

Blockmer[®]を中間体とする オリゴヌクレオチドの合成

Synthesis of Oligonucleotides Using Blockmer[®] as an Intermediate

片岡 正典
Masanori Kataoka

株式会社ナティアス 代表取締役、
国立大学法人 神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科(客員教授)
Chief Executive Officer, NATIAS Inc.
Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University(Research Visiting Professor)

KEYWORD ▶ oligonucleotide APIs chemical synthesis block elongation

はじめに

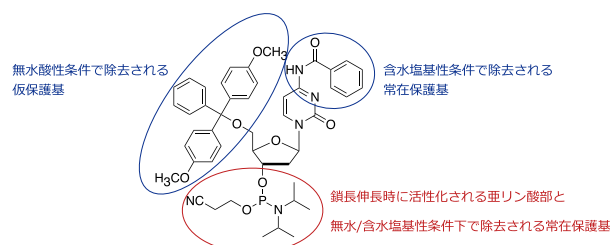
01

COVID-19の感染拡大による社会の変化により核酸の重要性が大きく増している。mRNAワクチンは最も有効なワクチンとして、real-timePCRやLamp法による遺伝子検査は信頼性の高い感染診断法として、ヌクレオチドアナログ薬はウィルス性疾患に対する最も効果の高い治療薬として、COVID-19の感染拡大の抑制に貢献し、with/postコロナ社会においても引き続き核酸の需要が伸びると予想されている。

ところで、mRNAのような数千塩基長の長鎖核酸の場合は酵素法で合成されるが、数十から百塩基程度のオリゴヌクレオチドは化学合成法で合成される。オリゴヌクレオチドは、核酸医薬品やPCR用プライマー/プローブ、コンパニオン薬、ゲノム編集用 guide RNA、核酸系アジュバントなどその応用範囲が広く、大きな市場を形成している。

オリゴヌクレオチドの化学合成においては、ヌクレオチド 3'-ホスホロアミダイトモノマーと呼ばれるモノヌクレオチドをビルディングブロックとして、任意の配列を自動合成装置に入力することで合成される。モノヌクレオチドをビルディングブロックとする合成法は1976年にLetsinger博士によるホスファイト法の発表¹⁾に端を発し、1981年にCaruthers博士がホスホロアミダイト法²⁾に発展させ、1984年にKöster博士がホスホロアミダイト原料の保護基をDMTr基、2-シアノエチル基、アシル基とすることで再現性良く核酸を合成できることを示し³⁾、ビルディングブロックの構造が固定された(図1)。現在では3'、5'両末端への官能基の導入や核酸塩基部やリボース部の化学修飾にも対応したホスホロアミダイトモノマーが市販されており、複雑な構造のオリゴヌクレオチドの合成も可能となっている。

しかし、オリゴヌクレオチドの用途の拡大によりこれまで利用されてきたオリゴヌクレオチド合成法の課題が顕在化し、核酸市場の発展におけるボトルネックとなっている。本稿ではナティアスのオリゴヌクレオチド合成技術開発の取り組みについて紹介したい。



チミン 3'-ホスホロアミダイトモノマー

図1 構築単位(アミダイトモノマー)

Blockmer[®]の開発

02

オリゴヌクレオチドの製造上の課題は以下の通りであり、製造産業におけるQCDS(品質、コスト、納期、スケーラビリティ)全てにおいて顕在化している⁴⁾。

- (1) 多段階合成による多様な不純物の蓄積と不完全な除去
- (2) 原料・反応剤・溶媒の過剰使用、大量の廃棄物
- (3) バッチスケールの限界

上記問題を解決するための手段として複数のモノヌクレオチドが連結したものを原料/中間体とする手法がある。ペプチド合成においてはセグメント縮合法として知られ、核酸製造においてはKhoranaらによる初期のオリゴヌクレオチド合成において採用されていた⁵⁾。しかし、煩雑な操作と低い収率によりほとんど実用化に至らず、前述のように現在ではモノヌクレオチドを構築単位とする合成法でほとんどのオリゴヌクレオチドが合成されている。

オリゴヌクレオチド合成において実用化されている数量体ヌクレオチド中間体としては、三量体の構築単位が知られ⁶⁾、コドンに対応した29種の三量体中間体とその混合物が市販されている

(図2)。リン酸部の保護基をクロロフェニル基とすることで化学的に安定な三量体を完成させているが煩雑な操作の問題は完全に解決しておらず、ホスホロアミダイトモノマーと比べて非常に高価なため、使用者としては大量に購入することが難しい。

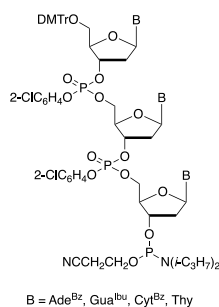


図2 コドンに対応した三量体原料

同様に、二量体中間体の市販が始まっているが、製造工程が煩雑であり、2-シアノエチル保護基は5価のリン酸エステルの中で不安定なことから、オリゴヌクレオチドの原料として求められる純度98%の二量体中間体は入手が困難であり、提供される配列も限定される(図3)。オリゴヌクレオチドの内製を目的とした数量体ヌクレオチド中間体の論文もあるが⁷⁾、いずれも不安定な2-シアノエチルホスフェート構造に基づいて設計されるため、煩雑な操作と純度の問題が解決していない。

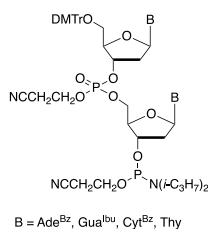


図3 2-シアノエチルホスフェート型二量体原料

一方で、ナティアスが製造する数量体ヌクレオチド中間体はBlockmer[®]という商品名で2-8量体が数百mgから数百gまで様々なスケールで販売されている^{8, 9)}。Blockmer[®]は化学的に安定な構造を有しており、主に固相合成での利用を想定したリン酸部が三価の亜リン酸エステルで構成される2-シアノエチルホスファイト型、主に液相合成での利用を想定してアリル保護基を採用するアリルホスフェート型、立体制御されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチド合成の原料となる光学活性型や加熱によって除去される熱除去型まで、用途に応じてBlockmer[®]の構造を選択できる(図4)。

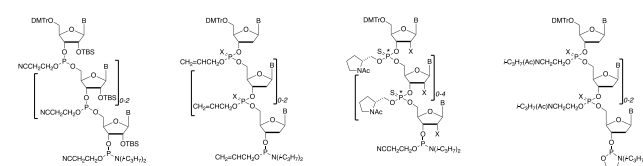


図4 ナティアス社から市販されるBlockmer[®]原料

CE-Blockmer[®]の固相法での利用

03

2-シアノエチルホスファイト型のBlockmer[®](CE-Blockmer[®])は固相法を採用する自動合成装置の利用を想定して開発された。リン酸部の保護基として広く利用される2-シアノエチル基は、前述の通りリン酸エステル中では容易に遊離し、三量体の0.05 mol/Lアセトニトリル溶液での半減期は約1日であることから自動合成装置での使用は制限される。一方、ナティアスのCE-Blockmer[®]はより安定なホスファイトを採用し、0.05 mol/Lアセトニトリル溶液での半減期は約7日であることから、百量体を越える中鎖オリゴヌクレオチド合成など、長時間を要する合成や合成スケジュールの変更など柔軟に対応できる¹⁰⁾。アモルファス状態の三量体CE-Blockmer[®]は-30℃で2年以上酸化/分解することなく保管できる。二量体、三量体の天然型リボヌクレオチド(DNA, RNA)のほか、種々の修飾ヌクレオチド(2'-OMe, 2'-OMOE, 2'-F, LNA)の供給が可能となっている。

CE-Blockmer[®]の合成は核酸塩基がアシル基で保護された5'-O-DMTrヌクレオチドを原料とし、リン酸化剤により系中でホスホロアミダイトモノマーに変換した後、系中で3'-O-アシルヌクレオチド¹¹⁾と反応させることによりヌクレオチド二量体を得る。弱塩基性条件下でアシル基を除去した後、再生された3'-水酸基をリン酸化剤によりホスホロアミダイトとし、同様の操作を繰り返すことにより三〜五量体のホスホロアミダイトに変換する。必要に応じて順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーをおこない、純度98%以上のCE-Blockmer[®]を得る(図5)。5'-水酸基の保護基をシリル系保護基とした原料を使用することで、5'-水酸基を鎖長伸長前に再生可能となる。これによって得られる5'-OH Blockmer[®]とCE-Blockmer[®]と反応させることにより四〜十量体のCE-Blockmer[®]を合成することも可能である。全工程を液相中でおこない、都度順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー

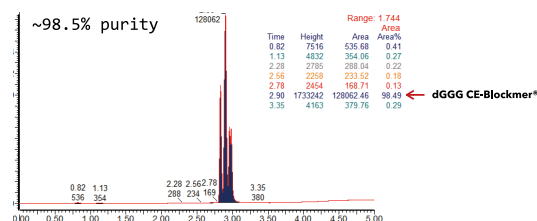


図5 CE-Blockmer[®]原料

を使用して精製する。ホスホロアミダイト化したBlockmer®の精製においては関東化学社等から市販されている低金属シリカゲルを使用することで、ホスホロアミダイトBlockmer®の純度は向上する。CE-Blockmer®の製造プロセスは日東電工社や塩野フィネス社と協力して最適化し、通算収率は大きく向上した(図6)¹²⁾。dGGGのように固相法で合成が困難な配列についてもBlockmer®は純度よく得られ、複数の修飾ヌクレオシドが含まれていても、問題なく製造できる。8種について製造経験があり、各Blockmer®間で製造条件の調整は必要なかった(図7)。

自動合成装置でCE-Blockmer®を使用する際の縮合条件は鎖

長によって異なり、二量体はホスホロアミダイトモノマーと同程度であるが、三量体は長時間を要する。縮合生成物の構造はホスホロアミダイトモノマーを用いる場合と等価であることから、キャッピング、酸化/硫化、脱トリチル化は条件を変更する必要はないが、三量体を使用して数百mg以上のスケールで合成をおこなう場合は酸化/硫化工程を2回実施するとより安定した結果が得られる(図8)。脱保護工程も条件を変更する必要は無い。

三量体CE-Blockmer®を使用した予備的な固相合成試験において、製造が困難とされるポリA配列のオリゴヌクレオチドを標的として実施した。日本テクノサービス社の協力の下におこなった

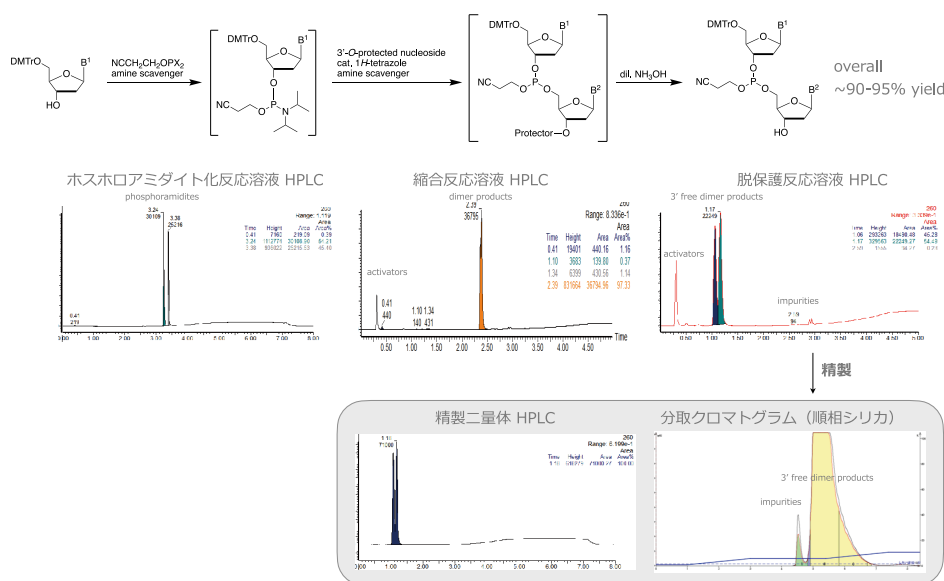


図6 CE-Blockmer®合成経路

8 modified Blockmers have been prepared.

dA ^F G	rA ^{OTBS} U ^{OTBS} C ^{OTBS}
dC ^F A ^{OMe} G ^{OMe}	dC ^F A ^{OMe} U ^{OMe}
dC ^F G ^{OMe} G ^{OMe}	dU ^F G ^{OMe} A ^{OMe}
dU ^F U ^F U ^F	dG ^L U ^L G ^L U ^L

Custom Blockmers can be ordered (lead : me: 2-4 weeks).

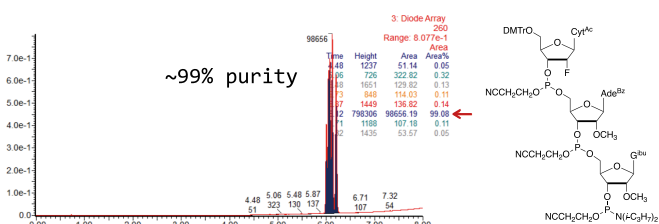


図7 修飾ヌクレオシド含有CE-Blockmer®原料

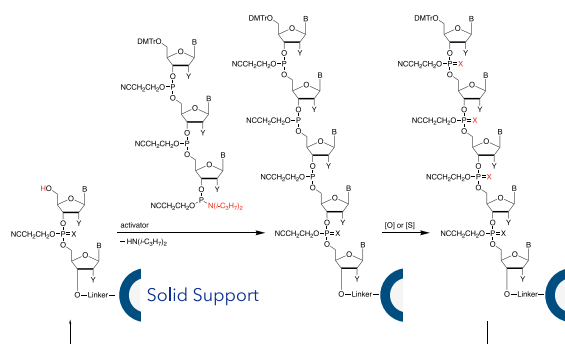


図8 Blockmer®を使用する鎖伸長サイクル

本試験では縮合時間をホスホロアミダイトモノマーと同じメソッドで実施したことから、縮合収率は低いものの、目的鎖長から3の倍数分短い不純物のみが確認された (図9)。

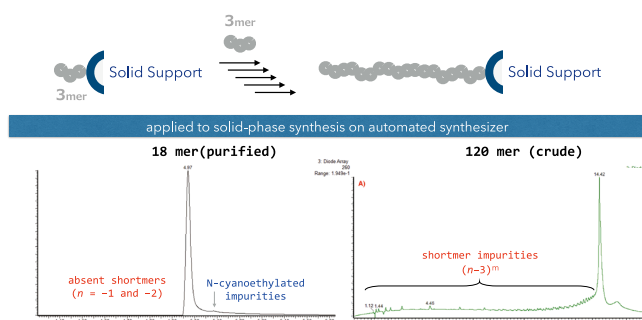


図9 CE-Blockmer®のみで鎖長伸長するオリゴヌクレオチドの固相合成

CE-Blockmer®を固相合成に使用する最も効率的な方法として、目的鎖長から使用するBlockmer®の鎖長を引いた鎖長までホスホロアミダイトモノマーを使って鎖長伸長し、最終工程にBlockmer®を使用して目的鎖長まで伸長することを提案したい。この方法では本質的にn-1およびn-2の短鎖不純物の生成を抑制し、精製負荷を下げることができる。例えば、二十量体合成において、十七量体までをモノマー原料、最終工程に三量体Blockmer®を使用することで 目的鎖長のオリゴヌクレオチドが得られる (図10)。

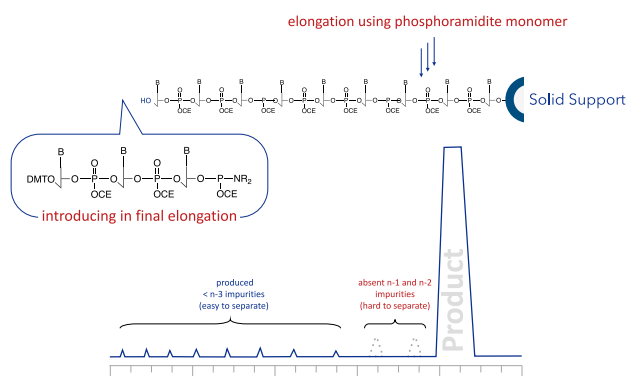


図10 Blockmer®原料を使用するオリゴヌクレオチドの固相合成

この方法で合成した硫化オリゴヌクレオチド二十一量体の精製例を示す (図11)。このサンプルは合成後に固相抽出で簡易精製をしたものであるが、簡易精製でも十分に純度の高いオリゴヌクレオチドが得られることがわかる。核酸医薬品で汎用される硫化されたオリゴヌクレオチド二十四量体のBlockmer®使用合成品と市販のHPLC精製品を比較したところ、Blockmer®使用合成品では短鎖不純物はほとんど存在しないのに対し (図12上)、市販のHPLC精製品はn-1, n-2鎖長の短鎖不純物をはじめとする多くの不純物が混在する (図12下)。

また、RNA 合成用の二量体リバー型CE-Blockmer®を使用することで、百量体を越える鎖長であっても純度良く得ることが

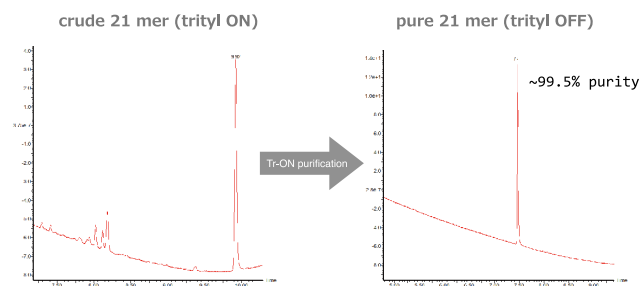


図11 Blockmer®原料で合成したオリゴヌクレオチドの簡易精製

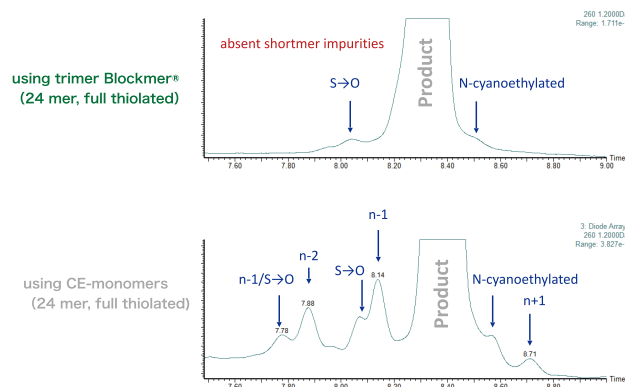


図12 精製オリゴヌクレオチドの純度比較

できる^{10, 13)}。二量体を原料とすることで鎖長伸長サイクル数が100超から半分の約50に削減できることから合成上のリスクが低減する。五量体を原料とすれば約20サイクルとなり、二十量体合成と同等の工程で百量体を越えるオリゴヌクレオチドの合成が可能となるが、準備すべきBlockmer®数が著しく増加するため、不特定の配列を並列合成するような用途では現実的ではない。ナティアスでは固定された配列の数種のオリゴヌクレオチドを大量に製造する際に限定して実施している。また、合成された百量体のHPLC において、メインピーク中のMS 分析で短鎖不純物はほとんど含まれていないことが明らかとなり、Blockmer®の有効性が示された (図13)。

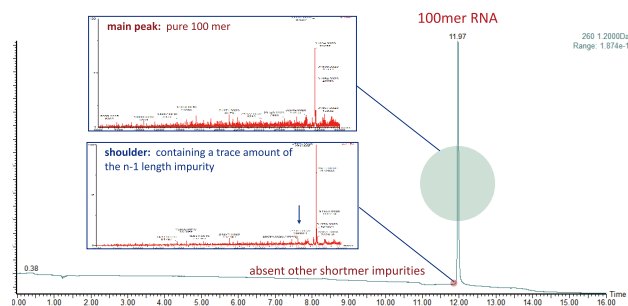


図13 百量体オリゴヌクレオチドの純度比較

AL-Blockmer®の液相法での利用

04

オリゴヌクレオチドの化学合成において、製造コストとスケラビリティを改善するための方策として液相法の採用が直接的であると考えられる⁴⁾。しかし、二十量体合成においては100工程を越える多段階となり、操作が煩雑となる液相合成の課題も強調される。1993年にBonora博士によってポリエチレングリコールを可溶化担体とする効率的液相合成法が発表され¹⁴⁾、液相法の煩雑性を低減することが可能となった。この方法では片末端がメチル基でキャップされたポリエチレンオキシドコハク酸モノエステルをヌクレオシドの3'に結合させ、ホスホロアミダイトモノマーを原料に鎖長伸長する(図14)。合成過程でヌクレオチド中間体は反応溶媒に溶解しており、各工程で沈殿化あるいはゲル濾過により中間体を精製することで煩雑性を緩和しているが、操作性の大きな改善には繋がらなかった。その後東京農工大の千葉博士がポリ脂質系担体を開発するなど、様々な可溶化担体が開発されてきたが¹⁵⁾、未だ製造コストと生産性の大きな改善に至っていない⁴⁾。

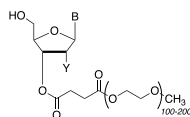


図14 ポリエチレングリコールを結合させたヌクレオシド

可溶性担体はオリゴヌクレオチド合成のコスト問題を解決するための1つの手段として一定の効果を示したが、製造上の諸問題を解決するためには多面的なアプローチが必須である。筆者は1997年に八量体のオリゴヌクレオチドの液相合成を発表している¹⁶⁾。テトラゾール活性化剤を触媒量使用してリン酸部がアリル保護された八量体中間体を合成し、これらがジクロロメタン-アセトニトリル溶液に可溶であることを示した。リン酸部がアリル保護された八量体Blockmer®が液相で合成可能であり、順相シリカゲルで精製可能であることを知識として保有しており、従来はモノマー原料に導入されていた可溶化担体を保護八量体に導入し、これを基点に鎖長伸長することを計画した。可溶化担体候補を安価な市販品を中心にスクリーニングした結果、フルオラスケミストリーで利用される炭素数6-8のポリフッ化アルキルアルコール(Ftag、図15)が最適であり、これを導入した八量体Blockmer®の有機溶媒に対する高い溶解性とシリカゲル薄層クロマトグラフィーでスミアすることなく検出されることが明らかとなった(図16)。

アリル保護されたヌクレオチド中間体(AL-Blockmer®)はCE-Blockmer®と異なり5価のリン酸型がより安定である¹⁷⁾。AL-Blockmer®は有機溶媒中で極めて安定であることから、有機溶媒中に長時間滞留する必要がある液相合成において有用である。合成はCE-Blockmer®と同様のプロセスで実施可能であり、四量体、八量体はより簡便に合成できる。核酸塩基がアシル基

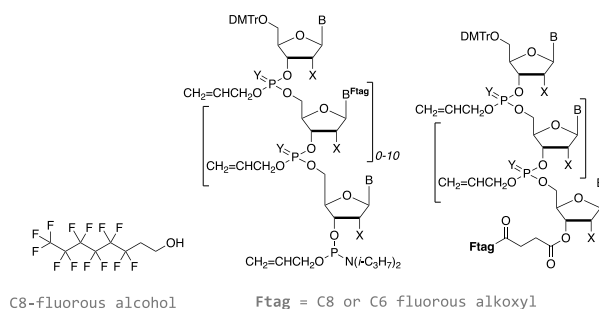


図15 フルオラスタグ化AL-Blockmer®

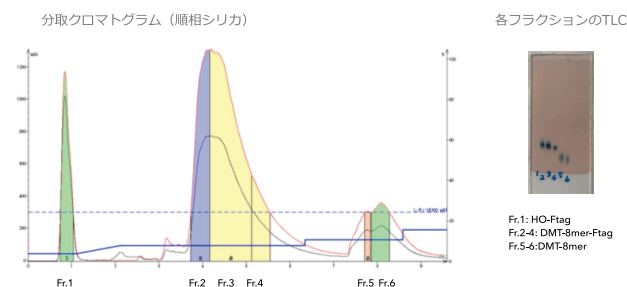


図16 フルオラスタグを導入した八量体AL-Blockmer®の順相シリカゲル精製

で保護された5'-O-DMTrヌクレオシドを原料とし、リン酸化剤により系中でホスホロアミダイトモノマーに変換した後、系中で3'-O-アシルヌクレオチドと反応させることによりヌクレオチド二量体を得て、位置選択的な脱保護をおこない、同様の操作を繰り返すことにより四量体、八量体AL-Blockmer®を得る。必要に応じて順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーをおこない、5'末端あるいは3'末端にFtagやシリル系保護基、DMTr基などが導入されたAL-Blockmer®を95%以上の純度で得ることができる(図17)。

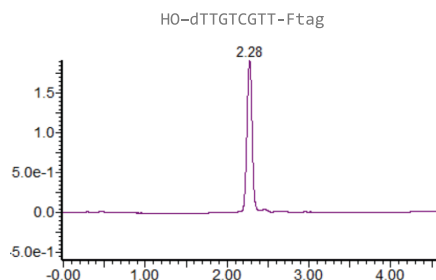


図17 フルオラスタグを導入した八量体AL-Blockmer®のHPLC図

液相法の優位点の一つとして反応のモニタリングが挙げられる。固相法では固体に担持されたヌクレオチド中間体の生成過程を正確にモニタリングすることは困難である一方、液相法ではLC-MS等を利用して簡便に反応溶液の経時変化を追うことが可能である。

ナティアスでは、AMEDの支援を受けて、24量体のオリゴヌクレオチドCpG ODN 2006の1kg製造試験を実施した。3'末端

にFtagが導入された八量体AL-Blockmer®を基点にホスホロアミダイト八量体AL-Blockmer®を用いて2回鎖長伸長をおこなうことで、CpG ODN 2006を簡便な操作で得ることができた。原料コストは固相法の10分の1以下であり、AL-Blockmer®を原料とする液相Block-elongation Systemの高いコスト/エネルギーパフォーマンスが示された（図18）。純度に関しては向上の余地を残しており、ナティアスでは液相法の改良を継続研究している。

今後の展開

05

ナティアスのBlockmer®を原料とするオリゴヌクレオチド合成が、固相法と液相法のいずれにおいても有効で、合成されるオリゴヌクレオチドの品質向上と製造コスト削減に大きく寄与することが実証された。

残す課題は2点。適用鎖長の限界に関して、Ftagを核酸塩基に導入した八量体Blockmer®を用いて液相、固相における合成鎖長の限界を確認したところ、固相合成においては240量体、液相合成においては128量体まで合成可能であることが明らかとなった。さらに長鎖オリゴヌクレオチドの合成に向けては固相担体の開発とオリゴヌクレオチド中間体の有機溶媒に対する溶解性の改善が必要となる。

スケーラビリティの課題に対しては、液相法を発展させたフ

ロー合成の運用を進めている。十量体Blockmer®の安定製造が可能となったいま、フロー合成技術への展開は容易に想像できるであろう。5'末端にFtagが導入された3'-ホスホロアミダイト十量体Blockmer®と3'末端にFtagが導入された十量体Blockmer®の混合液と活性化剤溶液を送液/混合することで縮合反応をおこない、流路に脱保護液を注入することにより二十量体オリゴヌクレオチドを得る生産機を整備した。バッチスケール100kg超のGMP準拠製造施設として2023年秋からの商用生産を計画している。モニタリングには質量分析検出器と³¹P NMRを採用しているが、NIRやUV-VIS、ラマン分光等の導入も予定する。この製造工程で得られる粗生成物溶液はさらにインラインで連続精製、ダイアフィルトレーションを経てスプレードライヤによる粉末化によって完全封じ込めされた連続生産装置となる（図19）。この連続生産装置の開発は中小企業庁の支援を受けてアカデミアと共同で進めている。オイル化したBlockmer®による無溶媒鎖長伸長法やエステル交換型鎖長伸長反応も知財化を進めており、近い将来、オリゴヌクレオチドの連続生産がナティアスによって実現すると確信する。

1 kg ODN synthesis	Conventional Method	Block-elongation System
	solid phase	liquid phase
Solvent Wastes	8,000L	60L (started from 8 mer) 120L (started from 4 mer)
Purity	90~95%	~98%
Production Time	7 days	4 days
Length	24 mer	24 mer

図18 製造法比較

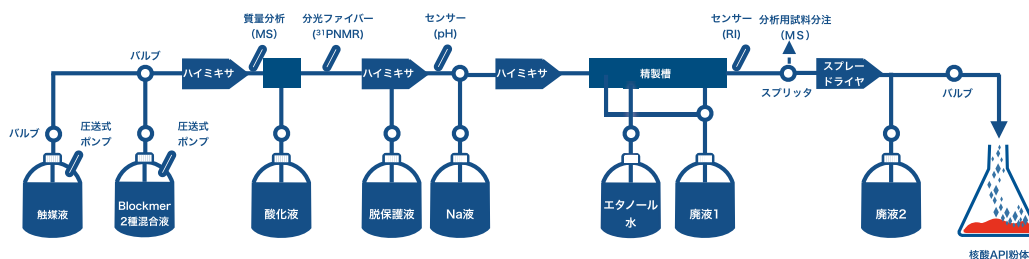


図19 フロー式核酸連続生産装置概略

参考文献

1. R. L. Letsinger, and W. B. Lunsford. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 12, 3655-3661.
2. S. L. Beaucage, and M. H. Caruthers. Deoxynucleoside phosphoramidites-A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 20, 1859-1862.
3. H. Köster, and N. D. Sinha. Process for the preparation of oligonucleotides. United States Patent, 4,725,677(1984).
4. A. G. Molina, and Y. S. Sanghvi. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry.* 2019, 77, 1, 1-17.
5. H. G. Khorana. Total Synthesis of the Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast. *Nature.* 1970, 227, 27-34.
6. A. L. Kayushin, M. D. Korosteleva, A. I. Miroshnikov, W. Kosch, D. Zubov, and N. Piel. A Convenient Approach to the Synthesis of Trinucleotide Phosphoramidites-Synthons for the Generation of Oligonucleotide/Peptide Libraries. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 19, 3748-3755.
7. X. Zhou, W. F. Kiesman, W. Yan, H. Jiang, F. D. Antia, J. Yang, Y. A. Fillon, L. Xiao, and X. Shi. Development of Kilogram-Scale Convergent Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* 2022, 87, 4, 2087-2110
8. NATiAS Inc. <https://www.natias.co.jp/index.php/en/blockmer-3/> (参照 2023-05-02)
9. 株式会社ナティアス．立体制御オリゴヌクレオチド合成用光学活性セグメントおよびその製造方法、ならびにそれを用いた立体制御オリゴヌクレオチドの合成方法．特許 第 7075681 号，優先日 20180502.
10. 片岡 正典，オリゴヌクレオチド合成用セグメントおよびその製造方法、ならびにそれを用いたオリゴヌクレオチドの合成方法．特許 第 7075680 号，優先日 20180502.
11. Jiří Smrč. 3'-O-Formyl-(N-acyl)-2'-deoxyribonucleosides as building units in the synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1982, 47, 8, 2157-2169.
12. M. Iwamoto, and M. Kataoka. Method for producing oligonucleotide. WO2021080021A1(2020).
13. M. Kataoka, Y. Tsuji, and C. Fukui, US Prov. Appl. No. 63/499274(2023)
14. G. M. Bonora, G. Biancotto, M. Maffini, and C. L. Scremin, Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 5, 1213-1217.
15. (a) K. Chiba, Y. Kono, S. Kim, K. Nishimoto, Y. Kitano, and M. Tada. A liquid-phase peptide synthesis in cyclohexane-based biphasic thermomorphic systems. *Chem. Comm.* 2002, 16, 1766-1767. (b) S. Kim, A. Tsuruyama, A. Ohmori, and K. Chiba. Solution-phase oligosaccharide synthesis in a cycloalkane-based thermomorphic system. *Chem. Comm.* 2008, 15, 1816-1818. (c) D. Takahashi, and T. Yamamoto. Development of an efficient liquid-phase peptide synthesis protocol using a novel fluorene-derived anchor support compound with Fmoc chemistry; AJIPHASE®. *Tetrahedron Lett.* 2012, 53, 15, 1936-1939.
16. Y. Hayakawa, and M. Kataoka. Preparation of Short Oligonucleotides via the Phosphoramidite Method Using a Tetrazole Promoter in a Catalytic Manner. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 49, 11758-11762.
17. M. Kataoka, Segment for oligonucleotide synthesis, Production method for same, and oligonucleotide synthesis method using same. WO2019/212061(2020).