

【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 1 部門第 1 区分
【発行日】 令和 4 年 10 月 4 日 (2022.10.4)

【国際公開番号】 WO2020/071407
【出願番号】 特願 2020-550483 (P2020-550483)
【国際特許分類】

C 1 2 N 15/10(2006.01)

C 1 2 N 15/113(2010.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/10

Z

C 1 2 N 15/113

Z Z N A

C 1 2 N 15/113 1 2 0 Z

C 1 2 N 5/10

10

【手続補正書】

【提出日】 令和 4 年 9 月 26 日 (2022.9.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

20

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的遺伝子の発現を抑制するヘアピン型一本鎖 RNA 分子の製造方法であって、

脱水縮合剤の存在下、緩衝液と親水性有機溶媒とを含む混合溶媒中で、下記式 (I) で表される第 1 の一本鎖オリゴ RNA 分子と下記式 (II) で表される第 2 の一本鎖オリゴ RNA 分子とを反応させる工程を含み、

$5' - Xc - Lx^1 \cdots (I)$

30

$Lx^2 - X - Y - Ly - Yc - 3' \cdots (II)$

【式 (I) 及び式 (II) 中、X、Xc、Y 及び Yc は、リボヌクレオチド残基からなり、Xc は、X と相補的であり、Yc は、Y と相補的であり、Ly は、非ヌクレオチド性リンカーであり、Lx¹ は、アミノ基を有する非ヌクレオチド性リンカーであり、Lx² は、カルボキシル基を有する非ヌクレオチド性リンカーであり、X-Y は、前記標的遺伝子に対する遺伝子発現抑制配列を含む】

前記脱水縮合剤は、トリアジン型脱水縮合剤、N-ヒドロキシ含窒素芳香環構造を含むウロニウム型脱水縮合剤、カルボジイミド型脱水縮合剤、2-ハロピリジニウム型脱水縮合剤、及びホルムアミジニウム型脱水縮合剤からなる群から選択され、

前記脱水縮合剤がカルボジイミド型脱水縮合剤の場合は、N-ヒドロキシ含窒素芳香族化合物又はシアノ (ヒドロキシイミノ) 酢酸エステルと組み合わせて使用し、

40

前記脱水縮合剤が 2-ハロピリジニウム型脱水縮合剤の場合は、N-ヒドロキシ含窒素芳香族化合物と組み合わせて使用し、

前記脱水縮合剤がホルムアミジニウム型脱水縮合剤の場合は、N-ヒドロキシ含窒素芳香族化合物又は N-炭化水素置換イミダゾール誘導体と組み合わせて使用する、ヘアピン型一本鎖 RNA 分子の製造方法。

【請求項 2】

前記リンカー Ly が、アミノ酸骨格又はアミノアルコール骨格を有する非ヌクレオチド性リンカーであり、前記リンカー Lx² が、アミノ酸骨格を有する非ヌクレオチド性リンカーである請求項 1 記載の製造方法。

50

チルピリジニウムヨージド、又はクロロ-N, N, N', N'-テトラメチルホルムアミジニウムヘキサフルオロホスファートであり、

前記N-ヒドロキシ含窒素芳香族化合物が、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールであり、

前記シアノ（ヒドロキシイミノ）酢酸エステルが、シアノ（ヒドロキシイミノ）酢酸エチルであり、

前記N-炭化水素置換イミダゾール誘導体が、N-メチルイミダゾールである、請求項1～7のいずれか一項記載の製造方法。

【請求項9】

前記脱水縮合剤と前記親水性の非プロトン性有機溶媒の組み合わせが、O-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファートとジメチルスルホキシドとの組み合わせ、O-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファートとN, N-ジメチルホルムアミドとの組み合わせ、N-（3'-ジメチルアミノプロピル）-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩と1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールとジメチルスルホキシドとの組み合わせ、又はクロロ-N, N, N', N'-テトラメチルホルムアミジニウムヘキサフルオロホスファートと1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールとジメチルスルホキシドとの組み合わせである、請求項7又は8のいずれか一項記載の製造方法。

【請求項10】

前記緩衝液のpHは、6.5～7.5である、請求項1～9のいずれか一項記載の製造方法。

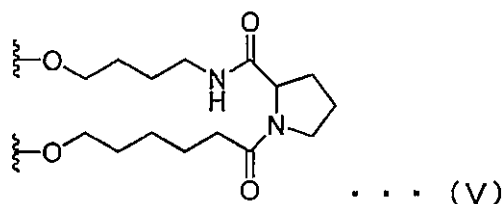
【請求項11】

L_yが、ピロリジン骨格又はピペリジン骨格を含む非ヌクレオチド性リンカーであり、L_x¹が、アミノ基を有する非ヌクレオチド性リンカーであり、L_x²が、カルボキシル基を有するピロリジン骨格及びピペリジン骨格の少なくとも一方を含む非ヌクレオチド性リンカーである、請求項1～10のいずれか一項記載の製造方法。

【請求項12】

L_yが、下記式（V）で表される、請求項1～11のいずれか一項記載の製造方法。

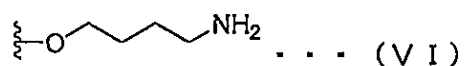
【化3】



【請求項13】

L_x¹が、下記式（VI）で表され、L_x²が、下記式（VII）で表される、請求項1～12のいずれか一項記載の製造方法。

【化4】



10

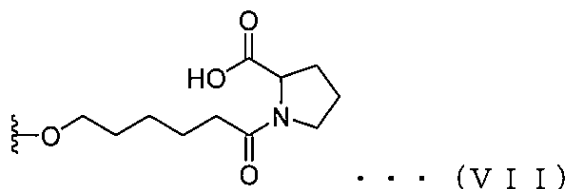
20

30

40

50

【化 5】



【請求項 14】

前記標的遺伝子は、TGF- β 1 遺伝子である、請求項 1～13 のいずれか一項記載の製造方法。

10

【請求項 15】

前記ヘアピン型一本鎖 RNA 分子は、配列番号 1 で表される塩基配列からなる、請求項 1～14 のいずれか一項記載の製造方法。

【請求項 16】

以下の (a) 又は (b) である、一本鎖オリゴ RNA 分子。

(a) 1 番目のリボヌクレオチド残基が Lx^2 と連結され、26 番目と 27 番目のリボヌクレオチド残基が Ly を介して連結されている配列番号 3 で表される塩基配列からなる一本鎖オリゴ RNA 分子

(b) 1 番目のリボヌクレオチド残基が Lx^2 と連結され、26 番目と 27 番目のリボヌクレオチド残基が Ly を介して連結されている配列番号 6 で表される塩基配列からなる一本鎖オリゴ RNA 分子

20

【請求項 17】

以下の (1) 又は (2) である、一本鎖オリゴ RNA 分子の組み合わせを含む、標的遺伝子の発現を抑制するためのヘアピン型一本鎖 RNA 分子の製造用のキット。

(1) 24 番目のリボヌクレオチド残基が Lx^1 と連結されている配列番号 2 で表される塩基配列からなる第 1 の一本鎖オリゴ RNA 分子と、1 番目のリボヌクレオチド残基が Lx^2 と連結され、26 番目と 27 番目のリボヌクレオチド残基が Ly を介して連結されている配列番号 3 で表される塩基配列からなる第 2 の一本鎖オリゴ RNA 分子の組み合わせ

(2) 22 番目のリボヌクレオチド残基が Lx^1 と連結されている配列番号 5 で表される塩基配列からなる第 1 の一本鎖オリゴ RNA 分子と、1 番目のリボヌクレオチド残基が Lx^2 と連結され、26 番目と 27 番目のリボヌクレオチド残基が Ly を介して連結されている配列番号 6 で表される塩基配列からなる第 2 の一本鎖オリゴ RNA 分子の組み合わせ

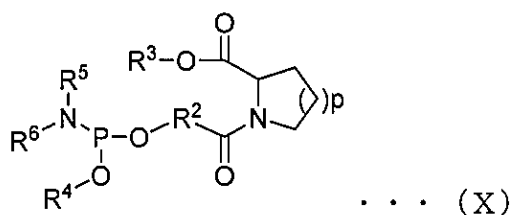
30

【請求項 18】

下記の i) 一般式 (X)、又は ii) 一般式 (X') で示される、アミダイト。

i) 一般式 (X) :

【化 6】



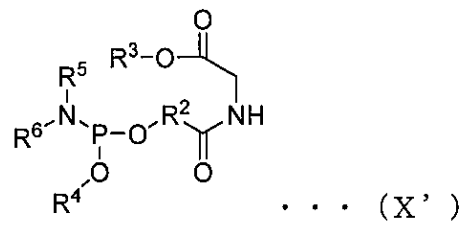
40

[式中、p は、1 又は 2 であり、 R^2 は、置換されていてもよいアルキレン鎖であり、 R^3 は、カルボン酸保護基であり、 R^4 は、電子吸引基で置換されたアルキル基であり、 R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して、アルキル基であり、同一でも異なってもよい。]

ii) 一般式 (X') :

50

【化 7】



10

〔式中、R²は、置換されていないアルキレン鎖であり、R³は、カルボン酸保護基であり、R⁴は、電子吸引基で置換されたアルキル基であり、R⁵及びR⁶は、それぞれ独立して、アルキル基であり、同一でも異なってもよい。〕

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

202007140700001.app

20

30

40

50