



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0042734  
(43) 공개일자 2025년03월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 21/00 (2006.01) C07H 1/00 (2006.01)  
C07H 19/10 (2006.01) C07H 21/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07H 21/00 (2013.01)  
C07H 1/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7000384
- (22) 출원일자(국제) 2023년07월21일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2025년01월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2023/026733
- (87) 국제공개번호 WO 2024/019137  
국제공개일자 2024년01월25일
- (30) 우선권주장  
JP-P-2022-117422 2022년07월22일 일본(JP)

- (71) 출원인  
스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤  
일본국 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 2쵸메 7반 1고
- (72) 발명자  
다케시타 레오  
일본 오이타켄 오이타시 오아자 츠루사키 2200반  
치 스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤 나이  
가노 도시후미  
일본 오사카후 오사카시 니시요도가와쿠 우타지마  
3쵸메 1방 21고 스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤  
나이  
다나카 유키  
일본 오이타켄 오이타시 오아자 츠루사키 2200반  
치 스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤 나이
- (74) 대리인  
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 14 항

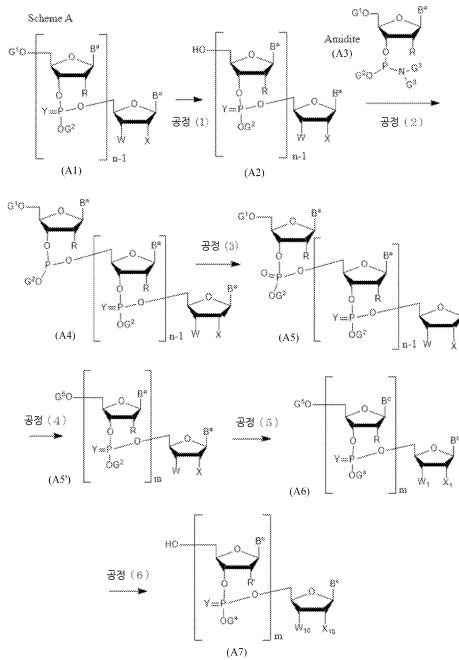
(54) 발명의 명칭 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법

(57) 요약

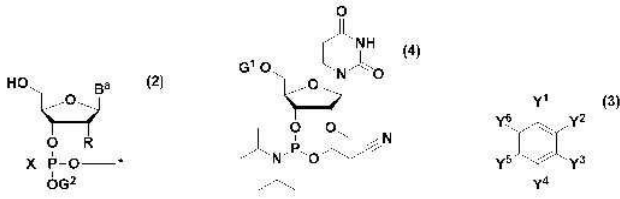
본 발명은, 식 (2) [식 중, G<sup>2</sup> 는 수산기의 보호기를 나타내고, B<sup>a</sup> 는, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타내고, R 은, 보호된 수산기 등을 나타내고, X 는, 산소 원자 등을 나타내고, 그리고, \* 가 붙어 있는 결합은, 핵산의 3' 말단측에 대한 결합을 나타낸다.] 로 나타내는 화합물과, 식 (4) [식 중, G<sup>1</sup> 은 수산기의 보

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



호기를 나타낸다.] 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 액티베이터의 존재하에서 축합시키는 공정을 포함하고, 상기 2'-OMe-U 아미다이트가, 아세트니트릴 및 식 (3) [식 중, Y<sup>1</sup> ~ Y<sup>6</sup> 은, 수소 원자, 메틸기 등을 나타낸다.] 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 혼합액에 용해되어 있는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 관한 것이다.



(52) CPC특허분류

C07H 19/10 (2013.01)

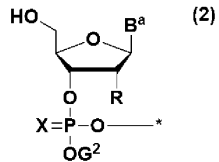
C07H 21/02 (2013.01)

명세서

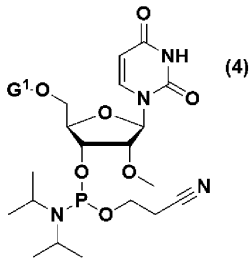
청구범위

청구항 1

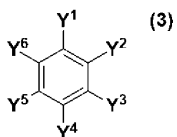
식 (2) :



[식 중,  
 $G^2$  는 수산기의 보호기를 나타내고,  
 $B^a$  는, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타내고,  
 $R$  은, 보호된 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는  $OQ'$  기를 나타내고,  
 $Q'$  는, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 알킬렌기를 나타내고,  
 $X$  는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고, 그리고,  
 \* 가 붙어 있는 결합은, 핵산의 3' 말단측에 대한 결합을 나타낸다.]  
 로 나타내는 화합물과 식 (4) :



[식 중,  
 $G^1$  은 수산기의 보호기를 나타낸다.]  
 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 액티베이터의 존재하에서 축합시키는 공정을 포함하고,  
 상기 2'-OMe-U 아미다이트가, 아세토니트릴 및 식 (3) :



[식 중,  $Y^1 \sim Y^6$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 메틸기, 에틸기, 또는 할로겐 원자를 나타낸다.]  
 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 혼합액에 용해되어 있는, 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소가, 메틸기, 에틸기, 및 할로젠 원자로 이루어지는 군에서 선택되는 1 개 또는 2 개의 치환기를 갖는 벤젠이고, 벤젠이 2 개의 치환기를 갖는 경우, 치환기는 동일해도 되고 상이해도 되는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소가, 톨루엔, o-자일렌, m-자일렌, p-자일렌, 클로로벤젠, o-디클로로벤젠, m-디클로로벤젠, p-디클로로벤젠, 및 그들의 2 종 이상의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트가 용해되는 혼합액에 포함되는 아세트니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소의 체적 비율이, 아세트니트릴 : 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소에서 99 : 1 ~ 1 : 99 인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트가 용해되는 혼합액에 포함되는 아세트니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소의 체적 비율이, 아세트니트릴 : 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소에서 90 : 10 ~ 10 : 90 인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트가 용해되는 혼합액에 포함되는 아세트니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소의 체적 비율이, 아세트니트릴 : 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소에서 90 : 10 ~ 40 : 60 인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트 용액에 있어서의 2'-OMe-U 아미다이트 농도가, 0.01 ~ 0.4 M 인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트 용액에 있어서의 2'-OMe-U 아미다이트 농도가, 0.05 ~ 0.2 M 인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 9

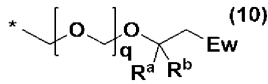
제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

액티베이터가 5-벤질티오-1H-테트라졸인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

### 청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

식 (2) 로 나타내는 화합물에 있어서의 R 이 보호된 수산기인 경우, 그 수산기의 보호기가, 식 (10) :



[식 중,  
 q 는 0 ~ 5 의 정수를 나타내고,  
 R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 는, 각각 동일 또는 상이하고, 메틸기, 에틸기 또는 수소 원자를 나타내고,  
 \* 표시가 붙어 있는 결합은 2' 수산기의 산소에 결합하고,  
 EW 는 전자 구인성기를 나타낸다.]  
 으로 나타내는 보호기인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

**청구항 11**

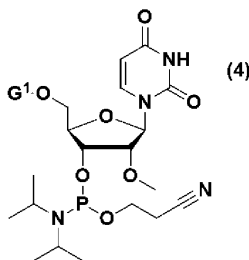
제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,  
 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트에 있어서, G<sup>1</sup> 이 4,4'-디메톡시트리틸기인, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

**청구항 12**

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,  
 고상 합성법에 의해 실시되는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

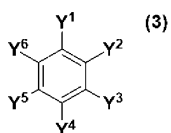
**청구항 13**

식 (4) :



[식 중,  
 G<sup>1</sup> 은 수산기의 보호기를 나타낸다.]

로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트, 아세트니트릴 및 식 (3) :



[식 중, Y<sup>1</sup> ~ Y<sup>6</sup> 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 메틸기, 에틸기, 또는 할로겐 원자를 나타낸다.]  
 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는, 용액.

**청구항 14**

제 13 항에 기재된 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트, 아세트니트릴 및 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 용액을, 올리고뉴클레오티드의 제조에 사용하는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 특허출원은, 일본 특허출원 2022-117422호 (2022년 7월 22일 출원) 에 기초하는 파리 조약상의 우선권 및 이익을 주장하는 것이고, 여기에 인용함으로써, 상기 출원에 기재된 내용의 전체가, 본 명세서 중에 인용되는 것으로 한다.

[0002] 본 발명은, 포스포라미다이트법을 이용한 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003] 핵산 올리고머인 올리고뉴클레오티드는, 유전자 검출을 목적으로 한 핵산 프로브나, PCR 에 사용되는 DNA 프로브, 의약품으로서의 안티센스 핵산, siRNA, 압타머 등 여러 분야에 있어서 이용되는 유용한 소재이다.

[0004] 올리고뉴클레오티드는, 포스포라미다이트법을 이용한 고상 합성법에 의해 제조 가능하다. 포스포라미다이트법에서는, 유리나 수지 담체 상에서 모노머인 뉴클레오시드의 포스포라미다이트 (이하 「아미다이트」 라고 칭한다) 를 순차 연결시켜 가고, 임의의 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제조한다. 구체적인 제조 공정은, 산성 용액을 사용하여 뉴클레오티드의 5' 말단의 수산기의 보호기를 탈보호하는 탈보호 공정과, 탈보호한 뉴클레오티드의 5' 말단의 수산기와 아미다이트의 아미다이트기를 액티베이터 존재하에서 반응시키는 축합 공정과, 새롭게 생긴 뉴클레오시드간의 결합을 3 개의 인으로부터 5 개의 인으로 산화시키는 산화 공정과, 미반응의 5' 말단의 수산기를 아실화하는 캐핑 공정을 포함한다. 이들 공정을 순차 반복함으로써, 아미다이트를 임의의 순서로 연결하고, 원하는 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 제조된다.

[0005] 특허문헌 1 등에 개시되는 바와 같이, 축합 공정에서 사용하는 아미다이트는 아세트니트릴에 용해시켜 아미다이트 용액으로서 사용한다. 한편, 아세트니트릴에 대한 용해도가 낮은 아미다이트의 경우에는, 이 수법을 이용하기는 곤란하다.

[0006] 아세트니트릴에 대한 용해도가 낮은 아미다이트의 하나로서, 2'-OMe-U 아미다이트를 들 수 있다. 2'-OMe-U 아미다이트의 용해도를 향상시키는 목적으로서, 아세트니트릴에 추가하여 디클로로메탄 (특허문헌 2, 비특허문헌 1) 을 첨가하여 아미다이트 용액을 조제하는 보고가 이루어져 있다. 이들 용매를 첨가함으로써, 2'-OMe-U 아미다이트의 용해도가 향상된다.

[0007] 이와 같은 올리고뉴클레오티드의 제조법이 개발되고 있지만, 합성된 올리고뉴클레오티드의 순도는, 반드시 만족스러운 것은 아니었다. 그 이유 중 하나로 n-1 mer 불순물의 존재가 있다. n-1 mer 불순물은 올리고뉴클레오티드 제조 중에 생기는 불순물이며, 목적 사슬 길이와 비교하여 1 개 짧은 사슬 길이를 갖는 불순물이다. 이 n-1 mer 불순물은 목적 사슬 길이의 올리고뉴클레오티드와의 분리가 곤란하다는 것이 알려져 있다 (비특허문헌 2). 그 때문에, 제조 중에 생기는 n-1 mer 불순물을 저감시키는 것이, 올리고뉴클레오티드의 효율적인 제조에 있어서 중요하다.

#### 선행기술문헌

##### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2019/170731호

(특허문헌 0002) 중국 특허출원 공개 제112007040호 명세서

##### 비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 28 (2018) 3774-3779

(비특허문헌 0002) Mass Spectrometry Reviews 40 (2021) 75-109

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0010] 본 발명은, 2'-OMe-U 를 1 개 이상 갖는 올리고뉴클레오타이드의 고순도의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

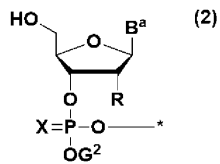
**과제의 해결 수단**

[0011] 본 발명자는, 상기 목적을 달성하기 위해 예의 검토를 거듭한 결과, 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서, 아세토니트릴과 방향족계 탄화수소를 사용하는 것을 특징으로 하는, 핵산 제조 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은, 이하의 양태를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0013] 1. 식 (2) :

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] [식 중,

[0017]  $G^2$  는 수산기의 보호기를 나타내고,

[0018]  $B^a$  는, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타내고,

[0019] R 은, 보호된 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는  $OQ'$  기를 나타내고,

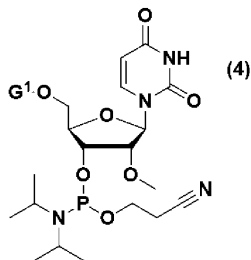
[0020]  $Q'$  는, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 알킬렌기를 나타내고,

[0021] X 는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고, 그리고,

[0022] \* 가 붙어 있는 결합은, 핵산의 3' 말단측에 대한 결합을 나타낸다.]

[0023] 로 나타내는 화합물과 식 (4) :

[0024] [화학식 2]



[0025]

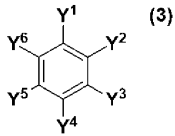
[0026] [식 중,

[0027]  $G^1$  은 수산기의 보호기를 나타낸다.]

[0028] 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 액티베이터의 존재하에서 축합시키는 공정을 포함하고,

[0029] 상기 2'-OMe-U 아미다이트가, 아세토니트릴 및 식 (3) :

[0030] [화학식 3]



[0031]

[0032] [식 중,  $Y^1 \sim Y^6$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 메틸기, 에틸기, 또는 할로젠 원자를 나타낸다.]

[0033] 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 혼합액에 용해되어 있는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0034] 2. 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소가, 메틸기, 에틸기, 및 할로젠 원자로 이루어지는 군에서 선택되는 1 개 또는 2 개의 치환기를 갖는 벤젠이고, 벤젠이 2 개의 치환기를 갖는 경우, 치환기는 동일해도 되고 상이해도 되는, [1] 에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0035] 3. 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소가, 톨루엔, o-자일렌, m-자일렌, p-자일렌, 클로로벤젠, o-디클로로벤젠, m-디클로로벤젠, p-디클로로벤젠, 및 그들의 2 종 이상의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는, [1] 에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0036] 4. 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트가 용해되는 혼합액에 포함되는 아세트니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소의 체적 비율이, 아세트니트릴 : 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소에서 99 : 1 ~ 1 : 99 인, [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0037] 5. 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트가 용해되는 혼합액에 포함되는 아세트니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소의 체적 비율이, 아세트니트릴 : 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소에서 90 : 10 ~ 10 : 90 인, [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0038] 6. 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트가 용해되는 혼합액에 포함되는 아세트니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소의 체적 비율이, 아세트니트릴 : 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소에서 90 : 10 ~ 40 : 60 인, [1] ~ [3] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

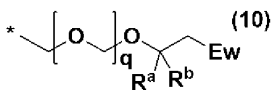
[0039] 7. 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트 용액에 있어서의 2'-OMe-U 아미다이트 농도가, 0.01 ~ 0.4 M 인, [1] ~ [6] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0040] 8. 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트 용액에 있어서의 2'-OMe-U 아미다이트 농도가, 0.05 ~ 0.2 M 인, [1] ~ [6] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0041] 9. 액티베이터가 5-벤질티오-1H-테트라졸인, [1] ~ [8] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0042] 10. 식 (2) 로 나타내는 화합물에 있어서의 R 이 보호된 수산기인 경우, 그 수산기의 보호기가, 식 (10) :

[0043] [화학식 4]



[0044]

[0045] [식 중,

[0046] q 는 0 ~ 5 의 정수를 나타내고,

[0047]  $R^a$  및  $R^b$  는, 각각 동일 또는 상이하고, 메틸기, 에틸기 또는 수소 원자를 나타내고,

[0048] \* 표시가 붙어 있는 결합은 2' 수산기의 산소에 결합하고,

[0049]  $E_w$  는 전자 구인성기를 나타낸다.]

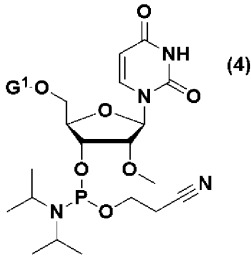
[0050] 으로 나타내는 보호기인, [1] ~ [9] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0051] 11. 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트에 있어서, G<sup>1</sup> 이 4,4'-디메톡시트리틸기인, [1] ~ [10] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0052] 12. 고상 합성법에 의해 실시되는, [1] ~ [11] 중 어느 한 항에 기재된 올리고뉴클레오티드의 제조 방법.

[0053] 13. 식 (4) :

[0054] [화학식 5]



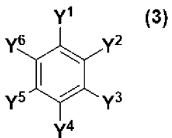
[0055]

[0056] [식 중,

[0057] G<sup>1</sup> 은 수산기의 보호기를 나타낸다.]

[0058] 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트, 아세토니트릴 및 식 (3) :

[0059] [화학식 6]



[0060]

[0061] [식 중, Y<sup>1</sup> ~ Y<sup>6</sup> 은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 메틸기, 에틸기, 또는 할로젠 원자를 나타낸다.]

[0062] 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는, 용액.

[0063] 14. [13] 에 기재된 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트, 아세토니트릴 및 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 용액을, 올리고뉴클레오티드의 제조에 사용하는 방법.

**발명의 효과**

[0064] 본 발명은, 2'-OMe-U 아미다이트를 1 개 이상 포함하는 올리고뉴클레오티드의 고순도의 제조 방법을 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

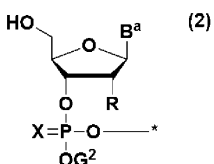
[0065] 도 1 은, 본 발명의 제법의 공정 (1) 내지 (6) 의 스킴 (스킴 A) 을 나타내는 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0066] 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 제조 방법은,

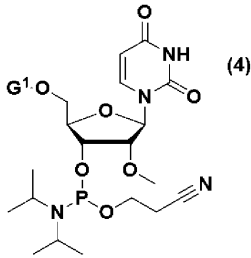
[0067] 식 (2) :

[0068] [화학식 7]

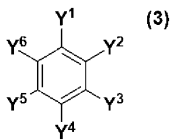


[0069]

- [0070] [식 중,
- [0071]  $G^2$  는 수산기의 보호기를 나타내고,
- [0072]  $B^a$  는, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타내고,
- [0073] R 은, 보호된 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,
- [0074] Q' 는, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 알킬렌기를 나타내고,
- [0075] X 는, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고, 그리고,
- [0076] \* 가 붙어 있는 결합은, 핵산의 3' 말단측에 대한 결합을 나타낸다.]
- [0077] 로 나타내는 화합물과 식 (4) :
- [0078] [화학식 8]



- [0079]
- [0080] [식 중,
- [0081]  $G^1$  은 수산기의 보호기를 나타낸다.]
- [0082] 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 액티베이터의 존재하에서 축합시키는 공정을 포함하고,
- [0083] 상기 2'-OMe-U 아미다이트가, 아세토니트릴 및 식 (3) :
- [0084] [화학식 9]



- [0085]
- [0086] [식 중,  $Y^1 \sim Y^6$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 수소 원자, 메틸기, 에틸기, 또는 할로겐 원자를 나타낸다.]
- [0087] 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 혼합액에 용해되어 있는, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0088] 올리고뉴클레오티드의 제조 방법은, 아세토니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소의 혼합액에, 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 용해시킨 2'-OMe-U 아미다이트 용액 및 액티베이터를 반응시키는 공정을 포함하는 것이어도 된다. 이하, 올리고뉴클레오티드의 제조 방법에 대해 설명한다.
- [0089] 본 발명에 있어서의 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매에 있어서, 아세토니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 혼합액을 사용함으로써, 제조한 올리고뉴클레오티드가 포함되는 n-1 mer 를 저장할 수 있다. 아세토니트릴과 식 (3) 으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 혼합액에 있어서의 혼합비는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 아세토니트릴과 방향족계 탄화수소의 체적비가, 예를 들어 99 : 1 ~ 1 : 99, 바람직하게는 90 : 10 ~ 10 : 90, 보다 바람직하게는 90 : 10 ~ 40 : 60 이다.
- [0090] 방향족계 탄화수소로는, 메틸기, 에틸기, 또는 할로겐 원자로 이루어지는 군에서 선택되는 치환기를 갖는 벤젠, 바람직하게는 메틸기, 에틸기, 또는 할로겐 원자로 이루어지는 군에서 선택되는 1 개 혹은 2 개의 치환기를 갖

는 벤젠, 보다 바람직하게는 톨루엔, o-자일렌, m-자일렌, p-자일렌, 클로로벤젠, o-디클로로벤젠, m-디클로로벤젠, p-디클로로벤젠, 및 그들의 2 종 이상의 혼합물이 사용 가능하다.

[0091] 2'-OMe-U 아미다이트 용액에는 아세토니트릴과 방향족계 탄화수소 이외의 용매도 혼합하여 사용해도 된다.

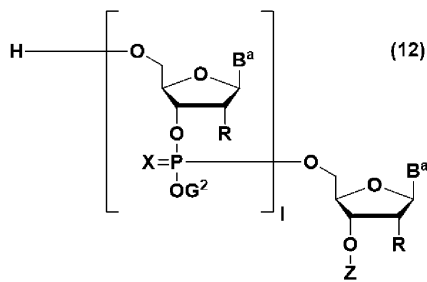
[0092] 2'-OMe-U 아미다이트 용액 중의 2'-OMe-U 아미다이트 농도는, 바람직하게는 0.01 M ~ 0.4 M, 보다 바람직하게는 0.05 M ~ 0.2 M 으로 조정된다.

[0093] 2'-OMe-U 아미다이트를 전술한 혼합 용매에 용해시킨 후에, 제올라이트 등의 건조제로 수분을 저감시킨 후에 사용할 수도 있다.

[0094] 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 보관에는, 유리제 용기, 플라스틱제 용기, 또는 금속제 용기를 사용할 수 있다. 플라스틱제 용기로는, 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌제 등의 용기를 사용할 수 있고, 금속제 용기로는, SUS 제 용기 또는 하스텔로이제 등의 용기를 사용할 수 있다.

[0095] 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트와의 반응 전구체는, 구체적으로는 이하의 식 (12) :

[0096] [화학식 10]



[0097]

[0098] (식 중,

[0099] G<sup>2</sup> 는 수산기의 보호기를 나타내고,

[0100] B<sup>a</sup> 는, 각각 독립적으로, 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타내고,

[0101] R 은, 보호된 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고,

[0102] Q' 는, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 알킬렌기를 나타내고,

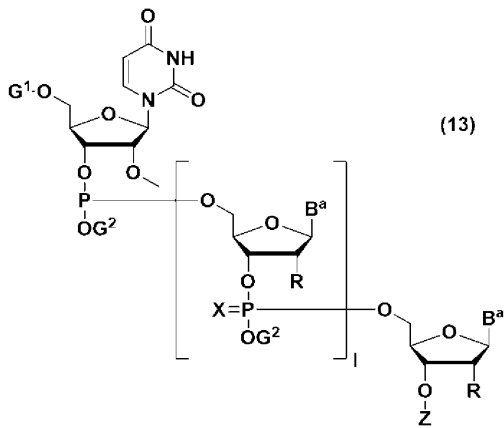
[0103] X 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,

[0104] Z 는, 고상 담체, 및 고상 담체와 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단의 리보스의 3' 위치의 수산기의 산소 원자를 잇는 연결부로 이루어지는 기를 나타내고, 그리고,

[0105] l 은, 0 ~ 300 의 정수를 나타낸다.)

[0106] 로 나타내는 화합물이며, 2'-OMe-U 아미다이트와 반응함으로써, 식 (13) :

[0107] [화학식 11]



[0108]

[0109] (식 중,

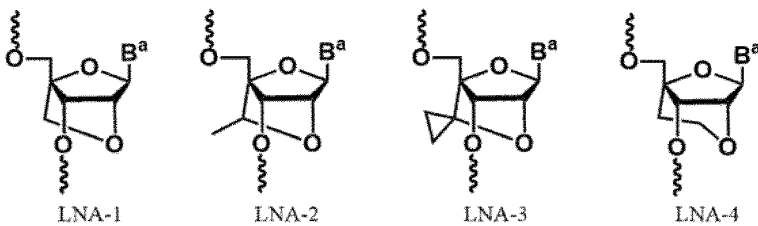
[0110]  $G^1$  은 수산기의 보호기를 나타내고,

[0111]  $G^2$ ,  $B^a$ ,  $R$ ,  $X$ ,  $Z$ ,  $l$  은, 상기 정의와 같다.)

[0112] 으로 나타내는 올리고뉴클레오티드로 변환된다.

[0113] 식 (2), (12) 및 (13) 에 있어서,  $R$  이  $OO'$  기를 나타내고,  $Q'$  가 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 알킬렌기 나타낼 때, 당해 구조로는, 구체적으로는 하기 LNA-1 ~ LNA-4 가 예시된다.

[0114] [화학식 12]



[0115]

[0116] (식 중,  $B^a$  는, 보호되어 있어도 되는 핵산염기를 나타낸다.)

[0117] 본 발명에서 사용되는 올리고뉴클레오티드 내에 포함되는 뉴클레오시드 (리보스, 및 디옥시리보스) 로는, DNA, RNA, 2'-O-MOE (2'-O-메톡시에틸), 2'-O-Me, 2'-F RNA, 및 상기 LNA 가 예시되지만, 상기 뉴클레오시드는, 이들로 한정되지 않는다.

[0118]  $Z$  로 나타내는, 고상 담체, 및 고상 담체와 핵산 올리고머의 3' 말단의 리보스의 2' 위치 혹은 3' 위치의 수산기의 산소 원자를 잇는 연결부로 이루어지는 기로는, 보다 구체적으로는, 하기 식 (18) 로 나타내는 구조를 들 수 있다.

[0119] [화학식 13]

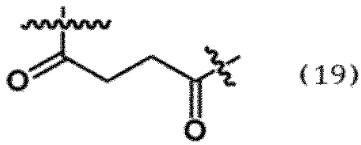


[0120]

[0121] 식 (18) 에 있어서,  $Sp$  는, 스페이서를 나타낸다.

[0122] 스페이서 ( $Sp$ ) 로는, 예를 들어, 하기 식 (19) 에 나타내는 구조식을 갖는 것이 예시된다.

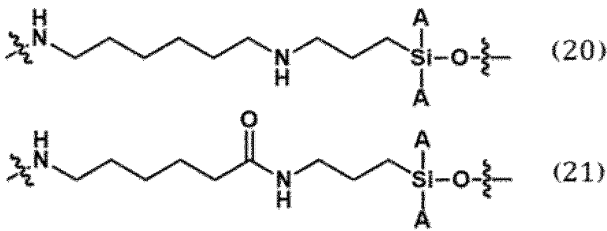
[0123] [화학식 14]



[0124]

[0125] Linker 는, 예를 들어, 하기 식 (20) 에 나타내는 구조여도 되고, 또는 식 (20) 의 구조에 있어서 헥사메틸렌아미노기 부분을 갖지 않는 구조로서, 아미노프로필기가 Si 에 결합한 구조여도 된다. 또는, Linker 는 하기 식 (21) 로 나타내는 구조여도 된다.

[0126] [화학식 15]



[0127]

[0128] (식 중,

[0129] A 는, 수산기, 알콕시기, 또는 알킬기 중 어느 것이어도 된다. 알콕시기로는, 예를 들어 메톡시기 및 에톡시기를 들 수 있다. 알킬기로는, 예를 들어 메틸기, 에틸기, 이소프로필기, n-프로필기를 들 수 있다. Si 는, 담체 표면의 수산기의 산소와 결합되어 있는 것을 나타낸다.)

[0130] Solid support 로는, 무기 다공질 담체나 유기계 수지 담체 등을 들 수 있다. 무기 다공질 담체에는, 예를 들어, Controlled Pore Glass (CPG) 및 제올라이트를 들 수 있다. 유기계 수지 담체에는, 예를 들어, 폴리스티렌으로 이루어지는 담체를 들 수 있다.

[0131] 올리고뉴클레오티드의 합성 방법은, 전형적으로는, 이하의 공정을 포함한다.

[0132] (1) 고상 담체에 링커를 개재하여 결합되어 있는 수산기가 보호된 뉴클레오시드의 5' 위치의 수산기를 탈보호하는 공정,

[0133] (2) 상기 공정에서 생성된 5' 위치의 수산기를 아미다이트 화합물과 축합 반응시켜 아인산트리에스테르 화합물을 얻는 공정,

[0134] (3) 상기 공정에서 생성된 아인산트리에스테르를 산화시켜 인산트리에스테르 결합으로 변환하여 신장시킨 핵산 분자를 제조하는 공정, 혹은, 티오인산트리에스테르로 변환하는 임의의 공정,

[0135] (4) 상기 공정 (1) ~ (3), 즉, 생성된 핵산 분자의 5' 위치의 수산기의 탈보호 공정, 5' 위치의 수산기와 아미다이트 화합물의 축합 공정, 및, 생성된 아인산트리에스테르의 산화 공정으로 구성되는 일련의 반응의 사이클을, 임의의 횟수 반복하고, 고상 담체 상에 핵산 분자를 합성하는 공정,

[0136] (5) 공정 (4) 에서 생성된 고상 담체 상의 핵산 분자를, 잘라내기 및 탈보호하는 공정에 제공하고, 고상 담체로부터 유리시켜, 보호기가 제거된 올리고뉴클레오티드를 제조하는 공정, 및,

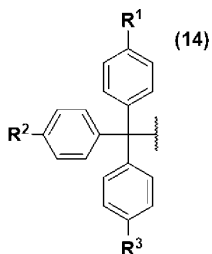
[0137] (6) 핵산 분자를 구성하는 리보스의 2' 수산기의 보호기를 탈보호하는 공정.

[0138] 단, 상기 올리고뉴클레오티드의 합성 방법에 있어서는, 공정 (2) 또는 (3) 에 이어서, 아미다이트 화합물과의 축합 반응이 진행되지 않았던 5' 위치의 수산기를 캐핑하는 공정을 포함하고 있어도 되고, 공정 (4) 를 구성하는 일련의 반응의 사이클 중 어느 한 공정의 사이에 캐핑 공정이 추가되어 있어도 된다.

[0139] 상기 (5) 의 공정은, 보다 구체적으로는, 공정 (4) 에서 생성된 고상 담체상의 핵산 분자를, 이하의 공정 (5-1) 및 (5-2) 의 반응의 순서로 실시된다. 여기서 공정 (5-1) 의 반응의 실시는, 임의여도 되고, 공정 (5-2) 의 반응의 실시는, 일본 특허공보 제4705716호에 기재된 방법을 이용해도 된다. 그 결과, 고상 담체로부터 유리한 핵산 분자로부터 보호기가 제거된 올리고뉴클레오티드, 혹은, 5' 말단의 수산기가 보호된 올리고뉴클레오

티드를 제조할 수 있다.

- [0140] (5-1) 핵산 분자의 5' 말단의 수산기의 보호기를 탈보호하는 반응, 및,
- [0141] (5-2) 핵산 분자를 고상 담체로부터 잘라내어 유리시키는 반응.
- [0142] 상기 공정 (1) 내지 (6) 의 스킴을, 도 1 의 스킴 A 에 나타낸다. 스킴 A 에 있어서의 화학식 중의 치환기 가운데,  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $B^a$ , 및 R 의 정의는, 상기 정의와 같다. 또,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$ ,  $B^c$ , 및 R' 의 정의는, 후술하는 바와 같다. 또, 스킴 A 의 화학식 중,
- [0143] Y 는, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고, 산소 원자 또는 황 원자를 나타내고,
- [0144] X 는, R 기를 나타내거나, 또는, OZ 기를 나타내고, 여기서, Z 는, 상기 정의와 같고,
- [0145] W 는, X 가 R 기를 나타낼 때, OZ 기를 나타내고, 여기서, Z 는, 상기 정의와 같고, 혹은, W 는, X 가 OZ 기를 나타낼 때, OV 기를 나타내고, 여기서, V 는, 수산기의 보호기를 나타내고,
- [0146]  $W_1$  은, W 기, 또는 W 기로부터 유도된 기 (예를 들어, 고상 담체로부터 잘라내어진 잔기, 탈보호된 기 등) 이며,
- [0147]  $W_{10}$  은,  $W_1$  기, 또는  $W_1$  기로부터 유도된 기 (예를 들어, 고상 담체로부터 잘라내어진 잔기, 탈보호된 기 등) 이며,
- [0148]  $X_1$  은, X 기, 또는 X 기로부터 유도된 기 (예를 들어, 고상 담체로부터 잘라내어진 잔기, 탈보호된 기 등) 이며,
- [0149]  $X_{10}$  는,  $X_1$  기, 또는  $X_1$  기로부터 유도된 기 (예를 들어, 고상 담체로부터 잘라내어진 잔기, 탈보호된 기 등) 이며,
- [0150] n 은, 1 ~ 300 의 정수를 나타내고, 그리고,
- [0151] m 은, 1 ~ 300 의 정수를 나타낸다.
- [0152] 식 (A5) 의 핵산 화합물은, 나아가 아미다이트법에 의해 뉴클레오티드형 또는 비뉴클레오티드형의 링커를 사용하여 임의의 사슬 길이만큼 신장시키고, 식 (A5') 로 나타내는 핵산 화합물의 제조에 사용할 수 있다. 식 (A5') 의 고상 담체에 결합된 핵산 화합물로부터 핵산 화합물만을 잘라내어, 식 (A6) 으로 나타내는 올리고뉴클레오티드를 얻은 후, 추가로 탈보호하여 식 (A7) 로 나타내는 올리고뉴클레오티드를 얻을 수도 있다.
- [0153] 이하, 각 식 중의 치환기에 대해 더욱 상세하게 설명한다.
- [0154]  $G^1$  로는, 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별한 제한 없이 사용할 수 있고, 아미다이트 화합물로 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다.  $G^1$  은 바람직하게는, 이하 식 (14) 로 나타내는 보호기이다.
- [0155] [화학식 16]



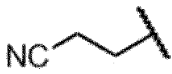
- [0156]
- [0157] (식 중,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$  은, 각각 독립적으로, 동일 또는 상이하고 수소 또는 알콕시기를 나타낸다.)
- [0158]  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$  은, 1 개가 수소이고, 나머지의 2 개가 동일 또는 상이한 (동일이 바람직하다) 알콕시기인 것이 바람직하고, 알콕시기로는 메톡시기가 특히 바람직하다.  $G^1$  로는, 구체적으로는, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기), 4-모노메톡시트리틸기, 및 4,4',4"-트리메톡시트리틸기가 바람직하고, 4,4'-디메톡시트리틸기가 특

히 바람직하다.

[0159]  $G^2$  로는, 보호기로서 기능할 수 있는 것이면 특별한 제한 없이 사용할 수 있고, 아미다이트 화합물에서 사용되는 공지된 보호기를 널리 사용할 수 있다.  $G^2$  로는, 예를 들어, 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 시클로알킬기, 할로알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 아릴알킬기, 시클로알케닐기, 시클로알킬알킬기, 시클릴알킬기, 하이드록시알킬기, 아미노알킬기, 알콕시알킬기, 헤테로시클릴알케닐기, 헤테로시클릴알킬기, 헤테로아릴알킬기, 실릴기, 실릴옥시알킬기, 모노, 디 또는 트리알킬실릴기, 모노, 디 또는 트리알킬실릴옥시알킬기 등을 들 수 있고, 이들은 1 개 이상의 전자 구인기로 치환되어 있어도 된다.

[0160]  $G^2$  는, 바람직하게는, 전자 구인기로 치환된 알킬기이다. 당해 전자 구인기로는, 예를 들어, 시아노기, 니트로기, 알킬술포닐기, 할로겐 원자, 아릴술포닐기, 트리할로메틸기, 트리알킬아미노기 등을 들 수 있고, 바람직하게는 시아노기이다.  $G^2$  로는, 특히 바람직한 것은, 2-시아노에틸기 (하기 식으로 나타내는 기) 이다.

[0161] [화학식 17]



[0162]

[0163]  $G^3$  은, 알킬기이며, 2 개의  $G^3$  이 서로 결합하여 고리형 구조를 형성하고 있어도 되고, 바람직하게는 양방이 이소프로필기이다.

[0164] 상기  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  및  $G^2$ ,  $G^3$  의 정의에 있어서의 알킬기는, 직사슬형 또는 분기 사슬형 중 어느 것이어도 되고, 바람직하게는 탄소수 1 ~ 12 의 알킬기, 보다 바람직하게는 탄소수 1 ~ 6 의 알킬기이다. 구체적인 알킬기의 예로는, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 및 헥실을 들 수 있다. 상기 치환기의 정의에 있어서의 알콕시기를 구성하는 알킬기 부분은, 여기서의 알킬기의 정의와 동일한 정의를 갖는다.

[0165]  $G^4$  는, 수소 원자, 알칼리 금속 이온, 암모늄 이온, 알킬암모늄 이온, 또는 하이드록시알킬암모늄 이온을 나타낸다. 알칼리 금속 이온으로는, 예를 들어, 나트륨 이온, 및 리튬 이온을 들 수 있다. 또, 알킬암모늄 이온으로서, 구체적인 알킬기의 예로는, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 및 헥실을 들 수 있지만, 보다 구체적으로는, 예를 들어, 디에틸암모늄 이온, 트리에틸암모늄 이온, 테트라부틸암모늄 이온, 헥실암모늄 이온, 및 디부틸암모늄 이온 등을 들 수 있다. 또, 하이드록시알킬암모늄 이온으로서, 구체적인 하이드록시알킬 부분의 예로는, 예를 들어, 하이드록시메틸, 하이드록시에틸, 하이드록시-n-프로필, 하이드록시이소프로필, 하이드록시-n-부틸, 트리스하이드록시메틸을 들 수 있지만, 보다 구체적인 하이드록시알킬암모늄 이온의 예로는, 트리스하이드록시메틸암모늄 이온 등을 들 수 있다.

[0166]  $G^5$  는, 수소 원자, 또는 보호기를 나타내고, 보호기를 나타내는 경우에는  $G^1$  과 동일한 보호기를 나타낸다.  $G^5$  는 탈보호된 경우에는 수소 원자이지만, 그 경우의 뉴클레오티드 화합물도 역시, 일련의 핵산 신장 반응의 공정에 제공된다.

[0167] 또, 본 발명의 방법에 있어서, 아미다이트 화합물은, 프리의 상태 또는 염의 상태로 사용할 수 있다. 아미다이트 화합물의 염으로는, 염기 부가염 또는 산 부가염을 들 수 있지만, 특별히 제한되지 않는다. 염기 부가염으로는, 구체적으로는, 나트륨염, 마그네슘염, 칼륨염, 칼슘염, 알루미늄염 등의 무기염기와 염 ; 메틸아민, 에틸아민, 에탄올아민 등의 유기염기와 염 ; 리신, 오르니틴, 아르기닌 등의 염기성 아미노산과의 염 ; 및 암모늄염을 들 수 있다. 산 부가염으로는, 구체적으로는, 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 질산, 인산 등의 광산 ; 포름산, 아세트산, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 말산, 타르타르산, 푸마르산, 숙신산, 락트산, 말레산, 시트르산, 메탄술포산, 트리플루오로메탄술포산, 에탄술포산 등의 유기산 ; 및, 아스파르트산, 글루탐산 등의 산성 아미노산과의 산 부가염을 들 수 있다. 아미다이트 화합물에는, 염, 수화물, 용매화물, 결정 다형 등의 형태도 포함된다.

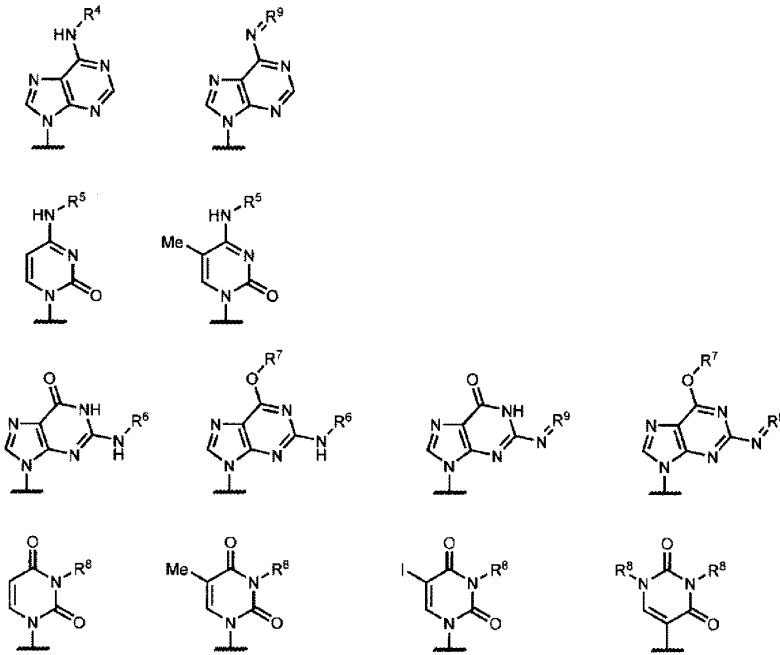
[0168] 본 명세서에 있어서는, 핵산염기란, 천연형 혹은 비천연형의 핵산염기 골격을 갖는 기를 의미한다. 상기 핵산염기는, 천연형 혹은 비천연형의 핵산염기 골격이 수식된 수식체도 포함한다.

[0169] B<sup>a</sup> 로 나타내는 보호기로 보호되어 있어도 되는 핵산염기는, 특별히 한정되지 않는다. 당해 핵산염기로는, 아데닌, 사이토신, 구아닌, 우라실, 티민, 5-메틸사이토신, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실 등을 들 수 있다.

또, 핵산염기는, 치환기에 의해 치환되어 있어도 된다. 그러한 치환기로는, 예를 들어, 플루오로기나 클로로기나 브로모기나 요오드기와 같은 할로겐 원자, 아세틸기와 같은 아실기, 메틸기나 에틸기와 같은 알킬기, 벤질기와 같은 아릴알킬기, 메톡시기와 같은 알콕시기, 메톡시에틸기와 같은 알콕시알킬기, 시아노에틸기와 같은 시아노알킬기, 하이드록시기, 하이드록시알킬기, 아실옥시메틸기, 아미노기, 모노알킬아미노기, 디알킬아미노기, 카르복시기, 시아노기, 및 니트로기 등, 그리고 그들의 2 종류 이상의 치환기의 조합을 들 수 있다.

[0170] B<sup>a</sup> 로 나타내는 핵산염기로는, 보다 구체적으로는, 이하의 구조가 예시된다.

[0171] [화학식 18]



[0172]

[0173] (상기 식 중,

[0174] R<sup>4</sup> 는, 수소 원자, 메틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0175] R<sup>5</sup> 는, 수소 원자, 아세틸기, 이소부틸릴기 또는 벤조일기를 나타내고,

[0176] R<sup>6</sup> 은, 수소 원자, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 페닐아세틸기, 아세틸기 또는 이소부틸릴기를 나타내고,

[0177] R<sup>7</sup> 은, 2-시아노에틸기를 나타내고,

[0178] R<sup>8</sup> 은, 수소 원자, 메틸기, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기 또는 4-메틸벤조일기를 나타내고, 그리고,

[0179] R<sup>9</sup> 는, 디메틸아미노메틸렌기를 나타낸다.)

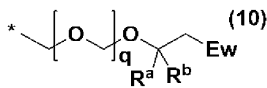
[0180] 핵산염기가 고리 밖에 아미노기를 갖는 경우, 당해 아미노기의 보호기로는, 특별히 한정되지 않고, 공지된 핵산 화학에서 사용되는 보호기를 사용할 수 있고, 그러한 보호기로는, 예를 들어, 벤조일기, 4-메톡시벤조일기, 아세틸기, 프로피오닐기, 부틸릴기, 이소부틸릴기, 페닐아세틸기, 페녹시아세틸기, 4-tert-부틸페녹시아세틸기, 4-이소프로필페녹시아세틸기, 및 (디메틸아미노)메틸렌기 등, 그리고 그들의 2 종류 이상의 보호기의 조합을 들 수 있다.

[0181] B<sup>c</sup> 는 무보호의 핵산염기를 나타내지만, 그 종류는 특별히 한정되지 않는다. 당해 핵산염기로는, 아데닌,

사이토신, 구아닌, 우라실, 티민, 5-메틸사이토신, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실 등을 들 수 있다. 또, 핵산염기는, 치환기에 의해 치환되어 있어도 된다. 그러한 치환기로는, 예를 들어, 플루오로기나 클로로기나 브로모기나 요오드기와 같은 할로젠 원자, 아세틸기와 같은 아실기, 메틸기나 에틸기와 같은 알킬기, 벤질기와 같은 아릴알킬기, 메톡시기와 같은 알콕시기, 메톡시에틸기와 같은 알콕시알킬기, 시아노에틸기와 같은 시아노알킬기, 하이드록시기, 하이드록시알킬기, 아실옥시메틸기, 아미노기, 모노알킬아미노기, 디알킬아미노기, 카르복시기, 시아노기, 및 니트로기 등, 그리고 그들의 2 종류 이상의 치환기의 조합을 들 수 있다.

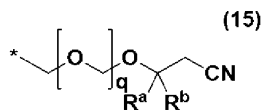
[0182] R 이, 보호된 수산기를 나타낼 때, 그 보호기는, 아마다이트법에 있어서 사용할 수 있는 것이면 되고, 예를 들어, 2'-tert-부틸디메틸실릴 (TBDMS) 기, 2'-비스(2-아세톡시)메틸 (ACE) 기, 2'-(트리이소프로필실릴옥시)메틸 (TOM) 기, 2'-(2-시아노에톡시)에틸 (CEE) 기, 2'-(2-시아노에톡시)메틸 (CEM) 기 (국제 공개 2006/022323호), 2'-파라-톨루일술폰닐에톡시메틸 (TEM) 기, 2'-EMM 기 (국제 공개 2013/027843호) 외에, 국제 공개 제 2019/208571호에 기재된 것을 사용할 수 있다. 이들 리보뉴클레오시드 (RNA) 의 2'보호기 중, 식 (10) 으로 나타내는 보호기가 바람직한 보호기로서 예시된다. 더욱 바람직하게는, E<sub>w</sub> 로 나타내는 전자 구인기로서 시아노기를 갖는 식 (15) 로 나타내는 보호기가 예시된다.

[0183] [화학식 19]



[0184]

[0185] [화학식 20]



[0186]

[0187] (식 중,

[0188] q 는 0 ~ 5 의 정수를 나타내고,

[0189] R<sup>a</sup> 및 R<sup>b</sup> 는 각각 동일 또는 상이하고, 메틸기, 에틸기 또는 수소 원자를 나타내고,

[0190] \* 표시가 붙어 있는 결합은 2' 수산기의 산소에 결합한다.

[0191] 그리고, E<sub>w</sub> 는 전자 구인성기를 나타낸다.)

[0192] 식 (15) 로 나타내는 보호기는, 예를 들어 국제 공개 제2013/027843호 및 국제 공개 제2019/208571호에 기재된 것에 따라서 합성할 수 있고, 이러한 보호기를 갖는 아마다이트 화합물을 올리고뉴클레오티드의 제조에 사용할 수 있다.

[0193] R 기가, 수산기 이외의 치환기인 뉴클레오티드 및 아마다이트는, 일본 특허공보 제3745226호 등에 기재된 공지된 방법, 국제 공개 제2001/053528호 혹은 일본 공개특허공보 2014-221817호 및 그것들에 인용되는 공지된 방법으로 합성되는 뉴클레오시드로부터 제조할 수도 있고, 나아가서는, 시판품으로서 입수 가능한 것을 사용하여, 후술하는 실시예에 기재된 방법에 준거하여 또는 이들 방법에 적절히 변경을 가한 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0194] R' 는, 수산기, 수소 원자, 불소 원자, 메톡시기, 2-메톡시에틸기, 또는 OQ' 기를 나타내고, Q' 는, 리보스의 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 메틸렌기, 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸렌기, 또는 4' 위치의 탄소 원자와 결합되어 있는 에틸리덴기를 나타낸다.

[0195] 상기 올리고뉴클레오티드의 합성은, 본 발명에 관련되는 2'-OMe-U 아마다이트를 사용한 축합 공정 이외에는, 일반적으로 공지된 방법 (예를 들어, 상기 일본 특허공보 제5157168호 또는 일본 특허공보 제5554881호에 기재된 방법) 에 따라서, 탈보호 공정, 축합 공정의 각 공정을 반복 실시함으로써, 핵산 신장 반응을 실시할 수 있다. 이하, 각 공정에 대해 설명한다.

[0196] (핵산 신장 반응)

[0197] 본 명세서에 있어서, 「핵산 신장 반응」이란, 포스포디에스테르 결합을 개재하여, 뉴클레오티드를 순차 결합시킴으로써, 핵산 분자를 신장시키는 반응을 의미한다. 핵산 신장 반응은, 일반적인 아마다이트법 (포스포라

미다이트법)의 순서에 따라 실시할 수 있다. 핵산 신장 반응은, 아미다이트법을 채용하는 핵산 자동 합성 장치 등을 사용하여 실시해도 되고, 액상 합성으로 실시해도 된다.

[0198] 올리고뉴클레오타이드의 사슬 길이는, 예를 들어, 20 mer 이상, 40 mer 이상, 50 mer 이상, 60 mer 이상, 80 mer 이상, 100 mer 이상, 200 mer 이상, 2 ~ 300 mer, 2 ~ 250 mer, 2 ~ 200 mer, 10 ~ 300 mer, 10 ~ 250 mer, 10 ~ 200 mer, 10 ~ 150 mer, 15 ~ 300 mer, 15 ~ 250 mer, 15 ~ 200 mer, 15 ~ 150 mer, 15 ~ 110 mer 여도 된다.

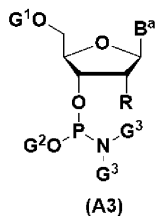
[0199] 공정 (1)의 탈보호 공정은, 고상 담체 상에 담지되는 RNA 사슬 말단의 5' 수산기의 보호기를 탈보호하는 공정이다 (도 1의 스킴 A 참조). G<sup>1</sup>로 나타내는 일반적인 보호기로는, 4,4'-디메톡시트리틸기 (DMTr 기)나 4-모노메톡시트리틸기, 4,4',4"-트리메톡시트리틸기가 사용된다. 탈보호는, 산을 사용하여 실시할 수 있다. 탈보호용의 산으로는, 예를 들어, 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로메탄술폰산, 트리클로로아세트산, 메탄술폰산, 염산, 아세트산, p-톨루엔술폰산 등을 들 수 있다.

[0200] 공정 (2)의 축합 공정은, 상기 탈보호 공정에 의해 탈보호한 올리고뉴클레오타이드 사슬 말단의 5' 수산기에 대해, 도 1의 스킴 A에 기재된 하기 식 (A3)으로 나타내는 뉴클레오시드포스포라미다이트를 결합시키는 반응이다. 또한, 핵산 신장에 사용하는 하기 식 (A3)으로 나타내는 포스포라미다이트로는, R이 보호된 수산기, 2'-OMe, 2'-F, 2'-O-tert-부틸디메틸실릴기, 2'-O-메톡시에틸기, 2'-H, 2'-플루오로-2'-디옥시-β-D-아라비노푸라노실 중인 것을 들 수 있다. 상기 뉴클레오시드포스포라미다이트로는, 5' 수산기가 보호기 (예, DMTr 기)로 보호된 것을 사용한다. 축합 공정은, 상기 뉴클레오시드포스포라미다이트를 활성화하는 액티베이터를 사용하여 실시할 수 있다. 액티베이터로는, 예를 들어, 5-벤질티오-1H-테트라졸 (BTT), 1H-테트라졸, 4,5-디시아노이미다졸 (DCI), 5-에틸티오-1H-테트라졸 (ETT), N-메틸벤즈이미다졸륨트리플레이트 (N-MeBIT), 벤즈이미다졸륨트리플레이트 (BIT), N-페닐이미다졸륨트리플레이트 (N-PhIMT), 이미다졸륨트리플레이트 (IMT), 5-니트로벤즈이미다졸륨트리플레이트 (NBT), 1-하이드록시벤조트리아졸 (HOBT) 또는 5-(비스-3,5-트리플루오로메틸페닐)-1H-테트라졸 등을 들 수 있고, 5-벤질티오-1H-테트라졸 (BTT)이 바람직하다.

[0201] 도 1의 스킴 A에 기재된 식 (A3)으로 나타내는 뉴클레오시드포스포라미다이트 (이하, 아미다이트라고 호칭한다)란, 이하와 같다.

[0202] 식 (A3) :

[0203] [화학식 21]



[0204]

[0205] (식 중,

[0206] G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, B<sup>a</sup>, 및 R은, 상기와 같다.)

[0207] 으로 나타내는 화합물.

[0208] 본 발명에서는, 식 (A3)의 아미다이트로서, 축합 공정의 적어도 1회에, 2'-OMe-U 아미다이트 (식 (4)로 나타내는 화합물)가 사용된다. 그리고, 그 축합 공정에 있어서, 2'-OMe-U 아미다이트가, 아세트니트릴 및 식 (3)으로 나타내는 방향족계 탄화수소를 포함하는 혼합액에 용해된 용액을 사용할 수 있다. 액티베이터는, 상기 혼합액에 첨가될 수 있다. 액티베이터는, 상기 혼합액에 용해되어 있어도 된다.

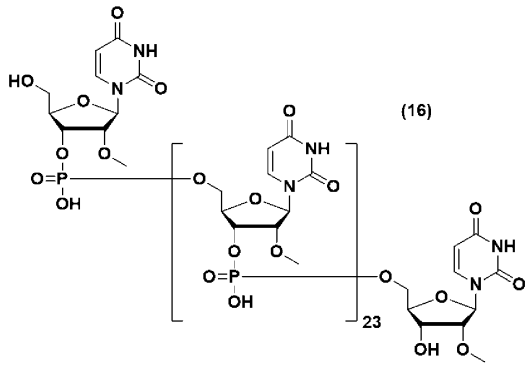
[0209] 축합 공정 후에는, 적절히, 미반응의 5' 수산기를 캐핑해도 된다. 캐핑은, 무수 아세트산-테트라하이드로푸란 용액, 폐녹시아세트산 무수물/N-메틸이미다졸 용액 등의 공지된 캐핑 용액을 사용하여 실시할 수 있다.

[0210] 공정 (3)의 산화 공정은, 상기 축합 공정에 의해 형성된 아인산기를 인산기 또는 티오인산기로 변환하는 공정이다. 본 공정은, 3개의 인으로부터 5개의 인으로 산화제를 사용하여 변환시키는 반응이며, 고상 담체에 담지되어 있는 올리고 핵산 유도체에 산화제를 작용시킴으로써 실시할 수 있다.

- [0211] 아인산기를 인산기로 변환하는 경우에는, 「산화제」로서, 예를 들어, 요오드를 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.005 ~ 2 M 의 농도가 되도록 조제하여 사용할 수 있다. 산화의 산소원으로는 물을 사용할 수 있고, 반응을 진행시키는 염기로는 피리딘, N-메틸이미다졸 (NMI), N-메틸모르폴린, 트리에틸아민을 사용할 수 있다. 또, 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 아세토니트릴, 테트라하이드로푸란 (THF) 또는 이들의 임의의 비율로 혼합하여 사용할 수도 있다. 예를 들어, 요오드/물/피리딘/아세토니트릴, 혹은 요오드/물/피리딘 혹은 요오드/물/피리딘/NMI, 혹은 요오드/물/피리딘/THF 를 사용할 수 있다. 반응 온도는, 5 °C ~ 50 °C 가 바람직하다. 반응 시간은, 통상 1 분 ~ 30 분이 적당하다. 사용하는 시약의 양은 고상 담체에 담지되어 있는 화합물 1 mol 에 대해 1 ~ 100 mol 이 바람직하고, 보다 바람직하게는 1 ~ 10 mol 이다.
- [0212] 아인산트리에스테르기를 티오인산기로 변환하는 경우에는, 「산화제」로서, 예를 들어, 황, 3H-1,2-벤조디티올-3-온-1,1-디옥시드 (Beaucage 시약), 3-아미노-1,2,4-디티아졸-5-티온 (ADTT), 5-페닐-3H-1,2,4-디티아졸-3-온 (POS), [(N,N-디메틸아미노메틸리덴)아미노]-3H-1,2,4-디티아졸린-3-티온 (DDTT), 및 페닐아세틸디술파이드 (PADS) 를 사용할 수 있다. 그 산화제는, 0.001 ~ 2 M 의 농도가 되도록 적당한 용매로 희석하여 사용할 수 있다. 반응에 사용하는 용매로는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 피리딘 또는 이들의 임의의 혼합 용매를 들 수 있다. 산화 공정은, 상기 캐핑 조작의 후에 실시해도 되고, 반대로, 산화 공정 후에 캐핑 조작을 실시해도 되고, 이 순서는 한정되지 않는다.
- [0213] 공정 (5) 에 있어서, 인산 보호기를 탈보호하는 공정은, 원하는 서열을 갖는 핵산의 합성이 완료된 후에는, 인산 부분의 보호기를 탈보호하기 위해서 아민 화합물을 작용시킨다. 아민 화합물로는, 예를 들어, 일본 특허 공보 제4705716호에 기재되는 디에틸아민 등을 들 수 있다.
- [0214] 신장의 마지막에 도입한 뉴클레오시드의 5' 수산기의 보호기는, 후술하는 고상 담체로부터의 잘라내기 및 보호기의 탈보호의 후, 5' 보호기를 태그로 하는 칼럼 정제를 위해서 사용해도 되고, 칼럼 정제 후, 5' 수산기의 보호기를 탈보호해도 된다.
- [0215] 공정 (5) 에 있어서의, 고상 담체 상에서 원하는 사슬 길이로 신장시킨 올리고뉴클레오티드의, 고상 담체로부터의 잘라내기는, 통상, 절단제로서 농암모니아수를 사용하여 실시된다.
- [0216] 또한 암모니아 또는 아민 화합물 등을 사용하여, 예를 들어, 고상 담체로부터 올리고뉴클레오티드 사슬을 절단하여 회수한다. 아민 화합물로는, 예를 들어, 메틸아민, 에틸아민, 이소프로필아민, 에틸렌디아민, 디에틸아민 등을 들 수 있다.
- [0217] 공정 (6) 에 있어서, 공정 (5) 에 있어서 고상 담체로부터 잘라내어진 핵산 화합물 (A6) 의 리보스의 2' 수산기의 보호기는, 국제 공개 제2006/022323호), 국제 공개 제2013/027843호, 또는 국제 공개 제2019/208571호에 기재된 방법에 따라서 제거할 수 있고, 탈보호한 올리고뉴클레오티드 (A7) 를 얻을 수 있다.
- [0218] 본 발명의 제조 방법을 이용하여 제조 가능한 올리고뉴클레오티드로는, 올리고뉴클레오티드 내에 포함되는 뉴클레오시드가, RNA, DNA, 그리고 2'-O-MOE, 2'-O-Me, 2'-F 를 갖는 RNA, 및 LNA 인 올리고뉴클레오티드를 들 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, Xiulong, Shen 등 저, Nucleic Acids Research, 2018, Vol. 46, No. 46, 1584-1600, 및 Daniel O'Reilly 등 저, Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 2, 546-558 에 기재된, 각종 뉴클레오시드의 예를 들 수 있다.
- [0219] 본 발명의 제조 방법에 있어서 사용 가능한 올리고뉴클레오티드의 전형적인 예를, 실시예에 기재된 예에 더하여 하기 예를 나타내지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0220] 이하, 서열의 설명 중, U 는 우리딘 (ST. 25 형식) 을, C 는 시티딘을, A 는 아데노신을, 또 G 는 구아노신을 나타낸다. 또, ST. 26 형식에 준한 T 는 우리딘을 나타낸다.
- [0221] 국제 공개 제2019/060442호에 기재되어 있는, 하기 서열 (A) 및 (B) 를 갖는 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다.
- [0222] 서열 (A) : 5'-AUGGAAUmAcUCUUGGUUmAcdTdT-3' (ST. 25 형식에 준한다) (5'-ATGGAATmACTCTTGGTTmAcdTdT-3' (ST. 26 형식에 준한다)) (Antisense) (서열 번호 1) 21 mer
- [0223] 서열 (B) : 5'-GUmAACmCmAAGAGUmAUmUmCmCmAUmdTdT-3' (ST. 25 형식에 준한다) (5'-GTmAACmCmAAGAGTmATmTmCmCmA TmdTdT-3' (ST. 26 형식에 준한다)) (Sense) (서열 번호 2) 21 mer
- [0224] 서열 (A) 및 (B) 중, Um 은 2'-O-메틸우리딘 (ST. 25 형식) 을, Tm 은 2'-O-메틸우리딘 (ST. 26 형식) 을, Cm



[0242] [화학식 22]



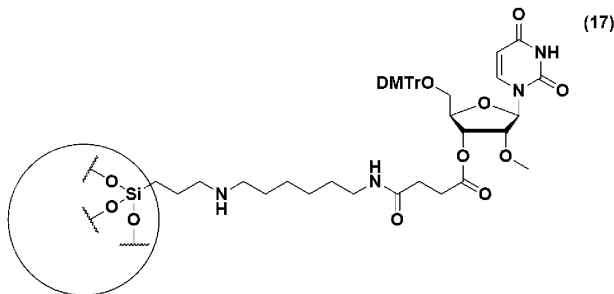
[0243]

[0244] 고상 담체로서, Controlled Pore Glass (CPG) 를 사용하고, 핵산 합성기로서 AKTA oligopilot plus 100 (GE 헬스케어사 제조) 을 사용하여, 포스포라미다이트 고상 합성법에 의해, 상기 서열 (I) 로 이루어지는 올리고뉴클레오티드를 3' 측에서 5' 측으로 향해 합성하였다. 합성은, 약 53  $\mu\text{mol}$  스케일로 실시하였다. 또, 합성에는, 식 (4) 로 나타내는 2'-OMe-U 아미다이트를 임의의 용매에 용해시킨 2'-OMe-U 아미다이트 용액을 사용하고, 디블로킹 용액으로서 고순도 디클로로아세트산톨루엔 용액을 사용하고, 축합제로서 5-벤질티오-1H-테트라졸 용액을 사용하고, 산화제로서 요오드 용액을 사용하고, 캐핑 용액으로서 페녹시아세트산 무수물 용액과 N-메틸이미다졸 용액을 사용하였다.

[0245] 다음으로, 본 발명의 제법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드의 구체적인 제조예를 나타낸다. 여기서, 하기 실시예에 있어서 본 발명의 제법에 의해 제조되는 올리고뉴클레오티드는, 상기 서열 번호 4 로 나타나는 서열 (I) 을 갖는 올리고뉴클레오티드이다.

[0246] 또, 이하의 실시예 및 비교예 중에 기재하는 2'-OMe-U 유도체 CPG 는 하기 식 (17) 로 나타내는 화합물을 의미한다. 단, 식 (17) 에 있어서 도시된 썬클은, CPG 를 모식적으로 나타내는 것이다.

[0247] [화학식 23]



[0248]

[0249] 실시예 1

[0250] 53.7  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체 CPG 와, 아세트니트릴 : 톨루엔 9 : 1 을 용매로 하여 75 mM 로 조정된 2'-OMe-U 아미다이트 용액을 사용하여, 서열 (I) 에 나타내는 올리고뉴클레오티드를 AKTA oligopilot plus 100 (GE 헬스케어사 제조) 에 의해, 3' 측에서 5' 측으로 향해 자동 합성하였다. 자동 합성의 순서는, 먼저, 3 % 디클로로아세트산톨루엔 용액을 CPG 에 송액하고, 5' 위치의 트리틸 보호기를 탈보호하고, 계속해서, 2'-OMe-U 아미다이트 용액과 축합제로서 5-벤질메르캅토-1H-테트라졸아세트니트릴 용액을 CPG 에 송액하고, 5' 위치의 수산기에 축합 반응을 진행시켰다. 계속해서, 50 mM 요오드 용액을 송액하고, 아인산기를 인산기로 변환하였다. 계속해서, 캐핑 용액으로서 0.1 M 페녹시아세트산 무수물 아세트니트릴 용액과 10 wt % N-메틸이미다졸/10 wt % 2,6-루티딘아세트니트릴 용액을 사용하고, 축합 반응이 진행되지 않았던 반응점에 캐핑을 실시하였다. 이들 공정을 합계 24 회 반복하고, 서열 (I) 에 나타나는 서열의 핵산 올리고뉴클레오티드를 CPG 담체 상에 합성하였다. 그 후, 5' 위치의 트리틸 보호기를 3 % 디클로로아세트산톨루엔 용액으로 탈보호하였다. 그 후, 8.0  $\mu\text{mol}$  의 올리고뉴클레오티드를 담지한 CPG 담체에 대해, 4.09 g 의 암모니아수와 1.21 g 의 에탄올을 사용하여, 올리고뉴클레오티드를 고상 담체로부터 유리시켰다. 그 후, 고상 담체를 여과에 의해 제거하고, 감압 건조에 의해 암모니아수와 에탄올을 제거하고, 원하는 올리고뉴클레오티드를 건조체로서 얻

었다. 측정 방법 2 에 의한 측정의 결과, 수량은 57.3 mg, 측정 방법 1 에 의한 측정의 결과, FLP 비율은 76.04 %, n-1 mer 비율은 7.17 % 였다.

- [0251] 실시예 2
- [0252] 실시예 1 의 방법에 있어서, 55.6  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체 CPG 와, 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서 아세토니트릴 : 톨루엔 4 : 1 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오티드를 얻었다. 수량은 58.3 mg, FLP 비율은 78.01 %, n-1 mer 비율은 5.24 % 였다.
- [0253] 실시예 3
- [0254] 실시예 1 의 방법에 있어서, 53.5  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체 CPG 와, 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서 아세토니트릴 : 톨루엔 4 : 6 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오티드를 얻었다. 수량은 54.3 mg, FLP 비율은 74.24 %, n-1 mer 비율은 4.14 % 였다.
- [0255] 실시예 4
- [0256] 실시예 1 의 방법에 있어서, 53.1  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체 CPG 와, 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서 아세토니트릴 : o-자일렌 4 : 1 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오티드를 얻었다. 수량은 58.6 mg, FLP 비율은 77.84 %, n-1 mer 비율은 5.22 % 였다.
- [0257] 실시예 5
- [0258] 실시예 1 의 방법에 있어서, 53.1  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체 CPG 와, 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서 아세토니트릴 : 클로로벤젠 4 : 1 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오티드를 얻었다. 수량은 57.3 mg, FLP 비율은 77.82 %, n-1 mer 비율은 5.78 % 였다.
- [0259] 실시예 6
- [0260] 실시예 1 의 방법에 있어서, 52.4  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체 CPG 와, 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서 아세토니트릴 : o-디클로로벤젠 4 : 1 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오티드를 얻었다. 수량은 56.4 mg, FLP 비율은 76.62 %, n-1 mer 비율은 5.50 % 였다.
- [0261] 비교예 1
- [0262] 실시예 1 의 방법에 있어서, 52.8  $\mu\text{mol}$  의 2'-OMe-U 유도체 CPG 와, 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서 아세토니트릴 : 디클로로메탄 4 : 1 을 사용하는 것 이외에는, 동일한 방법으로 서열 (I) 의 올리고뉴클레오티드를 얻었다. 수량은 59.4 mg, FLP 비율은 76.87 %, n-1 mer 비율은 7.68 % 였다.
- [0263] FLP 비율과, n-1 mer 비율에 대해, 실시예 1 ~ 6, 및 비교예 1 의 결과를 표 2 에 나타낸다.

**표 2**

실험 명칭	용매종	용매 혼합비 (체적비)	n-1 mer 비율	FLP 비율	n-1mer /FLP	비교예와의 상대비
실시예 1	아세토니트릴-톨루엔	9 : 1	7.17%	76.04%	0.094	94%
실시예 2	아세토니트릴-톨루엔	4 : 1	5.24%	78.01%	0.067	67%
실시예 3	아세토니트릴-톨루엔	2 : 3	4.14%	74.24%	0.056	56%
실시예 4	아세토니트릴-o-자일렌	4 : 1	5.22%	77.84%	0.067	67%
실시예 5	아세토니트릴-클로로벤젠	4 : 1	5.78%	77.82%	0.074	74%
실시예 6	아세토니트릴-o-디클로로벤젠	4 : 1	5.50%	76.62%	0.072	72%
비교예 1	아세토니트릴-디클로로메탄	4 : 1	7.68%	76.87%	0.100	100%

[0264]

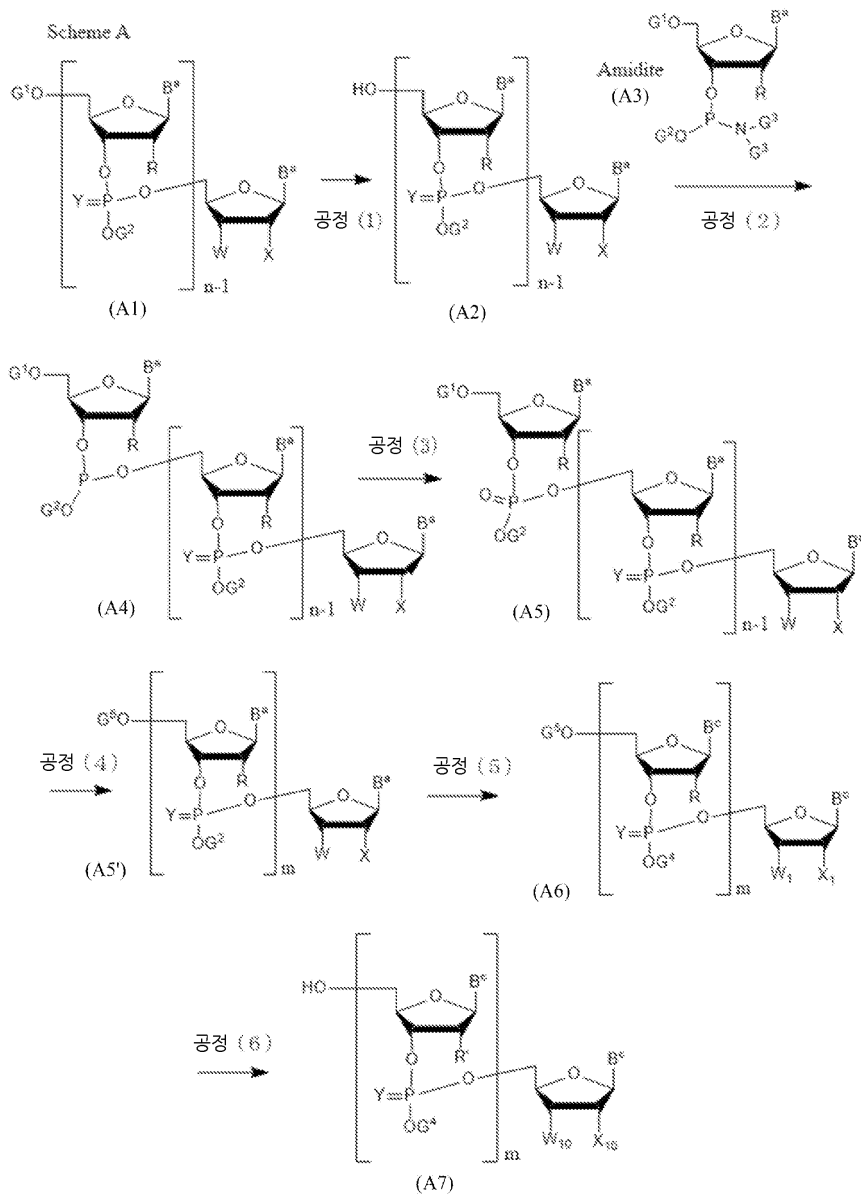
[0265] 상기 표 2 의 결과로부터, 아세토니트릴과 방향족계 탄화수소를 2'-OMe-U 아미다이트 용액의 용매로서 사용한 경우에는, 비교예 1 의 용액을 사용한 경우와 비교하여, n-1 mer 불순물을 상대적으로 저감 가능한 것을 알 수 있다.

[0266] 서열표 프리 텍스트

[0267] 서열표의 서열 번호 1 ~ 4 는, 본 발명의 제조 방법에 따라서 제조되는 올리고뉴클레오타드의 염기 서열을 나타낸다.

도면

도면1



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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