



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101855231 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 11

(21) 申请号 200880102959. 9

(22) 申请日 2008. 06. 19

(30) 优先权数据

60/944, 842 2007. 06. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 02. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/067494 2008. 06. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/157688 EN 2008. 12. 24

(73) 专利权人 路易斯安那州州立大学及农业机

械学院管理委员会

地址 美国路易斯安那州

专利权人 华沙大学

(72) 发明人 J·杰米利迪

E·M·戈鲁德琪恩-诺加尔斯卡

J·克瓦尔斯卡 E·达琴奇维克孜

R·E·罗德斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C07H 19/207(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/0194759 A1, 2003. 10. 16, 说明书第 8 页第 1 行图表, 权利要求 13. .

US 7074596 B2, 2006. 07. 11, 权利要求 1.

Fritz Eckstein. "Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: What is their origin and What is unique about them". 《Antisense & nucleic acid drug development》. 2000, 第 10 卷第 118 页第 2 栏第 2 段.

审查员 王景华

权利要求书3页 说明书24页

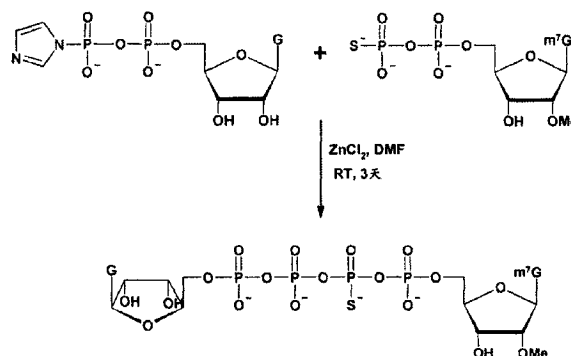
序列表2页 附图9页

(54) 发明名称

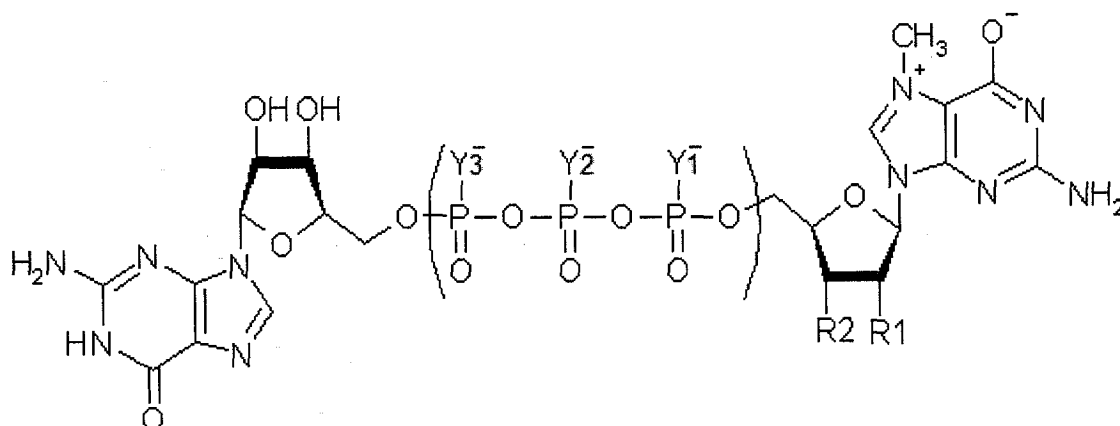
信使 RNA 帽的抗-反向硫代磷酸类似物的合成和用途

(57) 摘要

公开了新的 RNA 帽类似物, 其包含一个或多个硫代磷酸基团。所述类似物还在 7-甲基鸟苷的 2'-O 位置处包含修饰, 其防止它们在 mRNA 的体外合成过程中以相反的方向掺入, 并因此是“抗-反向帽类似物”(anti-reverse cap analog, ARCA)。所述 ARCA 修饰确保, S 原子在翻译和脱帽机器中都准确地定位在帽结合蛋白的活性位点内。所述新的 S-ARCA 类似物对于体内脱帽酶具有抗性。有些 S-ARCA 具有相比于不包含硫代磷酸基团的相应类似物而言更高的对于 eIF4E 的亲和力。当将包含各种 S-ARCA 的 mRNA 引入培养的细胞中时, 有些 mRNA 以相比于用常规类似物 m⁷GpppG 合成的 mRNA 而言高至五倍的程度有效地进行翻译。



1. 组合物,其包含



其中：

Y1 是 O, Y2 是 S, 和 Y3 是 O；

R1 选自 H、OH、OCH₃ 和 OCH₂CH₃；

R2 选自 H、OH、OCH₃ 和 OCH₂CH₃；和

如果 R1 是 OH, 那么 R2 不是 OH。

2. 权利要求 1 中所描述的组合物, 其中所述组合物基本上由单种立体异构体组成。

3. 权利要求 1 中所描述的组合物, 其中所述组合物包含至少两种非对映异构体即第一非对映异构体和第二非对映异构体的混合物；其中除了所述第一和第二非对映异构体在手性磷原子处具有不同的立体化学构型外, 所述第一和第二非对映异构体在其他方面是相同的；其中所述手性磷原子是与硫原子结合的磷原子。

4. RNA 分子, 其 5' 末端掺入有权利要求 1 的组合物。

5. 用于在体外合成权利要求 4 中所描述的 RNA 分子的方法, 所述方法包括使 ATP、CTP、UTP、GTP、所描述的组合物和多核苷酸模板, 在 RNA 聚合酶存在下, 在有助于所述 RNA 聚合酶将所述多核苷酸模板转录成 RNA 拷贝的条件下进行反应；由此所述 RNA 拷贝中的一些将会掺入有所描述的组合物, 从而产生所描述的 RNA 分子。

6. 用于在体外合成蛋白质或肽的方法, 所述方法包括在这样的条件下在无细胞蛋白质合成体系中翻译权利要求 4 中所描述的 RNA 分子, 其中所述 RNA 分子包含开放阅读框, 所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读框所编码的蛋白质或肽。

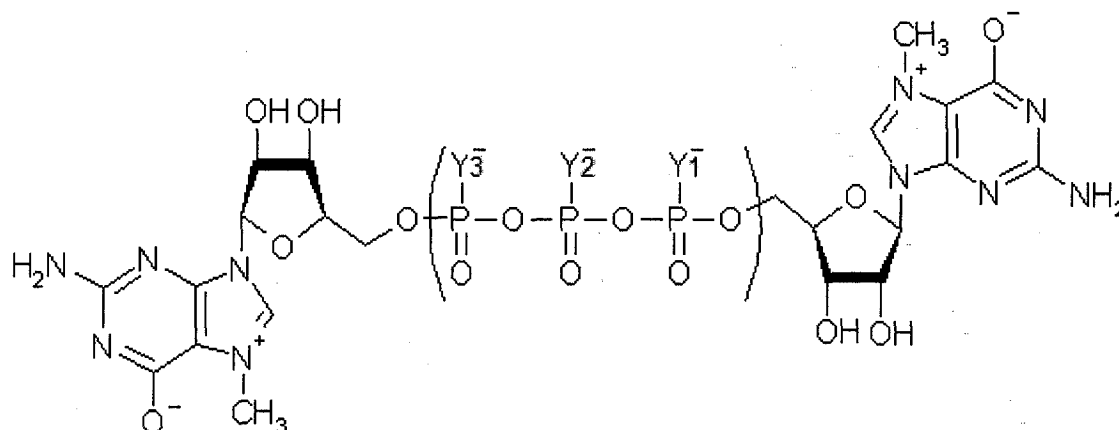
7. 权利要求 4 中所描述的 RNA 分子在制备试剂中的用途, 所述试剂用于在体内合成蛋白质或肽的方法中使用, 所述方法包括在这样的条件下将权利要求 4 中所描述的 RNA 分子引入细胞中, 其中所述 RNA 分子包含开放阅读框, 所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读框所编码的蛋白质或肽。

8. 权利要求 1 中所描述的组合物, 其中所述组合物包含 β-硫代磷酸基团, 并且其中所述组合物在生理条件下不被 Dcp2 水解。

9. 其 5' 末端掺入有权利要求 8 中所描述的组合物 RNA 分子在制备试剂中的用途, 所述试剂用于在体内合成蛋白质或肽的方法中使用, 所述方法包括在这样的条件下将其 5' 末端掺入有权利要求 8 中所描述的组合物 RNA 分子引入细胞中, 其中所述 RNA 分子包含开放阅读框, 所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读

框所编码的蛋白质或肽；其中该体内翻译速率为从其中 Y1、Y2 和 Y3 是氧原子的在其他方面相同的方法之中将能够获得的体内翻译速率的至少两倍。

10. 组合物,其包含



其中：

Y1 是 O, Y2 是 S, 和 Y3 是 O。

11. 权利要求 10 中所描述的组合物,其中所述组合物基本上由单种立体异构体组成。

12. 权利要求 10 中所描述的组合物,其中所述组合物包含至少两种非对映异构体,第一非对映异构体和第二非对映异构体,的混合物；其中除了所述第一和第二非对映异构体在手性磷原子处具有不同的立体化学构型外,所述第一和第二非对映异构体在其他方面是相同的；其中所述手性磷原子是与硫原子结合的磷原子。

13. RNA 分子,其 5' 末端掺入有权利要求 10 的组合物。

14. 用于在体外合成权利要求 13 中所描述的 RNA 分子的方法,所述方法包括使 ATP、CTP、UTP、GTP、所描述的组合物和多核苷酸模板,在 RNA 聚合酶存在下,在有助于所述 RNA 聚合酶将所述多核苷酸模板转录成 RNA 拷贝的条件下进行反应；由此所述 RNA 拷贝中的一些将会掺入有所描述的组合物,从而产生所描述的 RNA 分子。

15. 用于在体外合成蛋白质或肽的方法,所述方法包括在这样的条件下在无细胞蛋白质合成体系中翻译权利要求 13 中所描述的 RNA 分子,其中所述 RNA 分子包含开放阅读框,所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读框所编码的蛋白质或肽。

16. 权利要求 13 中所描述的 RNA 分子在制备试剂中的用途,所述试剂用于在体内合成蛋白质或肽的方法中使用,所述方法包括在这样的条件下将权利要求 13 中所描述的 RNA 分子引入细胞中,其中所述 RNA 分子包含开放阅读框,所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读框所编码的蛋白质或肽。

17. 权利要求 10 中所描述的组合物,其中所述组合物包含 β -硫代磷酸基团,并且其中所述组合物在生理条件下不被 Dcp2 水解。

18. 其 5' 末端掺入有权利要求 17 中所描述的组合物 RNA 分子在制备试剂中的用途,所述试剂用于在体内合成蛋白质或肽的方法中使用,所述方法包括在这样的条件下将其 5' 末端掺入有权利要求 17 中所描述的组合物 RNA 分子引入细胞中,其中所述 RNA 分子包含开放阅读框,所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读框所编码的蛋白质或肽；其中该体内翻译速率为从其中 Y1、Y2 和 Y3 是氧原子的在其他

方面相同的方法之中将能够获得的体内翻译速率的至少两倍。

19. 组合物,其包含一种或多种选自下列的化合物: $m_2^{7,2'}-^0Gpp_s pG$ 和 $m_2^{7,3'}-^0Gpp_s pG$ 。

20. 权利要求 19 中所描述的组合物,其中所述组合物基本上由所述化合物之一的单种立体异构体组成。

21. 权利要求 19 中所描述的组合物,其中所述组合物包含所述化合物之一的至少两种非对映异构体,第一非对映异构体和第二非对映异构体,的混合物;其中除了所述第一和第二非对映异构体在手性磷原子处具有不同的立体化学构型外,所述第一和第二非对映异构体在其他方面是相同的;其中所述手性磷原子是与硫原子结合的磷原子。

22. RNA 分子,其 5' 末端掺入有权利要求 19 的组合物。

23. 用于在体外合成权利要求 22 中所描述的 RNA 分子的方法,所述方法包括使 ATP、CTP、UTP、GTP、所描述的组合物和多核苷酸模板,在 RNA 聚合酶存在下,在有助于所述 RNA 聚合酶将所述多核苷酸模板转录成 RNA 拷贝的条件下进行反应;由此所述 RNA 拷贝中的一些将会掺入有所描述的组合物,从而产生所描述的 RNA 分子。

24. 用于在体外合成蛋白质或肽的方法,所述方法包括在这样的条件下在无细胞蛋白质合成体系中翻译权利要求 22 中所描述的 RNA 分子,其中所述 RNA 分子包含开放阅读框,所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读框所编码的蛋白质或肽。

25. 权利要求 22 中所描述的 RNA 分子在制备试剂中的用途,所述试剂用于在体内合成蛋白质或肽的方法中使用,所述方法包括在这样的条件下将权利要求 22 中所描述的 RNA 分子引入细胞中,其中所述 RNA 分子包含开放阅读框,所述条件有助于将所述 RNA 分子的所述开放阅读框翻译成由所述开放阅读框所编码的蛋白质或肽。

信使 RNA 帽的抗 - 反向硫代磷酸类似物的合成和用途

[0001] Jacek Jemielity, Ewa M. Grudzien-Nogalska, Joanna Kowalska, Edward Darzynkiewicz, 和 Robert E. Rhoads

[0002] 文件编号 : Jemielity 07S01W

[0003] 在美国中根据 35 U. S. C. § 119(e), 和在所有国家中根据适用的条约和公约, 要求 2007 年 6 月 19 日提交的临时美国申请系列号 60/944,842 的提交日期的权益。

[0004] 本发明的开发部分地在由国家综合医学研究所 (National Institute of General Medical Sciences) 给予的基金号 R01GM20818 下得到美国政府的资助。美国政府享有本发明中的某些权利。

[0005] 本发明的开发部分地在由波兰科学和高等教育部 (Polish Ministry of Science and Higher Education) 给予的基金号 2P04A 00628 下得到波兰政府的资助。

技术领域

[0006] 合成了新的信使 RNA 帽的抗 - 反向 (anti-reverse) 硫代磷酸类似物, 并且显示在 mRNA 的翻译中是有用的。

技术背景

[0007] 在真核细胞中, 大多数信使 RNA (mRNA) 的 5' 末端被封闭, 或“帽化 (加帽)”。此外, 还存在有一些也被帽化的其他形式的 RNA, 例如核内小 RNA (snRNA)。所述帽包含有在两个核苷部分之间的 5' - 5' 三磷酸键合和远端鸟嘌呤环上的 7- 甲基。mRNA 和 snRNA 的帽化促进其在细胞中的正常功能。

[0008] 能够在体外合成加帽的 RNA 分子是有用的, 因为这使得工作人员能够制备在各种生物学应用中表现适当的 RNA 分子。此类应用包括多肽的研究应用和商业生产, 例如, 在无细胞翻译体系中产生在特定位点包含“非天然”氨基酸的多肽, 或在培养的细胞中产生就其活性或稳定性而言需要翻译后修饰的多肽。在后者体系中, 合成进行显著更长的时间, 并因此产生更多的蛋白质。

[0009] 最经常用来在体外制备加帽的 RNA 的方法是, 在所有四种核糖核苷三磷酸和帽二核苷酸例如 $m^7G(5')ppp(5')G$ (此后, m^7GpppG) 存在下用细菌或噬菌体 RNA 聚合酶来转录 DNA 模板。聚合酶以下列方式来起始转录: m^7GpppG 的 Guo 部分的 3' -OH 对于下一个由模板所决定的核苷三磷酸上的 α - 磷酸发动亲核攻击, 从而导致产生初始产物 $m^7GpppGpN$ 。通过在转录反应混合物中将 m^7GpppG 与 GTP 的比率设定为在 5 和 10 之间来遏制备选的、由 GTP 起始的产物 $pppGpN$ 。

[0010] 合成 RNA 可以通过 DNA 模板的无细胞转录来合成。参见 R. Contreras 等人, “Simple, efficient in vitro synthesis of capped RNA useful for direct expression of cloned eukaryotic genes,” Nucl. Acids Res., 第 10 卷, 第 6353-6362 页 (1982); J. Yisraeli 等人, “Synthesis of long, capped transcripts in vitro by SP6 and T7 RNA polymerases,” 第 42-50 页, 在 J. Dahlberg 等人 (编辑), Meth. Enzymol., 第 180 卷, 第

42-50 页 (1989) 中;和 D. Melton 等人,“Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter,”Nucl. Acids Res., 第 12 卷,第 7035-7056 页 (1984)。

[0011] 如此产生的加帽的 RNA 在体外进行的剪接反应中是有活性的。参见 M. Konarska 等人,“Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. Cell, 第 38 卷,第 731-736 页 (1984);和 I. Edery 等人,“Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract,”Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第 82 卷,第 7590-7594 页 (1985)。

[0012] 加帽的 mRNA 在无细胞翻译体系中比非加帽的 mRNA 更有效地被翻译。参见 S. Muthukrishnan 等人,“5' -Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation,”Nature, 第 255 卷,第 33-37 页 (1975); L. Chu 等人,“Paradoxical observations on the 5' terminus of ovalbumin messenger ribonucleic acid,”J. Biol. Chem., 第 253 卷,第 5228-5231 页 (1978); E. Darzynkiewicz 等人,“ β -Globin mRNAs capped with m^7G , $m_2^{2,7}G$ or $m_3^{2,2,7}G$ differ in intrinsic translation efficiency,”Nucl. Acids Res., 第 16 卷,第 8953-8962 页 (1988);和 E. Darzynkiewicz 等人,“Inhibition of eukaryotic translation by nucleoside 5' -monophosphate analogues of mRNA 5' -cap: Changes in N7 substituent affect analogue activity,”Biochem., 第 28 卷,第 4771-4778 页 (1989)。

[0013] 5' -未甲基化的 mRNA 在翻译上的活性比 5' -甲基化的 mRNA 低。参见 G. Both 等人,“Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs in vitro,”Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第 72 卷,第 1189-1193 页 (1975)。

[0014] 通过电穿孔引入培养的哺乳动物细胞中的加帽的 mRNA 比非加帽的 mRNA 更有效地被翻译。参见 E. Grudzien 等人,“Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs,”J. Biol. Chem., 第 281 卷,第 1857-1867 页 (2006)。

[0015] A. Pasquinelli 等人,“Reverse 5' caps in RNAs made in vitro by phage RNA polymerases,”RNA, 第 1 卷,第 957-967 页 (1995) 报道了,噬菌体聚合酶使用 m^7GpppG 的 7-甲基鸟嘌呤部分的 3' -OH 来起始转录,这证明用该帽类似物制备的 RNA 产物中的大约三分之一至一半实际上包含相反方向的帽,即 $Gpppm^7GpN$ 。此类反向帽化的 RNA 分子表现异常。相同的作者报道,当将反向帽化的 pre-U1snRNA 转录物注射入光滑爪蟾 (*Xenopus laevis*) 细胞核中时,它们比天然转录物更慢地被输出。类似地,细胞质中的胞质反向帽化的 U1snRNA 不被正确地输入到细胞核中。

[0016] mRNA 上帽的存在强烈地刺激 mRNA 转录物翻译成蛋白质。E. Grudzien 等人,“Novel cap analogs for in vitro synthesis of mRNAs with high translational efficiency,”RNA, 第 10 卷,第 1479-1487 页 (2004) 证明,包含有专一地以相反方向掺入的帽的 mRNA 在无细胞体系中仅以包含有专一地以正常方向掺入的帽的 mRNA 的效率的 4% 进行翻译。

[0017] J. Stepinski 等人,“Synthesis and properties of mRNAs containing the novel ‘anti-reverse’ cap analogues 7-methyl(3' -O-methyl)GpppG and 7-methyl(3' -deoxy)GpppG,”RNA, 第 7 卷,第 1486-1495 页 (2001) 报道了不能以相反方向掺入的两种新型帽类似物, m^73' dGpppG 和 $m_2^{7,3'-O}$ GpppG,的合成和用途。用这些“抗-反

向帽类似物”(anti-reversecap analog, ARCA) 帽化的 mRNA 在体外体系中比用常规类似物 m^7GpppG 帽化的 mRNA 更有效地被翻译。还可参见, 美国专利号 7, 074, 596, 和美国专利申请公开 2003/0194759。

[0018] Z. Peng 等人, “Synthesis and application of a chain-terminating dinucleotide mRNA cap analog,” *Org. Lett.*, 第 4 卷, 第 161-164 页 (2002) 报道了 $m_2^{7,3'}-^0GpppG$ 的合成以及其在均一地加帽的 RNA 的体外转录中的用途。

[0019] J. Jemielity 等人, “Novel 'anti-reverse' cap analogues with superior translational properties,” *RNA*, 第 9 卷, 第 1108-1122 页 (2003) 报道, 用 $-OCH_3$ 或 $-H$ 在 2' 位进行取代以分别产生 $m_2^{7,2'}-^0GpppG$ 或 m^72' dGpppG, 这产生了具有与在 3' 位取代的 ARCA 的性质相等或稍微更有利的性质的 ARCA, 如通过与翻译帽结合蛋白 eIF4E 的结合, 在体外转录期间向 mRNA 中的正确掺入, 以及在不细胞体系中所获得的 mRNA 的翻译效率这样的标准所测量的。

[0020] 从引入培养的哺乳动物细胞中的合成 mRNA 所产生的蛋白质的量受限于通过天然周转过程的 mRNA 降解。mRNA 降解的主要体内途径通过由特异的焦磷酸酶 Dcp1/Dcp2 (其在 α 和 β 磷酸之间进行切割) 从完整的 mRNA 上去除帽来起始。E. Grudzien 等人 “Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs,” *J. Biol. Chem.*, 第 281 卷, 第 1857-1867 页 (2006) 设计并合成了其中亚甲基替代了 α 和 β 磷酸基团之间的 O 原子的帽类似物, $m_2^{7,3'}-^0Gpp_{CH_2}pG$, 用该类似物帽化的 mRNA 在体外对于通过重组人 Dcp2 的水解具有抗性。当引入培养的细胞中时, 用 $m_2^{7,3'}-^0Gpp_{CH_2}pG$ 帽化的 mRNA 比用 $m_2^{7,3'}-^0GpppG$ 帽化的 mRNA 更为稳定。

[0021] 存在两种已知的脱帽酶: Dcp1/Dcp2, 其作用于完整的 mRNA 以起始 $5' \rightarrow 3'$ 降解; 和 DcpS, 其作用于由于 $3' \rightarrow 5'$ 降解而产生的短的加帽的寡核苷酸。因为 Dcp1/Dcp2 或单独的 Dcp2 从加帽的 mRNA 上释放 m^7GDP , 所以切割可能发生在 α -和 β -磷酸之间。参见 Z. Wang 等人, “The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 第 99 卷, 第 12663-12668 页 (2002)。先前, 显示了, 核苷 $5'$ -单硫代磷酸以及三磷酸类似物例如 ATP γ S、GTP γ S 和 GDP β S, 对于磷酸酶是稳定的。参见 F. Eckstein 等人, “Guanosine $5'$ -O-(2-thiodiphosphate). An inhibitor of adenylate cyclase stimulation by guanine nucleotides and fluoride ions,” *J. Biol. Chem.*, 第 254 卷, 第 9829-9834 页 (1979), 和 D. Cassel 等人, “Activation of turkey erythrocyte adenylate cyclase and blocking of the catecholamine-stimulated GTPase by guanosine $5'$ -(gamma-thio) triphosphate,” *Biochem Biophys Res Commun*, 第 77 卷, 第 868-873 页 (1977)。此外, 还发现包含硫代磷酸核苷酸间键合的多核苷酸比其天然对应物更缓慢地被降解。参见 H. Matzura 等人, “Apolynucleotide containing alternation P = O and P = S linkages,” *Eur. J. Biochem.*, 第 3 卷, 第 448-452 页 (1968)。令人感兴趣的是, 硫代磷酸的非对映异构体可以显示出不同的对于核酸酶的敏感性。核酸酶 P1 水解 Sp 非对映异构体比 Rp 更快。参见 B. Potter 等人, “Synthesis and configurational analysis of a dinucleoside phosphate isotopically chiral at phosphorus. Stereochemical course of *Penicillium citrum* nuclease P1 reaction.” *Biochemistry*, 第 22 卷, 第 1369-1377 页 (1983)。相比于 Sp, 核糖核酸酶 T1 和蛇毒磷酸二酯酶优先切割 Rp 非对映异

构体。参见 F.Eckstein 等人, " Stereochemistry of the transesterification step of ribonuclease T 1 ", Biochemistry, 第 11 卷, 第 3507-3512 页 (1972), 和 P.Burgers 等人, " Absolute Configuration of the Diastereomers of Adenosine 5' -O-(1-thiotriphosphate) :Consequences for the stereochemistry of polymerization by DNA-dependent RNA polymerase from Escherichiacoli ", Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 第 75 卷, 第 4798-4800 页 (1978)。

[0022] 虽然用 $m_2^{7,3'-O}Gpp_{CH_2}pG$ 帽化的 mRNA 在培养的细胞中更为稳定,但是它具有较低的翻译效率,推测这是因为 $m_2^{7,3'-O}Gpp_{CH_2}pG$ 在体外以比 $m_2^{7,3'-O}GpppG$ 显著更低的亲和力与 eIF4E 结合。因此,即使它在培养的细胞中更为稳定,但这个优点却被较低的翻译效率给抵消了。

[0023] J.Kowalska 等人 " Synthesis and properties of mRNA capanalogs containing phosphorothioate moiety in 5' ,5' -triphosphate chain, " Nucleos.Nucleot.Nucl.Acids, 第 24 卷,第 595-600 页 (2005) 报道了其中用 S 替代 α 、 β 或 γ 磷酸部分中的 O 的三种帽类似物的合成,例如 m^7Gp_sppG 、 m^7Gppp_sG 和 $m^7Gpp_{S-CH_3}pG$ 。这些合成的硫代磷酸帽类似物是帽依赖性翻译的更加稳定的抑制剂,并且对于 DcpS 脱帽酶具有抗性。然而,无论在体外还是在体内,这些化合物并没有显示出比平常 ARCA 更高的翻译效率,因为它们可能在很大程度上以相反方向掺入。

[0024] 存在对于这样的修饰的需要,所述修饰将可能达到更高的翻译效率和增加对于体内和体外降解的抗性。本文所报道的独特的化合物可以做到这两者。

发明内容

[0025] 我们发现,在一个或多个磷酸处的 S- 取代连同 2' -O 甲基取代一起产生具有令人惊讶的性质的被称为 S-ARCA 的新型类似物。所述新的 ARCA 修饰确保, α 、 β 和 γ 硫代磷酸基团在翻译和脱帽机器 (machinery) 中都准确地定位在帽结合蛋白的活性位点内。这些类似物中的至少一些对于 Dcp1/Dcp2 具有抗性。有些 S-ARCA 具有相比于缺乏硫代磷酸基团的相应类似物而言高得多的对于 eIF4E 的亲和力。当将包含各种 S-ARCA 的 mRNA 引入培养的细胞中时,有些 mRNA 以相比于用常规类似物 m^7GpppG 合成的 mRNA 而言高至五倍的程度更有效地进行翻译。此外,用有些 S-ARCA 帽化的 mRNA 的半寿期长至用未修饰的帽合成的 mRNA 的半寿期的三倍。更有效地进行翻译的 mRNA 和更稳定的 mRNA 的组合导致在经转染的细胞中获得比使用常规的合成 mRNA 或者使用以早期 ARCA 帽化的 mRNA 更高的报道蛋白的总产量。S-ARCA 增加了体内稳定性和令人惊讶地增加了翻译效率,这是由于与 Dcp1/Dcp2 抗性相组合的更高的对于 eIF4E 的亲和力。令人惊讶地,在生理条件下对于通过 Dcp2 的水解的抗性与三磷酸中的 β - 硫代磷酸基团相关,并且预期也与四磷酸中的 γ - 硫代磷酸基团相关。另一个相比于平常 ARCA 而言的优点是出现 P- 非对映异构现象,这归因于硫代磷酸部分。在当硫代磷酸部分准确地定位于 α -、 β - 或 γ - 位置处时的每种情况下,仍然存在两种可能性来放置硫原子 (proR 和 proS), 这导致获得具有可能不同的生物学活性的两种不同的非对映异构体。例如,在对应物 D1 和 D2 非对映异构体和还有用 $m_2^{7,2'-O}Gpp_s pG$ (D1) 帽化的 mRNA 之间存在有对于 eIF4E 的结合亲和力的显著差异,并且该 D1 相比于其 D2 对应物而言对于 Dcp2 易感得多。因此,可以采用非对映异构体纯的 S-ARCA 作为 P- 手性探针,其可用于研究牵涉帽的酶促工艺步骤的立体化学过程。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1 描绘了 α S-ARCA $m_2^{7,2'}-^{18}O$ Gppp_sG (D1 和 D2) 的合成。

[0028] 图 2 描绘了 γ S-ARCA $m_2^{7,2'}-^{18}O$ Gp_sppG (D1 和 D2) 的合成。

[0029] 图 3 描绘了 β S-ARCA $m_2^{7,2'}-^{18}O$ Gpp_spG (D1 和 D2) 的合成。

[0030] 图 4 描绘了四磷酸 γ S-ARCA, $m_2^{7,2'}-^{18}O$ Gpp_sppG (D1 和 D2) 的合成。

[0031] 图 5 描绘了在三磷酸桥的 α 和 β 位置处具有两个硫代磷酸部分的 S-ARCA, $m_2^{7,2'}-^{18}O$ Gpp_sp_sG (D1、D2、D3 和 D4) 的合成。

[0032] 图 6A-6H 描绘了用 hDcp2 消化的体外合成的寡核苷酸的阴离子交换 HPLC 分析。

[0033] 图 7 描绘了用 S-ARCA 帽化的萤光素酶 mRNA 在 HC11 细胞中的衰变。

[0034] 图 8 描绘了用 S-ARCA 帽化的 mRNA 在 HC11 细胞中的翻译效率。

[0035] 图 9A-9E 描绘了用 S-ARCA 帽化的萤光素酶 mRNA 在 HC11 细胞中的多核糖体分布, 显示为在蔗糖梯度中的沉降, 通过监测 260nm 处的吸光度 (A), 和通过使用实时 PCR 以显示萤光素酶 mRNA (B、C 和 D) 和 GAPDH mRNA (E) 的分布。

[0036] 图 10 描绘了在用经 S-ARCA 帽化的 mRNA 对 HC11 细胞进行核穿孔 (nucleoporation) 后萤光素酶表达的时间过程。

[0037] 本发明的实施方式

[0038] 材料和方法

[0039] 实施例 1

[0040] 一般的化学操作程序

[0041] 使用在去离子水中的三乙基铵碳酸氢盐 (TEAB) 的线性梯度, 在 DEAE-Sephadex A-25 (HCO³⁻ 形式) 柱上通过离子交换色谱法来分离开中间体核苷酸, 并且在通过添加乙醇在减压下进行蒸发后, 将其分离为三乙基铵盐。通过分析型或半制备型 RP HPLC 来分离开终产物 (帽类似物), 并且在反复的冷冻干燥后, 将其分离为铵盐。分析型 HPLC 在装备有 Supelcosil LC-18-T 反相柱 (4.6x250mm, 流速为 1.3ml/分钟) 的 Spectra-Physics SP8800 装置上进行, 其中使用在 pH 5.9 的 0.05M 乙酸铵缓冲液中的 0-25% 甲醇线性梯度, 并且采用在 260nm 处的 UV- 检测。半制备型 HPLC 在装备有 WatersHR-C-18 反相柱 (19x300mm, 流速为 5.0ml/分钟) 的 Waters 600EMultisolvant Delivery System 上进行, 其中使用在 0.05M 乙酸铵缓冲液 (pH 5.9) 中的甲醇线性梯度, 并且采用在 260nm 处的 UV- 检测。

[0042] GMP 和 GDP 购自 Sigma-Aldrich, 并且通过使用 Dowex 50 WX 8 离子交换树脂而转化为三乙基铵盐。如先前在 J. Jemielity 等人 " Novel ' anti-reverse ' cap analogues with superior translational properties, " RNA, 第 9 卷, 第 1108-1122 页 (2003) 中所报道的那样来制备其他核苷酸, 即 m^7 GMP、 $m_2^{7,2'}-^{18}O$ GMP、 m^7 GDP、 $m_2^{7,2'}-^{18}O$ GDP。硫代磷酸三乙基铵盐通过下列方式而从 Na₃PSO₃ 制备: 在 Dowex 50WX 8 离子交换树脂上进行转化, 并且 (在蒸发至干后) 用贮存于 -20°C 的 99.8% 醇进行再度蒸发。参见 J. Kowalska 等人 " A simple and rapid synthesis of nucleotide analogues containing a phosphorothioate moiety at the terminal position of the phosphate chain ", Tetrahedron Lett., 第 48 卷, 第 5475-5479 页 (2007)。如先前所报道的那样来制备 7- 甲基鸟苷, 除了使用 DMF 而非 DMA 之外 (参见 J. Jones 等人, " Purine Nucleosides. 111. Methylation Studies of Certain Naturally Occurring Purine Nucleosides ", J. Am. Chem. Soc., 第 85 卷, 第 193-201 页

(1963))。通过类似的操作程序,从 2'-O-甲基鸟苷来合成 7,2'-O-二甲基鸟苷。根据 J.Kusmieriek 等人,“A new route to 2' (3')-O-alkyl purine nucleosides”, *Nucleic Acids Res.*, 第 1 卷,第 73-77 页,特别出版号 4(1978) 来制备 2'-O-甲基鸟苷。

[0043] 通过在 RP HPLC 上的再次色谱法 (re-chromatography)、使用负电喷雾电离的质谱法 (MS ESI-) 以及 ^1H NMR 和 ^{31}P NMR 光谱学,来确认最终化合物的结构和均一性。(结果显示在表 1 中) 分别在 399.94MHz 和 161.90MHz 处在 Varian UNITY-plus 光谱仪上于 25°C 记录了 ^1H NMR 和 ^{31}P NMR 谱。报告了相对于在 D_2O 中的 3-三甲基甲硅烷基-[2,2,3,3-D4]-丙酸钠 (TSP) (作为内标) 的 ^1H NMR 化学位移。报告了相对于在 D_2O 中的 20% 磷酸 (作为外标) 的 ^{31}P NMR 化学位移。使用负电喷雾电离 (ESI-), 在 Micromass QToF IMS 光谱仪上记录了质谱。

[0044] 实施例 2

[0045] 用于核苷酸的 N-酰化咪唑 (imidazolid) 衍生物 (GMP-Im 、 $\text{m}_2^{7,2'}\text{-GMP-Im}$ 、 GDP-Im 和 $\text{m}_2^{7,2'}\text{-GDP-Im}$) (7,8 和 12-15) 的一般操作程序

[0046] 参见 T.Mukaiyama 等人 "Phosphorylation by oxidation-reduction condensation. Preparation of active phosphorylating reagents", *M. Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 第 44 卷, 2284 (1971)。在 DMF (约 2.5ml/100mg 核苷酸) 中混合合适的核苷酸 (1 当量的 TEA 盐)、咪唑 (8 当量) 和 2,2'-联硫基二吡啶 (3 当量)。添加三乙胺 (2 当量) 和三苯膦 (3 当量), 并搅拌混合物 6-8 小时。用溶解在干燥的丙酮 (约 8ml/1ml DMF) 中的无水高氯酸钠 (1 当量 / 一个负电荷) 从反应混合物中沉淀出产物。在冷却至 4°C 后, 过滤沉淀物, 用冷的干燥的丙酮反复洗涤, 并在真空中通过 P_4O_{10} 进行干燥。产率为 80-100%。在 m^7GMP 的情况下, 由于其较低的在 DMF 中的溶解度, 使用 2 倍过量的试剂, 并且将反应时间延长至 24 小时。

[0047] 实施例 3

[0048] 用于核苷 5'-O-硫代磷酸 (9-11) 的一般操作程序

[0049] 将合适的核苷 (1 当量, 在真空中通过 P_4O_{10} 过夜干燥) 在磷酸三甲酯 (1.5ml/100mg 核苷) 中的悬浮液在冰 / 水浴上冷却至 0°C。添加 2,6-二甲基吡啶 (3 当量) 和 PSCl_3 (1.5 当量)。反应在 0°C 下维持过夜, 然后用 0.35M TEAB 猝灭并在室温下搅拌 1 小时。使用 0-0.7M TEAB 的线性梯度, 通过 DEAE Sephadex 色谱法来分离产物。产率: (9) 380mg (0.67mmol), 从 257mg (0.91mmol) 鸟苷开始 (74%); (10) 57mg (0.10mmol), 从 120mg (0.42mmol) 7-甲基鸟苷开始 (24%); (11) 75mg (0.13mmol), 从 70mg (0.23mmol) 7,2'-O-二甲基鸟苷开始 (53%)。

[0050] 实施例 4

[0051] 核苷 5'-(2-O-硫代二磷酸) 的合成

[0052] 7,2'-O-二甲基鸟苷 5'-O-(2-硫代二磷酸) (17)。向 14 (100mg, 0.21mmol) 和硫代磷酸三乙基铵盐 (220mg) 在 5ml DMF 中的悬浮液之中添加无水 ZnCl_2 (190mg, 1.40mmol)。将所得的溶液在室温下搅拌 20 分钟。通过添加 EDTA (520mg, 1.40mmol) 在 50ml 水中的溶液来猝灭反应, 并用固体 NaHCO_3 进行中和。使用 0-1.0M 的 TEAB 梯度, 在 DEAE Sephadex 上分离产物。产率: 106mg (0.15mmol) 的 (17), 作为 TEA 盐 (71%)。

[0053] 7-甲基鸟苷 5'-O-(2-硫代二磷酸) (16)。如对于 (17) 所描述的那样, 从

(13) (40mg, 0.089mmol) 和硫代磷酸三乙基铵盐 (100mg) 开始来合成该化合物。产率: 31mg (0.046mmol) 的 (16), 作为 TEA 盐 (52%)。

[0054] 实施例 5

[0055] 帽 S-ARCA 的合成

[0056] 下面是对于各种帽 S-ARCA 的合成的描述。合成途径描绘在图 1、2 和 3 中。(数字) 是指在图 1、2 和 3 中进行编号的化合物。

[0057] m^7Gppp_sG D1 和 D2 (1a, 1b)。向 (9) (10mg, 0.018mmol) 和 7 (15mg, 0.027mmol) 在 DMF (0.8ml) 中的悬浮液之中添加无水 $ZnCl_2$ (30mg, 0.22mmol)。反应在室温下维持 2 天。通过添加在 10ml 水中的 90mg EDTA 来猝灭反应, 并用固体 $NaHCO_3$ 进行中和。通过分析型 RP HPLC 来分离非对映异构体 (1a) 和 (1b)。产率: 0.8mg (1a) 和 1.0mg (1b), 作为 NH_4^+ 盐。合成的流程图显示在图 1 中。

[0058] m^7Gpp_pG D1 和 D2 (2a, 2b)。如对于 1 所描述的那样, 从在 2ml DMF 中的 16 (20mg, 0.030mmol)、15 (23mg, 0.053mmol)、 $ZnCl_2$ (60mg, 0.44mmol) 开始来合成该化合物。产率: 2.2mg (2a) 和 1.8mg (2b), 作为 NH_4^+ 盐。合成的流程图显示在图 3 中。

[0059] m^7Gp_ppG D1 和 D2 (3a, 3b)。如对于 (1) 所描述的那样, 从在 3.5ml DMF 中的 (10) (58mg, 0.090mmol)、(12) (120mg, 0.22mmol)、 $ZnCl_2$ (249mg, 1.8mmol) 开始来合成该化合物。产率: 14.7mg (3a) 和 10.1mg (3b), 作为 NH_4^+ 盐。合成的流程图显示在图 2 中。

[0060] $m_2^{7,2'}-^0Gppp_sG$ D1 和 D2 (4a, 4b)。将化合物 (9) (48mg, 0.084mmol) 和 (8) (57mg, 0.10mmol) 悬浮在 2ml DMF 中。随后, 添加无水 $ZnCl_2$ (115mg, 0.84mmol)。将所得的溶液在室温下维持 2 天。通过添加在 30ml 水中的 350mg EDTA 来猝灭反应, 并用固体碳酸氢钠进行中和。在 45 分钟内, 使用在 0.05M 乙酸铵 (pH = 5.9) 中的 0-50% 的甲醇线性梯度, 通过半制备型 RP HPLC 来分离产物。产率: 5.2mg (4a) 和 7.4mg (4b), 作为 NH_4^+ 盐。合成的流程图显示在图 1 中。

[0061] $m_2^{7,2'}-^0Gpp_pG$ D1 和 D2 (5a, 5b)。如对于 (4) 所描述的那样, 从在 5ml DMF 中的 (17) (106mg, 0.16mmol)、(15) (103mg, 0.24mmol) 和 $ZnCl_2$ (260mg, 1.9mmol) 开始来合成该化合物。用在 100ml 水中的 800mg EDTA 来猝灭反应, 并用固体碳酸氢钠进行中和。使用等度的 0.05M 乙酸铵 (pH = 5.9), 通过半制备型 RP HPLC 来分离产物。产率: 10.0mg (5a) 和 12.1mg (5b), 作为 NH_4^+ 盐。合成的流程图显示在图 3 中。

[0062] $m_2^{7,2'}-^0Gp_ppG$ D1 和 D2 (6a, 6b)。如对于 (4) 所描述的那样, 从在 3ml DMF 中的 (11) (70mg, 0.15mmol)、(12) (107mg, 0.20mmol) 和无水 $ZnCl_2$ (220mg, 1.6mmol) 开始来合成该化合物。用在 70ml 水中的 650mg EDTA 来猝灭反应。在 45 分钟内, 使用在 0.05M 乙酸铵 (pH = 5.9) 中的 0-50% 的甲醇线性梯度, 通过半制备型 RP HPLC 来分离产物。产率: 15mg (6a) 和 20mg (6b), 作为 NH_4^+ 盐。合成的流程图显示在图 2 中。

[0063] 通过在 RP HPLC 上的再次色谱法 (re-chromatography)、使用负电喷雾电离的质谱法 (MS ESI-) 以及 1H NMR 和 ^{31}P NMR 光谱学, 来确认上述最终化合物的结构和均一性。结果显示在下表 1 中。

[0064] 表 1

[0065] 相对于内标 3- 三甲基甲硅烷基 -[2, 2, 3, 3- 2H_4]- 丙酸钠的

[0066] 以百万分率表示的 1H NMR 化学位移 (± 0.01)

[0067] 以及相对于外标 H_3PO_4 的

[0068] 以百万分率表示的 ^{31}P NMR 化学位移 (± 0.01)

[0069]

	1a		1b		2a		2b		3a		3b	
	$m^7\text{G}$	G	$m^7\text{G}$	G	$m^7\text{G}$	G	$m^7\text{G}$	G	$m^7\text{G}$	G	$m^7\text{G}$	G
H8	- ^a	8.22	- ^a	8.14	9.00 ^b	8.04	9.01 ^b	7.94	9.11 ^b	8.01	9.08 ^b	8.01
H1'	5.92	5.85	5.91	5.84	5.83	5.74	5.84	5.74	5.92	5.79	5.90	5.79
H2'	4.58	4.62	4.58	4.62	4.58	4.71	4.45	4.60	4.58	4.69	4.54	4.67
H3'	4.46	4.47	4.46	4.47	4.49	4.54	4.42 ^c	4.42 ^c	4.50	4.49	4.49	4.42
H4'	4.35 ^c	4.35 ^c	4.35 ^c	4.35 ^c	4.27 ^c	4.36 ^c	4.36 ^c	4.39 ^c	4.34 ^c	4.39 ^c	4.36 ^c	4.42 ^c
H5'	4.38 ^c	4.31 ^c	4.38 ^c	4.31 ^c	4.42	4.27 ^c	4.39 ^c	4.22 ^c	4.38 ^c	4.27	4.37 ^c	4.29 ^c
H5''	4.26 ^c	4.31 ^c	4.26 ^c	4.31 ^c	4.36 ^c	4.27 ^c	4.36 ^c	4.20 ^c	4.33 ^c	4.26	4.35 ^c	4.29 ^c
CH_3 (N7)	4.07	-	4.05	-	4.06	-	4.03	-	4.07	-	4.07	-
$\text{P}\alpha$	44.17		44.17		-12.37		-12.37		-11.26		-11.26	
$\text{P}\beta$	-23.86		-23.86		30.27		30.18		-23.79		-23.79	
$\text{P}\gamma$	-11.29		-11.29		-12.37		-12.37		43.66		43.26	
	4a		4b		5a		5b		6a		6b	
	$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{G}$	G	$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{G}$	G	$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{G}$	G	$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{G}$	G	$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{G}$	G	$m_2^{7,2'-\text{O}}\text{G}$	G
H8	- ^a	8.10	- ^a	8.07	9.01 ^b	8.03	9.02 ^b	8.01	9.08 ^b	8.01	9.06 ^b	8.01
H1'	5.94	5.81	5.93	5.80	5.97	5.80	5.93	5.78	5.95	5.79	5.93	5.78
H2'	4.26	4.68	4.21	4.66	4.24	4.68	4.25 ^c	4.68	4.23	4.68	4.18	4.66
H3'	4.56	4.50	4.52	4.48 ^c	4.54	4.49	4.54	4.49	4.56	4.50	4.49 ^c	4.49 ^c
H4'	4.30 ^c	4.37 ^c	4.33 ^c	4.35 ^c	4.33 ^c	4.27 ^c	4.31 ^c	4.26 ^c	4.33	4.28	4.30 ^c	4.30 ^c
H5'	4.39 ^c	4.30 ^c	4.46 ^c	4.28 ^c	4.41	4.30 ^c	4.41	4.30 ^c	4.40	4.33 ^c	4.30 ^c	4.30 ^c
H5''	4.30 ^c	4.30 ^c	4.34 ^c	4.26 ^c	4.32 ^c	4.27 ^c	4.34 ^c	4.27 ^c	4.33 ^c	4.28	4.30 ^c	4.30 ^c
CH_3 (N7)	4.08	-	4.07	-	4.06	-	4.07	-	4.08	-	4.08	-
CH_3 (2'-O)	3.59	-	3.59	-	3.60	-	3.58	-	3.59	-	3.59	-
$\text{P}\alpha$	43.61		43.70		-12.10		-12.10		-11.25		-11.32	
$\text{P}\beta$	-23.86		-23.80		30.33		30.23		-23.85		-23.72	
$\text{P}\gamma$	-11.33		-11.34		-12.10		-12.10		43.63		43.13	

^a- 可交换的质子; ^b- 可交换的但可见的质子; ^c- 由于信号重叠而导致的近似值

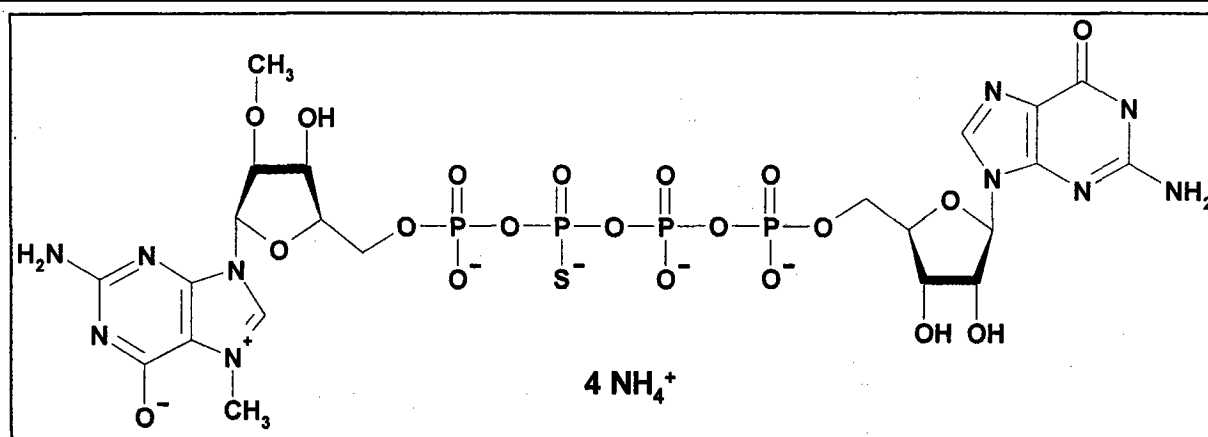
[0070] 实施例 6

[0071] 四磷酸 S-ARCA 的合成

[0072] 通过 $m_2^{7,2'-\text{O}}\text{Gpp}_s\text{ppG}$ 的合成显示了用于合成含有 5', 5' - 四磷酸桥的 S-ARCA 的所开发出的策略的效用 (图 4)。通过类似的方法可得到三种其他四磷酸 S-ARCA (即, $m_2^{7,2'-\text{O}}\text{Gp}_s\text{pppG}$ 、 $m_2^{7,2'-\text{O}}\text{Gppp}_s\text{pG}$ 、 $m_2^{7,2'-\text{O}}\text{Gpppp}_s\text{G}$) 的合成。

[0073] $m_2^{7,2'-\text{O}}\text{Gpp}_s\text{ppG}$ (D1 和 D2)

[0074]



[0075] 将 7,2'-O-二甲基鸟苷 5'-(硫代二磷酸) (20mg, 0.029mmol) 和鸟苷 5'-二磷酸 N-酰化咪唑 (30mg, 0.056mmol) 悬浮在 2ml DMF 中。随后, 添加无水 ZnCl_2 (61mg, 0.45mmol)。在室温下搅拌所得的溶液 3 天。通过添加在 20ml 水中的 EDTA (166mg, 0.45mmol) 来猝灭反应, 并用固体碳酸氢钠进行中和。使用 0-1.2M 的 TEAB 梯度, 通过离子交换 DEAE Sephadex 色谱法来分离开产物。收集包含 $\text{m}_2^{7,2'}\text{-}^0\text{Gpp}_s\text{ppG}$ 的非对映异构体混合物的级分, 倒在一起, 并在减压下通过反复添加乙醇来进行蒸发。在 60 分钟内, 使用在 0.05M 乙酸铵 ($\text{pH} = 5.9$) 中的 0-25% 甲醇线性梯度, 通过半制备型 RP HPLC 来达到最后的纯化。产率: 7mg $\text{m}_2^{7,2'}\text{-}^0\text{Gpp}_s\text{ppG}$ (非对映异构体混合物), 作为 NH_4^+ 盐。

[0076] MS ESI(-): 关于 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$ 的计算值: 897.02; 测定值: 879.09

[0077] D1: ^1H NMR: δ (ppm) 9.14 (1H, s), 8.08 (1H, s), 5.99 (1H, d), 5.813 (1H, d), 4.70 (1H, t), 4.64 (1H, t), 4.54 (1H, t), 4.45 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.29 (3H, m), 4.07 (3H, s), 3.60 (3H, s); ^{31}P NMR: δ 30.2 (1P, t, $\text{P}\gamma$), -11.1 (1P, dd, $\text{P}\delta$), -11.9 (1P, dd, $\text{P}\alpha$), -23.8 (1P, d, $\text{P}\beta$)

[0078] D2: ^1H NMR: δ (ppm) 9.16 (1H, s), 8.08 (1H, s), 6.03 (1H, d), 5.83 (1H, d), 4.70 (1H, t), 4.60 (1H, t), 4.54 (1H, t), 4.45 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.29 (3H, m), 4.07 (3H, s), 3.58 (3H, s); ^{31}P NMR: δ 30.2 (1P, t, $\text{P}\gamma$), -11.1 (1P, dd, $\text{P}\delta$), -11.9 (1P, dd, $\text{P}\alpha$), -23.8 (1P, d, $\text{P}\beta$)

[0079] 实施例 7

[0080] 具有两个硫代磷酸部分的 S-ARCA 的合成

[0081] 所开发出的策略还提供了用于合成在 5', 5' - 多磷酸桥中含有多个硫代磷酸部分 (这可以通过图 5 中所建议的合成路线来达到) 的化合物 (例如, 化合物 $\text{m}_2^{7,2'}\text{-}^0\text{Gpp}_s\text{P}_s\text{G}$) 的方法。将与先前对于腺苷 5' -O- 硫代磷酸的 N-酰化咪唑衍生物所报道的操作程序 [M. Shimazu 等人, "Regio- and stereocontrolled synthesis of 2' -5' -linked phosphorothioate oligoadenylates by uranyl ion catalyst in aqueous solution", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2002, 1778-1785] 相类似地来制备鸟苷 5' -O- 硫代磷酸的 N-酰化咪唑衍生物, 并用三乙基铵碳酸氢盐的线性梯度 (在去离子水中的 0 至 0.5M TEAB) 在 DEAE Sephadex A-25 上进行纯化。关于该合成的描绘显示在图 5 中。

[0082] 鸟苷 5' -O-(1,2-二硫代二磷酸)。将鸟苷 5' -O- 单硫代磷酸的 N-酰化咪唑衍生物 (三乙基铵盐, 53mg, 0.1mmol) 与硫代磷酸三乙基铵盐 (320mg, 约 1.2mmol) 相混合, 并将所得的混合物悬浮在 3.5ml DMF 中。随后, 添加无水氯化锌 (55mg, 0.4mmol) 和氯化锰 (50mg, 0.4mmol)。通过添加 EDTA 溶液 (270mg, 0.8mmol, 在 35ml 水中) 来猝灭反应, 并用碳

酸氢钠调至 pH 7。用三乙基铵碳酸氢盐的线性梯度（在去离子水中的 0 至 0.9M TEAB），在 DEAE-Sephadex A-25 柱上进行色谱法分离。收集包含鸟苷 5'-O-(1,2-二硫代二磷酸)的级分并通过添加乙醇在减压下进行蒸发，并且将所得的固体在真空中通过 P_4O_{10} 进行干燥。

[0083] $m_2^{7,2'}-^0Gpp_sP_sG$ 。将 7,2'-O-二甲基鸟苷 5'-O-单磷酸的 N-酰化咪唑衍生物（钠盐, 23mg, 0.05mmol）与鸟苷 5'-O-(1,2-二硫代二磷酸)（三乙基铵盐, 39mg, 0.05mmol）相混合，并将所得的混合物悬浮在 1.5mL DMF 中。随后，添加无水氯化锌（55mg, 0.4mmol）。通过添加 EDTA 溶液（135mg, 0.4mmol, 在 20mL 水中）来猝灭反应，并用碳酸氢钠调至 pH 7。 $m_2^{7,2'}-^0Gpp_sP_sG$ 非对映异构体（D1、D2、D3、D4）的色谱法分离和分开通过半制备型 RP HPLC 来进行。

[0084] 实施例 8

[0085] 细胞培养

[0086] HC11 乳腺上皮细胞以克隆方式衍生自 COMMA-1D 小鼠乳腺细胞系。参见，K. Danielson 等人，"Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vivo and functional differentiation in vitro," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 第 81 卷, 第 3756-3760 页 (1984)。细胞在含有 10% 牛生长血清 (HyClone)、5 μ g/ml 牛胰岛素 (Sigma)、10ng/ml 重组 EGF (BD Biosciences) 的 RPMI1640 培养基中进行生长。

[0087] 实施例 9

[0088] mRNA 的体外合成

[0089] 在所有四种核苷三磷酸和不同的帽二核苷酸存在下，用 T7 聚合酶在编码萤光素酶的质粒 (pluc-A₆₀) 存在下通过体外转录来合成加帽的 RNA。参见 J. Jemielity 等人，"Novel 'anti-reverse' cap analogues with superior translational properties," RNA, 第 9 卷, 第 1108-1122 页 (2003)。典型的转录反应包含 40mM Tris-HCl (pH 7.9)、6mM MgCl₂、2mM 亚精胺、10mM DTT、0.1mg/ml BSA、1U/ μ l 的 RNasin (Promega)、0.5mM ATP、0.5mM CTP、0.5mM UTP、0.1mM GTP、1mM 帽类似物、15 μ g/ml DNA 和 1U/ μ l 的 T7 聚合酶 (Promega)。pluc-A₆₀（其包含有在 pGEM4 (Promega) 中的整个萤火虫萤光素酶编码序列和 3'-末端的 60-nt poly(A) 束 (tract)（参见 E. Grudzien 等人，"Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs," J. Biol. Chem., 第 281 卷, 第 1857-1867 页 (2006)）用 HpaI 进行消化以合成萤光素酶 mRNA，并且用 NcoI 进行消化以合成加帽的寡核苷酸。

[0090] 在 10 μ Ci/ μ l 的 [α -³²P]GTP (ICN) 存在下，在 37°C 温育 45 分钟的 50- μ l 反应混合物中合成短 RNA（约 48nt 的加帽的寡核苷酸）。用苯酚和氯仿对反应混合物进行提取，然后根据制造商的实验方案，使用旋转柱 (spin column) (Ambion) 将 RNA 与未掺入的核苷酸分离开。通过契伦科夫 (Cerenkov) 计数法来测定 mRNA 的浓度，其中将最终转录反应混合物中 [α -³²P]GTP 的比放射性活度用于使 cpm 转换为 pmol。

[0091] 在 37°C 温育 45 分钟的 200- μ l 反应混合物中合成 mRNA。温育后，将 200- μ l 反应混合物在 37°C 下用 3 个单位的 DNA 酶 RQ1 (Promega) 处理 20 分钟，并使用制造商的实验方案，用 RNeasy 小型试剂盒 (Qiagen) 来纯化 RNA。采用分光光度测定法来测定 RNA 的浓度。

[0092] 实施例 10**[0093] 体外 RNA 脱帽测定法**

[0094] 使用加帽的 48-nt 寡核苷酸（萤光素酶 mRNA 的截短形式（48 个核苷酸））作为底物来测量 Dcp2 活性。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达 GST-hDcp2 并进行纯化, 如 Z. Wang 等人, " The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme, " *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 第 99 卷, 第 12663-12668 页 (2002) 所描述的。首先使加帽的寡核苷酸在 37°C 下在脱帽缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM 乙酸钾、2mM 乙酸镁、0.5mM MnCl_2 、2mM 二硫苏糖醇和 0.1mM 精胺) 中经历使用 GST-hDcp2 来进行的消化 2 小时。参见 C. Piccirillo 等人, " Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2, " *RNA*, 第 9 卷, 第 1138-1147 页 (2003)。然后, 将反应混合物用等体积的苯酚提取一次和用氯仿提取两次, 并且用乙醇来沉淀出 RNA。将脱帽反应的产物进一步用核糖核酸酶的混合物 (RiboShredder; Epicentre) 在 37°C 下消化 1 小时。产物在 4.6×250-mm Partisil 10SAX/25 柱 (Whatman) 上通过阴离子交换 HPLC 进行解析。梯度的组成如下: 水, 1 分钟; 至 112mM KH_2PO_4 的线性梯度 (pH 4.5), 20 分钟; 112-450mM KH_2PO_4 的线性梯度, 15 分钟; 450mM 至 1.5M KH_2PO_4 的线性梯度, 15 分钟; 和以 1.5M KH_2PO_4 的等度洗脱, 9 分钟; 全部以 1ml/ 分钟的流速。

[0095] 实施例 11**[0096] 在 HC11 细胞中的翻译效率和 mRNA 衰变的测量**

[0097] 使用两种方法 (电穿孔和核穿孔) 来将 RNA 递送入细胞中。在电穿孔的情况下, 用 Bio-Rad Genepulser™ 设备, 以 0.22kV 和 960 μF , 在 Gene pulser 杯池 (cuvette) (4mm 间隙) 中, 在总体积 400 μl 的血清减少的 RPMI 1640 培养基中, 将 5 μg RNA 引入 10^7 个 HC11 细胞中。在放电后, 细胞用 PBS 洗涤两次, 在室温下以 $300\times g$ 离心 2 分钟, 重悬浮在预热的完全培养基中, 并放置于 37°C。根据制造商的建议, 用 Amaxa Nucleofector II (Amata Biosystems) 来进行核穿孔。使用 Nucleofector 溶液 V 和一套所建议的方案 (程序 T-024), 将 1 微克的 RNA 引入 10^6 个 HC11 细胞中。

[0098] 为了测量翻译效率, 将细胞划分入几个 Eppendorf 管中, 放置在 37°C 的水浴中, 并摇动。为了测量 mRNA 稳定性, 将细胞分配入 35-mm 细胞培养皿中, 并且放置于 37°C 和在 5% CO_2 潮湿气氛中。在各个不同的时间处收获细胞, 并用 PBS 洗涤两次。

[0099] 为了细胞质 RNA 的提取, 在 175 μl 裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl (pH 8.0)、140mM NaCl、1.5mM MgCl_2 、0.5% (v/v) Igepal (Sigma) 和 1mM 二硫苏糖醇) 中裂解 2×10^5 个细胞。RNA 用 RNeasy 小型试剂盒来进一步进行纯化。为了蛋白质的提取, 在 200 μl 萤光素酶细胞培养物裂解试剂 (Promega) 中裂解 2×10^5 个细胞。根据制造商的实验方案 (Promega), 测量细胞提取物的萤光素酶活性。

[0100] 实施例 12**[0101] 多核糖体的制备**

[0102] 为了分离核糖体亚基和起始复合物, 用包含 0.1mg/ml 放线菌酮的冰冷的 PBS 处理 4×10^6 个 HC11 细胞 2 分钟, 用相同的培养基洗涤两次, 并且在 600 μl 的 0.3M NaCl、15mM Tris-HCl (pH 7.6)、15mM MgCl_2 、1% Triton X-100、1mg/ml 肝素和 0.1mg/ml 放线菌酮中进行裂解。在以 $14,000\times g$ 离心 10 分钟后, 将上清液铺层在 15-45% 蔗糖梯度 (在相同的但

缺少 Triton X-100 的缓冲液中) 上, 并且在 Beckman SW41Ti 转子中于 4°C 以 38,000rpm 离心 2 小时。通过连续监测在 260nm 处的吸光度来使梯度分级分离。从每个级分 (1ml) 中分离出 RNA, 并通过实时 PCR 来进行分析。

[0103] 实施例 13

[0104] 实时 PCR

[0105] 为了测量 mRNA 稳定性, 将从 HC11 细胞中分离并用 RNeasy 小型试剂盒 (Qiagen) 纯化的约 2 μ g 每种总 RNA 样品在 37°C 下用 3 个单位的 DNA 酶 RQ1 (Promega) 处理 20 分钟。在包含 5.5mM $MgCl_2$ 、500 μ M 每种 dNTP、2.5 μ M 随机六聚体、0.2 个单位的 RNA 酶抑制剂和 0.8 个单位的 MultiScribe 反转录酶 (Applied Biosystems) 的 20- μ l 反应混合物中对 400ng RNA 进行反转录。将反应混合物于 25°C 温育 10 分钟, 于 48°C 温育 30 分钟, 和于 95°C 温育 5 分钟。使用以 BeaconDesigner 工具 (Bio-Rad) 对于每种 mRNA 而设计的特异引物来进行定量实时 PCR。关于检测萤光素酶 mRNA 的 5'-末端的序列, 引物为 5'-CGTTCGGTTGGCAGAAGCTA-3' (SEQ ID NO:1) 和 5'-ACTGTTGAGCAATTCACGTTTCATT-3' (SEQ ID NO:2)。从帽结构至 3'-末端同聚物束的开始处, 萤光素酶 mRNA 由 1714 个核苷酸组成。这些引物扩增出核苷酸 226-398。使用引物 5'-CAATGTGTCCGTCGTGGATCT-3' (SEQ ID NO:3) 和 5'-GAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA-3' (SEQ ID NO:4), 通过相同的方法和在相同的 RNA 样品中测量小鼠 GAPDH mRNA 水平。

[0106] 用 iCycler IQ 实时 PCR 检测系统, 在包含 5 μ l 转录反应混合物 (50ng cDNA)、12.5 μ l IQ SYBRgreen Supermix 和 0.3mM 引物 (Bio-Rad) 的 25- μ l 反应混合物中进行扩增和检测。温育条件是在 95°C 下 3 分钟以用于聚合酶活化, 以及在 95°C 下 15 秒和在 60°C 下 1 分钟的 40 个循环。

[0107] 使用如在关于 ABI Prism 7700 Sequence Detection System 的第 2 号用户公报中所描述的绝对标准曲线方法来计算萤光素酶 mRNA 水平。在从标准曲线计算出萤光素酶 mRNA 的量后, 将其对于每个样品中小鼠 GAPDH mRNA 的量进行标准化。将在每个时间点处存留的萤光素酶 mRNA 的量转换为在零时存在的 RNA 的百分比, 并将结果以 " $\log_{10}([RNA])$ 对时间" 的形式进行作图以测定半寿期。为了分析来自多核糖体梯度的 RNA, 在 RNA 分离之前, 向每个级分中添加体外合成的 GFP mRNA 作为内标以检验 RNA 产量的变化。使用 GFP mRNA 水平来使萤光素酶和 GAPDH mRNA 的水平标准化。

[0108] 实施例 14

[0109] 对于 eIF4E 的结合亲和力

[0110] 通过荧光猝灭来测定 S 类似物对于鼠类 eIF4E 的结合亲和力。在 LS-50B 分光荧光计 (Perkin Elmer Co.) 上, 于 $20.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 在 50mM HEPES/KOH (pH 7.2)、100mM KCl、0.5mM EDTA、1mM DTT 中进行荧光滴定测量。向 1.4ml 的 0.1 蛋白质溶液中添加 1 μ l 浓度递增的帽类似物溶液的等份试样。考虑到样品稀释和内滤效应, 对荧光强度 (用 2.5nm 带宽在 280nm 处进行激发, 和用 4nm 带宽和 290nm 截止滤光片在 337nm 处进行检测) 进行修正。通过将荧光强度对于帽类似物总浓度的理论依赖性 (theoretical dependence) 与根据先前所描述的方程 (参见 A. Niedzwiecka 等人, "Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins," J. Mol. Biol., 第 319 卷, 第 615-635 页 (2002)) 的实验数据点相拟合, 来测定平衡缔合常数 (K_{AS})。将蛋白质浓度作为显示 "活性" 蛋白质的量的平衡方程的自

由参数进行拟合。将最终的 K_{AS} 计算为 3 至 10 次独立滴定的加权平均值,其中将所述权重作为数值标准差平方的倒数。使用 ORIGIN 6.0 (Microcal Software Inc., USA) 来进行数值非线性最小二乘回归分析。根据标准方程 $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{AS}$, 从 K_{AS} 值来计算结合的吉布斯自由能。

[0111] 实施例 15

[0112] 通过人和秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) DcpS 来进行的酶促水解

[0113] 根据先前所描述的操作程序 (L. S. Cohen 等人, “Nematode m7GpppG and m3(2,2,7) GpppG decapping: activities in *Ascaris* embryos and characterization of *C. elegans* scavenger DcpS,” RNA, 第 10 卷, 第 1609-1624 页 (2004)), 在大肠杆菌中表达人和线虫 DcpS。这两种蛋白质都于 -80°C 在含有 50mM KCl、0.2mM EDTA、1mM DTT、0.5mM PMSF 和 20% 甘油的 20mM Tris 缓冲液 (pH 7.5) 中进行贮存。在 37°C 下, 用 5.0 或 $7.0\ \mu\text{l}$ 的在 $500\ \mu\text{l}$ 含有 20mM MgCl_2 和 60mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 50mM TRIS 缓冲液 (pH = 7.9) 中的 DcpS (分别来自人或秀丽隐杆线虫) 处理浓度为 1mM 的合适的帽类似物 60-90 分钟。每 15-20 分钟从反应混合物中收集 $100\ \mu\text{l}$ 样品, 并通过在 90°C 下温育 3 分钟来使其失活。不经进一步处理, 通过分析型 RP HPLC 来分析所收集的样品, 其中在 15 分钟内使用在 0.1M KH_2PO_4 (pH = 6.0) 中的 0-50% 甲醇线性梯度, 并在 260nm 处进行 UV- 检测。

[0114] 实施例 16

[0115] 帽依赖性翻译的抑制

[0116] 将经微球菌核酸酶处理的兔网织红细胞裂解物用于体外翻译 (A. Cai 等人, “Quantitative assessment of mRNA cap analogues as inhibitors of in vitro translation,” Biochemistry, 第 38 卷, 第 8538-8547 页 (1999))。在 100mM 乙酸钾和 1.4mM 氯化镁时, 取得最佳的帽依赖性翻译。为了测定由各种帽类似物引起的翻译的抑制, 以 $5\ \mu\text{g/ml}$ 的浓度向裂解物中添加天然的兔珠蛋白 mRNA, 并通过 $[^3\text{H}]\text{Leu}$ 的掺入来测量蛋白质合成。如先前所描述的 (Cai 等人, 1999), 进行 K_t 数据的标准化。使用 $\lambda = 255\text{nm}$ 和 $\epsilon_m = 22.6 \times 10^3\text{M}$, 在 pH 7.0 下通过 UV 吸收来测量二核苷酸帽类似物溶液的浓度。

[0117] 结果

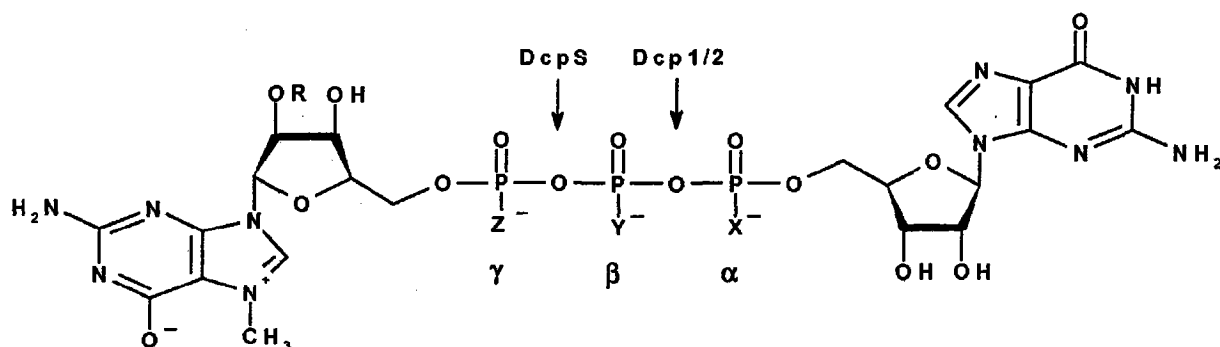
[0118] 实施例 17

[0119] 帽类似物的合成

[0120] 导致获得在三磷酸链的 α 、 γ 和 β 位置处拥有硫代磷酸基团的类似物的合成途径分别描绘在图 1、2 和 3 中。

[0121] 我们合成了一系列的 6 种帽类似物, 其在 $5'$, $5'$ -三磷酸链的 α 、 β 或 γ 位置处携带有单个硫代磷酸部分。(参见下文)。由于致立体性 (stereogenic) P- 中心的存在, 每种 S- 类似物以两种非对映异构体 (根据它们在 RP HPLC 期间的洗脱顺序而命名为 D1 和 D2) 的混合物形式而获得。通过 RP HPLC 成功地对每种 S- 类似物进行了拆分, 从而提供了 12 种化合物, 随后对这 12 种化合物在生物物理学和生物化学方面进行了表征。这些 S- 类似物中的 6 种包含 ARCA 修饰, 即在 $m^7\text{Guo}$ 部分中的 $2'$ -O- 甲基, 并因此称为 S-ARCA。在 β 位置处引入硫代磷酸基团产生了对 Dcp2 的抗性, 增加了半寿期, 和改善了翻译效率。

[0122]



[0123]

化合物	缩写	X	Y	Z	R	构型
1a	m ⁷ Gppp _s G (D1)	S	O	O	H	S _p
1b	m ⁷ Gppp _s G (D2)	S	O	O	H	R _p
2a	m ⁷ Gpp _s pG (D1)	O	S	O	H	n.a.
2b	m ⁷ Gpp _s pG (D2)	O	S	O	H	n.a.
3a	m ⁷ Gp _s ppG (D1)	O	O	S	H	n.a.
3b	m ⁷ Gp _s ppG (D2)	O	O	S	H	n.a.
4a	m ₂ ^{7,2'-O} Gppp _s G (D1)	S	O	O	CH ₃	S _p
4b	m ₂ ^{7,2'-O} Gppp _s G (D2)	S	O	O	CH ₃	R _p
5a	m ₂ ^{7,2'-O} Gpp _s pG (D1)	O	S	O	CH ₃	n.a.
5b	m ₂ ^{7,2'-O} Gpp _s pG (D2)	O	S	O	CH ₃	n.a.
6a	m ₂ ^{7,2'-O} Gp _s ppG (D1)	O	O	S	CH ₃	n.a.
6b	m ₂ ^{7,2'-O} Gp _s ppG (D2)	O	O	S	CH ₃	n.a.

[0124] n. a. - 未指定

[0125] S-ARCA 的该化学合成是最初对于具有未修饰的 5',5'-多磷酸桥的帽类似物所开发的化学合成的修改形式。参见 M. Kadokura 等人, "Efficient synthesis of γ-methyl-capped guanosine 5'-triphosphate as a 5'-terminal unique structure of U6 RNA via a new triphosphate bond formation involving activation of methyl phosphorimidazolidate using ZnCl₂ as a catalyst in DMF under anhydrous conditions," Tetrahedron Lett., 第 38 卷, 第 8359-8362 页 (1997); J. Stepinski 等人, "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogues 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG," RNA, 第 7 卷, 第 1486-1495 页 (2001); 和 J. Jemielity 等人, "Novel 'anti-reverse' cap analogues with superior translational properties," RNA, 第 9 卷, 第 1108-1122 页 (2003)。将两个单核苷酸种类 (其中之一首先转化为反应性 N-酰化咪唑衍生物) 在 DMF 中进行偶联。通过 8 倍过量的 ZnCl₂ 来促进反应, 所述 8 倍过量的 ZnCl₂ 显著地改善反应物在有机介质中的溶解度, 防止 N-酰化咪唑衍生物的水解, 和加速反应速率。在该合成中的重要步骤是在 DMF 中

在 ZnCl_2 存在下合适的 N- 酰化咪唑衍生物与核苷 5' - 硫代磷酸或核苷 5' - (2- 硫代二磷酸) 的偶联。在类似的、最近开发出的反应 (其采用硫代磷酸阴离子 (PSO_3^{3-}) 作为亲核体) 中有效地获得中间体核苷 5' - (2- 硫代二磷酸) 。参见 J.Kowalska 等人, “A simple and rapid synthesis of nucleotide analogues containing a phosphorothioate moiety at the terminal position of the phosphate chain”, Tetrahedron Lett, 第 48 卷, 2007, 5475-5479。我们所开发出的反应策略使得能够在多磷酸链的所选位置处引入硫代磷酸部分, 以及产生中间体核苷 5' - (2- 硫代二磷酸) 。

[0126] 如上文所显示的和如在权利要求书中所使用的, 称为 “ α ” 的磷酸部分对于 7- 甲基鸟苷部分来说最远端的磷酸部分。称为 “ β ” 的位置是在朝向 7- 甲基鸟苷部分移动的方向上的下一个磷酸, 和称为 “ γ ” 的位置是在朝向 7- 甲基鸟苷部分移动的方向上的下一个磷酸。在三磷酸 ARCA 中, 如上文所显示的, “ γ ” 是最靠近 7- 甲基鸟苷部分的磷酸。在四磷酸 ARCA 中, “ δ ” 磷酸将 “ γ ” 与 7- 甲基鸟苷相隔开。(在没有 7- 甲基鸟苷部分的 ARCA 中, 将会理解, 应当修改前面的定义以换而涉及具有这样的位置的部分, 即该位置类似于在本文所给出的实施例中的 7- 甲基鸟苷的位置) 。

[0127] 导致获得在 5' , 5' - 三磷酸桥的 α - 位置处经修饰的类似物 1 和 4 (即, $m^7\text{Gppp}_5\text{G}$ 和 $m_2^{7,2'}\text{-}^0\text{Gppp}_5\text{G}$) 的合成途径描绘在图 1 中。在这两个最后的偶联反应中, 都使用了 1.5 至 2 倍过量的磷酸 N- 酰化咪唑 (phosphorimidazolide) 以确保核苷 5' - 硫代磷酸的完全消耗。偶联稳步地进行, 这导致在 1-2 天内几乎完全消耗掉底物。在 γ 位置处经修饰的类似物 3 和 6 (即, $m^7\text{Gp}_5\text{ppG}$ 和 $m_2^{7,2'}\text{-}^0\text{Gp}_5\text{ppG}$) 的合成 (描绘在图 2 中) 与上文所描述的相似。在每种情况下, 如图 2 中所显示的那样, 通过 RP HPLC 来指示两种非对映异构体的形成。中间体核苷 5' - 硫代磷酸 9、10 和 11 经过合适的核苷的硫代磷酸化来合成, 所述硫代磷酸化于 0°C 在 2,6- 二甲基吡啶存在下在磷酸三甲酯中通过 PSCl_3 来进行, 类似于先前报道的操作程序 (J.R.Moran 等人, “A practical enzymatic synthesis of (S[P])-adenosine 5' -O-(1-thiotriphosphate) ((S[P])-ATP- α -S)”, J. Org. Chem., 第 49 卷, 第 704-706 页 (1984))。在化合物 10 和 11 的情况下, N7 位处的甲基化必须在硫代磷酸化步骤之前在核苷阶段进行, 这是因为否则甲基碘优先使硫原子烷基化 (未发表的发现)。通过采用 2,2' - 联硫基二吡啶 / 三苯膦活化体系, 经过与咪唑的反应而容易地达到将核苷 5' - 二磷酸转化为其 N- 酰化咪唑衍生物 (7、8 和 12-15) (T.Mukaiyama 等人, “Phosphorylation by oxidation-reduction condensation. Preparation of active phosphorylating reagents”, Bull. Chem. Soc. Jpn., 第 44 卷, 第 2284 页 (1971))。如图 3 中所描绘的那样, 合成在 β - 位置处经修饰的类似物, 即 $m^7\text{Gpp}_5\text{pG}$ (2) 和 $m_2^{7,2'}\text{-}^0\text{Gpp}_5\text{pG}$ (5)。最终的偶联的 HPLC 分析揭示了两种 P- 非对映异构体的形成。但是, 它们的保留时间非常相似。为了获得中间体核苷 5' -O-(2- 硫代二磷酸) 16 和 17, 我们采用了最近开发出的在核苷 5' - 单磷酸 N- 酰化咪唑和作为亲核体的硫代磷酸 (PSO_3^{3-}) 三乙基铵盐之间的偶联反应 (J.Kowalska 等人, “A simple and rapid synthesis of nucleotide analogues containing a phosphorothioate moiety at the terminal position of the phosphate chain”, Tetrahedron Lett, 第 48 卷, 2007, 5475-5479)。

[0128] 在所有导致获得帽类似物 1-6 的反应中, HPLC 分析都揭示, 作为主要产物形成了所希望的化合物, 只有适度量的副产物。尽管如此, 制备性的产量令人惊讶地低于由 HPLC

所指示的那些,在总体 10-20% 的范围内。这可能是由于在长时间的通过 RP HPLC 来分离非对映异构体的过程中材料的大量损失所致,RP HPLC 在许多情况下重复进行以便获得非对映异构体纯的样品。

[0129] 实施例 18

[0130] 体外脱帽反应

[0131] 我们就通过重组 hDcp2 的水解而测试了用任一种 S-ARCA 帽化的寡核苷酸,以测试用 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gppp}_5\text{G}$ 和 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gpp}_5\text{pG}$ 的各种非对映异构体帽化的 mRNA 在它们对于通过 Dcp1/Dcp2 的切割的敏感性方面是否不同。一般地,参见, Z. Wang 等人, " The hDcp2 protein is amammalian mRNA decapping enzyme, " *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 第 99 卷, 第 12663-12668 页 (2002); 和 Z. Wang 等人, " An mRNA Stability Complex Functions with Poly(A)-Binding Protein To Stabilize mRNA In Vitro " , *Mol. Cell. Biol.*, 第 19 卷, 第 4552-4560 页 (1999)。所使用的帽类似物在最初是未标记的, 因此为了追踪消化反应的产物, 我们在 $[\alpha-^{32}\text{P}]\text{GTP}$ 和 DNA 模板 (其中 G 是在启动子之后指定的第一个核糖核苷酸) 存在下合成了加帽的寡核苷酸。用所述 S-ARCA 中的任一种帽化的寡核苷酸经历体外 Dcp2 消化, 之后用核糖核酸酶混合物 (来自 Epicenter 的 RiboShredder) 进一步消化所述产物。通过最近邻转移 (nearest-neighbor transfer), 在核糖核酸酶消化后, 在 G 残基的 5'-侧处的任意核苷酸获得 ^{32}P - 标记的 3'-磷酸基团。然后, 使用阴离子交换色谱法将在 RNA 中的内部位置处的经标记的 3'-核苷单磷酸 (3'-NMP*) 与经标记的 5'-末端产物解析开 (图 6)。后者分别包括源自未帽化的转录物的 $p_3\text{Gp}^*$ 和 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gp}_3\text{Gp}^*$ (当使用 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gp}_3\text{G}$ 时), 或者由对于酶促切割具有抗性或不具有抗性的帽化的 RNA 而产生的 $p\text{Gp}^*$ 。所使用的帽类似物是 ARCA, 其确保它们仅以正确的方向掺入 RNA 中。这进一步保证了, 在核糖核酸酶处理后只观察到一种 5'-末端产物 ($m_2^{7,2'}-^0\text{Gp}_3\text{Gp}^*$)。未帽化的 RNA 不是 Dcp2 的底物, 这解释了为什么在 Dcp2 消化后观察到 $p_3\text{Gp}^*$ 产物。

[0132] 为了确定哪些帽类似物保护 mRNA 免于 hDcp2 切割, 我们用重组 hDcp2 消化加帽的、 ^{32}P - 标记的短 RNA, 其中采用这样的条件, 即在所述条件下 (i) 用 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gp}_3\text{G}$ 帽化的寡核苷酸完全被 hDcp2 消化 (图 6A), 和 (ii) 用 $m_2^{7,3'}-^0\text{Gpp}_{\text{CH}_2}\text{pG}$ 帽化的寡核苷酸具有抗性 (图 6B)。先前显示, $m_2^{7,3'}-^0\text{Gpp}_{\text{CH}_2}\text{pG}$ 保护 mRNA 免于 hDcp2 降解。参见 E. Grudzien 等人, " Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs, " *J. Biol. Chem.*, 第 281 卷, 第 1857-1867 页 (2006)。我们发现, 只有 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gpp}_5\text{pG}$ 的 D2 异构体使 RNA 对于 hDcp2 水解保持稳定 (图 6F)。用 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gppp}_5\text{G}$ 和 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gp}_5\text{ppG}$ 的异构体帽化的寡核苷酸不显示在对于 hDcp2 的稳定性方面的增加 (图 6C、6D、6G 和 6H)。

[0133] 实施例 19

[0134] 用硫代磷酸帽类似物帽化的 mRNA 的 5' 降解

[0135] 由于用 $m_2^{7,2'}-^0\text{Gpp}_5\text{pG}$ (D2) 帽化的短 RNA 对于 hDcp2 水解具有抗性, 我们预测, 该帽类似物的存在会影响细胞中 mRNA 的稳定性。我们使用核穿孔或电穿孔来将合成的荧光素酶 mRNA 引入 HC11 小鼠乳腺上皮细胞中。这些方法允许几乎紧接在放电后, 就测量细胞中的荧光素酶合成和荧光素酶 mRNA 水平。对于电穿孔, 我们使用先前优化的条件。参见 E. Grudzien 等人, " Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs, " *J. Biol. Chem.*, 第 281 卷, 第 1857-1867 页 (2006)。对于核穿孔, 我们遵

循由 Amaxa Biosystems 建议的条件（参见“材料和方法”）。由于 Amaxa 实验方案给出了最高的转染效率以及还有最高的细胞生存力，因而其被用于本文所描述的大多数实验。

[0136] 在体外合成了包含各种 5' - 末端帽和 3' - 末端 60-nt poly(A) 束的萤光素酶 mRNA (Luc-A₆₀)。在核穿孔后，以直至 90 分钟的间隔取出细胞以便测量翻译效率，其中使用萤光素酶活性增加的速率；或者以直至 8 小时的间隔取出细胞以通过实时 PCR 来测量萤光素酶 mRNA 稳定性。如果从包含经翻译的和未翻译的 mRNA 两者的细胞中回收 mRNA，那么翻译效率和 mRNA 稳定性的测定可能会是错误的。为了解决这个问题，我们测定了总胞质 mRNA 的降解速率，相比于多核糖体 mRNA。将用 $m_2^{7,2'}-{}^0Gp_3G$ 帽化的萤光素酶 mRNA 核穿孔入 HC11 细胞中，然后在各个不同时间处裂解所述细胞并且铺层在蔗糖梯度上以将多核糖体与起始复合物分离开。合并多核糖体级分，并纯化 RNA。为了追踪胞质 mRNA 降解，我们使用从总细胞提取物中分离出的 mRNA。在这两种情况下，均使用针对萤光素酶 mRNA 的 5' - 末端的引物对，通过实时 PCR 来定量萤光素酶 mRNA。

[0137] 与多核糖体相联合的转录物以大约与总胞质 mRNA 相同的速率被降解（数据未显示）。这暗示，即使在任何给定时间处存在经翻译的和未翻译的萤光素酶 mRNA 池 (pool)，但 mRNA 在它们之间自由交换。该观察结果验证了翻译效率和降解速率的测量结果。

[0138] 在核穿孔入 HC11 细胞中后，测定了用各种 S-ARCA 帽化的 Luc-A₆₀ 的稳定性。通过实时 PCR 测定了在各个不同时间处存留在细胞中的 mRNA。用 $m_2^{7,2'}-{}^0GpppG$ (D2) 帽化的 Luc-A₆₀ ($t_{1/2}$ = 257 分钟) 比用天然帽 $m_2^{7,2'}-{}^0Gp_3G$ ($t_{1/2}$ = 86 分钟) 或亲本化合物 $m_2^{7,2'}-{}^0Gp_3G$ ($t_{1/2}$ = 155 分钟) 帽化的 mRNA 更为稳定（图 7 和表 2）。这暗示，mRNA 稳定性的增加是由于对于通过 Dcp1/Dcp2 的水解的抗性而引起的。 $m_2^{7,2'}-{}^0GpppG$ (D1) ($t_{1/2}$ = 169 分钟) 和 $m_2^{7,2'}-{}^0GpppG$ (D1) ($t_{1/2}$ = 185 分钟) 都没有赋予比 $m_2^{7,2'}-{}^0Gp_3G$ ($t_{1/2}$ = 155 分钟) 显著更大的稳定性（表 2）。值得注意的是， $m_2^{7,2'}-{}^0GpppG$ (D1) 和 $m_2^{7,2'}-{}^0GpppG$ (D1) 对于 eIF4E 的亲合力都为 $m_2^{7,2'}-{}^0Gp_3G$ 的 3 倍。人们可能预期，用这些类似物帽化的 mRNA 将会更稳定，如果关于 eIF4E 和 Dcp1/Dcp2 之间的竞争的假说是正确的话。参见 E. Grudzien 等人，" Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs," J. Biol. Chem., 第 281 卷, 第 1857-1867 页 (2006)。对于用这些类似物帽化的 mRNA，我们没有观察到稳定性或翻译效率的增加（参见下文）。这可以表明，虽然 $m_2^{7,2'}-{}^0GpppG$ (D1) 和 $m_2^{7,2'}-{}^0GpppG$ (D1) 更强地结合 eIF4E，但存在有上限，超过了该上限，对于 eIF4E 的高亲合力不加速总体翻译。根据这个解释，当帽结合的速率变得足够高时，蛋白质合成起始中的一些其他步骤就成为是限速的。

[0139] 实施例 20

[0140] 在 HC11 细胞中用 S-ARCA 帽化的萤光素酶 mRNA 的翻译效率

[0141] 对于用 S-ARCA 帽化萤光素酶 mRNA，我们还测定了在培养的细胞中的翻译效率。这涉及在核穿孔后的各个不同时间处进行的两个测量：在经澄清的细胞裂解物中通过发光测定法而测量的萤光素酶活性，和通过实时 PCR 而测量的 Luc-A₆₀ 水平。通过已被递送入细胞中的萤光素酶 mRNA 的量来使萤光素酶活性标准化。为了测定在紧接于核穿孔后的时间处（即在出现任何衰变之前）在细胞中存在的 RNA 的量，在核穿孔后 2 至 8 小时的各个不同时间处收获细胞，并且提取胞质 RNA。使用扩增 5' - 末端附近序列的引物，通过实时 PCR 来测量萤光素酶 mRNA 的量。将在每个时间点处存留的萤光素酶 mRNA 以 " $\log_{10}([RNA])$ " 对

时间”的形式进行作图以测定 $t_{1/2}$ 。将曲线外推至 0 小时,并计算出递送入细胞中的 RNA 的量。我们定义了这样的条件,在所述条件下,在~ 30 分钟的最初的延滞期后,萤光素酶的积累随着时间是线性的,所述延滞期用于将 mRNA 募集至核糖体,完成第一条多肽链,和将萤光素酶释放到细胞溶胶中。

[0142] 用 $m_2^{7,2'-O}GpppG$ (D1) 和 $m_2^{7,2'-O}GpppG$ (D2) 帽化的 Luc-A₆₀mRNA 以分别为用 m^7Gp_3G 帽化的 mRNA 的 2.8 倍和 5.1 倍的程度更有效地进行翻译 (图 8 和表 2)。对于在兔网织红细胞裂解物体系中的无细胞翻译,用 $m_2^{7,2'-O}GpppG$ (D1) 和 $m_2^{7,2'-O}GpppG$ (D2) 帽化的 Luc-A₆₀mRNA 仅以为用 m^7Gp_3G 帽化的 Luc-A₆₀mRNA 的 2.3 倍的程度更有效地进行翻译 (数据未显示)。该差异暗示,在培养的细胞中翻译效率的增加与更高的 mRNA 稳定性 (其不是无细胞翻译体系的因素) 相关,这是因为只有用对于 hDcp2 具有抗性的类似物帽化的 mRNA 被更有效地翻译。

[0143] 表 2

[0144] 在 HC11 细胞中具有硫代磷酸帽类似物的萤光素酶 mRNA 的翻译效率和稳定性

[0145]

No.	Luc-A ₆₀ mRNA 上的帽的类型	帽 - eIF4E K _{AS} [M ⁻⁶] ^a	Dcp2 易感性 ^b	mRNA 半寿期 (分钟) ^c	相对 翻译效率 ^d
1	m^7Gp_3G	9.4 ± 0.8	ND	86 ± 1 *	1.00
2	$m_2^{7,2'-O}Gp_3G$	10.8 ± 0.3	100	155 ± 9	2.1 ± 0.2
3	$m_2^{7,2'-O}GpppsG$ (D1)	34.3 ± 1.3	96	169 ± 19	2.5 ± 0.8
4	$m_2^{7,2'-O}GpppsG$ (D2)	12.9 ± 0.9	98	164 ± 1	1.8 ± 0.4
5	$m_2^{7,2'-O}GppspG$ (D1)	42.1 ± 1.6	71	185 ± 22	2.8 ± 0.3
6	$m_2^{7,2'-O}GppspG$ (D2)	18.3 ± 3.4	6	257 ± 4 *	5.1 ± 0.5
7	$m_2^{7,2'-O}GpsppG$ (D1)	19.3 ± 1.8	84	149 ± 9	2.0 ± 0.1
8	$m_2^{7,2'-O}GpsppG$ (D2)	15.4 ± 0.5	91	139 ± 6	1.9 ± 0.1

[0146] ^a 在 20 °C 下小鼠 eIF4E (氨基酸 28-217) 与各种帽类似物的相互作用的平衡缔合常数。在大肠杆菌中表达小鼠 eIF4E (残基 28-217), 并且进行荧光时间同步滴定 (fluorescence time-synchronized titration), 如在 J. Zuberek 等人, " Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA cap analogs by electrostatic repulsion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein, " RNA, 第 9 卷, 第 52-61 页 (2003); 和 A. Niedzwiecka 等人, " Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins, " J. Mol. Biol., 第 319 卷, 第 615-635 页 (2002) 中所描述的。

[0147] ^b 使用图 4 的数据来估计用各种类似物帽化的寡核苷酸对于 hDcp2 水解的易感性。将在 44 分钟处 (未消化的帽) 和在 38 分钟处 (pGp^*) 洗脱出的峰中的放射性活度对于背

景放射性活度进行修正,并相加以代表帽中的总放射性活度。通过作为总放射性活度的百分比来表示的在 pGp^{*}中的放射性活度来给出 Dcp2 易感性。(ND) 未测定。

[0148] ^c 通过实时 PCR(其使用针对萤光素酶 mRNA 的 5'-末端的引物)来测定用所示的类似物帽化的 Luc-A₆₀mRNA 中 5'-末端序列的降解。

[0149] ^d 显示了在 HC11 细胞中用所示的帽类似物帽化的 Luc-A₆₀mRNA 的翻译效率。通过细胞中萤光素酶 RNA 的量来对萤光素酶活性进行标准化。如由 J.Jemielity 等人, " Novel ' anti-reverse ' cap analogues with superiortranslational properties " RNA,第 9 卷,第 1108-1122 页 (2003) 所描述的,计算出相对翻译效率。

[0150] ^{*} 指明了与用 m₂^{7,2'-0}Gp₃G 帽化的 mRNA 显著不同 (p < 0.05) 的半寿期。

[0151] 实施例 21

[0152] 在 HC11 细胞中用 S-ARCA 帽化的萤光素酶 mRNA 更有效地被募集至多核糖体

[0153] 我们采用了独立的方法来验证这样的观察结果:用 m₂^{7,20}Gpp_spG 帽化的 mRNA 更有效地被翻译,即它们的多核糖体分布(图 9A-9E)。相对于延伸或终止而言起始的速率的增加导致 mRNA 从较轻的多核糖体移动至较重的多核糖体。参见 H.Lodish, " Model for theregulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis, " Nature, 第 251 卷,第 385-388 页 (1974)。未预期帽结构的类型会影响延伸的速率。因此,移动至更高的多核糖体表明了更快的起始。

[0154] 将用 m⁷Gp₃G、m₂^{7,2'-0}Gp₃G 或 m₂^{7,2'-0}Gpp_spG (D2) 帽化的 LucA₆₀mRNA 电穿孔入 HC11 细胞中。在电穿孔后 4 小时,裂解这些细胞,并将经澄清的上清液铺层在蔗糖梯度上以将多核糖体与起始复合物分离开。萤光素酶 mRNA 主要地存在于多核糖体中(图 9A 和 9B,级分 6-11),尽管有些也存在于起始复合物的区域中(级分 3-5)。小的萤光素酶 mRNA 存在于未翻译的信使核糖核蛋白复合物(mRNP)池中(图 9A 和 9B,级分 1-2)。用标准 ARCA 即 m₂^{7,2'-0}Gp₃G 帽化的 mRNA 移动至更高的多核糖体(图 9C)。然而,用 m₂^{7,2'-0}Gpp_spG (D2) 帽化的 mRNA 移动至更加高的多核糖体,并且同时从 mRNP 区域中丢失(图 9D)。在相同的实验条件下,内源的 GAPDH mRNA 被有效地翻译(图 9E),尽管有些也沉积在起始复合物的区域中。总之,这些结果暗示,萤光素酶转录物的 5'-末端处 m₂^{7,2'-0}Gpp_spG (D2) 的存在增加它们的起始速率,从而确认了基于萤光素酶活性的积累的结果。

[0155] 实施例 22

[0156] S-ARCA 萤光素酶 mRNA 的更大的稳定性和更大的翻译效率的组合在 HC11 细胞中产生更多的总体蛋白质表达

[0157] 我们还测定了通过其酶促活性来测量的总的萤光素酶积累,作为关于用 m₂^{7,2'-0}Gp₃G、m₂^{7,2'-0}Gpp_spG (D1) 和 m₂^{7,2'-0}Gpp_spG (D2) 帽化的 mRNA 的时间的函数。对 HC11 细胞进行核穿孔,然后在直至 10 小时的各个不同时间处进行裂解。将在上清液中测量得到的萤光素酶活性对于递送入细胞中的 Luc-A₆₀ 的量进行标准化。如图 10 中所显示的,HC11 细胞中的萤光素酶活性在 3 小时处达到最大,然后在经过 10 小时下降至 1/10。表达的动力学与萤光素酶蛋白质的半寿期(其为约 180 分钟)(参见 J.Thompson 等人, " Modulation of fireflyluciferase stability and impact on studies of gene regulation, " Gene, 第 103 卷,第 171-177 页 (1991)) 和各种萤光素酶 mRNA 的半寿期(其分别为 155、185 和 257 分钟)相一致。对于用 m₂^{7,2'-0}Gpp_spG (D2) 帽化的 Luc-A₆₀(其具有最高的翻译效率和最

大的稳定性)来说,大多数萤光素酶发生积累。预测对于具有更长半寿期的蛋白质来说,来自用该类似物帽化的 mRNA 的总体蛋白质表达的增加是更加大的。

[0158] 实施例 23

[0159] 对于 eIF4E 的结合亲和力

[0160] 所述 S- 类似物的 K_{AS} 值和结合自由能 (ΔG°), 以及关于它们的未修饰的亲本化合物的同样的数据显示在表 3 中。令人惊讶地, 不但硫代磷酸部分的存在没有降低对于 eIF4E 的结合亲和力, 而且在有些情况下, 亲和力还显著增加了。 K_{AS} 值强烈地依赖于硫代磷酸修饰的位置和在不对称 P- 中心周围的绝对构型。有趣的是, 在每对非对映异构体中, D1 成员以 D2 成员或亲本类似物的 2.3 至 4.5 倍的亲和力与 eIF4E 结合。例如, $m_2^{7,2'}-O$ GppspG 的 D1 异构体的 K_{AS} 为 D2 或 $m_2^{7,2'}-O$ GpppG 的 3 倍。类似地, $m_2^{7,2'}-O$ GppspG 的 D1 异构体的 K_{AS} 为 D2 的 2 倍和为 $m_2^{7,2'}-O$ GpppG 的 4.5 倍。对于 γ -修饰的类似物, 观察到最大的在 D1/D2 非对映异构体之间的结合亲和力的差异。在另一个方面, 对于 β -取代的类似物, 观察到最大的在经修饰的和未修饰的对之间的差异。

[0161] 表 3

[0162] 鼠类 eIF4E (28-217) 与硫代磷酸帽类似物的结合的平衡缔合常数 (K_{AS}) 和结合自由能 (ΔG°), 其通过荧光猝灭来测定。

[0163]

	帽类似物	K_{AS} μM^{-1}	ΔG° 千卡/摩尔
	m^7GpppG	9.4 ± 0.4	-9.35 ± 0.02
1a	m^7 GpppsG (D1)	23.6 ± 0.8	-9.88 ± 0.02
1b	m^7 GpppsG (D2)	13.1 ± 0.8	-9.54 ± 0.03
2a	m^7 GppspG (D1)	45.0 ± 1.1	-10.26 ± 0.01
2b	m^7 GppspG (D2)	23.0 ± 0.4	$-9.87 \pm$
3a	m^7 GpsppG (D1)	30.8 ± 0.5	$-10.04 \pm$
3b	m^7 GpsppG (D2)	10.0 ± 0.2	-9.39 ± 0.01
	$m^{7,2'-O}$GpppG	10.8 ± 0.3	$-9.43 \pm$
4a	$m^{7,2'-O}$ GpppsG (D1)	19.2 ± 0.8	$-9.76 \pm$
4b	$m^{7,2'-O}$ GpppsG (D2)	15.0 ± 0.6	$-9.62 \pm$
5a	$m^{7,2'-O}$ GppspG (D1)	43.1 ± 1.4	-10.23 ± 0.02
5b	$m^{7,2'-O}$ GppspG (D2)	19.3 ± 2.2	$-9.77 \pm$
6a	$m^{7,2'-O}$ GpsppG (D1)	35.2 ± 1.1	$-10.12 \pm$
6b	$m^{7,2'-O}$ GpsppG (D2)	12.9 ± 0.4	$-9.53 \pm$
	$m^{7,2'-O}$GppppG	99.8 ± 6.0	--

[0164] **对于非对映异构体混合物所测定的

[0165] 实施例 24

[0166] 对于通过人和秀丽隐杆线虫 DcpS 的酶促水解的易感性

[0167] 使新系列的 S- 类似物经历由来自人和秀丽隐杆线虫来源的 DcpS 所催化的体外酶促水解。在所有实验中,将相应的未修饰的帽类似物用作阳性对照,即对于非 ARCA S- 类似物来说为 m^7GpppG ,和对于 S-ARCA 来说为 $m_2^{7,2'}-^0GpppG$ 。优化 DcpS 酶的量以提供在 40-90 分钟内对照底物的完全降解。通过 RP HPLC 来分析以各个不同时间间隔从反应混合物中收集的样品(如在“材料和方法”中所描述的)。

[0168] 在表 4 中,在导致于 40-90 分钟内未修饰的亲本化合物(即,对于非 ARCA S- 类似物来说为 m^7GpppG ,和对于 ARCA 来说为 $m_2^{7,2'}-^0GpppG$)完全降解的条件下,使 $4\mu M$ 浓度的帽类似物经历通过 DcpS 的酶促消化。如在“材料和方法”中所描述的,采用在 260nm 处的 UV 检测通过 RP HPLC 来分析以各个不同时间间隔从反应混合物中收集的样品。在表 4 中,被指定为“具有抗性”的类似物在所应用的条件下保持完全未被消化,而被指定为“被水解”的类似物以与各自未修饰的亲本化合物相当的效率被 DcpS 水解。发现在 γ - 位置处经修饰的 S- 类似物对于水解具有抗性,这不依赖于 P- 中心绝对构型(表 4)。即使将反应时间延长至 24 小时,使用各种不同的酶量,和修改反应缓冲液的组成,结果也不变。所有其他 S- 类似物以与未修饰的亲本类似物相当的效率被 hDcpS 水解。对于通过来自人和秀丽隐杆线虫来源的 DcpS 来进行的 S- 类似物水解,没有观察到显著的差异。

[0169] 对在 α - 位置处经修饰的类似物的 DcpS 降解产物的分析使得我们能够确定它们在不对称 P- 中心周围的绝对构型。我们发现,通过 DcpS 来进行的 $m^7GpppsG$ (D1) 或 $m^7GpppsG$ (D2) 的水解导致获得 m^7GMP 和鸟苷 $5'-(1-硫代二磷酸)$ (GDP αS) 的 D1 或 D2 异构体,而 $m_2^{7,2'}-^0GpppsG$ (D1) 或 $m_2^{7,2'}-^0GpppsG$ (D2) 的水解导致获得 $m_2^{7,2'}-^0GMP$ 和 GDP αS 的 D1 或 D2 异构体(数据未显示)。

[0170] 表 4

[0171] S- 类似物在体外对于通过 DcpS(来自人和秀丽隐杆线虫)的酶促水解的易感性
[0172]

对于通过 DcpS (来自人和秀丽隐杆线虫) 的酶促水解的抗性					
帽类似物			帽类似物		
	m^7GpppG	被水解		$m_2^{7,2'}-^0GpppG$	被水解
1a	$m^7GpppsG$ (D1)	被水解	4a	$m_2^{7,2'}-^0GpppsG$ (D1)	被水解
1b	$m^7GpppsG$ (D2)	被水解	4b	$m_2^{7,2'}-^0GpppsG$ (D2)	被水解
2a	m^7GppsG (D1)	被水解	5a	$m_2^{7,2'}-^0GppsG$ (D1)	被水解
2b	m^7GppsG (D2)	被水解	5b	$m_2^{7,2'}-^0GppsG$ (D2)	被水解
3a	$m^7GpsppG$ (D1)	具有抗性	6a	$m_2^{7,2'}-^0GpsppG$ (D1)	具有抗性
3b	$m^7GpsppG$ (D2)	具有抗性	6b	$m_2^{7,2'}-^0GpsppG$ (D2)	具有抗性

[0173] 实施例 25

[0174] 作为帽依赖性翻译的抑制剂的帽类似物

[0175] 在用天然兔珠蛋白 mRNA 进行规划的兔网织红细胞裂解物体系中检验了所述新的 S- 类似物抑制帽依赖性翻译的能力。在所述 12 种 S- 类似物中,选择出在 γ - 位置处经修饰的两种,即 m^7G_{psppG} (D1) 和 m^7G_{psppG} (D2),这是因为发现它们对于 DcpS 具有抗性和因为它们体内可能更稳定。将关于翻译抑制的数据与理论曲线相拟合,所述理论曲线描述了作为 mRNA 结合的竞争性抑制剂的函数的帽依赖性翻译 (Cai 等人,1999)。这使得我们能够测定 K_I ,即在帽依赖性翻译被抑制 50% 时的帽类似物浓度 (表 5)。发现这两种 S- 类似物都是比 m^7GpppG 更好的帽依赖性翻译的抑制剂,这构成了关于硫代磷酸部分通常使帽 -eIF4E 相互作用稳定化的额外的证据。此外, m^7G_{psppG} (D1) 比其 D2 对应物显著地更具有抑制性 ($K_I = 4.1 \pm 0.2 \mu M$ 对 $K_I = 12.1 \pm 3.2 \mu M$),这与其更高的对于 eIF4E 的结合亲和力 ($K_{AS} = 30.8 \pm 0.5$ 对 $K_{AS} = 10.0 \pm 0.2$) 相一致。

[0176] 表 5

[0177] 在兔网织红细胞切割液翻译体系中通过 γ - 修饰的 S- 类似物的帽依赖翻译的抑制的抑制常数 (K_I)

帽类似物		K_I μM^{-1}
[0178]	m^7GpppG	17.1 ± 2.5
3a	m^7G_{psppG} (D1)	4.1 ± 0.2
3b	m^7G_{psppG} (D2)	12.1 ± 3.2

[0179] 实施例 26

[0180] 作为帽依赖性翻译的体内抑制剂的用 S-ARCA 帽化的 mRNA 片段

[0181] S-ARCA,尤其是其中硫代磷酸修饰出现在 γ 位置处的三磷酸,例如在实施例 17 下的化合物 6a 和 6b 的未来应用可能是作为帽依赖性翻译的抑制剂。已充分证明,在癌细胞中帽依赖性翻译被上调,并且 eIF4E 的下调逆转恶性表型。在可能出现完全降解成核苷酸之前,当它们达到小于 25nt 的长度时,由于加帽的 mRNA 的 $3' \rightarrow 5'$ 降解而产生的片段必须进行脱帽。预期用在 γ 位置处包含硫代磷酸修饰的三磷酸 S-ARCA 帽化的此类片段对于 DcpS 具有抗性,类似于对于帽二核苷酸自身所显示的 (表 4, 见上)。因此,预期他们在细胞中积累并且与正常 mRNA 竞争募集至翻译机器。我们将用在 γ 位置处进行取代的三磷酸 S-ARCA (在实施例 17 下的化合物 6a 和 6b) 帽化的 mRNA 或 mRNA 片段引入培养的细胞中。然后,我们使用报道构建体来测量帽依赖性翻译对帽非依赖性翻译。我们预期前者优先被抑制。应当注意的是,ARCA 修饰是在掺入 mRNA 中后这些 S-ARCA 的正确方向所必需的,这是因为否则硫代磷酸部分可能不处于使得 mRNA 片段对于 DcpS 具有抗性的正确位置。

[0182] 类似地,我们分析作为帽依赖性翻译的潜在抑制剂的四磷酸 S-ARCA。我们预期,四磷酸 S-ARCA,尤其是包含 δ -硫代磷酸基团的那些,将不会在生理条件下被 DcpS 水解,并且将会抑制帽依赖性翻译。

[0183] 实施例 27

[0184] 权利要求书详细说明了三磷酸和四磷酸帽类似物二核苷酸的硫代磷酸修饰的所有组合,类似于下面所列出的那些。 $m^7\text{Guo}$ 的核糖部分的修饰是 2'-脱氧、3'-脱氧、阿拉伯糖、2'-O-乙基和 3'-O-乙基。G 的 7-取代基的修饰是甲基、乙基、丙基、丁基、苄基、经取代的苄基、萘基甲基、经取代的萘基甲基和其他经取代或未取代的 C1 至 C10 脂肪族或芳香族基团。鸟嘌呤部分的修饰是使用腺嘌呤、尿苷、胞嘧啶或 $m^7\text{G}$ 。可以合成这些各种修饰物,如本申请中所公开的和另外从本领域(例如美国专利申请公开 2003/0194759)已知的方法改编的。

	n	化合物	Y ₁ Y ₂ Y ₃ Y ₄			
			Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
[0185]	1	$m_2^{7,R}\text{GpsppG}$	S	O	O	-
	1	$m_2^{7,R}\text{GppspG}$	O	S	O	-
	1	$m_2^{7,R}\text{GpsppG}$	O	O	S	-
	1	$m_2^{7,R}\text{GpsppsG}$	S	O	S	-
	1	$m_2^{7,R}\text{GppspG}$	S	S	O	-
	1	$m_2^{7,R}\text{GpsppsG}$	O	S	S	-
	1	$m_2^{7,R}\text{GpspspsG}$	S	S	S	-
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspppG}$	S	O	O	O
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspppG}$	O	S	O	O
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspppG}$	O	O	S	O
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspppG}$	O	O	O	S
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspsppG}$	S	S	O	O
	2	$m_2^{7,R}\text{GpsppspG}$	S	O	S	O
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspppsG}$	S	O	O	S
	2	$m_2^{7,R}\text{GppspspG}$	O	S	S	O
	2	$m_2^{7,R}\text{GppsppsG}$	O	S	O	S
	2	$m_2^{7,R}\text{GpppspsG}$	O	O	S	S
[0186]	2	$m_2^{7,R}\text{GpspspspG}$	S	S	S	O
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspsppsG}$	S	S	O	S
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspppspsG}$	S	O	S	S
	2	$m_2^{7,R}\text{GpppspspsG}$	O	S	S	S
	2	$m_2^{7,R}\text{GpspspspsG}$	S	S	S	S

[0187] 本说明书中所引用的所有参考文献的全部公开内容通过提及而合并入本文。还通过提及而合并入了关于本发明者自己工作的下列出版物的全部公开内容,其不是本申请的现有技术:J. Kowalska 等人,“Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and

areresistant to the decapping pyrophosphatase DcpS,”RNA,第14卷,第1119-1131页(2008);E.Grudzien-Nogalska 等人,“Phosphorothioatecap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells,”RNA,第13卷,第1745-1755页(2007);和E.Darzynkiewicz 等人,“Methylene and phosphorothioate capdinucleotides:useful tools to study decapping and translation”,提交给 RNA Meeting,Seattle,Washington,June 20-25,2006 的摘要和海报。但是,在另外出现相矛盾的冲突的情形下,应当以本说明书为准。

序列表

<110>Board of Supervisors of Louisiana State University and
Agricultural and Mechanical College

Jemielity, Jacek

Grudzien-Nogalska, Ewa M.

Kowalska, Joanna

Darzynkiewicz, Edward

Rhoads, Robert E.

<120> 信使 RNA 帽的抗 - 反向硫代磷酸类似物的合成和用途

<130>Jemielity 07S01W

<140>PCT/US2008/___

<141>2008-06-19

<150>60/944, 842

<151>2007-06-19

<160>4

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>1

cgttcggttg gcagaagcta 20

<210>2

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>2

actgttgagc aattcacgtt catt 24

<210>3

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>3

caatgtgtcc gtcgtggatc t 21

<210>4

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物

<400>4

gaagagtggg agttgctggtt ga 22

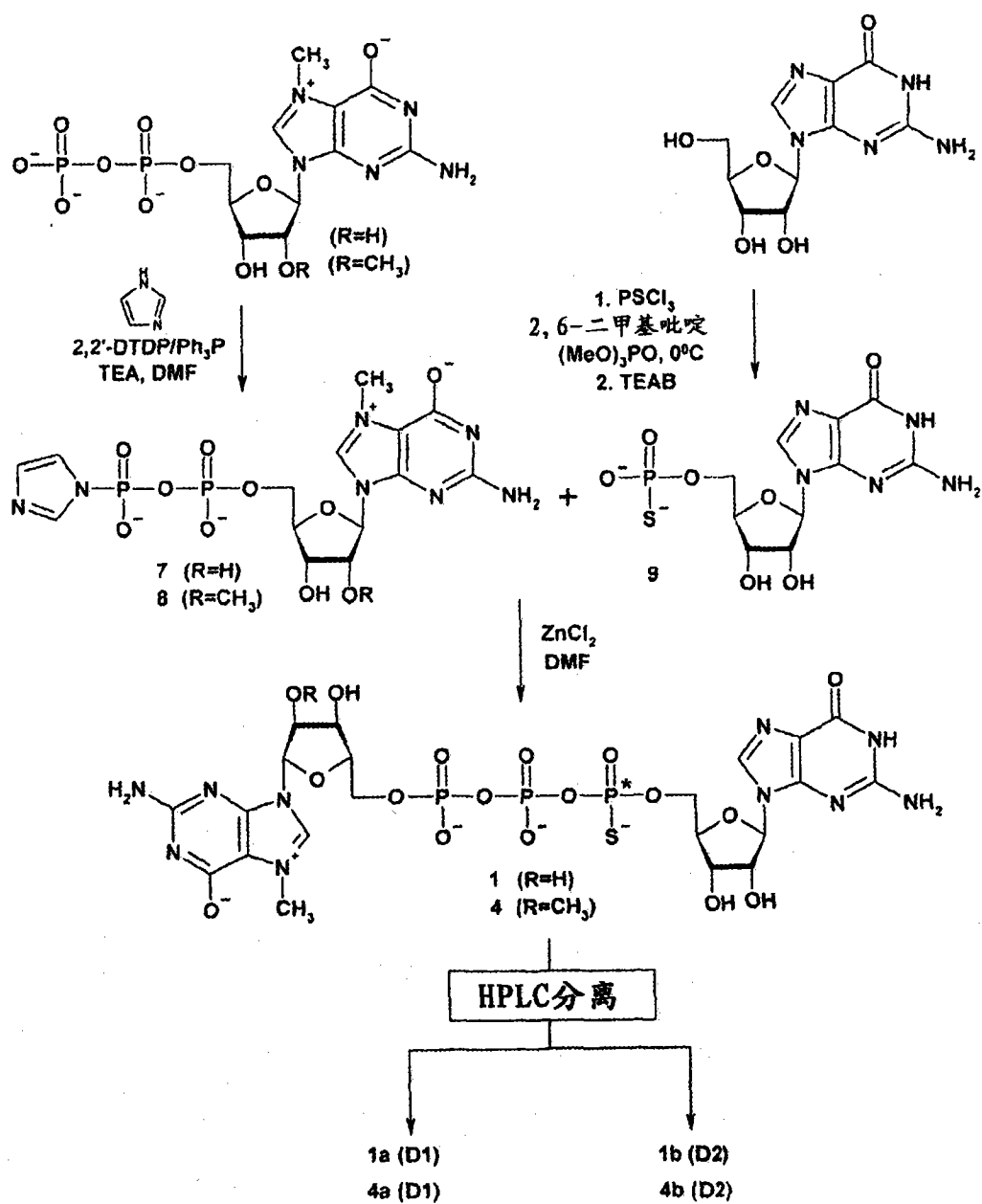


图 1

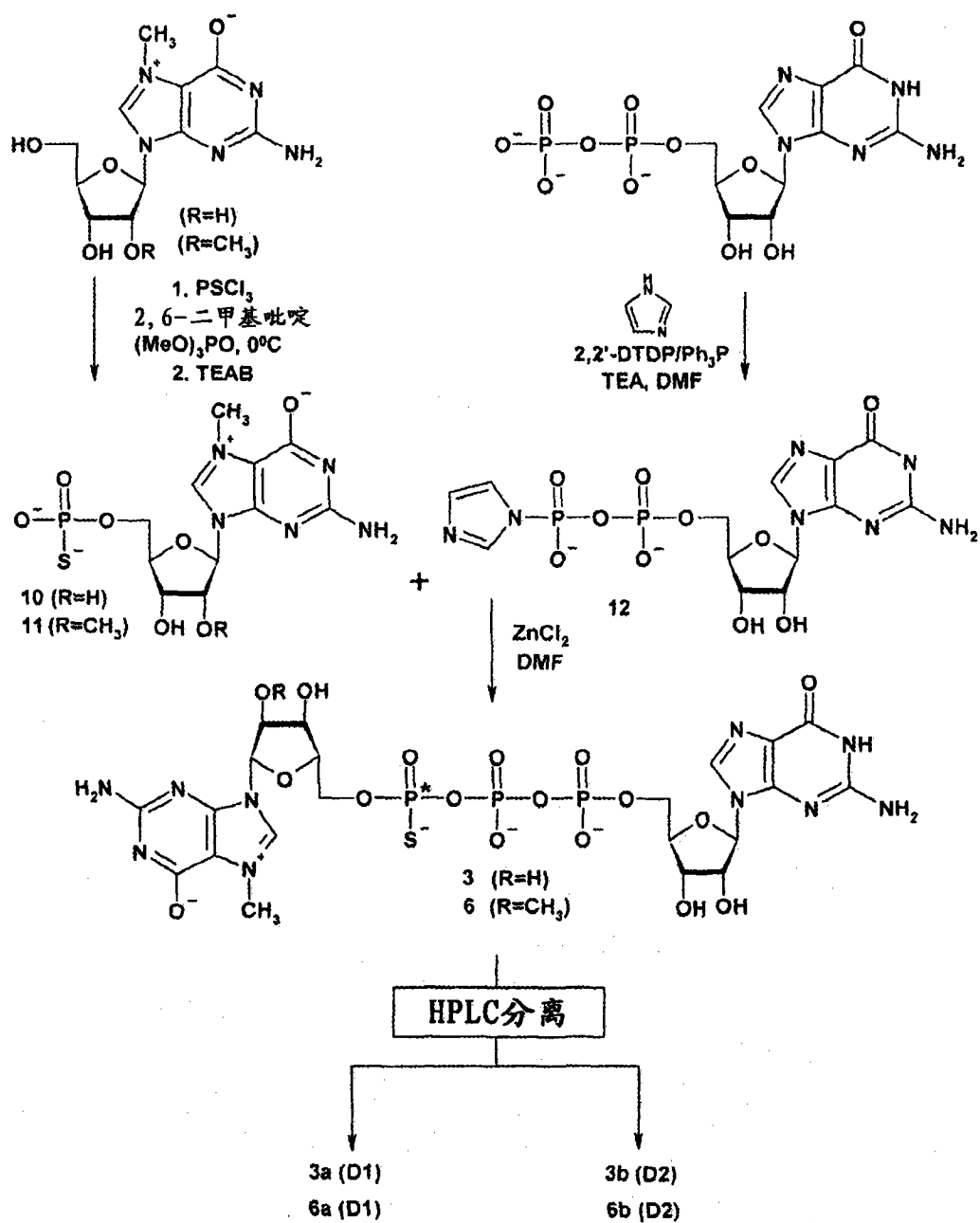


图 2

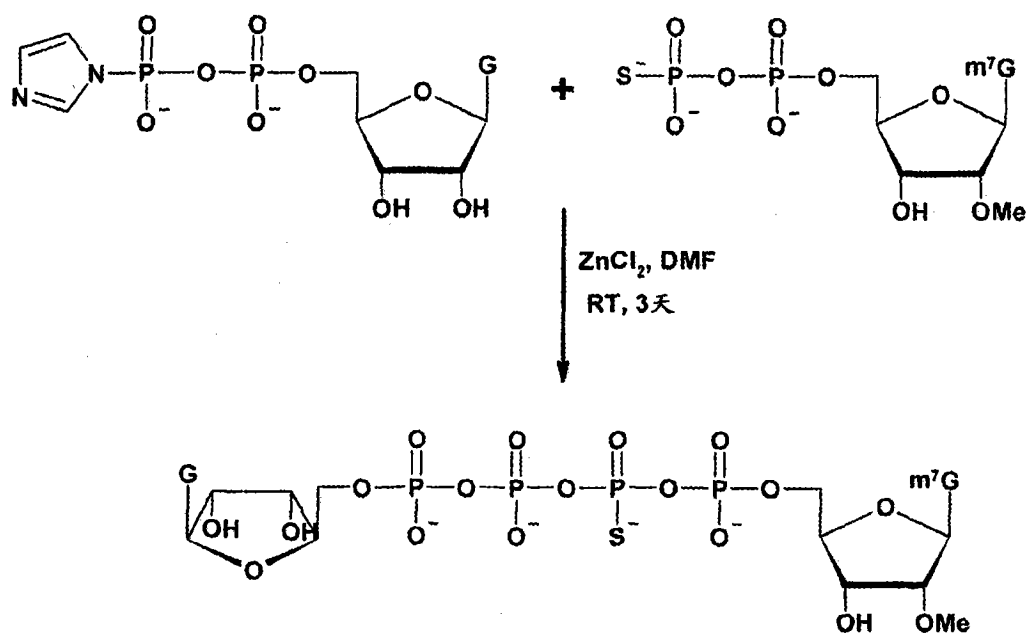


图 4

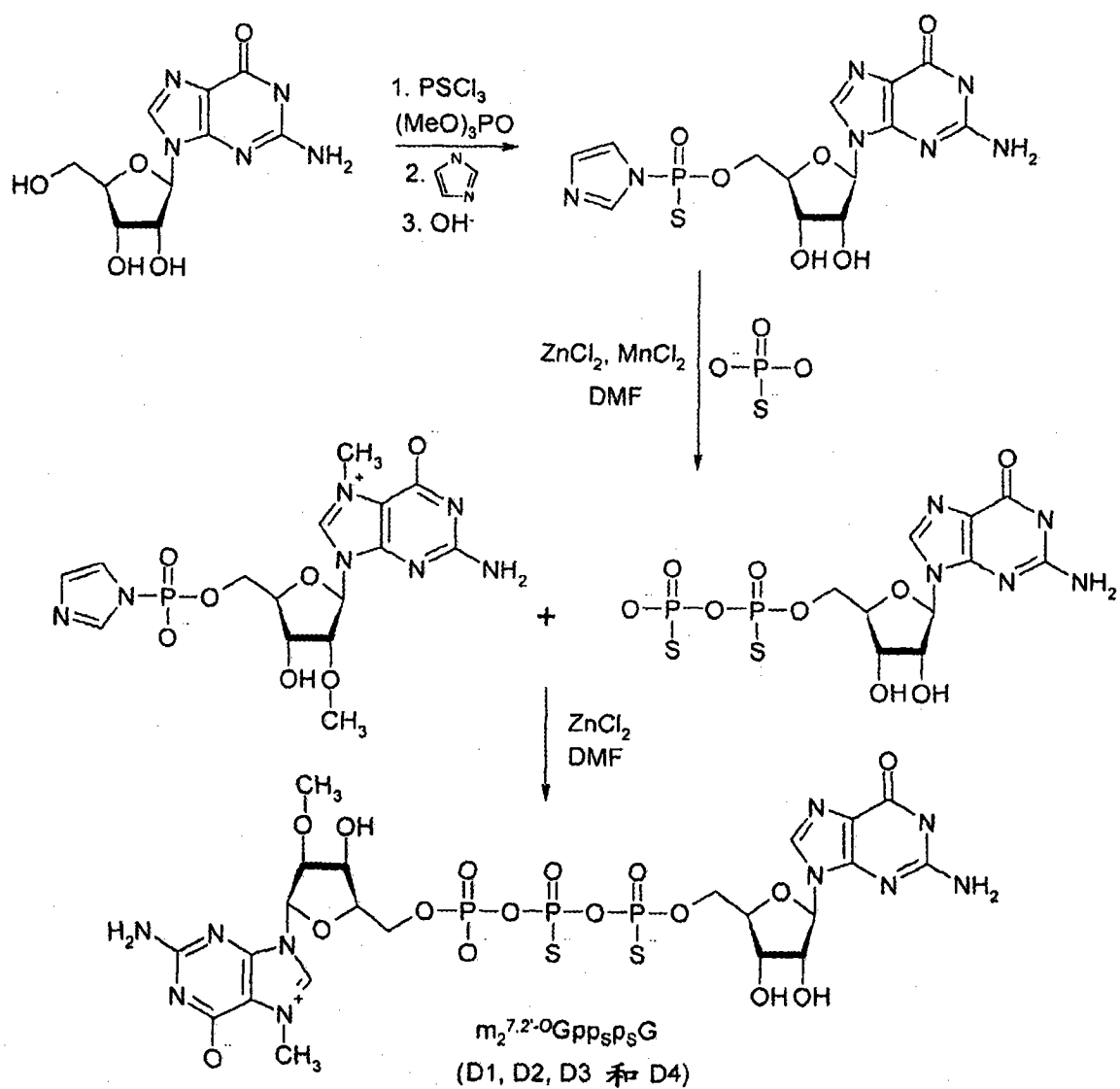
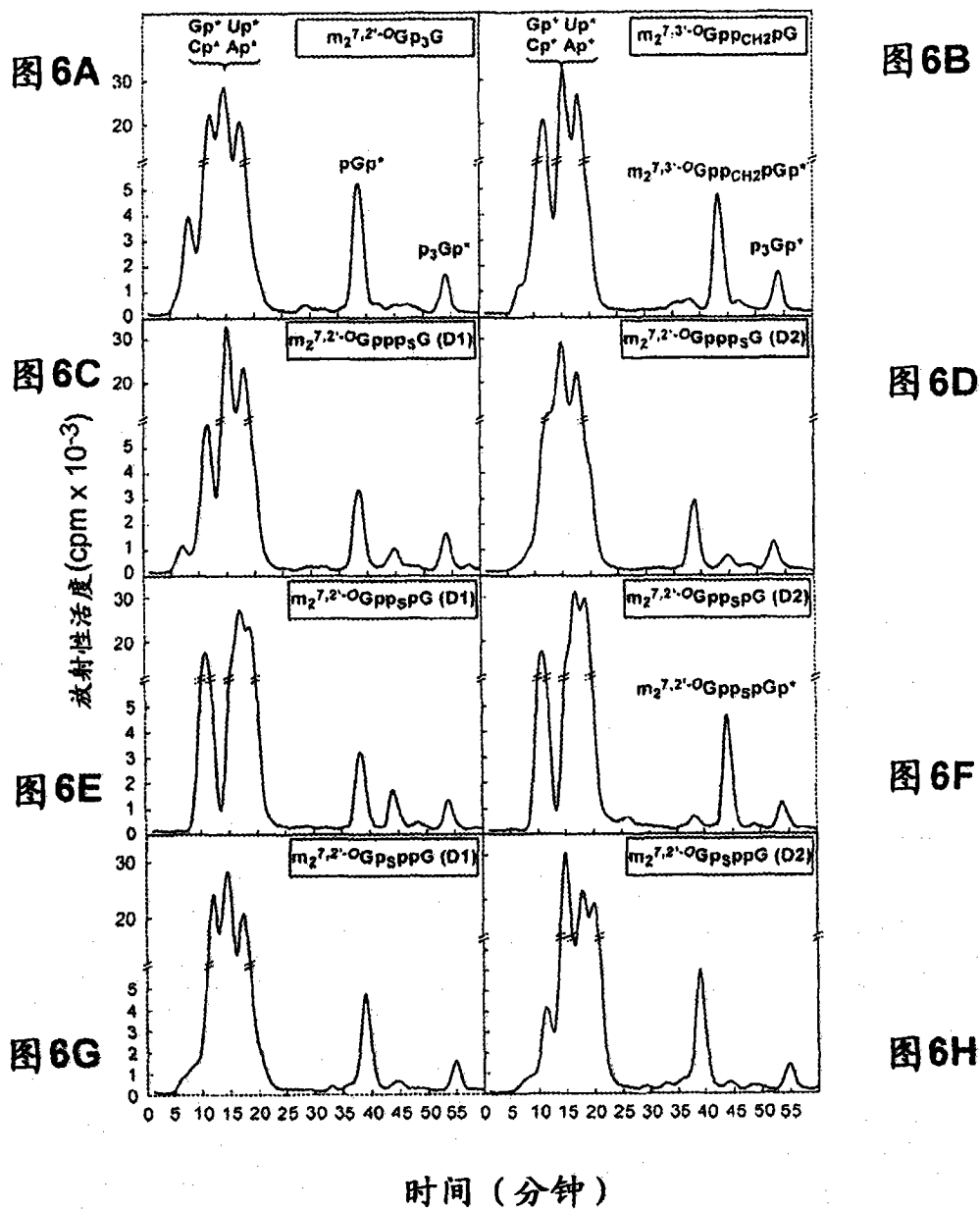


图 5



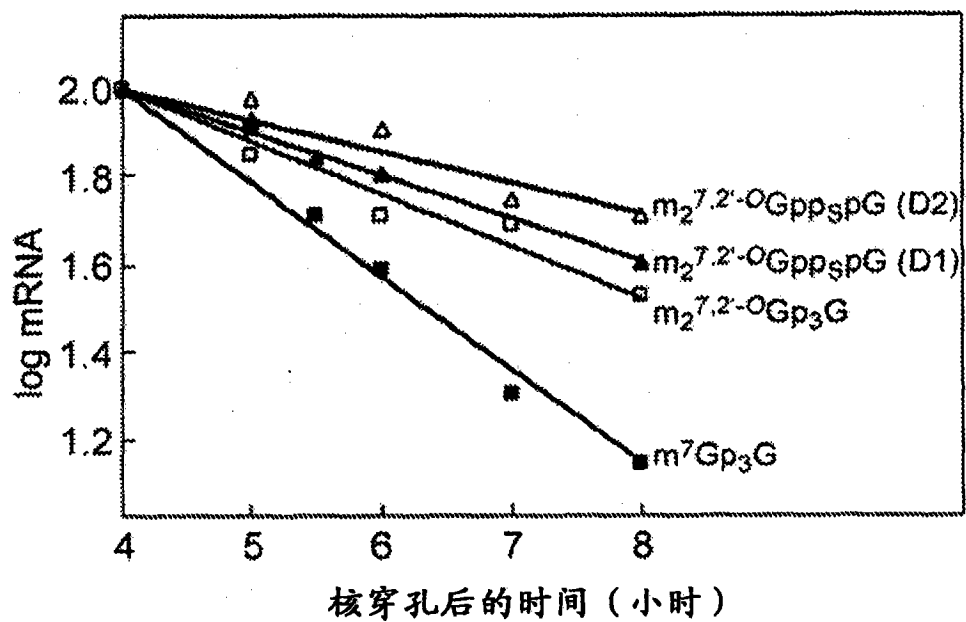


图 7

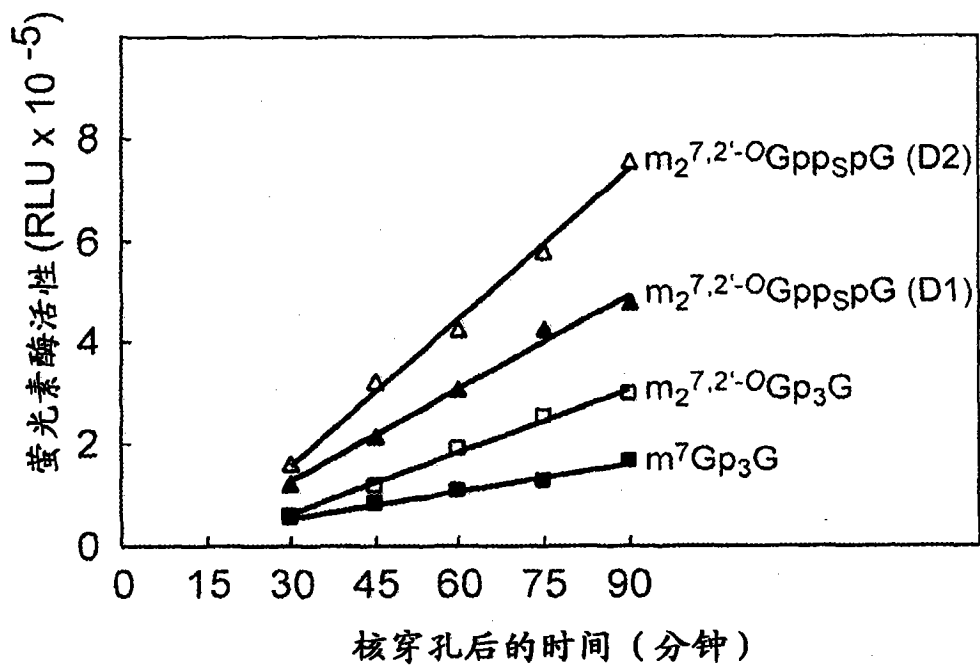


图 8

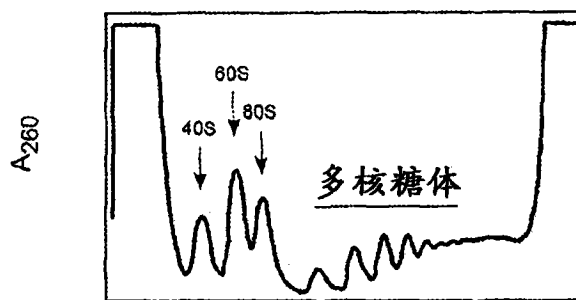


图 9A

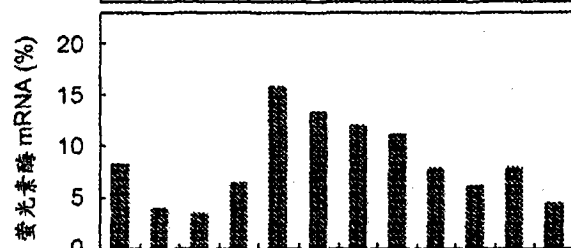


图 9B

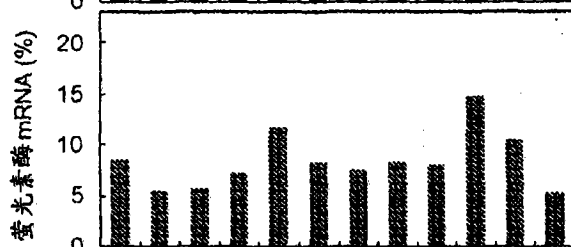


图 9C

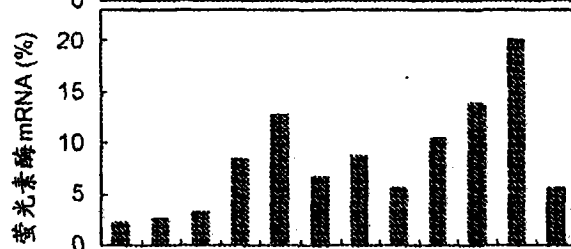


图 9D

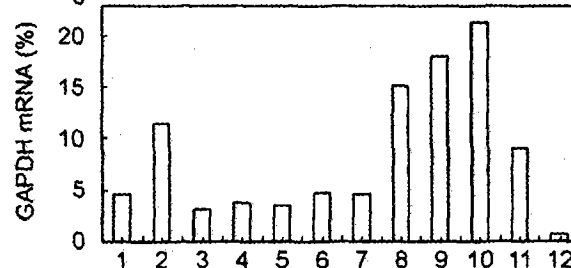


图 9E

级分编号

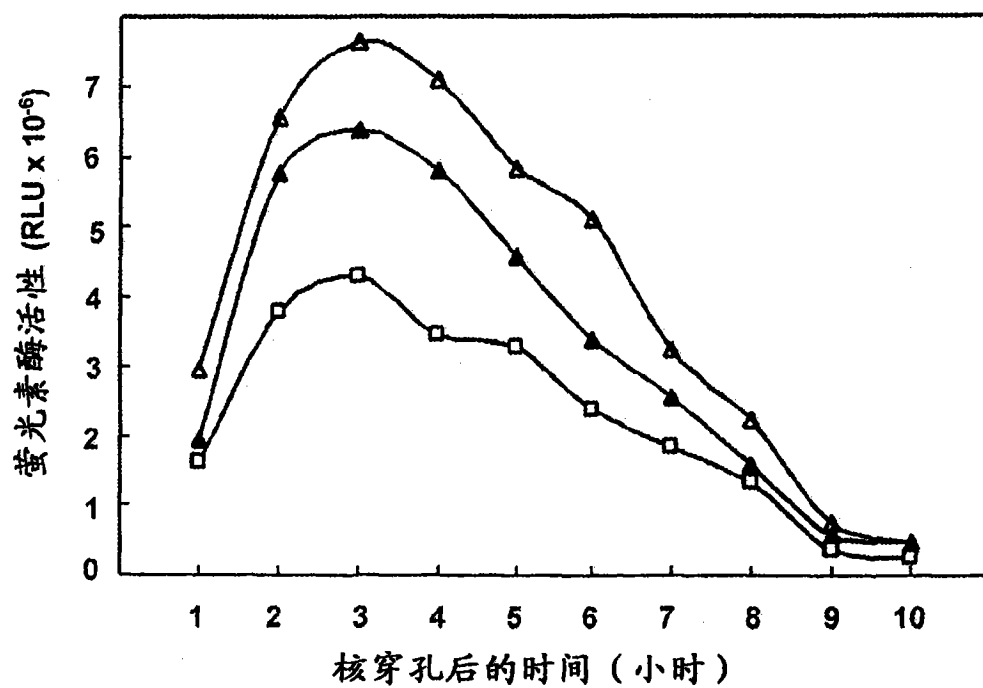


图 10