

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7699581号
(P7699581)

(45)発行日 令和7年6月27日(2025.6.27)

(24)登録日 令和7年6月19日(2025.6.19)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 H	21/02 (2006.01)	C 0 7 H	21/02
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/20 (2006.01)	A 6 1 K	47/20
A 6 1 K	31/7125(2006.01)	A 6 1 K	31/7125

請求項の数 13 (全29頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-515301(P2022-515301)
 (86)(22)出願日 令和3年3月31日(2021.3.31)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2021/014017
 (87)国際公開番号 WO2021/210409
 (87)国際公開日 令和3年10月21日(2021.10.21)
 審査請求日 令和5年12月20日(2023.12.20)
 (31)優先権主張番号 特願2020-72234(P2020-72234)
 (32)優先日 令和2年4月14日(2020.4.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73)特許権者 000002093
 住友化学株式会社
 東京都中央区日本橋二丁目7番1号
 (74)代理人 100145403
 弁理士 山尾 憲人
 (74)代理人 100150500
 弁理士 森本 靖
 (72)発明者 森山 悠也
 大阪府大阪市西淀川区歌島三丁目1番2
 1号 住友化学株式会社内
 審査官 松澤 優子

最終頁に続く

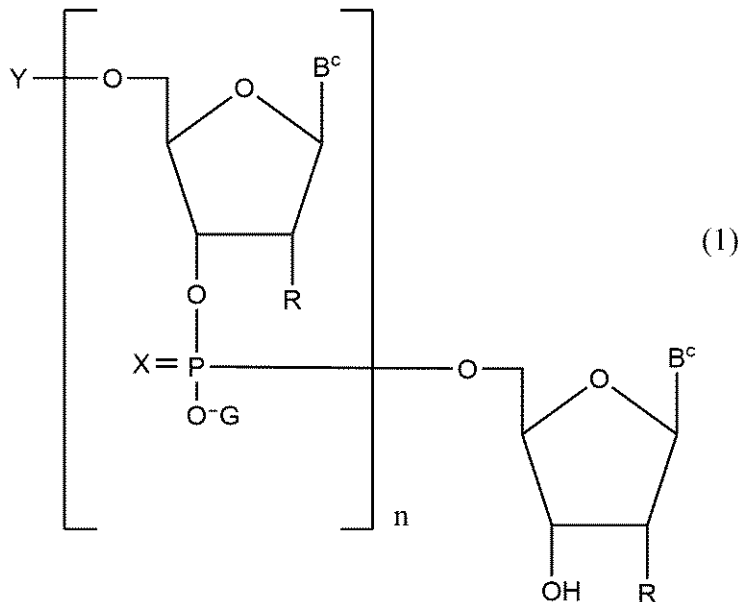
(54)【発明の名称】 核酸オリゴマーを含む組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(1)：

【化1】



(式中、

B^C は、それぞれ独立して同一又は相異なる核酸塩基を表し、

R は、それぞれ独立して同一又は相異なって、水素原子、フッ素原子または OQ 基を表し、

Q は、それぞれ独立して同一又は相異なって、水素原子、メチル基、2-メトキシエチル基、リボースの4'位の炭素原子と結合しているメチレン基、リボースの4'位の炭素原子と結合しているエチレン基、またはリボースの4'位の炭素原子と結合しているエチリデン基を表し、

X は、それぞれ独立して同一又は相異なって、酸素原子または硫黄原子を表し、

Y は、水素原子または水酸基の保護基を表し、

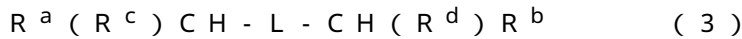
G は、アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、アルカリ金属イオン、水素イオンまたはヒドロキシアルキルアンモニウムイオンを表し、

n は、式(2)：

$$1 \leq n \leq 10 \quad (2) \text{ を満たす整数である。}$$

で示されるホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーの精製前の生成物を、アルキルアンモニウム塩、水溶性有機溶媒、及び水を含有する移動相を用いた逆相カラムクロマトグラフィー処理することにより得られたカラム溶出液と、添加剤とを含む組成物であって、該添加剤が、下記式(3)または(4)で表される化合物からなる群から選ばれる少なくとも一つの化合物を含む添加剤である、組成物。

式(3)：



(式中、

L は、 $-S-$ 、または $-SS-$ を表し、

R^a および R^b は、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、または下記の Z^1 および Z^2 からなる群から選ばれる少なくとも一つの基で置換されていてもよい $C1-6$ のアルキル基を表し、



(Z^1 および Z^2 において、

R^1 は、水素原子、アミノ基の保護基、または $C(O)-R^{11}$ 基を表し、

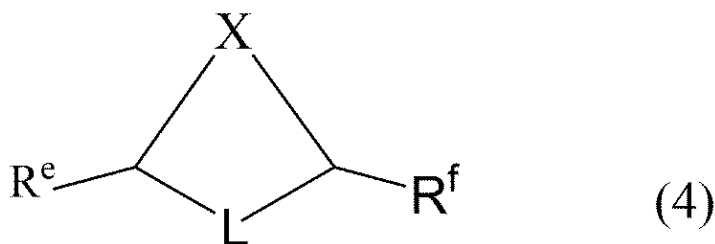
R^{11} は、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも一つの基で置換されていてもよい $C1-6$ のアルキル基、またはアミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも一つの基で置換されていてもよいフェニル基を表し、

R^2 は、保護されていてもよいカルボキシル基で置換されていてもよい $C1-6$ のアルキルイミノ基、または $-OR^{20}$ 基 (R^{20} は、水素原子またはカルボキシル基の保護基を表す。)を表し、

R^c および R^d は、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、または $C1-6$ のアルキル基を表す。)で示される化合物、

式(4)：

【化2】



(式中、

L は、前記と同じ意味を有し、

10

20

30

40

50

R^e および R^f は、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、C 1 - 6 アルコキシ - カルボニル基、カルボキシル基、または C 1 - 6 アルコキシカルボニル基またはカルボキシル基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、

X、L およびそれらが結合する炭素原子は、5 員もしくは 6 員の環構造を形成し、そして、

X は、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $(CH_3)CHCH_2$ 、 $(CH_3CH_2)CHCH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、 $(CH_3)CHCH_2CH_2$ 、 $CH_2(CH_3)CHCH_2$ 、 $CH=N$ 、 $(CH_3)C=N$ 、 CH_2NH 、 $(CH_3)CHNH$ 、 $(CH_3)_2CNH$ 、 $(COOH)CHNH$ 、 CH_2OCH_2 、 CH_2NHCH_2 、および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す。) で示される化合物。

10

【請求項 2】

R^1 が、水素原子、アミノ基の保護基、または $C(O) - R^{11}$ 基を表し、

R^{11} は、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、そして、

X が、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $(CH_3)CHCH_2$ 、 $(CH_3CH_2)CHCH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、 $(CH_3)CHCH_2CH_2$ 、 $CH_2(CH_3)CHCH_2$ 、 $CH=N$ 、 $(CH_3)C=N$ 、 CH_2NH 、 $(CH_3)CHNH$ 、 $(COOH)CHNH$ 、 CH_2OCH_2 および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

R^1 が、水素原子、ベンゾイル基、4 - メトキシベンゾイル基、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、フェニルアセチル基、フェノキシアセチル基、4 - tert - ブチルフェノキシアセチル基、4 - イソプロピルフェノキシアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル基、または $C(O) - R^{11}$ 基を表し、

20

R^{11} が、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、

R^2 が、メチル基、ベンジル基、アリル基および tert - ブチル基で保護されていてもよいカルボキシル基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキルイミノ基、または $-OR^{20}$ 基 (R^{20} は、水素原子、メチル基、ベンジル基、アリル基または tert - ブチル基を表す。) を表し、そして、

30

X が、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $(CH_3)CHCH_2$ 、 $(CH_3CH_2)CHCH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、 $(CH_3)CHCH_2CH_2$ 、 $CH_2(CH_3)CHCH_2$ 、 $CH=N$ 、 $(CH_3)C=N$ 、 CH_2NH 、 $(COOH)CHNH$ 、 CH_2OCH_2 、および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

R^e および R^f が、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、カルボキシル基、または、C 1 - 6 のアルキル基を表し、そして、

X が、 CH_2 、 $(CH_3)C=N$ 、 CH_2NH 、 CH_2OCH_2 、および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

40

R^1 が、水素原子、ベンゾイル基、ホルミル基、アセチル基、ベンジルオキシカルボニル基および 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル基、または $C(O) - R^{11}$ 基を表し、

R^{11} が、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、そして、

R^2 が、メチル基で保護されていてもよいカルボキシル基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキルイミノ基、または $-OR^{20}$ 基 (R^{20} は、水素原子またはメチル基を表す。) を表す、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

添加剤が、

50

- リポ酸、
 メチオニン、
 N - ホルミル - メチオニン、
 N - アセチル - メチオニン、
 N - ベンゾイル - メチオニン、
 N - カルボベンゾキシ - メチオニン、
 N - F m o c - メチオニン、
 メチオニンメチル塩酸塩、
 ジブチルスルフィド、
 ジヘキシルスルフィド、
 チアゾリジン - 2 - カルボン酸、
 2 - イソブチル - 4 , 5 - ジメチル - 3 - チアゾリン(異性体混合物)、
 4 - オキソチアン、
 1 , 4 チオキサン、および
 酸化型グルタチオン、からなる群から選ばれる少なくとも1つの化合物である、請求項1から5の何れか一項に記載の組成物。

10

【請求項7】

前記添加剤が、リポ酸、酸化型グルタチオンおよびメチオニンからなる群から選択される少なくとも1つの化合物である、請求項1から6の何れか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記アルキルアンモニウム塩がモノアルキルアンモニウム塩およびジアルキルアンモニウム塩からなる群から選ばれる少なくとも1つのアルキルアンモニウム塩である、請求項1から7の何れか一項に記載の組成物。

20

【請求項9】

前記水溶性有機溶媒が、アルコール系水溶性有機溶媒及びニトリル系水溶性有機溶媒からなる群から選ばれる水溶性有機溶媒である、請求項1から8の何れか一項に記載の組成物。

【請求項10】

前記式(1)において、Rが、それぞれ独立して、ヒドロキシ基またはメトキシ基である、請求項1から9の何れか一項に記載の組成物。

30

【請求項11】

前記式(1)において、Rがヒドロキシ基である、請求項1から9の何れか一項に記載の組成物。

【請求項12】

請求項1から11の何れか一項に記載の組成物と、酸素原子を少なくとも1つ有するC1 - C4の有機溶媒とを混合して、析出した核酸オリゴマーを単離することを含む、核酸オリゴマーの製造方法。

【請求項13】

固相合成法で合成された式(1)で示されるホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーの精製前の生成物を逆相カラムクロマトグラフィー処理することにより得られた式(1)で示される核酸オリゴマー、アルキルアンモニウム塩、水溶性有機溶媒及び水を含むカラム溶出液を添加剤と混合することを含む、請求項1から11の何れか一項に記載の組成物の製造方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、日本国特許出願2020-072234号(2020年4月14日出願)に基づくパリ条約上の優先権および利益を主張するものであり、ここに引用することによって、上記出願に記載された内容の全体が本明細書中に組み込まれるものとする。

【0002】

50

本発明は、核酸オリゴマーを含む組成物に関する。本発明は、さらに詳しくは、ホスホロチオエートを含む核酸オリゴマーを含む組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

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

【0004】

核酸オリゴマーは、固相合成法により合成されることが知られており、ホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーも固相法で合成される有用な化合物として知られている (特許文献 1)。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開第 2017/068377 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーは、その製造過程での安定性が問題となることがある。本発明は、ホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーを含む安定な組成物、その製造方法、および当該組成物からの前記核酸オリゴマーの効率的な製造方法を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、固相合成法におけるホスホロアミダイト法により生成する、ホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーの粗生成物を逆相クロマトグラフィー処理により得られる核酸オリゴマーを、アルキルアンモニウム塩、水溶性有機溶媒、水、およびある添加剤とを混合して得られる組成物が安定化することができることを見出した。よって、本発明は、当該組成物、その製造方法、および当該組成物からの核酸オリゴマーの効率的な製造方法を提供する。

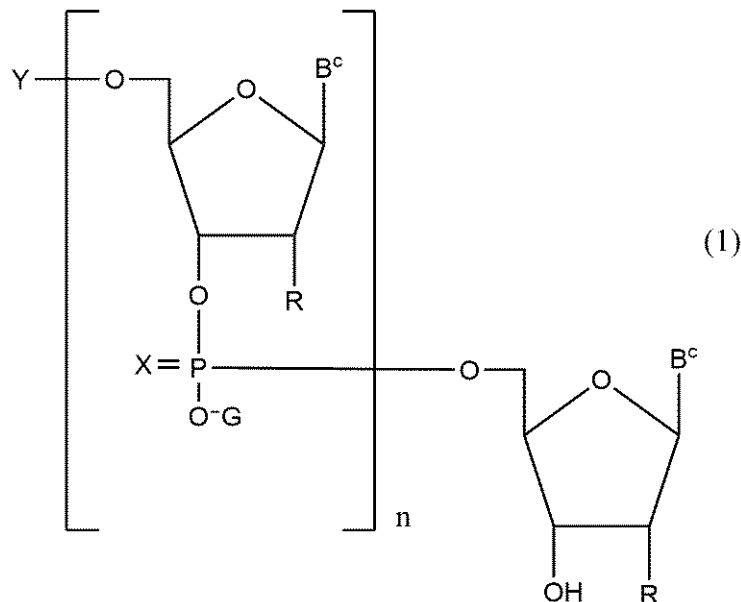
30

【0008】

本発明は、以下の態様を包含するが、これらに限定されるものではない。

項 1. 式 (1) :

【化 1】



40

50

(式中、

B^c は、それぞれ独立して同一又は相異なる核酸塩基を表し、

R は、それぞれ独立して同一又は相異なって、水素原子、フッ素原子、または OQ 基を表し、

Q は、それぞれ独立して同一又は相異なって、水素原子、メチル基、2-メトキシエチル基、リボースの 4' 位の炭素原子と結合しているメチレン基、リボースの 4' 位の炭素原子と結合しているエチレン基、またはリボースの 4' 位の炭素原子と結合しているエチリデン基を表し、

X は、それぞれ独立して同一又は相異なって、酸素原子または硫黄原子を表し、

Y は、水素原子または水酸基の保護基を表し、

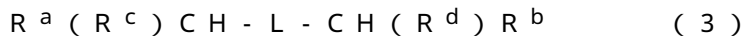
G は、アンモニウムイオン、アルキルアンモニウムイオン、アルカリ金属イオン、水素イオンまたはヒドロキシアルキルアンモニウムイオンを表し、

n は、式(2)：

$$1 \leq n \leq 10 \quad (2) \text{ を満たす整数である。}$$

で示されるホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマー、アルキルアンモニウム塩、水溶性有機溶媒、水、及び添加剤を含む組成物であり、該添加剤が、下記式(3)または(4)で表される化合物からなる群から選ばれる少なくとも一つの化合物を含む添加剤である、組成物。

式(3)：



(式中、

L は、 $-S-$ 、または $-SS-$ を表し、

R^a および R^b は、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、または下記の Z^1 および Z^2 からなる群から選ばれる少なくとも一つの基で置換されていてもよい $C1-6$ のアルキル基を表し、



(Z^1 および Z^2 において、

R^1 は、水素原子、アミノ基の保護基、または $C(O)-R^{11}$ 基を表し、

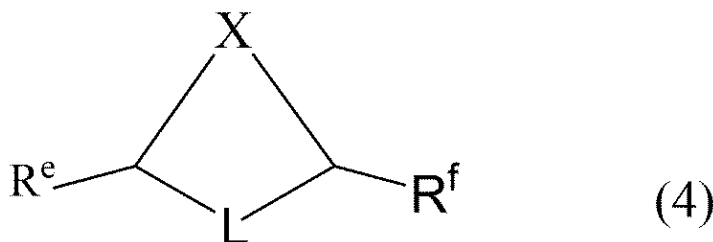
R^{11} は、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも一つの基で置換されていてもよい $C1-6$ のアルキル基、またはアミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも一つの基で置換されていてもよいフェニル基を表し、

R^2 は、保護されていてもよいカルボキシル基で置換されていてもよい $C1-6$ のアルキルイミノ基、または $-OR^{20}$ 基 (R^{20} は、水素原子またはカルボキシル基の保護基を表す。)を表し、

R^c および R^d は、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、または $C1-6$ のアルキル基を表す。)で示される化合物、

式(4)：

【化2】



(式中、

L は、前記と同じ意味を有し、

R^e および R^f は、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、 $C1-6$ アル

10

20

30

40

50

コキシ - カルボニル基、カルボキシル基、または C 1 - 6 アルコキシカルボニル基またはカルボキシル基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、

X、L およびそれらが結合する炭素原子は、5 員もしくは 6 員の環構造を形成し、

X は、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ 、 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CHCH}_2$ 、 C_6H_5 、 C_6H_4 、 C_6H_3 、 C_6H_2 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ 、 $\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ 、 $\text{CH}=\text{N}$ 、 $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{N}$ 、 CH_2NH 、 $(\text{CH}_3)\text{CHNH}$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CNH}$ 、 $(\text{COOH})\text{CHNH}$ 、 CH_2OCH_2 、 CH_2NHCH_2 、および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す。) で示される化合物。

【0009】

項 2 . R^1 が、水素原子、アミノ基の保護基、または $\text{C}(\text{O})-\text{R}^1$ 基を表し、

10

R^1 は、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、そして、

X が、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ 、 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CHCH}_2$ 、 C_6H_5 、 C_6H_4 、 C_6H_3 、 C_6H_2 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ 、 $\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ 、 $\text{CH}=\text{N}$ 、 $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{N}$ 、 CH_2NH 、 $(\text{CH}_3)\text{CHNH}$ 、 $(\text{COOH})\text{CHNH}$ 、 CH_2OCH_2 および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す、前項 1 に記載の組成物。

【0010】

項 3 . R^1 が、水素原子、ベンゾイル基、4 - メトキシベンゾイル基、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、フェニルアセチル基、フェノキシアセチル基、4 - tert - ブチルフェノキシアセチル基、4 - イソプロピルフェノキシアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基、9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル基、または $\text{C}(\text{O})-\text{R}^1$ 基を表し、

20

R^1 が、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、

R^2 が、メチル基、ベンジル基、アリル基および tert - ブチル基で保護されていてもよいカルボキシル基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキルイミノ基、または $-\text{OR}^2$ 基 (R^2 は、水素原子、メチル基、ベンジル基、アリル基または tert - ブチル基を表す。) を表し、そして、

X が、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ 、 $(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CHCH}_2$ 、 C_6H_5 、 C_6H_4 、 C_6H_3 、 C_6H_2 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ 、 $\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ 、 $\text{CH}=\text{N}$ 、 $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{N}$ 、 CH_2NH 、 $(\text{COOH})\text{CHNH}$ 、 CH_2OCH_2 、および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す、前項 1 または 2 に記載の組成物。

30

【0011】

項 4 . R^e および R^f が、同一または相異なり、それぞれ独立して、水素原子、カルボキシル基、または、C 1 - 6 のアルキル基を表し、そして、

X が、 CH_2 、 $(\text{CH}_3)\text{C}=\text{N}$ 、 CH_2NH 、 CH_2OCH_2 、および CH_2COCH_2 から選ばれる何れかの基を表す、前項 1 から 3 の何れか一項に記載の組成物。

【0012】

項 5 . R^1 が、水素原子、ベンゾイル基、ホルミル基、アセチル基、ベンジルオキシカルボニル基および 9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル基、または $\text{C}(\text{O})-\text{R}^1$ 基を表し、

40

R^1 が、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキル基を表し、そして、

R^2 が、メチル基で保護されていてもよいカルボキシル基で置換されていてもよい C 1 - 6 のアルキルイミノ基、または $-\text{OR}^2$ 基 (R^2 は、水素原子またはメチル基を表す。) を表す、前項 1 から 4 の何れか一項に記載の組成物。

【0013】

項 6 . 添加剤が、

- リポ酸、

メチオニン、

50

- N - ホルミル - メチオニン、
 N - アセチル - メチオニン、
 N - ベンゾイル - メチオニン、
 N - カルボベンゾキシ - メチオニン、
 N - F m o c - メチオニン、
 メチオニンメチル塩酸塩、
 ジブチルスルフィド、
 ジヘキシルスルフィド、
 チアゾリジン - 2 - カルボン酸、
 2 - イソブチル - 4 , 5 - ジメチル - 3 - チアゾリン(異性体混合物)、
 4 - オキソチアン、
 1 , 4 - チオキサソ、および
 酸化型グルタチオン、 かなる群から選ばれる少なくとも 1 つの化合物である、前項 1 から 5 の何れか一項に記載の組成物。 10
- 【 0 0 1 4 】
 項 7 . 前記添加剤が、リボ酸、酸化型グルタチオンおよびメチオニンからなる群から選択される少なくとも 1 つの化合物である、前項 1 から 6 の何れか一項に記載の組成物。
- 【 0 0 1 5 】
 項 8 . 前記アルキルアンモニウム塩がモノアルキルアンモニウム塩およびジアルキルアンモニウム塩からなる群から選ばれる少なくとも 1 つのアルキルアンモニウム塩である、前項 1 から 7 の何れか一項に記載の組成物。 20
- 【 0 0 1 6 】
 項 9 . 前記水溶性有機溶媒が、アルコール系水溶性有機溶媒及びニトリル系水溶性有機溶媒からなる群から選ばれる水溶性有機溶媒である、前項 1 から 8 の何れか一項に記載の組成物。
- 【 0 0 1 7 】
 項 1 0 . 前記式 (1) において、R が、それぞれ独立して、ヒドロキシ基またはメトキシ基である、前項 1 から 9 の何れか一項に記載の組成物。
- 【 0 0 1 8 】
 項 1 1 . 前記式 (1) において、R がヒドロキシ基である、前項 1 から 9 の何れか一項に記載の組成物。 30
- 【 0 0 1 9 】
 項 1 2 . 前項 1 から 1 1 の何れか一項に記載の組成物と、酸素原子を少なくとも 1 つ有する C 1 - C 4 の有機溶媒とを混合して、析出した核酸オリゴマーを単離することを含む、核酸オリゴマーの製造方法。
- 【 0 0 2 0 】
 項 1 3 . 固相合成法で合成された式 (1) の核酸オリゴマーの粗生成物を逆相カラムクロマトグラフィー処理により得られた式 (1) で示される核酸オリゴマー、アルキルアンモニウム塩、水溶性有機溶媒及び水を含むカラム溶出液を添加剤と混合することを含む、前項 1 から 1 2 の何れか一項に記載の組成物の製造方法。 40
- 【 発明の効果 】
 【 0 0 2 1 】
 本発明により、ホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーを含む安定な組成物、それを用いた前記核酸オリゴマーの効率的な製造方法が提供される。
- 【 図面の簡単な説明 】
 【 0 0 2 2 】
 【 図 1 】 図 1 は、ホスホロアミダイト法による核酸オリゴマーの合成の例を示す図である。
 【 発明を実施するための形態 】
 【 0 0 2 3 】
 前記式 (1) で示されるホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマー、アルキルア 50

ンモニウム塩、水溶性有機溶媒、水、及び添加剤を含む組成物であり、該添加剤が、ジスルフィド結合を有する化合物およびスルフィド結合を有する化合物からなる群から選ばれる少なくとも1つの化合物であることを特徴とする組成物について説明する。

前記式(1)において、B^Cで表される核酸塩基(以下、「塩基」と記すこともある。)は、天然または非天然の核酸塩基であってもよい。かかる非天然の核酸塩基としては、天然または非天然の核酸塩基の修飾アナログが例示される。核酸塩基としては、典型的には、プリン化合物及びピリミジン化合物が例示され、例えば、米国特許第3,687,808号、「Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering」, 858~859頁, クロシュビッツ ジューアイ(Kroschwitz J. I.) 編、John Wiley & Sons、1990、及びイングリッシュら(Englischra)、Angewandte Chemie、International Edition、1991、30巻、p. 613に開示される核酸塩基が例示される。

【0024】

具体的には、例えば、アデニン、イソグアニン、キサンチン、ヒポキサンチン及びグアニン等のプリン塩基；及び、シトシン、ウラシル及びチミン等のピリミジン塩基等が例示される。

【0025】

さらに、B^Cで表される核酸塩基としては、例えば、2-アミノアデニン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン等のアミノ誘導体；5-メチルウラシル、5-メチルシトシン、7-メチルグアニン、6-メチルプリン、2-プロピルプリン等のアルキル誘導体；5-ハロウラシル及び5-ハロシトシン；5-プロピニルウラシル及び5-プロピニルシトシン；6-アザウラシル、6-アザシトシン及び6-アザチミン；5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、5-(2-アミノプロピル)ウラシル、5-アミノアリルウラシル；8-ハロ化、アミノ化、チオール化、チオアルキル化、ヒドロキシル化及び他の8-置換プリン；5-トリフルオロメチル化及び他の5-置換ピリミジン；6-アザピリミジン；N-2、N-6及びO-6置換プリン(2-アミノプロピルアデニンを含む)；ジヒドロウラシル；3-デアザ-5-アザシトシン；7-デアザアデニン；N6-メチルアデニン、N6,N6-ジメチルアデニン；5-アミノ-アリル-ウラシル；N3-メチルウラシル；置換1,2,4-トリアゾール；2-ピリジノン；5-ニトロインドール；3-ニトロピロール；5-メトキシウラシル；ウラシル-5-オキシ酢酸；5-メトキシカルボニルメチルウラシル；2-チオウラシル、5-メチル-2-チオウラシル；5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウラシル；5-メチルアミノメチル-2-チオウラシル；3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウラシル；3-メチルシトシン；N4-アセチルシトシン；2-チオシトシン；N6-メチルアデニン；N6-イソペンチルアデニン；2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデニン；N-メチルグアニン；O-アルキル化塩基等が例示される。

【0026】

RがOQ基を表し、Qがリボースの4'位の炭素原子と結合しているメチレン基、リボースの4'位の炭素原子と結合しているエチレン基、またはリボースの4'位の炭素原子と結合しているエチリデン基を表すとき、当該構造は、下記の式(3)において示すLNA-1、LNA-2およびLNA-3の構造で示される。

【0027】

10

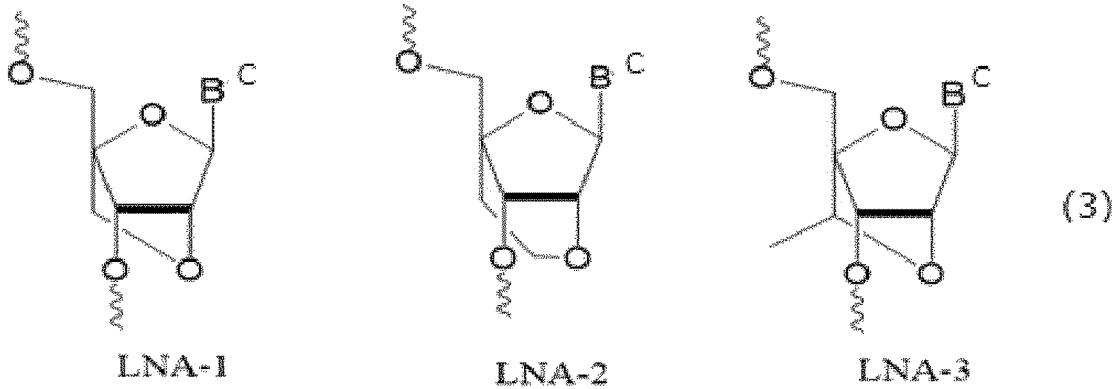
20

30

40

50

【化3】



10

【0028】

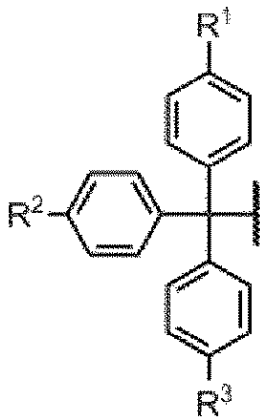
(式中、 B^C は、前記のと通りの核酸塩基を表す。)

【0029】

Yで示される水酸基の保護基としては、アミダイト法において、保護基として機能し得るものであれば特に制限なく使用することができ、例えば、アミダイト化合物に対して使用される公知の保護基を広く使用することができる。Yで示される水酸基の保護基は、好ましくは、以下の基である。

【0030】

【化4】



20

30

【0031】

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

前記アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基が例示される。

【0032】

式(1)の核酸オリゴマーの鎖長は、 $n = 15$ である。鎖長の上限としては、例えば、 $n = 200$ が例示される。前記核酸オリゴマーにおいては、 n 個あるXの少なくとも1つが硫黄原子であり、Xがすべて硫黄原子であってもよい。例えば、 $n = 103$ の場合、硫黄原子の数は6、12または20が例示される。

40

【0033】

式(1)の核酸オリゴマーは、例えば、DNAまたはRNAオリゴマー、あるいはこれらのオリゴマーに非天然型の核酸塩基を含むものであってもよい。前記核酸オリゴマーは、典型的には、一本鎖のDNAまたはRNAオリゴマーである。前記式(1)の核酸オリゴマーにおいて、置換基Rは、好ましくは、それぞれ独立して、ヒドロキシ基またはメトキシ基である。前記核酸オリゴマーとしては、置換基Rが、それぞれ独立して、ヒドロキシ基またはメトキシ基である式(1)の核酸オリゴマーであるRNAが好ましい。さらに詳しくは、置換基Rがヒドロキシ基であるヌクレオチドとメトキシ基であるヌクレオチド

50

の両方を含む核酸オリゴマーが好ましい。

【0034】

前記組成物中の核酸オリゴマーの濃度は、通常、 $0.05 \text{ mg/mL} \sim 5 \text{ mg/mL}$ であり、好ましくは $0.05 \text{ mg/mL} \sim 1 \text{ mg/mL}$ であり、より好ましくは $0.1 \text{ mg/mL} \sim 0.5 \text{ mg/mL}$ である。

【0035】

前記アルキルアンモニウム塩としては、通常、モノアルキルアンモニウム塩、ジアルキルアンモニウム塩およびトリアルキルアンモニウム塩が使用され、好ましくはモノアルキルアンモニウム塩およびジアルキルアンモニウム塩、より好ましくはジアルキルアンモニウム塩が使用される。モノアルキルアンモニウム塩を形成するモノアルキルアミンの炭素数は、好ましくは $3 \sim 10$ であり、より好ましくは $4 \sim 6$ であり、さらに好ましくはヘキシルアミンである。ジアルキルアンモニウム塩を形成するジアルキルアミンの炭素数は、好ましくは $4 \sim 10$ であり、より好ましくは $5 \sim 9$ である。好ましいジアルキルアミンは、ジブチルアミンである。トリアルキルアンモニウム塩を形成するトリアルキルアミンは、炭素数 $6 \sim 12$ のものが好ましく、 $6 \sim 9$ のものがより好ましく、具体的にはトリエチルアミンが例示される。

10

【0036】

前記モノアルキルアンモニウム塩、ジアルキルアンモニウム塩およびトリアルキルアンモニウム塩を形成する酸としては、例えば、炭酸、酢酸、ギ酸、トリフルオロ酢酸およびプロピオン酸が例示される。

20

【0037】

前記アンモニウム塩の濃度としては、通常、 $1 \sim 200 \text{ mM}$ であり、好ましくは $5 \sim 150 \text{ mM}$ であり、より好ましくは $20 \sim 100 \text{ mM}$ である。

【0038】

前記水溶性溶媒としては、アルコール系有機溶媒およびニトリル系有機溶媒が例示される。前記組成物中のアルコール系有機溶媒の量は、通常、 $0 \sim 20\%$ であり、好ましくは $0 \sim 15\%$ であり、より好ましくは $0\% \sim 10\%$ である。逆相カラムクロマトグラフィーで得られた溶離液画分には、通常、水、水溶性溶媒（例えば、アルコール系有機溶媒、ニトリル系有機溶媒）、アルキルアンモニウム塩、および式(1)の核酸オリゴマーが含まれる。上記溶離液中のニトリル系有機溶媒の量は、通常、 $10 \sim 70\%$ であり、好ましくは $20 \sim 60\%$ であり、より好ましくは $30 \sim 50\%$ である（以上%は、すべて質量%を表す。）。

30

【0039】

水の量は、前記の成分の濃度範囲を満足させるようにバランスをとる量であればよく、通常、 $90\% \sim 30\%$ であり、好ましくは $80\% \sim 40\%$ であり、より好ましくは $70\% \sim 40\%$ である。

【0040】

前記式(3)で表される添加剤について以下説明する。

Z¹において、R¹で表されるアミノ基の保護基として特に限定されず、公知の保護基を使用することができる。具体的な保護基としては、例えば、ベンゾイル基、4-メトキシベンゾイル基、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、フェニルアセチル基、フェノキシアセチル基、4-tert-ブチルフェノキシアセチル基、4-イソプロピルフェノキシアセチル基、ベンジルオキシカルボニル基および9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Fmoc基）などが例示される。好ましい保護基としては、ベンゾイル基、ホルミル基、ベンジルオキシカルボニル基、および9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基が例示される。

40

R¹¹で表される、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも1つの基で置換されていてよいC₁₋₆のアルキル基としては、例えば、(CH₂)₂CH(NH₂)(COOH)基が例示され、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも1つの基で置換されていてよいフェニル基としては、フェニル基

50

、アミノフェニル基、およびカルボキシフェニル基等が例示される。

好ましい R^{11} は、アミノ基およびカルボキシル基からなる群から選ばれる少なくとも1つの基で置換されていてよい $C1-6$ のアルキル基(例えば、 $(CH_2)_2CH(NH_2)(COOH)$ 基)が例示される。

Z^1 および Z^2 において、 COR^2 基としては、 $COOH$ 基および $COOR^{20}$ 基が例示され、 R^{20} で表されるカルボキシル基の保護基は、特に限定されず、公知の保護基を使用することができ、そのような保護基としては、例えば、メチル基、ベンジル基、アリル基および $tert$ -ブチル基等が例示される。

R^2 で表される保護されていてよいカルボキシル基で置換されていてよい $C1-6$ のアルキルイミノ基としては、例えば、メチルイミノ基、エチルイミノ基、プロピルイミノ基、ブチルイミノ基、ペンチルイミノ基、およびヘキシルイミノ基、あるいはこれらの基に、メチル基、ベンジル基、アリル基、または、 $tert$ -ブチル基で保護されていてよいカルボキシル基が置換した基が例示される。メチル基で保護されていてよいカルボキシル基で置換されていてよい $C1-6$ のアルキルイミノ基が好ましく、例えば、 $NHCH_2CO_2H$ 基が、好ましい基として例示される。

式(3)で表される添加剤としては、具体的には、メチオニン、酸化型グルタチオン、 N -ホルミルメチオニン、 N -アセチル- DL -メチオニン、 N -ベンゾイル- DL -メチオニン、 N -カルボベンゾキシ- DL -メチオニン、 N - $Fmoc$ - L -メチオニン、 L -メチオニンメチル塩酸塩、ジブチルスルフィド、およびジヘキシルスルフィドが例示される。

【0041】

次いで、式(4)で表される化合物の定義について説明する。

まず、 R^e および R^f で表される基において、 $C1-6$ のアルコキシカルボニル基および $C1-6$ のアルキル基を構成する $C1-6$ のアルキル基またはアルキル部分としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソブチル基、 n -ブチル基、ペンチル基およびヘキシル基が例示される。

R^e および R^f で表される基としては、水素原子、カルボキシル基、または $C1-6$ のアルキル基が好ましい。

R^e または R^f で表される基の具体例としては、カルボキシル基、イソブチル基、 $(CH_2)_4CO_2H$ 、および $CO_2C_2H_5$ が例示される。

X としては、前記のとおり式(4)において、記載した基が例示され、好ましい X は、 CH_2 、 CH_2CH_2 、 $(CH_3)CHCH_2$ 、 $(CH_3CH_2)CHCH_2$ 、 $CH_2CH_2CH_2$ 、 $(CH_3)CHCH_2CH_2$ 、 $CH_2(CH_3)CHCH_2$ 、 $CH=N$ 、 $(CH_3)C=N$ 、 CH_2NH 、 $(CH_3)CHNH$ 、 $(COOH)CHNH$ 、 CH_2OCH_2 、および CH_2COCH_2 であり、

さらに好ましくは、 CH_2 、 $(CH_3)C=N$ 、 CH_2NH 、 CH_2OCH_2 および CH_2COCH_2 である。

式(4)で表される化合物としては、具体的には、 γ -リポ酸、チアゾリジン-2-カルボン酸、2-イソブチル-4,5-ジメチル-3-チアゾリン(異性体混合物)などが例示される。

【0042】

これらの添加剤は、通常、水溶液あるいは水溶性有機溶媒の溶液として使用される。

【0043】

前記添加剤の濃度としては、通常、 $0.1\mu M \sim 100mM$ であり、好ましくは $1mM \sim 10mM$ である。

【0044】

前記添加剤は、購入するほかに、例えば、日本国特許第4,476,386号、日本国特許第5,317,836号、及び「Fundamentals of modern peptide synthesis」, 3~24頁, John Howl編, Muriel Amblard, Jean-Alain Fehrentz, Jean Martin

10

20

30

40

50

ez, Methods in Molecular Biology (商標) book series、volume 298、2005に開示される方法で入手することができる。

【0045】

本発明の組成物は、通常、固相合成法で合成された式(1)の核酸オリゴマーの粗生成物を、アルキルアンモニウム塩、水溶性有機溶媒、及び水を含有する移動相を用いた逆相カラムクロマトグラフィー処理することにより得られたカラム溶出液に、前記の添加剤を添加して得られる。あるいは、あらかじめ前記添加剤を含有する移動相を用いることで、逆相カラムクロマトグラフィーの溶離画分として本発明の組成物を調製してもよい。

【0046】

逆相カラムクロマトグラフィーにより得られる溶離画分は、一般的に核酸の分離分析に用いるクロマトグラフィーの条件下で、波長260nmのUV吸収で、組成を分析して、選択され集められる。集められた画分から精製された目的物である所定量のホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーが得られる。前記分析法としては、たとえば、非特許文献(Handbook of Analysis of Oligonucleotides and Related Products, CRC Press)に記載の方法を用いることができる。

10

【0047】

前記逆相カラムクロマトグラフィーの充填剤としては、疎水性の固定相となるシリカまたはポリマーとして、例えば、フェニル基、炭素数1~20のアルキル基およびシアノプロピル基から選ばれるいずれか1種以上が固定されたシリカまたはポリマーが例示される。かかる充填剤であるシリカまたはポリマーとしては、例えば、粒子径が、2μm以上、あるいは、5μm以上のものが使用される。

20

【0048】

逆相カラムクロマトグラフィーの移動相としては、例えば、前記のような濃度およびpHのアンモニウム塩の水溶液を含む移動相および前記の水溶性の有機溶媒を含み、その濃度を順次増大させる勾配をかけて使用する移動相が使用される。逆相カラムクロマトグラフィーの温度は、通常、20~100であり、好ましくは30~80であり、より好ましくは40~70である。本発明の組成物は、典型的には、前記のような逆相カラムクロマトグラフィーの溶離液画分として得られる。

【0049】

本発明の組成物は、例えば、保管工程の後に、核酸オリゴマーを単離するため再沈殿工程、分液工程、限外濾過工程、脱保護工程、および凍結乾燥工程といった後処理工程から選ばれる単一もしくは複数の工程に付してもよい。保管工程では、不活性ガスを用いることで保管容器内の雰囲気置換しても良い。不活性ガスとしては、例えば、窒素ガス、アルゴンガス、ヘリウムガスが例示される。

30

【0050】

再沈殿工程では、安定化した溶液を、貧溶媒と接触させ、核酸オリゴマーを析出させ、単離することができる。必要であれば、固液分離した状態から、液体部を除去してから、ろ過等により析出した核酸オリゴマーを集めて単離してもよい。再沈殿工程の貧溶媒としては、酸素原子を少なくとも1つ有するC1-C4の有機溶媒(例えば、C1-C4アルコール、テトラヒドロフラン、ジオキサン)が挙げられる。かかる溶媒としては、エタノールまたはイソプロパノールが好ましい。

40

【0051】

分液工程では、安定化した溶液に酢酸水溶液等の酸性水溶液、水、および食塩水等のうちの少なくとも一種を混合し、さらに水と混和しない有機溶媒を加えることで水層と有機層に分液し、所望の核酸オリゴマーを含む水層を取得することができる。

【0052】

限外濾過工程では、限外濾過膜を用いて保管工程後の溶液中に存在する核酸オリゴマーを所望の分子量以下の低分子成分と分離することができる。

【0053】

核酸オリゴマーの5'末端部位に保護基がある場合は、これを脱保護するため、保管工程

50

後の溶液に酢酸水溶液等の酸性水溶液、もしくは酢酸等の酸性物質を有機溶媒に溶解した溶液を混合することで、核酸オリゴマーの保護基を脱保護することができる。

【0054】

凍結乾燥工程では、凍結させた核酸オリゴマーの水溶液を減圧することで水を昇華させ、核酸オリゴマーと水分を分離することができる。

【0055】

ホスホロアミダイト法による核酸オリゴマーの合成は、公知の方法（例えば、前記の特許第5157168号公報または特許第5554881号公報に記載の方法）に従って、核酸伸長反応を行うことができる。ホスホロアミダイト法による核酸オリゴマーの製造については、図1に示すスキームのRNAの合成を例に挙げて、以下に示す反応経路（縮合反応、酸化、脱保護）を参照しながら核酸オリゴマーの製造方法について説明する。

10

【0056】

反応経路を示す前記化学式中、 B^a は、保護されていてもよい核酸塩基； Tr は保護基；であり、 X は、前記定義のとおりであり、 SP は無機多孔質担体のヌクレオシド構造以外の部分をそれぞれ表している。

【0057】

ヌクレオシド構造を有する無機多孔質担体（ $Sp - Nu$ ）およびアミダイトモノマー（ $Am - 1$ ）のヌクレオシドを構成する核酸塩基は、前記のとおり核酸塩基もしくは保護基で保護された核酸塩基である。

【0058】

好適なアミダイトモノマー（ $Am - 1$ ）の例としては、下記化学式（ $Am - 1'$ ）で表される化合物において、 R が、保護された水酸基を表すとき、具体的な保護基としては、tert-ブチルジメチルシリル（ $TBDMS$ ）基、ビス（2-アセトキシ）メチル（ ACE ）基、（トリイソプロピルシリロキシ）メチル（ TOM ）基、（2-シアノエトキシ）エチル（ CEE ）基、（2-シアノエトキシ）メチル（ CEM ）基、パラ-トルイルスルホニルエトキシメチル（ TEM ）基、（2-シアノエトキシ）メトキシメチル（ EMM ）基などで保護された、 $TBDMS$ アミダイト（ $TBDMS RNA Amidites$ 、商品名、ChemGenes Corporation）、 ACE アミダイト、 TOM アミダイト、 CEE アミダイト、 CEM アミダイト、 TEM アミダイト（Chakhmakhchevaの総説：Protective Groups in the Chemical Synthesis of Oligoribonucleotides、Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2013, Vol. 39, No. 1, pp. 1-21.）、 EMM アミダイト（国際公開第2013/027843号に記載）等が例示される。

20

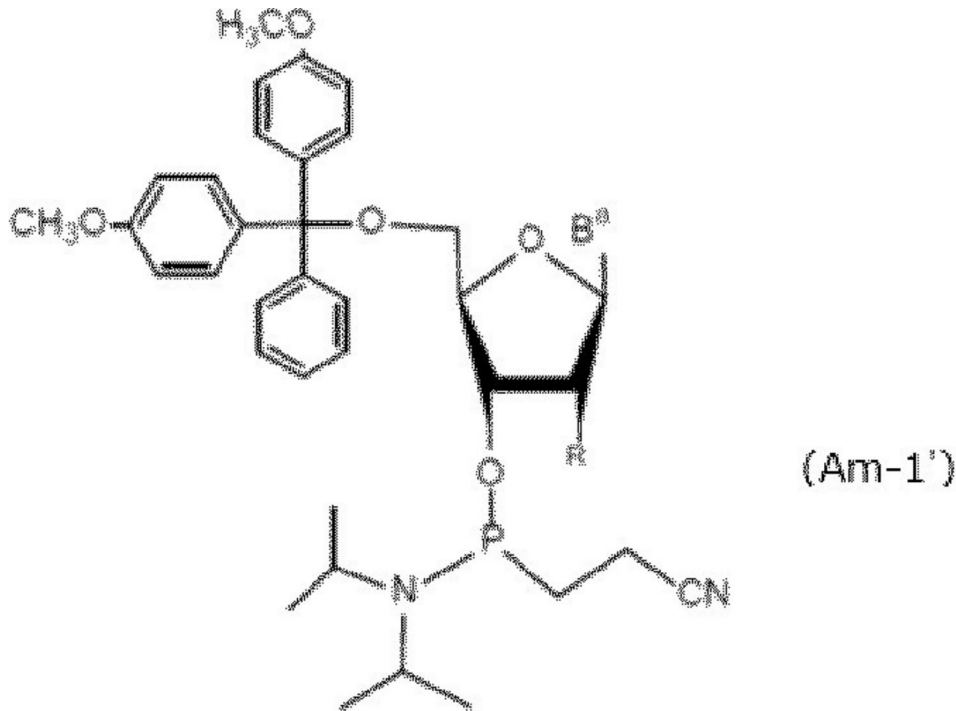
30

【0059】

40

50

【化5】



10

20

【0060】

(式中、Rは、前記のと通りの基を表し、B^aは、保護されていてもよい核酸塩基を示す。)

【0061】

[RNAの固相合成]

無機多孔質担体(Sp-Nu)のTr基を脱保護して、固相担体(Am-2)を得る。この後、アミダイトモノマー(Am-1)と、固相担体(Am-2)とを縮合反応させて、反応生成物(Am-3)を得る。この後、反応生成物(Am-3)を酸化して、生成物(Am-4)を得る。この後、生成物(Am-4)を脱保護(-Tr)して、生成物(Am-5)を得る。次いで、アミダイトモノマー(Am-1)と生成物(Am-5)とを更に縮合反応させて、ホスホジエステル結合を伸長していく。このように、伸長したオリゴヌクレオチド鎖末端の5'位のヒドロキシル基を、所望の配列となるように、一連の脱保護、縮合反応、酸化のサイクルを必要なだけ繰り返す。この後、固相担体から切り出すことにより、所望の配列の核酸分子を製造することができる。かかる合成は、ホスホロアミダイト法を採用する核酸自動合成装置等を用いてもよい。ここでは、RNAを例に挙げ説明するが、リボヌクレオチド以外のヌクレオチドを含む核酸化合物にも適用できるものである。

30

【0062】

Tr基を脱保護する工程では、固相担体上に担持されるRNA鎖末端の5'位のヒドロキシル基の保護基を脱保護する。保護基としては、トリチル系保護基(典型的には、DMTr基)が用いられる。脱保護は、酸を用いて行うことができる。脱保護用の酸としては、例えば、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、メタンスルホン酸、塩酸、酢酸、およびp-トルエンスルホン酸等が挙げられる。

40

【0063】

縮合工程では、前記の脱保護する工程により脱保護したRNA鎖末端の5'位のヒドロキシル基に対して、ヌクレオシドホスホロアミダイトを結合させて、ホスファイトを生成する。前記ヌクレオシドホスホロアミダイトとしては、5'位のヒドロキシル基が保護基(例えばDMTr基)で保護されたものを用いる。

【0064】

50

また、縮合工程は、前記ヌクレオシドホスホロアミダイトを活性化する活性化剤を用いて行うことができる。活性化剤としては、例えば、5 - ベンジルチオ - 1 H - テトラゾール (B T T)、1 H - テトラゾール、4 , 5 - ジシアノイミダゾール (D C I)、5 - エチルチオ - 1 H - テトラゾール (E T T)、N - メチルベンズイミダゾリウムトリフラート (N - M e B I T)、ベンズイミダゾリウムトリフラート (B I T)、N - フェニルイミダゾリウムトリフラート (N - P h I M T)、イミダゾリウムトリフラート (I M T)、5 - ニトロベンズイミダゾリウムトリフラート (N B T)、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (H O B T)、および 5 - (ビス - 3 , 5 - トリフルオロメチルフェニル) - 1 H - テトラゾール (A c t i v a t o r - 4 2) 等が挙げられる。

【 0 0 6 5 】

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

【 0 0 6 6 】

酸化工程は、前記縮合工程により形成されたホスファイトを酸化する工程である。酸化工程は、酸化剤を用いて行うことができる。酸化剤としては、ヨウ素、m - クロロ過安息香酸、tert - ブチルヒドロペルオキシド、2 - ブタノンペルオキシド、ビス (トリメチルシリル) ペルオキシド、1 , 1 - ジヒドロペルオキシシクロドデカン、および過酸化水素等が挙げられる。

【 0 0 6 7 】

亜リン酸トリエステル基をチオリン酸トリエステル基に変換する場合には、「酸化剤」として、例えば、硫黄、3 H - 1 , 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン - 1 , 1 - ジオキシド (B e a u c a g e 試薬)、3 - アミノ - 1 , 2 , 4 - ジチアゾール - 5 - チオン (A D T T)、5 - フェニル - 3 H - 1 , 2 , 4 - ジチアゾール - 3 - オン (P O S)、[(N , N - ジメチルアミノメチリデン) アミノ] - 3 H - 1 , 2 , 4 - ジチアゾリン - 3 - チオン (D D T T)、およびフェニルアセチルジスルフィド (P A D S) を使用することができる。該酸化剤は、0 . 0 0 1 ~ 2 M の濃度になるように適当な溶媒で希釈して使用することができる。反応に使用する溶媒としては、反応に参与しなければ特に限定されないが、例えば、ジクロロメタン、アセトニトリル、ピリジン又はこれらの任意の割合の混合溶媒が挙げられる。

【 0 0 6 8 】

酸化工程は、前記キャッピング操作の後で行ってもよいし、逆に、酸化工程の後でキャッピング操作を行ってもよいし、この順番は限定されない。

【 0 0 6 9 】

酸化工程後は、脱保護工程に戻り、合成すべき核酸オリゴマーのヌクレオチド配列に応じて、上記の縮合反応、酸化、脱保護の一連の工程を繰り返すことにより、所望の配列を有する RNA を合成することができる。

【 0 0 7 0 】

所望の配列を有する核酸オリゴマーの合成が完了した後は、アンモニアまたはアミン化合物を用いて、固相担体から RNA 鎖を切断して回収する。

【 0 0 7 1 】

ここでのアミン化合物としては、例えば、メチルアミン、エチルアミン、イソプロピルアミン、エチレンジアミン、ジエチルアミン、およびトリエチルアミン等が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

かくして得られる核酸オリゴマーの鎖長は、例えば、n = 60、n = 80 または n = 100、かつ、n = 200 のものが例示される。好ましくは、n = 60 である。具体的には、例えば、n = 67、100 または 120 である。

【 0 0 7 3 】

リン酸保護基を脱保護する工程は、所望の配列を有する核酸の合成が完了した後は、リン酸部分の保護基を脱保護するためにアミン化合物を作用させる。アミン化合物としては

10

20

30

40

50

、例えば、記載されるジエチルアミン等が挙げられる。

【0074】

リボースの2'位もしくは3'位の水酸基の保護基がある場合は、国際公開第2006/022323号公報)、国際公開第2013/027843号公報、または国際公開第2019/208571号公報に記載の方法に従って除くことができる。

【実施例】

【0075】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0076】

測定方法

以下の試験で用いた各測定方法を以下に示す。

(測定方法1: RNAの純度の測定方法)

分取後溶液中のRNAの純度の測定は、HPLCにより行った。分取したRNAをHPLC(波長260nm、カラムDNAPac™ PA200、4.0mm×250mm、8.0μm)によって各成分に分離し、得られたクロマトグラムのピークの総面積値における主生成物のピークの面積値からRNAの純度を算出した。HPLC測定条件を下記表1に示す。

【0077】

【表1】

カラム	DNAPac™ PA200, 4.0mm×250mm, 8.0μm
流速	1.0mL/min
検出波長	260nm
移動相A	25mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0) (10%アセトニトリル、6M尿素含有)
移動相B	25mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0) (500mM 過塩素酸ナトリウム、10%アセトニトリル、6M 尿素含有)
グラジエント条件	B conc. 20%(0min)-60%(60min)-90%(60.01min)-90%(65min) -20%(65.01min)-20%(80min)
カラム温度	80°C

【0078】

[参考例1]

RNAのアミダイト法による固相合成

以下に示すIの核酸配列を有するRNAを合成した。当該鎖は103塩基長からなる。

【0079】

鎖 I : A*U*A*ACUCAUUUGUAAAAAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU
AAGGCUAGUCCGU UAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU*U*U*U(
5'-3') (配列番号1)

前記配列の表記において、ヌクレオチドの間の記号*は、ヌクレオチドを繋ぐリン酸結合が、ホスホロチオエートであることを表す。

当該RNAは、ホスホロアミダイト法に基づき、核酸合成機(AKTA oligopilot plus 100 GEヘルスケア社)を用いて3'側から5'側に向かって合成した。合成は63μmolスケールにて実施した。また、当該合成にはRNAアミダイトとして、それぞれ下記の式のウリジンEMMアミダイト(国際公開第2013/027843号の実施例2に記載)、シチジンEMMアミダイト(同実施例3に記載)、アデノシンE

10

20

30

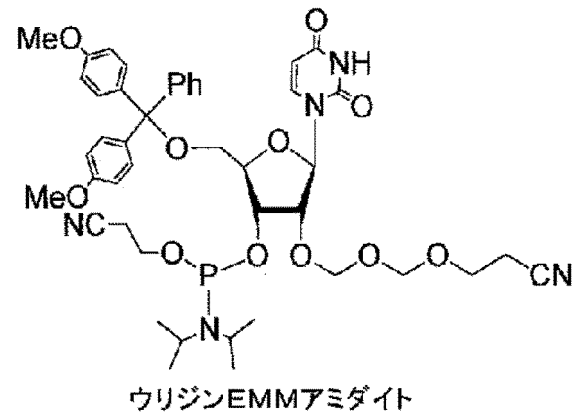
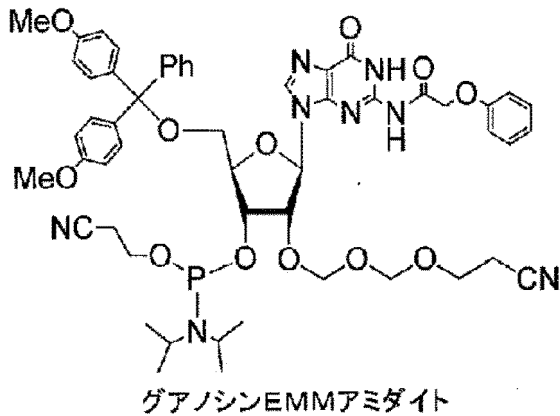
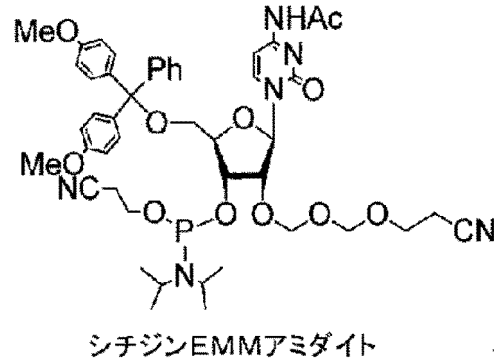
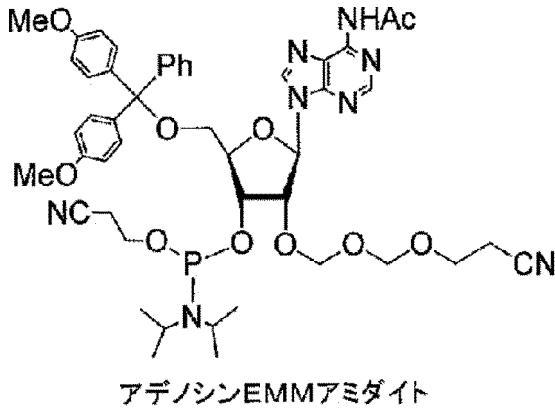
40

50

MMアミダイト（同実施例4に記載）、及びグアノシンEMMアミダイト（同実施例5に記載）を使用し、固相担体として多孔質ガラスを使用し、デブロッキング溶液としてジクロロ酢酸トルエン溶液を使用し、縮合剤として5-ベンジルチオ-1H-テトラゾールを使用し、酸化剤としてヨウ素溶液を使用し、硫化剤として3-アミノ-1,2,4-ジシアゾール-5-チオンを使用し、キャッピング溶液として無水フェノキシ酢酸溶液とN-メチルイミダゾール溶液とを使用して行った。核酸伸長終了後担体上の核酸にジエチルアミン溶液を作用させることでリン酸部分のシアノエチル保護基を選択的に脱保護した。ここで、EMMは、(2-シアノエトキシ)メトキシメチル基の略号である。

【0080】

【化6】



【0081】

固相合成後の固相担体からの切出しと脱保護は、国際公開第2013/027843号に記載の方法に従った。すなわち、アンモニア水溶液とエタノールとを加え、しばらく静置した後に固相担体をろ過し、溶媒を留去した。その後、テトラブチルアンモニウムフルオリドを用いて水酸基の脱保護を行った。得られたRNAを、注射用蒸留水を用いて所望の濃度となるように溶解した。

【0082】

RNAの分取精製

下記表2の条件でカラムクロマトグラフィー精製を行った。ただし、精製前にカラム内に移動相Aを流速4.7 mL/minで12.5分間通液したのちにサンプルを添加した。保持時間94.2分-95.8分までを分取し、得られた溶液をHPLCにて分析した。なお、前記測定方法1に記載の方法で純度を算出した。その結果、純度は94.2%であった。この分取精製したRNA溶液を用いて以下の実施例および比較例の実験を行った。

【0083】

10

20

30

40

50

【表 2】

装置	AKTApurifier100 (GE Healthcare社製)
検出器	UV 260nm
カラム	YMC製 Triart C18 10mm×250mm, 10 μ m
分離モード	逆相クロマトグラフィー
カラム温度	60°C
流速	4.7mL/min
移動相A	100mM ジブチルアンモニウムアセテート水溶液 (pH 7.0)
移動相B	アセトニトリル
分取幅	3.9mL
グラジエント 条件	B conc. 0%(0min)-30%(12.5min)-40%(95.8min)-100%(95.9min) -100%(104min)

10

20

【0084】

[実施例 1]

参考例 1 において逆相カラムクロマトグラフィーで分取精製した RNA 溶液 99 μ L を容量 300 mL のポリプロピレン製バイアル (サーモフィッシャー社) に入れ、添加剤溶液として、リポ酸のアセトニトリル溶液を 1 μ L 混合し、所定の濃度の試料を調製した。混合溶液の入ったバイアルを 60 に温調されたインキュベータ (ケニス社) に入れ、8 時間静置した。静置後、インキュベータから取り出したポリプロピレン製バイアルを室温まで冷却し、前記測定方法 1 に記載の方法で純度を算出した。結果を表 3 に示す。

【0085】

リポ酸の濃度が、3 mM (0.07%) に調製された組成物は、計算によれば、以下の組成を有する。水: 63.79%、アセトニトリル: 34.89%、ジブチルアミン 0.84%、酢酸: 0.39%、(ジブチルアンモニウム酢酸として 1.23%)、核酸濃度: 0.21 mg/mL (0.02%)。

30

【0086】

[実施例 2]

実施例 1 の実験において、添加剤溶液として、リポ酸のアセトニトリル溶液の代わりに、メチオニン水溶液を使用してメチオニンの濃度を 3 mM (0.05%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 3 に示す。

40

【0087】

[実施例 3]

実施例 1 の実験において、添加剤溶液として、リポ酸のアセトニトリル溶液の代わりに、酸化型グルタチオン水溶液を添加して、酸化型グルタチオンの濃度を 0.15 mM (0.01%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 3 に示す。

【0088】

[比較例 1]

参考例 1 において逆相カラムクロマトグラフィーで分取精製した RNA 溶液 100 μ L を容量 300 mL のポリプロピレン製バイアル (サーモフィッシャー社) に入れ、溶液の

50

入ったバイアルを60℃に温調されたインキュベータ（ケニス社）に入れ、8時間静置した。静置後、インキュベータから取り出したポリプロピレン製バイアルを室温まで冷却し、前記測定方法1に記載の方法で純度を算出した。結果を表3に示す。

【0089】

[比較例2]

実施例1の実験において、添加剤溶液として、リボ酸のアセトニトリル溶液の代わりに、システイン水溶液、N-アセチルシステインのアセトニトリル溶液、還元型グルタチオン水溶液、ジチオトレイトール水溶液、L-アスコルビン酸水溶液、または次亜硫酸ナトリウム水溶液をそれぞれ所定の濃度で用いる以外は、同様の条件で実験を行った。結果を表3に示す。

【0090】

【表3】

	添加剤	添加剤の濃度(mM)	HPLC測定純度 ¹⁾	核酸の保持率 ²⁾
実施例1	α-リボ酸	3.0	91.3%	97%
	α-リボ酸	0.3	84.1%	89%
	α-リボ酸	0.03	75.0%	80%
実施例2	L-メチオニン	3.0	93.2%	99%
実施例3	酸化型グルタチオン	0.15	74.3%	79%
比較例1	添加剤なし	-	66.2%	70%
比較例2	L-システイン	3.0	58.5%	62%
	N-アセチルシステイン	3.0	16.5%	18%
	還元型グルタチオン	0.15	38.7%	41%
	ジチオトレイトール	3.0	6.4%	7%
	L-アスコルビン酸	3.0	10.8%	11%
	次亜硫酸ナトリウム	3.0	25.2%	27%

1) 参考例1で調製した核酸（純度94.2%）を60℃/8時間静置した後の核酸の純度を表す。

2) 核酸の保持率(%) = 静置後の核酸純度 / 静置前の核酸純度

【0091】

[実施例4] (分取精製したRNA溶液からのRNAの回収)

実施例1においてリボ酸の濃度が3mMになるよう混合し、60℃で8時間静置した溶液を用いて以下の処理をした。溶液80μLを容量15mLのポリプロピレン製コニカルチューブ（Corning社）に入れ、酢酸ナトリウム水溶液（3M、pH=5.2）を40μL、エタノールを240μL追加した。得られたスラリー溶液を10分間、3000g、25℃で遠心し、上澄みを除去した。続いて70%エタノール水溶液を200μL入れ、10分間、3000g、25℃で遠心し、上澄みを除去する操作を2回繰り返してRNAを得た。得られたRNAを水80μLに溶解し、前記測定方法1に記載の方法でRNAの純度を算出すると、純度は85.8%であった。

【0092】

[比較例3]

比較例1において60℃で8時間静置した溶液を用いて以下の処理をした。溶液80μLを容量15mLのポリプロピレン製コニカルチューブ（Corning社）に入れ、酢酸ナトリウム水溶液（3M、pH=5.2）を40μL、エタノールを240μL追加した。得られたスラリー溶液を10分間、3000g、25℃で遠心し、上澄みを除去した。続いて70%エタノール水溶液を200μL入れ、10分間、3000g、25℃で遠心し、上澄みを除去する操作を2回繰り返してRNAを得た。得られたRNAを水80μLに溶解し、前記測定方法1に記載の方法で画分中のRNAの純度を算出すると、純度は70.9%であった。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 3 】

[参考例 2]

RNAのアミダイト法による固相合成

以下に示すIIの核酸配列を有するRNAを合成した。当該鎖は67塩基長からなる。

【 0 0 9 4 】

鎖II : Am*Gm*Cm*AmUmAmGmCAAGUUAmAAAUAGGmC*U*AmG*U*C*CmGUUAU
 CAAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGGCACmCmGmAGUCGGmUmGmCm*Um*
 Um*U (5'-3') (配列番号2)

前記配列の表記において、ヌクレオチドの間の記号*は、ヌクレオチドを繋ぐリン酸結合が、ホスホロチオエートであることを表す。アルファベットAm, Um, Cm, Gmは2'水酸基がメトキシ基に置き換わったヌクレオチドを示す。当該RNAは、ホスホロアミダイト法に基づき、核酸合成機 (AKTA oligo pilot plus 100 GEヘルスケア社) を用いて3'側から5'側に向かって合成した。合成は53 μmolスケールにて実施した。また、当該合成にはRNAアミダイトとして、ウリジンEMMアミダイト (国際公開第2013/027843号の実施例2に記載)、シチジンEMMアミダイト (同実施例3に記載)、アデノシンEMMアミダイト (同実施例4に記載)、およびグアノシンEMMアミダイト (同実施例5に記載) と、それぞれ下記の式のウリジン2'OMeアミダイト、シチジン2'OMeアミダイト、アデノシン2'OMeアミダイト、およびグアノシン2'OMeアミダイトを使用し、固相担体として多孔質ガラスを使用し、デブロッキング溶液としてジクロロ酢酸トルエン溶液を使用し、縮合剤として5-ベンジルチオ-1H-テトラゾールを使用し、酸化剤としてヨウ素溶液を使用し、硫化剤として3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオンを使用し、キャッピング溶液として無水フェノキシ酢酸溶液とN-メチルイミダゾール溶液とを使用して行った。核酸伸長終了後担体上の核酸にジエチルアミン溶液を作用させることでリン酸部分のシアノエチル保護基を選択的に脱保護した。ここで、EMMは、(2-シアノエトキシ)メトキシメチル基の略号である。

【 0 0 9 5 】

10

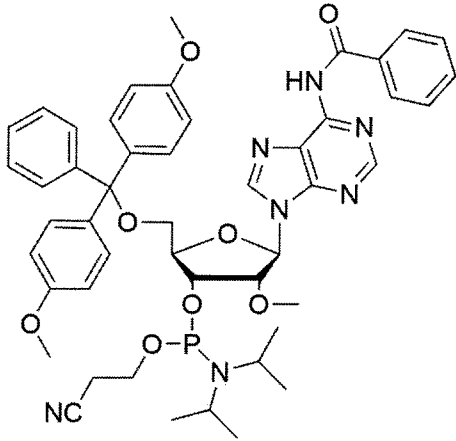
20

30

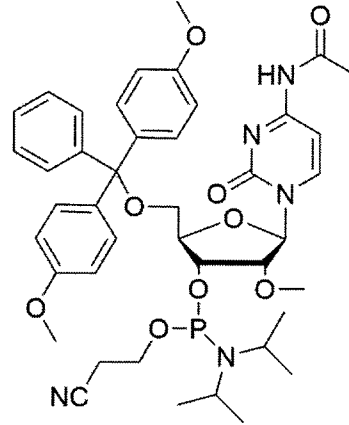
40

50

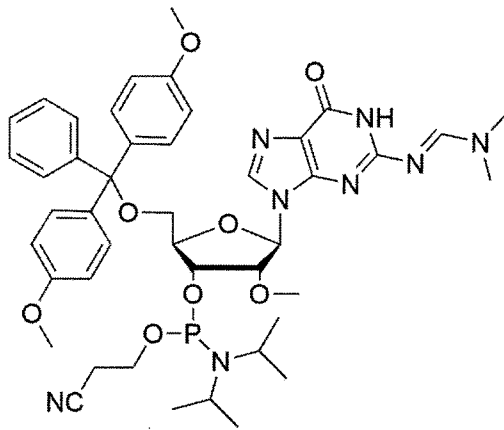
【化 7】



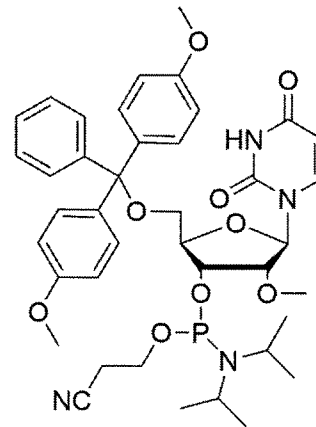
アデノシン2' OMeアミダイト



シチジン2' OMeアミダイト



グアノシン2' OMeアミダイト



ウリジン2' OMeアミダイト

【0096】

固相合成後の固相担体からの切出しと脱保護は、国際公開第2013/027843号に記載の方法に従った。すなわち、アンモニア水溶液とエタノールとを加え、しばらく静置した後に固相担体をろ過し、溶媒を留去した。その後、テトラブチルアンモニウムフルオリドを用いて水酸基の脱保護を行った。得られたRNAを、注射用蒸留水を用いて所望の濃度となるように溶解した。

【0097】

RNAの分取精製

下記表4の条件でカラムクロマトグラフィー精製を行った。ただし、精製前にカラム内に移動相Aを流速4.7 mL/minで12.5分間通液したのちにサンプルを添加した。保持時間66.7分-70.9分までを分取し、得られた溶液をHPLCにて分析した。なお、前記測定方法1に記載の方法で純度を算出した。その結果、純度94.2%であった。この分取精製したRNA溶液を用いて以下の実施例および比較例の実験を行った。

【0098】

10

20

30

40

50

【表 4】

装置	AKTApurifier100 (GE Healthcare社製)
検出器	UV 260nm
カラム	YMC製 Triart C18 10mm×250mm, 10 μ m
分離モード	逆相クロマトグラフィー
カラム温度	60℃
流速	4.7mL/min
移動相A	100mM ジブチルアンモニウムアセテート水溶液 (pH 7.0)
移動相B	アセトニトリル(10%メタノール含有(v/v))
分取幅	3.9mL
グラジエント条件	B conc. 0%(0min)-35%(12.5min)-50%(137.6min)-100%(137.7min)-100%(145.9min)

10

【0099】

[実施例 5]

参考例 2 において逆相カラムクロマトグラフィーで分取精製した RNA 溶液 99 μ L を容量 300 mL のポリプロピレン製バイアル (サーモフィッシャー社) に入れ、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液を 1 μ L 混合し、L - メチオニンの濃度が 1.5 mM の試料を調製した。混合溶液の入ったバイアルを 60 に温調されたインキュベータ (ケニス社) に入れ、8 時間静置した。静置後、インキュベータから取り出したポリプロピレン製バイアルを室温まで冷却し、前記測定方法 1 に記載の方法で純度を算出した。結果を表 5 に示す。

20

【0100】

L - メチオニンの濃度が、1.5 mM (0.02%) に調製された組成物は、計算によれば、以下の組成を有する。水：62.95%、アセトニトリル：32.21%、メタノール：3.59%、ジブチルアミン 0.82%、酢酸：0.38%、(ジブチルアンモニウム酢酸として 1.20%)、核酸濃度：0.31 mg/mL (0.03%)。

【0101】

[実施例 6]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、N - ホルミル - L - メチオニンのメタノール溶液を使用して N - ホルミル - L - メチオニンの濃度を 3 mM (0.06%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

30

【0102】

[実施例 7]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、N - アセチル - DL - メチオニンのメタノール溶液を使用して N - アセチル - DL - メチオニンの濃度を 3 mM (0.06%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

40

【0103】

[実施例 8]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、N - ベンゾイル - DL - メチオニンのメタノール溶液を使用して N - ベンゾイル - DL - メチオニンの濃度を 3 mM (0.08%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

【0104】

[実施例 9]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、N

50

- カルボベンゾキシ - D L - メチオニンのメタノール溶液を使用して N - カルボベンゾキシ - D L - メチオニンの濃度を 3 m M (0 . 1 2 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

【 0 1 0 5 】

[実施例 1 0]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、N - F m o c - L - メチオニンをメタノールとアセトニトリルの混合溶媒(混合比 5 0 : 5 0 (v / v)) に溶解した溶液を使用して N - F m o c - L - メチオニンの濃度を 3 m M (0 . 1 0 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

10

【 0 1 0 6 】

[実施例 1 1]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、L - メチオニンメチル塩酸塩の水溶液を使用して L - メチオニンメチル塩酸塩の濃度を 3 m M (0 . 0 7 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

【 0 1 0 7 】

[実施例 1 2]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、ジブチルスルフィドのアセトニトリル溶液を使用してジブチルスルフィドの濃度を 3 m M (0 . 0 5 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

20

【 0 1 0 8 】

[実施例 1 3]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに、ジヘキシルスルフィドのアセトニトリル溶液を使用してジブチルスルフィドの濃度を 3 m M (0 . 0 7 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

【 0 1 0 9 】

[実施例 1 4]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりにチアゾリジン - 2 - カルボン酸の水溶液を使用してチアゾリジン - 2 - カルボン酸の濃度を 3 m M (0 . 0 4 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

30

【 0 1 1 0 】

[実施例 1 5]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに 2 - イソブチル - 4 , 5 - ジメチル - 3 - チアゾリン(異性体混合物)のアセトニトリル溶液を使用して 2 - イソブチル - 4 , 5 - ジメチル - 3 - チアゾリン(異性体混合物)の濃度を 3 m M (0 . 0 6 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

40

【 0 1 1 1 】

[実施例 1 6]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに 4 - オキシチアンのアセトニトリル溶液を使用して 4 - オキシチアンの濃度を 3 m M (0 . 0 4 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の R N A の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

【 0 1 1 2 】

[実施例 1 7]

実施例 5 の実験において、添加剤溶液として、L - メチオニンの水溶液の代わりに 1 ,

50

4 - チオキサンのアセトニトリル溶液を使用して 1, 4 - チオキサンの濃度を 3 mM (0 . 0 3 %) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 5 に示す。

【 0 1 1 3 】

[比較例 4]

参考例 2 において逆相カラムクロマトグラフィーで分取精製した RNA 溶液 1 0 0 μ L を容量 3 0 0 m L のポリプロピレン製バイアル (サーマフィッシャー社) に入れ、溶液の入ったバイアルを 6 0 に温調されたインキュベータ (ケニス社) に入れ、8 時間静置した。静置後、インキュベータから取り出したポリプロピレン製バイアルを室温まで冷却し、前記測定方法 1 に記載の方法で純度を算出した。結果を表 5 に示す。

10

【表 5】

	添加剤	添加剤の濃度 (mM)	HPLC測定純度 ¹⁾	核酸の保持率 ²⁾
実施例 5	L-メチオニン	1. 5	9 1. 5 %	9 7 %
実施例 6	N-ホルミル-L-メチオニン	3. 0	9 2. 0 %	9 8 %
実施例 7	N-アセチル-DL-メチオニン	3. 0	9 2. 6 %	9 8 %
実施例 8	N-ベンゾイル-DL-メチオニン	3. 0	9 2. 5 %	9 8 %
実施例 9	N-カルボベンゾキシ-DL-メチオニン	3. 0	9 2. 6 %	9 8 %
実施例 1 0	N-F m o c-L-メチオニン	3. 0	9 2. 1 %	9 8 %
実施例 1 1	L-メチオニンメチル塩酸塩	3. 0	9 1. 5 %	9 7 %
実施例 1 2	ジブチルスルフィド	3. 0	8 8. 9 %	9 4 %
実施例 1 3	ジヘキシルスルフィド	3. 0	8 7. 0 %	9 2 %
実施例 1 4	チアゾリジン-2-カルボン酸	3. 0	9 2. 3 %	9 8 %
実施例 1 5	2-イソブチル-4, 5-ジメチル-3-チアゾリン(異性体混合物)	3. 0	9 0. 7 %	9 6 %
実施例 1 6	4-オキソチアン	3. 0	8 8. 8 %	9 4 %
実施例 1 7	1, 4-チオキサン	3. 0	8 9. 8 %	9 5 %
比較例 4	なし	-	8 3. 4 %	8 9 %

20

30

1) 参考例 2 で調製した核酸 (純度 9 4 . 2 %) を 6 0 / 8 時間静置した後の核酸の純度を表す。

40

2) 核酸の保持率 (%) = 静置後の核酸純度 / 静置前の核酸純度

【 0 1 1 4 】

[参考例 3]

RNA の分取精製

参考例 2 で得られたテトラブチルアンモニウムフルオリドを用いて水酸基の脱保護を行った RNA について、下記表 6 の条件でカラムクロマトグラフィー精製を行った。ただし、精製前にカラム内に移動相 A を流速 4 . 7 m L / m i n で 1 2 . 5 分間通液したのちにサンプルを添加した。保持時間 9 1 . 7 分 - 9 4 . 2 分までを分取し、得られた溶液を H P L C にて分析した。なお、前記測定方法 1 に記載の方法で純度を算出した。その結果、純度 9 5 . 1 % であった。この分取精製した RNA 溶液を用いて以下の実施例および比較

50

例の実験を行った。

【 0 1 1 5 】

【表 6】

装置	AKTApurifier100 (GE Healthcare社製)
検出器	UV 260nm
カラム	YMC製 Triart C18 10mm×250mm, 10 μ m
分離モード	逆相クロマトグラフィー
カラム温度	60°C
流速	4.7mL/min
移動相A	100mM ヘキシルアンモニウムアセテート水溶液 (pH 7.0)
移動相B	アセトニトリル(10%メタノール含有(v/v))
分取幅	3.9mL
グラジエント 条件	B conc. 0%(0min)-35%(12.5min)-50%(137.6min)- 100%(137.7min)-100%(145.9min)

10

【 0 1 1 6 】

[実施例 1 8]

参考例 3 において逆相カラムクロマトグラフィーで分取精製した RNA 溶液 99 μ L を容量 300 mL のポリプロピレン製バイアル (サーモフィッシャー社) に入れ、添加剤溶液として、 α -リポ酸のアセトニトリル溶液を 1 μ L 混合し、 α -リポ酸の濃度が 3 mM の試料を調製した。混合溶液の入ったバイアルを 60 $^{\circ}$ C に温調されたインキュベータ (ケニス社) に入れ、14 時間静置した。静置後、インキュベータから取り出したポリプロピレン製バイアルを室温まで冷却し、前記測定方法 1 に記載の方法で純度を算出した。結果を表 7 に示す。

20

【 0 1 1 7 】

α -リポ酸の濃度が、3.0 mM (0.07%) に調製された組成物は、計算によれば、以下の組成を有する。水: 59.69%、アセトニトリル: 35.38%、メタノール: 3.84%、ヘキシルアミン 0.61%、酢酸: 0.36%、(ヘキシルアンモニウム酢酸として 0.97%)、核酸濃度: 0.35 mg/mL (0.04%)。

30

【 0 1 1 8 】

[実施例 1 9]

実施例 1 8 の実験において、添加剤溶液として、 α -リポ酸のアセトニトリル溶液の代わりに、L-メチオニンの水溶液を使用して L-メチオニンの濃度を 3 mM (0.05%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 7 に示す。

【 0 1 1 9 】

[実施例 2 0]

実施例 1 8 の実験において、添加剤溶液として、 α -リポ酸のアセトニトリル溶液の代わりに、DL-メチオニンの水溶液を使用して DL-メチオニンの濃度を 3 mM (0.05%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 7 に示す。

40

【 0 1 2 0 】

[実施例 2 1]

実施例 1 8 の実験において、添加剤溶液として、 α -リポ酸のアセトニトリル溶液の代わりに、酸化型グルタチオンの水溶液を使用して酸化型グルタチオンの濃度を 3 mM (0.01%) の液として調製する以外は同様の条件で実験を行い、実験後の RNA の純度を測定した。結果を表 7 に示す。

【 0 1 2 1 】

50

[比較例 5]

参考例 3 において逆相カラムクロマトグラフィーで分取精製した RNA 溶液 100 μ L を容量 300 mL のポリプロピレン製バイアル (サーモフィッシャー社) に入れ、溶液の入ったバイアルを 60 に温調されたインキュベータ (ケニス社) に入れ、14 時間静置した。静置後、インキュベータから取り出したポリプロピレン製バイアルを室温まで冷却し、前記測定方法 1 に記載の方法で純度を算出した。結果を表 7 に示す。

【0122】

[比較例 6]

実施例 18 の実験において、添加剤溶液として、リポ酸のアセトニトリル溶液の代わりに、イソブチレンスルフィドのアセトニトリル溶液または 4-tert-ブチルジフェニルスルフィドのアセトニトリル溶液をそれぞれ所定の濃度で用いる以外は、同様の条件で実験を行った。結果を表 7 に示す。

【表 7】

	添加剤	添加剤の濃度 (mM)	HPLC測定純度 ¹⁾	核酸の保持率 ²⁾
実施例 18	α -リポ酸	3.0	91.9%	97%
実施例 19	L-メチオニン	3.0	91.4%	96%
実施例 20	DL-メチオニン	3.0	92.3%	97%
実施例 21	酸化型グルタチオン	0.15	91.0%	96%
比較例 5	添加剤なし	-	88.8%	93%
比較例 6	イソブチレンスルフィド	3.0	31.7%	33%
	4-tert-ブチルジフェニルスルフィド	3.0	85.0%	89%

1) 参考例 3 で調製した核酸 (純度 95.1%) を 60 / 8 時間静置した後の核酸の純度を表す。

2) 核酸の保持率 (%) = 静置後の核酸純度 / 静置前の核酸純度

【産業上の利用可能性】

【0123】

本発明によればホスホロチオエート結合を有する核酸オリゴマーを安定化させた組成物を得ることができ、よって、当該組成物を効率よく製造することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0124】

配列表の配列番号 1 および 2 は、本発明の製造方法に従って製造されるオリゴヌクレオチドの塩基配列を表す。

10

20

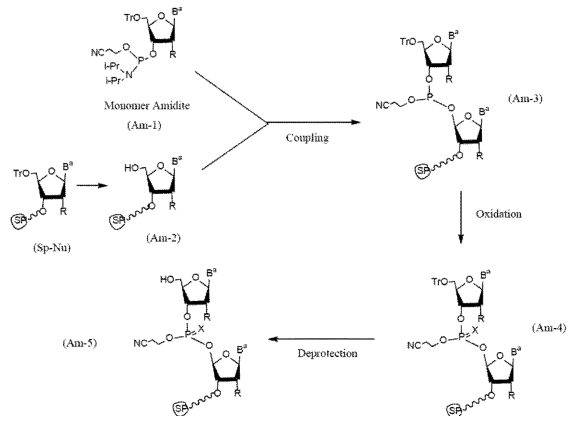
30

40

50

【図面】

【図 1】



10

【配列表】

[0007699581000001.app](#)

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

<i>C 0 7 H</i>	<i>1/06 (2006.01)</i>	<i>C 0 7 H</i>	<i>1/06</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/09 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>15/09</i>	<i>Z Z N A</i>
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/113 (2010.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>15/113</i>	<i>Z</i>

(56)参考文献

国際公開第 2 0 0 3 / 0 0 5 8 2 2 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 1 1 5 6 5 2 (W O , A 1)

特開平 0 7 - 1 7 0 9 8 1 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 H *2 1 / 0 2**A 6 1 K* *4 7 / 2 2**A 6 1 K* *4 7 / 1 8**A 6 1 K* *4 7 / 2 0**A 6 1 K* *3 1 / 7 1 2 5**C 0 7 H* *1 / 0 6**C 1 2 N* *1 5 / 0 9**C 1 2 N* *1 5 / 1 1 3**J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)**C a p l u s / R E G I S T R Y (S T N)*