

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7698631号  
(P7698631)

(45)発行日 令和7年6月25日(2025.6.25)

(24)登録日 令和7年6月17日(2025.6.17)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 H	21/02 (2006.01)	C 0 7 H	21/02	
C 0 7 H	21/04 (2006.01)	C 0 7 H	21/04	A
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A
C 0 7 C	53/16 (2006.01)	C 0 7 C	53/16	

請求項の数 24 (全37頁)

(21)出願番号	特願2022-510762(P2022-510762)	(73)特許権者	000002093 住友化学株式会社 東京都中央区日本橋二丁目7番1号
(86)(22)出願日	令和3年3月26日(2021.3.26)	(74)代理人	100145403 弁理士 山尾 憲人
(86)国際出願番号	PCT/JP2021/013023	(74)代理人	100150500 弁理士 森本 靖
(87)国際公開番号	WO2021/193954	(74)代理人	100176474 弁理士 秋山 信彦
(87)国際公開日	令和3年9月30日(2021.9.30)	(72)発明者	田中 雄樹 大阪府大阪市西淀川区歌島三丁目1番2 1号 住友化学株式会社内
審査請求日	令和5年12月15日(2023.12.15)	(72)発明者	加納 俊史 大阪府大阪市西淀川区歌島三丁目1番2 1号 住友化学株式会社内
(31)優先権主張番号	特願2020-58880(P2020-58880)		
(32)優先日	令和2年3月27日(2020.3.27)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

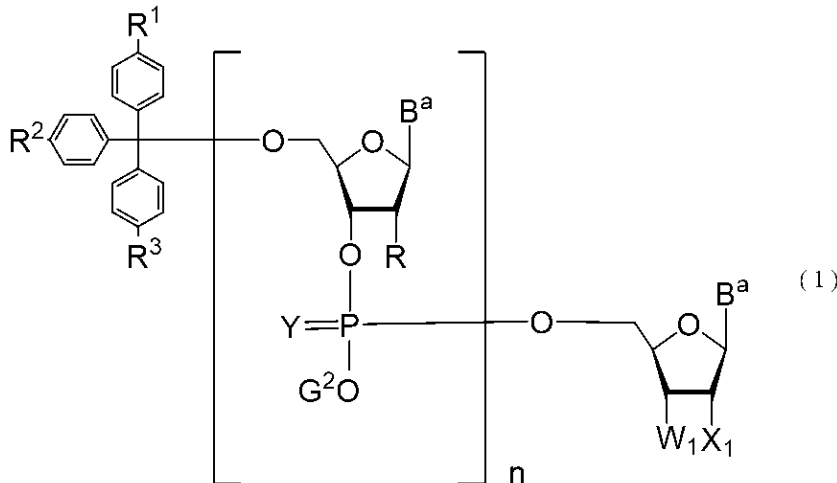
(54)【発明の名称】 核酸オリゴマーの製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(1)：

【化1】



10

(式中、  
G<sup>2</sup>は、水酸基の保護基を示し、

20

$B^a$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、保護基で保護されていてもよい核酸塩基を表し、

$R^1$ 、 $R^2$  及び  $R^3$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水素原子又はアルコキシ基を表し、

$R$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、保護された水酸基、水素原子、フッ素原子、メトキシ基、2-メトキシエチル基、または  $OQ'$  基を表し、

$Q'$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、リボースの 4' 位の炭素原子と結合しているメチレン基、リボースの 4' 位の炭素原子と結合しているエチレン基、またはリボースの 4' 位の炭素原子と結合しているエチリデン基を表し、

$Y$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、酸素原子または硫黄原子を表し、

$n$  は、1 ~ 200 の何れかの整数を表し、

$W_1$  は、 $OZ$  基を表し、かつ、 $X_1$  は、 $R$  基を表すか、あるいは

$W_1$  は、 $OV$  基を表し、かつ、 $X_1$  は、 $OZ$  基を表し、

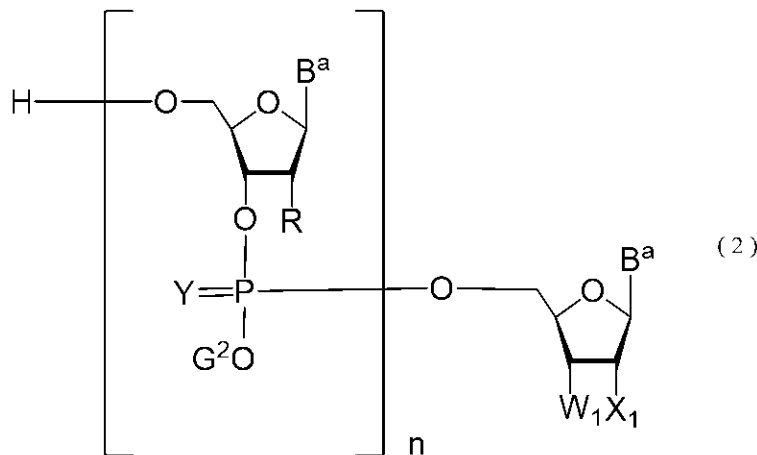
$V$  は、水酸基の保護基を表し、

$Z$  は、固相担体および連結基からなる構造を有する基である。

そして、 $n$  が 2 以上の整数のとき、式 (1) で示される核酸オリゴマーは、それぞれのヌクレオチドの間に、非ヌクレオチドリinker が組み込まれていてもよい。) )

で示される核酸オリゴマーと、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比 (ホルムアルデヒド  $m \text{ mol}$  / ジクロロ酢酸  $m \text{ mol}$ ) が、 $90 \times 10^{-6}$  以下であるジクロロ酢酸溶液を反応させる工程を含む、式 (2) :

【化 2】



(式中、

$G^2$ 、 $B^a$ 、 $R$ 、 $Y$ 、 $X_1$ 、 $W_1$  および  $n$  は、前記のとおりであり、そして、

式 (1) において定義されたとおり、ヌクレオチドの間に、非ヌクレオチドリinker が組み込まれていてもよい。) )

で示される核酸オリゴマーの製造方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の工程と、さらに、当該工程で生成する式 (2) で示される核酸オリゴマーから  $Z$  で表される基を除く工程、ならびに水酸基および核酸塩基の保護基を除く工程を含む、式 (2') :

10

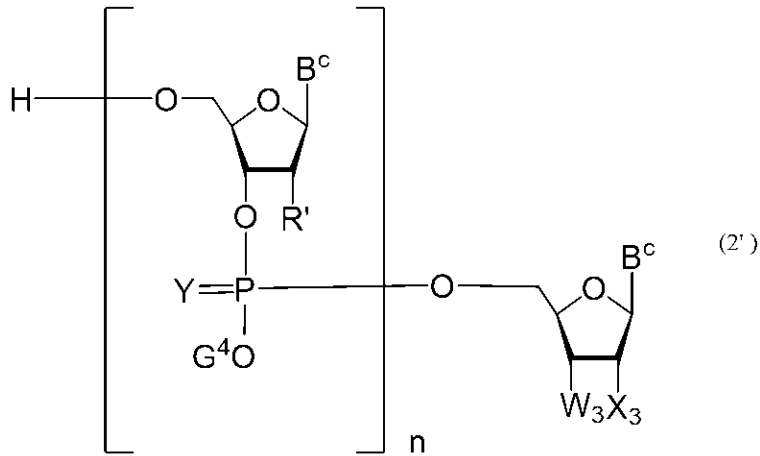
20

30

40

50

## 【化3】



10

(式中、

Yおよびnは、前記のとおりであり、

B<sup>c</sup>は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、核酸塩基を表し、

G<sup>4</sup>は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水素原子、アルカリ金属イオン、アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、またはヒドロキシルアルキルアンモニウムイオンを表し、

20

R'は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水酸基、水素原子、フッ素原子、メトキシ基、2-メトキシエチル基、またはOQ'基を表し、

Q'は、前記のとおりであり、

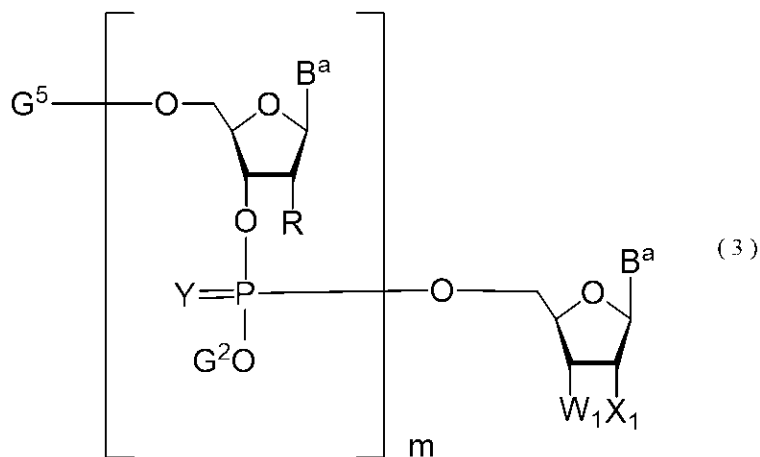
X<sub>3</sub>およびW<sub>3</sub>は各々、それぞれ独立して、水酸基を表すか、あるいはX<sub>3</sub>は、R'基を表し、かつ、W<sub>3</sub>は、水酸基を表す。) )

で示される核酸オリゴマーの製造方法。

## 【請求項3】

式(2)で示される核酸オリゴマーを、アミダイト法で任意に鎖長を伸長した式(3)：

## 【化4】



30

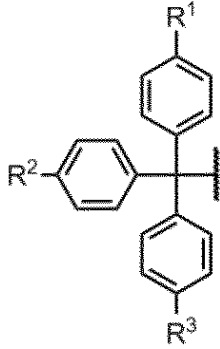
40

(式中、

G<sup>2</sup>、B<sup>a</sup>、R、Y、X<sub>1</sub>およびW<sub>1</sub>は、前記のとおりであり、G<sup>5</sup>は、

50

## 【化5】



10

で示される水酸基の保護基、もしくは水素原子を示し、

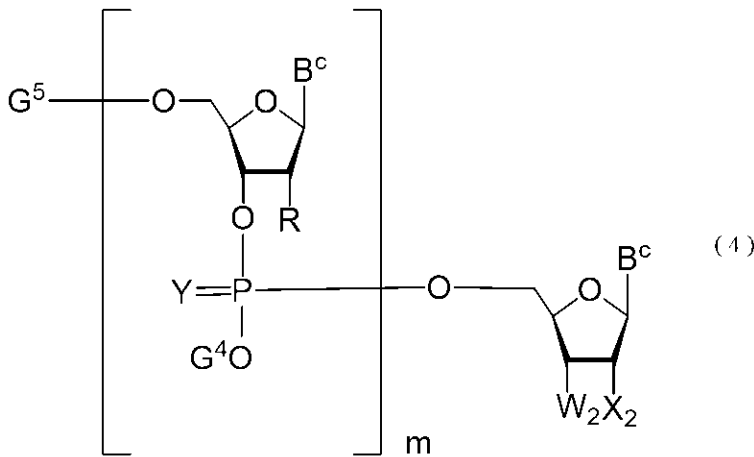
$R^1$ 、 $R^2$  及び  $R^3$  は、前記のとおりであり、

$m$  は、 $m \leq n$  を満たす整数である。）

で示される核酸化合物を得る工程、ならびに

式(3)で示される化合物から式(4)：

## 【化6】



20

30

(式中、

$G^5$ 、 $R$ 、 $Y$  および  $m$  は、前記のとおりであり、

$G^4$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水素原子、アルカリ金属イオン、アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、またはヒドロキシルアルキルアンモニウムイオンを表し、

$B^c$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、核酸塩基を表し、

$X_2$  は、水酸基を表し、かつ、 $W_2$  は、 $OV$  基を表すか、あるいは

$X_2$  は、 $R$  基を表し、かつ、 $W_2$  は、水酸基を表し、

$V$  は、水酸基の保護基を表す。）

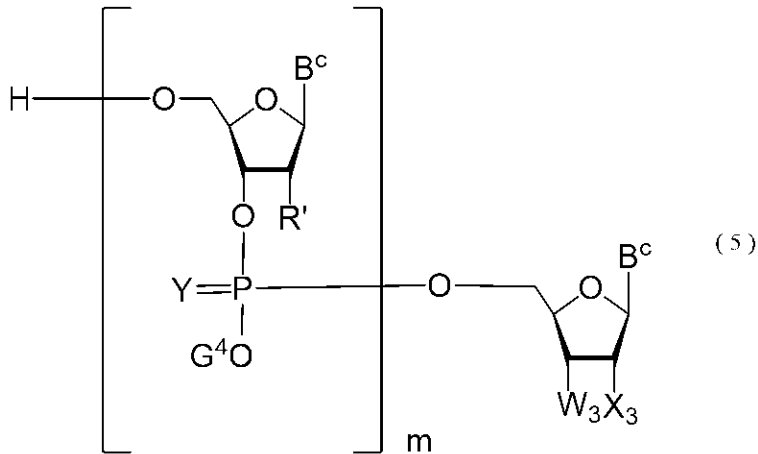
で示される化合物を切り出し、

40

さらに式(4)で示される化合物を脱保護して、式(5)：

50

## 【化 7】



10

(式中、

G<sup>4</sup>、B<sup>c</sup>、Yおよびmは、前記のとおりであり、

R'は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水酸基、水素原子、フッ素原子、メトキシ基、2-メトキシエチル基、またはOQ'基を表し、

Q'は、前記のとおりであり、

X<sub>3</sub>およびW<sub>3</sub>は各々、それぞれ独立して、水酸基を表すか、あるいはX<sub>3</sub>は、R'基を表し、かつ、W<sub>3</sub>は、水酸基を表す。) 20

で示される核酸オリゴマーを製造する工程をさらに含む、請求項1に記載の製造方法。

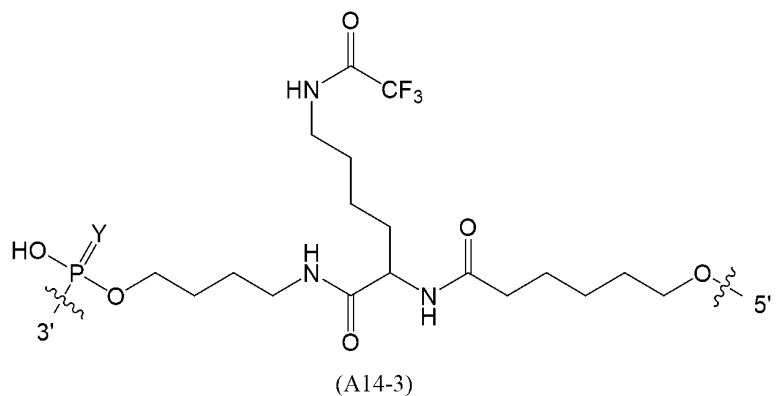
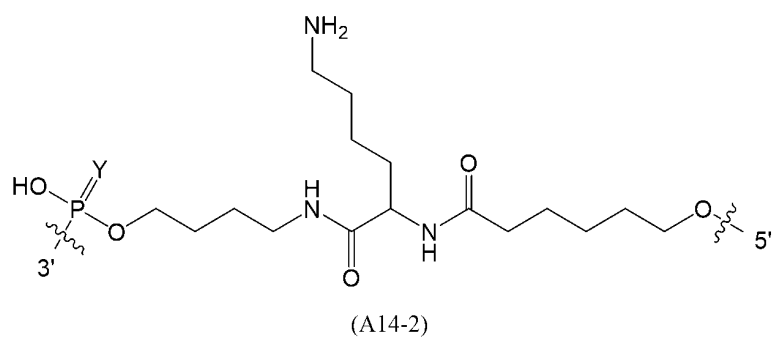
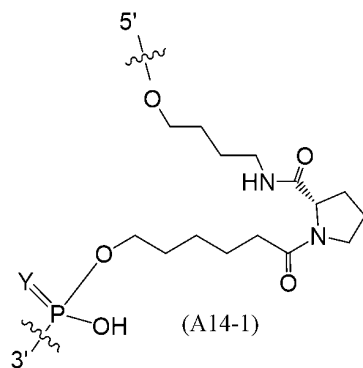
## 【請求項4】

非ヌクレオチドリンカーが、アミノ酸骨格からなるリンカーである、請求項1～3の何れか一項に記載の製造方法。

## 【請求項5】

アミノ酸骨格からなるリンカーが、下記式(A14-1)、(A14-2)および(A14-3)からなる群から選ばれる構造を有するリンカーである、請求項4に記載の製造方法。

## 【化 8】



30

40

50

(式中、Yは、前記のとおりである。)

【請求項6】

ジクロロ酢酸溶液が、ジクロロメタン、アセトニトリル、および芳香族有機溶媒からなる群から選ばれる少なくとも1つの溶媒を含む、請求項1～5の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項7】

ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒドmol/ジクロロ酢酸mol)が、 $43 \times 10^{-6}$ 以下である、請求項1～6の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項8】

ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒドmol/ジクロロ酢酸mol)が、 $22 \times 10^{-6}$ 以下である、請求項1～6の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項9】

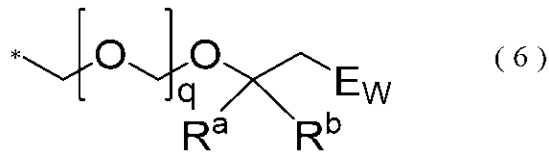
核酸オリゴマーが、リボ核酸(RNA)である、請求項1～8の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項10】

核酸オリゴマーが、リボ核酸(RNA)であり、そのリボースの2'位の水酸基の保護基が、式(6)で示される保護基である、請求項1～8の何れか一項に記載の製造方法。

式(6)：

【化9】



(式中、

qは、1～5の何れかの整数を表し、

$R^a$ および $R^b$ は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、メチル基、エチル基または水素原子を表し、

\*印は、リボースの2'位の水酸基由来の酸素原子との結合点を表し、そして、

$E_W$ は、電子求引基を表す。)

【請求項11】

$R^a$ および $R^b$ が同時に水素原子であり、かつ、 $E_W$ がシアノ基である、請求項10に記載の製造方法。

【請求項12】

核酸オリゴマーが、40鎖長以上のオリゴマーである、請求項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項13】

核酸オリゴマーが、50鎖長以上のオリゴマーである、請求項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項14】

核酸オリゴマーが、60鎖長以上のオリゴマーである、請求項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項15】

核酸オリゴマーが、80鎖長以上のオリゴマーである、請求項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

【請求項16】

核酸オリゴマーが、100鎖長以上のオリゴマーである、請求項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 17】

ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比（ホルムアルデヒド mol / ジクロロ酢酸 mol）が、 $90 \times 10^{-6}$  以下である、ジクロロ酢酸溶液。

## 【請求項 18】

ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比（ホルムアルデヒド mol / ジクロロ酢酸 mol）が、 $43 \times 10^{-6}$  以下である、請求項 17 に記載のジクロロ酢酸溶液。

## 【請求項 19】

ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比（ホルムアルデヒド mol / ジクロロ酢酸 mol）が、 $22 \times 10^{-6}$  以下である、請求項 17 に記載のジクロロ酢酸溶液。

## 【請求項 20】

ホルムアルデヒドを含む未精製ジクロロ酢酸溶液とホルムアルデヒドと共沸する溶媒を含む溶液からホルムアルデヒドを共沸させて留去することにより精製ジクロロ酢酸溶液を得る工程を含む、請求項 17 ~ 19 の何れか一項に記載のジクロロ酢酸溶液の製造方法。

10

## 【請求項 21】

共沸溶媒の沸点が、 $194$  以下である、請求項 20 に記載の製造方法。

## 【請求項 22】

共沸溶媒が、ジクロロメタン、アセトニトリルまたは芳香族有機溶媒である、請求項 20 または 21 に記載の製造方法。

## 【請求項 23】

芳香族有機溶媒がトルエンである、請求項 22 に記載の製造方法。

20

## 【請求項 24】

請求項 20 に記載のジクロロ酢酸溶液の精製工程および当該工程で得られた精製ジクロロ酢酸溶液を使用する請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の工程を含む、核酸オリゴマーの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は 2020 年 3 月 27 日に出願された日本国特許出願第 2020 - 058880 に対する優先権及びその利益を主張するものであり、その全内容は参照することにより本出願に組み込まれる。

30

本発明は、核酸オリゴマーの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年、核酸オリゴマーの医療分野への応用に関心が高まっている。例えば、アンチセンス核酸、アプタマー、リボザイム、および siRNA などの RNA 干渉 (RNAi) を誘導する核酸などが挙げられ、これらは核酸医薬品と呼ばれている。

## 【0003】

核酸オリゴマーは、固相合成法により合成可能であり、固相担体上で核酸を伸長して合成された核酸オリゴマーは、固相担体から切り出し、次いで、リボースを含む核酸オリゴマーは、リボースの 2' 位の水酸基の保護基を脱保護して除いて、目的とする核酸オリゴマーが製造されている。固相合成法ではヌクレオシドのホスホロアミダイト（以下、「アミダイト」と称する）が原料として用いられ、5' 位の水酸基の保護基は、ジクロロ酢酸溶液を用いて脱保護することが知られているが、従来のジクロロ酢酸溶液を用いて合成された核酸オリゴマーの収率は、必ずしも満足いくものではなく、合成は効率的ではなかった（特許文献 1）。

40

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0004】

【文献】国際公開第 99 / 43694 号公報

## 【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、核酸オリゴマーの効率的な製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

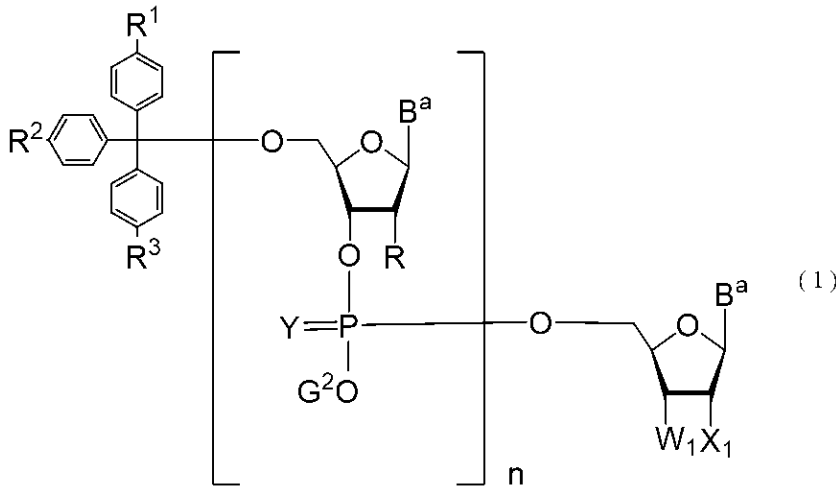
本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、核酸オリゴマーを合成する際に、ホルムアルデヒド濃度が一定以下であるジクロロ酢酸溶液を使用する、もしくはジクロロ酢酸の品質を向上させた後に使用することを特徴とする、核酸オリゴマーの効率的な製造方法を提供する。

【0007】

本発明は、以下の態様を包含するが、これらに限定されるものではない。

1. 式(1)：

【化1】



(式中、

$G^2$  は、水酸基の保護基を示し、

$B^a$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、保護基で保護されていてもよい核酸塩基を表し、

$R^1$ 、 $R^2$  及び  $R^3$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水素原子又はアルコキシ基を表し、

$R$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、保護された水酸基、水素原子、フッ素原子、メトキシ基、2-メトキシエチル基、または  $OQ'$  基を表し、

$Q'$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、リボースの4'位の炭素原子と結合しているメチレン基、リボースの4'位の炭素原子と結合しているエチレン基、またはリボースの4'位の炭素原子と結合しているエチリデン基を表し、

$Y$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、酸素原子または硫黄原子を表し、

$n$  は、1~200の何れかの整数を表し、

$W_1$  は、 $OZ$  基を表し、かつ、 $X_1$  は、 $R$  基を表すか、あるいは

$W_1$  は、 $OV$  基を表し、かつ、 $X_1$  は、 $OZ$  基を表し、

$V$  は、水酸基の保護基を表し、

$Z$  は、固相担体および連結基からなる構造を有する基である。

そして、 $n$  が2以上の整数のとき、式(1)で示される核酸オリゴマーは、それぞれのヌクレオチドの間に、非ヌクレオチドリinkerが組み込まれていてもよい。) )

で示される核酸オリゴマーと、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒド  $m \text{ mol}$  / ジクロロ酢酸  $m \text{ mol}$ ) が、 $90 \times 10^{-6}$  以下であるジクロロ酢酸溶液を反応させる工程を含む、式(2)：

10

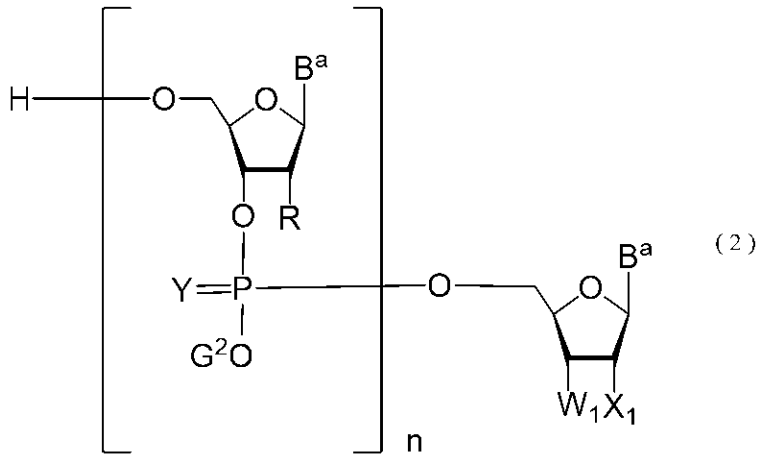
20

30

40

50

## 【化 2】



10

(式中、

$G^2$ 、 $B^a$ 、 $R$ 、 $Y$ 、 $X_1$ 、 $W_1$ および $n$ は、前記のとおりであり、そして、

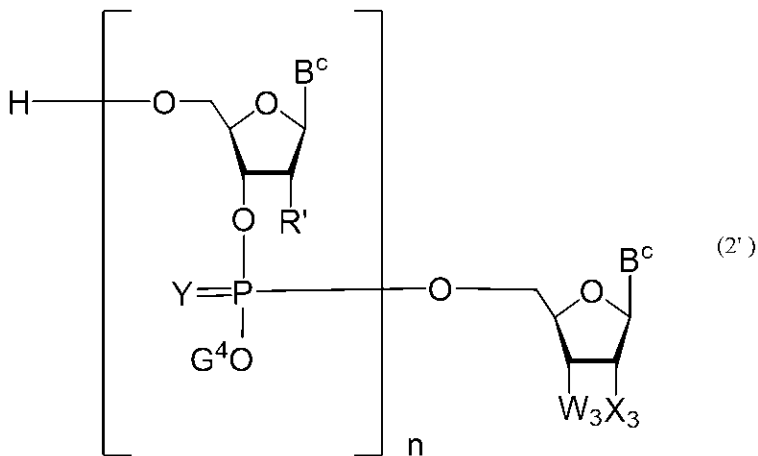
式(1)において定義されたとおり、ヌクレオチドの間に、非ヌクレオチドリinkerが組み込まれていてもよい。) )

で示される核酸オリゴマーの製造方法。

2. 前項1に記載の工程と、さらに、当該工程で生成する式(2)で示される核酸オリゴマーから $Z$ で表される基を除く工程、ならびに水酸基および核酸塩基の保護基を除く工程を含む、式(2') :

20

## 【化 3】



30

(式中、

$Y$ および $n$ は、前記のとおりであり、

$B^c$ は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、核酸塩基を表し、

$G^4$ は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水素原子、アルカリ金属イオン、アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、またはヒドロキシアルキルアンモニウムイオンを表し、

40

$R'$ は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水酸基、水素原子、フッ素原子、メトキシ基、2-メトキシエチル基、または $OQ'$ 基を表し、

$Q'$ は、前記のとおりであり、

$X_3$ および $W_3$ は各々、それぞれ独立して、水酸基を表すか、あるいは

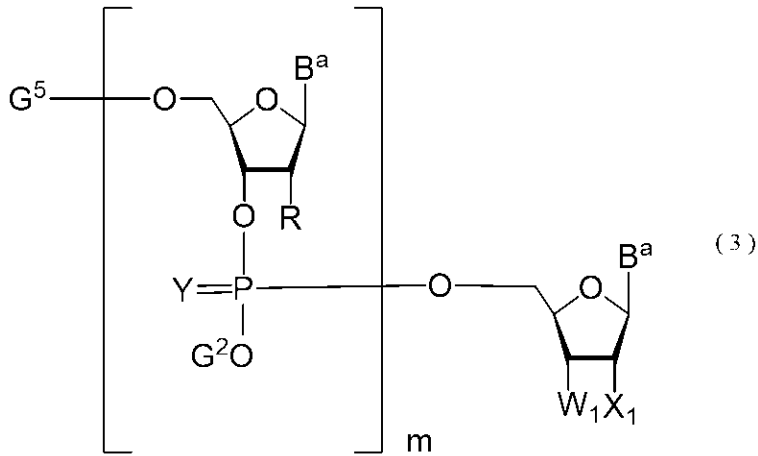
$X_3$ は、 $R'$ 基を表し、かつ、 $W_3$ は、水酸基を表す。) )

で示される核酸オリゴマーの製造方法。

3. 式(2)で示される核酸オリゴマーを、アミダイト法で任意に鎖長を伸長した式(3) :

50

## 【化4】

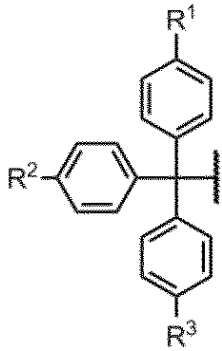


10

(式中、

G<sup>2</sup>、B<sup>a</sup>、R、Y、X<sub>1</sub>およびW<sub>1</sub>は、前記のとおりであり、G<sup>5</sup>は、

## 【化5】



20

で示される水酸基の保護基、もしくは水素原子を示し、

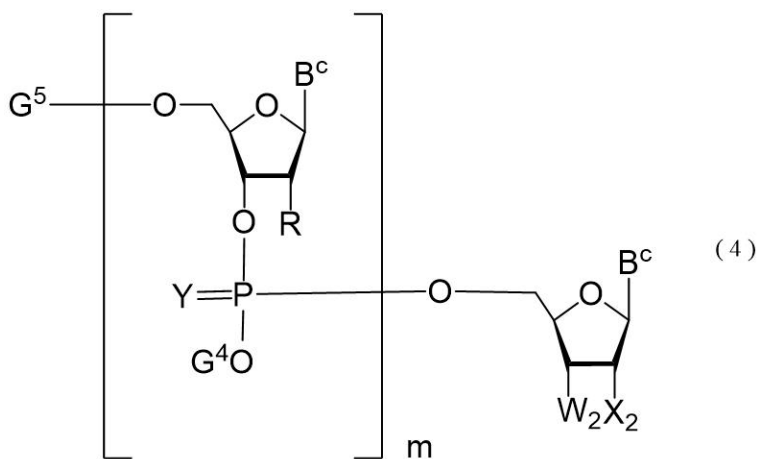
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>及びR<sup>3</sup>は、前記のとおりであり、

mは、m nを満たす整数である。) 30

で示される核酸化合物を得る工程、ならびに

式(3)で示される化合物から式(4)：

## 【化6】



40

(式中、

G<sup>5</sup>、R、Yおよびmは、前記のとおりであり、G<sup>4</sup>は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水素原子、アルカリ金属イオン、ア

50

ンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、またはヒドロキシアルキルアンモニウムイオンを表し、

$B^c$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、核酸塩基を表し、

$X_2$  は、水酸基を表し、かつ、 $W_2$  は、 $O^V$  基を表すか、あるいは

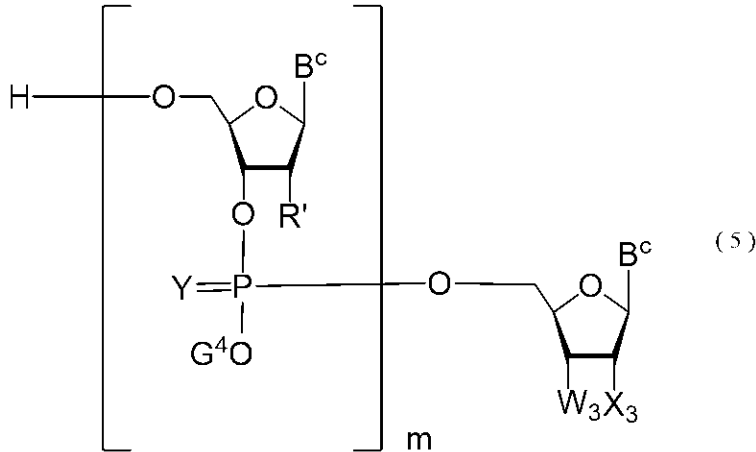
$X_2$  は、 $R$  基を表し、かつ、 $W_2$  は、水酸基を表し、

$V$  は、水酸基の保護基を表す。) )

で示される化合物を切り出し、

さらに式 (4) で示される化合物を脱保護して、式 (5) :

【化7】



(式中、

$G^4$ 、 $B^c$ 、 $Y$  および  $m$  は、前記のとおりであり、

$R'$  は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水酸基、水素原子、フッ素原子、メトキシ基、2-メトキシエチル基、または  $OQ'$  基を表し、

$Q'$  は、前記のとおりであり、

$X_3$  および  $W_3$  は各々、それぞれ独立して、水酸基を表すか、あるいは

$X_3$  は、 $R'$  基を表し、かつ、 $W_3$  は、水酸基を表す。) )

で示される核酸オリゴマーを製造する工程をさらに含む、前項1に記載の製造方法。

4. 非ヌクレオチドリンカーが、アミノ酸骨格からなるリンカーである、前項1~3の何れか一項に記載の製造方法。

5. アミノ酸骨格からなるリンカーが、下記式(A14-1)、(A14-2)および(A14-3)からなる群から選ばれる構造を有するリンカーである、前項4に記載の製造方法。

10

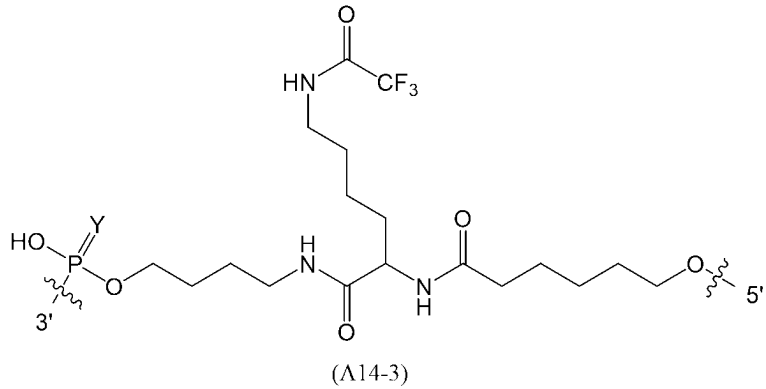
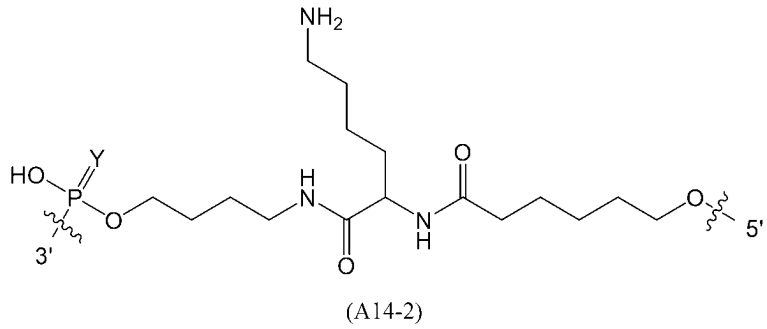
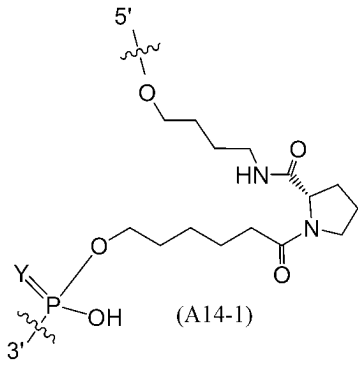
20

30

40

50

## 【化 8】



10

20

(式中、Yは、前記のとおりである。)

6．ジクロロ酢酸溶液が、ジクロロメタン、アセトニトリル、および芳香族有機溶媒からなる群から選ばれる少なくとも1つの溶媒を含む、前項1～5の何れか一項に記載の製造方法。

7．ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒドmol/ジクロロ酢酸mol)が、 $4.3 \times 10^{-6}$ 以下である、前項1～6の何れか一項に記載の製造方法。

8．ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒドmol/ジクロロ酢酸mol)が、 $2.2 \times 10^{-6}$ 以下である、前項1～6の何れか一項に記載の製造方法。

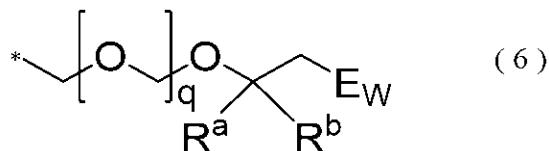
30

9．核酸オリゴマーが、リボ核酸(RNA)である、前項1～8の何れか一項に記載の製造方法。

10．核酸オリゴマーが、リボ核酸(RNA)であり、そのリボースの2'位の水酸基の保護基が、式(6)で示される保護基である、前項1～8の何れか一項に記載の製造方法。

式(6)：

## 【化 9】



40

(式中、

qは、1～5の何れかの整数を表し、

$R^a$ および $R^b$ は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、メチル基、エチル基または水素原子を表し、

\*印は、リボースの2'位の水酸基由来の酸素原子との結合点を表し、そして、

$E_W$ は、電子求引基を表す。)

11． $R^a$ および $R^b$ が同時に水素原子であり、かつ、 $E_W$ がシアノ基である、前項10に記載の製造方法。

50

12. 核酸オリゴマーが、40鎖長以上のオリゴマーである、前項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

13. 核酸オリゴマーが、50鎖長以上のオリゴマーである、前項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

14. 核酸オリゴマーが、60鎖長以上のオリゴマーである、前項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

15. 核酸オリゴマーが、80鎖長以上のオリゴマーである、前項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

16. 核酸オリゴマーが、100鎖長以上のオリゴマーである、前項1～11の何れか一項に記載の製造方法。

17. ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比（ホルムアルデヒドmol / ジクロロ酢酸mol）が、 $90 \times 10^{-6}$ 以下である、ジクロロ酢酸溶液。

18. ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比（ホルムアルデヒドmol / ジクロロ酢酸mol）が、 $43 \times 10^{-6}$ 以下である、前項17に記載のジクロロ酢酸溶液。

19. ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比（ホルムアルデヒドmol / ジクロロ酢酸mol）が、 $22 \times 10^{-6}$ 以下である、前項17に記載のジクロロ酢酸溶液。

20. ホルムアルデヒドを含む未精製ジクロロ酢酸溶液とホルムアルデヒドと共沸する溶媒を含む溶液からホルムアルデヒドを共沸させて留去することにより精製ジクロロ酢酸溶液を得る工程を含む、前項17～19の何れか一項に記載のジクロロ酢酸溶液の製造方法。

21. 共沸溶媒の沸点が、194以下である、前項20に記載の製造方法。

22. 共沸溶媒が、ジクロロメタン、アセトニトリルまたは芳香族有機溶媒である、前項20または21に記載の製造方法。

23. 芳香族有機溶媒がトルエンである、前項22に記載の製造方法。

24. 前項20に記載のジクロロ酢酸溶液の精製工程および当該工程で得られた精製ジクロロ酢酸溶液を使用する前項1～3の何れか一項に記載の工程を含む、核酸オリゴマーの製造方法。

#### 【発明の効果】

#### 【0008】

本発明は、効率的な核酸オリゴマーの製造方法を提供する。本発明の製造方法により、製造される核酸オリゴマーの収率向上が期待できる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0009】

【図1】図1は、式(1)で示される核酸オリゴマーから式(5)で示される核酸オリゴマーを製造する典型例を示すスキームAである。図中、 $G^1$ としては、水酸基の保護基として機能し得るものであれば特に制限なく使用することができ、アミダイト化合物で使用される公知の保護基を広く使用することができる。また、 $G^3$ は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、アルキル基を表し、あるいは2つの $G^3$ は互いに結合して環状構造を形成していてもよい。 $G^3$ としては、それぞれ独立して、同一又は相異なって、アルキル基、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、またはイソプロピル基であることが好ましく、両方がイソプロピル基であることがより好ましい。その他の記号は前記のとおりである。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0010】

前記式(1)で示される核酸オリゴマーに、ホルムアルデヒド濃度が一定以下であるジクロロ酢酸溶液を反応させ、前記式(2)で示される核酸オリゴマーを得る方法について説明する。

#### 【0011】

本発明のジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比（ホルムアルデヒドmol / ジクロロ酢酸mol）は、通常、 $90 \times 10^{-6}$ 以下、好ましくは、 $43 \times 10^{-6}$ 以下、より好ましくは、 $22 \times 10^{-6}$ 以下である。ジクロロ酢酸溶液中のホル

10

20

30

40

50

ムアルデヒド濃度測定方法には、ガスクロマトグラフ法または高速液体クロマトグラフ法がある。ガスクロマトグラフ法ではホルムアルデヒドを直接分析し濃度を算出する。高速液体クロマトグラフ法では、ホルムアルデヒドとアセチルアセトンとを反応させ、得られた3,5 ジアセチル 1,4 ジヒドロルチジンの量を測定し、ホルムアルデヒドの濃度を算出する。

【0012】

ジクロロ酢酸溶液中のジクロロ酢酸の濃度は、通常、0.1～2.4 M、好ましくは、0.1～1.2 M、より好ましくは、0.1～0.6 M、更に好ましくは、0.2～0.4 Mである。

【0013】

ジクロロ酢酸の希釈溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、ジクロロメタン、アセトニトリル、芳香族有機溶媒、水または任意の混合溶媒を挙げることができ、好ましくはジクロロメタン、アセトニトリル、および芳香族有機溶媒からなる群から選ばれる少なくとも1つの溶媒を挙げることができ、より好ましくは芳香族有機溶媒を挙げることができる。芳香族有機溶媒としては、トルエンを挙げることができる。

【0014】

上記反応における反応温度は、0～40 が好ましく、より好ましくは、10～30 である。

【0015】

ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドは、任意の溶媒または任意の混合溶媒との共沸により除去することができ、共沸溶媒としては、ジクロロ酢酸よりも沸点が低い溶媒であれば、特に限定されないが、ジクロロメタン、アセトニトリル、芳香族有機溶媒または任意の混合溶媒を挙げることができ、好ましくはジクロロメタン、アセトニトリル、または芳香族有機溶媒を挙げることができ、より好ましくは芳香族有機溶媒を挙げることができる。芳香族有機溶媒としては、トルエンを挙げることができる。

【0016】

共沸溶媒の沸点は、200 以下が好ましく、より好ましくは、194 以下である。

【0017】

ジクロロ酢酸溶液の保管には、ガラス製容器、プラスチック製容器、または金属製容器を使用することができる。プラスチック製容器としては、ポリエチレンまたはポリプロピレン製の容器を使用することができ、金属製容器としては、SUS製容器または Hastelloy 製の容器を使用することができる。

空気雰囲気下または不活性ガス雰囲気下で酸化溶液を保管することができ、不活性ガスとしては、アルゴン、窒素、二酸化炭素またはヘリウム等を使用することができる。

【0018】

5' 位の水酸基に保護基を有する核酸化合物としては、前記式(1)の核酸化合物が例示される。ジクロロ酢酸溶液を反応させて生成する核酸化合物としては、前記式(2)で示される核酸化合物が例示される。

前記式(1)および(2)において、Q' で表される、それぞれ独立して同一又は相異なって、リボースの4'位の炭素原子と結合しているメチレン基、リボースの4'位の炭素原子と結合しているエチレン基、またはリボースの4'位の炭素原子と結合しているエチリデン基を表す化合物として、具体的には下記式(7)の LNA-1、LNA-2、または LNA-3 で示される構造が挙げられる。

【0019】

10

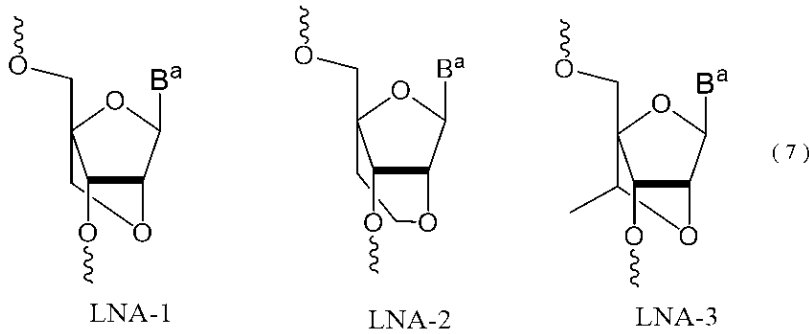
20

30

40

50

## 【化10】



10

(式中、B<sup>a</sup>は、保護されていてもよい核酸塩基を表す。)

## 【0020】

Zで示される、固相担体、および固相担体と核酸オリゴマーの3'末端のリボースの2'位もしくは3'位の水酸基の酸素原子とをつなぐ連結基からなる構造を有する基としては、より具体的には、下記式(8)で示される構造が挙げられる。

## 【化11】



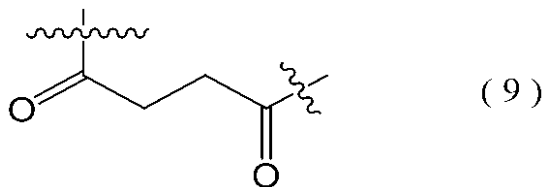
20

式(8)において、Spは、スペーサーを表す。

スペーサー(Sp)としては、例えば、下記式(9)に示す構造式を有するものが例示される。

## 【0021】

## 【化12】

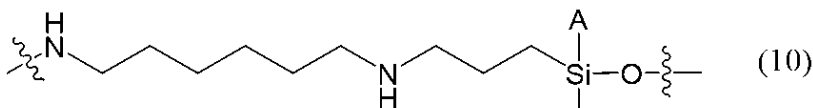


30

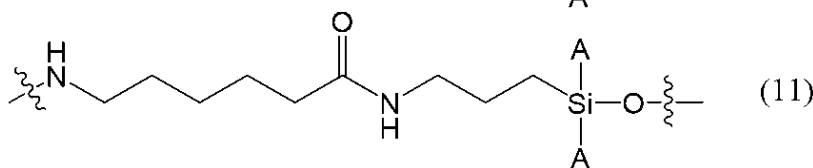
## 【0022】

Linkerは、例えば、下記式(10)に示す構造でもよいし、または式(10)の構造においてヘキサメチレンアミノ基部分を有さない構造であって、アミノプロピル基がSiに結合した構造でもよい。または、Linkerは下記式(11)で示す構造でもよい。

## 【化13】



40



(式中、

Aは、水酸基、アルコキシ基、またはアルキル基のいずれかであってもよい。アルコキシ基としては、例えばメトキシ基およびエトキシ基が挙げられる。アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、イソプロピル基、n-プロピル基が挙げられる。Siは、担

50

体表面の水酸基の酸素と結合していることを示す。)

Solid supportとしては、無機多孔質担体や有機系樹脂担体などが挙げられる。無機多孔質担体には、例えば、Controlled Pore Glass (CPG) が挙げられる。有機系樹脂担体には、例えば、ポリスチレンからなる担体が挙げられる。

【0023】

本発明で使用される核酸オリゴマー内に含まれるヌクレオシド（リボース、およびデオキシリボース）としては、DNA、RNA、2'-O-MOE（2'-O-メトキシエチル）、2'-O-Me、2'-F RNA、および前記のLNAが例示されるが、前記ヌクレオシドは、これらに限定されない。

10

【0024】

前記のジクロロ酢酸溶液による脱保護工程を含む、固相合成法による核酸オリゴマーの合成方法は、典型的には、以下の工程を含む。

(1) 固相担体にリンカーを介して結合している水酸基が保護されたヌクレオシドの5'位の水酸基を脱保護する工程、

(2) 前記工程で生成した5'位の水酸基をホスホロアミダイト化合物とカップリング反応させて垂リン酸トリエステル化合物を得る工程、

(3) 前記工程で生成した垂リン酸トリエステルを酸化してリン酸トリエステルに変換して伸長した核酸分子を製造する工程、あるいは、チオリン酸トリエステルに変換する任意の工程、

20

(4) 前記工程(1)~(3)、すなわち、生成した核酸分子の5'位の水酸基の脱保護工程、5'位の水酸基とアミダイト化合物とのカップリング工程、および、生成した垂リン酸トリエステルの酸化工程、から構成される一連の反応のサイクルを、任意の回数繰り返し、固相担体上に核酸分子を合成する工程、および

(5) 工程(4)で生成した固相担体上の核酸分子を、切り出しおよび脱保護する工程に供し、固相担体から遊離させて、保護基が除かれた核酸オリゴマーを製造する工程。

ただし、前記核酸オリゴマーの合成方法においては、工程(2)または(3)に続けて、ホスホロアミダイト化合物とのカップリング反応が進行しなかった5'位の水酸基をキャッピングする工程を含んでいてもよく、工程(4)を構成する一連の反応のサイクルの何れかの工程の間にキャッピング工程が付加されていてもよい。

30

【0025】

前記(5)の工程は、より具体的には、工程(4)で生成した固相担体上の核酸分子を、以下の工程(5-1)および(5-2)の反応の順に実施し、次いで工程(5-3)の反応に供することにより実施される。ここで工程(5-1)の反応の実施は、任意であってもよいし、工程(5-2)の反応の実施は、特許第4705716号公報に記載の方法を用いてもよい。その結果、固相担体から遊離した核酸分子から保護基が除かれた核酸オリゴマー、あるいは、5'末端の水酸基が保護された核酸オリゴマーを製造することができる。

(5-1) 核酸分子の5'末端の水酸基の保護基を脱保護する反応、

(5-2) 核酸分子を固相担体から切りだして遊離させる反応、および、

(5-3) 核酸分子を構成するリボースの2'位もしくは3'末端の3'位の水酸基の保護基を脱保護する反応。

40

【0026】

前記工程(1)から(5)のスキームを、図1に示す。図1に示される工程(1)または工程(4)における脱保護反応が、前記のジクロロ酢酸溶液を用いて実施される。スキームAにおける化学式中の置換基の定義は、前記定義のとおりである。

【0027】

前記式(1)の核酸化合物は、さらにアミダイト法によりヌクレオチド型または非ヌクレオチド型のリンカーを用いて任意の鎖長だけ伸長し、前記式(3)で示される核酸化合物の製造に使用することができる。前記式(3)の固相担体に結合した核酸化合物から核

50

酸化合物のみを切り出して、前記式(4)で示される核酸オリゴマーを得たのち、更に脱保護して前記式(5)で示される核酸オリゴマーを得ることもできる。以下、各式中の置換基についてさらに詳細に説明する。

【0028】

B<sup>a</sup>で示される保護基で保護されていてもよい核酸塩基およびB<sup>c</sup>で示される核酸塩基は、特に限定されない。当該核酸塩基としては、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、チミン、5-メチルシトシン、シュードウラシル、および1-メチルシュードウラシルなどが挙げられる。また、当該核酸塩基は、置換基により置換されていてもよい。そのような置換基としては、例えば、フルオロ基やクロロ基やプロモ基やヨード基のようなハロゲン原子、アセチル基のようなアシル基、メチル基やエチル基のようなアルキル基、ベンジル基のようなアリールアルキル基、メトキシ基のようなアルコキシ基、メトキシエチル基のようなアルコキシアルキル基、シアノエチル基のようなシアノアルキル基、ヒドロキシ基、ヒドロキシアルキル基、アシルオキシメチル基、アミノ基、モノアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、カルボキシ基、シアノ基、およびニトロ基など、並びにそれらの2種類以上の置換基の組み合わせが挙げられる。

10

【0029】

B<sup>a</sup>で示される保護基で保護されていてもよい核酸塩基の保護基としては、特に限定されず、公知の核酸化学で用いられる保護基を使用することができ、そのような保護基としては、例えば、ベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、4-メチルベンゾイル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、フェニルアセチル基、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、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、および(ジメチルアミノ)メチレン基など、並びにそれらの2種類以上の保護基の組み合わせが挙げられる。

20

【0030】

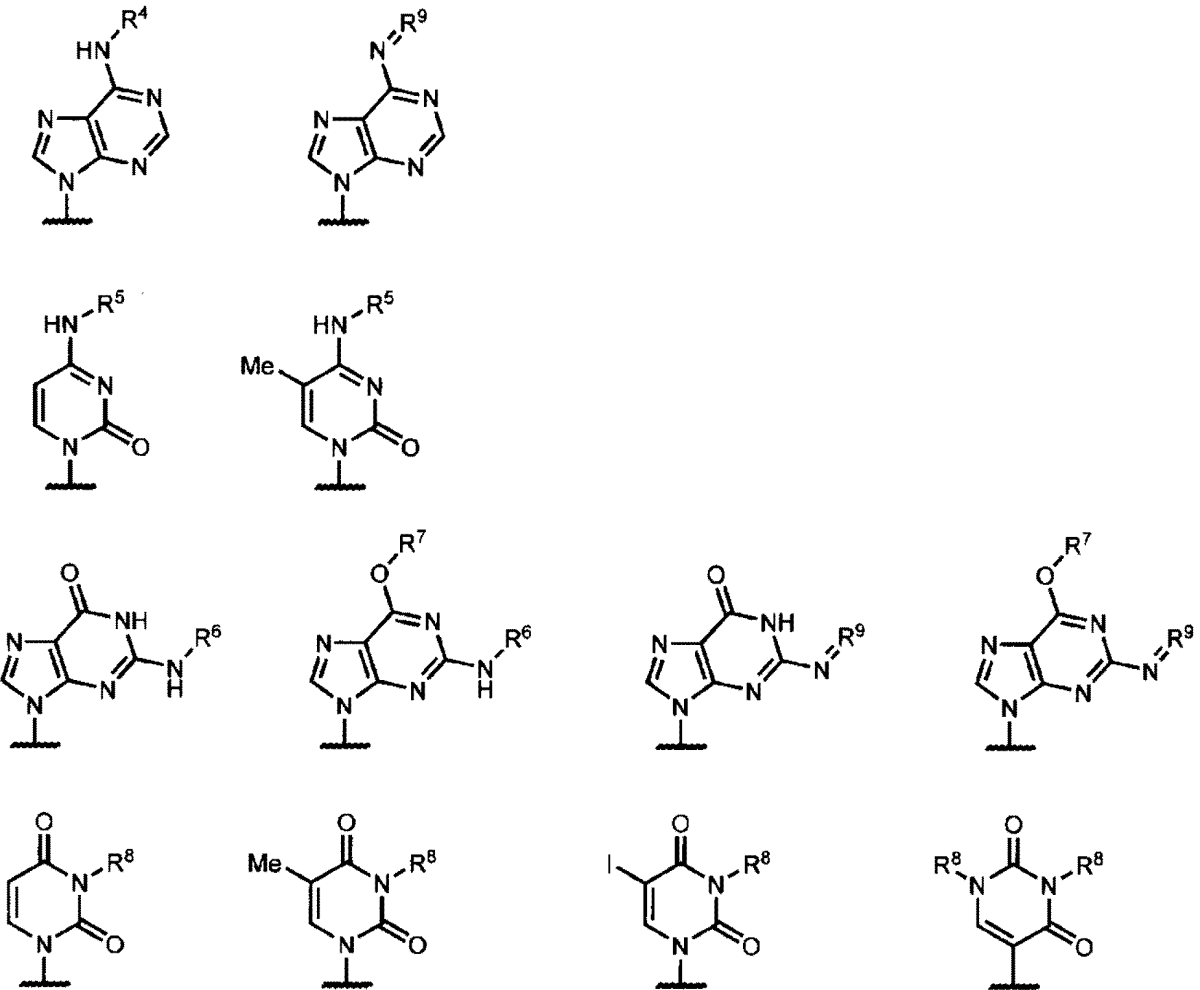
B<sup>a</sup>は、より具体的には、

30

40

50

## 【化 1 4】



10

20

## 【 0 0 3 1】

(上記式中、

$R^4$  は、水素原子、メチル基、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、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、フェニルアセチル基、アセチル基又はベンゾイル基を表し、

$R^5$  は、水素原子、アセチル基、イソブチリル基又はベンゾイル基を表し、

$R^6$  は、水素原子、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、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、フェニルアセチル基、アセチル基又はイソブチリル基を表し、

$R^7$  は、2-シアノエチル基を表し、

$R^8$  は、水素原子、メチル基、ベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基又は4-メチルベンゾイル基を表し、そして、

$R^9$  は、ジメチルアミノメチレン基を表す。)

のいずれかで表される基を表す。

## 【 0 0 3 2】

$B^c$  としては、より具体的には、上記  $B^a$  の具体例から保護基を除いた基が挙げられる。

## 【 0 0 3 3】

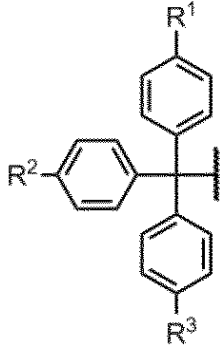
$G^5$  は、好ましくは、以下の基である。

30

40

50

## 【化15】



10

(式中、

$R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は、それぞれ独立して、同一又は相異なって、水素原子又はアルコキシ基を表す。)

## 【0034】

$R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は、1つが水素原子であり、残りの2つが同一または相異なる(同一が好ましい)アルコキシ基であることが好ましく、アルコキシ基としてはメトキシ基が特に好ましい。より好ましくは、 $G^5$ は、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMT r基)である。

## 【0035】

$G^2$ としては、水酸基の保護基として機能し得るものであれば特に制限なく使用することができ、アミダイト化合物で使用される公知の保護基を広く使用することができる。 $G^2$ としては、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、ハロアルキル基、アリール基、ヘテロアリール基、アリールアルキル基、シクロアルケニル基、シクロアルキルアルキル基、シクリルアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基、アルコキシアルキル基、ヘテロシクリルアルケニル基、ヘテロシクリルアルキル基、ヘテロアリールアルキル基、シリル基、シリルオキシアルキル基、モノ、ジ又はトリアルキルシリル基、モノ、ジ又はトリアルキルシリルオキシアルキル基などが挙げられ、これらは1つ以上の電子求引基で置換されていてもよい。

20

## 【0036】

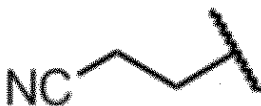
$G^2$ は、好ましくは、電子求引基で置換されたアルキル基である。当該電子求引基としては、例えば、シアノ基、ニトロ基、アルキルスルホニル基、ハロゲン原子、アリールスルホニル基、トリハロメチル基、およびトリアルキルアミノ基などが挙げられ、好ましくはシアノ基である。

30

## 【0037】

$G^2$ としては、特に好ましいのは、以下の基である。

## 【化16】



40

## 【0038】

前記 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $G^2$ の定義におけるアルキル基は、直鎖状又は分岐鎖状のいずれでもよく、好ましくは炭素数1~12のアルキル基、より好ましくは炭素数1~6のアルキル基である。具体的なアルキル基の例としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、及びヘキシル基が挙げられる。前記置換基の定義におけるアルコキシ基を構成するアルキル基部分は、ここでのアルキル基の定義と同じ定義を有する。

## 【0039】

50

また、本発明の方法において、アミダイト化合物は、フリーの状態又は塩の状態で使用することができる。アミダイト化合物の塩としては、塩基付加塩または酸付加塩が挙げられるが、特に制限されない。塩基付加塩としては、具体的には、ナトリウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩等の無機塩基との塩；メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン等の有機塩基との塩；リジン、オルニチン、アルギニン等の塩基性アミノ酸との塩；及びアンモニウム塩が挙げられる。酸付加塩としては、具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の鉱酸；ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、リンゴ酸、酒石酸、フマル酸、コハク酸、乳酸、マレイン酸、クエン酸、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、エタンスルホン酸等の有機酸；および、アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸との酸付加塩が挙げられる。アミダイト化合物には、塩、水和物、溶媒和物、および結晶多形などの形態も含まれる。

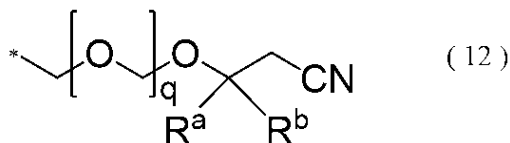
10

## 【0040】

Rは、好ましくは、保護された水酸基を示す。Rが保護された水酸基を示すときの保護基、またはVで示される水酸基の保護基は、アミダイト法において使用できるものであればよく、例えば、2'-tert-ブチルジメチルシリル(TBS)基、2'-ビス(2'-アセトキシ)メチル(ACE)基、2'-(トリイソプロピルシリロキシ)メチル(TOM)基、2'-(2'-シアノエトキシ)エチル(CEE)基、2'-(2'-シアノエトキシ)メチル(CEM)基、2'-パラ-トルイルスルホニルエトキシメチル(TEM)基、2'-EMM基(国際公開第2006/022323号公報)の他に、国際公開第2013/027843号公報および国際公開第2019/208571号公報に記載のものが使用できる。Vは、好ましくは、2'-tert-ブチルジメチルシリル(TBS)基である。また、本発明の方法で製造される核酸オリゴマーがリボ核酸(RNA)である場合など、核酸オリゴマー内にリボースが含まれる場合、そのリボースの2'位の水酸基の保護基として、前記式(6)で示される保護基が好ましい保護基として例示される。さらに好ましくは、E<sub>w</sub>で示される電子求引基としてシアノ基を有する式(12)で示される保護基が例示される。

20

## 【化17】



30

(式中、

q、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は、前記式(6)における定義と同義である。)

さらに好ましくは、式(12)で示される基において、qが1であり、R<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>が同時に水素原子である基が例示される。

## 【0041】

式(12)で示される保護基は、例えば国際公開第2013/027843号公報および国際公開第2019/208571号公報の記載に従って合成することができ、かかる保護基を有するアミダイト化合物を核酸化合物の製造に使用することができる。

40

核酸の伸長反応には、図1のスキームAに記載の式(13)のアミダイト化合物が使用される。

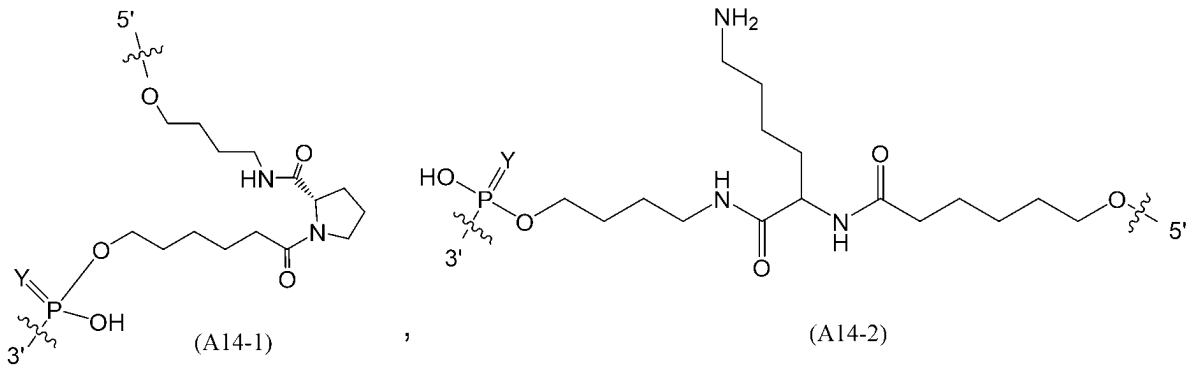
## 【0042】

非ヌクレオチドリンカーとしては、アミノ酸骨格からなるリンカー(例えば、特許第5157168号公報または特許第5554881号公報に記載されたアミノ酸骨格からなるリンカー)が例示される。具体的には、非限定的な例として、例えば、式(A14-1)もしくは(A14-2)もしくは(A14-3)(例えば、国際公開第2019/074110号公報に記載)で表されるリンカーが例示される。これらのリンカー以外に国際公開第2012/005368号公報、国際公開第2018/182008号公報または

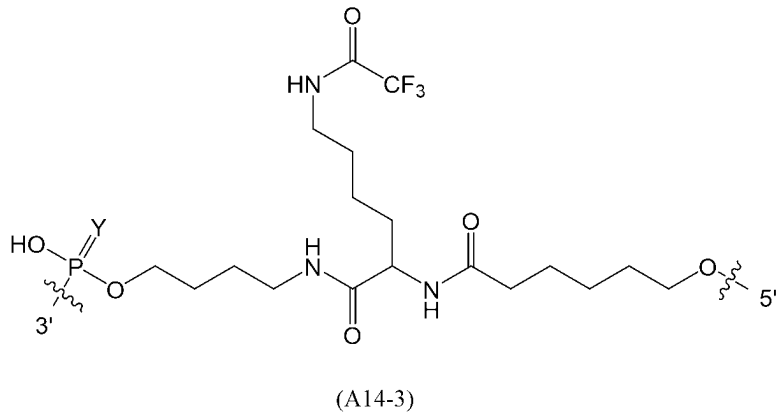
50

国際公開第2019/074110号公報に記載のリンカーが例示される。

【化18】



10



20

(式中、Yは、前記のとおりである。)

【0043】

式(13)におけるR基および式(5)におけるR'基が、水酸基以外の置換基であるヌクレオチドおよびアミダイトは、特許第3745226号公報などに記載された公知の方法、国際公開第2001/053528号公報あるいは特開2014-221817号公報およびそれらに引用される公知の方法で合成されるヌクレオチドから製造することもでき、さらには、市販品として入手可能なものを用いて、後述する実施例に記載の方法に則して又はこれらの方法に適宜変更を加えた方法により製造することができる。

30

【0044】

G<sup>4</sup>は、水素原子、アルカリ金属イオン、アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、またはヒドロキシルアルキルアンモニウムイオンを表す。アルカリ金属イオンとしては、例えば、ナトリウムイオン、およびリチウムイオンが挙げられる。また、アルキルアンモニウムイオンとして、具体的なアルキル基の例としては、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、及びヘキシル基が挙げられるが、より具体的には、例えば、ジエチルアンモニウムイオン、トリエチルアンモニウムイオン、テトラブチルアンモニウムイオン、ヘキシルアンモニウムイオン、およびジブチルアンモニウムイオンなどが挙げられる。また、ヒドロキシルアルキルアンモニウムイオンとして、具体的なヒドロキシルアルキル部分の例としては、例えば、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル、ヒドロキシ-n-プロピル、ヒドロキシイソプロピル、ヒドロキシ-n-ブチル、およびトリヒドロキシメチルが挙げられるが、より具体的なヒドロキシルアルキルアンモニウムイオンの例としては、トリヒドロキシメチルアンモニウムイオンなどが挙げられる。G<sup>4</sup>は、好ましくは、水素原子を表す。

40

【0045】

G<sup>5</sup>は、水素原子、または前記水酸基の保護基を表し、保護基を表す場合はG<sup>1</sup>も同じ保護基を表す。G<sup>5</sup>は脱保護された場合には水素原子であるが、その場合のヌクレオチド

50

化合物もまた、一連の核酸伸長反応の工程に供される。

【0046】

Yは、好ましくは、酸素原子である。

【0047】

W<sub>1</sub>およびX<sub>1</sub>は、好ましくは、W<sub>1</sub>がOZ基を表し、かつ、X<sub>1</sub>がR基を表す。

【0048】

W<sub>2</sub>およびX<sub>2</sub>は、好ましくは、W<sub>2</sub>が水酸基を表し、かつ、X<sub>2</sub>がR基を表す。

【0049】

W<sub>3</sub>およびX<sub>3</sub>は、好ましくは各々、それぞれ独立して、水酸基を表す。

【0050】

R'は、好ましくは、水酸基である。

【0051】

前記工程(1)から(5)のアミダイト法による核酸化合物の合成は、図1のスキーム中の工程(1)または工程(5)における、本発明に関わる脱保護工程以外は、一般的に公知の方法(例えば、前記の特許第5157168号公報または特許第5554881号公報に記載の方法)に従って、核酸伸長反応を行うことができる。以下、各工程について説明する。

【0052】

(核酸伸長反応)

本明細書において、「核酸伸長反応」とは、ホスホジエステル結合を介して、ヌクレオチドを順次結合させることにより、オリゴヌクレオチドを伸長させる反応を意味する。核酸伸長反応は、一般的なホスホロアミダイト法の手順に従い行うことができる。核酸伸長反応は、ホスホロアミダイト法を採用する核酸自動合成装置等を用いてもよい。

【0053】

核酸オリゴマーの鎖長は、例えば、20mer以上(すなわち、n=19)、40mer以上(すなわち、n=39)、50mer以上(すなわち、n=49)、60mer以上(すなわち、n=59)、80mer以上(すなわち、n=79)、100mer以上(すなわち、n=99)、2~200mer(すなわち、1<n<199)、10~150mer(すなわち、9<n<149)、15~110mer(すなわち、14<n<109)であってもよい。

【0054】

工程(1)の脱保護工程は、固相担体上に担持されたオリゴヌクレオチド鎖末端の5'水酸基の保護基を脱保護する工程である。一般的な保護基としては、4,4'-ジメトキシトリチル基(DMTri基)や4-モノメトキシトリチル基、4,4',4"-トリメトキシトリチル基が用いられる。脱保護は、酸を用いて行うことができる。脱保護用の酸としては、例えば、トリフルオロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリクロロ酢酸、メタンスルホン酸、塩酸、酢酸、およびp-トルエンスルホン酸等が挙げられる。

【0055】

工程(2)の縮合工程は、前記脱保護工程により脱保護したオリゴヌクレオチド鎖末端の5'水酸基に対して、図1のスキームAに記載の下記式(13)で示されるヌクレオシドホスホロアミダイトを結合させる反応である。なお、核酸伸長に用いるホスホロアミダイトとしては、式(13)または(A9)~(A12)で示されるアミダイト化合物を用いる。また、他に使用可能なホスホロアミダイトとして、2'-OMe、2'-F、2'-O-tert-ブチルジメチルシリル基、2'-O-メトキシエチル基、2'-H、および2'-フルオロ-2'-デオキシ-D-アラビノフラノシル基等が挙げられる。前記ヌクレオシドホスホロアミダイトとしては、5'水酸基が保護基(例、DMTri基)で保護されたものを用いる。縮合工程は、前記ヌクレオシドホスホロアミダイトを活性化する活性化剤または縮合剤を用いて行うことができる。活性化剤または縮合剤としては、例えば、5-ベンジルチオ-1H-テトラゾール(BTT)(5-ベンジルメルカプト-1H-テトラゾールとも称する)、1H-テトラゾール、4,5-ジシアノイミダゾール(DCI)、5

10

20

30

40

50

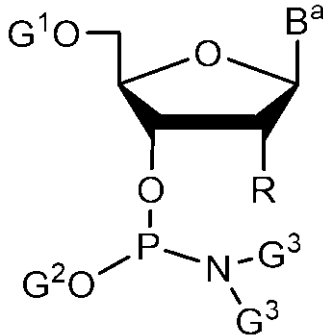
- エチルチオ - 1 H - テトラゾール ( E T T )、N - メチルベンズイミダゾリウムトリフラート ( N - M e B I T )、ベンズイミダゾリウムトリフラート ( B I T )、N - フェニルイミダゾリウムトリフラート ( N - P h I M T )、イミダゾリウムトリフラート ( I M T )、5 - ニトロベンズイミダゾリウムトリフラート ( N B T )、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール ( H O B T ) 又は 5 - ( ビス - 3 , 5 - トリフルオロメチルフェニル ) - 1 H - テトラゾール等が挙げられる。

【 0 0 5 6 】

図 1 のスキーム A に記載の式 ( 1 3 ) で示されるヌクレオシドホスホロアミダイト ( 以下、アミダイトと呼称する ) とは、以下のとおりである。

式:

【 化 1 9 】



(13)

( 式中、

G<sup>1</sup>、G<sup>2</sup>、G<sup>3</sup>、B<sup>a</sup>、および R は、前記の通りである。 ) で示される化合物。

【 0 0 5 7 】

縮合工程の後には、適宜、未反応の 5' 水酸基をキャッピングしてもよい。キャッピングは、無水酢酸 - テトラヒドロフラン溶液、またはフェノキシ酢酸無水物 / N - メチルイミダゾール溶液等の公知のキャッピング溶液を用いて行うことができる。

【 0 0 5 8 】

工程 ( 3 ) の酸化工程は、前記縮合工程により形成された亜リン酸基をリン酸基又はチオリン酸基に変換する工程である。本工程は、3 価のリンから 5 価のリンに酸化剤を使用して変換する反応であり、固相担体に担持されているオリゴ核酸誘導体に酸化剤を反応させることにより実施することができる。

亜リン酸基をリン酸基に変換する場合には、「酸化剤」として、例えば、ヨウ素を使用することができる。該酸化剤は、0.005 ~ 2 M の濃度になるように調製して使用することができる。酸化の酸素源としては水を用いることができ、反応を進行させる塩基としてはピリジン、N - メチルイミダゾール ( N M I )、N - メチルモルフォリン、またはトリエチルアミンなどを用いることができる。また、溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、アセトニトリル、テトラヒドロフラン ( T H F ) 又はこれらの任意の割合の混合溶媒が挙げられる。例えば、ヨウ素 / 水 / ピリジン / アセトニトリル、あるいはヨウ素 / 水 / ピリジンあるいはヨウ素 / 水 / ピリジン / N M I、あるいはヨウ素 / 水 / ピリジン / T H F を用いることができる。反応温度は、5 ~ 50 が好ましい。反応時間は、通常 1 分 ~ 3 0 分が適当である。使用する試薬の量は固相担体に担持されている化合物 1 m o l に対して 1 ~ 1 0 0 m o l が好ましく、より好ましくは 1 ~ 1 0 m o l である。

【 0 0 5 9 】

亜リン酸トリエステル基をチオリン酸トリエステル基に変換する場合には、「酸化剤」として、例えば、硫黄、3 H - 1, 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン - 1, 1 - ジオキシド ( B e a u c a g e 試薬 )、3 - アミノ - 1, 2, 4 - ジチアゾール - 5 - チオン ( A

10

20

30

40

50

DTT)、5-フェニル-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-オン(POS)、[(N,N-ジメチルアミノメチリデン)アミノ]-3H-1,2,4-ジチアゾリン-3-チオン(DDTT)、およびフェニルアセチルジスルフィド(PADS)を使用することができる。該酸化剤は、0.001~2Mの濃度になるように適当な溶媒で希釈して使用することができる。反応に使用する溶媒としては、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、ピリジン又はこれらの任意の割合の混合溶媒が挙げられる。酸化工程は、前記キャッピング操作の後で行ってもよいし、逆に、酸化工程の後でキャッピング操作を行ってもよいし、この順序は限定されない。

#### 【0060】

工程(5-1)において、伸長の最後に導入したヌクレオチドの5'位の水酸基の保護基は、後述の固相担体からの切り出し及び保護基の脱保護の後、5'位の水酸基の保護基をタグとするカラム精製のために使用してもよく、カラム精製後、5'位の水酸基の保護基を脱保護してもよい。

10

#### 【0061】

工程(5-2)において、リン酸保護基を脱保護する工程は、所望の配列を有する核酸の合成が完了した後は、リン酸部分の保護基を脱保護するためにアミン化合物を作用させる。アミン化合物としては、例えば、特許第4705716号公報に記載されるジエチルアミン等が挙げられる。

#### 【0062】

工程(5-2)における、固相担体上で所望の鎖長に伸長した核酸オリゴマーの、固相担体からの切り出しは、通常、切り出し剤として濃アンモニア水を用いて実施される。

20

#### 【0063】

更にアンモニア又はアミン化合物等を用いて、例えば、固相担体からオリゴヌクレオチド鎖を切断して回収する。アミン化合物としては、例えば、メチルアミン、エチルアミン、イソプロピルアミン、エチレンジアミン、またはジエチルアミン等が挙げられる。

#### 【0064】

工程(5-3)において、工程(5-2)において固相担体から切り出された核酸化合物(4)のリボースの2'位もしくは3'位の水酸基の保護基は、国際公開第2006/022323号公報)、国際公開第2013/027843号公報、または国際公開第2019/208571号公報に記載の方法に従って除くことができ、脱保護した核酸オリゴマー(5)を得ることができる。

30

#### 【0065】

本発明の製造方法を用いて製造可能な核酸オリゴマーとしては、核酸オリゴマー内に含まれるヌクレオチドが、RNA、DNA、並びに2'-O-MOE、2'-O-Me、2'-Fを有するRNA、およびLNAである核酸オリゴマーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えば、Xiulong, Shenら著、Nucleic Acids Research, 2018, Vol. 46, No.46, 1584-1600、およびDaniel O'Reillyら著、Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No.2, 546-558に記載された、様々なヌクレオチドの例が挙げられる。好ましくは、本発明の方法で製造される核酸オリゴマーはRNAである。

#### 【0066】

40

本発明の製造方法において使用可能な核酸オリゴマーの典型的な例を、実施例に記載の例に加えて下記の例を示すが、これらに限定されるものではない。

以下、配列の説明中、Uはウリジンを、Cはシチジンを、Aはアデノシンを、またGはグアノシンを示す。

国際公開第2019/060442号公報に記載されている、下記の配列(A)および(B)を有する核酸オリゴマーが挙げられる。

配列(A): 5'-AUGGAAUmACUCUUGGUUmACdTdT-3'(Antisense)(配列番号1)21mer

配列(B): 5'-GUmAACmCmAAGAGUmAUmUmCmCmAUmdTdT-3'(Sense)(配列番号2)21mer

50

配列 ( A ) および ( B ) 中、Umは2'-O-メチルウリジンを、Cmは2'-O-メチルシチジンを、またdTはチミジンを示す。

Daniel O'Reillyら著、Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No.2, 546-558 に記載されている核酸オリゴマー ( 553頁参照 ) が挙げられる。典型例として、下記の配列 ( C ) を有する核酸オリゴマーが挙げられる。

配列 ( C ) : 5' - AGAGCCAGCCUUCUUAUUGUUUUAGAGCUAUGCUGU - 3' ( 配列番号 3 ) 36mer

特許第4965745号公報に記載されている核酸オリゴマーが挙げられる。典型例として、下記の配列 ( D ) を有する核酸オリゴマーが挙げられる。

配列 ( D ) : 5' - CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC-P-GGCUGUUGUCAUACUUCUCA UGGUU - 3' ( 配列番号 4 , 5 ) 49mer 10

配列 ( D ) 中、“ P ” は、以下の式 ( A 5 ) において波線で区切られる部分構造で示される。

なお、配列表中の配列番号 4 の記載は、配列 ( D ) の 5' 末端から「 P 」の前までの下記の配列 ( D 1 ) の塩基配列を示し、配列番号 5 の記載は、配列 ( D ) の「 P 」の後から 3' 末端までの下記の配列 ( D 2 ) の塩基配列を示す。

配列 ( D 1 ) : 5' - CCAUGAGAAGUAUGACAACAGCC - 3' ( 配列番号 4 ) 23mer

配列 ( D 2 ) : 5' - GGCUGUUGUCAUACUUCUCAUGGUU - 3' ( 配列番号 5 ) 25mer

Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 2: 547に記載されている、下記の配列 ( E ) を有する核酸オリゴマーが挙げられる。 20

配列 ( E ) : 5' - ACAGCAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCU - 3' ( 配列番号 6 ) 67mer

特表2015-523856号公報、173頁に記載されている、下記の配列 ( F ) を有する核酸オリゴマーが挙げられる。

配列 ( F ) : 5' - GUUUUCCUUUUCAAGAAUCUCCUGGGCACCUAUCUUCUUAAGG UGCCCUCUUGUUUAAACCUGACCAGUUAACCGGCUGGUUAGGUUUUU - 3' ( 配列番号 7 ) 94mer

特表2017-537626号公報に記載されている核酸オリゴマーが挙げられる。典型例として、下記の配列 ( G )、( H )、( I )、および ( J ) を有する核酸オリゴマーが挙げられる。 30

配列 ( G ) : 5' - AGUCCUCAUCUCCUCAAGCGUUUUAGAGCUAGUAAUAGCAAGUU AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU - 3' ( 配列番号 8 ) 100mer

配列 ( H ) : 5' - GCAGAUGUAGUGUUUCCACAGUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGC AUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCUUUUUUU - 3' ( 配列番号 9 ) 113mer

配列 ( I ) : 5' - dAdGdTdCdCdTdCdAdTdCdTdCdCdTdCdAdAdGdCGUUUAAGA GCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU - 3' ( 配列番号 10 ) 113mer 40

配列 ( I ) 中、dTはチミジンを、dCは2'-デオキシシチジンを、dAは2'-デオキシアデノシンを、またdGは2'-デオキシグアノシンを示す。

配列 ( J ) : 5' - AmsGmsUmsCCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUA ACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUUmsUmsUmsU - 3' ( 配列番号 11 ) 113mer

配列 ( J ) 中、Umは2'-O-メチルウリジンを、Amは2'-O-メチルアデノシンを、Gmは2'-O-メチルグアノシンを、またsはホスホロチオエート修飾を示す。

#### 【実施例】

#### 【0067】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定され 50

るものではない。

<測定方法>

まず、以下の試験で用いた各種測定方法を以下に示す。

【0068】

オリゴヌクレオチド純度は、HPLCを用いて測定した。

HPLC測定条件を下記表1に示す。

(測定方法1：オリゴヌクレオチド純度の測定)

【表1】

表1

カラム	DNA Pac TM PA200 4×250mm	10
流速	1.0 mL/min	
検出波長	260nm	
移動相A	25mM Tris-HCl buffer (pH=8.0), 10% CH <sub>3</sub> CN, 6M Urea水	
移動相B	500mM NaClO <sub>4</sub> , 25mM Tris-HCl buffer (pH=8.0), 10% CH <sub>3</sub> CN, 6M Urea水	
グラジエント条件	B conc. 20% (0min) - 60% (60min) - 90% (60.01min) - 90% (65min) - 20% (65.01min) - 20% (80min)	
カラム温度	80°C	20

【0069】

(測定方法2：オリゴヌクレオチド収量の測定)

粗生成物のOD<sub>260</sub>を測定した。OD<sub>260</sub>とは1mL溶液(pH=7.5)における10mm光路長あたりのUV260nmの吸光度を表す。一般的にRNAでは1OD=40μgであることが知られていることから、前記OD<sub>260</sub>の測定値に基づき、収量を算出した。

【0070】

(測定方法3：ホルムアルデヒド濃度の測定)

ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒド濃度測定方法には、ガスクロマトグラフ法または高速液体クロマトグラフ法がある。ガスクロマトグラフ法ではホルムアルデヒドを直接分析し濃度を算出する。高速液体クロマトグラフ法では、ホルムアルデヒドとアセチルアセトンとを反応させ、得られた3,5 ジアセチル 1,4 ジヒドロルチジンの量を測定し、ホルムアルデヒドの濃度を算出する。

【0071】

<ジクロロ酢酸溶液の調製>

以下の試験で用いたホルムアルデヒド濃度の異なるジクロロ酢酸溶液は、予めホルムアルデヒド濃度の低いジクロロ酢酸溶液を調製し、得られたジクロロ酢酸溶液にホルムアルデヒド水溶液を添加して調製した。

【0072】

<オリゴヌクレオチドの固相合成>

配列(I)：5'-GGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3' (配列番号12) 20mer

配列(II)：5'-AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3' (配列番号13) 50mer

配列(III)：5'-AUAACUCAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3' (配列番号14) 100mer

前記配列(I)、(II)および(III)中、“A”は、以下の式(A1)において波線で区切られる部分構造で示される。“C”は、以下の式(A2)において波線で区切られる部分構造で示される。“G”は、以下の式(A3)において波線で区切られる部分構造で

30

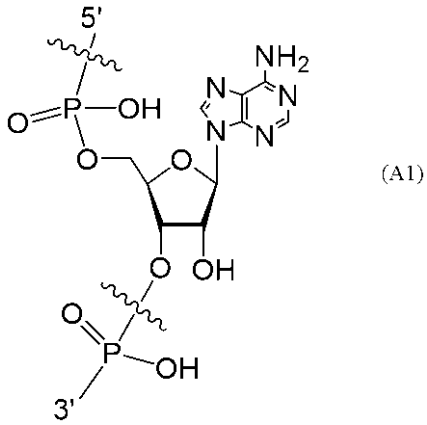
40

50

示される。Uは、以下の式(A4)において波線で区切られる部分構造で示される。なお、3'末端の“U”は、以下の式(A8)において波線で区切られる部分構造で示される。また、配列(I)中、5'末端の“G”は、以下の式(A6)において波線で区切られる部分構造で示され、配列(II)および(III)中、5'末端の“A”は、以下の式(A7)において波線で区切られる部分構造で示される。

【0073】

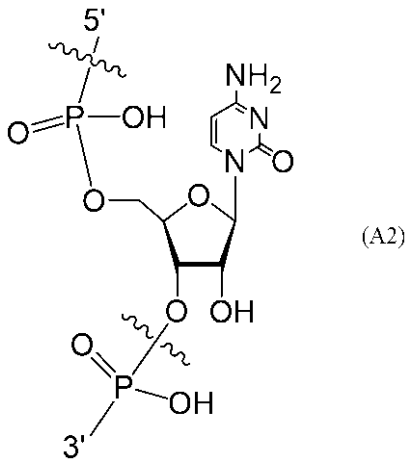
【化20】



10

【0074】

【化21】

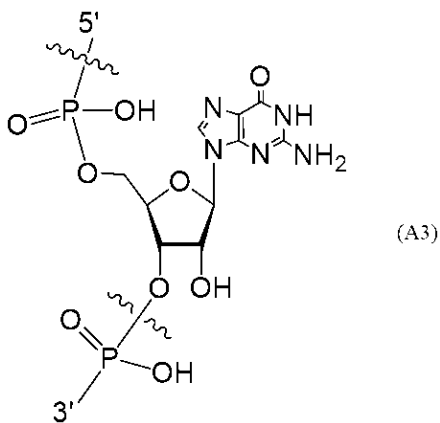


20

30

【0075】

【化22】

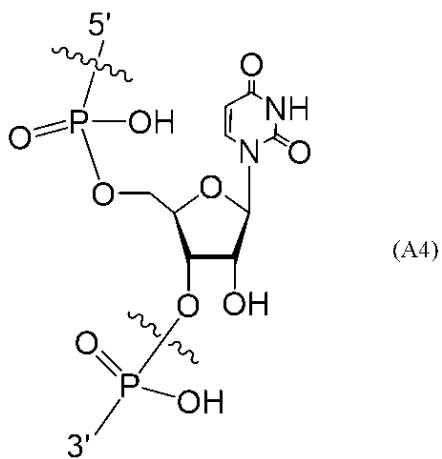


40

【0076】

50

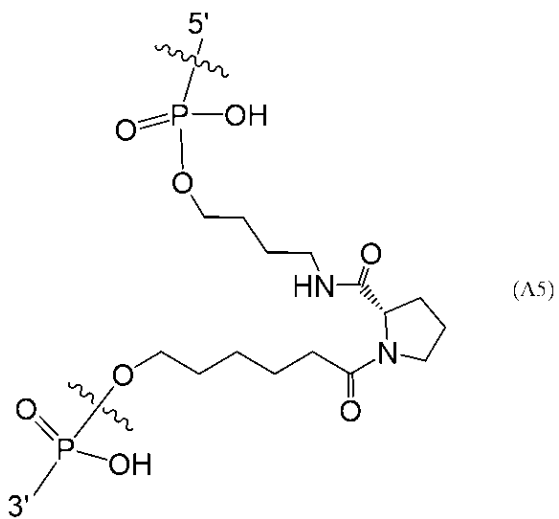
【化23】



10

【0077】

【化24】

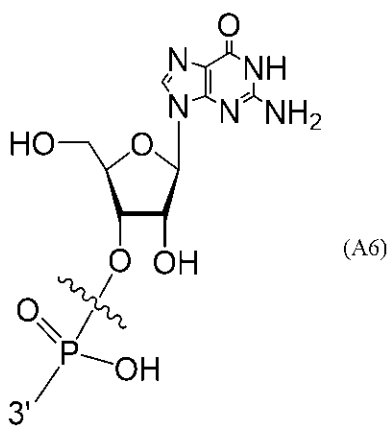


20

30

【0078】

【化25】

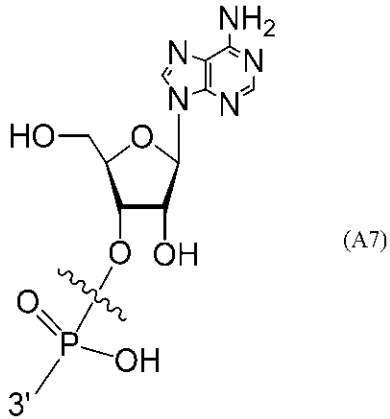


40

【0079】

50

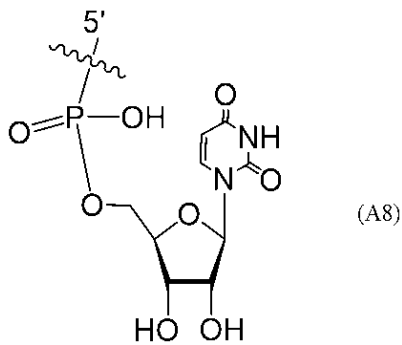
## 【化 2 6】



10

## 【 0 0 8 0】

## 【化 2 7】



20

## 【 0 0 8 1】

固相担体として、Controlled Pore Glass (CPG) を使用し、核酸合成機として NTS M - 4 MX - E (日本テクノサービス社製) を用いて、ホスホロアミダイト固相合成法により、前記配列 (I)、(II) および (III) からなるオリゴヌクレオチドを 3' 側から 5' 側に向かって合成した。合成は、約 1  $\mu\text{mol}$  スケールにて実施した。また、合成には、US 2012/0035246 の実施例 2 に記載のウリジン EMM アミダイト (A11)、実施例 3 に記載のシチジン EMM アミダイト (A9)、実施例 4 に記載のアデノシン EMM アミダイト (A12)、および実施例 5 に記載のグアノシン EMM アミダイト (A10) を使用し、デブロッキング溶液として 3% ジクロロ酢酸トルエン溶液を使用し、縮合剤として 5 - ベンジルメルカプト - 1H - テトラゾールを使用し、酸化剤としてヨウ素溶液を使用し、キャッピング溶液としてフェノキシ酢酸無水物溶液と N - メチルイミダゾール溶液を使用した。

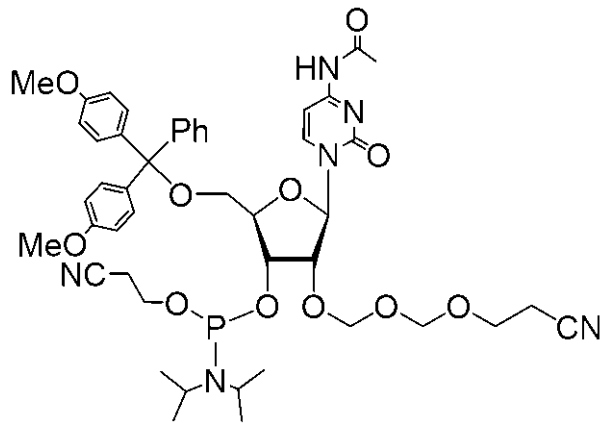
30

## 【 0 0 8 2】

40

50

【化 2 8】

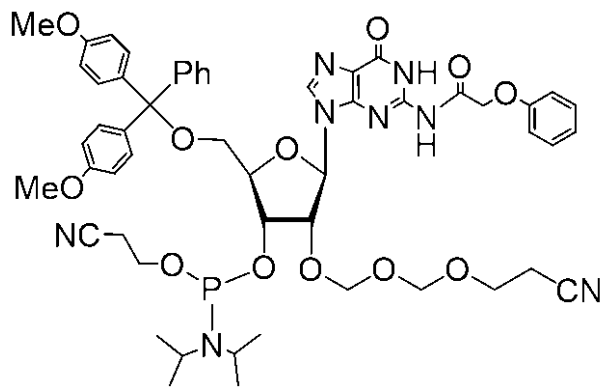


(A9)

10

【 0 0 8 3】

【化 2 9】

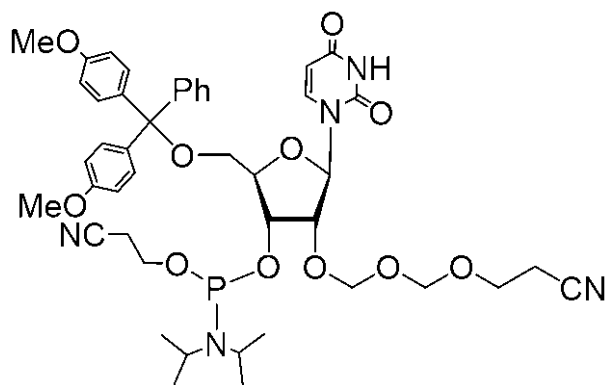


(A10)

20

【 0 0 8 4】

【化 3 0】



(A11)

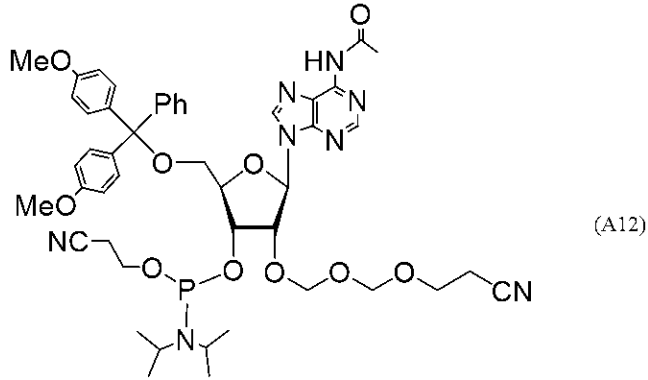
30

【 0 0 8 5】

40

50

## 【化 3 1】



10

## 【 0 0 8 6】

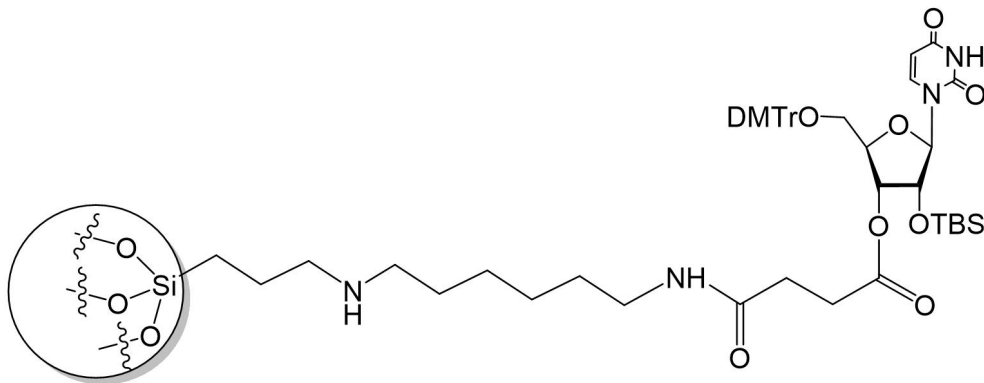
次に、本発明の製法により製造されるオリゴヌクレオチド（核酸オリゴマー）の具体的な製造例を示す。ここで、下記の実施例において本発明の製法により製造されるオリゴヌクレオチドは、前記配列（I）、（II）および（III）を有するオリゴヌクレオチドである。

また、以下の実施例および比較例中に記載するウリジン誘導体とは、下記の構造式で示される化合物を意味する。下記構造式において図示されたサークルは、CPGを模式的に示すものである。

20

## 【 0 0 8 7】

## 【化 3 2】



30

## 【 0 0 8 8】

## （実施例 1）

0.98  $\mu\text{mol}$  のウリジン誘導体を担持した Controlled Pore Glass (CPG) と、式 (A9)、式 (A10)、式 (A11)、または式 (A12) に示すアミダイトを用いて、配列 (I) に示す核酸オリゴマーを NTS M-4MX-E (日本テクノサービス社製) により、3' 側から 5' 側に向かって自動合成した。自動合成の手順は、まず、3% ジクロロ酢酸トルエン溶液を CPG に送液し、5' 位のトリチル保護基を脱保護した。この際、使用したジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒド濃度は、測定方法 3 により測定することができ、ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比 (ホルムアルデヒド  $\text{mol}$  / ジクロロ酢酸  $\text{mol}$ ) は、 $4.3 \times 10^{-7}$  であった。続いて、各種アミダイトと縮合剤として 5-ベンジルメルカプト-1H-テトラゾールを CPG に送液し、5' 位の水酸基にカップリング反応を進行させた。続いて、50 mM ヨウ素を含む酸化溶液を送液し、亜リン酸基をリン酸基に変換した。続いて、カップリング溶液として 0.1 M フェノキシ酢酸無水物アセトニトリル溶液と 10% N-メチルイミダゾール / 10% 2,6-ルチジンアセトニトリル溶液を使用し、カップリングが進行しなかった反応点にカップリングを施した。更にこれらの工程を合計 19 回繰り返した後、5' 末端の塩基における保護基 (DMTr 基) を 3% ジクロロ酢酸トルエン溶液で脱保護し、配

40

50

列 ( I ) に示される配列の核酸オリゴヌクレオチドを C P G 担体上に合成した。その後、 $0.98 \mu\text{mol}$  分のオリゴヌクレオチドを担持した C P G 担体に対して、28%アンモニア水 1.5 mL とエタノール 0.5 mL を流入し、混合物を  $40^\circ\text{C}$  で 4 時間保温することで核酸オリゴマーを固相担体から遊離させた後、濃縮により溶媒を除去した。次いで遊離オリゴヌクレオチドをジメチルスルホキシド 1.5 mL に溶解後、アセトニトリル 1.0 mL、ニトロメタン  $20 \mu\text{L}$  と攪子を入れた後、モレキュラーシーブ 4 A にて脱水処理を施した 1 M のフッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム ( T B A F ) のジメチルスルホキシド溶液  $2.08 \text{ mL}$  をスターラーによる攪拌下室温で流入し、混合物を  $33^\circ\text{C}$  で 4 時間保温することで 2' - E M M 保護基の脱保護を行った。その後、核酸オリゴマーの生成物を沈殿操作により得た。得られた生成物について、前記測定方法 1 に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、純度は 76.2% であった。また、前記測定方法 2 に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は  $4032 \mu\text{g}$  であり、 $1.00 \mu\text{mol}$  のウリジン誘導体を担持した C P G あたりの収量に換算すると  $4114 \mu\text{g}$  であった。結果を表 2 に示す。

【 0 0 8 9 】

( 実施例 2 )

実施例 1 の実験において、 $1.02 \mu\text{mol}$  のウリジン誘導体を担持した C o n t r o l l e d P o r e G l a s s ( C P G ) と、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比 (ホルムアルデヒド  $\text{mol}$  / ジクロロ酢酸  $\text{mol}$ ) が  $90 \times 10^{-6}$  である 3% ジクロロ酢酸トルエン溶液を用いる以外は、同様の方法で配列 ( I ) の核酸オリゴマーを得た。前記測定方法 1 に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、生成物の純度は 75.0% であった。また、前記測定方法 2 に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は  $4147 \mu\text{g}$  であり、 $1.00 \mu\text{mol}$  のウリジン誘導体を担持した C P G あたりの収量に換算すると  $4066 \mu\text{g}$  であった。結果を表 2 に示す。

【 0 0 9 0 】

( 参考例 1 )

実施例 1 の実験において、 $1.03 \mu\text{mol}$  のウリジン誘導体を担持した C o n t r o l l e d P o r e G l a s s ( C P G ) と、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比 (ホルムアルデヒド  $\text{mol}$  / ジクロロ酢酸  $\text{mol}$ ) が  $20 \times 10^{-5}$  である 3% ジクロロ酢酸トルエン溶液を用いる以外は、同様の方法で配列 ( I ) の核酸オリゴマーを得た。前記測定方法 1 に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、生成物の純度は 73.8% であった。また、前記測定方法 2 に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は  $3979 \mu\text{g}$  であり、 $1.00 \mu\text{mol}$  のウリジン誘導体を担持した C P G あたりの収量に換算すると  $3863 \mu\text{g}$  であった。結果を表 2 に示す。

【 0 0 9 1 】

( 実施例 3 )

$1.03 \mu\text{mol}$  のウリジン誘導体を担持した C o n t r o l l e d P o r e G l a s s ( C P G ) と、式 ( A 9 )、式 ( A 1 0 )、式 ( A 1 1 )、または式 ( A 1 2 ) に示すアミダイトを用いて、配列 ( I I ) に示す核酸オリゴマーを N T S M - 4 M X - E (日本テクノサービス社製) により、3' 側から 5' 側に向かって自動合成した。自動合成の手順は、まず、3% ジクロロ酢酸トルエン溶液を C P G に送液し、5' 位のトリチル保護基を脱保護した。この際、使用したジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒド濃度は、測定方法 3 により測定することができ、ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比 (ホルムアルデヒド  $\text{mol}$  / ジクロロ酢酸  $\text{mol}$ ) は、 $43 \times 10^{-7}$  であった。続いて、各種アミダイトと縮合剤として 5 - ベンジルメルカプト - 1 H - テトラゾールを C P G に送液し、5' 位の水酸基にカップリング反応を進行させた。続いて、50 mM ヨウ素を含む酸化溶液を送液し、亜リン酸基をリン酸基に変換した。続いて、カップリング溶液として 0.1 M フェノキシ酢酸無水物アセトニトリル溶液と 10% N - メチルイミダ

10

20

30

40

50

ゾール / 10% 2,6-ルチジンアセトニトリル溶液を使用し、カップリングが進行しなかった反応点にキャッピングを施した。更にこれらの工程を合計49回繰り返した後、5'末端の塩基における保護基(DMT r基)を3%ジクロロ酢酸トルエン溶液で脱保護し、配列(II)に示される配列の核酸オリゴヌクレオチドをCPG担体上に合成した。その後、1.03 μmol分のオリゴヌクレオチドを担持したCPG担体に対して、28%アンモニア水1.5 mLとエタノール0.5 mLを流入し、混合物を40°Cで4時間保温することで核酸オリゴマーを固相担体から遊離させた後、濃縮により溶媒を除去した。次いで遊離オリゴヌクレオチドをジメチルスルホキシド1.5 mLに溶解後、アセトニトリル1.0 mL、ニトロメタン20 μLと攪子を入れた後、モレキュラーシーブ4Aにて脱水処理を施した1Mのフッ化テトラ-n-ブチルアンモニウム(TBAF)のジメチルスルホキシド溶液2.08 mLをスターラーによる攪拌下室温で流入し、混合物を33°Cで4時間保温することで2'-EMM保護基の脱保護を行った。その後、核酸オリゴマーの生成物を沈殿操作により得た。得られた生成物について、前記測定方法1に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、純度は50.8%であった。また、前記測定方法2に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は9156 μgであり、1.00 μmolのウリジン誘導体を担持したCPGあたりの収量に換算すると8889 μgであった。結果を表2に示す。

【0092】

(実施例4)

実施例3の実験において、1.05 μmolのウリジン誘導体を担持したControlled Pore Glass(CPG)と、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒドmol/ジクロロ酢酸mol)が $90 \times 10^{-6}$ である3%ジクロロ酢酸トルエン溶液を用いる以外は、同様の方法で配列(II)の核酸オリゴマーを得た。前記測定方法1に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、生成物の純度は47.8%であった。また、前記測定方法2に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は9378 μgであり、1.00 μmolのウリジン誘導体を担持したCPGあたりの収量に換算すると8931 μgであった。結果を表2に示す。

【0093】

(参考例2)

実施例3の実験において、1.05 μmolのウリジン誘導体を担持したControlled Pore Glass(CPG)と、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒドmol/ジクロロ酢酸mol)が $20 \times 10^{-5}$ である3%ジクロロ酢酸トルエン溶液を用いる以外は、同様の方法で配列(II)の核酸オリゴマーを得た。前記測定方法1に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、生成物の純度は42.8%であった。また、前記測定方法2に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は9307 μgであり、1.00 μmolのウリジン誘導体を担持したCPGあたりの収量に換算すると8864 μgであった。結果を表2に示す。

【0094】

(実施例5)

0.99 μmolのウリジン誘導体を担持したControlled Pore Glass(CPG)と、式(A9)、式(A10)、式(A11)、または式(A12)に示すアミダイトを用いて、配列(III)に示す核酸オリゴマーをNTS M-4MX-E(日本テクノサービス社製)により、3'側から5'側に向かって自動合成した。自動合成の手順は、まず、3%ジクロロ酢酸トルエン溶液をCPGに送液し、5'位のトリチル保護基を脱保護した。この際、使用したジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒド濃度は、測定方法3により測定することができ、ジクロロ酢酸溶液中のホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒドmol/ジクロロ酢酸mol)は、 $43 \times 10^{-7}$ であった。続いて、各種アミダイトと縮合剤として5-ベンジルメルカプト-1H-テトラゾー

10

20

30

40

50

ルをCPGに送液し、5'位の水酸基にカップリング反応を進行させた。続いて、50 mMヨウ素を含む酸化溶液を送液し、亜リン酸基をリン酸基に変換した。続いて、カップリング溶液として0.1 Mフェノキシ酢酸無水物アセトニトリル溶液と10% N-メチルイミダゾール/10% 2,6-ルチジンアセトニトリル溶液を使用し、カップリングが進行しなかった反応点にカップリングを施した。更にこれらの工程を合計99回繰り返した後、5'末端の塩基における保護基(DMT r基)を3%ジクロロ酢酸トルエン溶液で脱保護し、配列(III)に示される配列の核酸オリゴヌクレオチドをCPG担体上に合成した。その後、1.03  $\mu\text{mol}$ 分のオリゴヌクレオチドを担持したCPG担体に対して、28%アンモニア水1.5 mLとエタノール0.5 mLを流入し、混合物を40で4時間保温することで核酸オリゴマーを固相担体から遊離させた後、濃縮により溶媒を除去した。次いで遊離オリゴヌクレオチドをジメチルスルホキシド1.5 mLに溶解後、アセトニトリル1.0 mL、ニトロメタン20  $\mu\text{L}$ と攪子を入れた後、モレキュラーシーブ4Aにて脱水処理を施した1Mのフッ化テトラ-n-ブチルアンモニウム(TBAF)のジメチルスルホキシド溶液2.08 mLをスターラーによる攪拌下室温で流入し、混合物を33で4時間保温することで2'-EMM保護基の脱保護を行った。その後、核酸オリゴマーの生成物を沈殿操作により得た。得られた生成物について、前記測定方法1に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、純度は33.1%であった。また、前記測定方法2に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は12889  $\mu\text{g}$ であり、1.00  $\mu\text{mol}$ のウリジン誘導体を担持したCPGあたりの収量に換算すると13019  $\mu\text{g}$ であった。結果を表2に示す。

【0095】

(実施例6)

実施例5の実験において、1.04  $\mu\text{mol}$ のウリジン誘導体を担持したControlled Pore Glass(CPG)と、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒド $\text{mol}$ /ジクロロ酢酸 $\text{mol}$ )が $90 \times 10^{-6}$ である3%ジクロロ酢酸トルエン溶液を用いる以外は、同様の方法で配列(III)の核酸オリゴマーを得た。前記測定方法1に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、生成物の純度は29.7%であった。また、前記測定方法2に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は13375  $\mu\text{g}$ であり、1.00  $\mu\text{mol}$ のウリジン誘導体を担持したCPGあたりの収量に換算すると12861  $\mu\text{g}$ であった。結果を表2に示す。

【0096】

(参考例3)

実施例5の実験において、0.99  $\mu\text{mol}$ のウリジン誘導体を担持したControlled Pore Glass(CPG)と、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒド $\text{mol}$ /ジクロロ酢酸 $\text{mol}$ )が $20 \times 10^{-5}$ である3%ジクロロ酢酸トルエン溶液を用いる以外は、同様の方法で配列(III)の核酸オリゴマーを得た。前記測定方法1に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの純度を測定した結果、生成物の純度は26.4%であった。また、前記測定方法2に記載の方法を用いて、オリゴヌクレオチドの収量を測定したところ、収量は12675  $\mu\text{g}$ であり、1.00  $\mu\text{mol}$ のウリジン誘導体を担持したCPGあたりの収量に換算すると12803  $\mu\text{g}$ であった。結果を表2に示す。

【0097】

(実施例7)

ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比(ホルムアルデヒド $\text{mol}$ /ジクロロ酢酸 $\text{mol}$ )が $25 \times 10^{-5}$ であるジクロロ酢酸溶液30 gに、トルエン300 mLを加え、エバポレーターを用いて、40でトルエンとホルムアルデヒドを共沸留去し、微黄色油状のジクロロ酢酸溶液34 gを得た。得られたジクロロ酢酸溶液に含まれるホルムアルデヒドを測定方法3に記載の方法で分析したところ、ホルムアルデヒドとジクロロ酢酸のモル比は、 $43 \times 10^{-7}$ であった。

【 0 0 9 8 】

【 表 2 】

表 2

	合成配列	ホルムアルデヒド / ジクロロ酢酸 モル比	収量 ( $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ )	生成物純 度 (%)	純収量(収 量 $\times$ 生成 物純度)	純収量の 相対数量
実施例1	配列(I)	$43 \times 10^{-7}$	4114	76.2	3135	1.10
実施例2	配列(I)	$90 \times 10^{-6}$	4066	75.0	3050	1.07
参考例1	配列(I)	$20 \times 10^{-5}$	3863	73.8	2851	1.00
実施例3	配列(II)	$43 \times 10^{-7}$	8889	50.8	4516	1.19
実施例4	配列(II)	$90 \times 10^{-6}$	8931	47.8	4269	1.13
参考例2	配列(II)	$20 \times 10^{-5}$	8864	42.8	3794	1.00
実施例5	配列(III)	$43 \times 10^{-7}$	13019	33.1	4309	1.27
実施例6	配列(III)	$90 \times 10^{-6}$	12861	29.7	3820	1.13
参考例3	配列(III)	$20 \times 10^{-5}$	12803	26.4	3380	1.00

10

【 0 0 9 9 】

上記表2の結果より、ホルムアルデヒド濃度が一定以下である本発明のジクロロ酢酸溶液を使用した場合には、参考例1、参考例2および参考例3のジクロロ酢酸溶液を使用した場合と比較して、高収率で核酸オリゴマーが得られた。

20

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 0 0 】

本発明は、効率的な核酸オリゴマーの製造方法を提供する。また、核酸オリゴマーの製造方法に従って製造される核酸オリゴマーの収率向上が期待できる。

【 配列表フリーテキスト 】

【 0 1 0 1 】

配列表の配列番号1～14は、本発明の製造方法に従って製造されるオリゴヌクレオチドの塩基配列を表す。

30

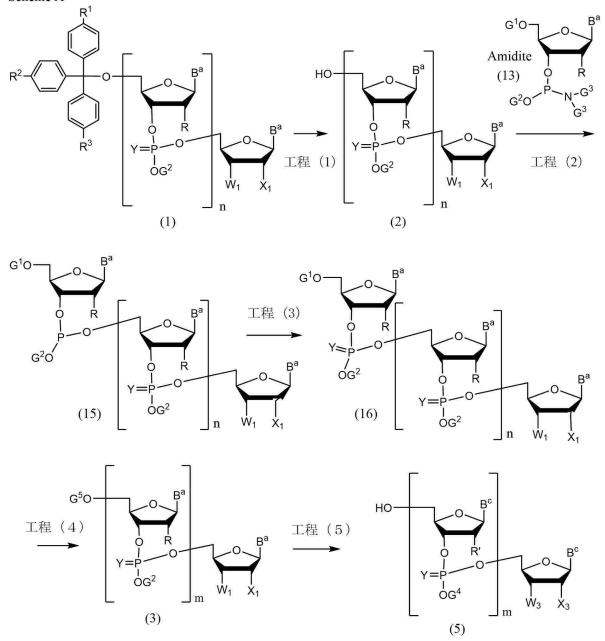
40

50

【 図面 】

【 図 1 】

Scheme A



10

20

【 配列表 】

[0007698631000001.app](#)

30

40

50

## フロントページの続き

審査官 早川 裕之

- (56)参考文献 国際公開第2017/131237(WO, A1)  
国際公開第2013/103146(WO, A1)  
国際公開第2016/158809(WO, A1)  
国際公開第2012/017919(WO, A1)  
国際公開第2019/189722(WO, A1)  
Nucleic Acids Research, 1996年, 24, 3048-3052  
Nucleic Acids Research, 1996年, 24, 3053-3058  
Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2017年, 13, 1368-1387
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C07H 21/  
C12N 15/11  
C07C 53/16  
CAplus/REGISTRY(STN)