

明 細 書

発明の名称：オリゴ核酸化合物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規なオリゴ核酸化合物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] オリゴ核酸化合物の製造方法として、固相法と液相法が知られている。固相法は固相担体に担持された基質と反応試薬を含む溶液とを接触させながら核酸を伸長する不均一系の反応方法である。固相法ではフィルター付きの反応容器を使用して、容器内で反応を行う、いわゆるバッチ法が使用される（例えば、非特許文献1、特許文献1を参照。）。また、核酸自動合成機（例えば、DNA、RNAシンセサイザー）のように、固相担体をカラムに入れて、そのカラムに反応試薬を含む溶液を流すことで反応させる擬似的なフロー合成法も知られている。

一方、液相法は基質と反応試薬の両方を含む溶液中で反応させることによって核酸を伸長する均一系の反応方法である。液相法も容器内で反応を行うバッチ法が使用される（例えば、特許文献2、特許文献3を参照。）。

[0003] 固相法、液相法、バッチ法、擬似的なフロー合成法のいずれの場合であっても、オリゴ核酸化合物の化学的合成法では、核酸化合物上の酸素原子またはアミノ基の保護基を除去する「脱保護」反応と、脱保護されて反応できるようになった酸素原子または窒素原子とリン原子との結合形成を行う「縮合」反応を何度も繰り返すことで核酸を伸長していく。

[0004] オリゴ核酸化合物を医薬品原料として使用する場合、オリゴ核酸化合物は高い純度が要求されるため、伸長反応の各工程において、副生成物の生成を抑制しつつ、反応効率および反応速度を向上する必要があるものの、使用することができる溶媒や試薬が限定されているため困難であった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開公報第1991／09033A1

特許文献2：国際公開公報第2014／077292A1

特許文献3：国際公開公報第2013／122236A1

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Acc. Chem. Res., Vol. 24, 278-284, 1991

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] オリゴ核酸化合物の伸長反応は、脱保護反応と縮合反応とを繰り返すため、複雑な不純物が生じる。本発明の目的は、オリゴ核酸化合物の純度に影響を与える不純物を特定し、その不純物の生成を制御する新規な製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

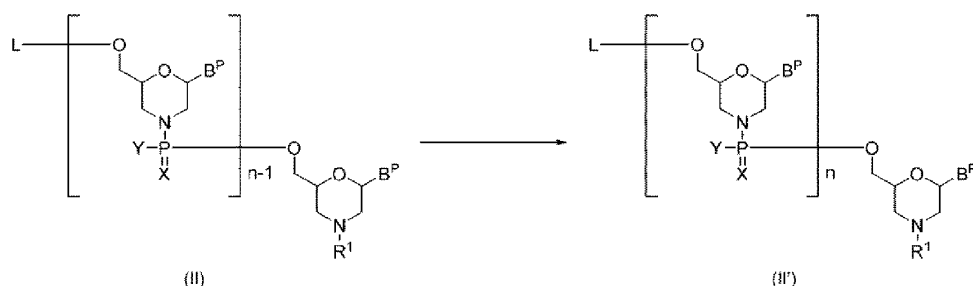
[0008] 本発明者らは、オリゴ核酸化合物の伸長反応において、縮合前の反応原料及び中間体の処理を鋭意検討することによって、効率よく脱保護反応及び縮合反応が進行すること、更に縮合反応の前処理により生じる不純物が、オリゴ核酸化合物の純度に影響を与えることを見出して、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、以下に関する。

[0010] <1>

モルホリノ核酸オリゴマーの伸長反応：

[化1]



[式中、

B^P は、独立して、保護されていてもよい核酸塩基であり；

R^1 は、トリチル、モノメトキシトリチル、又はジメトキシトリチルであり

；

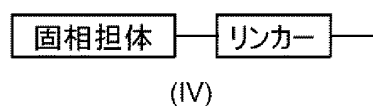
X は、 O 又は S であり；

Y は、ジアルキルアミノ、又はアルコキシであり；

n は、 $1 \sim 99$ の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、 $15 \sim 30$ の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、 $18 \sim 28$ の範囲内にある任意の整数であり；

L は、水素、アシル、又は式 (I V)：

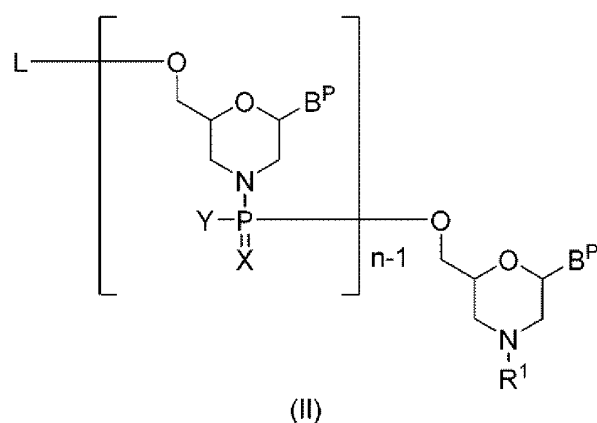
[化2]



で表される基である] において、

式 (I I)：

[化3]



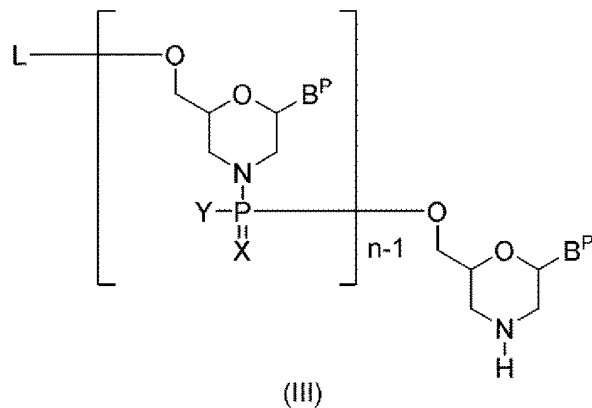
[式中、 L 、 B^P 、 X 、 Y 、 R^1 、及び n は、前記の通りである]

の化合物を、

酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式 (I I) の化合物より R^1 を除去して、

式 (I I I) :

[化4]



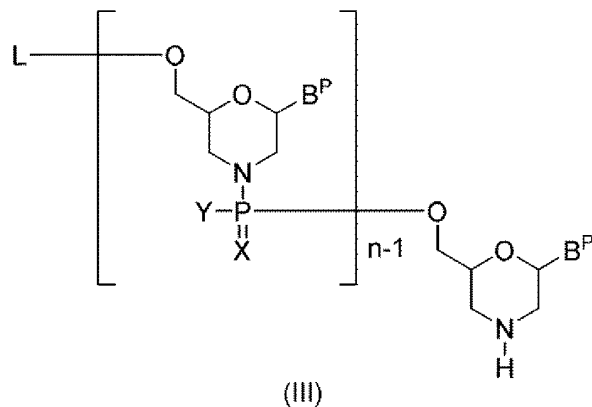
[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物にする工程を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法である。

[0011] <2>

更に、式 (I I I) :

[化5]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

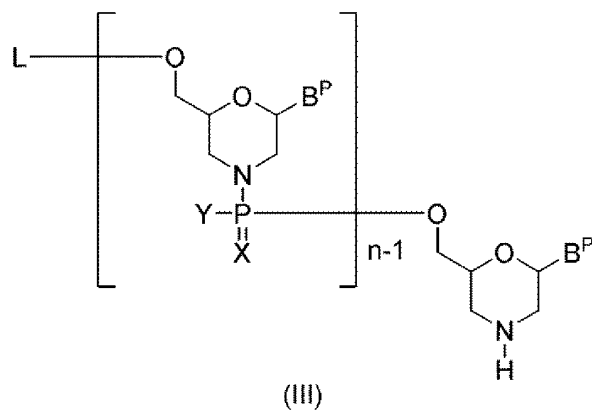
の化合物を、

塩基、アルコール類、及びハロゲン溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、<1>に記載の製造方法。

[0012] <3>

更に、式（Ⅲ）：

[化6]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

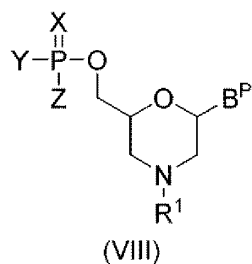
の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、
 <1>又は<2>に記載の製造方法。

[0013] <4>

更に、式（Ⅴ）：

[化7]



[式中、B^P、X、Y、及びR¹は、前記の通りであり、Zは、ハロゲン（例えば、クロロ、ブromo、ヨード）である]

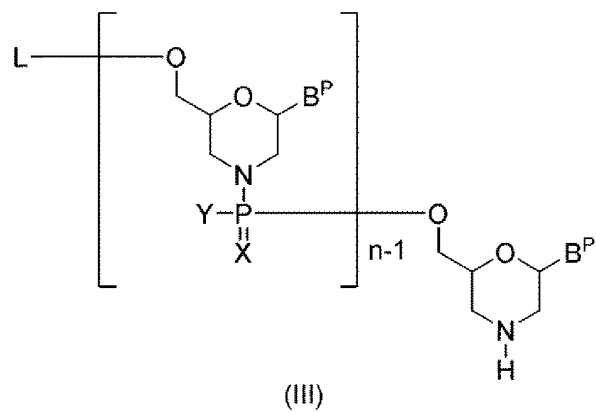
の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、
 <1>～<3>のいずれかに記載の製造方法。

[0014] <5>

更に、式 (I I I) :

[化8]

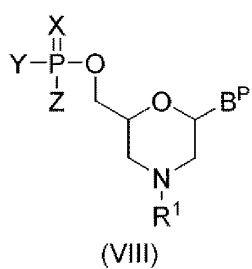


[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物と、有機アミンの存在下、

式 (V I I I) :

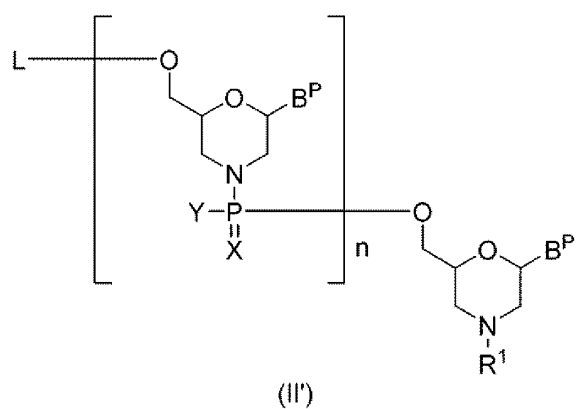
[化9]



[式中、X、Y、Z、B^P及びR¹は、前記の通りである] の化合物を反応させて、

式 (I I ') :

[化10]

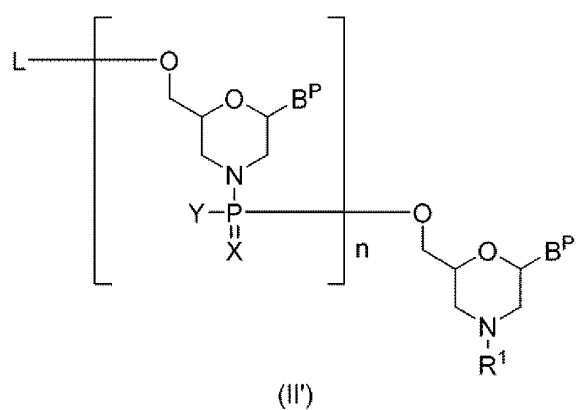


[式中、 L 、 B^P 、 X 、 Y 、 R^1 、及び n は、前記の通りである]
 の化合物とする工程を含む、＜1＞～＜4＞のいずれかに記載の製造方法。

[0015] ＜6＞

更に、式（II'）：

[化11]



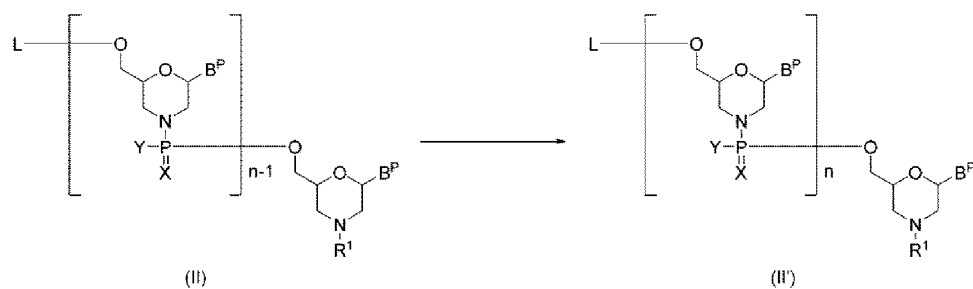
[式中、 L 、 B^P 、 X 、 Y 、 R^1 、及び n は、前記の通りである]
 の化合物を

アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、
 ＜1＞～＜5＞のいずれかに記載の製造方法。

[0016] ＜7＞

モルホリノ核酸オリゴマーの伸長反応：

[化12]



[式中、

B^P は、独立して、保護されていてもよい核酸塩基であり；

R^1 は、トリチル、モノメトキシトリチル、又はジメトキシトリチルであり

；

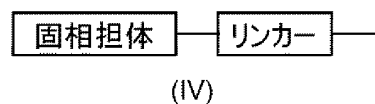
X は、 O 又は S であり；

Y は、ジアルキルアミノ、又はアルコキシであり；

n は、 $1 \sim 99$ の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、 $15 \sim 30$ の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、 $18 \sim 28$ の範囲内にある任意の整数であり；

L は、水素、アシル、又は式(IV)：

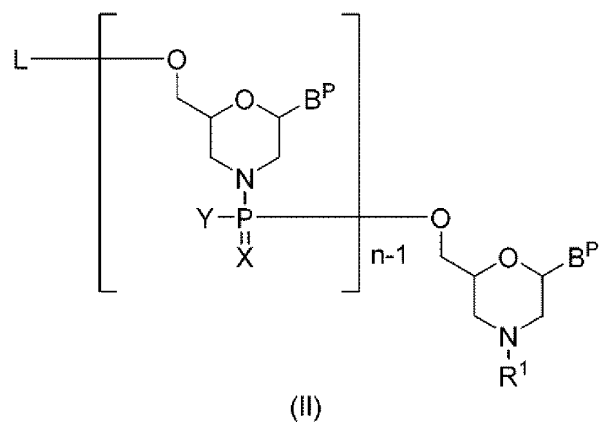
[化13]



で表される基である]において、

式(II)：

[化14]



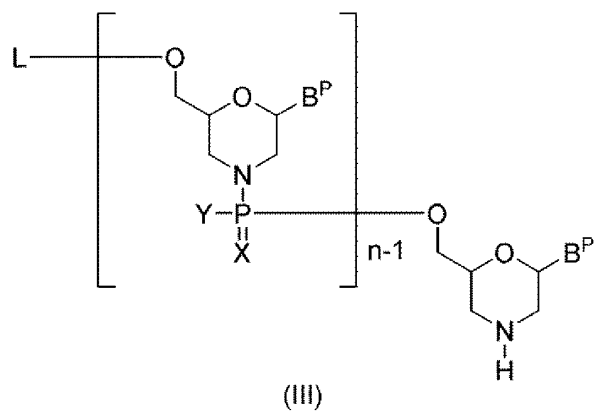
[式中、L、 B^P 、X、Y、 R^1 、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式(II)の化合物より R^1 を除去して、

式(III)：

[化15]

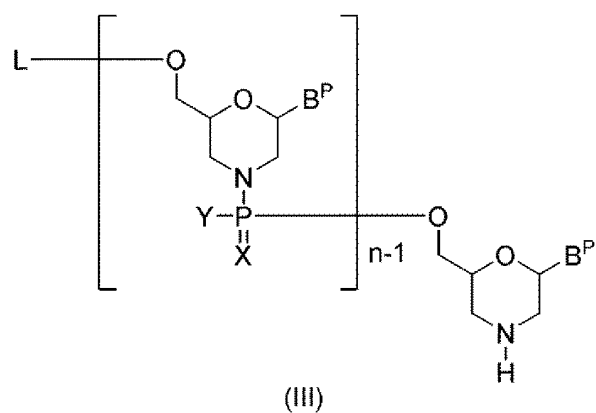


[式中、L、 B^P 、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物にする工程、

式(III)：

[化16]

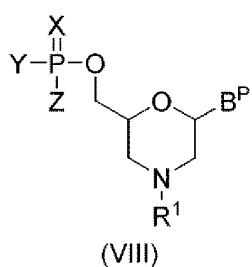


[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程、そして
式(VIII)：

[化17]



[式中、B^P、X、Y、Z、及びR¹は、前記の通りである]

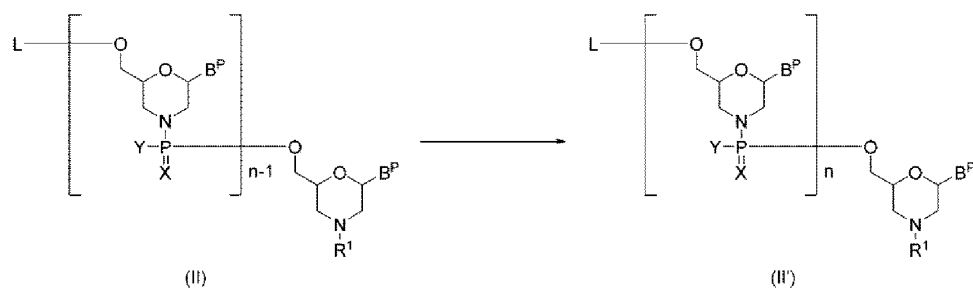
の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程
を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[0017] <8>

モルホリノ核酸オリゴマーの伸長反応：

[化18]



[式中、

B^P は、独立して、保護されていてもよい核酸塩基であり；

R^1 は、トリチル、モノメトキシトリチル、又はジメトキシトリチルであり

；

X は、 O 又は S であり；

Y は、ジアルキルアミノ、又はアルコキシであり；

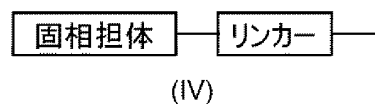
n は、 $1 \sim 99$ の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、 $15 \sim 30$ の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、 $18 \sim 28$ の範囲内にある任意の整数であり；

L は、水素、アシル、又は式(IV)：

にある任意の整数であり；

L は、水素、アシル、又は式(IV)：

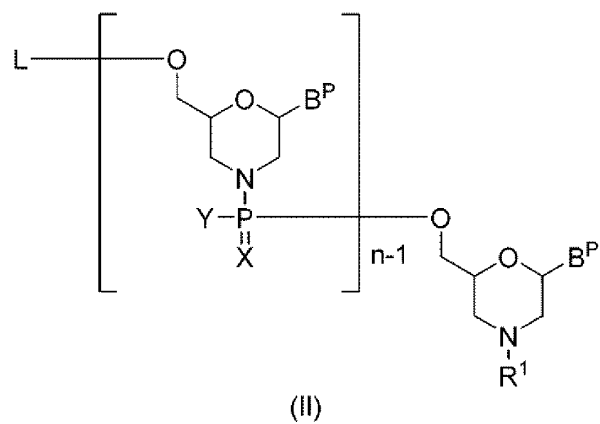
[化19]



で表される基である] において、

式(II)：

[化20]



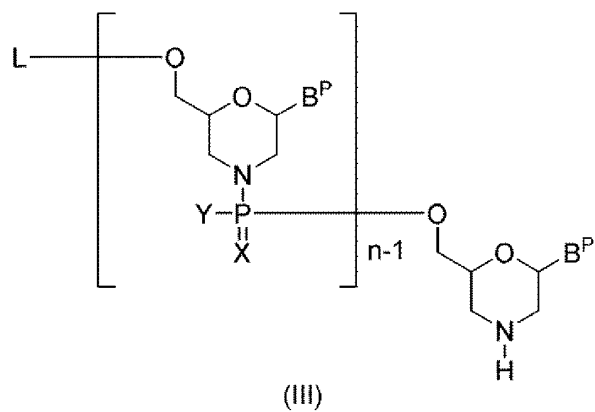
[式中、L、 B^P 、X、Y、 R^1 、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式 (I I) の化合物より R^1 を除去して、

式 (I I I) :

[化21]

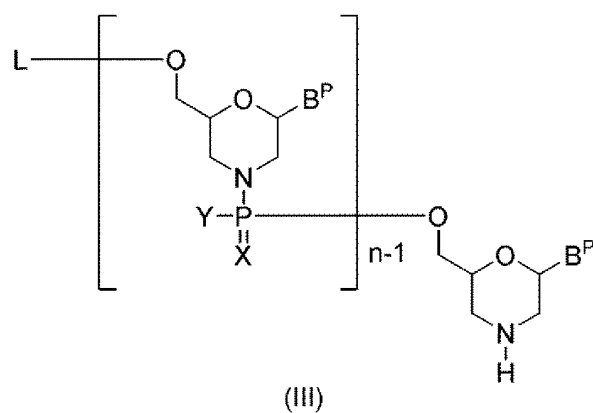


[式中、L、 B^P 、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物にする工程、

式 (I I I) :

[化22]

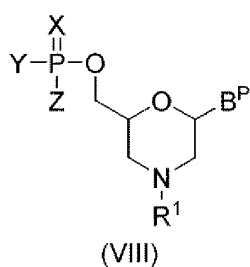


[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

式 (V I I I) :

[化23]



[式中、B^P、X、Y、Z、及びR¹は、前記の通りである]

の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[0018] < 9 >

前記酸及びスカベンジャーを含む溶液が、トリフルオロ酢酸及びトリイソプロピルシランを含む溶液である、< 1 > ~ < 8 > のいずれかに記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[0019] < 10 >

前記酸及びスカベンジャーを含む溶液が、トリフルオロ酢酸、トリエチル

アミン、トリイソプロピルシラン、2, 2, 2-トリフルオロエタノール、及びジクロロメタンを含む溶液である、＜1＞～＜9＞のいずれかに記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[0020] ＜1 1＞

前記有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液が、N-エチルモルホリン及び1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノンである、＜1＞～＜9＞のいずれかに記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[0021] ＜1 2＞

前記固相担体が、膨潤性ポリスチレン、非膨潤性ポリスチレン、PEG鎖結合型ポリスチレン、定孔ガラス、オキサリル化一定孔ガラス、Tenta Gel支持体-アミノポリエチレングリコール誘導体化支持体、又はPoros-ポリスチレン/ジビニルベンゼンのコポリマーである、＜1＞～＜1 1＞のいずれかに記載の製造方法。

[0022] ＜1 3＞

前記リンカーが、短鎖アルキレン、長鎖アルキレン、アミノ-短鎖アルキレン、アミノ-長鎖アルキレン、ジアシル短鎖アルキレン（例えば、スクシニル）、ジアシル長鎖アルキレン、又はジアルキレンスルホニルである、＜1＞～＜1 2＞のいずれかに記載の製造方法。

発明の効果

[0023] 本発明は、経済的で、収率よく、高純度で、モルホリノ核酸オリゴマーを製造することができる。

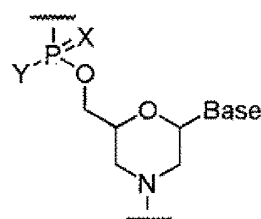
発明を実施するための形態

[0024] 以下に、本発明の詳細を説明する。

[0025] ＜モルホリノ核酸オリゴマー＞

本発明の一態様として、モルホリノ核酸オリゴマーは、式：

[化24]



[式中、Baseは、核酸塩基を表し、X、Yは、前記の通りである]
で表わされる基を構成単位とするオリゴマーである。

[0026] <核酸塩基>

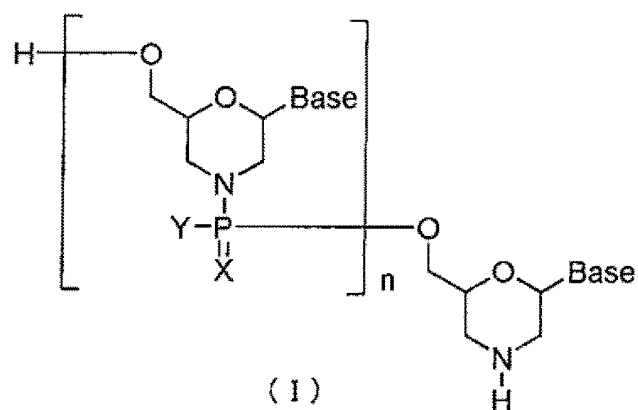
本発明の一態様において、「核酸塩基」は、例えば、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、シトシン、チミン、ウラシルまたはそれらの修飾塩基を挙げることができる。係る修飾塩基としては、例えば、シュードウラシル、3-メチルウラシル、ジヒドロウラシル、5-アルキルシトシン（例えば、5-メチルシトシン）、5-アルキルウラシル（例えば、5-エチルウラシル）、5-ハロウラシル（例えば、5-ブロモウラシル、5-フルオロウラシル）、6-アザピリミジン、6-アルキルピリミジン（例えば、6-メチルウラシル）、2-チオウラシル、4-チオウラシル、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5'-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、1-メチルアデニン、1-メチルヒポキサンチン、2, 2-ジメチルグアニン、3-メチルシトシン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、N⁶-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メチルカルボニルメチルウラシル、5-メチルオキシウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸、2-チオシトシン、プリン、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、イソグアニン、インドール、イミダゾール、キサンチンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。但し、Baseに係る核酸塩基

のアミノ基または水酸基は保護されていてもよい。

[0027] <モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法>

本発明の一態様は、式 (I) :

[化25]



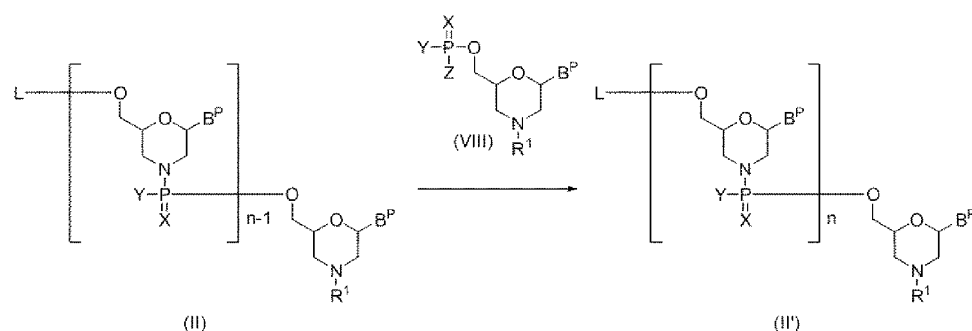
[式中、

Base、X、Yは、前記と同義であり；

nは、1～99の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、15～30の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、18～28の範囲内にある任意の整数である]のモルホリノ核酸オリゴマー（以下、モルホリノ核酸オリゴマー (I) という。）の製造方法である。

[0028] 本発明の一態様は、式 (II) の化合物と式 (VIII) の化合物とを反応させて、式 (II') の化合物を得る、モルホリノ核酸オリゴマーの伸長反応：

[化26]



[式中、

B^P は、独立して、保護されていてもよい核酸塩基であり；

R^1 は、トリチル、モノメトキシトリチル、又はジメトキシトリチルであり

；

X は、 O 又は S であり；

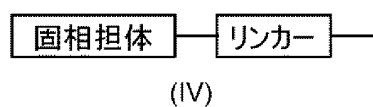
Y は、 OH 、低級アルコキシ、モノ低級アルキルアミノ、又はジ低級アルキルアミノであり；

Z は、ハロゲン（例えば、クロロ、ブロモ、ヨード）であり；

n は、 $1 \sim 99$ の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、 $15 \sim 30$ の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、 $18 \sim 28$ の範囲内にある任意の整数であり；

L は、水素、アシル、又は式（IV）：

[化27]



で表される基である］を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法である

。

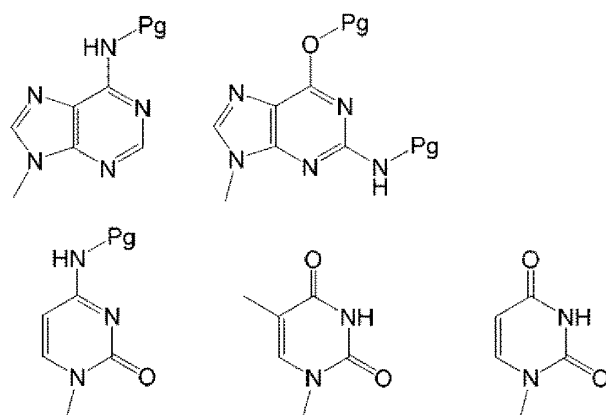
[0029] 本発明の一態様において、保護されていてもよい核酸塩基は、例えば、保護されていない「核酸塩基」および保護されている「核酸塩基」の両方を包含し、例えば、アミノ基および／または水酸基が保護されていないか、また

は保護されている、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、シトシン、チミン、ウラシルなどが挙げられる。

[0030] 本発明の一態様において、アミノ基の保護基は、核酸の保護基として使用されるものであれば特に制限されず、具体的には、例えば、ベンゾイル、4-メトキシベンゾイル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、フェニルアセチル、フェノキシアセチル、4-tert-ブチルフェノキシアセチル、4-イソプロピルフェノキシアセチル、(ジメチルアミノ)メチレンを挙げることができる。アミノ基の保護基としては、ベンゾイル、アセチル、フェノキシアセチル、4-tert-ブチルフェノキシアセチルが好ましい。水酸基の保護基としては、例えば、2-シアノエチル、4-ニトロフェネチル、フェニルスルホニルエチル、メチルスルホニルエチル、トリメチルシリルエチル、置換可能な任意の位置で1～5個の電子吸引性基で置換されていてもよいフェニル、ジフェニルカルバモイル、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、メチルフェニルカルバモイル、1-ピロリジニルカルバモイル、モルホリノカルバモイル、4-(tert-ブチルカルボキシ)ベンジル、4-[(ジメチルアミノ)カルボキシ]ベンジル、4-(フェニルカルボキシ)ベンジルを挙げることができる(例えば、国際公開公報第2009/064471A1を参照。)。水酸基の保護基としては、2-シアノエチル、4-ニトロフェネチル、4-(tert-ブチルカルボキシ)ベンジルが好ましい。グアニンの6位水酸基の保護基は、2-シアノエチルが好ましい。

[0031] 本発明の一態様において、保護されている核酸塩基は、例えば、下記の式：

[化28]



[式中、Pgは保護基を示す]

の基が挙げられる。

[0032] 本発明の一態様において、保護されている核酸塩基は、例えば、アミノ基がベンゾイルで保護されたアデニン (A^{Bz})、アミノ基がベンゾイルで保護されたシトシン (C^{Bz})、水酸基が2-シアノエチルで保護され、そしてアミノ基がフェノキシアセチルで保護されたグアニン (G^{CE}) などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0033] 本発明の一態様において、固相担体は、例えば、核酸の固相反応に使用しうる担体であれば特に制限されないが、例えば、(i) モルホリノ核酸オリゴマーの合成に使用しうる試薬（例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、N-エチルモルホリン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、N-メチルイミダゾール、ピリジン、無水酢酸、2,6-ルチジン、2,4-ルチジン、トリフルオロ酢酸）にほとんど溶解せず、(ii) モルホリノ核酸誘導体の合成に使用しうる試薬に対して化学的に安定であり、(iii) 化学修飾ができ、(iv) 望ましいモルホリノ核酸誘導体の装填ができ、(v) 処理中にかかる高圧に耐える十分な強度をもち、(vi) 一定の粒径範囲と分布であるものが望ましい。

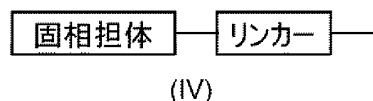
[0034] 本発明の一態様において、固相担体は、例えば、膨潤性ポリスチレン（例えば、アミノメチルポリスチレン樹脂 1%ジビニルベンゼン架橋 (200

～400メッシュ) (2.4～3.0mmol/g) (東京化成社製)、Aminomethylated Polystyrene Resin・HCl [ジビニルベンゼン1%, 100～200メッシュ] (ペプチド研究所社製)、Aminomethyl Resin [Polystyrene 1% Divinylbenzene copolymer, 200～400 mesh] (渡辺化学工業社製)、非膨潤性ポリスチレン (例えば、Primer Support (GE Healthcare社製))、PEG鎖結合型ポリスチレン (例えば、NH₂-PEG resin (渡辺化学工業社製)、TentaGel resin)、定孔ガラス (controlled pore glass; CPG) (例えば、CPG社製)、オキサリル化一定孔ガラス (例えば、Alulra, Nucleic Acid Research, Vol. 19, 1527 (1991) を参照)、TentaGel支持体-アミノポリエチレングリコール誘導体化支持体 (例えば、Wrightら, Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993) を参照)、Poros-ポリスチレン/ジビニルベンゼンのコポリマーを挙げることができる。

[0035] 本発明の一態様において、リンカーは、核酸やモルホリノ核酸誘導体を連結するために使用される公知のものを用いることができるが、例えば、短鎖アルキレン、長鎖アルキレン、アミノ-短鎖アルキレン、アミノ-長鎖アルキレン、ジアシル短鎖アルキレン (例えば、スクシニル)、ジアシル長鎖アルキレン、ジアルキレンスルホニル、好ましくは、3-アミノプロピル、スクシニル、2, 2'-ジエタノールスルホニル、長鎖アルキルアミノ (LCAA) を挙げることができる。

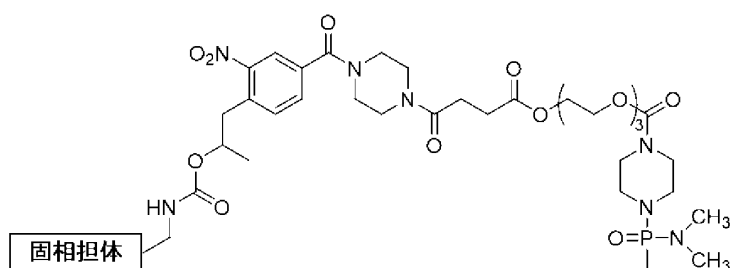
[0036] 本発明の一態様において、Lが、式 (IV) :

[化29]



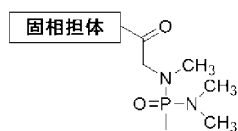
で表される基であって、式 (IV-1) :

[化30]



で表される基であるか、又は式 (I V - 2) :

[化31]

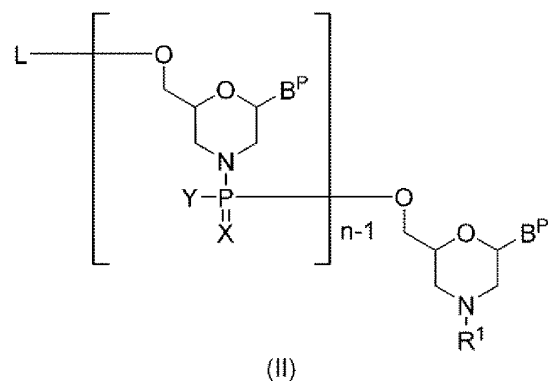


で表される基であってもよい。

[0037] 本発明の一態様において、

式 (I I) :

[化32]



[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]

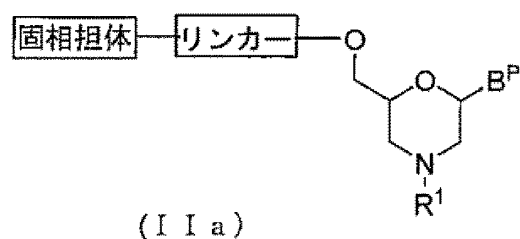
の化合物は、当該技術分野において公知の方法で調製することができる（例えば、WO 2012/043730を参照）。

[0038] <固相、リンカーへの結合>

[0039] 本発明の一態様として、化合物 (I I) において、nが1であり、Lが式

(I V) で表される基である、式 (I I a) :

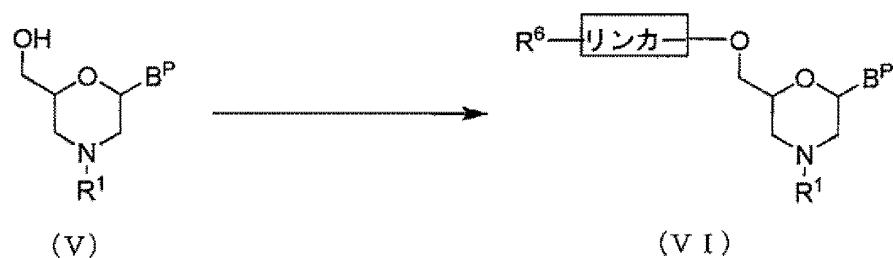
[化33]



[式中、B^P、R¹、リンカー、固相担体は、前記の通りである]
の化合物（以下、化合物 (I I a) という。）の製造工程を含むことができる。

[0040] 本発明の一態様として、式 (V) の化合物にアシル化剤を作用させることによって、式 (V I) の化合物（以下、化合物 (V I) という。）を製造する工程：

[化34]



[式中、

B^P及びR¹、は、前記と同義であり、リンカーは、ジアシル短鎖アルキレン（例えば、スクシニル）、ジアシル長鎖アルキレン、短鎖アルキレン、長鎖アルキレン、又はジアルキレンスルホニルであり、；

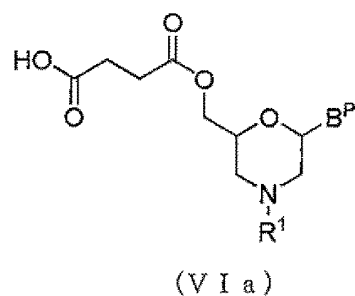
R⁶は、水酸基、ハロゲン、又は、アミノである]

を含むことができる。

[0041] 本工程は、化合物 (V) を出発原料として、公知のリンカーの導入反応により実施することができる。

[0042] 本発明の一態様として、式 (V I a) :

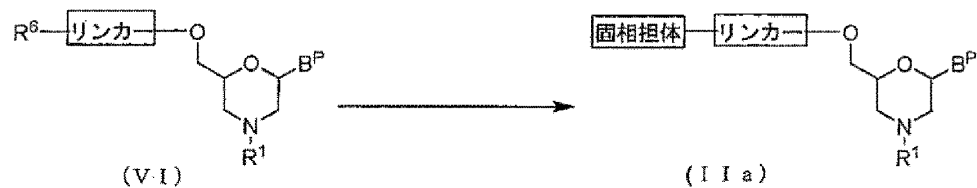
[化35]

[式中、B^P、R¹は、前記の通りである]

の化合物は、化合物(V)と無水コハク酸とを用いてエステル化反応として知られた方法を実施することにより製造する工程を含むことができる。

[0043] 本発明の一態様として、化合物(VI)に縮合剤等を作用させることによって、固相担体と反応させ、化合物(II a)を製造する工程：

[化36]

[式中、B^P、R⁶、R¹、リンカー、固相担体は、前記の通りである]

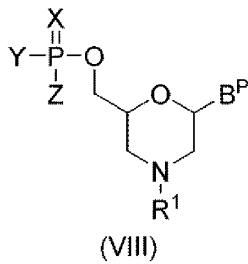
を含むことができる。

[0044] 本工程は、化合物(VI)と固相担体とを用いて縮合反応として知られた方法により製造することができる。

[0045] <原料>

本発明の一態様において、式(VIII)：

[化37]



[式中、B^P、X、Y、Z、及びR¹は、前記の通りである]

の化合物は、市販されているか、当該技術分野において公知の方法で調製して使用することができる。

[0046] 本発明の一態様において、式(VIII)の化合物は、例えば、下記の表1に記載の化合物が挙げられる。

[0047] [表1]

構造式			
略称	A ^P	C ^P	T ^P
構造式			
略称	A ^S	C ^S	U ^P
構造式			
略称	G ^{CE}	G ^{POB}	G ^I

[0048] 本発明の一態様は、前記伸長反応において、

- < (1) 脱保護工程前の洗浄工程>、
- < (2) 脱保護工程>、
- < (3) 中和工程>、
- < (4) 中和工程後の洗浄工程>、
- < (5) 縮合前の洗浄工程>、
- < (6) 縮合工程>、
- < (7) 縮合工程後の洗浄工程 1>、及び
- < (8) 縮合工程後の洗浄工程 2>

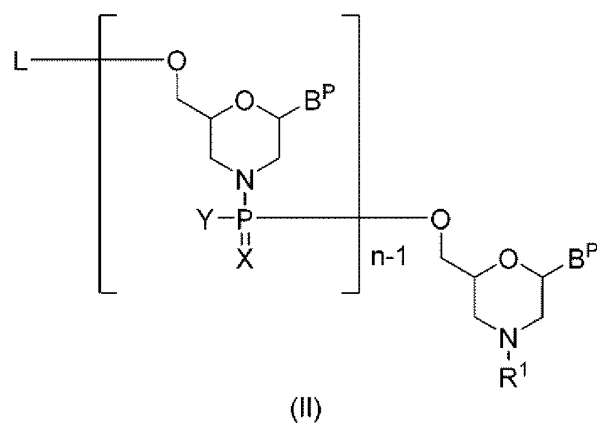
からなる群より選択される少なくとも一つの工程を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法である。

[0049] 以下に、(1)～(8)の工程を説明する。

[0050] < (1) 脱保護工程前の洗浄工程>

本工程は、式 (II)：

[化38]



[式中、L、B^p、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]の化合物を

、

(1) アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含む溶液で処理することを含む。

[0051] < (1) の溶液>

一実施形態において、前記工程（１）の溶液は、アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含有すれば特に限定されることなく、例えば、２，２，２－トリフルオロエタノール、ジフルオロエタノール、クロロホルム、ジクロロメタンからなる群より選択される少なくとも一つを使用することができ、好ましくは２，２，２－トリフルオロエタノール及びジクロロメタンを使用することができる。

[0052] ＜（１）の溶液＞

一実施形態において、前記工程（１）の溶液は、アルコール類をハロゲン溶媒に対して、例えば、体積比で０．０１倍～１００倍、好ましくは、０．１倍～２倍（ v/v ）で使用することができる。

[0053] ＜（１）の溶液の使用量＞

一実施形態において、前記工程（１）の溶液の使用量は、特に限定されることなく、例えば、化合物（１１）１ｇに対して、重量比で、例えば１倍量～１０００倍量の範囲内であり、好ましくは、２倍量～１００倍量の範囲内である。

[0054] ＜（１）の処理時間＞

一実施形態において、前記工程（１）の時間は、特に限定されることなく、例えば、０．１分～２４時間、好ましくは１分～５時間、更に好ましくは３分～１時間である。

[0055] ＜（１）の処理温度＞

一実施形態において、前記工程（１）の温度は、特に限定されることなく、例えば、０℃～４０℃、好ましくは１０℃～３５℃、更に好ましくは１５℃～３０℃である。

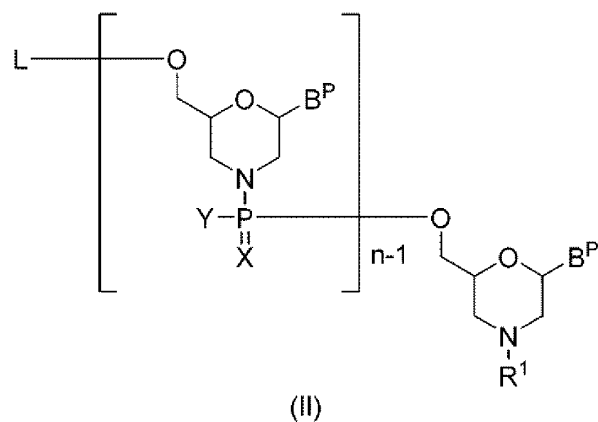
[0056] ＜工程（１）の回数＞

一実施形態において、前記工程（１）の回数は、特に限定されることなく、例えば、１～１０回であり、好ましくは１～５回である。

[0057] ＜（２）脱保護工程＞

本工程は、式（１１）：

[化39]

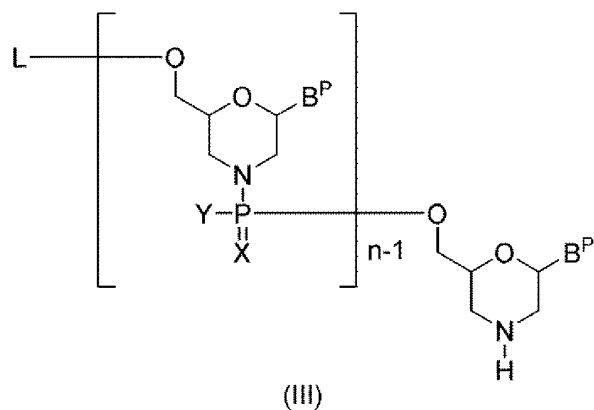


[式中、 L 、 B^P 、 X 、 Y 、 R^1 、及び n は、前記の通りである] の化合物を、

(2) 酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式 (I I) の化合物より R^1 を除去して、

式 (I I I) :

[化40]



[式中、 L 、 B^P 、 X 、 Y 、及び n は、前記の通りである] の化合物にすることを含む。

[0058] < (2) の酸 >

一実施形態において、酸は、例えば、塩酸、トリフルオロ酢酸、ジクロロ酢酸、又はトリクロロ酢酸を挙げることができ、好ましくはトリフルオロ酢

酸である。

[0059] < (2) の酸の使用量 >

一実施形態において、酸の使用量は、例えば、化合物 (11) 1 モルに対して、モル比で 1 倍量～500 倍量の範囲内であり、好ましくは 2 倍量～100 倍量の範囲内である。

[0060] < (2) の酸の濃度 >

一実施形態において、酸は 0.1%～30% の範囲内の濃度になるように適切な溶媒で希釈して使用することもできる。

[0061] < (2) の酸を希釈する溶媒 >

一実施形態において、使用する溶媒は、反応に関与しなければ特に限定されないが、例えば、ジクロロメタン、トルエン、アセトニトリル、アルコール類（エタノール、イソプロピルアルコール、2, 2, 2-トリフルオロエタノールなど）、水、又はこれらの混合物を挙げることができる。

[0062] < (2) の有機アミン >

一実施形態において、前記酸と一緒に、「有機アミン」を使用することができる。有機アミンとしては、特に限定されるものではないが、例えば、トリエチルアミン、N, N-ジイソプロピルエチルアミン、N-エチルモルホリン、ピリジンなどを挙げることができ、好ましくは、トリエチルアミンである。

[0063] < (2) の有機アミンの使用量 >

一実施形態において、有機アミンの使用量は、例えば、酸 1 モルに対して、モル比で 0.01 倍量～10 倍量の範囲内であり、好ましくは、0.1 倍量～2 倍量の範囲内である。

[0064] < (2) の酸と有機アミンの比 >

一実施形態において、酸と有機アミンとの塩又は混合物を使用する場合には、例えば、トリフルオロ酢酸とトリエチルアミンの塩又は混合物を挙げることができ、例えば、トリフルオロ酢酸 1.2 当量に対してトリエチルアミン 1 当量を混合したものを挙げることができる。

[0065] < (2) のスカベンジャー >

一実施形態において、スカベンジャーは、例えば、アルコール類（例えば、メタノール、エタノール、2, 2, 2-トリフルオロエタノールが挙げられる）、チオール類（メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、メルカプトコハク酸）、有機ケイ素化合物（例えば、トリイソプロピルシラン、トリエチルシラン、トリメチルシランが挙げられる）、及び芳香族化合物（例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、ピロール、インドール、アニソール、及びチオアニソールが挙げられる）からなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくは有機ケイ素化合物である。

[0066] < (2) のスカベンジャー >

一実施形態において、スカベンジャーは、例えば、メタノール、エタノール、メルカプトエタノール、2, 2, 2-トリフルオロエタノール、トリイソプロピルシラン、トリエチルシラン、トリメチルシラン、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、ピロール、インドール、アニソール、及びチオアニソールからなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくは、トリイソプロピルシラン及びエタノールからなる群より選択される一つであり、更に好ましくは、トリイソプロピルシランである。

[0067] < (2) のスカベンジャーの使用量 >

一実施形態において、スカベンジャーの使用量は、例えば、化合物 (I) 1 モルに対して、モル比で、例えば0.1 倍量～1000 倍量の範囲内であり、好ましくは0.5 倍量～100 倍量の範囲内であり、更に好ましくは1 倍～20 倍量の範囲内である。

[0068] < (2) の反応時間 >

一実施形態において、反応時間は、例えば、0.1 分～24 時間の範囲内であり、好ましくは、1 分～3 時間の範囲内である。

[0069] < (2) の反応温度 >

一実施形態において、反応温度は、例えば、0℃～40℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、10℃～35℃の範囲内であり、さらに好ましくは

、 $15^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ の範囲内である。

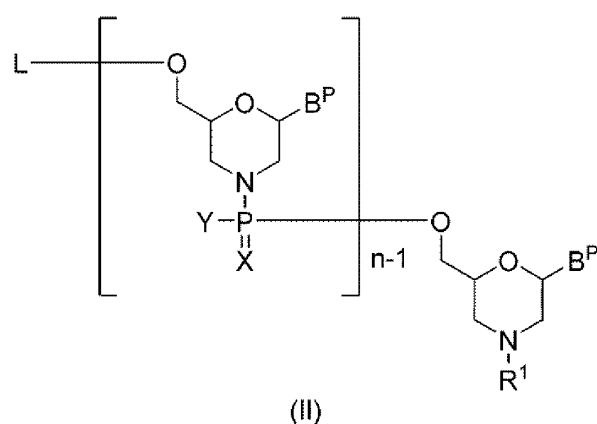
[0070] <工程(2)の回数>

一実施形態において、前記工程(2)の回数は、特に限定されることなく、例えば、 $1 \sim 10$ 回であり、好ましくは $1 \sim 8$ 回である。

[0071] <(1)脱保護前の洗浄と(2)脱保護の連続反応>

本発明の一実施形態では、式(II)：

[化41]



[式中、L、 B^P 、X、Y、 R^1 、及びnは、前記の通りである]の化合物を

、

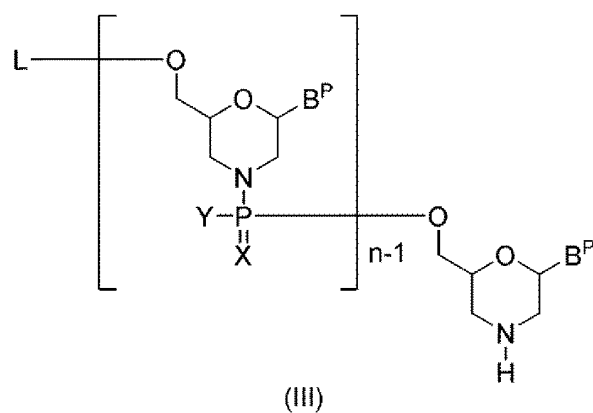
(1) アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含む溶液で処理して、続いて

、

(2) 酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、 R^1 を除去して、

式(III)：

[化42]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]の化合物にすることができる。

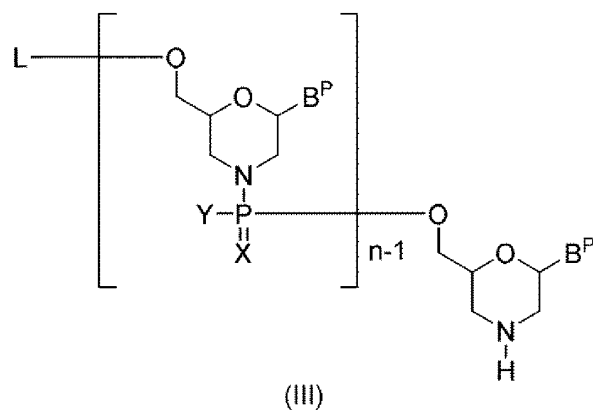
工程(1)及び(2)は、前記の記載の通りであり、適宜組み合わせることができる。

[0072] <(3) 中和工程>

本工程は、

式(III)：

[化43]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]の化合物を、
(3) 塩基及び溶媒(アルコール類及びハロゲン溶媒)を含む溶液で処理することを含む。

[0073] < (3) の塩基 >

一実施形態において、塩基は、保護基に影響を与えなければ特に限定されないが、例えば、トリエチルアミン、N, N-ジイソプロピルエチルアミン、ピリジンなどが挙げられ、好ましくはN, N-ジイソプロピルエチルアミンである。

[0074] < (3) の塩基の使用量 >

一実施形態において、塩基の使用量は、0.1% (v/v) ~ 30% (v/v) の範囲内の濃度になるように適切な溶媒で希釈して使用することもできる。

[0075] < (3) の溶液の使用量 >

一実施形態において、前記工程 (3) の溶液の使用量は、特に限定されることなく、例えば、化合物 (I) 1 g に対して、重量比で、例えば1倍量~1000倍量の範囲内であり、好ましくは、2倍量~100倍量の範囲内である。

[0076] < (3) の溶媒 >

一実施形態において、溶媒は、アルコール類、ハロゲン溶媒、極性溶媒、エーテル系溶媒、及びこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくはアルコール類及びハロゲン溶媒の混合物である。

[0077] 一実施形態において、アルコール類は、エタノール、イソプロピルアルコール、2, 2, 2-トリフルオロエタノールなどであり、好ましくは、イソプロピルアルコールである。

[0078] 一実施形態において、ハロゲン溶媒は、クロロホルム、ジクロロメタン、テトラクロロエタン、及びテトラクロロエチレンなどであり、好ましくは、ジクロロメタンである。

[0079] 一実施形態において、極性溶媒は、アセトニトリル、ジメチルスルホキシドなどである。

[0080] 一実施形態において、エーテル系溶媒は、テトラヒドロフラン、シクロペンチルメチルエーテルなどである。

[0081] < (3) の反応時間 >

一実施形態において、反応時間は、使用する塩基の種類、反応温度によって異なるが、例えば、0.1分～24時間の範囲内であり、好ましくは、1分～5時間の範囲内である。

[0082] < (3) の反応温度 >

一実施形態において、反応温度は、例えば、0℃～40℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、1℃～35℃の範囲内であり、さらに好ましくは、3℃～20℃の範囲内である。

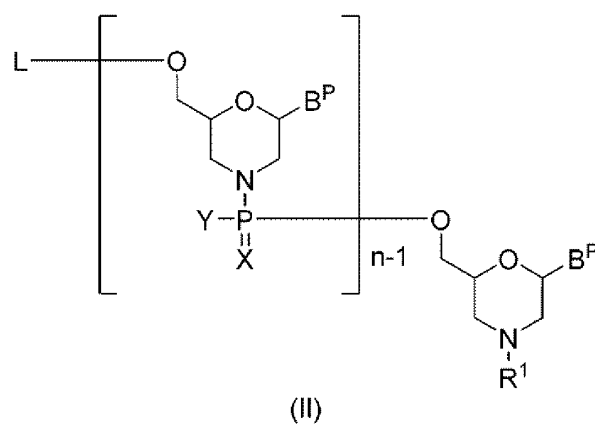
[0083] < 工程 (3) の回数 >

一実施形態において、前記工程 (3) の回数は、特に限定されることなく、例えば、1～10回であり、好ましくは1～5回である。

[0084] < (2) 脱保護と (3) 中和の連続反応 >

本発明の一実施形態では、式 (I I) :

[化44]



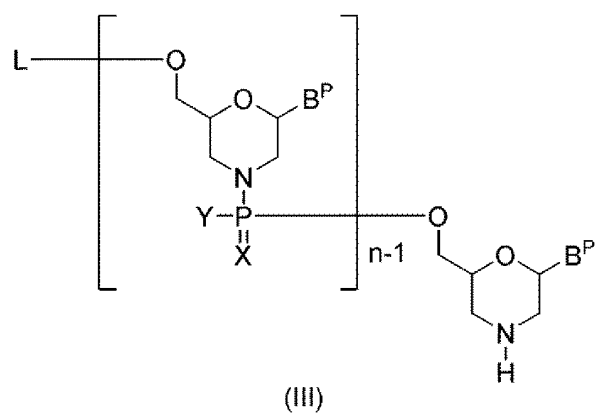
[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである] の化合物を

、

(2) 酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、R¹を除去して、

式 (I I I) :

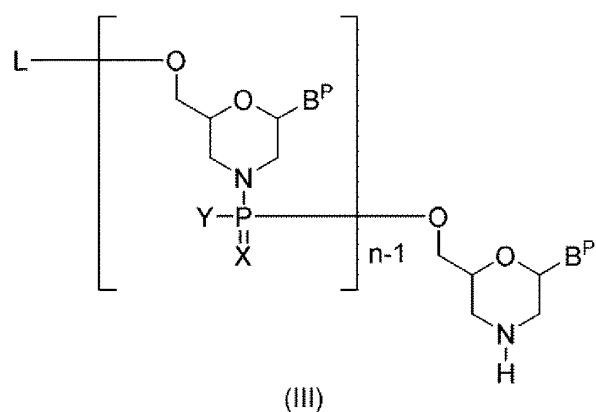
[化45]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]の化合物とし、続いて

式(III)：

[化46]



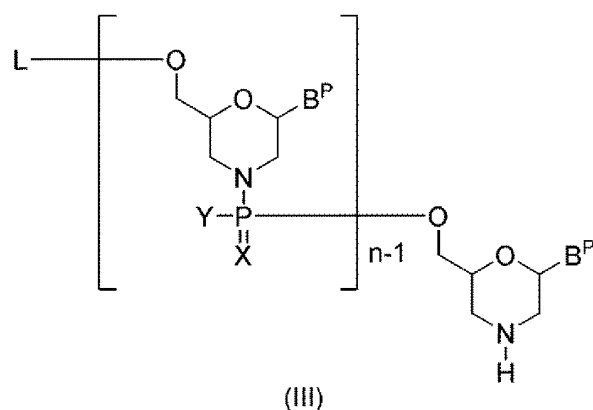
[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]の化合物を、
(3) 塩基及び溶媒（アルコール類及びハロゲン溶媒）を含む溶液で処理することができる。

工程(2)及び(3)は、前記の記載の通りであり、適宜組み合わせることができる。

[0085] <(4) 中和工程後の洗浄工程>

[0086] 本工程は、式(III)：

[化47]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]の化合物を、

(4) ハロゲン溶媒を含む溶液で処理することを含む。

[0087] <(4)の溶液>

一実施形態において、前記工程(4)の溶液は、ハロゲン溶媒を含有すれば特に限定されることなく、例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、テトラクロロエタン、及びテトラクロロエチレンからなる群より選択される少なくとも一つを使用することができ、好ましくはジクロロメタンである。

[0088] <(4)の溶液の使用量>

一実施形態において、前記工程(4)の溶液の使用量は、特に限定されることなく、例えば、化合物(III) 1gに対して、重量比で1倍量~1000倍量の範囲内であり、好ましくは、2倍量~100倍量の範囲内である。

[0089] <(4)の処理時間>

一実施形態において、前記工程(4)の時間は、特に限定されることなく、例えば、0.1分~2時間、好ましくは1分~60分、更に好ましくは3分~30分である。

[0090] <(4)の処理温度>

一実施形態において、前記工程(4)の温度は、特に限定されることなく、例えば、0℃~35℃、好ましくは10℃~30℃、更に好ましくは15

℃～25℃である。

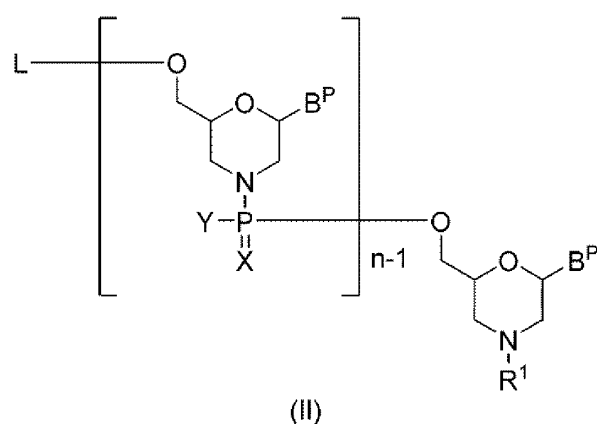
[0091] <工程（４）の回数>

一実施形態において、前記工程（４）の回数は、特に限定されることなく、例えば、１～１０回であり、好ましくは１～５回である。

[0092] <（２）脱保護、（３）中和、（４）中和後の洗浄の連続反応>

本発明の一実施形態では、式（ⅠⅠ）：

[化48]



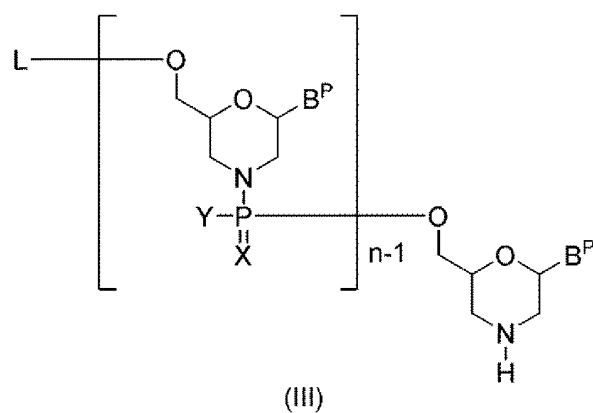
[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]の化合物を

、

（２）酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式（ⅠⅠ）の化合物よりR¹を除去して、

式（ⅠⅠⅠ）：

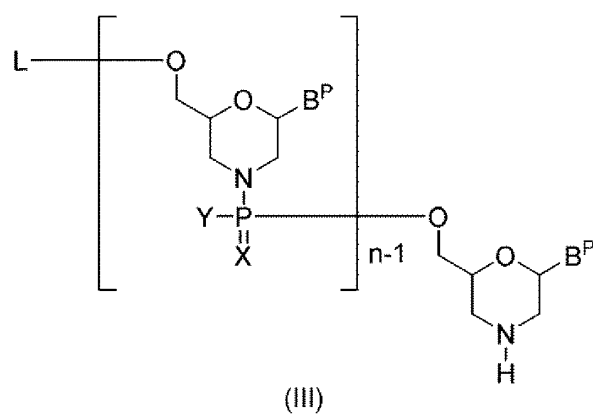
[化49]



[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである] の化合物とし、続いて

式 (III) :

[化50]



[式中、L、B^P、X、Y、R¹及びnは、前記の通りである] の化合物を、
 (3) 塩基及び溶媒（アルコール類及びハロゲン溶媒）を含む溶液で処理し、更に

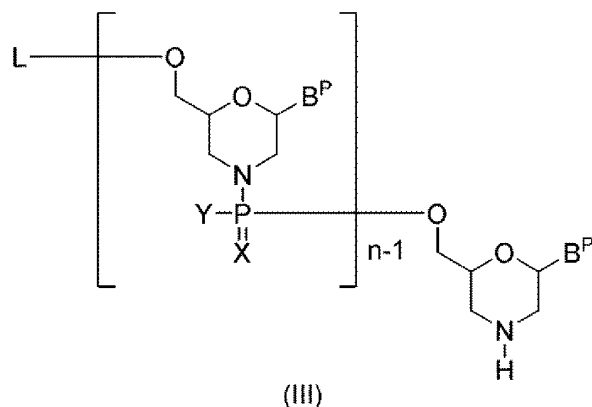
(4) ハロゲン溶媒を含む溶液で処理することができる。

工程 (1)、(2)、(3) は、前記の記載の通りであり、適宜組み合わせることができる。

[0093] < (5) 縮合前の洗浄工程 >

本工程は、式（Ⅲ）：

[化51]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]の化合物を、

(5) 有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理することを含む。

[0094] <(5)の有機アミン>

一実施形態として、有機アミンは、例えば、N，N－ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、及びN－エチルモルホリンからなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくはN－エチルモルホリンである。

[0095] <(5)の有機アミンの使用量>

一実施形態として、有機アミンの使用量としては、前記式（Ⅲ）化合物1モルに対して、モル比で、例えば1倍量～1000倍量の範囲内であり、好ましくは1倍量～100倍量の範囲内である。

[0096] <(5)の非プロトン性極性溶媒>

一実施形態として、非プロトン性極性溶媒は、例えば、1，3－ジメチル－2－イミダゾリジノン、N－メチルピロリドン、N，N－ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、又はこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくは1，3－ジメチル－2－イミダゾリジノンである。

[0097] <(5)の非プロトン性極性溶媒の使用量>

一実施形態として、非プロトン性極性溶媒の使用量としては、例えば、有機アミンに対して、体積比で1倍量～1000倍量（v／v）の範囲内であり、好ましくは3倍量～100倍量の範囲内である。

[0098] ＜（５）の溶液の使用量＞

一実施形態において、前記工程（５）の溶液の使用量は、特に限定されることなく、例えば、化合物（ⅠⅠ）1gに対して、重量比で、例えば0.5倍量～100倍量の範囲内であり、好ましくは、1倍量～50倍量の範囲内である。

[0099] ＜（５）の処理時間＞

一実施形態として、反応時間は、使用する有機アミンの種類、反応温度によって異なるが、通常0.1分～2時間の範囲内であり、好ましくは、1分～60分の範囲内である。

[0100] ＜（５）の処理温度＞

一実施形態として、反応温度は、例えば、0℃～100℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、10℃～50℃の範囲内である。

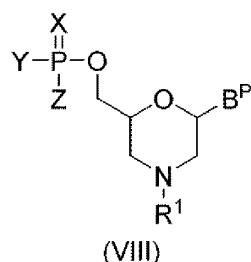
[0101] ＜工程（５）の回数＞

一実施形態において、前記工程（５）の回数は、特に限定されることなく、例えば、1～10回であり、好ましくは1～5回である。

[0102] ＜（６）縮合工程＞

[0103] 本工程は、式（ⅤⅠⅠⅠ）：

[化52]



[式中、B^p、X、Y、Z、及びR¹は、前記の通りである]の化合物を、
（６）有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理すること、例

えば有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む混合溶液に溶解させることを含む。

[0104] < (6) の有機アミン >

一実施形態として、有機アミンは、例えば、N, N-ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、及びN-エチルモルホリンからなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくはN-エチルモルホリンである。

[0105] < (6) の有機アミンの使用量 >

一実施形態として、有機アミンの使用量としては、例えば、前記式 (V I I I) 化合物 1 モルに対して、モル比で 0.1 倍量～1000 倍量の範囲内であり、好ましくは、1 倍量～100 倍量の範囲内である。

[0106] < (6) の非プロトン性極性溶媒 >

一実施形態として、非プロトン性極性溶媒は、例えば、1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、N-メチルピロリドン、N, N-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、又はこれらの混合物からなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくは 1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノンである。

[0107] < (6) の非プロトン性極性溶媒の使用量 >

一実施形態として、非プロトン性極性溶媒の使用量としては、例えば、有機アミンに対して、体積比で 1 倍量～1000 倍量 (v/v) の範囲内であり、好ましくは 3 倍量～100 倍量の範囲内である。

[0108] < (6) の処理時間 >

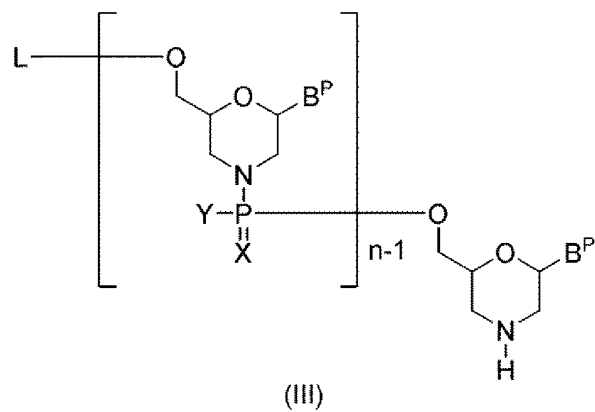
一実施形態として、処理時間は、使用する有機アミンの種類、反応温度によって異なるが、通常 0.1 分～48 時間の範囲内であり、好ましくは、1 分～24 時間の範囲内である。

[0109] < (6) の処理温度 >

一実施形態として、処理温度は、例えば、0℃～50℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、10℃～40℃の範囲内である。
ある。

[0110] 本工程は、さらに式 (III) :

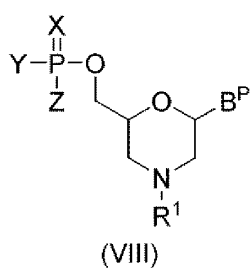
[化53]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]
の化合物と、有機アミンの存在下、

式 (V) :

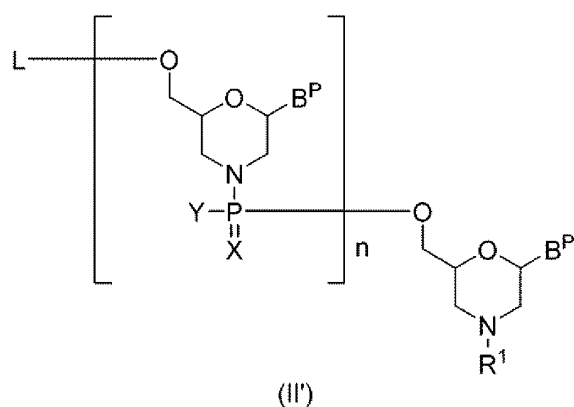
[化54]



[式中、X、Y、Z、B^P及びR¹は、前記の通りである] の化合物を反応させて、

式 (I') :

[化55]



[式中、L、B^p、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]の化合物とすることを含む。

[0111] 一実施形態として、前記式(VII)の化合物は、例えば、前記式(III)の化合物1モルに対して、モル比で、1倍量～10倍量の範囲内であり、好ましくは1倍量～5倍量の範囲内である。

[0112] 一実施形態として、有機アミンは、例えば、N，N-ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、及びN-エチルモルホリンからなる群より選択される少なくとも一つであり、好ましくはN-エチルモルホリンである。

[0113] 一実施形態として、有機アミンの使用量としては、例えば、前記式(VII)化合物1モルに対して、モル比で0.1倍量～1000倍量の範囲内であり、好ましくは1倍量～100倍量の範囲内である。

[0114] 一実施形態として、反応時間は、使用する有機アミンの種類、反応温度によって異なるが、通常10分～48時間の範囲内であり、好ましくは、30分～24時間の範囲内である。

[0115] 一実施形態として、反応温度は、例えば、0℃～100℃の範囲内が好ましく、より好ましくは、10℃～50℃の範囲内である。

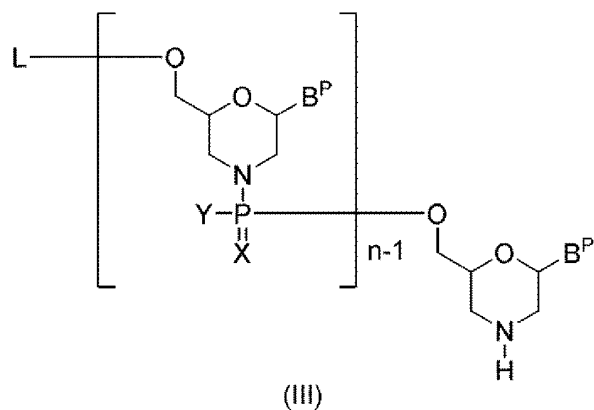
[0116] <工程(6)の回数>

一実施形態において、前記工程(6)の回数は、特に限定されることなく、例えば、1～3回であり、好ましくは1回である。

[0117] <洗浄、前処理、縮合の連続反応>

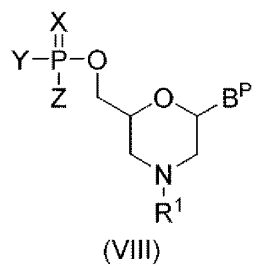
本発明の一実施形態では、式（ⅠⅠⅠ）：

[化56]



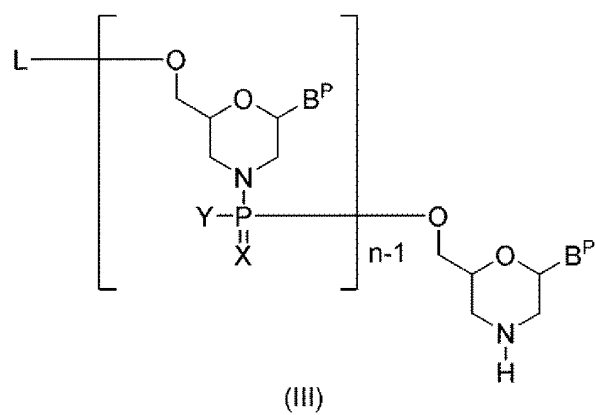
[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]の化合物を、
 (5) 有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理し、そして
 式（ⅤⅠⅠⅠ）：

[化57]



[式中、B^P、X、Y、Z、及びR¹は、前記の通りである]の化合物を、
 (6) 有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理した後、
 式（ⅠⅠⅠ）：

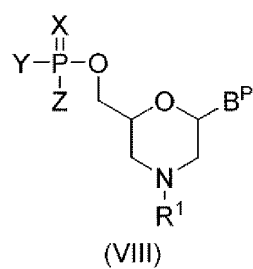
[化58]



〔式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである〕の化合物と、有機アミンの存在下、

式(VIII)：

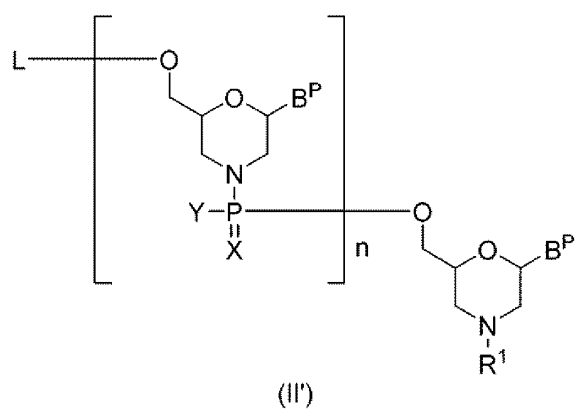
[化59]



〔式中、X、Y、Z、B^P及びR¹は、前記の通りである〕の化合物とを反応させて、

式(II')：

[化60]



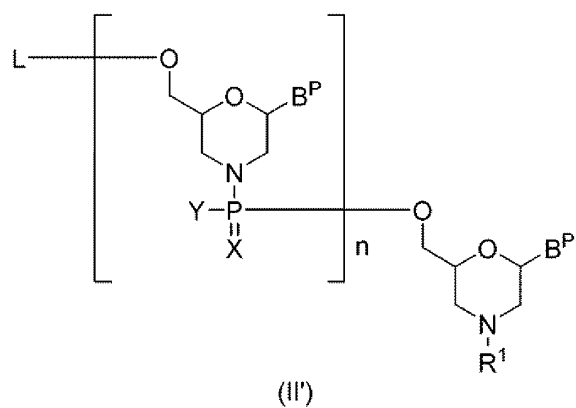
[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]の化合物とすることができる。

工程(5)、(6)は、前記の通りであり、適宜組み合わせることができる。

[0118] <(7)縮合工程後の洗浄工程1>

[0119] 本工程は、式(II'):

[化61]



[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]の化合物を(7)ハロゲン溶媒を含む溶液で処理することを含む。

[0120] <(7)の溶液>

一実施形態において、前記工程(7)の洗浄剤は、ハロゲン溶媒を含有すれば特に限定されことなく、例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、テ

トラクロロエタン、及びテトラクロロエチレンからなる群より選択される少なくとも一つを使用することができ、好ましくはジクロロメタンである。

[0121] < (7) の溶液の使用量 >

一実施形態において、前記工程 (7) の洗浄剤の使用量は、特に限定されることなく、例えば、化合物 (I I') 1 g に対して、重量比で、例えば、1 倍量～1 0 0 0 倍量の範囲内であり、好ましくは、2 倍量～1 0 0 倍量の範囲内である。

[0122] < (7) の処理時間 >

一実施形態において、前記工程 (7) の時間は、特に限定されることなく、例えば、0. 1 分～2 4 時間、好ましくは1 分～5 時間、更に好ましくは3 分～1 時間である。

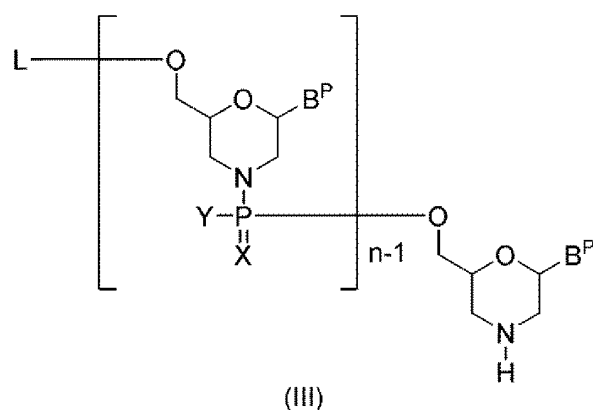
[0123] < (7) の処理温度 >

一実施形態において、前記工程 (7) の温度は、特に限定されることなく、例えば、0℃～4 0℃、好ましくは1 0℃～3 5℃、更に好ましくは1 5℃～3 0℃である。

[0124] < 縮合、縮合後の洗浄の連続反応 >

本発明の一実施形態では、(6) 式 (I I I) :

[化62]

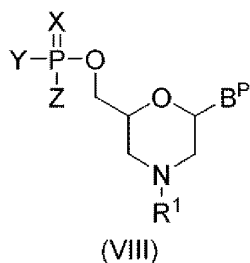


[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物と、有機アミンの存在下、

式 (V I I I) :

[化63]

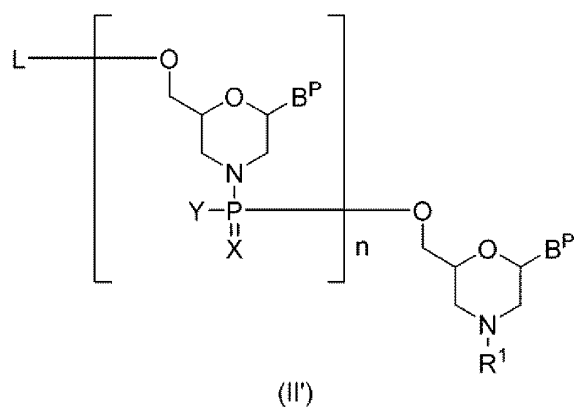


[式中、X、Y、Z、B^p及びR¹は、前記の通りである]

の化合物を、反応させて、

式 (I I') :

[化64]



[式中、L、B^p、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]の化合物とし、続いて、

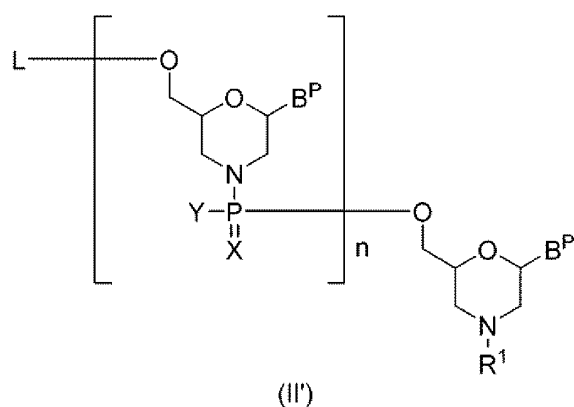
(7) ハロゲン溶媒を含む溶液で処理することができる。

工程(6)、(7)は、前記の通りであり、適宜組み合わせることができる。

[0125] <(8) 縮合工程後の洗浄工程2>

[0126] 本工程は、式 (I I') :

[化65]



[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]の化合物を
(8) アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含む溶液で処理することを含む。

[0127] <(8)の溶液>

一実施形態において、前記工程(8)の溶液は、アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含有すれば特に限定されることなく、例えば、2, 2, 2-トリフルオロエタノール、ジフルオロエタノール、クロロホルム、ジクロロメタンからなる群より選択される少なくとも一つを使用することができ、好ましくは2, 2, 2-トリフルオロエタノール及びジクロロメタンを使用することができる。

[0128] <(1)の溶液>

一実施形態において、前記工程(8)の溶液は、アルコール類をハロゲン溶媒に対して、例えば、0.01倍～100倍、好ましくは、0.1倍～2倍(v/v)で使用することができる。

[0129] <(1)の溶液の使用量>

一実施形態において、前記工程(8)の溶液の使用量は、特に限定されることなく、例えば、化合物(II') 1gに対して、重量比で、例えば1倍量～1000倍量の範囲内であり、好ましくは、2倍量～100倍量の範囲内である。

[0130] < (8) の処理時間 >

一実施形態において、前記工程 (8) の時間は、特に限定されることなく、例えば、0.1 分～24 時間、好ましくは 1 分～5 時間、更に好ましくは 3 分～1 時間である。

[0131] < (8) の処理温度 >

一実施形態において、前記工程 (8) の温度は、特に限定されることなく、例えば、0℃～40℃、好ましくは 10℃～35℃、更に好ましくは 15℃～30℃である。

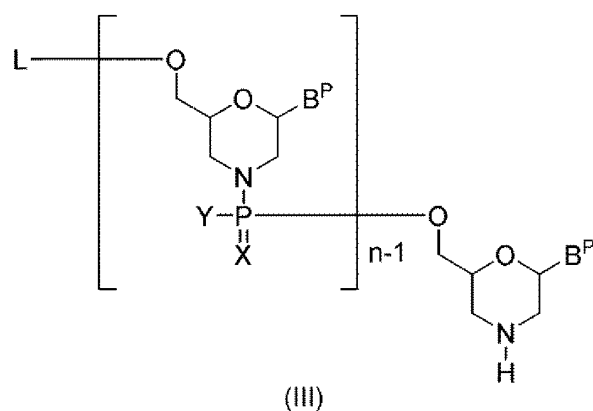
[0132] < 工程 (8) の回数 >

一実施形態において、前記工程 (8) の回数は、特に限定されることなく、例えば、1～10 回であり、好ましくは 1～5 回である。

[0133] < 縮合、縮合後の洗浄、連続反応 >

本発明の一実施形態では、(6) 式 (I I I) :

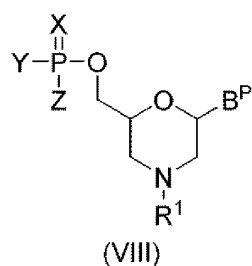
[化66]



[式中、L、B^P、X、Y、及び n は、前記の通りである]
の化合物と、

式 (V I I I) :

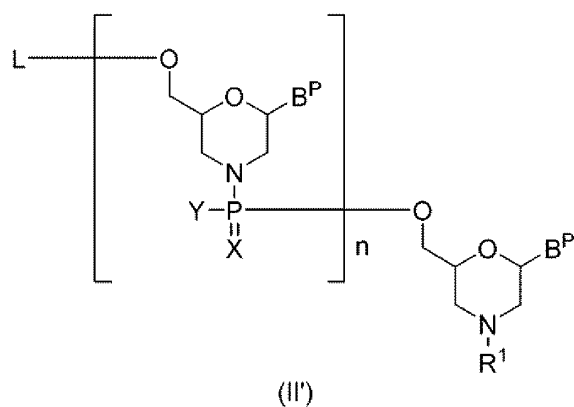
[化67]

[式中、X、Y、Z、B^P及びR¹は、前記の通りである]

の化合物とを、反応させて、

式 (I I') :

[化68]

[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]

の化合物とし、続いて、

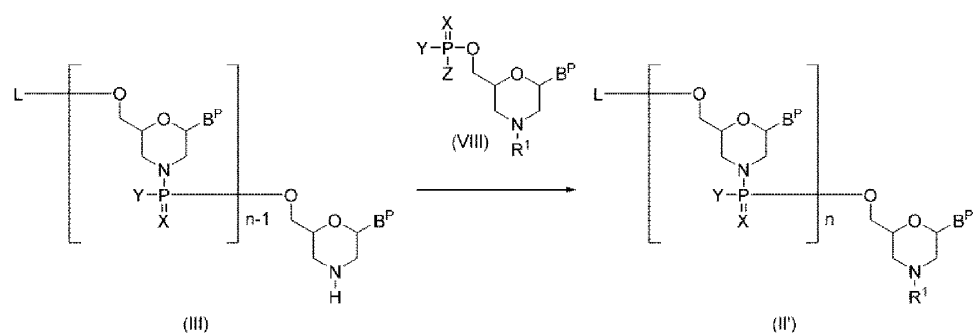
(7) ハロゲン溶媒を含む溶液で処理し、更に

(8) アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含む溶液で処理することができる。

工程 (6)、(7)、(8) は、前記通りであり、適宜組み合わせることができる。

[0134] 本発明の一態様は、前記伸長反応：

[化69]



に続いて、

< (A) 保護基の除去工程>、

< (B) モルホリノ窒素の保護基の除去工程>、及び

< (C) 精製工程>

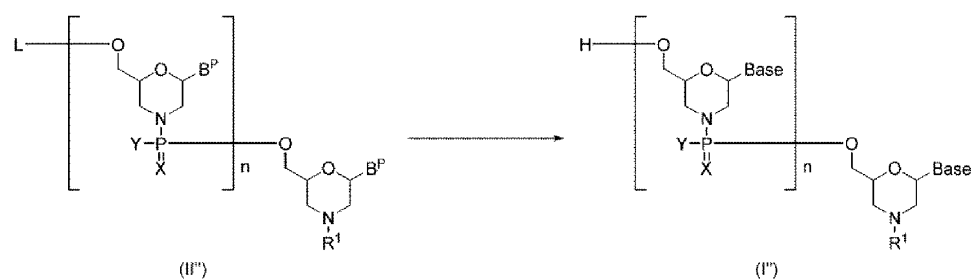
から選択される少なくとも一つの工程を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法である。

[0135] 以下に、工程 (A) ~ (C) について説明する。

[0136] < (A - 1) 保護基の除去工程>

一実施形態として、本工程は、式 (I I' ') の化合物より、式 (I' ') の化合物を得る工程：

[化70]



[式中、Base、B^P、R¹、L、n、X、Yは、前記の通りである]

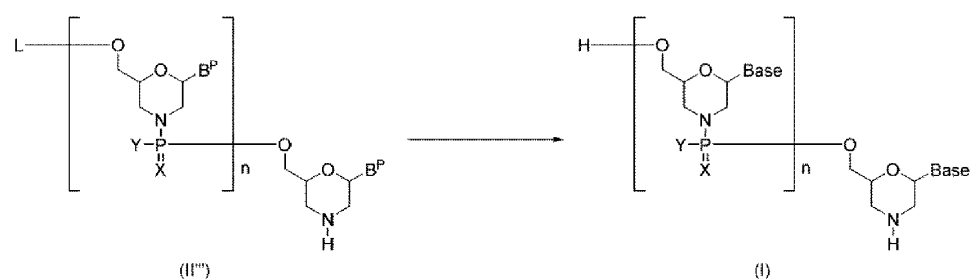
を含む。

[0137] < (A - 2) 保護基の除去工程>

一実施形態として、本工程は、式 (I I' ' ') の化合物より、式 (I)

の化合物を得る工程：

[化71]



[式中、Base、BP、R¹、L、n、X、Yは、前記の通りである]

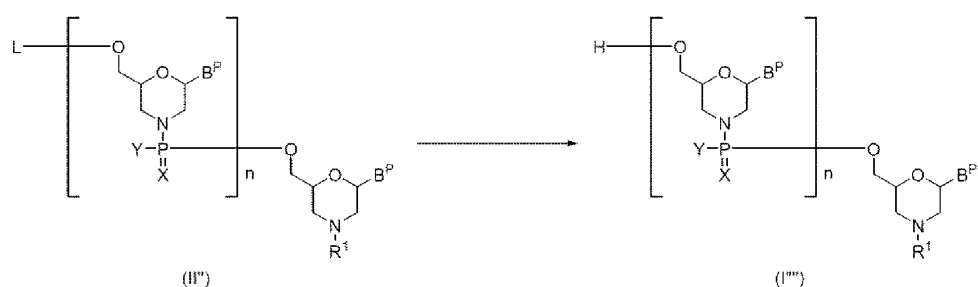
を含む。

[0138] < (A-3) 保護基の除去工程 >

一実施形態として、本工程は、式 (I I'') の化合物より、式 (I'')

の化合物を得る工程：

[化72]



[式中、BP、R¹、L、n、X、Yは、前記の通りである]

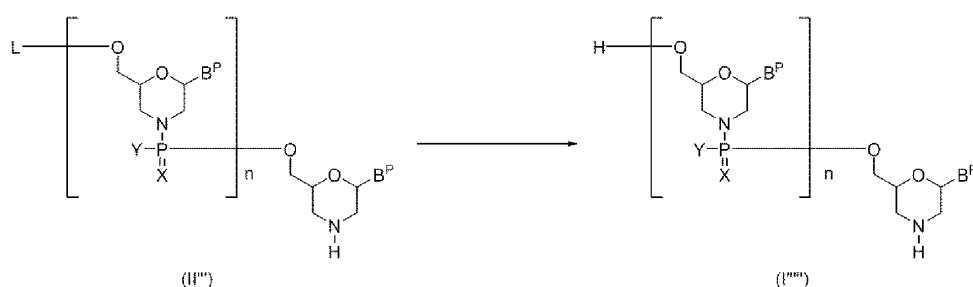
を含む。

[0139] < (A-4) 保護基の除去工程 >

一実施形態として、本工程は、式 (I I'') の化合物より、式 (I'

の化合物を得る工程：

[化73]



[式中、B^P、R¹、L、n、X、Yは、前記の通りである]

を含む。

[0140] 一実施形態として、

式(II')の化合物中のL及び式(II')の化合物中の保護されていても良い核酸塩基の保護基；並びに

式(II')の化合物中のL及び式(II')の化合物中の保護されていても良い核酸塩基の保護基

は、固相担体、リンカー、保護基の種類または性質に応じた脱保護処理を実施することにより、目的の化合物を製造することができる。例えば、「Green's PROTECTIVE GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS, 第4版、2006年」に記載されている脱保護方法に従い、化合物が有する全ての保護基を除去することができる。必要に応じて、該目的の化合物は更なる化学構造変換に付することができる。

[0141] 一実施形態として、

式(II')の化合物中のL；並びに

式(II')の化合物中のL

は、固相担体、リンカーの種類または性質に応じた脱保護処理を実施することにより、目的の化合物を製造することができる。

更に、式(II')の化合物中のB^P及びR¹；並びに

式(II')の化合物中のB^Pは、保護基の種類または性質に応じた脱保護処理を実施することにより、目的の化合物を製造することができる。

例えば、本明細書の記載の方法や「Green's PROTECTIV

E GROUPS in ORGANIC SYNTHESIS, 第4版、2006年」に記載されている脱保護方法に従い、化合物が有する全ての保護基を除去することができる。必要に応じて、該目的の化合物は更なる化学構造変換に付すことができる。

- [0142] 一実施形態として、例えば、(1) アンモニア水、(2) アンモニア水／エタノールまたは(3) メチルアミン－メタノール溶液／水の混合溶液で処理することにより、好ましくは(2) アンモニア水／エタノールの混合溶液で処理することにより、

式(ⅠⅠ'')の化合物中のL及び式(ⅠⅠ'')の化合物中の保護されていても良い核酸塩基の保護基；並びに

式(ⅠⅠ''')の化合物中のL及び式(ⅠⅠ''')の化合物中の保護されていても良い核酸塩基の保護基を除去することができる。

- [0143] 一実施形態として、(1) アンモニア水、(2) アンモニア水／エタノールまたは(3) メチルアミン－メタノール溶液／水の混合溶液の使用量としては、例えば、式(ⅠⅠ'')の化合物1g又は式(ⅠⅠ''')の化合物1gに対して、例えば、重量比で1倍量～1000倍量の範囲内であり、好ましくは3倍量～100の範囲内である。

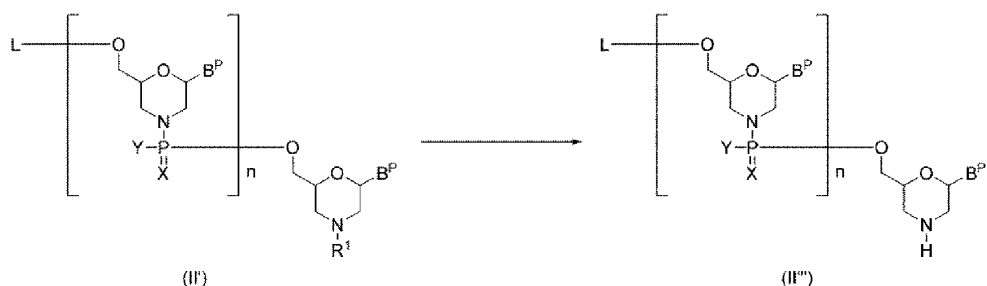
- [0144] 一実施形態として、反応時間は、反応温度等によって異なるが、10分～120時間の範囲内であり、好ましくは30分～72時間の範囲内であり、より好ましくは5時間～48時間の範囲内である。

- [0145] 一実施形態として、反応温度は、例えば、5℃～100℃の範囲内であり、好ましくは10℃～70℃の範囲内であり、より好ましくは15℃～50℃の範囲内である。

- [0146] <(B-1) モルホリノ窒素の保護基の除去工程>

一実施形態として、本工程は、式(ⅠⅠ')の化合物より、式(ⅠⅠ')の化合物中のR¹を除去して、式(ⅠⅠ''')の化合物を得る工程：

[化74]



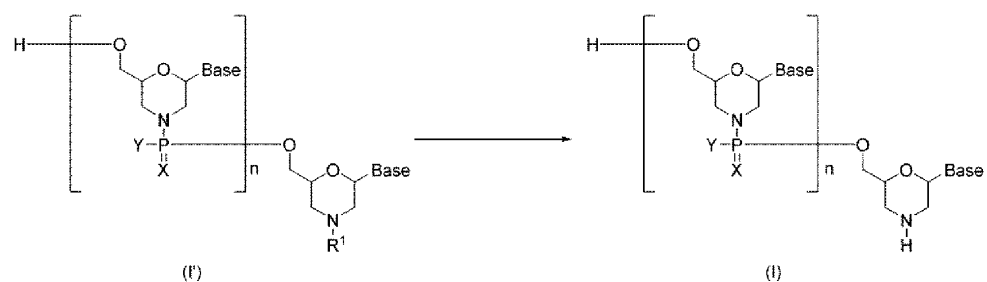
[式中、 B^P 、 L 、 n 、 R^1 、 X 、 Y は、前記の通りである。]

を含む。

[0147] < (B-2) モルホリノ窒素の保護基の除去工程 >

一実施形態として、本工程は、式 (I') の化合物より、式 (I') の化合物中の R^1 を除去して、式 (I) の化合物を得る工程：

[化75]



[式中、 $Base$ 、 X 、 Y 、 n 、 R^1 は、前記の通りである。]

を含む。

[0148] 一実施形態として、

式 (I I') の化合物より、式 (I I') の化合物中の R^1 を除去して、式 (I I' ' ') の化合物を得る工程；及び

式 (I') の化合物より、式 (I') の化合物中の R^1 を除去して、式 (I) の化合物を得る工程；及び

は、前記 (1) ~ (4) の工程において使用した条件を適用することができる。

[0149] < (11) 精製工程 >

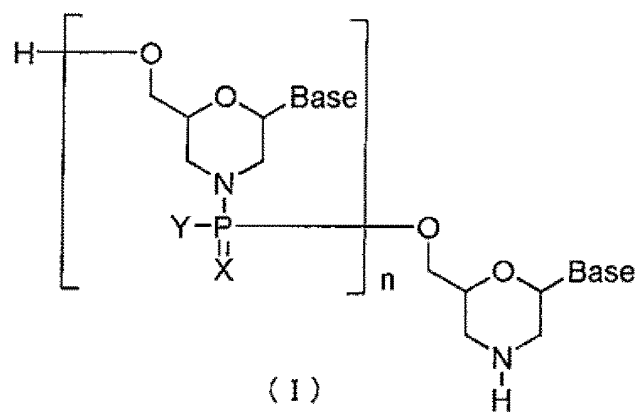
一実施形態として、本工程は、モルホリノ核酸オリゴマー（I）を反応混合物から通常の分離精製手段、例えば、抽出、濃縮、中和、濾過、遠心分離、沈殿化、再結晶、 C_1 から C_{18} の逆相カラムクロマトグラフィー、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、透析、限外ろ過などの手段を単独または組み合わせて用いることによって単離することを含む（例えば、国際公開公報第1991/09033A1を参照。）。

- [0150] 一実施形態として、逆相クロマトグラフィーを用いて所望の化合物を精製する場合には、溶出溶媒として、例えば20 mMのトリエチルアミン／酢酸緩衝液とアセトニトリルの混合溶液を使用することができる。
- [0151] 一実施形態として、イオン交換クロマトグラフィーを用いて所望の化合物を精製する場合には、例えば、1 Mの食塩水と10 mMの水酸化ナトリウム水溶液の混合溶液または50 mMのリン酸緩衝液の0.3 Mの食塩水を使用することができる。
- [0152] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（2）脱保護工程＞を含む。
- [0153] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（2）脱保護工程＞及び＜（3）中和工程＞を含む。
- [0154] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（2）脱保護工程＞、＜（3）中和工程＞、及び＜（4）中和工程後の洗浄工程＞を含む。
- [0155] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（5）縮合前の洗浄工程＞及び＜（6）縮合工程＞を含む。
- [0156] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（5）縮合前の洗浄工程＞、＜（6）縮合工程＞、並びに＜（7）縮合工程後の洗浄工程1＞及び／又は＜（8）縮合工程後の洗浄工程2＞を含む。

- [0157] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（２）脱保護工程＞、＜（５）縮合前の洗浄工程＞、及び＜（６）縮合工程＞を含む。
- [0158] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（２）脱保護工程＞、＜（３）中和工程＞、＜（５）縮合前の洗浄工程＞、及び＜（６）縮合工程＞を含む。
- [0159] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、
＜（１）脱保護工程前の洗浄工程＞、
＜（２）脱保護工程＞、
＜（３）中和工程＞、
＜（４）中和工程後の洗浄工程＞、
＜（５）縮合前の洗浄工程＞、
＜（６）縮合工程＞、
＜（７）縮合工程後の洗浄工程１＞、及び
＜（８）縮合工程後の洗浄工程２＞
を含む。
- [0160] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、＜（５）縮合前の洗浄工程＞を含まない。
- [0161] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、
＜（１）脱保護工程前の洗浄工程＞、
＜（２）脱保護工程＞、
＜（３）中和工程＞、
＜（４）中和工程後の洗浄工程＞、
＜（６）縮合工程＞、
＜（７）縮合工程後の洗浄工程１＞、及び
＜（８）縮合工程後の洗浄工程２＞
を含む。
- [0162] 本発明の一態様では、本発明の製造方法は、場合により＜キャッピング工程＞を含まない。

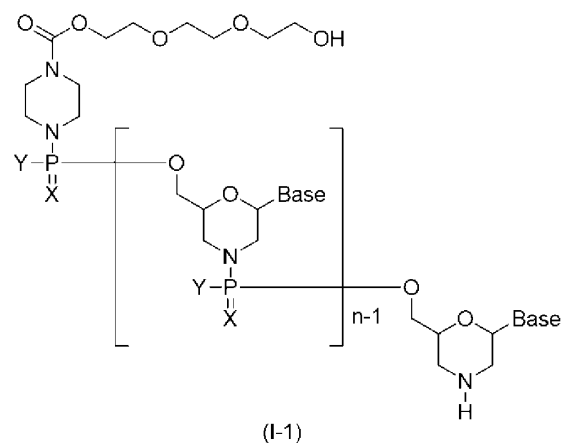
[0163] 本発明のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法によれば、式 (1) :

[化76]



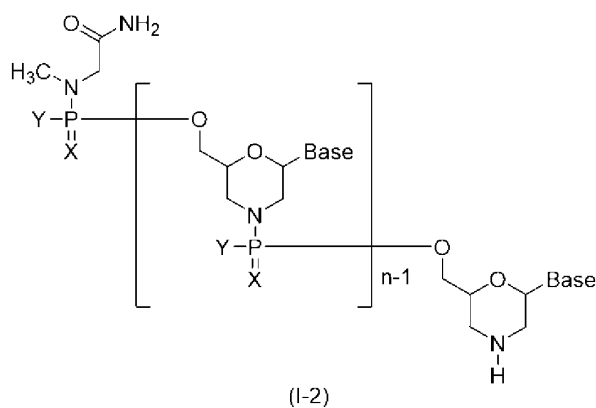
[式中、Base、X、Y、nは、前記の通りである] のモルホリノ核酸オリゴマー、式 (1-1) :

[化77]



[式中、Base、X、Y、nは、前記の通りである] のモルホリノ核酸オリゴマー、例えば、或いは、式 (1-2) :

[化78]

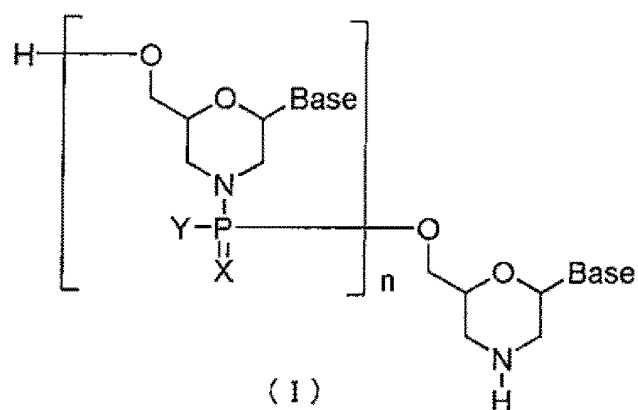


[式中、Base、X、Y、nは、前記の通りである] のモルホリノ核酸オリゴマー

を得ることができる。

[0164] 本発明の一態様において、式(1)：

[化79]

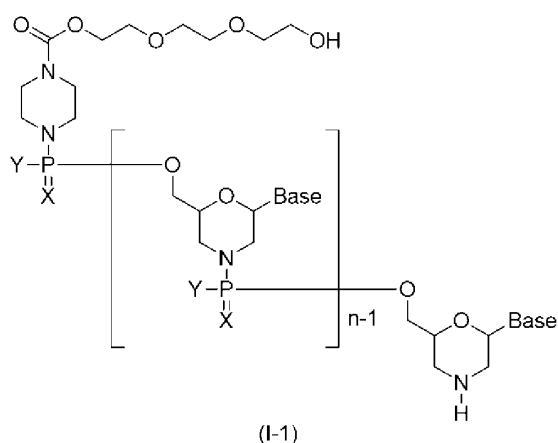


[式中、Base、X、Y、nは、前記の通りである] のモルホリノ核酸オリゴマーは、例えば、国際公開公報 (WO2012/029986、WO2013/100190、WO2015/137409、WO2015/194520、WO2017/047707、WO2021/132591、WO2021/172498等) に記載されているか、または当該国際公開公報の記載に基づいて当業者が認識し得る phosphorodi amida

te mopholino oligomer (PMO) であり、好ましくはヒトジストロフィン遺伝子の 51、53、45、55、44、及び 50 番目のエクソンからなる群より選択される少なくとも一つをスキッピングし得る phosphorodiamidate mopholino oligomer (PMO) であり、具体的には、Viltepsa (WO2012/029986 を参照；CAS 登録番号：2055732-84-6) が挙げられる。

[0165] 本発明の一態様において、式 (1-1) :

[化80]

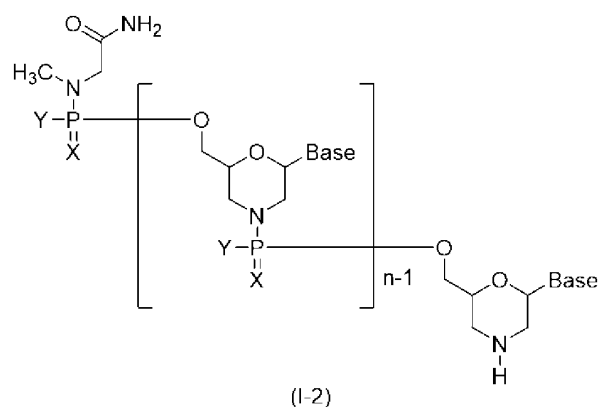


[式中、Base、X、Y、nは、前記の通りである] のモルホリノ核酸オリゴマーは、例えば、国際公開公報（WO2001/083740、WO2006/000057、WO 2010/048586、WO2010/050801、WO2011/057350、WO2014/144978、WO2014/153240等）に記載されているか、または当該国際公開公報の記載に基づいて当業者が認識し得る phosphorodiamidate morpholino oligomer（PMO）であり、好ましくはヒトジストロフィン遺伝子の51、53、45、55、44、及び50番目のエクソンからなる群より選択される少なくとも一つをスキッピングし得る phosphorodiamidate morpholino oligomer（PMO）であり、具体的には、Eteplirsen（W

02006/000057、WO2010/050801、WO2014/144978を参照；CAS登録番号：1173755-55-9）、Golodirsen（WO2001/083740、WO2006/000057を参照；CAS登録番号：1422959-91-8）、Casimersen（WO2001/083740、WO2006/000057、WO2011/057350を参照；CAS登録番号：1422958-19-7）が挙げられる。

[0166] 本発明の一態様において、本発明の製造方法により得られるモルホリノ核酸オリゴマーとしては、式（I-2）：

[化81]



〔式中、Base、X、Y、nは、前記の通りである〕のモルホリノ核酸オリゴマーが挙げられる。

実施例

[0167] 参考例1：モルホリノモノマー化合物

モルホリノモノマー化合物の構造式と略称を表2に示す。A^p、C^p、T^pは、市販品を使用するか、または当該技術分野において通常使用される方法で調製した（WO2008/008113を参照）。G^{CE}及びG^{POB}は、当該技術分野において通常使用される方法で調製した（WO2012/043730、WO2009/064471を参照）。

[0168]

[表2]

モルホリノモノマー化合物

構造式			
略称	A ^P	C ^P	T ^P
構造式			
略称	G ^{CE}	G ^{POB}	

[0169] 参考例2：4－{〔（2S，6R）－6－（4－ベンズアミド－2－オキソピリミジン－1－イル）－4－トリチルモルホリン－2－イル〕メトキシ}－4－オキソブタン酸の調製

4－{〔（2S，6R）－6－（4－ベンズアミド－2－オキソピリミジン－1－イル）－4－トリチルモルホリン－2－イル〕メトキシ}－4－オキソブタン酸は、当該技術分野において通常使用される方法で調製した（WO 2012/043730を参照）。

[0170] 参考例3：アミノメチルポリスチレン樹脂に担持された4－{〔（2S，6R）－6－（4－ベンズアミド－2－オキソピリミジン－1－イル）－4－トリチルモルホリン－2－イル〕メトキシ}－4－オキソブタン酸の調製

アミノメチルポリスチレン樹脂（渡辺化学工業社製）10.0gをピリジン130mLに入れ、参考例2で調製した4－{〔（2S，6R）－6－（4－ベンズアミド－2－オキソピリミジン－1－イル）－4－トリチルモルホリン－2－イル〕メトキシ}－4－オキソブタン酸12.1g、1－エチル－3－（3－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩17.3g、および4－DMAP 2.7gを加え、ピリジン10mLで洗いこんだ。次

いで、トリエチルアミン 15.3 mL、およびピリジン 20 mL を加え、室温で 1 日間攪拌した。反応後、樹脂をろ取した。得られた樹脂をピリジン、ジクロロメタン、メタノール、テトラヒドロフランの順で洗浄した。得られた樹脂にテトラヒドロフラン 125 mL、2,6-ルチジン 15.6 mL、ベンゾイルクロリド 12.7 g を加え、室温で 1 時間攪拌した。樹脂をろ取し、テトラヒドロフラン、メタノール、ジクロロメタンの順で洗浄し、減圧乾燥し、13.6 g の標記化合物を得た。

当該目的物のローディング量は、公知の方法を用いて、樹脂 1 g 当たりのトリチルのモル量を 409 nm における UV 吸光度を測定することにより決定した。樹脂のローディング量は、 $550 \mu\text{mol/g}$ であった。

[0171] UV 測定条件

機器：U-2910（日立製作所）

溶媒：メタンスルホン酸

波長：409 nm

ϵ 値：45000

[0172] 実施例 1：オリゴマーの調製

塩基配列が 5' - CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC - 3' である、モルホリノ核酸オリゴマーの合成

[0173] 1. 伸長反応

アミノメチルポリスチレン樹脂に担持された 4 - { [(2S, 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸（参考例 3）3.0 g (1.7 mmol) を反応槽に移し入れ、表 3 の合成サイクルを開始した。なお、伸長反応合成サイクル数は合成する鎖長に対応する数と定義した。モルホリノ核酸オリゴマーの塩基配列が 5' - CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC - 3' になるように、各縮合工程において、直前の伸長反応合成サイクルで得られたオリゴマーに対して、モルホリノモノマー化合物を 1.3 ~ 2.2 モル当量で使用した。

[0174] [表3]

伸長反応合成サイクルの詳細（実施例1）

ステップ	工程	試薬（溶液）	工程繰り返し回数	時間／工程
1	洗浄	洗浄溶液1	1回	5分
2	脱保護	脱保護溶液1	4～7回	5分
3	中和	中和溶液1	3回	5分
4	洗浄	洗浄溶液2	2回	5分
5	洗浄	洗浄溶液3	2回	5分
6	縮合	縮合溶液1 (モルホリノモノマー化合物+前処理液1)	1回	6時間～18時間
7	洗浄	洗浄溶液2	1回	5分
8	洗浄	洗浄溶液1	2回	5分

[0175] 洗浄溶液1として、30%2, 2, 2-トリフルオロエタノール（TFE）／ジクロロメタン（DCM）（DCM中に30%でTFEを含有する）を使用した。

洗浄溶液2として、DCMを使用した。

洗浄溶液3として、後に述べる前処理液1を使用した。

[0176] 脱保護溶液1として、トリフルオロ酢酸（1, 2当量）とトリエチルアミン（1当量）の混合物を5%（w/v）になるように、1%（v/v）のトリイソプロピルシラン（TIPS）と20%（v/v）のTFEを含有するDCM溶液で溶解したものをを使用した。

[0177] 中和溶液1として、イソプロピルアルコール（IPA）／N, N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）／DCM（353：75：1065（v/v）の比）を使用した。

[0178] 前処理液1として、N-エチルモルホリン（NEM）を含む1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン（DMI）の混合物を使用した（DMI中の5～6%NEM溶液（v/v））。

[0179] モルホリノモノマー化合物として、表1に記載のA_P、C_P、T_P、及びG^{CE}を用いた。モルホリノモノマー化合物を前処理液1に溶解し、前処理液1中の0.10～0.14Mモルホリノモノマー化合物溶液（縮合溶液1）を調製し、縮合溶液1として使用した。

[0180] <塩基配列が5' - CCTCCGGTTCTGAAGGTG - 3' である18merの調製におけるステップ5～7>

[0181] ステップ5

ステップ4の後、反応容器中の塩基配列が5' - CCTCCGGTTCTGAAGGT - 3' である17merのオリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂に、洗浄溶液3（DMI中の5.3% NEM溶液（v/v））を25mL加え、5分間攪拌し、そして反応容器中の溶液を排液した。続いて反応容器に洗浄溶液3を25mL加え、5分間攪拌し、溶液を排液した。

[0182] ステップ6

ステップ5の後、反応容器に、縮合溶液1（前処理液1中の0.12M G^{CE}溶液）を25mL加え、そして18時間攪拌した。

[0183] ステップ7

ステップ6の後、反応容器中の溶液を排液した。続いて反応容器に洗浄溶液2を50mL加え、5分間攪拌し、そして反応容器中の溶液を排液した。

[0184] 2. 乾燥工程

上記で合成したモルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂をDCMで2回洗浄して反応容器から回収し、6時間60℃で減圧乾燥した。モルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂を14.6g得た。

[0185] 実施例2

1. 伸長反応

アミノメチルポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S, 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸（参考例3と同様の方法で合成）3.0g（1.5mmol）を反応槽に移し入れ、表4の合成サイクルを開始した。なお、伸長反応合成サイクル数は合成する鎖長に対応する数と定義した。モルホリノ核酸オリゴマーの塩基配列が5' - CCT

CCGGTTCTGAAGGTGTTC-3' になるように、各縮合工程において、直前の伸長反応合成サイクルで得られたオリゴマーに対して、モルホリノモノマー化合物を1.3〜2.2モル当量で使用した。

実施例2では、実施例1のステップ5に換えて窒素ガスで反応器を置換した。具体的には、ステップ4の後、排液を行った後に、フィルターリアクターのフィルター下部に窒素バルーンを装着し、コックを開き、窒素通気を2回実施した。

[0186] [表4]

伸長反応合成サイクルの詳細（実施例2）				
ステップ	工程	試薬（溶液）	工程繰り返し回数	時間／工程
1	洗浄	洗浄溶液1	1回	5分
2	脱保護	脱保護溶液1	4〜7回	5分
3	中和	中和溶液1	3回	5分
4	洗浄	洗浄溶液2	2回	5分
5	縮合	縮合溶液2	1回	3時間〜6時間
6	洗浄	洗浄溶液2	1回	5分
7	キャッピング	キャッピング溶液1	1回	10分
8	洗浄	洗浄溶液2	1回	5分
9	洗浄	洗浄溶液1	2回	5分

[0187] 洗浄溶液1として、30%2,2,2-トリフルオロエタノール（TFE）／ジクロロメタン（DCM）（DCM中に30%でTFEを含有する）を使用した。

洗浄溶液2として、DCMを使用した。

[0188] 脱保護溶液1として、トリフルオロ酢酸（1.2当量）とトリエチルアミン（1当量）の混合物を5%（w／v）になるように、1%（v／v）のトリイソプロピルシラン（TIPS）と20%（v／v）のTFEを含有するDCM溶液で溶解したものを使用した。

[0189] 中和溶液1として、イソプロピルアルコール（IPA）／N,N-ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）／DCM（353：75：1065（v／v）の比）を使用した。

[0190] モルホリノモノマー化合物として、表1に記載のA_P、C_P、T_P、及びG^{CE}を用いた。モルホリノモノマー化合物をDMI中の5〜6%DIEA溶液

(v/v) に溶解し、0.10~0.13 M モルホリノモノマー化合物溶液（縮合溶液 2）を調製し、縮合溶液 2 として使用した。

[0191] キャッピング溶液 1 として、無水酢酸/DIPEA/DCM の混合物（0.5 : 1.25 : 98.25 (v/v) の比）を使用した。

[0192] <塩基配列が 5' - CCTCCGGTTCTGAAGGTG - 3' である 18mer の調製におけるステップ 2~7>

[0193] ステップ 2

ステップ 1 の後、反応容器中の塩基配列が 5' - CCTCCGGTTCTGAAGGT - 3' であり末端がトリチル基で保護されている、17mer のオリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂に、脱保護溶液 1 を 45 mL 加え、5 分間攪拌し、そして反応容器中の溶液を排液した。この工程をさらに 5 回繰り返した。

[0194] ステップ 3

ステップ 2 の後、反応容器に、中和溶液 1 を 50 mL 加え、5 分間攪拌し、そして反応容器中の溶液を排液した。この工程をさらに 2 回繰り返した。

[0195] ステップ 4

ステップ 3 の後、反応容器に、洗浄溶液 2 を 50 mL 加え、5 分間攪拌し、そして反応容器中の溶液を排液した。この工程をさらに 1 回繰り返した。

[0196] ステップ 5

ステップ 4 の後、反応容器を窒素置換で置換した後、し、縮合溶液 2（DMI 中の 5.3% DIPEA 溶液（v/v）中の 0.12 M GCE 溶液）を 25 mL 加え、そして 6 時間攪拌した。

[0197] ステップ 6

ステップ 5 の後、反応容器中の溶液を排液した。続いて反応容器に洗浄溶液 2 を 50 mL 加え、5 分間攪拌し、そして溶液を排液した。

[0198] ステップ 7

ステップ 6 の後、反応容器中の溶液を排液した。続いて反応容器にキャッピング溶液 1 を 50 mL 加え、10 分間攪拌し、そして溶液を排液した。

[0199] 2. 乾燥工程

上記で合成したモルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂をDCMで3回洗浄して反応容器から回収し、6時間60℃で減圧乾燥した。モルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂を11.7g得た。

[0200] 比較例1：オリゴマーの調製

塩基配列が5' - CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC - 3' であるモルホリノ核酸オリゴマーの合成

[0201] 1. 伸長反応

参考例2と同様の方法にて調製した、アミノメチルポリスチレン樹脂に担持された4 - { [(2S, 6R) - 6 - (4 - ベンズアミド - 2 - オキソピリミジン - 1 - イル) - 4 - トリチルモルホリン - 2 - イル] メトキシ } - 4 - オキソブタン酸（樹脂のローディング量は、458 $\mu\text{mol/g}$ ）50g（23mmol）を反応槽に移し入れ、表5の合成サイクルを開始した。モルホリノ核酸オリゴマーの塩基配列が5' - CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC - 3' になるように、各縮合工程において、直前の伸長反応合成サイクルで得られたオリゴマーに対して、モルホリノモノマー化合物を2.0～3.0モル当量で使用した。

[0202] [表5]

伸長反応合成サイクルの詳細（比較例1）

ステップ	工程	試薬（溶液）	工程繰り返し回数	時間／工程
1	脱保護	脱保護溶液2	3～8回	5分
2	中和	中和溶液2	4～5回	2分
3	洗浄	洗浄溶液2	3回	1分
4	洗浄	洗浄溶液4	1回	5分
5	縮合	縮合溶液2 （モルホリノモノマー化合物＋前処理液2）	1回	3時間～8時間
6	洗浄	洗浄溶液2	3回	1分
7*	キャッピング	キャッピング溶液	2回	3分
8	洗浄	洗浄溶液2	3回	1分

*最終の伸長反応合成サイクルではキャッピング工程を実施しない。

- [0203] 洗浄溶液 2 として、DCM を使用した。
- 洗浄溶液 4 として、後に述べる前処理液 2 を使用した。
- [0204] 脱保護溶液 2 として、トリフルオロ酢酸（2 当量）とトリエチルアミン（1 当量）の混合物を 3%（w/v）になるように、1%（v/v）のエタノールと 10%（v/v）の TFE を含有する DCM 溶液で溶解したものを使用した。
- [0205] 中和溶液 2 として、IPA/DIPEA/DCM（25：5：70（v/v）の比）を使用した。
- [0206] 前処理液 2 として、DIPEA/DMI の混合物（10：90（v/v）の比）を使用した。
- [0207] モルホリノモノマー化合物として、表 1 に記載の A^p、C^p、T^p、及び G^{CE} を用いた。モルホリノモノマー化合物を前処理液 2 に溶解し、前処理液 2 中の 0.16 M モルホリノモノマー化合物溶液（縮合溶液 2）を調製し、そして縮合溶液 2 として使用した。
- [0208] キャッピング溶液として、無水酢酸／2，6-ルチジン／DCM の混合物（20：30：50（v/v）の比）を使用した。
- [0209] 2. 乾燥工程
- 上記で合成したモルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂を反応容器から回収し、2 日間室温で減圧乾燥した。モルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂を 258.0 g 得た。
- [0210] 試験例 1 実施例 1 及び実施例 2 で調製したモルホリノ核酸オリゴマーと、比較例 1 で調製したモルホリノ核酸オリゴマーとの比較
- 塩基配列が 5' - CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC - 3' であるモルホリノ核酸オリゴマーを伸長反応で合成し、乾燥して得られた実施例 1 及び比較例 1 のモルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂を、それぞれおよそ 30 mg ずつ反応容器に入れ、脱保護溶液 1 を 0.75 mL 加えて室温で 40 分間反応した。脱保護溶液 1 を除去し

、樹脂を中和溶液 1 およびジクロロメタンで洗浄し、室温で減圧乾燥した。乾燥後の樹脂に 28%アンモニア水-エタノール（4/1）を加え、室温で 17 時間攪拌した。上澄み液を希釈して HPLC（C18 イオンペア分析）に供し、当該未精製の混合物中のモルホリノ核酸オリゴマーの純度を測定した。

実施例 1 及び実施例 2 で調製したモルホリノ核酸オリゴマーと、比較例 1 で調製したモルホリノ核酸オリゴマーとの比較により、実施例 1 及び 2 の製造方法によって、モルホリノ核酸オリゴマーの純度が向上することを確認した。

[0211] [表6]

モルホリノオリゴマーの純度

	モルホリノ核酸オリゴマーの純度
実施例 1	68.5%
実施例 2	62.9%
比較例 1	57.5%

[0212] 試験例 2 実施例 1 で調製したモルホリノ核酸オリゴマーと、比較例 1 で調製したモルホリノ核酸オリゴマーとの縮合反応収率の比較

実施例 1 の 1. 伸長反応の各伸長サイクル実施後に、モルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂を少量採取し、40%メチルアミン-メタノール溶液/水混合液を添加して、65℃で 10 分間反応して樹脂から切り出した。同様に、比較例 1 の 1. 伸長反応の各伸長サイクル実施後に、モルホリノ核酸オリゴマーが担持されたアミノメチルポリスチレン樹脂を少量採取し、28%アンモニア水-エタノール混合液を添加して 55℃で終夜反応して樹脂から切り出した。それぞれの上澄み液を希釈して HPLC（C18 イオンペア分析）に供し、縮合反応収率を以下の式に従い算出した。

[0213] 縮合反応収率 (%) = 100 - 原材料*のピーク面積値 ÷ (原材料のピーク

面積値+縮合反応後の主ピーク面積値)

[0214] *原材料とは、末端にトリチル基を持たず、縮合反応により得られる鎖長よりも1残基短い鎖長のモルホリノ核酸オリゴマーをいう。

[0215] 実施例1は比較例1より、縮合反応収率が改善された。

[0216] <略語>

T F E : 2, 2, 2-トリフルオロエタノール

D C M : ジクロロメタン

T F A : トリフルオロ酢酸

T E A : トリエチルアミン

T I P S : トリイソプロピルシラン

I P A : イソプロピルアルコール

D I P E A : N, N-ジイソプロピルエチルアミン

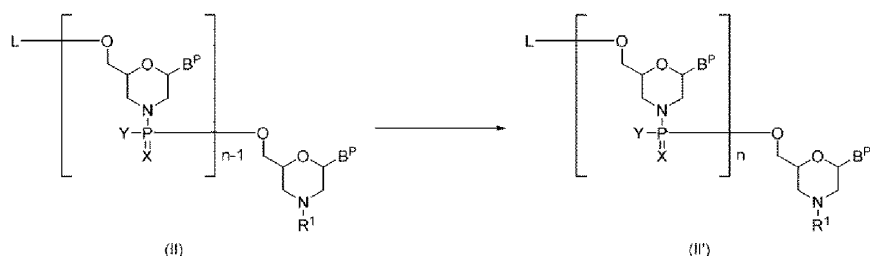
N E M : N-エチルモルホリン

D M I : 1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン

請求の範囲

[請求項1] モルホリノ核酸オリゴマーの伸長反応：

[化1]



[式中、

B^P は、独立して、保護されていてもよい核酸塩基であり；

R^1 は、トリチル、モノメトキシトリチル、又はジメトキシトリチルであり；

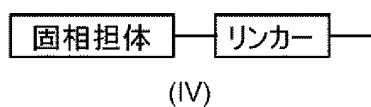
X は、O又はSであり；

Y は、ジアルキルアミノ、又はアルコキシであり；

n は、1～99の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、15～30の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、18～28の範囲内にある任意の整数であり；

L は、水素、アシル、又は式(IV)：

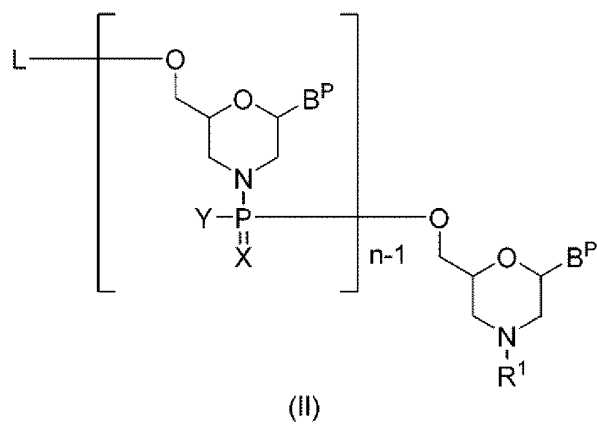
[化2]



で表される基である]において、

式(II)：

[化3]

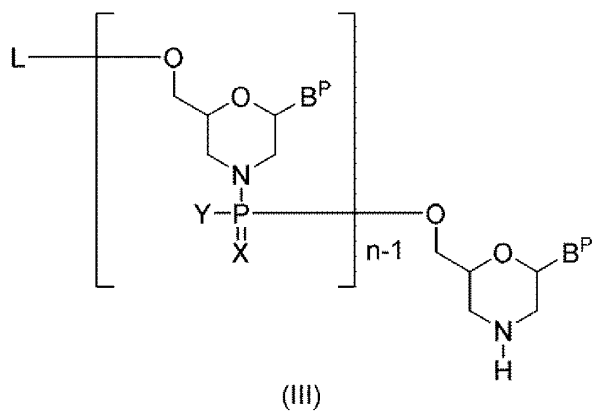
[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式(II)の化合物よりR¹を除去して、

式(III)：

[化4]

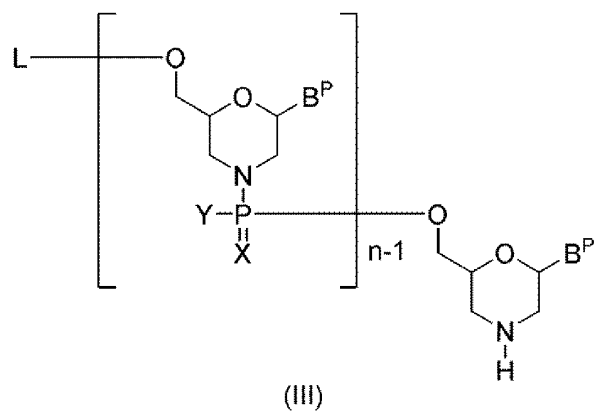
[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物にする工程を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[請求項2]

更に、式(III)：

[化5]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

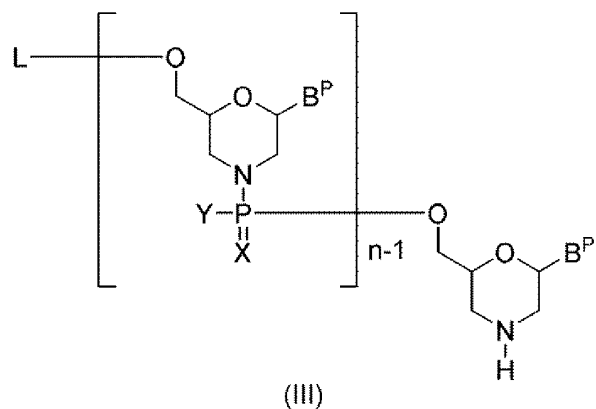
の化合物を、

塩基、アルコール類、及びハロゲン溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、請求項1に記載の製造方法。

[請求項3]

更に、式(III)：

[化6]



[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

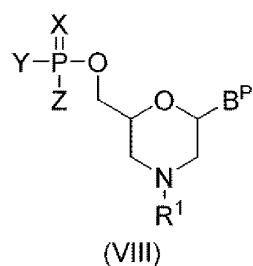
の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、請求項1又は2に記載の製造方法。

[請求項4]

更に、式(VIII)：

[化7]



[式中、B^P、X、Y、及びR¹は、前記の通りであり、Zは、ハロゲンである]

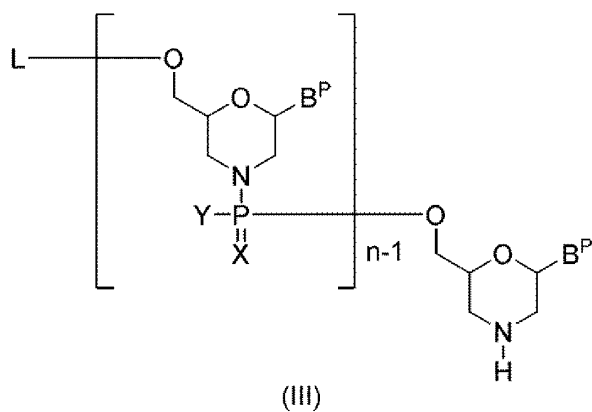
の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項5]

更に、式(III)：

[化8]

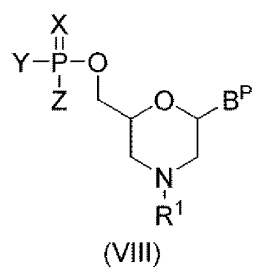


[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物と、有機アミンの存在下、

式(VIII)：

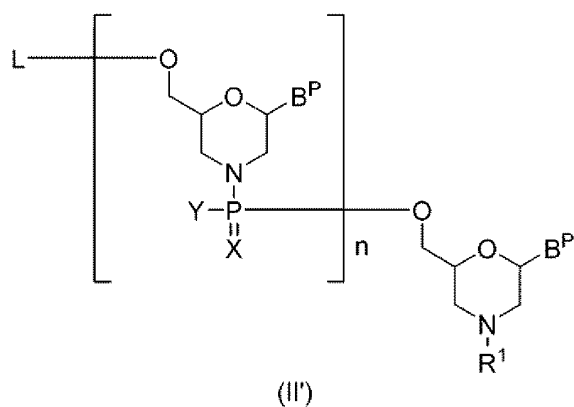
[化9]



[式中、X、Y、Z、B^P及びR¹は、前記の通りである] の化合物
を反応させて、

式 (I I ') :

[化10]



[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]
の化合物とする工程を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の製
造方法。

[請求項6] 更に、式 (I I ') :

[化11]

$$\left[\begin{array}{c} \text{L} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{B}^{\text{P}}) - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{P}(\text{Y})(\text{X})) - \text{CH}_2 - \text{O} - \end{array} \right]_n \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{B}^{\text{P}}) - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}^1) - \text{CH}_2 - \text{O} -$$

[式中、 L 、 B^p 、 X 、 Y 、 R^1 、及び n は、前記の通りである]

の化合物を

アルコール類及び／又はハロゲン溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項7]

モルホリノ核酸オリゴマーの伸長反応：

[化12]

$$\begin{array}{ccc} \text{L}-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{B}^{\text{P}})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{Y})(\text{X})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O} \right]_{n-1} & \longrightarrow & \text{L}-\left[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{B}^{\text{P}})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(\text{Y})(\text{X})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{R}^1)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O} \right]_n \\ \text{(II)} & & \text{(II')} \end{array}$$

[式中、

B^Pは、独立して、保護されていてもよい核酸塩基であり；

R¹は、トリチル、モノメトキシトリチル、又はジメトキシトリチルであり；

Xは、0又はSであり；

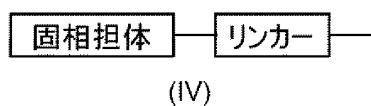
Yは、ジアルキルアミノ、又はアルコキシであり；

n は、1 ～ 99 の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、1

5～30の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、18～28の範囲内にある任意の整数であり；

Lは、水素、アシル、又は式（IV）：

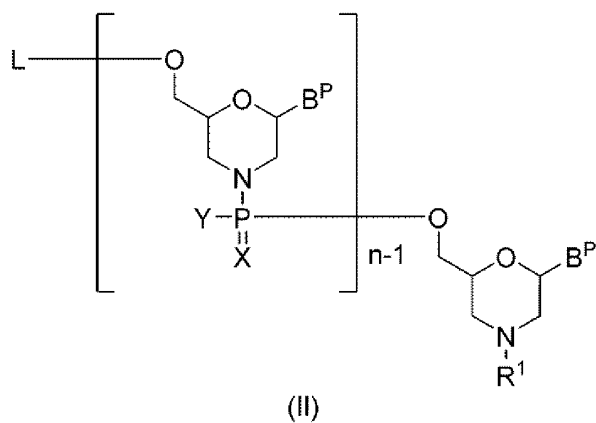
[化13]



で表される基である」において、

式（I I）：

[化14]



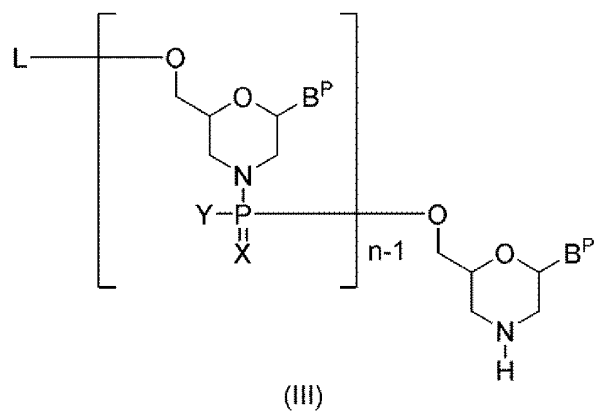
[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式（I I）の化合物よりR¹を除去して、

式（I I I）：

[化15]

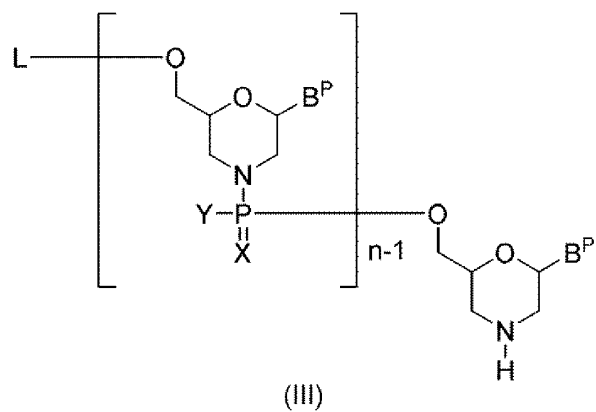


[式中、 L 、 B^P 、 X 、 Y 、及び n は、前記の通りである]

の化合物にする工程、

式 (III) :

[化16]



[式中、 L 、 B^P 、 X 、 Y 、及び n は、前記の通りである]

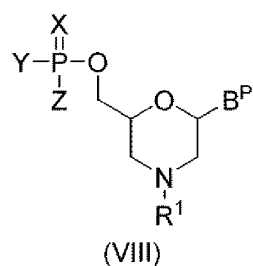
の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程、

そして

式 (V) :

[化17]



[式中、 B^P 、 X 、 Y 、 Z 、及び R^1 は、前記の通りである]

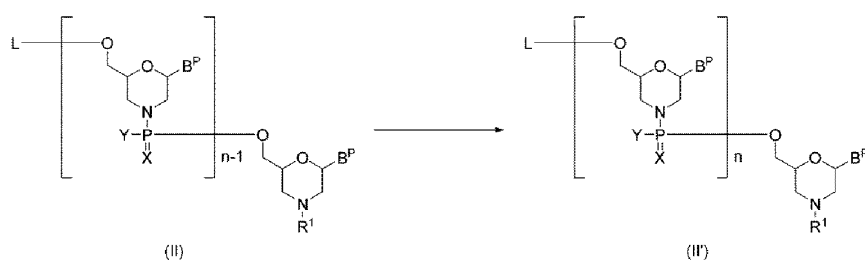
の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[請求項8]

モルホリノ核酸オリゴマーの伸長反応：

[化18]



[式中、

B^P は、独立して、保護されていてもよい核酸塩基であり；

R^1 は、トリチル、モノメトキシトリチル、又はジメトキシトリチルであり；

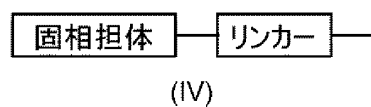
X は、 O 又は S であり；

Y は、ジアルキルアミノ、又はアルコキシであり；

n は、1～99の範囲内にある任意の整数であり、好ましくは、15～30の範囲内にある任意の整数であり、更に好ましくは、18～28の範囲内にある任意の整数であり；

L は、水素、アシル、又は式(IV)：

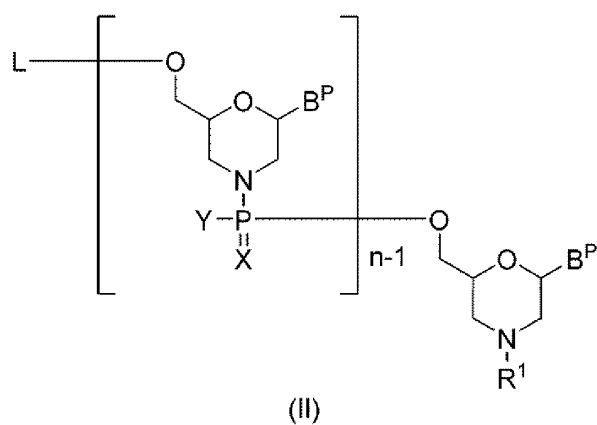
[化19]



で表される基である」において、

式 (I I) :

[化20]



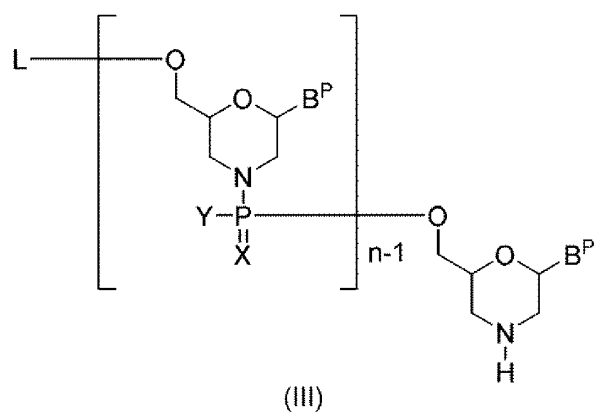
[式中、L、B^P、X、Y、R¹、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

酸及びスカベンジャーを含む溶液で処理して、式 (I I) の化合物よりR¹を除去して、

式 (I I I) :

[化21]

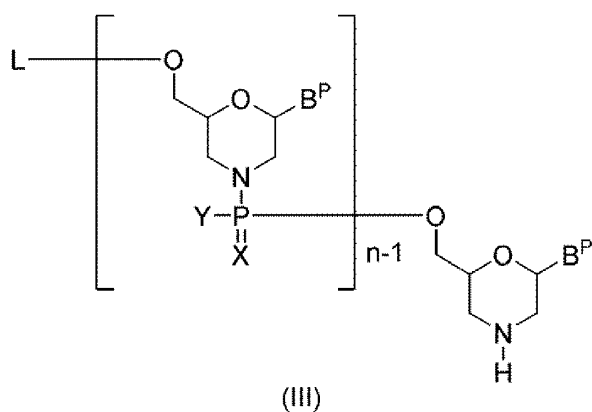


[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物にする工程、

式 (I I I) :

[化22]

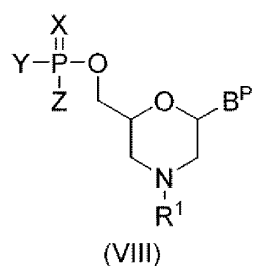


[式中、L、B^P、X、Y、及びnは、前記の通りである]

の化合物を、

式 (V I I I) :

[化23]



[式中、B^P、X、Y、Z、及びR¹は、前記の通りである]

の化合物を、

有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液で処理する工程を含む、モルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

[請求項9]

前記酸及びスカベンジャーを含む溶液が、トリフルオロ酢酸及びトリイソプロピルシランを含む溶液である、請求項1～8のいずれか一項に記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。

- [請求項10] 前記酸及びスカベンジャーを含む溶液が、トリフルオロ酢酸、トリエチルアミン、トリイソプロピルシラン、2, 2, 2-トリフルオロエタノール、及びジクロロメタンを含む溶液である、請求項1～9のいずれか一項に記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。
- [請求項11] 前記有機アミン及び非プロトン性極性溶媒を含む溶液が、N-エチルモルホリン及び1, 3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、請求項1～9のいずれか一項に記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。
- [請求項12] 前記固相担体が、膨潤性ポリスチレン、非膨潤性ポリスチレン、PEG鎖結合型ポリスチレン、定孔ガラス、オキサリル化一定孔ガラス、TentaGel支持体-アミノポリエチレングリコール誘導体化支持体、又はPoros-ポリスチレン/ジビニルベンゼンのコポリマーである、請求項1～11のいずれか一項に記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。
- [請求項13] 前記リンカーが、短鎖アルキレン、長鎖アルキレン、アミノ-短鎖アルキレン、アミノ-長鎖アルキレン、ジアシル短鎖アルキレン（例えば、スクシニル）、ジアシル長鎖アルキレン、又はジアルキレンスルホニルである、請求項1～12のいずれか一項に記載のモルホリノ核酸オリゴマーの製造方法。