]



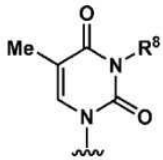
[0356]

[0357] [화학식 71]



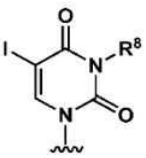
[0358]

[0359] [화학식 72]



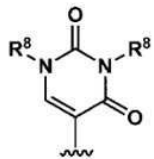
[0360]

[0361] [화학식 73]



[0362]

[0363] [화학식 74]



[0364]

[0365] (상기 식 중,

[0366] R^{4'} 는, 수소 원자, 또는 메틸기를 나타내고,

[0367] R^{5'} 는, 수소 원자, 또는 아세틸기를 나타내고,

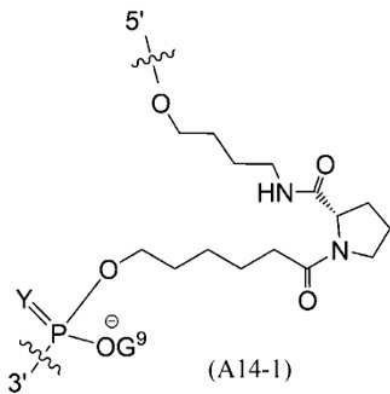
[0368] R^{6'} 는, 수소 원자를 나타내고,

[0369] R^{8'} 는, 수소 원자, 메틸기를 나타낸다.)

[0370] 식 (3) 및 식 (4) 의 핵산 올리고머의 5' 말단과 3' 말단의 뉴클레오티드의 사이의 p 개 (단, p 는, 식 : m-1 > p 를 만족하는 양의 정수이다.) 의 뉴클레오티드 대신에, 도입될 수 있는 비뉴클레오티드 링커에 대해 설명한다.

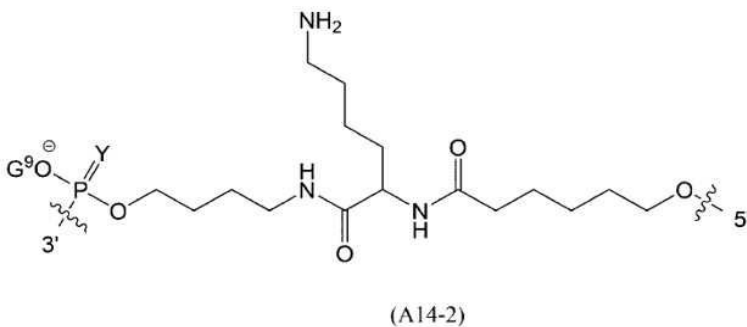
[0371] 비뉴클레오티드 링커로는, 아미노산 골격으로 이루어지는 링커 (예를 들어, 일본 특허공보 제5157168호 또는 일본 특허공보 제5554881호에 기재된 아미노산 골격으로 이루어지는 링커) 가 예시된다. 구체적으로는, 비한정적인 예로서 예를 들어, 하기 식 (A14-1), (A14-2) 또는 (14-3) (예를 들어, 일본 특허공보 제5555346호 또는 일본 특허공보 제5876890호에 기재) 으로 나타내는 링커가 예시된다. 이들 링커 이외에 국제 공개공보 제2012/005368호, 국제 공개공보 제2018/182008호 또는 국제 공개공보 제2019/074110호에 기재된 링커가 예시된다.

[0372] [화학식 75]



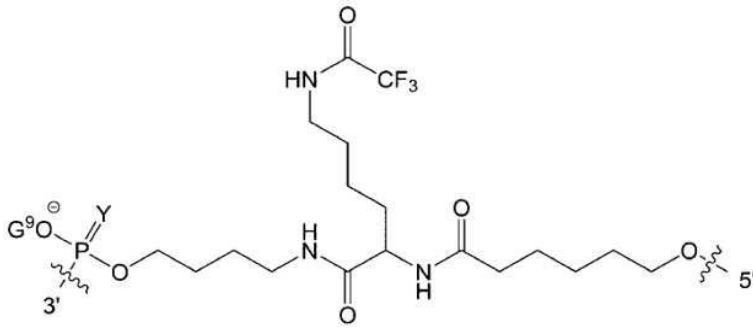
[0373]

[0374] [화학식 76]



[0375]

[0376] [화학식 77]



(A14-3)

[0377]

[0378]

식 (3) 에 있어서의 R 기 및 식 (4) 에 있어서의 R' 기가, 수산기 이외의 치환기인 뉴클레오티드 및 아미다이트는, 일본 특허공보 제3745226호 등에 기재된 공지된 방법, 국제 공개공보 제2001/053528호 혹은 일본 공개특허 공보 2014-221817호 및 거기에 인용되는 공지된 방법으로 합성되는 뉴클레오시드로부터 제조할 수도 있고, 나아가서는, 시판품으로서 입수 가능한 것을 사용하여, 후술하는 실시예에 기재된 방법에 준거하여 또는 이들 방법에 적절히 변경을 가한 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0379]

핵산 올리고머 (이하, 올리고뉴클레오티드라고도 기재한다) 의 고상 담체로부터의 절출

[0380]

절출 공정은, 원하는 사슬 길이의 핵산 올리고머를, 절출제로서 농암모니아수를 사용하여 실시하였다.

[0381]

포스포르아미다이트법에서는, 일반적으로 공지된 방법 (예를 들어, 상기 일본 특허공보 제5157168호 또는 일본 특허공보 제5554881호에 기재된 방법) 에 따라서, 탈보호 공정, 축합 공정, 및 산화 공정의 각 공정을 반복하여 실시함으로써, 핵산 신장 반응을 실시한다.

[0382]

(핵산 신장 반응)

[0383]

본 명세서에 있어서, 「핵산 신장 반응」 이란, 포스포디에스테르 결합을 개재하여, 뉴클레오티드를 순차 결합시킴으로써, 올리고뉴클레오티드를 신장시키는 반응을 의미한다. 핵산 신장 반응은, 일반적인 포스포르아미다이트법의 순서에 따라 실시할 수 있다. 핵산 신장 반응은, 포스포르아미다이트법을 채용하는 핵산 자동 합성 장치 등을 사용하여 실시해도 된다.

[0384]

핵산 올리고머의 사슬 길이는, 예를 들어, 2 ~ 200 mer 나 10 ~ 150 mer, 15 ~ 110 mer 이어도 된다.

[0385]

5' 탈보호 공정은, 고상 담체 상에 담지되는 RNA 사슬 말단의 5' 하이드록실기의 보호기를 탈보호하는 공정이다. 일반적인 보호기로는, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기) 나 4-모노메톡시트리틸기, 4,4',4"-트리메톡시트리틸기가 사용된다. 탈보호는, 산을 사용하여 실시할 수 있다. 탈보호용의 산으로는, 예를 들어, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리클로로아세트산, 메탄술폰산, 염산, 아세트산, 또는 p-톨루엔술폰산 등을 들 수 있다.

[0386]

축합 공정은, 상기 탈보호 공정에 의해 탈보호한 올리고뉴클레오티드 사슬 말단의 5' 하이드록실기에 대해, 식 (A13) 으로 나타내는 뉴클레오시드 포스포르아미다이트를 결합시키는 반응이다. 또한, 핵산 신장에 사용하는 포스포르아미다이트로는, 식 (A13) 또는 (A12) 로 나타내는 아미다이트 화합물을 사용한다. 또, 그 밖에 사용 가능한 포스포르아미다이트로서, 2'-OMe, 2'-F, 2'-O-tert-부틸디메틸실릴기, 2'-O-메톡시에틸기, 2'-H, 2'-플루오로-2'-데옥시-β-D-아라비노푸라노실 등을 들 수 있다. 상기 뉴클레오시드 포스포르아미다이트로는, 5' 하이드록실기가 보호기 (예, DMTr 기) 로 보호된 것을 사용한다. 축합 공정은, 상기 뉴클레오시드 포스포르아미다이트를 활성화하는 활성화제를 사용하여 실시할 수 있다. 활성화제로는, 예를 들어, 5-(벤질티오)-1H-테트라졸 (BTT), 1H-테트라졸, 4,5-디시아노이미다졸 (DCI), 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (ETT), N-메틸벤즈이미다졸륨트리플레이트 (N-MeBIT), 벤즈이미다졸륨트리플레이트 (BIT), N-페닐이미다졸륨트리플레이트 (N-PhIMT), 이미다졸륨트리플레이트 (IMT), 5-니트로벤즈이미다졸륨트리플레이트 (NBT), 또는 1-하이드록시벤조트리아졸 (HOBT) 또는 5-(비스-3,5-트리플루오로메틸페닐)-1H-테트라졸 등을 들 수 있다.

[0387]

축합 공정의 후에는, 적절히, 미반응의 5' 하이드록실기를 캐핑해도 된다. 캐핑은, 무수 아세트산-테트라하이드로푸란 용액, 페녹시아세트산 무수물/N-메틸이미다졸 용액 등의 공지된 캐핑 용액을 사용하여 실시할 수 있

다.

- [0388] 산화 공정은, 상기 촉합 공정에 의해 형성된 아인산기를 인산기 또는 티오인산기로 변환하는 공정이다. 본 공정은, 3 개의 인으로부터 5 개의 인으로 산화제를 사용하여 변환하는 반응이며, 고상 담체에 담지되어 있는 올리고 핵산 유도체에 산화제를 작용시킴으로써 실시할 수 있다.
- [0389] 아인산기를 인산기로 변환하는 경우에는, 「산화제」로서, 예를 들어, 요오드, 혹은 tert-부틸하이드로퍼옥사이드나 과산화수소 등의 과산, 혹은 (1S)-(+)-(10-camphorsulfonyl)-oxaziridine (CSO), 또는 이들의 2 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.005 ~ 2 M 의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용할 수 있다. 반응에 사용하는 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 피리딘, THF, 물, 아세토니트릴 또는 이들의 2 이상의 임의의 혼합 용매를 들 수 있다. 예를 들어, 요오드/물/피리딘/아세토니트릴, 혹은 요오드/물/피리딘, 혹은 요오드/물/피리딘/아세토니트릴/NMI, 혹은 요오드/물/피리딘/THF, 혹은 요오드/물/피리딘/THF/NMI, 혹은 CSO/아세토니트릴, 혹은 요오드/피리딘-아세트산이나 과산(tert-부틸하이드로퍼옥사이드/메틸렌클로라이드) 를 사용할 수 있다.
- [0390] 아인산트리에스테르기를 티오인산기로 변환하는 경우에는, 「산화제」로서, 예를 들어, 황, 3H-1,2-벤조디티올-3-온-1,1-디옥사이드 (Beaucage 시약), 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온 (ADTT), 5-페닐-3H-1,2,4-디티아졸-3-온 (POS), [(N,N-디메틸아미노메틸리덴)아미노]-3H-1,2,4-디티아졸린-3-티온 (DDTT), 또는 페닐아세틸디술파이드 (PADS) 등을 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.01 ~ 2 M 의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용할 수 있다. 반응에 사용하는 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 피리딘 또는 이들의 임의의 혼합 용매를 들 수 있다. 산화 공정은, 상기 캐핑 조작의 후에 실시해도 되고, 반대로, 산화 공정의 후에 캐핑 조작을 실시해도 되고, 이 순서는 한정되지 않는다.
- [0391] 인산 보호기를 탈보호하는 공정은, 원하는 서열을 갖는 핵산의 합성이 완료된 후에는, 인산 부분의 보호기를 탈보호하기 위해서 아민류를 작용시킨다. 아민류로는, 예를 들어, 일본 특허공보 제4705716호에 기재되는 디에틸아민 등을 들 수 있다.
- [0392] 신장의 마지막에 도입한 뉴클레오시드의 5' 하이드록실기의 보호기는, 후술하는 고상 담체로부터의 절출 및 보호기의 탈보호의 후에, 5' 보호기를 태그로 하는 칼럼 정제를 위해서 사용해도 되고, 칼럼 정제 후에, 5' 하이드록실기의 보호기를 탈보호해도 된다.
- [0393] 또한 암모니아수 또는 아민류 등을 사용하여, 예를 들어, 상기 스킴 2 로 나타내는 바와 같이 고상 담체로부터 올리고뉴클레오티드 사슬을 절단하여 회수한다. 아민류로는, 예를 들어, 메틸아민, 에틸아민, 프로필아민, 이소프로필아민, 에틸렌디아민, 또는 디에틸아민 등을 들 수 있다.
- [0394] 본 실시형태의 제조 방법을 이용하여 제조 가능한 핵산 올리고머로는, 핵산 올리고머 내에 포함되는 뉴클레오시드가, RNA, DNA, 그리고 2'-O-MOE, 2'-O-Me, 2'-F 를 갖는 RNA, 또는 LNA 인 핵산 올리고머를 들 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0395] 예를 들어, Xiulong, Shen 등 저, Nucleic Acids Research, 2018, Vol. 46, No. 46, 1584-1600, 또는 Daniel O'Reilly 등 저, Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 2, 546-558 에 기재된, 여러 가지 뉴클레오시드의 예를 들 수 있다.
- [0396] 본 실시형태의 제조 방법에 있어서 사용 가능한 핵산 올리고머의 전형적인 예를, 실시예에 기재된 예에 더해 하기 예를 나타내지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0397] 이하, 서열의 설명 중, U 는 우리딘을, C 는 시티딘을, A 는 아데노신을, G 는 구아노신을 나타낸다.
- [0398] 국제 공개 제2019/060442호에 기재되어 있는, 하기 서열 (B) 및 (C) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.
- [0399] 서열 (B) : 5'-AUGGAAUmACUCUUGGUUmCdTdT-3' (Antisense) (서열 번호 3) 21 mer
- [0400] 서열 (C) : 5'-GUmAACmCmAAGAGUmAUmUmCmCmAUmdTdT-3' (Sense) (서열 번호 4) 21 mer
- [0401] 서열 (B) 및 (C) 중, Um 은 2'-O-메틸우리딘을, Cm 은 2'-O-메틸시티딘을, 또 dT 는 티미딘을 나타낸다.
- [0402] Daniel O'Reilly 등 저, Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 2, 546-558 에 기재되어 있는 핵산 올리고머 (553 페이지 참조) 를 들 수 있다. 전형예로서, 하기 서열 (D) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.
- [0403] 서열 (D) : 5'-AGAGCCAGCCUUCUUAUUGUUUAGAGCUAUGCUGU-3' (서열 번호 5) 36 mer

- [0404] 일본 특허공보 제4965745호에 기재되어 있는 핵산 올리고머를 들 수 있다. 전형예로서, 하기 서열 (E) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.
- [0405] 서열 (E) : 5'-CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-P-GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU-3' 49 mer. 이 서열은 CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC (서열 번호 6), GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU (서열 번호 7) 로 이루어진다.
- [0406] 서열 (E) 중, "P" 는, 이하의 식 (A5) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다.
- [0407] Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 2 : 547 에 기재되어 있는, 하기 서열 (F) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.
- [0408] 서열 (F) : 5'-ACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCGUGUCU-3' (서열 번호 8) 67 mer
- [0409] JP 2015-523856, 173 페이지에 기재되어 있는, 하기 서열 (G) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.
- [0410] 서열 (G) : 5'-GUUUCCCUUUUCAAGAAAUCUCCUGGGCACCUAUCUUCUAGGUGCCUCCUUGUUUAAACCUGACCAGUUAACCGGCGUUAGGUUUUU-3' (서열 번호 9) 94 mer
- [0411] JP 2017-537626 에 기재되어 있는 핵산 올리고머를 들 수 있다. 전형예로서 하기 서열 (H), (J), (K), (L) 를 갖는 핵산 올리고머를 들 수 있다.
- [0412] 서열 (H) : 5'-AGUCCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCGUGUCUUU-3' (서열 번호 10) 100 mer 서열 (J) : 5'-GCAGAUAGUGUUUCCACAGUUUAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCGUGUCUUUUUU-3' (서열 번호 11) 113 mer
- [0413] 서열 (K) : 5'-dAdGdTdCdCdTdTdCdTdTdCdCdTdTdCdAdAdGdCGUUUAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCGUGUCUUUUUU-3' (서열 번호 12) 113 mer
- [0414] 서열 (K) 중, dT는 티미딘을, dC 는 2'-데옥시시티딘을, dA 는 2'-데옥시아데노신을, 또 dG 는 2'-데옥시구아노신을 나타낸다.
- [0415] 서열 (L) : 5'-AmsGmsUmsCCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGGGCACCGAGUCGUGUCUUUmsUmsU-3' (서열 번호 13) 113 mer
- [0416] 서열 (L) 중, Um 은 2'-O-메틸우리딘을, Am 은 2'-O-메틸아데노신을, Gm 은 2'-O-메틸구아노신을, 또는 포스포로티오에이트 수식을 나타낸다.
- [0417] 실시예
- [0418] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들 예로 한정되는 것은 아니다.
- [0419] (측정 방법)
- [0420] 이하의 시험에서 사용한 각 측정 방법을 이하에 나타낸다.
- [0421] (측정 방법 1 : 올리고뉴클레오티드의 순도의 측정 방법)
- [0422] 고상 합성 후의 올리고뉴클레오티드 미정제 생성물의 순도의 측정은, HPLC 에 의해 실시하였다. 미정제 생성물을 HPLC (과장 : 260 nm, 칼럼 : ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm (Waters 제조)) 에 의해 각 성분으로 분리하고, 얻어진 크로마토그램의 총면적치에 있어서의 주생성물의 면적치로부터 올리고뉴클레오티드의 순도를 산출하였다.
- [0423] HPLC 측정 조건을 하기 표 1 에 나타낸다.

표 1

칼럼	ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 2.1mm×100mm, 1.7 μm (Waters 제조)
유속	0.2mL/min
검출 파장	260nm
이동상 A	물 458.3g과 아세트산 15.0g 및 핵실아민 25.3g을 혼합한 용액 100mL 와 물 400mL 를 혼합한 용액
이동상 B	물 458.3g과 아세트산 15.0g 및 핵실아민 25.3g을 혼합한 용액 100mL 와 아세토니트릴 400mL 를 혼합한 용액
그라디언트 조건	B conc. :43%(0min)-56%(70min)-90%(70.01min)-90%(75min)-43%(75.01min)-43%(90min)
칼럼 온도	80°C

[0424]

[0425]

(측정 방법 2 : 올리고뉴클레오티드 수량의 측정)

[0426]

상기 미정제 생성물의 OD₂₆₀ 을 측정하였다. OD₂₆₀ 이란 1 mL 용액 (pH=7.5) 에 있어서의 10 mm 광로 길이당 UV 260 nm 의 흡광도를 나타낸다. 일반적으로 RNA 에서는 1 OD = 40 μg 인 것이 알려져 있는 점에서, 상기 OD₂₆₀ 의 측정치에 기초하여, 수량을 산출하였다. 또한, 고상 담체의 단위 체적당 수량을 산출하였다. 실시예 1 ~ 21 에 대해서는 비교예 1 의 수량에 대한 상대 수량을 구하였다. 실시예 22 ~ 33 에 대해서는 비교예 2 의 수량에 대한 상대 수량을 구하였다.

[0427]

(올리고뉴클레오티드의 고상 합성)

[0428]

서열 (I) : 5'-AGCAGAGUACACACAGCAUUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' 53 mer

[0429]

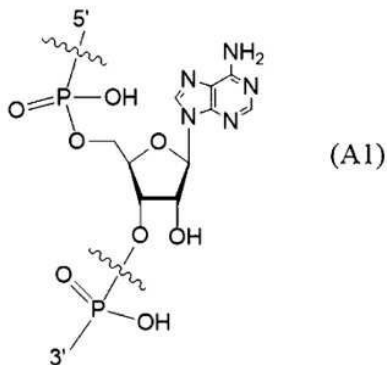
상기 서열 (I) 에 있어서, "A" 는, 이하의 식 (A1) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. "C" 는, 이하의 식 (A2) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. "G" 는, 이하의 식 (A3) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. U 는, 이하의 식 (A4) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. "P" 는, 이하의 식 (A5) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. 또한, 5' 말단의 "A" 는, 이하의 식 (A6) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. 또, 3' 말단의 "G" 는, 이하의 식 (A7) 에 있어서 파선으로 구획되는 부분 구조로 나타낸다. 단, 구조식 중의 인산기는 염이어도 된다.

[0430]

환언하면, 서열 (I) 은 상기 "P" 로 결합된 AGCAGAGUACACACAGCAUUAUACC (서열 번호 1), 및 GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC (서열 번호 2) 로 이루어진다.

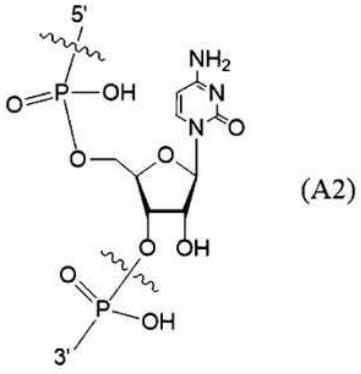
[0431]

[화학식 78]



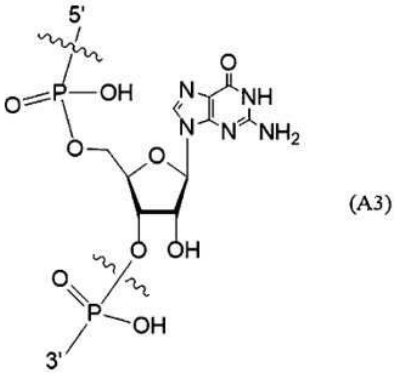
[0432]

[0433] [화학식 79]



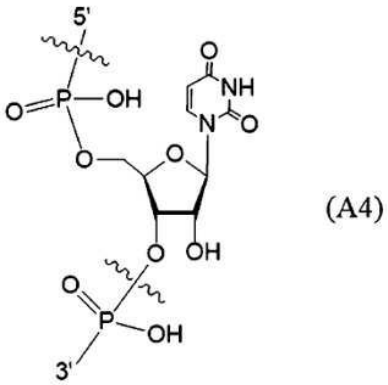
[0434]

[0435] [화학식 80]



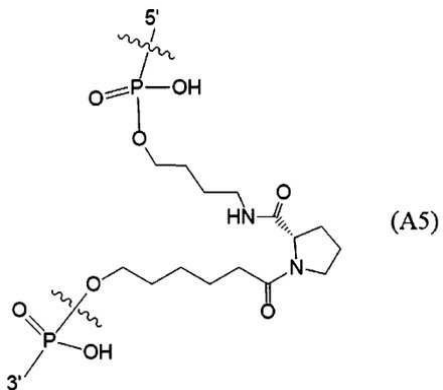
[0436]

[0437] [화학식 81]



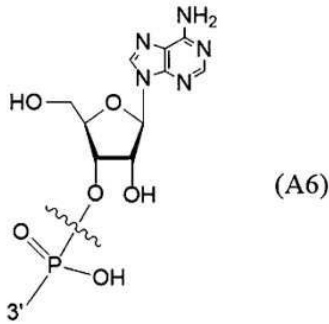
[0438]

[0439] [화학식 82]



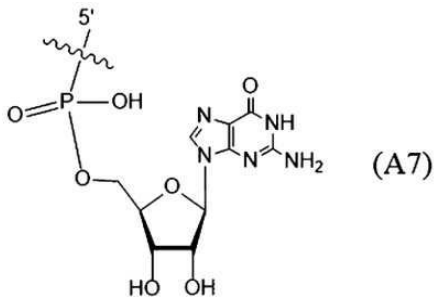
[0440]

[0441] [화학식 83]



[0442]

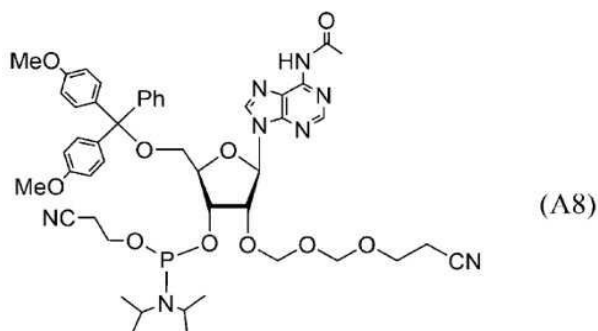
[0443] [화학식 84]



[0444]

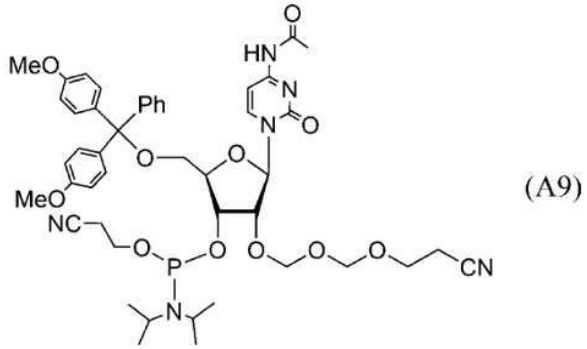
[0445] 고상 담체로서, 컨트롤드·포어·유리 (Controlled Pore Glass (CPG)) 를 사용하고, 핵산 합성기로서 AKTA oligopilot plus 100 (GE 헬스케어사 제조) 를 사용하여, 포스포르아미다이트 고상 합성법에 의해, 상기 서열 (1) 로 이루어지는 올리고뉴클레오타이드를 3' 측으로부터 5' 측으로 향해 합성하였다. 합성은 77.89 μmol 스케일로 실시하였다. 또, 합성에는, 국제 공개공보 제2013/027843호의 실시예 2 에 기재된 우리딘 EMM 아미다이트 (A11), 실시예 3 에 기재된 시티딘 EMM 아미다이트 (A9), 실시예 4 에 기재된 아데노신 EMM 아미다이트 (A8), 실시예 5 에 기재된 구아노신 EMM 아미다이트 (A10), 및 국제 공개공보 제2017/188042호에 기재된 화합물 (A12), 및 일본 특허공보 제5157168호의 실시예 9 에 기재된 N^6 -아세틸-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-0-(2-시아노에톡시메틸)아데노신3'-0-(2-시아노에틸N,N-디이소프로필포스포르아미다이트 (A15), 실시예 8 에 기재된 N^2 -아세틸-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-0-(2-시아노에톡시메틸)구아노신3'-0-(2-시아노에틸N,N-디이소프로필포스포르아미다이트) (A17), 실시예 5 에 기재된 N^4 -아세틸-5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-0-(2-시아노에톡시메틸)시티딘3'-0-(2-시아노에틸N,N-디이소프로필포스포르아미다이트) (A16), 실시예 2 에 기재된 5'-0-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-0-(2-시아노에톡시메틸)우리딘3'-0-(2-시아노에틸N,N-디이소프로필포스포르아미다이트) (A18) 를 사용하고, 디블로킹 용액으로서 디클로로아세트산톨루엔 용액을 사용하고, 축합제로서 5-(벤질티오)-1H-테트라졸을 사용하고, 산화제로서 요오드 용액을 사용하고, 그리고 캐핑 용액으로서 페녹시아세트산 무수물 용액과 N-메틸이미다졸 용액을 사용하였다. 핵산 신장 종료 후, 담체 상의 핵산에 디에틸아민 용액을 작용시킴으로써 인산 부분의 시아노에틸 보호기를 선택적으로 탈보호하였다.

[0446] [화학식 85]

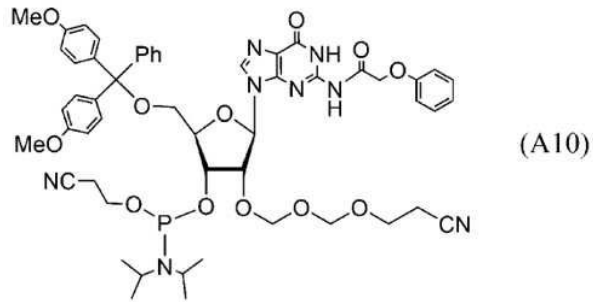


[0447]

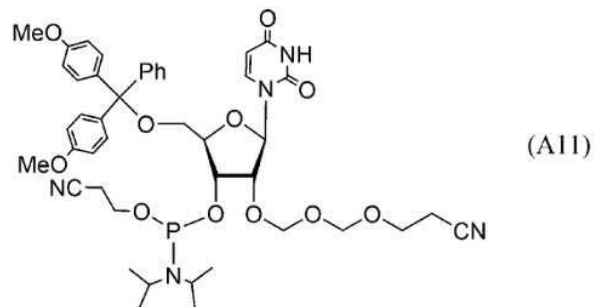
[0448] [화학식 86]



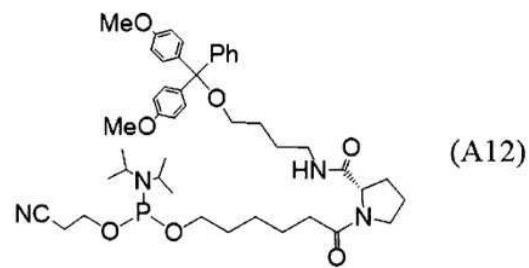
[0449] [화학식 87]



[0451] [화학식 88]

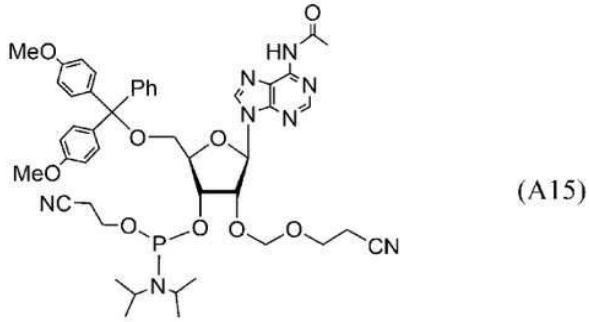


[0453] [화학식 89]

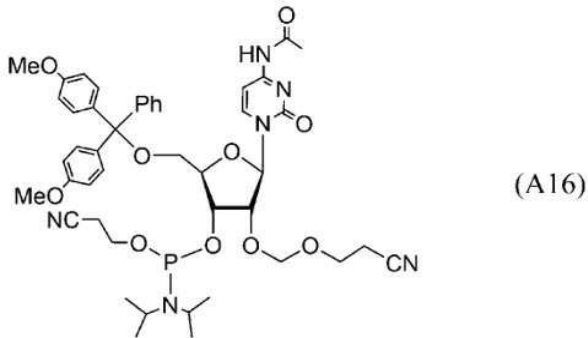


[0455]

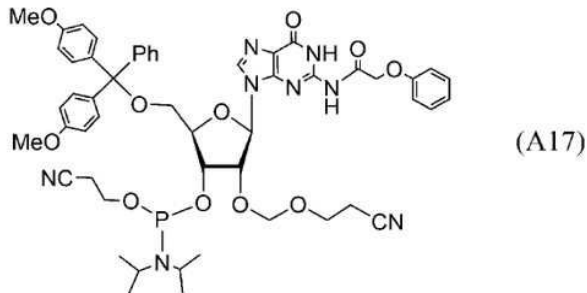
[0456] [화학식 90]



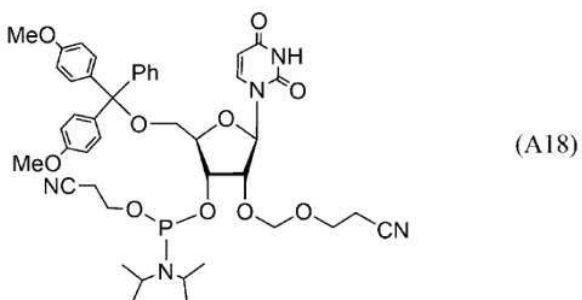
[0457] [화학식 91]



[0459] [화학식 92]



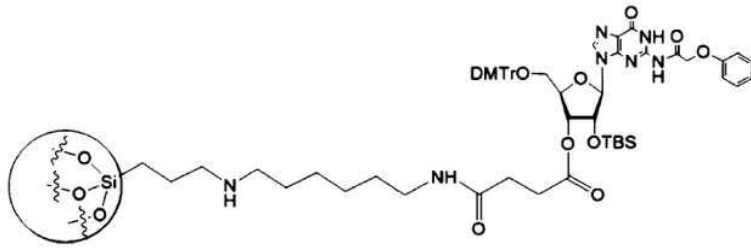
[0461] [화학식 93]



[0463] 다음으로, 본 실시형태의 제조 방법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드 (핵산 올리고머) 의 구체적인 제조예를 나타낸다. 반응은, 공기하 (산소 농도 21 %) 에서 실시하였다. 여기서, 하기 실시예에 있어서 본 실시형태의 제조 방법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드는, 상기 서열 번호 1 및 2 로 나타내는 서열 (1) 을 갖는 올리고뉴클레오티드이다.

[0464] 또, 이하의 실시예 및 비교예 중에 기재하는 구아노신 유도체란, 하기 구조식으로 나타내는 화합물을 의미한다. 하기 구조식에 있어서 도시된 서클은, CPG 를 모식적으로 나타내는 것이다.

[0466] [화학식 94]



[0467]

[0468] (실시예 1)

[0469]

93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12)에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I)의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세토니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.504 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 0.73 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 0.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레컬러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.1 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.4 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0470] (실시예 2)

[0471]

93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12)에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I)의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세토니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.504 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 2.85 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 0.5 몰), 용해하고, 나아가 몰레컬러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.1 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0472] (실시예 3)

[0473]

93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12)에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I)의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세토니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.503 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 5.83 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레컬러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.2 몰) 을 유

입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0474] (실시예 4)

[0475] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.489 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 11.56 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 2.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.0 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0476] (실시예 5)

[0477] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.512 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 17.81 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 3.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.79 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.1 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0478] (실시예 6)

[0479] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.510 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 23.11 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 4.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.76 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.2 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여,

올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0480] (실시예 7)

[0481] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.503 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 4-sec-부틸-2,6-디-tert-부틸페놀 7.20 mg 을 첨가 (4-sec-부틸-2,6-디-tert-부틸페놀의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.2 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보존함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0482] (실시예 8)

[0483] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.485 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 6-tert-부틸-2,4-자일레놀 4.20 mg 을 첨가 (6-tert-부틸-2,4-자일레놀의 양은 보호기 1 몰당 0.9 몰), 용해하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.76 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.6 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보존함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.1 mg, 순도는 56 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0484] (실시예 9)

[0485] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.492 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 4,6-디-tert-부틸-m-크레졸 5.30 mg 을 첨가 (4,6-디-tert-부틸-m-크레졸의 양은 보호기 1 몰당 0.9 몰), 용해하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.77 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.5 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보존함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.4 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0486] (실시예 10)

[0487]

93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.506 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 1,4-디하이드록시 벤젠 3.00 mg 을 첨가 (1,4-디하이드록시 벤젠의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.0 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0488]

(실시에 11)

[0489]

93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.493 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 세바크산비스(2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜) 1.30 mg 을 첨가 (세바크산비스(2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜) 의 양은 보호기 1 몰당 0.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.79 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.2 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0490]

(실시에 12)

[0491]

93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.492 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 세바크산비스(2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜) 6.40 mg 을 첨가 (세바크산비스(2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜) 의 양은 보호기 1 몰당 0.5 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.76 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.2 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0492]

(실시에 13)

[0493]

93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올

3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.511 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜 0.66 mg 을 첨가 (메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜의 양은 보호기 1 몰당 0.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러 시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 26.8 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0494] (실시예 14)

[0495] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.499 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜의 양은 보호기 1 몰당 0.5 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러 시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.79 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.9 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0496] (실시예 15)

[0497] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.495 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜 6.50 mg 을 첨가 (메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜의 양은 보호기 1 몰당 1.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러 시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.75 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.6 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0498] (실시예 16)

[0499] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.508 μmol 분의

용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 2,2,6,6-테트라메틸피페리딘1-옥실 프리 라디칼 4.9 mg 을 첨가 (2,2,6,6-테트라메틸피페리딘1-옥실 프리 라디칼의 양은 보호기 1 몰당 1.2 몰), 용해하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폰용액 0.83 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.8 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 55 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0500] (실시예 17)

[0501] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폰용액에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.485 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 디옥타데실술폰화이드 14.30 mg 을 첨가 (디옥타데실술폰화이드의 양은 보호기 1 몰당 1.1 몰), 또한 디메틸술폰용액을 0.28 g 추가, 용해하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폰용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.3 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 55 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0502] (실시예 18)

[0503] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폰용액에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.489 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 벤조페논 5.00 mg 을 첨가 (벤조페논의 양은 보호기 1 몰당 1.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폰용액 0.79 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.5 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 55 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0504] (실시예 19)

[0505] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폰용액에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.505 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, n-옥타노하이드라지드 4.10 mg 을 첨가 (n-옥타노하이드라지드의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폰용액 0.79 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.5 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노

에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0506] (실시예 20)

[0507] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.500 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 숙신산디하이드라지드 3.90 mg 을 첨가 (숙신산디하이드라지드의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.81 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.6 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.1 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0508] (실시예 21)

[0509] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.494 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 트리페닐포스핀 6.00 mg 을 첨가 (트리페닐포스핀의 양은 보호기 1 몰당 0.9 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.79 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.2 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0510] (비교예 1)

[0511] 93.79 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A15), 식 (A16), 식 (A17), 식 (A18), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다.

그 후, 30.03 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.15 g 과 에탄올 3.07 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 니트로메탄 0.46 g 과 아세트니트릴 2.99 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.498 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 그곳에 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.6 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-시아노에톡시메톡시 (CEM) 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.1 mg, 순도는 48 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0512] (실시예 22)

[0513] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12)에 나타내는 아마다이트를 사용하여, 서열 (I)의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.504 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 1.15 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 0.2 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.2 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0514] (실시예 23)

[0515] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12)에 나타내는 아마다이트를 사용하여, 서열 (I)의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.513 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 5.87 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.7 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0516] (실시예 24)

[0517] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12)에 나타내는 아마다이트를 사용하여, 서열 (I)의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.511 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 23.20 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 4.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.8 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 55 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0518] (실시예 25)

[0519] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12)에 나타내는 아마다이트를 사용하여, 서열 (I)의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100에 의해 실시하였다.

그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.514 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 34.10 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 5.8 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.82 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.1 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.4 mg, 순도는 55 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0520] (실시에 26)

[0521] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.508 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 2,6-디-tert-부틸-p-크레졸 (BHT) 47.10 mg 을 첨가 (BHT 의 양은 보호기 1 몰당 8.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.76 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.3 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0522] (실시에 27)

[0523] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.513 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 6-tert-부틸-2,4-자일레놀 6.00 mg 을 첨가 (6-tert-부틸-2,4-자일레놀의 양은 보호기 1 몰당 1.3 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.8 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.5 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0524] (실시에 28)

[0525] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.513 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 6-tert-부틸-2,4-자일레놀 6.00 mg 을 첨가 (6-tert-부틸-2,4-자일레놀의 양은 보호기 1 몰당 1.3 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.8 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.5 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.520 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 4,6-디-tert-부틸-m-크레졸 5.10 mg 을 첨가 (4,6-디-tert-부틸-m-크레졸의 양은 보호기 1 몰당 0.9 몰), 용해하고, 나아가 몰레컬러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.3 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.3 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0526] (실시예 29)

[0527] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.504 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜 0.70 mg 을 첨가 (메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜의 양은 보호기 1 몰당 0.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레컬러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 28.2 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 50 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0528] (실시예 30)

[0529] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.511 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 2,2,6,6-테트라메틸피페리딘1-옥실 프리 라디칼 4.50 mg 을 첨가 (2,2,6,6-테트라메틸피페리딘1-옥실 프리 라디칼의 양은 보호기 1 몰당 1.1 몰), 용해하고, 나아가 몰레컬러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-n-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.78 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 27.8 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 52 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0530] (실시예 31)

[0531] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.503 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 디옥타데실술포이드 14.00 mg 을 첨가 (디옥타데실술포이드의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 디메틸술폭사이드 0.28 g 을 첨가, 용해하고, 나아가 몰레컬러시브

4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-*n*-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.81 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.4 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 54 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0532] (실시예 32)

[0533] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.521 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 벤조페논 4.80 mg 을 첨가 (벤조페논의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-*n*-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.83 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.0 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0534] (실시예 33)

[0535] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.491 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 과 트리페닐포스핀 6.40 mg 을 첨가 (트리페닐포스핀의 양은 보호기 1 몰당 1.0 몰), 용해하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-*n*-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.79 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 29.4 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.0 mg, 순도는 53 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오타이드의 수량을 측정하였다.

[0536] (비교예 2)

[0537] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오타이드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오타이드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.510 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 을 첨가하고, 나아가 몰레큘러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-*n*-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 1.56 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 55.8 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 °C 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.1 mg, 순도는 49 % 였다. 얻어진 미정제 생성물에 대해, 상기 측정 방

법 1 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 순도를 측정하고, 또, 상기 측정 방법 2 에 기재된 방법을 이용하여, 올리고뉴클레오티드의 수량을 측정하였다.

[0538] (참고예 1)

[0539] 93.86 μmol 의 구아노신 유도체를 담지한 CPG 와, 식 (A8), 식 (A9), 식 (A10), 식 (A11), 또는 식 (A12) 에 나타내는 아미다이트를 사용하여, 서열 (I) 의 고상 합성을 AKTA oligopilot plus 100 에 의해 실시하였다. 그 후, 30.02 μmol 분의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체를 채취하고, 암모니아수 10.18 g 과 에탄올 3.03 g 을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시킨 후, 담체를 여과 분리하고, 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하는 여과액을 농축 건조시켰다. 이어서 유리 올리고뉴클레오티드를 13.24 g 의 디메틸술폭사이드에 용해 후에, 아세트니트릴 3.00 g 을 첨가한 용액으로부터, 0.497 μmol 분의 용액을 용량 15 mL 의 팔콘 튜브에 채취하였다. 거기에, 니트로메탄 2.89 mg 을 첨가하고, 나아가 몰레클러시브 4A 로 탈수 처리를 실시한 1 M 의 불화테트라-*n*-부틸암모늄 (TBAF) 의 디메틸술폭사이드 용액 0.82 g (TBAF 의 양은 보호기 1 몰당 30.1 몰) 을 유입하고, 볼텍스 믹서에 의해 균일하게 교반하고, 그 후 혼합물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 시간 보온함으로써 2'-EMM 보호기의 탈보호를 실시하였다. 보호기의 탈보호를 실시하였다. 미정제 생성물은 침전 조작에 의해 얻었다. 수량은 4.2 mg, 순도는 49 % 였다.

[0540] 또한, 얻어진 미정제 생성물의 전체량을 포함하는 수용액 4.7 mL 를 어피니티 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 구체적으로는, Cytiva 사 제조 AKTApure150 을 사용하여, 시판되는 어피니티 칼럼 (SkillPak Toyopearl AF-Chelate-650M, 1 mL, Tosoh Corporation) 에 핵산 수용액 전체량을 어플라이하고, 이동상을 물로 하여, 유속 0.6 mL/min 로 20 mL 송액하였다. 용출액의 UV (260 nm) 는 모니터에 의해 확인할 수 있고, 핵산의 용출이 확인된 부분의 전량을 회수하여, 막여과에 의해 농축함으로써 핵산 정제물을 얻었다.

[0541] 측정 결과를 하기 표 2 ~ 표 4 에 나타낸다.

[0542] 하기 표에 있어서, 라디칼 반응 저해제의 사용량은, 고상 담체에 담지되어 있는 화합물 1 mol 에 대해, 식 (3) 에 있어서의 R 이 식 (1) 로 나타내는 기인 수를 곱한 수치에 대한 사용량을 의미한다.

표 2

	2' 위치 보호기	라디칼 반응 저해제	라디칼 반응 저해제 사용량	단위 체적당 상대 수량	핵산 HPLC 측정 순도
실시예 1	CEM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	0.1 당량	1.06	52%
실시예 2	CEM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	0.5 당량	1.02	53%
실시예 3	CEM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	1.0 당량	1.02	53%
실시예 4	CEM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	2.1 당량	1.00	53%
실시예 5	CEM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	3.0 당량	1.00	52%
실시예 6	CEM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	4.0 당량	1.00	52%
실시예 7	CEM	4-sec-부틸-2,6-디-tert-부틸페놀	1.0 당량	1.02	54%
실시예 8	CEM	6-tert-부틸-2,4-자일레놀	0.9 당량	1.03	56%
실시예 9	CEM	4,6-디-tert-부틸-m-크레졸	0.9 당량	1.10	52%
실시예 10	CEM	1,4-디하이드록시벤젠	1.0 당량	1.05	53%
실시예 11	CEM	세바스산비스(2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜)	0.1 당량	1.06	52%
실시예 12	CEM	세바스산비스(2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜)	0.5 당량	1.06	54%

[0543]

표 3

	2' 위치 보호기	라디칼 반응 저해제	라디칼 반응 저해제 사용량	단위 체적당 상대 수량	핵산 HPLC 측정 순도
실시에 13	CEM	메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜	0.1 당량	1.00	52%
실시에 14	CEM	메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜	0.5 당량	0.99	52%
실시에 15	CEM	메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리딜	1.1 당량	0.99	52%
실시에 16	CEM	2,2,6,6-테트라메틸피페리딘1-옥실 프리 라디칼	1.0 당량	1.00	55%
실시에 17	CEM	디옥타데실술폰파이드	1.1 당량	1.01	55%
실시에 18	CEM	벤조페논	1.1 당량	1.04	55%
실시에 19	CEM	n-옥타노하이드라지드	1.0 당량	1.05	54%
실시에 20	CEM	속산디하이드라지드	1.0 당량	1.00	52%
실시에 21	CEM	트리페닐포스핀	0.9 당량	1.05	54%
비교예 1	CEM	없음	-	1.00	48%

[0544]

표 4

	2' 위치 보호기	라디칼 반응 저해제	라디칼 반응 저해제 사용량	단위 체적당 상대 수량	핵산 HPLC 측정 순도
실시예 22	EMM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	0.2 당량	1.03	53%
실시예 23	EMM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	1.0 당량	0.98	53%
실시예 24	EMM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	4.0 당량	1.04	55%
실시예 25	EMM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	5.8 당량	1.08	55%
실시예 26	EMM	2,6-디-tert-부틸-p-크레졸	8.1 당량	1.05	54%
실시예 27	EMM	6-tert-부틸-2,4-자일레놀	1.3 당량	1.10	54%
실시예 28	EMM	4,6-디-tert-부틸-m-크레졸	0.9 당량	1.05	53%
실시예 29	EMM	메타크릴산2,2,6,6-테트라메틸-4-피페리닐	0.1 당량	1.03	50%
실시예 30	EMM	2,2,6,6-테트라메틸피페리딘1-옥실 프리 라디칼	1.1 당량	0.98	52%
실시예 31	EMM	디옥타데실술폰파이드	1.0 당량	0.98	54%
실시예 32	EMM	벤조페논	1.0 당량	0.98	53%
실시예 33	EMM	트리페닐포스핀	1.0 당량	0.99	53%
비교예 2	EMM	없음	-	1.00	49%

[0545]

[0546] 상기 표 2 ~ 표 4 에 나타내는 바와 같이, 명세서 중에 기재된 올리고뉴클레오티드에 포함되는 리보스의 수산기의 보호기의 탈보호 반응을, 라디칼 반응 저해제의 존재하에서 실시함으로써, 라디칼 반응 저해제가 존재하지 않는 조건에서 실시한 경우와 비교하여, 그 탈보호 반응이 효율적으로 진행되고, 그 결과, 높은 순도로 탈보호된 올리고뉴클레오티드를 얻을 수 있었다.

[0547] 산업상 이용가능성

[0548] 본 발명에 의해, 효율적으로 핵산 올리고머를 제조할 수 있다.

[0549] 서열표 프리 텍스트

[0550] 서열표의 서열 번호 1 ~ 13 은, 본 발명의 제조 방법에 따라서 제조되는 올리고뉴클레오티드의 염기 서열을 나타낸다.

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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