

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6571663号
(P6571663)

(45) 発行日 令和1年9月4日(2019.9.4)

(24) 登録日 令和1年8月16日(2019.8.16)

(51) Int.Cl.

C07H 21/02 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

F 1

C07H 21/02
C12N 15/11 Z N A

請求項の数 12 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2016-542861 (P2016-542861)	(73) 特許権者	511055429 ケムジーンズ コーポレーション アメリカ合衆国 O 1887 マサチュー セツツ州 ウィルミントン インダストリ アル ウエイ 33
(86) (22) 出願日	平成26年9月15日 (2014. 9. 15)	(74) 代理人	110002295 特許業務法人森脇特許事務所
(65) 公表番号	特表2016-531157 (P2016-531157A)	(74) 代理人	100117042 弁理士 森脇 正志
(43) 公表日	平成28年10月6日 (2016. 10. 6)	(72) 発明者	スリヴァスタヴァ スレッシュ シー. アメリカ合衆国, O 1887 マサチュー セツツ州, ウィルミントン, インダストリ アル ウエイ 33
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/055711		
(87) 國際公開番号	W02015/039053		
(87) 國際公開日	平成27年3月19日 (2015. 3. 19)		
審査請求日	平成29年9月8日 (2017. 9. 8)		
(31) 優先権主張番号	61/877, 980		
(32) 優先日	平成25年9月14日 (2013. 9. 14)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

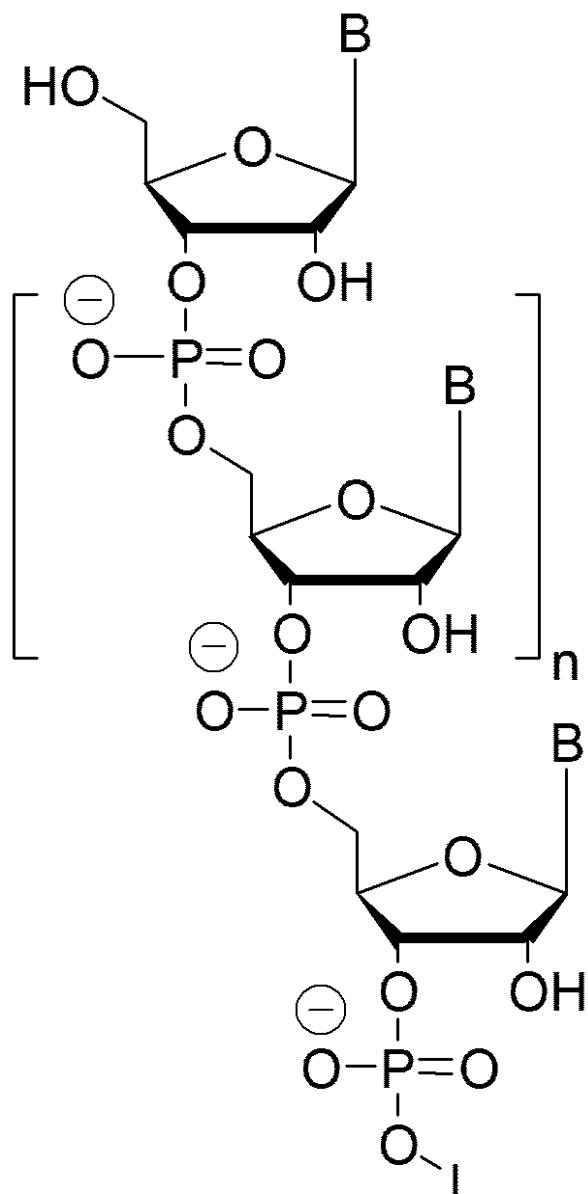
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】逆方向アプローチを使用した長いRNAの非常に効果的な合成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の化学式のRNAオリゴヌクレオチドを合成するプロセスであって、



B は、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、6 - オキソプリン、5 - メチルシトシン、5 - メチルウラシル、5 - フルオロウラシル、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザアデノシンおよび5 - フルオロサイトシンからなる群から選択される1種であり、

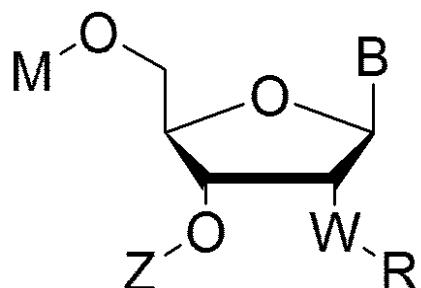
n は、整数100～約200であり、

L は、ヌクレオシドまたは、リンカーまたはスペーサを有するコレステロール、ビオチン、エチレンギリコール、グリセロール、ポリエチレンギリコール、ヘキサエチレンギリコール、アミノリンカー、二硫化物リンカー、ペプチドリンカー、ポリペプチドリンカー、タンパク質、発蛍光団、クエンチャーモーラー、一つ以上の2'、5' - 結合デオキシヌクレオシド単位、一つ以上の2'、5' - 結合リボヌクレオシド単位、および一つ以上の2'、5' - 結合デオキシリボース単位からなる群から選択される非ヌクレオシド配位子であり、

L は、介在するリン酸塩を介して RNA ヌクレオチドの3'末端に付着され、

前記 RNA オリゴヌクレオチドの合成プロセスは、RNA ヌクレオチドの5'末端から3'末端への方向であり、当該プロセスは、以下のステップを有する。

(a) 化学式2で表されるヌクレオシドを使用し、



(化学式2)

10

Mは、化学式Y - C(O)で表され、付加的にオリゴヌクレオチド合成に適する固相担体につながるリンカーであり、

ここで、Yは、2個の炭素と20個の炭素間の長さを有する炭化水素ジラジカル部分であり、そして、

Yは、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、アリールおよびアルアルキルからなる群から選択され、そして、炭化水素ジラジカル部分は、付加的に、介在する-O-、-S-、-S(O)₂-、-C(O)-および-NR₆-から成り、R₆は、水素ラジカル、または置換C₁~C₂₀アルキルまたは置換アルアルキルであり、

Wは、酸素ジラジカル、N-Hジラジカルおよびフッ素ラジカルからなる群から選択され、そして、

20

Rは、

Wが酸素ジラジカルである場合、Rはtert-ブチルジメチルシリル(TBDM-S)、またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン(TOM)であり、そして、

WがN-Hジラジカルである場合、Rは、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、トリフルオロアセチル、アセチル、アルカノイルおよびアロイルからなる群から選択され、そして、

Wがフッ素ラジカルである場合、Rは存在せず、

Bは、9-(N⁶-ベンゾイルアデニル)-、9-(N⁶-アセチルアデニル)-、9-(N⁶-tert-ブチルフェノキシアセチルアデニル)-、9-(N⁶-フェノキシアセチルアデニル)-、9-(N⁶-イソプロピルフェノキシアセチルアデニル)-、1-(N⁴-ベンゾイルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)シトシニル)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェニルアセチルシトシン)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、9-(N²-イソブチルグアニン)-、9-(N²-tert-ブチルフェノキシアセチルグアニン)-、9-(N²-イソプロピルフェノキシアセチルグアニン)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、および、1-ウラシリル-からなるヌクレオシド塩基ラジカルからなる群から選択されるか、または、

Bは、1-(N⁴-ベンゾイル-5メチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル))-、5-メチルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチル-5-メチルシトシニル)-、1-(5-メチル-ウラシリル)-、1-(5-フルオロ-ウラシリル)-、1-(N⁴-ベンゾイル-7-デアザアデニル)-、9-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル))-、7-デアザアデニル)-、9-(N²-イソブチル-7-デアザグアニル)-、および、9-N²-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザグアニル)-からなる群から選択される修飾ヌクレオシド塩基ラジカルであり、

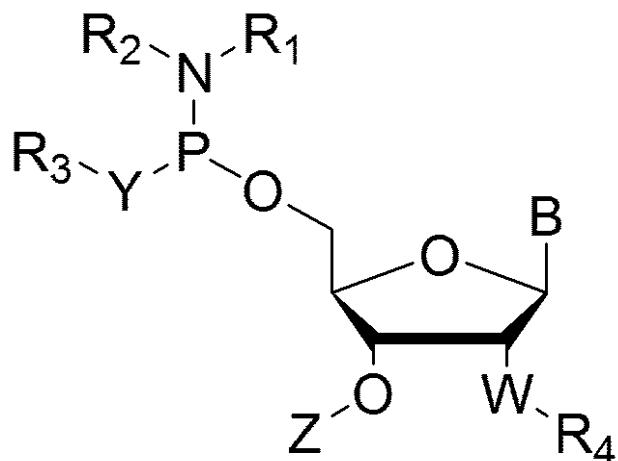
30

Zは、ジメトキシトリフェニル(DMT)、モノメトキシトリフェニル(MMT)およびトリメトキシトリフェニル(TMT)からなる群から選択されるものであり、

(b) オリゴヌクレオチド合成装置上の化学式1で表されるホスホラミダイトを配置し

40

50



(化学式1)

Yは、酸素原子または硫黄原子であり、

Wは、酸素ジラジカル、N-Hジラジカルおよびフッ素ラジカルからなる群から選択され；そして、

R₄は、

20

Wが酸素ジラジカルである場合、R₄はtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン(TOM)であり；そして、

WがN-Hジラジカルである場合、R₄は、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、トリフルオロアセチル、アセチル、アルカノイルおよびアロイルからなる群から選択され、

Wがフッ素ラジカルである場合、R₄は存在しないように、選択され、

Bは、9-(N⁶-ベンゾイルアデニル)-、9-(N⁶-アセチルアデニル)-、9-(N⁶-tert-ブチルフェノキシアセチルアデニル)-、9-(N⁶-フェノキシアセチルアデニル)-、9-(N⁶-イソプロピルフェノキシアセチルアデニル)-、1-(N⁴-ベンゾイルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチルシトシニル)-、1-(N⁴-N,N-ジメチルホルムアミジニル)シトシニル)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェニルアセチルシトシン)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、9-(N²-イソブチルグアニン)-、9-(N²-tert-ブチルフェノキシアセチルグアニン)-、9-(N²-イソプロピルフェノキシアセチルグアニン)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、および、1-ウラシリル-からなるヌクレオシド塩基ラジカルからなる群から選択されるか、または、

30

Bは、1-(N⁴-ベンゾイル-5-メチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-、5-メチルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチル-5-メチルシトシニル)-、1-(5-メチル-ウラシリル)-、1-(5-フルオロ-ウラシリル)-、1-(N⁴-ベンゾイル-5-フルオロシトシル)-、9-(N⁶-ベンゾイル-7-デアザアデニル)-、9-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-、7-デアザアデニル)-、9-(N²-イソブチル-7-デアザグアニル)-、および、9-N²-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザグアニル)-からなる群から選択される修飾ヌクレオシド塩基ラジカルであり、

40

Zは、ジメトキシトリフェニル(DMT)、モノメトキシトリフェニル(MMT)およびトリメトキシトリフェニル(TMT)からなる群から選択されるものであり、

50

R₁は、アルキルまたはアリールラジカルであり、
 R₂は、アルキルまたはアリールラジカルであり、そして、
 R₃は、シアノエチル、アルキルまたはアリールラジカルであり、
 Bは、水素であるか、または、アミン保護基を有する各一级アミンで付加的に官能基化される核酸塩基であり、

(c) 化学式2で表されるヌクレオシド固相担体から保護基Zを取り除き、
 (d) 保護基を少なくとも一つ有するオリゴヌクレオチドを生じさせるために、補助試薬の混合物を用いて、オリゴヌクレオチド合成装置において、化学式2のヌクレオシドおよび式1のホスホラミダイトをカップリングすることにより、RNA合成のプロセスを実行し、
10

(e) ホスホラミダイトにL基を提供し、
 (f) L基を有するオリゴヌクレオチドを生じさせるために、オリゴヌクレオチドの末端に、L基を伴うホスホラミダイトを加え、
 (g) 固相担体からL基を有するオリゴヌクレオチドを分離し、
 (h) オリゴヌクレオチドから少なくとも一つの保護基を取り除き、
 (i) オリゴヌクレオチドを生じさせるためにシリル保護基を取り除き、
 (j) オリゴヌクレオチドを沈殿させ、
 (k) 純度を決定するためにオリゴヌクレオチドを分析するプロセスにおいて、
 ステップ(d)における補助試薬の混合物は、フェノキシ樹脂無水酢酸/テトラヒドロフラン/ピリジン、10%のN-メチルイミダゾール/テトラヒドロフラン、3%のトリクロロ酢酸(トルエン中)、0.05Mのヨウ素/ピリジン/水/テトラヒドロフランおよび0.35Mの5-エチルチオ-1-H-テトラゾール(アセトニトリル中)から成ることを特徴とする、プロセス。
20

【請求項2】

Lはリンカーまたはスペーサを有するコレステロールであり、そして、nは整数100~約200であることを特徴とする、請求項1に記載のプロセス。

【請求項3】

Lはポリエチレングリコールであり、そして、nは整数100~約200であることを特徴とする、請求項1に記載のプロセス。

【請求項4】

前記RNAオリゴヌクレオチドは、100~200merの長鎖RNAであることを特徴とする、請求項1に記載のプロセス。
30

【請求項5】

前記RNAオリゴヌクレオチドが、さらに、デオキシ、バックボーン修飾塩基、修飾DNAまたは修飾RNA塩基を含むRNAキメラに合成される、請求項1に記載のプロセス。

【請求項6】

前記RNAオリゴヌクレオチドが、さらに、末端、分岐点、または、前記RNAオリゴヌクレオチド鎖内に、一つ以上の5'、2'、2'、3'結合を含む、請求項1に記載のプロセス。
40

【請求項7】

前記RNAオリゴヌクレオチドが、さらに、天然および修飾ヌクレオシド、脱塩基部位、逆脱塩基部位、発色団または配位子を含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項8】

前記RNAオリゴヌクレオチドが、さらに、発色団、配位子、一リン酸エステル基、二リン酸エステル基または三リン酸エステル基を含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項9】

前記RNAオリゴヌクレオチドが、さらに、一つ以上のデオキシ、修飾デオキシ、または修飾リボヌクレオシドとの分岐点を含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項10】

10

20

30

40

50

H P L C ゲル電気泳動または R N A 精製技術を用いる前記 R N A オリゴヌクレオチドの精製ステップをさらに含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 1 1】

表面への前記 R N A オリゴヌクレオチドの標識および付着のステップをさらに含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 1 2】

分子生物学研究開発において、前記 R N A オリゴヌクレオチドを利用するステップをさらに含む、請求項 1 に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【 0 0 0 1 】

相互参照

本特許協力条約出願は 2 0 1 3 年 9 月 1 4 日に出願された、米国仮特許出願第 6 1 / 8 7 7 , 9 8 0 号の利点に基づき、主張する。これらの特許の開示内容は、参照することによって本願に組み込まれるものとする。

【 0 0 0 2 】

本発明は、モノマーhosホラミダイトを使用する長い R N A オリゴマの合成、および逆の 5' → 3' 方向での R N A オリゴヌクレオチド合成に適した対応する固相担体に関する。特に、この発明は、約 1 0 0 - m e r ~ 約 2 0 0 - m e r の長い R N A オリゴマの合成に適応できる実験条件を使用するものを対象とする。

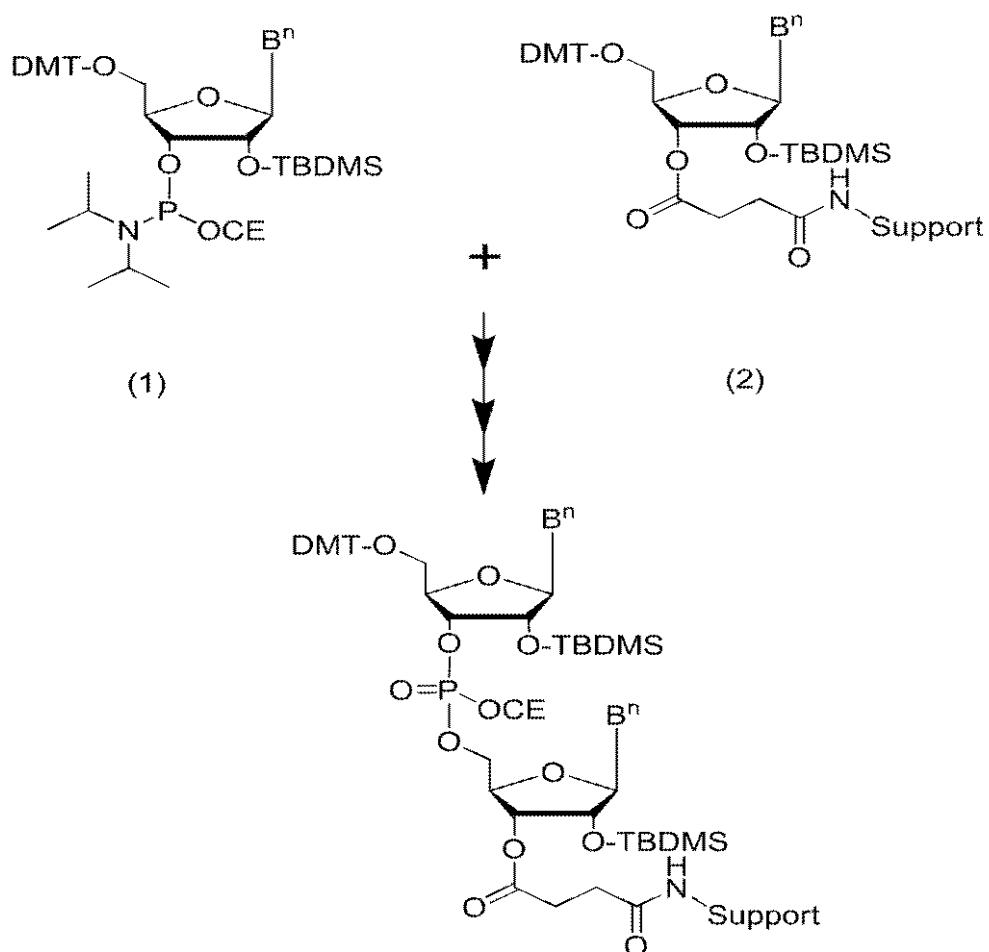
20

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

3' → 5' 方向での定義された配列 R N A 合成は、現在ではかなり確立され、非常に多様な治療用グレードの R N A アプタマ、t R N A、s i R N A および生物活性 R N A 分子の合成および開発のために近年使用されている。この 3' → 5' 合成アプローチは、オリゴヌクレオチドを生じさせるために、3' - アミダイトおよび 3' - 担体を利用する。

【 0 0 0 4 】



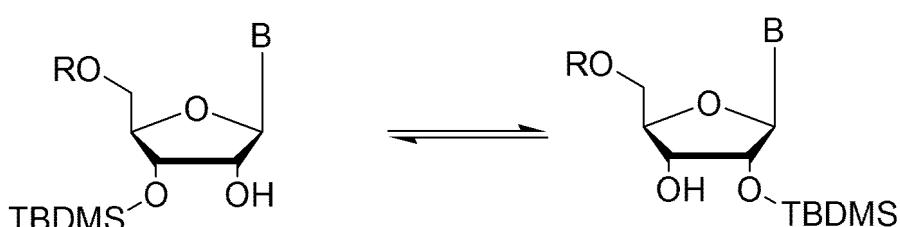
(化学式 I)

30

【 0 0 0 5 】

しかしながら 3' - 5' 合成アプローチは、3' - 位から 2' - 位まで、O - T B D M S 基の移動で大きなドローバック (draw back) を有し、逆もまた同じとなる。

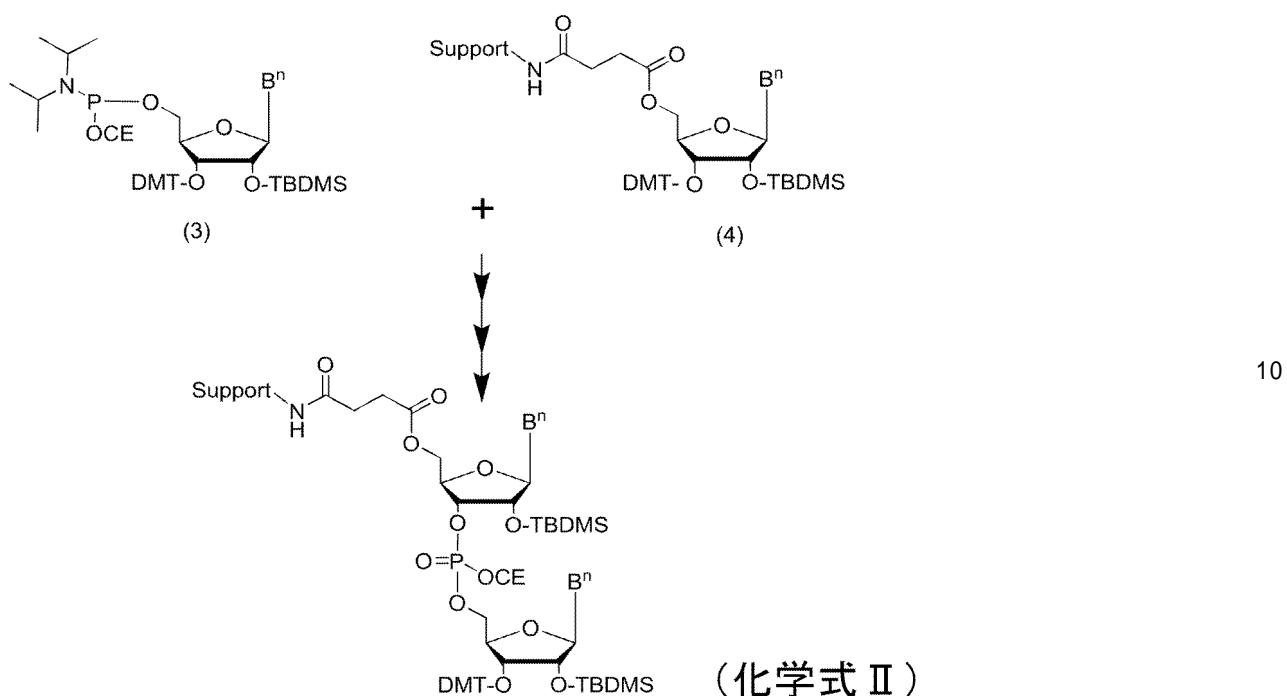
【 0 0 0 6 】



【 0 0 0 7 】

対照的に、5' - 3' 合成アプローチ (「逆方向」合成または「逆合成」と呼ばれる) は、O - T B D M S 基の移動という問題をうまく回避している。5' - 3' 合成アプローチは、オリゴヌクレオチドを生じさせるために、5' - アミダイトおよび 5' - 担体を利用し、以下のようにまとめられる。

【 0 0 0 8 】



【0009】

米国特許第8,309,707号および米国特許第8,541,569号には、RNA合成のための5' - 3'アプローチについての記載がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許第8,309,707号

【特許文献2】米国特許第8,541,569号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

5' - 3'アプローチのおかげで、さまざまな長さのRNA（例えば31-mer、43-mer、74-merおよび76-mer）が提供される。例えば、

A. 31-mer G-rich RNAキメラ合成（16のグアノシンを含むオリゴヌクレオチド）（図1を参照）

配列：5' - A C G G G A A G A G G G A A m e U G A G G G m e U A C G A G G G C G m e U - 3'（配列番号No.4）。

「m e U」が修飾塩基2' - O - メチルウリジンである点に注意する。

B. 43-mer RNA合成（図2を参照）

配列：G G C C C A U C C G U G G A G G 9 8 8 8 7 6 7 7 7 C C C A G G G 8 8 8 7 6 7 7 6 C G G U C（配列番号No.5）：

「6」は、修飾塩基2' - O - メチルアデノシンを表し；

「7」は、修飾塩基2' - O - メチルシチジンを表し；

「8」は、修飾塩基2' - O - メチルグアノシンを表し；

そして、

「9」は、修飾塩基2' - O - メチルウリジンを表す点に注意。

C. 74-mer RNA合成（図3を参照）

配列：U C C U C U G U A G U U C A G U C G G U A G A A C G G C G G A C G G A C U U U C A A U C C G U A U G U C A C U G G U U C G A G U C C A G U C A G G A G C（配列番号No.6）。

D . 7 6 - m e r RNA 合成 (図 4 を参照)

配列 : G C C C G G A U A G C U C A G U C G G U A G A G C A U C
 A G A C U U U U U A U C U G A G G G U C C A G G G U U C A A
 G U C C C U G U U C G G G C G C C A (配列番号 N o . 7)

【 0 0 1 2 】

しかしながら、特に RNA 合成のための 5' 3' アプローチの適用において、さらに長い RNA (例えば 100 - m e r ~ 200 - m e r) の合成が達成される必要がある。

【 0 0 1 3 】

並行して、複数の状況により、さらに長い RNA の研究が非常に重要となっている。

(A) 非コ - ド RNA (n c R N A) は、哺乳類の X 染色体不活性化を制御することが公知で、スモール RNA を產生するために加工されてもよい。 10

(<http://genesdev.cshlp.org/content/23/13/1494.long>)

(B) RNA 干渉 (R N A i) 機構は、転写後に遺伝子発現を制御するマイクロ RNA (m i R N A) および低分子干渉 RNA (s i R N A) の生成における役割を十分に特徴づける。

m r h 1 として公知の 2 . 4 - k b 非スプライス、ポリアデニル化核保持 n c R N A は、 80 - n t スモール RNA を產生するために、 D r o s h a により加工される。

(C) m i R N A および p i w i - 干渉 RNA (p i R N A) が最近最も注目されているが、長い RNA 転写物は、異なる固有とされる機能を有するスモール RNA へ加工する際の制御において、重要な役割を有する。 20

(D) 長い n c R N A は、スモール RNA を產生するために加工可能であるが、他の転写物がどのように加工されるにも影響することができる。(例えば、スモール RNA に切られるそれらの機能を調整するか、またはそれらの p r e - m R N A スプライシングパターンを変更することによって)

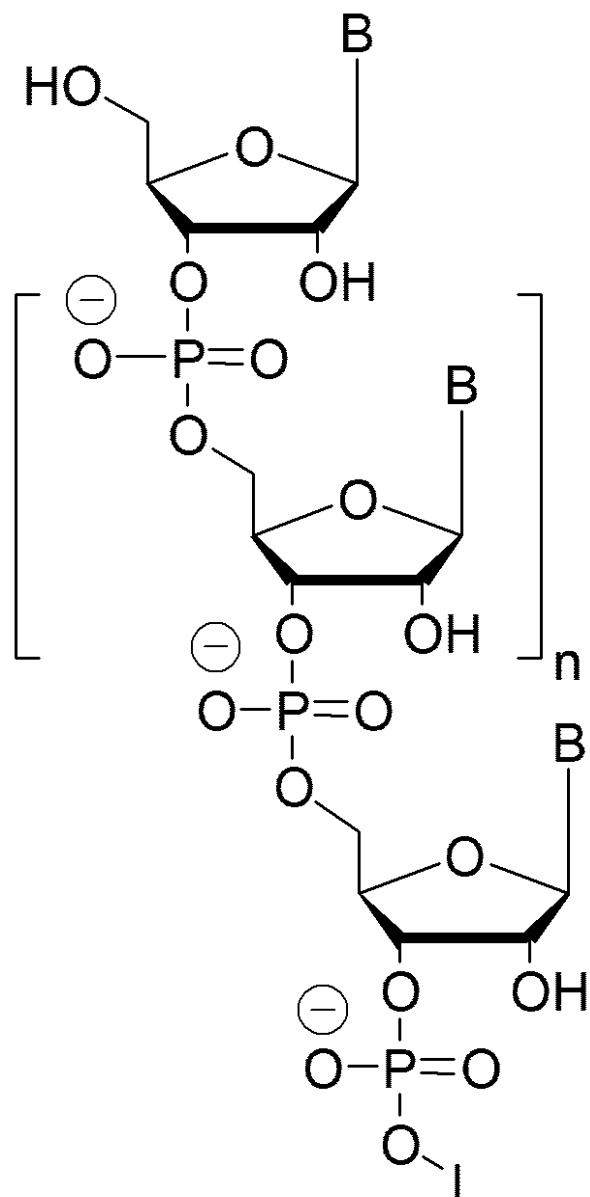
(E) n c R N A は、他の転写物にスモール RNA を產生させないようにする。

(F) 非コ - ド RNA およびホルモン制御は、新生の分野である。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 4 】

以下の化学式の RNA オリゴヌクレオチドを合成するプロセス :



ここで、

B は、アデニン、シトシン、グアニン、ウラシル、6 - オキソプリン、5 - メチルシトシン、5 - メチルウラシル、5 - フルオロウラシル、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザアデノシンおよび5 - フルオロサイトシンからなる群から選択される1種であり；

n は、整数 100 ~ 約 200 であり；

L は、ヌクレオシドまたは、リンカーまたはスペーサを有するコレステロール、ビオチン、エチレンギリコール、グリセロール、ポリエチレンギリコール、ヘキサエチレンギリコール、アミノリンカー、二硫化物リンカー、ペプチドリンカー、ポリペプチドリンカー、タンパク質、発蛍光団、クエンチャーモーラー、一つ以上の2'、5' - 結合デオキシヌクレオシド単位、一つ以上の2'、5' - 結合リボヌクレオシド単位、および一つ以上の2'、5' - 結合デオキシリボース単位からなる群から選択される非ヌクレオシド配位子であり

ここで、L は、介在するリン酸塩を介して RNA ヌクレオチドの 3' 末端に付着され；そして、

【0015】

RNA オリゴヌクレオチドの合成プロセスは、RNA ヌクレオチドの 5' 末端から 3' 末端への方向であり、当該プロセスは、以下のステップを有する。

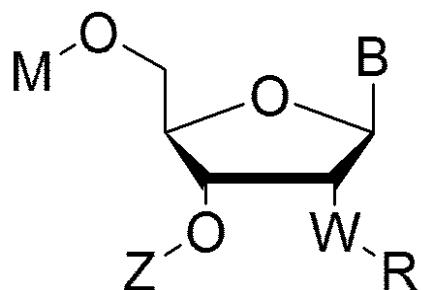
(a) 化学式 2 で表されるヌクレオシドを使用し、

40

50

40

50



(化学式2)

ここで、

10

Mは、化学式Y-C(O)で表され、付加的にオリゴヌクレオチド合成に適する固相担体につながるリンカーであり、

ここで、Yは、2個の炭素と20個の炭素間の長さを有する炭化水素ジラジカル部分であり、そして、

Yは、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、アリールおよびアルアルキルからなる群から選択され、そして、炭化水素ジラジカル部分は、付加的に、介在する-O-、-S-、-S(O)₂-、-C(O)-および-NR₆-から成り、R₆は、水素ラジカル、または置換C₁~C₂₀アルキルまたは置換アルアルキルであり、

Wは、酸素ジラジカル、N-Hジラジカルおよびフッ素ラジカルからなる群から選択され、そして、

20

Rは、

Wが酸素ジラジカルである場合、Rはtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン(TOM)であり、そして、

WがN-Hジラジカルである場合、Rは、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、トリフルオロアセチル、アセチル、アルカノイルおよびアロイルからなる群から選択され、そして、

Wがフッ素ラジカルである場合、Rは存在せず、

Bは、9-(N⁶-ベンゾイルアデニニル)-、9-(N⁶-アセチルアデニニル)-、9-(N⁶-tert-ブチルフェノキシアセチルアデニニル)-、9-(N⁶-フェノキシアセチルアデニニル)-、9-(N⁶-イソプロピルフェノキシアセチルアデニニル)-、1-(N⁴-ベンゾイルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)シトシニル)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェニルアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、9-(N²-イソブチルグアニン)-、9-(N²-tert-ブチルフェノキシアセチルグアニン)-、9-(N²-イソプロピルフェノキシアセチルグアニン)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、および、1-ウラシリル-からなるヌクレオシド塩基ラジカルからなる群から選択されるか、または、

Bは、1-(N⁴-ベンゾイル-5メチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル))-、5-メチルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチル-5-メチルシトシニル)-、1-(5-メチル-ウラシリル)-、1-(5-フルオロ-ウラシリル)-、1-(N⁴-ベンゾイル-7-デアザアデニル)-、9-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル))-、7-デアザアデニル)-、9-(N²-イソブチル-7-デアザグアニル)-、および、9-N²-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザグアニル)-からなる群から選択される修飾ヌクレオシド塩基ラジカルであり、

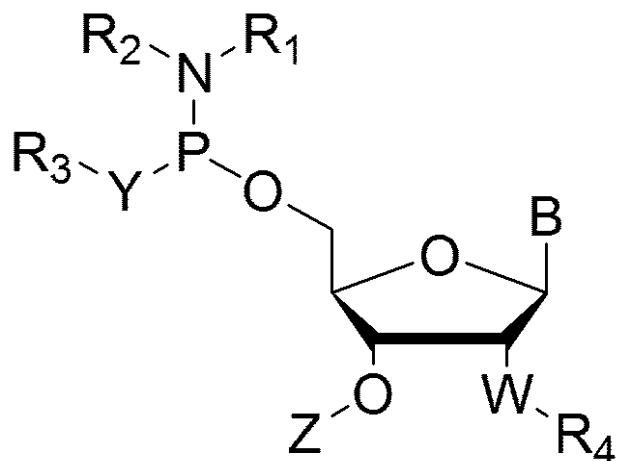
40

Zは、ジメトキシトリフェニル(DMT)、モノメトキシトリフェニル(MMT)およびトリメトキシトリフェニル(TMT)からなる群から選択されるものであり、

【0016】

50

(b) オリゴヌクレオチド合成装置上の化学式 1 で表されるホスホラミダイトを配置し、



10

(化学式 1)

Y は、酸素原子または硫黄原子であり、

W は、酸素ジラジカル、N - H ジラジカルおよびフッ素ラジカルからなる群から選択され、そして、

R₄ は、

W が酸素ジラジカルである場合、R₄ は t e r t - ブチルジメチルシリル (TBDMS) 20) またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン (TOM) であり；そして、

W が N - H ジラジカルである場合、R₄ は、フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 、トリフルオロアセチル、アセチル、アルカノイルおよびアロイルからなる群から選択され、

W がフッ素ラジカルである場合、R₄ は存在しないように、

選択され；

B は、9 - (N⁶ - ベンゾイルアデニル) - 、9 - (N⁶ - アセチルアデニル) - 、9 - (N⁶ - t e r t - ブチルフェノキシアセチルアデニル) - 、9 - (N⁶ - フェノキシアセチルアデニル) - 、9 - (N⁶ - イソプロピルフェノキシアセチルアデニル) - 、1 - (N⁶ - (N, N - ジメチルホルムアミジニル) アデニル) - 、1 - (N⁴ - ベンゾイルシトシニル) - 、1 - (N⁴ - アセチルシトシニル) - 、1 - (N⁴ - (N, N - ジメチルホルムアミジニル) シトシニル) - 、1 - (N⁴ - フェノキシアセチルシトシニル) - 、1 - (N⁴ - t e r t - ブチルフェニルアセチルシトシン) - 、1 - (N⁴ - イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル) - 、9 - (N² - イソブチルグアニン) - 、9 - (N² - t e r t - ブチルフェノキシアセチルグアニン) - 、9 - (N² - イソプロピルフェノキシアセチルグアニン) - 、1 - (N⁴ - フェノキシアセチルシトシニル) - 、1 - (N⁴ - t e r t - ブチルフェノキシアセチルシトシニル) - 、1 - (N⁴ - イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル) - 、および、1 - ウラシリル - からなるヌクレオシド塩基ラジカルからなる群から選択されるか、または、

B は、1 - (N⁴ - ベンゾイル - 5 - メチルシトシニル) - 、1 - (N⁴ - (N, N - ジメチルホルムアミジニル) - 、5 - メチルシトシニル) - 、1 - (N⁴ - アセチル - 5 - メチルシトシニル) - 、1 - (5 - メチル - ウラシリル) - 、1 - (5 - フルオロ - ウラシリル) - 、1 - (N⁴ - ベンゾイル - 5 - フルオロシトシル) - 、9 - (N⁶ - ベンゾイル - 7 - デアザアデニル) - 、9 - (N⁶ - (N, N - ジメチルホルムアミジニル) - 、7 - デアザアデニル) - 、9 - (N² - イソブチル - 7 - デアザグアニル) - 、および、9 N² - (N, N - ジメチルホルムアミジニル) - 7 - デアザグアニル) - からなる群から選択される修飾ヌクレオシド塩基ラジカルであり、

Z は、ジメトキシトリフェニル (DMT) 、モノメトキシトリフェニル (MMT) およびトリメトキシトリフェニル (TMT) からなる群から選択されるものであり、

R₁ は、アルキルまたはアリールラジカルであり、

40

50

R_2 は、アルキルまたはアリールラジカルであり、そして、
 R_3 は、シアノエチル、アルキルまたはアリールラジカルであり、
B は、水素であるか、または、アミン保護基を有する各一級アミンで付加的に官能基化される核酸塩基である。

【0017】

(c) 化学式2で表されるヌクレオシド固相担体から保護基Zを取り除き、

【0018】

(d) 保護基を少なくとも一つ有するオリゴヌクレオチドを生じさせるために、補助試薬の混合物を用いて、オリゴヌクレオチド合成装置において、化学式2のヌクレオシドおよび式1のホスホラミダイトをカップリングすることにより、RNA合成のプロセスを実行し、
10

【0019】

(e) ホスホラミダイトにL基を提供し、

【0020】

(f) L基を有するオリゴヌクレオチドを生じさせるために、オリゴヌクレオチドの末端に、L基を伴うホスホラミダイトを加え、

【0021】

(g) 固相担体からL基を有するオリゴヌクレオチドを分離し、

【0022】

(h) オリゴヌクレオチドから少なくとも一つの保護基を取り除き、
20

【0023】

(i) オリゴヌクレオチドを生じさせるためにシリル保護基を取り除き、

【0024】

(j) オリゴヌクレオチドを沈殿させ、

【0025】

(k) 純度を決定するためにオリゴヌクレオチドを分析する。

【0026】

ここで、ステップ(d)における補助試薬の混合物は、フェノキシ樹脂無水酢酸/テトラヒドロフラン/ピリジン、10%のN-メチルイミダゾール/テトラヒドロフラン、3%のトリクロロ酢酸(トルエン中)、0.05Mのヨウ素/ピリジン/水/テトラヒドロフランおよび0.35Mの5-エチルチオ-1-H-テトラゾール(アセトニトリル中)から成る。
30

【0027】

Lはリンカーまたはスペーサを有するコレステロールであり、nは整数100～約200である、RNAオリゴヌクレオチドを合成するプロセス。

【0028】

Lは、ポリエチレングリコール(PEG)であり、nは整数100～約200である、RNAオリゴヌクレオチドを合成するプロセス。

【0029】

RNAオリゴヌクレオチドを合成するプロセスによりRNAオリゴヌクレオチドが合成される、RNAオリゴヌクレオチド。
40

【0030】

逆RNA合成方法論を用いる100-mer～約200-merの長鎖RNAのRNA合成の方法。

【0031】

RNAオリゴヌクレオチドが、さらに、デオキシ、バックボーン修飾塩基、修飾DNAまたは修飾RNA塩基を含むRNAキメラに合成される、長鎖RNAの精製の方法。

【0032】

末端、分岐点、または、RNAオリゴヌクレオチド鎖内に、一つ以上の5'、2'、2'、3'結合を含む、RNAオリゴヌクレオチドの精製の方法。
50

【0033】

天然および修飾ヌクレオシド、脱塩基部位、逆脱塩基部位、発色団または配位子を含む、RNAオリゴヌクレオチドの精製の方法。

【0034】

RNAオリゴヌクレオチドが、さらに、発色団、配位子、一リン酸エステル基、二リン酸エステル基または三リン酸エ斯特ル基を含む、RNAオリゴヌクレオチドの精製の方法。
。

【0035】

一つ以上のデオキシ、修飾デオキシ、または修飾リボヌクレオシドとの分岐点を含む、RNAオリゴヌクレオチドの精製の方法。

10

【0036】

HPLCゲル電気泳動またはRNA精製技術を用いるRNAオリゴヌクレオチドの精製ステップをさらに含む、RNAオリゴヌクレオチドの精製の方法。

【0037】

RNAオリゴヌクレオチドの表面への標識および付着の方法。

【0038】

分子生物学研究開発において、上記の方法により精製されたRNAオリゴヌクレオチドを利用する方法。

【図面の簡単な説明】**【0039】**

20

【図1】31-mer RNA合成を目的とする図である。

【図2】43-mer RNA合成を目的とする図である。

【図3】74-mer RNA合成を目的とする図である。

【図4】76-mer RNA合成を目的とする図である。

【図5】100-mer合成のトリチルの棒グラフである。

【図6】150-mer合成のトリチルの棒グラフである。

【図7】200-mer合成のトリチルの棒グラフである。

【図8】200-mer合成のUV分析である。

【図9】それぞれ、ポリリボアデノシン100-mer合成のIE HPLC、ポリリボアデノシン150-mer合成のIE HPLC、およびポリリボアデノシン200-mer合成のIE HPLCである。

30

【図10】ポリリボアデノシン100-merおよび200-merのオリゴヌクレオチドのゲルである。

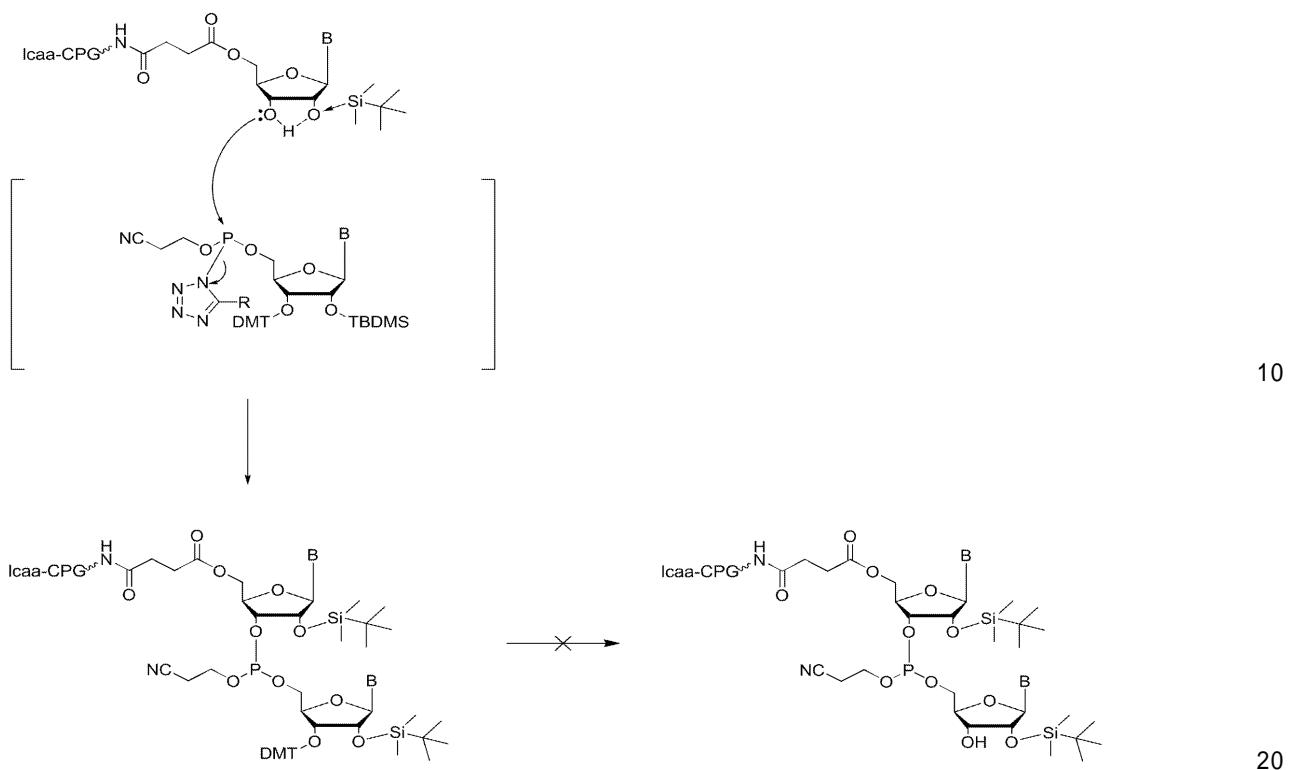
【発明を実施するための形態】**【0040】**

本発明は概して「長いRNA」に関連し、それは、おおよそ少なくとも100-merであり、そして約200-merもしくはさらに長くできるRNAオリゴヌクレオチドとして、一般に理解されている。用語「長いRNA」および「より長いRNA」は、本発明の全体にわたってほとんど同じ意味で使用される。

【0041】

40

約100-mer～約200-merの範囲の長いRNAの合成を達成するためには、高効率のカップリングと、低減されたカップリングタイムとの両方が重要となる。



【0042】

約100-mer～約200-merの範囲の長いRNAの合成を達成するためには、その過程で補助剤の新規な組合せを使用することが重要である。実験の詳細は後述する。

【0043】

表1：ポリリボアデノシンオリゴヌクレオチド100-mer、150-merおよび200-merの合成

Seq. #1 (配列番号1)	5rA rAr Ar Ar ArArArA
Seq. #2 (配列番号2)	5rA rAr Ar Ar Ar Ar ArArArA
Seq. #3 (配列番号3)	5rA rAr Ar Ar Ar Ar Ar ArArArA

ここで、「5」は、5'-末端リン酸塩を表す

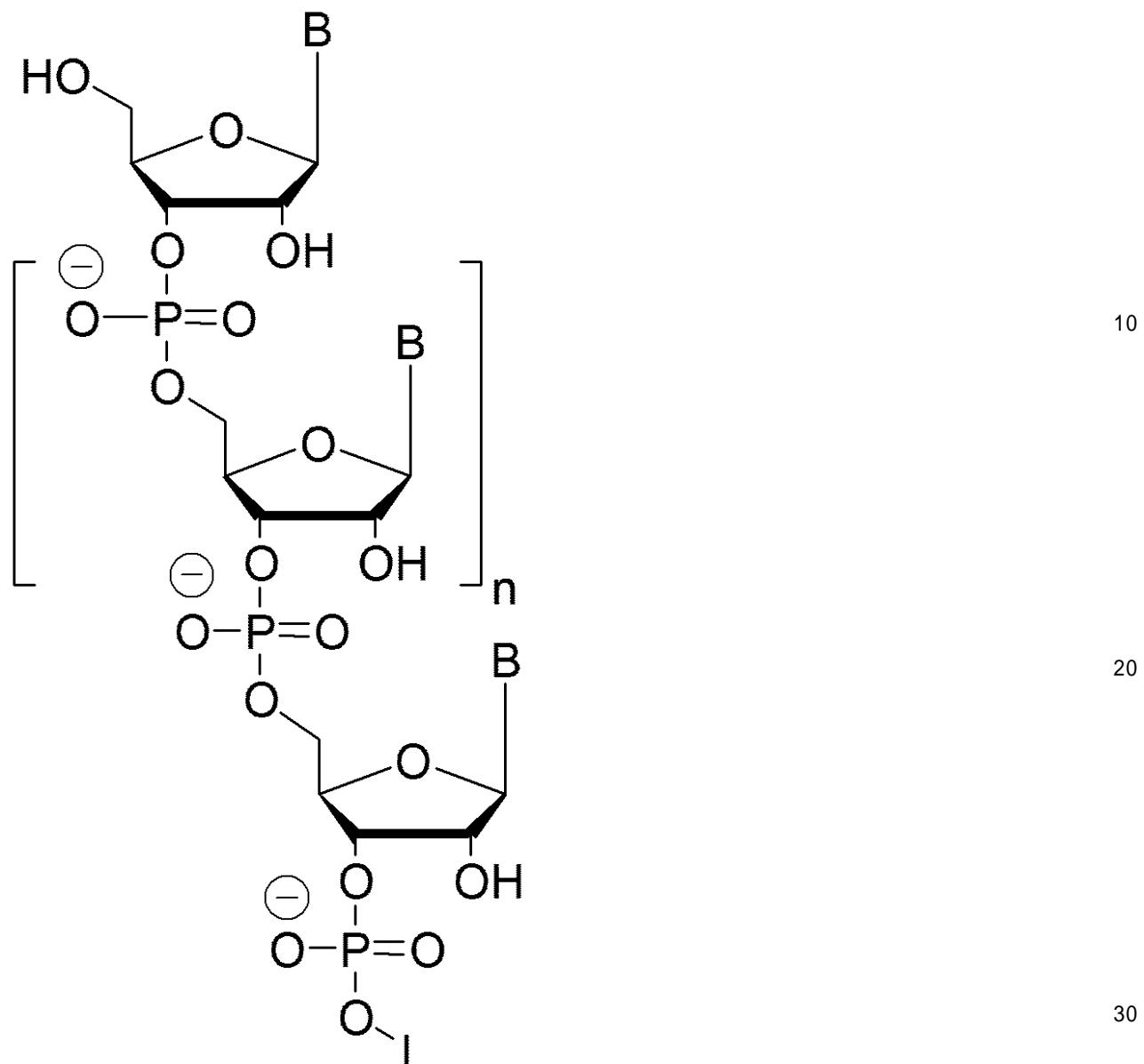
【0044】

本発明によれば、5'から3'方向のRNAオリゴヌクレオチドを合成するプロセスは、以下の化学式のRNAオリゴヌクレオチドを目的とする。

10

20

30



ここで、

B は、アデニン、シトシン、グアノシン、ウラシル、イノシン、5 - メチル - シトシン、5 - メチル - ウラシル、5 - フルオロ - ウラシル、7 - デアザ - アデニン、7 - デアザ - アデノシンおよび5 - フルオロ - サイトシンからなる群から選択される 1 種であり；

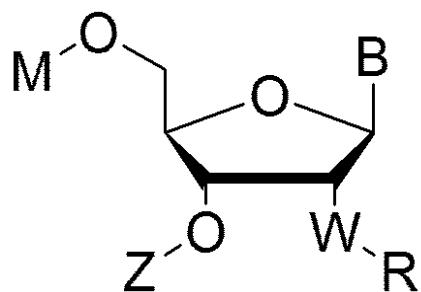
n は、整数 100 ~ 約 200 であり；

L は、ヌクレオシド、リンカーまたはスペーサを有するコレステロールからなる群から選択される非ヌクレオシド配位子、ビオチン、エチレングリコール、グリセロール、ポリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール、アミノリンカー、二硫化物リンカー、ペプチドリンカー、ポリペプチドリンカー、タンパク質、発蛍光団、クエンチャーカラー、一つ以上の 2'、5' - 結合デオキシヌクレオシド単位、一つ以上の 2'、5' - 結合リボヌクレオシド単位、および一つ以上の 2'、5' - 結合デオキシリボース単位であり、ここで、L は、介在するリン酸塩を介して RNA ヌクレオチドの 3' 末端に付着される。

【0045】

RNA のプロセスは、RNA ヌクレオチドの 5' 末端から 3' 末端への方向において合成される。そして、プロセスは次の工程を含む：

(a) ヌクレオシドに化学式 2 で表される固相担体を使用し、



(化学式2)

ここで、

10

Mは、水素ラジカルまたはリンカーであり；

Mがリンカーである場合、化学式Y - C(O)で表され、付加的にオリゴヌクレオチド合成に適する固相担体につなげられ、

ここで、Yは、2個の炭素と20個の炭素間の長さを有する炭化水素ジラジカル部分であり、そして、Yは、アルキル、アルケニル、シクロアルキル、アリールおよびアルアルキルからなる群から選択され、そして、炭化水素ジラジカル部分は、付加的に、介在する-O-、-S-、-S(O)₂-、-C(O)-および-NR₆-から成り、R₆は、水素ラジカルであるか、または、置換C₁~C₂₀アルキルまたは置換アルアルキルであり；

Wは、酸素ジラジカル、N-Hジラジカルおよびフッ素ラジカルからなる群から選択され、そして、

Rは、

20

Wが酸素ジラジカルである場合、Rはtert-ブチルジメチルシリル(TBDMs)またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン(TOM)であり；そして、

WがN-Hジラジカルである場合、RはR₅^xで表され、xは、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、トリフルオロアセチル、アセチル、アルカノイルおよびアロイルからなる群から選択され；そして、

Wがフッ素ラジカルである場合、Rが存在しないように、

選択され；

30

Bは、9-(N⁶-ベンゾイルアデニニル)-、9-(N⁶-アセチルアデニニル)-、9-(N⁶-tert-ブチルフェノキシアセチルアデニニル)-、9-(N⁶-フェノキシアセチルアデニニル)-、9-(N⁶-イソプロピルフェノキシアセチルアデニニル)-、1-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)アデニニル)、1-(N⁴-ベンゾイルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)シトシニル)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェニルアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、9-(N²-イソブチルグアニン)-、9-(N²-tert-ブチルフェノキシアセチルグアニン)-、9-(N²-イソプロピルフェノキシアセチルグアニン)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、および、1-ウラシリル-からなるヌクレオシド塩基ラジカルからなる群から選択されるか；または、

40

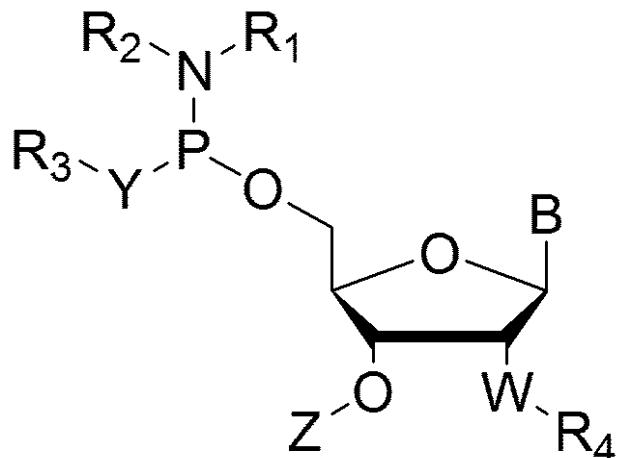
Bは、1-(N⁴-ベンゾイル-5メチルシトシニル)-1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-5-メチルシトシニル)-1-(N⁴-アセチル-5-メチルシトシニル)-1-(5-メチル-ウラシリル)-1-(5-フルオロ-ウラシリル)-1-(N⁴-ベンゾイル-5-フルオロシトシル)-9-(N⁶-ベンゾイル-7-デアザアデニル)-9-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザアデニル)-9-(N²-イソブチル-7-デアザグアニル)-そして、9N²-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザグアニル)-からなる群から選択される修飾ヌクレオシド塩基ラジカルであり；

50

Zは、ジメトキシトリフェニル(DMT)、モノメトキシトリフェニル(MMT)およびトリメトキシトリフェニル(TMT)からなる保護基である；

【0046】

(b) オリゴヌクレオチド合成装置上に、化学式1で表されるホスホラミダイトを配置し、



10

(化学式1)

ここで、

20

Yは、酸素原子または硫黄原子であり；

Wは、酸素ジラジカル、N-Hジラジカルおよびフッ素ラジカルからなる群から選択され；そして、

R₄は、

Wが酸素ジラジカルである場合、R₄はtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン(TOM)であり；そして

WがN-Hジラジカルである場合、R₄はR₅^xで表され、xは、フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)、トリフルオロアセチル、アセチル、アルカノイルおよびアロイルからなる群から選択され；そして、

Wがフッ素ラジカルである場合、R₄は存在しないように、

30

選択され；

Bは、9-(N⁶-ベンゾイルアデニニル)-、9-(N⁶-アセチルアデニニル)-、9-(N⁶-tert-ブチルフェノキシアセチルアデニニル)-、9-(N⁶-フェノキシアセチルアデニニル)-、9-(N⁶-イソプロピルフェノキシアセチルアデニニル)-、1-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)アデニニル)1-(N⁴-ベンゾイルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)シトシニル)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェニルアセチルシトシン)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、9-(N²-イソブチルグアニン)-、9-(N²-tert-ブチルフェノキシアセチルグアニン)-、9-(N²-イソプロピルフェノキシアセチルグアニン)-、1-(N⁴-フェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-tert-ブチルフェノキシアセチルシトシニル)-、1-(N⁴-イソプロピルフェノキシアセチルシトシニル)-、および、1-ウラシリル-からなるヌクレオシド塩基ラジカルからなる群から選択されるか；または、

40

Bは、1-(N⁴-ベンゾイル-5メチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-5-メチルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチル-5-メチルシトシニル)-、1-(5-メチル-ウラシリル)-、1-(5-フルオロ-ウラシリル)-、1-(N⁴-ベンゾイル-5-フルオロシトシル)-、9-(N⁶-ベンゾイル-7-デアザアデニル)-、9-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザアデニル)-、9-(N²-イソブチル-7-デアザグアニル)-、および、9

50

$N^2 - (N, N\text{-ジメチルホルムアミジニル}) - 7 - \text{デアザグアニル}$ - からなる群から選択される修飾ヌクレオシド塩基ラジカルであり；

Zは、ジメトキシトリフェニル(DMT)、モノメトキシトリフェニル(MMT)およびトリメトキシトリフェニル(TMT)からなる保護基であり；

R₁は、アルキルまたはアリールラジカルであり；

R₂は、アルキルまたはアリールラジカルであり；そして、

R₃は、シアノエチル、アルキルまたはアリールラジカルである。

Bは、水素であるか、または、アミン保護基を有する各一級アミンで付加的に官能基化される核酸塩基である。

【0047】

10

(c) 化学式2で表されるヌクレオシド固相担体から保護基Zを取り除き、

【0048】

(d) 保護基を少なくとも一つ有するオリゴヌクレオチドを生じさせるために、補助試薬の混合物を用いて、オリゴヌクレオチド合成装置において、化学式2のヌクレオシドおよび式1のホスホラミダイトをカップリングすることによりRNA合成のプロセスを実行し、

【0049】

(e) L基を有するホスホラミダイトを提供し、

【0050】

(f) L基を有するオリゴヌクレオチドを生じさせるために、オリゴヌクレオチドの末端に、L基を有するホスホラミダイトを加え、

20

【0051】

(g) 固相担体からL基を有するオリゴヌクレオチドを分離し、

【0052】

(h) オリゴヌクレオチドから少なくとも一つの保護基を取り除き、

【0053】

(i) オリゴヌクレオチドを沈殿させ、そして

【0054】

(j) 純度を決定するためにオリゴヌクレオチドを分析する。

30

【0055】

補助試薬は、CAP-A(フェノキシ樹脂無水酢酸/テトラヒドロフラン/ピリジン)、CAP-B(10%のN-メチルイミダゾール/テトラヒドロフラン)、DMT除去試薬(3%のTCA(トルエン中))、酸化溶液(0.05Mのヨウ素/ピリジン/水/テトラヒドロフラン)および活性化試薬(0.35Mの5-エチルチオ-1-H-テトラゾール(アセトニトリル中))から成る。

【0056】

本発明によれば、長いRNAは、100~200のモノマーを有するRNAオリゴマである。この目的を達成するために、このプロセスには補助試薬が重要である。RNAの逆合成(すなわち、5'→3'方向)において、補助試薬は、通常、TCA/DCM、DCA/DCM、TCA/トルエン、DCA/トルエン、無水アセトニトリル、CAP-A、CAP-B、さまざまな濃度のヨウ素/THF/ピリジン/H₂O、適切な硫化試薬の1つ、アセトニトリル溶液としての適切な活性化試薬の1つの組合せである。

40

【0057】

補助試薬は完成までモノマー5'-アミダイトの高いカップリングを許容するので、本発明で利用される補助試薬が有用である。従って、カップリングタイムがより短い0.3MのBMT(5-ベンジルチオテトラゾール)または0.5MのETT(5-チオエチルテトラゾール)のような補助試薬には特に関連しており、異なるカップリングタイムを使用し、より短いRNAオリゴマのために使用される同じ試薬と比較して、高いカップリン

50

グ効率という固有の結果をもたらす。

【0059】

本発明の一実施例によれば、Lはリンカーまたはスペーサを有するコレステロールであり、そして、nは整数100～約200である。

【0060】

本発明の他の一実施例において、Lはポリエチレンギリコール(PEG)であり、そして、nは整数100～約200である。

【0061】

本発明の他の実施例は、上記のプロセスにより合成される、n=100、150または約200であるRNAオリゴヌクレオチドに関連する。RNAオリゴヌクレオチドは5'から3'への方向で合成されるので、「m+1」種と呼ばれる不純物は存在しない。10

【0062】

両方の方法論により合成される3' - 末端の3' - コlesteroール抱合を有するオリゴヌクレオチドに関する我々のデータから、すなわち、3' - 5' 方向および5' - 3' 方向は、公開された我々の特許ではっきりと示される。

【0063】

本発明の他の実施例は、逆RNA合成方法論を用いた100-mer～200-merの長鎖RNAのRNA合成の方法に関連がある。

【0064】

本発明はまた、デオキシ、バックボーン修飾塩基、修飾DNAおよび修飾RNA塩基から成る、長鎖RNAキメラを含む。長鎖RNAは、逆方法論を用いて、末端、分岐点、または、鎖の内で、一つ以上の5'、2'、2'、3' 結合を有する。20

【0065】

本発明によれば、他の実施例は、逆合成方法論を用いる、天然および修飾ヌクレオシド、脱塩基部位、逆脱塩基部位、発色団および配位子を含む長鎖RNAである。

【0066】

本発明の他の実施例は、逆合成方法論を用いる、発色団、配位子、一リン酸エステル、二リン酸エステルまたは三リン酸エステル基から成る長鎖RNAである。

【0067】

本発明のさらにもう一つの実施例は、逆RNA方法論を用いる、一つ以上のデオキシ - 修飾デオキシ、または修飾リボヌクレオシドとの分岐点を有する長鎖RNAである。30

【0068】

さらにまた、本発明は、HPLCゲル電気泳動または他のRNA精製技術による、逆方法論により合成される長鎖RNAの精製の方法を含む。

【0069】

本発明はまた、逆方法論により合成される長鎖RNAの、表面(例えばさまざまな種類のチップ、ポリエチレンギリコール、合成されるオリゴヌクレオチドの3' - 末端を介する担体)への標識および付着の方法を含む。このように、オリゴヌクレオチドへの官能基(例えばアミン官能)の導入は、アルデヒド官能を含むチップまたは表面への付着を許容する。40

【0070】

本発明は、分子生物学研究開発の逆方法論により合成される長鎖RNAを使用する方法を更に含む。本発明によるプロセスによって合成されるRNAは、3' - 5' - 方向における通常のプロセスにより合成されるRNAとは区別される、生化学的性状を所有することを示す。

【0071】

オリゴヌクレオチド合成

オリゴヌクレオチドSeq. #1(配列番号No.1)(100-mer)、Seq. #2(配列番号No.2)(150-mer)、Seq. #3(配列番号No.3)が、合成される。Seq. #2(200-merまで延長)は、Seq. #3を除いて、1 mi50

c r o m o l e スケ - ルの 5' 3' 方向の R E V - R N A ホスホアミダイト化学を用いて、合成された。 Seq. # 3 は、 0 . 5 m o l e スケ - ルで合成された。合成は、標準 R N A を用いて Expedite 8900 合成装置で実行された。(1 m o l e サイクル、および固相担体を有するモノマーのカップリングタイム、6 . 0 分) オリゴヌクレオチドにおいて合成 5 は、汎用 UnyLinker support 3000A (ChemGenes Cat # N - 4000 - 30) を表す。

【 0072 】

(1) 使用アミダイト

N⁶ - t b p a c - 2' - O - T B D M S - 3' - O - D M T - アデノシン - 5' - シアノエチル - N , N - ジイソプロピル - ホスホラミダイト。 10

Lot # AT239-9 (ChemGenes Cat # ANP - 3407)

【 0073 】

(2) 使用 C P G

汎用 UnyLinker support 3000A、ChemGenes Cat # N - 4000 - 30、Lot # AT157 - 9

【 0074 】

(3) 使用補助試薬

無水アセトニトリル R N - 1447

C A P A (フェノキシ酢酸無水物 / T H F / ピリジン)

C A P B (10 % の N - メチルイミダゾール / T H F) 20

D M T 除去試薬 (3 % の T C A (トルエン中))

酸化溶液 (0 . 0 5 M の ヨウ素 / ピリジン / H₂O / T H F)

活性化試薬、5 - エチルチオ - 1 - H - テトラゾール (E T T) (0 . 3 5 M (アセトニトリル中))

【 0075 】

最初に、60m l の促進 (expedite) ボトルのアミダイトを使用し、溶液 0 . 15 M を生成するために、乾燥アセトニトリルにおいて溶解する。その後、モノマー ボトルをポ - ト # A 上の合成装置に取り付ける。

【 0076 】

合成の後、コントロールドポアガラス (C P G) 固相担体は、3 . 0 m l のジエチルエ - テルで洗浄され、2 m l のミクロチュ - ブへ移動された。オリゴヌクレオチドは、Seq. # 1 の培養により、65 で 45 分、1 . 2 m l の 33 % のメチルアミン (無水エタノ - ル中) で、C P G と開裂および脱保護された。 (Aldrich Cat # 534102 - 250 m l 、 Lot # SHBC2933V) 30

【 0077 】

Seq. # 2 および 3 では、65 で 90 分、1 . 2 m l の 33 % のメチルアミン (無水エタノ - ル中) 。 (Aldrich Cat # 534102 - 250 m l 、 Lot # SHBC2933V) その後、- 20 で 30 分間、管を冷却する。それから、上澄み液は取り除かれ、そして、C P G は 500 u l の水で洗浄され；上澄み液は、speed v a c に溜められ、乾燥された。超音波浴を使用し 45 で 4 時間、t - プチルジメチルシリル保護基は、1000 u l のトリエチルアミンフッ化水素酸塩での処理により、R N A 残基から取り除かれた。 (Oakwood chemical Cat # 003029 、 Lot # F29E) オリゴヌクレオチドは、3 . 0 m l の n - ブタノ - ルにより沈殿した。サンプルは - 20 で 1 時間、冷却され、それから 10 分間、5 , 000 g で遠心分離された。 40

上澄み液は静かに移され、そして、ペレットはもう一度、n - ブタノ - ルで洗浄された。最後に、500 u l アセトニトリルで洗浄され、再び、5000 回転数 / 分で 5 分間、遠心分離し、上澄み液は静かに移された。ペレットは、1000 u l の M . Q 水に溶かされ、そして、OD (Crude desalt) を点検する。

【 0078 】

10

20

40

50

それからオリゴヌクレオチドは、緩衝液 A = (5 . 0 %、 1 . 0 M の T R I S および 10 . 0 % のメタノ - ル) pH 7 . 5 の過塩素酸ナトリウムの直線勾配を用いて、イオン交換 H P L C により精製された。緩衝液 B = 0 . 5 M の過塩素酸ナトリウム（緩衝液 A 中）。

【 0 0 7 9 】

全てのサンプルは、 Source 15 Q カラム (1 . 0 cm × 25 cm) 上に装填され、 40 分にわたる直線 0 % ~ 85 % の過塩素酸ナトリウム勾配により溶離された。サンプルは 295 nm でモニタされ、そして、所望のオリゴヌクレオチド種に対応するピークが集められ、 5 . 0 volume の 2 % の L i C l O 4 (アセトン中) を加えることによって沈殿させる。そして、 5 , 000 g で 10 分間遠心処理が続いた。上澄み液は、静かに 10 移され；ペレットは、エタノ - ルで洗浄された。

【 0 0 8 0 】

100 - mer RNA 合成のトリチルの棒グラフが図 5 に示される。トリチルの棒グラフでは、オリゴのステップ当たりのカップリング効率が一定の方法で続行し、そして、鎖長が成長しても、カップリングの脱落がないことを意味すると分かる。

【 0 0 8 1 】

150 - mer RNA 合成のトリチルの棒グラフが図 6 に示される。棒グラフから、 150 - mer 合成が重要な脱落もなく、一定してスム - ズに進行していると観察される。

【 0 0 8 2 】

200 - mer RNA 合成のトリチルの棒グラフが図 7 に示される。この種の長いオリゴヌクレオチドであっても、ステップ当たりのカップリング効率が一定の方式で続行し、そして、鎖長が成長してもカップリングの重要な脱落がないと観察される。

【 0 0 8 3 】

100 - mer 合成、 150 - mer 合成および 200 - mer 合成の I E H P L C (図 9) 予想通りに、 1 . 0 mol e スケ - ルで合成される粗製の 100 - mer は、予想される溶出時間で幅広いピークを示す。予想通りに、 150 - mer の粗製のオリゴヌクレオチドの I E H P L C は、予想される溶出時間でより幅広いピークをさらに示す。

200 - mer の I E H P L C は、さらにより幅広いピークで、予想される溶出時間で溶離する。

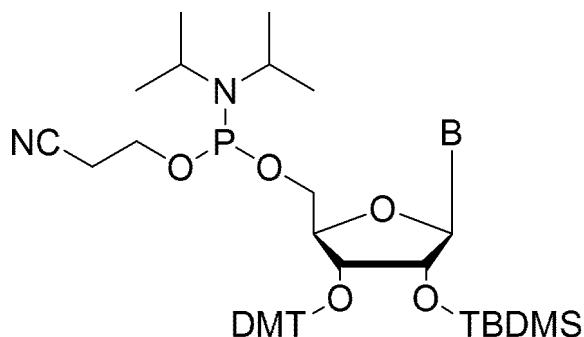
【 0 0 8 4 】

100 - mer および 200 - mer RNA 合成のゲル (図 10) は、 80 - mer マークよりわずかにゆっくり移動する 100 - mer の帯域を示す。 200 - mer は 100 - mer よりゆっくり、そして、 150 - mer より更にゆっくり移動するのが分かる。

【 0 0 8 5 】

本発明の逆 RNA モノマー - ホスホラミダイトは、 3' - D M T 基をリボヌクレオシドに含み、 2' - t B D シリル (t B D S i) - 5' - シアノエチルホスホロアミダイト (C E D) (構造 16) 、 3' - D M T 2' - t B D シリル - 5' - スクシニル - I c a a C P G - n - 保護ヌクレオシド (構造 17) 、または 3' - D M T - 2' - トライソプロピルシリルオキシメチレン (T O M) - 5' - C E D ホスホラミダイト基 (構造 18) を保有する。

【 0 0 8 6 】



10

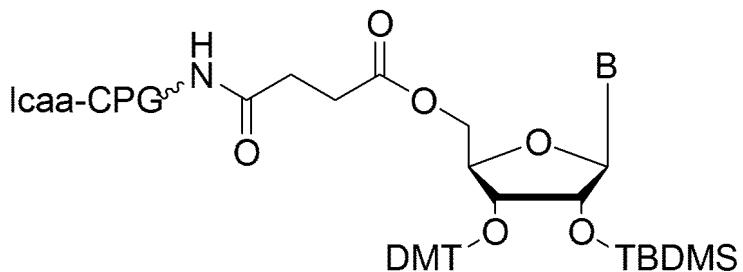
B = A (*N*-Bz), C (*N*-Bz), C (*N*-Ac), G (*N*-iBu),
 A (*N*-tBPac), C (*N*-tBPac), C (*N*-tBPac), G (*N*-tBPac),
 A (*N*-Pac), C (*N*-Pac), C (*N*-Pac), G (*N*-Pac), U.

構造 (1 6)

3' - D M T - 2' - t B D シリル - 5' - アミダイト

(逆 R N A - t B D シリル - アミダイト)

【 0 0 8 7 】



20

B = A (*N*-Bz), C (*N*-Bz), C (*N*-Ac), G (*N*-iBu),
 A (*N*-tBPac), C (*N*-tBPac), C (*N*-tBPac), G (*N*-tBPac),
 A (*N*-Pac), C (*N*-Pac), C (*N*-Pac), G (*N*-Pac), U.

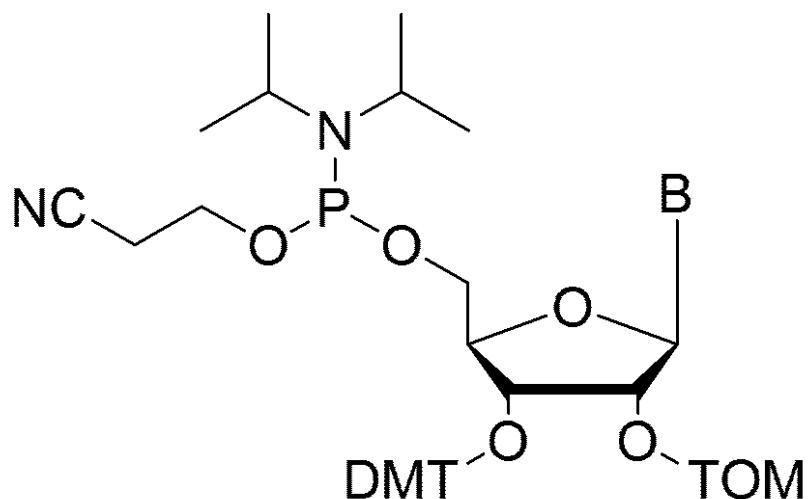
30

構造 (1 7)

3' - D M T - 2' - t B D シリル - 5' - C P G

(逆 R N A - t B D s i l y l - 5' - I c a a C P G)

【 0 0 8 8 】



10

$$B = A (N\text{-Ac}), C (N\text{-Ac}), G (N\text{-Ac}), U.$$

構造 (18)

20

3' - D M T - 2' - T O M (トリイソプロピルシリルオキシメチレン) - 5' - アミダイト

(逆 R N A - T O M - 5' - アミダイト)

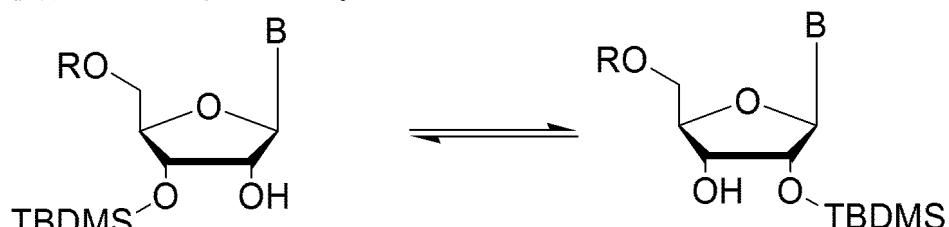
【0089】

本発明はまた、開示された組成物を調製する方法を教示する。最初の塩基 (starting base) は、イソプロピリデン保護ヌクレオシド 20 を産出するヌクレオシド 19 を保護した。イソプロピリデン基除去が続くベンゾイル化は、5' - ベンゾイル化ヌクレオシド 22 を産する。ピリジンの T B D M S 塩化物との連続的なシリル化反応は、それぞれ 3 : 2 の比率の 2' - および 3' - T B D M S 保護ヌクレオシド (23 および 24) の混合物を提供する。カラムクロマトグラフィ後に、異性体は分離され、% 収率で単離された。異性体 23 の更なる反応により、3' - D M T - 2' - T B D M S 保護ヌクレオシド 26 が産出された。

30

【0090】

すなわち、3' - ヒドロキシル基の次の官能基化の間に、2' - T B D M S 基の重要な移動があると考えられる。



40

スキ - ム (1)

【0091】

D M T - (4, 4 - ジメトキシトリチル) を有する 3' - ヒドロキシル基の官能基化の間、重要な移動の発生は認められなかった。さらに、3' - T B D M S 保護異性体 24 も、ピリジン中の塩化 D M T を有する異性体 23 と同じトリチル化反応に関与していた。しかしながら、ヌクレオシド 25 はその反応で観察されなかった。したがって、2' - T B D M S 保護ヌクレオシド 23 とその異性体 24 のコンタミネーションの場合には、不必要的異性体 25 はトリチル化条件において形成されず、所望のヌクレオシド 26 が高純度で単離できる。3' - T B D M S 保護ヌクレオシド 24 は、所望のプロダクトの合成において

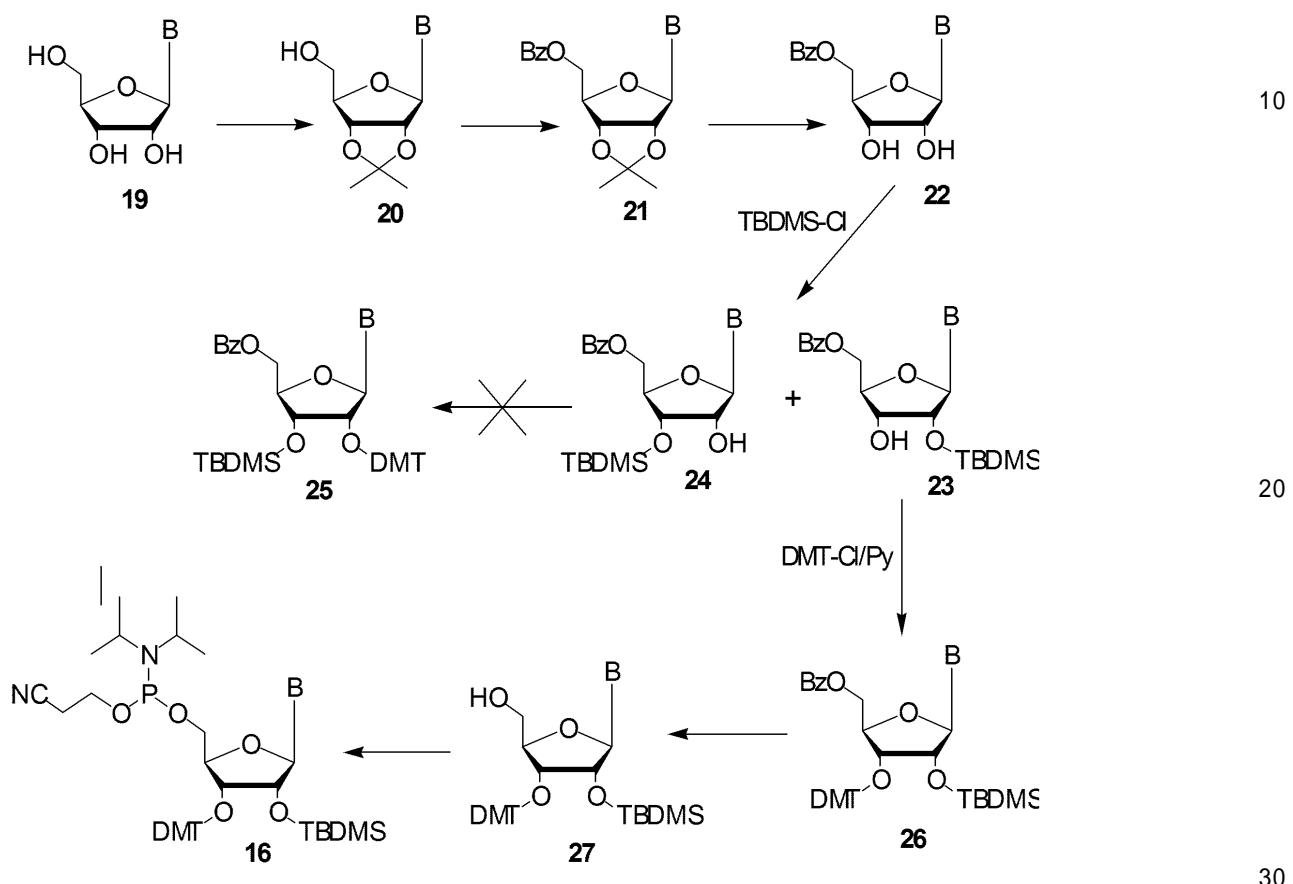
50

て利用することができ、スキ - ム 1 で概説される異性化法のために 23 に変換することができる。

【 0092 】

C E D P および D I P A テトラゾール酸塩を用いて、ホスフィチル化反応が続く、メタノ - ル中の水酸化ナトリウムによる 5' - ベンゾイル基の除去により、最終的な逆ホスホラミダイト 16 を産出される。

【 0093 】



B = a) A (N-Bz), b) C (N-Bz), c) C (N-Ac), d) G (N-iBu)

e) A (N-tBPac), f) C (N-tBPac), g) G (N-tBPac),

h) A (N-Pac), i) C (N-Pac), j) G (N-Pac), k) U.

スキ - ム (2)

【 0094 】

逆ホスホラミダイトを用いるオリゴヌクレオチド合成は、5' → 3' 方向で実行された。
。

【 0095 】

以下に設けられる実施例は、本発明をさらに説明する。これらは単に例示的なものであって、本発明の範囲を限定するように解釈すべきではない。

【 0096 】

特に、以下の実施例は、本発明の化合物を得るための合成法を示す。本発明の化合物を調製するのに役立つ出発原料およびその中間体は、市販であるか、または周知の合成法および試薬を使用して、市販の材料から調製することができます。すべてのオリゴヌクレオチド配列が左側の 5' - 末端から右側の 3' - 末端へ記載される。3' - D M T - 5' - C E D ホスホラミダイトのカップリング効率はステップ毎に 99 % を超えるカップリングを示し、高純度 R N A を導く。多量のホモポリマ - および 20 ~ 21 - m e r s オリゴヌ

クレオチドは、これらのモノマーhosホラミダイトを用いて合成された。

【0097】

我々のデータは、3' - 5' 方向の合成の標準的な 3' - C E D ホスホラミダイトと比較して、逆 RNA モノマー (5' - 3' - 方向) を用いるオリゴ合成の間、カップリング効率に差異がないことを示す。

【0098】

もう一つの実施例では、本発明は、オリゴヌクレオチドの 3' - 末端での修飾または標識とともにリボ核酸オリゴマの合成のための方法を提供する。親油性、長い鎖状配位子または発色団の蛍光体および消光剤を必要とする 3' - 末端修飾 RNA の合成は、対応するホスホラミダイトを用いて行うことができる。我々のデータは、通常の方法と比較して、
10 5' - 3' - 方向合成には、非常に明確な利点を有することを示す。

【0099】

加えて、固相担体 (例えば HEG または PEG - 2000) で利用できない 3' - 修飾は、5' - 3' 方向の合成を用いて簡単に導入することができ、逆相 HPLC により精製できる。オリゴヌクレオチドは RP HPLC により精製され、95 ~ 98 % の純粋なプロダクトを産出した。

【実施例】

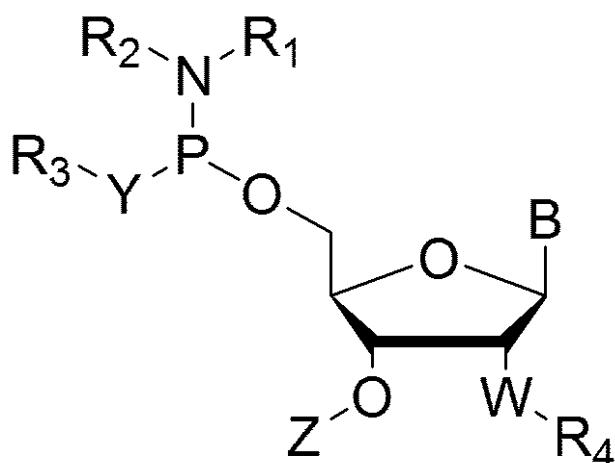
【0100】

下記の注は、さまざまな革新、利点および可能性、およびいくつかのプロダクトおよび本発明のプロセス詳細を要約する。
20

このリストは、便利で例示的な要約として役立つことを意味し、完全ではなく、網羅的でなく、制限するものではない。

【0101】

化学式 1 の誘導体化されたヌクレオシドおよびホスホラミダイト



10

20

30

ここで、

Y は、酸素または硫黄であり；

W は、酸素、窒素、硫黄またはフッ素であり；

W が硫黄でないときに、R₄ は T B D M S 、トリイソプロピルシリルオキシメチレン、F m o c 、アルキル、アリールまたはアセチルのようなシリルエ - テルであり；

W が硫黄であるときは、R₄ はベンゾイル、アセチルまたは二硫化物であり；

Z は、DMT、MMT、TMT 保護基であり；

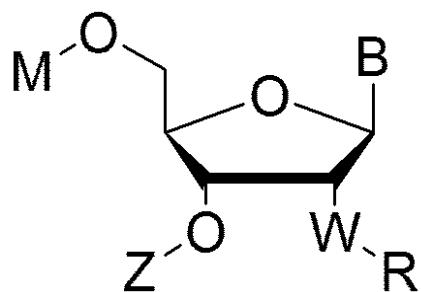
R₁ および R₂ は、アルキルまたはアリール基からそれぞれに選択され；

R₃ は、シアノエチル、アルキルまたはアリールである。

【0102】

化学式 2 の固相担体に付着した誘導体化されたヌクレオシド。

40



ここで、

Mは、水素ラジカルまたはY-CO-であり；

10

Yは、長さ2～20の原子の鎖であり、酸素、窒素および硫黄からなる群から独立して選択される一つ以上のヘテロ原子によって、付加的に置換される炭化水素鎖を主成分としており、または、固相担体への結合に適するいずれかのリンカー（例えば、CPG、ポリスチレン、またはオリゴヌクレオチド合成に適する他のいずれかの固相担体）であり；

Wは、酸素、窒素、硫黄またはフッ素であり；

Wが硫黄でない場合は、Rは、シリルエ-テル（例えばTBDMS、トリイソプロピルシリルオキシメチレン、Fmoc、アルキル、アリール、アミノまたはアセチル）であるか、Wが硫黄である場合には、Rはベンゾイル、アセチルまたは二硫化物であり；

Zは、DMT、MMT、TMT保護基である。

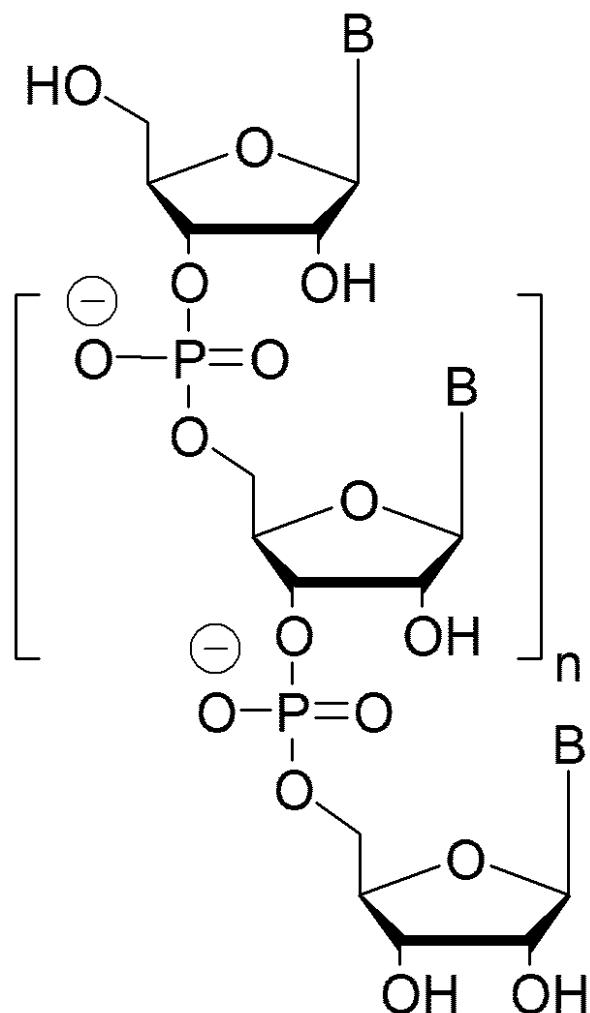
【0103】

20

合成RNAオリゴマの化学式10に示されるオリゴヌクレオチド結合構造の5'から3'方向を介した、逆方向の方法。

RNAは、天然または修飾された核酸塩基、gapmer、ホスホジエステル、ホスホロチオエ-ト、ホスホセレン酸塩から成る。合成は自動、半自動のDNA/RNA、または他の合成装置、または手動で行うことができる。合成は、ミクログラムからキログラムスケ-ルといった、さまざまなスケ-ルで行うことができる。

【0104】



化学式 (1 0)

【 0 1 0 5 】

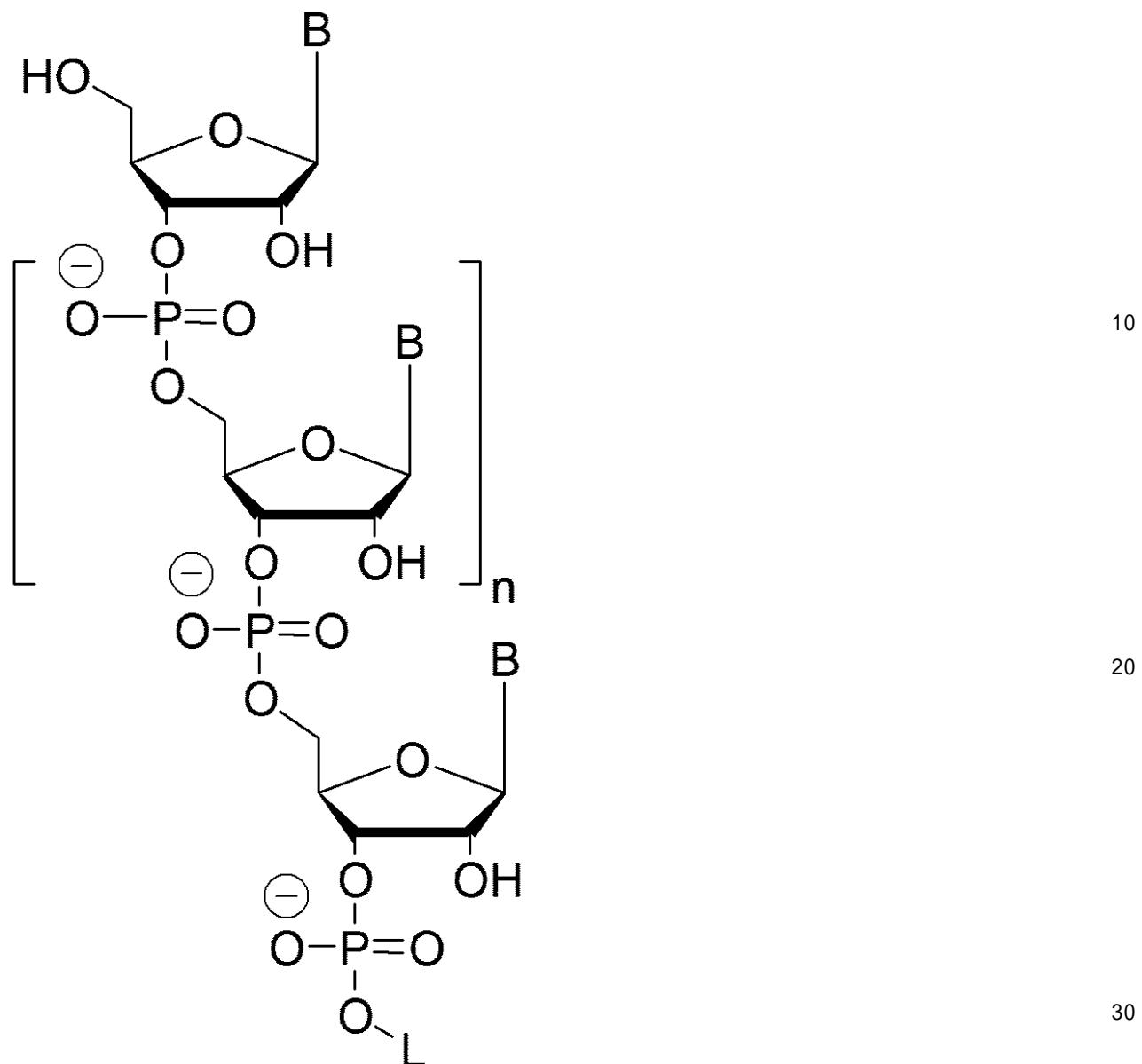
対応するホスホラミダイト（化学式 1 1 ）を用いた R N A 分子の 3' - 末端への修飾の付着の方法であり、Lは、ビオチンまたはコレステロールのような修飾であるか、または蛍光体、クエンチャーカラー、ポリエチレングリコールおよびペプチドからなる群から選択される。

【 0 1 0 6 】

10

20

30



化学式 (11)

【0107】

高純度RNAを生じさせる逆方向(5' → 3') RNA合成を用いた、自動の高純度RNAの合成。

【0108】

コレステロール、ヘキサエチルオキシグリコール(HEG)およびポリエチレングリコール(PEG)といった、巨大分子を有するRNAの3'-共役。

【0109】

自動化された逆方向(5' → 3')のRNA合成の応用は、M+1オリゴヌクレオチド不純物をなくす。

【0110】

前述のこの方法により取り込まれる修飾ヌクレオシドは、5'-フルオロ-U、5'-フルオロ-dU、5'-フルオロ-dC、5'-フルオロ-rC、ブソイドウリジン、5'-メチル-dU、5'-メチル-rU、5'-メチル-dC、5'-メチル-rC、5'-ブロモ-dU、5'-ブロモ-rU、5'-ブロモ-dC、5'-ブロモ-rC、5'-ヨード-dU、5'-ヨード-rU、5'-ビニル-dU、5'-ビニル-rU、5'-ビニルチミジン、N-3メチルデオキシウリジン、N-3メチル-リボウリジン、N-3メチルチミジン、4チオウリジン、4-チオ-2'-デオキシウリジン、2,6-ジアミノ

40

50

プリンデオキシリボシド、N - 3 メチルリボチミジン、2、6 - ジアミノプリンリボシド、8 - プロモ 2' - デオキシアデノシン、8 - プロモ - r - アデノシン、8 - オキソ - デオキシアデノシン、8 - オキソ - リボアデノシン、8 - オキソ - 2' - デオキシ - アデノシン、8 - オキソ - リボアデノシン、8 - オキソ - デオキシイノシン、8 - オキソ - リボ - イノシン、8 - プロモ - デオキシイノシン、8 - プロモ - リボ - イノシン、N - 1 メチルリボアデノシン、N - 1 メチル 2' - デオキシアデノシン、N - 1 メチル 2' - デオキシイノシン、N - 1 メチルリボアデノシン、N - 1 メチルデオキシグアノシン、N - 1 - メチル - リボグアノシン、エテノアデノシン、エテノ 2' - デオキシアデノシン、プリン 2' - デオキシリボシド、プリン - ヌクレオシド、2 - アミノプリン - 2' - デオキシリボシド、2 - アミノプリン - リボヌクレオシドに限定されるものではないが、一つ以上のプリンまたはピリミジン修飾から成ることができる。10

【0111】

この方法により合成されるRNAの内部位置の標識は、例えば、フルオレセイン - C - 5 dT、ダブシリル(D a b c y l) - C - 5チミジン、内部カルボキシル基 5 - dU - メチルアクリレ - ト、ビオチンdT(dUのC - 5へスペーサを介して付着のビオチン)、アミノ - dT(C - 5 dUにC - 6スペーサを介して付着の末端アミノ)に限定されるものではないが、発色団によって達成可能である。

【0112】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、本発明の方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で、2' - デオキシ - 2' - フルオロリボヌクレオシド(2' - FANA)(例えばA、C、G、U)、イノシン、および2' - フルオロを含む修飾ヌクレオシドから、成ることができる。20

【0113】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、この方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で、2' - デオキシ - 2' - メトキシリボヌクレオシド(2' - OMe -)(例えばA、C、G、U)、イノシン、および2' - メトキシを含む修飾ヌクレオシドから成ることができる。

【0114】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、この方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で2' - デオキシ - 2' - アミノリボヌクレオシド(2' - NH₂)(例えばA、C、G、U)、イノシン、および2' - アミノを含む修飾ヌクレオシドから成ることができる。30

【0115】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、この方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で、2' - デオキシ - 2' - 末端アミノリボヌクレオシド(2' - 末端NH₂)から成ることができ、ヌクレオシド(例えばA、C、G、U)、イノシン、および2' - 末端アミノを含む修飾ヌクレオシド上の2 - 10の原子から、スペーサを介して付着される。

【0116】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、この方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で、2' - デオキシ - 2' - メトキシエトキシリボヌクレオシド(2' - MOE)(例えばA、C、G、U)、イノシン、および2' - MOEを含む修飾ヌクレオシドから成ることができる。40

【0117】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、この方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で、他の2' - O - アルキル基(例えば、2' - デオキシ - 2' - エトキシ、プロパルギル、ブチンリボヌクレオシド(2' - OEt、O - プロパルギル、2' - O - ブチン)(例えばA、C、G、U))、イノシン、および2' - 2' - OEt、O - プロパルギル、2' - O - ブチンを含む修飾ヌクレオシドから成ることができる。

【0118】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、この方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で、2'-デオキシ-2'-フルオロアラビノヌクレオシド(2'-FANA)(例えばA、C、G、U)、イノシン、および2'-FANAを含む修飾ヌクレオシド)から成ることができる。

【0119】

修飾ヌクレオシドの糖修飾は、この方法により合成されるRNAまたはDNA塩基配列の一つ以上の位置で、2'-デオキシ-2'-フルオロ-4'-チオアラビノヌクレオシド(4'-S-FANA)(例えばA、C、G、U)、イノシンおよび4'-S-FANAを含む修飾ヌクレオシドから成ることができる。

【0120】

RNAは、配列の3'-末端、または、配列の5'-末端で、配列内の一つ以上の2'-5'-結合で行われる。

【0121】

3'-末端を有するRNAは、この逆付着のデオキシヌクレオシド(例えばdT、dC、dG、dG、チミジン)を含む本発明の方法により合成されることができ、それらの3'-ヒドロキシル官能基を介して付着される。

【0122】

3'-末端を有するRNAは、この逆付着のリボヌクレオシド(例えばrA、rC、rG、rU)を含む発明の方法により合成されることができ、それらの2'または3'-ヒドロキシル官能基を介して取り付けられる。

【0123】

逆RNA合成は、2'-トリイソプロピルシリルオキシメチル(TOM)保護基を含み、達成されてもよい。

【0124】

逆RNA合成は、2'-t-ブチルジチオメチル(DTM)保護基を含み、達成されてもよい。

【0125】

逆RNA合成は、2'-デオキシ-2'-フルオロ-ベ-タ-D-アラビノ核酸(FANA)から成る修飾塩基を含み、達成されてもよい。

【0126】

逆RNA合成は、4'-チオ-2'-デオキシ-2'-フルオロ-ベ-タ-D-アラビノ核酸(4'-チオ-FANA)から成る修飾塩基を含み、達成されてもよい。

【0127】

逆RNA合成は、2'-O-メチル修飾を用いた修飾された糖を含み、達成されてもよい。

【0128】

逆RNA合成は、二環式のロックされた核酸(locked nucleic acid: LNA)を用いて達成されてもよい。

【0129】

逆RNA合成は、アルトリト-ル糖修飾オリゴヌクレオチド(ANA)から成る修飾された糖を使用してもよい。

【0130】

逆RNA合成は、疎水性部分上のアミダイト官能基を介してか、または、末端アミノ基を有する逆合成されたオリゴヌクレオチドの3'-末端のアミノリンカーを介して、RNAの3'-末端で、親油性または疎水性基の共役のステップを含むことができる。後の合成は、オリゴヌクレオチドの3'-末端のアミノと、親油性部分上のカルボン酸官能基との間のカップリングステップを必要とする。親油性部分は、さまざまなグリコール(例えばトリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール、ポリエチレングリコール、さまざまな脂質)から成る。

【0131】

10

20

30

40

50

逆RNA合成は、この種のペプチドの遊離アミン官能基、または逆合成RNA上の3'-末端カルボン酸官能基を用いて、ペプチド（例えば細胞透過性ペプチド（CPP）または膜貫通ペプチド（MPP））の共役のステップを含むことができる。適切なカルボキシリ官能基を有するCPPおよびMPPは、逆合成RNAの3'-末端の遊離末端アミノ官能基にカップリングができる。

【0132】

逆RNA合成は、配列の3'-末端、または、配列の5'-末端で、配列内の2'-5'-結合DNA単位または2'-5'-RNA単位を含む。

【0133】

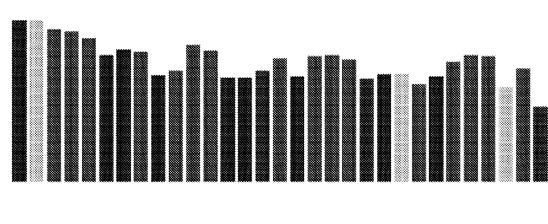
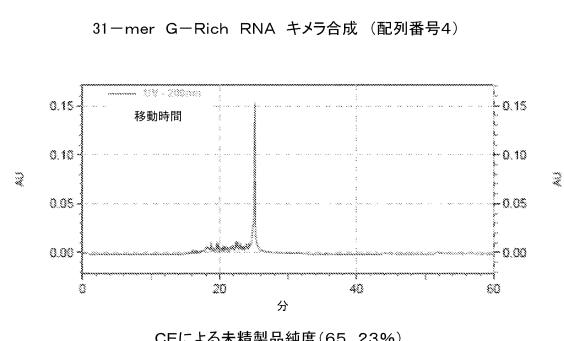
当業者は、ル-チンの実験法以上のものを用いなくても、本明細書に記載される本発明の特定の態様には多くの同等物があることを認識するであろうし、または確認することが可能であろう。この種の同等物は、以下の請求項に含まれる。従属クレ-ムにおいて開示される実施例のいかなる組合せも、本発明の範囲内であると考察される。10

【0134】

本発明は、いくつかの利点を提供する。第1に、逆方向のRNA合成（すなわち、5'から3'方向）は、3'から5'方向のRNA合成に存在するM+1不純物を含まないRNAオリゴヌクレオチドを生じさせる。合成がモノマーの意図した数（M）で止まらないときに、M+1種が現れるが、予想外の数（M+1）モノマーへと進む。第2に、粗製のRNA純度は89%~93%の間で変動し、1ステップにつき約99.5%のカップリング効率ということを意味する。第3に、粗製のRNAの単一の精製は、95%~98%の純粋なオリゴヌクレオチドを生じさせる。第4には、本発明は、生物医学研究の多くの面で有用である長いRNAの合成を可能にする。20

【図1】

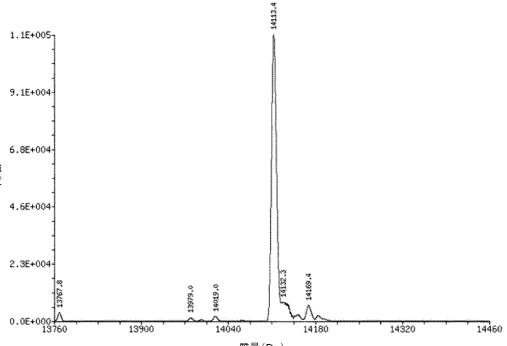
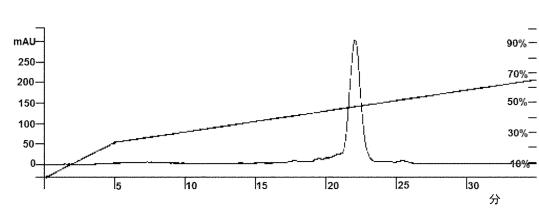
Fig. 1



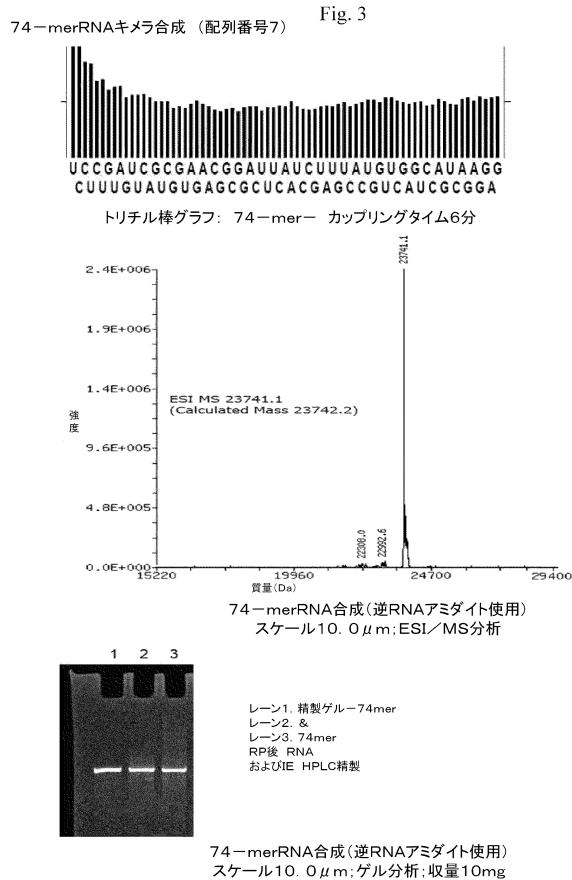
【図2】

Fig. 2

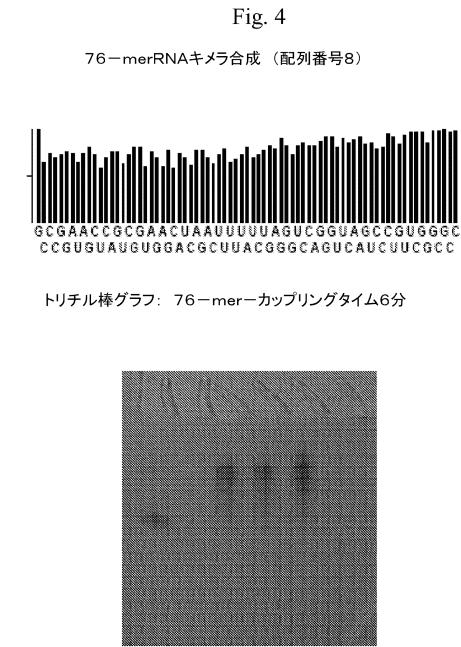
43-merRNAキメラ合成（配列番号5）



【図3】



【図4】



ページ:合成されたさまざまなRNA(Crude desalting 76-mer)

レーン1. プロモフェノールブルー; レーン2. 76-mer(通常のRNA);
レーン3. 76-mer(逆RNA); レーン4. 76-mer(逆TOM RNA)

【図5】

Fig. 5

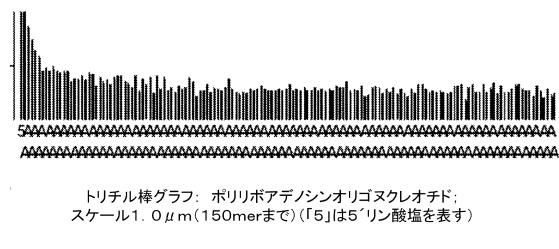
100-merRNA合成(配列番号1)



【図7】

Fig. 7

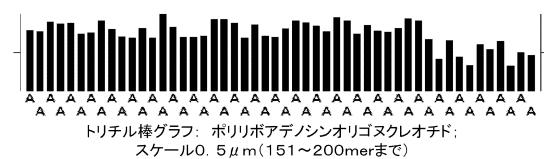
200-merRNA合成(配列番号3)



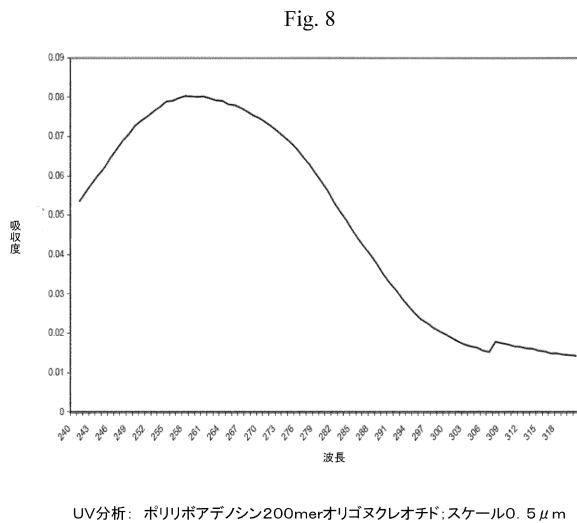
【図6】

Fig. 6

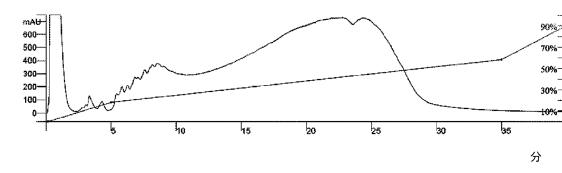
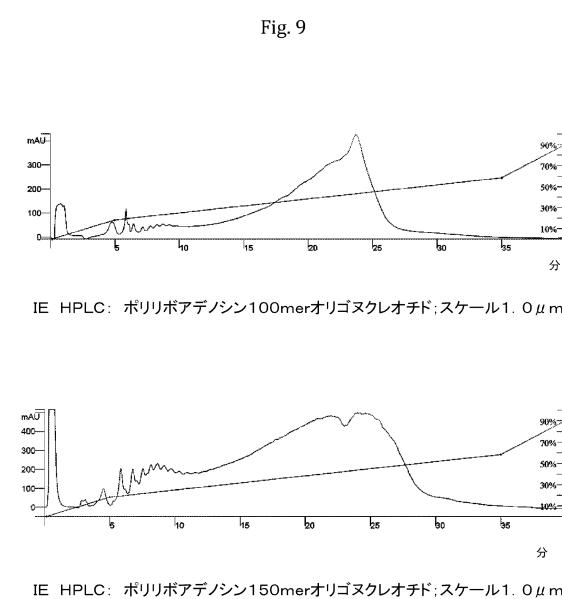
150-merRNA合成(配列番号2)



【図 8】



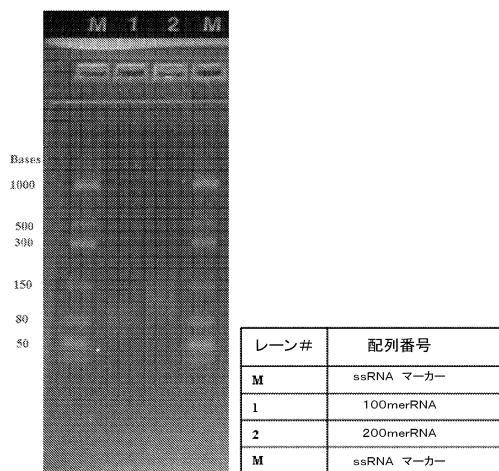
【図 9】



【図 10】

Fig. 10

100mer&200mer RNA合成



ゲル: ポリリボアデノシン100mer&200merオリゴヌクレオチド;
E-Gel EX 2% アガロース

【配列表】0006571663000001.app0006571663000002.xml

フロントページの続き

(72)発明者 スリヴァスタヴァ ナヴィーン ピー.

アメリカ合衆国, 01887 マサチューセッツ州, ウィルミントン, インダストリアル ウェイ
33

審査官 三上 晶子

(56)参考文献 特表2011-515078(JP,A)

特表2013-520438(JP,A)

特表2012-502032(JP,A)

Link technologies: Product Guide 2010[online], 2010年, Retrieved from the Internet
<URL:<http://www.linktech.co.uk/documents/517/517.pdf>>[retrieved on 3 August 2018]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00 - 99/00

C12N 15/11

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)