



(10) 申请公布号 CN 119855824 A

(43) 申请公布日 2025.04.18

(21) 申请号 202380064067.9

(22) 申请日 2023.09.01

(30) 优先权数据

2022-142150 2022.09.07 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.03.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/032085 2023.09.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/053578 JA 2024.03.14

(71) 申请人 株式会社日本触媒

地址 日本

(72) 发明人 野村友美 四十庆佑 田中优贵

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

专利代理师 刘新宇 李恩华

(51) Int.Cl.

C07H 21/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

核酸的制造方法、杂质的去除方法以及杂质少的核酸

(57) 摘要

本发明是一种核酸的制造方法等,其包括:步骤A,合成碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸;步骤B,使步骤A中得到的核酸在中性或酸性的pH条件下与亲核试剂接触;以及步骤C,对步骤B中得到的核酸的保护基进行脱保护。根据本发明,能降低用现有技术无法去除的副产物(B)的含量,制造纯度高的核酸。

1. 一种核酸的制造方法,其包括:
步骤A,合成碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸;
步骤B,使步骤A中得到的核酸在中性或酸性的pH条件下与亲核试剂接触;以及
步骤C,对步骤B中得到的核酸的保护基进行脱保护。
2. 根据权利要求1所述的制造方法,其中,
所述pH为约3~约8。
3. 根据权利要求1或2所述的制造方法,其中,
所述亲核试剂为水和/或醇。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的制造方法,其中,
在约5°C~约80°C下与所述亲核试剂接触约0.25小时以上。
5. 一种核酸杂质的去除方法,其中,通过使碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸在中性或酸性的pH条件下与亲核试剂接触,接着对核酸的保护基进行脱保护而得到目标核酸,从目标核酸中去除质量比所述核酸大34道尔顿的核酸杂质。
6. 根据权利要求5所述的去除方法,其中,
所述pH为约3~约8。
7. 根据权利要求5或6所述的去除方法,其中,
所述亲核试剂为水和/或醇。
8. 根据权利要求5~7中任一项所述的去除方法,其中,
在约5°C~约80°C下与所述亲核试剂接触约0.25小时以上。
9. 一种核酸,其中,核酸与核酸杂质的质谱分析时的检测离子强度比相对于所述核酸100为0.50以下,所述核酸杂质是所述核酸中会包含的、质量比所述核酸大34道尔顿的核酸杂质。

核酸的制造方法、杂质的去除方法以及杂质少的核酸

技术领域

[0001] 本发明涉及一种核酸的制造方法、杂质的去除方法以及杂质少的核酸。

背景技术

[0002] 以往,上市的医药品的药理活性成分主要是低分子化合物,但最近包含肽、核酸之类的中分子的药理活性成分的医药品也逐渐大量上市。特别是核酸医药具有能通过与靶标的mRNA形成碱基对而特异性地发挥作用等在其他种子药物中未发现的特征性的作用机制,因此是目前非常期待今后的开发的种子药物。

[0003] 作为核酸医药的原料的核酸通常通过化学合成来进行制造。作为介绍核酸的该制造方法的文献,例如可列举出下述专利文献1。

[0004] 专利文献1涉及寡核苷酸的脱保护法,介绍了如下内容等:使固相合成的寡核苷酸与有机胺等接触,在不使寡核苷酸从固相脱离的情况下切断保护基。

[0005] 就医药品而言,从确保其安全性的观点考虑,杂质的种类、量在各种限制下严格地进行品质管理。在原料药制造中,杂质的管理也同样严格,更希望创造出去除在作为原料药的核酸的制造中产生的杂质的技术。

[0006] 作为去除杂质来纯化核酸的方法,已知反相柱(RPC)、反相高效液相色谱法(RP HPLC)、阴离子交换色谱法(AEX)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)等。

[0007] 此外,专利文献2中记载了一种寡核苷酸的纯化,其使用包含强阴离子交换配体、强阳离子交换配体以及疏水性配体的混合模式基质来去除包含非复合化寡核苷酸和失败序列的杂质(权利要求1、第0006段等)。

[0008] 专利文献3中记载了一种寡核苷酸的纯化,其使用疏水性相互作用色谱法(HIC)来去除n-1杂质、P=O杂质、脱碱基杂质、CNEt杂质、N+1杂质等产物相关杂质(权利要求1、第0006段等)。

[0009] 专利文献4中记载了一种寡核苷酸的纯化,其使用二相系流动相-固定相液-液色谱法来去除短聚物(shortmer)、长聚物(longmer)等其他寡核苷酸(权利要求1、第0003段)。

[0010] 专利文献5中记载了一种寡核苷酸的纯化,其使用可滴定的阴离子交换组合物来去除短的寡核苷酸等杂质(权利要求1、第0012段等)。

[0011] 专利文献6中记载了一种寡核苷酸的纯化,其使用多孔性的载体来去除杂质(权利要求1等)。

[0012] 非专利文献1中记载了在治疗用寡核苷酸的制造中控制和去除非寡核苷酸产物相关杂质(PRI)。

[0013] 现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献1:日本专利4705716号公报

[0016] 专利文献2:日本特表2022-539327号公报

[0017] 专利文献3:日本特表2019-518759号公报

- [0018] 专利文献4:日本特表2014-525254号公报
[0019] 专利文献5:日本特表2005-520547号公报
[0020] 专利文献6:日本特开平7-227284号公报
[0021] 非专利文献
[0022] 非专利文献1:Org.Process Res.Dev.,2022,26,1130-1144

发明内容

[0023] 发明要解决的问题

[0024] 本申请的发明人等发现存在如下问题:在核酸的制造中,质量比目标核酸(A)大34道尔顿的核酸(副产物(B))会作为杂质包含在核酸(A)中。副产物(B)与核酸(A)的分子量和物性非常接近,因此即使使用专利文献1~6以及非专利文献1等以往公知的纯化方法也无法去除。

[0025] 因此,本发明的技术问题在于提供一种去除副产物(B),降低杂质的含量的核酸的制造方法。本发明的技术问题还在于提供一种去除副产物(B)的方法和副产物(B)少的核酸。

[0026] 用于解决问题的方案

[0027] 本发明人进行了深入研究,结果发现,在核酸合成后,在碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的状态下,用亲核试剂处理合成的核酸,接着进行脱保护,由此副产物(B)的含量显著降低。本发明人基于该见解,完成了以下所示的本发明。

[0028] [1]一种核酸的制造方法,其包括:步骤A,合成碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸;步骤B,使步骤A中得到的核酸在中性或酸性的pH条件下与亲核试剂接触;以及步骤C,对步骤B中得到的核酸的保护基进行脱保护。

[0029] [2]根据[1]所述的制造方法,其中,所述pH为约3~约8。

[0030] [3]根据[1]或[2]所述的制造方法,其中,所述亲核试剂为水和/或醇。

[0031] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的制造方法,其中,在约5°C~约80°C下与所述亲核试剂接触约0.25小时以上。

[0032] [5]一种核酸杂质的去除方法,其中,通过使碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸在中性或酸性的pH条件下与亲核试剂接触,接着对核酸的保护基进行脱保护而得到目标核酸,从目标核酸中去除比所述核酸大34道尔顿的核酸杂质。

[0033] [6]根据[5]所述的去除方法,其中,所述pH为约3~约8。

[0034] [7]根据[5]或[6]所述的去除方法,其中,所述亲核试剂为水和/或醇。

[0035] [8]根据[5]~[7]中任一项所述的去除方法,其中,在约5°C~约80°C下与所述亲核试剂接触约0.25小时以上。

[0036] [9]一种核酸,其中,核酸与核酸杂质的质谱分析时的检测离子强度比相对于所述核酸100为0.50以下,所述核酸杂质是所述核酸中会包含的、质量比所述核酸大34道尔顿的核酸杂质。

[0037] 发明效果

[0038] 本发明的核酸的制造方法能降低用现有技术无法去除的副产物(B)的含量,制造纯度高的核酸。

具体实施方式

[0039] 以下,对本发明的核酸的制造方法的各事项详细地进行说明。其中,以下的记载是用于对本发明进行说明的示例,并非旨在将本发明仅特别限定于该记载范围。

[0040] 本说明书和权利要求书中使用的术语“约”是指在以约表示的数值的 $\pm 10\%$ 范围内的数值,优选在 $\pm 5\%$ 范围内的数值,更优选在 $\pm 2\%$ 范围内的数值,特别优选在 $\pm 1\%$ 范围内的数值。

[0041] 1.核酸的制造方法

[0042] 本发明的核酸的制造方法是包括以下步骤的核酸的制造方法:步骤A,合成碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸;步骤B,使步骤A中得到的核酸在中性至酸性的pH条件下与亲核试剂接触;以及步骤C,对步骤B中得到的核酸的保护基进行脱保护。

[0043] (核酸)

[0044] 本发明中的核酸具有核苷通过磷酸二酯键、硫代磷酸酯键或酰胺磷酸酯键连结而成的结构,优选为寡核苷酸。寡核苷酸的长度没有特别限定,例如为10~100碱基长度,特别优选为12~60碱基长度。

[0045] 就本发明中的核酸而言,所合成的结构为单链,糖为核糖或脱氧核糖,碱基选自腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)。理想的是,本发明中的核酸包含腺嘌呤等嘌呤碱基。在本说明书中,“碱基长度”的单位可以替换为“mer”的单位或“核苷酸”的单位。

[0046] 作为本发明中的核酸,例如可列举出DNA或RNA。

[0047] 只要没有特别说明,则DNA的糖部分为脱氧核糖环,碱基部分选自腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶。只要没有特别说明,则RNA的糖部分为核糖环,碱基部分选自腺嘌呤、尿嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶。

[0048] 通过本发明合成的单链的RNA或DNA可以直接用作反义、CpG寡核苷酸或适配体,也可以通过使具有互补的碱基序列的单链的RNA或DNA之间形成碱基对(退火),制造双链的RNA或DNA,用作siRNA、miRNA、诱饵、HDO(异源双链核酸)。

[0049] (核酸的修饰)

[0050] 本发明中的核酸例如可以是其碱基部分被取代基修饰的核酸。作为取代基,例如可列举出:卤素基、酰基、烷基、芳基烷基、烷氧基、羟基、氨基、单烷基氨基、二烷基氨基、羧基、氰基、硝基等。作为该经修饰的碱基,例如可列举出:8-溴腺嘌呤基、8-溴鸟嘌呤基、5-溴胞嘧啶基、5-溴尿嘧啶基、5-碘尿嘧啶基、5-碘胞嘧啶基、5-氟尿嘧啶基、5-甲基胞嘧啶基(mC)、8-氧代鸟嘌呤基、次黄嘌呤基等。

[0051] 本发明中的核酸例如可以是对其糖部分进行了2'位修饰、5'位修饰、交联型修饰的核酸。作为2'位修饰的具体例子,例如可列举出:2'-F、2'-O-甲基(2'-OMe)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)等。作为5'位修饰的具体例子,例如可列举出:5'-甲基(5'-Me)、5'-环丙烯基(5'-CP)等。作为该交联型修饰的具体例子,有在2'位与4'位之间引入交联结构的修饰,例如可列举出:2',4'-BNA/LNA、2',4'-BNACOC、2',4'-BNANC、ENA、AmNA、scpBNA、cEt、GuNA等。

[0052] 本发明中的核酸可以在几个核苷酸单元(例如1~3个核苷酸)或全部核苷酸单元上进行修饰。

[0053] (核酸的合成方法)

[0054] (1) 步骤A

[0055] 在步骤A中,合成碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸。

[0056] 作为具有氨基的碱基,可列举出:腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或它们被取代基修饰而成的碱基。作为酰基系保护基,例如可列举出:苯甲酰基、异丁酰基、乙酰基、苯氧基乙酰基、异丙基苯氧基乙酰基、叔丁基苯氧基乙酰基等,优选可列举出:苯甲酰基、乙酰基或异丁酰基等。

[0057] 而且,在步骤A中,核酸中的磷酸二酯键、硫代磷酸酯键或酰胺磷酸酯键也可以被保护基保护。作为磷酸二酯键、硫代磷酸酯键或酰胺磷酸酯键的保护基,可列举出在常规方法中使用的保护基,例如可列举出2-氰基乙基。

[0058] 作为合成步骤A的核酸的方法,没有限定,可列举出:固相合成方法、液相合成方法等。优选为固相合成方法或液相合成方法,特别优选为固相合成方法。以下,作为一个例子对固相合成方法的详情进行说明。

[0059] (固相合成方法)

[0060] 本发明中的固相合成方法只要在本说明书中没有特别说明,就可以按照常规方法进行。固相合成方法可列举出:H-磷酸酯法、磷酸酯法、亚磷酰胺法,特别优选可列举出亚磷酰胺法。

[0061] 在步骤A中,利用亚磷酰胺法的固相合成法例如可以通过依次进行以下的步骤(a)~(e)来执行。

[0062] (a) 脱保护步骤:去除经由接头担载于固相的核苷的5'位羟基的保护基。

[0063] (b) 偶联步骤:使用活化剂,使与核苷亚磷酰胺的3'位羟基键合的磷原子和担载于固相的核苷的5'位羟基之间缩合。

[0064] (c) 氧化/硫化步骤:使用氧化剂或硫化剂,将核苷之间的亚磷酸酯键(也包括键合有保护基的情况)转化为磷酸二酯键(也包括键合有保护基的情况)或硫代磷酸酯键(也包括键合有保护基的情况)。

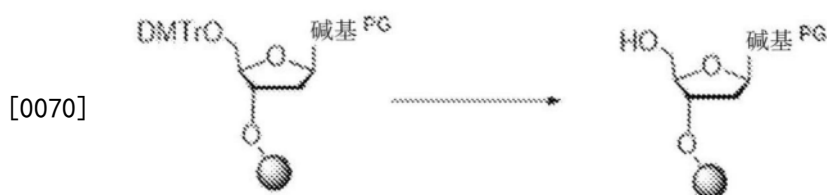
[0065] (d) 加帽步骤:使用加帽剂使保护基键合于步骤(b)中未反应的、担载于固相的核苷的5'位羟基。加帽步骤是用于防止步骤(b)的未反应物参与下次之后的步骤(a)~(d)的反应的步骤。

[0066] (e) 氰基乙基去除步骤:将步骤(a)~(d)反复进行所期望的次数后,在不使所制造的所期望的链长的核酸从固相脱离的情况下,从核苷之间的磷酸二酯键或硫代磷酸酯键中去除保护基。

[0067] 以下使用结构式对步骤(a)~(e)进行例示。

[0068] 需要说明的是,下述结构式是脱氧核糖环(2'位键合有氢原子)的例子,但使用核糖环(2'位键合有羟基)、将其修饰而得到的物质(例如2'位被O-甲氧基乙基化(2'-MOE)、O-甲基化(2'-OMe)或氟化(2'-F)而得到的物质)的情况也同样。

[0069] 步骤(a):



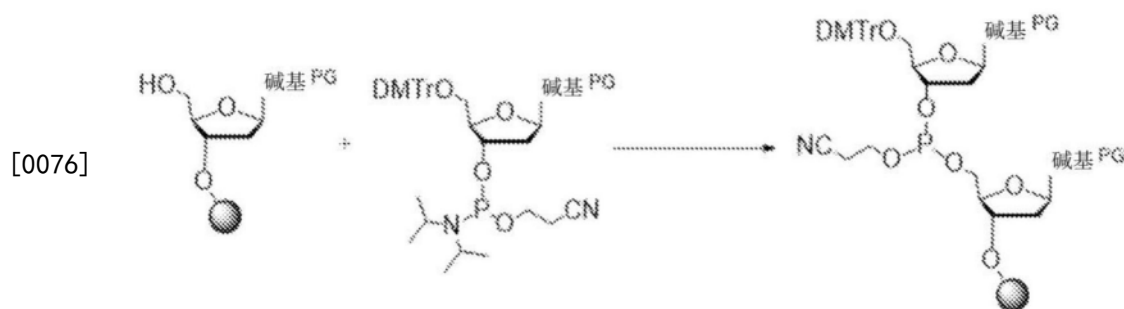
[0071] [式中,DMTr表示4,4'-二甲氧基三苯甲基。碱基^{PG}独立地表示腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶或将它们修饰而得到的物质,其碱基部分的氨基被酰基系保护基保护。●部分表示与接头键合的固相载体]

[0072] 作为固相合成中的固相载体,例如可列举出:玻璃珠、树脂珠、硅胶,优选玻璃珠或树脂珠。

[0073] 作为接头,例如可列举出:3-氨基丙基、琥珀酰基、2,2'-二乙醇磺酰基、长链烷基氨基(LCAA)等。

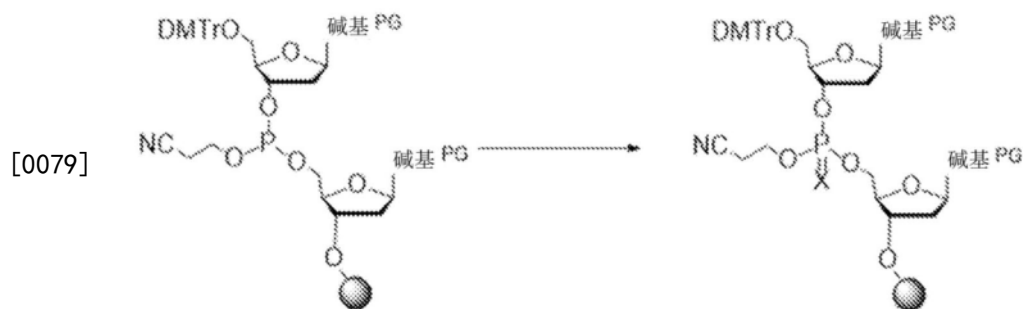
[0074] 作为担载于固相的核苷、核苷酸链、核苷亚磷酰胺等的5'位羟基的保护基,除了4,4'-二甲氧基三苯甲基以外,例如还可以使用4-甲氧基三苯甲基等。

[0075] 步骤(b):



[0077] [式中,DMTr、碱基^{PG}、●部分与上述含义相同]

[0078] 作为步骤(b)中使用的活化剂,例如可列举出:1H-四唑、5-乙硫基四唑、4,5-二氯咪唑、4,5-二氰基咪唑、苯并三唑三氟甲磺酸盐、咪唑三氟甲磺酸盐、吡啶三氟甲磺酸盐、N,N-二异丙基乙胺、2,4,6-三甲基吡啶/N-甲基咪唑、5-(苄硫基)-1H-四唑、5-[3,5-双(三氟甲基)苯基]四唑等。步骤(c):



[0080] [式中,DMTr、碱基^{PG}、●部分与上述含义相同。X表示氧原子或硫原子]

[0081] 作为步骤(c)的氧化剂,例如可列举出:间氯过氧苯甲酸、偏高碘酸盐、过氧化氢、碘、(1S)-(+)-(10-樟脑磺)啞嗪等,作为硫化剂,例如可列举出:3-[N,N-二甲基氨基亚甲基]氨基]-3H-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(DDTT)、3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(Beaucage试剂)、3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮、双苯乙酰基二硫化物(PADS)、四乙基秋兰姆二硫化物(TETD)、3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(ADTT)等。作为步骤(c)的反应溶剂,例如可列举出:二氯甲烷、乙腈、吡啶、3-甲基吡啶、水、四氢呋喃或将它们以任意组合混合而成的溶剂等。

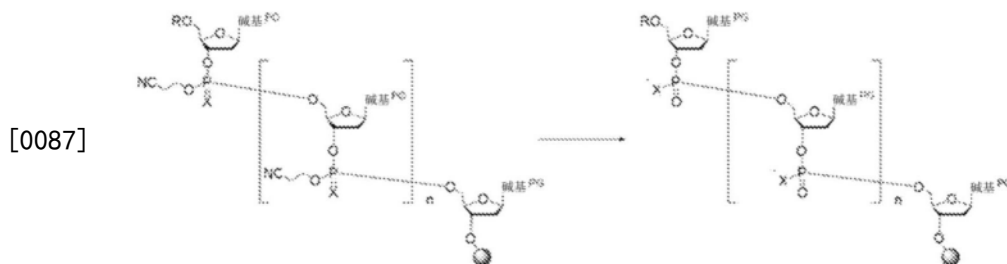
[0082] 步骤(d):



[0084] [式中,DMTr、碱基^{PG}、●部分与上述含义相同]

[0085] 作为步骤(d)的加帽剂,例如可列举出:乙酸酐、苯氧基乙酸酐等。作为步骤(d)的反应溶剂,例如可列举出:乙腈、吡啶、2,6-二甲基吡啶、四氢呋喃或将它们以任意组合混合而成的溶剂等。

[0086] 步骤(e):



[0088] [式中,碱基^{PG}、●、X与上述含义相同。R表示4,4'-二甲氧基三苯甲基或氢原子。n表示0以上的整数]

[0089] 作为步骤(e)的氰基乙基去除剂,例如可列举出:三乙胺、二乙胺、1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯等。该氰基乙基去除剂例如也可以用乙腈、甲苯等稀释来使用。

[0090] (2) 步骤B

[0091] 在步骤B中,使步骤A中得到的核酸在中性或酸性的pH条件下与亲核试剂接触。通过步骤B,能降低用现有技术无法去除的副产物(B)的含量,制造纯度高的核酸。

[0092] 作为亲核试剂,没有特别限定,可列举出:水、醇、硫醇、胺、卤化物离子、氰化物离子等。具体而言,可列举出:水、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇、壬醇、癸醇、十一烷醇、十二烷醇、乙二醇、甘油、苯酚、甲硫醇、乙硫醇、十二烷硫醇、二硫苏糖醇、甲胺、二甲胺、乙胺、二乙胺、乙二胺、苯胺、吡咯烷、哌啶、哌嗪、吗啉等。优选选自水、醇、硫醇,更优选可列举出水或/或醇,进一步优选可列举出水、伯醇以及仲醇,例如选自水、甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇,从获得和操作的容易性等考虑,更进一步优选选自水、甲醇、乙醇,最优选水。呈液体的亲核试剂可以用作溶剂。

[0093] 步骤B在中性(例如pH6~8)或酸性(例如pH6以下)的pH条件下进行,优选在约3~8的pH条件下进行,更优选在约4~7的pH条件下进行。

[0094] 步骤B中的亲核试剂与合成物的接触量没有特别限定,从生产效率的观点等考虑,相对于核酸1mmol,优选为1mL~1000mL,更优选为5mL~100mL,特别优选为10mL~50mL。存在亲核试剂与合成物的接触时间越长,本发明的效果越高的倾向,例如为0.25小时以上,优选为0.5小时以上,更优选为1小时以上,进一步优选为2小时以上,从生产效率的观点等考虑,理想的是在24小时以内。

[0095] 步骤B中的亲核试剂与合成物的接触中的温度没有特别限定,例如为5°C~80°C的范围内的温度,更优选为10°C~50°C,从操作的容易性的观点等考虑,特别优选为15°C~30°C。

[0096] 与亲核试剂接触时使用的容器的接液面的材质没有特别限定,例如可列举出:SUS316、SUS316L、SUS304、玻璃、丙烯酸树脂、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、PET、PTFE、PFA、ETFE、FEP等,优选选自玻璃、丙烯酸树脂、聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、PET、PTFE、PFA,更优选选自玻璃、丙烯酸树脂、聚乙烯、聚丙烯、PTFE、PFA。通过在非金属制容器中实施与亲核试剂接触的操作,即使在目标寡核苷酸具有硫代磷酸酯的情况下,也能够抑制由金属离子从反应容器的溶出引起的切割和脱保护步骤中的脱硫体杂质(目标寡核苷酸的硫代磷酸酯键变化为磷酸二酯键而成的物质)的生成。

[0097] 步骤B中的与亲核试剂的接触可以在合成中使用的反应柱中进行,或者在从反应柱中取出后移送的其他容器中进行。

[0098] (3) 步骤C

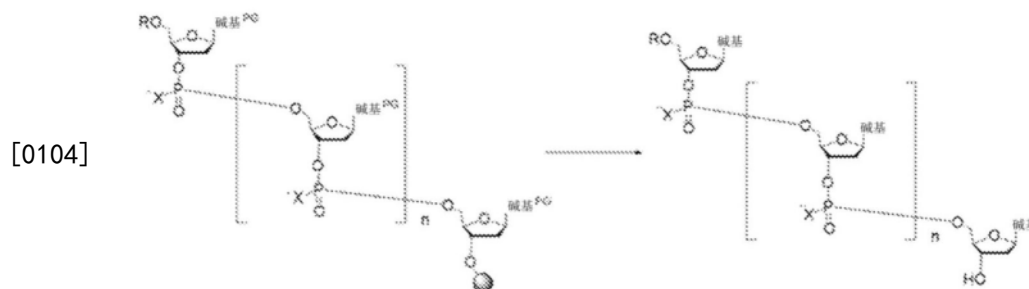
[0099] 在步骤C中,对步骤B中得到的核酸的保护基进行脱保护。

[0100] 在步骤A的合成核酸的方法为固相合成方法的情况下,步骤C(对保护基进行脱保护的步骤)可以是同时从固相载体切割核酸的步骤。

[0101] 在步骤A的上述步骤(a)~(e)以及步骤B之后,可以进行以下的步骤(f)作为步骤C。

[0102] (f) 切割/脱保护步骤:使用切割/脱保护剂从固相载体切割直至步骤(e)和步骤B为止制造的所期望的链长的核酸,使其碱基部、2'位羟基等保护基脱离。

[0103] 步骤(f):



[0105] [式中,碱基^{PG}、●、X与上述含义相同。碱基独立地表示去除了保护基的腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶或将它们修饰而得到的物质。R表示4,4'-二甲氧基三苯甲基或氢原子。n表示0以上的整数](切割/脱保护步骤中的反应液)

[0106] 作为切割/脱保护剂,例如可列举出:浓氨水、甲胺、氢氧化钠等碱性物质。浓氨水的氨浓度优选为20~30重量%,更优选为25~30重量%。所使用的切割/脱保护剂的量相对于担载于固相载体的核酸1mmol优选为10mL~1000mL,相对于核酸1mmol更优选为50mL~500mL。

[0107] 切割/脱保护剂例如也可以用水、甲醇、乙醇、异丙醇、1-丙醇、1-丁醇、2-丁醇、乙腈、四氢呋喃、1,2-二甲氧基乙烷、二甲基亚砜等稀释来使用,优选用水、乙醇或异丙醇稀释。切割/脱保护步骤中的反应液优选为碱性,更理想的是pH10~14。

[0108] 步骤(f)的反应温度例如为5~75°C范围内的温度,优选为15~60°C范围内的温度。步骤(f)的反应时间例如在48小时以下进行,优选在24小时以下进行。

[0109] 通过切割/脱保护剂,进行核酸从固相载体的切割,进而去除与核酸键合的保护基。

[0110] 上述固相合成法的步骤(a)~(f)可以使用市售的核酸自动合成装置等来实施。此

外,按照上述步骤,以核苷酸链从3'位碳原子向5'位碳原子的方向延伸的方式制造核酸。

[0111] (4) 分离纯化步骤

[0112] 制造出的核酸可以通过通常进行的分离纯化方法,例如反相色谱法、反相离子对色谱法、离子交换色谱法、疏水性相互作用色谱法、凝胶过滤色谱法等进行核酸的纯化。此外,还可以通过超滤等去除溶液中所含的作为杂质的盐,可以通过冷冻干燥使寡核酸溶液粉体化。

[0113] (副产物(B))

[0114] 本发明的核酸的制造方法能降低用现有技术无法去除的副产物(B)的含量,制造纯度高的核酸。具体而言,质量比目标核酸(A)大34道尔顿的核酸杂质(副产物(B))的质谱分析时的检测离子强度比相对于核酸(A)100为0.50以下,优选为0.10以下。

[0115] 本申请发明人推定,副产物(B)是在合成操作中,主要是在所述步骤(a)中,通过在其序列中所含的腺嘌呤碱基上发生成为更高极性的突变而生成的。此外,副产物(B)与目标核酸(A)的分子量和极性等物性接近,难以通过阴离子交换色谱法等核酸制造中通常使用的分离纯化技术去除。因此,理想的是,在分离纯化步骤之前,在步骤B和步骤C中降低副产物(B)的含有率。

[0116] 制造出的核酸的品质的分析可以通过组合通常进行的核酸的分析方法、例如作为分离方法的反相色谱法、反相离子对色谱法、离子交换色谱法等、作为检测器的UV检测器、质谱仪等来进行。核酸中的副产物(杂质)量可以在使用UV检测器的情况下根据检测出的峰的面积比、在使用质谱仪的情况下根据检测出的离子强度比等计算出。作为离子强度比的计算方法,可以使用通过去卷积操作将检测出的核酸的多价离子群转化为分子(中性物种)的质量或一价离子的 m/z (将离子的质量除以统一原子质量单位而得到的相对质量除以离子的电荷数而得到的无量纲量)后进行计算的方法、提取特定的多价离子的信号强度进行计算的方法等。

[0117] 2. 杂质的去除方法

[0118] 本发明的杂质的去除方法是去除核酸杂质(副产物(B))的方法,其中,通过使碱基部分的氨基被酰基系保护基保护的核酸在中性至酸性的pH条件下与亲核试剂接触,接着对核酸的保护基进行脱保护而得到目标核酸,从目标核酸中去除质量比所述核酸大34道尔顿的核酸杂质。

[0119] 本发明的杂质的去除方法可以通过进行上述步骤B和步骤C来实施。

[0120] 3. 杂质少的核酸

[0121] 本发明的杂质少的核酸是如下核酸:核酸与核酸杂质的质谱分析时的检测离子强度比相对于所述核酸100为0.50以下,所述核酸杂质是所述核酸中会包含的、质量比所述核酸大34道尔顿的核酸杂质。

[0122] 本发明的杂质少的核酸可以使用上述本发明的核酸的制造方法来制造。

[0123] 实施例

[0124] 以下列举实施例等对本发明进一步详细地进行说明,但本发明并不限定于这些实施例等。

[0125] 只要没有特别说明,则下述实施例等的DNA的糖部分为脱氧核糖环,碱基部分选自腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶。只要没有特别说明,则实施例中的LNA(2',4'-BNA)的糖

部分具有核糖环的2'位氧原子与4'位碳原子之间交联(-CH₂-)的结构,碱基部分选自腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、5-甲基胞嘧啶。在制造例和比较制造例中,使用苯甲酰基作为腺嘌呤的6位氨基的保护基,使用异丁酰基作为鸟嘌呤的2位氨基的保护基,使用苯甲酰基作为胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶的4位氨基的保护基。

[0126] [制造例1]

[0127] (亲核试剂种类的研究)

[0128] 使用填充有固相载体的SUS316L制反应柱和核酸合成装置OligoPilot(注册商标) plus100,在经由接头与固相载体键合的核苷上依次缩合亚磷酸胺,最后通入三乙胺/乙腈(1:1)混合溶液,由此合成目标寡核苷酸(FLP)。

[0129] 接着,将键合有该目标寡核苷酸的固相载体在玻璃制试验管中在相对于每1mmol固相载体担载量为20mL的表1记载的任一亲核试剂中在20°C下浸渍3小时并振荡。然后,将该固相载体在28重量%氨水溶液/乙醇(4:1)混合溶液中在60°C下浸渍8小时,进行该目标寡核苷酸从固相载体的切割和保护基的脱保护。

[0130] 上述切割/脱保护后,将该混合溶液用水/乙醇(4:1)混合溶液稀释,由此得到该目标寡核苷酸的粗液(实施例1~5)。

[0131] 需要说明的是,上述固相载体、接头、目标寡核苷酸如下所示。

[0132] 固相载体、接头:Primer Support(注册商标) 5G Unylinker 350(Cytiva)。

[0133] 目标寡核苷酸(FLP):5'-T(L)^ˆG(L)^ˆC^ˆT^ˆA^ˆG^ˆC^ˆA^ˆG^ˆA^ˆT^ˆG^ˆC^ˆT^ˆA(L)^ˆmC(L)-3'
(序列编号1:16mer,^ˆ表示硫代磷酸酯键。此外,在碱基旁边记载有(L)的各核苷单元是与LNA(2',4'-BNA)相同的结构,其他核苷单元表示与DNA相同的结构单元。mC表示碱基为甲基胞嘧啶)。

[0134] [比较制造例1]

[0135] 使用制造例1中合成的键合有目标寡核苷酸的固相载体,将“接着,将键合有该目标寡核苷酸的固相载体在玻璃制试验管中在相对于每1mmol固相载体担载量为20mL的表1记载的任一亲核试剂中在20°C下浸渍3小时并振荡。然后,将该固相载体在28重量%氨水溶液/乙醇(4:1)混合溶液中”变更为“接着,将键合有该目标寡核苷酸的固相载体在28重量%氨水溶液/乙醇(4:1)混合溶液中”,除此之外,在与制造例1相同的条件下进行相同的操作,得到目标寡核苷酸的粗液(比较例1)。

[0136] [制造例2]

[0137] (接触条件的比较研究)

[0138] 将“在相对于每1mmol固相载体担载量为20mL的表1记载的任一亲核试剂中在20°C下浸渍3小时并振荡”变更为“在表2记载的任一接触温度、每单位固相载体担载量的水接触量、接触时间的条件下在水中浸渍并振荡”,除此之外,在与制造例1相同的条件下进行相同的操作,得到目标寡核苷酸的粗液(实施例6~12)。

[0139] [比较制造例2]

[0140] 使用制造例2中合成的键合有目标寡核苷酸的固相载体,在与比较制造例1相同的条件下进行相同的操作,由此得到目标寡核苷酸的粗液(比较例2)。

[0141] [制造例3]

[0142] (接触时间的研究)

[0143] 使用填充有固相载体的SUS316L制反应柱和核酸合成装置OligoPilot(注册商标) plus100,在经由接头与固相载体键合的核苷上依次缩合亚磷酰胺,最后通入三乙胺/乙腈(1:1)混合溶液,由此合成目标寡核苷酸(FLP),然后用4分钟向反应柱中通入相对于每1mmol固相载体担载量为960mL的水,由此使固相载体与水接触。

[0144] 接着,将键合有该目标寡核苷酸的固相载体在玻璃制试管中在28重量%氨水溶液/乙醇(4:1)混合溶液中在60°C下浸渍19小时,进行该目标寡核苷酸从固相载体的切割和保护基的脱保护。

[0145] 上述切割/脱保护后,将该混合溶液用水/乙醇(4:1)混合溶液稀释,由此得到该目标寡核苷酸的粗液(参考例1)。

[0146] 需要说明的是,上述固相载体、接头、目标寡核苷酸如下所示。

[0147] 固相载体、接头:Primer Support(注册商标)5G Unylinker 350(Cytiva)。

[0148] 目标寡核苷酸(FLP):5'-C[^]T[^]A[^]G[^]C[^]A[^]G[^]A[^]T[^]G[^]C[^]T-3'(序列编号2:12mer DNA,[^]表示硫代磷酸酯键)。

[0149] [比较制造例3]

[0150] 将“合成目标寡核苷酸(FLP),然后用4分钟向反应柱中通入相对于每1mmol固相载体担载量为960mL的水,由此使固相载体与水接触”变更为“合成目标寡核苷酸(FLP)”,除此之外,在与制造例3相同的条件下进行相同的操作,得到目标寡核苷酸的粗液(比较例3)。

[0151] [制造例4]

[0152] (目标寡核苷酸的纯化)

[0153] 准备通过与制造例1相同的条件、相同的操作而得到的粗液(使用水作为亲核试剂的粗液,实施例13)和通过与比较制造例1相同的条件、相同的操作而得到的粗液(比较例4)。

[0154] 使用阴离子交换色谱法在下述条件下分别分离纯化上述粗液,得到纯化后的含寡核苷酸的液体(实施例13、比较例4)。

[0155] 分离纯化条件:离子交换树脂;BioPro IEX SmartSep Q20(YMC),柱体积;7mL,柱温;室温,流动相A:10mM氢氧化钠水溶液/甲醇(85:15)混合溶液,流动相B:10mM氢氧化钠·2M氯化钠水溶液/甲醇(85:15)混合溶液。

[0156] [试验例1:副产物(B)量的测定]

[0157] 针对制造例1~4以及比较制造例1、2中制造的各寡核苷酸的粗液(制造例4还针对纯化后的含寡核苷酸的液体),在下述条件下进行利用超高效液相色谱质谱法(UHPLC-MS)的测定,求出目标寡核苷酸(FLP)的量和质量比目标寡核苷酸增加34道尔顿的副产物(B)的量,计算出副产物(B)的含有率(副产物的离子强度/目标寡核苷酸(FLP)的离子强度(%))。需要说明的是,本说明书中的副产物(B)在质量比目标寡核苷酸增加34道尔顿这一点上是共通的,但按目标寡核苷酸的每个种类为不同的物质。

[0158] 测定条件:UHPLC装置;Vanquish UHPLC系统,质谱仪;Q Exactive,柱;Waters ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18、130Å、1.7μm、2.1mm×100mm,UV检测;260nm,缓冲液A;100mM HFIP,8mM TEA in H₂O:MeCN=98:2,缓冲液B;H₂O:MeCN=50:50,温度;60°C,离子化法;ESI,检测模式;负,喷雾电压;2.5|kV|,毛细管温度;250°C。

[0159] 上述测定的结果如下述表1~4所示。

[0160] [试验例2:目标寡核苷酸 (FLP) 量的测定]

[0161] 分别针对制造例4中制造的寡核苷酸的粗液和纯化后的含寡核苷酸的液体的各试样溶液,在下述条件下进行利用超高效液相色谱法 (UHPLC) 的测定,计算出目标寡核苷酸 (FLP) 的纯度(目标寡核苷酸 (FLP) 的峰面积/全部峰的总面积(%))。

[0162] 测定条件:UHPLC装置;ACQUITY UPLC,柱;Waters ACQUITY UPLC (注册商标) Oligonucleotide BEH C18、130Å、1.7μm、2.1mm×100mm,UV检测;260nm,缓冲液A;100mM HFIP,8mM TEA in H₂O:MeCN=98:2,缓冲液B;H₂O:MeCN=50:50,温度;60°C。

[0163] 进而,分别针对制造例4中制造的寡核苷酸的粗液和纯化后的含寡核苷酸的液体的各试样溶液,用水稀释后,进行利用分光光度计的吸光度的测定,根据得到的OD值计算出产率(实际测定得到的OD值相对于理论上能获得的最大OD值的比例)。

[0164] 上述测定的结果如下述表4所示。

[0165] [表1]

[0166]	亲核试剂的种类	副产物 (B) 量/FLP量 (%)
实施例1	水	0.04
实施例2	甲醇	0.02
实施例3	乙醇	0.09
实施例4	异丙醇	0.46
实施例5	正丁醇	0.26
比较例1	无	0.99

[0167] [表2]

[0168]	水接触温度 (°C)	水接触时间 (hr)	水接触量 (mL/mmol)	副产物 (B) 量/FLP 量 (%)
实施例 6	15	2	10	0.2
实施例 7	15	8	7	0.08
实施例 8	15	8	31	0.08
实施例 9	20	0.5	23	0.44
实施例 10	20	2	26	0.16
实施例 11	30	0.5	5	0.09
实施例 12	30	3	18	0.01

[0169]	比较例 2	无	无	无	0.69
--------	-------	---	---	---	------

[0170] [表3]

[0171]	有无通水	副产物 (B) 量/FLP量 (%)
比较例3	无	1.11
参考例1	有	0.82

[0172] [表4]

	水接触	粗液		纯化后液体		产率 (%)
		FLP 纯度 (%)	副产物 (B) 量 /FLP 量 (%)	FLP 纯度 (%)	副产物 (B) 量 /FLP 量 (%)	
[0173] 比较例 4	无	71.27	0.69	97.12	0.50	51
实施例 13	有	71.17	0.04	96.61	0.05	52

[0174] 上述表1~4中记载的副产物(B)量/FLP量(%)是将FLP(全长产物:目标寡核苷酸)设为100(%)时的副产物(B)的比例(%)。

[0175] 如表1所示,示出:就与本发明的特定的亲核试剂(水、甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇)接触的样品(实施例1~5)而言,与不与亲核试剂接触的样品(比较例1)相比,副产物(B)的含有率显著低。

[0176] 此时,确认了:在亲核试剂为甲醇的实施例2的情况下,生成了3.20%(将目标寡核苷酸设为100%时的比例)的目标寡核苷酸的腺嘌呤碱基被甲氧基取代的烷氧基副产物。可认为烷氧基副产物可以通过反相色谱法与目标寡核苷酸分离。

[0177] 如表2所示,关于本发明的与水的接触,示出:接触的水的量对副产物(B)的含有率不造成影响(实施例7、8)。

[0178] 此外,示出:通过与水接触0.5小时(实施例9),与不与水接触的情况(比较例2)相比,副产物(B)的含有率显著降低。此外,示出:与仅与水接触4分钟的情况(表3的参考例1)相比,接触0.5小时的情况(表2的实施例9)下的副产物(B)的减少率大,接触2小时的情况(表2的实施例10)下的副产物(B)的减少率更大。由以上结果示出:随着接触时间的延长,使副产物(B)的含有率降低的效果增强。

[0179] 此外,示出:与水的接触温度为30°C的情况(表2的实施例11)与接触温度为15°C的情况(表2的实施例6)、20°C的情况(表2的实施例9)相比,副产物(B)快速减少。由以上结果示出:随着接触温度的上升,使该杂质的含有率降低的效果增强。

[0180] 如表4所示,示出:本发明的与水的接触与通常的分离纯化操作相比,使副产物(B)的含有率降低的效果高。此外,确认了有无与水接触对FLP纯度、产率不造成影响。

[0181] 产业上的可利用性

[0182] 本发明有助于制造杂质含量低的高品质的核酸医药。