



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108350018 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680064758.9

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22)申请日 2016.11.17

代理人 杨宏军 唐峥

(30)优先权数据

2015-224617 2015.11.17 JP

(51)Int.Cl.

C07H 21/04(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.04

C07H 19/10(2006.01)

C07H 19/20(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2016/084150 2016.11.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/086397 JA 2017.05.26

(71)申请人 日产化学工业株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 菅原祐大

权利要求书10页 说明书121页 附图1页

(54)发明名称

寡核苷酸的制造方法

(57)摘要

本发明提供寡核苷酸的新制造方法,所述方法使用分离容易、且保存稳定性高的核苷或寡核苷酸。本发明的寡核苷酸的制造方法包括下述工序:使在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、且5'位或3'位为羟基的核苷或寡核苷酸的该5'-羟基或3'-羟基进行H-磷酸酯化。

1.寡核苷酸的制造方法,所述制造方法包括下述工序:

使在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、且5'位或3'位为羟基的核苷或寡核苷酸的该5'-羟基或3'-羟基进行H-磷酸酯化。

2.如权利要求1所述的制造方法,所述制造方法包括至少1个延伸反应循环,所述延伸反应循环包括下述工序:

使在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、且5'位或3'位为羟基的核苷或寡核苷酸的该5'-羟基或3'-羟基进行H-磷酸酯化。

3.如权利要求2所述的制造方法,其中,所述延伸反应循环包括下述工序:

第一工序,所述第一工序包括:将在选自2'位、3'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、在3'位具有被基本保护基或准固相保护基保护的羟基、且在5'位具有被临时保护基保护的羟基的第一核苷或第一寡核苷酸的临时保护基除去而生成5'-羟基;

第二工序,所述第二工序包括:使用H-磷酸酯化试剂使生成的5'-羟基进行H-磷酸酯化;以及

第三工序,所述第三工序中,由经H-磷酸酯化的5'-羟基、和在3'位具有羟基且在5'位具有被临时保护基保护的羟基的第二核苷或第二寡核苷酸的3'-羟基形成亚磷酸二酯键,从而得到第一核苷或第一寡核苷酸、与第二核苷或第二寡核苷酸的结合体。

4.如权利要求3所述的制造方法,所述制造方法还包括第四工序,所述第四工序包括:

将所述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键。

5.如权利要求3所述的制造方法,所述制造方法还包括第四工序,所述第四工序包括:

将所述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键或氨基磷酸二酯键。

6.如权利要求4或5所述的制造方法,所述制造方法还包括第五工序,所述第五工序中,向在选自所述第一工序~第四工序中的至少一道工序中得到的反应混合物中添加极性溶剂从而生成沉淀物,并且,通过固液分离来取得所生成的沉淀物。

7.如权利要求6所述的制造方法,其中,所述极性溶剂为碳原子数1~6的醇溶剂或碳原子数1~6的腈溶剂。

8.如权利要求3~7中任一项所述的制造方法,所述制造方法还包括第六工序,所述第六工序中,将所述基本保护基、临时保护基和准固相保护基全部除去。

9.如权利要求3~8中任一项所述的制造方法,其中,所述第一核苷或第一寡核苷酸在3'位具有被准固相保护基保护的羟基。

10.如权利要求3~9中任一项所述的制造方法,其中,所述第三工序使用所述第二核苷。

11.如权利要求2所述的制造方法,其中,所述延伸反应循环包括下述工序:

第七工序,所述第七工序包括:将在选自2'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、在5'位具有被基本保护基或准固相保护基保护的羟基、且在3'位具有被临时保护基保护的羟基的第三核苷或第三寡核苷酸的临时保护基除去而生成3'-羟基;

第八工序,所述第八工序包括:使用H-磷酸酯化试剂使生成的3'-羟基进行H-磷酸酯

化;以及

第九工序,所述第九工序中,由经H-磷酸酯化的3'-羟基、和在5'位具有羟基且在3'位具有被临时保护基保护的羟基的第四核苷或第四寡核苷酸的5'-羟基形成亚磷酸二酯键,从而得到第三核苷或第三寡核苷酸、与第四核苷或第四寡核苷酸的结合体。

12.如权利要求11所述的制造方法,所述制造方法还包括第十工序,所述第十工序包括:将所述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键。

13.如权利要求11所述的制造方法,所述制造方法还包括第十工序,所述第十工序包括:将所述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键或氨基磷酸二酯键。

14.如权利要求12或13所述的制造方法,所述制造方法还包括第十一工序,所述第十一工序中,向在所述第七工序~第十工序中的任一工序中得到的反应混合物中添加极性溶剂从而生成沉淀物,并且,通过固液分离来取得所生成的沉淀物。

15.如权利要求14所述的制造方法,其中,所述极性溶剂为碳原子数1~6的醇溶剂或碳原子数1~6的腈溶剂。

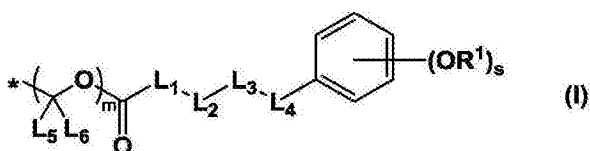
16.如权利要求11~15中任一项所述的制造方法,所述制造方法还包括第十二工序,所述第十二工序中,将所述基本保护基、临时保护基和准固相保护基全部除去。

17.如权利要求11~16中任一项所述的制造方法,其中,所述第三核苷或第三寡核苷酸在5'位具有被准固相保护基保护的羟基。

18.如权利要求11~17中任一项所述的制造方法,其中,所述第九工序使用第四核苷。

19.如权利要求1~18中任一项所述的制造方法,其中,所述准固相保护基由下述式(I)表示,

[化学式1]



式(I)中,*表示与所述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

L¹为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L²为单键、-C(=O)-、-CON(R²)-、-OC(=O)-、-N(R²)C(=O)-、-C(O)-或-O-,所述-CON(R²)-式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R²)C(=O)-式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L³为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L⁴为单键、-C(=O)-、-CON(R²)-、-OC(=O)-、-N(R²)C(=O)-、-C(O)-或-O-,所述-CON(R²)-式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R²)C(=O)-式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L⁵为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

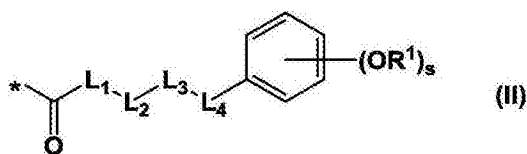
L⁶为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

m为0或1,

在核酸碱基部具有所述准固相保护基、且该准固相保护基的m为0时,该准固相保护基的 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 中的单键的数目为0~3。

20. 如权利要求1~18中任一项所述的制造方法,其中,所述准固相保护基由下述式(II)表示,

[化学式2]



式(II)中,*表示与所述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^2 为单键、-COO-、-CON(R^2)-、-OCO-、-N(R^2)CO-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)CO-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^4 为单键、-COO-、-CON(R^2)-、-OCO-、-N(R^2)CO-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)CO-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

在核酸碱基部具有所述准固相保护基时,该准固相保护基的 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 中的单键的数目为0~3。

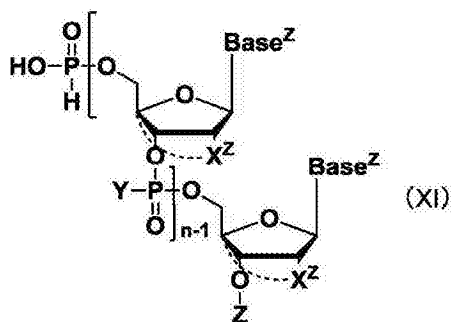
21. 如权利要求3~20中任一项所述的制造方法,其中,所述临时保护基为叔丁基二甲基甲硅烷基、4,4'-二甲氧基三苯甲基、或乙酰丙酰基。

22. 如权利要求1~21中任一项所述的制造方法,其中,所述进行H-膦酸酯化的工序使用选自亚磷酸、亚磷酸二苯酯、苯基-H-膦酸酯的三乙基铵盐、对甲苯甲酰基-H-膦酸酯的三乙基铵盐、2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮、三氯化磷中的至少一种H-膦酸酯化试剂。

23. 如权利要求1~22中任一项所述的制造方法,其中,所述第一核苷~第四核苷及第一寡核苷酸~第四寡核苷酸中包含的核酸碱基各自独立地为选自6-氨基嘌呤-9-基(腺嘌呤残基)、2-氨基-6-羟基嘌呤-9-基(鸟嘌呤残基)、2-氧代-4-氨基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胞嘧啶残基)、2-氧代-4-氨基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(5-甲基胞嘧啶残基)、2-氧代-4-羟基-1,2-二氢嘧啶-1-基(尿嘧啶残基)及2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胸腺嘧啶残基)中的至少1种。

24. 下述式(XI)表示的化合物或其盐,

[化学式3]



式 (XI) 中, n 表示 1 以上的任意的整数,

Base^Z 各自独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基,

X^Z 各自独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在 4 位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基,

Y 各自独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单 C1-6 烷基氨基或二 C1-6 烷基氨基,

Z 表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基;

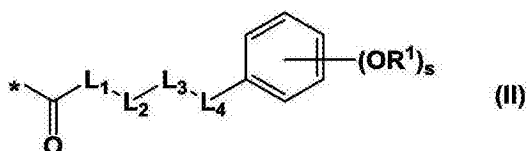
并且满足下述条件中的至少一个:

Base^Z 中的至少 1 个为被准固相保护基保护的核酸碱基,

X^Z 中的至少 1 个为被准固相保护基保护的羟基, 以及,

Z 为准固相保护基。

25. 如权利要求 24 所述的化合物或其盐, 其中, 所述准固相保护基由下述式 (II) 表示, [化学式 4]



式 (II) 中, $*$ 表示与所述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

R^1 为 C1-40 烷基、C2-40 链烯基或 C2-40 炔基, s 为 1~5 的整数,

L^1 为单键、C1-6 亚烷基、C2-6 亚链烯基或 C2-6 亚炔基,

L^2 为单键、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(R^2)-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(R^2)\text{CO}-$ 或 $-\text{O}-$, 所述 $-\text{CON}(R^2)-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6 烷基、C1-6 卤代烷基、C2-6 链烯基或 C2-6 卤代链烯基, 所述 $-\text{N}(R^2)\text{CO}-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6 烷基、C1-6 卤代烷基、C2-6 链烯基或 C2-6 卤代链烯基,

L^3 为单键、C1-6 亚烷基、C2-6 亚链烯基或 C2-6 亚炔基,

L^4 为单键、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(R^2)-$ 、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(R^2)\text{CO}-$ 或 $-\text{O}-$, 所述 $-\text{CON}(R^2)-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6 烷基、C1-6 卤代烷基、C2-6 链烯基或 C2-6 卤代链烯基, 所述 $-\text{N}(R^2)\text{CO}-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6 烷基、C1-6 卤代烷基、C2-6 链烯基或 C2-6 卤代链烯基,

在核酸碱基部具有所述准固相保护基时, 该准固相保护基的 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 中的单键的数目为 0~3。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的化合物或其盐, 其满足下述条件中的至少一方:

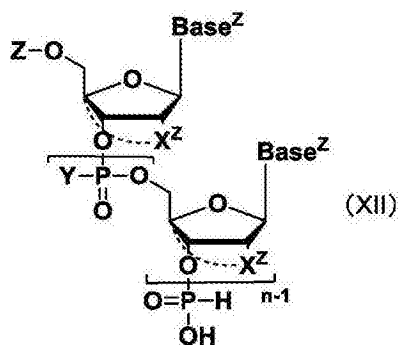
所述式 (XI) 中的 Base^Z 中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基, 以及,

Z 为准固相保护基。

27. 如权利要求24~26中任一项所述的化合物或其盐,其中,所述式(XI)中的Z为准固相保护基。

28. 如权利要求24~27中任一项所述的化合物或其盐,其中,所述式(XI)中的n为1~30。

29. 下述式(XII)表示的化合物或其盐,
[化学式5]



式(XII)中,

n表示1以上的任意的整数,

Base^Z分别独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基,

X^Z分别独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在4位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基,

Y分别独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单C1-6烷基氨基或二C1-6烷基氨基,

Z表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基;

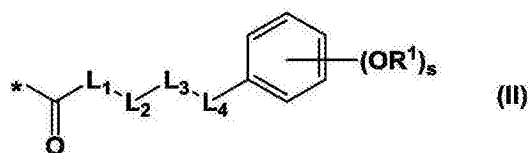
并且满足下述条件中的至少一个:

Base^Z中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基,

X^Z中的至少一个为被准固相保护基保护的羟基,以及,

Z为准固相保护基。

30. 如权利要求29所述的化合物或其盐,其中,所述准固相保护基由下述式(II)表示,
[化学式6]



式(II)中,*表示与所述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

L¹为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L²为单键、-COO-、-CON(R²)-、-OCO-、-N(R²)CO-或-O-,所述-CON(R²)-式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R²)CO-式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L³为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ 或 $-O-$ ，所述 $-CON(R^2)-$ 式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，所述 $-N(R^2)CO-$ 式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

在核酸碱基部具有所述准固相保护基时，该准固相保护基的 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 中的单键的数目为0~3。

31. 如权利要求29或30所述的化合物或其盐，其满足下述条件中的至少一方：

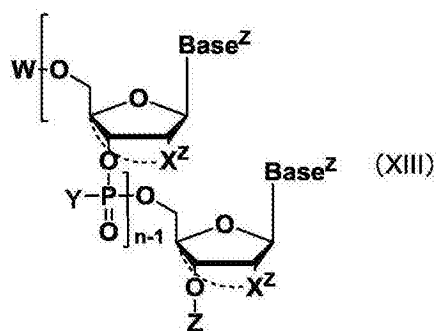
所述式(XII)中的 $Base^Z$ 中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基，以及， Z 为准固相保护基。

32. 如权利要求29~31中任一项所述的化合物或其盐，其中，所述式(XII)中的 Z 为准固相保护基。

33. 如权利要求29~32中任一项所述的化合物或其盐，其中，所述式(XII)中的 n 为1~30。

34. 下述式(XIII)表示的化合物或其盐，

[化学式7]



式(XIII)中， n 表示1以上的任意的整数，

$Base^Z$ 各自独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基，

X^Z 各自独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在4位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基，

W 表示氢原子或临时保护基，

Y 各自独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单C1-6烷基氨基或二C1-6烷基氨基，

Z 表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基；

并且满足下述条件中的至少一个：

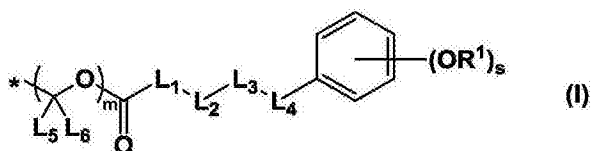
$Base^Z$ 中的至少1个为被准固相保护基保护的核酸碱基，

X^Z 中的至少1个为被准固相保护基保护的羟基，以及，

Z 为准固相保护基；

所述准固相保护基中的至少1个由式(I)表示，

[化学式8]



式(I)中,*表示与所述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^2 为单键、-COO-、-CON(R^2)-、-OCO-、-N(R^2)CO-、-C(O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)CO-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^4 为单键、-COO-、-CON(R^2)-、-OCO-、-N(R^2)CO-、-C(O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)CO-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

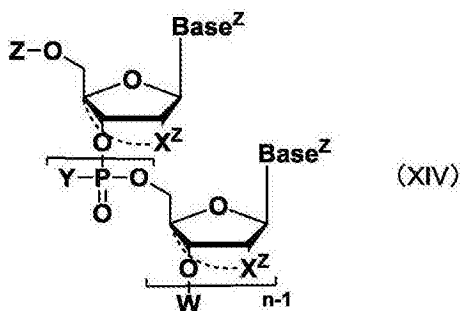
L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

m 为0或1,当 m 为0时, L^4 不是单键。

35. 下述式(XIV)表示的化合物或其盐,

[化学式9]



式(XIV)中,

n 表示1以上的任意的整数,

$Base^Z$ 分别独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基,

X^Z 分别独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在4位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基,

W 表示氢原子或临时保护基,

Y 分别独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单C1-6烷基氨基或二C1-6烷基氨基,

Z 表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基;

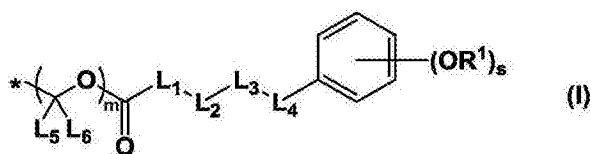
并且满足下述条件中的至少一个:

$Base^Z$ 中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基,

X^Z 中的至少一个为被准固相保护基保护的羟基,以及,

Z 为准固相保护基;

所述准固相保护基中的至少1个由式(I)表示,
[化学式10]



式(I)中,*表示与所述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^2 为单键、-C(=O)-、-CON(R^2)-、-OC(=O)-、-N(R^2)C(=O)-、-C(=O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)C(=O)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^4 为单键、-C(=O)-、-CON(R^2)-、-OC(=O)-、-N(R^2)C(=O)-、-C(=O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)C(=O)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

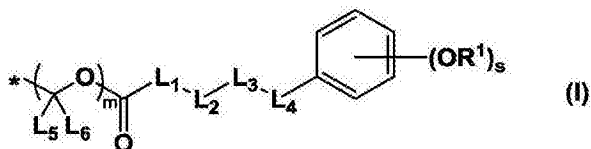
L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

m 为0或1,当 m 为0时, L^4 不是单键。

36. 下述式(I)表示的准固相保护基,

[化学式11]



式(I)中,*表示与选自核苷或寡核苷酸的2'位、3'位和5'位的羟基以及核酸碱基部中的至少一处的键合位置,

R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^2 为单键、-C(=O)-、-CON(R^2)-、-OC(=O)-、-N(R^2)C(=O)-、-C(=O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)C(=O)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^4 为单键、-C(=O)-、-CON(R^2)-、-OC(=O)-、-N(R^2)C(=O)-、-C(=O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)C(=O)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

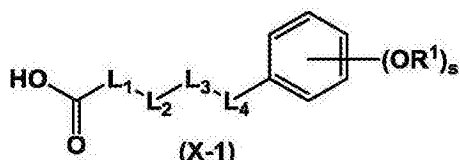
m 为0或1,当 m 为0时, L^4 不是单键。

37. 在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有下述式(I)表示的准固相

保护基的核苷或寡核苷酸的制造方法,所述制造方法中,

使下述核苷或寡核苷酸、与下述式 (X-1) 表示的羧基化合物、下述式 (X-2) 表示的酰卤化物、或下述式 (X-3) 表示的卤代烷基化合物进行反应,所述核苷或寡核苷酸在3' 位和5' 位独立地具有羟基或被保护的羟基,并且在选自2' 位、3' 位、5' 位和核酸碱基部中的至少一处具有羟基、或者在2' 位和核酸碱基部中的至少一处具有羟基或氨基,

[化学式12]



式 (X-1) 中, R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

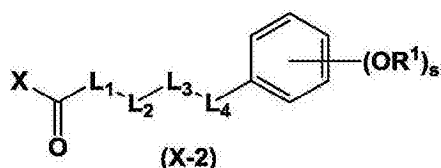
L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^2 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-O-$, 所述 $-CON(R^2)-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基, 所述 $-N(R^2)CO-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

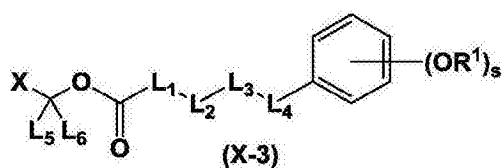
L^4 为 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-O-$, 所述 $-CON(R^2)-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基, 所述 $-N(R^2)CO-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[化学式13]



式 (X-2) 中, X 为卤素原子, R^1 、 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 与所述式 (X-1) 中的定义相同,

[化学式14]



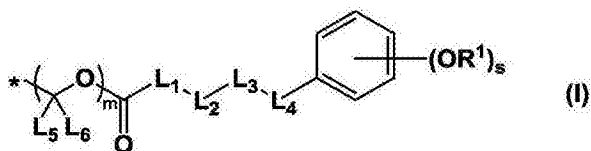
式 (X-3) 中, X 为卤素原子, R^1 、 L^1 、 L^2 和 L^3 与所述式 (X-1) 中的定义相同,

L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-O-$, 所述 $-CON(R^2)-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基, 所述 $-N(R^2)CO-$ 式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[化学式15]



式(I)中,*表示与选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处的键合位置,

R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^2 为单键、-C(=O)-、-CON(R^2)-、-OC(=O)-、-N(R^2)C(=O)-、-C(=O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)C(=O)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

L^4 为单键、-C(=O)-、-CON(R^2)-、-OC(=O)-、-N(R^2)C(=O)-、-C(=O)-或-O-,所述-CON(R^2)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,所述-N(R^2)C(=O)-式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

m 为0或1,当 m 为0时, L^4 不是单键。

寡核苷酸的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及寡核苷酸的新制造方法。

背景技术

[0002] 伴随着基因组药物开发、基因诊断・治疗等最尖端生物相关研究的快速进步・发展,近年来,DNA探针、siRNA、反义DNA、反义RNA等寡核苷酸已被积极地利用。作为寡核苷酸的化学合成方法,已知有亚磷酰胺法、H-磷酸酯法等。

[0003] 在亚磷酰胺法中,使用了作为代表性的酰胺(amidite)化试剂的氯(二异丙基氨基)次亚磷酸2-氰基乙酯或双(二异丙基氨基)次亚磷酸2-氰基乙酯等。这些试剂非常昂贵,在进行酰胺化体的分离时,必须进行柱纯化、超低温下的再沉淀等复杂的操作。另外,对于酰胺化体而言,由于其稳定性低,所以需要于-20℃进行保存。

[0004] 与此相对,在H-磷酸酯法中,使用了作为代表性的H-磷酸酯化试剂的亚磷酸二苯酯或亚磷酸等。它们是廉价的,但在进行H-磷酸酯体的分离时,必须进行柱纯化等复杂的操作。对于H-磷酸酯体而言,由于其稳定性的原因,所以需要于0℃进行保存(例如参见非专利文献1)。

[0005] 目前,基于亚磷酰胺法的固相合成法的工艺优化及自动化已有进展,因此,基于亚磷酰胺法的固相合成法在速度方面是有利的,被最广泛地使用。然而,对于固相合成法而言,存在下述这样的缺点:因设备的制约而导致在规模扩大方面存在限制,过量使用试剂和原料,中间阶段的反应的进行情况的确认、中间体结构的分析等也困难。

[0006] 近年来,作为液相合成法,研究了利用准固相保护基的H-磷酸酯法。具体而言,报道了使用聚乙二醇(MPEG)(例如参见专利文献1)、含有长链烃的基团(例如参见专利文献2)等作为准固相保护基的合成法。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2014-017615号

[0010] 专利文献2:国际公开第2014-077292号

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Humana出版社, 1993,第44-73页

发明内容

[0013] 发明所要解决的问题

[0014] 在利用聚乙二醇(MPEG)的合成法中,示出了21聚体以下的寡核苷酸的合成例,但每一延伸循环中均需要利用GPC进行柱纯化。另外,在利用含有长链烃的基团的制造方法中,示出了5聚体的寡核苷酸的合成例,但脱保护工序的收率低。

[0015] 如上所述,在寡核苷酸的化学合成法中,使用酰胺化体或H-磷酸酯体,但分离时的

操作性、化合物的稳定性均存在问题,期望能应对大量合成的寡核苷酸的新制造方法。

[0016] 本发明的目的在于提供寡核苷酸的新制造方法,所述方法使用分离容易、且保存稳定性高的核苷或寡核苷酸。

[0017] 用于解决问题的手段

[0018] 为了解决如上所述的问题,本申请的发明人进行了深入研究,结果发现,利用包括使具有准固相保护基的核苷或寡核苷酸的5'位羟基或3'位羟基进行H-磷酸酯化的工序的制造方法(其与由偶联工序、对磷原子进行修饰的工序(氧化反应、硫化反应等)、脱保护工序等构成的通常的制造方法不同),能解决上述问题,从而完成了本发明。

[0019] 本发明包括以下方案。

[0020] [1]寡核苷酸的制造方法,所述制造方法包括下述工序:使在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、且5'位或3'位为羟基的核苷或寡核苷酸的该5'-羟基或3'-羟基进行H-磷酸酯化。

[0021] [2]如[1]所述的制造方法,所述制造方法包括至少1个延伸反应循环,所述延伸反应循环包括下述工序:使在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、且5'位或3'位为羟基的核苷或寡核苷酸的该5'-羟基或3'-羟基进行H-磷酸酯化。

[0022] [3]如[2]所述的制造方法,其中,前述延伸反应循环包括下述工序:

[0023] 第一工序,所述第一工序包括:将在选自2'位、3'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、在3'位具有被基本保护基或准固相保护基保护的羟基、且在5'位具有被临时保护基保护的羟基的第一核苷或第一寡核苷酸的临时保护基除去而生成5'-羟基;

[0024] 第二工序,所述第二工序包括:使用H-磷酸酯化试剂使生成的5'-羟基进行H-磷酸酯化;以及

[0025] 第三工序,所述第三工序中,由经H-磷酸酯化的5'-羟基、和在3'位具有羟基且在5'位具有被临时保护基保护的羟基的第二核苷或第二寡核苷酸的3'-羟基形成亚磷酸二酯键,从而得到第一核苷或第一寡核苷酸、与第二核苷或第二寡核苷酸的结合体。

[0026] [4]如[3]所述的制造方法,所述制造方法还包括第四工序,所述第四工序包括:将前述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键。

[0027] [5]如[3]所述的制造方法,所述制造方法还包括第四工序,所述第四工序包括:将前述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键或氨基磷酸二酯键。

[0028] [6]如[4]或[5]所述的制造方法,所述制造方法还包括第五工序,所述第五工序中,向在选自前述第一工序~第四工序中的至少一道工序中得到的反应混合物中添加极性溶剂从而生成沉淀物,并且,通过固液分离来取得所生成的沉淀物。

[0029] [7]如[6]所述的制造方法,其中,前述极性溶剂为碳原子数1~6的醇溶剂或碳原子数1~6的腈溶剂。

[0030] [8]如[3]~[7]中任一项所述的制造方法,所述制造方法还包括第六工序,所述第六工序中,将前述基本保护基、临时保护基和准固相保护基全部除去。

[0031] [9]如[3]~[8]中任一项所述的制造方法,其中,前述第一核苷或第一寡核苷酸在3'位具有被准固相保护基保护的羟基。

[0032] [10]如[3]～[9]中任一项所述的制造方法,其中,前述第三工序使用第二核苷。

[0033] [11]如[2]所述的制造方法,其中,前述延伸反应循环包括下述工序:

[0034] 第七工序,所述第七工序包括:将在选自2'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、在5'位具有被基本保护基或准固相保护基保护的羟基、且在3'位具有被临时保护基保护的羟基的第三核苷或第三寡核苷酸的临时保护基除去而生成3'-羟基;

[0035] 第八工序,所述第八工序包括:使用H-磷酸酯化试剂使生成的3'-羟基进行H-磷酸酯化;以及

[0036] 第九工序,所述第九工序中,由经H-磷酸酯化的3'-羟基、和在5'位具有羟基且在3'位具有被临时保护基保护的羟基的第四核苷或第四寡核苷酸的5'-羟基形成亚磷酸二酯键,从而得到第三核苷或第三寡核苷酸、与第四核苷或第四寡核苷酸的结合体。

[0037] [12]如[11]所述的制造方法,所述制造方法还包括第十工序,所述第十工序包括:将前述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键。

[0038] [13]如[11]所述的制造方法,所述制造方法还包括第十工序,所述第十工序包括:将前述结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键或氨基磷酸二酯键。

[0039] [14]如[12]或[13]所述的制造方法,所述制造方法还包括第十一工序,所述第十一工序中,向在所述第七工序～第十工序中的任一工序中得到的反应混合物中添加极性溶剂从而生成沉淀物,并且,通过固液分离来取得所生成的沉淀物。

[0040] [15]如[14]所述的制造方法,其中,前述极性溶剂为碳原子数1～6的醇溶剂或碳原子数1～6的腈溶剂。

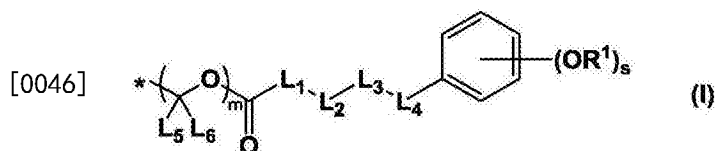
[0041] [16]如[11]～[15]中任一项所述的制造方法,所述制造方法还包括第十二工序,所述第十二工序中,将前述基本保护基、临时保护基和准固相保护基全部除去。

[0042] [17]如[11]～[16]中任一项所述的制造方法,其中,前述第三核苷或第三寡核苷酸在5'位具有被准固相保护基保护的羟基。

[0043] [18]如[11]～[17]中任一项所述的制造方法,其中,前述第九工序使用第四核苷。

[0044] [19]如[1]～[18]中任一项所述的制造方法,其中,前述准固相保护基由下述式(I)表示,

[0045] [化学式1]



[0047] (式中,*表示与前述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0048] R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1～5的整数,

[0049] L¹为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基(alkenylene group)或C2-6亚炔基,

[0050] L²为单键、-COO-、-CON(R²)- (式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-C(O)-或-O-,

[0051] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0052] L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

[0053] L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

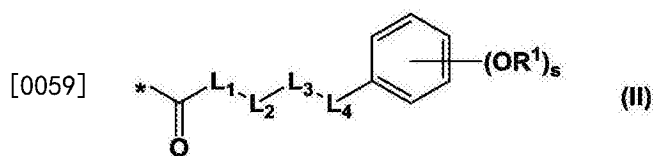
[0054] L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

[0055] m 为0或1，

[0056] 在核酸碱基部具有前述准固相保护基、且该准固相保护基的 m 为0时，该准固相保护基的 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 中的单键的数目为0~3)。

[0057] [20]如[1]~[18]中任一项所述的制造方法，其中，前述准固相保护基由下述式(II)表示，

[0058] [化学式2]



[0060] (式中，*表示与前述准固相保护基所保护的基团的键合位置，

[0061] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基， s 为1~5的整数，

[0062] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0063] L^2 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)或 $-O-$ ，

[0064] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0065] L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)或 $-O-$ ，

[0066] 在核酸碱基部具有前述准固相保护基时，该准固相保护基的 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 中的单键的数目为0~3)。

[0067] [21]如[3]~[20]中任一项所述的制造方法，其中，前述临时保护基为叔丁基二甲基甲硅烷基、4,4'-二甲氧基三苯甲基、或乙酰丙酰基(levulinoyl)。

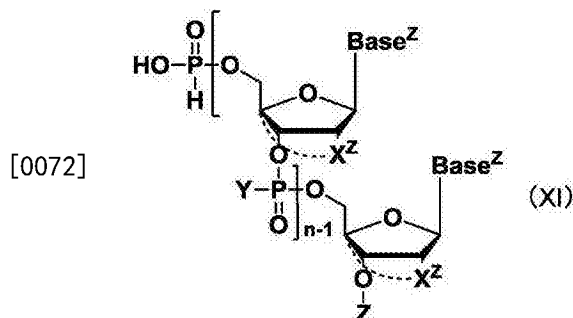
[0068] [22]如[1]~[21]中任一项所述的制造方法，其中，前述进行H-膦酸酯化的工序使用选自亚磷酸、亚磷酸二苯酯、苯基-H-膦酸酯(phenyl-H-phosphonate)的三乙基铵盐、对甲苯甲酰基-H-膦酸酯(p-toluy1-H-phosphonate)的三乙基铵盐、2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮(2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one)、三氯化磷中的至少一种H-膦酸酯化试剂。

[0069] [23]如[1]~[22]中任一项所述的制造方法，其中，前述核苷及寡核苷酸中包含的核酸碱基各自独立地为选自6-氨基嘌呤-9-基(腺嘌呤残基)、2-氨基-6-羟基嘌呤-9-基(鸟嘌呤残基)、2-氧代-4-氨基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胞嘧啶残基)、2-氧代-4-氨基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(5-甲基胞嘧啶残基)、2-氧代-4-羟基-1,2-二氢嘧啶-1-基(尿嘧啶残基)

及2-氧代-4-羟基-5-甲基-1,2-二氢嘧啶-1-基(胸腺嘧啶残基)中的至少1种。

[0070] [24]下述式(XI)表示的化合物或其盐,

[0071] [化学式3]



[0073] (式中,n表示1以上的任意的整数,

[0074] Base^Z 各自独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基,

[0075] X^Z 各自独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在4位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基,

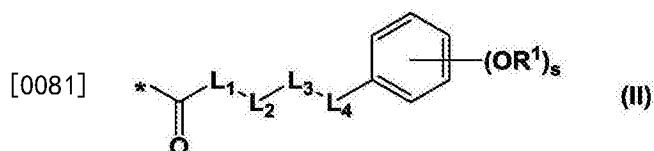
[0076] Y各自独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单C1-6烷基氨基或二C1-6烷基氨基,

[0077] Z表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基;

[0078] 并且满足下述条件中的至少一个: Base^Z 中的至少1个为被准固相保护基保护的核酸碱基, X^Z 中的至少1个为被准固相保护基保护的羟基,以及,Z为准固相保护基。)

[0079] [25]如[24]所述的化合物或其盐,其中,前述准固相保护基由下述式(II)表示,

[0080] [化学式4]



[0082] (式中,*表示与前述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0083] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

[0084] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0085] L^2 为单键、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)或 $-\text{O}-$,

[0086] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0087] L^4 为单键、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(\text{R}^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^2)\text{CO}-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)或 $-\text{O}-$,

[0088] 在核酸碱基部具有准固相保护基时,该准固相保护基的 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 中的单键的数目为0~3)。

[0089] [26]如[24]或[25]所述的化合物或其盐,其满足下述条件中的至少一方:前述式

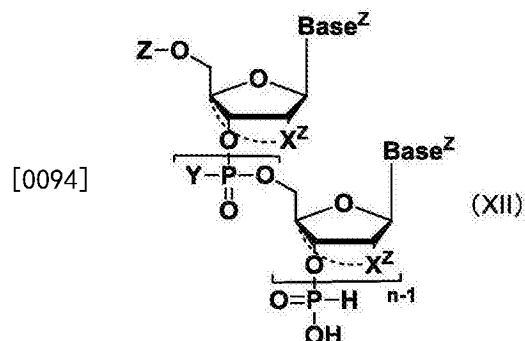
(XI) 中的 Base^Z 中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基, 以及, Z 为准固相保护基。

[0090] [27] 如 [24] ~ [26] 中任一项所述的化合物或其盐, 其中, 前述式 (XI) 中的 Z 为准固相保护基。

[0091] [28] 如 [24] ~ [27] 中任一项所述的化合物或其盐, 其中, 前述式 (XI) 中的 n 为 1 ~ 30。

[0092] [29] 下述式 (XII) 表示的化合物或其盐,

[0093] [化学式 5]



[0095] (式中,

[0096] n 表示 1 以上的任意的整数,

[0097] Base^Z 分别独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基,

[0098] X^Z 分别独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在 4 位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基,

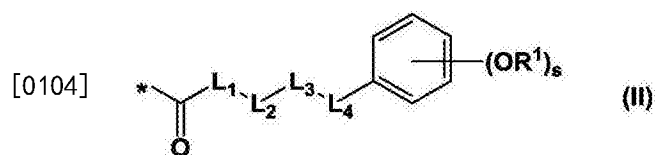
[0099] Y 分别独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单 C1-6 烷基氨基或二 C1-6 烷基氨基,

[0100] Z 表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基;

[0101] 并且满足下述条件中的至少一个: Base^Z 中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基, X^Z 中的至少一个为被准固相保护基保护的羟基, 以及, Z 为准固相保护基。)

[0102] [30] 如 [29] 所述的化合物或其盐, 其中, 前述准固相保护基由下述式 (II) 表示,

[0103] [化学式 6]



[0105] (式中, * 表示与前述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0106] R^1 为 C1-40 烷基、C2-40 链烯基或 C2-40 炔基, s 为 1 ~ 5 的整数,

[0107] L^1 为单键、C1-6 亚烷基、C2-6 亚链烯基或 C2-6 亚炔基,

[0108] L^2 为单键、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(R^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6 烷基、C1-6 卤代烷基、C2-6 链烯基或 C2-6 卤代链烯基)、 $-\text{OCO}-$ 、 $-\text{N}(R^2)\text{CO}-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6 烷基、C1-6 卤代烷基、C2-6 链烯基或 C2-6 卤代链烯基) 或 $-O-$,

[0109] L^3 为单键、C1-6 亚烷基、C2-6 亚链烯基或 C2-6 亚炔基,

[0110] L^4 为单键、 $-\text{COO}-$ 、 $-\text{CON}(R^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6 烷基、C1-6 卤代烷基、C2-6

链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中, R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基) 或-O-,

[0111] 在核酸碱基部具有前述准固相保护基时, 该准固相保护基的L¹、L²、L³和L⁴中的单键的数目为0~3)。

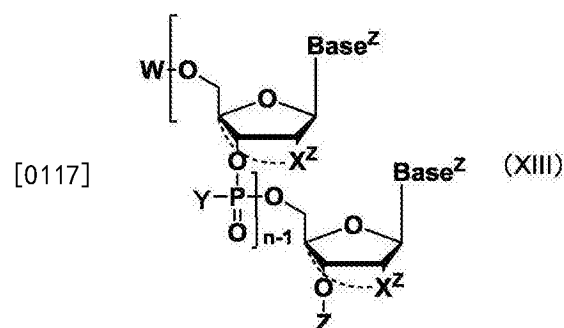
[0112] [31]如[29]或[30]所述的化合物或其盐, 其满足下述条件中的至少一方: 前述式(XII)中的Base^Z中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基, 以及, Z为准固相保护基。

[0113] [32]如[29]~[31]中任一项所述的化合物或其盐, 其中, 前述式(XII)中的Z为准固相保护基。

[0114] [33]如[29]~[32]中任一项所述的化合物或其盐, 其中, 前述式(XII)中的n为1~30。

[0115] [34]下述式(XIII)表示的化合物或其盐,

[0116] [化学式7]



[0118] [式中, n表示1以上的任意的整数,

[0119] Base^Z各自独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基,

[0120] X^Z各自独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在4位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基,

[0121] W表示氢原子或临时保护基,

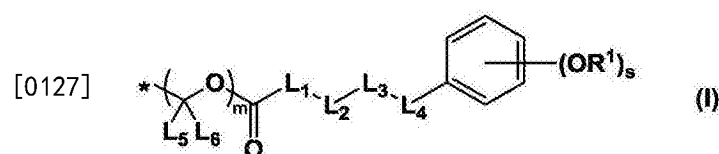
[0122] Y各自独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单C1-6烷基氨基或二C1-6烷基氨基,

[0123] Z表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基;

[0124] 并且满足下述条件中的至少一个: Base^Z中的至少1个为被准固相保护基保护的核酸碱基, X^Z中的至少1个为被准固相保护基保护的羟基, 以及, Z为准固相保护基;

[0125] 前述准固相保护基中的至少1个由式(I)表示,

[0126] [化学式8]



[0128] (式中, *表示与前述准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0129] R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s为1~5的整数,

[0130] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0131] L^2 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

[0132] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0133] L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

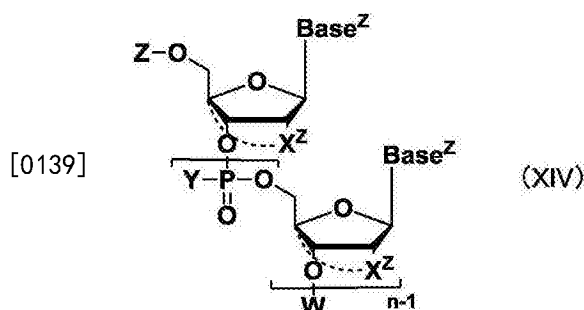
[0134] L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

[0135] L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

[0136] m 为0或1，当 m 为0时， L^4 不是单键。)]。

[0137] [35]下述式(XIV)表示的化合物或其盐，

[0138] [化学式9]



[0140] [式中，

[0141] n 表示1以上的任意的整数，

[0142] $Base^Z$ 分别独立地表示核酸碱基、被基本保护基保护的核酸碱基或被准固相保护基保护的核酸碱基，

[0143] X^Z 分别独立地表示氢原子、卤素原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、在4位碳原子进行桥连的有机基团或被准固相保护基保护的羟基，

[0144] W 表示氢原子或临时保护基，

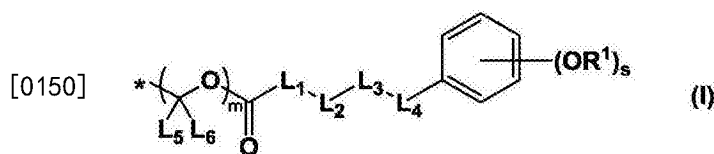
[0145] Y 分别独立地表示氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基、硫醇基、被基本保护基保护的硫醇基、氢化硼基、单C1-6烷基氨基或二C1-6烷基氨基，

[0146] Z 表示氢原子、基本保护基、临时保护基或准固相保护基；

[0147] 并且满足下述条件中的至少一个： $Base^Z$ 中的至少一个为被准固相保护基保护的核酸碱基， X^Z 中的至少一个为被准固相保护基保护的羟基，以及， Z 为准固相保护基；

[0148] 前述准固相保护基中的至少1个由式(I)表示，

[0149] [化学式10]



[0151] (式中，*表示与前述准固相保护基所保护的基团的键合位置，

[0152] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基， s 为1~5的整数，

[0153] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0154] L^2 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

[0155] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0156] L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

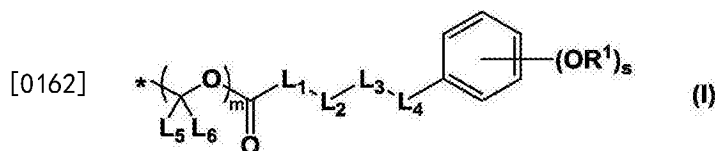
[0157] L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

[0158] L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

[0159] m 为0或1，当 m 为0时， L^4 不是单键。)]。

[0160] [36]下述式(I)表示的准固相保护基，

[0161] [化学式11]



[0163] (式中，*表示与选自核苷或寡核苷酸的2'位、3'位和5'位的羟基以及核酸碱基部中的至少一处的键合位置，

[0164] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基， s 为1~5的整数，

[0165] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0166] L^2 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

[0167] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基，

[0168] L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中， R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$ ，

[0169] L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

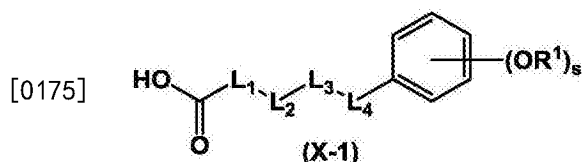
[0170] L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基，

[0171] m 为0或1，当 m 为0时， L^4 不是单键。)]。

[0172] [37]在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有下述式(I)表示的准固相保护基的核苷或寡核苷酸的制造方法，所述制造方法中，

[0173] 使下述核苷或寡核苷酸、与下述式(X-1)表示的羧基化合物、下述式(X-2)表示的酰卤化物、或下述式(X-3)表示的卤代烷基化合物进行反应，所述核苷或寡核苷酸在3'位和5'位独立地具有羟基或被保护的羟基，并且在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有羟基、或者在2'位和核酸碱基部中的至少一处具有羟基或氨基，

[0174] [化学式12]



[0176] (式中, R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

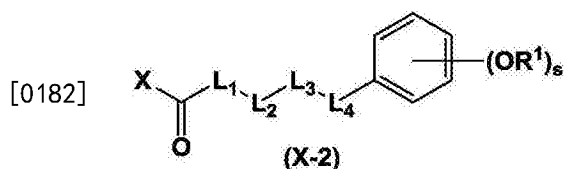
[0177] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0178] L^2 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$,

[0179] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

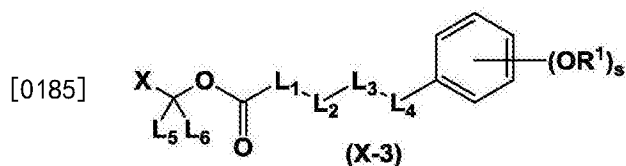
[0180] L^4 为 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$)

[0181] [化学式13]



[0183] (式中, X 为卤素原子, R^1 、 L^1 、 L^2 、 L^3 和 L^4 与前述式 (X-1) 中的定义相同。)

[0184] [化学式14]



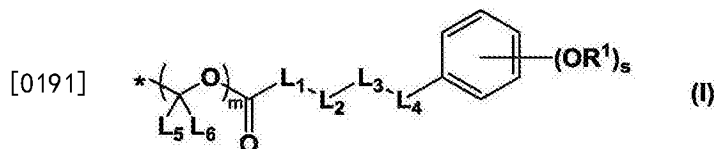
[0186] (式中, X 为卤素原子, R^1 、 L^1 、 L^2 和 L^3 与前述式 (X-1) 中的定义相同,

[0187] L^4 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-C(O)-$ 或 $-O-$,

[0188] L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[0189] L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基。)

[0190] [化学式15]



[0192] (式中, $*$ 表示与选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处的键合位置,

[0193] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

[0194] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0195] L^2 为单键、 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、 $-OCO-$ 、 $-N(R^2)CO-$ (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷

基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-C(O)-或-O-

[0196] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0197] L^4 为单键、-COO-、-CON(R^2)- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-C(O)-或-O-

[0198] L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[0199] L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[0200] m为0或1,当m为0时, L^4 不是单键。)

[0201] 发明的效果

[0202] 通过本发明,可提供寡核苷酸的新制造方法,所述制造方法使用分离容易、且保存稳定性高的核苷或寡核苷酸。另外,该新制造方法可应对寡核苷酸的大量合成。

附图说明

[0203] 图1:为表示用于合成寡核苷酸的核酸单体的稳定性的图。

具体实施方式

[0204] 以下,详细说明本发明。

[0205] 只要没有特别说明,则本说明书中使用的全部的技术术语及科学术语具有与本发明所属技术领域技术人员通常理解的含义相同的含义。与本说明书中的记载相同或等等的任意的方法及材料可在本发明的实施或试验中使用,优选的方法及材料记载在下文中。

[0206] 术语“工序”,不仅包括独立的工序,即使在无法与其他工序明确区别的情况下,只要能达成该工序所期望的目的,则也被包括在本术语中。另外,使用“~”示出的数值范围表示将“~”的前后所记载的数值分别作为最小值和最大值而包含在内的范围。

[0207] 需要说明的是,本说明书中,“n-”表示正,“i-”表示异,“t-”及“tert-”表示叔,“Ph”表示苯基,“Py”表示吡啶基或吡啶,“Me”表示甲基,“Et”表示乙基,“Pr”表示丙基,“Bu”表示丁基,“Bn”表示苄基,“Boc”表示叔丁氧基羰基,“TBS”表示叔丁基二甲基甲硅烷基,“TIPS”表示三异丙基甲硅烷基,“TBDPS”表示叔丁基二苯基甲硅烷基,“DMTr”表示4,4'-二甲氧基三苯甲基。

[0208] “ L^1 ”与“ L_1 ”含义相同,“ L^2 ”与“ L_2 ”含义相同,“ L^3 ”与“ L_3 ”含义相同,“ L^4 ”与“ L_4 ”含义相同,“ L^5 ”与“ L_5 ”含义相同,“ L^6 ”与“ L_6 ”含义相同。

[0209] 本说明书中,所谓“卤素原子”,是指氟原子、氯原子、溴原子、或碘原子。

[0210] 所谓“C1-6烷基”,是指碳原子数为1~6的直链或支链状的饱和烃基,可举出例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基及异己基等。

[0211] 所谓“C2-6链烯基”,是指在任意的位置具有1个以上双键的、碳原子数为2~6的直链或支链状的烃基,可举出例如乙烯基(vinyl group)、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基(高烯丙基(homoallyl))、4-戊烯基、5-己烯基等。

[0212] 所谓“C2-6炔基”,是指在任意的位置具有1个以上三键的、碳原子数为2~6的直链或支链状的烃基,可举出例如乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、

4-戊炔基、5-己炔基等。

[0213] 所谓“C1-40烷基”，是指碳原子数为1~40的直链或支链状的饱和烃基，可举出例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基、癸基、十八烷基、二十烷基、三十烷基、四十烷基等。

[0214] 所谓“C2-40链烯基”，是指在任意的具有1个以上双键的、碳原子数为2~40的直链或支链状的烃基，可举出例如乙烯基(vinyl group)、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基(高烯丙基)、4-戊烯基、5-己烯基、10-癸烯基、18-十八碳烯基、20-二十碳烯基、30-三十碳烯基、40-四十碳烯基等。

[0215] 所谓“C2-40炔基”，是指在任意的具有1个以上三键的、碳原子数为2~40的直链或支链状的烃基，可举出例如乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、4-戊炔基、5-己炔基、10-癸炔基、18-十八碳炔基、20-二十碳炔基、30-三十碳炔基、40-四十碳炔基等。

[0216] 所谓“C10-30烷基”，是指碳原子数为10~30的直链或支链状的饱和烃基，可举出例如癸基、十八烷基、二十烷基、三十烷基等。

[0217] 所谓“C15-25烷基”，是指碳原子数为15~25的直链或支链状的饱和烃基，可举出例如十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十二烷基等。

[0218] 所谓“C15-20烷基”，是指碳原子数为15~20的直链或支链状的饱和烃基，可举出例如十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基等。

[0219] 所谓“C10-30链烯基”，是指在任意的具有1个以上双键的、碳原子数为10~30的直链或支链状的烃基，可举出例如2-癸烯基、10-癸烯基、18-十八碳烯基、20-二十碳烯基、30-三十碳烯基等。

[0220] 所谓“C1-6亚烷基”，是指从前述“C1-6烷基”去除任意位置的1个氢原子而得到的2价取代基，可举出例如亚甲基、亚乙基(乙烷二基)、丙烷-1,3-二基、丙烷-2,2-二基、2,2-二甲基丙烷-1,3-二基、己烷-1,6-二基、3-甲基丁烷-1,2-二基等。

[0221] 所谓“C2-6亚烷基”，是指前述“C1-6亚烷基”中的碳原子数为2~6的直链或支链状的2价取代基，可举出例如亚乙基(乙烷二基)、丙烷-1,3-二基、丙烷-2,2-二基、己烷-1,6-二基、3-甲基丁烷-1,2-二基等。

[0222] 所谓“C2-6亚链烯基”，是指从前述“C2-6链烯基”去除任意位置的1个氢原子而得到的2价取代基，可举出例如乙烯-1,1-二基、乙烯-1,2-二基、丙烯-1,1-二基、丙烯-1,2-二基、丙烯-1,3-二基、丁-1-烯-1,4-二基、丁-1-烯-1,3-二基、丁-2-烯-1,4-二基、丁-1,3-二烯-1,4-二基、戊-2-烯-1,5-二基、己-3-烯-1,6-二基、己-2,4-二烯-1,6-二基等。

[0223] 所谓“C2-6亚炔基”，是指从前述“C2-6炔基”去除任意位置的1个氢原子而得到的2价取代基，可举出例如乙炔-1,2-二基、丙炔-1,3-二基、丁-1-炔-1,4-二基、丁-1-炔-1,3-二基、丁-2-炔-1,4-二基、戊-2-炔-1,5-二基、戊-2-炔-1,4-二基、己-3-炔-1,6-二基等。

[0224] 所谓“C1-6卤代烷基”，是指用1个以上的前述“卤素原子”取代前述“C1-6烷基”的任意位置的氢原子而形成的基团，可举出例如单氟甲基、单氟乙基、单氟丙基、2,2,3,3,3-五氟丙基、单氯甲基、三氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、2,2,2-三氯乙基、1,2-二溴乙基及1,1,1-三氟丙烷-2-基等。

[0225] 所谓“C2-6卤代链烯基”，是指用1个以上的前述“卤素原子”取代前述“C2-6链烯

基”的任意位置的氢原子而形成的基团。

[0226] 所谓“C3-6环烷基”，是指从构成环的碳原子数为3~6个的单环系、稠环系、桥环系或螺环系的脂肪族烃环去除任意位置的1个氢原子而得到的1价取代基，作为具体例，可举出环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

[0227] 所谓“C1-6烷氧基”，是指前述“C1-6烷基”与氧基(-O-)键合而得到的基团。

[0228] 所谓“单C1-6烷基氨基”，是指1个前述C1-6烷基与氨基键合而得到的基团，可举出例如甲基氨基、乙基氨基、正丙基氨基、异丙基氨基、正丁基氨基、异丁基氨基、仲丁基氨基、叔丁基氨基、正戊基氨基、异戊基氨基、新戊基氨基、正己基氨基及异己基氨基等。

[0229] 所谓“二C1-6烷基氨基”，是指相同或不同的2个前述“C1-6烷基”与氨基键合而得到的基团，可举出例如二甲基氨基、二乙基氨基、二正丙基氨基、二异丙基氨基、二正丁基氨基、二异丁基氨基、二叔丁基氨基、二正戊基氨基、二正己基氨基、N-乙基-N-甲基氨基、N-甲基-N-正丙基氨基、N-异丙基-N-甲基氨基、N-正丁基-N-甲基氨基、N-异丁基-N-甲基氨基、N-叔丁基-N-甲基氨基、N-甲基-N-正戊基氨基、N-正己基-N-甲基氨基、N-乙基-N-正丙基氨基、N-乙基-N-异丙基氨基、N-正丁基-N-乙基氨基、N-乙基-N-异丁基氨基、N-叔丁基-N-乙基氨基、N-乙基-N-正戊基氨基、N-乙基-N-正己基氨基等。

[0230] “C1-6烷氧基羰基”、“单C1-6烷基氨基羰基”及“二C1-6烷基氨基羰基”等分别表示前述“C1-6烷氧基”、“单C1-6烷基氨基”及“二C1-6烷基氨基”与羰基(-C(O)-)键合而得到的基团。

[0231] 所谓“C6-10芳基”，是指从构成环的原子全部为碳原子、且碳原子数为6~10个的单环式或双环式的芳香族烃环去除任意位置的1个氢原子而得到的1价取代基，作为具体例，可举出苯基及萘基等。

[0232] 所谓“5-10元杂芳基”，是指从构成环的原子的数目为5~10个、且构成环的原子中含有1~5个杂原子(该杂原子是指氮原子、氧原子或硫原子，为2个以上时，可以相同也可以不同。)的单环系或稠环系的芳香族杂环去除任意位置的1个氢原子而得到的1价取代基。

[0233] 作为单环系的“5-10元杂芳基”，可举出2-噻吩基、3-噻吩基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-吡喃基、3-吡喃基、4-吡喃基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、1-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、1-吡唑基、3-吡唑基、4-吡唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、3-异噻唑基、4-异噻唑基、5-异噻唑基、1,2,4-三唑-1-基、1,2,4-三唑-3-基、1,2,4-三唑-5-基、1,2,3-三唑-1-基、1,2,3-三唑-4-基、1,2,3-三唑-5-基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-吡嗪基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、3-哒嗪基、4-哒嗪基、1,3,4-噁二唑-2-基、1,3,4-噻二唑-2-基、1,2,4-噁二唑-3-基、1,2,4-噁二唑-5-基、1,2,4-噻二唑-3-基、1,2,4-噻二唑-5-基、1,2,5-噁二唑-3-基及1,2,5-噻二唑-3-基等。

[0234] 作为稠环系的“5-10元杂芳基”，可举出2-苯并呋喃基、3-苯并呋喃基、4-苯并呋喃基、5-苯并呋喃基、6-苯并呋喃基、7-苯并呋喃基、1-异苯并呋喃基、4-异苯并呋喃基、5-异苯并呋喃基、2-苯并噻吩基、3-苯并噻吩基、4-苯并噻吩基、5-苯并噻吩基、6-苯并噻吩基、7-苯并噻吩基、1-异苯并噻吩基、4-异苯并噻吩基、5-异苯并噻吩基、2-苯并噻唑基、3-苯并噻唑基、4-苯并噻唑基、5-苯并噻唑基、6-苯并噻唑基、7-苯并噻唑基、2-苯并吡喃基、3-苯并吡喃基、4-苯并吡喃基、5-苯并吡喃基、6-苯并吡喃基、7-苯并吡喃基、8-苯并吡喃基、1-

吡啶基、2-吡啶基、3-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、7-吡啶基、8-吡啶基、1-异吡啶基、2-异吡啶基、4-异吡啶基、5-异吡啶基、1-咪唑基、2-咪唑基、3-咪唑基、4-咪唑基、5-咪唑基、6-咪唑基、7-咪唑基、1-噻唑基、2-噻唑基、3-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、6-噻唑基、7-噻唑基、1-噁唑基、2-噁唑基、3-噁唑基、6-噁唑基、7-噁唑基、8-噁唑基、2-噻嗪基、3-噻嗪基、4-噻嗪基、5-噻嗪基、6-噻嗪基、7-噻嗪基、8-噻嗪基、1-异噻嗪基、3-异噻嗪基、4-异噻嗪基、5-异噻嗪基、6-异噻嗪基、7-异噻嗪基、8-异噻嗪基、1-酞嗪基(phthalaziny1)、5-酞嗪基、6-酞嗪基、2,7-萘啶-1-基、2,7-萘啶-3-基、2,7-萘啶-4-基、2,6-萘啶-1-基、2,6-萘啶-3-基、2,6-萘啶-4-基、1,8-萘啶-2-基、1,8-萘啶-3-基、1,8-萘啶-4-基、1,7-萘啶-2-基、1,7-萘啶-3-基、1,7-萘啶-4-基、1,7-萘啶-5-基、1,7-萘啶-6-基、1,7-萘啶-8-基、1,6-萘啶-2-基、1,6-萘啶-3-基、1,6-萘啶-4-基、1,6-萘啶-5-基、1,6-萘啶-7-基、1,6-萘啶-8-基、1,5-萘啶-2-基、1,5-萘啶-3-基、1,5-萘啶-4-基、1,5-萘啶-6-基、1,5-萘啶-7-基、1,5-萘啶-8-基、2-喹啉基、5-喹啉基、6-喹啉基、2-喹唑啉基、4-喹唑啉基、5-喹唑啉基、6-喹唑啉基、7-喹唑啉基、8-喹唑啉基、3-噌啉基、4-噌啉基、5-噌啉基、6-噌啉基、7-噌啉基、8-噌啉基、2-蝶啶基、4-蝶啶基、6-蝶啶基及7-蝶啶基等。

[0235] 所谓“芳烷基”，是指前述“C1-6烷基”的任意的氢原子被前述“C6-10芳基”取代而得到的1价取代基。

[0236] 所谓“杂芳烷基”，是指前述“C1-6烷基”的任意的氢原子被前述“5-10元杂芳基”取代而得到的1价取代基。

[0237] 所谓“3-11元含氮非芳香族杂环基”，是指从含有至少1个以上氮原子的、构成环的原子数为3~11个的单环系、稠环系(对于该稠环系而言，非芳香族环可与非芳香族环或芳香族环稠合)、桥环系或螺环系的非芳香族性的杂环去除任意位置的1个氢原子而得到的1价取代基，可举出氮杂环丁基、吡咯烷基、2-氧代吡咯烷基、哌啶基、3-氧代哌啶基、哌嗪基、吗啉代基(morpholino group)、硫代吗啉代基、高吗啉代基(homomorpholino group)、高哌嗪基(homopiperazino group)等。

[0238] “C1-40烷基硫基”、“C3-6环烷基硫基”、“C6-10芳基硫基”、“5-10元杂芳基硫基”、“芳烷基硫基”及“杂芳基硫基”等分别表示前述“C1-40烷基”、“C3-6环烷基”、“C6-10芳基”、“5-10元杂芳基”、“芳烷基”及“杂芳基”与硫基(-S-)键合而得到的基团。

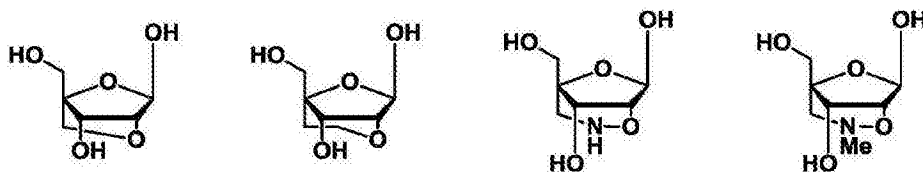
[0239] 本说明书中，所谓的成为寡核苷酸的结构单元的“核苷”，是指核酸碱基通过N-糖苷化而键合于糖(例如，核糖、2'-脱氧核糖、2'位与4'位桥连的核糖)的1'位而成的化合物。

[0240] 此处，前述核糖及2'-脱氧核糖为未取代、或被选自C1-6烷基、卤素原子、羟基、氨基、被基本保护基保护的羟基、被保护的氨基中的1个以上取代基取代。另外，前述C1-6烷基为未取代、或被从卤素原子、C1-6烷氧基羰基、单C1-6烷基氨基羰基及二C1-6烷基氨基羰基等中独立地选择的1个以上取代基取代。前述C1-6烷氧基羰基、单C1-6烷基氨基羰基及二C1-6烷基氨基羰基等为未取代、或者被C6-10芳基、5-10元杂芳基或3-11元含氮非芳香族杂环基取代。

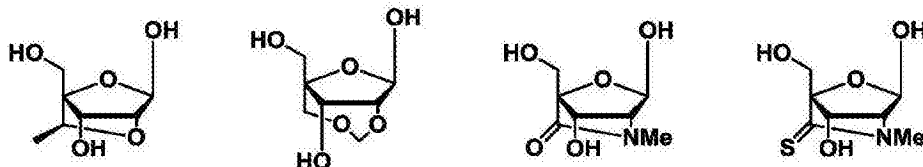
[0241] 所谓的2'位与4'位桥连的核糖，没有特别限制，只要核苷的2'位与4'位介由桥连基团进行了桥连即可，可举出例如2'位与4'位通过C2-6亚烷基(该亚烷基为未取代、或被C1-6烷基取代。另外，该亚烷基的1或2个亚甲基未被替换、或被替换为选自-O-、-NR¹¹- (R¹¹表示氢原子或C1-6烷基)、-S-、-CO-、-CS-、-COO-、-OCONR¹²- (R¹²表示氢原子或C1-6烷基)、-

CONR¹³- (R¹³表示氢原子或C1-6烷基) 及-CSNR¹⁴- (R¹⁴表示氢原子或C1-6烷基) 中的基团) 进行了桥连的核糖。作为具体例,可举出下述式的化合物。核苷的糖优选为核糖或2'-脱氧核糖。

[0242] [化学式16]



[0243]



[0244] 本说明书中,所谓“核酸碱基”,没有特别限制,只要是可用于合成核酸的碱基即可,可举出例如胞嘧啶基、尿嘧啶基、胸腺嘧啶基、5-甲基胞嘧啶基等嘧啶碱基、腺嘌呤基、鸟嘌呤基等嘌呤碱基。另外,所谓的“被保护的核酸碱基”,例如是指:在作为具有氨基的核酸碱基的腺嘌呤基、鸟嘌呤基、或胞嘧啶基中,氨基被保护;为具有羟基的核酸碱基的情况下,羟基被保护;为具有硫醇基的核酸碱基的情况下,硫醇基被保护;或者,在具有羰基的核酸碱基中,与在该环上取代的氨基或羟基共轭,羰基成为羟基的形式而被保护;等等,优选为被能耐受3'位或5'位处的临时保护基的脱保护条件的保护基保护的核酸碱基。

[0245] 作为前述核酸碱基中的“氨基的保护基”,没有特别限制,可举出例如PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (有机合成中的保护基),第3版,JOHN WILLY&SONS出版(1999年)等中记载的保护基。作为所述的“氨基的保护基”的具体例,可举出例如特戊酰基、特戊酰氧基甲基、三氟乙酰基、苯氧基乙酰基、4-异丙基苯氧基乙酰基、4-叔丁基苯氧基乙酰基、乙酰基、苯甲酰基、异丁酰基、二甲基甲脒基、9-芴基甲基氧基羰基等。这些中,优选苯氧基乙酰基、4-异丙基苯氧基乙酰基、乙酰基、苯甲酰基、异丁酰基、及二甲基甲脒基。

[0246] 作为前述核酸碱基中的“羟基的保护基”,没有特别限制,可举出例如PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS,第3版,JOHN WILLY&SONS出版(1999年)等中记载的任意的保护基。具体而言,可举出烷基(甲基、叔丁基等)、芳基甲基(苄基、对甲氧基苄基等)、烷氧基烷基(甲氧基甲基、甲氧基乙基、氰基乙氧基甲基、乙氧基乙基等)、2-四氢吡喃基、氰基乙基、氨基甲酰基(苯基氨基甲酰基、1,1-二氧代硫代吗啉-4-硫代氨基甲酰基等)、酰基(乙酰基、特戊酰基、异丁酰基、苯甲酰基、苯氧基乙酰基、乙酰丙酰基、3-苯甲酰基丙酰基等)、甲硅烷基(三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基等)、[(三异丙基甲硅烷基)氧基]甲基(Tom基)、1-(4-氯苯基)-4-乙氧基哌啶-4-基(Cpep基)等。这些中,优选乙酰基、苯甲酰基、苄基或对甲氧基苄基。

[0247] 作为前述核酸碱基中的“硫醇基的保护基”,除了与“羟基的保护基”同样的保护基之外,可举出形成二硫醚键的保护基。

[0248] 另外,核酸碱基的羰基进行共轭而成为羟基的形式从而被保护时,例如,可与苯酚、2,5-二氯苯酚、3-氯苯酚、3,5-二氯苯酚、2-甲酰基苯酚、2-萘酚、4-甲氧基苯酚、4-氯苯酚、2-硝基苯酚、4-硝基苯酚、4-乙酰基氨基苯酚、五氟苯酚、4-特戊酰氧基苯甲醇、4-硝基苯乙基醇、2-(甲基磺酰基)乙醇、2-(苯基磺酰基)乙醇、2-氰基乙醇、2-(三甲基甲硅烷基)

乙醇、二甲基氨基甲酰氯、二乙基氨基甲酰氯、乙基苯基氨基甲酰氯、1-吡咯烷甲酰氯、4-吗啉甲酰氯、二苯基氨基甲酰氯等进行反应,对羰基加以保护。

[0249] 另外,作为该“核酸碱基”,除了上述的基团之外,还可包含:核酸碱基在任意的位被1~3个任意的取代基(例如,卤素原子、烷基、芳烷基、烷氧基、酰基、烷氧基烷基、羟基、氨基、单烷基氨基、二烷基氨基、羧基、氰基、硝基等)取代而得到的修饰核酸碱基(例如,8-溴腺嘌呤基、8-溴鸟嘌呤基、5-溴胞嘧啶基、5-碘胞嘧啶基、5-溴尿嘧啶基、5-碘尿嘧啶基、5-氟尿嘧啶基、5-甲基胞嘧啶基、8-氧代鸟嘌呤基、次黄嘌呤基等)。

[0250] (延伸反应循环)

[0251] 本说明书中所谓的“延伸反应循环”,是指下述反应循环:使具有准固相保护基的核苷或寡核苷酸进行H-磷酸酯化,然后使其与具有羟基的核苷或寡核苷酸反应,得到具有准固相保护基的核苷或寡核苷酸与具有羟基的核苷或寡核苷酸介由含磷基团进行结合而成的结合体。

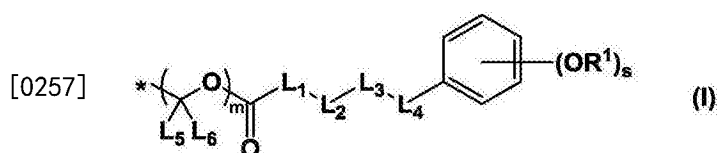
[0252] 延伸反应循环例如包括下述工序:包括将具有准固相保护基、且在3'位或5'位具有被临时保护基保护的羟基的核苷或寡核苷酸的临时保护基除去而生成羟基的步骤的工序;包括使生成的羟基进行H-磷酸酯化而得到H-磷酸酯体的步骤的工序;由H-磷酸酯体、和具有羟基的核苷或寡核苷酸得到它们介由亚磷酸二酯键进行结合而成的寡核苷酸的工序。

[0253] (准固相保护基)

[0254] 本发明中使用的所谓准固相保护基,是指下述的保护基,通过使反应底物具有该保护基,使反应底物及反应产物变得可溶于低极性溶剂,从而可进行液相中的反应,并且,通过添加一定以上的极性溶剂,反应产物或反应底物将发生沉淀,从而可进行固液分离;而且,所述保护基在可将5'位羟基或3'位羟基的下述临时保护基除去的条件下稳定。通过使用具有准固相保护基的反应底物,可同时实现反应性和后处理的简便性。

[0255] 作为准固相保护基,可举出下述式(I)表示的基团。

[0256] [化学式17]



[0258] 式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0259] R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

[0260] L¹为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0261] L²为单键、-COO-、-CON(R²)- (式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-C(O)-或-O-,

[0262] L³为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0263] L⁴为单键、-COO-、-CON(R²)- (式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R²)CO- (式中,R²表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-C(O)-或-O-,

[0264] L⁵为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[0265] L⁶为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[0266] m为0或1。

[0267] 此处, L^2 为-COO-或-O-、 L^4 为-OCO-或-O-时, L^3 优选为C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基。

[0268] 作为准固相保护基的代表例,例如,可举出:

[0269] 3,4,5-三(十八烷基氧基)苄基氧基琥珀酰基(3-{3,4,5-三(十八烷基氧基)苄基氧基羰基}丙酰基),

[0270] 3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰基,

[0271] 4-氧代-4-(2,4,6-三(十八烷基氧基)苯基)丁酰基,

[0272] 2-(3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺基)乙氧基琥珀酰基(3-[2-{3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺基}乙氧基羰基]丙酰基),

[0273] 2-(N-甲基-3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺基)乙氧基琥珀酰基(3-[2-{N-甲基-3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺基}乙氧基羰基]丙酰基),

[0274] (N-甲基-3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺基)乙酰基,

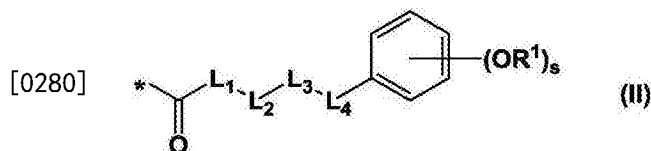
[0275] ((3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰基)氧基)甲基,以及

[0276] 2-(N-甲基-3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺基)乙氧基琥珀酰基氧基甲基({3-[2-{N-甲基-3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺基}乙氧基羰基]丙酰基}氧基)甲基),等等。

[0277] 作为准固相保护基的具体例,还可举出国际公开第2014-077292号等中公开的基团。

[0278] 准固相保护基优选为下述式(II)表示的基团。

[0279] [化学式18]



[0281] 式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0282] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

[0283] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0284] L^2 为单键、-COO-、-CON(R^2)- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)或-O-,

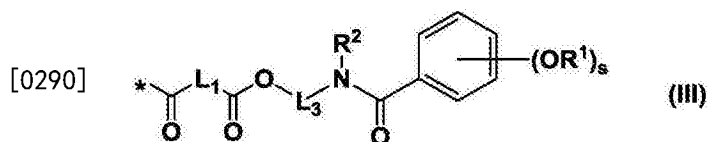
[0285] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0286] L^4 为单键、-COO-、-CON(R^2)- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)或-O-。

[0287] 此处, L^2 为-COO-或-O-、 L^4 为-OCO-或-O-时, L^3 更优选为C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基。

[0288] 准固相保护基进一步优选为下述式(III)表示的基团。

[0289] [化学式19]



[0291] 式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0292] R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

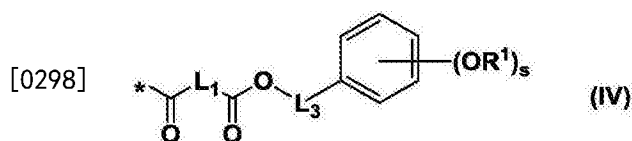
[0293] L¹为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基,

[0294] L³为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基,

[0295] R²为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基或C2-6链烯基。

[0296] 另外,准固相保护基进一步优选为下述式(IV)表示的基团。

[0297] [化学式20]



[0299] 式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

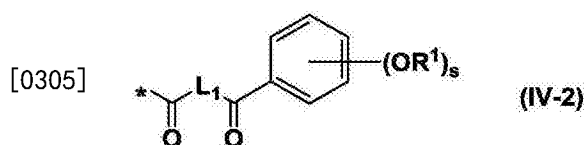
[0300] R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

[0301] L¹为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基,

[0302] L³为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基。

[0303] 另外,准固相保护基进一步优选为下述式(IV-2)表示的基团。

[0304] [化学式21]



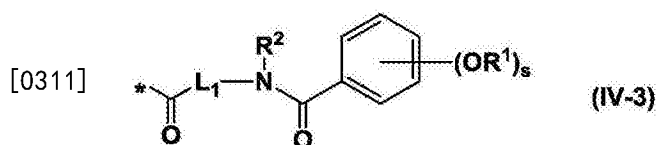
[0306] 式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0307] R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

[0308] L¹为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基。

[0309] 另外,准固相保护基进一步优选为下述式(IV-3)表示的基团。

[0310] [化学式22]



[0312] 式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0313] R¹为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基,s为1~5的整数,

[0314] L¹为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基,

[0315] R²为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基或C2-6链烯基。

[0316] 式(II)~式(IV-2)中,L¹优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚乙基。

[0317] 式(IV-3)中,L¹优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚甲基。

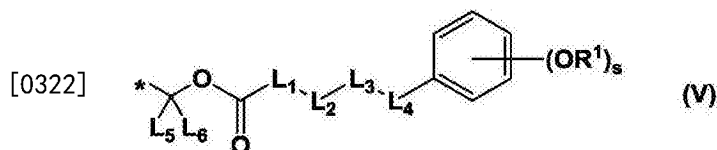
[0318] 式(II)~式(IV)中,L³优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚甲基或亚乙基。

[0319] 式(II)、式(III)及式(IV-3)中,R²优选为氢原子或C1-6烷基,特别优选为氢原子

或甲基。

[0320] 作为其他方式,准固相保护基优选为下述式(V)表示的基团。

[0321] [化学式23]



[0323] 式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0324] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

[0325] L^1 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0326] L^2 为单键、-COO-、-CON(R^2)- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-C(O)-或-O-,

[0327] L^3 为单键、C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基,

[0328] L^4 为单键、-COO-、-CON(R^2)- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-OCO-、-N(R^2)CO- (式中, R^2 表示氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基)、-C(O)-或-O-,

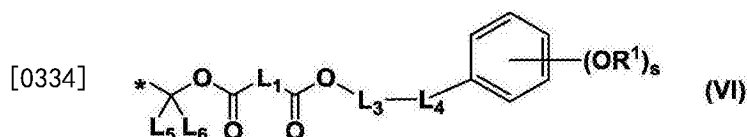
[0329] L^5 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基,

[0330] L^6 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基、C2-6链烯基或C2-6卤代链烯基。

[0331] 此处, L^2 为-COO-或-O-、 L^4 为-OCO-或-O-时, L^3 更优选为C1-6亚烷基、C2-6亚链烯基或C2-6亚炔基。

[0332] 准固相保护基进一步优选为下述式(VI)表示的基团或下述式(VII)表示的基团。

[0333] [化学式24]



[0335] (式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0336] R^1 为C1-40烷基、C2-40链烯基或C2-40炔基, s 为1~5的整数,

[0337] L^1 为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基,

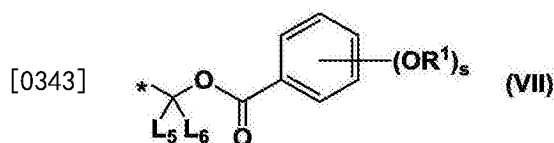
[0338] L^3 为C1-6亚烷基或C2-6亚链烯基,

[0339] L^4 为单键或-N(R^2)CO- (式中, R^2 为氢原子、C1-6烷基、C1-6卤代烷基或C2-6链烯基),

[0340] L^5 为氢原子或C1-6烷基,

[0341] L^6 为氢原子或C1-6烷基)

[0342] [化学式25]



[0344] (式中,*表示与准固相保护基所保护的基团的键合位置,

[0345] L^5 为氢原子或C1-6烷基,

[0346] L^6 为氢原子或C1-6烷基)

[0347] 准固相保护基进一步更优选为前述式(VII)表示的基团。

[0348] 式(I)、式(V)及(VI)中, L^1 优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚甲基或亚乙基。

[0349] 式(I)、式(V)及(VI)中, L^3 优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚甲基或亚乙基。

[0350] 式(I)、式(V)~式(VII)中, L^5 和 L^6 特别优选为氢原子。

[0351] 式(I)~式(VII)表示的准固相保护基的 R^1 优选为C10-30烷基或C10-30链烯基,更优选为C10-30烷基,进一步优选为C15-25烷基,进一步更优选为C15-20烷基,特别优选为十八烷基。

[0352] 式(I)~式(VII)表示的准固相保护基的 s 优选为2~4的整数,更优选为3。

[0353] 式(I)~式(VII)中, s 为2~5时,各 R^1 可以相同也可以不同。

[0354] (临时保护基)

[0355] 本发明中使用的所谓临时保护基,是指保护5'位羟基或3'位羟基的保护基,是在前述“延伸反应循环”中被脱保护的保护基。对于经脱保护而得到的5'位羟基或3'位羟基而言,在延伸反应循环中,经H-磷酸酯化之后,被应用于与其他核苷或寡核苷酸的结合。关于临时保护基,例如,可举出以下的文献中记载的那样的保护基。

[0356] Protective Groups in Organic Synthesis, Greene T.W.和Wuts P.G.M., Wiley Interscience出版,1999;以及Protecting Groups, Kocienski P.J., 1994, Georg Thieme Verlag。

[0357] (基本保护基)

[0358] 本发明中使用的所谓基本保护基,是指:保护核酸碱基中的氨基、羰基、羟基、或硫醇基、或者2'位羟基、3'位羟基或5'位羟基、或者磷酸二酯键的羟基或硫代磷酸二酯键的硫醇基的保护基,是在前述“延伸反应循环”中未被脱保护、并且不具有前述“准固相保护基”所具有的功能的一般的保护基。关于基本保护基,例如,可举出以下的文献中记载的保护基。

[0359] Protective Groups in Organic Synthesis, Greene T.W.和Wuts P.G.M., Wiley Interscience出版,1999;以及Protecting Groups, Kocienski P.J., 1994, Georg Thieme Verlag。

[0360] 可用于核酸碱基中的氨基、羟基、或硫醇基的基本保护基与前述核酸碱基中的“氨基的保护基”、前述核酸碱基中的“羟基的保护基”、前述核酸碱基中的“硫醇基的保护基”相同。

[0361] 关于可用于核酸碱基中的羰基的基本保护基,可举出苯氧基、2,5-二氯苯基、3-氯苯基、3,5-二氯苯基、2-甲酰基苯基、2-萘基、4-甲氧基苯基、4-氯苯基、2-硝基苯基、4-硝基苯基、4-乙酰基氨基苯基、五氟苯基、4-特戊酰氧基苄基烷基、4-硝基苄基烷基、2-(甲基磺酰基)乙基、2-(苯基磺酰基)乙基、2-氰基乙基、2-(三甲基甲硅烷基)乙基、二甲基氨基羰基、二乙基氨基羰基、N-甲基-N-苯基氨基甲酰基、1-吡咯烷基羰基、4-吗啉代羰基、N,N-二苯基氨基羰基等,按照前述的方法,可得到具有上述经保护的羰基的核苷酸或寡核苷酸。

[0362] 关于2'位羟基的基本保护基,作为 X^2 中的“被基本保护基保护的羟基”的基本保护基而在后文中说明。3'位羟基和5'位羟基的基本保护基作为 Z 中的“被基本保护基保护的羟

基”的基本保护基而在后文中说明。

[0363] 保护磷酸二酯键的羟基或硫代磷酸二酯键的硫醇基的基本保护基在后文中说明。

[0364] 被保护基保护的官能团(被准固相保护基保护的羟基及核酸碱基、被临时保护基保护的羟基、被基本保护基保护的羟基、氨基、硫醇基等)分别表示该官能团的氢原子被该保护基取代。

[0365] 本说明书中,“在4位碳原子进行桥连的有机基团”是指将糖的2'位与4'位桥连的有机基团,没有特别限制,例如表示作为C2-6亚烷基(该亚烷基为未取代、或被C1-6烷基取代。此处,该亚烷基的1个或2个亚甲基未被替换、或被替换为选自-O-、-NR¹¹- (R¹¹表示氢原子或C1-6烷基)、-S-、-CO-、-CS-、-COO-、-OCONR¹²- (R¹²表示氢原子或C1-6烷基)、-CONR¹³- (R¹³表示氢原子或C1-6烷基)及-CSNR¹⁴- (R¹⁴表示氢原子或C1-6烷基)中的基团)的桥连基团。

[0366] (寡核苷酸的制造方法)

[0367] 接下来,对本发明涉及的寡核苷酸的制造方法(以下,也称为“本发明的制造方法”)进行说明。具体而言,对用核苷或寡核苷酸(以下,也称为“p个聚合寡核苷酸”)从被准固相保护基保护的核苷或寡核苷酸(以下,也称为“n个聚合寡核苷酸”)延伸从而制造被准固相保护基保护的寡核苷酸(以下,也称为“n+p个聚合寡核苷酸”)的方法进行说明。需要说明的是,所谓n个聚合寡核苷酸,是指n个核苷介由含磷基团进行结合而成的寡核苷酸,n=1时,n个聚合寡核苷酸可理解为核苷,关于p个聚合寡核苷酸也同样。

[0368] 此处,n个聚合寡核苷酸具有2个以上核酸碱基部时,各核酸碱基部可以相同也可以不同,n个聚合寡核苷酸具有2个以上准固相保护基时,各准固相保护基可以相同也可以不同,n个聚合寡核苷酸具有2个以上基本保护基时,各基本保护基可以相同也可以不同,n个聚合寡核苷酸具有2个以上的在4位碳原子进行桥连的有机基团时,各在4位碳原子进行桥连的有机基团可以相同也可以不同。

[0369] 关于p个聚合寡核苷酸也同样。

[0370] 寡核苷酸的制造方法包括磷酸酯化工序,即,使在选自2'位、3'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、且5'位或3'位为羟基的核苷或寡核苷酸的该5'-羟基或3'-羟基进行H-磷酸酯化。

[0371] 另外,寡核苷酸的制造方法包括至少1个包括前述H-磷酸酯化工序的延伸反应循环。

[0372] 寡核苷酸的制造方法的特征在于,在延伸反应循环中包括下述工序:使具有准固相保护基的核苷或寡核苷酸的5'位羟基或3'位羟基进行H-磷酸酯化的工序。寡核苷酸的制造方法优选在延伸反应循环中包括以下的工序a~工序d。需要说明的是,对于工序a~工序d的顺序而言,按照工序a、工序b、工序c、工序d的顺序进行,或者按照工序a、工序d、工序b、工序c的顺序进行。优选的顺序为工序a、工序b、工序c、工序d的顺序。

[0373] (工序a)

[0374] 工序a是脱临时保护基工序,所述脱临时保护基工序包括:将在并非延伸末端的羟基、核酸碱基部和2'位中的至少一处具有准固相保护基、并且延伸末端的羟基被临时保护基保护的核苷或寡核苷酸的临时保护基除去而形成羟基。

[0375] (工序b)

[0376] 工序b是磷酸酯化工序,所述磷酸酯化工序包括:利用H-磷酸酯化试剂使将临时保护基除去而得到的羟基进行H-磷酸酯化。

[0377] (工序c)

[0378] 工序c是偶联工序,所述偶联工序包括:向在工序b中进行了H-磷酸酯化的核苷或寡核苷酸中添加具有羟基的核苷或寡核苷酸,介由该羟基通过亚磷酸二酯键而进行缩合。

[0379] (工序d)

[0380] 工序d是转化工序,所述转化工序包括:将形成的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键(磷酸三酯键)或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键(硫代磷酸-0,0,S-三酯键)等。

[0381] 此处,前述氨基磷酸二酯键的氨基为未取代、或者被1个或2个C1-6烷基取代。

[0382] 被基本保护基保护的磷酸二酯键是磷酸二酯键的1个羟基的氢原子被C1-40烷基、C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基、芳烷基或杂芳烷基等取代而得到的键。此处,前述C1-6烷基为未取代、或被卤素原子、氰基等取代。C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基、芳烷基及杂芳烷基为未取代、或被C1-6烷基、卤素原子、氰基等取代。

[0383] 被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键是硫代磷酸二酯键的1个硫醇基的氢原子被C1-40烷基、C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基、芳烷基或杂芳烷基等取代而得到的键。此处,前述C1-40烷基为未取代、或被卤素原子、氰基等取代。C3-6环烷基、C6-10芳基、5-10元杂芳基、芳烷基及杂芳烷基为未取代、或被C1-6烷基、卤素原子、氰基等取代。

[0384] 工序a中使用的具有准固相保护基的核苷或寡核苷酸中包含的核苷数n没有特别限制,只要为1以上的任意的整数即可,优选为1~50,更优选为1~30,进一步优选为1~20,进一步更优选为1~10,特别优选为1~5。

[0385] 工序c中使用的具有羟基的核苷或寡核苷酸中包含的核苷数p没有特别限制,只要为1以上的任意的整数即可,优选为1~50,更优选为1~30,进一步优选为1~20,进一步优选为1~5,进一步更优选为1~3,特别优选为1,即,特别优选使用核苷。

[0386] 需要说明的是,也可将工序d中得到的反应混合物直接用于工序a。另外,也可在工序d结束后,通过适当进行升温等而同时进行工序a。

[0387] 对于寡核苷酸的制造方法而言,可通过进一步包括下述工序e,从而简便且有效地将过量原料、副产物除去,将核苷或寡核苷酸纯化。

[0388] (工序e)

[0389] 工序e是分离工序,所述分离工序中,向在工序a~工序d中的任意工序中得到的反应混合物中添加极性溶剂,使具有准固相保护基的核苷或寡核苷酸沉淀,通过固液分离而获得。

[0390] 需要说明的是,工序e不能在不使用准固相保护基的通常的液相合成法中、或固相合成法中存在,是使用准固相保护基的液相合成法中特有的工序。

[0391] 延伸反应循环中包括的工序e的数目没有特别限制。在工序a~工序d中的任意工序之后均可进行工序e。

[0392] 在工序a~工序d的各工序之后,各自独立地包括例如0~5次、优选0~3次、更优选0~2次、进一步优选0或1次工序e。此处,在工序a~工序d中的至少一者之后包括1次以上的工序e。

[0393] 优选在延伸反应循环中包括1~4次工序e。从能严格地管理・控制副产物的生成、诱导产生高纯度的寡核苷酸这样的观点考虑,优选的是,在延伸反应循环中,在工序a之后、工序b之后和工序d之后中的至少一者,各包括1次工序e。更优选的是,在延伸反应循环中,在工序b之后包括1次工序e,或在工序d之后包括1次工序e,或在工序b和工序d之后各包括1次工序e。

[0394] 作为其他方式,更优选的是,在延伸反应循环中,在工序a之后包括1次工序e,或在工序b之后包括1次工序e,或在工序a和工序b之后各包括1次工序e,进一步优选的是,在延伸反应循环中,在工序a和工序b之后各包括1次工序e。

[0395] 如果是能通过原料的当量管理和对反应的控制来控制副产物的产生量的情况,则优选在将工序a~工序d作为基本单位而反复进行之后,进行工序e。

[0396] 寡核苷酸的制造方法还可包括工序f。由此,能分离・制造所期望的寡核苷酸。

[0397] (工序f)

[0398] 工序f是将工序a~工序e中得到的寡核苷酸的基本保护基、临时保护基及准固相保护基全部除去的脱保护工序。

[0399] 对于寡核苷酸的制造方法而言,根据寡核苷酸的延伸方向,主要可分为方法A或方法B。方法A中,通过工序a~工序c将5'位的羟基转化,在5'位延伸核苷或寡核苷酸。方法B中,通过工序a~工序c将3'位的羟基转化,在3'位延伸核苷或寡核苷酸。

[0400] 方法A是包括下述工序的寡核苷酸的制造方法:

[0401] 第一工序(工序a),所述第一工序包括:将在选自2'位、3'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、在3'位具有被基本保护基或准固相保护基保护的羟基、且在5'位具有被临时保护基保护的羟基的第一核苷或第一寡核苷酸的临时保护基除去,生成5'-羟基;

[0402] 第二工序(工序b),所述第二工序包括:使用H-磷酸酯化试剂使生成的5'-羟基进行H-磷酸酯化;

[0403] 第三工序(工序c),所述第三工序中,由经H-磷酸酯化的5'-羟基、和在3'位具有羟基且在5'位具有被临时保护基保护的羟基的第二核苷或第二寡核苷酸的3'-羟基形成亚磷酸二酯键,从而得到第一核苷或第一寡核苷酸、与第二核苷或第二寡核苷酸的结合体;以及

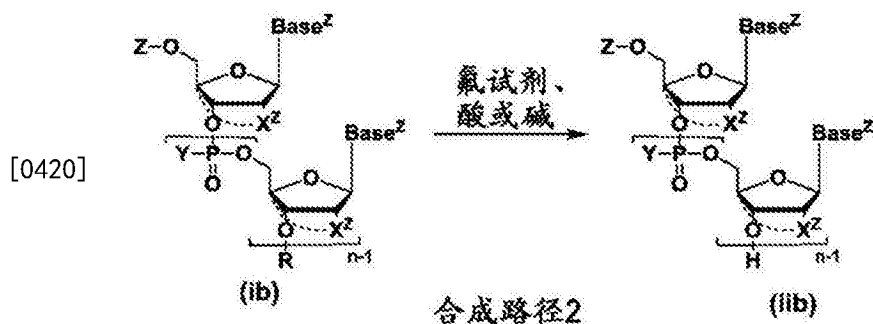
[0404] 第四工序(工序d),所述第四工序包括:将结合体的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键、或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键。

[0405] 方法B是包括下述工序的寡核苷酸的制造方法:

[0406] 第七工序(工序a),所述第七工序包括:将在选自2'位、5'位和核酸碱基部中的至少一处具有准固相保护基、在5'位具有被基本保护基或准固相保护基保护的羟基、且在3'位具有被临时保护基保护的羟基的第三核苷或第三寡核苷酸的临时保护基除去而生成3'-羟基;

[0407] 第八工序(工序b),所述第八工序包括:使用H-磷酸酯化试剂使生成的3'-羟基进行H-磷酸酯化;

[0408] 第九工序(工序c),所述第九工序包括:由经H-磷酸酯化的3'-羟基、和在5'位具有羟基且在3'位具有被临时保护基保护的羟基的第四核苷或第四寡核苷酸的5'-羟基形成亚



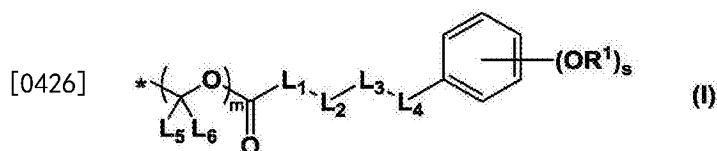
[0421] 准固相保护基优选包含在Base^Z和Z中的至少一者中,更优选包含在Z中。

[0422] Z优选为基本保护基或准固相保护基,更优选为准固相保护基。

[0423] X^Z或Z中包含的优选的准固相保护基为前述的式(I)~(VII)表示的基团,而且优选的方式也同样。

[0424] Base^Z中包含的准固相保护基优选为m为1的下述式(I)表示的基团、或m为0且L¹、L²、L³和L⁴中的单键的数目为0~3的下述式(I)表示的基团。

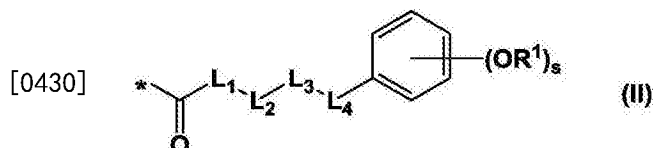
[0425] [化学式28]



[0427] 式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(I)中的定义相同,而且优选的方式也同样。

[0428] Base^Z中包含的准固相保护基更优选为L¹、L²、L³和L⁴中的单键的数目为0~3的下述式(II)表示的基团。

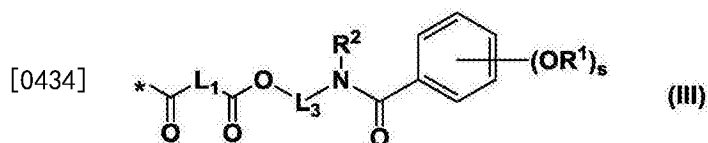
[0429] [化学式29]



[0431] 式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(II)中的定义相同,而且优选的方式也同样。

[0432] Base^Z中包含的准固相保护基进一步优选为下述式(III)表示的基团。

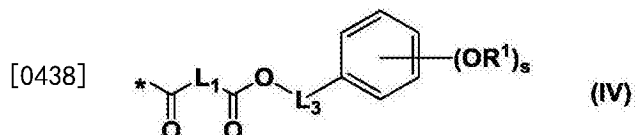
[0433] [化学式30]



[0435] 式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(II)中的定义相同。

[0436] 另外,Base^Z中包含的准固相保护基进一步优选为下述式(IV)表示的基团。

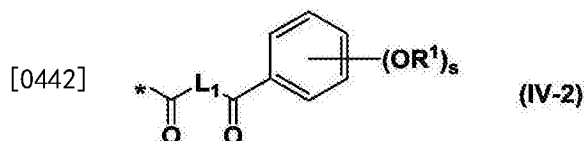
[0437] [化学式31]



[0439] 式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(IV)中的定义相同。

[0440] 另外, X^Z 或Z中包含的准固相保护基进一步优选为下述式(IV-2)表示的基团。

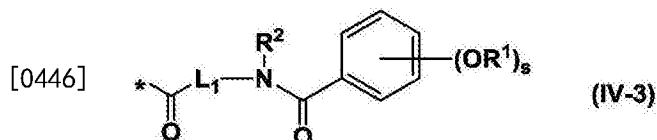
[0441] [化学式32]



[0443] 式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(IV-2)中的定义相同。

[0444] 另外, X^Z 或Z中包含的准固相保护基进一步优选为下述式(IV-3)表示的基团。

[0445] [化学式33]



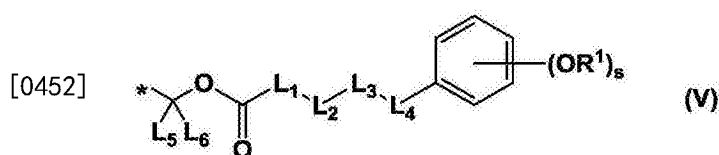
[0447] 式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(IV-3)中的定义相同。

[0448] Base^Z 中包含的式(II)~式(IV-3)表示的准固相保护基的 L^1 优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚乙基。

[0449] Base^Z 中包含的式(II)~式(IV)表示的准固相保护基的 L^3 优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚甲基或亚乙基。

[0450] 作为其他方式, Base^Z 中包含的准固相保护基优选为下述式(V)表示的基团。

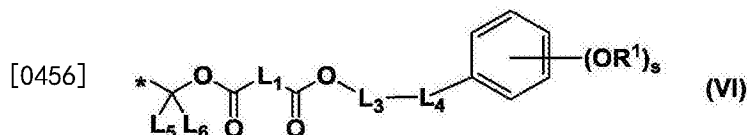
[0451] [化学式34]



[0453] 式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(V)中的定义相同,优选的方式也同样。

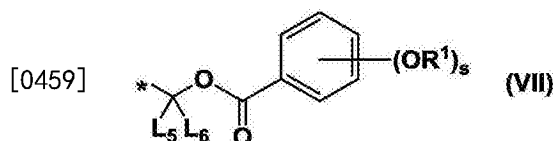
[0454] Base^Z 中包含的准固相保护基进一步优选为下述式(VI)表示的基团或下述式(VII)表示的基团。

[0455] [化学式35]



[0457] (式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(VI)中的定义相同)

[0458] [化学式36]



[0460] (式中,*表示与核酸碱基部的键合位置,其他符号与前述式(VII)中的定义相同)

[0461] Base^Z 中包含的准固相保护基进一步更优选为前述式(VII)表示的基团。

[0462] Base^z中包含的式(I)、式(V)或(VI)表示的准固相保护基的L¹优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚甲基或亚乙基。

[0463] Base^z中包含的式(I)、式(V)或(VI)表示的准固相保护基的L³优选为C1-6亚烷基,特别优选为亚甲基或亚乙基。

[0464] Base^z中包含的式(I)、式(V)~式(VII)表示的准固相保护基的L⁵和L⁶特别优选为氢原子。

[0465] Base^z中包含的式(I)~式(VII)表示的准固相保护基的R¹优选为C10-30烷基或C10-30链烯基,更优选为C10-30烷基。

[0466] Base^z中包含的式(I)~式(VII)表示的准固相保护基的s优选为2~4的整数,更优选为3。

[0467] 式(I)~式(VII)中,s为2~5时,各R¹可以相同也可以不同。

[0468] m=1的式(I)、式(V)~式(VII)表示的准固相保护基被导入至胸腺嘧啶或尿嘧啶时特别有用。

[0469] 对于可用于寡核苷酸的延伸末端的羟基的临时保护基R而言,只要是可用氟试剂、酸或碱脱保护、且可作为羟基的保护基使用的基团即可,没有特别限制。作为可用氟试剂脱保护的临时保护基R,可举出甲硅烷基(叔丁基二甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三甲基甲硅烷基等)。作为可用酸脱保护的临时保护基R,可举出咕吨基(9-(9-苯基)咕吨基、9-苯基硫基咕吨基等)、烷氧基烷基(1-甲氧基-1-甲基乙基、1,3-二氧杂环戊烷-2-基、1,3-苯并二氧杂环戊烯-2-基等)、烷基硫基烷基(1,3-二硫杂环戊烷-2-基、1,3-苯并二硫杂环戊烯(benzodithiol)-2-基)、烷氧基羰基(叔丁基氧基羰基等)、及三芳基甲基(三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、单甲氧基三苯甲基等)等。作为可用碱脱保护的临时保护基R,可举出乙酰丙酰基、3-苯甲酰基丙酰基。优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、三苯甲基、9-(9-苯基)咕吨基、9-苯基硫基咕吨基、1,1-双(4-甲氧基苯基)-1-苯基甲基(二甲氧基三苯甲基)、1-(4-甲氧基苯基)-1,1-二苯基甲基(单甲氧基三苯甲基)。这些中,从脱保护的容易性、获得的容易性的观点考虑,优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、单甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基,更优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、二甲氧基三苯甲基,特别优选为二甲氧基三苯甲基。叔丁基二甲基甲硅烷基也是特别优选的。

[0470] 作为X^z中的“被基本保护基保护的羟基”的基本保护基,可举出例如PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS,第3版,JOHN WILLY&SONS出版(1999年)等中记载的保护基。具体而言,可举出烷基(甲基、叔丁基等)、芳基甲基(苄基、对甲氧基苄基等)、二芳基甲基(二苯基甲基等)、烷氧基烷基(甲氧基甲基、甲氧基乙基、乙氧基乙基、氰基乙氧基甲基等)、2-四氢吡喃基、氰基乙基、氨基甲酰基(苯基氨基甲酰基、1,1-二氧化硫代吗啉-4-硫代氨基甲酰基等)、酰基(乙酰基、特戊酰基、苯甲酰基、乙酰丙酰基、3-苯甲酰基丙酰基等)、甲硅烷基(三异丙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基等)、[(三异丙基甲硅烷基)氧基]甲基(Tom)基、1-(4-氯苯基)-4-乙氧基哌啶-4-基(Cpep)基等。这些中,优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、或叔丁基二苯基甲硅烷基,更优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基。作为其他方式,优选为乙酰丙酰基或3-苯甲酰基丙酰基,更优选为乙酰丙酰基。

[0471] X^z优选为氢原子、羟基、被基本保护基保护的羟基或在4位碳原子进行桥连的有机

基团,更优选为氢原子、羟基、或者被C1-6烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基或叔丁基二苯基甲硅烷基保护的羟基,进一步优选为氢原子或被三异丙基甲硅烷基保护的羟基。此处,前述C1-6烷基为未取代、或被选自C1-6烷氧基羰基、单C1-6烷基氨基羰基、二C1-6烷基氨基羰基中的基团取代。

[0472] 作为其他方式, X^z 更优选为C2-6亚烷基(该亚烷基为未取代、或被甲基取代。此处,该亚烷基的1个或2个亚甲基未被替换、或被替换为选自-O-、-NR¹¹- (R¹¹表示氢原子或甲基)、-CO-、-CS-、-COO-、-OCONR¹²- (R¹²表示氢原子或甲基)、-CONR¹³- (R¹³表示氢原子或甲基)及-CSNR¹⁴- (R¹⁴表示氢原子或甲基)中的基团)表示的在4位碳原子进行桥连的有机基团。 X^z 更优选为亚乙基(该亚乙基的1个或2个亚甲基未被替换、或者被替换为选自-O-、-CONR¹³- (R¹³表示氢原子或甲基)及-CSNR¹⁴- (R¹⁴表示氢原子或甲基)中的基团)表示的在4位碳原子进行桥连的有机基团。

[0473] 作为Z中的基本保护基,可举出作为 X^z 中的“被基本保护基保护的羟基”的基本保护基而列举的基本保护基。

[0474] 其中,优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、乙酰丙酰基或3-苯甲酰基丙酰基,更优选为乙酰丙酰基或3-苯甲酰基丙酰基,进一步优选为乙酰丙酰基。

[0475] 作为 X^z 或Z中的基本保护基,可使用在将临时保护基脱保护的条件下不发生脱保护的保护基。例如,在使用可用酸脱保护的临时保护基的情况下,可使用在前述临时保护基中列举的保护基中的、不能用酸脱保护但能用碱或氟试剂脱保护的保护基作为基本保护基。反之,在使用可用碱脱保护的临时保护基的情况下,可使用在前述临时保护基中列举的保护基中的、不能用碱脱保护但能用酸或氟试剂脱保护的保护基作为基本保护基。另外,在使用可用氟试剂脱保护的临时保护基的情况下,可使用在前述临时保护基中列举的保护基中的、不能用氟试剂脱保护但能用酸或碱脱保护的保护基作为基本保护基。

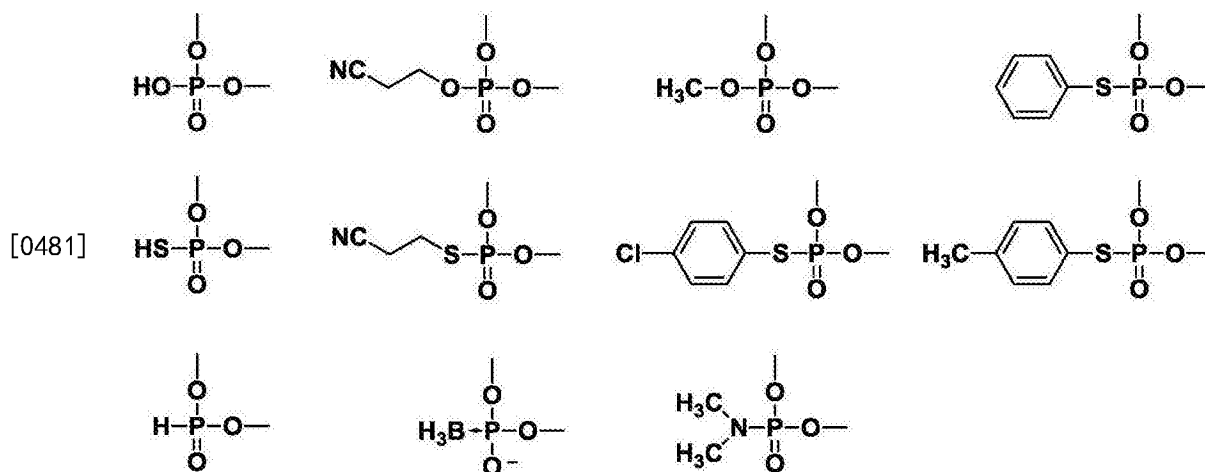
[0476] 例如, X^z 或Z中的基本保护基为乙酰丙酰基或3-苯甲酰基丙酰基等时,临时保护基优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基等甲硅烷基、或三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、单甲氧基三苯甲基等三芳基甲基。

[0477] 临时保护基为乙酰丙酰基或3-苯甲酰基丙酰基等时, X^z 或Z中的基本保护基优选为叔丁基二甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基等甲硅烷基、或三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、单甲氧基三苯甲基等三芳基甲基。尤其是在方法B的情况下,也可将乙酰丙酰基或3-苯甲酰基丙酰基等作为临时保护基使用。

[0478] Y分别独立地表示氢原子、羟基、被保护的羟基、硫醇基、被保护的硫醇基、氢化硼、单C1-6烷基氨基或二C1-6烷基氨基。被保护的羟基与在后述的工序d中转化的“被基本保护基保护的磷酸二酯键”中取代羟基的基团同样。被保护的硫醇基与在后述的工序d中转化的“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键”中取代硫醇基的基团同样。

[0479] Y分别独立地优选为氢原子、羟基、硫醇基或2-氰基乙氧基,更优选为羟基或硫醇基。包含Y的磷官能团例如具有以下的结构(或在以下的结构上形成盐而得到的结构)。

[0480] [化学式37]



[0482] 工序a在不对反应造成影响的溶剂中进行。在该溶剂中的溶解度越高,越可期待优异的反应性,因此,优选选择目标化合物的溶解度高的低极性溶剂。具体而言,可举出氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷等卤素系溶剂;苯、甲苯、二甲苯、均三甲苯等芳香族系溶剂;乙酸乙酯、乙酸异丙酯等酯系溶剂;己烷、戊烷、庚烷、辛烷、壬烷、环己烷等脂肪族系溶剂;四氢呋喃、乙醚、环戊基甲基醚、叔丁基甲基醚等醚系溶剂。这些溶剂可以以任意的比例混合2种以上而使用。另外,也可以以任意的比例在上述低极性溶剂中混合吡啶等含氮芳香族系溶剂、乙腈、丙腈等腈系溶剂、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮等酰胺系溶剂等极性溶剂而使用,只要n个聚合寡核苷酸能溶解即可。其中,工序a中使用的溶剂优选为二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、苯、甲苯、二甲苯、均三甲苯、己烷、戊烷、庚烷、壬烷、环己烷、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、叔丁基甲基醚、环戊基甲基醚、或它们的组合,特别优选为二氯甲烷、四氢呋喃。

[0483] 工序a中的n个聚合寡核苷酸在溶剂中的浓度没有特别限制,只要溶解即可,优选为1~30重量%。

[0484] 作为工序a中可使用的氟试剂、酸或碱,没有特别限制,只要能达成临时保护基的良好脱保护即可。

[0485] 作为氟试剂,优选氟化氢吡啶盐、四丁基氟化铵、氟化氢的三乙胺盐、氢氟酸、氟化铵、氟化铵的氟化氢加成物、氟化钾或氟化钾的氟化氢加成物,其中,更优选氟化氢吡啶盐或四丁基氟化铵,特别优选氟化氢吡啶盐。

[0486] 作为酸,优选为三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、盐酸、乙酸、硝酸铵铈、膦酸或磷酸,其中,更优选为三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、盐酸、乙酸或硝酸铵铈,进一步优选为三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸或对甲苯磺酸,特别优选为二氯乙酸或膦酸。三氟乙酸或对甲苯磺酸也是特别优选的。

[0487] 作为碱,可举出胍衍生物(胍一水合物、乙酸胍、硫酸胍、乙酰胍、胍基甲酸甲酯、苯基胍、对甲苯磺酰胍等)、乙二胺衍生物(乙二胺等)及无机碱(碳酸钾等)等。作为碱,优选胍衍生物,更优选胍一水合物。

[0488] 对于这些氟试剂、酸及碱而言,可用上述低极性溶剂进行稀释而使用。另外,除了氟试剂、酸及碱以外,也可利用Chirazyme L-2、Chirazyme L-5等酶进行脱保护。

[0489] 关于工序a中的氟试剂、酸或碱的使用量,相对于n个聚合寡核苷酸1摩尔而言,可

使用1~100摩尔,优选为1~40摩尔,更优选为1~30摩尔,进一步优选为5~30摩尔。

[0490] 工序a的反应温度没有特别限制,只要使反应进展即可,优选为-10℃~60℃,更优选为0℃~50℃,进一步优选为0℃~30℃。反应时间根据使用的n个聚合寡核苷酸的种类、氟试剂、酸或碱的种类、溶剂的种类、反应温度等的不同而不同,优选为5分钟~50小时,更优选为5分钟~12小时,更优选为30分钟~6小时。

[0491] 被用作脱保护剂的氟试剂、酸或碱若在后述的工序c的偶联反应中存在,则诱发p个聚合寡核苷酸(iv)的5'位或3'位羟基的临时保护基R的脱保护,因此,需要利用猝灭处理将其除去。对于猝灭处理而言,在脱保护剂为氟试剂或酸的情况下,利用硅试剂或有机碱进行,在脱保护剂为前述碱的情况下,利用酮化合物进行。

[0492] 作为猝灭处理中可使用的硅试剂,没有特别限制,只要能将前述氟试剂猝灭即可,优选为六甲基二硅氧烷[TMS₂O]、三甲基氯硅烷[TMSCl]、六甲基二硅氮烷、三甲基溴硅烷、三甲基碘硅烷、三氟甲磺酸三甲基甲硅烷基酯、三乙基氯硅烷、三异丙基氯硅烷、叔丁基二甲基氯硅烷、叔丁基二苯基氯硅烷、苯基二甲基氯硅烷、二苯基甲基氯硅烷、三苯基氯硅烷,更优选为TMS₂O、TMSCl,特别优选为TMS₂O。

[0493] 作为猝灭处理中可使用的有机碱,没有特别限制,只要能将前述的酸中和即可,优选为吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、苯并咪唑、1,2,4-三唑、N-苯基咪唑、2-氨基-4,6-二甲基嘧啶、1,10-菲咯啉、咪唑、N-甲基咪唑、2-氯苯并咪唑、2-溴苯并咪唑、2-甲基咪唑、2-苯基苯并咪唑、N-苯基苯并咪唑、5-硝基苯并咪唑,更优选为吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、苯并咪唑、1,2,4-三唑、N-苯基咪唑、N-甲基咪唑、2-氨基-4,6-二甲基嘧啶、1,10-菲咯啉,特别优选为吡啶。

[0494] 作为猝灭处理中可使用的酮化合物,没有特别限制,只要能消耗前述的碱即可,可举出乙酰丙酮、丙酮等,优选为乙酰丙酮。

[0495] 关于工序a中的猝灭处理中可使用的硅试剂、有机碱或酮化合物的使用量,相对于氟试剂、酸或碱1摩尔而言,例如为0.01~100摩尔,优选为0.1~50摩尔,更优选为1~20摩尔,进一步优选为1~3摩尔。

[0496] 为了在液相中连续地进行工序a、随后的工序b,优选在工序a中的临时保护基R的脱保护反应中、或脱保护反应后添加阳离子捕捉剂。在并非连续地进行工序a和工序b的情况下,可以添加阳离子捕捉剂,也可以不添加阳离子捕捉剂。

[0497] 作为阳离子捕捉剂,没有特别限制,只要不进行由被除去的保护基R而导致的再保护(恢复为原料)、不进行向被脱保护的官能团的副反应即可,可使用吡咯、2-甲基吡咯、3-甲基吡咯、2,3-二甲基吡咯、2,4-二甲基吡咯等吡咯衍生物;吡啶、4-甲基吡啶、5-甲基吡啶、6-甲基吡啶、7-甲基吡啶、5,6-二甲基吡啶、6,7-二甲基吡啶等吡啶衍生物。从可得到良好的阳离子捕捉效果这样的观点考虑,优选为吡咯、3-甲基吡咯、2,4-二甲基吡咯、吡啶、4-甲基吡啶、5-甲基吡啶、6-甲基吡啶、7-甲基吡啶、5,6-二甲基吡啶、6,7-二甲基吡啶,更优选为吡咯、3-甲基吡咯、吡啶,进一步优选为吡咯、吡啶,特别优选为吡咯。

[0498] 关于前述阳离子捕捉剂的使用量,相对于n个聚合寡核苷酸(ia或ib)1摩尔而言,例如为1~50摩尔,优选为1~15摩尔,更优选为1~3摩尔。

[0499] 在工序a之后,可实施工序b或工序d。在工序b或工序d之前,根据需要,可利用分液处理、溶剂蒸馏去除而置换成工序b或工序d中使用的溶剂,可进行工序e而进行n个聚合寡

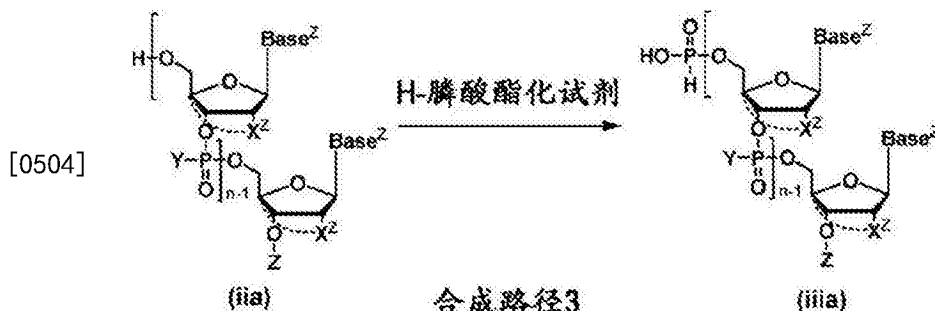
核苷酸的5'位羟基的脱保护体(iia)或3'位羟基的脱保护体(iib)的分离等。

[0500] (工序b)(磷酸酯化工序)

[0501] 首先,将方法A或方法B的各情况下的工序b示于合成路径3或4。

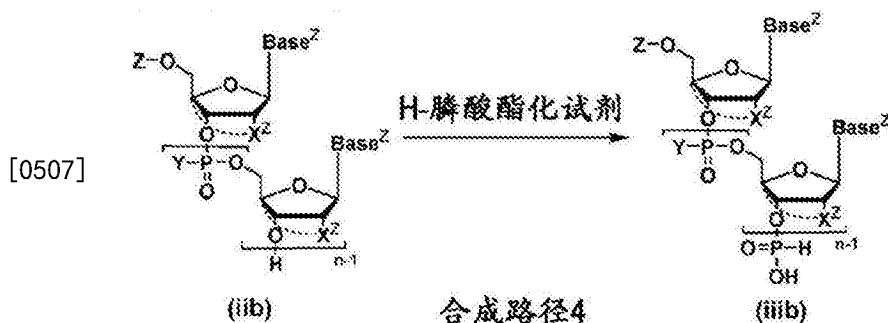
[0502] 方法A中的工序b是使方法A中的前述工序a或后述的工序d中得到的n个聚合寡核苷酸的5'位羟基的脱保护体(iia)的5'位羟基进行H-磷酸酯化的工序(下述合成路径3)。合成路径3中,各符号的含义与前述定义相同。

[0503] [化学式38]



[0505] 方法B中的工序b是使方法B中的前述工序a或后述的工序d中得到的n个聚合寡核苷酸的3'位羟基的脱保护体(iib)的3'位羟基进行H-磷酸酯化的工序(下述合成路径4)。合成路径4中,各符号的含义与前述定义相同。

[0506] [化学式39]



[0508] 关于工序b中可使用的溶剂,具体而言,可举出与前述工序a同样的溶剂。其中,优选为二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、苯、甲苯、二甲苯、均三甲苯、己烷、戊烷、庚烷、壬烷、环己烷、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、叔丁基甲基醚、环戊基甲基醚、或它们的组合,进一步优选为吡啶、二氯甲烷,特别优选为吡啶。

[0509] 在工序b中使用吡啶等含氮芳香族系溶剂以外的溶剂的情况下,优选添加吡啶等亲核试剂。作为亲核试剂,没有特别限制,只要能达成良好的H-磷酸酯化即可,具体而言,可举出吡啶、2,6-二叔丁基吡啶、2-甲基吡啶、3-甲基吡啶、4-甲基吡啶、3,4-二甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、2,4-二甲基吡啶、3,5-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、4-乙酰基吡啶、N,N-二甲基氨基吡啶、2-氰基吡啶、3-氰基吡啶、4-氰基吡啶、2-氯吡啶、3-氯吡啶、4-氯吡啶、2-甲氧基吡啶、3-甲氧基吡啶、4-甲氧基吡啶、甲基吡啶酸乙酯、烟酸乙酯、异烟酸乙酯等吡啶系亲核试剂;(S,S)-2,6-双(4-异丙基-2-噁唑啉-2-基)吡啶、(R,R)-2,6-双(4-苯基-2-噁唑啉-2-基)吡啶等Pybox系亲核试剂、喹啉、奎宁、奎尼丁、辛可宁等喹啉系亲核试剂、N-甲基咪唑、咪唑、2-甲基吡嗪、3-甲基吡嗪、1,10-菲咯啉等含氮芳香族系亲核试剂;4-甲氧基吡啶-N-氧化物等N-氧化物系亲核试剂;N,N-二甲基苯胺等苯胺系亲核试剂;1,3-二叔丁基

咪唑-2-叉 (ylidene)、1,3-二均三甲苯基咪唑-2-叉等N-杂环卡宾系亲核试剂;三苯基膦、亚磷酸三甲酯等磷系亲核试剂;三乙胺、1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷等脂肪族胺系亲核试剂等。其中,优选吡啶、2-甲基吡啶、4-甲基吡啶、3,4-二甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶、N,N-二甲基氨基吡啶、3-甲氧基吡啶、4-甲氧基吡啶、(S,S)-2,6-双(4-异丙基-2-噁唑啉-2-基)吡啶、(R,R)-2,6-双(4-苯基-2-噁唑啉-2-基)吡啶、喹啉、奎尼丁、N-甲基咪唑、3-甲基哒嗪、4-甲氧基吡啶-N-氧化物,特别优选吡啶。

[0510] 关于工序b中的亲核试剂的使用量,没有特别限制,相对于n个聚合寡核苷酸(ia或ib)1摩尔而言,例如为1~300摩尔,优选为1~100摩尔,更优选为1~40摩尔。

[0511] 工序b中可使用的H-膦酸酯化试剂没有特别限制,只要能达成良好的H-膦酸酯化即可,可举出亚磷酸、亚磷酸二芳基酯(亚磷酸二苯酯等)、芳基-H-膦酸酯的铵盐(苯基-H-膦酸酯的三乙基铵盐、对甲苯甲酰基-H-膦酸酯的三乙基铵盐等)、卤化磷(2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮、三氯化磷等)等。其中,优选亚磷酸、亚磷酸二苯酯、苯基-H-膦酸酯的三乙基铵盐、对甲苯甲酰基-H-膦酸酯的三乙基铵盐、2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮、三氯化磷,更优选亚磷酸、亚磷酸二苯酯。

[0512] 在使用亚磷酸、芳基-H-膦酸酯的铵盐作为H-膦酸酯化试剂的情况下,优选添加缩合剂。作为该缩合剂,可举出在H-膦酸酯法中通常使用的缩合剂,具体而言,可举出2,2-二甲基丁酰氯、异丁酰氯、特戊酰氯、乙酰氯、1-金刚烷基氯(1-adamantyl chloride)、氯磷酸二苯酯、2,4,6-三异丙基苯磺酰氯、2-(苯甲酰基三唑-1-基氧基)-1,3-二甲基-2-吡咯烷-1-基-1,3,2-二氮杂磷杂环戊烷六氟化物[BOMP]、N,N-双(2-噁唑烷基)次磷酰氯[BopCl]、苯甲酰氯、苯甲酸酐、碳酸二苯酯、碳酸二对硝基苯基酯、碳酸双五氟苯基酯等碳酸二芳基酯等。其中,优选2,2-二甲基丁酰氯、异丁酰氯、1-金刚烷基氯、氯磷酸二苯酯、2,4,6-三异丙基苯磺酰氯、BopCl,更优选2,2-二甲基丁酰氯。

[0513] 在使用亚磷酸二芳基酯或芳基-H-膦酸酯的铵盐作为H-膦酸酯化试剂的情况下,通过在反应结束后用水和三乙胺等叔胺进行处理,可转化为H-膦酸酯基。

[0514] 关于工序b中的H-膦酸酯化试剂的使用量,相对于n个聚合寡核苷酸(ia或ib)1摩尔而言,优选为1~100摩尔,更优选为1~40摩尔,进一步优选为10~40摩尔。

[0515] 关于工序b中的缩合剂的使用量,相对于n个聚合寡核苷酸(ia或ib)1摩尔而言,优选使用1~100摩尔,更优选为1~40摩尔,进一步优选为10~30摩尔。

[0516] 工序b的反应温度没有特别限制,只要使反应进展即可,优选为-10℃~60℃,更优选为20℃~50℃。反应时间根据使用的n个聚合寡核苷酸的种类、溶剂的种类、亲核试剂的种类、H-膦酸酯化试剂的种类、缩合剂的种类、反应温度等的不同而不同,优选为5分钟~24小时,更优选为10分钟~12小时,更优选为30分钟~6小时。

[0517] 在工序b之后,可实施工序c。在工序c之前,根据需要,可利用分液处理、溶剂蒸馏去除而置换成工序c中使用的溶剂,或者,可利用工序e而进行n个聚合寡核苷酸的5'位H-膦酸酯体(iia)或3'位H-膦酸酯体(ib)的分离。

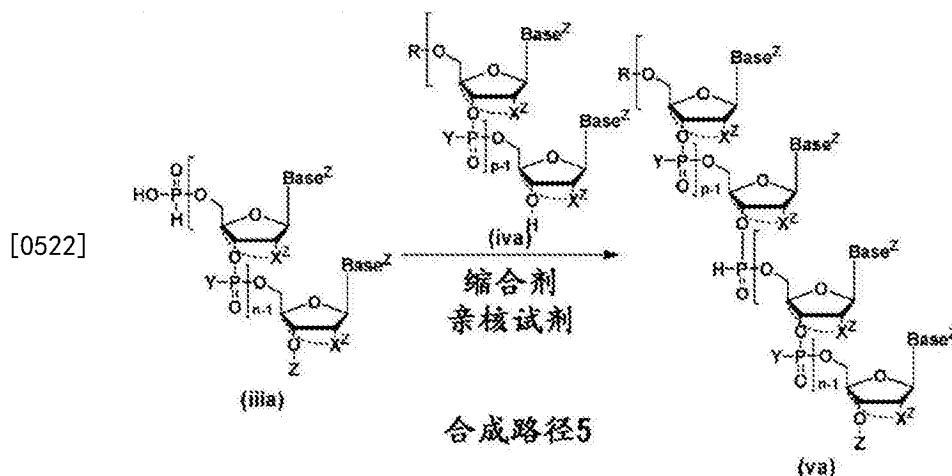
[0518] (工序c)(偶联工序)

[0519] 首先,将方法A或方法B的各情况下的(工序c)示于合成路径5或6。

[0520] 方法A中的(工序c)是使前述方法A中的(工序b)中得到的n个聚合寡核苷酸的5'位羟基的H-膦酸酯体(iia)、与5'位羟基被临时保护基R保护并且具有3'位羟基的p个聚合寡

核苷酸 (iva) (式中, p 表示 1 以上的任意的整数, $p=1$ 时, 表示核苷。) 缩合的工序 (合成路径 5)。

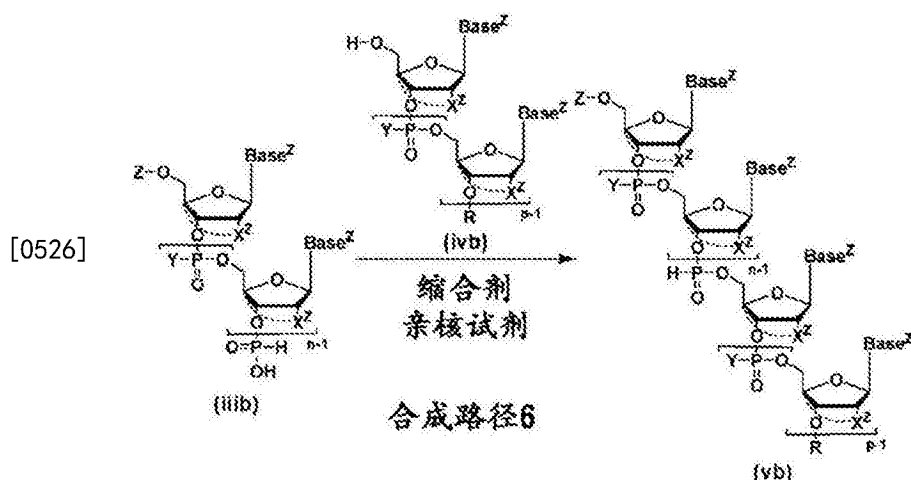
[0521] [化学式 40]



[0523] 式中, p 表示 1 以上的任意的整数, 其他符号的含义与前述定义相同, 在化合物 (iva) 中的 Base^Z 和 X^Z 中的至少一者中可以包含准固相保护基, 也可不包含准固相保护基。具有 2 个以上核酸碱基部的情况、具有 2 个以上准固相保护基的情况、及具有 2 个以上基本保护基的情况也与前述定义同样。

[0524] 方法 B 中的工序 c 是使前述方法 B 中的工序 b 中得到的 n 个聚合寡核苷酸的 3' 位羟基的 H-磷酸酯体 (iiib)、与 3' 位羟基被临时保护基 R 保护并且具有 5' 位羟基的 p 个聚合寡核苷酸 (ivb) (式中, p 表示 1 以上的任意的整数, $p=1$ 时, 表示核苷。) 缩合的工序 (合成路径 6)。合成路径 6 中, 各符号的含义与前述定义相同, 在化合物 (ivb) 中的 Base^Z 和 X^Z 中的至少一者中可以包含准固相保护基, 也可不包含准固相保护基。

[0525] [化学式 41]



[0527] 关于工序 c 中可使用的溶剂, 具体而言, 可举出与前述工序 a 同样的溶剂。其中, 优选吡啶、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯等, 特别优选吡啶。

[0528] 在工序 c 中使用吡啶等含氮芳香族系溶剂以外的溶剂的情况下, 优选添加吡啶等亲核试剂。作为亲核试剂, 没有特别限制, 只要能达成良好的偶联反应即可, 具体而言, 可举出与前述工序 b 同样的亲核试剂, 特别优选吡啶。

[0529] 相对于工序b中得到的n个聚合寡核苷酸的H-磷酸酯体(iiaa或iibb)1摩尔而言,工序c中使用的前述亲核试剂例如为1~100摩尔,优选为1~20摩尔,进一步优选为1~10摩尔。

[0530] 关于工序c中使用的p个聚合寡核苷酸(iva或ivb)的使用量,相对于工序b中得到的n个聚合寡核苷酸的H-磷酸酯体(iiaa或iibb)1摩尔而言,优选为1~10摩尔,更优选为1~5摩尔,进一步优选为1~3摩尔,特别优选为1~1.5摩尔。

[0531] 关于工序c中可使用的缩合剂,没有特别限制,只要能使偶联反应良好地进行即可,具体而言,可举出与前述工序b同样的缩合剂。其中,优选2,2-二甲基丁酰氯、异丁酰氯、1-金刚烷基氯、氯磷酸二苯酯、2,4,6-三异丙基苯磺酰氯、双(2-氧代-3-噁唑烷基)次磷酰氯、碳酸双五氟苯基酯等,特别优选2,2-二甲基丁酰氯或碳酸双五氟苯基酯。

[0532] 相对于工序b中得到的n个聚合寡核苷酸的H-磷酸酯体(iiaa或iibb)1摩尔而言,工序c中使用的缩合剂例如为1~200摩尔,优选为1~100摩尔,更优选为1~50摩尔。

[0533] 工序c的反应温度没有特别限制,只要使反应进展即可,优选为-10℃~60℃,更优选为0℃~50℃,进一步优选为0℃~30℃。反应时间根据使用的n个聚合寡核苷酸的种类、溶剂的种类、亲核试剂的种类、缩合剂的种类、反应温度等的不同而不同,优选为1分钟~12小时,更优选为2分钟~6小时,进一步优选为5分钟~3小时。

[0534] 在合成路径5或6中残留有式(iva或ivb)表示的化合物或其盐、或者在合成路径3或4中残留有式(iia或iib)表示的化合物或其盐的情况下,可根据需要而在工序c的反应之后对得到的溶液实施封端反应(capping reaction)。对于封端反应而言,可使用乙酸酐、苯甲酸酐等酸酐,或除了前述的缩合剂以外,还使用甲基-H-磷酸酯的三乙基铵盐、乙基-H-磷酸酯的三乙基铵盐、异丙基-H-磷酸酯的三乙基铵盐及2-氰基乙基-H-磷酸酯的三乙基铵盐等烷基-H-磷酸酯的铵盐,利用通常的方法实施。

[0535] 需要说明的是,所谓封端反应,是指将在偶联反应、氧化反应后残留的具有羟基的化合物的羟基转化为不能使核苷或寡核苷酸延伸的取代基的反应。

[0536] 封端反应可在后述的工序d之后实施。封端反应优选在工序c或工序d之后实施。

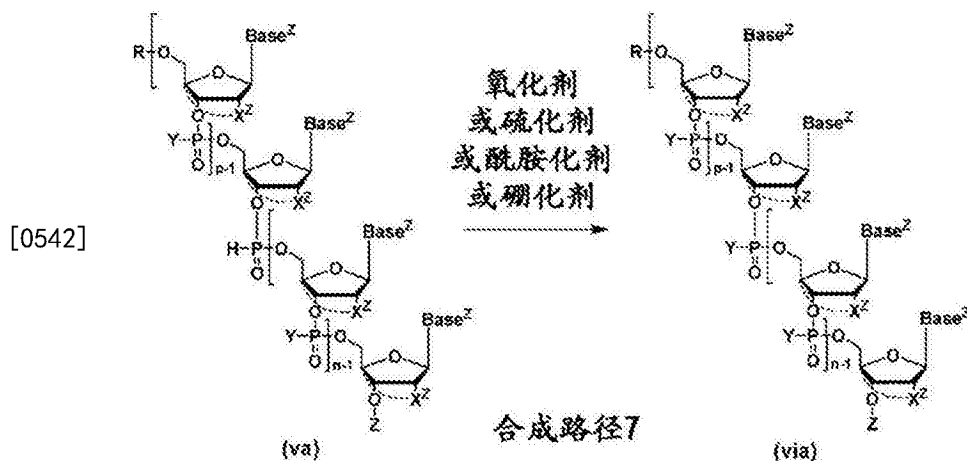
[0537] 在工序c之后,可实施工序d或工序a。在工序d或工序a之前,根据需要,可利用分液处理、溶剂蒸馏去除而置换成工序b或工序a中使用的溶剂,可进行工序e而进行n+p个聚合寡核苷酸(va或vb)的分离等。另外,也可将工序c的反应溶液直接用于随后的工序d或工序a。

[0538] (工序d)(转化工序)

[0539] 工序d是通过使工序c中得到的n+p个聚合寡核苷酸(va或vb)或工序a中得到的n个聚合寡核苷酸与对磷原子进行修饰的试剂反应,从而将该n+p个聚合寡核苷酸(va或vb)的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键的工序。

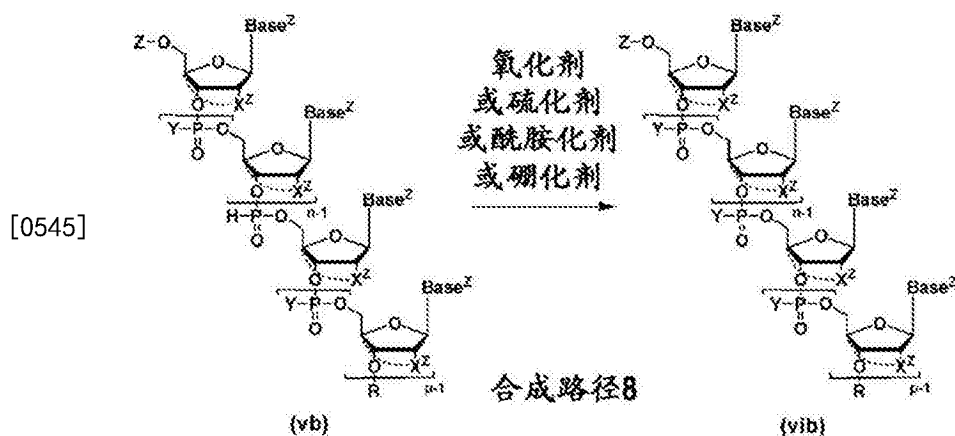
[0540] 方法A中的工序d由下述合成路径7(合成路径7中,各符号的含义与前述定义相同,但在工序a后的情况下,R为氢原子)表示。

[0541] [化学式42]



[0543] 方法B中的工序d由下述合成路径8(合成路径8中,各符号的含义与前述定义相同,但在工序a后的情况下,R为氢原子)表示。

[0544] [化学式43]



[0546] 工序d可在不对工序c中得到的 $n+p$ 个聚合寡核苷酸(va或vb)或工序a中得到的 n 个聚合寡核苷酸(iaa或iib)进行分离的情况下、仅通过向工序c或工序a后的反应混合物中直接添加对磷原子进行修饰的试剂而进行。作为对磷原子进行修饰的试剂,可使用氧化剂、硫化剂、酰胺化剂或硼化剂。优选使用氧化剂或硫化剂,转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键、或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键,更优选转化为磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键。也可将工序c中得到的 $n+p$ 个聚合寡核苷酸(va或vb)或工序a中得到的 n 个聚合寡核苷酸(iaa或iib)分离后进行工序d。

[0547] 关于工序d中可使用的溶剂,具体而言,可举出与前述工序a同样的溶剂,可根据使用的氧化剂、硫化剂、酰胺化剂或硼化剂来适当选择。

[0548] 关于工序d中可使用的“氧化剂”,没有特别限制,只要具有在不氧化其他部位的情况下将亚磷酸二酯键氧化成磷酸二酯键的能力即可,优选碘、(1S)-(+)-(10-苄基磺酰基)氧氮杂环丙烷、叔丁基过氧化氢(TBHP)、2-丁酮过氧化物、1,1-二氢过氧化环十二烷、双(三甲基甲硅烷基)过氧化物、间氯过苯甲酸。从可达成收率或反应速度良好的氧化反应这样的观点考虑,更优选碘、叔丁基过氧化氢、2-丁酮过氧化物,特别优选碘。对于所述氧化剂而言,可用适当的溶剂稀释成为0.05~2M的浓度而使用。作为所述稀释溶剂,没有特别限制,只要是相对于反应为非活性的溶剂即可,可举出吡啶、四氢呋喃[THF]、二氯甲烷、水、或它们的混合溶剂。其中,例如,优选使用碘/水/吡啶的混合溶剂或碘/水/吡啶/THF的混合溶

剂。

[0549] 工序d中使用前述氧化剂时,工序d的反应溶剂与前述稀释溶剂同样。

[0550] 工序d中可使用的“硫化剂”没有特别限制,只要具有可将亚磷酸二酯键转化为硫代磷酸二酯键的能力即可,优选单质硫、3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(ADTT)、3-((N,N-二甲基氨基亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(DDTT)、3H-1,2-苯并二硫杂环戊烯-3-酮-1,1-二氧化物(3H-1,2-benzodithiol-3-one-1,1-dioxide)(Beaucage试剂)、3H-1,2-苯并二硫杂环戊烯-3-酮、苯乙酰基二硫化物(phenylacetyl disulfide,PADS)、二硫化四乙基秋兰姆(tetraethylthiuram disulfide,TETD)、N-(苯甲酰基硫基)-琥珀酰亚胺。从可进行收率或反应速度良好的反应这样的观点考虑,更优选单质硫、ADTT,特别优选单质硫。对于所述硫化剂而言,可用适当的溶剂稀释成为0.05~2M的浓度而使用。作为所述稀释溶剂,没有特别限制,只要是相对于反应为非活性的溶剂即可,可举出例如二氯甲烷、乙腈、吡啶或它们的混合溶剂。

[0551] 在工序d中使用前述硫化剂的情况下,工序d的反应溶剂与前述稀释溶剂同样。

[0552] 将亚磷酸二酯键转化为“被基本保护基保护的磷酸二酯键”时的试剂没有特别限制,只要具有该转化能力即可,优选对应的醇化合物、和四氯化碳、碘、溴化三氯化碳、N-氯琥珀酰亚胺、三氯异氰尿酸、次氯酸钠、3,3-二氯-5,5-二甲基乙内酰脲、N,N'-二氯双(2,4,6-三氯苯基)脲等氧化剂。作为前述转化反应的溶剂,没有特别限制,只要是相对于反应为非活性的溶剂即可,可举出二氯甲烷、吡啶或它们的混合溶剂,优选为二氯甲烷或吡啶,更优选为吡啶。

[0553] 将亚磷酸二酯键转化为“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键”时的试剂没有特别限制,只要具有该转化能力即可,可举出邻苯二甲酰亚胺系硫化剂、含琥珀酸系硫化剂及吗啉二酮系硫化剂等。作为前述转化反应的溶剂,只要是相对于反应为非活性的溶剂即可,可举出二氯甲烷、吡啶或它们的混合溶剂,优选为二氯甲烷或吡啶,更优选为吡啶。

[0554] 作为邻苯二甲酰亚胺系硫化剂,可举出与作为目标的“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键”对应的N-(C1-40烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(C3-6环烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(C6-10芳基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(5-10元杂芳基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(芳烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺及N-(杂芳基硫基)邻苯二甲酰亚胺等。此处,作为目标的“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键”包含卤素原子、氰基、C1-6烷基等取代基时,可使用在前述N-(C1-40烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(C3-6环烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(C6-10芳基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(5-10元杂芳基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(芳烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺及N-(杂芳基硫基)邻苯二甲酰亚胺的对应的部分包含这些取代基的硫化剂。作为邻苯二甲酰亚胺系硫化剂,具体而言,可举出N-[(2-氰基乙基)硫基]邻苯二甲酰亚胺、N-(甲基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(乙基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(丙基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(异丙基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(丁基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(叔丁基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(环己基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(十二烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(苄基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-(苯基硫基)邻苯二甲酰亚胺、N-[(对氯苯基)硫基]邻苯二甲酰亚胺、N-[(对甲基苯基)硫基]邻苯二甲酰亚胺及N-[(2-苯并噻唑基)硫基]邻苯二甲酰亚胺等。

[0555] 作为琥珀酸系硫化剂,可举出与作为目标的“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯

键”对应的N-(C1-40烷基硫基)琥珀酰亚胺、N-(C3-6环烷基硫基)琥珀酰亚胺、N-(C6-10芳基硫基)琥珀酰亚胺、N-(5-10元杂芳基硫基)芳烷基硫基琥珀酰亚胺及N-(杂芳基硫基)琥珀酰亚胺等。此处,作为目标的“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键”包含卤素原子、氰基、C1-6烷基等取代基时,可使用在前述N-(C1-40烷基硫基)琥珀酰亚胺、N-(C3-6环烷基硫基)琥珀酰亚胺、N-(C6-10芳基硫基)琥珀酰亚胺、N-(5-10元杂芳基硫基)琥珀酰亚胺、N-(芳烷基硫基)琥珀酰亚胺及N-(杂芳基硫基)琥珀酰亚胺的对应的部分包含这些取代基的硫化剂。作为含琥珀酰亚胺的硫化剂,具体而言,可举出N-[(2-氰基乙基)硫基]琥珀酰亚胺、N-(甲基硫基)琥珀酰亚胺、N-(乙基硫基)琥珀酰亚胺、N-(丙基硫基)琥珀酰亚胺、N-(异丙基硫基)琥珀酰亚胺、N-(丁基硫基)琥珀酰亚胺、N-(叔丁基硫基)琥珀酰亚胺、N-(环己基硫基)琥珀酰亚胺、N-(十二烷基硫基)琥珀酰亚胺、N-(苄基硫基)琥珀酰亚胺、N-(苯基硫基)琥珀酰亚胺、N-[(对氯苯基)硫基]琥珀酰亚胺、N-[(对甲基苯基)硫基]琥珀酰亚胺及N-[(2-苯并噻唑基)硫基]琥珀酰亚胺等。

[0556] 作为吗啉二酮系硫化剂,可举出与作为目标的“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键”对应的N-(C1-40烷基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(C3-6环烷基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(C6-10芳基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(5-10元杂芳基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(芳烷基硫基)吗啉-3,5-二酮及N-(杂芳基硫基)吗啉-3,5-二酮等。此处,作为目标的“被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键”包含卤素原子、氰基、C1-6烷基等取代基时,可使用在前述N-(C1-40烷基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(C3-6环烷基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(C6-10芳基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(5-10元杂芳基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(芳烷基硫基)吗啉-3,5-二酮及N-(杂芳基硫基)吗啉-3,5-二酮的对应的部分包含这些取代基的硫化剂。作为吗啉二酮系硫化剂,具体而言,可举出N-[(2-氰基乙基)硫基]吗啉-3,5-二酮、N-(甲基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(乙基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(丙基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(异丙基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(丁基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(叔丁基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(环己基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(十二烷基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(苄基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-(苯基硫基)吗啉-3,5-二酮、N-[(对氯苯基)硫基]吗啉-3,5-二酮、N-[(对甲基苯基)硫基]吗啉-3,5-二酮及N-[(2-苯并噻唑基)硫基]吗啉-3,5-二酮等。

[0557] 关于工序d中使用的“酰胺化剂”,没有特别限制,只要具有能将亚磷酸二酯键转化为氨基磷酸二酯键的能力即可,优选对应的胺化合物、和四氯化碳、碘、溴化三氯化碳、N-氯琥珀酰亚胺、三氯异氰尿酸、次氯酸钠、3,3-二氯-5,5-二甲基乙内酰脲、N,N'-二氯双(2,4,6-三氯苯基)脲等氧化剂。作为前述转化反应的溶剂,没有特别限制,只要是相对于反应为非活性的溶剂即可,可举出二氯甲烷、吡啶或它们的混合溶剂,优选为二氯甲烷或吡啶,更优选为吡啶。

[0558] 关于工序d中使用的“硼化剂”,没有特别限制,只要具有能将亚磷酸二酯键转化为硼烷磷酸二酯键的能力即可,优选氢化硼(BH₃)、BH₃-THF络合物、BH₃-二甲基硫醚络合物、BH₃-吡啶络合物等。作为前述转化反应的溶剂,没有特别限制,只要是相对于反应为非活性的溶剂即可,可举出二氯甲烷、吡啶或它们的混合溶剂,优选为二氯甲烷或吡啶,更优选为吡啶。

[0559] 关于对磷原子进行修饰的试剂的使用量,相对于工序c中得到的n+p个聚合寡核苷酸(va或vb)或工序a中得到的n个聚合寡核苷酸(ia或ib)1摩尔而言,优选为1~50摩尔,

更优选为1~15摩尔,进一步优选为1~10摩尔,进一步更优选为1~7摩尔。

[0560] 反应温度没有特别限制,只要能使反应进展即可,优选为-10℃~60℃,更优选为20℃~50℃。反应时间根据工序c中得到的n+p个聚合寡核苷酸(va或vb)或工序a中得到的n个聚合寡核苷酸(ia或ib)的种类、使用的对磷原子进行修饰的试剂的种类、反应温度等的不同而不同,优选为1分钟~24小时,更优选为10分钟~12小时,进一步优选为30分钟~6小时。

[0561] 在使用氧化剂或硫化剂的情况下,该氧化剂及硫化剂可能在反应结束后或在下一工序以后诱发不期望的副反应,为了抑制该副反应,可在反应结束后使用还原剂进行猝灭处理。具体而言,作为还原剂,使用3价的磷试剂(例如,亚磷酸三甲酯、亚磷酸三乙酯、三(2-羧基乙基)膦等亚磷酸三烷基酯、亚磷酸二甲酯、亚磷酸二乙酯等亚磷酸二烷基酯)、硫代硫酸钠等还原剂。前述猝灭处理也可省略。

[0562] 在工序c之后进行工序d时,在合成路径5或6中残留有式(iva或ivb)表示的化合物或其盐、或者在合成路径3或4中残留有式(ia或ib)表示的化合物或其盐的情况下,可根据需要而在工序d的反应之后对得到的溶液实施封端反应。对于封端反应而言,可使用乙酸酐、苯甲酸酐等酸酐,或除了前述的缩合剂以外,还使用甲基-H-膦酸酯的三乙基铵盐、乙基-H-膦酸酯的三乙基铵盐、异丙基-H-膦酸酯的三乙基铵盐及2-氰基乙基-H-膦酸酯的三乙基铵盐等烷基-H-膦酸酯的铵盐,利用通常的方法实施。

[0563] 封端反应也可在所述的工序c之后实施。

[0564] 在工序a之后进行工序d时,在工序d之后不实施前述封端反应。

[0565] (工序e)(沉淀化及固液分离工序)

[0566] 工序e是向工序a~工序d中的任意工序中得到的反应溶液中添加极性溶剂,从而使寡核苷酸沉淀,通过固液分离来取得寡核苷酸的工序。

[0567] 作为工序e中的极性溶剂,可使用例如甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇等醇系溶剂;乙腈、丙腈等腈系溶剂;丙酮、2-丁酮等酮系溶剂;二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、N-甲基哌啶酮等酰胺系溶剂、二甲基亚砷等亚砷系溶剂;水、以及它们中2种以上的混合溶剂。工序e中的极性溶剂优选为醇系溶剂、腈系溶剂,更优选为碳原子数1~6的醇溶剂或碳原子数1~6的腈溶剂,特别优选为甲醇或乙腈。

[0568] 使用工序d中得到的反应溶液进行工序e的情况下,通过使用将前述的还原剂添加至作为沉淀化溶剂的甲醇、乙腈中而得到的溶液,从而可在进行对磷原子进行修饰的试剂的猝灭处理的同时进行工序e。

[0569] 对于本发明的寡核苷酸的制造方法而言,通过反复进行所期望的次数的上述工序a~工序e,从而能以高纯度和高收率得到作为目标的寡核苷酸。

[0570] (工序f)(脱保护·寡核苷酸分离工序)

[0571] 寡核苷酸的制造方法中,在工序e之后,可根据基本保护基、临时保护基及准固相保护基的种类·性质而进行脱保护,将寡核苷酸分离。作为脱保护的方法,例如可按照PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS,第3版,JOHN WILLY&SONS出版(1999年)等中记载的脱保护方法,进行将寡核苷酸的全部保护基除去的工序。具体而言,可通过利用氨水、氨水/乙醇溶液、或氨水与甲胺水溶液的混合液进行处理,从而将准固相保护基、以及作为基本保护基的苯甲酰基、异丁酰基、苯氧基乙酰基、乙酰基、乙酰丙酰基等、作为保护磷酸

二酯键或硫代磷酸二酯键的基本保护基的2-氰基乙基等全部除去。另外,可通过利用工序a中使用的氟试剂、酸或碱、或者对它们进行适当稀释而得到的溶液进行处理,从而将5'位或3'位羟基的临时保护基除去。另外,也可使用下述方法:按照Journal of the Chemical Society,Perkin Transactions 1,2002年,2619页-2633页中记载的脱保护方法,用DBU[1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯]及三甲基氯硅烷进行处理从而将保护磷酸二酯键或硫代磷酸二酯键的氰基乙基等除去,然后用氨水将准固相保护基、以及作为基本保护基的苯甲酰基、异丁酰基、苯氧基乙酰基、乙酰基、乙酰丙酰基等除去。另外,也可使用利用无机碱(碳酸钾等)将作为基本保护基的苯甲酰基、异丁酰基、苯氧基乙酰基、乙酰基、乙酰丙酰基等除去的方法。

[0572] 对于被基本保护基保护的磷酸二酯键而言,例如,通过利用Journal of the Chemical Society,Perkin Transactions 1,1999,1477页-1486页中记载的方法(用(E)-2-硝基苯甲醛肟、吡啶-2-醛肟等肟化合物及1,1,3,3-四甲基胍、DBU等碱进行处理的方法)进行脱保护,从而可转化为磷酸二酯键。对于被2-氰基乙基等可通过 β 脱离而进行脱保护的基本保护基保护的硫代磷酸二酯键而言,可以通过前述碱性条件下的脱保护而转化为硫代磷酸二酯键。对于被其他的基本保护基保护的硫代磷酸二酯键而言,例如可通过利用Journal of the Chemical Society,Perkin Transactions 1,1999,1477页-1486页中记载的方法(利用前述肟化合物及前述碱进行处理的方法等)进行脱保护,从而转化为磷酸二酯键。

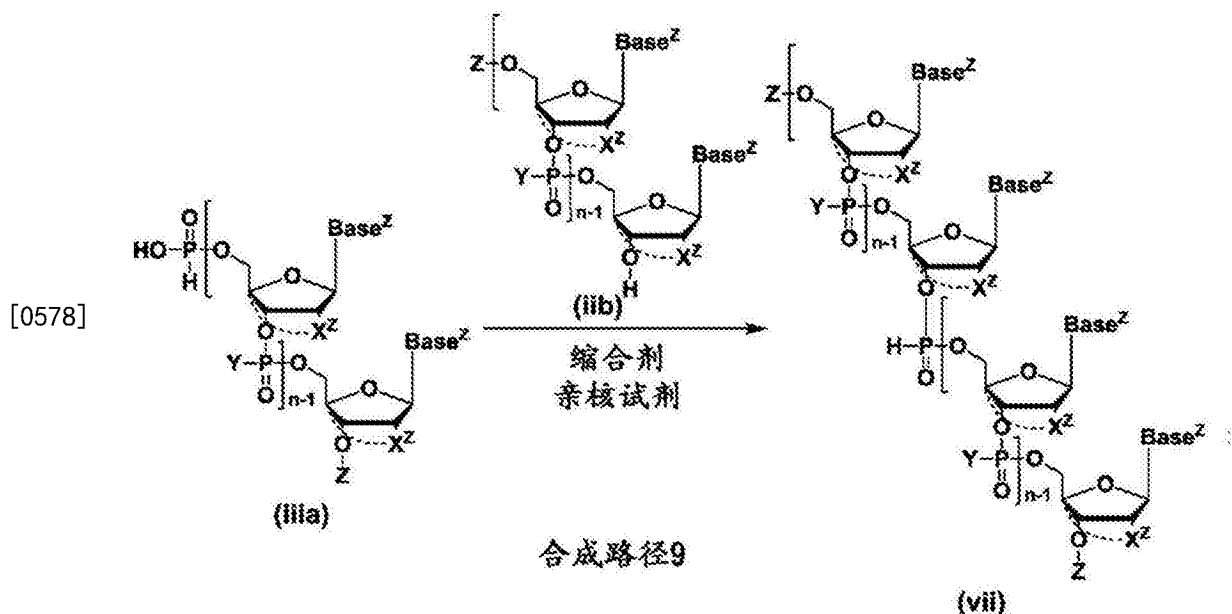
[0573] 不具有保护基的寡核苷酸容易被酶分解,因此,优选在空气清洁度控制的条件下对寡核苷酸进行分离。

[0574] 上述工序a~工序d及工序f中的反应进展的确认均可适用与通常的液相有机合成反应同样的方法。即,可利用薄层硅胶色谱法、高效液相色谱法等来追踪反应。

[0575] 对于通过工序e或工序f得到的寡核苷酸而言,也可通过进一步实施有机合成反应,从而形成所期望的寡核苷酸衍生物。也可使用利用方法A制造的寡核苷酸及利用方法B制造的寡核苷酸,利用方法A或方法B来制造寡核苷酸。

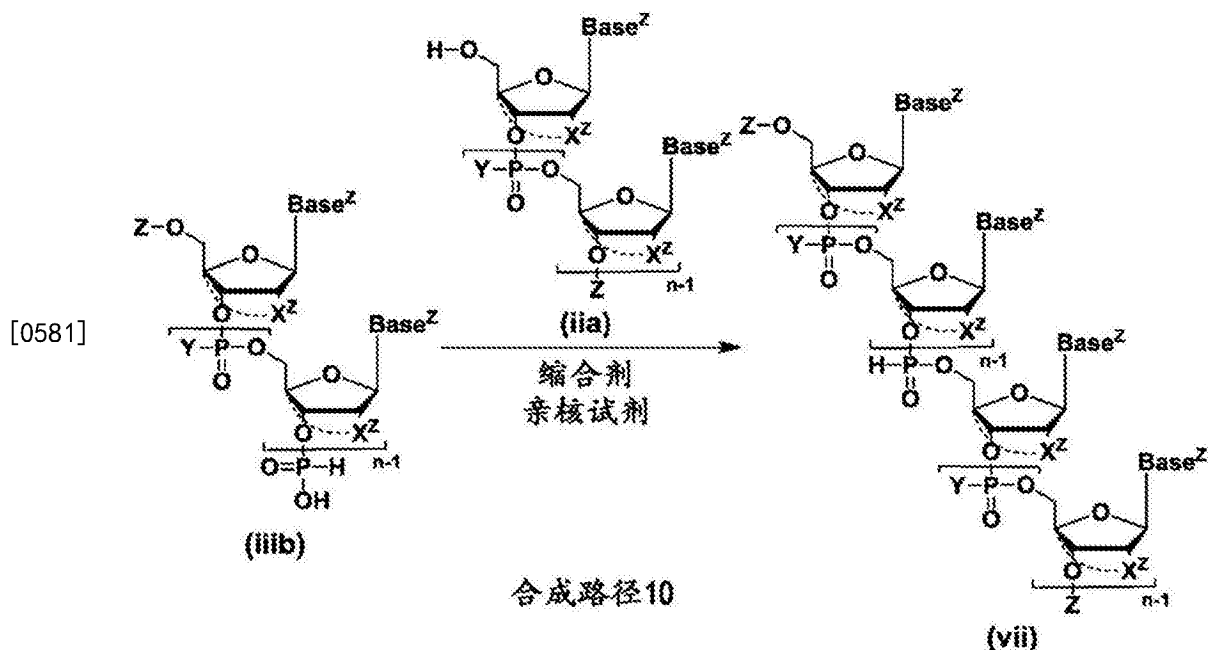
[0576] 例如,可在与前述工序c同样的条件下,使方法A中的工序b中得到的n个聚合寡核苷酸的5'位羟基的H-磷酸酯体(iia)、与方法B中的工序a中得到的n个聚合寡核苷酸(iib)介由亚磷酸二酯键而缩合。将本工序示于合成路径9。合成路径中的符号与前述定义相同,式(iia)的n与式(iib)的n可以相同也可以不同,式(iia)的Z与式(iib)的Z可以相同也可以不同。

[0577] [化学式44]



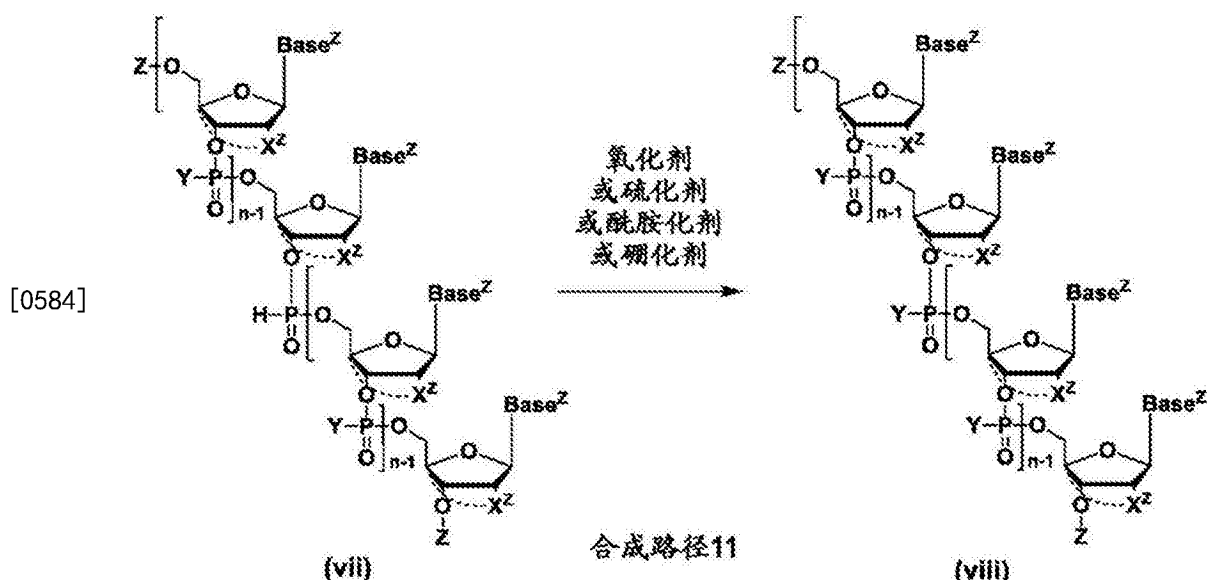
[0579] 另外,可在与前述工序c同样的条件下,使方法B中的工序b中得到的n个聚合寡核苷酸的5'位羟基的H-磷酸酯体(iiib)、与方法A中的工序a中得到的n个聚合寡核苷酸(ia)介由亚磷酸二酯键而缩合。将本工序示于合成路径10。合成路径中的符号与前述定义相同,式(iiib)的n与式(ia)的n可以相同也可以不同,式(iiib)的Z与式(ia)的Z可以相同也可以不同。

[0580] [化学式45]



[0582] 可在与工序d同样的条件下,将前述缩合得到的寡核苷酸(vii)的亚磷酸二酯键转化为磷酸二酯键、硫代磷酸二酯键、氨基磷酸二酯键、硼烷磷酸二酯键、被基本保护基保护的磷酸二酯键或被基本保护基保护的硫代磷酸二酯键。将本工序示于合成路径11。合成路径中的符号与前述定义相同,式(vii)中的2个n可以相同也可以不同,式(vii)中的2个Z可以相同也可以不同。式(viii)也同样。

[0583] [化学式46]



[0585] 可使用通过前述介由亚磷酸二酯键而缩合的工序得到的反应混合物,与工序e同样地实施分离工序,所述分离工序中,使具有准固相保护基的经缩合的前述核苷或寡核苷酸(vii)沉淀,通过固液分离来取得所述具有准固相保护基的经缩合的前述核苷或寡核苷酸(vii)。另外,可使用通过前述将亚磷酸二酯键转化的工序而得到的反应混合物,与工序e同样地实施分离工序,所述分离工序中,使具有准固相保护基的亚磷酸二酯键已被转化的核苷或寡核苷酸(viii)沉淀,通过固液分离来取得所述具有准固相保护基的亚磷酸二酯键已被转化的核苷或寡核苷酸(viii)。

[0586] 在前述分离工序之后,可与工序f同样地,根据基本保护基、临时保护基及准固相保护基的种类·性质而进行脱保护,将寡核苷酸分离。

[0587] 在前述基于亚磷酸二酯键的缩合体(vii)、或该亚磷酸二酯键的转化体(viii)所具有的2个Z中的至少1个为基本保护基、且也可将该基本保护基作为临时保护基使用的情况下,可将前述基于亚磷酸二酯键的缩合体(vii)、或该亚磷酸二酯键的转化体(viii)在合成路径1或2中作为式(ia或ib)表示的化合物使用,实施方法A或方法B中的工序a。

[0588] 制造的寡核苷酸可用于各种人体用或动物用的医药品(RNA、DNA、寡核苷酸医药等)、功能性食品、特定保健食品、食品、化学产品、生物体用高分子材料、工业用高分子材料等各种用途。

[0589] 寡核苷酸的制造方法中的起始物质可通过进行现有的氧化、还原、水解、酯化反应、酰胺缩合等广为人知的官能团转化法(例如参见Comprehensive Organic Transformations,第二版,R.C.Larock著,Wiley-VCH(1999年)等)来制造。

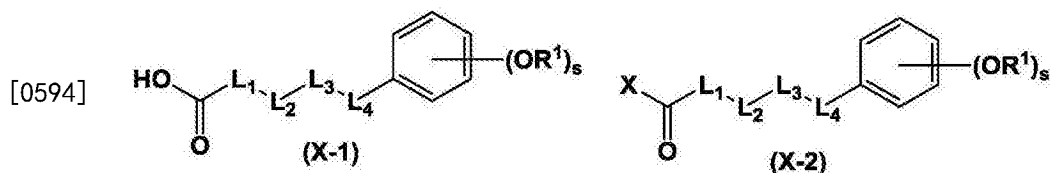
[0590] 例如,对于在2'位与4'位经- CSNR^{14} -(R^{14} 表示氢原子或C1-6烷基)桥连的核糖上键合核酸碱基而得到的核苷,可由对应的具有经- CONR^{13} -(R^{13} 表示氢原子或C1-6烷基)桥连的结构核苷等,使用硫代羰基化试剂(例如劳森试剂等),根据需要进行保护反应及脱保护反应来合成。

[0591] 导入了准固相保护基的核苷或寡核苷酸可通过如下所示的方法制造,但下述制造方法是为了示出常规的制造方法的一个例子,不限制本实施方式涉及的导入了准固相保护基的核苷等的制造方法。

[0592] 导入了m为0的前述式(I)表示的准固相保护基的核苷或寡核苷酸例如可通过下述

式(X-1)所示的羧酸或下述式(X-2)所示的羧酰卤、与核苷或寡核苷酸的羟基或核酸碱基的反应而得到。

[0593] [化学式47]



[0595] 式中,X表示卤素原子,其他符号与前述定义相同。

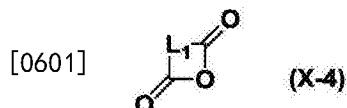
[0596] 在准固相保护基的导入中使用羧酸的情况下,可在溶剂中,使用二环己基碳二亚胺、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、N,N,N',N'-四甲基-O-(苯并三唑-1-基)脲鎓六氟磷酸盐及羰基二咪唑等缩合剂,将准固相保护基导入至核苷或寡核苷酸。根据需要,可组合使用1-羟基苯并三唑等添加剂。在使用羧酰卤的情况下,可举出在溶剂中使用三乙胺、二异丙基乙胺等碱的方法。作为溶剂,可举出氯仿、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷等卤素系溶剂;苯、甲苯、二甲苯、均三甲苯等芳香族系溶剂;乙酸乙酯、乙酸异丙酯等酯系溶剂;己烷、戊烷、庚烷、辛烷、壬烷、环己烷等脂肪族系溶剂;四氢呋喃、乙醚、环戊基甲基醚、叔丁基甲基醚等醚系溶剂;N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮等酰胺系溶剂等。

[0597] 该羧酸或酰卤可通过进行现有的氧化、还原、水解等广为人知的官能团转化法(例如参见Comprehensive Organic Transformations,第二版,R.C.Larock著,Wiley-VCH(1999年)等)来制造。

[0598] 另外,也可利用上述缩合法、官能团转化法等形成 L^1 与 L^2 之间的键、 L^2 与 L^3 之间的键、 L^3 与 L^4 之间的键中的任意键,阶段性地导入准固相保护基。另外, L^2 为 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $OCO-$ 或 $-N(R^2)CO-$ 时,也可利用上述缩合法、官能团转化法等形成 L^2 所包含的酯键或酰胺键,阶段性地导入准固相保护基。 L^4 为 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $OCO-$ 或 $-N(R^2)CO-$ 时也同样。此处, R^2 与前述定义相同。

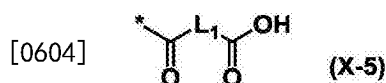
[0599] 例如,可以使核苷或寡核苷酸、与式(X-4)表示的二羧酸酐(琥珀酸酐等)反应,得到含有具有羧基的下述式(X-5)表示的基团的核苷或寡核苷酸,然后,使该含有具有羧基的式(X-5)表示的基团的核苷或寡核苷酸、与下述式(X-6)所示的醇化合物或下述式(X-7)所示的胺化合物缩合,从而制造具有m为0、且 L^2 为 $-COO-$ 或 $-CON(R^2)-$ 的前述式(I)表示的准固相保护基的核苷或寡核苷酸。

[0600] [化学式48]



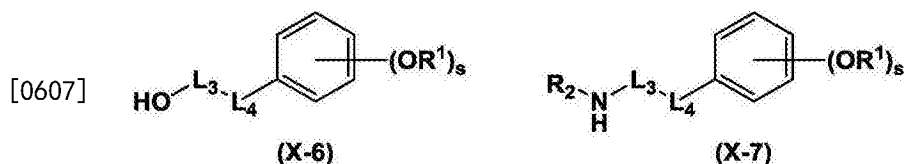
[0602] 式中, L^1 与前述定义相同。

[0603] [化学式49]



[0605] 式中的符号与前述定义相同。

[0606] [化学式50]

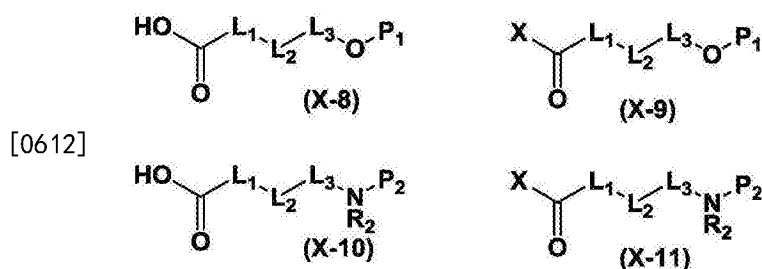


[0608] 式中的符号与前述定义相同。

[0609] 前述含有具有羧基的式(X-5)表示的基团的核苷或寡核苷酸、与前述式(X-6)所示的醇化合物或前述式(X-7)所示的胺化合物的缩合通常可在溶剂中使用二环己基碳二亚胺、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐、N,N,N',N'-四甲基-O-(苯并三唑-1-基)脲鎓六氟磷酸盐或羰基二咪唑等缩合剂进行。根据需要,可组合使用1-羟基苯并三唑等添加剂。溶剂与前述式(X-1)或式(X-2)所示的化合物和核苷或寡核苷酸的反应同样。

[0610] 另外,例如,可以通过在与前述缩合反应同样的条件下使下述式(X-8)或(X-10)所示的羧酸或者下述式(X-9)或(X-11)所示的羧酰卤、与核苷或寡核苷酸的羟基或核酸碱基缩合,随后根据需要进行脱保护反应,由此,得到下述式(X-12)表示的醇化合物或下述式(X-13)表示的氨基化合物,在与前述缩合反应同样的条件下使得到的式(X-12)表示的醇化合物或式(X-13)表示的氨基化合物、与式(X-14)表示的羧基化合物或式(X-15)表示的芳基羧酰卤缩合,从而制造具有m为0、且L⁴为-OCO-或-N(R²)CO-的前述式(I)表示的准固相保护基的核苷或寡核苷酸。

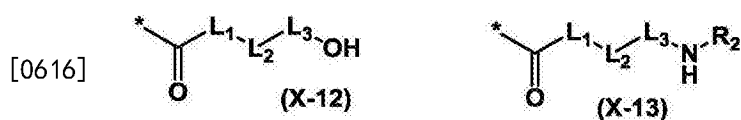
[0611] [化学式51]



[0613] (式中,P¹表示羟基的保护基,P²表示氨基的保护基,X表示卤素原子,其他符号与前述定义相同。)

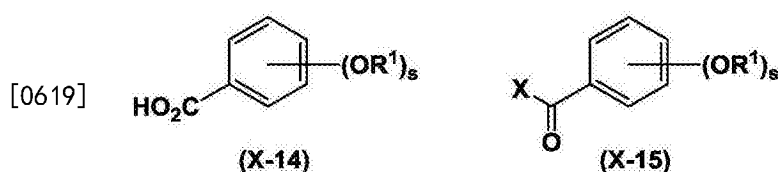
[0614] P¹可从保护羟基的临时保护基或基本保护基中选择,P²可从保护氨基的基本保护基中选择。

[0615] [化学式52]



[0617] 式中的符号与前述定义相同。

[0618] [化学式53]

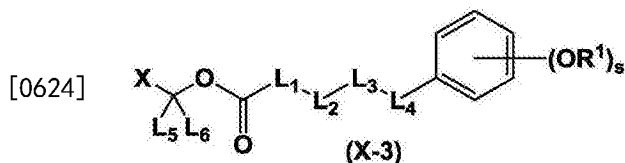


[0620] 式中的符号与前述定义相同,X表示卤素原子。

[0621] 前述脱保护反应的条件可参考PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS,第3版,JOHN WILLY&SONS出版(1999年)等。

[0622] 导入了m为1的前述式(I)所示的准固相保护基的核苷或寡核苷酸例如可通过使下述式(X-3)所示的烷基卤化物、与核苷或寡核苷酸的羟基或核酸碱基在溶剂中反应而得到。

[0623] [化学式54]



[0625] 式中,X表示卤素原子,其他符号与前述定义相同。

[0626] 在前述式(X-3)所示的烷基卤化物与核苷或寡核苷酸的反应中,可使用碱(碳酸钾、三乙胺等)。作为前述溶剂,可使用前述的卤素系溶剂、芳香族系溶剂、酯系溶剂、脂肪族系溶剂、醚系溶剂或酰胺系溶剂等,其中,可使用酰胺系溶剂。

[0627] 前述式(X-3)所示的烷基卤化物可通过使前述式(X-1)所示的羧酸与氯甲磺酰氯在溶剂中反应(国际公开第2014-144285号中记载的方法)来制造,还可通过使前述式(X-1)所示的羧酸、多聚甲醛(paraformaldehyde)及氯化锌在溶剂中反应(Journal of Medicinal Chemistry,2009年,第52卷,第771页-778页的方法)来制造。

[0628] 另外,也可利用上述缩合法、官能团转化法等形成 L^1 与 L^2 之间的键、 L^2 与 L^3 之间的键、 L^3 与 L^4 之间的键中的任意键,阶段性地导入准固相保护基。另外, L^2 为 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $OCO-$ 或 $-N(R^2)CO-$ 时,也可利用上述缩合法、官能团转化法等形成 L^2 所包含的酯键或酰胺键,阶段性地导入准固相保护基。 L^4 为 $-COO-$ 、 $-CON(R^2)-$ 、 $OCO-$ 或 $-N(R^2)CO-$ 时也同样。此处, R^2 与前述定义相同。

[0629] 实施例

[0630] 接下来,列举实施例来具体地说明本发明,但本发明不受它们的限制。需要说明的是,实施例中,NMR表示核磁共振波谱,MS表示质谱。

[0631] 在记载了 1H -NMR数据的情况下,表示以300MHz(JNM-ECP300;日本电子(JEOL)公司制,或JNM-ECX300;日本电子(JEOL)公司制)进行测定、以四甲基硅烷为内标物质而得到的信号的化学位移 δ (单位:ppm)(分裂模式、积分值)。“s”表示单峰,“d”表示双重峰,“t”表示三重峰,“q”表示四重峰,“quint”表示五重峰,“dd”表示双重双峰(doublet of doublet),“m”表示多重峰,“brs”表示宽单峰,“ $CDCl_3$ ”表示氘代氯仿,“ C_5D_5N ”表示氘代吡啶。

[0632] 在记载了 ^{31}P -NMR数据的情况下,表示用JNM-ECX300(日本电子(JEOL)公司制)测得的信号的化学位移 δ (单位:ppm)。

[0633] 对于MS而言,在没有特别说明的情况下,在以下的条件1下,利用ESI(电喷雾离子化)法测定。“ESI $^+$ ”表示ESI正离子模式,“ESI $^-$ ”表示ESI负离子模式。

[0634] 条件1:

[0635] 装置:AB SCIEX TripleTOF 5600

[0636] 柱:Kinetex PFP(2.6 μm ,2.1 $\times$ 75mm)

[0637] 柱温:40 $^{\circ}C$

[0638] 洗脱液组成:

[0639] 有机相:四氢呋喃/乙腈=1/1 (体积比)

[0640] 水相:10mM甲酸铵水溶液

[0641] 以50/50的有机相与水相的混合比开始测定,在测定开始后10分钟内线性地变更为90/10。之后5分钟,将有机相与水相的混合比固定为90/10。

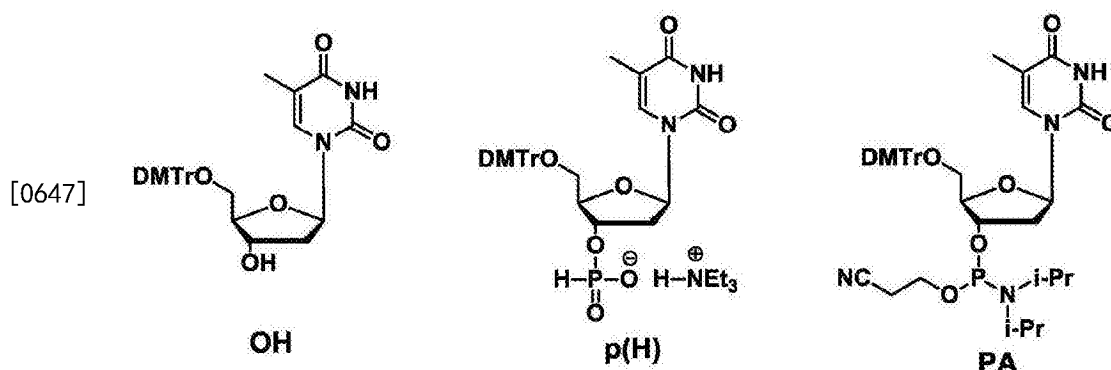
[0642] 流速:0.50mL/min,

[0643] 检测波长:260nm

[0644] 对于利用硅胶柱色谱法进行的纯化而言,在没有特别说明的情况下,使用山善制Hi-Flash柱。

[0645] 参考例(在5'位羟基具有4,4'-二甲氧基三苯甲基的核酸单体的稳定性评价)

[0646] [化学式55]

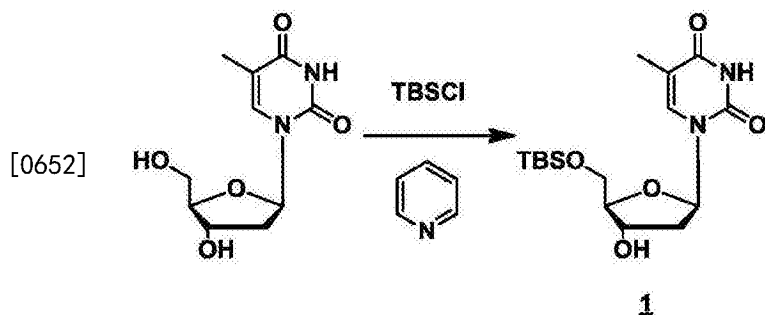


[0648] 作为用于合成寡核苷酸的核酸单体,选择了5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(thymidine) [OH]、5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羟基氧磷基(phosphinyl)胸苷三乙胺盐[p(H)]、和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-氰基乙氧基(二异丙基氨基)磷基胸苷[PA]。分别保持固体状态于100℃进行搅拌,经过一定时间后,进行HPLC分析。将其结果示于图1。

[0649] 由图1可知,与H-磷酸酯体及酰胺化体相比,核苷稳定。

[0650] 参考合成例1(在5'位羟基具有叔丁基二甲基甲硅烷基的核苷的合成):化合物1的合成

[0651] [化学式56]

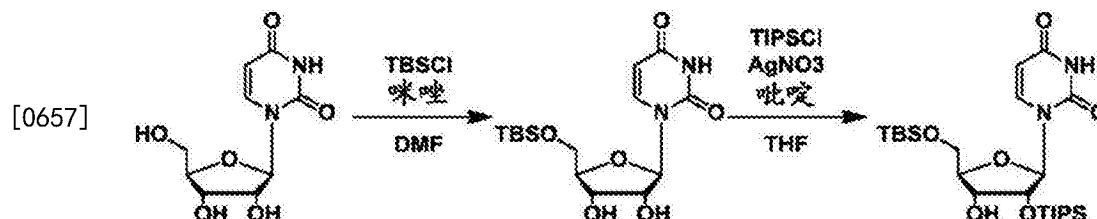


[0653] 在氮气气氛下,于0℃,向胸苷(24.20g,100mmol)的吡啶(60mL)悬浮液中,添加叔丁基二甲基氯硅烷(16.62g,110mmol),进行22小时29分钟的搅拌。在减压下蒸馏去除溶剂,添加二氯甲烷和水,进行分液。向得到的水层中添加二氯甲烷,进行分液,合并得到的有机层,用5%碳酸氢钠水溶液洗涤,并用水洗涤。在减压下蒸馏去除溶剂,将添加甲苯而析出的固体过滤,以白色固体形式得到化合物1(29.77g,收率84%)。

[0654] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.11 (s, 3H)、0.12 (s, 3H)、0.92 (s, 9H)、1.92 (d, 3H)、2.02-2.16 (m, 2H)、2.32-2.39 (m, 1H)、3.81-3.92 (m, 2H)、4.01-4.04 (m, 1H)、4.45-4.49 (m, 1H)、6.36 (q, 1H)、7.48 (d, 1H)、8.27 (brs, 1H)。

[0655] 参考合成例2(在5'位羟基具有叔丁基二甲基甲硅烷基、在2'位羟基具有三异丙基甲硅烷基的核苷的合成): 5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-O-三异丙基甲硅烷基尿嘧啶核苷的合成

[0656] [化学式57]



[0658] 工序1 5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)尿嘧啶核苷的合成

[0659] 在氮气气氛下,在室温下,向尿嘧啶核苷(12.03g, 49.3mmol)、咪唑(6.74g, 99.0mmol)的N,N-二甲基甲酰胺[DMF](120g)溶液中,添加叔丁基二甲基氯硅烷(7.76g, 51.5mmol),进行5小时1分钟的搅拌。将该反应混合物滴加至水(240g)中,过滤析出的固体。向得到的粗产物中添加甲苯,进行30分钟的搅拌,进行过滤,以白色固体形式得到5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)尿嘧啶核苷(10.49g, 收率59%)。

[0660] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.11 (s, 6H)、0.92 (s, 9H)、3.82-3.87 (m, 1H)、4.00-4.05 (m, 1H)、4.14-4.15 (m, 1H)、4.21-4.26 (m, 2H)、5.67 (d, 1H)、5.90 (d, 1H)、8.06 (d, 1H)。

[0661] 工序2 5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-O-三异丙基甲硅烷基尿嘧啶核苷的合成

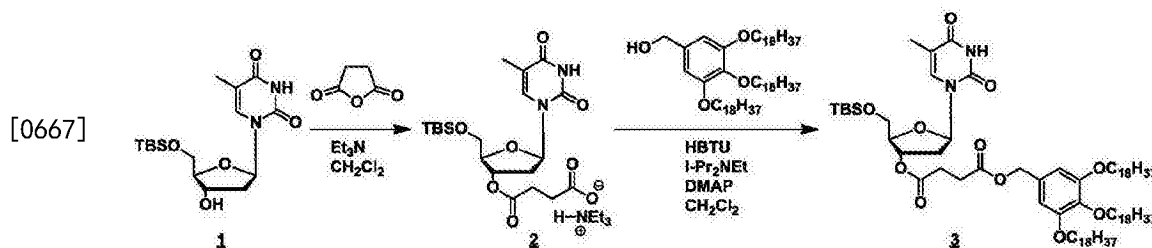
[0662] 在氮气气氛下,在室温下,向5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)尿嘧啶核苷(5.40g, 15.1mmol)、硝酸银[AgNO_3](10.3g, 60.6mmol)、吡啶(6.1mL, 75mmol)的THF(50mL)悬浮液中,添加三异丙基氯硅烷(11.65g, 60.4mmol),进行23小时6分钟的搅拌。用硅藻土对该反应混合物进行过滤,在减压下蒸馏去除溶剂,添加乙酸乙酯。添加水,进行分液,向得到的水层中添加乙酸乙酯,进行分液。合并得到的有机层,用6%碳酸氢钾水溶液洗涤,并用水洗涤。在减压下蒸馏去除溶剂,添加己烷,使固体析出,冷却至0℃后,进行过滤,以白色固体形式得到5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-O-三异丙基甲硅烷基尿嘧啶核苷(5.24g, 收率68%)。

[0663] 针对得到的滤液,在减压下进行蒸馏去除,用硅胶色谱法(己烷-乙酸乙酯)进行纯化,以白色固体形式得到5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-O-三异丙基甲硅烷基尿嘧啶核苷(1.72g, 收率22%)。

[0664] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.12 (s, 6H)、0.94 (s, 9H)、1.04-1.16 (m, 21H)、2.80 (d, 1H)、3.81 (d, 1H)、3.96 (d, 1H)、4.13-4.20 (m, 2H)、4.36 (t, 1H)、5.70 (d, 1H)、6.07 (d, 1H)、7.95 (dd, 1H)、8.17 (brs, 1H)。

[0665] 实施例1(在3'位羟基键合有准固相保护基的核苷的合成): 化合物3的合成

[0666] [化学式58]



[0668] 工序1化合物2的合成

[0669] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物1 (8.02g, 22.4mmol)、琥珀酸酐 (3.35g, 33.5mmol) 的二氯甲烷 (80g) 溶液中,添加三乙胺 (6.21mL, 44.8mmol), 进行4小时3分钟的搅拌。向反应混合物中添加2.0M磷酸-三乙胺水溶液, 进行分液。针对得到的有机层, 使用2M磷酸-三乙胺水溶液, 利用2次分液进行洗涤, 用硫酸镁干燥, 然后在减压下蒸馏去除溶剂, 以淡紫色固体的形式得到化合物2 (11.37g, 收率91%)。

[0670] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.13 (s, 6H)、0.93 (s, 9H)、1.23 (t, 9H)、1.92 (d, 3H)、2.04-2.13 (m, 1H)、2.39-2.46 (m, 1H)、2.55-2.66 (m, 4H)、3.02 (q, 6H)、3.86-3.95 (m, 2H)、4.13 (d, 1H)、5.25 (d, 1H)、6.35 (q, 1H)、7.55 (d, 1H)。

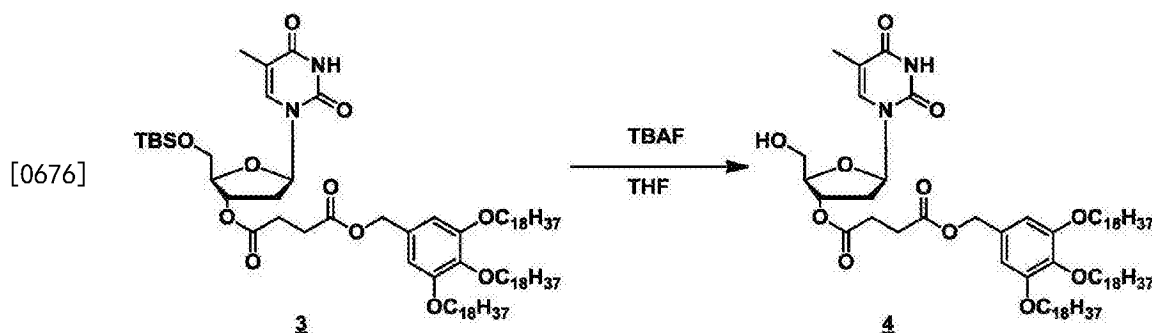
[0671] 工序2化合物3的合成

[0672] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物2 (2.79g, 5.0mmol)、3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲醇 (按照Tetrahedron, 2011, 67, 6633-6643中记载的方法合成) (3.13g, 3.4mmol) 的二氯甲烷 (65g) 溶液中,添加2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸盐 [HBTU] (2.55g, 6.7mmol)、二异丙基乙胺 (1.2mL, 7.1mmol)、二甲基氨基吡啶 [DMAP] (847mg, 6.9mmol), 进行1小时8分钟的搅拌。向反应混合物中添加甲醇, 过滤析出的固体, 以白色固体形式得到化合物3 (4.53g, 收率98%)。

[0673] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.130 (s, 3H)、0.133 (s, 3H)、0.88 (t, 9H)、0.94 (s, 9H)、1.14-1.83 (m, 96H)、1.93 (d, 3H)、2.05-2.15 (m, 1H)、2.37-2.44 (m, 1H)、2.68 (t, 4H)、3.89-3.97 (m, 8H)、4.07 (d, 1H)、5.02 (s, 2H)、5.27 (d, 1H)、6.34 (q, 1H)、6.53 (s, 2H)、7.54 (d, 1H)、8.11 (brs, 1H)。

[0674] 实施例2 (TBS基的脱保护): 化合物4的合成

[0675] [化学式59]

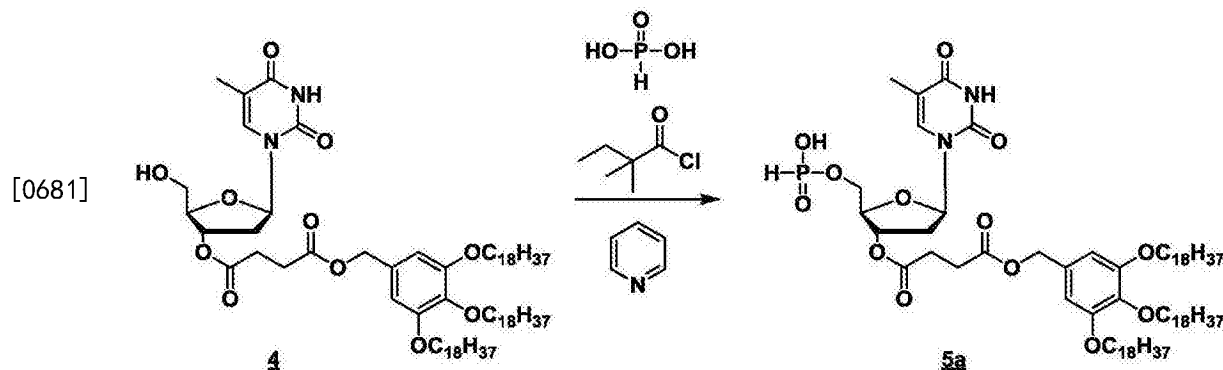


[0677] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物3 (2.97g, 2.2mmol) 的四氢呋喃 [THF] (65g) 溶液中,添加1.0M四丁基氟化铵 [TBAF]/THF溶液 (2.4mL, 2.4mmol), 进行2小时10分钟的搅拌。向反应混合物中添加甲醇, 过滤析出的固体, 以白色固体形式得到化合物4 (2.66g, 收率98%)。

[0678] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.09–1.84 (m, 96H)、1.93 (d, 3H)、2.30–2.45 (m, 2H)、2.62–2.73 (m, 4H)、3.82–4.04 (m, 9H)、5.02 (s, 2H) 5.25–5.29 (m, 1H)、6.19 (q, 1H)、6.53 (s, 2H)、7.49 (d, 1H)、8.07 (brs, 1H)。

[0679] 实施例3 (H-磷酸酯化): 化合物5a的合成

[0680] [化学式60]



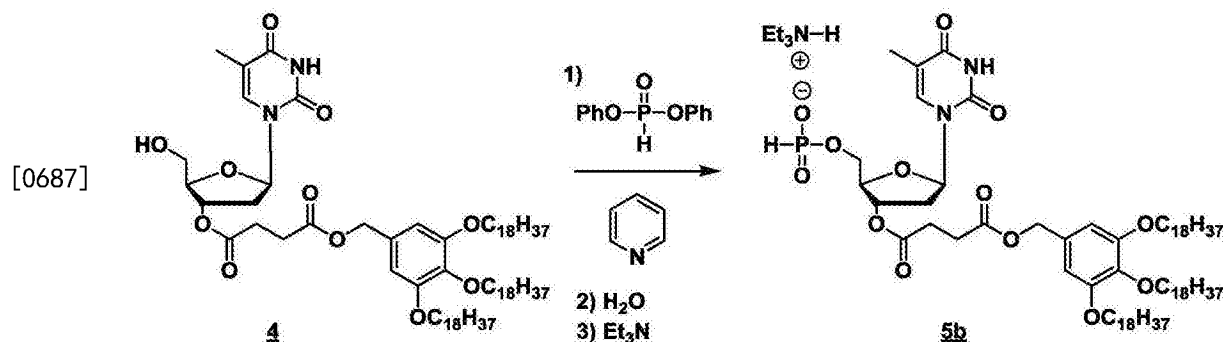
[0682] 在氮气气氛下, 于40℃, 向亚磷酸 (336mg, 4.0mmol) 的吡啶 (10mL) 溶液中, 添加2, 2-二甲基丁酰氯 (0.33mL, 2.4mmol), 进行39分钟的搅拌。向该反应混合物中添加化合物4 (498mg, 0.40mmol), 于40℃进行1小时搅拌, 添加2, 2-二甲基丁酰氯 (56μL, 0.40mmol), 进而进行1小时45分钟的搅拌。添加乙腈, 使固体析出, 用冰冷却后, 进行过滤, 以白色固体形式得到化合物5a (562mg)。

[0683] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.16–1.83 (m, 96H)、1.92 (d, 3H)、2.31–2.35 (m, 2H)、2.68 (brs, 4H)、3.90–3.98 (m, 6H)、4.17–4.24 (m, 3H)、5.02 (s, 2H)、5.39 (d, 1H)、6.38 (q, 1H)、6.53 (s, 2H)、6.94 (d, 1H)、7.68 (d, 1H)。

[0684] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 6.54。

[0685] 实施例4 (H-磷酸酯化): 化合物5b (三乙胺盐) 的合成

[0686] [化学式61]



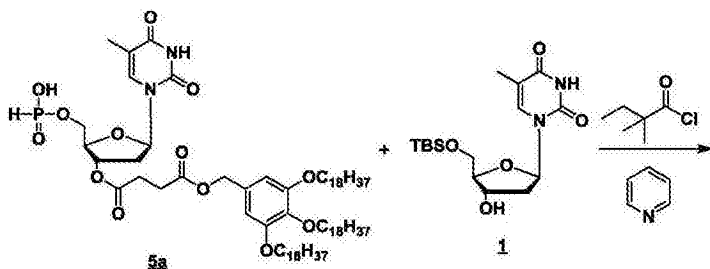
[0688] 在氮气气氛下, 于35℃, 向亚磷酸二苯酯 (0.72g, 3.1mmol) 的吡啶 (7g) 溶液中, 添加化合物4 (0.5g, 0.40mmol) 的吡啶 (5g) 溶液, 用吡啶 (3g) 洗涤。于35℃进行1小时55分钟的搅拌, 依次添加水 (2.5g)、三乙胺 (1.9g), 进行26分钟的搅拌。添加乙腈, 过滤析出的固体, 以白色固体形式得到化合物5b (507mg)。

[0689] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.20–1.81 (m, 105H)、1.98 (s, 3H)、2.32–2.35 (m, 2H)、2.67 (brs, 4H)、3.00–3.09 (m, 6H)、3.90–4.17 (m, 9H)、5.02 (s, 2H)、5.41 (t, 1H)、6.41 (t, 1H)、6.53 (s, 2H)、6.90 (d, 1H)、7.84 (s, 1H)、7.92 (brs, 1H)、12.67 (brs, 1H)。

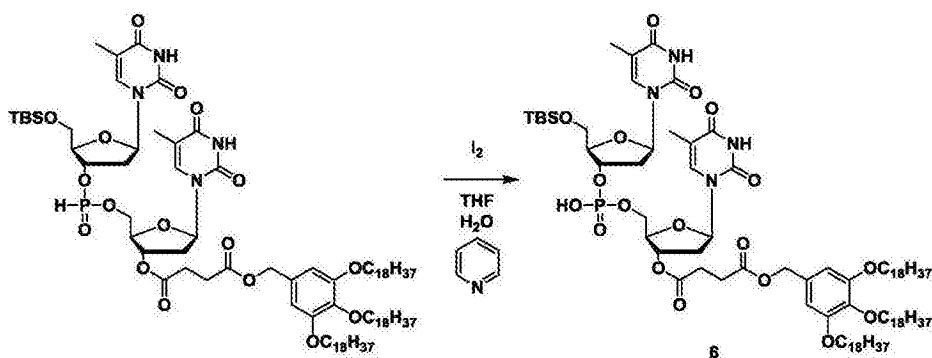
[0690] ^{31}P -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ 5.11.

[0691] 实施例5(偶联及氧化): 化合物6的合成

[0692] [化学式62]



[0693]



[0694] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物5a(49mg)和化合物1(20mg,0.056mmol)的吡啶(1mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(25 μL ,0.18mmol),进行41分钟的搅拌。然后,添加0.1M碘吡啶/THF/水溶液(0.73mL,0.073mmol),进行29分钟的搅拌,添加亚磷酸三甲酯(4.3 μL ,0.036mmol)。在减压下浓缩反应混合物,添加乙腈,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以肉色固体形式得到化合物6(34mg)。

[0695] ^1H -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ 0.091-0.13 (m, 6H)、0.85-0.95 (m, 18H)、1.08-1.83 (m, 96H)、1.90 (s, 3H)、1.91 (s, 3H)、2.36 (brs, 2H)、2.57-2.67 (m, 6H)、3.81-4.29 (m, 12H)、4.91 (t, 1H)、5.01 (s, 2H)、5.42 (s, 1H)、6.28-6.37 (m, 2H)、6.53 (s, 2H)、7.51 (s, 1H)、7.72 (s, 1H)。

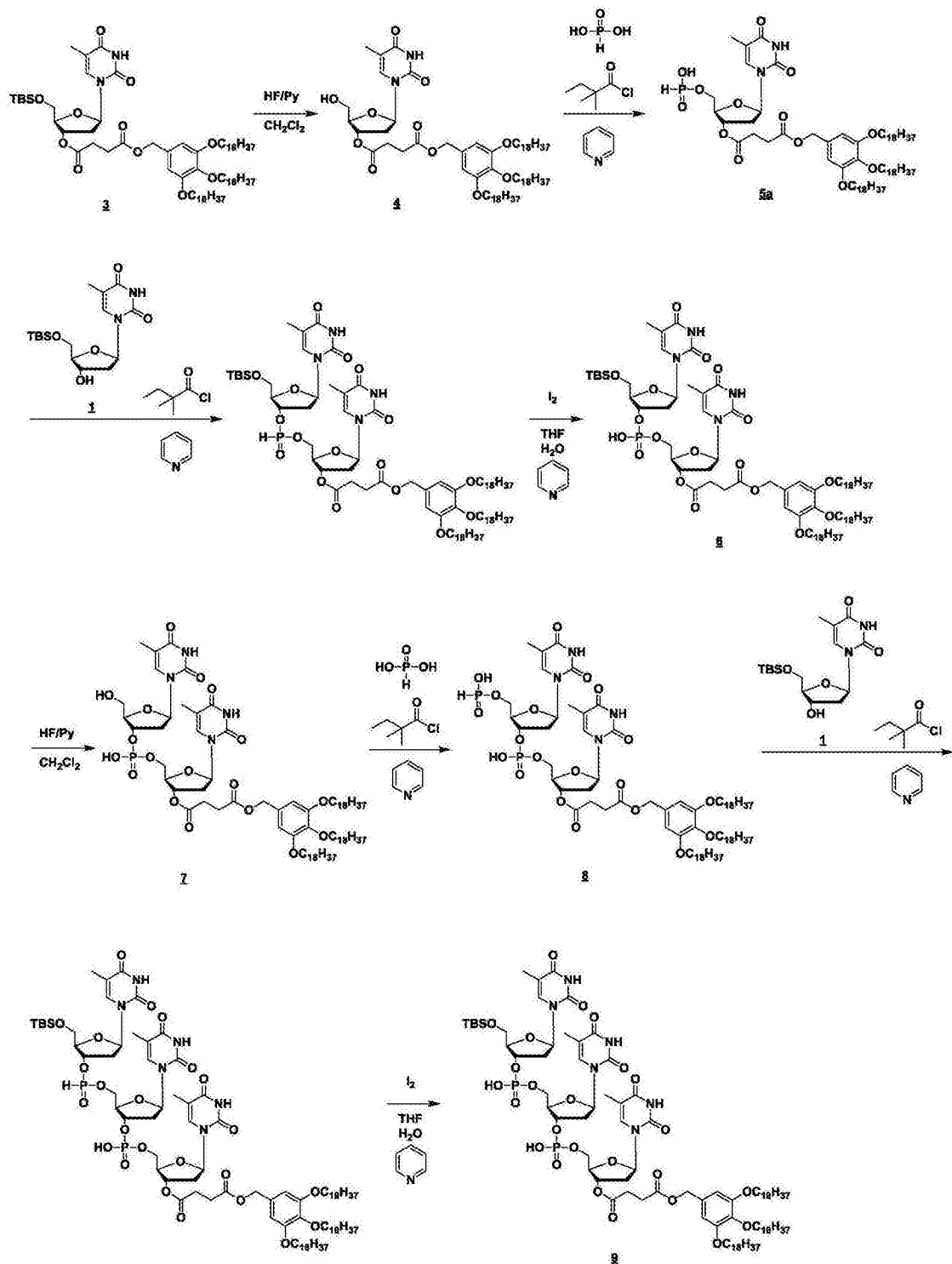
[0696] ^{31}P -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ 0.70.

[0697] MS (ESI $^-$): $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1654.1197.

[0698] 实施例6(三聚体(3mer)合成): 化合物9的合成

[0699] [化学式63]

[0700]



[0701] 工序1化合物6的合成

[0702] 在氮气气氛下,于40℃,向化合物3(1.00g,0.74mmol)的二氯甲烷(5mL)溶液中,添加氟化氢-吡啶(86.5μL,3.3mmol),进行4小时42分钟的搅拌,添加六甲基二硅氧烷[TMS₂O](0.55mL,2.6mmol)。向相当于0.57mmol化合物3的量的该反应混合物中,添加吡啶(8mL),在减压下浓缩。再次添加吡啶(8mL),在减压下浓缩,添加吡啶(6mL),制成化合物4的吡啶溶液。

[0703] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(0.50g,6.1mmol)的吡啶(16mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.41mL,3.0mmol),进行35分钟的搅拌。向该溶液中添加化合物4的吡啶溶液,用吡啶(1mL)洗涤。于40℃进行6小时35分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.12mL,0.87mmol),进而进行3小时搅拌。添加乙腈,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以白色固体形式得到化合物5a(737mg)。

[0704] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物5a(702mg)和化合物1(279mg,0.78mmol)的吡啶(14mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.36mL,2.6mmol),进行33分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液(6.3mL,0.63mmol),进行21分钟的搅拌,添加亚磷酸三甲酯(12μL,0.11mmol)。向反应混合物中添加乙腈,使固体析出,在减压下浓缩,添加乙腈,用冰冷却后,进行过滤,以淡肉色固体形式得到化合物6(799mg)。

[0705] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.096 (s, 3H)、0.11 (s, 3H)、0.85-0.95 (m, 18H)、1.10-1.83 (m, 96H)、1.90 (s, 3H)、1.91 (s, 3H)、2.35 (brs, 2H)、2.57-2.67 (m, 6H)、3.86-4.28 (m, 12H)、4.92 (t, 1H)、5.02 (s, 2H)、5.35 (s, 1H)、6.28-6.33 (m, 2H)、6.53 (s, 2H)、7.49 (s, 1H)、7.59 (s, 1H)。

[0706] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.96。

[0707] 工序2化合物9的合成

[0708] 在氮气气氛下,于40℃,向化合物6(750mg)的二氯甲烷(4mL)溶液中,添加氟化氢-吡啶(51.9μL,2.0mmol),进行3小时23分钟的搅拌,添加六甲基二硅氧烷[TMS_2O](0.33mL,1.6mmol)。添加吡啶(8mL),在减压下浓缩。再次添加吡啶(8mL),在减压下浓缩,添加吡啶(6mL),制成化合物7的吡啶溶液。

[0709] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(0.37g,4.4mmol)的吡啶(12mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.37mL,2.7mmol),进行39分钟的搅拌。向该溶液中添加化合物7的吡啶溶液,用吡啶(1mL)洗涤。于40℃进行1小时43分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯(61μL,0.44mmol),进而进行3小时31分钟的搅拌。添加乙腈,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以白色固体形式得到化合物8(611mg)。

[0710] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物8(600mg)和化合物1(194mg,0.54mmol)的吡啶(10mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.25mL,1.8mmol),进行34分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液(4.3mL,0.43mmol),进行58分钟的搅拌,添加亚磷酸三甲酯(16μL,0.14mmol)。向反应混合物中添加乙腈,使固体析出,在减压下浓缩,添加乙腈,用冰冷却后,进行过滤,以淡肉色固体形式得到化合物9(634mg)。

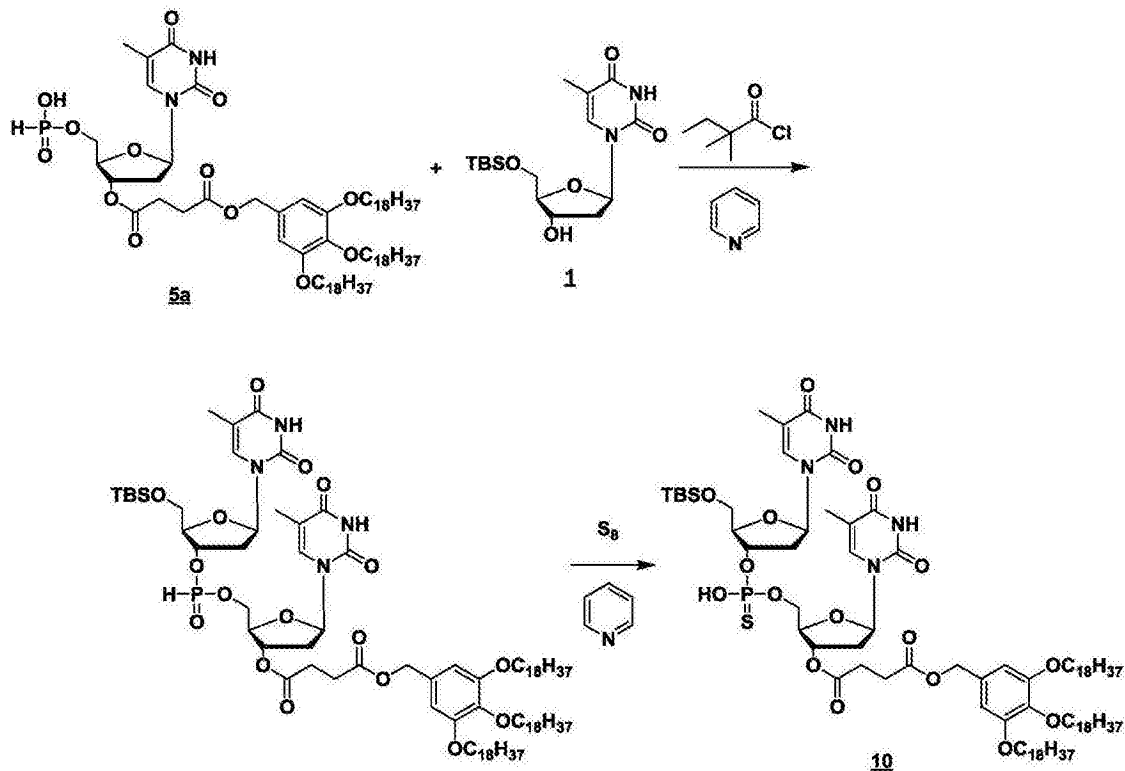
[0711] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.093 (s, 3H)、0.10 (s, 3H)、0.85-0.92 (m, 18H)、1.09-1.89 (m, 105H)、2.01-2.52 (m, 6H)、2.67 (brs, 4H)、3.85-4.26 (m, 15H)、4.92 (s, 1H)、5.01 (s, 2H)、5.02 (s, 1H)、5.38 (s, 1H)、6.13 (s, 1H)、6.24-6.30 (m, 2H)、6.53 (s, 2H)、7.42 (s, 1H)、7.48 (s, 1H)、7.60 (s, 1H)。

[0712] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ -1.52、-1.33。

[0713] 实施例7(偶联及硫化):化合物10的合成

[0714] [化学式64]

[0715]



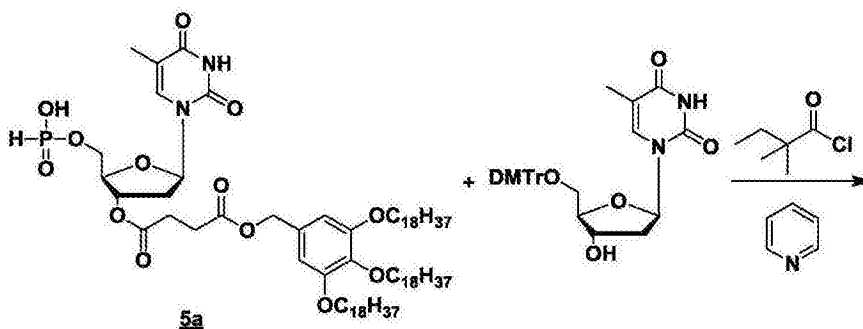
[0716] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物5a (102mg) 和化合物1 (38mg, 0.11mmol) 的吡啶 (2mL) 溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯 (49μL, 0.36mmol), 进行23分钟的搅拌。然后,添加单质硫 (28mg, 0.87mmol), 进行1小时8分钟的搅拌,添加乙腈,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以白色固体形式得到化合物10 (121mg)。

[0717] ³¹P-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ60.46、61.07.

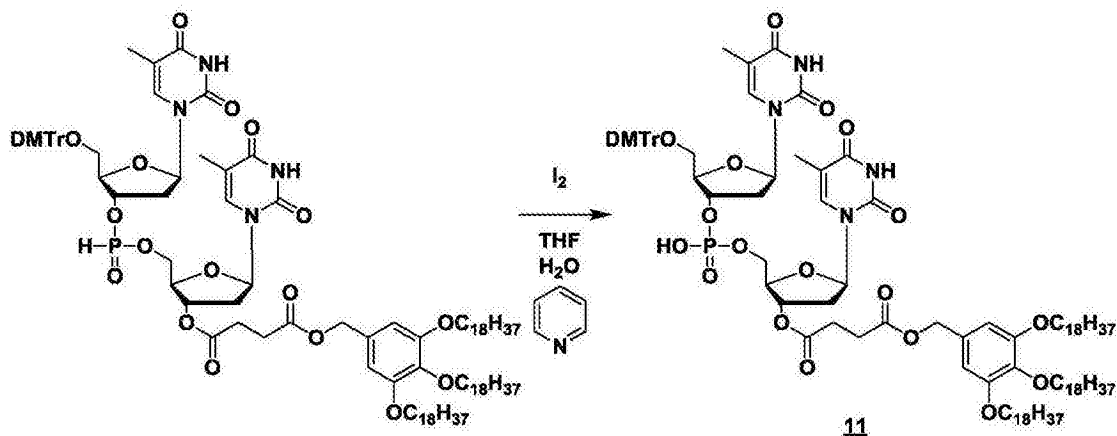
[0718] MS (ESI⁻): [M-H]⁻ 1670.0959.

[0719] 实施例8 (临时保护基为二甲氧基三苯甲基时的二聚体 (2mer) 合成): 化合物11的合成

[0720] [化学式65]



[0721]

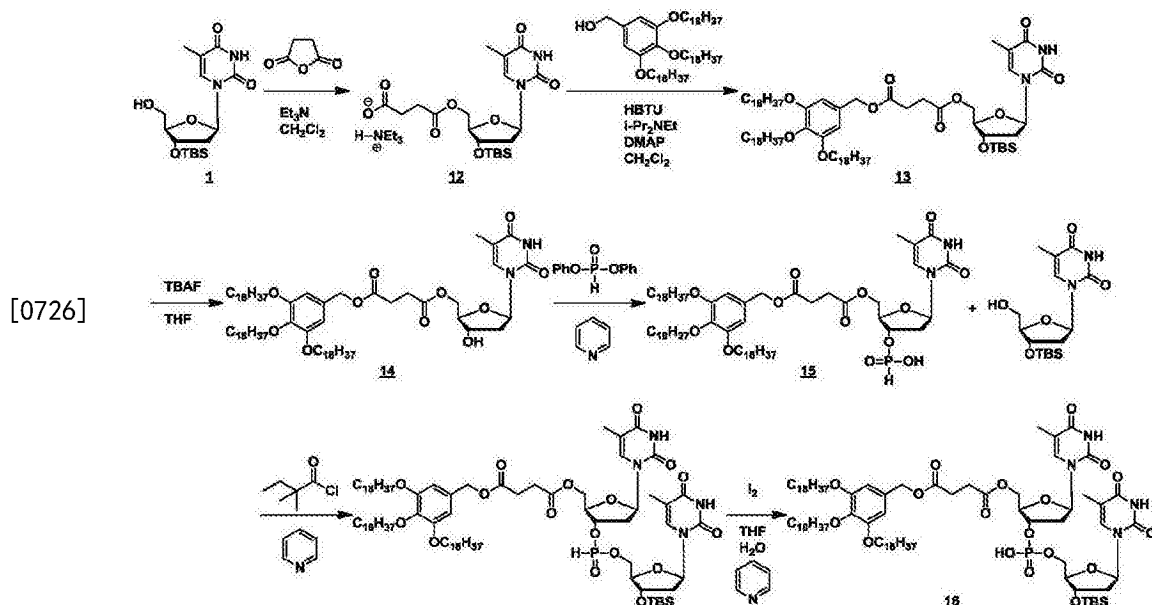


[0722] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物5a (103mg) 和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷(东京化成工业公司制) (61mg, 0.11mmol) 的吡啶 (2mL) 溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯 (50μL, 0.36mmol), 进行22分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液 (0.88mL, 88μmol), 进行57分钟的搅拌,添加亚磷酸三甲酯 (1.7μL, 14μmol)。添加乙腈,在减压下浓缩反应混合物。添加乙腈,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以淡红色固体形式得到化合物11 (96mg)。

[0723] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.09–2.01 (m, 102H)、2.37–2.69 (m, 8H)、3.67–4.22 (m, 18H)、4.91–5.02 (m, 3H)、5.38 (s, 1H)、6.09 (s, 1H)、6.25 (s, 1H)、6.54 (s, 2H)、6.81–7.36 (m, 13H)、7.51 (s, 1H)、7.56 (s, 1H)。

[0724] 实施例9 (5' → 3' 方向的二聚体合成): 化合物16的合成

[0725] [化学式66]



[0727] 工序1化合物12的合成

[0728] 在氮气气氛下,在室温下,向3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷(Berry(ベリー)公司制)(3.07g,8.6mmol)、琥珀酸酐(1.29g,12.9mmol)的二氯甲烷(31g)溶液中,添加三乙胺(2.64g,26.1mmol),进行2小时33分钟的搅拌。向反应混合物中添加2.0M磷酸-三乙胺水溶液,进行分液。针对得到的有机层,使用2M磷酸-三乙胺水溶液,通过2次分液进行洗涤,用硫酸镁干燥,然后在减压下蒸馏去除溶剂,以白色泡状固体(3.73g)形式得到化合物12。

[0729] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.10 (s, 3H)、0.12 (s, 3H)、0.90 (s, 9H)、1.23 (t, 9H)、1.90 (s, 3H)、2.05-2.14 (m, 1H)、2.36-2.43 (m, 1H)、2.51-2.86 (m, 4H)、3.00 (q, 6H)、4.10 (brs, 1H)、4.21-4.26 (m, 1H)、4.40-4.43 (m, 1H)、4.59-4.63 (m, 1H)、5.30 (s, 1H)、6.08 (q, 1H)、7.41 (d, 1H)、9.95 (brs, 1H)。

[0730] 工序2化合物13的合成

[0731] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物12(3.73g,8.2mmol)、3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲醇(4.96g,5.4mmol)的二氯甲烷(224g)溶液中,添加2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐[HBTU](4.13g,10.9mmol)、二异丙基乙胺(1.42g,11.0mmol)、二甲基氨基吡啶(1.37g,11.2mmol),进行16小时18分钟的搅拌。向反应混合物中添加甲醇,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物13(7.18g)。

[0732] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.080-0.085 (m, 6H)、0.86-0.89 (m, 18H)、1.18-1.84 (m, 96H)、1.94 (d, 3H)、2.05-2.14 (m, 1H)、2.27-2.34 (m, 1H)、2.64-2.74 (m, 4H)、3.91-3.98 (m, 6H)、4.04-4.07 (m, 1H)、4.20-4.39 (m, 3H)、5.01 (s, 2H)、6.25 (t, 1H)、6.52 (s, 2H)、7.27 (d, 1H)、8.01 (brs, 1H)。

[0733] 工序3(延伸反应循环工序a:脱保护)化合物14的合成

[0734] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物13(6.06g,4.5mmol)的四氢呋喃[THF](60g)溶液中,添加1.0M四丁基氟化铵[TBAF]/THF溶液(4.5mL,4.9mmol),进行1小时23分钟的搅拌。向反应混合物中添加甲醇,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物14(5.45g)。

[0735] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.08-1.84 (m, 96H)、1.93 (d, 3H)、2.07-2.16 (m, 1H)、2.32-2.40 (s, 1H)、2.62-2.79 (m, 4H)、3.91-4.00 (m, 7H)、4.16 (dd, 1H)、4.27

(quint, 1H)、4.39 (dd, 1H)、5.01 (q, 2H)、6.25 (t, 1H)、6.53 (s, 2H)、7.24 (d, 1H)。

[0736] 工序4(延伸反应循环工序b:H-磷酸酯化) 化合物15的合成

[0737] 在氮气气氛下,在室温下,向亚磷酸二苯酯(1.36g, 5.8mmol)的吡啶(15mL)溶液中,添加化合物14(1.05g, 0.85mmol)的吡啶(10mL)溶液,用吡啶(5mL)洗涤。于40℃进行1小时22分钟的搅拌,依次添加水(5.13g)、三乙胺(3.79g),进行14分钟的搅拌。向反应混合物中添加乙腈,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物15(1.09g)。

[0738] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.20-1.83 (m, 96H)、1.93 (d, 3H)、2.14-2.23 (m, 1H)、2.54-2.74 (m, 5H)、3.90-3.98 (m, 6H)、4.32-4.39 (m, 3H)、4.80-4.86 (m, 1H)、5.00 (s, 2H)、6.30 (t, 1H)、6.52 (s, 2H)、6.89 (d, 1H)、7.28 (d, 1H)、8.17 (brs, 1H)、12.32 (brs, 1H)。

[0739] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 3.86。

[0740] 工序5(延伸反应循环工序c及d:偶联及氧化) 化合物16的合成

[0741] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物15(250mg)和3'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)胸苷(97mg, 0.27mmol)的吡啶(5mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.12mL, 0.90mmol),进行29分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液(2.2mL, 0.22mmol),进行40分钟的搅拌,添加亚磷酸三甲酯(4.3 μL , 36 μmol)。在减压下浓缩反应混合物,添加乙腈,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以淡肉色固体形式得到化合物16(270mg)。

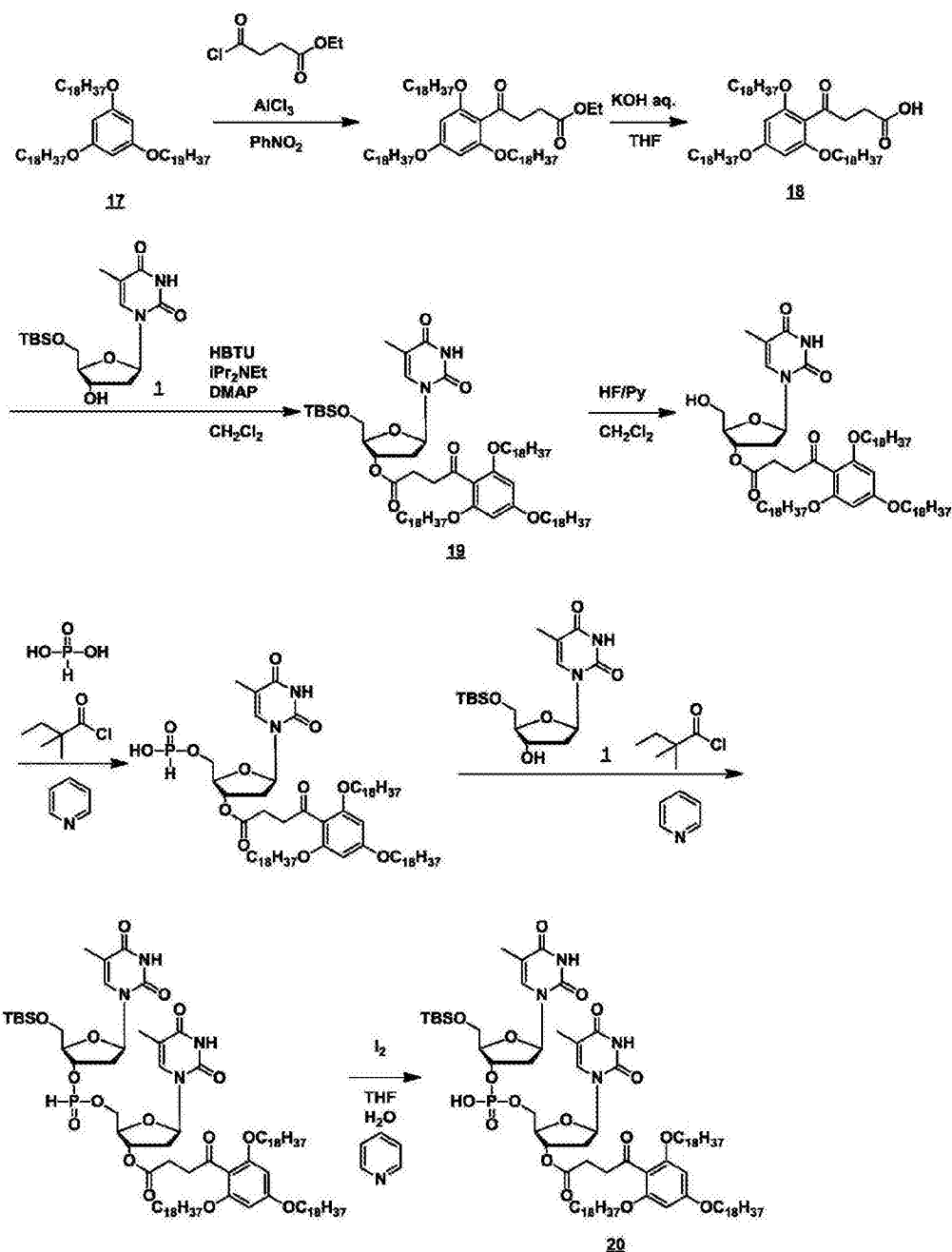
[0742] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.076 (s, 6H)、0.83-0.96 (m, 18H)、1.06-1.83 (m, 96H)、1.89 (s, 3H)、1.92 (s, 3H)、2.11-2.67 (m, 8H)、3.90-4.47 (m, 13H)、4.92 (s, 1H)、4.99 (s, 2H)、6.19-6.28 (m, 2H)、6.52 (s, 2H)、7.26 (s, 1H)、7.55 (s, 1H)。

[0743] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ -0.48。

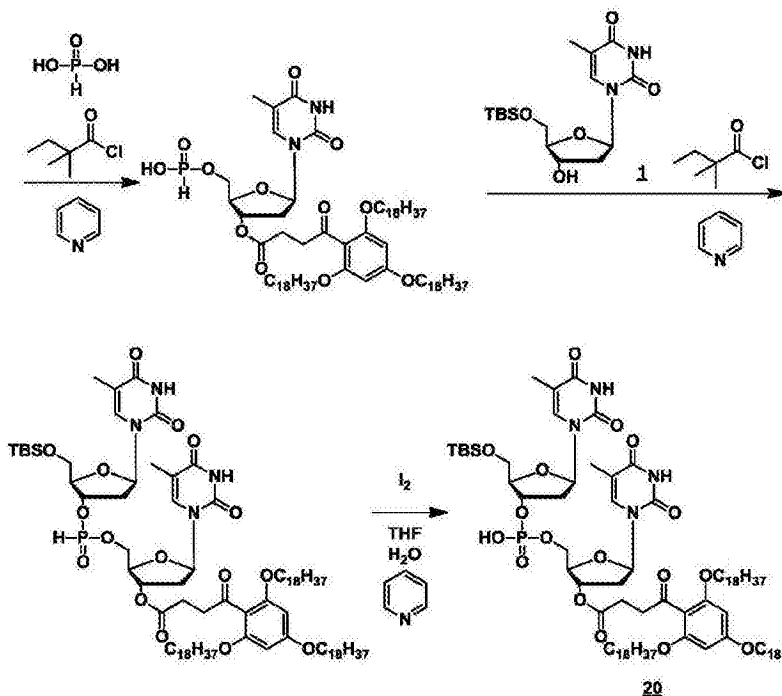
[0744] MS (ESI $^-$): $[\text{M-H}]^-$ 1654.1123。

[0745] 实施例10(二聚体合成): 化合物20的合成

[0746] [化学式67]



[0747]



[0748] 工序1化合物18的合成

[0749] 在氮气气氛下,于 60°C ,向化合物17(按照日本特开第2011-126993号中记载的方法合成)(4.26g, 4.8mmol)的硝基苯(43g)溶液中,添加琥珀酸单乙酯酰氯(1.36mL, 9.7mmol),添加氯化铝(1.30g, 9.8mmol),于 60°C 进行2小时2分钟的搅拌。冷却至室温,使用水通过2次分液进行洗涤。向得到的有机层中添加甲醇,使固体析出,进行过滤,得到淡黄色固体。

[0750] 向该固体的THF(15g)溶液中,添加氢氧化钾(3.17g, 48mmol)水溶液,在加热回流下进行1小时25分钟的搅拌。添加水(2g),用浓盐酸将水层的pH调节至7~8。添加二氯甲烷(38g)、水(12g),进行分液,在减压下浓缩得到的有机层。将得到的残余物溶解于THF中,添加甲醇,过滤析出的固体,以褐色固体形式得到化合物18(3.70g)。

[0751] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 0.88 (t, 9H)、1.11-1.88 (m, 96H)、3.17 (t, 2H)、3.62 (t、

2H)、4.04 (t, 4H)、4.11 (t, 2H)、6.53 (s, 2H)。

[0752] MS (ESI⁻): [M-H]⁻981.8884。

[0753] 工序2化合物19的合成

[0754] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物18 (3.56g, 3.6mmol)、化合物1 (1.98g, 5.6mmol)的二氯甲烷 (22g) 溶液中,添加2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐[HBTU] (2.75g, 7.3mmol)、二异丙基乙胺 (1.23mL, 7.2mmol)、二甲基氨基吡啶 (0.91g, 7.4mmol),进行1小时31分钟的搅拌。向反应混合物中添加水,进行分液。针对得到的水层,用二氯甲烷进行分液,合并得到的有机层,用饱和氯化钠水溶液进行洗涤,在减压下浓缩。添加己烷,使固体析出,进行过滤,将固体除去。用硅胶色谱法(己烷-乙酸乙酯)纯化得到的粗产物,以橙色油状物形式得到化合物19 (2.85g)。

[0755] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 0.13 (s, 6H)、0.88 (t, 9H)、0.93 (s, 9H)、1.14-1.87 (m, 96H)、1.92 (d, 3H)、2.05-2.14 (m, 1H)、2.39-2.45 (m, 1H)、2.67 (t, 2H)、3.09 (t, 2H)、3.88-3.94 (m, 8H)、4.11 (d, 1H)、5.27 (d, 1H)、6.05 (s, 2H)、6.35 (q, 1H)、7.55 (d, 1H)、8.01 (d, 1H)。

[0756] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1322.0619。

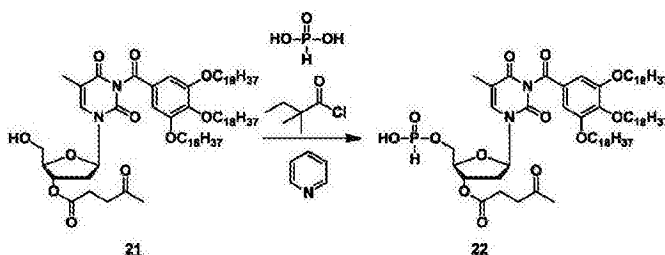
[0757] 工序3化合物20的合成

[0758] 在氮气气氛下,向化合物19 (22.5mg)的二氯甲烷 (0.3mL) 溶液中,添加氟化氢-吡啶 (3μL),进行7小时3分钟的搅拌,添加三甲基氯硅烷[TMSCl] (10μL)。添加吡啶 (0.1mL),添加亚磷酸 (2.9mg)、2,2-二甲基丁酰氯 (20μL),添加化合物1 (12.9mg)。进行2天搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯 (10μL),进而进行1小时28分钟的搅拌。添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液 (1mL),进行1天搅拌,添加硫代硫酸钠已饱和的乙腈与水的混合溶剂(乙腈/水=9/1(重量比)),进行过滤,得到化合物20。

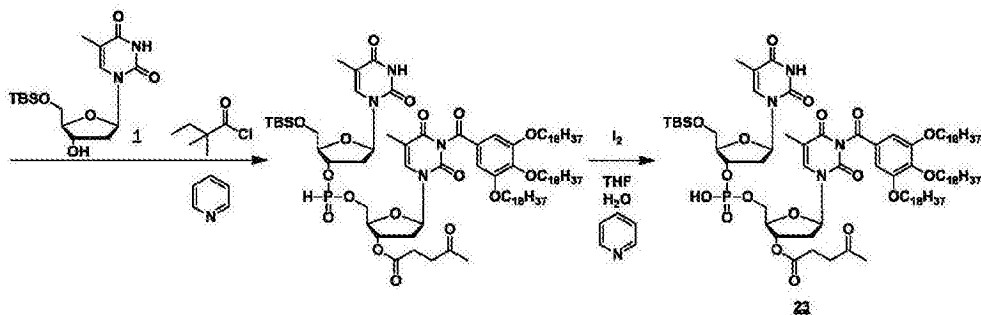
[0759] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1624.1104。

[0760] 实施例11 (二聚体合成): 化合物23的合成

[0761] [化学式68]



[0762]



[0763] 工序1化合物22的合成

[0764] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸 (329mg, 4.0mmol)的吡啶 (11mL) 溶液中,添加2,

2-二甲基丁酰氯 (0.33mL, 2.4mmol), 进行32分钟的搅拌。向该溶液中添加化合物21 (按照国际公开第2014-077292号中记载的方法合成) (492mg, 0.39mmol), 用吡啶 (0.40mL) 洗涤。于40℃进行3小时40分钟的搅拌, 添加乙腈, 使固体析出, 用冰冷却后, 进行过滤, 以淡黄色固体形式得到化合物22 (495mg)。

[0765] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.17-1.83 (m, 96H)、1.97 (d, 3H)、2.18 (s, 3H)、2.33-2.44 (m, 2H)、2.54-2.58 (m, 2H)、2.73-2.79 (m, 2H)、3.95-4.05 (m, 6H)、4.20 (t, 1H)、4.27 (d, 2H)、5.37 (d, 1H)、6.38 (t, 1H)、7.10 (s, 2H)、6.94 (d, 1H)、7.76 (d, 1H)。

[0766] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 6.62。

[0767] 工序2化合物23的合成

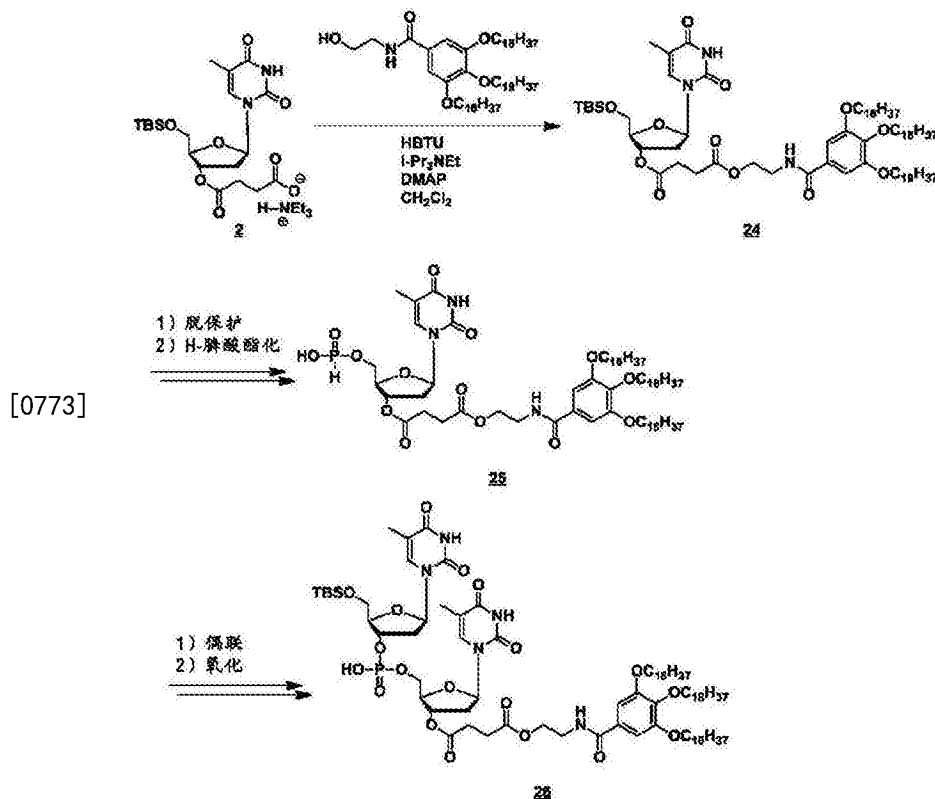
[0768] 在氮气气氛下, 于25℃, 向化合物22 (453mg) 和化合物1 (177mg, 0.50mmol) 的吡啶 (9mL) 溶液中, 添加2, 2-二甲基丁酰氯 (0.14mL, 1.0mmol), 进行28分钟的搅拌。添加2, 2-二甲基丁酰氯 (0.14mL, 1.0mmol), 进而进行44分钟的搅拌, 然后, 添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液 (4.0mL, 0.40mmol), 进行1小时36分钟的搅拌, 添加亚磷酸三甲酯 (7.8 μL , 0.066mmol)。向反应混合物中添加乙腈, 使固体析出, 在减压下浓缩, 添加乙腈, 用冰冷却后, 进行过滤, 以淡褐色固体形式得到化合物23 (478mg)。

[0769] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.095-0.13 (m, 6H)、0.85-0.97 (m, 18H)、1.08-1.83 (m, 96H)、1.89-1.95 (m, 6H)、2.06-2.39 (m, 7H)、2.54-2.65 (m, 2H)、2.75-2.82 (m, 2H)、3.86-4.30 (m, 12H)、4.90-5.39 (m, 2H)、6.12-6.40 (m, 2H)、7.12 (d, 2H)、7.45-7.82 (m, 2H)。

[0770] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ -1.27。

[0771] 实施例12 (二聚体合成): 化合物26的合成

[0772] [化学式69]



[0774] 工序1化合物24的合成

[0775] 在氮气气氛下,于40℃,向化合物2(89mg,0.16mmol)、N-(2-羟基乙基)-3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺(按照日本特开第2001-122889号中记载的方法合成)(100mg,0.10mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液中,添加2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐[HBTU](77mg,0.20mmol)、二异丙基乙胺(35μL,0.21mmol)、二甲基氨基吡啶(25mg,0.20mmol),进行1小时21分钟的搅拌。向反应混合物中添加甲醇,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物24(135mg,收率93%)。

[0776] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.096 (s, 3H)、0.11 (s, 3H)、0.88 (t, 9H)、0.91 (s, 9H)、1.12-1.84 (m, 96H)、1.92 (d, 3H)、2.04-2.14 (m, 1H)、2.34-2.41 (m, 1H)、2.68 (brs, 4H)、3.70 (q, 2H)、3.86 (s, 2H)、3.96-4.02 (m, 6H)、4.07 (s, 1H)、4.32 (t, 2H)、5.25 (d, 1H)、6.29-6.34 (m, 1H)、6.55 (t, 1H)、6.98 (s, 2H)、7.52 (d, 1H)、8.07 (brs, 1H)。

[0777] MS (ESI⁺): [M+H]⁺ 1409.0956。

[0778] 工序2化合物25的合成

[0779] 在氮气气氛下,于40℃,向化合物24(99mg,0.070mmol)的二氯甲烷(0.5mL)溶液中,添加氟化氢-吡啶(8.3μL,0.32mmol),进行3小时34分钟的搅拌,添加六甲基二硅氧烷[TMS₂O](53mL,0.25mmol)。添加吡啶(1mL),在减压下浓缩。再次添加吡啶(1mL),在减压下浓缩,添加吡啶(0.8mL),制成已经脱保护的化合物的吡啶溶液。

[0780] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(57mg,0.693mmol)的吡啶(2mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(59μL,0.43mmol),进行31分钟的搅拌。向该混合物中添加上述的已经脱保护的化合物的吡啶溶液,用吡啶(0.5mL)洗涤。于40℃进行1小时12分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯(15μL,0.11mmol),进而进行1小时17分钟的搅拌。向反应混合物中添加乙腈,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以白色固体形式得到化合物25(78mg)。

[0781] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.18-1.83 (m, 96H)、1.91 (s, 3H)、2.19-2.36 (m, 2H)、2.65 (brs, 4H)、3.69 (brs, 2H)、3.95-4.01 (m, 6H)、4.13 (s, 1H)、4.17 (s, 1H)、4.20 (s, 1H)、4.32 (t, 2H)、5.28 (d, 1H)、6.29 (q, 1H)、6.80 (brs, 1H)、6.88 (d, 1H)、7.00 (s, 2H)、7.53 (s, 1H)。

[0782] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 6.86。

[0783] MS (ESI⁻): [M-H]⁻ 1356.9650。

[0784] 工序3化合物26的合成

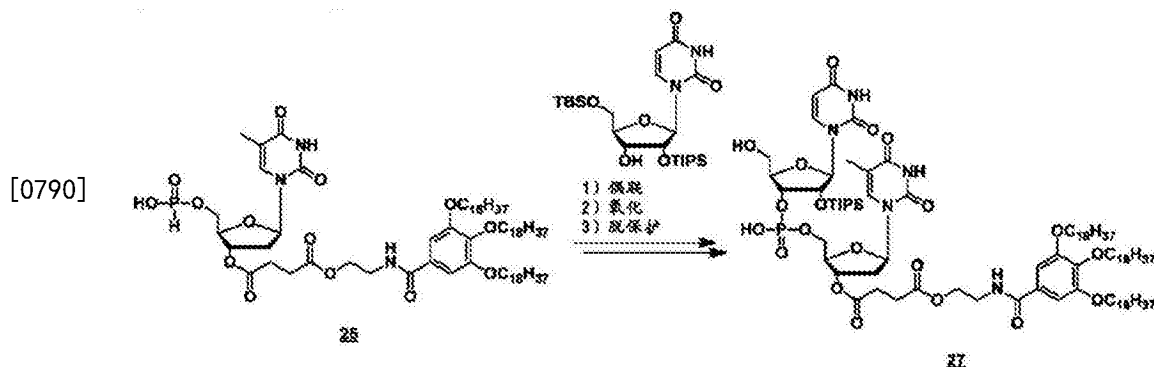
[0785] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物25(69mg)和化合物1(28mg,78mmol)的吡啶(1.4mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(35μL,0.25mmol),进行48分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液(0.6mL,0.060mmol),进行1小时搅拌,添加亚磷酸三甲酯(1.2μL,0.010mmol)。在减压下浓缩反应混合物,添加乙腈,用冰冷却后,进行过滤,以淡褐色固体形式得到化合物26(76mg)。

[0786] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.087-0.12 (m, 6H)、0.85-0.95 (m, 18H)、1.17-1.78 (m, 96H)、1.86-1.89 (m, 6H)、2.02-2.65 (m, 8H)、3.67-4.30 (m, 16H)、4.92-5.36 (m, 2H)、6.12-6.32 (m, 2H)、6.90 (brs, 1H)、6.99-7.03 (m, 2H)、7.45-7.60 (m, 2H)。

[0787] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ -1.11。

[0788] 实施例13(RNA的二聚体合成):化合物27的合成

[0789] [化学式70]

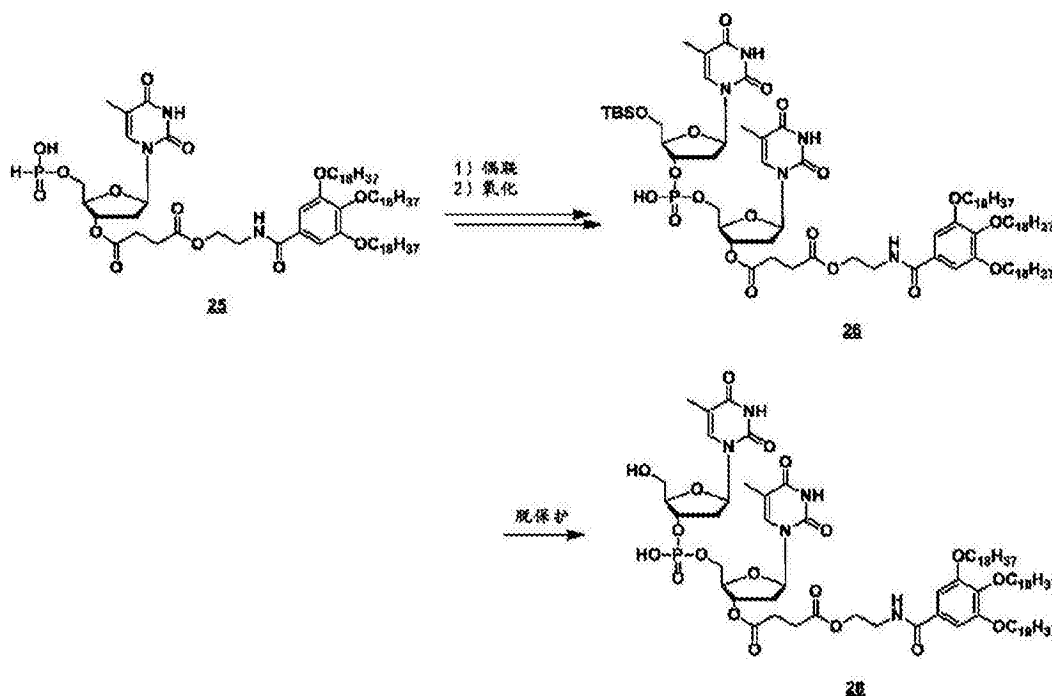


[0791] 在氮气气氛下,于40℃,向化合物25(9.4mg)和5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-O-三异丙基甲硅烷基尿嘧啶核苷(参考合成例2中所记载)(5.3mg,10mmol)的吡啶(0.50mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(9.4μL,69μmol),进行37分钟的搅拌。然后,添加包含0.05M的碘的吡啶和水的溶液(0.17mL,8.5μmol),进行4小时搅拌,然后,于80℃进行15小时23分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物27。

[0792] MS(ESI⁻):[M-H]⁻1755.1612.

[0793] 实施例14(偶联~脱保护连续化):化合物28的合成

[0794] [化学式71]



[0795]

[0796] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物25(100mg)和化合物1(38mg,0.11mmol)的吡啶(5.0mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(47μL,0.34mmol),进行14分钟的搅拌。然后,添加包含0.05M的碘的吡啶和水的溶液(1.7mL,0.085mmol),进行55分钟的搅拌,进而添加包含0.05M的碘的吡啶和水的溶液(0.41mL,0.021mmol),进行38分钟的搅拌。然后,添加亚磷酸二甲酯(0.63μL,0.0069mmol),于100℃进行5小时57分钟的搅拌。将反应混合物冷却,添加至乙腈(41g)中,使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以肉色固体形式得到化合物28(0.11g)。

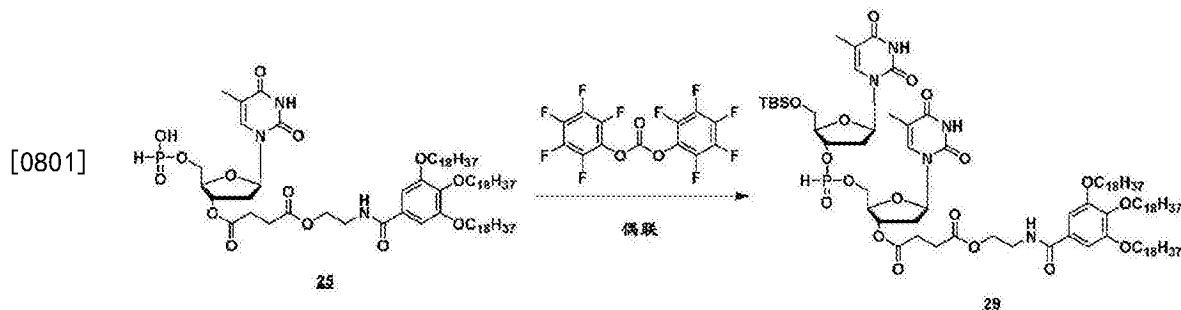
[0797] ¹H-NMR:(300MHz;CDCl₃)δ0.88(t,9H)、1.17-1.82(m,96H)、1.86(s,3H)、2.23-2.34

(m, 4H)、2.64 (brs, 4H)、3.67-4.31 (m, 16H)、5.04 (brs, 1H)、5.41 (s, 1H)、6.13 (t, 1H)、6.29 (t, 1H)、6.97-7.00 (m, 1H)、7.02 (s, 2H)、7.26-7.63 (m, 2H)、9.28 (brs, 2H)。

[0798] ^{31}P -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ -0.069。

[0799] 实施例15(使用碳酸双五氟苯基酯作为缩合剂的偶联): 化合物29的合成

[0800] [化学式72]

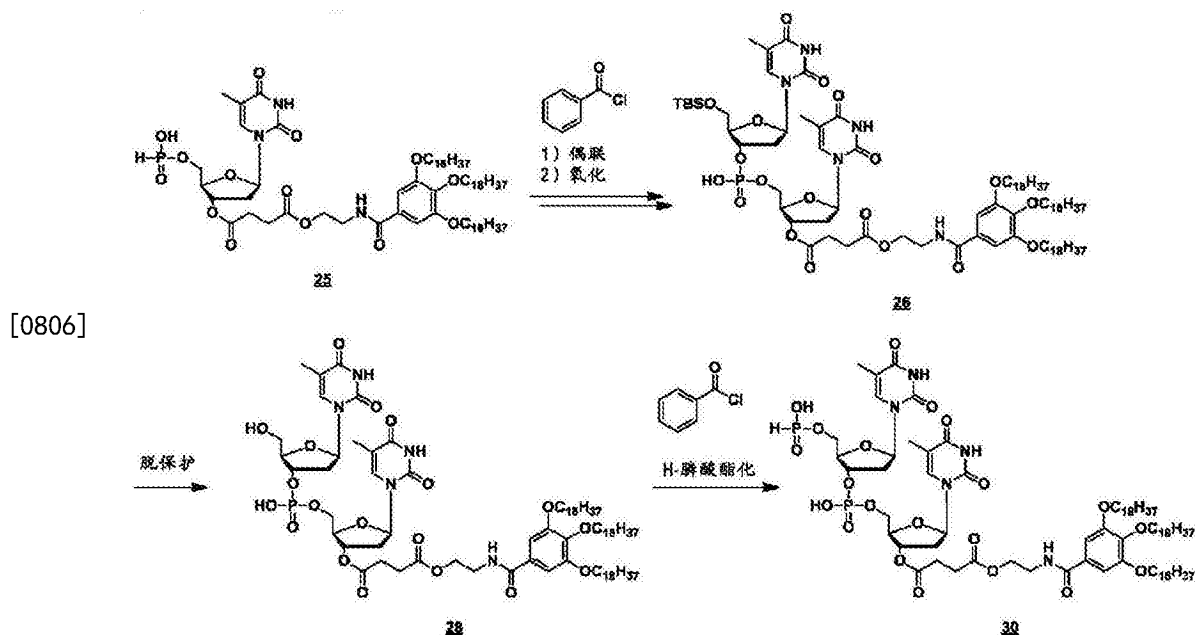


[0802] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物25 (10mg) 和化合物1 (4.2mg, 0.012mmol) 的吡啶 (0.50mL) 溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯 (15.4mg, 0.039mmol), 进行20分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,作为主产物得到化合物29。

[0803] MS (ESI⁻): [M-H]⁻ 1711.1424。

[0804] 实施例16(将苯甲酰氯用于缩合剂的1个循环): 化合物30的合成

[0805] [化学式73]



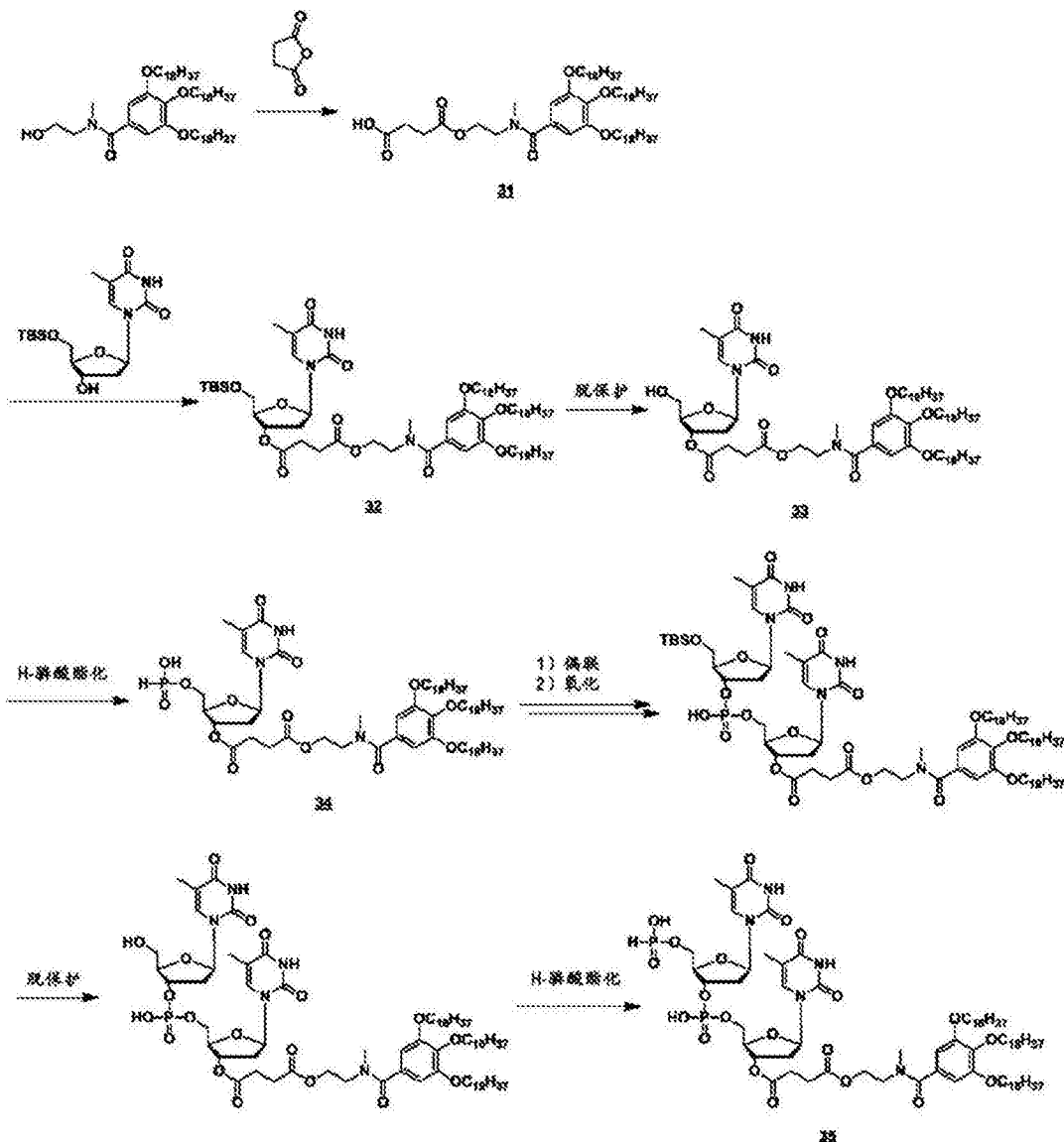
[0807] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物25 (102mg) 和化合物1 (39mg, 0.11mmol) 的吡啶 (5.0mL) 溶液中,添加苯甲酰氯 (24μL, 0.21mmol), 进行15分钟的搅拌。然后,添加包含0.05M 的碘的吡啶和水的溶液 (2.1mL, 0.11mmol), 进行36分钟的搅拌后,添加亚磷酸二甲酯 (3.2μL, 0.035mmol)。于100℃进行4小时31分钟的搅拌,在减压下浓缩反应混合物。添加吡啶 (5.0mL), 在减压下浓缩后,添加吡啶 (5.0mL)。添加亚磷酸 (56mg, 0.68mmol), 将苯甲酰氯 (50μL, 0.43mmol) 分成3等份,于40℃,每隔10分钟进行添加,进行2小时35分钟的搅拌,添加苯甲酰氯 (8.3μL, 0.071mmol), 进而进行54分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (44g) 中,过滤析出的固体,以淡褐色固体形式得到化合物30 (0.11g)。

[0808] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.87 (t, 9H)、1.08–1.99 (m, 102H)、2.23–2.63 (m, 8H)、3.67 (brs, 2H)、3.96 (t, 6H)、4.15–4.27 (m, 6H)、5.08 (brs, 1H)、5.35 (s, 1H)、6.16 (s, 1H)、6.24 (s, 1H)、6.83 (d, 1H)、7.04 (s, 2H)、7.13 (brs, 1H)、7.47 (s, 1H)、7.53 (s, 1H)、9.86 (brs, 2H)。

[0809] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ -1.59、5.89。

[0810] 实施例17 (使用DNA, 以脱保护连续化的方式进行1个循环): 化合物35的合成

[0811] [化学式74]



[0813] 工序1化合物31的合成

[0814] 在氮气气氛下, 在室温下, 向N-(2-羟基乙基)-N-甲基-3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酰胺(按照日本特开第2001-253896号中记载的方法合成)(5.0g, 5.1mmol)和琥珀酸酐(1.0g, 10mmol)的二氯甲烷(50g)溶液中, 添加三乙胺(2.1mL, 15mmol), 进行1小时57分钟的搅拌。然后, 将反应混合物添加至乙腈(513g)中, 使固体析出, 然后过滤, 以白色固体形式得到化合物31(5.3g, 收率95%)。

[0815] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.86–0.90 (m, 9H)、1.09–1.84 (m, 96H)、2.65 (s, 4H)、3.05

(s, 3H)、3.76 (brs, 2H)、3.96 (t, 6H)、4.38 (brs, 2H)、6.58 (s, 2H)。

[0816] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1082.9343。

[0817] 工序2化合物32的合成

[0818] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物31 (1.0g, 0.92mmol) 和化合物1 (0.51g, 1.4mmol) 的二氯甲烷 (25mL) 溶液中,添加HBTU (0.70g, 1.8mmol)、二异丙基乙胺 (0.31mL, 1.8mmol)、DMAP (0.23g, 1.9mmol), 进行1小时9分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至甲醇 (102g) 中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物32 (1.3g, 收率99%)。

[0819] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 0.13 (s, 6H)、0.86-0.94 (m, 18H)、1.09-1.84 (m, 96H)、1.92 (s, 3H)、2.14-2.43 (m, 2H)、2.66 (brs, 4H)、3.06 (s, 3H)、3.68 (brs, 2H)、3.90-3.98 (m, 8H)、4.10 (s, 1H)、4.34 (brs, 2H)、5.27 (d, 1H)、6.34 (q, 1H)、6.57 (s, 2H)、7.54 (s, 1H)、8.07 (brs, 1H)。

[0820] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1421.1060。

[0821] 工序3化合物33的合成

[0822] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物32 (1.2g, 0.86mmol) 的THF (10mL) 溶液中,添加 1.0M TBAF/THF溶液 (0.95mL, 0.95mmol), 进行1小时10分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至甲醇 (123g) 中,过滤析出的固体,以淡肉色固体形式得到化合物33 (1.2g, 定量性的)。

[0823] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 0.88 (t, 9H)、1.03-1.84 (m, 96H)、1.92 (s, 3H)、2.36-2.41 (m, 2H)、2.65 (brs, 4H)、3.06 (s, 3H)、3.75 (brs, 2H)、3.86 (brs, 2H)、3.93-3.98 (m, 6H)、4.07 (d, 1H)、4.36 (brs, 2H)、5.30-5.34 (m, 1H)、6.21 (t, 1H)、6.59 (s, 2H)、7.51 (s, 1H)、8.21 (brs, 1H)。

[0824] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1307.0241。

[0825] 工序4化合物34的合成

[0826] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸 (0.63g, 7.6mmol) 的吡啶 (20mL) 溶液中,添加2, 2-二甲基丁酰氯 (0.68mL, 5.0mmol), 进行32分钟的搅拌。向该溶液中添加化合物33 (1.0g, 0.77mmol), 于40℃进行3小时3分钟的搅拌,添加2, 2-二甲基丁酰氯 (52μL, 0.38mmol), 进而进行1小时4分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (210g) 中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物34 (1.0g)。

[0827] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 0.88 (t, 9H)、1.10-1.81 (m, 96H)、1.91 (s, 3H)、2.33-2.37 (m, 2H)、2.66 (brs, 4H)、3.06 (s, 3H)、3.68-3.80 (brs, 2H)、3.94-4.36 (m, 11H)、6.36 (q, 1H)、6.59 (s, 2H)、6.90 (d, 1H)、7.60 (s, 1H)。

[0828] ³¹P-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 6.56。

[0829] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1370.9904。

[0830] 工序5化合物35的合成

[0831] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物34 (106mg) 和化合物1 (43mg, 0.12mmol) 的吡啶 (2.0mL) 溶液中,添加2, 2-二甲基丁酰氯 (49μL, 0.36mmol), 进行30分钟的搅拌。然后,添加包含0.05M的碘的吡啶和水的溶液 (2.0mL, 0.10mmol), 进行38分钟的搅拌,进而添加包含0.05M的碘的吡啶和水的溶液 (0.13mL, 0.0063mmol), 进行10分钟的搅拌。然后,添加亚磷酸二甲酯 (3.3μL, 0.036mmol), 于100℃进行3小时33分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,添加吡啶 (5.0mL), 再次在减压下浓缩后,添加吡啶 (1.5mL)。

[0832] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(64mg,0.77mmol)的吡啶(2.0mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(64μL,0.46mmol),进行28分钟的搅拌。向该溶液中添加上述的包含已经脱保护的化合物的反应混合物,于40℃进行1小时5分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯(20μL,0.14mmol),进而进行1小时12分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈(51g)中,使所析出的固体过滤析出,以褐色固体形式得到化合物35(0.12g)。

[0833] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.15-1.89 (m, 102H)、2.23-2.38 (m, 4H)、2.66 (brs, 4H)、3.05 (s, 3H)、3.72 (brs, 2H)、3.93-4.35 (m, 14H)、5.11 (brs, 1H)、5.37 (s, 1H)、6.17 (brs, 1H)、6.28 (t, 1H)、6.58 (s, 2H)、6.83 (d, 1H)、7.46 (s, 1H)、7.54 (s, 1H)、9.61 (brs, 2H)。

[0834] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ -1.52、6.01。

[0835] MS (ESI⁻): [M-H]⁻ -1675.0476。

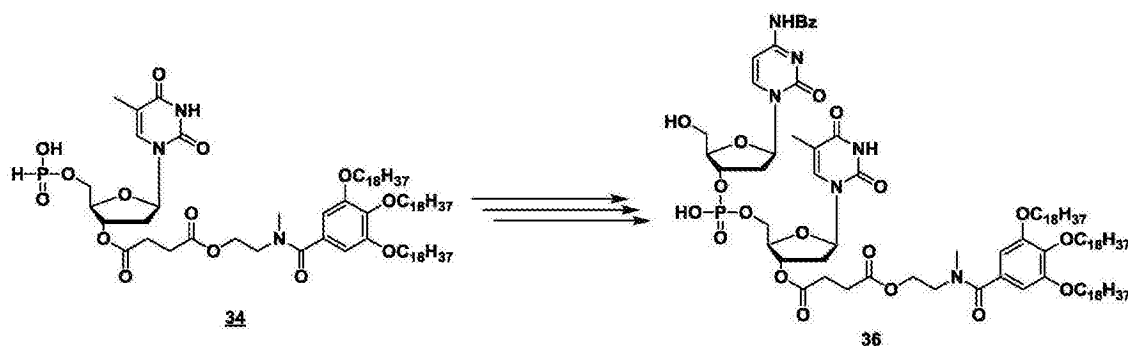
[0836] 实施例18~29(缩合剂考察): 化合物29的合成

[0837] 在与实施例15同样的条件下,将缩合剂变更为HBTU(16.1mg, 实施例18)、1,1'-羰基二咪唑[CDI](5.6mg, 实施例19)、甲磺酰氯[MsCl](2.8μL, 实施例20)、六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基磷(tripyrrolidinophosphonium) [PyBOP](20.8mg, 实施例21)、N,N'-二环己基碳二亚胺[DCC](9.1mg, 实施例22)、三氟乙酸酐[TFAA](4.7μL, 实施例23)、三氟乙酸五氟苯基酯(6.1μL, 实施例24)、对甲苯磺酰氯(9.1mg, 实施例25)、异丁酰氯(3.8μL, 实施例26)、乙酰氯(2.6μL, 实施例27)、丙酰氯(3.1μL, 实施例28)或丁酰氯(3.7μL, 实施例29)来实施反应,得到化合物29。在实施例19、20、21、22、25、26中,作为主产物得到了化合物29。

[0838] 实施例30(使用脱氧胞嘧啶核苷(deoxycytidine)的二聚体合成): 化合物36的合成

[0839] [化学式75]

[0840]



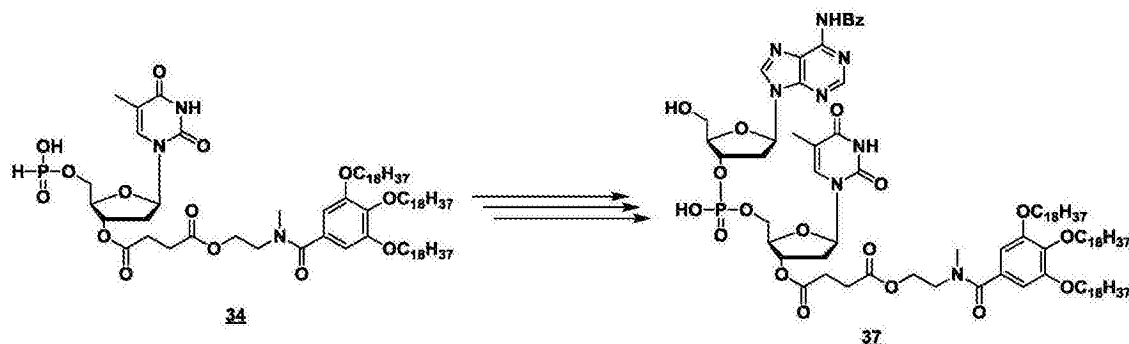
[0841] 在与实施例17的工序5同样的条件下,将化合物1变更为N⁴-苯甲酰基-5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(东京化成工业公司制)(5.3mg)来实施反应,作为主产物得到化合物36。

[0842] MS (ESI⁻): [M-H]⁻ -1700.0868。

[0843] 实施例31(使用脱氧腺嘌呤核苷(deoxyadenosine)的二聚体合成): 化合物37的合成

[0844] [化学式76]

[0845]



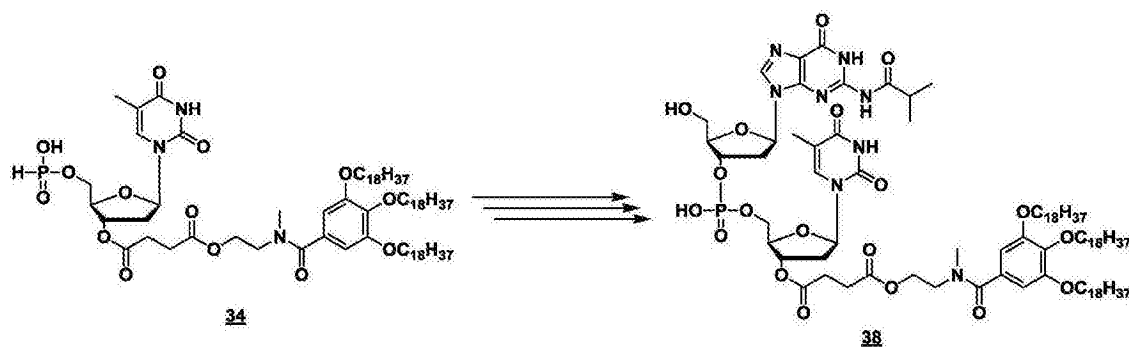
[0846] 在与实施例17的工序5同样的条件下,将化合物1变更为N⁶-苯甲酰基-5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(5.4mg)来实施反应,作为主产物得到化合物37。

[0847] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1726.1283.

[0848] 实施例32(使用脱氧鸟嘌呤核苷(deoxyguanosine)的二聚体合成):化合物38的合成

[0849] [化学式77]

[0850]



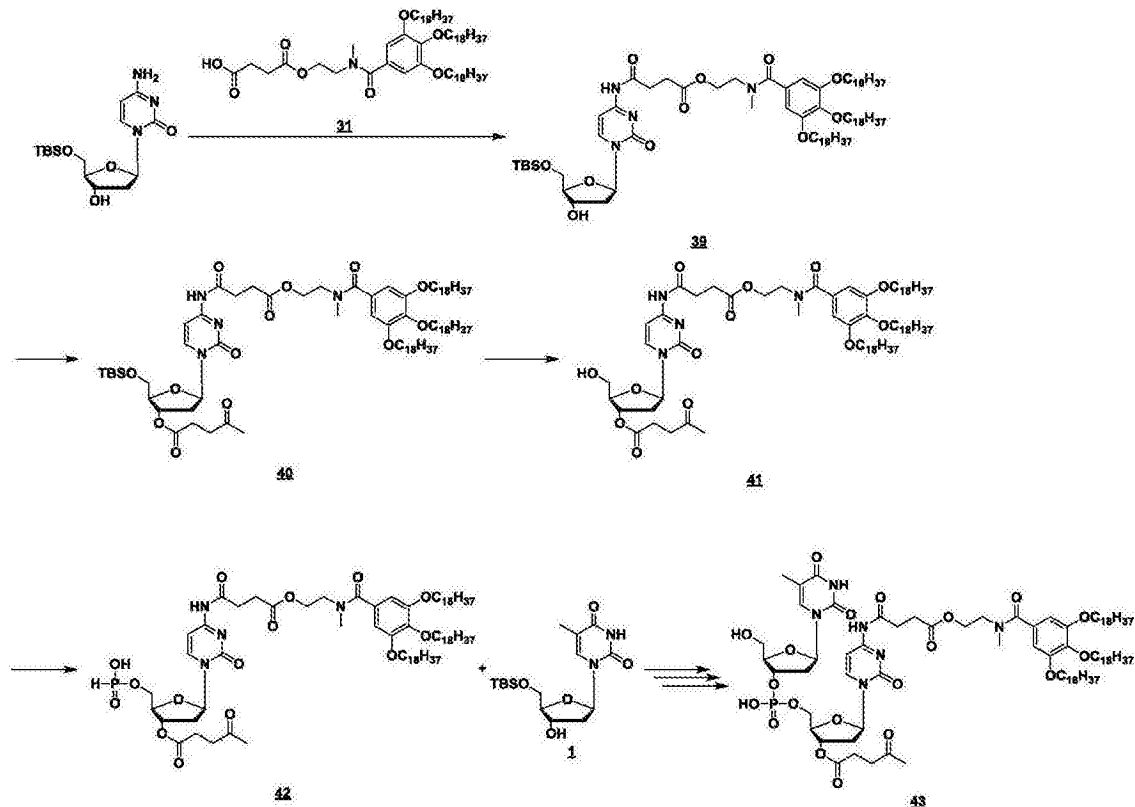
[0851] 在与实施例17的工序5同样的条件下,将化合物1变更为N²-异丁酰基-5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(6.5mg)来实施反应,作为主产物得到化合物38。

[0852] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1706.1275.

[0853] 实施例33(在核酸碱基中导入了准固相保护基的单体及二聚体合成):化合物40的合成

[0854] [化学式78]

[0855]



[0856] 工序1化合物39的合成

[0857] 在氮气气氛下,于40℃,向5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(按照Journal of Organic Chemistry,2011年,第76卷,第105页-126页中记载的方法合成)(2.5g,7.3mmol)和化合物31(5.3g,4.9mmol)的二氯甲烷(155mL)及DMF(25mL)的混合溶液中,添加1-羟基苯并三唑[HOBt](无水)(0.74g,5.5mmol),接下来,添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐[WSC·HCl](1.9g,9.9mmol),进行1小时40分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,然后,添加至甲醇(503g)中,使固体析出,然后进行过滤,以黄色固体形式得到化合物39(6.8g,收率98%)。

[0858] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.09-0.10 (m, 6H) 、0.84-0.90 (m, 18H) 、1.20-1.81 (m, 96H) 、2.12-2.21 (m, 1H) 、2.28-2.36 (m, 1H) 、2.61-2.77 (m, 5H) 、3.05 (s, 3H) 、3.76 (brs, 2H) 、3.81-3.97 (m, 8H) 、4.07 (q, 1H) 、4.37 (brs, 2H) 、4.40-4.45 (m, 1H) 、6.29 (t, 1H) 、6.57 (s, 2H) 、7.31 (d, 1H) 、8.31 (d, 1H) 、8.88 (brs, 1H) 。

[0859] MS (ESI⁻): $[\text{M-H}]^-$ 1406.1107.

[0860] 工序2化合物40的合成

[0861] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物39(6.7g,4.8mmol)、DMAP(0.062g,0.50mmol)、乙酰丙酸(0.86g,7.4mmol)的THF(69g)溶液中,添加WSC·HCl(1.4g,7.5mmol),进行50分钟的搅拌。然后,添加DMAP(0.26g,2.1mmol),在室温下进行3天搅拌。对反应混合物进行过滤后,在减压下浓缩得到的滤液,添加THF(38g)而制成溶液,然后添加至乙腈(505g)中,过滤析出的固体,以淡黄色固体形式得到化合物40(6.7g,收率93%)。

[0862] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.09 (s, 6H) 、0.86-0.90 (m, 18H) 、1.26-1.81 (m, 96H) 、2.01-2.13 (m, 2H) 、2.20 (s, 3H) 、2.52-2.80 (m, 8H) 、3.06 (s, 3H) 、3.77 (brs, 2H) 、3.86-3.98

(m, 8H)、4.20 (s, 1H)、4.38 (brs, 2H)、5.26 (d, 1H)、6.32–6.37 (m, 1H)、6.57 (s, 2H)、7.33 (d, 1H)、8.27 (d, 1H)、9.17 (brs, 1H)。

[0863] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1504.1412。

[0864] 工序3化合物41的合成

[0865] 在氮气气氛下,于30℃,向化合物37 (6.5g, 4.3mmol)、乙酸 (2.9mL, 50mmol) 的THF (71g) 溶液中,添加1.0M TBAF/THF溶液 (28mL, 28mmol),进行4小时53分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至甲醇 (531g) 中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物41 (6.0g, 定量性的)。

[0866] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 0.88 (t, 9H)、1.20–1.80 (m, 96H)、2.20 (s, 3H)、2.38–2.80 (m, 10H)、3.05 (s, 3H)、3.78 (brs, 2H)、3.88–3.98 (m, 8H)、4.18 (d, 1H)、4.39 (brs, 2H)、5.36 (quint, 1H)、6.20 (dd, 1H)、6.59 (s, 2H)、7.21–7.31 (m, 1H)、8.19 (d, 1H)。

[0867] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1390.0541。

[0868] 工序4化合物42的合成

[0869] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸 (1.20g, 14.6mmol) 的吡啶 (40mL) 溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯 (1.28mL, 9.3mmol),进行30分钟的搅拌。向该溶液中添加化合物41 (2.0g, 1.4mmol),于40℃进行1小时23分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物42 (2.2g)。

[0870] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 0.88 (t, 9H)、1.26–1.83 (m, 96H)、2.19 (s, 3H)、2.38–2.88 (m, 10H)、3.06 (s, 3H)、3.75 (brs, 2H)、3.92–4.35 (m, 11H)、5.37 (d, 1H)、6.17 (t, 1H)、6.58 (s, 2H)、6.88 (d, 1H)、7.26–7.28 (m, 1H)、8.51 (d, 1H)。

[0871] ³¹P-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ 5.73。

[0872] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1454.0237。

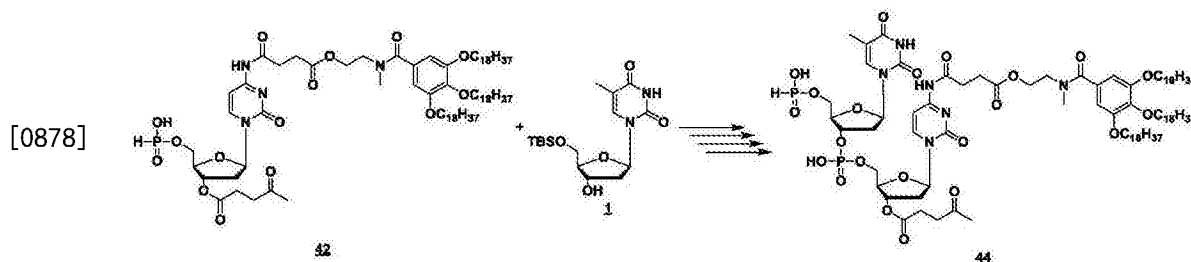
[0873] 工序5化合物43的合成

[0874] 在氮气气氛下,于40℃,向化合物42 (96mg) 和化合物1 (36mg, 0.10mmol) 的吡啶 (2.0mL) 溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯 (45μL, 0.33mmol),进行23分钟的搅拌。然后,添加包含0.05M的碘的吡啶和水的溶液 (2.6mL, 0.13mmol),进行1小时29分钟的搅拌。然后,添加亚磷酸二甲酯 (3.0μL, 0.033mmol),添加水 (0.26mL, 14.4mmol) 后,于70℃进行15小时55分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,作为主产物得到化合物43。

[0875] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1694.1110。

[0876] 实施例34 (二聚体合成): 化合物44的合成

[0877] [化学式79]



[0879] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物42 (1.0g) 和化合物1 (0.35g, 0.98mmol) 的吡啶 (20mL) 溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.45mL, 3.3mmol),进行17分钟的搅拌。然后,添加

包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液(9.8mL, 0.98mmol), 进行38分钟的搅拌。然后, 在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯(27g)并在减压下浓缩的操作, 然后, 添加二氯甲烷(12g), 通过过滤除去不溶物, 用二氯甲烷(6g)洗涤两次。在室温下向该溶液中添加氟化氢-吡啶(76.1μL, 2.9mmol), 进行18小时57分钟的搅拌。添加TMSCl(0.29mL, 2.3mmol), 进行17分钟的搅拌。然后, 在减压下浓缩反应混合物, 添加吡啶, 在减压下浓缩。

[0880] 在氮气气氛下, 于40℃, 向亚磷酸(0.70g, 8.5mmol)的吡啶(18mL)溶液中, 添加2, 2-二甲基丁酰氯(0.80mL, 5.8mmol), 进行39分钟的搅拌。向该溶液中添加前述浓缩物, 于40℃进行2小时37分钟的搅拌。然后, 将反应混合物添加至乙腈(518g)中, 过滤析出的固体, 以淡肉色固体形式得到化合物44(1.0g)。

[0881] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.15-1.83 (m, 96H)、1.90 (s, 3H)、2.18 (s, 3H)、2.46-2.95 (m, 12H)、3.06 (s, 3H)、3.68 (brs, 2H)、3.92-4.34 (m, 14H)、5.02 (s, 1H)、5.35 (s, 1H)、6.16 (t, 1H)、6.25 (t, 1H)、6.59 (s, 2H)、6.82 (d, 1H)、7.07 (d, 1H)、7.46 (s, 1H)、8.65 (d, 1H)。

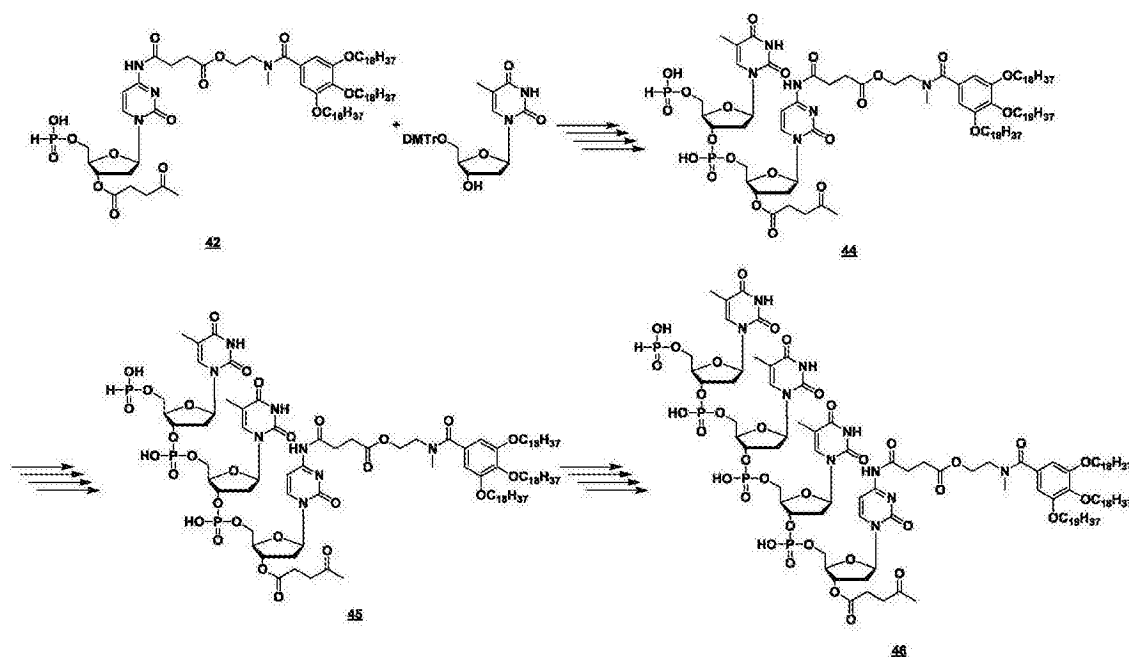
[0882] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ -2.16、4.97。

[0883] MS (ESI $^-$): $[\text{M-H}]^-$ 1758.0754。

[0884] 实施例35(四聚体(4mer)合成): 化合物46的合成

[0885] [化学式80]

[0886]



[0887] 工序1化合物44的合成

[0888] 在氮气气氛下, 于25℃, 向化合物42(0.94g)和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(东京化成工业公司制)(0.49g, 0.91mmol)的吡啶(20mL)溶液中, 添加作为缩合剂的2, 2-二甲基丁酰氯(0.42mL, 3.0mmol), 进行20分钟的搅拌(偶联反应)。然后, 添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液(9.1mL, 0.91mmol), 进行20分钟的搅拌。然后, 添加原甲酸三甲酯(1.3mL, 12mmol), 于25℃进行34分钟的搅拌, 在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯(30g)并在减压下浓缩的操作, 然后, 添加二氯甲烷(10mL), 通过抽滤除去不溶物, 用二

氯甲烷 (5mL) 萃取2次。在室温下向该溶液中添加吡咯 (0.13mL, 1.8mmol)、磷酸 (0.73g, 9.1mmol), 进行29分钟的搅拌。在室温下添加吡啶 (2.8mL), 然后, 将2,2-二甲基丁酰氯 (0.83mL, 6.0mmol) 分成3等份, 每隔10分钟进行添加, 进行1小时16分钟的搅拌, 添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.14mL, 1.0mmol), 进而进行45分钟的搅拌。然后, 将反应混合物添加至乙腈 (396g) 中, 过滤析出的固体, 以淡灰色固体形式得到化合物44 (1.0g)。

[0889] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1758.0512.

[0890] 工序2化合物45的合成

[0891] 在氮气气氛下, 于25℃, 向化合物44 (0.98g) 和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷 (东京化成工业公司制) (0.45g, 0.83mmol) 的吡啶 (20mL) 溶液中, 添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.38mL, 2.8mmol), 进行27分钟的搅拌。然后, 添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液 (8.3mL, 0.83mmol), 进行44分钟的搅拌。然后, 添加原甲酸三甲酯 (1.2mL, 11mmol), 于25℃进行42分钟的搅拌, 在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯 (30g) 并在减压下浓缩的操作, 然后, 添加二氯甲烷 (10mL), 通过抽滤除去不溶物, 用二氯甲烷 (5mL) 萃取2次。于20℃, 向该溶液中添加吡咯 (0.12mL, 1.7mmol)、磷酸 (0.69g, 8.3mmol), 进行30分钟的搅拌。于25℃, 添加吡啶 (2.8mL), 然后, 将2,2-二甲基丁酰氯 (0.76mL, 5.5mmol) 分成3等份, 每隔10分钟进行添加, 进行39分钟的搅拌, 添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.14mL, 1.0mmol), 进而进行49分钟的搅拌。然后, 将反应混合物添加至乙腈 (396g), 过滤析出的固体, 以淡灰色固体形式得到化合物45 (1.2g)。

[0892] MS (ESI⁺): [M+H]⁺2064.1191.

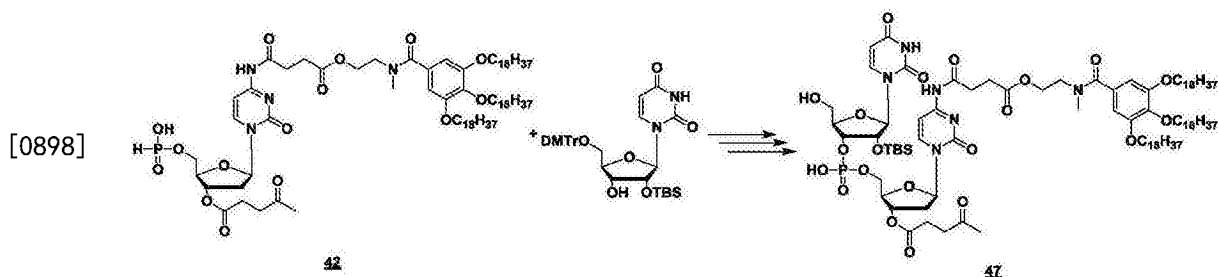
[0893] 工序3化合物46的合成

[0894] 在氮气气氛下, 于25℃, 向化合物45 (1.16g) 和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷 (东京化成工业公司制) (0.43g, 0.81mmol) 的吡啶 (20mL) 溶液中, 添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.37mL, 2.7mmol), 进行29分钟的搅拌。然后, 添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液 (8.1mL, 0.81mmol), 进行25分钟的搅拌。然后, 添加原甲酸三甲酯 (1.2mL, 11mmol), 于25℃进行21分钟的搅拌, 在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯 (30g) 并在减压下浓缩的操作, 然后, 添加二氯甲烷 (10mL), 通过抽滤除去不溶物, 用二氯甲烷 (5mL) 洗涤2次。于27~30℃, 向该溶液中添加吡咯 (0.11mL, 1.6mmol) 及磷酸 (0.65g, 8.1mmol), 进行24分钟的搅拌。于22~28℃, 添加吡啶 (3.0mL), 然后, 将2,2-二甲基丁酰氯 (0.74mL, 5.4mmol) 分成3等份, 每隔10分钟进行添加, 进行41分钟的搅拌, 添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.49mL, 3.6mmol), 进而进行1小时20分钟的搅拌。然后, 将反应混合物添加至乙腈 (397g) 中, 使所析出的固体过滤析出, 以淡灰色固体形式得到化合物46 (1.33g)。

[0895] MS (ESI⁺): [M+H]⁺2368.1574.

[0896] 实施例36 (使用RNA的二聚体合成): 化合物47的合成

[0897] [化学式81]



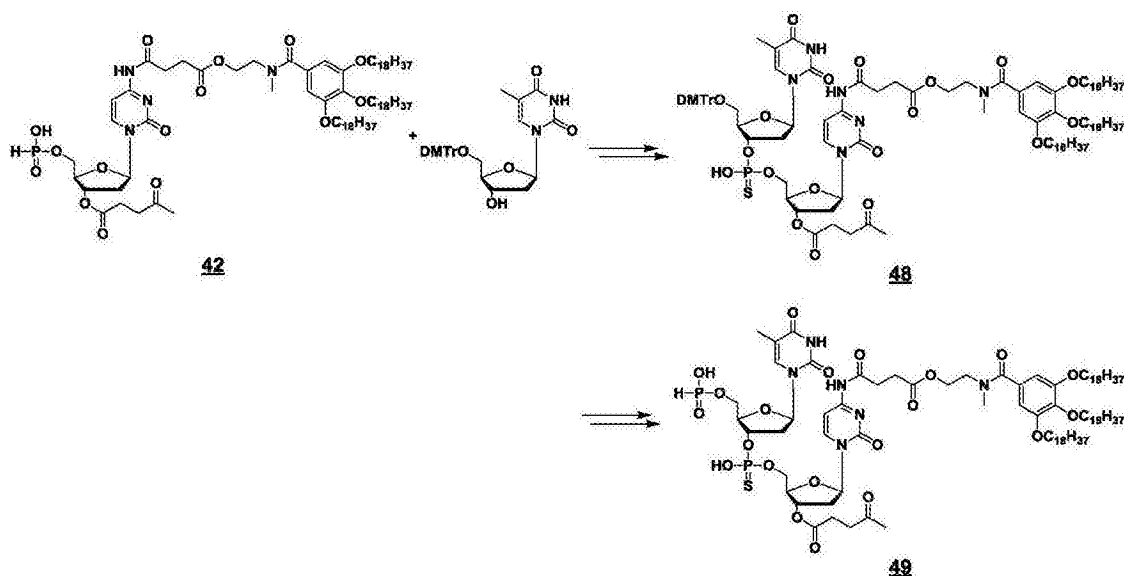
[0899] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物42(9.5mg)和2'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)尿嘧啶核苷(由关东化学公司购入)(7.8mg,0.012mmol)的吡啶(0.20mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(4.5μL,0.033mmol),进行35分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF及水的溶液(98μL,0.098mmol),进行20分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,反复进行3次添加甲苯(1mL)并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷(0.30mL),通过抽滤除去不溶物,用二氯甲烷(0.20mL×2次)萃取。在室温下向该溶液中添加吡咯(2μL,0.029mmol)、磷酸(9.1mg,0.11mmol),进行30分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,作为主产物得到化合物47。

[0900] MS(ESI⁻):[M-H]⁻1810.2131.

[0901] 实施例37(二聚体合成):化合物49的合成

[0902] [化学式82]

[0903]



[0904] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物42(104mg)和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(东京化成工业公司制)(58mg,107mmol)的吡啶(2.0mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(46μL,0.34mmol),进行32分钟的搅拌,由此进行偶联反应。然后,添加作为硫化剂的单质硫(3.2mg,0.10mmol),进行1小时32分钟的搅拌,在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯(4.0mL)并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷(1.0mL),用注射器过滤器除去不溶物,用二氯甲烷(0.50mL×2次)洗涤。在室温下向该溶液中添加吡咯(14μL,0.20mmol)、磷酸(80mg,1.0mmol),进行36分钟的搅拌,由此,进行脱临时保护基反应。在室温下添加吡啶(0.30mL),然后将2,2-二甲基丁酰氯(92μL,0.67mmol)分成3等份,每隔10分钟进行添加,进行2小时24分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯(16μL,0.12mmol),进而进行40分钟的搅

拌。然后,将反应混合物添加至乙腈(49g)中,使所析出的固体过滤析出,以白色固体形式得到化合物49(98mg)。

[0905] MS(ESI⁻):[M-H]⁻1774.0443.

[0906] 实施例38(硫化剂考察二聚体合成):化合物49的合成

[0907] 在与实施例37同样的条件下,将硫化剂变更为3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(11.8mg)来实施反应,以淡黄色固体形式得到化合物49(99mg)。

[0908] 实施例39(硫化剂考察二聚体合成):化合物48的合成

[0909] 在与实施例37同样的条件下,将硫化剂变更为3-((二甲基氨基-亚甲基)氨基)-3H-1,2,4-二噻唑-3-硫酮[DDTT](11.8mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物48。

[0910] 实施例40(硫化剂考察二聚体合成):化合物48的合成

[0911] 将在与实施例37同样的条件下实施的偶联反应后的反应溶液分成4等份,并将硫化剂变更为3H-1,2-苯并二硫杂环戊烯-3-酮(3.7mg)来实施,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物48。

[0912] 实施例41(硫化剂考察二聚体合成):化合物48的合成

[0913] 使用实施例40中得到的偶联反应后的反应溶液的四分之一,在与实施例37同样的条件下,将硫化剂变更为3H-1,2-苯并二硫杂环戊烯-3-酮-1,1-二氧化物(3.3mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物48。

[0914] 实施例42(硫化剂考察二聚体合成):化合物48的合成

[0915] 使用实施例40中得到的偶联反应后的反应溶液的四分之一,在与实施例37同样的条件下,将硫化剂变更为二硫化四乙基秋兰姆(4.4mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物48。

[0916] 实施例43(硫化剂考察二聚体合成):化合物48的合成

[0917] 在与实施例37同样的条件下,将硫化剂变更为双(苯乙酰基)二硫化物(bis(phenylacetyl)disulfide)(4.5mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物48。

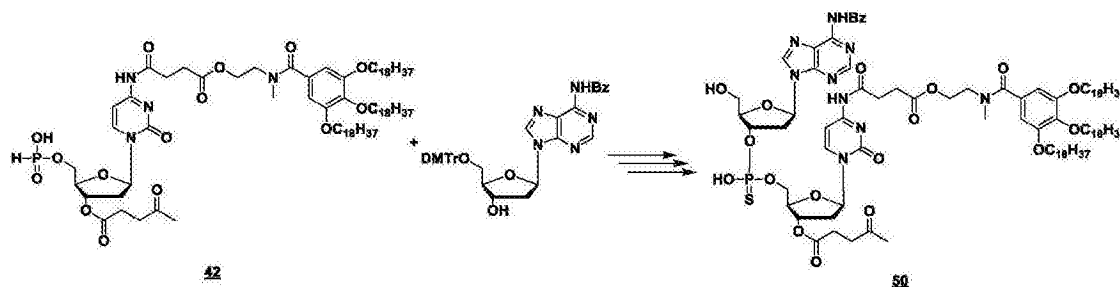
[0918] 实施例44(硫化剂考察二聚体合成):化合物48的合成

[0919] 在与实施例37同样的条件下,将硫化剂变更为N-(苯甲酰基硫基)-琥珀酰亚胺(按照Synthesis,1980年,第721-722页中记载的方法合成)(3.7mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物48。

[0920] 实施例45(使用脱氧腺嘌呤核苷的二聚体合成):化合物50的合成

[0921] [化学式83]

[0922]



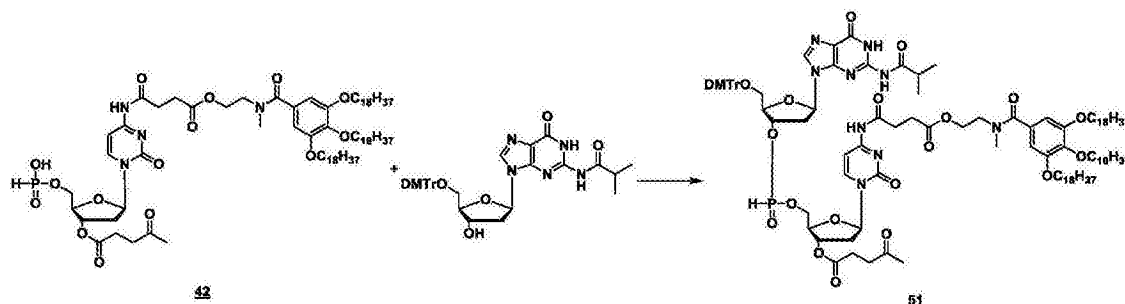
[0923] 在与实施例37同样的条件下,将5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷变更为N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(66.4mg)来实施反应,在减压下将脱临时保护基反应后的反应混合物浓缩,得到化合物50。

[0924] MS(ESI⁻):[M-H]⁻1823.1213.

[0925] 实施例46(使用脱氧鸟嘌呤核苷的二聚体合成):化合物51的合成

[0926] [化学式84]

[0927]

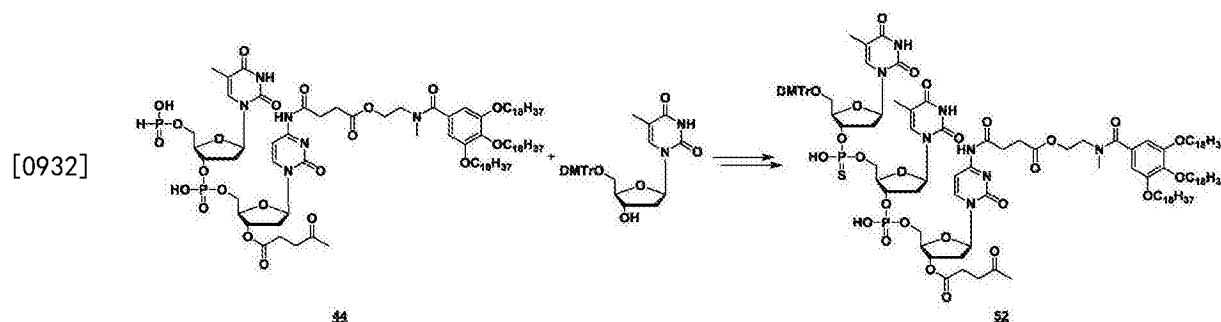


[0928] 在与实施例37同样的条件下,将5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷变更为N²-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(6.6mg)来实施反应,在减压下将偶联反应后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物51。

[0929] MS(ESI⁻):[M-H]⁻2075.2896.

[0930] 实施例47(三聚体合成):化合物52的合成

[0931] [化学式85]



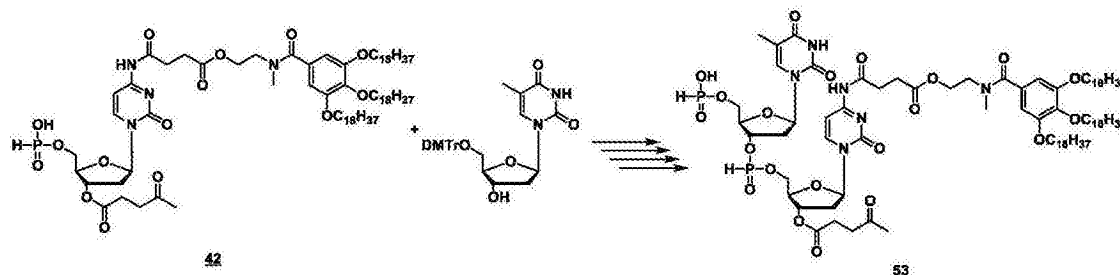
[0933] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物44(9.5mg)和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(东京化成工业公司制)(6.0mg,0.011mmol)的吡啶(0.20mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(3.8μL,0.028mmol),进行26分钟的搅拌。然后,添加单质硫(2.1mg,0.065mmol),进行1小时40分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,作为主产物得到化合物52。

[0934] MS(ESI⁻):[M-H]⁻2316.2547.

[0935] 实施例48(以H-膦酸二酯(H-phosphonatediester)进行二聚体合成):化合物53的合成

[0936] [化学式86]

[0937]

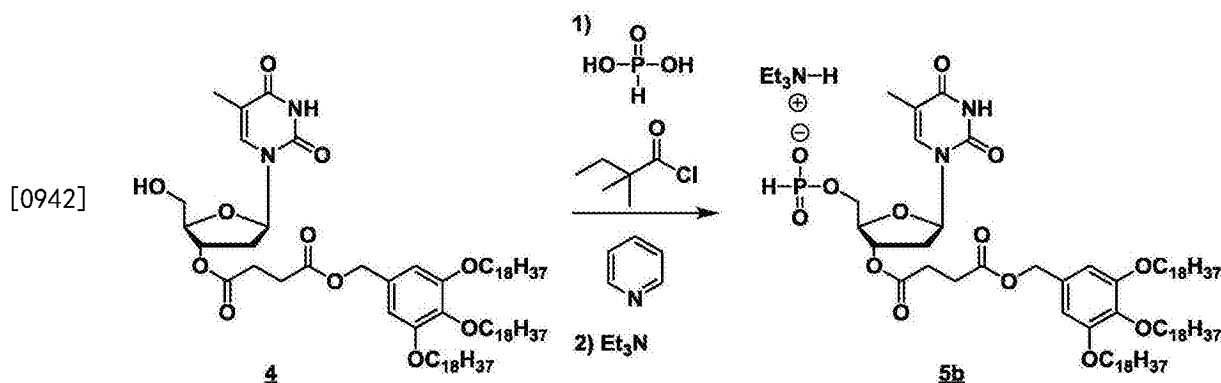


[0938] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物42 (12mg) 和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷(东京化成工业公司制) (7.0mg, 0.013mmol) 的THF (0.20mL) 溶液中添加吡啶 (1.7μL, 0.034mmol), 然后添加2,2-二甲基丁酰氯 (4.6μL, 0.034mmol), 进行45分钟的搅拌。然后,追加吡啶 (1.7μL, 0.034mmol), 进行18分钟的搅拌。于25℃,向该溶液中添加吡咯 (1.4μL, 0.020mmol)、磷酸 (8.5mg, 0.10mmol), 进行44分钟的搅拌。添加二氯甲烷 (0.20mL), 进而进行1小时20分钟的搅拌。于25℃,添加吡啶 (30μL), 然后将2,2-二甲基丁酰氯 (9.2μL, 0.067mmol) 分成3等份,每隔10分钟进行添加,进行35分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (2g) 中,过滤析出的固体,得到化合物53。

[0939] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1742.1016.

[0940] 实施例49 (H-磷酸酯化): 化合物5b (三乙胺盐) 的合成

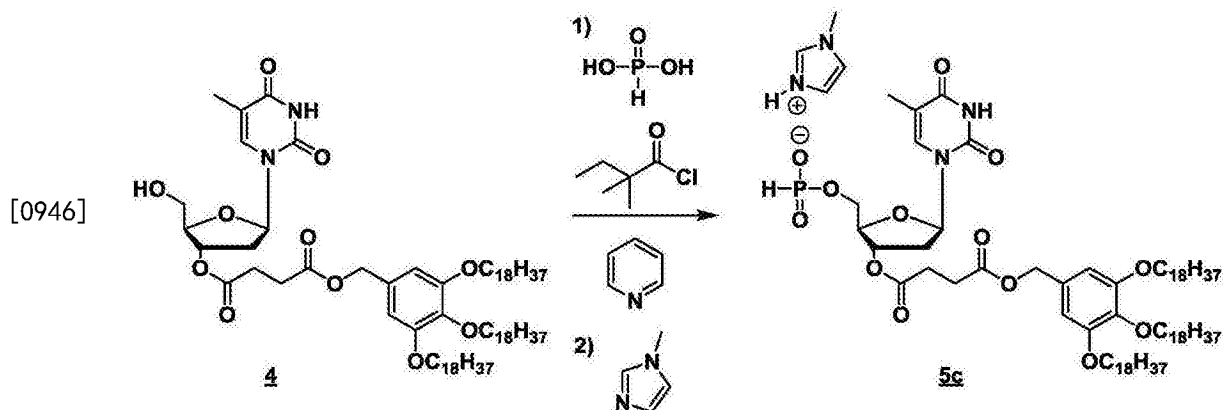
[0941] [化学式87]



[0943] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸 (345mg, 4.2mmol) 的吡啶 (10mL) 溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.33mL, 2.4mmol), 进行35分钟的搅拌。向该反应混合物中添加化合物4 (497mg, 0.40mmol), 于40℃进行1小时2分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯 (83μL, 0.61mmol), 进而进行1小时13分钟的搅拌。添加三乙胺 (2.8mL, 20mmol), 然后添加乙腈 (211g), 使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以白色固体形式得到化合物5b (547mg)。

[0944] 实施例50 (H-磷酸酯化): 化合物5c (N-甲基咪唑盐) 的合成

[0945] [化学式88]



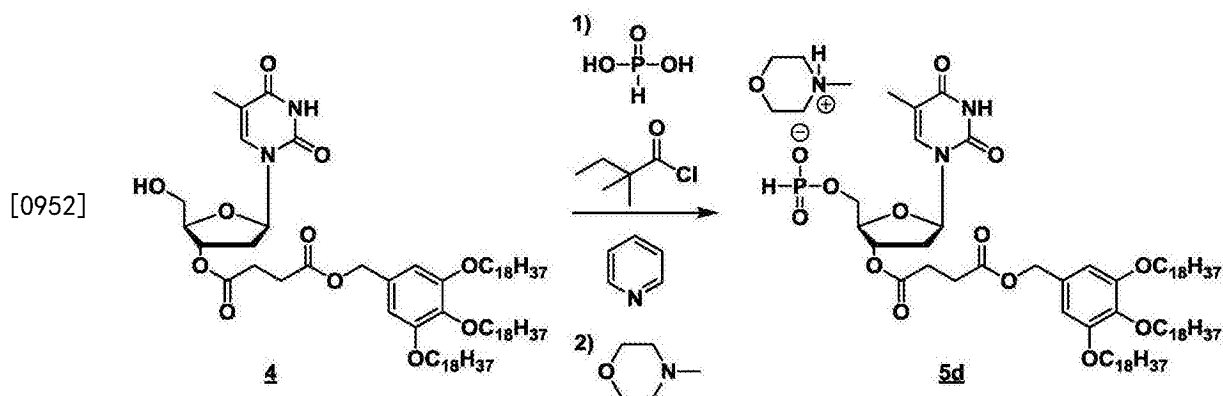
[0947] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(241mg,2.9mmol)的吡啶(7mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.23mL,1.7mmol),进行30分钟的搅拌。向该反应混合物中添加化合物4(350mg,0.28mmol),于40℃进行1小时49分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯(39μL,0.28mmol),进而进行2小时搅拌。将得到的溶液分成3等份(相当于0.093mmol化合物4),添加N-甲基咪唑(0.32mL,4.1mmol),然后,添加乙腈(40g),使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以固体形式得到化合物5c(103mg)。

[0948] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t,9H)、1.26-1.83 (m,96H)、1.92 (s,3H)、2.32-2.36 (m,2H)、2.67 (s,4H)、3.89-3.98 {m,6H+3H(N-甲基咪唑)}、4.18-4.21 (m,3H)、5.02 (s,2H)、5.41 (t,1H)、6.38 (t,1H)、6.53 (s,2H)、6.93 (d,1H)、7.04 (s,1H,N-甲基咪唑)、7.31 (s,1H,N-甲基咪唑)、7.73 (d,1H)、8.84 (s,1H,N-甲基咪唑)。

[0949] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 5.74。

[0950] 实施例51 (H-磷酸酯化): 化合物5d (N-甲基吗啉盐) 的合成

[0951] [化学式89]



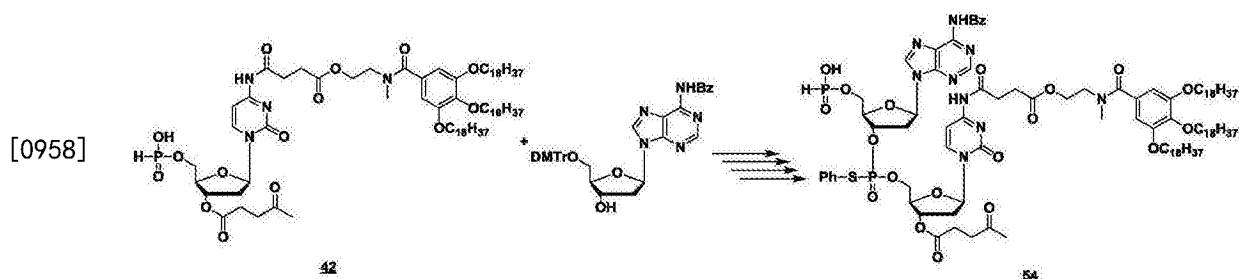
[0953] 向在实施例50中已分成3等份的溶液中的1份(相当于0.093mmol化合物4)中,添加N-甲基吗啉(0.45mL,4.1mmol),然后添加乙腈(43g),使固体析出,用冰冷却后,进行过滤,以固体形式得到化合物5d(96mg)。

[0954] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t,9H)、1.09-1.84 (m,96H)、1.96 (s,3H)、2.01 (s,3H,N-甲基吗啉)、2.31-2.36 (m,2H)、2.68 (s,4H)、2.76 (s,4H,N-甲基吗啉)、3.90-3.98 {m,6H+4H(N-甲基吗啉)}、4.10-4.17 (m,3H)、5.02 (s,2H)、5.41 (t,1H)、6.38 (t,1H)、6.53 (s,2H)、6.89 (d,1H)、7.71 (d,1H)。

[0955] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 5.88。

[0956] 实施例52(二聚体合成):化合物54的合成

[0957] [化学式90]



[0959] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物42(99mg)和N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(66mg,0.10mmol)的吡啶(2.0mL)溶液中,添加作为缩合剂的2,2-二甲基丁酰氯(28μL,0.20mmol),进行21分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-(苯基硫基)邻苯二甲酰亚胺(27mg,0.11mmol),进行43分钟的搅拌。添加水(3.6μL,0.20mmol),进行1小时37分钟的搅拌,在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯(4.0mL)并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷(2.0mL),在室温下添加吡咯(14μL,0.20mmol)、磷酸(8.7mg,0.11mmol),进行1小时28分钟的搅拌,由此进行脱临时保护基反应。在室温下添加吡啶(0.30mL)、磷酸(74mg,0.90mmol),然后,将2,2-二甲基丁酰氯(92μL,0.67mmol)分成3等份,每隔10分钟进行添加,进行59分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯(31μL,0.22mmol),进而进行42分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈(51g)中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物54(100mg)。

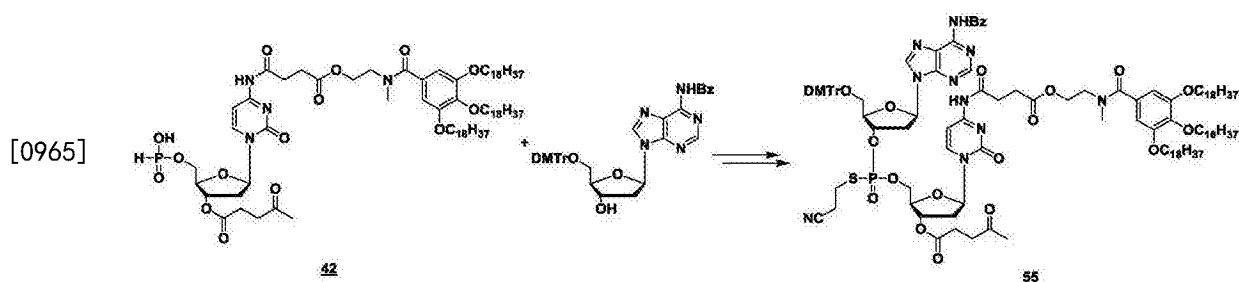
[0960] ¹H-NMR: (300MHz;CDCl₃) δ0.88(t,9H)、1.13-1.80(m,96H)、2.17-2.85(m,15H)、3.03(s,3H)、3.68-4.33(m,16H)、5.20-5.35(m,2H)、6.07-6.17(m,2H)、6.43-6.53(m,2H)、6.56(s,2H)、7.24-8.78(m,14H)。

[0961] ³¹P-NMR: (300MHz;CDCl₃) δ6.10、25.20、25.30。

[0962] MS(ESI⁺): [M+H]⁺1965.1202。

[0963] 实施例53(硫化剂考察二聚体合成):化合物55的合成

[0964] [化学式91]



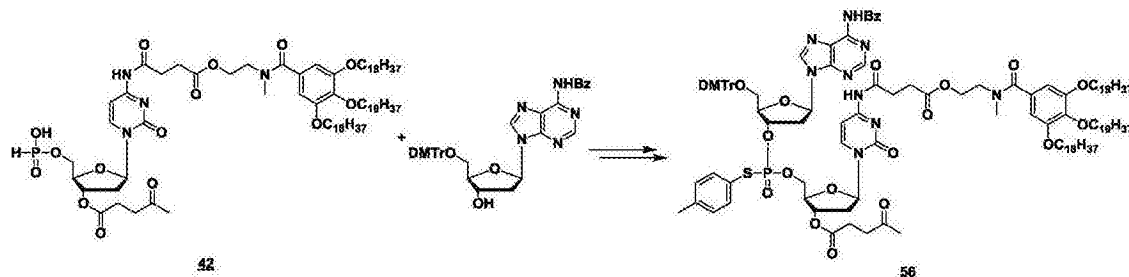
[0966] 在与实施例52同样的条件下,将硫化剂变更为N-[(2-氰基乙基)硫基]邻苯二甲酰亚胺(按照Tetrahedron,1997年,第53卷,第14411-14416页中记载的方法合成)(4.3mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物55。

[0967] MS(ESI⁺): [M+H]⁺2180.2862。

[0968] 实施例54(硫化剂考察二聚体合成):化合物56的合成

[0969] [化学式92]

[0970]



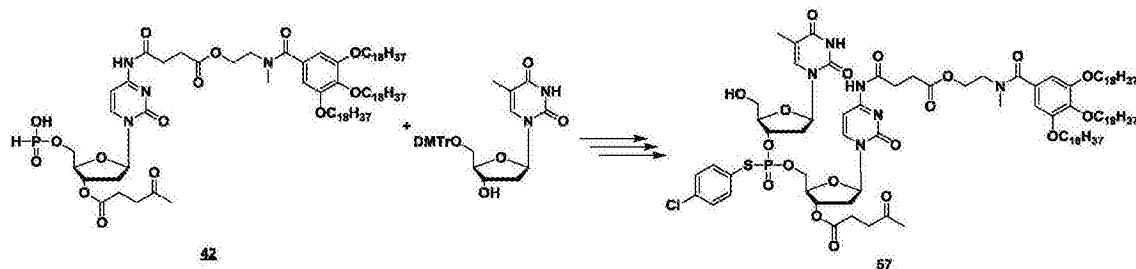
[0971] 在与实施例52同样的条件下,将硫化剂变更为N-[(对甲基苯基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺(按照Nucleic Acid Research,1999年,第27卷,第963-971页中记载的方法合成)(27mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物56。

[0972] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺2217.2981.

[0973] 实施例55(硫化剂考察二聚体合成):化合物57的合成

[0974] [化学式93]

[0975]



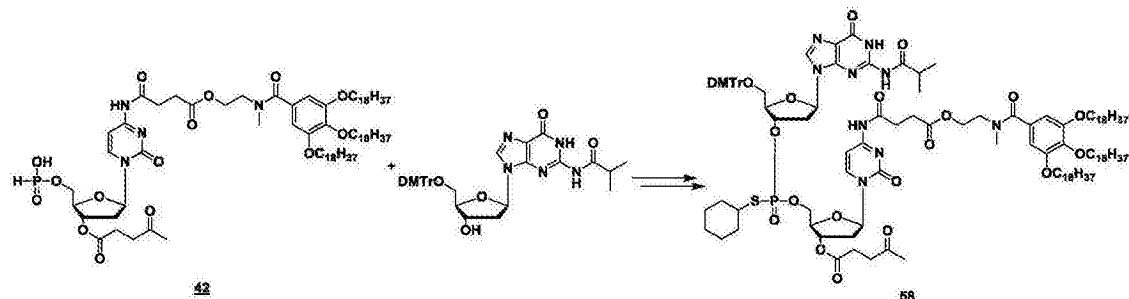
[0976] 在与实施例52同样的条件下,将N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷变更为5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(东京化成工业公司制)(5.2mg),将硫化剂变更为N-[(对氯苯基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺(按照Tetrahedron,1997年,第53卷,第14411-14416页中记载的方法合成)(4.3mg)来实施,在减压下将脱临时保护基反应后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物57。

[0977] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺1788.1262.

[0978] 实施例56(硫化剂考察二聚体合成):化合物58的合成

[0979] [化学式94]

[0980]



[0981] 在与实施例52同样的条件下,将N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷变更为N²-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(7.0mg),将硫化剂变更为N-(环己基硫基)邻苯二甲酰亚胺

(3.3mg) 来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,得到化合物58。

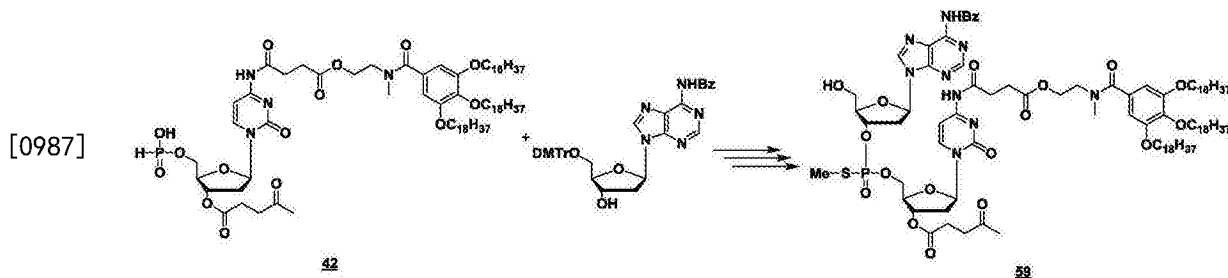
[0982] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺2191.3401.

[0983] 实施例57 (二聚体合成): 化合物55的合成

[0984] 在与实施例53同样的条件下,将缩合剂变更为碳酸双五氟苯基酯 (9.1mg) 来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物55。

[0985] 实施例58 (硫化剂考察二聚体合成): 化合物59的合成

[0986] [化学式95]

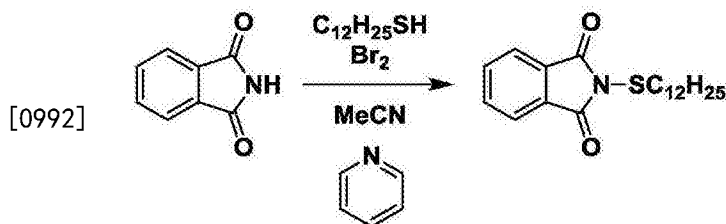


[0988] 在与实施例52同样的条件下,将硫化剂变更为N-(甲基硫基)邻苯二甲酰亚胺 (按照Tetrahedron,1997年,第53卷,第14411-14416页中记载的方法合成) (9.9mg) 来实施反应,在减压下将脱临时保护基反应后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物59。

[0989] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺1839.1373.

[0990] 参考合成例3 (硫化剂合成): N-(十二烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺的合成

[0991] [化学式96]



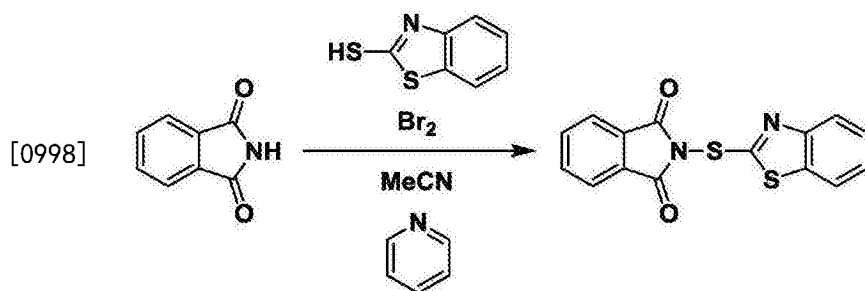
[0993] 在氮气气氛下,向邻苯二甲酰亚胺 (4.0g,27mmol) 的乙腈 (15mL) 和吡啶 (12mL) 的混合溶液中添加十二烷基硫醇 (6.8mL,29mmol),在室温下,经40分钟滴加溴 (1.7mL,33mmol) 的乙腈 (20mL) 溶液,在室温下进行2小时43分钟的搅拌。添加甲醇 (32g)、水 (5g),冷却至0℃,过滤析出的固体,以白色固体形式得到目标物 (6.0g)。

[0994] ¹H-NMR: (300MHz;CDCl₃) δ0.88 (t,3H)、1.08-1.64 (m,20H)、2.88 (t,2H)、7.75-7.80 (m,2H)、7.89-7.95 (m,2H)。

[0995] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺348.2003.

[0996] 参考合成例4 (硫化剂合成): N-[(2-苯并[d]噻唑基)硫基]邻苯二甲酰亚胺的合成

[0997] [化学式97]



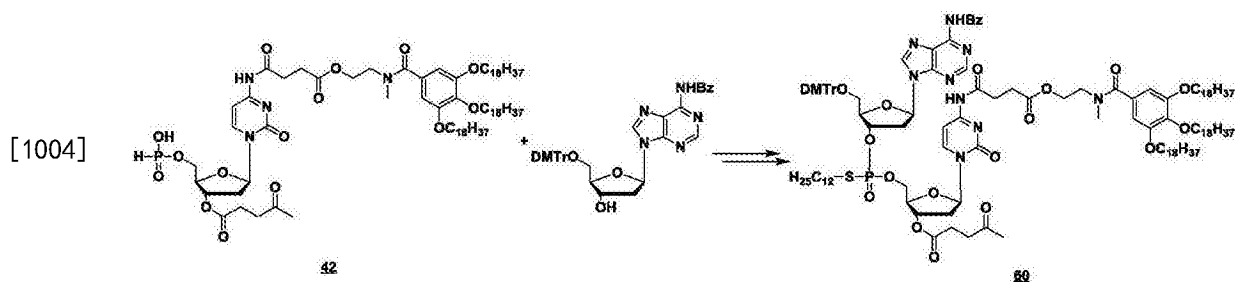
[0999] 在氮气气氛下,向邻苯二甲酰亚胺(4.0g,27mmol)的乙腈(15mL)和吡啶(12mL)的混合溶液中添加2-巯基苯并噻唑(4.8g,29mmol),在室温下经38分钟滴加溴(1.7mL,33mmol)的乙腈(20mL)溶液,在室温下进行4小时30分钟的搅拌。添加甲醇(30g)、水(5g),进行17分钟的搅拌,过滤析出的固体,以淡粉色固体的形式得到目标物(6.8g)。

[1000] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 7.27–7.38 (m, 1H)、7.40–7.48 (m, 1H)、7.69–7.77 (m, 1H)、7.82–7.94 (m, 3H)、7.99–8.62 (m, 2H)。

[1001] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 313.0090。

[1002] 实施例59(硫化剂考察二聚体合成):化合物60的合成

[1003] [化学式98]



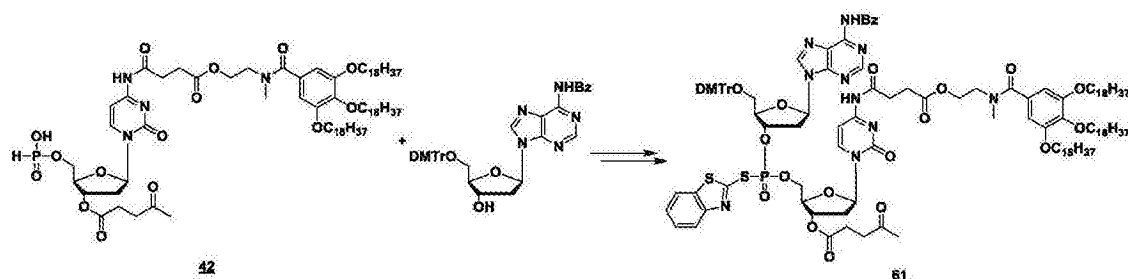
[1005] 在与实施例52同样的条件下,将硫化剂变更为N-(十二烷基硫基)邻苯二甲酰亚胺(4.0mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,得到化合物60。

[1006] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2295.4570。

[1007] 实施例60(硫化剂考察二聚体合成):化合物61的合成

[1008] [化学式99]

[1009]



[1010] 在与实施例52同样的条件下,将硫化剂变更为N-[2-苯并[d]噻唑基]硫基邻苯二甲酰亚胺(4.8mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,得到化合物61。

[1011] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2277.2747。

[1012] 实施例61(缩合剂考察二聚体合成):化合物55的合成

[1013] 在与实施例53同样的条件下,将缩合剂变更为乙酸五氟苯基酯(7.1mg)来实施反

应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物55。

[1014] 实施例62(缩合剂考察二聚体合成):化合物55的合成

[1015] 在与实施例53同样的条件下,将缩合剂变更为氯磷酸二苯酯(4.2μL)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物55。

[1016] 实施例63(缩合剂考察二聚体合成):化合物55的合成

[1017] 在与实施例52同样的条件下,将缩合剂变更为氯磷酸双(2-氯苯基)酯(4.6μL)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物55。

[1018] 实施例64(缩合剂考察二聚体合成):化合物55的合成

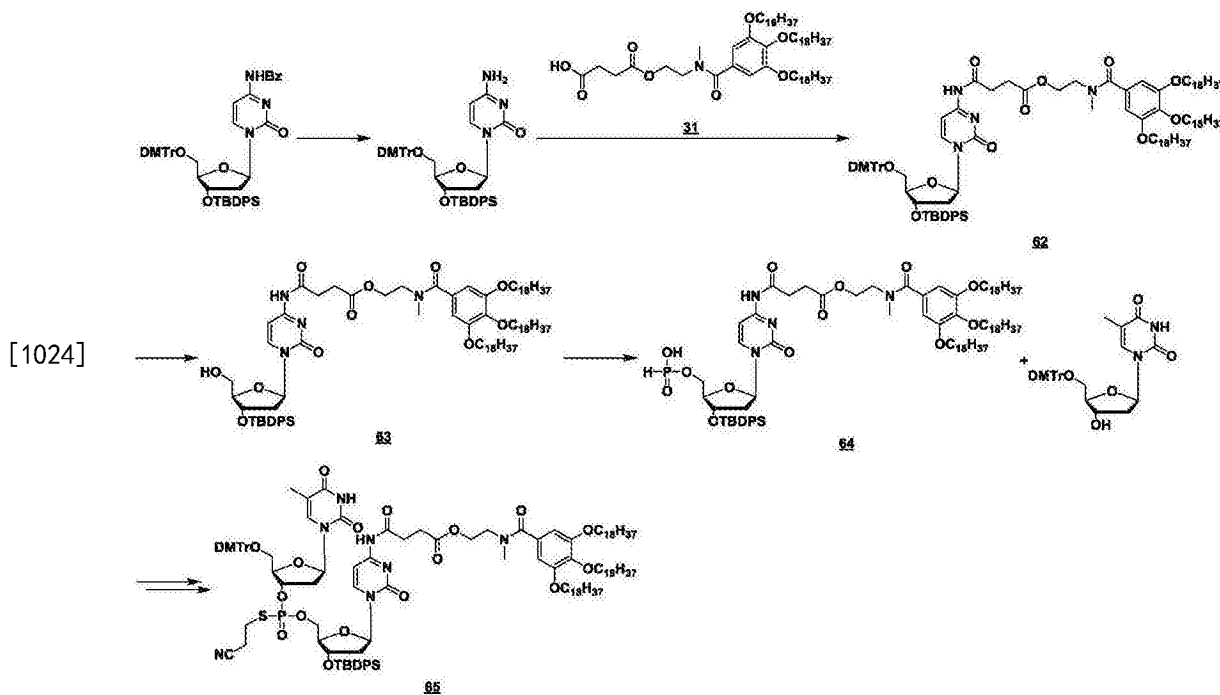
[1019] 在与实施例53同样的条件下,将缩合剂变更为氯磷酸双(2,4-二氯苯基)酯(10.7mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物55。

[1020] 实施例65(缩合剂考察二聚体合成):化合物55的合成

[1021] 在与实施例53同样的条件下,将缩合剂变更为氯磷酸双(2,6-二甲基苯基)酯(7.1mg)来实施反应,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物55。

[1022] 实施例66(利用3'位TBDPS基的二聚体合成):化合物65的合成

[1023] [化学式100]



[1025] 工序1 3'-O-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷的合成

[1026] 在氮气气氛下,在室温下,向N⁴-苯甲酰基-3'-O-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(按照Biochemistry,2004年,第43卷,第6167-6181页中记载的方法合成)(6.5g,6.8mmol)的甲醇(301g)溶液中,添加40%甲胺水溶液(5.8mL,69mmol),进行23小时26分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,然后,利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化,以泡状固体形式得到目标物(5.1g,收率98%)。

[1027] ¹H-NMR: (300MHz;CDCl₃) δ1.00 (s,9H)、1.95-1.97 (m,1H)、2.51-2.59 (m,1H)、3.02-3.07 (m,1H)、3.25-3.30 (m,1H)、3.77 (s,6H)、4.44-4.49 (m,1H)、5.22 (d,1H)、6.35 (t,1H)、

6.71-6.75 (m, 4H)、7.08-7.41 (m, 16H)、7.53-7.59 (m, 4H)、7.77 (d, 1H)。

[1028] MS (ESI⁺): [M+H]⁺768.3391。

[1029] 工序2化合物62的合成

[1030] 在氮气气氛下,于40℃,向3'-O-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(2.5g, 3.2mmol)和化合物31(2.2g, 2.0mmol)的二氯甲烷(70mL)及吡啶(14mL)的混合溶液中,添加HOBt(无水)(0.35g, 2.6mmol),接下来,添加WSC·HCl(0.92g, 4.8mmol),进行2小时26分钟的搅拌。通过过滤除去反应混合物中的不溶物,在减压下浓缩后添加至甲醇(250g)中,使固体析出,然后进行过滤,以白色固体形式得到化合物62(3.5g)。

[1031] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ0.88 (s, 9H)、1.01 (s, 9H)、1.26-1.81 (m, 96H)、1.91-1.99 (m, 1H)、2.68-2.71 (m, 5H)、3.04-3.08 (m, 4H)、3.25-3.29 (m, 1H)、3.77 (brs, 8H)、3.95 (t, 6H)、4.13-4.46 (m, 4H)、6.30 (t, 1H)、6.56 (s, 2H)、6.72-6.75 (m, 4H)、6.91 (d, 1H)、7.08-7.42 (m, 15H)、7.53-7.59 (m, 4H)、8.05 (d, 1H)、8.92 (brs, 1H)。

[1032] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1834.2754。

[1033] 工序3化合物63的合成

[1034] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物62(3.5g, 1.9mmol)的二氯甲烷(35g)溶液中,添加吡咯(0.39mL, 5.7mmol),于10℃,添加二氯乙酸(1.6mL, 19mmol),进行1小时53分钟的搅拌。添加吡啶(0.77mL, 9.5mmol),将反应混合物添加至甲醇(351g)中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物63(2.8g)。

[1035] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ0.88 (s, 9H)、1.08 (s, 9H)、1.26-1.82 (m, 96H)、2.16-2.25 (m, 1H)、2.51-2.59 (m, 1H)、2.69-2.75 (m, 4H)、3.04 (s, 3H)、3.19-3.24 (m, 1H)、3.61-3.65 (m, 3H)、3.92-4.43 (m, 10H)、6.21 (t, 1H)、6.57 (s, 2H)、7.21 (d, 1H)、7.35-7.45 (m, 6H)、7.60-7.66 (m, 4H)、8.03 (d, 1H)、9.02 (brs, 1H)。

[1036] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1532.1383。

[1037] 工序4化合物64的合成

[1038] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(0.39g, 4.7mmol)的吡啶(14mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.41mL, 3.0mmol),进行30分钟的搅拌。于30℃,向该溶液中添加化合物63(0.70g, 0.46mmol),于30℃进行46分钟的搅拌。然后,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.38mL, 2.7mmol),进行58分钟的搅拌。将反应混合物添加至乙腈(200g)中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物64(0.70g)。

[1039] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1596.1098。

[1040] 工序5化合物65的合成

[1041] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物64(0.70g)和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)胸苷(0.37g, 0.68mmol)的吡啶(20mL)溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(0.57g, 1.4mmol),进行24分钟的搅拌。然后,添加N-[(2-氰基乙基)硫基]邻苯二甲酰亚胺(0.17g, 0.71mmol),进行16小时54分钟的搅拌。将反应混合物添加至甲醇(200g)中,过滤析出的固体,得到化合物65(0.88g)。

[1042] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ0.88 (s, 9H)、1.07 (s, 9H)、1.25-2.01 (m, 97H)、2.33-2.93 (m, 10H)、3.04 (s, 3H)、3.32-4.34 (m, 24H)、5.08-5.18 (m, 1H)、6.25-6.36 (m, 2H)、6.58 (s,

2H)、6.82-6.85 (m、4H)、7.22-7.65 (m、21H)、7.79-7.85 (m、1H)、8.96 (brs、1H)、9.28 (brs、1H)。

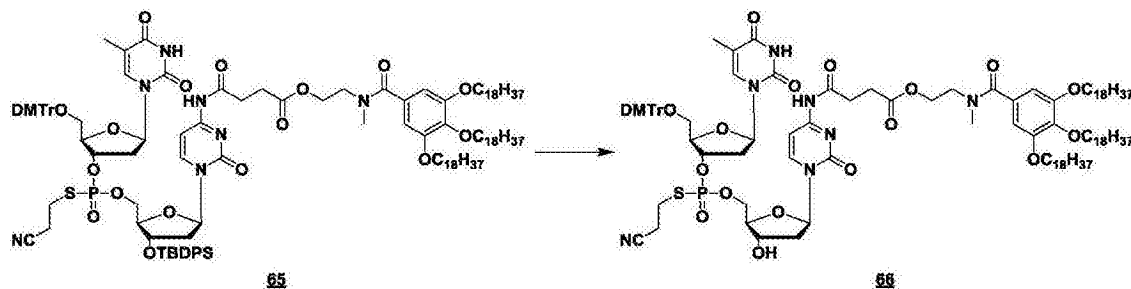
[1043] ^{31}P -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ 27.08、27.20。

[1044] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2207.3152。

[1045] 实施例67 (3' 位TBDPS基的脱保护): 化合物66的合成

[1046] [化学式101]

[1047]



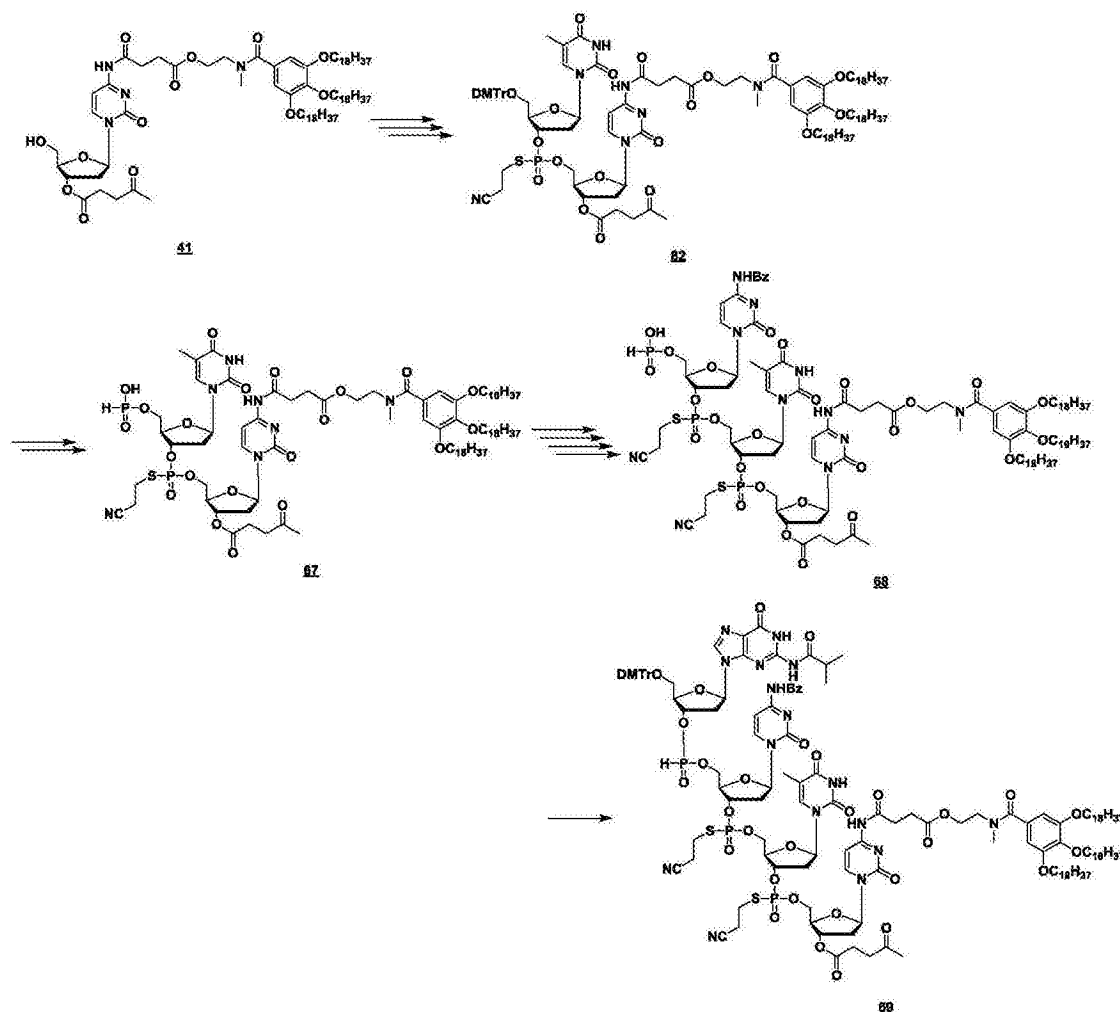
[1048] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物65 (10mg) 的二氯甲烷 (0.20mL) 溶液中,添加氟化氢-吡啶 (1.3 μL , 0.045mmol), 进行3小时45分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物66。

[1049] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1969.2010。

[1050] 实施例68 (四聚体合成): 化合物69的合成

[1051] [化学式102]

[1052]



[1053] 工序1化合物67的合成

[1054] 在氮气气氛下,向化合物42 (1.5g) 的吡啶 (20mL) 溶液中,添加5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷 (东京化成工业公司制) (0.34g, 0.62mmol)、碳酸双五氟苯基酯 (0.74g, 1.9mmol), 进行22分钟的搅拌。然后,添加N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (0.19g, 0.81mmol), 进行15小时29分钟的搅拌,得到包含化合物82的反应溶液。然后,添加亚磷酸三乙酯 (90μL, 0.52mmol)、水 (0.28mL, 16mmol), 于25℃进行1小时搅拌,在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯 (25g) 并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷 (20mL), 于10℃添加吡咯 (0.11mL, 1.6mmol)、磷酸 (1.0g, 13mmol), 进行1小时15分钟的搅拌。添加吡啶 (3.0mL) 后,在室温下,将2,2-二甲基丁酰氯 (0.96mL, 7.0mmol) 分成4等份,每隔10分钟进行添加,进行33分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.48mL, 3.5mmol), 进而进行35分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (200g) 中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物67 (1.9g)。

[1055] MS (ESI⁺): [M+H]⁺ 1829.0819.

[1056] 工序2化合物68的合成

[1057] 在与工序1同样的条件下,使用化合物67代替化合物42、使用N⁴-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷 (东京化成工业公司制) (0.60g) 代替5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷来实施反应,以白色固体形式得到化合物68 (0.97g)。

[1058] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺2291.1664.

[1059] 工序3化合物69的合成

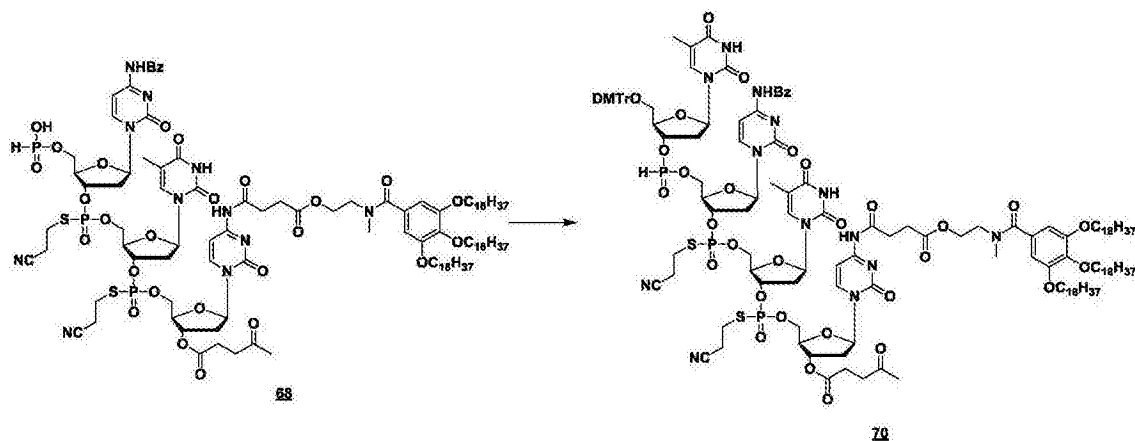
[1060] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物68 (0.96g) 和N²-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(东京化成工业公司制) (0.51g,0.80mmol) 的吡啶(20mL) 溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(0.65g,1.7mmol),进行10分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物69。

[1061] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺2912.4312.

[1062] 实施例69(四聚体合成):化合物70的合成

[1063] [化学式103]

[1064]



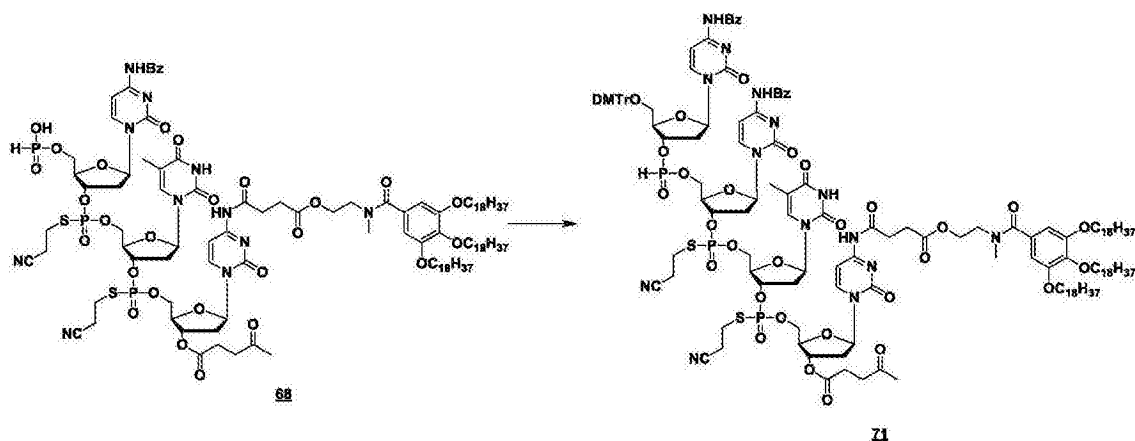
[1065] 在与实施例68的工序1同样的条件下,使用化合物68代替化合物42来实施反应,得到化合物70。

[1066] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺2817.3753.

[1067] 实施例70(四聚体合成):化合物71的合成

[1068] [化学式104]

[1069]



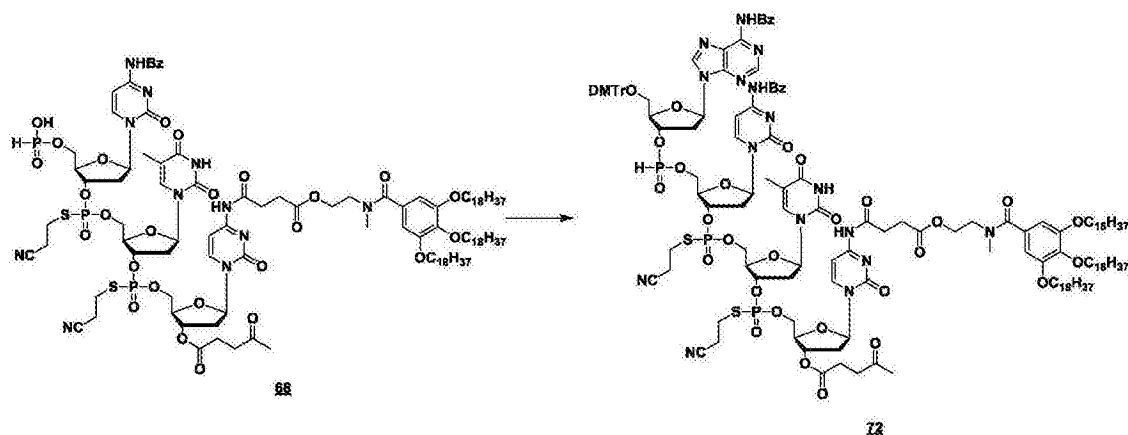
[1070] 在与实施例68的工序1同样的条件下,使用化合物68代替化合物42、使用N⁴-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(东京化成工业公司制) (5.4mg) 代替5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷来实施反应,得到化合物71。

[1071] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺2906.4242.

[1072] 实施例71 (四聚体合成): 化合物72的合成

[1073] [化学式105]

[1074]



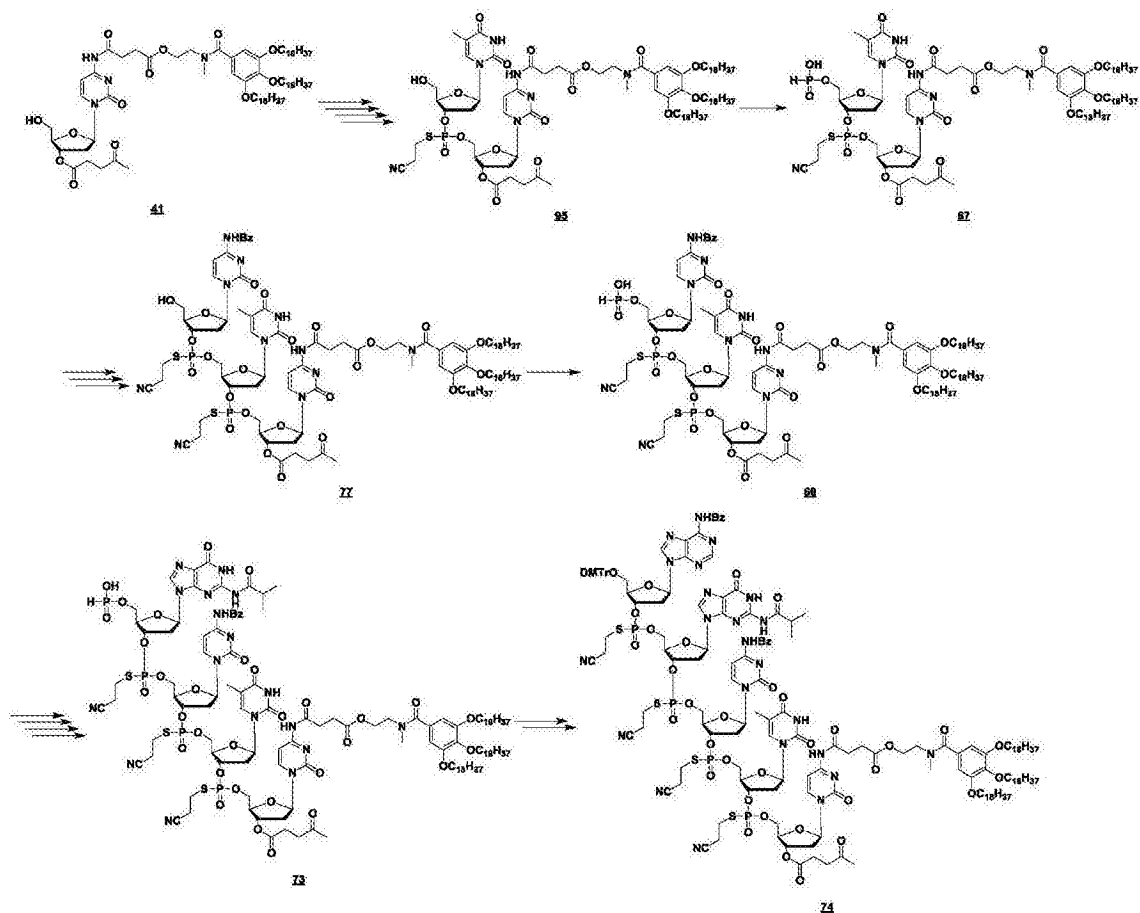
[1075] 在与实施例68的工序1同样的条件下,使用化合物68代替化合物42、使用N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(4.9mg)代替5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-胸苷来实施反应,得到化合物72。

[1076] MS(ESI⁺): [M+H]⁺2930.4184.

[1077] 实施例72 (五聚体 (5mer) 合成): 化合物74的合成

[1078] [化学式106]

[1079]



[1080] 工序1化合物67的合成

[1081] 在氮气气氛下,向化合物42 (1.2g) 的吡啶 (20mL) 溶液中添加5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基) 胸苷(东京化成工业公司制) (0.44g, 0.80mmol)、碳酸双五氟苯基酯 (0.67g, 1.7mmol), 进行23分钟的搅拌。然后,添加N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (0.19g, 0.83mmol), 进行1小时32分钟的搅拌。然后,添加亚磷酸三乙酯 (90 μ L, 0.52mmol)、水 (0.28mL, 16mmol), 于25℃进行50分钟的搅拌,在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯 (25g) 并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷 (20mL), 于10℃,添加吡咯 (0.11mL, 1.6mmol)、二氯乙酸 (0.43mL, 5.3mmol), 进行2小时27分钟的搅拌。添加吡啶 (3.0mL), 升温至室温,将反应混合物添加至乙腈 (200g) 中,过滤析出的固体,以淡肉色固体形式得到化合物95 (0.72g)。

[1082] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.25-1.89 (m, 99H)、2.20 (s, 3H)、2.21-2.89 (m, 13H)、3.06-3.20 (m, 5H)、3.21-3.98 (m, 11H)、4.19-4.4.44 (m, 6H)、5.32-5.34 (m, 2H)、6.10-6.23 (m, 2H)、6.58 (s, 2H)、7.41 (t, 1H)、7.51 (d, 1H)、7.95-8.08 (m, 1H)、8.70-9.60 (m, 2H)。

[1083] $^{31}\text{P-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 27.55、27.94。

[1084] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1765.1162。

[1085] 在氮气气氛下,在室温下,向得到的化合物95 (0.72g) 的二氯甲烷 (15mL) 和吡啶 (2.3mL) 的混合溶液中,添加膦酸 (0.56g, 6.8mmol), 将2,2-二甲基丁酰氯 (0.56mL, 4.1mmol) 分成4等份,每隔10分钟进行添加,进行31分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.42mL, 3.1mmol), 进而进行23分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (203g) 中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物67 (0.72g)。

[1086] 工序2化合物68的合成

[1087] 在氮气气氛下,向化合物67 (0.72g) 的吡啶 (19mL) 溶液中添加 N^4 -苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(东京化成工业公司制) (0.49g, 0.77mmol)、碳酸双五氟苯基酯 (0.60g, 1.5mmol), 进行22分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (0.18g, 0.76mmol), 进行1小时10分钟的搅拌。然后,将反应混合物分成2等份,在减压下浓缩其中一份。反复进行3次添加甲苯 (10g) 并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷 (10mL), 于10℃添加吡咯 (51 μ L, 0.74mmol)、二氯乙酸 (0.20mL, 2.4mmol), 进行2小时10分钟的搅拌。添加吡啶 (1.2mL), 升温至室温,进一步将反应混合物分成2等份,将其中一份添加至乙腈 (50g) 中,使所析出的固体过滤析出,以淡肉色固体形式得到化合物77 (0.18g)。

[1088] 在氮气气氛下,在室温下,向得到的化合物77 (0.18g) 的二氯甲烷 (3.0mL) 和吡啶 (0.50mL) 的混合溶液中,添加膦酸 (0.12g, 1.5mmol), 将2,2-二甲基丁酰氯 (0.13mL, 0.96mmol) 分成4等份,每隔10分钟进行添加,进行57分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯 (33 μ L, 0.24mmol), 进而进行40分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (51g) 中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物68 (0.15g)。

[1089] 工序3化合物73的合成

[1090] 在与工序2同样的条件下,使用化合物68代替化合物67、使用 N^2 -异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(东京化成工业公司制) (86mg) 代替 N^4 -苯

甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷来实施反应,以白色固体形式得到化合物73(0.12g)。

[1091] MS(ESI⁺):[M+H]⁺2759.2472.

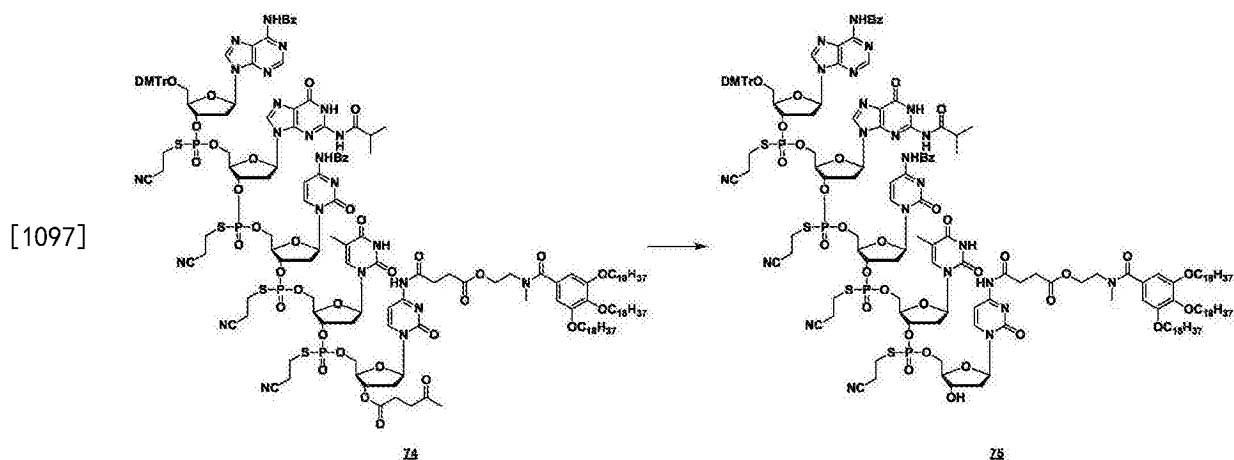
[1092] 工序4化合物74的合成

[1093] 在与工序2同样的条件下,使用化合物73代替化合物67、使用N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(66mg)代替N⁴-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷来实施反应。在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物74。

[1094] MS(ESI⁺):[M+2H]²⁺1742.2655.

[1095] 实施例73(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物75的合成

[1096] [化学式107]



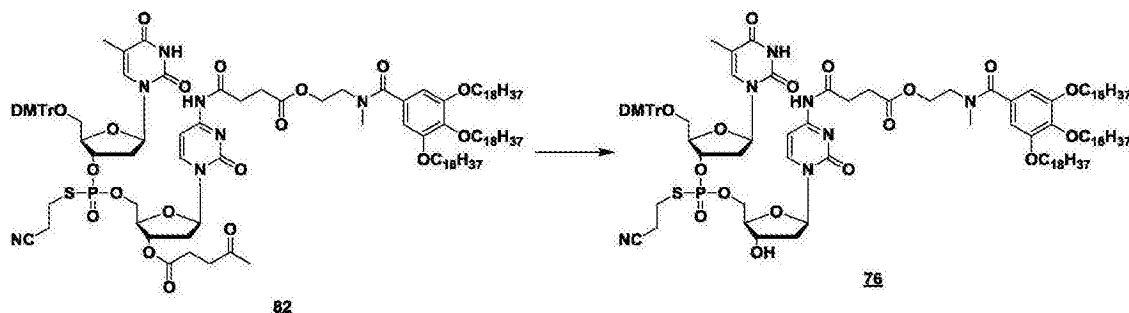
[1098] 将实施例72的工序4中得到的硫化后的反应混合物的一半冷却至0℃,添加胍一水合物(4.4μL,0.091mmol),进行3小时40分钟的搅拌。进而添加胍一水合物(2.2μL,0.045mmol),进行1小时7分钟的搅拌,添加乙酰丙酮(50μL)。然后,将反应混合物添加至乙腈(25g)中,过滤析出的固体,得到化合物75。

[1099] MS(ESI⁺):[M+2H]²⁺1693.2314.

[1100] 实施例74(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物76的合成

[1101] [化学式108]

[1102]

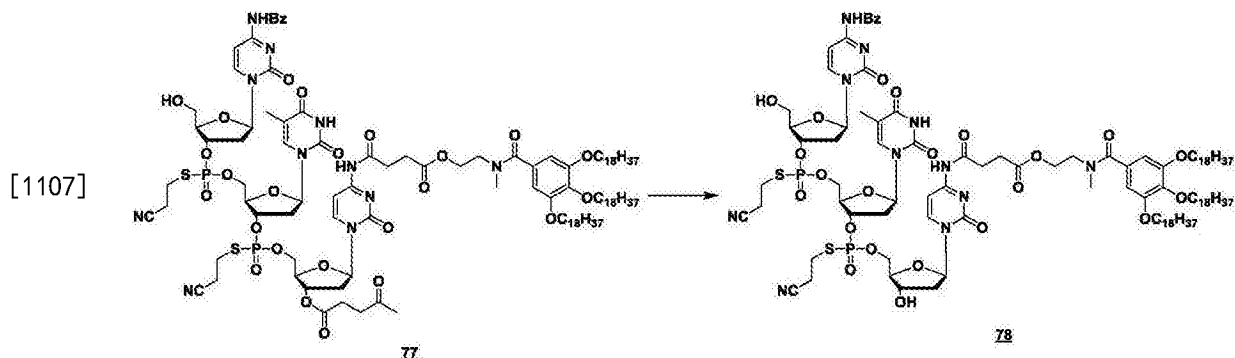


[1103] 在室温下,向实施例68的工序1中得到的包含化合物82的硫化后的反应混合物的0.5重量%中,添加胍一水合物(1.3μL),进行4小时搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物76。

[1104] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺1969.2134.

[1105] 实施例75 (3' 位乙酰丙酰基的脱保护): 化合物78的合成

[1106] [化学式109]



[1108] 在氮气气氛下,将化合物77 (99mg, 45μmol) 的二氯甲烷 (2.0mL) 和乙酸 (0.40mL) 的混合溶液冷却至0℃,添加胼一水合物 (5.2μL, 0.11mmol), 进行10小时28分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,添加至甲醇 (30g) 中,过滤析出的固体,得到化合物78 (70mg)。

[1109] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺2129.1466.

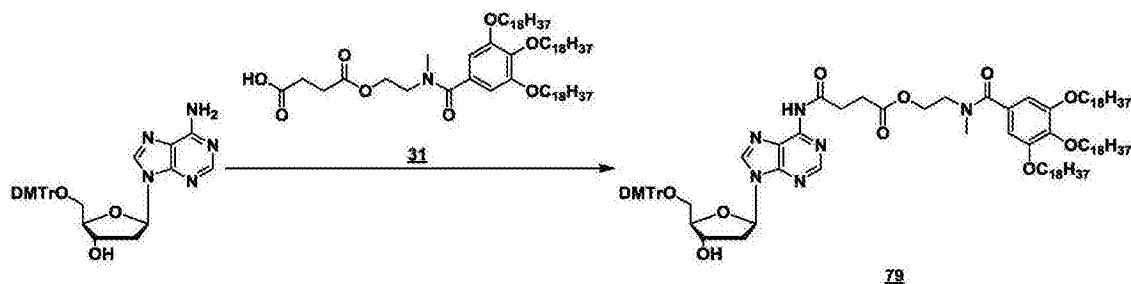
[1110] 实施例76 (硫化剂考察二聚体合成): 化合物82的合成

[1111] 在与实施例68的工序2同样的条件下,将硫化剂变更为N-[(2-氰基乙基) 硫基] 琥珀酰亚胺 (按照Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 2002年, 第2619-2633页中记载的方法合成) (13.7mg) 来实施,在减压下将硫化后的反应混合物浓缩,得到化合物82。

[1112] 实施例77 (向腺嘌呤导入准固相保护基): 化合物79的合成

[1113] [化学式110]

[1114]



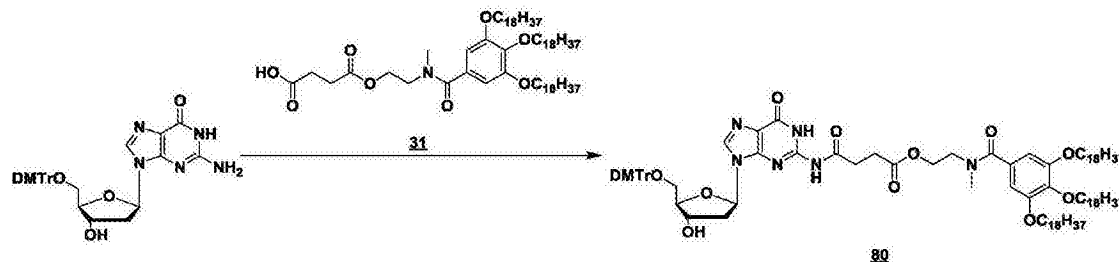
[1115] 在氮气气氛下,于40℃,向5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷 (东京化成工业公司制) (41mg, 0.075mmol) 和化合物31 (53mg, 0.049mmol) 的二氯甲烷 (1.5mL) 和吡啶 (0.30mL) 的混合溶液中,添加HOBt (无水) (7.0mg, 0.052mmol), 接下来,添加WSC·HCl (17.7mg, 0.092mmol), 进行5小时搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物79。

[1116] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺1620.1583.

[1117] 实施例78 (向鸟嘌呤导入准固相保护基): 化合物80的合成

[1118] [化学式111]

[1119]

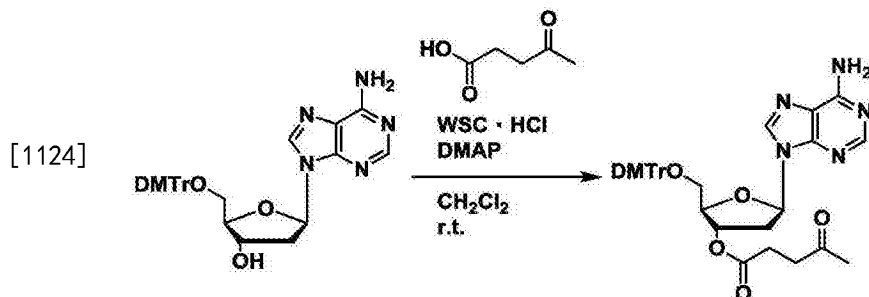


[1120] 在氮气气氛下,于40℃,向5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(东京化成工业公司制)(43mg,0.075mmol)和化合物31(50mg,0.046mmol)的二氯甲烷(1.5mL)和吡啶(0.30mL)的混合溶液中,添加HOBt(无水)(7.2mg,0.053mmol),接下来,添加WSC·HCl(18.4mg,0.096mmol),进行约1周搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物80。

[1121] MS(ESI⁺):[M+H]⁺1636.1879.

[1122] 参考合成例5(腺嘌呤核苷3'位乙酰丙酰基化):5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧腺嘌呤核苷的合成

[1123] [化学式112]



[1125] 在氮气气氛下,在室温下,向5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(Chem-Impex公司制)(2.6g,4.6mmol)、DMAP(58mg,0.48mmol)和乙酰丙酸(0.80g,6.9mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中,添加WSC·HCl(1.3g,6.8mmol),进行3小时55分钟的搅拌。添加乙酸(0.45mL)和三乙胺(0.78mL)的水(20g)溶液,进行5分钟的搅拌,进行分液。向得到的有机层中添加水(20g),进行3分钟的搅拌,进行分液。在减压下蒸馏去除得到的有机层的溶剂,然后利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化,以淡黄色泡状固体形式得到5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧腺嘌呤核苷(2.8g,收率93%)。

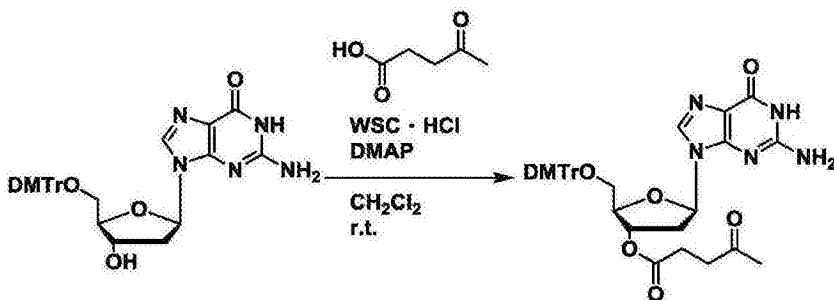
[1126] ¹H-NMR:(300MHz;CDCl₃)δ2.21(s,3H)、2.58-2.66(m,3H)、2.76-2.81(m,2H)、2.90-3.00(m,1H)、3.42(d,2H)、3.78(s,6H)、4.29(s,1H)、5.51(d,1H)、5.96(s,2H)、6.43-6.48(m,1H)、6.80(d,4H)、7.18-7.44(m,9H)、7.97(s,1H)、8.28(s,1H)。

[1127] MS(ESI⁺):[M+H]⁺652.2741.

[1128] 参考合成例6(鸟嘌呤核苷3'位乙酰丙酰基化):5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷的合成

[1129] [化学式113]

[1130]



[1131] 在氮气气氛下,在室温下,向5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(Chem-Impex公司制)(1.5g,2.6mmol)、DMAP(39mg,0.32mmol)和乙酰丙酸(0.63g,5.4mmol)的二氯甲烷(60mL)溶液中,添加WSC·HCl(1.0g,5.4mmol),进行27小时44分钟的搅拌。添加乙酸(0.26mL)和三乙胺(0.46mL)的水(20g)溶液,进行23分钟的搅拌,进行分液。向得到的有机层中添加水(21g),进行8分钟的搅拌,进行分液。在减压下蒸馏去除得到的有机层的溶剂,以淡黄色固体形式得到5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(1.8g)。

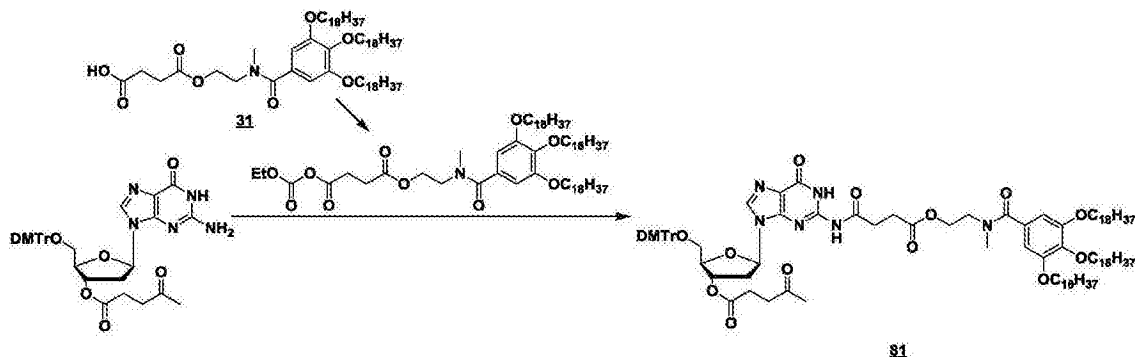
[1132] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 2.20 (s, 3H) 、2.49–2.94 (m, 6H) 、3.39 (s, 2H) 、3.77 (d, 6H) 、4.24 (s, 1H) 、5.52 (d, 1H) 、6.07 (s, 2H) 、6.19–6.24 (m, 1H) 、6.80 (d, 4H) 、7.19–7.40 (m, 9H) 、7.63 (s, 1H) 、11.97 (brs, 1H) .

[1133] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺ 668.2715.

[1134] 实施例79 (向鸟嘌呤导入准固相保护基): 化合物81的合成

[1135] [化学式114]

[1136]



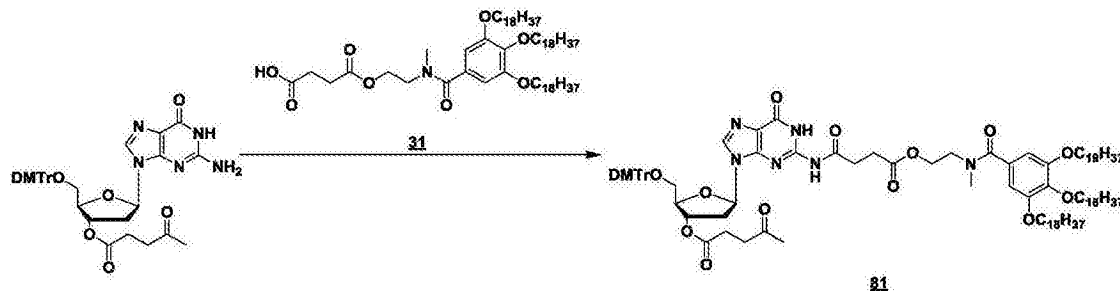
[1137] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物31 (8.9mg, 8.2 μ mol) 的二氯甲烷 (1.0mL) 溶液中,添加氯甲酸乙酯 (1.3 μ L, 0.014mmol), 接下来,添加三乙胺 (1.9 μ L, 0.014mmol), 进行1小时57分钟的搅拌。进而,添加氯甲酸乙酯 (1.3 μ L, 0.014mmol)、三乙胺 (1.9 μ L, 0.014mmol), 进行36分钟的搅拌。然后,在室温下添加5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷 (10.5mg, 0.016mmol), 进行59分钟的搅拌,然后在室温下添加三乙胺 (0.10mL, 0.72mmol), 升温至40 $^{\circ}$ C, 进行3小时3分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物81。

[1138] MS (ESI⁺) : [M+H]⁺1734.1983.

[1139] 实施例80 (向鸟嘌呤导入准固相保护基): 化合物81的合成

[1140] [化学式115]

[1141]



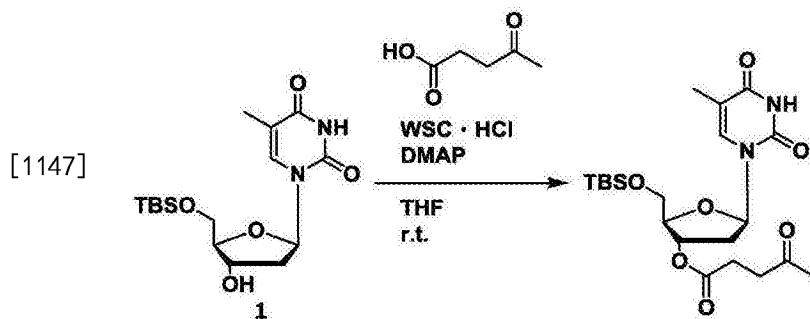
[1142] 在氮气气氛下,于40℃,向5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(0.94g,1.4mmol)和化合物31(1.0g,0.93mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中,依次添加二异丙基乙胺(0.78mL,4.6mmol)、DMAP(0.57g,4.7mmol)、WSC·HCl(0.89g,4.6mmol),进行3小时21分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,添加甲醇(100g),过滤析出的固体,得到化合物81的粗产物(1.5g)。利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化粗产物,得到化合物81(47mg)。

[1143] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.26-1.81 (m, 96H)、2.19 (s, 3H)、2.20-2.60 (m, 7H)、2.75-2.80 (m, 2H)、2.94-3.06 (m, 4H)、3.37 (d, 2H)、3.38-3.79 (m, 8H)、3.95 (t, 6H)、3.90-4.50 (m, 3H)、5.50 (d, 1H)、6.12-6.20 (m, 1H)、6.57 (s, 2H)、6.76-6.80 (m, 4H)、7.19-7.43 (m, 9H)、7.79 (s, 1H)、9.34 (brs, 1H)、11.89 (brs, 1H)。

[1144] MS (ESI $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1734.1951。

[1145] 参考合成例7:5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3'-O-乙酰丙酰基胸苷的合成

[1146] [化学式116]

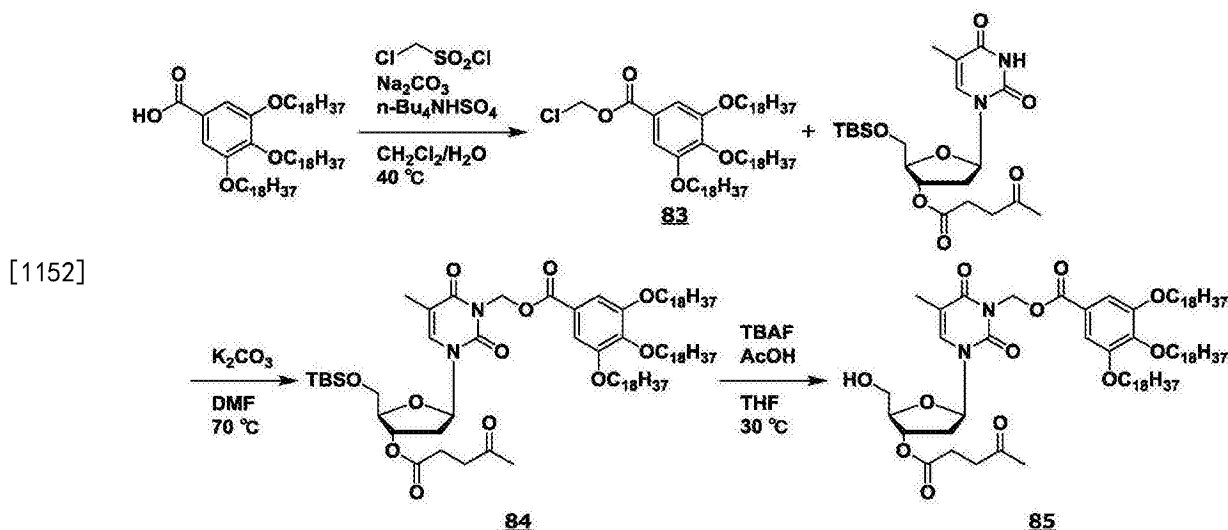


[1148] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物1(5.3g,15mmol)、DMAP(0.17g,1.4mmol)和乙酰丙酸(2.8g,24mmol)的THF(38g)溶液中,添加WSC·HCl(4.6g,24mmol),进行15小时13分钟的搅拌。添加乙酸(1.5g,26mmol)和三乙胺(2.6g,19mmol)的水(38g)溶液,进行5分钟的搅拌,添加乙酸乙酯(37g),进行14分钟的搅拌,进行分液。在减压下蒸馏去除得到的有机层的溶剂,以淡橙色固体形式得到5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3'-O-乙酰丙酰基胸苷(6.9g)。

[1149] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.13 (s, 6H)、0.93 (s, 9H)、1.92 (d, 3H)、2.05-2.15 (m, 1H)、2.21 (s, 3H)、2.39-2.45 (m, 1H)、2.58-2.62 (m, 2H)、2.76-2.81 (m, 2H)、3.90-3.91 (m, 2H)、4.099-4.103 (m, 1H)、5.26 (d, 1H)、6.37 (q, 1H)、7.55 (d, 1H)、9.34 (brs, 1H)。

[1150] 实施例81(在胸腺嘧啶3位键合有准固相保护基的核苷的合成):化合物85的合成

[1151] [化学式117]



[1153] 工序1化合物83的合成

[1154] 在氮气气氛下,在室温下,向3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酸(按照国际公开第2014-077292号中记载的方法合成)(3.0g,3.2mmol)、碳酸钠(1.1g,10mmol)、硫酸氢四正丁基铵(0.13g,0.38mmol)的二氯甲烷(71g)和水(30g)的混合溶液中,添加氯甲磺酰氯(0.39mL,3.9mmol),进行2小时42分钟的搅拌。进而添加氯甲磺酰氯(60 μL ,0.60mmol),进行18分钟的搅拌,然后升温至 $40\text{ }^\circ\text{C}$,进行10分钟的搅拌。停止搅拌,进行分液,向得到的水层中添加二氯甲烷,进行萃取。合并得到的有机层,在减压下蒸馏去除溶剂,添加乙腈(70g),过滤析出的固体,以白色固体(3.16g)形式得到化合物83。

[1155] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.86-0.90 (m,9H)、1.26-1.84 (m,96H)、3.99-4.05 (m,6H)、5.93-6.01 (m,2H)、7.27-7.36 (m,2H)。

[1156] 工序2化合物84的合成

[1157] 在氮气气氛下,于 $70\text{ }^\circ\text{C}$,向化合物83(1.0g,1.1mmol)、5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3'-O-乙酰丙酰基胸苷(0.71g,1.6mmol)的 DMF (50mL)溶液中,添加碳酸钾(0.21g,1.5mmol),进行2小时5分钟的搅拌,进而添加碳酸钾(0.91g,6.6mmol),进行2小时44分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈(201g)中,过滤析出的固体,以黄色固体形式得到化合物84(1.01g)。

[1158] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.14 (s,6H)、0.86-0.93 (m,18H)、1.26-1.81 (m,96H)、2.13-2.43 (m,5H)、2.56-2.60 (m,2H)、2.74-2.79 (m,2H)、3.92-4.12 (m,9H)、5.26 (d,1H)、6.22 (q,2H)、6.42 (q,1H)、7.22 (s,2H)、7.59 (s,1H)。

[1159] $\text{MS}(\text{ESI}^+)$: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1394.0827。

[1160] 工序3化合物85的合成

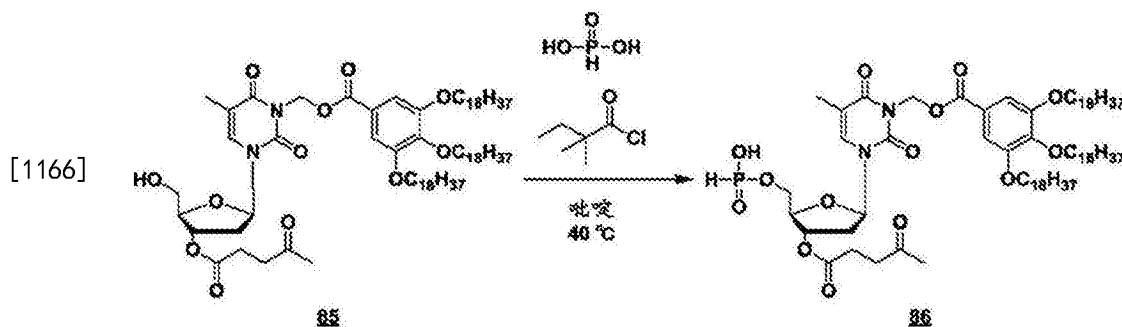
[1161] 在氮气气氛下,于 $30\text{ }^\circ\text{C}$,向化合物84(0.94g,0.67mmol)、乙酸(0.41mL,7.2mmol)的 THF (10mL)溶液中,添加1.0M TBAF/THF 溶液(3.5mL,3.5mmol),进行4小时2分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至甲醇(100g)中,过滤析出的固体,以黄色固体形式得到化合物85(0.85g,收率99%(工序3))。

[1162] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t,9H)、1.26-1.81 (m,96H)、2.20 (s,3H)、2.39-2.44 (m,2H)、2.58-2.60 (m,2H)、2.76-2.78 (m,2H)、3.93 (t,3H)、3.96-4.01 (m,6H)、4.11 (d,1H)、5.34-5.38 (m,1H)、6.21 (q,2H)、6.32 (t,1H)、7.21 (s,2H)、7.61 (d,1H)。

[1163] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1279.9950.

[1164] 实施例82 (H-磷酸酯化): 化合物86的合成

[1165] [化学式118]



[1167] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(0.40g,4.9mmol)的吡啶(15mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(0.45mL,3.3mmol),进行39分钟的搅拌。向该溶液中添加化合物85(0.65g,0.51mmol),于40℃进行1小时27分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈(151g)中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物86(0.66g)。

[1168] ¹H-NMR: (300MHz;CDCl₃) δ0.88 (t,9H)、1.26-1.81 (m,96H)、1.97 (d,3H)、2.19 (s,3H)、2.34-2.41 (m,2H)、2.55-2.59 (m,2H)、2.74-2.78 (m,2H)、3.96-4.01 (m,6H)、4.20-4.29 (m,3H)、5.39 (d,1H)、6.20 (q,2H)、6.45-6.50 (m,1H)、6.96 (d,1H)、7.21 (s,2H)、7.76-7.81 (m,1H)。

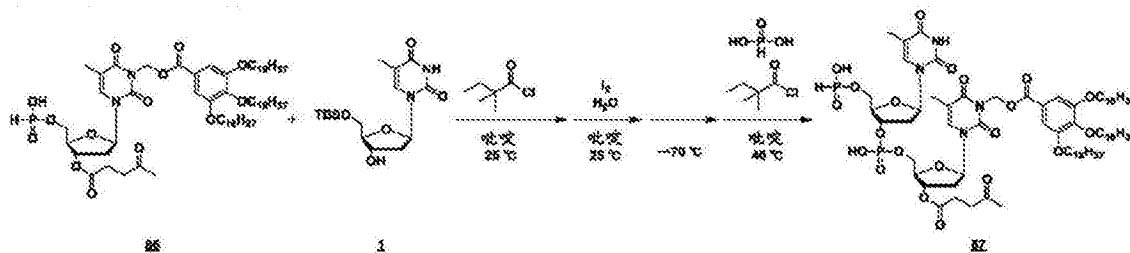
[1169] ³¹P-NMR: (300MHz;CDCl₃) δ6.28。

[1170] MS (ESI⁻): [M-H]⁻1341.9722。

[1171] 实施例83 (二聚体合成): 化合物87的合成

[1172] [化学式119]

[1173]



[1174] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物86(51mg)和化合物1(19mg,0.053mmol)的吡啶(1.0mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(24μL,0.18mmol),进行19分钟的搅拌。然后,添加包含0.05M的碘的吡啶和水的溶液(1.1mL,0.055mmol),进行36分钟的搅拌。然后,添加水(0.14mL),升温至70℃,进行15小时43分钟的搅拌。然后,在减压下浓缩反应混合物,实施2次添加吡啶并在减压下浓缩的操作,得到包含TBS基被脱保护的化合物的反应混合物。

[1175] 在氮气气氛下,于40℃,向亚磷酸(43mg,0.52mmol)的吡啶(1.5mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(49μL,0.36mmol),进行38分钟的搅拌。向该溶液中添加上述的包含已经脱保护的化合物的反应混合物,于40℃进行2小时14分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈(26g)中,过滤析出的固体,以褐色固体形式得到化合物87(52mg)。

[1176] ¹H-NMR: (300MHz;CDCl₃) δ0.88 (t,9H)、1.08-1.83 (m,96H)、1.89 (s,3H)、1.94 (s,

3H)、2.19 (s, 3H)、2.23-2.79 (m, 8H)、3.96-4.00 (m, 6H)、4.18-4.41 (m, 6H)、5.18 (brs, 1H)、5.38 (d, 1H)、6.14-6.25 (m, 3H)、6.43-6.48 (m, 1H)、6.86 (d, 1H)、7.21 (s, 2H)、7.46 (s, 1H)、7.65 (s, 1H)。

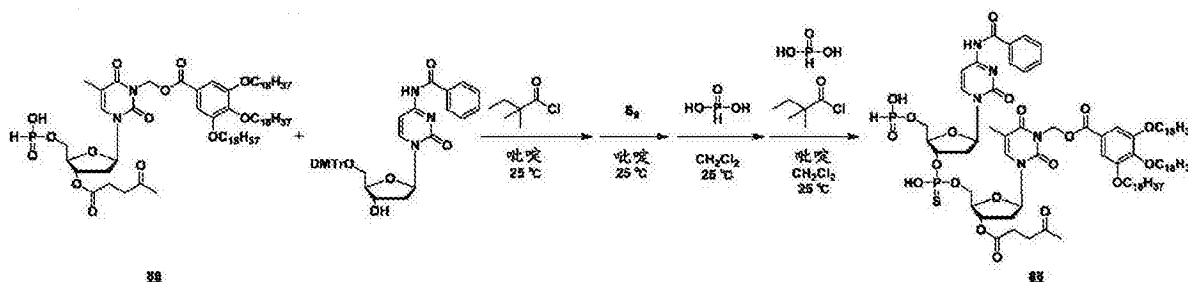
[1177] ^{31}P -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ -1.10、6.08。

[1178] MS (ESI $^-$): $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1646.0226。

[1179] 实施例84(二聚体合成): 化合物88的合成

[1180] [化学式120]

[1181]



[1182] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物86 (52mg) 和 N^4 -苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(东京化成工业公司制) (36mg, 0.057mmol) 的吡啶 (1.0mL) 溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯 (15 μL , 0.11mmol), 进行53分钟的搅拌。然后,添加单质硫 (13mg, 0.41mmol), 进行2小时10分钟的搅拌。然后,在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯 (2mL) 并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷 (0.50mL), 通过抽滤除去不溶物,用二氯甲烷进行洗涤 (0.25mL $\times$ 2次)。在室温下向该溶液中添加吡咯 (7.4 μL , 0.11mmol) 和磷酸 (46mg, 0.56mmol), 进行51分钟的搅拌。在室温下添加吡啶 (0.15mL), 然后,将2,2-二甲基丁酰氯 (49 μL , 0.36mmol) 分成3等份,每隔10分钟进行添加,进行35分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯 (16 μL , 0.12mmol), 进而进行45分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (26g) 中,过滤析出的固体,以淡黄色固体形式得到化合物88 (47mg)。

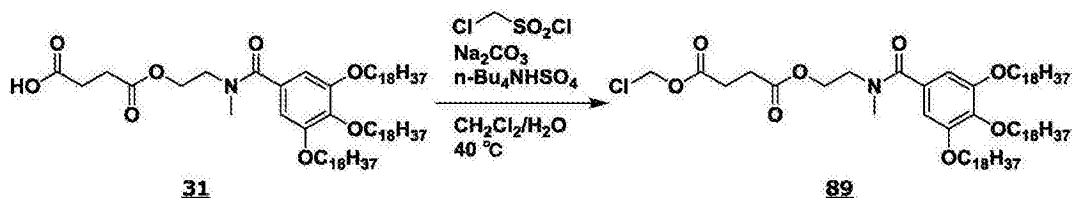
[1183] ^1H -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、0.98-1.99 (m, 99H)、2.13-2.34 (m, 7H)、2.56 (brs, 2H)、2.75 (brs, 2H)、3.97-4.21 (m, 12H)、5.17-5.35 (m, 2H)、6.14-6.21 (m, 3H)、6.44 (t, 1H)、6.93 (d, 1H)、7.20 (s, 2H)、7.54-8.34 (m, 8H)。

[1184] ^{31}P -NMR: (300MHz; CDCl_3) δ 5.11、59.77、61.38。

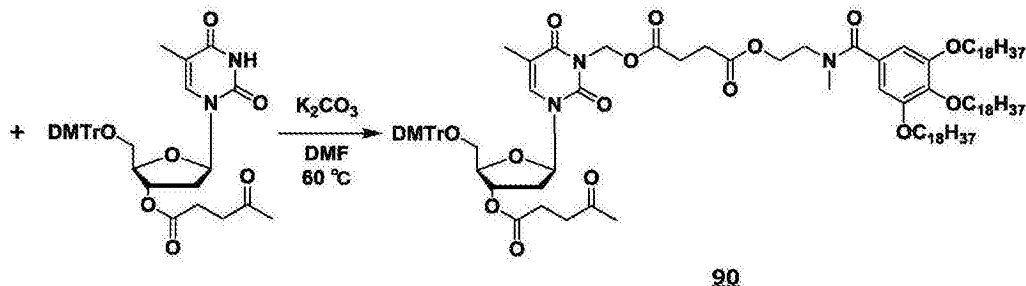
[1185] MS (ESI $^-$): $[\text{M}-\text{H}]^-$ 1751.0079。

[1186] 实施例85(在胸腺嘧啶3位键合有准固相保护基的核苷的合成): 化合物90的合成

[1187] [化学式121]



[1188]



90

[1189] 工序1化合物89的合成

[1190] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物31 (1.0g, 0.92mmol)、碳酸钠 (0.36g, 3.4mmol)、硫酸氢四正丁基铵 (34mg, 0.11mmol) 的二氯甲烷 (30g) 和水 (10g) 的混合溶液中,添加氯甲磺酰氯 (0.20mL, 2.0mmol), 进行41分钟的搅拌。然后,升温至40℃,进行2小时19分钟的搅拌。停止搅拌,进行分液,向得到的水层中添加二氯甲烷,进行萃取。合并得到的有机层,在减压下蒸馏去除溶剂,添加乙腈 (50g), 过滤析出的固体,以淡黄色固体 (0.96g) 形式得到化合物89。

[1191] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.26–1.84 (m, 96H)、2.70–2.73 (m, 4H)、3.05 (s, 3H)、3.74 (brs, 2H)、3.93–3.98 (m, 6H)、4.36 (brs, 2H)、5.69 (s, 2H)、6.58 (s, 2H)。

[1192] MS (ESI $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1132.9248。

[1193] 工序2化合物90的合成

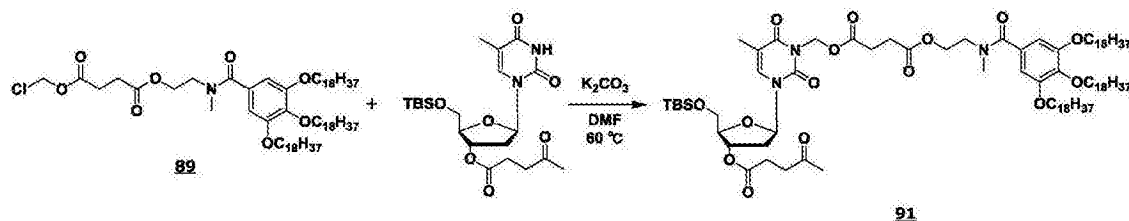
[1194] 在氮气气氛下,于60℃,向化合物89 (11mg, 9.7 μ mol)、5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基胸苷 (按照国际公开第2014-077292号中记载的方法合成) (10mg, 0.016mmol) 的DMF (0.20mL) 溶液中,添加碳酸钾 (20mg, 0.15mmol), 进行19小时30分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物90。

[1195] MS (ESI $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1739.1983。

[1196] 实施例86 (在胸腺嘧啶3位键合有准固相保护基的核苷的合成): 化合物91的合成

[1197] [化学式122]

[1198]



91

[1199] 在与实施例85的工序2同样的条件下,将5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基胸苷变更为5'-O-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-3'-O-乙酰丙酰基胸苷 (11mg) 来实施反应。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物91。

[1200] MS (ESI $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1551.1540。

[1201] 实施例87(使用二氯甲烷溶剂的二聚体合成):化合物43的合成

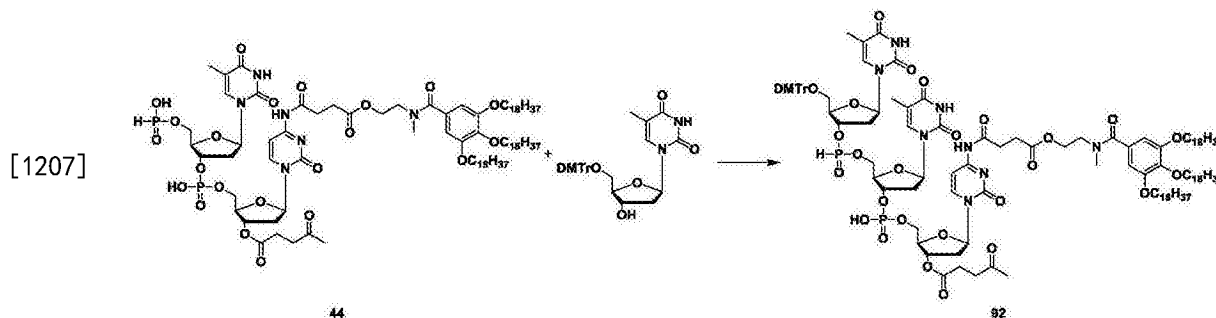
[1202] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物42(98mg)、化合物1(36mg,0.10mmol)和吡啶(53μL,0.66mmol)的二氯甲烷(2.0mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(45μL,0.33mmol),进行50分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF和水的溶液(0.98mL,0.098mmol),进行38分钟的搅拌。然后,添加亚磷酸二甲酯(3.0μL,0.033mmol),添加二氯甲烷(1.0mL),在减压下浓缩。添加二氯甲烷(5.0mL),再次在减压下浓缩。通过抽滤除去不溶物,用二氯甲烷进行洗涤(1.0mL×2次)。于40℃,向该溶液中添加氟化氢-吡啶(84.5μL,3.3mmol),进行5小时33分钟的搅拌。添加TMSCl(0.41mL,3.3mmol),在减压下浓缩反应混合物,得到化合物43。

[1203] 实施例88(使用THF溶剂的二聚体合成):化合物43的合成

[1204] 在氮气气氛下,于25℃,向化合物42(85mg)、化合物1(30mg,0.084mmol)和吡啶(45μL,0.55mmol)的THF(1.5mL)溶液中,添加2,2-二甲基丁酰氯(38μL,0.28mmol),进行14分钟的搅拌。然后,添加包含0.1M的碘的吡啶、THF和水的溶液(1.2mL,0.12mmol),进行3小时49分钟的搅拌。然后,添加亚磷酸二甲酯(3.0μL,0.033mmol),在减压下浓缩反应混合物。添加甲苯(3.0mL)并反复进行3次减压下浓缩,添加二氯甲烷(1.0mL),通过抽滤除去不溶物,用二氯甲烷进行洗涤(1.0mL×2次)。于25℃,向该溶液中添加氟化氢-吡啶(6.5μL,0.25mmol),于40℃搅拌一夜。然后,在减压下浓缩反应混合物,得到化合物43。

[1205] 实施例89(缩合剂考察):化合物92的合成

[1206] [化学式123]



[1208] 在与实施例35的工序2同样的条件下,将缩合剂变更为2,4,6-三异丙基苯磺酰氯(8.4mg)来实施反应,在减压下将偶联反应后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物92。

[1209] MS(ESI⁻): [M-H]⁻2284.3243.

[1210] 实施例90(缩合剂考察):化合物92的合成

[1211] 在与实施例35的工序2同样的条件下,将缩合剂变更为2,4-二磺酰二氯均三甲苯(2,4-mesitylenedisulfonyl dichloride)(8.8mg)来实施反应,在减压下将偶联反应后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物92。

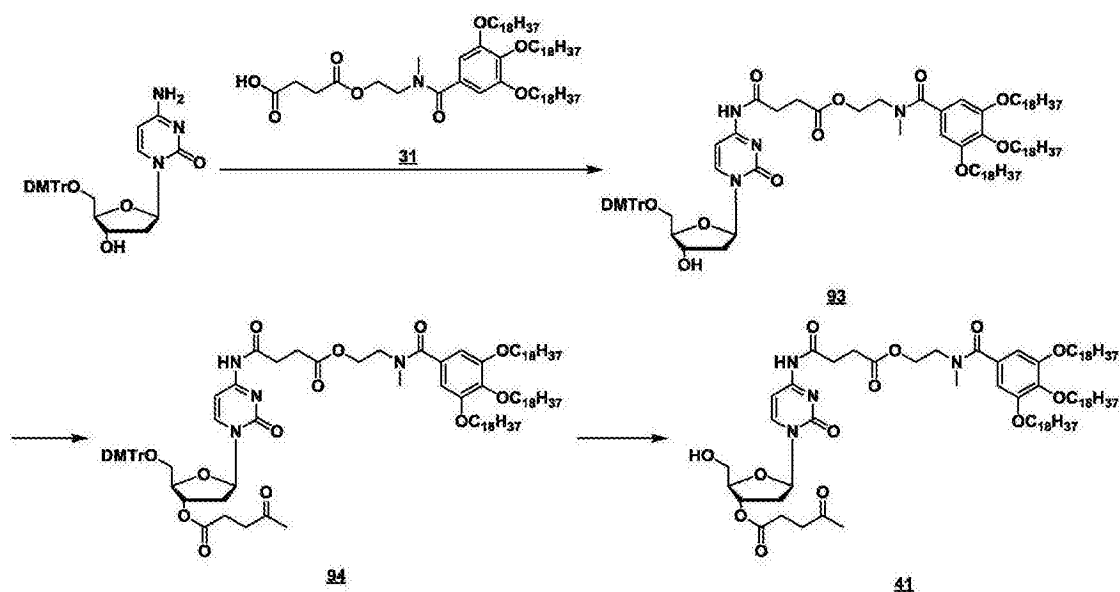
[1212] 实施例91(缩合剂考察):化合物92的合成

[1213] 在与实施例35的工序2同样的条件下,将缩合剂变更为1-金刚烷甲酰氯(1-adamantanecarbonyl chloride)(5.5mg)来实施反应,在减压下将偶联反应后的反应混合物浓缩,作为主产物得到化合物92。

[1214] 实施例92(在核酸碱基中导入了准固相保护基的单体及二聚体合成):化合物41的合成

[1215] [化学式124]

[1216]



[1217] 工序1化合物93的合成

[1218] 在与实施例66的工序2同样的条件下,使用5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(Chem-Impex公司制)(4.0g)代替3'-O-(叔丁基二苯基甲硅烷基)-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷来实施反应,以白色固体形式得到化合物93(7.4g)。

[1219] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.19-1.80 (m, 96H)、2.17-2.28 (m, 1H)、2.69-2.80 (m, 5H)、3.05 (s, 3H)、3.41-3.79 (m, 10H)、3.92-3.97 (m, 6H)、4.09-4.46 (m, 4H)、6.24 (t, 1H)、6.57 (s, 2H)、6.84 (d, 4H)、7.15-7.40 (m, 10H)、8.20 (d, 1H)、9.27 (brs, 1H)。

[1220] MS (ESI $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1596.1595。

[1221] 工序2化合物94的合成

[1222] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物93(7.4g, 4.7mmol)、DMAP(0.065g, 0.53mmol)、乙酰丙酸(0.87g, 7.5mmol)的二氯甲烷(70mL)溶液中,添加WSC·HCl(1.4g, 7.5mmol),进行5小时4分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈(504g)中,过滤析出的固体,以淡黄色固体形式得到化合物94(7.9g)。

[1223] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.20-1.81 (m, 96H)、2.19 (s, 3H)、2.23-2.33 (m, 1H)、2.51-2.60 (m, 2H)、2.70-2.80 (m, 7H)、3.06 (s, 3H)、3.44 (d, 2H)、3.79 (brs, 8H)、3.93-3.98 (m, 6H)、4.03-4.36 (m, 3H)、5.39 (d, 2H)、6.27 (t, 1H)、6.57 (s, 2H)、6.81-6.85 (m, 4H)、7.11 (d, 1H)、7.21-7.36 (m, 9H)、8.07 (d, 1H)、9.32 (brs, 1H)。

[1224] 工序3化合物41的合成

[1225] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物94(5.8g, 3.4mmol)的二氯甲烷(50g)溶液中,添加吡咯(0.71mL, 10mmol)、二氯乙酸(1.4mL, 17mmol),进行23分钟的搅拌。添加吡啶(1.4mL, 17mmol),将反应混合物添加至甲醇(502g)中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物41(4.6g)。

[1226] 实施例93(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物78的合成

[1227] 在与实施例75同样的条件下,使用乙酰肼(7.6mg)代替肼一水合物,在室温下实施反应,在减压下浓缩反应混合物,得到化合物78。

[1228] 实施例94(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物78的合成

[1229] 在氮气气氛下,将化合物77(10mg,4.5 μ mol)的二氯甲烷(0.20mL)与吡啶(0.20mL)的混合溶液冷却至0℃,添加硫酸肼(10.7mg,0.082mmol),于40℃搅拌一夜。在减压下浓缩反应混合物,得到化合物78。

[1230] 实施例95(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物78的合成

[1231] 在与实施例75同样的条件下,使用乙二胺(1.5 μ L)代替肼一水合物,于40℃实施反应,在减压下浓缩反应混合物,得到化合物78。

[1232] 实施例96(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物78的合成

[1233] 在与实施例75同样的条件下,使用乙酸肼(0.7mg)代替肼一水合物来实施反应,在减压下浓缩反应混合物,作为主产物得到化合物78。

[1234] 实施例97(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物78的合成

[1235] 在与实施例75同样的条件下,使用苯基肼(2.5mg)代替肼一水合物来实施反应,在减压下浓缩反应混合物,得到化合物78。

[1236] 实施例98(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物78的合成

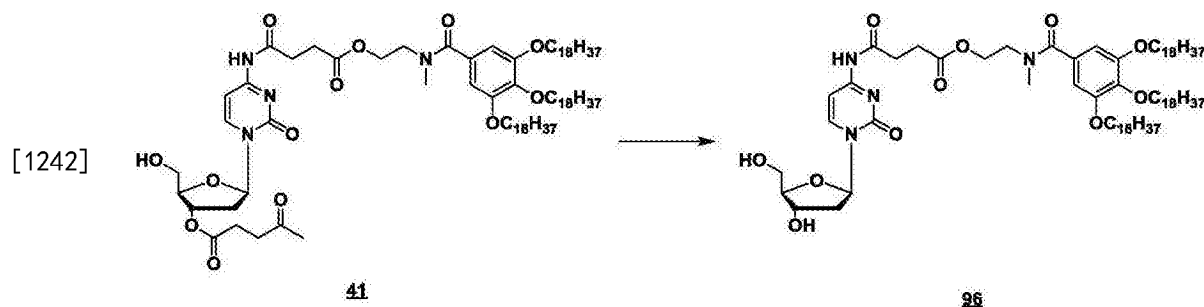
[1237] 在与实施例75同样的条件下,使用对甲苯磺酰肼(2.0mg)代替肼一水合物来实施反应,在减压下浓缩反应混合物,得到化合物78。

[1238] 实施例99(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物78的合成

[1239] 在与实施例75同样的条件下,使用肼基甲酸甲酯(3.1mg)代替肼一水合物来实施反应,在减压下浓缩反应混合物,得到化合物78。

[1240] 实施例100(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物96的合成

[1241] [化学式125]



[1243] 在氮气气氛下,将肼一水合物(0.50mg,10.3mmol)的二氯甲烷(0.20mL)与乙酸(40 μ L)的混合溶液冷却至0℃,添加化合物41(10mg,7.3 μ L)的二氯甲烷(0.10mL)溶液,进行5小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物96的生成。

[1244] 实施例101(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物96的合成

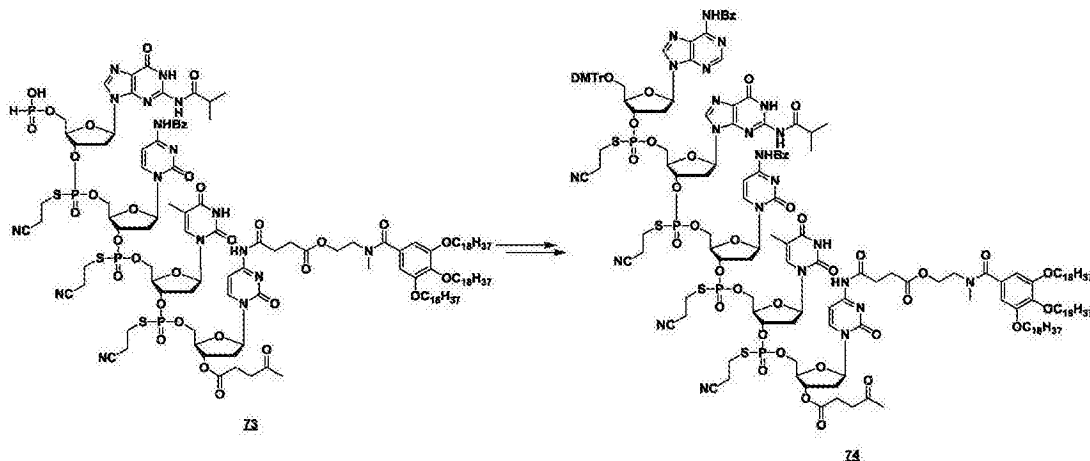
[1245] 在氮气气氛下,将Chirazyme L-2(3.7mg)添加至0.15M磷酸缓冲液(pH6.8)(0.23g)中。然后,添加化合物41(9.0mg,6.5 μ mol)的1,4-二氧杂环己烷(1.0g)溶液,升温至40℃,进行13小时20分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物96的生成。

[1246] 实施例102(3'位乙酰丙酰基的脱保护):化合物96的合成

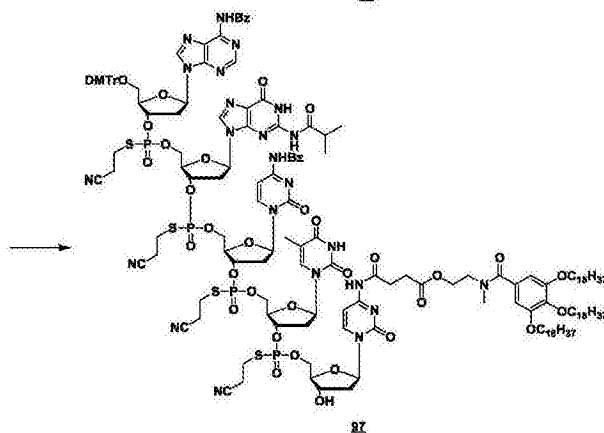
[1247] 在氮气气氛下,将Chirazyme L-5 (10mg)添加至0.15M磷酸缓冲液 (pH6.8) (0.21g) 中。然后,添加化合物41 (10mg, 7.2 μ mol) 的1,4-二氧杂环己烷 (1.0g) 溶液,升温至40℃,进行13小时20分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物96的生成。

[1248] 实施例103 (在3'末端具有羟基的五聚体合成): 化合物97的合成

[1249] [化学式126]



[1250]



[1251] 工序1化合物74的合成

[1252] 在与实施例72的工序4同样的条件下实施反应,将硫化后的反应混合物添加至甲醇中,过滤析出的固体,以淡肉色固体形式得到化合物74 (2.3g, 90%)。

[1253] 工序2化合物97的合成

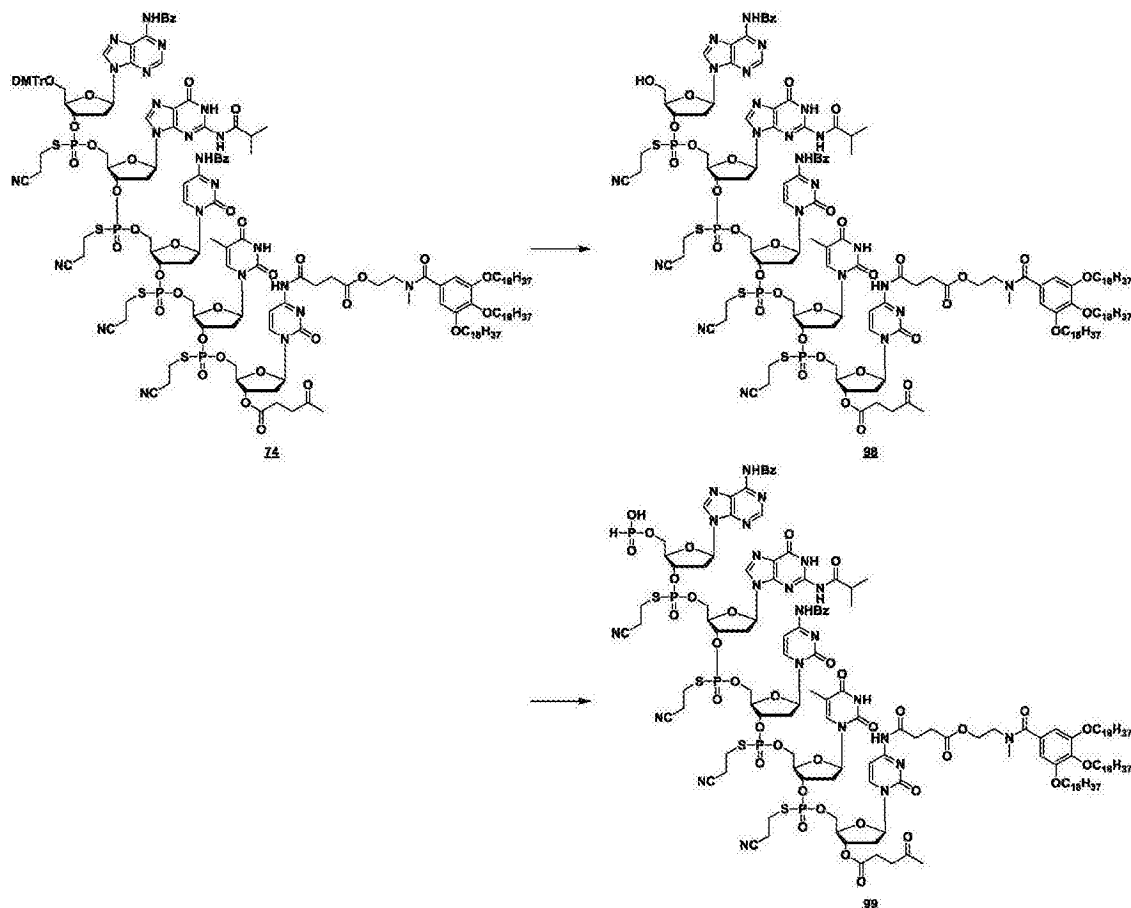
[1254] 在氮气气氛下,将化合物74 (0.50g, 0.14mmol) 的THF (20mL) 溶液冷却至0℃,添加乙酸 (3.0mL),然后,添加胍一水合物 (14 μ L, 0.29mmol),进行6小时搅拌。向反应混合物中添加乙酰丙酮 (100 μ L),升温至室温,在减压下浓缩后,添加至甲醇 (102g) 中,过滤析出的固体,得到化合物97 (0.45g)。

[1255] MS (ESI⁺): [M+2H]²⁺ 1693.2456.

[1256] 实施例104 (在5'末端具有H-磷酸酯基的五聚体合成): 化合物99的合成

[1257] [化学式127]

[1258]



[1259] 工序1化合物98的合成

[1260] 在氮气气氛下,将化合物74 (0.51g, 0.15mmol) 的二氯甲烷溶液 (10mL) 冷却至10℃,添加吡咯 (30μL, 0.43mmol), 进行14分钟的搅拌。然后,添加二氯乙酸 (82μL, 1.0mmol), 进行4小时3分钟的搅拌。添加吡啶 (1.5mL), 升温至室温,将反应混合物添加至乙腈 (86g) 中,过滤析出的固体,得到化合物98 (0.46g)。

[1261] MS (ESI⁺): [M+2H]²⁺ 1591.1922.

[1262] 工序2化合物99的合成

[1263] 在氮气气氛下,于40℃,向化合物98 (0.45g, 0.14mmol) 的二氯甲烷 (5.0mL) 与吡啶 (1.0mL) 的混合溶液中添加磷酸 (0.20g, 2.4mmol), 将2,2-二甲基丁酰氯 (0.19mL, 1.4mmol) 分成4等份,每隔10分钟进行添加,进行1小时53分钟的搅拌,添加2,2-二甲基丁酰氯 (0.42mL, 0.71mmol), 进而进行1小时8分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (84g) 中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物99 (0.42g)。

[1264] MS (ESI⁺): [M+2H]²⁺ 1623.1824.

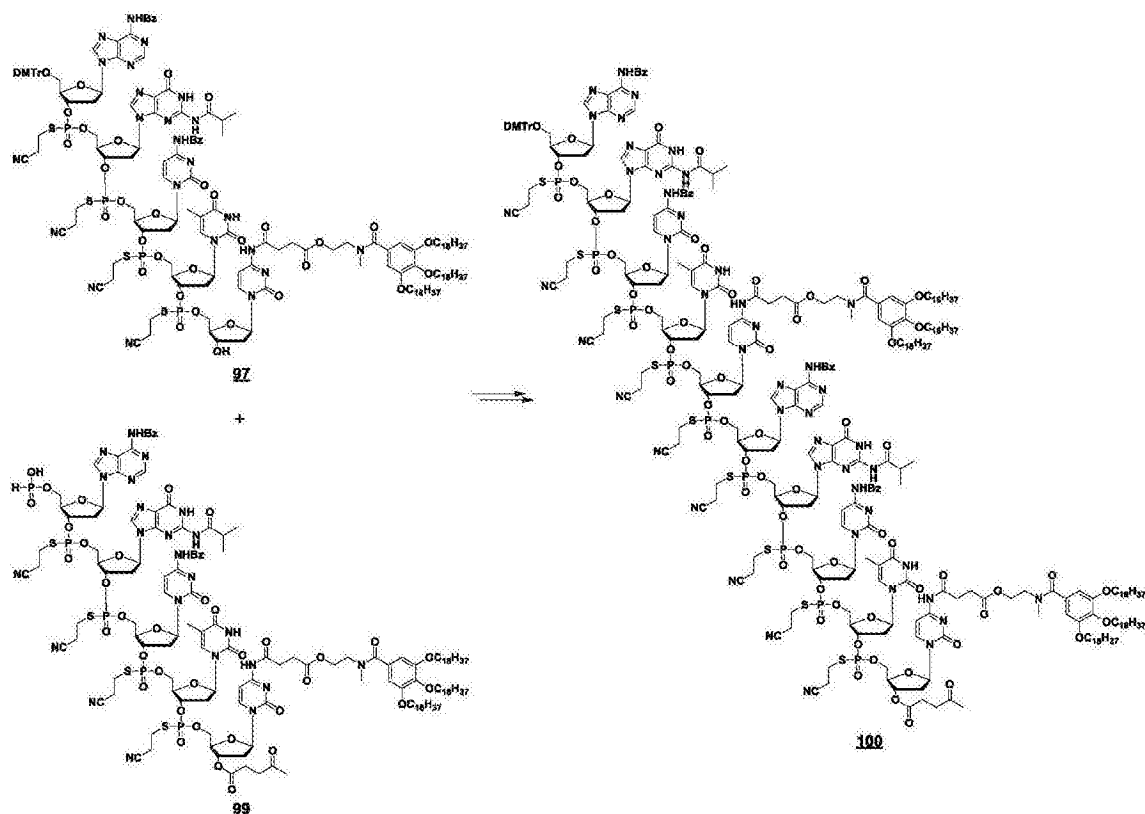
[1265] 实施例105 (五聚体合成): 化合物99的合成

[1266] 在氮气气氛下,将化合物74 (10mg, 2.9μmol)、吡咯 (60μL, 8.6μmol) 的二氯甲烷溶液 (0.20mL) 冷却至10℃,添加磷酸 (0.71mg, 8.6μmol), 进行1小时35分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物98为主产物。然后,添加吡啶 (30μL), 升温至室温,添加2,2-二甲基丁酰氯 (8.0μL, 58μmol), 进行30分钟的搅拌。对反应混合物进行LC-MS分析,确认了化合物99为主产物。

[1267] 实施例106 (十聚体 (10mer) 合成): 化合物100的合成

[1268] [化学式128]

[1269]



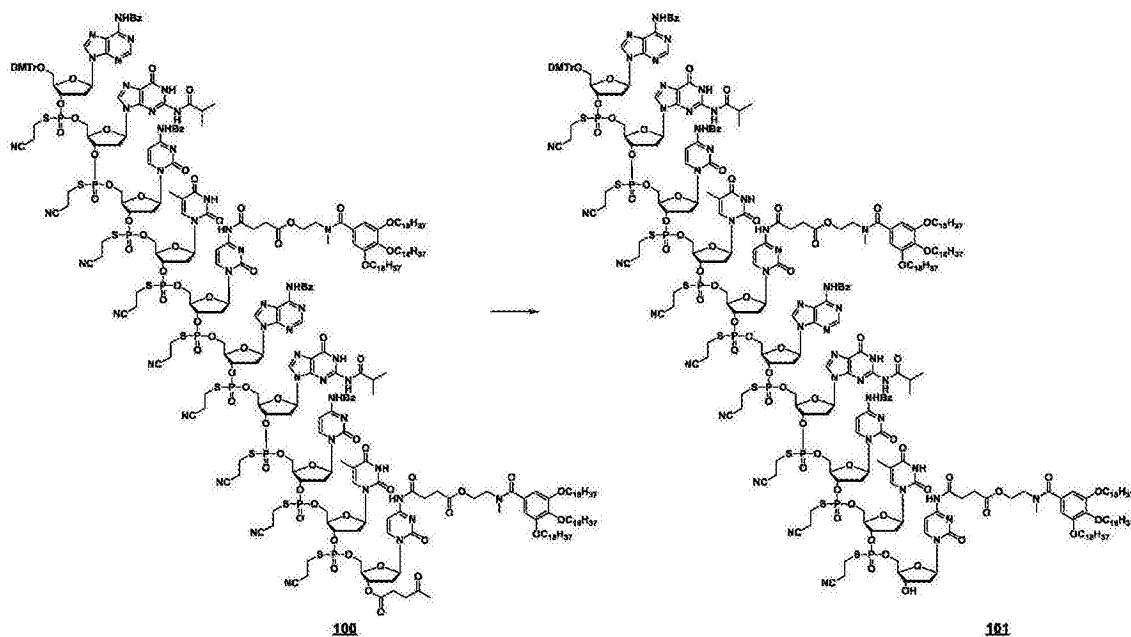
[1270] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物97 (0.44g, 0.13mmol) 和化合物99 (0.41g) 的吡啶 (10mL) 溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯 (0.80g, 2.0mmol), 进行11分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (62mg, 0.27mmol), 进行1小时52分钟的搅拌。将反应混合物添加至甲醇 (102g) 中, 过滤析出的固体, 得到化合物100 (0.81g)。

[1271] MS (ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2232.9346.

[1272] 实施例107 (在3' 末端具有羟基的十聚体合成): 化合物101的合成

[1273] [化学式129]

[1274]



[1275] 在氮气气氛下,将化合物100 (0.39g, 58 μ mol) 的THF (15mL) 溶液冷却至0℃,添加乙酸 (2.3mL), 然后,添加胍一水合物 (5.5 μ L, 0.11mmol), 进行7小时搅拌。进而添加胍一水合物 (5.5 μ L, 0.11mmol), 进行1小时12分钟的搅拌。向反应混合物中添加乙酰丙酮 (0.50mL), 升温至室温,在减压下浓缩后,将该浓缩物添加至甲醇 (100g) 中,过滤析出的固体,得到化合物101 (0.35g)。

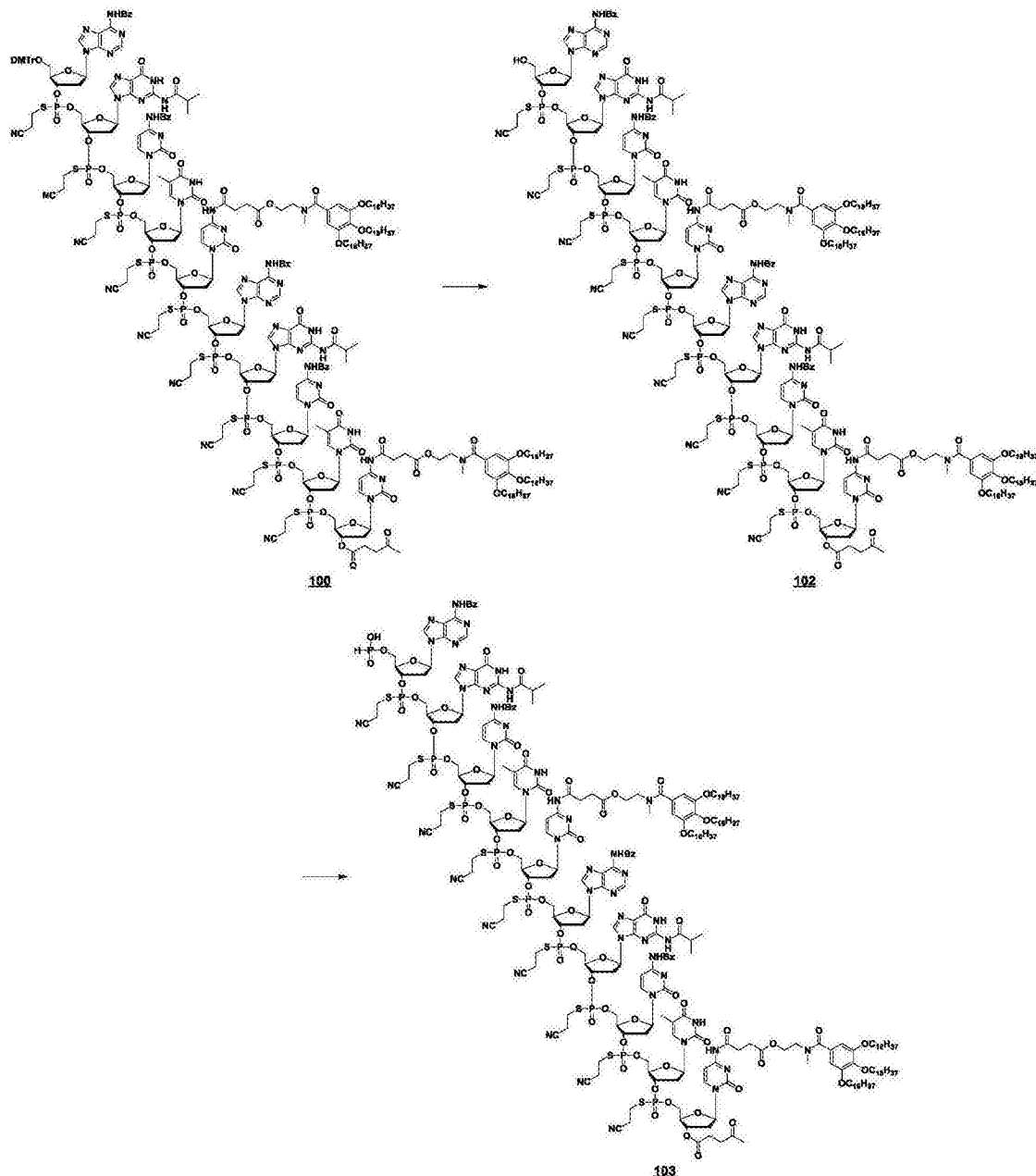
[1276] 在氮气气氛下,将化合物101 (0.15g, 23 μ mol) 的THF (3.0mL) 溶液冷却至10℃,添加乙酸 (0.90mL), 然后,添加胍一水合物 (7.5 μ L, 0.15mmol), 进行30分钟的搅拌。将反应混合物添加至甲醇 (57g) 中,过滤析出的固体,得到化合物101 (0.14g)。

[1277] MS (ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2200.2656.

[1278] 实施例108 (在5'末端具有H-膦酸酯基的十聚体合成): 化合物103的合成

[1279] [化学式130]

[1280]



[1281] 工序1化合物102的合成

[1282] 在氮气气氛下,将化合物100 (0.39g, 58 μ mol)、咪唑 (21mg, 0.18mmol) 的二氯甲烷溶液 (8.0mL) 冷却至10℃,添加二氯乙酸 (33 μ L, 0.40mmol), 进行2小时搅拌。进而添加二氯乙酸 (14 μ L, 0.17mmol), 进行2小时32分钟的搅拌。添加吡啶 (0.60mL), 升温至室温, 将反应混合物添加至甲醇 (100g) 中, 过滤析出的固体, 得到化合物101 (0.35g)。

[1283] MS (ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2132.2235.

[1284] 工序2化合物103的合成

[1285] 在氮气气氛下, 于40℃, 向化合物101 (0.17g, 27 μ mol) 的二氯甲烷 (1.0mL) 与吡啶 (0.20mL) 的混合溶液中添加磷酸 (38mg, 0.46mmol), 将2,2-二甲基丁酰氯 (36 μ L, 0.27mmol) 分成4等份, 每隔10分钟进行添加, 进行1小时5分钟的搅拌, 添加2,2-二甲基丁酰氯 (73 μ L, 0.53mmol), 进而进行49分钟的搅拌。然后, 将反应混合物添加至乙腈 (51g) 中, 过滤析出的

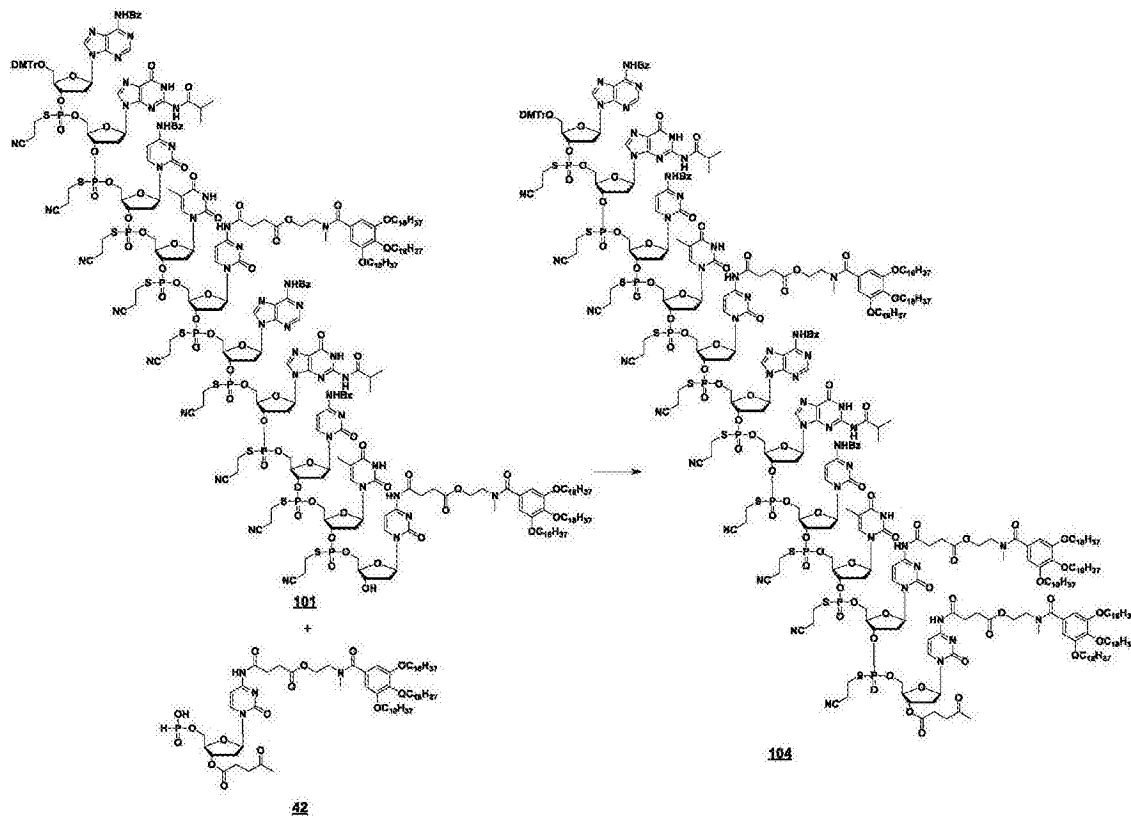
固体,以白色固体形式得到化合物102(0.17g)。

[1286] MS (ESI⁺): [M+3H]³⁺2153.5570.

[1287] 实施例109(十一聚体(11mer)合成):化合物104的合成

[1288] [化学式131]

[1289]



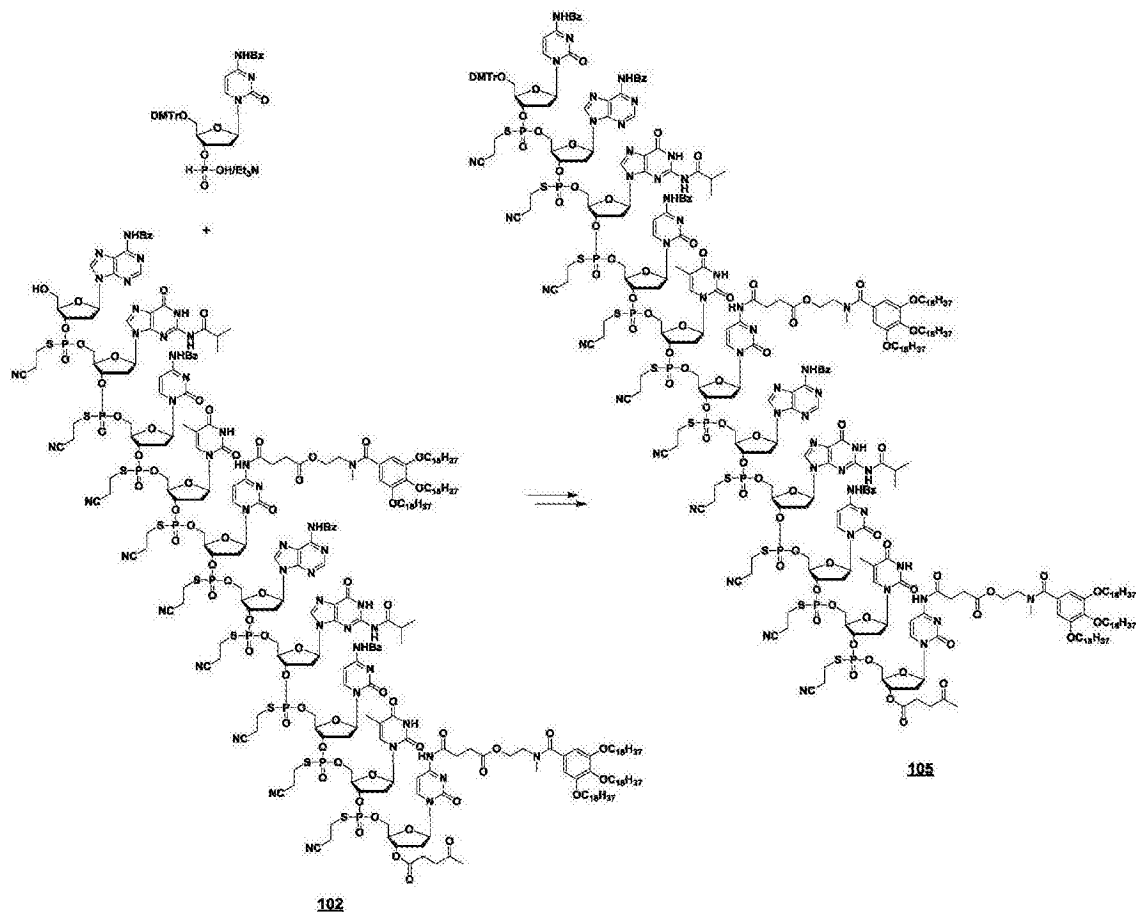
[1290] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物101(5.5mg,0.83 μ mol)和化合物42(2.7mg)的吡啶(0.20mL)溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(50mg,0.13mmol),进行3小时8分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-巯基乙基)硫基]邻苯二甲酰亚胺(3.4mg,15 μ mol),进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物104的生成。

[1291] MS (ESI⁺): [M+3H]³⁺2707.5985.

[1292] 实施例110(十一聚体合成):化合物105的合成

[1293] [化学式132]

[1294]

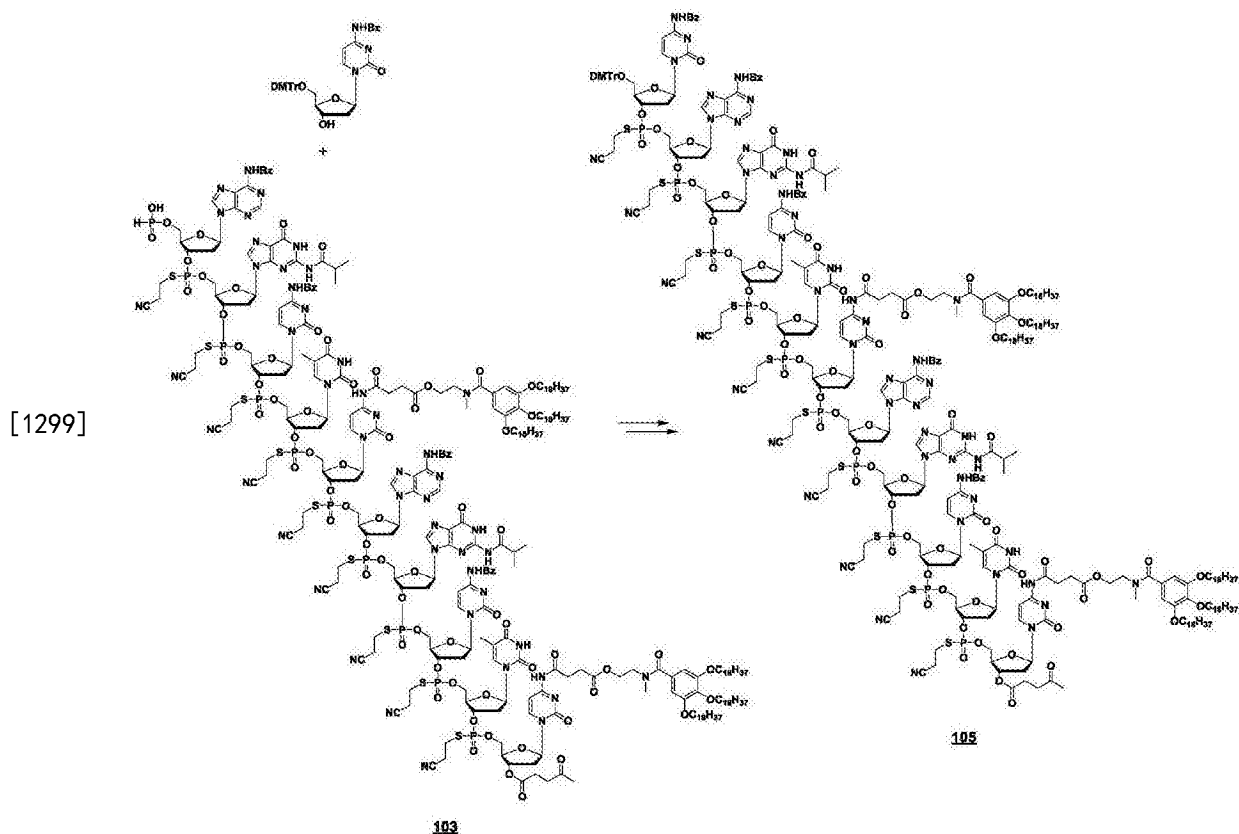


[1295] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物102(5.8mg,0.91 μ mol)和5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羟基氧磷基-2'-脱氧胞嘧啶核苷三乙胺盐(ChemGenes Corporation制)(2.3mg,2.9 μ mmol)的吡啶(0.20mL)溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(28mg,72 μ mol),进行1小时40分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基)硫基]邻苯二甲酰亚胺(3.6mg,16 μ mol),进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物105为主产物。

[1296] MS(ESI⁺):[M+3H]³⁺2386.9640.

[1297] 实施例111(十一聚体合成):化合物105的合成

[1298] [化学式133]

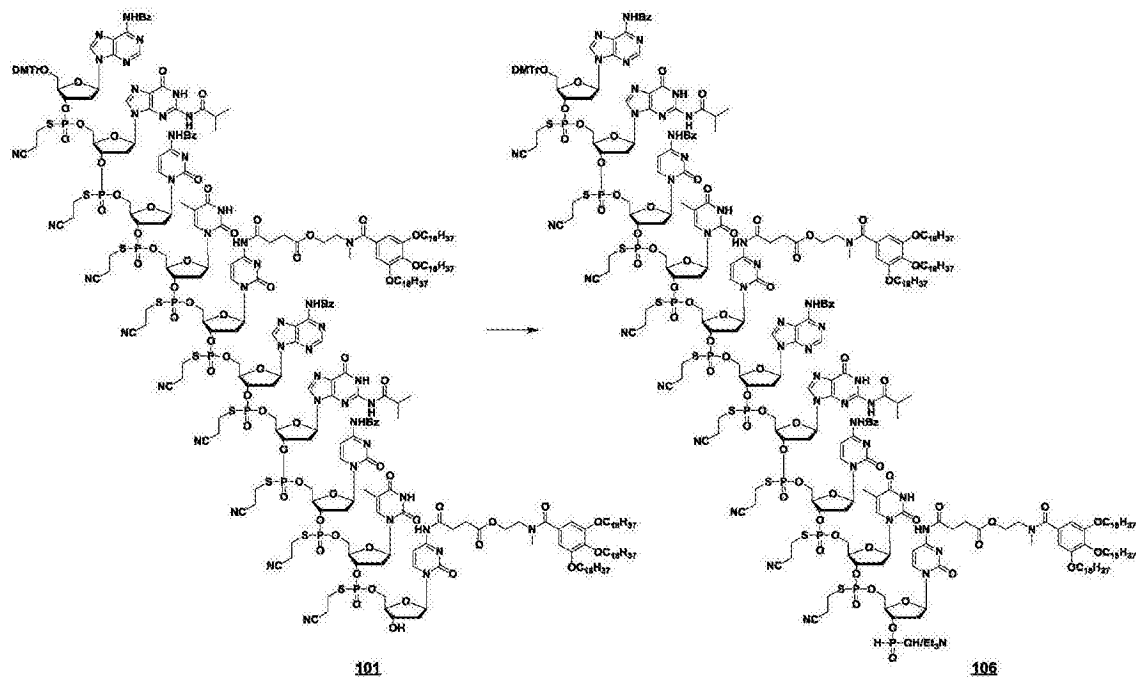


[1300] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物103 (4.5mg, 0.70 μ mol) 和N⁴-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧胞嘧啶核苷(东京化成工业公司制) (2.9mg, 4.6 μ mmol) 的吡啶 (0.20mL) 溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯 (23mg, 57 μ mol), 进行28分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (2.8mg, 12 μ mol), 进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物105的生成。

[1301] 实施例112(在3' 末端具有H-膦酸酯基的十聚体合成): 化合物106的合成

[1302] [化学式134]

[1303]



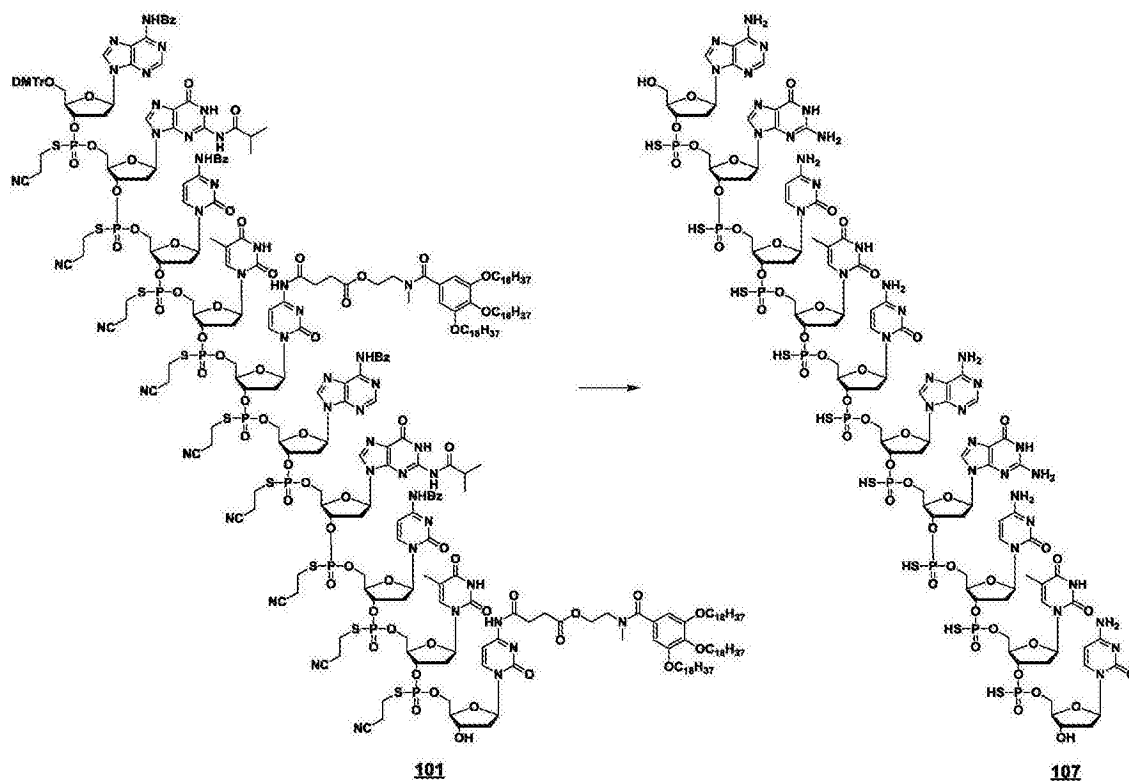
[1304] 在氮气气氛下,在室温下,向亚磷酸二苯酯(2.0 μ L,10 μ mol)的吡啶(0.20mL)溶液中,添加化合物101(9.3mg,1.4 μ mol),在室温下进行3小时7分钟的搅拌。然后,追加亚磷酸二苯酯(2.0 μ L,10 μ mol),在室温下进行11小时50分钟的搅拌。依次添加水、三乙胺,利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物106的生成。

[1305] MS(ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2221.5833.

[1306] 实施例113(十聚体的脱保护):化合物107的合成

[1307] [化学式135]

[1308]



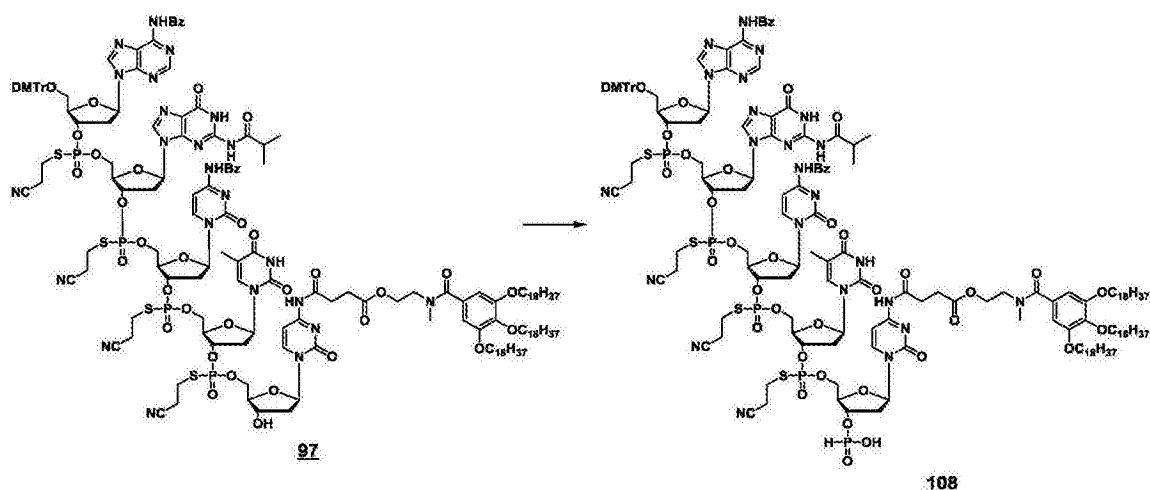
[1309] 在氮气气氛下,将化合物101 (8.7mg, 1.3 μ mol) 的乙醇 (0.15g) 悬浮液升温至45℃, 添加40%甲胺水溶液 (0.50mL), 进行20分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析, 确认了化合物107的生成。

[1310] MS (ESI⁺): [M+2H]²⁺1566.1633

[1311] 实施例114 (在3'末端具有H-磷酸酯基的五聚体合成): 化合物108的合成

[1312] [化学式136]

[1313]



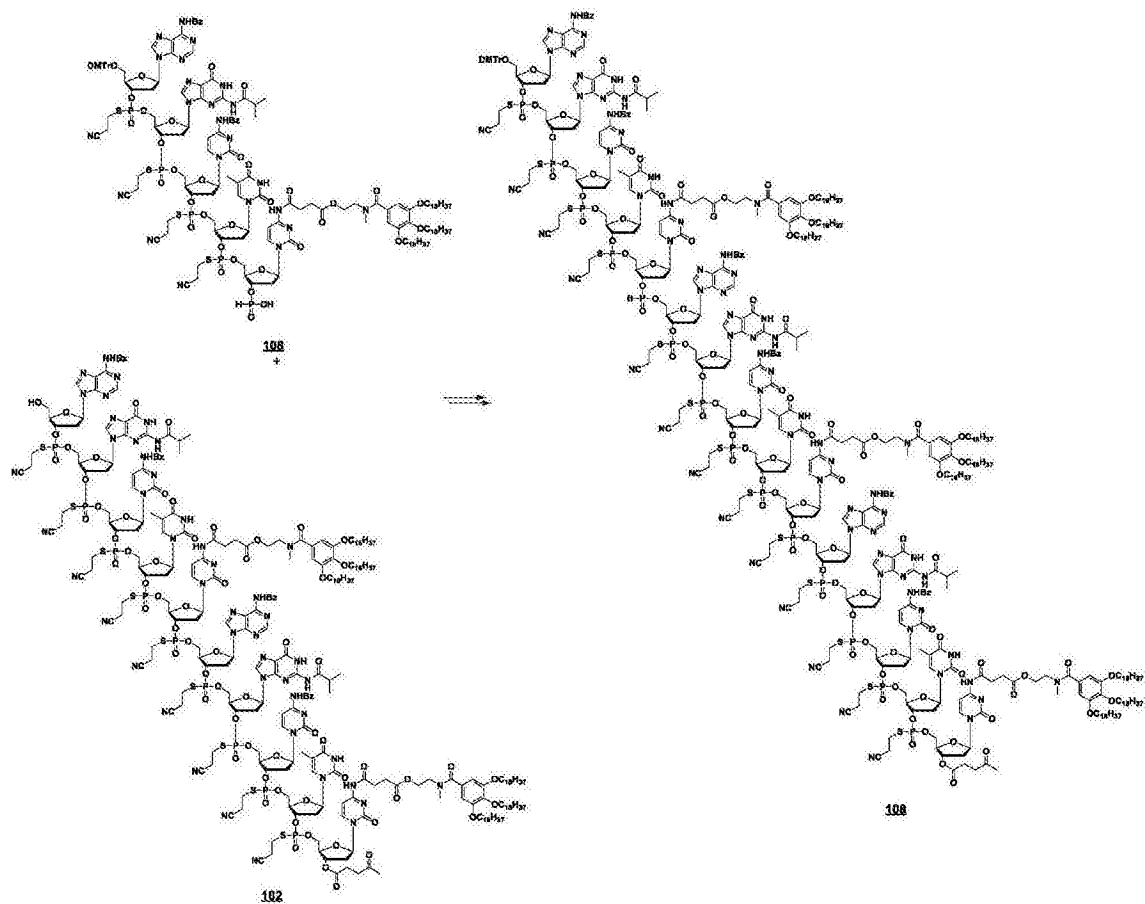
[1314] 在氮气气氛下,在室温下,向亚磷酸二苯酯 (3.9 μ L, 20 μ mol) 的吡啶 (0.20mL) 溶液中,添加化合物97 (9.0mg, 2.7 μ mol), 在室温下进行1小时搅拌。然后,添加水 (50 μ L), 将反应混合物添加至乙腈中,过滤析出的固体,以白色固体形式得到化合物108 (0.80mg)。

[1315] MS (ESI⁺): [M+2H]²⁺1725.2231.

[1316] 实施例115(十五聚体(15mer)合成):化合物109的合成

[1317] [化学式137]

[1318]



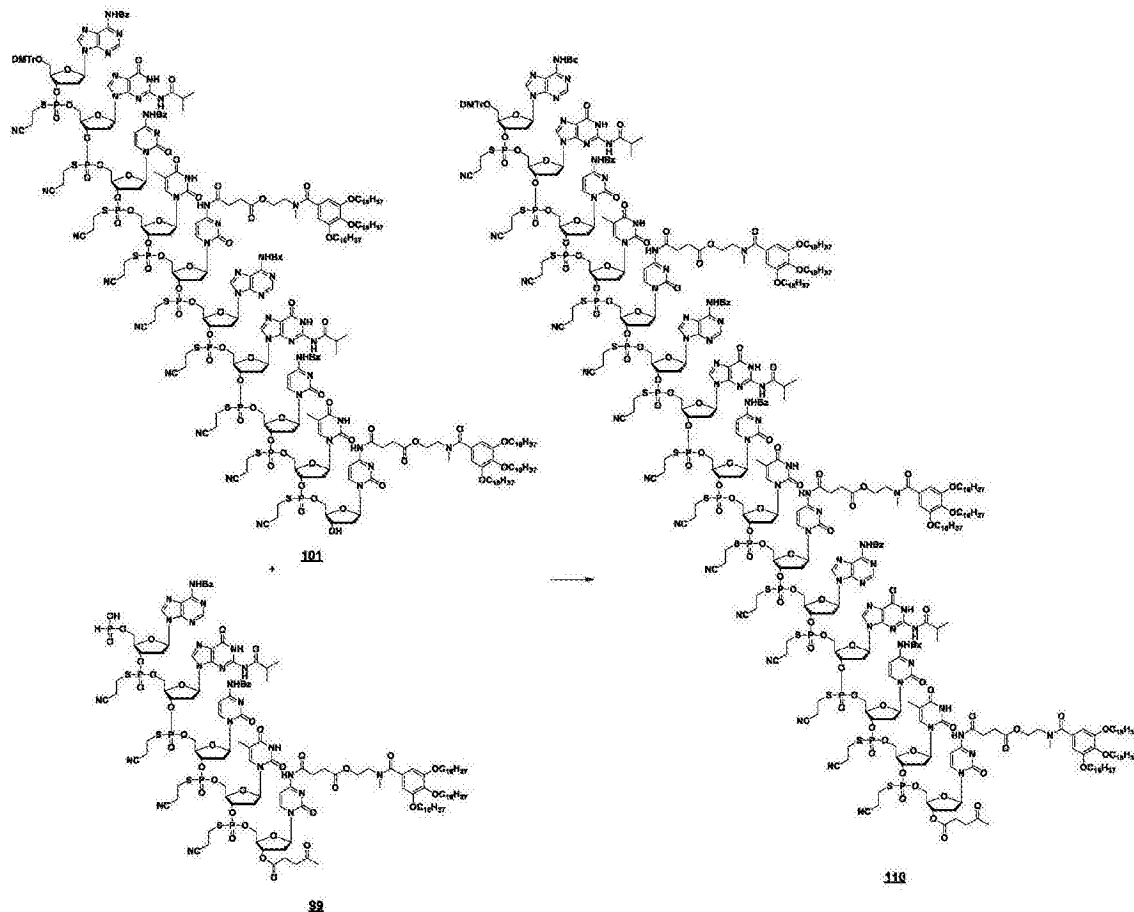
[1319] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物102(1.7mg,0.27 μ mol)和化合物108(0.80mg)的吡啶(0.20mL)溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(29mg,73 μ mol),进行30分钟的搅拌。对反应混合物进行LC-MS分析,确认了化合物109的生成。

[1320] MS(ESI⁺):[M+4H]⁴⁺2457.0209.

[1321] 实施例116(十五聚体合成):化合物107的合成

[1322] [化学式138]

[1323]



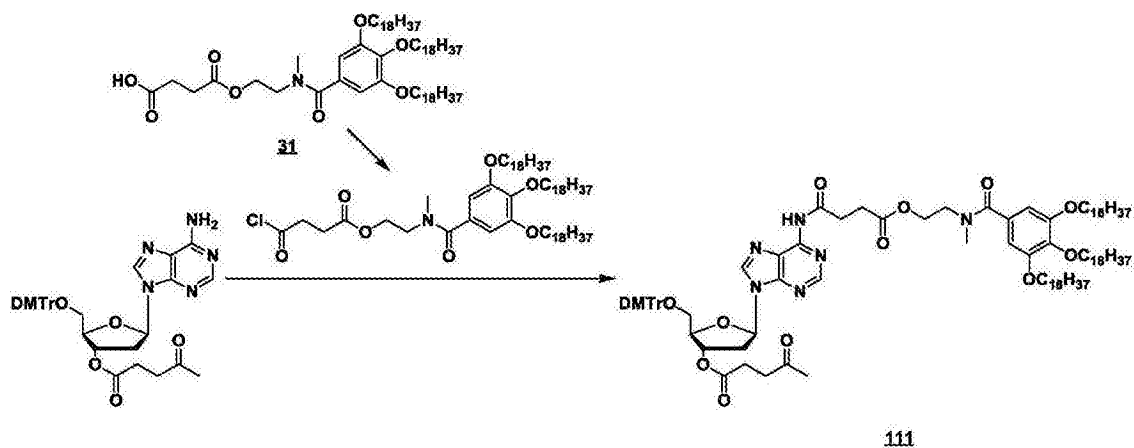
[1324] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物101 (11mg, 1.7 μ mol) 和化合物99 (4.8mg) 的吡啶 (0.20mL) 溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯 (64mg, 0.16mmol), 进行1小时5分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (5.0mg, 22 μ mol), 进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物110的生成。

[1325] MS (ESI⁺): [M+4H]⁴⁺ 2478.2707.

[1326] 实施例117 (向腺嘌呤中导入准固相保护基): 化合物111的合成

[1327] [化学式139]

[1328]



[1329] 在氮气气氛下,将化合物31 (11mg, 10 μ mol) 的二氯甲烷 (0.20mL) 和DMF (5.0 μ L) 的

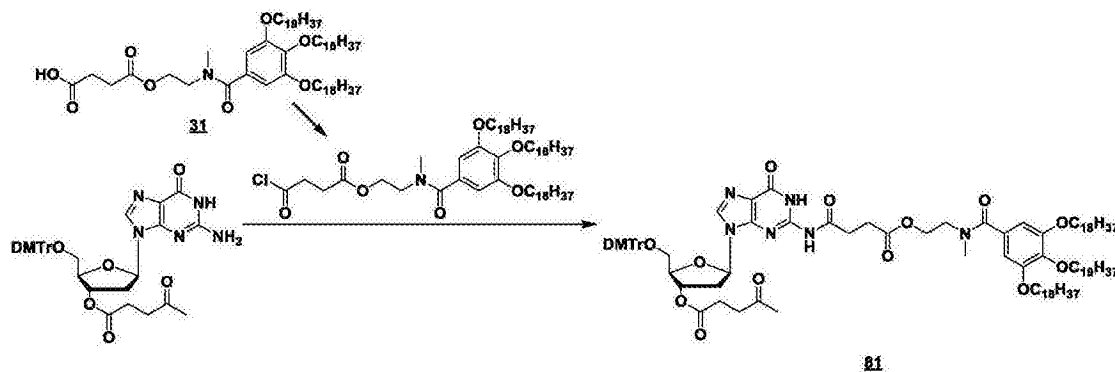
混合溶液冷却至10℃,添加亚硫酰二氯(4.0μL,55μL),然后升温至室温,进行58分钟的搅拌。于10℃,将该反应混合物添加至5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧腺嘌呤核苷(12mg,18μmol)和二异丙基乙胺(14μL,83μmol)的二氯甲烷(0.20mL)溶液中,进行1小时20分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物111的生成。

[1330] MS(ESI⁺): [M+H]⁺1718.2007.

[1331] 实施例118(向鸟嘌呤导入准固相保护基):化合物81的合成

[1332] [化学式140]

[1333]

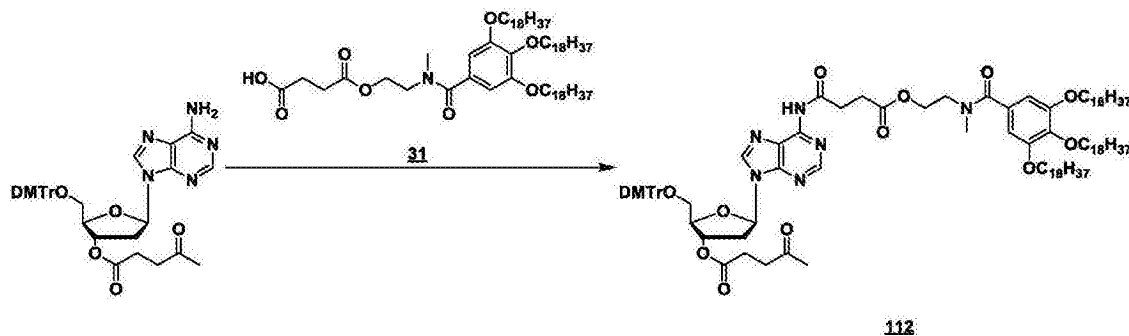


[1334] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物31(12mg,11μmol)的二氯甲烷(0.30mL)与DMF(5.0μL)的混合溶液中,添加亚硫酰二氯(4.0μL,55μL),进行20分钟的搅拌。在室温下将该反应混合物添加至5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷(10mg,15μmol)和二异丙基乙胺(28μL,0.17mmol)的二氯甲烷(0.20mL)溶液中,进行30分钟的搅拌。对反应混合物进行LC-MS分析,确认了化合物81的生成。

[1335] 实施例119(向腺嘌呤中导入准固相保护基):化合物112的合成

[1336] [化学式141]

[1337]



[1338] 在氮气气氛下,于40℃,向5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧腺嘌呤核苷(0.93g,1.4mmol)和化合物31(1.1g,0.97mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液中,依次添加DMAP(0.56g,4.6mmol)、WSC·HCl(0.90g,4.7mmol),进行16小时35分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物,添加甲醇(102g),过滤析出的固体,得到化合物112的粗产物(1.3g)。利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化粗产物,得到化合物112(0.68g)。

[1339] ¹H-NMR:(300MHz;CDCl₃) δ0.85(t,9H)、1.25-1.81(m,96H)、2.21(s,3H)、2.59-3.07(m,11H)、3.26-3.78(m,12H)、3.93-4.31(m,9H)、5.53(d,1H)、6.48-6.49(m,1H)、6.59(s、

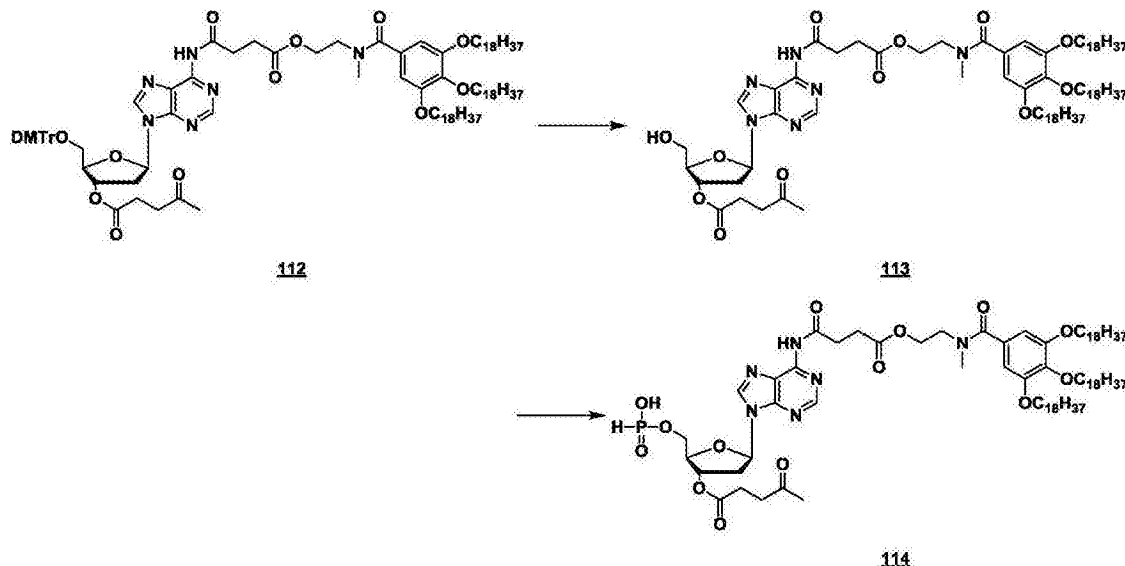
2H)、6.77-6.80 (m, 4H)、7.20-7.38 (m, 9H)、8.10 (s, 1H)、8.61 (s, 1H)、8.83 (brs, 1H)。

[1340] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1718.2015。

[1341] 实施例120 (导入了准固相保护基的腺嘌呤核苷的5'位官能团转化): 化合物114的合成

[1342] [化学式142]

[1343]



[1344] 工序1化合物113的合成

[1345] 在氮气气氛下, 将化合物112 (0.29g, 0.17mmol) 的二氯甲烷 (1.0mL) 溶液冷却至10℃, 添加吡咯 (35μL, 0.51mmol), 进行5分钟的搅拌。然后, 添加二氯乙酸 (42μL, 0.51mmol), 进行1小时13分钟的搅拌。添加吡啶 (0.14mL), 升温至室温, 将反应混合物添加至乙腈 (50g) 中, 过滤析出的固体, 得到化合物113 (0.20g)。

[1346] ¹H-NMR: (300MHz; CDCl₃) δ0.88 (t, 9H)、1.16-1.83 (m, 96H)、2.22 (s, 3H)、2.45-2.51 (m, 1H)、2.59-2.63 (m, 2H)、2.79-2.83 (m, 4H)、3.07-3.20 (m, 4H)、3.27-4.29 (m, 15H)、5.56 (d, 1H)、6.31-6.36 (m, 1H)、6.58 (s, 2H)、8.06 (d, 1H)、8.64 (s, 1H)、8.93 (brs, 1H)。

[1347] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1416.0785。

[1348] 工序2化合物114的合成

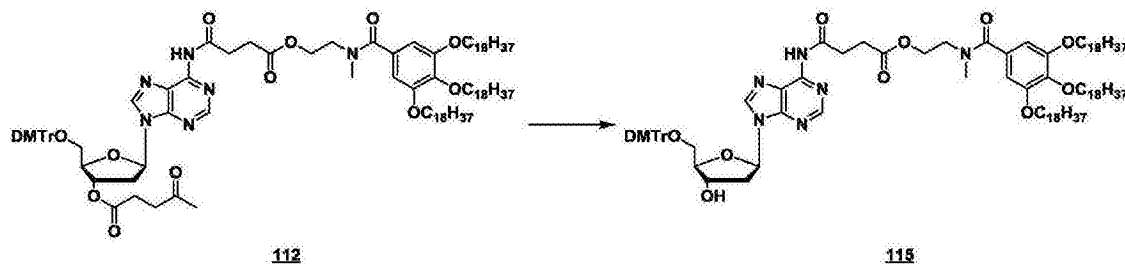
[1349] 在氮气气氛下, 将磷酸 (17mg, 0.21mmol) 的吡啶 (0.30mL) 溶液升温至40℃, 添加2, 2-二甲基丁酰氯 (6.3μL, 46μmol), 进行30分钟的搅拌。然后, 添加化合物113 (11mg, 7.8μmol), 进行2小时15分钟的搅拌, 添加2, 2-二甲基丁酰氯 (21μL, 0.15mmol), 进而进行1小时10分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析, 确认了化合物114为主产物。

[1350] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1480.0474。

[1351] 实施例121 (导入了准固相保护基的腺嘌呤核苷的3'位脱保护): 化合物115的合成

[1352] [化学式143]

[1353]

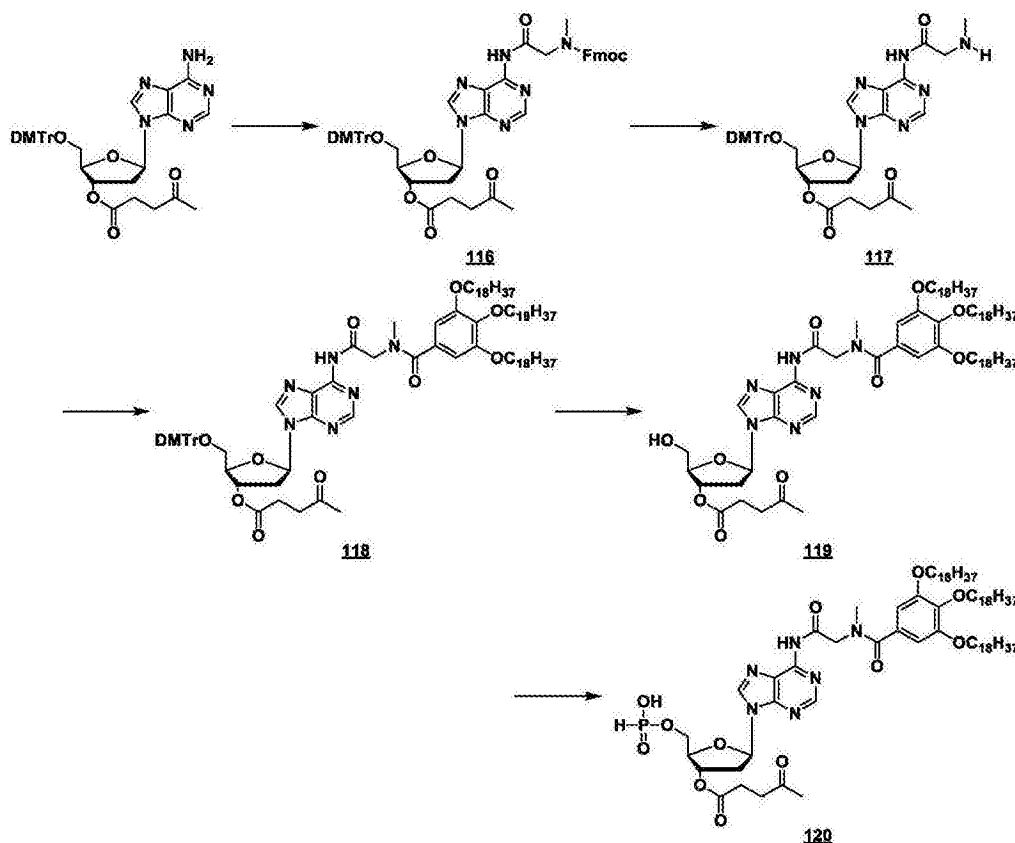


[1354] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物112 (33mg, 19 μ mol) 的二氯甲烷 (0.13g) 溶液中添加乙酸 (0.20mL), 然后,冷却至0 $^{\circ}$ C,添加胍一水合物 (1.9 μ L, 39 μ mol), 进行4小时30分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物115为主产物。

[1355] MS (ESI $^{+}$): [M+H] $^{+}$ 1620.1626.

[1356] 实施例122 (新型准固相保护基的合成及腺嘌呤核苷的5' 位官能团转化): 化合物120的合成

[1357] [化学式144]



[1359] 工序1化合物116的合成

[1360] 在氮气气氛下,将5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-乙酰丙酰基-2'-脱氧腺嘌呤核苷 (2.0g, 3.1mmol) 和DMAP (0.78g, 6.4mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液升温至40 $^{\circ}$ C,依次添加N- α -(9-苄基甲氧基羰基)-N- α -甲基甘氨酸 (2.0g, 6.3mmol)、WSC $\cdot$ HCl (1.2g, 6.3mmol), 于40 $^{\circ}$ C进行3小时搅拌。冷却至室温,用5%碳酸氢钠水溶液洗涤2次,针对得到的有机层,用水洗涤1次。对于有机层,在减压下浓缩后,利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化,得到化合物116 (1.3g)。

[1361] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 2.21 (s, 3H)、2.42–2.81 (m, 5H)、3.05–3.14 (m, 4H)、3.45 (brs, 2H)、3.77 (s, 6H)、4.00–4.69 (m, 6H)、5.55 (brs, 1H)、6.50 (brs, 1H)、6.77–6.91 (m, 4H)、7.19–7.78 (m, 17H)、8.14 (d, 1H)、8.52–8.90 (m, 2H). MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 945.3776.

[1362] 工序2化合物117的合成

[1363] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物116 (0.10g, 0.11mmol) 的乙腈 (2.1g) 溶液中,添加哌啶 (32 μL , 0.32mmol), 进行2小时39分钟的搅拌。添加庚烷, 进行分液, 将乙腈层用庚烷洗涤3次。在减压下浓缩得到的有机层, 得到化合物117 (61mg)。

[1364] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 723.3209.

[1365] 工序3化合物118的合成

[1366] 在氮气气氛下,向3,4,5-三(十八烷基氧基)苯甲酸(按照国际公开第2014-077292号中记载的方法合成) (51mg, 55 μmol) 和化合物117 (61mg, 85 μmol) 的二氯甲烷 (2.5g) 溶液中,添加HOBt (无水) (12mg, 90 μmol), 接下来,添加WSC $\cdot$ HCl (18mg, 92 μmol), 进行4小时39分钟的搅拌。将反应混合物添加至甲醇 (31g) 中,使固体析出,然后进行过滤,以白色固体形式得到化合物118 (65mg)。

[1367] $^1\text{H-NMR}$: (300MHz; CDCl_3) δ 0.88 (t, 9H)、1.26–1.77 (m, 96H)、2.21 (s, 3H)、2.58–2.81 (m, 5H)、3.01–3.16 (m, 4H)、3.78 (s, 6H)、3.96 (s, 6H)、4.81 (s, 2H)、5.53 (d, 1H)、6.48 (q, 1H)、6.70 (s, 2H)、6.77–7.39 (m, 14H)、8.11 (s, 1H)、8.58 (brs, 1H)。

[1368] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1632.1611.

[1369] 工序4化合物120的合成

[1370] 在氮气气氛下,将化合物118 (11mg, 6.9 μmol) 和吡啶 (2.1mg, 18 μmol) 的二氯甲烷 (0.20mL) 溶液冷却至10 $^{\circ}\text{C}$ 中,添加磷酸 (14mg, 0.17mmol), 进行1小时27分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物119为主产物。

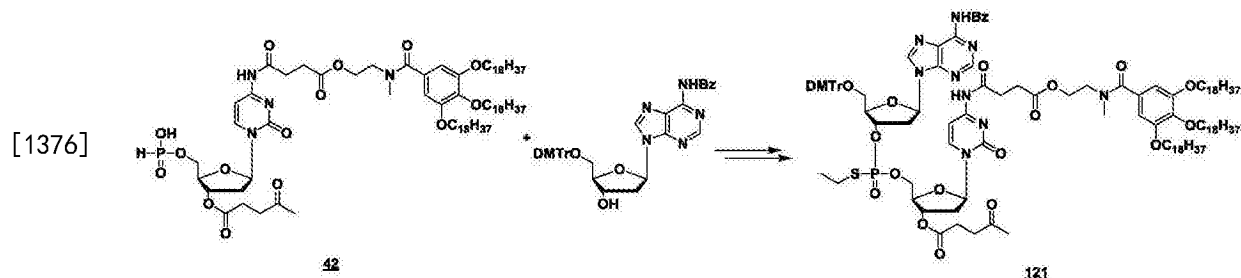
[1371] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1330.0382.

[1372] 然后,添加吡啶 (0.050mL), 升温至室温,添加2,2-二甲基丁酰氯 (14 μL , 0.10mmol), 进行1小时40分钟的搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物120为主产物。

[1373] MS (ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1394.0054.

[1374] 实施例123(硫化剂考察): 化合物121的合成

[1375] [化学式145]



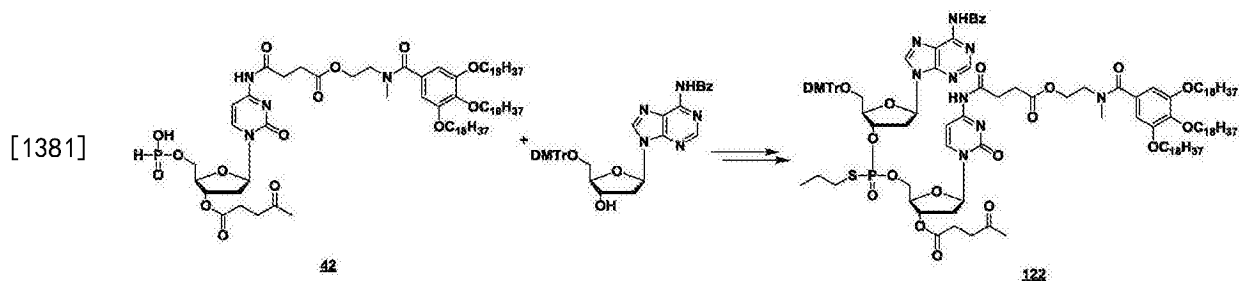
[1377] 在氮气气氛下,于25 $^{\circ}\text{C}$,向化合物42 (0.15g) 和 N^6 -苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧腺嘌呤核苷(东京化成工业公司制) (0.10g, 0.16mmol) 的吡啶 (3.0mL) 溶液中,添加作为缩合剂的碳酸双五氟苯基酯 (0.13g, 0.32mmol), 进行20分钟的搅拌,由此,进行偶联反应。向反应混合物 (3.53g) 中的0.47g中添加作为硫化剂的N-(乙基硫

基)邻苯二甲酰亚胺(按照Synlett,2009年,第1期,第112页-116页中记载的方法合成)(4.5mg,22 μ mol),在室温下进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物121为主产物。

[1378] MS(ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+2155.2871$.

[1379] 实施例124(硫化剂考察):化合物122的合成

[1380] [化学式146]

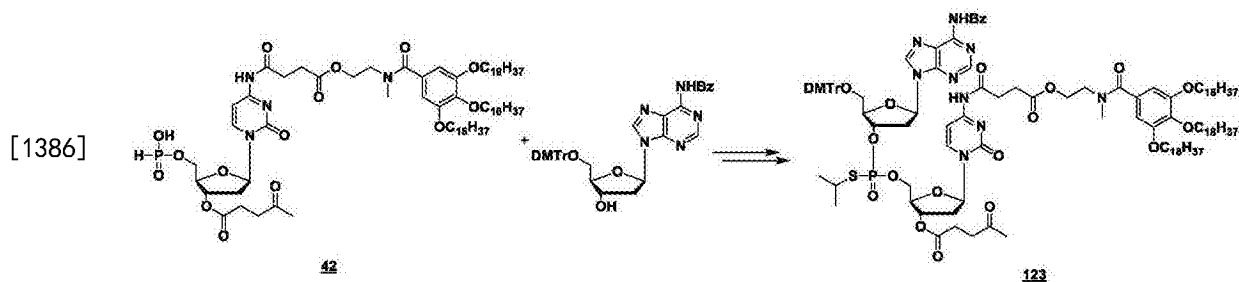


[1382] 向实施例123中得到的偶联反应后的反应混合物(0.46g)中,添加作为硫化剂的N-(正丙基硫基)邻苯二甲酰亚胺(按照Bioorganic&Medicinal Chemistry,2006年,第14卷,第11期,第3775页-3784页中记载的方法合成)(5.7mg,26 μ mol),在室温下进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物122为主产物。

[1383] MS(ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+2169.3107$.

[1384] 实施例125(硫化剂考察):化合物123的合成

[1385] [化学式147]

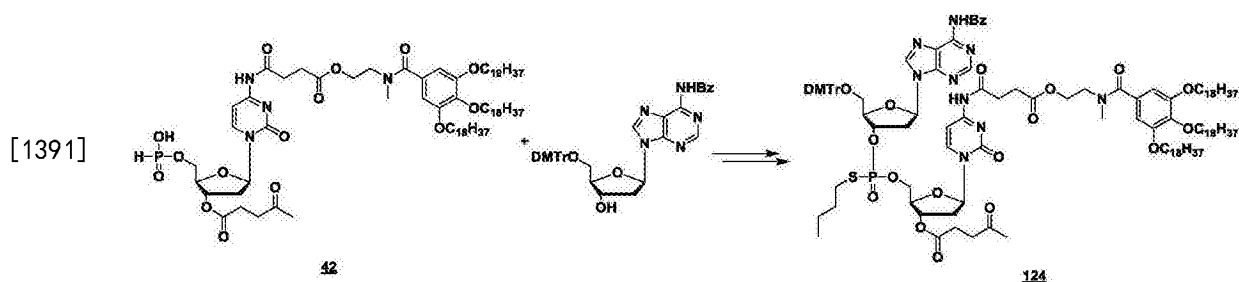


[1387] 向实施例123中得到的偶联反应后的反应混合物(0.48g)中,添加作为硫化剂的N-(异丙基硫基)邻苯二甲酰亚胺(按照Bioorganic&Medicinal Chemistry,2006年,第14卷,第11期,第3775页-3784页中记载的方法合成)(5.6mg,25 μ mol),在室温下进行3小时30分钟的搅拌。然后,追加N-(异丙基硫基)邻苯二甲酰亚胺(32mg,0.15mmol),进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物123为主产物。

[1388] MS(ESI^+): $[\text{M}+\text{H}]^+2169.2959$.

[1389] 实施例126(硫化剂考察):化合物124的合成

[1390] [化学式148]

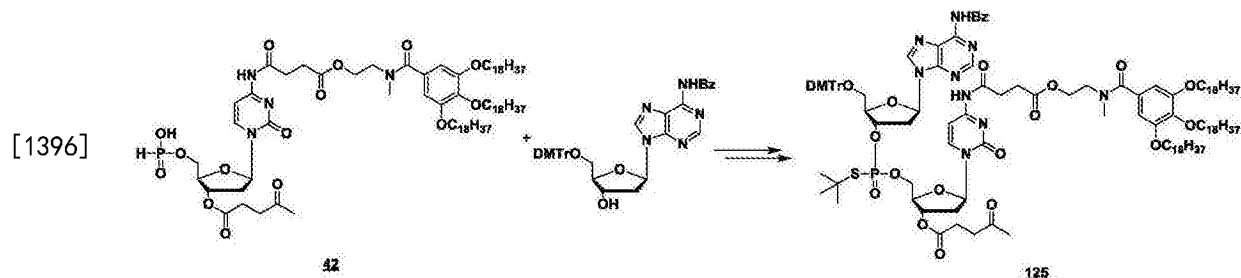


[1392] 向实施例123中得到的偶联反应后的反应混合物(0.48g)中,添加作为硫化剂的N-(正丁基硫基)邻苯二甲酰亚胺(按照Bioorganic&Medicinal Chemistry,2006年,第14卷,第11期,第3775页-3784页中记载的方法合成)(6.6mg,28 μ mol),在室温下进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物124为主产物。

[1393] MS(ESI⁺):[M+H]⁺2183.3273.

[1394] 实施例127(硫化剂考察):化合物125的合成

[1395] [化学式149]

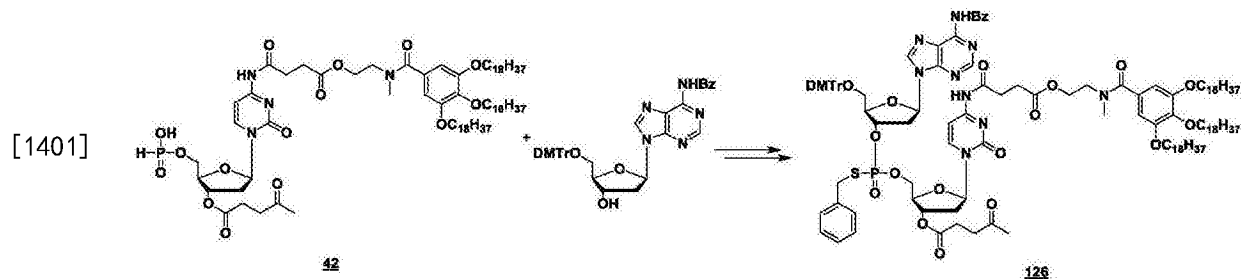


[1397] 向实施例123中得到的偶联反应后的反应混合物(0.47g)中,添加作为硫化剂的N-(叔丁基硫基)邻苯二甲酰亚胺(按照Synlett,2009年,第1期,第112页-116页中记载的方法合成)(6.4mg,27 μ mol),在室温下进行3小时30分钟的搅拌。然后,追加N-(叔丁基硫基)邻苯二甲酰亚胺(0.11g,0.47mmol),进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物125为主产物。

[1398] MS(ESI⁺):[M+H]⁺2183.3326.

[1399] 实施例128(硫化剂考察):化合物126的合成

[1400] [化学式150]

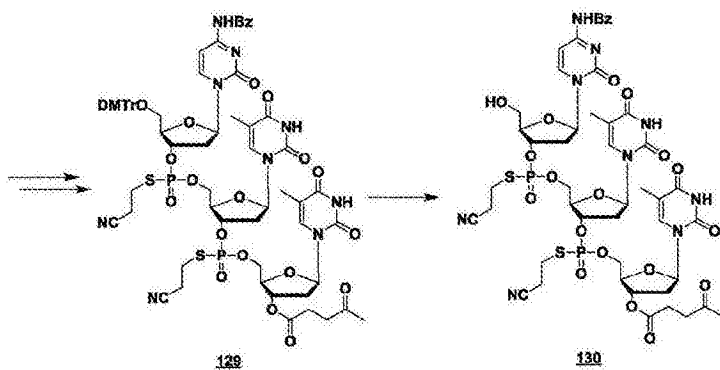
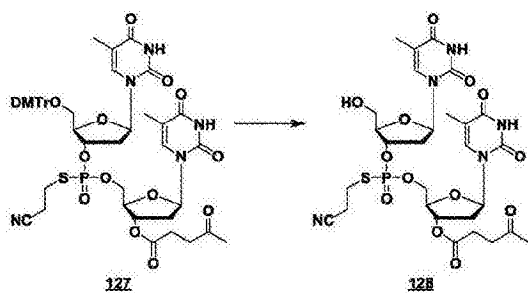


[1402] 向实施例123中得到的偶联反应后的反应混合物(0.48g)中,添加作为硫化剂的N-(苄基硫基)邻苯二甲酰亚胺(按照Bioorganic&Medicinal Chemistry,2006年,第14卷,第11期,第3775页-3784页中记载的方法合成)(5.7mg,21 μ mol),在室温下进行1小时搅拌。利用LC-MS对反应混合物进行分析,确认了化合物126为主产物。

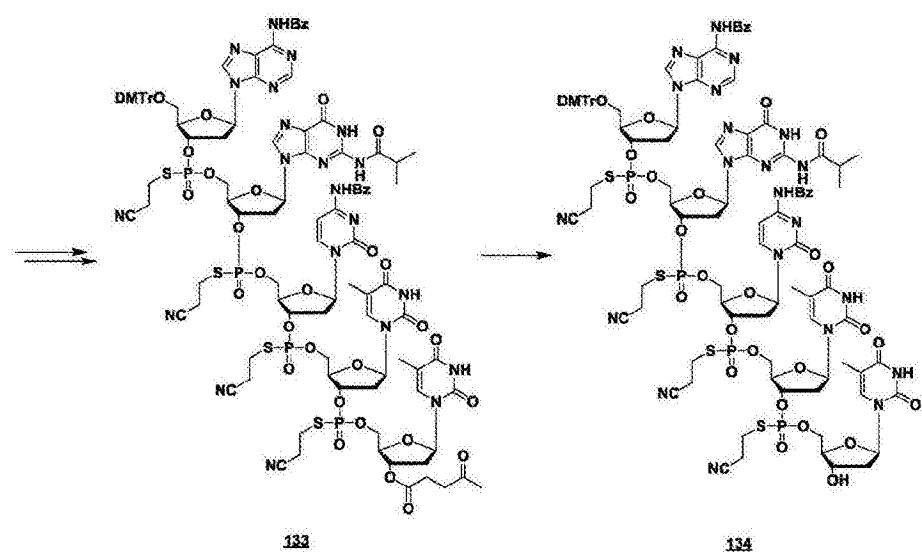
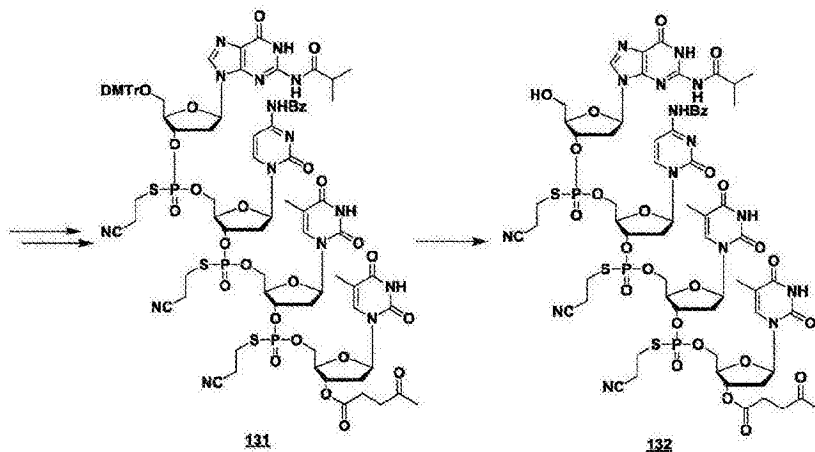
[1403] MS(ESI⁺):[M+H]⁺2217.3232

[1404] 参考合成例8(五聚体合成):化合物134的合成

[1405] [化学式151]



[1406]



[1407] 工序1化合物128的合成

[1408] 向使用3'-O-乙酰丙酰基胸苷(按照Bioorganic&Medicinal Chemistry,2013年,

第21卷,第8013页-8018页中记载的方法合成) (0.75g, 2.2mmol)、按照日本特表2003-525305中记载的方法合成的含有化合物132的二氯甲烷(26g)溶液中添加吡啶(0.78g, 6.6mmol),冷却至10℃,添加二氯乙酸(0.90mL, 11mmol),进行1小时17分钟的搅拌。进而添加二氯乙酸(0.90mL, 11mmol),进行40分钟的搅拌。将反应混合物添加至5%碳酸氢钠水溶液中,进行分液。实施11次向得到的水层中添加二氯甲烷并进行分液的再萃取操作,合并得到的有机层,在减压下蒸馏去除溶剂,得到粗产物。利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化粗产物,得到化合物128(0.65g)。

[1409] MS (ESI⁺): [M+H]⁺714.1865.

[1410] 工序2化合物130的合成

[1411] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物133(0.65g, 0.91mmol)和N²-异丁酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羟基氧磷基-2'-脱氧胞嘧啶核苷三乙胺盐(ChemGenes Corporation制)(1.0g, 1.3mmol)的吡啶(8mL)溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(1.3g, 3.2mmol),进行15分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基)硫基]邻苯二甲酰亚胺(0.43g, 1.9mmol),进行1小时57分钟的搅拌。添加二氯甲烷和5%碳酸氢钠水溶液,进行分液,将得到的水层用二氯甲烷洗涤2次。合并得到的有机层,在减压下蒸馏去除溶剂,得到含有化合物134的反应混合物(13g)。对于其中的12g,进一步在减压下浓缩,反复进行3次添加甲苯并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷(16g)、吡啶(0.30g, 2.6mmol),冷却至10℃,添加二氯乙酸(0.69mL, 8.4mmol),进行1小时40分钟的搅拌。将反应混合物添加至5%碳酸氢钠水溶液中,进行分液。实施2次向得到的水层中添加二氯甲烷并进行分液的再萃取操作,合并得到的有机层,在减压下蒸馏去除溶剂,得到粗产物。利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化粗产物,得到化合物130(0.30g)。

[1412] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1176.2650.

[1413] 工序3化合物132的合成

[1414] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物130(0.24g, 0.20mmol)和N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羟基氧磷基-2'-脱氧鸟嘌呤核苷三乙胺盐(ChemGenes Corporation制)(0.23g, 0.29mmol)的吡啶(6mL)溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(0.43g, 1.1mmol),进行27分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基)硫基]邻苯二甲酰亚胺(0.10g, 0.43mmol),进行1小时34分钟的搅拌。添加二氯甲烷和5%碳酸氢钠水溶液,进行分液,将得到的水层用二氯甲烷洗涤2次。合并得到的有机层,在减压下蒸馏去除溶剂,得到含有化合物136的反应混合物。反复进行3次添加甲苯并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷(8.0g)和吡啶(77mg, 0.66mmol),冷却至10℃,添加二氯乙酸(0.17mL, 2.0mmol),进行2小时8分钟的搅拌。将反应混合物添加至5%碳酸氢钠水溶液中,进行分液。实施2次向得到的水层中添加二氯甲烷并进行分液的再萃取操作,合并得到的有机层,在减压下蒸馏去除溶剂,得到粗产物。利用硅胶色谱法(氯仿-甲醇)纯化粗产物,得到化合物132(0.12g)。

[1415] MS (ESI⁺): [M+H]⁺1644.3648.

[1416] 工序4化合物134的合成

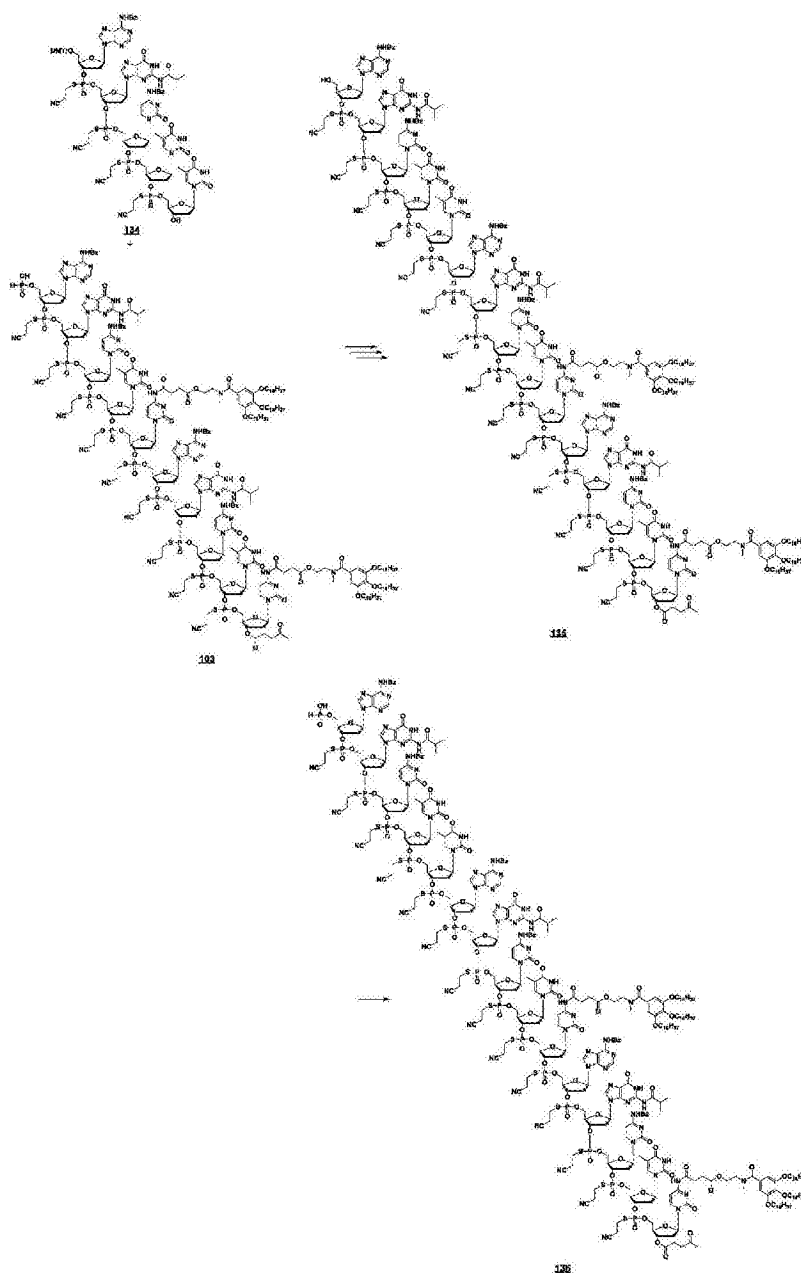
[1417] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物132(0.12g, 74μmol)和N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-羟基氧磷基-2'-脱氧腺嘌呤核苷三乙胺盐(ChemGenes Corporation制)(90mg, 0.11mmol)的吡啶(5mL)溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯(0.28g,

0.71mmol), 进行1小时2分钟的搅拌。然后, 添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基) 巯基] 邻苯二甲酰亚胺 (37mg, 0.16mmol), 进行2小时8分钟的搅拌。添加二氯甲烷、乙腈和5%碳酸氢钠水溶液, 进行分液, 将得到的水层用二氯甲烷和乙腈的混合溶剂洗涤2次。合并得到的有机层, 在减压下蒸馏去除溶剂, 得到含有化合物133的反应混合物。向该反应混合物中添加二氯甲烷 (3.1g), 冷却至0℃, 添加乙酸 (0.15mL), 然后, 添加胍一水合物 (36μL, 0.74mmol), 进行1小时26分钟的搅拌。向反应混合物中添加乙酰丙酮 (0.30mL), 升温至室温, 添加5%碳酸氢钠水溶液, 进行分液, 实施2次向得到的水层中添加二氯甲烷并进行分液的再萃取操作, 合并得到的有机层, 在减压下蒸馏去除溶剂, 得到粗产物。利用硅胶色谱法 (氯仿-甲醇) 纯化粗产物, 得到化合物134 (55mg)。

[1418] MS (ESI⁺): [M+H]⁺ 2334.5224.

[1419] 实施例129 (十五聚体合成): 化合物136的合成

[1420] [化学式152]



[1421]

[1422] 工序1化合物135的合成

[1423] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物103 (43mg) 和化合物134 (19mg, 8.3 μ mol) 的吡啶 (1.4mL) 溶液中,添加碳酸双五氟苯基酯 (59mg, 0.15mmol), 进行58分钟的搅拌。然后,添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (10mg, 44 μ mol), 进行40分钟的搅拌。然后,在减压下浓缩反应混合物。反复进行3次添加甲苯 (2g) 并在减压下浓缩的操作,然后,添加二氯甲烷 (1.2mL), 于10 $^{\circ}$ C, 添加吡啶 (2.5mg, 21 μ mol)、二氯乙酸 (6.2 μ L, 76mmol), 进行1小时51分钟的搅拌。然后,追加二氯乙酸 (6.2 μ L, 76mmol), 进行2小时41分钟的搅拌。进而追加二氯乙酸 (6.2 μ L, 76mmol), 进行1小时38分钟的搅拌。添加吡啶 (0.20mL), 升温至室温,将反应混合物添加至乙腈 (38g) 中,使所析出的固体过滤析出,以淡肉色固体形式得到化合物135 (51mg)。

[1424] MS (ESI $^{+}$): [M+4H] $^{4+}$ 2140.0080.

[1425] 工序2化合物136的合成

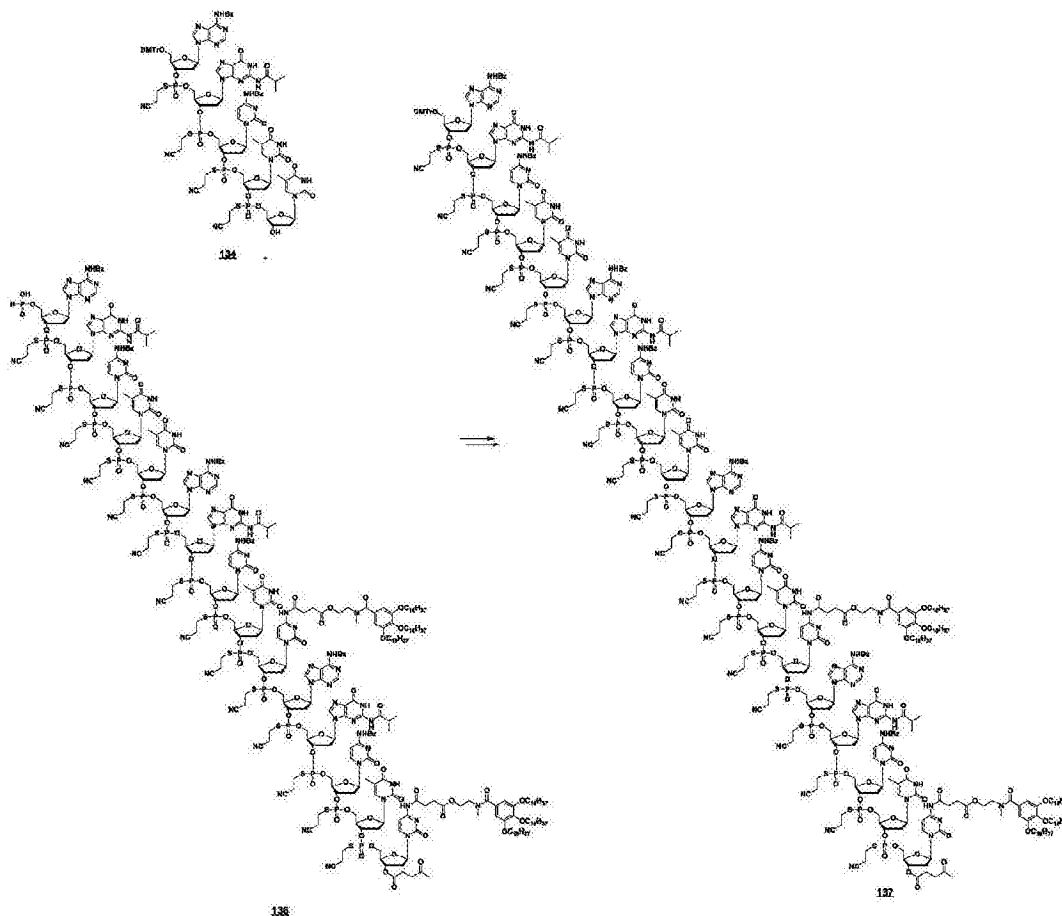
[1426] 在氮气气氛下,于40 $^{\circ}$ C,向化合物135 (50mg, 5.8 μ mol) 的二氯甲烷 (2.0mL) 和吡啶 (0.12mL) 的混合溶液中添加磷酸 (19mg, 0.23mmol), 将2,2-二甲基丁酰氯 (25 μ L, 0.18mmol) 分成5等份,进行1小时12分钟的搅拌。然后,将反应混合物添加至乙腈 (39g) 中,过滤析出的固体,以淡肉色固体形式得到化合物136 (44mg)。

[1427] MS (ESI $^{+}$): [M+4H] $^{4+}$ 2155.9794.

[1428] 实施例130 (二十聚体 (20mer) 合成): 化合物137的合成

[1429] [化学式153]

[1430]



[1431] 在氮气气氛下,在室温下,向化合物134 (19mg, 8.1 μ mol) 和化合物136 (44mg) 的吡

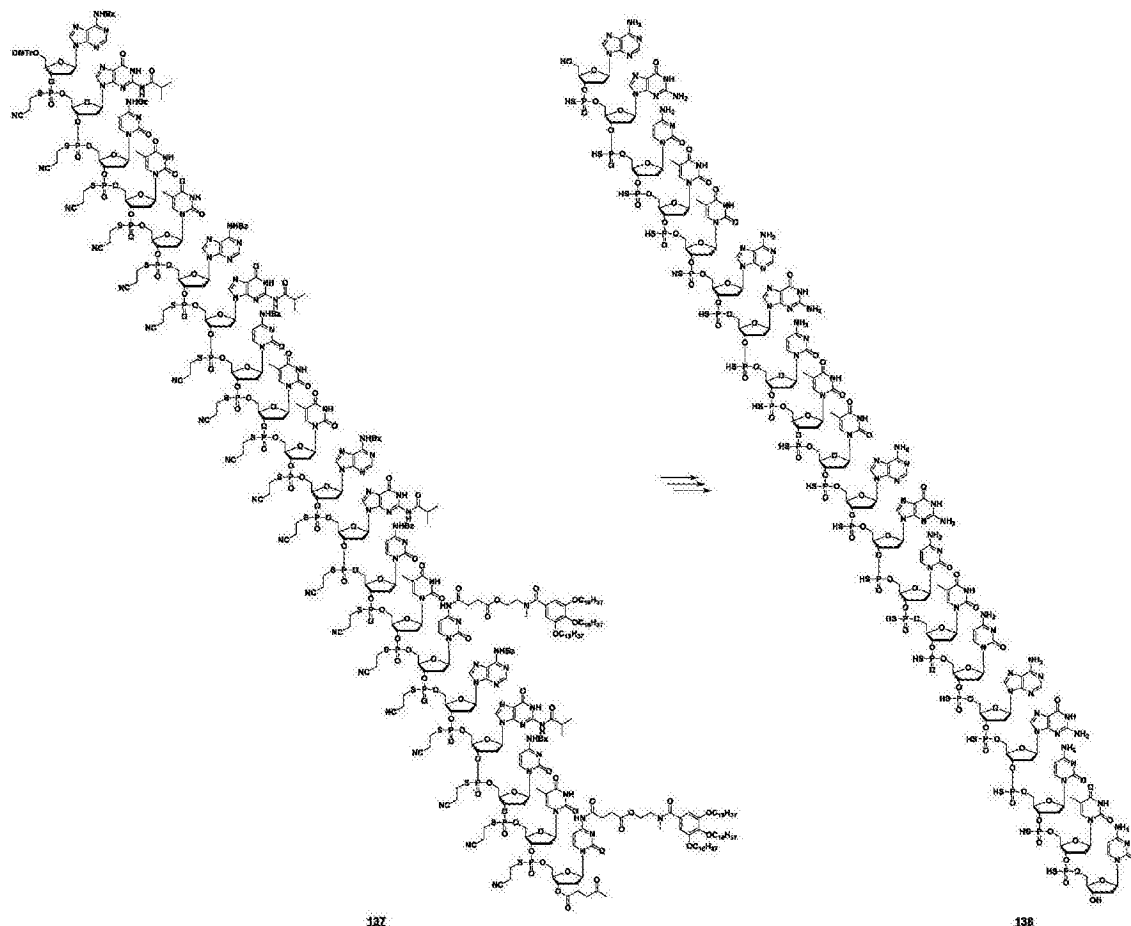
啉 (1.2mL) 溶液中, 添加碳酸双五氟苯基酯 (274mg, 0.69mmol), 进行1小时搅拌。然后, 添加作为硫化剂的N-[(2-氰基乙基) 硫基] 邻苯二甲酰亚胺 (5.1mg, 22 μ mol), 进行1小时搅拌。将反应混合物添加至甲醇 (30g) 中, 过滤析出的固体, 以白色固体形式得到化合物137 (46mg)。

[1432] MS (ESI⁺): [M+5H]⁵⁺ 2205.1210.

[1433] 实施例131 (二十聚体的脱保护): 化合物138的合成

[1434] [化学式154]

[1435]



[1436] 在氮气气氛下, 在室温下, 向化合物137 (2.6mg, 0.24 μ mol) 的二氯甲烷 (0.38g) 溶液中, 添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯[DBU] (3.5 μ L, 23 μ mol)、TMSCl (0.70 μ L, 5.5 μ mol), 进行30分钟的搅拌。在减压下浓缩反应混合物 (1.6g), 添加28%氨水 (1.0mL)、乙二醇四乙酸 (3.1mg, 11 μ mol), 于80℃进行2小时6分钟的搅拌。对反应混合物进行LC-MS分析, 确认了化合物138的生成。

[1437] MS (ESI⁺): [M+3H]³⁺ 2123.8976.

[1438] 产业上的可利用性

[1439] 本发明可提供能应对大量合成的寡核苷酸的新制造方法, 所述方法使用分离容易、且保存稳定性高的核苷或寡核苷酸, 所述方法利用与由偶联工序、氧化反应或硫化反应等对磷原子进行修饰的工序、脱保护工序等构成的通常的制造方法不同的、包括使具有准固相保护基的核苷或寡核苷酸的5'位羟基或3'位羟基进行H-磷酸酯化的工序的制造方法。因此, 本发明可适用于siRNA、反义核酸、疫苗的佐剂等寡核苷酸的制造, 在基因组药物开

发、基因诊断・治疗等领域中非常有用。

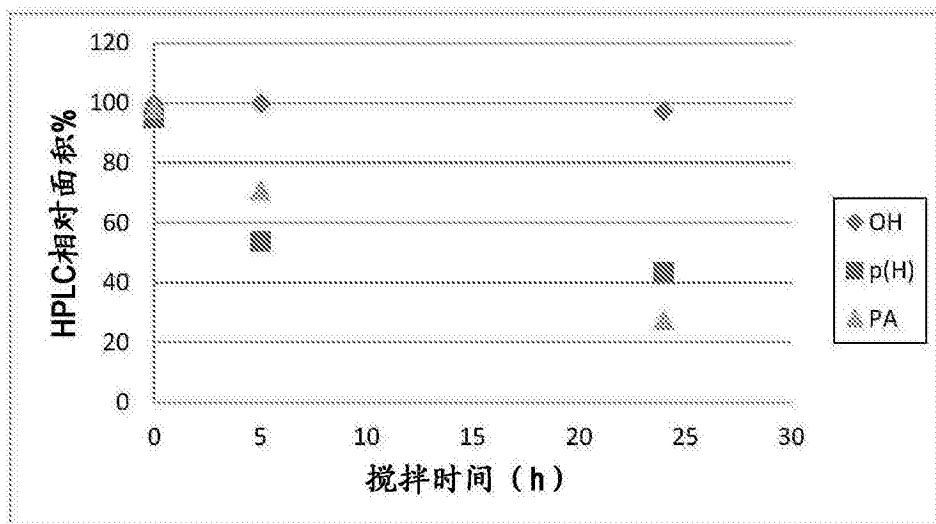


图1