

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成30年3月8日 (2018.3.8)

【公表番号】特表2017-512774(P2017-512774A)

【公表日】平成29年5月25日 (2017.5.25)

【年通号数】公開・登録公報2017-019

【出願番号】特願2016-557214(P2016-557214)

【国際特許分類】

C 0 7 H 19/06 (2006.01)

C 0 7 H 19/16 (2006.01)

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 0 7 H 19/06 Z N A

C 0 7 H 19/16

C 0 7 H 21/04 A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年1月29日 (2018.1.29)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 8】

アミノ L N A - T とそのオキソ類似体 L N A - T との比較は、アミノ L N A - T が、その相補体に対する安定性が L N A - T よりも低いことを示している。同様に、アミノ E N A - T は、そのオキソ類似体のものよりも非常に低い二重鎖安定化効果を有するようである。驚くべきことに、アミノ C B B N - T とそのオキソ C B B N - T 類似体との比較は、アミノ C B B N 修飾がオキソ C B B N - T よりも 2 ~ 4 / 修飾だけ有意に安定にすることを示している（表 3 および図 3 B を参照のこと）。理論に縛られるものではないが、L N A の 2' - O（プロトン受容体）は、アミノ L N A の場合のように、それを 2' 位でプロトン供与体により置換する場合よりも、二重鎖水和および安定性に対する安定化効果が高いと仮定する。反対に、アミノ C B B N は、そのオキソ C B B N 類似体よりも、二重鎖水和および安定性に対するプラス効果がかなり高いようであり、いかなる他の 2' 4' - 炭素 - 架橋二環式ヌクレオチドにおいても見られない T m の増強を提供する（図 3 A および 3 B を参照のこと）。

【表 3】

表 3

アミノ/CBBN, PS 骨格10101様 T _m 研究, RNA 相補体						
オリゴ #	オリゴ名	配列	T _m	ΔT _{m, 親}	ΔT _m /修飾	
10101	208a_10101	ICs;dTs;dTs;dTs;ITs;ITs;dGs;ICs;dTs;ICs;GsdTs;ICs;dTs;ITs;IA	86.7	NA	NA	
11919	208a_10101_2アミノ/CBBN_PS	ICs;dTs;dTs;dTs;dTs;abTs;abTs;dGs;ICs;dTs;ICs;GsdTs;ICs;dTs;ITs;IA	80.04	-6.66	-6.66	
11920	208a_10101_1アミノ/CBBN_PS	ICs;dTs;dTs;dTs;dTs;ITs;ITs;dGs;ICs;dTs;ICs;GsdTs;ICs;dTs;abTs;IA	85.125	-1.575	-0.7875	
アミノ-ヌクレオシド, リン酸骨格 T _m 研究, RNA 相補体						
	DNA_9mer_PO_3LNA-T	dG;IT;dG;dA;IT;dA;IT;dG;dC	50	NA	NA	
	DNA_9mer_PO_3アミノ/LNA-T	dG;aIT;dG;dA;aIT;dA;aIT;dG;dC	47	-1	-1	
10930	208a_1CBBN_DNA_PO	dC;dT;dT;dT;dT;dT;dG;dC;bT;dC;dG;dT;dC;dT;dA	58.3	NA	NA	
11915	208a_1アミノ/CBBN_DNA_PO	dC;dT;dT;dT;dT;dT;dG;dC;abT;dC;dG;dT;dC;dT;dA	62.0	+3.7	+3.7	

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0153】

DMTr - aC (Bz) (tfa) アミダイト (58)

DMTr - aC (Bz) (tfa) (0.35 g、0.45 mmol) を計量して、攪拌棒およびセプタムシールを有する 100 mL 丸底フラスコに入れた。フラスコに DCM (7 mL) および 2 - シアノエチル N, N, N', N' - テトライソプロピルホスホルジアミダイト (0.27 g、0.89 mmol) を充填した。4, 5 - ジシアノイミダゾール (53 mg、0.45 mmol) を一度に添加し、反応混合物を一晩攪拌した。反応混合物を DCM (40 mL) で希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (2 × 20 mL) およびブライン (1 × 10 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過し、濃縮した。残留物を TEA 処理した 25 g Biota ge SNAP カラムにアプライし、9 カラム容量のヘキサン中 30 ~ 100 % 酢酸エチル勾配で溶出した。生成物を含む画分を合わせて、白色の泡状物質として DMTr - aC (Bz) (tfa) アミダイト (0.38 g、86 %) を得た。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

2' C - 架橋二環式ヌクレオシドまたはヌクレオチドの アノマーを生成するための方法であって、

a) 核酸塩基をグリコシル化する工程であって、グリコシル供与体が、保護されたアルキルヒドロキシまたはアルキルアミンをその 2' 位に含有する、工程と、

b) 該グリコシル基の 2' 位および 4' 位で環化する工程とを含む、方法。

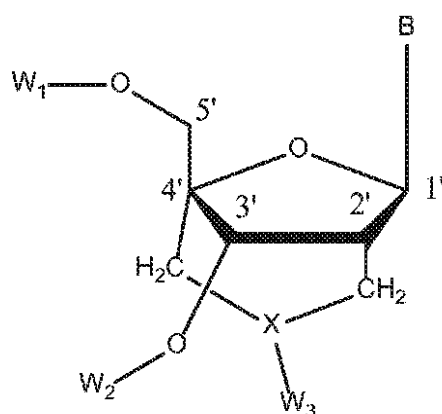
(項目 2)

前記 2' C - 架橋二環式ヌクレオシドまたはヌクレオチドの前記 アノマーを精製または回収する工程をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記 2' C - 架橋二環式ヌクレオシドまたはヌクレオチドが、式 I：

【化 4】



式 I

(式中、

X は N、S、または O から選択され、

W₁ および W₂ はそれぞれ、H、アルコール保護基、示されている O を含むリン酸エステル、示されている O を含むホスホロチオエートエステル、ジホスフェートもしくはトリホ

スフェート、またはホスホルアミダイトから独立して選択され、
 W_3 は、ヌル、H、O、アミン保護基、ホスホルアミダイト、XがNの場合にNを含むホスホルアミデートエステル、XがNの場合にNを含むホスホルジアミデートエステル、メチル、アルキル、シクロアルキル、カルボキサミド、糖、脂肪酸、他の分子コンジュゲート、 $-C_1(O)R$ 、もしくは $-COOR$ から独立して選択され、ここで、Rは、アリール、直鎖状、分岐状もしくは環状アルキルもしくはアルケニル、糖、脂肪酸、または他の分子コンジュゲート、例えば薬物コンジュゲートであり、

Bは核酸塩基である)

の構造を有するかまたはそのホスホルアミダイトである、項目1に記載の方法。

(項目4)

XがNである、項目3に記載の方法。

(項目5)

XがSである、項目3に記載の方法。

(項目6)

XがOである、項目3に記載の方法。

(項目7)

前記核酸塩基がプリンである、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記核酸塩基が、アデニン、グアニン、またはその誘導体である、項目7に記載の方法

。

(項目9)

前記核酸塩基がピリミジンである、項目1から6のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記核酸塩基が、チミン、シトシン、もしくはウラシル、またはその誘導体である、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記核酸塩基が過シリル化されている、項目1から10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記アルコール保護基が、4,4'-ジメトキシトリチル、エステル、シリル、または酸不安定エーテルから選択される、項目3から11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記アミン保護基が、カルボベンジルオキシ(Cbz)、p-メトキシベンジルカルボニル(MozまたはMeOZ)、tert-ブチルオキシカルボニル(BOC)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(FMOC)、アセチル(Ac)、ベンゾイル(Bz)、ベンジル(Bn)、またはトリフルオロアセチル(tfa)から選択される、項目3から11のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記グリコシル供与体が、アセチル保護されたメチルヒドロキシをその2'位に含有し、前記環化する工程が、アミン、マスクされたアミンまたは保護されたアミンで該ヒドロキシを置換し、該2'位および4'位を環化することを含む、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記グリコシル供与体が、保護されたメチルアミンまたはマスクされたメチルアミンをその2'位に含有し、前記環化する工程が、該2'位の保護されたメチルアミンまたはマスクされたメチルアミンおよびその4'位を直接環化することを含む、項目1から13のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記グリコシル供与体が、保護されたメチルヒドロキシまたはマスクされたメチルヒドロキシをその2'位に含有し、前記環化する工程が、該ヒドロキシをチオール、マスクされたチオールまたは保護されたチオールで置換し、該2'位および4'位を環化すること

を含む、項目 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 17)

前記グリコシル供与体が、アセチル保護されたメチルヒドロキシをその 2' 位に含有し、前記環化する工程が、該ヒドロキシを脱アセチル化し、該 2' 位および 4' 位を環化することを含む、項目 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

前記グリコシル供与体が、アルコール保護基をその 3' 位に含有する、項目 1 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 19)

前記アルコール保護基がエーテルである、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記アルコール保護基が熱および酸安定性である、項目 18 に記載の方法。

(項目 21)

前記アルコール保護基が、4, 4'-ジメトキシトリチル、アセチル、シリル、ベンジル、置換ベンジルまたは不安定エーテルから選択される、項目 18 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 22)

前記グリコシル供与体が、置換されていてもよいペントースである、項目 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 23)

前記グリコシル供与体が、リボース、アラビノースまたはグルコース由来のものである、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記グリコシル化する工程が、50%を超える アノマー収率をもたらす、項目 1 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 25)

前記グリコシル化する工程が、7:3 を超える、8:2 を超える、または 9:1 を超える アノマー比をもたらす、項目 24 に記載の方法。