

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月12日(12.09.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/185697 A1

(51) 国際特許分類:

C07H 21/02 (2006.01) C07H 1/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/007795

(22) 国際出願日: 2024年3月1日(01.03.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-033032 2023年3月3日(03.03.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東海国立大学機構 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKAI NATIONAL HIGHER EDUCATION AND RESEARCH SYSTEM) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).

(72) 発明者: 阿部 洋(ABE, Hiroshi); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 木村 康明(KIMURA, Yasuaki); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 橋谷 文貴(HASHIYA, Fumitaka); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP). 阿部 奈保子(ABE, Naoko); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人東海国立大学機構内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYNUCLEOTIDE LINKED PRODUCT

(54) 発明の名称: ポリヌクレオチド連結産物の製造方法

(57) Abstract: The present disclosure provides a technique that enables the simple preparation and/or purification of a desired polynucleotide linked product. Specifically, a desired polynucleotide linked product can be simply prepared and/or isolated by using a polynucleotide fragment containing a hydrophobic tag for the linking reaction.

(57) 要約: 本開示は、所望のポリヌクレオチド連結産物を簡便に調製及び/又は精製可能な技術を提供する。具体的には、疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片を連結反応に用いることで、所望のポリヌクレオチド連結産物が簡便に調製及び/又は単離され得る。



WO 2024/185697 A1

明 細 書

発明の名称：ポリヌクレオチド連結産物の製造方法

技術分野

[0001] 本開示は、ポリヌクレオチド連結産物の製造方法、ポリヌクレオチドの精製方法、及び疎水性タグを含むポリヌクレオチド等に関する。

背景技術

[0002] 近年、抗体医薬や低分子医薬に次ぐ次世代の医薬として核酸医薬が注目されている。特にmRNA医薬は新型コロナウイルスに対するワクチンとして用いられており、COVID-19パンデミック下において世間からの関心も高い。

[0003] 生体内安定性や翻訳効率、純度等の観点から、mRNA医薬のさらなる改良が検討されている。例えば特許文献1においては、ヌクレオチド類の5'末端側に疎水性保護基を導入することにより、所望の5'末端構造を有するヌクレオチド類を精製する技術が検討されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2023/282245号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] mRNA医薬は、RNAの5'末端側から順に、キャップ構造（5'キャップ）、5'非翻訳領域（5' UTR）、翻訳領域、3'非翻訳領域（3' UTR）、及びポリA鎖から構成される。特許文献1では、所望の5'末端構造を有するヌクレオチド類を得ることを主目的としており、3'末端側の構造の制御については、具体的には検討されていない。

[0006] 一般的にmRNAは、DNAを鋳型として5'末端のキャップ構造から3' UTRまで転写した後に（in vitro 転写法：IVT法）、ポリA鎖を付加することで合成される。しかしIVT法を用いたmRNA合成法では、3'末端配列や付加するポリA鎖長の

制御が困難である。したがって従来のIVT法を用いたmRNA合成においては、均質なmRNA、特に3'末端側の構造が制御されたmRNAを得ることが困難である。

[0007] また、mRNA医薬においては長鎖RNAを高純度に調製することが重要である。長鎖ポリヌクレオチドを調製する方法の1つに複数のポリヌクレオチド断片を連結する方法がある。ポリヌクレオチド断片を連結することにより長鎖ポリヌクレオチドを得ようとする場合、連結反応を定量的に進行させることは非常に困難であるため、連結反応後の当該反応系には所望のポリヌクレオチド連結産物と未反応のポリヌクレオチド断片とが混在することとなる。このため、当該方法においては、ポリヌクレオチド断片の連結反応後に所望のポリヌクレオチド連結産物を精製することが必要である。

[0008] 本発明者らは上記事情に鑑みて、所望のポリヌクレオチド連結産物を簡便に調製及び／又は精製可能な技術を提供することを主な目的とした。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片を連結反応に用いることで、所望のポリヌクレオチド連結産物を簡便に調製及び／又は単離できる可能性を見出した。そしてさらに改良を重ね、本開示を完成させるに至った。

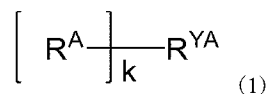
[0010] 本開示は例えば以下の項に記載の主題を包含する。

項1.

工程(α)：疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片(A)、及び疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片(B)を連結する工程を含み、

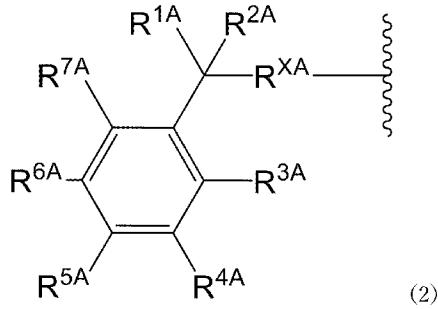
前記ポリヌクレオチド断片(A)が一般式(1)：

[化1]



[式中：kは1以上の整数を示す。R^{YA}はポリヌクレオチドからk個の原子又は基を除いてなるk個の基を示す。R^Aは同一又は異なって、一般式(2)：

[化2]

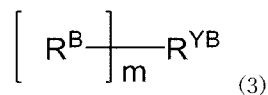


(式中： R^{1A} はアルキル基を示す。 R^{2A} は水素原子又はアルキル基を示す。 R^{3A} 及び R^{5A} のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。 R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す（ただし R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す）。 R^{xA} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

で表される、ポリヌクレオチド断片であり、かつ、

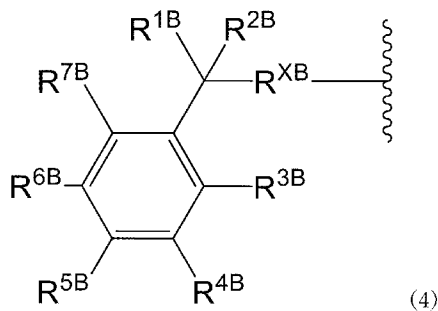
前記ポリヌクレオチド断片 (B) が一般式 (3) :

[化3]



[式中：mは1以上の整数を示す。 R^{YB} はポリヌクレオチドからm個の原子又は基を除いてなるm価の基を示す。 R^B は同一又は異なって、一般式 (4) :

[化4]



(式中： R^{1B} はアルキル基を示す。 R^{2B} は水素原子又はアルキル基を示す。 R^{3B} 及び R^{5B} のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。 R^{4B} 、 R^{6B} 、及び R^{7B} は同一又は異なって、水素原子、アルキ

ル基、又はアルコキシ基を示す（ただし R^{3B} がニトロ基である場合、 R^{4B} 及び R^{7B} は水素原子を示す）。 R^{XB} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

で表される、ポリヌクレオチド断片である、
ポリヌクレオチド連結産物の製造方法。

項2.

工程（ β ）：前記ポリヌクレオチド連結産物を、当該連結産物の疎水性の程度に基づいて精製する工程

をさらに含む、項1に記載の製造方法。

項3.

工程（ γ ）：前記疎水性タグを脱離する工程

をさらに含む、項1又は2に記載の製造方法。

項4.

R^A が R^{YA} の3'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合している、項1~3のいずれかに記載の製造方法。

項5.

R^B が R^{YB} の5'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合している、項1~4のいずれかに記載の製造方法。

項6.

前記工程（ β ）が、液体クロマトグラフィーによる分離工程を含む、項2~5のいずれかに記載の製造方法。

項7.

前記工程（ γ ）が、光照射による疎水性タグの脱離工程及び／又は還元処理による疎水性タグの脱離工程を含む、項3~6のいずれかに記載の製造方法。

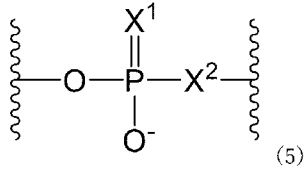
項8.

前記ポリヌクレオチド断片（A）が有するリンカー R^{XA} 、及び前記ポリヌクレオチド断片（B）が有するリンカー R^{XB} が、同一又は異なって、単結合、 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-(CH_2)_n-R^8-$ 、又は

—O—C(=O)—(CH₂)_n—R⁸— [式中、nは1以上の整数を示す。R⁸は一般式

(5) :

[化5]

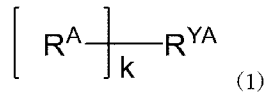


(X¹及びX²は同一又は異なって、O又はSである) で表される2価の基を示す。] である、項1～7のいずれかに記載の製造方法。

項9.

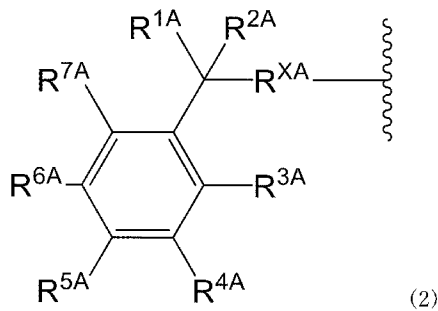
前記ポリヌクレオチド断片(A)が一般式(1) :

[化6]



[式中：kは1以上の整数を示す。R^{YA}はポリヌクレオチドからk個の原子又は基を除いてなるk価の基を示す。R^Aは同一又は異なって、一般式(2) :

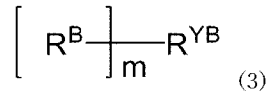
[化7]



(式中：R^{1A}は炭素数1～30のアルキル基を示す。R^{2A}は水素原子又は炭素数1～10のアルキル基を示す。R^{3A}及びR^{5A}のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、炭素数1～10のアルキル基、又は炭素数1～10のアルコキシ基を示す。R^{4A}、R^{6A}、及びR^{7A}は同一又は異なって、水素原子、炭素数1～10のアルキル基、又は炭素数1～10のアルコキシ基を示す(ただしR^{3A}がニトロ基である場合、R^{4A}及びR^{7A}は水素原子を示す)。R^{XA}はリンカーを示す。) で表される基を示す。]

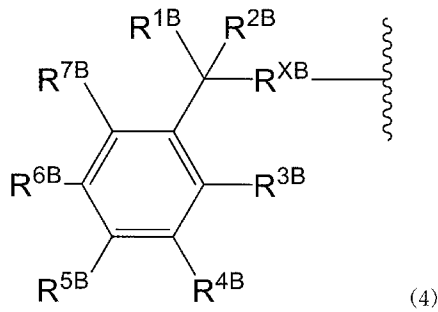
で表されるポリヌクレオチド断片であり、かつ、
前記ポリヌクレオチド断片 (B) が一般式 (3) :

[化8]



[式中：mは1以上の整数を示す。R^{YB}は同一又は異なって、ポリヌクレオチドからm個の原子又は基を除いてなるm個の基を示す。R^Bは一般式 (4) :

[化9]



(式中：R^{1B}は炭素数1~30のアルキル基を示す。R^{2B}は水素原子又は炭素数1~10のアルキル基を示す。R^{3B}及びR^{5B}のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示す。R^{4B}、R^{6B}、及びR^{7B}は同一又は異なって、水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示す(ただしR^{3B}がニトロ基である場合、R^{4B}及びR^{7B}は水素原子を示す)。R^{XB}はリンカーを示す。)で表される基を示す。]

で表されるポリヌクレオチド断片である、項1~8のいずれかに記載の製造方法。

項10.

前記ポリヌクレオチド連結産物の塩基長が20塩基長~2000塩基長である、項1~9のいずれかに記載の製造方法。

項11.

前記工程(α)において当該反応系が、前記ポリヌクレオチド断片(A)の少なくとも一部と相補的な配列、及び前記ポリヌクレオチド断片(B)の少なく

とも一部と相補的な配列を有するポリヌクレオチドを含む、項1～10のいずれかに記載の製造方法。

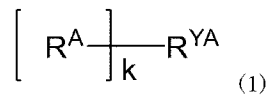
項12.

前記ポリヌクレオチド連結産物がmRNA医薬である、項1～11のいずれかに記載の製造方法。

項13.

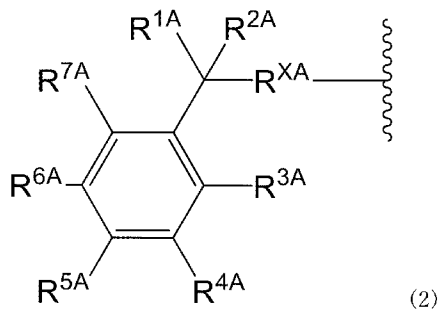
一般式(1)：

[化10]



[式中、kは1以上の整数を示す。R^{YA}はポリヌクレオチドからk個の原子又は基を除いてなるk個の基を示す。R^Aは同一又は異なって、一般式(2)：

[化11]



(式中：R^{1A}はアルキル基を示す。R^{2A}は水素原子又はアルキル基を示す。R^{3A}及びR^{5A}のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。R^{4A}、R^{6A}、及びR^{7A}は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す(ただしR^{3A}がニトロ基である場合、R^{4A}及びR^{7A}は水素原子を示す)。R^{xA}はリンカーを示す。)で表される基を示す。]

で表され、かつ、

R^AがR^{YA}の3'末端側から1～30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合している、ポリヌクレオチド。

項14.

R^A が R^{YA} の5'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合している、項13に記載のポリヌクレオチド。

項15.

前記一般式(1)において、

R^{1A} が炭素数1~30のアルキル基を示し、

R^{2A} は水素原子又は炭素数1~10のアルキル基を示し、

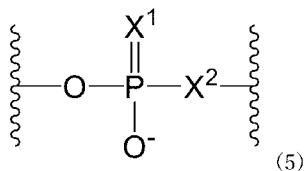
R^{3A} 及び R^{5A} のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示し、

R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} は同一又は異なって、水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示す(ただし R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す)ことを特徴とする、項13又は14に記載のポリヌクレオチド。

項16.

前記リンカー R^{XA} が、同一又は異なって、単結合、 $-O-CH_2-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-(CH_2)_n-R^8-$ 、又は $-O-C(=O)-(CH_2)_n-R^8-$ [式中、 n は1以上の整数を示す。 R^8 は一般式(5) :

[化12]



(X^1 及び X^2 は同一又は異なって、O又はSである)で表される2価の基を示す。]である、項13~15のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

項17.

20~2000塩基長である、項13~16のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

項18.

mRNA医薬である、項13~17のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

項 19.

RNA連結産物の製造方法であって、

工程 (α) : 疎水性タグを含むRNA断片 (A) 、及び疎水性タグを含むRNA断片 (B) を連結する工程、

工程 (β) : RNA連結産物を、当該連結産物の疎水性の程度に基づいて精製する工程、並びに

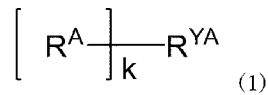
工程 (γ) : 疎水性タグを脱離する工程

を含み、

前記工程 (α) において当該反応系が、前記RNA断片 (A) の少なくとも一部と相補的な配列、及び前記RNA断片 (B) の少なくとも一部と相補的な配列を有するポリヌクレオチドを含み、

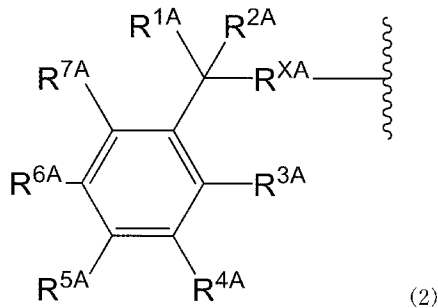
前記RNA断片 (A) が一般式 (1) :

[化13]



[式中 : kは1以上の整数を示す。R^{YA}はRNAからk個の原子又は基を除いてなるk価の基を示す。R^Aは同一又は異なって、一般式 (2) :

[化14]



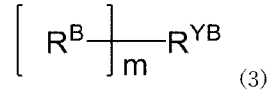
(式中 : R^{1A}はアルキル基を示す。R^{2A}は水素原子又はアルキル基を示す。R^{3A}及びR^{5A}のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。R^{4A}、R^{6A}、及びR^{7A}は同一又は異なって、水素原子、アルキ

ル基、又はアルコキシ基を示す（ただし R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す）。 R^{xA} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

で表される、RNA断片であり、かつ、

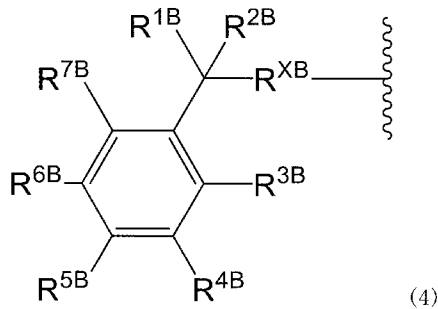
前記RNA断片 (B) が一般式 (3) :

[化15]



[式中：mは1以上の整数を示す。 R^{YB} はRNAからm個の原子又は基を除いてなるm個の基を示す。 R^B は同一又は異なって、一般式 (4) :

[化16]



(式中： R^{1B} はアルキル基を示す。 R^{2B} は水素原子又はアルキル基を示す。 R^{3B} 及び R^{5B} のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。 R^{4B} 、 R^{6B} 、及び R^{7B} は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す（ただし R^{3B} がニトロ基である場合、 R^{4B} 及び R^{7B} は水素原子を示す）。 R^{xB} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

で表される、RNA断片であり、

前記工程 (β) が、液体クロマトグラフィーによる分離工程を含み、かつ、

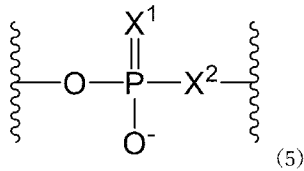
前記工程 (γ) が、光照射による疎水性タグの脱離工程及び／又は還元処理による疎水性タグの脱離工程を含む、

RNA連結産物の製造方法。

項 20.

前記RNA断片 (A) が有するリンカー R^{XA} 、及び前記RNA断片 (B) が有するリンカー R^{XB} が、同一又は異なって、単結合、 $-O-CH_2-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-(CH_2)_n-R^8-$ 、又は $-O-C(=O)-(CH_2)_n-R^8-$ [式中、 n は1以上の整数を示す。 R^8 は一般式 (5) :

[化17]

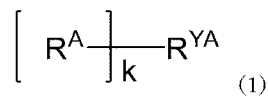


(X^1 及び X^2 は同一又は異なって、 O 又は S である) で表される2価の基を示す。]である、項19に記載の製造方法。

項21.

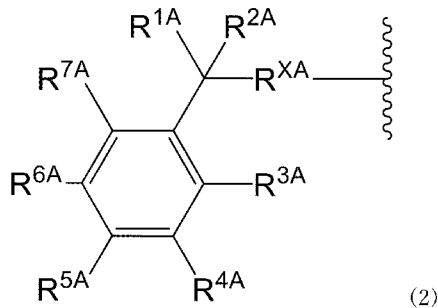
前記RNA断片 (A) が一般式 (1) :

[化18]



[式中： k は1以上の整数を示す。 R^{YA} はRNAから k 個の原子又は基を除いてなる k 価の基を示す。 R^A は同一又は異なって、一般式 (2) :

[化19]



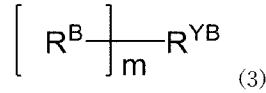
(式中： R^{1A} は炭素数1~30のアルキル基を示す。 R^{2A} は水素原子又は炭素数1~10のアルキル基を示す。 R^{3A} 及び R^{5A} のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示す。 R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} は同一又は異なって、水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又

は炭素数1~10のアルコキシ基を示す（ただし R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す）。 R^{xA} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

で表されるRNA断片であり、かつ、

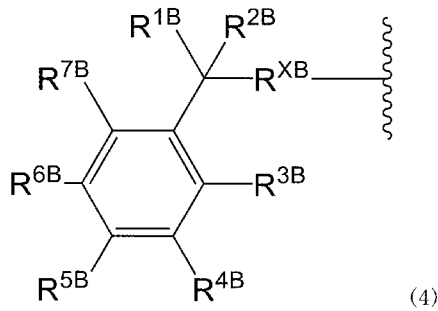
前記RNA断片 (B) が一般式 (3) :

[化20]



[式中：mは1以上の整数を示す。 R^{yB} は同一又は異なって、RNAからm個の原子又は基を除いてなるm個の基を示す。 R^B は一般式 (4) :

[化21]



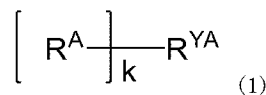
(式中： R^{1B} は炭素数1~30のアルキル基を示す。 R^{2B} は水素原子又は炭素数1~10のアルキル基を示す。 R^{3B} 及び R^{5B} のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示す。 R^{4B} 、 R^{6B} 、及び R^{7B} は同一又は異なって、水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示す（ただし R^{3B} がニトロ基である場合、 R^{4B} 及び R^{7B} は水素原子を示す）。 R^{xB} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

で表されるRNA断片である、項19又は20に記載の製造方法。

項22.

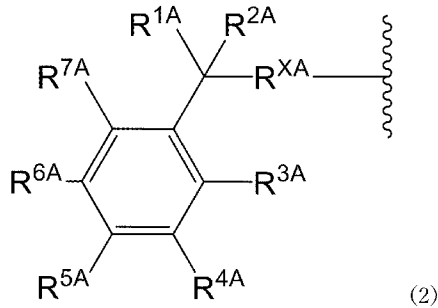
一般式 (1) :

[化22]



[式中、kは1以上の整数を示す。R^{YA}はRNAからk個の原子又は基を除いてなるk価の基を示す。R^Aは同一又は異なって、一般式(2)：

[化23]



(式中：R^{1A}が炭素数1~30のアルキル基を示し、R^{2A}は水素原子又は炭素数1~10のアルキル基を示し、R^{3A}及びR^{5A}のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示し、R^{4A}、R^{6A}、及びR^{7A}は同一又は異なって、水素原子、炭素数1~10のアルキル基、又は炭素数1~10のアルコキシ基を示す(ただしR^{3A}がニトロ基である場合、R^{4A}及びR^{7A}は水素原子を示す)。R^{XA}はリンカーを示す。)で表される基を示す。]

で表され、

R^AがR^{YA}の3'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合しており、かつ

R^AがR^{YA}の5'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合している、RNA。

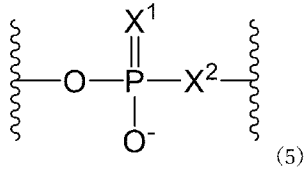
項23.

前記リンカーR^{XA}が、同一又は異なって、単結合、—O—CH₂—、—O—C(=

O)—、—C(=O)—、—O—(CH₂)_n—R⁸—、又は—O—C(=O)—(CH₂)_n—R⁸—

— [式中、nは1以上の整数を示す。R⁸は一般式(5)：

[化24]



(X^1 及び X^2 は同一又は異なって、O又はSである) で表される2価の基を示す。] である、項22に記載のRNA。

発明の効果

[0011] 上述の通りmRNA医薬は、RNAの5'末端側から順に、キャップ構造(5'キャップ)、5'非翻訳領域(5'UTR)、翻訳領域、3'非翻訳領域(3'UTR)、及びポリA鎖から構成される。翻訳領域以外の構造がmRNAの安定性や翻訳効率に影響することが知られているが、従来のmRNA合成法では、3'末端配列や付加するポリA鎖長の制御が困難であった。すなわち従来のmRNA合成法で得られるmRNAは、特に3'末端配列やポリA鎖長において均質ではなかった。一方本開示の技術によれば、疎水性タグを含むRNA断片同士を連結して疎水性の程度に基づいて精製を行うことにより、均質なmRNAを高い純度で得ることができる。また前記疎水性タグは温和な条件で脱離可能であるため、精製した連結産物から疎水性タグを脱離させた後に、さらにRNA断片を連結させることが可能である。すなわち所望の長さのRNA連結産物が得られるまで、RNA断片の連結・連結産物の精製・疎水性タグの脱離の工程を繰り返すことができる(図1)。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本開示の技術を用いたポリヌクレオチド連結産物の調製及び精製方法の概要を示す。図中右側は、各段階で逆相HPLCを行った場合に想定されるピークの変動を示す。

[図2]試験例2で行った還元処理前後の逆相HPLCの結果を示す。

[図3]試験例3において核酸自動合成機で合成した、5'末端にCPR-Nbを、3'末端に化合物26を導入した25merのRNAを示す。

[図4]試験例3で得た、5'末端にCPR-Nbを、3'末端に化合物26を導入した25merのRNAについて、逆相HPLCを行った結果を示す。*は目的の生成物(5'末端及

び3'末端に疎水性タグを有するRNA)のピークを示す。その他のピークは目的生成物から少なくとも1つの疎水性タグが外れたものを示すと考えられる。

[図5]図4に示した目的生成物を分取して、再度逆相HPLCを行った結果を示す。

[図6]試験例3において分取した目的のRNAに対して紫外線照射を行った後の逆相HPLCの結果を示す。

[図7]試験例4でライゲーション反応に用いたDNAテンプレート(i)、5'末端に疎水性タグを有する25merのRNA断片(ii)、及び3'末端に疎水性タグを有する25merのRNA断片(iii)、並びに前記ライゲーション反応によって生じる連結産物の模式図を示す。

[図8]試験例4で行った逆相HPLCの結果を示す。

[図9]試験例5の概要を示す。

[図10]ARCA(anti-reverse cap analog)を用いた従来の共転写的導入法(左図)及び試験例5-1で行った「Pure Capアナログ」を基質として用いる転写反応(右図)の概要を示す。

[図11]試験例5-1で転写した、NanoLuc(商標)ルシフェラーゼ(Promega社)をコードする配列を示す。

[図12]試験例5-1で得た転写産物についての逆相HPLCの結果を示す(分取及び紫外線照射前)。目的産物のピークを*で示す。

[図13]試験例5-1で行った、分取後の目的産物(*)及び分取後紫外線照射した産物(*')についての逆相HPLC結果を示す。

[図14]試験例5-1で行った、変性PAGEの結果を示す。

[図15]試験例5-2-1で合成した、ポリA鎖を含むRNAの配列を示す。PSはホスホロチオエート基を示す。

[図16]試験例5-2-1で合成した、ポリA鎖を含むRNAを、逆相HPLCで分離した結果を示す(紫外線照射前)。*は目的産物のピークを示す。

[図17]試験例5-2-1で行った、分取後の目的産物(*)の変性PAGEの結果を示す。

[図18]試験例5-2-1で行った、分取後の目的産物 (*) 及び分取後紫外線照射した産物 (*') についての逆相HPLC結果を示す。

[図19]試験例5-2-3で行ったポスト修飾前後の逆相HPLCの結果を示す。なお、ポスト修飾前の結果は図18に示したものと同一である。左図はポスト修飾前、右図はポスト修飾後の結果である。

[図20]試験例5-2-3で行った変性PAGEの結果を示す。3-OME : 3' 末端に3つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA。5-OME : 3' 末端に5つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA。

[図21]試験例5-2の概要を示す。

[図22]試験例5-3で行った逆相HPLC (分取及び紫外線照射前) の結果を示す。

[図23]試験例5-3で行った変性PAGEの結果を示す。レーン左から、マーカー、5' 側RNA断片、完全長mRNA (RNA連結産物)。

[図24]試験例5-3で行った逆相HPLC (分取及び紫外線照射後) の結果を示す。

[図25]試験例5-4の結果を示す。グラフ下部の構造は、試験例5-4に用いた各RNAの3' 末端側の構造を示す。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本開示に包含される各実施形態について、さらに詳細に説明する。本開示は、ポリヌクレオチド連結産物の製造方法、ポリヌクレオチド連結産物の精製方法、及び疎水性タグを含むポリヌクレオチド等を好ましく包含するが、これらに限定されるわけではなく、本開示は本明細書に開示され当業者が認識できる全てを包含する。

[0014] 本開示に包含されるポリヌクレオチド連結産物の製造方法は、疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片を連結する工程 (本開示において、工程 (α) と称されることがある) を含む。

[0015] 本開示において「ポリヌクレオチド」及び「核酸」は同じ意味で用いられ、2以上の任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指すものとする。また、「ポリヌクレオチド」との用語には「ポリヌクレオチド誘導体」が含まれる。すなわち本開示の「ポリヌクレオチド」との用語は、ヌクレオチドの誘導体を

含むポリヌクレオチド；ヌクレオチド間の結合が通常とは異なるポリヌクレオチド；及びヌクレオチドの誘導体を含み、さらに、ヌクレオチド間の結合が通常とは異なるポリヌクレオチドをも包含する。

[0016] ポリヌクレオチド誘導体のより具体的な例として、公知の化学修飾が施されたものが挙げられる。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、糖（リボース）の2位の水酸基を、 $-OR$ （ R は、例えば CH_3 （ $2'-O-Me$ ）、 $CH_2CH_2OCH_3$ （ $2'-O-MOE$ ）、 $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $CH_2CONHCH_3$ 、 CH_2CH_2CN 等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換等が挙げられる。ポリヌクレオチド誘導体の具体的な例としてさらに、リン酸部分やヒドロキシル部分が、例えば、ビオチン、アミノ基、低級アルキルアミン基、アセチル基等で修飾されたもの等を挙げることができるが、これに限定されない。また、ヌクレオチドの糖部の2' 酸素と4' 炭素を架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したものであるBNA（LNA）等もまた、ポリヌクレオチド誘導体として用いられ得る。

[0017] ヌクレオチドを構成する核酸塩基のより具体的な例として、DNA、RNA中の典型的な塩基（アデニン（A）、ウラシル（U）、グアニン（G）、シトシン（C）等）のみならず、これ以外の塩基、例えばヒポキサンチン（I）、修飾塩基等も包含される。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（5-ブロモウラシル）、6-アザピリミジン、6-アルキルピリミジン（6-メチルウラシル）、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-アミノプリン、イソグアニン、インドール、イミダゾール、キサンチン等が挙げられる。

[0018] ポリヌクレオチドとしては、本開示の技術の必要性が高く、また本開示の技術により優れた機能を有するものが得られるという観点から、RNAが特に好ましい。

[0019] 本開示において「ポリヌクレオチド断片」とは、後述する連結反応の基質となるポリヌクレオチドを指す。また、「ポリヌクレオチド連結産物」とは当該連結反応による生成物を指す。したがって、連結反応を連続して行う場合、先の連結反応によって生じた「ポリヌクレオチド連結産物」は、後の連結反応においては「ポリヌクレオチド断片」と称され得る。例えば、ポリヌクレオチド (a)、ポリヌクレオチド (b)、及びポリヌクレオチド (c) を順に連結するとき、第1の連結反応においてポリヌクレオチド (a) 及びポリヌクレオチド (b) は本開示の「ポリヌクレオチド断片」に、ポリヌクレオチド (a) 及びポリヌクレオチド (b) が連結されたポリヌクレオチド (a+b) は本開示の「ポリヌクレオチド連結産物」に、それぞれ該当する。一方第2の連結反応においては、ポリヌクレオチド (a+b) 及びポリヌクレオチド (c) が「ポリヌクレオチド断片」に、ポリヌクレオチド (a+b) 及びポリヌクレオチド (c) が連結されたポリヌクレオチド (a+b+c) が「ポリヌクレオチド連結産物」に、それぞれ該当する。

[0020] 本開示における「連結反応」は、2以上のポリヌクレオチドが連結される反応（すなわちポリヌクレオチド同士の分子間反応）であれば特に制限されず、化学合成的な連結反応であってもよく酵素的な連結反応であってもよい。化

学合成的な連結反応としては例えば、市販の自動核酸合成装置を用いて行われる連結反応等が挙げられる。酵素的な連結反応としては例えば、T4 DNAリガーゼ、E. coli DNAリガーゼ、Tfi DNAリガーゼ等のDNAリガーゼによる連結反応、T4 RNAリガーゼ1、T4 RNAリガーゼ2等のRNAリガーゼによる連結反応等が挙げられる。本開示における「連結反応」は酵素的な連結反応であることが好ましく、RNAリガーゼによる連結反応であることがより好ましく、T4 RNAリガーゼ2による連結反応であることが特に好ましい。また、本開示における「連結反応」はホスオジエステル結合が新たに生じる連結反応であることが好ましい。

[0021] 連結反応が酵素的な連結反応である場合、典型的には、連結対象である複数種（例えば2～5種、2～3種、又は2種）のポリヌクレオチド断片及び酵素（例えばリガーゼ）を含む溶液（好ましくはさらに鋳型を含む）中で連結反応を行う。この場合、反応温度は、酵素活性を発揮できる温度であれば特に制限されず、例えば10～80℃、15～50℃、15～40℃、又は15～35℃である。また、反応時間は、検出可能な程度の連結産物が生成される限りにおいて特に制限されず、例えば1～48時間、又は4～24時間である。

[0022] 特に制限されないが、本開示の連結反応においては当該反応系が、後述するポリヌクレオチド断片（A）の少なくとも一部と相補的な配列、及び後述するポリヌクレオチド断片（B）の少なくとも一部と相補的な配列を有するポリヌクレオチドを含むことが好ましい。当該ポリヌクレオチドは連結反応において「鋳型」として機能し、連結反応の効率を向上させ得る。より具体的には、ポリヌクレオチド断片（A）及びポリヌクレオチド断片（B）が当該鋳型の相補的な部位にアニーリングすることで、両ポリヌクレオチド断片の末端が近接することとなる。このため、例えば上述した連結反応が酵素的な連結反応である場合、当該酵素が両ポリヌクレオチド断片の末端を連結する反応の効率が向上し得る。

[0023] また、IVT法で得られるRNA断片の3'末端側配列は均質ではない。しかし鋳型存在下で連結反応を行うことで、所望の配列を有するRNA断片の3'末端にのみ

他方のRNA断片が連結することが期待される。すなわち特にIVT法で得られるRNA断片を連結反応に用いる場合に、反応系に鋳型が存在することによって目的外の配列を有する連結産物の生成が抑制され得る。

[0024] 本開示において用いられるポリヌクレオチド断片の調製方法は特に制限されず、従来公知の方法、又は従来公知の方法から容易に想到可能な方法を採用することができる。例えば市販の自動核酸合成装置を用いて化学的に合成してもよく、所望の配列をコードした鋳型となるポリヌクレオチドとポリヌクレオチド合成酵素を用いて酵素的に合成してもよく、複数のポリヌクレオチドを連結してもよい。ポリヌクレオチド合成酵素としては例えば、DNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼ等が挙げられる。さらに、前記合成に用いる原料又は基質として（モノ又はポリ）ヌクレオチド誘導体を用いてもよく、ポリヌクレオチドを合成した後に修飾を行ってもよい。

[0025] 本開示において、前記連結反応に供されるポリヌクレオチド断片の長さは本開示の効果が阻害されない限りにおいて特に制限されない。例えば2～100000塩基長、又は5～50000塩基長であってもよく、10～10000塩基長であることが好ましく、15～5000塩基長であることがより好ましく、20～1000塩基長であることが特に好ましい。前記範囲の上限又は下限は、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、又は90000塩基長であってもよい。

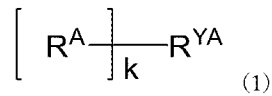
[0026] 本開示において、前記連結反応によって得られるポリヌクレオチド連結産物の長さは本開示の効果が阻害されない限りにおいて特に制限されない。例えば5～200000塩基長、又は10～100000塩基長であってもよく、20～50000塩基長であることが好ましく、50～10000塩基長であることがより好ましく、100～5000塩基長であることが特に好ましい。前記範囲の上限又は下限は、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、400

0、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、
50000、60000、70000、80000、90000、100000、200000、300000、
400000、500000、600000、700000、800000、又は900000塩基長であってもよ
い。

[0027] 本開示に包含されるポリヌクレオチド連結産物の製造方法は、より詳細に
は、以下のポリヌクレオチド断片 (A) 及び以下のポリヌクレオチド断片 (B)
を連結する工程を含む。

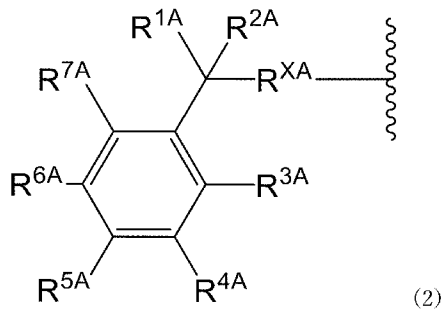
[0028] ポリヌクレオチド断片 (A) : 以下の一般式 (1) :

[化25]



[式中、kは1以上の整数を示す。R^{YA}はポリヌクレオチドからk個の原子又は基
を除いてなるk個の基を示す。R^Aは同一又は異なって、以下の一般式 (2) :

[化26]

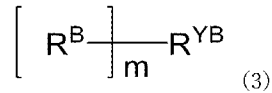


(式中、R^{1A}はアルキル基を示す。R^{2A}は水素原子又はアルキル基を示す。R^{3A}及
びR^{5A}のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、アルキル基、又はアル
コキシ基を示す。R^{4A}、R^{6A}、及びR^{7A}は同一又は異なって、水素原子、アルキル
基、又はアルコキシ基を示す (ただしR^{3A}がニトロ基である場合、R^{4A}及びR^{7A}は
水素原子を示す)。R^{xA}はリンカーを示す。) で表される基を示す。]

で表される、ポリヌクレオチド断片。

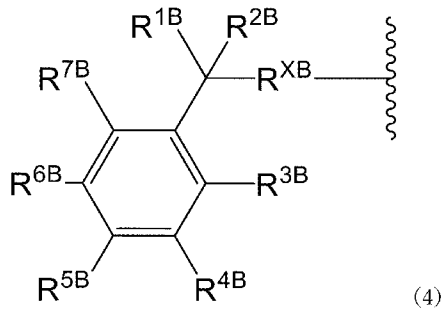
[0029] ポリヌクレオチド断片 (B) : 以下の一般式 (3) :

[化27]



[式中、mは1以上の整数を示す。R^{YB}はポリヌクレオチドからm個の原子又は基を除いてなるm個の基を示す。R^Bは同一又は異なって、以下の一般式(4)：

[化28]



(式中、R^{1B}はアルキル基を示す。R^{2B}は水素原子又はアルキル基を示す。R^{3B}及びR^{5B}のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。R^{4B}、R^{6B}、及びR^{7B}は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す(ただしR^{3B}がニトロ基である場合、R^{4B}及びR^{7B}は水素原子を示す)。R^{XB}はリンカーを示す。)で表される基を示す。]

で表される、ポリヌクレオチド断片。

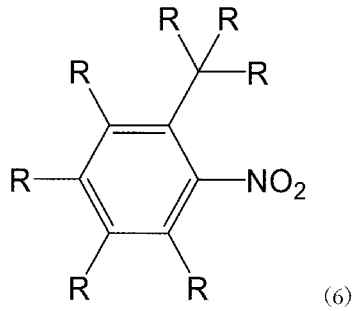
[0030] 上記一般式(2)又は(4)のうちリンカーを除いた構造を、本開示において特に「疎水性タグ」と称することがある。

[0031] 本開示において、kは1以上の整数であり、かつ本開示の効果が奏される限りにおいて特に制限されない。kは1~100であってもよく、1~50であってもよく、1~20であることが好ましく、1~10であることがより好ましく、1~5であることが特に好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、又は45であってもよい。以上のkに関する記載はmに援用される。なお、k及びmは同一であってもよく、異なってもよい。

- [0032] R^{1A} はアルキル基であれば特に制限されない。また、直鎖アルキル基であってもよく分岐鎖アルキル基であってもよい。さらに炭素数も特に制限されず、例えば炭素数1~30であってもよく、1~20であることが好ましく、1~10であることがより好ましく、1~5であることが特に好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、又は29であってもよい。以上の R^{1A} に関する記載は R^{1B} に援用される。なお、 R^{1A} 及び R^{1B} は同一であってもよく、異なってもよい。
- [0033] R^{2A} は水素原子又はアルキル基であれば特に制限されないが、水素原子であることが好ましい。 R^{2A} がアルキル基である場合、直鎖アルキル基であってもよく分岐鎖アルキル基であってもよい。さらに炭素数も特に制限されず、例えば炭素数1~10であってもよく、1~5であることが好ましく、1~4であることがより好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、又は9であってもよい。以上の R^{2A} に関する記載は R^{2B} に援用される。なお、 R^{2A} 及び R^{2B} は同一であってもよく、異なってもよい。
- [0034] R^{3A} 及び R^{5A} のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。 R^{3A} がニトロ基である場合、疎水性タグはo-ニトロベンジル骨格を有する。 R^{5A} がニトロ基である場合、疎水性タグはp-ニトロベンジル骨格を有する。なお、本開示においては、以下一般式(6)で表される構造をo-ニトロベンジル骨格と、一般式(7)で表される構造をp-ニトロベンジル骨格と、それぞれ称する。また本開示において、o-ニトロベンジル骨格又はp-ニトロベンジル骨格を有する部位を「ニトロベンジル部」と称することがある。

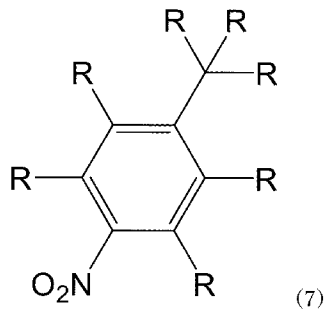
一般式(6) :

[化29]



一般式 (7) :

[化30]



[式中、Rはニトロ基以外の任意の置換基、又は水素原子を示す。]

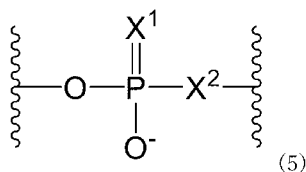
[0035] 特に制限されないが本開示のポリヌクレオチド断片は、 R^{3A} がニトロ基であること、すなわち疎水性タグが α -ニトロベンジル骨格を有することが好ましい。 R^{3A} 及び R^{5A} のうちニトロ基でない方は、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基であれば特に制限されないが、水素原子であることが好ましい。アルキル基である場合、直鎖アルキル基であってもよく分岐鎖アルキル基であってもよい。アルコキシ基である場合、直鎖アルコキシ基であってもよく分岐鎖アルコキシ基であってもよい。アルキル基又はアルコキシ基である場合、炭素数は特に制限されず、例えば炭素数1~10であってもよく、1~5であることが好ましく、1~4であることがより好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、又は9であってもよい。以上の R^{3A} 及び R^{5A} に関する記載は R^{3B} 及び R^{5B} に援用される。なお、 R^{3A} 及び R^{3B} 、並びに R^{5A} 及び R^{5B} は同一であってもよく、異なってもよい。

[0036] R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示すが、 R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す。特に制限されないが、 R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} は水素原子であることが好ましい。アルキル基である場合、直鎖アルキル基であってもよく分岐鎖アルキル基であってもよい。アルコキシ基である場合、直鎖アルコキシ基であってもよく分岐鎖アルコキシ基であってもよい。アルキル基又はアルコキシ基である場合、炭素数は特に制限されず、例えば炭素数1~10であってもよく、1~5であることが好ましく、1~4であることがより好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、又は9であってもよい。以上の R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} に関する記載は R^{4B} 、 R^{6B} 、及び R^{7B} に援用される。なお、 R^{4A} 及び R^{4B} 、 R^{6A} 及び R^{6B} 、並びに R^{7A} 及び R^{7B} は同一であってもよく、異なってもよい。

[0037] 本明細書において、アルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、 n -プロピル基、イソプロピル基、 n -ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、sec-ブチル基、 n -ペンチル基、ネオペンチル基、 n -ヘキシル基、3-メチルペンチル基等が挙げられる。また、アルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、 n -プロポキシ基、イソプロポキシ基、 n -ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基等が挙げられる。

[0038] R^{XA} はリンカーを示し、後述する疎水性タグの脱離工程において疎水性タグが脱離し得る限り、その構造は特に制限されない。 R^{XA} の構造としては例えば、単結合、 $-O-CH_2-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-(CH_2)_n-R^{\delta}$ 、 $-O-C(=O)-(CH_2)_n-R^{\delta}-$ [式中、 n は1以上の整数を示す。 R^{δ} は一般式(5)]:

[化31]



(X^1 及び X^2 は同一又は異なって、0又はSである) で表される2価の基を示す。] 等が挙げられる。以上の R^{XA} に関する記載は R^{XB} に援用される。なお、 R^{XA} 及び R^{XB} は同一であってもよく、異なってもよい。

[0039] R^{YA} はポリヌクレオチドからk個の原子又は基を除いてなるk価の基を示す。上述の通り本開示の「ポリヌクレオチド」との用語には「ポリヌクレオチド誘導体」が含まれる。したがって、 R^{YA} はポリヌクレオチド誘導体からk個の原子又は基を除いてなるk価の基であってもよい。前記ポリヌクレオチド誘導体としては、例えばメチル化等のアルキル化修飾されたもの等が挙げられる。

[0040] R^{YB} はポリヌクレオチドからm個の原子又は基を除いてなるm価の基を示す。 R^{YB} はポリヌクレオチド誘導体からm個の原子又は基を除いてなるm価の基であってもよく、前記ポリヌクレオチド誘導体としては、例えばメチル化等のアルキル化修飾されたもの等が挙げられる。

[0041] ポリヌクレオチドから除かれる原子又は基としては、例えばリン酸基、リン酸基を構成する水酸基又は水素原子、糖部の水酸基又は水素原子、核酸塩基のアミノ基又は水素原子等が挙げられる。

[0042] 特に制限されないが、 R^A は R^{YA} の3'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合していることが好ましい。換言すれば、本開示のポリヌクレオチド断片(A)は3'末端側から1~30塩基の位置に少なくとも1つの疎水性タグを有することが好ましい。後述する工程(β):ポリヌクレオチド連結産物を疎水性の程度に基づいて精製する工程において、当該精製効率を高める観点から、ポリヌクレオチド断片(A)は前記疎水性タグを3'末端側から1~20塩基の位置に有することがより好ましく、1~10塩基の位置に有することがさらに好ましく、1~5塩基の位置に有することが特に好ましい。また、これと同様の観点、さらにポリヌクレオチド断片(A)の製造効率等の観点から、ポリヌクレオチド断片(A)は前記疎水性タグを3'末端に有することが好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、又は29であってもよい。

[0043] 特に制限されないが、 R^B は R^{YB} の5'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合していることが好ましい。換言すれば、本開示のポリヌクレオチド断片(B)は5'末端側から1~30塩基の位置に少なくとも1つの疎水性タグを有することが好ましい。後述する工程(β):ポリヌクレオチド連結産物を疎水性の程度に基づいて精製する工程において、当該精製効率を高める観点から、ポリヌクレオチド断片(B)は前記疎水性タグを5'末端側から1~20塩基の位置に有することがより好ましく、1~10塩基の位置に有することがさらに好ましく、1~5塩基の位置に有することが特に好ましい。また、これと同様の観点、さらにポリヌクレオチド断片(B)の製造効率等の観点から、ポリヌクレオチド断片(B)は前記疎水性タグを3'末端に有することが好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、又は29であってもよい。

[0044] ポリヌクレオチド断片(A)は、ポリペプチドのコード配列を含むことが好ましく、また当該コード配列に加えて5'非翻訳領域(5'UTR)を含むことも好ましい。ポリヌクレオチド断片(B)は、ポリA領域(核酸塩基がアデニンであるヌクレオチドが複数(例えば3塩基~500塩基、好ましくは10塩基~300塩基、より好ましくは20塩基~250塩基)連結してなる領域)を含むことが好ましい。上記断片としてRNAである断片を用いて連結反応を行うことにより、均質なmRNA、特に3'末端側の構造が制御されたmRNAを得ることができる。

[0045] 本開示に包含されるポリヌクレオチド連結産物の製造方法は、前記ポリヌクレオチド連結産物を、当該連結産物の疎水性の程度に基づいて精製する工程(本開示において、工程(β)と称されることがある)をさらに含むことが好ましい。工程(β)に用いられる方法は、疎水性の程度に応じて化合物を分離可能である限りにおいて特に制限されず、公知の方法又は公知の方法から容易に想到可能な方法を採用できる。このような方法としては、例えば液体クロマトグラフィー、膜分離等が挙げられる。工程(β)は液体クロマトグラフィーによる分離工程を含むことが好ましく、逆相液体クロマトグラフィーによる

分離工程を含むことがより好ましく、逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相 HPLC）による分離工程を含むことが特に好ましい。

[0046] 工程（β）が逆相液体クロマトグラフィーによる分離工程を含む場合、カラムに充填される充填剤は、結合相として炭素数1~40のアルキル基を含むことが好ましい。当該アルキル基の炭素数は2~30であってもよく、3~20であることが好ましく、4~18であることがより好ましく、4~8であることが特に好ましい。前記範囲の上限又は下限は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、又は39であってもよい。結合相として炭素数4のアルキル基を含む充填剤が充填されたカラムとして、例えばYMC-Triart Bio C4（YMC社）等が挙げられる。

[0047] 逆相液体クロマトグラフィーで用いる移動相は、疎水性の程度に応じて化合物を分離可能である限りにおいて特に制限されず、例えば水、並びに、メタノール及びアセトニトリル（ACN）等の有機溶媒等を用いることができる。また、水／有機溶媒の比率を連続的に変化させ、グラジエント溶出を行ってもよい。さらに、クロマトグラフィーを行う温度も特に制限されず、例えば10~50℃程度であってもよく、15~40℃程度であってもよく、20~30℃程度であることが好ましく、25℃程度であることがより好ましい。

[0048] 本開示に包含されるポリヌクレオチド連結産物の製造方法は、光照射による疎水性タグの脱離工程及び／又は還元処理による疎水性タグの脱離工程（本開示において、工程（γ）と称されることがある）をさらに含むことが好ましい。工程（γ）において脱離する部位は疎水性タグを含む限り特に制限されない。したがって、脱離する部位は前記リンカーを含んでもよく、含まなくてもよい。

[0049] 上述の通り、本開示の疎水性タグはo-ニトロベンジル骨格又はp-ニトロベンジル骨格を有する。疎水性タグがo-ニトロベンジル骨格を有する場合、光照射又は還元処理により、疎水性タグが脱離し得る。一方で、疎水性タグがp-ニトロベンジル骨格を有する場合、疎水性タグは光照射によっては脱離しない

が、還元処理によっては脱離し得る。したがって、ポリヌクレオチド連結産物が o -ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグと p -ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグの両方を含む場合、先に光照射を行うことで o -ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグを選択的に脱離させ、その後還元処理を行うことで p -ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグを脱離させるという「外し分け」が可能である。

- [0050] 前記光照射の条件は、疎水性タグが脱離し得る限りにおいて特に制限されず、当該疎水性タグの性質等に応じて適宜設定することができる。例えば300nm~400nmの波長の光を、0.5~10mW/cm²の光量で、1~60分間程度照射してもよい。
- [0051] 前記還元処理の条件は、疎水性タグが脱離し得る限りにおいて特に制限されず、当該疎水性タグの性質等に応じて適宜設定することができる。例えば20~45℃において1~1000mMの亜ジチオン酸ナトリウム溶液中で、10~60分間インキュベートしてもよい。
- [0052] なお、疎水性タグが脱離したポリヌクレオチドは疎水性が低下（すなわち親水性が向上）するため、このことをもって疎水性タグの脱離を確認することができる。例えば、工程（ γ ）後のサンプルの方が工程（ γ ）前のサンプルよりも逆相HPLCにおける保持時間が短くなった場合には、疎水性タグが脱離したものと評価され得る。
- [0053] 本開示の製造方法によって得られるポリヌクレオチド連結産物は、mRNA医薬であってもよい。上述の通りmRNA医薬は、RNAの5'末端側から順に、キャップ構造（5'キャップ）、5'非翻訳領域（5'UTR）、翻訳領域、3'非翻訳領域（3'UTR）、及びポリA鎖から構成される。本開示の製造方法によれば、5'キャップからポリA鎖までの構造が均質なポリヌクレオチド連結産物が得られる。特にmRNA医薬はその特性上、体内での目的タンパク質の発現効率（翻訳効率）が高度に制御される必要がある。mRNAの末端側の構造は、当該mRNAの安定性や翻訳効率に大きく影響することが知られている。したがって、本開示の製造方法に

よって得られる、5' キャップからポリA鎖までの構造が高度に制御されたポリヌクレオチド連結産物は、mRNA医薬として好適であるといえる。

[0054] なお、本明細書において「含む」とは、「含有する」の他に、「本質的にかからなる」と、「からなる」をも包含する (The term “comprising” includes “essentially consisting of” and “consisting of.”)。また、本開示は、本明細書に説明した構成要件の任意の組み合わせを全て包含する。

[0055] また、上述した本開示の各実施形態について説明した各種特性（性質、構造、数値、機能等）は、本開示に包含される主題を特定するにあたり、どのように組み合わせられてもよい。すなわち、本開示には、本明細書に記載される組み合わせ可能な各特性のあらゆる組み合わせからなる主題が全て包含される。

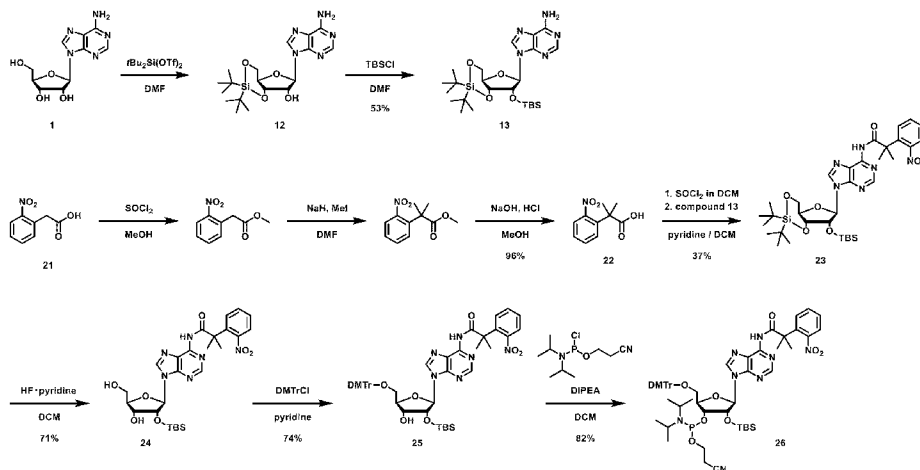
実施例

[0056] 以下、例を示して本開示の実施形態をより具体的に説明するが、本開示の実施形態は下記の例に限定されるものではない。なお、特に断らない限り、以下「%」は「質量%」を示すものとする。

[0057] 試験例1 疎水性タグの合成

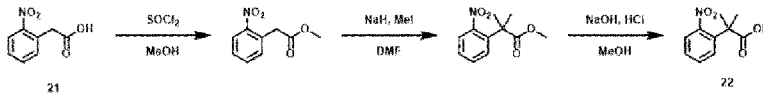
3' 末端に導入する疎水性タグ用のアミダイト化合物（化合物26）を合成した。その合成スキームを以下に示す。

[化32]



[0058] 1-1. 化合物22 : 2-methyl-2-(2-nitrophenyl)propanoic acidの合成

[化33]



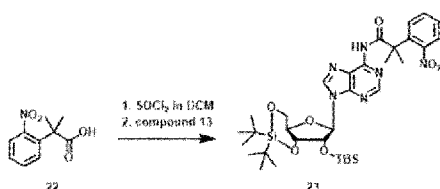
2-ニトロフェニル酢酸 (0.500 g, 2.76 mmol, 1.0 eq.) をメタノール (MeOH) (15.0 mL) に溶解し、氷浴で冷却した。前記溶液に塩化チオニル (300 μ L, 4.14 mmol, 1.5 eq.) を0 $^{\circ}$ Cで滴下して加えた。当該混合物を室温で2時間攪拌した。混合物を酢酸エチルで希釈した後、水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させて濃縮した。残渣をN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) (15.0 mL) に溶解し、水素化ナトリウム (0.166 g, 6.90 mmol, 2.5 eq.) を溶液に少量ずつ添加した。当該混合物を室温で30分間攪拌した後、ヨードメタン (395 μ L, 6.35 mmol, 2.3 eq.) を加え、室温で一晩攪拌した。当該混合物を酢酸エチルで希釈した後、水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させて濃縮した。残渣をMeOH (5.00 mL) に溶解し、NaOH水溶液 (8 M, 5.00 mL) を添加した。85 $^{\circ}$ Cで3時間攪拌し、HCl水溶液 (2 M) を加えて pH 3.0 - 4.0 に調整した。当該混合物を酢酸エチルで希釈した後、水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥して濃縮し、目的化合物 (521 mg, 90.2% 収率) を黄色粉末として得た。

[¹H NMR] (594 MHz, CDCl₃, ppm) δ 7.97 (d, J=8.32, 1H, aromatic), 7.62-7.61 (m, 2H, aromatic), 7.43-7.41 (m, 1H, aromatic), 1.70 (s, 6H, CH₃)

[HRMS] (ESI) m/z Cal. for C₁₀H₁₁NNaO₄⁺[M+Na]⁺; 232.0580 found 232.0655

[0059] 1-2. 化合物23 : 3',5'-O-bis(t-butylsilyl)-2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-N⁶-[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosineの合成

[化34]



2-methyl-2-(2-nitrophenyl)propanoic acid (化合物 22) (1.20 g, 5.75 mmol, 3.0 eq.) をジクロロメタン (DCM) (30.0 mL) に溶かし、氷浴で冷却した。当該溶液に塩化チオニル (1.25 mL, 17.3 mmol, 9.0 eq.) を0 °Cで滴下して添加した。混合物を40 °Cで4時間攪拌した。溶液をエバポレーターで濃縮し、残渣をDCM/ピリジン (= 5/1, 10.0 mL) に溶解した (溶液A)。4-ジメチルアミノピリジン (70.2 mg, 0.575 mmol, 0.3 eq.) を溶液Aに加え、20分間攪拌した。3',5'-O-bis(t-butylsilyl)-2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)adenosine (化合物 13) (1.00 g, 1.92 mmol, 1.0 eq.) をピリジン (5.00 mL) に溶解させ (溶液B)、トリエチルアミン (801 μ L, 5.75 mmol, 3.0 eq.) を室温にて加えた。溶液Aを溶液Bに滴下し、混合物を80 °Cで一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水、NaHCO₃飽和水溶液及び飽和食塩水で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濃縮した。残渣を12.5%アセトニトリル/ジクロロメタンで溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、目的化合物 (0.507 g, 36.9% 収率) を茶色の泡状物として得た。

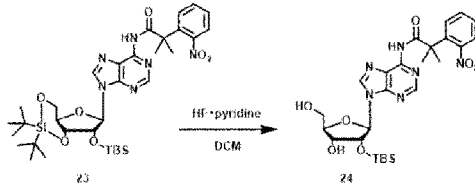
[¹H NMR] (594 MHz, DMSO, ppm, mixture of rotamer) δ 9.92–9.78 (m, 1H, NH), 8.66–8.56 (m, 2H, C²H · C⁸H), 7.85–7.51 (m, 4H, aromatic), 6.05–6.00 (m, 1H, C¹H), 4.73–4.64 (m, 2H, C²H · C⁵H), 4.37–4.34 (m, 1H, C³H), 4.03–3.97 (m, 2H, C⁴H · C⁵H), 1.95–1.72 (m, 6H, (CH₃)₂), 1.044, 1.040 (2s, 9H, tBu), 0.984, 0.980 (2s, 9H, tBu), 0.85 (s, 9H, tBu), 0.087, 0.083 (2s, 3H, Si-CH₃), 0.060, 0.056 (2s, 3H, Si-CH₃)

[¹³C NMR] (149 MHz, DMSO, ppm, mixture of rotamer) δ 173.63, 152.12, 151.80, 150.58, 149.51, 143.63, 138.65, 133.81, 129.87, 128.79, 125.97, 125.61, 91.74, 75.72, 75.27, 74.76, 67.51, 48.42, 27.86, 27.56, 27.35, 26.26, 22.77, 20.50, 18.55, 14.62, -4.02, -4.62

[HRMS] (ESI) m/z Cal. for C₃₄H₅₂N₆NaO₇Si₂⁺[M+Na]⁺; 735.3328 found
735.3303

[0060] 1-3. 化合物24 : 2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-N⁶-[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosineの合成

[化35]



ピリジン (250 μL) を用いて、フッ化水素-ピリジン (43.8 μL , 1.05 mmol, 2.5 eq.) を冷却下で注意深く希釈した。得られた溶液を、 0°C に冷却したDCM(10 mL)及び3',5'-O-bis(t-butylsilyl)-2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-N⁶-[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosine (化合物23) (0.300 g, 0.421 mmol, 1.0 eq) の攪拌懸濁液にゆっくり加え、 0°C において9時間反応させた。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水、 NaHCO_3 飽和水溶液及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を Na_2SO_4 上で乾燥させ、濃縮した。残渣を4-100%酢酸エチル/ヘキサンで溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、目的化合物 (0.270 g, 44.1%収率) を茶色の泡状物として得た。

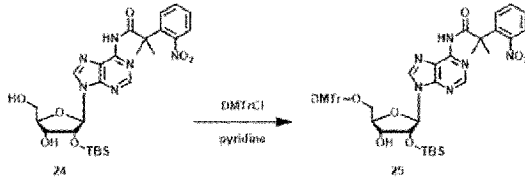
[¹H NMR] (594 MHz, CH_3OD , ppm, mixture of rotamer) δ 8.64-8.59 (m, 2H, C²H · C⁸H), 7.90-7.85 (m, 2H, aromatic), 7.76-7.73 (m, 1H, aromatic), 7.55-7.52 (m, 1H, aromatic), 6.12-6.05 (m, 1H, C^{1'}H), 4.86-4.81 (m, 1H, C^{2'}H), 4.27-4.26 (m, 1H, C^{3'}H), 4.17-4.12 (m, 1H, C^{4'}H), 3.90-3.84 (m, 1H, C^{5'}H), 3.77-3.72 (m, 1H, C^{5'}H), 1.82 (s, 6H, (CH₃)₂), 0.78-0.77 (m, 9H, tBu), -0.05--0.06 (m, 3H, Si-CH₃), -0.17--0.19 (m, 3H, Si-CH₃)

[¹³C NMR] (149 MHz, CDCl_3 , ppm, mixture of rotamer) δ 174.29, 151.61, 151.36, 149.67, 149.21, 143.29, 137.73, 133.33, 129.07, 128.40, 125.43, 89.60, 86.58, 75.99, 71.06, 61.63, 26.20, 25.05, 24.80, 17.61, -6.14, -6.48

[HRMS] (ESI) m/z Cal. for $C_{26}H_{36}N_6NaO_7Si^+[M+Na]^+$; 595.2307 found
595.2278

[0061] 1-4. 化合物25 : 5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-N⁶-[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosineの合成

[化36]



2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-N⁶-[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosine (化合物 24) (0.500 g, 0.932 mmol, 1.0 eq.) をベンゼンで各3回共蒸発させた。この化合物をピリジン (10 mL) に溶解させた。室温でこの溶液に4,4'-dimethoxytrityl chloride (0.349 g, 0.103 mmol, 1.1 eq.) と4-dimethylaminopyridine (0.002 g, 0.0187 mmol, 0.02 eq.) を加え、一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水、NaHCO₃飽和水溶液及び飽和食塩水で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濃縮した。残渣を4-50%酢酸エチル/ヘキサンで溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、目的化合物 (0.604 g, 74.0% 収率) を黄色泡状物として得た。

[¹H NMR] (594 MHz, DMSO, ppm, mixture of rotamer) δ 9.90 (s, 1H, NH), 8.60-8.53 (m, 2H, C²H · C⁸H), 7.851, 7.848 (2s, 1H, aromatic), 7.78 (dd, J=0.8, 5.6, 1H, aromatic), 7.73-7.70 (m, 1H, aromatic), 7.53-7.51 (m, 1H, aromatic), 7.35-7.34 (m, 2H, aromatic), 7.23-7.15 (m, 7H, aromatic), 6.82-6.79 (m, 4H, aromatic), 6.01 (d, J=4.75, 1H, C¹H), 5.15 (d, J=6.53, 1H, OH), 4.82 (t, J=3.20, 1H, C²H), 4.25-4.22 (m, 1H, C³H), 4.09-4.08 (m, 1H, C⁴H), 3.69-3.68 (m, 6H, OCH₃), 3.27-3.22 (m, 2H, C⁵H), 1.95, 1.72 (2s, 6H, CH₃), 0.73, 0.72 (2s, 9H, tBu), -0.067, -0.072 (2s, 3H, Si-CH₃), -0.15, -0.17 (2s, 3H, Si-CH₃)

[¹³C NMR] (149 MHz, CDCl₃, ppm, mixture of rotamer) δ 172.69, 158.63, 152.76, 151.59, 149.54, 149.27, 144.62, 141.63, 137.70, 135.73, 133.58, 130.17, 130.14, 128.95, 128.84, 128.22, 127.99, 127.01, 126.16, 123.32, 113.29, 88.65, 86.70, 84.12, 75.56, 71.37, 63.24, 55.33, 48.55, 27.10, 25.67, 17.98, 14.28, -4.78, -5.10

[HRMS] (ESI) m/z Cal. for C₄₇H₅₄N₆NaO₉Si⁺[M+Na]⁺ ; 897.3614 found 897.3652

[0062] 1-5. 化合物26 : 5'-O-dimethoxytrityl- N⁶-[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosine, 2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramiditeの合成

5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-N⁶-[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosine (化合物25) (0.604 g, 0.691 mmol, 1.0 eq.) をベンゼンとそれぞれ3回共蒸発させた。この化合物をDCM (7.0 mL) に溶解させた。この溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.722 mL, 4.15 mmol, 6.0 eq.) 及び2-cyanoethyl N,N-diisopropylchlorophosphoramidite (0.409 mL, 1.73 mmol, 2.5 eq.) を0°Cで加え、混合物を一晩攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水、NaHCO₃飽和水溶液及び飽和食塩水で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濃縮した。残渣を12.5%アセトニトリル/ジクロロメタンで溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、目的化合物 (0.612 g, 82.3% 収率) を茶色の泡状物として得た。

[¹H NMR] (594 MHz, DMSO, ppm, mixture of rotamer and stereoisomers) δ 9.91, 9.76 (2s, 1H, NH), 8.65-8.48 (m, 2H, C²H · C⁸H), 7.84 (dd, J=0.80, 5.20, 1H, aromatic), 7.78 (d, J=7.72, 1H, aromatic), 7.71 (t, J=5.2, 1H, aromatic), 7.53-7.51 (m, 1H, aromatic), 7.38-7.36 (m, 2H, aromatic), 7.26-7.16 (m, 7H, aromatic), 6.83-6.79 (m, 4H, aromatic), 6.02-5.97 (m, 1H, C^{1'}H), 5.15-5.13 (m,

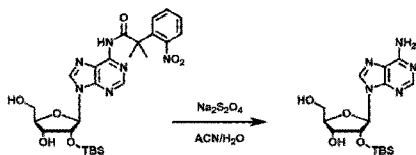
1H, C^{2'}H), 4.42–4.21 (m, 2H, C^{3'}H · C^{4'}H), 3.83–3.76 (m, 2H, CH₂), 3.68–3.65 (m, 6H, OCH₃), 3.57–3.54 (m, 2H, CH-iPr), 3.40–3.36 (m, 1H, C^{5'}H), 3.24–3.21 (m, 1H, C^{5'}H), 2.86–2.74 (m, 2H, CH₂), 1.90, 1.72 (2s, 6H, CH₃), 1.19–0.98 (m, 12H, iPr), 0.674 (s, 9H, tBu), –0.11, –0.14 (2s, 3H, Si-CH₃), –0.30, –0.31 (2s, 3H, Si-CH₃)

[¹³C NMR] (149 MHz, DMSO, ppm, mixture of rotamer and stereoisomers) δ 173.575, 158.65, 151.89, 149, 52, 145.30, 130.25, 129.92, 128.32, 128.12, 125.61, 119.36, 113.68, 88.56, 86.31, 82.07, 73.69, 73.69, 63.66, 59.37, 59.25, 55.55, 52.42, 48.45, 27.51, 25.98, 25.01, 24.95, 24.80, 24.76, 18.09, –4.37, –4.82 [³¹P NMR] (241 MHz, DMSO, ppm, mixture of rotamer and stereoisomers) δ 150.23, 148.78

[HRMS] (ESI) m/z Cal. for C₅₆H₇₁N₈NaO₁₀PSi⁺[M+Na]⁺; 1097.4692 found 1097.4745

[0063] 試験例2 還元処理によるニトロベンジル部の脱離反応

[化37]



[0064] 本発明者らは試験例1–3で得た化合物24について、亜ジチオン酸を用いた還元条件下におけるニトロベンジル部の脱離反応を検討した。なお、上述の通り本開示において「ニトロベンジル部」とは、*o*-ニトロベンジル骨格又は*p*-ニトロベンジル骨格を有する部位を指す。

[0065] 具体的には、化合物24を0.1 MのNa₂S₂O₄溶液（水／アセトニトリル = 1 / 1, 1 mL）に溶解した後、37°Cで30分間インキュベートすることにより、還元処理を行った。前記還元処理前後の逆相HPLCの結果を、図2に示す。図2から明らかかなように、還元処理前の化合物の保持時間が20分付近であった一方で、

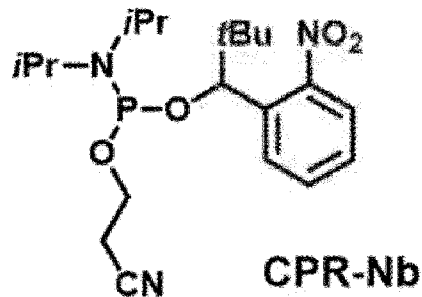
還元処理後は16分付近に溶出されていた。当該結果から、ニトロベンジル部の脱離が定量的に進行したことが示された。

[HRMS] (ESI) m/z Cal. for $C_{16}H_{27}N_5NaO_4Si^+[M+Na]^+$; 404.1724 found
404.1679

[0066] 試験例3 化合物26の安定性と疎水性の評価

本発明者らは、化合物26を3'末端に導入したRNAを核酸自動合成機で合成し、その安定性と疎水性の評価を行った。具体的には、25merのRNAの5'末端にCPR-Nbを、3'末端には化合物26を導入したRNAを核酸自動合成機で合成した。合成したRNAの構造を図3に示す（配列番号1）。また、CPR-Nbの構造を以下に示す。図3中、 p^{Nb} は2-cyanoethyl (2,2-dimethyl-1-(2-nitrophenyl)propyl) diisopropylphosphoramiditeを用いて、 A^{Nb} は5'-O-dimethoxytrityl- N^6 -[2-nitrobenzyl(dimethyl)carbonyl]-adenosine及び2'-O-(t-butyl dimethylsilyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite (化合物26)を用いて、RNA中に導入された。

[化38]



[0067] 5'末端にCPR-Nbを、3'末端に化合物26を導入した25merのRNAを合成後、逆相HPLCで解析したところ、目的のRNAを収率良く合成できたことが確認された（図4、5）。さらに、分取した目的のRNAに対して紫外線照射を行ったところ、逆相HPLCの保持時間が4分程度短くなった（図6）。なお、紫外線照射は、具体的には365nmの紫外光を4,000 $\mu W/cm^2$ の光量で15分間照射することにより行った。以降特に記載がない限り、紫外線照射は前記条件にて行った。また、LC-MS解析の結果から、前記紫外線照射によって5'末端のニトロベンジル

部が選択的に脱離していることが確認された ((positive mode) $[M+H]^+$ Cal. 8375.0725 found 8375.42)。

[0068] 試験例2に記載の通り、化合物26のニトロベンジル部は還元処理により脱離可能である。したがって、試験例2及び3の結果から、光照射と還元処理によるニトロベンジル部の「外し分け」が可能であることが判明した。

[0069] 試験例4 疎水性タグによるRNA連結産物の精製

次に本発明者らは、5'末端に疎水性タグを有するポリヌクレオチド断片と、3'末端に疎水性タグを有するポリヌクレオチド断片とをライゲーションし、連結産物の疎水性を評価した。概要を図7に示す。具体的には、5'末端に疎水性タグを有する25merのRNA断片(図7中の(ii))、3'末端に疎水性タグを有する25merのRNA断片(図7中の(iii))、前記各ポリヌクレオチド断片と相補的な配列を有するDNAテンプレート(図7中の(i))、及びT4 RNA リガーゼ2を混合し、25°Cで16時間インキュベートした。ライゲーション後、当該反応液をTE飽和フェノールとクロロホルムで抽出し、激しく混和して生じたタンパク質性不溶物を除去した。水層をクロロホルムで抽出し、アルコール沈殿による脱塩操作を行った後に、逆相HPLCと変性PAGEを行った。逆相HPLCの結果を図8に示す。図8から明らかのように、逆相HPLCにおいて疎水性タグを2つ有する連結産物(図7及び8中の(iv))は、基質として用いたRNA断片(図7及び8中の(ii)及び(iii))よりもカラムへの保持時間が長くなった。

[0070] 以上の結果から、疎水性タグを有するポリヌクレオチド断片を連結反応の基質として用いることにより、疎水性の差を利用してポリヌクレオチド連結産物と未反応のポリヌクレオチド断片とを分離し、ポリヌクレオチド連結産物を容易に精製可能なことが判明した。

[0071] 試験例5. 疎水性タグを用いたmRNAの精製

次に本発明者らは、疎水性タグを有するRNA断片を連結してmRNAを調製し、当該mRNAを疎水性タグによって精製することを検討した。

[0072] 具体的には以下の3つの段階によりmRNAを調製・精製した。

第1段階：目的配列を含むプラスミドDNAを鋳型に用いて、IVT法により5'末端のキャップ構造から3' UTRまでを調製する。

第2段階：ポリA鎖を含む配列を核酸自動合成機で化学合成した後、その末端に疎水性タグを導入する。

第3段階：第1段階及び第2段階で得られたRNAを連結し、完全長のmRNAを調製した後、逆相HPLCにより精製する。

概要を図9に示す。

[0073] 試験例5-1. 目的RNAの転写合成（第1段階）

一般的にmRNAにキャップ構造を導入する手法として、ARCA (anti-reverse cap analog) を用いた共転写的導入法と、キャップ化酵素を用いた転写後導入法が挙げられる。共転写的導入法では、ARCAとヌクレオチドトリリン酸 (NTPs) を基質に用いてRNAポリメラーゼによる逆転写を行うことで、キャップ化RNAと未キャップ化RNAとの混合物が得られる (図10)。共転写導入法では反応系の構築の制約から、RNAのキャップ化効率は8割程度に留まる。一方転写後導入法では、転写合成された5'トリリン酸RNAがキャップ化酵素の基質となり、酵素的にキャップ構造が導入されるが、転写後導入法は酵素反応であるため反応効率が安定しない。

[0074] そこで本発明者らは、従来のARCAに疎水性タグを導入した「Pure Capアナログ」を基質として転写反応を行った。Pure Capアナログを基質として転写反応を行うと、当該転写産物はキャップ化RNAと未キャップ化RNAの混合物として得られる。キャップ化RNAは疎水性タグを有するが、未キャップ化RNAは疎水性タグを有しないため、逆相HPLCによってキャップ化RNAを単離できる。以上の概要を図10に示す。また、ARCAとPure Capアナログの構造を以下に示す。

[化39]



[0075] 具体的には、「Pure Capアナログ」を用いてRNA (671mer) の転写合成を行った。転写した配列はNanoLuc (商標) ルシフェラーゼ (Promega社) をコードするものである (図1 1、配列番号2)。まず、Pure Capアナログ、ATP、UTP、GTP、CTP、テンプレートDNA、及びT7 RNAポリメラーゼを含む転写反応液を調製し、37°Cで2時間インキュベートした。転写反応後、組み換えDNaseを加えて37°Cで30分間インキュベートし、当該反応液をTE飽和フェノールとクロロホルムで抽出した後、激しく混和して生じたタンパク質性不溶物を除去した。水層をクロロホルムで抽出し、アルコール沈殿による脱塩操作を行った後に、逆相HPLCにて目的のRNAを分取した (図1 2、1 3) (YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001) 4.6×250 mm, S-5 μm, 30 nm, A : 50 mM TEAA, 5% ACN, B : ACN, gradient : [B%] 0→20% (0→20 min.), flow rate : 1.0 mL/min., detection wavelength : 260 nm, column temperature : 50 °C)。逆相HPLCにおいて、キャップ化RNAと未キャップ化RNAの保持時間には2分程度の差があり、キャップ化RNAの単離を行うために十分な時間差であることが確認された。さらにサンプルの分取後、紫外線照射を行うと、RNAの保持時間は2分程度短くなっており、ニトロベンジル部の脱離が確認された (図1 3)。なお、分取したサンプルは変性PAGEによってそのRNA長を確認した (図1 4)。

[0076] 試験例5-2. ポリA鎖の化学合成と3'末端のポスト修飾 (第2段階)

5-2-1. ポリA鎖の化学合成

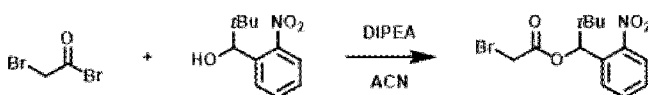
核酸自動合成機によりポリA鎖を含むRNAを化学合成した。化学合成の際、RNAの3'末端に3つの2'-O-methyl adenosine、及びホスホロチオエート基を導入した。当該RNA配列を図1 5に示す (配列番号3)。合成したRNAの5'末端は、上述したCPR-Nbを用いてリン酸化した。その後、逆相HPLCにてCPR-Nbが結合したRNAを単離した (図1 6)。また、変性PAGEを行い、分取したサンプルが目的のRNA長であることを確認した (図1 7)。当該RNAに紫外線を照射して、5'末端のニトロベンジル部を脱離させた。なおニトロベンジル部の脱離

は、逆相HPLCにおいて紫外線照射後のサンプルの保持時間が約3.5分短くなったことにより確認された（図18）。

[0077] 5-2-2. ブロモ酢酸誘導体 (2,2-dimethyl-1-(2-nitrophenyl)propyl 2-bromoacetate) の合成

以下のスキームに示すようにブロモアセチルブロミドとニトロベンジルアルコールを反応させて、ブロモ酢酸誘導体 (2,2-dimethyl-1-(2-nitrophenyl)propyl 2-bromoacetate) を合成した。

[化40]



[0078] ニトロベンジルアルコール (100 mg, 0.478 mmol, 1.0 eq.) をアセトニトリル (4.00 mL) に溶解した。この溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) (166 μ L, 0.956 mmol, 2.0 eq.) 及び臭化2-ブロモアセチル (248 μ L, 2.87 mmol, 6.0 eq.) を加え、50°Cで6時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層をNa₂SO₄上で乾燥させ、濃縮した。残渣を16.7%アセトニトリル/ジクロロメタンで溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、目的化合物 (0.125 g, 79.1% 収率) を黄色油状物として得た。

[¹H NMR] (594 MHz, CDCl₃, ppm) δ 7.88 (d, J=11.88, 1H, aromatic), 7.58 (d, J=5.94, 2H, aromatic), 7.45-7.41 (m, 1H, aromatic), 6.51 (s, 1H, CH-tBu), 3.85 (dd, J=0.8, 3.6, 2H, CH₂-Br), 0.95 (s, 9H, tBu)

[¹³C NMR] (149 MHz, CDCl₃, ppm) δ 166.04, 149.29, 132.61, 132.50, 128.97, 128.82, 124.72, 77.82, 77.47, 77.15, 76.82, 36.39, 25.80, 25.68, 25.59

[HRMS] (ESI) m/z Cal. for C₁₃H₁₆BrNNaO₄⁺[M+Na]⁺; 352.0155 found
352.0240

[0079] 5-2-3. 3'末端のポスト修飾

5-2-1で得たRNAと5-2-2で得たブromo酢酸誘導体とを、DMF中で室温にて2時間インキュベートした。当該反応前後の逆相HPLCの結果を図19に示す。図19に示す通り、当該反応後のサンプルの保持時間は反応前のサンプルに比べて10分程度長くなっていた。以上の結果から合成後のRNAの3'末端に疎水性タグが導入されたことが確認された(3'末端のポスト修飾)。

[0080] また、3'末端に5つの2'-O-methyl adenosineを持つRNAも同様に合成し、後述する試験例5-3及び5-4にて用いた。さらに、ポリAがメチル化修飾されていないRNAも同様に合成し、後述する試験例5-4に用いた。

[0081] なおポスト修飾後のサンプルは、変性PAGEによりそのRNA長を確認した(図20)。以上の試験例5-2の概要を図21に示す。

[0082] 試験例5-3. RNA断片の連結と逆相HPLCによる単離精製(第3段階)

試験例5-1で転写合成したRNA断片及び試験例5-2で化学合成したポリAを含むRNA断片を用いて、T4 RNA リガーゼ 2によるライゲーションを行った。なお、IVT法で得られるRNA断片の3'末端側配列は均質ではない。しかし鑄型鎖存在下でライゲーションを行うことで、所望の配列を有するRNA断片の3'末端にのみポリA鎖を含むRNA断片が連結することが期待される。

[0083] 試験例5-1で転写合成したRNA断片(図22中の(ii))、試験例5-2で化学合成したポリAを含むRNA断片(図22中の(iv))、前記各RNA断片と相補的な配列を有するDNAテンプレート(図22中の(i))、及びT4 RNA リガーゼ 2を混合し、25°Cで2時間インキュベートした。ライゲーション後、当該反応液をTE飽和フェノールとクロロホルムで抽出し、激しく混和して生じたタンパク質性不溶物を除去した。水層をクロロホルムで抽出し、アルコール沈殿による脱塩操作を行った後に、逆相HPLCと変性PAGEを行った。結果を図22及び23に示す。なお上述の通り、試験例5-2では3'末端に3つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA断片、3'末端に5つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA断片、及びポリAがメチル化修飾されていないRNA断片を得た。本試験例では3'末端に5つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA断片を用いたときの結果を代表例として記載するが、3'末端に3つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA断片

、及びポリAがメチル化修飾されていないRNA断片についても同様の操作を行った。

[0084] 変性PAGEの結果から、目的の連結産物（756 mer（671 + 85 mer））は図22中の（iii）であることが確認された。上述の通り、当該連結産物は5' キャップ構造からポリAまでを有する完全長mRNAである。

[0085] なお試験例5-3においては試験例4と異なり、連結産物（iii）の方が基質（iv）よりも逆相HPLCにおける保持時間が短かった。本試験例において連結産物（iii）は基質（iv）よりも疎水性タグを1つ多く有するが、（iv）よりも塩基長が大幅に長い。このため、疎水性タグが増えたことによる疎水性向上効果を、塩基長が長くなったことによる親水性向上効果（一般に核酸は多数の親水性基を有する）が上回ったことが考えられる。

[0086] 次に本発明者らは、上記操作で得た完全長mRNA（RNA連結産物）に紫外線照射を行った後、逆相HPLCで解析した（図24）。図22と図24との比較から明らかのように、紫外線照射後の完全長mRNAの保持時間は、紫外線照射前の保持時間よりも3分程度短くなっていた。また、紫外線照射後の完全長mRNAは単一のピークを示した（図24）。以上より、疎水性タグを含むニトロベンジル部が、紫外線照射によって高い効率で完全長mRNAから脱離することが判明した。

[0087] 5-4. 翻訳効率の評価

本発明者らは、ARCAを用いた従来の転写合成法によって得たmRNA（図25中（i））；試験例5-3で得た、IVT法で調節した5' 末端側断片と、核酸自動合成機で調製した3' 末端側断片とをRNAリガーゼでライゲーションして得たmRNA（連結後逆相HPLCによる精製なし、図25中（ii）及び（iii））；IVT法で調節した5' 末端側断片とポリAを含む核酸自動合成機で調製した3' 末端側断片とをRNAリガーゼでライゲーションした後、3' 末端を疎水性タグでポスト修飾して逆相HPLCで精製し、その後紫外線照射で疎水性タグを脱離させて得たmRNA（図25中（iv））；並びに、IVT法で調節した5' 末端側断片（図25中（v））について、細胞内での翻訳効率を評価した。上述の通り、各mRNAは

NanoLuc (商標) ルシフェラーゼ (Promega社) をコードしている。本試験例ではNano-Glo (商標) Luciferase Assay System (Promega社)を用いて、発光強度を指標として翻訳効率を評価した。

[0088] より具体的には、以下の手順で翻訳効率を評価した。

Day 1: 96ウェルプレートに、 2.0×10^4 cells/100 μ LでHeLa細胞を播種した。Day 2: Lipofectamine (商標) Messenger MAX (Thermo Fisher Scientific社)を用いて、20ng/wellのmRNAをトランスフェクションした。37°Cで5時間インキュベートした後、Nano-Glo (商標) Luciferase Assay System (Promega社)を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。結果を図25に示す。

[0089] 図25から明らかのように、5'末端側断片と3'末端側断片とを連結した後、3'末端に付加した疎水性タグによって逆相HPLCで精製したmRNAの翻訳効率は、連結後逆相HPLCで精製していないmRNAの翻訳効率よりも約14.9倍翻訳効率が高く、従来の転写合成法によって得たmRNAの翻訳効率よりも約3.7倍翻訳効率が高かった。

[0090] 6. 考察

以上の実験結果より、1) o-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグとp-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグとを使い分けることにより、光照射と還元処理による疎水性タグの「外し分け」が可能であること、2) 疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片を連結反応の基質に用いることで、疎水性の程度の変化に基づいて未反応のポリヌクレオチド断片と連結産物の混合物から連結産物のみを簡便に精製できること、3) 前記精製後、高い効率で連結産物から疎水性タグを脱離させられること、4) ポリヌクレオチド断片を調製する際に、疎水性タグを付加し得るホスホロチオエート基等の部位を導入しておくことで、当該ポリヌクレオチド断片に事後的に疎水性タグを導入（ポスト修飾）できること、5) 疎水性タグを有するRNA断片を連結して完全長mRNAを調製できること、6) 連結後疎水性タグによる精製を行ったmRNAの翻訳効率は、従来の

転写合成法によって得たmRNAの翻訳効率、及び連結後疎水性タグによる精製を行っていないmRNAの翻訳効率よりも顕著に高いこと、が明らかとなった。

[0091] 上述の通りmRNA医薬は、RNAの5'末端側から順に、キャップ構造（5'キャップ）、5'非翻訳領域（5'UTR）、翻訳領域、3'非翻訳領域（3'UTR）、及びポリA鎖から構成される。翻訳領域以外の構造がmRNAの安定性や翻訳効率に影響することが知られているが、従来のmRNA合成法では、3'末端配列や付加するポリA鎖長の制御が困難であった。すなわち従来のmRNA合成法で得られるmRNAは、特に3'末端配列やポリA鎖長において均質ではなかった。一方本開示の技術によれば、疎水性タグを含むRNA断片同士を連結して疎水性の程度に基づいて精製を行うことにより、均質なmRNAを高い純度で得ることができる。また前記疎水性タグは温和な条件で脱離可能であるため、精製した連結産物から疎水性タグを脱離させた後に、さらにRNA断片を連結させることが可能である。すなわち所望の長さのRNA連結産物が得られるまで、RNA断片の連結・連結産物の精製・疎水性タグの脱離の工程を繰り返すことができる。したがって本開示の技術は、長鎖RNAを高純度に調製することが求められるmRNA医薬の製造において、特に好適に用いられ得る。

[0092] o-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグは光照射と還元処理のいずれによっても脱離可能である。一方、p-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグは、光照射によっては脱離できないが還元処理によっては脱離可能である。すなわちo-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグとp-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグとを使い分けることにより、光照射と還元処理による疎水性タグの「外し分け」が可能である。したがって例えば3'末端側から順次ポリヌクレオチド断片を連結していくときに、3'末端側のポリヌクレオチド断片にp-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグを、5'末端側のポリヌクレオチド断片にo-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグを、それぞれ付加してから連結する態様が想定される。連結産物を疎水性の程度に基づいて精製した後、光照射によってo-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグのみを脱離させることができ、以後、o-ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグを付加したポリ

ヌクレオチド断片の連結・連結産物の精製・光照射による o -ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグの脱離、の工程を繰り返すことができる。前記工程を繰り返して所望の連結産物が得られた時点で還元処理を行うことにより、 o -ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグ及び p -ニトロベンジル骨格を有する疎水性タグを脱離させることができる（図1）。

[0093] なお上述の通り、試験例5-3においては試験例4と異なり、連結産物 (iii) の方が基質 (iv) よりも逆相HPLCにおける保持時間が短かった。これは、疎水性タグが増えたことによる疎水性向上効果を、塩基長が長くなったことによる親水性向上効果が上回ったためであると推測される。ポリヌクレオチド断片及び目的とするポリヌクレオチド連結産物の長さに応じて各ポリヌクレオチド断片に付加する疎水性タグの数を増減することにより、疎水性の程度に基づいて連結産物を精製する工程における連結産物の分離を制御可能であると考えられる。

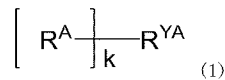
請求の範囲

[請求項1]

工程 (α) : 疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片 (A)、及び疎水性タグを含むポリヌクレオチド断片 (B) を連結する工程を含み、

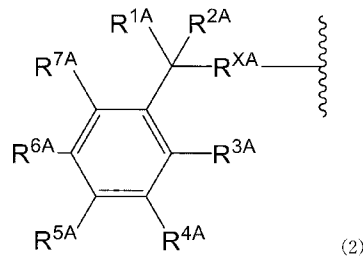
前記ポリヌクレオチド断片 (A) が一般式 (1) :

[化1]



[式中 : kは1以上の整数を示す。R^{YA}はポリヌクレオチドからk個の原子又は基を除いてなるk個の基を示す。R^Aは同一又は異なって、一般式 (2) :

[化2]

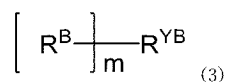


(式中 : R^{1A}はアルキル基を示す。R^{2A}は水素原子又はアルキル基を示す。R^{3A}及びR^{5A}のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。R^{4A}、R^{6A}、及びR^{7A}は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す (ただしR^{3A}がニトロ基である場合、R^{4A}及びR^{7A}は水素原子を示す)。R^{XA}はリンカーを示す。) で表される基を示す。]

で表される、ポリヌクレオチド断片であり、かつ、

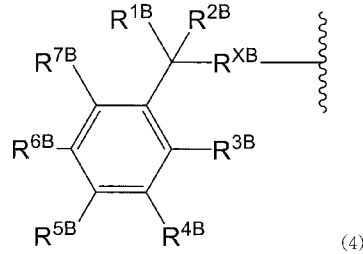
前記ポリヌクレオチド断片 (B) が一般式 (3) :

[化3]



[式中：mは1以上の整数を示す。R^{YB}はポリヌクレオチドからm個の原子又は基を除いてなるm個の基を示す。R^Bは同一又は異なって、一般式(4)：

[化4]



(式中：R^{1B}はアルキル基を示す。R^{2B}は水素原子又はアルキル基を示す。R^{3B}及びR^{5B}のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。R^{4B}、R^{6B}、及びR^{7B}は同一又は異なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す(ただしR^{3B}がニトロ基である場合、R^{4B}及びR^{7B}は水素原子を示す)。R^{XB}はリンカーを示す。)で表される基を示す。]

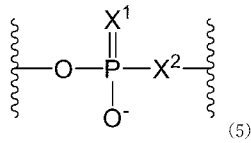
で表される、ポリヌクレオチド断片である、
ポリヌクレオチド連結産物の製造方法。

- [請求項2] 工程(β)：前記ポリヌクレオチド連結産物を、当該連結産物の疎水性の程度に基づいて精製する工程
をさらに含む、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 工程(γ)：前記疎水性タグを脱離する工程
をさらに含む、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項4] R^AがR^{YA}の3'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合している、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項5] R^BがR^{YB}の5'末端側から1~30塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも1つに結合している、請求項1又は2に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記工程(β)が、液体クロマトグラフィーによる分離工程を含む、請求項2に記載の製造方法。

[請求項7] 前記工程 (γ) が、光照射による疎水性タグの脱離工程及び／又は還元処理による疎水性タグの脱離工程を含む、請求項3に記載の製造方法。

[請求項8] 前記ポリヌクレオチド断片 (A) が有するリンカー R^{XA} 、及び前記ポリヌクレオチド断片 (B) が有するリンカー R^{XB} が、同一又は異なって、単結合、 $-O-CH_2-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-(CH_2)_n-R^8-$ 、又は $-O-C(=O)-(CH_2)_n-R^8-$ [式中、 n は1以上の整数を示す。 R^8 は一般式 (5) :

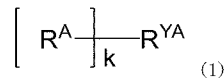
[化5]



(X^1 及び X^2 は同一又は異なって、O又はSである) で表される2価の基を示す。] である、請求項1又は2に記載の製造方法。

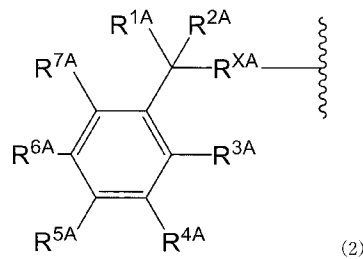
[請求項9] 前記ポリヌクレオチド断片 (A) が一般式 (1) :

[化6]



[式中： k は1以上の整数を示す。 R^{YA} はポリヌクレオチドから k 個の原子又は基を除いてなる k 価の基を示す。 R^A は同一又は異なって、一般式 (2) :

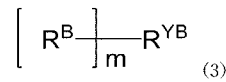
[化7]



(式中： R^{1A} は炭素数1～30のアルキル基を示す。 R^{2A} は水素原子又は炭素数1～10のアルキル基を示す。 R^{3A} 及び R^{5A} のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、炭素数1～10のアルキル基、又は炭素数1～10のアルコキシ基を示す。 R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} は同一又は異なって、水素原子、炭素数1～10のアルキル基、又は炭素数1～10のアルコキシ基を示す（ただし R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す）。 R^{XA} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

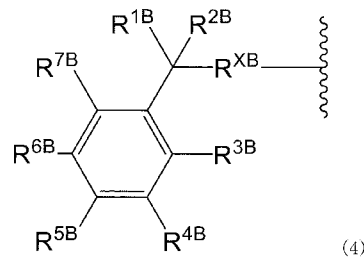
で表されるポリヌクレオチド断片であり、かつ、前記ポリヌクレオチド断片 (B) が一般式 (3) :

[化8]



[式中：mは1以上の整数を示す。 R^{YB} は同一又は異なって、ポリヌクレオチドからm個の原子又は基を除いてなるm価の基を示す。 R^B は一般式 (4) :

[化9]



(式中： R^{1B} は炭素数1～30のアルキル基を示す。 R^{2B} は水素原子又は炭素数1～10のアルキル基を示す。 R^{3B} 及び R^{5B} のどちらか一方はニトロ基を示し、他方は水素原子、炭素数1～10のアルキル基、又は炭素数1～10のアルコキシ基を示す。 R^{4B} 、 R^{6B} 、及び R^{7B} は同一又は異なって、水素原子、炭素数1～10のアルキル基、又は炭素数1～10のアルコキシ基を示す（ただし R^{3B} がニトロ基である場合、 R^{4B} 及び R^{7B}

は水素原子を示す)。R^{XB}はリンカーを示す。)で表される基を示す。]

で表されるポリヌクレオチド断片である、請求項1又は2に記載の製造方法。

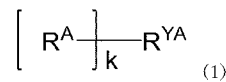
[請求項10] 前記ポリヌクレオチド連結産物の塩基長が20塩基長～2000塩基長である、請求項1又は2に記載の製造方法。

[請求項11] 前記工程(α)において当該反応系が、前記ポリヌクレオチド断片(A)の少なくとも一部と相補的な配列、及び前記ポリヌクレオチド断片(B)の少なくとも一部と相補的な配列を有するポリヌクレオチドを含む、請求項1又は2に記載の製造方法。

[請求項12] 前記ポリヌクレオチド連結産物がmRNA医薬である、請求項1又は2に記載の製造方法。

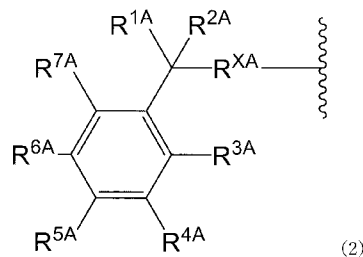
[請求項13] 一般式(1)：

[化10]



[式中、kは1以上の整数を示す。R^{YA}はポリヌクレオチドからk個の原子又は基を除いてなるk個の基を示す。R^Aは同一又は異なって、一般式(2)：

[化11]



(式中：R^{1A}はアルキル基を示す。R^{2A}は水素原子又はアルキル基を示す。R^{3A}及びR^{5A}のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す。R^{4A}、R^{6A}、及びR^{7A}は同一又は異

なって、水素原子、アルキル基、又はアルコキシ基を示す（ただし R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す）。 R^{XA} はリンカーを示す。）で表される基を示す。]

で表され、かつ、

R^A が R^{YA} の 3' 末端側から 1~30 塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも一つに結合している、ポリヌクレオチド。

[請求項14] R^A が R^{YA} の 5' 末端側から 1~30 塩基に位置するヌクレオチドの少なくとも一つに結合している、請求項 1 3 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項15] 前記一般式 (1) において、

R^{1A} が炭素数 1~30 のアルキル基を示し、

R^{2A} は水素原子又は炭素数 1~10 のアルキル基を示し、

R^{3A} 及び R^{5A} のどちらか一方はニトロ基を、他方は水素原子、炭素数 1~10 のアルキル基、又は炭素数 1~10 のアルコキシ基を示し、

R^{4A} 、 R^{6A} 、及び R^{7A} は同一又は異なって、水素原子、炭素数 1~10 のアルキル基、又は炭素数 1~10 のアルコキシ基を示す（ただし R^{3A} がニトロ基である場合、 R^{4A} 及び R^{7A} は水素原子を示す）ことを特徴とする、請求項 1 3 又は 1 4 に記載のポリヌクレオチド。

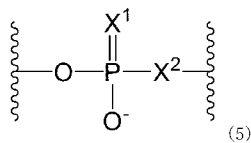
[請求項16] 前記リンカー R^{XA} が、同一又は異なって、単結合、 $-O-CH_2-$

$-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-(CH_2)_n-R^8-$ 、又は

$-O-C(=O)-(CH_2)_n-R^8-$ [式中、 n は 1 以上の整数を示す。 R^8 は

一般式 (5) :

[化12]



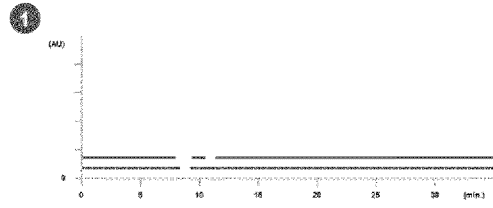
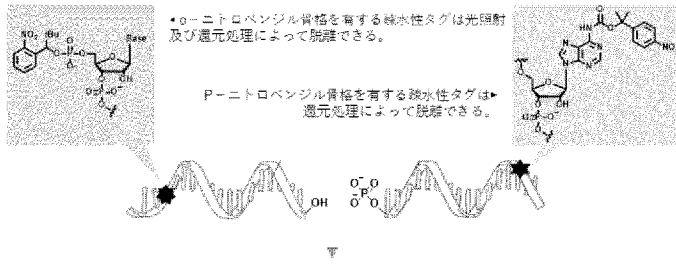
(X^1 及び X^2 は同一又は異なって、0又はSである) で表される2価の基を示す。] である、請求項13又は14に記載のポリヌクレオチド。

[請求項17] 20~2000塩基長である、請求項13又は14に記載のポリヌクレオチド。

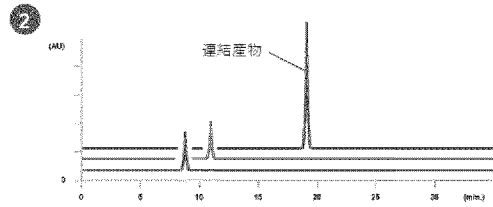
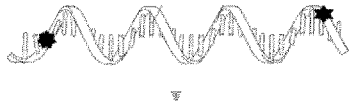
[請求項18] mRNA医薬である、請求項13又は14に記載のポリヌクレオチド。

[図 1]

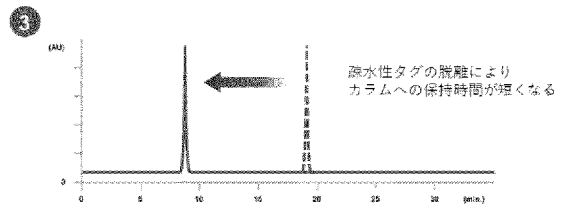
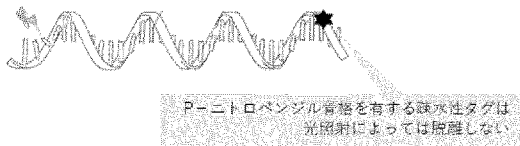
① ポリヌクレオチド断片の調製



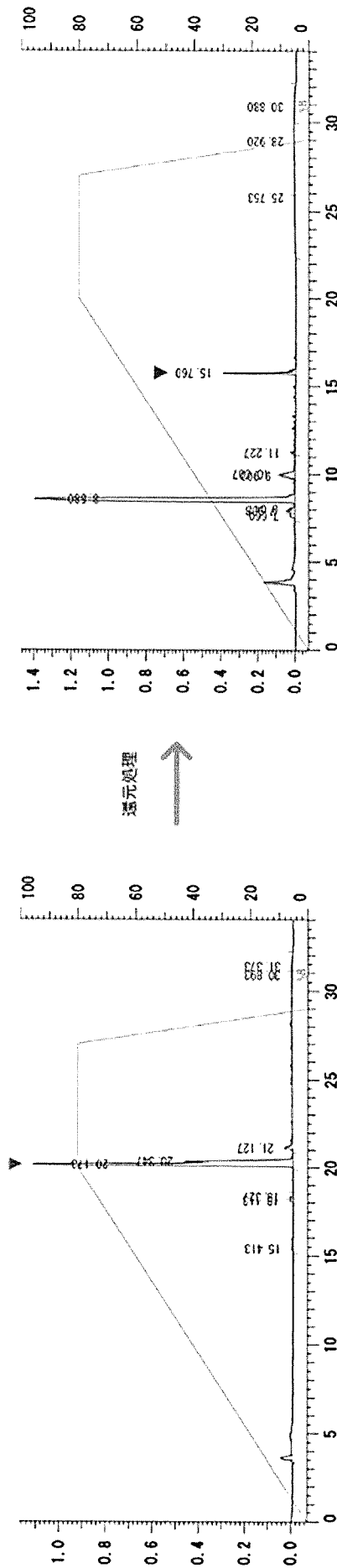
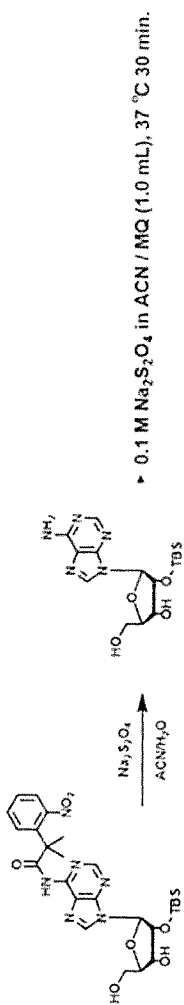
② ポリヌクレオチド断片の連結、連結産物の精製



③ 疎水性タグの脱離



[図 2]

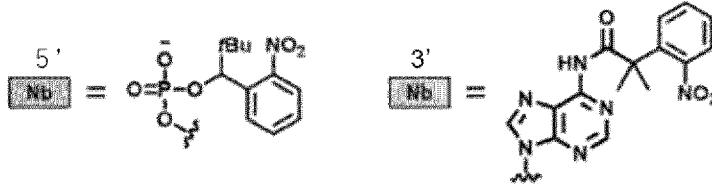


HydroSphere C18 (HS12805-2546WT, serial# 108AB00175) 4.6 × 250mm, 5-5 μm, 30 nm
 A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN, gradient) [B%] 0 → 80% (0 → 20 min), flow rate) 1.0 mL/min., detection wavelength) 260 nm, column temperature) r.t.

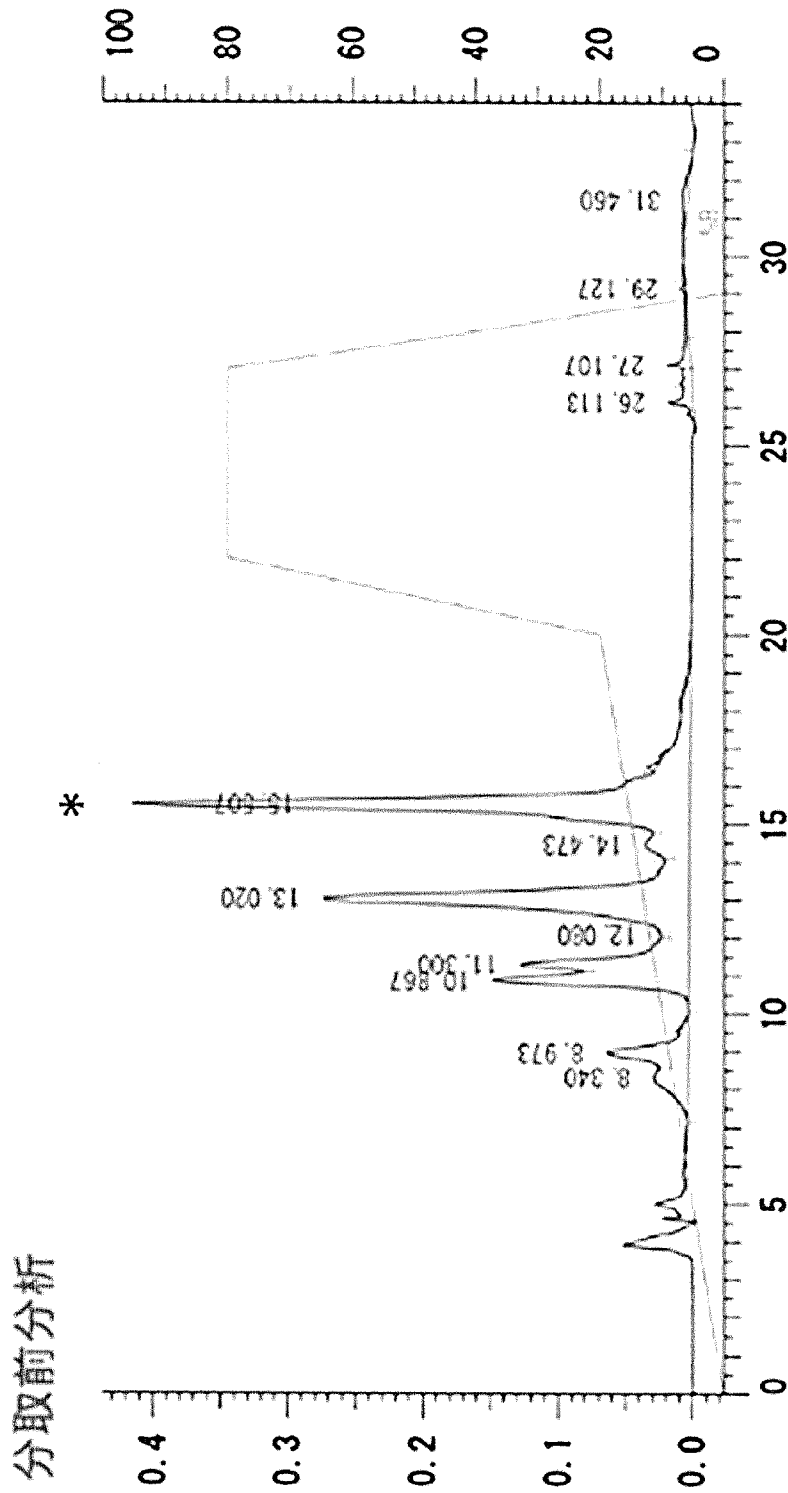
[3]



(配列番号 1) 5'-p^{Nb}-GAU GAG CAG GGA ACU GUG UUG UUA^{Nb} dG-3'

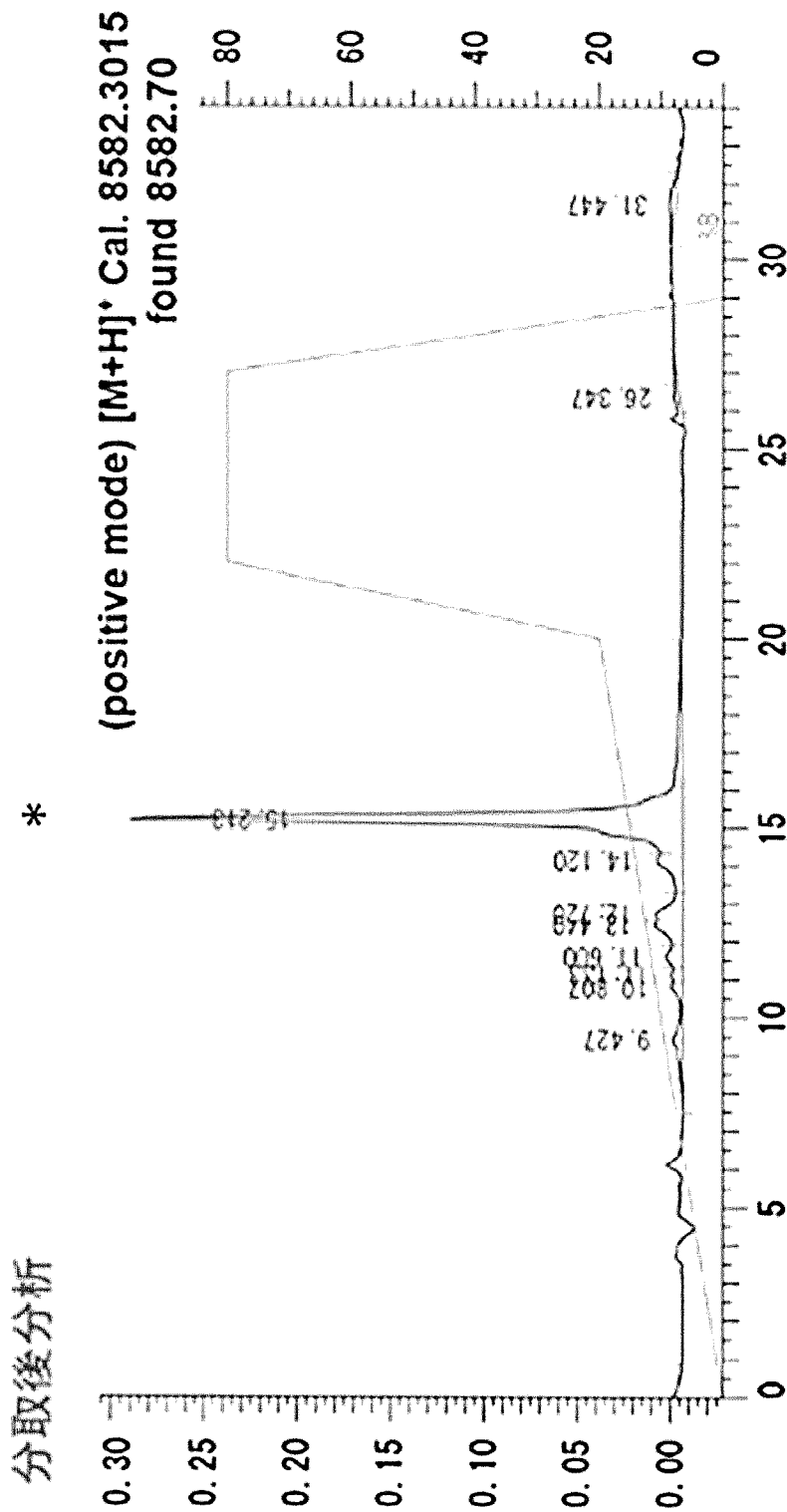


[図 4]



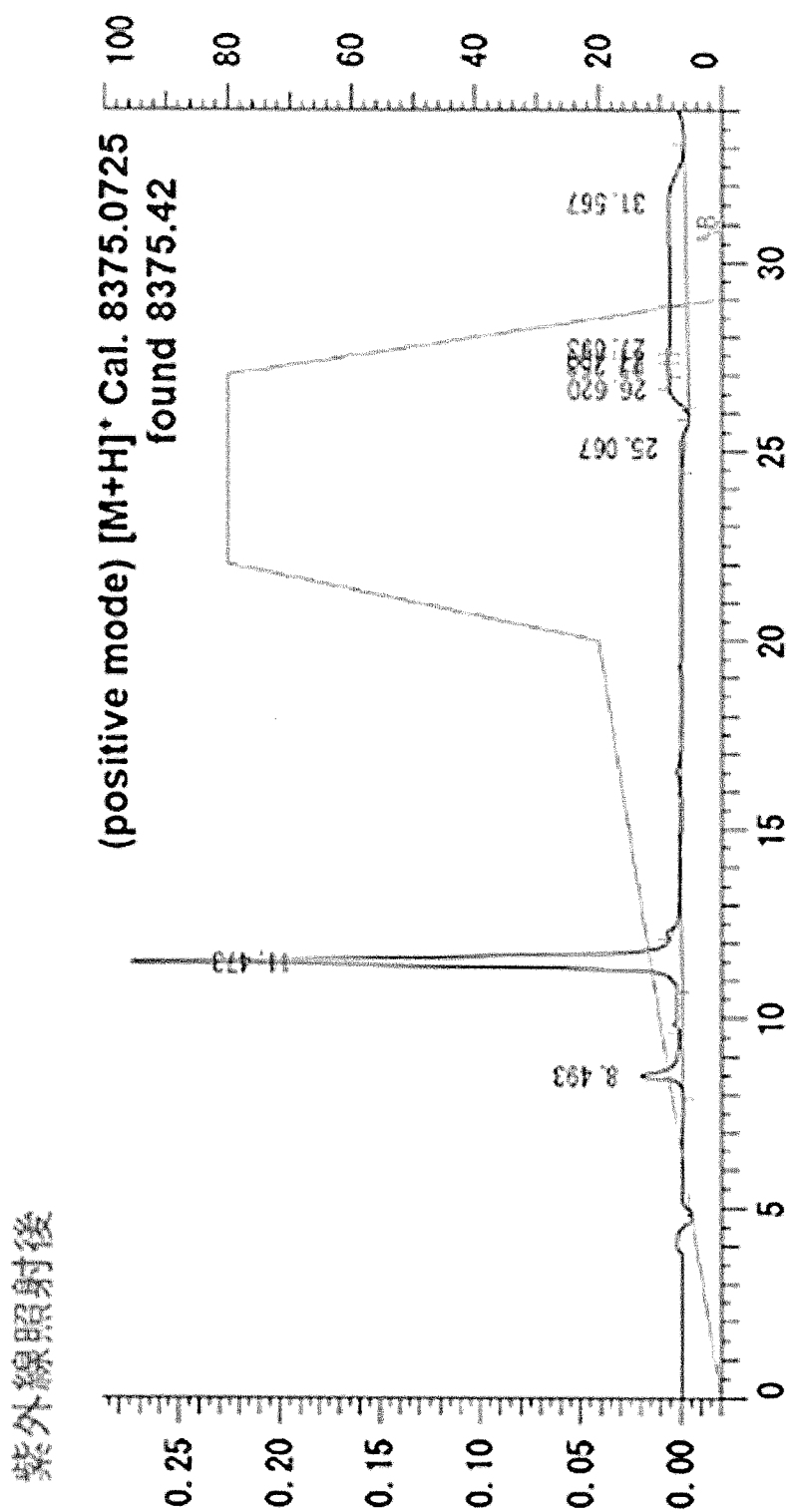
YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001) 4.6 × 250 mm, S-5 μm, 30 mm
 A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN, gradient) [B%] 0 → 20% (0 → 20 min., flow rate) 1.0 mL/min., detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

[図 5]



YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001) 4.6 × 250 mm, S-5 μm, 50 nm
A) 50 mM IEAA, 5% ACN, B) ACN, gradient) [B%] 0 → 20% (0 → 20 min.), flow rate) 1.0 mL/min., detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

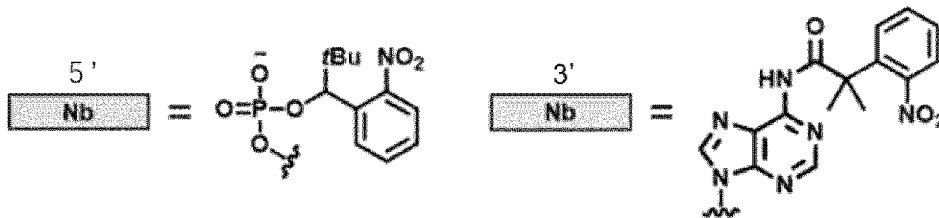
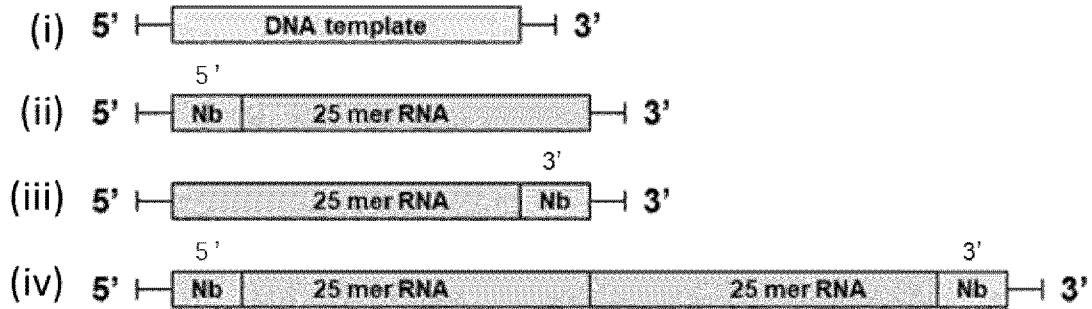
[図 6]



YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001) 4.6 × 250 mm, S-5 (μm, 30 nm)
 A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN, gradient) [B%] 0 → 20% (0 → 20 min.), flow rate) 1.0 mL/min., detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

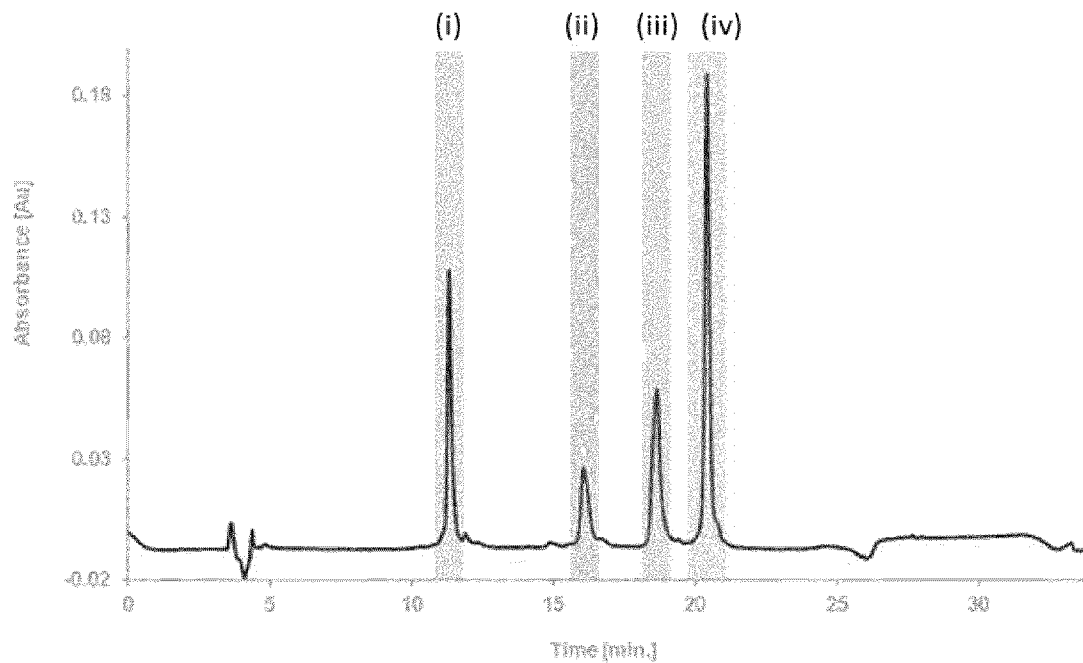
[7]

RNA ligation



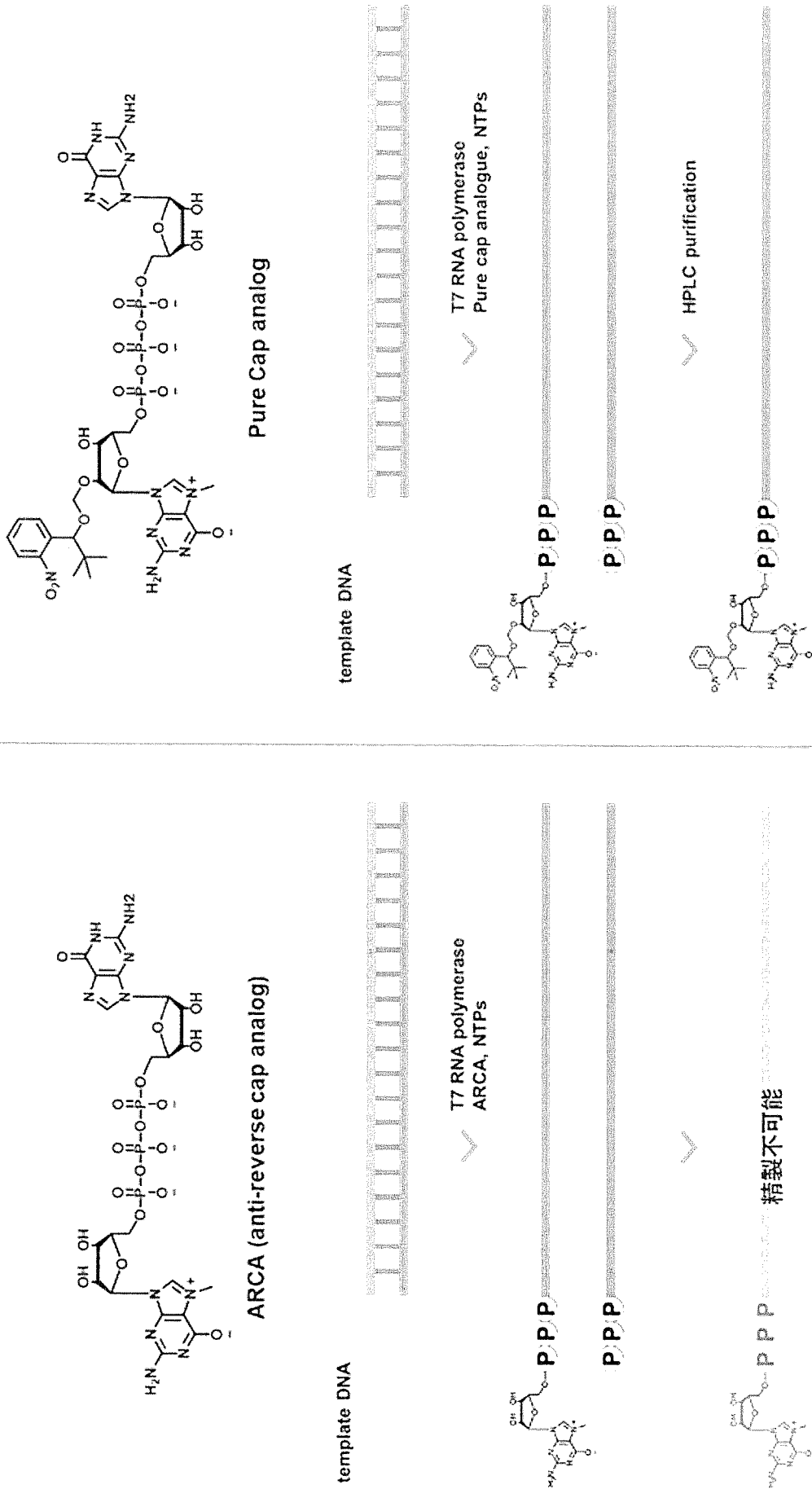
[8]

Reverse phase HPLC



YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001), 4.6 × 250 mm, S-5 μ m, 30 nm
 A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN, gradient) [B%] 0→20% (0→20 min.), flow rate) 1.0 mL/min.,
 detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

[図 10]



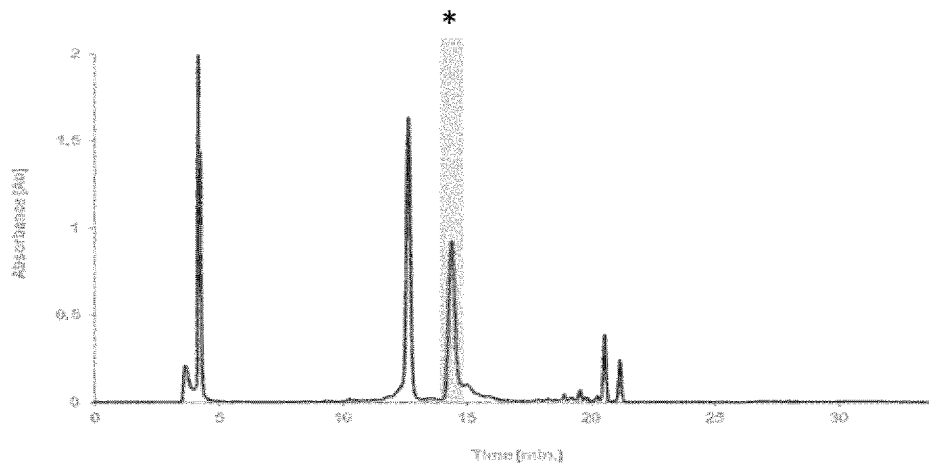
[図 11]

(配列番号 2) :

5' -

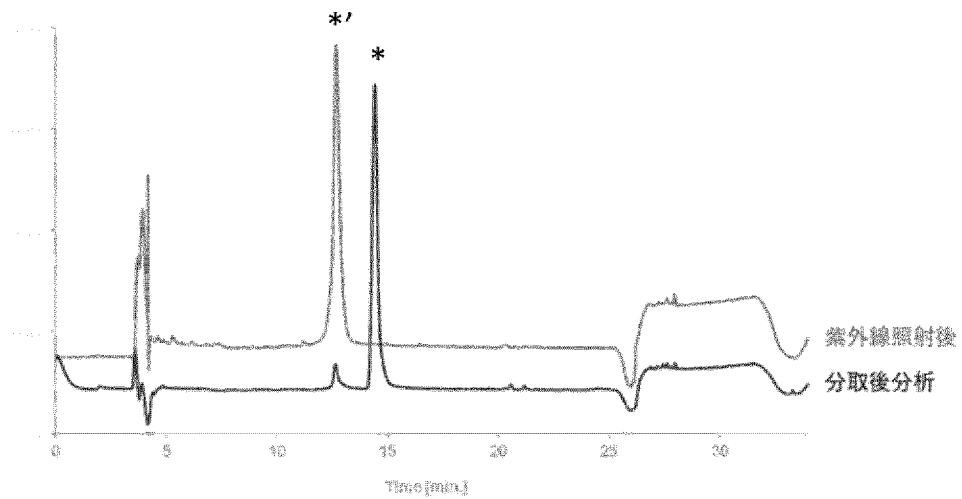
CCCGGAUCCUAAUACGACUCACUAUAGGCGCAUUAUAAGGUGACGC
 GUGUGGCCUCGAACACCGAGCGACCCUGCAGCGACCCGCUUAAAAG
 CUUGGCAAUCCGGUACUGUUGGUAAAAGCCACCAUGGUCUUCACACU
 CGAAGAUUUCGUUGGGGACUGGCGACAGACAGCCGGCUACAACCUG
 GACCAAGUCCUUGAACAGGGAGGUGUGUCCAGUUUGUUUCAGAAUC
 UCGGGGUGUCCGUAACUCCGAUCCAAAGGAUUGUCCUGAGCGGUGA
 AAAUGGGCUGAAGAUCGACAUCCAUGUCAUCAUCCCGUAUGAAGGU
 CUGAGCGGCGACCAAUGGGCCAGAUCGAAAAAAUUUUUAAGGUGG
 UGUACCCUGUGGAUGAUCACUUUAAGGUGAUCCUGCACUAUGG
 CACACUGGUAAUCGACGGGGUUACGCCGAACAUGAUCGACUAUUUC
 GGACGGCCGUAUGAAGGCAUCGCCGUGUUCGACGGCAAAAAGAUCA
 CUGUAACAGGGACCCUGUGGAACGGCAACAAAUAUUCGACGAGCG
 CCUGAUCACCCCGACGGCUCUCCUGCUGUUCGAGUAACCAUCAAC
 GGAGUGACCGGCUGGCGGCUGUGCGAACGCAUUCUGGCGUAAUUCU
 AGAGUACGCCUGCAACUUGGUGAAAGG-3'

[図 12]



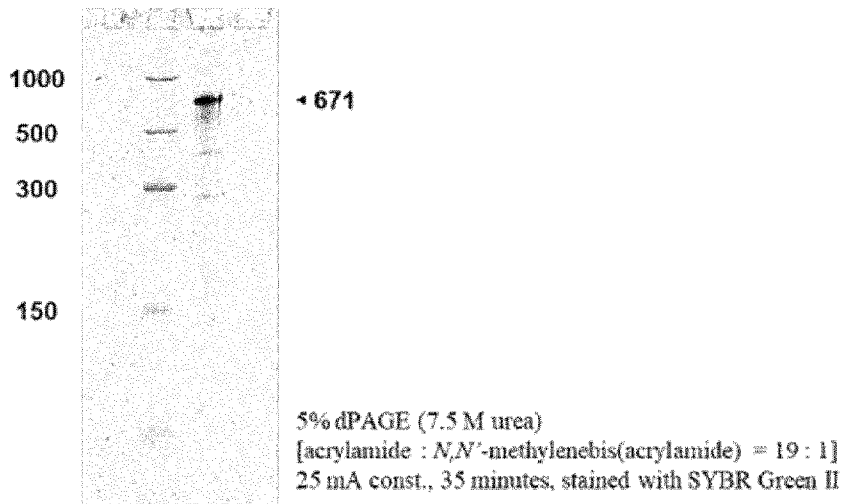
YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001) 4.6 × 250 mm, S-5 μm, 30 mm
 A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN, gradient) [B%] 0→20% (0→20 min.), flow rate) 1.0 mL/min., detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

[図 13]



YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001) 4.6 × 250 mm, S-5 μm, 30 nm
 A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN, gradient) [B%] 0→20% (0→20 min.), flow rate) 1.0 mL/min., detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

[図 14]



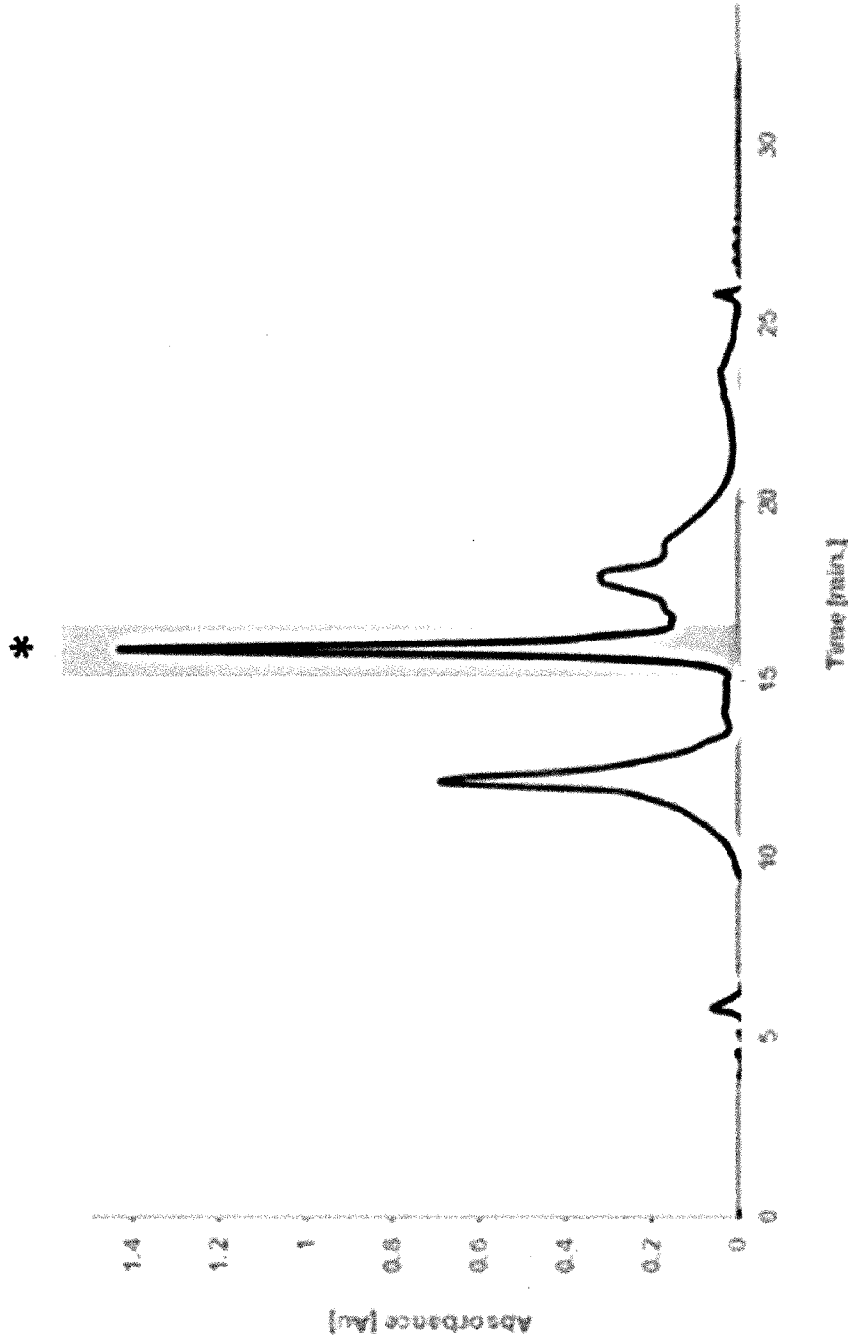
[図 15]

(配列番号 3) :

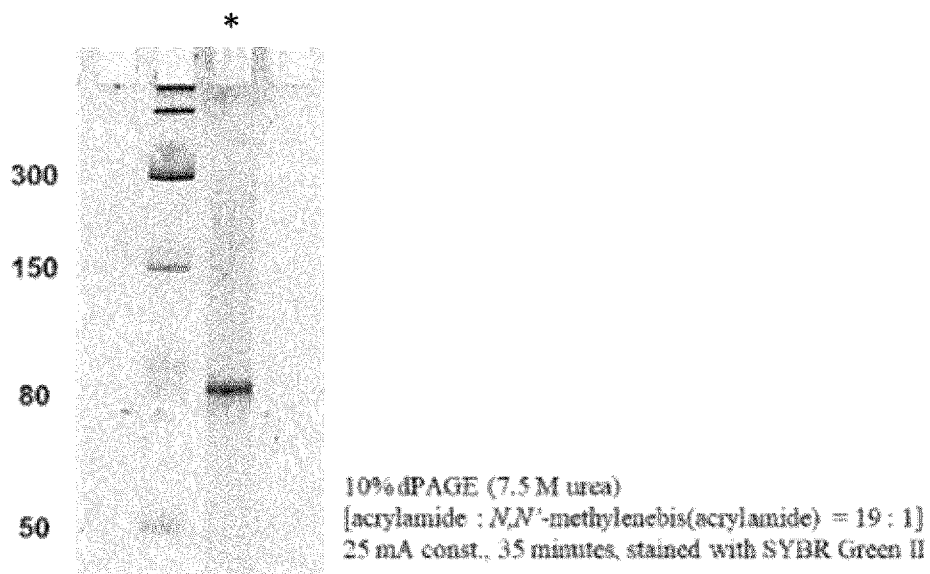
5' - PO₄ND
 GGA GCC ACC AUG GUC UUC ACA CUC GAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA
 AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA*A* A* PS - 3' (A*:2'-OMe adenosine)

PS : ホスホロチオエート基

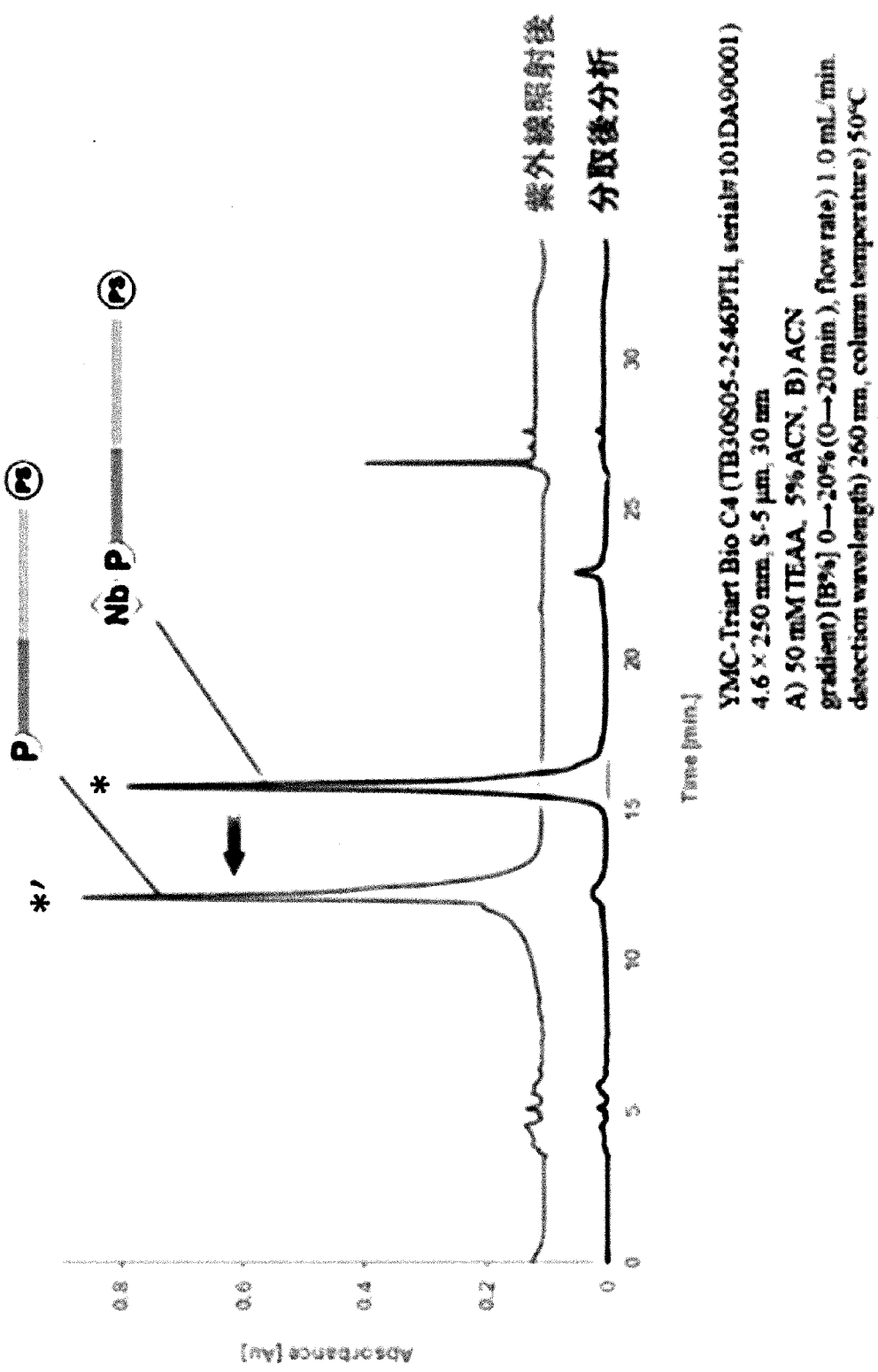
[図 16]



YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA90001)
4.6 × 250 mm, 5-5 μm, 30 mm
A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN
gradient) [B%] 0→20% (0→20 min.), flow rate) 1.0 mL/min.
detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

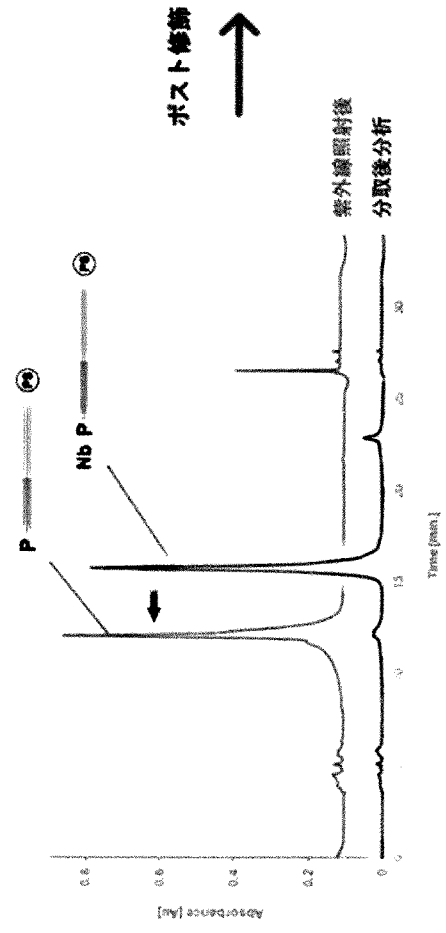
[ 17]

[図 18]

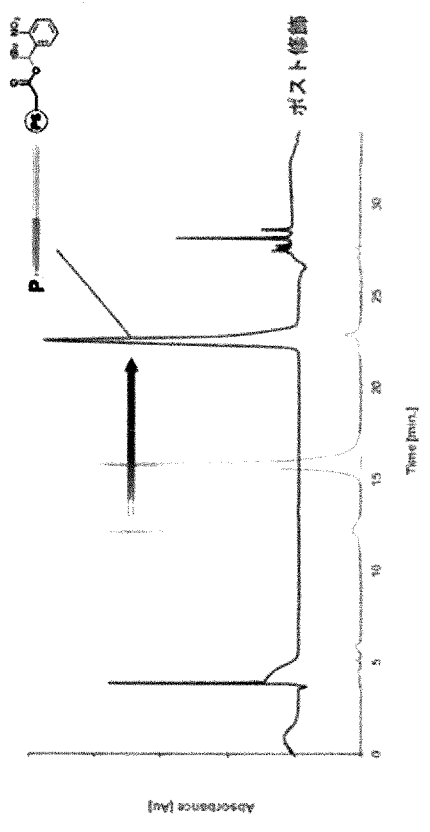


[図 19]

HPLC (分取後分析と紫外線照射後のサンプル)

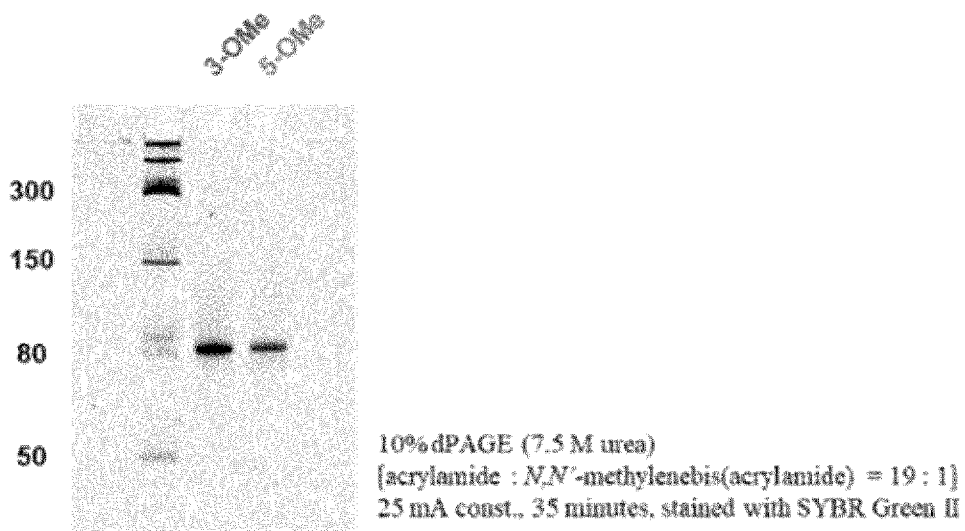


HPLC (ポスト修飾後のサンプル)



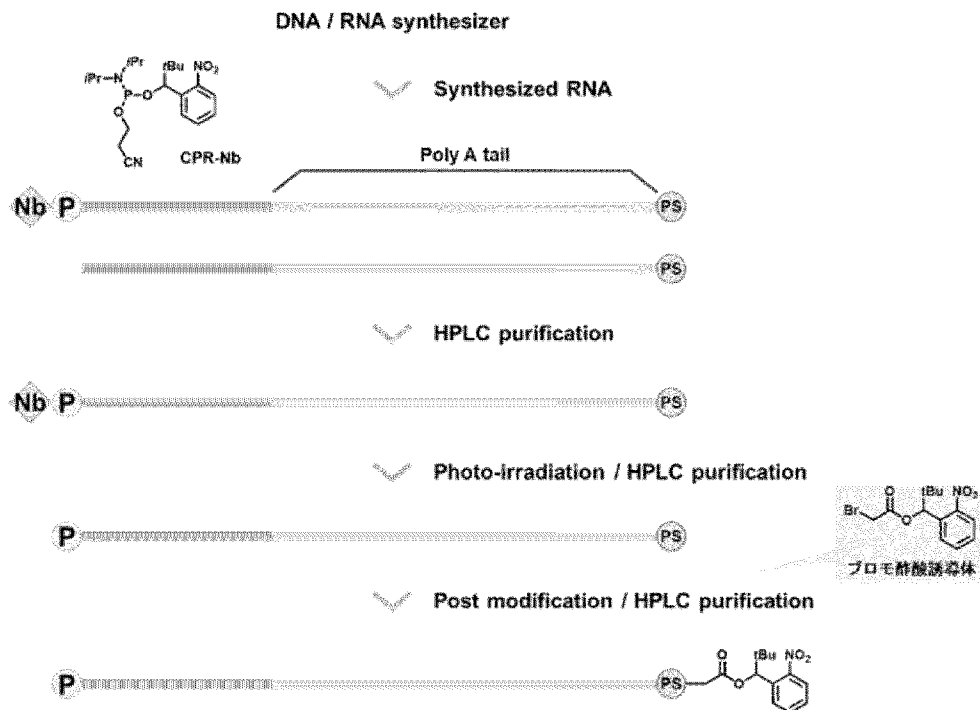
YMC-Triart Bio C4 (TB30S05-2546PTH, serial#101DA900001)
 4.6 × 250 mm, S-5 μm, 30 mm
 A) 50 mM TEAA, 5% ACN, B) ACN
 gradient) [B%] 0→20% (0→20 min), flow rate) 1.0 mL/min.
 detection wavelength) 260 nm, column temperature) 50°C

[図 20]

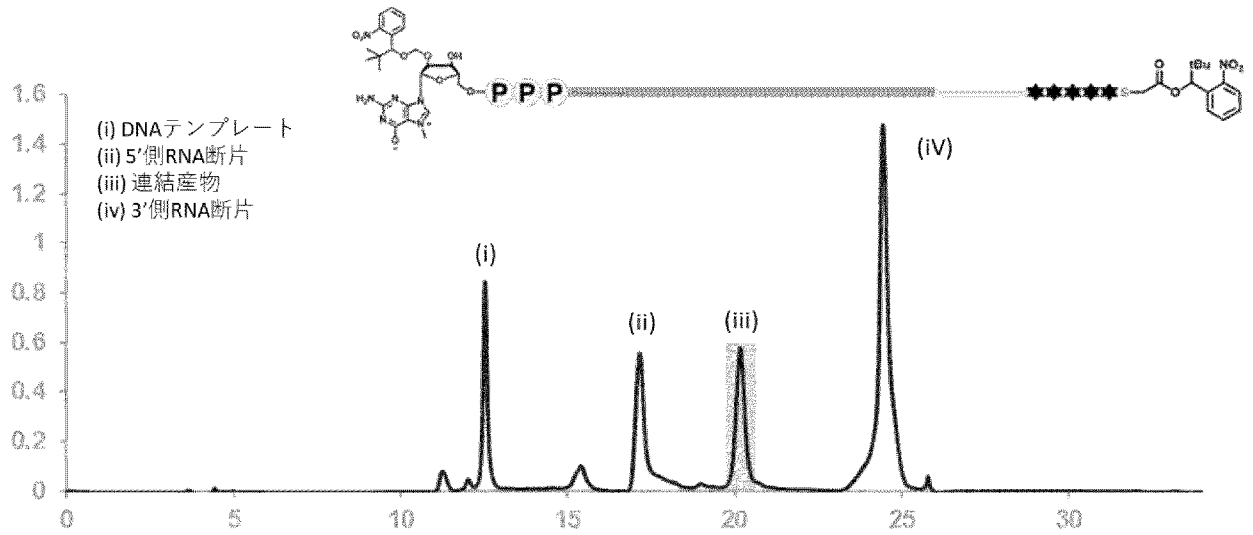


3-OME : 3'末端に3つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA
5-OME : 3'末端に5つの2'-O-methyl adenosineを持つRNA

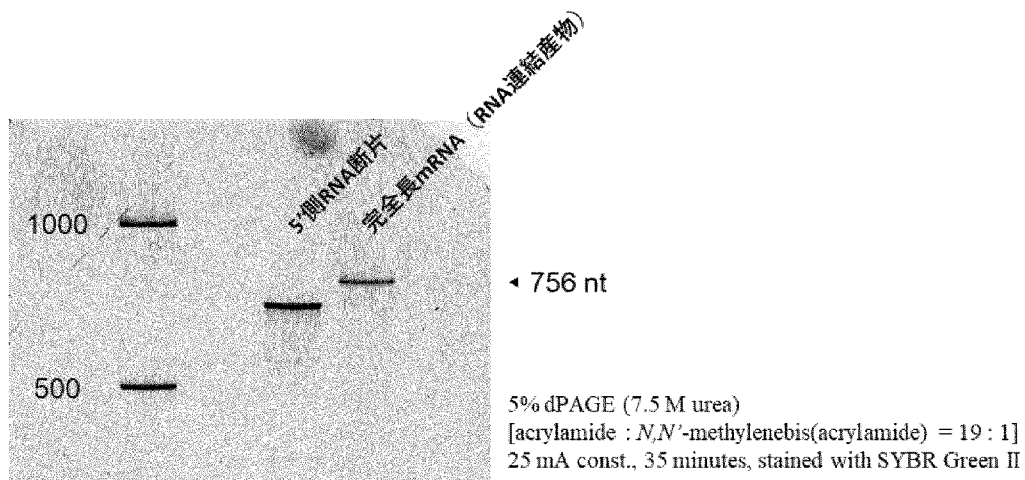
[図 21]



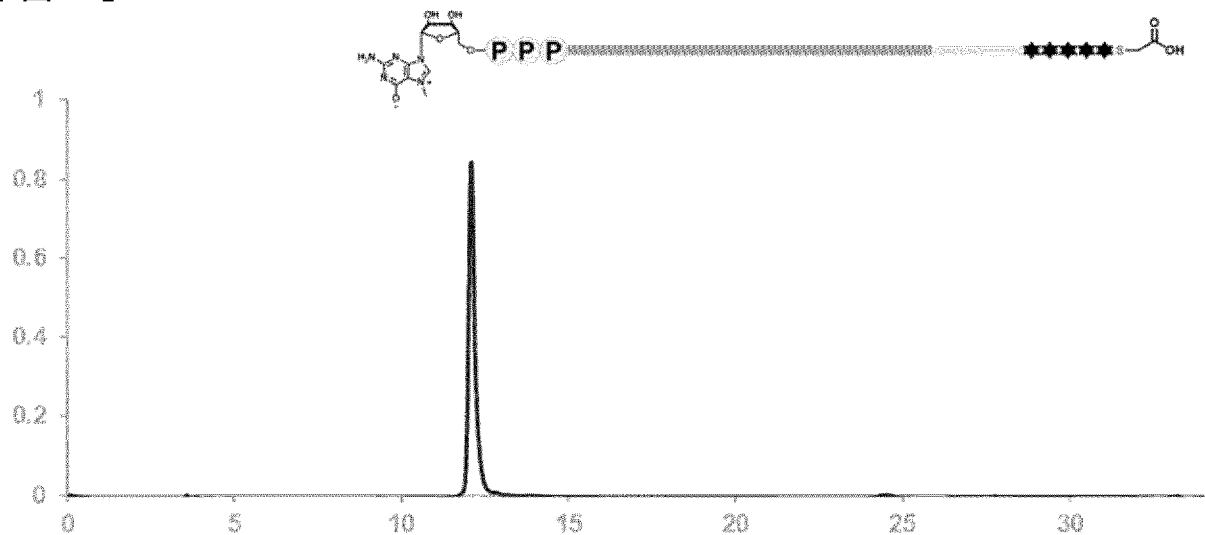
[図 22]



[図 23]



[図 24]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/007795

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07H 21/02</i> (2006.01)i; <i>A61K 48/00</i> (2006.01)i; <i>C07H 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/10</i> (2006.01)i FI: C07H21/02 CSP; C07H1/00; A61K48/00; C12N15/10 Z ZNA		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H21/02; A61K48/00; C07H1/00; C12N15/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WU, Li et al. Synthesis of Site-Specifically Phosphate-Caged siRNAs and Evaluation of Their RNAi Activity and Stability. Chemistry - A European Journal. 2014, 20, pp. 12114-12122 fig. 2, 3, column "conclusion", etc.	13-18
X	WO 2021/020562 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 04 February 2021 (2021-02-04) examples, tables 1, 2, etc.	13-17
X	WO 2009/113709 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 17 September 2009 (2009-09-17) examples, scheme 1, etc.	13-17
X	SANEYOSHI, H. et al. Development of Bioreduction Labile Protecting Groups for the 2'-Hydroxyl Group of RNA. Organic Letters. 2020, 22(15), pp. 6006-6009, DOI: 10.1021/acs.orglett.0c02086 fig. 2(a)	13-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 May 2024		Date of mailing of the international search report 21 May 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/007795

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STUTZ, A. et al. Novel Fluoride-Labile Nucleobase-Protecting Groups for the Synthesis of 3'(2')-O-Aminoacylated RNA Sequences. Helvetica Chimica Acta. 2000, 83(9), pp. 2477-2503 schemes 7, 9	13-16
Y	WO 2023/277168 A1 (KYOWA KIRIN CO., LTD.) 05 January 2023 (2023-01-05) claims, examples	1-18
Y	WO 2023/282245 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 12 January 2023 (2023-01-12) claims, examples, paragraphs [0009], [0043]-[0095]	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/007795

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/007795

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021/020562 A1	04 February 2021	US 2022/0282294 A1 examples, tables 1, 2, etc. EP 4006135 A1 CN 114302965 A	
WO 2009/113709 A1	17 September 2009	US 2011/0009607 A1 examples, scheme 1, etc. EP 2270142 A1	
WO 2023/277168 A1	05 January 2023	CA 3225964 A claims, examples	
WO 2023/282245 A1	12 January 2023	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07H 21/02(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)i FI: C07H21/02 CSP; C07H1/00; A61K48/00; C12N15/10 Z ZNA		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07H21/02; A61K48/00; C07H1/00; C12N15/10 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WU, Li et al., Synthesis of Site-Specifically Phosphate-Caged siRNAs and Evaluation of Their RNAi Activity and Stability, Chemistry - A European Journal, 2014, 20, pp. 12114-12122 Figure 2, 3, Conclusion欄等	13-18
X	WO 2021/020562 A1 (国立研究開発法人科学技術振興機構) 04.02.2021 (2021 - 02 - 04) 実施例、表1, 2等	13-17
X	WO 2009/113709 A1 (国立大学法人東京大学) 17.09.2009 (2009 - 09 - 17) 実施例、スキーム1等	13-17
X	SANEYOSHI, H. et al., Development of Bioreduction Labile Protecting Groups for the 2'-Hydroxyl Group of RNA, Organic Letters, 2020, 22(15), pp. 6006-6009, DOI: 10.1021/acs.orglett.0c02086 Figure 2(a)	13-16
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07.05.2024	国際調査報告の発送日 21.05.2024
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 早乙女 智美 4P 3759 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	STUTZ, A. et al., Novel Fluoride-Labile Nucleobase-Protecting Groups for the Synthesis of 3' (2')-O-Aminoacylated RNA Sequences, Helvetica Chimica Acta, 2000, 83(9), pp. 2477-2503 Scheme 7, 9	13-16
Y	WO 2023/277168 A1 (協和キリン株式会社) 05.01.2023 (2023 - 01 - 05) 請求の範囲、実施例	1-18
Y	WO 2023/282245 A1 (国立研究開発法人科学技術振興機構) 12.01.2023 (2023 - 01 - 12) 請求の範囲、実施例、段落[0009], [0043]-[0095]	1-18

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/007795

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2021/020562	A1	04.02.2021	US	2022/0282294	A1	
					実施例、表 1, 2 等		
				EP	4006135	A1	
				CN	114302965	A	

WO	2009/113709	A1	17.09.2009	US	2011/0009607	A1	
					実施例、スキーム 1 等		
				EP	2270142	A1	

WO	2023/277168	A1	05.01.2023	CA	3225964	A	
					請求の範囲、実施例		

WO	2023/282245	A1	12.01.2023		(ファミリーなし)		
