



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I729028 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105137671

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 17 日

(51)Int. Cl. : C07H19/10 (2006.01)

C07H19/20 (2006.01)

C07H21/04 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/17 日本

2015-224617

(71)申請人：日商日產化學工業股份有限公司 (日本) NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

(JP)

日本

(72)發明人：菅原祐大 SUGAWARA, YUDAI (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

EP 2816053A1

US 2012/0296074A1

WO 2005/028494A1

審查人員：劉祥音

申請專利範圍項數：44 項 圖式數：1 共 270 頁

(54)名稱

寡核苷酸的製造方法

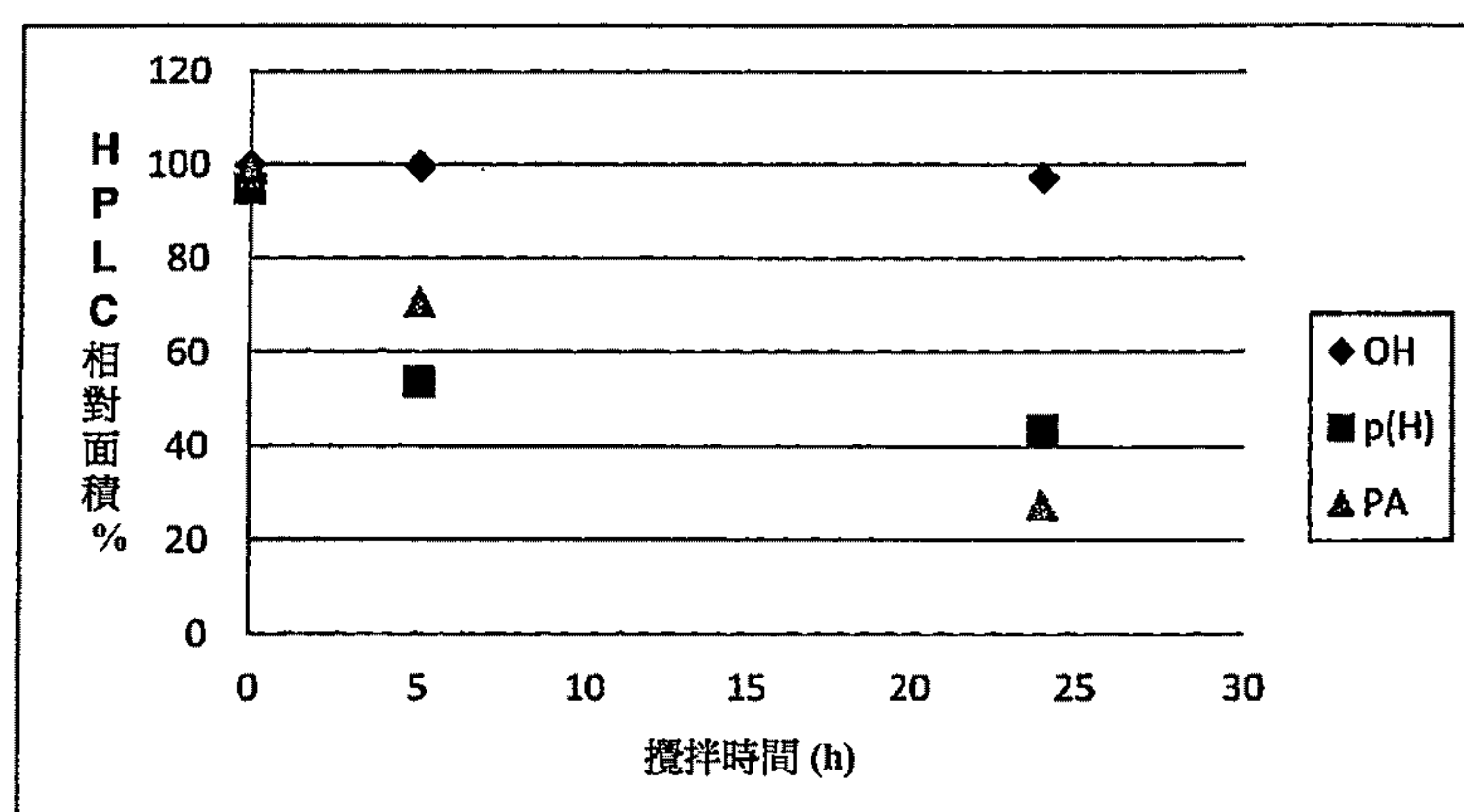
(57)摘要

本發明為提供一種使用容易分離且保存安定性高的核苷酸或寡核苷酸之寡核苷酸的新穎製造方法。

其為含有於選自由 2' 位、3' 位、5' 位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，將 5' 位或 3' 位為羥基之核苷酸或寡核苷酸的該 5'-羥基或 3'-羥基經 H-磷酸酯化的步驟之寡核苷酸的製造方法。

指定代表圖：

圖 1



I729028

發明摘要

※申請案號：105137671

※申請日：105 年 11 月 17 日

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

寡核苷酸的製造方法

【中文】

本發明為提供一種使用容易分離且保存安定性高的核苷酸或寡核苷酸之寡核苷酸的新穎製造方法。

其為含有於選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，將 5'位或 3'位為羥基之核苷酸或寡核苷酸的該 5'-羥基或 3'-羥基經 H-磷酸酯化的步驟之寡核苷酸的製造方法。

【英文】

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

寡核苷酸的製造方法

【技術領域】

[0001] 本發明係關於寡核苷酸之新穎製造方法。

【先前技術】

[0002] 隨著基因組創藥或基因診斷・治療等最先端生物關連研究的急速進步・發展，近年來興盛利用 DNA 探針、siRNA、反義 DNA、反義 RNA 等寡核苷酸。作為寡核苷酸之化學合成方法，已知有亞磷醯胺法、H-膦酸酯法等。

在亞磷醯胺法中，可使用作為代表性氨基亞化試藥的氯(二異丙基胺基)亞膦酸 2-氰基乙酯或雙(二異丙基胺基)亞膦酸 2-氰基乙酯等。這些試藥非常高價，需要於氨基亞體分離時在管柱純化或超低溫之再沈澱等煩雜操作。又，氨基亞體因其安定性低故必須保存在 -20°C 。

相對於此，在 H-膦酸酯法中，使用作為代表性 H-膦酸酯化試藥的亞磷酸二苯酯或亞磷酸等。這些較為便宜，但在 H-膦酸酯體分離時，需要管柱純化等煩雜的操作。H-膦酸酯體因其安定性的原因故必須保存在 0°C (例如參照非專利文獻 1)。

[0003] 在現今，因藉由亞磷醯胺法的固相合成法之

製程最適化及自動化更進展著，故藉由亞磷醯胺法之固相合成法在速度面上較為有利，最被泛用。但，在固相合成法中因有設備制約上規模提升的限制，故有著使用過剩試藥及原料，在途中階段的反應進行狀況之確認、中間體結構解析等亦為困難之缺點。

[0004] 近年來，作為液相合成法，使用擬似固相保護基的 H-磷酸酯法正被檢討著。具體有聚乙二醇(MPEG)(例如參照專利文獻 1)或含有長鏈烴之基(例如參照專利文獻 2)等作為擬似固相保護基使用的合成法已被揭示。

[先行技術文獻]

[專利文獻]

[0005]

[專利文獻 1]國際公開第 2014-017615 號

[專利文獻 2]國際公開第 2014-077292 號

[非專利文獻]

[0006]

[非專利文獻 1]Protocols for Oligonucleotides and Analogs Humana Press (1993)、44-73 頁

【發明內容】

[發明所解決的問題]

[0007] 對於使用聚乙二醇(MPEG)之合成法，雖有舉出至 21 聚體的寡核苷酸之合成例，但在每次伸長循環後

必須經 GPC 進行管柱純化。又，對於使用含有長鏈烴之基的製法，雖記載 5 聚體之寡核苷酸的合成例，但脫保護步驟為低產率。

如上述，雖在寡核苷酸的化學合成法中使用氨基亞體或者 H-膦酸酯體，皆在分離時的操作性或化合物的安定性具有課題，期待可對應大量合成之新穎寡核苷酸的製造方法。

[0008] 本發明之目的為使用可分離容易且保存安定性高的核苷酸或寡核苷酸，提供寡核苷酸的新穎製造方法。

[解決課題的手段]

[0009] 欲解決如此課題，本發明者們經詳細研究結果，發現與由偶合步驟、將磷原子經修飾的步驟(氧化反應、硫化反應等)、脫保護步驟等所構成的通常製造方法相異的製造方法，其為藉由含有將具有擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸之 5'位羥基或 3'位羥基進行 H-膦酸酯化的步驟之製造方法，解決上述課題，而完成本發明。

[0010] 本發明為含有以下者。

[1] 含有於選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼(Nucleic acid base)部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，將 5'位或 3'位為羥基之核苷酸或寡核苷酸的該 5'-羥基或 3'-羥基進行 H-膦酸酯化的步驟之寡核苷酸的製造方法。

[2] 如 [1] 所記載的製造方法，其為含有至少一個以下

伸長反應循環者，該伸長反應循環為含有選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，將於 5'位或 3'位為羥基的核苷酸或寡核苷酸之該 5'-羥基或 3'-羥基進行 H-磷酸酯化的步驟。

[0011] [3]如[2]之製造方法，其中前述伸長反應循環為具有以下步驟者；

第一步驟為含有，於選自 2'位、3'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，於 3'位具有以基本保護基或擬似固相保護基所保護的羥基，將於 5'位具有以一時保護基所保護的羥基之第一核苷酸或第一寡核苷酸之一時保護基經除去後生成 5'-羥基的步驟；

第二步驟為含有，將所生成的 5'-羥基使用 H-磷酸酯化試藥進行 H-磷酸酯化的步驟；

第三步驟為含有，由 H-磷酸酯化的 5'-羥基，於 3'位具有羥基且於 5'位具有以一時保護基所保護的羥基之第二核苷酸或第二寡核苷酸的 3'-羥基形成亞磷酸二酯鍵，得到第一核苷酸或第一寡核苷酸與第二核苷酸或第二寡核苷酸之共軛物的第三步驟。

[0012] [4]如[3]之製造方法，其為進一步含有以下第四步驟，該步驟為含有將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、以基本保護基所保護的磷酸二酯鍵或以基本保護基所保護的硫代磷酸二酯鍵之步驟。

[0013] [5]如[3]之製造方法，其為進一步含有以下第

四步驟，該步驟為含有將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵或胺基磷酸二酯鍵的步驟。

[0014] [6]如[4]或[5]之製造方法，其為進一步含有第五步驟，該步驟為於由選自由前述第一步驟至第四步驟所成群的至少 1 種步驟所得的反應混合物中，添加極性溶劑使其產生沈澱物，與將所生成的沈澱物藉由固液分離而取得者。

[0015] [7]如[6]之製造方法，其中前述極性溶劑為碳數 1 至 6 的醇溶劑或碳數 1 至 6 的腈溶劑。

[0016] [8]如[3]至[7]中任一項之製造方法，其中更含有將前述基本保護基、一時保護基及擬似固相保護基皆除去的第六步驟。

[0017] [9]如[3]至[8]中任一項之製造方法，其中前述第一核苷酸或第一寡核苷酸具有於 3'位以擬似固相保護基所保護的羥基。

[0018] [10]如[3]至[9]中任一項之製造方法，其中前述第三步驟為使用前述第二核苷酸。

[0019] [11]如[2]之製造方法，其為含有以下第七步驟至第九步驟者；

第七步驟為含有，前述伸長反應循環為，於選自由 2'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，於 5'位具有以基本保護基或擬似固相保護基所保護的羥基，將於 3'位具有以一時保護基所保護的羥基之第三核

苷酸或第三寡核苷酸的一時保護基除去後生成 3'-羥基之步驟；

第八步驟為含有，將所生成的 3'-羥基使用 H-膦酸酯化試藥，使其進行 H-膦酸酯化之步驟；

第九步驟為含有，由經 H-膦酸酯化的 3'-羥基，與於 5'位具有羥基，於 3'位具有以一時保護基所保護的羥基之第四核苷酸或第四寡核苷酸的 5'-羥基形成亞磷酸二酯鍵，得到第三核苷酸或第三寡核苷酸與第四核苷酸或第四寡核苷酸的共軛物之步驟。

[0020] [12]如[11]之製造方法，其中更含有第十步驟，該步驟為含有，將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、以基本保護基所保護的磷酸二酯鍵或以基本保護基所保護的硫代磷酸二酯鍵之步驟。

[0021] [13]如[11]之製造方法，其中更含有第十步驟，該步驟為含有，將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵或胺基磷酸二酯鍵之步驟。

[0022] [14]如[12]或[13]之製造方法，其中更含有第十一步驟，該步驟為，於由前述第七步驟至第十步驟中任一步驟所得的反應混合物中，添加極性溶劑使其產生沈澱物，與將所生成的沈澱物藉由固液分離而取得者。

[0023] [15]如[14]之製造方法，其中前述極性溶劑為碳數 1 至 6 的醇溶劑或碳數 1 至 6 的腈溶劑。

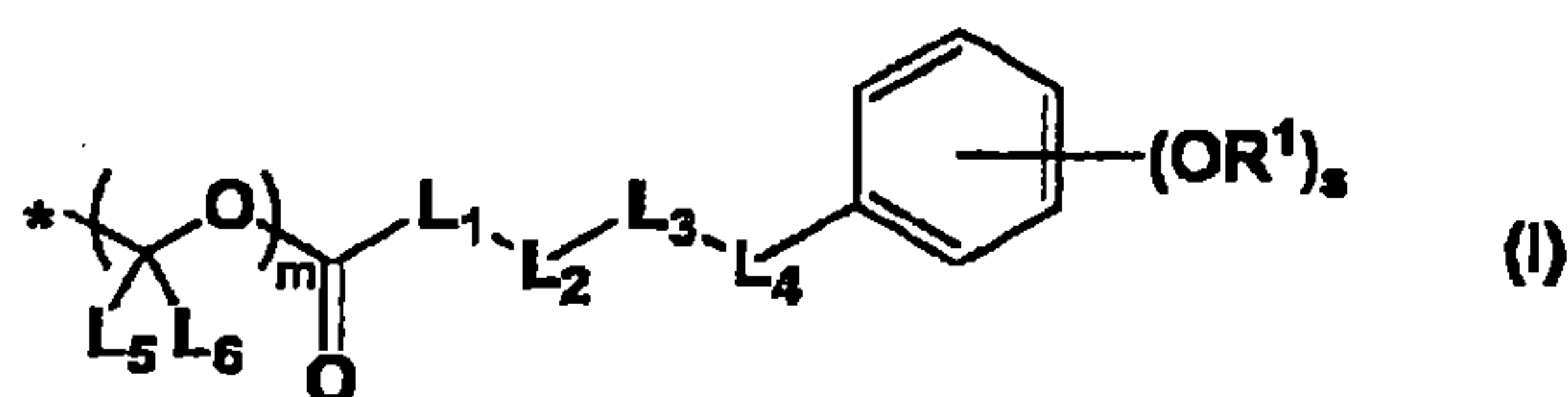
[0024] [16]如[11]至[15]中任一項之製造方法，其中更含有第十二步驟，該步驟為，將前述基本保護基、一時保護基及擬似固相保護基皆除去之步驟。

[0025] [17]如[11]至[16]中任一項之製造方法，其中前述第三核苷酸或第三寡核苷酸為於 5'位具有以擬似固相保護基所保護的羥基。

[0026] [18]如[11]至[17]中任一項之製造方法，其中前述第九步驟為使用第四核苷酸。

[0027] [19]如[1]至[18]中任一項之製造方法，其中前述擬似固相保護基為下述式(I)

【化 1】



[0028] (式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{O}-$ ，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

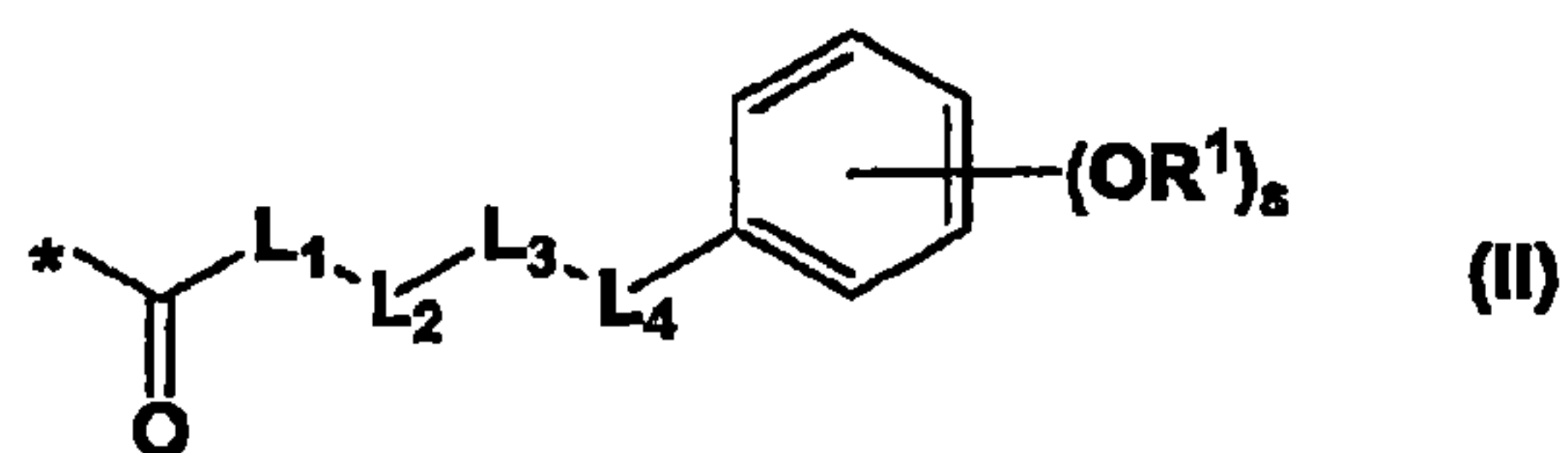
L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

M 為 0 或 1，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有，該擬似固相保護基之 m 為 0 時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3) 所示者。

[0029] [20] 如 [1] 至 [18] 中任一項之製造方法，其中前述擬似固相保護基為下述式 (II)

【化 2】



[0030] (式中，* 表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或-O-，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3)所示者。

[0031] [21]如[3]至[20]中任一項之製造方法，其中前述一時保護基為 tert-丁基二甲基矽基、4、4'-二甲氧基三苯甲基或乙醯丙醯基。

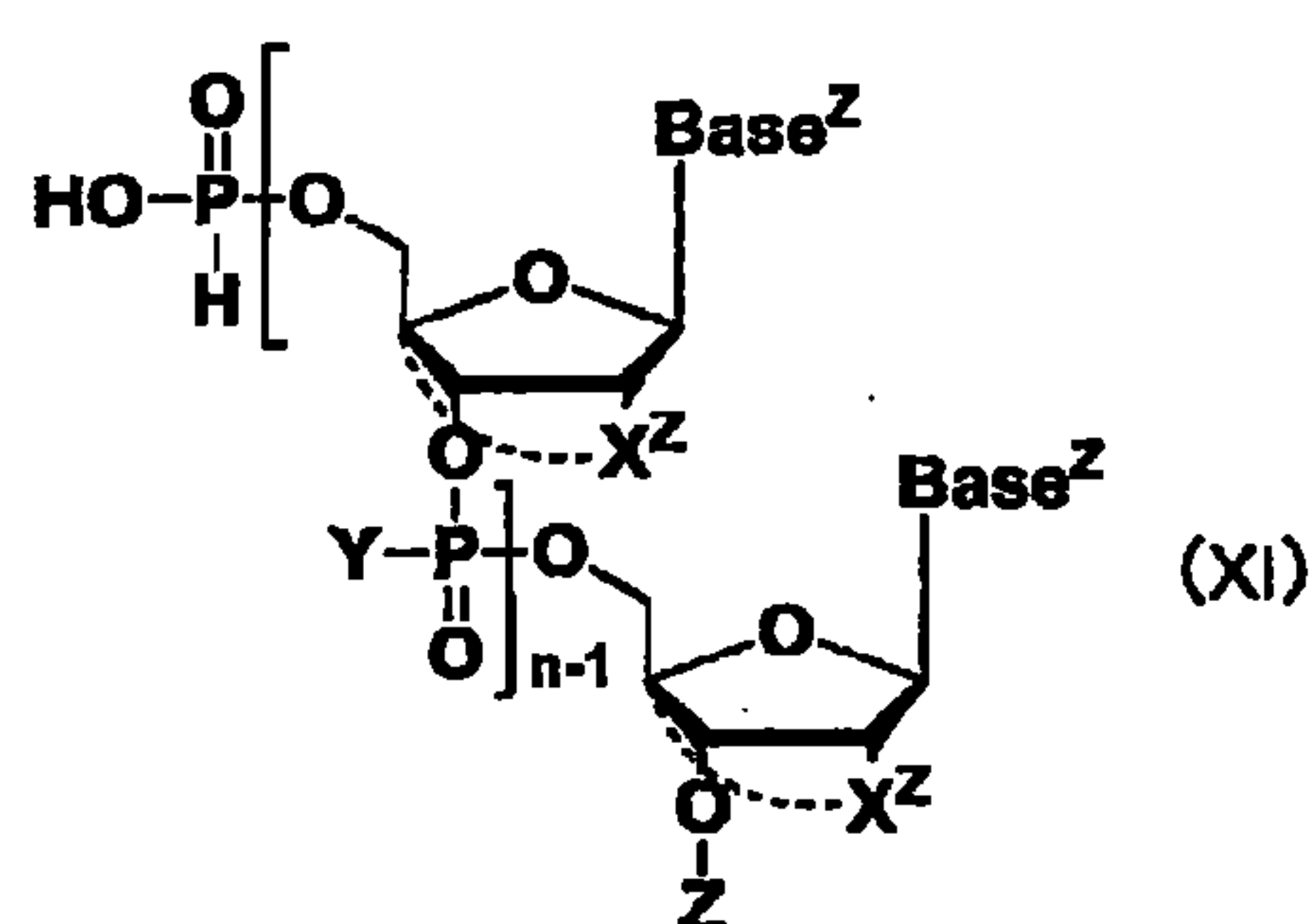
[0032] [22]如[1]至[21]中任一項之製造方法，其中前述進行 H-磷酸酯化的步驟為使用選自由亞磷酸、亞磷酸二苯基、苯基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、p-甲苯甲醯基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、2-氯-4H-1,3,2-苯並二氧磷素-4-酮、三氯化磷所成群的至少一種 H-磷酸酯化試藥。

[0033] [23]如[1]至[22]中任一項之製造方法，其中於

前述第一至第四核苷酸及第一至第四寡核苷酸所含之核酸鹼，各獨立為選自由 6-胺基嘌呤-9-基(腺嘌呤殘基)、2-胺基-6-羥基嘌呤-9-基(鳥嘌呤殘基)、2-氧代-4-胺基-1,2-二氫嘓啶-1-基(胞嘓啶殘基)、2-氧代-4-胺基-5-甲基-1,2-二氫嘓啶-1-基(5-甲基胞嘓啶殘基)、2-氧代-4-羥基-1,2-二氫嘓啶-1-基(尿嘓啶殘基)及 2-氧代-4-羥基-5-甲基-1,2-二氫嘓啶-1-基(胸腺嘓啶殘基)所成群的至少 1 種。

[0034] [24]一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式 (XI)：

【化 3】



[0035] [式中，n 表示 1 以上的任意整數，

Base^Z ，各獨立表示核酸鹼、以基本保護基所保護的核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，

X^Z ，各獨立表示氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，

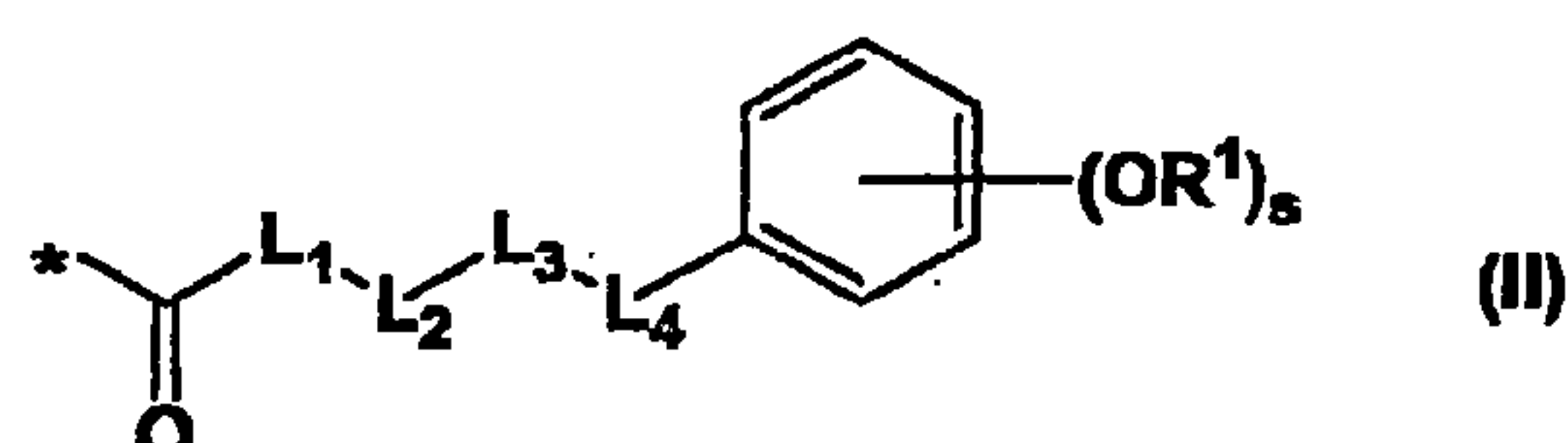
Y，各獨立表示氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護的硫醇基、氫化硼基、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，

Z 表示氫原子、基本保護基、一時保護基或擬似固相保護基，

且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的羟基，及 Z 為擬似固相保護基的至少一項]所示。

[0036] [25]如[24]之化合物或其鹽，其中前述擬似固相保護基為下述式(II)

【化4】



[0037] (式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 $-\text{O}-$ 、

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、

C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、
-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-
6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 -O-，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有時，該擬似固
相保護基之 L¹、L²、L³ 及 L⁴ 中，單鍵數目為 0 至 3)所
示。

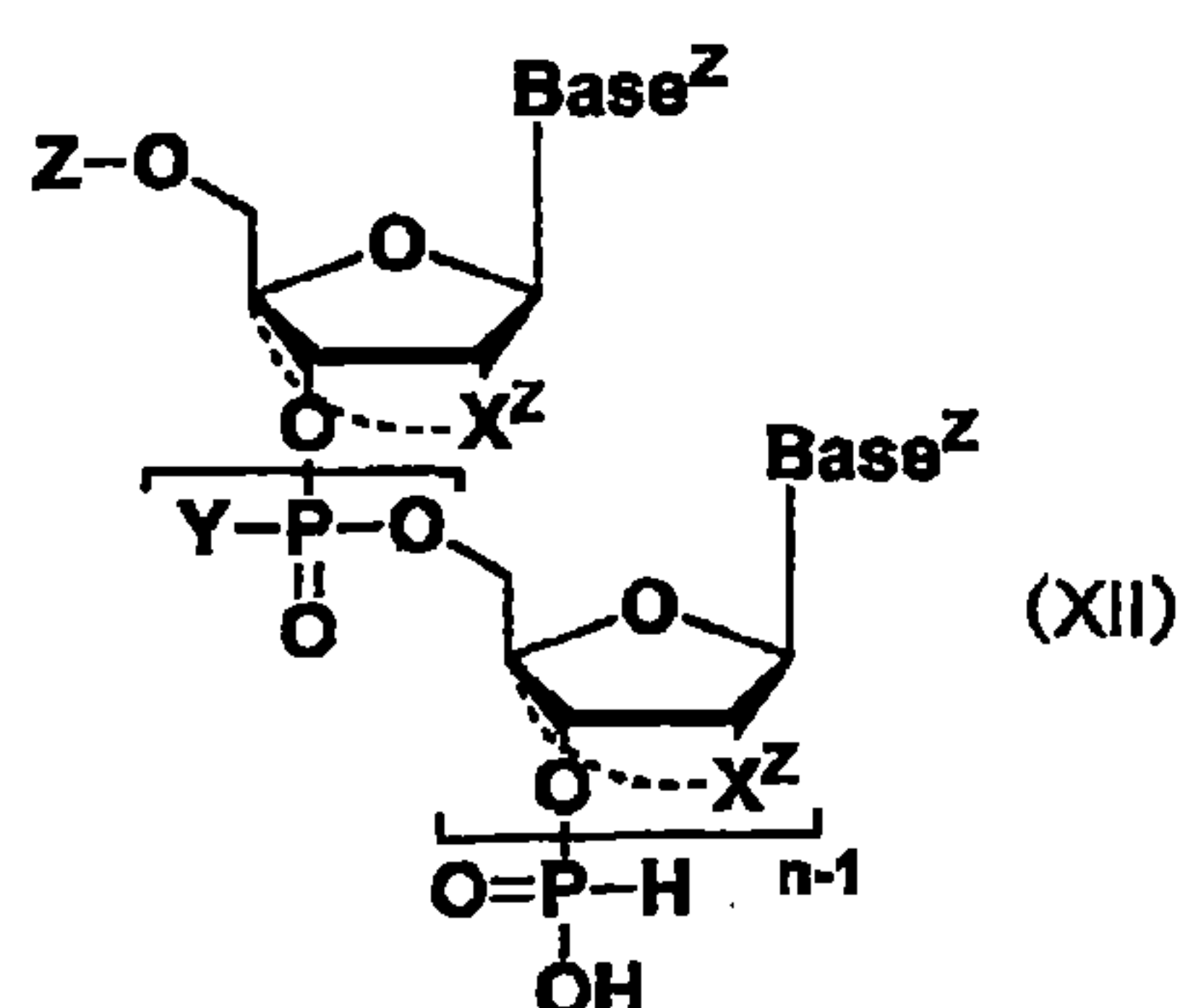
[0038] [26]如[24]或[25]之化合物或其鹽，其為滿足
前述式(XI)中之 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所
保護的核酸鹼，及 Z 為擬似固相保護基的至少一項。

[0039] [27]如[24]至[26]中任一項之化合物或其鹽，
其中前述式(XI)中之 Z 為擬似固相保護基。

[0040] [28]如[24]至[27]中任一項之化合物或其鹽，
其中前述式(XI)中之 n 為 1 至 30。

[0041] [29]一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式
(XII)：

【化 5】



[0042] [式中，

n 表示 1 以上的任意整數，

Base^Z 為獨立表示各核酸鹼、以基本保護基所保護的

核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，

X^Z 為獨立表示各氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，

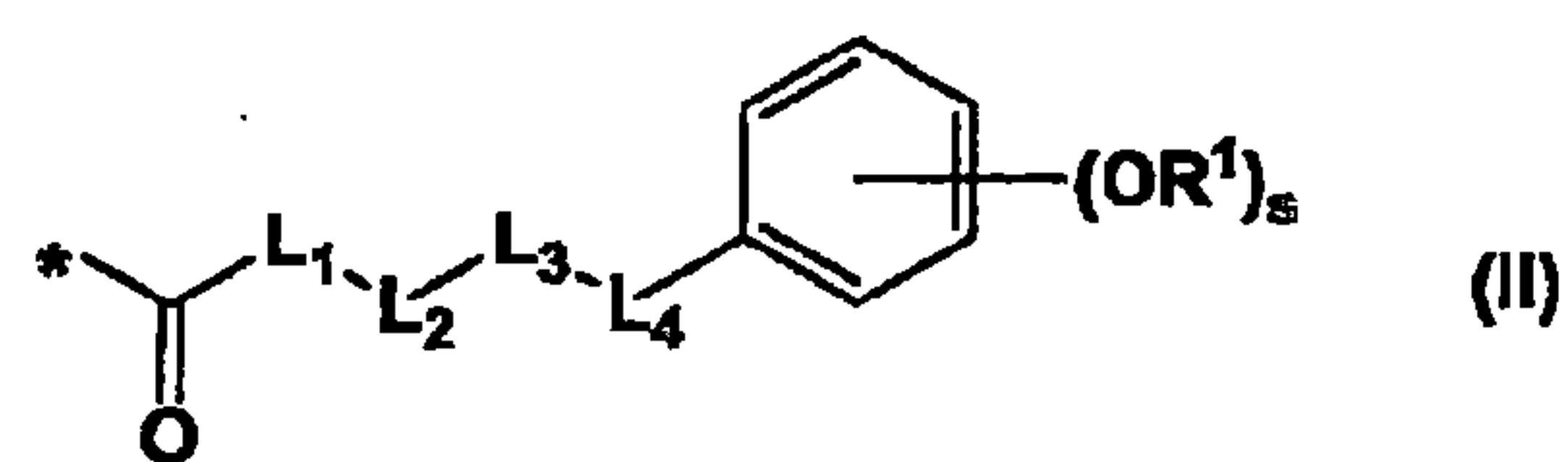
Y 為獨立表示各氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護的硫醇基、氫化硼基、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，

Z 表示氫原子、基本保護基、一時保護基或擬似固相保護基，

且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的羥基，及 Z 為擬似固相保護基之至少一項]所示。

[0043] [30]如[29]之化合物或其鹽，其中前述擬似固相保護基為下述式(II)

【化 6】



[0044] (式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 $-\text{O}-$ ，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 $-\text{O}-$ ，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3)所示。

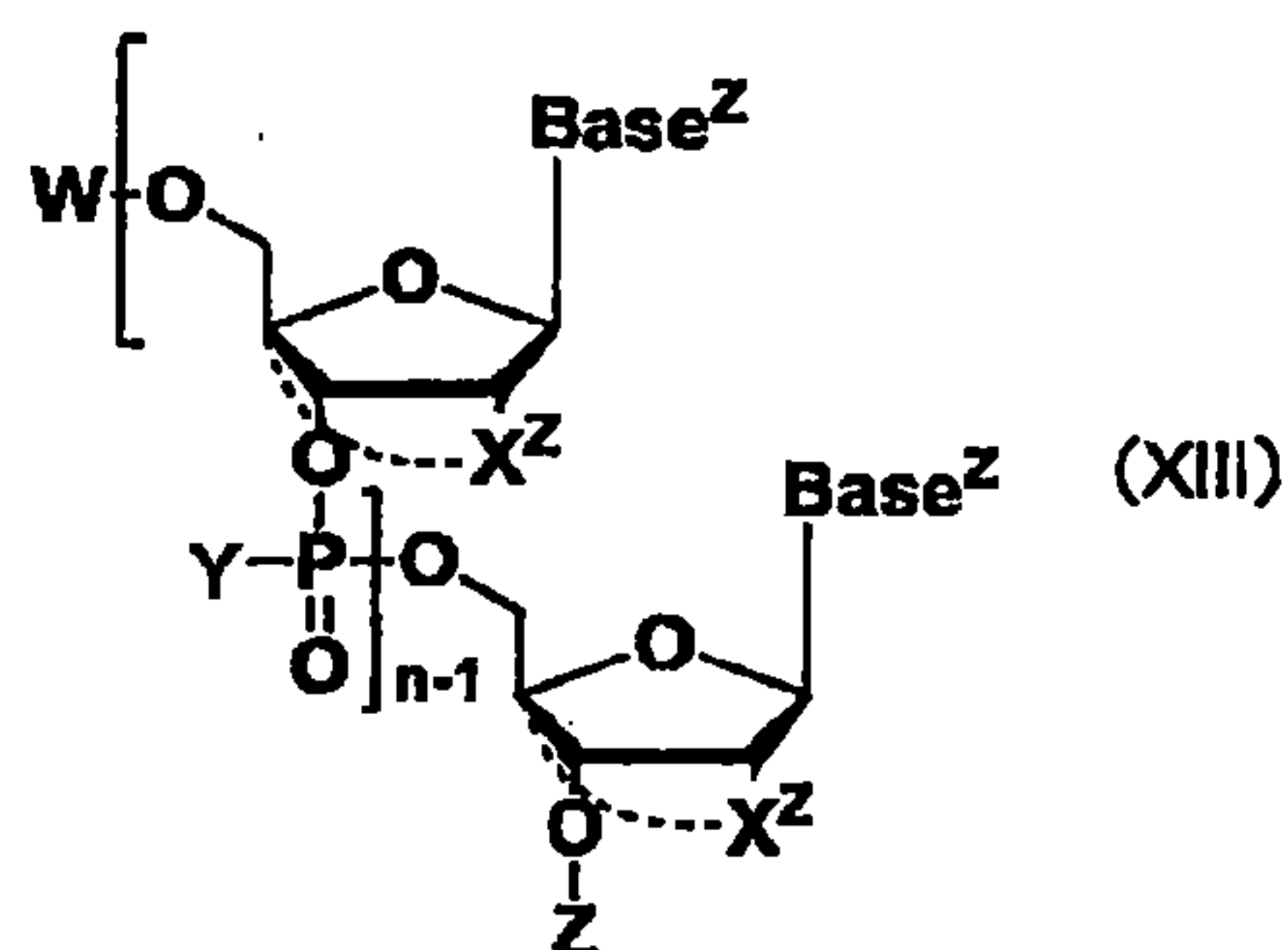
[0045] [31]如[29]或[30]之化合物或其鹽，其為滿足前述式(XII)中之 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、及 Z 為擬似固相保護基的至少一項。

[0046] [32]如[29]至[30]中任一項之化合物或其鹽，其中前述式(XII)中之 Z 為擬似固相保護基。

[0047] [33]如[29]至[32]中任一項之化合物或其鹽，其中前述式(XII)中之 n 為 1 至 30。

[0048] [34]一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式(XIII)：

【化 7】



[0049] [式中， n 表示 1 以上的任意整數，

Base^Z 各獨立表示核酸鹼、以基本保護基所保護的核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，

X^Z 各獨立表示氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，

W 表示氫原子或一時保護基，

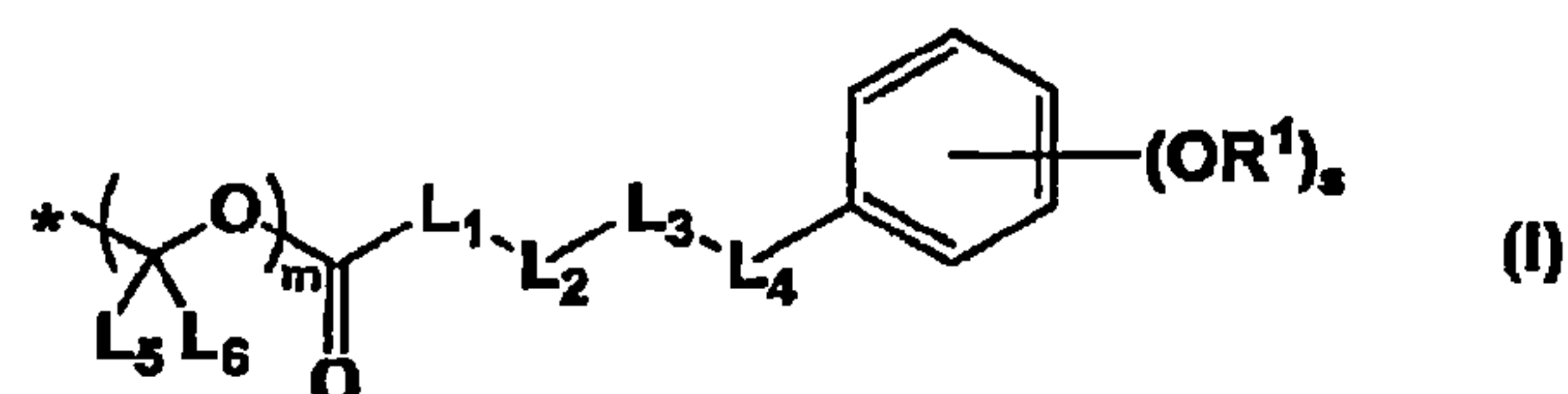
Y 各獨立表示氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護的硫醇基、氫化硼基、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，

Z 表示氫原子、基本保護基、一時保護基或擬似固相保護基，

且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的羥基，及 Z 為擬似固相保護基之至少一項，

前述擬似固相保護基的至少一個為式(I)

【化8】



[0050] (式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L¹ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L² 為單鍵、-COO-、-CON(R²)- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L³ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L⁴ 為單鍵、-COO-、-CON(R²)- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

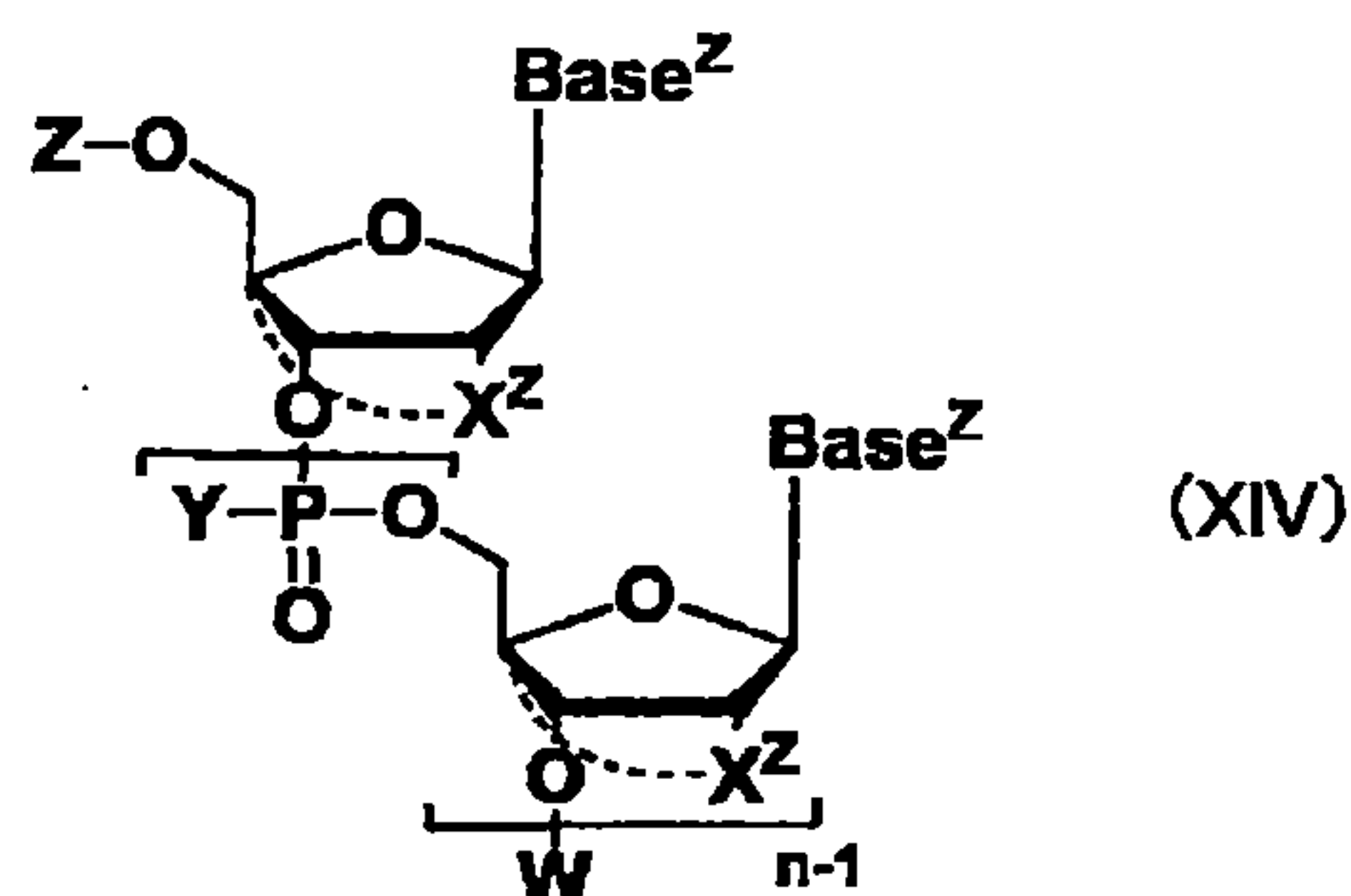
L⁵ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L⁶ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1， m 為 0 時， L^4 非單鍵)所示]所示。

[0051] [35]一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式 (XIV)：

【化 9】



[0052] (式中，

n 表示 1 以上的任意整數，

Base^Z 為獨立表示各核酸鹼、以基本保護基所保護的核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，

X^Z 為獨立表示各氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，

W 表示氫原子或一時保護基，

Y 為獨立表示各氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護的硫醇基、氫化硼基、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，

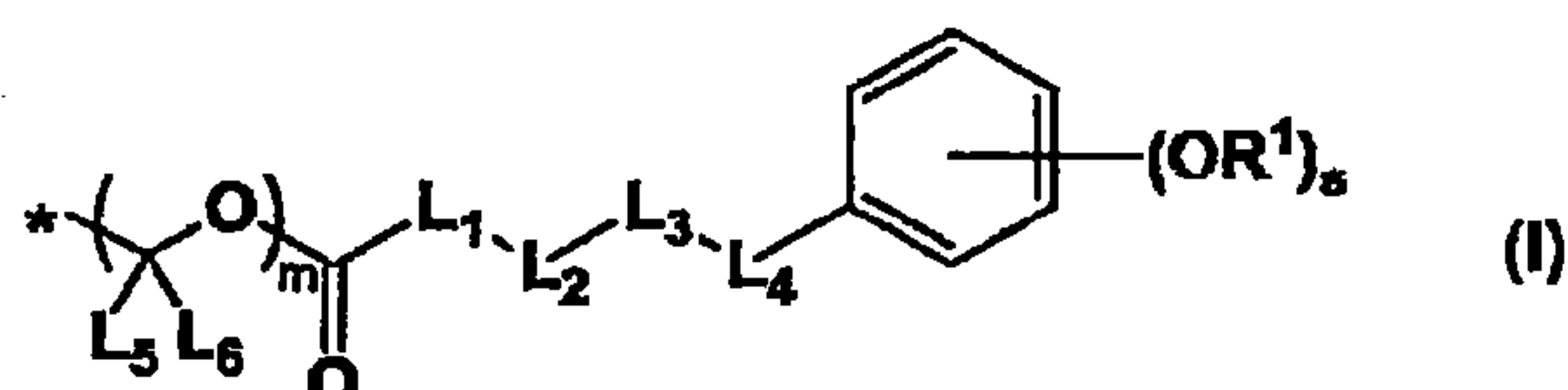
Z 表示氫原子、基本保護基、一時保護基或擬似固相保護基，

且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的

經基，及 Z 為擬似固相保護基的至少 1 項，

前述擬似固相保護基的至少一個為式(I)

【化 10】



[0053] (式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L¹ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L² 為單鍵、-COO-、-CON(R²)- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或 -O-，

L³ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L⁴ 為單鍵、-COO-、-CON(R²)- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或 -O-，

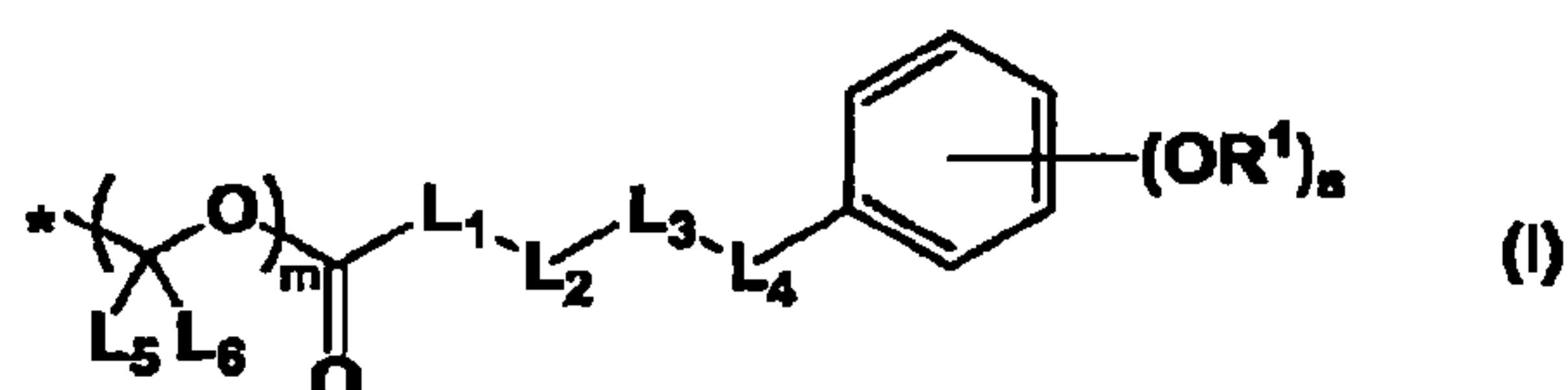
L⁵ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1， m 為 0 時， L^4 非單鍵)所示]所示化合物、或其鹽。

[0054] [36]一種擬似固相保護基，其特徵係由下述式 (I)

【化 1 1】



[0055] (式中，*表示與選自由核苷酸或寡核苷酸的 2' 位、3' 位及 5' 位的羥基以及核酸鹼部所成群的至少 1 處的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、

C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、
-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-
6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L⁵ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或
C2-6 鹵烯基，

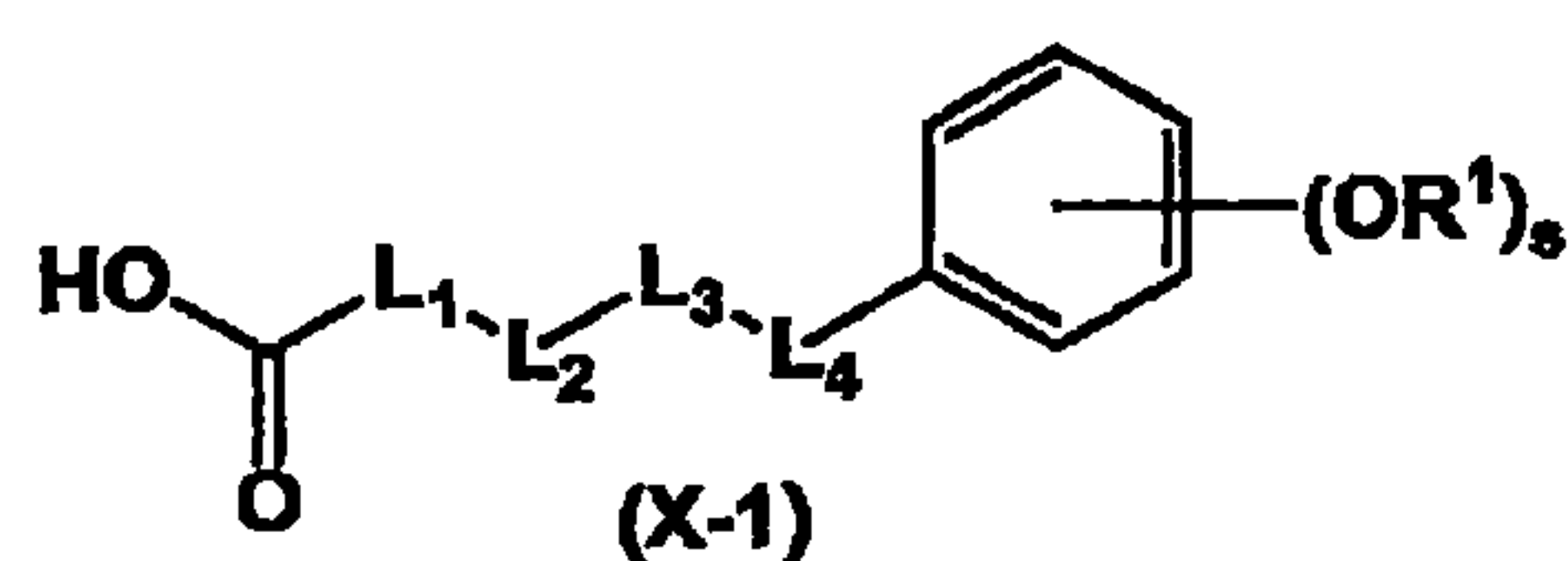
L⁶ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或
C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1，m 為 0 時，L⁴ 非單鍵)所示。

[0056] [37]一種核苷酸或寡核苷酸的製造方法，其為
製造具有以下擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸，其特
徵為將於 3'位及 5'位，獨立具有羥基或經保護的羥基、
於選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處
具有羥基，或於 2'位及核酸鹼部的至少 1 處具有羥基或胺
基之核苷酸或寡核苷酸，

與下述式(X-1)

【化 1 2】



[0057] (式中，R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40
炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L¹ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔
基，

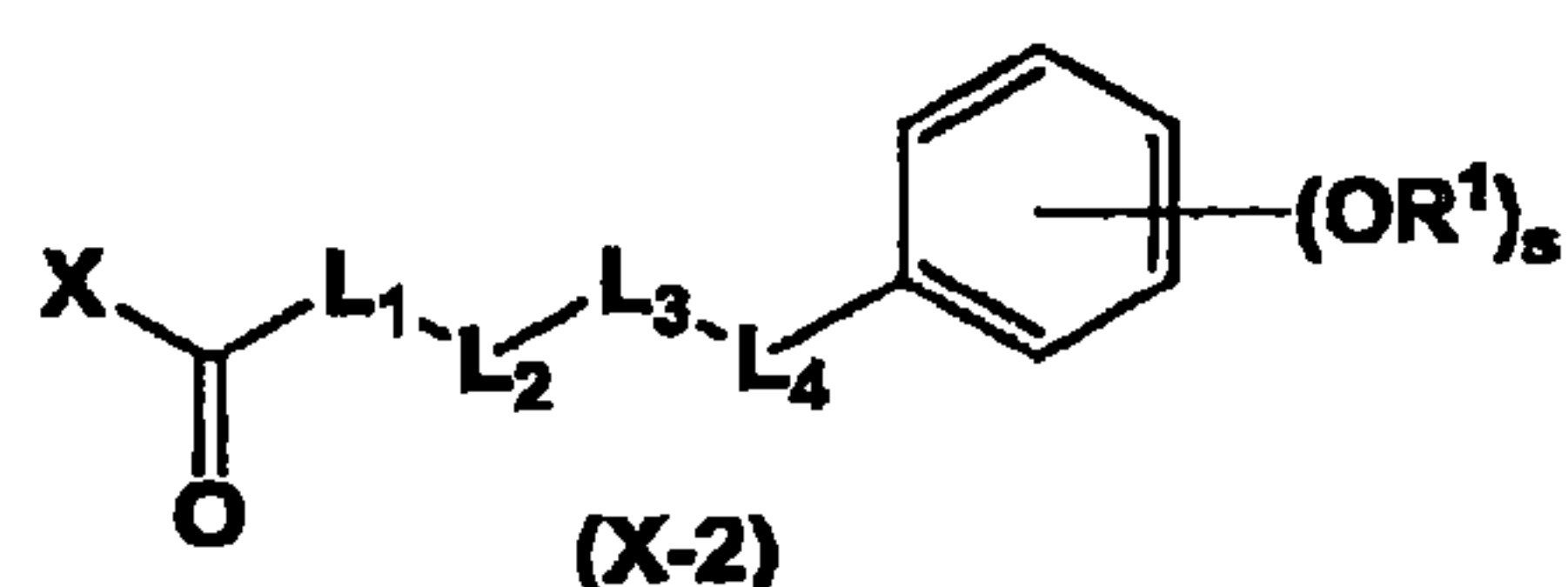
L² 為單鍵、-COO-、-CON(R²)-(式中 R² 表示氫原子、

C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、
-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-
6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L³ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔
基，

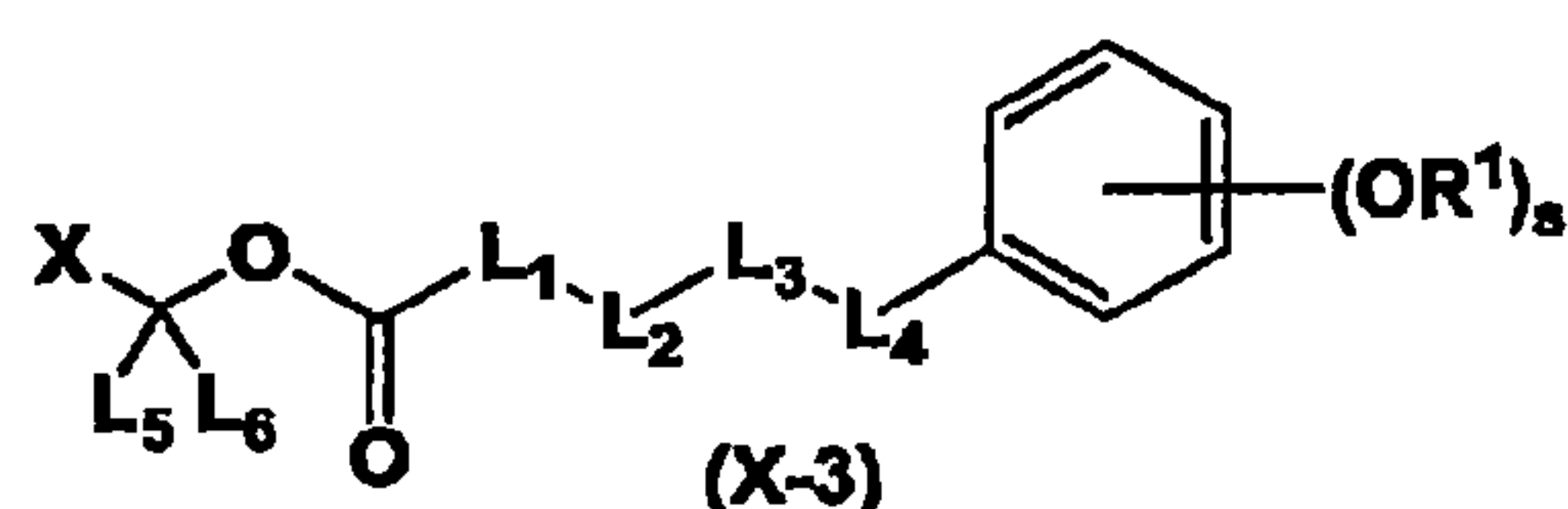
L⁴ 為 -COO-、-CON(R²)-(式中 R² 表示氫原子、C1-6
烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、
-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷
基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-)所示羧基化
合物、下述式(X-2)

【化13】



[0058] (式中，X 為鹵素原子，R¹、L¹、L²、L³ 及 L⁴
與前述式(X-1)中的定義相同)所示酸鹵素化物或下述式(X-
3)

【化14】



[0059] (式中，X 為鹵素原子，R¹、L¹、L²、及 L³ 與
前述式(X-1)中之定義相同，

L⁴ 為單鍵、-COO-、-CON(R²)-(式中 R² 表示氫原子、

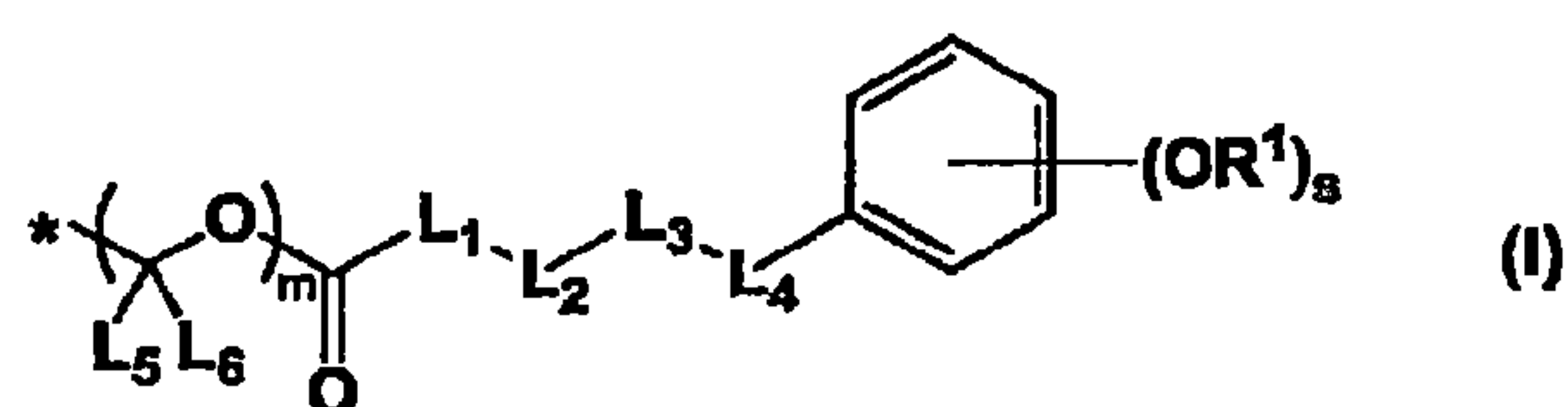
C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、
-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-
6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L⁵ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或
C2-6 鹵烯基，

L⁶ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或
C2-6 鹵烯基)所示鹵素化烷基化合物進行反應，

製造於選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的
至少 1 處具有下述式(I)

【化 1 5】



[0060] (式中，*表示與選自由 2'位、3'位、5'位及核
酸鹼部所成群的至少 1 處的鍵結位置，

R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1
至 5 的整數，

L¹ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔
基，

L² 為單鍵、-COO-、-CON(R²)-(式中 R² 表示氫原子、
C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、
-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-
6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L³ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔

基，

L^4 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{O}-$ ，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1， m 為 0 時， L^4 非單鍵)所示擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸。

[發明之效果]

[0061] 依據本發明，可提供使用容易分離且保存安定性高之核苷酸或寡核苷酸的寡核苷酸之新穎製造方法。又，該新穎製造方法可對應寡核苷酸之大量合成。

【圖式簡單說明】

[0062]

[圖 1]表示使用於寡核苷酸合成的核酸單體之安定性圖。

【實施方式】

[實施發明的形態]

[0063] 以下對於本發明做詳細說明。

雖無特別記載，在本說明書所使用的所有技術用語及科學用語皆與本發明所屬記屬領域中斯業者所理解的一般意思相同。記載於本說明書的同樣或同等任意方法及材料皆可使用於本發明之實施或試驗中，但該較佳方法及材料如以下所記載。

所謂「步驟」之用語，並非僅為獨立步驟，即使無法與其他步驟做明確區分，只要可達成該步驟所期待的目的，皆含於本用語中。又，使用「 $\sim$ 」所示數值範圍係將「 $\sim$ 」的前後所記載的數值作為各最小值及最大值而涵蓋的範圍。

[0064] 且，本說明書中「n-」表示正、「i-」表示異、「t-」及「tert-」表示第三，「Ph」表示苯基、「Py」表示吡啶基或吡啶、「Me」表示甲基、「Et」表示乙基、「Pr」表示丙基、「Bu」表示丁基、「Bn」表示苯甲基、「Boc」表示第三丁氧基羰基、「TBS」表示第三丁基二甲基矽基、「TIPS」表示三異丙基矽基、「TBDPS」表示第三丁基二苯基矽基、「DMTr」表示4,4'-二甲氧基三苯甲基。

「 L^1 」與「 L_1 」為同義，「 L^2 」與「 L_2 」為同義，「 L^3 」與「 L_3 」為同義，「 L^4 」與「 L_4 」為同義，「 L^5 」與「 L_5 」為同義，「 L^6 」與「 L_6 」為同義。

[0065] 本說明書中所謂「鹵素原子」為氟原子、氯原子、溴原子或碘原子。

[0066] 所謂「C1-6 烷基」表示碳數為 1 至 6 的直鏈或分支狀飽和烴基，例如可舉出甲基、乙基、n-丙基、異丙基、n-丁基、異丁基、sec-丁基、tert-丁基、n-戊基、異戊基、新戊基、n-己基及異己基等。

[0067] 所謂「C2-6 烯基」表示於任意位置上具有 1 個以上的雙鍵，碳數為 2 至 6 的直鏈或分支狀烴基，例如可舉出乙烯基(乙烯基)、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)、異丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基(高烯丙基)、4-戊烯基、5-己烯基等。

[0068] 所謂「C2-6 炔基」表示於任意位置上具有 1 個以上的參鍵，碳數為 2 至 6 的直鏈或分支狀烴基，例如可舉出乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、4-戊炔基、5-己炔基等。

[0069] 所謂「C1-40 烷基」表示碳數為 1 至 40 的直鏈或分支狀飽和烴基，例如可舉出甲基、乙基、n-丙基、異丙基、n-丁基、異丁基、sec-丁基、tert-丁基、n-戊基、異戊基、新戊基、n-己基、異己基、癸基、十八烷基、二十烷基、三十烷基、四十烷基等。

[0070] 所謂「C2-40 烯基」表示於任意位置上具有 1 個以上的雙鍵之碳數為 2 至 40 的直鏈或分支狀烴基，例如可舉出乙烯基(乙烯基)、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)、異丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基(高烯丙基)、4-戊烯基、5-己烯基、10-癸烯基、18-十八烯基、20-二十烯基、30-三十烯基、40-四十烯基等。

[0071] 所謂「C2-40 炔基」表示於任意位置上具有 1 個以上的參鍵之碳數為 2 至 40 的直鏈或分支狀烴基，例如可舉出乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、4-戊炔基、5-己炔基、10-癸炔基、18-十八炔基、20-二十炔基、30-三十炔基、40-四十炔基等。

[0072] 所謂「C10-30 烷基」表示碳數為 10 至 30 的直鏈或分支狀飽和烴基，例如可舉出癸基、十八烷基、二十烷基、三十烷基等。

[0073] 所謂「C15-25 烷基」表示碳數為 15 至 25 的直鏈或分支狀飽和烴基，例如可舉出十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十二烷基等。

[0074] 所謂「C15-20 烷基」表示碳數為 15 至 20 的直鏈或分支狀飽和烴基，例如可舉出十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基等。

[0075] 所謂「C10-30 烯基」表示於任意位置上具有 1 個以上的雙鍵之碳數為 10 至 30 的直鏈或分支狀烴基，例如可舉出 2-癸烯基、10-癸烯基、18-十八烯基、20-二十烯基、30-三十烯基等。

[0076] 所謂「C1-6 伸烷基」表示自前述「C1-6 烷基」中除去 1 個任意位置之氫原子的 2 價取代基，例如可舉出伸甲基、伸乙基(乙烷二基)、丙烷-1,3-二基、丙烷-2,2-二基、2,2-二甲基-丙烷-1,3-二基、己烷-1,6-二基、3-甲基丁烷-1,2-二基等。

[0077] 所謂「C2-6 伸烷基」表示前述「C1-6 伸烷基」之中，碳數為 2 至 6 的直鏈或分支狀 2 價之取代基，例如可舉出伸乙基(乙烷二基)、丙烷-1,3-二基、丙烷-2,2-二基、己烷-1,6-二基、3-甲基丁烷-1,2-二基等。

[0078] 所謂「C2-6 伸烯基」表示自前述「C2-6 烯基」除去 1 個任意位置的氫原子之 2 價的取代基，例如可舉出乙烯-1,1-二基、乙烯-1,2-二基、丙烯-1,1-二基、丙烯-1,2-二基、丙烯-1,3-二基、丁-1-烯-1,4-二基、丁-1-烯-1,3-二基、丁-2-烯-1,4-二基、丁-1,3-二烯-1,4-二基、戊-2-烯-1,5-二基、己-3-烯-1,6-二基、己-2,4-二烯-1,6-二基等。

[0079] 所謂「C2-6 伸炔基」表示自前述「C2-6 炔基」除去 1 個任意位置的氫原子之 2 價的取代基，例如可舉出乙炔-1,2-二基、丙炔-1,3-二基、丁-1-炔-1,4-二基、丁-1-炔-1,3-二基、丁-2-炔-1,4-二基、戊-2-炔-1,5-二基、戊-2-炔-1,4-二基、己-3-炔-1,6-二基等。

[0080] 所謂「C1-6 鹵烷基」表示在 1 個以上之前述「鹵素原子」中，前述「C1-6 烷基」的任意位置之氫原子被取代而成的基，例如可舉出單氟甲基、單氟乙基、單氟丙基、2,2,3,3,3-五氟丙基、單氯甲基、三氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、2,2,2-三氯乙基、1,2-二溴乙基及 1,1,1-三氟丙烷-2-基等。

[0081] 所謂「C2-6 鹵烯基」表示在 1 個以上的前述「鹵素原子」中，前述「C2-6 烯基」的任意位置之氫原

子被取代而成的基。

[0082] 所謂「C3-6 環烷基」表示自構成環的碳原子數為 3 至 6 個之單環系、縮合環系、交聯環系或螺環系之脂肪族烴環除去 1 個任意位置的氫原子之 1 價取代基，作為具體例子，可舉出環丙基、環丁基、環戊基、環己基等。

[0083] 所謂「C1-6 烷氧基」表示前述「C1-6 烷基」於氧基(-O-)鍵結的基。

[0084] 所謂「單 C1-6 烷基胺基」表示 1 個前述 C1-6 烷基鍵結於胺基的基，例如可舉出甲基胺基、乙基胺基、n-丙基胺基、異丙基胺基、n-丁基胺基、異丁基胺基、sec-丁基胺基、tert-丁基胺基、n-戊基胺基、異戊基胺基、新戊基胺基、n-己基胺基及異己基胺基等。

[0085] 所謂「二 C1-6 烷基胺基」表示相同或相異的 2 個前述「C1-6 烷基」鍵結於胺基的基，例如可舉出二甲基胺基、二乙基胺基、二-n-丙基胺基、二異丙基胺基、二-n-丁基胺基、二異丁基胺基、二-t-丁基胺基、二-n-戊基胺基、二-n-己基胺基、N-乙基-N-甲基胺基、N-甲基-N-n-丙基胺基、N-異丙基-N-甲基胺基、N-n-丁基-N-甲基胺基、N-異丁基-N-甲基胺基、N-t-丁基-N-甲基胺基、N-甲基-N-n-戊基胺基、N-n-己基-N-甲基胺基、N-乙基-N-n-丙基胺基、N-乙基-N-異丙基胺基、N-n-丁基-N-乙基胺基、N-乙基-N-異丁基胺基、N-t-丁基-N-乙基胺基、N-乙基-N-n-戊基胺基、N-乙基-N-n-己基胺基等。

[0086] 「C1-6 烷氧基羰基」、「單 C1-6 烷基胺基羰基」及「二 C1-6 烷基胺基羰基」等表示各前述「C1-6 烷氧基」、「單 C1-6 烷基胺基」及「二 C1-6 烷基胺基」鍵結於羰基(-C(O)-)的基。

[0087] 所謂「C6-10 芳基」表示自構成環的原子皆為碳原子之碳原子數為 6 至 10 個的單環式或二環式之芳香族烴環除去 1 個任意位置之氫原子的 1 價取代基，作為具體例子可舉出苯基及萘基等。

[0088] 所謂「5-10 員雜芳基」表示自構成環之原子數為 5 至 10 個，構成環之原子中含有 1 至 5 個雜原子(該雜原子表示氮原子、氧原子或硫原子，2 個以上時可相同亦可相異)之單環系或縮合環系的芳香族雜環除去 1 個任意位置之氫原子的 1 價取代基。

[0089] 作為單環系之「5-10 員雜芳基」，可舉出 2-噻吩基、3-噻吩基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-吡喃基、3-吡喃基、4-吡喃基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、1-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、1-吡唑基、3-吡唑基、4-吡唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、3-異噻唑基、4-異噻唑基、5-異噻唑基、1,2,4-三唑-1-基、1,2,4-三唑-3-基、1,2,4-三唑-5-基、1,2,3-三唑-1-基、1,2,3-三唑-4-基、1,2,3-三唑-5-基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、3-異噁唑基、4-異噁唑基、5-異噁唑基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-吡嗪基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、3-噻嗪基、4-噻嗪基、1,3,4-噁二唑-2-基、1,3,4-噻二

唑-2-基、1,2,4-噁二唑-3-基、1,2,4-噁二唑-5-基、1,2,4-噻二唑-3-基、1,2,4-噻二唑-5-基、1,2,5-噁二唑-3-基及1,2,5-噻二唑-3-基等。

[0090] 作為縮合環系的「5-10 員雜芳基」，可舉出2-苯並呋喃基、3-苯並呋喃基、4-苯並呋喃基、5-苯並呋喃基、6-苯並呋喃基、7-苯並呋喃基、1-異苯並呋喃基、4-異苯並呋喃基、5-異苯並呋喃基、2-苯並噻吩基、4-苯並噻吩基、5-苯並噻吩基、6-苯並噻吩基、7-苯並噻吩基、1-異苯並噻吩基、4-異苯並噻吩基、5-異苯並噻吩基、2-苯並噻唑基、3-苯並噻唑基、4-苯並噻唑基、5-苯並噻唑基、6-苯並噻唑基、7-苯並噻唑基、2-色烯基、3-色烯基、4-色烯基、5-色烯基、6-色烯基、7-色烯基、8-色烯基、1-吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、7-吡啶基、8-吡啶基、1-異吡啶基、2-異吡啶基、4-異吡啶基、5-異吡啶基、1-吡嗪基、2-吡嗪基、3-吡嗪基、4-吡嗪基、5-吡嗪基、6-吡嗪基、7-吡嗪基、2-嘧啶基、6-嘧啶基、7-嘧啶基、8-嘧啶基、2-喹啉基、3-喹啉基、4-喹啉基、5-喹啉基、6-喹啉基、7-喹啉基、8-喹啉基、1-異喹啉基、3-異喹啉基、4-異喹啉基、5-異喹啉基、6-異喹啉基、7-異喹啉基、8-異喹啉基、1-酞嗪基、5-酞嗪基、6-酞嗪基、2,7-萘啶(Naphthyridin)-1-基、2,7-萘啶-3-基、2,7-萘啶-4-基、2,6-萘啶-1-基、2,6-萘啶-3-基、2,6-萘啶-4-基、1,8-萘啶-

2-基、1,8-萘啶-3-基、1,8-萘啶-4-基、1,7-萘啶-2-基、1,7-萘啶-3-基、1,7-萘啶-4-基、1,7-萘啶-5-基、1,7-萘啶-6-基、1,7-萘啶-8-基、1,6-萘啶-2-基、1,6-萘啶-3-基、1,6-萘啶-4-基、1,6-萘啶-5-基、1,6-萘啶-7-基、1,6-萘啶-8-基、1,5-萘啶-2-基、1,5-萘啶-3-基、1,5-萘啶-4-基、2-喹啉基、5-喹啉基、6-喹啉基、2-喹啉基、4-喹啉基、5-喹啉基、6-喹啉基、7-喹啉基、8-喹啉基、3-噌啉基、4-噌啉基、5-噌啉基、6-噌啉基、7-噌啉基、8-噌啉基、2-喋啶基、4-喋啶基、6-喋啶基及 7-喋啶基等。

[0091] 所謂「芳烷基」表示前述「C1-6 烷基」的任意氫原子由前述「C6-10 芳基」所取代的 1 價取代基。

[0092] 所謂「雜芳烷基」表示前述「C1-6 烷基」的任意氫原子藉由前述「5-10 員雜芳基」所取代的 1 價取代基。

[0093] 所謂「3-11 員含氮非芳香族雜環基」表示自含有至少 1 個以上氮原子之構成環的原子數為 3 至 11 個之單環系、縮合環系(該縮合環系中非芳香族環可縮合為非芳香族環或芳香族環)、交聯環系或螺環系的非芳香族性之雜環除去 1 個任意位置之氮原子的 1 價取代基，可舉出氮雜環丁基、吡咯烷基、2-氧代吡咯烷基、哌啶基、3-氧代哌啶基、哌嗪基、嗎啉代基、硫代嗎啉代基、高嗎啉代基、高哌嗪基等。

[0094] 「C1-40 烷基硫基」、「C3-6 環烷基硫基」、「C6-10 芳基硫基」、「5-10 員雜芳基硫基」、「芳烷基硫代基」及「雜芳基硫基」等表示各前述「C1-40 烷基」、「C3-6 環烷基」、「C6-10 芳基」、「5-10 員雜芳基」、「芳烷基」及「雜芳基」鍵結於硫代基(-S-)之基。

[0095] 對於本說明書，所謂成為寡核苷酸之構成單位的「核苷酸」表示於核酸鹼為糖(例如可舉出核糖、2'-脫氧核糖、2'位與4'位經交聯的核糖)的1'位藉由N-糖苷化所鍵結的化合物。

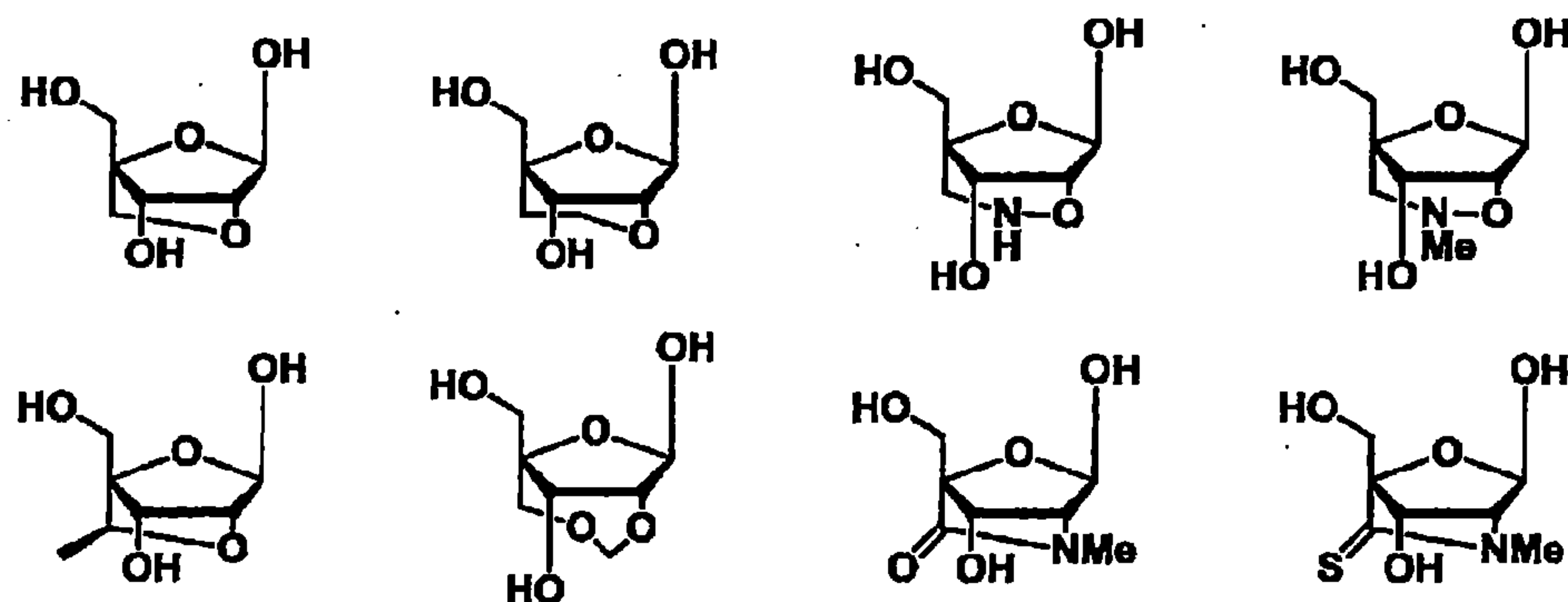
其中，前述核糖及2'-脫氧核糖為無取代，或由選自由C1-6 烷基、鹵素原子、羥基、胺基、以基本保護基所保護的羥基、經保護的胺基所成群的1個以上取代基所取代。又，前述C1-6 烷基為無取代，或獨立由選自由鹵素原子、C1-6 烷氧基羰基、單C1-6 烷基胺基羰基及二C1-6 烷基胺基羰基等1個以上取代基所取代。前述C1-6 烷氧基羰基、單C1-6 烷基胺基羰基及二C1-6 烷基胺基羰基等為無取代，或由C6-10 芳基、5-10 員雜芳基或3-11 員含氮非芳香族雜環基所取代。

所謂2'位與4'位經交聯的核糖僅為核苷酸的2'位與4'位藉著交聯基進行交聯，並無限定，例如可舉出2'位與4'位以C2-6 伸烷基(該伸烷基為無取代，或由C1-6 烷基所取代。又該伸烷基的1個或者2個伸甲基未被取代，或

由選自由 $-O-$ 、 $-NR^{11}-$ (R^{11} 表示氫原子或 C1-6 烷基)、 $-S-$ 、 $-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-COO-$ 、 $-OCONR^{12}-$ (R^{12} 表示氫原子或 C1-6 烷基)、 $-CONR^{13}-$ (R^{13} 表示氫原子或 C1-6 烷基) 及 $-CSNR^{14}-$ (R^{14} 表示氫原子或 C1-6 烷基) 的基所取代) 進行交聯的核糖。作為具體例子可舉出下述式化合物。核苷酸的糖較佳為核糖或 2'-脫氧核糖。

[0096]

【化 16】



[0097] 對於本說明書，所謂「核酸鹼」僅為使用於核酸之合成者即可，並無特別限制，例如可舉出胞嘧啶基、尿嘧啶基、胸腺嘧啶基、5-甲基胞嘧啶基等嘧啶鹼、腺苷酸基、鳥苷酸基等嘌呤鹼。又，所謂「經保護的核酸鹼」表示例如可舉出具有胺基的核酸鹼之腺苷酸基、鳥苷酸基、或胞嘧啶基中，胺基經保護者、具有羥基之核酸鹼時羥基經保護者、具有硫醇基之核酸鹼時硫醇基經保護者、或對於具有羰基的核酸鹼，與於該環被取代的胺基或羥基經共軛而羰基成為羥基的形式而被保護者等意思，以可耐得住以 3'位或 5'位中之一時保護基的脫保護條件之

保護基所保護的核酸鹼為佳。

[0098] 作為前述核酸鹼中之「胺基的保護基」，並無特別限定，例如可舉出 PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第3版、JOHN WILLY&SONS 出版(1999 年)等所記載的保護基。作為該「胺基的保護基」之具體例子，例如可舉出新戊醯基、戊醯氧基甲基、三氟乙醯基、苯氧基乙醯基、4-異丙基苯氧基乙醯基、4-tert-丁基苯氧基乙醯基、乙醯基、苯甲醯基、異丁醯基、二甲基甲脒基、9-芴基甲基氧羰基等。彼等中，以苯氧基乙醯基、4-異丙基苯氧基乙醯基、乙醯基、苯甲醯基、異丁醯基、及二甲基甲脒基為佳。

[0099] 作為前述核酸鹼中之「羥基的保護基」，並無特別限定，例如可舉出 PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第3版、JOHN WILLY&SONS 出版(1999 年)等記載的任意保護基。具體為可舉出烷基(甲基、tert-丁基等)、芳基甲基(苯甲基、p-甲氧基苯甲基等)、烷氧基烷基(甲氧基甲基、甲氧基乙基、氰基乙氧基甲基、乙氧基乙基等)、2-四氫吡喃基、氰基乙基、胺基甲醯基(苯基胺基甲醯基、1,1-二氧代硫代嗎啉-4-硫代胺基甲醯基等)、醯基(乙醯基、新戊醯基、異丁醯基、苯甲醯基、苯氧基乙醯基、乙醯丙醯基、3-苯甲醯基丙醯基等)、矽基(三甲基矽基、三乙基矽基、三異丙基矽基、tert-丁基二甲基矽基、tert-丁基二苯基矽基等)、[(三異丙基矽基)氧基]甲基(Tom 基)、1-(4-氯苯基)-4-乙氧基哌啶-

4-基(C₆H₅ 基)等。這些中亦以乙醯基、苯甲醯基、苯甲基或 p-甲氧基苯甲基為佳。

作為前述核酸鹼中之「硫醇基的保護基」，除與「羥基之保護基」的同樣保護基以外，可舉出形成二硫化物鏈結的保護基。

[0100] 又，當核酸鹼的羰基經共軛而成為羥基形式而受到保護時，例如可將酚、2,5-二氯酚、3-氯酚、3,5-二氯酚、2-甲醯基酚、2-萘酚、4-甲氧基酚、4-氯酚、2-硝基酚、4-硝基酚、4-乙醯胺基酚、五氟酚、4-戊醯氧基苯甲基醇、4-硝基苯乙基醇、2-(甲基磺醯基)乙醇、2-(苯基磺醯基)乙醇、2-氰基乙醇、2-(三甲基矽基)乙醇、二甲基胺基甲酸氯化物、二乙基胺基甲酸氯化物、乙基苯基胺基甲酸氯化物、1-吡咯烷羧酸氯化物、4-嗎啉羧酸氯化物、二苯基胺基甲酸氯化物等經反應後保護羰基。

[0101] 又，於該「核酸鹼」中，於除上述基以外，亦包含核酸鹼藉由任意取代基(例如可舉出鹵素原子、烷基、芳烷基、烷氧基、醯基、烷氧基烷基、羥基、胺基、單烷基胺基、二烷基胺基、羧基、氰基、硝基等)，於任意位置上以 1 至 3 個經取代的修飾核酸鹼(例如可舉出 8-溴腺苷酸基、8-溴鳥苷酸基、5-溴胞嘧啶基、5-碘胞嘧啶基、5-溴尿嘧啶基、5-碘尿嘧啶基、5-氟尿嘧啶基、5-甲基胞嘧啶基、8-氧代鳥苷酸基、次黃嘌呤基等)。

[0102]

〔伸長反應循環〕

所謂本說明書中「伸長反應循環」表示，將具有擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸進行 H-磷酸酯化後，與具有羥基的核苷酸或寡核苷酸進行反應，得到具有擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸與具有羥基的核苷酸或寡核苷酸介著含有磷的基進行鍵結的共軛物之反應循環。

[0103] 伸長反應循環為，例如含有具有擬似固相保護基，除去於 3'位或 5'位具有以一時保護基進行保護的羥基之核苷酸或寡核苷酸的一時保護基而生成羥基的步驟、含有將生成的羥基進行 H-磷酸酯化後得到 H-磷酸酯體之步驟、由 H-磷酸酯體與具有羥基的核苷酸或寡核苷酸，得到這些介著亞磷酸二酯鍵進行鍵結的寡核苷酸之步驟。

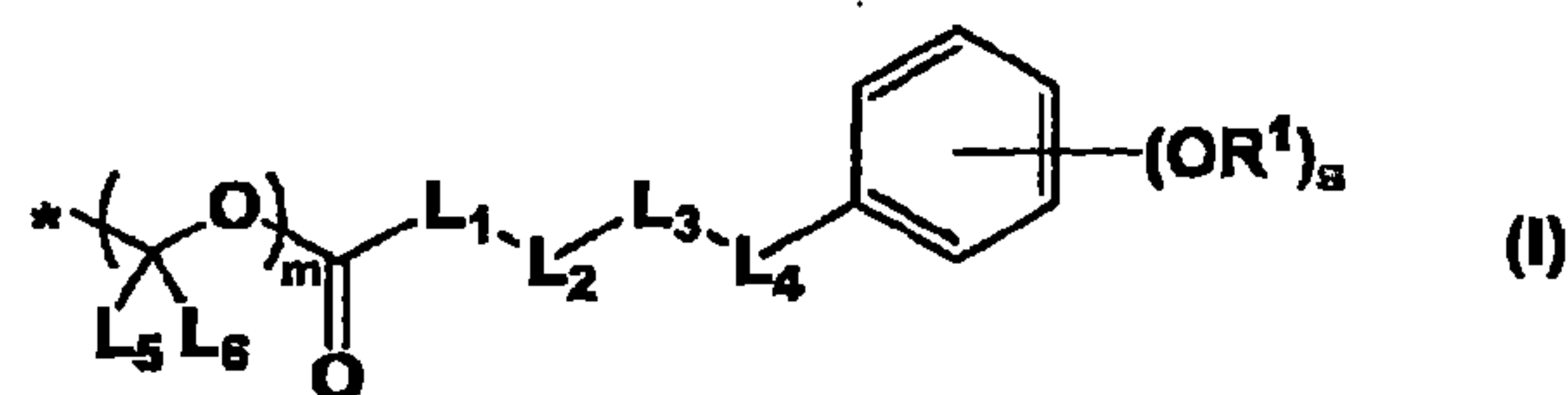
[0104]

〔擬似固相保護基〕

所謂本發明中所使用的擬似固相保護基表示，藉由將該保護基具有反應基質，使反應基質及反應生成物於低極性溶劑為可溶化，可進行液相中之反應的同時，藉由一定以上極性溶劑的添加使反應生成物或反應基質沈澱，成為可固液分離之保護基，在除去 5'位羥基或者 3'位羥基的下述一時保護基之條件下為安定之保護基。藉由使用具有擬似固相保護基的反應基質，可兼具反應性與後處理之簡便性。

[0105] 作為擬似固相保護基，可舉出下述式(I)所示基。

【化 17】



[0106] 式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或 -O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或 -O-，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1。

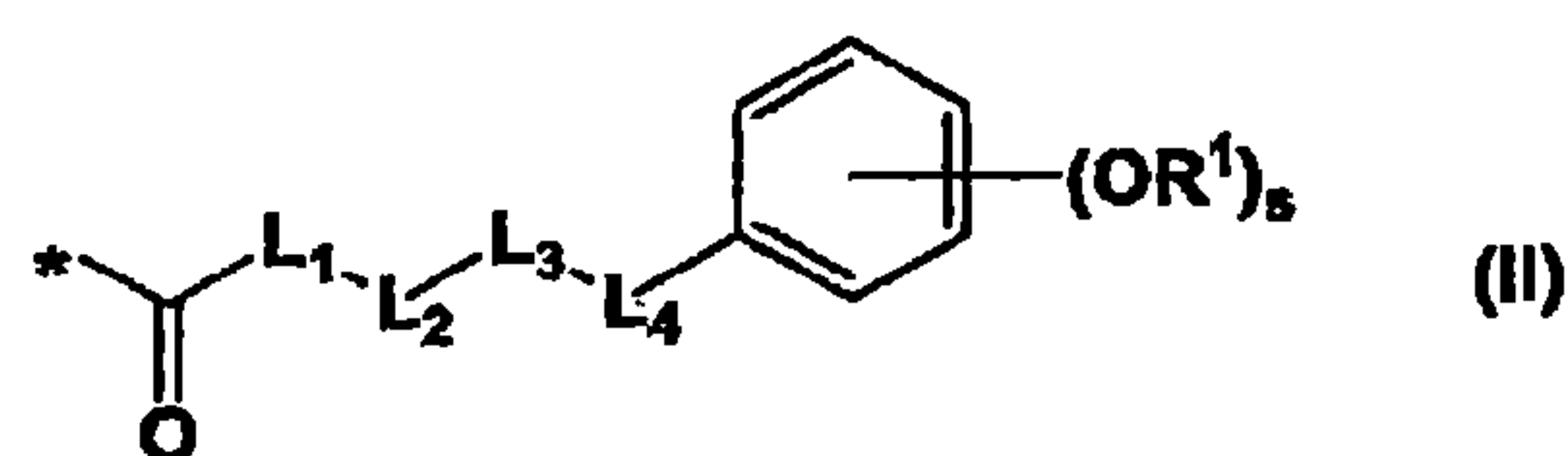
其中， L^2 為 -COO- 或 -O-， L^4 為 -OCO- 或 -O- 時， L^3 為 C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基者為佳。

[0107] 作為擬似固相保護基的代表例子，例如可舉出 3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲基氧基琥珀醯基(3-{3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲基氧羰基}丙醯基)、3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯基、4-氧代-4-(2,4,6-參(十八烷氧基)苯基)丁醯基、2-(3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺)乙氧基琥珀醯基(3-[2-{3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺}乙氧基羰基]丙醯基)、2-(N-甲基-3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺)乙氧基琥珀醯基(3-[2-{N-甲基-3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺}乙氧基羰基]丙醯基)、(N-甲基-3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺)乙醯基、((3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯基)氧基)甲基、及 2-(N-甲基-3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺)乙氧基琥珀醯基氧基甲基({(3-[2-{N-甲基-3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺}乙氧基羰基]丙醯基)氧基}甲基)等。

作為擬似固相保護基的具體例子，亦可舉出國際公開第 2014-077292 號等所揭示的基。

[0108] 擬似固相保護基較佳為下述式(II)所示基。

【化 18】



[0109] 式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基

之鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 -O-，

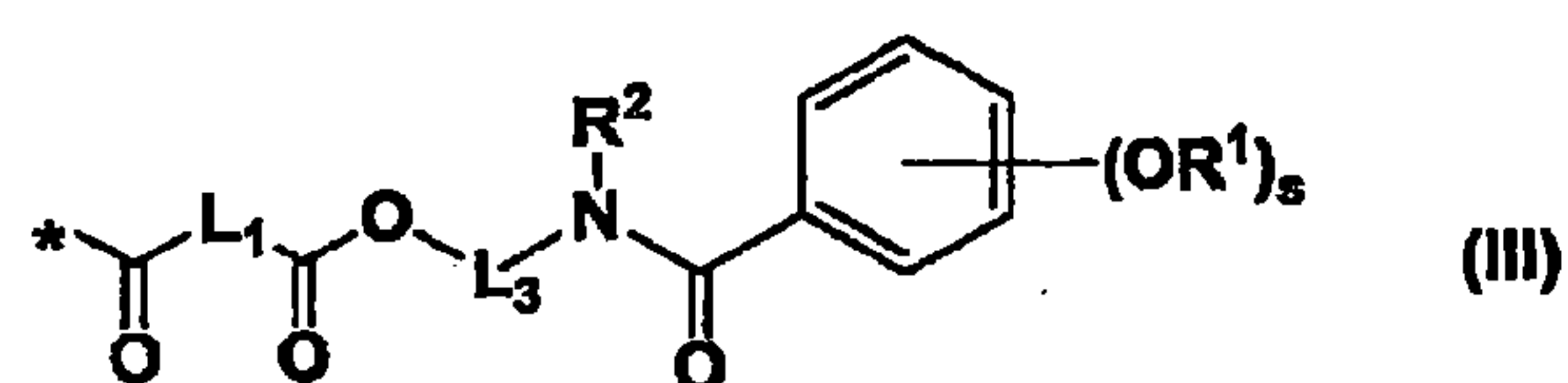
L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 -O-。

其中， L^2 為 -COO- 或 -O-， L^4 為 -OCO- 或 -O- 時， L^3 以 C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基者為較佳。

[0110] 擬似固相保護基更佳為下述式(III)所示基。

【化 19】



[0111] 式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

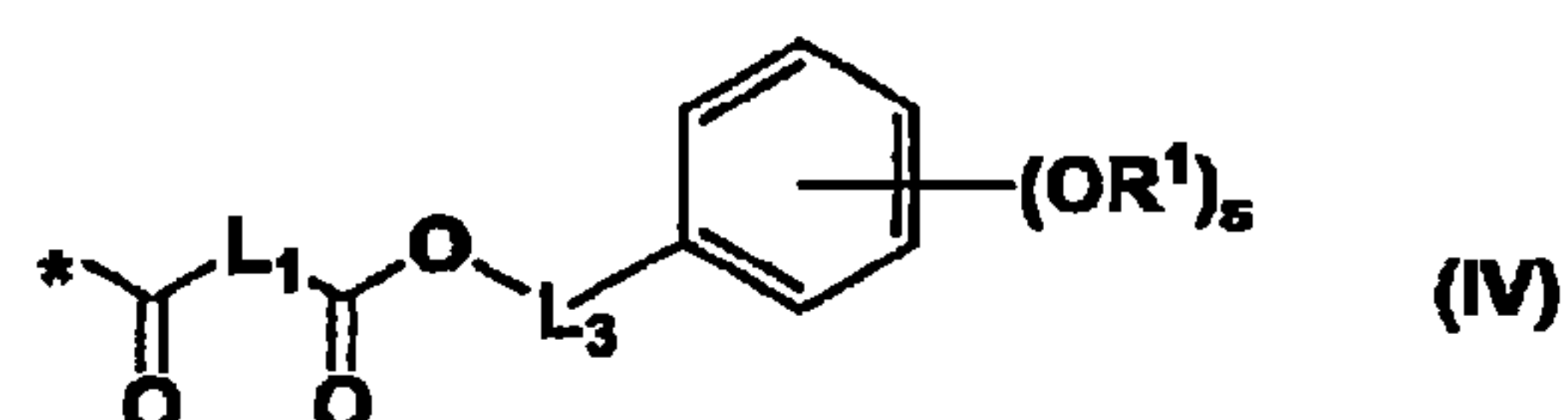
L^1 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基，

L^3 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基，

R^2 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基或 C2-6 烯基。

又，擬似固相保護基更佳為下述式(IV)所示基。

【化 2 0】



[0112] 式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

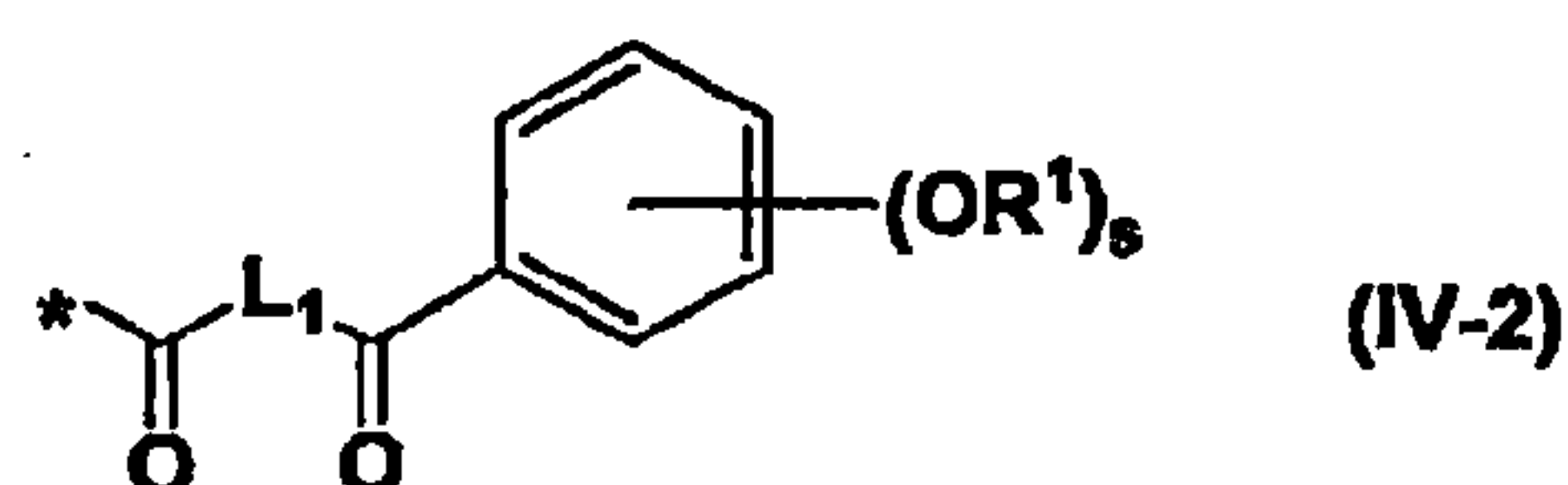
R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基，

L^3 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基。

又，擬似固相保護基更佳為下述式(IV-2)所示基。

【化 2 1】



[0113] 式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

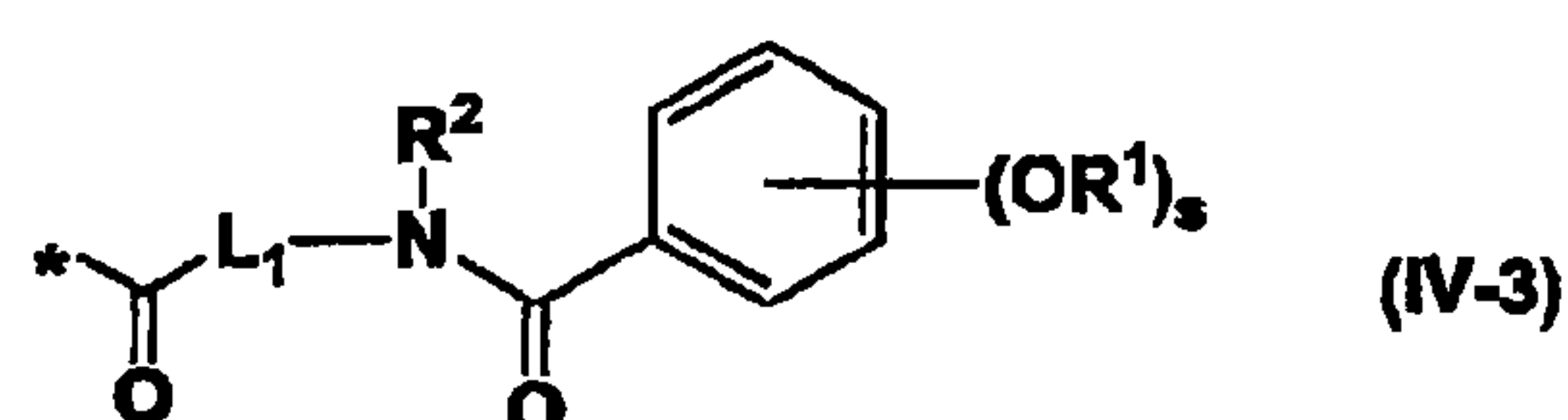
R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1

至 5 的整數，

L^1 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基。

[0114] 又，擬似固相保護基更佳為下述式(IV-3)所示基。

【化 2 2】



[0115] 式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基，

R^2 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基或 C2-6 烯基。

[0116] 對於式(II)至式(IV-2)， L^1 以 C1-6 伸烷基為佳，特佳為伸乙基。

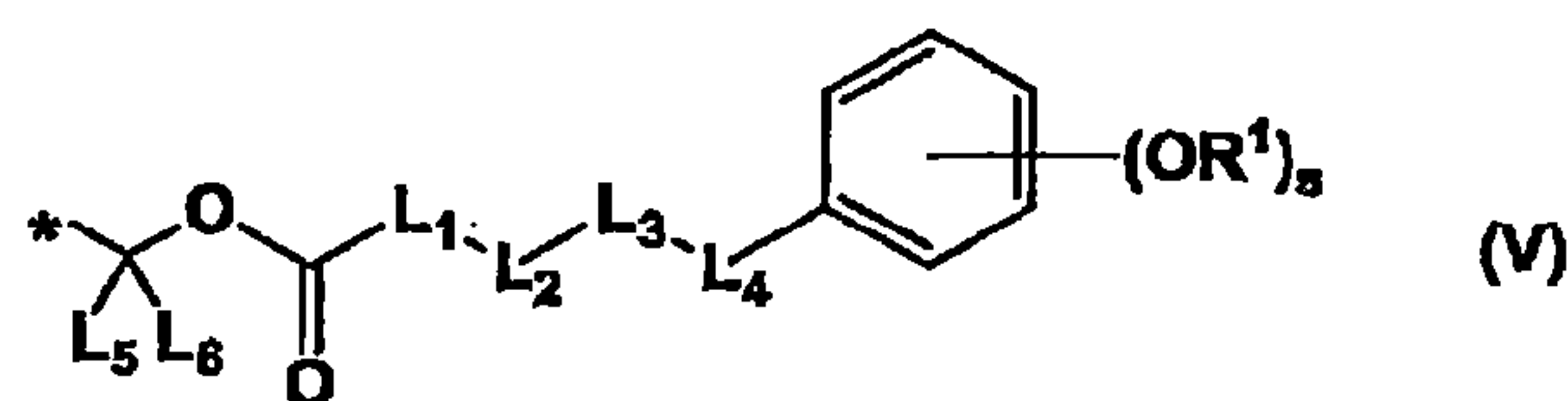
對於式(IV-3)， L^1 以 C1-6 伸烷基為佳，特佳為伸甲基。

對於式(II)至式(IV)， L^3 以 C1-6 伸烷基為佳，特佳為伸甲基或伸乙基。

對於式(II)、式(III)及式(IV-3)， R^2 以氫原子或 C1-6 烷基為佳，特佳為氫原子或甲基。

[0117] 做為其他態樣，以擬似固相保護基較佳為下述式(V)所示基。

【化 2 3】



[0118] 式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

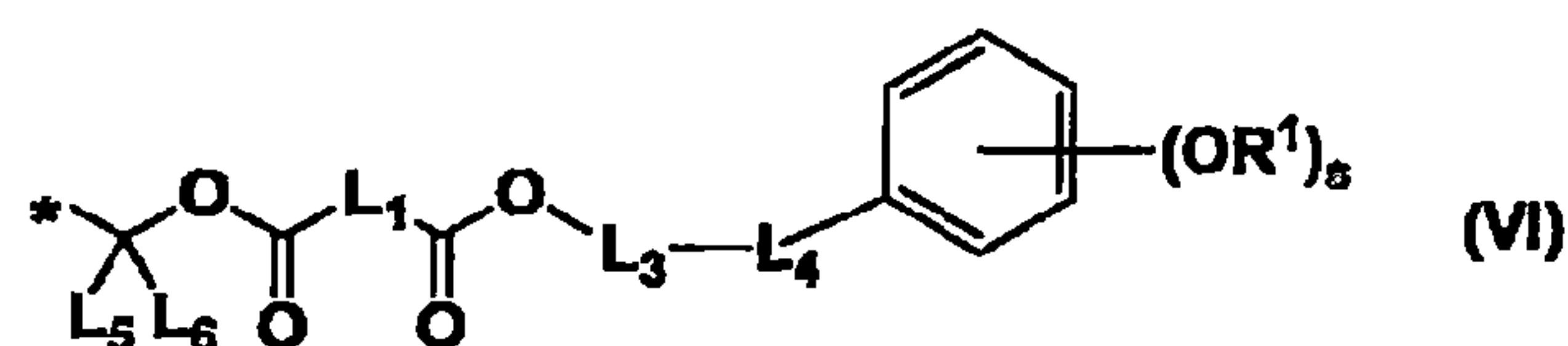
L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基。

其中， L^2 為 $-\text{COO}-$ 或 $-\text{O}-$ ， L^4 為 $-\text{OCO}-$ 或 $-\text{O}-$ 時， L^3 為 C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基為較佳。

[0119] 擬似固相保護基更佳為下述式(VI)

【化 2 4】



[0120] (式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基，

L^3 為 C1-6 伸烷基或 C2-6 伸烯基，

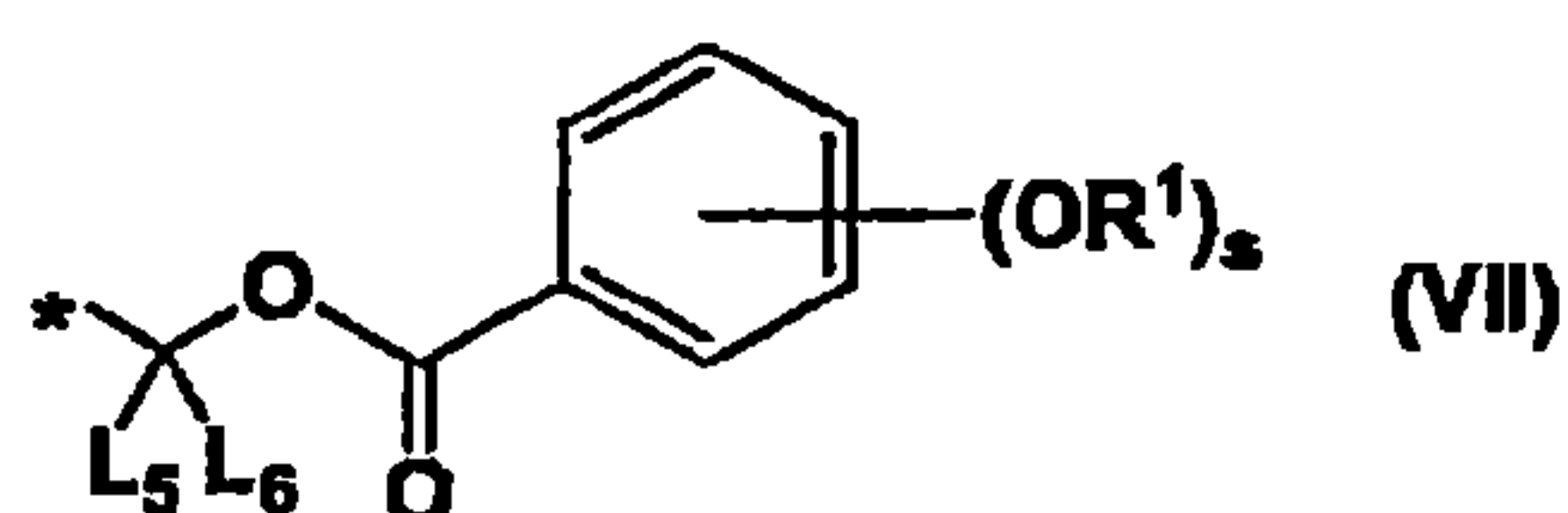
L^4 為單鍵或 $-\text{N}(R^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基或 C2-6 烯基)，

L^5 為氫原子或 C1-6 烷基，

L^6 為氫原子或 C1-6 烷基)所示基、或下述式(VII)

[0121]

【化 2 5】



[0122] (式中，*表示擬似固相保護基與所要保護的基之鍵結位置，

L^5 為氫原子或 C1-6 烷基，

L^6 為氫原子或 C1-6 烷基)所示基。

[0123] 擬似固相保護基更佳為前述式(VII)所示基。

[0124] 對於式(I)、式(V)及(VI)， L^1 以 C1-6 伸烷基為佳，特佳為伸甲基或伸乙基。

對於式(I)、式(V)及(VI)， L^3 較佳為 C1-6 伸烷基，特佳為伸甲基或伸乙基。

[0125] 對於式(I)、式(V)至式(VII)， L^5 及 L^6 特佳為氫原子。

[0126] 式(I)至式(VII)所示擬似固相保護基的 R^1 以 C10-30 烷基或 C10-30 烯基為佳，較佳為 C10-30 烷基，更佳為 C15-25 烷基，更較佳為 C15-20 烷基，特佳為十八烷基。

式(I)至式(VII)所示擬似固相保護基的較佳為 2 至 4 的整數，更佳為 3。

對於式(I)至式(VII)， s 為 2 至 5 時，各 R^1 可為相同或相異。

[0127]

〔一時保護基〕

所謂使用於本發明的一時保護基表示保護 5'位羥基或者 3'位羥基之保護基，對於前述「伸長反應循環」為經脫保護的保護基。經脫保護的 5'位羥基或者 3'位羥基對於伸長反應循環，經 H-磷酸酯化後，被利用於與其他核苷酸或寡核苷酸之鍵結。一時保護基，例如可舉出如以下文

獻所記載的保護基。

Protective Groups in Organic Synthesis, Greene T.W. and Wuts P.G.M., published by Wiley Interscience, 1999 及 Protecting Groups, Kocienski P.J., 1994, Georg Thieme Verlag。

[0128]

〔基本保護基〕

所謂本發明所使用的基本保護基表示，其為保護核酸鹼中之胺基、羰基、羥基、或者硫醇基或、2'位羥基、3'位羥基或者5'位羥基、或磷酸二酯鍵的羥基或者硫代磷酸二酯鍵之硫醇基的保護基，對於前述「伸長反應循環」中未被脫保護，且不具有前述「擬似固相保護基」所具有的功能之一般保護基。基本保護基，例如可舉出如以下文獻所記載的保護基。

Protective Groups in Organic Synthesis, Greene T.W. and Wuts P.G.M., published by Wiley Interscience, 1999 及 Protecting Groups, Kocienski P.J., 1994, Georg Thieme Verlag。

[0129] 使用於核酸鹼中之胺基、羥基、或者硫醇基的基本保護基如前述核酸鹼中之「胺基的保護基」、前述核酸鹼中之「羥基的保護基」、前述核酸鹼中之「硫醇基的保護基」。

[0130] 使用於核酸鹼中之羰基的基本保護基，可舉出苯氧基、2,5-二氯苯基、3-氯苯基、3,5-二氯苯基、2-甲

醯基苯基、2-萘基、4-甲氧基苯基、4-氯苯基、2-硝基苯基、4-硝基苯基、4-乙醯胺基苯基、五氟苯基、4-戊醯氧基苯甲基烷基、4-硝基苯乙基烷基、2-(甲基磺醯基)乙基、2-(苯基磺醯基)乙基、2-氰基乙基、2-(三甲基矽基)乙基、二甲基胺基羰基、二乙基胺基羰基、N-甲基-N-苯基胺基甲醯基、1-吡咯烷羰基、4-嗎啉代羰基、N,N-二苯基胺基羰基等，依據前述方法，可得到具有上述經保護的羰基之核苷酸或寡核苷酸。

[0131] 2'位羥基的基本保護基為作為 X^Z 中之「以基本保護基所保護的羥基」的基本保護基如後述。3'位羥基及 5'位羥基的基本保護基作為 Z 中之「以基本保護基所保護的羥基」的基本保護基如後述。

[0132] 保護磷酸二酯鍵的羥基或者硫代磷酸二酯鍵的硫醇基之基本保護基如後述。

[0133] 以保護基進行保護的官能基(以擬似固相保護基進行保護的羥基及核酸鹼、以一時保護基進行保護的羥基、以基本保護基所保護的羥基、胺基、硫醇基等)表示各該官能基之氫原子藉由該保護基進行取代的意思。

[0134] 本說明書中「於 4 位碳原子進行交聯的有機基」表示將糖的 2'位與 4'位進行交聯的有機基，雖無特別限定，例如可舉出 C2-6 伸烷基(該伸烷基可為無取代，或由 C1-6 烷基所取代。其中，該伸烷基的 1 個或者 2 個伸甲基未被取代，或由選自 $-O-$ 、 $-NR^{11}-$ (R^{11} 表示氫原子或 C1-6 烷基)、 $-S-$ 、 $-CO-$ 、 $-CS-$ 、 $-COO-$ 、 $-OCONR^{12}-$ (R^{12}

表示氫原子或 C1-6 烷基)、 $-\text{CONR}^{13}-$ (R^{13} 表示氫原子或 C1-6 烷基)及 $-\text{CSNR}^{14}-$ (R^{14} 表示氫原子或 C1-6 烷基)的基所取代)之交聯基。

[0135]

[寡核苷酸的製造方法]

其次，對於有關本發明之寡核苷酸的製造方法(以下亦稱為「本發明之製造方法」)做說明。具體對於由以擬似固相保護基所保護的核苷酸或寡核苷酸(以下亦稱為「 n 個聚合寡核苷酸」)，以核苷酸或寡核苷酸(以下亦稱為「 p 個聚合寡核苷酸」)進行伸長，製造以擬似固相保護基進行保護的寡核苷酸(以下亦稱為「 $n+p$ 個聚合寡核苷酸」)的方法做說明。且所謂 n 個聚合寡核苷酸表示 n 個核苷酸介著含有磷的基進行鍵結之寡核苷酸， $n=1$ 時， n 個聚合寡核苷酸被分解為核苷酸，對於 p 個聚合寡核苷酸亦為同樣。

[0136] 其中， n 個聚合寡核苷酸為具有 2 個以上核酸鹼部時，各核酸鹼部可為相同或相異， n 個聚合寡核苷酸為具有 2 個以上擬似固相保護基時，各擬似固相保護基可為相同或相異， n 個聚合寡核苷酸為具有 2 個以上基本保護基時，各基本保護基可為相同或相異， n 個聚合寡核苷酸為具有 2 個以上之 4 位碳原子進行交聯的有機基時，於各 4 位碳原子進行交聯的有機基可為相同或相異。

對於 p 個聚合寡核苷酸亦為同樣。

[0137] 寡核苷酸的製造方法為含有於選自由 2' 位、

3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，將 5'位或 3'位為羥基之核苷酸或寡核苷酸的該 5'-羥基或 3'-羥基經 H-磷酸酯化的磷酸酯化步驟。

又，寡核苷酸的製造方法為含有至少一種含有前述 H-磷酸酯化步驟之伸長反應循環。

[0138] 寡核苷酸的製造方法為於伸長反應循環，係以含有將持有擬似固相保護基之核苷酸或寡核苷酸的 5'位羥基或 3'位羥基進行 H-磷酸酯化之步驟為特徵。寡核苷酸的製造方法較佳為將以下步驟 a 至步驟 d 含於伸長反應循環。且，步驟 a 至步驟 d 的順序為，以步驟 a、步驟 b、步驟 c、步驟 d 的順序進行，或以步驟 a、步驟 d、步驟 b、步驟 c 的順序進行。較佳順序為步驟 a、步驟 b、步驟 c、步驟 d 之順序。

[0139]

(步驟 a)

步驟 a 為含有於非伸長末端的羥基、核酸鹼部及 2'位之中的至少 1 個具有擬似固相保護基，且除去伸長末端的羥基以一時保護基進行保護的核苷酸或寡核苷酸之一時保護基後成為羥基之脫一時保護基步驟。

[0140]

(步驟 b)

步驟 b 為含有將除去一時保護基的羥基藉由 H-磷酸酯化試藥進行 H-磷酸酯化之磷酸酯化步驟。

[0141]

(步驟 c)

步驟 c 為含有對於在步驟 b 經 H-膦酸酯化的核苷酸或寡核苷酸，添加具有羥基的核苷酸或寡核苷酸，介著該羥基經亞磷酸二酯鍵使其縮合的偶合步驟。

[0142]

(步驟 d)

步驟 d 為含有將所形成之亞磷酸二酯鍵變換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵(磷酸三酯鍵)或以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵(硫代磷酸-O,O,S-三酯鍵)等變換步驟。

其中，前述胺基磷酸二酯鍵的胺基可為無取代，或以 1 或者 2 個 C1-6 烷基進行取代。

以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵為，磷酸二酯鍵的 1 個羥基之氫原子為藉由 C1-40 烷基、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 員雜芳基、芳烷基或雜芳烷基等進行取代的鍵。其中，前述 C1-6 烷基為無取代或藉由鹵素原子、氰基等所取代。C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 員雜芳基、芳烷基及雜芳烷基為無取代，或藉由 C1-6 烷基、鹵素原子、氰基等所取代。

以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵為，硫代磷酸二酯鍵的 1 個硫醇基之氫原子藉由 C1-40 烷基、C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 員雜芳基、芳烷基或雜芳烷基等所取代的鍵。其中前述 C1-40 烷基為無取代，或藉由鹵

素原子、氰基等所取代。C3-6 環烷基、C6-10 芳基、5-10 員雜芳基、芳烷基及雜芳烷基為無取代，或藉由 C1-6 烷基、鹵素原子、氰基等所取代。

[0143] 含於在步驟 a 所使用的具有擬似固相保護基之核苷酸或寡核苷酸的核苷酸數 n 若為 1 以上之任意整數即可，並無特別限定，以 1 至 50 為佳，較佳為 1 至 30，更佳為 1 至 20，更較佳為 1 至 10，特佳為 1 至 5。

含於在步驟 c 所示使用的具有羥基之核苷酸或寡核苷酸的核苷酸數 p 若為 1 以上的任意整數即可，並無特別限定，以 1 至 50 為佳，較佳為 1 至 30，更佳為 1 至 20，更較佳為 1 至 5，進一步較佳為 1 至 3，特佳為 1，換言之使用核苷酸為特佳。

且，將在步驟 d 所得之反應混合物可直接使用於步驟 a。又，藉由於步驟 d 終了後適宜地昇溫等，可同時進行步驟 a。

[0144] 寡核苷酸的製造方法可進一步藉由含有下述步驟 e，可簡便且有效果地除去過剩原料或副產物，純化核苷酸或寡核苷酸。

(步驟 e)

步驟 e 為於在步驟 a 至步驟 d 中任一所得之反應混合物添加極性溶劑，使具有擬似固相保護基之核苷酸或寡核苷酸沈澱後，藉由固液分離取得之分離步驟。

且，步驟 e 並未存在於未使用擬似固相保護基之通常

液相合成法，亦未存在於固相合成法，其為使用擬似固相保護基的液相合成法之特有步驟。

[0145] 含於伸長反應循環之步驟 e 的數目並無特別限制。步驟 e 亦可在步驟 a 至步驟 d 中任一步驟後進行。

步驟 e 為於步驟 a 至步驟 d 的各步驟後，各獨立例如含有 0~5 次，較佳為含有 0~3 次，更佳為含有 0~2 次，更較佳為含有 0 或 1 次。其中，步驟 a~d 之後至少 1 個為含有 1 次以上的步驟 e。

於伸長反應循環中，以含有 1 至 4 次的步驟 e 者為佳。步驟 e 為，伸長反應循環中，於步驟 a 之後、步驟 b 之後及步驟 d 之後的至少 1 個中含有各 1 次時，可嚴格地控制副產物產生，由可達到高純度寡核苷酸之觀點來看為佳。步驟 e 為於伸長反應循環中，於步驟 b 之後含有 1 次，或於步驟 d 之後含有 1 次，或於步驟 b 及步驟 d 之後各含 1 次較佳。

作為其他態樣，步驟 e 為在伸長反應循環中，於步驟 a 之後含有 1 次，或於步驟 b 之後含有 1 次，或於步驟 a 及步驟 b 之後各含有 1 次，但較佳為步驟 a 及步驟 b 之後各含有 1 次為較佳。

[0146] 藉由原料之當量管理與控制反應，可控制副產物之產生量的狀況即可，將步驟 a 至步驟 d 作為基本單位重複後，進行步驟 e 者為佳。

[0147] 寡核苷酸的製造方法可進一步含有步驟 f。藉此可分離並製造所望寡核苷酸。

(步驟 f)

步驟 f 為將在步驟 a 至步驟 e 所得之寡核苷酸的基本保護基、一時保護基及擬似固相保護基全除去之脫保護步驟。

[0148] 寡核苷酸的製造方法為藉由寡核苷酸的伸長方向，主要可分類為方法 A 或方法 B。方法 A 中，將 5' 位的羥基藉由步驟 a 至步驟 c 進行變換，於 5' 位伸長核苷酸或寡核苷酸。在方法 B 中，將 3' 位的羥基藉由步驟 a 至步驟 c 進行變換，於 3' 位伸長核苷酸或寡核苷酸。

[0149] 方法 A 為含有，

含有於選自由 2' 位、3' 位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，於 3' 位具有以基本保護基或擬似固相保護基進行保護的羥基，於 5' 位具有以一時保護基進行保護的羥基之第一核苷酸或第一寡核苷酸的一時保護基經除去後生成 5'-羥基的步驟之第一步驟(步驟 a)與、

含有將所生成的 5'-羥基使用 H-膦酸酯化試藥進行 H-膦酸酯化的步驟之第二步驟(步驟 b)與

由進行 H-膦酸酯化的 5'-羥基與於 3' 位具有羥基，於 5' 位具有以一時保護基進行保護的羥基之第二核苷酸或第二寡核苷酸的 3'-羥基行程亞磷酸二酯鍵，得到第一核苷酸或第一寡核苷酸與第二核苷酸或第二寡核苷酸之共軛物的第三步驟(步驟 c)與

含有將共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫

代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵、或以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵者之第四步驟(步驟 d)的寡核苷酸之製造方法。

[0150]

方法 B 為含有

含有於選自由 2'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，於 5'位具有以基本保護基或擬似固相保護基進行保護的羥基，於 3'位具有以一時保護基進行保護的羥基之第三核苷酸或第三寡核苷酸的一時保護基經除去而生成 3'-羥基之步驟的第七步驟(步驟 a)與

含有將所生成的 3'-羥基使用 H-磷酸酯化試藥進行 H-磷酸酯化之步驟的第八步驟(步驟 b)與

經 H-磷酸酯化的 3'-羥基與於 5'位具有羥基，於 3'位具有以一時保護基進行保護的羥基之第四核苷酸或第四寡核苷酸的 5'-羥基形成亞磷酸二酯鍵，得到第三核苷酸或第三寡核苷酸與第四核苷酸或第四寡核苷酸之共軛物的第九步驟(步驟 c)與

含有將共軛物的亞磷酸二酯鍵變換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、以基本保護基所保護的磷酸二酯鍵、或以基本保護基所保護的硫代磷酸二酯鍵之步驟的第十步驟(步驟 d)之寡核苷酸的製造方法。

[0151] 以下對於步驟 a 至步驟 f 的順序作詳細說明。

[0152]

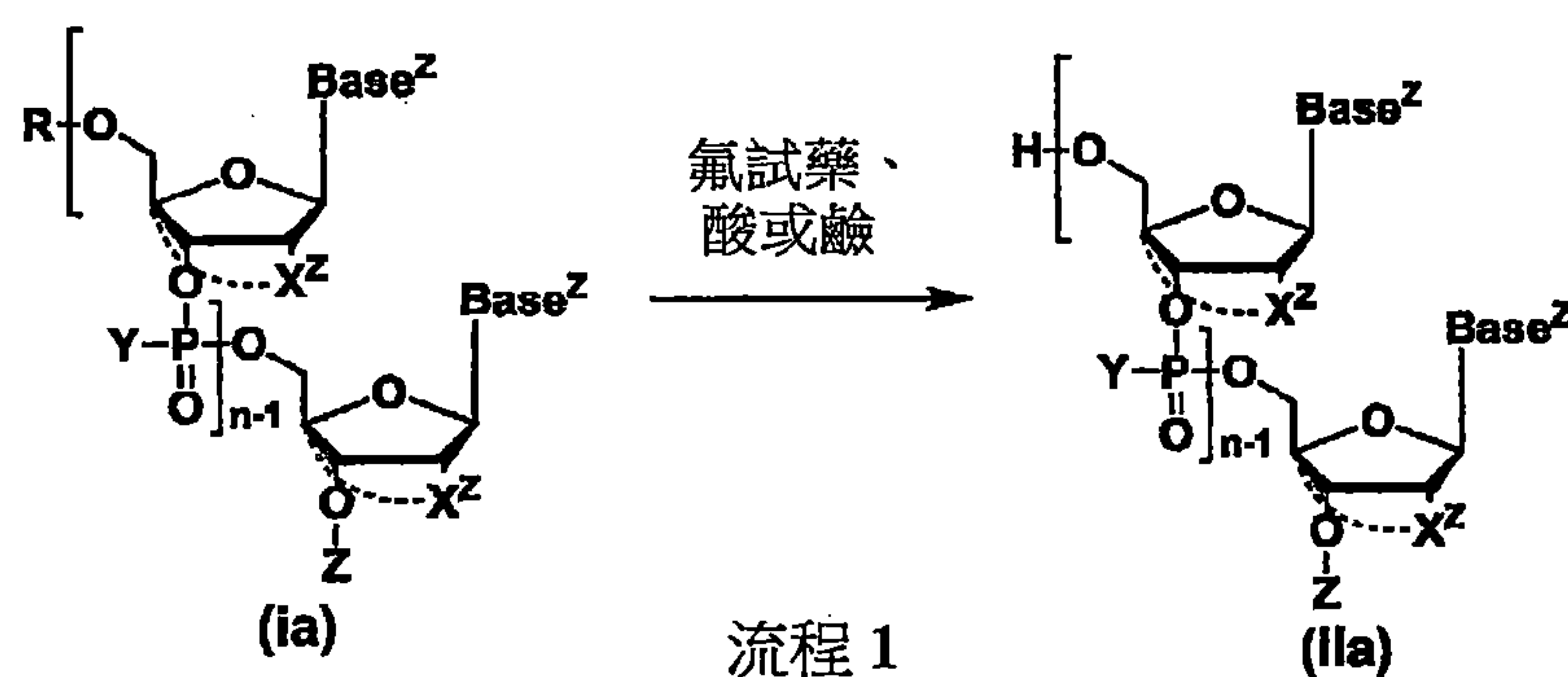
(步驟 a)(脫一時保護基步驟)

首先，將方法 A 或方法 B 的各情況的步驟 a 表示流程 1 或 2。

方法 A 中之步驟 a 對於低極性溶劑中，將 5' 位羥基為可由氟試藥、酸或鹼進行除的一時保護基 R 所保護的 n 個聚合寡核苷酸(ia)(式中，n 表示 1 以上的任意整數，n=1 時表示核苷酸)的一時保護基 R，藉由氟試藥、酸或鹼的添加除去之步驟(脫一時保護基步驟)(流程 1)。

[0153]

【化 2 6】



[0154] 流程中，n 表示 1 以上的任意整數，Base^z 為獨立表示各核酸鹼、以基本保護基所保護的核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，R 表示一時保護基，X^z 為獨立表示各氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，Y 為獨立表示各氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護

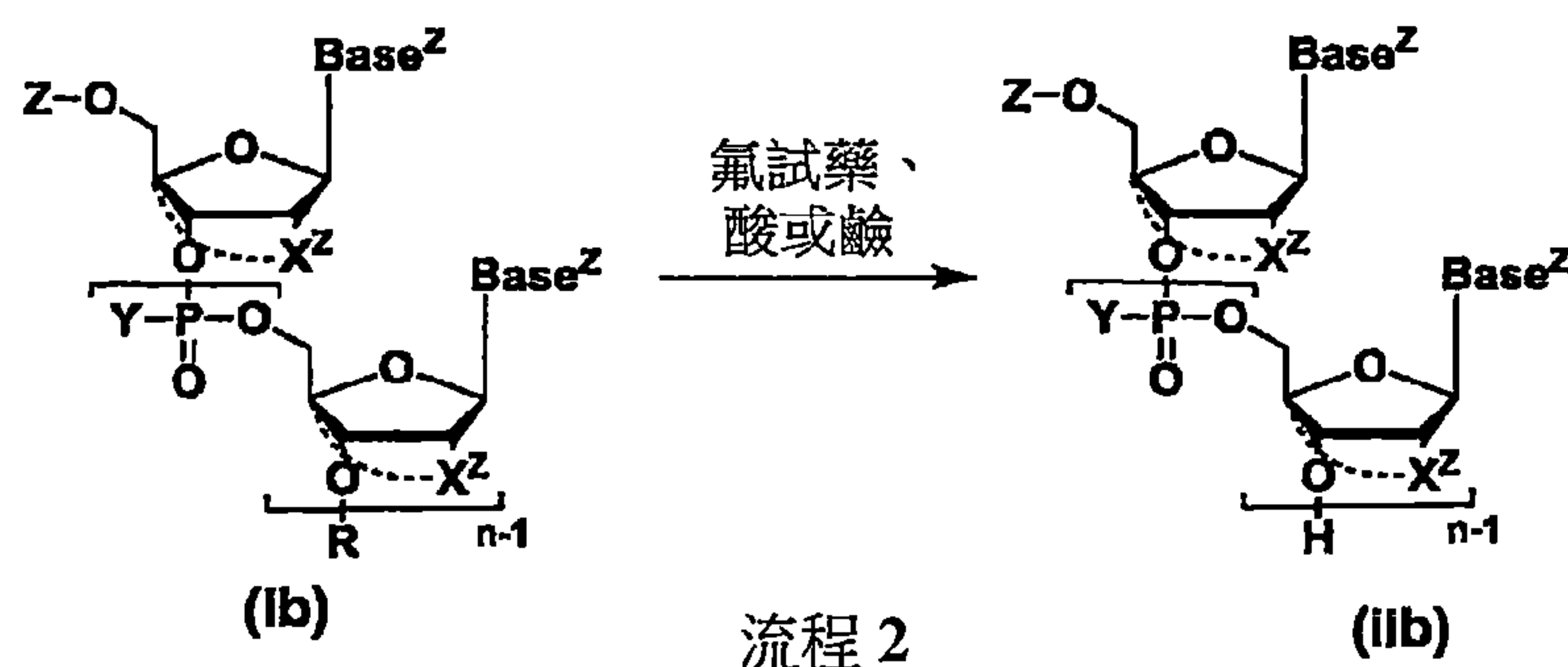
的硫醇基、氫化硼、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，Z 表示基本保護基、一時保護基或擬似固相保護基。其中，Base^Z、X^Z 及 Z 之中至少 1 個中含有擬似固相保護基。

其中，流程 1 中化合物(ia)或(iaa)為具有 2 個以上核酸鹼部時，各核酸鹼部可為相同或相異，(ia)或(iaa)具有 2 個以上擬似固相保護基時，各擬似固相保護基可為相同或相異，(ia)或(iaa)具有 2 個以上基本保護基時，各基本保護基可為相同或相異，n 個聚合寡核苷酸為具有於 2 個以上 4 位碳原子進行交聯的有機基時，於各 4 位碳原子進行交聯的有機基可為相同或相異。

[0155] 方法 B 中之(步驟 a)，對於低極性溶劑中，將 3'位羥基藉由氟試藥、可由酸或鹼除去的以一時保護基 R 進行保護的 n 個聚合寡核苷酸(ib)(式中，n 表示 1 以上的任意整數，n=1 時表示核苷酸)的一時保護基 R 藉由氟試藥、酸或鹼之添加而除去之步驟(脫一時保護基步驟)(流程 2)。且，流程中，n、Base^z、R、X^z、Y 及 Z 與流程 1 中的定義相同。

[0156]

【化 2 7】



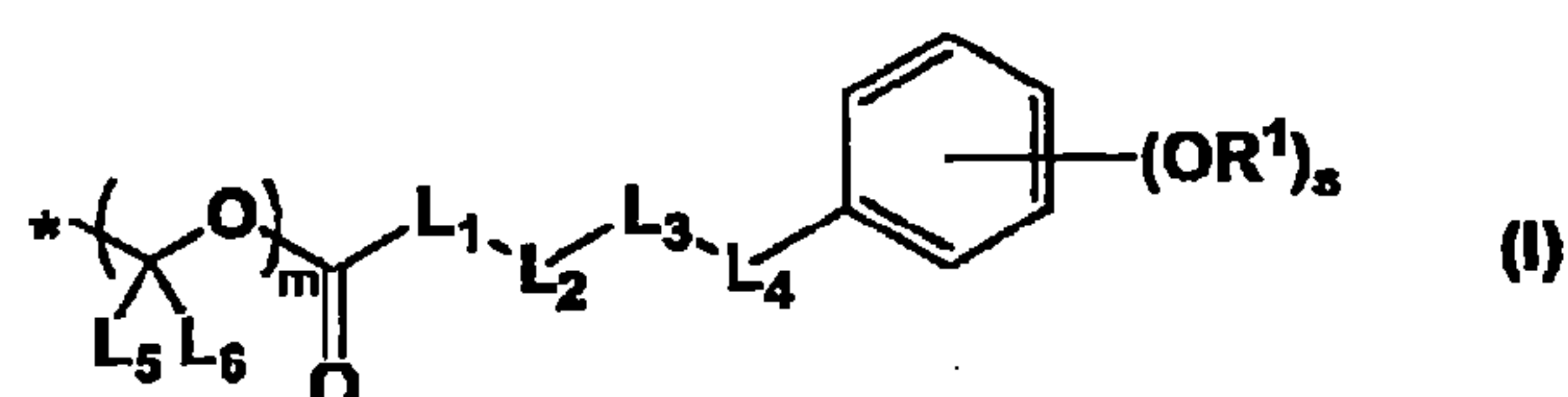
[0157] 擬似固相保護基以含於 Base^Z 及 Z 之中的至少 1 個者為佳，含於 Z 之中者為較佳。

Z 較佳為基本保護基或擬似固相保護基，更佳為擬似固相保護基。

[0158] 含於 X^Z 或 Z 的較佳擬似固相保護基為前述式 (I) 至 (VII) 所示基，較佳態樣亦相同。

[0159] 含於 Base^Z 之擬似固相保護基為下述式 (I) 所示基， m 為 1 基或或 m 為 0， L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中之單鍵數以 0 至 3 的基為佳。

【化 2 8】

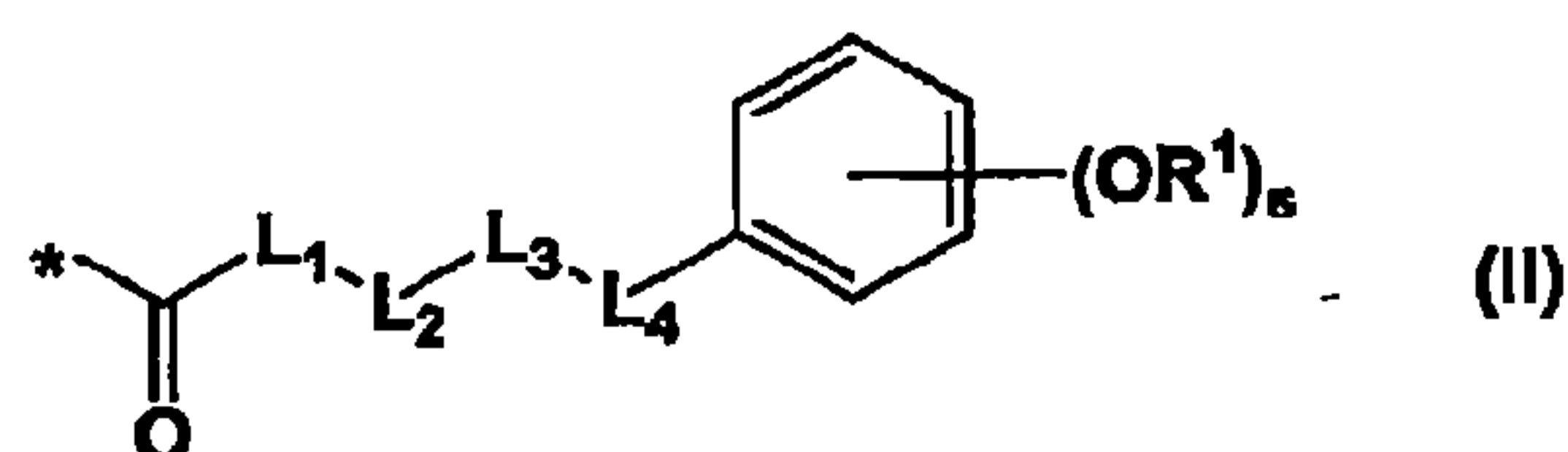


[0160] 式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式 (I) 中之定義相同，較佳態樣亦相同。

[0161] 含於 Base^Z 的擬似固相保護基為下述式 (II) 所示基， L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數為 0 至 3 的基為較佳。

[0162]

【化 2 9】



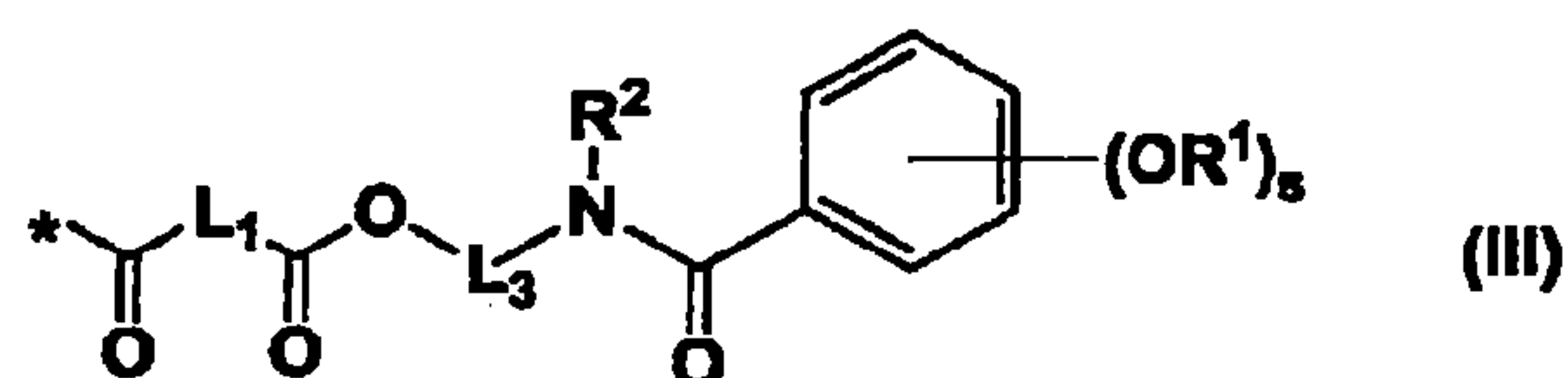
[0163] 式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記

號為與前述式(II)中之定義相同，較佳態樣亦相同。

[0164] 含於 Base^z 的擬似固相保護基以下述式(III)所示基為更佳。

[0165]

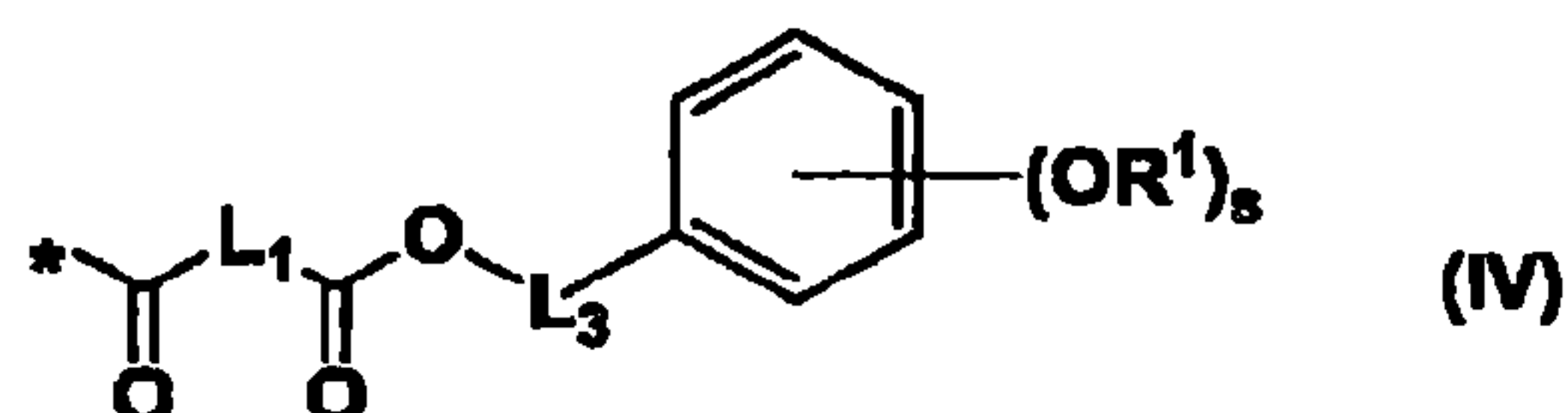
【化 3 0】



[0166] 式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式(III)中之定義相同。

[0167] 又， Base^z 中所含之擬似固相保護基以下述式(IV)所示基為更佳。

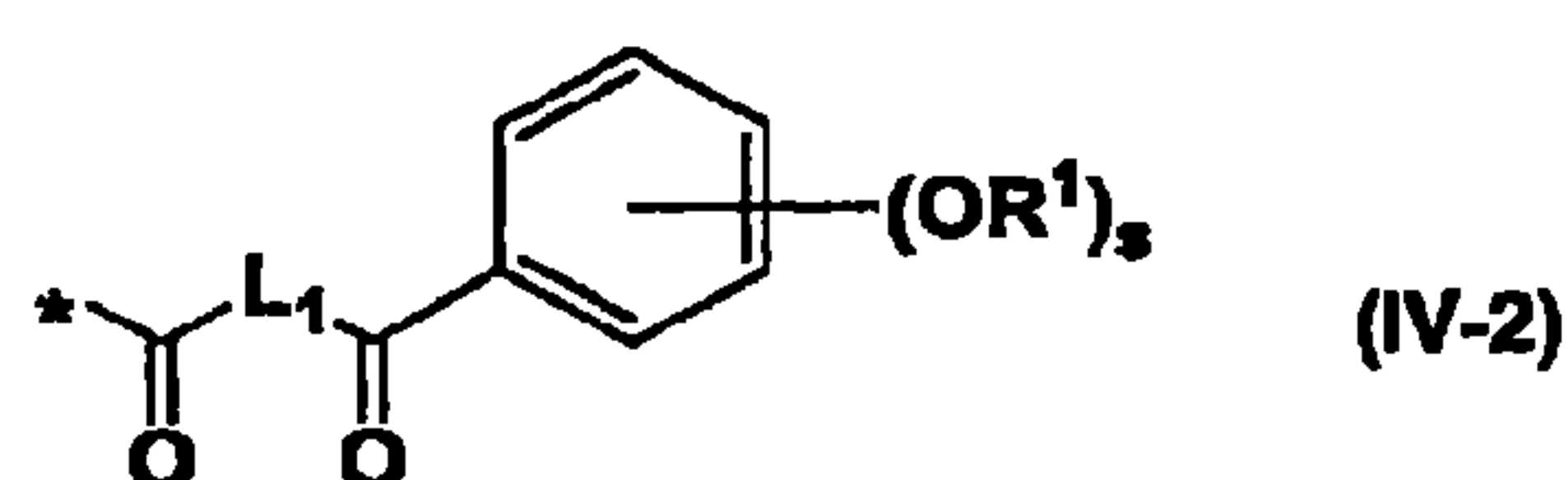
【化 3 1】



[0168] 式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式(IV)中之定義相同。

[0169] 又，含於 X^z 或 Z 之擬似固相保護基以下述式(IV-2)所示基者為更佳。

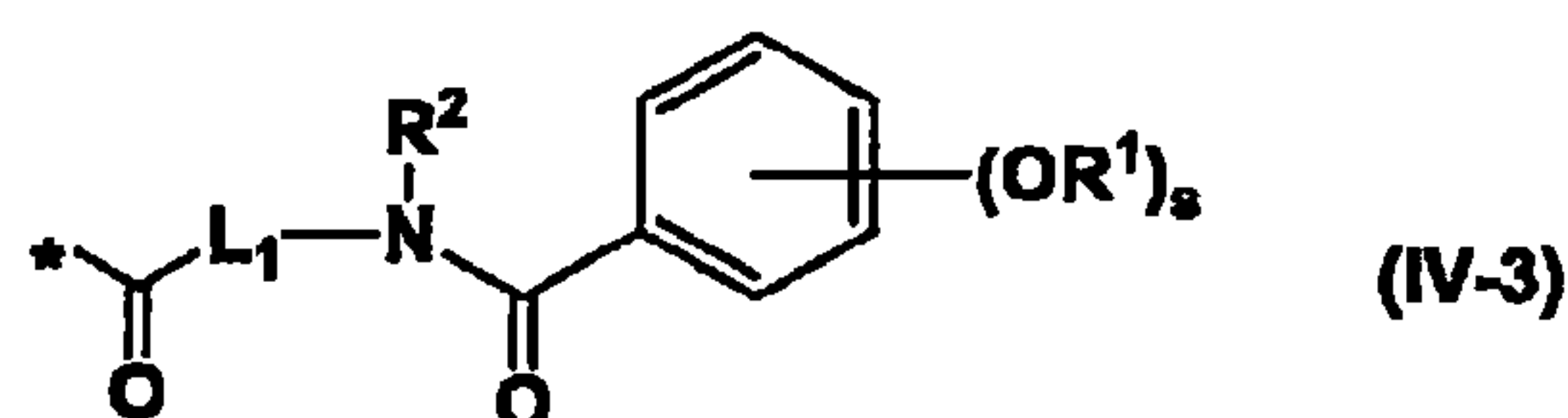
【化 3 2】



[0170] 式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式(IV-2)中之定義相同。

[0171] 又，含於 X^Z 或 Z 之擬似固相保護基以下述式(IV-3)所示基為更佳。

【化 3 3】



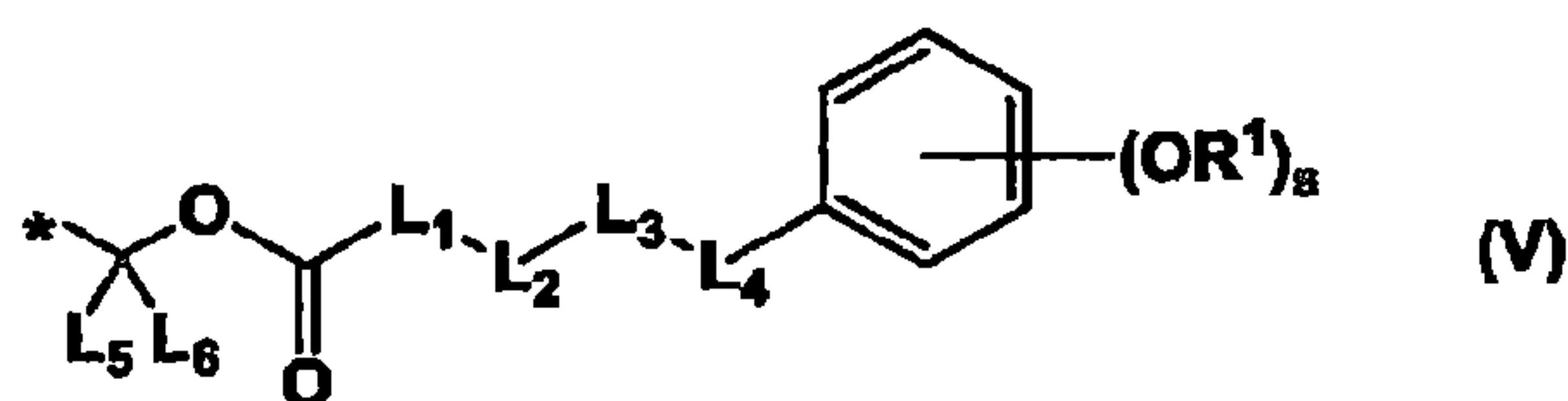
式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式(IV-3)中之定義相同。

[0172] 含於 $Base^Z$ 的式(II)至式(IV-3)所示擬似固相保護基之 L^1 較佳為 C1-6 伸烷基，特佳為伸乙基。

含於 $Base^Z$ 之式(II)至式(IV)所示擬似固相保護基的 L^3 較佳為 C1-6 伸烷基，特佳為伸甲基或伸乙基。

[0173] 作為其他態樣，含於 $Base^Z$ 之擬似固相保護基較佳為下述式(V)所示基。

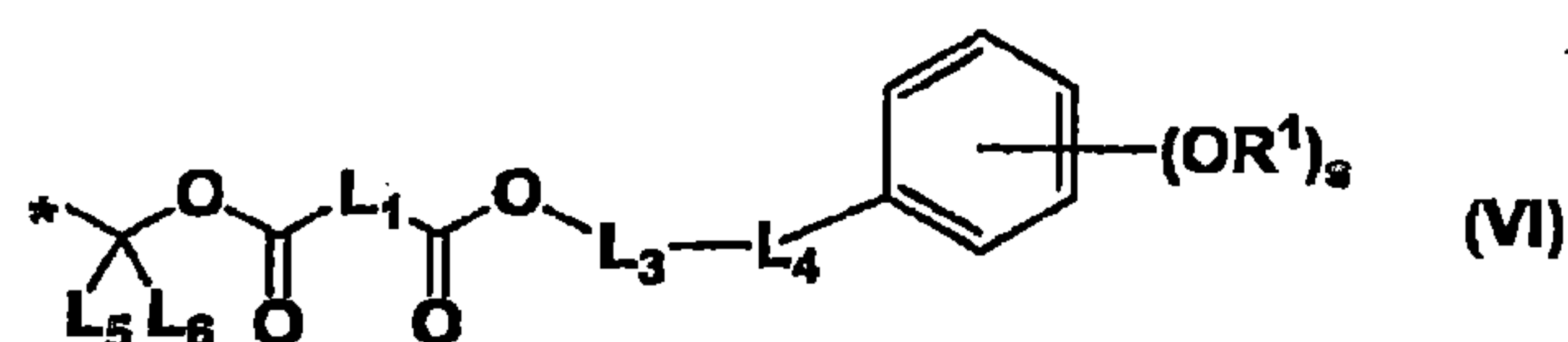
【化 3 4】



[0174] 式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式(V)中之定義相同，較佳態樣亦相同。

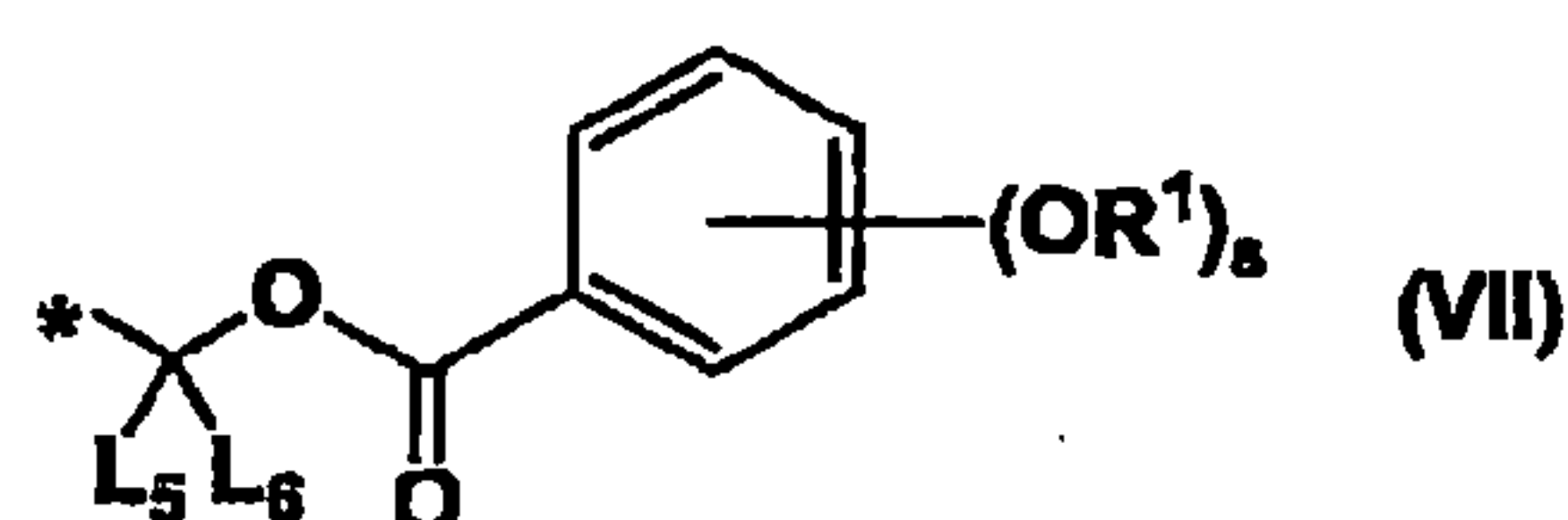
[0175] 含於 $Base^Z$ 的擬似固相保護基更佳為下述式(VI)

【化 3 5】



[0176] (式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式(VI)中之定義相同)所示基、或下述式(VII)

【化 3 6】



[0177] (式中，*表示與核酸鹼部之鍵結位置，其他記號與前述式(VII)中之定義相同)所示基。

[0178] 含於 Base^z 的擬似固相保護基更較佳為前述式(VII)所示基。

[0179] 含於 Base^z 的式(I)、式(V)或(VI)所示擬似固相保護基之 L^1 較佳為 C1-6 伸烷基，特佳為伸甲基或伸乙基。

含於 Base^z 的式(I)、式(V)或(VI)所示擬似固相保護基之 L^3 較佳為 C1-6 伸烷基，特佳為伸甲基或伸乙基。

[0180] 含於 Base^z 的式(I)、式(V)至式(VII)所示擬似固相保護基之 L^5 及 L^6 特佳為氫原子。

[0181] 含於 Base^z 之式(I)至式(VII)所示擬似固相保護基的 R^1 較佳為 C10-30 烷基或 C10-30 烯基，更佳為 C10-30 烷基。

含於 Base^z 之式(I)至式(VII)所示擬似固相保護基的 s

較佳為 2 至 4 的整數，更佳為 3。

對於式(I)至式(VII)， s 為 2 至 5 時，各 R^1 可為相同或相異。

[0182] $m=1$ 之式(I)、式(V)至式(VII)所示擬似固相保護基導入於胸腺嘧啶或尿嘧啶時，特別有用。

[0183] 可使用於寡核苷酸之伸長末端的羥基之一時保護基 R 可藉由氟試藥、酸或鹼進行脫保護，若為可作為羥基的保護基所使用者即可，並無特別限定。作為以氟試藥可脫保護的一時保護基 R ，可舉出矽基(*tert*-丁基二甲基矽基、三乙基矽基、三甲基矽基等)。作為可以酸進行脫保護的一時保護基 R ，可舉出葉黃素基(9-(9-苯基)葉黃素基、9-苯基硫基葉黃素基等)、烷氧基烷基(1-甲氧基-1-甲基乙基、1,3-二呋喃-2-基、1,3-苯並二氧雜環戊-2-基等)、烷基硫基烷基(1,3-二硫戊環-2-基、1,3-苯並二硫醇-2-基)、烷氧基羰基(*tert*-丁基氧羰基等)、及三芳基甲基(三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、單甲氧基三苯甲基等)等。作為以鹼可進行脫保護之一時保護基 R ，可舉出乙醯丙醯基、3-苯甲醯基丙醯基。較佳為 *tert*-丁基二甲基矽基、三苯甲基、9-(9-苯基)葉黃素基、9-苯基硫基葉黃素基、1,1-雙(4-甲氧基苯基)-1-苯基甲基(二甲氧基三苯甲基)、1-(4-甲氧基苯基)-1,1-二苯基甲基(單甲氧基三苯甲基)。彼等中，以容易脫保護且容易獲得之觀點來看，以 *tert*-丁基二甲基矽基、單甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基為佳，以 *tert*-丁基二甲基矽基、二甲氧基三苯甲基為

較佳，以二甲氧基三苯甲基為特佳。以 *tert*-丁基二甲基矽基為更特佳。

[0184] 作為在 X^Z 中之「以基本保護基所保護的羥基」的基本保護基，例如可舉出 PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第 3 版、JOHN WILLY&SONS 出版(1999 年)等記載的保護基。具體可舉出烷基(甲基、*tert*-丁基等)、芳基甲基(苯甲基、*p*-甲氧基苯甲基等)、二芳基甲基(二苯基甲基等)、烷氧基烷基(甲氧基甲基、甲氧基乙基、乙氧基乙基、氰基乙氧基甲基等)、2-四氫吡喃基、氰基乙基、胺基甲醯基(苯基胺基甲醯基、1,1-二氧代硫代嗎啉-4-硫代胺基甲醯基等)、醯基(乙醯基、新戊醯基、苯甲醯基、乙醯丙醯基、3-苯甲醯基丙醯基等)、矽基(三異丙基矽基、*tert*-丁基二甲基矽基、*tert*-丁基二苯基矽基等)、[(三異丙基矽基)氧基]甲基(Tom)基、1-(4-氯苯基)-4-乙氧基哌啶-4-基(Cpep)基等。彼等中，亦以 *tert*-丁基二甲基矽基、三異丙基矽基或 *tert*-丁基二苯基矽基為佳，以 *tert*-丁基二甲基矽基、三異丙基矽基為較佳。作為其他態樣，以乙醯丙醯基或 3-苯甲醯基丙醯基為佳，以乙醯丙醯基為較佳。

[0185] X^Z 較佳為氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基或於 4 位碳原子進行交聯的有機基，較佳為氫原子、羥基、或以 C1-6 烷基、*tert*-丁基二甲基矽基、三異丙基矽基或者 *tert*-丁基二苯基矽基所保護的羥基，更佳為氫原子或以三異丙基矽基所保護的羥基。其中，前述 C1-

6 烷基為無取代或以選自由 C1-6 烷氧基羰基、單 C1-6 烷基胺基羰基、二 C1-6 烷基胺基羰基所成群的基所取代。

作為其他態樣， X^Z 較佳為 C2-6 伸烷基(該伸烷基為無取代或以甲基所取代。其中，該伸烷基的 1 或者 2 個伸甲基為不被取代，或可選自 -O-、-NR¹¹-(R¹¹ 表示氫原子或甲基)、-CO-、-CS-、-COO-、-OCONR¹²-(R¹² 表示氫原子或甲基)、-CONR¹³-(R¹³ 表示氫原子或甲基)及 -CSNR¹⁴-(R¹⁴ 表示氫原子或甲基)的基進行取代)所示 4 位碳原子上進行交聯的有機基。 X^Z 較佳為伸乙基(該伸乙基的 1 或者 2 個伸甲基為不被取代或以選自 -O-、-CONR¹³-(R¹³ 表示氫原子或甲基)及 -CSNR¹⁴-(R¹⁴ 表示氫原子或甲基)的基進行取代)所示 4 位碳原子上進行交聯的有機基。

[0186] 作為 Z 中之基本保護基，可舉出作為 X^Z 中之「以基本保護基所保護的羥基」的基本保護基所舉出者。

其中亦以 tert-丁基二甲基矽基、三異丙基矽基、tert-丁基二苯基矽基、乙醯丙醯基或 3-苯甲醯基丙醯基為佳，以乙醯丙醯基或 3-苯甲醯基丙醯基為較佳，以乙醯丙醯基為更佳。

[0187] 於 X^Z 或 Z 中之基本保護基，在脫保護一時保護基之條件下可使用未經脫保護的保護基。例如，使用以酸進行脫保護的一時保護基時，於前述一時保護基所舉出者中，將未以酸進行脫保護的鹼或以氟試藥進行脫保護的保護基可作為基本保護基使用。相反地，使用以鹼進行脫保護的一時保護基時，於前述一時保護基所舉出者中，將

以鹼未能脫保護之以酸或氟試藥可脫保護之保護基，可作為基本保護基使用。又，使用以氟試藥進行脫保護之一時保護基時，於前述一時保護基所舉出者中，將未以氟試藥進行脫保護的以酸或鹼進行脫保護的保護基可作為基本保護基使用。

[0188] 例如， X^Z 或 Z 中之基本保護基為乙醯丙醯基或 3-苯甲醯基丙醯基等時，一時保護基係以 *tert*-丁基二甲基矽基、三乙基矽基等矽基或三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、單甲氧基三苯甲基等三芳基甲基為佳。

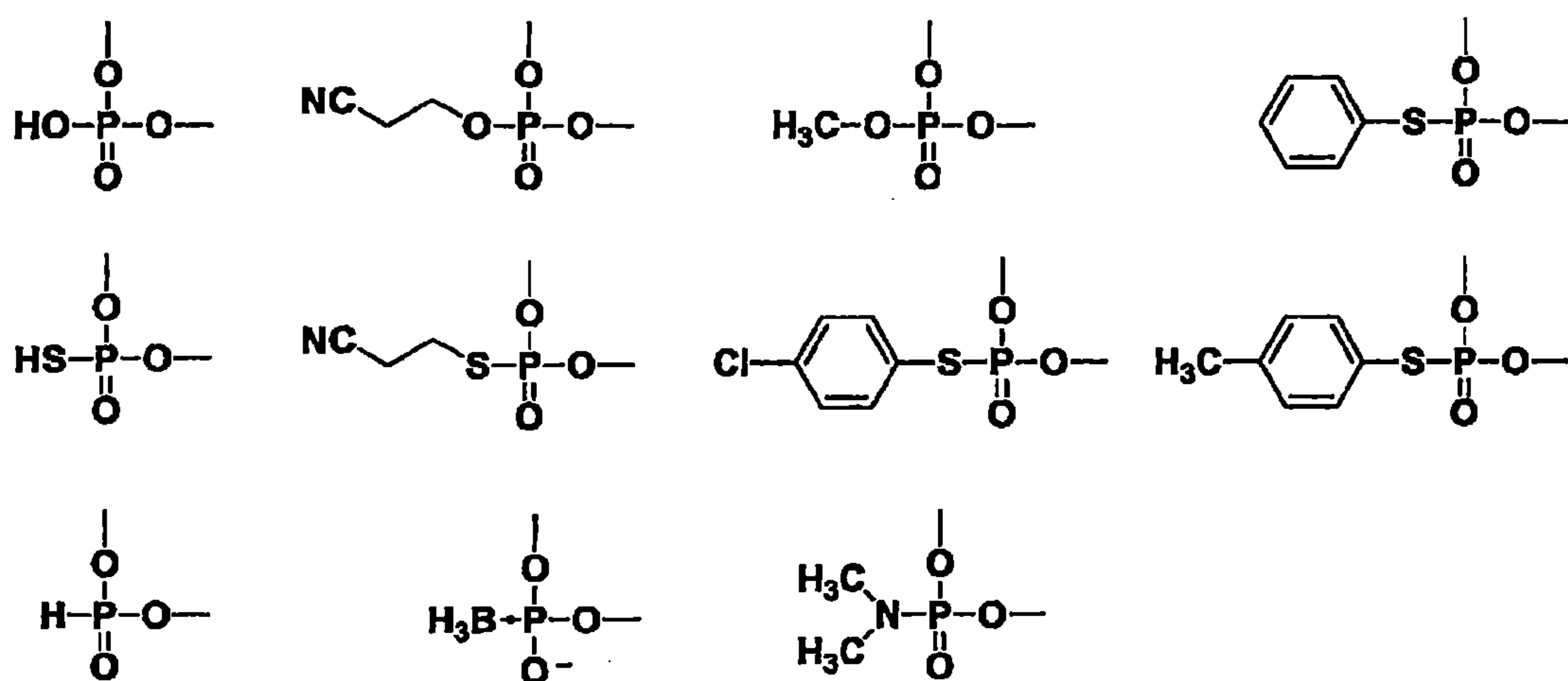
一時保護基為乙醯丙醯基或 3-苯甲醯基丙醯基等時， X^Z 或 Z 中之基本保護基以 *tert*-丁基二甲基矽基、三乙基矽基等矽基或三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、單甲氧基三苯甲基等三芳基甲基為佳。特別在方法 B 之情況下，可將乙醯丙醯基或 3-苯甲醯基丙醯基等作為一時保護基使用。

[0189] Y 為獨立表示各氫原子、羥基、經保護的羥基、硫醇基、經保護的硫醇基、氫化硼、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基。對於經保護的羥基在後述步驟 d 變換的「以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵」，與取代為羥基之基相同。對於經保護的硫醇基在後述步驟 d 變換的「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」，與取代為硫醇基之基相同。

Y 為獨立表示各以為氫原子、羥基、硫醇基或 2-氰基乙氧基為佳，較佳為羥基或硫醇基。含有 Y 之磷官能基，例如具有以下結構(或於以下結構附有鹽之結構)。

[0190]

【化 3 7】



[0191] 步驟 a 在不會影響反應之溶劑中進行。於該溶劑中之溶解度越高，可期待優良反應性，故選擇作為目的之化合物的溶解度高之低極性溶劑者為佳。具體為可舉出氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷等鹵素系溶劑；苯、甲苯、二甲苯、三甲苯等芳香族系溶劑；乙酸乙酯、乙酸異丙基等酯系溶劑；己烷、戊烷、庚烷、辛烷、壬烷、環己烷等脂肪族系溶劑；四氫呋喃、二乙基醚、環戊基甲基醚、tert-丁基甲基醚等醚系溶劑。這些溶劑可將 2 種以上以任意比例進行混合後使用。又，於上述低極性溶劑中，可將吡啶等含氮芳香族系溶劑、乙腈、丙腈等腈系溶劑、N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮等醯胺系溶劑等極性溶劑溶解於 n 個聚合寡核苷酸以外，可藉由任意比例進行混合後使用。其中亦以使用於步驟 a 之溶劑為二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、苯、甲苯、二

甲苯、三甲苯、己烷、戊烷、庚烷、壬烷、環己烷、乙酸乙酯、乙酸異丙基、四氫呋喃、tert-丁基甲基醚、環戊基甲基醚、或這些組合為佳，以二氯甲烷、四氫呋喃為特佳。

[0192] 於步驟 a 中之 n 個聚合寡核苷酸的溶劑中之濃度若可溶解即可，並無特別限定，較佳為 1 至 30 重量 %。

[0193] 作為使用於步驟 a 之氟試藥、酸或鹼，僅可達成一時保護基良好的脫保護者即可，並無特別限定。

作為氟試藥，以氟化氫之吡啶鹽、四丁基銨氟化物、氟化氫之三乙基胺鹽、氟化氫酸、氟化銨、氟化銨之氟化氫加成物、氟化鉀或氟化鉀之氟化氫加成物為佳，其中亦以氟化氫的吡啶鹽或四丁基銨氟化物為較佳，以氟化氫的吡啶鹽為特佳。

作為酸，以三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、p-甲苯磺酸、鹽酸、乙酸、硝酸銨銻、膦酸或磷酸為佳，其中亦以三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、p-甲苯磺酸、鹽酸、乙酸或硝酸銨銻為較佳，以三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸或 p-甲苯磺酸為更佳，以二氯乙酸或膦酸為特佳。三氟乙酸或 p-甲苯磺酸亦特佳。

作為鹼，可舉出胍衍生物(胍一水合物、胍乙酸鹽、硫酸胍鎘、乙醯醯胍、甲基胍(Carbazate)、苯基胍、p-甲苯磺醯基胍等)、乙二胺衍生物(乙二胺等)及無機鹼(碳酸

鉀等)等。作為鹼，以胼衍生物為佳，以胼一水合物為較佳。

這些氟試藥、酸及鹼可經由上述低極性溶劑進行稀釋後使用。又，除氟試藥、酸及鹼以外，可藉由固定化脂肪酶 L-2、固定化脂肪酶 L-5 等酵素進行脫保護。

[0194] 於步驟 a 中之氟試藥、酸或鹼的使用量對於 n 個聚合寡核苷酸 1 莫耳而言，可使用 1 至 100 莫耳，較佳為 1 至 40 莫耳，更佳為 1 至 30 莫耳，特佳為 5 至 30 莫耳。

[0195] 步驟 a 之反應溫度若可進行反應即可，並無特別限定，以 -10°C 至 60°C 為佳，以 0°C 至 50°C 為較佳，以 0°C 至 30°C 為更佳。反應時間可依使用之 n 個聚合寡核苷酸的種類、氟試藥、酸或鹼的種類、溶劑的種類、反應溫度等而相異，以 5 分鐘至 50 小時為佳，以 5 分鐘至 12 小時為較佳，以 30 分鐘至 6 小時為更佳。

[0196] 作為脫保護劑所使用的氟試藥、酸或鹼，若存在於如後述步驟 c 之偶合反應中時，因會誘發 p 個聚合寡核苷酸(iv)的 5'位或者 3'位羥基之一時保護基 R 的脫保護，故必須藉由淬火處理而除去。淬火處理的脫保護劑若為氟試藥或酸時，藉由矽試藥或有機鹼進行，脫保護劑若為前述鹼時，藉由酮化合物而進行。

[0197] 作為使用於淬火處理之矽試藥，若可將前述氟試藥進行淬火者即可，並無特別限定，以六甲基二矽氧烷 $[\text{TMS}_2\text{O}]$ 、三甲基矽基氯化物 $[\text{TMSCl}]$ 、六甲基二矽氮

烷、三甲基矽基溴化物、三甲基矽基碘化物、三甲基矽基三氟甲烷磺酸鹽、三乙基矽基氯化物、三異丙基矽基氯化物、*tert*-丁基二甲基矽基氯化物、*tert*-丁基二苯基矽基氯化物、苯基二甲基矽基氯化物、二苯基甲基矽基氯化物、三苯基矽基氯化物為佳，以 TMS_2O 、 TMSCl 為較佳，以 TMS_2O 為特佳。

[0198] 作為使用於淬火處理之有機鹼，僅為可中和前述酸者即可，並無特別限定，以吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、苯並咪唑、1,2,4-三唑、*N*-苯基咪唑、2-胺基-4,6-二甲基嘧啶、1,10-菲咯啉、咪唑、*N*-甲基咪唑、2-氯苯並咪唑、2-溴苯並咪唑、2-甲基咪唑、2-苯基苯並咪唑、*N*-苯基苯並咪唑、5-硝基苯並咪唑為佳，以吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、苯並咪唑、1,2,4-三唑、*N*-苯基咪唑、*N*-甲基咪唑、2-胺基-4,6-二甲基嘧啶、1,10-菲咯啉為較佳，以吡啶為特佳。

[0199] 作為使用於淬火處理之酮化合物，僅可消費前述鹼者即可，並無特別限定，可舉出乙醯丙酮、丙酮等，較佳為乙醯丙酮。

[0200] 使用於步驟 a 中之淬火處理的矽試藥、有機鹼或酮化合物之使用量對於氟試藥、酸或鹼 1 莫耳而言，例如為 0.01 至 100 莫耳，較佳為 0.1 至 50 莫耳，更佳為 1 至 20 莫耳，更較佳為 1 至 3 莫耳。

[0201] 進步驟 a 後繼續進行的步驟 b 在液相中為連續化進行，故步驟 a 中之一時保護基 R 的脫保護反應中、

或於脫保護反應後添加陽離子捕捉劑為佳。不連續步驟 a 與步驟 b 時，可添加或不添加陽離子捕捉劑。

[0202] 作為陽離子捕捉劑，藉由除去之保護基 R 的再保護(回到原料)或對經脫保護的官能基之副反應若未進行下，並無特別限定，可使用吡咯、2-甲基吡咯、3-甲基吡咯、2,3-二甲基吡咯、2,4-二甲基吡咯等吡咯衍生物；吡啶、4-甲基吡啶、5-甲基吡啶、6-甲基吡啶、7-甲基吡啶、5,6-二甲基吡啶、6,7-二甲基吡啶等吡啶衍生物。由可得到良好陽離子捕捉效果之觀點來看，以吡咯、3-甲基吡咯、2,4-二甲基吡咯、吡啶、4-甲基吡啶、5-甲基吡啶、6-甲基吡啶、7-甲基吡啶、5,6-二甲基吡啶、6,7-二甲基吡啶為佳，以吡咯、3-甲基吡咯、吡啶為較佳，以吡咯、吡啶為更佳，以吡咯為特佳。

[0203] 前述陽離子捕捉劑之使用量對於 n 個聚合寡核苷酸(ia 或 ib)1 莫耳而言，例如為 1 至 50 莫耳，較佳為 1 至 15 莫耳，更佳為 1 至 3 莫耳。

[0204] 於步驟 a 之後，實施步驟 b 或步驟 d。於步驟 b 或步驟 d 之前，視必要藉由分液處理、溶劑餾去，對在步驟 b 或步驟 d 所使用的溶劑之取代，進行步驟 e，可使 n 個聚合寡核苷酸之 5'位羥基的脫保護體(ia)或者 3'位羥基的脫保護體(ib)之分離等進行。

[0205]

(步驟 b)(磷酸酯化步驟)

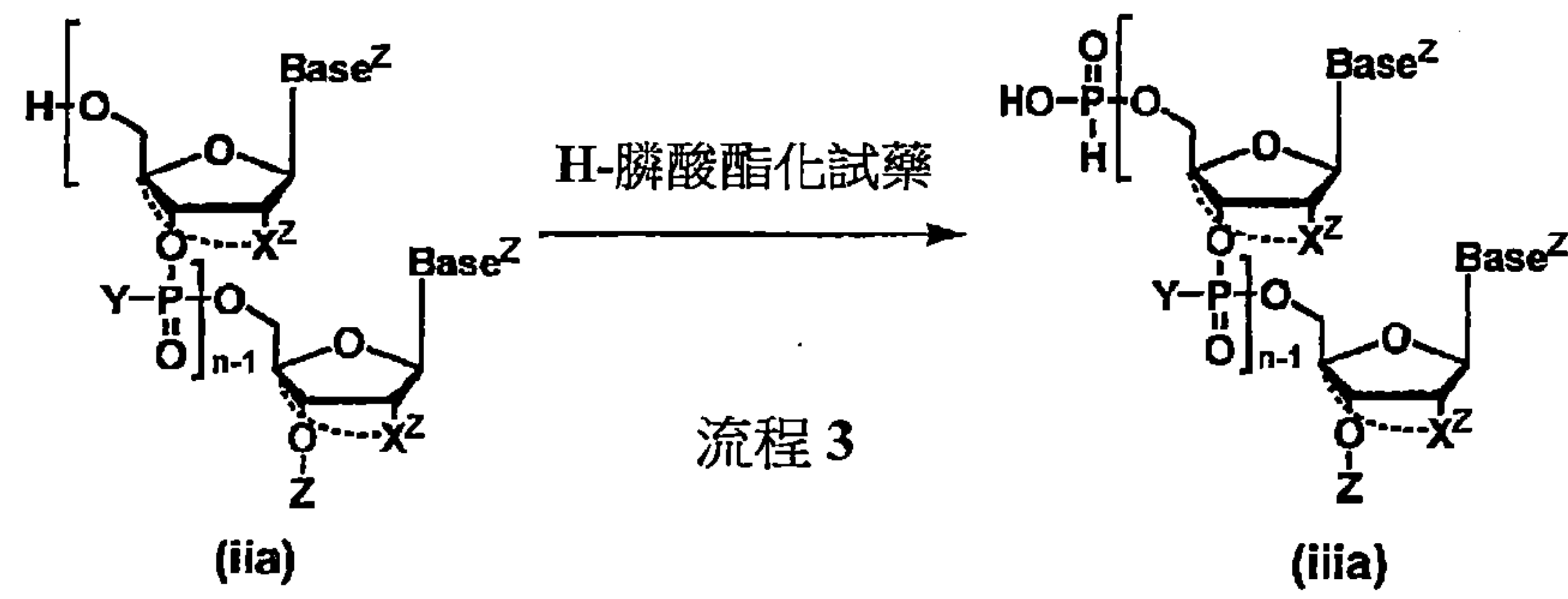
首先，將方法 A 或方法 B 的各情況之步驟 b 表示於

流程 3 或 4。

於方法 A 中之步驟 b 為，將在方法 A 中之前述步驟 a 或者後述步驟 d 所得之 n 個聚合寡核苷酸的 5' 位羥基的脫保護體 (iia) 的 5' 位羥基進行 H-磷酸酯化的步驟 (下述流程 3)。流程 3 中各記號與前述定義相同。

[0206]

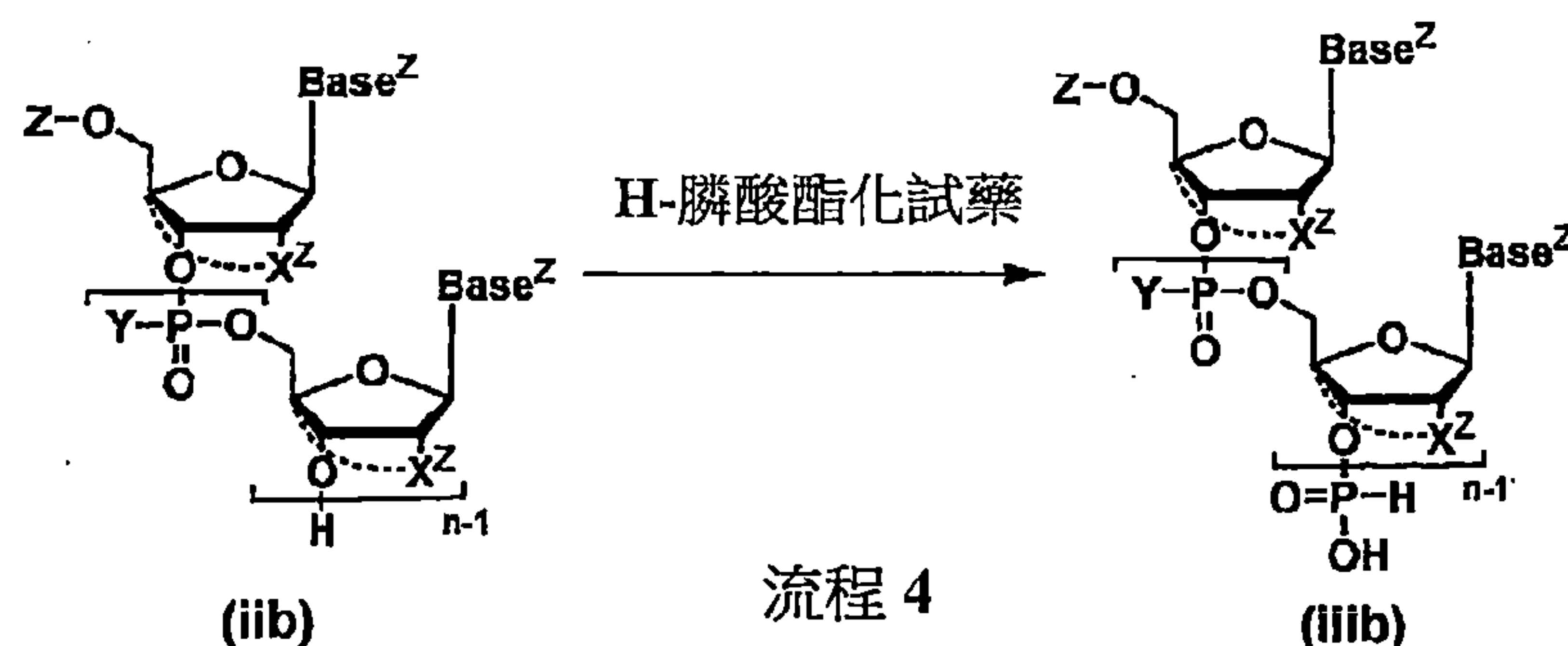
【化 3 8】



[0207] 在方法 B 中之步驟 b 為，將方法 B 中之前述步驟 a 或者後述的步驟 d 所得之 n 個聚合寡核苷酸之 3' 位羥基的脫保護體 (iib) 的 3' 位羥基進行 H-磷酸酯化的步驟 (下述流程 4)。流程 4 中各記號與前述定義相同。

[0208]

【化39】



[0209] 在步驟 b 所使用的溶劑，具體可舉出與前述步驟 a 之相同溶劑。其中亦以二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、苯、甲苯、二甲苯、三甲苯、己烷、戊烷、庚烷、壬烷、環己烷、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、四氫呋喃、tert-丁基甲基醚、環戊基甲基醚或這些組合為佳，以吡啶、二氯甲烷為更佳，以吡啶為特佳。

[0210] 在步驟 b 使用吡啶等含氮芳香族系溶劑以外的溶劑時，添加吡啶等求核劑為佳。作為求核劑，若可達成良好 H-磷酸酯化者即可，並無特別限定，具體可舉出吡啶、2,6-二-tert-丁基吡啶、2-甲基吡啶、3-甲基吡啶、4-甲基吡啶、3,4-盧剔啶、2,6-盧剔啶、2,4-盧剔啶、3,5-盧剔啶、2,4,6-可力丁、4-乙醯吡啶、N,N-二甲基胺基吡啶、2-氰基吡啶、3-氰基吡啶、4-氰基吡啶、2-氯吡啶、3-氯吡啶、4-氯吡啶、2-甲氧基吡啶、3-甲氧基吡啶、4-甲氧基吡啶、甲基吡啶酸乙基、菸鹼酸乙基、異菸鹼酸乙基等吡啶系求核劑；(S,S)-2,6-雙(4-異丙基-2-噁唑啉-2-基)吡啶、(R,R)-2,6-雙(4-苯基-2-噁唑啉-2-基)吡啶等 Pybox 系求核劑、喹啉、奎寧、奎尼丁、辛可寧等喹啉系求核

劑、N-甲基咪唑、嘓啖、2-甲基吡嗪、3-甲基噻嗪、1,10-菲咯啉等含氮芳香族系求核劑；4-甲氧基吡啖-N-氧化物等 N-氧化物系求核劑；N,N-二甲基苯胺等苯胺系求核劑；1,3-二-*tert*-丁基咪唑-2-亞基、1,3-雙三甲苯基咪唑-2-亞基等 N-雜環狀卡賓(Carbene)求核劑；三苯基磷、亞磷酸三甲基等磷系求核劑；三乙基胺、1,4-二氮雜雙環[2.2.2]辛烷等脂肪族胺系求核劑等。其中亦以吡啖、2-甲基吡啖、4-甲基吡啖、3,4-盧剔啖,2,6-盧剔啖、2,4,6-可力丁、N,N-二甲基胺基吡啖、3-甲氧基吡啖、4-甲氧基吡啖、(*S,S*)-2,6-雙(4-異丙基-2-噁唑啉-2-基)吡啖、(*R,R*)-2,6-雙(4-苯基-2-噁唑啉-2-基)吡啖、喹啉、奎尼丁、N-甲基咪唑、3-甲基噻嗪、4-甲氧基吡啖-N-氧化物為佳，以吡啖為特佳。

[0211] 步驟 b 中之求核劑的使用量並無特別限制，對於 n 個聚合寡核苷酸(iia 或 iib)1 莫耳而言，例如為 1 至 300 莫耳，較佳為 1 至 100 莫耳，更佳為 1 至 40 莫耳。

[0212] 使用於步驟 b 之 H-磷酸酯化試藥若可達成良好 H-磷酸酯化即可，並無特別限定，可舉出亞磷酸、亞磷酸二芳基(亞磷酸二苯基等)、芳基-H-磷酸酯之銨鹽(苯基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、*p*-甲苯甲醯基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽等)、鹵化磷(2-氯-4*H*-1,3,2-苯並二氧磷素-4-酮、三氯化磷等)等。其中亦以亞磷酸、亞磷酸二苯基、苯基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、*p*-甲苯甲醯基-H-磷酸酯之

三乙基銨鹽、2-氯-4H-1,3,2-苯並二氧磷素-4-酮、三氯化磷為佳，以亞磷酸、亞磷酸二苯酯為較佳。

[0213] 作為 H-膦酸酯化試藥，使用亞磷酸、芳基-H-膦酸酯的銨鹽時，添加縮合劑者為佳。作為該縮合劑，可舉出通常使用於 H-膦酸酯法的縮合劑，具體可舉出 2,2-二甲基丁醯基氯化物、異丁醯基氯化物、新戊醯氯、乙醯氯、1-金剛烷基氯化物、氯磷酸二苯酯、2,4,6-三異丙基苯磺醯基氯化物、2-(苯甲醯基三唑-1-基氧基)-1,3-二甲基-2-吡咯烷-1-基-1,3,2-二氮雜磷鎗 六氟油酸酯[BOMP]、N,N-雙(2-噁唑烷基)膦氯化物[BopCl]、苯甲醯基氯化物、安息香酸酐、碳酸二苯酯、碳酸二-p-硝基苯酯或碳酸雙五氟苯酯等碳酸二芳酯等。其中亦以 2,2-二甲基丁醯基氯化物、異丁醯基氯化物、1-金剛烷基氯化物、氯磷酸二苯基、2,4,6-三異丙基苯磺醯基氯化物、BopCl 為佳，以 2,2-二甲基丁醯基氯化物為較佳。

[0214] 作為 H-膦酸酯化試藥，使用亞磷酸二芳基或芳基-H-膦酸酯之銨鹽時，於反應終了後藉由以水與三乙基胺等 3 級胺進行處理，可變換為 H-膦酸酯基。

[0215] 步驟 b 中之 H-膦酸酯化試藥的使用量對於 n 個聚合寡核苷酸(iia 或 iib)1 莫耳而言，以 1 至 100 莫耳為佳，以 1 至 40 莫耳為較佳，以 10 至 40 莫耳為更佳。

[0216] 步驟 b 中之縮合劑的使用量對於 n 個聚合寡核苷酸(iia 或 iib)1 莫耳而言，以 1 至 100 莫耳使用為佳，以 1 至 40 莫耳為較佳，以 10 至 30 莫耳為更佳。

[0217] 步驟 b 之反應溫度若可進行反應即可，並無特別限定，以 -10°C 至 60°C 為佳，以 20°C 至 50°C 為較佳。反應時間，依據所使用的 n 個聚合寡核苷酸之種類、溶劑之種類、求核劑之種類、H-磷酸酯化試藥之種類、縮合劑之種類、反應溫度等而相異，以 5 分鐘至 24 小時為佳，以 10 分鐘至 12 小時為較佳，以 30 分鐘至 6 小時為更佳。

[0218] 於步驟 b 之後，實施步驟 c。於步驟 c 之前，視必要，可進行分液處理、藉由溶劑餾去對在步驟 c 所使用的溶劑之取代、或藉由步驟 e 之 n 個聚合寡核苷酸的 5' 位 H-磷酸酯體(iiiia)或者 3' 位 H-磷酸酯體(iiib)的分離。

[0219]

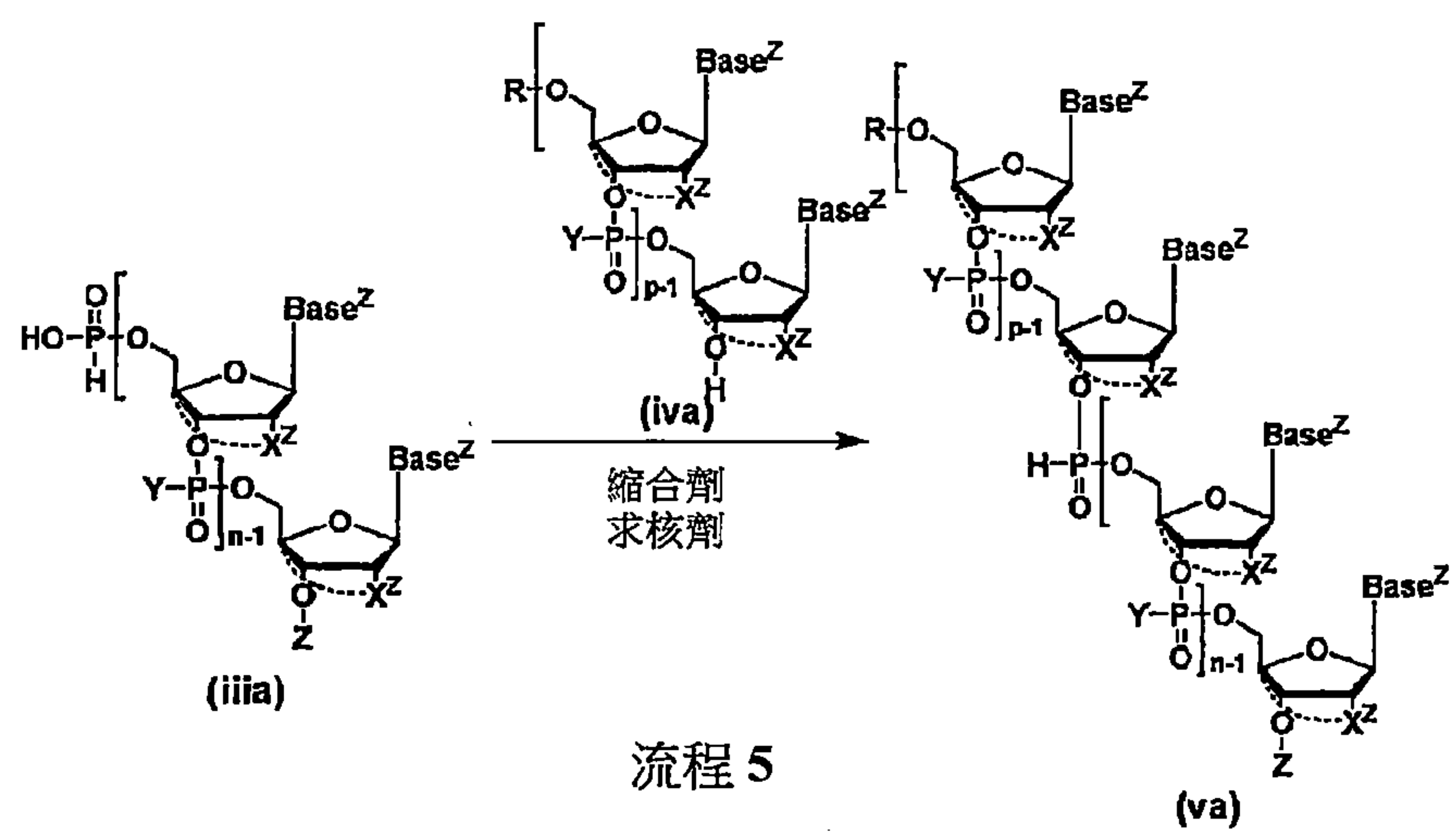
(步驟 c)(偶合步驟)

首先方法 A 或方法 B 之各情況(步驟 c)如流程 5 或 6 所示。

於方法 A 中之(步驟 c)為，使在前述方法 A 中之(步驟 b)所得之 n 個聚合寡核苷酸的 5' 位羥基之 H-磷酸酯體(iiiia)與、5' 位羥基藉由一時保護基 R 進行保護，且具有 3' 位羥基之 p 個聚合寡核苷酸(iva)(式中， p 表示 1 以上之任意整數， $p=1$ 時表示核苷酸)進行縮合之步驟(流程 5)。

[0220]

【化 4 0】

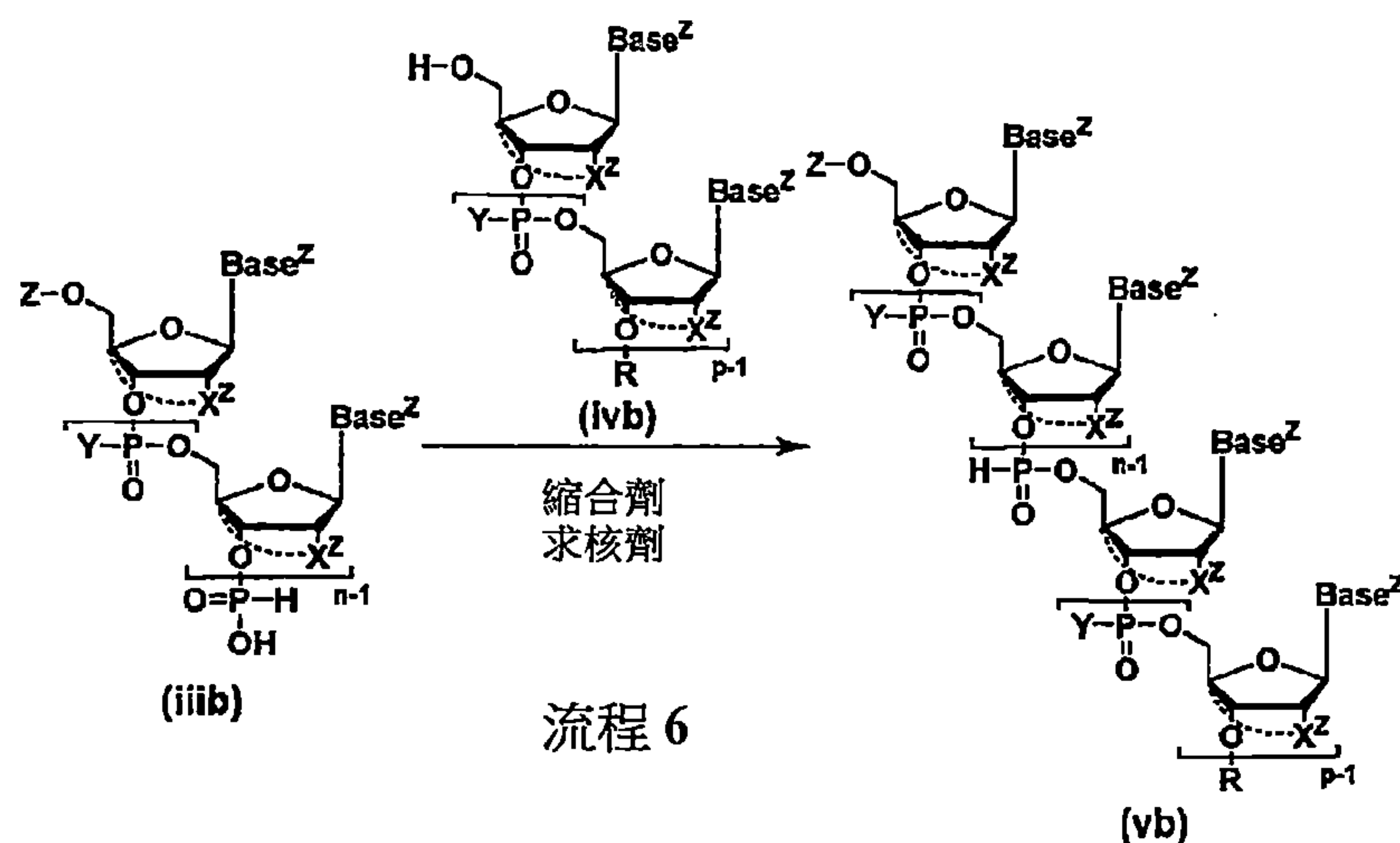


[0221] 式中， p 表示 1 以上的任意整數，其他記號與前述定義相同，但化合物(iva)中之 Base^Z 及 X^Z 之中的至少 1 個中可含有或可不含有擬似固相保護基。具有 2 個以上核酸鹼部時，具有 2 個以上擬似固相保護基時及具有 2 個以上基本保護基時亦與前述定義相同。

[0222] 方法 B 中之步驟 c 為將在前述方法 B 中之步驟 b 所得之 n 個聚合寡核苷酸的 3'位羥基之 H-磷酸酯體(iiiib)與 3'位羥基藉由一時保護基 R 進行保護，且具有 5'位羥基之 p 個聚合寡核苷酸(ivb)(式中， p 表示 1 以上之任意整數， $p=1$ 時表示核苷酸)進行縮合之步驟(流程 6)。流程 6 中，各記號與前述定義相同，但化合物(ivb)中之 Base^Z 及 X^Z 中的至少 1 個可含有會未含有擬似固相保護基。

[0223]

【化 4 1】



[0224] 在步驟 c 所使用的溶劑，具體可舉出與前述步驟 a 相同的溶劑。其中亦以吡啶、二氯甲烷、四氫呋喃、甲苯等為佳，以吡啶為特佳。

[0225] 在步驟 c 中，使用吡啶等含氮芳香族系溶劑以外的溶劑時，添加吡啶等求核劑者為佳。作為求核劑，若可達成良好偶合反應者即可，並無特別限定，具體可舉出與前述步驟 b 同樣之求核劑，以吡啶為特佳。

[0226] 在步驟 c 所使用的前述求核劑對於在步驟 b 所得之 n 個聚合寡核苷酸的 H-磷酸酯體(iiaa 或 iibb)1 莫耳而言，例如為 1~100 莫耳，以 1~20 莫耳為佳，更佳為 1~10 莫耳。

[0227] 使用於步驟 c 的 p 個聚合寡核苷酸(iva 或 ivb)之使用量，對於在步驟 b 所得之 n 個聚合寡核苷酸的 H-磷酸酯體(iiaa 或 iibb)1 莫耳而言，以 1 至 10 莫耳為佳，較佳為 1 至 5 莫耳，更佳為 1 至 3 莫耳，特佳為 1 至 1.5 莫耳。

[0228] 使用於步驟 c 的縮合劑，若可使偶合反應良好地進行即可，並無特別限定，具體可舉出與前述步驟 b 之相同縮合劑。其中亦以 2,2-二甲基丁醯基氯化物、異丁醯基氯化物、1-金剛烷基氯化物、氯磷酸二苯基、2,4,6-三異丙基苯磺醯基氯化物、雙(2-氧代-3-噁唑烷基)膦酸氯化物、碳酸雙五氟苯酯等為佳，以 2,2-二甲基丁醯基氯化物或碳酸雙五氟苯酯為特佳。

[0229] 使用於步驟 c 的縮合劑對於在步驟 b 所得之 n 個聚合寡核苷酸的 H-膦酸酯體(iiaa 或 iibb)1 莫耳而言，例如為 1 至 200 莫耳，較佳為 1 至 100 莫耳，更佳為 1 至 50 莫耳。

[0230] 步驟 c 的反應溫度若可進行反應即可，並無特別限定，以 -10℃ 至 60℃ 為佳，以 0℃ 至 50℃ 為較佳，以 0℃ 至 30℃ 為更佳。反應時間為依據使用的 n 個聚合寡核苷酸之種類、溶劑之種類、求核劑之種類、縮合劑之種類、反應溫度等而相異，以 1 分鐘至 12 小時為佳，以 2 分鐘至 6 小時為較佳，以 5 分鐘至 3 小時為更佳。

[0231] 於步驟 c 之反應後，若在流程 5 或 6 中、式(iva 或 ivb)所示化合物或其鹽、或者流程 3 或 4 中殘存式(iia 或 iib)所示化合物或其鹽時，視必要，將所得之溶液可賦予封端反應。封端反應為使用乙酸酐、安息香酸酐等酸酐，或加入於前述縮合劑，使用甲基-H-膦酸酯的三乙基銨鹽、乙基-H-膦酸酯的三乙基銨鹽、異丙基-H-膦酸酯的三乙基銨鹽及 2-氰基乙基-H-膦酸酯的三乙基銨鹽等烷

基-H-磷酸酯之銨鹽，可依據一般方法實施。

且，所謂封端反應為將殘存於偶合反應、氧化反應後的具有羥基之化合物的羥基，變換為不使核苷酸或寡核苷酸伸長的取代基之反應。

封端反應可在後述步驟 d 之後實施。封端反應可在步驟 c 或步驟 d 之後實施為佳。

[0232] 於步驟 c 之後，實施步驟 d 或步驟 a。於步驟 d 或步驟 a 之前，視必要藉由分液處理、溶劑餾去，對在步驟 d 或步驟 a 所使用的溶劑之取代，進行步驟 e 的 $n+p$ 個聚合寡核苷酸(v_a 或 v_b)的分離等可進行。又，亦可將步驟 c 的反應溶液直接使用於下面步驟 d 或步驟 a。

[0233]

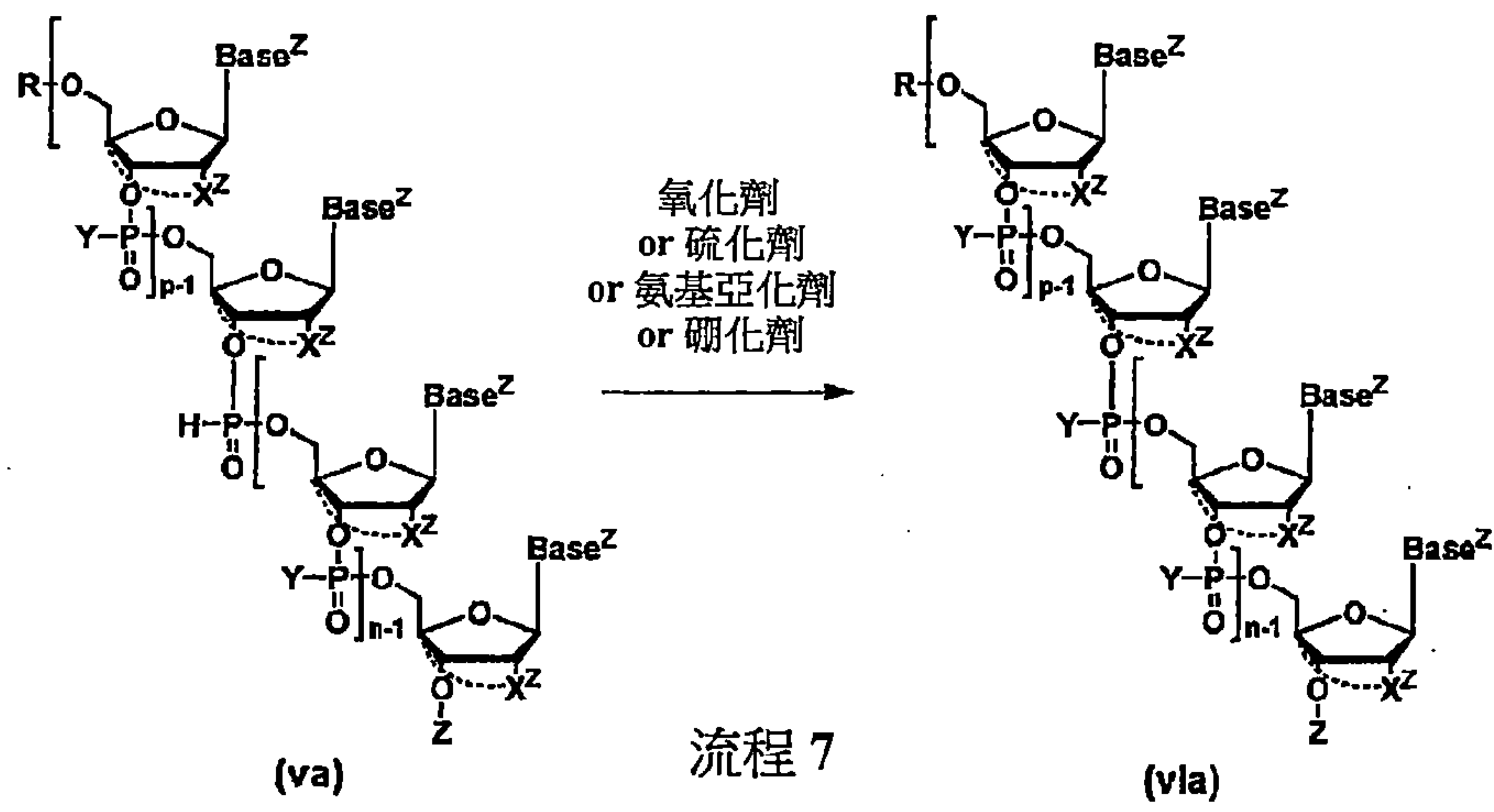
(步驟 d)(變換步驟)

步驟為藉由於在步驟 c 所得之 $n+p$ 個聚合寡核苷酸(v_a 或 v_b)或者在步驟 a 所得之 n 個聚合寡核苷酸使修飾磷原子的試藥進行反應，將該 $n+p$ 個聚合寡核苷酸(v_a 或 v_b)的亞磷酸二酯鍵變換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵或以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵之步驟。

[0234] 方法 A 中之步驟 d 為下述流程 7(流程 7 中，各記號與前述定義相同，但步驟 a 後時，R 為氫原子)所示。

[0235]

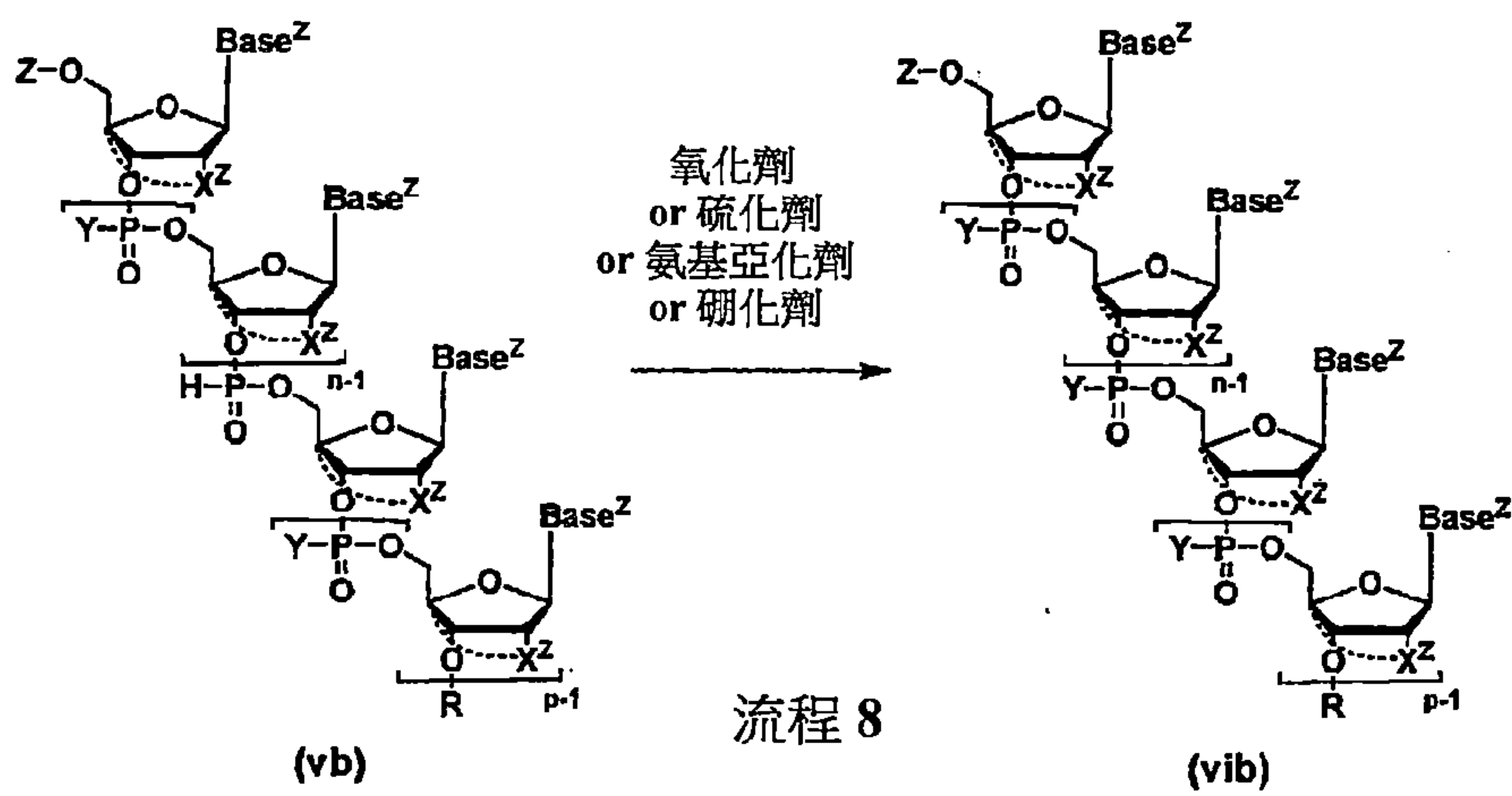
【化 4 2】



[0236] 方法 B 中之步驟 d 為下述流程 8(流程 8 中，各記號與前述定義相同，但步驟 a 後時，R 為氫原子)所示。

[0237]

【化 4 3】



[0238] 步驟 d 為，無須分離在步驟 c 所得的 $n+p$ 個聚合寡核苷酸(va 或 vb)或在步驟 a 所得之 n 個聚合寡核苷酸(iaa 或 iib)，於步驟 c 或步驟 a 後之反應混合物中，可

直接添加修飾磷原子之試藥而進行。作為修飾磷原子的試藥，可使用氧化劑、硫化劑、氨基亞化劑或硼化劑。使用氧化劑或硫化劑，變換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵、或以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵者為佳，轉換為磷酸二酯鍵或硫代磷酸二酯鍵者為較佳。步驟 d 為，可將在步驟 c 所得之 $n+p$ 個聚合寡核苷酸(va 或 vb)或在步驟 a 所得之 n 個聚合寡核苷酸(iia 或 iib)進行分離而進行。

[0239] 在步驟 d 所使用的溶劑，具體可舉出與前述步驟 a 之相同溶劑，可藉由所使用之氧化劑、硫化劑、氨基亞化劑或硼化劑做適宜選擇。

[0240] 在步驟 d 所使用的「氧化劑」無須氧化其他部位，僅具有將亞磷酸二酯鍵氧化為磷酸二酯鍵的能力即可，並無特別限定，以碘、(1S)-(+)-(10-異冰片基磺醯基)氧氮丙啶、*tert*-丁基過氧化氫(TBHP)、2-丁酮過氧化物、1,1-二氫過氧環十二烷、雙(三甲基矽基)過氧化物、*m*-氯過安息香酸為佳。由達到產率或反應速度良好之氧化反應的觀點來看，以碘、*tert*-丁基過氧化氫、2-丁酮過氧化物為佳，以碘為特佳。該氧化劑可以適當的溶劑稀釋至 0.05 至 2M 的濃度後使用。作為該稀釋溶劑，若對反應為惰性的溶劑即可，並無特別限定，可舉出吡啶、四氫呋喃[THF]、二氯甲烷、水或這些混合溶劑。其中，例如使用碘/水/吡啶之混合溶劑或者碘/水/吡啶/THF 之混合溶劑為佳。

在步驟 d 使用前述氧化劑時，步驟 d 之反應溶劑與前述稀釋溶劑相同。

[0241] 使用於步驟 d 之「硫化劑」若具有使亞磷酸二酯鍵變換為硫代磷酸二酯鍵之能力者即可，並無特別限定，以單體硫、3-胺基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(ADTT)、3-((N,N-二甲基胺基亞甲基)胺基)-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(DDTT)、3H-1,2-苯並二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(Beaucage 試藥)、3H-1,2-苯並二硫醇-3-酮、苯基乙醯二硫化物(PADS)、四乙基秋蘭姆二硫化物(TETD)、N-(苯甲醯基硫)-琥珀酸醯亞胺為佳。由產率或反應速度為良好之反應進行的觀點來看，以單體硫、ADTT 為較佳，單體硫為特佳。該硫化劑可使用適當溶劑稀釋至 0.05 至 2M 的濃度後使用。作為該稀釋溶劑，若為對反應為惰性之溶劑即可，並無特別限定，例如可舉出二氯甲烷、乙腈、吡啶或這些混合溶劑。

在步驟 d 使用前述硫化劑時，步驟 d 之反應溶劑與前述稀釋溶劑相同。

[0242] 將亞磷酸二酯鍵變換為「以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵」時的試藥，僅具有該變換能力即可，並無特別限定，以對應之醇化合物與四氯化碳、碘、溴化三氯化碳、N-氯琥珀酸醯亞胺、三氯異氰尿酸、次亞氯酸鈉、3,3-二氯-5,5-二甲基乙內醯脲、N,N'-二氯雙(2,4,6-三氯苯基)尿素等氧化劑為佳。作為前述變換反應之溶劑，若對反應為惰性之溶劑即可，並無特別限定，可舉出二氯

甲烷、吡啶或這些混合溶劑，較佳為二氯甲烷或吡啶，更佳為吡啶。

[0243] 將亞磷酸二酯鍵變換為「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」時的試藥，僅具有該變換能力者即可，並無特別限定，可舉出鄰苯二甲醯亞胺系硫化劑、含琥珀酸系硫化劑及嗎啉二酮系硫化劑等。作為前述變換反應之溶劑，若對反應為惰性的溶劑即可，並無特別限定，可舉出二氯甲烷、吡啶或這些混合溶劑，較佳為二氯甲烷或吡啶，更佳為吡啶。

[0244] 作為鄰苯二甲醯亞胺系硫化劑，對應目的之「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」之 N-(C1-40 烷基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(C3-6 環烷基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(C6-10 芳基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(5-10 員雜芳基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(芳烷基硫)鄰苯二甲醯亞胺及 N-(雜芳基硫基)鄰苯二甲醯亞胺等可舉出。其中，目的之「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」含有鹵素原子、氰基、C1-6 烷基等取代基時，可使用前述 N-(C1-40 烷基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(C3-6 環烷基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(C6-10 芳基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(5-10 員雜芳基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(芳烷基硫)鄰苯二甲醯亞胺及 N-(雜芳基硫基)鄰苯二甲醯亞胺之對應部分含有這些取代基之硫化劑。作為鄰苯二甲醯亞胺系硫化劑，具體可舉出 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺、N-(甲基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(乙基硫基)鄰苯二甲醯

亞胺、N-(丙基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(異丙基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(丁基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(tert-丁基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(環己基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(十二烷基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(苯甲基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-(苯基硫基)鄰苯二甲醯亞胺、N-{(p-氯苯基)硫代}鄰苯二甲醯亞胺、N-{(p-甲基苯基)硫代}鄰苯二甲醯亞胺及 N-[(2-苯並噁唑基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺等。

[0245] 作為琥珀酸系硫化劑，對應目的之「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」之 N-(C1-40 烷基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(C3-6 環烷基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(C6-10 芳基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(5-10 員雜芳基硫基)芳烷基硫琥珀酸醯亞胺及 N-(雜芳基硫基)琥珀酸醯亞胺等可舉出。其中，目的之「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」含有鹵素原子、氰基、C1-6 烷基等取代基時，可使用前述 N-(C1-40 烷基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(C3-6 環烷基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(C6-10 芳基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(5-10 員雜芳基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(芳烷基硫基)琥珀酸醯亞胺及 N-(雜芳基硫基)琥珀酸醯亞胺之對應部分含有這些取代基之硫化劑。作為含琥珀酸醯亞胺硫化劑，具體可舉出 N-[(2-氰基乙基)硫代]琥珀酸醯亞胺、N-(甲基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(乙基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(丙基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(異丙基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(丁基硫基)琥珀酸醯亞胺、N-(tert-丁基硫

基)琥珀酸鹽亞胺、N-(環己基硫基)琥珀酸鹽亞胺、N-(十二烷基硫)琥珀酸鹽亞胺、N-(苯甲基硫基)琥珀酸鹽亞胺、N-(苯基硫基)琥珀酸鹽亞胺、N-{(p-氯苯基)硫代}琥珀酸鹽亞胺、N-{(p-甲基苯基)硫代}琥珀酸鹽亞胺及 N-[(2-苯並噻唑基)硫代]琥珀酸鹽亞胺等。

[0246] 作為嗎啉二酮系硫化劑，對應目的之「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」之 N-(C1-40 烷基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(C3-6 環烷基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(C6-10 芳基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(5-10 員雜芳基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(芳烷基硫)嗎啉-3,5-二酮及 N-(雜芳基硫基)嗎啉-3,5-二酮等可舉出。其中，目的之「以基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵」為含有鹵素原子、氰基、C1-6 烷基等取代基時，可使用前述 N-(C1-40 烷基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(C3-6 環烷基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(C6-10 芳基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(5-10 員雜芳基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(芳烷基硫)嗎啉-3,5-二酮及 N-(雜芳基硫基)嗎啉-3,5-二酮之對應部分含有這些取代基之硫化劑。作為嗎啉二酮系硫化劑，具體可舉出 N-[(2-氰基乙基)硫代]嗎啉-3,5-二酮、N-(甲基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(乙基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(丙基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(異丙基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(丁基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(tert-丁基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(環己基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(十二烷基硫)嗎啉-3,5-二酮、N-(苯甲基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-(苯基硫基)嗎啉-3,5-二酮、N-{(p-

氯苯基)硫代}嗎啉-3,5-二酮、N-{(p-甲基苯基)硫代]嗎啉-3,5-二酮及 N-[(2-苯並噻唑基)硫代]嗎啉-3,5-二酮等。

[0247] 使用於步驟 d 之「氨基亞化劑」若為具有將亞磷酸二酯鍵變換為胺基磷酸二酯鍵之能力者即可，並無特別限定，以對應之胺化合物與四氯化碳、碘、溴化三氯化碳、N-氯琥珀酸鹽亞胺、三氯異氰尿酸、次亞氯酸鈉、3,3-二氯-5,5-二甲基乙內鹽脲、N,N'-二氯雙(2,4,6-三氯苯基)尿素等氧化劑為佳。作為前述變換反應之溶劑，若對反應為惰性的溶劑即可，並無特別限定，可舉出二氯甲烷、吡啶或這些混合溶劑，較佳為二氯甲烷或吡啶，更佳為吡啶。

[0248] 在步驟 d 所使用的「硼化劑」僅為具有將亞磷酸二酯鍵變換為硼烷磷酸二酯鍵之能力者即可，並無特別限定，以氫化硼(BH₃)、BH₃-THF 錯體、BH₃-二甲基硫化物錯體、BH₃-吡啶錯體等為佳。作為前述變換反應之溶劑，若對反應為惰性之溶劑即可，並無特別限定，可舉出二氯甲烷、吡啶或這些混合溶劑，以二氯甲烷或吡啶為佳，較佳為吡啶。

[0249] 修飾磷原子的試藥之使用量對於在步驟 c 所得之 n+p 個聚合寡核苷酸(va 或者 vb)或在步驟 a 所得之 n 個聚合寡核苷酸(iia 或者 iib)1 莫耳而言，以 1 至 50 莫耳為佳，較佳為 1 至 15 莫耳，更佳為 1 至 10 莫耳，更較佳為 1 至 7 莫耳。

[0250] 反應溫度僅反應可進行即可並無特別限定，

以 -10°C 至 60°C 為佳，以 20°C 至 50°C 為較佳。反應時間雖依據在步驟 c 所得的 $n+p$ 個聚合寡核苷酸(va 或者 vb)或在步驟 a 所得之 n 個聚合寡核苷酸(ia 或者 ib)的種類、使用的修飾磷原子的試藥之種類、反應溫度等而相異，較佳為 1 分鐘至 24 小時，更佳為 10 分鐘至 12 小時，更較佳為 30 分鐘至 6 小時。

[0251] 使用氧化劑或硫化劑時，該氧化劑及硫化劑可能會再反應終了後或次步驟以後誘發出不期待的副反應，欲抑制該副反應，可於反應終了後使用還原劑進行淬火處理。作為具體還原劑，可使用 3 價磷試藥(例如可舉出亞磷酸三甲基、亞磷酸三乙酯、參(2-羧基乙基)磷等亞磷酸三烷基或亞磷酸二甲基或亞磷酸二乙基等亞磷酸二烷基)、硫代硫酸鈉等還原劑。前述淬火處理亦可能可省略。

[0252] 於步驟 c 之後進行步驟 d 時，於步驟 d 的反應之後，流程 5 或 6 中，式(iva 或 ivb)所示化合物或其鹽，或者流程 3 或 4 中，式(ia 或 ib)所示化合物或其鹽有殘存時，視必要可將所得之溶液賦予封端反應。封端反應為使用乙酸酐、安息香酸酐等酸酐，加入於或前述縮合劑，使用甲基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、乙基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、異丙基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽及 2-氰基乙基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽等烷基-H-磷酸酯之銨鹽，可藉由通常方法實施。

封端反應可在前述步驟 c 之後實施。

於步驟 a 之後進行步驟 d 時，於步驟 d 之後不實施前述封端反應。

[0253]

(步驟 e)(沈澱化及固液分離步驟)

步驟 e 為於由步驟 a 至步驟 d 中任一所得之反應溶液中加入極性溶劑後使寡核苷酸沈澱，並藉由固液分離而取得之步驟。

[0254] 作為步驟 e 中之極性溶劑，例如可舉出甲醇、乙醇、異丙醇 n-丁醇等醇系溶劑；乙腈、丙腈等腈系溶劑；丙酮、2-丁酮等酮系溶劑；二甲基甲醯胺、二甲基乙醯胺、N-甲基哌啶酮等醯胺系溶劑、二甲基亞砷等亞砷系溶劑；使用水、以及 2 種以上混合溶劑。於步驟 e 中之極性溶劑較佳為醇系溶劑、腈系溶劑，較佳為碳數 1 至 6 的醇溶劑或碳數 1 至 6 的腈溶劑，特佳為甲醇或乙腈。

[0255] 使用在步驟 d 所得之反應溶液進行步驟 e 時，藉由使用將前述還原劑加入於沈澱化溶劑之甲醇或乙腈的溶液，修飾磷原子的試藥之淬火處理與步驟 e 可同時進行。

[0256] 本發明之寡核苷酸的製造方法為，將上述步驟 a 至步驟 e 重複所望次數後，可得到高純度且高產率之目的寡核苷酸。

[0257]

(步驟 f)(脫保護·寡核苷酸分離步驟)

對於寡核苷酸的製造方法，於步驟 e 之後，對應基本

保護基、一時保護基及擬似固相保護基之種類・性質，進行脫保護，可分離寡核苷酸。作為脫保護之方法，例如依據 PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第3版、JOHN WILLY&SONS 出版(1999 年)等記載的脫保護方法，可進行除去寡核苷酸之所有保護基的步驟。具體為擬似固相保護基、以及基本保護基之苯甲醯基、異丁醯基、苯氧基乙醯基、乙醯基、乙醯丙醯基等保護磷酸二酯鍵或硫代磷酸二酯鍵保護之基本保護基的 2-氰基乙基等可藉由在氨水、氨水/乙醇溶液、或氨水與甲基胺水溶液之混合液進行處理，將所有除去。又，5'位或 3'位羥基的一時保護基可藉由在步驟 a 所使用的氟試藥、酸或鹼、或將這些經適宜稀釋後的溶液進行處理而除去。又，依據 journal of the chemistry coordination science park transaction1、2002 年、2619 頁-2633 頁所記載的脫保護方法，以 DBU[1,8-二氮雜雙環[5.4.0]-7-十一碳烯]及三甲基矽基氯化物進行處理，除去保護磷酸二酯鍵或硫代磷酸二酯鍵之氰基乙基等後，可藉由氨水除去擬似固相保護基、以及基本保護基之苯甲醯基、異丁醯基、苯氧基乙醯基、乙醯基、乙醯丙醯基等方法。又，亦可使用藉由無機鹼(碳酸鉀等)除去基本保護基之苯甲醯基、異丁醯基、苯氧基乙醯基、乙醯基、乙醯丙醯基等方法。

藉由基本保護基所保護之磷酸二酯鍵，例如可舉出 journal of the chemistry coordination science park transaction1、1999、1477 頁-1486 頁所記載之方法(以(E)-

2-硝基苯甲醛肟、吡啶-2-醛肟等肟化合物及、1、1、3、3-四甲基胍、DBU 等鹼進行處理之方法)進行脫保護，可變換為磷酸二酯鍵。2-氰基乙基等藉由 β 脫離之可脫保護的基本保護基進行保護的硫代磷酸二酯鍵藉由前述鹼性條件下的脫保護，可變換為硫代磷酸二酯鍵。以其他基本保護基所保護之硫代磷酸二酯鍵，例如依據 *journal of the chemistry coordination science park transaction* 1、1999、1477 頁-1486 頁所記載之方法(以前述肟化合物及前述鹼進行處理的方法等)進行脫保護後，可變換為磷酸二酯鍵。

不具有保護基之寡核苷酸因藉由酵素容易分解，故空氣清淨度管理下分離寡核苷酸為佳。

[0258] 上述步驟 a 至步驟 d 及步驟 f 中之反應進行的確認，可適用任一種與一般液相有機合成反應之相同方法。即可使用薄層矽膠層析法、高速液體層析法等來追蹤反應。

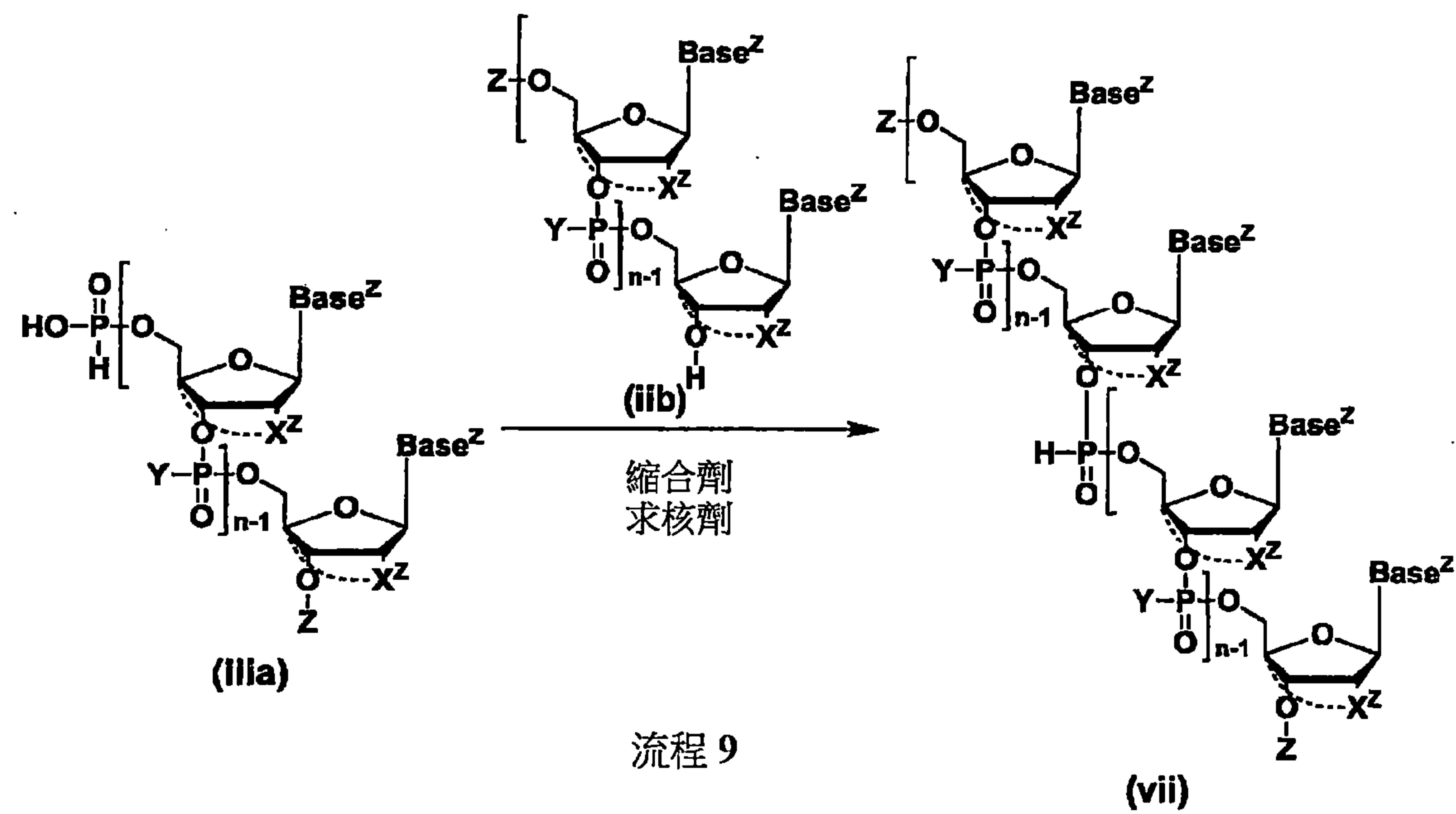
[0259] 藉由步驟 e 或步驟 f 所得之寡核苷酸，進一步藉由實施有機合成反應，可導向所望寡核苷酸衍生物。可使用使用方法 A 所製造的寡核苷酸及使用方法 B 所製造的寡核苷酸，使用方法 A 或方法 B 製造出寡核苷酸。

[0260] 例如，將以方法 A 中之步驟 b 所得的 n 個聚合寡核苷酸之 5'位羥基的 H-磷酸酯體(iia)與、以方法 B 中之步驟 a 所得的 n 個聚合寡核苷酸(iib)與，在與前述步驟 c 之同樣條件下，可藉由亞磷酸二酯鍵進行縮合。本步

驟表示於流程 9。流程中之記號與前述定義相同，式(iia)的 n 與式(iib)的 n 可相同或相異，式(iia)的 Z 與式(iib)的 Z 可相同亦可相異。

[0261]

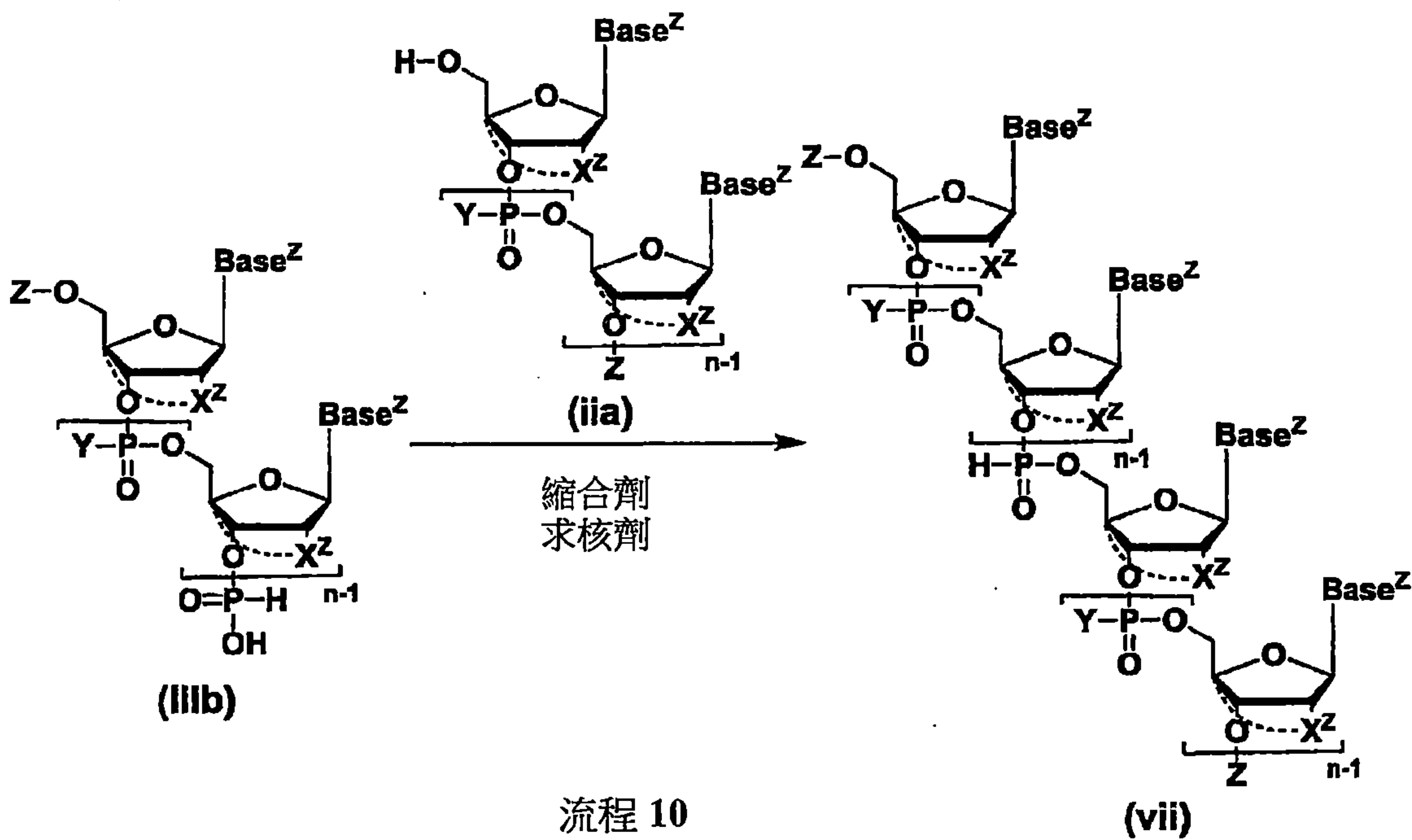
【化 4 4】



[0262] 又，將以方法 B 中之步驟 b 所得之 n 個聚合寡核苷酸的 3'位羥基之 H-磷酸酯體(iib)與、以方法 A 中之步驟 a 所得之 n 個聚合寡核苷酸(iia)在與前述步驟 c 之相同條件下，可藉由亞磷酸二酯鍵進行縮合。本步驟如流程 10 所示。流程中之記號與前述定義相同，式(iib)的 n 與式(iia)的 n 可相同亦可相異，式(iib)的 Z 與式(iia)的 Z 可相同亦可相異。

[0263]

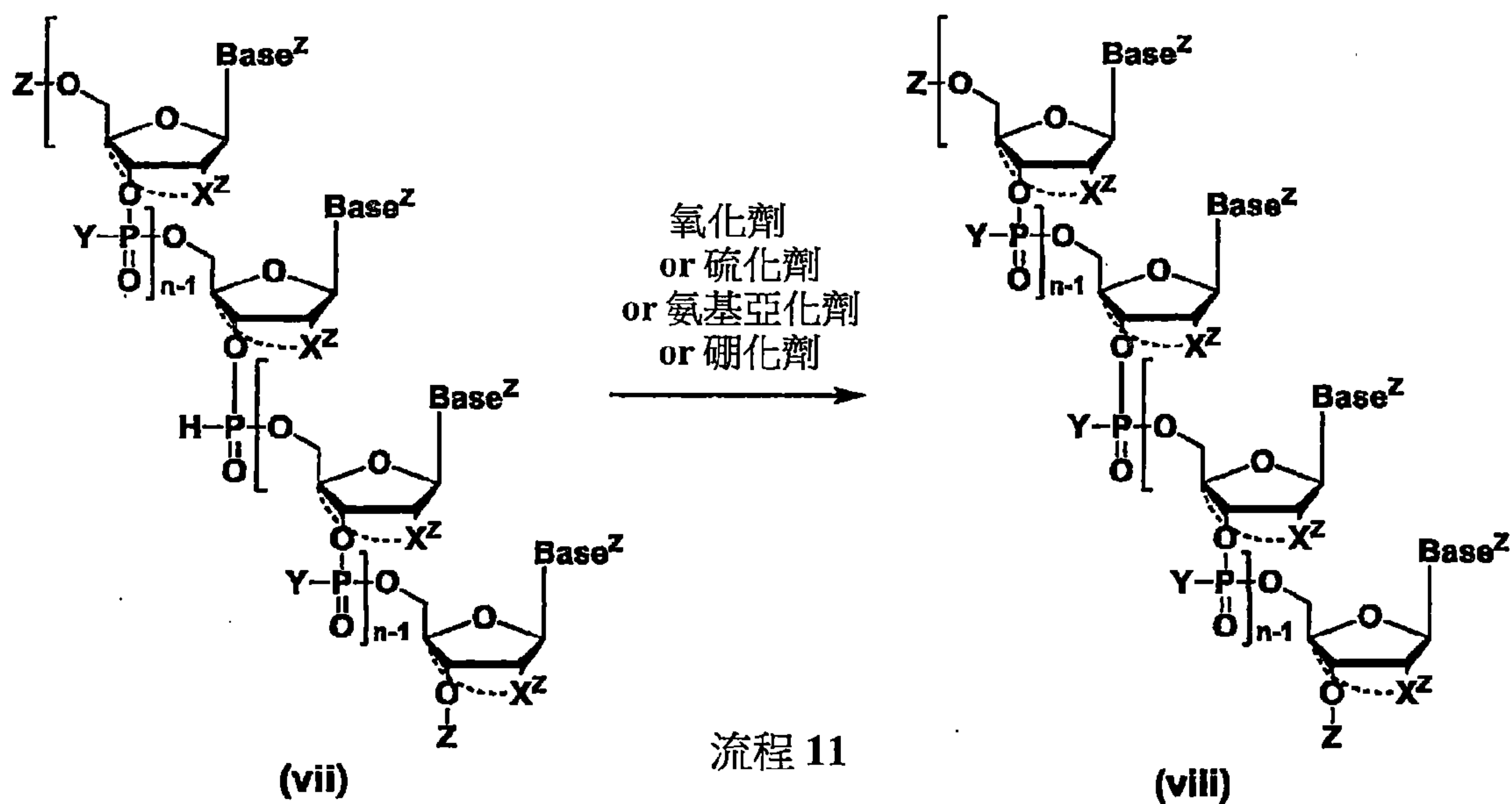
【化 4 5】



[0264] 將前述經縮合的寡核苷酸(vii)的亞磷酸二酯鍵在與步驟 d 之同樣條件下，可轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、以基本保護基進行保護的磷酸二酯鍵或以基本保護基所保護的硫代磷酸二酯鍵。本步驟如流程 11 所示。流程中之記號與前述定義相同，式(vii)中之 2 個 n 可相同或相異，式(vii)中之 2 個 Z 可相同亦可相異。式(viii)亦相同。

[0265]

【化 4 6】



[0266] 使用前述藉由亞磷酸二酯鍵進行縮合的步驟所得的反應混合物，與步驟 e 同樣下將具有擬似固相保護基之經縮合的前述核苷酸或寡核苷酸(vii)沈澱，可實施藉由固液分離所取得的分離步驟。又，使用藉由轉換前述亞磷酸二酯鍵之步驟所得之反應混合物，與步驟 e 同樣地，將具有擬似固相保護基之亞磷酸二酯鍵經變換的核苷酸或寡核苷酸(viii)沈澱，可實施藉由固液分離所取得之分離步驟。

[0267] 於前述分離步驟之後，與步驟 f 同樣地，配合基本保護基、一時保護基及擬似固相保護基之種類・性質，進行脫保護，可分離寡核苷酸。

[0268] 前述藉由亞磷酸二酯鍵之縮合體(vii)、或該亞磷酸二酯鍵之變換體(viii)所具有的 2 個 Z 之內的至少一個為基本保護基，可將該基本保護基作為一時保護基使

用時，將藉由前述亞磷酸二酯鍵之縮合體(vii)、或該亞磷酸二酯鍵之變換體(viii)於流程 1 或 2 中作為式(ia 或 ib)所示化合物使用，可實施方法 A 或方法 B 中之步驟 a。

[0269] 所製造之寡核苷酸可使用於各種人體用或動物用之醫藥品(RNA、DNA、寡核苷酸醫藥、等)、功能性食品、特定保健食品、食品、化成品、生體用高分子材料、工業用高分子材料等各種用途。

[0270] 寡核苷酸的製造方法中之出發物質可藉由已知的氧化、還原、水解、酯化反應、醯胺縮合等一般官能基變換法(例如可參照 Comprehensive Organic Transformations, Second Edition、R.C.Larock 著、Wiley-VCH(1999 年)等)進行而製造。

例如 2'位與 4'位以 $-\text{CSNR}^{14}-(\text{R}^{14}$ 表示氫原子或 C1-6 烷基)進行交聯的核糖上，鍵結核酸鹼之核苷酸係由具有以對應的 $-\text{CONR}^{13}-(\text{R}^{13}$ 表示氫原子或 C1-6 烷基)進行交聯的結構之核苷酸等，使用硫代羰基化試藥(例如勞森試藥等)，勢必要進行保護反應及脫保護反應而合成。

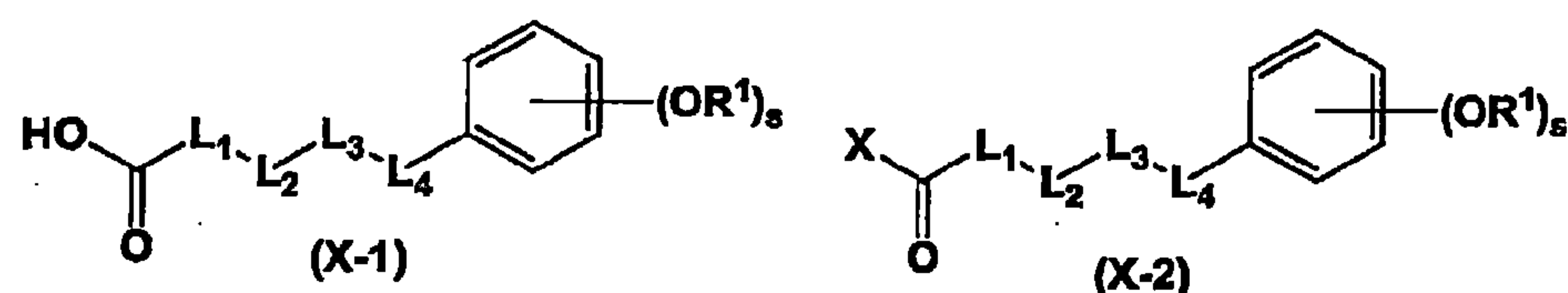
[0271] 導入擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸可具以下所示方法製造，但下述製造方法為一般製造方法的一例子者，並非限定於有關本實施形態之擬似固相保護基經導入的核苷酸等製造方法者。

[0272] 前述式(I)所示擬似固相保護基之中，m 為 0 之基經導入的核苷酸或寡核苷酸，例如可藉由下述式(X-1)所示的羧酸或者下述式(X-2)所示的羧酸鹵化物與核苷酸

或寡核苷酸之羥基或者核酸鹼的反應而得。

[0273]

【化 4 7】



[0274] 式中，X 表示鹵素原子，其他記號與前述定義相同。

[0275] 於擬似固相保護基的導入使用羧酸時，於溶劑中使用二環己基碳二亞胺、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽、N,N,N',N'-四甲基-O-(苯並三唑-1-基)脲六氟磷酸酯及羰基二咪唑等縮合劑，可將擬似固相保護基導入於核苷酸或寡核苷酸。視必要，可組合 1-羥基苯並三唑等添加劑而使用。使用羧酸鹵化物時，可舉出溶劑中使用三乙基胺、二異丙基乙基胺等鹼的方法。作為溶劑，可舉出氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷等鹵素系溶劑；苯、甲苯、二甲苯、三甲苯等芳香族系溶劑；乙酸乙酯、乙酸異丙酯等酯系溶劑；己烷、戊烷、庚烷、辛烷、壬烷、環己烷等脂肪族系溶劑；四氫呋喃、二乙基醚、環戊基甲基醚、tert-丁基甲基醚等醚系溶劑；N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺、N-甲基吡咯啉酮等醯胺系溶劑等。

[0276] 該羧酸或者酸鹵化物可藉由進行已知的氧

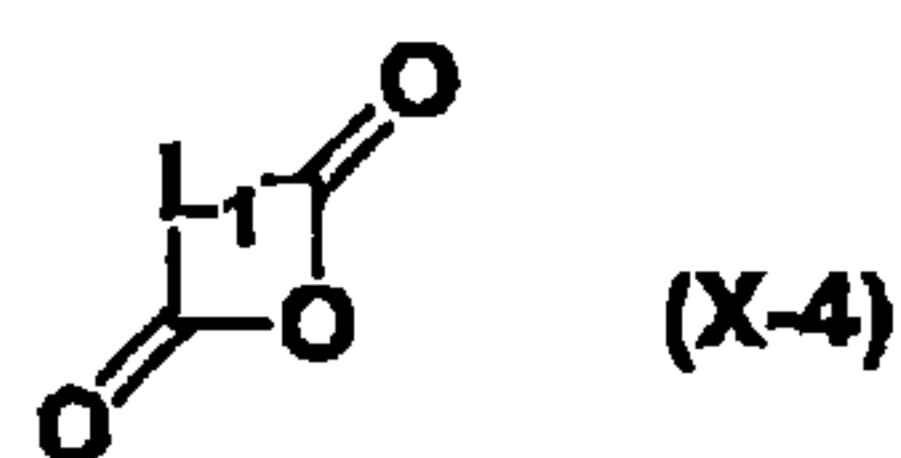
化、還原、水解等、一般已知的官能基變換法(例如參照 Comprehensive Organic Transformations, Second Edition、R.C.Larock 著、Wiley-VCH(1999 年)等)而製造。

又，於 L^1 與 L^2 間之鍵結、 L^2 與 L^3 間之鍵結、 L^3 與 L^4 間之鍵結內，將任意鍵結使用上述縮合法或官能基變換法等而形成，可階段式地導入擬似固相保護基。又， L^2 為 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ 、 $\text{OCO}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ 時，將 L^2 所含的酯鍵或醯胺鍵使用上述縮合法或官能基變換法等而形成，可階段式地導入擬似固相保護基。 L^4 與 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ 、 $\text{OCO}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ 之情況亦相同。其中， R^2 與前述定義相同。

[0277] 例如可舉出核苷酸或寡核苷酸與式(X-4)所示二羧酸酐(琥珀酸酐等)進行反應，得到具有持羧基的下述式(X-5)所示基之核苷酸或寡核苷酸後，將該具有持羧基之式(X-5)所示基的核苷酸或寡核苷酸與下述式(X-6)所示醇化合物或下述式(X-7)所示胺化合物進行縮合，製造出前述式(I)所示擬似固相保護基之中， m 為 0， L^2 為具有 $-\text{COO}-$ 或 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ 之基的核苷酸或寡核苷酸。

[0278]

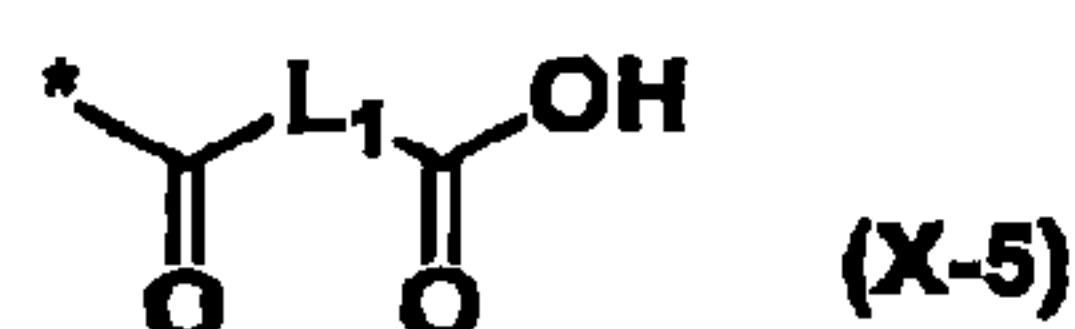
【化 4 8】



式中， L^1 與前述定義相同。

[0279]

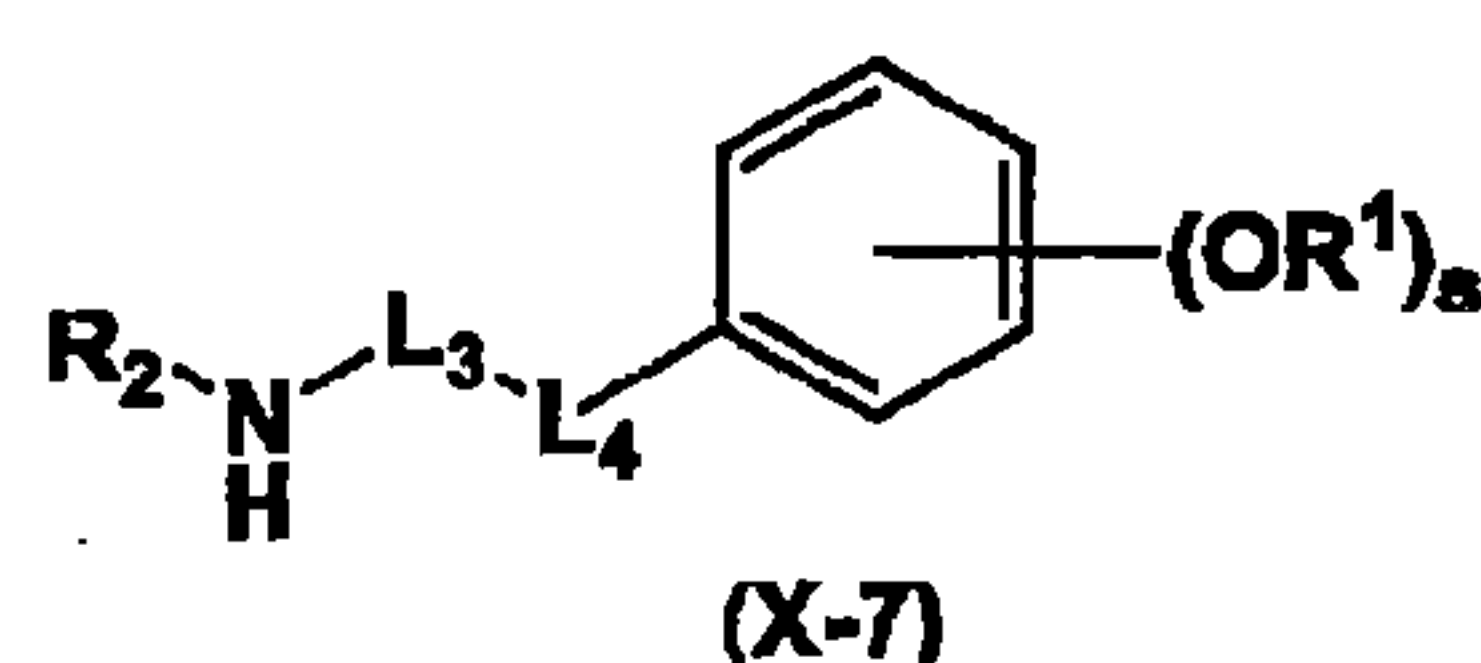
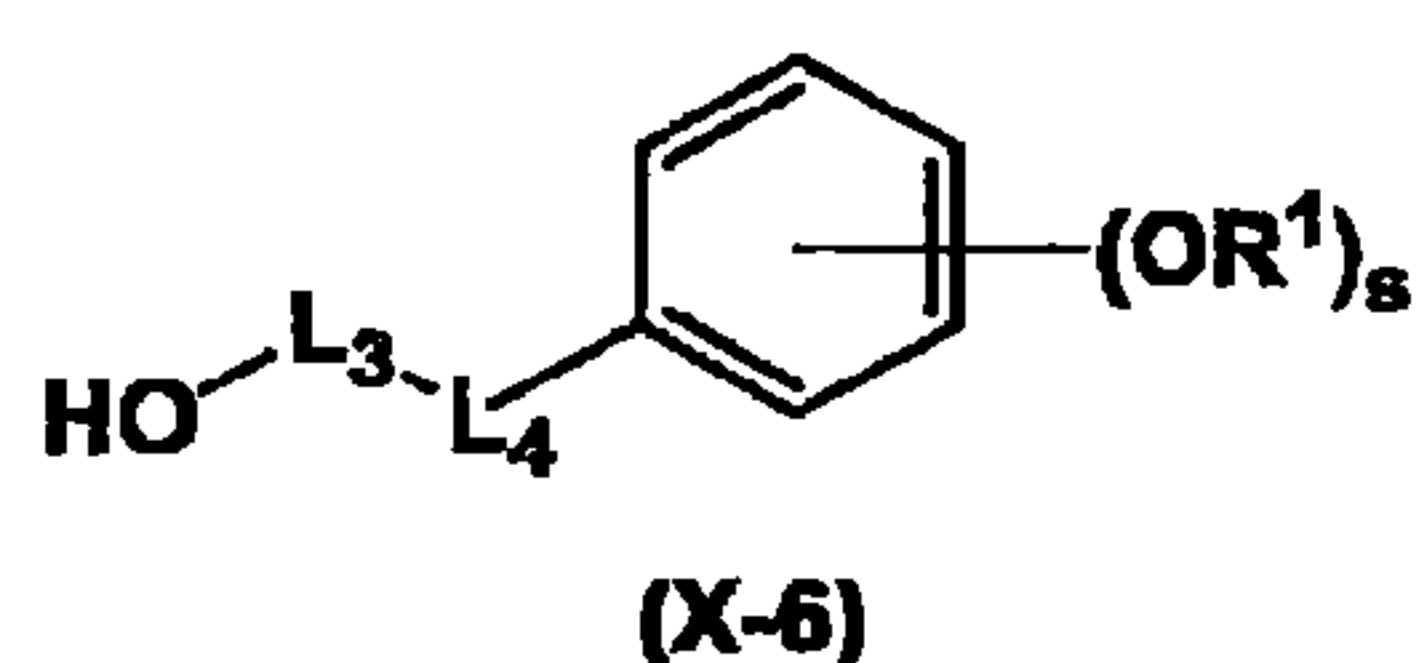
【化 4 9】



式中的記號與前述定義相同。

[0280]

【化 5 0】



式中的記號與前述定義相同。

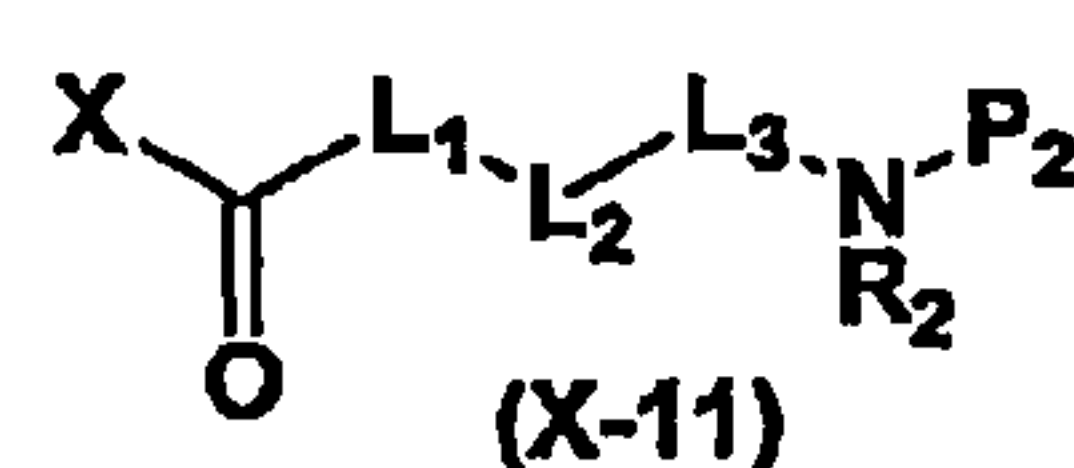
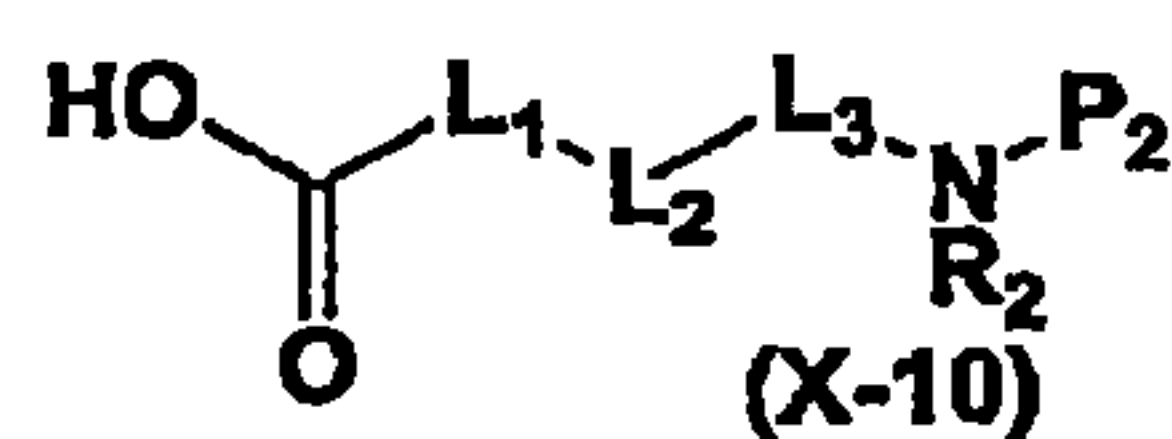
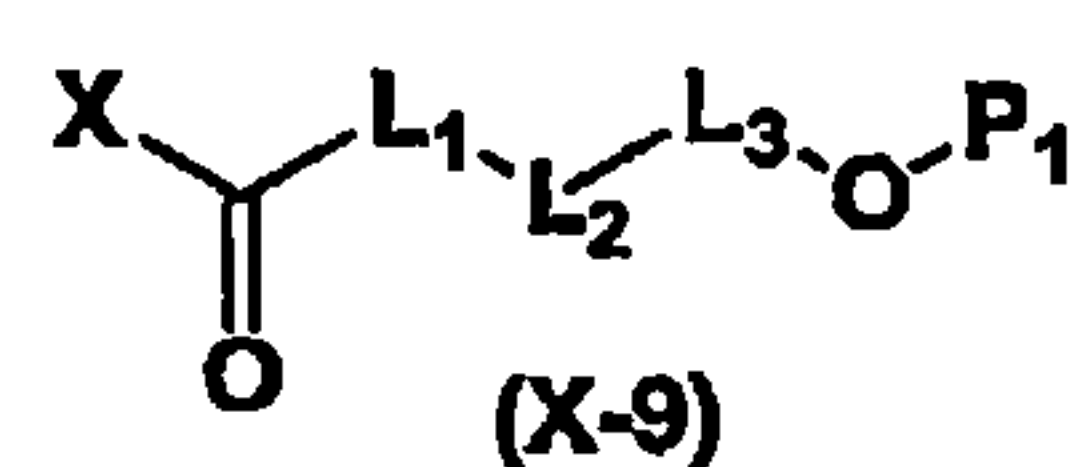
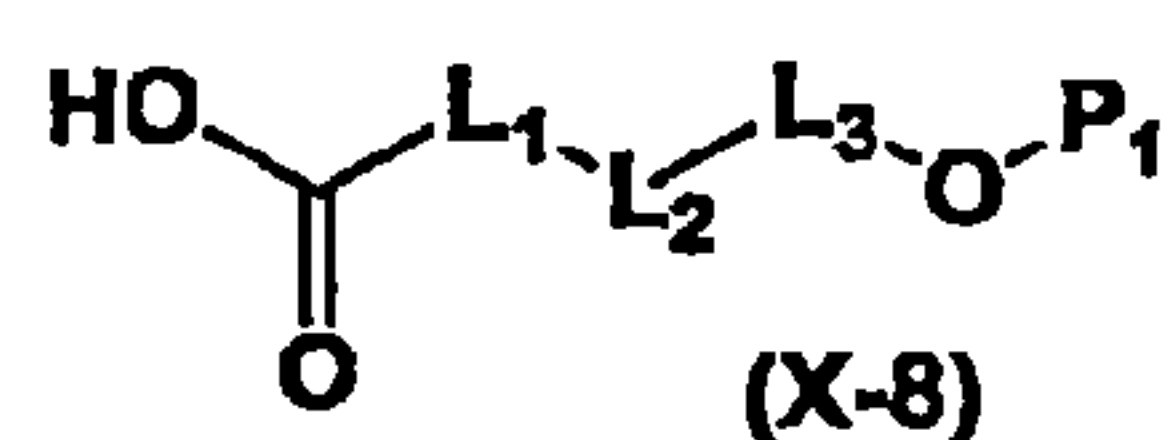
[0281] 具有持前述羧基的式(X-5)所示基之核苷酸或寡核苷酸與前述式(X-6)所示醇化合物或前述式(X-7)所示胺化合物的縮合，通常在溶劑中使用二環己基碳二亞胺、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽、N,N,N',N'-四甲基-O-(苯並三唑-1-基)脲六氟磷酸酯或羰基二咪唑等縮合劑。視必要，可組合1-羥基苯並三唑等添加劑後使用。溶劑與在前述式(X-1)或者式(X-2)所示化合物與核苷酸或寡核苷酸之反應相同。

[0282] 又，例如將下述式(X-8)或者(X-10)所示羧酸或下述式(X-9)或者(X-11)所示羧酸鹵化物與核苷酸或寡核苷酸之羥基或者核酸鹼在與前述縮合反應之相同條件下進行縮合，視必要其後進行脫保護反應後，得到下述式(X-

12)所示醇化合物或下述式(X-13)所示胺基化合物，將所得之式(X-12)所示醇化合物或式(X-13)所示胺基化合物與式(X-14)所示羧基化合物或式(X-15)所示芳基羧酸鹵化物以與前述縮合反應之相同條件下進行縮合，可製造出前述式(I)所示擬似固相保護基中，具有 m 為 0， L^4 為 $-\text{OCO}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ 之基的核苷酸或寡核苷酸。

[0283]

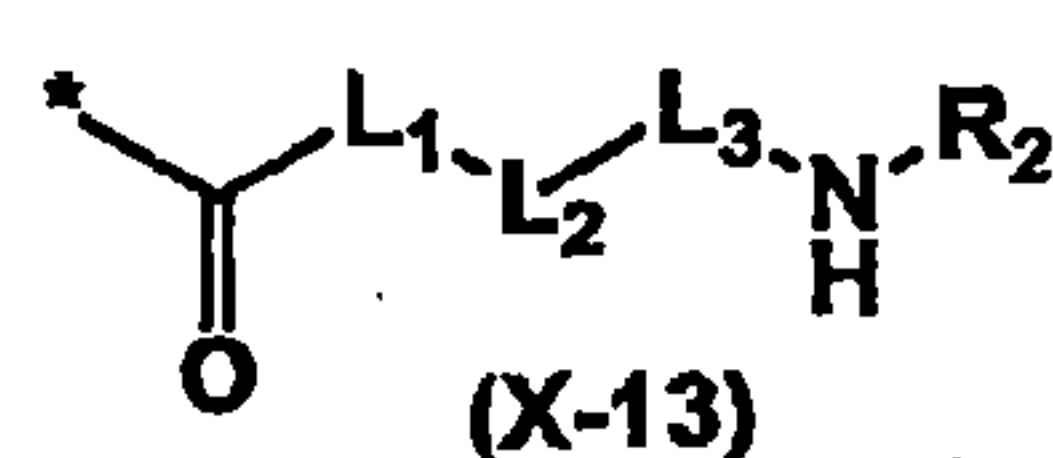
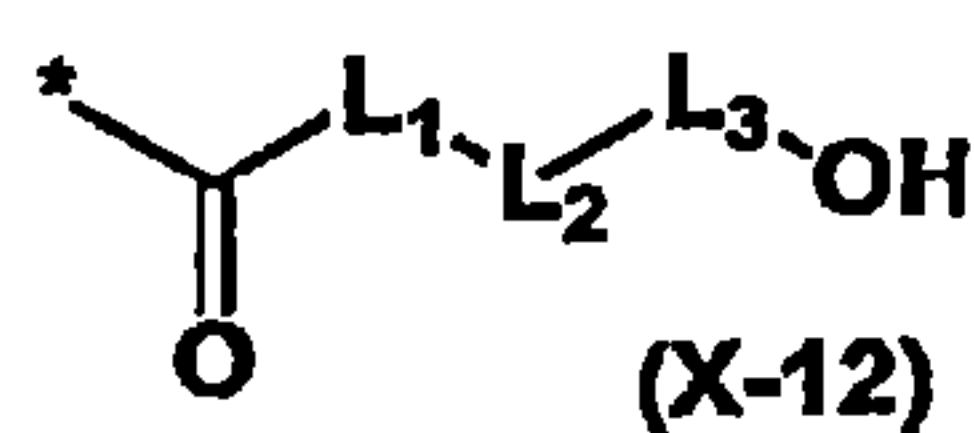
【化 5 1】



[0284] (式中， P^1 表示羥基之保護基， P^2 表示胺基之保護基， X 表示鹵素原子，其他記號與前述定義相同) P^1 可選自保護羥基之一時保護基或基本保護基， P^2 可選自保護胺基之基本保護基。

[0285]

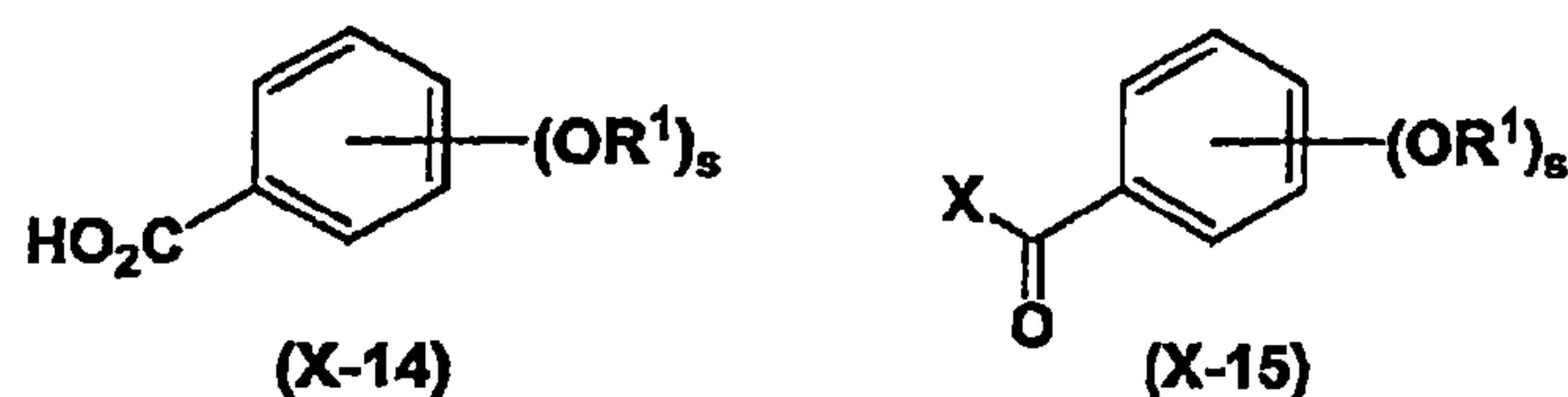
【化 5 2】



[0286] 式中的記號與前述定義相同。

[0287]

【化 5 3】



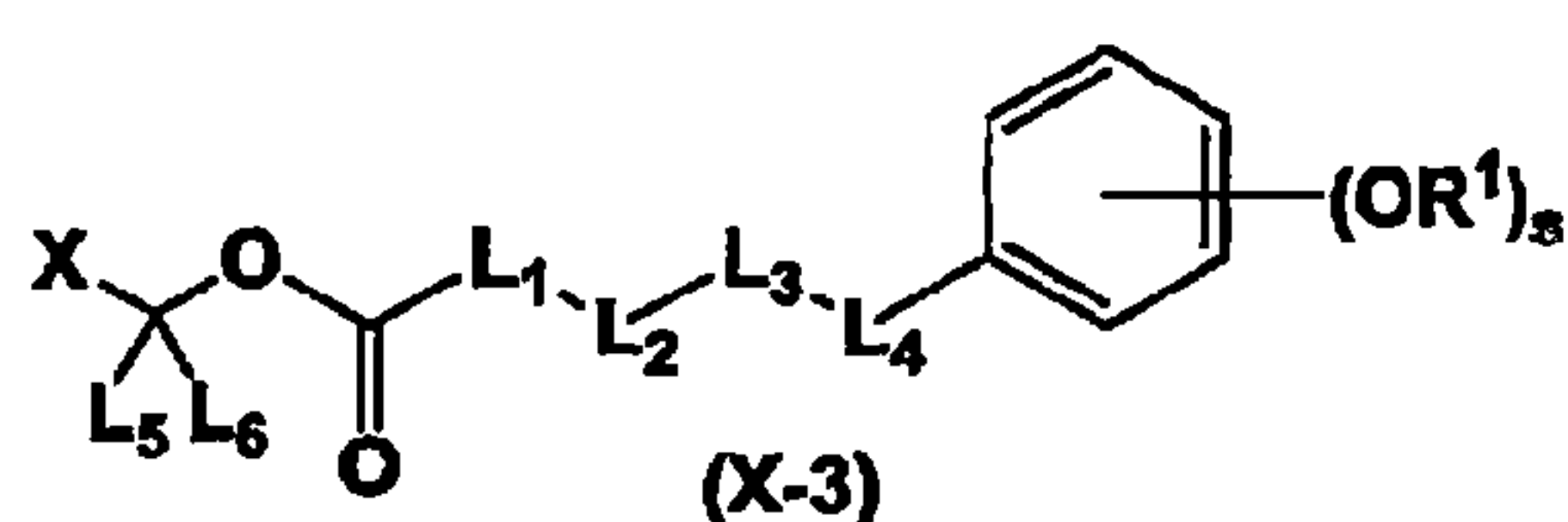
[0288] 式中的記號與前述定義相同，X 表示鹵素原子。

[0289] 前述脫保護反應之條件可參照 PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS、第 3 版、JOHN WILLY&SONS 出版(1999 年)等。

[0290] 前述式(I)所示擬似固相保護基之中，導入 m 為 1 之基的核苷酸或寡核苷酸，例如可藉由將下述式(X-3)所示烷基鹵化物與核苷酸或寡核苷酸之羥基或者核酸鹼在溶劑中進行反應而得。

[0291]

【化 5 4】



[0292] 式中，X 表示鹵素原子，其他記號與前述定義相同。

[0293] 於前述式(X-3)所示烷基鹵化物與核苷酸或寡核苷酸之反應中使用鹼(碳酸鉀、三乙基胺等)。作為前述溶劑，使用前述鹵素系溶劑、芳香族系溶劑、酯系溶劑、脂肪族系溶劑、醚系溶劑或醯胺系溶劑等所使用者，其中

亦可使用醯胺系溶劑。

[0294] 前述式(X-3)所示烷基鹵化物為可藉由將前述式(X-1)所示羧酸與氯甲磺酸氯化物在溶劑中進行反應(國際公開第 2014-144285 號所記載的方法)，又藉由將前述式(X-1)所示羧酸、對甲醛及氯化鋅在溶劑中進行反應後製造(Journal of Medicinal Chemistry、2009 年、52 卷、771 頁-778 頁的方法)。

又， L^1 與 L^2 之間的鍵結、 L^2 與 L^3 之間的鍵結、 L^3 與 L^4 之間的鍵結內，將任意鍵結使用上述縮合法或官能基變換法等而形成，可藉由階段式導入擬似固相保護基。又， L^2 為 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ 、 $\text{OCO}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ 時，將 L^2 所含的酯鍵或醯胺鍵使用上述縮合法或官能基變換法等而形成，可藉由階段式導入擬似固相保護基。 L^4 為 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ 、 $\text{OCO}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ 時亦相同。其中， R^2 與前述定義相同。

[實施例]

[0295] 其次舉出實施例具體說明本發明，但本發明並未受到這些限定。且實施例中，NMR 表示核磁共振光譜，MS 表示質量分析。

[0296] ^1H -NMR 數據若記載時，係以 300MHz(JNM-ECP300；日本電子(JEOL)公司製、或 JNM-ECX300；日本電子(JEOL)公司製)所測定，其表示將四甲基矽烷作為內部標準的信號之化學位移 δ (單位：ppm)(分裂圖型、積分

值)。「s」表示單重，「d」表示雙重，「t」表示三重，「q」表示四重，「quint」表示五重，「dd」表示雙重·of·雙重，「m」表示多重，「brs」表示寬單重，「CDCl₃」表示重氯仿，「C₅D₅N」表示重吡啶。

若記載 ³¹P-NMR 數據時，表示以 JNM-ECX300；日本電子(JEOL)公司製)所測定的信號之化學位移 δ(單位：ppm)。

[0297] MS 若無特別記載時，藉由以下條件 1，使用 ESI(電子噴霧離子化)法進行測定。「ESI⁺」表示 ESI 正離子模式，「ESI⁻」表示 ESI 負離子模式。

條件 1：

裝置：AB SCIEX TripleTOF 5600

管柱：Kinetex PFP(2.6μm、2.1×75mm)

管柱溫度：40℃

溶離液組成：

有機層：四氫呋喃/乙腈=1/1(體積比)

水層：10mM 甲酸銨水溶液

將有機層與水層的混合比以 50/50 進行測定開始後，在 10 分鐘直線地改為 90/10。其後 5 分鐘，將有機層與水層之混合比固定在 90/10。

流速：0.50mL/min、

檢測波長：260nm

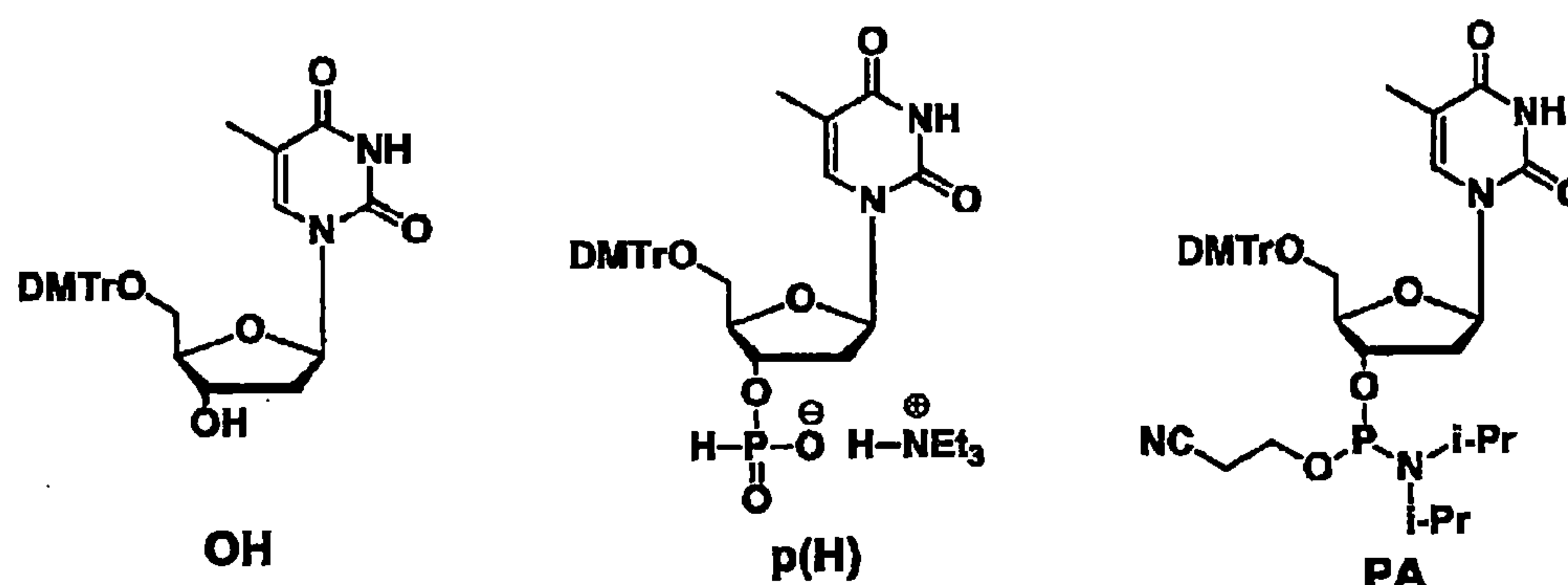
[0298] 在矽膠管柱層析法的純化雖無特別記載時，其為使用山善製 Hi-Flash 管柱。

[0299]

參考例 (於 5'位羥基具有 4,4'-二甲氧基三苯甲基之核酸單體的安定性評估)

[0300]

【化 5 5】



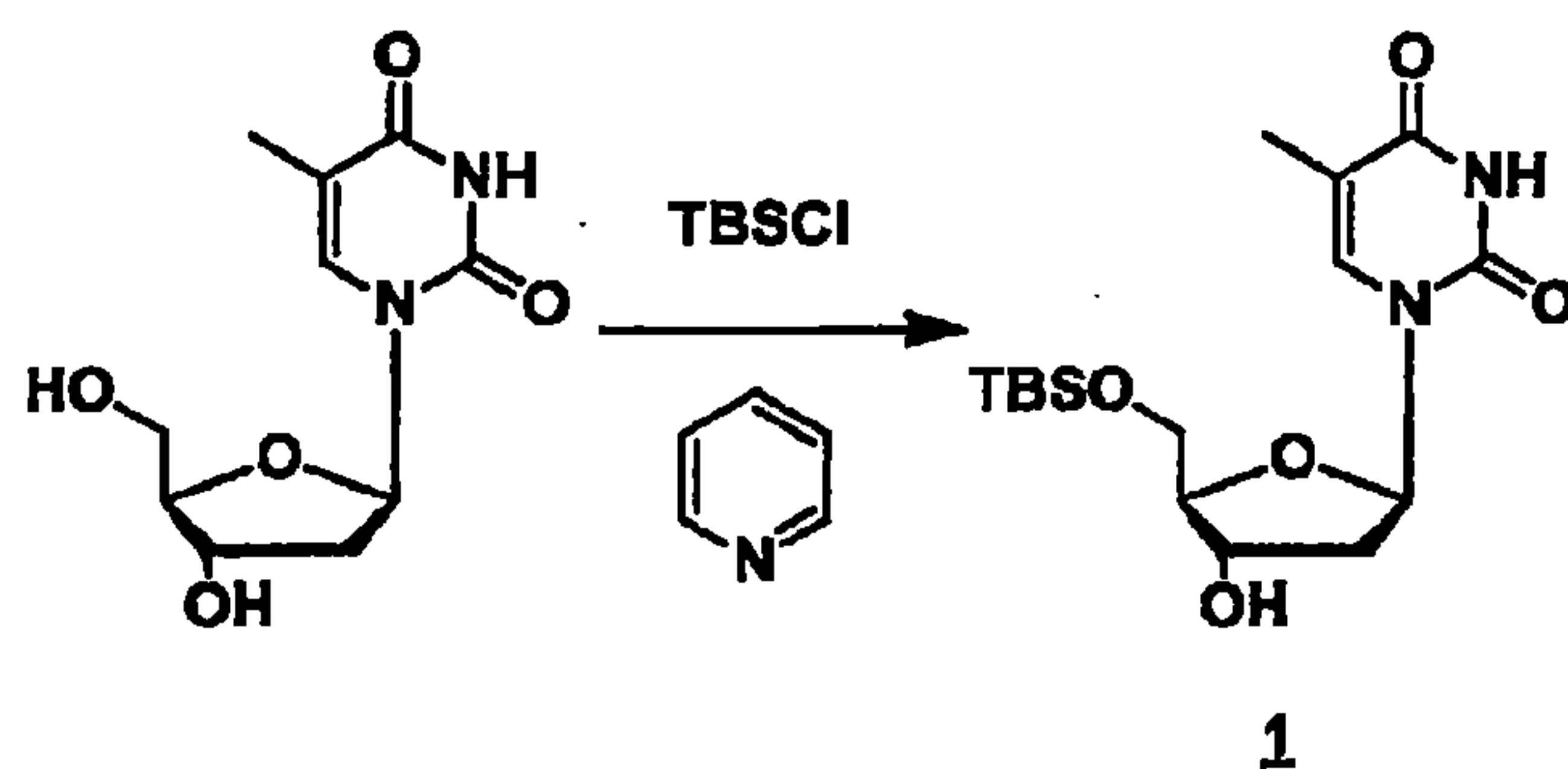
[0301] 作為使用於寡核苷酸合成的核酸單體，選擇 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷[OH]、5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羥基磷胸苷 三乙基胺鹽[p(H)]、及 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-氰基乙氧基(二異丙基胺基)磷胸苷[PA]。各固體直接在 100℃ 進行攪拌，於一定小時經過後進行 HPLC 分析。該結果如圖 1 所示。

[0302] 由圖 1 可得知，與 H-磷酸酯體及氨基亞體比較，核苷酸較為安定。

[0303] 參考合成例 1 (於 5'位羥基具有 tert-丁基二甲基矽基的核苷酸之合成)：化合物 1 之合成

[0304]

【化 5 6】



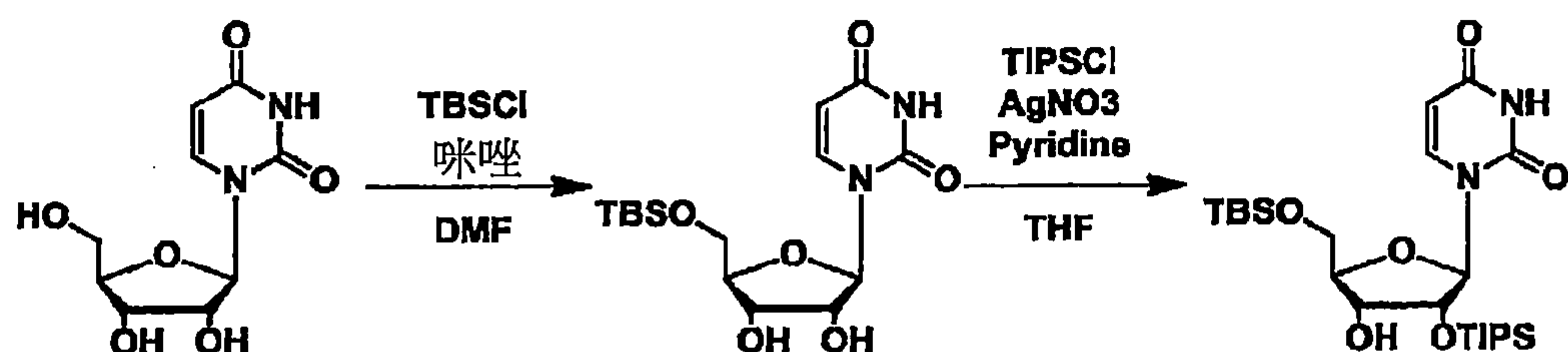
[0305] 在氮氣環境下，於胸苷(24.20g、100mmol)的吡啶(60mL)懸浮液中，在 0℃ 加入 *tert*-丁基二甲基矽基氯化物(16.62g、110mmol)，進行 22 小時 29 分鐘之攪拌。將溶劑減壓下餾去，加入二氯甲烷與水後分液。於所得之水層中加入二氯甲烷並分液，合併所得之有機層，以 5% 碳酸氫鈉水溶液洗淨，並以水洗淨。將溶劑減壓下餾去，加入甲苯並析出的固體經過濾後得到化合物 1(29.77g，產率 84%)之白色固體。

¹H-NMR：(300MHz；CDCl₃)δ0.11(s、3H)、0.12(s、3H)、0.92(s、9H)、1.92(d、3H)、2.02-2.16(m、2H)、2.32-2.39(m、1H)、3.81-3.92(m、2H)、4.01-4.04(m、1H)、4.45-4.49(m、1H)、6.36(q、1H)、7.48(d、1H)、8.27(brs、1H)。

[0306] 參考合成例 2 (於 5'位羥基具有 *tert*-丁基二甲基矽基，於 2'位羥基具有三異丙基矽基的核苷酸之合成)：5'-O-(*tert*-丁基二甲基矽基)-2'-O-三異丙基矽基尿苷之合成

[0307]

【化 5 7】



[0308] 步驟 1 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)尿苷之合成

在氮氣環境下，於尿苷(12.03g、49.3mmol)、咪唑(6.74g、99.0mmol)的 N,N -二甲基甲醯胺[DMF](120g)溶液中，在室溫加入 tert-丁基二甲基矽基氯化物(7.76g、51.5mmol)，進行 5 小時 1 分鐘攪拌。將該反應混合物滴入於水(240g)中，將析出的固體經過濾。於所得之粗物中加入甲苯後進行 30 分鐘攪拌，經過濾後得到 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)尿苷(10.49g，產率 59%)之白色固體。

$^1\text{H-NMR}$ ：(300MHz； CDCl_3) δ 0.11(s、6H)、0.92(s、9H)、3.82-3.87(m、1H)、4.00-4.05(m、1H)、4.14-4.15(m、1H)、4.21-4.26(m、2H)、5.67(d、1H)、5.90(d、1H)、8.06(d、1H)。

[0309] 步驟 2 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-O-三異丙基矽基尿苷之合成

在氮氣環境下，於 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)尿苷(5.40g、15.1mmol)、硝酸銀[AgNO_3](10.3g、60.6mmol)、吡啶(6.1mL,75mmol)的 THF (50mL)懸浮液中，在室溫加入三異丙基矽基氯化物(11.65g、60.4mmol)，進行 23 小時 6

分鐘攪拌。將該反應混合物以矽藻土過濾，將溶劑減壓下餾去後加入乙酸乙酯。加入水並分液，於所得之水層中加入乙酸乙酯並分液。合併所得之有機層，以 6%碳酸氫鉀水溶液洗淨，以水洗淨。將溶劑減壓下餾去，加入己烷並析出固體，在 0℃ 冷卻後，經過濾後得到 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-O-三異丙基矽基尿苷(5.24g，產率 68%)之白色固體。

將所得之濾液在減壓下餾去，以矽膠層析法(己烷-乙酸乙酯)進行純化後，得到 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-O-三異丙基矽基尿苷(1.72g，產率 22%)之白色固體。

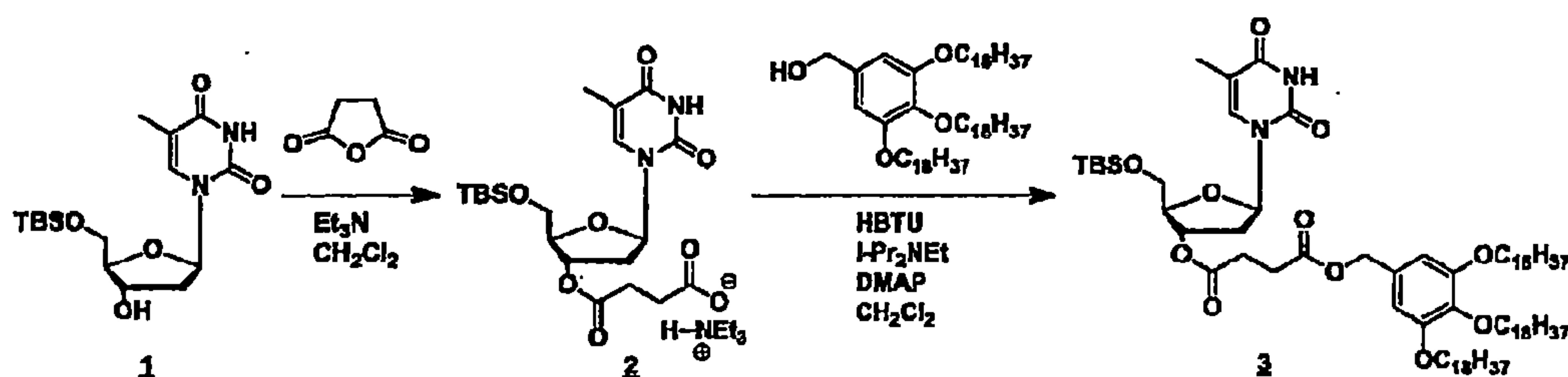
$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.12(s、6H)、0.94(s、9H)、1.04-1.16(m、21H)、2.80(d、1H)、3.81(d、1H)、3.96(d、1H)、4.13-4.20(m、2H)、4.36(t、1H)、5.70(d、1H)、6.07(d、1H)、7.95(dd、1H)、8.17(brs、1H)。

[0310]

實施例 1(於 3'位羥基鍵結擬似固相保護基之核苷酸的合成)：化合物 3 之合成

[0311]

【化 5 8】



[0312]

步驟 1 化合物 2 之合成

在氮氣環境下，於化合物 1(8.02g、22.4mmol)、琥珀酸酐(3.35g、33.5mmol)的二氯甲烷(80g)溶液中，在室溫加入三乙基胺(6.21mL、44.8mmol)，進行 4 小時 3 分鐘攪拌。於反應混合物加入 2.0M 磷酸-三乙基胺水溶液並分液。將所得之有機層以 2M 磷酸-三乙基胺水溶液進行 2 次分液而洗淨，以硫酸鎂乾燥後，將溶劑減壓下餾去，得到化合物 2 之薄紫色固體(11.37g，產率 91%)。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.13(s、6H)、0.93(s、9H)、1.23(t、9H)、1.92(d、3H)、2.04-2.13(m、1H)、2.39-2.46(m、1H)、2.55-2.66(m、4H)、3.02(q、6H)、3.86-3.95(m、2H)、4.13(d、1H)、5.25(d、1H)、6.35(q、1H)、7.55(d、1H)。

[0313]

步驟 2 化合物 3 之合成

在氮氣環境下，於化合物 2(2.79g、5.0mmol)、3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲基醇(依據 Tetrahedron、2011、67、6633-6643 所記載的方法所合成)(3.13g、3.4mmol)的二氯甲烷(65g)溶液中，在室溫加入 2-(1H-苯並三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽[HB TU](2.55g、6.7mmol)、二異丙基乙基胺(1.2mL、7.1mmol)、二甲基胺基吡啶[DMAP](847mg、6.9mmol)，進行 1 小時 8 分鐘攪拌。於反應混合物加入甲醇並將析出的固體過濾，得到化合物

3(4.53 g, 產率 98%)之白色固體。

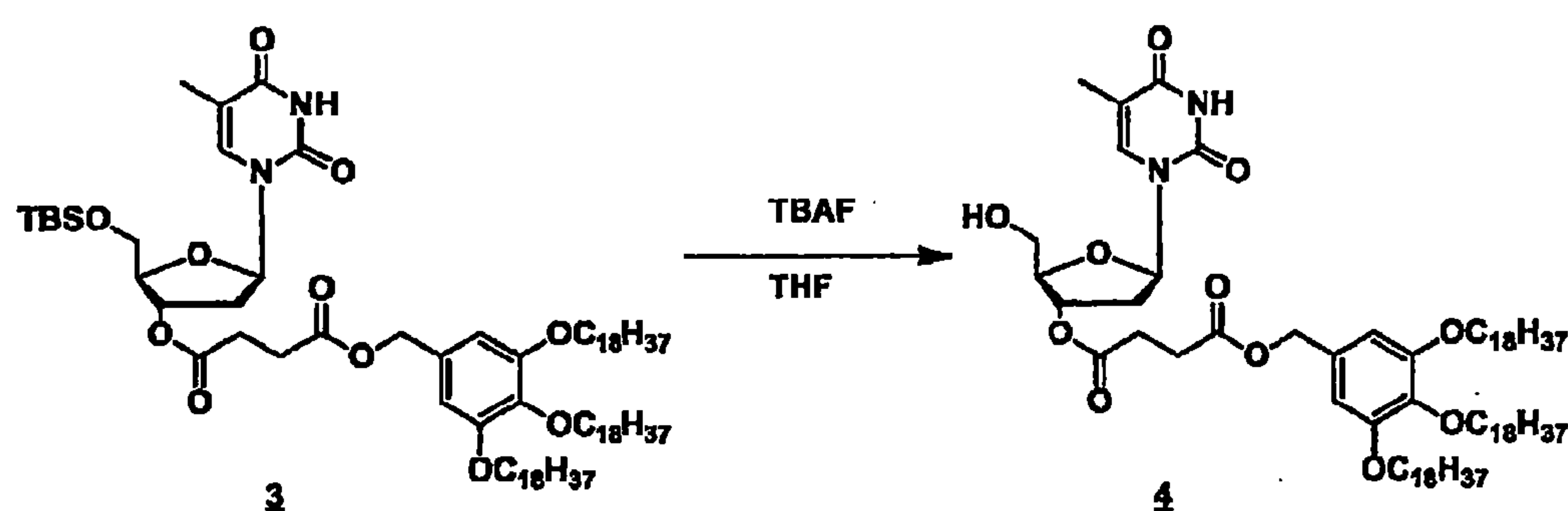
$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.130(s、3H)、0.133(s、3H)、0.88(t、9H)、0.94(s、9H)、1.14-1.83(m、96H)、1.93(d、3H)、2.05-2.15(m、1H)、2.37-2.44(m、1H)、2.68(t、4H)、3.89-3.97(m、8H)、4.07(d、1H)、5.02(s、2H)、5.27(d、1H)、6.34(q、1H)、6.53(s、2H)、7.54(d、1H)、8.11(brs、1H)。

[0314]

實施例 2(TBS 基的脫保護)：化合物 4 之合成

[0315]

【化 5 9】



[0316] 在氮氣環境下，於化合物 3(2.97g、2.2mmol)的四氫呋喃[THF](65g)溶液，在室溫加入 1.0M 四丁基銨氟化物[TBAF]/THF 溶液(2.4mL、2.4mmol)，進行 2 小時 10 分鐘攪拌。於反應混合物中加入甲醇並過濾析出之固體，得到化合物 4(2.66g，產率 98%)之白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.09-1.84(m、96H)、1.93(d、3H)、2.30-2.45(m、2H)、2.62-

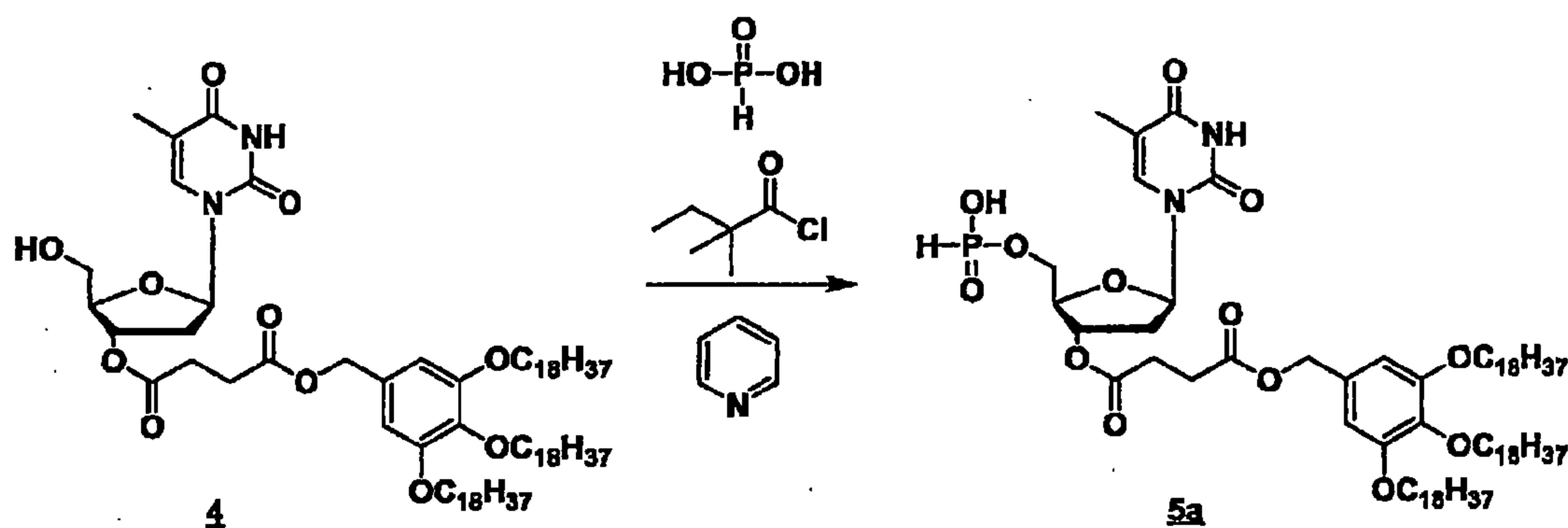
2.73(m、4H)、3.82-4.04(m、9H)、5.02(s、2H)5.25-5.29(m、1H)、6.19(q、1H)、6.53(s、2H)、7.49(d、1H)、8.07(brs、1H)。

[0317]

實施例 3(H-磷酸酯化)：化合物 5a 之合成

[0318]

【化 6 0】



[0319] 在氮氣環境下，於亞磷酸(336mg、4.0mmol)的吡啶(10mL)溶液，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.33mL、2.4mmol)，進行 39 分鐘攪拌。於該反應混合物中，加入化合物 4(498mg、0.40mmol)，在 40℃ 進行 1 小時攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(56μL、0.40mmol)，再進行 1 小時 45 分鐘攪拌。加入乙腈並析出固體，經冰冷後過濾後得到化合物 5a(562mg)之白色固體。

¹H-NMR：(300MHz；CDCl₃)δ0.88(t、9H)、1.16-1.83(m、96H)、1.92(d、3H)、2.31-2.35(m、2H)、

2.68(brs、4H)、3.90-3.98(m、6H)、4.17-4.24(m、3H)、
5.02(s、2H)、5.39(d、1H)、6.38(q、1H)、6.53(s、2H)、
6.94(d、1H)、7.68(d、1H)。

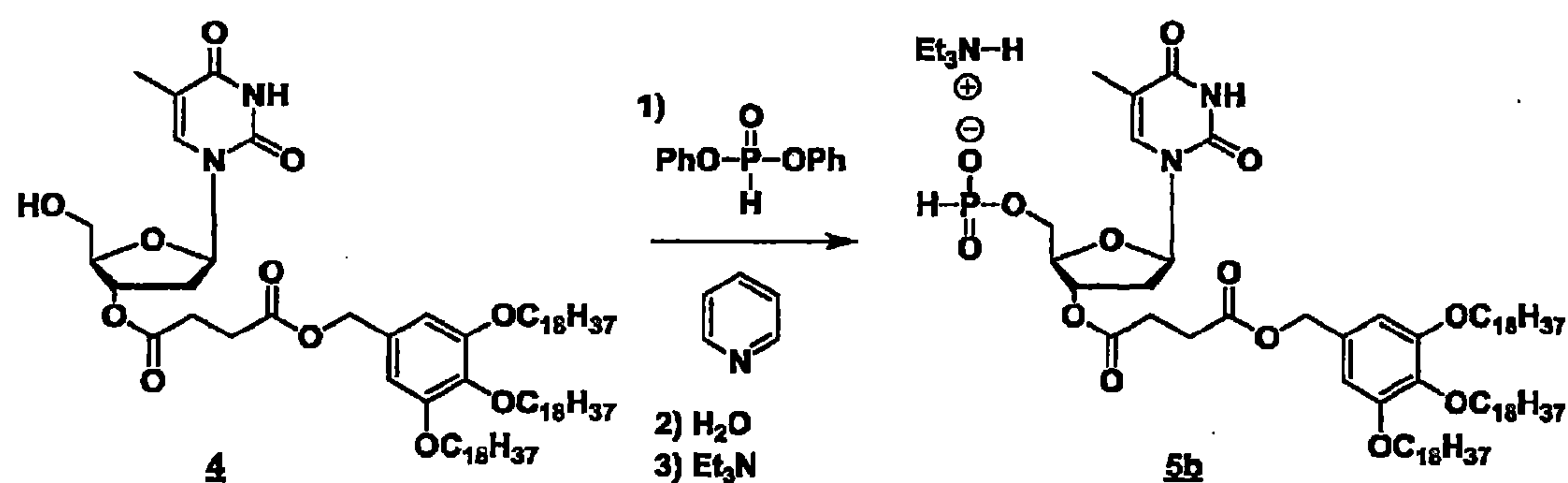
^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 6.54。

[0320]

實施例 4(H-磷酸酯化)：化合物 5b(三乙基胺鹽)之合成

[0321]

【化 6 1】



[0322] 在氮氣環境下，於亞磷酸二苯基(0.72g、3.1mmol)的吡啶(7g)溶液中，在 35°C 加入化合物 4(0.5g、0.40mmol)的吡啶(5g)溶液，以吡啶(3g)洗淨。在 35°C 進行 1 小時 55 分鐘攪拌，以水(2.5g)、三乙基胺(1.9g)的順序加入並進行 26 分鐘攪拌。將加入乙腈所析出的固體經過濾，得到化合物 5b(507mg)之白色固體。

^1H -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.20-1.81(m、105H)、1.98(s、3H)、2.32-2.35(m、2H)、2.67(brs、4H)、3.00-3.09(m、6H)、3.90-4.17(m、9H)、5.02(s、2H)、5.41(t、1H)、6.41(t、1H)、6.53(s、2H)、

6.90(d、1H)、7.84(s、1H)、7.92(brs、1H)、12.67(brs、1H)。

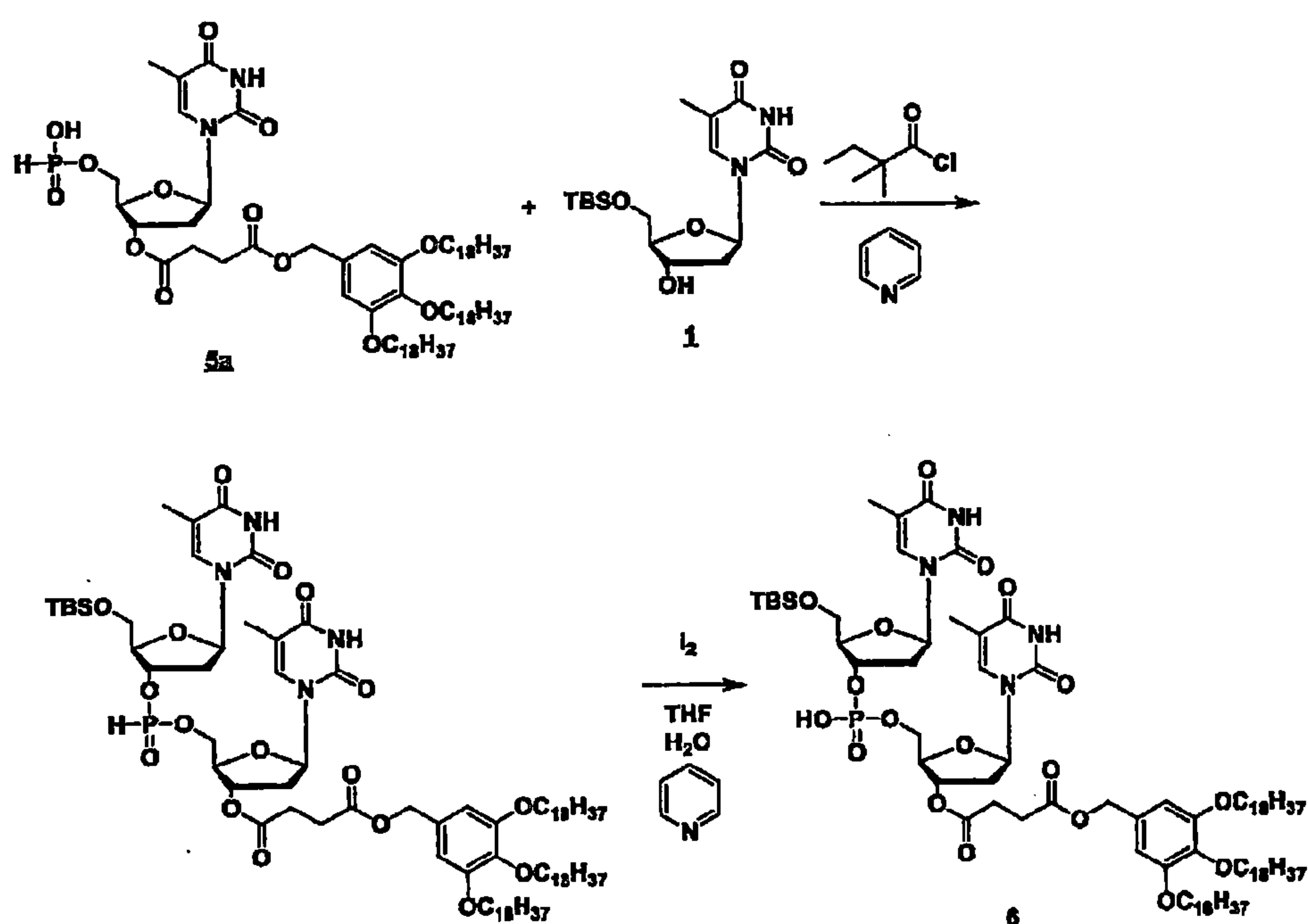
^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 5.11。

[0323]

實施例 5(偶合及酸化)：化合物 6 之合成

[0324]

【化 6 2】



[0325] 在氮氣環境下，於化合物 5a(49mg)與化合物 1(20mg、0.056mmol)的吡啶(1mL)溶液中，在 25°C 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物($25\mu\text{L}$ 、0.18mmol)，進行 41 分鐘攪拌。其後加入 0.1M 碘 吡啶/THF/水溶液(0.73mL 、0.073mmol)，進行 29 分鐘攪拌，加入亞磷酸三甲基($4.3\mu\text{L}$ 、0.036mmol)。將反應混合物減壓下濃縮，加入乙腈並析出固體，於冰冷後過濾後得到化合物 6(34mg)之皮

膚色固體。

^1H -NMR : (300MHz ; CDCl_3) δ 0.091-0.13(m 、 6H) 、
0.85-0.95(m 、 18H) 、 1.08-1.83(m 、 96H) 、 1.90(s 、 3H) 、
1.91(s 、 3H) 、 2.36(brs 、 2H) 、 2.57-2.67(m 、 6H) 、 3.81-
4.29(m 、 12H) 、 4.91(t 、 1H) 、 5.01(s 、 2H) 、 5.42(s 、
1H) 、 6.28-6.37(m 、 2H) 、 6.53(s 、 2H) 、 7.51(s 、 1H) 、
7.72(s 、 1H) 。

^{31}P -NMR : (300MHz ; CDCl_3) δ 0.70 。

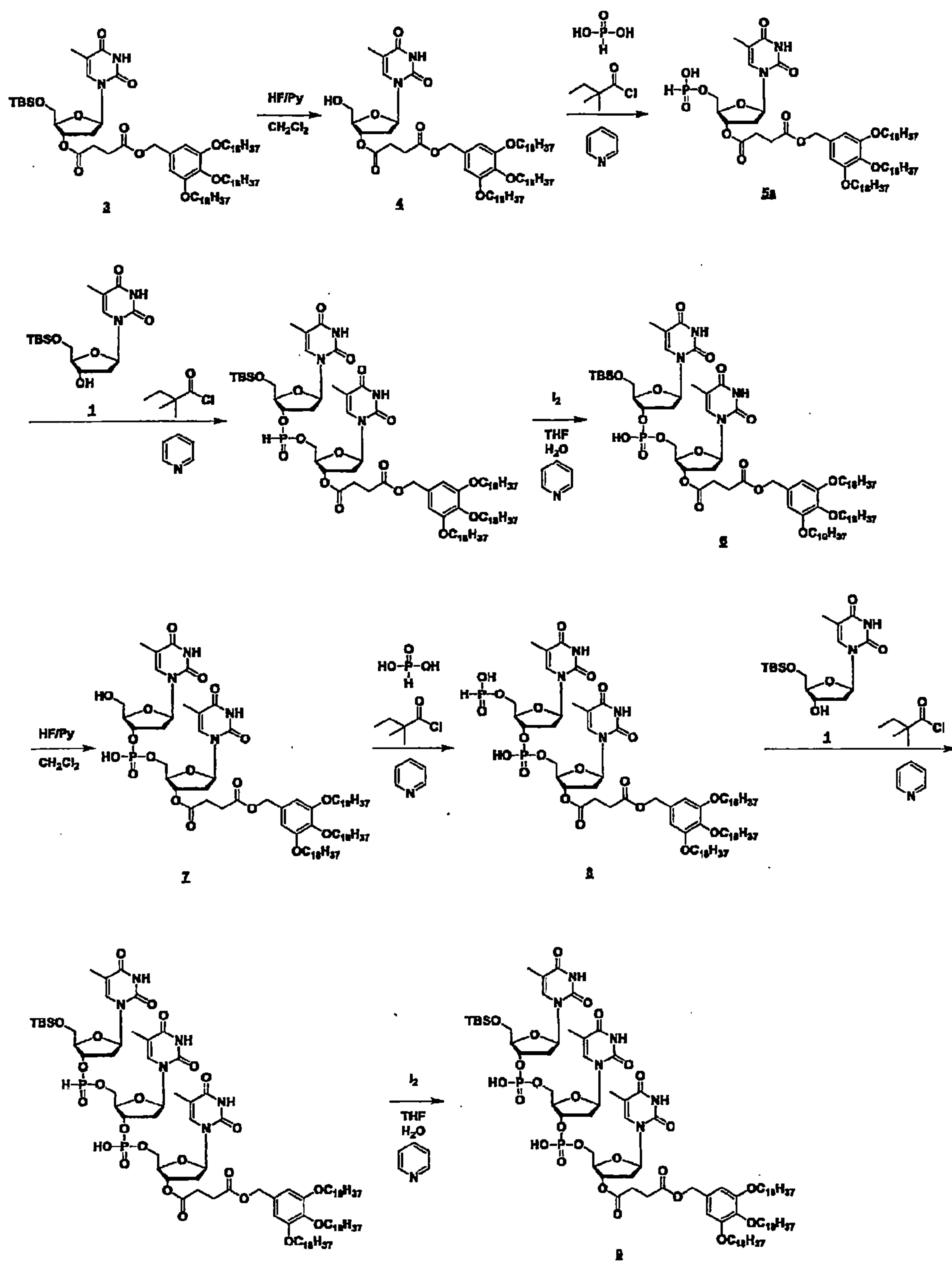
MS(ESI $^-$) : $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1654.1197 。

[0326]

實施例 6(3mer 合成) : 化合物 9 之合成

[0327]

【化 6 3】



[0328]

步驟 1 化合物 6 之合成

在氮氣環境下，於化合物 3(1.00g、0.74mmol)的二氯

甲烷 (5mL) 溶液，在 40℃ 加入 氟化氫 - 吡啶 (86.5 μ L、3.3mmol)，進行 4 小時 42 分鐘攪拌，加入 六甲基二矽氧烷 [TMS₂O] (0.55mL、2.6mmol)。該反應混合物中，於化合物 3 0.57mmol 中加入 吡啶 (8mL)，在減壓下濃縮。再度加入 吡啶 (8mL)，減壓下濃縮後加入 吡啶 (6mL)，成為化合物 4 之吡啶溶液。

在氮氣環境下，於亞磷酸 (0.50g、6.1mmol) 的吡啶 (16mL) 溶液，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.41mL、3.0mmol)，進行 35 分鐘攪拌。於該溶液加入化合物 4 之吡啶溶液，並以吡啶 (1mL) 洗淨。在 40℃ 進行 6 小時 35 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.12mL、0.87mmol) 並再進行 3 小時攪拌。加入乙腈並析出固體，經冰冷後過濾，得到化合物 5a (737mg) 之白色固體。

在氮氣環境下，於化合物 5a (702mg) 與化合物 1 (279mg、0.78mmol) 的吡啶 (14mL) 溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.36mL、2.6mmol)，進行 33 分鐘攪拌。其後，加入含有 0.1M 之碘、吡啶、THF 及水的溶液 (6.3mL、0.63mmol)，進行 21 分鐘攪拌，加入亞磷酸三甲基 (12 μ L、0.11mmol)。於反應混合物加入乙腈並析出固體，減壓下濃縮，加入乙腈使其冰冷後過濾，得到化合物 6 (799mg) 之淡皮膚色固體。

¹H-NMR : (300MHz ; CDCl₃) δ 0.096 (s、3H)、0.11 (s、3H)、0.85-0.95 (m、18H)、1.10-1.83 (m、96H)、1.90 (s、

3H)、1.91(s、3H)、2.35(brs、2H)、2.57-2.67(m、6H)、3.86-4.28(m、12H)、4.92(t、1H)、5.02(s、2H)、5.35(s、1H)、6.28-6.33(m、2H)、6.53(s、2H)、7.49(s、1H)、7.59(s、1H)。

^{31}P -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ 0.96。

[0329]

步驟 2 化合物 9 之合成

在氮氣環境下，於化合物 6(750mg)的二氯甲烷(4mL)溶液，在 40℃加入氟化氫-吡啶(51.9 μ L、2.0mmol)，進行 3 小時 23 分鐘攪拌，加入六甲基二矽氧烷[TMS_2O](0.33mL、1.6mmol)。加入吡啶(8mL)，減壓下濃縮。再度加入吡啶(8mL)，減壓下濃縮，加入吡啶(6mL)，成為化合物 7 之吡啶溶液。

在氮氣環境下，於亞磷酸(0.37g、4.4mmol)的吡啶(12mL)溶液中，在 40℃加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.37mL、2.7mmol)，進行 39 分鐘攪拌。於該溶液加入化合物 7 的吡啶溶液，以吡啶(1mL)洗淨。在 40℃進行 1 小時 43 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(61 μ L、0.44mmol)再進行 3 小時 31 分鐘攪拌。加入乙腈並析出固體，經冰冷後過濾，得到化合物 8(611mg)之白色固體。

在氮氣環境下，於化合物 8(600mg)與化合物 1(194mg、0.54mmol)的吡啶(10mL)溶液中，在 25℃加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.25mL、1.8mmol)，進行 34 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘、吡啶、THF 及水之溶

液(4.3mL、0.43mmol)，進行 58 分鐘攪拌，加入亞磷酸三甲基(16 μ L、0.14mmol)。於反應混合物中加入乙腈並析出固體，減壓下濃縮，加入乙腈並冰冷後過濾，得到化合物 9(634mg)之淡皮膚色固體。

$^1\text{H-NMR}$ ：(300MHz； CDCl_3) δ 0.093(s、3H)、0.10(s、3H)、0.85-0.92(m、18H)、1.09-1.89(m、105H)、2.01-2.52(m、6H)、2.67(brs、4H)、3.85-4.26(m、15H)、4.92(s、1H)、5.01(s、2H)、5.02(s、1H)、5.38(s、1H)、6.13(s、1H)、6.24-6.30(m、2H)、6.53(s、2H)、7.42(s、1H)、7.48(s、1H)、7.60(s、1H)。

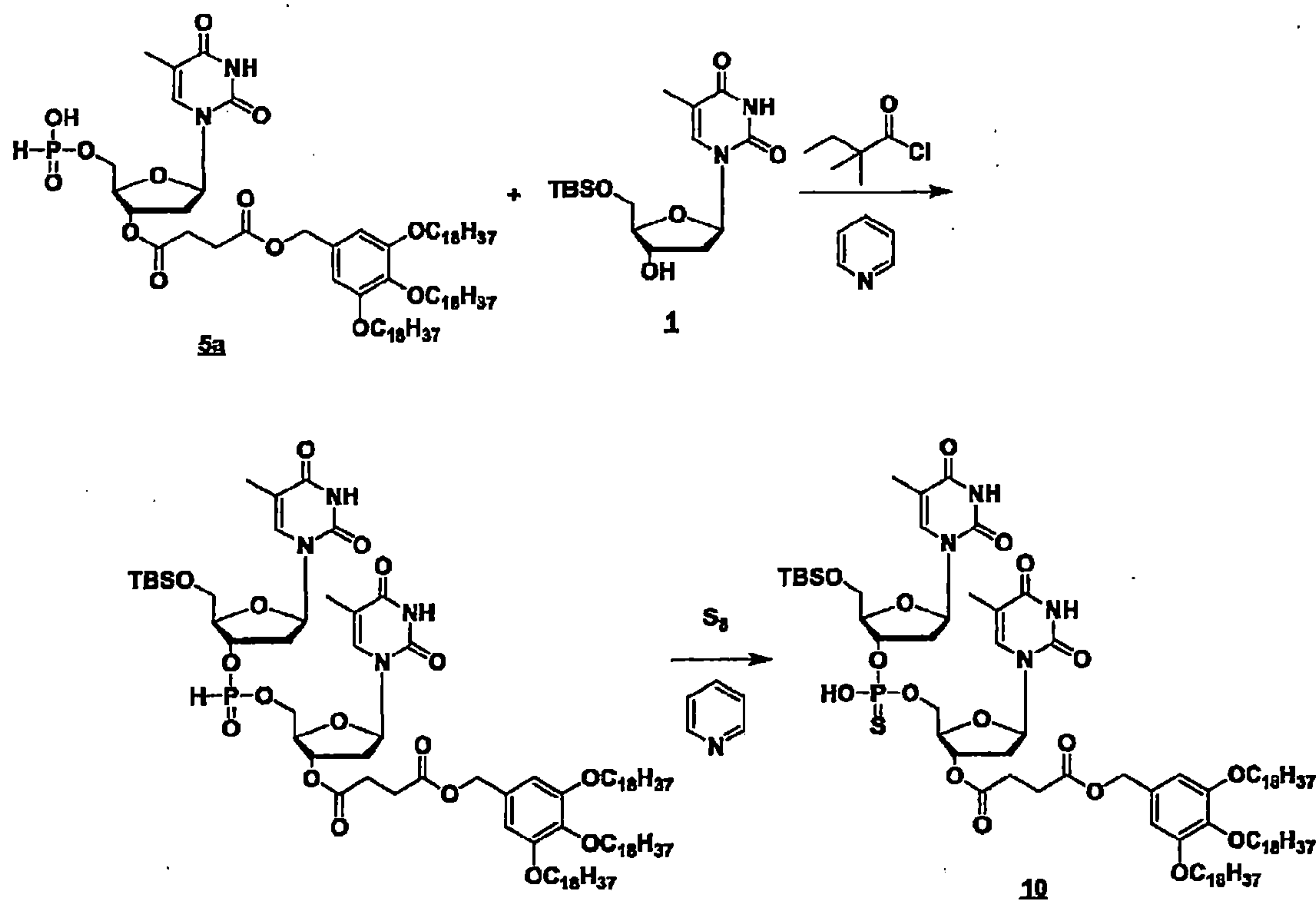
$^{31}\text{P-NMR}$ ：(300MHz； CDCl_3) δ -1.52、-1.33。

[0330]

實施例 7(偶合及硫化)：化合物 10 之合成

[0331]

[化 6 4]



[0332] 在氮氣環境下，於化合物 5a(102mg)與化合物 1(38mg、0.11mmol)的吡啶(2mL)溶液在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(49 μ L,0.36mmol)，進行 23 分鐘攪拌。其後加入單體硫(28mg、0.87mmol)，進行 1 小時 8 分鐘攪拌，加入乙腈並析出固體，經冰冷後過濾，得到化合物 10(121mg)之白色固體。

³¹P-NMR：(300MHz；CDCl₃) δ 60.46、61.07。

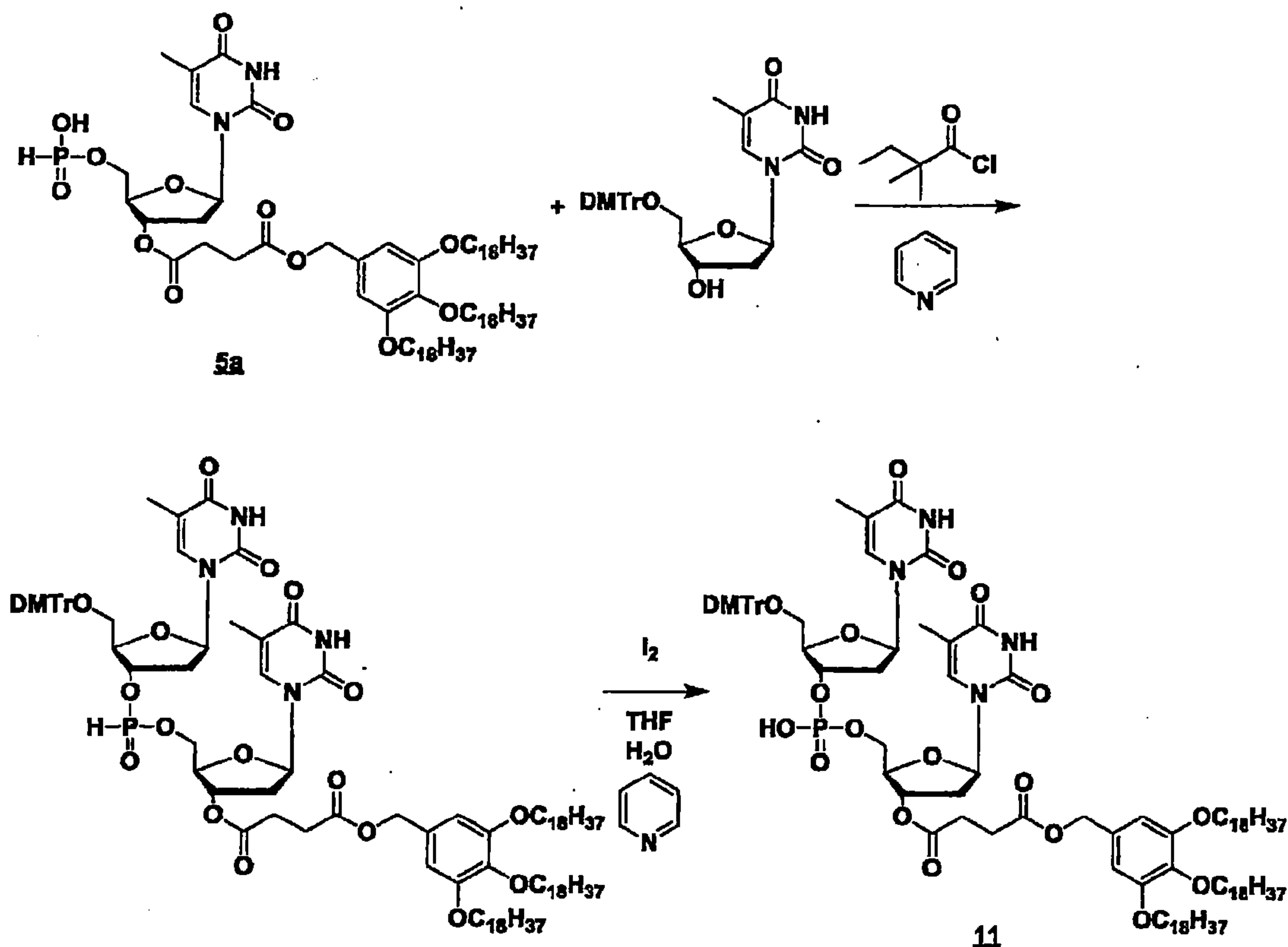
MS(ESI⁻)：[M-H]⁻ 1670.0959。

[0333]

實施例 8(一時保護基為二甲氧基三苯甲基時的 2mer 合成)：化合物 11 之合成

[0334]

【化 6 5】



[0335] 在氮氣環境下，於化合物 5a(103mg)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(61mg、0.11mmol)的吡啶(2mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(50μL,0.36mmol)，進行 22 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘、吡啶、THF 及水的溶液(0.88mL、88μmol)，進行 57 分鐘攪拌，加入亞磷酸三甲基(1.7μL,14μmol)。加入乙腈並將反應混合物減壓下濃縮。加入乙腈並析出固體，經冰冷後過濾，得到化合物 11(96mg)之淡紅色固體。

¹H-NMR : (300MHz ; CDCl₃)δ0.88(t、9H)、1.09-2.01(m、102H)、2.37-2.69(m、8H)、3.67-4.22(m、18H)、

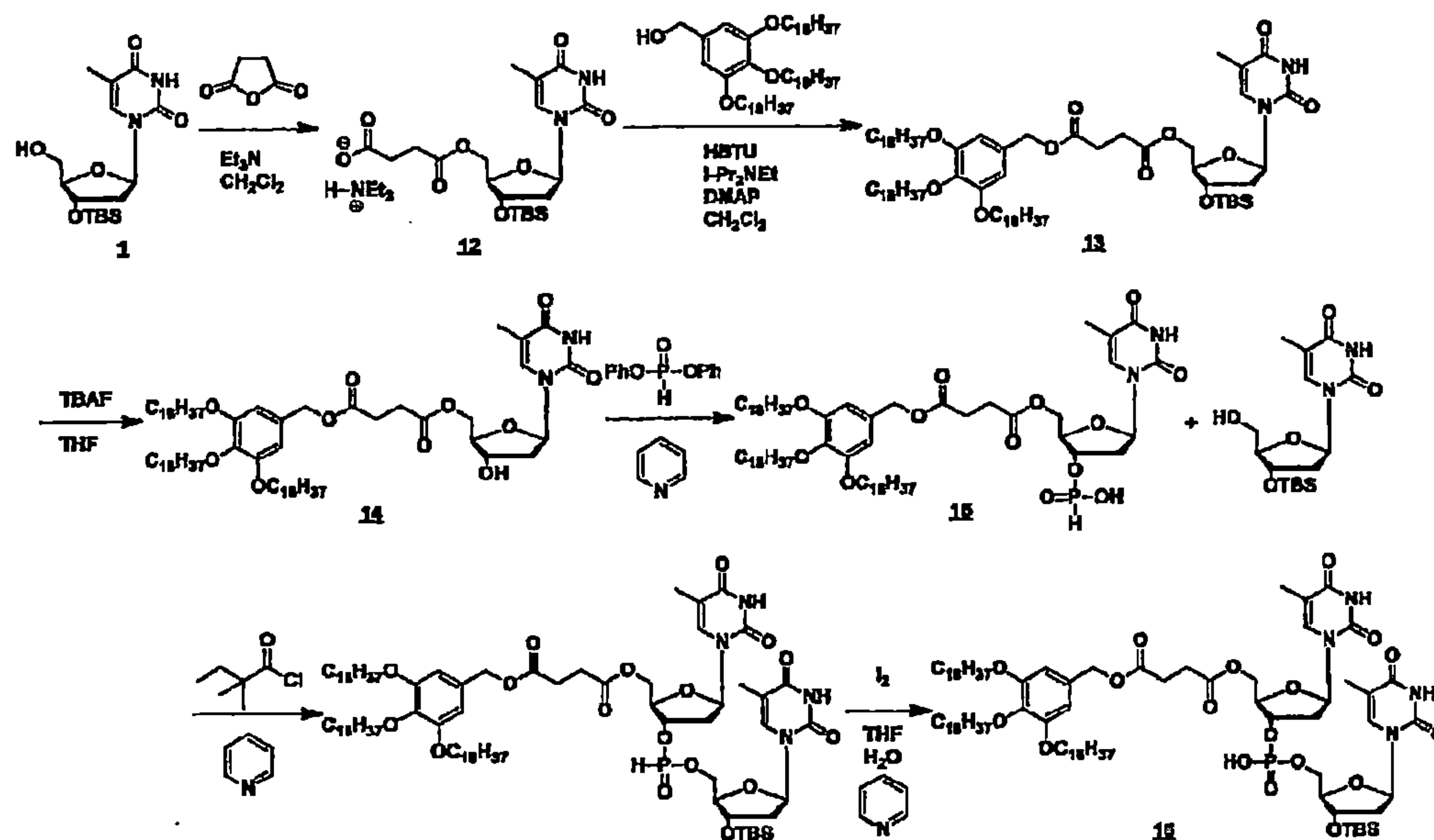
4.91-5.02(m、3H)、5.38(s、1H)、6.09(s、1H)、6.25(s、1H)、6.54(s、2H)、6.81-7.36(m、13H)、7.51(s、1H)、7.56(s、1H)。

[0336]

實施例 9(對 5'→3'方向之 2mer 合成)：化合物 16 之合成

[0337]

【化 6 6】



[0338]

步驟 1 化合物 12 之合成

在氮氣環境下，於 3'-O-(tert-丁基二甲基矽基)胸苷 (Berry 公司製)(3.07g、8.6mmol)、琥珀酸酐(1.29g、12.9mmol)的二氯甲烷(31g)溶液，在室溫加入三乙基胺(2.64g、26.1mmol)，進行 2 小時 33 分鐘攪拌。於反應混合物加入 2.0M 磷酸-三乙基胺水溶液並分液。將所得之

有機層以 2M 磷酸-三乙基胺水溶液進行 2 次分液並洗淨，以硫酸鎂乾燥後，將溶劑減壓下餾去，得到化合物 12 之白色泡狀固體(3.73g)。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.10(s、3H)、0.12(s、3H)、0.90(s、9H)、1.23(t、9H)、1.90(s、3H)、2.05-2.14(m、1H)、2.36-2.43(m、1H)、2.51-2.86(m、4H)、3.00(q、6H)、4.10(brs、1H)、4.21-4.26(m、1H)、4.40-4.43(m、1H)、4.59-4.63(m、1H)、5.30(s、1H)、6.08(q、1H)、7.41(d、1H)、9.95(brs、1H)。

[0339]

步驟 2 化合物 13 之合成

在氮氣環境下，於化合物 12(3.73g、8.2mmol)、3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲基醇(4.96g、5.4mmol)的二氯甲烷(224g)溶液，在室溫加入 2-(1H-苯並三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽[HBTU](4.13g、10.9mmol)、二異丙基乙基胺(1.42g、11.0mmol)、二甲基胺基吡啶(1.37g、11.2mmol)，進行 16 小時 18 分鐘攪拌。於反應混合物中加入甲醇並過濾析出之固體，得到化合物 13(7.18g)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.080-0.085(m、6H)、0.86-0.89(m、18H)、1.18-1.84(m、96H)、1.94(d、3H)、2.05-2.14(m、1H)、2.27-2.34(m、1H)、2.64-2.74(m、4H)、3.91-3.98(m、6H)、4.04-4.07(m、1H)、4.20-4.39(m、3H)、5.01(s、2H)、6.25(t、1H)、6.52(s、2H)、

7.27(d、1H)、8.01(brs、1H)。

[0340]

步驟 3(伸長反應循環步驟 a：脫保護)化合物 14 之合成

在氮氣環境下，於化合物 13(6.06g、4.5mmol)的四氫呋喃[THF](60g)溶液，在室溫加入 1.0M 四丁基銨氟化物[TBAF]/THF 溶液(4.5mL、4.9mmol)，進行 1 小時 23 分鐘攪拌。於反應混合物中加入甲醇並過濾析出之固體，得到化合物 14(5.45g)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.08-1.84(m、96H)、1.93(d、3H)、2.07-2.16(m、1H)、2.32-2.40(s、1H)、2.62-2.79(m、4H)、3.91-4.00(m、7H)、4.16(dd、1H)、4.27(quint、1H)、4.39(dd、1H)、5.01(q、2H)、6.25(t、1H)、6.53(s、2H)、7.24(d、1H)。

[0341]

步驟 4(伸長反應循環步驟 b：H-磷酸酯化)化合物 15 之合成

在氮氣環境下，於亞磷酸二苯基(1.36g、5.8mmol)的吡啶(15mL)溶液，在室溫加入化合物 14(1.05g、0.85mmol)的吡啶(10mL)溶液，以吡啶(5mL)洗淨。在 40℃ 進行 1 小時 22 分鐘攪拌，以水(5.13g)、三乙基胺(3.79g)的順序加入並進行 14 分鐘攪拌。於反應混合物加入乙腈並析出的固體經過濾，得到化合物 15(1.09g)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.20-

1.83(m、96H)、1.93(d、3H)、2.14-2.23(m、1H)、2.54-2.74(m、5H)、3.90-3.98(m、6H)、4.32-4.39(m、3H)、4.80-4.86(m、1H)、5.00(s、2H)、6.30(t、1H)、6.52(s、2H)、6.89(d、1H)、7.28(d、1H)、8.17(brs、1H)、12.32(brs、1H)。

^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 3.86。

[0342]

步驟 5(伸長反應循環步驟 c 及 d：偶合及酸化)化合物 16 之合成

在氮氣環境下，於化合物 15(250mg)與 3'-O-(tert-丁基二甲基矽基)胸苷(97mg、0.27mmol)的吡啶(5mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.12mL、0.90mmol)，進行 29 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 的碘、吡啶、THF 及水的溶液(2.2mL、0.22mmol)，進行 40 分鐘攪拌，加入亞磷酸三甲基(4.3 μ L、36 μ mol)。將反應混合物減壓下濃縮，加入乙腈並析出固體，冰冷後過濾，得到化合物 16(270mg)的淡皮膚色固體。

^1H -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 0.076(s、6H)、0.83-0.96(m、18H)、1.06-1.83(m、96H)、1.89(s、3H)、1.92(s、3H)、2.11-2.67(m、8H)、3.90-4.47(m、13H)、4.92(s、1H)、4.99(s、2H)、6.19-6.28(m、2H)、6.52(s、2H)、7.26(s、1H)、7.55(s、1H)。

^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ -0.48。

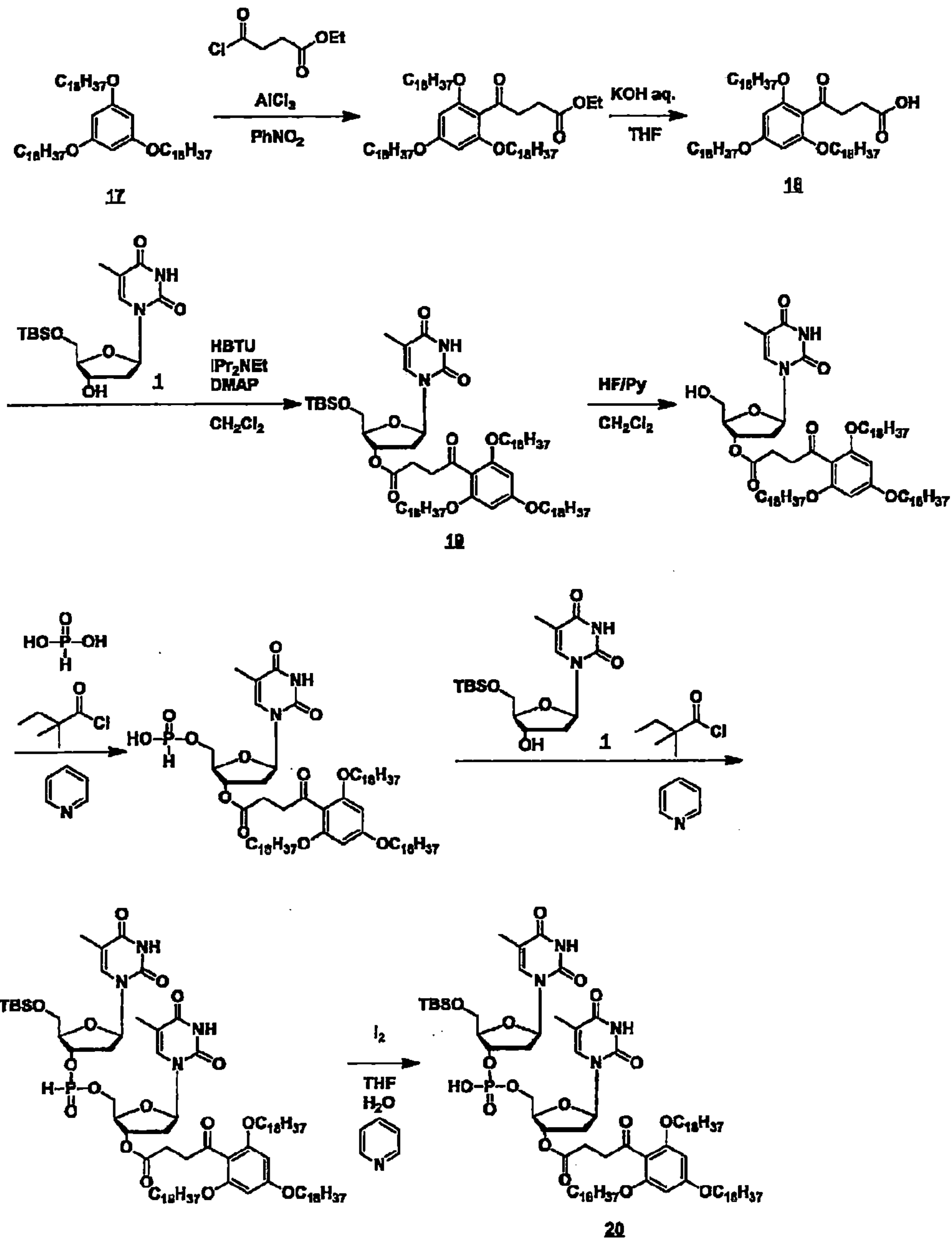
MS(ESI $^-$)：[M-H] $^-$ 1654.1123。

[0343]

實施例 10(2mer 合成)：化合物 20 之合成

[0344]

【化 6 7】



[0345]

步驟 1 化合物 18 之合成

在氮氣環境下，於化合物 17(依據日本特開第 2011-126993 號所記載的方法合成)(4.26g、4.8mmol)的硝基苯(43g)溶液中，在 60℃ 加入琥珀酸單乙基氯化物(1.36mL, 9.7mmol)，加入氯化鋁(1.30g、9.8mmol)，在 60℃ 進行 2 小時 2 分鐘攪拌。冷卻至室溫，以水經 2 次分液並洗淨。於所得之有機層加入甲醇並析出固體，經過濾得到淡黃色固體。

於該固體之 THF(15g)溶液中，加入氫氧化鉀(3.17g、48mmol)水溶液，加熱迴流下進行 1 小時 25 分鐘攪拌。加入水(2g)，以濃鹽酸將水層的 pH 自 7 調整至 8。加入二氯甲烷(38g)、水(12g)並分液，將所得之有機層在減壓下濃縮。將所得之殘渣溶解於 THF，加入甲醇並析出的固體經過濾，得到化合物 18(3.70g)之褐色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 0.88(t、9H)、1.11-1.88(m、96H)、3.17(t、2H)、3.62(t、2H)、4.04(t、4H)、4.11(t、2H)、6.53(s、2H)。

MS(ESI⁻) : $[\text{M-H}]^-$ 981.8884。

[0346]

步驟 2 化合物 19 之合成

在氮氣環境下，於化合物 18(3.56g、3.6mmol)、化合物 1(1.98g、5.6mmol)的二氯甲烷(22g)溶液，在室溫加入 2-(1H- 苯並三唑 -1- 基)-1,1,3,3- 四甲基脲六氟磷酸鹽 [HBTU](2.75g、7.3mmol)、二異丙基乙基胺(1.23mL、7.2mmol)、二甲基胺基吡啶(0.91g、7.4mmol)，進行 1 小

時 31 分鐘攪拌。於反應混合物加入水並分液。將所得之水層以二氯甲烷分液，合併所得之有機層，以飽和氯化鈉水溶液洗淨，並減壓下濃縮。加入己烷並析出固體，經過濾除去固體。將所得之粗物以矽膠層析法(己烷-乙酸乙酯)純化後得到化合物 19(2.85g)之橘色油狀物。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.13(s、6H)、0.88(t、9H)、0.93(s、9H)、1.14-1.87(m、96H)、1.92(d、3H)、2.05-2.14(m、1H)、2.39-2.45(m、1H)、2.67(t、2H)、3.09(t、2H)、3.88-3.94(m、8H)、4.11(d、1H)、5.27(d、1H)、6.05(s、2H)、6.35(q、1H)、7.55(d、1H)、8.01(d、1H)。

$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1322.0619。

[0347]

步驟 3 化合物 20 之合成

在氮氣環境下，於化合物 19(22.5mg)的二氯甲烷(0.3mL)溶液中加入氟化氫-吡啶(3 μL)，進行 7 小時 3 分鐘攪拌，加入三甲基矽基氯化物[TMSCl](10 μL)。加入吡啶(0.1mL)，加入亞磷酸(2.9mg)、2,2-二甲基丁醯基氯化物(20 μL)，加入化合物 1(12.9mg)。進行 2 天攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(10 μL)並再進行 1 小時 28 分鐘攪拌。加入含有 0.1M 的碘之吡啶、THF 及水的溶液(1mL)，進行 1 天攪拌，加入硫代硫酸鈉為飽和的乙腈與水的混合溶劑(乙腈/水=9/1(重量比))並過濾後得到化合物 20。

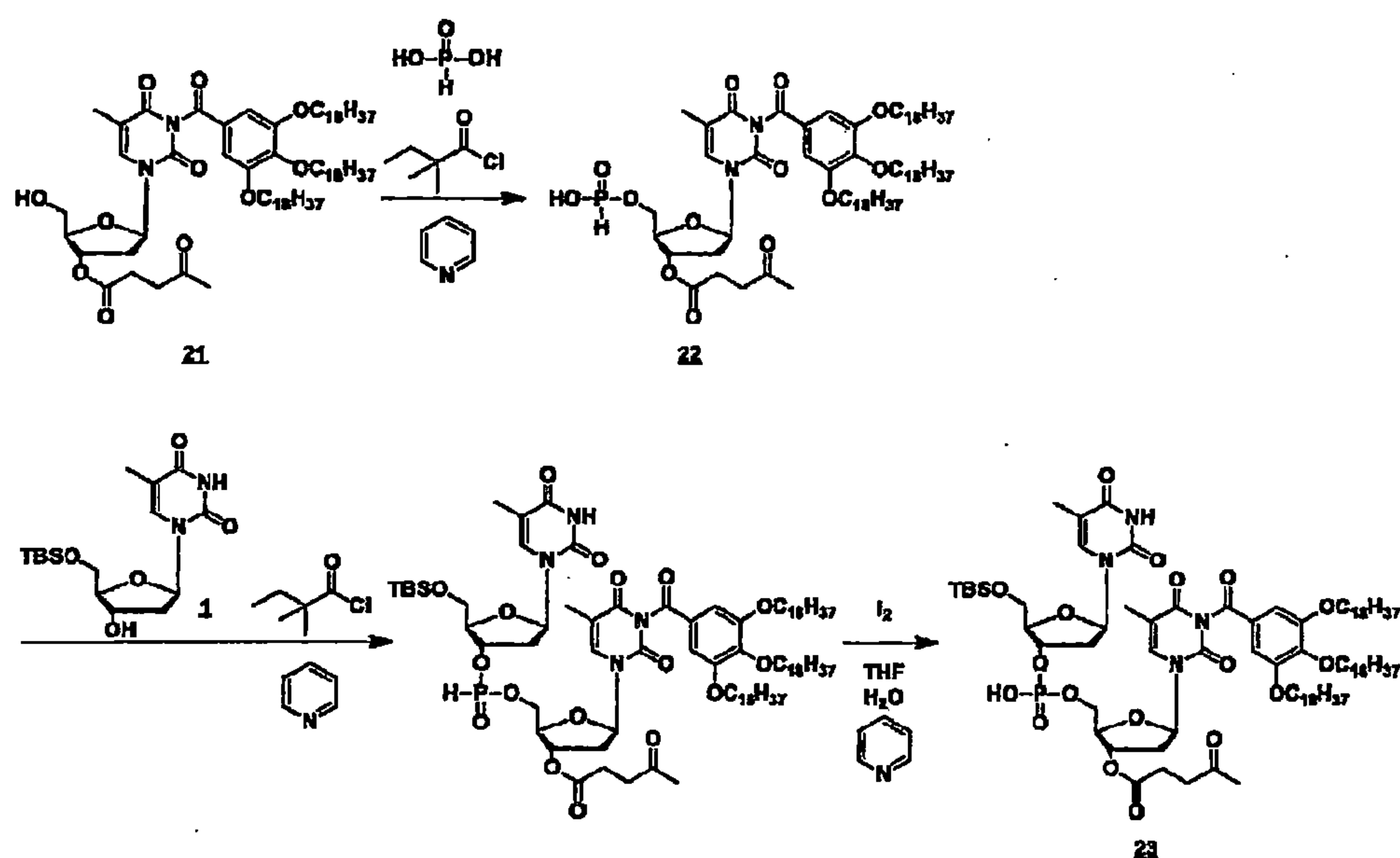
MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1624.1104。

[0348]

實施例 11(2mer 合成)：化合物 23 之合成

[0349]

【化 6 8】



[0350]

步驟 1 化合物 22 之合成

在氮氣環境下，於亞磷酸(329mg、4.0mmol)的吡啶(11mL)溶液，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.33mL、2.4mmol)，進行 32 分鐘攪拌。於該溶液中加入化合物 21(依據國際公開第 2014-077292 號所記載的方法進行合成)(492mg、0.39mmol)，以吡啶(0.40mL)洗淨。在 40℃ 進行 3 小時 40 分鐘攪拌，加入乙腈並析出固體，冰冷後過濾，得到化合物 22(495mg)之淡黃色固體。

¹H-NMR : (300MHz ; CDCl₃)δ0.88(t、9H)、1.17-

1.83(m、96H)、1.97(d、3H)、2.18(s、3H)、2.33-2.44(m、2H)、2.54-2.58(m、2H)、2.73-2.79(m、2H)、3.95-4.05(m、6H)、4.20(t、1H)、4.27(d、2H)、5.37(d、1H)、6.38(t、1H)、7.10(s、2H)、6.94(d、1H)、7.76(d、1H)。

^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 6.62。

[0351]

步驟 2 化合物 23 之合成

在氮氣環境下，於化合物 22(453mg)與化合物 1(177mg、0.50mmol)的吡啶(9mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.14mL、1.0mmol)，進行 28 分鐘攪拌。加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.14mL、1.0mmol)再進行 44 分鐘攪拌，其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液(4.0mL、0.40mmol)，進行 1 小時 36 分鐘攪拌，加入亞磷酸三甲基(7.8 μL 、0.066mmol)。於反應混合物中加入乙腈並析出固體，減壓下濃縮，加入乙腈並冰冷後過濾，得到化合物 23(478mg)之淡褐色固體。

^1H -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 0.095-0.13(m、6H)、0.85-0.97(m、18H)、1.08-1.83(m、96H)、1.89-1.95(m、6H)、2.06-2.39(m、7H)、2.54-2.65(m、2H)、2.75-2.82(m、2H)、3.86-4.30(m、12H)、4.90-5.39(m、2H)、6.12-6.40(m、2H)、7.12(d、2H)、7.45-7.82(m、2H)。

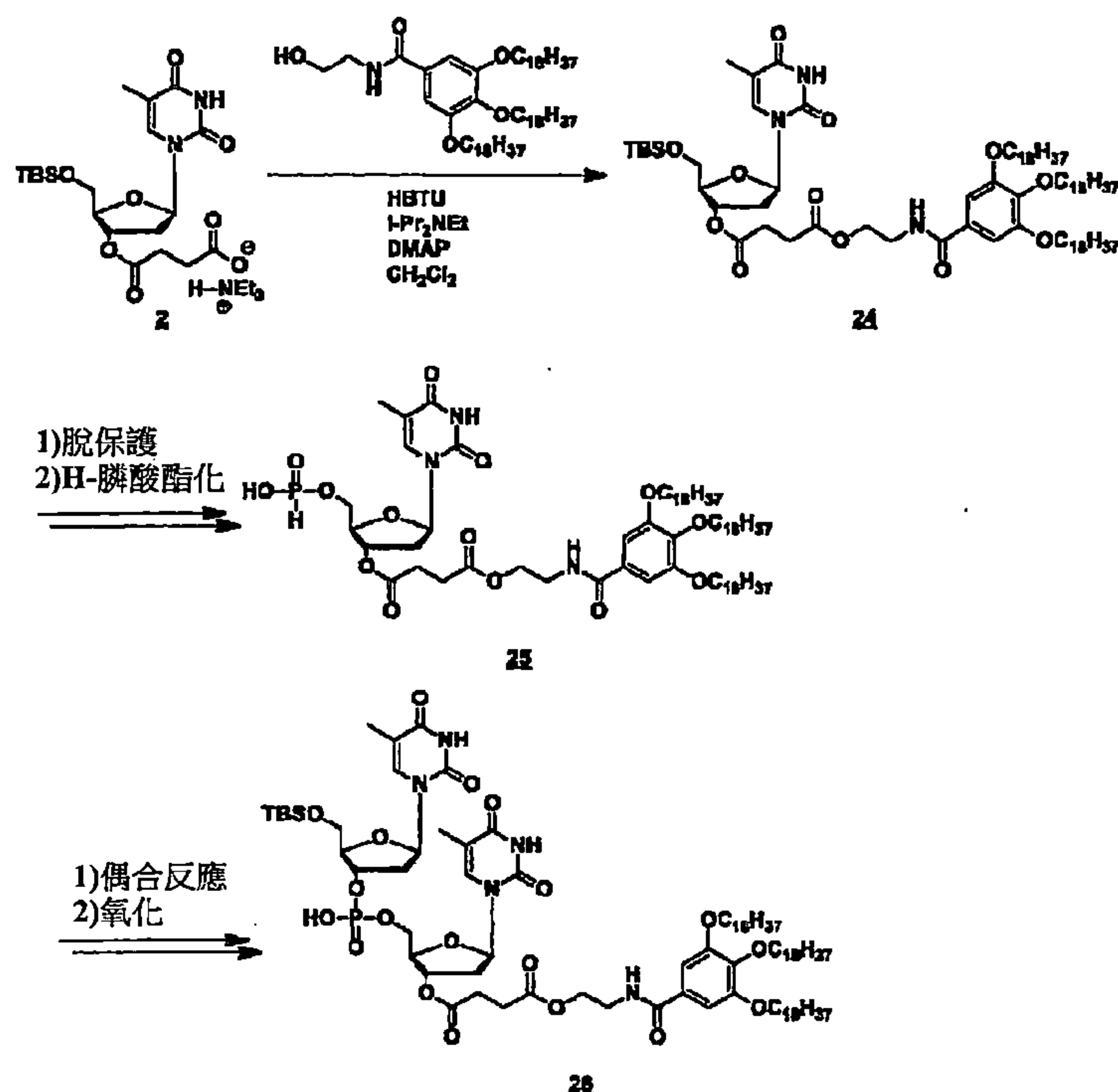
^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ -1.27。

[0352]

實施例 12(2mer 合成)：化合物 26 之合成

[0353]

【化 6 9】



[0354]

步驟 1 化合物 24 之合成

在氮氣環境下，於化合物 2(89mg、0.16mmol)、N-(2-羥基乙基)-3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺(依據日本特開第 2001-122889 號所記載的方法進行合成)(100mg、0.10mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液中，在 40℃ 加入 2-(1H-苯並三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽 [HBTU](77mg、0.20mmol)、二異丙基乙基胺(35μL、0.21mmol)、二甲基胺基吡啶(25mg、0.20mmol)，進行 1 小時 21 分鐘攪拌。於反應混合物中加入甲醇並過濾析出

之固體，得到化合物 24(135mg，產率 93%)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.096(s、3H)、0.11(s、3H)、0.88(t、9H)、0.91(s、9H)、1.12-1.84(m、96H)、1.92(d、3H)、2.04-2.14(m、1H)、2.34-2.41(m、1H)、2.68(brs、4H)、3.70(q、2H)、3.86(s、2H)、3.96-4.02(m、6H)、4.07(s、1H)、4.32(t、2H)、5.25(d、1H)、6.29-6.34(m、1H)、6.55(t、1H)、6.98(s、2H)、7.52(d、1H)、8.07(brs、1H)。

$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1409.0956。

[0355]

步驟 2 化合物 25 之合成

在氮氣環境下，於化合物 24(99mg、0.070mmol)的二氯甲烷(0.5mL)溶液中，在 40℃ 加入氟化氫-吡啶(8.3 μ L、0.32mmol)，進行 3 小時 34 分鐘攪拌，加入六甲基二矽氧烷[TMS_2O](53mL、0.25mmol)。加入吡啶(1mL)，減壓下濃縮。再度加入吡啶(1mL)，減壓下濃縮，加入吡啶(0.8mL)，成為經脫保護的化合物之吡啶溶液。

在氮氣環境下，於亞磷酸(57mg、0.693mmol)的吡啶(2mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(59 μ L、0.43mmol)，進行 31 分鐘攪拌。於該混合物中加入上述經脫保護的化合物之吡啶溶液，以吡啶(0.5mL)洗淨。在 40℃ 進行 1 小時 12 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(15 μ L、0.11mmol)再進行 1 小時 17 分鐘攪拌。於反應混合物中加入乙腈並析出固體，冰冷後過濾，

得到化合物 25(78mg)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t 、 9H) 、 1.18-1.83(m 、 96H) 、 1.91(s 、 3H) 、 2.19-2.36(m 、 2H) 、 2.65(brs 、 4H) 、 3.69(brs 、 2H) 、 3.95-4.01(m 、 6H) 、 4.13(s 、 1H) 、 4.17(s 、 1H) 、 4.20(s 、 1H) 、 4.32(t 、 2H) 、 5.28(d 、 1H) 、 6.29(q 、 1H) 、 6.80(brs 、 1H) 、 6.88(d 、 1H) 、 7.00(s 、 2H) 、 7.53(s 、 1H)。

$^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 6.86。

MS(ESI $^-$) : $[\text{M-H}]^-$ 1356.9650。

[0356]

步驟 3 化合物 26 之合成

在氮氣環境下，於化合物 25(69mg)與化合物 1(28mg 、 78mmol)的吡啶(1.4mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(35 μ L 、 0.25mmol)，進行 48 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液(0.6mL 、 0.060mmol)，進行 1 小時攪拌，加入亞磷酸三甲基(1.2 μ L 、 0.010mmol)。將反應混合物減壓下濃縮，加入乙腈並冰冷後過濾，得到化合物 26(76mg)之淡褐色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.087-0.12(m 、 6H) 、 0.85-0.95(m 、 18H) 、 1.17-1.78(m 、 96H) 、 1.86-1.89(m 、 6H) 、 2.02-2.65(m 、 8H) 、 3.67-4.30(m 、 16H) 、 4.92-5.36(m 、 2H) 、 6.12-6.32(m 、 2H) 、 6.90(brs 、 1H) 、 6.99-7.03(m 、 2H) 、 7.45-7.60(m 、 2H)。

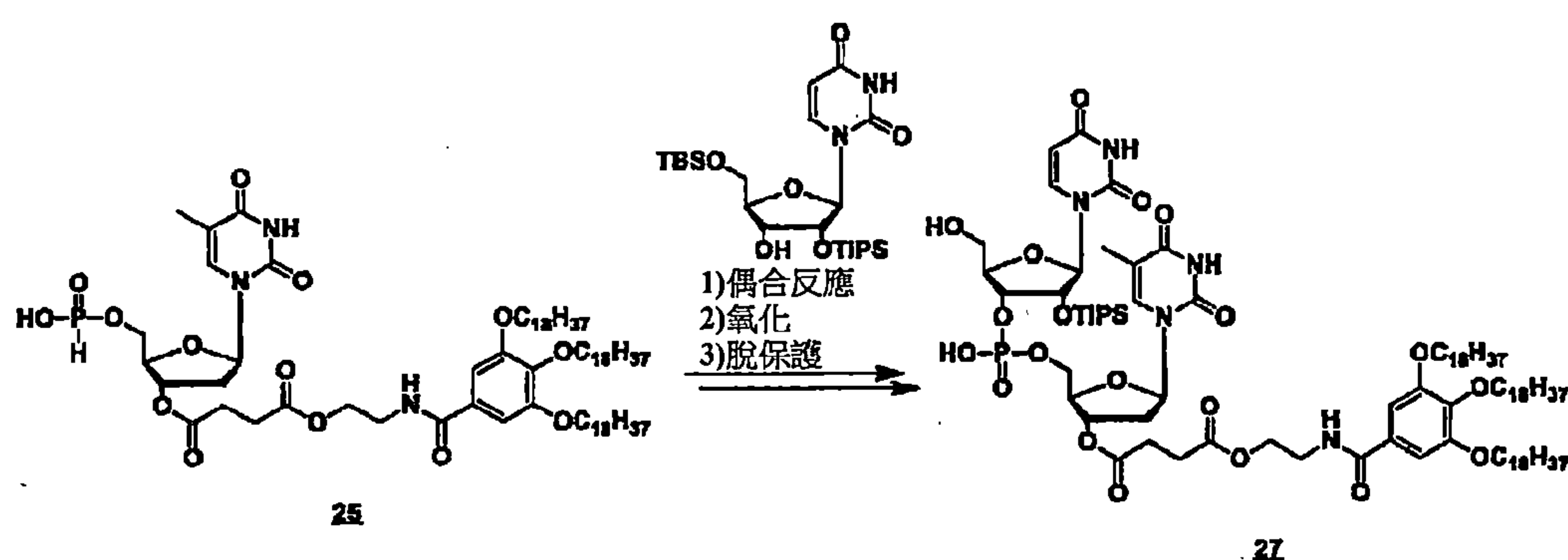
^{31}P -NMR : (300MHz ; CDCl_3) δ -1.11。

[0357]

實施例 13(在 RNA 之 2mer 合成)：化合物 27 之合成

[0358]

【化 70】



[0359] 在氮氣環境下，於化合物 25(9.4mg)與 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-O-三異丙基矽基尿苷(參考合成例 2 記載)(5.3mg、10mmol)的吡啶(0.50mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(9.4 μ L、69 μ mol)，進行 37 分鐘攪拌。其後加入含有 0.05M 的碘之吡啶與水的溶液(0.17mL、8.5 μ mol)並進行 4 小時攪拌，其後在 80℃ 進行 15 小時 23 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮，得到化合物 27。

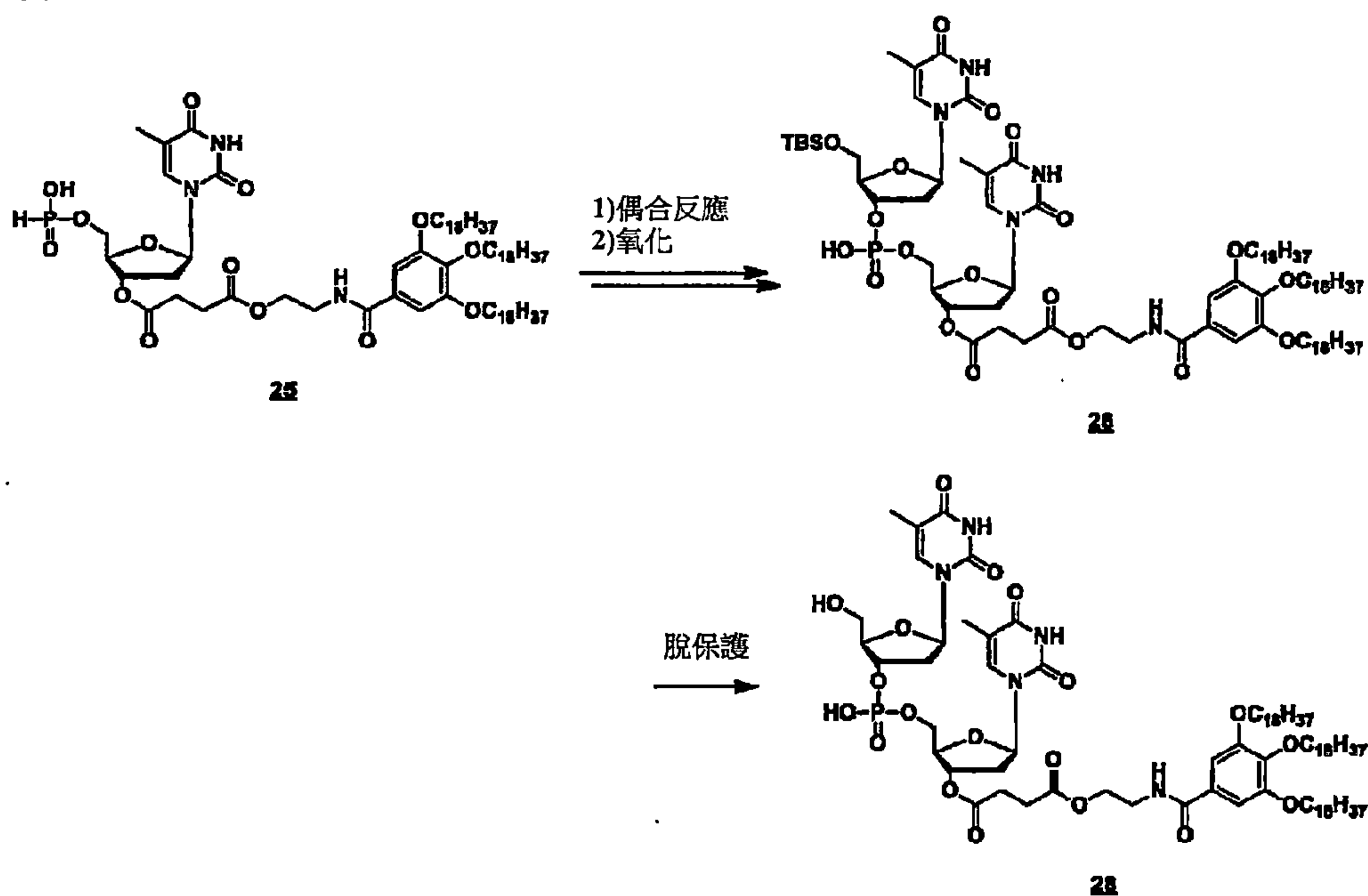
MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1755.1612。

[0360]

實施例 14(偶合～脫保護連續化)：化合物 28 之合成

[0361]

【化 7 1】



[0362] 在氮氣環境下，於化合物 25(100mg)與化合物 1(38mg、0.11mmol)的吡啶(5.0mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(47 μ L、0.34mmol)，進行 14 分鐘攪拌。其後加入含有 0.05M 之碘的吡啶與水的溶液(1.7mL、0.085mmol)，進行 55 分鐘攪拌，進一步加入含有 0.05M 之碘的吡啶與水的溶液(0.41mL、0.021mmol)，進行 38 分鐘攪拌。其後，加入亞磷酸二甲基(0.63 μ L、0.0069mmol)，進行在 100℃ 的 5 小時 57 分鐘攪拌。將反應混合物冷卻，加入乙腈(41g)並析出固體，冰冷後過濾，得到化合物 28(0.11g)之皮膚色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.17-1.82(m、96H)、1.86(s、3H)、2.23-2.34(m、4H)、2.64(brs、4H)、3.67-4.31(m、16H)、5.04(brs、1H)、5.41(s、1H)、6.13(t、1H)、6.29(t、1H)、6.97-7.00(m、

1H)、7.02(s、2H)、7.26-7.63(m、2H)、9.28(brs、2H)。

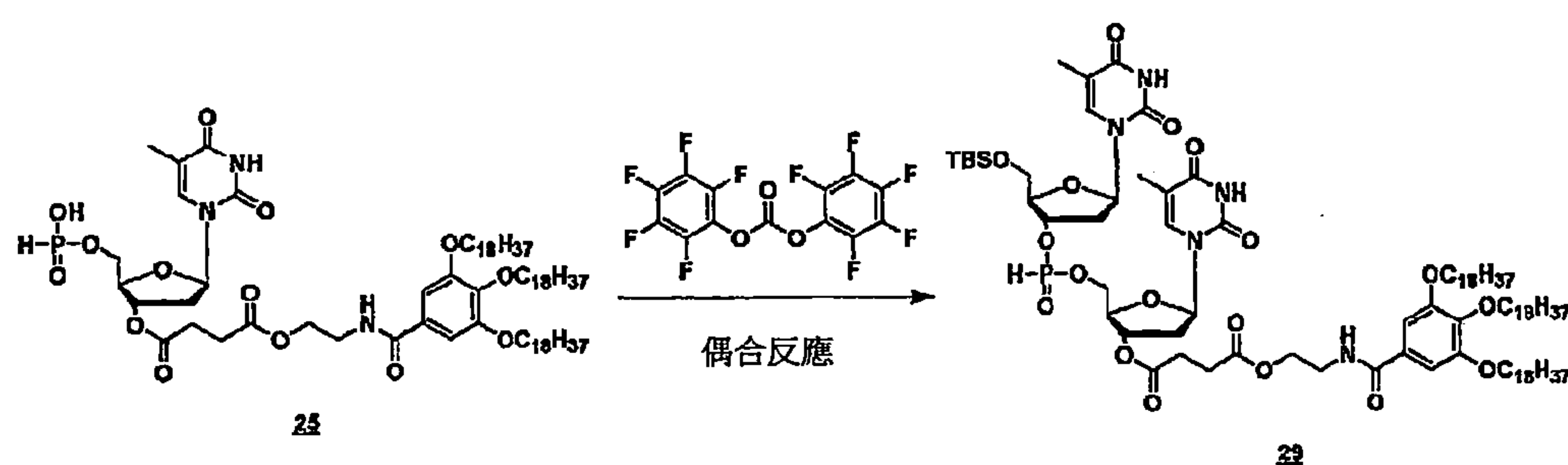
^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ -0.069。

[0363]

實施例 15(將碳酸雙五氟苯酯作為縮合劑使用的偶合)：化合物 29 之合成

[0364]

【化 7 2】



[0365] 在氮氣環境下，於化合物 25(10mg)與化合物 1(4.2mg、0.012mmol)的吡啶(0.50mL)溶液中，在 25℃ 加入碳酸雙五氟苯酯(15.4mg、0.039mmol)，進行 20 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮，得到將化合物 29 作為主生成物者。

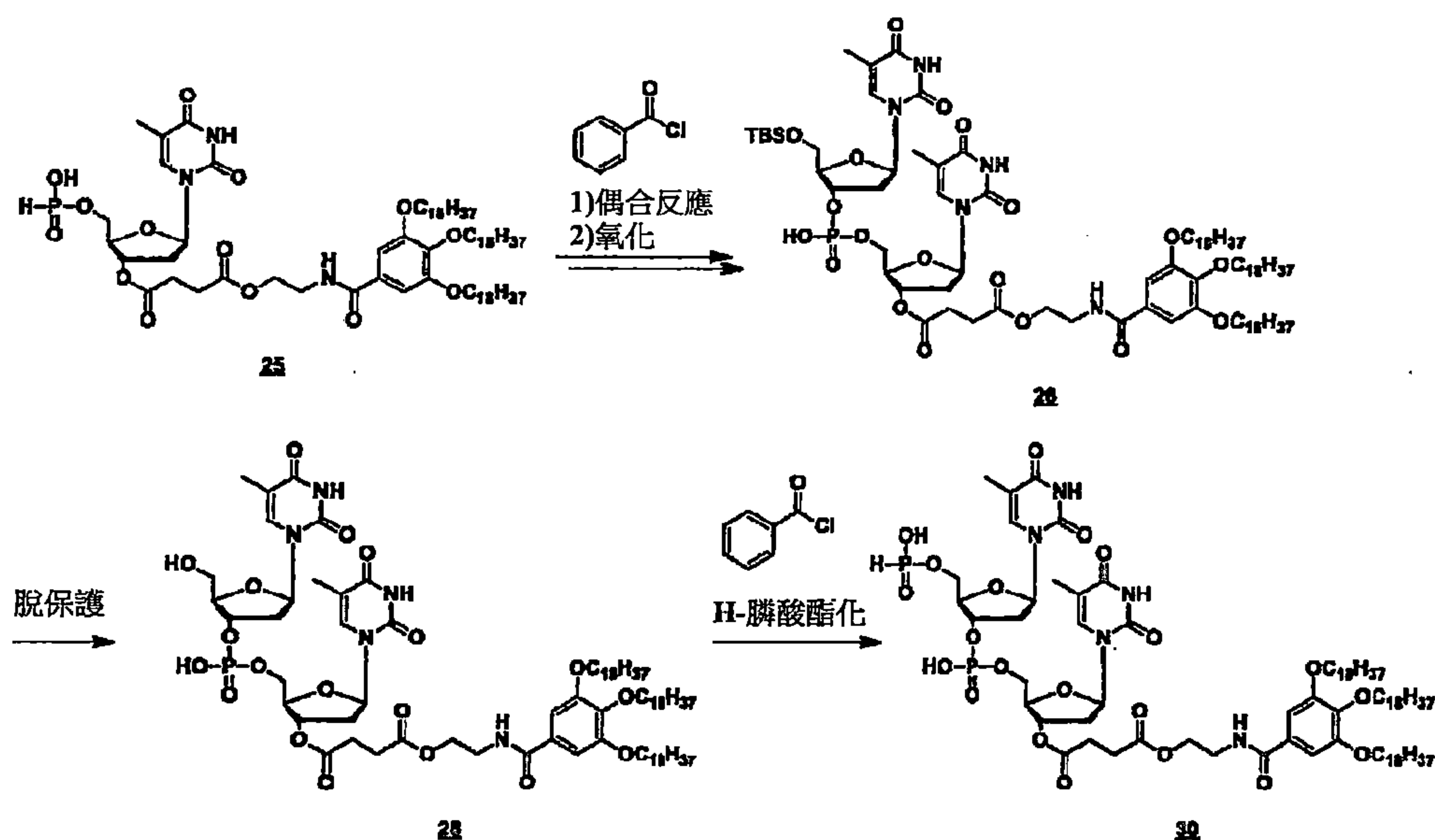
MS(ESI⁻)：[M-H]⁻ 1711.1424。

[0366]

實施例 16(將苯甲醯氯使用於縮合劑之 1 循環)：化合物 30 之合成

[0367]

【化 7 3】



[0368] 在氮氣環境下，於化合物 25(102mg)與化合物 1(39mg、0.11mmol)的吡啶(5.0mL)溶液中，在 25℃ 加入苯甲醯氯(24μL、0.21mmol)，進行 15 分鐘攪拌。其後加入含有 0.05M 之碘的吡啶與水的溶液(2.1mL、0.11mmol)，進行 36 分鐘攪拌後，加入亞磷酸二甲基(3.2μL、0.035mmol)。在 100℃ 進行 4 小時 31 分鐘攪拌，將反應混合物減壓下濃縮。加入吡啶(5.0mL)，減壓下濃縮後，加入吡啶(5.0mL)。加入亞磷酸(56mg、0.68mmol)，將苯甲醯氯(50μL、0.43mmol)分為 3 分，在 40℃ 下隔 10 分鐘加入，進行 2 小時 35 分鐘攪拌，加入苯甲醯氯(8.3μL、0.071mmol)，再進行 54 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(44g)並析出的固體經過濾後，得到化合物 30(0.11g)的淡褐色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.87(t、9H)、1.08-

1.99(m、102H)、2.23-2.63(m、8H)、3.67(brs、2H)、
3.96(t、6H)、4.15-4.27(m、6H)、5.08(brs、1H)、
5.35(s、1H)、6.16(s、1H)、6.24(s、1H)、6.83(d、1H)、
7.04(s、2H)、7.13(brs、1H)、7.47(s、1H)、7.53(s、
1H)、9.86(brs、2H)。

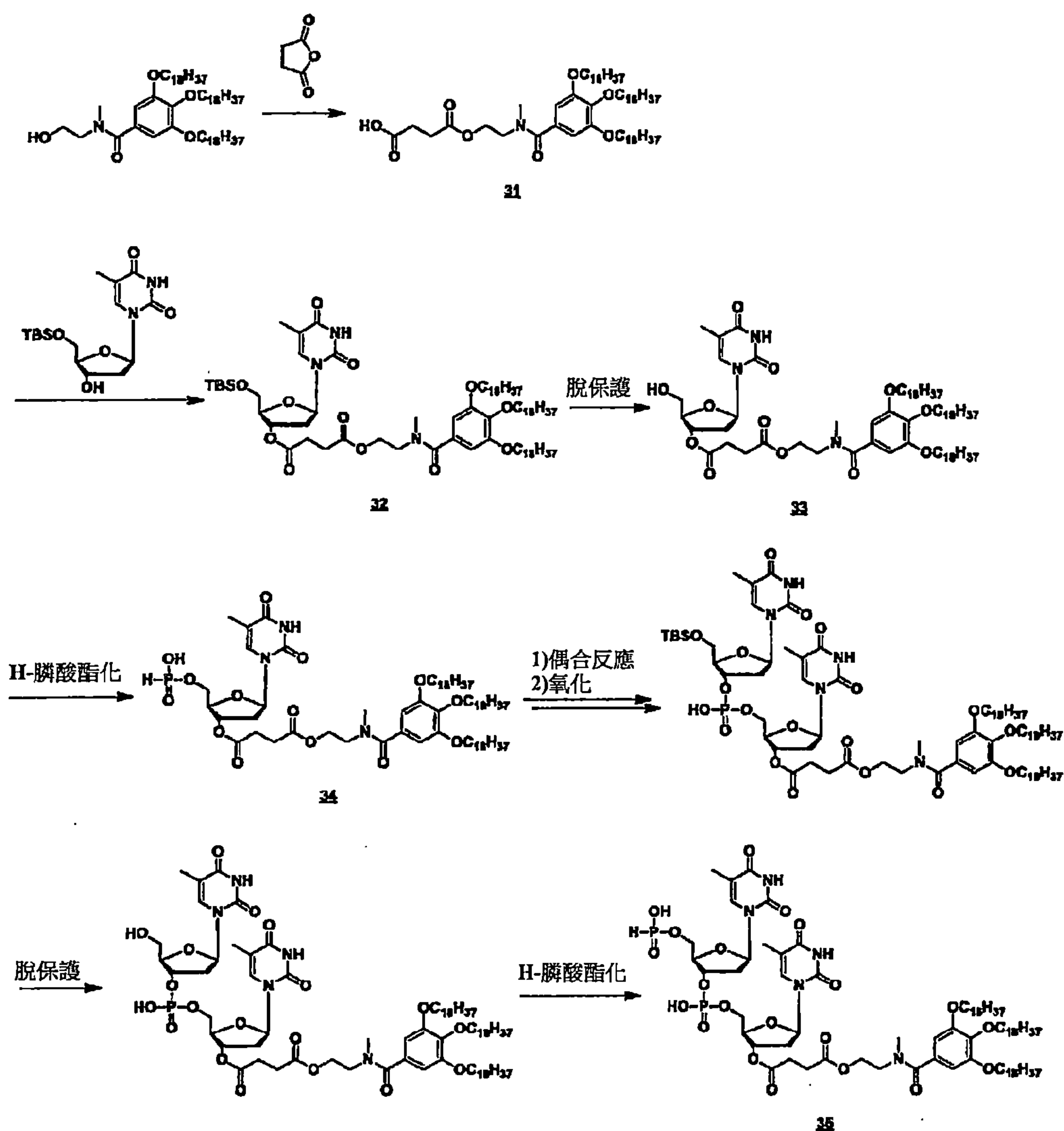
^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ -1.59、5.89。

[0369]

實施例 17(以 DNA 進行脫保護連續化之 1 循環)：化合物
35 之合成

[0370]

【化 7 4】



[0371]

步驟 1 化合物 31 之合成

在氮氣環境下，於 N-(2-羥基乙基)-N-甲基-3,4,5-參(十八烷氧基)苯甲醯胺(依據日本特開第 2001-253896 號所記載的方法所合成)(5.0g、5.1mmol)與琥珀酸酐(1.0g、10mmol)的二氯甲烷(50g)溶液，在室溫加入三乙基胺(2.1mL、15mmol)，進行 1 小時 57 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(513g)並析出固體後過濾，得到化合

物 31(5.3g, 產率 95%)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.86-0.90(m, 9H) 、 1.09-1.84(m, 96H) 、 2.65(s, 4H) 、 3.05(s, 3H) 、 3.76(brs, 2H) 、 3.96(t, 6H) 、 4.38(brs, 2H) 、 6.58(s, 2H) 。

MS(ESI) : $[\text{M-H}]^-$ 1082.9343 。

[0372]

步驟 2 化合物 32 之合成

在氮氣環境下，於化合物 31(1.0g, 0.92mmol)與化合物 1(0.51g, 1.4mmol)的二氯甲烷(25mL)溶液，在室溫加入 HBTU(0.70g, 1.8mmol)、二異丙基乙基胺(0.31mL, 1.8mmol)、DMAP(0.23g, 1.9mmol)，進行 1 小時 9 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於甲醇(102g)並析出的固體經過濾，得到化合物 32(1.3g, 產率 99%)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.13(s, 6H) 、 0.86-0.94(m, 18H) 、 1.09-1.84(m, 96H) 、 1.92(s, 3H) 、 2.14-2.43(m, 2H) 、 2.66(brs, 4H) 、 3.06(s, 3H) 、 3.68(brs, 2H) 、 3.90-3.98(m, 8H) 、 4.10(s, 1H) 、 4.34(brs, 2H) 、 5.27(d, 1H) 、 6.34(q, 1H) 、 6.57(s, 2H) 、 7.54(s, 1H) 、 8.07(brs, 1H) 。

MS(ESI) : $[\text{M-H}]^-$ 1421.1060 。

[0373]

步驟 3 化合物 33 之合成

在氮氣環境下，於化合物 32(1.2g, 0.86mmol)的

THF(10mL) 溶液，在室溫加入 1.0M TBAF/THF 溶液 (0.95mL、0.95mmol)，進行 1 小時 10 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於甲醇(123g)，並將析出的固體經過濾，得到化合物 33(1.2g、定量的)之淡皮膚色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.03-1.84(m、96H)、1.92(s、3H)、2.36-2.41(m、2H)、2.65(brs、4H)、3.06(s、3H)、3.75(brs、2H)、3.86(brs、2H)、3.93-3.98(m、6H)、4.07(d、1H)、4.36(brs、2H)、5.30-5.34(m、1H)、6.21(t、1H)、6.59(s、2H)、7.51(s、1H)、8.21(brs、1H)。

MS(ESI⁻): [M-H]⁻ 1307.0241。

[0374]

步驟 4 化合物 34 之合成

在氮氣環境下，於亞磷酸(0.63g、7.6mmol)的吡啶(20mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.68mL、5.0mmol)，進行 32 分鐘攪拌。於該溶液中，加入化合物 33(1.0g、0.77mmol)，在 40℃ 進行 3 小時 3 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(52 μ L、0.38mmol)再進行 1 小時 4 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(210g)並將析出的固體經過濾後得到化合物 34(1.0g)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.10-1.81(m、96H)、1.91(s、3H)、2.33-2.37(m、2H)、2.66(brs、4H)、3.06(s、3H)、3.68-3.80(brs、2H)、3.94-

4.36(m、11H)、6.36(q、1H)、6.59(s、2H)、6.90(d、1H)、7.60(s、1H)。

^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 6.56。

MS(ESI $^-$)：[M-H] $^-$ 1370.9904。

[0375]

步驟 5 化合物 35 之合成

在氮氣環境下，於化合物 34(106mg)與化合物 1(43mg、0.12mmol)的吡啶(2.0mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(49 μL 、0.36mmol)，進行 30 分鐘攪拌。其後加入含有 0.05M 之碘的吡啶與水的溶液(2.0mL、0.10mmol)，進行 38 分鐘攪拌，再加入含有 0.05M 的碘之吡啶與水的溶液(0.13mL、0.0063mmol)，進行 10 分鐘攪拌。其後，加入亞磷酸二甲基(3.3 μL 、0.036mmol)，在 100℃ 進行 3 小時 33 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮，加入吡啶(5.0mL)，再度減壓下濃縮後，加入吡啶(1.5mL)。

在氮氣環境下，於亞磷酸(64mg、0.77mmol)的吡啶(2.0mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(64 μL 、0.46mmol)，進行 28 分鐘攪拌。於該溶液中加入含有上述的經脫保護的化合物之反應混合物，在 40℃ 進行 1 小時 5 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(20 μL 、0.14mmol)，再進行 1 小時 12 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(51g)，並將析出之固體經析出過濾後，得到化合物 35(0.12g)之褐色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t 、 9H) 、 1.15-1.89(m 、 102H) 、 2.23-2.38(m 、 4H) 、 2.66(brs 、 4H) 、 3.05(s 、 3H) 、 3.72(brs 、 2H) 、 3.93-4.35(m 、 14H) 、 5.11(brs 、 1H) 、 5.37(s 、 1H) 、 6.17(brs 、 1H) 、 6.28(t 、 1H) 、 6.58(s 、 2H) 、 6.83(d 、 1H) 、 7.46(s 、 1H) 、 7.54(s 、 1H) 、 9.61(brs 、 2H) 。

$^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ -1.52 、 6.01 。

MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1675.0476 。

[0376]

實施例 18~29(縮合劑檢討) : 化合物 29 之合成

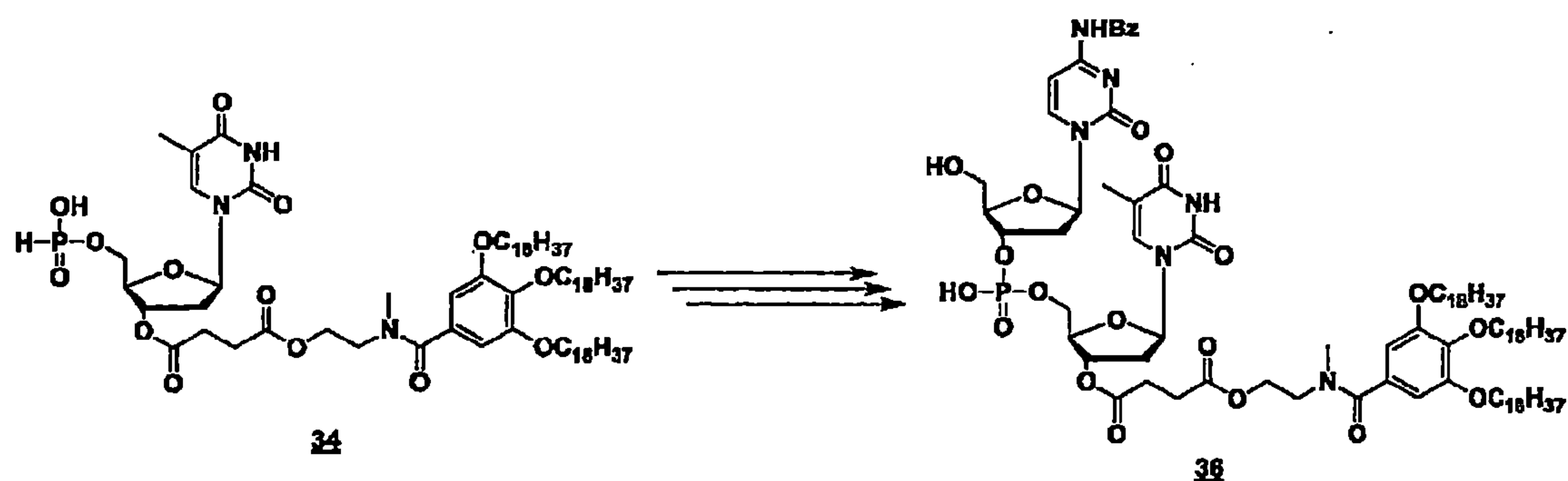
[0377] 與實施例 15 之同樣條件下，將縮合劑變更為 HBTU(16.1mg 、 實施例 18) 、 1,1'- 羰基二咪唑 [CDI](5.6mg 、 實施例 19) 、 甲烷磺醯基氯化物 [MsCl](2.8 μL 、 實施例 20) 六氟磷酸(苯並三唑-1-基氧基) 三吡咯烷鎂 [PyBOP](20.8mg 、 實施例 21) 、 N,N'-二環己基碳二亞胺 [DCC](9.1mg 、 實施例 22) 、 三氟乙酸酐 [TFAA](4.7 μL 、 實施例 23) 、 三氟乙酸五氟苯基(6.1 μL 、 實施例 24) 、 p-甲苯磺醯基氯化物(9.1mg 、 實施例 25) 、 異丁醯基氯化物(3.8 μL 、 實施例 26) 、 乙醯氯(2.6 μL 、 實施例 27) 、 丙醯基氯化物(3.1 μL 、 實施例 28) 或丁醯基氯化物(3.7 μL 、 實施例 29) 實施反應，得到化合物 29。在實施例 19、20、21、22、25、26 中得到主生成物之化合物 29。

[0378]

實施例 30(使用脫氧胞苷之 2mer 合成) : 化合物 36 之合成

[0379]

【化 7 5】



[0380] 與實施例 17 之步驟 5 的同樣條件下，將化合物 1 變更為 N⁴-苯甲醯基-5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-脫氧胞苷(東京化成工業公司製)(5.3mg)並實施反應，得到將化合物 36 作為主生成物者。

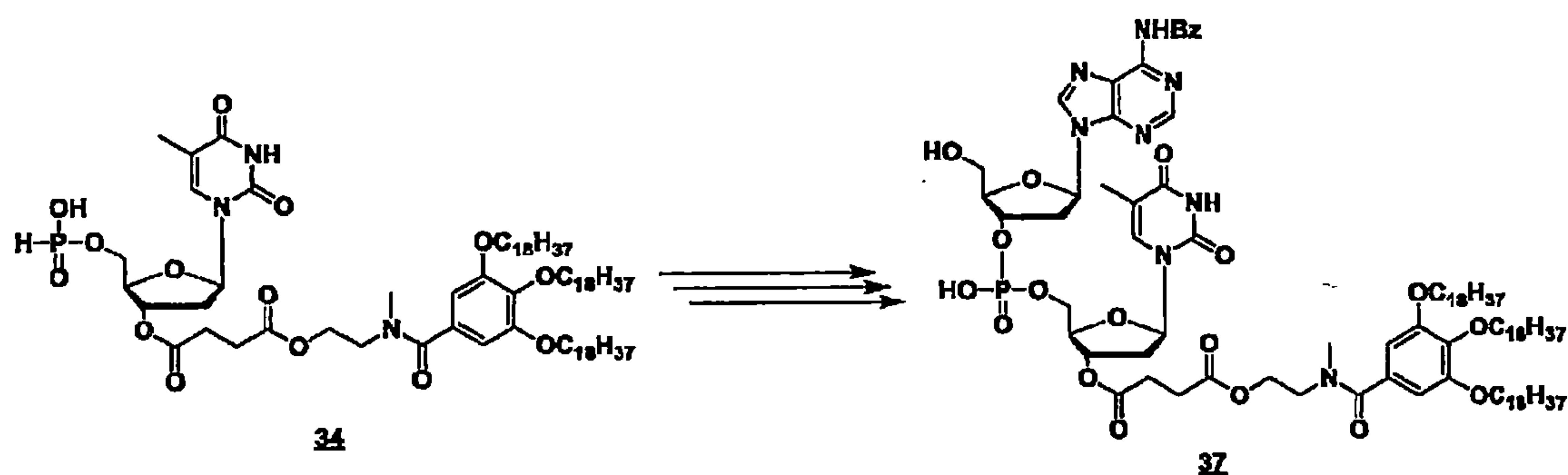
MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1700.0868。

[0381]

實施例 31(使用脫氧腺苷之 2mer 合成)：化合物 37 之合成

[0382]

【化 7 6】



[0383] 與實施例 17 之步驟 5 的同樣條件下，將化合物

物 1 變更為 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-脫氧腺苷(東京化成工業公司製)(5.4mg)並實施反應，得到將化合物 37 作為主生成物者。

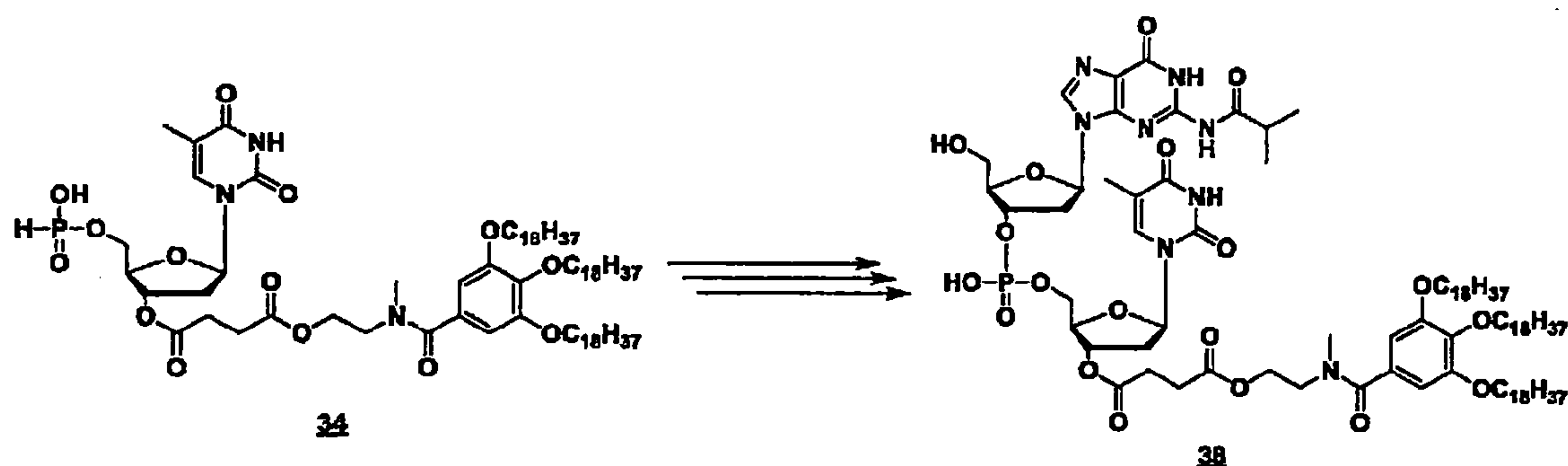
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 1726.1283。

[0384]

實施例 32(使用脫氧鳥嘌呤核苷之 2mer 合成)：化合物 38 之合成

[0385]

【化 7 7】



[0386] 與實施例 17 之步驟 5 的同樣條件下，將化合物 1 變更為 N²-異丁醯基-5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(東京化成工業公司製)(6.5mg)並實施反應，得到將化合物 38 作為主生成物者。

MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1706.1275。

[0387]

實施例 33(於核酸鹼導入擬似固相保護基之單體及 2mer 合成)：化合物 43 之合成

[0388]

步驟 1 化合物 39 之合成

在氮氣環境下，於 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-2'-脫氧胞苷(依據 Journal of Organic Chemistry、2011 年、76 卷、105 頁-126 頁所記載的方法而合成)(2.5g、7.3mmol) 與化合物 31(5.3g、4.9mmol)的二氯甲烷(155mL)及 DMF(25mL)的混合溶液中，在 40℃ 加入 1-羥基苯並三唑 [HOBt](酞)(0.74g、5.5mmol)，繼續加入 1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽 [WSC·HCl](1.9g、9.9mmol)，進行 1 小時 40 分鐘攪拌。將反應混合物在減壓下濃縮後，加入甲醇(503g)並析出固體後經過濾，得到化合物 39(6.8g，產率 98%)之黃色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.09-0.10(m 、 6H) 、 0.84-0.90(m 、 18H) 、 1.20-1.81(m 、 96H) 、 2.12-2.21(m 、 1H) 、 2.28-2.36(m 、 1H) 、 2.61-2.77(m 、 5H) 、 3.05(s 、 3H) 、 3.76(brs 、 2H) 、 3.81-3.97(m 、 8H) 、 4.07(q 、 1H) 、 4.37(brs 、 2H) 、 4.40-4.45(m 、 1H) 、 6.29(t 、 1H) 、 6.57(s 、 2H) 、 7.31(d 、 1H) 、 8.31(d 、 1H) 、 8.88(brs 、 1H) 。

MS(ESI⁻) : $[\text{M-H}]^-$ 1406.1107 。

[0390]

步驟 2 化合物 40 之合成

在氮氣環境下，於化合物 39(6.7g 、 4.8mmol) 、 DMAP(0.062g 、 0.50mmol) 、 乙醯丙酸(0.86g 、 7.4mmol)的 THF(69g) 溶液中，在室溫加入 WSC · HCl(1.4g 、 7.5mmol)，進行 50 分鐘攪拌。其後，加入 DMAP(0.26g 、 2.1mmol)，在室溫進行 3 天攪拌。將反應混合物過濾後，將所得之濾液在減壓下濃縮後，加入 THF(38g)成為溶液後，加入乙腈(505g)並析出之固體經過濾，得到化合物 40(6.7g，產率 93%)之淡黃色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.09(s 、 6H) 、 0.86-0.90(m 、 18H) 、 1.26-1.81(m 、 96H) 、 2.01-2.13(m 、 2H) 、 2.20(s 、 3H) 、 2.52-2.80(m 、 8H) 、 3.06(s 、 3H) 、 3.77(brs 、 2H) 、 3.86-3.98(m 、 8H) 、 4.20(s 、 1H) 、 4.38(brs 、 2H) 、 5.26(d 、 1H) 、 6.32-6.37(m 、 1H) 、 6.57(s 、 2H) 、 7.33(d 、 1H) 、 8.27(d 、 1H) 、 9.17(brs 、

1H)。

MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1504.1412。

[0391]

步驟 3 化合物 41 之合成

在氮氣環境下，於化合物 37(6.5g、4.3mmol)、乙酸(2.9mL、50mmol)的 THF(71g)溶液中，在 30℃ 加入 1.0M TBAF/THF 溶液(28mL、28mmol)，進行 4 小時 53 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於甲醇(531g)並將所析出之固體經過濾，得到化合物 41(6.0g、定量的)的白色固體。

¹H-NMR : (300MHz ; CDCl₃) δ0.88(t、9H)、1.20-1.80(m、96H)、2.20(s、3H)、2.38-2.80(m、10H)、3.05(s、3H)、3.78(brs、2H)、3.88-3.98(m、8H)、4.18(d、1H)、4.39(brs、2H)、5.36(quint、1H)、6.20(dd、1H)、6.59(s、2H)、7.21-7.31(m、1H)、8.19(d、1H)。

MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1390.0541。

[0392]

步驟 4 化合物 42 之合成

在氮氣環境下，於亞磷酸(1.20g、14.6mmol)的吡啶(40mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(1.28mL、9.3mmol)，進行 30 分鐘攪拌。於該溶液中加入化合物 41(2.0g、1.4mmol)，在 40℃ 進行 1 小時 23 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈並將析出之固體經過濾，得到化合物 42(2.2g)的白色固體。

^1H -NMR : (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t 、 9H) 、 1.26-1.83(m 、 96H) 、 2.19(s 、 3H) 、 2.38-2.88(m 、 10H) 、 3.06(s 、 3H) 、 3.75(brs 、 2H) 、 3.92-4.35(m 、 11H) 、 5.37(d 、 1H) 、 6.17(t 、 1H) 、 6.58(s 、 2H) 、 6.88(d 、 1H) 、 7.26-7.28(m 、 1H) 、 8.51(d 、 1H) 。

^{31}P -NMR : (300MHz ; CDCl_3) δ 5.73 。

MS(ESI^-) : $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1454.0237 。

[0393]

步驟 5 化合物 43 之合成

在氮氣環境下，於化合物 42(96mg)與化合物 1(36mg、0.10mmol)的吡啶(2.0mL)溶液中，在 40℃加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(45 μL 、0.33mmol)，進行 23 分鐘攪拌。其後加入含有 0.05M 之碘的吡啶與水的溶液(2.6mL、0.13mmol)，進行 1 小時 29 分鐘攪拌。其後，加入亞磷酸二甲基(3.0 μL 、0.033mmol)，加入水(0.26mL,14.4mmol)後，在 70℃進行 15 小時 55 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮，得到化合物 43 作為主生成物者。

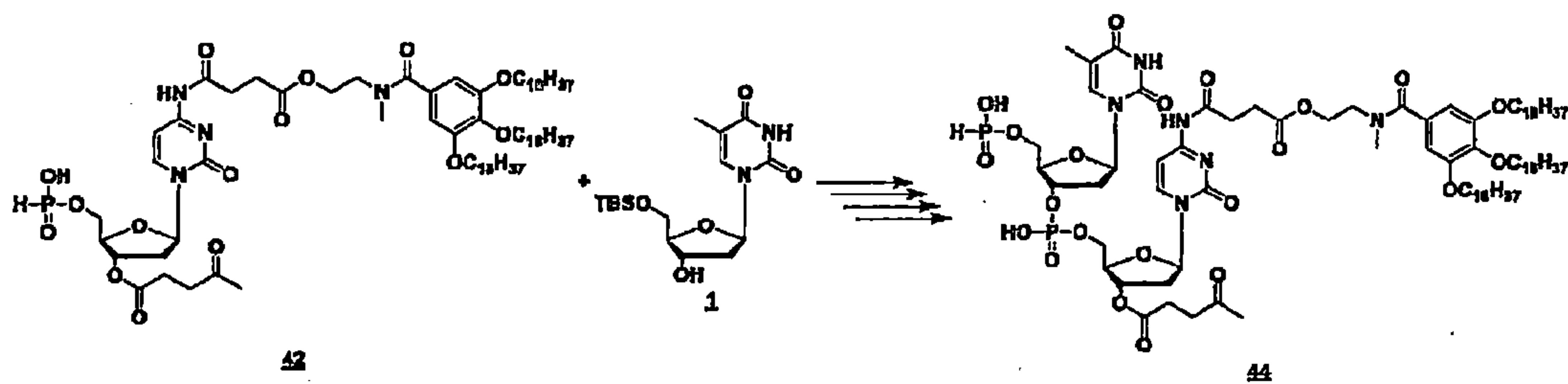
MS(ESI^-) : $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1694.1110 。

[0394]

實施例 34(2mer 合成)：化合物 44 之合成

[0395]

【化 7 9】



[0396] 在氮氣環境下，於化合物 42(1.0g)與化合物 1(0.35g、0.98mmol)的吡啶(20mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.45mL、3.3mmol)，進行 17 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液(9.8mL、0.98mmol)，進行 38 分鐘攪拌。其後，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯(27g)在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(12g)，將不溶物經過濾除去，以二氯甲烷(6g)進行二次洗淨。於該溶液中，將氟化氫-吡啶(76.1 μ L、2.9mmol)在室溫下加入，進行 18 小時 57 分鐘攪拌。加入 TMSCl(0.29mL、2.3mmol)，進行 17 分鐘攪拌。其後，將反應混合物減壓下濃縮，加入吡啶，在減壓下濃縮。

在氮氣環境下，於亞磷酸(0.70g、8.5mmol)的吡啶(18mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.80mL、5.8mmol)，進行 39 分鐘攪拌。於該溶液中加入前述濃縮物，並在 40℃ 進行 2 小時 37 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(518g)並經析出的固體經過濾，得到化合物 44(1.0g)之淡皮膚色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.15-

1.83(m、96H)、1.90(s、3H)、2.18(s、3H)、2.46-2.95(m、12H)、3.06(s、3H)、3.68(brs、2H)、3.92-4.34(m、14H)、5.02(s、1H)、5.35(s、1H)、6.16(t、1H)、6.25(t、1H)、6.59(s、2H)、6.82(d、1H)、7.07(d、1H)、7.46(s、1H)、8.65(d、1H)。

^{31}P -NMR : (300MHz ; CDCl_3) δ -2.16、4.97。

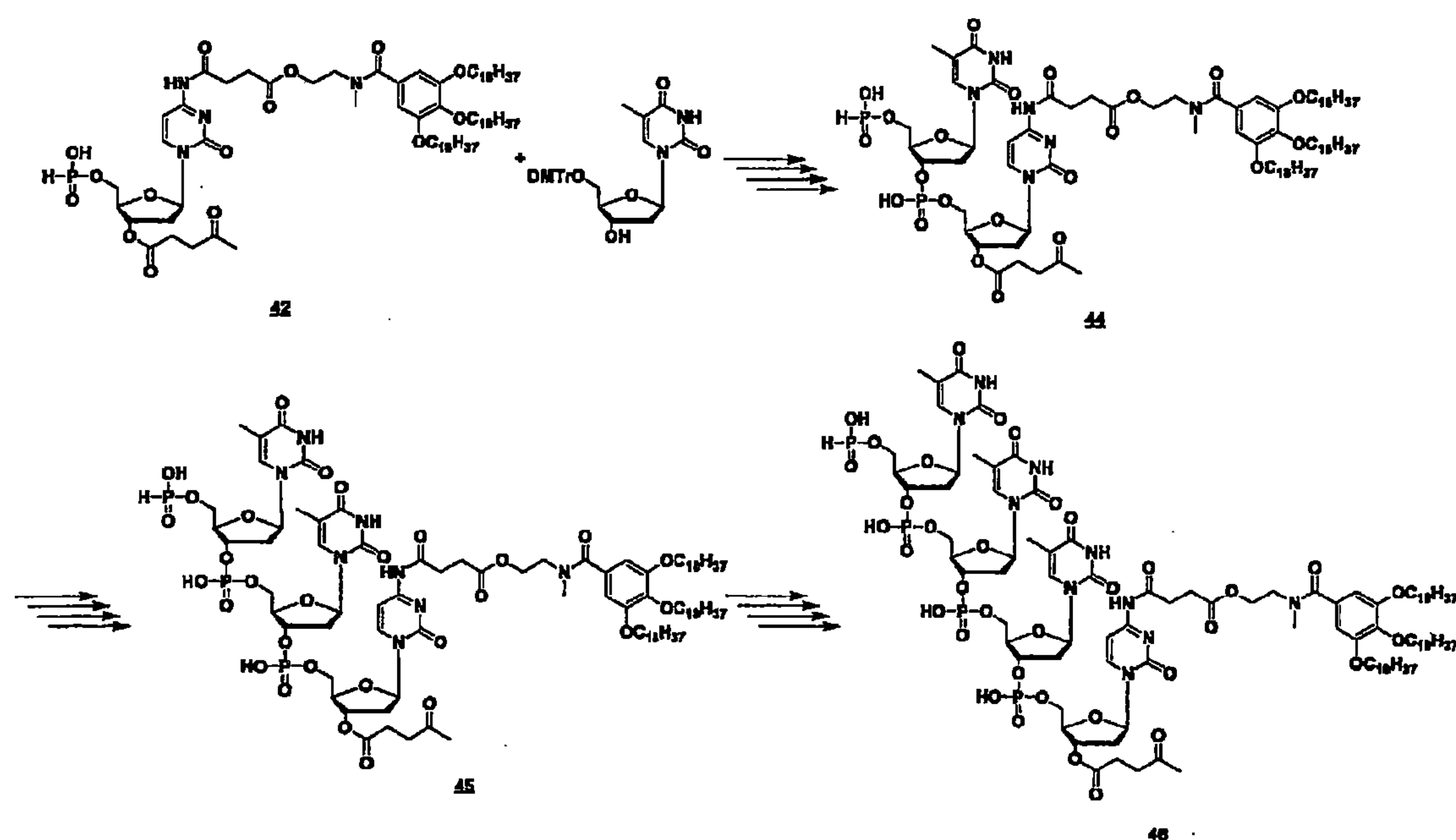
MS(ESI $^-$) : $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1758.0754。

[0397]

實施例 35(4mer 合成) : 化合物 46 之合成

[0398]

[化 80]



[0399]

步驟 1 化合物 44 之合成

在氮氣環境下，於化合物 42(0.94g)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(0.49g、

0.91mmol)的吡啶(20mL)溶液中，在 25℃ 加入作為縮合劑之 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.42mL、3.0mmol)，進行 20 分鐘攪拌(偶合反應)。其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液(9.1mL、0.91mmol)，進行 20 分鐘攪拌。其後，加入鄰甲酸三甲酯(1.3mL、12mmol)，在 25℃ 進行 34 分鐘攪拌，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯(30g)，在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(10mL)，將不溶物以吸引過濾除去後，以二氯甲烷(5mL)進行 2 次萃取。於該溶液中，將吡咯(0.13mL、1.8mmol)、磷酸(0.73g、9.1mmol)在室溫下加入，進行 29 分鐘攪拌。將吡啶(2.8mL)在室溫下加入後，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.83mL、6.0mmol)分為 3 分，隔 10 分鐘加入並進行 1 小時 16 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.14mL、1.0mmol)，再進行 45 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(396g)並析出之固體經過濾後得到化合物 44(1.0g)之淡灰色固體。

MS(ESI⁻): [M-H]⁻ 1758.0512。

[0400]

步驟 2 化合物 45 之合成

在氮氣環境下，於化合物 44(0.98g)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(0.45g、0.83mmol)的吡啶(20mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.38mL、2.8mmol)，進行 27 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液(8.3mL、

0.83mmol)，進行 44 分鐘攪拌。其後，加入鄰甲酸三甲基 (1.2mL、11mmol)，在 25℃ 進行 42 分鐘攪拌，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯 (30g) 並在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷 (10mL)，將不溶物以吸引過濾除去，以二氯甲烷 (5mL) 進行 2 次萃取。於該溶液中，將吡咯 (0.12mL、1.7mmol)、磷酸 (0.69g、8.3mmol) 在 20℃ 加入，進行 30 分鐘攪拌。將吡啶 (2.8mL) 在 25℃ 下加入後，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.76mL、5.5mmol) 分為 3 分並隔 10 分鐘加入後進行 39 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.14mL、1.0mmol) 再進行 49 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈 (396g) 並經析出的固體經過過濾後得到化合物 45 (1.2g) 之淡灰色固體。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2064.1191。

[0401]

步驟 3 化合物 46 之合成

在氮氣環境下，於化合物 45 (1.16g) 與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷 (東京化成工業公司製) (0.43g、0.81mmol) 的吡啶 (20mL) 溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.37mL、2.7mmol)，進行 29 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液 (8.1mL、0.81mmol)，進行 25 分鐘攪拌。其後，加入鄰甲酸三甲基 (1.2mL、11mmol)，在 25℃ 進行 21 分鐘攪拌，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯 (30g) 並在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，二氯甲烷 (10mL)，將不溶物以吸引過濾除

去，以二氯甲烷(5mL)進行 2 次洗淨。於該溶液中，將吡咯(0.11mL、1.6mmol)及磷酸(0.65g、8.1mmol)在 27～30℃下加入，進行 24 分鐘攪拌。將吡啶(3.0mL)在 22～28℃下加入後，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.74mL、5.4mmol)分為 3 分並隔 10 分鐘加入，進行 41 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.49mL、3.6mmol)，再進行 1 小時 20 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(397g)並將析出的固體經析出過濾後，得到化合物 46(1.33g)之淡灰色固體。

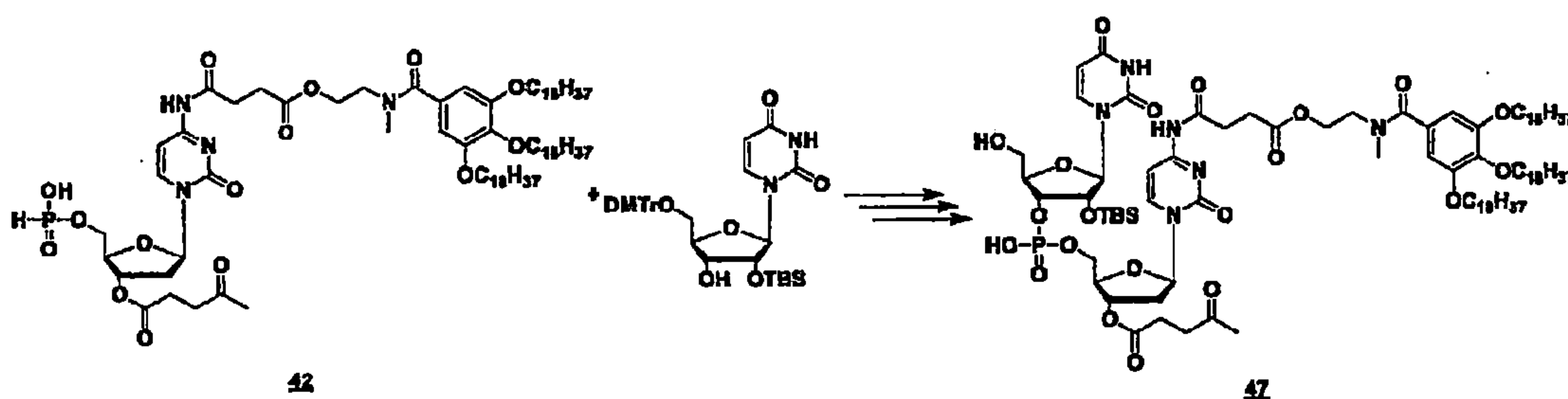
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2368.1574。

[0402]

實施例 36(在 RNA 之 2mer 合成): 化合物 47 之合成

[0403]

【化 8 1】



[0404] 在氮氣環境下，於化合物 42(9.5mg)與 2'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)尿苷(由關東化學公司所購入)(7.8mg、0.012mmol)的吡啶(0.20mL)溶液中，在 25℃加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(4.5μL、0.033mmol)，進行 35 分鐘攪拌。其後加入含有

0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液(98 μ L、0.098mmol)，進行 20 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮，加入甲苯(1mL)，在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(0.30mL)，將不溶物以吸引過濾除去，以二氯甲烷(0.20mL $\times$ 2 次)萃取。於該溶液中，將吡咯(2 μ L、0.029mmol)、磷酸(9.1mg、0.11mmol)在室溫下加入，進行 30 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮，得到將化合物 47 作為主生成物者。

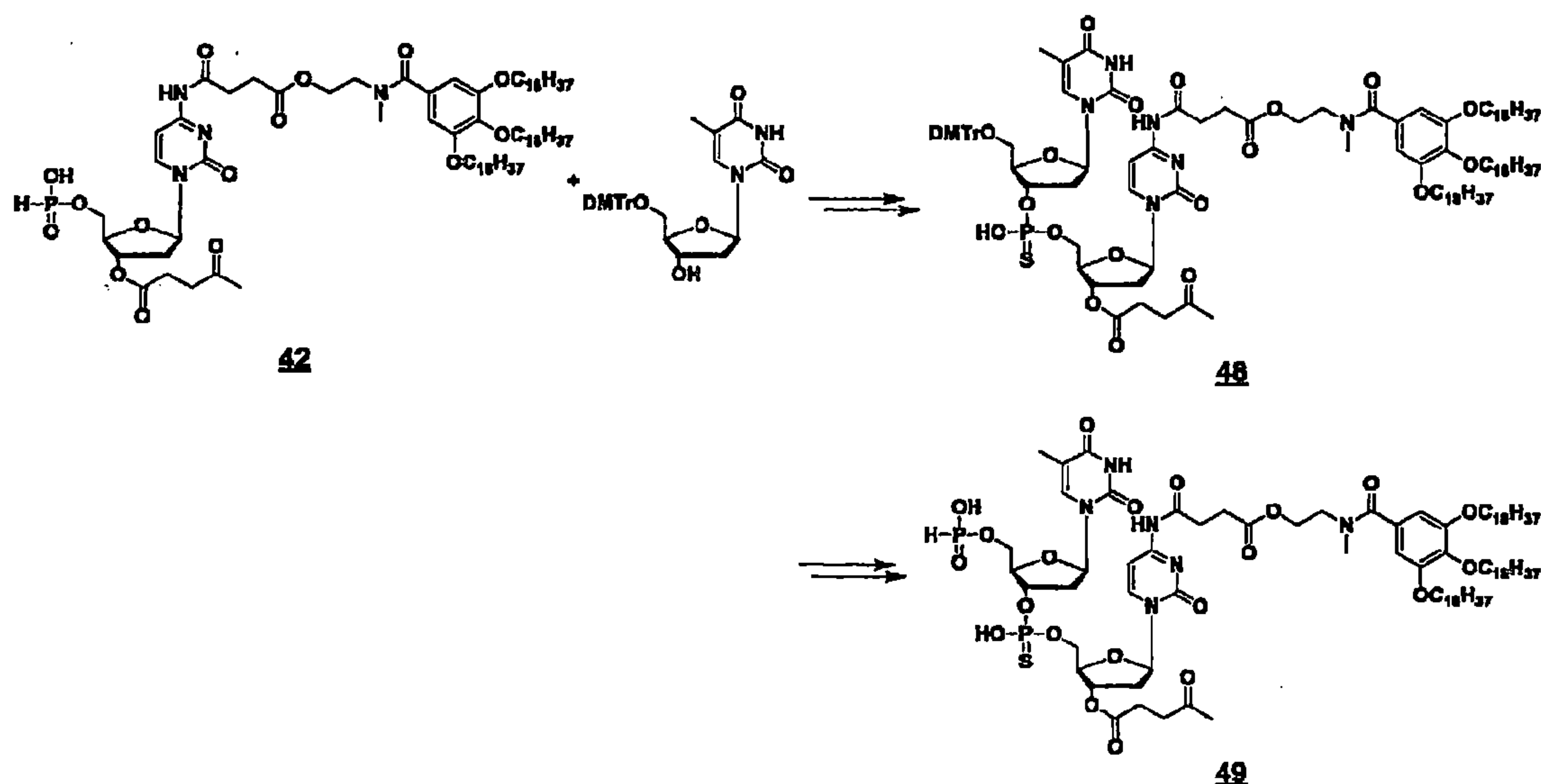
MS(ESI⁻): [M-H]⁻ 1810.2131。

[0405]

實施例 37(2mer 合成): 化合物 49 之合成

[0406]

【化 8 2】



[0407] 在氮氣環境下，於化合物 42(104mg)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司

製)(58mg、107mmol)的吡啶(2.0mL)溶液中，在室溫加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(46 μ L、0.34mmol)，進行 32 分鐘攪拌而進行偶合反應。其後，作為硫化劑加入單體硫(3.2mg、0.10mmol)，進行 1 小時 32 分鐘攪拌，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯(4.0mL)在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(1.0mL)，將不溶物以注射器濾器除去，以二氯甲烷(0.50mL $\times$ 2 次)洗淨。於該溶液中，將吡咯(14 μ L、0.20mmol)、膦酸(80mg、1.0mmol)在室溫下加入，進行 36 分鐘攪拌後，進行脫一時保護基反應。將吡啶(0.30mL)在室溫下加入後，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(92 μ L、0.67mmol)分為 3 分並隔 10 分鐘加入，進行 2 小時 24 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(16 μ L、0.12mmol)，再進行 40 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(49g)並將析出之固體進行析出過濾後得到化合物 49(98mg)的白色固體。

MS(ESI⁻): [M-H]⁻ 1774.0443。

[0408]

實施例 38(硫化劑檢討 2mer 合成): 化合物 49 之合成

[0409] 在與實施例 37 之同樣條件下，將硫化劑變更為 3-胺基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(11.8mg)，實施反應後，得到化合物 49(99mg)之淡黃色固體。

[0410]

實施例 39(硫化劑檢討 2mer 合成): 化合物 48 之合成

[0411] 在與實施例 37 之同樣條件下，將硫化劑變更

為 3-((二甲基胺基-亞甲基)胺基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮 [DDTT](11.8mg)，實施反應後，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 48 作為主生成物者。

[0412]

實施例 40(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 48 之合成

[0413] 將與實施例 37 之同樣條件下實施的偶合反應後之反應溶液分為 4 分，將硫化劑變更為 3H-1,2-苯並二硫醇-3-酮(3.7mg)並實施，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 48 作為主生成物者。

[0414]

實施例 41(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 48 之合成

[0415] 使用在實施例 40 所得之偶合反應後的反應溶液的 4 分之 1，在與實施例 37 之同樣條件下，將硫化劑變更為 3H-1,2-苯並二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(3.3mg)，實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 48 作為主生成物者。

[0416]

實施例 42(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 48 之合成

[0417] 使用在實施例 40 所得之偶合反應後的反應溶液的 4 分之 1，在與實施例 37 之同樣條件下，將硫化劑變更為四乙基秋蘭姆二硫化物(4.4mg)，實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 48 作為主生成物者。

[0418]

實施例 43(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 48 之合成

[0419] 在與實施例 37 之同樣條件下，將硫化劑變更為雙(苯基乙醯)二硫化物(4.5mg)，實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 48 作為主生成物者。

[0420]

實施例 44(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 48 之合成

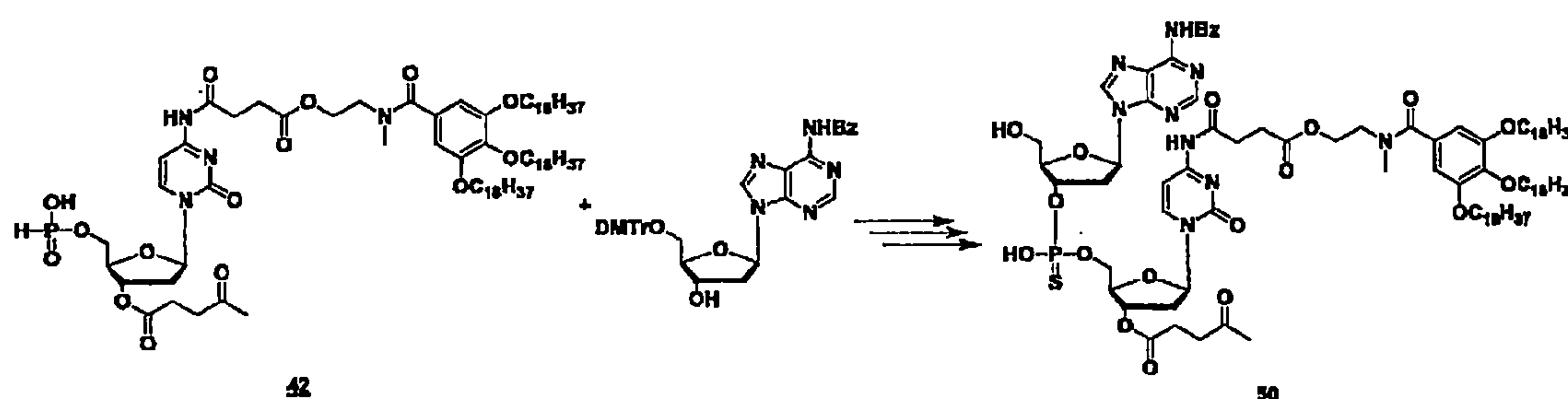
[0421] 在與實施例 37 之同樣條件下，將硫化劑變更為 N-(苯甲醯基硫)-琥珀酸醯亞胺(依據 Synthesis、1980 年、721-722 頁所記載的方法進行合成)(3.7mg)，實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 48 作為主生成物者。

[0422]

實施例 45(使用脫氧腺苷的 2mer 合成)：化合物 50 之合成

[0423]

【化 8 3】



[0424] 在與實施例 37 之同樣條件下，將 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷變更為 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷(東京化成工業公司

製)(66.4mg)，實施反應，將脫一時保護基反應後之反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 50。

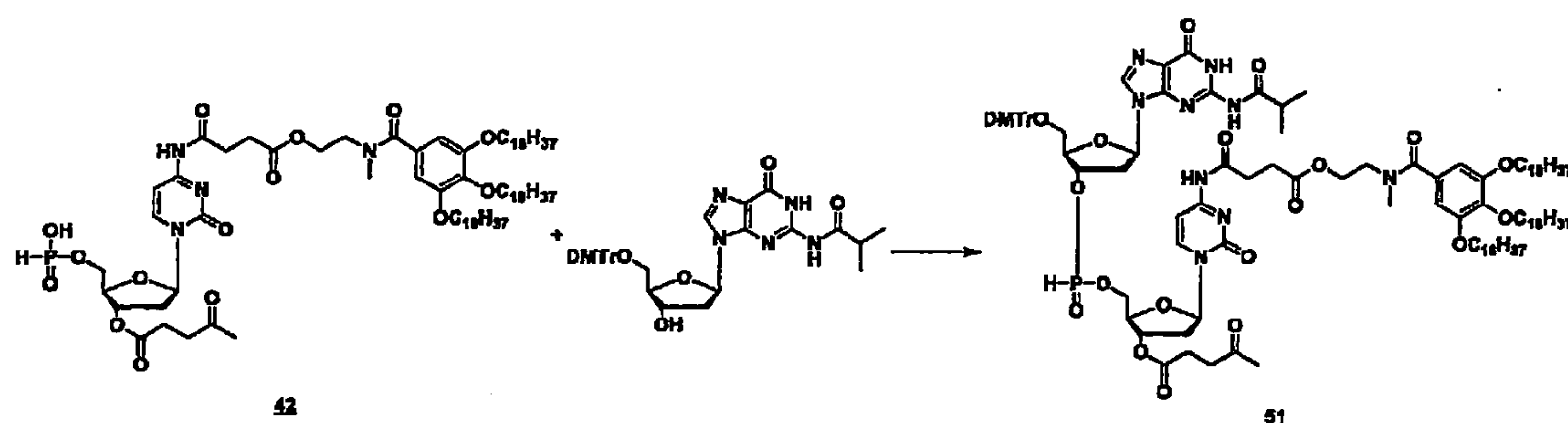
MS(ESI⁻)：[M-H]⁻ 1823.1213。

[0425]

實施例 46(使用脫氧鳥嘌呤核苷的 2mer 合成)：化合物 51 之合成

[0426]

【化 8 4】



[0427] 在與實施例 37 之同樣條件下，將 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷變更為 N²-異丁醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(東京化成工業公司製)(6.6mg)，實施反應，將偶合反應後之反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 51 作為主生成物者。

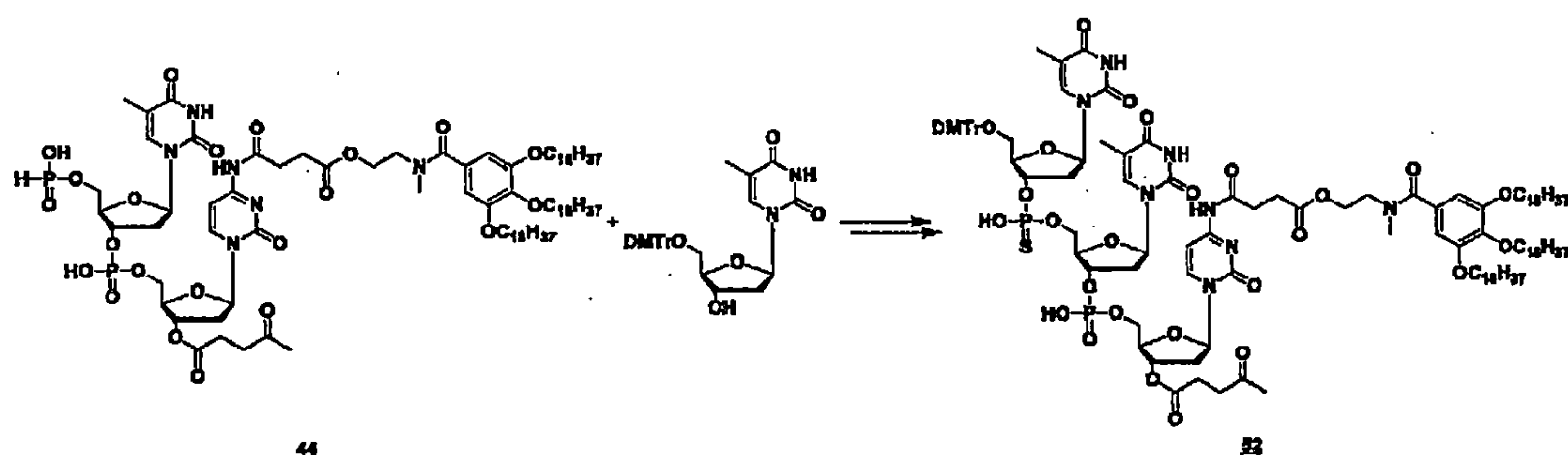
MS(ESI⁻)：[M-H]⁻ 2075.2896。

[0428]

實施例 47(3mer 合成)：化合物 52 之合成

[0429]

【化 8 5】



[0430] 在氮氣環境下，於化合物 44(9.5mg)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(6.0mg、0.011mmol)的吡啶(0.20mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(3.8μL、0.028mmol)，進行 26 分鐘攪拌。其後，單體硫(2.1mg、0.065mmol)，進行 1 小時 40 分鐘攪拌。將反應混合物在減壓下濃縮，得到將化合物 52 作為主生成物者。

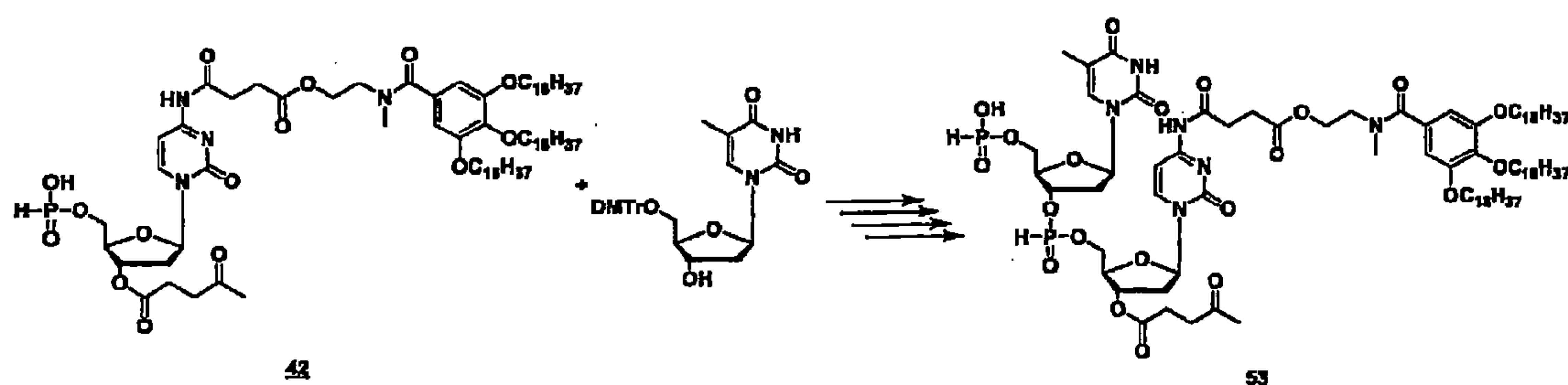
MS(ESI⁻): [M-H]⁻ 2316.2547。

[0431]

實施例 48(在 H-磷酸酯二酯進行 2mer 合成): 化合物 53 之合成

[0432]

【化 8 6】



[0433] 在氮氣環境下，於化合物 42(12mg)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(7.0mg、0.013mmol)的 THF(0.20mL)溶液中，在 25℃ 加入吡啶(1.7μL、0.034mmol)後，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(4.6μL、0.034mmol)，進行 45 分鐘攪拌。其後追加吡啶(1.7μL、0.034mmol)，進行 18 分鐘攪拌。於該溶液中，將吡咯(1.4μL、0.020mmol)、膦酸(8.5mg、0.10mmol)在 25℃ 下加入，進行 44 分鐘攪拌。加入二氯甲烷(0.20mL)，再進行 1 小時 20 分鐘攪拌。將吡啶(30μL)在 25℃ 下加入後，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(9.2μL、0.067mmol)分為 3 分並隔 10 分鐘加入，進行 35 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(2g)，並將析出的固體經過濾，得到化合物 53。

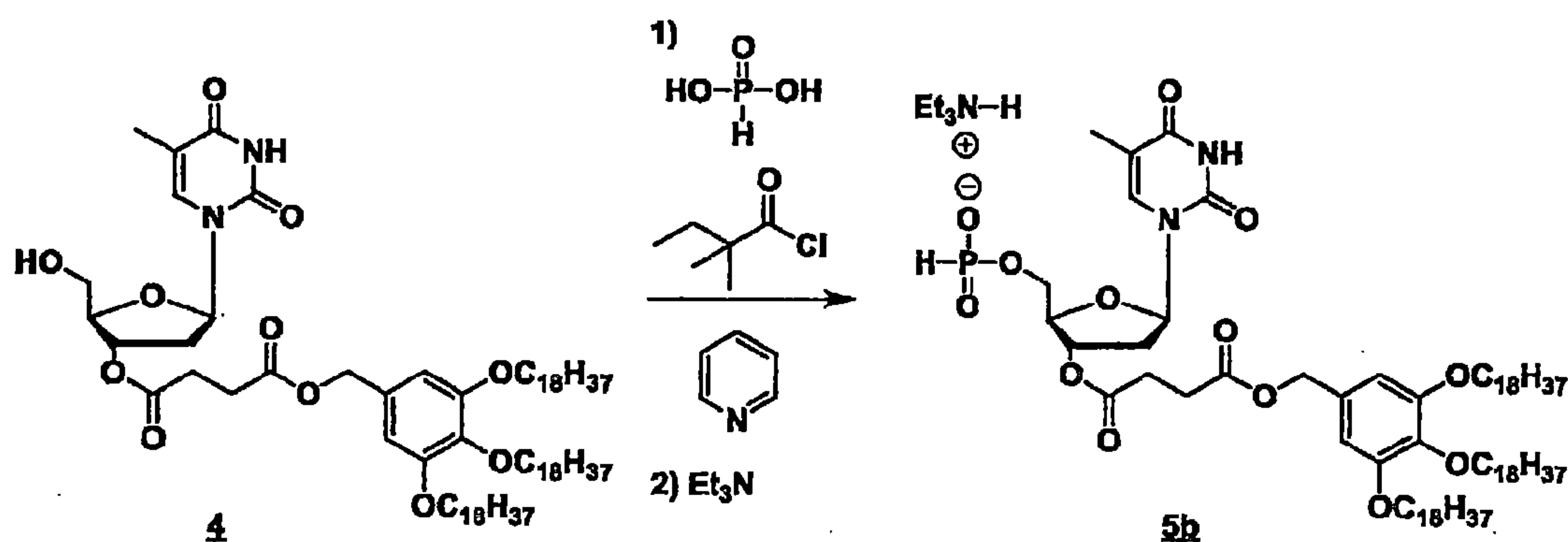
MS(ESI⁻): [M-H]⁻ 1742.1016。

[0434]

實施例 49(H-膦酸酯化): 化合物 5b(三乙基胺鹽)之合成

[0435]

【化 8 7】



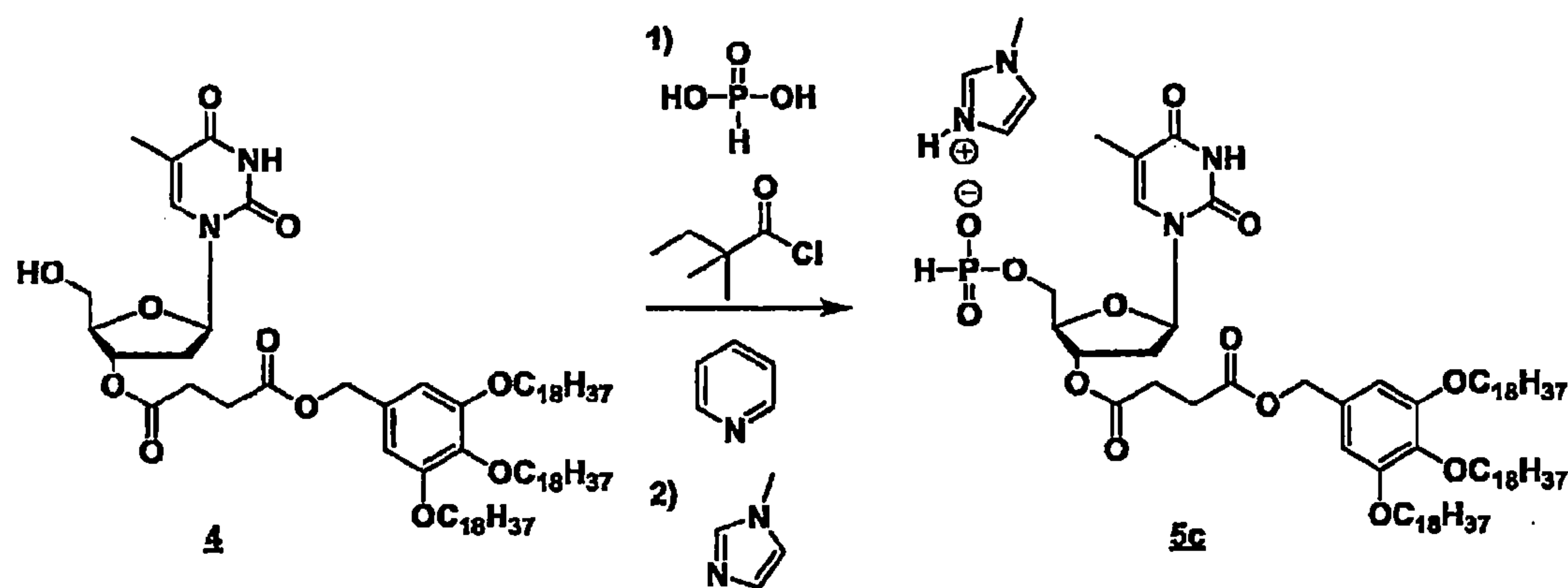
[0436] 在氮氣環境下，於亞磷酸(345mg、4.2mmol)的吡啶(10mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.33mL、2.4mmol)，進行 35 分鐘攪拌。於該反應混合物加入化合物 4(497mg、0.40mmol)，在 40℃ 進行 1 小時 2 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(83μL、0.61mmol)後再進行 1 小時 13 分鐘攪拌。加入三乙基胺(2.8mL、20mmol)後，加入乙腈(211g)並析出固體，冰冷後經過濾，得到化合物 5b(547mg)的白色固體。

[0437]

實施例 50(H-磷酸酯化)：化合物 5c(N-甲基咪唑鹽)之合成

[0438]

【化 8 8】



[0439] 在氮氣環境下，於亞磷酸(241mg、2.9mmol)的吡啶(7mL)溶液，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.23mL、1.7mmol)，進行 30 分鐘攪拌。於該反應混合物中加入化合物 4(350mg、0.28mmol)，在 40℃ 進行 1 小時 49 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(39μL、

0.28mmol)，再進行 2 小時攪拌。將所得之溶液分為 3 分 (化合物 4：0.093mmol 相當)，加入 N-甲基咪唑(0.32mL、4.1mmol)後，加入乙腈(40g)並析出固體，冰冷後經過濾後得到化合物 5c(103mg)之固體。

$^1\text{H-NMR}$ ：(300MHz； CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.26-1.83(m、96H)、1.92(s、3H)、2.32-2.36(m、2H)、2.67(s、4H)、3.89-3.98{m、6H+3H(N-甲基咪唑)}、4.18-4.21(m、3H)、5.02(s、2H)、5.41(t、1H)、6.38(t、1H)、6.53(s、2H)、6.93(d、1H)、7.04(s、1H、N-甲基咪唑)、7.31(s、1H、N-甲基咪唑)、7.73(d、1H)、8.84(s、1H、N-甲基咪唑)。

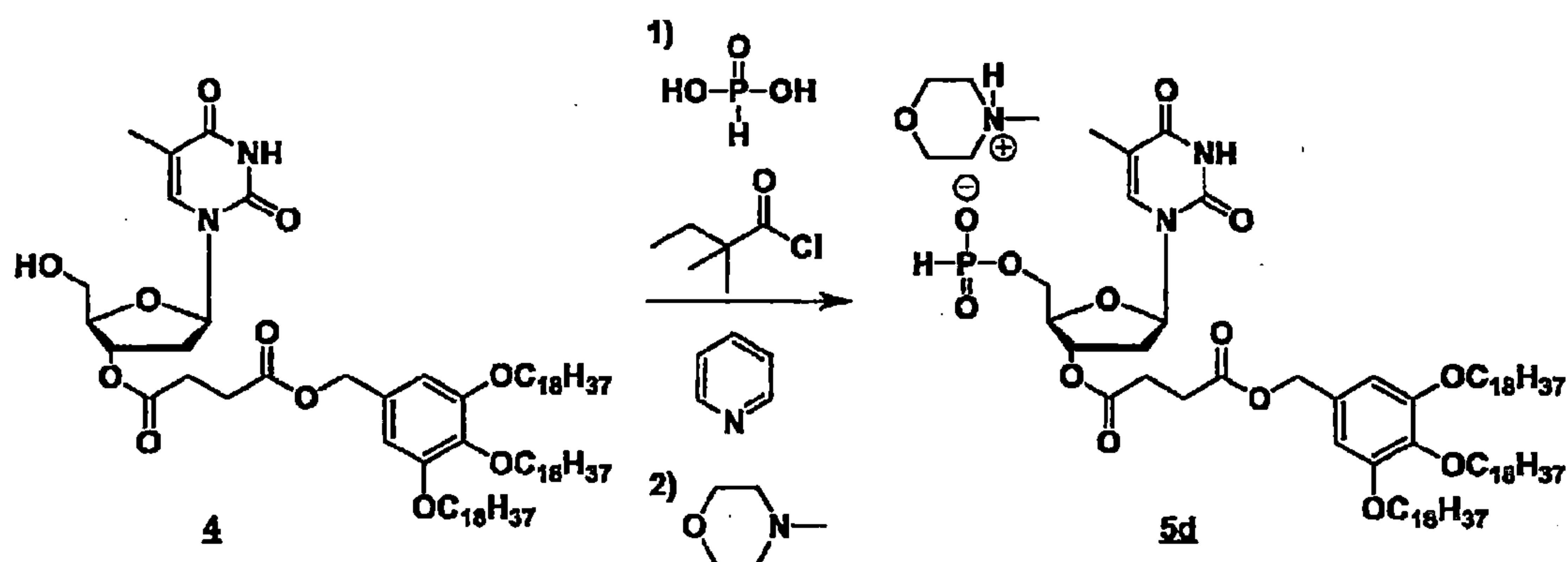
$^{31}\text{P-NMR}$ ：(300MHz； CDCl_3) δ 5.74。

[0440]

實施例 51(H-磷酸酯化)：化合物 5d(N-甲基嗎啉鹽)之合成

[0441]

【化 8 9】



[0442] 對於在實施例 50 分為 3 分的溶液之 1(化合物

4 : 0.093mmol 相當) , 加入 N- 甲基嗎啉 (0.45mL 、 4.1mmol)後 , 加入乙腈 (43g) , 析出固體 , 冰冷後過濾 , 得到化合物 5d(96mg)之固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t 、 9H) 、 1.09-1.84(m 、 96H) 、 1.96(s 、 3H) 、 2.01(s 、 3H 、 N- 甲基嗎啉) 、 2.31-2.36(m 、 2H) 、 2.68(s 、 4H) 、 2.76(s 、 4H 、 N- 甲基嗎啉) 、 3.90-3.98{m 、 6H+4H(N- 甲基嗎啉)} 、 4.10-4.17(m 、 3H) 、 5.02(s 、 2H) 、 5.41(t 、 1H) 、 6.38(t 、 1H) 、 6.53(s 、 2H) 、 6.89(d 、 1H) 、 7.71(d 、 1H)。

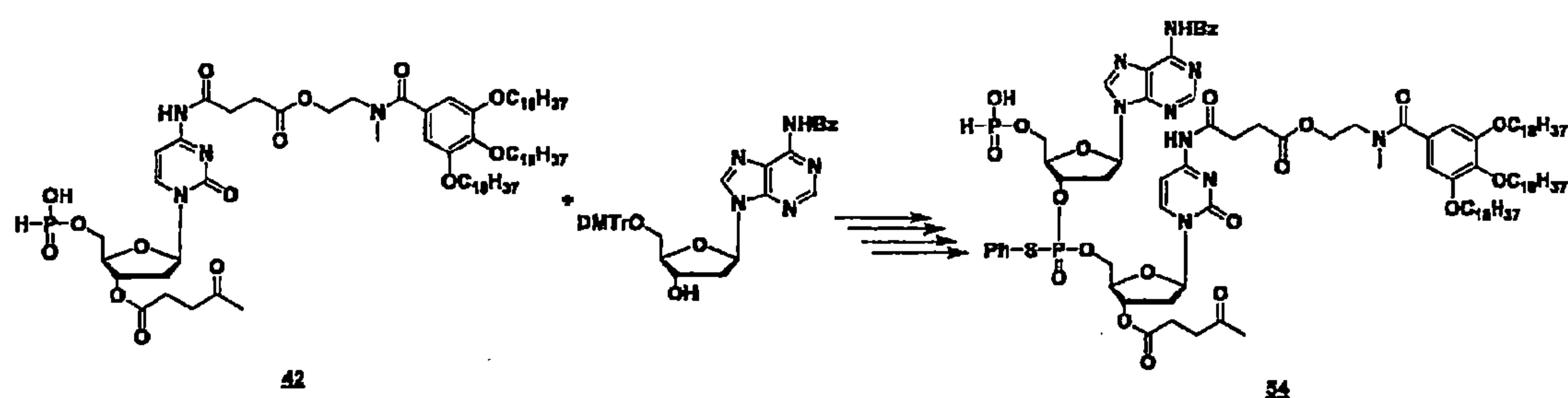
$^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 5.88。

[0443]

實施例 52(2mer 合成) : 化合物 54 之合成

[0444]

【化 9 0】



[0445] 在氮氣環境下 , 於化合物 42(99mg)與 N^6 - 苯甲醯基 -5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷(東京化成工業公司製)(66mg 、 0.10mmol)的吡啶 (2.0mL)溶液中 , 在 25°C 加入作為縮合劑之 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (28 μL 、 0.20mmol) , 進行 21 分鐘攪拌。其後 , 加入作為

硫化劑之 N-(苯基硫基)鄰苯二甲醯亞胺 (27mg、0.11mmol)，進行 43 分鐘攪拌。加入水 (3.6 μ L、0.20mmol) 並進行 1 小時 37 分鐘攪拌，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯 (4.0mL) 在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷 (2.0mL)，將吡咯 (14 μ L、0.20mmol)、磷酸 (8.7mg、0.11mmol) 在室溫下加入，進行 1 小時 28 分鐘攪拌後，進行脫一時保護基反應。將吡啶 (0.30mL)、磷酸 (74mg、0.90mmol) 在室溫中加入後，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (92 μ L、0.67mmol) 分為 3 分，並隔 10 分鐘加入進行 59 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (31 μ L、0.22mmol) 後再進行 42 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈 (51g) 中並過濾析出的固體，得到化合物 54 (100mg) 的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.13-1.80(m、96H)、2.17-2.85(m、15H)、3.03(s、3H)、3.68-4.33(m、16H)、5.20-5.35(m、2H)、6.07-6.17(m、2H)、6.43-6.53(m、2H)、6.56(s、2H)、7.24-8.78(m、14H)。

$^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 6.10、25.20、25.30。

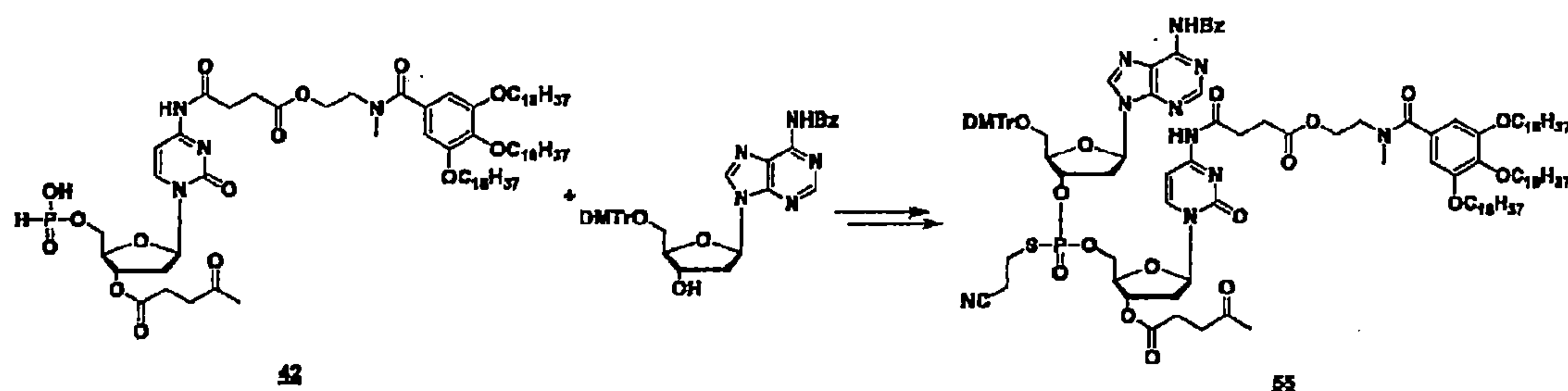
MS(ESI $^+$) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1965.1202。

[0446]

實施例 53(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 55 之合成

[0447]

【化 9 1】



[0448] 在與實施例 52 之同樣條件，將硫化劑變更為 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(依據 Tetrahedron、1997 年、53 卷、14411-14416 頁所記載的方法進行合成)(4.3mg)而實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 55 作為主生成物者。

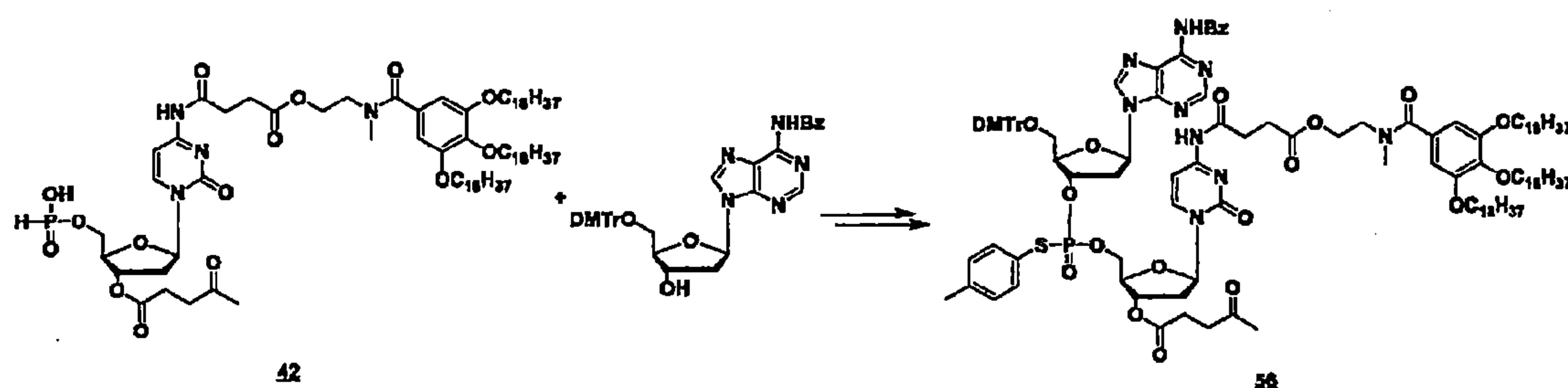
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2180.2862。

[0449]

實施例 54(硫化劑檢討 2mer 合成): 化合物 56 之合成

[0450]

【化 9 2】



[0451] 與實施例 52 同樣條件下，將硫化劑變更為 N-[(p-甲基苯基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(依據 Nucleic Acid Research、1999 年、27 卷、963-971 頁所記載的方法進行

合成)(27mg)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 56 作為主生成物者。

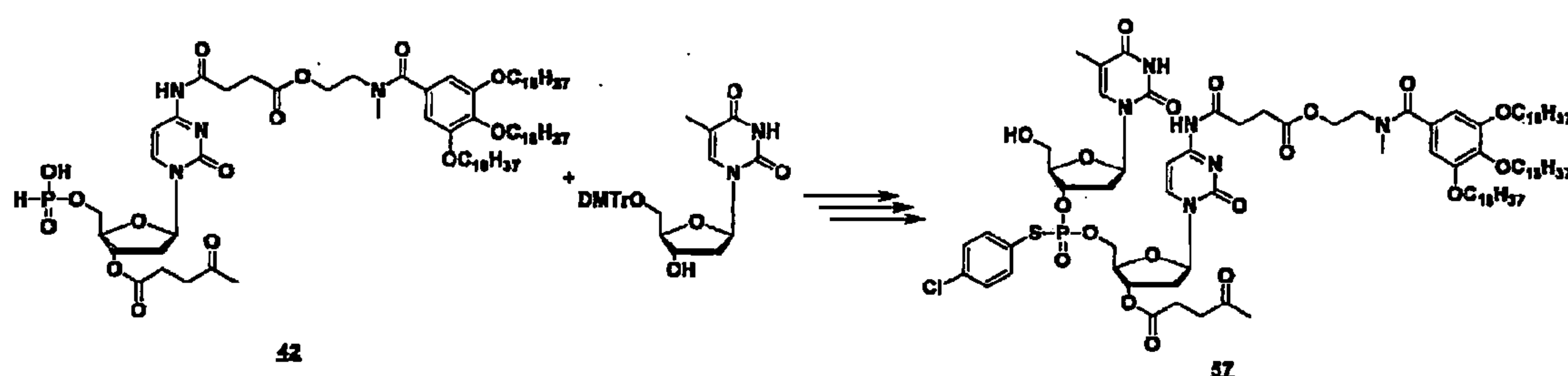
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 2217.2981。

[0452]

實施例 55(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 57 之合成

[0453]

【化 9 3】



[0454] 與實施例 52 之同樣條件下，將 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷變更為 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(5.2mg)，將硫化劑變更為 N-[(p-氯苯基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(依據 Tetrahedron、1997 年、53 卷、14411-14416 頁所記載的方法進行合成)(4.3mg)並實施，將脫一時保護基反應後之反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 57 作為主生成物者。

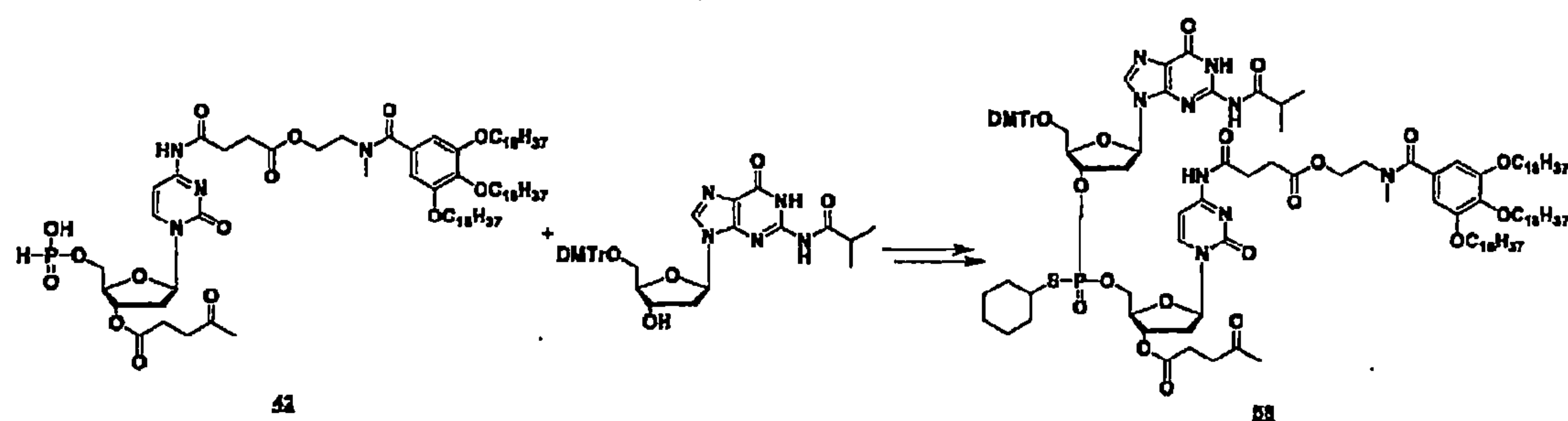
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 1788.1262。

[0455]

實施例 56(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 58 之合成

[0456]

【化 9 4】



[0457] 與實施例 52 之同樣條件下，將 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷變更為 N²-異丁醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(東京化成工業公司製)(7.0mg)，將硫化劑變更為 N-(環己基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(3.3mg)而實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 58。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2191.3401。

[0458]

實施例 57(2mer 合成): 化合物 55 之合成

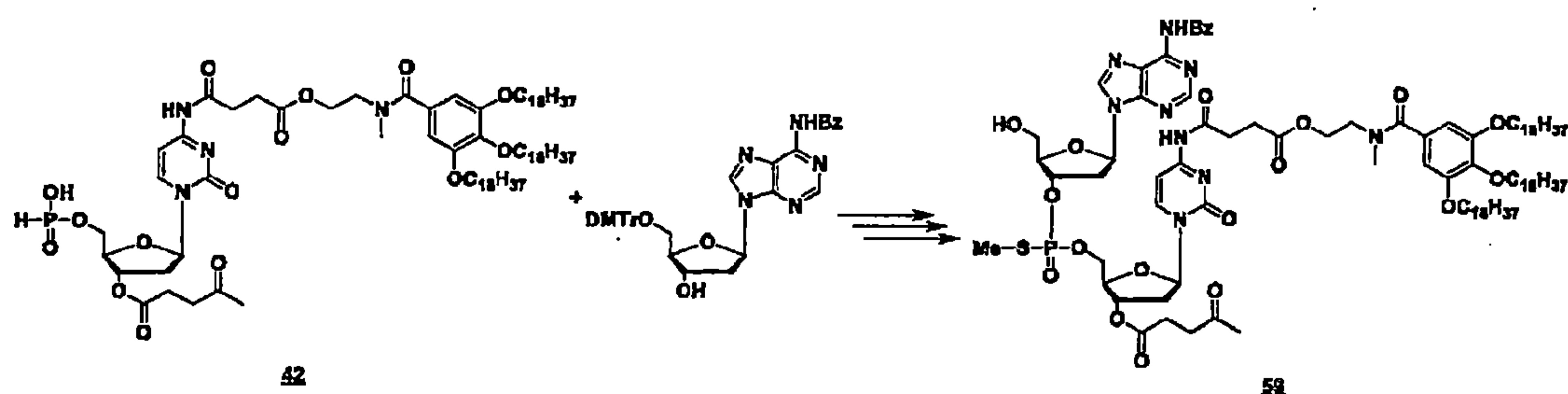
[0459] 與實施例 53 同樣條件下，將縮合劑變更為碳酸雙五氟苯酯(9.1mg)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 55 作為主生成物者。

[0460]

實施例 58(硫化劑檢討 2mer 合成): 化合物 59 之合成

[0461]

【化 9 5】



[0462] 與實施例 52 同樣條件下，將硫化劑變更為 N-(甲基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(依據 Tetrahedron、1997 年、53 卷、14411-14416 頁所記載的方法進行合成)(9.9mg)並實施反應，將脫一時保護基反應後之反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 59 作為主生成物者。

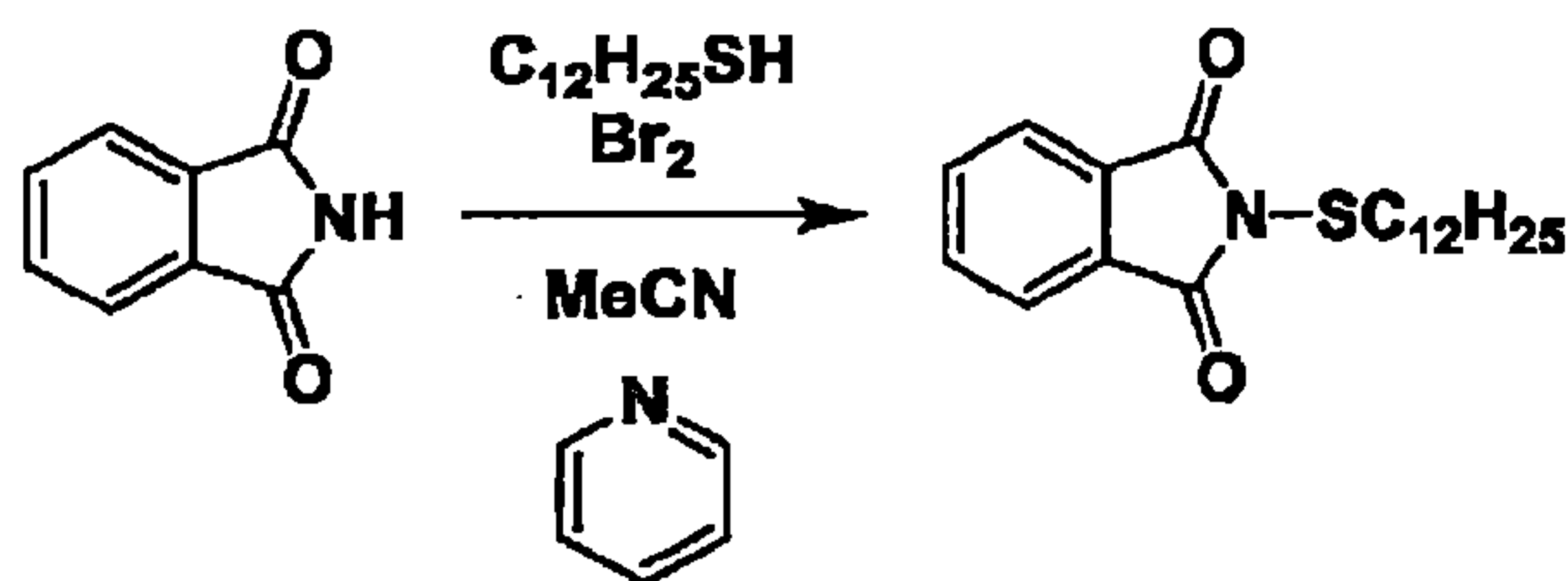
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1839.1373。

[0463]

參考合成例 3(硫化劑合成): N-(十二烷基硫)鄰苯二甲醯亞胺之合成

[0464]

【化 9 6】



[0465] 在氮氣環境下，於鄰苯二甲醯亞胺(4.0g、27mmol)的乙腈(15mL)與吡啶(12mL)的混合溶液中加入十二烷基硫醇(6.8mL、29mmol)，在室溫將溴(1.7mL、

33mmol)的乙腈(20mL)溶液經 40 分鐘滴入，在室溫進行 2 小時 43 分鐘攪拌。加入甲醇(32g)、水(5g)，冷卻至 0℃，將析出的固體經過濾後得到目的物(6.0g)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、3H)、1.08-1.64(m、20H)、2.88(t、2H)、7.75-7.80(m、2H)、7.89-7.95(m、2H)。

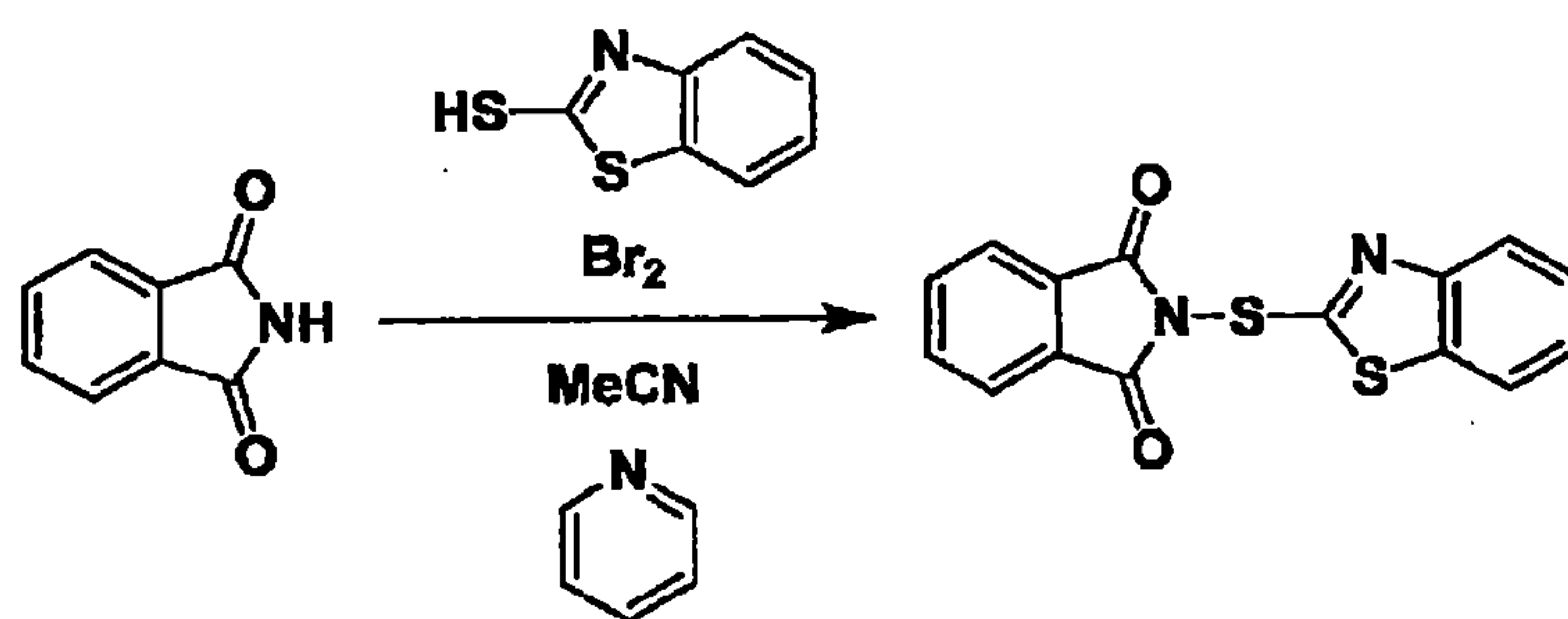
$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.2003。

[0466]

參考合成例 4(硫化劑合成)：N-[(2-苯並[d]噻唑基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺之合成

[0467]

【化 9 7】



[0468] 在氮氣環境下，於鄰苯二甲醯亞胺(4.0g、27mmol)的乙腈(15mL)與吡啶(12mL)的混合溶液加入 2-巰基苯並噻唑(4.8g、29mmol)，在室溫將溴(1.7mL、33mmol)的乙腈(20mL)溶液經 38 分鐘滴入，在室溫進行 4 小時 30 分鐘攪拌。加入甲醇(30g)、水(5g)，進行 17 分鐘攪拌，過濾析出之固體後得到目的物(6.8g)之淡粉紅色固

體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 7.27-7.38(m、1H)、
7.40-7.48(m、1H)、7.69-7.77(m、1H)、7.82-7.94(m、
3H)、7.99-8.62(m、2H)。

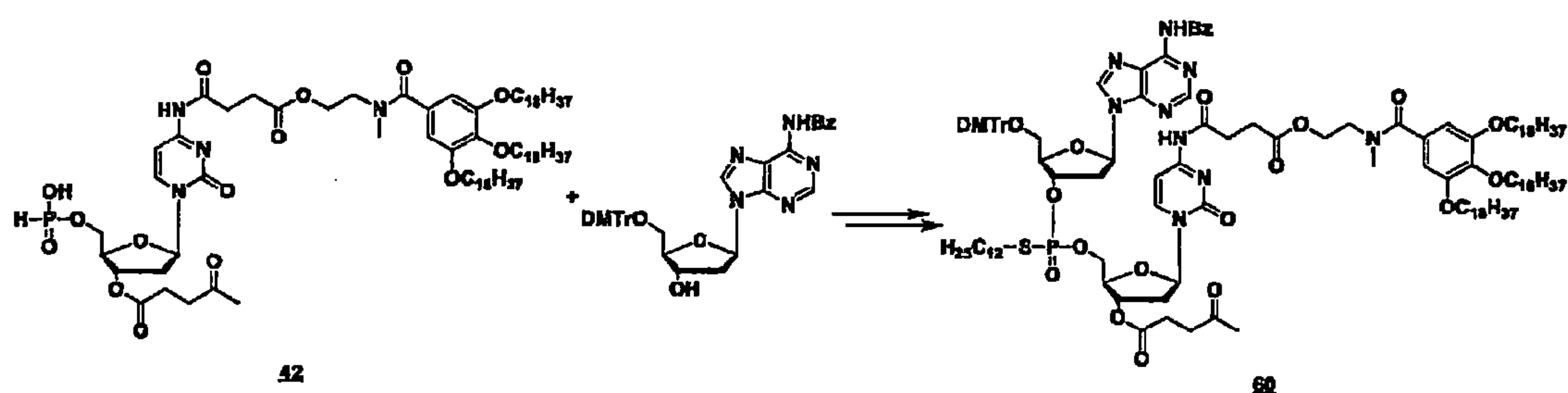
$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 313.0090。

[0469]

實施例 59(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 60 之合成

[0470]

【化 98】



[0471] 與實施例 52 同樣條件下，將硫化劑變更為 N-(十二烷基硫)鄰苯二甲醯亞胺(4.0mg)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 60。

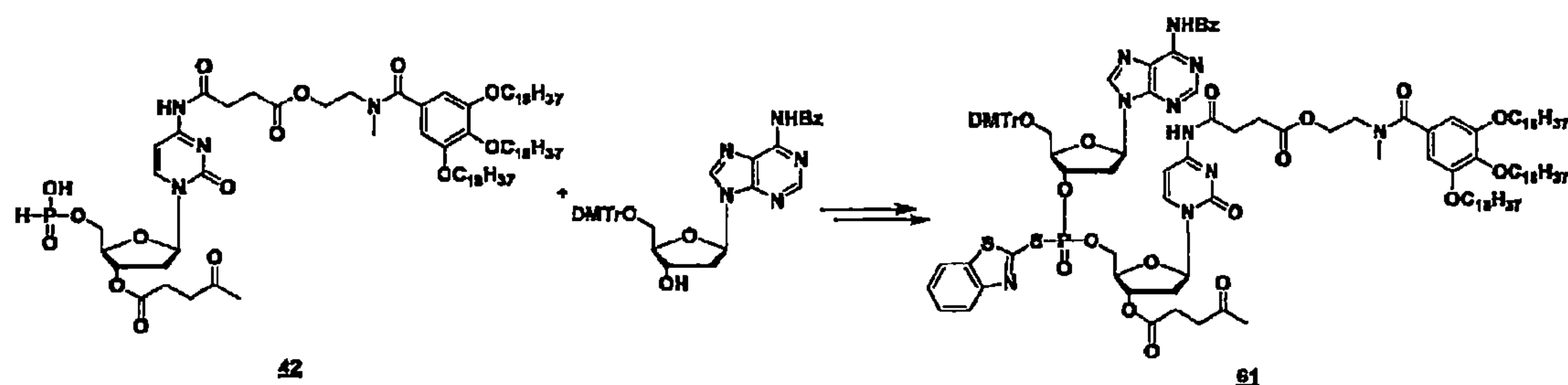
$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2295.4570。

[0472]

實施例 60(硫化劑檢討 2mer 合成)：化合物 61 之合成

[0473]

【化 9 9】



[0474] 與實施例 52 同樣條件下，將硫化劑變更為 N-[(2-苯並[d]噻唑基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(4.8mg)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 61。

MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 2277.2747。

[0475]

實施例 61(縮合劑檢討 2mer 合成)：化合物 55 之合成

[0476] 與實施例 53 同樣條件下，將縮合劑變更為乙酸五氟苯酯(7.1mg)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 55 作為主生成物者。

[0477]

實施例 62(縮合劑檢討 2mer 合成)：化合物 55 之合成

[0478] 與實施例 53 同樣條件下，將縮合劑變更為氯磷酸二苯基(4.2μL)實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，化合物 55 作為主生成物者。

[0479]

實施例 63(縮合劑檢討 2mer 合成)：化合物 55 之合成

[0480] 與實施例 52 之同樣條件下，將縮合劑變更為

氯磷酸雙(2-氯苯基)(4.6 μ L)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 55 作為主生成物者。

[0481]

實施例 64(縮合劑檢討 2mer 合成)：化合物 55 之合成

[0482] 與實施例 53 同樣條件下，將縮合劑變更為氯磷酸雙(2、4-二氯苯基)(10.7mg)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 55 作為主生成物者。

[0483]

實施例 65(縮合劑檢討 2mer 合成)：化合物 55 之合成

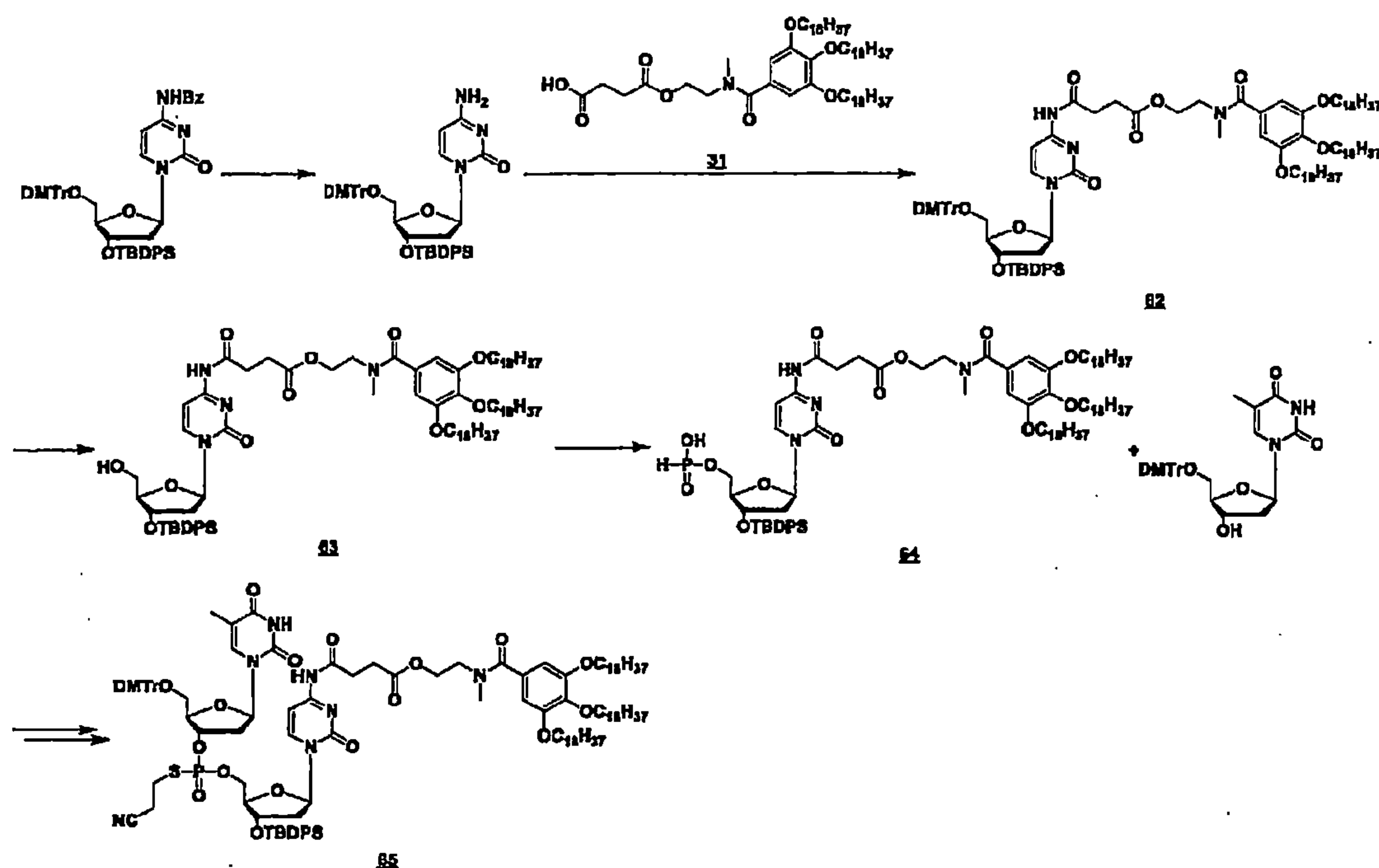
[0484] 與實施例 53 同樣條件下，將縮合劑變更為氯磷酸雙(2、6-二甲基苯基)(7.1mg)並實施反應，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮，得到化合物 55 作為主生成物者。

[0485]

實施例 66(在 3'位 TBDPS 基之 2mer 合成)：化合物 65 之合成

[0486]

【化 1 0 0】



[0487] 步驟 1 3'-O-(tert-丁基二苯基矽基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷之合成

在氮氣環境下，於 N⁴-苯甲醯基-3'-O-(tert-丁基二苯基矽基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷(依據 Biochemistry、2004 年、43 卷、6167-6181 頁所記載的方法進行合成)(6.5g、6.8mmol)的甲醇(301g)溶液，在室溫加入 40%甲基胺水溶液(5.8mL、69mmol)，進行 23 小時 26 分鐘攪拌。將反應混合物在減壓下濃縮後以矽膠層析法(氯仿-甲醇)進行純化後得到目的物(5.1g，產率 98%)之泡狀固體。

¹H-NMR：(300MHz；CDCl₃)δ1.00(s、9H)、1.95-1.97(m、1H)、2.51-2.59(m、1H)、3.02-3.07(m、1H)、3.25-3.30(m、1H)、3.77(s、6H)、4.44-4.49(m、1H)、

5.22(d、1H)、6.35(t、1H)、6.71-6.75(m、4H)、7.08-7.41(m、16H)、7.53-7.59(m、4H)、7.77(d、1H)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 768.3391。

[0488]

步驟 2 化合物 62 之合成

在氮氣環境下，於 3'-O-(tert-丁基二苯基矽基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷(2.5g、3.2mmol)與化合物 31(2.2g、2.0mmol)的二氯甲烷(70mL)及吡啶(14mL)的混合溶液，在 40℃ 加入 HOBt(無水)(0.35g、2.6mmol)，繼續加入 WSC·HCl(0.92g、4.8mmol)並進行 2 小時 26 分鐘攪拌。將反應混合物中之不溶物藉由過濾除去，在減壓下濃縮後加入甲醇(250g)並析出固體後過濾，得到化合物 62(3.5g)的白色固體。

¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃)δ0.88(s、9H)、1.01(s、9H)、1.26-1.81(m、96H)、1.91-1.99(m、1H)、2.68-2.71(m、5H)、3.04-3.08(m、4H)、3.25-3.29(m、1H)、3.77(brs、8H)、3.95(t、6H)、4.13-4.46(m、4H)、6.30(t、1H)、6.56(s、2H)、6.72-6.75(m、4H)、6.91(d、1H)、7.08-7.42(m、15H)、7.53-7.59(m、4H)、8.05(d、1H)、8.92(brs、1H)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1834.2754。

[0489]

步驟 3 化合物 63 之合成

在氮氣環境下，於化合物 62(3.5g、1.9mmol)的二氯

甲烷 (35g) 溶液在室溫加入吡咯 (0.39mL、5.7mmol)，在 10℃ 加入二氯乙酸 (1.6mL、19mmol)，進行 1 小時 53 分鐘攪拌。加入吡啶 (0.77mL、9.5mmol)，將反應混合物加入於甲醇 (351g)，並將析出的固體過濾後得到化合物 63 (2.8g) 的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(s、9H)、1.08(s、9H)、1.26-1.82(m、96H)、2.16-2.25(m、1H)、2.51-2.59(m、1H)、2.69-2.75(m、4H)、3.04(s、3H)、3.19-3.24(m、1H)、3.61-3.65(m、3H)、3.92-4.43(m、10H)、6.21(t、1H)、6.57(s、2H)、7.21(d、1H)、7.35-7.45(m、6H)、7.60-7.66(m、4H)、8.03(d、1H)、9.02(brs、1H)。

$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1532.1383。

[0490]

步驟 4 化合物 64 之合成

在氮氣環境下，於亞磷酸 (0.39g、4.7mmol) 的吡啶 (14mL) 溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.41mL、3.0mmol)，進行 30 分鐘攪拌。於該溶液中在 30℃ 下加入化合物 63 (0.70g、0.46mmol)，並在 30℃ 進行 46 分鐘攪拌。其後，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (0.38mL、2.7mmol)，進行 58 分鐘攪拌。將反應混合物加入於乙腈 (200g) 並將析出的固體過濾後得到化合物 64 (0.70g) 的白色固體。

$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1596.1098。

[0491]

步驟 5 化合物 65 之合成

在氮氣環境下，於化合物 64(0.70g)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(0.37g、0.68mmol)的吡啶(20mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(0.57g、1.4mmol)，進行 24 分鐘攪拌。其後加入 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(0.17g、0.71mmol)，進行 16 小時 54 分鐘攪拌。將反應混合物加入於甲醇(200g)後過濾析出的固體，得到化合物 65(0.88g)。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(s、9H)、1.07(s、9H)、1.25-2.01(m、97H)、2.33-2.93(m、10H)、3.04(s、3H)、3.32-4.34(m、24H)、5.08-5.18(m、1H)、6.25-6.36(m、2H)、6.58(s、2H)、6.82-6.85(m、4H)、7.22-7.65(m、21H)、7.79-7.85(m、1H)、8.96(brs、1H)、9.28(brs、1H)。

$^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 27.08、27.20。

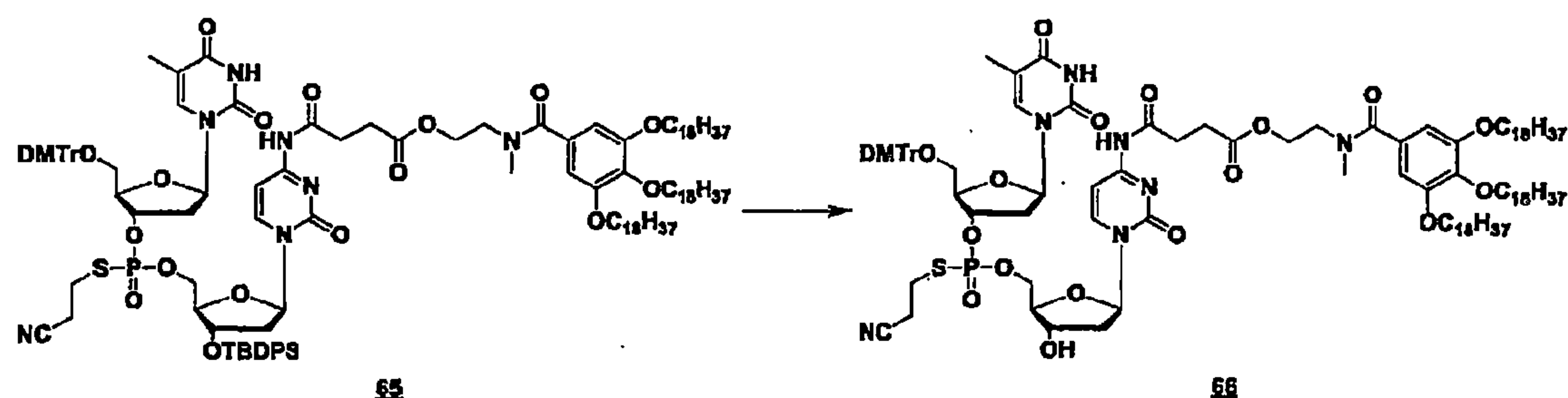
MS(ESI $^+$) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2207.3152。

[0492]

實施例 67(3'位 TBDPS 基的脫保護)：化合物 66 之合成

[0493]

【化 101】



[0494] 在氮氣環境下，於化合物 65(10mg)的二氯甲烷 (0.20mL) 溶液，在室溫加入氟化氫 - 吡啶 (1.3 μ L、0.045mmol)，進行 3 小時 45 分鐘攪拌。將反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 66。

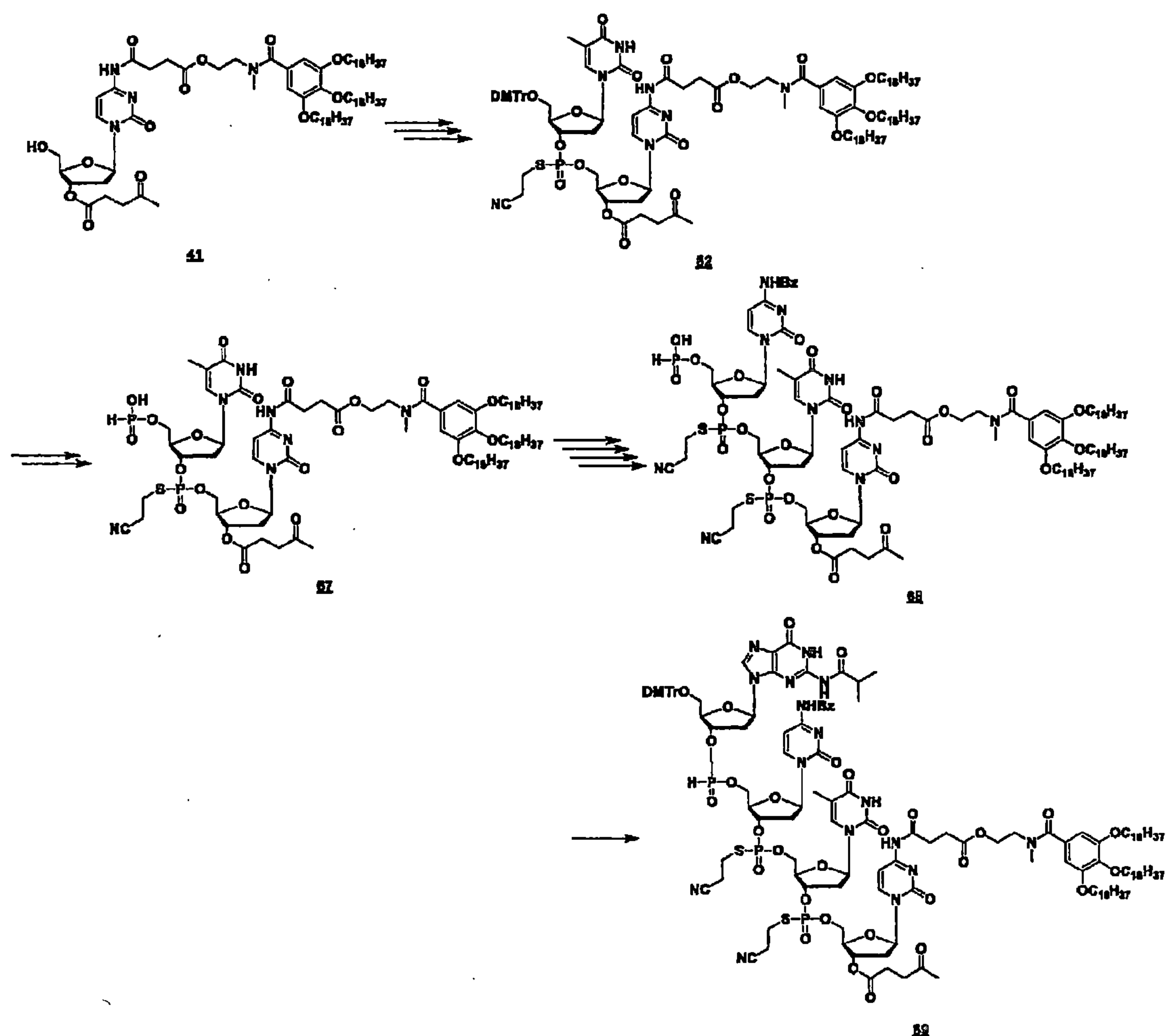
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 1969.2010。

[0495]

實施例 68(4mer 合成)：化合物 69 之合成

[0496]

【化 102】



[0497]

步驟 1 化合物 67 之合成

在氮氣環境下，於化合物 42(1.5g)的吡啶(20mL)溶液中加入 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(0.34g、0.62mmol)、碳酸雙五氟苯酯(0.74g、1.9mmol)，進行 22 分鐘攪拌。其後加入 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(0.19g、0.81mmol)，進行 15 小時 29 分鐘攪拌，得到含有化合物 82 之反應溶液。其後，加入亞磷酸三乙酯(90 μ L、0.52mmol)、水(0.28mL、16mmol)並在 25 $^{\circ}$ C 下攪拌 1 小時攪拌，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯(25g)在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(20mL)，將吡咯(0.11mL、1.6mmol)、磷酸(1.0g、13mmol)在 10 $^{\circ}$ C 下加入，進行 1 小時 15 分鐘攪拌。加入吡啶(3.0mL)後，在室溫下將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.96mL、7.0mmol)分 4 分並隔 10 分鐘加入，進行 33 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.48mL、3.5mmol)再進行 35 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(200g)並將析出之固體經過濾後得到化合物 67(1.9g)的白色固體。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1829.0819。

[0498]

步驟 2 化合物 68 之合成

與步驟 1 同樣條件下，取代化合物 42 使用化合物 67，取代 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷使用 N⁴-苯甲

醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷(東京化成工業公司製)(0.60g)而實施反應後，得到化合物 68(0.97g)的白色固體。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2291.1664。

[0499]

步驟 3 化合物 69 之合成

在氮氣環境下，於化合物 68(0.96g)與 N²-異丁醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(東京化成工業公司製)(0.51g、0.80mmol)的吡啶(20mL)溶液中，在 25℃ 加入碳酸雙五氟苯酯(0.65g、1.7mmol)，進行 10 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 69。

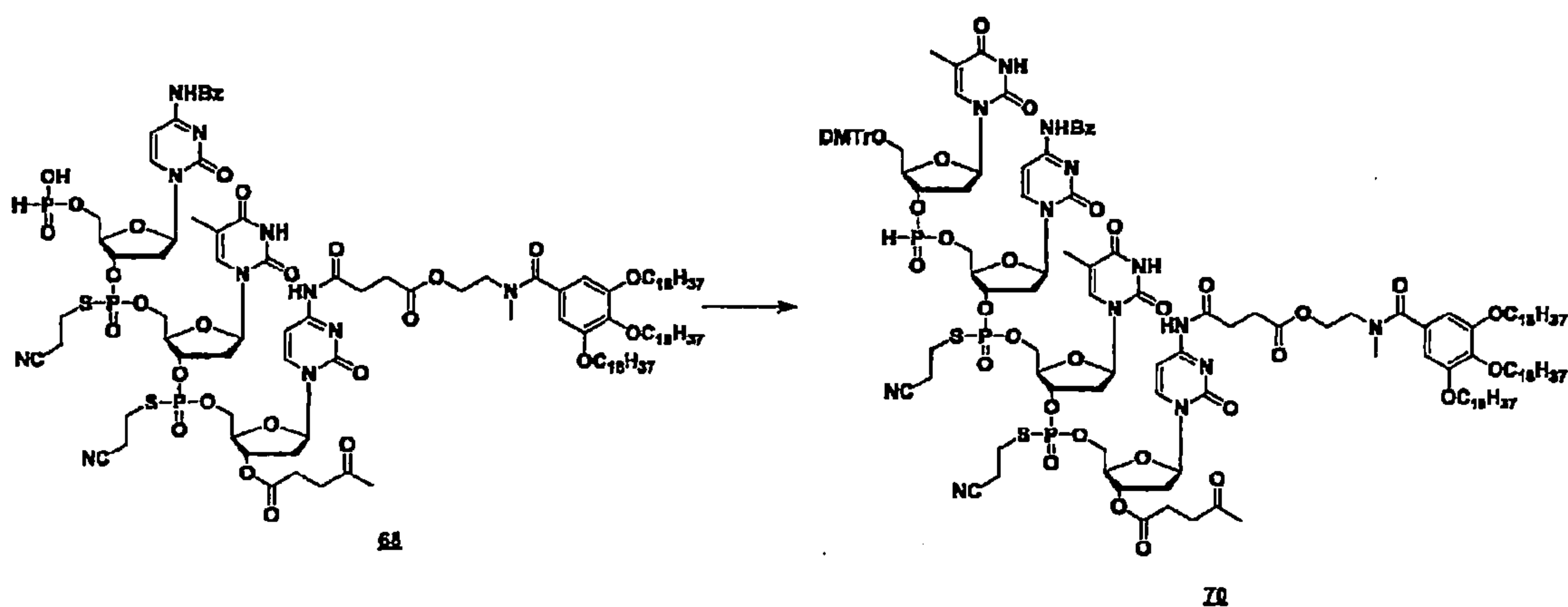
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2912.4312。

[0500]

實施例 69(4mer 合成): 化合物 70 之合成

[0501]

[化 103]



[0502] 與實施例 68 之步驟 1 同樣條件下，取代化合

物 42 使用化合物 68 並實施反應後，得到化合物 70。

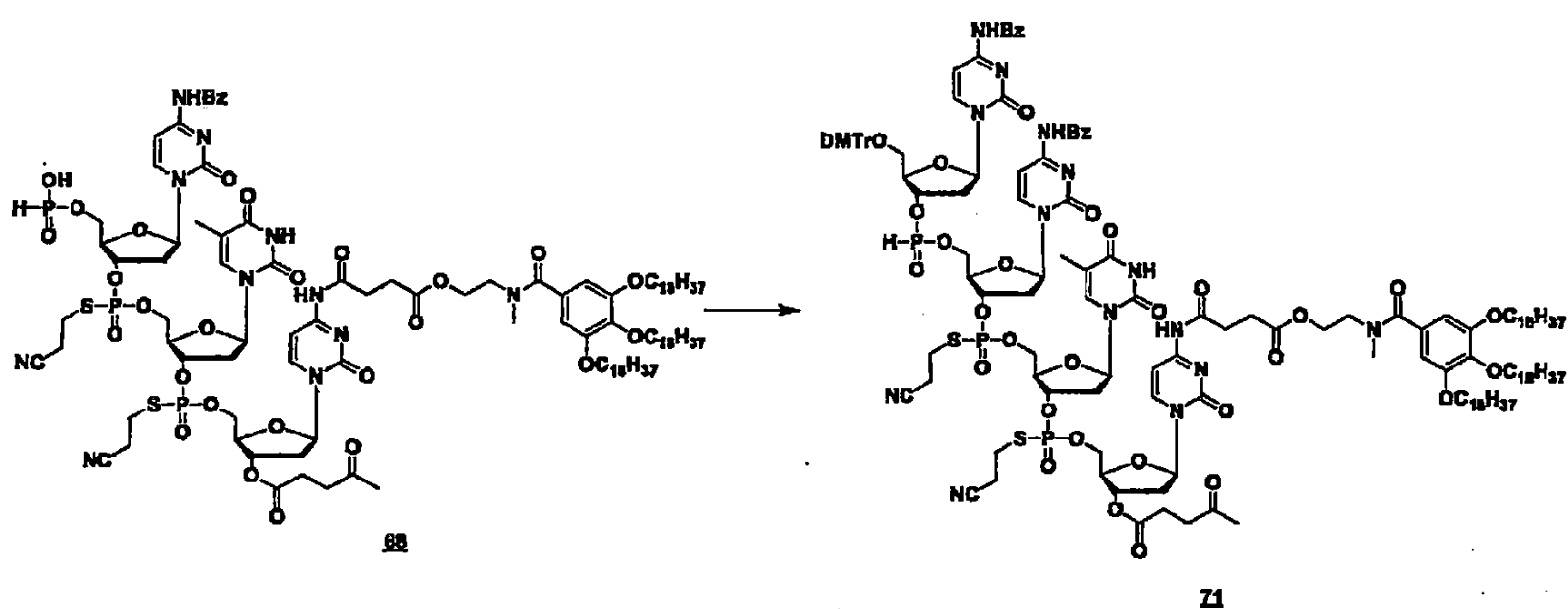
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 2817.3753。

[0503]

實施例 70(4mer 合成) : 化合物 71 之合成

[0504]

【化 104】



[0505] 與實施例 68 之步驟 1 同樣條件下，取代化合物 42 使用化合物 68，取代 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷使用 N⁴-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷(東京化成工業公司製)(5.4mg)並實施反應後，得到化合物 71。

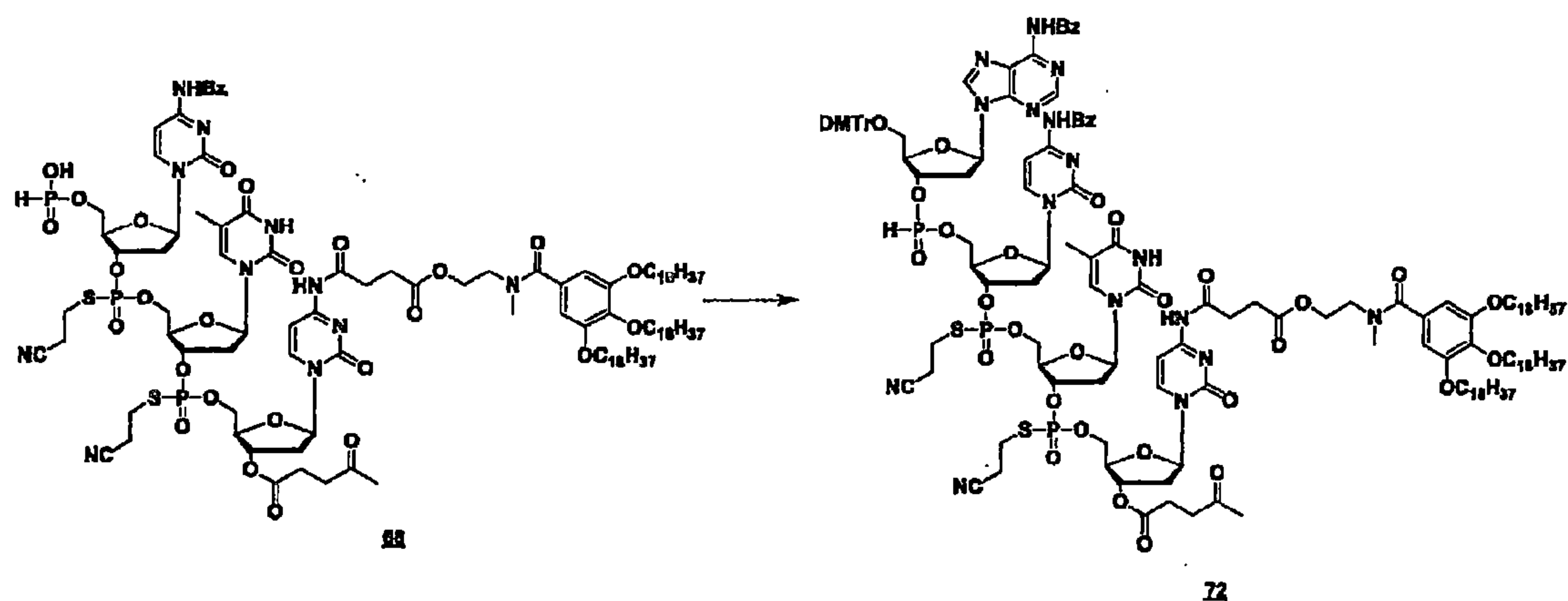
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 2906.4242。

[0506]

實施例 71(4mer 合成) : 化合物 72 之合成

[0507]

【化 1 0 5】



[0508] 與實施例 68 之步驟 1 同樣條件下，取代化合物 42 使用化合物 68，取代 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-胸苷使用 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷(東京化成工業公司製)(4.9mg)並實施反應後，得到化合物 72。

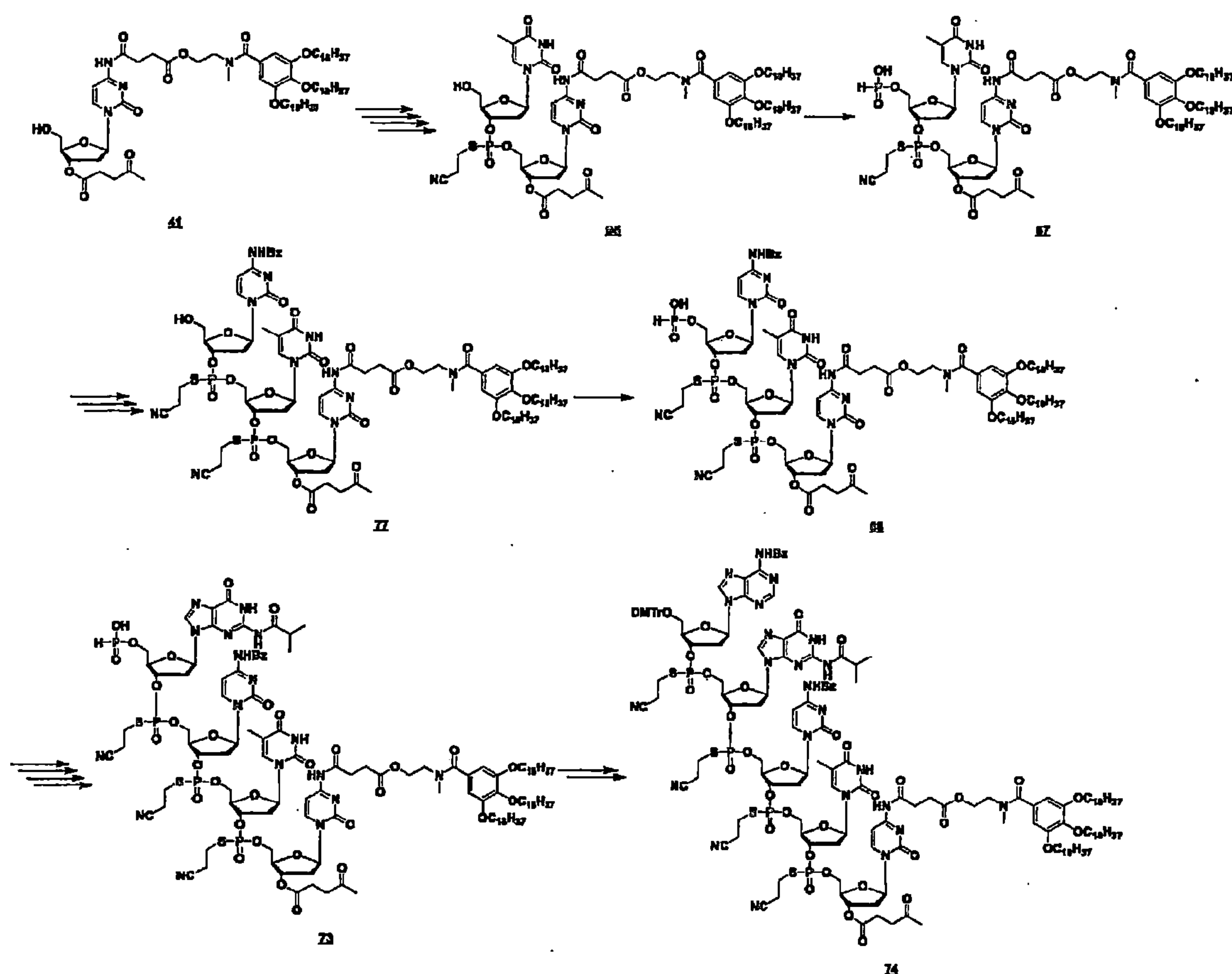
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2930.4184。

[0509]

實施例 72(5mer 合成): 化合物 74 之合成

[0510]

【化106】



[0511]

步驟 1 化合物 67 之合成

在氮氣環境下，於化合物 42(1.2g)的吡啶(20mL)溶液加入 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(東京化成工業公司製)(0.44g、0.80mmol)、碳酸雙五氟苯酯(0.67g、1.7mmol)，進行 23 分鐘攪拌。其後 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(0.19g、0.83mmol)，進行 1 小時 32 分鐘攪拌。其後，加入亞磷酸三乙酯(90 μ L、0.52mmol)、水(0.28mL、16mmol)，在 25 $^{\circ}$ C 進行 50 分鐘攪拌，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯(25g)並在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(20mL)，將吡咯(0.11mL、

1.6mmol)、二氯乙酸(0.43mL、5.3mmol)在 10℃ 下加入，進行 2 小時 27 分鐘攪拌。加入吡啶(3.0mL)後升溫至室溫，將反應混合物加入於乙腈(200g)，並將析出的固體過濾，得到化合物 95(0.72g)之淡皮膚色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.25-1.89(m、99H)、2.20(s、3H)、2.21-2.89(m、13H)、3.06-3.20(m、5H)、3.21-3.98(m、11H)、4.19-4.4.44(m、6H)、5.32-5.34(m、2H)、6.10-6.23(m、2H)、6.58(s、2H)、7.41(t、1H)、7.51(d、1H)、7.95-8.08(m、1H)、8.70-9.60(m、2H)。 $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 27.55、27.94。

$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1765.1162. 在氮氣環境下，於所得之化合物 95(0.72g)的二氯甲烷(15mL)與吡啶(2.3mL)的混合溶液中，在室溫加入膦酸(0.56g、6.8mmol)，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.56mL、4.1mmol)分為 4 分，並隔 10 分鐘加入進行 31 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.42mL、3.1mmol)後在進行 23 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(203g)並將析出的固體過濾後得到化合物 67(0.72g)的白色固體。

[0512]

步驟 2 化合物 68 之合成

在氮氣環境下，於化合物 67(0.72g)的吡啶(19mL)溶液加入 N^4 -苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷(東京化成工業公司製)(0.49g、0.77mmol)、碳酸雙

五氟苯酯(0.60g、1.5mmol)，進行 22 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑加入 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(0.18g、0.76mmol)，進行 1 小時 10 分鐘攪拌。其後，將反應混合物分為 2 分，一方在減壓下濃縮。加入甲苯(10g)後減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(10mL)，將吡咯(51 μ L、0.74mmol)、二氯乙酸(0.20mL、2.4mmol)在 10℃下加入，進行 2 小時 10 分鐘攪拌。加入吡啶(1.2mL)後升溫至室溫，將反應混合物在分為 2 分，將一方加入於乙腈(50g)並將析出的固體進行析出過濾後得到化合物 77(0.18g)之淡皮膚色固體。

在氮氣環境下，於所得之化合物 77(0.18g)的二氯甲烷(3.0mL)與吡啶(0.50mL)的混合溶液中，在室溫下加入膦酸(0.12g、1.5mmol)，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.13mL、0.96mmol)分為 4 分，隔 10 分鐘加入，並進行 57 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(33 μ L、0.24mmol)再進行 40 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(51g)並將析出的固體過濾後得到化合物 68(0.15g)的白色固體。

[0513]

步驟 3 化合物 73 之合成

與步驟 2 同樣條件下，取代化合物 67 使用化合物 68，取代 N⁴-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷使用 N²-異丁醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(東京化成工業公司製)(86mg)，實

施反應後，得到化合物 73(0.12g)的白色固體。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2759.2472。

[0514]

步驟 4 化合物 74 之合成

與步驟 2 同樣條件下，取代化合物 67 使用化合物 73，取代 N⁴-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷使用 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷(東京化成工業公司製)(66mg)，並實施反應。將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 74 作為主生成物者。

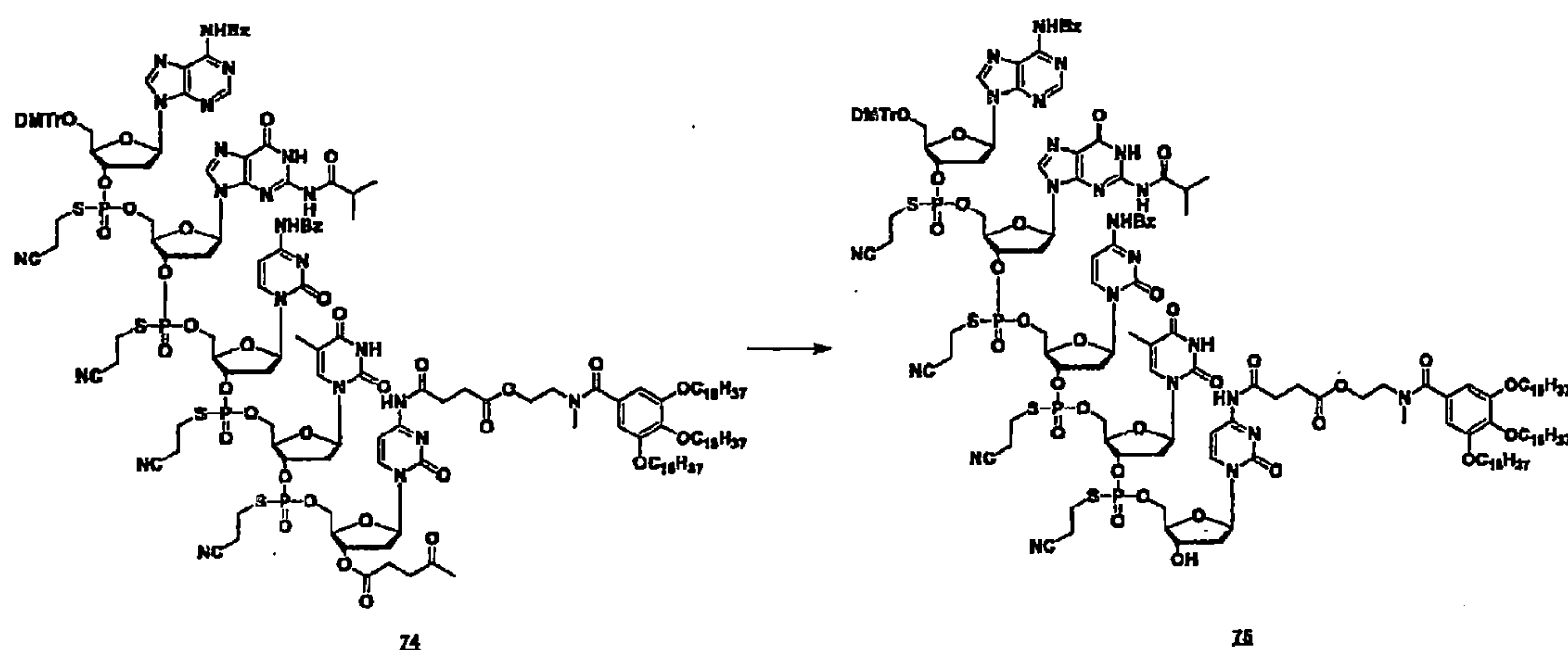
MS(ESI⁺): [M+2H]²⁺ 1742.2655。

[0515]

實施例 73(3'位乙醯丙醯基的脫保護): 化合物 75 之合成

[0516]

【化 107】



[0517] 將在實施例 72 的步驟 4 所得之硫化後反應混合物的一半冷卻於 0℃，加入胼 1 水合物(4.4μL、

0.091mmol)並進行 3 小時 40 分鐘攪拌。再加入胼 1 水合物(2.2 μ L、0.045mmol)並進行 1 小時 7 分鐘攪拌，加入乙醯丙酮(50 μ L)。其後，將反應混合物加入於乙腈(25g)並將析出的固體過濾後得到化合物 75。

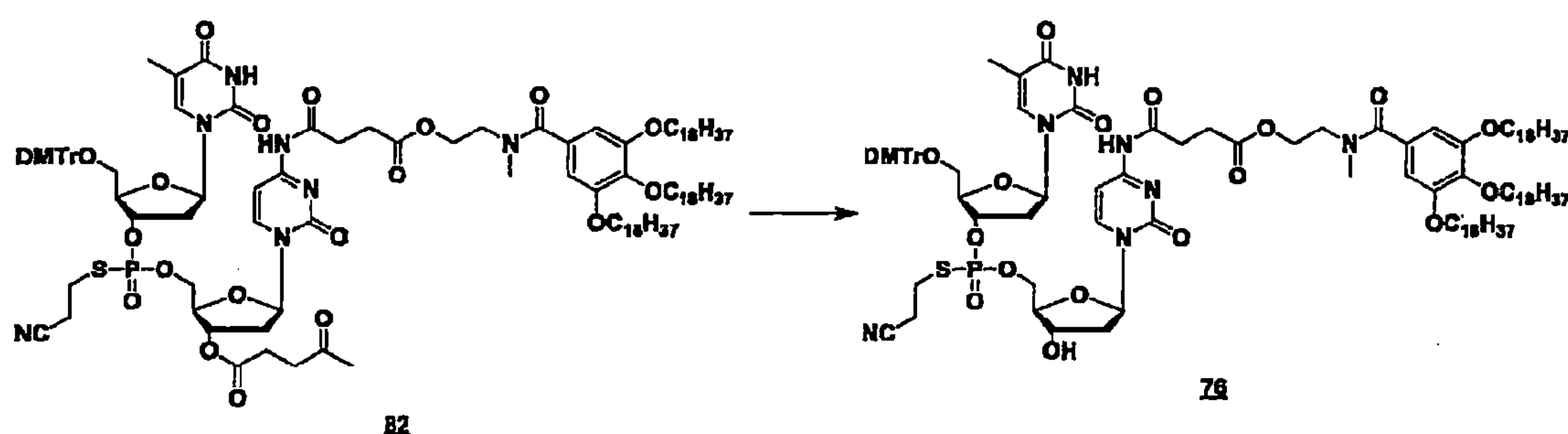
MS(ESI⁺) : [M+2H]²⁺ 1693.2314。

[0518]

實施例 74(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 76 之合成

[0519]

【化 108】



[0520] 在實施例 68 的步驟 1 所得之含有化合物 82 之硫化後反應混合物的 0.5 重量%中，在室溫加入胼 1 水合物(1.3 μ L)並進行 4 小時攪拌。將反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 76。

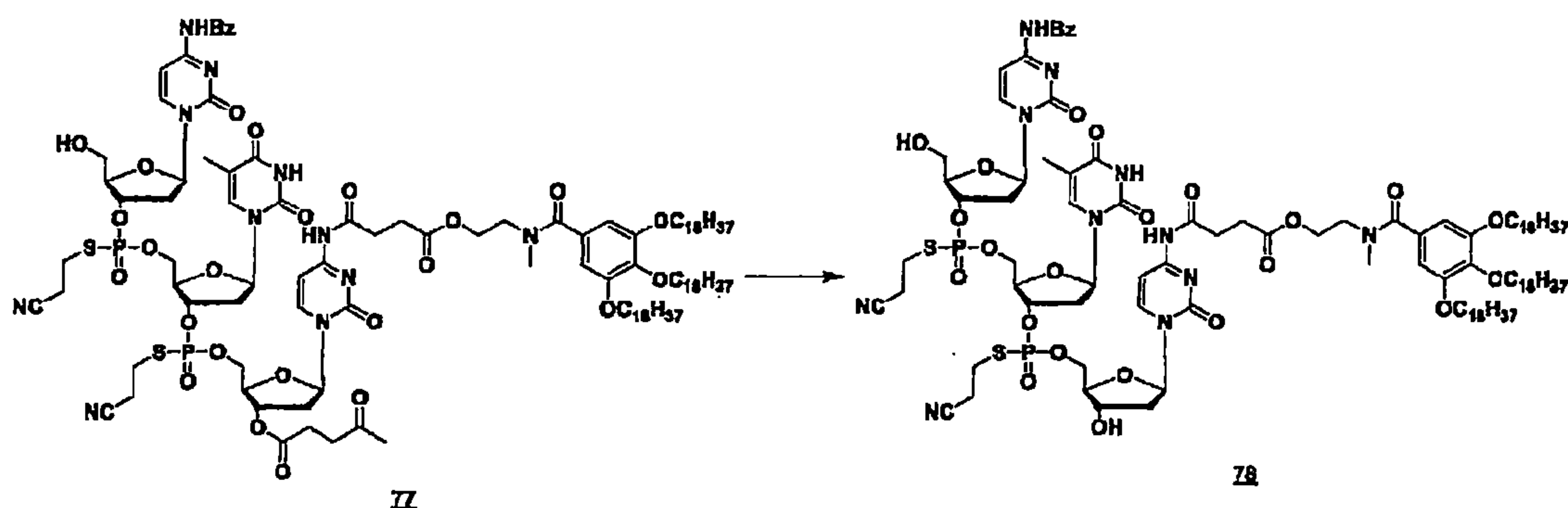
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 1969.2134。

[0521]

實施例 75(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

[0522]

【化 1 0 9】



[0523] 在氮氣環境下，將化合物 77(99mg、45 μ mol)的二氯甲烷(2.0mL)與乙酸(0.40mL)的混合溶液冷卻至0℃，加入胼 1 水合物(5.2 μ L、0.11mmol)並進行 10 小時 28 分鐘攪拌。將反應混合物在減壓下濃縮後，加入甲醇(30g)並將析出的固體經過濾後得到化合物 78(70mg)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2129.1466。

[0524]

實施例 76(硫化劑檢討 2mer 合成): 化合物 82 之合成

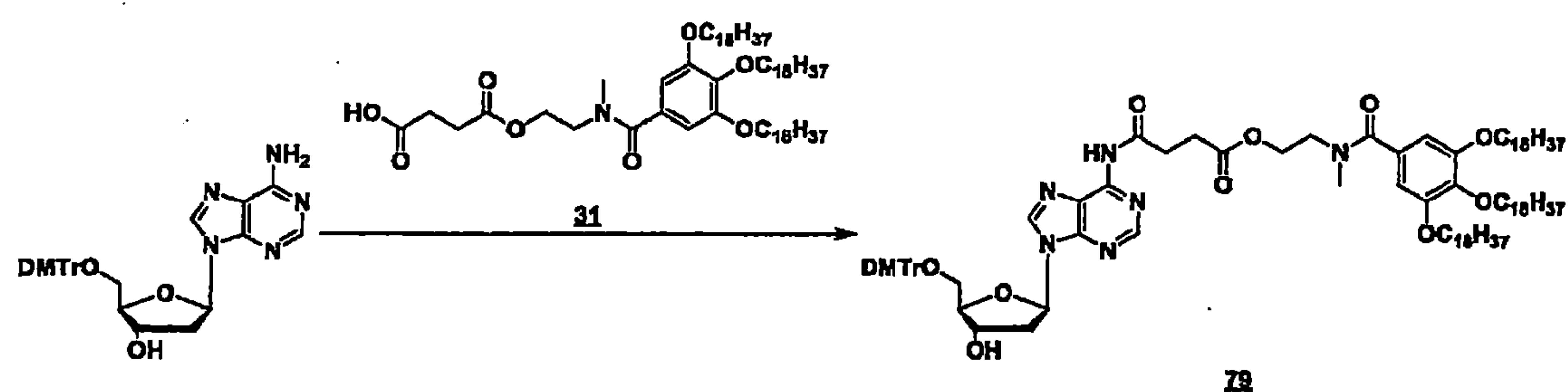
[0525] 與實施例 68 的步驟 2 同樣條件下，將硫化劑變更為 N-[(2-氰基乙基)硫代]琥珀酸鹽亞胺(Journal of Chemistry Society Perkin Transaction 1、2002 年、2619-2633 頁所記載的方法進行合成)(13.7mg)並實施，將硫化後的反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 82。

[0526]

實施例 77(對腺嘌呤之擬似固相保護基導入): 化合物 79 之合成

[0527]

【化 1 1 0】



[0528] 在氮氣環境下，於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷(東京化成工業公司製)(41mg、0.075mmol)與化合物 31(53mg、0.049mmol)的二氯甲烷(1.5mL)及吡啶(0.30mL)的混合溶液中，在 40℃ 加入 HOBt(無水)(7.0mg、0.052mmol)，繼續加入 WSC·HCl(17.7mg、0.092mmol)並進行 5 小時攪拌。將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 79。

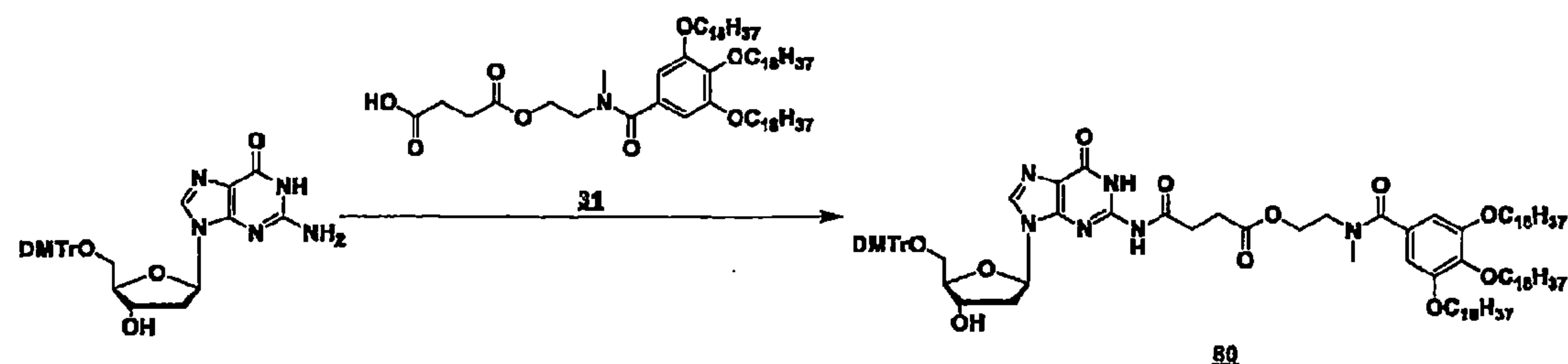
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1620.1583。

[0529]

實施例 78(對鳥嘌呤之擬似固相保護基導入): 化合物 80 之合成

[0530]

【化 1 1 1】



[0531] 在氮氣環境下，於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(東京化成工業公司製)(43mg、0.075mmol)與化合物 31(50mg、0.046mmol)的二氯甲烷(1.5mL)及吡啶(0.30mL)的混合溶液中，在 40℃ 加入 HOBt(無水)(7.2mg、0.053mmol)，繼續加入 WSC·HCl(18.4mg、0.096mmol)，進行約 1 星期攪拌。將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 80。

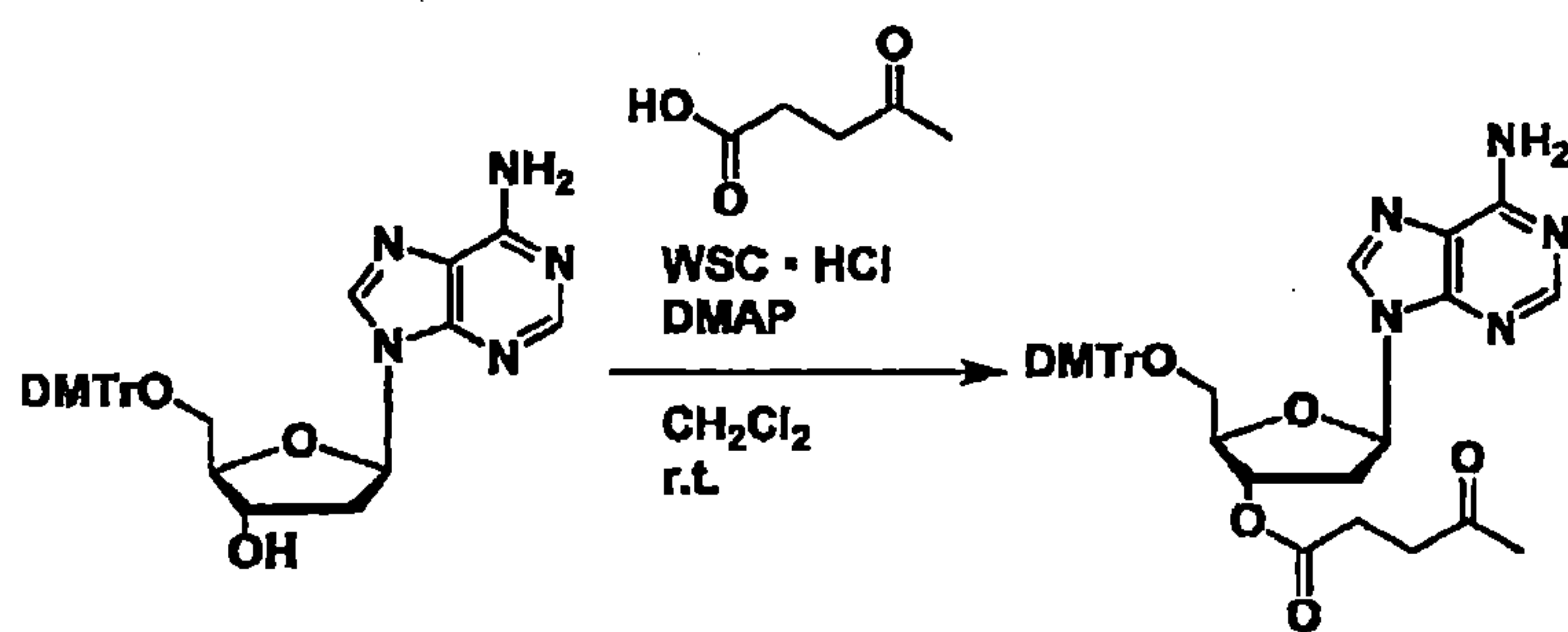
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1636.1879。

[0532]

參考合成例 5(腺苷 3'位乙醯丙醯基化): 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧腺苷之合成

[0533]

【化 1 1 2】



[0534] 在氮氣環境下，於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷(Chem-Impex 公司製)(2.6g、4.6mmol)、DMAP(58mg、0.48mmol)及乙醯丙酸(0.80g、6.9mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液，在室溫加入 WSC·HCl(1.3g、6.8mmol)，進行 3 小時 55 分鐘攪拌。加入乙酸(0.45mL)及三乙基胺(0.78mL)的水(20g)溶液並進行 5 分

鐘攪拌並經分液。於所得之有機層中加入水(20g)並進行 3 分鐘攪拌，並經分液。將所得之有機層的溶劑在減壓下餾去後，以矽膠層析法(氯仿-甲醇)進行純化後得到 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧腺苷(2.8g，產率 93%)之淡黃色泡狀固體。

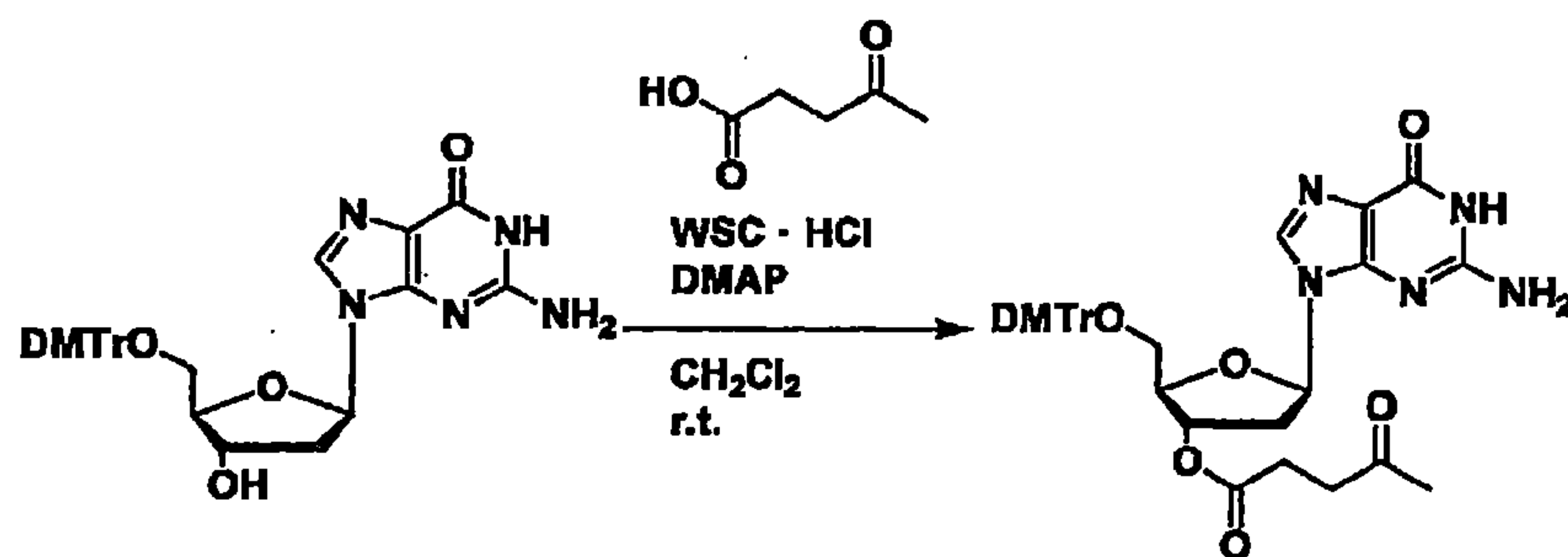
$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 2.21(s、3H)、2.58-2.66(m、3H)、2.76-2.81(m、2H)、2.90-3.00(m、1H)、3.42(d、2H)、3.78(s、6H)、4.29(s、1H)、5.51(d、1H)、5.96(s、2H)、6.43-6.48(m、1H)、6.80(d、4H)、7.18-7.44(m、9H)、7.97(s、1H)、8.28(s、1H)。MS(ESI^+) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 652.2741。

[0535]

參考合成例 6(鳥嘌呤核苷 3'位乙醯丙醯基化)：5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧鳥嘌呤核苷之合成

[0536]

【化 1 1 3】



[0537] 在氮氣環境下，於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷 (Chem-Impex 公司製)(1.5g、

2.6mmol)、DMAP(39mg、0.32mmol)及乙醯丙酸(0.63g、5.4mmol)的二氯甲烷(60mL)溶液，在室溫加入WSC·HCl(1.0g、5.4mmol)，進行27小時44分鐘攪拌。加入乙酸(0.26mL)及三乙基胺(0.46mL)的水(20g)溶液並進行23分鐘攪拌並分液。於所得之有機層中加入水(21g)並進行8分鐘攪拌，經分液。將所得之有機層經溶劑減壓下餾去，得到5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(1.8g)之淡黃色固體。

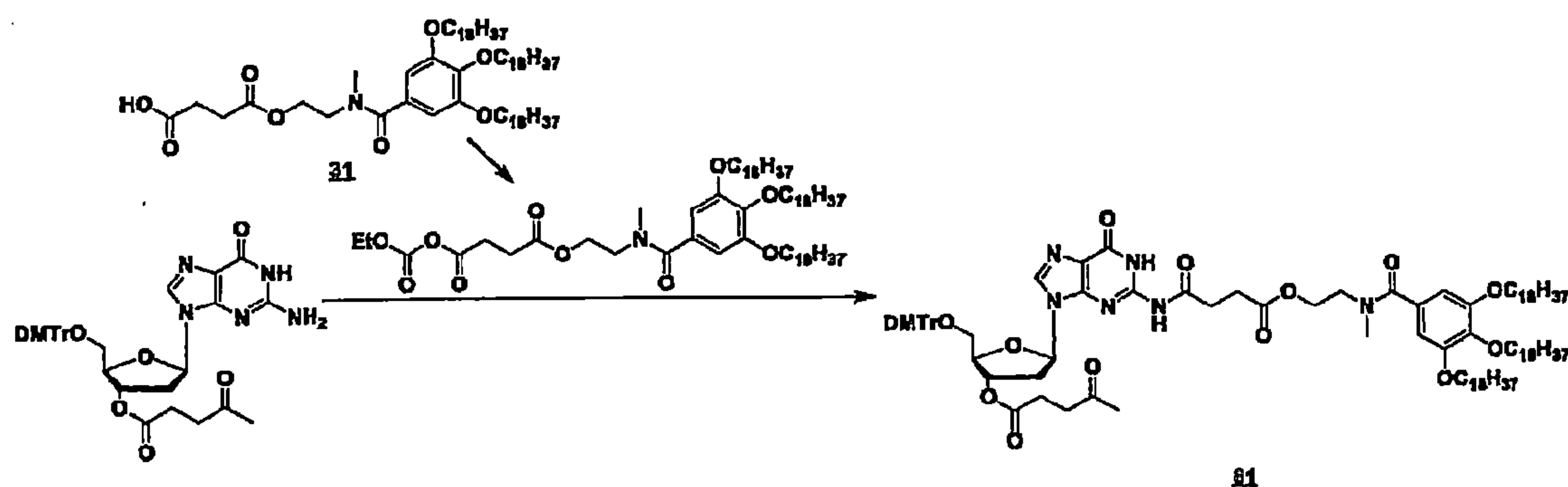
$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 2.20(s、3H)、2.49-2.94(m、6H)、3.39(s、2H)、3.77(d、6H)、4.24(s、1H)、5.52(d、1H)、6.07(s、2H)、6.19-6.24(m、1H)、6.80(d、4H)、7.19-7.40(m、9H)、7.63(s、1H)、11.97(brs、1H)。
 $\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 668.2715。

[0538]

實施例 79(對鳥嘌呤之擬似固相保護基導入)：化合物 81之合成

[0539]

【化114】



[0540] 在氮氣環境下，於化合物 31(8.9mg、8.2 μ mol)的二氯甲烷(1.0mL)溶液，在室溫加入氯甲酸乙酯(1.3 μ L、0.014mmol)，繼續加入三乙基胺(1.9 μ L、0.014mmol)並進行 1 小時 57 分鐘攪拌。進一步加入氯甲酸乙酯(1.3 μ L、0.014mmol)、三乙基胺(1.9 μ L、0.014mmol)後進行 36 分鐘攪拌。其後，將 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(10.5mg、0.016mmol)在室溫下加入並進行 59 分鐘攪拌後，將三乙基胺(0.10mL、0.72mmol)在室溫下加入，升溫至 40℃ 後進行 3 小時 3 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 81。

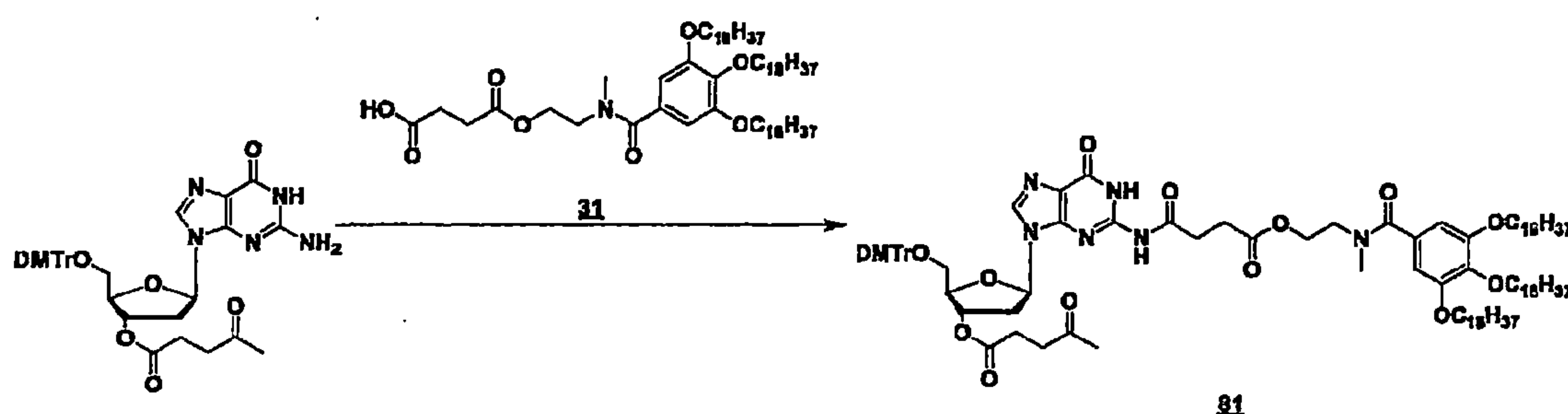
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1734.1983。

[0541]

實施例 80(對鳥嘌呤之擬似固相保護基導入): 化合物 81 之合成

[0542]

【化 1 1 5】



[0543] 在氮氣環境下，於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(0.94g、

1.4mmol) 與 化 合 物 31(1.0g、0.93mmol) 的 二 氯 甲 烷 (100mL) 溶 液 中，在 40℃ 以 二 異 丙 基 乙 基 胺 (0.78mL、4.6mmol)、DMAP(0.57g、4.7mmol)、WSC·HCl(0.89g、4.6mmol) 的 順 序 加 入，進 行 3 小 時 21 分 鐘 攪 拌。將 反 應 混 合 物 在 減 壓 下 濃 縮，加 入 甲 醇 (100g) 後 將 析 出 的 固 體 過 濾，得 到 化 合 物 81 之 粗 物 (1.5g)。將 粗 物 以 矽 膠 層 析 法 (氯 仿-甲 醇) 進 行 純 化 後 得 到 化 合 物 81 (47mg)。

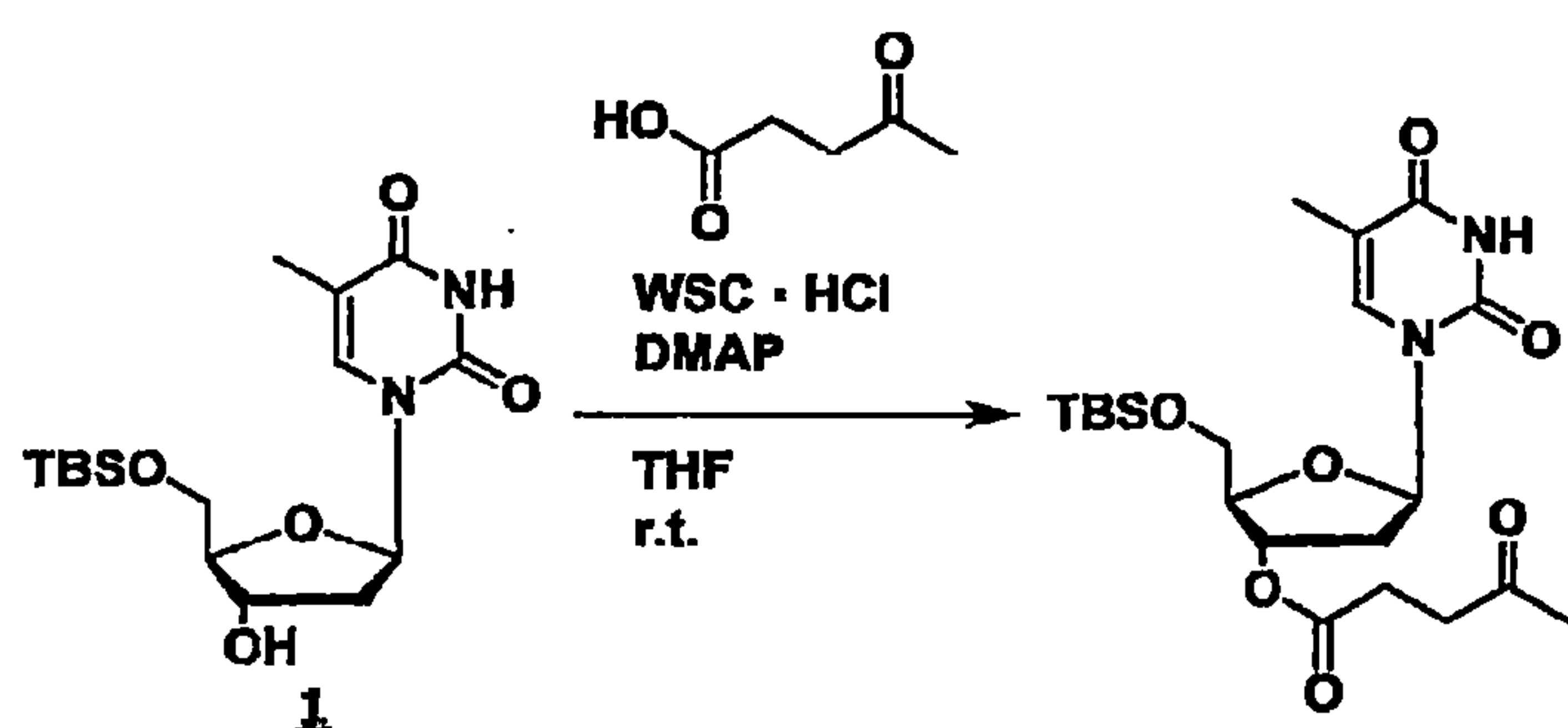
$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.26-1.81(m、96H)、2.19(s、3H)、2.20-2.60(m、7H)、2.75-2.80(m、2H)、2.94-3.06(m、4H)、3.37(d、2H)、3.38-3.79(m、8H)、3.95(t、6H)、3.90-4.50(m、3H)、5.50(d、1H)、6.12-6.20(m、1H)、6.57(s、2H)、6.76-6.80(m、4H)、7.19-7.43(m、9H)、7.79(s、1H)、9.34(brs、1H)、11.89(brs、1H)。MS(ESI^+) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1734.1951。

[0544]

參 考 合 成 例 7 : 5'-O-(tert-丁 基 二 甲 基 矽 基)-3'-O-乙 醯 丙 醯 基 胸 苷 之 合 成

[0545]

【化 1 1 6】



[0546] 在氮氣環境下，於化合物 1(5.3g、15mmol)、DMAP(0.17g、1.4mmol)及乙醯丙酸(2.8g、24mmol)的THF(38g)溶液，在室溫加入 WSC·HCl(4.6g、24mmol)，進行 15 小時 13 分鐘攪拌。加入乙酸(1.5g、26mmol)及三乙基胺(2.6g、19mmol)的水(38g)溶液，進行 5 分鐘攪拌，加入乙酸乙酯(37g)後進行 14 分鐘攪拌並分液。將所得之有機層的溶劑經減壓下餾去後得到 5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-3'-O-乙醯丙醯基胸苷(6.9g)的淡橘色固體。

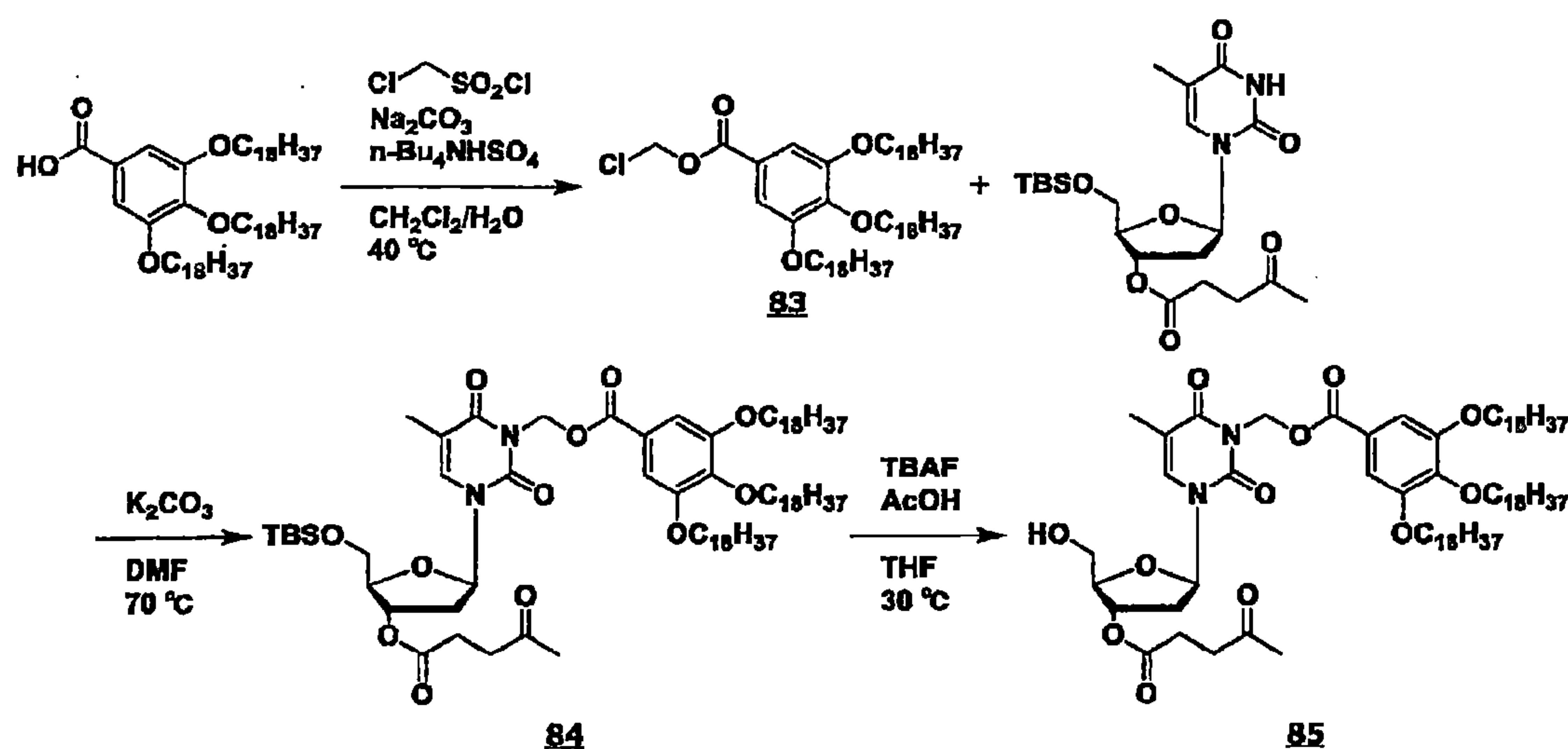
$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.13(s、6H)、0.93(s、9H)、1.92(d、3H)、2.05-2.15(m、1H)、2.21(s、3H)、2.39-2.45(m、1H)、2.58-2.62(m、2H)、2.76-2.81(m、2H)、3.90-3.91(m、2H)、4.099-4.103(m、1H)、5.26(d、1H)、6.37(q、1H)、7.55(d、1H)、9.34(brs、1H)。

[0547]

實施例 81(於胸腺嘧啶 3 位鍵結擬似固相保護基之核苷酸的合成)：化合物 85 之合成

[0548]

【化 1 1 7】



[0549]

步驟 1 化合物 83 之合成

在氮氣環境下，於 3,4,5-參(十八烷氧基)安息香酸(依據國際公開第 2014-077292 號所記載的方法進行合成)(3.0g、3.2mmol)、於碳酸鈉(1.1g、10mmol)、硫酸氫四-n-丁基銨(0.13g、0.38mmol)的二氯甲烷(71g)與水(30g)的混合溶液中，在室溫下加入氯甲磺酸氯化物(0.39mL、3.9mmol)，進行 2 小時 42 分鐘攪拌。再加入氯甲磺酸氯化物(60 μL 、0.60mmol)並進行 18 分鐘攪拌後，升溫至 40°C 後進行 10 分鐘攪拌。停止攪拌後分液，於所得之水層中加入二氯甲烷並萃取。合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去，加入乙腈(70g)並將析出的固體經過濾後得到化合物 83 之白色固體(3.16g)。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.86-0.90(m、9H)、1.26-1.84(m、96H)、3.99-4.05(m、6H)、5.93-6.01(m、

2H)、7.27-7.36(m、2H)。

[0550]

步驟 2 化合物 84 之合成

在氮氣環境下，於化合物 83(1.0g、1.1mmol)、5'-O-(tert-丁基二甲基矽基)-3'-O-乙醯丙醯基胸苷(0.71g、1.6mmol)的 DMF(50mL)溶液中，在 70℃ 加入碳酸鉀(0.21g、1.5mmol)，並進行 2 小時 5 分鐘攪拌，再加入碳酸鉀(0.91g、6mmol)並進行 2 小時 44 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(201g)中，並將析出的固體經過濾後得到化合物 84(1.01g)之黃色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.14(s、6H)、0.86-0.93(m、18H)、1.26-1.81(m、96H)、2.13-2.43(m、5H)、2.56-2.60(m、2H)、2.74-2.79(m、2H)、3.92-4.12(m、9H)、5.26(d、1H)、6.22(q、2H)、6.42(q、1H)、7.22(s、2H)、7.59(s、1H)。

MS(ESI^+) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1394.0827。

[0551]

步驟 3 化合物 85 之合成

在氮氣環境下，於化合物 84(0.94g、0.67mmol)、乙酸(0.41mL、7.2mmol)的 THF(10mL)溶液中，在 30℃ 加入 1.0M TBAF/THF 溶液(3.5mL、3.5mmol)，進行 4 小時 2 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於甲醇(100g)並將析出的固體經過濾後，得到化合物 85(0.85g，產率 99%(步驟 3))之黃色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t 、 9H) 、 1.26-1.81(m 、 96H) 、 2.20(s 、 3H) 、 2.39-2.44(m 、 2H) 、 2.58-2.60(m 、 2H) 、 2.76-2.78(m 、 2H) 、 3.93(t 、 3H) 、 3.96-4.01(m 、 6H) 、 4.11(d 、 1H) 、 5.34-5.38(m 、 1H) 、 6.21(q 、 2H) 、 6.32(t 、 1H) 、 7.21(s 、 2H) 、 7.61(d 、 1H) 。

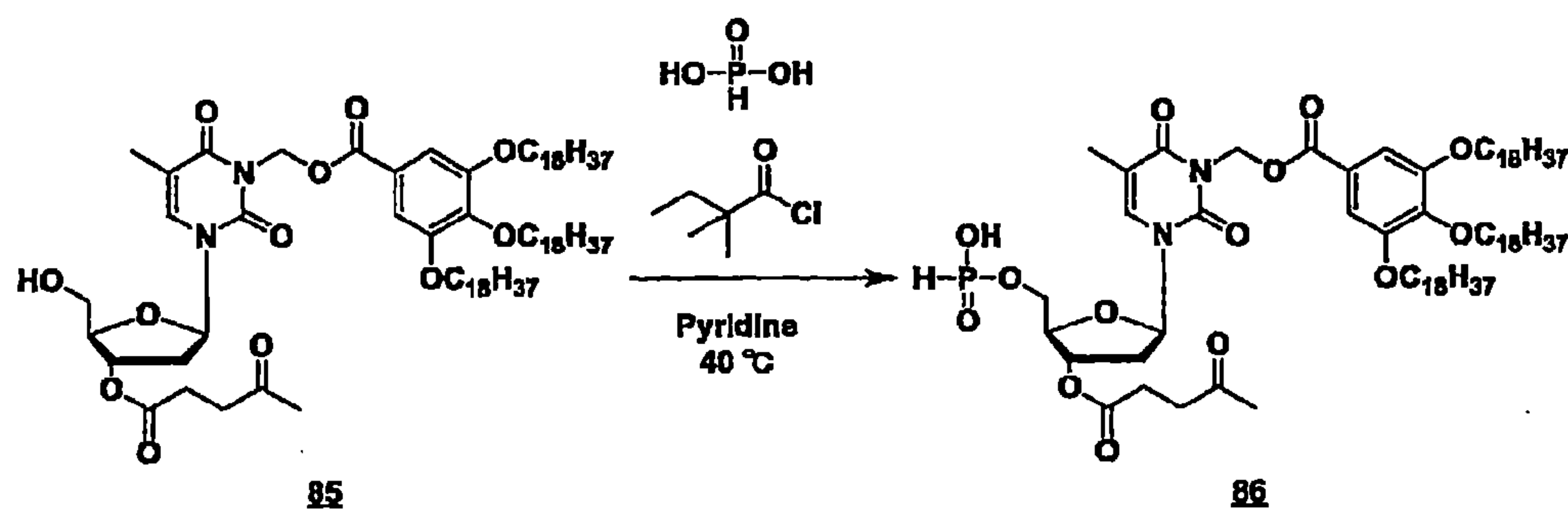
$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1279.9950 。

[0552]

實施例 82(H-磷酸酯化) : 化合物 86 之合成

[0553]

【化 1 1 8】



[0554] 在氮氣環境下，於亞磷酸(0.40g、4.9mmol)的吡啶(15mL)溶液在 40°C 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.45mL、3.3mmol)，進行 39 分鐘攪拌。於該溶液加入化合物 85(0.65g、0.51mmol)，在 40°C 進行 1 小時 27 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(151g)，並將析出的固體經過濾後得到化合物 86(0.66g)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t 、 9H) 、 1.26-1.81(m 、 96H) 、 1.97(d 、 3H) 、 2.19(s 、 3H) 、 2.34-

2.41(m、2H)、2.55-2.59(m、2H)、2.74-2.78(m、2H)、3.96-4.01(m、6H)、4.20-4.29(m、3H)、5.39(d、1H)、6.20(q、2H)、6.45-6.50(m、1H)、6.96(d、1H)、7.21(s、2H)、7.76-7.81(m、1H)。

^{31}P -NMR：(300MHz； CDCl_3) δ 6.28。

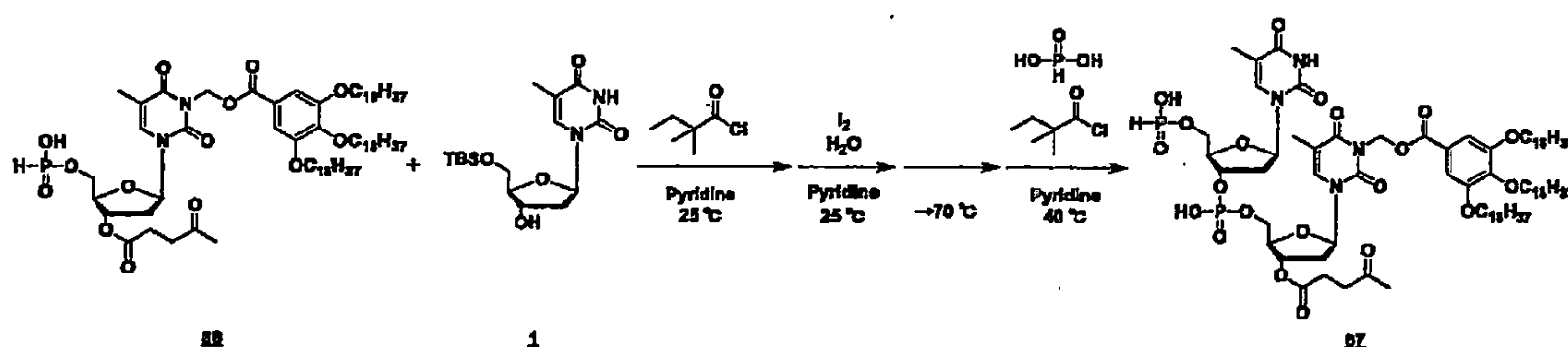
MS(ESI $^-$)：[M-H] $^-$ 1341.9722。

[0555]

實施例 83(2mer 合成)：化合物 87 之合成

[0556]

【化 1 1 9】



[0557] 在氮氣環境下，於化合物 86(51mg)與化合物 1(19mg、0.053mmol)的吡啶(1.0mL)溶液中，在 25℃加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(24 μ L、0.18mmol)，進行 19 分鐘攪拌。其後加入含有 0.05M 之碘的吡啶與水的溶液(1.1mL、0.055mmol)，進行 36 分鐘攪拌。其後，加入水(0.14mL)並升溫至 70℃，進行 15 小時 43 分鐘攪拌。其後，將反應混合物在減壓下濃縮，加入吡啶並在減壓下濃縮的操作重複 2 次實施，得到含有 TBS 基經脫保護體的化合物之反應混合物。

在氮氣環境下，於亞磷酸(43mg、0.52mmol)的吡啶(1.5mL)溶液中，在 40℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(49 μ L、0.36mmol)，進行 38 分鐘攪拌。於該溶液中加入含有上述經脫保護的化合物之反應混合物，在 40℃ 進行 2 小時 14 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(26g)並過濾析出的固體，得到化合物 87(52mg)之褐色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.08-1.83(m、96H)、1.89(s、3H)、1.94(s、3H)、2.19(s、3H)、2.23-2.79(m、8H)、3.96-4.00(m、6H)、4.18-4.41(m、6H)、5.18(brs、1H)、5.38(d、1H)、6.14-6.25(m、3H)、6.43-6.48(m、1H)、6.86(d、1H)、7.21(s、2H)、7.46(s、1H)、7.65(s、1H)。

$^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ -1.10、6.08。

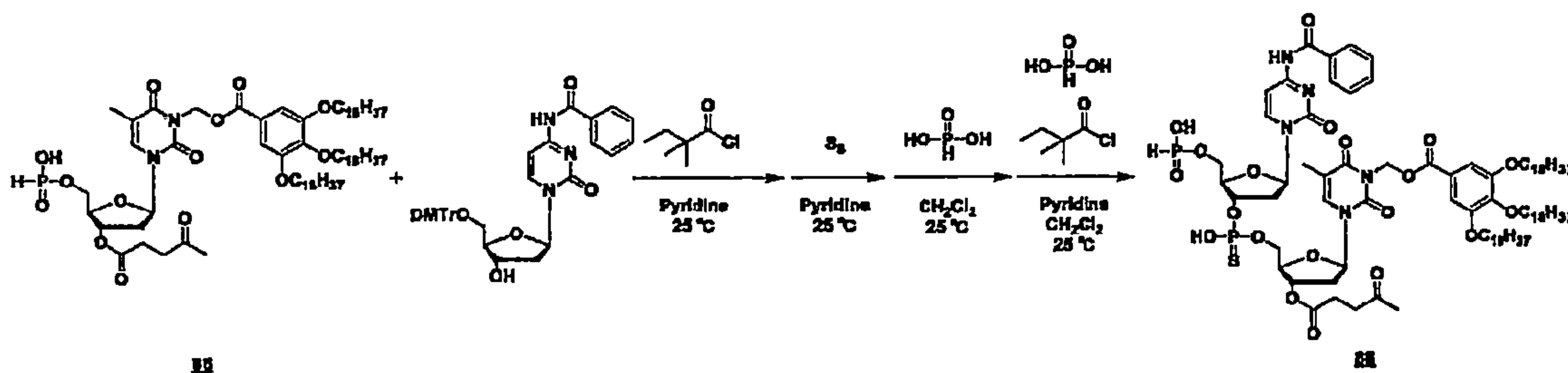
MS(ESI $^-$) : [M-H] $^-$ 1646.0226。

[0558]

實施例 84(2mer 合成)：化合物 88 之合成

[0559]

【化 120】



[0560] 在氮氣環境下，於化合物 86(52mg)與 N⁴-苯

甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷(東京化成工業公司製)(36mg、0.057mmol)的吡啶(1.0mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(15μL、0.11mmol)，進行 53 分鐘攪拌。其後加入單體硫(13mg、0.41mmol)，進行 2 小時 10 分鐘攪拌。其後，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯(2mL)，在減壓下並濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(0.50mL)，將不溶物以吸引過濾除去，以二氯甲烷(0.25mL×2 次)洗淨。於該溶液中將吡咯(7.4μL、0.11mmol)及膦酸(46mg、0.56mmol)在室溫下加入，進行 51 分鐘攪拌。將吡啶(0.15mL)在室溫下加入後，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(49μL、0.36mmol)分為 3 分，並隔 10 分鐘加入進行 35 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(16μL、0.12mmol)再進行 45 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(26g)，並將析出的固體經過濾後得到化合物 88(47mg)之淡黃色固體。

¹H-NMR : (300MHz ; CDCl₃)δ0.88(t、9H)、0.98-1.99(m、99H)、2.13-2.34(m、7H)、2.56(brs、2H)、2.75(brs、2H)、3.97-4.21(m、12H)、5.17-5.35(m、2H)、6.14-6.21(m、3H)、6.44(t、1H)、6.93(d、1H)、7.20(s、2H)、7.54-8.34(m、8H)。

³¹P-NMR : (300MHz ; CDCl₃)δ5.11、59.77、61.38。

MS(ESI⁻) : [M-H]⁻ 1751.0079。

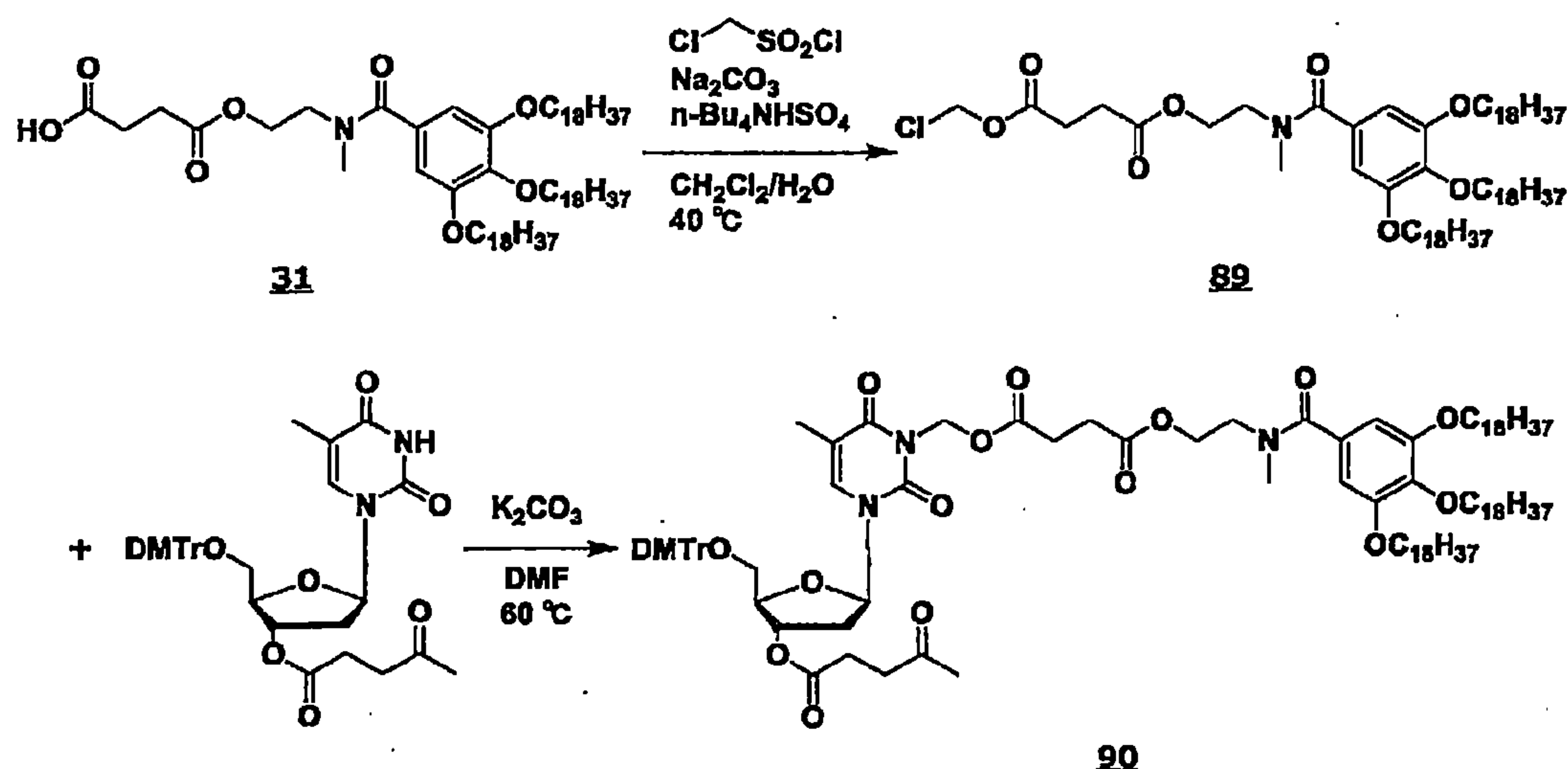
[0561]

實施例 85(於胸腺嘧啶 3 位鍵結擬似固相保護基之核苷酸

之合成)：化合物 90 之合成

[0562]

【化 1 2 1】



[0563]

步驟 1 化合物 89 之合成

在氮氣環境下，於化合物 31(1.0g、0.92mmol)、碳酸鈉(0.36g、3.4mmol)、硫酸氫四-n-丁基銨(34mg、0.11mmol)的二氯甲烷(30g)與水(10g)的混合溶液中，在室溫下加入氯甲磺酸氯化物(0.20mL、2.0mmol)並進行 41 分鐘攪拌。其後，升溫至 40℃，進行 2 小時 19 分鐘攪拌。停止攪拌後分液，於所得之水層中加入二氯甲烷，並進行萃取。合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去，加入乙腈(50g)並將析出的固體經過濾後得到化合物 89 之淡黃色固體(0.96g)。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.26-1.84(m、96H)、2.70-2.73(m、4H)、3.05(s、3H)、

3.74(brs、2H)、3.93-3.98(m、6H)、4.36(brs、2H)、5.69(s、2H)、6.58(s、2H)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1132.9248。

[0564]

步驟 2 化合物 90 之合成

在氮氣環境下，於化合物 89(11mg、9.7μmol)、5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基胸苷(依據國際公開第 2014-077292 號所記載的方法進行合成)(10mg、0.016mmol)的 DMF(0.20mL)溶液中，在 60℃ 加入碳酸鉀(20mg、0.15mmol)，並進行 19 小時 30 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 90。

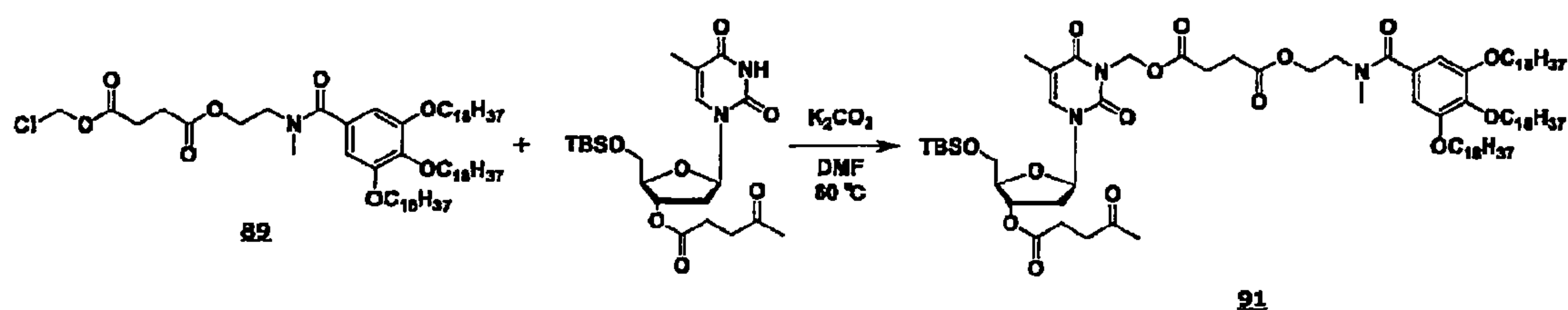
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1739.1983。

[0565]

實施例 86(於胸腺嘧啶 3 位鍵結擬似固相保護基之核苷酸的合成): 化合物 91 之合成

[0566]

【化 1 2 2】



[0567] 與實施例 85 之步驟 2 同樣條件下，將 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基胸苷變更為 5'-

O-(tert-丁基二甲基矽基)-3'-O-乙醯丙醯基胸苷(11mg)並實施反應。將反應混合物減壓下濃縮，得到化合物 91。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1551.1540。

[0568]

實施例 87(在二氯甲烷溶劑進行 2mer 合成): 化合物 43 之合成

[0569] 在氮氣環境下，於化合物 42(98mg)、化合物 1(36mg、0.10mmol)與吡啶(53μL、0.66mmol)的二氯甲烷(2.0mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(45μL、0.33mmol)，進行 50 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液(0.98mL、0.098mmol)，進行 38 分鐘攪拌。其後，加入亞磷酸二甲基(3.0μL、0.033mmol)，加入二氯甲烷(1.0mL)，減壓下濃縮。加入二氯甲烷(5.0mL)，再度減壓下濃縮。將不溶物以吸引過濾除去，以二氯甲烷(1.0mL×2 次)洗淨。於該溶液將氟化氫-吡啶(84.5μL、3.3mmol)在 40℃ 下加入，進行 5 小時 33 分鐘攪拌。加入 TMSCl(0.41mL、3.3mmol)，將反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 43。

[0570]

實施例 88(在 THF 溶劑進行 2mer 合成): 化合物 43 之合成

[0571] 在氮氣環境下，於化合物 42(85mg)、化合物 1(30mg、0.084mmol)與吡啶(45μL、0.55mmol)的 THF(1.5mL)溶液中，在 25℃ 加入 2,2-二甲基丁醯基氯化

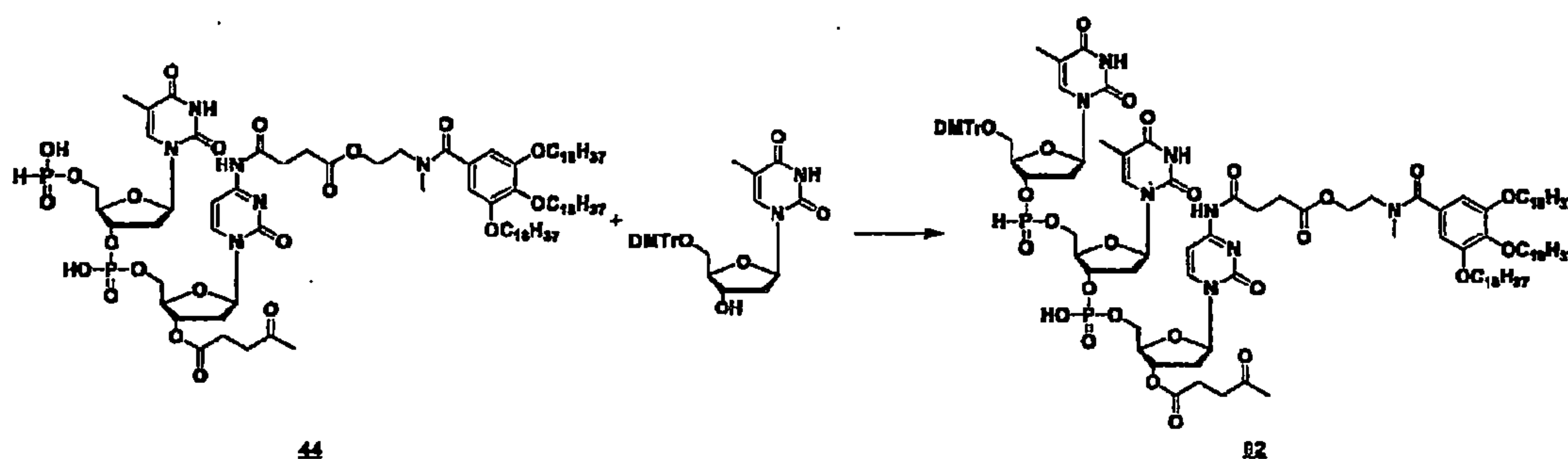
物 (38 μ L、0.28mmol)，進行 14 分鐘攪拌。其後加入含有 0.1M 之碘的吡啶、THF 及水的溶液 (1.2mL、0.12mmol)，進行 3 小時 49 分鐘攪拌。其後，加入亞磷酸二甲基 (3.0 μ L、0.033mmol)，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯 (3.0mL)，在減壓下濃縮重複 3 次後，加入二氯甲烷 (1.0mL)，將不溶物以吸引過濾除去，以二氯甲烷 (1.0mL $\times$ 2 次) 洗淨。於該溶液將氟化氫-吡啶 (6.5 μ L、0.25mmol) 在 25 $^{\circ}$ C 下加入，在 40 $^{\circ}$ C 進行一整夜攪拌。其後，將反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 43。

[0572]

實施例 89(縮合劑檢討)：化合物 92 之合成

[0573]

【化 1 2 3】



[0574] 與實施例 35 之步驟 2 同樣條件下，將縮合劑變更為 2、4、6-三異丙基苯磺酸氯化物 (8.4mg) 並實施反應，將偶合反應後之反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 92 作為主生成物者。

MS(ESI $^{-}$)：[M-H] $^{-}$ 2284.3243。

[0575]

實施例 90(縮合劑檢討)：化合物 92 之合成

[0576] 與實施例 35 之步驟 2 同樣條件下，將縮合劑變更為 2、4-三甲苯二磺酸二氯化物(8.8mg)並實施反應，將偶合後反應的反應混合物經減壓下濃縮後得到化合物 92 作為主生成物者。

[0577]

實施例 91(縮合劑檢討)：化合物 92 之合成

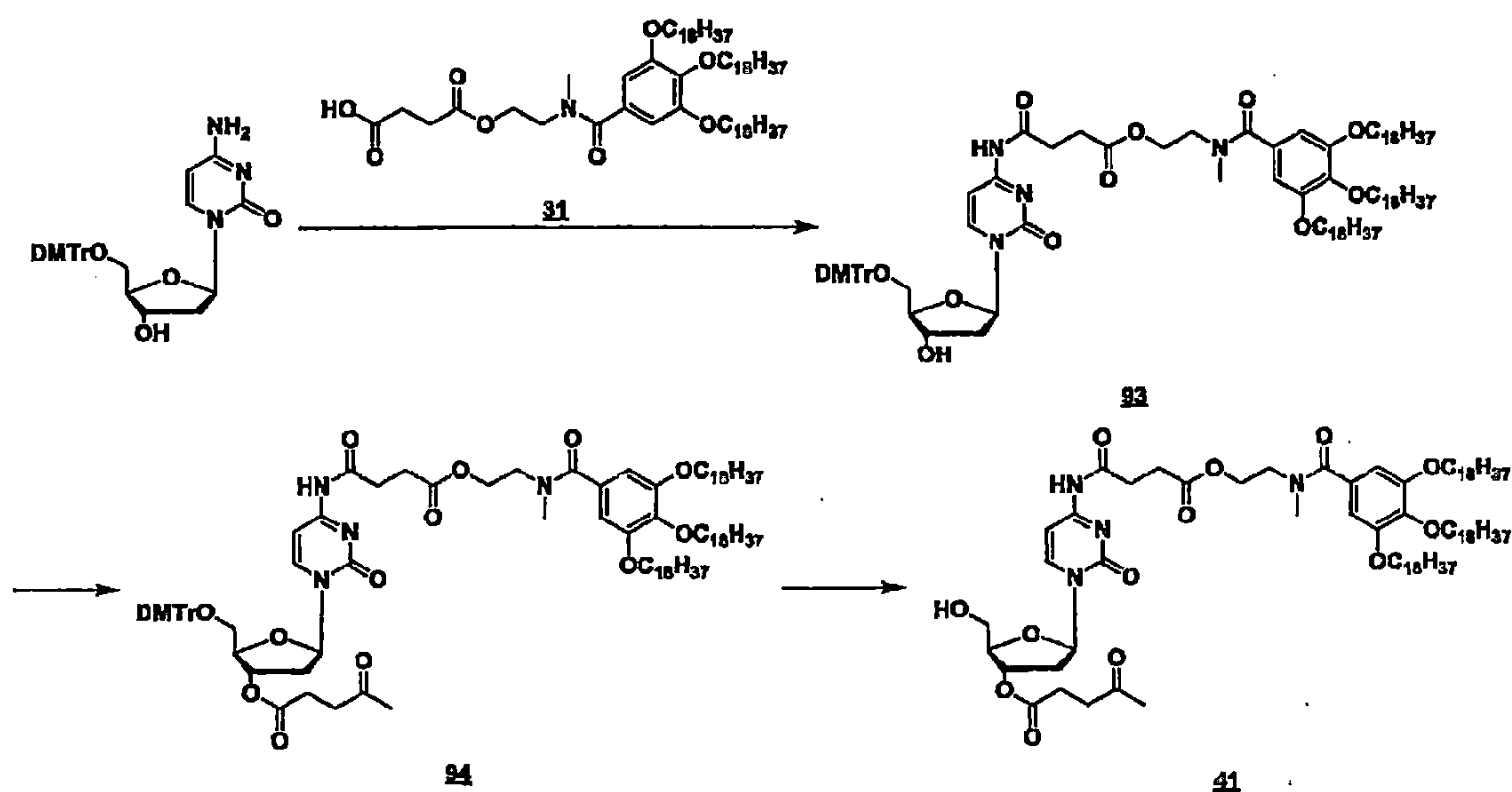
[0578] 與實施例 35 之步驟 2 同樣條件下，將縮合劑變更為 1-金剛烷羰基氯化物(5.5mg)並實施反應，將偶合反應後的反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 92 作為主生成物者。

[0579]

實施例 92(於核酸鹼導入擬似固相保護基之單體及 2mer 合成)：化合物 41 之合成

[0580]

【化 124】



[0581]

步驟 1 化合物 93 之合成

與實施例 66 之步驟 2 同樣條件下，取代 3'-O-(tert-丁基二苯基矽基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷使用 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷 (Chem-Impex 公司製)(4.0g)並實施反應後，得到化合物 93(7.4g)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.19-1.80(m、96H)、2.17-2.28(m、1H)、2.69-2.80(m、5H)、3.05(s、3H)、3.41-3.79(m、10H)、3.92-3.97(m、6H)、4.09-4.46(m、4H)、6.24(t、1H)、6.57(s、2H)、6.84(d、4H)、7.15-7.40(m、10H)、8.20(d、1H)、9.27(brs、1H)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1596.1595。

[0582]

步驟 2 化合物 94 之合成

在氮氣環境下，於化合物 93(7.4g、4.7mmol)、DMAP(0.065g、0.53mmol)、乙醯丙酸(0.87g、7.5mmol)的二氯甲烷(70mL)溶液，在室溫加入 WSC·HCl(1.4g、7.5mmol)，進行 5 小時 4 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(504g)，並將析出的固體經過濾後得到化合物 94(7.9g)之淡黃色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.20-1.81(m、96H)、2.19(s、3H)、2.23-2.33(m、1H)、2.51-2.60(m、2H)、2.70-2.80(m、7H)、3.06(s、3H)、3.44(d、

2H)、3.79(brs、8H)、3.93-3.98(m、6H)、4.03-4.36(m、3H)、5.39(d、2H)、6.27(t、1H)、6.57(s、2H)、6.81-6.85(m、4H)、7.11(d、1H)、7.21-7.36(m、9H)、8.07(d、1H)、9.32(brs、1H)。

[0583]

步驟 3 化合物 41 之合成

在氮氣環境下，於化合物 94(5.8g、3.4mmol)的二氯甲烷(50g)溶液，在室溫加入吡咯(0.71mL、10mmol)、二氯乙酸(1.4mL、17mmol)，進行 23 分鐘攪拌。加入吡啶(1.4mL、17mmol)，將反應混合物加入於甲醇(502g)並將析出的固體經過濾後得到化合物 41(4.6g)的白色固體。

[0584]

實施例 93(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

[0585] 與實施例 75 之同樣條件下，取代胼 1 水合物使用乙醯醯胼(7.6mg)，在室溫下實施反應，將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 78。

[0586]

實施例 94(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

[0587] 在氮氣環境下，將化合物 77(10mg、4.5 μ mol)的二氯甲烷(0.20mL)與吡啶(0.20mL)的混合溶液冷卻至 0℃，加入硫酸胼鎢(10.7mg、0.082mmol)，在 40℃ 進行一整夜攪拌。將反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 78。

[0588]

實施例 95(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

[0589] 與實施例 75 之同樣條件下，取代胍 1 水合物使用乙二胺(1.5 μ L)，在 40℃下實施反應，將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 78。

[0590]

實施例 96(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

[0591] 與實施例 75 之同樣條件下，取代胍 1 水合物使用胍乙酸鹽(0.7mg)並實施反應，將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 78 作為主生成物者。

[0592]

實施例 97(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

[0593] 與實施例 75 之同樣條件下，取代胍 1 水合物使用苯基胍(2.5mg)並實施反應，將反應混合物在減壓下濃縮後得到化合物 78。

[0594]

實施例 98(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

[0595] 與實施例 75 之同樣條件下，取代胍 1 水合物使用 p-甲苯磺醯基胍(2.0mg)並實施反應，將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 78。

[0596]

實施例 99(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 78 之合成

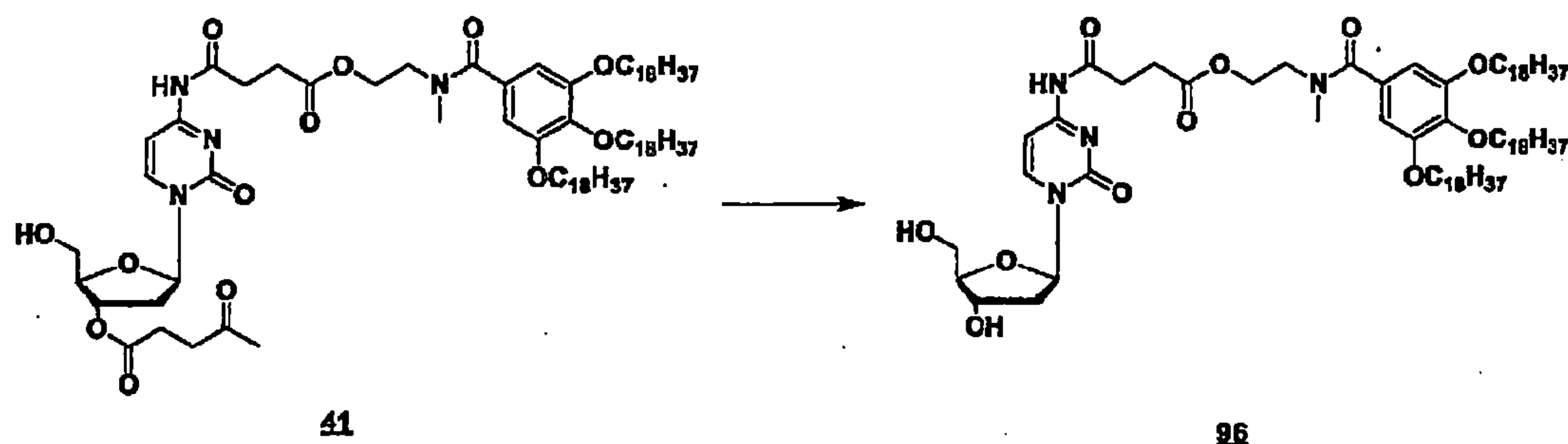
[0597] 與實施例 75 之同樣條件下，取代胍 1 水合物使用甲基胍(3.1mg)並實施反應，將反應混合物減壓下濃縮後得到化合物 78。

[0598]

實施例 100(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 96 之合成

[0599]

【化 1 2 5】



[0600] 在氮氣環境下，將胼 1 水合物 (0.50mg、10.3mmol) 的二氯甲烷 (0.20mL) 與乙酸 (40 μ L) 的混合溶液冷卻至 0 $^{\circ}$ C，加入化合物 41 (10mg、7.3 μ L) 的二氯甲烷 (0.10mL) 溶液並進行 5 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 進行分析，確認化合物 96 之生成。

[0601]

實施例 101(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 96 之合成

[0602] 在氮氣環境下，將固定化脂肪酶 L-2 (3.7mg) 加入於 0.15M 磷酸緩衝液 (pH6.8) (0.23g)。其後，加入化合物 41 (9.0mg、6.5 μ mol) 的 1,4-二噁烷 (1.0g) 溶液，升溫至 40 $^{\circ}$ C，進行 13 小時 20 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 96 的生成。

[0603]

實施例 102(3'位乙醯丙醯基的脫保護)：化合物 96 之合成

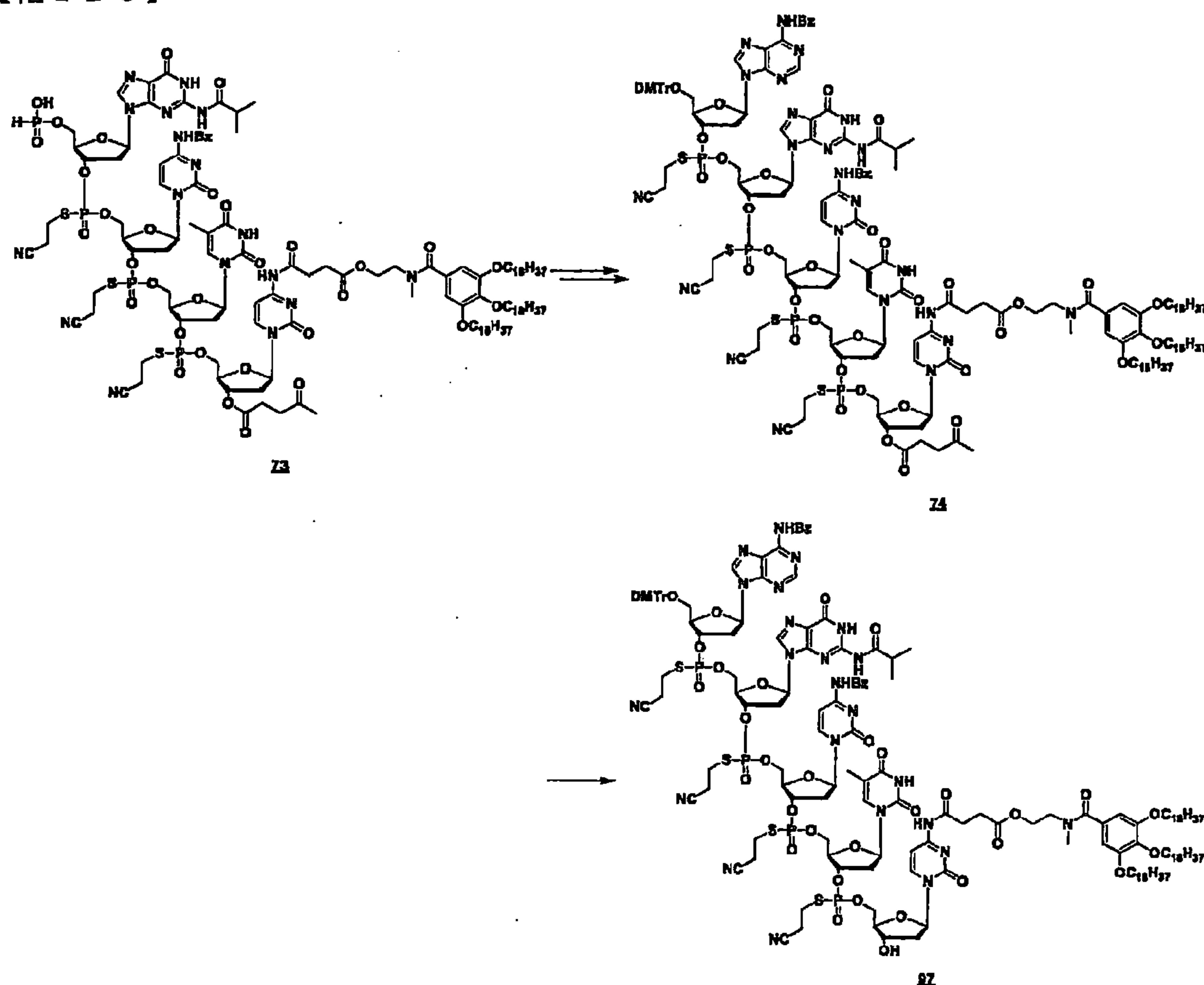
[0604] 在氮氣環境下，將固定化脂肪酶 L-5(10mg) 加入於 0.15M 磷酸緩衝液 (pH6.8)(0.21g)。其後，加入化合物 41(10mg、7.2 μ mol)的 1,4-二噁烷(1.0g)溶液並升溫至 40℃，進行 13 小時 20 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 96 的生成。

[0605]

實施例 103(於 3'末端具有羥基之 5mer 合成)：化合物 97 之合成

[0606]

【化 1 2 6】



[0607]

步驟 1 化合物 74 之合成

與實施例 72 的步驟 4 之同樣條件下實施反應，將硫化後的反應混合物加入於甲醇中並過濾析出的固體，得到化合物 74(2.3g、90%)之淡皮膚色固體。

[0608]

步驟 2 化合物 97 之合成

在氮氣環境下，將化合物 74(0.50g、0.14mmol)的 THF(20mL)溶液冷卻至 0℃，加入乙酸(3.0mL)後，加入胍 1 水合物(14μL、0.29mmol)，進行 6 小時攪拌。於反應混合物加入乙醯丙酮(100μL)，升溫至室溫，減壓下濃縮後，加入於甲醇(102g)並將析出之固體過濾後得到化合物 97(0.45g)。

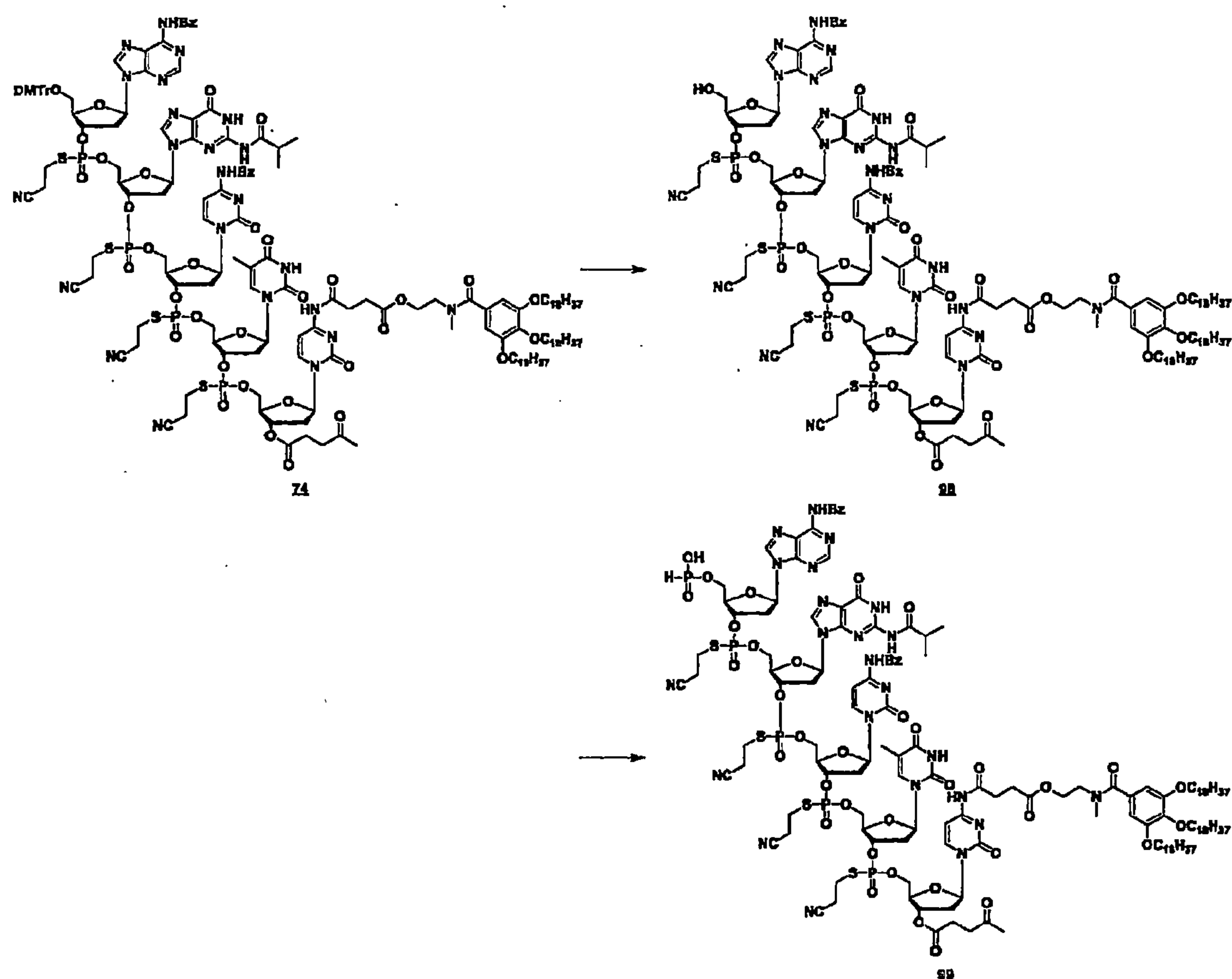
MS(ESI⁺)：[M+2H]²⁺ 1693.2456。

[0609]

實施例 104(於 5'末端具有 H-磷酸酯基之 5mer 合成)：化合物 99 之合成

[0610]

【化 1 2 7】



[0611]

步驟 1 化合物 98 之合成

在氮氣環境下，將化合物 74(0.51g、0.15mmol)的二氯甲烷溶液(10mL)冷卻至 10℃，加入吡咯(30μL、0.43mmol)並進行 14 分鐘攪拌。其後，加入二氯乙酸(82μL、1.0mmol)，進行 4 小時 3 分鐘攪拌。加入吡啶(1.5mL)後升溫至室溫，將反應混合物加入於乙腈(86g)後將析出的固體經過濾後得到化合物 98(0.46g)。

MS(ESI⁺): [M+2H]²⁺ 1591.1922。

[0612]

步驟 2 化合物 99 之合成

在氮氣環境下，於化合物 98(0.45g、0.14mmol)的二氯甲烷(5.0mL)與吡啶(1.0mL)的混合溶液中，在 40℃ 加入膦酸(0.20g、2.4mmol)，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.19mL、1.4mmol)分為 4 分，隔 10 分鐘加入，並進行 1 小時 53 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(0.42mL、0.71mmol)再進行 1 小時 8 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(84g)並將析出的固體經過濾後，得到化合物 99(0.42g)的白色固體。

MS(ESI⁺): [M+2H]²⁺ 1623.1824。

[0613]

實施例 105(5mer 合成): 化合物 99 之合成

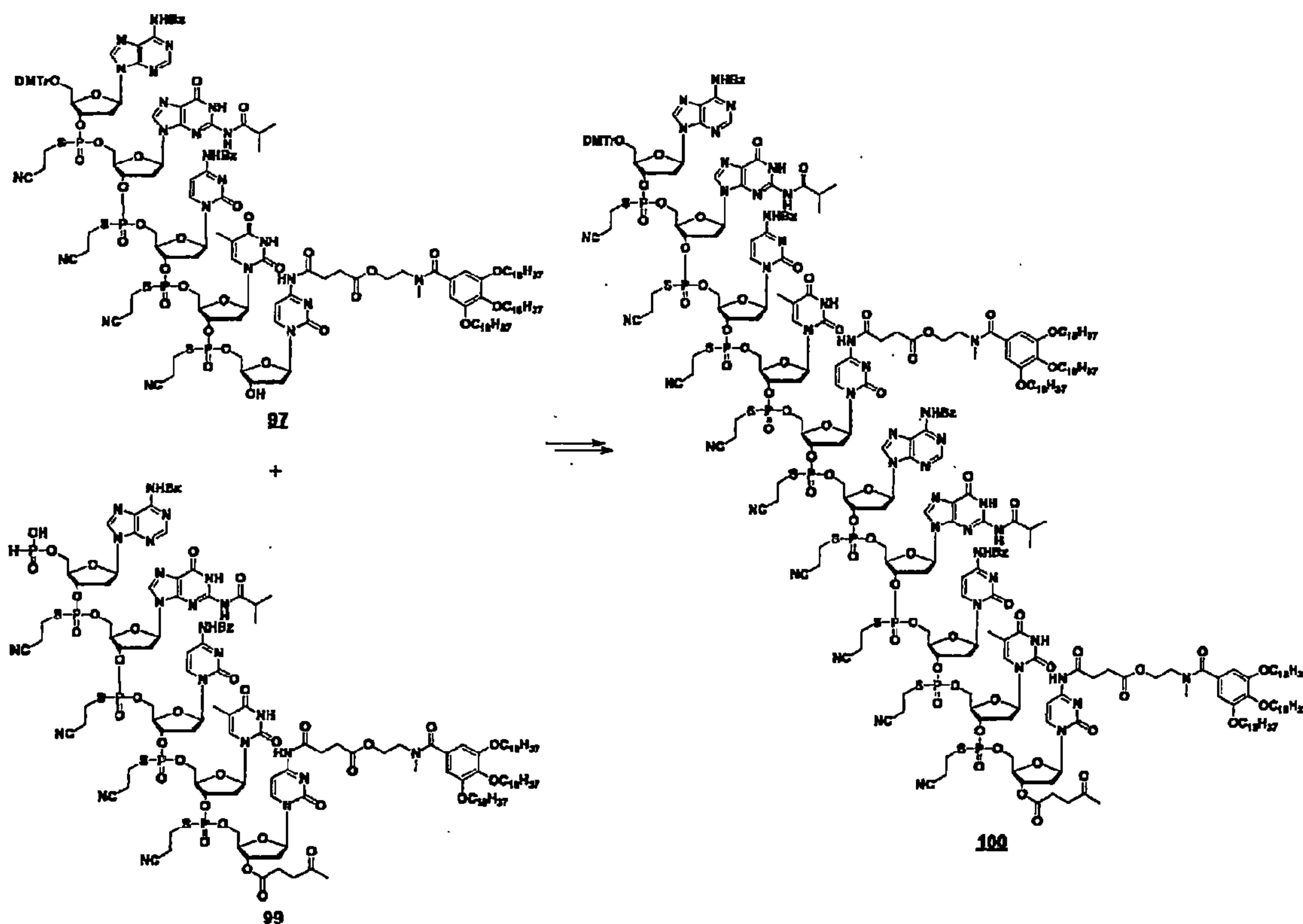
[0614] 在氮氣環境下，將化合物 74(10mg、2.9μmol)、吡咯(60μL、8.6μmmol)的二氯甲烷溶液(0.20mL)冷卻至 10℃，加入膦酸(0.71mg、8.6μmol)，進行 1 小時 35 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 98 為主生成物。其後，加入吡啶(30μL)並升溫至室溫，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(8.0μL、58μmmol)，進行 30 分鐘攪拌。經反應混合物藉由 LC-MS 分析，確認化合物 99 為主生成物。

[0615]

實施例 106(10mer 合成): 化合物 100 之合成

[0616]

【化 1 2 8】



[0617] 在氮氣環境下，於化合物 97(0.44g、0.13mmol)與化合物 99(0.41g)的吡啶(10mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(0.80g、2.0mmol)，進行 11 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑加入 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(62mg、0.27mmol)，進行 1 小時 52 分鐘攪拌。將反應混合物加入於甲醇(102g)，並將析出的固體經過濾後得到化合物 100(0.81g)。

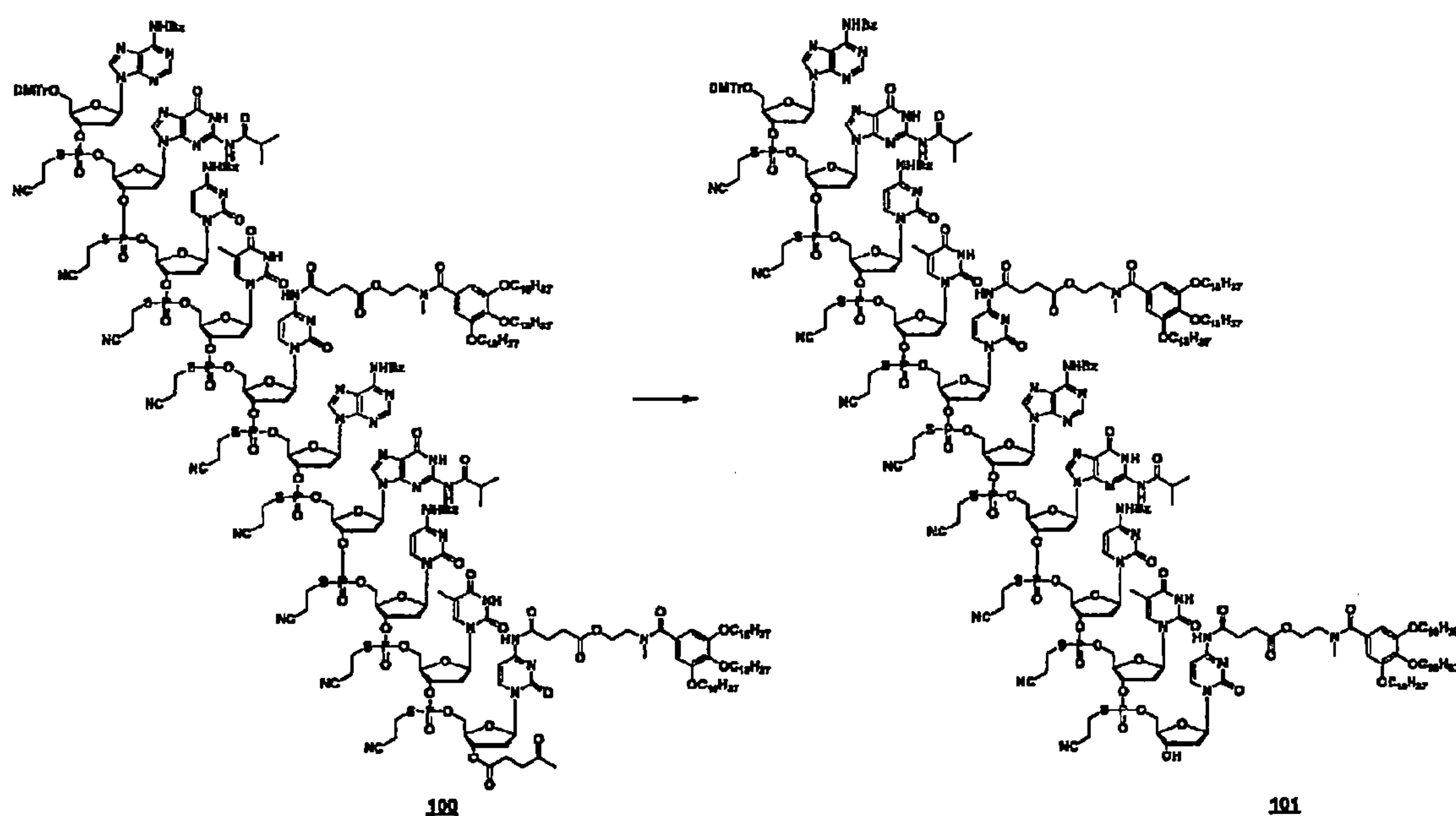
MS(ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2232.9346。

[0618]

實施例 107(於 3'末端具有羥基之 10mer 合成): 化合物 101 之合成

[0619]

【化 1 2 9】



[0620] 在氮氣環境下，將化合物 100(0.39g、58 μ mol)的 THF(15mL)溶液冷卻至 0℃，加入乙酸(2.3mL)後，加入胼 1 水合物(5.5 μ L、0.11mmol)，進行 7 小時攪拌。再加入胼 1 水合物(5.5 μ L、0.11mmol)，進行 1 小時 12 分鐘攪拌。於反應混合物加入乙醯丙酮(0.50mL)，升溫至室溫，減壓下濃縮後，將該濃縮物加入於甲醇(100g)，並將析出的固體經過濾後得到化合物 101(0.35g)。

在氮氣環境下，將化合物 101(0.15g、23 μ mol)的 THF(3.0mL)溶液冷卻至 10℃，加入乙酸(0.90mL)後，加入胼 1 水合物(7.5 μ L、0.15mmol)，進行 30 分鐘攪拌。將反應混合物加入於甲醇(57g)，並將析出的固體經過濾後得到化合物 101(0.14g)。

MS(ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2200.2656。

[0621]

- 211 -

在氮氣環境下，將化合物 100(0.39g、58 μ mol)、吡啶(21mg、0.18mmol)的二氯甲烷溶液(8.0mL)冷卻至 10℃，加入二氯乙酸(33 μ L、0.40mmol)，進行 2 小時攪拌。再加入二氯乙酸(14 μ L、0.17mmol)，進行 2 小時 32 分鐘攪拌。加入吡啶(0.60mL)升溫至室溫，將反應混合物加入於甲醇(100g)，將析出的固體經過濾後得到化合物 102(0.35g)。

MS(ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2132.2235。

[0624]

步驟 2 化合物 103 之合成

在氮氣環境下，於化合物 102(0.17g、27 μ mol)的二氯甲烷(1.0mL)與吡啶(0.20mL)的混合溶液在 40℃加入膦酸(38mg、0.46mmol)，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(36 μ L、0.27mmol)分為 4 分，並隔 10 分鐘加入，進行 1 小時 5 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(73 μ L、0.53mmol)再進行 49 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(51g)，將析出的固體經過濾後得到化合物 103(0.17g)的白色固體。

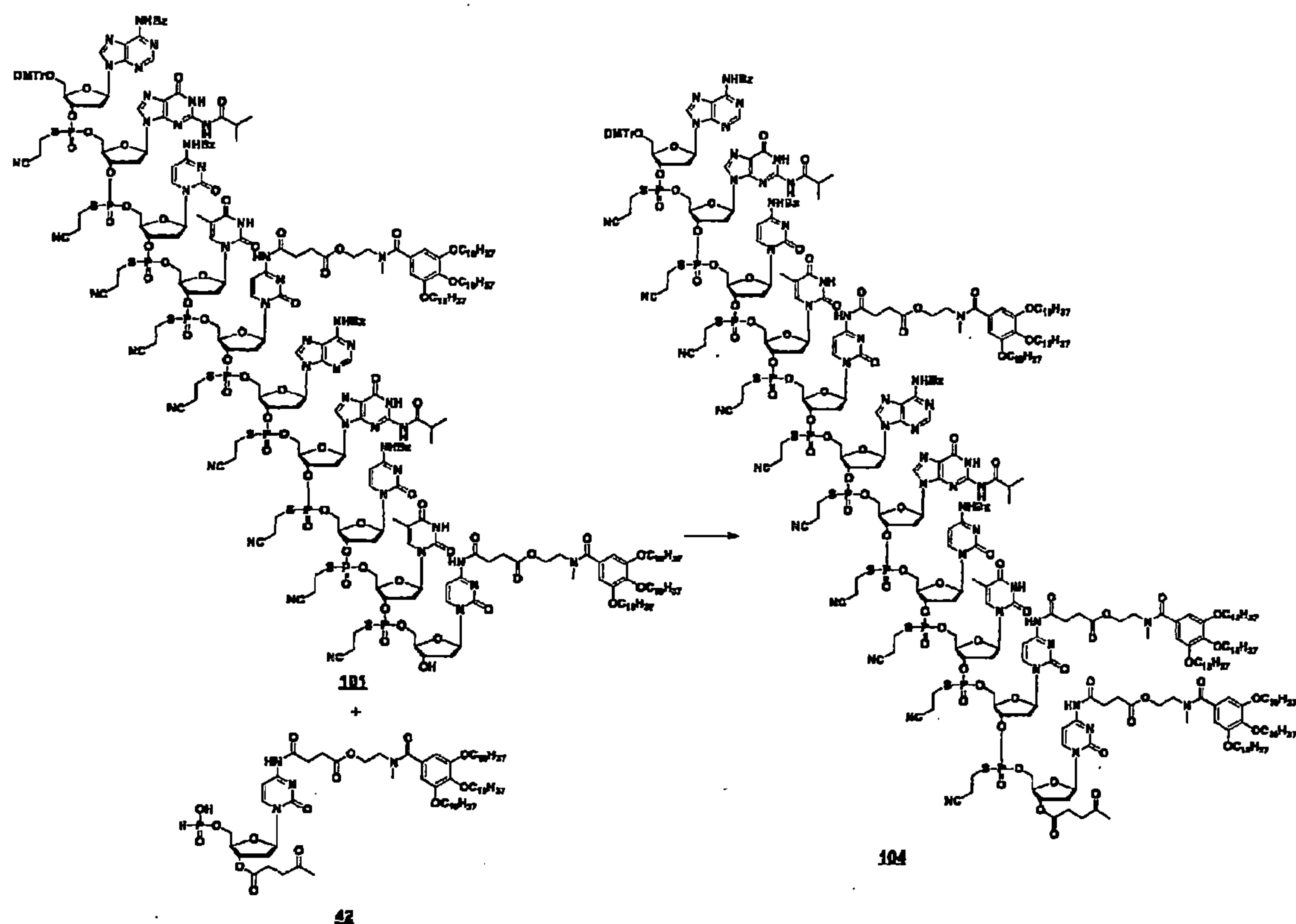
MS(ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2153.5570。

[0625]

實施例 109(11mer 合成): 化合物 104 之合成

[0626]

【化 1 3 1】



[0627] 在氮氣環境下，於化合物 101(5.5mg、0.83 μ mol)與化合物 42(2.7mg)的吡啶(0.20mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(50mg、0.13mmol)，進行 3 小時 8 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑加入 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(3.4mg、15 μ mol)，進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 104 的生成。

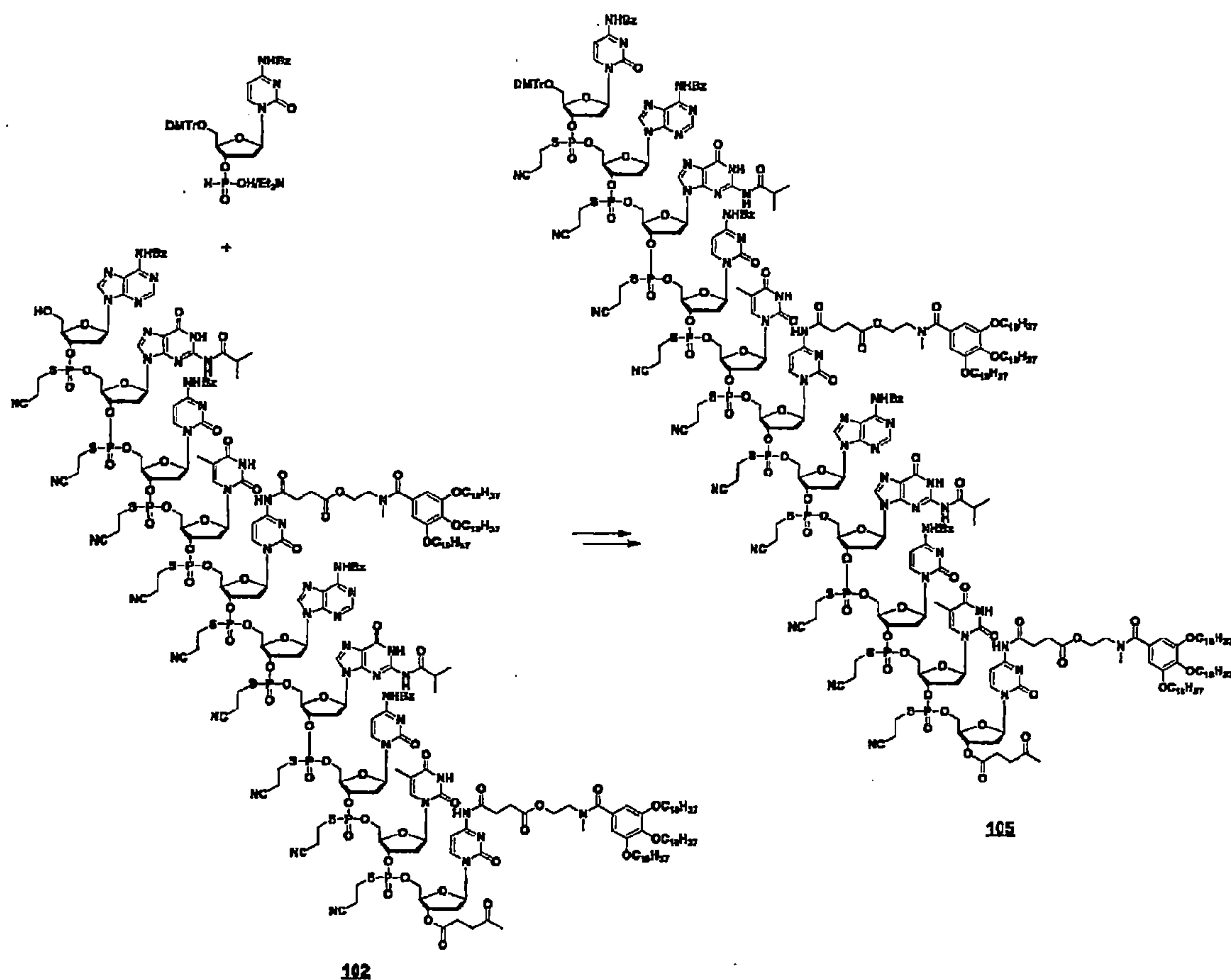
MS(ESI⁺)：[M+3H]³⁺ 2707.5985。

[0628]

實施例 110(11mer 合成)：化合物 105 之合成

[0629]

【化 1 3 2】



[0630] 在氮氣環境下，於化合物 102(5.8mg、0.91 μ mol)與 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羥基磷-2'-脫氧胞苷三乙基胺鹽(Chem jeans 公司製)(2.3mg、2.9 μ mol)的吡啶(0.20mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(28mg、72 μ mol)，進行 1 小時 40 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑使用 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(3.6mg、16 μ mol)，進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 105 為主生成物。

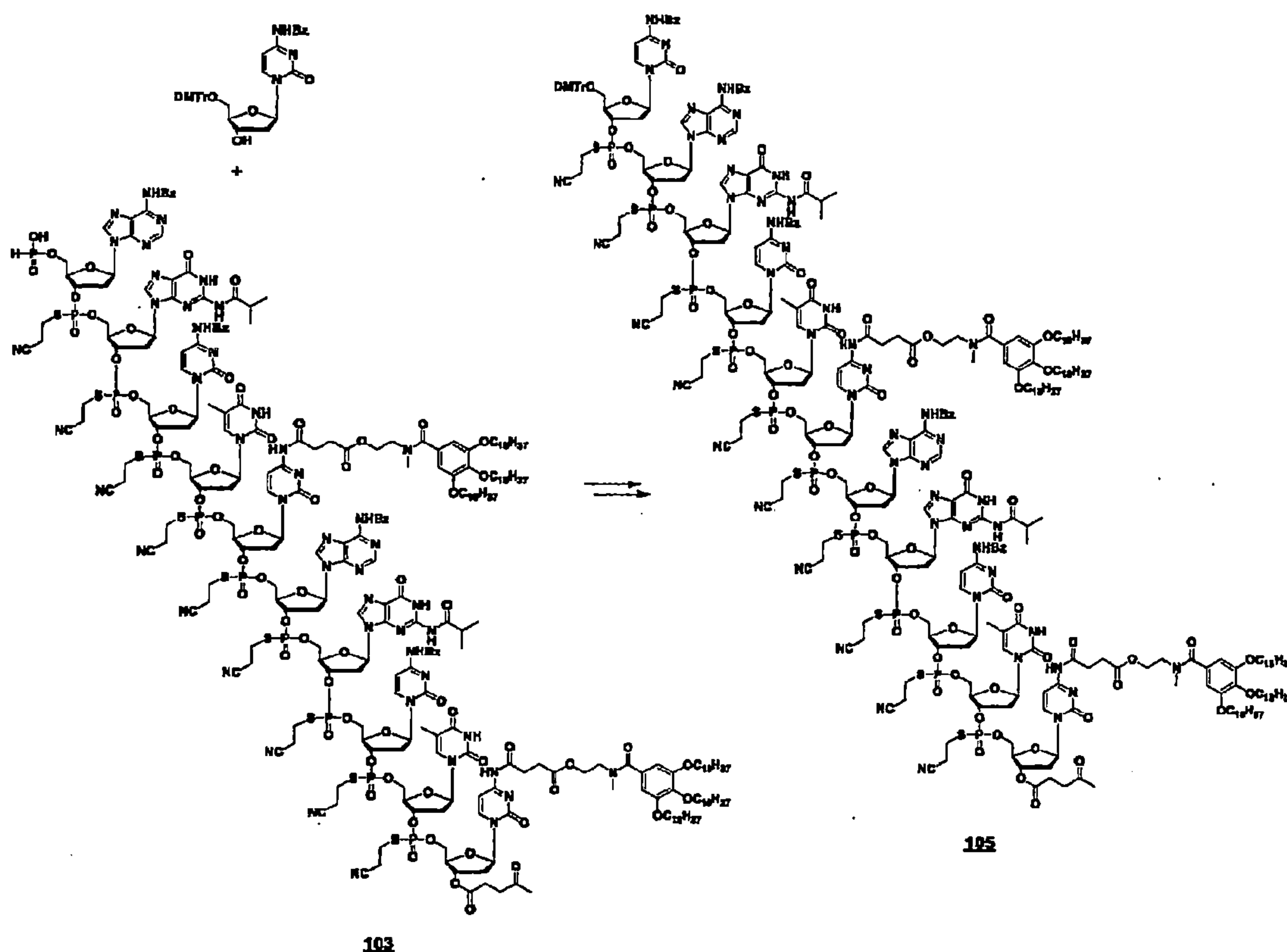
MS(ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2386.9640。

[0631]

實施例 111(11mer 合成)：化合物 105 之合成

[0632]

【化 1 3 3】



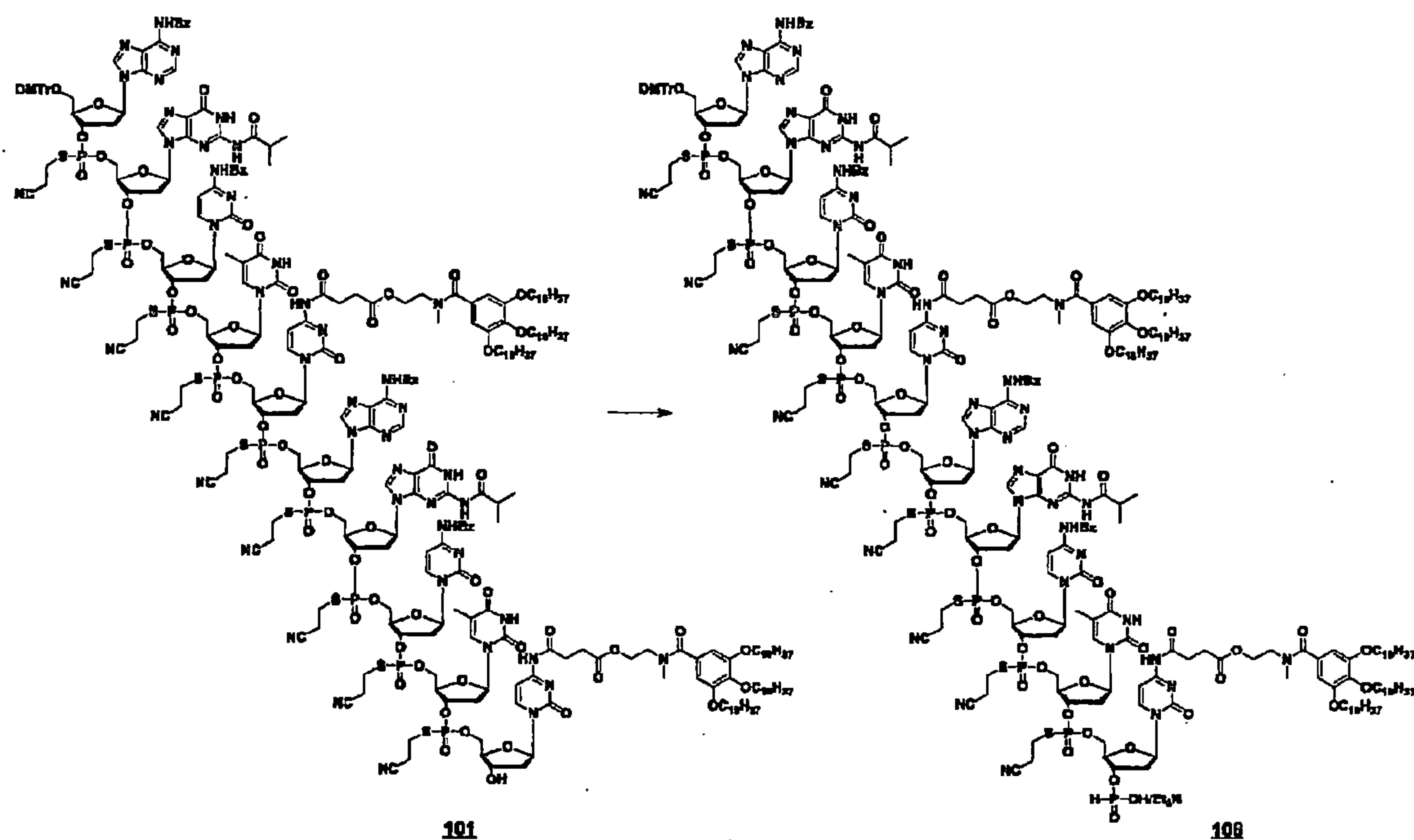
[0633] 在氮氣環境下，於化合物 103(4.5mg、0.70 μ mol)與 N⁴-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧胞苷(東京化成工業公司製)(2.9mg、4.6 μ mol)的吡啶(0.20mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(23mg、57 μ mol)，進行 28 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑使用 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(2.8mg、12 μ mol)，進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 105 的生成。

[0634]

實施例 112(於 3'末端具有 H-膦酸酯基之 10mer 合成)：化合物 106 之合成

[0635]

【化 1 3 4】



[0636] 在氫氣環境下，於亞磷酸二苯基(2.0 μ L、10 μ mol)的吡啶(0.20mL)溶液，在室溫加入化合物 101(9.3mg、1.4 μ mol)，在室溫進行 3 小時 7 分鐘攪拌。其後，追加亞磷酸二苯基(2.0 μ L、10 μ mol)，在室溫進行 11 小時 50 分鐘攪拌。以水、三乙基胺的順序加入，將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 106 的生成。

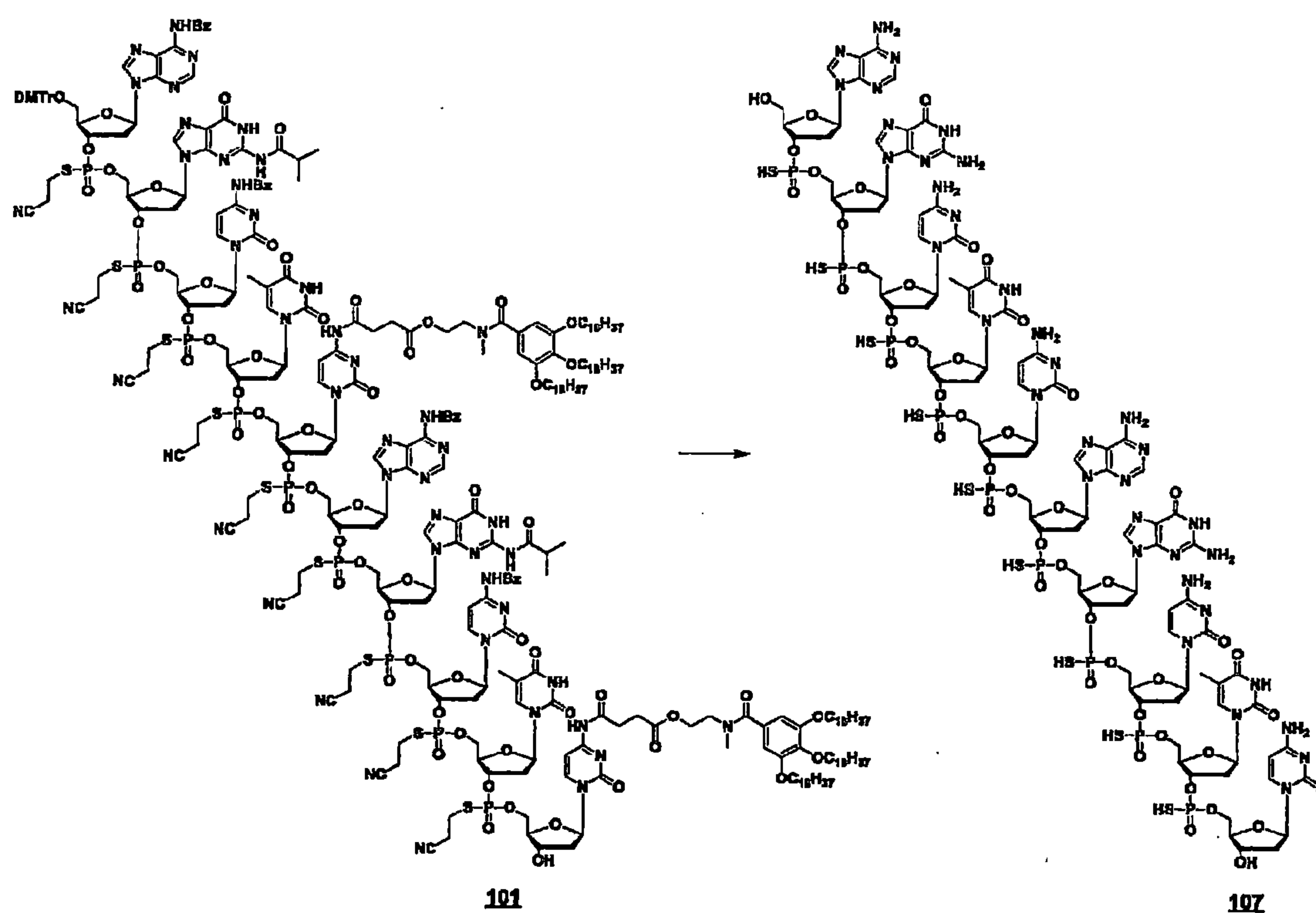
MS(ESI⁺)：[M+3H]³⁺ 2221.5833。

[0637]

實施例 113(10mer 的脫保護)：化合物 107 之合成

[0638]

【化 1 3 5】



[0639] 在氬氣環境下，將化合物 101(8.7mg、 $1.3\mu\text{mol}$)的乙醇(0.15g)懸浮液升溫至 45°C ，加入 40%甲基胺水溶液(0.50mL)，進行 20 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 107 的生成。

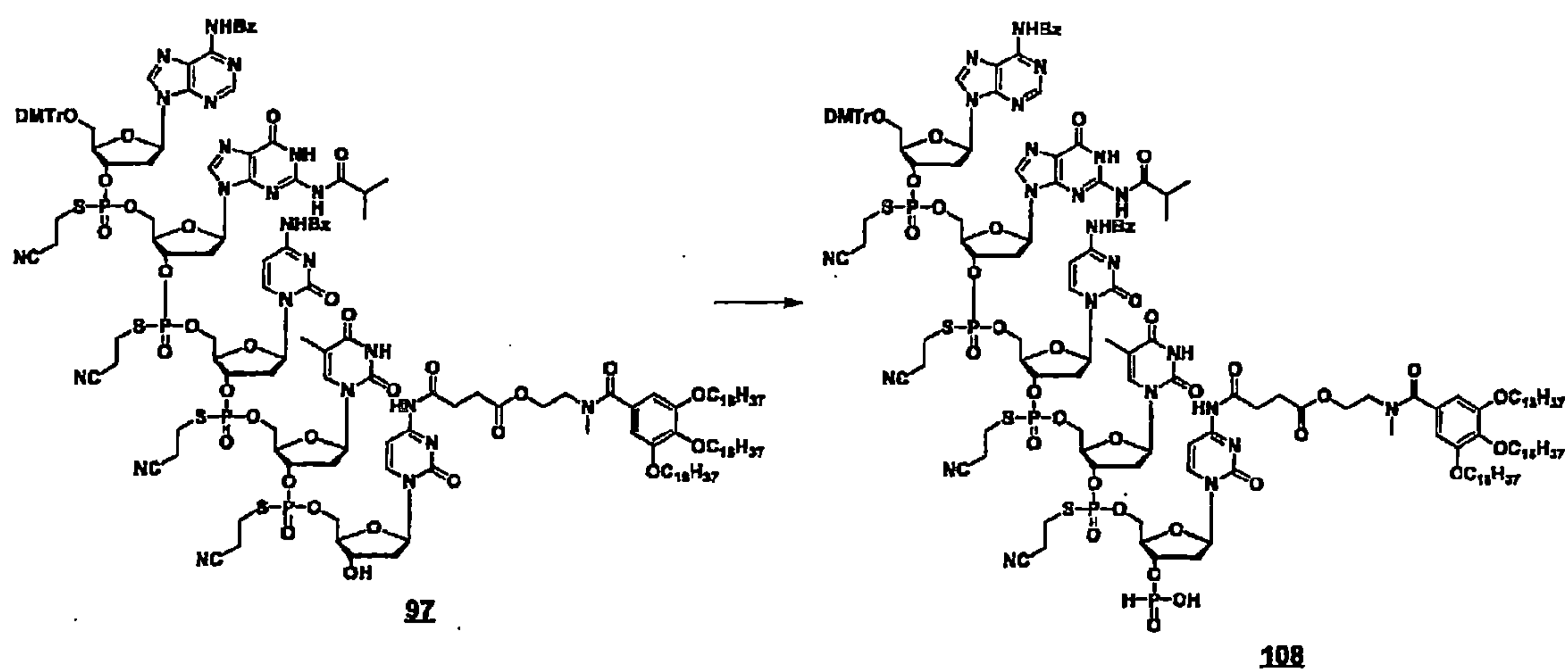
MS(ESI⁺): $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1566.1633

[0640]

實施例 114(於 3'末端具有 H-磷酸酯基之 5mer 合成): 化合物 108 之合成

[0641]

【化 1 3 6】



[0642] 在氮氣環境下，於亞磷酸二苯基 (3.9 μ L、20 μ mol) 的吡啶 (0.20mL) 溶液，在室溫加入化合物 97 (9.0mg、2.7 μ mol)，在室溫進行 1 小時攪拌。其後，加入水 (50 μ L)，將反應混合物加入於乙腈，將析出的固體經過過濾後得到化合物 108 (0.80mg) 的白色固體。

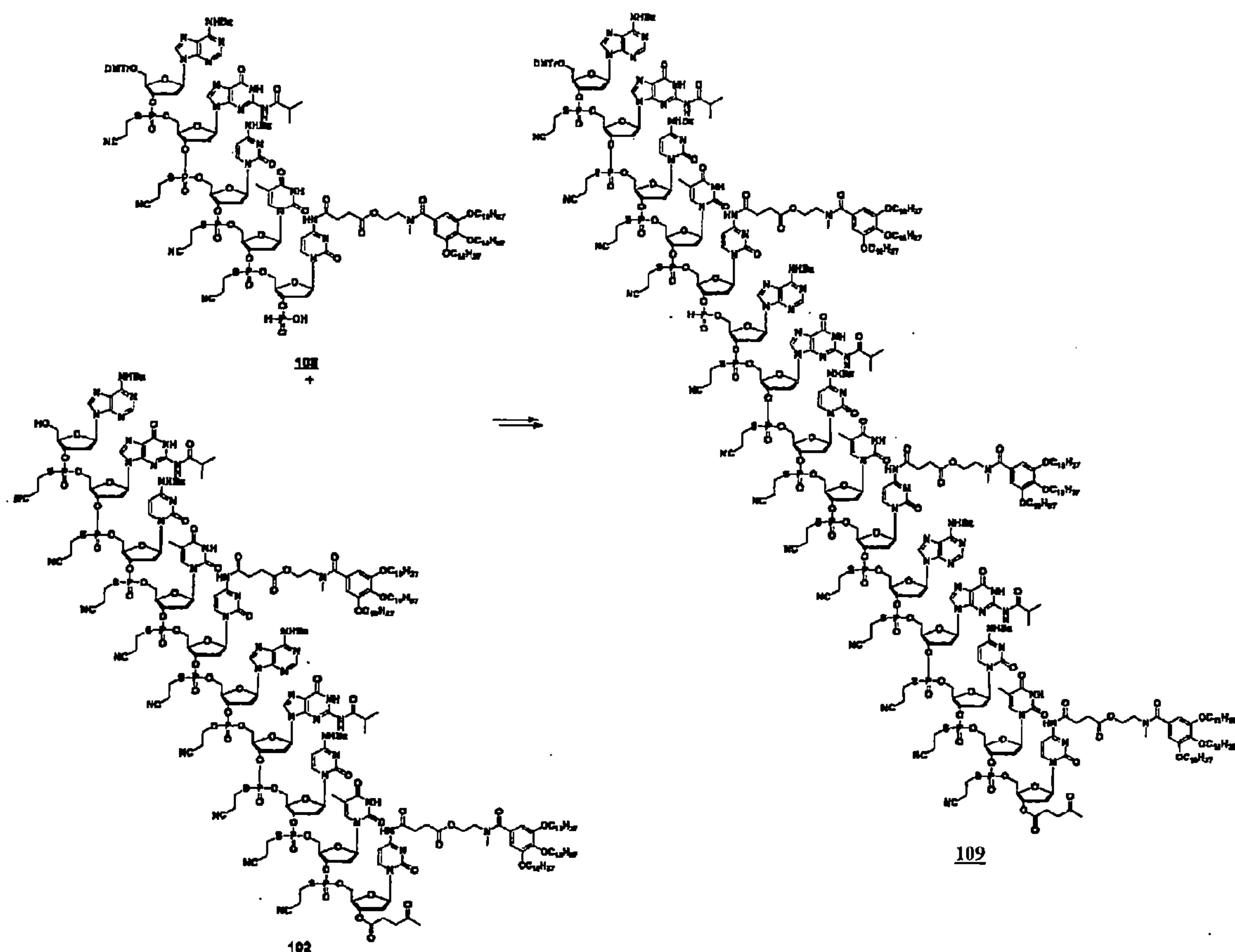
MS(ESI⁺): [M+2H]²⁺ 1725.2231。

[0643]

實施例 115 (15mer 合成): 化合物 109 之合成

[0644]

【化 1 3 7】



[0645] 在氬氣環境下，於化合物 102(1.7mg、0.27 μ mol)與化合物 108(0.80mg)的吡啶(0.20mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(29mg、73 μ mol)，進行 30 分鐘攪拌。將反應混合物經 LC-MS 分析後，確認化合物 109 的生成。

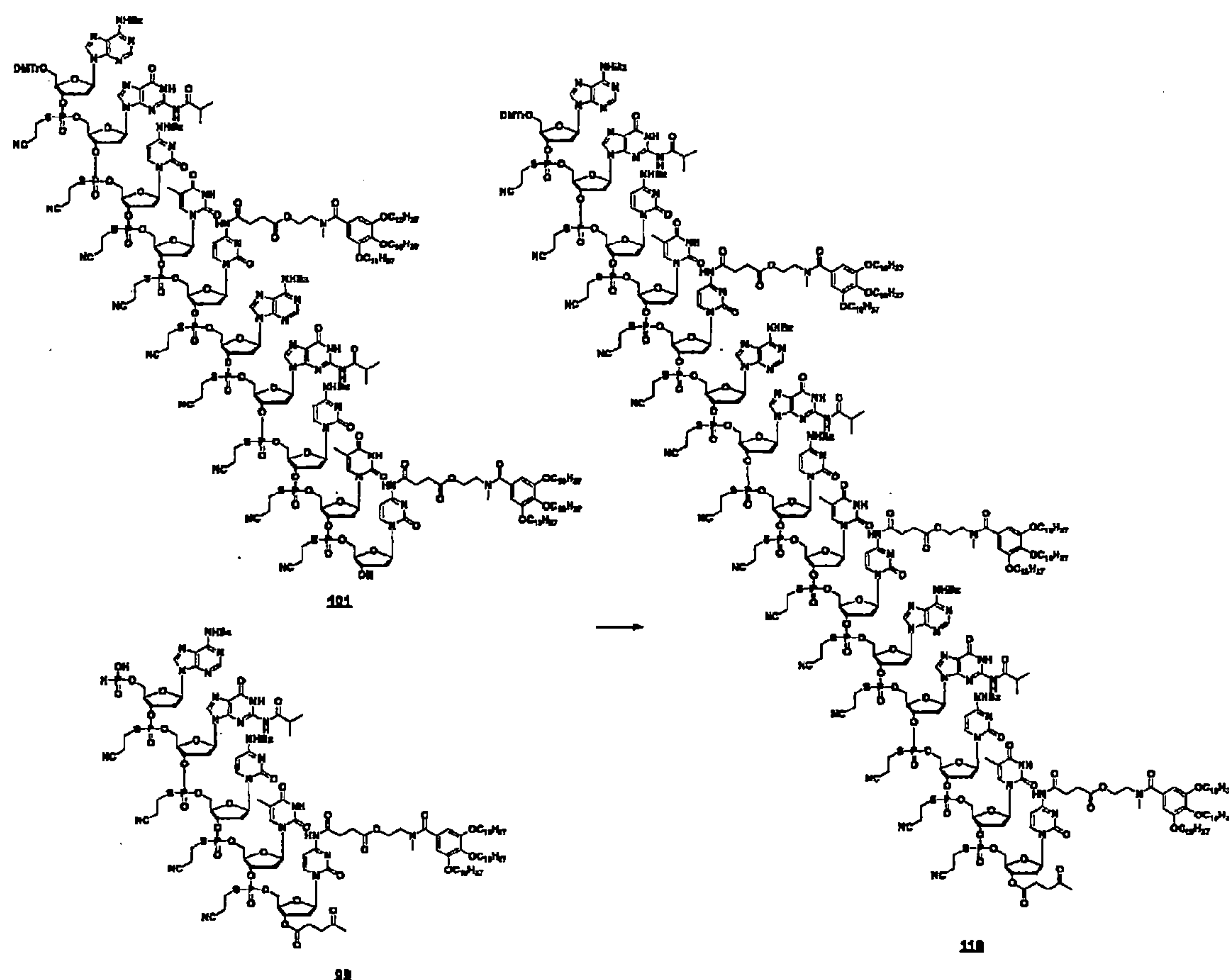
MS(ESI⁺)：[M+4H]⁴⁺ 2457.0209。

[0646]

實施例 116(15mer 合成)：化合物 110 之合成

[0647]

【化 138】



[0648] 在氮氣環境下，於化合物 101(11mg、 $1.7\mu\text{mol}$)與化合物 99(4.8mg)的吡啶(0.20mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(64mg、 0.16mmol)，進行 1 小時 5 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑使用 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(5.0mg、 $22\mu\text{mol}$)，進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 110 的生成。

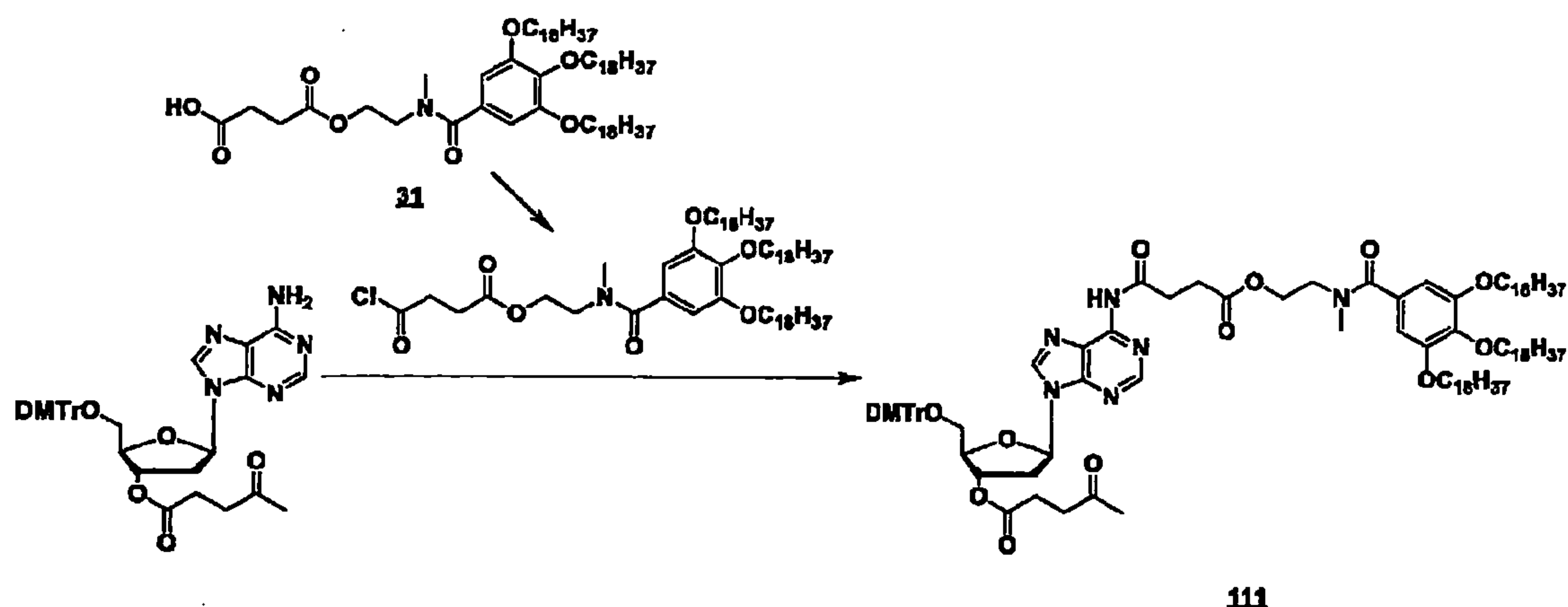
MS(ESI⁺): $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ 2478.2707。

[0649]

實施例 117(對腺嘌呤之擬似固相保護基導入): 化合物 111 之合成

[0650]

【化 1 3 9】



[0651] 在氮氣環境下，將化合物 31(11mg、10 μ mol)的二氯甲烷(0.20mL)與 DMF(5.0 μ L)的混合溶液冷卻至 10℃，加入亞硫醯氯(4.0 μ L、55 μ mol)後升溫至室溫，進行 58 分鐘攪拌。將該反應混合物 10℃ 下加入於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧腺苷(12mg、18 μ mol)與二異丙基乙基胺(14 μ L、83 μ mol)的二氯甲烷(0.20mL)溶液中，進行 1 小時 20 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 111 的生成。

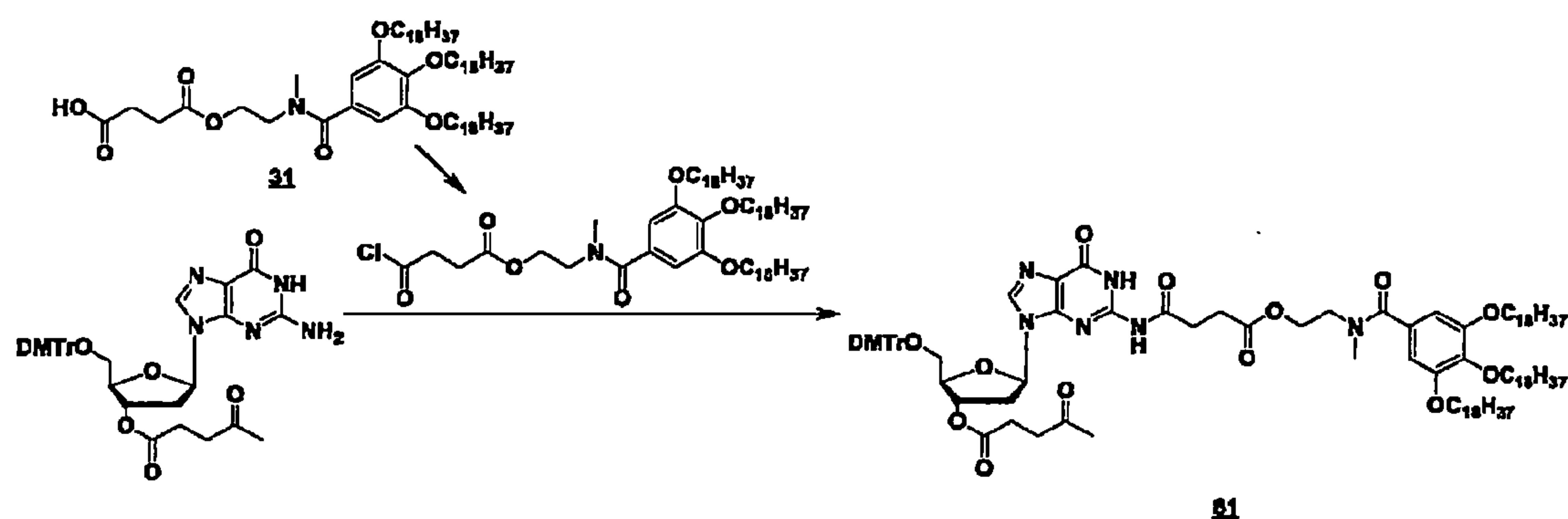
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1718.2007。

[0652]

實施例 118(對鳥嘌呤之擬似固相保護基導入): 化合物 81 之合成

[0653]

【化 1 4 0】



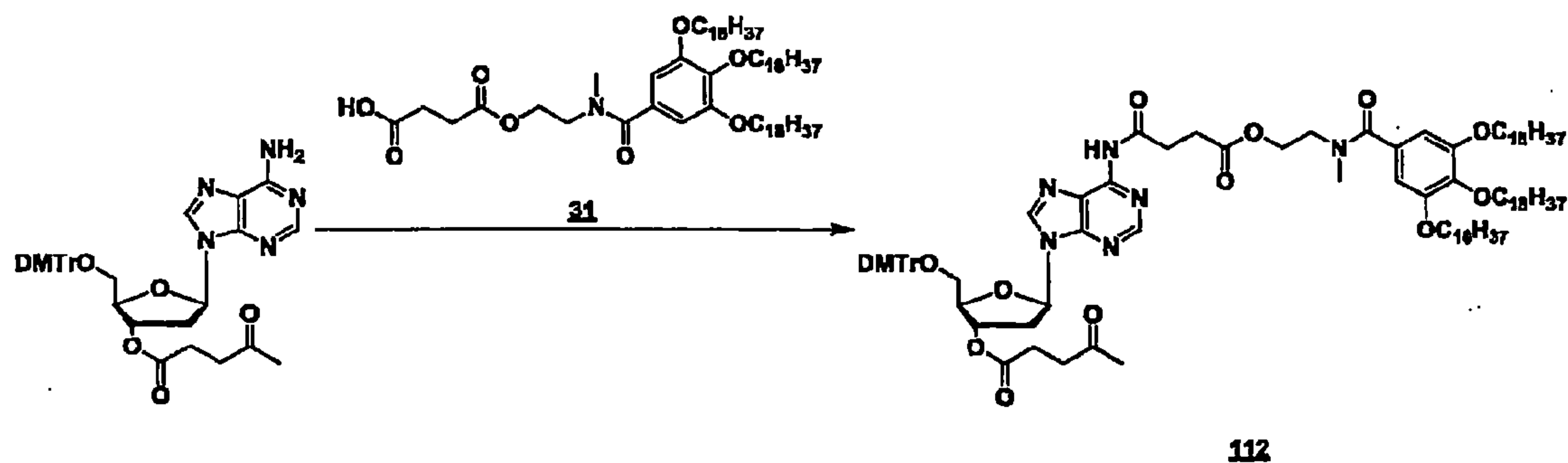
[0654] 在氮氣環境下，於化合物 31(12mg、11 μ mol)的二氯甲烷(0.30mL)與 DMF(5.0 μ L)的混合溶液中，在室溫加入亞硫醯氯(4.0 μ L、55 μ mol)，進行 20 分鐘攪拌。將該反應混合物在室溫下加入於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧鳥嘌呤核苷(10mg、15 μ mol)與二異丙基乙基胺(28 μ L、0.17mmol)的二氯甲烷(0.20mL)溶液，進行 30 分鐘攪拌。將反應混合物經 LC-MS 分析後，確認化合物 81 的生成。

[0655]

實施例 119(對腺嘌呤之擬似固相保護基導入)：化合物 112 之合成

[0656]

【化 1 4 1】



[0657] 在氮氣環境下，於 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧腺苷(0.93g、1.4mmol)與化合物 31(1.1g、0.97mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中，在 40℃ 以 DMAP(0.56g、4.6mmol)、WSC·HCl(0.90g、4.7mmol)的順序加入，進行 16 小時 35 分鐘攪拌。將反應混合物減壓下濃縮，加入甲醇(102g)，將析出的固體經過濾後得到化合物 112 的粗物(1.3g)。將粗物以矽膠層析法(氯仿-甲醇)純化後得到化合物 112(0.68g)。

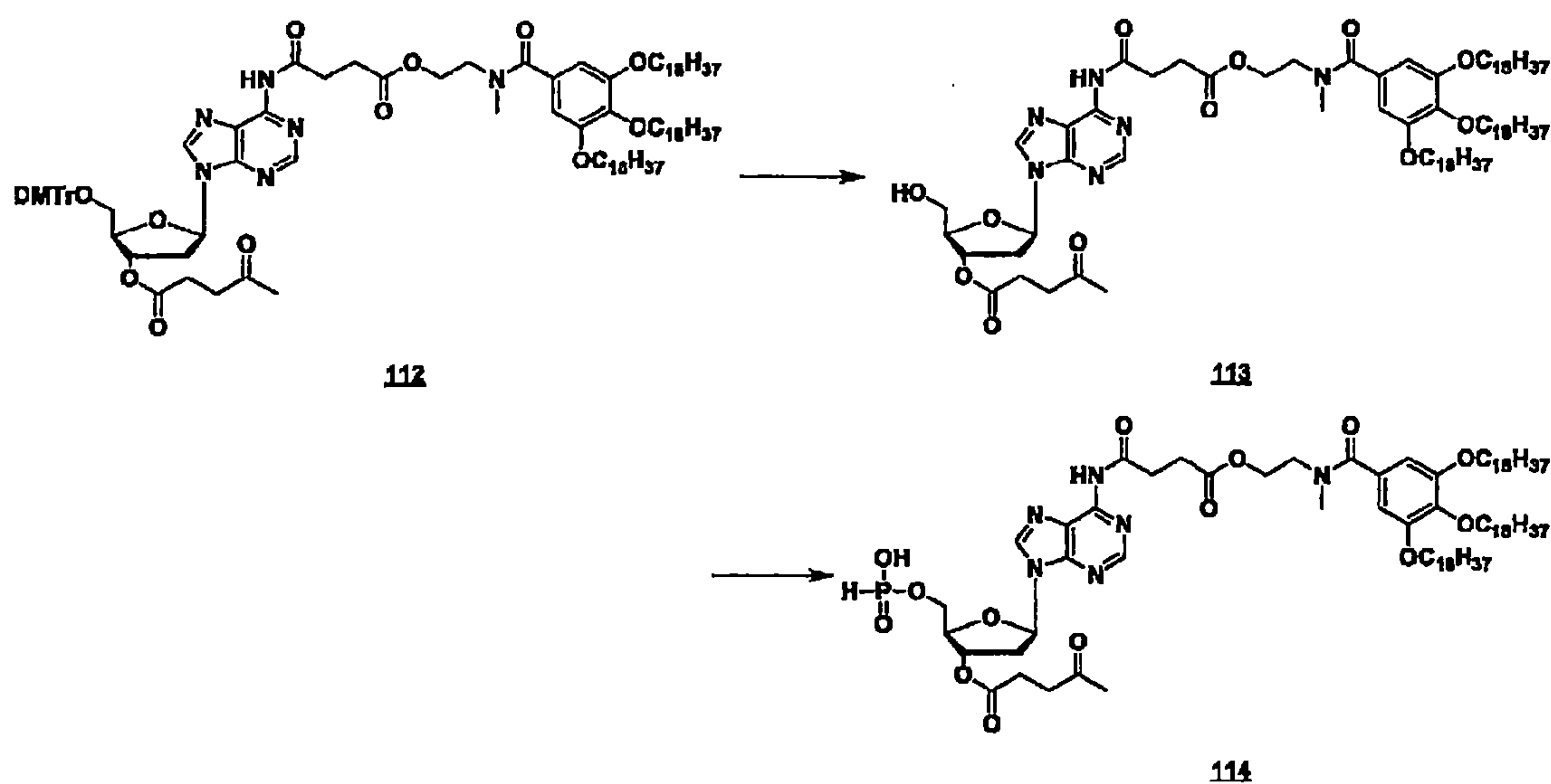
$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.85(t、9H)、1.25-1.81(m、96H)、2.21(s、3H)、2.59-3.07(m、11H)、3.26-3.78(m、12H)、3.93-4.31(m、9H)、5.53(d、1H)、6.48-6.49(m、1H)、6.59(s、2H)、6.77-6.80(m、4H)、7.20-7.38(m、9H)、8.10(s、1H)、8.61(s、1H)、8.83(brs、1H)。MS(ESI^+) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1718.2015。

[0658]

實施例 120(導入擬似固相保護基之腺苷的 5'位官能基變換)：化合物 114 之合成

[0659]

【化 1 4 2】



[0660]

步驟 1 化合物 113 之合成

在氮氣環境下，將化合物 112(0.29g、0.17mmol)的二氯甲烷(1.0mL)溶液冷卻至 10℃，加入吡咯(35μL、0.51mmol)並進行 5 分鐘攪拌。其後，加入二氯乙酸(42μL、0.51mmol)，進行 1 小時 13 分鐘攪拌。加入吡啶(0.14mL)後升溫至室溫，將反應混合物加入於乙腈(50g)，將析出的固體經過濾後得到化合物 113(0.20g)。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.16-1.83(m、96H)、2.22(s、3H)、2.45-2.51(m、1H)、2.59-2.63(m、2H)、2.79-2.83(m、4H)、3.07-3.20(m、4H)、3.27-4.29(m、15H)、5.56(d、1H)、6.31-6.36(m、1H)、6.58(s、2H)、8.06(d、1H)、8.64(s、1H)、8.93(brs、1H)。MS(ESI $^+$) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1416.0785。

[0661]

步驟 2 化合物 114 之合成

在氮氣環境下，將膦酸 (17mg、0.21mmol) 的吡啶 (0.30mL) 溶液升溫至 40℃，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (6.3μL、46μmol) 並進行 30 分鐘攪拌。其後，加入化合物 113 (11mg、7.8μmol) 並進行 2 小時 15 分鐘攪拌，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物 (21μL、0.15mmol)，再進行 1 小時 10 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 114 為主生成物。

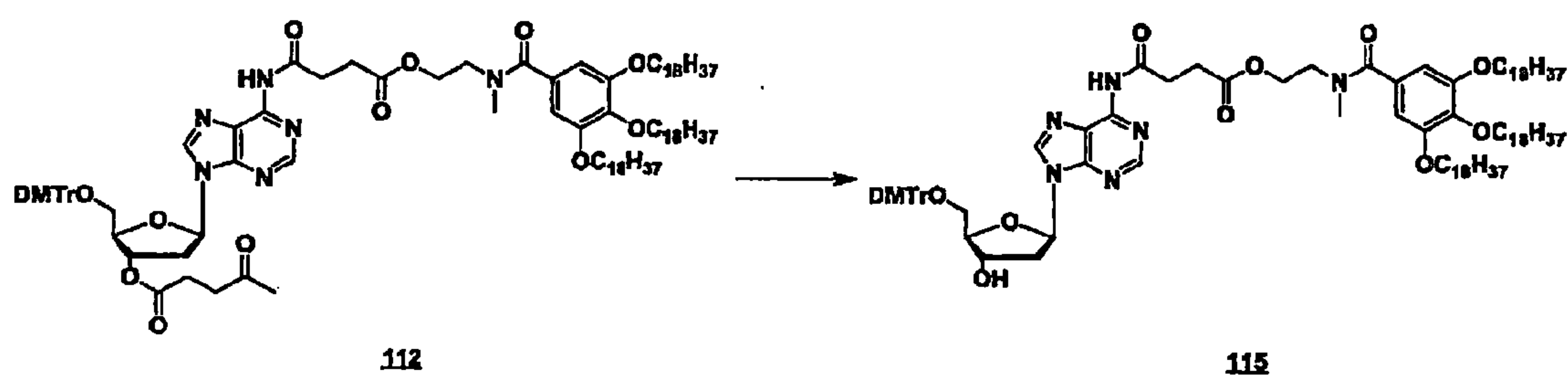
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1480.0474。

[0662]

實施例 121(導入擬似固相保護基之腺苷的 3'位脫保護):
化合物 115 之合成

[0663]

【化 1 4 3】



[0664] 在氮氣環境下，於化合物 112 (33mg、19μmol) 的二氯甲烷 (0.13g) 溶液在室溫下加入乙酸 (0.20mL) 後，冷卻至 0℃，加入胼 1 水合物 (1.9μL、39μmol)，進行 4 小時 30 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合

物 115 為主生成物。

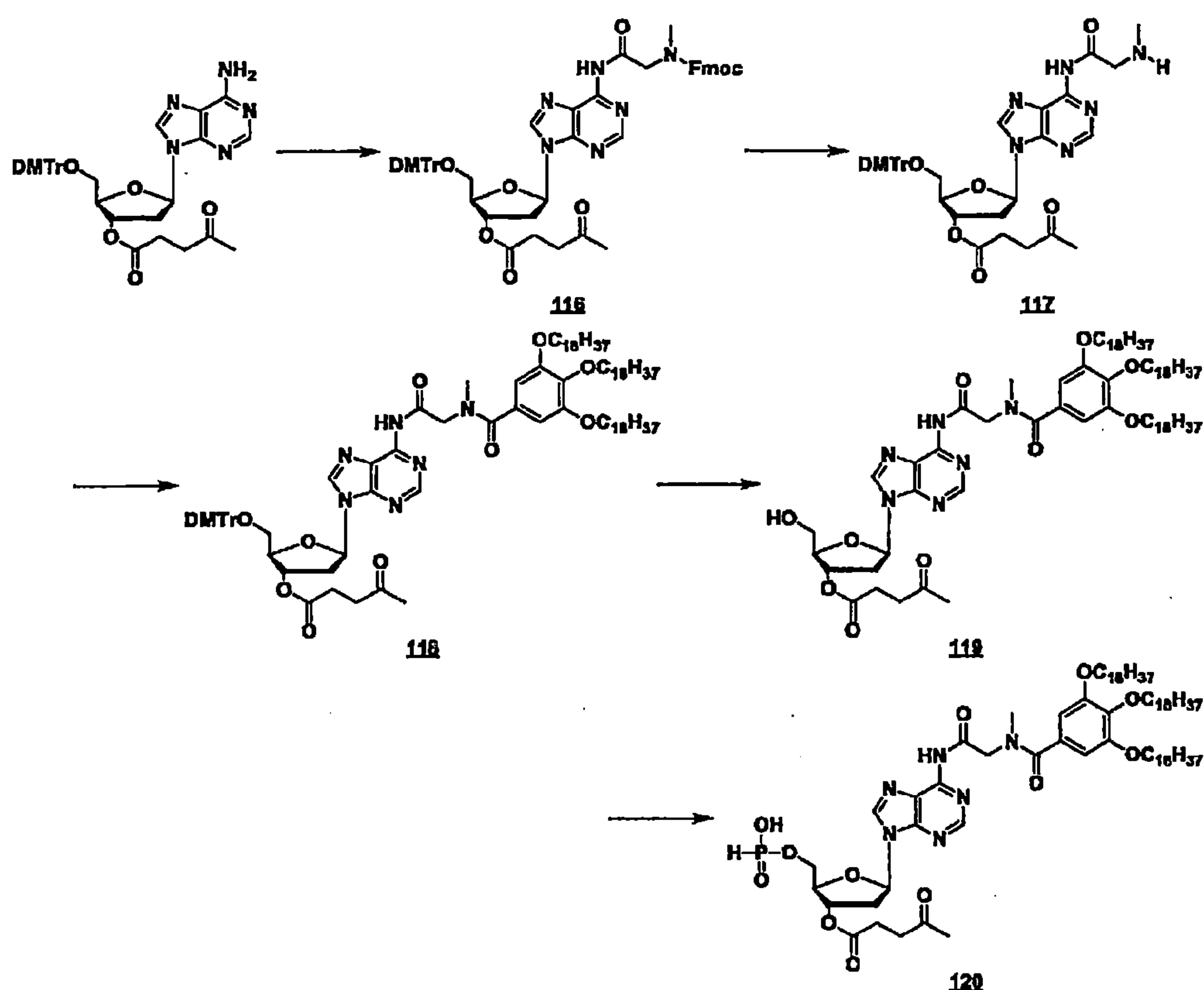
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 1620.1626。

[0665]

實施例 122(新穎擬似固相保護基之合成及腺苷之 5'位官能基變換) : 化合物 120 之合成

[0666]

【化 1 4 4】



[0667]

步驟 1 化合物 116 之合成

在氮氣環境下，將 5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙醯丙醯基-2'-脫氧腺苷 (2.0g、3.1mmol) 與 DMAP(0.78g、6.4mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液升溫至

40℃，以 N- α -(9-苄基甲氧基羰基)-N- α -甲基甘胺酸 (2.0g、6.3mmol)、WSC·HCl(1.2g、6.3mmol)的順序加入，在 40℃進行 3 小時攪拌。冷卻至室溫後，以 5%碳酸氫鈉水溶液洗淨 2 次，將所得之有機層以水洗淨 1 次。將有機層在減壓下濃縮後以矽膠層析法(氯仿-甲醇)進行純化後得到化合物 116(1.3g)。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 2.21(s、3H)、2.42-2.81(m、5H)、3.05-3.14(m、4H)、3.45(brs、2H)、3.77(s、6H)、4.00-4.69(m、6H)、5.55(brs、1H)、6.50(brs、1H)、6.77-6.91(m、4H)、7.19-7.78(m、17H)、8.14(d、1H)、8.52-8.90(m、2H)。MS(ESI^+) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 945.3776。

[0668]

步驟 2 化合物 117 之合成

在氮氣環境下，於化合物 116(0.10g、0.11mmol)的乙腈(2.1g)溶液，在室溫加入吡啶(32 μL 、0.32mmol)，並進行 2 小時 39 分鐘攪拌。加入庚烷後分液，將乙腈層以庚烷洗淨 3 次。將所得之有機層在減壓下濃縮後得到化合物 117(61mg)。

MS(ESI^+) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 723.3209。

[0669]

步驟 3 化合物 118 之合成

在氮氣環境下，於 3,4,5-參(十八烷氧基)安息香酸(依據國際公開第 2014-077292 號所記載的方法進行合

成)(51mg、55 μ mol)與化合物 117(61mg、85 μ mol)的二氯甲烷(2.5g)溶液中，加入 HOBt(無水)(12mg、90 μ mol)，繼續加入 WSC·HCl(18mg、92 μ mol)，進行 4 小時 39 分鐘攪拌。將反應混合物加入於甲醇(31g)，析出固體後經過濾，得到化合物 118(65mg)的白色固體。

$^1\text{H-NMR}$: (300MHz ; CDCl_3) δ 0.88(t、9H)、1.26-1.77(m、96H)、2.21(s、3H)、2.58-2.81(m、5H)、3.01-3.16(m、4H)、3.78(s、6H)、3.96(s、6H)、4.81(s、2H)、5.53(d、1H)、6.48(q、1H)、6.70(s、2H)、6.77-7.39(m、14H)、8.11(s、1H)、8.58(brs、1H)。

$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1632.1611。

[0670]

步驟 4 化合物 120 之合成

在氮氣環境下，將化合物 118(11mg、6.9 μ mol)及吡啶(2.1mg、18 μ mol)的二氯甲烷(0.20mL)溶液冷卻至 10 $^{\circ}\text{C}$ ，加入膦酸(14mg、0.17mmol)，進行 1 小時 27 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 119 為主生成物。

$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1330.0382。

其後，加入吡啶(0.050mL)並升溫至室溫，加入 2,2-二甲基丁醯基氯化物(14 μ L、0.10mmol)，進行 1 小時 40 分鐘攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 120 為主生成物。

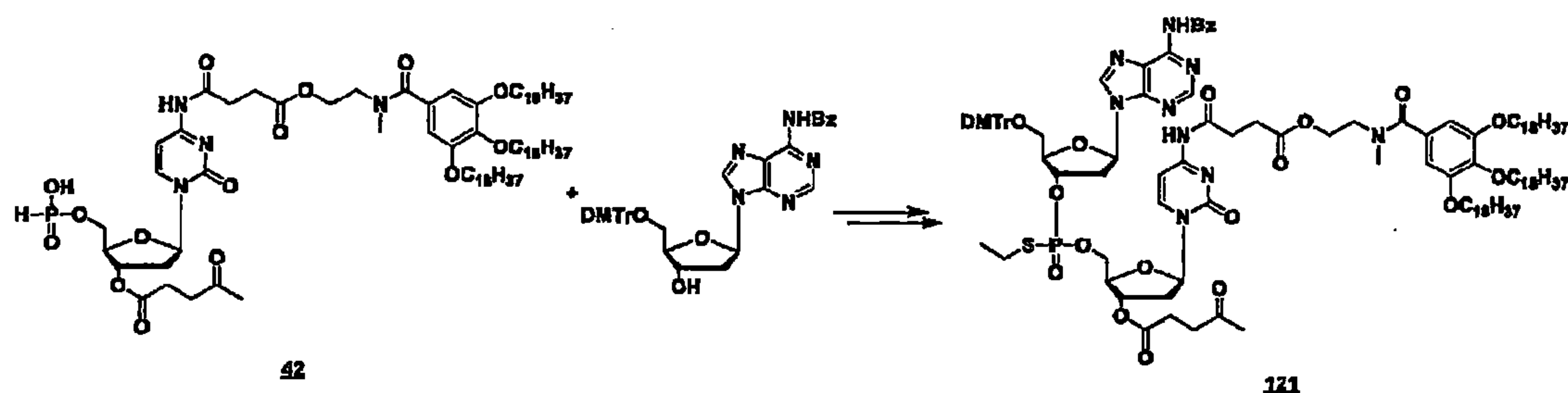
$\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1394.0054。

[0671]

實施例 123(硫化劑檢討): 化合物 121 之合成

[0672]

【化 1 4 5】



[0673] 在氮氣環境下，於化合物 42(0.15g)與 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脫氧腺苷(東京化成工業公司製)(0.10g、0.16mmol)的吡啶(3.0mL)溶液中，在 25℃ 加入作為縮合劑之碳酸雙五氟苯酯(0.13g、0.32mmol)，進行 20 分鐘攪拌，進行偶合反應。反應混合物(3.53g)之中，於 0.47g 加入作為硫化劑的 N-(乙基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(依據 Shinret、2009 年、1 號、112 頁-116 頁所記載的方法進行合成)(4.5mg、22μmol)，在室溫進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 121 為主生成物。

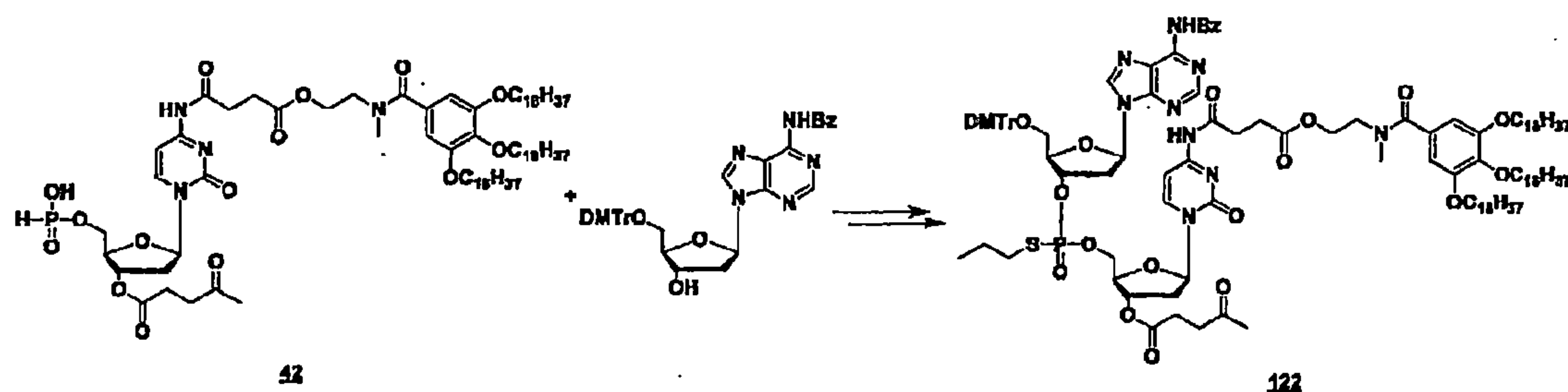
MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 2155.2871。

[0674]

實施例 124(硫化劑檢討): 化合物 122 之合成

[0675]

【化 1 4 6】



[0676] 於在實施例 123 所得之偶合反應後的反應混合物(0.46g)中，加入作為硫化劑之 N-(n-丙基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(依據 Bio Organic and Medicinal Chemistry、2006 年、14 卷、11 號、3775 頁-3784 頁所記載的方法進行合成)(5.7mg、26 μ mol)，在室溫進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 122 為主生成物。

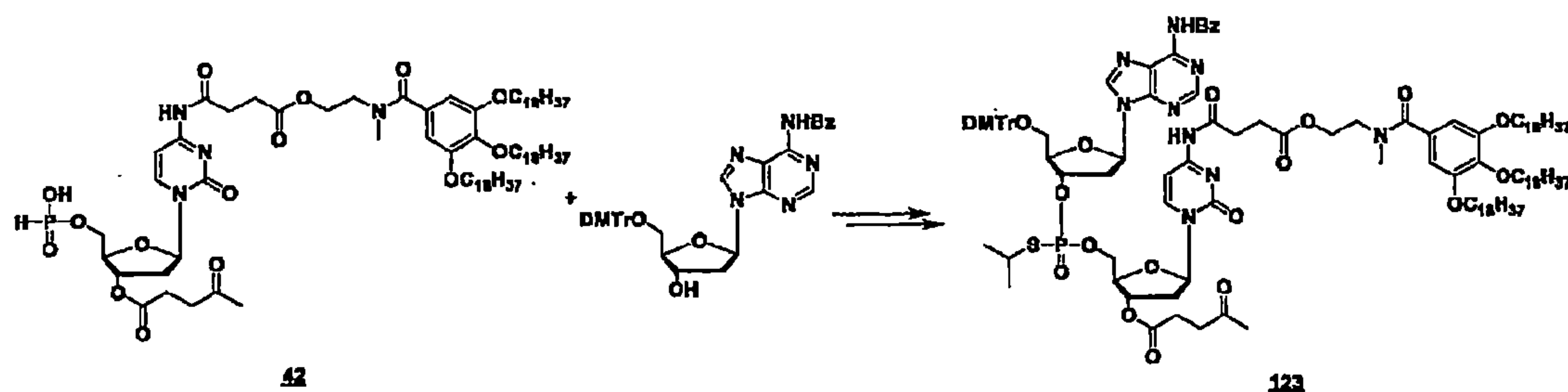
MS(ESI⁺)：[M+H]⁺ 2169.3107。

[0677]

實施例 125(硫化劑檢討)：化合物 123 之合成

[0678]

【化 1 4 7】



[0679] 於在實施例 123 所得之偶合反應後的反應混

合物(0.48g)中，作為硫化劑加入 N-(異丙基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(依據 Bio Organic and Medicinal Chemistry、2006 年、14 卷、11 號、3775 頁-3784 頁所記載的方法進行合成)(5.6mg、25 μ mol)，在室溫進行 3 小時 30 分鐘攪拌。其後，追加 N-(異丙基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(32mg、0.15mmol)，進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 123 為主生成物。

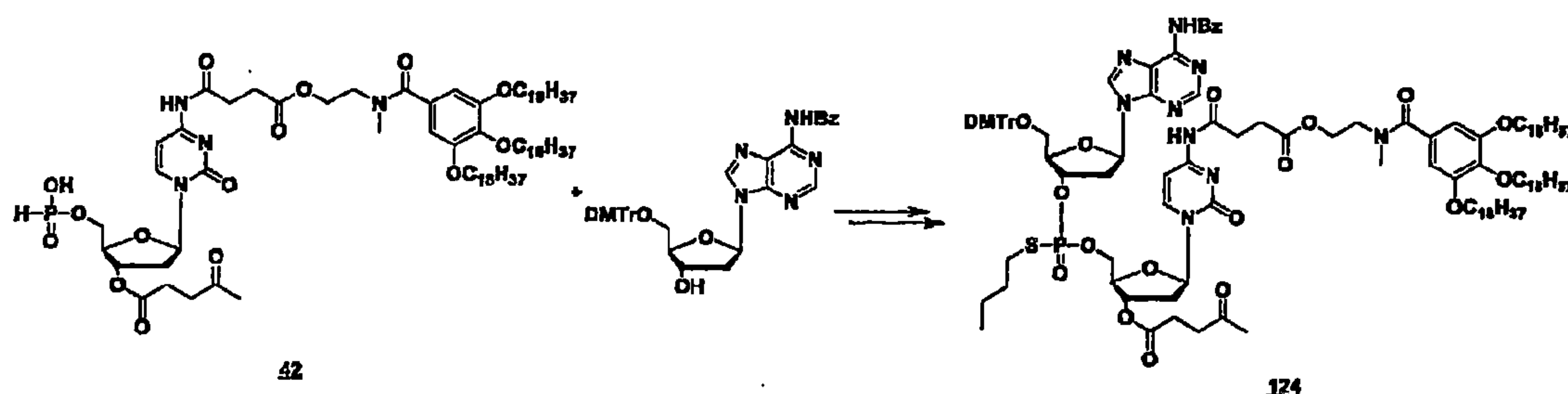
MS(ESI⁺)：[M+H]⁺ 2169.2959。

[0680]

實施例 126(硫化劑檢討)：化合物 124 之合成

[0681]

【化 1 4 8】



[0682] 於在實施例 123 所得之偶合反應後的反應混合物(0.48g)中，作為硫化劑加入 N-(n-丁基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(依據 Bio Organic and Medicinal Chemistry、2006 年、14 卷、11 號、3775 頁-3784 頁所記載的方法進行合成)(6.6mg、28 μ mol)，在室溫進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 124 為主生成物。

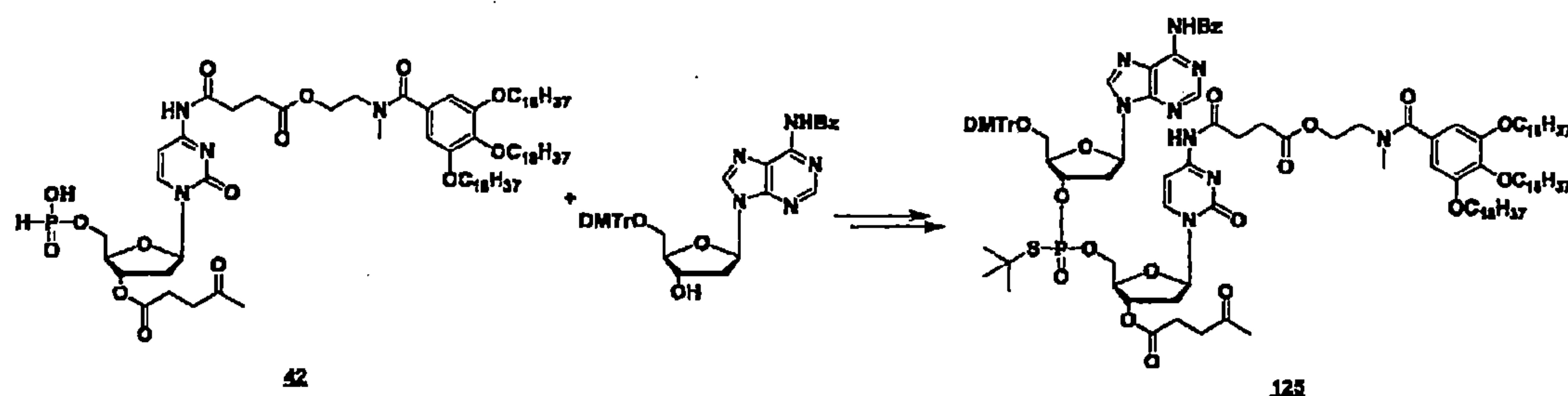
MS(ESI⁺)：[M+H]⁺ 2183.3273。

[0683]

實施例 127(硫化劑檢討)：化合物 125 之合成

[0684]

【化 149】



[0685] 於在實施例 123 所得之偶合反應後的反應混合物(0.47g)，作為硫化劑加入 N-(tert-丁基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(依據 Shinret、2009 年、1 號、112 頁-116 頁所記載的方法進行合成)(6.4mg、27 μ mol)，在室溫進行 3 小時 30 分鐘攪拌。其後，追加 N-(tert-丁基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(0.11g、0.47mmol)，進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 125 為主生成物。

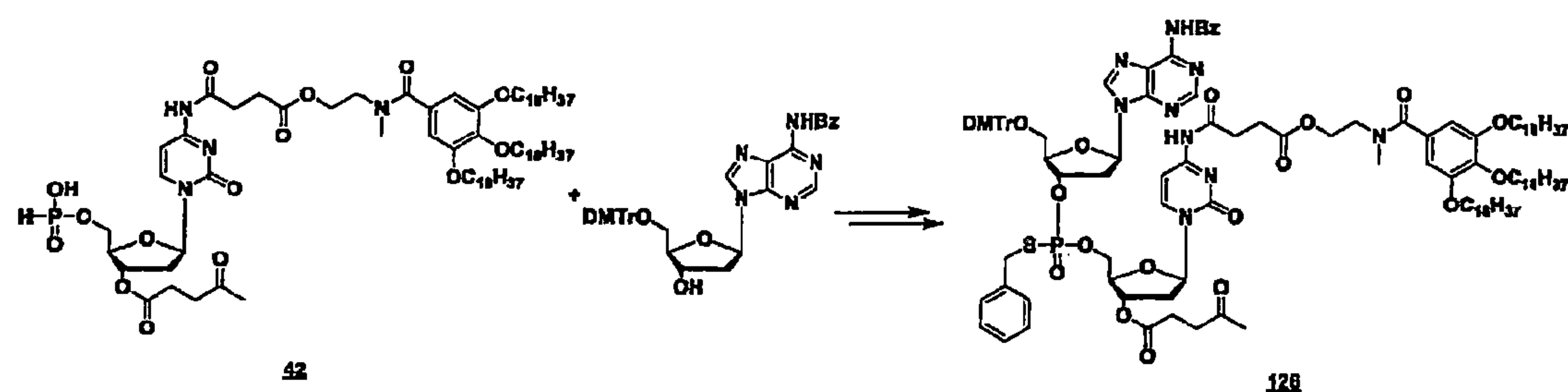
MS(ESI⁺)：[M+H]⁺ 2183.3326。

[0686]

實施例 128(硫化劑檢討)：化合物 126 之合成

[0687]

【化 1 5 0】



[0688] 於在實施例 123 所得的偶合反應後之反應混合物(0.48g)中，作為硫化劑加入 N-(苯甲基硫基)鄰苯二甲醯亞胺(依據 Bio Organic and Medicinal Chemistry、2006 年、14 卷、11 號、3775 頁-3784 頁所記載的方法進行合成)(5.7mg、21 μ mol)，在室溫進行 1 小時攪拌。將反應混合物藉由 LC-MS 分析後確認化合物 126 為主生成物。

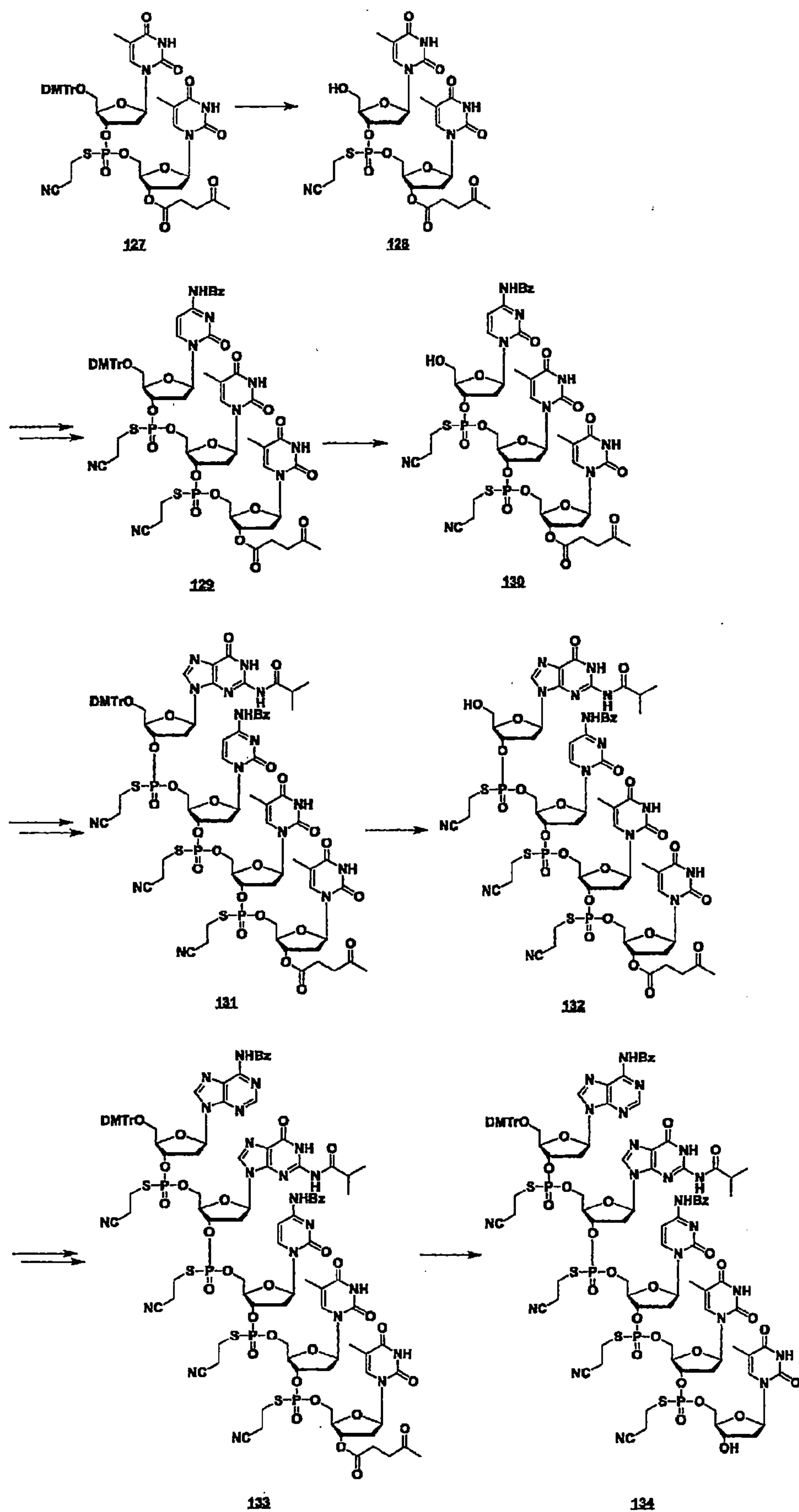
MS(ESI⁺)：[M+H]⁺ 2217.3232

[0689]

參考合成例 8(5mer 合成)：化合物 134 之合成

[0690]

【化151】



[0691]

步驟 1 化合物 128 之合成

使用 3'-O-乙醯丙醯基胸苷(依據 Bio Organic and Medicinal Chemistry、2013 年、21 卷、8013 頁-8018 頁所記載的方法進行合成)(0.75g、2.2mmol)，於含有依據特表 2003-525305 所記載的方法進行合成之化合物 127 的二氯甲烷(26g)溶液中，加入吡啶(0.78g、6.6mmol)並冷卻至 10℃，加入二氯乙酸(0.90mL、11mmol)，進行 1 小時 17 分鐘攪拌。再加入二氯乙酸(0.90mL、11mmol)，進行 40 分鐘攪拌。將反應混合物加入於 5%碳酸氫鈉水溶液並分液。於所得之水層中加入二氯甲烷，並分液的再萃取操作實施 11 次，合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去得到粗物。將粗物以矽膠層析法(氯仿-甲醇)純化後得到化合物 128(0.65g)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 714.1865。

[0692]

步驟 2 化合物 130 之合成

在氮氣環境下，於化合物 128(0.65g、0.91mmol)與 N⁴-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羥基磷-2'-脫氧胞苷三乙基胺鹽(Chem jeans 公司製)(1.0g、1.3mmol)的吡啶(8mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(1.3g、3.2mmol)，進行 15 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑加入 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(0.43g、1.9mmol)，進行 1 小時 57 分鐘攪拌。加入二氯甲烷與 5%

碳酸氫鈉水溶液並分液，將所得之水層以二氯甲烷洗淨 2 次。合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去，得到含有化合物 129 之反應混合物(13g)。其中將 12g 進一步減壓下濃縮，加入甲苯後減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(16g)、吡啶(0.30g、2.6mmol)，冷卻至 10℃，加入二氯乙酸(0.69mL、8.4mmol)，進行 1 小時 40 分鐘攪拌。將反應混合物加入於 5%碳酸氫鈉水溶液並分液。於所得之水層中加入二氯甲烷並分液，將再萃取操作的實施 2 次，合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去得到粗物。將粗物以矽膠層析法(氯仿-甲醇)純化後得到化合物 130(0.30g)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1176.2650。

[0693]

步驟 3 化合物 132 之合成

在氮氣環境下，於化合物 130(0.24g、0.20mmol)與 N²-異丁醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羥基磷-2'-脫氧鳥嘌呤核苷三乙基胺鹽(Chem jeans 公司製)(0.23g、0.29mmol)的吡啶(6mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(0.43g、1.1mmol)，進行 27 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑使用 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(0.10g、0.43mmol)，進行 1 小時 34 分鐘攪拌。加入二氯甲烷與 5%碳酸氫鈉水溶液並分液，將所得之水層以二氯甲烷洗淨 2 次。合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去，得到含有化合物 131 之反應混合物。加入甲苯並將減壓下

濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(8.0g)及吡啶(77mg、0.66mmol)，冷卻至 10℃，加入二氯乙酸(0.17mL、2.0mmol)，進行 2 小時 8 分鐘攪拌。將反應混合物加入於 5%碳酸氫鈉水溶液並分液。於所得之水層中加入二氯甲烷並進行分液，再萃取操作實施 2 次，合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去，得到粗物。將粗物以矽膠層析法(氯仿-甲醇)純化後得到化合物 132(0.12g)。

MS(ESI⁺): [M+H]⁺ 1644.3648。

[0694]

步驟 4 化合物 134 之合成

在氮氣環境下，於化合物 132(0.12g、74μmol)與 N⁶-苯甲醯基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羥基磷-2'-脫氧腺苷三乙基胺鹽(Chem jeans 公司製)(90mg、0.11mmol)的吡啶(5mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(0.28g、0.71mmol)，進行 1 小時 2 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑使用 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(37mg、0.16mmol)，進行 2 小時 8 分鐘攪拌。加入二氯甲烷、乙腈與 5%碳酸氫鈉水溶液並分液，將所得之水層以二氯甲烷與乙腈之混合溶劑洗淨 2 次。合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去，得到含有化合物 133 之反應混合物。於該反應混合物中加入二氯甲烷(3.1g)，冷卻之 0℃，加入乙酸(0.15mL)後，加入胼 1 水合物(36μL、0.74mmol)，進行 1 小時 26 分鐘攪拌。於反應混合物加入乙醯丙酮(0.30mL)後升溫至室溫，加入 5%碳酸氫鈉水溶

液並分液後所得之水層加入於二氯甲烷並分液的再萃取操作實施 2 次，合併所得之有機層，將溶劑減壓下餾去得到粗物。將粗物以矽膠層析法(氯仿-甲醇)純化後得到化合物 134(55mg)。

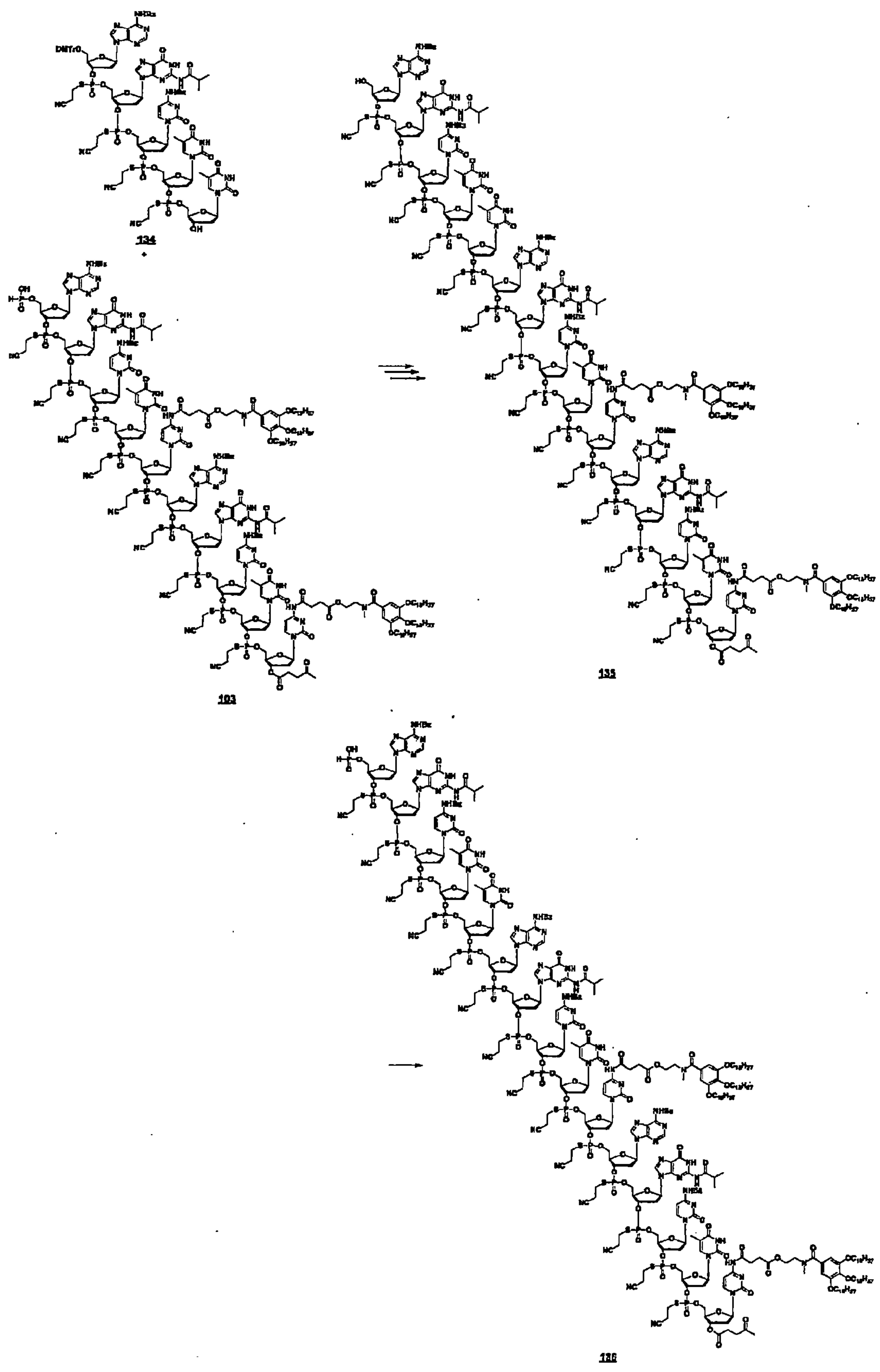
MS(ESI⁺) : [M+H]⁺ 2334.5224。

[0695]

實施例 129(15mer 合成)：化合物 136 之合成

[0696]

【化 1 5 2】



[0697]

步驟 1 化合物 135 之合成

在氮氣環境下，於化合物 103(43mg)與化合物 134(19mg、8.3 μ mol)的吡啶(1.4mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(59mg、0.15mmol)，進行 58 分鐘攪拌。其後，作為硫化劑使用 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二甲醯亞胺(10mg、44 μ mol)，進行 40 分鐘攪拌。其後，將反應混合物在減壓下濃縮。加入甲苯(2g)並在減壓下濃縮的操作重複 3 次後，加入二氯甲烷(1.2mL)，將吡啶(2.5mg、21 μ mol)、二氯乙酸(6.2 μ L、76 μ mol)在 10 $^{\circ}$ C 下加入，進行 1 小時 51 分鐘攪拌。其後，追加二氯乙酸(6.2 μ L、76 μ mol)，進行 2 小時 41 分鐘攪拌。進一步追加二氯乙酸(6.2 μ L、76 μ mol)，進行 1 小時 38 分鐘攪拌。加入吡啶(0.20mL)並升溫至室溫，將反應混合物加入於乙腈(38g)，將析出的固體析出過濾後得到化合物 135(51mg)之淡皮膚色固體。

MS(ESI⁺): [M+4H]⁴⁺ 2140.0080。

[0698]

步驟 2 化合物 136 之合成

在氮氣環境下，於化合物 135(50mg、5.8 μ mol)的二氯甲烷(2.0mL)與吡啶(0.12mL)的混合溶液中，在 40 $^{\circ}$ C 加入磷酸(19mg、0.23mmol)，將 2,2-二甲基丁醯基氯化物(25 μ L、0.18mmol)分為 5 分加入後進行 1 小時 12 分鐘攪拌。其後，將反應混合物加入於乙腈(39g)，將析出的固

體經過濾後得到化合物 136(44mg)之淡皮膚色固體。

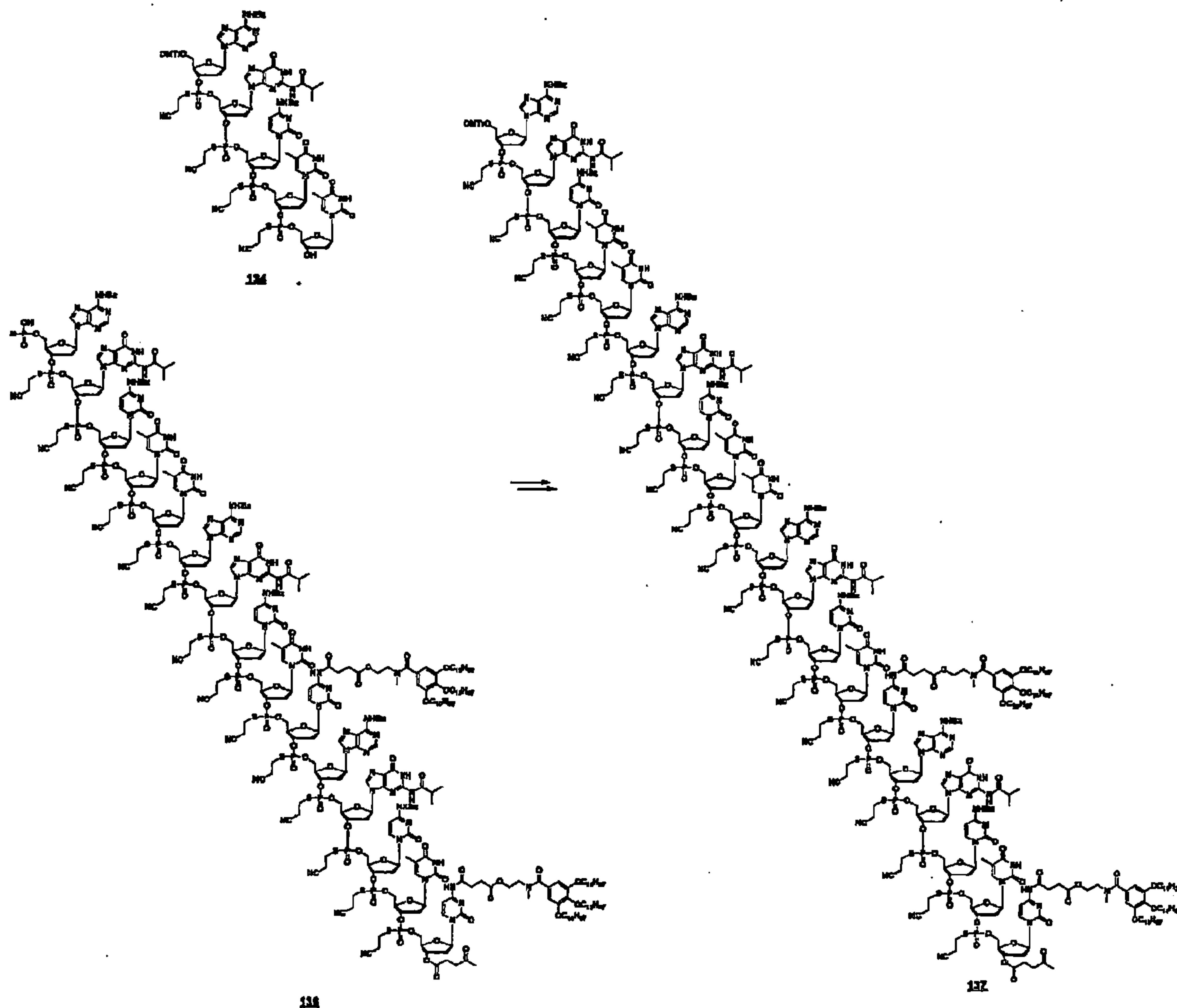
MS(ESI⁺): [M+4H]⁴⁺ 2155.9794。

[0699]

實施例 130(20mer 合成): 化合物 137 之合成

[0700]

【化 1 5 3】



[0701] 在氮氣環境下，於化合物 134(19mg、8.1 μ mol)與化合物 136(44mg)的吡啶(1.2mL)溶液，在室溫加入碳酸雙五氟苯酯(274mg、0.69mmol)，進行 1 小時攪拌。其後，作為硫化劑使用 N-[(2-氰基乙基)硫代]鄰苯二

甲醯亞胺 (5.1mg、22 μ mol)，進行 1 小時攪拌。將反應混合物加入於甲醇 (30g)，將析出的固體經過濾後得到化合物 137(46mg)的白色固體。

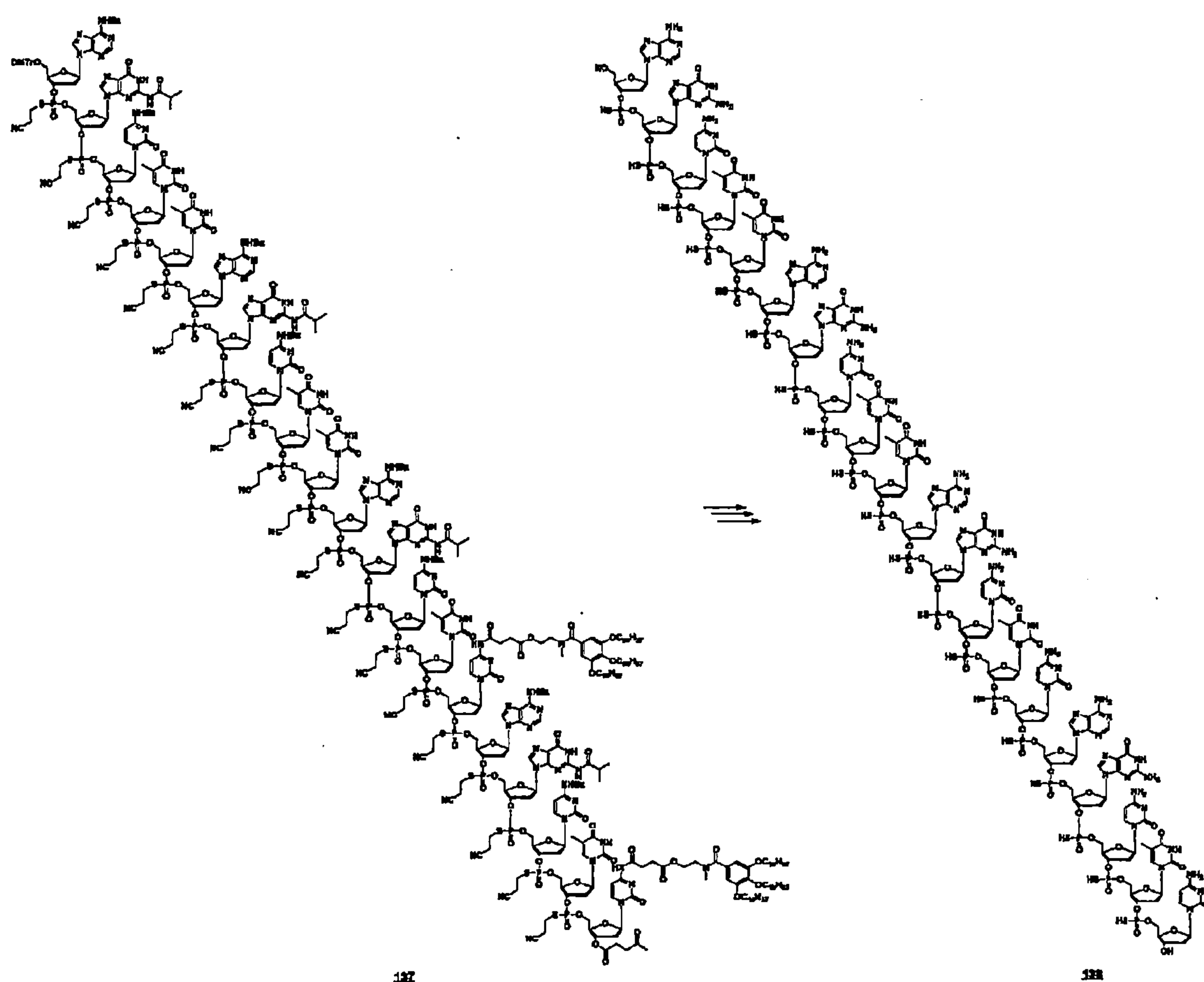
MS(ESI⁺) : [M+5H]⁵⁺ 2205.1210。

[0702]

實施例 131(20mer 的脫保護)：化合物 138 之合成

[0703]

【化 1 5 4】



[0704] 在氮氣環境下，於化合物 137(2.6mg、0.24 μ mol)的二氯甲烷 (0.38g)溶液，在室溫加入 1,8-二氮

雜雙環 [5.4.0]-7-十一碳烯 [DBU](3.5 μ L、23 μ mol)、TMSCl(0.70 μ L、5.5 μ mol)，進行 30 分鐘攪拌。將反應混合物(1.6g)在減壓下濃縮，加入 28%氨水(1.0mL)、乙二胺四乙酸(3.1mg、11 μ mol)，在 80 $^{\circ}$ C 進行 2 小時 6 分鐘攪拌。將反應混合物經 LC-MS 分析後，確認化合物 138 的生成。

MS(ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2123.8976。

[產業上可利用性]

[0705] 本發明為與由偶合步驟、氧化反應或硫化反應等將磷原子經修飾的步驟、脫保護步驟等所構成的通常製造方法相異的製造方法，可提供藉由含有具有擬似固相保護基之核苷酸或寡核苷酸的 5'位羥基或 3'位羥基經 H-膦酸酯化的步驟之製造方法，使用容易分離且保存安定性高的核苷酸或寡核苷酸，可對應大量合成之寡核苷酸的新穎製造方法。因此，本發明可適用於 siRNA、反義核酸、疫苗的輔助劑等寡核苷酸之製造上，在基因組創藥或基因診斷・治療等領域中極有用。

申請專利範圍

1.一種寡核苷酸的製造方法，其特徵為含有於選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼（Nucleic acid base）部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，將 5'位或 3'位為羥基之核苷酸或寡核苷酸的該 5'-羥基或 3'-羥基進行 H-磷酸酯化的步驟。

2.如請求項 1 之製造方法，其中至少含有 1 個伸長反應循環，該伸長反應循環為含有於選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，將 5'位或 3'位為羥基之核苷酸或寡核苷酸的該 5'-羥基或 3'-羥基進行 H-磷酸酯化的步驟。

3.如請求項 2 之製造方法，其中前述伸長反應循環為具有以下步驟者；

第一步驟為含有，於選自 2'位、3'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，於 3'位具有以基本保護基或擬似固相保護基所保護的羥基，將於 5'位具有以一時保護基所保護的羥基之第一核苷酸或第一寡核苷酸之一時保護基經除去後生成 5'-羥基的步驟；

第二步驟為含有，將所生成的 5'-羥基使用 H-磷酸酯化試藥進行 H-磷酸酯化的步驟；

第三步驟為含有，由 H-磷酸酯化的 5'-羥基，與於 3'位具有羥基且於 5'位具有以一時保護基所保護的羥基之第二核苷酸或第二寡核苷酸的 3'-羥基形成亞磷酸二酯鍵，得到第一核苷酸或第一寡核苷酸與第二核苷酸或第二寡核

苷酸之共軛物的第三步驟。

4.如請求項 3 之製造方法，其為進一步含有以下第四步驟，該步驟為含有將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、以基本保護基所保護的磷酸二酯鍵或以基本保護基所保護的硫代磷酸二酯鍵之步驟。

5.如請求項 3 之製造方法，其為進一步含有以下第四步驟，該步驟為含有將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵或胺基磷酸二酯鍵的步驟。

6.如請求項 4 或 5 之製造方法，其為進一步含有第五步驟，該步驟為於由選自由前述第一步驟至第四步驟所成群的至少 1 種步驟所得的反應混合物中，添加極性溶劑使其產生沈澱物，與將所生成的沈澱物藉由固液分離而取得者。

7.如請求項 6 之製造方法，其中前述極性溶劑為碳數 1 至 6 的醇溶劑或碳數 1 至 6 的腈溶劑。

8.如請求項 3 至 5 中任一項之製造方法，其中更含有將前述基本保護基、一時保護基及擬似固相保護基皆除去的第六步驟。

9.如請求項 3 至 5 中任一項之製造方法，其中前述第一核苷酸或第一寡核苷酸具有於 3' 位以擬似固相保護基所保護的羥基。

10.如請求項 3 至 5 中任一項之製造方法，其中前述

第三步驟為使用前述第二核苷酸。

11.如請求項 2 之製造方法，其為含有以下第七步驟至第九步驟者；

第七步驟為含有，前述伸長反應循環為，於選自由 2' 位、5' 位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，於 5' 位具有以基本保護基或擬似固相保護基所保護的羥基，將於 3' 位具有以一時保護基所保護的羥基之第三核苷酸或第三寡核苷酸的一時保護基除去後生成 3'-羥基之步驟；

第八步驟為含有，將所生成的 3'-羥基使用 H-膦酸酯化試藥，使其進行 H-膦酸酯化之步驟；

第九步驟為含有，由經 H-膦酸酯化的 3'-羥基，與於 5' 位具有羥基，於 3' 位具有以一時保護基所保護的羥基之第四核苷酸或第四寡核苷酸的 5'-羥基形成亞磷酸二酯鍵，得到第三核苷酸或第三寡核苷酸與第四核苷酸或第四寡核苷酸的共軛物之步驟。

12.如請求項 11 之製造方法，其中更含有第十步驟，該步驟為含有，將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵、胺基磷酸二酯鍵、以基本保護基所保護的磷酸二酯鍵或以基本保護基所保護的硫代磷酸二酯鍵之步驟。

13.如請求項 11 之製造方法，其中更含有第十步驟，該步驟為含有，將前述共軛物的亞磷酸二酯鍵轉換為磷酸二酯鍵、硫代磷酸二酯鍵、硼烷磷酸二酯鍵或胺基磷酸二

酯鍵之步驟。

14.如請求項 12 或 13 之製造方法，其中更含有第十一步驟，該步驟為，於由前述第七步驟至第十步驟中任一步驟所得的反應混合物中，添加極性溶劑使其產生沈澱物，與將所生成的沈澱物藉由固液分離而取得者。

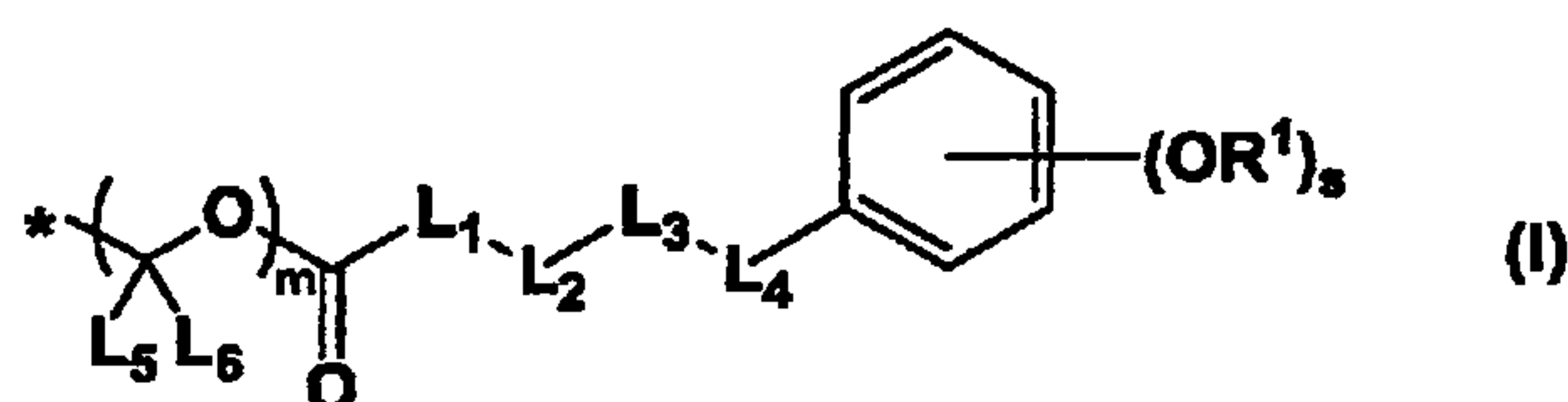
15.如請求項 14 之製造方法，其中前述極性溶劑為碳數 1 至 6 的醇溶劑或碳數 1 至 6 的腈溶劑。

16.如請求項 11 至 13 中任一項之製造方法，其中更含有第十二步驟，該步驟為，將前述基本保護基、一時保護基及擬似固相保護基皆除去的步驟。

17.如請求項 11 至 13 中任一項之製造方法，其中前述第三核苷酸或第三寡核苷酸為於 5'位具有以擬似固相保護基所保護的羥基。

18.如請求項 11 至 13 中任一項之製造方法，其中前述第九步驟為使用第四核苷酸。

19.如請求項 3 至 5、11 至 13 中任一項之製造方法，其中前述擬似固相保護基為下述式(I)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

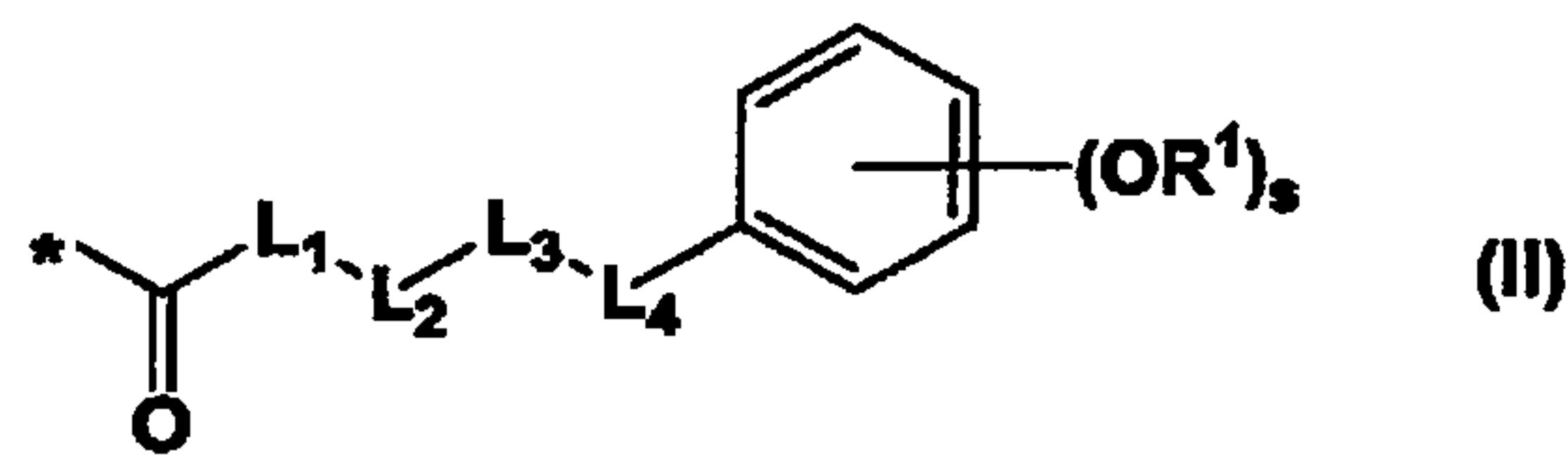
L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有，該擬似固相保護基之 m 為 0 時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3)所示者。

20.如請求項 19 之製造方法，其中 R^1 為 C10-30 烷基或 C10-30 烯基。

21.如請求項 3 至 5、11 至 13 中任一項之製造方法，其中前述擬似固相保護基為下述式(II)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 -O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 -O-，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3)所示者。

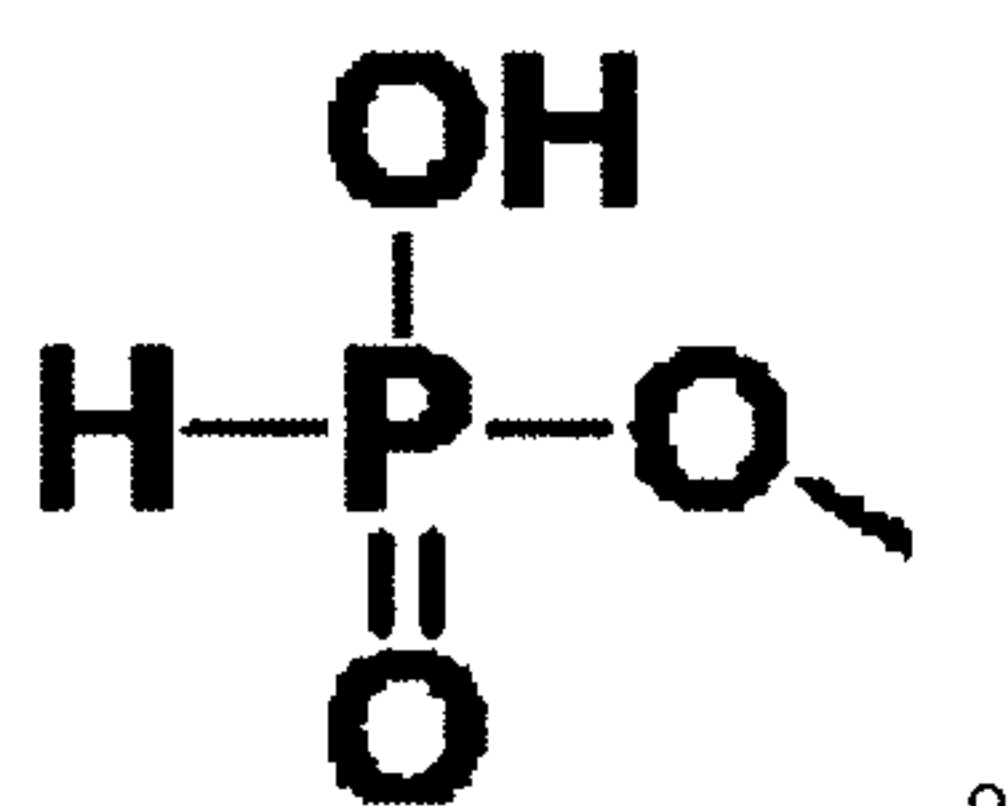
22.如請求項 3 至 5、11 至 13 中任一項之製造方法，其

中前述一時保護基為 *tert*-丁基二甲基矽基、4、4'-二甲氧基三苯甲基或乙醯丙醯基。

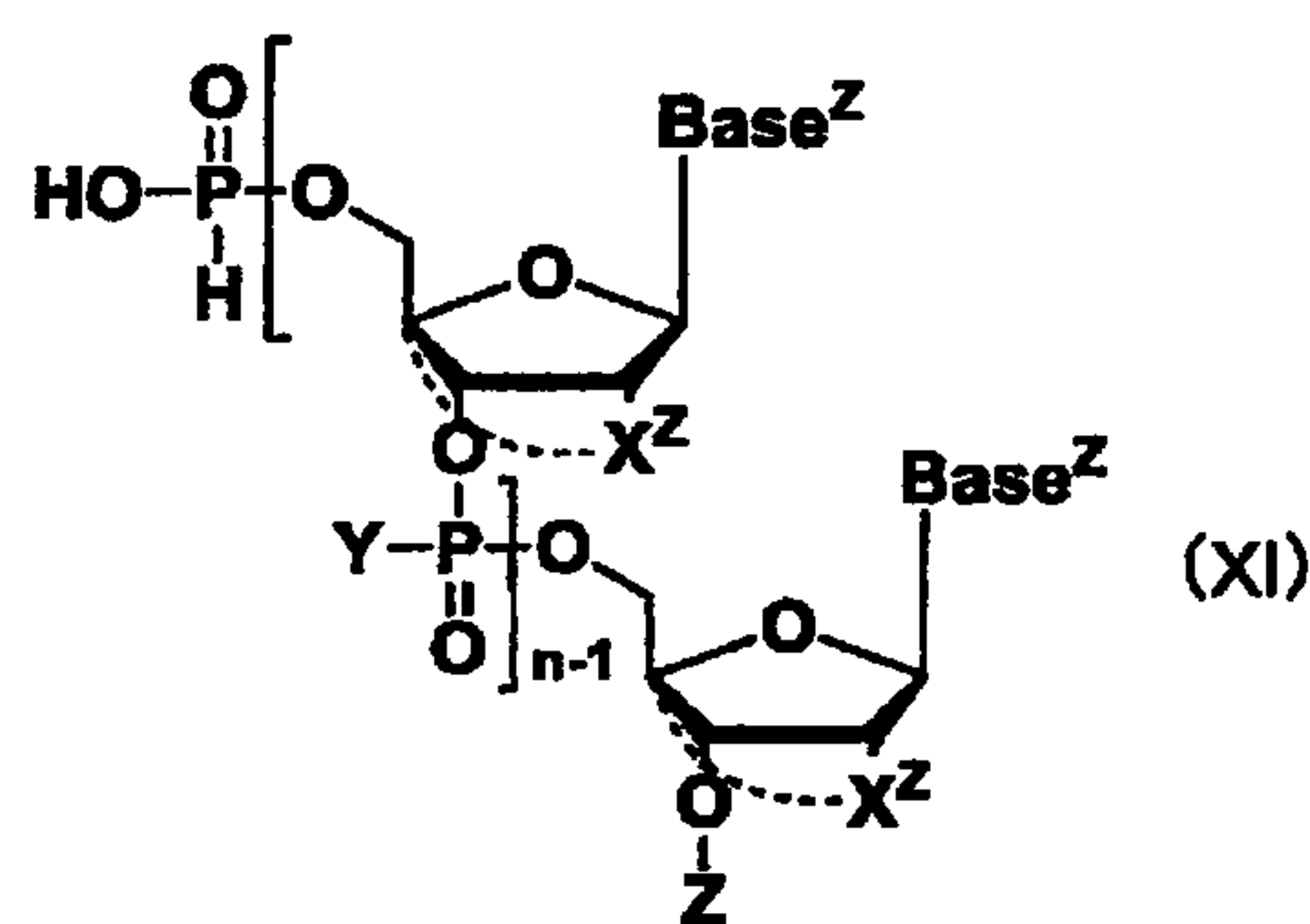
23.如請求項 3 至 5、11 至 13 中任一項之製造方法，其中前述進行 H-磷酸酯化的步驟為使用選自由亞磷酸、亞磷酸二苯基、苯基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、*p*-甲苯甲醯基-H-磷酸酯之三乙基銨鹽、2-氯-4H-1,3,2-苯並二氧磷素-4-酮、三氯化磷所成群的至少一種 H-磷酸酯化試藥。

24.如請求項 3 至 5、11 至 13 中任一項之製造方法，其中於前述第一至第四核苷酸及第一至第四寡核苷酸所含之核酸鹼，各獨立為選自由 6-胺基嘌呤-9-基(腺嘌呤殘基)、2-胺基-6-羥基嘌呤-9-基(鳥嘌呤殘基)、2-氧代-4-胺基-1,2-二氫嘧啶-1-基(胞嘧啶殘基)、2-氧代-4-胺基-5-甲基-1,2-二氫嘧啶-1-基(5-甲基胞嘧啶殘基)、2-氧代-4-羥基-1,2-二氫嘧啶-1-基(尿嘧啶殘基)及 2-氧代-4-羥基-5-甲基-1,2-二氫嘧啶-1-基(胸腺嘧啶殘基)所成群的至少 1 種。

25. 一種核苷酸或寡核苷酸，其特徵為於選自由 2' 位、3' 位、5' 位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，5' 位或 3' 位為下述式所示基：



26.一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式(XI)：



[式中， n 表示 1 以上的任意整數，

Base^Z ，各獨立表示核酸鹼、以基本保護基所保護的核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，

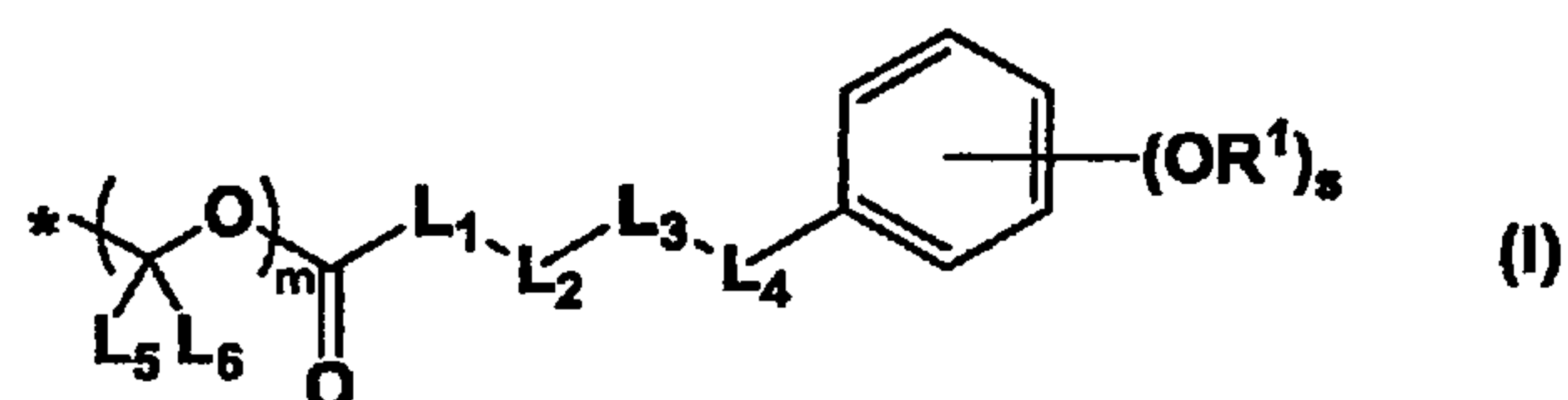
X^Z ，各獨立表示氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，

Y ，各獨立表示氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護的硫醇基、氫化硼基、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，

Z 表示氫原子、基本保護基、一時保護基或擬似固相保護基，

且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的羥基，及 Z 為擬似固相保護基的至少一項]所示。

27.如請求項 26 之化合物或其鹽，其中前述擬似固相保護基為下述式(I)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

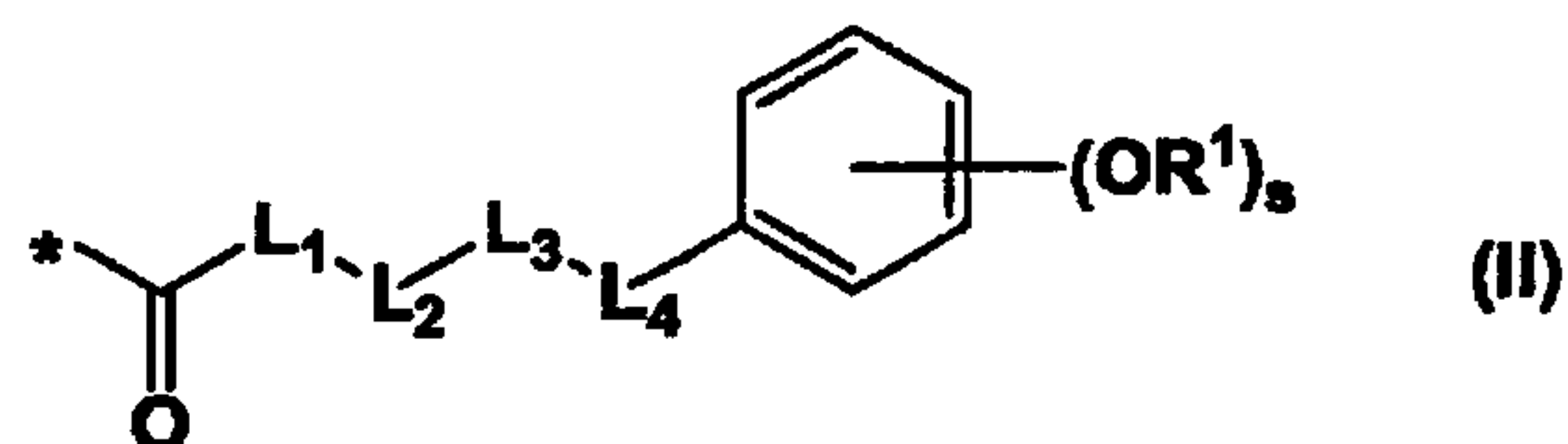
L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有，該擬似固相保護基之 m 為 0 時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3)所示者。

28.如請求項 26 之化合物或其鹽，其中前述擬似固相保護基為下述式(II)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 -O-、

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或 -O-、

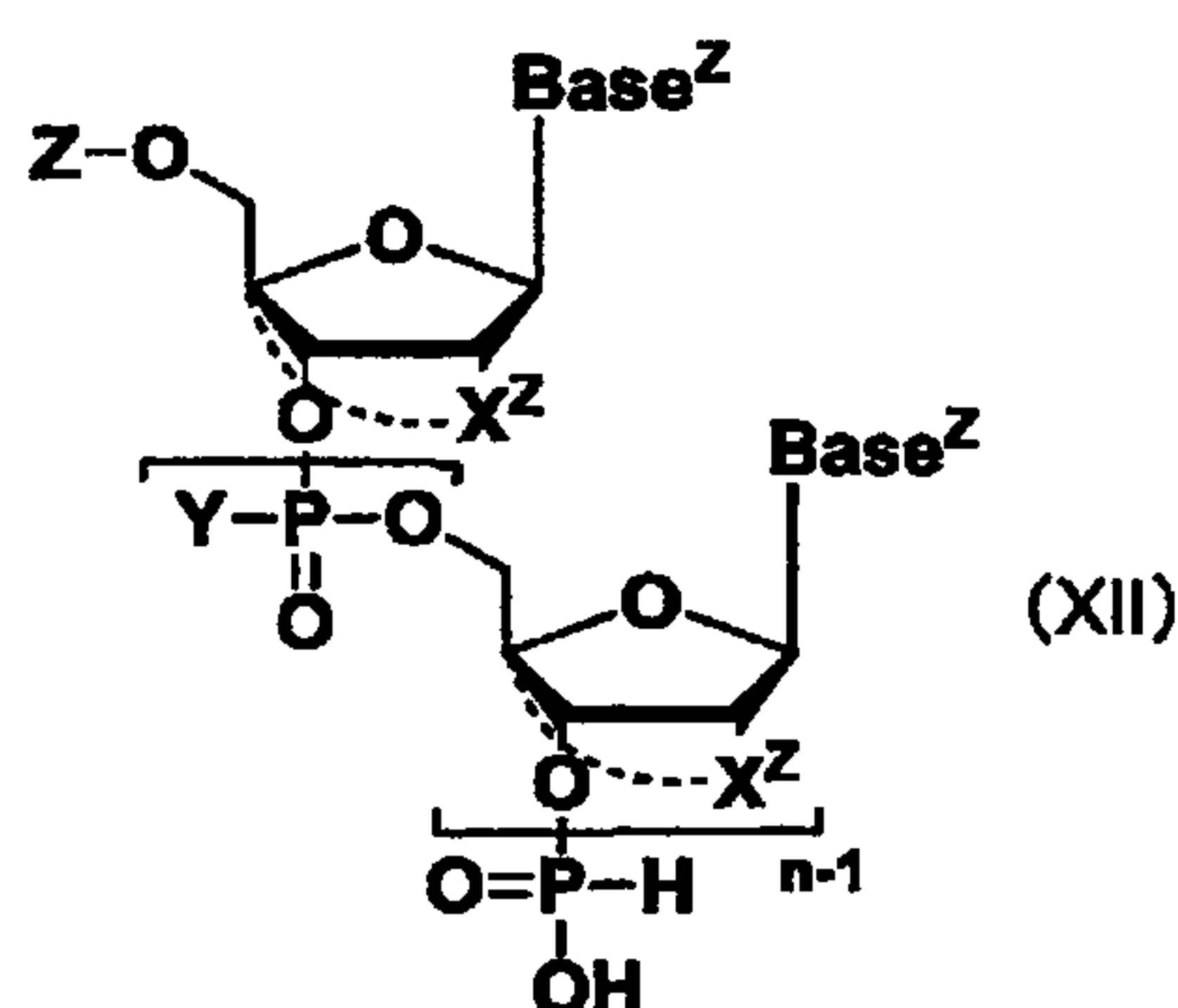
將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3)所示。

29.如請求項 26 或 27 之化合物或其鹽，其為滿足前述式(XI)中之 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，及 Z 為擬似固相保護基的至少一項。

30.如請求項 29 之化合物或其鹽，其中前述式(XI)中之 Z 為擬似固相保護基。

31.如請求項 26 至 28 中任一項之化合物或其鹽，其中前述式(XI)中之 n 為 1 至 30。

32.一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式(XII)：



[式中，

n 表示 1 以上的任意整數，

Base^Z 為獨立表示各核酸鹼、以基本保護基所保護的核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，

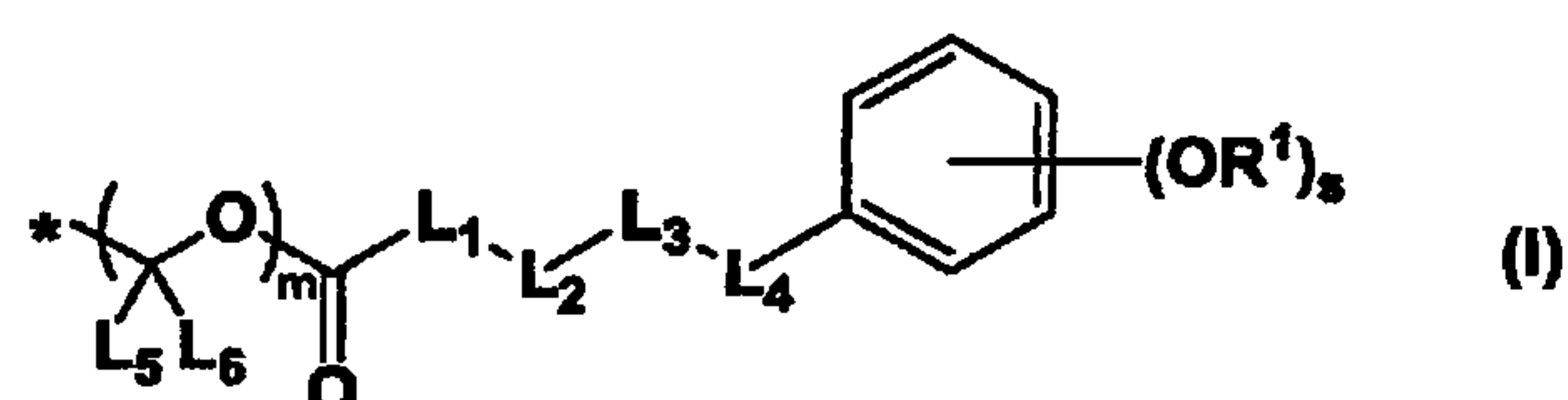
X^Z 為獨立表示各氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，

Y 為獨立表示各氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護的硫醇基、氫化硼基、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，

Z 表示氫原子、基本保護基、一時保護基或擬似固相保護基，

且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的羥基，及 Z 為擬似固相保護基之至少一項]所示。

33. 如請求項 31 之化合物或其鹽，其中前述擬似固相保護基為下述式(I)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或 -O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、

-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

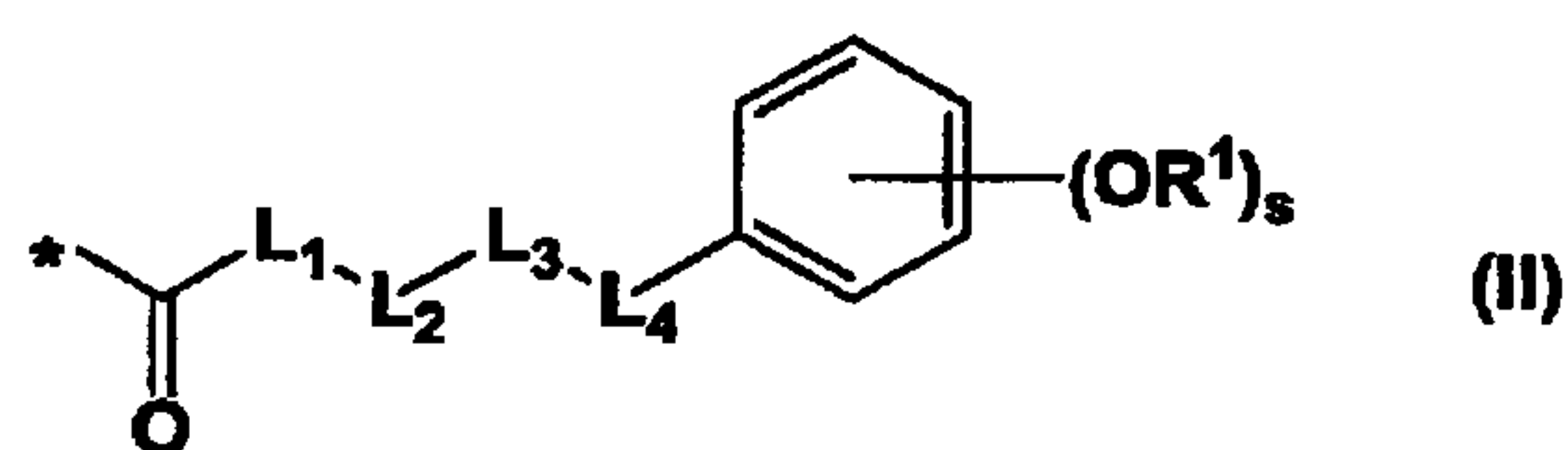
L⁵ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L⁶ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1，

將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有，該擬似固相保護基之 m 為 0 時，該擬似固相保護基之 L¹、L²、L³ 及 L⁴ 中，單鍵數目為 0 至 3)所示者。

34.如請求項 32 之化合物或其鹽，其中前述擬似固相保護基為下述式(II)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L¹ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L² 為單鍵、-COO-、-CON(R²)-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-

6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)或-O-，

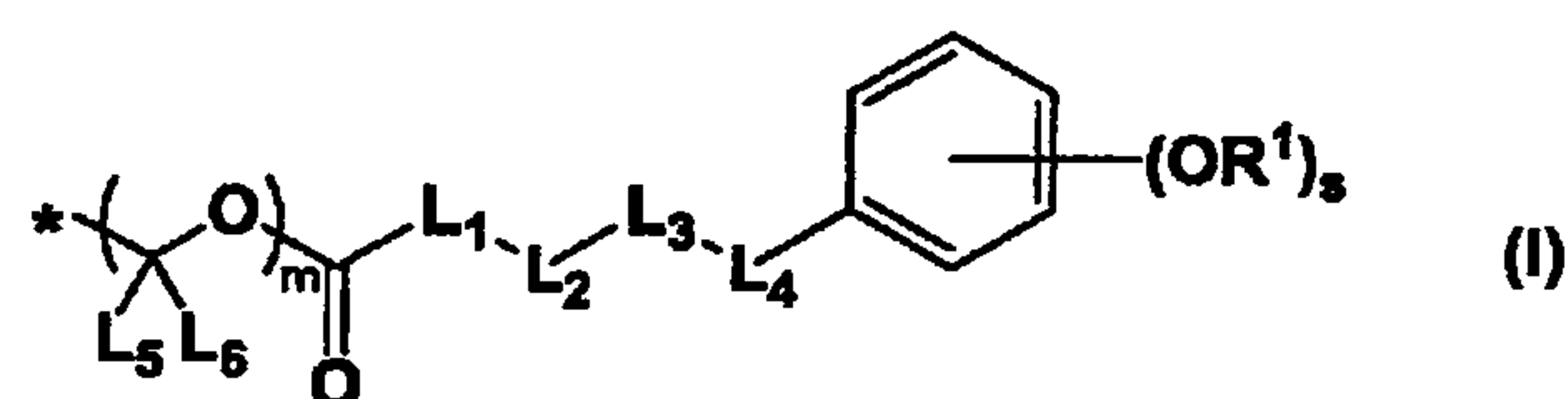
將前述擬似固相保護基於核酸鹼部具有時，該擬似固相保護基之 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 中，單鍵數目為 0 至 3)所示。

35.如請求項 32 至 34 中任一項之化合物或其鹽，其為滿足前述式(XII)中之 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、及 Z 為擬似固相保護基的至少一項。

36.如請求項 35 之化合物或其鹽，其中前述式(XII)中之 Z 為擬似固相保護基。

37.如請求項 32 至 34 中任一項之化合物或其鹽，其中前述式(XII)中之 n 為 1 至 30。

38. 一種核苷酸或寡核苷酸，其特徵為於選自由 2' 位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有擬似固相保護基，於 5'位或 3'位為羥基或以一時保護基所保護的羥基，前述擬似固相保護基的至少 1 個為下述式(I)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

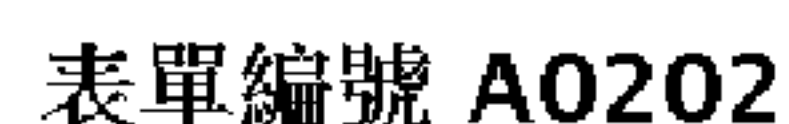
L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO-(式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

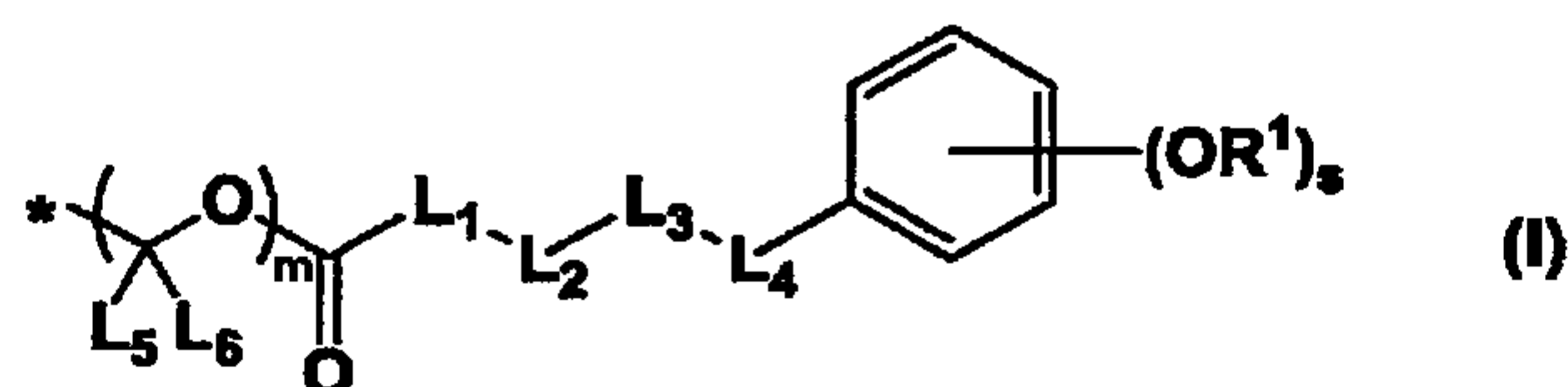
m 為 0 或 1，

40. 一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式(XIII)：



且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的羥基，及 Z 為擬似固相保護基之至少一項，

前述擬似固相保護基的至少一個為式 (I)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或 -O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

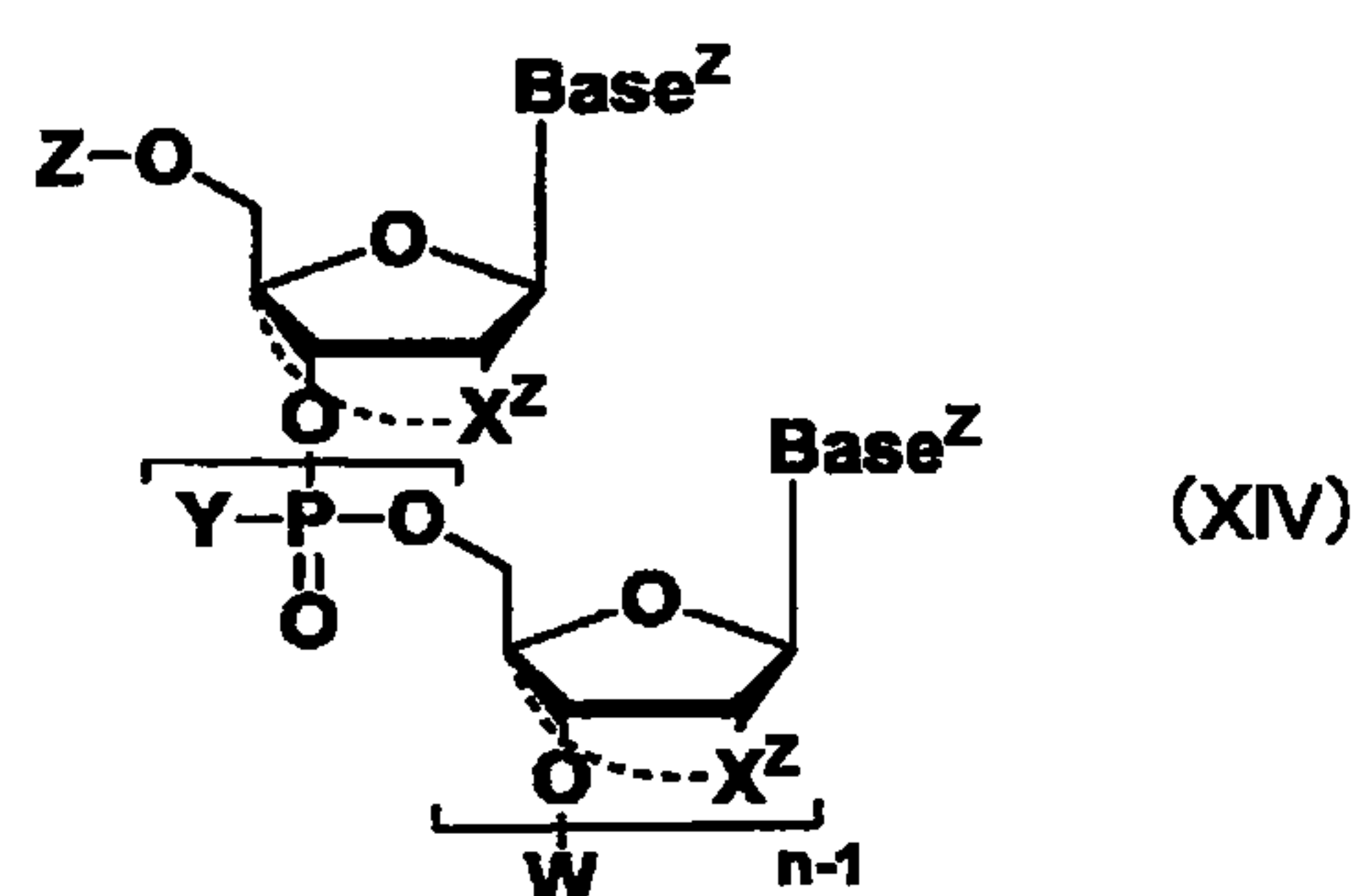
L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或 -O-，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1， m 為 0 時， L^4 非單鍵)所示]所示。

41.一種化合物或其鹽，其特徵係由下述式(XIV)：



(式中，

n 表示 1 以上的任意整數，

$Base^Z$ 為獨立表示各核酸鹼、以基本保護基所保護的核酸鹼或以擬似固相保護基所保護的核酸鹼，

X^Z 為獨立表示各氫原子、鹵素原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、於第 4 位碳原子進行交聯的有機基或以擬似固相保護基所保護的羥基，

W 表示氫原子或一時保護基，

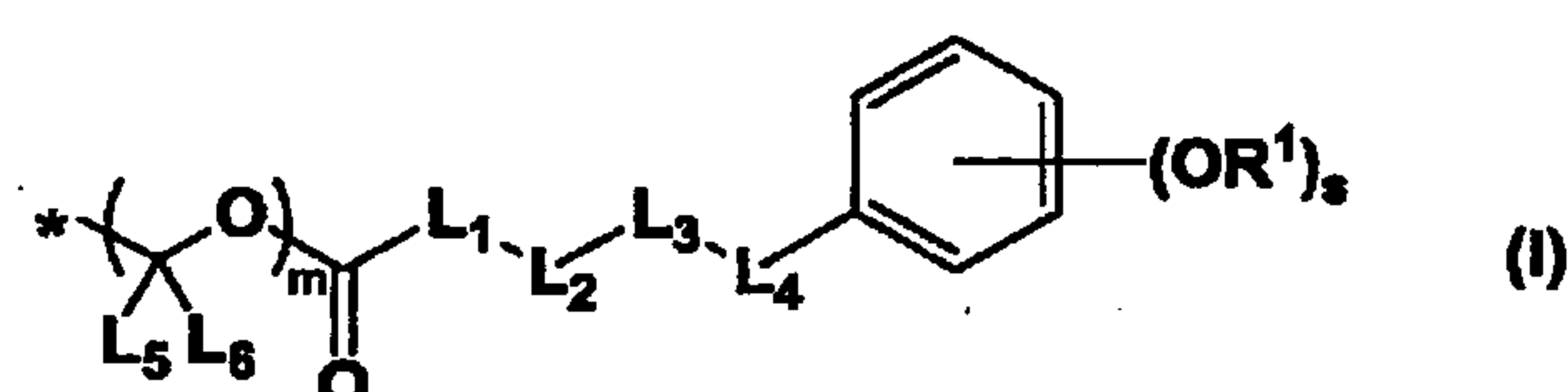
Y 為獨立表示各氫原子、羥基、以基本保護基所保護的羥基、硫醇基、以基本保護基所保護的硫醇基、氫化硼基、單 C1-6 烷基胺基或二 C1-6 烷基胺基，

Z 表示氫原子、基本保護基、一時保護基或擬似固相

保護基，

且滿足 Base^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的核酸鹼、 X^Z 的至少一個為以擬似固相保護基所保護的羥基，及 Z 為擬似固相保護基的至少 1 項，

前述擬似固相保護基的至少一個為式(I)



(式中，*表示前述擬似固相保護基與欲保護之基的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{O}-$ ，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

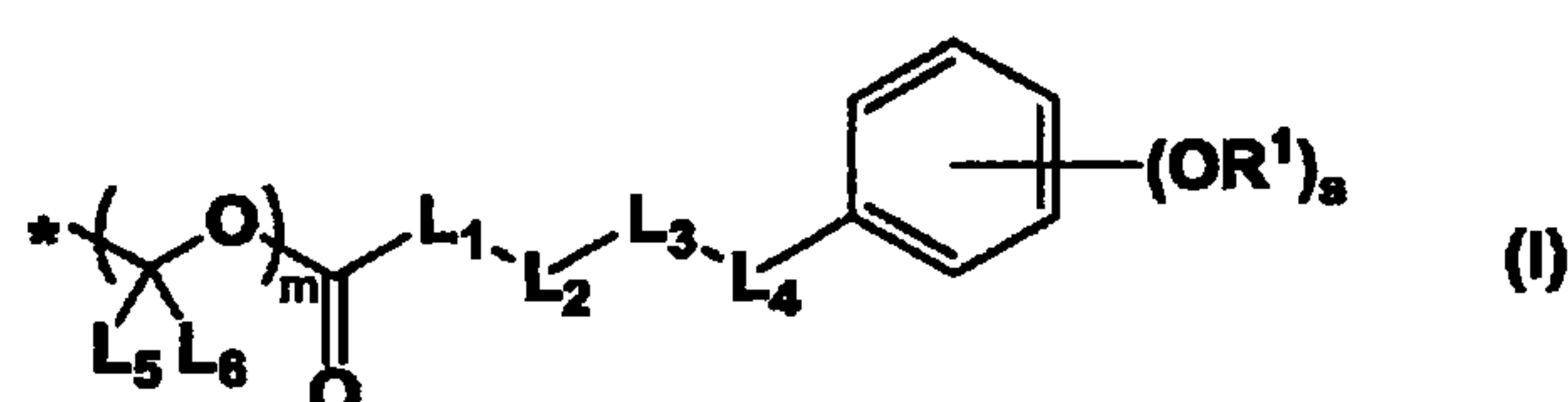
L^4 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{O}-$ ，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1， m 為 0 時， L^4 非單鍵)所示]所示化合物、或其鹽。

42.一種擬似固相保護基，其特徵係由下述式(I)



(式中，*表示與選自由核苷酸或寡核苷酸的 2'位、3'位及 5'位的羥基以及核酸鹼部所成群的至少 1 處的鍵結位置，

R^1 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基， s 為 1 至 5 的整數，

L^1 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^2 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、-COO-、-CON(R^2)- (式中 R^2 表示氫原子、

C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、
-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-
6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L⁵ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或
C2-6 鹵烯基，

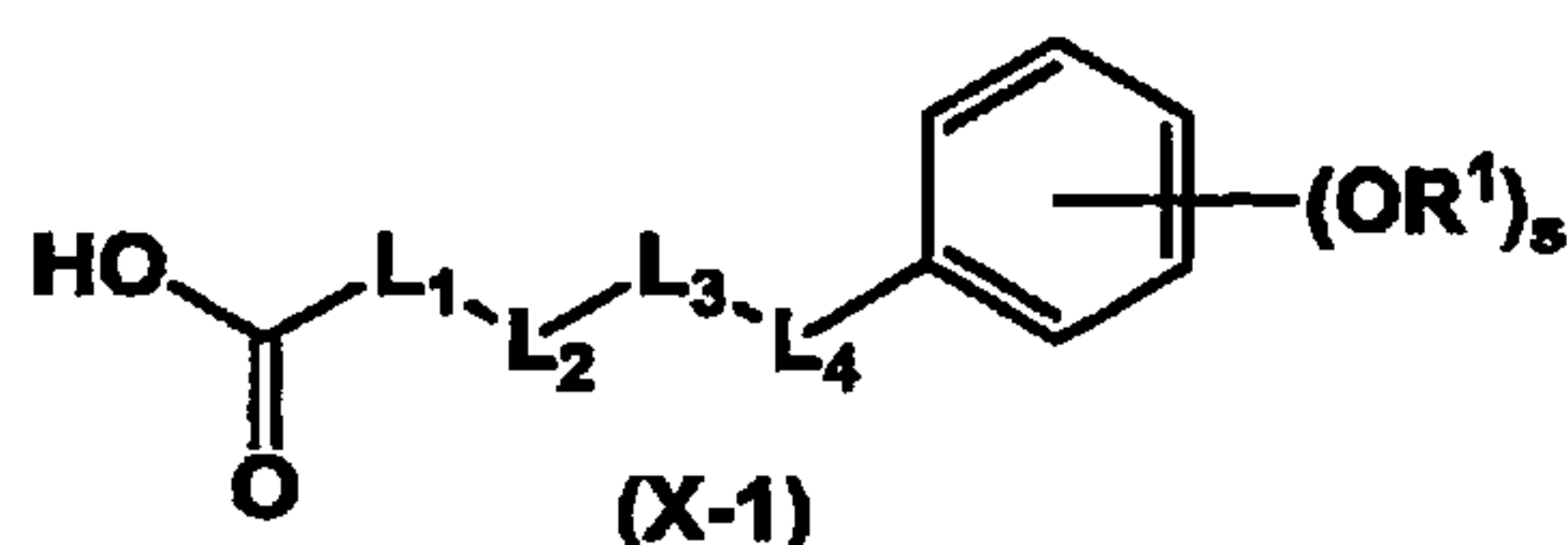
L⁶ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或
C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1，m 為 0 時，L⁴ 非單鍵)所示。

43.如請求項 42 的擬似固相保護基，其中 R¹ 為 C10-
30 烷基或 C10-30 烯基。

44.一種核苷酸或寡核苷酸的製造方法，其為製造具
有以下擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸，其特徵為將
於 3'位及 5'位，獨立具有羥基或經保護的羥基、於選自
由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有羥
基，或於 2'位及核酸鹼部的至少 1 處具有羥基或胺基之核
苷酸或寡核苷酸，

與下述式(X-1)



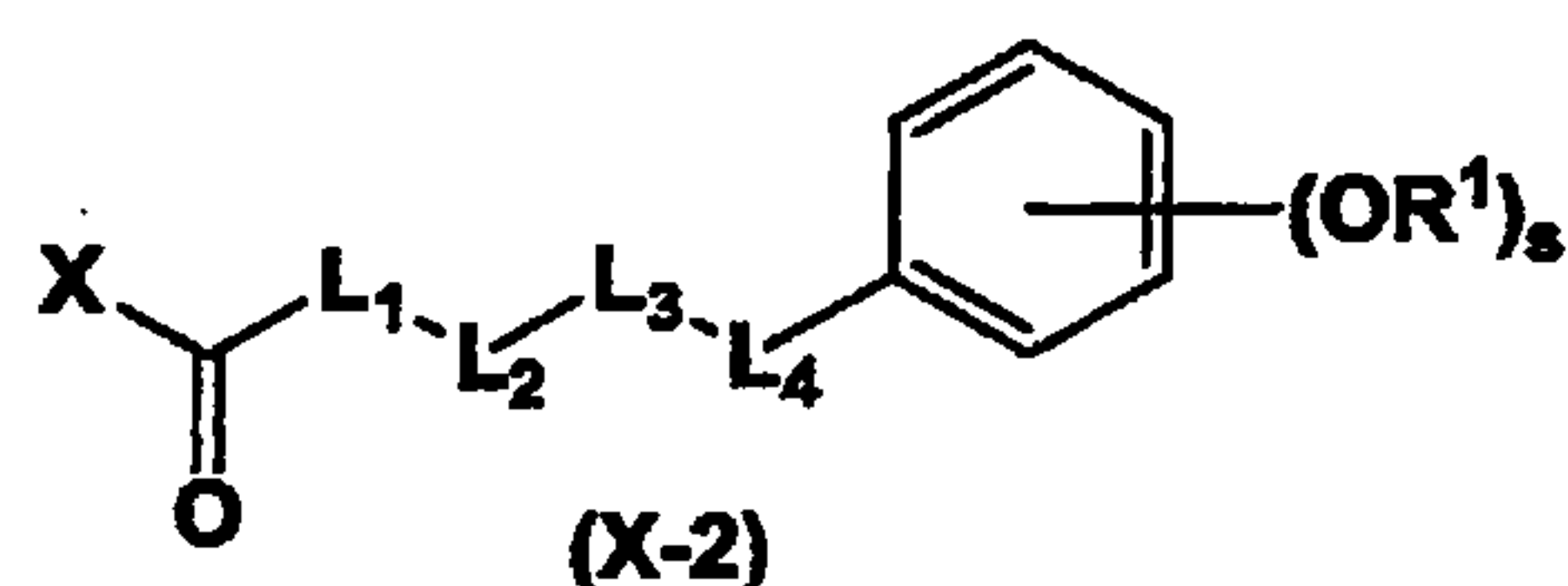
(式中，R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔
基，s 為 1 至 5 的整數，

L¹ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔
基，

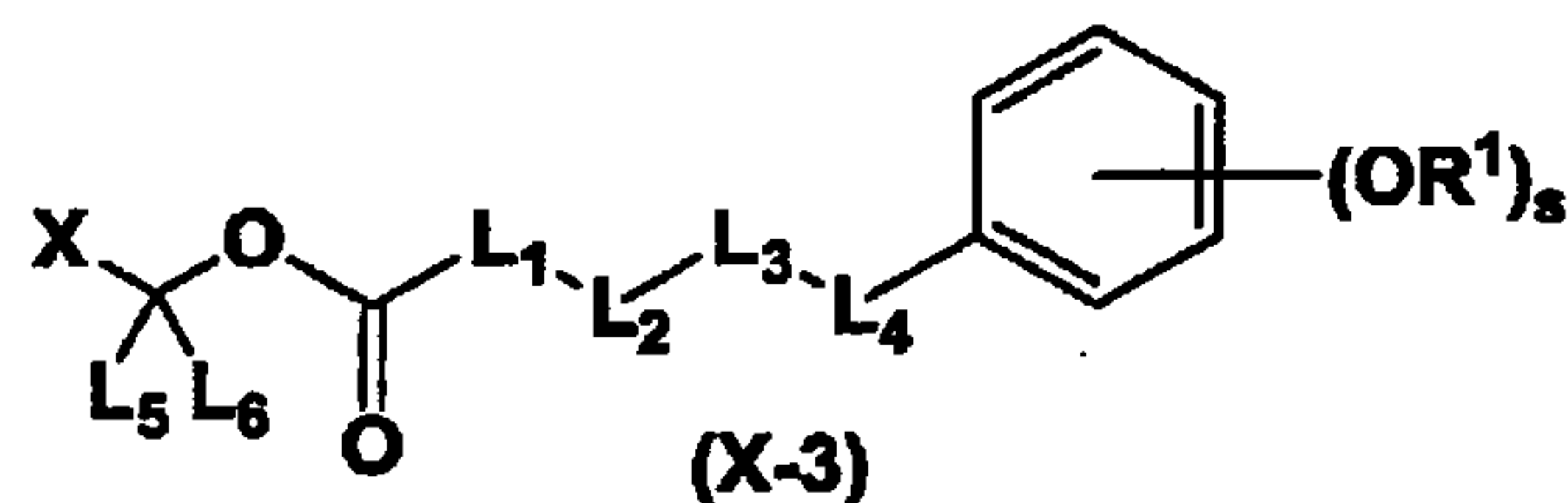
L^2 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{O}-$ ，

L^3 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{O}-$)所示羧基化合物、下述式(X-2)



(式中，X 為鹵素原子， R^1 、 L^1 、 L^2 、 L^3 及 L^4 與前述式(X-1)中的定義相同)所示酸鹵素化物或下述式(X-3)



(式中，X 為鹵素原子， R^1 、 L^1 、 L^2 、及 L^3 與前述式(X-1)中之定義相同，

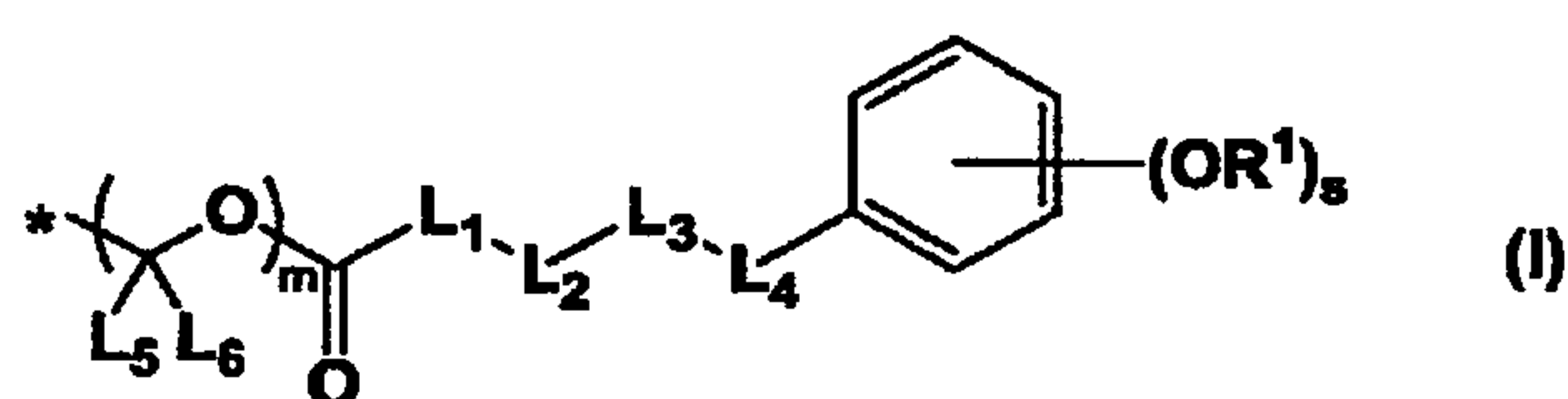
L^4 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、

-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L⁵ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L⁶ 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)所示鹵素化烷基化合物進行反應，

製造於選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處具有下述式(I)



(式中，*表示與選自由 2'位、3'位、5'位及核酸鹼部所成群的至少 1 處的鍵結位置，

R¹ 為 C1-40 烷基、C2-40 烯基或 C2-40 炔基，s 為 1 至 5 的整數，

L¹ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L² 為單鍵、-COO-、-CON(R²)-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-OCO-、-N(R²)CO-(式中 R² 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、-C(O)-或-O-，

L³ 為單鍵、C1-6 伸烷基、C2-6 伸烯基或 C2-6 伸炔基，

L^4 為單鍵、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中 R^2 表示氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基)、 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{O}-$ ，

L^5 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

L^6 為氫原子、C1-6 烷基、C1-6 鹵烷基、C2-6 烯基或 C2-6 鹵烯基，

m 為 0 或 1， m 為 0 時， L^4 非單鍵)所示擬似固相保護基的核苷酸或寡核苷酸。

圖 式

圖 1

