

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7235512号
(P7235512)

(45)発行日 令和5年3月8日(2023.3.8)

(24)登録日 令和5年2月28日(2023.2.28)

(51)国際特許分類

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

F I

C 0 7 H 21/04

A

請求項の数 20 (全63頁)

(21)出願番号 特願2018-567264(P2018-567264)
 (86)(22)出願日 平成29年6月22日(2017.6.22)
 (65)公表番号 特表2019-518778(P2019-518778
 A)
 (43)公表日 令和1年7月4日(2019.7.4)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/038643
 (87)国際公開番号 WO2017/223258
 (87)国際公開日 平成29年12月28日(2017.12.28)
 審査請求日 令和2年6月18日(2020.6.18)
 (31)優先権主張番号 62/354,433
 (32)優先日 平成28年6月24日(2016.6.24)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 398050098
 バイオジエン・エムエイ・インコーポレ
 イテッド
 Biogen MA Inc.
 アメリカ合衆国02142マサチューセ
 ッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリー
 ト225番
 (74)代理人 100118902
 弁理士 山本 修
 (74)代理人 100106208
 弁理士 宮前 徹
 (74)代理人 100120112
 中西 基晴
 (74)代理人 100188374
 弁理士 一宮 維幸

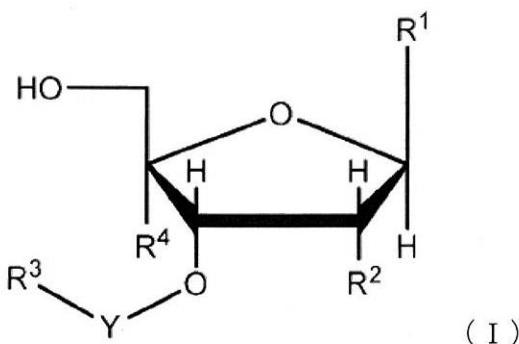
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キャッピング工程を有さないチオール化オリゴヌクレオチドの合成

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

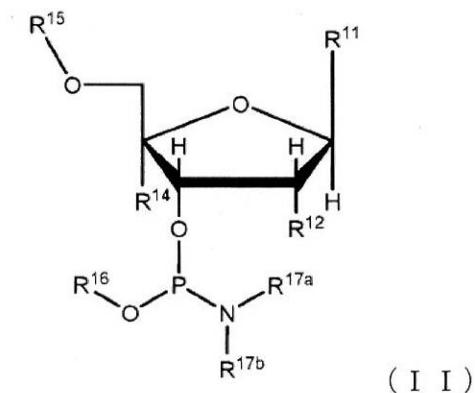
オリゴヌクレオチドを調製するためのプロセスであって

a)式(I)の化合物：

【化1】

を式(II)の化合物：

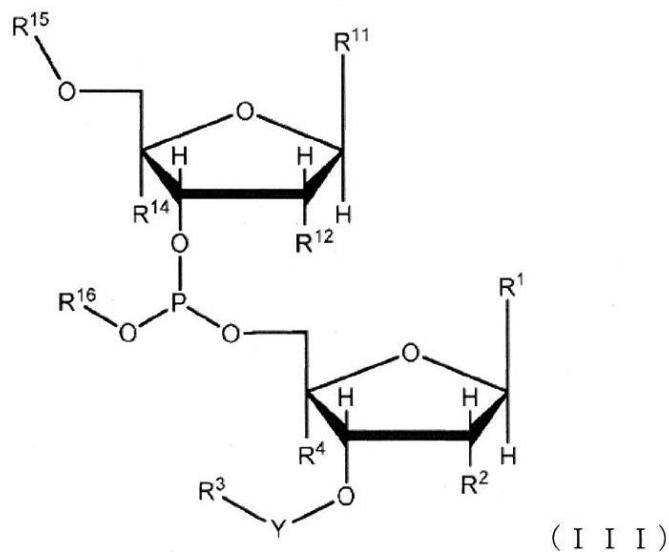
【化 2】



10

と反応させて、式(III)の化合物：

【化 3】



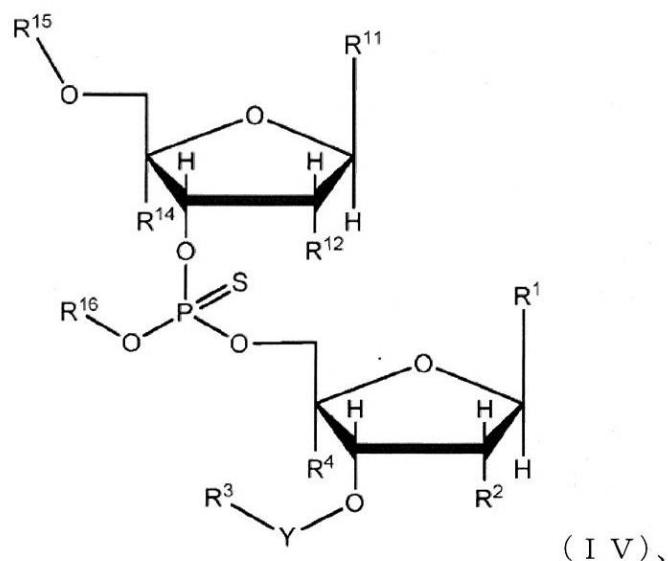
20

30

を形成することと；

b) 前記式(III)の化合物を、硫化剤を用いて硫化して、式(IV)の化合物：

【化 4】

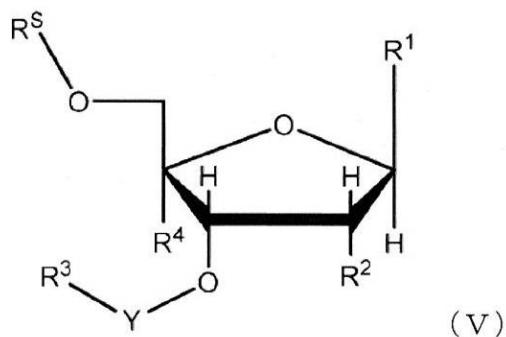


40

50

を形成し、式(Ⅰ)の未反応化合物から式(Ⅴ)の化合物：

【化5】



10

を形成することと；

を含み、

式中

各R¹及びR¹¹は、独立して、核酸塩基であり、前記核酸塩基のNH₂が、存在する場合、アミン保護基によって保護されており；

各R²及びR¹²は、H、ハロ、及びC₁₋₆アルコキシによって置換されていてもよいC₁₋₆アルコキシからなる群から独立して選択され；

R³は、リンカーを含んでいてもよい固体支持体であり；

Yは、非存在、ヌクレオチド、または2以上のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり；

各R⁴は、独立してHであるか、またはR²の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

各R¹⁴は、独立してHであるか、またはR¹²の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

R¹⁵は、ヒドロキシ保護基であり；

R¹⁶は、-CNによって置換されていてもよいC₁₋₆アルキルであり；

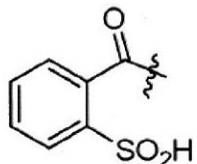
R^{17a}及びR^{17b}は、独立してC₁₋₆アルキルであり；

ここで、(i)前記硫化剤は、3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(XHまたはADTT)であり、かつR^Sは、-C(SH)(=N)-CNであるか、(ii)前記硫化剤は、フェニルアセチルジスルフィド(PADS)であり、かつR^Sは、-C(=O)CH₂C₆H₅であるか、(iii)前記硫化剤は、3-(ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン(DDTT)であり、かつR^Sは、-C(=S)NH₂(=S)N=CHN(CH₃)₂であるか、または(iv)前記硫化剤は、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキサイド(Beaucage試薬)であり、かつR^Sは、

20

30

【化6】



40

であり；

前記硫化剤は、工程b)において0~30分間再循環され、式(Ⅰ)の未反応化合物を前記式(Ⅴ)の化合物に変換し、かつ前記式(ⅢⅢ)の化合物を前記式(ⅣⅤ)の化合物に変換し；

前記硫化剤は、前記リンカー、または第1ヌクレオチドが前記固体支持体に直接付着しているときには前記第1ヌクレオチドに対して、3~6当量で添加され、式(Ⅰ)の未反応化合物を式(Ⅴ)の化合物に変換し、かつ前記式(ⅢⅢ)の化合物を前記式(ⅣⅤ)

50

の化合物に変換し；

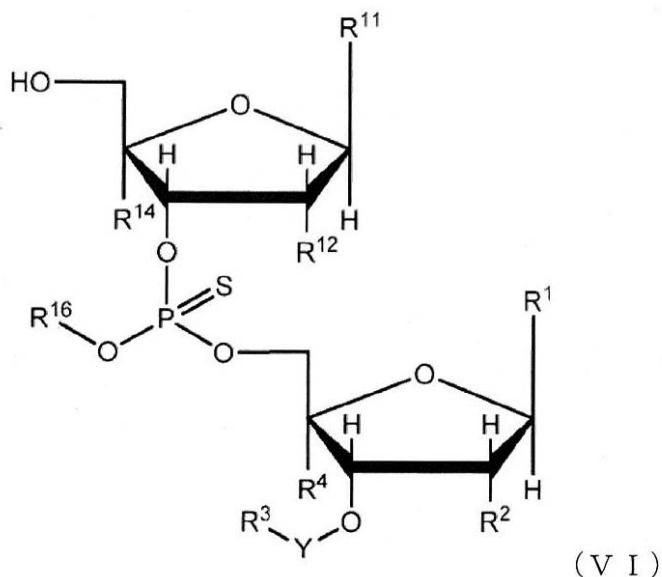
前記式（I）、（II）、（III）、（IV）、及び（V）の化合物が、薬学的に許容可能な塩の形態であってもよく；

式（I）の未反応化合物は、式（I）の未反応化合物の5'-OHをキャッピングする他の試薬を添加することなく、前記硫化剤または硫化工程b)の副生成物によってキャッピングされる、前記プロセス。

【請求項2】

c) 前記式（IV）の化合物を脱保護して、式（VI）の化合物：

【化7】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、請求項1に記載のプロセス。

【請求項3】

d) 前記式（VI）の化合物を式（II）の化合物と反応させて、式（VII）の化合物：

10

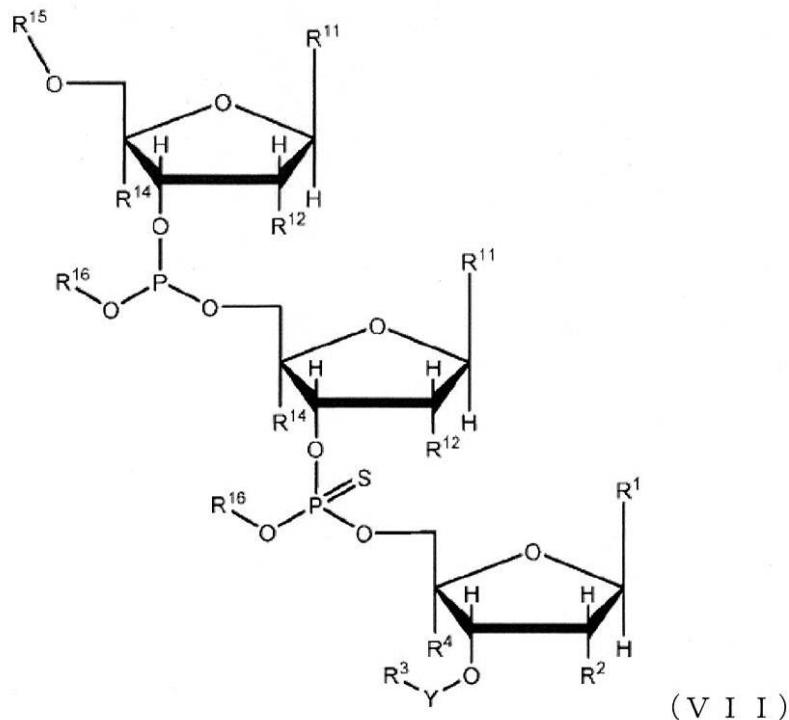
20

30

40

50

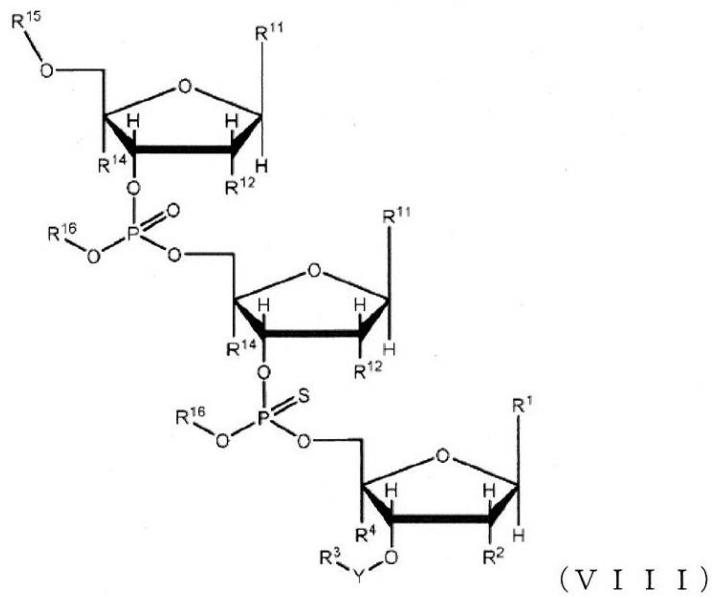
【化 8】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程と；

e) 前記式 (VIII) の化合物を、酸化剤を用いて酸化して、式 (IX) の化合物：

【化 9】



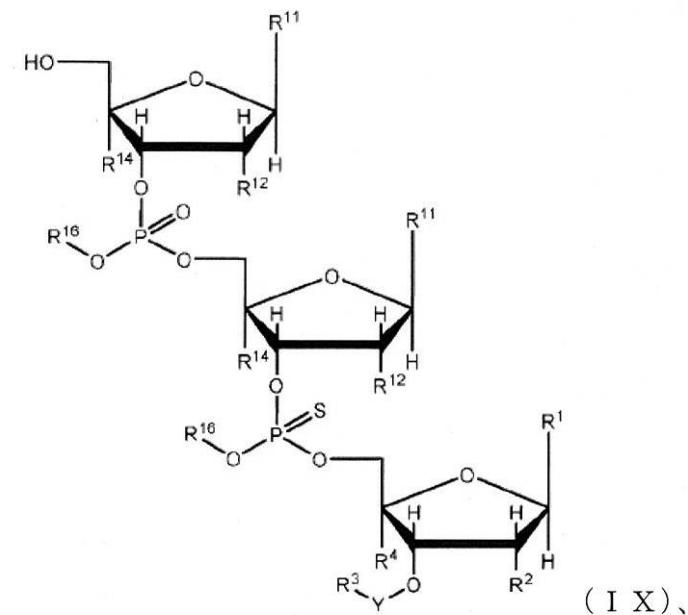
を形成する工程と

をさらに含む、請求項 2 に記載のプロセス。

【請求項 4】

f) 前記式 (IX) の化合物を脱保護して、式 (IX) の化合物：

【化 1 0】



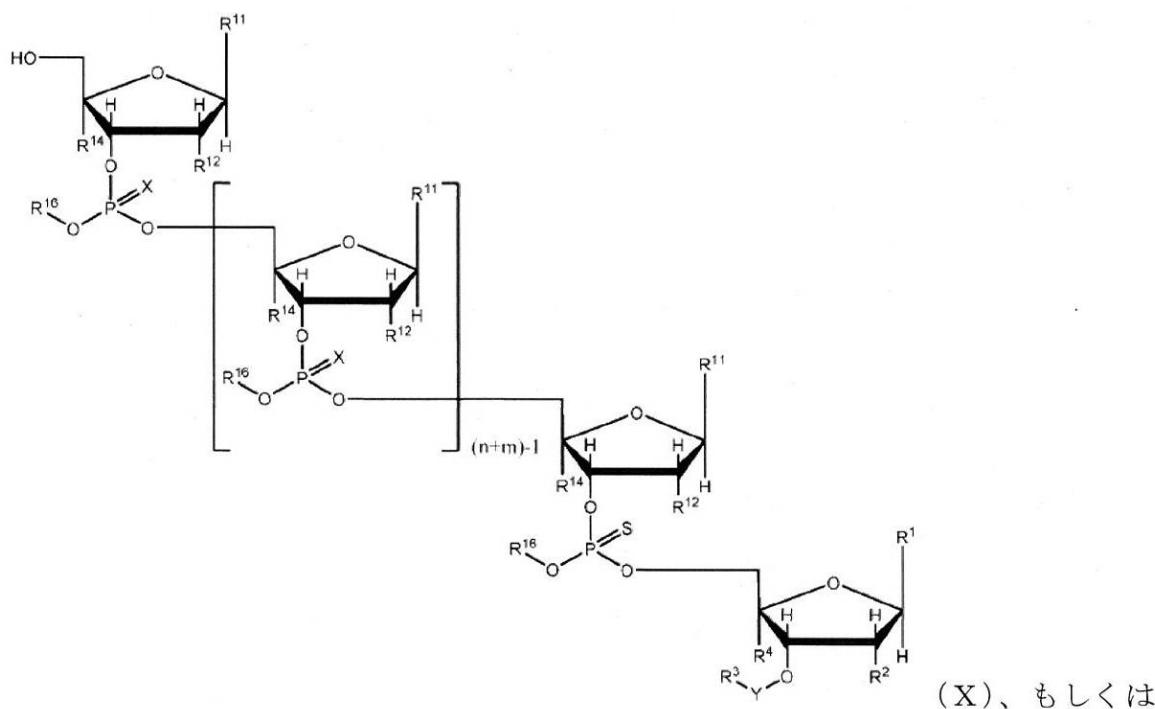
またはその薬学的に許容可能な塩
を形成する工程をさらに含む、請求項 3 に記載のプロセス。

20

【請求項 5】

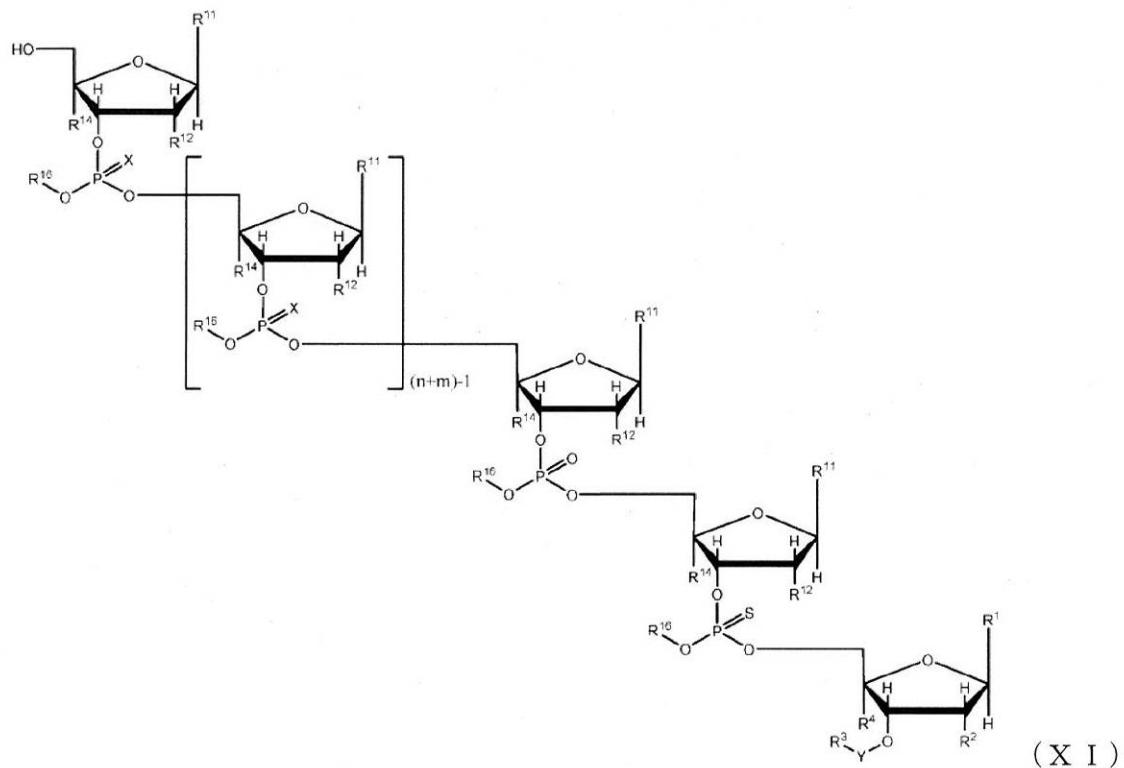
前記式 (V I) の化合物または前記式 (I X) の化合物によって開始して、工程 a) 、 b) 、及び c) が n 回繰り返され、工程 d) 、 e) 及び f) が m 回繰り返され、工程 a) 、 b) 、及び c) 、ならびに工程 d) 、 e) 及び f) の繰り返しが、互いに対してもいずれの順序で行われてもよく、n が少なくとも 1 であり、m が 0 、 1 、 2 、 3 、または 4 であり、式 (X) もしくは (X I) のオリゴヌクレオチド：

【化 1 1】



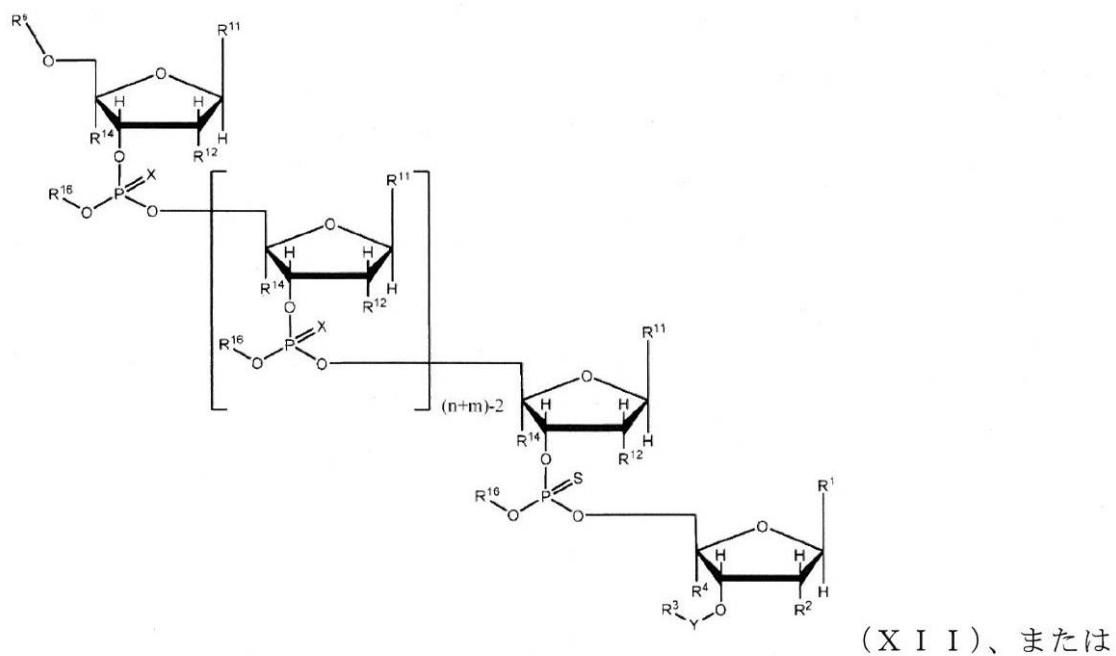
50

【化 1 2】

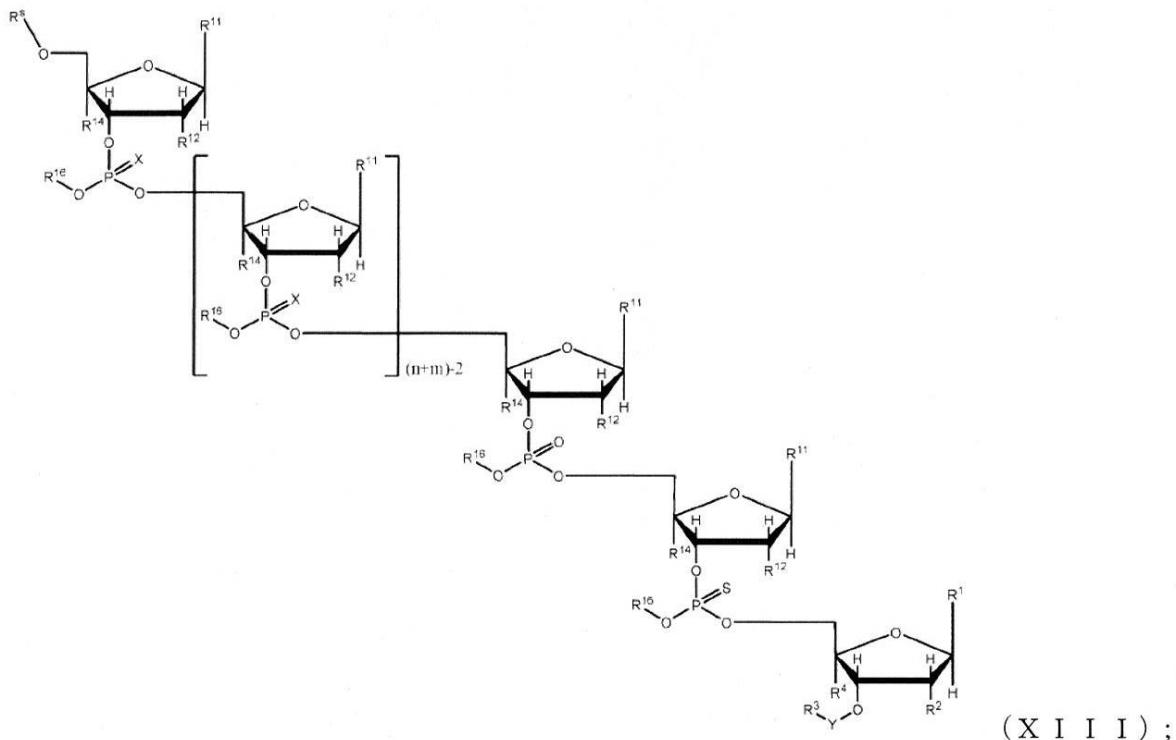


またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (V I) または (IX) のいくらかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (X II) または (X III) の化合物：

【化 1 3】



【化14】

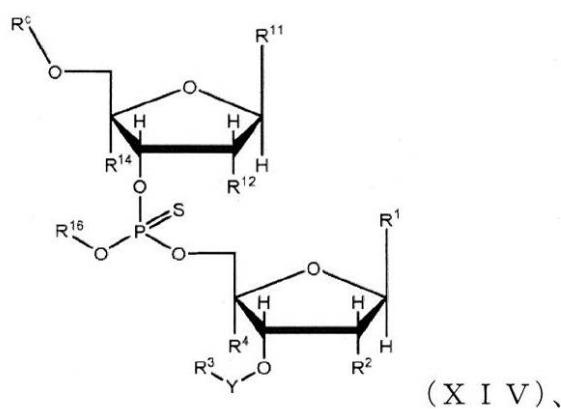


式中、各Xは、SまたはOから独立して選択され、ただし、前記式(X)、(XI)、(XII)、または(XIII)の化合物において、4、3、2、1、または0回のみ、XがOである；を形成する、請求項4に記載のプロセス。

【請求項6】

g) 前記式(VI)の未反応化合物をキャッピング剤と反応させて、式(XIV)の化合物：

【化15】

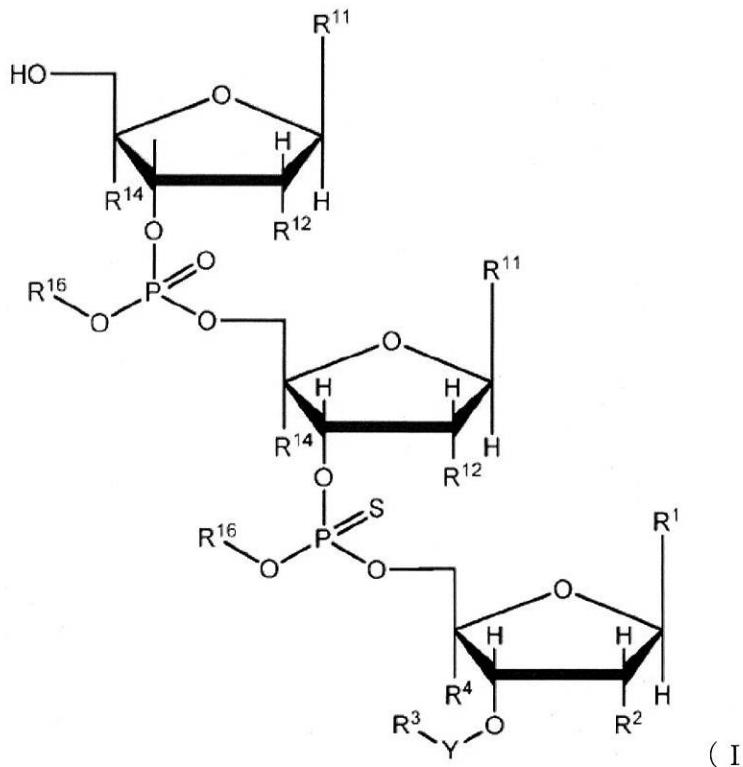


またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含み、R^cが、前記キャッピング剤から形成されたヒドロキシ保護基である、請求項3に記載のプロセス。

【請求項7】

h) 前記式(VIII)の化合物を脱保護して、式(IX)の化合物：

【化16】

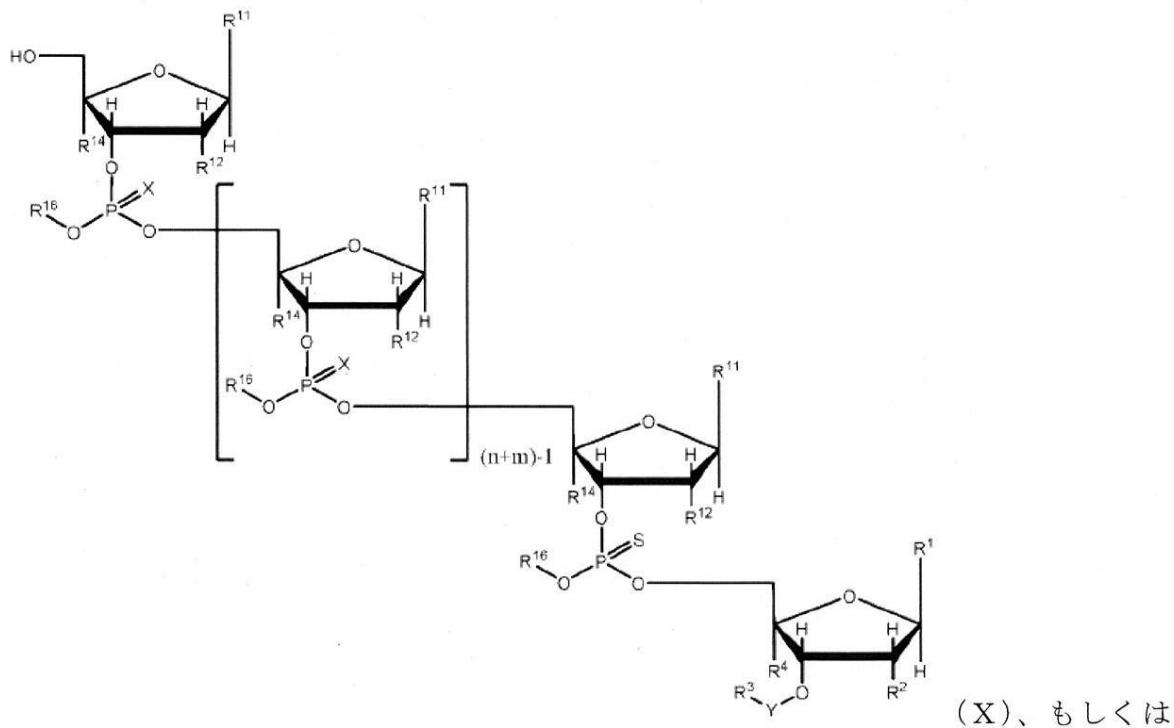


またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、請求項6に記載のプロセス。

【請求項8】

前記式(VI)の化合物または前記式(IX)の化合物によって開始して、工程a)、b)、及びc)がn回繰り返され、工程d)、e)、g)及びh)がm回繰り返され、工程a)、b)、及びc)ならびに工程d)、e)、g)及びh)の繰り返しが、互いに対してもうれの順序で行われてもよく、nが少なくとも1であり、mが0以上であり、式(X)もしくは(XI)のオリゴヌクレオチド：

【化17】

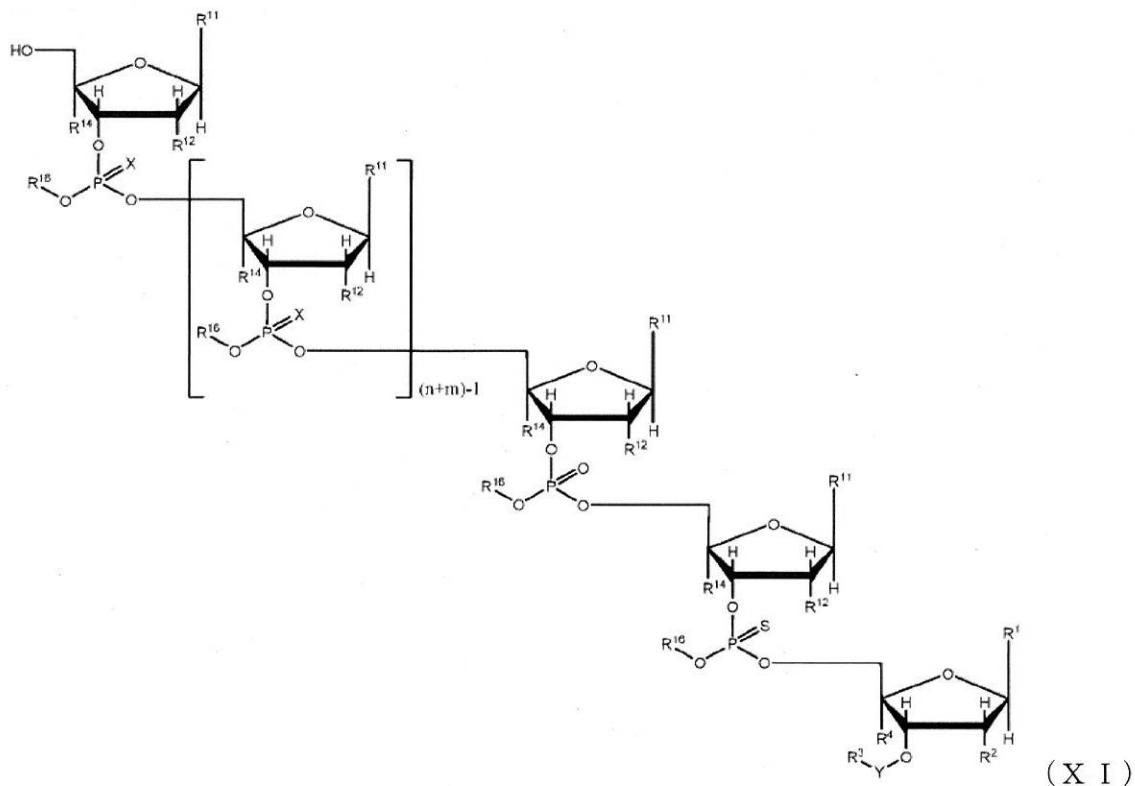


10

(X)、もしくは

20

【化18】



30

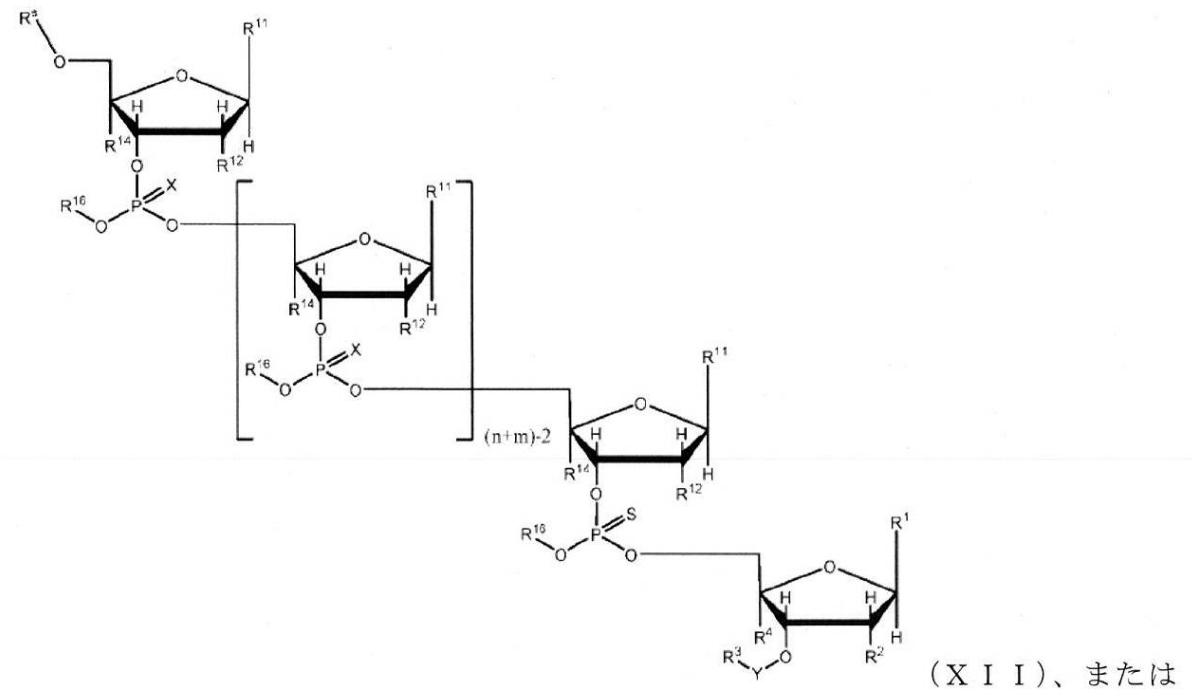
40

(X I)

またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴスクレオチドを形成することにおいて、工程 a)、b)、及び c)、または工程 d)、e)、g)及び h)の各繰り返しにより、式 (V I) または (I X) のいくらかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (X I I) または (X I I I) の化合物：

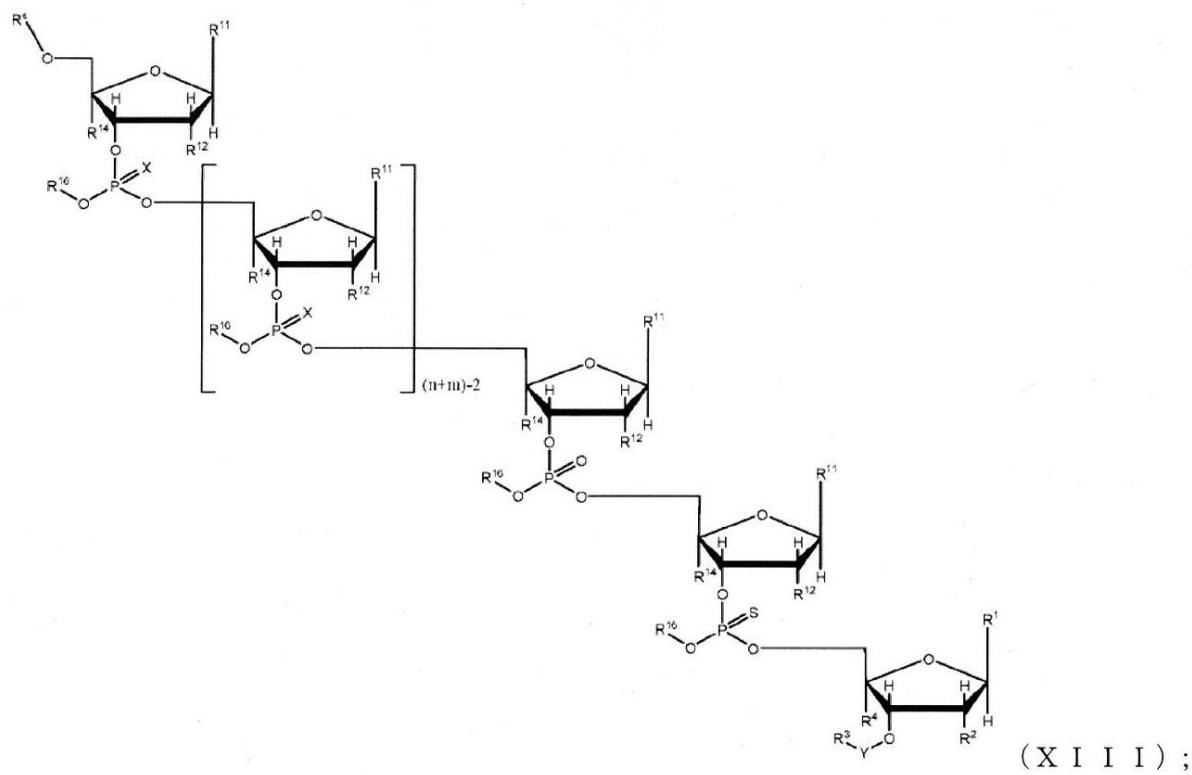
50

【化 19】



20

【化 20】



式中、各 X は、S または O から独立して選択される；を形成する、請求項 7 に記載のプロセス。

【請求項 9】

n が、2 ~ 1 0 0 0、2 ~ 5 0 0、2 ~ 1 0 0、2 ~ 5 0、または 2 ~ 2 5 である、請求項 5 または 8 に記載のプロセス。

【請求項 10】

50

前記固体支持体に付着した前記リンカーが開裂される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 11】

前記硫化剤が、フェニルアセチルジスルフィド (PADS) であり、かつ R^S が、 $-C(=O)CH_2C_6H_5$ である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 12】

前記硫化剤が、3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン (XH または ADTT) であり、かつ R^S が、 $-C(SH)(=N)-CN$ である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 13】

前記硫化剤が、1 ~ 20 回、1 ~ 10 回、もしくは 1 ~ 5 回再循環される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 14】

前記硫化剤の濃度が、0.02M ~ 2.0M または 0.05M ~ 0.5M である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 15】

前記硫化剤が、0.02M ~ 0.1M の濃度で添加される 3-(ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ) - 3H - 1,2,4-ジチアゾール-3-チオン (DDTT) である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 16】

(i) 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、及び 5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記 NH₂ 基が、存在する場合、PhCO-、CH₃CO-、iPrCO-、Me₂N-CH=、または Me₂N-CMe= によって保護されている、または

(ii) 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、及び 5-メチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記 NH₂ 基が、存在する場合、PhCO-、CH₃CO-、iPrCO-、Me₂N-CH=、または Me₂N-CMe= によって保護されている、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 17】

(i) 各 R² 及び R¹² が、H、F、及び C₁ ~ 4 アルコキシによって置換されていてもよい C₁ ~ 4 アルコキシからなる群から独立して選択され；

各 R⁴ が、独立して H であるか、または R² の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の C₁ ~ 4 アルキル基によって置換されていてもよい 5 または 6 員環であり；

R¹⁶ が -CH₂CH₂CN であり；

R^{17a} 及び R^{17b} が、独立して、C₁ ~ 4 アルキルであり；

各 R¹⁴ が、独立して H であるか、または R¹² の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の C₁ ~ 4 アルキル基によって置換されていてもよい 5 または 6 員環である；

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 18】

(i) Y が存在しない、

(ii) Y が、単一のヌクレオチドである、

(iii) Y が、2 ~ 50 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、

(iv) Y が、2 ~ 40 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、

(v) Y が、2 ~ 30 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、または

(vi) Y が、2 ~ 25 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

式(X)の化合物が、2~30のヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、

(i) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾RNAのみを含んでいてもよい、

(ii) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA及び修飾RNAを含んでいてもよい、

(iii) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーであってもよい、

(iv) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAのみを含んでいてもよい、

(v) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号1であってもよい、

(vi) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号2であってもよい、

または

(vii) 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号8であってもよい、
請求項5または8に記載のプロセス。

【請求項20】

各R²及びR¹²が、H、または、C_{1~4}アルコキシによって置換されていてもよいC_{1~4}アルコキシから独立して選択され；

R¹⁵が、4,4'-ジメトキシトリチルであり；

R¹⁶が、-CH₂CH₂CNであり；

R^{17a}及びR^{17b}が、独立して、C_{1~6}アルキルであり；

R⁵が、-C(=N)(SH)-CNまたは-C(=O)CH₂C₆H₅である、

請求項1~14のいずれか一項に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、米国特許法第119(e)条の下に、2016年6月24日に出願された米国仮特許出願第62/354,433号の出願日の優先権を主張し、その全内容が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

現出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出されている配列表を包含し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。当該ASCIIのコピーは、2017年6月20日に作成されており、名称が123429-00220_SL.txtであり、サイズが3,101バイトである。

【背景技術】

【0003】

オリゴヌクレオチドは、研究及び医療目的で化学的に合成され得る短いDNAまたはRNAオリゴマーである。オリゴヌクレオチドは、特定の配列を生成するためにヌクレオチド残基を段階的に付加することによって典型的には調製される。チオール化オリゴヌクレオチドの現在の固相合成製造法は、サイクル当たり4反応、すなわち、脱保護（例えば、脱トリチル化）、カップリング、硫化、及びキャッピングの繰り返しを使用する。キャッピング工程は、各サイクルにおいてホスホロアミダイトとカップリングしなかったあらゆる未反応の5'-ヒドロキシル基をブロックするように設計されたものであったため、失敗配列が、後のサイクルにおいてカップリング反応にさらに関与せず、失敗したカップリングのヌクレオシドが存在しない不純物を発生させる。キャッピング工程は、典型的には、塩基触媒、例えばピリジンまたはN-メチルモルホリンと共に無水酢酸を使用して行われる。

【0004】

成長するオリゴマーに各ヌクレオチドを付加するために4つの工程のそれぞれを完了させる必要があるため、工程の数を減少させることができ、各ヌクレオチドの付加に必要とされる時間量を減少させ、その上、オリゴヌクレオチド合成を完了するのに必要とされる試薬

10

20

30

40

50

量を減少させる。そのため、オリゴヌクレオチドを調製するための新規の合成方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、従来のサイクル当たり4反応ではなく、サイクル当たり3反応、すなわち、脱トリチル化、カップリング、及び硫化の繰り返しを使用した、完全または部分チオール化オリゴヌクレオチドの固相合成製造法を本明細書において記載する。

【0006】

典型的には、ヌクレオチドは、固体支持体に付着したオリゴマーの最後のヌクレオチドの遊離5'-ヒドロキシルを、適切なホスホロアミダイトとカップリングすることによって成長するオリゴマー鎖に付加される。カップリング反応における非効率さは、後のカップリング反応において自由に反応する5'-ヒドロキシル基のいくつかのを脱離させ、結果として、単一なヌクレオチドが存在しない、しかしランダムである、複雑なオリゴマー混合物を生じさせる。したがって、未反応の5'-ヒドロキシルが後に反応することを防止するために、5'-ヒドロキシルが、硫化工程の前または後に、キャッピング試薬、例えば無水酢酸の使用を介してキャッピングされる。

10

【0007】

驚くべきことに、本発明者らは、硫化工程の前または後のキャッピング工程を排除したプロセスを開発した。特に、本発明者らは、驚くべきことに、未反応の5'-ヒドロキシル基を、プロセスに新たに導入される必要がある試薬、例えば、無水酢酸によってキャッピングするのではなく、硫化工程の際に発生する副生成物が未反応の5'-ヒドロキシ基をキャッピングするのに使用され得ることを発見した。これらの副生成物、または、ある特定の場合には、硫化剤それ自体、例えばPADSが、固体支持体にわたって再循環されて、ホスホロアミダイトとカップリングしなかった5'-ヒドロキシ基をキャッピングし得る。未反応の5'-ヒドロキシル基は、別個のキャッピング工程を必要とすることなく硫化副生成物と反応し、後のサイクルにおいてカップリングすることにはもはや利用することはできない。

20

【0008】

完全チオール化オリゴヌクレオチド（すなわち、ホスホチオレート（-P=S）結合のみを含むオリゴヌクレオチド）に関して、キャッピング工程は全く必要でなく、上記プロセスは、サイクル当たり3反応のみ（脱保護、カップリング、及び硫化）を含む。

30

【0009】

ここで記載されているプロセスは、ホスホチオレート（-P=S）及びホスホジエステル（-P=O）の両結合を含む部分チオール化オリゴヌクレオチドを調製するのにも使用され得る。部分チオール化オリゴヌクレオチドは、サイクルにおける第3工程が、-P=O結合または-P=S結合のいずれが望ましいかに応じて酸化または硫化のいずれかである、4反応工程サイクルによって従来的に調製されている。本明細書で記載されているプロセスの使用は、硫化工程の後のキャッピング工程を排除するのに使用され得る。しかし、酸化工程の副生成物は、未反応の5'-ヒドロキシ基をキャッピングしないため、残存量の未反応の5'-ヒドロキシル基が、酸化工程の後に残存し得る。しかし、少數の、例えば、4つ以下の-P=O結合を含む部分チオール化オリゴヌクレオチドに関しては、酸化工程後にキャッピング工程を用いなくても、本明細書で記載されているプロセスを使用することができる。多数の、例えば5以上の-P=O結合を含む部分チオール化オリゴヌクレオチドに関しては、本明細書で記載されているプロセスを使用することができるが、例えば無水酢酸を用いた従来のキャッピング工程を、各酸化工程の後に使用してもよい。しかし、キャッピング工程は、どれだけ多くの-P=O結合が存在するかにかかわらず、硫化工程後になお必要とされない。

40

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】3工程オリゴヌクレオチド合成方法の図を示す。

50

【図2】従来の4工程オリゴヌクレオチド合成方法の図を示す。なお、硫化工程は、サイクルプロセス当たり従来の4反応においてキャッピング工程の前または後に実施されてよい。

【図3】PADSを用いた4反応サイクル(上部)；PADSを用いた3反応サイクル(中央)；及びキサンタンヒドリドを用いた3反応サイクル(下部)について質量分析によって純度を比較したクロマトグラムである。

【図4】硫化剤としてPADSを用いた4反応サイクルプロセス(下部)及び3反応サイクルプロセス(上部)によって調製されたBIB078を比較したRPIP HPLCクロマトグラムである。

【図5】硫化剤としてPADSを用いた4反応サイクルプロセス(下部)及び3反応サイクルプロセス(上部)によって調製されたBIB078を比較したRPIP HPLCクロマトグラムである。

【図6】硫化剤としてPADSを用いた4反応サイクルプロセス(下部)及び3反応サイクルプロセス(上部)によって調製されたBIB078を比較した質量分析クロマトグラムである。

【図7】硫化剤としてPADSを用いた4反応サイクルプロセス(下部)及び3反応サイクルプロセス(上部)によって調製されたBIB078を比較した質量分析クロマトグラムである。

【図8】PADSを、アセトニトリル-d₃中、3-ピコリンによってエージングした、BuOH、P(OMe)₃及びPADSの反応混合物の経時的な¹H NMRスペクトルを示す。

【図9】PADSを、アセトニトリル-d₃中、N-メチルイミダゾールによってエージングした、BuOH、P(OMe)₃及びPADSの反応混合物の経時的な¹H NMRスペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

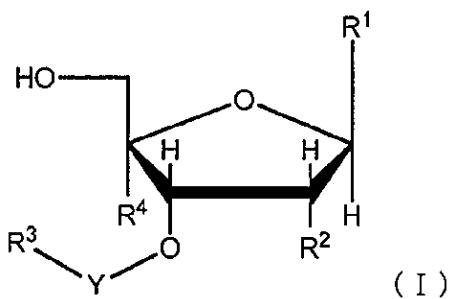
【0011】

本発明の第1実施形態は、オリゴヌクレオチドを調製するためのプロセスであって

a)式(I)の化合物：

【0012】

【化1】



【0013】

を式(II)の化合物：

【0014】

10

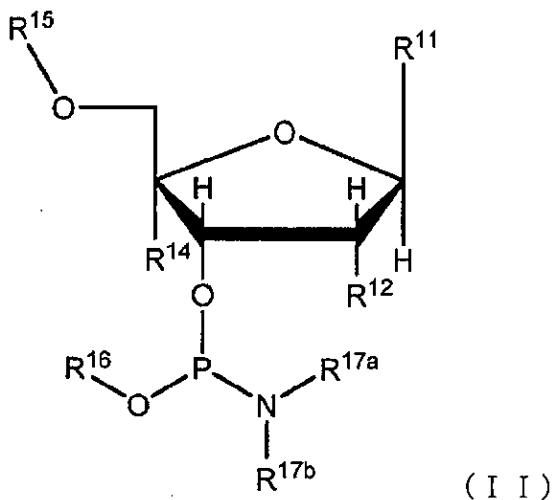
20

30

40

50

【化2】

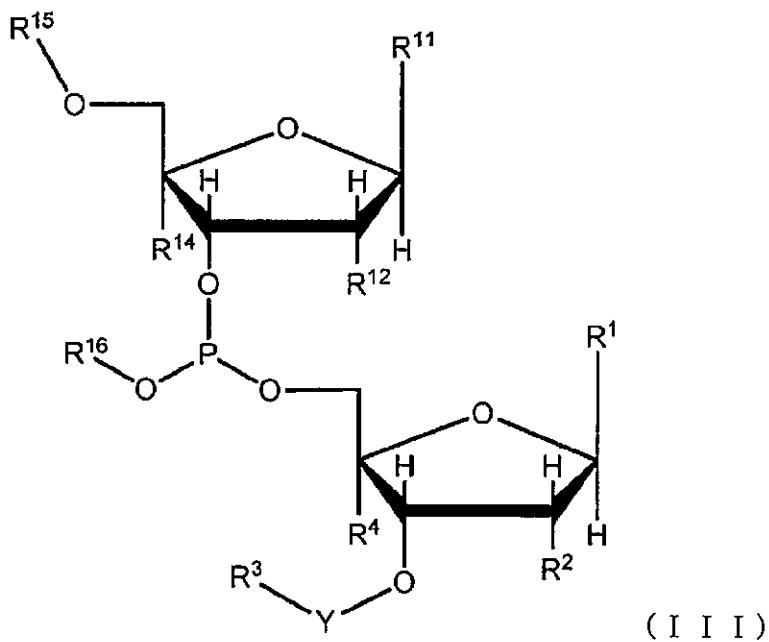


【0015】

と反応させて、式(III)の化合物：

【0016】

【化3】



【0017】

を形成することと；

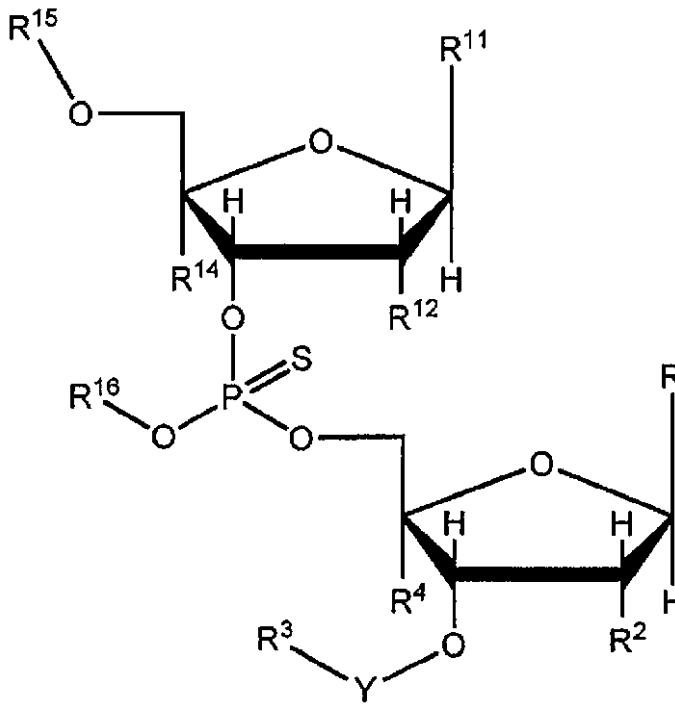
b) 式(III')の化合物を、硫化剤を用いて硫化して、式(IV)の化合物：

【0018】

40

50

【化4】



(IV)

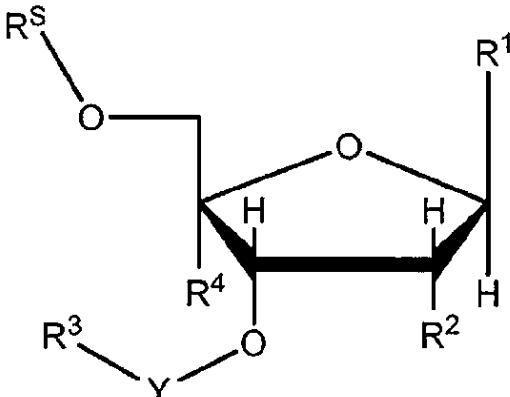
20

【0019】

を形成し、式(Ⅰ)の未反応化合物から式(Ⅴ)の化合物：

【0020】

【化5】



(V);

30

【0021】

を形成することと；

を含み、

式中、

40

各R¹及びR¹¹は、独立して、核酸塩基であり、核酸塩基のNH₂が、存在する場合、アミン保護基によって保護されており；

各R²及びR¹²は、H、ハロ、及びC₁₋₆アルコキシによって任意選択的に置換されているC₁₋₆アルコキシからなる群から独立して選択され；

R³は、リンカーアリの固体支持体であり；

Yは、非存在、ヌクレオチド、または2以上のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり；

各R⁴は、独立してHであるか、またはR²のアルコキシ基と共に環を形成し；

各R¹⁴は、独立してHであるか、またはR¹²のアルコキシ基と共に環を形成し；

50

R¹⁵は、ヒドロキシ保護基であり；

R¹⁶は、-CNによって任意選択的に置換されているC₁₋₆アルキルであり；

R^{17a}及びR^{17b}は、独立してC₁₋₆アルキルであり；

R^Sは、硫化剤の副生成物から形成されたヒドロキシ保護基であり；

硫化剤は、式(I)の未反応化合物から式(V)の化合物に実質的に完全に変換し、かつ式(III)の化合物から式(IV)の化合物に変換するのに十分な時間量で反応され；

式(I)の未反応化合物から式(V)の化合物に実質的に完全に変換し、かつ式(II)の化合物から式(IV)の化合物に変換するのに十分な量の硫化剤が添加され；

式(I)、(II)、(III)、(IV)、及び(V)の化合物が、任意選択的に、薬学的に許容可能な塩の形態である、上記プロセスである。

10

【0022】

本明細書において使用されているとき、「十分な時間量」は、反応条件に基づいて当業者によって決定され得る。例えば、第13実施形態において提供されている時間、すなわち、0~30分、例えば、0、5、10、15、20、25、または30分は、「十分な時間量」である。

【0023】

本明細書において使用されているとき、「実質的に完全に変換すること」は、反応条件に基づいて当業者によって決定され得る。特に、実質的に完全に変換することは、式(I)の未反応化合物または式(III)の50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%を、それぞれ、式(V)または式(IV)に変換することを意味する。

20

【0024】

第1実施形態のいくつかの態様において、上記プロセスは、工程bの後に追加のキャッピング工程を含まない。具体的には、式(I)、(VI)、または(IX)の任意の未反応化合物は、式(I)、(VI)、または(IX)の任意の未反応化合物をキャッピングするいずれの他の試薬も添加する必要なく、硫化工程bの副生成物によってキャッピングされる。

【0025】

第1実施形態の特定の態様において、

R¹¹は、シトシン、グアニン、アデニン、チミン（または5-メチルウラシル）、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、及び5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、ここで、核酸塩基のNH₂基は、存在する場合、PhCO-、CH₃CO-、iPrCO-、Me₂N-CH=、またはMe₂N-CMe=によって保護されている。

30

R¹²は、H、ハロ、C₁₋₄アルコキシ、及びC₁₋₄アルコキシC₁₋₄アルコキシからなる群から選択され；

各R¹⁴は、独立してHであるか、またはR¹²のアルコキシ基と共に5もしくは6員環を形成し；

R¹⁵は、4,4'-ジメトキシトリチル、[ビス-(4-メトキシフェニル)フェニルメチル] (DMT) またはトリチル(トリフェニルメチル、Tr)から選択されるヒドロキシ保護基である。

40

R¹⁶は、-CNで置換されたC₁₋₄アルキルであり；

R^{17a}及びR^{17b}は、独立して、C₁₋₄アルキルである。

【0026】

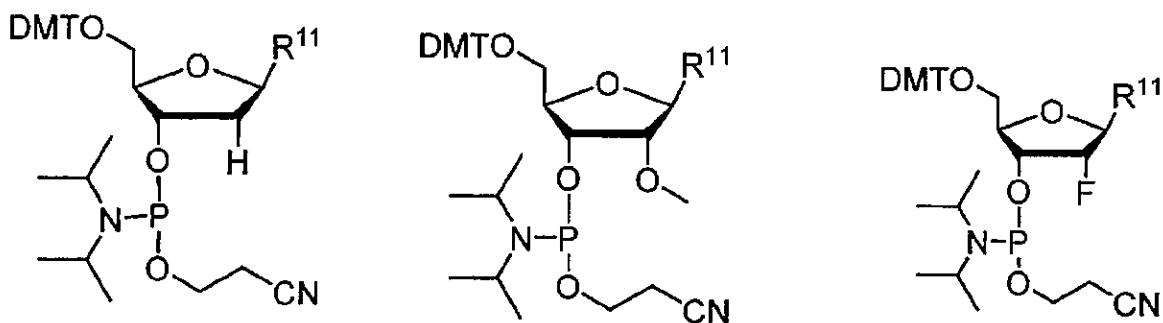
特定の実施形態において、

第1実施形態の具体的な態様において、式(II)は、以下の構造式：

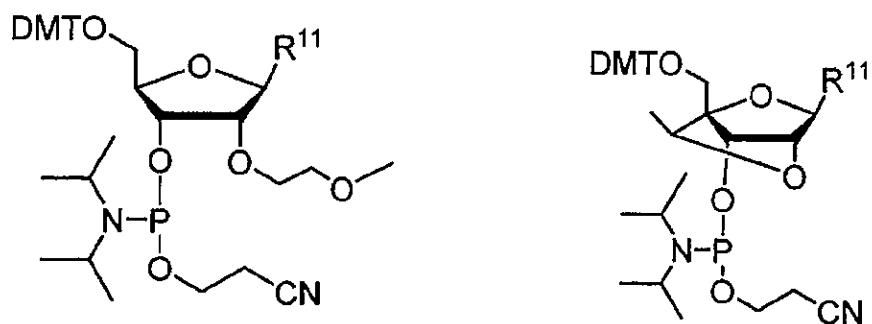
【0027】

50

【化6】



10



20

【0028】

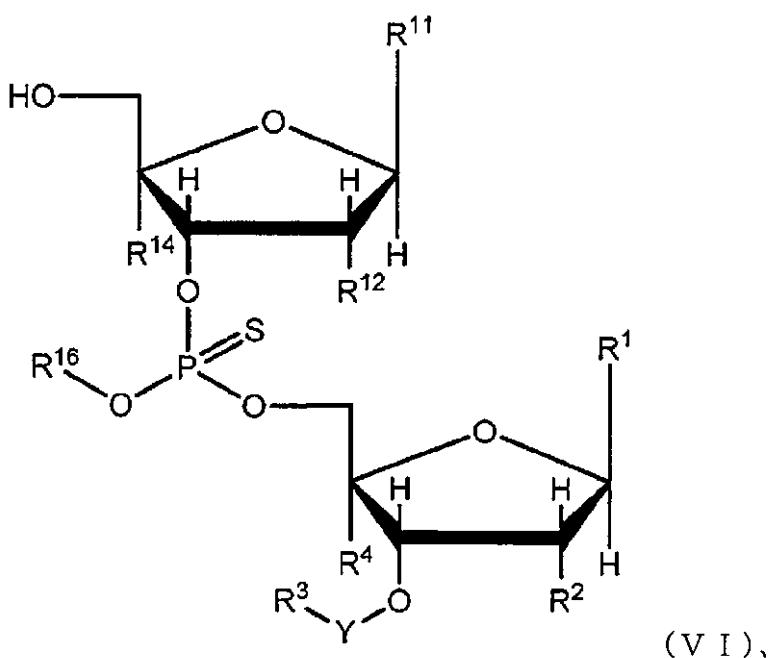
式中、DMTOは、4,4'-ジメトキシトリチル保護5'-ヒドロキシであり、¹R¹は、第1実施形態で定義されている通りである；のいずれか1つから選択される。

【0029】

本発明の第2実施形態は、第1実施形態またはこれらのいずれかの様式で記載されているプロセスであって、c)式(IV)の化合物を脱保護して式(VI)の化合物：

【0030】

【化7】



30

40

【0031】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、上記プロセスである。

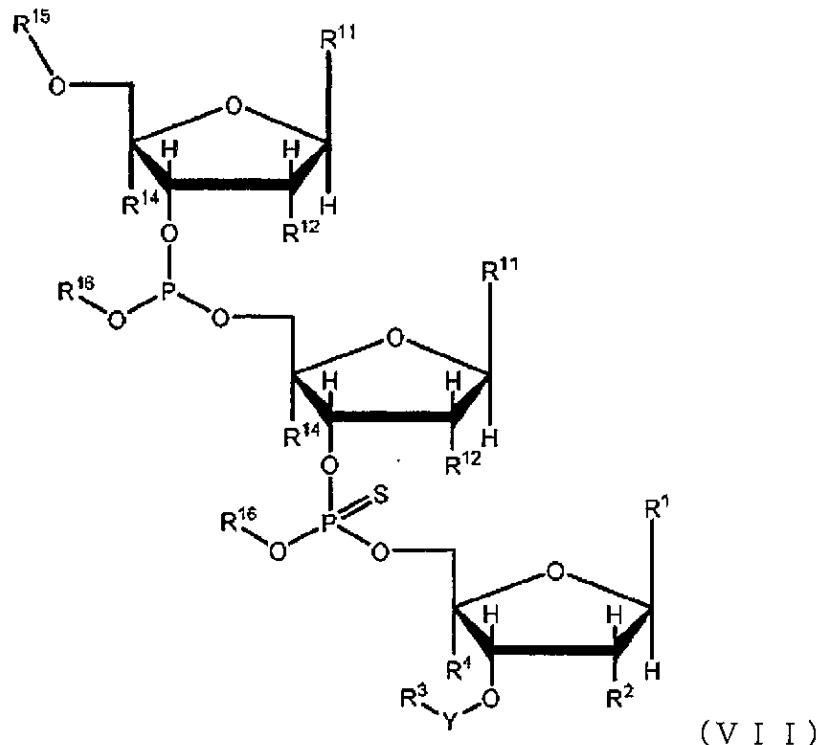
【0032】

50

本発明の第3実施形態は、第2実施形態で記載されているプロセスであって、d)式(ⅤⅠ)の化合物を式(Ⅱ)の化合物と反応させて、式(ⅤⅢ)の化合物：

【0033】

【化8】



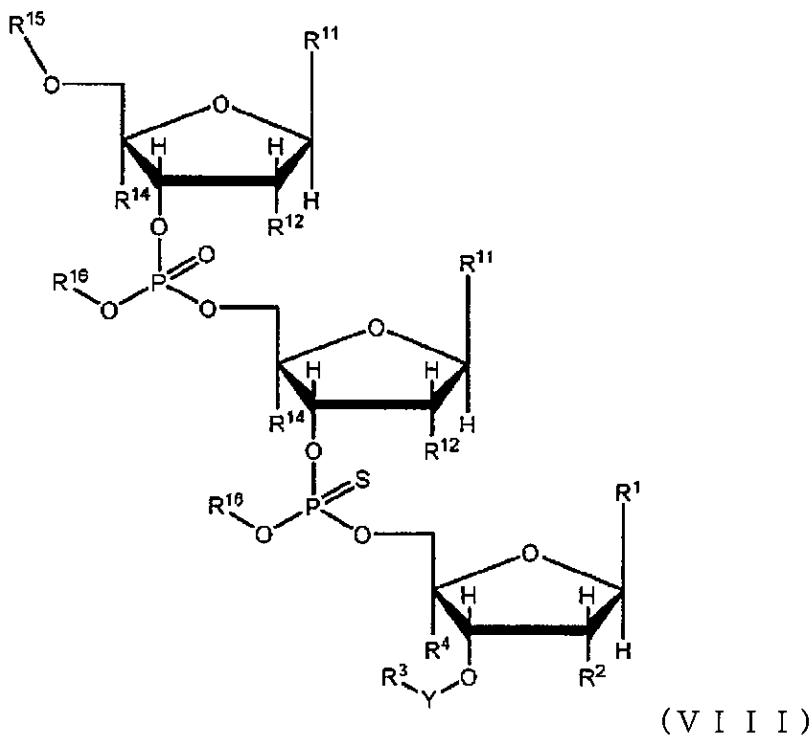
【0034】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程と；

e)式(ⅤⅢ)の化合物を、酸化剤を用いて酸化して、式(ⅤⅨ)の化合物：

【0035】

【化9】



【0036】

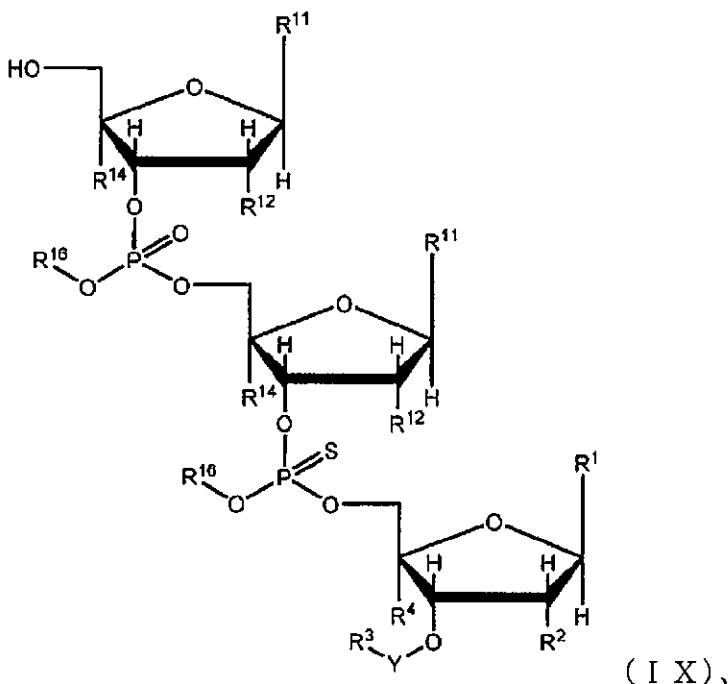
を形成する工程とをさらに含む、上記プロセスである。

【0037】

本発明の第4実施形態は、第3実施形態で記載されているプロセスであって、f)式(ⅤⅠⅠⅠ)の化合物を脱保護して式(IX)の化合物：

【0038】

【化10】



【0039】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、上記プロセスである。

【0040】

本発明の第5実施形態は、第2及び第4実施形態で記載されているプロセスであって、式(ⅤⅠ)の化合物または式(IX)の化合物によって開始して、工程a)、b)、及びc)がn回繰り返され、工程d)、e)及びf)がm回繰り返され、工程a)、b)、及びc)、ならびに工程d)、e)及びf)の繰り返しが、互いに対してもうれの順序で行われてもよく、nが少なくとも1以上であり、mが0、1、2、3、または4であり、式(X)もしくは(XI)のオリゴヌクレオチド：

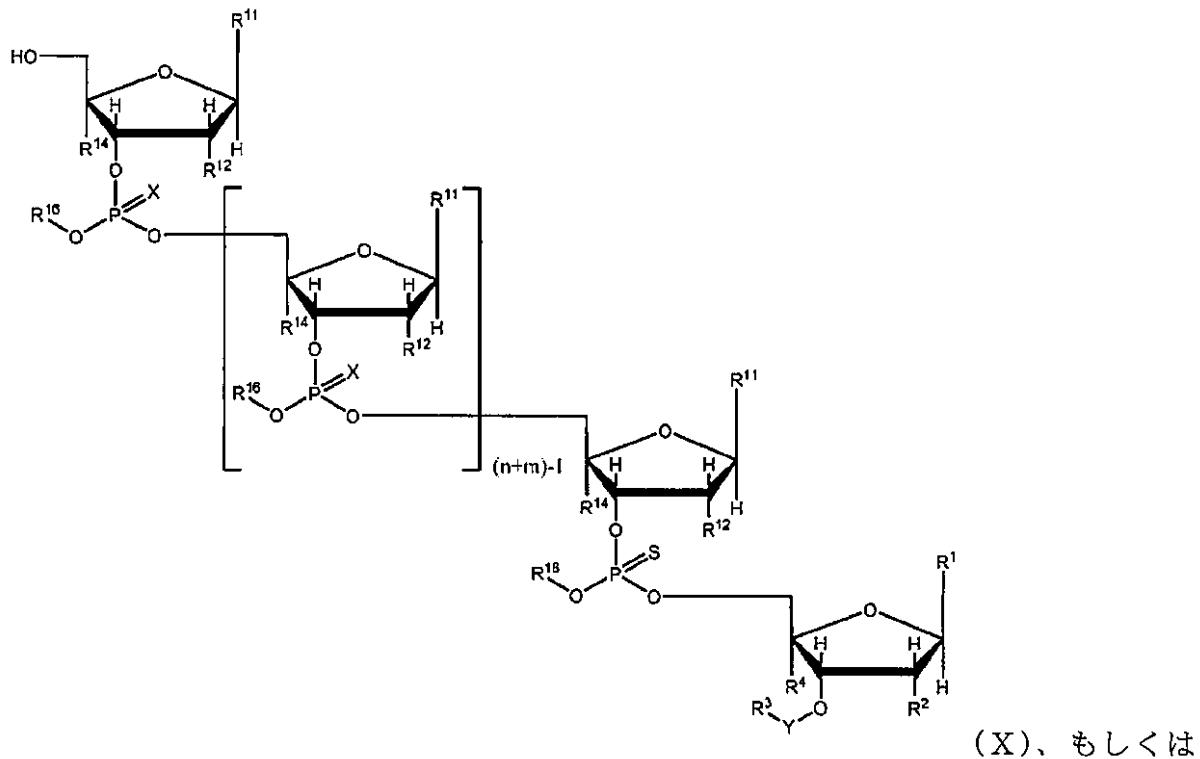
【0041】

30

40

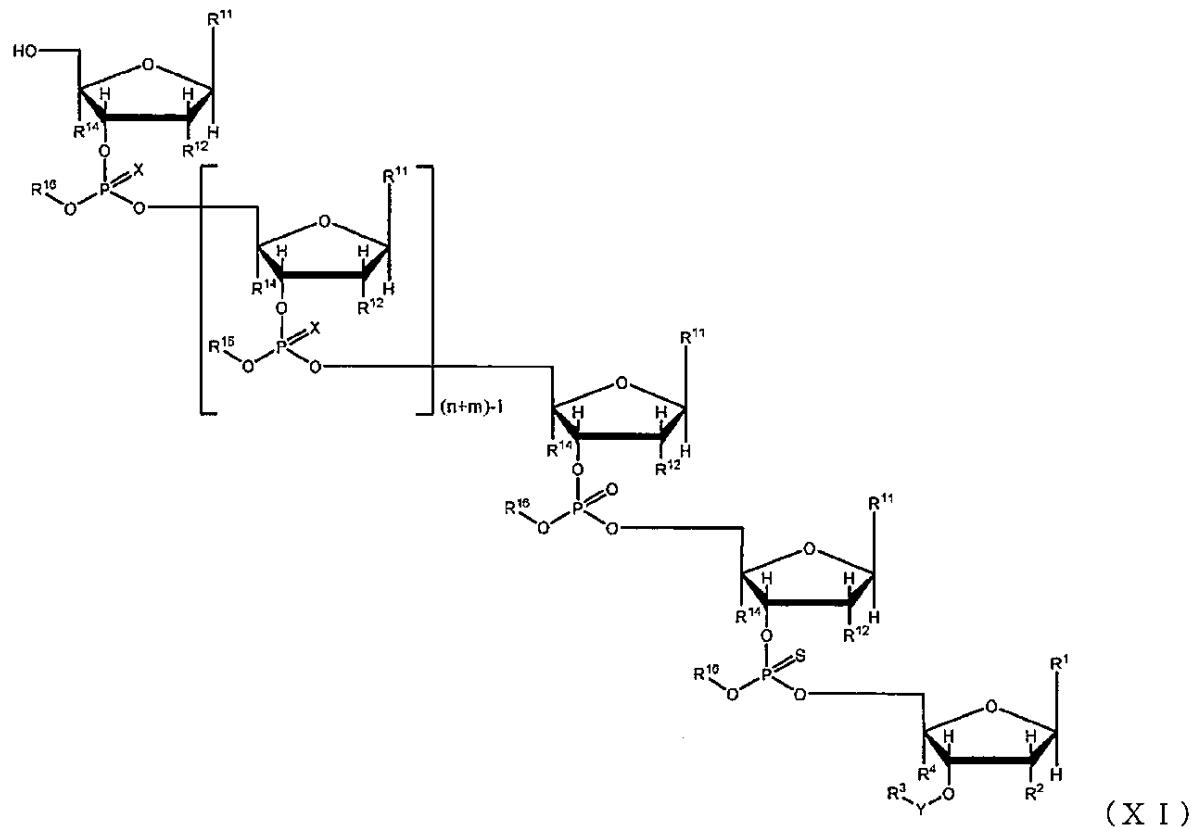
50

【化11】



【0042】

【化12】



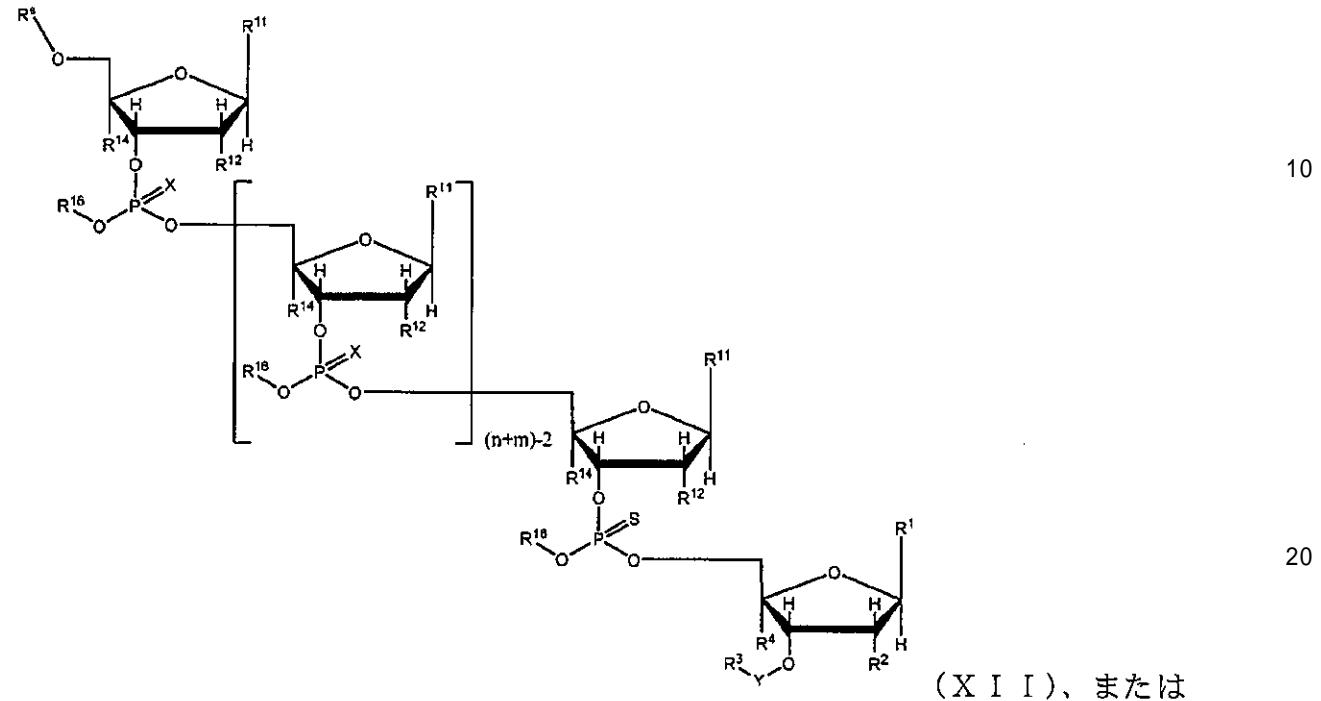
【0043】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程a、b、及びc、または工程d、e、及びfの各繰り返しにより

、式(VI)及び(XIX)のいくらかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または硫化工程後の硫化剤の副生成物と反応して、式(XXII)または(XXIII)の化合物：

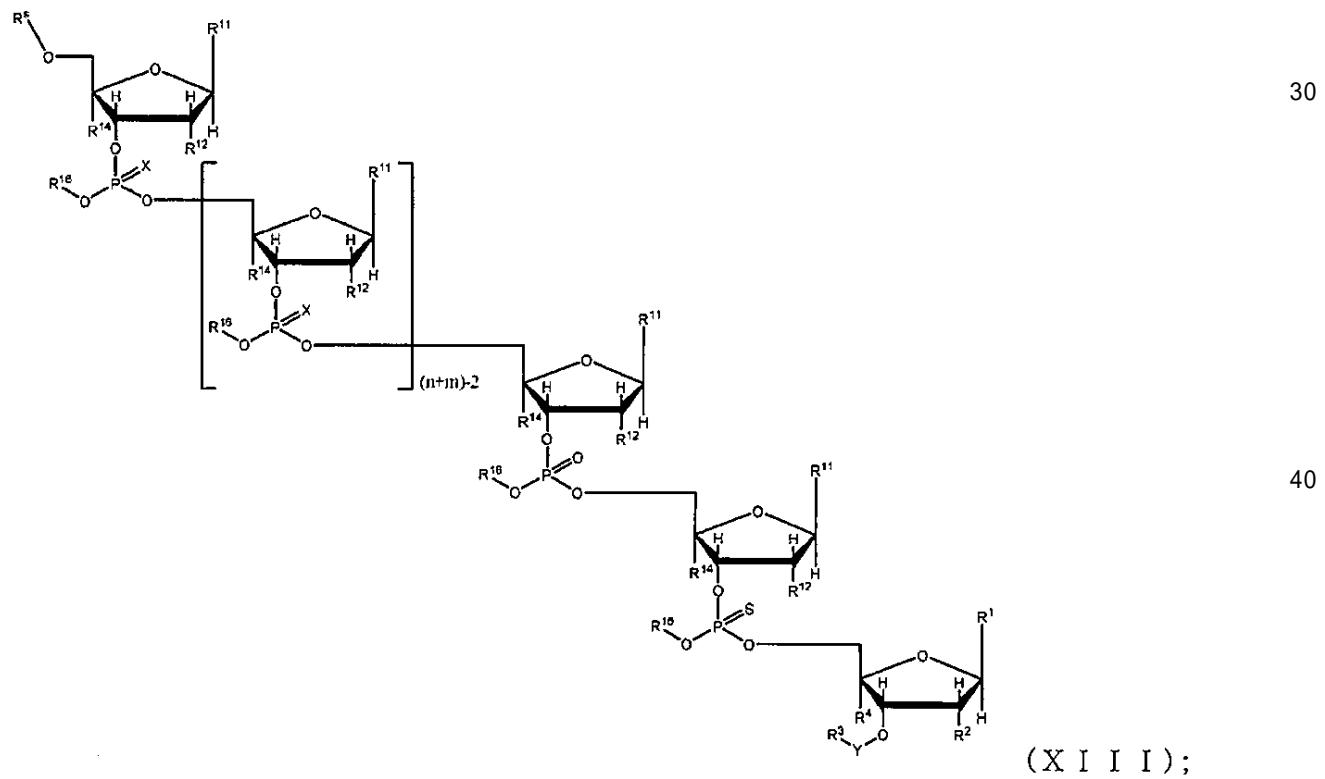
【0044】

【化13】



【0045】

【化14】



【0046】

50

式中、各 X は、S または O から独立して選択され、ただし、式(X)、(XI)、(XII)、及び(XIII)の化合物において、4、3、2、1、または0回のみ、X がOである；を形成する、上記プロセスである。特に、n は、1～30、5～25、または10～15 であり、m は、0、1、2、3、または4 である。

【0047】

第5実施形態で上記に記載されているプロセスは、所望のオリゴヌクレオチドを形成するためのヌクレオチドの段階的付加を含む。これらの工程は、それぞれ、ヌクレオチドを、成長するオリゴヌクレオチドに付加する、3反応を含む。第1工程（工程a及びdに相当する）において、ヌクレオシド（例えば、式(I)の化合物）の5'末端が、ヌクレオチド（例えば、式(II)の化合物）の3'末端にカップリングされる。これらの2つの新たに結合されたヌクレオチド間の連結がホスホチオエート（すなわち、例えば、式(IV)におけるようなP=S結合）であるべきかまたはホスホジエステル（すなわち、例えば、式(VIII)におけるようなP=O結合）であるべきかに応じて、オリゴヌクレオチドは、それぞれ、硫化される（工程b）か、または酸化される（工程e）かのいずれかとなる。最後に、次の5'-ヒドロキシ基が脱保護され（工程cまたはf、例えば、式(VI)及び(IX)）、上記プロセスが繰り返されて次のヌクレオシドを付加する。上記のように「式(VI)及び(IX)のいくらかの未反応化合物」は、カップリング工程a）またはd）が完了しても、式(VI)及び(IX)のいくらかの化合物が未反応で残存して後のカップリング反応に利用可能であり、結果として、所望のオリゴヌクレオチドと比較して、オリゴヌクレオチドが存在しないオリゴヌクレオチドを生じさせ得ることを意味する。所望のオリゴヌクレオチドと比較して、たった1つのオリゴヌクレオチドも存在しないオリゴヌクレオチド（「N-1不純物」）は、所望のオリゴヌクレオチドから分離することが難しい可能性があるため、N-1不純物の形成を防止するために、未反応の5'-OHのヒドロキシのキャッピングが必要である。「いくらかの」により、例えば、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、または0.5%未満が残存し得る任意の量が企図される。

【0048】

そのため、このプロセスは、いずれのキャッピング工程も全く必要とすることなく、任意の数のホスホチオエート結合及び最大4つのホスホジエステルを有するオリゴヌクレオチドの合成を可能にする。なぜなら、いずれの未反応の5'-ヒドロキシ基も、硫化剤それ自身、または硫化剤と2つのヌクレオシド間の連結におけるリン原子との反応の副生成物と反応するからである。これは、カップリング工程の後に未反応の5'-OHのいずれかをロックするキャッピング工程が行われる従来の合成とは対照的である。

【0049】

本発明の第6実施形態は、第3実施形態で記載されているプロセスであって、g)式(VI)の未反応化合物をキャッピング剤と反応させて、式(XIV)の化合物：

【0050】

10

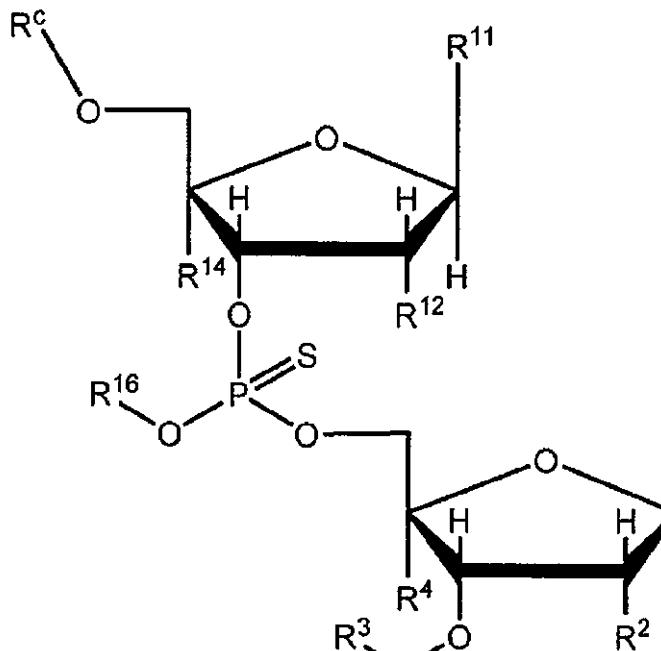
20

30

40

50

【化 1 5】



(XIV),

10

20

【0051】

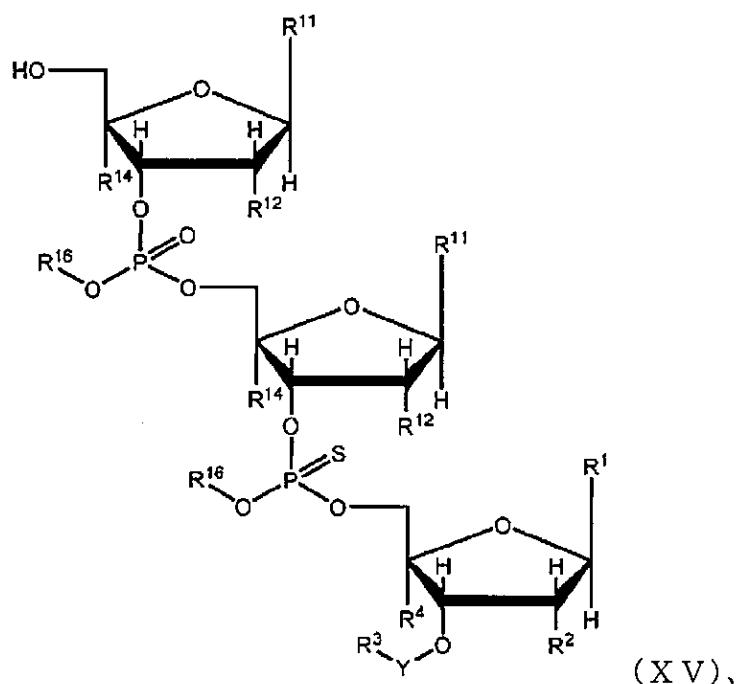
またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含み、R^cが、キャッピング剤から形成されたヒドロキシ保護基である、上記プロセスである。「キャッピング剤」は、塩基触媒、例えばピリジンまたはN-メチルモルホリンを用いる、当業者に公知のいずれのキャッピング剤、例えば、無水酢酸であってもよい。

【0052】

本発明の第7実施形態は、第6実施形態で記載されているプロセスであって、h)式(VIII)の化合物を脱保護して式(XV)の化合物：

【0053】

【化 1 6】



(XV),

30

40

50

【0054】

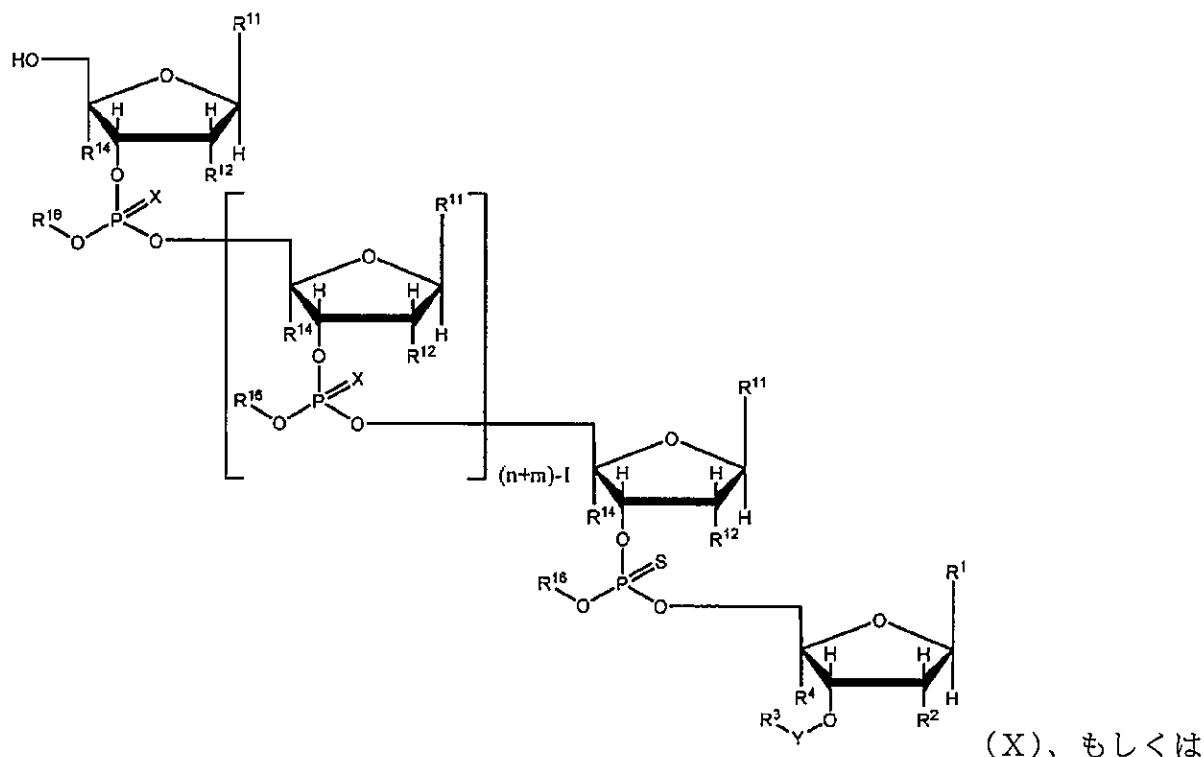
またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、上記プロセスである。

【0055】

本発明の第8実施形態は、第7実施形態で記載されているプロセスであって、式(VI)の化合物または式(IX)の化合物によって開始して、工程a)、b)、及びc)がn回繰り返され、工程d)、e)、g)及びh)がm回繰り返され、工程a)、b)、及びc)ならびに工程d)、e)、g)及びh)の繰り返しが、互いに対してもうれの順序で行われてもよく、nが少なくとも1であり、mが0以上であり、式(X)もしくは(XVII)のオリゴヌクレオチド：

【0056】

【化17】

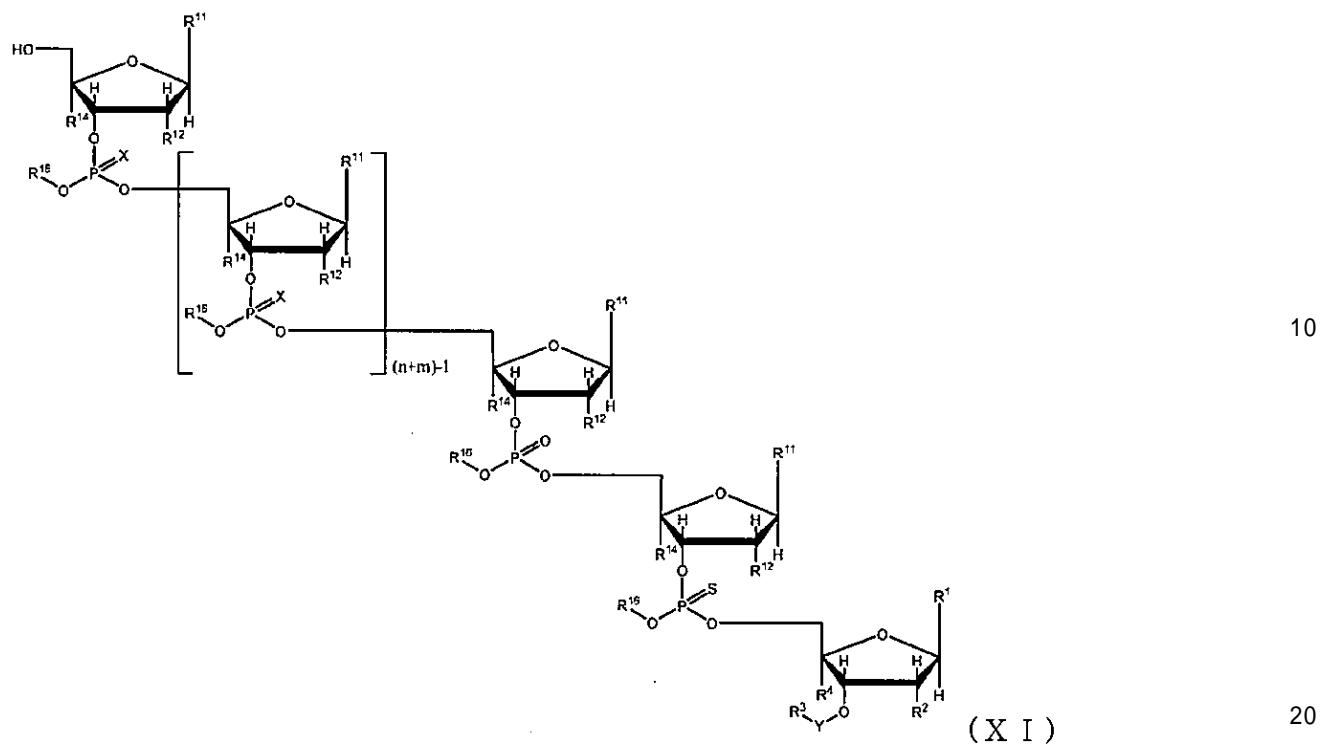


【0057】

40

50

【化18】

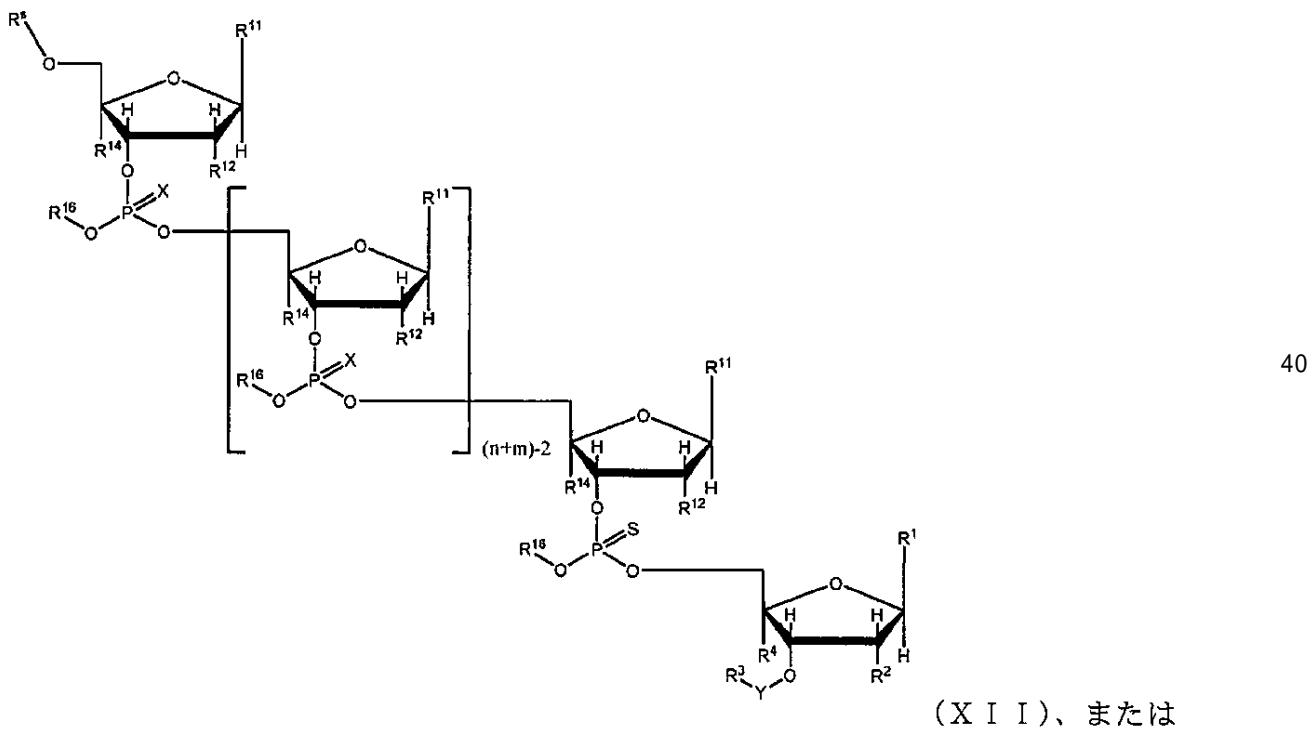


【0058】

またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴスクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (V I) 及び (IX) のいくらかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または硫化工程後の硫化剤の副生成物と反応して、式 X I I または X I I I の化合物：

【0059】

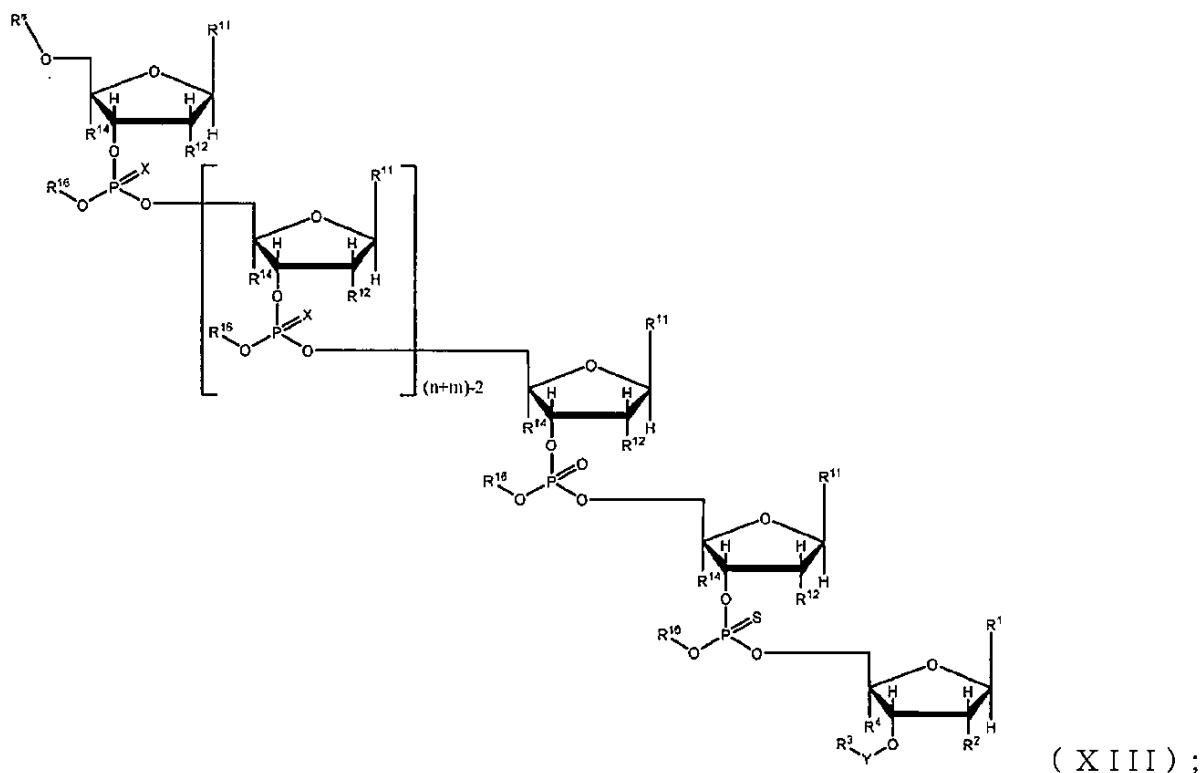
【化19】



または

【0060】

【化20】



【0061】

式中、各Xは、SまたはOから独立して選択される；を形成する、上記プロセスである。特に、nは、1～30、5～25、または10～15であり、mは、0～10、0～5、または5～10である。

【0062】

第8実施形態で上記に記載されているプロセスは、所望のオリゴヌクレオチドを形成するためのヌクレオチドの段階的付加を含む。これらの工程は、それぞれ、ホスホチオエート連結を含有するヌクレオチドを、成長するオリゴヌクレオチドに付加する、3反応、及びホスホジエステル連結を含有するヌクレオチドを、成長するオリゴヌクレオチドに付加する、4反応を含む。第1工程（工程a及びdに相当する）において、ヌクレオシド（例えば、式Iの化合物）の5'末端が、ヌクレオチド（例えば、式IIの化合物）の3'末端にカップリングされて、これら2つのヌクレオチドをカップリングする（化合物、例えば式（III）及び（VI））の化合物を形成する。これらの2つの新たに結合されたヌクレオチド間の連結が、ホスホチオエート（すなわち、P=S結合）であるべきかまたはホスホジエステル（すなわち、P=O結合）であるべきかに応じて、オリゴヌクレオチドは、硫化される（工程b、化合物、例えば式（IV）の化合物を形成する）かまたは酸化される（工程e、化合物、例えば式（IV）または（VII）の化合物を形成する）かのいずれかとなる。第5実施形態で上記に記載されているプロセスとは異なり、第8実施形態は、非限定数のホスホジエステル連結を許容するため、キャッピング工程は、各酸化工程（工程g）の後に完了されなければならない。しかし、第5実施形態としては、硫化工程の後にキャッピング工程が必要とされない。第5実施形態としては、次の5'-ヒドロキシ基が脱保護され（工程cまたはh、例えば、式（VI）及び（IX））、上記プロセスが繰り返されて次のヌクレオシドを付加する。そのため、このプロセスは、任意の数のホスホチオエート結合及びホスホジエステル結合によるオリゴヌクレオチドの合成を可能にし、酸化工程を含むサイクルの後にのみキャッピング工程を必要とする。これは、硫化工程を含んでいても、未反応の5'OHのいずれかをブロックするキャッピング工程がサイクルごとにされる従来の合成とは対照的である。

30

40

40

50

【0063】

第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、及び第8実施形態のいくつかの態様において、式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)、(XI)、(XII)、(XIII)、または(XV)の化合物が、塩ではない。

【0064】

第5または第8実施形態の特定の態様において、nは、2~1000である。特に、nは、2~500である。特に、nは、2~50である。特に、nは、2~25である。

【0065】

第9実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、及び第8実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、固体支持体に付着したリンカーが、開裂している。

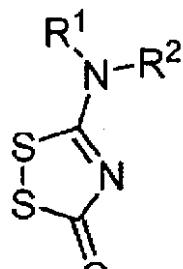
10

【0066】

第10実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、及び第9実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤が式Aの化合物：

【0067】

【化21】



(A)

20

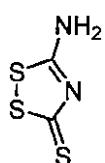
【0068】

式中、R¹及びR²の各々が、H、任意選択的に置換されているアルキル及び任意選択的に置換されているアリール基から独立して選択される；である。第10実施形態の特定の態様において、R¹及びR²は、両方がHであり：

30

【0069】

【化22】



【0070】

これは、3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(XHまたはADTT)として知られている。いくつかの態様において、R^Sは、-C(SH)(=N)-CNである。

40

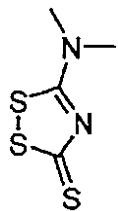
【0071】

第10実施形態の特定の態様において、R¹及びR²は、両方がメチルであり：

【0072】

50

【化23】



【0073】

これは、3-(N,N-ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン(DDTT)として知られている。いくつかの態様において、R^Sは、-C(=S)NH₂C(=S)N=CHN(CH₃)₂である。

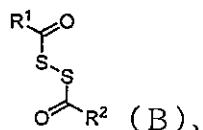
10

【0074】

第11実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、及び第9実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、式Bの化合物：

【0075】

【化24】



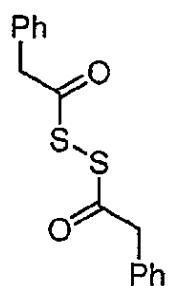
20

【0076】

式中、R¹及びR²の各々は、H、任意選択的に置換されているアルキル及び任意選択的に置換されているアリール基から独立して選択される；である。第10実施形態の特定の態様において、R¹及びR²は、両方がベンジル(PhCH₂)であり：

【0077】

【化25】



30

【0078】

これは、フェニルアセチルジスルフィド(PADS)として知られている。特定の態様において、R^Sは、-C(=O)CH₂C₆H₅である。

40

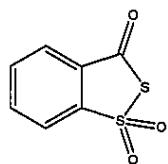
【0079】

第12実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、及び第9実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキサイド(Beaucage試薬)：

【0080】

50

【化26】

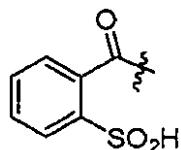


【0081】

である。第12実施形態の具体的な態様において、R^Sは、

【0082】

【化27】



【0083】

である。

【0084】

第13実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、及び第12実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、0～30分、例えば、0、5、10、15、20、25、または30分間硫化剤を再循環させることによって反応する。一実施形態において、硫化剤は、1～30分、1～20分、1～10分、または1～5分間再循環される。別の実施形態において、硫化剤は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10分間再循環される。

10

【0085】

第14実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、及び第13実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、少なくとも0～20回、例えば、1、2、5、10、15、20回再循環される。一実施形態において、硫化剤は、1～20回、1～10回、または1～5回再循環される。

20

【0086】

第15実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、及び第14実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化剤は、固体支持体に付着した第1ヌクレオシドの量に対して3～6当量の硫化剤を再循環させることによって反応する。

30

【0087】

第16実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、及び第15実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、硫化試薬の濃度は、0.02M～2.0Mである。いくつかの態様において、硫化剤は、ピリジン、3-ピコリン、アセトニトリル、またはこれらの混合物に溶解される。第16実施形態の特定の態様において、硫化試薬の濃度は、0.05M～0.5Mである。特定の態様において、硫化試薬は、ピリジンに溶解された、0.02M～0.1M、例えば、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、または0.1Mの濃度で添加された3-(ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン(DDTT)である。特定の態様において、硫化試薬は、アセトニトリル(ACN)中、0.01M～0.2M、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.

40

50

11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2Mの濃度で添加された3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキサイド(Bea u c a g e 試薬)である。特定の態様において、硫化試薬は、アセトニトリル(ACN)/3-ピコリン中、0.01M~0.2M、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2Mの濃度で添加されたフェニルアセチルジスルフィド(PADS)である。特定の態様において、硫化試薬は、ピリジン中、0.01M~0.2M、例えば、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.2Mの濃度で添加された3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(XHまたはADTT)である。

【0088】

ある特定の実施形態において、上記の硫化試薬(例えば、フェニルアセチルジスルフィド(PADS)または3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(XH))は、本発明のプロセスでの使用の前に塩基で処理される(すなわち、エージング)。例示的な塩基として、限定されないが、N-メチルイミダゾール、ピリジン及び3-ピコリンが挙げられる。硫化試薬は、1分~5日、例えば5分~24時間、10分~12時間、30分~10時間、1時間~8時間、2時間~6時間、または3時間~5時間、塩基によってエージングされ(すなわち、塩基で処理され)得る。一実施形態において、硫化試薬は、4時間エージングされる。別の実施形態において、硫化試薬PADSは、本発明のプロセスにおいて使用される前に、3-ピコリンによって4時間エージングされる。

【0089】

第17実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、及び第16実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、核酸塩基は、シトシン、グアニン、アデニン、チミン(または5-メチルウラシル)、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7-メチルグアニン、5,6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、及び5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、ここで、核酸塩基のNH₂基は、存在する場合、PhCO-、CH₃CO-、iPrCO-、Me₂N-CH=、またはMe₂N-CMe=によって保護されている。特定の実施形態において、核酸塩基は、シトシン、グアニン、アデニン、チミン(または5-メチルウラシル)、ウラシル、及び5-メチルシトシンからなる群から選択され、ここで、核酸塩基のNH₂基は、存在する場合、PhCO-、CH₃CO-、iPrCO-、Me₂N-CH=、またはMe₂N-CMe=によって保護されている。

【0090】

第18実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、及び第17実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、各R²及びR^{1,2}は、H、F、及びC₁₋₄アルコキシによって任意選択的に置換されているC₁₋₄アルコキシからなる群から独立して選択され；各R⁴は、独立してHであるか、またはR²のアルコキシ基と共に環を形成し、ここで、当該環は、1~3個のC₁₋₄アルキル基によって任意選択的に置換されている5または6員環であり；R^{1,6}は、-CH₂CH₂CNであり；R^{1,7a}及びR^{1,7b}は、独立して、C₁₋₄アルキルであり；各R^{1,4}は、独立してHであるか、またはR^{1,2}のアルコキシ基と共に環を形成し、当該環は、1~3個のC₁₋₄アルキル基によって任意選択的に置換されている5または6員環である。

【0091】

第19実施形態において、上記プロセスは、第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第16、第17及び第18実施形態のいずれか1つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通り

10

20

30

40

50

であり、各 R² 及び R¹² は、 H または C_{1~4} アルコキシによって任意選択的に置換されている C_{1~4} アルコキシから独立して選択され； R¹⁵ は、 4 , 4' -ジメトキシトリチルであり； R¹⁶ は、 -CH₂CH₂CN であり； R^{17a} 及び R^{17b} は、 独立して、 C_{1~6} アルキルであり； R⁵ は、 -C(=N)(SH)-CN または -C(=O)CH₂C₆H₅ である。

【0092】

第 20 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、第 15、第 16、第 17、第 18、及び第 19 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、 Y は、存在しない。代替的には、 Y は、 単一のヌクレオチドである。代替的には、 Y は、 2 ~ 50 のヌクレオチド、特に、 2 ~ 40 のヌクレオチド、 2 ~ 30 のヌクレオチド、または 2 ~ 25 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである。

10

【0093】

第 21 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、第 15、第 16、第 17、第 18、第 19、及び第 20 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、式(X) または (XI) の化合物は、 2 ~ 30 のヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。特定の態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、修飾 RNA のみを含む。代替的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA 及び修飾 RNA を含む。特に、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ギャップマーである。代替的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA のみを含む。

20

【0094】

第 22 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、第 15、第 16、第 17、第 18、第 19、第 20、及び第 21 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、(5' ~ 3') の配列

T C A C T T C A T A A T G C T G G (配列番号 1)、

ここで、オリゴヌクレオチドの各インターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエート連結であり、オリゴヌクレオチドの各ヌクレオシドは、 2' - O - メトキシエチル (MOE) ヌクレオシドであり、各シトシンは、 5' - メチルシトシンである；を有するホスホロチオエートオリゴヌクレオチドである。配列番号 1 は、 B I I B 0 5 8 としても知られており、 WO 2007 / 002390、WO 2010 / 148249、及び US 8,980,853 に記載されており、それぞれの教示は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0095】

第 23 実施形態において、上記プロセスは、第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 6、第 7、第 8、第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14、第 15、第 16、第 17、第 18、第 19、第 20、及び第 21 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれかの態様で記載されている通りであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、 5 - 1 0 - 5 MOE ギャップマーであり、(5' ~ 3') の配列

40

C A G G A T A C A T T T C T A C A G C T (配列番号 2)、

ここで、ヌクレオシド 1 ~ 5 及び 16 ~ 20 は、それぞれ、 2' - O - メトキシエチルリボース修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド 6 ~ 15 は、それぞれ、 2' - デオキシヌクレオシドであり、ヌクレオシド 2 ~ 3、4 ~ 5、16 ~ 17、及び 18 ~ 19 間のインターヌクレオシド連結は、ホスホジエステル連結であり、ヌクレオシド 1 ~ 2、3 ~ 4、5 ~ 6、6 ~ 7、7 ~ 8、8 ~ 9、9 ~ 10、10 ~ 11、11 ~ 12、12 ~ 13、13 ~ 14、14 ~ 15、15 ~ 16、17 ~ 18、及び 19 ~ 20 間のインターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエート連結であり、各シトシンは、 5' - メチルシトシンである；を有する。配列番号 2 は、以下の化学表記法によって記載されている： mCes Aeo G es Geo Aes Tds Ads mCds Ads Tds Tds Tds mC

50

d s T d s A d s m C e o A e s G e o m C e s T e ;

A = アデニン、

m C = 5' - メチルシトシン

G = グアニン、

T = チミン、

e = 2' - O - メトキシエチルリボース修飾糖、

d = 2' - デオキシリボース糖、

s = ホスホロチオエートインターヌクレオシド連結、及び

o = ホスホジエステルインターヌクレオシド連結。

配列番号 2 は、 B I I B 0 6 7 または I S I S 6 6 6 8 5 3 として知られている通り
であり、 WO 2 0 1 5 1 5 3 8 0 0 に記載されており、その教示は、参照により本明細書
に組み込まれる。 10

【 0 0 9 6 】

第 2 4 実施形態において、上記プロセスは、第 1 、 第 2 、 第 3 、 第 4 、 第 5 、 第 6 、 第
7 、 第 8 、 第 9 、 第 1 0 、 第 1 1 、 第 1 2 、 第 1 3 、 第 1 4 、 第 1 5 、 第 1 6 、 第 1 7 、
第 1 8 、 第 1 9 、 第 2 0 、 及び第 2 1 実施形態のいずれか 1 つ、またはこれらのいずれか
の態様で記載されている通りであり、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、 4 - 8 - 6 ギ
ヤップマーであり、 (5 ' ~ 3 ') の配列：

G C C C C T A G C G C G A C U C (配列番号 8)

ここで、ヌクレオシド 1 ~ 4 及び 1 3 ~ 1 8 は、それぞれ、 2 ' - O - メトキシエチルリボ
ース修飾ヌクレオシドであり、ヌクレオシド 5 ~ 1 2 は、それぞれ、 2 ' - デオキシリボヌ
クレオチドであり、ヌクレオシド 2 ~ 3 、 3 ~ 4 、 1 3 ~ 1 4 、 1 4 ~ 1 5 、 及び 1 5 ~
1 6 間のインターヌクレオシド連結は、ホスホジエステル連結であり、ヌクレオシド 1 ~
2 、 4 ~ 5 、 5 ~ 6 、 6 ~ 7 、 7 ~ 8 、 8 ~ 9 、 9 ~ 1 0 、 1 0 ~ 1 1 、 1 1 ~ 1 2 、 1
2 ~ 1 3 、 1 6 ~ 1 7 及び 1 7 ~ 1 8 間のインターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエ
ート連結であり、各シトシンは、 5 - メチルシトシンであり、ウラシルは、 5 - メチルウ
ラシルである；を有する。配列番号 8 以下の化学表記法によって記載されている：

【 0 0 9 7 】

【 化 2 8 】

$5' \text{-} \underline{\text{G}}^{\text{Me}} \underline{\text{C}}_{\text{P=O}}^{\text{Me}} \underline{\text{C}}_{\text{P=O}}^{\text{Me}} \underline{\text{C}}^{\text{Me}} \text{CTAG}^{\text{Me}} \text{CG}^{\text{Me}} \text{CG}^{\text{Me}} \underline{\text{C}}_{\text{P=O}} \underline{\text{G}}_{\text{P=O}} \underline{\text{A}}_{\text{P=O}}^{\text{Me}} \underline{\text{C}}^{\text{Me}} \underline{\text{U}}^{\text{Me}} \underline{\text{C}} \text{-} 3'$

下線 = M o E リボヌクレオチド

G = グアニン

$^{\text{M e }} \text{C}$ = 5 - メチルシトシン

T = チミン

A = アデニン

$^{\text{M e }} \text{U}$ = 5 - メチルウラシル（チミンとしても知られている）

P = O = ホスホジエステルインターヌクレオシド連結

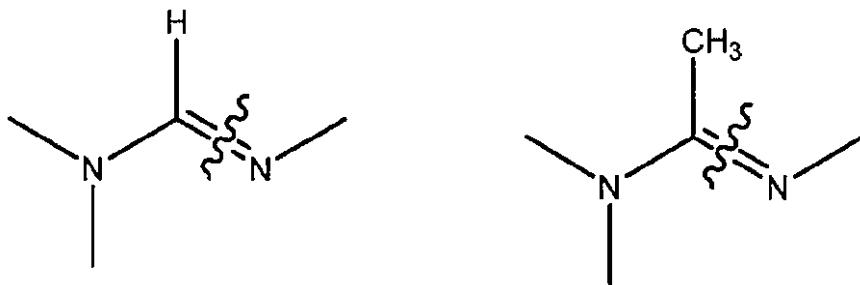
任意の他のインターヌクレオシド連結は、ホスホロチオエステル連結である。 40

【 0 0 9 8 】

「アミン保護基」は、アミン基、 NH_2 を保護するのに好適な任意の基を包含し、例え
ば、限定されないが、 PhCO- 、 $\text{CH}_3\text{CO-}$ 、 iPrCO- 、 及び $\text{Me}_2\text{N-CH=}$
、 $\text{Me}_2\text{N-CMe=}$ が挙げられる。 $\text{Me}_2\text{N-CH=}$ 及び $\text{Me}_2\text{N-CMe=}$ によって保
護されるアミノ基の得られる構造は以下の通りである：

【 0 0 9 9 】

【化29】



10

【0100】

さらなるアミン保護基は、Greene, TW et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007)に見出され得る。

【0101】

理論によって拘束されることを望まないが、カップリング工程の際にカップリングしなかった5' - ヒドロキシは、例えばPADSなどの硫化剤による硫化からヒドロキシリル誘導体を、またはキサンタンヒドリドからN - シアノカーボンイミドチオエートを、またはDTTからN , N - ジメチルチオ尿素 - N - チオカルボキシレートを形成すると考えられる：

【0102】

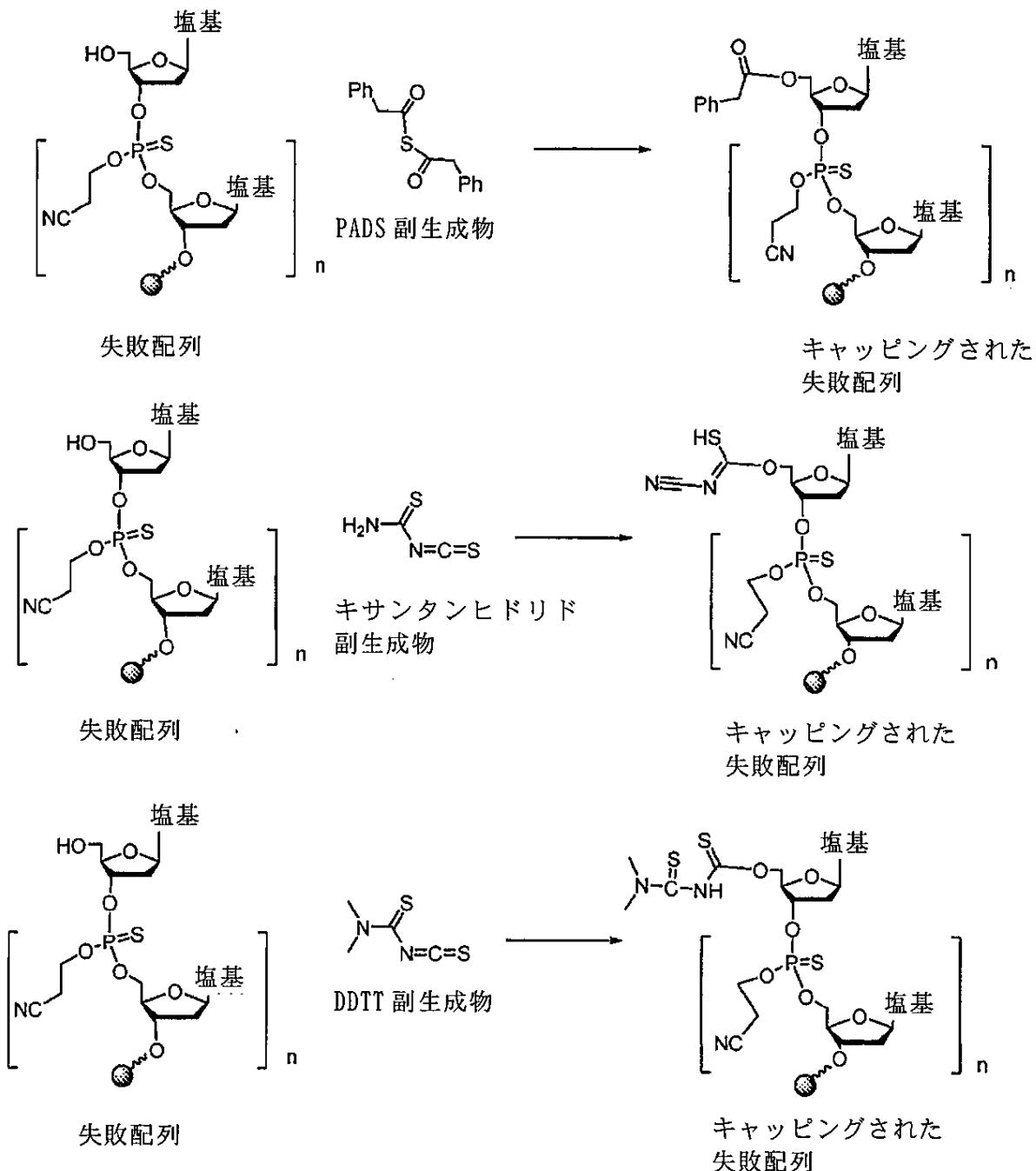
20

30

40

50

【化30】



【0103】

「ヒドロキシ保護基」は、ヒドロキシ基OHを保護するのに好適な任意の基を包含する。これらの保護基及びヒドロキシ保護基のさらなる例は、Greene, TW et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Ed., John Wiley and Sons (2007)に見出され得る。

【0104】

具体的な実施形態において、ヒドロキシ保護基は、キャッピング剤から形成され（例えば、式(XIV)におけるR^c）、例えば、アセチル(Ac)；ベンゾイル(Bz)；ベンジル(Bn)；-メトキシエトキシメチルエーテル(MEM)；メトキシメチルエーテル(MOM)；メトキシトリチル[(4-メトキシフェニル)ジフェニルメチル, MM T]；p-メトキシベンジルエーテル(PMB)；メチルチオメチルエーテル；ピバロイル(Piv)；テトラヒドロピラニル(THP)；テトラヒドロフラン(THF)；シリルエーテル(限定されないが、トリメチルシリル(TMS)、tert-ブチルジメチル

シリル (TBDMS)、トリ-イソ-プロピルシリルオキシメチル (TOM)、及びトリイソプロピルシリル (TIPS) エーテルを含む) ; メチルエーテル、ならびにエトキシエチルエーテル (EE) から選択され得る。

【0105】

代替的には、ヒドロキシ保護基は、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの 5' - ヒドロキシをブロックし(例えば、式(I I)、(I I I)、(I V)、(V I I)、及び(V I I I)におけるR¹⁵)、特定の態様においては、4', 4' -ジメトキシトリチル、[ビス-(4-メトキシフェニル)フェニルメチル] (DMT) またはトリチル(トリフェニルメチル、Tr) から選択される、酸に不安定な保護基である。

【0106】

「核酸塩基」は、ヌクレオシドの複素環式塩基部分を意味する。核酸塩基は、天然に存在するものであっても、修飾されていてもよい。ある特定の実施形態において、核酸塩基は、別の核酸の核酸塩基に水素結合することが可能である任意の原子または原子の基を含んでいてよい。特に、核酸塩基は、複素環式塩基、典型的には、プリン及びピリミジンである。「非修飾」または「天然」核酸塩基、例えば、プリン核酸塩基であるアデニン (A) 及びグアニン (G)、ならびにピリミジン核酸塩基であるチミン (T)、シトシン (C) 及びウラシル (U) に加えて、当業者に公知の多くの修飾核酸塩基または核酸塩基類似体が、本明細書に記載されている方法によって合成される化合物への組み込みに適している。ある特定の実施形態において、修飾核酸塩基は、親核酸塩基、例えば 7-デアザプリン、5-メチルシトシン、または G-クランプなどに構造がかなり類似する核酸塩基である。ある特定の実施形態において、核酸塩基類似体は、例えば三環式フェノキサジン核酸塩基類似体などの、より複雑な構造を含む。上記の修飾核酸塩基の調製のための方法は、当業者に周知である。

10

【0107】

「ヌクレオシド」は、複素環式塩基部分及び糖部分を含む化合物を意味する。

【0108】

「ヌクレオチド」は、ホスフェート連結基を含むヌクレオシドを意味する。

【0109】

「オリゴヌクレオチド」は、複数の連結されたヌクレオシドを含む化合物を指す。ある特定の実施形態において、複数のヌクレオシドの 1 つ以上が修飾されている。ある特定の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、1 つ以上のリボヌクレオシド (RNA) 及び / またはデオキシリボヌクレオシド (DNA) を含む。

30

【0110】

「インタヌクレオシド連結」は、オリゴヌクレオチドの隣接するヌクレオシド間の共有結合的連結を意味する。

【0111】

「ギャップマー」は、リボヌクレアーゼ H 開裂を支持する複数のヌクレオシドを有する内部領域が、1 つ以上のヌクレオシドを有する外部領域間に位置付けられているキメラアンチセンス化合物を意味し、ここで、内部領域を含むヌクレオシドは、外部領域を含むヌクレオシド(複数可)とは化学的に異なっている。

40

【0112】

本明細書において使用されているとき、「アルキル」という用語は、完全飽和の分岐または非分岐炭化水素部分を指す。好ましくは、アルキルは、1 ~ 20 個の炭素原子、より好ましくは 1 ~ 16 個の炭素原子、1 ~ 10 個の炭素原子、1 ~ 6 個の炭素原子、または 1 ~ 4 個の炭素原子を含む。いくつかの実施形態において、アルキルは、6 ~ 20 個の炭素原子を含む。アルキルの代表例として、限定されないが、メチル、エチル、n-プロピル、イソ-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、n-ヘプチル、n-オクチル、n-ノニル、または n-デシルが挙げられる。

50

【0113】

「アリール」という用語は、環部分において6～14個の炭素原子を有する単環式、二環式または三環式芳香族炭化水素基を指す。一実施形態において、アリールという用語は、6～10個の炭素原子を有する単環式及び二環式芳香族炭化水素基を指す。アリール基の代表例として、フェニル、ナフチル、フルオレニル、及びアントラセニルが挙げられる。

【0114】

「アリール」という用語はまた、少なくとも1つの環が芳香族であり、1または2つの非芳香族炭化水素環（複数可）に縮合している二環式または三環式基も指す。非限定例として、テトラヒドロナフタレン、ジヒドロナフタレン及びインダニルが挙げられる。

【0115】

アルキルまたはアリールの両方の基についての任意選択的な置換基は、各事象において、C₁～6アルキル、C₂～6アルケニル、C₂～6アルキニル、3～7員のカルボシクリル、3～7員のヘテロシクリル、ハロ、-CN、-C(O)R^a、-C(O)₂R^a、-C(O)N(R^a)₂、-OR^a、-N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)R^a、-N(R^a)N(R^a)₂、-NO₂、-N(R^a)C(O)₂R^a、-N(R^a)C(O)N(R^a)₂、-N(R^a)S(O)₂R^a、-SR^a、-S(O)R^a、-S(O)₂R^a、-S(O)N(R^a)₂、及び-S(O)₂N(R^a)₂から独立して選択され；

R^aは、各事象において、H、C₁～6アルキル、3～6員の単環式カルボシクリル、及び3～6員の単環式ヘテロシクリルから独立して選択される。

【0116】

本明細書において使用されているとき、「カルボシクリル」という用語は、3～7個の炭素原子、3～6、または5～7個の炭素原子の飽和または不飽和の単環式または二環式炭化水素基を指す。「カルボシクリル」という用語は、シクロアルキル基及び芳香族基を包含する。「シクロアルキル」という用語は、3～7個の炭素原子、3～6個の炭素原子、または5～7個の炭素原子の完全飽和の単環式または二環式炭化水素基を指す。例示的な単環式カルボシクリル基として、限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘプテニル、シクロブタジエニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプタジエニル、フェニル及びシクロヘプタトリエニルが挙げられる。例示的な二環式カルボシクリル基として、ビシクロ[2.1.1]ヘキシル、ビシクロ[2.2.1]ヘプチル、ビシクロ[2.2.1]ヘプテニル、トリシクロ[2.2.1.0^{2,6}]ヘプタニル、6,6-ジメチルビシクロ[3.1.1]ヘプチル、または2,6,6-トリメチルビシクロ[3.1.1]ヘプチル、スピロ[2.2]ペンテニル、及びスピロ[3.3]ヘプタニルが挙げられる。

【0117】

「架橋環系」という用語は、本明細書において使用されているとき、カルボシクリルまたはヘテロシクリル環を有する環系であって、当該環の2つの非隣接原子が、C、N、O、またはSから選択される1つ以上（好ましくは1～3つ）の原子によって接続されている（架橋されている）、上記環系である。架橋環系は、6～7環員を有していてよい。

【0118】

「スピロ環系」という用語は、本明細書において使用されているとき、2つの環を有する環系であって、環のそれぞれが、カルボシクリルまたはヘテロシクリルから独立して選択され、2つの環構造が1つの環原子を共通して有している、上記環系である。スピロ環系は、5～7環員を有する。

【0119】

本明細書において使用されているとき、「ヘテロシクリル」という用語は、3～7環員、または特に3～6環員もしくは5～7環員を有する飽和または不飽和の、単環式または二環式（例えば、架橋もしくはスピロ環系）環系であって、これらの少なくとも1つが、ヘテロ原子であり、これらの最大4つ（例えば、1、2、3、または4）が、ヘテロ原子であってよく、当該ヘテロ原子が、O、S及びNから独立して選択され、ここで、Cが酸

10

20

30

40

50

化され得（例えば、C(O)）、Nが酸化（例えば、N(O)）または四級化され得、Sが、スルホキシド及びスルホンに任意選択的に酸化され得る、上記環系を指す。不飽和複素環式環として、ヘテロアリール環が挙げられる。本明細書において使用されているとき、「ヘテロアリール」という用語は、O、S及びNから独立して選択される1～4個のヘテロ原子を有する芳香族の5または6員の単環式環系であって、Nが、酸化（例えば、N(O)）または四級化され得、Sが、スルホキシド及びスルホンに任意選択的に酸化され得る、上記環系を指す。一実施形態において、ヘテロシクリルは、3～7員の飽和単環式、3～6員の飽和単環式、または5～7員の飽和単環式環である。一実施形態において、ヘテロシクリルは、3～7員の単環式、3～6員の単環式または5～7員の単環式環である。別の実施形態において、ヘテロシクリルは、6～7員の二環式環である。ヘテロシクリル基は、ヘテロ原子または炭素原子において付着され得る。ヘテロシクリルの例として、アジリジニル、オキシラニル、チイラニル、オキサジリジニル、ジオキシラニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、チオラニル、イミダゾリジニル、ピラゾリジニル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリジニル、チアゾリジニル、イソチアゾリジニル、ジオキソラニル、ジチオラニル、オキサチオラニル、ピペリジニル、テトラヒドロピラニル、チアニル、ピペラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ジオキサンニル、ジチアニル、トリオキサンニル、トリチアニル、アゼパニル、オキセパニル、チエパニル、ジヒドロフラニル、イミダゾリニル、ジヒドロピラニル、及びヘテロアリール環などが挙げられ、これらとして、アジリニル、オキシレニル、チイレニル、ジアジリニル、アゼチル、オキセチル、チエチル、ピロリル、フラニル、チオフェニル（またはチエニル）、イミダゾリル、ピラゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、フラザニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、ジチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピラニル、チオピラニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、オキサジニル、チアジニル、ジオキシニル、ジチイニル、オキサチアニル、トリアジニル、テトラジニル、アゼピニル、オキセピニル、チエピニル、ジアゼピニル、及びチアゼピニルなどが挙げられる。二環式複素環式環系の例として、3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサンニル、3-アザビシクロ[3.1.1]ヘプタニル、2-アザスピロ[3.3]ヘプタニル、2-オキサ-6-アザスピロ[3.3]ヘプタニル、及び5-アザスピロ[2.3]ヘキサンニルが挙げられる。

【0120】

30

「ハロゲン」または「ハロ」は、フルオロ、クロロ、ブロモまたはヨードであつてよい。

【実施例】

【0121】

例示

実施例1 オリゴヌクレオチド合成。

オリゴヌクレオチドを、固体支持体としてNitttophase HLLynLinker (Kinovate、350 μmol/gを投入) を用いてAKTA100固相合成機を使用して0.72～2.2mmolスケールで合成した。各ヌクレオシドを付着させるための合成サイクルは、3反応工程：脱トリチル化、カップリング、及び硫化；からなる。脱トリチル化工程を、試薬としてトルエン(10%)中ジクロロ酢酸によって達成した。カップリング工程を、固体支持体を通して、対応するホスホロアミダイト(アセトニトリル中0.1～0.2M)及び4,5-ジシアノイミダゾール(0.1M N-メチルイミダゾールを含有するアセトニトリル中1.0M)の溶液を循環させることによって行った。硫化工程を、以下の溶液：(a)アセトニトリル/3-ピコリン(1:1、v/v)中0.2M PADS；(b)ピリジン中0.2Mの3-アミノ-1,2,4-ジチアゾール-5-チオン(XH)；(c)アセトニトリル中0.2Mの3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキサイド(Beaucage試薬)；または(d)ピリジン中0.1Mの3-((ジメチルアミノ-メチリデン)アミノ)-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン(DDTT)；のうちいずれか1つを循環させることによって完了させた。対照実験では、合成は、4反応工程：脱トリチル化、カップリング、及び

40

50

硫化、及びキャッピング工程からなる。硫化工程後にキャッピング工程を用いることを除いて、全ての工程を上記と同様に実施した。キャッピングを、アセトニトリル中の無水酢酸、ピリジン、及びN-メチルイミダゾールの混合物によって行った。支持体からのオリゴヌクレオチドの開裂及び塩基の脱保護を昇温(50~60)にて濃水酸化アンモニアム中で実施した。合成反応パラメータを以下の表1にまとめる。オリゴヌクレオチド生成物をLC-MSによって分析した。

【0122】

【表1-1】

表1-プロセスプロトコル

プロセス工程	変数	3反応サイクル	4反応サイクル	単位	
合成支持体	支持体	Nitrophase UnyLinker HL	Nitrophase UnyLinker HL	$\mu\text{mol/g}$	
	投入	350	350	$\mu\text{mol/g}$	
脱トリチル化	試薬	10% DCA	10% DCA		
	脱ブロック体積	3	3	CV*	
	反応時間	3-6	3-6	分	
カップリング	当量アミダイト	1.5	1.5	eq**	
	濃アミダイト	0.2	0.2	M	
	活性化剤:アミダイト比	5:1	5:1		
	活性化剤	DCI [1.0M] 及び NMI [0.1M]	DCI [1.0M] 及びNMI [0.1M]		
	リサイクル流量	240	240	cm ³ /時	
	リサイクル時間	3.2	3.2	分	
硫化	試薬	ACN/3-ピコリン中 0.2M PADS(1:1、 v/v) または ピリジン中0.2M XH または ACN 中 0.2M Beaucage試薬 または ピリジン中 0.1M DDTT	ACN/3-ピ コリン (1:1 、 v/v) 中 0.2M PADS	ピリジン中 0.2M XH	
	投入体積	1.1	1.2	CV	
	反応時間	リサイクル形態	形態を通してリサイクルまたは流动	形態を通してリサイクルまたは流动	
		5	3.3	5	

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

酸化	試薬	水 / ピリジン中 0.5Mヨウ素	水 / ピリジン中 0.5Mヨウ 素	
	投入体積	2.0	2.0	CV
	接触時間	5	5	分
キャッシング	試薬	なし	キャッシング A、 2:3:5 [NMI / ピリジン / ACN] キャッシング B、 1:4 [Ac ₂ O / ACN]	
	キャッシング投入体積		0.3	CV
	反応時間		3~8	分
リン脱保護	試薬	50% TEA	50% TEA	
	投入体積	1.6	1.6	CV
	反応時間	90	90	分

* CV : カラム体積

** e q. : 当量

【0123】

プロセスによって調製されるオリゴヌクレオチド：

1. B I I B 0 5 8 (配列番号 1)、18マーhosホロチオエートオリゴヌクレオチド、各リボオリゴヌクレオチドは、2'位にメトキシ-エチル (MoE) を含む。

2. B I I B 0 6 7 (配列番号 2)、5-10-5ギャップマーhosホチオエステル及びhosホジエステル混合骨格オリゴヌクレオチド。ギャップマーの中心ブロックは、10デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2' - MoEリボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。

3. 以下の表2に示すhosホロチオエートオリゴヌクレオチド A、B、C、D、及び E。

4. B I I B 0 7 8 (配列番号 8)、4-8-6ギャップマーhosホチオエステル及びhosホジエステル混合骨格オリゴヌクレオチド。ギャップマーの中心ブロックは、8デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2' - MoEリボヌクレオチドのブロックによりフランクされている。

【0124】

【化31】



【0125】

(配列番号 8)

下線: MoEリボヌクレオチド

P = O : hosホジエステル

任意の他のもの: hosホチオエステル

【0126】

10

20

30

40

50

【表2】

表2. ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドA、B、C、D、及びE

コード	配列タイプ	ホスホロチオエートオリゴヌクレオチド配列	
A	全DNA配列	^{Me} CGA ^{Me} CT ATA ^{Me} CG ^{Me} CG ^{Me} CAA TATGG (配列番号3)	
B	5'-10'-5'ギャップマー ギャップマーの中心プロックは、10デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2'-OMeリボヌクレオチドのプロックによりフランクされている。	^{Me} CGA ^{Me} CU ATA ^{Me} CG ^{Me} CG ^{Me} CAA UAUGG (配列番号4)	10
C	5'-10'-5'ギャップマー ギャップマーの中心プロックは、10デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2'-MeOリボヌクレオチドのプロックによりフランクされている。	^{Me} CGA ^{Me} CT ATA ^{Me} CG ^{Me} CG ^{Me} CAA TATGG (配列番号5)	20
D	5'-10'-5'ギャップマー ギャップマーの中心プロックは、10デオキシリボヌクレオチドであり、これは、cEtリボヌクレオチドのプロックによりフランクされている。	^{Me} CGA ^{Me} CU ATA ^{Me} CG ^{Me} CG ^{Me} CAA UAUGG (配列番号6)	
E	5'-10'-5'ギャップマー ギャップマーの中心プロックは、10デオキシリボヌクレオチドであり、これは、2'-フルオロリボヌクレオチドのプロックによりフランクされている。	CGACU ATA ^{Me} CG ^{Me} CG ^{Me} CAA UAUGG (配列番号7)	30

【0127】

40

結果

1 . B I I B 0 5 8

B I I B 0 5 8 を本発明のプロセス（すなわち、3反応サイクル）を使用して調製し、サイクルプロセス当たり従来の4反応のものと比較した。PADS及びキサンタンヒドリドを硫化剤として使用した。硫化反応を、5分間、再循環モードとした。各プロセスの結果を表3に示す。

【0128】

50

【表3】

表3. B I I B 0 5 8 の粗収率及び純度の比較

	PADS		キサンタンヒドリド
	4反応サイクル	3反応サイクル	3反応サイクル
合計オリゴヌクレオチド収率(%)	84.06	86.56	86.31
DMT/オリゴヌクレオチドの収率(%)	70.81	77.12	76.89
合計純度(%)	83.08	89.19	89.09
MS純度(%)	91.97	93.29	93.67
UV純度(%)	91.59	95.50	95.02

【0129】

PADSを硫化剤として用いて4反応サイクルを3反応サイクルと比較すると、B I I B 0 5 8 の収率及び純度が3反応サイクルにおいて増大し、新たな不純物が発生しなかった。PADSと同様に実施した3反応サイクルにおけるキサンタンヒドリド。質量分析クロマトグラムの比較を図3に与える。

【0130】

2. B I I B 0 6 7

PADSを硫化剤として用いて、B I I B 0 6 7 を本発明のプロセス（すなわち、3反応サイクル）を使用して調製し、サイクルプロセス当たり従来の4反応のものと比較した。硫化反応を、5分間、再循環モードとした。B I I B 0 0 5 8 とは異なり、B I I B 0 6 7 は、P = O結合ならびにP = S結合を含む。そのため、3つの異なる反応を行った：1) 4反応サイクル、2) 3反応サイクル、及び3) 酸化工程の後のみにキャッピング工程を有する3反応サイクル。そのため、かかるヌクレオチドについては硫化工程ではなく酸化が含まれており、酸化工程の後にキャッピング工程を行わなかった。各プロセスの結果を表4に示す。

【0131】

【表4】

表4. B I I B 0 6 7 の粗収率及び純度の比較

	4反応サイクル	3反応サイクル	
		酸化後のキャッピング反応を有さず	酸化後のキャッピング反応を有する
合計オリゴヌクレオチド収率(%)	86.60	95.5	101.28
DMT/オリゴヌクレオチド(%)	66.70	76.5	80.74
質量純度(%)	89.00	90.70	87.84
UV純度(%)	86.50	88.30	90.75
合計純度(%)	76.99	80.09	79.71

【0132】

4反応サイクルを、酸化後にキャッピング反応を用いない3反応サイクルと比較すると、B I I B 0 6 7 の収率及び純度が増大し、新たな不純物が発生しなかった。酸化反応の

10

20

30

40

50

後にのみキャッピング工程を有しても、3反応サイクルによって調製されるB I I B 0 6 7の全体の純度は改善されなかった。そのため、キャッピングを有さない3反応サイクルは、P=O結合を含むオリゴヌクレオチドについても使用することができる。

【0133】

3. オリゴヌクレオチドA、B、C、D、及びE

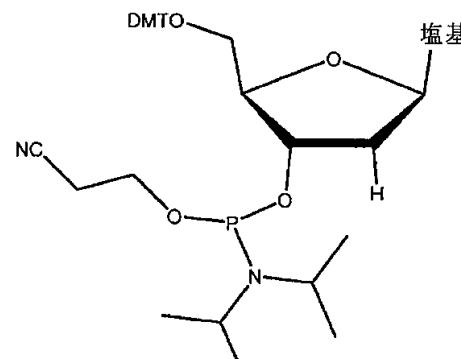
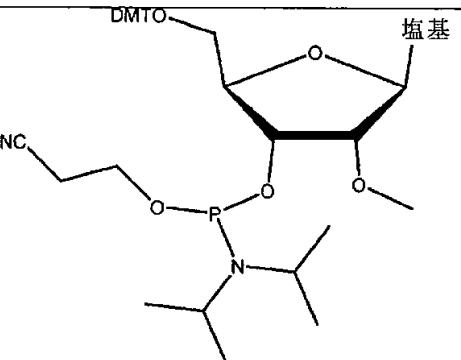
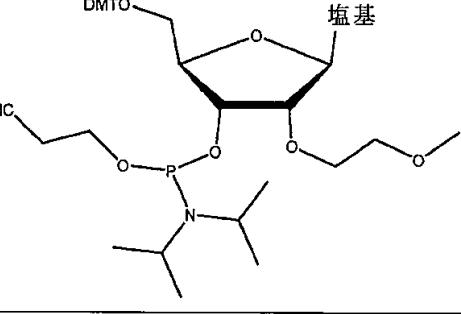
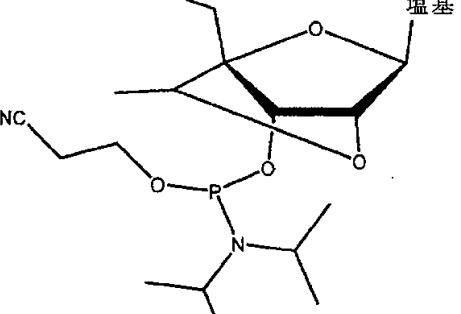
オリゴヌクレオチドA、B、C、D、及びEを本発明のプロセスを使用して調製し、サイクルプロセス当たり従来の4反応のものと比較した。表5は、合成に使用したアミダイトを与える。使用した硫化剤を表6に示す。

【0134】

【表5-1】

10

表5. 合成のためのアミダイト

5'ODMT-デオキシ-ホスホロアミダイト		H
5'ODMT-2'OMe-ホスホロアミダイト		OMe
5'ODMT-2'MoE-ホスホロアミダイト		MoE
5'ODMT-cEt-ホスホロアミダイト		cEt

20

30

40

50

【表 5 - 2】

5' ODMT-2' F-ホスホロアミダイト		F
------------------------	--	---

10

【0135】

【表 6】

表 6. 対応するオリゴヌクレオチドの合成に使用した硫化試薬

オリゴヌクレオチド	硫化試薬	
A	XH	PADS
B	XH	PADS
C	XH	PADS
D	XH	PADS
E	XH	PADS

20

【0136】

表 7 に示すように、本発明のプロセスからの粗オリゴヌクレオチドの収率、UV 純度及びMS 不純物プロファイルは、従来の 4 反応サイクルプロセスによって調製された粗オリゴヌクレオチドと同様である。

30

【0137】

40

50

【表 7 - 1】

表 7. 生成物におけるDMTの光学収率(OD)及びRPIP HPLC純度

硫化試薬	オリゴヌクレオチド	4反応サイクル	3反応サイクル	結論
キサンタンヒドリド	A	142.10D/ μ mol UV:73.61%	146.80D/ μ mol UV:78.65%	1. 3反応サイクルプロセスからの粗生成物の収率及びUV純度は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。 2. 3反応サイクルプロセスからのMS不純物プロファイルは、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と匹敵する。
	B	149.80D/ μ mol UV:78.20%	155.70D/ μ mol UV:79.71%	上記と同じ
	C	150.40D/ μ mol UV:80.56%	154.30D/ μ mol UV:82.36%	上記と同じ
	D	126.30D/ μ mol UV:71.15%	129.40D/ μ mol UV:73.31%	上記と同じ
	E	133.10D/ μ mol UV:71.34%	137.80D/ μ mol UV:73.10%	上記と同じ
PADS	A	146.70D/ μ mol UV:83.32%	154.90D/ μ mol UV:77.66%	上記と同じ
	B	150.10D/ μ mol UV:81.33%	154.30D/ μ mol UV:79.17%	上記と同じ
	C	158.80D/ μ mol UV:79.27%	159.20D/ μ mol UV:78.80%	上記と同じ
	D	107.50D/ μ mol UV:72.29%	129.30D/ μ mol UV:71.13%	1. 3反応サイクルプロセスからの粗生成物の収率及びUV純度は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。 2. 3反応サイクルプロセスからのMS

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

				不純物プロファイルは、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。3反応サイクルプロセスでのN-1不純物は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物より多い。
E		141.00D/ μmol UV:73.90%	140.90D/ μmol UV:75.77%	1. 3反応サイクルプロセスからの粗生成物の収率及びUV純度は、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と同様である。 2. 3反応サイクルプロセスからのMS不純物プロファイルは、4反応サイクルプロセスからの粗生成物と匹敵する。
Beaucage 試薬	A	167.4 OD/ μmol UV:79.70%	166.10D/ μmol UV:78.39%	上記と同じ

【0138】

4 . B I I B 0 7 8

B I I B 0 7 8 を本発明のプロセス（すなわち、3反応サイクル）を使用して調製し、従来の、サイクルプロセス当たり4反応のものと比較した。P A D S を硫化剤として使用した。硫化反応を、3分間、再循環モードとした。各プロセスの結果を表8及び図4～7に示す。

【0139】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8. B I I B 0 7 8 の粗収率及び純度の比較

PADS		
	4反応サイクルプロセス	3反応サイクルプロセス
DMT/オリゴヌクレオチドの収率 (%)	63.5	71.7
合計純度 (%)	81.29	83.46
MS純度 (%)	86.80	87.82
UV純度 (%)	93.65	95.04

【0140】

4反応サイクルを、PADSを硫化剤として用いる3反応サイクルと比較すると、B I I B 0 7 8の収率及び純度が3反応サイクルにおいて増大し、新たな不純物が発生しなかつた。HPLCクロマトグラム及び質量分析クロマトグラムの比較を図4~7に与える。

【0141】

実施例2. 硫化及びキャッピングについての二役のPADSのNMR研究

最初のNMR実験において、PADSをアセトニトリル-d3中の3-ピコリンにおいて22~16時間エージングした(スキーム1)。エージング後、n-BuOHを溶液に添加し、異なる点においてNMRスペクトルを採取した。スペクトルは、 $\text{P}(\text{OMe})_3$ の形成が非常に遅いことを示した。

【0142】

上記と同じ手順の後の別個の実験において、BuOHの添加後、反応混合物に $\text{P}(\text{OMe})_3$ を添加し、反応混合物のNMRスペクトルを異なる点において記録した。 $\text{P}(\text{OMe})_3$ は、固相合成におけるホスファイト中間体と同様の構造を有する。スペクトルは、約2分で $\text{P}(\text{OMe})_3$ の硫化が完了し、BuOHのエステル化(キャッピング)が生じたことを示した(図8)。

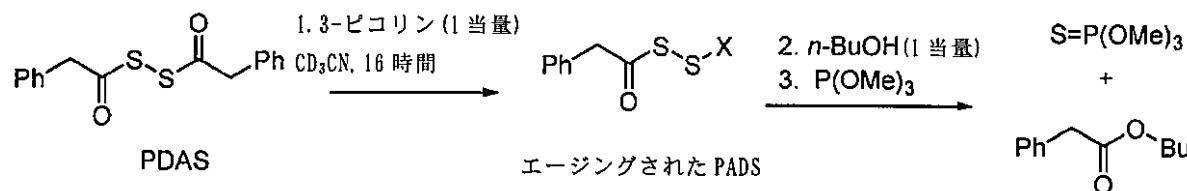
【0143】

これらの実験結果は、硫化の際に活性なキャッピング試薬が発生し、存在するアルコールをキャッピングしたことを実証した。

スキーム1.

【0144】

【化32】



【0145】

塩基としてN-メチルイミダゾールを用いて同じ実験を繰り返してPADSをエージングし、同様の結果を得た(スキーム2)。 $\text{P}(\text{OMe})_3$ を添加しないと、エステル化反応は非常に遅いが、BuOHのエステル化は硫化反応後すぐに生じた。これらの結果は、同じく、硫化及びキャッピングが、一旦硫化が起こって生じたことを示した(図9)。

スキーム2. NMRにおけるPADSのエージング

【0146】

10

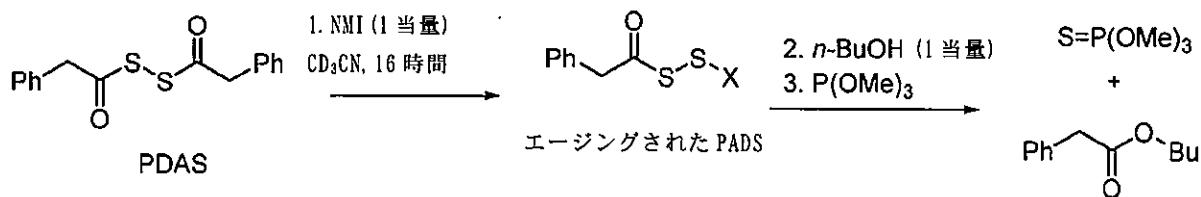
20

30

40

50

【化33】



【0147】

N M I : N - メチルイミダゾール

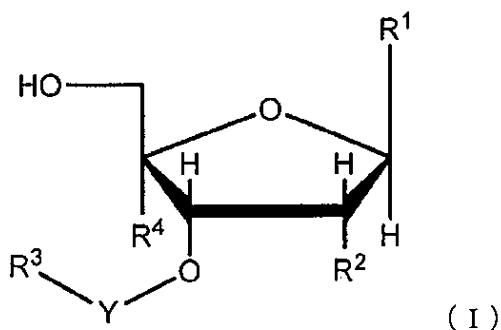
10

発明の態様

[態様 1] オリゴヌクレオチドを調製するためのプロセスであって

a) 式 (I) の化合物 :

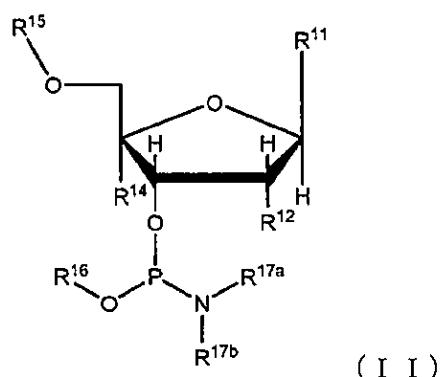
【化34】



20

を式 (II) の化合物 :

【化35】



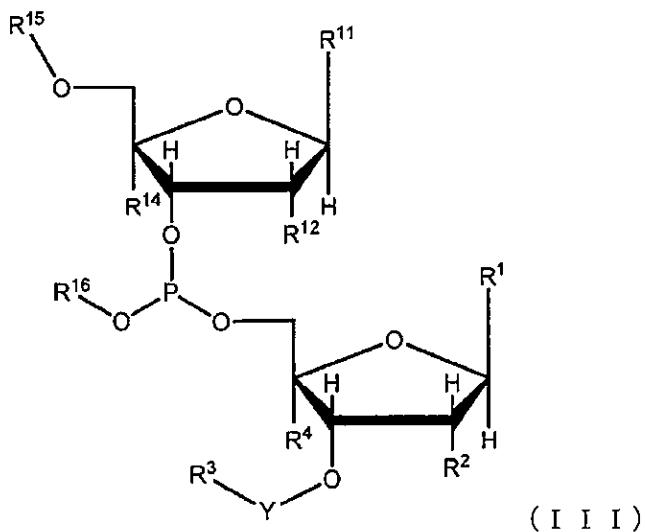
30

と反応させて、式 (III) の化合物 :

40

50

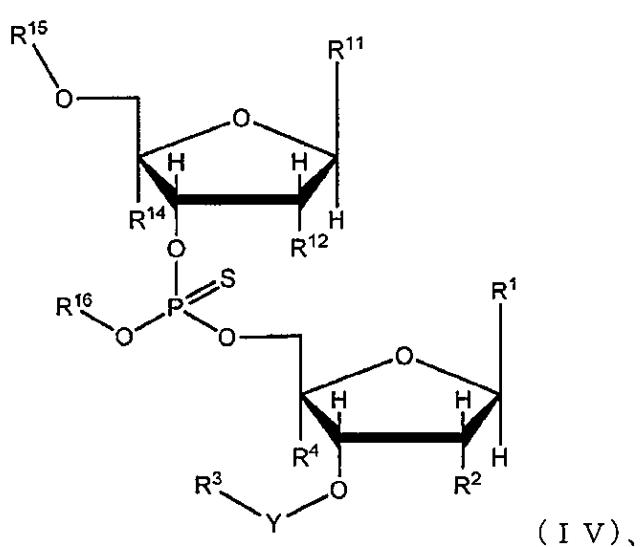
【化36】



を形成することと；

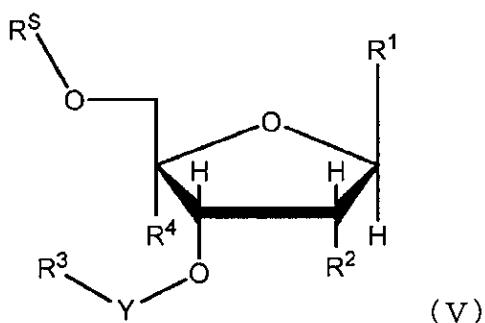
b) 前記式(III)の化合物を、硫化剤を用いて硫化して、式(IV)の化合物：

【化37】



を形成し、式(I)の未反応化合物から式(V)の化合物：

【化38】



を形成することと；

を含み、

式中

40

50

各 R¹ 及び R¹¹ は、独立して、核酸塩基であり、前記核酸塩基の NH₂ が、存在する場合、アミン保護基によって保護されており；

各 R² 及び R¹² は、H、ハロ、及び C₁₋₆ アルコキシによって任意選択的に置換されている C₁₋₆ アルコキシからなる群から独立して選択され；

R³ は、リンカーを任意選択的に含む固体支持体であり；

Y は、非存在、ヌクレオチド、または 2 以上のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドであり；

各 R⁴ は、独立して H であるか、または R² の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

各 R¹⁴ は、独立して H であるか、または R¹² の前記アルコキシ基と共に環を形成し；

R¹⁵ は、ヒドロキシ保護基であり；

R¹⁶ は、-CN によって任意選択的に置換されている C₁₋₆ アルキルであり；

R^{17a} 及び R^{17b} は、独立して C₁₋₆ アルキルであり；

R⁵ は、前記硫化剤の副生成物から形成されたヒドロキシ保護基であり；

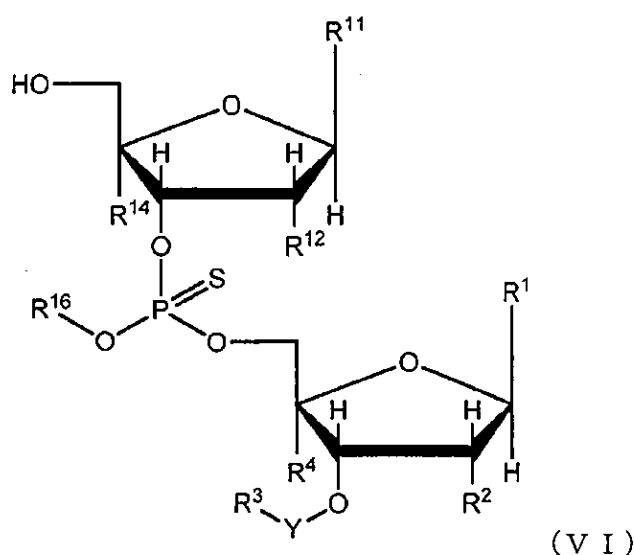
前記硫化剤は、式(I)の未反応化合物から前記式(V)の化合物に実質的に完全に変換し、かつ前記式(III)の化合物から前記式(IV)の化合物に変換するのに十分な時間量で反応され；

式(I)の未反応化合物から式(V)の化合物に実質的に完全に変換し、かつ前記式(III)の化合物から前記式(IV)の化合物に変換するのに十分な量の硫化剤が添加され；

前記式(I)、(II)、(III)、(IV)、及び(V)の化合物が、任意選択的に、薬学的に許容可能な塩の形態である、前記プロセス。

[態様 2] c) 前記式(IV)の化合物を脱保護して、式(VI)の化合物：

【化 3 9】



またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、態様 1 に記載のプロセス。

[態様 3] d) 前記式(VI)の化合物を式(II)の化合物と反応させて、式(VII)の化合物：

10

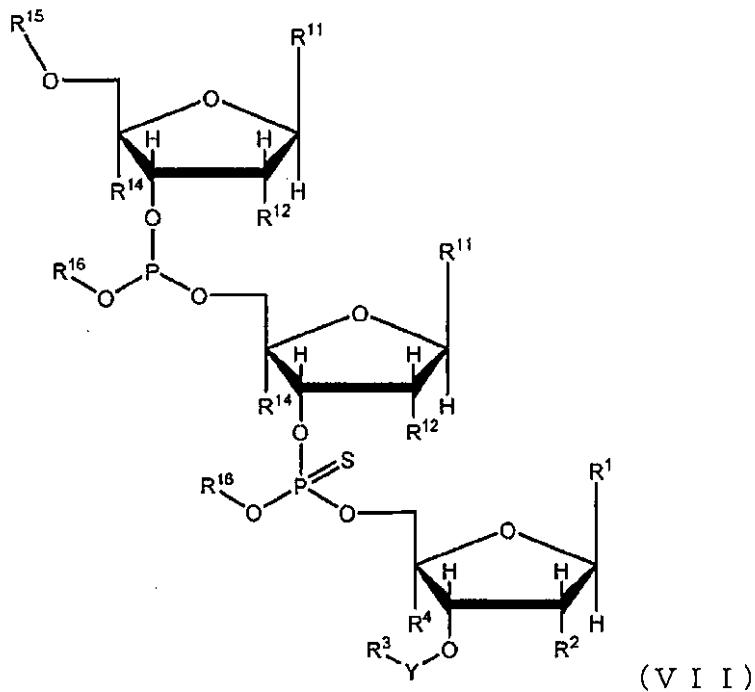
20

30

40

50

【化40】



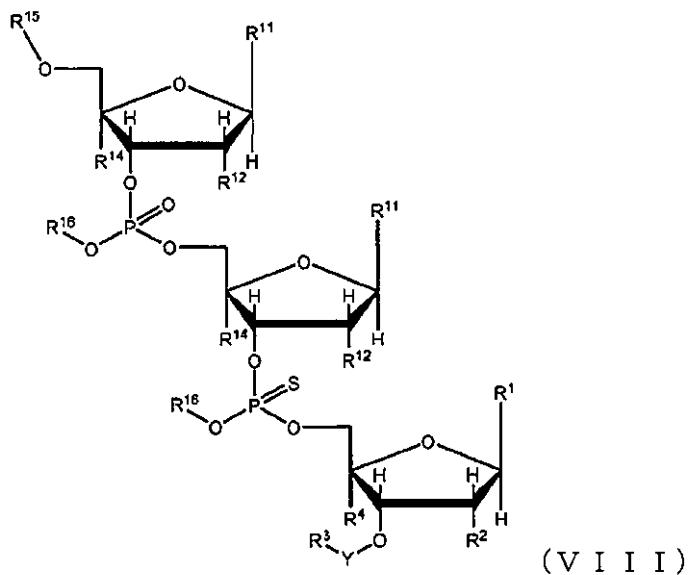
20

20

またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程と；

e) 前記式 (VII) の化合物を、酸化剤を用いて酸化して、式 (VIII) の化合物：

【化41】



30

40

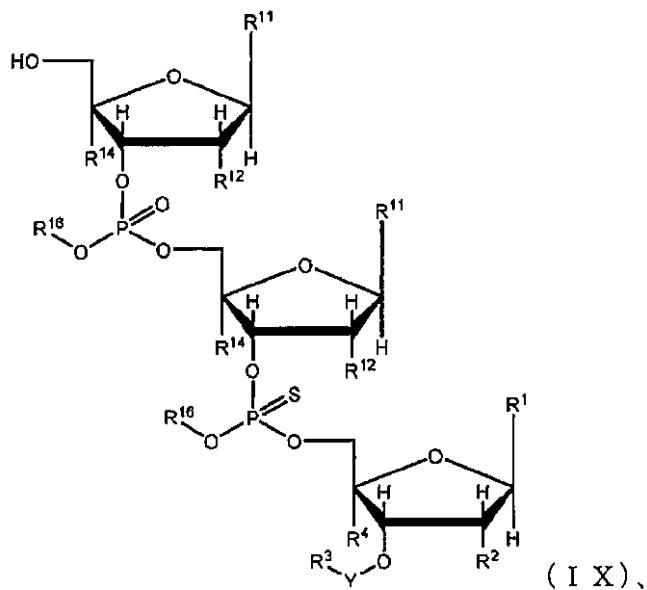
を形成する工程と

をさらに含む、態様2に記載のプロセス。

[態様4] f) 前記式 (VIII) の化合物を脱保護して、式 (IX) の化合物：

50

【化42】

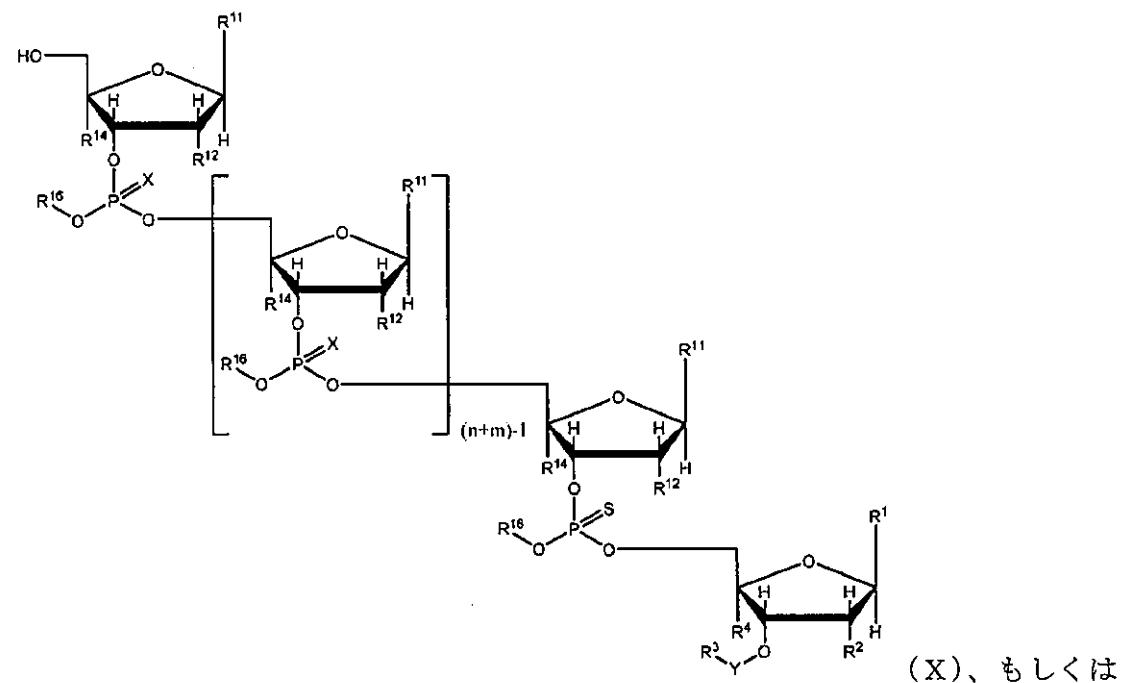


またはその薬学的に許容可能な塩

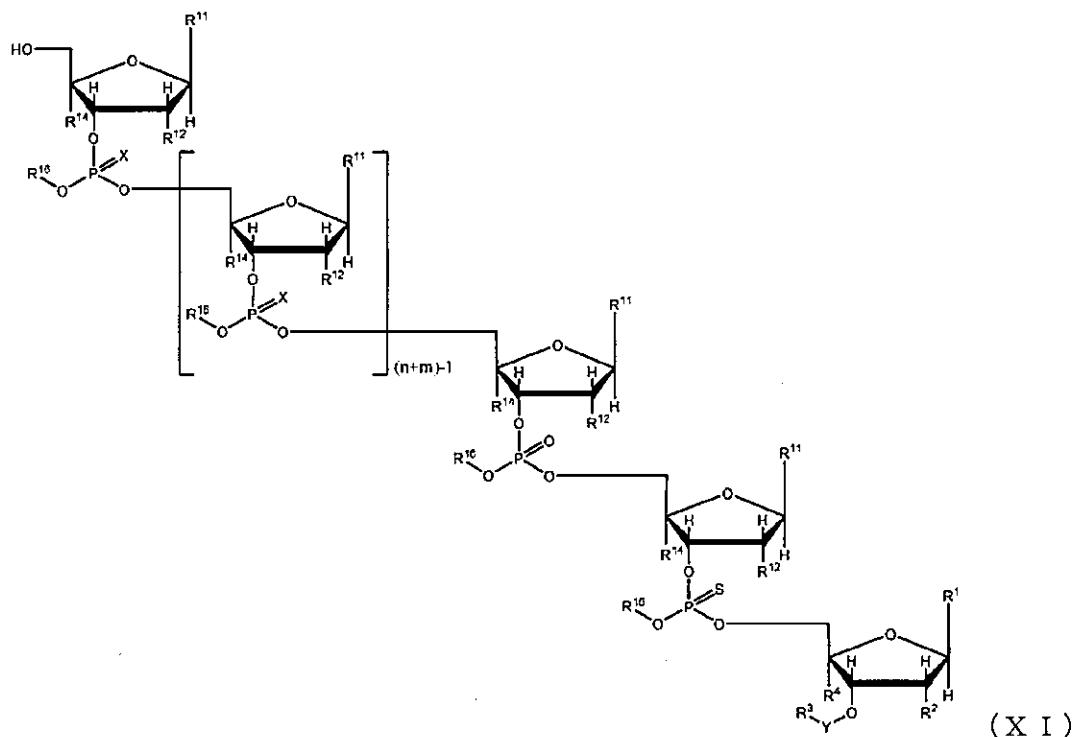
を形成する工程をさらに含む、態様3に記載のプロセス。

[態様5]前記式(VI)の化合物または前記式(IX)の化合物によって開始して、工程a)、b)、及びc)がn回繰り返され、工程d)、e)及びf)がm回繰り返され、工程a)、b)、及びc)、ならびに工程d)、e)及びf)の繰り返しが、互いに対していはずれの順序で行われてもよく、nが少なくとも1であり、mが0、1、2、3、または4であり、式(X)もしくは(XI)のオリゴヌクレオチド：

【化43】

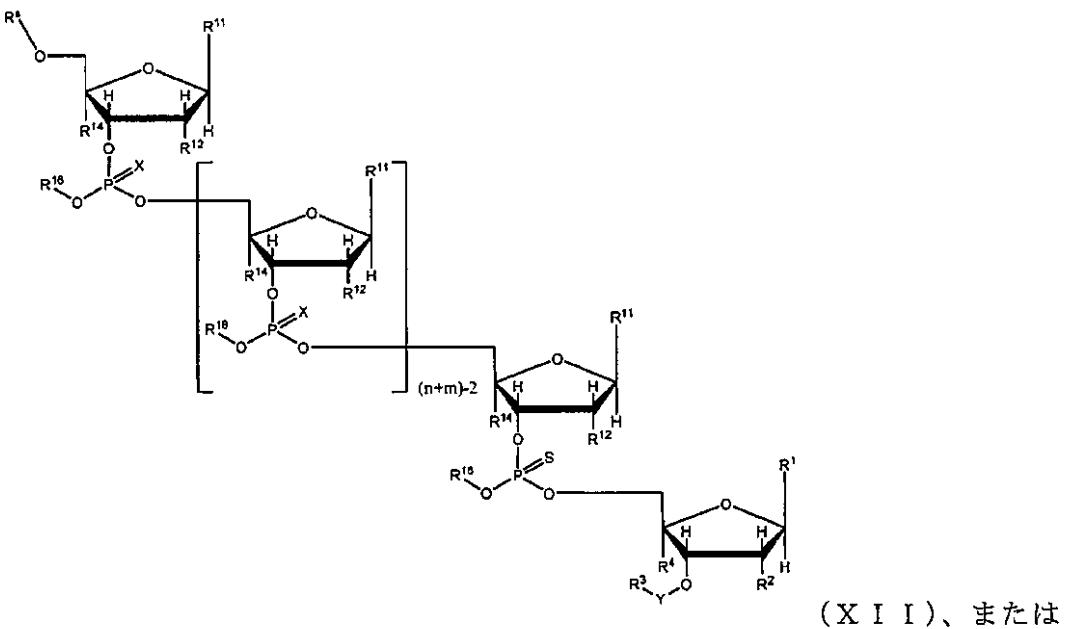


【化44】

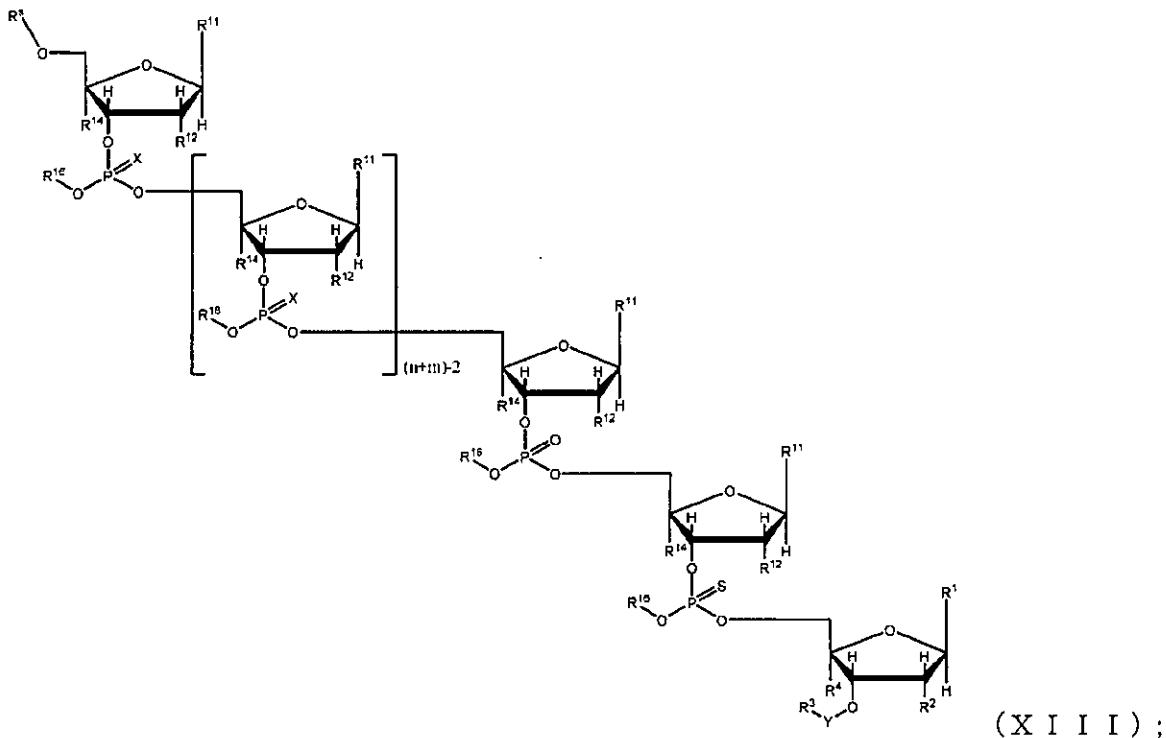


またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (V I) または (I X) のいくらかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (X I I) または (X I I I) の化合物：

【化45】



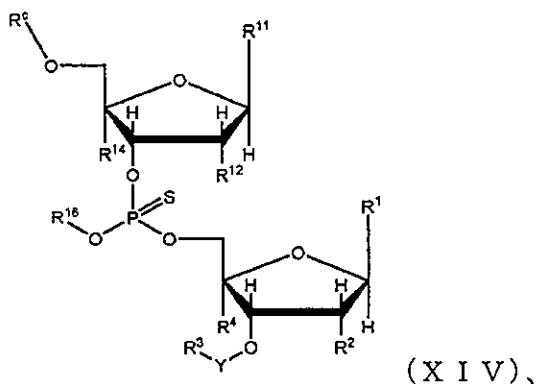
【化46】



式中、各Xは、SまたはOから独立して選択され、ただし、前記式(X)、(XI)、(XII)、または(XIII)の化合物において、4、3、2、1、または0回のみ、XがOである；を形成する、態様2または4に記載のプロセス。

[態様6] g) 前記式(VI)の未反応化合物をキャッピング剤と反応させて、式(XIV)の化合物：

【化47】



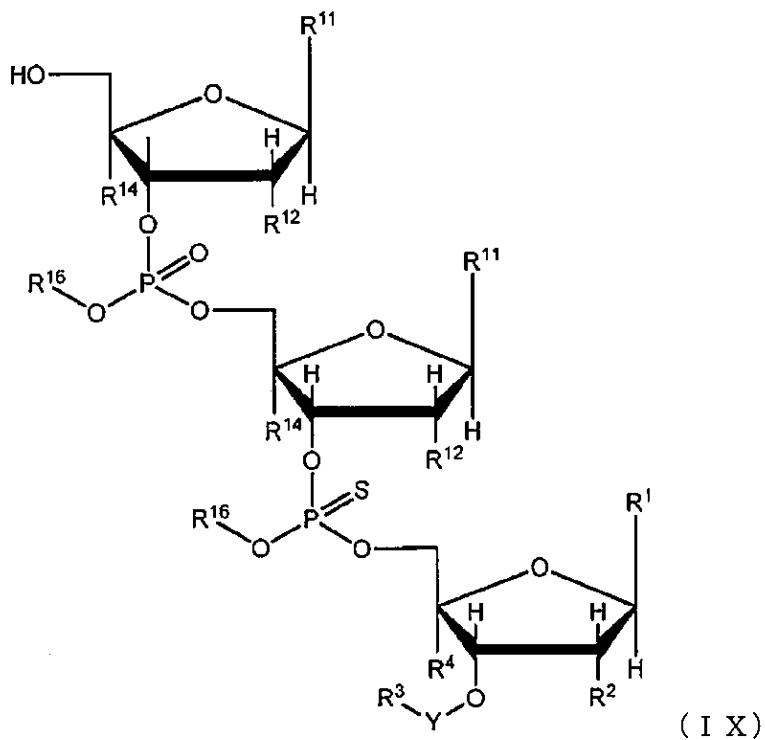
またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含み、R^cが、前記キャッピング剤から形成されたヒドロキシ保護基である、態様3に記載のプロセス。

[態様7] h) 前記式(VIII)の化合物を脱保護して、式(IX)の化合物：

40

50

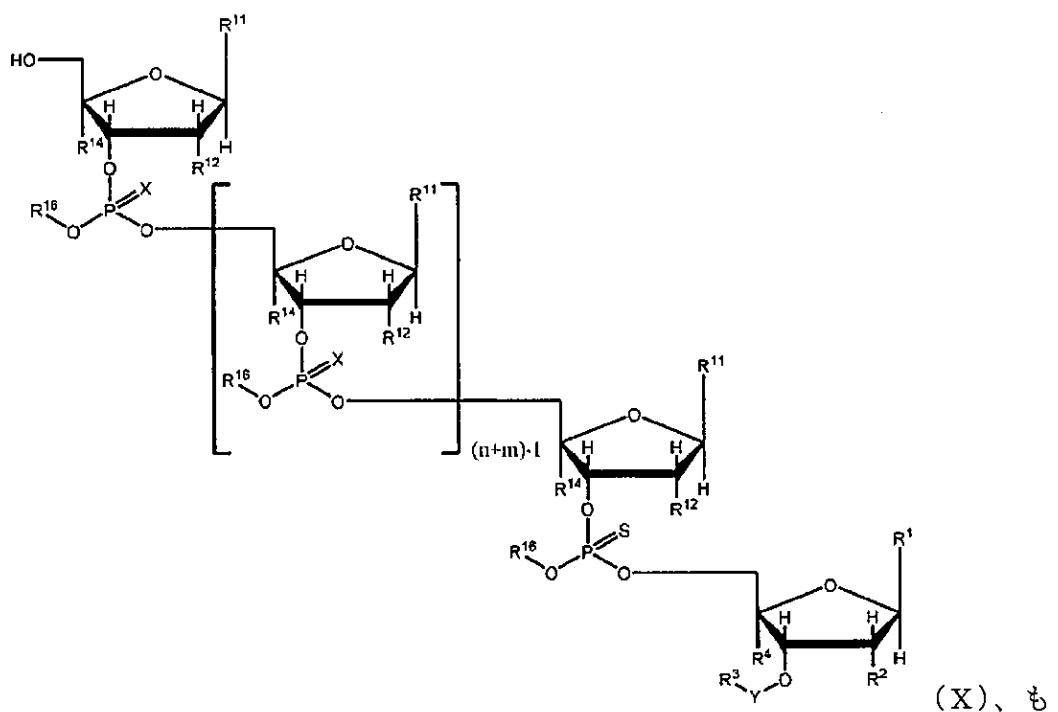
【化48】



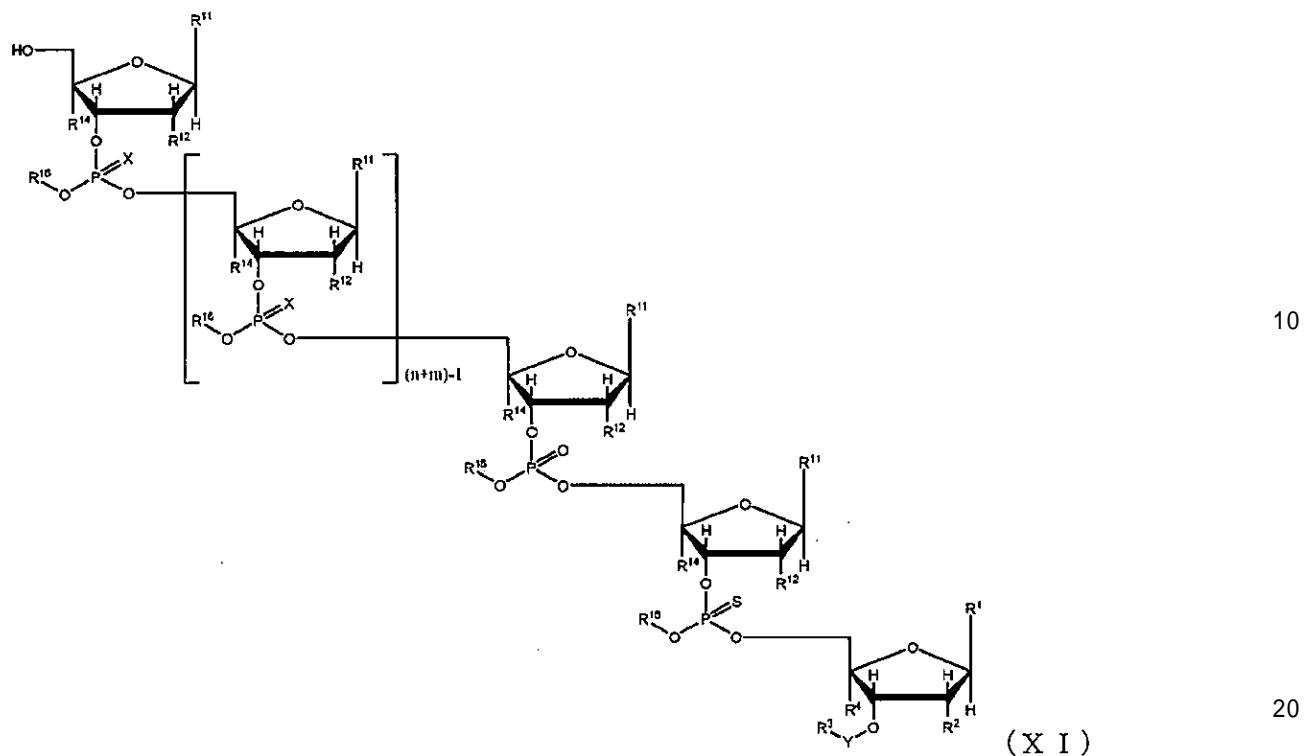
またはその薬学的に許容可能な塩を形成する工程をさらに含む、態様6に記載のプロセス。

[態様8]前記式(VI)の化合物または前記式(IX)の化合物によって開始して、工程a)、b)、及びc)がn回繰り返され、工程d)、e)、g)及びh)がm回繰り返され、工程a)、b)、及びc)ならびに工程d)、e)、g)及びh)の繰り返しが、互いに対してもいずれの順序で行われてもよく、nが少なくとも1であり、mが0以上であり、式(X)もしくは(XVII)のオリゴヌクレオチド：

【化49】

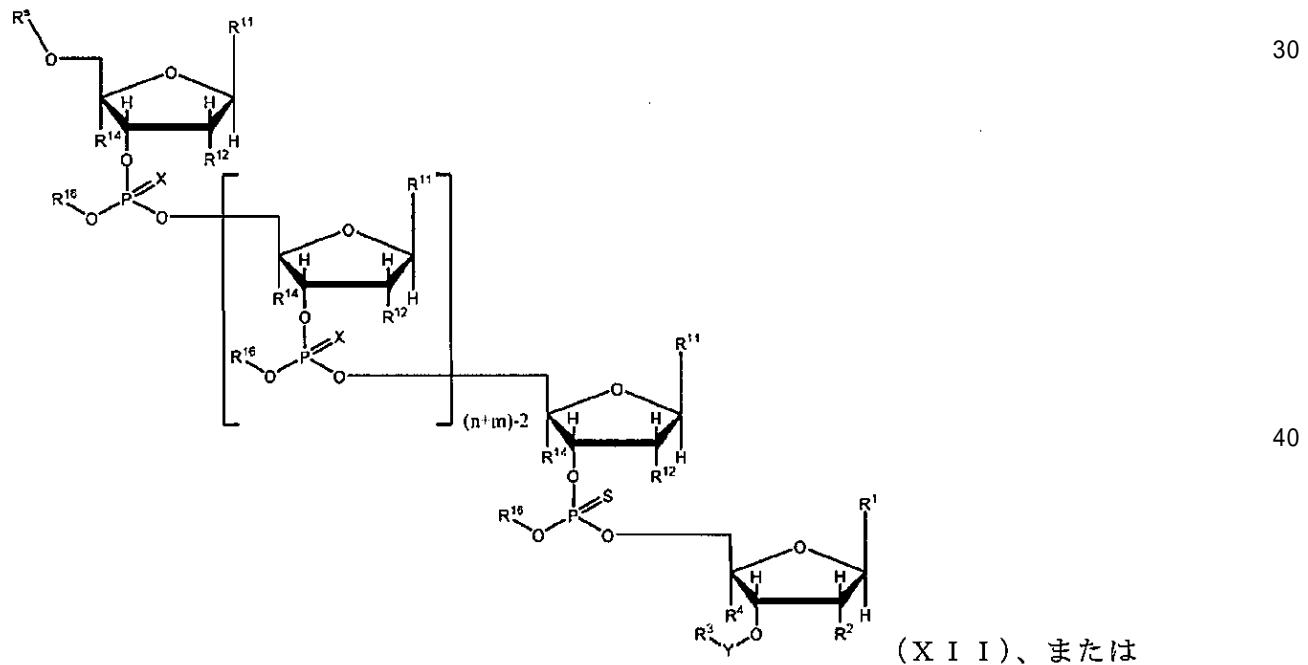


【化 5 0】

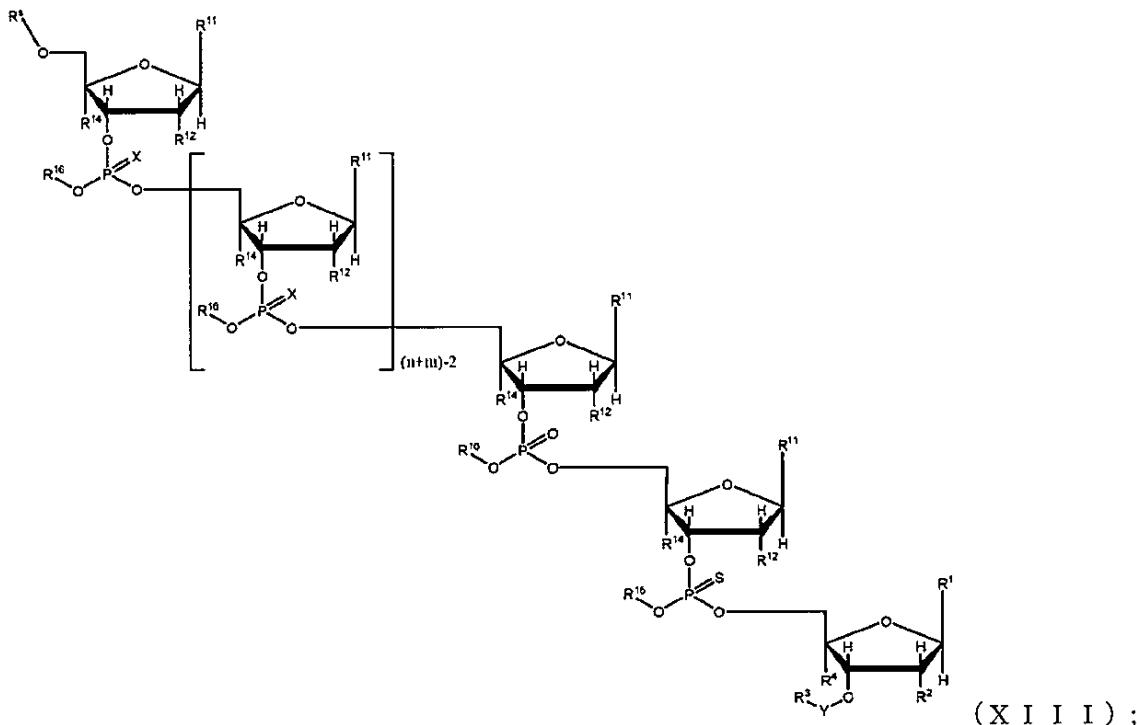


またはその薬学的に許容可能な塩を形成すること、あるいは、オリゴヌクレオチドを形成することにおいて、工程 a、b、及び c、または工程 d、e、及び f の各繰り返しにより、式 (V I) または (I X) のいくらかの未反応化合物を結果として生じ、これが、過剰の硫化剤または前記硫化工程後の前記硫化剤の副生成物と反応して、式 (X I I) または (X I I I) の化合物：

【化 5 1】



【化 5 2】



式中、各 X は、S または O から独立して選択される；を形成する、態様 7 に記載のプロセス。

[態様 9] n が、2 ~ 1 0 0 0 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

[態様 10] n が、2 ~ 5 0 0 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

[態様 11] n が、2 ~ 1 0 0 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

[態様 12] n が、2 ~ 5 0 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

[態様 13] n が、2 ~ 2 5 である、態様 5 または 8 に記載のプロセス。

[態様 14] 前記固体支持体に付着した前記リンカーが開裂される、態様 1 ~ 1 3 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 15] 前記硫化剤が、3 - アミノ - 1 , 2 , 4 - ジチアゾール - 5 - チオン (X H または A D T T) であり、R^S が、- C (S H) (= N) - C N である、態様 1 ~ 1 4 のいずれかに記載のプロセス。

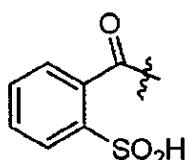
[態様 16] 前記硫化剤が、フェニルアセチルジスルフィド (P A D S) であり、R^S が、- C (= O) C H 2 C 6 H 5 である、態様 1 ~ 1 4 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 17] 前記硫化剤が、3 - (ジメチルアミノ - メチリデン) アミノ - 3 H - 1 , 2 , 4 - ジチアゾール (D D T T) であり、R^S が、- C (= S) N H C (= S) N = C H N (C H 3) 2 である、態様 1 ~ 1 4 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 18] 前記硫化剤が、3 H - 1 , 2 - ベンゾジチオール - 3 - オン 1 , 1 - ジオキサイド (Beaucage 試薬) である、態様 1 ~ 1 4 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 19] R^S が、

【化 5 3】



である、態様 1 4 に記載のプロセス。

10

20

30

40

50

[態様 20] 前記硫化剤が、前記硫化剤を 0 ~ 30 分間再循環させることによって反応する、態様 1 ~ 19 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 21] 前記硫化剤が、少なくとも 0 ~ 20 回再循環される、態様 1 ~ 20 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 22] 前記硫化剤が、1 ~ 20 回、1 ~ 10 回、または 1 ~ 5 回再循環される、態様 1 ~ 20 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 23] 前記硫化剤は、前記リンカー、または第 1 ヌクレオチドが前記固体支持体に直接付着しているときには前記第 1 ヌクレオチドに対して、3 ~ 6 当量の硫化剤を再循環させることによって反応する、態様 1 ~ 22 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 24] 前記硫化試薬の濃度が、0.02M ~ 2.0M である、態様 1 ~ 23 のいずれかに記載のプロセス。 10

[態様 25] 前記硫化試薬の濃度が、0.05M ~ 0.5M である、態様 1 ~ 24 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 26] 前記硫化試薬が、0.02M ~ 0.1M の濃度で添加される 3 - (ジメチルアミノ - メチリデン) アミノ) - 3H - 1 , 2 , 4 - ジチアゾール (DDTT) である、態様 1 ~ 25 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 27] 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、7 - メチルグアニン、5 , 6 - ジヒドロウラシル、5 - メチルシトシン、及び 5 - ヒドロキシメチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記 NH₂ 基が、存在する場合、PhCO-、CH₃CO-、iPrCO-、Me₂N-CH=、または Me₂N-CMe= によって保護されている、態様 1 ~ 26 のいずれかに記載のプロセス。 20

[態様 28] 前記核酸塩基が、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル、及び 5 - メチルシトシンからなる群から選択され、前記核酸塩基の前記 NH₂ 基が、存在する場合、PhCO-、CH₃CO-、iPrCO-、Me₂N - CH=、または Me₂N - CMe= によって保護されている、態様 1 ~ 27 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 29] 各 R² 及び R¹² が、H、F、及び C_{1 - 4} アルコキシによって任意選択的に置換されている C_{1 - 4} アルコキシからなる群から独立して選択され；

各 R⁴ が、独立して H であるか、または R² の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の C_{1 - 4} アルキル基によって任意選択的に置換されている 5 または 6 員環であり； 30

R¹⁶ が - CH₂CH₂CN であり；

R^{17a} 及び R^{17b} が、独立して、C_{1 - 4} アルキルであり；

各 R¹⁴ が、独立して H であるか、または R¹² の前記アルコキシ基と共に環を形成し、前記環が、1 ~ 3 個の C_{1 - 4} アルキル基によって任意選択的に置換されている 5 または 6 員環である；

態様 1 ~ 28 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 30] 各 R² 及び R¹² が、H、または、C_{1 - 4} アルコキシによって任意選択的に置換されている C_{1 - 4} アルコキシから独立して選択され；

R¹⁵ が、4 , 4' - ジメトキシトリチルであり； 40

R¹⁶ が、- CH₂CH₂CN であり；

R^{17a} 及び R^{17b} が、独立して、C_{1 - 6} アルキルであり；

R⁵ が、- C(=N)(SH)-CN または - C(=O)CH₂C₆H₅ である；

態様 1 ~ 29 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 31] Y が存在しない、態様 1 ~ 30 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 32] Y が、単一のヌクレオチドである、態様 1 ~ 30 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 33] Y が、2 ~ 50 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様 1 ~ 30 のいずれかに記載のプロセス。

[態様 34] Y が、2 ~ 40 のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様 1 ~ 50

30のいずれかに記載のプロセス。

[態様35] Yが、2~30のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様1~30のいずれかに記載のプロセス。

[態様36] Yが、2~25のヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである、態様1~30のいずれかに記載のプロセス。

[態様37] 式(X)の化合物が、2~30のヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである、態様1~36のいずれかに記載のプロセス。

[態様38] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、修飾RNAのみを含む、態様37に記載のプロセス。

[態様39] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、DNA及び修飾RNAを含む、態様37に記載のプロセス。 10

[態様40] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ギャップマーである、態様37に記載のプロセス。

[態様41] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、DNAのみを含む、態様37に記載のプロセス。

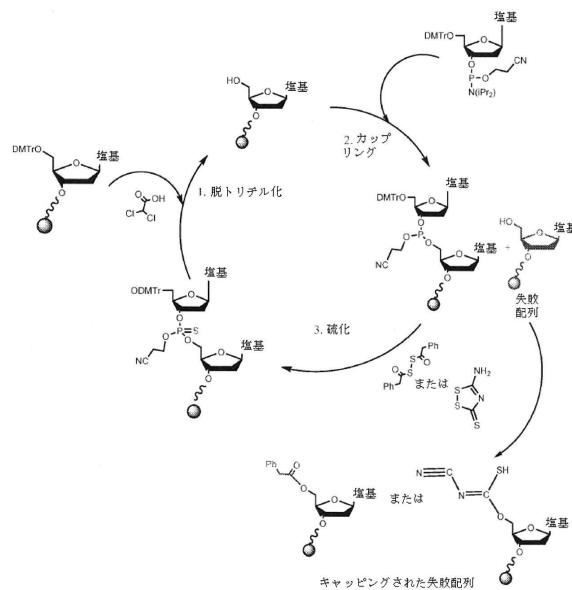
[態様42] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列が、配列番号1である、態様37に記載のプロセス。

[態様43] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列が、配列番号2である、態様37に記載のプロセス。

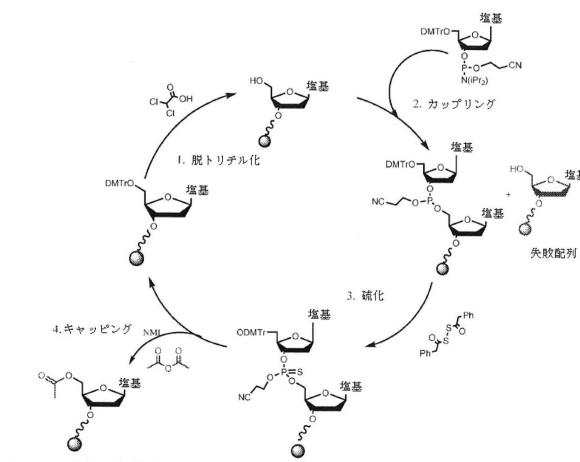
[態様44] 前記アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列が、配列番号8である、態様37に記載のプロセス。 20

【図面】

【図1】



【図2】



10

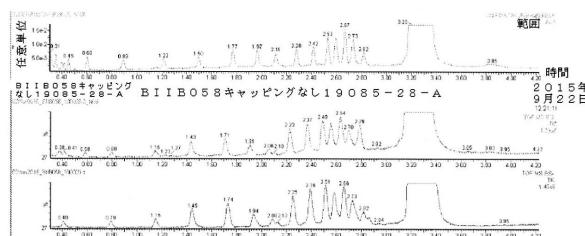
20

30

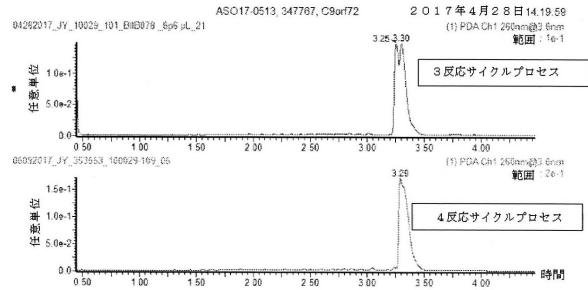
40

50

【図3】

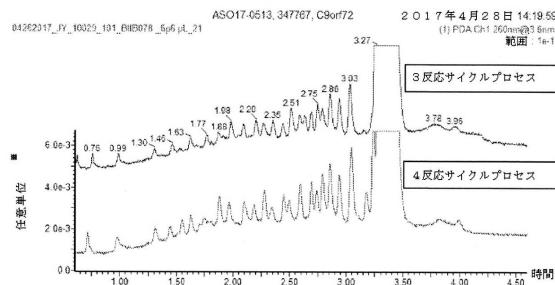


【図4】

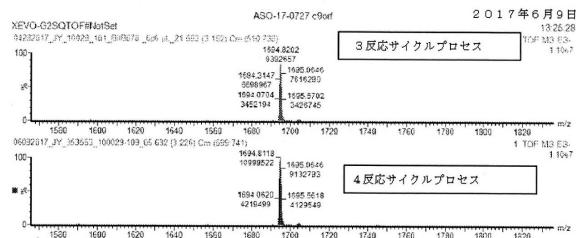


10

【図5】

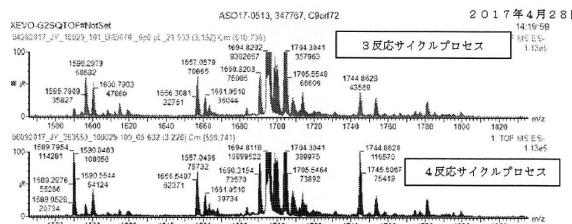


【図6】

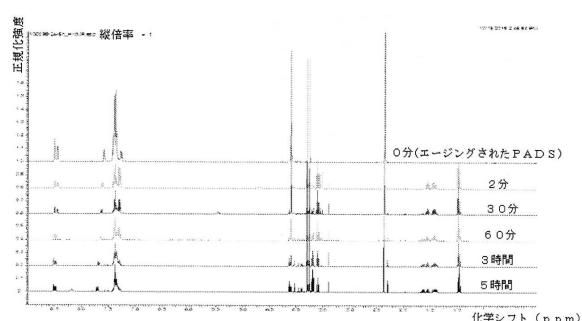


20

【図7】



【図8】

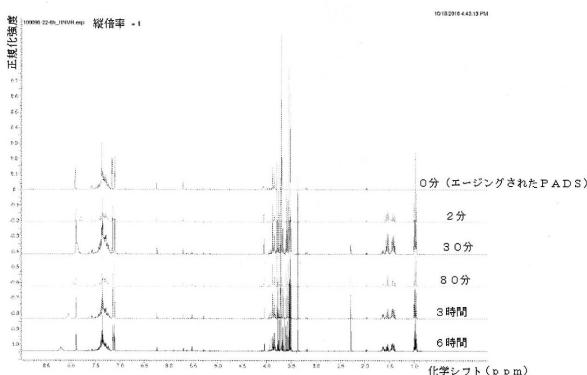


30

40

50

【図 9】



10

【配列表】

0007235512000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 シー , シアーンリン
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート 2 2 5 番 バイ
オジエン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ヤン , ジミン
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート 2 2 5 番 バイ
オジエン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72)発明者 キースマン , ウィリアム・エフ
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート 2 2 5 番 バイ
オジエン・エムエイ・インコーポレイテッド

(72)発明者 フィロン , ヤニック
アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート 2 2 5 番 バイ
オジエン・エムエイ・インコーポレイテッド

審査官 鳥居 福代

(56)参考文献 米国特許第 0 6 8 0 9 1 9 5 (U S , B 1)
ZACHARIA S CHERUVALLATH , ORGANIC PROCESS RESEARCH AND DEVELOPMENT , 米
国 , 2000年05月 , VOL:4, NR:3 , PAGE(S):199 - 204

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 H
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)