

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4148991号
(P4148991)

(45) 発行日 平成20年9月10日(2008.9.10)

(24) 登録日 平成20年7月4日(2008.7.4)

(51) Int.Cl. F I
 C O 7 H 21/00 (2006.01) C O 7 H 21/00
 C O 7 H 1/06 (2006.01) C O 7 H 1/06

請求項の数 6 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平8-522208 (86) (22) 出願日 平成8年1月18日(1996.1.18) (65) 公表番号 特表平10-512566 (43) 公表日 平成10年12月2日(1998.12.2) (86) 国際出願番号 PCT/SE1996/000043 (87) 国際公開番号 W01996/022299 (87) 国際公開日 平成8年7月25日(1996.7.25) 審査請求日 平成14年12月3日(2002.12.3) (31) 優先権主張番号 9500183-0 (32) 優先日 平成7年1月20日(1995.1.20) (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)	(73) 特許権者 ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス ・アクチボラグ スウェーデン国、エスー751 82・ウ プサラ(番地なし) (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (74) 代理人 弁理士 船山 武 (74) 代理人 弁理士 伏見 直哉 (72) 発明者 ヨハンソン, ハンス スウェーデン国、エスー753 12・ウ プサラ、ルンデルスグレンド・2・ペー 最終頁に続く
--	--

(54) 【発明の名称】 短核酸の精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

合成中の不要な反応又は不完全な反応によって形成される欠陥オリゴヌクレオチドから合成オリゴヌクレオチドを精製する方法であって、

水溶性形態にある保護された合成オリゴヌクレオチドを含む試料を、陰イオン交換基を有する親水性吸着剤と、前記保護オリゴヌクレオチドが前記吸着剤に結合することを可能にする条件下で接触させることと、その後前記吸着された保護オリゴヌクレオチドから欠陥オリゴヌクレオチドを分離させることを含む前記方法であって、

0 から 4 M までの NaCl 濃度に相当するイオン強度条件下で前記吸着剤が前記保護オリゴヌクレオチドに結合することを特徴とする前記方法。

【請求項2】

吸着されている間に、前記吸着された保護オリゴヌクレオチドを脱保護する請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記イオン強度が 0.1 から 3 M までの NaCl 濃度に相当する請求項2に記載の方法。

【請求項4】

(a) 前記保護基を開裂するための脱保護剤を含む溶液であって、

(b) 前記吸着剤に吸着された状態に脱保護オリゴヌクレオチドを維持するイオン強度を有する前記溶液を

前記合成オリゴヌクレオチドを吸着した後の吸着剤と共にインキュベーションし、且つ、

このインキュベーションを、脱保護を得るために十分な時間に亘って行うことを特徴とする請求項2または3に記載の方法。

【請求項5】

前記合成オリゴヌクレオチドを脱保護後に前記吸着剤から脱着させることを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記合成オリゴヌクレオチドの脱着を塩勾配を使用して行うことを特徴とする請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

所期のオリゴヌクレオチドが疎水性保護基を含む、混合物からの合成オリゴヌクレオチドの精製。

合成オリゴヌクレオチド中のヌクレオチド残基の個数は、原則的に、1より大きいいずれかの整数であり得る。現在使用されているオリゴヌクレオチド合成経路では、このヌクレオチド残基数は、200個未満であることが多く、一般的には100個未満である。

合成オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、及び、修飾塩基と修飾糖と修飾リン酸基を含む類似体を含む。特定の修飾を、ヌクレオチド残基の1個、2個以上、又は、全てにおいて繰り返すことが可能である。典型的な修飾は、その骨格におけるチオレーションであり、例えば、リン酸基の1個の酸素原子が硫黄で置き換えられる（ホスホロチオアートオリゴマー）ことと、リン酸基の2個の酸素原子が硫黄で置き換えられる（ホスホロジチオアートオリゴマー）こととが可能である。別の典型的な修飾は、特定の塩基におけるアルキル化（例えば、メチル化）である。

技術的背景と従来技術

薬剤としてオリゴヌクレオチドを使用することによって、高度に精製された合成オリゴヌクレオチドの大規模生産の必要性が著しく増大するだろう。今日では、典型的には、その各々のリン酸基において活性化した5'-保護ヌクレオチドを、固体支持体に固着させた成長オリゴヌクレオチド鎖の末端ヌクレオチド残基内の脱保護5位と段階的に且つ予め決められた順序で反応させることによって、オリゴヌクレオチドを合成する。5位の最も一般的な保護基は強疎水性であり、好ましくは4,4'-ジメトキシフェニルメチル（ジメトキシトリチル = DMTr）である。別のこうした保護基は、9-フェニルキサンテン-9-イル（ピクシル = Px）である。典型的には、結果として得られる5'-末端保護オリゴヌクレオチドを、強疎水性マトリックス上でのクロマトグラフィー（逆相クロマトグラフィー = RPC）を陰イオン交換クロマトグラフィー（IEX）と組み合わせることによって精製してきた。現在まで使用されてきた、RPCを基礎とする精製手順の全てに共通しているのは、吸着されたオリゴヌクレオチドを溶離させるために水溶性有機溶媒（例えば、アセトニトリル）を使用することである。

オリゴヌクレオチド精製のための典型的手順は、少なくとも次の諸段階を含むことだろう。

(1) 合成中に使用した固体支持体からのオリゴヌクレオチドの開裂 (cleavage)。この開裂を、高濃度 (25%) のアンモニアを高温度で数時間加えることによって行うことが一般的である。

(2) アンモニアの除去。

(3) 末端ヌクレオチド残基の5位の保護基が欠如した欠陥配列を除去するためのRPC。

(4) 所期の全長オリゴヌクレオチドがRPC樹脂上に吸着されているままである間の、又は、樹脂からの溶離の後における、脱保護。一般的には、弱酸による処理によって脱保護を行う。

(5) 次第に増大する濃度の有機溶媒（例えば、アセトニトリル）を加えることによる、RPCカラムからのオリゴヌクレオチドの溶離。

(6) 前に溶離させたオリゴヌクレオチドの陰イオン交換カラム上へのローディング、及

10

20

30

40

50

び、その後での、次第に増大する濃度の無機塩を加えることによるオリゴヌクレオチドの溶離。

(7) 所期生成物の濃縮と調合。

オリゴヌクレオチド及びその類似体の合成と精製に関しては、例えば、Methods in Molecular Biology 20 (1993) (Agrawal S 編, Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A.) を参照されたい。

粒子状の強疎水性マトリックスと粒子状の陰イオン交換マトリックスとを均質に混合したカラムの中で、上記R P C段階を行うことが示唆されている(米国特許第4,997,927号)。このアプローチは、アセトニトリル及びジクロロメタンのような有機溶媒を使用することを必要とする。

10

従来技術の欠点

こうした従来 of 公知の方法は、大規模プロセスの設計を困難で高コストなものにする幾つかの欠点を有する。大量の有機溶媒を取り扱うためには、爆発の危険がない装置と、毒性に対する予防措置とが必要である。有機溶媒の回収と廃棄のために、及び、多段階プロセスを行うための労力とクロマトグラフィー装置とに関連した追加コストのために、その生産コストは更に増大する。

発明の目的

本発明の目的は、合成オリゴヌクレオチドの精製のための、単純化された、より安全で、より低コストの方法を提供することである。

20

発明

こうした目的は、水溶性形態の所期の保護オリゴヌクレオチドを含む試料を、陰イオン交換基で置換されており且つ高及び低イオン強度(例えば、0 Mから3 Mまでの範囲内のNaCl濃度に相当する)の条件下でそのオリゴヌクレオチドに結合する親水性クロマトグラフィー媒質(吸着剤)の上に、その吸着剤に上記保護オリゴヌクレオチドが吸着されることを可能にする条件下で適用することによって実現される。

高及び低イオン強度の条件下で保護オリゴヌクレオチドに結合する性質は、その吸着剤が、その親水性にも係わらず、僅かであるが測定可能な非イオン結合(実際、粗水性であると思われる)を示すことを意味する。

後続の段階では、吸着された保護オリゴヌクレオチドを脱保護し、所期の全長オリゴヌクレオチドを、適切な緩衝成分を含む水性溶媒(好ましくは、水)を使用して溶離させる。こうした各々の段階のための適切な条件は、精製すべきオリゴヌクレオチドの望ましくない劣化を著しく生じさせるものであってはならない。

30

試料

試料は、疎水性保護基を有する所期のオリゴヌクレオチドを含むあらゆる試料であることが可能である。こうした試料は、固相マトリックスから取り外した後の、オリゴヌクレオチドの合成から得られる粗材料であることが可能である。従って、この試料は、所期のオリゴヌクレオチドと、上記固相マトリックスから取り外すために加える試薬との他に、合成中の不要な反応又は不完全な反応によって形成される欠陥オリゴヌクレオチド(欠陥配列)の水溶性形態も含む。こうした欠陥オリゴヌクレオチドは、保護形態及び/又は非保護形態であることが可能である。

40

段階

吸着剤への保護オリゴヌクレオチドの吸着

重要な問題は、保護オリゴヌクレオチドと吸着剤との間の非イオン結合を可能にする条件を与えることである。このことは、保護オリゴヌクレオチドの選択的吸着の条件(即ち、より高い塩濃度)の方が明らかに有利であるけれども、低イオン濃度において、保護オリゴヌクレオチドと非保護オリゴヌクレオチドの両方をこの段階で吸着することが可能であることを意味する。このことは、一方では、こうした条件が臨界的ではなく、粗試料を、程度の差はあっても、全く予精製段階なしに直接的にそのまま使用することが可能であることを意味している。吸着後には、未吸着試料成分、及び(存在する場合は)合成中に使

50

用した支持体からのオリゴヌクレオチドの開裂に由来する過剰量の薬剤を取り除くために、洗浄段階を行うことが好ましい。保護オリゴヌクレオチドと非保護オリゴヌクレオチドのどちらが吸着された場合においても、疎水性保護基を持たないオリゴヌクレオチドの選択的脱着を可能にする条件（即ち、塩濃度の増大）を適用することが有利である。

吸着段階とその後に続く洗浄段階に関しては、一般的に、これらの段階の間に次の条件が選択される。

イオン強度： 洗浄溶液において高イオン強度を使用する洗浄段階が最終生成物の高純度を得るために好適であるが、原則的には、イオン強度が広い範囲内で様々であってよい。0 Mから4 Mまで、好ましくは0.1 Mから3 Mまで、又は、0.5 Mから3 MまでのNaCl濃度に相当するイオン強度が一般的に効率が良い。適切な塩はNaCl又は他の無機水溶性塩である。

10

温度： 一般的には0 から50 までであり、好ましくは10 から40 までである。

pH： アルカリ性、即ち、一般的には7から14までのpH値、好ましくは8から12までのpH値である。

より高い塩濃度が非保護オリゴヌクレオチドを溶離させるだろう。

脱保護

保護オリゴヌクレオチドが吸着された状態にある間に脱保護を生じさせることが好ましい。この条件は、一般的に各々の保護基に対して適用される条件と同一であるが、形成される脱保護オリゴヌクレオチドが（陰イオン交換を経て）吸着状態のままであることが可能であるように条件を維持することが好ましい。このことは、一般的に、保護基が疎水性化合物に変換される場合に、この疎水性化合物も吸着された状態のまま残る可能性があることを意味する。典型的には、脱保護が生じるように、保護基に適合した開裂剤溶液（cleavage solution）と共に吸着剤をインキュベーションする。例えばDMTrのような加水分解によって遊離可能な基の場合には、この開裂剤溶液が、比較的強い有機カルボン酸（例えば、トリフルオロ酢酸）を開裂剤として含むことが多い。ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸を使用することも可能である。脱保護オリゴヌクレオチドが吸着状態のまま残ることを確実なものとするために、イオン強度は、一般的に、可能な限り低く保たれる（多くの場合には、0.5 M未満）。典型的には、温度が低ければ低いほど長いインキュベーション時間が必要となることを考慮しながら、温度を0 から40 までの範囲内で選択し、インキュベーション時間を1分間から60分間までの範囲内で選択する。

20

30

脱保護オリゴヌクレオチドの溶離

この段階を、親水性陰イオン交換体からオリゴヌクレオチドを溶離させるための一般的方法を使用して行う。溶液は水性であり、最も好ましくは水であり、適切な塩（一般的には、NaClのような無機水溶性塩）と緩衝成分を含む。長さに従ってオリゴヌクレオチドを溶離させるために、塩勾配を使用して溶離を行うことが最も好ましい。開始濃度、最終濃度、及び、勾配の大きさは、分離させるべきオリゴマーの量と長さに応じて決まるだろう。イオン強度を変化させながら溶離を段階的に行うことも可能である。一般的には、イオン強度は0 Mから3 Mの範囲内であり、勾配の大きさは5カラム体積から40カラム体積までの範囲内である。

40

保護基由来の疎水性化合物は、オリゴヌクレオチドの溶離後も、吸着剤上に残ったままだろう。この化合物を、疎水性水溶性共溶媒（例えば、イソプロパノールとエタノールのような低級アルコール）を含む水性溶液を使用して吸着剤から溶離させることが可能である。

上記のように、吸着と脱保護と溶離の適切な順序を使用することによって、選択された親水性陰イオン交換吸着剤上で高度の精製を行うことが可能となるだろう。吸着された保護オリゴヌクレオチドを脱保護の前に脱着させるプロトコルを選択する場合には、このプロトコルでは、より短い形のオリゴヌクレオチドから所期の全長オリゴヌクレオチドを分離させるために、追加のイオン交換段階が必要になるだろう。

吸着剤

50

適切な吸着剤は、明らかに親水性であるが、1つ以上の疎水基を有する修飾オリゴヌクレオチドに対して非イオ的に結合する能力を僅かではあるが測定可能な度合いで有する吸着剤である。この吸着剤は、タンパク質及びペプチド（例えば、シトクロムC、卵アルブミン、及び、アンギオテンシン）の非特異的吸着を全く示さないか又は極めて僅かしか示さないと同時に、高イオン強度（例えば、0.5 Mから3 MまでのNaCl濃度に相当するイオン強度）においてDMTr保護オリゴヌクレオチドに結合する能力を依然として有することが必要である。構造的に見た場合に、このことは、吸着剤が、疎水基に比較して過剰な親水基（例えば、アルコール性OH⁻、陰イオン交換基、オリゴ-及びポリエチレンオキシド基他）をその表面上に露出させなければならないことを意味する。

存在することが可能な疎水基の例は、芳香環を含むヒドロカルビル、及び/又は、直鎖、枝分れ、もしくは、環状アルキル基もしくは鎖である。

陰イオン交換基の例はアミノ基であり、特に、ジエチルアミノエチル基のような第三級アミノ基、並びに、トリアルキルアンモニウムアルキル基（例えば、トリメチルアンモニウムアルキル基、トリエチルアンモニウムアルキル基、及び、2-ヒドロキシエチルジエチルアンモニウムアルキル基）、ジアルキルアリアルアンモニウム-アルキル基（例えば、ジメチルアニリニウムアルキル基）、及び、環含有アンモニウム基（例えば、N-メチル（ピペリジニウム）-及びピリジニウムアルキル基）のような第四級アミノ基である。窒素を吸着剤に結合するアルキル基は、エチレンのような短アルキレン鎖であることが可能である。吸着剤の陰イオン交換基の個数は、本発明の方法にとって臨界的ではない。適切な度合いの非特異的吸着を有し、且つ、媒質1 mL当たり1 μmolから1,000 μmolまでの、好ましくは媒質1 mL当たり50 μmolから1,000 μmolまでの陰イオン交換基を有する陰イオン交換体を使用することが可能である。本発明に関する上記の一般ルールを考慮しながら、イオン交換能力と試料体積と吸着/脱保護/溶離条件との適切な組合せを見出すことは、当業者にとって困難なことではないだろう。

有効である可能性がある幾つかの吸着剤を、科学文献と特許文献に基づいて想定することが可能である。例えば、適切な陰イオン交換基及び疎水基がその上に付着させられている、架橋デキストラン、ポリアクリルアミド、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）及び他のポリメタクリレート、並びに、セルロース等を主成分とする水不溶性ポリマーから調製するクロマトグラフィー吸着剤である。場合によっては、こうした基体ポリマーが十分な疎水性を与える可能性もある。

こうした吸着剤は、上記親水性と陰イオン交換基を有するように上記ポリマーのいずれかで被覆することによって又はその表面上で誘導体化することによって親水性にしてある強疎水性基体マトリックス（例えば、ポリジビニルベンゼン及びポリスチレン（随意に、互いのコポリマーとして）、ポリエチレン、ポリプロピレン等）で構成されることも可能である。この場合には、適切な非イオ的に結合能力が、上記基体マトリックス自身又は上記誘導体化に由来することが可能である。

吸着剤は一般的に多孔性であり、粒子形態（例えば、ビーズ）であるか又は連続している（モノリス状）であることが可能である。粒子形態の吸着剤をを充填床又は流動床（膨張床（expanded beds））の形で使用することが可能である。

最適形態

優先日において最も好ましい吸着剤は、SOURCETM30Q（Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden）の名称で市販入手可能だった。この製造者によれば、この媒質は、剛性で、多孔性で、球形の単分散陰イオン交換体である。基体マトリックスは、ヒドロキシル基を含む架橋アルキルエーテルの層で被覆してあるポリスチレン/ジビニルベンゼンビーズで作られている。この陰イオン交換基は第四級タイプ（トリメチルアンモニウム）であり、親水性スパーサーアームを介して被覆に付着している。保護オリゴヌクレオチド（特に、その5末端位置に疎水基を有するオリゴヌクレオチド）に結合する能力は、塩基性ポリスチレン/ジビニルベンゼン基体マトリックスから、又は、親水性化の際に導入される基（例えば、アルキルエーテル基）から得られるだろう。

10

20

30

40

50

本発明の最適な形態では、そのリン酸基中の少なくとも1つの酸素が硫黄によって置き換えられているオリゴヌクレオチド類似体を精製する（ホスホロチオアート及びホスホロジチオアート）。

本発明のこの最適形態を、次の実験セクションで更に詳細に説明する。

実験セクション

試料：経路長1 cm、260 nmで測定した場合に4460光学密度単位(ODU)を有する25%アンモニア溶液35 mL。処理したオリゴヌクレオチドは、Oligo Pilot (R) DNA/RNA Synthesiser上で合成したホスホロチオアート25-merだった。全長生成物に相当する25-merの量は、粗材料の吸光度測定と毛管電気泳動とから推定した場合に2359 ODUであった。

カラムと吸着剤：媒質SOURCE™30Q (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)をHR16カラム(Pharmacia Biotech AB)の中に充填し、その結果として16 x 110 mmの充填床を得た。クロマトグラフィー手順の全てを、Bio Pilot (R) (クロマトグラフィーシステム、Pharmacia Biotech AB)上で行った。次の諸段階を次に示す順序で行った。

(1) 試料を上記カラム上に適用させ、その後で、カラムを2カラム体積(Cv)の10 mM NaOHで洗浄し、更に、2 x Cvの3.0 M NaCl (pH 12)で洗浄し、その後で、再び2 x Cvの10 mM NaOHで洗浄した。この段階では、非ジメトキシトリチル化欠陥配列を洗浄除去した。

(2) 溶離液が酸性pHとなるまで約3 x Cvの0.4%トリフルオロ酢酸で上記カラムを洗浄した後、そのカラムを20分間そのままにし、25-merから完全にDMTr基を開裂させた。その後で、10 mM NaOHを使用してカラムを塩基性pHに再平衡化した。

(3) 25-merを溶離させ、25 x Cvに亙って12の定pH値において0.8 M - 1.9 M NaClの直線NaCl勾配を使用することによって、より短い配列から更に精製した。各々10 mLのフラクションを集め、毛管電気泳動で分析した。全長生成物はそのオリゴヌクレオチド全体の92%を越える割合を占めるフラクションをプールした。

(4) 最後に、イソプロパノール中の2 M NaCl (30% (w/w))を2 x Cv使用することによって、カラムを清浄化した。

毛管電気泳動によって測定した時に98%の純度を有する生成物を収量66.37 mgで得たことが、上記プールの分析から明らかになった。全収率は76%だった。クロマトグラフィープロセスの完了に要した時間は3時間未満だった。

フロントページの続き

審査官 渡辺 仁

(56)参考文献 特開昭61-072797(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C07H 21/00

C07H 1/06