

(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.

F I

C O 7 H 21/02 (2006.01)

C O 7 H 21/02

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 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)
 (86) (22) 出願日 平成26年9月15日 (2014.9.15)
 (65) 公表番号 特表2016-531157 (P2016-531157A)
 (43) 公表日 平成28年10月6日 (2016.10.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/055711
 (87) 国際公開番号 W02015/039053
 (87) 国際公開日 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)

(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 1 8 8 7 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 3 3
 (74) 代理人 110002295
 特許業務法人森脇特許事務所
 (74) 代理人 100117042
 弁理士 森脇 正志
 (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 1 8 8 7 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 3 3

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】

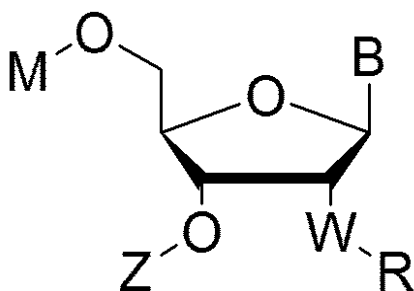
【請求項 1】

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、



40

(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 $-NR_6-$ から成り、 R_6 は、水素ラジカル、または置換 $C_{1\sim 20}$ 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

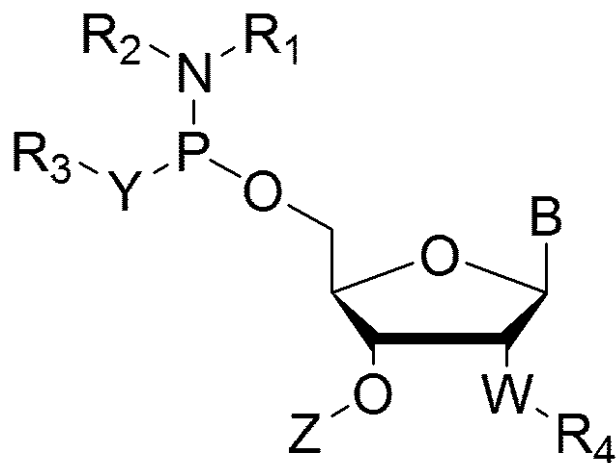
Bは、1-(N⁴-ベンゾイル-5メチルシトシニル)-、1-(N⁴-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-5-メチルシトシニル)-、1-(N⁴-アセチル-5-メチルシトシニル)-、1-(5-メチル-ウラシル)-、1-(5-フルオロ-ウラシル)-、1-(N⁴-ベンゾイル-5-フルオロシトシル)-、9-(N⁶-ベンゾイル-7-デアザアデニル)-、9-(N⁶-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザアデニル)-、9-(N²-イソブチル-7-デアザグアニル)-、および、9-N²-(N,N-ジメチルホルムアミジニル)-7-デアザグアニル)-からなる群から選択される修飾ヌクレオシド塩基ラジカルであり、

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、

(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

50



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、

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 - (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 - 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

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 - ウラシル) -、1 - (5 - フルオロ - ウラシル) -、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、

50

R₁ は、アルキルまたはアリーールラジカルであり、
R₂ は、アルキルまたはアリー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、

(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)、0.05 Mのヨウ素/ピリジン/水/テトラヒドロフランおよび0.35 M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。

【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 ~ 200 mer 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。

【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。

【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

HPLCゲル電気泳動またはRNA精製技術を用いる前記RNA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11】

表面への前記RNA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12】

分子生物学研究開発において、前記RNA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

【0001】

相互参照

本特許協力条約出願は2013年9月14日に出願された、米国仮特許出願第61/877,980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。

【0002】

本発明は、モノマーホスホラミダイトを使用する長いRNAオリゴマの合成、および逆の5'→3'方向でのRNA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100-mer～約200-merの長いRNA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。

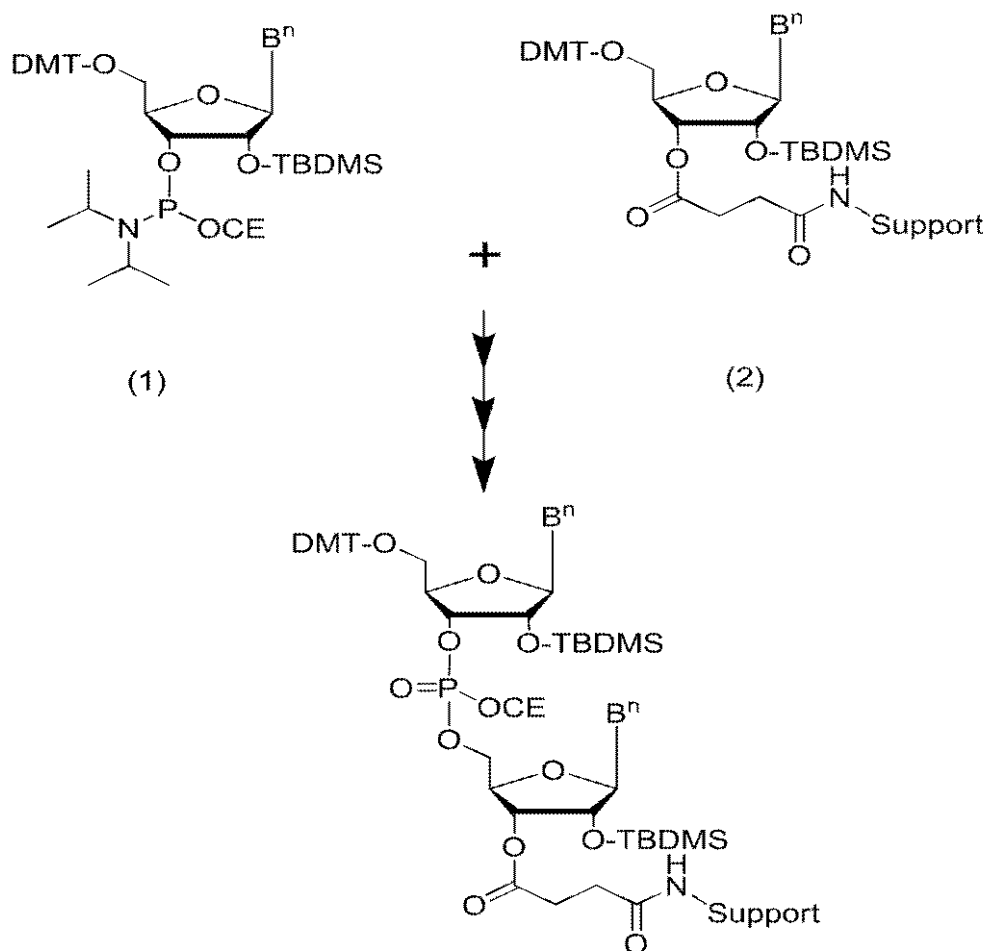
20

【背景技術】

【0003】

3'→5'方向での定義された配列RNA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RNAアプタマ、tRNA、siRNAおよび生物活性RNA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。

【0004】



10

20

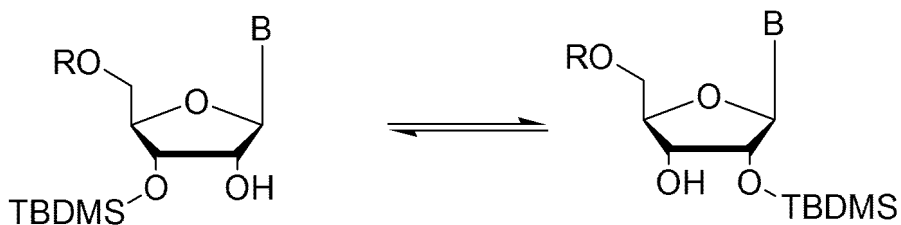
(化学式 I)

30

【0005】

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。

【0006】

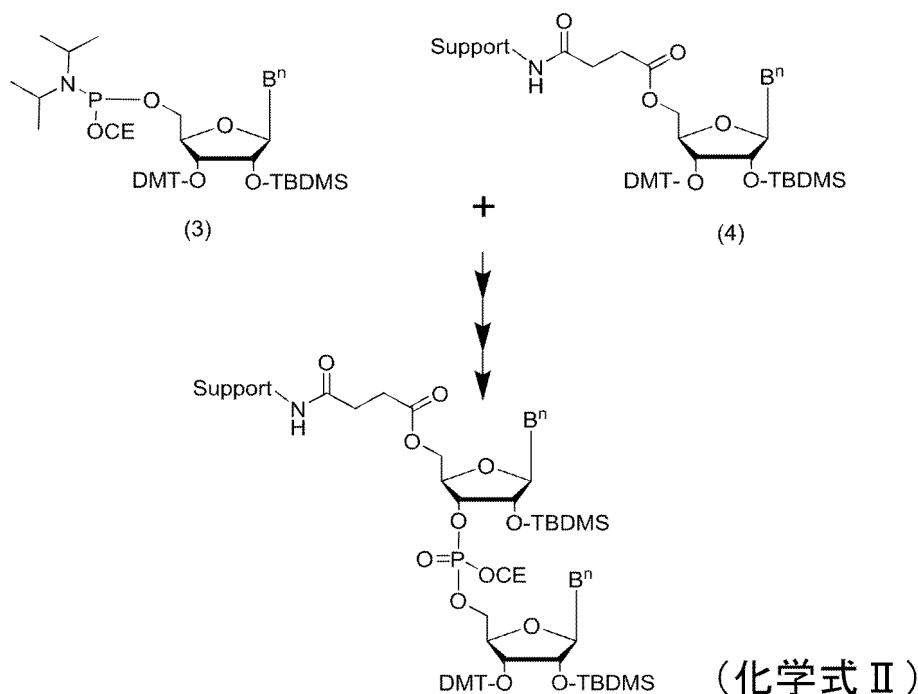


40

【0007】

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。

【0008】



10

20

【 0 0 0 9 】

米国特許第 8 , 3 0 9 , 7 0 7 号および米国特許第 8 , 5 4 1 , 5 6 9 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 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 8 , 3 0 9 , 7 0 7 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 8 , 5 4 1 , 5 6 9 号

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

30

【 0 0 1 1 】

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)。

「meU」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 9 8 8 8 7 6 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) :

40

「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 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 A G G A G C (配列番号 No. 6)。

50

D . 7 6 - m e r R N A 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-mer ~ 200-mer)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) 非コードRNA (ncRNA)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を産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 (RNAi)機構は、転写後に遺伝子発現を制御するマイクロRNA (miRNA)および低分子干渉RNA (siRNA)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-kb非スプライス、ポリアデニル化核保持ncRNAは、80-ntスモールRNAを産生するために、D r o s h aにより加工される。

(C) miRNAおよびp i w i - 干渉RNA (piRNA)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ncRNAは、スモールRNAを産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)

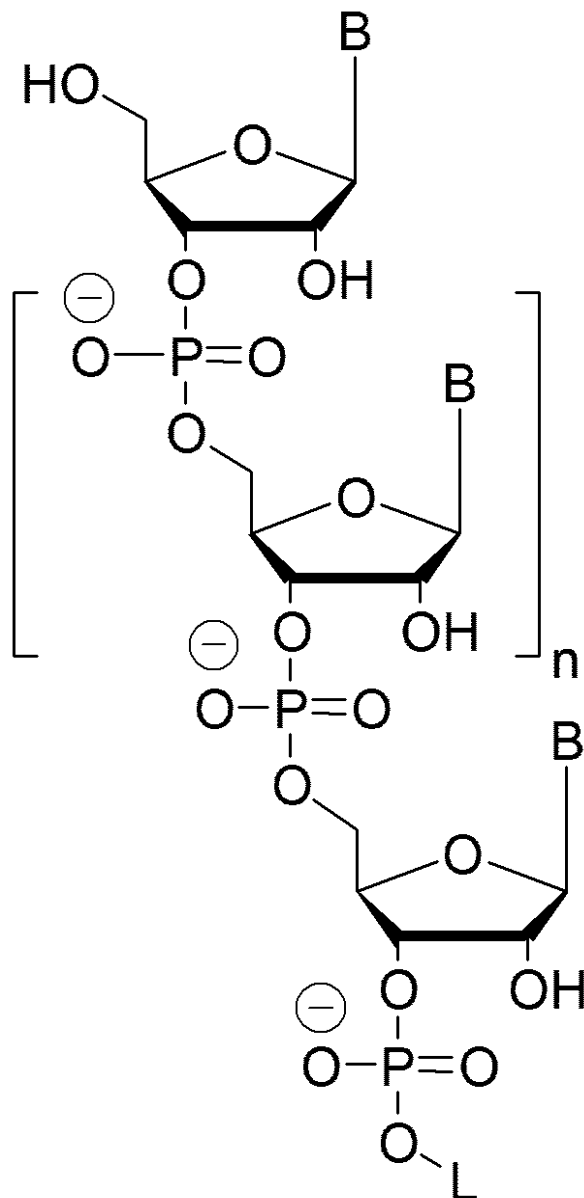
(E) ncRNAは、他の転写物にスモールRNAを産生させないようにする。

(F) 非コード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：



10

20

30

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、ピオチン、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、ペプチドリナー、ポリペプチドリナー、タンパク質、発蛍光団、クエンチャー色素、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

40

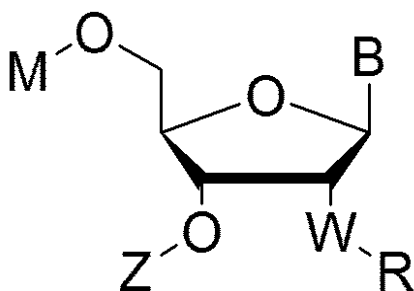
ここで、Lは、介在するリン酸塩を介してRNAヌクレオチドの3'末端に付着され；そして、

【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、

50



(化学式 2)

ここで、

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 - N R₆ - 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、

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 (T B D M S) 、またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン (T O M) 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 (F m o c)、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 - ウラシル) - 、 1 - (5 - フルオロ - ウラシル) - 、 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 (D M T) 、モノメトキシトリフェニル (M M T) およびトリメトキシトリフェニル (T M T) からなる群から選択されるものであり、

【 0 0 1 6 】

10

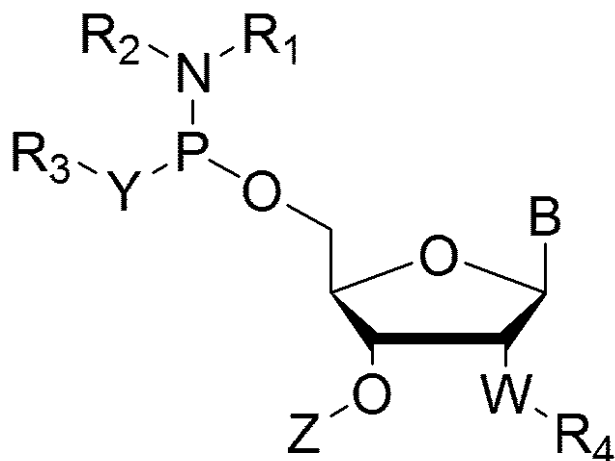
20

30

40

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 *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、

20

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 - ウラシル) - 、1 - (5 - フルオロ - ウラシル) - 、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、

R₁ は、アルキルまたはアリールラジカルであり、

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)、0.05 M のヨウ素 / ピリジン / 水 / テトラヒドロフランおよび 0.35 M 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ステル基を含む、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】

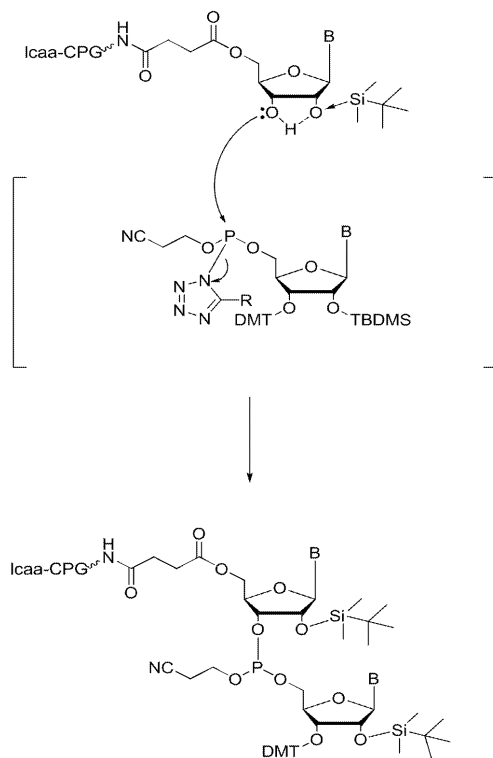
【0040】

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。



10

20

【 0 0 4 2 】

約 1 0 0 - m e r ~ 約 2 0 0 - m e r の 範 囲 の 長 い R N A 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。

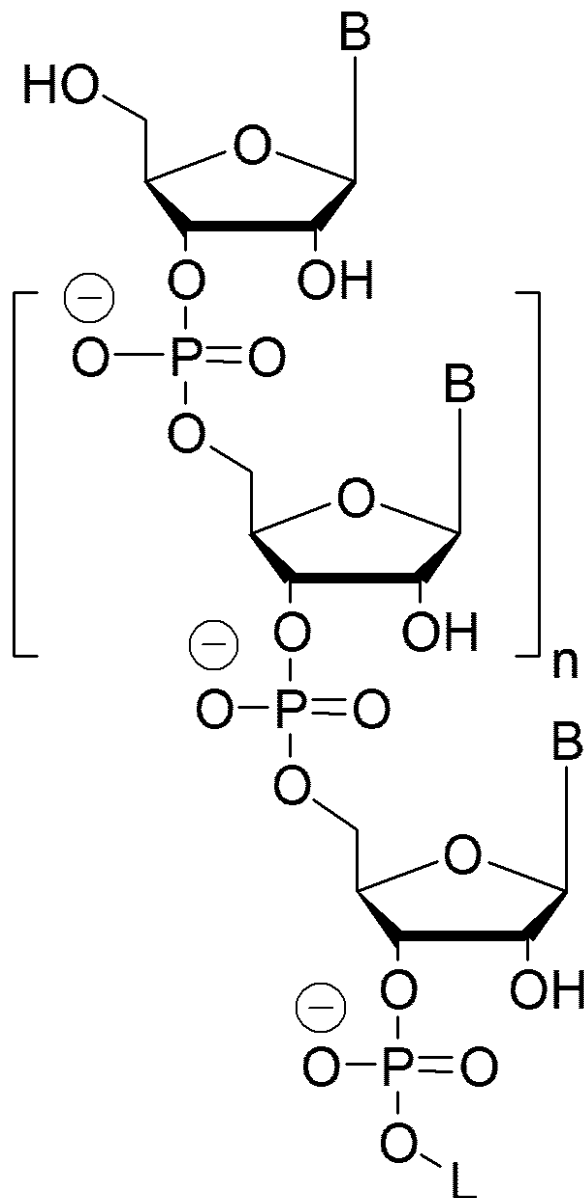
【 0 0 4 3 】

表 1 : ポリリボアデノシンオリゴヌクレオチド 1 0 0 - m e r、1 5 0 - m e r および
 2 0 0 - m e r の 合 成

20

30

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；

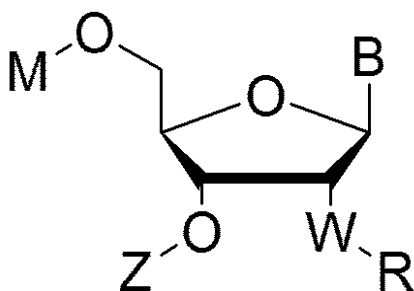
Lは、ヌクレオシド、リンカーまたはスパーサを有するコレステロールからなる群から選択される非ヌクレオシド配位子、ビオチン、エチレングリコール、グリセロール、ポリエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール、アミノリンカー、二硫化物リンカー、ペプチドリナー、ポリペプチドリナー、タンパク質、発蛍光団、クエンチャー色素、一つ以上の2'、5'-結合デオキシヌクレオシド単位、一つ以上の2'、5'-結合リボヌクレオシド単位、および一つ以上の2'、5'-結合デオキシリボース単位であり、ここで、Lは、介在するリン酸塩を介してRNAヌクレオチドの3'末端に付着される。

40

【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、

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 - N R₆ - 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、

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 (T B D M S) またはトリイソプロピルシリルオキシメチレン (T O M) 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 (F m o c) 、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；

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 - (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 - 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 - ウラシル) - 1 - (5 - フルオロ - ウラシル) - 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、 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；

10

20

30

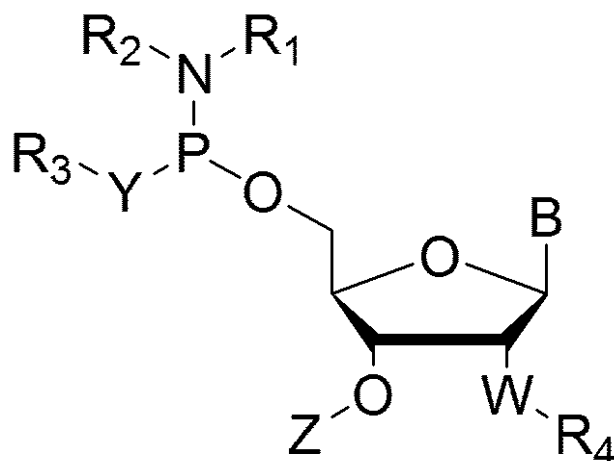
40

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-（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-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

40

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-ウラシル-からなるヌクレオチ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-ウラシル）-、1-（5-フルオロ-ウラシル）-、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 - 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) からなる保護基であり；

R_1 は、アルキルまたはアリールラジカルであり；

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】

(d) L 基を有するホスホラミダイトを提供し、

【0050】

(e) 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】

(f) 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】

(g) 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】

(h) 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、

【0054】

(i) オリゴヌクレオチドを沈殿させ、そして

【0055】

30

(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。

【0056】

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 (0.05 M 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 (0.35 M 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。

【0057】

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' - から 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/ H_2O 、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

【0058】

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 0.3 M の BMT (5 - ベンジルチオテトラゾール) または 0.5 M 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はポリエチレングリコール(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'-コレステロ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、鎖の中で、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、ポリエチレングリコール、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 mi

50

cromoleスケールの5' - 3' 方向のREV-RNAホスホロアミダイト化学を用いて、合成された。Seq. # 3は、0.5 moleスケールで合成された。合成は、標準RNAを用いてExpedite 8900合成装置で実行された。(1 mole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-tbpac-2'-O-TBDMS-3'-O-DMT-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。

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

【0073】

(2) 使用CPG

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RN-1447

CAP A (フェノキシ酢酸無水物/THF/ピリジン)

CAP B (10%のN-メチルイミダゾール/THF)

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/H₂O/THF)

活性化試薬、5-エチルチオ-1-H-テトラゾール(ETT)(0.35M(アセトニトリル中))

【0075】

最初に、60mlの促進(expedite)ボトルのアミダイトを使用し、溶液0.15M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(CPG)固相担体は、3.0mlのジエチルエ-テルで洗浄され、2mlのマイクロチュ-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、1.2mlの33%のメチルアミン(無水エタノ-ル中)で、CPGと開裂および脱保護された。(Aldrich Cat # 534102-250ml、Lot # SHBC2933V)

【0077】

Seq. # 2および3では、65 で90分、1.2mlの33%のメチルアミン(無水エタノ-ル中)。(Aldrich Cat # 534102-250ml、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、CPGは500ulの水で洗浄され；上澄み液は、speed vacに溜められ、乾燥された。超音波浴を使用し45 で4時間、t-ブチルジメチルシリル保護基は、1000ulのトリエチルアミンフッ化水素酸塩での処理により、RNA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、3.0ml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、5,000gで遠心分離された。

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、500ul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、1000ulのM.Q水に溶かされ、そして、OD(Crude desalt)を点検する。

【0078】

10

20

30

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 1 0 . 0 % のメタノール) p H 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、S o u r c e 1 5 Q カラム (1 . 0 c m × 2 5 c m) 上に装填され、4 0 分にわたる直線 0 % ~ 8 5 % 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 2 9 5 n m 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 v o l u m e 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 , 0 0 0 g で 1 0 分間遠心処理が続いた。上澄み液は、静かに移され ; ペレットは、エタノールで洗浄された。

10

【 0 0 8 0 】

1 0 0 - m e r R N A 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 】

1 5 0 - m e r R N A 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、1 5 0 - m e r 合成が重要な脱落もなく、一定してスムースに進行していると観察される。

【 0 0 8 2 】

2 0 0 - m e r R N A 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。

20

【 0 0 8 3 】

1 0 0 - m e r 合成、1 5 0 - m e r 合成および 2 0 0 - m e r 合成の I E H P L C (図 9) 予想通りに、1 . 0 m o l e スケールで合成される粗製の 1 0 0 - m e r 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、1 5 0 - m e r 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。

2 0 0 - m e r 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。

30

【 0 0 8 4 】

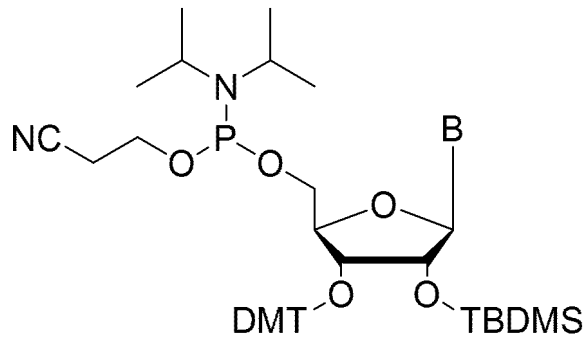
1 0 0 - m e r および 2 0 0 - m e r R N A 合成のゲル (図 1 0) は、8 0 - m e r マーカよりわずかにゆっくり移動する 1 0 0 - m e r の帯域を示す。2 0 0 - m e r は 1 0 0 - m e r よりゆっくり、そして、1 5 0 - m e r より更にゆっくり移動するのが分かる。

【 0 0 8 5 】

本発明の逆 R N A 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 1 6) 、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 1 7) 、または 3 ' - D M T - 2 ' - トリ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 1 8) を保有する。

40

【 0 0 8 6 】



10

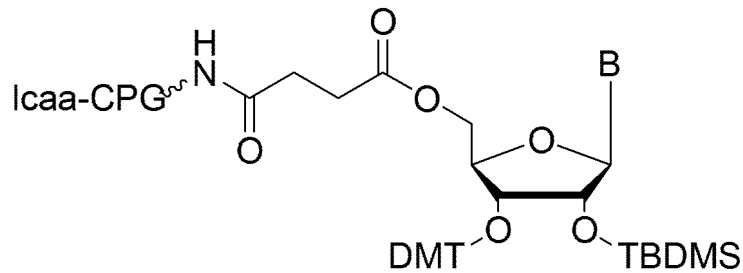
B = A (*N*-Bz), C (*N*-Bz), C (*N*-Ac), G (*N*-iBu),
 A (*N*-*t*BPac), C (*N*-*t*BPac), C (*N*-*t*BPac), G (*N*-*t*BPac),
 A (*N*-Pac), C (*N*-Pac), C (*N*-Pac), G (*N*-Pac), U.

構造 (1 6)

3' - DMT - 2' - *t*BDシリル - 5' - アミダイト

(逆RNA - *t*BD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*-*t*BPac), C (*N*-*t*BPac), C (*N*-*t*BPac), G (*N*-*t*BPac),
 A (*N*-Pac), C (*N*-Pac), C (*N*-Pac), G (*N*-Pac), U.

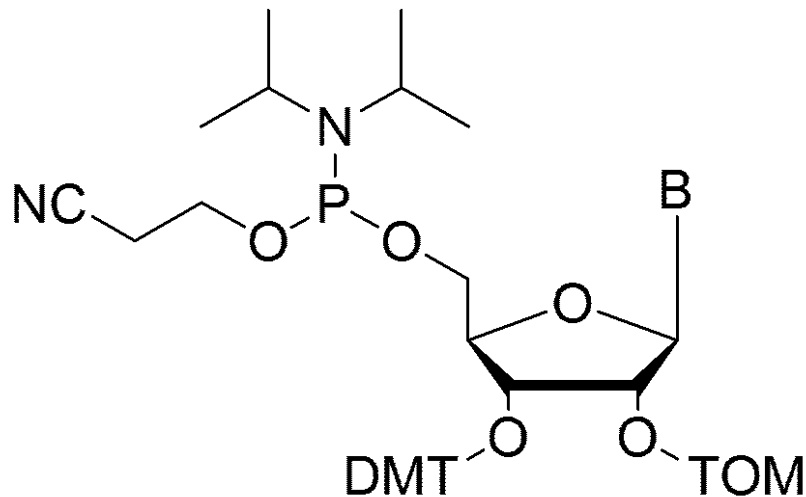
30

構造 (1 7)

3' - DMT - 2' - *t*BDシリル - 5' - CPG

(逆RNA - *t*BDsilyl - 5' - Icaa CPG)

【 0 0 8 8 】



10

B = A (N-Ac), C (N-Ac), G (N-Ac), U.

構造 (18)

20

3' - DMT - 2' - TOM (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RNA - TOM - 5' - アミダイト)

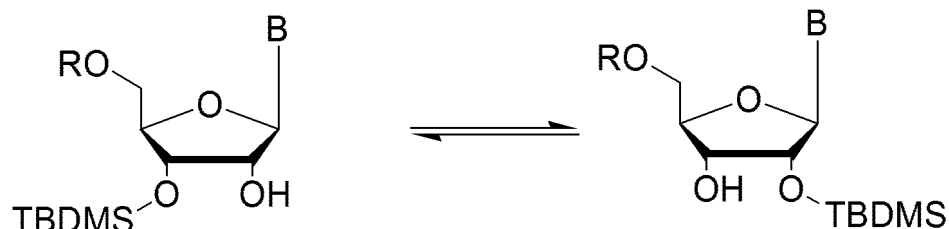
【 0089 】

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 (s t a r t i n g b a s e) 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 - ションの場合には、不必要な異性体 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

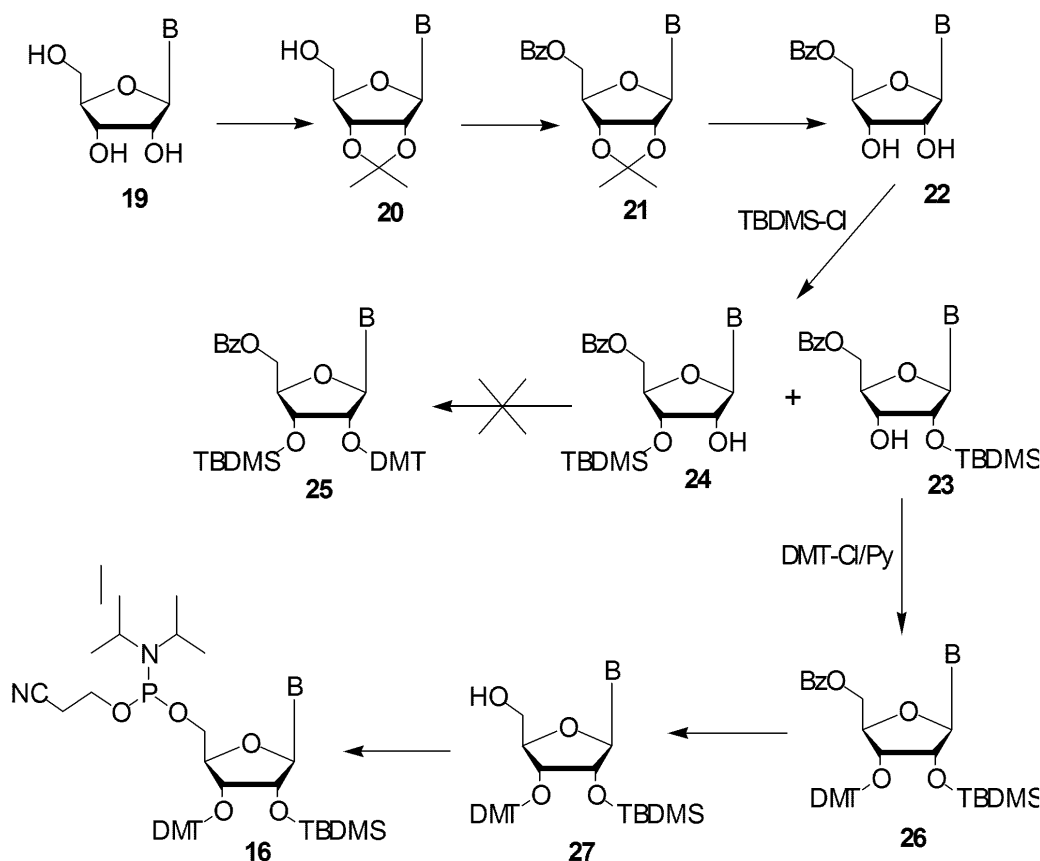
50

て利用することができ、スキーム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】

CEDPおよびDIPAテトラゾール酸塩を用いて、ホスフィチル化反応が続く、メタノー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.

スキーム(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されることができる。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'-DMT-5'-CED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RNAを導く。多量の水ポリマ-および20~21-mersオリゴヌ

クレオチドは、これらのモノマーホス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、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。

10

【0099】

加えて、固相担体(例えばH E GまたはP E G - 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H P L Cにより精製できる。オリゴヌクレオチドはR P H P L C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】

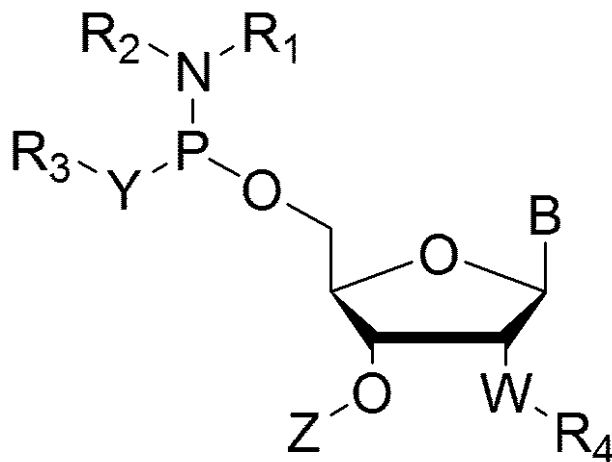
下記の注は、さまざまな革新、利点および可能性、およびいくつかのプロダクトおよび本発明のプロセス詳細を要約する。

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



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；

40

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；

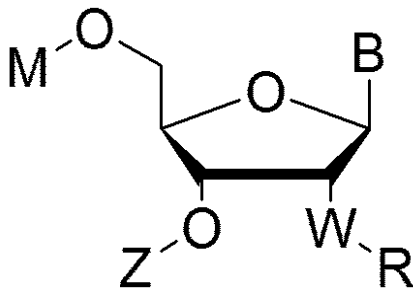
Zは、D M T、M M T、T M T保護基であり；

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。



ここで、

Mは、水素ラジカルまたはY - C O - であり；

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】

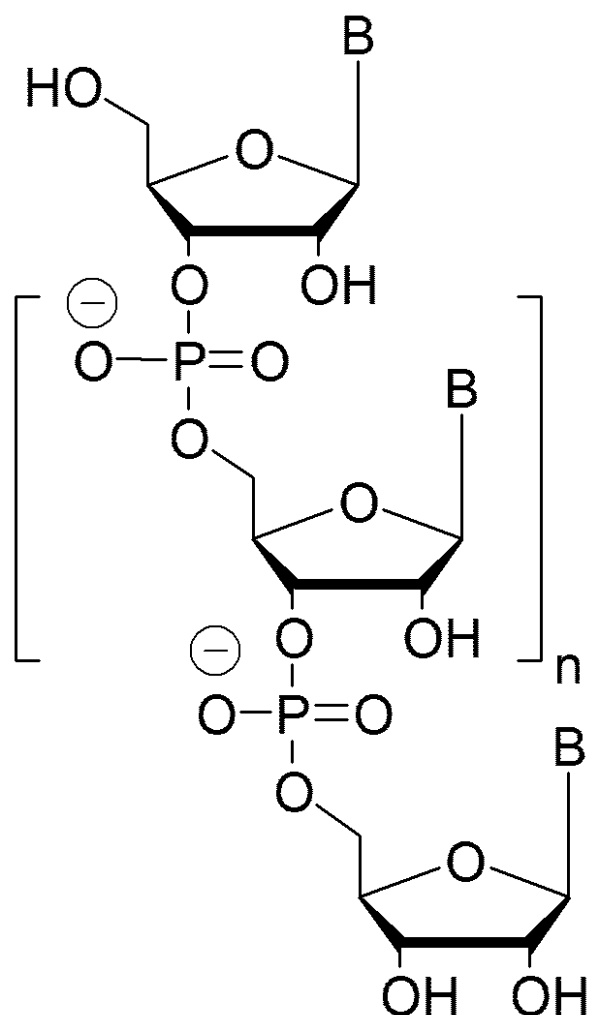
合成RNAオリゴマの化学式10に示されるオリゴヌクレオチド結合構造の5'から3'方向を介した、逆方向の方法。

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、ホスホリチオエ - 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、マイクログラムからキログラムスケールといった、さまざまなスケールで行うことができる。

【0104】

10

20



10

20

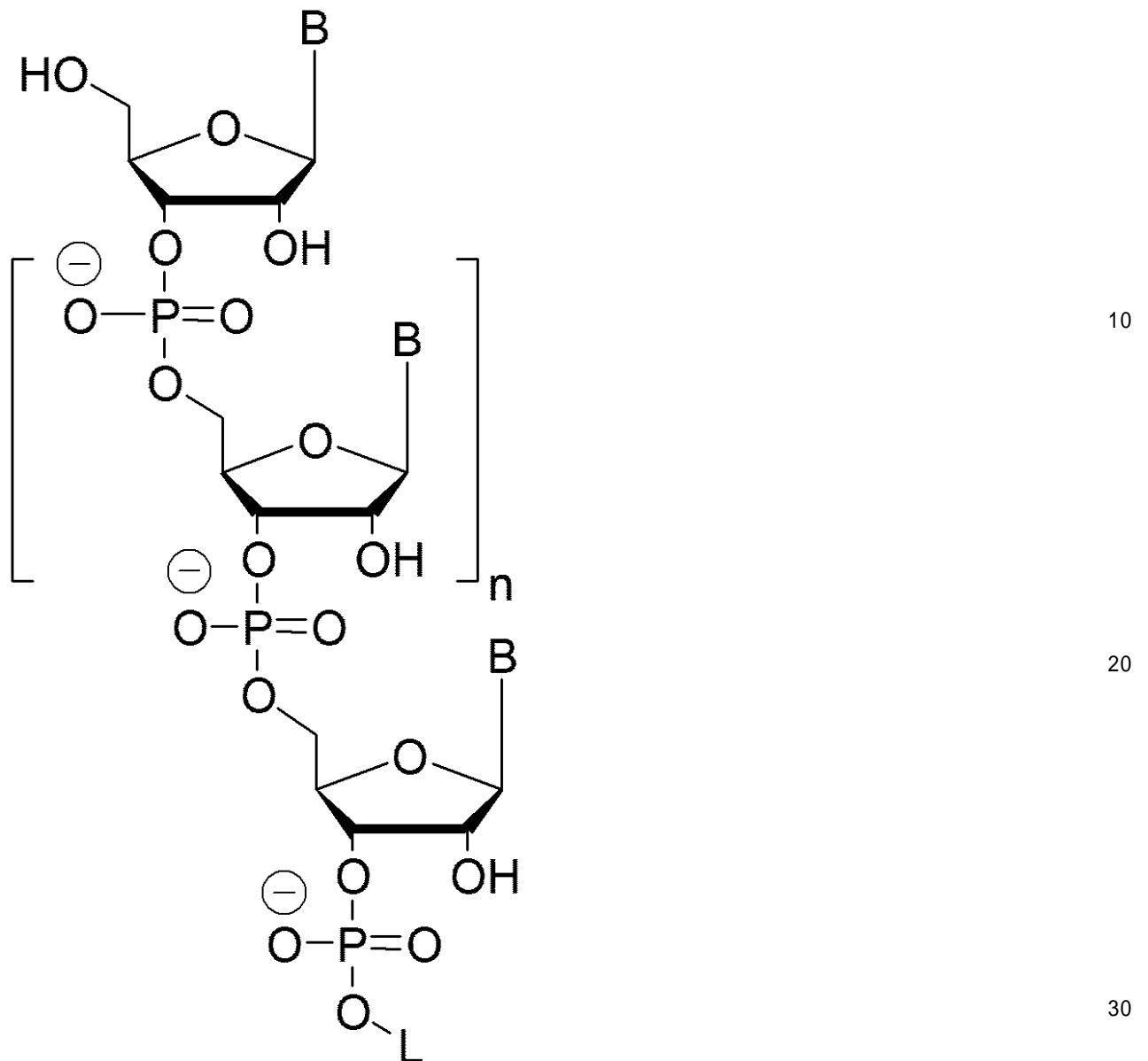
化学式 (1 0)

【 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 RNA 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、クエンチャー色素、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。

30

【 0 1 0 6 】



化学式 (1 1)

【 0 1 0 7 】

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。

【 0 1 0 8 】

コレステロール、ヘキサエチルオキシグリコール (H E G) およびポリエチレングリコール (P E G) といた、巨大分子を有する RNA の 3 ´ - 共役。

【 0 1 0 9 】

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。

【 0 1 1 0 】

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 d U、5 - フルオロ - d C、5 - フルオロ - r C、プソイドウリジン、5 - メチル - d U、5 - メチル - r U、5 - メチル - d c、5 - メチル - r C、5 - プロモ - d U、5 - プロモ - r U、5 - プロモ - d c、5 - プロモ - r C、5 - ヨ - ド - d U、5 - ヨ - ド - r U、5 - ビニル - d U、5 - ビニル - r U、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 - ブロモ 2' - デオキシアデノシン、8 - ブロモ - 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 - ブロモ - デオキシイノシン、8 - ブロモ - 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、ピオチン dT (dTのC - 5 ヘスペーサを介して付着のピオチン)、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' - F A N A) (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' - O M e -) (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' - N H₂) (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 N H₂) 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' - M O E) (例えばA、C、G、U)、イノシン、および2' - M O E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' - O E t、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' - O E t、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】

50

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、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-β-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-β-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。適切なカルボキシル官能基を有する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されることができる。

【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】

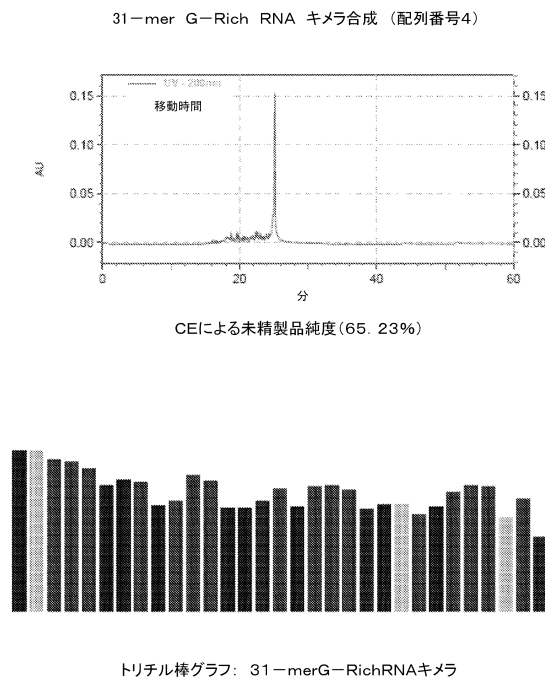
当業者は、ル-チンの実験法以上のものを用いなくとも、本明細書に記載される本発明の特定の態様には多くの同等物があることを認識するであろうし、または確認することが可能であろう。この種の同等物は、以下の請求項に含まれる。従属クレームにおいて開示される実施例のいかなる組合せも、本発明の範囲内であると考察される。

【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。

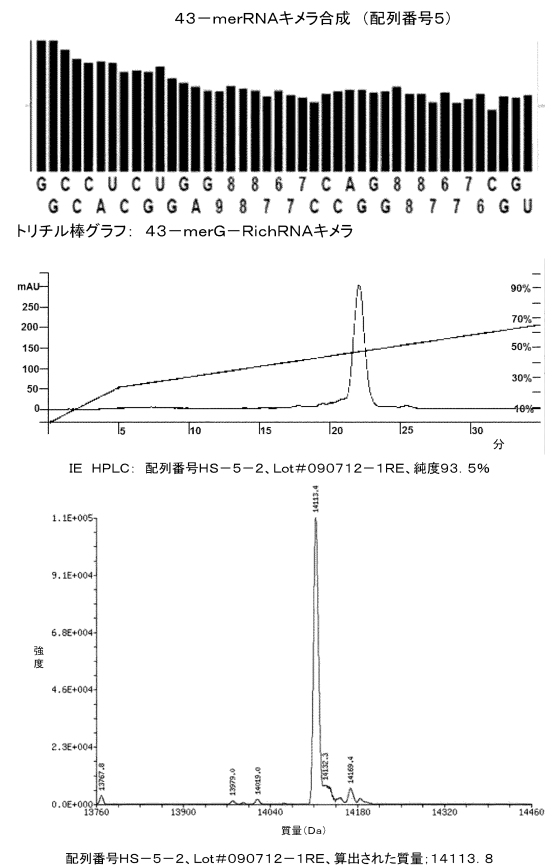
【図1】

Fig. 1

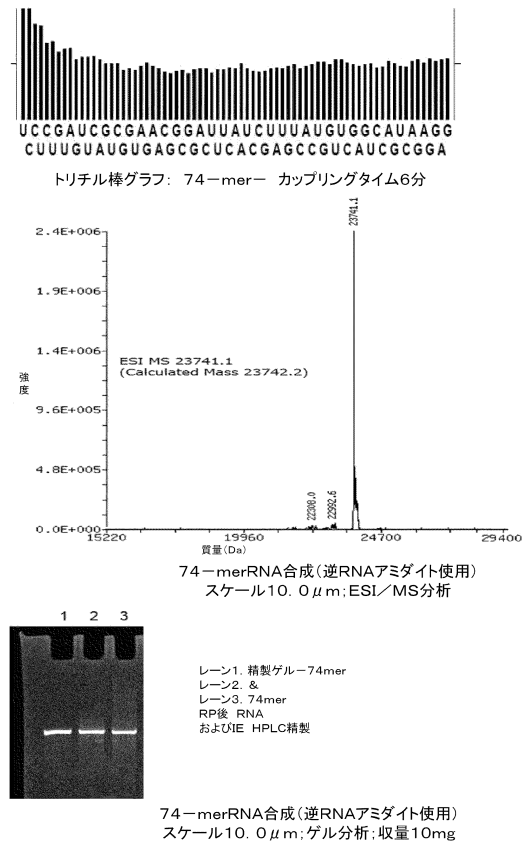


【図2】

Fig. 2



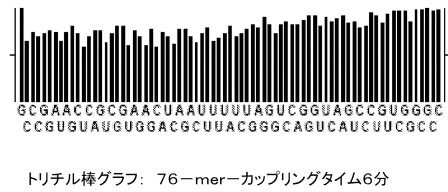
【図 3】

Fig. 3
74-merRNAキメラ合成 (配列番号7)

【図 4】

Fig. 4

76-merRNAキメラ合成 (配列番号8)



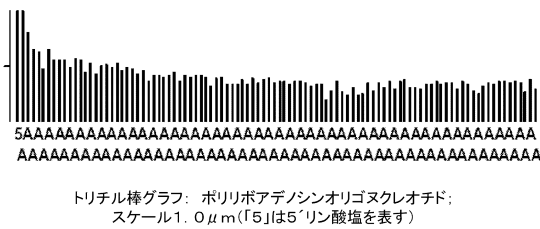
ページ: 合成されたさまざまなRNA (Crude desalted 76-mer)

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

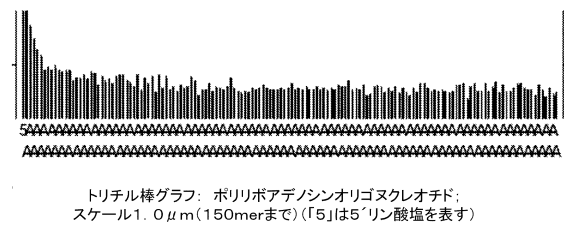
100-merRNA合成 (配列番号1)



【図 7】

Fig. 7

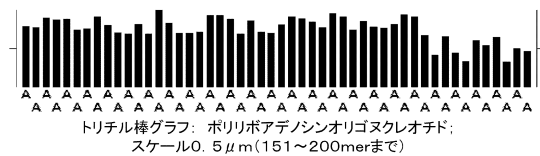
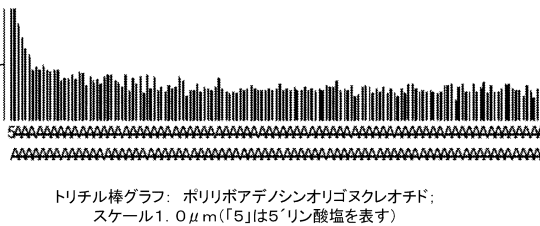
200-merRNA合成 (配列番号3)



【図 6】

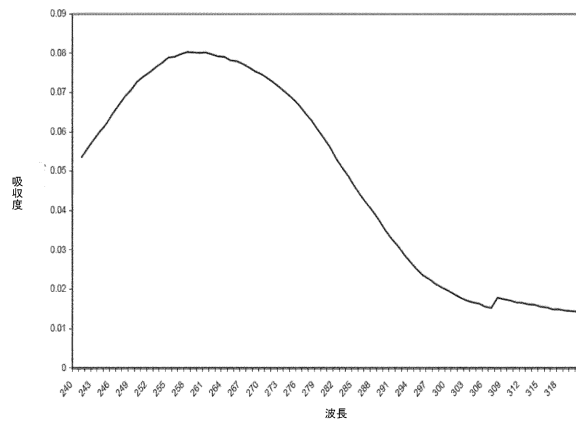
Fig. 6

150-merRNA合成 (配列番号2)



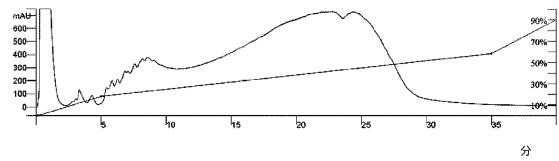
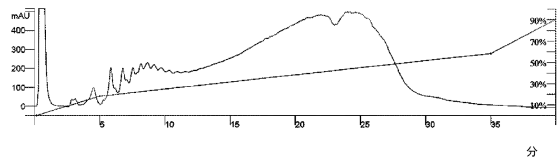
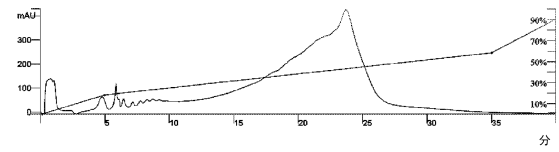
【図 8】

Fig. 8



【図 9】

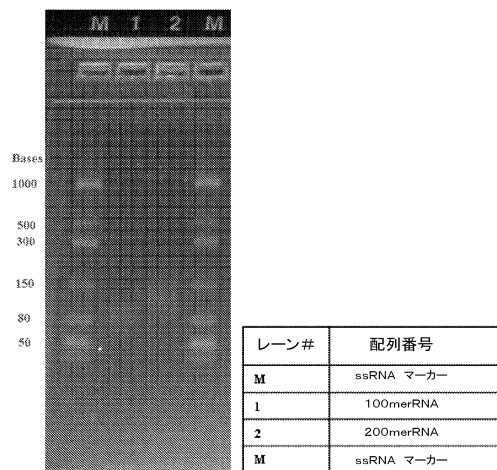
Fig. 9



【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.app

0006571663000002.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
CAplus/REGISTRY(STN)