(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0020743
(43) 공개일자 2019년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 21/00 (2006.01) *C07H 1/00* (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07H 21/00 (2013.01)
C07H 1/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7001173
(22) 출원일자(국제) 2017년06월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년01월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/038643
(87) 국제공개번호 WO 2017/223258
국제공개일자 2017년12월28일
(30) 우선권주장
62/354,433 2016년06월24일 미국(US)

(71) 출원인
바이오젠 엠에이 인코포레이티드
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 비니 스트리트 225
(72) 발명자
시, 샹린
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 비니 스트리트 225 바이오젠 엠에이 인코포레이티드 내
양, 지민
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 비니 스트리트 225 바이오젠 엠에이 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

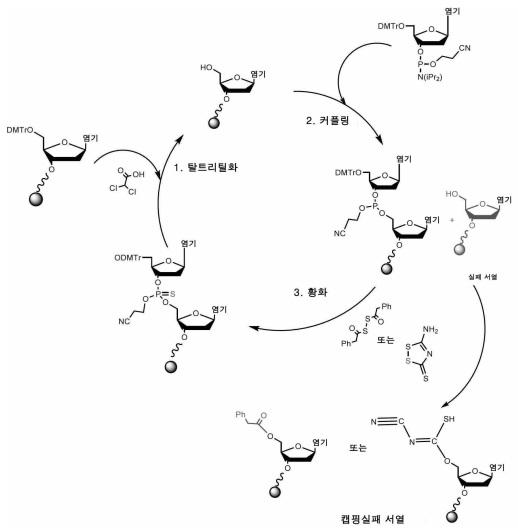
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 **캡핑 단계 없이 티올화된 올리고뉴클레오타이드의 합성**

(57) 요 약

본 발명은 황화제가 미반응된 5'-OH기를 캡핑하므로, 캡핑 단계를 필요로 하지 않고 티올화된 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 합성 방법을 기재한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07H 21/02 (2013.01)
C07H 21/04 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 2310/11 (2013.01)
C12N 2310/341 (2013.01)
(72) 발명자
키스만, 윌리엄, 에프.
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 비니 스트리트 225 바이오젠 엠에이 인코포레이티드 내
피용, 야니크
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 비니 스트리트 225 바이오젠 엠에이 인코포레이티드 내

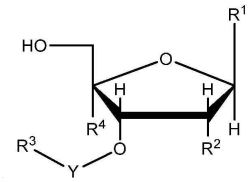
명 세 서

청구범위

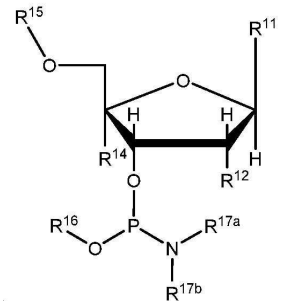
청구항 1

다음을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법:

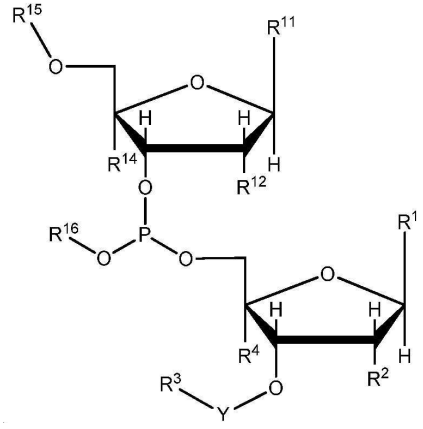
a) 다음 화학식 I의 화합물을 다음 화학식 II의 화합물과 반응시켜 다음 화학식 III의 화합물을 형성하는 단계:



(I),

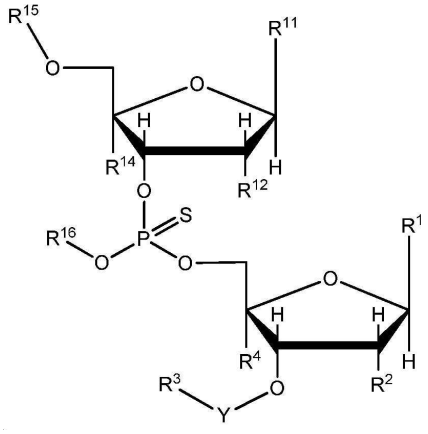


(II),



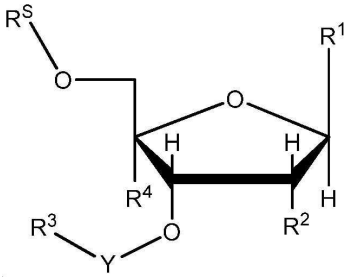
(III); 및

b) 상기 화학식 III의 화합물을 황화제로 황화시켜 다음 화학식 IV의 화합물을 형성하는 단계:



(IV),

및 화학식 I의 미반응된 화합물로부터 다음 화학식 V의 화합물을 형성하는 단계:



(V); 여기서

각각의 R^1 및 R^{11}은 독립적으로 핵염기이고, 여기서 상기 핵염기의 NH_2는, 존재한다면, 아민 보호기로 보호되고;

각각의 R^2 및 R^{12}는 독립적으로 H, 할로, 및 선택적으로 C_{1-6}알콕시로 치환된 C_{1-6}알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^3은 선택적으로 링커를 포함하는 고체 지지체이고;

Y는 부재, 뉴클레오타이드, 또는 2개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드이고;

각각의 R^4는 독립적으로 H이거나, R^2의 알콕시 그룹과 환을 형성하고;

각각의 R^{14}는 독립적으로 H이거나, R^{12}의 알콕시 그룹과 환을 형성하고;

R^{15}는 하이드록시 보호기이고;

R^{16}은 -CN에 의해 선택적으로 치환된 C_{1-6}알킬이고;

R^{17a} 및 R^{17b}는 독립적으로 C_{1-6}알킬이고;

R^S는 황화제의 부산물로부터 형성된 하이드록시 보호기이고;

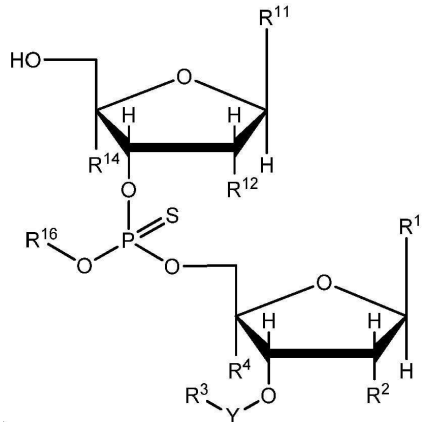
여기서, 황화제는 화학식 I의 미반응된 화합물을 화학식 V의 화합물로 실질적으로 완전히 전환시키고, 화학식 III의 화합물을 화학식 IV의 화합물로 전환시키기에 충분한 시간 동안 반응되고;

여기서, 충분한 양의 황화제는 화학식 I의 미반응된 화합물을 화학식 V의 화합물로 실질적으로 완전히 전환시키고, 화학식 III의 화합물을 화학식 IV의 화합물로 전환시키기 위해 첨가되고;

여기서, 화학식 I, II, III, IV 및 V의 화합물은 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 염의 형태이다.

청구항 2

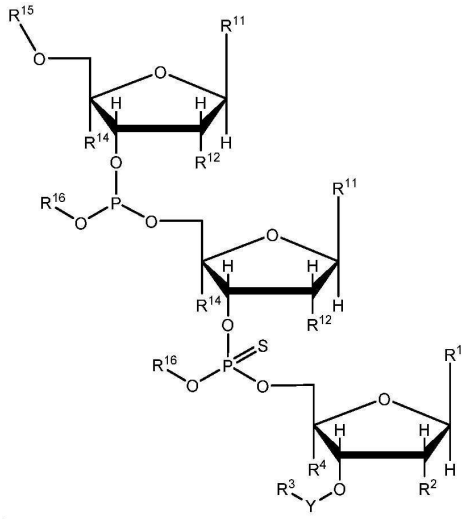
청구항 1에 있어서, c) 화학식 IV의 화합물을 탈보호시켜 다음 화학식 VI의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법:



(VI), 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

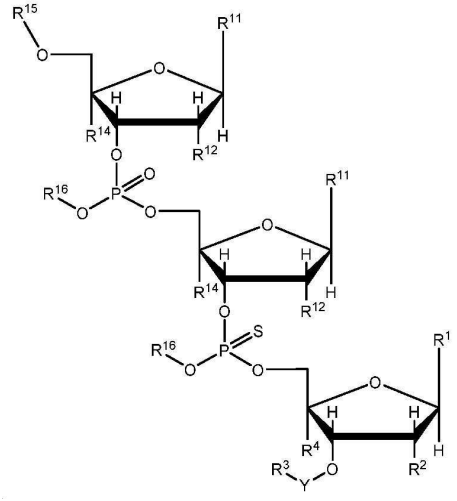
청구항 3

청구항 2에 있어서, d) 화학식 VI의 화합물을 화학식 II의 화합물과 반응시켜 다음 화학식 VII의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 화합물:



(VII) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및

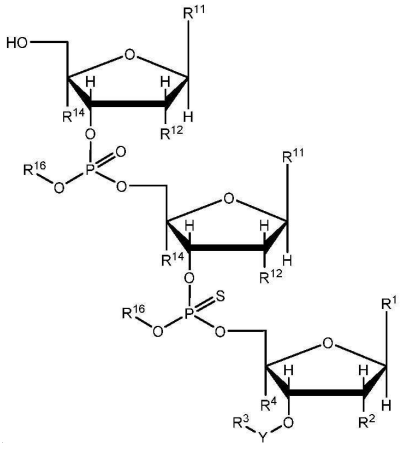
e) 화학식 VII의 화합물을 산화제로 산화시켜 다음 화학식 VIII의 화합물을 형성하는 단계:



(VIII).

청구항 4

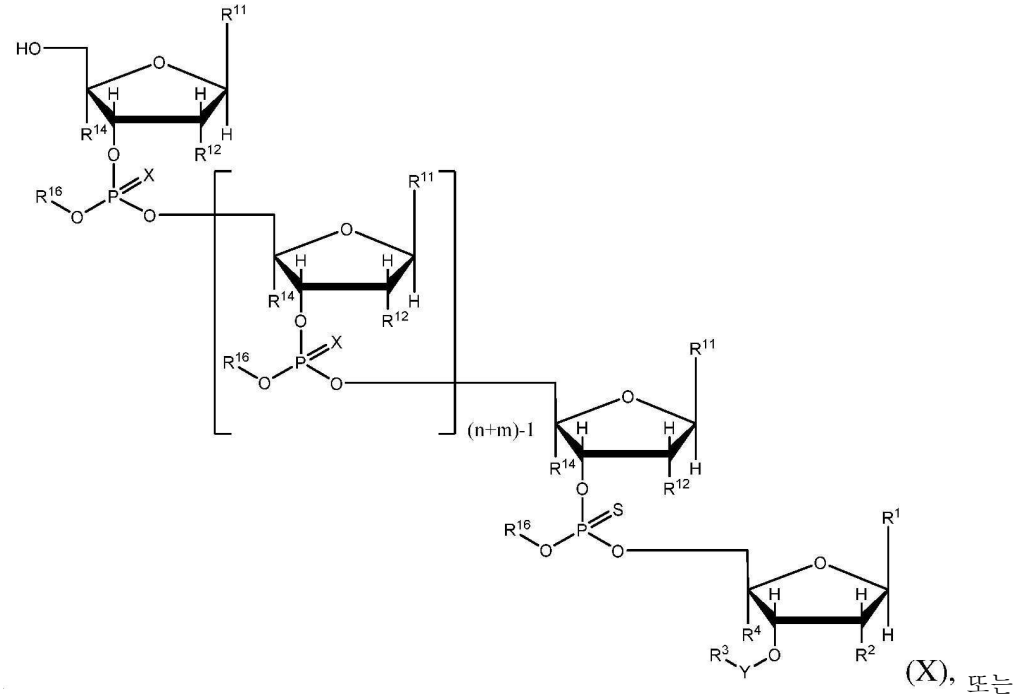
청구항 3에 있어서, f) 화학식 VIII의 화합물을 탈보호시켜 다음 화학식 IX의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법:



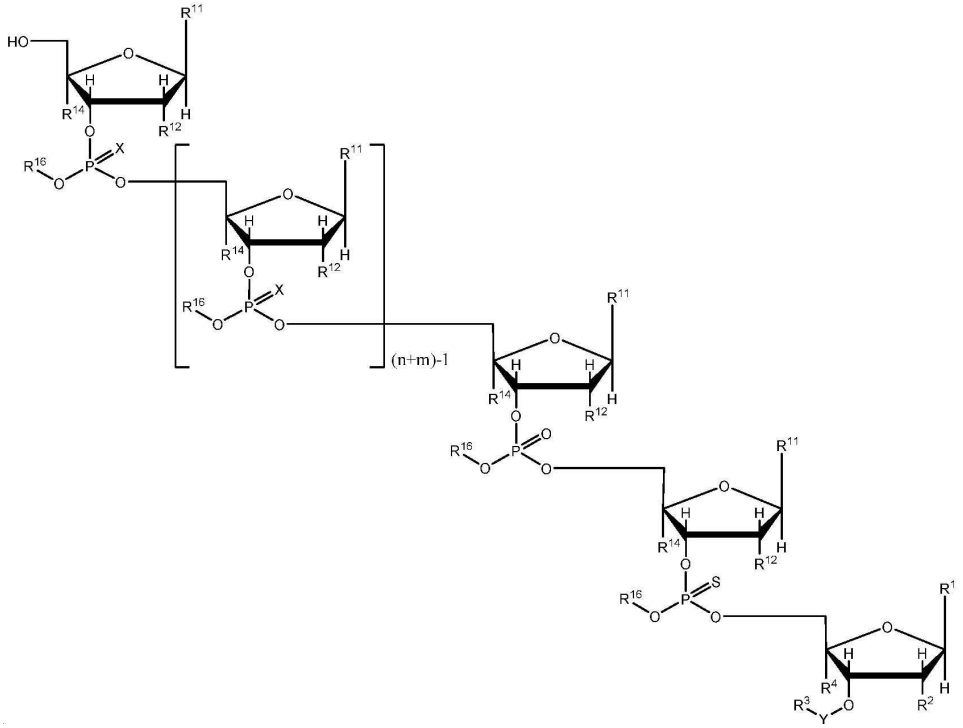
(IX), 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

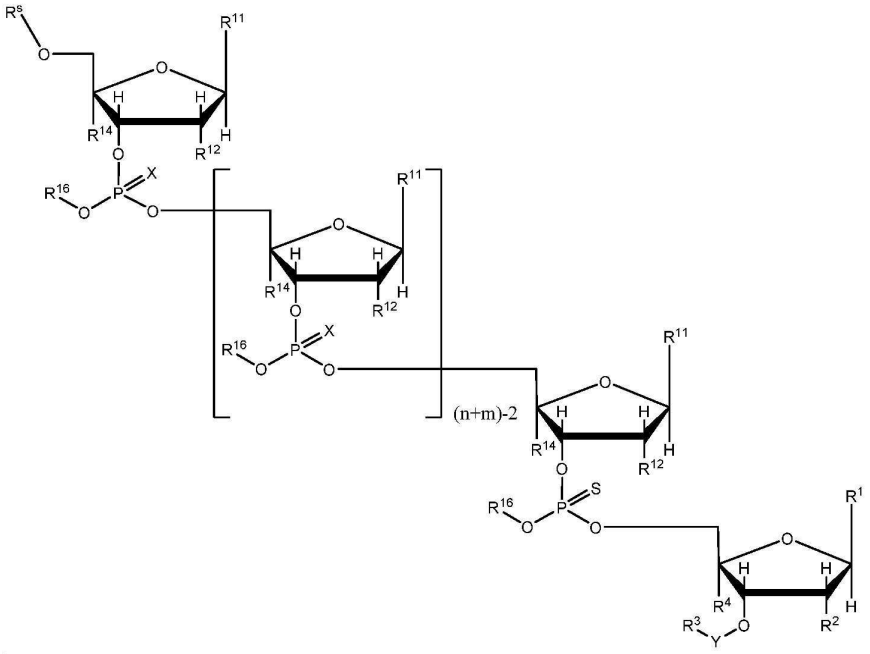
청구항 2 또는 4에 있어서, 상기 화학식 VI의 화합물 또는 상기 화학식 IX의 화합물로 출발하여, 단계 a), b), 및 c)를 n회 반복하고, 단계 d), e), 및 f)를 m회 반복하여 다음 화학식 X 또는 XI의 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 이때 단계 a), b), 및 c) 및 단계 d), e) 및 f)의 반복은 서로에 대해 임의의 순서로 발생하고, n은 적어도 1이고, m은 0, 1, 2, 3, 또는 4인, 방법:



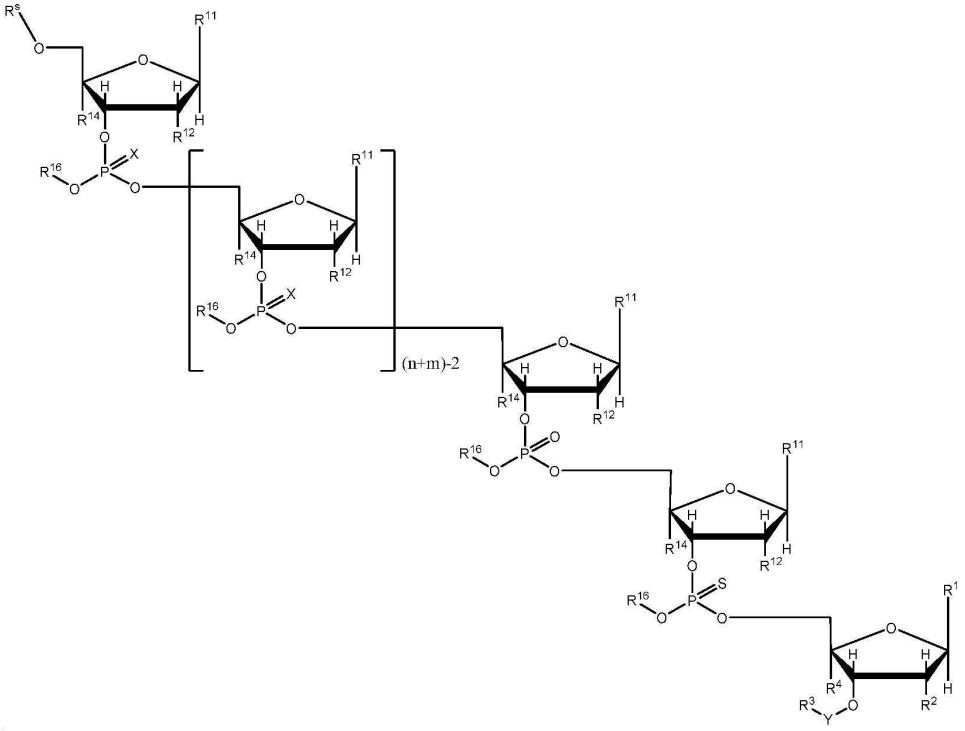
(X), 또는



(XI) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 단계 a, b, 및 c, 또는 단계 d, e, 및 f의 각각의 반복은 과량의 황화제 또는 황화 단계 후 황화제의 부산물과 반응하여 다음 화학식 XII 또는 XIII의 화합물을 형성하는 화학식 VI 또는 IX의 일부 미반응된 화합물을 초래하고:



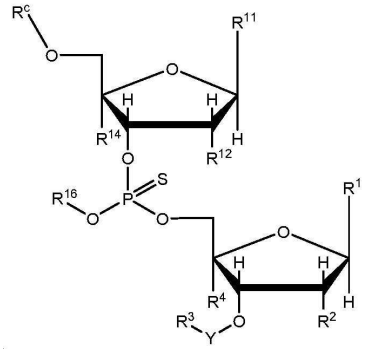
(XII), 또는



(XIII); 여기서, 각각의 X는 독립적으로 S 또는 O로부터 선택되고, 단, X는 화학식 X, XI, XII 또는 XIII의 화합물에서 단지 4, 3, 2, 1 또는 0회 O이다.

청구항 6

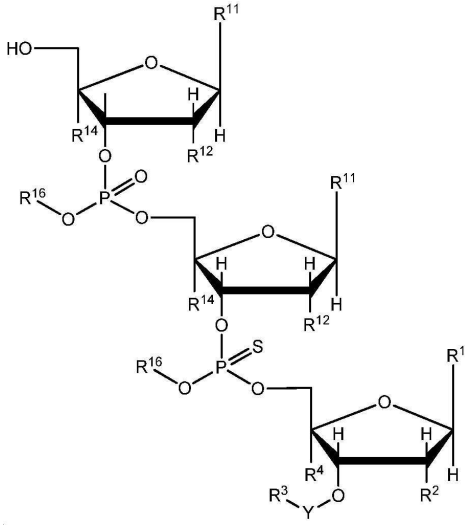
청구항 3에 있어서, g) 화학식 VI의 미반응된 화합물을 캡핑제와 반응시켜 다음 화학식 XIV의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 화합물:



(XIV), 여기서 R^c는 캡핑제로부터 형성된 하이드록시 보호기이다.

청구항 7

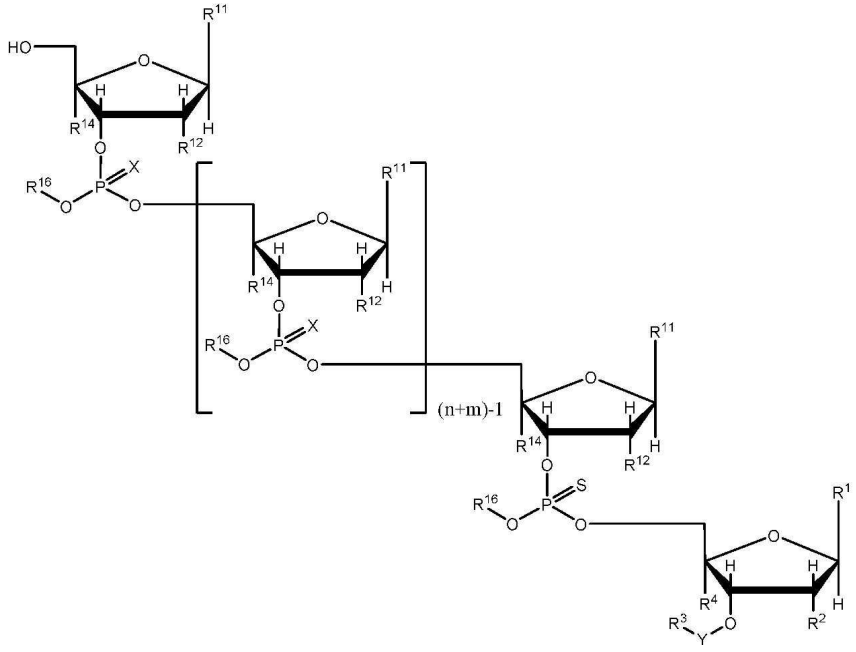
청구항 6에 있어서, h) 화학식 VIII의 화합물을 탈보호시켜 다음 화학식 IX의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법:



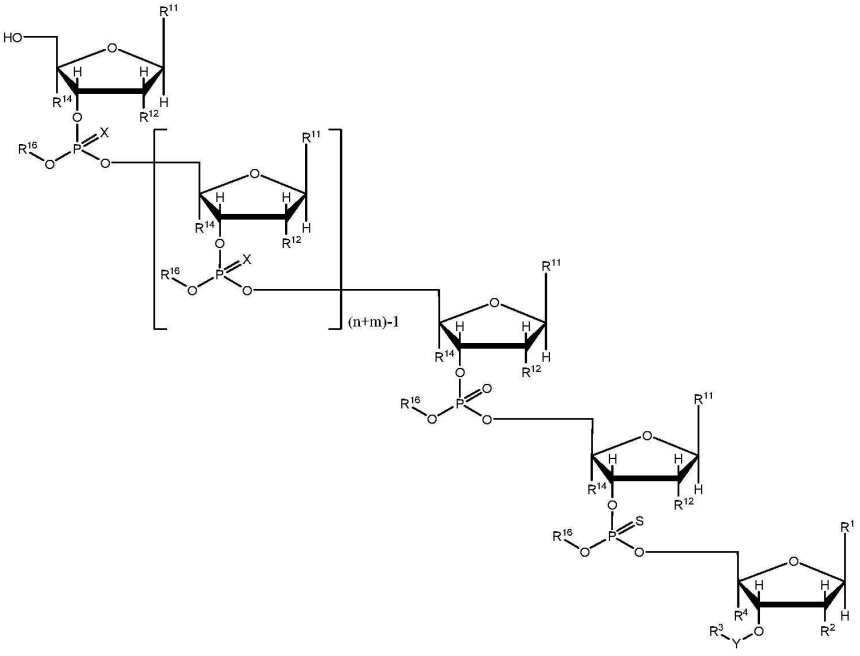
(IX).

청구항 8

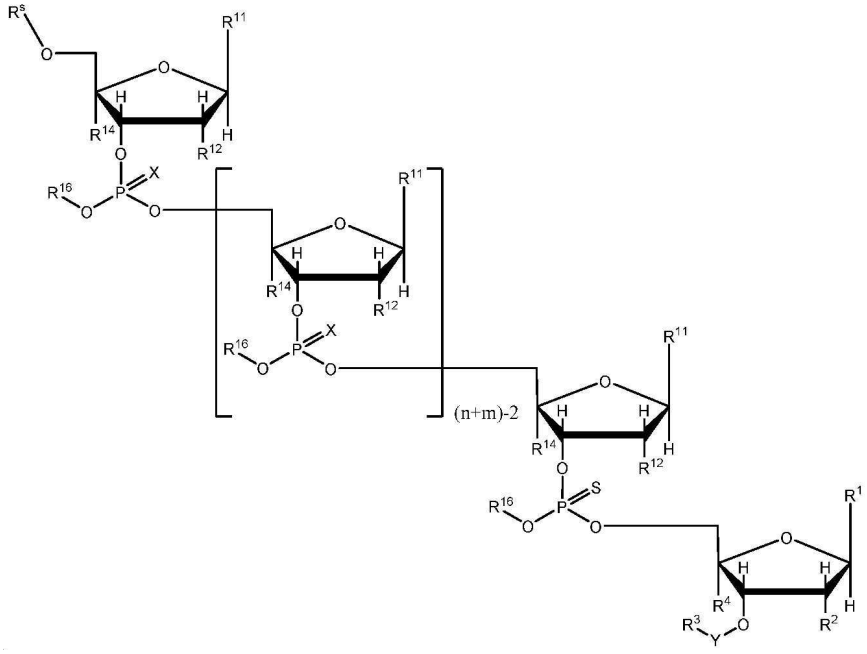
청구항 7에 있어서, 상기 화학식 VI의 화합물 또는 상기 화학식 IX의 화합물로 출발하여, 단계 a), b), 및 c)를 n회 반복하고, 단계 d), e), g) 및 h)를 m회 반복하여 다음 화학식 X 또는 XVII의 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 이때 단계 a), b), 및 c) 및 단계 d), e), g) 및 h)의 반복은 서로에 대해 임의의 순서로 발생할 수 있고, n은 적어도 1이고, m은 0 이상인, 방법:



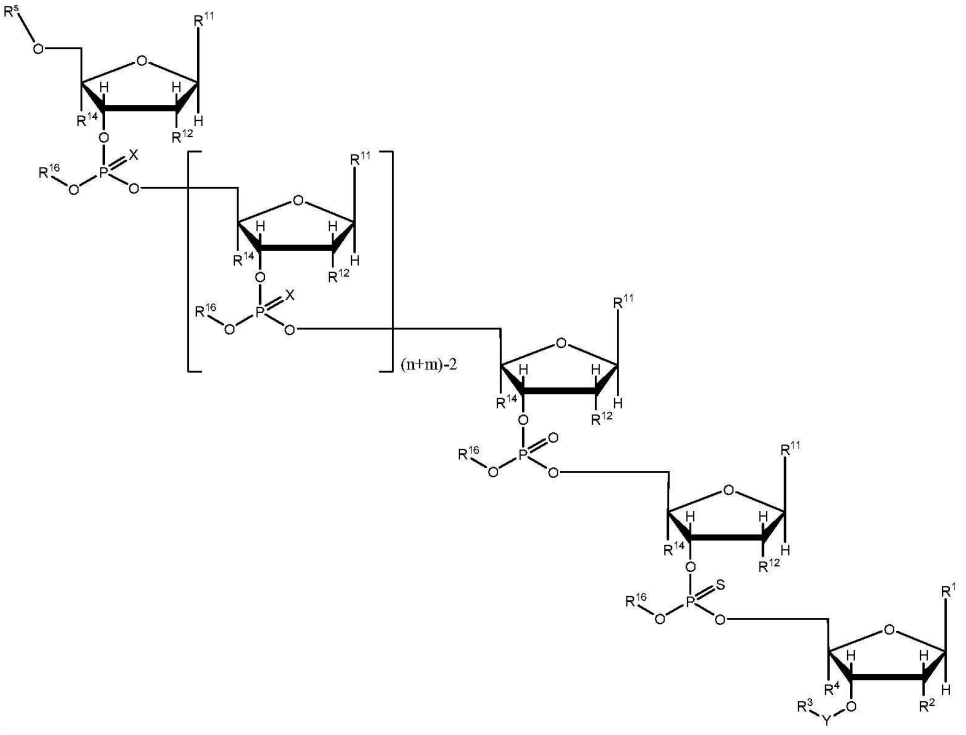
(X), 또는



(XI) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 단계 a, b, 및 c, 또는 단계 d, e, 및 f의 각각의 반복은 과량의 황화제 또는 황화 단계 후 황화제의 부산물과 반응하여 다음 화학식 XII 또는 XIII의 화합물을 형성하는 화학식 VI 또는 IX의 일부 미반응된 화합물을 초래하고:



(XII), 또는



(XIII);

여기서 각각의 X는 S 또는 O로부터 독립적으로 선택된다.

청구항 9

청구항 5 또는 8에 있어서, n이 2 내지 1000인, 방법.

청구항 10

청구항 5 또는 8에 있어서, n이 2 내지 500인, 방법.

청구항 11

청구항 5 또는 8에 있어서, n이 2 내지 100인, 방법.

청구항 12

청구항 5 또는 8에 있어서, n이 2 내지 50인, 방법.

청구항 13

청구항 5 또는 8에 있어서, n이 2 내지 25, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고체 지지체에 부착된 링커가 절단되는, 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온 (XH 또는 ADTT)이고, R^S가 -C(SH)(=N)-CN인, 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가 페닐아세틸 디설파이드(PADS)이고, R^S가 $-C(=O)CH_2C_6H_5$인, 방법.

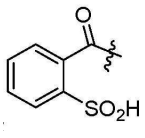
청구항 17

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가 3-(디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸(DDTT)이고, R^S가 $-C(=S)NHC(=S)N=CHN(CH_3)_2$인, 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드(뷰케이지 시약)인, 방법.

청구항 19

청구항 14에 있어서, R^S가  인, 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가, 황화제를 0 내지 30분 동안 재순환시킴으로써 반응

되는, 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가 적어도 0-20회 재순환되는, 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가 1 내지 20회, 1 내지 10회, 또는 1 내지 5회 재순환되는, 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화제가, 링커 또는 제1 뉴클레오타이드가 고체 지지체에 직접 부착되는 경우, 제1 뉴클레오타이드에 대해 3 내지 6당량의 황화제를 재순환시킴으로써 반응되는, 방법.

청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화 시약의 농도가 0.02 M 내지 2.0 M인, 방법.

청구항 25

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화 시약의 농도가 0.05 M 내지 0.5 M인, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 황화 시약이 0.02 M 내지 0.1 M의 농도로 첨가된 3-(디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸 (DDTT)인, 방법.

청구항 27

청구항 1 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵염기가 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민, 우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 7-메틸구아닌, 5,6-디하이드로우라실, 5-메틸시토신, 및 5-하이드록시메틸시토신으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 핵염기의 NH_2 그룹은, 존재한다면, PhCO-, CH_3CO-, *i*PrCO-, Me_2N-CH=, 또는 Me_2N-CMe=로 보호되는, 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵염기가 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민, 우라실, 및 5-메틸시토신으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 핵염기의 NH_2 그룹은, 존재한다면, PhCO-, CH_3CO-, *i*PrCO-, Me_2N-CH=, 또는 Me_2N-CMe=로 보호되는, 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 다음과 같은, 방법:

각각의 R^{2} 및 R^{12}가 H, F, 및 선택적으로 C_{1-4}알콕시로 치환된 C_{1-4}알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

각각의 R^{4}가 독립적으로 H이거나, R^{2}의 알콕시 그룹과 환을 형성하고, 여기서 상기 환은 선택적으로 1 내지 3개의 C_{1-4} 알킬 그룹으로 치환된 5원 또는 6원 환이고;

R^{16}이 $-CH_2CH_2CN$이고;

R^{17a} 및 R^{17b}가 독립적으로 C_{1-4}알킬이고;

각각의 R^{14}가 독립적으로 H이거나, R^{12}의 알콕시 그룹과 환을 형성하고, 여기서 상기 환은 선택적으로 1 내지 3개의 C_{1-4} 알킬 그룹으로 치환된 5원 또는 6원 환이다;

청구항 30

청구항 1 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 다음과 같은, 방법: 각각의 R^{2} 및 R^{12} 가 H 또는 선택적으로 C_{1-4}알콕시로 치환된 C_{1-4}알콕시로부터 독립적으로 선택되고;

R^{15}가 4,4'-디메톡시트리틸이고;

R^{16}이 $-CH_2CH_2CN$이고;

R^{17a} 및 R^{17b}가 독립적으로 C_{1-6}알킬이고;

R^{S}가 $-C(=N)(SH)-CN$ 또는 $-C(=O)CH_2C_6H_5$이다.

청구항 31

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, Y가 부재인, 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, Y가 단일 뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 33

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, Y가 2 내지 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 34

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, Y가 2 내지 40개의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, Y가 2 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 36

청구항 1 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, Y가 2 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 37

청구항 1 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 X의 화합물이 2 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 안티-센스 올리고뉴클레오타이드인, 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서, 상기 안티-센스 올리고뉴클레오타이드가 변형된 RNA만을 포함하는, 방법.

청구항 39

청구항 37에 있어서, 상기 안티-센스 올리고뉴클레오타이드가 DNA 및 변형된 RNA를 포함하는, 방법.

청구항 40

청구항 37에 있어서, 상기 안티-센스 올리고뉴클레오타이드가 갭머인, 방법.

청구항 41

청구항 37에 있어서, 상기 안티-센스 올리고뉴클레오타이드가 DNA만을 포함하는, 방법.

청구항 42

청구항 37에 있어서, 상기 안티-센스 올리고뉴클레오타이드의 서열이 서열번호:1과 같은, 방법.

청구항 43

청구항 37에 있어서, 상기 안티-센스 올리고뉴클레오타이드의 서열이 서열번호:2와 같은, 방법.

청구항 44

청구항 37에 있어서, 상기 안티-센스 올리고뉴클레오타이드의 서열이 서열번호:8과 같은, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본원은 35 U.S.C. §119(e) 하에 다음의 출원일의 이점을 주장한다: 미국가출원 제62/354,433호(2016년 6월 24일에 출원됨), 그 전체 내용은 이로써 참고로 편입된다.

[0003] **서열목록**

[0004] 본원은 ASCII 형식으로 전자 제출되고 이의 전문이 본원에 참고로 통합된 서열목록을 함유한다. 2017년 6월 20일에 생성된 상기 ASCII 카피는 123429-00220_SL.txt로서 칭명되고, 크기가 3,101 바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 올리고뉴클레오타이드는 연구 및 의료 목적을 위해 화학적으로 합성될 수 있는 짧은 DNA 또는 RNA 올리고머이다. 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 특이적 서열을 생성하기 위해 뉴클레오타이드 잔기의 단계적 첨가에 의해 제조된다. 티올화된 올리고뉴클레오타이드의 현재 고체상 합성 제조 공정은 사이클당 4-반응, 즉 탈보호 *(예를 들어*, 탈트리틸화), 커플링, 황화, 및 캡핑의 반복을 사용한다. 캡핑 단계는 각각의 사이클에서 포스포르아미다이트와 결합하지 못한 임의의 미반응된 5'-하이드록실 그룹을 차단하도록 설계되었고, 따라서 실패 서열은 실패된 커플링의 뉴클레오사이드를 누락시키는 불순물을 생성하기 위해 후속 사이클에서 커플링 반응에 더 이상 참여하지 않는다. 캡핑 단계는 전형적으로 염기 촉매, 예를 들어, 피리딘 또는 N-메틸 모르폴린과 함께 아세트산 무수물을 사용하여 수행된다.

[0006] 성장하는 올리고머에 각각의 뉴클레오타이드를 첨가하기 위해 4개 단계 각각을 완료할 필요가 있기 때문에, 단계의 수를 감소시키면 각 뉴클레오타이드 첨가에 필요한 시간의 양을 줄이고, 또한 올리고뉴클레오타이드 합성을 완료하는 데 필요한 시약의 양을 감소시킬 것이다. 따라서, 올리고뉴클레오타이드를 제조하기 위한 신규한 합성 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 사이클당 종래의 4-반응보다는 사이클당 3-반응, 즉 탈트리틸화, 커플링, 및 황화의 반복을 사용하여 완전히 또는 부분적으로 티올화된 올리고뉴클레오타이드에 대한 고체상 합성 제조 공정을 기재한다.

[0008] 전형적으로, 뉴클레오타이드는 고체 지지체에 부착된 올리고머의 마지막 뉴클레오타이드의 유리 5'-하이드록실을 적절한 포스포르아미다이트와 결합시킴으로써 성장하는 올리고머 쇄에 첨가된다. 커플링 반응의 비효율성은 5'-하이드록실 그룹 중 일부가 후속 커플링 반응에서 자유롭게 반응하여 올리고머의 복잡한 혼합물이 단일의, 그러나 무작위 뉴클레오타이드를 갖지 않게 한다. 따라서, 미반응된 5'-하이드록실이 나중에 반응하는 것을 방지하기 위해, 5'-하이드록실은 황화 단계 이전 또는 이후에 아세트산 무수물과 같은 캡핑 시약의 사용을 통해 캡핑된다.

[0009] 놀랍게도, 본 발명자들은 황화 단계 이전 또는 이후에 캡핑 단계를 제거하는 공정을 개발했다. 특히, 미반응된 5'-하이드록실 그룹을 공정에 새로 도입될 필요가 있는 시약, 예를 들어, 아세트산무수물로 캡핑하기 보다, 본 발명자들은 놀랍게도 황화 단계 동안 생성된 부산물이 미반응된 5'-하이드록시 그룹을 캡핑하는 데 사용될 수 있음을 밝혀냈다. 이들 부산물 또는 특정 경우에, 황화제 자체, 예를 들어, PADS는 포스포르아미다이트와 커플링되지 않은 5'-하이드록시 그룹을 캡핑하기 위해 고체 지지체를 교차하여 재순환시킬 수 있다. 미반응된 5' 하이드록실 그룹은 별도의 캡핑 단계의 필요 없이 황화 부산물과 반응하고, 후속 사이클에서 커플링하는데 더 이상 이용 가능하지 않다.

[0010] 완전히 티올화된 올리고뉴클레오타이드(*즉*, 포스포티올레이트 (-P=S) 결합 만을 포함하는 올리고뉴클레오타이드)의 경우, 캡핑 단계가 전혀 필요하지 않고, 공정은 사이클당 3개의 반응(탈보호, 커플링, 및 황화) 만을 포함한다.

[0011] 본원에 기재된 공정은 또한 포스포티올레이트 (-P=S) 및 포스포디에스테르 (-P=O) 결합을 모두 포함하는 부분적으로 티올화된 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 데 사용될 수 있다. 부분적으로 티올화된 올리고뉴클레오타이드는 종래에 4-반응 단계 사이클로 제조되고, 사이클 중 제3 단계는 -P=O 또는 -P=S 결합이 목적시 되는 지의 여부에 따라 산화 또는 황화이다. 본원에 기재된 공정의 용도는 황화 단계 후 캡핑 단계를 제거하는 데 사용될 수 있다. 그러나, 산화 단계의 부산물이 미반응된 5'-하이드록시를 캡핑하지 않기 때문에, 미반응된 5'-하이드록실 그룹의 잔존량은 산화 단계 후 잔류할 수 있다. 그러나, 소수, 예를 들어, 4개 이하의 -P=O 결합을 포함하는 부분적으로 티올화된 올리고뉴클레오타이드의 경우, 본원에 기재된 공정은 산화 단계 후 캡핑 단계 없이도 사용될 수 있다. 다수, 예를 들어, 5개 이상의 -P=O 결합을 포함하는 부분적으로 티올화된 올리고뉴클레오타이

드의 경우, 본원에 기재된 공정이 사용될 수 있지만, 예를 들어, 아세트산 무수물을 사용하는 종래의 캡핑 단계가 각각의 산화 단계 후에 사용될 수 있다. 그러나, 캡핑 단계는 얼마나 많은 -P=O 결합이 존재하는 지와 관계없이 황화 단계 후에 여전히 필요하지 않다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 3-단계 올리고뉴클레오타이드 합성 방법의 다이어그램이다.

도 2는 종래의 4-단계 올리고뉴클레오타이드 합성 방법의 다이어그램이다. 황화 단계는 종래의 사이클당 4-반응 공정에서 캡핑 단계 전 또는 후에 수행될 수 있음이 주시된다.

도 3은 PADS를 사용하는 4-반응-사이클(상부); PADS를 사용하는 3-반응-사이클(중간); 및 크산탄 하이드라이드를 사용하는 3-반응-사이클(하단)에 대한 질량 분석법에 의한 순도를 비교하는 크로마토그램이다.

도4 및 도5는 황화제로서 PADS를 사용하는 4-반응-사이클 공정 (하단) 및 3-반응-사이클 공정 (상단)에 의해 제조된 BIIB078을 비교하는 RPIP HPLC 크로마토그램이다.

도6 및 도7은 황화제로서 PADS를 사용하는 4-반응-사이클 공정 (하단) 및 3-반응-사이클 공정 (상단)에 의해 제조된 BIIB078을 비교하는 질량 분석법 크로마토그램이다.

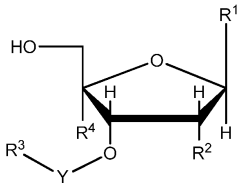
도 8은 BuOH, $P(OMe)_3$ 및 PADS의 반응 혼합물에 대한 경시적인 ^1H NMR 스펙트럼을 도시하고, 여기서 PADS는 아세토니트릴-*d3*. 중의 3-피콜린으로 숙성시켰다.

도 9는 BuOH, $P(OMe)_3$ 및 PADS의 반응 혼합물에 대한 경시적인 ^1H NMR 스펙트럼을 도시하고, 여기서 PADS는 아세토니트릴-*d3*. 중의 N-메틸 이미다졸로 숙성시켰다.

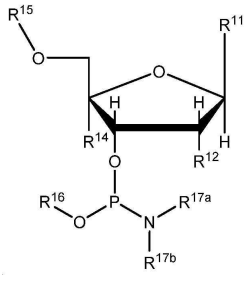
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 제1 구현예는 다음을 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법이다:

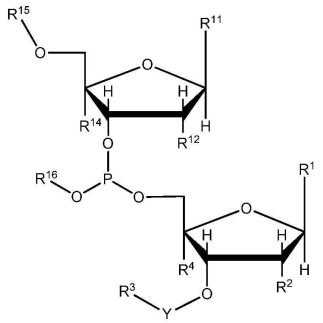
[0014] a) 다음 화학식 I의 화합물을 반응시키는 단계:



[0015] (I), 다음 화학식 II의 화합물과:

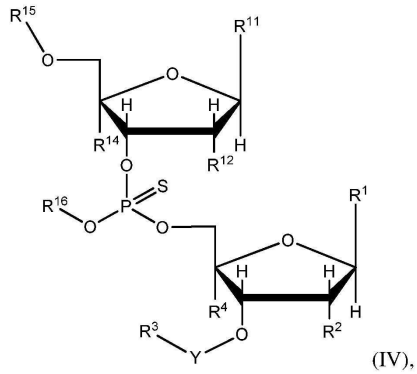


[0016] (II), 다음 화학식 III의 화합물을 형성하기 위해,

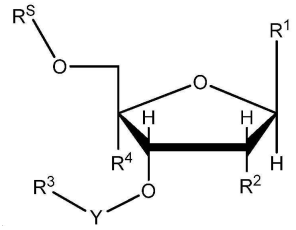


[0017] (III); 및

[0018] b) 화학식 III의 화합물을 황화제로 황화시켜 다음 화학식 IV의 화합물을 형성하는 단계:

[0019]  (IV),

[0020] 및 화학식 I의 미반응된 화합물로부터 다음 화학식 V의 화합물을 형성하는 단계:

[0021]  (V); 여기서,

[0022] 각각의 R^1 및 R^{11}은 독립적으로 핵염기이고, 여기서 상기 핵염기의 NH_2는, 존재한다면, 아민 보호기로 보호되고;

[0023] 각각의 R^2 및 R^{12}는 독립적으로 H, 할로, 및 선택적으로 C_{1-6}알콕시로 치환된 C_{1-6}알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0024] R^3은 선택적으로 링커를 포함하는 고체 지지체이고;

[0025] Y는 부재, 뉴클레오타이드, 또는 2개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드이고;

[0026] 각각의 R^4는 독립적으로 H이거나, R^2의 알콕시 그룹과 환을 형성하고;

[0027] 각각의 R^{14}는 독립적으로 H이거나, R^{12}의 알콕시 그룹과 환을 형성하고;

[0028] R^{15}는 하이드록시 보호기이고;

[0029] R^{16}은 -CN에 의해 선택적으로 치환된 C_{1-6}알킬이고;

[0030] R^{17a} 및 R^{17b}는 독립적으로 C_{1-6}알킬이고;

[0031] R^S는 황화제의 부산물로부터 형성된 하이드록시 보호기이고;

[0032] 여기서, 황화제는 화학식 I의 미반응된 화합물을 화학식 V의 화합물로 실질적으로 완전히 전환시키고, 화학식 III의 화합물을 화학식 IV의 화합물로 전환시키기에 충분한 시간 동안 반응되고;

[0033] 여기서, 충분한 양의 황화제는 화학식 I의 미반응된 화합물을 화학식 V의 화합물로 실질적으로 완전히 전환시키고, 화학식 III의 화합물을 화학식 IV의 화합물로 전환시키기 위해 첨가되고;

[0034] 여기서, 화학식 I, II, III, IV 및 V의 화합물은 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 염의 형태이다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "충분한 시간"은 반응 조건을 기반으로 하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 제13 구현예에서 제공된 시간, 즉 0 내지 30분, 예를 들어, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30분이 "충분한 시간"이다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 완전히 전환시키기 위해"는 반응 조건을 기반으로 하여 당업자에

의해 결정될 수 있다. 특히, 실질적으로 완전히 전환시키는 것은 화학식 I의 미반응된 화합물의 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%를 화학식 V의 화합물로 또는 화학식 III의 화합물을 화학식 IV의 화합물로 전환시킴을 의미한다.

[0037] 제1 구현예의 일부 양태에서, 공정은 단계 b 이후 추가의 캡핑 단계를 포함하지 않는다. 구체적으로, 화학식 I, VI 또는 IX의 임의의 미반응된 화합물은 화학식 I, VI 또는 IX의 임의의 미반응된 화합물을 캡핑하기 위해 임의의 다른 시약을 첨가할 필요 없이 황화 단계 b의 부산물에 의해 캡핑된다.

[0038] 제1 구현예의 특정 양태에서,

[0039] R^{11}은 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민 (또는 5-메틸 우라실), 우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 7-메틸구아닌, 5,6-디하이드로우라실, 5-메틸시토신, 및 5-하이드록시메틸시토신으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 핵염기의 NH_2 그룹은, 존재한다면, PhCO-, CH_3CO-, *i*PrCO-, Me_2N-CH=, 또는 Me_2N-CMe=로 보호된다.

[0040] R^{12}는 H, 할로, C_{1-4}알콕시, 및 C_{1-4}알콕시C_{1-4}알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0041] 각각의 R^{14}는 독립적으로 H이거나, R^{12}의 알콕시 그룹과 함께 5원 또는 6원 환을 형성하고;

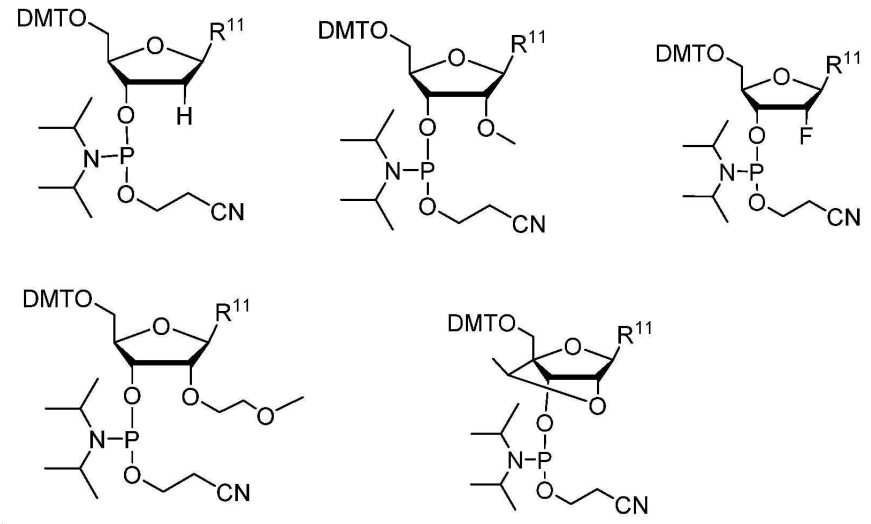
[0042] R^{15}는 4,4'-디메톡시트리틸, [비스-(4-메톡시페닐)페닐메틸] (DMT) 또는 트리틸 (트리페닐메틸, Tr)로부터 선택된 하이드록시 보호기이다.

[0043] R^{16}은 -CN으로 치환된 C_{1-4}알킬이고;

[0044] R^{17a} 및 R^{17b}는 독립적으로 C_{1-4}알킬이다.

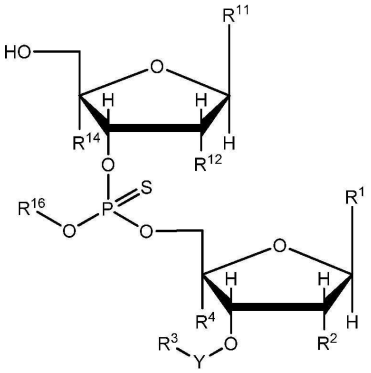
[0045] 특정 구현예에서,

[0046] 제1 구현예의 특정 양태에서, 화학식 II는 하기 구조식 중 어느 하나로부터 선택된다:

[0047] 

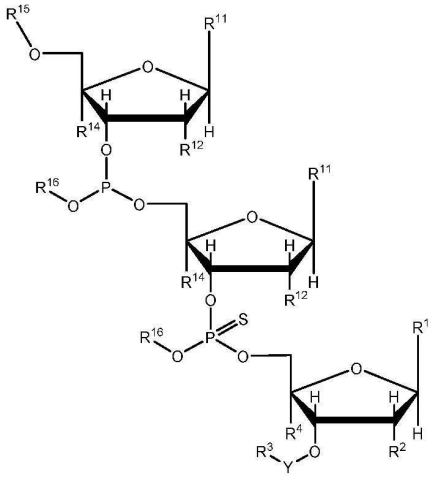
[0048] 여기서, DMTO는 4,4'-디메톡시트리틸 보호된 5'-하이드록시이고, R^{11}은 제1 구현예에 대해 정의된 바와 같다.

[0049] 본 발명의 제2 구현예는 c) 화학식 IV의 화합물을 탈보호시켜 다음 화학식 VI의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 제1 구현예 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같은 공정이다:



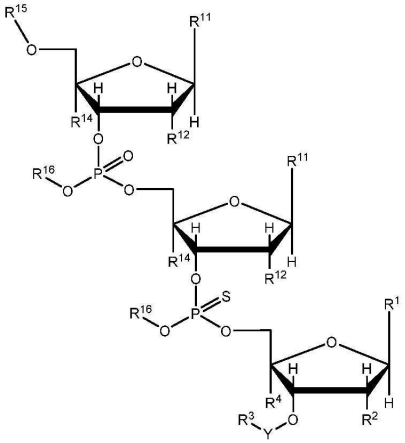
[0050] (VI), 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

[0051] 본 발명의 제3 구현예는 d) 화학식 VI의 화합물을 화학식 II의 화합물과 반응시켜 다음 화학식 VII의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 제2 구현예에 대해 기재된 바와 같은 공정이다:



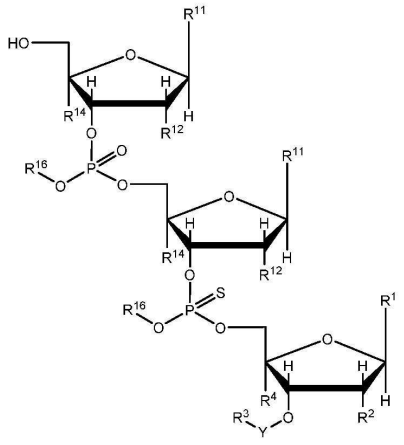
[0052] (VII) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염; 및

[0053] e) 화학식 VII의 화합물을 산화제로 산화시켜 다음 화학식 VIII의 화합물을 형성하는 단계:

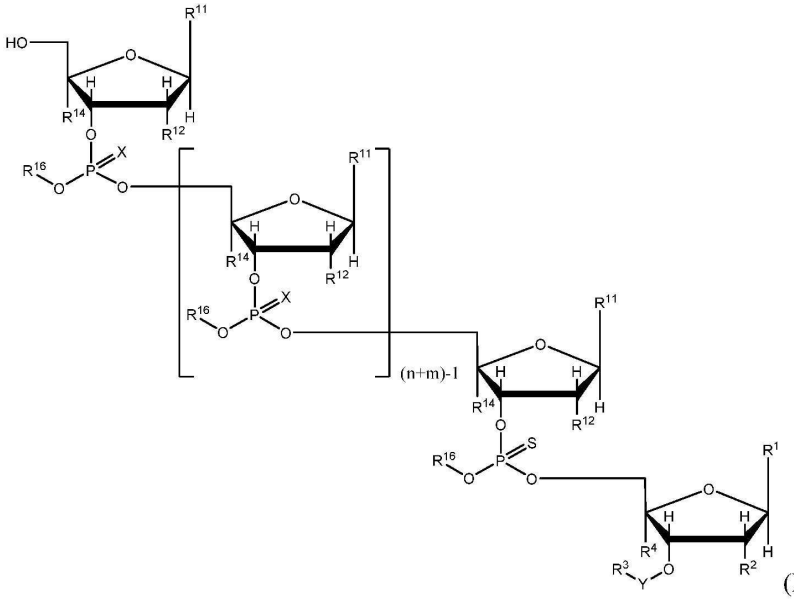


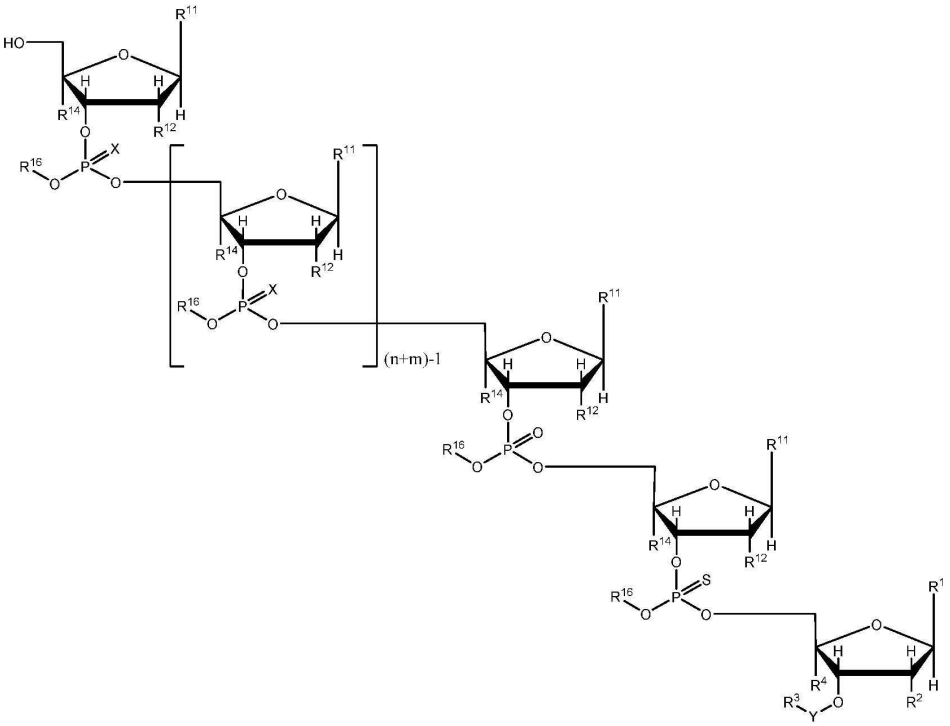
[0054] (VIII).

[0055] 본 발명의 제4 구현예는 f) 화학식 VIII의 화합물을 탈보호시켜 다음 화학식 IX의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 제3 구현예에 대해 기재된 바와 같은 공정이다:

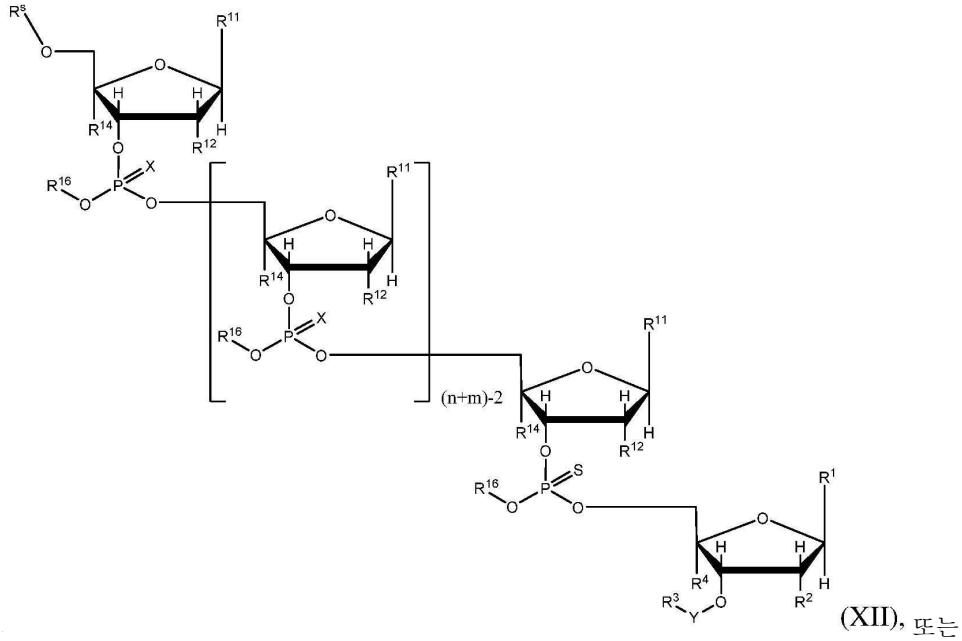
[0056]  (IX), 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

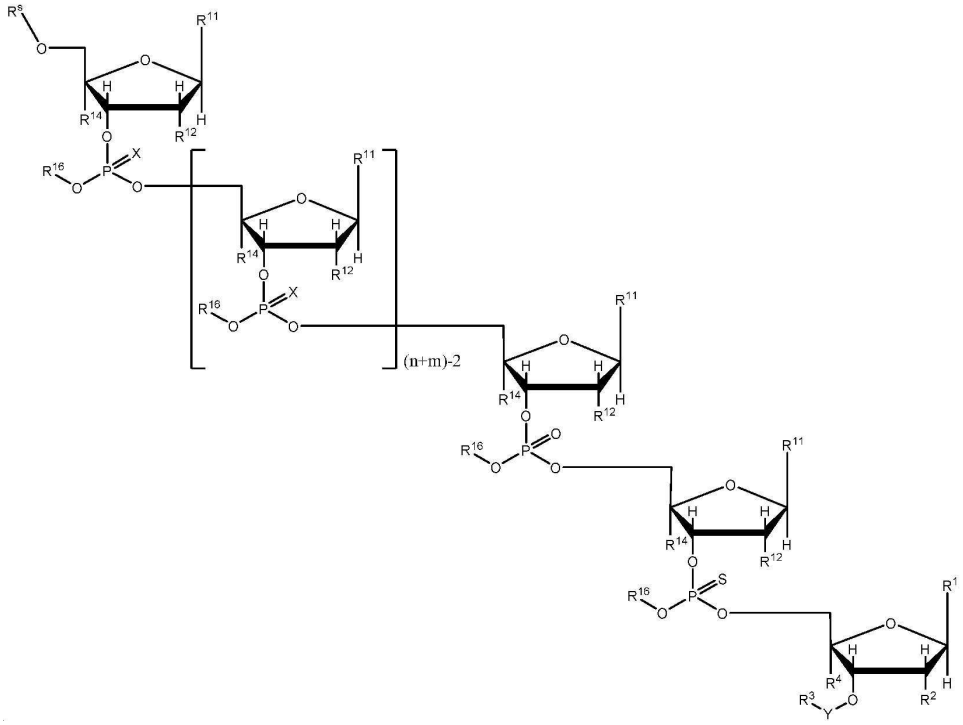
[0057] 본 발명의 제5 구현예는 화학식 VI의 화합물 또는 화학식 IX의 화합물로 출발하여, 단계 a), b) 및 c)를 n회 반복하고, 단계 d), e) 및 f)를 m회 반복하여 다음 화학식 X 또는 XI의 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 단계 a), b), 및 c) 및 단계 d), e) 및 f)의 반복은 서로에 대해 임의의 순서로 일어날 수 있고, n은 적어도 1 또는 그 이상이고, m은 0, 1, 2, 3, 또는 4인, 제2 및 제4 구현예에 대해 기재된 바와 같은 공정이고:

[0058] 
(X), 또는

[0059] 

[0060] (XI) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 단계 a, b, 및 c, 또는 단계 d, e, 및 f의 각각의 반복은 과량의 황화제 또는 황화 단계 후 황화제의 분산물과 반응하여 다음 화학식 XII 또는 XIII의 화합물을 형성하는 화학식 VI 및 IX의 일부 미반응된 화합물을 초래하고:

[0061] 
(XII), 또는

[0062] 

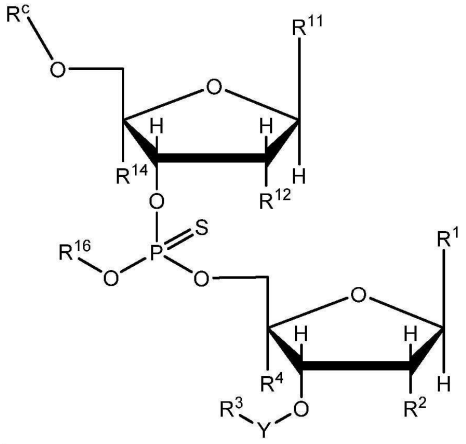
[0063] (XIII); 여기서, 각각의 X는 S 또는 O로부터 독립적으로 선택되고, 단, X는 화학식 X, XI, XII, 및 XIII에서 단지 4, 3, 2, 1 또는 0회 O이다. 특히, n은 1 내지 30, 5 내지 25, 또는 10 내지 15이고, m은 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.

[0064] 제5 구현예에 대해 상기 기재된 공정은 목적하는 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위해 뉴클레오타이드의 단계적인 첨가를 포함한다. 이들 단계 각각은 뉴클레오타이드를 성장하는 올리고뉴클레오타이드에 첨가하기 위한 3개 반응을 포함한다. 제1 단계(단계 a 및 d에 상응)에서, 뉴클레오사이드(예: 화학식 I의 화합물)의 5' 말단은 뉴클레오타이드(예: 화학식 II의 화합물)의 3' 말단에 커플링된다. 이들 2개의 새로 결합된 뉴클레오타이드 사이의 연결이 포스포티오에이트 (즉, 예를 들어, 화학식 IV에서와 같은 P=S 결합) 또는 포스포디에스테르 (즉, 예를 들어, 화학식 VIII에서와 같은 P=O 결합)인지의 여부에 따라, 올리고뉴클레오타이드는 각각 황화되거나(단계 b) 또는 산화된다(단계 e). 마지막으로, 다음 5'-하이드록시 그룹은 탈보호되고(단계 c 또는 f, 예를 들어, 화학식 VI 및 IX), 공정은 다음 뉴클레오사이드에 첨가하기 위해 반복한다. 상기에 기재된 바와 같이 "화학식 VI 및 IX의 일부 미반응된 화합물"은 커플링 단계 a) 또는 d)가 완전하더라고, 화학식 VI 및 IX의 일부 화합물

은 미반응된 채로 잔류하고, 후속 커플링 반응에 이용 가능하고, 이는 목적하는 올리고뉴클레오타이드에 비해 올리고뉴클레오타이드가 누락된 올리고뉴클레오타이드를 초래할 것이다. 목적하는 올리고뉴클레오타이드에 비해 단지 1개의 올리고뉴클레오타이드("N-1 불순물")를 누락하는 올리고뉴클레오타이드는 목적하는 올리고뉴클레오타이드로부터 분리하는 것이 어려울 수 있기 때문에, 미반응된 5-OH 하이드록시의 캡핑이 N-1 불순물의 형성을 방지하는 데 필요하다. "일부"란, 임의의 양이 고려되고, 예를 들어, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 0.5% 미만이 잔류할 수 있다.

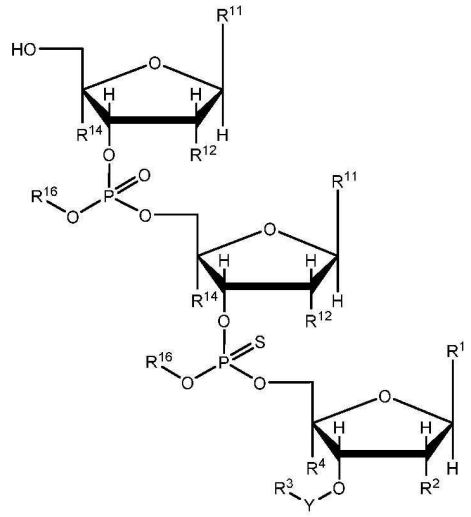
[0065] 따라서, 이 공정은 임의의 미반응된 5'-하이드록시 그룹이 황화제 자체 또는 두 뉴클레오사이드 사이의 연결에서 인원자와 황화제의 반응의 부산물과 반응하기 때문에 임의의 캡핑 단계를 전혀 필요로 하지 않고 임의의 수의 포스포티오에이트 결합 및 최대 4개의 포스포디에스테르를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 합성을 가능하게 한다. 이것은 임의의 미반응된 5'OH를 차단하는 캡핑 단계가 커플링 단계 후 수행되는 종래의 합성과 대조적이다.

[0066] 본 발명의 제6 구현예는 g) 화학식 VI의 미반응된 화합물을 캡핑제와 반응시켜 다음 화학식 XIV의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 제3 구현예에 대해 기재된 공정이다:



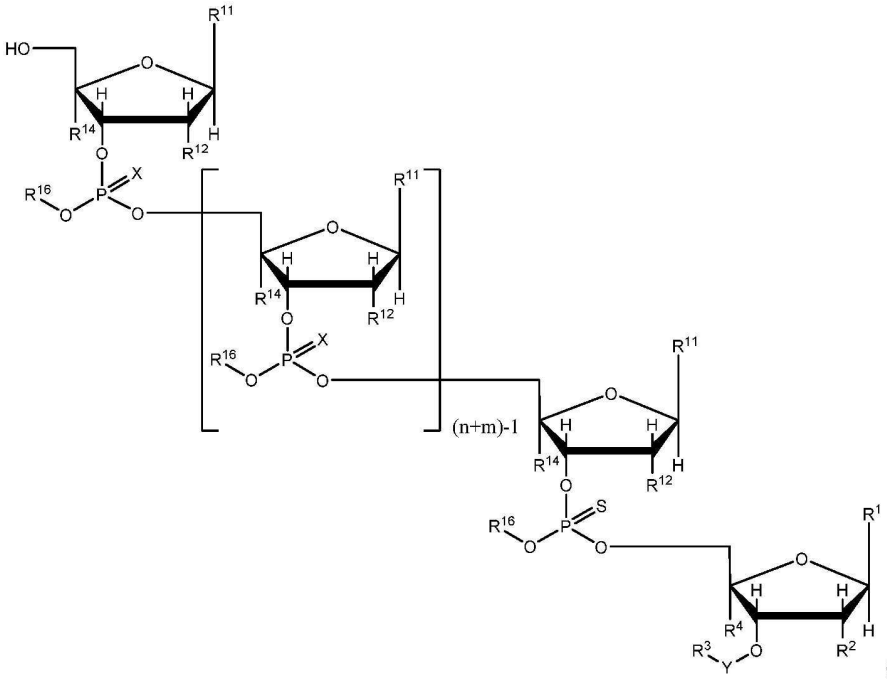
[0067] (XIV), 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 여기서 R^c는 캡핑제로부터 형성된 하이드록시 보호기이다. "캡핑제"는 당업자에게 공지된 임의의 캡핑제, 예를 들어, 염기 촉매, 예를 들어, 피리딘 또는 N-메틸 모르폴린을 갖는 아세트산 무수물일 수 있다.

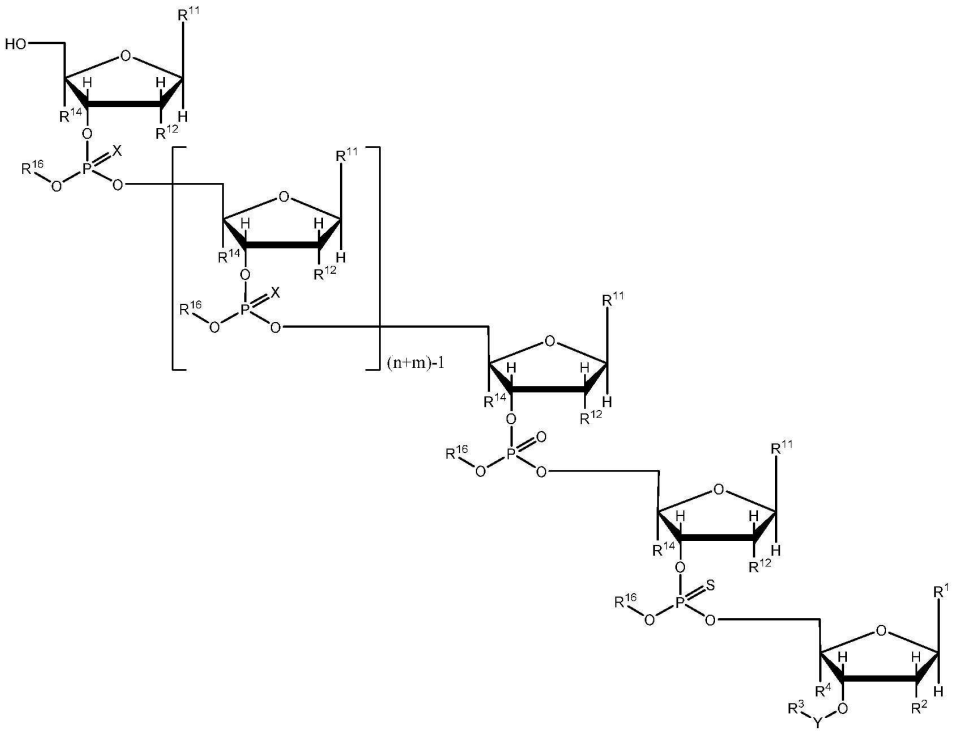
[0068] 본 발명의 제7 구현예는 h) 화학식 VIII의 화합물을 탈보호시켜 다음 화학식 XV의 화합물을 형성하는 단계를 추가로 포함하는, 제6 구현예에 대해 기재된 공정이다:



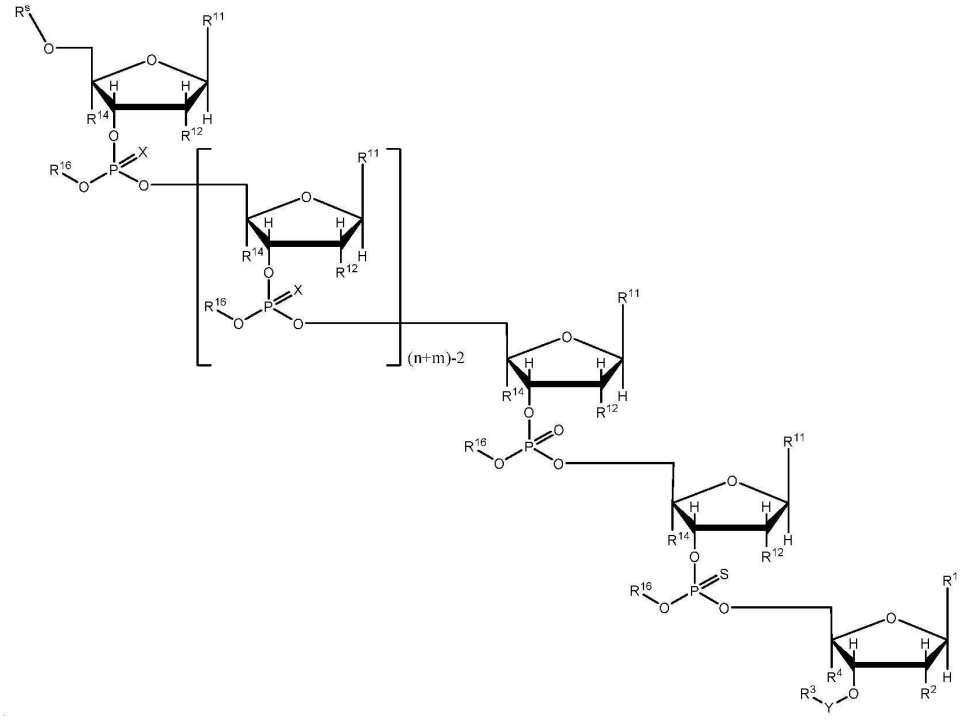
[0069] (XV), 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

[0070] 본 발명의 제8 구현예는, 화학식 VI의 화합물 또는 화학식 IX의 화합물로 출발하여, 단계 a), b), 및 c)를 n회 반복하고, 단계 d), e), g) 및 h)를 m회 반복하여 다음 화학식 X 또는 XVII의 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 단계 a), b), 및 c) 및 단계 d), e), g) 및 h)의 반복은 서로에 대해 임의의 순서로 발생할 수 있고, n은 적어도 1이고, m은 0 이상인, 제7 구현예에 대해 기재된 바와 같은 공정이다:

[0071] 
(X), 또는

[0072] 

[0073] (XI) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 단계 a, b, 및 c, 또는 단계 d, e, 및 f의 각각의 반복은 과량의 황화제 또는 황화 단계 후 황화제의 부산물과 반응하여 다음 화학식 XII 또는 XIII의 화합물을 형성하는 화학식 VI 및 IX의 일부 미반응된 화합물을 초래한다:_또는



[0074]

[0075] (XIII); 여기서 각각의 X는 S 또는 O로부터 독립적으로 선택된다. 특히, n은 1 내지 30, 5 내지 25, 또는 10 내지 15이고, m은 0 내지 10, 0 내지 5, 또는 5 내지 10이다.

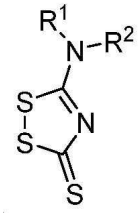
[0076] 제8 구현예에 대해 상기 기재된 공정은 목적하는 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위해 뉴클레오타이드의 단계적인 첨가를 포함한다. 이들 단계 각각은 포스포티오에이트 연결을 함유하는 뉴클레오타이드를 성장하는 올리고뉴클레오타이드에 첨가하는 3개 반응 및 포스포디에스테르 연결을 함유하는 뉴클레오타이드를 성장하는 올리고뉴클레오타이드에 첨가하는 4개 반응을 포함한다. 제1 단계 (단계 a 및 d에 상응)에서, 뉴클레오사이드 (예: 화학식 I의 화합물)의 5' 말단은 이들 두 뉴클레오타이드(화학식 III 및 VII의 화합물과 같은 화합물을 형성)를 커플링시키는 뉴클레오타이드(예: 화학식 II의 화합물)의 3' 말단에 커플링된다. 이들 두 개의 새로 결합된 뉴클레오타이드 사이의 연결이 포스포티오에이트 (즉, P=S 결합) 또는 포스포디에스테르 (즉, P=O 결합)인지의 여부에 따라, 올리고뉴클레오타이드는 황화되거나(단계 b, 화학식 IV의 화합물과 같은 화합물 형성) 또는 산화된다(단계 e, 화학식 IV 또는 VIII의 화합물과 같은 화합물 형성). 제5 구현예에 대해 상기 기재된 공정과 달리, 제8 구현예는 무제한의 포스포디에스테르 연결을 허용하기 때문에, 캡핑 단계는 각 산화 단계(단계 g) 후에 완료되어야 한다. 그러나, 제5 구현예의 경우와 같이, 어떤 캡핑 단계도 황화 단계 후 필요하지 않다. 제5 구현예의 경우, 다음 5'-하이드록시 그룹은 탈보호되고(단계 c 또는 h, 예를 들어, 화학식 VI 및 IX), 공정은 다음 뉴클레오사이드를 첨가하기 위해 반복된다. 따라서, 이 공정은 임의의 수의 포스포티오에이트 결합 및 포스포디에스테르 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드의 합성을 가능하게 하고, 산화 단계를 포함하는 사이클 후에만 캡핑 단계를 필요로 한다. 이것은 황화 단계를 포함하는 것조차 임의의 미반응된 5'OH를 차단하는 캡핑 단계가 매 사이클마다 수행되는 종래의 합성과 대조적이다.

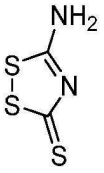
[0077] 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 및 제8 구현예의 일부 양태에서, 화학식 I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, 또는 XV의 화합물은 염이 아니다.

[0078] 제5 또는 제8 구현예의 특정 양태에서, n은 2 내지 1000이다. 특히, n은 2 내지 500이다. 특히, n은 2 내지 50이다. 특히, n은 2 내지 25이다.

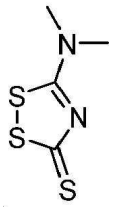
[0079] 제9 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 및 제8 구현예 중 어느 하나 또는 이의임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 여기서 고체 지지체에 부착된 링커는 절단된다.

[0080] 제10 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8 및 제9 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 황화제는 다음 화학식 A의 화합물이다:

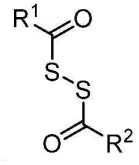
[0081]  (A), 여기서, 각각의 R^1 및 R^2는 H, 선택적으로 치환된 알킬 및 선택적으로 치환된 아릴 그룹으로부터 독립적으로 선택된다. 제10 구현예의 특정 양태에서, R^1 및 R^2는 둘 다 H이다:

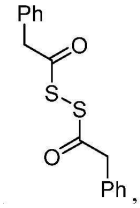
[0082] , 이는 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온 (XH 또는 ADTT)으로 공지된다. 일부 양태에서, R^S는 -C(SH)(=N)-CN이다.

[0083] 제10 구현예의 특정 양태에서, R^1 및 R^2는 둘 다 메틸이다:

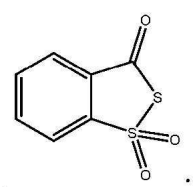
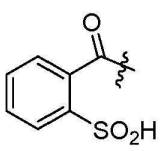
[0084] , 이는 3-(N,N-디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸 (DDTT)로서 공지된다. 일부 양태에서, R^S는 -C(=S)NHC(=S)N=CHN(CH_3)$_2$이다.

[0085] 제11 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8 및 제9 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 황화제는 다음 화학식 B의 화합물이다:

[0086]  (B), 여기서, 각각의 R^1 및 R^2는 H, 선택적으로 치환된 알킬 및 선택적으로 치환된 아릴 그룹로부터 독립적으로 선택된다. 제10 구현예의 특정 양태에서, R^1 및 R^2는 둘 다 벤질 ($PhCH_2$)이다:

[0087] , 이는 페닐아세틸 디설파이드 (PADS)로서 공지된다. 특정 양태에서, 및 R^S는 -C(=O)$CH_2C_6H_5$이다.

[0088] 제12 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8 및 제9 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 황화제는 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드 (뷰케이지 시약)이다:

[0089]  · 제12 구현예의 특정 양태에서, R^S는  · 이다.

[0090] 제13 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11 및 제12 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 여기서 황화제는 황화제를 0 내지 30분 동안, 예를

들어, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30분 동안 재순환시킴으로써 반응된다. 하나의 구현예에서, 황화제는 1 내지 30분, 1 내지 20분, 1 내지 10분, 또는 1 내지 5분 동안 재순환된다. 또 다른 구현예에서, 황화제는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10분 동안 재순환된다.

[0091] 제14 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12 및 제13 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 여기서 황화제는 적어도 0-20회, 예를 들어, 1, 2, 5, 10, 15, 20회 재순환된다. 하나의 구현예에서, 황화제는 1-20회, 1-10회, 또는 1-5회 재순환된다.

[0092] 제15 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13 및 제14 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 황화제는 고체 지지체에 부착된 제1 뉴클레오사이드의 양에 비해 3 내지 6당량의 황화제를 재순환시킴으로써 반응된다.

[0093] 제16 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14 및 제15 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 황화제의 농도는 0.02 M 내지 2.0 M이다. 일부 양태에서, 황화제는 피리딘, 3-피콜린, 아세토니트릴, 또는 이들의 혼합물에 용해시킨다. 제16 구현예의 특정 양태에서, 황화 시약의 농도는 0.05 M 내지 0.5 M이다. 특정 양태에서, 황화 시약은 피리딘에 0.02 M 내지 0.1 M의 농도로 첨가된, 예를 들어, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07,0.08, 0.09, 또는 0.1M 용해된 3-(디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸 (DDTT)이다. 특정 양태에서, 황화 시약은 아세토니트릴 (ACN)에 0.01 M 내지 0.2 M, 예를 들어, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07,0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.2 M의 농도로 첨가된 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드 (뷰케이지 시약)이다. 특정 양태에서, 황화 시약은 아세토니트릴 (ACN)/3-피콜린에 0.01 M 내지 0.2 M, 예를 들어, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07,0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.2 M의 농도로 첨가된 페닐아세틸 디설파이드 (PADS)이다. 특정 양태에서, 황화 시약은 피리딘에 0.01 M 내지 0.2 M, 예를 들어, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07,0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.2 M의 농도로 첨가된 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온 (XH 또는 ADTT)이다.

[0094] 특정 구현예에서, 상기 기재된 황화 시약(*예를 들어*, 페닐아세틸 디설파이드 (PADS) 또는 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온 (XH))은 본 발명의 공정에 사용 전에 염기로 처리한다(*즉*, 숙성시킨다). 예시적인 염기는, 비제한적으로, N-메틸이미다졸, 피리딘 및 3-피콜린을 포함한다. 황화 시약은 1분 내지 5일 동안, 예를 들어, 5분 내지 24시간, 10분 내지 12시간, 30분 내지 10시간, 1시간 내지 8시간, 2시간 내지 6시간, 또는 3시간 내지 5시간 동안 염기로 숙성시킬 수 있다(*즉*, 염기로 처리한다). 일 구현예에서, 황화 시약은 4시간 동안 숙성시킨다. 또 다른 구현예에서, 황화 시약 PADS는 본 발명의 공정에 사용되기 전에 4시간 동안 3-피콜린으로 숙성시킨다.

[0095] 제17 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15 및 제16 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 핵염기는 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민 (또는 5-메틸 우라실), 우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 7-메틸구아닌, 5,6-디하이드로우라실, 5-메틸시토신 및 5-하이드록시메틸시토신으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 핵염기의 NH_2 그룹은, 존재한다면, PhCO-, CH_3CO-, *i*PrCO-, Me_2N-CH=, 또는 Me_2N-CMe=로 보호된다. 특정 구현예에서, 핵염기는 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민 (또는 5-메틸 우라실), 우라실, 및 5-메틸시토신으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 핵염기의 NH_2 그룹은, 존재한다면, PhCO-, CH_3CO-, *i*PrCO-, Me_2N-CH=, 또는 Me_2N-CMe=로 보호된다.

[0096] 제18 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15, 제16 및 제17 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 각각의 R^2 및 R^{12}는 H, F, 및 선택적으로 C_{1-4} 알콕시로 치환된 C_{1-4} 알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 각각의 R^4는 독립적으로 H이거나, R^2의 알콕시 그룹과 환을 형성하고, 여기서 상기 환은 선택적으로 1 내지 3개의 C_{1-4} 알킬 그룹으로 치환된 5원 또는 6원 환이고; R^{16}은 $-CH_2CH_2CN$이고; R^{17a} 및 R^{17b}는 독립적으로 C_{1-4} 알킬이고; 각각의 R^{14}는 독립적으로 H이거나, R^{12}의 알콕시 그룹과 환을 형성하고, 여기서 상기 환은 선택적으로 1 내지 3개의 C_{1-4} 알킬 그룹으로 치환된 5원 또는 6원 환이다.

[0097] 제19 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제

15, 제16, 제17 및 제18 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 각각의 R^2 및 R^{12}는 H 또는 선택적으로 C_{1-4} 알콕시로 치환된 C_{1-4} 알콕시로부터 독립적으로 선택되고; R^{15}는 4,4'-디메톡시트리틸이고; R^{16}은 $-CH_2CH_2CN$이고; R^{17a} 및 R^{17b}는 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고; R^S는 -C(=N)(SH)-CN 또는 $-C(=O)CH_2C_6H_5$이다.

[0098] 제20 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15, 제16, 제17, 제18 및 제19 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, Y는 부재이다. 대안적으로, Y는 단일 뉴클레오타이드이다. 대안적으로, Y는 2 내지 50개의 뉴클레오타이드, 특히, 2 내지 40개의 뉴클레오타이드, 2 내지 30개의 뉴클레오타이드, 또는 2 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0099] 제21 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15, 제16, 제17, 제18, 제19 및 제20 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 화학식 X 또는 XI의 화합물은 2 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함하는 안티-센스 올리고뉴클레오타이드이다. 특정 양태에서, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 RNA만을 포함한다. 대안적으로, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드는 DNA 및 변형된 RNA를 포함한다. 특히, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드는 갭머이다. 대안적으로, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드는 DNA만을 포함한다.

[0100] 제22 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15, 제16, 제17, 제18, 제19, 제20 및 제21 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드는 다음을 갖는 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드이다: 서열(5'로부터 3'로)

[0101] TCACTTTCATAATGCTGG (서열번호:1),

[0102] 여기서, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고, 올리고뉴클레오타이드의 각각의 뉴클레오사이드는 2′ -O- 메톡시에틸 (MOE) 뉴클레오사이드이고, 각각의 시토신은 5-메틸시토신이다. 서열번호:1은 BIIB058로서도 공지되고, WO2007/002390, WO2010/148249, 및 US8,980,853에 기재되어 있으며, 각각의 교시는 본원에 참고로 편입된다.

[0103] 제23 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15, 제16, 제17, 제18, 제19, 제20 및 제21 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드의 서열은 다음을 갖는 5-10-5 MOE 갭머이다: 서열(5'로부터 3'로)

[0104] CAGGATACATTTCTACAGCT (서열번호:2),

[0105] 여기서, 뉴클레오사이드 1-5 및 16-20 각각은 2'-O-메톡시에틸리보오스 변형된 뉴클레오사이드이고, 각각의 뉴클레오사이드 6-15는 2'-데옥시뉴클레오사이드이고, 여기서 뉴클레오사이드 2 내지 3, 4 내지 5, 16 내지 17, 및 18 내지 19 사이의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 연결이고, 뉴클레오사이드 1 내지 2, 3 내지 4, 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 13 내지 14, 14 내지 15, 15 내지 16, 17 내지 18, 및 19 내지 20 사이의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고, 각각의 시토신은 5'-메틸시토신이다. 서열번호: 2는 하기 화학적 표기법으로 기재된다: mCes Aeo Ges Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mCds Tds Ads mCeo Aes Geo mCes Te; 여기서,

[0106] A = 아데닌,

[0107] mC = 5'-메틸시토신

[0108] G = 구아닌,

[0109] T = 티민,

[0110] e = 2'-O-메톡시에틸리보스 변형된 당,

[0111] d = 2'-데옥시리보스 당,

[0112] s = 포스포로티오에이트 뉴클레오사이드간 연결, 및

[0113] o = 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결.

[0114] 서열번호:2는 BIIB067 또는 ISIS 666853으로서 공지되고, WO2015153800에 기재되어 있으며, 이의 교시는 본원에 참고로 편입된다.

[0115] 제24 구현예에서, 공정은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 제15, 제16, 제17, 제18, 제19, 제20 및 제21 구현예 중 어느 하나 또는 이의 임의의 양태에 대해 기재된 바와 같고, 안티-센스 올리고뉴클레오타이드는 다음을 갖는 4-8-6 갭머이다: 서열(5'로부터 3'로)

[0116] GCCCCTAGCGCGCGACUC (서열번호:8)

[0117] 여기서, 뉴클레오사이드 1-4 및 13-18 각각은 2'-O-메톡시에틸리보오스 변형된 뉴클레오사이드이고, 각각의 뉴클레오사이드 5-12는 2'-데옥시 리보뉴클레오타이드이고, 여기서 뉴클레오사이드 2 내지 3, 3 내지 4, 13 내지 14, 14 내지 15, 및 15 내지 16 사이의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포디에스테르 연결이고, 뉴클레오사이드 1 내지 2, 4 내지 5, 5 내지 6, 6 내지 7, 7 내지 8, 8 내지 9, 9 내지 10, 10 내지 11, 11 내지 12, 12 내지 13, 16 내지 17 및 17 내지 18 사이의 뉴클레오사이드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이고, 각각의 시토신은 5-메틸시토신이고, 우라실은 5-메틸우라실이다. 서열번호: 8은 하기 화학적 표기법에 의해 기재된다:

[0118] $\mathbf{5'\text{-}\,G^{Me}\underline{C}_{P=O}{}^{Me}\underline{C}_{P=O}{}^{Me}\underline{C}^{Me}CTAG^{Me}CG^{Me}CG^{Me}\underline{C}_{P=O}\underline{G}_{P=O}\underline{A}_{P=O}{}^{Me}\underline{C}^{Me}\underline{U}^{Me}\underline{C}\,\text{-}\,3'}$

[0119] 밑줄 = MoE 리보뉴클레오타이드

[0120] G = 구아닌

[0121] ^{Me}C = 5-메틸시토신

[0122] T = 티민

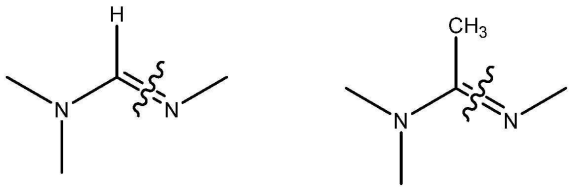
[0123] A = 아데닌

[0124] ^{Me}U = 5-메틸우라실 (티민으로도 공지됨)

[0125] P=O = 포스포디에스테르 뉴클레오사이드간 연결

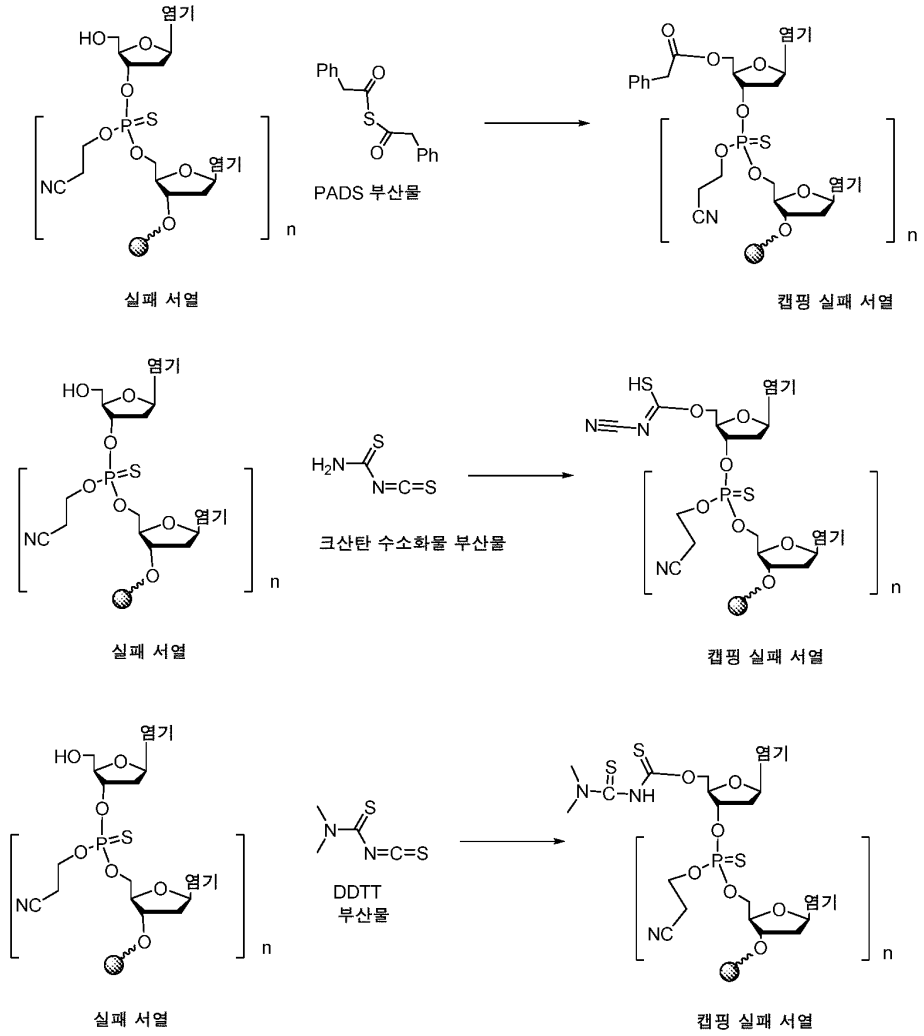
[0126] 임의의 다른 뉴클레오사이드간 연결은 포스포티오에스테르 연결이다.

[0127] "아민 보호기"는 아민 그룹, NH_2를 보호하기에 적합한 임의의 그룹, 예를 들어, 비제한적으로, PhCO-, CH_3CO-, *i*PrCO-, 및 Me_2N-CH=, Me_2N-CMe=를 포함한다. Me_2N-CH= 및 Me_2N-CMe=에 의해 보호된 아미노기의 생성되는 구조는 다음과 같다:

[0128] 

[0129] 추가의 아민 보호기 는 문헌[참조: Greene, TW et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007)]에서 찾을 수 있다.

[0130] 이론에 의해 구속되기를 바라지 않으면서, 커플링 단계 동안 커플링되지 못한 5'-하이드록시는, 예를 들어, PADS, 또는 크산탄 하이드라이드로부터의 *N*-시아노카본이미도티오에이트, 또는 DDTT로부터의 *N,N*-디메틸티오우레아-*N*-티오카복실레이트와 같은 황화제에 의한 황화로부터 하이드록실 유도체를 형성하는 것으로 간주된다:



[0131]

[0132] "하이드록시 보호기"는 하이드록시 그룹, OH를 보호하기에 적합한 임의의 그룹을 포함한다. 이들 보호기 및 하이드록시 보호기의 추가의 예는 문헌[참조: Greene, TW et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007)]에서 찾을 수 있다.

[0133] 특정 구현예에서, 하이드록시 보호기는 캡핑제 (*예를 들어*, 화학식 XIV에서R^c)로부터 형성되고, 예를 들어, 아세틸 (Ac); 벤조일 (Bz); 벤질 (Bn); β-록시에톡시메틸 에테르 (MEM); 메톡시메틸 에테르 (MOM); 메톡시트리틸 [(4-메톡시페닐)디페닐메틸, MMT); p-메톡시벤질 에테르 (PMB); 메틸티오메틸 에테르; 피발로일 (Piv); 테트라하이드로피라닐 (THP); 테트라하이드로푸란 (THF); 실릴 에테르 (비제한적으로, 트리메틸실릴 (TMS), 3급-부틸디메틸실릴 (TBDMS), 트리-이소-프로필실릴옥시메틸 (TOM), 및 트리이소프로필실릴 (TIPS) 에테르 포함); 메틸 에테르, 및 에톡시에틸 에테르 (EE)로부터 선택될 수 있다.

[0134] 대안적으로, 하이드록시 보호기는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드의 5'-하이드록시 (*예를 들어*, 화학식 II, III, IV, VII 및 VIII에서 R^{15})를 차단하고, 특정 양태에서, 4,4'-디메톡시트리틸, [비스-(4-메톡시페닐)페닐메틸] (DMT) 또는 트리틸 (트리페닐메틸, Tr)로부터 선택된 산-불안정성 보호기이다.

[0135] "핵염기"는 뉴클레오사이드의 복소환형 염기 부분이다. 핵염기는 천연일 수 있거나, 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 핵염기는 또 다른 핵산의 핵염기에 수소 결합할 수 있는 임의의 원자 또는 원자의 그룹을 포함할 수 있다. 특히, 핵염기는 복소환형 염기, 전형적으로 퓨린 및 피리미딘이다. "비변형된" 또는 "천연" 핵염기, 예를 들어, 퓨린 핵염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 핵염기 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U) 이외에, 당업자에게 공지된 많은 변형된 핵염기 또는 핵염기 모방체는 본원에 기재된 방법으로 합성된 화합물에 혼입될 수 있다. 특정 구현예에서, 변형된 핵염기는 모체 핵염기와 구조가 상당히 유사한 핵염기, 예를 들어, 7-데아자 퓨린, 5-메틸 시토신, 또는 G-클램프이다. 특정 구현예에서, 핵염기 모방체는, 예를 들어, 삼환형 펜옥사진 핵염기 모방체와 같은 더 복합한 구조를 포함한다. 상기 언급된 변형된 핵염기의 제조 방법은 당업자에

게 익히 공지되어 있다.

[0136] "뉴클레오사이드"는 복소환형 염기 잔기 및 당 잔기를 포함하는 화합물을 의미한다.

[0137] "뉴클레오타이드"는 포스페이트 연결 그룹을 포함하는 뉴클레오사이드를 의미한다.

[0138] "올리고뉴클레오타이드" 복수의 연결된 뉴클레오사이드를 포함하는 화합물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 복수의 뉴클레오사이드 중 하나 이상은 변형된다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 리보뉴클레오사이드 (RNA) 및/또는 데옥시리보뉴클레오사이드 (DNA)를 포함한다.

[0139] "뉴클레오사이드간 연결"은 올리고뉴클레오타이드의 인접한 뉴클레오사이드 사이의 공유결합을 의미한다.

[0140] "갭머"는 RNase H 절단을 지지하는 복수의 뉴클레오사이드를 갖는 내부 영역이 하나 이상의 뉴클레오사이드를 갖는 외부 영역 사이에 배치된 키메라 안티센스 화합물을 의미하고, 여기서, 내부 영역을 포함하는 뉴클레오사이드는 외부 영역을 포함하는 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오사이드들과 화학적으로 구별된다.

[0141] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "알킬"은 완전 포화된 분지형 또는 비분지형 탄화수소 잔기를 지칭한다. 바람직하게는, 알킬은 1 내지 20개의 탄소 원자, 더 바람직하게는 1 내지 16개의 탄소 원자, 1 내지 10개의 탄소 원자, 1 내지 6개의 탄소 원자, 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 구현예에서, 알킬은 6 내지 20개의 탄소 원자를 포함한다. 알킬의 대표적인 예는, 비제한적으로, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, 2급-부틸, 이소-부틸, 3급-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, n-헥실, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, n-헵틸, n-옥틸, n-노닐, 또는 n-데실을 포함한다.

[0142] 용어 "아릴"은 환 부분에 6 내지 14개의 탄소 원자를 갖는 단환형, 이환형 또는 삼환형 방향족 탄화수소 그룹을 지칭한다. 하나의 구현예에서, 용어 아릴은 6 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 단환형 및 이환형 방향족 탄화수소 그룹을 지칭한다. 아릴의 대표적인 예는 페닐, 나프틸, 플루오레닐, 및 안트라세닐을 포함한다.

[0143] 용어 "아릴"은 또한 적어도 하나의 환이 방향족이고, 1 또는 2개의 비방향족 탄화수소 환(들)에 융합된 이환형 또는 삼환형 그룹을 지칭한다. 비제한적인 예는 테트라하이드로나프탈렌, 디하이드로나프탈레닐 및 인다닐을 포함한다.

[0144] 알킬 또는 아릴 그룹 둘 다의 선택적인 치환체는 각각 C_{1-6}알킬, C_{2-6}알케닐, C_{2-6}알키닐, 3원 내지 7원 카보사이클릴, 3원 내지 7원 헤테로사이클릴, 할로, -CN, $-C(O)R^a$, $-C(O)_2R^a$, $-C(O)N(R^a)_2$, $-OR^a$, $-N(R^a)_2$, $-N(R^a)C(O)R^a$, $-N(R^a)N(R^a)_2$, $-NO_2$, $-N(R^a)C(O)_2R^a$, $-N(R^a)C(O)N(R^a)_2$, $-N(R^a)S(O)_2R^a$, $-SR^a$, $-S(O)R^a$, $-S(O)_2R^a$, $-S(O)N(R^a)_2$, 및 $-S(O)_2N(R^a)_2$로부터 독립적으로 선택되고;

[0145] R^a는 각각 독립적으로 H, C_{1-6}알킬, 3원 내지 6원 단환형 카보사이클릴, 및 3원 내지 6원 단환형 헤테로사이클릴로부터 선택된다.

[0146] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "카보사이클릴"은 3 내지 7개의 탄소 원자, 3 내지 6개, 또는 5 내지 7개의 탄소 원자의 포화 또는 불포화된 단환형 또는 이환형 탄화수소 그룹을 지칭한다. 용어 "카보사이클릴"은 사이클로알킬 그룹 및 방향족 그룹을 포함한다. 용어 "사이클로알킬"은 3 내지 7개의 탄소 원자, 3 내지 6개의 탄소 원자, 또는 5 내지 7개의 탄소 원자의 완전히 포화된 단환형 또는 이환형 탄화수소 그룹을 지칭한다. 예시적인 단환형 카보사이클릴 그룹은, 비제한적으로, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 사이클로프로페닐, 사이클로부테닐, 사이클로페넨틸, 사이클로헥세닐, 사이클로헵테닐, 사이클로부타디에닐, 사이클로펜타디에닐, 사이클로헥사디에닐, 사이클로헵타디에닐, 페닐 및 사이클로헵타트리에닐을 포함한다. 예시적인 이환형 카보사이클릴 그룹은 바이사이클로[2.1.1]헥실, 바이사이클로[2.2.1]헵틸, 바이사이클로[2.2.1]헵테닐, 트리사이클로[2.2.1.$0^{2,6}$]헵타닐, 6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵틸, 또는 2,6,6-트리메틸바이사이클로[3.1.1]헵틸, 스피로[2.2]펜타닐, 및 스피로[3.3]헵타닐을 포함한다.

[0147] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "브릿징된 환 시스템"은 환의 2개의 비인접 원자가 C, N, O, 또는 S로부터 선택된 하나 이상(바람직하게는 1 내지 3개)의 원소에 의해 연결된(브릿징된) 카보사이클릴 또는 헤테로사이클릴 환을 갖는 환 시스템이다. 브릿징된 환 시스템은 6 내지 7개의 환 구성원을 갖는다.

[0148] 용어 "스피로 환 시스템," 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 각각 카보사이클릴 또는 헤테로사이클릴로부터 독

립적으로 선택되는 2개의 환을 갖는 환 시스템이고, 여기서 2개의 환 구조는 하나의 환 원자를 공동으로 갖는다. 스피로 환 시스템은 5 내지 7개의 환 구성원을 갖는다.

[0149] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로사이클릴"은 3 내지 7개의 환 구성원, 또는 특히 3 내지 6개의 환 구성원 또는 5 내지 7개의 환 구성원을 갖는 포화 또는 불포화된 단환형 또는 이환형 (예: 브릿징된 또는 스피로 환 시스템) 환 시스템을 지칭하고, 이중 적어도 하나는 헤테로원자이고, 이중 최대 4개 (*예*: 1, 2, 3 또는 4개)는 헤테로원자일 수 있고, 여기서 헤테로원자는 O, S 및 N으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 C는 산화될 수 있고(예: C(O)), N은 산화되거나(예: N(O)) 사원화될 수 있고, S는 선택적으로 설폭사이드 및 설폰으로 산화될 수 있다. 불포화된 복소환형 환은 헤테로아릴 환을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "헤테로아릴"은 O, S 및 N으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 방향족 5 또는 6원 단환형 환 시스템을 지칭하고, 여기서 N은 산화되거나(예: N(O)) 사원화될 수 있고, S는 선택적으로 설폭사이드 및 설폰으로 산화될 수 있다. 하나의 구현예에서, 헤테로사이클릴은 3원 내지 7원 포화된 단환형 또는 3원 내지 6원 포화된 단환형 또는 5원 내지 7원 포화된 단환형 환이다. 하나의 구현예에서, 헤테로사이클릴은 3원 내지 7원 단환형 또는 3원 내지 6원 단환형 또는 5원 내지 7원 단환형 환이다. 또 다른 구현예에서, 헤테로사이클릴은 6원 또는 7원 이환형 환이다. 헤테로사이클릴 그룹은 헤테로원자 또는 탄소 원자에 부착시킬 수 있다. 헤테로사이클릴의 예는 아지리디닐, 옥시라닐, 티이라닐, 옥사지리디닐, 디옥이시라닐, 아제티디닐, 옥세타닐, 티에타닐, 피롤리디닐, 테트라하이드로푸라닐, 티올라닐, 이미다졸리디닐, 피라졸리디닐, 옥사졸리디닐, 이속사졸리디닐, 티아졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 디옥솔라닐, 디티올라닐, 옥사티올라닐, 피페리디닐, 테트라하이드로피라닐, 티아닐, 피페라지닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 디옥사닐, 디티아닐, 트리옥사닐, 트리티아닐, 아제파닐, 옥세파닐, 티에파닐, 디하이드로푸라닐, 이미다졸리닐, 디하이드로피라닐, 및 아지리닐, 옥시레닐, 티이레닐, 디아지리닐, 아제틸, 옥세틸, 티에틸, 피롤릴, 푸라닐, 티오페닐 (또는 티에닐), 이미다졸릴, 피라졸릴, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 푸라자닐, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴, 디티아졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 피리디닐, 피라닐, 티오피라닐, 피라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 옥사지닐, 티아지닐, 디옥시닐, 디티이닐, 옥사티아닐, 트리아지닐, 테트라지닐, 아제피닐, 옥세피닐, 티에피닐, 디아제피닐, 및 티아제피닐 등을 포함하는 헤테로아릴 환을 포함한다. 이환형 복소환형 환 시스템의 예는 3-아자바이사이클로[3.1.0]헥사닐, 3-아자바이사이클로[3.1.1]헵타닐, 2-아자스피로[3.3]헵타닐, 2-옥사-6-아자스피로[3.3]헵타닐, 및 5-아자스피로[2.3]헥사닐을 포함한다.

[0150] "할로겐" 또는 "할로"는 플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도일 수 있다.

[0151] **예시**

[0152] **실시예 1 올리고뉴클레오타이드 합성.**

[0153] 올리고뉴클레오타이드는 고체 지지체로서 Nittophase HL Unylinker (Kinovate, 부하량 350 μmol/g)가 장착된 AKTA 100 고체상 합성화기를 사용하여 0.72-2.2 mmol 척도로 합성했다. 각각의 뉴클레오사이드를 부착시키기 위한 합성 사이클은 3개 반응 단계: 탈트리틸화, 커플링, 및 황화로 구성된다. 탈트리틸화 단계는 시약으로서 톨루엔(10%) 중의 디클로로아세트산으로 달성된다. 커플링 단계는 고체 지지체를 통해 상응하는 포스포르아미다이트 (아세토니트릴 중 0.1-0.2 M) 및 4,5-디시아노이미다졸 (0.1M N-메틸이미다졸을 함유하는 아세토니트릴 중 1.0 M)의 용액을 순환시킴으로써 수행되었다. 황화 단계는 하기 용액 중의 어느 하나를 순환시킴으로써 완료되었다:(a) 아세토니트릴/3-피콜린 중 0.2 M PADS (1:1, v/v); (b) 피리딘 중 0.2 M 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온(XH); (c) 아세토니트릴 중 0.2 M 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드 (뷰케이지 시약); 또는 (d) 피리딘 중 0.1 M 3-((디메틸아미노-메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온 (DDTT). 대조군 실험을 위해, 합성은 4개 반응 단계: 탈트리틸화, 커플링, 황화 및 캡핑 단계로 이루어진다. 모든 단계는 황화 단계 이후 캡핑 단계를 제외하고 상기한 바와 동일한 방식으로 수행된다. 캡핑은 아세토니트릴 중 아세트산 무수물, 피리딘, 및 *N*-메틸 이미다졸의 혼합물로 수행했다. 지지체로부터 올리고뉴클레오타이드의 절단 및 염기 탈보호는 승온(50 내지 60℃)에서 농축된 수산화암모늄에서 수행했다. 합성 반응 파라미터는 이하 표 1에 요약된다. 올리고뉴클레오타이드 생성물은 LC-MS에 의해 분석했다.

[0154] 표 1- 공정 프로토콜

처리 단계	가변성	3-반응-사이클	4-반응-사이클		단위
합성 지지체	지지체	Nittophase Unylinker HL	Nittophase Unylinker HL		μmol/g
	부하량	350	350		μmol/g
탈트리틸화	시약	10% DCA	10% DCA		
	탈차단 용적	3	3		CV*
	반응 시간	3-6	3-6		분
커플링	Eq 아미다이트	1.5	1.5		eq**
	농축아미다이트	0.2	0.2		M
	활성제: 아미다이트 비	5:1	5:1		
	활성제	DCI [1.0 M] 및 NMI [0.1 M]	DCI [1.0 M] 및 NMI [0.1 M]		
	재순환 유량	240	240		cm/hr
	재순환 시간	3.2	3.2		분
황화	시약	ACN/3-피콜린 (1:1, v/v) 중의 0.2 M PADS 또는 피리딘 중 0.2 M XH 또는 ACN 중 0.2 M 뷰케이지 시약 또는 피리딘 중 0.1M DDTT	ACN/3-피콜린 (1:1, v/v) 중 0.2M PADS	피리딘 중 0.2 M XH	
	충전 용적	1.1	1.2	1.1	CV
	반응 시간	재순환 방식	플로우스루(Flow through) 방식	재순환 또는 플로우스루 방식	분
		5	3.3	5	
산화	시약	물/피리딘 중 0.5 M 요오드	물/피리딘 중 0.5 M 요오드		
	충전 용적	2.0	2.0		CV
	접촉 시간	5	5		분
캡핑	시약	부재	Cap A, 2:3:5 [NMI/피리딘/ACN] Cap B 1:4 [Ac_2O/ACN]		
	캡핑 충전 용적		0.3		CV
	반응 시간		3-8		분

[0155]

인 탈보호	시약	50 % TEA	50 % TEA	
	충전 용적	1.6	1.6	CV
	반응 시간	90	90	분

* CV: 칼럼 용적
** eq.:당량

[0156]

[0157] **공정에 의해 제조된 올리고뉴클레오타이드:**

[0158] 1. BIIB 058 (서열번호:1), 18-mer 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드, 여기서 각각의 리브올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 메톡시-에틸 (MoE)를 포함한다.

[0159] 2. BIIB 067 (서열번호:2), 5-10-5 갭머 포스포티오에스테르 및 포스포디에스테르 혼합된 백본 올리고뉴클레오타이드.갭머의 중심 블록은 2'-MoE 리보뉴클레오타이드의 블록에 인접하는 10 데옥시 리보뉴클레오타이드이다.

[0160] 3. 이하 표 2에 제시된 바와 같은 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 A, B, C, D, 및 E.

[0161] 4. BIIB 078 (서열번호:8), 4-8-6 갭머 포스포티오에스테르 및 포스포디에스테르 혼합된 백본 올리고뉴클레오타이드.갭머의 중심 블록은 2'-MoE 리보뉴클레오타이드에 인접하는 8 데옥시 리보뉴클레오타이드이다.

[0162] **5′ - G^{Me}C$_{P=O}$^{Me}C$_{P=O}$^{Me}C^{Me}CTAG^{Me}CG^{Me}CG^{Me}C$_{P=O}$G$_{P=O}$A$_{P=O}$^{Me}C^{Me}U^{Me}C - 3′** (서열번호:8)

[0163] 밑줄: MoE 리보뉴클레오타이드

[0164] **P=O:** 포스포디에스테르

[0165] **임의의 기타:** 포스포티오에스테르

[0166] 표 2. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 A, B, C, D, 및 E

코드	서열 유형	포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 서열
A	완전 DNA 서열	^{Me}CGA^{Me}CT ATA^{Me}CG^{Me}CG^{Me}CAA TATGG (서열번호:3)
B	5-10-5 갭머 갭머의 중심 블록은 2' -OMe 리보뉴클레오타이드의 블록에 인접하는 10 데옥시 리보뉴클레오타이드이다.	^{Me}CGA^{Me}CU ATA^{Me}CG^{Me}CG^{Me}CAA UAUGG (서열번호:4)
C	5-10-5 갭머 갭머의 중심 블록은 2' -MoE 리보뉴클레오타이드의 블록에 인접하는 10 데옥시 리보뉴클레오타이드이다.	^{Me}CGA^{Me}CT ATA^{Me}CG^{Me}CG^{Me}CAA TATGG (서열번호:5)
D	5-10-5 갭머 갭머의 중심 블록은 cEt 리보뉴클레오타이드의 블록에 인접하는 10 데옥시 리보뉴클레오타이드이다.	^{Me}CGA^{Me}CU ATA^{Me}CG^{Me}CG^{Me}CAA UAUGG (서열번호:6)
E	5-10-5 갭머 갭머의 중심 블록은 2' -플루오로 리보뉴클레오타이드에 인접하는 10 데옥시 리보뉴클레오타이드이다.	CGACU ATA^{Me}CG^{Me}CG^{Me}CAA UAUGG (서열번호:7)

[0167]

[0168] **결과**

[0169] 1.BIIB058

[0170] BIIB058은 본 발명의 공정 (즉, 3-반응-사이클)을 사용하여 제조하고, 종래의 사이클당 4-반응 공정과 비교했다. PADS 및 크산탄 하이드라이드가 황화제로서 사용되었다. 황화 반응은 5분 동안 재순환 방식이었다. 각 공정의 결과는 표 3에 제시된다.

[0171] 표 3. BIIB058 미정제 수율 및 순도 비교

	PADS		크산탄 하이드라이드
	4-반응-사이클	3-반응-사이클	3-반응-사이클
총 올리고 수율 (%)	84.06	86.56	86.31
DMT-온 올리고 수율 (%)	70.81	77.12	76.89
총 순도 (%)	83.08	89.19	89.09
MS 순도 (%)	91.97	93.29	93.67
UV 순도 (%)	91.59	95.50	95.02

[0172]

[0173] 황화제로서 PADS를 사용하는 4-반응-사이클과 3-반응-사이클을 비교하면, BIIB058의 수율 및 순도는 3-반응-사이클에서 증가되었고, 신규한 불순물은 생성되지 않았다. 3-반응-사이클에서 크산탄 하이드라이드는 PADS와 유사하게 수행했다. 질량 분석법 크로마토그램의 비교는 도 3에 제공된다.

[0174] 2. BIIB067

[0175] BIIB067은 본 발명의 공정 (즉, 3-반응-사이클)을 사용하여 제조하고, 황화제로서 사용된 PADS를 사용하는 종래의 사이클당 4-반응 공정과 비교했다. 황화 반응은 5분 동안 재순환 방식이었다. BIIB0058과 달리, BIIB067은 P=O 결합뿐만 아니라 P=S 결합을 포함한다. 따라서, 3개의 상이한 반응을 수행했다:1) 4 반응-사이클, 2) 3 반응-사이클, 및 3) 산화 단계 후에만 첨가된 캡핑 단계를 갖는 3 반응-사이클. 따라서 그 뉴클레오타이드에 대한 황화 단계가 아닌 산화 단계를 포함할 것이고, 산화 단계 후에어떤 캡핑 단계도 수행되지 않았다. 각 공정의 결과는 표 4에 제시한다.

[0176] 표 4. BIIB 067 미정제 수율 및 순도 비교

[0177]

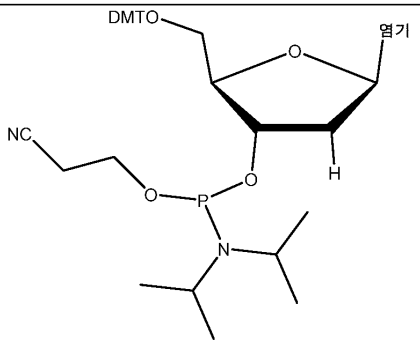
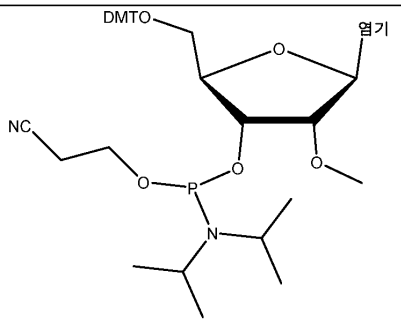
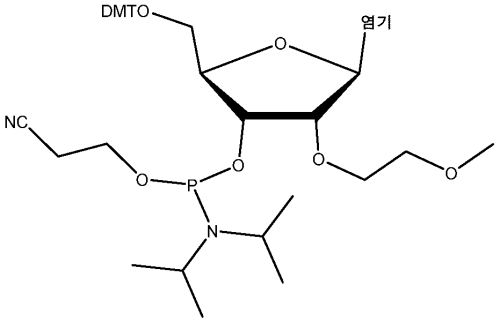
	4 반응-사이클	3 반응-사이클	
		산화 후 캡핑 반응 부재	산화 후 캡핑 반응 존재
총 올리고뉴클레오타이드 수율 (%)	86.60	95.5	101.28
DMT-ON 올리고뉴클레오타이드 (%)	66.70	76.5	80.74
질량 순도 (%)	89.00	90.70	87.84
UV 순도 (%)	86.50	88.30	90.75
총 순도 (%)	76.99	80.09	79.71

[0178] 산화 후 캡핑 반응이 없는 4-반응-사이클과 3-반응-사이클을 비교하면, BIIB067 의 수율 및 순도는 증가되었고, 신규한 불순물은 전혀 생성되지 않았다. 산화 반응 후 캡핑 단계의 포함 만이 3-반응-사이클에 의해 제조된 BIIB067의 전체 순도를 개선시키지 않았다. 따라서, 캡핑 반응 부재의 3-반응-사이클은 P=O 결합을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 경우에도 사용될 수 있다.

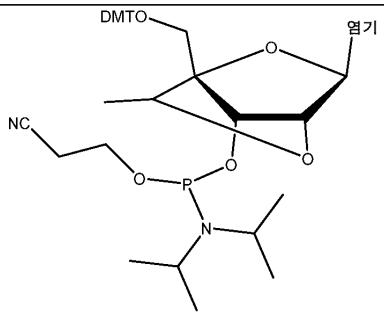
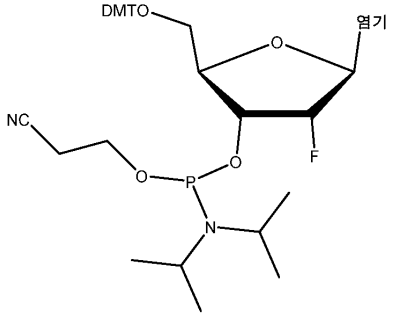
[0179] 3.올리고뉴클레오타이드 A, B, C, D, 및 E

[0180] 올리고뉴클레오타이드 A, B, C, D, 및 E는 본 발명의 공정을 사용하여 제조하고, 종래의 사이클당 4-반응 공정과 비교했다. 표 5는 합성에 사용된 아미다이트를 제공한다. 사용된 황화제는 표 6에 제시된다.

[0181] 표 5. 합성용 아미다이트

5'ODMT- 데옥시- 포스포르아미다이트		**H**
5'ODMT- 2'OMe- 포스포르아미다이트		**OMe**
5'ODMT- 2'MoE- 포스포르아미다이트		**MoE**

[0182]

5'ODMT-cEt- 포스포르아미다이트		**cEt**
5'ODMT-2'F- 포스포르아미다이트		**F**

[0183]

[0184] 표 6. 상응하는 올리고뉴클레오타이드의 합성용으로 사용된 황화 시약

올리고뉴클레오타이드	황화 시약	
A	XH	PADS
B	XH	PADS
C	XH	PADS
D	XH	PADS
E	XH	PADS

[0185]

[0186] 표 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 공정으로부터 미정제 올리고뉴클레오타이드의 수율, UV 순도, 및 MS 불순물 프로파일은 종래의 4-반응-사이클 공정에 의해 제조된 미정제 올리고뉴클레오타이드와 유사하다.

[0187] 표 7. DMT-온 생성물의 광학 수율 (OD) 및 RPIP HPLC 순도

황화 시약	올리고뉴클레오타이드	4 반응-사이클	3 반응-사이클	결론
크산탄 하이드라이드	A	142.1 OD/μmol UV:73.61 %	146.8 OD/μmol UV:78.65 %	1. 3-반응-사이클 공정의 미정제물의 수율 및 UV 순도는 4-반응-사이클 공정의 미정제물과 유사하다. 2. 3-반응-사이클 공정의 MS 불순물 프로파일은 4-반응-사이클 공정의 미정제물과 양립 가능하다.
	B	149.8 OD/μmol UV:78.20 %	155.7 OD/μmol UV:79.71 %	상기와 동일
	C	150.4 OD/μmol UV:80.56 %	154.3 OD/μmol UV:82.36 %	상기와 동일
	D	126.3 OD/μmol UV:71.15 %	129.4 OD/μmol UV:73.31 %	상기와 동일
	E	133.1 OD/μmol UV:71.34 %	137.8 OD/μmol UV:73.10 %	상기와 동일
PADS	A	146.7 OD/μmol UV:83.32 %	154.9 OD/μmol UV:77.66 %	상기와 동일
	B	150.1 OD/μmol UV:81.33 %	154.3 OD/μmol UV:79.17 %	상기와 동일
	C	158.8 OD/μmol UV:79.27 %	159.2 OD/μmol UV:78.80 %	상기와 동일
	D	107.5 OD/μmol UV:72.29 %	129.3 OD/μmol UV:71.13 %	1. 3-반응-사이클 공정의 미정제물의 수율 및 UV 순도는 4-반응-사이클 공정의 미정제물과 유사하다. 2. 3-반응-사이클 공정의 MS 불순물 프로파일은 4-반응-사이클 공정의 미정제물과 양립 가능하다.3-반응-사이클 공정의 N-1 불순물은 4-반응-사이클 공정의 미정제물보다 더 높다.
	E	141.0 OD/μmol UV:73.90 %	140.9 OD/μmol UV:75.77 %	1. 3-반응-사이클 공정의 미정제물의 수율 및 UV 순도는 4-반응-사이클 공정의 미정제물과 유사하다.

[0188]

				2. 3-반응-사이클 공정의 MS 불순물 프로파일은 4-반응-사이클 공정의 미정제물과 양립 가능하다.
뷰케이지 시약	A	167.4 OD/μmol UV:79.70 %	166.1 OD/μmol UV:78.39 %	상기와 동일

[0189]

[0190] 4. BIIB 078

[0191] BIIB078을 본 발명의 공정 (즉, 3-반응-사이클)을 사용하여 제조하고, 종래의 사이클당 4-반응 공정과 비교했다. PADS는 황화제로서 사용되었다. 황화 반응은 3분 동안 재순환 방식이었다. 각 공정의 결과는 다음에 제시된다: 표 8 및 도4-7.

[0192] 표 8. BIIB 078 미정제 수율 및 순도 비교

	PADS	
	4 반응-사이클 공정	3 반응-사이클 공정
DMT-온 올리고 수율 (%)	63.5	71.7
총 순도 (%)	81.29	83.46
MS 순도 (%)	86.80	87.82
UV 순도 (%)	93.65	95.04

[0193]

[0194] 황화제로서 PADS를 사용하는 4-반응-사이클과 3-반응-사이클을 비교하면, BIIB078의 수율 및 순도는 3-반응-사이클에서 증가되었고, 어떤 신규한 불순물도 생성되지 않았다. HPLC 크로마토그램 및 질량 분석법 크로마토그램의 비교는 다음에 제공된다: 도4-7.

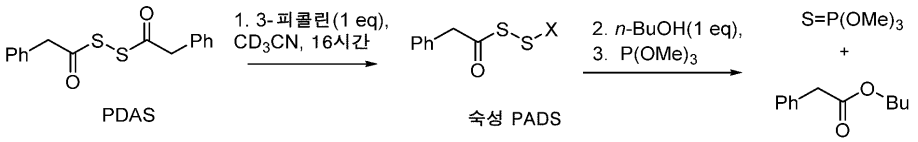
[0195] **실시예 2.황화 및 캡핑에 대한 PADS의 이중 역할의 NMR 연구**

[0196] 제1 NMR 실험에서, PADS는 아세토니트릴-*d3* 중 3-피콜린에서 16시간 동안 22 ℃에서 숙성시켰다(반응식 1). 숙성시킨 후, n-BuOH를 용액에 첨가하고, NMR 스펙트럼을 상이한 시점에 취했다. 스펙트럼은, $PHCH_2CO_2Bu$의 형성이 매우 느렸음을 보여주었다.

[0197] 상기한 바와 동일한 절차에 따르는 별개의 실험에서, BuOH의 첨가 후, 반응 혼합물에 $P(OMe)_3$을 첨가하고, 반응 혼합물의 NMR 스펙트럼은 상이한 시점에 기록했다. $P(OMe)_3$은 고상 합성에서 포스파이트 중간체와 유사한 구조를 가졌다. 스펙트럼은, 약 2분 내에 $P(OMe)_3$의 황화가 완료되었고, BuOH의 에스테르화 (캡핑)가 발생했음을 보여주었다(도 8).

[0198] 이들 실험 결과는, 황화 동안 활성 캡핑 시약이 생성되었고 그것이 존재하는 알코올을 캡핑시켰다는 것을 입증했다.

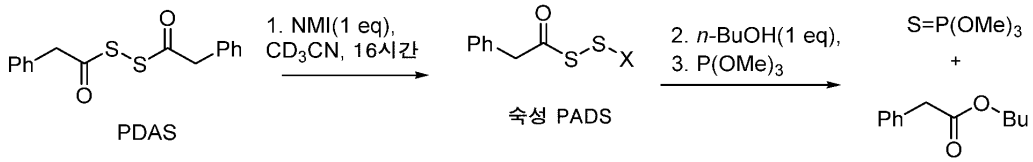
[0199] 반응식 1.



[0200]

[0201] 동일한 실험은 PADS를 숙성시키기 위한 염기로서 N-메틸 이미다졸을 사용하여 반복했고, 유사한 결과가 수득되었다(반응식 2). $P(OMe)_3$을 첨가하지 않으면, 에스테르화 반응은 매우 느렸지만, BuOH의 에스테르화는 황화 반응 직후에 일어났다. 이들 결과는 다시 황화가 발생하면, 황화 및 캡핑이 발생함을 보여주었다(도 9).

[0202] 반응식 2. NMI에서 PADS의 숙성

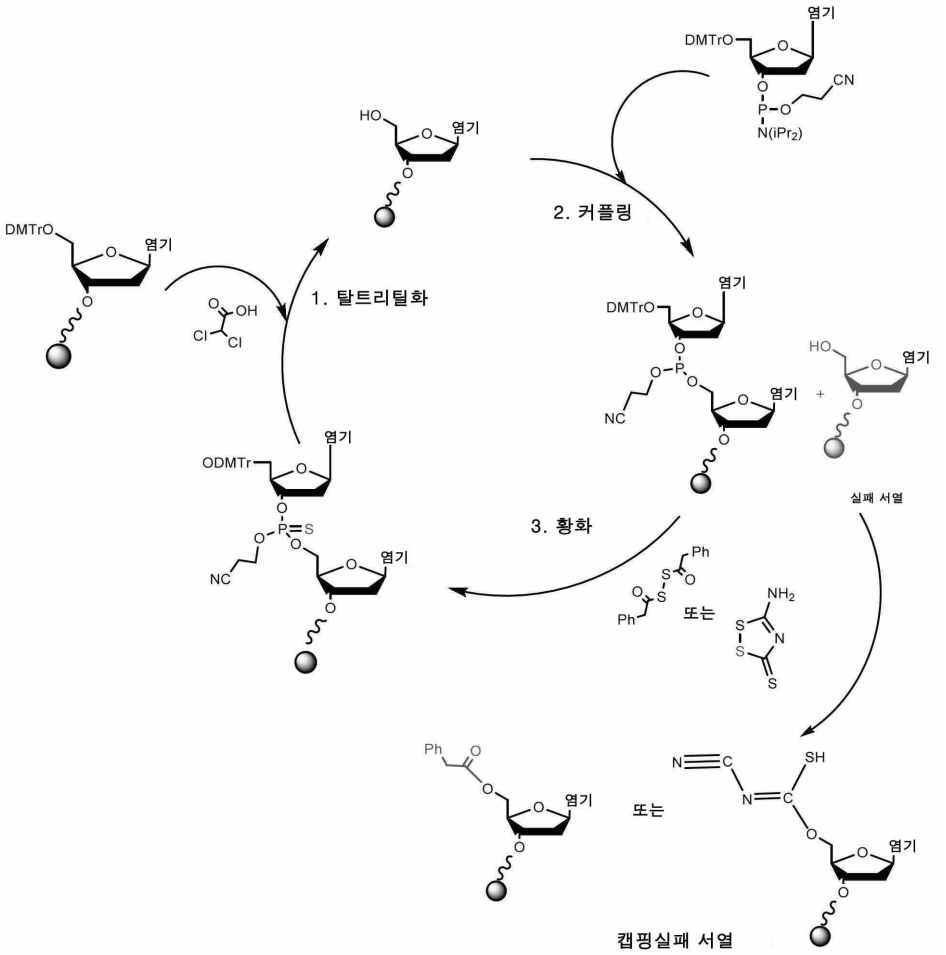


NMI: N-메틸 이미다졸

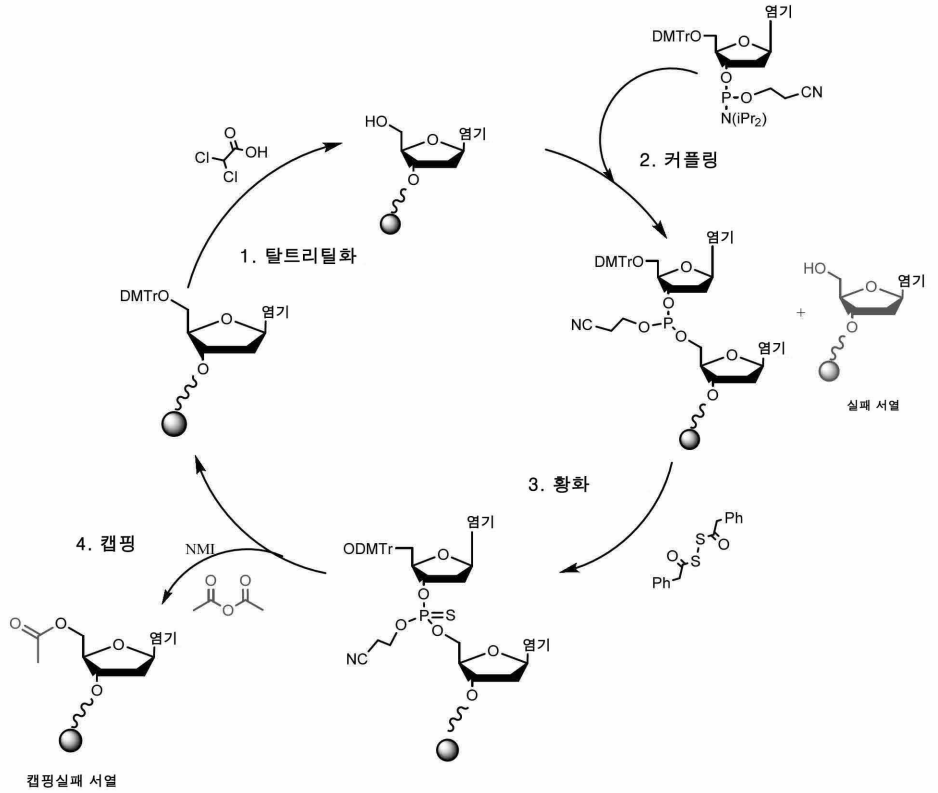
[0203]

도면

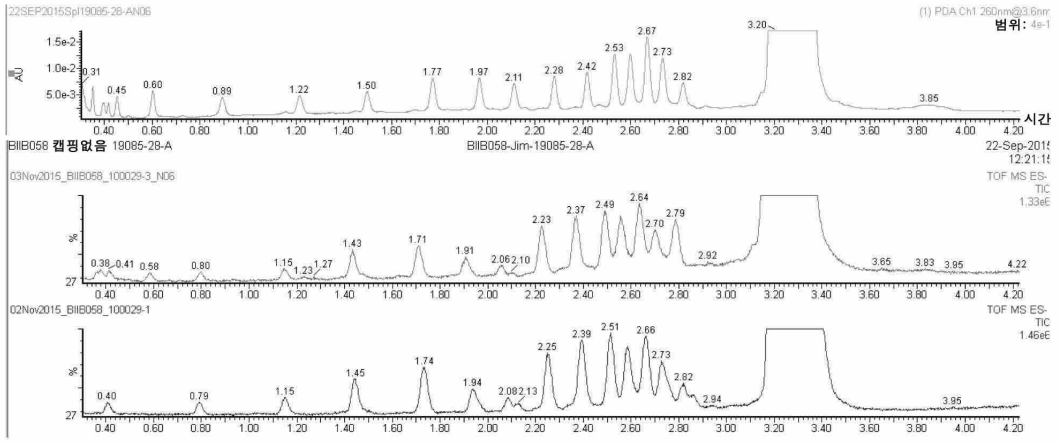
도면1



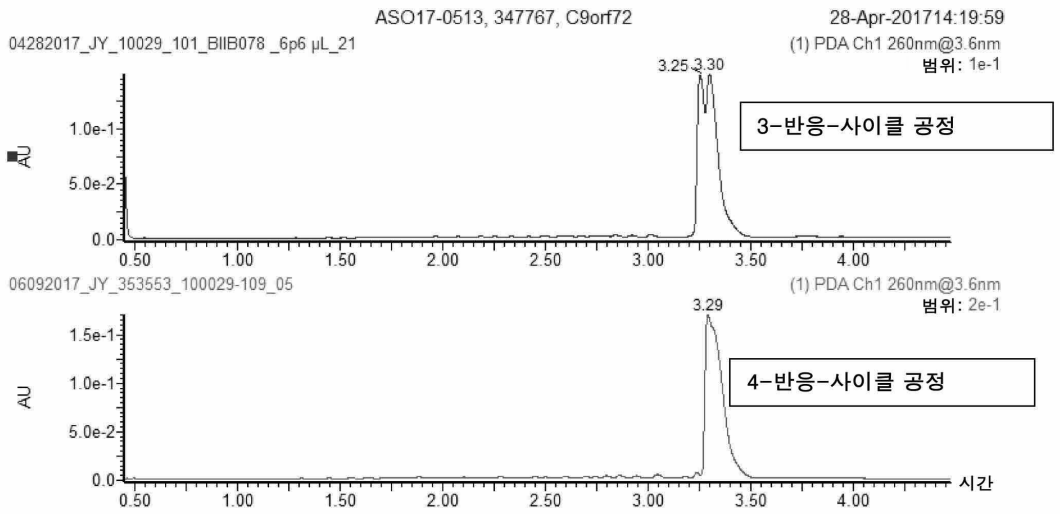
도면2


염기
DMTrO
O
P-O
CN
N(iPr2)
2. 커플링
HO
염기
Cl
OH
Cl
1. 탈트리틸화
DMTrO
염기
염기
DMTrO
NC
O
P
O
염기
HO
염기
실패 서열
3. 황화
Ph
S
O
S
Ph
4. 캡핑
NMI
염기
ODMTr
O
P=S
NC
염기
염기
캡핑실패 서열

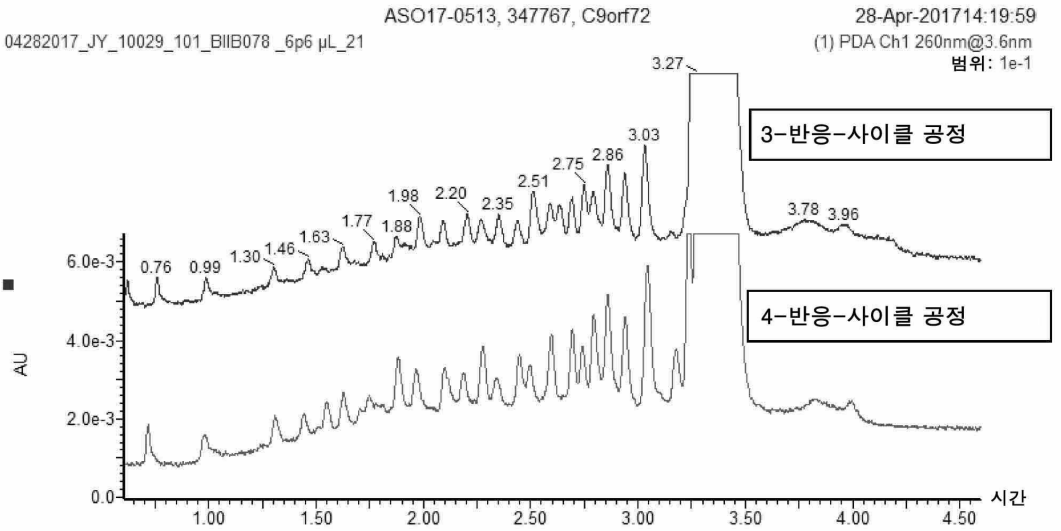
도면3


22SEP2015Spl19085-28-AN06
(1) PDA Ch1 260nm@3.6nm
범위: 4e-1
AU
시간
BIIB058 캡핑없음 19085-28-A
BIIB058-Jim-19085-28-A
22-Sep-2015
12:21:15
03Nov2015_BIIB058_100029-3_N06
TOF MS ES-
TIC
1.33e8
02Nov2015_BIIB058_100029-1
TOF MS ES-
TIC
1.46e8

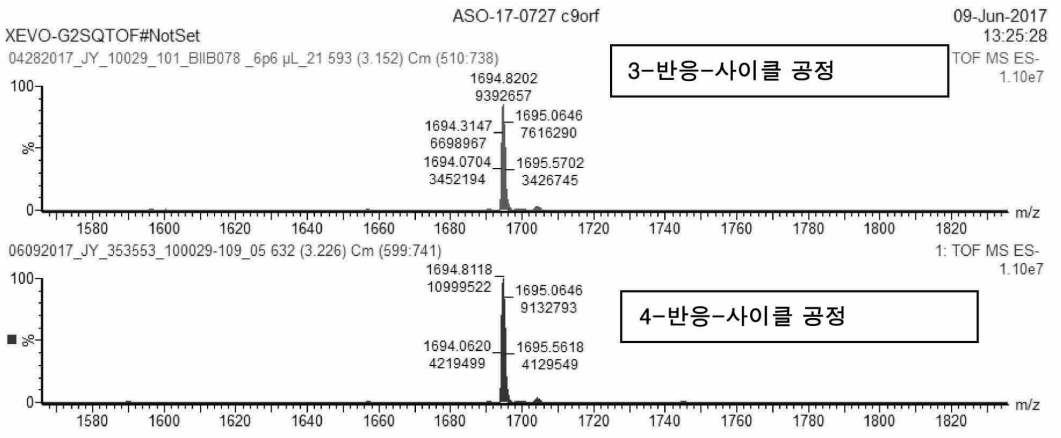
도면4


ASO17-0513, 347767, C9orf72
28-Apr-201714:19:59
04282017_JY_10029_101_BIIB078 _6p6 µL_21
(1) PDA Ch1 260nm@3.6nm
범위: 1e-1
3.25 3.30
3-반응-사이클 공정
AU
06092017_JY_353553_100029-109_05
(1) PDA Ch1 260nm@3.6nm
범위: 2e-1
3.29
4-반응-사이클 공정
시간

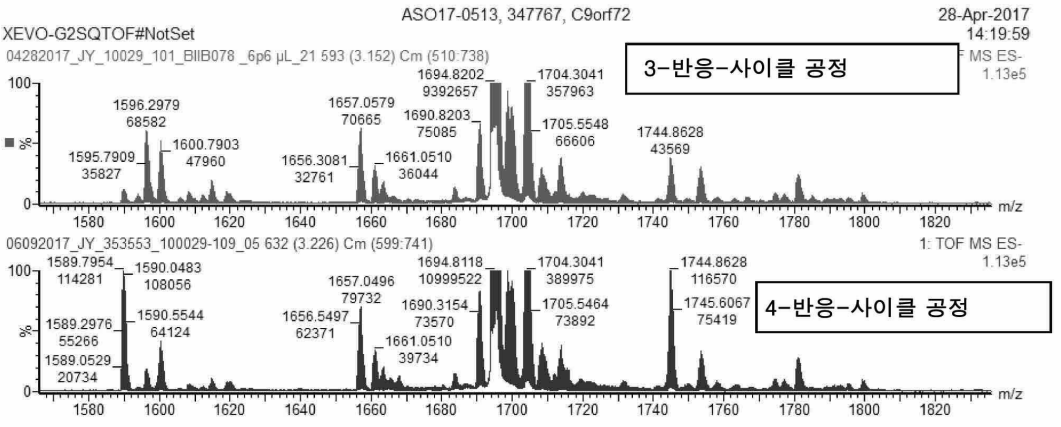
도면5


ASO17-0513, 347767, C9orf72
28-Apr-201714:19:59
04282017_JY_10029_101_BIIB078 _6p6 µL_21
(1) PDA Ch1 260nm@3.6nm
범위: 1e-1
3.27
3.03
2.86
2.75
2.51
2.35
2.20
1.98
1.88
1.77
1.63
1.46
1.30
0.99
0.76
3.78
3.96
3-반응-사이클 공정
4-반응-사이클 공정
AU
시간

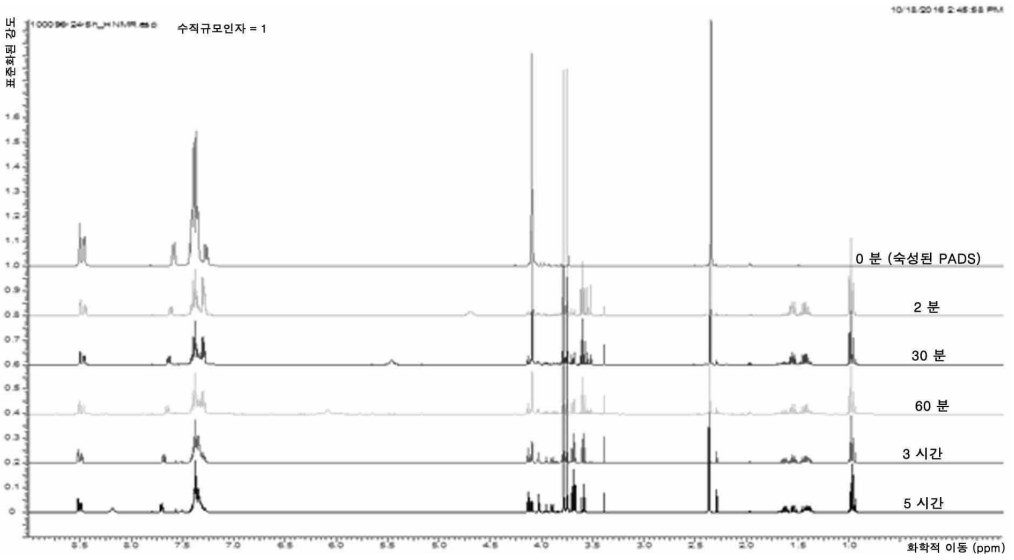
도면6


ASO-17-0727 c9orf
09-Jun-2017
13:25:28
XEVO-G2SQTOF#NotSet
04282017_JY_10029_101_BIIB078 _6p6 µL_21 593 (3.152) Cm (510:738)
TOF MS ES-
1.10e7
1694.8202
9392657
1694.3147
6698967
1695.0646
7616290
1694.0704
3452194
1695.5702
3426745
3-반응-사이클 공정
m/z
06092017_JY_353553_100029-109_05 632 (3.226) Cm (599:741)
1: TOF MS ES-
1.10e7
1694.8118
10999522
1695.0646
9132793
1694.0620
4219499
1695.5618
4129549
4-반응-사이클 공정
m/z

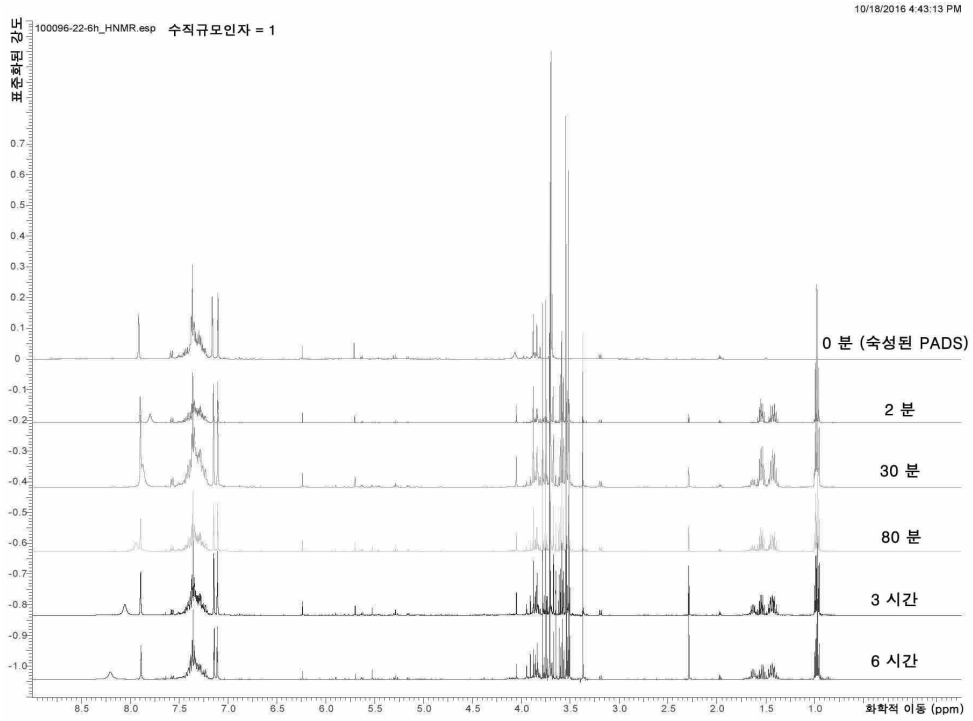
도면7


ASO17-0513, 347767, C9orf72
28-Apr-2017
14:19:59
XEVO-G2SQTOF#NotSet
04282017_JY_10029_101_BIIB078 _6p6 µL_21 593 (3.152) Cm (510:738)
3-반응-사이클 공정
1694.8202 9392657
1704.3041 357963
1596.2979 68582
1657.0579 70665
1690.8203 75085
1705.5548 66606
1744.8628 43569
1595.7909 35827
1600.7903 47960
1656.3081 32761
1661.0510 36044
m/z
06092017_JY_353553_100029-109_05 632 (3.226) Cm (599:741)
1: TOF MS ES- 1.13e5
4-반응-사이클 공정
1589.7954 114281
1590.0483 108056
1694.8118 10999522
1704.3041 389975
1744.8628 116570
1657.0496 79732
1690.3154 73570
1705.5464 73892
1745.6067 75419
1589.2976 55266
1590.5544 64124
1656.5497 62371
1661.0510 39734
1589.0529 20734

도면8


수직규모인자 = 1
표준화된 강도
0 분 (숙성된 PADS)
2 분
30 분
60 분
3 시간
5 시간
화학적 이동 (ppm)

도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOGEN MA INC.

<120> SYNTHESIS OF THIOLATED OLIGONUCLEOTIDES WITHOUT A CAPPING STEP

<130> 123429-00220

<150> 62/354,433

<151> 2016-06-24

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 1

tcactttcat aatgctgg 18

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 2

caggatacat ttctacagct 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 3

cgactatacg cgcaatatgg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 4

cgacuatacg cgcaauaugg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 5

cgactatacg cgcaatatgg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 6

cgacuatacg cgcaauaugg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 7

cgacuatacg cgcaauaugg 20

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 8

gcccctagcg cgcgacuc 18