(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149414
(43) 공개일자 2024년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 21/00 (2006.01) *C07H 1/02* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 21/00 (2013.01)
C07H 1/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7029378
(22) 출원일자(국제) 2023년02월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년08월30일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/003685
(87) 국제공개번호 WO 2023/149563
국제공개일자 2023년08월10일
(30) 우선권주장
JP-P-2022-016004 2022년02월04일 일본(JP)
JP-P-2022-142047 2022년09월07일 일본(JP)

(71) 출원인
닛토덴코 가부시키가이샤
일본국 오사카후 이바라키시 시모호츠미 1-1-2
(72) 발명자
요시다, 케이
일본, 오사카 5678680, 이바라키시, 시모호츠미, 1-1-2, 닛토 덴코 코퍼레이션 씨/오
이다, 토모요시
일본, 오사카 5678680, 이바라키시, 시모호츠미, 1-1-2, 닛토 덴코 코퍼레이션 씨/오
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

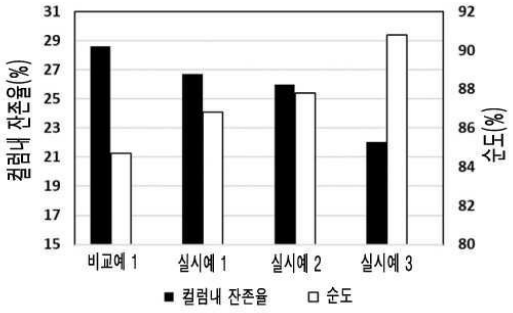
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **올리고뉴클레오티드의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은, 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법에 있어서, 합성 공정에 있어서 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기내 잔존량을 억제하고, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 감소시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법으로서, 활성화제의 존재 하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정을 포함하고, 상기 공정에서 사용하는 상기 활성화제의 양이, 상기 공정에서 사용하는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양의 10.0 내지 15.0배에 해당하는 양인, 상기 방법 등에 의해 , 상기 과제가 해결되었다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07H 21/02 (2013.01)
C07H 21/04 (2013.01)
(72) 발명자
이와모토, 마사푸미
일본, 오사카 5678680, 이바라키시, 시모호츠미, 1-1-2, 닛토 덴코 코퍼레이션 씨/오
매타, 에리
일본, 오사카 5678680, 이바라키시, 시모호츠미, 1-1-2, 닛토 덴코 코퍼레이션 씨/오
마츠나미, 준
일본, 오사카 5678680, 이바라키시, 시모호츠미, 1-1-2, 닛토 애널리티컬 테크노-센터 씨오., 엘티디. 씨/오

명 세 서

청구범위

청구항 1

올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법으로서, 활성화제의 존재하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정을 포함하고,

상기 공정에서 사용되는 활성화제의 양이 상기 공정에서 사용되는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양의 10.0 내지 15.0배에 해당하는 양인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 공정에서 사용되는 활성화제의 양이 상기 담지된 뉴클레오시드의 10.0 내지 25.0 배에 해당하는 양인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 공정에서 사용되는 상기 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양이 상기 담지된 뉴클레오시드의 1.0 내지 2.0 배에 해당하는 양인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

활성화제가 4,5-디시아노이미다졸, 5-(에틸티오)-1H-테트라졸, 5-(벤질티오)-1H-테트라졸 및 사카린 1-메틸이미다졸로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 공정에서 용액의 온도가 0 내지 20℃인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] DNA 올리고뉴클레오티드나 RNA 올리고뉴클레오티드 등의 핵산의 화학 합성에 있어서 포스포로아미다이트법이 널리 사용되고 있다. 포스포로아미다이트 방법에 있어서, 전형적으로, 올리고뉴클레오티드는 적절한 활성화제의 존재하에 뉴클레오시드, 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 순차적으

로 첨가함으로써 합성된다.

[0003] 포스포로아미다이트 방법에 있어서, 일반적으로, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트는 이론적 양에 대해 1.5 내지 10.0배의 양으로 사용된다. 뉴클레오시드 포스포로아미다이트는 합성 원료 중에서도 고가이기 때문에, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 감소시킬 수 있으면, 생산 비용을 대폭 절감할 수 있다.

[0004] 그러나, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 감소시키면서, 양호한 순도로 올리고뉴클레오티드를 얻는 방법은 지금까지 알려지지 않았다.

[0005] 특허문헌 1에는, 사용하는 활성화제의 양에 대하여, 뉴클레오시드 유도체의 양 대비, 1 내지 20배가 적당하고, 1 내지 10배 몰량이 바람직한 것으로 기재되어 있지만, 합성 공정에서의 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기 내 잔존량을 억제하고, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 감소시키면서, 양호한 순도로 올리고뉴클레오티드를 얻는 방법에 대해서는 기재되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 국제 공개특허 제2006/022323호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은, 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법에 있어서, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기내 잔존량을 억제하고, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 감소시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은, 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법에 대해 예의 연구에 임하는 중, 활성화제의 사용량을 증가시킴으로써, 합성 공정에 있어서의 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기내 잔존량을 억제할 수 있고, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 줄일 수 있다는 것을 발견하였다. 그리고 이러한 지견에 기초하여 추가 연구를 계속한 결과, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 즉, 본 발명은 이하에 관한 것이다.

[0010] [1] 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법으로서, 활성화제의 존재하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 , 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정을 포함하고, 상기 공정에 사용하는 상기 활성화제의 양이, 상기 공정에 사용하는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양의 10.0 내지 15.0배에 해당하는 양인, 방법.

[0011] [2] 상기 공정에 사용하는 상기 활성화제의 양이, 상기 담지된 뉴클레오시드의 10.0 내지 25.0배에 해당하는 양인, [1]에 기재된 방법.

[0012] [3] 상기 공정에 사용하는 상기 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양이, 상기 담지된 뉴클레오시드의 1.0 내지 2.0배에 해당하는 양인, [1] 또는 [2]에 기재된 방법.

[0013] [4] 활성화제가 4,5-디시아노이미다졸, 5-(에틸티오)-1H-테트라졸, 5-(벤질티오)-1H-테트라졸 및 사카린 1-메틸이미다졸로 이루어진 군으로부터 선택되는, [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0014] [5] 상기 공정에 있어서 용액의 온도가 0 내지 20℃인, [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 방법.

발명의 효과

[0015] 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법에 있어서 활성화제의 사용량을 증가시킴으로써, 합성 공정에서의 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기내 잔존량을 억제할 수 있고, 고가의 재료인 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 줄이면서 양호한 순도의 올리고뉴클레오티드를 얻을 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오티드의 제

조에 있어서 각 공정에서의 용액의 온도를 저온으로 함으로써, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기 내 잔존량을 억제할 수 있고, 고가의 재료인 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량을 줄이면서 양호한 순도의 올리고뉴클레오티드를 얻을 수 있다.

[0016] 특정 이론에 구속되는 것은 바람직하지 않지만, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기 내 잔류는 올리고뉴클레오티드의 인산 부위의 2-시아노에틸(CNET) 보호기가 의도하지 않고 탈리됨으로써 형성되는 수산기에, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트가 커플링 공정에서 결합함으로써 발생하며, 사슬 길이 신장 반응(담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 5' 또는 3' 말단 수산기와의 반응)에 관여할 수 없게 되는 것으로 보이므로, 활성화제의 사용량을 증가시킴으로써, CNET 보호기의 탈리에 의해 형성된 올리고뉴클레오티드의 수산기에 대한 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 결합이 억제되고, 반응 용기 내 에서 소비되는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양이 감소하고, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량 감소가 실현되는 것으로 생각된다. 또한, 용액의 온도를 저온으로 함으로써, 올리고뉴클레오티드의 인산 부위의 CNET 보호기의 탈리가 억제되고, CNET 보호기의 탈리에 의해 형성된 올리고뉴클레오티드의 수산기에의 결합에 의해 소비되는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양이 감소하여, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 사용량 감소가 실현될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 비교예 1, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3에 있어서 컬럼내 잔존율 및 순도를 나타낸다.

도 2는 비교예 2, 실시예 4, 실시예 5 및 실시예 6에 있어서 컬럼내 잔존율 및 순도를 나타낸다.

도 3은 비교예 3 및 실시예 7에 있어서 컬럼내 잔존율 및 순도를 나타낸다.

도 4는 비교예 4, 실시예 8 및 실시예 9에 있어서 컬럼내 잔존율 및 순도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0019] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 당업자가 통상 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 참조되는 모든 특허, 출원 및 기타 간행물 및 정보는 그 전체를 참조하여 본 명세서에 포함된다. 또한, 본 명세서에서 참조된 출판물과 본 명세서의 기재에 모순이 발생한 경우에는, 본 명세서의 기재가 우선되는 것으로 한다.

[0020] 본 발명은 일 측면에서 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 제조는, 적합한 활성화제의 존재하에서, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트와, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 축합 반응에 의해 뉴클레오티드의 부가가 행해지는, 소위 포스포로아미다이트법을 사용하여 수행된다.

[0022] 본 발명에 있어서, 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법은, 예를 들면,

[0023] (a) 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지되고, 보호기가 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 결합되어 있는, 보호 뉴클레오시드로부터 상기 보호기를 탈리(탈보호)시키는 공정,

[0024] (b) 보호기가 탈리된, 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 활성화제의 존재하에 결합(커플링)시키는 공정,

[0025] (c) 공정 (b)에 의해 형성된 결합을 황화 또는 산화시키는 공정, 및

[0026] (d) 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드에서 미결합된 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기를 캡핑하는 공정;

[0027] 을 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법은, 상기 (a) 내지 (d) 이외에 추가 공정을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법은 활성화제의 존재하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정을 포함한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 뉴클레오시드란, 뉴클레오시드 염기와 당이 결합한 화합물을 지칭하며, 아데노신, 티미딘,

구아노신, 시티딘, 우리딘 등의 천연에 존재하는 뉴클레오시드, 또는 변형된 뉴클레오시드일 수 있다. 변형된 뉴클레오시드는, 이에 제한되지 않지만, 예를 들어, 뉴클레오시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기가 티올기 또는 아미노기로 치환된 것을 포함한다. 뉴클레오시드 염기는 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실과 같은 천연에 존재하는 염기, 또는 변형된 뉴클레오시드 염기일 수 있다. 뉴클레오시드의 당 부분은 천연에 존재하는 데옥시리보스 또는 리보스일 수 있고, D 또는 L 배열을 취할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 뉴클레오티드란, 뉴클레오시드 염기와 당과 인산이 결합한 화합물을 지칭하며, 아데노신 삼인산, 티미딘 삼인산, 구아노신 삼인산, 시티딘 삼인산, 우리딘 삼인산 등 천연에 존재하는 뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 뉴클레오티드의 뉴클레오시드 염기 부분은 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 및 우라실과 같은 천연에 존재하는 염기, 또는 변형된 뉴클레오시드 염기일 수 있다. 뉴클레오시드의 당 부분은 천연에 존재하는 데옥시리보스 또는 리보스일 수 있고, D 또는 L 배열을 취할 수 있다. 인산 부분은, 예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트, 및 인산메틸일 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 올리고뉴클레오티드란, 뉴클레오시드 염기, 당, 인산이 포스포디에스테르 결합으로 이어진 구조를 갖는 화합물을 지칭하며, 천연에 존재하는 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 2'-데옥시리보 핵산(이하, 「DNA」) 및 리보 핵산 (이하, 「RNA」) 및 변형된 당 부분, 변형된 인산 부분, 또는 변형된 뉴클레오 염기를 함유하는 핵산을 포함한다. 당 부분의 변형은 리보스 고리를 헥소스, 시클로펜틸 또는 시클로헥실 고리로 대체하는 것을 포함한다. 대안적으로, 천연에 존재하는 핵산의 D-리보스 고리를 L-리보스 고리로 대체하거나, 천연에 존재하는 핵산의 β-아노머를 α-아노머로 대체할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한, 하나 이상의 비염기성 부분을 포함할 수 있다. 변형된 인산 부분은 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸포스포네이트 및 포스페이트 메틸을 포함한다. 이러한 핵산 유사체는 당업자에게 공지되어 있다. 상기 언급된 2 개 이상의 혼합물을 포함하는 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어, 데옥시리보 및 리보뉴클레오시드의 혼합물, 특히 2'-O- 메틸 또는 2'-O-메톡시에틸리보뉴클레오시드와 같은 2'-O-치환 리보뉴클레오 시드의 혼합물을 포함하는 올리고뉴클레오티드로부터 제조 가능하다. 뉴클레오 시드의 혼합물을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 예는 리보자임을 포함한다.

[0033] 본 발명에서, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트는 아미다이트로 유도체화된 뉴클레오시드를 지칭한다. 본 발명에 있어서, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트는, 뉴클레오시드의 3' 위치의 수산기 또는 5' 위치의 수산기 중 어느 한 쪽이 포스포로아미다이트화되어 있고, 다른 쪽에는 보호기가 결합되어 있다.

[0034] 아미다이트화는, 예를 들어, 1H-테트라졸을 활성화제에 사용하고, 적절하게 보호된 뉴클레오시드에 대해 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미다이트를 반응시킴으로써 수행할 수 있다.

[0035] 뉴클레오시드 포스포로아미다이트는 단량체이거나 2mer 내지 24mer와 같은 올리고머일 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 활성화제란, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 활성화시키는 제제를 말하며, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 반응시키기 위해 사용되며, 액티베이터 또는 커플링제라고도 불린다. 본 발명에서는 포스포로아미다이트법에 일반적으로 사용되는 활성화제를 사용할 수 있다. 본 발명에 사용되는 활성화제는 이에 한정되지 않지만, 예를 들어, 4,5-디시아노이미다졸, 5-(에틸티오)-1H-테트라졸, 5-(벤질티오)-1H-테트라졸 및 사카린 1-메틸이미다졸 등이고, 바람직하게는 4,5-디시아노이미다졸이다.

[0037] 본 발명에 있어서, 「담체에 직접적으로 담지된 뉴클레오시드」란, 담체의 반응점에 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드가 결합하고 있는 화합물의 뉴클레오시드 부분(뉴클레오시드 염기와 당이 결합한 화합물 부분)을 지칭하며, 「담체에 간접적으로 담지된 뉴클레오시드」란, 뉴클레오티드가 담체의 반응점에 폴리뉴클레오티드 등의 화합물을 통해 결합하고 있는 뉴클레오시드 부분(뉴클레오시드 염기와 당이 결합하여 형성되는 화합물 부분)을 지칭한다.

[0038] 본 발명의 일 실시형태에서, 활성화제의 존재하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오 시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정에 사용하는 상기 활성화제의 양은, 예를 들어, 상기 공정에서 사용되는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양의 10.0 내지 15.0 배에 해당하는 양이다. 구체적으로는, 10.0배, 10.5배, 11.0배, 11.5배, 12.0배, 12.5배, 13.0배, 13.5배, 14.0배, 14.5배, 15.0배에 해당하는 양이며, 이들 수치 중 어느 2개 사이의 범위 내일 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시형태에서, 활성화제의 존재하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정에서 사용

하는 상기 활성화제의 양은, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 상기 담지된 뉴클레오시드의 양의 10.0 내지 25.0배에 해당하는 양이 바람직하다. 구체적으로는, 10.0배, 10.5배, 11.0배, 11.5배, 12.0배, 12.5배, 13.0배, 13.5배, 14.0배, 14.5배, 15.0배, 15.5배, 16.0배, 16.5배, 17.0배, 17.5배 , 18.0배, 18.5배, 19.0배, 19.5배, 20.0배, 20.5배, 21.0배, 21.5배, 22 0배, 22.5배, 23.0배, 23.5배, 24.0배, 24.5배, 25.0배에 해당하는 양이며, 이들 수치 중 어느 2개 사이의 범위 내일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시형태에서, 활성화제의 존재하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정에 사용하는 상기 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양은, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 상기 담지된 뉴클레오시드의 1.0 내지 2.0배에 해당하는 양이 바람직하다. 구체적으로는, 1.0배, 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배에 해당하는 양이며, 이들 수치 중 어느 2개 사이의 범위 내일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시형태에서, 활성화제의 존재하에 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 결합시키는 공정에서의 용액의 온도는, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 0 내지 30℃가 바람직하고, 0 내지 20℃가 보다 바람직하고, 5 내지 20℃가 더욱 바람직하다. 구체적으로는, 0℃, 1℃, 2℃, 3℃, 4℃, 5℃, 6℃, 7℃, 8℃, 9℃, 10℃, 11℃, 12℃, 13℃, 14℃, 15℃, 16℃, 17℃, 18℃, 19℃, 20℃, 21℃, 22℃, 23℃, 24℃, 25℃, 26℃, 27℃, 28℃, 29℃, 30℃이며, 이들 수치 중 어느 2개 사이의 범위 내일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 올리고뉴클레오티드를 제조하는 방법으로서,

[0043] (a) 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지되고, 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 보호기가 결합되어 있는, 보호 뉴클레오시드로부터 상기 보호기를 탈리시키는 공정,

[0044] (b) 보호기가 탈리된, 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드의 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기에 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 활성화제의 존재하에서 결합시키는 공정,

[0045] (c) 공정 (b)에 의해 형성된 결합을 황화 또는 산화시키는 공정, 및

[0046] (d) 담체에 직접적 또는 간접적으로 담지된 뉴클레오시드에서 미결합된 3' 위치 또는 5' 위치의 수산기, 티올기 또는 아미노기를 캡핑하는 공정;

[0047] 을 포함하는, 상기 방법에 있어서, (a) 내지 (d) 중 어느 하나의 공정에 있어서의 용액의 온도는, 0 내지 30℃이고, 바람직하게는 0 내지 20℃이고, 보다 바람직하게는 5 내지 20℃이다 . 구체적으로는, 0℃, 1℃, 2℃, 3℃, 4℃, 5℃, 6℃, 7℃, 8℃, 9℃, 10℃, 11℃, 12℃, 13℃, 14℃, 15℃, 16℃, 17℃, 18℃, 19℃, 20℃, 21℃, 22℃, 23℃, 24℃, 25℃, 26℃, 27℃, 28℃, 29℃, 30℃이며, 이들 수치 중 어느 2개 사이의 범위 내일 수 있다.

[0048] 또한, 용액의 온도를 제어하는 방법으로서는, 미리 원하는 온도로 제어한 용액을 각 공정에 공급하는 방법, 각 공정에 있어서 용액을 공급한 후, 반응 용기의 냉각 등에 의해 원하는 온도로 제어하는 방법, 반응 용기 내에 파이프를 구비하고, 파이프 내에 냉매 등을 통액함으로써 원하는 온도로 제어하는 방법 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서, 미리 원하는 온도로 제어한 용액을 각 공정에 공급할 때의 온도를 공급액 온도라고 한다.

[0049] 본 명세서에 있어서, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 반응 용기내 잔존량이란, 올리고뉴클레오티드의 합성 공정에 있어서, 예를 들면 상기 설명한 이론 등에 의해, 반응 용기에 잔존하는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양을 가리킨다. 포스포로아미다이트의 반응 용기내 잔량은, 예를 들면, 각 합성 사이클에 있어서의 산화 공정 또는 황화 공정의 폐액, 및 임의로 합성 사이클 중 커플링 반응 후의 세정액을 회수하고, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 DMTr(4,4'-디메톡시트리페닐메틸기) 보호기의 양은 HPLC 분석에 의해 측정할 수 있다.

[0050] [실시예]

[0051] 본 발명을 이하의 실시예를 참조하여 보다 상세하게 설명하지만, 이들은 본 발명의 특정한 구체예를 나타내는 것이며, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0052] (1) DNA 올리고뉴클레오티드의 합성

[0053] 다공질 수지 비드(NittoPhase(등록상표) HL UnyLinker350)를 합성 스케일(비드의 반응점의 합계)이 480 μmol이 되도록 합성 컬럼(용적 12.6 ml)에 넣고, AKTAoligopilotplus100 합성기(Cytiva제)에 세트하여, 뉴클레오시

드 포스포로아미다이트 및 활성화제로서 4,5-디시아노이미다졸(DCI)을, 표 1에 기재된 양으로 투입하고, 표 1에 기재된 조건으로 커플링 반응(축합 시간: 5분)을 수행하였다. 모든 활성화제는 아세토니트릴에 용해시키고 0.7M로 제조하였다. 그 밖의 합성 시약은 탈보호제로서 톨루엔 중 3% DCA, 황화제로서 피리딘 중 수소화잔탄 0.2M으로 조제한 것, 캡화제로서 아세토니트릴 중 루티딘, N-메틸이미다졸 및 무수 아세트산의 혼합 용액, 아민 워시 반응액으로서 아세토니트릴 중 TBA(8:2의 비율)를 사용하였다. 24mer DNA 올리고뉴클레오티드(5'-TCGACGTTATTGACGTTATTGACGTA-3', 아인산 에스테르를 모두 황화: 서열번호 1)를 합성하고, 말단의 DMTr 보호기를 제거하였다. 합성 후, DNA 올리고뉴클레오티드가 결합된 다공질 수지 비드를 건조시켰다. 그 후, 다공질 수지 비드를 암모니아수에 침지하고, 다공질 수지 비드로부터 해당 DNA 올리고뉴클레오티드를 잘라내고, 염기 아미노기의 탈보호를 수행하여, DNA 올리고뉴클레오티드가 용해된 여과액을 얻었다.

[0054] (2) 합성된 DNA 올리고뉴클레오티드의 순도 측정

[0055] 올리고뉴클레오티드 시료 여과액을 5OD로 조제한 것에 대해 하기의 조건으로 고속 액체 크로마토그램(HPLC)에 의한 측정을 수행하였다. 또한, 주성분이 검출되고 나서 약 10분까지의 피크 면적의 총합을 100%로 하여 주성분의 피크 면적(%)을 합성 순도(Full-length: 면적%)로 하였다.

[0056] 컬럼: Waters사제, ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column, 130Å, 1.7μm, 2.1mm×100mm

[0057] UV 검출: 260nm

[0058] 이동상 A: 400 mM HFIP/15 mM TEA 수용액

[0059] 이동상 B: 메탄올

[0060] 컬럼 온도: 60℃

[0061] (3) 컬럼 내에 잔류하는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양의 측정

[0062] 올리고뉴클레오티드의 인산 부위에 결합하고 있던 뉴클레오시드 포스포로아미다이트는, 황화 공정에서 황화제에 의해 탈리되어 폐액과 함께 배출되기 때문에, 24mer DNA의 합성, 즉 총 24회의 각 합성 사이클에서의 황화 공정의 폐액을 모두 회수했다. 또한, 24회째의 합성 사이클의 커플링 반응 후에 있어서는, 충분히 세정하기 위해 5컬럼 용적분(63 ml)의 아세토니트릴로 컬럼 내를 세정하고, 이 또한 폐액으로서 회수하였다. 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양은 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 DMTr 보호기의 절대량으로부터 추정되었다. 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 가수분해하여 DMTr 보호기를 얻고, 0.1M 파라톨루엔술폰산 일수화물(pTSA)의 아세토니트릴 용액으로 적절히 희석한 후, DMTr 보호기의 절대량을 하기 조건으로 HPLC에 의해 측정을 수행하였다.

[0063] 컬럼: Waters사제, Atlantis T3, 130Å, 3.0μm, 2.1mm×150mm

[0064] MS 검출: ESI-Posi. m/z303

[0065] 이동상 A: 0.1% 포름산 수용액

[0066] 이동상 B: 아세토니트릴

[0067] 컬럼 온도: 40℃

[0068] 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 컬럼내 잔존율은, 폐액 중의 DMTr절대량(결합하고 있던 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 해당)을, 반응에 투입한 뉴클레오시드 포스포로아미다이트 양(합성 스케일×뉴클레오시드 포스포로아미다이트 해당 양)으로 나누어 산출하였다.

[0069] (4) 결과

[0070] 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0071]

	아미다이트 투입량	활성화제 투입량	활성화제/아미다이트	공급액 온도				결과		
				탈보호	커플링	황화	캡핑	컬럼내 잔존율		순도
	해당 양	해당 양	배	℃	℃	℃	℃	%	비교예 대비%	%
실시예 1	1.7	17.9	10.5	22.5	22.5	22.5	22.5	26.7	0.93	86.8
실시예 2	1.7	23.8	14	22.5	22.5	22.5	22.5	26.0	0.91	87.8
실시예 3	1.7	23.8	14	15	15	15	15	22.0	0.77	90.8
비교예 1	1.7	6.0	3.5	22.5	22.5	22.5	22.5	28.6	-	84.7
실시예 4	1.2	12.6	10.5	22.5	22.5	22.5	22.5	18.8	0.94	85.3
실시예 5	1.2	16.8	14	22.5	22.5	22.5	22.5	18.7	0.94	85.4
실시예 6	1.2	16.8	14	15	15	15	15	16.7	0.84	87.2
비교예 2	1.2	4.2	3.5	22.5	22.5	22.5	22.5	19.9	-	80.2

[0072] 비교예 대비%에 대해서, 실시예 1 내지 3의 값은 비교예 1의 컬럼내 잔존율을 1로 했을 때 실시예 1 내지 3의 잔존율을 나타내고, 실시예 4 내지 6의 값은 비교예 2의 컬럼내 잔존율을 1로 했을 때 실시예 4 내지 6의 잔존율을 나타낸다. 비교예 대비%가 1 미만이면 비교예에 비해 컬럼 내의 잔존량이 억제되어 있는 것을 나타낸다.

[0073] 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 1.7배 해당 양으로 사용하고, 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대해 각각 3.5배, 10.5배 및 14배 사용한 비교예 1, 실시예 1 및 실시예 2, 또한 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대하여 14배 사용하고, 공급액 온도를 15℃로 한 실시예 3에 있어서의 컬럼내 잔존율 및 순도를 도 1에 나타냈다. 활성화제의 사용량이 증가함에 따라, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 컬럼 내 잔존율이 감소하고, 합성된 DNA 올리고뉴클레오티드의 순도가 증가하였다. 또한, 실시예 3과 같이 공급액 온도를 15℃로 저하시킴으로써, 더욱 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 컬럼내 잔존율은 감소하고, 합성된 DNA 올리고뉴클레오티드의 순도는 증가하였다.

[0074] 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 1.2배 해당 양으로 사용하고, 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대해 각각 3.5배, 10.5배 및 14배 사용한 비교예 2, 실시예 4 및 실시예 5, 또한, 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대하여 14배 사용하고, 공급액 온도를 15℃로 한 실시예 6에 있어서의 컬럼내 잔존율 및 순도를 도 2에 나타냈다. 활성화제의 사용량이 증가함에 따라, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 컬럼 내 잔존율이 감소하고, 합성된 DNA 올리고뉴클레오티드의 순도가 증가하였다. 또한, 실시예 6과 같이 공급액 온도를 15℃로 저하시킴으로써, 더욱 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 컬럼 내 잔존율은 감소하고, 합성된 DNA 올리고뉴클레오티드의 순도는 증가하였다.

[0075] (5) RNA 올리고뉴클레오티드의 합성

[0076] 다공성 수지 비드(NittoPhase(등록상표) HL 250-2'OMeA)를 합성 스케일(비드의 반응점의 합계)이 352μmol이 되도록 합성 컬럼(용적 12.6ml)에 넣고, AKTAoligopilotplus100 합성기(Cytiva) 제조)에 세트하고, 뉴클레오시드 포스포로아미다이트 및 활성화제로서 5-(에틸티오)-1H-테트라졸(ETT)을 표 2에 기재된 양으로 투입하고, 표 2에 기재된 조건으로 커플링 반응(축합 시간: 10분) 을 수행하였다. 모든 활성화제는 아세토니트릴에 용해시키고 0.6M로 제조하였다. 다른 합성 시약은 탈보호제로서 톨루엔 중 3% DCA, 산화제로서 요오드 용액(0.05mol/L: 용매는 피리딘:물(9:1)의 비율), 캡화제로서 아세토니트릴 중 루티딘 , N-메틸이미다졸과 무수 아세트산의 혼합 용액, 아민 워시 반응액으로서 아세토니트릴 중 TBA(8:2의 비율)를 사용하였다. 24mer 2'OMeRNA 올리고뉴클레오티드(5'-UCGACGUAUAUGACGUAUAUGACGUA-3', 아인산 에스테르를 모두 산화: 서열번호 2)를 합성하고, 말단 DMTr 보호기를 제거하였다. RNA 올리고뉴클레오티드가 결합된 다공성 수지 비드를 건조시켰다. 그 후, 다공질 수지 비드를 암모니아수에 침지하고, 다공질 수지 비드로부터 해당 RNA 올리고뉴클레오티드를 잘라내어, 염기 아미노기의 탈보호를 수행하여, 2'OMeRNA 올리고뉴클레오티드가 용해된 여과액을 얻었다.

[0077] (6) 합성된 RNA 올리고뉴클레오티드의 순도 측정

[0078] 올리고뉴클레오티드 시료 여과액을 5OD로 조제한 것에 대해 하기의 조건으로 고속 액체 크로마토그램(HPLC)에 의한 측정을 수행하였다. 또한, 주성분이 검출되고 나서 약 10분까지의 피크 면적의 총합을 100%로 하여 주성분

의 피크 면적(%)을 합성 순도(Full-length: 면적%)로 하였다.

[0079] 컬럼: Waters사제, ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18 Column, 130Å, 1.7μm, 2.1mm×100mm

[0080] UV 검출: 260nm

[0081] 이동상 A: 400 mM HFIP/15 mM TEA 수용액

[0082] 이동상 B: 메탄올

[0083] 컬럼 온도: 60℃

[0084] (7) 컬럼에 잔류하는 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양의 측정

[0085] 올리고뉴클레오티드의 인산 부위에 결합하고 있던 뉴클레오시드 포스포로아미다이트는 산화 공정에서 산화제에 의해 탈리되어 폐액과 함께 배출되기 때문에, 24mer 2'OMeRNA의 합성, 즉 총 24회의 각 합성 사이클에서의 산화 공정의 폐액을 모두 회수하였다. 또한, 24회째의 합성 사이클의 커플링 반응 후에 있어서는, 충분히 세정하기 위해 5 컬럼 용적분(63 ml)의 아세토니트릴로 컬럼 내를 세정하고, 이것도 폐액으로서 회수하였다. 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양은 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 DMTr 보호기의 절대량으로부터 추정되었다. 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 가수분해하여 DMTr 보호기를 얻고, 0.1M 파라톨루엔술폰산 일수화물(pTSA)의 아세토니트릴 용액으로 적절히 희석한 후, DMTr 보호기의 절대량을 하기 조건으로 HPLC에 의해 측정을 수행하였다.

[0086] 컬럼: Waters사제, Atlantis T3, 130Å, 3.0μm, 2.1mm×150mm

[0087] MS 검출: ESI-Posi. m/z303

[0088] 이동상 A: 0.1% 포름산 수용액

[0089] 이동상 B: 아세토니트릴

[0090] 컬럼 온도: 40℃

[0091] 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 컬럼내 잔존율은, 폐액 중의 DMTr 절대량(결합하고 있던 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 해당)을, 반응에 투입한 뉴클레오시드 포스포로아미다이트량(합성 스케일×뉴클레오시드 포스포로아미다이트 해당 양)으로 나누어 산출하였다.

[0092] (8) 결과

[0093] 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

[0094]

	아미다이트 투입량	활성화제 투입량	활성화제/아미다이트	공급액 온도				결과		
				탈보호	커플링	황화	캡핑	컬럼내 잔존율		순도
	해당 양	해당 양	배	℃	℃	℃	℃	%	비교예 대비%	%
실시예 7	2	24	12.0	22.5	22.5	22.5	22.5	12.7	0.63	86.7
비교예 3	2	6.6	3.3	22.5	22.5	22.5	22.5	20.3	-	85.5
실시예 8	1.4	16.8	12.0	22.5	22.5	22.5	22.5	10.7	0.85	85.1
실시예 9	1.4	16.8	12.0	15	15	15	15	7.7	0.61	87.6
비교예 4	1.4	4.6	3.3	22.5	22.5	22.5	22.5	12.6	-	80.0

[0095] 비교예 대비%에 대해서, 실시예 7의 값은 비교예 3의 컬럼내 잔존율을 1로 했을 때 실시예7의 잔존율을 나타내고, 실시예 8 및 9의 값은 비교예 4의 컬럼내 잔존율을 1로 했을 때 실시예 8 및 9의 잔존율을 나타낸다. 비교예 대비%가 1 미만이면 비교예에 비해 컬럼 내의 잔존량이 억제되어 있는 것을 나타낸다.

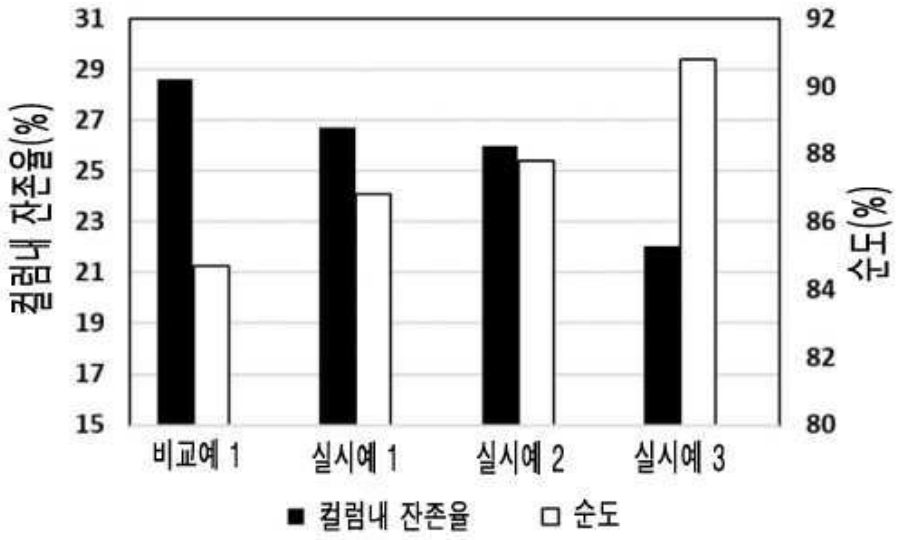
[0096] 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 2.0배 해당 양, 공급액 온도를 22.5℃로 하고, 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대해 각각 3.3배 및 12.0배 사용한 비교예 3, 및 실시예 7에서의 컬럼내 잔존율 및 순

도를 도 3에 나타냈다. 합성된 RNA 올리고뉴클레오티드의 컬럼내 잔존율은, 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대하여 12.0배로 했을 경우, 12.7%로 저하되어, RNA 올리고뉴클레오티드의 순도가 향상되었다 .

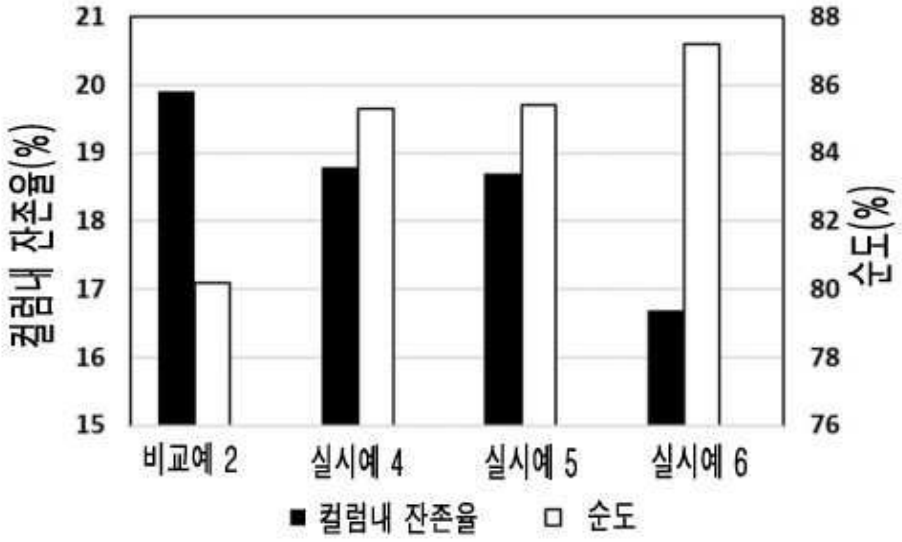
[0097] 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 1.4배 해당 양으로 사용하고, 공급액 온도를 22.5℃로 하고, 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대해 각각 3.3배 및 12.0배 사용한 비교예 4, 및 실시예 8, 또한 뉴클레오시드 포스포로아미다이트를 1.4배 해당 양으로 사용하고, 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대해 12배 사용하고, 공급액 온도를 15℃로 한 실시예 9에 있어서의 컬럼내 잔존율 및 순도를 도 4에 나타냈다. 도 4에서도 활성화제를 뉴클레오시드 포스포로아미다이트의 양에 대하여 12.0배로 증가시키면 컬럼내 잔존율은 감소하고, 합성된 RNA 올리고뉴클레오티드의 순도는 높은 값을 나타냈다. 실시예 9에서 합성된 RNA 올리고뉴클레오티드의 컬럼내 잔존율은 더욱 감소하였고, 순도는 더 높은 값을 나타냈다. 따라서, 비교예 3에 비해 실시예 9에서는 수식형의 RNA 뉴클레오시드 포스포로아미다이트라도, 컬럼내 잔존율을 저하시킴으로써 RNA 뉴클레오시드 포스포로아미다이트 투입량을 크게 감소시켜도 순도를 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

도면

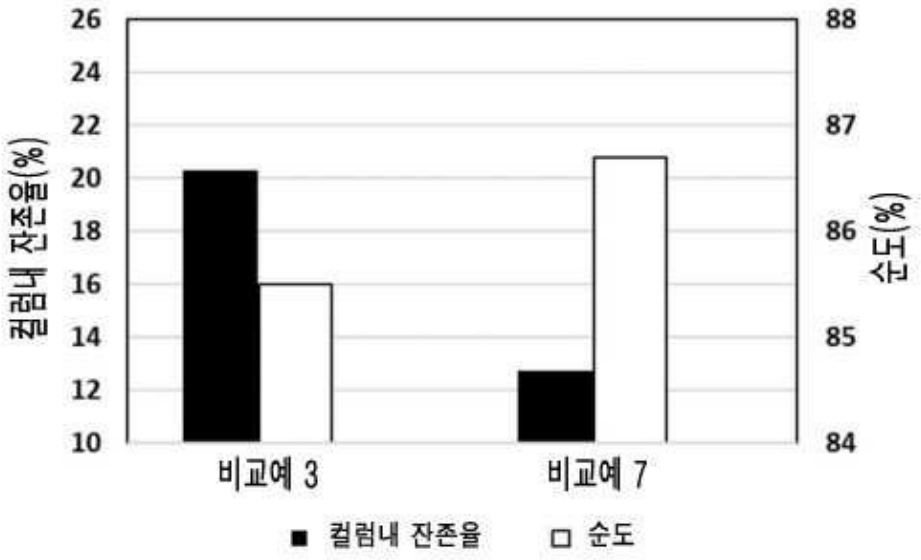
도면1



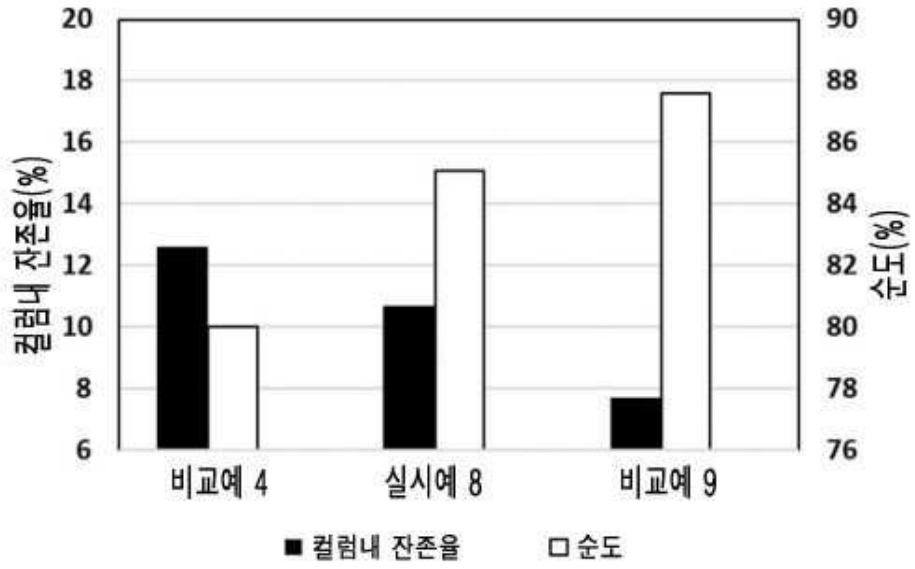
도면2


21
20
19
18
17
16
15
88
86
84
82
80
78
76
컬럼내 잔존율(%)
순도(%)
비교예 2
실시예 4
실시예 5
실시예 6
■ 컬럼내 잔존율
□ 순도

도면3


26
24
22
20
18
16
14
12
10
88
87
86
85
84
컬럼내 잔존율(%)
순도(%)
비교예 3
비교예 7
■ 컬럼내 잔존율
□ 순도

도면4


20
18
16
14
12
10
8
6
컬럼내 잔존율(%)
90
88
86
84
82
80
78
76
순도(%)
비교예 4
실시예 8
비교예 9
■ 컬럼내 잔존율
□ 순도

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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