



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0129006  
(43) 공개일자 2024년08월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07F 9/6533 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07F 9/6533 (2013.01)  
C07H 21/04 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7025422
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월27일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년07월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2022/048385
- (87) 국제공개번호 WO 2023/127918  
국제공개일자 2023년07월06일
- (30) 우선권주장  
JP-P-2021-212132 2021년12월27일 일본(JP)

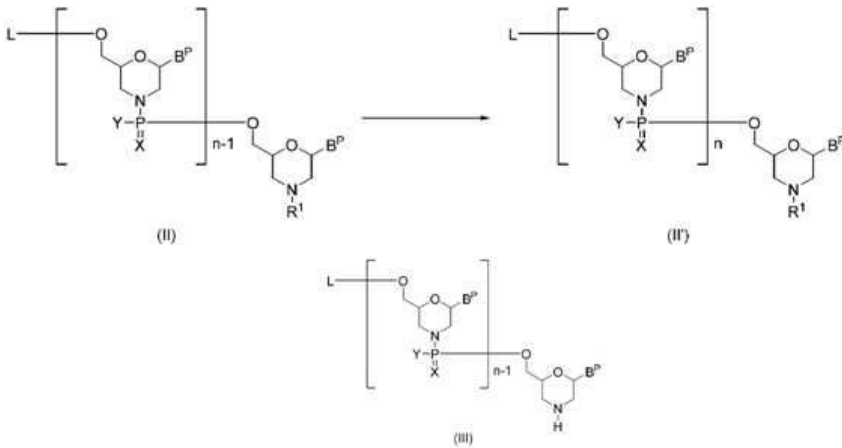
- (71) 출원인  
니뽀 신야쿠 가부시카이가이사  
일본 교토후 6018550 교토시 미나미쿠 잇쇼인니시  
노쇼몬구치초 14
- (72) 발명자  
노가타 마사키  
일본국 6018550 교토후 교토시 미나미쿠 잇쇼인  
니시노쇼 몬구치초 14, 니뽀 신야쿠 가부시카이가  
이사 내  
시바 요시노부  
일본국 6018550 교토후 교토시 미나미쿠 잇쇼인  
니시노쇼 몬구치초 14, 니뽀 신야쿠 가부시카이가  
이사 내  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인(유한) 다래

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **올리고 핵산 화합물의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은, 다음 식으로 표시되는 모르폴리노 핵산 올리고머의 신장 반응에 있어서, 식 (II)의 화합물을, 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여 식 (III)의 화합물로 하는 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법(식 중의 각 기호는 명세서 중에서 정의한 바와 같다)에 관한 것이다.



(72) 발명자

**시모오카 다쿠야**

일본국 6018550 교토후 교토시 미나미쿠 잇쇼인 니  
시노쇼 문구치쵸 14, 니뿐 신야쿠 가부시카이사  
내

**요코이 겐토**

일본국 6018550 교토후 교토시 미나미쿠 잇쇼인 니  
시노쇼 문구치쵸 14, 니뿐 신야쿠 가부시카이사  
내

---

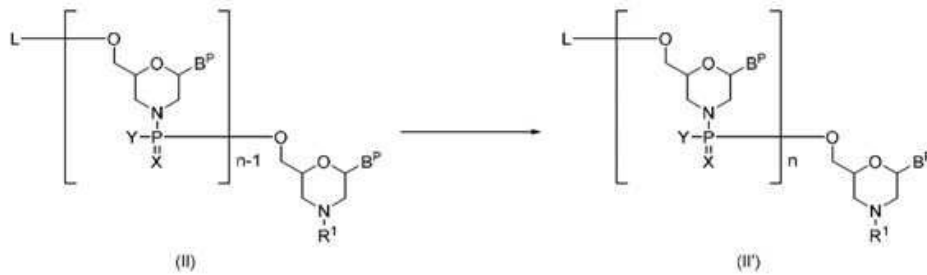
명세서

청구범위

청구항 1

모르폴리노 핵산 올리고머의 신장 반응:

[화학식 1]



[식 중,

$B^P$ 는, 독립하여, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기이고;

$R^1$ 은, 트리틸, 모노메톡시트리틸 또는 디메톡시트리틸이며;

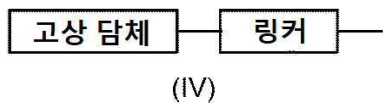
X는, O 또는 S이고;

Y는, 디알킬아미노 또는 알콕시이며;

n은, 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이고, 바람직하게는, 15~30의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 더욱 바람직하게는, 18~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이고;

L은, 수소, 아실, 또는 식 (IV):

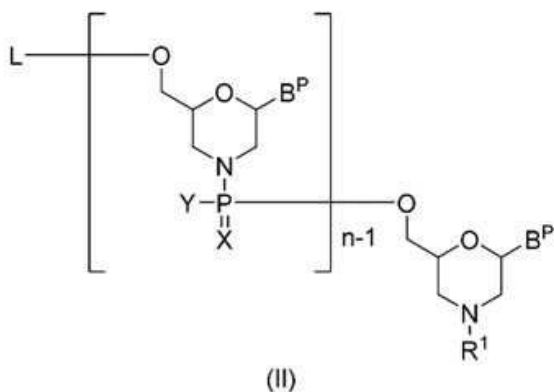
[화학식 2]



로 표시되는 기이다]에 있어서,

식 (II):

[화학식 3]



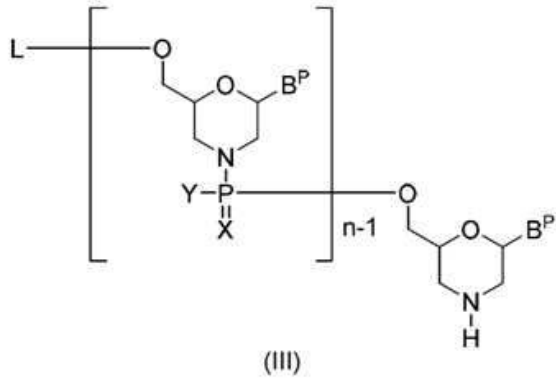
[식 중, L,  $B^P$ , X, Y,  $R^1$  및 n은 상기와 같다]

의 화합물을,

산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

식 (III):

[화학식 4]



[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

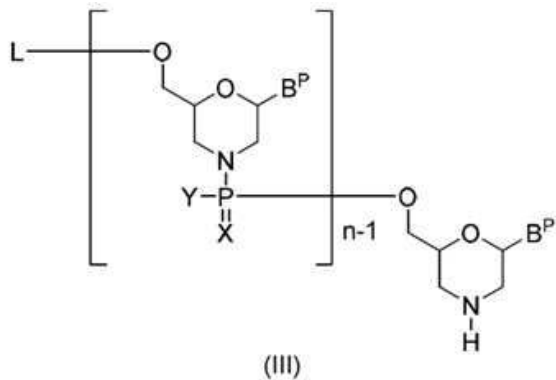
의 화합물로 하는 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

또한, 식 (III):

[화학식 5]



[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

의 화합물을,

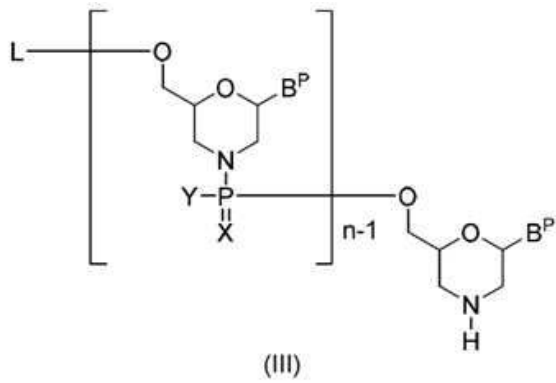
염기, 알코올류 및 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, 제조 방법.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

또한, 식 (III):

[화학식 6]



[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

의 화합물을,

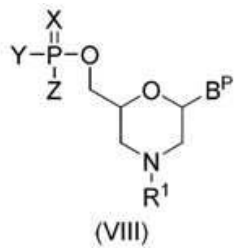
유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, 제조 방법.

**청구항 4**

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

또한, 식 (VIII):

[화학식 7]



[식 중, B<sup>P</sup>, X, Y 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같으며, Z는 할로젠이다]

의 화합물을,

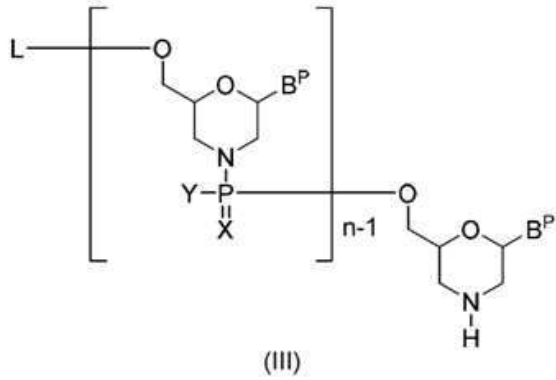
유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, 제조 방법.

**청구항 5**

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

또한, 식 (III):

[화학식 8]

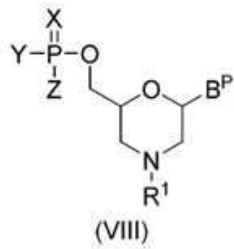


[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

의 화합물과, 유기 아민의 존재하,

식 (VIII):

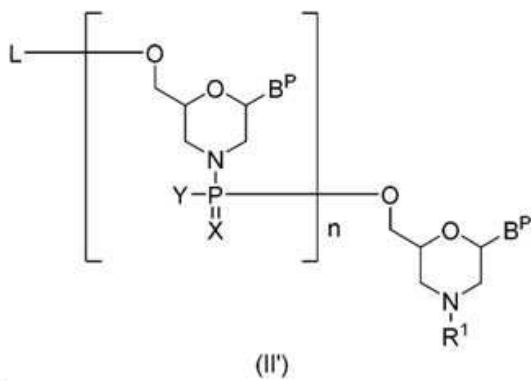
[화학식 9]



[식 중, X, Y, Z, B<sup>P</sup> 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]의 화합물을 반응시켜,

식 (II'):

[화학식 10]



[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

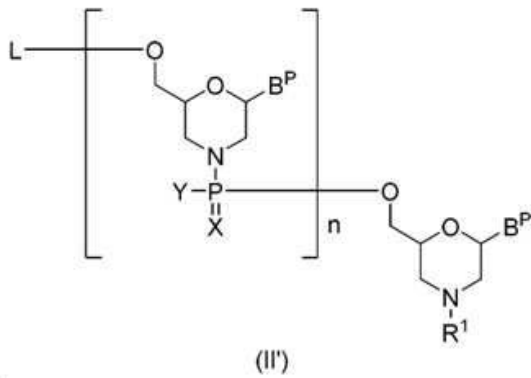
의 화합물로 하는 공정을 포함하는, 제조 방법.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

또한, 식 (II'):

[화학식 11]



[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

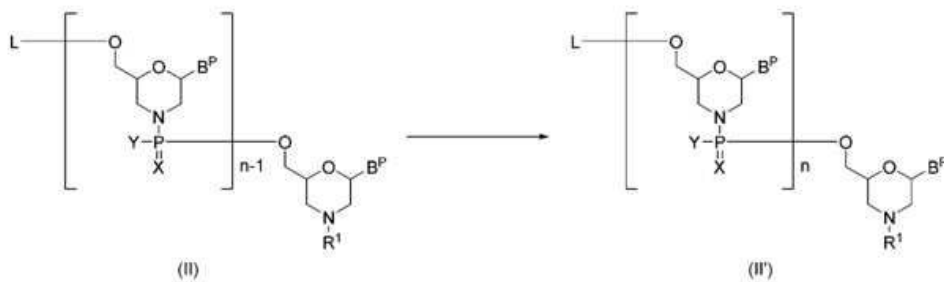
의 화합물을,

알코올류 및/또는 할로겐 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, 제조 방법.

**청구항 7**

모르폴리노 핵산 올리고머의 신장 반응:

[화학식 12]



[식 중,

B<sup>P</sup>는, 독립하여, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기이고;

R<sup>1</sup>은, 트리틸, 모노메톡시트리틸 또는 디메톡시트리틸이며;

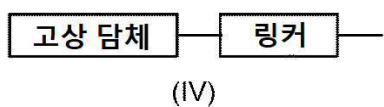
X는, O 또는 S이고;

Y는, 디알킬아미노 또는 알콕시이며;

n은, 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이고, 바람직하게는, 15~30의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 더욱 바람직하게는, 18~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이고;

L은, 수소, 아실, 또는 식 (IV):

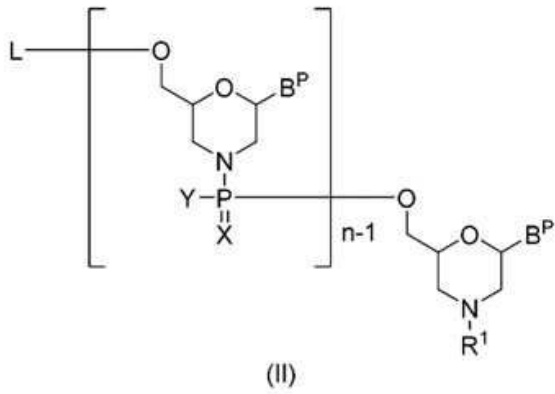
[화학식 13]



로 표시되는 기이다]에 있어서,

식 (II):

[화학식 14]



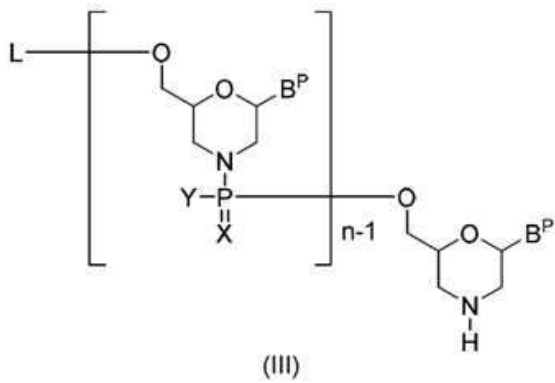
[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

의 화합물을,

산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

식 (III):

[화학식 15]

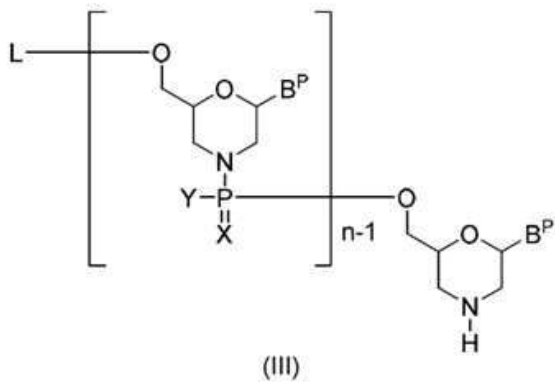


[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

의 화합물로 하는 공정,

식 (III):

[화학식 16]



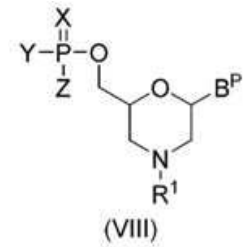
[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

의 화합물을,

유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정, 그리고

식 (VIII):

[화학식 17]



[식 중, B<sup>P</sup>, X, Y, Z 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]

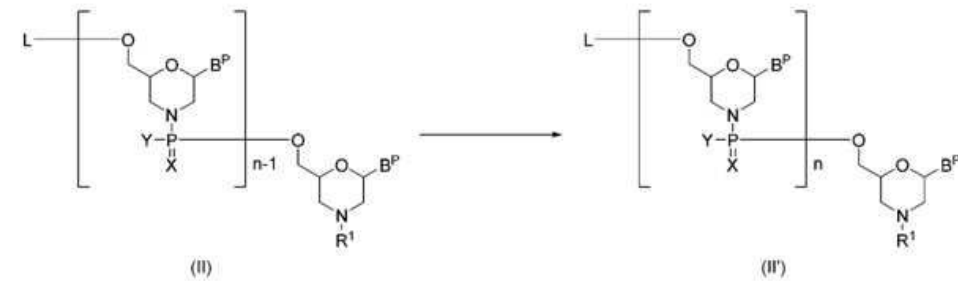
의 화합물을,

유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

### 청구항 8

모르폴리노 핵산 올리고머의 신장 반응:

[화학식 18]



[식 중,

B<sup>P</sup>는, 독립하여, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기이고;

R<sup>1</sup>은, 트리틸, 모노메톡시트리틸 또는 디메톡시트리틸이며;

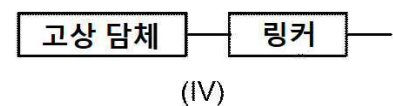
X는, O 또는 S이고;

Y는, 디알킬아미노 또는 알콕시이며;

n은, 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이고, 바람직하게는, 15~30의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 더욱 바람직하게는, 18~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이고;

L은, 수소, 아실, 또는 식 (IV):

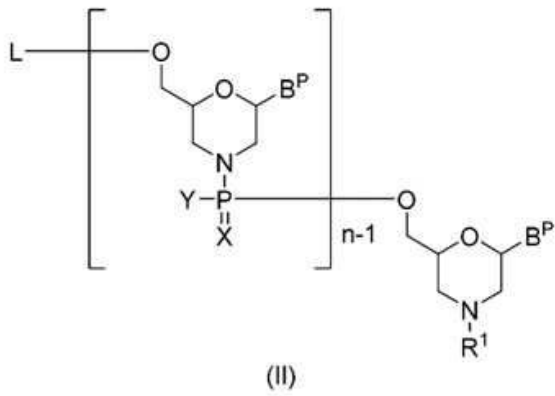
[화학식 19]



로 표시되는 기이다]에 있어서,

식 (II):

[화학식 20]



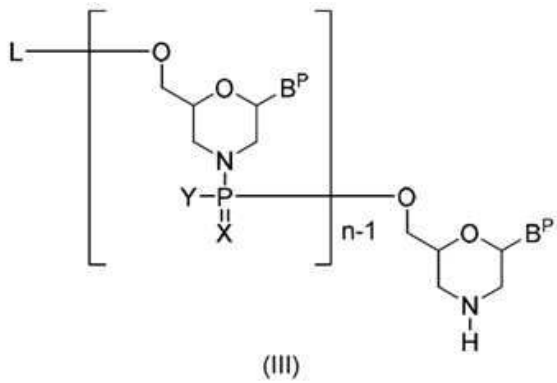
[식 중, L, B<sup>p</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

의 화합물을,

산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

식 (III):

[화학식 21]

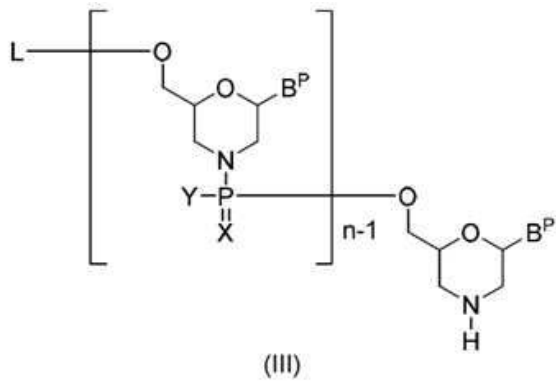


[식 중, L, B<sup>p</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

의 화합물로 하는 공정,

식 (III):

[화학식 22]

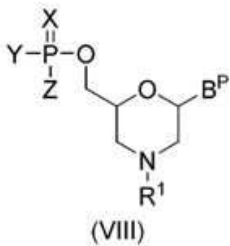


[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

의 화합물을,

식 (VIII):

[화학식 23]



[식 중, B<sup>P</sup>, X, Y, Z 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]

의 화합물을,

유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

#### 청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액이, 트리플루오로초산 및 트라이소프로필실란을 포함하는 용액인, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

#### 청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액이, 트리플루오로초산, 트리에틸아민, 트라이소프로필실란, 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 디클로로메탄을 포함하는 용액인, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

#### 청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액이, N-에틸모르폴린 및 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논인, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

#### 청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 고상 담체가, 팽윤성 폴리스티렌, 비팽윤성 폴리스티렌, PEG쇄 결합형 폴리스티렌, 정공(定孔) 유리, 옥살릴화-정공 유리, TentaGel 지지체-아미노폴리에틸렌 글리콜 유도체화 지지체 또는 Poros-폴리스티렌/디비닐벤젠의 코폴리머인, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

**청구항 13**

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커가, 단쇄 알킬렌, 장쇄 알킬렌, 아미노-단쇄 알킬렌, 아미노-장쇄 알킬렌, 디아실 단쇄 알킬렌(예를 들면, 숙시닐), 디아실 장쇄 알킬렌 또는 디알킬렌술폰닐인, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은, 신규한 올리고 핵산 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 올리고 핵산 화합물의 제조 방법으로서, 고상법(固相法)과 액상법(液相法)이 알려져 있다. 고상법은 고상 담체에 담지(擔持)된 기질과 반응 시약을 포함하는 용액을 접촉시키면서 핵산을 신장하는 불균일계의 반응 방법이다. 고상법에서는 필터가 부착된 반응 용기를 사용하여, 용기 내에서 반응을 행하는, 이른바 배치법이 사용된다(예를 들면, 비특허문헌 1, 특허문헌 1을 참조.). 또, 핵산 자동 합성기(예를 들면, DNA, RNA 신세서 이저)와 같이, 고상 담체를 컬럼에 넣고, 그 컬럼에 반응 시약을 포함하는 용액을 흘림으로써 반응시키는 의사적(擬似的)인 플로우 합성법도 알려져 있다.

[0003] 한편, 액상법은 기질과 반응 시약의 양쪽을 포함하는 용액 중에서 반응시킴으로써 핵산을 신장하는 균일계의 반응 방법이다. 액상법도 용기 내에서 반응을 행하는 배치법이 사용된다(예를 들면, 특허문헌 2, 특허문헌 3을 참조.).

[0004] 고상법, 액상법, 배치법, 의사적인 플로우 합성법 중 어느 경우라도, 올리고 핵산 화합물의 화학적 합성법에서는, 핵산 화합물 상의 산소 원자 또는 아미노기의 보호기를 제거하는 「탈보호」 반응과, 탈보호되어 반응할 수 있게 된 산소 원자 또는 질소 원자와 인 원자와의 결합 형성을 행하는 「축합」 반응을 몇 번이나 반복함으로써 핵산을 신장해 간다.

[0005] 올리고 핵산 화합물을 의약품 원료로서 사용하는 경우, 올리고 핵산 화합물은 높은 순도가 요구되기 때문에, 신장 반응의 각 공정에 있어서, 부생성물의 생성을 억제하면서, 반응 효율 및 반응 속도를 향상할 필요가 있지만, 사용할 수 있는 용매나 시약이 한정되어 있기 때문에 곤란했다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0006] (특허문헌 0001) 국제공개공보 제1991/09033 A1
- (특허문헌 0002) 국제공개공보 제2014/077292 A1
- (특허문헌 0003) 국제공개공보 제2013/122236 A1

**비특허문헌**

- [0007] (비특허문헌 0001) Acc.Chem.Res., Vol. 24, 278-284, 1991

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 올리고 핵산 화합물의 신장 반응은, 탈보호 반응과 축합 반응을 반복하기 때문에, 복잡한 불순물이 발생한다. 본 발명의 목적은, 올리고 핵산 화합물의 순도에 영향을 주는 불순물을 특정하고, 그 불순물의 생성을 제어하는 신규한 제조 방법을 제공하는 것에 있다.

**과제의 해결 수단**

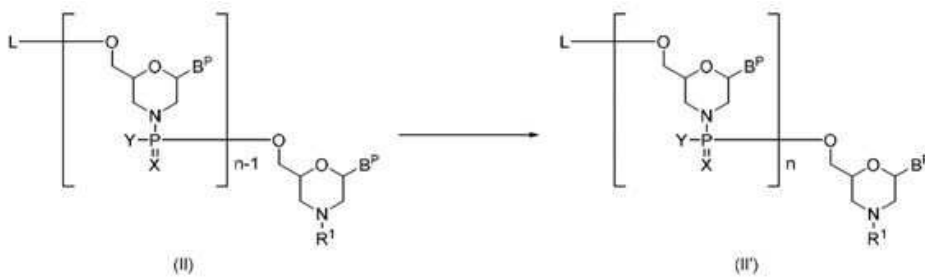
[0009] 본 발명자들은, 올리고 핵산 화합물의 신장 반응에 있어서, 축합 전의 반응 원료 및 중간체의 처리를 예의 검토 함으로써, 효율 좋게 탈보호 반응 및 축합 반응이 진행되는 것, 또한 축합 반응의 전처리에 의해 발생하는 불순 물이, 올리고 핵산 화합물의 순도에 영향을 주는 것을 찾아내어, 본 발명을 완성했다.

[0010] 즉, 본 발명은, 이하에 관한 것이다.

[0011] <1>

[0012] 모르폴리노 핵산 올리고머의 신장 반응:

**화학식 1**



[0013]

[0014] [식 중,

[0015] B<sup>P</sup>는, 독립하여, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기이고;

[0016] R<sup>1</sup>은, 트리틸, 모노메톡시트리틸 또는 디메톡시트리틸이며;

[0017] X는, O 또는 S이고;

[0018] Y는, 디알킬아미노 또는 알콕시이며;

[0019] n은, 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이고, 바람직하게는, 15~30의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 더욱 바람직하게는, 18~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이고;

[0020] L은, 수소, 아실, 또는 식 (IV):

**화학식 2**

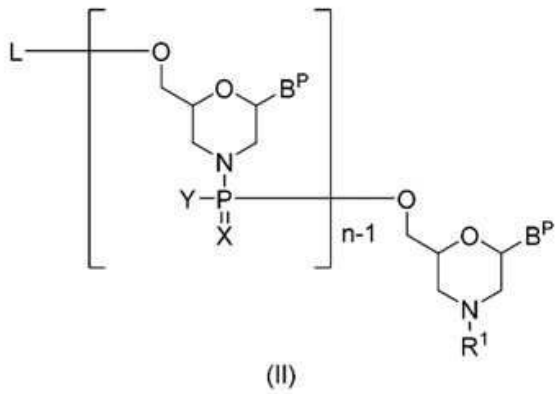


[0021] (IV)

[0022] 로 표시되는 기이다]에 있어서,

[0023] 식 (II):

화학식 3



[0024]

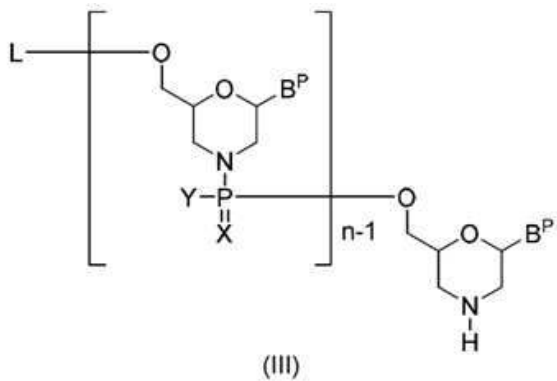
[0025] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

[0026] 의 화합물을,

[0027] 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

[0028] 식 (III):

화학식 4



[0029]

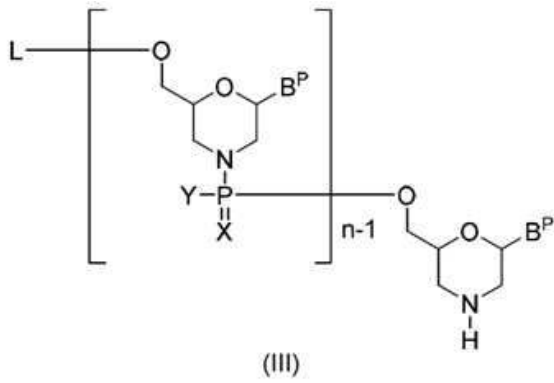
[0030] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0031] 의 화합물로 하는 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법이다.

[0032] <2>

[0033] 또한, 식 (III):

화학식 5



[0034]

[0035] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

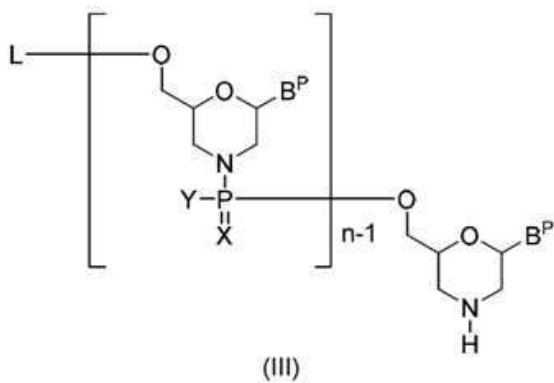
[0036] 의 화합물을,

[0037] 염기, 알코올류 및 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, <1>에 기재한 제조 방법.

[0038] <3>

[0039] 또한, 식 (III):

화학식 6



[0040]

[0041] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

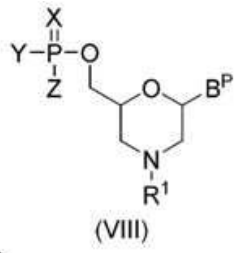
[0042] 의 화합물을,

[0043] 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, <1> 또는 <2>에 기재한 제조 방법.

[0044] <4>

[0045] 또한, 식 (VIII):

화학식 7



[0046]

[0047] [식 중, B<sup>p</sup>, X, Y 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같으며, Z는 할로젠(예를 들면, 클로로, 브로모, 요오도)이다]

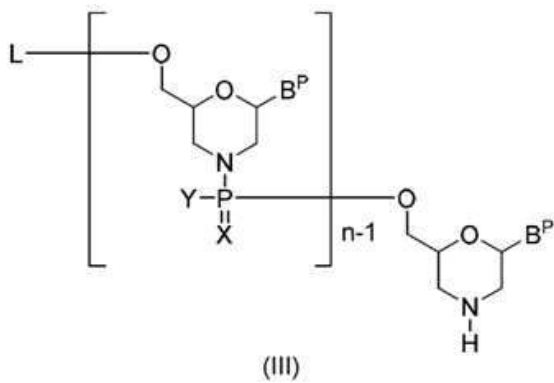
[0048] 의 화합물을,

[0049] 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, <1> ~ <3> 중 어느 것에 기재한 제조 방법.

[0050] <5>

[0051] 또한, 식 (III):

화학식 8



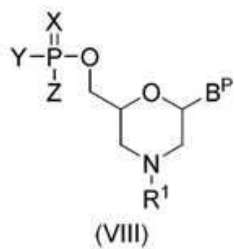
[0052]

[0053] [식 중, L, B<sup>p</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0054] 의 화합물과, 유기 아민의 존재하,

[0055] 식 (VIII):

화학식 9

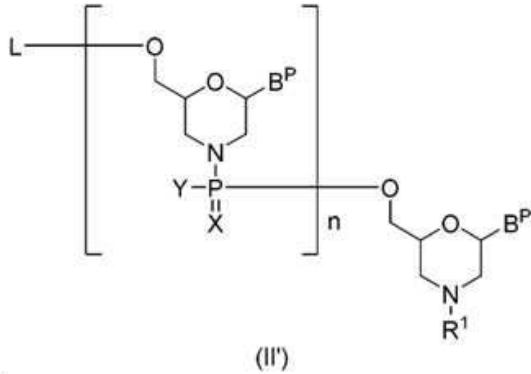


[0056]

[0057] [식 중, X, Y, Z, B<sup>P</sup> 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]의 화합물을 반응시켜,

[0058] 식 (II'):

**화학식 10**



[0059]

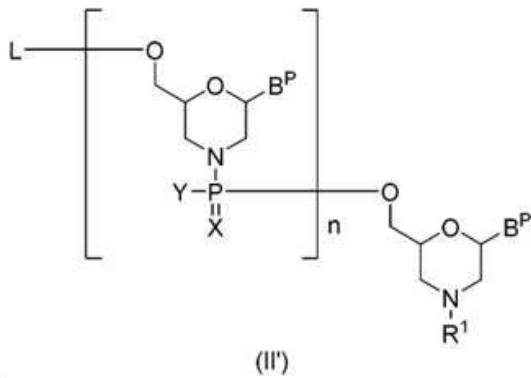
[0060] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

[0061] 의 화합물로 하는 공정을 포함하는, <1>~<4> 중 어느 것에 기재한 제조 방법.

[0062] <6>

[0063] 또한, 식 (II'):

**화학식 11**



[0064]

[0065] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

[0066] 의 화합물을,

[0067] 알코올류 및/또는 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, <1>~<5> 중 어느 것에 기재한 제조 방법.

[0068] <7>

[0069] 모르폴리노 핵산 올리고머의 신장 반응:



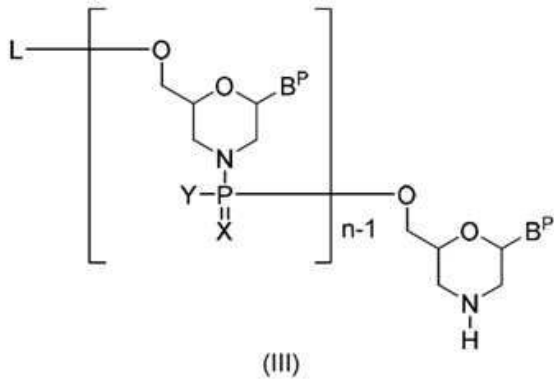
[0082] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

[0083] 의 화합물을,

[0084] 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

[0085] 식 (III):

**화학식 15**



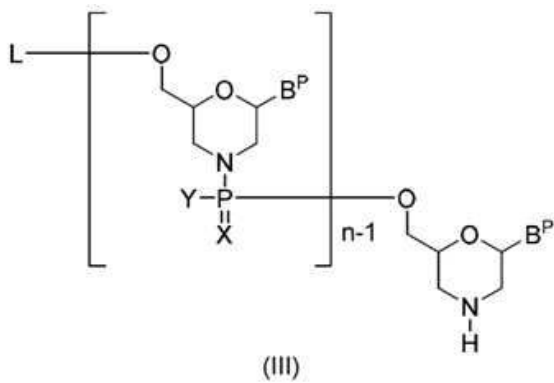
[0086] ..

[0087] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0088] 의 화합물로 하는 공정,

[0089] 식 (III):

**화학식 16**



[0090] ..

[0091] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0092] 의 화합물을,

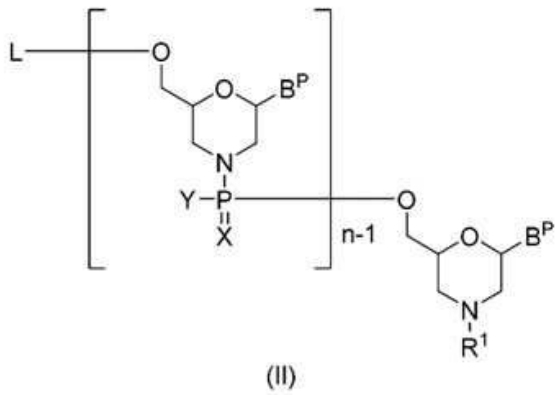
[0093] 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정, 그리고 식 (VIII):



[0109] 로 표시되는 기이다]에 있어서,

[0110] 식 (II):

**화학식 20**



[0111]

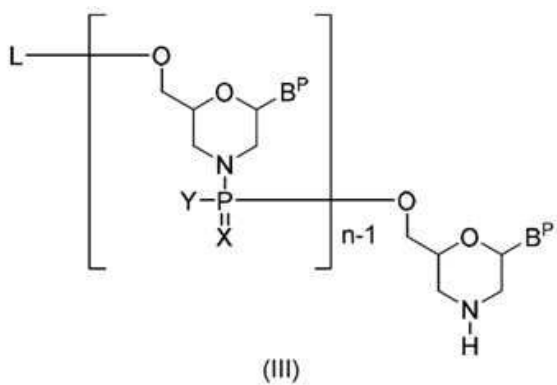
[0112] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

[0113] 의 화합물을,

[0114] 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

[0115] 식 (III):

**화학식 21**



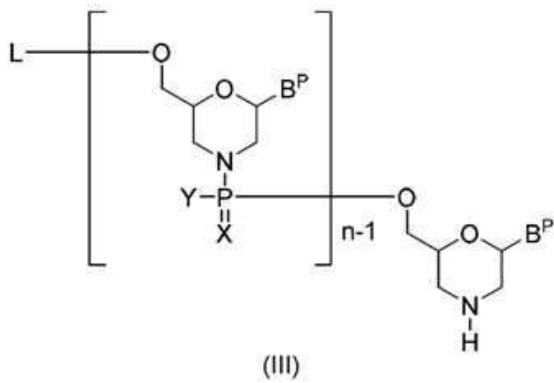
[0116]

[0117] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0118] 의 화합물로 하는 공정,

[0119] 식 (III):

화학식 22



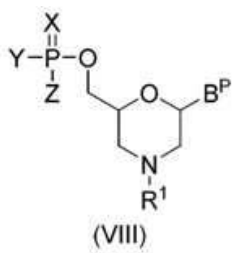
[0120]

[0121] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0122] 의 화합물을,

[0123] 식 (VIII):

화학식 23



[0124]

[0125] [식 중, B<sup>P</sup>, X, Y, Z 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]

[0126] 의 화합물을,

[0127] 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

[0128] <9>

[0129] 상기 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액이, 트리플루오로초산(酢酸) 및 트라이소프로필실란을 포함하는 용액인, <1> ~ <8> 중 어느 것에 기재한 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

[0130] <10>

[0131] 상기 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액이, 트리플루오로초산, 트리에틸아민, 트라이소프로필실란, 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 디클로로메탄을 포함하는 용액인, <1> ~ <9> 중 어느 것에 기재한 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

[0132] <11>

[0133] 상기 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액이, N-에틸모르폴린 및 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논인, <1> ~ <9> 중 어느 것에 기재한 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법.

[0134] <12>

[0135] 상기 고상 담체가, 팽윤성 폴리스티렌, 비팽윤성 폴리스티렌, PEG쇄 결합형 폴리스티렌, 정공(定孔) 유리, 옥살

릴화-정공 유리, TentaGel 지지체-아미노폴리에틸렌 글리콜 유도체화 지지체 또는 Poros-폴리스티렌/디비닐벤젠의 코폴리머인, <1> ~ <11> 중 어느 것에 기재한 제조 방법.

[0136] <13>

[0137] 상기 링커가, 단쇄 알킬렌, 장쇄 알킬렌, 아미노-단쇄 알킬렌, 아미노-장쇄 알킬렌, 디아실 단쇄 알킬렌(예를 들면, 숙시닐), 디아실 장쇄 알킬렌 또는 디알킬렌술포닐인, <1> ~ <12> 중 어느 것에 기재한 제조 방법.

**발명의 효과**

[0138] 본 발명은, 경제적이고, 수율 좋게, 고순도로, 모르폴리노 핵산 올리고머를 제조할 수 있다.

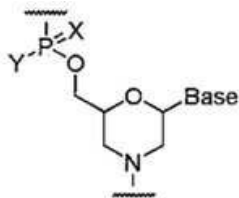
**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0139] 이하에, 본 발명의 상세를 설명한다.

[0140] <모르폴리노 핵산 올리고머>

[0141] 본 발명의 일 양태로서, 모르폴리노 핵산 올리고머는, 식:

**화학식 24**



[0142]

[0143] [식 중, Base는 핵산 염기를 나타내고, X, Y는 상기와 같다]

[0144] 로 표시되는 기를 구성 단위로 하는 올리고머이다.

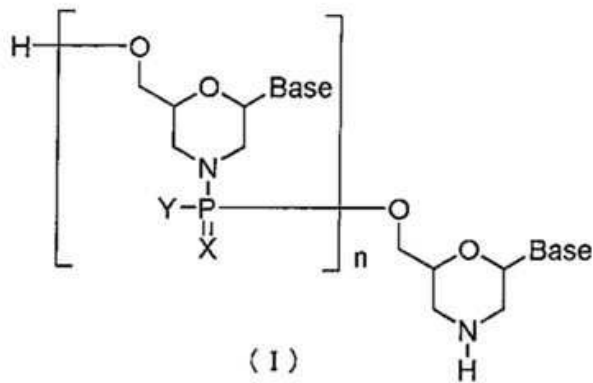
[0145] <핵산 염기>

[0146] 본 발명의 일 양태에 있어서, 「핵산 염기」는, 예를 들면, 아데닌, 구아닌, 히포크산틴, 시토신, 티민, 우라실 또는 그들의 수식(修飾) 염기를 들 수 있다. 이러한 수식 염기로는, 예를 들면, 슈도우라실, 3-메틸우라실, 디히드로우라실, 5-알킬시토신(예를 들면, 5-메틸시토신), 5-알킬우라실(예를 들면, 5-에틸우라실), 5-할로우라실(예를 들면, 5-브로모우라실, 5-플루오로우라실), 6-아자피리미딘, 6-알킬피리미딘(예를 들면, 6-메틸우라실), 2-티오우라실, 4-티오우라실, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시메틸)우라실, 5'-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 1-메틸아데닌, 1-메틸히포크산틴, 2,2-디메틸구아닌, 3-메틸시토신, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, N<sup>6</sup>-메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메틸카르보닐메틸우라실, 5-메틸옥시우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 2-메틸티오-N<sup>6</sup>-이소헨테닐 아데닌, 우라실-5-옥시초산, 2-티오시토신, 푸린, 2,6-디아미노푸린, 2-아미노푸린, 이소구아닌, 인돌, 이미다졸, 크산틴을 들 수 있지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 단, Base에 관한 핵산 염기의 아미노기 또는 수산기는 보호되어 있어도 된다.

[0147] <모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법>

[0148] 본 발명의 일 양태는, 식 (I):

화학식 25



[0149]

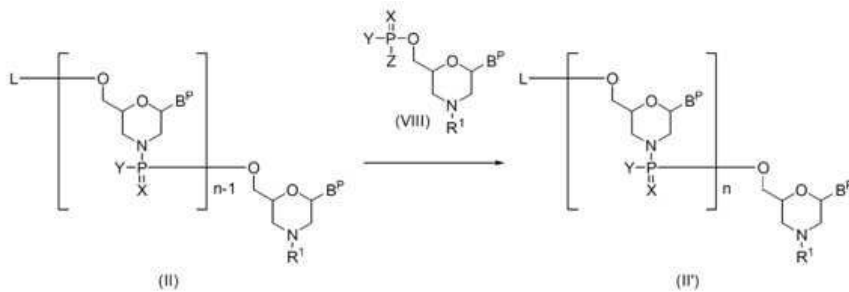
[0150] [식 중,

[0151] Base, X, Y는 상기와 동의이고;

[0152] n은, 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 바람직하게는, 15~30의 범위 내에 있는 임의의 정수이고, 더욱 바람직하게는, 18~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이다]의 모르폴리노 핵산 올리고머(이하, 모르폴리노 핵산 올리고머 (I)이라고 한다.)의 제조 방법이다.

[0153] 본 발명의 일 양태는, 식 (II)의 화합물과 식 (VIII)의 화합물을 반응시켜, 식 (II')의 화합물을 얻는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 신장 반응:

화학식 26



[0154]

[0155] [식 중,

[0156] B<sup>P</sup>는, 독립하여, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기이고;

[0157] R<sup>1</sup>은, 트리틸, 모노메톡시트리틸 또는 디메톡시트리틸이며;

[0158] X는, O 또는 S이고;

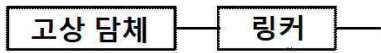
[0159] Y는, OH, 저급 알콕시, 모노저급 알킬아미노 또는 디저급 알킬아미노이고;

[0160] Z는, 할로젠(예를 들면, 클로로, 브로모, 요오도)이며;

[0161] n은, 1~99의 범위 내에 있는 임의의 정수이고, 바람직하게는, 15~30의 범위 내에 있는 임의의 정수이며, 더욱 바람직하게는, 18~28의 범위 내에 있는 임의의 정수이고;

[0162] L은, 수소, 아실, 또는 식 (IV):

화학식 27



(IV)

[0163]

[0164]

[0165]

[0166]

[0167]

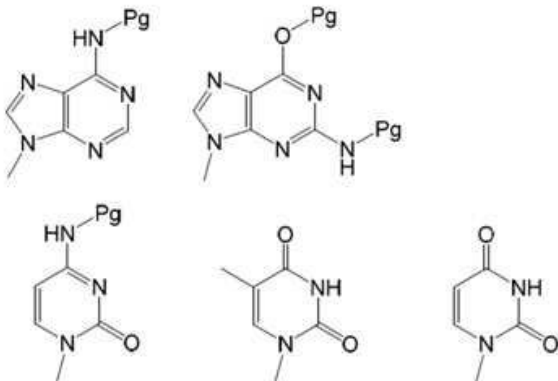
로 표시되는 기이다]을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법이다.

본 발명의 일 양태에 있어서, 보호되어 있어도 되는 핵산 염기는, 예를 들면, 보호되어 있지 않은 「핵산 염기」 및 보호되어 있는 「핵산 염기」의 양쪽을 포함하고, 예를 들면, 아미노기 및/또는 수산기가 보호되어 있지 않거나 또는 보호되어 있는, 아데닌, 구아닌, 히포크산틴, 시토신, 티민, 우라실 등을 들 수 있다.

본 발명의 일 양태에 있어서, 아미노기의 보호기는, 핵산의 보호기로서 사용되는 것이면 특별히 제한되지 않고, 구체적으로는, 예를 들면, 벤조일, 4-메톡시벤조일, 아세틸, 프로피오닐, 부티릴, 이소부티릴, 페닐아세틸, 페녹시아세틸, 4-tert-부틸페녹시아세틸, 4-이소프로필페녹시아세틸, (디메틸아미노)메틸렌을 들 수 있다. 아미노기의 보호기로는, 벤조일, 아세틸, 페녹시아세틸, 4-tert-부틸페녹시아세틸이 바람직하다. 수산기의 보호기로는, 예를 들면, 2-시아노에틸, 4-니트로페네틸, 페닐술포닐에틸, 메틸술포닐에틸, 트리메틸실릴에틸, 치환 가능한 임의의 위치에서 1~5개의 전자 흡인성기로 치환되어 있어도 되는 페닐, 디페닐카르바모일, 디메틸카르바모일, 디에틸카르바모일, 메틸페닐카르바모일, 1-피롤리디닐카르바모일, 모르폴리노카르바모일, 4-(tert-부틸카르복시)벤질, 4-[(디메틸아미노)카르복시]벤질, 4-(페닐카르복시)벤질을 들 수 있다(예를 들면, 국제공개공보 제2009/064471 A1을 참조.). 수산기의 보호기로는, 2-시아노에틸, 4-니트로페네틸, 4-(tert-부틸카르복시)벤질이 바람직하다. 구아닌의 6번 위치 수산기의 보호기는, 2-시아노에틸이 바람직하다.

본 발명의 일 양태에 있어서, 보호되어 있는 핵산 염기는, 예를 들면, 하기 식의 기를 들 수 있다:

화학식 28



[0168]

[0169]

[0170]

[0171]

[식 중, Pg는 보호기를 나타낸다].

본 발명의 일 양태에 있어서, 보호되어 있는 핵산 염기는, 예를 들면, 아미노기가 벤조일로 보호된 아데닌(A<sup>Bz</sup>), 아미노기가 벤조일로 보호된 시토신(C<sup>Bz</sup>), 수산기가 2-시아노에틸로 보호되고, 그리고 아미노기가 페녹시아세틸로 보호된 구아닌(G<sup>CE</sup>) 등을 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다.

본 발명의 일 양태에 있어서, 고상 담체는, 예를 들면, 핵산의 고상 반응에 사용할 수 있는 담체이면 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면, (i) 모르폴리노 핵산 올리고머의 합성에 사용할 수 있는 시약(예를 들면, 디클로로메탄, 아세트니트릴, N-에틸모르폴린, N,N-디이소프로필에틸아민, N-메틸이미다졸, 피리딘, 무수 초산, 2,6-루티딘, 2,4-루티딘, 트리플루오로초산)에 거의 용해하지 않고, (ii) 모르폴리노 핵산 유도체의 합성에 사용할 수 있는 시약에 대해 화학적으로 안정하며, (iii) 화학 수식을 할 수 있고, (iv) 바람직한 모르폴리노 핵산 유도체의 장점을 할 수 있으며, (v) 처리 중에 가해지는 고압에 견디는 충분한 강도를 갖고, (vi) 일정한 입경 범위를

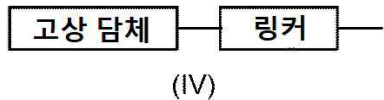
와 분포인 것이 바람직하다.

[0172] 본 발명의 일 양태에 있어서, 고상 담체는, 예를 들면, 팽윤성 폴리스티렌(예를 들면, 아미노메틸 폴리스티렌 수지 1% 디비닐벤젠 가교(200~400 메시)(2.4~3.0mmol/g)(도쿄 가세이사 제조), Aminomethylated Polystyrene Resin·HCl[디비닐벤젠 1%, 100~200 메시](펩티드 겐큐쇼사 제조), Aminomethyl Resin[Polystyrene 1% Divinylbenzene copolymer, 200-400 mesh](와타나베 가가쿠 고교사 제조)), 비팽윤성 폴리스티렌(예를 들면, Primer Support(GE Healthcare사 제조)), PEG쇄 결합형 폴리스티렌(예를 들면, NH<sub>2</sub>-PEG resin(와타나베 가가쿠 고교사 제조), TentaGel resin), 정공 유리(controlled pore glass; CPG)(예를 들면, CPG사 제조), 옥살릴화-정공 유리(예를 들면, Alul 외, Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527(1991)을 참조), TentaGel 지지체-아미노폴리에틸렌 글리콜 유도체화 지지체(예를 들면, Wright 외, Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373(1993)을 참조), Poros-폴리스티렌/디비닐벤젠의 코폴리머를 들 수 있다.

[0173] 본 발명의 일 양태에 있어서, 링커는, 핵산이나 모르폴리노 핵산 유도체를 연결하기 위해 사용되는 공지의 것을 이용할 수 있지만, 예를 들면, 단쇄 알킬렌, 장쇄 알킬렌, 아미노-단쇄 알킬렌, 아미노-장쇄 알킬렌, 디아실 단쇄 알킬렌(예를 들면, 숙시닐), 디아실 장쇄 알킬렌, 디알킬렌술포닐, 바람직하게는, 3-아미노프로필, 숙시닐, 2,2'-디에탄올술포닐, 장쇄 알킬아미노(LCAA)를 들 수 있다.

[0174] 본 발명의 일 양태에 있어서, L이, 식 (IV):

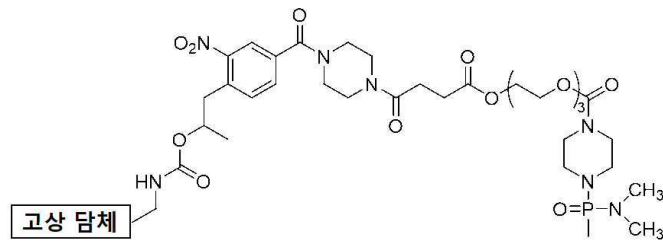
**화학식 29**



[0175]

[0176] 로 표시되는 기로서, 식 (IV-1):

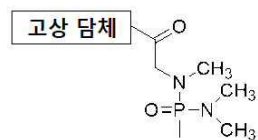
**화학식 30**



[0177]

[0178] 로 표시되는 기이거나, 또는 식 (IV-2):

**화학식 31**



[0179]

[0180] 로 표시되는 기여도 된다.

[0181] 본 발명의 일 양태에 있어서,

[0182] 식 (II):



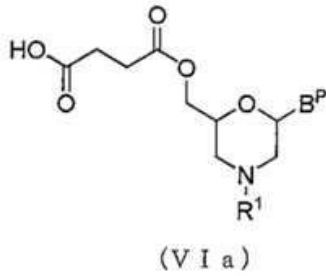
[0195] R<sup>6</sup>는, 수산기, 할로젠 또는 아미노이다]

[0196] 을 포함할 수 있다.

[0197] 본 공정은, 화합물 (V)를 출발 원료로 하여, 공지의 링커의 도입 반응에 의해 실시할 수 있다.

[0198] 본 발명의 일 양태로서, 식 (VIa):

**화학식 35**



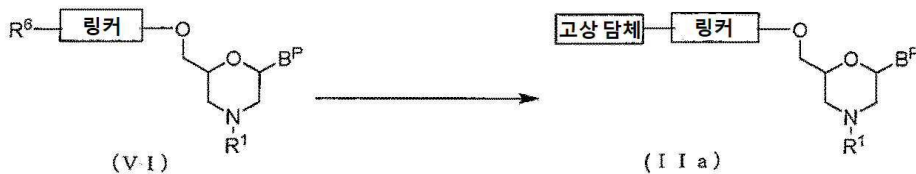
[0199]

[0200] [식 중, B<sup>p</sup>, R<sup>1</sup>은 상기와 같다]

[0201] 의 화합물은, 화합물 (V)와 무수 호박산을 이용하여 에스테르화 반응으로서 알려진 방법을 실시함으로써 제조하는 공정을 포함할 수 있다.

[0202] 본 발명의 일 양태로서, 화합물 (VI)에 축합제 등을 작용시킴으로써, 고상 담체와 반응시켜, 화합물 (IIa)를 제조하는 공정:

**화학식 36**



[0203]

[0204] [식 중, B<sup>p</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>1</sup>, 링커, 고상 담체는 상기와 같다]

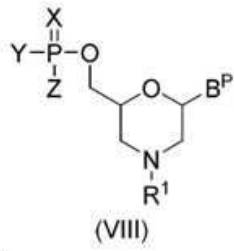
[0205] 을 포함할 수 있다.

[0206] 본 공정은, 화합물 (VI)와 고상 담체를 이용하여 축합 반응으로서 알려진 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0207] <원료>

[0208] 본 발명의 일 양태에 있어서, 식 (VIII):

화학식 37



[0209]

[0210]

[식 중, B<sup>p</sup>, X, Y, Z 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]

[0211]

의 화합물은, 시판되고 있거나, 당해 기술분야에 있어서 공지 방법으로 조제하여 사용할 수 있다.

[0212]

본 발명의 일 양태에 있어서, 식 (VIII)의 화합물은, 예를 들면, 하기의 표 1에 기재한 화합물을 들 수 있다.

표 1

구조식			
약칭	A <sup>p</sup>	C <sup>p</sup>	T <sup>p</sup>
구조식			
약칭	A <sup>u</sup>	C <sup>u</sup>	U <sup>p</sup>
구조식			
약칭	G <sup>CE</sup>	G <sup>POB</sup>	G <sup>l</sup>

[0213]

본 발명의 일 양태는, 상기 신장 반응에 있어서,

[0214]

<(1) 탈보호 공정 전의 세정 공정>,

[0215]

<(2) 탈보호 공정>,

[0216]

<(3) 중화 공정>,

[0217]

<(4) 중화 공정 후의 세정 공정>,

[0218]

<(5) 축합 전의 세정 공정>,

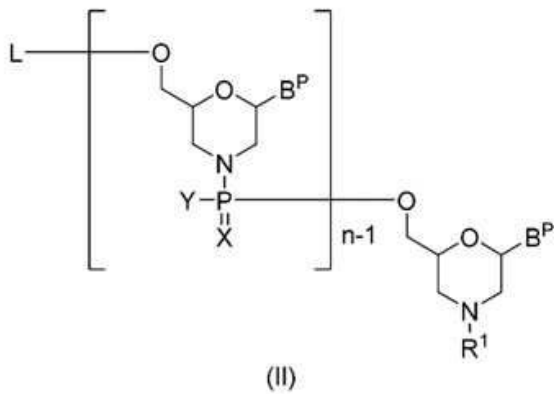
[0219]

<(6) 축합 공정>,

[0220]

- [0221] <(7) 축합 공정 후의 세정 공정 1>, 및
- [0222] <(8) 축합 공정 후의 세정 공정 2>
- [0223] 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법이다.
- [0224] 이하에, (1)~(8)의 공정을 설명한다.
- [0225] <(1) 탈보호 공정 전의 세정 공정>
- [0226] 본 공정은, 식 (II):

**화학식 38**



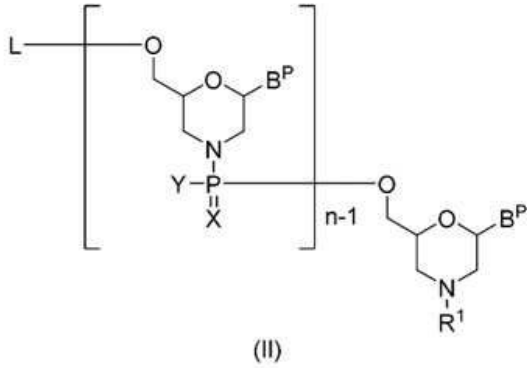
- [0227]
- [0228] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,
- [0229] (1) 알코올류 및/또는 할로겐 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 것을 포함한다.
- [0230] <(1)의 용액>
- [0231] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (1)의 용액은, 알코올류 및/또는 할로겐 용매를 함유하면 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 2,2,2-트리플루오로에탄올, 디플루오로에탄올, 클로로포름, 디클로로메탄으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 사용할 수 있고, 바람직하게는 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 디클로로메탄을 사용할 수 있다.
- [0232] <(1)의 용액>
- [0233] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (1)의 용액은, 알코올류를 할로겐 용매에 대해, 예를 들면, 체적비로 0.01배~100배, 바람직하게는 0.1배~2배(v/v)로 사용할 수 있다.
- [0234] <(1)의 용액의 사용량>
- [0235] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (1)의 용액의 사용량은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 화합물 (II) 1g에 대해, 중량비로, 예를 들면 1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 2 배량~100 배량의 범위 내이다.
- [0236] <(1)의 처리 시간>
- [0237] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (1)의 시간은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 0.1분~24시간, 바람직하게는 1분~5시간, 더욱 바람직하게는 3분~1시간이다.
- [0238] <(1)의 처리 온도>
- [0239] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (1)의 온도는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 0℃~40℃, 바람직하게는 10℃~35℃, 더욱 바람직하게는 15℃~30℃이다.
- [0240] <공정 (1)의 횟수>

[0241] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (1)의 횟수는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 1~10회이고, 바람직하게는 1~5회이다.

[0242] <(2) 탈보호 공정>

[0243] 본 공정은, 식 (II):

**화학식 39**

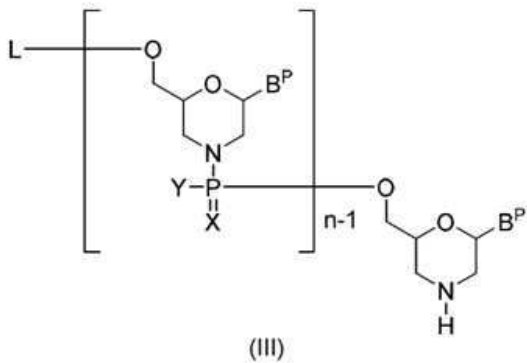


[0244] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0246] (2) 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

[0247] 식 (III):

**화학식 40**



[0248] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물로 하는 것을 포함한다.

[0250] <(2)의 산>

[0251] 일 실시형태에 있어서, 산은, 예를 들면, 염산, 트리플루오로초산, 디클로로초산 또는 트리클로로초산을 들 수 있고, 바람직하게는 트리플루오로초산이다.

[0252] <(2)의 산의 사용량>

[0253] 일 실시형태에 있어서, 산의 사용량은, 예를 들면, 화합물 (II) 1 몰에 대해, 몰비로 1 배량~500 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 2 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0254] <(2)의 산의 농도>

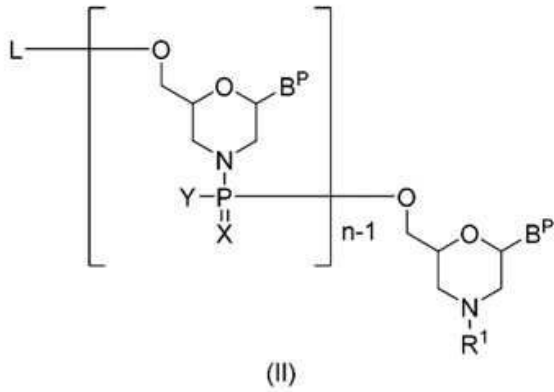
[0255] 일 실시형태에 있어서, 산은 0.1%~30%의 범위 내의 농도가 되도록 적절한 용매로 희석하여 사용할 수도

있다.

- [0256] <(2)의 산을 회석하는 용매>
- [0257] 일 실시형태에 있어서, 사용하는 용매는, 반응에 관여하지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 디클로로메탄, 톨루엔, 아세토니트릴, 알코올류(에탄올, 이소프로필알코올, 2,2,2-트리플루오로에탄올 등), 물 또는 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0258] <(2)의 유기 아민>
- [0259] 일 실시형태에 있어서, 상기 산과 함께, 「유기 아민」을 사용할 수 있다. 유기 아민으로는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 트리에틸아민, N,N-디이소프로필에틸아민, N-에틸모르폴린, 피리딘 등을 들 수 있고, 바람직하게는 트리에틸아민이다.
- [0260] <(2)의 유기 아민의 사용량>
- [0261] 일 실시형태에 있어서, 유기 아민의 사용량은, 예를 들면, 산 1 몰에 대해, 몰비로 0.01 배량~10 배량의 범위 내이고, 바람직하게는, 0.1 배량~2 배량의 범위 내이다.
- [0262] <(2)의 산과 유기 아민의 비>
- [0263] 일 실시형태에 있어서, 산과 유기 아민과의 염 또는 혼합물을 사용하는 경우에는, 예를 들면, 트리플루오로초산과 트리에틸아민의 염 또는 혼합물을 들 수 있고, 예를 들면, 트리플루오로초산 1.2 당량에 대해 트리에틸아민 1 당량을 혼합한 것을 들 수 있다.
- [0264] <(2)의 스캐빈저>
- [0265] 일 실시형태에 있어서, 스캐빈저는, 예를 들면, 알코올류(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올을 들 수 있다), 티올류(메르캅토에탄올, 디티오트레이톨, 메르캅토호박산), 유기 규소 화합물(예를 들면, 트리이소프로필실란, 트리에틸실란, 트리메틸실란을 들 수 있다), 및 방향족 화합물(예를 들면, 1-히드록시벤조트리아졸, 피롤, 인돌, 아니솔 및 티오아니솔을 들 수 있다)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는 유기 규소 화합물이다.
- [0266] <(2)의 스캐빈저>
- [0267] 일 실시형태에 있어서, 스캐빈저는, 예를 들면, 메탄올, 에탄올, 메르캅토에탄올, 2,2,2-트리플루오로에탄올, 트리이소프로필실란, 트리에틸실란, 트리메틸실란, 1-히드록시벤조트리아졸, 피롤, 인돌, 아니솔 및 티오아니솔로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는, 트리이소프로필실란 및 에탄올로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나이며, 더욱 바람직하게는, 트리이소프로필실란이다.
- [0268] <(2)의 스캐빈저의 사용량>
- [0269] 일 실시형태에 있어서, 스캐빈저의 사용량은, 예를 들면, 화합물 (II) 1 몰에 대해, 몰비로, 예를 들면 0.1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 0.5 배량~100 배량의 범위 내이며, 더욱 바람직하게는 1배~20배량의 범위 내이다.
- [0270] <(2)의 반응 시간>
- [0271] 일 실시형태에 있어서, 반응 시간은, 예를 들면, 0.1분~24시간의 범위 내이고, 바람직하게는 1분~3시간의 범위 내이다.
- [0272] <(2)의 반응 온도>
- [0273] 일 실시형태에 있어서, 반응 온도는, 예를 들면, 0℃~40℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~35℃의 범위 내이며, 더욱 바람직하게는 15℃~30℃의 범위 내이다.
- [0274] <공정 (2)의 횟수>
- [0275] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (2)의 횟수는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면 1~10회이고, 바람직하게는 1~8회이다.
- [0276] <(1) 탈보호 전의 세정과 (2) 탈보호의 연속 반응>

[0277] 본 발명의 일 실시형태에서는, 식 (II):

**화학식 41**



[0278] ...

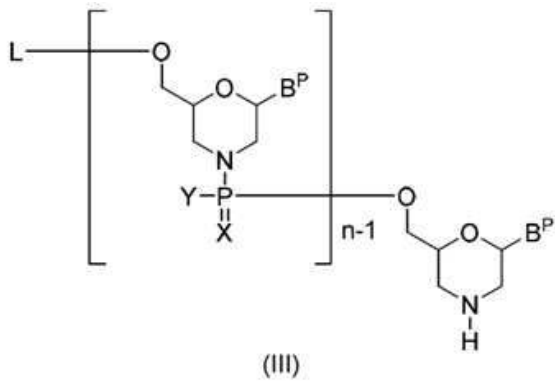
[0279] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0280] (1) 알코올류 및/또는 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리하고, 계속해서

[0281] (2) 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, R<sup>1</sup>을 제거하여,

[0282] 식 (III):

**화학식 42**



[0283] ...

[0284] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물로 할 수 있다.

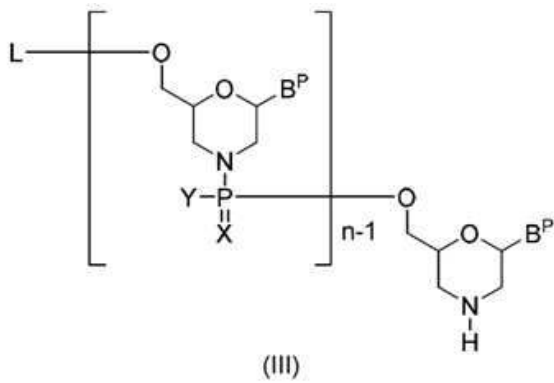
[0285] 공정 (1) 및 (2)는, 상기의 기재와 같으며, 적절히 조합할 수 있다.

[0286] <(3) 중화 공정>

[0287] 본 공정은,

[0288] 식 (III):

화학식 43



[0289]

[0290] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0291] (3) 염기 및 용매(알코올류 및 할로겐 용매)를 포함하는 용액으로 처리하는 것을 포함한다.

[0292] <(3)의 염기>

[0293] 일 실시형태에 있어서, 염기는, 보호기에 영향을 주지 않으면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 트리에틸아민, N,N-디이소프로필에틸아민, 피리딘 등을 들 수 있고, 바람직하게는 N,N-디이소프로필에틸아민이다.

[0294] <(3)의 염기의 사용량>

[0295] 일 실시형태에 있어서, 염기의 사용량은, 0.1%(v/v)~30%(v/v)의 범위 내의 농도가 되도록 적절한 용매로 희석하여 사용할 수도 있다.

[0296] <(3)의 용액의 사용량>

[0297] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (3)의 용액의 사용량은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 화합물 (III) 1g에 대해, 중량비로, 예를 들면 1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 2 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0298] <(3)의 용매>

[0299] 일 실시형태에 있어서, 용매는, 알코올류, 할로겐 용매, 극성 용매, 에테르계 용매, 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는 알코올류 및 할로겐 용매의 혼합물이다.

[0300] 일 실시형태에 있어서, 알코올류는, 에탄올, 이소프로필알코올, 2,2,2-트리플루오로에탄올 등이고, 바람직하게는 이소프로필알코올이다.

[0301] 일 실시형태에 있어서, 할로겐 용매는, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로에탄 및 테트라클로로에틸렌 등이고, 바람직하게는 디클로로메탄이다.

[0302] 일 실시형태에 있어서, 극성 용매는, 아세트니트릴, 디메틸술폭시드 등이다.

[0303] 일 실시형태에 있어서, 에테르계 용매는, 테트라히드로푸란, 시클로펜틸메틸에테르 등이다.

[0304] <(3)의 반응 시간>

[0305] 일 실시형태에 있어서, 반응 시간은, 사용하는 염기의 종류, 반응 온도에 따라 다르지만, 예를 들면, 0.1분~24 시간의 범위 내이고, 바람직하게는 1분~5시간의 범위 내이다.

[0306] <(3)의 반응 온도>

[0307] 일 실시형태에 있어서, 반응 온도는, 예를 들면, 0℃~40℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 1℃~35℃의 범위 내이며, 더욱 바람직하게는 3℃~20℃의 범위 내이다.

[0308] <공정 (3)의 횟수>

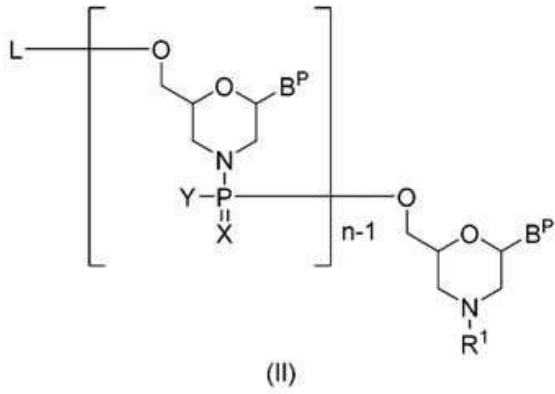
[0309] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (3)의 횟수는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 1~10회이고, 바람직하게는

1~5회이다.

[0310] <(2) 탈보호와 (3) 중화의 연속 반응>

[0311] 본 발명의 일 실시형태에서는, 식 (II):

**화학식 44**



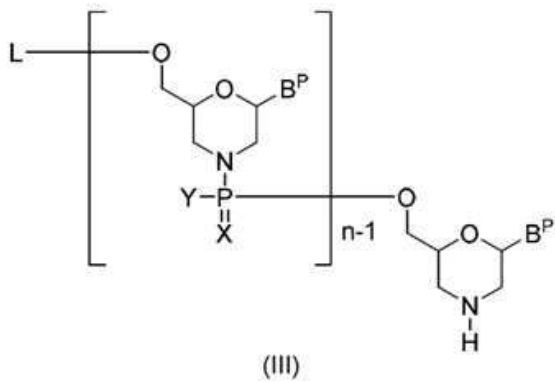
[0312] ...

[0313] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0314] (2) 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, R<sup>1</sup>을 제거하여,

[0315] 식 (III):

**화학식 45**

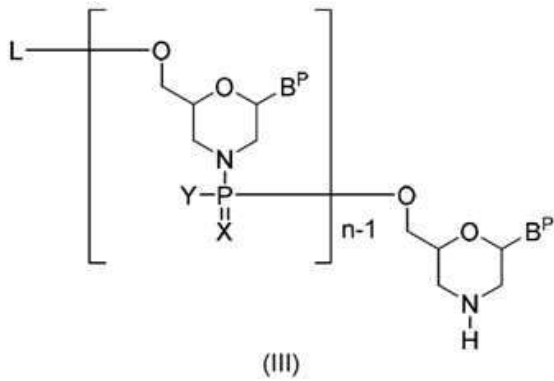


[0316] ...

[0317] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물로 하고, 계속해서

[0318] 식 (III):

화학식 46



[0319]

[0320]

[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0321]

(3) 염기 및 용매(알코올류 및 할로젠 용매)를 포함하는 용액으로 처리할 수 있다.

[0322]

공정 (2) 및 (3)은, 상기의 기재와 같으며, 적절히 조합할 수 있다.

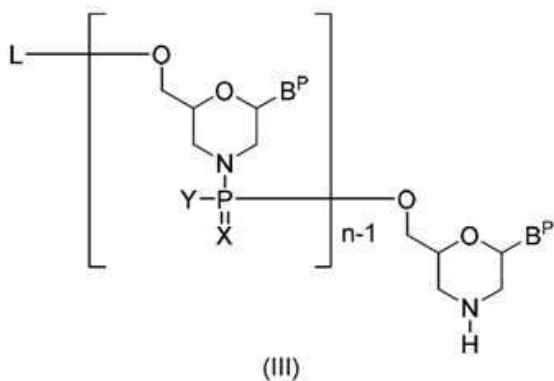
[0323]

<(4) 중화 공정 후의 세정 공정>

[0324]

본 공정은, 식 (III):

화학식 47



[0325]

[0326]

[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0327]

(4) 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 것을 포함한다.

[0328]

<(4)의 용액>

[0329]

일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (4)의 용액은, 할로젠 용매를 함유하면 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로에탄 및 테트라클로로에틸렌으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 사용할 수 있고, 바람직하게는 디클로로메탄이다.

[0330]

<(4)의 용액의 사용량>

[0331]

일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (4)의 용액의 사용량은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 화합물 (III) 1g에 대해, 중량비로 1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 2 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0332]

<(4)의 처리 시간>

[0333] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (4)의 시간은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 0.1분~2시간, 바람직하게는 1분~60분, 더욱 바람직하게는 3분~30분이다.

[0334] <(4)의 처리 온도>

[0335] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (4)의 온도는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 0℃~35℃, 바람직하게는 10℃~30℃, 더욱 바람직하게는 15℃~25℃이다.

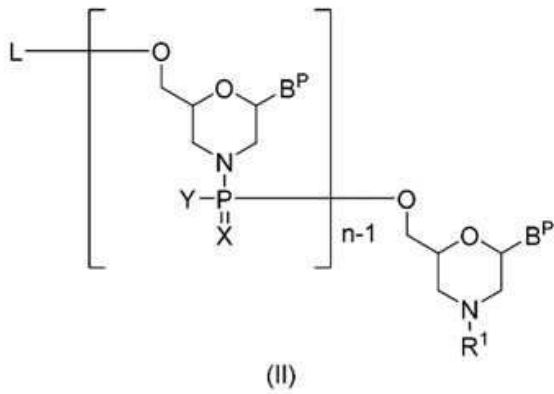
[0336] <공정 (4)의 횟수>

[0337] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (4)의 횟수는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 1~10회이고, 바람직하게는 1~5회이다.

[0338] <(2) 탈보호, (3) 중화, (4) 중화 후의 세정의 연속 반응>

[0339] 본 발명의 일 실시형태에서는, 식 (II):

**화학식 48**



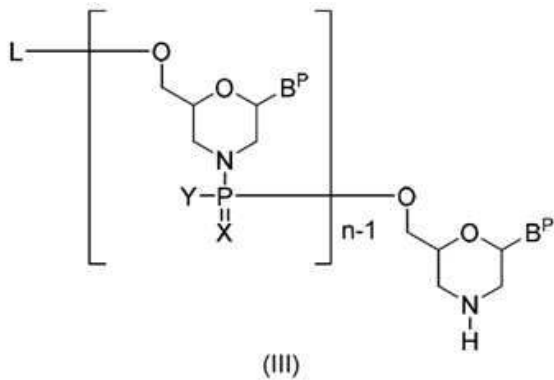
[0340] ...

[0341] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0342] (2) 산 및 스캐빈저를 포함하는 용액으로 처리해, 식 (II)의 화합물로부터 R<sup>1</sup>을 제거하여,

[0343] 식 (III):

**화학식 49**

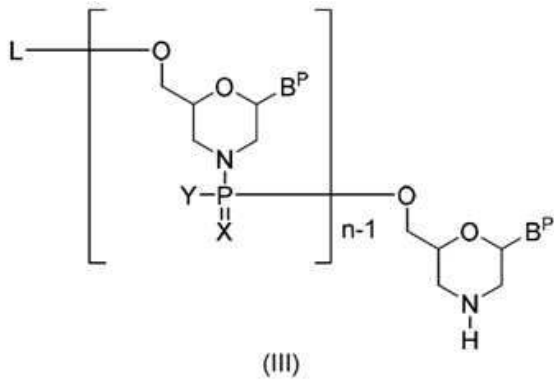


[0344] ...

[0345] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물로 하고, 계속해서

[0346] 식 (III):

화학식 50



[0347]

[0348]

[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0349]

(3) 염기 및 용매(알코올류 및 할로겐 용매)를 포함하는 용액으로 처리하고, 추가로

[0350]

(4) 할로겐 용매를 포함하는 용액으로 처리할 수 있다.

[0351]

공정 (1), (2), (3)은, 상기의 기재와 같으며, 적절히 조합할 수 있다.

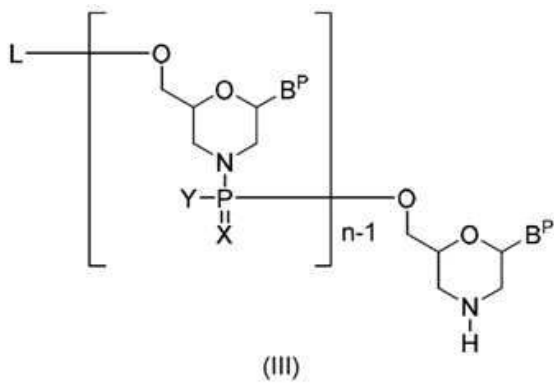
[0352]

<(5) 축합 전의 세정 공정>

[0353]

본 공정은, 식 (III):

화학식 51



[0354]

[0355]

[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0356]

(5) 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 것을 포함한다.

[0357]

<(5)의 유기 아민>

[0358]

일 실시형태로서, 유기 아민은, 예를 들면, N,N-디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민 및 N-에틸모르폴린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는 N-에틸모르폴린이다.

[0359]

<(5)의 유기 아민의 사용량>

[0360]

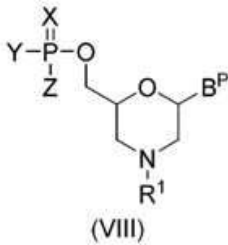
일 실시형태로서, 유기 아민의 사용량으로는, 상기 식 (III) 화합물 1 몰에 대해, 물비로, 예를 들면 1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 1 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0361]

<(5)의 비프로톤성 극성 용매>

- [0362] 일 실시형태로서, 비프로톤성 극성 용매는, 예를 들면, 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논, N-메틸피롤리돈, N,N-디메틸포름아미드, 테트라히드로푸란 또는 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논이다.
- [0363] <(5)의 비프로톤성 극성 용매의 사용량>
- [0364] 일 실시형태로서, 비프로톤성 극성 용매의 사용량으로는, 예를 들면, 유기 아민에 대해, 체적비로 1 배량~1000 배량(v/v)의 범위 내이고, 바람직하게는 3 배량~100 배량의 범위 내이다.
- [0365] <(5)의 용액의 사용량>
- [0366] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (5)의 용액의 사용량은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 화합물 (III) 1g에 대해, 중량비로, 예를 들면 0.5 배량~100 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 1 배량~50 배량의 범위 내이다.
- [0367] <(5)의 처리 시간>
- [0368] 일 실시형태로서, 반응 시간은, 사용하는 유기 아민의 종류, 반응 온도에 따라 다르지만, 통상 0.1분~2시간의 범위 내이고, 바람직하게는 1분~60분의 범위 내이다.
- [0369] <(5)의 처리 온도>
- [0370] 일 실시형태로서, 반응 온도는, 예를 들면, 0℃~100℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~50℃의 범위 내이다.
- [0371] <공정 (5)의 횟수>
- [0372] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (5)의 횟수는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 1~10회이고, 바람직하게는 1~5회이다.
- [0373] <(6) 축합 공정>
- [0374] 본 공정은, 식 (VIII):

**화학식 52**



- [0375] ..
- [0376] [식 중, B<sup>p</sup>, X, Y, Z 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]의 화합물을,
- [0377] (6) 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 것, 예를 들면 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 혼합 용액에 용해시키는 것을 포함한다.
- [0378] <(6)의 유기 아민>
- [0379] 일 실시형태로서, 유기 아민은, 예를 들면, N,N-디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민 및 N-에틸모르폴린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는 N-에틸모르폴린이다.
- [0380] <(6)의 유기 아민의 사용량>
- [0381] 일 실시형태로서, 유기 아민의 사용량으로는, 예를 들면, 상기 식 (VIII) 화합물 1 몰에 대해, 몰비로 0.1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 1 배량~100 배량의 범위 내이다.
- [0382] <(6)의 비프로톤성 극성 용매>
- [0383] 일 실시형태로서, 비프로톤성 극성 용매는, 예를 들면, 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논, N-메틸피롤리돈, N,N-디

메틸포름아미드, 테트라히드로푸란 또는 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논이다.

[0384]

<(6)의 비프로톤성 극성 용매의 사용량>

[0385]

일 실시형태로서, 비프로톤성 극성 용매의 사용량으로는, 예를 들면, 유기 아민에 대해, 체적비로 1 배량~1000 배량(v/v)의 범위 내이고, 바람직하게는 3 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0386]

<(6)의 처리 시간>

[0387]

일 실시형태로서, 처리 시간은, 사용하는 유기 아민의 종류, 반응 온도에 따라 다르지만, 통상 0.1분~48시간의 범위 내이고, 바람직하게는 1분~24시간의 범위 내이다.

[0388]

<(6)의 처리 온도>

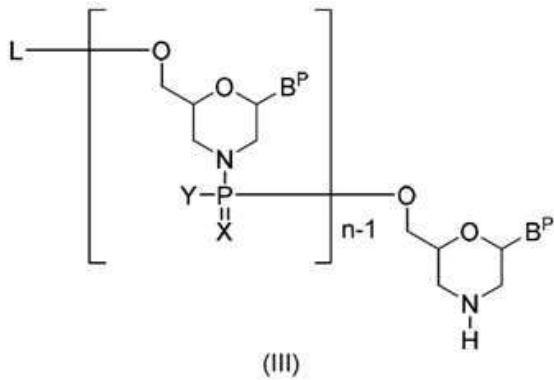
[0389]

일 실시형태로서, 처리 온도는, 예를 들면, 0℃~50℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~40℃의 범위 내이다.

[0390]

본 공정은, 추가로 식 (III):

**화학식 53**



[0391]

...

[0392]

[식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

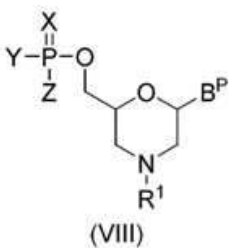
[0393]

의 화합물과, 유기 아민의 존재하,

[0394]

식 (VIII):

**화학식 54**



[0395]

...

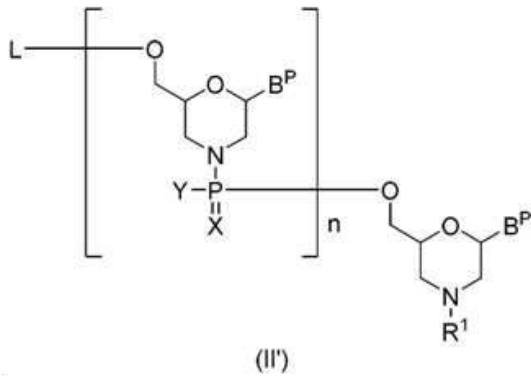
[0396]

[식 중, X, Y, Z, B<sup>P</sup> 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]의 화합물을 반응시켜,

[0397]

식 (II'):

화학식 55



[0398]

[0399] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물로 하는 것을 포함한다.

[0400] 일 실시형태로서, 상기 식 (VIII)의 화합물은, 예를 들면, 상기 식 (III)의 화합물 1 몰에 대해, 몰비로 1 배량~10 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 1 배량~5 배량의 범위 내이다.

[0401] 일 실시형태로서, 유기 아민은, 예를 들면, N,N-디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민 및 N-에틸모르폴린으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고, 바람직하게는 N-에틸모르폴린이다.

[0402] 일 실시형태로서, 유기 아민의 사용량으로는, 예를 들면, 상기 식 (VIII) 화합물 1 몰에 대해, 몰비로 0.1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 1 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0403] 일 실시형태로서, 반응 시간은, 사용하는 유기 아민의 종류, 반응 온도에 따라 다르지만, 통상 10분~48시간의 범위 내이고, 바람직하게는 30분~24시간의 범위 내이다.

[0404] 일 실시형태로서, 반응 온도는, 예를 들면, 0℃~100℃의 범위 내가 바람직하고, 보다 바람직하게는 10℃~50℃의 범위 내이다.

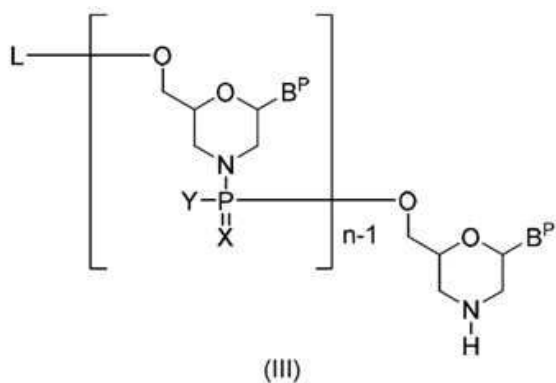
[0405] <공정 (6)의 횟수>

[0406] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (6)의 횟수는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 1~3회이고, 바람직하게는 1회이다.

[0407] <세정, 전처리, 축합의 연속 반응>

[0408] 본 발명의 일 실시형태에서는, 식 (III):

화학식 56



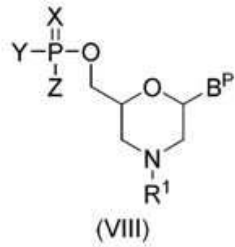
[0409]

[0410] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물을,

[0411] (5) 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리하고, 그리고

[0412] 식 (VIII):

**화학식 57**



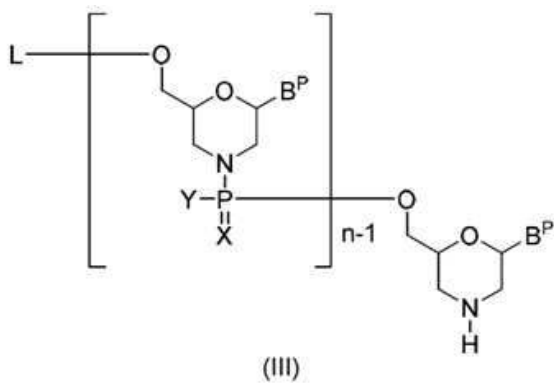
[0413] ...

[0414] [식 중, B<sup>P</sup>, X, Y, Z 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]의 화합물을,

[0415] (6) 유기 아민 및 비프로톤성 극성 용매를 포함하는 용액으로 처리한 후,

[0416] 식 (III):

**화학식 58**

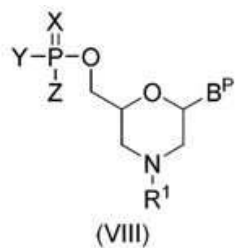


[0417] ...

[0418] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]의 화합물과, 유기 아민의 존재하,

[0419] 식 (VIII):

**화학식 59**

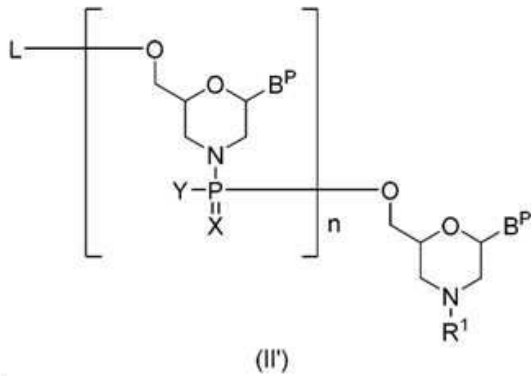


[0420] ...

[0421] [식 중, X, Y, Z, B<sup>P</sup> 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]의 화합물을 반응시켜,

[0422] 식 (II'):

**화학식 60**



[0423]

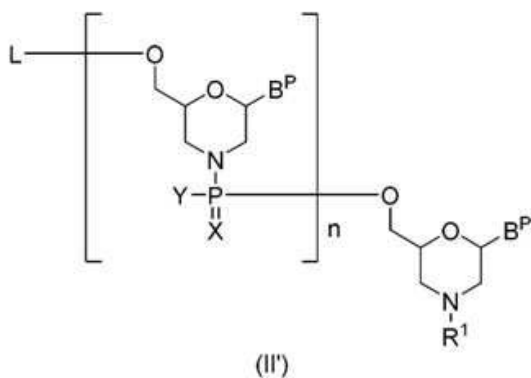
[0424] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물로 할 수 있다.

[0425] 공정 (5), (6)은 상기와 같으며, 적절히 조합할 수 있다.

[0426] <(7) 축합 공정 후의 세정 공정 1>

[0427] 본 공정은, 식 (II'):

**화학식 61**



[0428]

[0429] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물을

[0430] (7) 할로겐 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 것을 포함한다.

[0431] <(7)의 용액>

[0432] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (7)의 세정제는, 할로겐 용매를 함유하면 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로에탄 및 테트라클로로에틸렌으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 사용할 수 있고, 바람직하게는 디클로로메탄이다.

[0433] <(7)의 용액의 사용량>

[0434] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (7)의 세정제의 사용량은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 화합물 (II') 1g에 대해, 중량비로, 예를 들면, 1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 2 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0435] <(7)의 처리 시간>

[0436] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (7)의 시간은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 0.1분~24시간, 바람직하게는 1분~5시간, 더욱 바람직하게는 3분~1시간이다.

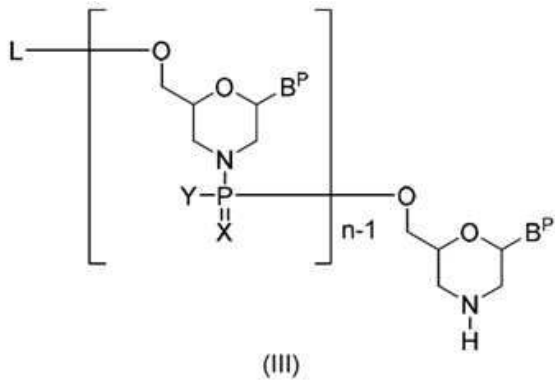
[0437] <(7)의 처리 온도>

[0438] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (7)의 온도는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 0℃~40℃, 바람직하게는 10℃~35℃, 더욱 바람직하게는 15℃~30℃이다.

[0439] <축합, 축합 후의 세정의 연속 반응>

[0440] 본 발명의 일 실시형태에서는, (6) 식 (III):

**화학식 62**



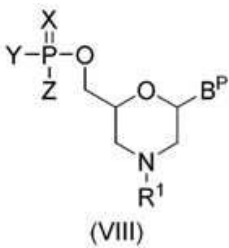
[0441] ...

[0442] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0443] 의 화합물과, 유기 아민의 존재하,

[0444] 식 (VIII):

**화학식 63**



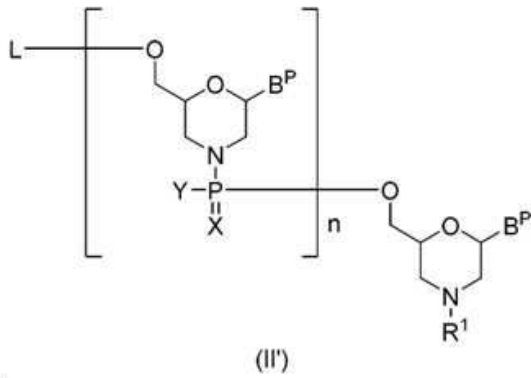
[0445] ...

[0446] [식 중, X, Y, Z, B<sup>P</sup> 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]

[0447] 의 화합물을 반응시켜,

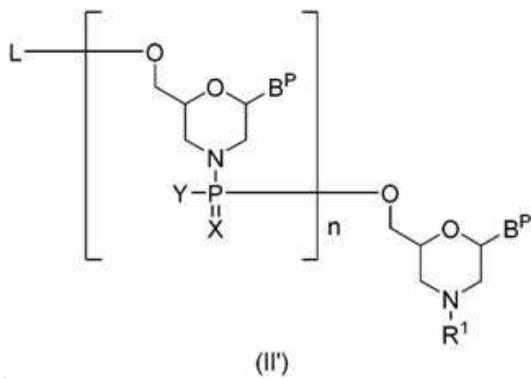
[0448] 식 (II'):

화학식 64



- [0449]
- [0450] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물로 하고, 계속해서
- [0451] (7) 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리할 수 있다.
- [0452] 공정 (6), (7)은 상기와 같으며, 적절히 조합할 수 있다.
- [0453] <(8) 축합 공정 후의 세정 공정 2>
- [0454] 본 공정은, 식 (II'):

화학식 65



- [0455]
- [0456] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]의 화합물을
- [0457] (8) 알코올류 및/또는 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리하는 것을 포함한다.
- [0458] <(8)의 용액>
- [0459] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (8)의 용액은, 알코올류 및/또는 할로젠 용매를 함유하면 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 2,2,2-트리플루오로에탄올, 디플루오로에탄올, 클로로포름, 디클로로메탄으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 사용할 수 있고, 바람직하게는 2,2,2-트리플루오로에탄올 및 디클로로메탄을 사용할 수 있다.
- [0460] <(8)의 용액>
- [0461] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (8)의 용액은, 알코올류를 할로젠 용매에 대해, 예를 들면, 0.01배~100배, 바람직하게는 0.1배~2배(v/v)로 사용할 수 있다.
- [0462] <(8)의 용액의 사용량>

[0463] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (8)의 용액의 사용량은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 화합물 (II') 1g에 대해, 중량비로, 예를 들면 1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 2 배량~100 배량의 범위 내이다.

[0464] <(8)의 처리 시간>

[0465] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (8)의 시간은, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 0.1분~24시간, 바람직하게는 1분~5시간, 더욱 바람직하게는 3분~1시간이다.

[0466] <(8)의 처리 온도>

[0467] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (8)의 온도는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 0℃~40℃, 바람직하게는 10℃~35℃, 더욱 바람직하게는 15℃~30℃이다.

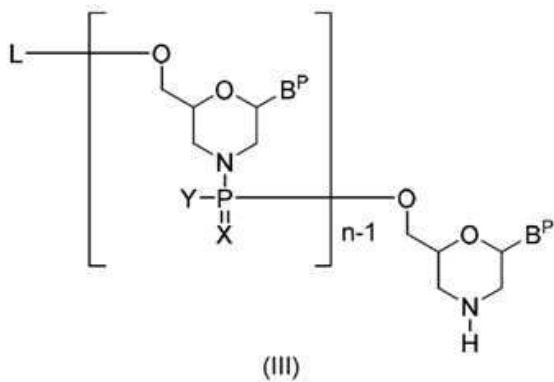
[0468] <공정 (8)의 횟수>

[0469] 일 실시형태에 있어서, 상기 공정 (8)의 횟수는, 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 1~10회이고, 바람직하게는 1~5회이다.

[0470] <축합, 축합 후의 세정, 연속 반응>

[0471] 본 발명의 일 실시형태에서는, (6) 식 (III):

**화학식 66**



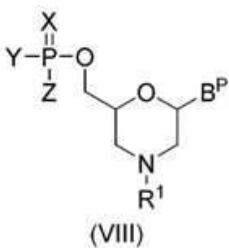
[0472]

[0473] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y 및 n은 상기와 같다]

[0474] 의 화합물과,

[0475] 식 (VIII):

**화학식 67**

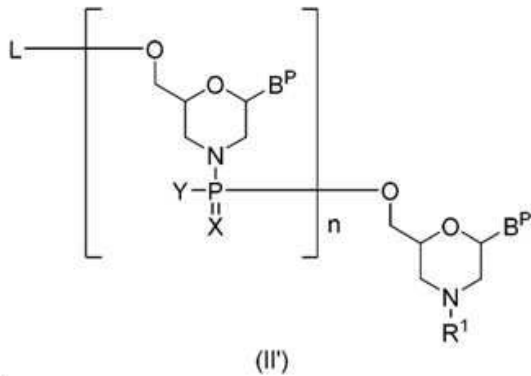


[0476]

[0477] [식 중, X, Y, Z, B<sup>P</sup> 및 R<sup>1</sup>은 상기와 같다]

[0478] 의 화합물을 반응시켜,  
 [0479] 식 (II'):

**화학식 68**



[0480]

[0481] [식 중, L, B<sup>P</sup>, X, Y, R<sup>1</sup> 및 n은 상기와 같다]

[0482] 의 화합물로 하고, 계속해서

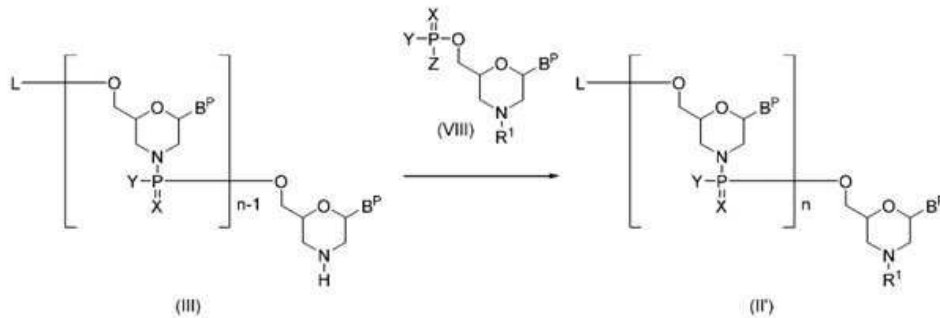
[0483] (7) 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리하고, 추가로

[0484] (8) 알코올류 및/또는 할로젠 용매를 포함하는 용액으로 처리할 수 있다.

[0485] 공정 (6), (7), (8)은 상기와 같으며, 적절히 조합할 수 있다.

[0486] 본 발명의 일 양태는, 상기 신장 반응:

**화학식 69**



[0487]

[0488] 에 이어서,

[0489] <(A) 보호기의 제거 공정> ,

[0490] <(B) 모르폴리노 질소의 보호기의 제거 공정> , 및

[0491] <(C) 정제 공정>

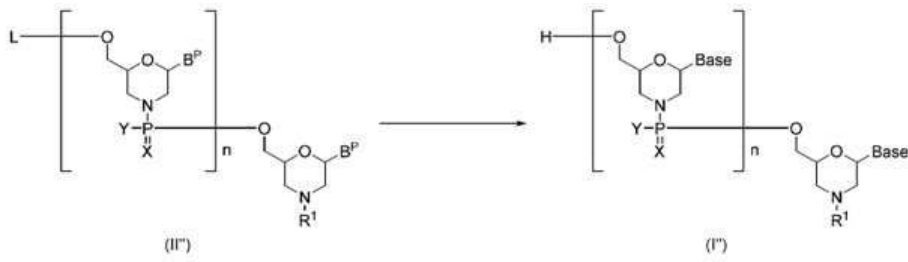
[0492] 으로부터 선택되는 적어도 하나의 공정을 포함하는, 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법이다.

[0493] 이하에, 공정 (A)~(C)에 대해서 설명한다.

[0494] <(A-1) 보호기의 제거 공정>

[0495] 일 실시형태로서, 본 공정은, 식 (II'')의 화합물로부터, 식 (I'')의 화합물을 얻는 공정:

화학식 70



[0496]

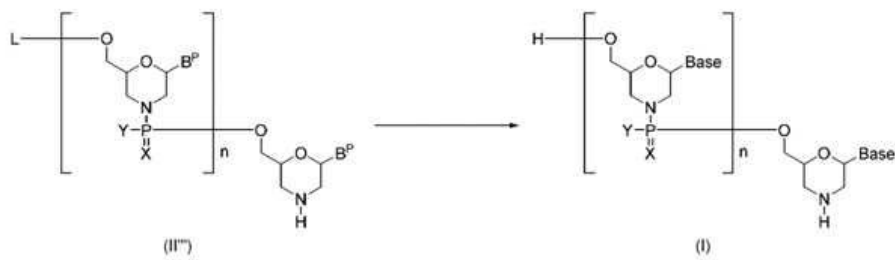
[0497] [식 중, Base, B<sup>P</sup>, R<sup>1</sup>, L, n, X, Y는 상기와 같다]

[0498] 을 포함한다.

[0499] <(A-2) 보호기의 제거 공정>

[0500] 일 실시형태로서, 본 공정은, 식 (II'')의 화합물로부터, 식 (I)의 화합물을 얻는 공정:

화학식 71



[0501]

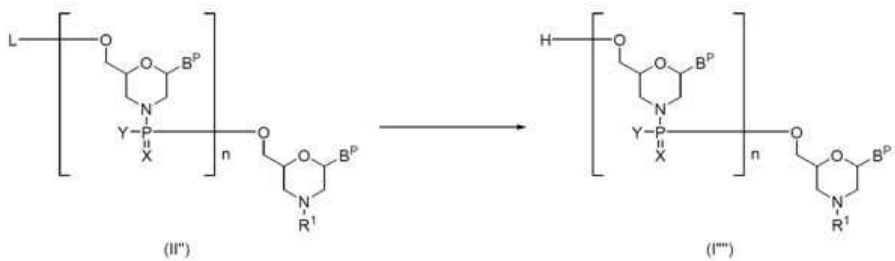
[0502] [식 중, Base, B<sup>P</sup>, L, n, X, Y는 상기와 같다]

[0503] 을 포함한다.

[0504] <(A-3) 보호기의 제거 공정>

[0505] 일 실시형태로서, 본 공정은, 식 (II''')의 화합물로부터, 식 (I''')의 화합물을 얻는 공정:

화학식 72



[0506]

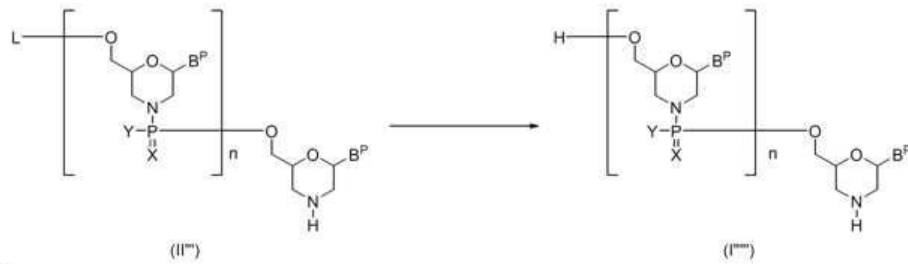
[0507] [식 중, B<sup>P</sup>, R<sup>1</sup>, L, n, X, Y는 상기와 같다]

[0508] 을 포함한다.

[0509] <(A-4) 보호기의 제거 공정>

[0510] 일 실시형태로서, 본 공정은, 식 (II''')의 화합물로부터, 식 (I''''')의 화합물을 얻는 공정:

**화학식 73**



[0511]

[0512] [식 중, B<sup>P</sup>, L, n, X, Y는 상기와 같다]

[0513] 을 포함한다.

[0514] 일 실시형태로서,

[0515] 식 (II'')의 화합물 중의 L 및 식 (II'')의 화합물의 중의 보호되어 있어도 되는 핵산 염기의 보호기; 그리고

[0516] 식 (II''')의 화합물 중의 L 및 식 (II''')의 화합물 중의 보호되어 있어도 되는 핵산 염기의 보호기는,

[0517] 고상 담체, 링커, 보호기의 종류 또는 성질에 따른 탈보호 처리를 실시함으로써, 목적의 화합물을 제조할 수 있다. 예를 들면, 「Green's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS, 제4판, 2006년」에 기재되어 있는 탈보호 방법에 따라, 화합물이 갖는 모든 보호기를 제거할 수 있다. 필요에 따라, 해당 목적의 화합물은 추가적인 화학 구조 변환을 행할 수 있다.

[0518] 일 실시형태로서,

[0519] 식 (II'')의 화합물 중의 L; 그리고

[0520] 식 (II''')의 화합물 중의 L은,

[0521] 고상 담체, 링커의 종류 또는 성질에 따른 탈보호 처리를 실시함으로써, 목적의 화합물을 제조할 수 있다.

[0522] 또한, 식 (I''''')의 화합물 중의 B<sup>P</sup> 및 R<sup>1</sup>; 그리고

[0523] 식 (I''''')의 화합물 중의 B<sup>P</sup>는, 보호기의 종류 또는 성질에 따른 탈보호 처리를 실시함으로써, 목적의 화합물을 제조할 수 있다.

[0524] 예를 들면, 본 명세서에 기재된 방법이나 「Green's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS, 제4판, 2006년」에 기재되어 있는 탈보호 방법에 따라, 화합물이 갖는 모든 보호기를 제거할 수 있다. 필요에 따라, 해당 목적의 화합물은 추가적인 화학 구조 변환을 행할 수 있다.

[0525] 일 실시형태로서, 예를 들면, (1) 암모니아수, (2) 암모니아수/에탄올 또는 (3) 메틸아민-메탄올 용액/물의 혼합 용액으로 처리함으로써, 바람직하게는 (2) 암모니아수/에탄올의 혼합 용액으로 처리함으로써,

[0526] 식 (II'')의 화합물 중의 L 및 식 (II'')의 화합물 중의 보호되어 있어도 되는 핵산 염기의 보호기; 그리고

[0527] 식 (II''')의 화합물 중의 L 및 식 (II''')의 화합물 중의 보호되어 있어도 되는 핵산 염기의 보호기

[0528] 를 제거할 수 있다.

[0529] 일 실시형태로서, (1) 암모니아수, (2) 암모니아수/에탄올 또는 (3) 메틸아민-메탄올 용액/물의 혼합 용액의 사용량으로는, 예를 들면, 식 (II'')의 화합물 1g 또는 식 (II''')의 화합물 1g에 대해, 예를 들면, 중량비로 1 배량~1000 배량의 범위 내이고, 바람직하게는 3 배량~100 배량의 범위 내이다.

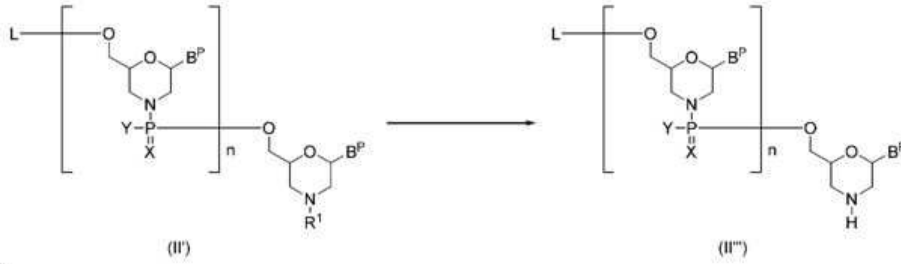
[0530] 일 실시형태로서, 반응 시간은, 반응 온도 등에 따라 다르지만, 10분~120시간의 범위 내이고, 바람직하게는 30 분~72시간의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 5시간~48시간의 범위 내이다.

[0531] 일 실시형태로서, 반응 온도는, 예를 들면, 5°C~100°C의 범위 내이고, 바람직하게는 10°C~70°C의 범위 내이며, 보다 바람직하게는 15°C~50°C의 범위 내이다.

[0532] <(B-1) 모르폴리노 질소의 보호기의 제거 공정>

[0533] 일 실시형태로서, 본 공정은, 식 (II')의 화합물로부터, 식 (II')의 화합물 중의 R<sup>1</sup>을 제거하여, 식 (II''')의 화합물을 얻는 공정:

**화학식 74**



[0534]

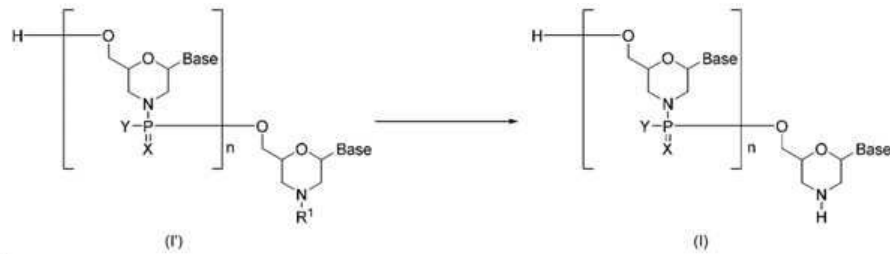
[0535] [식 중, B<sup>p</sup>, L, n, R<sup>1</sup>, X, Y는 상기와 같다.]

[0536] 을 포함한다.

[0537] <(B-2) 모르폴리노 질소의 보호기의 제거 공정>

[0538] 일 실시형태로서, 본 공정은, 식 (I')의 화합물로부터, 식 (I')의 화합물 중의 R<sup>1</sup>을 제거하여, 식 (I)의 화합물을 얻는 공정:

**화학식 75**



[0539]

[0540] [식 중, Base, X, Y, n, R<sup>1</sup>은 상기와 같다.]

[0541] 을 포함한다.

[0542] 일 실시형태로서,

[0543] 식 (II')의 화합물로부터, 식 (II')의 화합물 중의 R<sup>1</sup>을 제거하여, 식 (II''')의 화합물을 얻는 공정; 및

[0544] 식 (I')의 화합물로부터, 식 (I')의 화합물 중의 R<sup>1</sup>을 제거하여, 식 (I)의 화합물을 얻는 공정;은,

[0545] 상기 (1)~(4)의 공정에 있어서 사용한 조건을 적용할 수 있다.

[0546] <(11) 정제 공정>

[0547] 일 실시형태로서, 본 공정은, 모르폴리노 핵산 올리고머 (I)을 반응 혼합물로부터 통상의 분리 정제 수단, 예를 들면, 추출, 농축, 중화, 여과, 원심분리, 침전화, 재결정, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>18</sub>의 역상 컬럼 크로마토그래피, 양이온 교환 컬럼 크로마토그래피, 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피, 겔 여과 컬럼 크로마토그래피, 고속 액체 크로마토

그래피, 투석, 한외 여과 등의 수단을 단독 또는 조합하여 이용함으로써 단리하는 것을 포함한다(예를 들면, 국제공개공보 제1991/09033 A1을 참조.).

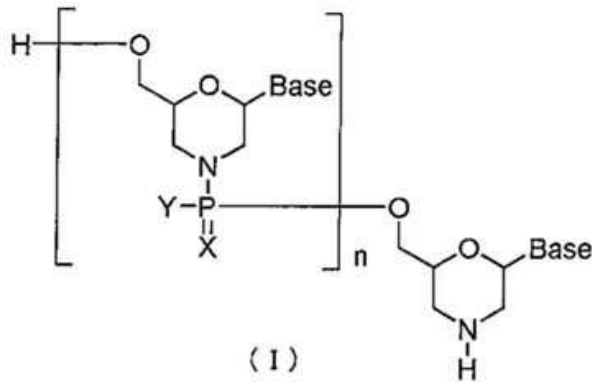
- [0548] 일 실시형태로서, 역상 크로마토그래피를 이용하여 원하는 화합물을 정제하는 경우에는, 용출 용매로서, 예를 들면 20mM의 트리에틸아민/초산 완충액과 아세트니트릴의 혼합 용액을 사용할 수 있다.
- [0549] 일 실시형태로서, 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 원하는 화합물을 정제하는 경우에는, 예를 들면, 1M의 식염수와 10mM의 수산화나트륨 수용액의 혼합 용액 또는 50mM의 인산 완충액의 0.3M의 식염수를 사용할 수 있다.
- [0550] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(2) 탈보호 공정>을 포함한다.
- [0551] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(2) 탈보호 공정> 및 <(3) 중화 공정>을 포함한다.
- [0552] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(2) 탈보호 공정>, <(3) 중화 공정> 및 <(4) 중화 공정 후의 세정 공정>을 포함한다.
- [0553] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(5) 축합 전의 세정 공정> 및 <(6) 축합 공정>을 포함한다.
- [0554] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(5) 축합 전의 세정 공정>, <(6) 축합 공정>, 그리고 <(7) 축합 공정 후의 세정 공정 1> 및/또는 <(8) 축합 공정 후의 세정 공정 2>를 포함한다.
- [0555] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(2) 탈보호 공정>, <(5) 축합 전의 세정 공정> 및 <(6) 축합 공정>을 포함한다.
- [0556] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(2) 탈보호 공정>, <(3) 중화 공정>, <(5) 축합 전의 세정 공정> 및 <(6) 축합 공정>을 포함한다.
- [0557] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은,
- [0558] <(1) 탈보호 공정 전의 세정 공정> ,
- [0559] <(2) 탈보호 공정> ,
- [0560] <(3) 중화 공정> ,
- [0561] <(4) 중화 공정 후의 세정 공정> ,
- [0562] <(5) 축합 전의 세정 공정> ,
- [0563] <(6) 축합 공정> ,
- [0564] <(7) 축합 공정 후의 세정 공정 1> , 및
- [0565] <(8) 축합 공정 후의 세정 공정 2>
- [0566] 를 포함한다.
- [0567] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, <(5) 축합 전의 세정 공정>을 포함하지 않는다.
- [0568] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은,
- [0569] <(1) 탈보호 공정 전의 세정 공정> ,
- [0570] <(2) 탈보호 공정> ,
- [0571] <(3) 중화 공정> ,
- [0572] <(4) 중화 공정 후의 세정 공정> ,
- [0573] <(6) 축합 공정> ,
- [0574] <(7) 축합 공정 후의 세정 공정 1> , 및
- [0575] <(8) 축합 공정 후의 세정 공정 2>

[0576] 를 포함한다.

[0577] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 제조 방법은, 경우에 따라 <캡핑 공정>을 포함하지 않는다.

[0578] 본 발명의 모르폴리노 핵산 올리고머의 제조 방법에 의하면, 식 (I):

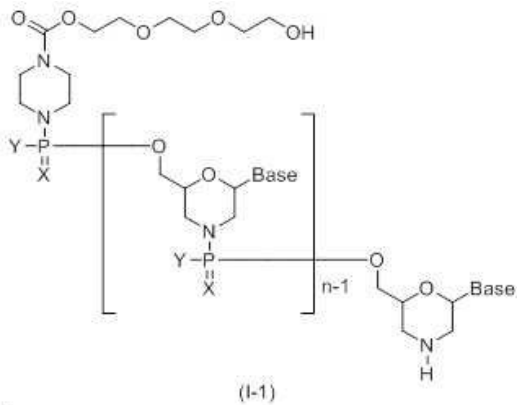
**화학식 76**



[0579] ..

[0580] [식 중, Base, X, Y, n은 상기와 같다]의 모르폴리노 핵산 올리고머, 식 (I-1):

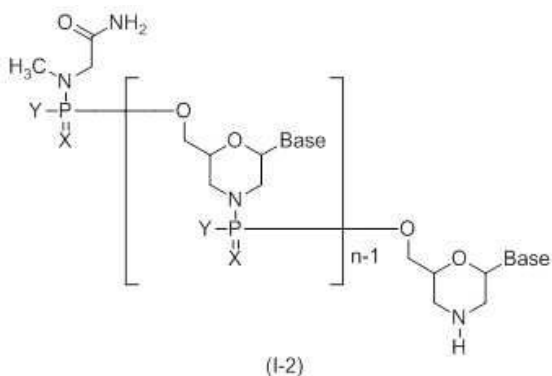
**화학식 77**



[0581] ..

[0582] [식 중, Base, X, Y, n은 상기와 같다]의 모르폴리노 핵산 올리고머, 예를 들면, 또는, 식 (I-2):

**화학식 78**



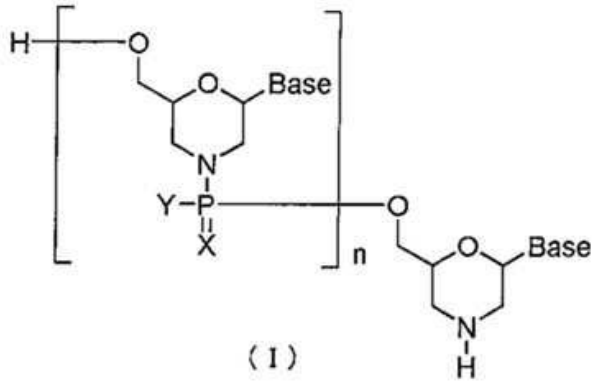
[0583] ..

[0584] [식 중, Base, X, Y, n은 상기와 같다]의 모르폴리노 핵산 올리고머

[0585] 를 얻을 수 있다.

[0586] 본 발명의 일 양태에 있어서, 식 (I):

**화학식 79**

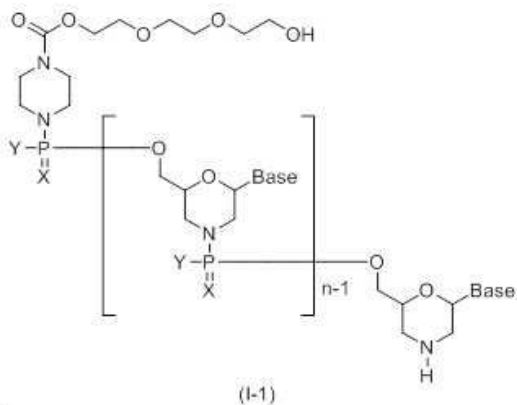


[0587] ...

[0588] [식 중, Base, X, Y, n은 상기와 같다]의 모르폴리노 핵산 올리고머는, 예를 들면, 국제공개공보 (W02012/029986, W02013/100190, W02015/137409, W02015/194520, W02017/047707, W02021/132591, W02021/172498 등)에 기재되어 있거나, 또는 당해 국제공개공보의 기재에 의거하여 당업자가 인식할 수 있는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(phosphorodiamidate morpholino oligomer; PMO)이고, 바람직하게는 인간 디스트로핀 유전자의 51, 53, 45, 55, 44 및 50번째의 엑손으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 스킵할 수 있는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이며, 구체적으로는, 빌텡소 (Viltepso)(W02012/029986을 참조; CAS 등록번호: 2055732-84-6)를 들 수 있다.

[0589] 본 발명의 일 양태에 있어서, 식 (I-1):

**화학식 80**



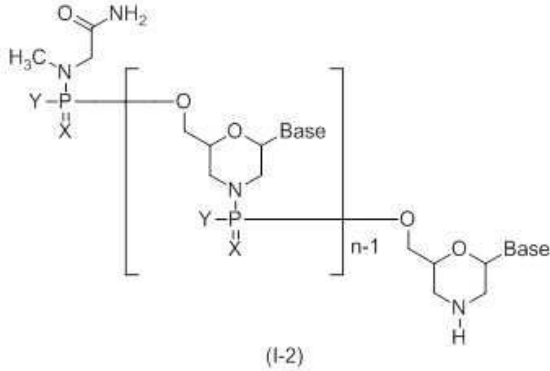
[0590] ...

[0591] [식 중, Base, X, Y, n은 상기와 같다]의 모르폴리노 핵산 올리고머는, 예를 들면, 국제공개공보 (W02001/083740, W02006/000057, W02010/048586, W02010/050801, W02011/057350, W02014/144978, W02014/153240 등)에 기재되어 있거나, 또는 당해 국제공개공보의 기재에 의거하여 당업자가 인식할 수 있는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이고, 바람직하게는 인간 디스트로핀 유전자의 51, 53, 45, 55, 44 및 50번째의 엑손으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 스킵할 수 있는 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이며, 구체적으로는, 에테플리르센(Eteplirsen)(W02006/000057, W02010/050801,

W02014/144978을 참조; CAS 등록번호: 1173755-55-9), 골로디르센(Golodirsen)(W02001/083740, W02006/000057을 참조; CAS 등록번호: 1422959-91-8), 카시메르센(Casimersen)(W02001/083740, W02006/000057, W02011/057350을 참조; CAS 등록번호: 1422958-19-7)을 들 수 있다.

[0592] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명의 제조 방법에 의해 얻어지는 모르폴리노 핵산 올리고머로는, 식 (I-2):

**화학식 81**



[0593] ...  
 [0594] [식 중, Base, X, Y, n은 상기와 같다]의 모르폴리노 핵산 올리고머를 들 수 있다.

**실시예**

[0595] 참고예 1: 모르폴리노 모노머 화합물

[0597] 모르폴리노 모노머 화합물의 구조식과 약칭을 표 2에 나타낸다. A<sup>p</sup>, C<sup>p</sup>, T<sup>p</sup>는, 시판품을 사용하거나, 또는 당해 기술분야에 있어서 통상 사용되는 방법으로 조제했다(W02008/008113을 참조). G<sup>CE</sup> 및 G<sup>POB</sup>는, 당해 기술 분야에 있어서 통상 사용되는 방법으로 조제했다(W02012/043730, W02009/064471을 참조).

**표 2**

모르폴리노 모노머 화합물			
구조식			
약칭	A <sup>p</sup>	C <sup>p</sup>	T <sup>p</sup>
구조식			
약칭	G <sup>CE</sup>	G <sup>POB</sup>	

[0598] ...  
 [0599] 참고예 2: 4-{{(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일}메톡시}-4-옥소부탄산의 조제

[0600] 4-{{(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일}메톡시}-4-옥소부탄산은, 당해 기술

분야에 있어서 통상 사용되는 방법으로 조제했다(W02012/043730을 참조).

- [0601] 참고예 3: 아미노메틸폴리스티렌 수지에 담지된 4-[[[(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일]메톡시]-4-옥소부탄산의 조제
- [0602] 아미노메틸폴리스티렌 수지(와타나베 가가쿠 고교사 제조) 10.0g을 피리딘 130mL에 넣고, 참고예 2에서 조제한 4-[[[(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일]메톡시]-4-옥소부탄산 12.1g, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 염산염 17.3g 및 4-DMAP 2.7g을 첨가하여, 피리딘 10mL로 세정했다. 이어서, 트리에틸아민 15.3mL 및 피리딘 20mL를 첨가하여, 실온에서 1일간 교반했다. 반응 후, 수지를 여과하여 취했다. 얻어진 수지를 피리딘, 디클로로메탄, 메탄올, 테트라히드로푸란의 순으로 세정했다. 얻어진 수지에 테트라히드로푸란 125mL, 2,6-루티딘 15.6mL, 벤조일 클로리드 12.7g을 첨가하여, 실온에서 1시간 교반했다. 수지를 여과하여 취하고, 테트라히드로푸란, 메탄올, 디클로로메탄의 순으로 세정하고, 감압 건조하여, 13.6g의 표기 화합물을 얻었다.
- [0603] 당해 목적물의 로딩량은, 공지의 방법을 이용하여, 수지 1g당의 트리틸의 몰량을 409nm에서의 UV 흡광도를 측정함으로써 결정했다. 수지의 로딩량은, 550 μmol/g이었다.
- [0604] UV 측정 조건
- [0605] 기기: U-2910(히타치 세이사쿠쇼)
- [0606] 용매: 메탄술폰산
- [0607] 파장: 409nm
- [0608] ε 치: 45000
- [0609] 실시예 1: 올리고머의 조제
- [0610] 염기서열이 5'-CCTCCGGTCTGAAGGTGTC-3'인, 모르폴리노 핵산 올리고머의 합성
- [0611] 1. 신장 반응
- [0612] 아미노메틸폴리스티렌 수지에 담지된 4-[[[(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일]메톡시]-4-옥소부탄산(참고예 3) 3.0g(1.7mmol)을 반응조(反應槽)에 옮겨 넣고, 표 3의 합성 사이클을 개시했다. 또한, 신장 반응 합성 사이클 수는 합성하는 사슬 길이(鎖長)에 대응하는 수라고 정의했다. 모르폴리노 핵산 올리고머의 염기서열이 5'-CCTCCGGTCTGAAGGTGTC-3'가 되도록, 각 축합 공정에 있어서, 직전의 신장 반응 합성 사이클에서 얻어진 올리고머에 대해, 모르폴리노 모노머 화합물을 1.3~2.2 몰 당량으로 사용했다.

**표 3**

신장 반응 합성 사이클의 상세(실시예 1)

스텝	공정	시약(용액)	공정 반복 횟수	시간/공정
1	세정	세정 용액 1	1회	5분
2	탈보호	탈보호 용액 1	4~7회	5분
3	중화	중화 용액 1	3회	5분
4	세정	세정 용액 2	2회	5분
5	세정	세정 용액 3	2회	5분
6	축합	축합 용액 1 (모르폴리노 모노머 화합물 + 전처리액1)	1회	6시간~18시간
7	세정	세정 용액 2	1회	5분
8	세정	세정 용액 1	2회	5분

- [0613]
- [0614] 세정 용액 1로서, 30% 2,2,2-트리플루오로에탄올(TFE)/디클로로메탄(DCM)(DCM 중에 30%로 TFE를 함유한다)을 사용했다.
- [0615] 세정 용액 2로서, DCM을 사용했다.

- [0616] 세정 용액 3으로서, 뒤에 말하는 전처리액 1을 사용했다.
- [0617] 탈보호 용액 1로서, 트리플루오로초산(1.2 당량)과 트리에틸아민(1 당량)의 혼합물을 5%(w/v)가 되도록, 1% (v/v)의 트리아이소프로필실란(TIPS)과 20%(v/v)의 TFE를 함유하는 DCM 용액으로 용해한 것을 사용했다.
- [0618] 중화 용액 1로서, 이소프로필알코올(IPA)/N,N-다이소프로필에틸아민(DIPEA)/DCM(353:75:1065(v/v)의 비)을 사용했다.
- [0619] 전처리액 1로서, N-에틸모르폴린(NEM)을 포함하는 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논(DMI)의 혼합물을 사용했다(DMI 중의 5~6% NEM 용액(v/v)).
- [0620] 모르폴리노 모노머 화합물로서, 표 1에 기재한 A<sup>p</sup>, C<sup>p</sup>, T<sup>p</sup> 및 G<sup>CE</sup>를 이용했다. 모르폴리노 모노머 화합물을 전처리액 1에 용해해, 전처리액 1 중의 0.10~0.14M 모르폴리노 모노머 화합물 용액(축합 용액 1)을 조제하여, 축합 용액 1로서 사용했다.
- [0621] <염기서열이 5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTG-3'인 18mer의 조제에 있어서의 스텝 5~7>
- [0622] 스텝 5
- [0623] 스텝 4 후, 반응 용기 중의 염기서열이 5'-CCTCCGGTTCTGAAGGT-3'인 17mer의 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지에, 세정 용액 3(DMI 중의 5.3% NEM 용액(v/v))을 25mL 첨가하여, 5분간 교반하고, 그리고 반응 용기 중의 용액을 배액(排液)했다. 계속해서 반응 용기에 세정 용액 3을 25mL 첨가하여, 5분간 교반하고, 용액을 배액했다.
- [0624] 스텝 6
- [0625] 스텝 5 후, 반응 용기에, 축합 용액 1(전처리액 1 중의 0.12M G<sup>CE</sup> 용액)을 25mL 첨가하고, 그리고 18시간 교반했다.
- [0626] 스텝 7
- [0627] 스텝 6 후, 반응 용기 중의 용액을 배액했다. 계속해서 반응 용기에 세정 용액 2를 50mL 첨가하여, 5분간 교반하고, 그리고 반응 용기 중의 용액을 배액했다.
- [0628] 2. 건조 공정
- [0629] 상기에서 합성한 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 DCM으로 2회 세정하여 반응 용기로부터 회수하고, 6시간 60℃에서 감압 건조했다. 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 14.6g 얻었다.
- [0630] 실시예 2
- [0631] 1. 신장 반응
- [0632] 아미노메틸 폴리스티렌 수지에 담지된 4-[(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일]메톡시}-4-옥소부탄산(참고예 3과 마찬가지로의 방법으로 합성) 3.0g(1.5mmol)을 반응조에 옮겨 넣고, 표 4의 합성 사이클을 개시했다. 또한, 신장 반응 합성 사이클 수는 합성하는 사슬 길이에 대응하는 수라고 정의했다. 모르폴리노 핵산 올리고머의 염기서열이 5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTC-3'가 되도록, 각 축합 공정에 있어서, 직전의 신장 반응 합성 사이클에서 얻어진 올리고머에 대해, 모르폴리노 모노머 화합물을 1.3~2.2 몰 당량으로 사용했다.
- [0633] 실시예 2에서는, 실시예 1의 스텝 5를 대체하여 질소 가스로 반응기를 치환했다. 구체적으로는, 스텝 4 후, 배액을 행한 후에, 필터 리액터의 필터 하부에 질소 벌룬을 장착하고, 콕을 열어, 질소 통기를 2회 실시했다.

표 4

신장 반응 합성 사이클의 상세 (실시예 2)

스텝	공정	시약(용액)	공정 반복 횟수	시간/공정
1	세정	세정 용액 1	1 회	5분
2	탈보호	탈보호 용액 1	4 ~ 7 회	5분
3	중화	중화 용액 1	3 회	5분
4	세정	세정 용액 2	2 회	5분
5	축합	축합 용액 2	1 회	3시간 ~ 6시간
6	세정	세정 용액 2	1 회	5분
7	캡핑	캡핑 용액 1	1 회	10분
8	세정	세정 용액 2	1 회	5분
9	세정	세정 용액 1	2 회	5분

[0634]

[0635] 세정 용액 1로서, 30% 2,2,2-트리플루오로에탄올(TFE)/디클로로메탄(DCM)(DCM 중에 30%로 TFE를 함유한다)을 사용했다.

[0636] 세정 용액 2로서, DCM을 사용했다.

[0637] 탈보호 용액 1로서, 트리플루오로초산(1.2 당량)과 트리에틸아민(1 당량)의 혼합물을 5%(w/v)가 되도록, 1%(v/v)의 트라이소프로필실란(TIPS)과 20%(v/v)의 TFE를 함유하는 DCM 용액으로 용해한 것을 사용했다.

[0638] 중화 용액 1로서, 이소프로필알코올(IPA)/N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA)/DCM(353:75:1065(v/v)의 비)을 사용했다.

[0639] 모르폴리노 모노머 화합물로서, 표 1에 기재한 A<sup>p</sup>, C<sup>p</sup>, T<sup>p</sup> 및 G<sup>CE</sup>를 이용했다. 모르폴리노 모노머 화합물을 DMI 중의 5~6% DIPEA 용액(v/v)에 용해해, 0.10~0.13M 모르폴리노 모노머 화합물 용액(축합 용액 2)을 조제하여, 축합 용액 2로서 사용했다.

[0640] 캡핑 용액 1로서, 무수 초산/DIPEA/DCM의 혼합물(0.5:1.25:98.25(v/v)의 비)을 사용했다.

[0641] <염기서열이 5'-CCTCCGGTCTGAAGGTG-3'인 18mer의 조제에 있어서의 스텝 2~7>

[0642] 스텝 2

[0643] 스텝 1 후, 반응 용기 중의 염기서열이 5'-CCTCCGGTCTGAAGGT-3'이고 말단이 트리틸기로 보호되어 있는, 17mer의 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지에, 탈보호 용액 1을 45mL 첨가하여, 5분간 교반하고, 그리고 반응 용기 중의 용액을 배액했다. 이 공정을 추가로 5회 반복했다.

[0644] 스텝 3

[0645] 스텝 2 후, 반응 용기에, 중화 용액 1을 50mL 첨가하여, 5분간 교반하고, 그리고 반응 용기 중의 용액을 배액했다. 이 공정을 추가로 2회 반복했다.

[0646] 스텝 4

[0647] 스텝 3 후, 반응 용기에, 세정 용액 2를 50mL 첨가하여, 5분간 교반하고, 그리고 반응 용기 중의 용액을 배액했다. 이 공정을 추가로 1회 반복했다.

[0648] 스텝 5

[0649] 스텝 4 후, 반응 용기를 질소 치환으로 치환한 후, 축합 용액 2(DMI 중의 5.3% DIPEA 용액(v/v) 중의 0.12M G<sup>CE</sup> 용액)를 25mL 첨가하고, 그리고 6시간 교반했다.

[0650] 스텝 6

[0651] 스텝 5 후, 반응 용기 중의 용액을 배액했다. 계속해서 반응 용기에 세정 용액 2를 50mL 첨가하여, 5분간 교반하고, 그리고 용액을 배액했다.

- [0652] 스텝 7
- [0653] 스텝 6 후, 반응 용기 중의 용액을 배액했다. 계속해서 반응 용기에 캡핑 용액 1을 50mL 첨가하여, 10분간 교반하고, 그리고 용액을 배액했다.
- [0654] 2. 건조 공정
- [0655] 상기에서 합성한 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 DCM으로 3회 세정하여 반응 용기로부터 회수하고, 6시간 60°C에서 감압 건조했다. 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 11.7g 얻었다.
- [0656] 비교예 1: 올리고머의 조제
- [0657] 염기서열이 5'-CCTCCGGTCTGAAGGTGTC-3'인 모르폴리노 핵산 올리고머의 합성
- [0658] 1. 신장 반응
- [0659] 참고예 2와 마찬가지로 방법으로 조제한, 아미노메틸 폴리스티렌 수지에 담지된 4-[(2S,6R)-6-(4-벤즈아미드-2-옥소피리미딘-1-일)-4-트리틸모르폴린-2-일]메톡시}-4-옥소부탄산(수지의 로딩량은, 458 μmol/g) 50g(23mmol)을 반응조에 옮겨 넣고, 표 5의 합성 사이클을 개시했다. 모르폴리노 핵산 올리고머의 염기서열이 5'-CCTCCGGTCTGAAGGTGTC-3'가 되도록, 각 축합 공정에 있어서, 직전의 신장 반응 합성 사이클에서 얻어진 올리고머에 대해, 모르폴리노 모노머 화합물을 2.0~3.0 몰 당량으로 사용했다.

**표 5**

신장 반응 합성 사이클의 상세(비교예 1)

스텝	공정	시약(용액)	공정 반복 횟수	시간/공정
1	탈보호	탈보호 용액 2	3 ~ 8 회	5 분
2	중화	중화 용액 2	4 ~ 5 회	2 분
3	세정	세정 용액 2	3 회	1 분
4	세정	세정 용액 4	1 회	5 분
5	축합	축합 용액 2 (모르폴리노 모노머 화합물 + 전처리액 2)	1 회	3시간 ~ 8시간
6	세정	세정 용액 2	3 회	1 분
7 *	캡핑	캡핑 용액	2 회	3 분
8	세정	세정 용액 2	3 회	1 분

\*최종의 신장 반응 합성 사이클에서는 캡핑 공정을 실시하지 않는다.

- [0660]
- [0661] 세정 용액 2로서, DCM을 사용했다.
- [0662] 세정 용액 4로서, 뒤에 말하는 전처리액 2를 사용했다.
- [0663] 탈보호 용액 2로서, 트리플루오로초산(2 당량)과 트리에틸아민(1 당량)의 혼합물을 3%(w/v)가 되도록, 1%(v/v)의 에탄올과 10%(v/v)의 TFE를 함유하는 DCM 용액으로 용해한 것을 사용했다.
- [0664] 중화 용액 2로서, IPA/DIPEA/DCM(25:5:70(v/v)의 비)을 사용했다.
- [0665] 전처리액 2로서, DIPEA/DMI의 혼합물(10:90(v/v)의 비)을 사용했다.
- [0666] 모르폴리노 모노머 화합물로서, 표 1에 기재한 A<sup>p</sup>, C<sup>p</sup>, T<sup>p</sup> 및 G<sup>CE</sup>를 이용했다. 모르폴리노 모노머 화합물을 전처리액 2에 용해해, 전처리액 2 중의 0.16M 모르폴리노 모노머 화합물 용액(축합 용액 2)을 조제하고, 그리고 축합 용액 2로서 사용했다.
- [0667] 캡핑 용액으로서, 무수 초산/2,6-루티딘/DCM의 혼합물(20:30:50(v/v)의 비)을 사용했다.
- [0668] 2. 건조 공정
- [0669] 상기에서 합성한 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 반응 용기로부터 회수하고,

2일간 실온에서 감압 건조했다. 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 258.0g 얻었다.

[0670] 시험예 1 실시예 1 및 실시예 2에서 조제한 모르폴리노 핵산 올리고머와, 비교예 1에서 조제한 모르폴리노 핵산 올리고머의 비교

[0671] 염기서열이 5'-CCTCCGGTCTGAAGGTGTTTC-3'인 모르폴리노 핵산 올리고머를 신장 반응으로 합성하고, 건조하여 얻어진 실시예 1 및 비교예 1의 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를, 각각 대략 30mg씩 반응 용기에 넣고, 탈보호 용액 1을 0.75mL 첨가하여 실온에서 40분간 반응했다. 탈보호 용액 1을 제거하고, 수지를 중화 용액 1 및 디클로로메탄으로 세정하여, 실온에서 감압 건조했다. 건조 후의 수지에 28% 암모니아수-에탄올(4/1)을 첨가하여, 실온에서 17시간 교반했다. 상청액을 희석하여 HPLC(C18 이온쌍 분석)에 제공하고, 당해 미정제 혼합물 중의 모르폴리노 핵산 올리고머의 순도를 측정했다.

[0672] 실시예 1 및 실시예 2에서 조제한 모르폴리노 핵산 올리고머와, 비교예 1에서 조제한 모르폴리노 핵산 올리고머의 비교로부터, 실시예 1 및 2의 제조 방법에 의해, 모르폴리노 핵산 올리고머의 순도가 향상되는 것을 확인했다.

표 6

모르폴리노 올리고머의 순도

	모르폴리노 핵산 올리고머의 순도
실시예 1	68.5%
실시예 2	62.9%
비교예 1	57.5%

[0673]

[0674] 시험예 2 실시예 1에서 조제한 모르폴리노 핵산 올리고머와, 비교예 1에서 조제한 모르폴리노 핵산 올리고머의 축합 반응 수율의 비교

[0675] 실시예 1의 1. 신장 반응의 각 신장 사이클 실시 후에, 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 소량 채취해, 40% 메틸아민-메탄올 용액/물 혼합액을 첨가하고, 65℃에서 10분간 반응시켜 수지로부터 잘라냈다. 마찬가지로, 비교예 1의 1. 신장 반응의 각 신장 사이클 실시 후에, 모르폴리노 핵산 올리고머가 담지된 아미노메틸 폴리스티렌 수지를 소량 채취해, 28% 암모니아수-에탄올 혼합액을 첨가하고 55℃에서 밤새 반응시켜 수지로부터 잘라냈다. 각각의 상청액을 희석하여 HPLC(C18 이온쌍 분석)에 제공하고, 축합 반응 수율을 이하의 식에 따라 산출했다.

[0676] 축합 반응 수율(%) = 100 - 원재료 \* 의 피크 면적치 ÷ (원재료의 피크 면적치 + 축합 반응 후의 주피크 면적치)

[0677] \* 원재료란, 말단에 트리틸기를 갖지 않고, 축합 반응에 의해 얻어지는 사슬 길이보다도 1 잔기 짧은 사슬 길이의 모르폴리노 핵산 올리고머를 말한다.

[0678] 실시예 1은 비교예 1보다, 축합 반응 수율이 개선되었다.

[0679] <약어>

[0680] TFE: 2,2,2-트리플루오로에탄올

[0681] DCM: 디클로로메탄

[0682] TFA: 트리플루오로초산

[0683] TEA: 트리에틸아민

[0684] TIPS: 트리아이소프로필실란

[0685] IPA: 이소프로필알코올

- [0686] DIPEA: N,N-디이소프로필에틸아민
- [0687] NEM: N-에틸모르폴린
- [0688] DMI: 1,3-디메틸-2-이미다졸리디논