

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6673211号  
(P6673211)

(45) 発行日 令和2年3月25日(2020.3.25)

(24) 登録日 令和2年3月9日(2020.3.9)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C O 7 F 9/6558 (2006.01)</b>	C O 7 F 9/6558 C S P
A 6 1 K 31/787 (2006.01)	A 6 1 K 31/787
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 35 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2016-554089 (P2016-554089)	(73) 特許権者	000000066
(86) (22) 出願日	平成27年10月13日 (2015.10.13)		味の素株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/078960		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87) 国際公開番号	W02016/060135	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開日	平成28年4月21日 (2016.4.21)		弁理士 高島 一
審査請求日	平成30年9月11日 (2018.9.11)	(74) 代理人	100125070
(31) 優先権主張番号	特願2014-210046 (P2014-210046)		弁理士 土井 京子
(32) 優先日	平成26年10月14日 (2014.10.14)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100163658
			弁理士 小池 順造
		(74) 代理人	100174296
			弁理士 當麻 博文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子がトリチル基、9-(9-フェニル)キサントニル基、9-フェニルチオキサントニル基、1,1-ビス(4-メトキシフェニル)-1-フェニルメチル基、ジ(C<sub>1-6</sub>アルコキシ)トリチル基、1-(4-メトキシフェニル)-1,1-ジフェニルメチル基及びモノ(C<sub>1-18</sub>アルコキシ)トリチル基からなる群より選択される一時保護基で保護されたp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(pは、1以上の任意の整数を示す。)を、5'末端、及びノ又は核酸塩基又は修飾核酸塩基(ここで、当該核酸塩基は、ピリミジン塩基又はプリン塩基であり、当該修飾核酸塩基は、ハロゲン原子、アルキル基、アラルキル基、アルコキシ基、アシル基、アルコキシアルキル基、ヒドロキシ基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、カルボキシ基、シアノ基及びニトロ基からなる群から選ばれる1~3個の置換基で置換されている前記核酸塩基であり、当該核酸塩基又は当該修飾核酸塩基のアミノ基は、ピバロイル基、ピバロイロキシメチル基、トリフルオロアセチル基、フェノキシアセチル基、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、4-tert-ブチルフェノキシアセチル基、アセチル基、ベンゾイル基、イソブチリル基、ジメチルホルムアミジニル基又は9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基で保護されていてもよく、当該核酸塩基又は当該修飾核酸塩基のカルボニル基は、フェノール、2,5-ジクロロフェノール、3-クロロフェノール、3,5-ジクロロフェノール、2-ホルミルフェノール

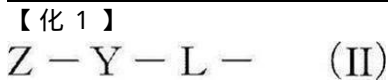
10

20

ル、2 - ナフトール、4 - メトキシフェノール、4 - クロロフェノール、2 - ニトロフェノール、4 - ニトロフェノール、4 - アセチルアミノフェノール、ペンタフルオロフェノール、4 - ピバロイロキシベンジルアルコール、4 - ニトロフェネチルアルコール、2 - (メチルスルフォニル)エタノール、2 - (フェニルスルフォニル)エタノール、2 - シアノエタノール、2 - (トリメチルシリル)エタノール、ジメチルカルバミン酸クロライド、ジエチルカルバミン酸クロライド、エチルフェニルカルバミン酸クロライド、1 - ピロリジンカルボン酸クロライド、4 - モルホリンカルボン酸クロライド又はジフェニルカルバミン酸クロライドと反応することによって保護されているもよい。)が、各々独立に、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護され、かつモルフォリン環窒素原子が保護されていないn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(nは、1以上の任意の整数を示す。)と、そのモルフォリン環窒素原子を介してホスホルアミダート結合又はホスホロジアミダート結合により縮合させた後、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物であるn+p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する工程を含む、n+p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法。

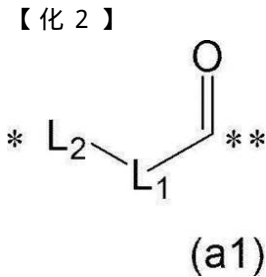
10

ここで、前記炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基は、下記式(II)：



20

[Lは、単結合、又は式(a1)：



30

[式中、\*は、Yとの結合位置を示し；

\* \* は、保護される、酸素原子又は窒素原子との結合位置を示し；

L<sub>1</sub>は、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されているもよい2価のC<sub>1-22</sub>炭化水素基を示し；かつ

L<sub>2</sub>は、C(=O)を示すか、又は\* \* \* N(R<sup>3</sup>) - R<sup>1</sup> - N(R<sup>2</sup>) C(=O) \* \*

(式中、\* \* は、L<sub>1</sub>との結合位置を示し、\* \* \* は、Yとの結合位置を示し、R<sup>1</sup>は、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基でC<sub>1-22</sub>アルキレン基を示し、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、もしくはヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されているもよいC<sub>1-22</sub>アルキル基を示すか、又はR<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が一緒になって、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、ア

40

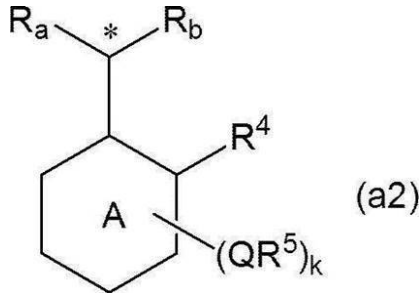
50

ルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキソ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキレン結合を形成していてもよい。)で表される基を示す。]で示される基を示し、

Yは、単結合、酸素原子、又はNR (Rは、水素原子、アルキル基又はアラルキル基を示す。)を示し、ならびに

Zは、式(a2)：

【化3】



10

[式中、\*は、Yとの結合位置を示し；

環Aは、ベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

R<sup>4</sup>は、水素原子を示すか、あるいはR<sub>b</sub>が、下記式(a3)で表される基であり、かつ環A及び環Bが共にベンゼン環である場合には、R<sup>6</sup>と一緒に単結合又はO-を示して、環Bと共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；

20

k個のQは、独立してそれぞれ単結合を示すか、あるいは-O-、-S-、-OC(=O)-、-NHC(=O)-又は-NH-を示し；

k個のR<sup>5</sup>は、独立してそれぞれ、炭素数10~40のアルキル基、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を1~3個有するベンジル基、又は炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を1~3個有するシクロヘキシル基を示し；

kは、1~4の整数を示し；

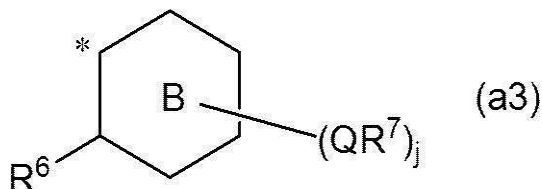
環Aは、k個のQR<sup>5</sup>に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよく；

30

R<sub>a</sub>は、水素原子を示し；

R<sub>b</sub>は、水素原子、又は式(a3)：

【化4】



40

(式中、\*は、結合位置を示し；

環Bはベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

jは、0~4の整数を示し；

j個のQは、前記と同意義を示し；

j個のR<sup>7</sup>は、独立してそれぞれ、炭素数10~40のアルキル基を示し；

R<sup>6</sup>は、水素原子を示すか、又はR<sup>4</sup>と一緒に単結合又はO-を示して、環Aと共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；かつ

環Bは、j個のQR<sup>7</sup>に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基

50

からなる群から選択される置換基を有していてもよい。)で表される基を示し、あるいは  $R_a$  及び  $R_b$  は一緒になって、カルボニル基を形成する。]で表される基であり、かつ前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基は、レプリニル基、*o*-ニトロベンジル基、ベンゾフェノン誘導体、プロモクマリン誘導体、アリルオキシカルボニル基、ベンジル基又はシリル系保護基である。

【請求項 2】

$n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの 5' 末端及び核酸塩基又は修飾核酸塩基、並びに  $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの核酸塩基又は修飾核酸塩基のうち、少なくとも一つが、炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基で保護されている、請求項 1 記載の製造方法。

10

【請求項 3】

$n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの 5' 末端が、炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基で保護されている、請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 4】

$p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの核酸塩基又は修飾核酸塩基が、各々独立に、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基又は前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護されている、請求項 1 記載の製造方法。

20

【請求項 5】

抽出操作の前に、反応混合物を、クエンチ剤で処理する、請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 6】

クエンチ剤が、第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物、又はホスホノ基を有する化合物からなるクエンチ剤である、請求項 5 記載の製造方法。

【請求項 7】

クエンチ剤が、1 個の第二級アミノ基及び 1 又は 2 個のカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤である、請求項 5 記載の製造方法。

【請求項 8】

クエンチ剤が、プロリルグルタミン酸である、請求項 5 記載の製造方法。

30

【請求項 9】

クエンチ剤が、プロリルプロリンである、請求項 5 記載の製造方法。

【請求項 10】

クエンチ剤が、ホスホノ基を有する化合物からなるクエンチ剤である、請求項 5 記載の製造方法。

【請求項 11】

クエンチ剤が、フェニルホスホン酸である、請求項 5 記載の製造方法。

【請求項 12】

更に、下記工程を含有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の製造方法；請求項 1 に記載の工程の前に、非極性溶媒中において、モルフォリン環窒素原子がトリチル基、9 - (9 - フェニル)キサンテニル基、9 - フェニルチオキサンテニル基、1, 1 - ビス(4 - メトキシフェニル) - 1 - フェニルメチル基、ジ(C<sub>1-6</sub>アルコキシ)トリチル基、1 - (4 - メトキシフェニル) - 1, 1 - ジフェニルメチル基及びモノ(C<sub>1-18</sub>アルコキシ)トリチル基からなる群より選択される一時保護基で保護され、かつ 5' 末端、及び / 又は核酸塩基又は修飾核酸塩基が、各々独立に、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護された  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドから、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去し、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物である  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する工程。

40

50

## 【請求項 13】

カチオン捕捉剤の存在下に酸と反応させて、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去する、請求項 12 記載の製造方法。

## 【請求項 14】

カチオン捕捉剤が、メルカプト基及びカルボキシ基を有する化合物、又はカルボキシ基を有するインドール化合物からなるカチオン捕捉剤である、請求項 13 記載の製造方法。

## 【請求項 15】

カチオン捕捉剤が、1 個のメルカプト基及び 1 又は 2 個のカルボキシ基を有する化合物からなるカチオン捕捉剤である、請求項 13 記載の製造方法。

## 【請求項 16】

カチオン捕捉剤が、チオリンゴ酸又は 3 -メルカプトプロピオン酸である、請求項 13 記載の製造方法。

## 【請求項 17】

モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基が、シリル系保護基である、請求項 1 記載の製造方法。

## 【請求項 18】

モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基が、tert -ブチルジメチルシリル基、ジイソプロピルフェニルシリル基、トリフェニルシリル基、又はジフェニルtert -ブトキシシリル基である、請求項 1 記載の製造方法。

## 【請求項 19】

p が 1 である、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の製造方法。

## 【請求項 20】

更に、下記工程を含有する、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の製造方法；請求項 1 に記載の工程で得られた n + p 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの保護基を全て除去する工程。

## 【請求項 21】

モルフォリン環窒素原子の一時保護基が、トリチル基、ジメトキシトリチル基、又はモノメトキシトリチル基である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の製造方法。

## 【請求項 22】

非極性溶媒が、ハロゲン系溶媒、芳香族系溶媒、エステル系溶媒、脂肪族系溶媒、非極性エーテル系溶媒、及びこれらの組合せからなる群より選択される溶媒である、請求項 12 ~ 21 のいずれか一項に記載の製造方法。

## 【請求項 23】

請求項 12 に記載の工程で得られた反応混合物からモルフォリノオリゴヌクレオチドを単離せずにそのまま請求項 1 に記載の工程で使用する、請求項 12 ~ 22 のいずれか一項に記載の製造方法。

## 【請求項 24】

非極性溶媒中において、モルフォリン環窒素原子がトリチル基、9 - (9 - フェニル)キサンテニル基、9 - フェニルチオキサンテニル基、1, 1 - ビス(4 - メトキシフェニル) - 1 - フェニルメチル基、ジ(C<sub>1-6</sub>アルコキシ)トリチル基、1 - (4 - メトキシフェニル) - 1, 1 - ジフェニルメチル基及びモノ(C<sub>1-18</sub>アルコキシ)トリチル基からなる群より選択される一時保護基で保護され、かつ 5' 末端が炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護された n 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを、カチオン捕捉剤の存在下に酸と反応させて、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去する工程を含む、モルフォリン環窒素原子が保護されていない n 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド (n は、1 以上の任意の整数を示す。) の製造方法。

ここで、前記炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基は、下記式 (I I) :

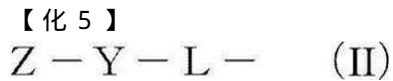
10

20

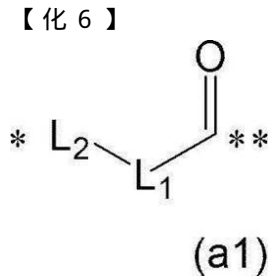
30

40

50



[ L は、単結合、又は式 ( a 1 ) :



10

[ 式中、 \* は、 Y との結合位置を示し ;

\* \* は、保護される、酸素原子又は窒素原子との結合位置を示し ;

$L_1$  は、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよい2価の  $C_{1-22}$  炭化水素基を示し ; かつ

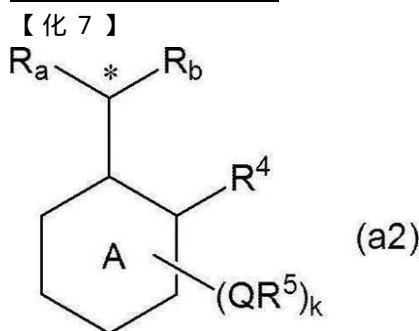
20

$L_2$  は、  $C(=O)$  を示すか、又は \* \* \*  $N(R^3) - R^1 - N(R^2)C(=O)$  \* \* ( 式中、 \* \* は、  $L_1$  との結合位置を示し、 \* \* \* は、 Y との結合位置を示し、  $R^1$  は、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよい  $C_{1-22}$  アルキレン基を示し、  $R^2$  及び  $R^3$  は、それぞれ独立して、水素原子、もしくはヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよい  $C_{1-22}$  アルキレン基を示すか、又は  $R^2$  及び  $R^3$  が一緒になって、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよい  $C_{1-22}$  アルキレン結合を形成していてもよい。) で表される基を示す。 ] で示される基を示し、

30

Y は、単結合、酸素原子、又は  $NR$  ( R は、水素原子、アルキル基又はアラルキル基を示す。) を示し、ならびに

Z は、式 ( a 2 ) :



40

[ 式中、 \* は、 Y との結合位置を示し ;

50

環 A は、ベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

$R^4$  は、水素原子を示すか、あるいは  $R_b$  が、下記式 (a3) で表される基であり、かつ環 A 及び環 B が共にベンゼン環である場合には、 $R^6$  と一緒になって単結合又は O - を示して、環 B と共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；

k 個の Q は、独立してそれぞれ単結合を示すか、あるいは - O - 、 - S - 、 - OC(=O) - 、 - NHC(=O) - 又は - NH - を示し；

k 個の  $R^5$  は、独立してそれぞれ、炭素数 10 ~ 40 の分岐鎖アルキル基、炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルケニル基を 1 ~ 3 個有するベンジル基、又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルケニル基を 1 ~ 3 個有するシクロヘキシル基を示し；

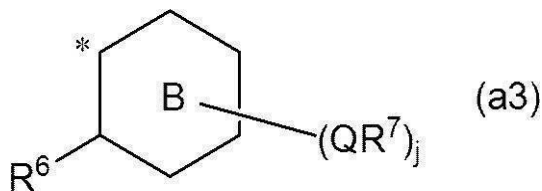
k は、1 ~ 4 の整数を示し；

環 A は、k 個の  $QR^5$  に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよく；

$R_a$  は、水素原子を示し；

$R_b$  は、水素原子、又は式 (a3) ；

【化 8】



(式中、\* は、結合位置を示し；

環 B はベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

j は、0 ~ 4 の整数を示し；

j 個の Q は、前記と同意義を示し；

j 個の  $R^7$  は、独立してそれぞれ、炭素数 10 ~ 40 の分岐鎖アルキル基を示し；

$R^6$  は、水素原子を示すか、又は  $R^4$  と一緒になって単結合又は O - を示して、環 A と共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；かつ

環 B は、j 個の  $QR^7$  に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよい。) で表される基を示し、あるいは  $R_a$  及び  $R_b$  は一緒になって、カルボニル基を形成する。] で表される基であり、かつ前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基は、レプリニル基、o-ニトロベンジル基、ベンゾフェノン誘導体、プロモクマリン誘導体、アリルオキシカルボニル基、ベンジル基又はシリル系保護基である。

【請求項 25】

カチオン捕捉剤が、メルカプト基及びカルボキシ基を有する化合物、又はカルボキシ基を有するインドール化合物からなるカチオン捕捉剤である、請求項 24 記載の製造方法。

【請求項 26】

カチオン捕捉剤が、1 個のメルカプト基及び 1 又は 2 個のカルボキシ基を有する化合物からなるカチオン捕捉剤である、請求項 24 記載の製造方法。

【請求項 27】

カチオン捕捉剤が、チオリンゴ酸又は 3 -メルカプトプロピオン酸である、請求項 24 記載の製造方法。

【請求項 28】

p 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド及び n 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドが有する核酸塩基又は修飾核酸塩基のうち、少なくとも一つが、炭素数 10 以上 300

10

20

30

40

50

以下のアルキル基及び／又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護されている、請求項1記載の製造方法。

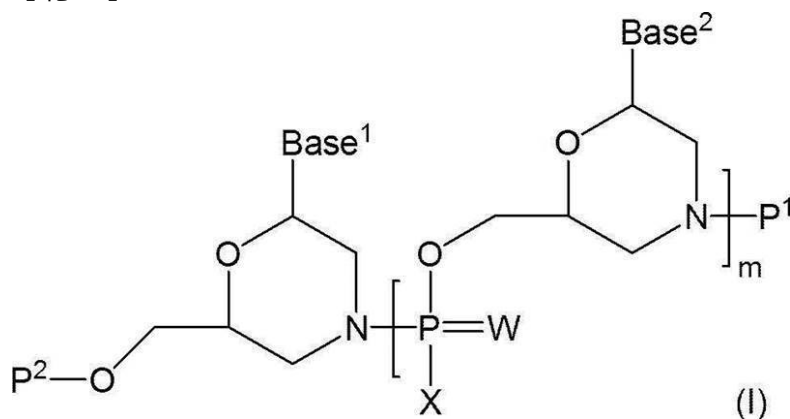
【請求項29】

炭素数10以上300以下のアルキル基及び／又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基が、炭素数10以上300以下の分岐鎖アルキル基及び／又は炭素数10以上300以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基である、請求項28記載の製造方法。

【請求項30】

一般式(I)：

【化9】



[式中、

$m$ は、0以上の任意の整数を示し、

$P^1$ は、水素原子、またはトリチル基、9-(9-フェニル)キサンテニル基、9-フェニルチオキサンテニル基、1,1-ビス(4-メトキシフェニル)-1-フェニルメチル基、ジ(C<sub>1-6</sub>アルコキシ)トリチル基、1-(4-メトキシフェニル)-1,1-ジフェニルメチル基及びモノ(C<sub>1-8</sub>アルコキシ)トリチル基からなる群より選択される一時保護基を示し、

$P^2$ は、炭素数10以上300以下のアルキル基及び／又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いは $P^1$ と異なる条件下で除去可能な保護基を示し、

$Base^1$ 及び $m$ 個の $Base^2$ は、独立してそれぞれ核酸塩基又は修飾核酸塩基を示し、

前記核酸塩基は、ピリミジン塩基又はプリン塩基であり、

前記修飾核酸塩基は、ハロゲン原子、アルキル基、アラルキル基、アルコキシ基、アシル基、アルコキシアルキル基、ヒドロキシ基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、カルボキシ基、シアノ基及びニトロ基からなる群から選ばれる1~3個の置換基で置換されている前記核酸塩基であり、

前記核酸塩基又は前記修飾核酸塩基のアミノ基は、ピバロイル基、ピバロイロキシメチル基、トリフルオロアセチル基、フェノキシアセチル基、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、4-tert-ブチルフェノキシアセチル基、アセチル基、ベンゾイル基、イソブチリル基、ジメチルホルムアミジニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基、又は炭素数10以上300以下のアルキル基及び／又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護されていてもよく、

前記核酸塩基又は前記修飾核酸塩基のカルボニル基は、フェノール、2,5-ジクロロフェノール、3-クロロフェノール、3,5-ジクロロフェノール、2-ホルミルフェノール、2-ナフトール、4-メトキシフェノール、4-クロロフェノール、2-ニトロフェノール、4-ニトロフェノール、4-アセチルアミノフェノール、ペンタフルオロフェノール、4-ピバロイロキシベンジルアルコール、4-ニトロフェネチルアルコール、2-(メチルスルフォニル)エタノール、2-(フェニルスルフォニル)エタノール、2-シ

10

20

30

40

50

アノエタノール、2-(トリメチルシリル)エタノール、ジメチルカルバミン酸クロライド、ジエチルカルバミン酸クロライド、エチルフェニルカルバミン酸クロライド、1-ピロリジンカルボン酸クロライド、4-モルホリンカルボン酸クロライド、又はジフェニルカルバミン酸クロライドと反応することによって保護されていてもよく、

m個のXは、独立してそれぞれジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基、または4位窒素原子がアシル基で保護され、さらにヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキソ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよい1-ピペラジニル基を示し、

10

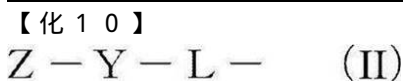
m個のWは、酸素原子を示す。

但し、1) Base<sup>1</sup>が保護基で保護されている場合の保護基、m個の任意のBase<sup>2</sup>が保護基で保護されている場合の任意の保護基、及びP<sup>2</sup>で示される保護基、の少なくとも一つは、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基であり、かつ

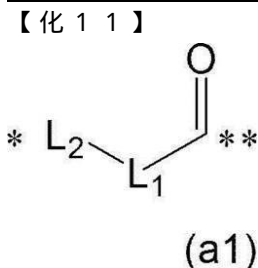
2) P<sup>2</sup>が炭素数10以上300以下の直鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の直鎖アルケニル基を有する保護基である場合、Base<sup>1</sup>及びm個の任意のBase<sup>2</sup>の少なくとも一つは、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護された核酸塩基又は修飾核酸塩基である。

20

ここで、前記炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基は、下記式(II)：



[Lは、単結合、又は式(a1)：



30

[式中、\*は、Yとの結合位置を示し；

\*\*は、保護される、酸素原子又は窒素原子との結合位置を示し；

L<sub>1</sub>は、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキソ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよい2価のC<sub>1-2</sub>炭化水素基を示し；かつ

40

L<sub>2</sub>は、C(=O)を示すか、又は\*\*\*N(R<sup>3</sup>)-R<sup>1</sup>-N(R<sup>2</sup>)C(=O)\*\*(式中、\*\*は、L<sub>1</sub>との結合位置を示し、\*\*\*は、Yとの結合位置を示し、R<sup>1</sup>は、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキソ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよいC<sub>1-2</sub>アルキレン基を示し、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ独立して、水素原子、もしくはヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルア

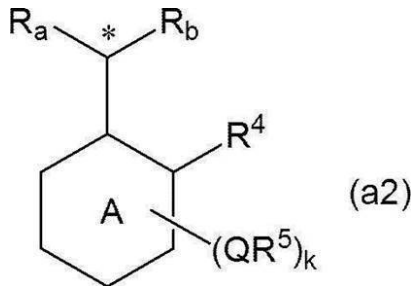
50

ミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキル基を示すか、又はR<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が一緒になって、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基及びオキシ基からなる群より選択される置換基で置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキレン結合を形成していてもよい。)で表される基を示す。]で示される基を示し、

Yは、単結合、酸素原子、又はNR (Rは、水素原子、アルキル基又はアラルキル基を示す。)を示し、ならびに

Zは、式(a2)：

【化12】



10

20

[式中、\*は、Yとの結合位置を示し；

環Aは、ベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

R<sup>4</sup>は、水素原子を示すか、あるいはR<sub>b</sub>が、下記式(a3)で表される基であり、かつ環A及び環Bが共にベンゼン環である場合には、R<sup>6</sup>と一緒に単結合又はO-を示して、環Bと共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；

k個のQは、独立してそれぞれ単結合を示すか、あるいは-O-、-S-、-OC(=O)-、-NHC(=O)-又は-NH-を示し；

k個のR<sup>5</sup>は、独立してそれぞれ、炭素数10~40のアルキル基、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を1~3個有するベンジル基、又は炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を1~3個有するシクロヘキシル基を示し；

30

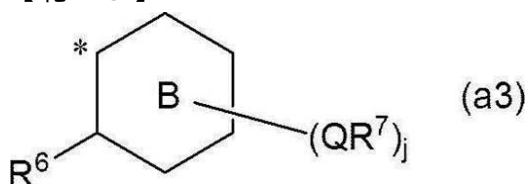
kは、1~4の整数を示し；

環Aは、k個のQR<sup>5</sup>に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよく；

R<sub>a</sub>は、水素原子を示し；

R<sub>b</sub>は、水素原子、又は式(a3)：

【化13】



40

(式中、\*は、結合位置を示し；

環Bはベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

jは、0~4の整数を示し；

j個のQは、前記と同意義を示し；

j個のR<sup>7</sup>は、独立してそれぞれ、炭素数10~40のアルキル基を示し；

R<sup>6</sup>は、水素原子を示すか、又はR<sup>4</sup>と一緒に単結合又はO-を示して、環Aと共に

50

にフルオレニル基又はキサンテニル基を形成していてもよく；かつ環 B は、j 個の Q R<sup>7</sup> に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい C<sub>1-6</sub> アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよい C<sub>1-6</sub> アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよい。) で表される基を示し、あるいは R<sub>a</sub> 及び R<sub>b</sub> は一緒になって、カルボニル基を形成する。] で表される基であり、かつ前記 P<sup>1</sup> と異なる条件下で除去可能な保護基は、レプリニル基、o-ニトロベンジル基、ベンゾフェノン誘導体、プロモクマリン誘導体、アリルオキシカルボニル基、ベンジル基又はシリル系保護基である。]

で示されるモルフォリノヌクレオチド。

【請求項 3 1】

m が 0 ~ 19 の整数である、請求項 3 0 記載のモルフォリノヌクレオチド。

【請求項 3 2】

炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基が、

3, 4, 5 - トリ ( オクタデシルオキシ ) ベンゾイル基、及び 3, 4, 5 - トリ ( 2', 3' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンゾイル基からなる群から選択される、請求項 3 0 又は 3 1 に記載のモルフォリノヌクレオチド。

【請求項 3 3】

P<sup>2</sup> が、シリル系保護基である、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のモルフォリノヌクレオチド。

【請求項 3 4】

シリル系保護基が、tert - ブチルジメチルシリル基、ジイソプロピルフェニルシリル基、トリフェニルシリル基、又はジフェニル tert - ブトキシシリル基である、請求項 3 3 に記載のモルフォリノヌクレオチド。

【請求項 3 5】

P<sup>1</sup> が、トリチル基、モノメトキシトリチル基、又はジメトキシトリチル基である、請求項 3 0 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のモルフォリノヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法及び、該製造方法の原料として用いられるモルフォリノヌクレオチドに関する。

【背景技術】

【0002】

モルフォリノオリゴヌクレオチドは、DNA、RNA に対する親和性が高く、各種ヌクレアーゼに対する抵抗性があり、生体内で安定であり、毒性も低いため、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしての利用が注目されている化合物である ( 非特許文献 1 参照 ) 。

【0003】

モルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法として、固相合成法および液相合成法が報告されている ( 非特許文献 2、特許文献 1 ~ 5 参照 ) 。

固相合成法は、自動合成化が可能でありスピード面で有利であるが、設備制約上スケールアップに制限があり、また、反応性が低いため、ヌクレオチド伸長反応において使用される試薬であるモノマーを過剰に使用する必要があり、工業的な大量合成に適さない。また、途中段階での反応の進行状況の確認、中間体構造解析等も困難という欠点もある。

一方、液相合成法は、溶解性や後処理操作の煩雑さなどの課題があり、アンチセンス医薬品として利用されうる鎖長のモルフォリノオリゴヌクレオチドを大量かつ迅速に合成することは困難であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

10

20

30

40

50

【特許文献1】国際公開第91/09033号

【特許文献2】国際公開第2008/008113号

【特許文献3】米国特許出願公開第2009/0131632号明細書

【特許文献4】国際公開第2009/064471号

【特許文献5】国際公開第2012/043730号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Summerton, J.等, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 1997年, Vol. 7, p. 187.

10

【非特許文献2】Harakawa等, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012年, Vol. 22, p. 1445-1447

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、液相法で効率的かつ高収率にモルフォリノオリゴヌクレオチドを製造する方法、及び当該方法の原料となる新規モルフォリノヌクレオチドを提供することである。

【課題を解決するための手段】

20

【0007】

本発明者らは、液相での縮合反応によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを製造する過程において、脱保護反応や縮合反応後に沈殿化により目的物を単離する手法の場合、操作が煩雑になり、操作時間が膨大になる点に着目し、沈殿化に代えて抽出操作による後処理を行い、不純物を水層側に除去する手法により、効率的に目的物を単離し得ることを見出した。さらに脱保護反応後の抽出操作による後処理と、縮合反応後の抽出操作による後処理を組み合わせることで、モルフォリノオリゴヌクレオチドの伸長反応を一つの反応容器で行うことができる、いわゆるワンポット合成が可能となることを見出した。

また本発明者らは、液相での縮合反応によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを製造する過程において、縮合反応後に残留する原料のモルフォリノヌクレオチドモノマーが次工程で反応に関与して二重付加を引き起こし、副生物を生じるため、鎖長が長くなるほど精製が困難となり、モルフォリノオリゴヌクレオチドの伸長も困難となる点に着目し、縮合反応後の後処理に抽出操作を採用し、例えば、特定の化合物(クエンチ剤)で系を処理することにより、残留する原料モノマー由来の不純物を抽出操作で水層側に効率的に除去できることを見出した。

30

また本発明者らは、液相での縮合反応によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを製造する過程において、縮合反応前にモルフォリン環の窒素を保護するトリチル基等の保護基の脱保護により生じる保護基由来の化合物が、次の縮合工程で反応に関与して副生物を生じるため、これもまた液相合成における長鎖のモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造を困難としている点に着目し、脱保護反応後の後処理に抽出操作を採用し、例えば、特定の化合物(カチオン捕捉剤)で系を処理することにより、トリチル基等の保護基由来の不純物を抽出操作で水層側に効率的に除去できることを見出した。

40

また本発明者らは、液相での縮合反応によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを製造する過程において、5'末端及び/又は核酸塩基を炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基(以下、「アンカー」ともいう。)で保護すること(以下、「アンカリング」ともいう。)により、前記縮合反応及び脱保護反応が良好に進行し、さらに抽出操作で水層側に不純物を淘汰する際に、モルフォリノヌクレオチドの非極性溶媒への溶解性や分層性が向上し、不純物を抽出操作で水層側に効率的に除去でき、より効率的にモルフォリノオリゴヌクレオチドを伸長合成できることを見出した。

50

また本発明者らは、液相での縮合反応によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを製造する過程において、核酸塩基が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護されたモルフォリノヌクレオチドモノマーを用いることにより、前記縮合反応及び脱保護反応が良好に進行し、さらに抽出操作で水層側に不純物を淘汰する際に、モルフォリノヌクレオチドの非極性溶媒への溶解性や分層性が向上し、不純物を抽出操作で水層側に効率的に除去できることを見出した。

また本発明者らは、液相での縮合反応によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを製造する過程において、上記のように保護基として炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基を使用する場合に、炭素数10以上300以下の分岐鎖のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の分岐鎖のアルケニル基を有する保護基を採用することにより、前記縮合反応及び脱保護反応が良好に進行し、さらに抽出操作で水層側に不純物を淘汰する際に、モルフォリノヌクレオチドの非極性溶媒への溶解性や分層性が向上し、不純物を抽出操作で水層側に効率的に除去でき、より効率的にモルフォリノオリゴヌクレオチドを伸長合成できることを見出した。

10

本発明者らはこれらの方法により、モルフォリノオリゴヌクレオチドを液相法により効率的かつ高収率に製造できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下を含む。

[1] 5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護されたp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(pは、1以上の任意の整数を示す。)を、5'末端及び/又は核酸塩基が、各々独立に、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護され、かつモルフォリン環窒素原子が保護されていないn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(nは、1以上の任意の整数を示す。)と、そのモルフォリン環窒素原子を介してホスホルアミダート結合又はホスホロジアミダート結合により縮合させた後、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物であるn+p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する工程(以下、「工程(2)」)という)を含む、n+p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法。

20

[2] n個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの5'末端及び核酸塩基、並びにp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの核酸塩基のうち、少なくとも一つが、炭素数10以上300以下の分岐鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基で保護されている、[1]記載の製造方法。

30

[3] n個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの5'末端が、炭素数10以上300以下の分岐鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基で保護されている、[1]記載の製造方法。

[4] p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの核酸塩基が、各々独立に、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基又は前記モルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護されている、[1]記載の製造方法。

40

[5] 抽出操作の前に、反応混合物を、クエンチ剤で処理する、[1]記載の製造方法。

[6] クエンチ剤が、第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物、又はホスホノ基を有する化合物からなるクエンチ剤である、[5]記載の製造方法。

[7] クエンチ剤が、1個の第二級アミノ基及び1又は2個のカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤である、[5]記載の製造方法。

[8] クエンチ剤が、プロリルグルタミン酸である、[5]記載の製造方法。

[9] クエンチ剤が、プロリルプロリンである、[5]記載の製造方法。

[10] クエンチ剤が、ホスホノ基を有する化合物からなるクエンチ剤である、[5]記載の製造方法。

[11] クエンチ剤が、フェニルホスホン酸である、[5]記載の製造方法。

50

[ 1 2 ] 更に、下記工程を含有する、[ 1 ] ~ [ 1 1 ] のいずれかに記載の製造方法；前記 [ 1 ] に記載の工程（工程（ 2 ））の前に、非極性溶媒中において、モルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護され、かつ 5 ' 末端及び / 又は核酸塩基が、各々独立に、炭素数 1 0 以上 3 0 0 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 1 0 以上 3 0 0 以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護された n 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドから、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去し、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物である n 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する工程（以下、「工程（ 1 ）」という）。

[ 1 3 ] カチオン捕捉剤の存在下に酸と反応させて、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去する、[ 1 2 ] 記載の製造方法。

[ 1 4 ] カチオン捕捉剤が、メルカプト基及びカルボキシ基を有する化合物、又はカルボキシ基を有するインドール化合物からなるカチオン捕捉剤である、[ 1 3 ] 記載の製造方法。

[ 1 5 ] カチオン捕捉剤が、1 個のメルカプト基及び 1 又は 2 個のカルボキシ基を有する化合物からなるカチオン捕捉剤である、[ 1 3 ] 記載の製造方法。

[ 1 6 ] カチオン捕捉剤が、チオリンゴ酸又は 3 - メルカプトプロピオン酸である、[ 1 3 ] 記載の製造方法。

[ 1 7 ] モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基が、シリル系保護基である、[ 1 ] に記載の製造方法。

[ 1 8 ] モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基が、tert - ブチルジメチルシリル基、ジイソプロピルフェニルシリル基、トリフェニルシリル基、又はジフェニル tert - ブトキシシリル基である、[ 1 ] 記載の製造方法。

[ 1 9 ] p が 1 である、[ 1 ] ~ [ 1 8 ] のいずれかに記載の製造方法。

[ 2 0 ] 炭素数 1 0 以上 3 0 0 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 1 0 以上 3 0 0 以下のアルケニル基を有する保護基が、下記式（ I I ）：

【 0 0 0 8 】

【化 1】

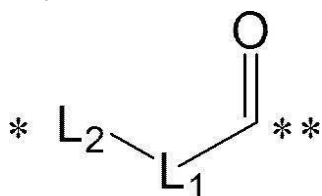


【 0 0 0 9 】

[ L は、単結合、又は式（ a 1 ）：

【 0 0 1 0 】

【化 2】



(a1)

【 0 0 1 1 】

[ 式中、\* は、Y との結合位置を示し；

\*\* は、保護される、酸素原子又は窒素原子との結合位置を示し；

L<sub>1</sub> は、置換されていてもよい 2 価の C<sub>1 - 2 2</sub> 炭化水素基を示し；かつ

L<sub>2</sub> は、C (= O) を示すか、又は \*\*\* N ( R<sup>3</sup> ) - R<sup>1</sup> - N ( R<sup>2</sup> ) C (= O) \*\* ( 式中、\*\* は、L<sub>1</sub> との結合位置を示し、\*\*\* は、Y との結合位置を示し、R<sup>1</sup> は、置換されていてもよい C<sub>1 - 2 2</sub> アルキレン基を示し、R<sup>2</sup> 及び R<sup>3</sup> は、それぞれ独立して、水素原子もしくは置換されていてもよい C<sub>1 - 2 2</sub> アルキル基を示すか、又は R<sup>2</sup> 及

10

20

30

40

50

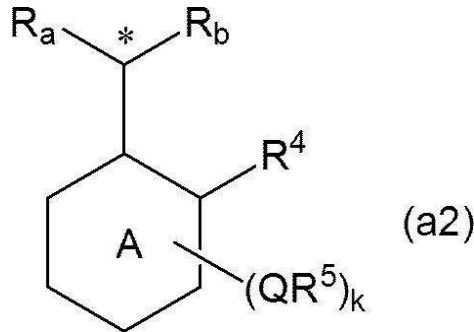
び  $R^3$  が一緒になって、置換されていていてもよい  $C_{1-2}$  アルキレン結合を形成していてもよい。) で表される基を示す。] で示される基を示し、

Y は、単結合、酸素原子、又は  $NR$  ( $R$  は、水素原子、アルキル基又はアラルキル基を示す。) を示し、ならびに

Z は、式 (a2) :

【0012】

【化3】



10

【0013】

[ 式中、\* は、Y との結合位置を示し；

環 A は、ベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

$R^4$  は、水素原子を示すか、あるいは  $R_b$  が、下記式 (a3) で表される基であり、かつ環 A 及び環 B が共にベンゼン環である場合には、 $R^6$  と一緒になって単結合又は O - を示して、環 B と共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；

20

k 個の Q は、独立してそれぞれ単結合を示すか、あるいは - O - 、 - S - 、 - OC(=O) - 、 - NHC(=O) - 又は - NH - を示し；

k 個の  $R^5$  は、独立してそれぞれ、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する有機基を示し；

k は、1 ~ 4 の整数を示し；

環 A は、k 個の  $QR^5$  に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていていてもよい  $C_{1-6}$  アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていていてもよい  $C_{1-6}$  アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよく；

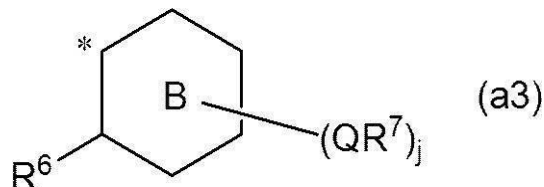
30

$R_a$  は、水素原子を示し；

$R_b$  は、水素原子、又は式 (a3) :

【0014】

【化4】



【0015】

( 式中、\* は、結合位置を示し；

環 B はベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

j は、0 ~ 4 の整数を示し；

j 個の Q は、前記と同意義を示し；

j 個の  $R^7$  は、独立してそれぞれ、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する有機基を示し；

$R^6$  は、水素原子を示すか、又は  $R^4$  と一緒になって単結合又は O - を示して、環 A と共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；かつ

環 B は、j 個の  $QR^7$  に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていていてもよい  $C_{1-6}$  アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていていてもよい  $C_{1-6}$  アルコキシ基

40

50

からなる群から選択される置換基を有していてもよい。)で表される基を示し、あるいは  $R_a$  及び  $R_b$  は一緒になって、カルボニル基を形成する。]で表される基である、[1] ~ [19]のいずれか一項に記載の製造方法。

[21]更に、下記工程を含有する、[1] ~ [20]のいずれかに記載の製造方法；

[1]に記載の工程(工程(2))で得られた  $n + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの保護基を全て除去する工程(以下、「工程(4)」という)。

[22]酸性条件下で除去可能な一時保護基が、トリチル基、ジメトキシトリチル基、又はモノメトキシトリチル基である、[1] ~ [21]のいずれかに記載の製造方法。

[23]非極性溶媒が、ハロゲン系溶媒、芳香族系溶媒、エステル系溶媒、脂肪族系溶媒、非極性エーテル系溶媒、及びこれらの組合せからなる群より選択される溶媒である、[1] ~ [22]のいずれかに記載の製造方法。

10

[24][12]に記載の工程(工程(1))で得られた反応混合物からモルフォリノオリゴヌクレオチドを単離せずにそのまま[1]に記載の工程(工程(2))で使用する、[12] ~ [23]のいずれかに記載の製造方法。

[25]非極性溶媒中において、モルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護され、かつ5'末端が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護された  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを、カチオン捕捉剤の存在下に酸と反応させて、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去する工程(工程(1))、を含む、モルフォリン環窒素原子が保護されていない  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド( $n$ は、1以上の任意の整数を示す。)の製造方法。

20

[26]カチオン捕捉剤が、メルカプト基及びカルボキシ基を有する化合物、又はカルボキシ基を有するインドール化合物からなるカチオン捕捉剤である、[25]記載の製造方法。

[27]カチオン捕捉剤が、1個のメルカプト基及び1又は2個のカルボキシ基を有する化合物からなるカチオン捕捉剤である、[25]記載の製造方法。

[28]カチオン捕捉剤が、チオリンゴ酸又は3-メルカプトプロピオン酸である、[25]記載の製造方法。

[29]  $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド及び  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドが有する核酸塩基のうち、少なくとも一つが、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護されている、[1]記載の製造方法。

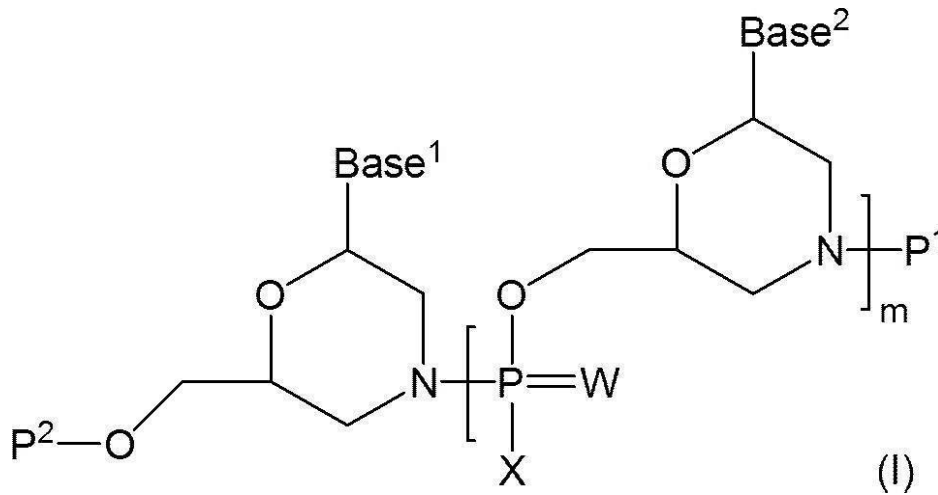
30

[30]炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基が、炭素数10以上300以下の分岐鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基である、[29]記載の製造方法。

[31]一般式(I)：

【0016】

【化5】



10

【0017】

[式中、

mは、0以上の任意の整数を示し、

P<sup>1</sup>は、水素原子または酸性条件下で除去可能な一時保護基を示し、P<sup>2</sup>は、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いはP<sup>1</sup>と異なる条件下で除去可能な保護基を示し、

20

Base<sup>1</sup>は、保護基で保護されていてもよい核酸塩基を示し、m個のBase<sup>2</sup>は、独立してそれぞれ保護基で保護されていてもよい核酸塩基を示し、m個のXは、独立してそれぞれジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基、または4位窒素原子が保護基で保護され、さらに置換されていてもよい1-ピペラジニル基を示し、

m個のWは、酸素原子を示す。

但し、1) Base<sup>1</sup>が保護基で保護されている場合の保護基、m個の任意のBase<sup>2</sup>が保護基で保護されている場合の任意の保護基、及びP<sup>2</sup>で示される保護基、の少なくとも一つは、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基であり、かつ

2) P<sup>2</sup>が炭素数10以上300以下の直鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の直鎖アルケニル基を有する保護基である場合、Base<sup>1</sup>及びm個の任意のBase<sup>2</sup>の少なくとも一つは、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護された核酸塩基である。]

30

で示されるモルフォリノヌクレオチド。

[32] mが0~19の整数である、[31]記載のモルフォリノヌクレオチド。

[33] 炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基が、下記式(II)：

【0018】

【化6】



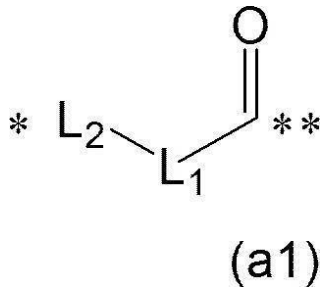
40

【0019】

[Lは、単結合、又は式(a1)：

【0020】

【化7】



【0021】

10

[式中、\* は、Yとの結合位置を示し；

\* \* は、保護される、酸素原子又は窒素原子との結合位置を示し；

L<sub>1</sub> は、置換されていてもよい2価のC<sub>1-22</sub>炭化水素基を示し；かつ

L<sub>2</sub> は、C(=O)を示すか、又は\*\*\*N(R<sup>3</sup>)-R<sup>1</sup>-N(R<sup>2</sup>)C(=O)\*\* (式中、\*\* は、L<sub>1</sub>との結合位置を示し、\*\*\* は、Yとの結合位置を示し、R<sup>1</sup>は、置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキレン基を示し、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ独立して、水素原子もしくは置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキル基を示すか、又はR<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が一緒になって、置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキレン結合を形成していてもよい。)で表される基を示す。]で示される基を示し、

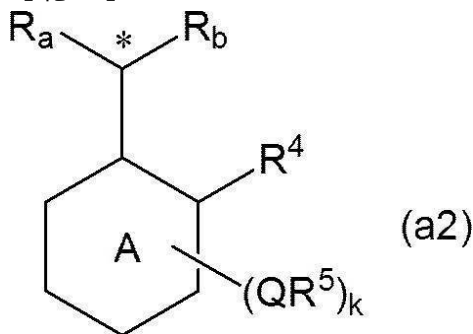
Yは、単結合、酸素原子、又はNR(Rは、水素原子、アルキル基又はアラルキル基を示す。)を示し、ならびに

20

Zは、式(a2)：

【0022】

【化8】



30

【0023】

[式中、\* は、Yとの結合位置を示し；

環Aは、ベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

R<sup>4</sup>は、水素原子を示すか、あるいはR<sub>b</sub>が、下記式(a3)で表される基であり、かつ環A及び環Bが共にベンゼン環である場合には、R<sup>6</sup>と一緒に単結合又はO-を示して、環Bと共にフルオレニル基又はキサンテニル基を形成していてもよく；

k個のQは、独立してそれぞれ単結合を示すか、あるいは-O-、-S-、-OC(=O)-、-NHC(=O)-又は-NH-を示し；

40

k個のR<sup>5</sup>は、独立してそれぞれ、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基を示し；

kは、1~4の整数を示し；

環Aは、k個のQR<sup>5</sup>に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよく；

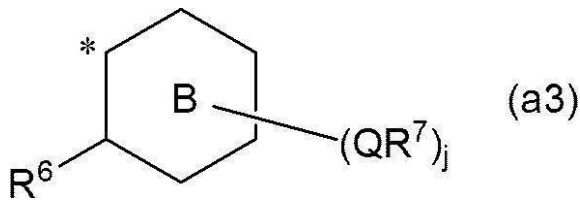
R<sub>a</sub>は、水素原子を示し；

R<sub>b</sub>は、水素原子、又は式(a3)：

【0024】

50

【化 9】



【 0 0 2 5 】

(式中、\* は、結合位置を示し；  
 環 B はベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；  
 j は、0 ~ 4 の整数を示し；  
 j 個の Q は、前記と同意義を示し；  
 j 個の R<sup>7</sup> は、独立してそれぞれ、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する有機基を示し；  
 R<sup>6</sup> は、水素原子を示すか、又は R<sup>4</sup> と一緒になって単結合又は O - を示して、環 A と共にフルオレニル基又はキサンテニル基を形成していてもよく；かつ  
 環 B は、j 個の Q R<sup>7</sup> に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい C<sub>1</sub> - <sub>6</sub> アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよい C<sub>1</sub> - <sub>6</sub> アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよい。) で表される基を示し、あるいは R<sub>a</sub> 及び R<sub>b</sub> は一緒になって、カルボニル基を形成する。] で表される基である、[ 3 1 ] 又は [ 3 2 ] に記載のモルフォリノヌクレオチド。  
 [ 3 4 ] 炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基が、  
 3 , 4 , 5 - トリ ( オクタデシルオキシ ) ベンゾイル基、及び 3 , 4 , 5 - トリ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンゾイル基からなる群から選択される、[ 3 1 ] 又は [ 3 2 ] に記載のモルフォリノヌクレオチド。  
 [ 3 5 ] P<sup>2</sup> が、シリル系保護基である、[ 3 1 ] ~ [ 3 4 ] のいずれかに記載のモルフォリノヌクレオチド。  
 [ 3 6 ] P<sup>2</sup> が、tert - ブチルジメチルシリル基、ジイソプロピルフェニルシリル基、トリフェニルシリル基、又はジフェニル tert - ブトキシシリル基である、[ 3 1 ] ~ [ 3 5 ] のいずれかに記載のモルフォリノヌクレオチド。  
 [ 3 7 ] P<sup>1</sup> が、トリチル基、モノメトキシトリチル基、又はジメトキシトリチル基である、[ 3 1 ] ~ [ 3 6 ] のいずれかに記載のモルフォリノヌクレオチド。

【発明の効果】

【 0 0 2 6 】

本発明によれば、モルフォリノオリゴヌクレオチドの液相合成において、縮合反応後に残留する原料のモルフォリノヌクレオチドモノマーや縮合反応前の脱保護による生じる保護基由来の不純物を抽出操作により簡便に水層側に除去でき、これら不純物による副反応も抑制されるため、高品質のモルフォリノオリゴヌクレオチドを大量かつ効率的に製造することが可能となった。

また、特に 5' 末端に存在する水酸基やアミノ基、及び / 又は核酸塩基を炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖のアルケニル基を有する保護基で保護することにより、また好ましくは核酸塩基をこのような保護基で保護することにより、また好ましくは分岐鎖のアルキル基及び / 又は分岐鎖のアルケニル基を有する保護基で保護することにより、縮合反応及び脱保護反応も良好に進行し、さらに抽出操作におけるモルフォリノオリゴヌクレオチドの溶解性や分層性が向上し、後処理をより効率的に行うことが可能となった。

すなわち、本発明によれば、縮合反応を液相中で行うことにより反応性が固相法に比べて格段に向上し、使用するモノマー当量を格段に低減でき、さらに反応後は抽出操作によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを簡便に単離・精製することができるので、医薬品に利用される鎖長のモルフォリノオリゴヌクレオチドを液相合成法において効率的かつ高

10

20

30

40

50

収率に製造することが可能となった。

【発明を実施するための形態】

【0027】

〔用語の説明〕

文中で特に断らない限り、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味をもつ。本明細書に記載されたものと同様または同等の任意の方法および材料は、本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及したすべての刊行物および特許は、例えば、記載された発明に関連して使用されうる刊行物に記載されている、構築物および方法論に記載および開示する目的で、参照として本明細書に組み入れられる。

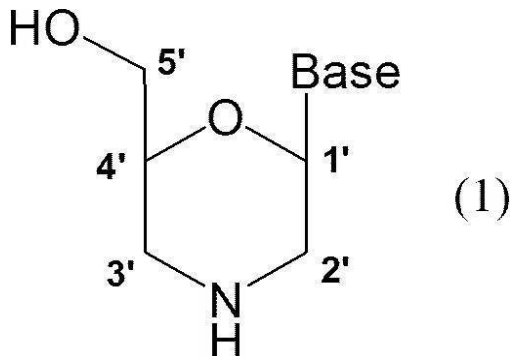
10

【0028】

本明細書において、モルフォリノオリゴヌクレオチドの構成単位となる「モルフォリノヌクレオシド」とは、下記式(1)で表される化合物である。

【0029】

【化10】



20

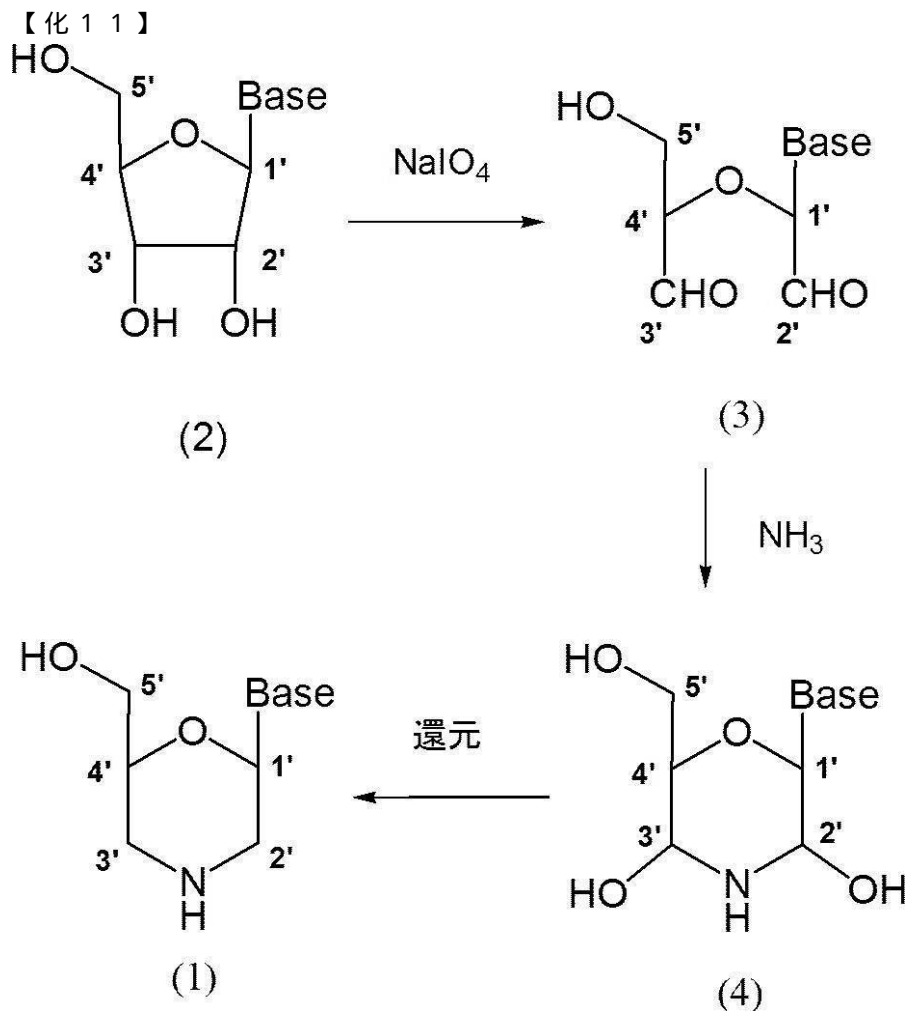
【0030】

(式中、Baseは、保護されていてもよい核酸塩基を示す)

モルフォリノヌクレオシド(1)は、自体公知の方法(例えば、WO91/09033 A1に記載の方法)、又はそれに準じた方法に従い調製することができる。具体的には、下記スキームに示すように、対応するリボヌクレオシド(2)を過ヨウ素酸ナトリウム等で酸化開環して対応する2',3'-ジアルデヒド(3)とし、2',3'-ジアルデヒド(3)をアンモニアで閉環して2',3'-ジヒドロキシモルフォリノヌクレオシド(4)とし、2',3'-ジヒドロキシモルフォリノヌクレオシド(4)を還元剤(例、水素化シアノホウ素ナトリウム、水素化トリアセトキシホウ素ナトリウムなど)で還元することにより、モルフォリノヌクレオシド(1)を得ることができる。

30

【0031】



10

20

## 【0032】

なお、本明細書において、モルフォリノヌクレオシドの位置番号（1'、2'など）は、原料であるリボヌクレオシド（2）のリボースの炭素原子の位置番号に対応したものを使用するものとする。

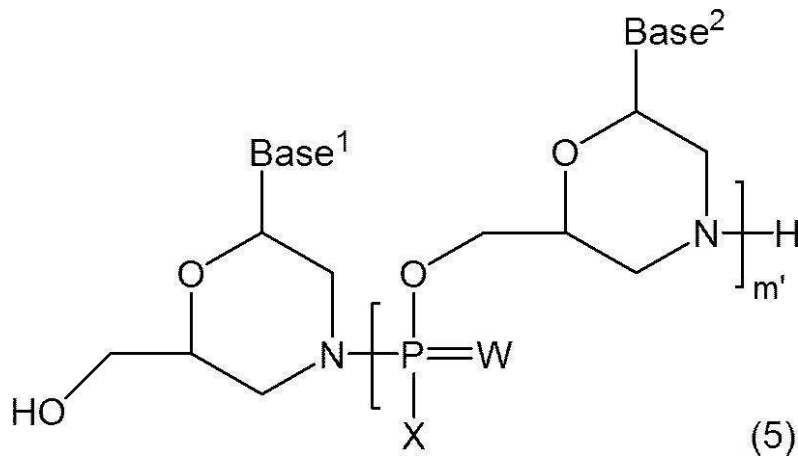
30

## 【0033】

本明細書において、モルフォリノオリゴヌクレオチドとは、2以上のモルフォリノヌクレオシドが5'位水酸基とモルフォリン環の窒素原子を介してホスホルアミダート結合又はホスホロジアミダート結合により重合した化合物を意味し、例えば、 $m' + 1$ 個重合したモルフォリノオリゴヌクレオチドとしては、下記式（5）で表される化合物が挙げられる。

## 【0034】

## 【化12】



40

50

## 【 0 0 3 5 】

( 式中、

$m'$  は、1 以上の任意の整数を示し、

$Base^1$  及び  $m'$  個の  $Base^2$  は、独立してそれぞれ保護されていてもよい核酸塩基を示し、

$m'$  個の  $X$  は、独立してそれぞれ  $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、4 位窒素原子が保護基で保護され、さらに置換されていてもよい 1 - ピペラジニル基等を示し、

$m'$  個の  $W$  は、酸素原子を示す。)

## 【 0 0 3 6 】

本明細書において、「4 位窒素原子が保護基で保護され、さらに置換されていてもよい 1 - ピペラジニル基」とは、ピペラジニル基の 4 位窒素原子が保護基で保護されていることを意味し、モルフォリノヌクレオチドのモルフォリン環窒素原子の脱保護条件に耐え得る保護基により保護されている 1 - ピペラジニル基が好ましい。かかる「ピペラジニル基 4 位窒素原子の保護基」としてはアシル基が好ましく、例えば、モノフルオロアセチル基、ジフルオロアセチル基、トリフルオロアセチル基、2 - フルオロプロピオニル基、2, 2 - ジフルオロプロピオニル基、3, 3, 3 - トリフルオロプロピオニル基、2, 3, 3, 3 - テトラフルオロプロピオニル基、ペンタフルオロプロピオニル基等の炭素鎖にフルオロ基を有するアシル基がより好ましい(国際公開第 2 0 0 8 / 0 0 8 1 1 3 号パンフレット参照)。ピペラジニル基は、ピペラジニル基の炭素原子に結合する水素原子が置換されていてもよく、置換基としては、メチル基等のアルキル基(好ましくは炭素原子数 1 ~ 3)等が挙げられる。

## 【 0 0 3 7 】

本明細書において、核酸化学の慣例に倣い、モルフォリノオリゴヌクレオチドの 5' 位の遊離水酸基を有する側の末端(上記式(5)の左下側)のモルフォリノヌクレオチドを「5' - 末端」、反対側の末端(上記式(5)の右上側)のモルフォリノヌクレオチドを「3' - 末端」と称すものとする。

## 【 0 0 3 8 】

本明細書において、「核酸塩基」とは、核酸の合成に使用されるものであれば特に制限されず、例えば、シトシル基、ウラシル基、チミシル基等のピリミジン塩基、アデニル基、グアニル基等のプリン塩基を挙げることができる。モルフォリノヌクレオチドに存在する複数の核酸塩基は異種の核酸塩基であってもよく、同種の核酸塩基であってもよい。また、「保護されていてもよい核酸塩基」とは、例えば、核酸塩基上に存在するアミノ基や水酸基が保護されている核酸塩基が挙げられ、例えば、アミノ基を有する核酸塩基であるアデニル基、グアニル基、またはシトシル基において、アミノ基が保護されていてもよく、核酸塩基のアミノ基がモルフォリノヌクレオチドのモルフォリン環窒素原子の脱保護条件に耐え得る保護基により保護されている核酸塩基が好ましい。かかる「アミノ基の保護基」としては、特に限定されず、例えば、グリーンズ・プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス(Greene's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS)、第 4 版、ウィリー・インターサイエンス(Wiley-Interscience)出版(2006 年)等に記載されている保護基を挙げることができる。かかる「アミノ基の保護基」の具体例としては、例えば、ピバロイル基、ピバロイルオキシメチル基、トリフルオロアセチル基、フェノキシアセチル基、4 - イソプロピルフェノキシアセチル基、4 - tert - ブチルフェノキシアセチル基、アセチル基、ベンゾイル基、イソブチリル基、ジメチルホルムアミジニル基、9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル基等を挙げることができる。これらの中でも、フェノキシアセチル基、4 - イソプロピルフェノキシアセチル基、アセチル基、ベンゾイル基、イソブチリル基及びジメチルホルムアミジニル基が好ましい。また、核酸塩基のカルボニル基が保護されていてもよく、例えば、フェノール、2, 5 - ジクロロフェノール、3 - クロロフェノール、3, 5 - ジクロロフェノール、2 - ホルミルフェノール、2 - ナフトール、4 - メトキシフェノール、4 - クロロフェノール、2 - ニトロフェノール、4 -

10

20

30

40

50

ニトロフェノール、4 - アセチルアミノフェノール、ペンタフルオロフェノール、4 - ピバロイルオキシベンジルアルコール、4 - ニトロフェネチルアルコール、2 - (メチルスルフォニル)エタノール、2 - (フェニルスルフォニル)エタノール、2 - シアノエタノール、2 - (トリメチルシリル)エタノール、ジメチルカルバミン酸クロライド、ジエチルカルバミン酸クロライド、エチルフェニルカルバミン酸クロライド、1 - ピロリジンカルボン酸クロライド、4 - モルフォリンカルボン酸クロライド、ジフェニルカルバミン酸クロライド等を反応させて、カルボニル基を保護することができる。ここで、カルボニル基の保護基については、特に導入しなくてもよい場合がある。また、該「核酸塩基」には、上記した基の他に、核酸塩基が任意の置換基(例えば、ハロゲン原子、アルキル基、アラルキル基、アルコキシ基、アシル基、アルコキシアルキル基、ヒドロキシ基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、カルボキシ基、シアノ基、ニトロ基等)により任意の位置に1 ~ 3個置換されている修飾核酸塩基(例えば、8 - ブロモアデニル基、8 - ブロモグアニル基、5 - プロモシトシル基、5 - ヨードシトシル基、5 - プロモウラシル基、5 - ヨードウラシル基、5 - フルオロウラシル基、5 - メチルシトシル基、8 - オキソグアニル基、ヒポキサンチニル基等)も包含される。

10

また、「アミノ基の保護基」としては、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基も含まれ、自体公知の方法またはこれに準ずる方法に従ってアミノ基を保護することができる。例えば、チミニル基のピリミジン環上の窒素原子を、3, 4, 5 - トリ(オクタデシルオキシ)安息香酸クロライドを塩基存在下に反応させることにより保護することができる。

20

## 【0039】

本明細書中、「ハロゲン原子」とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子である。

## 【0040】

本明細書中、「アルキル(基)」としては、直鎖状または分岐鎖状の炭素数1以上のアルキル基が挙げられ、特に炭素数範囲の限定がない場合には、好ましくは $C_{1-10}$ アルキル基であり、より好ましくは $C_{1-6}$ アルキル基である。炭素数範囲の限定がない場合の好適な具体例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec - ブチル、tert - ブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられ、特にメチル、エチルが好ましい。

30

## 【0041】

本明細書中、「アラルキル(基)」としては、 $C_{7-20}$ アラルキル基が挙げられ、好ましくは $C_{7-16}$ アラルキル基( $C_{6-10}$ アリール -  $C_{1-6}$ アルキル基)である。好適な具体例としては、ベンジル、1 - フェニルエチル、2 - フェニルエチル、1 - フェニルプロピル、ナフチルメチル、1 - ナフチルエチル、1 - ナフチルプロピル等が挙げられ、特にベンジルが好ましい。

## 【0042】

本明細書中、「アルコキシ(基)」としては、炭素数1以上のアルコキシ基が挙げられ、特に炭素数範囲の限定がない場合には、好ましくは $C_{1-10}$ アルコキシ基であり、より好ましくは $C_{1-6}$ アルコキシ基である。炭素数範囲の限定がない場合の好適な具体例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec - ブトキシ、tert - ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシ等が挙げられ、特にメトキシ、エトキシが好ましい。

40

## 【0043】

本明細書中、「アシル(基)」としては、例えば、直鎖状または分岐鎖状の $C_{1-6}$ アルカノイル基、 $C_{7-13}$ アロイル基等が挙げられる。具体的には、例えば、ホルミル、アセチル、n - プロピオニル、イソプロピオニル、n - ブチリル、イソブチリル、ピバロイル、パレリル、ヘキサノイル、ベンゾイル、ナフトイル、レプリニル等が挙げられ、これらはそれぞれ置換されていてもよい。

## 【0044】

50

本明細書中、「アルケニル(基)」としては、直鎖状または分岐鎖状の $C_{2-6}$ アルケニル基等が好ましく、例えば、ビニル、1-プロペニル、アリル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル等が挙げられる。中でも、 $C_{2-4}$ アルケニル基が好ましい。

【0045】

本明細書中、「アルキニル(基)」としては、 $C_{2-6}$ アルキニル基等が好ましく、例えば、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニル、4-ペンチニル、1-ヘキシニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、4-ヘキシニル、5-ヘキシニル等が挙げられる。中でも、 $C_{2-4}$ アルキニル基が好ましい。

【0046】

本明細書中、「シクロアルキル(基)」は、環状アルキル基を意味し、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル等が挙げられる。中でも、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の $C_{3-6}$ シクロアルキル基が好ましく、シクロヘキシルが特に好ましい。

【0047】

本明細書中、「アリール(基)」は、芳香族性を示す単環式あるいは多環式(縮合)の炭化水素基を意味し、具体的には、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、ピフェニル、2-アンズリル等の $C_{6-14}$ アリール基等が挙げられる。中でも $C_{6-10}$ アリール基がより好ましく、フェニルが特に好ましい。

【0048】

本明細書中、「炭化水素基」としては、例えば、脂肪族炭化水素基、芳香脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基および芳香族炭化水素基等が挙げられ、具体的には、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基等の1価基およびそれらから誘導される2価基である。

【0049】

本明細書中、「炭化水素基を有する有機基」とは、前記「炭化水素基」を有する基を意味し、「炭化水素基を有する有機基」中の「炭化水素基」以外の部位は任意に設定することができる。例えば、リンカーとして-O-、-S-、-COO-、-OCONH-、および-CONH-等の部位を有していてもよい。

【0050】

本明細書中、「置換されていてもよい」における「置換基」には、前記のハロゲン原子、アルキル基、アラルキル基、アルコキシ基、アシル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基の他、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基(アルコキシ部は前記アルコキシ基と同様)、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基(アルキル部は前記アルキル基と同様)、アルキルスルフィニル基(アルキル部は前記アルキル基と同様)、アルキルスルフォニル基(アルキル部は前記アルキル基と同様)、アミノ基、モノアルキルアミノ基(アルキル部は前記アルキル基と同様)、ジアルキルアミノ基(アルキル部は前記アルキル基と同様)、オキソ基などが包含される。

【0051】

〔5'末端及び/又は核酸塩基が特定の保護基で保護されていてもよく、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護されていてもよいモルフォリノヌクレオチド〕

本発明で使用される特定の保護基で5'末端(例えば、5'位水酸基若しくは5'位水酸基の置換基上に存在する水酸基及び/又はアミノ基)及び/又は核酸塩基が保護されていてもよいモルフォリノヌクレオチドを使用することにより、液相合成に適したモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法を提供することができる。

目的とするモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法において高効率かつ高収率が達成できるという観点から、5'位水酸基若しくは5'位水酸基の置換基上に存在する水酸基及び/又は核酸塩基が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以

10

20

30

40

50

上300以下のアルケニル基を有する保護基（アンカー）で保護されていてもよいモルフォリヌクレオチドが好ましい。

中でも、目的とするモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法においてより高効率かつ高収率が達成できるという観点から、核酸塩基が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護されているモルフォリヌクレオチドが好ましい。炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基としては、炭素数10以上300以下の分岐鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基が好ましく、特に核酸塩基が炭素数10以上300以下の分岐鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基で保護されているモルフォリヌクレオチドが好ましい。

10

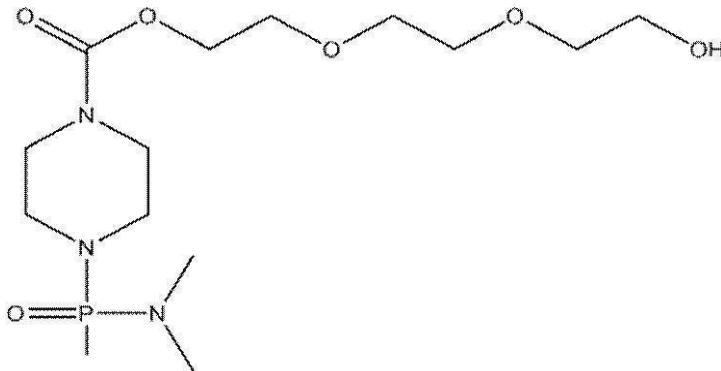
#### 【0052】

「5'位水酸基が水酸基を有する置換基を有する」場合とは、5'位水酸基の水素原子が水酸基を有する置換基で置換されていることを意味する。「水酸基を有する置換基」の「置換基」としては、主鎖が1ないし20個の原子で構成されるものであれば特に限定はない。ここで、「主鎖」とは、5'位水酸基の酸素原子と置換基上に存在する水酸基の酸素原子を結ぶ最短の原子鎖を意味し、当該原子鎖はさらに置換されていてもよい。主鎖を構成する原子としては、炭素原子、酸素原子、窒素原子、硫黄原子、リン原子等から選択される。「水酸基を有する置換基」としては、具体的には、アルキル基、アラルキル基、アシル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アルコキシカルボニル基等の炭化水素基を有する有機基において、炭化水素基上の水素原子が水酸基で置換されているものなどが挙げられる。また例えば、国際公開第2008/008113号パンフレットに開示されている下記5'位水酸基の置換基等が挙げられる。5'位水酸基がアミノ基を有する置換基を有する場合は、5'位水酸基の水素原子がアミノ基を有する置換基で置換されていることを意味し、その他は上記と同様である。

20

#### 【0053】

##### 【化13】



30

#### 【0054】

「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」としては、1価基およびそれから誘導される2価基が挙げられる、中でも炭素数10~40のアルキル基が好ましく、炭素数10~30のアルキル基が特に好ましい。「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」のアルキル基、アルケニル基は直鎖又は分岐鎖のアルキル基、直鎖又は分岐鎖のアルケニル基を含む。本発明の製造方法においては、分岐鎖のアルキル基、分岐鎖のアルケニル基が好ましく、特に分岐鎖のアルキル基が好ましい。「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」の好ましい具体例としては、例えば、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル基、3,7,11-トリメチルドデシル基、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル基、2,6,10-トリメチルウンデシル基、2,2,4,8,10,10-ヘキサメチル-5-ウンデシ

40

50

ル基、2,6,10-トリメチルウンデカ-1,5,9-トリエニル基、2,6-ジメチルヘプチル基、2,6-ジメチルヘプタ-5-エニル基、2,6-ジメチルヘプタ-1,5-ジエニル基、9-ノナデシル基、12-メチルトリデシル基、11-メチルトリデシル基、11-メチルドデシル基、10-メチルウンデシル基、8-ヘプタデシル基、7-ペンタデシル基、7-メチルオクチル基、3-メチルオクチル基、3,7-ジメチルオクチル基、3-メチルヘプチル基、3-エチルヘプチル基、5-ウンデシル基、2-ヘプチル基、2-メチル-2-ヘキシル基、2-ヘキシル基、3-ヘプチル基、4-ヘプチル基、4-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、2,4,4-トリメチルペンチル基等の分岐鎖アルキル基又は分岐鎖アルケニル基、あるいはオクタデシル基、ヘプタデシル基、ヘキサデシル基、ペンタデシル基、テトラデシル基、トリデシル基、ドデシル基、ウンデシル基、デシル基、ノニル基、オクチル基、ヘプチル基、ヘキシル基、及びペンチル基等の直鎖アルキル基の1価の脂肪族炭化水素基、およびそれらから誘導される2価基が挙げられる。

10

【0055】

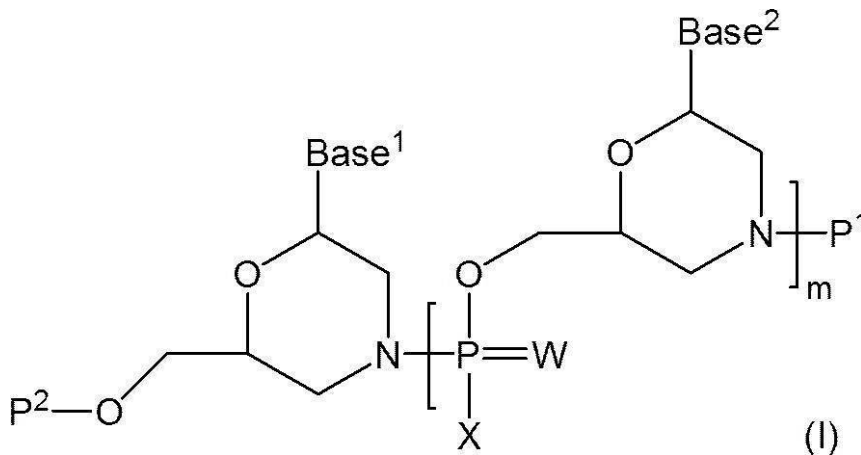
5'位水酸基若しくは5'位水酸基の置換基上に存在する水酸基及び/又は核酸塩基が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護されていてもよく、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護されていてもよいモルフォリノヌクレオチドとしては、具体的には、下記一般式(I)で表される化合物(以下、本発明化合物と称することもある。)が挙げられる。

20

一般式(I):

【0056】

【化14】



30

【0057】

[式中、

mは、0以上の任意の整数を示し、

P<sup>1</sup>は、水素原子または酸性条件下で除去可能な一時保護基を示し、

P<sup>2</sup>は、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いはP<sup>1</sup>と異なる条件下で除去可能な保護基を示し、

40

Base<sup>1</sup>は、保護基で保護されていてもよい核酸塩基を示し、

m個のBase<sup>2</sup>は、独立してそれぞれ保護基で保護されていてもよい核酸塩基を示し、

m個のXは、独立してそれぞれジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基、または4位窒素原子が保護基で保護され、さらに置換されていてもよい1-ピペラジニル基を示し、

m個のWは、酸素原子を示す。]

【0058】

本発明化合物は、後述の本発明のモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法において、5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護されたp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(

50

p は、1 以上の任意の整数を示す。) と結合し、 $m + 1 + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド (p は、1 以上の任意の整数を示す。) を形成することができる。

m が 0 の時、本発明化合物は、「モルフォリノヌクレオシド」と解し、本発明のモルフォリノオリゴヌクレオチド合成における 5' 位末端の出発化合物である。また、本発明化合物には、広義には 3' 末端側のモルフォリン環窒素原子が未保護 ( $P^1$  が水素原子) のものも包含される。

#### 【0059】

上記式 (I) における m は、0 以上の任意の整数を示し、好ましくは、0 である。m の上限は、特に限定されるものではないが、49 以下が好ましく、29 以下がより好ましく、19 以下が更に好ましい。

#### 【0060】

本発明化合物の 3' 末端のモルフォリン環窒素原子の保護基として用いることができる一時保護基  $P^1$  としては、酸性条件下で脱保護可能であり、水酸基の保護基として用いられるものであれば、特に限定はされないが、トリチル基、9-(9-フェニル)キサンテニル基、9-フェニルチオキサンテニル基、1,1-ビス(4-メトキシフェニル)-1-フェニルメチル基、ジメトキシトリチル基等のジ( $C_{1-6}$ アルコキシ)トリチル基、1-(4-メトキシフェニル)-1,1-ジフェニルメチル基、モノメトキシトリチル基等のモノ( $C_{1-18}$ アルコキシ)トリチル基等を挙げることができる。これらの中でも、脱保護のしやすさ、入手の容易さの観点から、トリチル基、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基であることが好ましく、より好ましくは、トリチル基、ジメトキシトリチル基である。

#### 【0061】

本発明化合物の 5' 位水酸基の保護基として用いることができる保護基  $P^2$  としては、 $P^1$  と異なる条件下で脱保護可能であり、水酸基の保護基として用いられるものであれば、特に限定はされない。例えば、ヒドラジンで除去できるレプリニル基、光で除去できる o-ニトロベンジル基、ベンゾフェノン誘導体、プロモクマリン誘導体等の光解除性保護基、パラジウム触媒等による接触還元で脱保護可能なアリルオキシカルボニル基 (Alloc 基) 及びベンジル基、フッ化物イオンによって除去できるシリル系保護基が挙げられる。中でもシリル系保護基が好ましい。シリル系保護基の例としては、tert-ブチルジメチルシリル基、ジイソプロピルフェニルシリル基、トリフェニルシリル基、ジフェニル tert-ブトキシシリル基等を挙げることができる。また保護基  $P^2$  は、前記に記載した「炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及びノ又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基」であってもよい。

#### 【0062】

上記式 (I) における  $Base^1$ 、及び m 個の  $Base^2$  は、独立してそれぞれ保護されていてもよい核酸塩基を示す。「保護されていてもよい核酸塩基」とは、例えば、アミノ基を有する核酸塩基であるアデニル基、グアニル基、またはシトシル基において、アミノ基が保護されていてもよいこと、或いは、環状イミド基を有するチミル基、ウラシル基において、イミド基が保護されていてもよいことを意味し、核酸塩基のアミノ基がモルフォリノヌクレオチドのモルフォリン環窒素原子の脱保護条件に耐え得る保護基により保護されている核酸塩基が好ましい。かかる「アミノ基の保護基」及び「イミド基の保護基」としては、特に限定されず、例えば、グリーンズ・プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス (Greene's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS)、第 4 版、ウィリー・インターサイエンス (Wiley-Interscience) 出版 (2006 年) 等に記載されている保護基を挙げることができる。かかる「アミノ基の保護基」及び「イミド基の保護基」の具体例としては、例えば、ピパロイル基、ピパロイルオキシメチル基、トリフルオロアセチル基、フェノキシアセチル基、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、4-tert-ブチルフェノキシアセチル基、アセチル基、ベンゾイル基、イソブチリル基、ジメチルホルムアミジニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基等を挙げることができる。

10

20

30

40

50

これらの中でも、フェノキシアセチル基、4 - イソプロピルフェノキシアセチル基、アセチル基、ベンゾイル基、イソブチリル基、及びジメチルホルムアミジニル基が好ましい。また、核酸塩基のカルボニル基が保護されていてもよく、例えば、フェノール、2, 5 - ジクロロフェノール、3 - クロロフェノール、3, 5 - ジクロロフェノール、2 - ホルミルフェノール、2 - ナフトール、4 - メトキシフェノール、4 - クロロフェノール、2 - ニトロフェノール、4 - ニトロフェノール、4 - アセチルアミノフェノール、ペンタフルオロフェノール、4 - ピバロイルオキシベンジルアルコール、4 - ニトロフェネチルアルコール、2 - (メチルスルフォニル)エタノール、2 - (フェニルスルフォニル)エタノール、2 - シアノエタノール、2 - (トリメチルシリル)エタノール、ジメチルカルバミン酸クロライド、ジエチルカルバミン酸クロライド、エチルフェニルカルバミン酸クロライド、1 - ピロリジンカルボン酸クロライド、4 - モルフォリンカルボン酸クロライド、ジフェニルカルバミン酸クロライド等を反応させて、カルボニル基を保護することができる。ここで、カルボニル基の保護基については、特に導入しなくてもよい場合がある。

10

「保護されていてもよい核酸塩基」には、前記に記載した「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基」が含まれる。

#### 【0063】

なお、上記式(I)において、

1) Base<sup>1</sup>が保護基で保護されている場合の保護基、m個の任意のBase<sup>2</sup>が保護基で保護されている場合の任意の保護基、及びP<sup>2</sup>で示される保護基の少なくとも一つは、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基であり、かつ

20

2) P<sup>2</sup>が炭素数10以上300以下の直鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の直鎖アルケニル基を有する保護基である場合、Base<sup>1</sup>及びm個の任意のBase<sup>2</sup>の少なくとも一つは、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基で保護された核酸塩基である化合物が好ましい。

#### 【0064】

上記式(I)において、Base<sup>1</sup>が保護基で保護されている場合の保護基、m個の任意のBase<sup>2</sup>が保護基で保護されている場合の任意の保護基の少なくとも一つが、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基であるのが好ましい。この場合の保護基P<sup>2</sup>としては、前述したシリル系保護基が好ましい。

30

#### 【0065】

上記式(I)において、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基は、炭素数10以上300以下の分岐鎖アルキル基及び/又は炭素数10以上300以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基であるのがより好ましい。

#### 【0066】

上記式(I)におけるm個のXは、独立してそれぞれジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基、または4位窒素原子が保護基で保護され、さらに置換されていてもよい1 - ピペラジニル基を示し、好ましくはジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基である。

40

ジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、N - エチル - N - メチルアミノ基などが好ましく、ジメチルアミノ基が好ましい。

#### 【0067】

ピペラジニル基の4位窒素原子の保護基としては、アシル基が好ましく、例えば、モノフルオロアセチル基、ジフルオロアセチル基、トリフルオロアセチル基、2 - フルオロプロピオニル基、2, 2 - ジフルオロプロピオニル基、3, 3, 3 - トリフルオロプロピオニル基、2, 3, 3, 3 - テトラフルオロプロピオニル基、ペンタフルオロプロピオニル基等の炭素鎖にフルオロ基を有するアシル基がより好ましい。当該保護基は、通常、伸長

50

反応終了後に脱保護するが、国際公開第2008/008113号パンフレットに記載の方法に準じて、脱保護後、ピペラジノ基のアミノ基を更に修飾基で修飾してもよい。修飾基としては、ハロゲン原子、アルキル基、アラルキル基、アルコキシ基、アシル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリアル基、ヒドロキシ基、ニトロ基、シアノ基、グアニジル基、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、スルホ基、ホスホ基、アルキルチオ基、アルキルスルフィニル基、アルキルスルフォニル基などが挙げられる。ピペラジニル基における修飾基としては、置換されていてもよいアシル基が好ましく、グアニジル基で置換されていてもよいアシル基(例、6-グアニジノヘキサノイル基)がより好ましい。当該ピペラジニル基は、ピペラジニル基の炭素原子に結合する水素原子が置換されていてもよく、置換基としては、メチル基等のアルキル基(好ましくは炭素原子数1~3)等が挙げられる。

10

【0068】

m個のWは、酸素原子を示す。

【0069】

上記式(I)におけるP<sup>2</sup>で表される保護基及び/又はBase<sup>1</sup>の保護基が「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基」である場合、当該保護基として好ましくは下記式(II)：

【0070】

【化15】



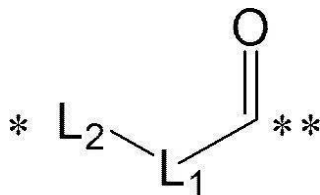
20

【0071】

[Lは、単結合、又は式(a1)：

【0072】

【化16】



(a1)

30

【0073】

[式中、\*は、Yとの結合位置を示し；

\*\*は、保護される、酸素原子又は窒素原子との結合位置を示し；

L<sub>1</sub>は、置換されていてもよい2価のC<sub>1-22</sub>炭化水素基を示し；かつ

L<sub>2</sub>は、C(=O)を示すか、又は\*\*\*N(R<sup>3</sup>)-R<sup>1</sup>-N(R<sup>2</sup>)C(=O)\*\*

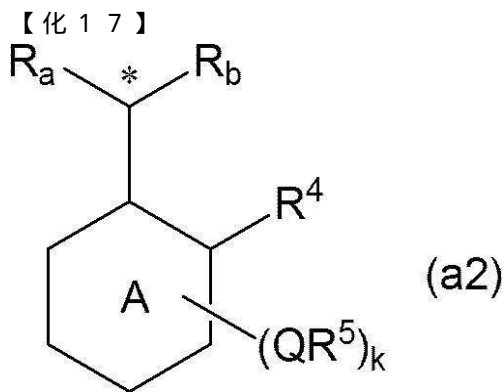
(式中、\*\*は、L<sub>1</sub>との結合位置を示し、\*\*\*は、Yとの結合位置を示し、R<sup>1</sup>は、置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキレン基を示し、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、それぞれ独立して、水素原子もしくは置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキル基を示すか、又はR<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>が一緒になって、置換されていてもよいC<sub>1-22</sub>アルキレン結合を形成していてもよい。)で表される基を示す。]で示される基を示し、

40

Yは、単結合、酸素原子、又はNR(Rは、水素原子、アルキル基又はアラルキル基を示す。)を示し、ならびに

Zは、式(a2)：

【0074】



10

【0075】

[式中、\*は、Yとの結合位置を示し；

環Aは、ベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

R<sup>4</sup>は、水素原子を示すか、あるいはR<sub>b</sub>が、下記式(a3)で表される基であり、かつ環A及び環Bが共にベンゼン環である場合には、R<sup>6</sup>と一緒に単結合又はO-を示して、環Bと共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；

k個のQは、独立してそれぞれ単結合を示すか、あるいは-O-、-S-、-OC(=O)-、-NHC(=O)-又は-NH-を示し；

k個のR<sup>5</sup>は、独立してそれぞれ、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基を示し；

20

kは、1~4の整数を示し；

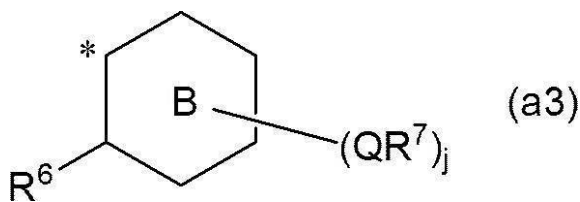
環Aは、k個のQR<sup>5</sup>に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよく；

R<sub>a</sub>は、水素原子を示し；

R<sub>b</sub>は、水素原子、又は式(a3)；

【0076】

【化18】



30

【0077】

(式中、\*は、結合位置を示し；

環Bはベンゼン環又はシクロヘキサン環を示し；

jは、0~4の整数を示し；

j個のQは、前記と同意義を示し；

j個のR<sup>7</sup>は、独立してそれぞれ、炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基を示し；

40

R<sup>6</sup>は、水素原子を示すか、又はR<sup>4</sup>と一緒に単結合又はO-を示して、環Aと共にフルオレニル基又はキサントニル基を形成していてもよく；かつ

環Bは、j個のQR<sup>7</sup>に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、及びハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよい。)で表される基を示し、あるいはR<sub>a</sub>及びR<sub>b</sub>と一緒に、カルボニル基を形成する。)で表される保護基である。

【0078】

上記式(a1)で表されるリンカーLの好ましい態様としては、式(a1)中、L<sub>1</sub>が、エチレン基、またはCH<sub>2</sub>-O-1,4-フェニレン-O-CH<sub>2</sub>を示し；かつ

L<sub>2</sub>が、C(=O)を示すか、または\*\*\*N(R<sup>3</sup>)-R<sup>1</sup>-N(R<sup>2</sup>)C(=O)\*

50

\* (式中、\*\*は、 $L_1$ との結合位置を示し、\*\*\*は、Yとの結合位置を示し、 $R^1$ は、 $C_{1-6}$ アルキレン基を示し、 $R^2$ および $R^3$ は、独立してそれぞれ水素原子、もしくは置換されていてもよい $C_{1-6}$ アルキル基を示すか、または $R^2$ および $R^3$ が一緒になって、置換されていてもよい $C_{1-6}$ アルキレン結合を形成していてもよい。)で表される基である、基である。

## 【0079】

上記式(a1)で表されるリンカーLの別の好ましい態様としては、式(a1)中、 $L_1$ が、エチレン基を示し；かつ  
 $L_2$ が、 $C(=O)$ を示す、基である。

## 【0080】

上記式(a1)で表されるリンカーLの別の好ましい態様としては、式(a1)中、 $L_1$ が、エチレン基を示し；かつ  
 $L_2$ 中の $N(R^3) - R^1 - N(R^2)$ 部分が、ピペラジニレン基を示す、基である。

## 【0081】

上記式(a1)で表されるリンカーLの更に別の好ましい態様としては、式(a1)中、 $L_1$ が、エチレン基を示し；かつ  
 $L_2$ が、\*\*\* $N(R^3) - R^1 - N(R^2)C(=O)$ \*\* (式中、\*\*は、 $L_1$ との結合位置を示し、\*\*\*は、Yとの結合位置を示し、 $R^1$ は、ペンチレン基、またはヘキシレン基を示し、 $R^2$ および $R^3$ は、それぞれ独立して、水素原子もしくはメチル基を示す。)で表される基である、基である。

## 【0082】

上記リンカーLの特に好ましい例は、単結合、または入手が容易で安価なスクシニル基である。

## 【0083】

上記式(I)におけるYは、単結合、酸素原子、またはNR(Rは、水素原子、アルキル基またはアラルキル基を示す。)を示す。

## 【0084】

本明細書中、Rで示される「アルキル基」としては、 $C_{1-30}$ アルキル基が挙げられ、好ましくは $C_{1-10}$ アルキル基、より好ましくは $C_{1-6}$ アルキル基である。好適な具体例としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル等が挙げられ、特にメチル、エチルが好ましい。

## 【0085】

本明細書中、Rで示される「アラルキル基」としては、 $C_{7-30}$ アラルキル基が挙げられ、好ましくは $C_{7-20}$ アラルキル基、より好ましくは $C_{7-16}$ アラルキル基( $C_{6-10}$ アリール- $C_{1-6}$ アルキル基)である。好適な具体例としては、ベンジル、1-フェニルエチル、2-フェニルエチル、1-フェニルプロピル、 $\alpha$ -ナフチルメチル、1-( $\beta$ -ナフチル)エチル、2-( $\beta$ -ナフチル)エチル、1-( $\beta$ -ナフチル)プロピル、 $\alpha$ -ナフチルメチル、1-( $\beta$ -ナフチル)エチル、2-( $\beta$ -ナフチル)エチル、1-( $\beta$ -ナフチル)プロピル等が挙げられ、特にベンジルが好ましい。

## 【0086】

Rとしては、水素原子、 $C_{1-6}$ アルキル基または $C_{7-16}$ アラルキル基が好ましく、水素原子、メチル、エチルまたはベンジルがより好ましく、水素原子が特に好ましい。

## 【0087】

Yとしては、単結合、酸素原子またはNHが好ましい。

## 【0088】

Zの好ましい態様としては、式(a2)で表される基である。

## 【0089】

上記式(I)におけるZの好ましい態様、即ち、上記式(I)におけるZの式(a2)で表される基は、特定のベンジル基(式(a2)中、環Aがベンゼン環であり、 $R_a$ と $R_b$ が共に水素原子であり、かつ $R^4$ が水素原子である)；特定のベンゾイル基(式(a2

10

20

30

40

50

)中、環Aがベンゼン環であり、 $R_a$ と $R_b$ が一緒になって酸素原子を形成し、かつ $R^4$ が水素原子である)；特定のジフェニルメチル基(式(a2)中、環Aがベンゼン環であり、 $R_a$ が水素原子であり、 $R^4$ が水素原子であり、 $k$ が1~3であり、かつ $R_b$ が式(a3)(式中、環Bがベンゼン環であり、 $R^6$ が水素原子であり、 $j$ が0または1である。)で表される基である)；特定のフルオレニル基(式(a2)中、環Aがベンゼン環であり、 $R_a$ が水素原子であり、 $k$ が1であり、 $R_b$ が式(a3)(式中、環Bがベンゼン環であり、かつ $j$ が0である。)で表される基であり、かつ $R^6$ が $R^4$ と一緒に単結合を示して、環Aと共にフルオレン環を形成する)；特定のキサンテニル基(式(a2)中、環Aがベンゼン環であり、 $R_a$ が水素原子であり、 $k$ が1であり、 $R_b$ が式(a3)(式中、環Bがベンゼン環であり、かつ $j$ が0である。)で表される基であり、かつ $R^6$ が $R^4$ と一緒に $-O-$ を示して、環Aと共にキサンチン環を形成する)を包含する。

10

## 【0090】

上記式(a2)における環Aとしては、ベンゼン環又はシクロヘキサン環であり、好ましくはベンゼン環である。

## 【0091】

上記式(a2)中の $k$ 個の $QR^5$ 基、並びに式(a3)中の $j$ 個の $QR^7$ 基において、 $Q$ は、単結合であるか、あるいは $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-NHC(=O)-$ または $-NH-$ であり、好ましくは $-O-$ である。 $k$ 個の $QR^5$ 基、並びに $j$ 個の $QR^7$ 基は、それぞれ同一のものであっても異なるものであってもよい。

20

## 【0092】

上記式(a2)において、「 $R_a$ 及び $R_b$ は一緒になって、酸素原子を形成する」とは、 $R_a$ 及び $R_b$ が一緒になって、カルボニル基( $C(=O)$ )を形成することを意味する。

## 【0093】

$R^5$ または $R^7$ として示される「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」とは、その分子構造中に炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する1価の有機基である。

## 【0094】

「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」における「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」の炭素数としては、炭素数14~40が好ましく、炭素数14~30がより好ましい。

30

「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」における「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」の部位は、特に限定されず、末端に存在しても(1価基)、それ以外の部位に存在してもよい(例えば2価基)。

## 【0095】

「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」としては、1価基およびそれから誘導される2価基が挙げられ、中でも炭素数14~40のアルキル基が好ましく、炭素数14~30のアルキル基が特に好ましい。

40

「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」のアルキル基、アルケニル基は直鎖又は分岐鎖のアルキル基、直鎖又は分岐鎖のアルケニル基を含む。本発明の製造方法においては、分岐鎖のアルキル基、分岐鎖のアルケニル基が好ましく、特に分岐鎖のアルキル基が好ましい。「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」の好ましい具体例としては、例えば、3,7,11,15-テトラメチルヘキサデシル基、3,7,11-トリメチルドデシル基、2,6,10,14-テトラメチルペンタデシル基、2,6,10-トリメチルウンデシル基、2,2,4,8,10,10-ヘキサメチル-5-ウンデシ

50

ル基、2,6,10-トリメチルウンデカ-1,5,9-トリエニル基、2,6-ジメチルヘプチル基、2,6-ジメチルヘプタ-5-エニル基、2,6-ジメチルヘプタ-1,5-ジエニル基、9-ノナデシル基、12-メチルトリデシル基、11-メチルトリデシル基、11-メチルドデシル基、10-メチルウンデシル基、8-ヘプタデシル基、7-ペンタデシル基、7-メチルオクチル基、3-メチルオクチル基、3,7-ジメチルオクチル基、3-メチルヘプチル基、3-エチルヘプチル基、5-ウンデシル基、2-ヘプチル基、2-メチル-2-ヘキシル基、2-ヘキシル基、3-ヘプチル基、4-ヘプチル基、4-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、2,4,4-トリメチルペンチル基等の分岐鎖アルキル基又は分岐鎖アルケニル基、あるいはオクタデシル基、ヘプタデシル基、ヘキサデシル基、ペンタデシル基、テトラデシル基、トリデシル基、ドデシル基、ウンデシル基、デシル基、ノニル基、オクチル基、ヘプチル基、ヘキシル基、及びペンチル基等の直鎖アルキル基の1価の脂肪族炭化水素基、およびそれらから誘導される2価基が挙げられる。

10

## 【0096】

「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」中の「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」以外の部位は任意に設定することができる。例えば、リンカーとして-O-、-S-、-COO-、-OCONH-、および-CONH-、並びに、炭化水素基(1価基または2価基)等の部位を有していてもよい。かかる「炭化水素基」としては、例えば、脂肪族炭化水素基、芳香脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基および芳香族炭化水素基等が挙げられ、具体的には、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基、アラルキル基等の1価基およびそれらから誘導される2価基が用いられる。「脂肪族炭化水素基」以外の部位の「アルキル基」、「アルケニル基」、「アルキニル基」、「シクロアルキル基」、「アリール基」、または「アラルキル基」としては、例えば、前記したのと同様のものを挙げるができる。当該「炭化水素基」は、ハロゲン原子(塩素原子、臭素原子、フッ素原子、ヨウ素原子)、1個以上のハロゲン原子により置換されていていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、オキソ基等から選択される置換基で置換されていていてもよい。

20

## 【0097】

上記一般式(I)中のZを構成する「R<sup>5</sup>(基)」および/または「R<sup>7</sup>(基)」として示される「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」は、分岐等によって複数の「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」が存在してもよい。「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」中に「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基」が複数存在する場合には、その各々は同一のものであっても異なるものであってもよい。

30

## 【0098】

上記一般式(I)中のZを構成する「R<sup>5</sup>(基)」および/または「R<sup>7</sup>(基)」として示される「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」における、炭素数合計の下限は10以上が好ましく、12以上がより好ましく、14以上が更に好ましく、18以上が更に一層好ましく、30以上が殊更好ましい。一方、「R<sup>5</sup>(基)」および/または「R<sup>7</sup>(基)」として示される「炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する有機基」における、炭素数合計の上限は、200以下が好ましく、150以下がより好ましく、120以下が更に好ましく、100以下が更に一層好ましく、80以下が殊更好ましく、60以下が特に好ましい。当該炭素数が大きいほど、モルフォリノオリゴヌクレオチドが長鎖となった場合でも本発明化合物の極性溶媒における溶解性が良好となる。

40

## 【0099】

50

上記式 ( a 2 ) で表される Z の好ましい態様としては、式 ( a 2 ) 中、  
 環 A は、ベンゼン環を示し；  
 $R_a$  および  $R_b$  は、共に水素原子を示し；  
 $R^4$  は、水素原子を示し、  
 $k$  個の Q は、 - O - を示し、  
 $k$  個の  $R^5$  は、独立してそれぞれ炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する有機基 ( 例えば、 $C_{10-40}$  アルキル基 ) を示し；かつ  
 $k$  は、 1 ~ 3 の整数を示す、基である。

## 【 0 1 0 0 】

10

上記式 ( a 2 ) で表される Z の別の好ましい態様としては、式 ( a 2 ) 中、  
 環 A は、ベンゼン環を示し；  
 $k$  は、 1 ~ 3 の整数を示し；  
 $R_a$  および  $R_b$  は、共に水素原子を示し；  
 $R^4$  は、水素原子を示し；  
 $k$  個の Q は、 - O - を示し、  
 $k$  個の  $R^5$  は、独立してそれぞれ炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を 1 ~ 3 個有するベンジル基、または炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を 1 ~ 3 個有するシクロヘキシル基を示し；かつ  
 環 A が、  $k$  個の Q  $R^5$  に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルキル基、およびハロゲン原子で置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよい、基である。

20

## 【 0 1 0 1 】

上記式 ( a 2 ) で表される Z の別の好ましい態様としては、式 ( a 2 ) 中、  
 環 A は、ベンゼン環を示し；  
 $R_a$  は、水素原子を示し；  
 $R^4$  は、水素原子を示し；  
 $R_b$  は、上記式 ( a 3 ) ( 式中、 \* は結合位置を示し；環 B は、ベンゼン環を示し；  $j$  は、 0 ~ 3 の整数を示し；  $j$  個の Q は - O - を示し；  $j$  個の  $R^7$  は、独立してそれぞれ  $C_{10-40}$  アルキル基を示し；  $R^6$  は、水素原子を示す。 )  
 で表される基である、基である。

30

## 【 0 1 0 2 】

上記式 ( a 2 ) で表される Z の更に別の好ましい態様としては、式 ( a 2 ) 中、  
 環 A は、ベンゼン環を示し；  
 $R_a$  は、水素原子を示し；  
 $R_b$  は、上記式 ( a 3 ) ( 式中、 \* は結合位置を示し；環 B は、ベンゼン環を示し；  $j$  は、 0 ~ 3 の整数を示し；  $j$  個の Q は - O - を示し；  $j$  個の  $R^7$  は、独立してそれぞれ  $C_{10-40}$  アルキル基を示し；  
 $R^6$  は、環 A の  $R^4$  と一緒になって単結合または - O - を形成し、それにより環 A と環 B は一緒になってフルオレニル基またはキサントニル基を示す。 ) で表される基を示す、基である。

40

## 【 0 1 0 3 】

上記式 ( a 2 ) で表される Z の別の好ましい態様としては、式 ( a 2 ) 中、  
 環 A は、ベンゼン環を示し；  
 $R_a$  および  $R_b$  は、一緒になって酸素原子を形成し；  
 $R^4$  は、水素原子を示し、  
 $k$  個の Q は、 - O - であり、  
 $k$  個の  $R^5$  は、独立してそれぞれ炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する有機基 ( 例えば、 $C_{10-40}$  アルキル基

50

)を示し;かつ

kは、1~3の整数を示す、基である。

【0104】

上記式(a2)で表されるZの別の好ましい態様としては、式(a2)中、

環Aは、ベンゼン環を示し;

kは、1~3の整数を示し;

R<sub>a</sub>およびR<sub>b</sub>は、一緒になって酸素原子を形成し;

R<sup>4</sup>は、水素原子を示し;

k個のQは、-O-を示し、

k個のR<sup>5</sup>は、独立してそれぞれ炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を1~3個有するベンジル基、または炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を1~3個有するシクロヘキシル基を示し;かつ

環Aが、k個のQR<sup>5</sup>に加えて、更にハロゲン原子、ハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、およびハロゲン原子で置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルコキシ基からなる群から選択される置換基を有していてもよい、基である。

【0105】

式(II): Z-Y-L-で表される保護基としては、3'末端のモルフォリン環窒素原子の保護基P<sup>1</sup>を除去し得る酸性条件下では切断されにくく、塩基性条件下で切断される基が好ましい。

かかる保護基の代表的な例としては、例えば、Lが、上記式(a1)で表される基(好ましくは、スクシニル基等)であり、かつZ-Y-が、以下の基であるものが挙げられる。

3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)ベンジルオキシ基、

3,5-ジ(ドコシルオキシ)ベンジルオキシ基、

3,5-ビス[3',4',5'-トリ(オクタデシルオキシ)ベンジルオキシ]ベンジルオキシ基、

3,4,5-トリス[3',4',5'-トリ(オクタデシルオキシ)ベンジルオキシ]ベンジルオキシ基、

3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)ベンジルアミノ基、

2,4-ジ(ドコシルオキシ)ベンジルアミノ基、

3,5-ジ(ドコシルオキシ)ベンジルアミノ基、

ジ(4-ドコシルオキシフェニル)メチルアミノ基、

4-メトキシ-2-[3',4',5'-トリ(オクタデシルオキシ)ベンジルオキシ]ベンジルアミノ基、

4-メトキシ-2-[3',4',5'-トリ(オクタデシルオキシ)シクロヘキシルメチルオキシ]ベンジルアミノ基、

2,4-ジ(ドデシルオキシ)ベンジルアミノ基、

フェニル(2,3,4-トリ(オクタデシルオキシ)フェニル)メチルアミノ基、

ジ[4-(12-ドコシルオキシドデシルオキシ)フェニル]メチルアミノ基、

3,5-ビス[3',4',5'-トリ(オクタデシルオキシ)ベンジルオキシ]ベンジルアミノ基、または

3,4,5-トリス[3',4',5'-トリ(オクタデシルオキシ)ベンジルオキシ]ベンジルアミノ基。

また、かかる保護基の別の代表的な例としては、例えば、Lが、単結合であり、かつZ-Y-が、以下の基であるものが挙げられる。

3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)ベンゾイル基、または

3,4,5-トリ(2',3'-ジヒドロフィチルオキシ)ベンゾイル基。

【0106】

また、保護基Z-Y-L-の別の態様としては、以下のベンジルスクシニル基、または

10

20

30

40

50

ジフェニルメチルスクシニル基が挙げられる。

2 - { 2 , 4 - ジ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

3 , 5 - ジ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルスクシニル基 ;

4 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルスクシニル基 ;

2 - { 1 - [ ( 2 - クロロ - 5 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) フェニル ) ] ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

3 , 4 , 5 - トリ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルスクシニル基 ;

2 - { 3 , 4 , 5 - トリ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

10

2 - { 4 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

2 - { 2 - [ 3 ' , 4 ' , 5 ' - トリ ( 2 ' ' , 3 ' ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルオキシ ] - 4 - メトキシベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

2 - { 4 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) - 2 - メトキシベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

4 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) - 2 - メチルベンジルスクシニル基 ;

2 - { 4 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) - 2 - メチルベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

4 - [ 2 , 2 , 4 , 8 , 10 , 10 - ヘキサメチル - 5 - ドデカノイルアミノ ] ベンジルスクシニル基 ;

20

2 - { 4 - [ 2 , 2 , 4 , 8 , 10 , 10 - ヘキサメチル - 5 - ドデカノイルアミノ ] ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

4 - ( 3 , 7 , 11 - トリメチルドデシルオキシ ) ベンジルスクシニル基 ;

2 - { 4 - ( 3 , 7 , 11 - トリメチルドデシルオキシ ) ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

2 - { 3 , 5 - ジ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

2 - { 1 - [ 2 , 3 , 4 - トリ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) フェニル ] ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

30

2 - { 1 - [ 4 - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) フェニル ] - 4 ' - ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基 ;

3 , 4 , 5 - トリス [ 3 , 4 , 5 - トリ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジル ] ベンジルスクシニル基 ; および

2 - { 3 , 4 , 5 - トリス [ 3 , 4 , 5 - トリ ( 2 ' , 3 ' - ジヒドロフィチルオキシ ) ベンジル ] ベンジルアミノカルボニル } エチルカルボニル基。

【 0 1 0 7 】

式 ( I I ) : Z - Y - L - で表される保護基の別の好ましい態様としては、

L 及び Y が、単結合であり、

Z が、式 ( a 2 ) を示し、

40

環 A が、ベンゼン環を示し ;

R<sub>a</sub> および R<sub>b</sub> が、一緒になって酸素原子を形成し ;

R<sup>4</sup> が、水素原子を示し、

k 個の Q が、 - O - であり、

k 個の R<sup>5</sup> が、独立してそれぞれ炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する有機基 ( 例えば、C<sub>10-40</sub> アルキル基 ) を示し ; かつ

k は、1 ~ 3 の整数を示す、基である。

【 0 1 0 8 】

式 ( I I ) : Z - Y - L - で表される保護基の別の好ましい態様としては、

50

L が、式 ( a 1 ) を示し、L<sub>2</sub> が、 \* \* \* N ( R<sup>3</sup> ) - R<sup>1</sup> - N ( R<sup>2</sup> ) C ( = O ) \* \*  
 ( 式中、\* \* は、L<sub>1</sub> との結合位置を示し、\* \* \* は、Y との結合位置を示し、R<sup>1</sup> は、  
 置換されていてもよい C<sub>1 - 2 2</sub> アルキレン基を示し、R<sup>2</sup> および R<sup>3</sup> は、それぞれ独立  
 して、水素原子もしくは置換されていてもよい C<sub>1 - 2 2</sub> アルキル基を示すか、または R<sup>2</sup>  
 および R<sup>3</sup> が一緒になって、置換されていてもよい C<sub>1 - 2 2</sub> アルキレン結合を形成し  
 てもよい。 ) を示し、Y が、単結合を示し、

Z が、式 ( a 2 ) を示し、

環 A が、ベンゼン環を示し；

R<sub>a</sub> および R<sub>b</sub> が、一緒になって酸素原子を形成し；

R<sup>4</sup> が、水素原子を示し、

k 個の Q が、- O - であり、

k 個の R<sup>5</sup> が、独立してそれぞれ炭素数 1 0 以上 3 0 0 以下のアルキル基及び / 又は炭素  
 数 1 0 以上 3 0 0 以下のアルケニル基を有する有機基 ( 例えば、C<sub>1 0 - 4 0</sub> アルキル基  
 ) を示し；かつ

k は、1 ~ 3 の整数を示す、基である。

【 0 1 0 9 】

一般式 ( I ) で表される本発明化合物の好ましい態様としては、一般式 ( I ) 中、  
 m が 0 であり、

P<sup>1</sup> が、トリチル基、ジ ( C<sub>1 - 6</sub> アルコキシ ) トリチル基、又はモノ ( C<sub>1 - 6</sub> アルコ  
 キシ ) トリチル基であり；

P<sup>2</sup> が、tert - ブチルジメチルシリル基、ジイソプロピルフェニルシリル基、トリフ  
 ェニルシリル基又はジフェニル tert - ブトキシシリル基であり；

Base<sup>1</sup> が、保護基で保護されていてもよい、シトシル基、ウラシル基、チミシル基、  
 アデニル基、またはグアニル基であり；かつ

Base<sup>2</sup> が、それぞれ保護されていてもよい、シトシル基、ウラシル基、チミシル基、  
 アデニル基、またはグアニル基である、

化合物である。

【 0 1 1 0 】

[ 本発明化合物の製造方法 ]

m が 0 である一般式 ( I ) ( 以下、「一般式 ( I a ) 」と称する ) で表される本発明化  
 合物の製造方法としては、特に限定されないが、自体公知の方法またはこれらに準ずる方  
 法 ( Richard T. Pon et al. , Nucleic Acids Resea  
 rch 2 0 0 4 , 3 2 , 6 2 3 - 6 3 1 . ) に従って、上記保護基の前駆体から製造す  
 ることができる。

上記一般式 ( I a ) において P<sup>2</sup> が式 ( I I ) Z - Y - L - ( 式中、L は、スクシニル  
 基であり、Y 及び Z は、前述の通りである。 ) である化合物の一般的な製造方法を以下に  
 示す。

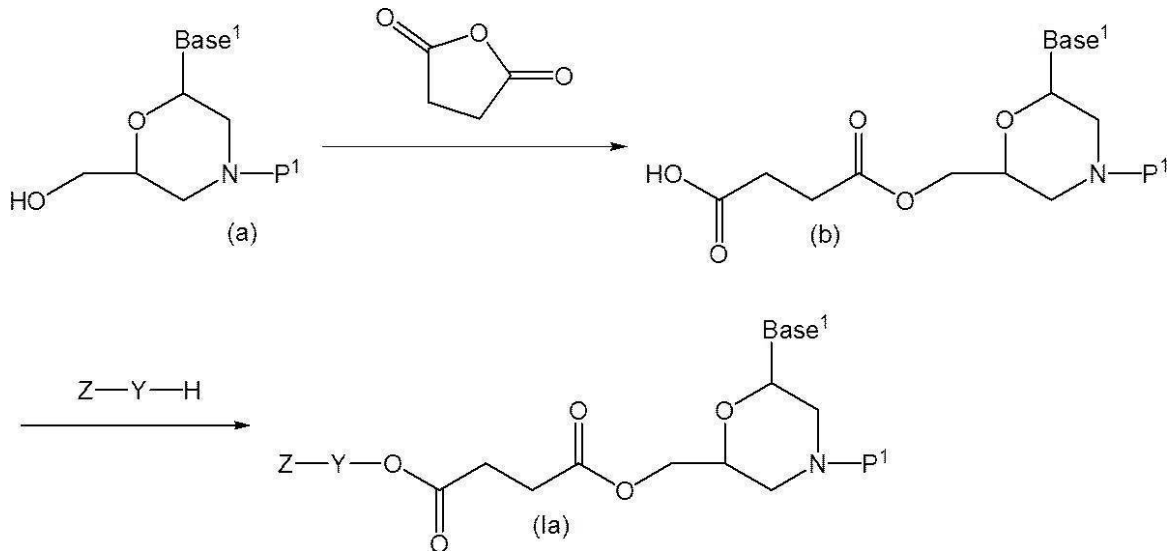
【 0 1 1 1 】

10

20

30

## 【化19】



10

## 【0112】

(式中の各記号は前記と同義である。)

3'末端モルフォリン環窒素原子が保護基P<sup>1</sup>により保護されたモルフォリノヌクレオシド(a)を、塩基存在下、コハク酸無水物と反応させることにより、5'位水酸基にコハク酸が導入された化合物(b)を得る。化合物(b)を縮合剤存在下、保護基の前駆体(Z-Y-H)(アルコールまたはアミン)と脱水縮合させることにより、一般式(Ia)で表される化合物を得ることができる。

20

## 【0113】

上記モルフォリノヌクレオシド(a)から化合物(b)の変換工程は、反応に不活性な溶媒中で行うのが有利である。このような溶媒としては、反応が進行する限り特に限定されないが、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルム、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素系溶媒、またはペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン等の脂肪族炭化水素系溶媒、またはジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、シクロペンチルメチルエーテル等のエーテル系溶媒、あるいはそれらの混合溶媒が好ましい。中でもジクロロメタン、またはクロロホルムが特に好ましい。

30

## 【0114】

塩基としては、特に限定されないが、例えば、後述するような有機塩基が挙げられ、好ましくはN,N-ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン等である。

## 【0115】

上記脱水縮合工程は、反応に不活性な溶媒中で行うのが有利である。このような溶媒としては、反応が進行する限り特に限定されないが、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルム、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素系溶媒、またはペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン等の脂肪族炭化水素系溶媒、或いはそれらの混合溶媒が好ましい。中でもジクロロメタン、クロロホルムが特に好ましい。

40

## 【0116】

化合物(b)とZ-Y-Hとの縮合反応に使用する縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびその塩酸塩(EDC·HCl)、ヘキサフルオロリン酸(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウム(PyBop)、O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート(TBTU)、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-5-クロロ-1H-ベンゾトリアゾリウム-3-オキシドヘキサフ

50

ルオロホスフェート (HCTU)、O-ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) 等が挙げられる。中でも HBTU、HCTU、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびその塩酸塩 (EDC·HCl) が好ましい。

#### 【0117】

縮合剤の使用量は、化合物 (b) 1 モルに対して、1 ~ 10 モルであり、好ましくは 1 ~ 5 モルである。また、Z-Y-H の使用量は、化合物 (b) 1 モルに対して 1 ~ 10 モルであり、好ましくは 1 ~ 5 モルである。反応温度は、反応が進行しさえすれば特に限定されないが、-10 ~ 50 が好ましく、0 ~ 30 がより好ましい。反応時間は、30分 ~ 70時間である。

10

#### 【0118】

上記一般式 (Ia) 中の L がスクシニル基以外の化合物についても、上記製造方法におけるコハク酸無水物に代えて、対応する酸無水物、対応するジカルボン酸ハライド、対応するジカルボン酸の活性エステル等を用いて、同様の反応を行うことにより製造することができる。

また、Y が単結合である場合の化合物については、Z-Y-H の活性化誘導体 (ハロゲン化物、酸ハロゲン化物、活性化カルボキシ基等) を、自体公知の方法に従って、モルフォリノヌクレオシド (a) と反応させるか、あるいは、Z-Y-H とモルフォリノヌクレオシド (a) を縮合剤の存在下に反応させることにより、製造することができる。Z-Y-H とモルフォリノヌクレオシド (a) の縮合反応は、Z-Y-H と化合物 (b) の縮合反応と同様に行うことができる。

20

m が 1 以上である一般式 (I) で示される化合物は、出発原料として、一般式 (Ia) で示される化合物を用いて、下記の本発明の製造方法に従い、5' 末端伸長プロセスを繰り返すことにより製造することができる。

#### 【0119】

前記保護基の前駆体 (Z-Y-H) (アルコール、アミンまたはカルボン酸) の製造方法としては、特に限定されないが、自体公知の方法 (例えば、Bu11. Chem. Soc. Jpn. 2001, 74, 733-738、特開2000-44493号公報、国際公開第2006/104166号パンフレット、国際公開第2007/034812号パンフレット、国際公開第2007/122847号パンフレット、国際公開第2010/113939号パンフレット、特開2010-275254号公報、国際公開第2012/157723号パンフレット等参照) またはこれらに準ずる方法に従って原料化合物から製造することができる。

30

なお、原料化合物として使用する化合物、例えば、一般式 (I) 中の Z を構成する R<sup>5</sup>、R<sup>7</sup> に対応するハロゲン化物等は、市販品として入手可能であるか、あるいは、自体公知の方法またはこれらに準ずる方法に従って製造することができる。

また、該保護基の前駆体 (Z-Y-H) は、上記したとおり、自体公知の方法またはこれらに準ずる方法に従って製造することができるが、原料化合物が反応に影響を及ぼす置換基 (例えば、水酸基、アミノ基、カルボキシ基) を有する場合には、原料化合物を予め公知の方法に従い、適当な保護基で保護した後に反応を行うことが一般的である。かかる保護基は、反応後に、酸処理、アルカリ処理、接触還元等の公知の方法に従い除去することができる。

40

#### 【0120】

3' 末端モルフォリン環窒素原子が保護基 P<sup>1</sup> により保護されたモルフォリノヌクレオシド (a) の製造方法としては、特に限定されないが、自体公知の方法 (例えば、WO91/09033A1 参照) またはこれらに準ずる方法に従ってモルフォリノヌクレオシド (1) から製造することができる。

例えば、P<sup>1</sup> がトリチル基である場合は、モルフォリノヌクレオシド (1) を、トリエチルアミン等の塩基存在下に塩化トリチルと反応させることにより、化合物 (a) を得ることができる。

50

また、 $P^1$  が水素原子である化合物 ( a ) は、 $P^1$  が一時保護基である化合物 ( a ) を後述の脱保護工程 ( 1 ) に付することにより得ることができる。

【 0 1 2 1 】

〔本発明の製造方法〕

次に、本発明にかかるモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法 ( 以下、「本発明の製造方法」ともいう。 ) について説明する。具体的には、適宜保護された  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドから、適宜保護された  $n + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドへの製造方法について説明していくが、例えば、 $n = 1$  の場合には、 $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドは、「モルフォリノヌクレオシド」と解し、 $p = 1$  の場合には、 $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドは、「モルフォリノヌクレオシド」と解し、 $n + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドは、「モルフォリノジヌクレオチド」と解すべきものである。

10

本発明の製造方法は、以下の工程 ( 2 ) を含有する。

【 0 1 2 2 】

( 2 ) 5' 位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護された  $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド (  $p$  は、1 以上の任意の整数を示す。 ) を、5' 末端 ( 5' 位水酸基若しくは5' 位水酸基が水酸基を有する置換基を有する場合は該置換基上に存在する水酸基 ) 及び / 又は核酸塩基が各々独立に炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護され、かつモルフォリン環窒素原子が保護されていない  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド (  $n$  は、1 以上の任意の整数を示す。 ) と、そのモルフォリン環窒素原子を介してホスホルアミダート結合又はホスホロジアミダート結合により縮合させた後、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物である  $n + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する工程。

20

$p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの核酸塩基は、各々独立に、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基又は前記モルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護されていてもよい。

$n$  の上限は、特に限定されるものではないが、50 以下が好ましく、30 以下がより好ましく、20 以下が更に好ましい。

30

$p$  の上限は、特に限定されるものではないが、50 以下が好ましく、30 以下がより好ましく、20 以下が更に好ましく、5 以下が更に一層好ましく、3 以下が特に好ましい。

【 0 1 2 3 】

本発明の製造方法は、好ましくは、更に、下記工程 ( 1 ) を含有し、工程 ( 2 ) で使用される  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドが調製される。

( 1 ) 工程 ( 2 ) の前に、非極性溶媒中において、モルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護され、かつ5' 末端 ( 5' 位水酸基若しくは5' 位水酸基が置換基を有する場合は該置換基上に存在する水酸基 ) 及び / 又は核酸塩基が、各々独立に炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護された  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去し、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物である  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する工程。

40

【 0 1 2 4 】

$n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの5' 位水酸基若しくは5' 位水酸基の置換基上に存在する水酸基及び各核酸塩基、並びに  $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの各核酸塩基のうち、少なくとも一つが炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基で保護されていることにより、得られる  $n + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの脂溶性が向上し、簡便かつ効

50

果的に過剰原料や副生物を除去して、 $n + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを精製することができる。

【0125】

精製効率の観点から、 $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド及び  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドが有する核酸塩基のうち、少なくとも一つが、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基で保護されているのが好ましい。

【0126】

精製効率の観点から、炭素数 10 以上 300 以下のアルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下のアルケニル基を有する保護基は、炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルキル基及び / 又は炭素数 10 以上 300 以下の分岐鎖アルケニル基を有する保護基であるのが好ましい。

10

【0127】

本発明の製造方法に、更に、工程 (4) を含有させることにより、モルフォリノオリゴヌクレオチドを単離・製造することができる。

(4) 得られた  $n + p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの保護基を全て除去する工程。

以下に、各工程について詳細に説明する。

【0128】

1. 「 $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド」の説明

20

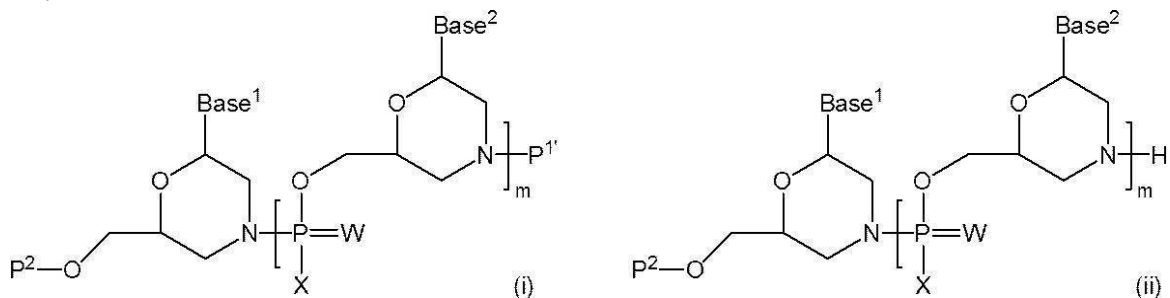
まず、工程 (1) 及び (2) の原料に用いられる  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドについて説明する。

工程 (1) で使用される  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドは、例えば、下記一般式 (i) に示されるような、モルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護された  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを示し、工程 (2) で使用される  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドは、例えば、下記一般式 (ii) に示されるような、モルフォリン環窒素原子が保護されていない  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを示す。

【0129】

【化20】

30



【0130】

(式中、  
 $m$  は、 $n - 1$  に相当する 0 以上の任意の整数を示し、  
 $P^{1'}$  は、酸性条件下で除去可能な一時保護基を示し、  
 他の記号は、式 (I) における各定義と同義である。)

40

【0131】

一般式 (i) 及び (ii) 中の各記号について、以下に説明する。

$m$  の上限は、特に限定されるものではないが、通常 99 以下、好ましくは 74 以下、さらに好ましくは 49 以下、さらに好ましくは 29 以下である。

【0132】

一般式 (i) 中の  $P^{1'}$  で表される酸性条件下で除去可能な一時保護基としては、酸性条件下で脱保護可能であり、水酸基の保護基として用いられるものであれば、特に限定は

50

されないが、トリチル基、9-(9-フェニル)キサントニル基、9-フェニルチオキサントニル基、1,1-ビス(4-メトキシフェニル)-1-フェニルメチル基、ジメトキシトリチル基等のジ(C<sub>1-6</sub>アルコキシ)トリチル基、1-(4-メトキシフェニル)-1,1-ジフェニルメチル基、モノメトキシトリチル基等のモノ(C<sub>1-18</sub>アルコキシ)トリチル基等を挙げることができる。これらの中でも、脱保護のしやすさ、入手の容易さの観点から、トリチル基、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基であることが好ましく、より好ましくは、トリチル基、ジメトキシトリチル基である。

【0133】

## 2. 「p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド」の説明

まず、工程(2)の原料に用いられるp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドについて説明する。 10

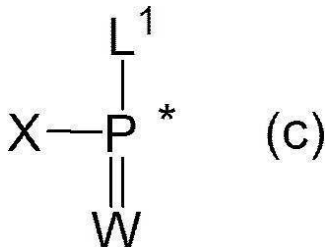
工程(2)で使用される「5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護されたp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(pは、1以上の任意の整数を示す。)」としては、当該構造要件を満たす限り特に限定されない。

【0134】

「5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され」とは、モルフォリノオリゴヌクレオチド5'位水酸基が、例えば、下記式(c)：

【0135】

【化21】



【0136】

(式中、

\*は、モルフォリノオリゴヌクレオチドの5'末端水酸基に結合する位置を示し、 30

L<sup>1</sup>は、脱離基を示し、

Xは、ジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基、または4位窒素原子が保護基で保護され、さらに置換されていてよい1-ピペラジニル基を示し、

Wは、酸素原子を示す。

で表される基で修飾されていることを意味する。

【0137】

「活性化ホスホルアミダート化」とは、上記式において、XがジC<sub>1-6</sub>アルキルアミノ基または4位窒素原子が保護基で保護され、さらに置換されていてよい1-ピペラジニル基であり、かつWが酸素原子である場合を意味する。

【0138】

L<sup>1</sup>で示される脱離基としては、例えば、ハロゲン原子、メタンсульフォニルオキシ基、p-トルエンсульフォニルオキシ基等が挙げられ、塩素原子が好ましい。 40

X及びWの定義、例示、好ましい態様は、上記式(I)で説明した通りである。

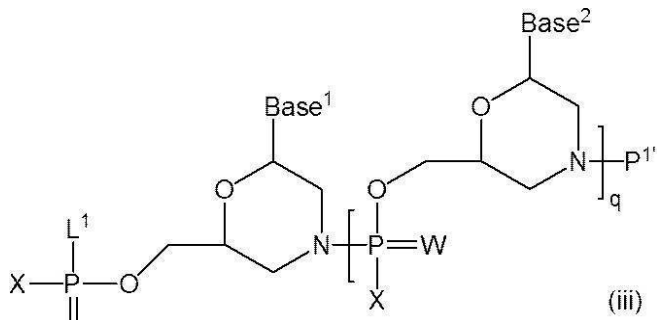
「酸性条件下で除去可能な一時保護基」の定義、例示、好ましい態様は、上記式(I)で説明した通りである。

【0139】

工程(2)に使用される好ましいp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドとしては、一般式(iii)に示される化合物が挙げられる。

【0140】

【化22】



10

【0141】

(式中、

q は、p - 1 に相当する 0 以上の任意の整数を示し、

P<sup>1''</sup> は、酸性条件下で除去可能な一時保護基を示し、

他の記号は、式 (I) 及び式 (c) における各定義と同義である。)

【0142】

一般式 (iii) 中の q としては、0 が好ましい。q の上限は、特に限定されるものではないが、通常 9 以下、好ましくは 7 以下、さらに好ましくは 4 以下、さらに好ましくは 2 以下である。

【0143】

20

一般式 (iii) 中の P<sup>1''</sup> で表される酸性条件下で除去可能な一時保護基としては、酸性条件下で脱保護可能であり、水酸基の保護基として用いられるものであれば、特に限定はされないが、トリチル基、9 - (9 - フェニル) キサンテニル基、9 - フェニルチオキサンテニル基、1, 1 - ビス(4 - メトキシフェニル) - 1 - フェニルメチル基、ジメトキシトリチル基等のジ(C<sub>1</sub> - 6 アルコキシ)トリチル基、1 - (4 - メトキシフェニル) - 1, 1 - ジフェニルメチル基、モノメトキシトリチル基等のモノ(C<sub>1</sub> - 18 アルコキシ)トリチル基等を挙げることができる。これらの中でも、脱保護のしやすさ、入手の容易さの観点から、トリチル基、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基であることが好ましく、より好ましくは、トリチル基、ジメトキシトリチル基である。

【0144】

30

一般式 (iii) 中のその他の記号の好ましい態様は、上記式 (I) 及び (c) で説明した通りである。

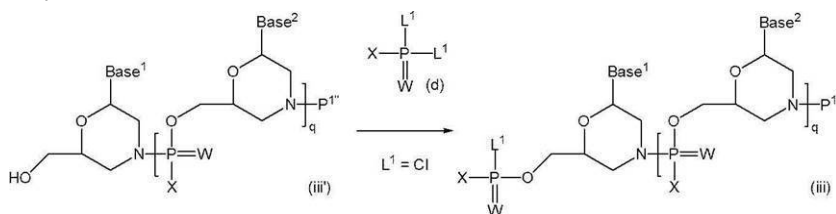
【0145】

本発明の p 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドは、自体公知の方法(例えば、WO 91/09033A1 に記載の方法)、又はそれに準じた方法に従い調製することができる。例えば、L<sup>1</sup> が塩素原子である化合物は、一般式 (iii) において 5' 位水酸基が活性化されていない下記式 (iii') の化合物を、例えば、一般式 (d) : Cl<sub>2</sub>P(=W)(X) (式中、W 及び X は、前記と同義である) で表されるジクロロホスホロアミダートと反応させることにより製造することができる。

【0146】

40

【化23】



【0147】

一般式 (d) で表されるジクロロホスホロアミダートとしては、市販品を使用することができ、或いは公知の方法(例えば、WO 91/09033 や WO 2008/00811

50

3等)に記載の方法またはそれに準じる方法により製造することができる。

一般式(i i i')の化合物は、例えば、WO 91/09033等の公知の方法により調製することができる。

【0148】

### 3. 工程(1)~(3)の説明

以下、工程(1)~(3)を、便宜上、式(i)、(ii)、(iii)等を参照して説明するが、これに限定されるものではない。

【0149】

#### 工程(1)(脱保護工程)

本工程は、縮合工程(2)の前に、非極性溶媒中において、モルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護され、かつ5'末端(5'位水酸基若しくは5'位水酸基が置換基を有する場合は該置換基上に存在する水酸基)及び/又は核酸塩基が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護されたn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i)を、モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去し、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物である5'末端(5'位水酸基若しくは5'位水酸基の置換基上に存在する水酸基)及び/又は核酸塩基が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護され、かつモルフォリン環窒素原子が保護されてい

10

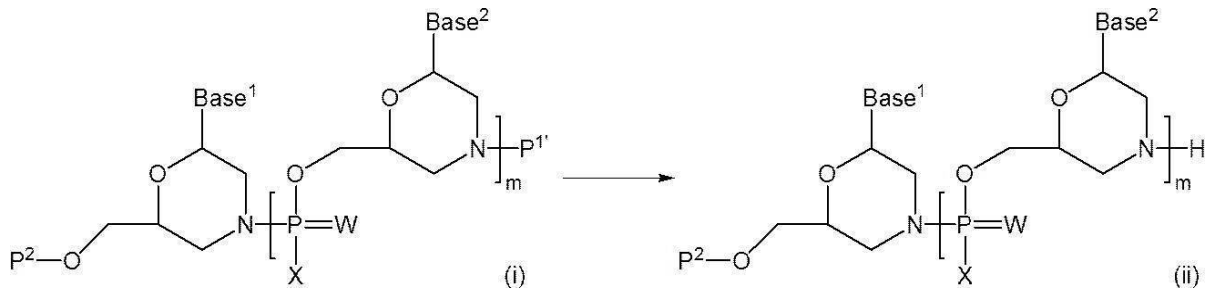
20

ないn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(ii)を分離する工程(脱保護工程)である。

前記一時保護基の除去は、カチオン補捉剤の存在下に酸と反応させて行うのが好ましい。

【0150】

【化24】



30

【0151】

(式中、各記号は、前記と同義である。)

【0152】

本工程は、反応に影響を及ぼさない溶媒中で行われる。当該溶媒における溶解度が高い程、優れた反応性が期待できるため、本発明のn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i)の溶解度の高い非極性溶媒を選択することが好ましい。具体的には、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン系溶媒；ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の芳香族系溶媒；酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル系溶媒；ヘキサン、ペンタン、ヘプタン、オクタン、ノナン、シクロヘキサン等の脂肪族系溶媒；ジエチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、tert-ブチルメチルエーテル等の非極性エーテル系溶媒が挙げられる。中でも、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン、ヘキサン、ペンタン、ヘプタン、ノナン、シクロヘキサン、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、tert-ブチルメチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル等が好ましい。これらの溶媒は2種以上を適宜の割合で混合して用いてもよい。

40

【0153】

50

本工程における  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド ( $i$ ) の溶媒中の濃度は、溶解していれば特に限定されないが、好ましくは 1 ~ 30 質量%である。

【0154】

本工程に使用する酸としては、良好な脱保護が達成できさえすれば特に限定されないが、トリフルオロ酢酸、シアノピリジントリフルオロ酢酸塩及びトリフルオロエタノール、トリエチルアミントリフルオロ酢酸塩、シアノ酢酸、酢酸、ジクロロ酢酸、リン酸、メシル酸、トシル酸、塩酸等を使用することが好ましい。

良好な反応を達成できるという観点で、トリフルオロ酢酸、シアノピリジントリフルオロ酢酸塩、トリエチルアミントリフルオロ酢酸塩、シアノ酢酸がより好ましく、シアノピリジントリフルオロ酢酸塩、トリエチルアミントリフルオロ酢酸塩が更に好ましく、トリエチルアミントリフルオロ酢酸塩が特に好ましい。これら酸は、上記非極性溶媒で希釈しても構わない。また、前記酸を使用する際には、特定の塩基（例、トリエチルアミン等）を組み合わせ、酸性度を適宜調整して使用しても構わない。

【0155】

本工程における酸の使用量は、 $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド ( $i$ ) 1 モルに対し、1 ~ 100 モルであり、好ましくは 1 ~ 40 モルである。

【0156】

本工程においては、脱保護反応によって生じるトリチルカチオン等の保護基  $P^1$  のカチオン化物等による副反応を防ぐため、カチオン捕捉剤を添加してもよい。好ましいカチオン捕捉剤としては、メルカプト基及びカルボキシ基を有する化合物からなるカチオン捕捉剤、又はカルボキシ基を有するインドール化合物からなるカチオン捕捉剤が挙げられる。カチオン捕捉剤として、具体的には、例えばチオリンゴ酸、3-メルカプトプロピオン酸、システイン、システニルグルタミン酸などの1個のメルカプト基及び1又は2個のカルボキシ基を有する化合物；並びにインドールカルボン酸、インドールジカルボン酸、トリプトファン、トリプトファンルグルタミン酸、ブタンジカルボン酸 1-(1H-インドール-5-イル)エステルなどの1又は2個のカルボキシ基を有するインドール化合物が挙げられる。中でもチオリンゴ酸、3-メルカプトプロピオン酸、ブタンジカルボン酸 1-(1H-インドール-5-イル)エステルが好ましい。カチオン捕捉剤は2種以上を併用してもよい。

【0157】

カチオン捕捉剤の使用量は、 $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド ( $ii$ ) に対する  $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド ( $iii$ ) の過剰量 ( $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド ( $iii$ ) のモル数 -  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド ( $ii$ ) のモル数) を考慮して適宜決定することができ、当該過剰量 (モル) に対して 1 ~ 20 当量が好ましく、1 ~ 10 当量がより好ましい。

【0158】

本工程の反応温度は、反応が進行しさえすれば特に限定されないが、-10 ~ 50 が好ましく、0 ~ 40 がより好ましい。反応時間は、使用する  $n$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドの種類、酸の種類、溶媒の種類、反応温度等により異なるが、5分 ~ 24時間である。

【0159】

脱保護剤として使用される酸は次工程の縮合工程中に存在すると、 $p$  個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド ( $iii$ ) の保護基  $P^1$  の脱保護を誘発するため、除去または中和処理が必要である。本脱保護工程、それに続く縮合工程を液中で連続して行うためには、本工程において 3' 末端モルフォリン環窒素原子の一時保護基を除去した後、有機塩基や無機塩基より中和して、洗浄等の抽出操作により除去することが好ましい。

中和に使用する有機塩基としては、前出の酸を中和することができ、得られた塩が縮合剤として機能しうるものであれば特に限定されないが、反応が良好に進行するという観点で、 $N, N$ -ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、4-シアノピリジン、トリエチルアミン、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムが好ましく、 $N, N$ -ジイソプロピルエチルアミ

10

20

30

40

50

ン、トリエチルアミンがより好ましく、N, N - ジイソプロピルエチルアミンが特に好ましい。

【0160】

本工程における有機塩基の使用量は、酸1モルに対し、1～10モルであり、好ましくは1～3モルである。

【0161】

工程(1')：さらに、本工程において、脱保護反応によって生じるトリチルカチオン等の保護基P'のカチオン化物及びカチオン捕捉剤との付加体を水層へ移行させて除去する。すなわち、得られた反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物であるn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する。抽出操作は反応溶媒として非極性溶媒を使用している場合は、反応混合物に水を添加して行うことができる。また水と親水性有機溶媒の混合溶媒を添加してもよい。例えば、N, N - ジメチルアセトアミド、アセトニトリル、N, N - ジメチルホルムアミド等の親水性有機溶媒と水との混合溶媒を用いるのが好ましく、特にN, N - ジメチルホルムアミドと水の混合溶媒が好ましい。系中に存在させる水の量は慣用の抽出操作の範囲内で当業者が適宜設定することができ、それに従って、混合溶媒を使用する場合の水及び有機溶媒の量も適宜設定することができる。

10

【0162】

工程(2)(縮合工程)

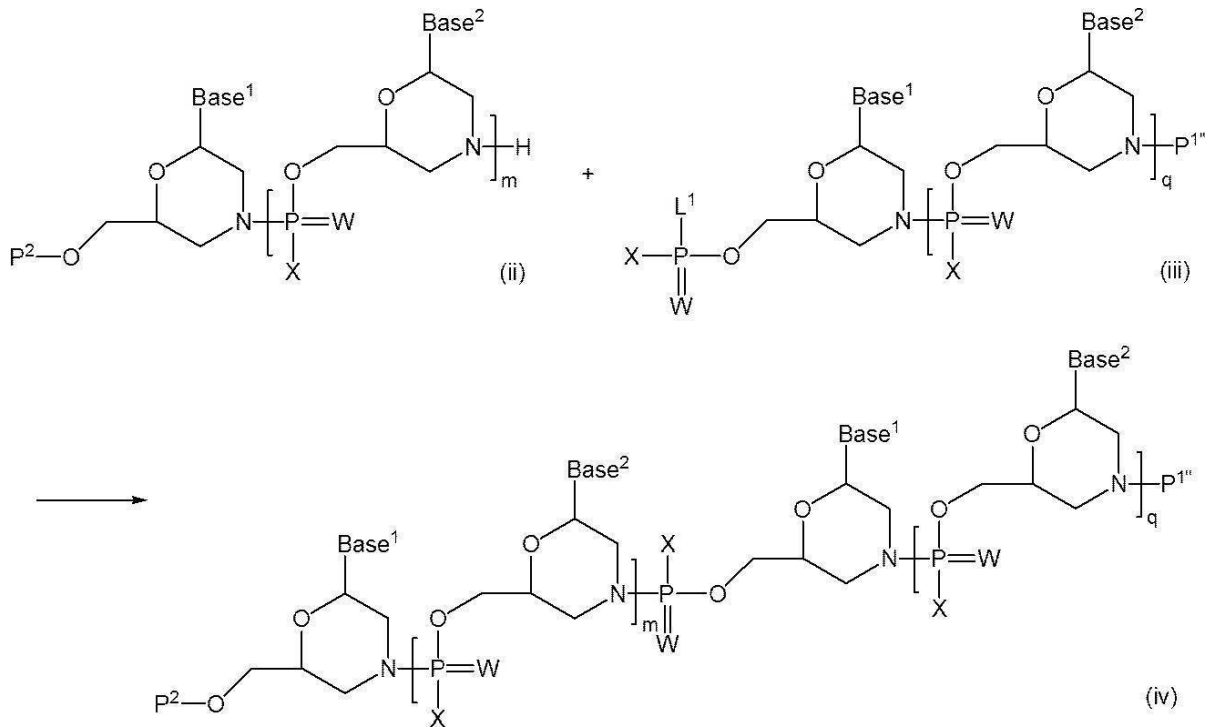
本工程は、5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護されたp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(iii)を、5'末端(5'位水酸基若しくは5'位水酸基が水酸基を有する置換基を有する場合は該置換基上に存在する水酸基)及び/又は核酸塩基が炭素数10以上300以下のアルキル基及び/又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基或いは前記モルフォリン環窒素原子の一時保護基と異なる条件下で除去可能な保護基で保護され、かつモルフォリン環窒素原子が保護されていないn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(ii)と、そのモルフォリン環窒素原子を介してホスホルアミダート結合又はホスホロジアミダート結合により縮合させた後、得られた反応混合物を、抽出操作に付し、生成物であるn+p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(iv)を有機層側に分離する工程である。得られた反応混合物は、抽出操作の前に、第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤で処理するのが好ましい。

20

30

【0163】

## 【化 25】



## 【0164】

(式中、各記号は、前記と同義である。)

5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子が酸性条件下で除去可能な一時保護基で保護されたp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(iii)としては、pが1である場合(すなわち、5'位水酸基が活性化ホスホルアミダート化され、かつモルフォリン環窒素原子が一時保護基P<sup>1''</sup>により保護されたモルフォリノヌクレオチド)が好ましい。

## 【0165】

本工程においては、使用するn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(ii)としては特に限定されるものではないが、好ましくは、前記工程(1)で得られたものを使用することができる。その場合、n個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(ii)を単離することなく、工程(1)後の反応液に、p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(iii)を直接添加するだけで行うことができる。

## 【0166】

本工程は、反応に影響を及ぼさない溶媒中で行われる。本発明のn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(ii)の溶解度の高い非極性溶媒を選択することが好ましい。具体的には、クロロホルム、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン系溶媒；ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の芳香族系溶媒；酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル系溶媒；ヘキサン、ペンタン、ヘプタン、オクタン、ノナン、シクロヘキサン等の脂肪族系溶媒；ジエチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル、tert-ブチルメチルエーテル等の非極性エーテル系溶媒が挙げられる。中でも、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン、ヘキサン、ペンタン、ヘプタン、ノナン、シクロヘキサン、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、tert-ブチルメチルエーテル、シクロペンチルメチルエーテル等が好ましい。これらの溶媒は2種以上を適宜の割合で混合して用いてもよい。また、n個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(ii)が溶解し得る限り、極性溶媒を適宜の割合で混合して用いてもよい。具体的には、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル系溶媒；アセトン、2-ブタノン等のケトン系溶媒；1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン等の極性エーテル系溶媒、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン、1,3-ジメチル-2-イミダゾリノン等のアミド系溶媒；ジ

10

20

30

40

50

メチルスルホキシド等のスルホキシド系溶媒等の極性溶媒が挙げられる。

【0167】

p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i i)の使用量は、n個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i)1モルに対し、1~10モルであり、好ましくは1~5モル、さらに好ましくは1~2モルである。

【0168】

反応温度は、反応が進行しさえすれば特に限定されないが、0~100が好ましく、20~50がより好ましい。反応時間は、縮合させるn個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i)、p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i i)の種類、反応温度等によって異なるが、30分~24時間である。

10

【0169】

本縮合反応の終了後、抽出操作の前に、反応混合物をクエンチ剤で処理することが好ましい。当該クエンチ剤を使用することにより、縮合反応中に残留したp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i i)を完全にクエンチすることができ、次サイクルの縮合反応中において残留した活性化モルフォリノヌクレオチドが二重付加を引き起こすことを回避できるので、目的のモルフォリノオリゴヌクレオチドの品質低下を防ぐことができる。

なお、二重付加とは、前サイクルの縮合反応で使用されて残留した活性化モルフォリノヌクレオチドが次サイクルの縮合反応で反応し、同じ残基が二重に付加されることを言う。

【0170】

クエンチ剤としては、第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物、又はホスホノ基を有する化合物からなるクエンチ剤が好ましい。第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤としては、1個の第二級アミノ基及び1又は2個のカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤が好ましい。第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤として、具体的には、例えばプロリルグルタミン酸、N-メチルアラニン、プロリン、N-メチルグリシン、N-メチルグリシルグルタミン酸、プロリルプロリン、プロリルアスパラギン酸などが挙げられる。中でもプロリルグルタミン酸およびプロリルプロリンが好ましい。ホスホノ基を有する化合物からなるクエンチ剤としては、フェニルホスホン酸などのホスホノ基を有する化合物が挙げられる。中でもフェニルホスホン酸が好ましい。クエンチ剤は2種以上を併用してもよい。

20

30

【0171】

第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤の使用量は、n個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i)に対するp個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i i)の過剰量(p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i i)のモル数 - n個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i)のモル数)を考慮して適宜決定することができ、当該過剰量(モル)に対して0.1~10当量が好ましく、0.3~3当量がより好ましい。

【0172】

反応混合物に第二級アミノ基及びカルボキシ基を有する化合物からなるクエンチ剤を添加した後、0~100、好ましくは、20~50で、30分~24時間、好ましくは30分~5時間反応させることにより、p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド(i i i)を完全にクエンチすることができる。

40

【0173】

クエンチ剤で処理した反応混合物を抽出操作に付し、効率的に原料モノマーの基づく不純物を抽出操作で水層側に除去できる。すなわち、反応混合物を抽出操作に付し、有機層側に生成物であるn+p個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを分離する。抽出操作は反応溶媒として非極性溶媒を使用している場合は、反応混合物に水を添加して行うことができる。また、水と極性溶媒の混合溶媒を添加してもよい。例えば、N,N-ジメチルアセトアミド、アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド等の極性溶媒と水との混合溶媒を用いるのが好ましく、特にN,N-ジメチルホルムアミドと水の混合溶媒が好まし

50

い。系中に存在させる水の量は慣用の抽出操作の範囲内で当業者が適宜設定することができる、それに従って、混合溶媒を使用する場合の水及び有機溶媒の量も適宜設定することができる。

【0174】

#### 工程(3)(抽出単離工程)

本工程は、工程(2)で得られた $n + p$ 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド( $iv$ )を含む反応液から、抽出操作により $n + p$ 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド( $iv$ )を単離精製する方法である。

【0175】

抽出操作については、特に限定されないが、好ましくは、工程(2)で得られた反応液に必要に応じて非極性溶媒及び/又は水を添加して、非極性溶媒相-水相で分層させ、非極性溶媒に $n + p$ 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチドを移行させることにより行われる。当該抽出操作により、残存した原料、試薬、副生物(例えば、酸、クエンチ剤、クエンチ剤が付加した $p$ 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド等)等の不純物を水相中に淘汰することができる。

10

【0176】

本工程において、 $n + p$ 個重合オリゴヌクレオチド( $iv$ )を非極性溶媒中に移行させるために必要に応じて添加される非極性溶媒としては、前記に記載した縮合反応に使用する非極性溶媒と同じものが挙げられる。よって、縮合反応の溶媒として非極性溶媒を使用した場合は、それをそのまま抽出における非極性溶媒として使用してもよい。また必要に応じて、極性溶媒を添加してもよく、例えば水と極性溶媒の混合溶媒を非極性溶媒に加えて分層させ、抽出操作を行ってもよい。必要に応じて添加される極性溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール等のアルコール系溶媒、アセトニトリル、プロピオニトリル等のニトリル系溶媒、アセトン、2-ブタノン等のケトン系溶媒、1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン等の極性エーテル系溶媒、 $N, N$ -ジメチルホルムアミド、 $N, N$ -ジメチルアセトアミド、 $N$ -メチルピペリドン等のアミド系溶媒、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド系溶媒、ならびにこれら2種以上の混合溶媒が挙げられる。中でも、アミド系溶媒、ニトリル系溶媒、及びこれらの組合せが好ましく、 $N, N$ -ジメチルアセトアミド、アセトニトリル、 $N, N$ -ジメチルホルムアミド、及びこれらの組合せがより好適に使用される。本発明における極性溶媒としては、特に $N, N$ -ジメチルホルムアミドが好ましい。

20

30

【0177】

非極性溶媒相-水相間で分層後に、水層を除去することにより、不純物を淘汰することができる。さらに、水層を除去した非極性溶媒に水または水と極性溶媒との混合溶媒を添加、攪拌し、分層させて水層を除去することにより(本発明において、このような抽出操作を「洗浄」ということがある。)、残存した少量の不純物をさらに淘汰することができる。

極性溶媒による洗浄の回数は特に限定はないが、非極性溶媒を薄層シリカゲルクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどで分析し、非極性溶媒層に次サイクルのヌクレオチド伸長反応が阻害されない程度に不純物が低減するまで繰り返し行ってもよい。

40

【0178】

水と極性溶媒の混合溶媒中の水の含量は、当業者が適宜設定できるが、例えば1~10%( $v/v$ )が好ましく、3~8%( $v/v$ )がより好ましい。

【0179】

抽出操作後の非極性溶媒層を濃縮することにより、 $n + p$ 個重合モルフォリノオリゴヌクレオチド( $iv$ )を単離することができる。その際、濃縮した反応容器に次サイクルの溶媒、試薬を添加することにより、ワンポットでヌクレオチド伸長を繰り返し行うことができる。あるいは、抽出操作後の非極性溶媒層を濃縮することなく、次サイクルのヌクレオチド伸長に付することも可能である。

【0180】

50

本発明のモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法は、上記工程(1)~(3)を所望の回数繰返すことで高純度かつ高収率で目的の高重合度モルフォリノオリゴヌクレオチドを得ることができる。

【0181】

工程(4)(脱保護・モルフォリノオリゴヌクレオチド単離工程)

本発明のモルフォリノオリゴヌクレオチドの製造方法においては、工程(2)の後に、保護基の種類・性質に応じて、脱保護を行い、モルフォリノオリゴヌクレオチドを単離することができる。脱保護の方法としては、例えば、グリーンズ・プロテクティブ・グループス・イン・オーガニック・シンセシス(Greene's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS)、第4版、ウィリー・インターサイエンス(Wiley-Interscience)出版(2006年)等に記載されている脱保護方法に従い、モルフォリノオリゴヌクレオチドの全ての保護基を除去する工程を行うことができる。具体的には、本願発明における炭素数10以上300以下のアルキル基及びノ又は炭素数10以上300以下のアルケニル基を有する保護基、ならびにモルフォリン環窒素原子の保護基と異なる条件下で除去可能な保護基は、アンモニア水、アンモニア水/エタノール溶液、またはアンモニア水とメチルアミン水溶液の混合液で処理することにより、全て除去することができる。また、モルフォリノオリゴヌクレオチド3'末端モルフォリン環窒素原子の保護基は、工程(1)で使用される酸またはそれらを適宜希釈した溶液で処理することにより除去することができる。

10

【0182】

上記各工程における反応の進行の確認は、いずれも一般的な液相有機合成反応と同様の方法を適用できる。すなわち、薄層シリカゲルクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を用いて反応を追跡することができる。

20

【0183】

工程(4)より得られたモルフォリノオリゴヌクレオチドは、更に有機合成反応を施すことにより、所望のモルフォリノオリゴヌクレオチド誘導体へと導くこともできる。

【0184】

本発明によって製造されたモルフォリノオリゴヌクレオチドは、各種人体用または動物用の医薬品(RNA、DNA、オリゴ核酸医薬、ペプチド修飾モルフォリノオリゴヌクレオチド等)、機能性食品、特定保健食品、食品、化成品、生体用や工業用の高分子材料等の各種用途に使用することができる。

30

【実施例】

【0185】

以下、実施例に沿って本発明を更に詳細に説明するが、これら実施例は本発明の範囲を何ら限定するものではない。また、本発明において使用する試薬や装置、材料は特に言及されない限り、商業的に入手可能である。また、本明細書において、略号で表示する場合、各表示は特に言及しない限り、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものである。また、混合溶媒(溶液)において示した比は、特に断らない限り容量比を示す。%は、特に断らない限り重量%を示す。

40

【0186】

実施例で使用される略号は、以下のとおりである。

- mo : モルフォリノヌクレオチド
- moA : モルフォリノアデノシン
- moG : モルフォリノグアノシン
- moC : モルフォリノシチジン
- moT : モルフォリノチミジン
- moU : モルフォリノウリジン
- PMO : ホスホロジアミダート モルフォリノオリゴヌクレオチド

例えば、PMO[A-GC]と表示した場合は、左側が5'末端、右側が3'末端で

50

あり、5'末端からモルフォリノアデノシン、モルフォリノグアノシン、モルフォリノシチジンの順のホスホロジアミダートモルフォリノオリゴヌクレオチドであることを意味する。

b z : ベンゾイル基

B z l : ベンジル基

c H x : シクロヘキシル基

p a c : フェノキシアセチル基

c e : 2 - シアノエチル基

モルフォリノヌクレオチドの核酸塩基が保護されているとき、保護基は核酸塩基の略号 (A、G、C、T及びU) の右側に上付きで表示するものとする。

例えば、C<sup>bz</sup>は、シトシンのアミノ基がベンゾイル基で保護されていることを意味し、G<sup>ce/pac</sup>はグアニンのアミノ基がフェノキシアセチル基、カルボニル基が2 - シアノエチル基で保護されていることを意味する。

O P h y : 3, 4, 5 - トリ (2', 3' - ジヒドロフィチルオキシ) ベンジルオキシ基

D p m : ジフェニルメチル基

s u c : スクシニル基

T r、T r t : トリチル基

T B S O : t e r t - ブチルジメチルシロキシ基

T O B : 3, 4, 5 - トリ (オクタデシルオキシ) ベンゾイル基

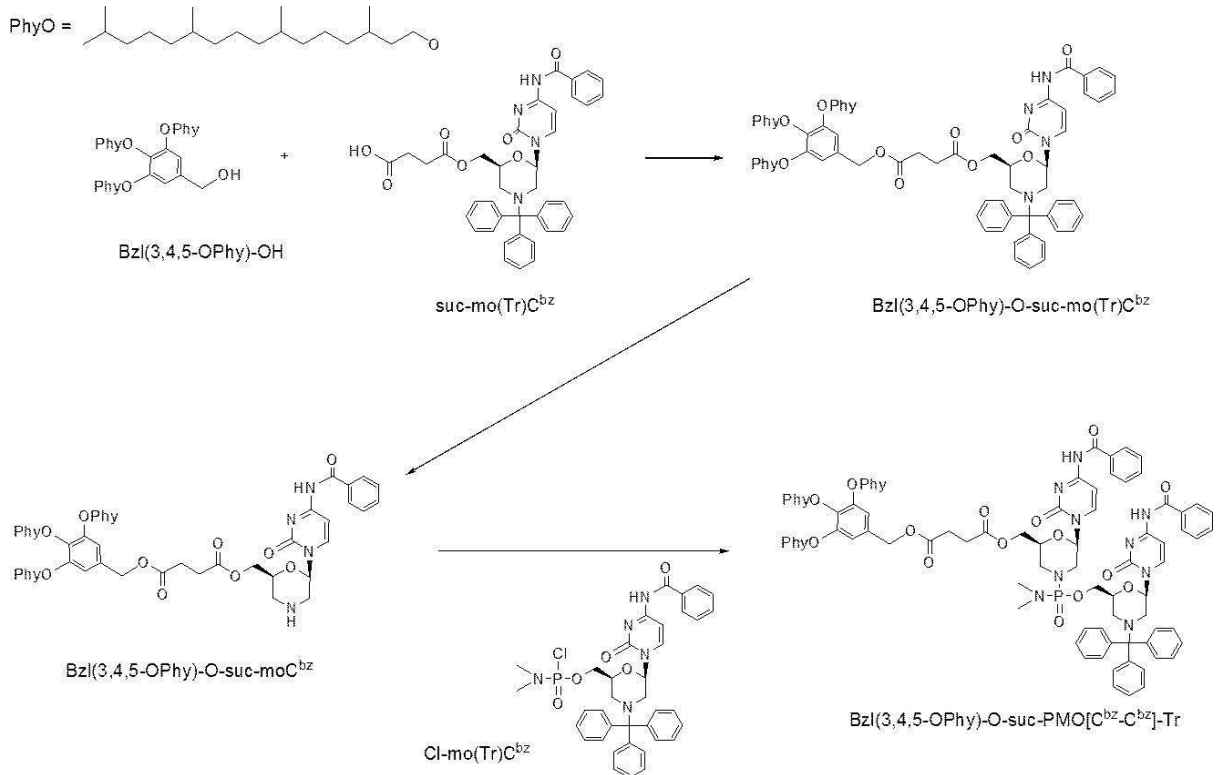
P h y T O B : 3, 4, 5 - トリ (2', 3' - ジヒドロフィチルオキシ) ベンゾイル基

【 0 1 8 7 】

実施例 1 5'末端にBzl(3,4,5-OPhy)-O-含有アンカーを有する基質を用いる伸長反応

【 0 1 8 8 】

【 化 2 6 】



【 0 1 8 9 】

1) 縮合 - 1

Bzl(3,4,5-OPhy)-OH(1.00 g, 1.00 mmol)をクロロホルム(10 mL)に溶解させた後、suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup> (0.27 g, 0.40 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジミド塩酸塩(0.09 g, 0.44 mmol)および4-ジメチルアミノピリジン(10 mg, 0.02 mmol)を加え、室温で17時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣にシクロヘキサン(10 mL)およびへ

10

20

30

40

50

ブタン(5 mL)を加えた。アセトニトリル(10 mL)を加え分液洗浄を2回実施して、上層の溶媒を減圧留去後、減圧乾燥し、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr) $C^{bz}$ を油状物として得た(1.64 g, 99%)。

TOF-MS+ (m/z) 1652.0

【0190】

2) トリチル基の脱保護 - 1

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr) $C^{bz}$ (1.60 g, 0.97 mmol)をクロロホルム(16 mL)に溶解させた後、2,2,2-トリフルオロエタノール(4.33 mL, 59.4 mmol)およびチオリンゴ酸(1.45 g, 9.68 mmol)を添加した。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.88 g, 7.75 mmol)とトリエチルアミン(0.48 g, 4.84 mmol)のクロロホルム溶液(13.7 mL)を滴下し、15 で2.5時間撹拌した。その後、トリフルオロ酢酸(0.110 g, 0.97 mmol)のクロロホルム溶液(1.0 mL)を追加し、1時間撹拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(3.15g, 24.2 mmol)のクロロホルム溶液(31 mL)を滴下した。得られた溶液を、5%炭酸ナトリウム水溶液とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 20mL×2)を用いて洗浄した。有機層を20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 20mL×5)および20%食塩水(20 mL)にて順次洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo $C^{bz}$ を含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

10

TOF-MS+ (m/z) 1410.0.

【0191】

3) 縮合 - 2

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo $C^{bz}$ (1.37 g, 0.97 mmol相当)を含む有機層(85.9 g)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.30 mL, 1.74 mmol)およびCl-mo-(Tr) $C^{bz}$  (1.01 g, 1.45 mmol)を加え、室温で17時間撹拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.42 mL, 2.42 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.59 g, 2.42 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(12.7 mL, 174 mmol)を加え、室温で3時間撹拌した。さらに、プロリルグルタミン酸(0.12 g, 0.48 mmol)を加え、室温で30分間撹拌した。反応液を5 vol% 2,2,2-トリフルオロエタノール水溶液(70 mL×3)を用いて洗浄した。クロロホルム(4 mL)を用いて水層から目的物を再抽出し、有機層に合わせた。得られたBzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[ $C^{bz}$ - $C^{bz}$ ]-Trを含む有機層をそのまま次の反応に供した。

20

TOF-MS+ (m/z) 2071.1

【0192】

4) トリチル基の脱保護 - 2

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[ $C^{bz}$ - $C^{bz}$ ]-Tr(2.01 g, 0.97 mmol相当)を含む有機層(80.3 g)を氷冷し、トリフルオロ酢酸(0.95 g, 8.36 mmol)のクロロホルム溶液を滴下した。次いで、2,2,2-トリフルオロエタノール(4.33 mL, 59.4 mmol)およびチオリンゴ酸(1.45 g, 9.68 mmol)を加えた。さらに、トリフルオロ酢酸(0.88 g, 7.75 mmol)とトリエチルアミン(0.48 g, 4.84 mmol)のクロロホルム溶液(13.7 mL)を滴下し、15 で1.5時間撹拌した後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(3.00 g, 23.2 mmol)のクロロホルム溶液(30 mL)を滴下した。反応液を、5%炭酸ナトリウム水溶液とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 80 mL)、20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 80 mL)および20%食塩水(80 mL×2)を用いて順次洗浄した。溶媒を減圧濃縮し、得られたBzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[ $C^{bz}$ - $C^{bz}$ ]-Hを含む有機層を、そのまま次の反応に供した。

30

40

TOF-MS+ (m/z) 915.1(M+2H)<sup>+</sup>

【0193】

上記3)および4)の方法に従って、目的物を単離せずに縮合およびトリチル基の脱保護をワンポットで順次行い、7merまで伸長させた。

【0194】

5) トリチル基の脱保護 - 7

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[ $C^{bz}$ - $C^{bz}$ -T- $C^{bz}$ - $C^{bz}$ -G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>]-Tr (4.19 g, 0.97 mmol相当)を含む有機層を5vol% 2,2,2-トリフルオロエタノール水溶液(50 mL×2)で洗浄

50

し、有機層を氷冷後、2,2,2-トリフルオロエタノール(9.8 mL, 135 mmol)およびチオリンゴ酸(0.44g, 2.90mmol)を加えた。次いでトリフルオロ酢酸(0.88 g, 7.75 mmol)とトリエチルアミン(0.48 g, 4.84mmol)のクロロホルム溶液(13.7 mL)を滴下し、15 で1時間撹拌した。さらに、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.25g, 9.68 mmol)のクロロホルム溶液(12.5 mL)を滴下した。反応液を、5%炭酸ナトリウム水溶液とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 70 mL)、20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 70mL × 2)および20%食塩水(80 mL)を用いて順次洗浄した。溶媒を減圧濃縮し、得られたBzl(3, 4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>]-Hを含む有機層を、そのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1361.2(M+3H)<sup>+</sup>

【 0 1 9 5 】

6 ) 縮合 - 8

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>]-H (3.95 g, 0.97 mmol相当)を含む有機層にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.30 mL, 1.74 mmol)およびCl-mo-(Tr)T(0.89 g, 1.45 mmol)を添加し、室温で15時間撹拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.08 mL, 12.1 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.59 g, 2.42 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(10 mL, 137 mmol)を加え、室温で4時間撹拌した。得られた溶液に水(70 mL × 2)を加えて洗浄し、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-T]-Trを含む有機層をそのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1552.0(M+3H)<sup>+</sup>

【 0 1 9 6 】

7 ) トリチル基の脱保護 - 8

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-T]-Tr (4.51 g, 0.97 mmol相当)を含む有機層を5vol% 2,2,2-トリフルオロエタノール水(50 mL × 2)で洗浄し、有機層を氷冷後、2,2,2-トリフルオロエタノール(10 mL, 135 mmol)およびチオリンゴ酸(0.44 g, 2.90 mmol)を加えた。次いでトリフルオロ酢酸(0.88 g, 7.75 mmol)とトリエチルアミン(0.48 g, 4.84 mmol)のクロロホルム溶液(13.7 mL)を滴下し、15 で1時間撹拌した。さらに、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.25 g, 9.68 mmol)のクロロホルム溶液(12.5 mL)を滴下した。反応液を、5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 90 mL)、20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 90 mL × 2)および20%食塩水(90 mL)を用いて順次洗浄した。溶媒を減圧濃縮し、得られたBzl(3, 4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-T]-Hを含む有機層を、そのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1471.3(M+3H)<sup>+</sup>

【 0 1 9 7 】

8 ) 縮合 - 9

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-T]-H (4.27 g, 0.97 mmol相当)を含む有機層にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.30 mL, 1.74 mmol)およびCl-mo-(Tr)T(0.89 g, 1.45 mmol)を添加し、室温で15時間撹拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.08 mL, 12.1 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.59 g, 2.42 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(10 mL, 137 mmol)を加え、室温で2時間撹拌した。得られた溶液にトリフルオロ酢酸(1.60 g, 14.0 mmol)のクロロホルム溶液を滴下し、水(70 mL × 3)にて洗浄した。有機層を濃縮し、得られた残渣に氷冷下でアセトニトリル(30 mL)を加え、沈殿物を濾取し、減圧乾燥することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-T-T]-Tr (3.57 g, 0.72 mmol, 収率72% vs Bzl(3,4,5-OPhy)-OH)を淡黄色粉体として得た。

TOF-MS+ (m/z) 1662.0(M+3H)<sup>+</sup>

【 0 1 9 8 】

9 ) 脱保護後の質量分析

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T-C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-G<sup>ce/pac</sup>-T-T]-Tr(5 mg)にエ

10

20

30

40

50

タノール(0.05mL)および28%アンモニア水(0.15mL)を加え、55 で15時間攪拌した。反応液にアセトニトリル(0.1mL)およびシクロヘキサン(0.3mL)を加えた後、水層にシクロヘキサン(0.3mL×2)を加え洗浄した。水層に50%メタノール水溶液(0.7mL)を加え、生じた固形物をろ過にて除去した。得られたPMO[C-C-T-C-C-G-G-T-T]-Tr水溶液の質量分析を行った。

TOF-MS+ (m/z) 1039.0(M+3H)<sup>+</sup>

【0199】

1' ) 縮合 - 1 の別法

Bzl(3,4,5-OPhy)-OH(3.0g, 3.01 mmol)をクロロホルム(30 mL)に溶解させ、suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup>(2.43 g, 3.61 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(0.69 g, 3.61 mmol)および4-ジメチルアミノピリジン(22 mg, 0.18 mmol)を加え、室温で17時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣にシクロヘキサン(30 mL)およびヘプタン(30 mL)を加えて溶解させた。アセトニトリル(30 mL)を加えて2回分液洗浄した。上層の溶媒を減圧留去後、減圧乾燥することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup>(4.67 g, 99%)を油状物として得た。

10

TOF-MS+ (m/z) 1652.0

【0200】

2' ) トリチル基の脱保護 - 1 の別法

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup>(0.30 g, 0.18 mmol)をクロロホルム(3 mL)に溶解させた後、2,2,2-トリフルオロエタノール(0.79 mL, 10.9 mmol)および3-メルカプトプロピオン酸(0.08 mL, 0.91 mmol)を添加した。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.16 g, 1.45 mmol)とトリエチルアミン(0.10 g, 0.91 mmol)のクロロホルム溶液を滴下し、室温下、1.5時間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.19 g, 1.45 mmol)のクロロホルム溶液を滴下した。得られた溶液を、10%炭酸ナトリウム水溶液とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 3 mL×2)、40%N,N-ジメチルホルムアミド水溶液(5mL)および20%食塩水(3mL)を用いて順次洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-moC<sup>bz</sup>を含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

20

【0201】

2' ' ) トリチル基の脱保護 - 1 の別法

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup>(0.80 g, 0.48 mmol)をクロロホルム(6.4 mL)に溶解させた後、2,2,2-トリフルオロエタノール(2.1 mL, 29.0 mmol)およびチオリンゴ酸(0.22 g, 1.45 mmol)を添加した。氷冷後、混合物にトリフルオロ酢酸(0.44 g, 3.87 mmol)とトリエチルアミン(0.24 g, 2.42 mmol)のクロロホルム溶液(1.5 mL)を滴下し、15 で90分間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.25 g, 1.94 mmol)のクロロホルム溶液(1.7 mL)を滴下した。得られた溶液を、5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 8 mL×2)および20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 8 mL×3)にて順次洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-moC<sup>bz</sup>を含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

30

TOF-MS+ (m/z) 1410.1

【0202】

3' ) 縮合 - 2 の別法

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-moC<sup>bz</sup>(0.25 g, 0.18 mmol相当)を含む有機層にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.06 mL, 0.33 mmol)およびCl-mo-(Tr)C<sup>bz</sup>(0.19 g, 0.27 mmol)を添加し、室温で17時間攪拌した。反応液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.01 mL, 0.04 mmol)およびCl-mo-(Tr)C<sup>bz</sup>(0.03g, 0.04mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。さらに、反応液にモルフォリン(0.022 mL, 0.25 mmol)を加えた。得られたBzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trを含む有機層をそのまま次の反応に供した。

40

【0203】

3' ' ) 縮合 - 2 の別法

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-moC<sup>bz</sup>(0.24 mmol相当)を含む有機層にN,N-ジイソプロピルエチ

50

ルアミン(0.07 mL, 0.38 mmol)およびCl-mo-(Tr) $C^{bz}$ (0.22 g, 0.32 mmol)を加え、室温で52時間攪拌した。反応後N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.32 mL, 1.82 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.09 g, 0.36 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(0.94 mL)を加え、室温で3時間攪拌した。2,2,2-トリフルオロエタノールと0.1 mM 塩酸の混合溶液(1:19, 3.5 mL×2)を用いて洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[ $C^{bz}$ - $C^{bz}$ ]-Trを含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 2071.8

【0204】

実施例2 実施例1の3)におけるクエンチ剤の変更(クエンチ剤:L-プロリルL-プロリン)

【0205】

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr) $C^{bz}$ (0.80 g, 0.48 mmol)をクロロホルム(6.4 mL)に溶解させた後、2,2,2-トリフルオロエタノール(2.1 mL, 29.0 mmol)およびチオリンゴ酸(0.22 g, 1.45 mmol)を添加した。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.44 g, 3.87 mmol)とトリエチルアミン(0.24 g, 2.42 mmol)のクロロホルム溶液(1.5 mL)を滴下し、15 で90分間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.25 g, 1.94 mmol)のクロロホルム溶液(1.7 mL)を滴下した。得られた溶液を、5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 8 mL×2)および20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 8 mL×3)にて順次洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo $C^{bz}$ を含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1410.1

【0206】

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo $C^{bz}$ (0.24 mmol相当)を含む有機層にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.07 mL, 0.38 mmol)およびCl-mo-(Tr) $C^{bz}$ (0.22 g, 0.32 mmol)を加え、室温で52時間攪拌した。反応液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.32 mL, 1.82 mmol)、L-プロリルL-プロリン(0.07 g, 0.36 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(0.94 mL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を、2,2,2-トリフルオロエタノールと0.1 mM塩酸の混合溶液(1:19, 3.5 mL×2)により洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[ $C^{bz}$ - $C^{bz}$ ]-Trを含む有機層を得た。

TOF-MS+ (m/z) 2071.8

【0207】

実施例3 実施例1の2)におけるカチオン捕捉剤の変更(カチオン捕捉剤:ブタンジカルボン酸 1-(1H-インドール-5-イル)エステル)

【0208】

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr) $C^{bz}$ (0.80 g, 0.48 mmol)をクロロホルム(6.4 mL)に溶解させた後、2,2,2-トリフルオロエタノール(2.1 mL, 29.0 mmol)およびブタンジカルボン酸 1-(1H-インドール-5-イル)エステル(0.34 g, 1.45 mmol)を添加した。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.44 g, 3.87 mmol)とトリエチルアミン(0.24 g, 2.42 mmol)のクロロホルム溶液(1.5 mL)を滴下し、15 で90分間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.25 g, 1.94 mmol)のクロロホルム溶液(1.7 mL)を滴下した。得られた溶液を5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 8 mL×2)および20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 8 mL×3)にて順次洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo $C^{bz}$ を含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1410.1

【0209】

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo $C^{bz}$ (0.24 mmol相当)を含む有機層にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.07 mL, 0.38 mmol)およびCl-mo-(Tr) $C^{bz}$ (0.22 g, 0.32 mmol)を加え、室温で52時間攪拌した。反応液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.32 mL, 1.82 mmol)、L-プロリルL-グルタミン酸(0.09 g, 0.36 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(0.9

10

20

30

40

50

4 mL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を、2,2,2-トリフルオロエタノールと0.1 mM塩酸の混合溶液(1:19, 3.5 mL×2)にて洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trを含む有機層を得た。

TOF-MS+ (m/z) 2071.8

【0210】

実施例4 実施例1の3)におけるクエンチ剤の変更(クエンチ剤:フェニルホスホン酸)

【0211】

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup>(1.0 g, 0.61 mmol)をクロロホルム(8.0 mL)に溶解させ、2,2,2-トリフルオロエタノール(2.6 mL, 36.3 mmol)およびチオリンゴ酸(0.27 g, 1.82 mmol)を添加した。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.55 g, 4.84 mmol)とトリエチルアミン(0.31 g, 3.03 mmol)のクロロホルム溶液(1.9 mL)を滴下し、15℃で120分間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.31 g, 2.42 mmol)のクロロホルム溶液(2.1 mL)を滴下した。得られた溶液を5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 10 mL×2)および20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 10 mL×3)にて順次洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-moC<sup>bz</sup>を含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1410.1

【0212】

Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-moC<sup>bz</sup>(0.61 mmol相当)を含む有機層に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.16 mL, 0.94 mmol)およびCl-mo-(Tr)C<sup>bz</sup>(0.55 g, 0.79 mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.79 mL, 4.54 mmol)、フェニルホスホン酸(0.14 g, 0.91 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(2.33 mL)を加え、室温で2時間攪拌し、さらにフェニルホスホン酸(0.57 g, 3.63 mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.78 mL, 4.50 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を、2,2,2-トリフルオロエタノールと0.1 mM塩酸の混合溶液(1:19, 8.5 mL×2)にて洗浄することにより、Bzl(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trを含む有機層を得た。

TOF-MS+ (m/z) 2071.8

【0213】

実施例5 5'末端にDpm(4,4'-OPhy)-NH-含有アンカーを有する基質を用いる伸長反応

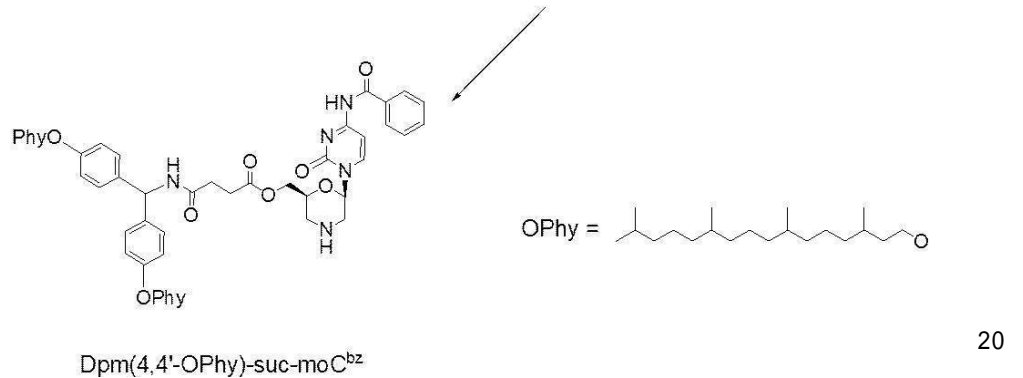
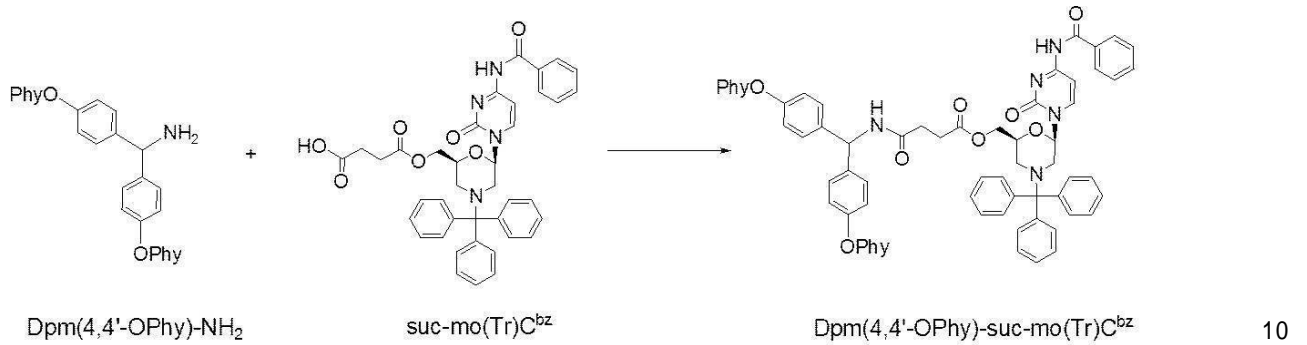
【0214】

10

20

30

【化27】



【0215】

1) 縮合 - 1

Dpm(4,4'-OPhy)-NH<sub>2</sub> (0.30 g, 0.39 mmol)をクロロホルム(3 mL)に溶解させた後、suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup> (0.10 g, 0.15 mmol)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(0.04 g, 0.17mmol)を加え、室温で21時間攪拌した。反応液にクロロホルム(10mL)を加えた後、20%食塩水(10mL)を用いて洗浄し、得られたDpm(4,4'-OPhy)-suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup>を含む溶液をそのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1430.8

【0216】

2) トリチル基の脱保護 - 1

Dpm(4,4'-OPhy)-suc-mo(Tr)C<sup>bz</sup>(0.55 g, 0.39 mmol)をクロロホルム(6 mL)に溶解させた後、2,2,2-トリフルオロエタノール(1.9 mL, 26.1 mmol)およびチオリンゴ酸(0.58 g, 3.85 mmol)を加えた。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.35 g, 3.08 mmol)とトリエチルアミン(0.19 g, 1.93 mmol)のクロロホルム溶液(5.5 mL)を滴下し、15℃で1.5時間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.20 g, 9.25 mmol)のクロロホルム溶液(12 mL)を滴下した。得られた溶液に5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 25 mL)、20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 25 mL × 2)および20%食塩水(25mL × 2)を用いて順次洗浄後、有機層を減圧濃縮することにより、Dpm(4,4'-OPhy)-suc-moC<sup>bz</sup>を得た。

TOF-MS+ (m/z) 1188.8

【0217】

実施例 6 5'末端にcHxCH<sub>2</sub>(3,4,5-OPhy)-O-含有アンカーを有する基質を用いる伸長反応

【0218】

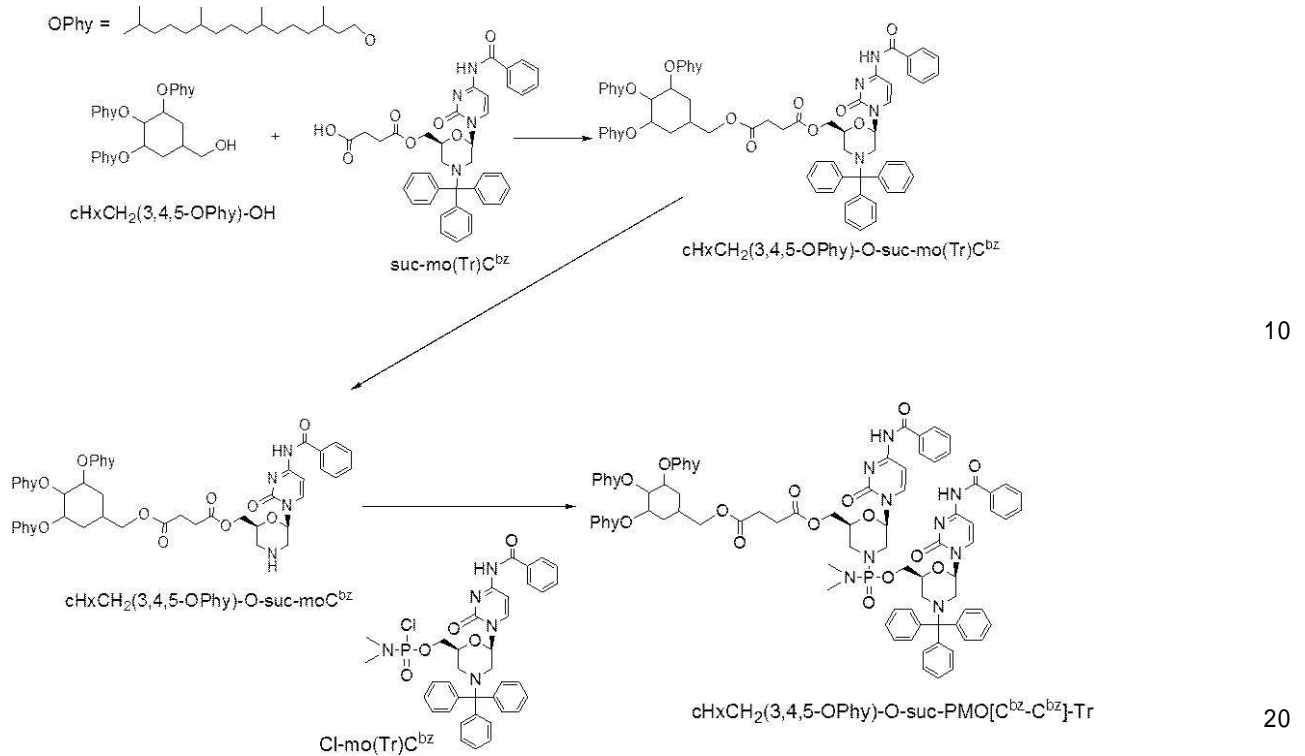
10

20

30

40

## 【化28】



## 【0219】

## 1) 縮合 - 1

$cHxCH_2(3,4,5-O-Phy)-OH$  (1.0g, 1.09 mmol) をクロロホルム (10 mL) に溶解させ、 $suc-mo(Tr)C^{bz}$  (0.95 g, 1.41 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (0.27 g, 1.41 mmol) および 4-ジメチルアミノピリジン (9 mg, 0.07 mmol) を加え、室温で 23 時間攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣にシクロヘキサン (30 mL) およびヘプタン (30 mL) を加えて溶解させ、アセトニトリル (30 mL) で 2 回分液洗浄した。上層の溶媒を減圧留去した後、残渣にメタノール (10 mL) を加えて固体をスラリー洗浄することにより  $cHxCH_2(3,4,5-O-Phy)-O-suc-mo(Tr)C^{bz}$  (1.62 g, 100%) を無色の固体として得た。

TOF-MS+ (m/z) 1574.8

30

## 【0220】

## 2) トリチル基の脱保護 - 1

$cHxCH_2(3,4,5-O-Phy)-O-suc-mo(Tr)C^{bz}$  (1.00 g, 0.64 mmol) をクロロホルム (8.0 mL) に溶解させ、2,2,2-トリフルオロエタノール (2.7 mL, 38.1 mmol) およびチオリンゴ酸 (0.29 g, 1.90 mmol) を添加した。氷冷後、混合物にトリフルオロ酢酸 (0.58 g, 5.08 mmol) とトリエチルアミン (0.32 g, 3.17 mmol) のクロロホルム溶液 (1.9 mL) を滴下し、15 で 150 分間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.33 g, 2.54 mmol) のクロロホルム溶液 (2.2 mL) を滴下した。得られた溶液を 5% 炭酸ナトリウム水と N,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液 (4:1, 10 mL × 2) および 20% 食塩水と N,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液 (3:2, 10 mL × 3) にて順次洗浄することにより、 $cHxCH_2(3,4,5-O-Phy)-O-suc-moC^{bz}$  を含む有機層を得、該有機層をそのまま次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1331.7

40

## 【0221】

## 3) 縮合 - 2

$cHxCH_2(3,4,5-O-Phy)-O-suc-moC^{bz}$  (0.64 mmol 相当) を含む有機層に N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.17 mL, 0.99 mmol) および  $Cl-mo(Tr)C^{bz}$  (0.58 g, 0.83 mmol) を加え、室温で 16 時間攪拌した。反応液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.83 mL, 4.76 mmol)、プロリルグルタミン酸 (0.23 g, 0.95 mmol) および 2,2,2-トリフルオロエタノール (2.36 mL) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液を 2,2,2-トリフルオロエタノールと 0.1 mM

50

塩酸の混合溶液(1:19, 8.5 mL × 2)にて洗浄することにより、cHxCH<sub>2</sub>(3,4,5-OPhy)-O-suc-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trを含む有機層を得た。

TOF-MS+ (m/z) 1993.7

【0222】

#### 実施例7 アンカーを有さない基質を用いる伸長反応

##### 1) シリル系保護基の導入

2-(N-ベンゾイル)シトシル-6-ヒドロキシメチル-4-トリチルモルホリン(4.00 g, 6.99 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(40 mL)に溶解させた。混合物を氷冷後、イミダゾール(3.80 g, 55.9 mmol)およびtert-ブチルジメチルクロロシラン(4.21 g, 27.9 mmol)を加え、40 に昇温して2時間撹拌した。反応液に水(300 mL)、酢酸エチル(150 mL)およびヘキサン(150 mL)を加えて分液洗浄を行った。上層を回収し水(100 ml)を加えて分液洗浄を行った。上層を回収して溶媒を減圧留去した後、40 にて減圧乾燥することにより、2-(N-ベンゾイル)シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリンを得た(5.80 g, 120%)。

TOF-MS+ (m/z) 686.9

【0223】

##### 2) トリチル基の脱保護 - 1

2-(N-ベンゾイル)シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリン(0.10 g, 0.15mmol)をクロロホルム(0.50 mL)に溶解させた後、2,2,2-トリフルオロエタノール(0.15 mL, 2.09 mmol)およびチオリンゴ酸(0.066 g, 0.44 mmol)を加えた。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.13 g, 1.17 mmol)とトリエチルアミン(0.074 g, 0.73 mmol)のクロロホルム溶液(0.35 mL)を滴下し、15 で2時間撹拌した。氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.75g, 0.58 mmol)のクロロホルム溶液(0.51 mL)を滴下した。得られた溶液に5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 2.0mL × 2)を加えて分液洗浄した。下層を回収し、20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 2.0mL × 3)にて分液洗浄して下層を回収した。2-(N-ベンゾイル)シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチルモルホリンを含む有機層を減圧濃縮し、次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 444.6

【0224】

##### 3) 縮合 - 2

2-(N-ベンゾイル)シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチルモルホリン(0.065 g, 0.15 mmol相当)を含む有機層(0.65 mL)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.046 mL, 0.26 mmol)、[2-(N-ベンゾイル)シトシル-4-トリチルモルホリン-6-イル]メチルジメチルホスホロアミドクロリデート(0.15 g, 0.22 mmol)を加え、室温で23時間撹拌した。反応液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.32 mL, 1.82 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.089 g, 0.36 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(0.14 mL, 1.93 mmol)を加え、室温で3.5時間撹拌した。水(2 mL × 2)を用いて分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trtを含む下層を回収し、減圧濃縮し次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1106.3

【0225】

##### 4) トリチル基の脱保護 - 2

TBSO-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trt (0.16 g, 0.15 mmol相当)を含む有機層(1.61 mL)を氷冷した後、トリフルオロ酢酸(0.23 g, 2.28 mmol)のクロロホルム(1.20 ml)溶液を滴下した。混合物に、2,2,2-トリフルオロエタノール(0.67 mL, 8.79 mmol)およびチオリンゴ酸(0.066 g, 0.44 mmol)を加えた。次いでトリフルオロ酢酸(0.13g, 1.17 mmol)とトリエチルアミン(0.044 g, 0.44 mmol)のクロロホルム溶液(1.00 mL)を滴下し、15 で1時間撹拌した後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.075 g, 0.58 mmol)のクロロホルム溶液(0.50 mL)を滴下した。5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 3.00 mL × 2)および20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 3.00 mL × 3)にて順次

10

20

30

40

50

分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-Hを含む下層を回収し、減圧濃縮し次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 864.0

【0226】

5) 縮合 - 3

TBSO-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>]-H (0.13 g, 0.15 mmol相当)を含む有機層(1.26 mL)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.046 mL, 0.26 mmol)、(4-トリチル-2-チミジルモルホリン-6-イル)メチルジメチルホスホロアミドクロリデート(0.13 g, 0.22 mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。反応液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.32 mL, 1.82 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.089 g, 0.36 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(0.67 mL, 9.41 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。水(2 mL×2)を用いて分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>bz</sup>-C<sup>bz</sup>-T]-Trtを含む下層を回収し、減圧濃縮して乾固させ目的物を含む結晶を得た。

10

TOF-MS+ (m/z) 1436.6

【0227】

実施例8 核酸塩基部位のみにアンカリング(直鎖アンカー(オクタデシルオキシ基を有するアンカー)保護)された基質を用いる伸長反応

1) シリル系保護基の導入

2-シトシル-6-ヒドロキシメチル-4-トリチルモルホリン(4.00 g, 8.54 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(40 mL)に溶解させた。混合物を氷冷後、イミダゾール(4.65 g, 68.3 mmol)およびtert-ブチルジメチルクロロシラン(5.15 g, 34.1 mmol)を添加し、40 に昇温して2時間攪拌した。反応液に水(300 mL)、酢酸エチル(150 mL)およびヘキサン(150 mL)を添加して分液洗浄を行った。上層を回収し水(100 mL)を加えて分液洗浄を行った。上層を回収して減圧留去し、40 にて減圧乾燥することにより、2-シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリンを得た(6.23 g, 125%)。

20

TOF-MS+ (m/z) 582.8

【0228】

2) 核酸塩基部位の直鎖アンカーによるアンカリング

3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)安息香酸(1.00 g, 1.08 mmol)をクロロホルム(10 mL)に溶解させ、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.56 mL, 3.23 mmol)を添加した。混合物を氷冷後、0-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩(0.61 g, 1.62 mmol)を添加して、室温にて30分間攪拌した。反応液に2-シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリン(1.26 g, 2.16 mmol)およびクロロホルム(1.0 mL)を添加し、40 にて16時間攪拌した。反応液にアセトニトリル(10 mL)を加えて減圧濃縮した後、アセトニトリル(10 mL)を添加して30分間攪拌し晶析させた。得られた結晶を減圧濾過により濾別し、アセトニトリル(10 mL)を添加してスラリー洗浄を行った。結晶を減圧濾過により濾別し、真空乾燥を行うことにより、2-[N-{3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)ベンゾイル}]シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリンを得た(1.59 g, 99%)。

30

TOF-MS+ (m/z) 1492.4

【0229】

3) トリチル基の脱保護 - 1

2-[N-{3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)ベンゾイル}]シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリン(0.50 g, 0.34 mmol)をクロロホルム(3.25 mL)に溶解させた後、混合物に2,2,2-トリフルオロエタノール(0.75 mL, 10.46 mmol)およびチオリンゴ酸(0.15 g, 1.01 mmol)を加えた。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.31 g, 2.68 mmol)とトリエチルアミン(0.17 g, 1.68 mmol)のクロロホルム溶液(1.00 mL)を滴下し、15 で1.5時間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.17 g, 1.34 mmol)のクロロホルム溶液(1.20 mL)を滴下した。得られた溶液に5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 10.0 mL×2)を加えて分液洗浄した。下層を回収し、20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 10.0 mL×3)にて分液洗浄して下層を回収した。2-[N-{3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)ベンゾイル}]シトシ

40

50

ル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチルモルホリンを含む有機層を減圧濃縮し、次の反応に供した。

TOF-MS+ (m/z) 1250.0

【0230】

4) 縮合 - 2

2-[N-{3,4,5-トリ(オクタデシルオキシ)ベンゾイル}]シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチルモルホリン(0.42 g, 0.34 mmol相当)を含む有機層(4.20 mL)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.11 mL, 0.60 mmol)および{2-(N-ベンゾイル)シトシル-4-トリチルモルホリン-6-イル}メチルジメチルホスホロアミドクロリデート(0.35 g, 0.50 mmol)を加え、室温で19.5時間撹拌した。反応液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.73 mL, 4.19 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.20 g, 0.84 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(0.90 mL, 12.5 mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。水(6.30 mL×2)を用いて分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>TOB</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trtを含む下層を回収し、減圧濃縮し、次の反応に供した。

10

TOF-MS+ (m/z) 1911.7

【0231】

5) トリチル基の脱保護 - 2

TBSO-PMO[C<sup>TOB</sup>-C<sup>bz</sup>]-Trt(0.75 g, 0.34 mmol相当)を含む有機層(7.50 mL)を氷冷した後、トリフルオロ酢酸(0.35 g, 3.43 mmol)のクロロホルム(3.47 mL)溶液を滴下した。混合物に、2,2,2-トリフルオロエタノール(2.11 mL, 27.6 mmol)およびチオリンゴ酸(0.15 g, 1.01 mmol)を加えた。次いでトリフルオロ酢酸(0.31 g, 2.68 mmol)とトリエチルアミン(0.17 g, 1.68 mmol)のクロロホルム溶液(1.00 mL)を滴下し、15℃で1.5時間撹拌した後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.17 g, 1.34 mmol)のクロロホルム溶液(0.50 mL)を滴下した。5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 7.50 mL×2)および20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 7.50 mL×3)にて順次分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>TOB</sup>-C<sup>bz</sup>]-Hを含む下層を回収し、減圧濃縮し次の反応に供した。

20

TOF-MS+ (m/z) 1669.4

【0232】

6) 縮合 - 3

TBSO-PMO[C<sup>TOB</sup>-C<sup>bz</sup>]-H(0.56 g, 0.34 mmol相当)を含む有機層(5.60 mL)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.11 mL, 0.60 mmol)および(4-トリチル-2-チミジルモルホリン-6-イル)メチルジメチルホスホロアミドクロリデート(0.31 g, 0.50 mmol)を加え、室温で18時間撹拌した。反応液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.73 mL, 4.19 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.20 g, 0.84 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(2.71 mL, 37.8 mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。水(11.2 mL×2)を用いて分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>TOB</sup>-C<sup>bz</sup>]-T]-Trtを含む下層を回収し減圧濃縮後、アセトニトリル(22.4 mL)を加えて沈殿させ、減圧濾過により沈殿物を濾別した。得られた結晶にアセトニトリル(11.2 mL)を加えてスラリー洗浄を行い、減圧濾過にて結晶を濾別し、真空乾燥することにより目的物(0.63 g, 84%)を得た。

30

TOF-MS+ (m/z) 2242.0

【0233】

実施例9 核酸塩基部位のみにアンカリング(分岐鎖アンカー(2',3'-ジヒドロフィチルオキシ基を有するアンカー)保護)された基質を用いる伸長反応

1) 核酸塩基部位の分岐鎖アンカーによるアンカリング

3,4,5-トリ(2',3'-ジヒドロフィチルオキシ)安息香酸(2.00 g, 1.98 mmol)をクロロホルム(16 mL)に溶解させた後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.77 mL, 5.93 mmol)を添加した。混合物を氷冷後、O-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸塩(1.12 g, 2.97 mmol)を添加して、室温にて30分間撹拌した。反応液に2-シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモ

50

ルホリン(2.30 g, 3.95 mmol)およびクロロホルム(4.0 mL)を添加し、40 °Cにて17時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(60 mL)およびクロロホルム(40 mL)を加えて分液洗浄を行い、回収した下層に20%食塩水(60 mL × 2)を加えて分液洗浄を行った。得られた下層を減圧濃縮し、シクロヘキサン(60 mL)、ヘプタン(20 mL)およびアセトニトリル(60 mL)を加えて分液洗浄を行った。回収した下層にシクロヘキサン(30 mL)およびヘプタン(15 mL)を加えて分液洗浄を行った。2回の分液洗浄にて得られた上層を混合し、アセトニトリル(30 mL)を加えて分液洗浄を行った。上層を回収して減圧濃縮し、40 °Cにて減圧乾燥を行うことにより、2-[N-{3,4,5-トリ(2',3'-ジヒドロフィチルオキシ)ベンゾイルアミノ}]シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリンを得た(3.47 g, 112%)。

10

TOF-MS+ (m/z) 1576.5

【0234】

2) トリチル基の脱保護 - 1

2-[N-{3,4,5-トリ(2',3'-ジヒドロフィチルオキシ)ベンゾイルアミノ}]シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチル-4-トリチルモルホリン(1.00 g, 0.63 mmol)をクロロホルム(6.50 mL)に溶解させた後、混合物に2,2,2-トリフルオロエタノール(1.50 mL, 2.09 mmol)およびチオリンゴ酸(0.29 g, 1.90 mmol)を加えた。混合物を氷冷後、トリフルオロ酢酸(0.58 g, 5.07 mmol)とトリエチルアミン(0.32 g, 3.17 mmol)のクロロホルム溶液(2.0 mL)を滴下し、15 °Cで1時間攪拌した。反応液を氷冷後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.33 g, 2.54 mmol)のクロロホルム溶液(2.2 mL)を滴下した。得られた溶液に5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 20 mL × 2)を加えて分液洗浄した。下層を回収し、20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 20 mL × 3)にて分液洗浄して下層を回収した。2-[N-{3,4,5-トリ(2',3'-ジヒドロフィチルオキシ)ベンゾイルアミノ}]シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチルモルホリンを含む有機層を減圧濃縮し、次の反応に供した。

20

TOF-MS+ (m/z) 1334.2

【0235】

3) 縮合 - 2

2-[N-{3,4,5-トリ(2',3'-ジヒドロフィチルオキシ)ベンゾイルアミノ}]シトシル-6-(tert-ブチルジメチルシロキシ)メチルモルホリン(0.85 g, 0.63 mmol相当)を含む有機層(8.50 mL)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.20 mL, 1.14 mmol)、(4-トリチル-2-チミジルモルホリン-6-イル)メチルジメチルホスホロアミドクロリデート(0.58 g, 0.95 mmol)を加え、室温で19時間攪拌した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.38 mL, 7.93 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.39 g, 1.59 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(2.46 mL, 34.3 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。水(12.7 mL × 2)を用いて分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>Phy</sup>TOB-T]-Trを含む下層を回収し、氷冷後トリフルオロ酢酸(0.16 g, 1.40 mmol)のクロロホルム(0.80 mL)溶液を滴下した。得られた溶液を減圧濃縮し、次の反応に供した。

30

TOF-MS+ (m/z) 1906.8

【0236】

4) トリチル基の脱保護 - 2

TBSO-PMO[C<sup>Phy</sup>TOB-T]-Tr(1.21 g, 0.63 mmol相当)を含む有機層(12.1 mL)を氷冷した後、2,2,2-トリフルオロエタノール(2.73 mL, 38.1 mmol)およびチオリンゴ酸(0.29 g, 1.90 mmol)を加えた。混合物にトリフルオロ酢酸(0.58 g, 5.07 mmol)とトリエチルアミン(0.32 g, 3.17 mmol)のクロロホルム溶液(1.00 mL)を滴下し、15 °Cで1.5時間攪拌した後、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.33 g, 2.54 mmol)のクロロホルム溶液(0.50 mL)を滴下した。5%炭酸ナトリウム水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(4:1, 18.1 mL × 2)および20%食塩水とN,N-ジメチルホルムアミドの混合溶液(3:2, 18.1 mL × 3)にて順次分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>Phy</sup>TOB-T]-Hを含む下層を回収し、減圧濃縮し、次の反応に供した。

40

50

TOF-MS+ (m/z) 1664.5

【 0 2 3 7 】

5) 縮合 - 3

TBSO-PMO[C<sup>PhyTOB</sup>-T]-H(1.06 g, 0.63 mmol相当)を含む有機層(10.6 mL)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.20 mL, 1.14 mmol)および{2-(N-ベンゾイルアデニル)-4-トリチルモルホリン-6-イル}メチルジメチルホスホロアミドクロリデート(0.69 g, 0.95 mmol)を加え、室温で68.5時間攪拌した。反応液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.38 mL, 7.93 mmol)、プロリルグルタミン酸(0.39 g, 1.59 mmol)および2,2,2-トリフルオロエタノール(5.12 mL, 71.3 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。水(21.1 mL×2)を用いて分液洗浄し、TBSO-PMO[C<sup>PhyTOB</sup>-T-A<sup>bz</sup>]-Trを含む下層を回収し、減圧濃縮して目的物を含む油状物を得た。

10

TOF-MS+ (m/z) 2350.2

【 産業上の利用可能性 】

【 0 2 3 8 】

本発明によれば、縮合反応を液相中で行うことにより反応性が固相法に比べて格段に向上し、使用するモノマー当量を格段に低減でき、さらに反応後は抽出操作によりモルフォリノオリゴヌクレオチドを簡便に単離・精製することができるので、医薬品に利用される鎖長のモルフォリノオリゴヌクレオチドを液相合成法において効率的かつ高収率に製造できる方法を提供できるようになった。

【 0 2 3 9 】

本出願は、日本国で2014年10月14日に出願された特願2014-210046を基礎としており、その内容は本明細書にすべて包含されるものである。

20

## フロントページの続き

- (74)代理人 100137729  
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301  
弁理士 戸崎 富哉
- (72)発明者 高橋 大輔  
三重県四日市市大字日永1730 味の素株式会社内
- (72)発明者 鳥居 高好  
三重県四日市市大字日永1730 味の素株式会社内

審査官 前田 憲彦

- (56)参考文献 国際公開第2013/074834(WO, A1)  
国際公開第2013/100190(WO, A1)  
国際公開第2011/018798(WO, A1)  
特表2010-505741(JP, A)  
米国特許出願公開第2010/0099159(US, A1)  
国際公開第2012/043730(WO, A1)  
特表2011-503184(JP, A)  
特表平05-504563(JP, A)  
特許第6477464(JP, B2)  
米国特許出願公開第2004/0033973(US, A1)  
米国特許出願公開第2013/0267697(US, A1)  
European Journal of Organic Chemistry, 2013年, 2013(7), p.1271-1286

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07F 9/00  
A61K 31/00  
A61K 48/00  
CAplus/REGISTRY(STN)