



등록특허 10-2742219



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월13일

(11) 등록번호 10-2742219

(24) 등록일자 2024년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07H 21/00 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07H 21/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07H 21/00 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2018-7021714

(22) 출원일자(국제) 2017년01월27일

심사청구일자 2022년01월07일

(85) 번역문제출일자 2018년07월26일

(65) 공개번호 10-2018-0100595

(43) 공개일자 2018년09월11일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2017/050447

(87) 국제공개번호 WO 2017/130151

국제공개일자 2017년08월03일

(30) 우선권주장

PL415967 2016년01월29일 폴란드(PL)

(56) 선행기술조사문헌

JP2008546424 A

KR1020150127582 A

JP2011522542 A

(73) 특허권자

유니웨시테트 바르샤바

폴란드, 바르샤바 피엘-00-927, 크라코위스키 프
레즈드미씨에 26/28

(72) 발명자

제미에리티 야첵

폴란드, 01- 451 바르샤바, 유엘. 로만스카 1/78

팩-다브로우스카 카자

폴란드, 01-002 바르샤바, 유엘. 노울리파이
21/60

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 20 항

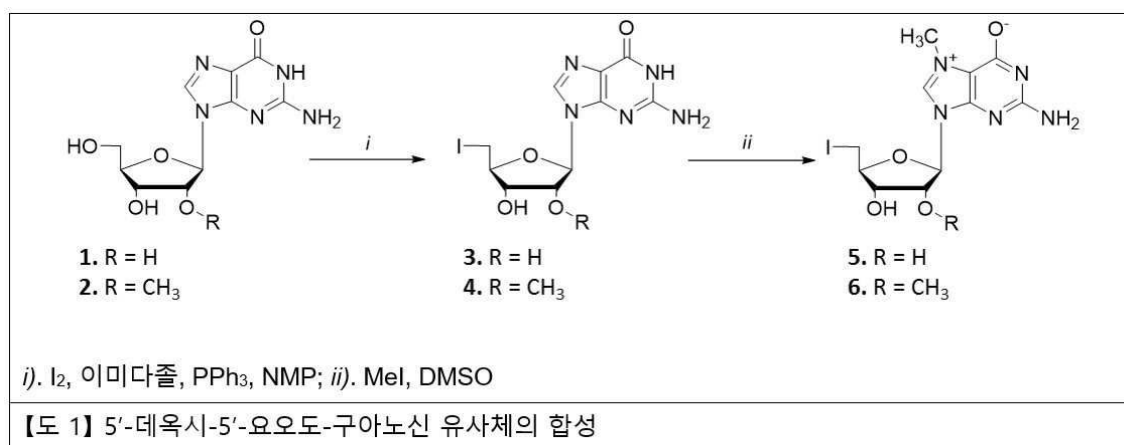
심사관 : 류동언

(54) 발명의 명칭 5'-포스포로티올레이트 mRNA 5'-말단 (캡) 유사체, 이를 포함하는 mRNA, 이를 얻기 위한 방법, 및 이의 용도

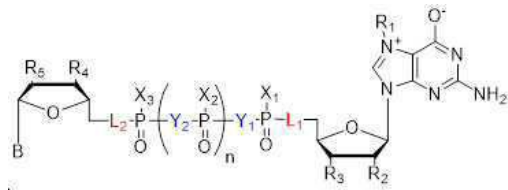
(57) 요약

본 발명은 7-메틸구아노신 뉴클레오시드의 5' 위치에 황 원자를 포함하는 mRNA 5' 말단 (캡)의 유사체인 뉴클레오타이드에 관한 것이다. 개시된 화합물은 DcpS (Decapping Scavenger) 효소에 의해 인식되어 (결합되고 비-가수분해되어), 그의 저해제로서의 치료적 용도를 확인할 수 있다. DcpS는 피로포스파타아제 활성을 갖는 캡-특이적 효 (뒷면에 계속)

대표도



소이며, 척수성 근위축 (spinal muscular atrophy) (SMA) 치료에서 치료 표적으로 확인되었다. 개시된 화합물 중 일부는 포스페이트 사슬 내에 추가적인 변형을 가지며, DcpS 효소에 대한 그의 친화력을 조절한다. 본 발명은 또한 세포 조건에서 증가된 안정성 및 번역 활성을 갖는, 5' 말단이 5'-포스포로티올레이트 모이어티를 포함하는 mRNA 5'-말단 (캡) 유사체로 변형된 mRNA, 이의 제조 방법, 이의 용도, 및 이를 포함하는 약학 제제에 관한 것으로, 여기서 L^1 및 L^2 는 독립적으로 O 및 S를 포함하는 군에서 선택되며, L_1 및 L_2 중 적어도 하나는 O가 아니다.



화학식 1

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07H 21/02 (2013.01)

(72) 발명자

보이작 블라제이

폴란드, 95-200 파비아니스, 유엘. 톨룬스카 13/15

바라노우스키 마레크

폴란드, 01-466바르샤바, 유엘. 파우스탄코우 슬라
스키치 102/31

노웍카 안나

폴란드, 05-120 레지오노오, 유엘. 미에드지아나
3에이

코왈스카 조아나

폴란드, 02-109 바르샤바, 유엘. 크지에시아 트로
즈데나 5디/8

시코르스키 파웰

폴란드, 00-728 바르샤바, 보브로위예카 11에이/24

와르민스키 마르친

폴란드, 03-133 바르샤바, 유엘. 노우드우르스카
27/504

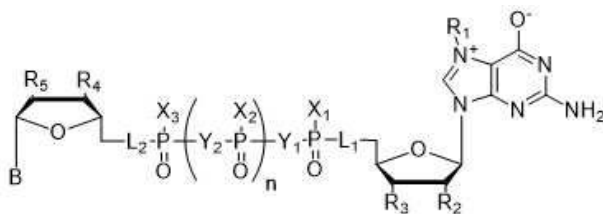
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체(cap analog):

화학식 1



여기서,

L_1 및 L_2 는 O 또는 S로부터 독립적으로 선택되며, L_1 및 L_2 중 적어도 하나는 O가 아니고;

n 은 0, 1, 또는 2이고;

X_1 , X_2 , 및 X_3 은 O 또는 S로부터 독립적으로 선택되고;

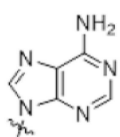
R_1 은 CH_3 , C_2H_5 , CH_2Ph , 알킬, 또는 치환된 알킬로부터 선택되고;

R_2 및 R_3 은 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, N_3 , 알킬, 알케닐 또는 알키닐로부터 독립적으로 선택되고;

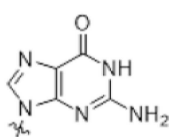
R_4 및 R_5 는 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, CH_2COOH , N_3 , CH_2N_3 , 알킬, 알케닐, 또는 알키닐로부터 독립적으로 선택되고;

Y_1 및 Y_2 는 CH_2 , $CHCl$, CCl_2 , CF_2 , CHF , NH , 또는 O로부터 독립적으로 선택되고;

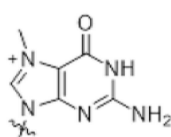
B는 하기 화학식 3, 4, 5, 6 또는 7에 따른 그룹이다:



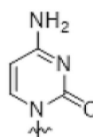
화학식 3



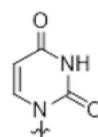
화학식 4



화학식 5



화학식 6



화학식 7

청구항 2

제1항에 있어서, 하기로 이루어진 군에서 선택되는, 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체:

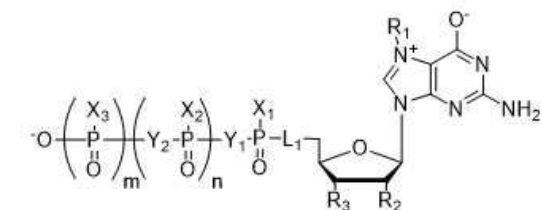
No	화합물	구조식	화학명
21	m^7GppSG		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P2-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 디포스페이트
22	$m^7GpppSG$		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트
23	m^7GSppG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P2-구아노신-5'-일 디포스페이트
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2,3-메틸레노트리포스페이트
26	$m^{7,2'0}GSpppG$		P1-(2'-O-메틸-7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트

30	$m^7GSppspG$ D1		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일-티오투리포스페이트 D1
31	$m^7GSppspG$ D2		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2-티오투리포스페이트 D2
32	$m^7GSppspSG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트
33	$m^7GSppspSG$ D1		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D1
34	$m^7GSppspSG$ D2		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D2
35	$m^7GppspSG$ D1		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D1
36	$m^7GppspSG$ D2		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D2
37	$m^7GpCHppSG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 1,2-메틸레노트리포스페이트
38	$m^{7,2'}GpppSG$		P1-(2'-O-메틸-7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트

청구항 3

하기 화학식 2에 따른 5'-포스포리보티레이트 유사체:

화학식 2



여기서,

m은 0 또는 1이고;

n은 0, 1, 또는 2이고;

L₁은 S이고;

X₁, X₂, 및 X₃은 0 또는 S로부터 독립적으로 선택되고;

R₁은 CH₃, C₂H₅, CH₂Ph, 알킬, 또는 치환된 알킬로부터 선택되고;

R₂ 및 R₃은 H, OH, OCH₃, OC₂H₅, -COOH, N₃, 알킬, 또는 치환된 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

Y₁ 및 Y₂는 CH₂, CHCl, CCl₂, CHF, CF₂, NH, 또는 O로부터 독립적으로 선택된다.

청구항 4

제1항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 포함하는, 척수성 근위축(spinal muscular atrophy, SMA) 또는 SMA의 증상을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 포함하는 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 접촉시키는 것을 포함하는, DcpS 활성을 조절하거나, DcpS 효소 활성을 저해하거나, 또는 hDcpS 효소 활성을 저해하는 시험관 내 방법.

청구항 9

제1항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 접촉시키는 것을 포함하는, mRNA 분해, mRNA 스플라이싱(splicing), 또는 둘 다를 조절하는 시험관 내 방법.

청구항 10

제1항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 척수성 근위축(SMA) 또는 SMA의 증상을 치료하기 위한 약학 제제(pharmaceutical formulation).

청구항 11

5' 말단에 제1항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 포함하는 mRNA.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체가 $m^7GSpppG$ (24번), $m^{7,2'0}GSpppG$ (26번), $m^7GSpppSG$ (32번), $m^7GSpppG$ D1(30번), $m^7GSpppG$ D2(31번), $m^7GSpppSG$ D1(33번), 및 $m^7GSpppSG$ D2(34번)로 이루어진 군에서 선택되는, mRNA.

청구항 13

mRNA 분자의 5' 말단에 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 포함하는 mRNA의 제조 방법으로서, 제1항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체가 mRNA 분자의 합성 동안 도입되는(incorporated) 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체가 $m^7GSpppG$ (24번), $m^{7,2'0}GSpppG$ (26번), $m^7GSpppSG$ (32번), $m^7GSpppG$ D1(30번), $m^7GSpppG$ D2(31번), $m^7GSpppSG$ D1(33번), 및 $m^7GSpppSG$ D2(34번)를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, mRNA의 제조 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, mRNA의 합성이 시험관 내(*in vitro*) 전사를 통해 진행되는 것을 특징으로 하는, mRNA의 제조 방법.

청구항 16

제13항의 방법으로 제조된 mRNA.

청구항 17

제11항의 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 포함하는 mRNA를 이용한 단백질 생성 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 단백질의 생성이 세포 또는 비-세포 시스템에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 19

제11항의 mRNA를 포함하는, 척수성 근위축(SMA)을 치료, SMA 증상을 완화, 또는 암을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제11항의 mRNA를 포함하는 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 조성물이 척수성 근위축(SMA)의 치료, SMA 증상의 완화, 항암 의약으로서의 사용, 또는 항암 면역치료에서 사용하기 위한 것인, 조성물.

청구항 24

제11항의 mRNA 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 척수성 근위축(SMA)의 치료, SMA 증상의 완화, 항암

의약으로서의 사용, 또는 항암 면역치료에서 사용하기 위한 약학 제제.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 5'-포스포로티올레이트 모이어티를 포함하는 mRNA 5'-말단 (캡)의 유사체, 이의 제조 방법, 중간체, 이의 용도에 관한 것이다.

[0002] 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체는 의약, 특히 척수성 근위축 (spinal muscular atrophy) (SMA) 치료를 위한 의약으로서의 용도를 가능하게 하는 DcpS 효소 저해제로 사용된다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5' 포스포로티올레이트 모이어티를 포함하는 mRNA 5' 말단 (캡) 유사체를 갖는 5' 말단이 변형된 mRNA에 관한 것으로, 변형

은 세포 조건 하에서 증가된 안정성 및 번역 활성을 갖는 mRNA 전사물을 얻는 것을 목적으로 한다. 이러한 성질을 가진 전사물은 mRNA에 기초한 신규한 유전자 치료에 적용될 수 있다.

배경 기술

- [0003] 화학적으로 유래된 mRNA 5'-말단 유사체는 다양한 용도를 가지며, 상기 구조 내 수행된 변형은 이러한 화합물의 생물학적 성질을 유의하게 변형시킬 수 있다 (Ziemniak, Strenkowska et al., 2013). 캡 유사체의 다양한 응용 중, 가장 빈번한 것은 치료 목적 (예를 들어, DcpS 효소의 저해 - 척수성 근위축 (spinal muscular atrophy) 치료)을 위한 저분자 캡-의존적 과정으로서의 그의 용도를 포함한다. 한편, 적절히 변형된 디뉴클레오티드 캡 유사체는 세포 조건 하 개선된 안정성 및 번역 활성을 갖는 전사물을 얻기 위하여 시험관내 (*in vitro*) 공동-전사에 의한 전령 (messenger) mRNA를 변형하는데 사용된다. 이러한 성질을 가진 전사물은 mRNA 기반 신규 유전자 치료의 맥락에서 점점 더 연구되고 있다. 후자의 경우, 다른 탈캡핑 효소, Dcp2에 대한 캡 구조 저항성이 핵심 문제이다.
- [0004] DcpS 효소 (탈캡핑 스캐빈저 (Decapping Scavenger))는 진핵생물에서 mRNA 분해 과정에 관여하는 효소이다. 진핵 세포에서 주요 mRNA 분해 경로는 2가지 (5'→3' 분해 그리고 3'→5' 분해)가 있다 (Rydzik, Lukaszewicz et al., 2009). 두 분해 경로 모두 탈아데닐화에 의해 개시된다. α 및 β 포스페이트 사이의 결합의 절단 및 5' 엑소뉴클레아제에 의한 분해의 결과로서, 5'→3' 방향으로의 분해에 이어 mRNA 탈캡핑이 나타난다. 3'→5' 분해는 3'-말단으로부터 시작되는 엑소좀에 의한 mRNA 분해를 포함한다. 이러한 분해는 디뉴클레오티드 캡 잔기 또는 캡이 달린 짧은 올리고뉴클레오티드의 방출을 초래하며, 이후 이는 DcpS 효소에 의해 분해된다. DcpS는 HIT 패밀리에 피로포스파타아제에 속하며 7-메틸구아노신 5'-모노포스페이트 (m^7GMP) 및 이에 따른 뉴클레오시드 5'-디포스페이트 또는 짧은 올리고뉴클레오티드인 제2 산물을 방출하는 γ 및 β 포스페이트 사이의 캡을 가수분해한다. 더 긴 캡이 달린 mRNA는 DcpS의 기질이 아니다. 5'→3' mRNA 분해 산물인 7-메틸구아노신 5'-디포스페이트 (m^7GDP) 또한 DcpS의 기질이 아니다. 3'→5' 분해 동안 mRNA로부터 방출되는 불필요한 캡 잔기가 다른 캡-의존적 세포 과정에 악영향을 줄 수 있기 때문에 DcpS 효소의 활성은 세포 항상성에 필수적인 것으로 여겨진다. DcpS는 세포질과 핵 양쪽에 위치하며, 이곳에서 스플라이싱 조절에 관여할 수 있다 (Shen, Liu et al., 2008). 따라서, 세포 내 DcpS 역할은 3'→5' mRNA 분해에서 그의 잘 특성화된 기능을 넘어서 수 있음이 암시된다 (Bail and Kiledjian 2008).
- [0005] DcpS 저해가 척수성 근위축에서 치료 효과를 제공한다는 것이 2008년 보고되었다. SMA는 6000명 출생 마다 평균 1명 발생하는 흔한 신경퇴행성 질환이다 (Akagi and Campbell 1962). 이는 *SMN* 유전자에 의해 코딩되는 SMN 단백질 (Survival Motor Neuron)의 낮은 수준에 의해 유발된다. 2개의 SMN 유전자, 즉, *SMN1*과 *SMN2*는 인간에 존재한다. 두 유전자 간의 주요 차이점은 엑손 7에서의 서열 변화로, 이는 전-mRNA 스플라이싱에 영향을 미친다. 그 결과, *SMN1* 유전자의 발현은 안정한 기능성 단백질로 이어지는 반면, *SMN2*로부터 발현되는 단백질은 단축된다. 삭제, *SMN2*-유사 유전자로의 전환, 및 점 돌연변이를 포함한 *SMN1* 유전자의 두 카피의 변이는 SMA 질병을 초래한다. 오직 하나의 결손 *SMN1* 카피를 갖는 사람은 SMA 보인자이나, 어떠한 질병 증상을 보이지 않는다.
- [0006] 상동 SMN2 유전자는 충분한 양의 기능성 SMN 단백질을 제공할 수 없으나, 더 높은 수의 SMN2 유전자 카피는 보다 양성인 질병 경과에 수반되는 것으로 나타났다. 따라서, SMN2 유전자에 의해 코딩되는 세포 내 단백질의 양을 증가시키는 화합물은 SMA에 대한 치료제가 될 수 있을 것으로 보인다. 일부 5-치환된 퀴나졸린이 SMN2 유전자 발현을 심지어 2배로 증가시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다 (Akagi and Campbell, 1962). 상기 활성화의 기저를 이루는 분자 메커니즘을 풀기 위한 노력으로, 방사성 표지를 이용한 다른 연구에서, 저자들은 DcpS가 5-치환된 퀴나졸린에 결합하는 단백질을 확인하였다.
- [0007] 이러한 실험들은 DcpS를 SMA 치료 내 치료 표적으로 확인하도록 하였다.
- [0008] 추가적인 연구는 다양한 C5-치환된 퀴나졸린이 DcpS 효소의 잠재적인 저해제 (이미 나노몰 농도에서도)이며, 저해제로서의 가능성은 *SMN2* 유전자 프로모터 활성화 수준과 연관성이 있음을 나타내었다. 이들 화합물의 치료제로서의 가능성은 이후 마우스 모델에서 생체내 (*in vivo*) 입증되었다 (Butchbach, Singh et al., 2010). DcpS 저해제 중 하나인, RG3039 화합물이 SMA 마우스에서 운동 기능을 개선한다는 것이 최근 보고되었다 (Van Meerbeke, Gibbs et al.).
- [0009] 진행중인 전임상 및 임상 시험에도 불구하고, 여전히 SMA의 효과적인 치료법이 없으므로, 치료제로서 가능성이 있는 새로운 화합물에 대한 지속적인 요구가 있다.

- [0010] 트리포스페이트 다리 (bridge) 및 7-메틸구아노신 리보오스에 변형을 갖는 디뉴클레오타이드 캡 유사체는 캡핑된 RNA 분자의 시험관내 합성을 위해 사용될 수 있다. 상기 방법은 개선된 생물학적 성질, 특히, 증가된 번역 활성 및 연장된 세포 내 반감기를 갖는 RNA 분자를 얻을 수 있도록 하기 때문에 유용하다 (Grudzien, Kalek et al., 2006). 이러한 2가지 특징은 동일한 양의 mRNA를 사용하는 동안 유의하게 더 많은 양의 단백질이 얻어질 수 있도록 한다. 이는 연구, 그리고 예를 들어 암 면역치료와 같은 치료 용도를 포함한 펩티드 및 단백질의 상업적인 생산에서 광범위한 응용분야를 찾을 수 있다 (Sahin, Kariko et al., 2014).
- [0011] 캡핑된 mRNA를 시험관내 얻기 위해 사용되는 가장 일반적인 방법은, 모든 4개의 리보뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 (m⁷GpppG)와 같은 캡 디뉴클레오타이드 존재 하에 세균 또는 박테리오파지 RNA 중합효소를 이용하여 DNA 주형 상에서 mRNA를 합성하는 것이다. 중합효소는 다음 전사될 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 알파-포스페이트 상의 m⁷GpppG 내 구오 (Guo) 모이어티의 3'-OH의 친핵성 공격에 의해 전사를 개시하며, 이는 최초 산물로서 m⁷GpppGpN을 낳는다 (Contreras and Fiers 1981, Konarska, Padgett et al., 1984).
- [0012] 포유류 세포의 배양물에 도입된 합성 mRNA에 의해 생산되는 단백질의 양은 세포 조건에서 mRNA 분해에 의해 제한된다. 생체내 mRNA 분해는 알파 및 베타 포스페이트 사이의 결합을 절단하는 특정 피로포스파타아제 Dcp1/Dcp2에 의한 mRNA의 5'-말단으로부터의 캡 제거에 의해 주로 개시된다 (Mildvan, Xia et al., 2005). 조절 단백질 Dcp1과 복합체를 형성하는 Dcp2 효소는, 전장 전사물 또는 그의 적어도 20 뉴클레오타이드 단편으로부터의 캡 구조를 절단하는 것의 원인이 된다 (Lykke-Andersen 2002). Dcp1/Dcp2 복합체는 유전자 발현 조절에서 역할을 한다. 상기 효소 활성에 저항성을 갖는 캡 내 mRNA 전사물을 만드는 것은 이렇게 변형된 mRNA에 의해 코딩되는 단백질의 증가된 발현을 유도한다 (Ziemniak, Strenkowska et al., 2013). 변형이 동시에 번역 개시 인자와의 상호작용을 손상시키지 않는 경우, 이는 증가된 mRNA 번역 활성을 유도한다. 이러한 성질을 갖는 mRNA는 암 면역치료 (Kuhn, Diken et al., 2010), 줄기세포 재프로그래밍 (Warren, Manos et al., 2010) 또는 결합 있는 형태로 또는 불충분한 양으로 세포 내 형성된 단백질의 보충을 포함하는 치료상의 적용에 바람직하다. Dcp2 효소에 대한 저항성을 증가시키는, 캡 구조의 트리포스페이트 다리 내 변형이 문헌 상에 알려져 있다. 이는 그 중에서도, 알파-베타 다리 위치에 산소 원자가 메틸렌 그룹으로 치환된 유사체, 베타 위치의 비-다리 산소가 황 원자 또는 붕인산 그룹으로 교체된 유사체를 포함한다. 메틸렌 유사체의 경우, 증가된 mRNA 안정성은 세포 내 단백질 합성 효율의 증가를 초래하지 않는데, 이는 아마도 eIF4E 단백질에 대한 감소된 친화력 때문이다 (Grudzien, Kalek et al., 2006). 베타 위치 내 비-다리의 변형의 경우, Dcp2에 대해 증가된 저항성 및 eIF4E에 대해 증가된 친화력으로 인해 세포 내 이와 같이 변형된 mRNA의 번역 활성이 증가한다 (Grudzien-Nogalska, Jemielity et al., 2007) (Kowalska, Wypijewska del Nogal et al., 2014). mRNA로 포함 (incorporation)될 때 Dcp2에 의한 분해에 대해 감소된 민감성을 보여주는 모든 캡 유사체의 공통 특성은, 효소에 의한 캡 절단 부위, 즉, 트리포스페이트 다리 내 알파-베타 위치 근처에 변형이 편재화된 것이었다.

발명의 내용

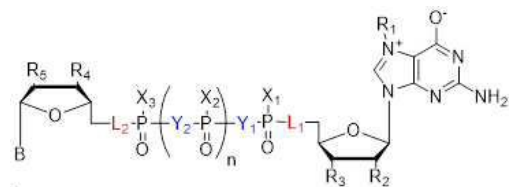
- [0013] 기술된 최신 기술을 고려할 때, 본 발명의 목적은 시사된 난점을 극복하고 DcpS 활성에 영향을 미치는 새로운 클래스의 뉴클레오타이드 mRNA 5'-말단 유사체, SMA 치료를 포함한 그의 용도, 및 그의 합성 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 5' 말단이 5'-포스포로티올레이트 모이어티를 포함하는 mRNA 5'-말단 (캡) 유사체로 변형되어, mRNA 안정성 및 세포 내 그 mRNA에 의해 코딩되는 단백질의 생합성 효율이 증가된 mRNA를 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 5' 말단이 5'-포스포로티올레이트 모이어티를 포함하는 mRNA 5'-말단 (캡) 유사체로 변형된 mRNA를 제공하는 것이며, 그 전사물은 mRNA 기반 신규 유전자 치료에서 사용되기 위한 것을 포함하여 의약으로 사용되기 위한 것으로 의도된다.
- [0015] 본 발명은 신규한 클래스의 뉴클레오타이드 mRNA 5'-말단 유사체에 관한 것이다. 상기 새로운 유사체는 5'-뉴클레오타이드 위치에 황 원자를 포함하며, 즉, 적어도 5' 위치의 하나의 산소 원자가 황 원자로 치환된다. 우리는 놀랍게도 7-메틸구아노신 측면의 5' 위치에 황 원자로의 변형을 포함하는 새로운 유사체가 DcpS 효소의 가수분해 활성에 저항성을 가지며, DcpS 효소의 저해제이고, 이에 따라 SMA 치료에 치료적 관련성을 갖는 SMN 단백질의 발현에 영향을 미침을 발견하였다. DcpS의 활성에 대해 안정성을 가지고/가지거나 DcpS 활성에 영향을 미치는 이러한 화합물은 또한 스플라이싱 조절 및 제어뿐만 아니라 mRNA 분해의 조절에서 사용될 것이다. 하기 유사체는 저해 성질의 관점에서 특히 바람직한 것으로 나타났다: m⁷GSpppG (24번), m⁷GSpppSG (32번), m⁷GSpppG D1

(30번), m^7GSp_pSG D2 (31번), m^7GSp_pSG D1 (33번), m^7GSp_pSG D2 (34번), 그리고 가장 바람직한 것은 m^7GSp_pSG D2 (34번)이었다. m^7GSp (12번), m^7GSpG (23번), m^7GSpCH_pG (25번), $m^{7,2'0}GSp_pG$ (26번), m^7GpCH_pSG (37번)가 동일하게 유리하다.

[0016] 본 발명은 또한 5' 말단이 5'-포스포로티올레이트 모이어티를 포함하는 mRNA 5'-말단 (캡) 유사체로 변형되어, mRNA 안정성 및 세포 내 그 mRNA에 의해 코딩되는 단백질의 생합성 효율이 증가된 mRNA에 관한 것이다. 본 발명은 또한 5' 말단이 5' 포스포로티올레이트 모이어티를 포함하는 mRNA 5'-말단 (캡) 유사체로 변형된 mRNA에 관한 것으로, 변형된 mRNA는 mRNA 기반 신규 유전자 치료에서 사용되기 위한 것을 포함하여 의약으로 사용되기 위한 것으로 의도된다.

[0017] 놀랍게도, 본 발명자들은 시험관내 전사 방법에 의해 mRNA로 포함된 이후, 7-메틸구아노신 측면의 5' 위치에 황 원자로의 변형을 포함하는 본 발명에 따른 새로운 유사체가 효소 Dcp1/2의 가수분해 활성에 저항성을 나타내게 되며, 이에 따라 mRNA의 안정성 및 HeLa 세포주를 포함하는 세포 내 그 mRNA에 의해 코딩되는 단백질의 생합성 효율에 영향을 미침을 발견하였다. Dcp1/2에 의한 캡 내 트리포스페이트 다리의 절단 위치로부터 떨어진 곳에 위치한 변형은 처음으로 캡 구조로 하여금 그의 제거 과정에 대한 저항성을 유발하도록 하여, mRNA의 반감기를 증가하도록 한다. 이러한 예상치 못한 발견은 암 면역치료에서 면역 체계의 특이적인 활성화의 경우에서와 같이, 공급된 합성 mRNA를 기초로 한 바람직한 단백질의 발현을 포함하는 유전자 치료에서 유의한 치료적 중요성을 가진다. 따라서, 예를 들어 특정 암 유형에 대한 단백질 특성을 코딩하는 변형된 mRNA 전사물은 특정 항원을 포함하는 암 세포에 대한 면역 체계를 활성화하기 위해 사용될 수 있다. 하기 유사체는 변형된 mRNA의 번역 성질의 관점에서 특히 바람직한 것으로 나타났다: m^7GSp_pG (24번), $m^{7,2'0}GSp_pG$ (26번), m^7GSp_pSG (32번), m^7GSp_pSG D1 (30번), m^7GSp_pSG D2 (31번), m^7GSp_pSG D1 (33번), m^7GSp_pSG D2 (34번), 그리고 가장 바람직한 것은 $m^{7,2'0}GSp_pG$ (26번)이다.

[0018] 본 발명은 화학식 1에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체에 관한 것이다:



[0019]

화학식 1

[0021] 여기서

[0022] L^1 및 L^2 는 독립적으로 O 및 S를 포함하는 군에서 선택되며, L_1 및 L_2 중 적어도 하나는 O가 아니고;

[0023] $n = 0, 1$, 또는 2이고;

[0024] X_1, X_2, X_3 은 독립적으로 O, S를 포함하는 군에서 선택되고;

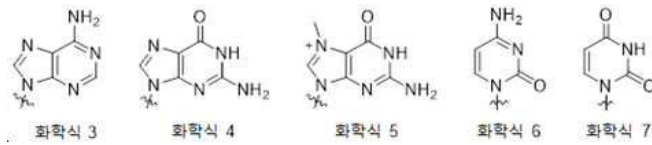
[0025] R^1 은 CH_3, C_2H_5, CH_2Ph , 알킬 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0026] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, $OCH_3, OC_2H_5, -COOH, CH_2COOH, N_3, CH_2N_3$, 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함하는 군에서 선택되고;

[0027] R^4 및 R^5 는 독립적으로 H, OH, $OCH_3, OC_2H_5, -COOH, CH_2COOH, N_3, CH_2N_3$, 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함하는 군에서 선택되고;

[0028] Y_1, Y_2 는 독립적으로 $CH_2, CHCl, CCl_2, CF_2, CHF, NH, O$ 를 포함하는 군에서 선택되고;

[0029] B는 하기 화학식 3, 4, 5, 6 또는 7에 따른 그룹이다:



바람직한 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체는 하기로 이루어진 군에서 선택된다:

No	화합물	구조식	화학명
21	m^7GppSG		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P2-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 디포스페이트
22	$m^7GpppSG$		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트
23	m^7GSppG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P2-구아노신-5'-일 디포스페이트
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2,3-메틸레노트리포스페이트
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-메틸-7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트

30	$m^7GSpppG$ D1		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일-티오투리포스페이트 D1
31	$m^7GSpppG$ D2		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2-티오투리포스페이트 D2
32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트
33	$m^7GSpppSG$ D1		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D1
34	$m^7GSpppSG$ D2		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D2
35	$m^7GpppSG$ D1		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D1
36	$m^7GpppSG$ D2		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오투리포스페이트 D2

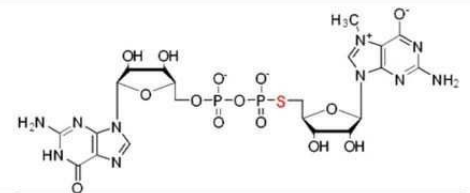
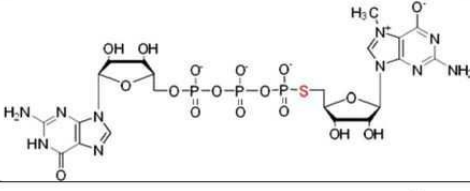
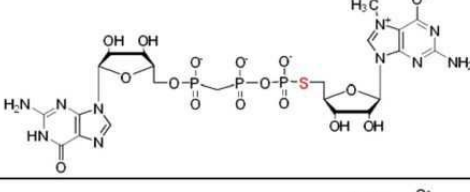
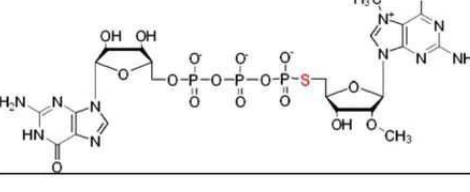
[0033]

37	m^7GpCH_2ppSG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 1,2-메틸레노트리포스페이트
38	$m^{7,2'}GpppSG$		P1-(2'-O-메틸-7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트

[0034]

[0035]

보다 더 바람직한 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체 화합물은 하기로 이루어진 군에서 선택된다:

No	화합물	구조식	화학명
23	m^7GSppG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P2-구아노신-5'-일 디포스페이트
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2,3-메틸레노트리포스페이트
26	$m^{7,2'0}GSpppG$		P1-(2'-O-메틸-7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트

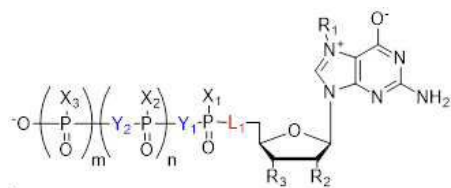
[0036]

30	$m^7GSp_{pp}pG$ <i>D1</i>		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2-트리포스페이트 D1
31	$m^7GSp_{pp}pG$ <i>D2</i>		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2-티오텐트리포스페이트 D2
32	$m^7GSp_{pp}pSG$		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트
33	$m^7GSp_{pp}pSG$ <i>D1</i>		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오텐트리포스페이트 D1
34	$m^7GSp_{pp}pSG$ <i>D2</i>		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오텐트리포스페이트 D2
37	m^7GpCH_2ppSG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 1,2-메틸렌티오텐트리포스페이트

[0037]

[0038]

본 발명은 또한 화학식 2에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체에 관한 것이다:



[0039]

[0040]

화학식 2

[0041]

여기서

[0042]

$m=0, 1$ 이고

[0043]

$n = 0, 1$, 또는 2 이고;

[0044]

L^1 은 S이고

[0045]

X_1, X_2, X_3 은 독립적으로 O, S를 포함하는 군에서 선택되고;

[0046] R^1 은 CH_3 , C_2H_5 , CH_2Ph , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0047] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, N_3 , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0048] Y_1 , Y_2 는 독립적으로 CH_2 , $CHCl$, CCl_2 , CHF , CF_2 , NH 및 O를 포함하는 군에서 선택된다;

[0049] 바람직한 5'-포스포로티올레이트 유사체는 하기 화학식 13의 7-메틸구아노신 5'-데옥시-5'-티오구아노신 5'-디포스포로티올레이트이다:



[0050]

[0051] **화학식 13.**

[0052] 본 발명은 또한 의약으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체에 관한 것이다.

[0053] 본 발명은 또한 척수성 근위축 (spinal muscular atrophy, SMA)의 치료 및/또는 SMA 증상의 완화에서 의약으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체에 관한 것이다.

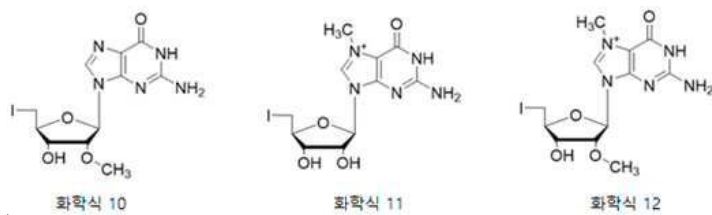
[0054] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체의 의약 제조 용도에 관한 것이다.

[0055] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체의 척수성 근위축 (SMA)의 치료 및/또는 SMA 증상의 완화를 위한 의약의 제조 용도에 관한 것이다.

[0056] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체의 DcpS 활성의 조절자, 바람직하게는 DcpS, 더욱 바람직하게는 hDcpS 효소 활성의 저해제로서의 용도에 관한 것이다.

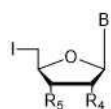
[0057] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체의 mRNA 분해의 조절 및/또는 mRNA 스플라이싱의 조절에서의 용도에 관한 것이다.

[0058] 본 발명은 나아가 하기 나타난 화학식 10, 11, 및 12에 따른 구조를 가지는 5'-데옥시-5'-요오도구아노신의 유사체에 관한 것이다:



[0059]

[0060] 본 발명은 나아가 화학식 1에 따른 화합물의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 화학식 1에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 형성하기 위하여 화학식 8에 따른 5'-요오도뉴클레오시드를 말단 티오포스페이트 모이어티를 포함하는 화학식 2에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체와 반응시키는 단계를 포함한다:



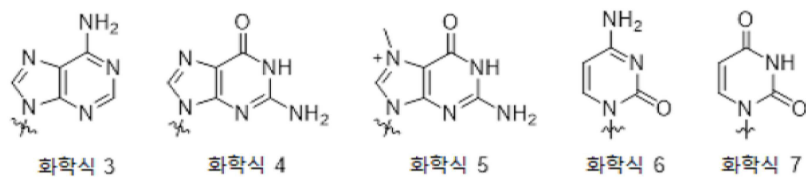
[0061]

[0062] **화학식 8**

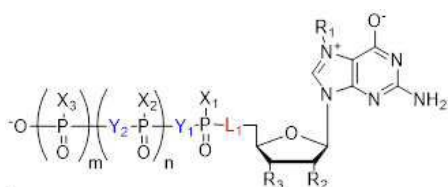
[0063] 여기서

[0064] R^4 및 R^5 는 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, N_3 , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0065] B는 하기 화학식 3, 4, 5, 6 또는 7에 따른 그룹이다:



[0066]



[0067]

[0068] 화학식 2

[0069] 여기서

[0070] $m=0, 1$ 이고

[0071] $n = 0, 1$, 또는 2이고;

[0072] L^1 은 0 또는 S이고;

[0073] X_1, X_2, X_3 은 독립적으로 O, S를 포함하는 군에서 선택되고;

[0074] R^1 은 CH_3, C_2H_5, CH_2Ph , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고

[0075] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, $OCH_3, OC_2H_5, -COOH, N_3$, 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

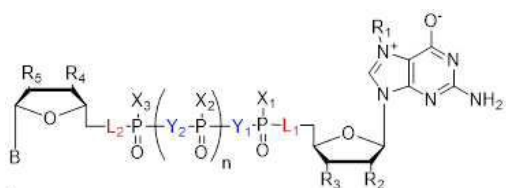
[0076] Y_1 및 Y_2 는 독립적으로 $CH_2, CHCl, CCl_2, CHF, CF_2, NH$, 및 O를 포함하는 군에서 선택되고;

[0077] 여기서 $n = 0$ 이고 $m = 1$ 이면, X_3 은 S이고, X_1 은 O이고;

[0078] $n = 1$ 이고 $m = 0$ 이면, X_2 는 S이고; X_1 은 O이고;

[0079] $n = 1$ 이고 $m = 1$ 이면, X_3 은 S이고; X_1, X_2 는 O이고

[0080]



[0081] 화학식 1

[0082] 여기서

[0083] L^1 및 L^2 는 독립적으로 O 및 S를 포함하는 군에서 선택되고, L_1 및 L_2 중 적어도 하나는 O가 아니고;

[0084] $n = 0, 1$, 또는 2이고;

[0085] X_1, X_2, X_3 은 독립적으로 O, S를 포함하는 군에서 선택되고;

[0086] R^1 은 CH_3, C_2H_5, CH_2Ph , 알킬 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

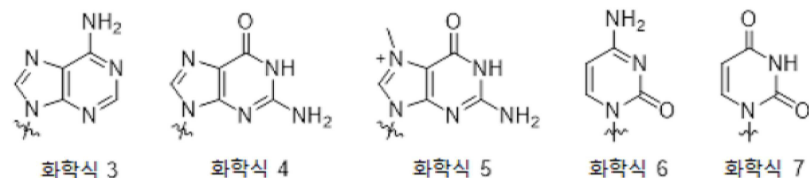
[0087] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, $OCH_3, OC_2H_5, -COOH, CH_2COOH, N_3, CH_2N_3$, 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함하는

군에서 선택되고;

[0088] R^4 및 R^5 는 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, CH_2COOH , N_3 , CH_2N_3 , 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함하는 군에서 선택되고;

[0089] Y_1 , Y_2 는 독립적으로 CH_2 , $CHCl$, CCl_2 , CF_2 , CHF , NH , O 를 포함하는 군에서 선택되고;

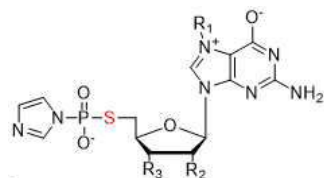
[0090] B는 하기 화학식 3, 4, 5, 6 또는 7에 따른 그룹이다:



[0091]

[0092] 바람직하게, 상기 언급된 합성 방법은 화학식 2에 따른 화합물, 화학식 8에 따른 화합물 및 염기로서 DBU (1,8-디아자비시클로(5.4.0)온데-7-엔)의 등몰량을 사용하는 것을 포함한다.

[0093] 본 발명은 또한 화학식 2a에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체의 제조 방법에 관한 것으로, 화학식 2a에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체를 형성하기 위하여 화학식 9에 따른 이미다졸리드 유도체를 트리에틸암모늄 포스페이트 염 또는 티오인산나트륨과 반응시킨다:



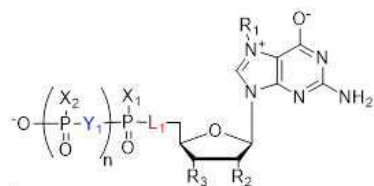
[0094]

[0095] **화학식 9**

[0096] 여기서

[0097] R^1 은 CH_3 , C_2H_5 , CH_2Ph , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0098] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, N_3 , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;



[0099]

[0100] **화학식 2a**

[0101] 여기서

[0102] $n = 0, 1$, 또는 2이고;

[0103] L^1 은 O 또는 S 이고;

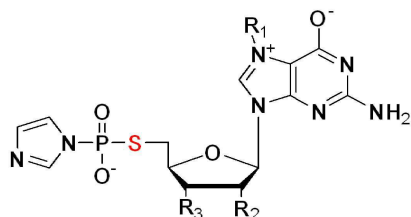
[0104] X_1 및 X_2 는 독립적으로 O , S 를 포함하는 군에서 선택되고;

[0105] R^1 은 CH_3 , C_2H_5 , CH_2Ph , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0106] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, N_3 , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0107] Y^1 은 독립적으로 CH_2 , $CHCl$, CCl_2 , CHF , CF_2 , NH , 또는 O 를 포함하는 군에서 선택된다.

[0108] 본 발명은 또한 화학식 1에 따른 화합물의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 화학식 1에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 형성하기 위하여 화학식 9에 따른 이미다졸리드 유도체를 말단 티오포스페이트 모이어티를 포함하는 화학식 2a에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체와 반응시키는 단계를 포함한다:



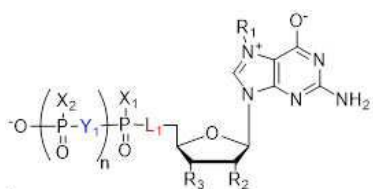
[0109]

[0110] **화학식 9**

[0111] 여기서

[0112] R^1 은 CH_3 , C_2H_5 , CH_2Ph , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0113] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, N_3 , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;



[0114]

[0115] **화학식 2a**

[0116] 여기서

[0117] $n = 1$ 이고

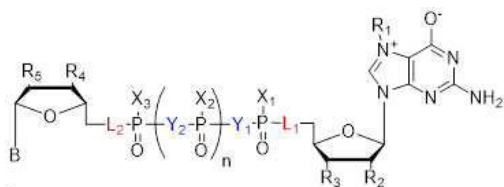
[0118] L^1 은 O 또는 S이고;

[0119] X_1 및 X_2 는 독립적으로 O, S를 포함하는 군에서 선택되고;

[0120] R^1 은 CH_3 , C_2H_5 , CH_2Ph , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0121] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, N_3 , 알킬, 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0122] Y_1 은 독립적으로 CH_2 , $CHCl$, CCl_2 , CHF , CF_2 , NH , 또는 O를 포함하는 군에서 선택되고;



[0123]

[0124] **화학식 1**

[0125] 여기서

[0126] L^1 및 L^2 는 독립적으로 O 및 S를 포함하는 군에서 선택되고, L_1 및 L_2 중 적어도 하나는 O가 아니고;

[0127] $n = 0, 1$, 또는 2이고;

[0128] X_1 , X_2 , X_3 은 독립적으로 O, S를 포함하는 군에서 선택되고;

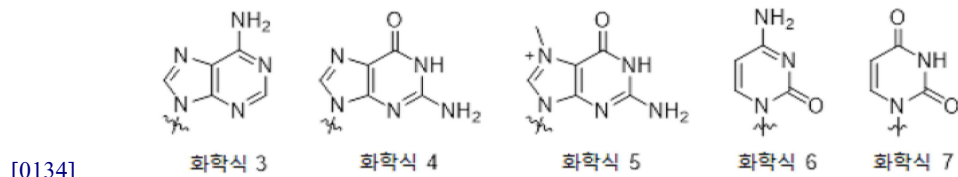
[0129] R^1 은 CH_3 , C_2H_5 , CH_2Ph , 알킬 또는 치환된 알킬을 포함하는 군에서 선택되고;

[0130] R^2 및 R^3 은 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, CH_2COOH , N_3 , CH_2N_3 , 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함하는 군에서 선택되고;

[0131] R^4 및 R^5 는 독립적으로 H, OH, OCH_3 , OC_2H_5 , $-COOH$, CH_2COOH , N_3 , CH_2N_3 , 알킬, 알케닐, 또는 알키닐을 포함하는 군에서 선택되고;

[0132] Y_1 , Y_2 는 독립적으로 CH_2 , $CHCl$, CCl_2 , CF_2 , CHF , NH , O를 포함하는 군에서 선택되고;

[0133] B는 하기 화학식 3, 4, 5, 6 또는 7에 따른 그룹이다:



[0135] 이미다졸리드 유도체를 이용한 합성 방법에서, 바람직하게 상기 반응은 2가 금속 염화물의 존재 하에서 수행되며, 여기서 바람직한 2가 금속 염화물은 염화아연 ($ZnCl_2$)이다.

[0136] 이미다졸리드 유도체를 이용한 합성 방법에서, 바람직하게 포스페이트 그룹, 티오포스페이트 그룹, 또는 화학식 2a에 따른 화합물에 대해 1.5배 과량의 화학식 9에 따른 이미다졸리드가, 8배 과량의 2가 금속 염화물의 존재 하에 사용된다.

[0137] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 제제에 관한 것이다.

[0138] 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 본 발명에 따른 약학 제제는 DcpS 활성, 바람직하게 hDcpS 활성을 저해하는 성질을 가지며, SMA 치료에서 사용되기 위한 것으로 의도된다.

[0139] 약학적으로 허용가능한 담체의 선정은 약학 제제의 투여 방법과 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체를 세포, 조직, 또는 유기체로의 전달 전의 분해의 비활성화로부터 보호하기 위한 필요성에 의존적일 것이다. 약학적으로 허용가능한 담체는 용매, 분산매 및 보조제 (코팅물질, 계면활성제, 향미료, 향산화제 등)를 포함한다. 본 발명에 따른 약학 제제는 주사, 경구, 국소 투여 및 직장 투여를 포함한 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다. 약학 제제의 투여량은 투여 경로, 치료 또는 예방을 요하는 상태, 및 기타 관련 상황을 이유로 하여 설정된다.

[0140] 본 발명은 또한 신규한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 5' 말단에 포함하는 mRNA에 관한 것이다.

[0141] 바람직한 mRNA는 $m^7GSp\text{pp}G$ (24번), $m^{7,2'0}GSp\text{pp}G$ (26번), $m^7GSp\text{pp}SG$ (32번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{G}$ D1 (30번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{G}$ D2 (31번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{SG}$ D1 (33번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{SG}$ D2 (34번)를 포함하는 군에서 선택되는 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 특징으로 하며, 더욱 바람직하게 이는 $m^{7,2'0}GSp\text{pp}G$ (26번)이다.

[0142] 본 발명은 또한 분자의 5'-말단에 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 포함하는 mRNA의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체가 mRNA 분자의 합성 동안 포함되는 것을 포함한다.

[0143] 바람직한 mRNA의 제조 방법에서, 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체는 $m^7GSp\text{pp}G$ (24번), $m^{7,2'0}GSp\text{pp}G$ (26번), $m^7GSp\text{pp}SG$ (32번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{G}$ D1 (30번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{G}$ D2 (31번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{SG}$ D1 (33번), $m^7GSp\text{p}_sP\text{SG}$ D2 (34번)를 포함하는 군에서 선택되고, 더욱 바람직하게 이는 $m^{7,2'0}GSp\text{pp}G$ (26번)이다.

- [0144] 바람직한 mRNA의 제조 방법에서, mRNA의 합성은 시험관내 전사를 통해 진행된다.
- [0145] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 분자의 5'-말단에 포함하는 mRNA의 제조 방법에 의해 제조된 mRNA에 관한 것이다.
- [0146] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 단백질의 생성을 위해 분자의 5'-말단에 포함하는 mRNA의 용도에 관한 것이다.
- [0147] 단백질의 생성을 위한 mRNA의 사용은 바람직하게는 세포 또는 비-세포 시스템에서 수행된다.
- [0148] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 mRNA 및 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 분자의 5' 말단에 포함하는 mRNA의 제조 방법에 따라 제조된 의약으로 사용하기 위한 mRNA에 관한 것이다.
- [0149] 이러한 mRNA는 바람직하게 척수성 근위축 (SMA)의 치료 및/또는 SMA 증상의 완화를 위한 의약으로 사용된다.
- [0150] 바람직하게, 이러한 mRNA는 항-암 의약, 더욱 바람직하게는 항-암 면역치료에서의 의약으로 사용되기 위해 이용된다.
- [0151] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 mRNA 및 의약의 제조에서 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체를 분자의 5' 말단에 포함하는 mRNA의 제조 방법에 따라 제조된 mRNA의 용도에 관한 것이다.
- [0152] 바람직한 용도에서, mRNA는 항-암 의약, 더욱 바람직하게는 항-암 면역치료에서의 의약으로서, 척수성 근위축 (SMA)의 치료 및/또는 SMA 증상의 완화를 위한 의약의 제조에 사용된다.
- [0153] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 mRNA 및 본 발명에 따른 5'-포스포로티올레이트 유사체를 분자의 5' 말단에 포함하는 mRNA의 제조 방법에 따라 제조된 mRNA 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 제제에 관한 것이다.
- [0154] 메틸화되지 않은 화합물 (GppSG 및 GpppSG)은 생물학적 연구를 위한 대조군으로 합성되었다.
- [0155] 표 1은 본 발명자들에 의해 처음으로 얻어진 적절히 변형된 뉴클레오타이드의 합성에 사용되는 알킬화제를 나열한다. 표 2 및 3은 얻어지고 이어 생물물리학적 및 생화학적 방법에 의해 특징지어지는 5'-포스포로티올레이트 캡 유사체를 나열한다.
- [0156] 표 2 및 표 3에 나열된 화합물 중, 7-메틸구아노신의 측면의 5'-위치에 황을 포함하는 5'-포스포로티올레이트 유사체 (화합물 12, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 34 및 37번)가 SMA 치료와 관련하여 특히 바람직하며, 이들은 DcpS 효소의 존재 하에서의 안정성을 특징으로 한다.

표 1

- [0157] 5'-테옥시-5'-요오도-구아노신 유사체 (화합물 번호는 구조 옆에 표기됨)

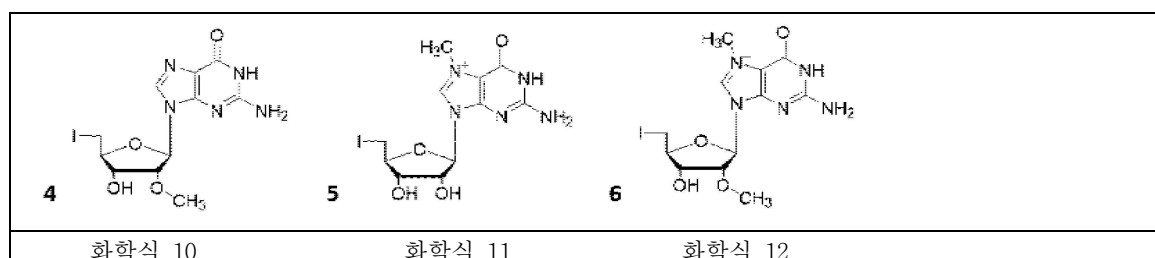


표 2

[0158] 모노뉴클레오타이드 5'-티오포스페이트 유사체: 패널 A - 구아노신, 패널 B - 7-메틸로구아노신

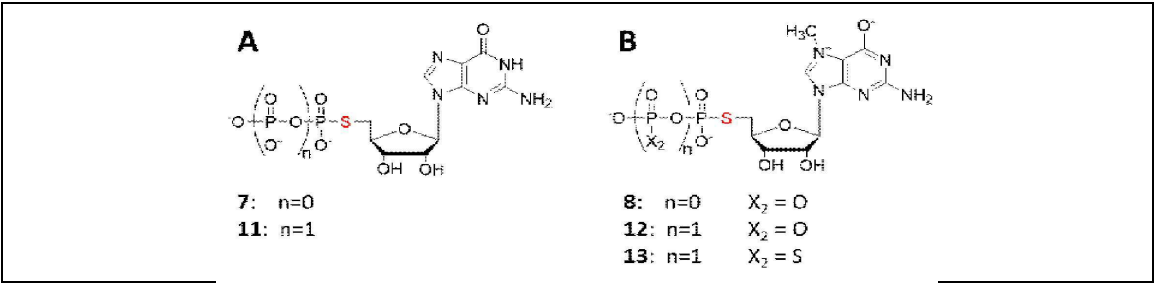


표 3

[0159] 5'-티오포스페이트 캡 유사체

19: n=0 20: n=1								
화합물 번호	화합물	n	R	L1	L2	Y1	Y2	X2
21	⁷ _m GppSG	0	H	O	S	O	O	O
22	⁷ _m GpppSG	1	H	O	S	O	O	O
23	⁷ _m GSppG	0	H	S	O	O	O	O
24	⁷ _m GSpppG	1	H	S	O	O	O	O
25	⁷ _m GSppCH ₂ pG	1	H	S	O	O	CH ₂	O
38	^{7,2'0} _m GpppSG	1	CH ₃	O	S	O	O	O
26	^{7,2'0} _m GSpppG	1	CH ₃	S	O	O	O	O
32	⁷ _m GSpppSG	1	H	S	S	O	O	O
35	⁷ _m Gpp _s pSG D1	1	H	O	S	O	O	S
36	⁷ _m Gpp _s pSG D2	1	H	O	S	O	O	S
30	⁷ _m GSpp _s pG D1	1	H	S	O	O	O	S
31	⁷ _m GSpp _s pG D2	1	H	S	O	O	O	S
33	⁷ _m GSpp _s pSG D1	1	H	S	S	O	O	S
34	⁷ _m GSpp _s pSG D2	1	H	S	S	O	O	S
37	⁷ _m GpCH ₂ ppSG	1	H	O	S	CH ₂	O	O

[0160] 상세한 설명에서 인용된 문서 및 여기서 참조된 문서는 참고문헌으로서 여기에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0161] 본 발명의 보다 나은 이해를 위하여 실시예 및 첨부된 도면을 이용하여 설명한다:

도 1은 5'-데옥시-5'-요오도-구아노신 유사체의 합성을 보여준다.

도 2는 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-티오포스페이트의 합성을 보여준다. A - 구아노신 유도체의 합성; B - 7-메틸로구아노신 유도체의 합성.

도 3은 S-알킬화를 통한 5'-티오포스페이트 캡 유사체의 합성을 보여준다. A - 알킬화 반응에서 사용된 말단 티오포스페이트; B - 5'-데옥시-5'-요오도-구아노신 (도 1) 및 A에 나타난 말단 티오포스페이트를 이용한 알킬화 반응 체계도.

도 4는 이미다졸리드를 통한 5'-티오포스페이트 캡 유사체의 합성을 보여준다. A - 방법에 사용되는 화합물; B - 2개의 상이한 활성화된 유도체 (9번 및 29번)를 이용한 최종 화합물 합성.

도 5는 DcpS에 의한 천연 디뉴클레오티드 기질의 가수분해 및 5'-S 변형된 유사체의 안정성 연구를 보여준다:

패널 A - 천연 캡 유사체 m^7GpppG 의 DcpS에 대한 안정성 연구; 패널 B - 캡 유사체 (20번) (표 3)의 DcpS 효소에 대한 안정성 연구; 패널 C - 캡 유사체 (21번) (표 3)의 DcpS 효소에 대한 안정성 연구.

도 7은 m^7GSp_{pSG} D2를 갖는 복합체 내 효소 $\Delta N37hDcpS$ 의 활성 부위의 결정체 구조를 보여준다.

도 8은 SpDcp1/2 탈캡핑 효소와 함께 인큐베이팅된 다양한 캡 유사체로 캡핑된 짧은 26 nt RNA (5' 말단에 캡이 없는 전사물은 25 nt 길이임)의 Dcp1/2 효소 활성화에 대한 민감성을 보여준다. 반응은 0, 5, 15, 30분 동안 수행하고, 반응 종료 후 반응 혼합물을 변성된 15 % 폴리악릴아미드 겔 상에서 용해하고, 전기영동 분리가 완료된 후 겔을 SYBR-Gold (Invitrogen)로 염색하였다. 각 패널 상에서 가장 왼쪽 레인은 캡핑되지 않은 RNA인 대조군을 가리킨다.

도 9는 도 8 상의 데이터로부터 결정된 Dcp1/2 효소 활성화에 대한 상대적인 민감성을 보여준다. Dcp1/2 활성화에 대한 상대적인 민감성은 캡핑된 그리고 캡핑되지 않은 RNA에 대응되는 밴드의 강도의 총합에 대한 5' 말단에 캡핑된 RNA에 대응되는 밴드의 강도의 비율로 계산하였다. 모든 수치는 개별 RNA에 대해 시간 0분에 관하여 정규화되었다.

도 10은 토끼 망상적혈구 추출물 내 5' 말단이 다양한 캡 유사체로 캡핑된 레닐라 (*Renilla*) 루시페라아제를 코딩하는 mRNA의 번역 효율의 측정으로부터 얻어진 상대적인 번역 효율을 보여준다.

도 11은 선택된 시점에서의 루시페라아제 활성화에 기초하여 확인된 HeLa 세포 내 상대적인 번역 효율을 보여준다. 결과는 m^7GpppG 로 캡핑된 mRNA로 형질감염된 세포의 용해물에 대해 측정된 루시페라아제 활성화에 대한, 5' 말단이 $m_2^{7, 2'-O}GSp_{pSG}$ 또는 $m_2^{7, 2'-O}GpppSG$ 로 캡핑된 mRNA로 형질감염된 세포의 용해물에 대해 측정된 루시페라아제 활성화의 비율로 나타난다. 막대 그래프는 3개의 생물학적 반복의 평균값을 나타낸다.

5'-티오포스페이트 캡 유사체의 화학 합성은 하기의 화학 성질에 기초한 3개의 뉴클레오티드 합성 방법의 창의적인 조합이다:

1) 이미다졸리드 뉴클레오티드 유도체 (하기 문헌을 참조한다 [Abrams and Schiff 1973; Barnes, Waldrop et al. 1983; Kalek, Jemielity et al. 2006 및 Kalek, Jemielity et al. 2005])

2) 뉴클레오시드 유도체를 포함하는 할로젠에 의한 S-알킬화 (하기 문헌을 참조한다 [Arakawa, Shiokawa et al. 2003])

3) 말단 뉴클레오시드 β -티오-디 및 γ -티오-트리포스페이트의 합성 (하기 문헌을 참조한다 [Zuberek, Jemielity et al. 2003])

5'-위치에 황을 포함하는 캡 유사체를 합성하기 위하여, 우리는 뉴클레오시드 및 디뉴클레오티드 캡 유사체의 모노-, 디-, 및 트리포스페이트의 다양한 5'-포스포리보오에이트 유사체의 합성을 대체로 가능하게 하는 2개의 보완적인 접근법을 개발하였다 (도 2 내지 도 4). 접근법 1 (도 2 및 도 3의 첫번째 단계)은 β - 또는 γ -티오포스페이트에 의한 5'-데옥시-5'-요오도뉴클레오시드의 친핵성 치환 반응을 이용한 S-알킬화 반응을 포함한다.

5' 위치에 황 원자를 갖는 디뉴클레오타이드 화합물을 생산하는 두번째 접근법 (도 4)은 촉매로서 $ZnCl_2$ 의 존재 하에서, 적절한 이미다졸리드 뉴클레오타이드가 이전에 활성화된 형태와 디포스페이트 사이의 커플링 반응을 이용한다 (두 경우 모두, 정해진 단계에서 S-알킬화 반응이 사용되었다).

첫번째 접근법은 말단 위치에 대응되는 포스포로티오에이트 모이어티를 갖고 있는 대응되는 포스포로티오에이트 (모노-, 디-, 트리-)를 사용한다. 상기 반응을 위한 최적의 조건은 등몰량의 포스포로티오에이트, 5'-요오도뉴클레오타이드 및 염기로서 DBU (1,8-디아자비시클로 (5.4.0) 운텍-7-엔)를 사용하는 것이다. 지금까지, 상기 방법을 사용하여, 우리는 트리포스페이트 다리의 α - β 및 β - γ 위치에 메틸렌 변형을 포함하는 유닛 2개를 포함하는 9개의 상이한 디뉴클레오타이드 캡 유사체를 얻었다 (도 3).

효율적인 생산을 위한 두번째 접근법은, 유기 배지 내 용해도를 또한 증가시키고, 이미다졸리드 유도체를 가수분해로부터 보호하며, 이미다졸 유도체 및 하나의 분자에 더 가까운 다른 분자의 포스페이트를 얻음으로써 반응 속도를 높이는 $ZnCl_2$ 와 같은 2가 금속 염화물의 존재가 필요하다. 상기 반응을 위한 최적의 조건은 디포스페이트에 대해 1.5배의 이미다졸 유도체를 DMF 내 8배 과량의 $ZnCl_2$ 의 존재 하에서 사용하는 것이다. 두번째 방법을 이용하여 우리는 5' 위치에 2개의 황 그리고 트리포스페이트 사슬 내 β -비가교 위치에 황을 포함하는 9개의 5'-포스포로티오에이트 캡 유사체를 추가로 얻었다 (도 4). 지금까지 이러한 유형의 반응에서 뉴클레오타이드의 5'-포스포로티오에이트 유사체의 사용은 기술된바 없다. 인 원자 상에 위치한 입체 중심의 존재 때문에, β -S-황 원자를 포함하는 각 유사체는 부분입체이성질체의 혼합물로서 얻어졌다 (RP-HPLC 컬럼에서 용출되는 순서에 따라 D1 및 D2라 함). 개별 부분입체이성질체는 RP-HPLC에 의해 분리되었다.

얻은 캡 유사체는 이온 교환 크로마토그래피, DEAE 세파덱스 (Sephadex) A-25에 의해 정제되었고, 순도가 충분하지 않은 경우에는 분취 HPLC에 의해 정제되었다. 이후, 정제된 화합물의 생화학적 그리고 생물학적 성질이 시험되었다.

5' 위치에 황 원자를 포함하는 캡 유사체를 유도하는 합성 경로는 도 1 내지 4에 도시되어 있다.

얻은 캡 유사체를 이후 인간 효소 DcpS (hDcpS)의 기질로서 시험하였다. 역상 HPLC (RP HPLC)를 이용하여 결정된 것과 같이, 오직 4개의 유사체: m^7GppSG (21번), $m^7GpppSG$ (22번) $m^{7,2'-O}GpppSG$ (38번) 및 m^7Gpp_pSG D1/D2 (35번 - 36번)가 DcpS에 의해 가수분해된다. 7-메틸화된 구아노신의 측면으로부터 5' 위치에 황 원자를 포함하는 다른 유사체는 hDcpS에 의한 가수분해에 저항성을 갖는다 (2개의 상이한 유사체 (22번 및 24번)의 안정성 비교 - 도 5, 표 4). 21번, 22번, 38번 및 35번 - 36번 화합물에 대조적으로, 유사체 37번 (m^7GpCH_2ppSG)은 메틸렌비스포스포네이트 모이어티로 추가로 변형되었고, 또한 효소 hDcpS에 의한 가수분해에 저항성을 가졌다 (표 5). 이어서, 효소 활성에 저항성을 갖는 화합물에 대해 파라미터 IC_{50} 을 결정하면서 효소 hDcpS에 대한 이들 화합물의 저해 능력을 결정하기 위하여 형광법 및 형광발생 프로브를 사용하였다 (특히 출원 PL406893을 참조한다). 연구 후, 결과로 얻은 화합물은 인간 효소 DcpS의 매우 좋은 저해제임이 밝혀졌다.

모든 시험된 캡 유사체 중 hDcpS 효소에 대해 가장 우수한 저해 성질을 나타내는 유사체 34번은, 효소의 단축된 버전 ($\Delta N37hDcpS$; 전장 효소는 결정을 형성하지 않음)과 함께 결정화되었고, 복합체의 2.05 Å 해상도 구조는 X-선 결정학에 의해 결정되었다 (도 7). 복합체 구조에서 관찰된 유사체 34번의 형태는, 촉매적으로-비활성화된 H277N hDcpS 변이체와 복합체를 이룬 비-변형된 캡 유사체 m^7GpppG (화합물 0번)의 형태와 유의하게 상이하다 (Gu, Fabrega et al. 2004). 특히 이들 2개의 리간드 사이의 실질적인 차이는 트리포스페이트 다리의 정렬에서 관찰되었고, 이는 촉매 중심으로부터 유사체 34번의 γ 포스페이트를 배제하는 결과를 초래하였다. 나아가, C-말단 도메인과 일반적인 캡/DcpS 효소 복합체의 상호작용 외에도, 유사체 34번은 리신 142 및 티로신 143 잔기 사이의 수소 결합을 통해 상호작용한다. 이들 아미노산은 촉매 주기 동안 서로에 대해 이동하는 C- 및 N-말단 도메인을 연결하는 소위 힌지 영역에 위치한다.

얻어진 화합물의 구조 및 순도는 질량 분석 및 1H 및 ^{31}P NMR로 확인하였다.

천연 기질에 대해 확립된 촉매 매커니즘과 일관되게, 얻은 화합물의 가수분해는 7-메틸구아노신에 인접한 포스페이트 그룹 상의 친핵성 공격을 통해 이루어지기 때문에, $m^7GSpppG$ (화합물 24번) 및 그의 유사체가 hDcpS에 저항성을 가진다는 결과는 예기치 못한 것이다.

요약하면, 본 발명은 5'-포스포로티오에이트 모이어티를 포함하는 mRNA의 5' 말단 (캡)의 다양한 유사체의 구조

및 합성 방법을 기술한다. 기술된 캡 유사체, 그들의 효소 DcpS에 대한 성질, 그들의 사용 방법, 특히 척수성 근위축 (SMA)의 치료 및/또는 SMA 증상의 완화를 위한 사용 방법 중 어느 것도 선행 문헌에 기술된 적이 없다.

선택된 유사체는 RNA SP6 중합효소 (New England BioLabs)를 이용한 시험관내 전사 방법을 이용한 mRNA 합성을 위해 사용된다. 35개 길이의 뉴클레오타이드를 갖는 전사물의 군 중 몇 퍼센트가 캡 구조를 갖는지가 검사되었고, 이후 스킴조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*)의 재조합 효소 Dcp1/2에 의한 분해에 대한 전사물의 민감성이 검사되었다 (실시에 2, 시험 4, 도 8, 도 9, 탭. 6.). 루시페라아제 (리포터 유전자로서)를 코딩하는 전장 전사물은 토끼 망상적혈구 용해물 (도 10, 실시예 2, 시험 5) 및 변형된 mRNA로 형질감염된 HeLa 세포 (도 11, 실시예 2, 시험 6)에서 번역되었다. 두 경우 모두에서, 두 번역 시스템 내 mRNA 번역 효율은 합성된 단백질 (루시페라아제)의 활성을 검사함으로써 결정되었다 (탭. 6.).

본 명세서에서 사용된 용어는 하기의 의미를 가진다. 여기서 정의되지 않은 용어는 본 개시사항 및 본 특허출원의 상세한 설명의 맥락의 관점에서 당업자에 의해 제시되고 이해되는 의미를 가진다. 하기의 규칙은 달리 언급되지 않는 한 본 상세한 설명에서 사용되었으며, 용어는 하기 정의에서 지시된 의미를 갖는다.

용어 “알킬”은 표시된 수의 탄소 원자를 갖는 포화된, 선형 또는 분지형 히드로카르보닐 치환기를 지칭한다. 알킬 치환기의 예로는 -메틸, -에틸, -*n*-프로필, -*n*-부틸, -*n*-펜틸, -*n*-헥실, -*n*-헵틸, -*n*-옥틸, -*n*-노닐 및 -*n*-데실이 있다. 대표적인 분지형 -(C1-C10)알킬은 -이소프로필, -*sec*-부틸, -이소부틸, -*tert*-부틸, -이소펜틸, -네오펜틸, -1-메틸부틸, -2-메틸부틸, -3-메틸부틸, -1,1-디메틸프로필, -1,2-디메틸프로필, -1-메틸펜틸, -2-메틸펜틸, -3-메틸펜틸, -4-메틸펜틸, -1-에틸부틸, -2-에틸부틸, -3-에틸부틸, -1,1-디메틸부틸, -1,2-디메틸부틸, 1,3-디메틸부틸, -2,2-디메틸부틸, -2,3-디메틸부틸, -3,3-디메틸부틸, -1-메틸헥실, 2-메틸헥실, -3-메틸헥실, -4-메틸헥실, -5-메틸헥실, -1,2-디메틸펜틸, -1,3-디메틸펜틸, -1,2-디메틸헥실, -1,3-디메틸헥실, -3,3-디메틸헥실, 1,2-디-메틸헵틸, -1,3-디메틸헵틸 및 -3,3-디메틸헵틸 등을 포함한다.

용어 “알케닐”은 표시된 수의 탄소 원자를 가지며 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 포화된, 선형 또는 분지형 비환형 히드로카르보닐 치환기를 지칭한다. 알케닐 치환기의 예로는 -비닐, -알릴, -1-부텐일, -2-부텐일, -이소부틸렌일, -1-펜텐일, -2-펜텐일, -3-메틸-1-부텐일, -2-메틸-2-부텐일, -2,3-디메틸-2-부텐일, -1-헥센일, -2-헥센일, -3-헥센일, -1-헵텐일, -2-헵텐일, -3-헵텐일, -1-옥텐일, -2-옥텐일, -3-옥텐일, -1-노넬일, -2-노넬일, -3-노넬일, -1-디켄일, -2-디켄일, -3-디켄일 등이 있다.

용어 “알킬닐”은 표시된 수의 탄소 원자를 가지며 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 포화된, 선형 또는 분지형 비환형 히드로카르보닐 치환기를 지칭한다. 알킬닐 치환기의 예로는 아세틸렌일, 프로핀일, -1-부틴일, -2-부틴일, -1-펜틴일, -2-펜틴일, -3-메틸-1-부틴일, 4-펜틴일, -1-헥신일, -2-헥신일, -5-헥신일 등이 있다.

용어 “헤테로원자”는 산소, 황, 질소, 인 등의 군에서 선택된 원자를 지칭한다.

용어 “HPLC”는 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography)를 지칭하며, “HPLC”를 위한 용매로 설계된 용매는 HPLC 분석을 위한 적합한 순도의 용매를 의미한다.

용어 “NMR”은 핵 자기 공명 (nuclear magnetic resonance)을 의미한다.

용어 “세포 시스템”은 RNA 주형 상에서 단백질 생합성 과정을 수행할 수 있는 세포를 지칭한다.

용어 “비-세포 시스템”은 RNA 주형에 기초한 단백질 생합성에 필수적인 모든 성분을 포함하는 생물학적 혼합물, 주로 동물 또는 식물 세포의 용해물을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0162] 하기의 실시예는 단지 본 발명을 예시하고 그의 다양한 양태를 설명하기 위하여 제공되며, 이를 제한하기 위하여 제공되는 것이 아니고, 첨부된 청구범위에서 정의된 모든 범위와 동일시되어서는 안된다. 하기 실시예는 달리 언급되지 않는 한, 업계에서 사용되는 표준 재료 및 방법 또는 특정 재료 및 방법을 위해 제조사에 의해 권고되는 절차의 사용을 포함한다.

[0163] 실시예

[0164] 합성, 분리와 관련된 전반적인 정보 및 새로운 캡 유사체의 특징

[0165] 중간체인 뉴클레오타이드를 이온 교환 크로마토그래피에 의해 탈이온수 내 선형 구배의 트리에틸암모늄 중탄산염

(TEAB)을 이용하여 DEAE 세파덱스 (Sephadex) A-25 (HCO_3^- 형태) 상에서 정제하였다. 감압 하 증발 후, TEAB 버퍼를 분해하기 위하여 96% 에탄올을 수차례 가하는 동안, 중간체를 트리에틸암모늄 염으로 분리하였다. 최종 산물 (캡 유사체)을 동일한 방식으로 정제한 후, 반-분취 (semi-preparative) HPLC에 의해 정제하고, 수차례 동결 건조 처리하여 암모늄 염으로 분리하였다. 분석 역상 HPLC (RP HPLC)를 Agilent Technologies Series 1200 장치 상에서, 0.05 M 아세트산암모늄 (pH 5.9) 내 선형 구배의 0% - 25% 메탄올 (프로그램 A) 또는 0.05 M 아세트산암모늄 (pH 5.9) 내 선형 구배의 0% - 50% 메탄올 (프로그램 B)을 갖는 Supelcosil LC-18 RP-T 컬럼 (4.6 x 250 mm, 유속 1.3 ml/분)을 이용하여 수행하였다. 용출된 화합물을 UV-VIS 검출기 (260 nm에서) 및 형광 검출기 (여기 260 nm, 방출 370 nm)를 이용하여 검출하였다. 동일한 장치 상에서 이동상으로서 0.05 M 아세트산암모늄 (pH 5.9) 내 선형 구배의 아세토니트릴을 이용한 Discovery RP Amide C16 컬럼 (21.2 mm x 250 mm, 유속 5.0 ml/분)을 이용하여 분취 (preparative) RP HPLC를 수행하였다. ^1H NMR 및 ^{31}P NMR 스펙트럼을 Varian UNITY-plus 상에서 25°C, 그리고 각각 399.94 MHz 및 161.90 MHz의 주파수에서 기록하였다. ^1H NMR 화학 이동을 D_2O (내부 기준) 내 TSP (3-트리메틸실릴 [2,2,3,3-D4] 소듐 프로피오네이트)에 대하여 기록하였다. ^{31}P NMR 화학 이동을 D_2O 내 20% 인산 (외부 기준)에 대하여 기록하였다. 음성 [MS ESI (-)] 또는 양성 이온 모드 [MS ESI (+)] 내 고해상도 질량 스펙트럼을 Micromass QToF 1 MS 상에서 기록하였다. Tecan Infinitt 200 @PRO 상에서 480 nm에서의 여기 및 535 nm에서의 방출을 이용하여 형광 플레이트 판독기를 판독하였다. 시료를 검정 96-웰 플레이트 (Greiner)에 위치시켰다. 피펫팅 로봇 모스키토 크리스탈 (pipetting robot Mosquito Crystal) (TTP Labtech)을 활용하여 3-렌즈 웰을 갖는 96-웰 플레이트 (Swissci) 상에서 결정화를 수행하였다. 용매 및 기타 시약을 Sigma-Aldrich에서 구매하고 달리 언급되지 않는 한 추가 정제 없이 사용하였다. GMP 및 GDP의 상업적으로 입수가능한 나트륨 염을 Dowex 50 WX8 상에서 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 트리에틸암모늄 염으로 변환하였다. 트리에틸암모늄 염 및 $m^7\text{GMP}$ 및 $m^7\text{GDP}$ 나트륨 염, $m^7\text{GMP-Im}$ 및 $m^7\text{GDP-Im}$ 을 문헌에서 기술된 것과 같이 얻었다 (Kalek, Jemielity et al. 2005), (Jemielity, Fowler et al. 2003). 5'-데옥시-5'-요오도-구아노신, 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-모노티오포스페이트 및 트리에틸아민 포스포로티오에이트를 문헌에서 기술된 것과 같이 얻었다 ((Arakawa, Shiokawa et al. 2003), (Zuberek, Jemielity et al. 2003)). $m^7\text{GpCH}_2\text{p}$ 트리에틸암모늄 염을 문헌에서 기술된 것과 같이 제조하였다 (Kalek, Jemielity et al. 2006). GpCH_2pS 를 문헌에서 기술된 것과 같이 제조하였다 (Kowalska, Ziemniak et al. 2008).

[0166] 하기 실시예에서는, 특정 화합물에 대한 괄호 내에 도면 및 특정 치환기를 가리키는 숫자에 대한 언급이 나타나며, 이는 특정 캡 유사체에 대한 특정 숫자에 대응된다.

[0167] 실시예 1. 새로운 캡 유사체의 합성 및 분리

[0168] 5'-요오도 뉴클레오시드 유도체 (도 1, 3번, 4번) 합성의 전반적인 방법

[0169] N-메틸-2-피롤리디논 (뉴클레오시드가 0.25 mol/l의 농도가 될 때까지) 내 대응되는 뉴클레오시드 (1 mmol), 트리페닐포스핀 (3 mmol, M=262.29 g/mol) 및 이미다졸 (6 mmol, M=68.08 g/mol)을 자기로 저은 현탁액에 요오드 (3 mmol, M=253.81 g/mol)를 실온에서 5분 넘게 가하였다. 반응을 3시간 이상 수행하고, RP HPLC를 이용하여 반응 경과를 모니터링하였다. 이후, 반응 혼합물을 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (3:1, v/v) 용액에 부어 반응 혼합물을 12배 희석하였다. 흰색 결정성 침전이 24시간 동안 4°C에서 두 층의 계면에 형성되었다. 침전물을 감압 하 여과하고 염화메틸렌으로 세척한 후 진공으로 P_2O_5 상에서 건조시켰다.

[0170] 5'-데옥시-5'-요오도-구아노신 (도 1, 3번)

[0171] 5'-데옥시-5'-요오도-구아노신 (도 1, 3번), (10.4 g, 26.5 mmol, 75%)을 구아노신 (도 1, 1번) (10 g, 35.3 mmol)으로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. t_R (B) = 12.36분;

[0172] ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 10.65 (s, 1H, H-1), 7.89 (s, 1H, H-8), 6.47 (bs, 2H, NH2), 5.68 (d, 1H, J = 6.26 Hz, H-1'), 5.51 (d, 1H, J = 6.26 Hz, 2'-OH), 5.35 (d, 1H, J = 4.70 Hz, 3'-OH), 4.59 (q, 1H, J = 5.48 Hz, H-2'), 4.03 (q, 1H, J = 5.09, 3.13 Hz, H-3'), 3.90 (dt, 1H, J = 6.26, 3.13 Hz, H-4'), 3.53 (dd, 1H, J = 6.26, 5.87 Hz, H-5'), 3.39 (dd, 1H, J = 10.17, 6.65 Hz, H-5'); HRMS ESI (-)

$C_{10}H_{11}IN_5O_4^-$, (M-H)⁻의 계산치 m/z : 391.9861, 실측치 391.98610

[0173] 5'-데옥시-5'-요오도-2'-O-메틸-구아노신 (도 1, 4번)

[0174] 2'-O-메틸-5'-데옥시-5'-요오도-구아노신 (도 1, 4번), (328.8 mg, 0.81 mmol, 80%)을 2'-O-메틸구아노신 (도 1, 2 번) (300 mg, 1.0 mmol)으로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. t_R (B) = 14.44분;

[0175] 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7.95 (s, 1H, H-8), 6.50 (bs, 2H, NH₂), 5.81 (d, 1H, J = 6.41 Hz, H-1'), 5.50 (d, 1H, J = 5.34 Hz, 3'-OH), 4.41, 4.40 (2d, 1H, J = 6.26, 6.41 Hz, H-2'), 4.28-4.25 (m, 1H, H-3'), 3.97, 3.96 (2t, 1H, J = 6.56, 3.05 Hz, H-4'), 3.56 (dd, 1H, J = 6.41, 10.38 Hz, H-5'), 3.43 (dd, 1H, J = 10.53, 6.87, 6.71 Hz, H-5'), 3.30 (s, 3H, CH₃);

[0176] HRMS ESI (-) $C_{11}H_{13}IN_5O_4^-$ [M-H]⁻의 계산치 m/z : 406.0090, 실측치 406.0021.

[0177] 5'-데옥시-5'-요오도-7-메틸구아노신 (도 1, 5번)

[0178] 5'-데옥시-5'-요오도-구아노신 (도 1, 3번) (2g, 5.09 mmol)을 무수 DMF (20 mL)에 용해시키고 MeI (2.5 mL, 40.7 mmol)을 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 자석 교반기로 교반하였다. 반응 과정은 RP HPLC로 모니터링하였다. 시작 물질이 관찰되지 않았을 때, 물 (10 mL)을 가하여 반응을 중단시키고, 과량의 요오드화메틸을 진공 하 증발시킨 후 반응 혼합물을 감압 하 농축하였다. 이후, 남은 조 산물 CH_2Cl_2 (100 mL)를 가하였고 노랑색 침전물이 형성되었다. 침전물을 감압 하 여과하고, CH_2Cl_2 (3 x 20 mL)로 세척한 후 24시간 동안 진공에서 P_4O_{10} 상에서 건조하였다. 1.6 g를 생산하였다 (77.0 %). t_R (B) = 11.94분;

[0179] 1H NMR (400 MHz, D₂O) δ ppm 5.98 (d, 1H, J = 3.91 Hz, H-1'), 4.81 (dd, 1H, J = 4.70 Hz, H-2'), 4.31 (t, 1H, J = 5.09, H-3'), 4.15 (q, 1H, J = 5.48, H-4'), 4.07 (s, 3H, CH₃), 3.50-3.62 (m, 2H, J = 4.70, 5.87 Hz, H-5');

[0180] HRMS ESI (+) $C_{11}H_{15}IN_5O_4^+$ [M+H]⁺의 계산치 m/z : 408.01687, 실측치 408.01163.

[0181] 5'-데옥시-5'-요오도-2'-O-메틸-7-메틸구아노신 (도 1, 6번)

[0182] 5'-데옥시-5'-요오도-2'-O-메틸구아노신 (도 1, 4번) (200.8 mg, 0.49 mmol)을 무수 DMSO (3.3 mL)에 용해시키고 MeI (0.25 mL, 3.9 mmol)을 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 자석 교반기로 교반하였다. 반응 과정은 RP HPLC로 모니터링하였다. 시작 물질이 관찰되지 않았을 때, 반응을 물 (10 mL)로 종료시키고 pH를 NaHCO₃를 이용하여 중성으로 조정한 후, 과량의 요오드화메틸을 디에틸 에테르로 추출하고 수상을 폴링 (polled)한 뒤, 혼합물을 농축시키고 분취 HPLC에 의해 정제하여 45.8 mg의 화합물 (77 %)을 수득하였다. t_R (B) = 11.94분;

[0183] 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 9.03 (s, 1H, H-8), 6.39 (bs, 2H, NH₂), 5.95 (d, 1H, J = 4.27 Hz, H-1'), 4.40 (t, 1H, J = 4.58 Hz, H-2'), 4.24 (t, 1H, J = 4.88 Hz, H-3'), 4.08-4.06 (m, 1H, H-4'), 4.02 (s, 3H, CH₃), 3.59 (dd, 1H, J = 5.19, 4.88, 10.68 Hz, H-5'), 3.50 (dd, 1H, J = 7.93, 7.63, 10.68 Hz, H-5'), 3.41 (s, 3H, CH₃);

[0184] HRMS ESI (-) $C_{12}H_{15}IN_5O_4^-$ [M-H]⁻의 계산치 m/z : 420.01741, 실측치: 420.01758.

[0185] 구아노신 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-모노포스포티올레이트 (도 2, 7번)

[0186] 100 mL의 DMF:H₂O 혼합물 (1:1, v/v) 내 5'-데옥시-5'-요오도구아노신 (도 2, 3번) (2.0 g, 5.1 mmol)의 현탁액에 티오인산3나트륨 (4.6 g, 25.5 mmol)을 가하였다. 반응 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 침전물을 여과하여 제거하고, 여과물을 감압 하 증발시켰다. 잔여물을 50 mL의 물에 용해시키고 과량의 티오인산3나트륨을 100 mL의 메탄올을 가하여 침전시켰다. 분리 후, 조 산물을 세파덱스 (Sephadex) 상에서 이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 산물을 동결건조하였다. 1.9 g를 생산하였다 (64 %). t_R (B) = 4.24분;

- [0187] ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 8.05 (s, 1H, H-8), 5.89 (d, 1H, $J = 5.73$ Hz, H-1'), 4.85 (dd, 1H, $J = 5.48$ Hz, H-2'), 4.51 (2d, 1H, $J = 4.98, 4.23$ Hz, H-3'), 4.33-4.39 (m, 1H, H-4'), 3.16-3.08 (m, 2H, Hz, H-5'); ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 15.42 (s, 1P);
- [0188] HRMS ESI (-) $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 378.02788, 실측치: 378.02828.
- [0189] **구아노신 5'-데옥시-5'-티오-7-메틸구아노신-5'-모노포스포티올레이트 (도 2, 8번)**
- [0190] 100 mL의 DMF 내 5'-데옥시-5'-요오도-7-메틸구아노신 (도 2, 6번) (2.0 g, 4.92 mmol)의 현탁액에 티오인산3나트륨 (4.43 g, 24.6 mmol)을 가하였다. 반응 혼합물을 48시간 동안 실온에서 교반하였다. 침전물을 제거하고 여과물을 감압 하 증발시켰다. 잔여물을 50 mL의 물에 용해시키고 과량의 티오인산3나트륨을 메탄올 (100 mL)을 가하여 침전시켰다. 분리 후, 조 산물을 세파덱스 (Sephadex) 상에서 이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 산물을 동결건조하였다. 1.55 g를 생산하였다 (53%). t_R (B) = 4.64분;
- [0191] ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 7.85 (s, 1H, H-8), 5.89 (d, 1H, $J = 3.74$ Hz, H-1'), 4.78-4.75 (m, 1H, H-2'), 4.43-4.39 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.09 (s, 3H, CH_3), 3.08-2.94 (m, 2H, Hz, H-5'); ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 14.45 (s, 1P);
- [0192] HRMS ESI (-) $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 392.04353, 실측치: 392.04378.
- [0193] **구아노신 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-모노포스포티올레이트 이미다졸리드 합성의 전반적인 과정 (도 2, 9번, 10번)**
- [0194] 적합한 시작 화합물 (뉴클레오타이드 TEA 염) (1 mmol)을 이미다졸 (10 mmol) 및 DMF 내 2,2'-디티오디피리딘 (3 mmol)에 혼합하였다 (뉴클레오타이드 농도가 0.15 M이 될 때까지). 다음으로, 트리에틸아민 (3 mmol) 및 트리페닐포스핀 (3 mmol)을 가하고, 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 건조 아세톤 (가해진 DMF의 10배 큰 부피) 내 NaClO_4 의 무수 용액 (각 포스페이트 모이티에 대해 4 mmol)을 가하여 반응 혼합물로부터 산물을 침전시켰다. 4°C로 식힌 후 침전물을 여과하고, 차가운 건조 아세톤으로 세척한 후 진공에서 P_{4010} 상에서 건조시켰다.
- [0195] **구아노신 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-모노포스포티올레이트 이미다졸리드 (도 2, 9번)**
- [0196] 구아노신 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-모노포스포티오에이트 이미다졸리드 (도 2, 9번) (352 mg, 0.75 mmol, 89 %)를 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-모노포스포티오에이트 (도 2, 7번) (500 mg, 0.86 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. t_R (B) = 8.27분;
- [0197] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 11.69 (m, 1P);
- [0198] HRMS ESI (-) $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 428.05476, 실측치 428.05452.
- [0199] **5'-데옥시-5'-티오구아노신-7-메틸구아노신-5'-모노포스포티올레이트 이미다졸리드 (도 2, 10번)**
- [0200] 5'-데옥시-5'-티오구아노신-7-메틸구아노신-5'-모노포스포티오에이트 이미다졸리드 (도 2, 10번) (321 mg, 0.69 mmol, 82%)를 5'-데옥시-5'-티오-7-메틸구아노신-5'-모노포스포티오에이트 (도 2, 8번) (500 mg, 0.84 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. t_R (B)=8.39분;
- [0201] HRMS ESI (-) $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 442.07041, 실측치 442.07070.
- [0202] **구아노신 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-디포스포티올레이트 (도 2, 11번)**
- [0203] 구아노신 5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-모노포스포티오에이트 이미다졸리드 (도 2, 9번) (100 mg, 0.22 mmol)를 무수 DMF (2 mL)에 용해시키고, 트리스(트리에틸암모늄) 포스페이트 (100 mg, 0.26 mmol)를 가한 후,

ZnCl₂ (235.84 mg, 1.76 mmol)를 가하였다. 반응 과정은 RP-HPLC로 조절하였다. 반응 혼합물을 실온에서 시작 물질이 사라질 때까지 교반하였다. 이후, EDTA 수용액 (513.92 mg, 1.76 mmol, 50 mL)을 가하여 반응을 중단시키고 1M NaHCO₃으로 중화하였다. 조 산물을 DEAE-Sephadex 상에서 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고 TEA 염으로 분리하였다. 108.5 mg을 생산하였다 (0.14 mmol, 65 %);

[0204] HRMS ESI (-) C₁₀H₁₄N₅O₁₀P₂S⁻ [M-H]⁻의 계산치 m/z : 457.99421, 실측치 457.99481.

[0205] 5'-데옥시-5'-티오구아노신-7-메틸구아노신-디포스페이트 (도 2, 12번)

[0206] 5'-데옥시-5'-티오구아노신-7-메틸구아노신-5'-모노포스포로티오에이트 이미다졸리드 (도 2, 10번) (100 mg, 0.21 mmol)를 무수 DMF (2 mL)에 용해시키고, 트리스(트리에틸암모늄)-포스페이트 (100 mg, 0.26 mmol)를 가한 후, ZnCl₂ (224.54 mg, 1.68 mmol)를 가하였다. 반응 과정은 RP-HPLC로 조절하였다. 반응 혼합물을 실온에서 시작 물질이 사라질 때까지 교반하였다. 이후, EDTA 수용액 (490.56 mg, 1.68 mmol, 50 mL)을 가하여 반응을 중단시키고 1M NaHCO₃으로 중화하였다. 조 산물을 DEAE-Sephadex 상에서 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고 TEA 염으로 분리하였다. 91 mg을 생산하였다 (0.12 mmol, 54 %), t_R (B) = 5.07분,

[0207] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ ppm 8.11 (s, 1H, H-8 천천히 교환가능함), 5.97 (d, 1H, J = 3.91 Hz, H-1'), 4.50, 4.49 (2d, 1H, J = 5.09 Hz, H-2'), 4.41 (q, 1H, J = 5.48, 5.09 Hz, H-3'), 4.07 (s, 3H, CH₃), 3.34-3.13 (m, 3H, H-4', H-5'); ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ ppm 6.71 (d, 1P, J = 30.81 Hz), 8.21 (d, 1P, J = 30.81 Hz);

[0208] HRMS ESI (-) C₁₁H₁₆N₅O₁₀P₂S⁻ [M-H]⁻의 계산치 m/z : 472.00986, 실측치 472.00967.

[0209] 구아노신 5'-데옥시-5'-티오-7-메틸구아노신-2'-디포스포로티올레이트 (도 2, 13번)

[0210] 5'-데옥시-5'-티오구아노신-7-메틸구아노신-5'-모노포스포로티오에이트 이미다졸리드 (도 2, 10번) (100 mg, 0.21 mmol)를 무수 DMF (2 mL)에 용해시키고, 티오인산나트륨 (47 mg, 0.26 mmol)을 가한 후, ZnCl₂ (224.54 mg, 1.68 mmol)를 가하였다. 반응 과정은 RP-HPLC로 조절하였다. 반응 혼합물을 실온에서 시작 물질이 사라질 때까지 교반하였다. 이후, EDTA 수용액 (490.56 mg, 1.68 mmol, 50 mL)을 가하여 반응을 중단시키고 1M NaHCO₃으로 중화하였다. 조 산물을 DEAE-Sephadex 상에서 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고 분리된 TEA 염을 즉시 커플링 반응에 사용하였다. 110 mg을 생산하였다 (0.13 mmol, 64 %);

[0211] HRMS ESI (-) C₁₁H₁₆N₅O₉P₂S₂⁻ [M-H]⁻의 계산치 m/z : 487.98702, 실측치 487.98724.

[0212] S-알킬화를 통한 5'-S-캡 유사체의 합성

[0213] 전반적인 절차

[0214] 뉴클레오시드 말단 티오포스페이트 TEA 염 (1 당량)을 DMSO (ca. 0.1 - 0.2 M 농도까지)에 현탁하였다. 이후, DBU (1,8-디아자비스클로(5.4.0)운데-7-엔) (1 당량) 및 5'-요오도구아노신 유도체 (1 equiv.)를 가하였다. 반응 과정을 RP HPLC로 모니터링하였다. 말단 티오포스페이트로부터 신호가 없으면 1% 아세트산을 pH7까지 가하여 반응을 중단하고, 반응 혼합물을 물로 희석한 후 에틸아세테이트로 세척하였다. 산물을 DEAE-Sephadex 상에서 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고 트리에틸암모늄 염으로 분리하였다. 산물은 반-분취 RP-HPLC로 정제하였다.

[0215] P1-(구아노신-5'-일)-P2-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 디포스페이트 - GppSG (도 3, 19번)

[0216] GppSG (207 mOD, 0.009 mmol, 24%)를 GDPβS (도 3, 14번), (506 mOD, 0.042 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 6.9분;

[0217] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ ppm 7.96 (s, 1 H), 7.81 (s, 1 H), 5.77 (d, 1 H, J = 5.48 Hz), 5.70 (d, 1 H, J = 5.87 Hz), 4.80-4.70 (m, 2H, 물 신호와 중첩됨), 4.64 (t, 1 H, J = 5.48 Hz), 4.43 (t, 1 H, t, J = 3.91

Hz), 4.37 (t, 1 H, $J = 3.91$ Hz), 4.30-4.15 (m, 4H), 3.30-3.13 (m, 2 H);

[0218] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 7.63 (d, 1P, $J = 32.28, 12.5$ Hz), -12.02 (d, 1P, $J = 30.81$ Hz);

[0219] HRMS ESI (-) $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 723.07531, 실측치 723.07546.

[0220] *P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P2-(5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 디포스페이트 - m⁷GppSG (도 3, 21번)*

[0221] m⁷GppSG (1028 mOD, 0.045 mmol, 9 %)를 m⁷GDPβS (도 3, 17번, 5830 mOD, 0.51 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 5.9분;

[0222] ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 8.98 (s, 1 H, H-8 m⁷G), 7.87 (s, 1 H, H-8 G), 5.88 (d, 1 H, $J = 2.0$ Hz, H-1' m⁷G), 5.73 (d, 1 H, $J = 5.7$ Hz, H-1' G), 4.69 (t, 1 H, $J = 5.5$ Hz, H-2' G), 4.51 (bs., 1 H, H-2' m⁷G), 4.32 - 4.44 (m, 5 H, H-3' G, H-3' m⁷G, H-4' G, H-4' m⁷G, H-5' m⁷G), 4.24 (dd, 1 H, $J=11.3, 5.4$ Hz, H5" m⁷G), 4.04 (s, 3 H, CH_3), 3.24 - 3.41 (m, 2 H, H5', 5" G);

[0223] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 7.38 (dt, 1P, $J = 29.0, 11.5$ Hz), -12.00 (d, 1P, $J = 32.23$ Hz);

[0224] HRMS ESI (-) $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 737.09096, 실측치 737.09052.

[0225] *P1-(7-메틸-5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P2-구아노신-5'-일 디포스페이트 - m⁷GSppG (도 3, 23번)*

[0226] m⁷GSppG (1660 mOD, 0.073 mmol, 35%)를 GDPβS (도 3, 14번; 2532 mOD, 0.21 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 7.75분;

[0227] ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 7.99 (s, 1 H, H-8 G), 5.83 (d, 1 H, $J = 4.2$ Hz, H-1' m⁷G), 5.80 (d, 1 H, $J = 6.0$ Hz, H-1' G), 4.65 - 4.70 (2 H, m, H-2' G, H-2' m⁷G), 4.45 (t, 1 H, $J = 4.1$ Hz, H-3' G), 4.19 - 4.41 (5 H, m, H-3' m⁷G, H-4' G, H-4' m⁷G, H5', 5" G), 4.05 (s, 3 H, CH_3), 3.35 - 3.43 (m, 2 H, H5', 5" m⁷G);

[0228] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 7.32 (dt, 1P, $J = 29.0, 11.0$ Hz), -11.84 (d, 1P, $J = 29.00$ Hz);

[0229] HRMS ESI (-) $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 737.09096, 실측치 737.09146.

[0230] *P1-(구아노신-5'-일)-P3-(5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트 - GpppSG (도 3, 20번)*

[0231] GpppSG (1149 mOD, 0.051 mmol, 51 %)를 GTP $_{\gamma}$ S (도 3, 15번; 1233 mOD, 0.10 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 5.50분;

[0232] ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 8.02 (s, 1 H, H-8 G), 7.90 (s, 1 H, H-8 G), 5.82 (d, 1 H, $J = 6.0$ Hz, H-1' G), 5.78 (d, 1 H, $J = 6.2$ Hz, H-1' G), 4.84 (t, 1 H, $J = 5.7$ Hz, H-2' G), 4.74 (t, 1 H, $J = 5.7$ Hz, H-2' G), 4.52 (t, 1 H, $J = 4.2$ Hz, H-3' G), 4.47 (t, 1 H, $J = 4.3$ Hz, H-3' G), 4.30 - 4.38 (m, 2 H, H-4', 5' G), 4.27 (m, 2 H, H-4', 5" G), 3.25 - 3.35 (m, 2 H, H5', 5" G);

[0233] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 8.21 (dt, 1P, $J = 27.00, 13.3$ Hz), -11.34 (d, 1P, $J = 19.30$ Hz), --23.78 (dd, 1P, $J = 27.00, 19.30$ Hz);

[0234] HRMS ESI (-) $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z : 803.04164, 실측치 803.04135.

- [0235] *P1-(7-메틸-5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트 - m⁷GSpppG (도 3, 24번)*
- [0236] m⁷GSpppG (729 mOD, 0.032 mmol, 13 %)를 GTP_vS (도 3, 15번; 3000 mOD, 0.25 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 5.36분;
- [0237] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ ppm 8.92 (s, 1 H, H-8 m⁷G), 7.96 (s, 1 H, H-8 G), 5.78 (d, 1 H, J = 4.30 Hz, H-1' m⁷G), 5.74 (d, 1 H, J = 5.87 Hz, H-1' G), 4.63 (m, 2 H, H-2' G, H2' m⁷G), 4.48 (dd, 1 H, J = 4.43, 3.52 Hz, H-3' m⁷G), 4.36 - 4.26 (m, 4 H, H-3' G, H-4' G, H-4' m⁷G, H-5' G), 4.24 - 4.19 (m, 1H, H-5' G), 4.00 (s, 3 H, CH₃), 3.33 - 3.24 (2 H, m, H-5', 5" m⁷G);
- [0238] ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ ppm 7.57 (d, 1P, J = 27.88 Hz), -11.68 (d, 1P, J = 20.54 Hz), -24.00 (dd, 1P, J = 29.35, 22.01 Hz);
- [0239] HRMS ESI (-) C₂₁H₂₈N₁₀O₁₇P₃S⁻ [M-H]⁻의 계산치 m/z 817.05729, 실측치 817.05494.
- [0240] *P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트 - m⁷GpppSG (도 3, 22번)*
- [0241] m⁷GpppSG (1582 mOD, 0.07 mmol, 32 %)를 m⁷GTP_vS (도 3, 18번; 2616 mOD, 0.23 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 6.06분;
- [0242] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ ppm 9.02 (s, 1 H, H-8 m⁷G), 7.87 (s, 1 H, H-8 G), 5.84 (d, 1 H, J = 3.52 Hz, H1' m⁷G), 5.70 (d, 1 H, J = 6.65 Hz, H-1' G), 4.80 - 4.67 (m, 1 H, H-2' G), 4.52 (t, 1 H, J = 4.30 Hz, H-2' m⁷G), 4.41 (dd, 2 H, J=4.70, 4.30 Hz, H3' G, H3' m⁷G), 4.38 - 4.30 (m, 2 H, H-4' G, H-4' m⁷G), 4.36-4.31 m, 2H, H5' m⁷G), 4.02 (s, 3 H, CH₃), 3.30-3.20 (m, 2 H, J = 12.6, 6.3 Hz, H5', 5" G);
- [0243] ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ ppm 7.66 (d, 1P, J = 29.35 Hz), -11.73 (d, 1P, J = 22.01 Hz), -23.95 (dd, 1P, J = 22.01, 27.88 Hz);
- [0244] HRMS ESI (-) C₂₁H₂₈N₁₀O₁₇P₃S⁻ [M-H]⁻의 계산치 m/z: 817.05729, 실측치 817.05748.
- [0245] *P1-(2'-O-메틸-7-메틸-5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트 - m₂^{7,2'-0}GSpppG (도 3, 26번)*
- [0246] m₂^{7,2'-0}GSpppG (140 mOD, 0.006 mmol, 5%)를 GTP_vS (도 3, 15번; 1500 mOD, 0.12 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 7.89분;
- [0247] ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ ppm 7.93 (s, 1H, G), 5.81 (d, 1H, J = 3.91 Hz, H-1' m⁷G), 5.72 (d, 1H, J = 6.26 Hz, H-1' G), 4.65 (t, 1H, J = 5.48 Hz, H-2' m⁷G), 4.43-4.40 (m, 1H, H-2', G, H-3' m⁷G), 4.32-4.18 (m, 6H, H-3' G, H-4', H-5', G, m⁷G), 4.01 (s, 3H, CH₃), 3.52 (s, 3H, OCH₃);
- [0248] ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ ppm 7.35 (d, 1P, J = 26.41 Hz), -11.68 (d, 1P, J = 19.07 Hz), -24.02, -24.18 (2d, 1P, J = 26.41, 19.07 Hz);
- [0249] HRMS ESI (-) C₂₂H₃₀N₁₀O₁₇P₃S⁻ [M-H]⁻의 계산치 m/z 831.07294, 실측치 831.07477.

- [0250] *P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일-2,3-메틸레노트리포스페이트* - $m^7GSppCH_2pG$ (도 3, 25번)
- [0251] $m^7GSppCH_2pG$ (353 mOD, 0.016 mmol, 27%)를 $m^7GpCH_2pp\gamma S$ (도 3, 16번; 717 mOD, 0.06 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 6.36분;
- [0252] 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 9.03 (s, 1H, H-8, m^7G), 8.17 (s, 1H, G), 5.83 (d, 1H, J = 4.30 Hz, H-1' m^7G), 5.78 (d, 1H, J = 4.48 Hz, H-1' G), 4.70-4.66 (m, 2H, H-2' m^7G , H-2' G), 4.46 (d, 1H, J = 3.91, 5.09 Hz, H-3' G), 4.38-4.33 (m, 2H, H-3' m^7G , H-4' G), 4.32-4.28 (m, 1H, H-4' m^7G), 4.26-4.20 (m, 1H, H-5' G), 4.19-4.13 (m, 1H, H-5' G), 4.02 (s, 3H, CH_3), 3.34-3.22 (m, 4H, H-5' G, m^7G); ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm
- [0253] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 17.03 (d, 1P, J = 10.27 Hz), 7.47-6.97 (m, 2P);
- [0254] HRMS ESI (-) $C_{22}H_{30}N_{10}O_{16}P_3S^-$ [M-H]⁻의 계산치 m/z 815.07803, 실측치 815.07923.
- [0255] 이미다졸리드를 통한 5'-S- 캡 유사체의 합성
- [0256] 전반적인 절차
- [0257] 5'-S-GMP-Im, (도 2, 9번) (나트륨 염, 50 mg, 0.11 mmol) 및 적합한 디포스페이트 (1 mmol): $m_2^{7,2'-0}GDP$ (도 4, 28번), m^7GpCH_2p (도 4, 27번), $m^7-5'S GDP$ (도 2, 12번), $m^7GSpp\beta S$ (도 2, 13번) 또는 $m^7GDP\beta S$ (도 3, 17번)를 무수 DMF (1.0 mL)에 현탁시키고 무수 $ZnCl_2$ (95 mg, 10 당량, 0.7 mmol)를 가하였다. 반응 혼합물을 시약이 용해될 때까지 세차게 흔들었다. 반응 과정은 RP-HPLC로 모니터링하였다. 완료 후 (24시간), 적절한 양의 EDTA 용액 (Na_2EDTA , 237 mg, 0.7 mmol)을 가하고, 고체 $NaHCO_3$ 으로 pH를 6으로 조정한 후 조 산물을 DEAE-Sephadex에 의한 이온 교환 크로마토그래피로 정제하고, TEA 염으로 분리하였다 (또는 직접 분취 HPLC로 정제하였다). 이후 산물을 RP-HPLC로 추가 정제하였다.
- [0258] *P1-(2'-O-메틸-7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트* - $m_2^{7,2'-0}GpppSG$ (도 4, 38번)
- [0259] $m_2^{7,2'-0}GpppSG$ (122 mOD, 0.005 mmol, 6%)를 $m_2^{7,2'-0}GDP$ (도 4, 28번; 912 mOD, 0.08 mmol)로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A)=6.29분;
- [0260] 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 9.00 (s, 1H, H-8 m^7G), 7.88 (s, 1H, G), 5.87 (d, 1H, J = 2.74 Hz, H-1' m^7G), 5.69 (d, 1H, J = 6.65 Hz, H-1' G), 4.64 (t, 1H, J = 5.48 Hz, H-2' m^7G), 4.48 (dd, 1H, J = 4.48 Hz, H-2' G), 4.43-4.38 (m, 2H, H-3' G, H-3' m^7G), 4.36-4.32 (m, 1H, H-4' G), 4.30-4.26 (m, 1H, H-4' m^7G), 4.25-4.16 (m, 2H, H-5' G), 4.03 (s, 3H, CH_3), 3.53 (s, 3H, OCH_3), 3.30-3.22 (m, 2H, H-5' m^7G);
- [0261] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 7.68(d, 1P, J = 27.88 Hz), -11.68 (d, 1P, J = 20.54 Hz), -23.78, -23.94 (2d, 1P, J = 27.88, 19.07Hz);
- [0262] HRMS ESI (-) $C_{22}H_{30}N_{10}O_{17}P_3S^-$ [M-H]⁻의 계산치 m/z 831.07294, 실측치 831.07350.
- [0263] *P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 1,2-메틸렌트리포스페이트* - m^7GpCH_2ppSG (도

4, 37번)

[0264] $m^7\text{GpCH}_2\text{ppSG}$ (1002 mOD, 0.044 mmol, 25 %)를 $m^7\text{GpCH}_2\text{p}$ (도 4, 27번; 2052 mOD, 0.18 mmol) 및 5'-S-GMP-Im (122 mg, 0.27 mmol)으로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 6.26분,

[0265] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm 9.31 (s, 1H, H-8, $m^7\text{G}$), 8.02 (s, 1H, G), 5.90 (d, 1H, J = 3.13 Hz, H-1' $m^7\text{G}$), 5.75 (d, 1H, J = 5.87 Hz, H-1' G), 4.80-4.70 (m, 2H, 용매 신호와 중첩됨, H-2' $m^7\text{G}$, H-2', G), 4.58 (dd, 1H, J = 3.91, 3.48 Hz, H-3', G), 4.48 (t, 1H, H-3', $m^7\text{G}$), 4.40 (dd, 1H, J = 3.91, 4.06, H-4', G), 4.37-4.29 (m, 3H, H-4', $m^7\text{G}$, H-5', G), 4.19-4.13 (m, 2H, H-5', G), 4.03 (s, 3H, CH_3), 3.30-3.19 (m, 2H, H-5', G, $m^7\text{G}$), 2.40 (t, 2H, J = 20.35 Hz, CH_2);

[0266] $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ ppm 17.11 (d, 1P, J = 8.80 Hz), 7.64-6.76 (m, 2P);

[0267] HRMS ESI (-) $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z 815.07803, 실측치 815.07906.

[0268] P1-(7-메틸-5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트 - $m^7\text{GSpppSG}$ (도 4, 32번)

[0269] $m^7\text{GSpppSG}$ (768 mOD, 32 mg, 0.028 mmol, 40 %)를 m^7 -5'S-GDP (57 mg, 0.07 mmol) 및 5'S-GMP-Im (50 mg, 0.11 mmol)으로부터 시작하여 일반적인 절차에 따라 수득하였다. RP-HPLC: t_R (A) = 6.80분;

[0270] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm 8.38 (s, 1H, H-8 $m^7\text{G}$ 천천히 교환가능함), 7.84 (s, 1H, G), 5.78 (d, 1H, J = 4.70 Hz, H-1' $m^7\text{G}$), 5.69 (d, 1H, J = 6.65 Hz, H-1' G), 4.64 (t, 1H, J = 4.70 Hz, H-2' $m^7\text{G}$), 4.40, 4.39 (2d, 1H, J = 2.74, 3.52, 4.40 Hz, H-3', G), 4.36-4.29 (m, 3H, H-4' G, H-5', G), 3.99 (s, 3H, CH_3), 4.37-4.28 (m, 3H, H-4', H-5', $m^7\text{G}$);

[0271] $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ ppm 7.74 (t, 2P, J = 27.88), -24.61 (t, 1P, J = 29.35 Hz);

[0272] HRMS ESI (-) $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2^-$ [M-H] $^-$ 의 계산치 m/z 833.03445, 실측치 833.03550.

[0273] P1-(7-메틸-5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2-티오투리포스페이트 - $m^7\text{GSpp}_3\text{pG D1/D2}$ (도 4, 각각 30번, 31번)

[0274] $m^7\text{GSpp}_3\text{pG}$ (1080 mOD, 45 mg, 0.039 mmol, 56 %)를 $m^7\text{GSpp}_3\text{S}$ (56 mg, 0.07 mmol) 및 5'S-GMP-Im (50 mg, 0.11 mmol)으로부터 일반적인 절차에 따라 부분입체이성질체 D1/D2의 혼합물로서 수득하였다. 부분입체이성질체를 RP-HPLC를 이용하여 분리하고 암모늄 염으로 분리하였다. D1 (도 4, 30번): (438 mOD, 18 mg, 0.016 mmol, 23%) RP-HPLC: t_R (A) = 6.56분;

[0275] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm 8.98 (s, 1H, H-8, $m^7\text{G}$), 8.08 (s, 1H, G), 5.82 (d, 1H, J = 4.27 Hz, H-1' $m^7\text{G}$), 5.77 (d, 1H, J = 5.80 Hz, H-1' G), 4.67-4.65 (m, 2H, H-2' $m^7\text{G}$, H-2', G), 4.49-4.47 (m, 1H, H-3', G), 4.39-4.35 (m, 1H, H-3', $m^7\text{G}$, H-4', G), 4.33-4.23 (m, 3H, H-4', $m^7\text{G}$, H-5', G), 4.02 (s, 3H, CH_3), 3.38-3.25 (m, 2H, H-5', $m^7\text{G}$);

[0276] $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ ppm 29.18 (dd, 1P, J = 34.83, 27.37 Hz), 6.96 (dt, 1P, J = 34.83, 12.44 Hz), -12.37 (d, 1P, J = 27.37 Hz);

- [0277] HRMS ESI (-) $C_{21}H_{28}N_{10}O_{16}P_3S_2^-$ $[M-H]^-$ 의 계산치 m/z : 833.03445, 실측치 833.03549;
- [0278] **D2 (도 4, 31번)**: m^7GSpp_pSG D2 (380 mOD, 16 mg, 0.014 mmol, 20%) RP-HPLC: t_R (A) = 6.71분;
- [0279] 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 8.98 (s, 1H, H-8, m^7G), 8.14 (s, 1H, G), 5.82 (d, 1H, J = 4.27 Hz, H-1' m^7G), 5.77 (d, 1H, J = 5.49 Hz, H-1' G), 4.69-4.65 (m, 2H, H-2' m^7G , H-2', G), 4.49-4.45 (m, 1H, H-3', G), 4.40-4.35 (m, 1H, H-3', m^7G , H-4', G), 4.34-4.21 (m, 3H, H-4', m^7G , H-5', G), 4.03 (s, 3H, CH_3), 3.39-3.24 (m, 2H, H-5', m^7G);
- [0280] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 29.44-28.67 (m, 1P), 7.17-6.54 (m, 1P), -12.09-(-12.72) (m, 1P);
- [0281] HRMS ESI (-) $C_{21}H_{28}N_{10}O_{16}P_3S_2^-$ $[M-H]^-$ 의 계산치 m/z : 833.03445, 실측치 833.03606.
- [0282] ***P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오텐리포스페이트 - m^7GSpp_pSG D1/D2 (도 4, 각각 33번, 34번)***
- [0283] **m^7GSpp_pSG** (942 mOD, 39 mg, 0.003 mmol, 48 %)를 $m^7GSpp_\beta S$ (56 mg, 0.07 mmol) 및 5'S-GMP-Im (50 mg, 0.11 mmol)으로부터 일반적인 절차에 따라 부분입체이성질체 D1/D2의 혼합물로서 수득하였다. 부분입체이성질체를 RP-HPLC를 이용하여 분리하고 암모늄 염으로 분리하였다. **D1 (도 4, 33번)** (510 mOD, 21 mg, 0.018 mmol, 26 %) RP-HPLC: t_R (A) = 7.53분;
- [0284] 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 9.00 (s, 1H, H-8, m^7G), 7.99 (s, 1H, G), 5.83 (d, 1H, J = 4.27 Hz, H-1' m^7G), 5.75 (d, 1H, J = 6.10 Hz, H-1' G), 4.79-4.68 (m, 2H, 용매 신호와 중첩됨, H-2' m^7G , H-2', G), 4.44 (dd, 1H, J = 4.58 Hz, H-3', G), 4.41-4.33 (m, 3H, H-3', m^7G , H-4', G, m^7G), 4.03 (s, 3H, CH_3), 3.39-3.26 (m, 4H, H-5', G, m^7G);
- [0285] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 28.25 (t, 1P, J = 34.83 Hz), 7.31-6.74 (m, 2P);
- [0286] HRMS ESI (-) $C_{21}H_{28}N_{10}O_{15}P_3S_3^-$ $[M-H]^-$ 의 계산치 m/z : 849.01161, 실측치 849.01213.
- [0287] **D2 (도 4, 34번)** (274 mOD, 11 mg, 0.0098 mmol, 14 %), RP-HPLC: t_R (A) = 7.62분;
- [0288] 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ppm 8.99 (s, 1H, H-8, m^7G), 8.04 (s, 1H, G), 5.83 (d, 1H, J = 4.58 Hz, H-1' m^7G), 5.75 (d, 1H, J = 6.10 Hz, H-1' G), 4.78-4.66 (m, 2H, 용매 신호와 중첩됨, H-2' m^7G , H-2', G), 4.46-4.42 (m, 1H, H-3', G), 4.41-4.34 (m, 3H, H-3', m^7G , H-4', G, m^7G), 4.04 (s, 3H, CH_3), 3.39-3.24 (m, 4H, H-5', G, m^7G);
- [0289] ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ ppm 28.29 (t, 1P, J = 34.83 Hz), 7.32-6.68 (m, 2P);
- [0290] HRMS ESI (-) $C_{21}H_{28}N_{10}O_{15}P_3S_3^-$ $[M-H]^-$ 의 계산치 m/z : 849.01161, 실측치 849.01217.
- [0291] ***P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-티오텐리포스페이트 - m^7Gpp_pSG D1/D2 (도 4, 각각 35번, 36번)***
- [0292] **$m^7GppspSG$** (1941 mOD, 0.086 mmol, 28 %)를 $m^7GDP_\beta S$ (3492 mOD, 0.31 mmol) 및 5'S-GMP-Im (5550 mOD, 0.46

mmol)으로부터 일반적인 절차에 따라 부분입체이성질체 D1/D2의 혼합물로서 수득하였다. 부분입체이성질체를 RP-HPLC를 이용하여 분리하고 암모늄 염으로 분리하였다. **D1 (도 4, 35번)**: (888 mOD, 0.039 mmol, 13%) RP-HPLC: t_R (A) = 7.12분;

[0293] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm 9.07 (s, 1H, H-8, $m^7\text{G}$), 7.95 (s, 1H, G), 5.88 (d, 1H, $J = 3.52$ Hz, H-1' $m^7\text{G}$), 5.74 (d, 1H, $J = 6.26$ Hz, H-1' G), 4.80-4.70 (m, 2H, H-2' $m^7\text{G}$, H-2', D_2O 신호와 중첩되는 G), 4.56 (dd, 1H, $J = 4.70, 3.52$ Hz, H-3', G), 4.47-4.40 (m, 2H, H-3', $m^7\text{G}$, H-4', G), 4.39-4.33 (m, 3H, H-4', $m^7\text{G}$, H-5', G), 4.03 (s, 3H, CH_3), 3.35-3.20 (m, 2H, H-5', $m^7\text{G}$);

[0294] $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ ppm 29.00 (dd, 1P, $J = 33.75, 26.41\text{Hz}$), 6.98 (d, 1P, $J = 33.75, \text{Hz}$), -12.56 (d, 1P, $J = 24.94$ Hz);

[0295] HRMS ESI (-) $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 의 계산치 m/z : 833.03445, 실측치 833.03514.;

[0296] **D2 (도 4, 36번)**: $m^7\text{GppspG}$ D2 (1053 mOD, 0.046 mmol, 15%) RP-HPLC: t_R (A) = 7.42분;

[0297] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ ppm 9.04 (s, 1H, H-8, $m^7\text{G}$), 7.95 (s, 1H, G), 5.85 (d, 1H, $J = 3.52$ Hz, H-1' $m^7\text{G}$), 5.73 (d, 1H, $J = 6.26$ Hz, H-1' G), 4.80-4.70 (m, 2H, H-2' $m^7\text{G}$, H-2', D_2O 신호와 중첩되는 G), 4.54 (dd, 1H, $J = 4.30, 3.91$ Hz, H-3', G), 4.45 (t, 1H, $J = 5.09$ Hz, H-3', $m^7\text{G}$), 4.43-4.40 (m, 1H, H-4', G), 4.39-4.32 (m, 3H, H-4', $m^7\text{G}$, H-5', G), 4.03 (s, 3H, CH_3), 3.37-3.21 (m, 2H, H-5', $m^7\text{G}$);

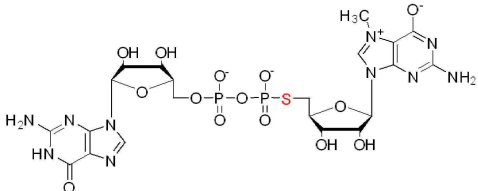
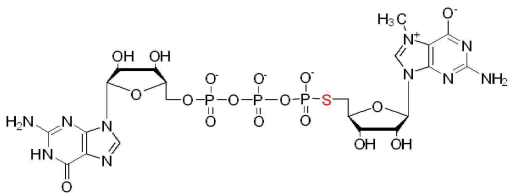
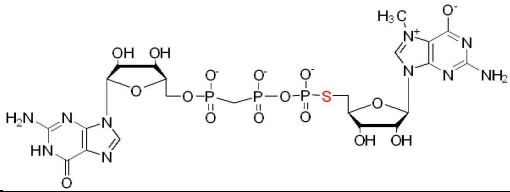
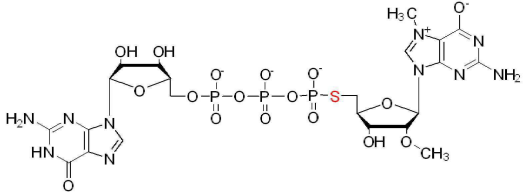
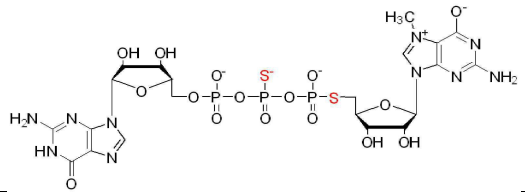
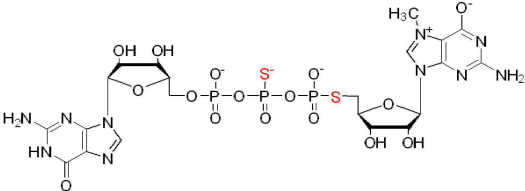
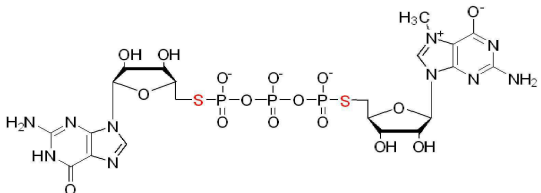
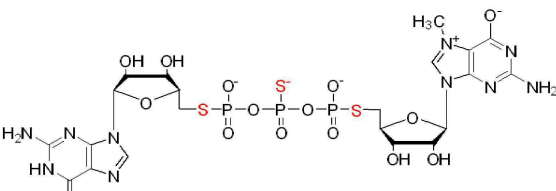
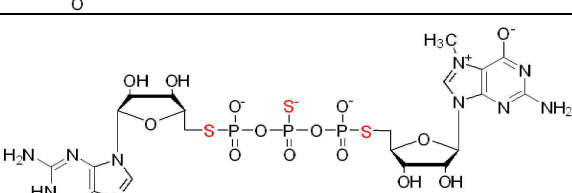
[0298] $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) δ ppm 28.99 (dd, 1P, $J = 33.75, 26.41, 24.94\text{Hz}$), 6.94 (d, 1P, $J = 35.21, \text{Hz}$), -12.48 (d, 1P, $J = 24.94$ Hz);

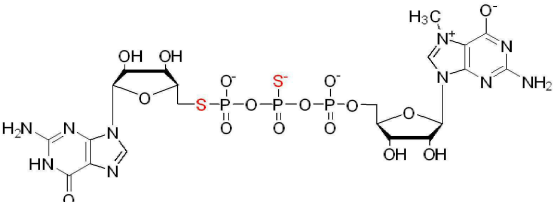
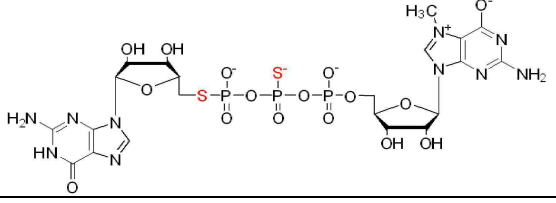
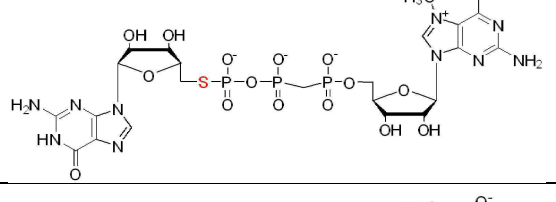
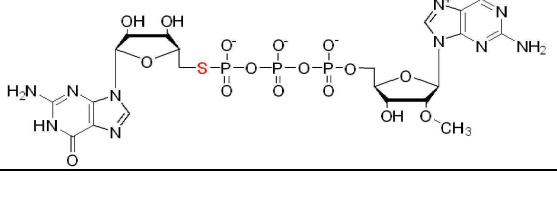
[0299] HRMS ESI (-) $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 의 계산치 m/z : 833.03445, 실측치 833.03494.

표 4

[0300] 합성되고 연구된 새로운 캡 유사체를 나타내었다.

번호	화합물	구조식	화학명
12	$m^7\text{GSpp}$		5'-메톡시-5'-티오구아노신-5'-7-메틸로구아노신 디포스페이트
21	$m^7\text{GppSG}$		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P2-(5'-메톡시-5'-티오구아노신-5'-일) 디포스페이트
22	$m^7\text{GpppSG}$		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-메톡시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트

23	m^7 GSppG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P2-구아노신-5'-일 디포스페이트
24	m^7 GSpppG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트
25	m^7 GSppCH ₂ pG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2,3-메틸펜트리포스페이트
26	$m^{7,2'0}$ GSpppG		P1-(2'-O-메틸-7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 트리포스페이트
30	m^7 GSpp _s pG D1		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2- 트리포스페이트 D1
31	m^7 GSpp _s pG D2		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 2- 트리포스페이트 D2
32	m^7 GSpppSG		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트
33	m^7 GSpp _s pSG D1		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2- 트리포스페이트 D1
34	m^7 GSpp _s pSG D2		P1-(7-메틸-5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-(5'-데옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2- 트리포스페이트 D2

35	$m^7\text{Gpp}_s\text{pSG}$ D1		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-트리포스페이트 D1
36	$m^7\text{Gpp}_s\text{pSG}$ D2		P1-(7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 2-트리포스페이트 D2
37	$m^7\text{GpCH}_2\text{ppSG}$		P1-(7-메틸-5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일)-P3-구아노신-5'-일 1,2-메틸렌트리포스페이트
38	$m^{7,2'0}\text{GpppSG}$		P1-(2'-O-메틸-7-메틸-구아노신-5'-일)-P3-(5'-테옥시-5'-티오구아노신-5'-일) 트리포스페이트

[0301] 실시예 2. 새로운 캡 유사체 특성

[0302] 시험 1. DcpS 효소에 의한 분해에 대한 유사체의 민감성 연구.

[0303] 시험의 목적은 새로운 5'-티오포스페이트 캡 유사체가 인간 DcpS 효소 (hDcpS)에 의해 가수분해되는지 여부를 확인하는 것이다. DcpS 효소를 코딩하는 재조합 인간 단백질은 이전에 기술된 것과 같이 발현되었다 (Kowalska, Lewdorowicz et al. 2008). 새로운 유사체의 hDcpS 가수분해에 대한 민감성은 200 mM KCl 및 0.5 mM EDTA를 포함하는 50 mM Tris-HCl 버퍼에서 시험되었다. 반응 혼합물은 시험된 캡 유사체 (20 μM) 및 400 μl 의 버퍼 내 hDcpS 효소 (100 nM)를 포함한다. 적절한 간격으로 100 μl 의 시료를 반응 혼합물로부터 수집하였다. 시료는 98 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2.5분 동안 배양된 후, 0 $^{\circ}\text{C}$ 로 식히고 일반적인 정보에 기술된 조건 하에서 RP-HPLC로 분석하였다. 시험에서, 또한 상업적으로 입수가 가능한 DcpS의 저해제로, 화합물 RG3039 (000번) (<https://www.mda.org/quest/fda-approves-phase-1-clinical-trial-rg3039-sma>), GppSG (19번), GpppSG (20번), 및 대조군으로서 $m^7\text{GpppG}$ (0번) 및 $m^7\text{Gpp}$ (00번)를 시험하였다. 얻은 예시적인 결과는 도 5 및 표 5에 나타난다.

[0304] 시험 2. 선택된 저해제의 IC_{50} 결정

[0305] 시험의 목적은 특정 저해제가 특정 조건에서 DcpS 활성을 최대 값의 50%까지 저해하는 농도를 결정하는 것이었다. 본 시험 및 시험 1에서의 버퍼는 동일하다. 10개의 혼합물 반응을 동시에 준비하였으며 각각은 $m^7\text{GMPF}$ (60 μM), hDcpS 효소 (50 nM) 및 200 μl 의 버퍼 내 0-50 μM 농도 범위의 시험 화합물을 포함하였다. 적절한 시간 경과 후, 30%의 기질이 저해제 없이 산물로 변환될 때, 100 μl 의 ACN과 혼합하여 반응을 중지시켰다. 시료 중 25 μl 를 분석을 위해 취하고, DMSO 내 농도 2.5 μM 의 90 μl 의 TBDS-플루오레세인 용액을 혼합하여 60분간 인큐베이션하였다. 다음으로, 100 μl 의 200 mM HEPES 버퍼 pH = 7.0를 시료에 가하고 형광을 전반적인 정보에 기술된 것과 같이 측정하였다. 그 결과에 기초하여, 저해제 농도 의존성 vs. 형광을 그래프화하고 이론적인 곡선을 데이터에 맞추어 IC_{50} 값을 결정하였다. 얻은 결과를 표 5 및 도 5에 나타내었다.

[0306]

IC₅₀ 값 및 선택된 화합물에 대한 DcpS 효소에 의한 분해의 민감성.

번호	화합물	DcpS 민감성	IC ₅₀ [μM]
0	⁷ _m GpppG	가수분해될 수 있음	nd
00	⁷ _m Gpp	저항성/저해제	4.30 ± 0.78
000	RG3039	저항성/저해제	0.041 ± 0.012
12	⁷ _m GSpp	저항성/저해제	1.93 ± 0.38
19	GppSG	가수분해될 수 있음	100 초과
20	GpppSG	가수분해될 수 있음	100 초과
21	⁷ _m GppSG	가수분해될 수 있음	nd
22	⁷ _m GpppSG	가수분해될 수 있음	nd
23	⁷ _m GSppG	저항성/저해제	2.81 ± 0.51
24	⁷ _m GSpppG	저항성/저해제	0.84 ± 0.07
25	⁷ _m GSppCH ₂ pG	저항성/저해제	6.25 ± 1.22
26	^{7,2'0} _m GSpppG	저항성/저해제	12.57 ± 5.22
30	⁷ _m GSpp _s pG D1	저항성/저해제	0.23 ± 0.04
31	⁷ _m GSpp _s pG D2	저항성/저해제	0.17 ± 0.02
32	⁷ _m GSpppSG	저항성/저해제	0.33 ± 0.09
33	⁷ _m GSpp _s pSG D1	저항성/저해제	0.26 ± 0.04
34	⁷ _m GSpp _s pSG D2	저항성/저해제	0.051 ± 0.008
35	⁷ _m Gpp _s pSG D1	가수분해될 수 있음	nd
36	⁷ _m Gpp _s pSG D2	가수분해될 수 있음	nd
37	⁷ _m GpCH ₂ ppSG	저항성/저해제	5.67 ± 1.01
38	^{7,2'0} _m GpppSG	가수분해될 수 있음	72 ± 17

[0307]

시험 3. 유사체 34번 (⁷_m GSpp_spSG D2)과 복합체를 이룬 인간 DcpS 효소의 구조 결정 (ΔN37hDcpS)

[0308]

시험의 목적은 유사체 34번과 인간 DcpS 효소의 상호작용의 매커니즘을 연구하는 것이다. N-말단이 절단된 재조합 인간 DcpS 효소 (ΔN37 - 잔기 Ala38 내지 Ser337)를 이전에 기술된 것에 따라 얻었다 (Singh et al. 2008). 0.1 M 유사체 34 및 7.3 mg/mL DcpS 효소 (결정화 구성 전에 15분 동안 얼음에서 인큐베이팅함)를 포함하는 0.2 uL의 시료 및 0.2 uL의 저수지 용액 (reservoir solution)을 이용하여 시팅 드랍 증기 확산 (sitting drop vapor diffusion)에 의한 결정화를 수행하였다. 복합체 결정이 29% PEG 4000 및 0.1M Tris·HCl pH 7.6을 포함하는 혼합물에서 약 1주 후 나타났다. 결정을 포함하는 드랍에 저수지 용액 및 글리세롤 (1:1 v/v)의 혼합물을 가한 후 결정을 회수하고 액체 질소에서 급속 냉동하였다. Dectris PILATUS 6M 검출기를 이용하여 100K에서 싱크로트론 원료 (Beamline 14.1, Bessy II, Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany)에서 회절 데이터를 수집하고 이후 그 데이터를 XDS 소프트웨어 (Kabsch 2010)를 이용하여 가공하였다. 조사 모델로서 DG157493 저해제 (pdb: 3BL9) (Singh, Salcius et al. 2008)에 결합된 DcpS의 구조를 이용하고 Phaser 소프트웨어 (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007)를 이용하여 분자 치환법 (Molecular Replacement)에 의해 구조를 규명하였다. ProDRG (Schuttelkopf and van Aalten 2004)를 이용하여 리간드 모델 및 디서너리를 생성하였다. Coot 소프트웨어 (Emsley & Cowtan 2004)에서 모델 구축 및 리간드 맞춤을 수행하였다. 그 구조는 phenix.refine (Adams, Afonine et al. 2010)을 이용하여 정제하였다.

[0309]

시험 4. Dcp1/2 효소를 이용한 분해에 대한 5' 말단의 캡 유사체를 포함하는 짧은 RNA 분자의 민감성 연구.

[0310]

본 연구의 목적은 선택된 5'-포스포티오에이트 캡 유사체가 RNA의 5' 말단에 포함되는 것이, 그로 인해 제조된 전사물의 Dcp1/2 탈캡핑 효소 활성화에 대한 민감성에 영향을 미칠 수 있는지를 확인하는 것이었다. 헤테로다이어

Dcp1/2 형태의 스킨조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) 재조합 단백질을 이전에 기술된 것과 같이 얻었다 (Floor, Jones et al. 2010). 본 어세이에서 이용된 전사체는 RNA SP6 중합효소 (New England BioLabs)를 이용하여 시험관내 전사에 의해 얻었다. 어닐링된 올리고뉴클레오티드: ATACGATTAGGTGACACTATAGAAGAAGCGGGCATGCGGCCAGCCATAGCCGATCA (서열번호 1), 및 TGATCGGCTATGGCTGGCCGCATGCCGCTTCTTATAGTGTCACCTAAATCGTAT (서열번호 2)를 시험관내 전사에서 주형으로 사용하였고, SP6 중합효소 (ATTTAGGTGACACTATAGA (서열번호 3))에 대한 프로모터 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 GAAGAAGCGGGCAUGCGGCCAGCCAUAGCCGAUCA (서열번호 4)의 서열을 갖는 35 nt 길이의 RNA를 얻도록 하나, 5' 말단 캡핑된 RNA는 36 nt 길이이다. 전형적인 시험관내 전사 반응을 20 μ l 부피에서 수행하고 40°C에서 2시간 동안 인큐베이팅하였으며 하기를 포함하였다: 1U SP6 중합효소, 1U RiboLock RNA 분해효소 저해제 (ThermoFisher Scientific), 0.5 mM ATP/CTP/UTP, 0.125 mM GTP, 1.25 mM 디뉴클레오티드 캡 유사체 및 0.1 μ M 주형. 2시간 동안 인큐베이팅한 후, 1U DNA 분해효소 I (Ambion)을 반응 혼합물에 가하고 30분 동안 37°C에서 계속 인큐베이팅한 후, EDTA를 25 mM의 최종 농도까지 가하였다. 얻은 RNA를 RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research)를 이용하여 정제하였다. 이후 합성된 RNA의 질을 변성된 15% 폴리악릴아미드 겔 상에서 결정하였다. RNA의 농도를 번갈아 분광광도법으로 측정하였다. 이렇게 얻은 RNA는 3' 말단의 실질적 이질성을 특징으로 하며, 이런 이유로 문제점을 제거하기 위하여, 25 nt 길이의 RNA를 얻도록 하는 DNazyme 10-23 (TGATCGGCTAGGCTAGCTACAACGAGGCTGGCCGC (서열번호 5))과 함께 상기 얻은 RNA를 인큐베이팅하였다. 5' 말단에 캡을 갖는 RNA는 26 nt 길이였다. 3' 말단의 절단 반응은 다음과 같다: 1 μ M의 RNA를 50 mM $MgCl_2$ 및 50 mM Tris-HCl pH 8.0을 포함하는 혼합물 내 1 μ M의 DNazyme 10-23과 함께 1시간 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다 (Coleman et al., 2004).

[0311] 효소 시험을 위하여 20 ng의 각 RNA를 사용하였고, 이를 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NH_4Cl , 0.01 % NP-40, 1 mM DTT, 및 5 mM $MgCl_2$ 를 포함하는 버퍼 내 3.5 nM Dcp1/2 효소와 함께 인큐베이팅하였다. 반응을 37°C에서 최종 부피 25 μ l 내에서 수행하였다. 0, 5, 15 그리고 30분 후 5 M 요소, 44 % 포름아미드, 20 mM EDTA, 0.03 % 브로모페놀 블루, 0.03 % 자일렌 시아놀의 혼합물의 동량을 가하여 반응을 중지시켰다. 반응 산물을 변성된 15 % 폴리악릴아미드 겔 상에 용해시키고, 전기영동 분리가 완료된 후, 겔을 SYBR Gold (Invitrogen)로 염색하고 Storm 860 phosphorImager (GE Healthcare)를 이용하여 시각화하였다. 얻은 결과를 ImageQuant 소프트웨어 (Molecular Dynamics)로 정량하였다. 본 어세이의 대표적인 결과를 도 8, 도 9 및 또한 표 6에 나타내었다.

표 6

[0312] 5' 말단에 선택된 캡 유사체를 포함하는 mRNA의 생물학적 성질

	캡핑 효율 ^a	Dcp1/2 민감성 ^b	상대적인 번역 효율 ^c
GpppG	0.91	0	0.05 \pm 0.01
m ⁷ GpppG	0.93	0.69	1.00
m ₂ ^{7, 2'-O} GpppG	0.84	0.52	1.56 \pm 0.14
m ₂ ^{7, 2'-O} GpppG D2	0.82	0.43	3.45 \pm 0.42
m ₂ ^{7, 2'-O} GSpppG	0.70	0.07	1.73 \pm 0.24
m ₂ ^{7, 2'-O} GpppSG	0.76	0.52	2.23 \pm 0.31

[0313] ^a 도 8 (시점 0')의 데이터는 캡핑 효율을 계산하기 위해 사용되었다.

[0314] ^b 도 8의 데이터는 15분의 시점 및 개별 RNA에 대한 정규화 이후 0' 시점까지 캡핑되지 않은 RNA 및 캡핑된 RNA의 총합에 대한 캡핑된 RNA의 비율로 정해진, Dcp1/2 활성에 대한 민감성을 계산하기 위해 사용되었다.

[0315] ^c 상대적인 번역 효율은 5' 말단이 m⁷GpppG 로 캡핑된 mRNA에 대해 얻은 수치에 대해 정규화한 후의 생물학적 3 배 복제물 (triplicates) 내 레닐라 (*Renilla*) 루시페라아제 mRNA의 평균 번역 효율을 나타낸다.

[0316] 시험 5. 토끼 망상적혈구 용해물 내 mRNA의 번역 효율에 대한 신규한 캡 유사체 존재의 효과에 대한 연구.

- [0317] 본 연구의 목적은 번역 효율에 대한 mRNA의 5' 말단에 신규한 캡 유사체의 도입의 효과를 확인하는 것이었다. 상기 목적을 위하여 mRNA를 코딩하고 5' 말단에 캡 구조를 달리하는 일련의 레닐라 루시페라아제를 제조하였다. 본 시험에 사용된 전사물을 SP6 RNA 중합효소를 이용한 시험관내 전사 반응에 의해 얻었다. 시험관내 전사를 위한 주형으로서, 프라이머 ATTTAGGTGACACTATAGAACAGATCTCGAGCTCAAGCTT (서열번호 6) 및 GTTTAAACATTTAAATGCAATGA (서열번호 7) 및 hRLuc-prNA2(A)128 플라스미드 (Williams et al. 2010)를 이용하여 제조된 PCR 산물을 사용하였다. 이에 따라 수행된 PCR 반응은 SP6 중합효소에 대한 프로모터 서열을 레닐라 루시페라아제를 코딩하는 서열의 업스트림에 도입되도록 하였다. 전사 반응 그 자체는 상기한 짧은 RNA 합성 (시험 4)과 유사하다. 반응은 2시간 동안 20 µl에서 40℃로 수행하고, 하기를 포함하였다: 1U SP6 중합효소, 1U RiboLock RNA 분해효소 저해제 (ThermoFisher Scientific), 0.5 mM ATP/CTP/UTP, 0.125 mM GTP, 1.25 mM 디뉴클레오티드 캡 유사체 및 100 µg의 주형. 2시간 인큐베이션에 이어, 1U DNA 분해효소 I (Ambion)을 가하고 인큐베이션을 30분 동안 37℃에서 지속한 후, EDTA를 25 mM 최종 농도까지 가하였다. 얻은 mRNA를 NucleoSpin RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel)를 이용하여 정제하였다. 합성된 RNA의 질은 변성된 15% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 확인하였다. RNA 농도는 분광광도법으로 결정하였다.
- [0318] 시험관내 번역 반응을 캡-의존적 번역을 위해 결정된 조건 (Rydzik et al., 2009)으로 토끼 망상적혈구 용해물 (RRL, Promega)에서 수행하였다. 전형적인 반응 혼합물 (10 µl)은 40% RRL 용해물, 0.01 mM 아미노산 혼합물 (Promega), 1.2 mM MgCl₂, 170 mM 아세트산칼륨 및 5' 말단에 적절한 캡 유사체를 갖는 mRNA를 코딩하는 레닐라 루시페라아제를 포함하였고, 상기 혼합물을 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 4개의 상이한 농도의 mRNA: 0.1 ng/µl, 0.25 ng/µl, 0.5 ng/µl, 0.75 ng/µl를 실험에서 사용하였다. 합성된 루시페라아제의 활성은 마이크로플레이트 리더 시너지 (Synergy) H1 (BioTek) 내에서 이중 (Dual)-루시페라아제 리포터 어세이 시스템 (Promega)을 이용하여 측정하였다. 얻은 결과를 Origin (Gambit) 소프트웨어에서 분석하고, 이론적인 곡선을 실험 데이터에 맞추었으며, 얻은 곡선의 기울기는 번역 효율을 나타낸다. 대표적인 데이터를 도 10에 나타내었고, 3배 복제물에 대해 얻은 평균 번역 효율은 표 6에 나타내었다.
- [0319] **시험 6. HeLa 세포 내 mRNA의 번역 효율에 대한 신규한 캡 유사체의 효과에 대한 연구.**
- [0320] 인간 자궁 경부암 HeLa 세포를 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco) 및 L-글루타민으로 보충된 최종 농도 2 mM의 DMEM (Gibco)에서 5% CO₂ 및 37℃로 배양하였다. 예정된 실험 전날, 항생제 없이 100 µl의 배지에 현탁된 10⁴ 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰마다 접종하였다. 세포 형질감염은 다음과 같이 진행하였다: 0.3 µl 리포펙타민 MessengerMAX 감염 시약 (Invitrogen), 0.1 µg mRNA 및 10 µl Opti-MEM (Gibco)을 각 웰에 가하였다. 형질감염을 인큐베이터에서 1시간 동안 수행하였다. 형질감염시킨 후, 세포를 PBS로 3회 세척하고 항생제 없는 신선한 배지로 보충하였다. 형질감염을 시작한지 2, 3, 4.5, 6.5, 10.5 및 24시간 후, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 용해시킨 후 루시페라아제 활성을 시너지 (Synergy) H1 마이크로플레이트 리더를 이용한 루시페라아제 리포터 어세이 시스템 (Promega)을 이용하여 측정하였다. 예시 데이터는 도 11에 나타내었다.
- [0321] 반딧불이 루시페라아제를 코딩하고 3' 말단에 2개의 반복 β-글로빈 3'UTR 및 128 아데닌의 폴리(A) 꼬리를 갖는 mRNA를 형질감염을 위해 사용하였다. 5' 말단에 상이한 캡 유사체를 포함하는 상기 mRNA를 시험관내 전사에 의해 얻었다. AarI (ThermoFisher Scientific)로 분해된 pJET_luc128A 플라스미드를 합성을 위한 주형으로 사용하였다. 전형적인 시험관내 전사 반응을 40℃에서 2시간 동안 20 µl의 부피에서 수행하였고, 하기를 포함하였다: 1U SP6 중합효소, 1U RiboLock RNA 분해효소 저해제 (ThermoFisher Scientific), 0.5 mM ATP/CTP/UTP, 0.125 mM GTP, 1.25 mM 디뉴클레오티드 캡 유사체 및 0.1 µg의 상기 주형. mRNA 제조의 다음 단계는 상기한 것과 같은 mRNA를 코딩하는 레닐라 루시페라아제의 경우와 같다 (시험 5). 나아가, NucleoSpin RNA Clean-up XS 컬럼을 이용한 mRNA를 정제한 후, 전사물을 2 µg 글리코젠 및 아세트산나트륨의 존재 하에서 에탄올 침전시키고 탈이온수에 용해하였다.

[0322] 서열 목록

```

<110> Uniwersytet Warszawski
<120> 5''-phosphorothiolate mRNA 5'-end (cap) analogs, mRNA comprising the
same,method of obtaining and uses thereof
<130> PZ/3566/AGR/PCT
<160> 7
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 57
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> Oligonucleotide 1
<400> 1
atacagattta ggtgacacta tagaagaagc gggcatgcgg ccagccatag ccgatca      57

<210> 2
<211> 57
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> Oligonucleotide 2
<400> 2
tgatcggcta tggctggcgg catgcccgct tcttctatag tgtcacctaa atcgtat      57

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> SP6 polymerase promotor seq
<400> 3
atttaggtga cactataga      19

<210> 4
<211> 35
<212> RNA
<213> artificial
<220>
<223> Short RNA transcript
<400> 4
gaagaagcgg gcaugcggcc agccauagcc gauga      35

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> DNazym 10-23
<400> 5
tgatcggcta ggctagctac aacgaggctg gccgc      35

<210> 6
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> Oligonucleotide 3
<400> 6
atttaggtga cactatagaa cagatctcga gctcaagctt      40

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> Oligonucleotide 4
<400> 7
gtttaaacat ttaaatgcaa tga

```

[0323]

[0324]

[0325] 참고 문헌

- [0326] Abrams, W. R. and J. A. Schiff (1973). "Studies of sulfate utilization by algae. II. An enzyme-bound intermediate in the reduction of adenosine-5'-phosphosulfate (APS) by cell-free extracts of wild-type *Chlorella* and mutants blocked for sulfate reduction." *Arch Mikrobiol* **94**(1): 1-10.
- [0327] Adams, P., P. Afonine, G. Bunkoczi, V. Chen, I. Davis, N. Echols, J. Headd, L. Hung, G. Kapral, R. Grosse-Kunstleve, A. McCoy, N. Moriarty, R. Oeffner, R. Read, D. Richardson, J. Richardson, T.

Terwilliger and P. Zwart (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **66**: 213-221.

- [0328] Akagi, J. M. and L. L. Campbell (1962). "STUDIES ON THERMOPHILIC SULFATE-REDUCING BACTERIA III. : Adenosine Triphosphate-sulfurylase of *Clostridium nigrificans* and *Desulfovibrio desulfuricans*." J Bacteriol **84**(6): 1194-1201.
- [0329] Arakawa, H., M. Shiokawa, O. Imamura and M. Maeda (2003). "Novel bioluminescent assay of alkaline phosphatase using adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate as substrate and the luciferin-luciferase reaction and its application." Anal Biochem **314**(2): 206-211.
- [0330] Bail, S. and M. Kiledjian (2008). "DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes?" Rna Biology **5**(4): 216-219.
- [0331] Barnes, S., R. Waldrop and A. S. Neighbors (1983). "Alkaline butanol extraction of bile salt and steroid sulfate esters: application to the assay of sulfotransferases." Anal Biochem **133**(2): 470-475.
- [0332] Butchbach, M. E. R., J. Singh, M. Þorsteinsdottir, L. Saieva, E. Slominski, J. Thurmond, T. Andr u sson, J. Zhang, J. D. Edwards, L. R. Simard, L. Pellizzoni, J. Jarecki, A. H. M. Burghes and M. E. Gurney (2010). "Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy." Human Molecular Genetics **19**(3): 454-467.
- [0333] Contreras, R. and W. Fiers (1981). "Initiation of transcription by rna polymerase-II in permeable, SV40-infected or noninfected, CV1 cells - evidence for multiple promoters of SV40 late transcription." Nucleic Acids Research **9**(2): 215-236.
- [0334] Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **60**: 2126-2132.
- [0335] Floor, S., B. Jones, G. Hernandez and J. Gross (2010). "A split active site couples cap recognition by Dcp2 to activation." Nature Structural & Molecular Biology **17**(9): 1096-U1099.
- [0336] Grudzien, E., M. Kalek, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads (2006). "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs." Journal of Biological Chemistry **281**(4): 1857-1867.
- [0337] Grudzien-Nogalska, E., J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads (2007). "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells." Rna-a Publication of the Rna Society **13**(10): 1745-1755.
- [0338] Gu, M. G., C. Fabrega, S. W. Liu, H. D. Liu, M. Kiledjian and C. D. Lima (2004). "Insights into the structure, mechanism, and regulation of scavenger mRNA decapping activity." Molecular Cell **14**(1): 67-80.
- [0339] Jemielity, J., T. Fowler, J. Zuberek, J. Stepinski, M. Lewdorowicz, A. Niedzwiecka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads (2003). "Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties." Rna-a Publication of the Rna Society **9**(9): 1108-1122.
- [0340] Kabsch, W. (2010). "XDS." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **66**: 125-132.
- [0341] Kalek, M., J. Jemielity, Z. M. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis and E. Darzynkiewicz (2006). "Enzymatically stable 5' mRNA cap analogs: Synthesis and binding studies with human DcpS decapping enzyme." Bioorganic & Medicinal Chemistry **14**(9): 3223-3230.
- [0342] Kalek, M., J. Jemielity, E. Grudzien, J. Zuberek, E. Bojarska, L. S. Cohen, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, R. E. Rhoads and E. Darzynkiewicz (2005). "Synthesis and biochemical properties of novel mRNA 5' cap analogs resistant to enzymatic hydrolysis." Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids **24**(5-7): 615-621.
- [0343] Konarska, M. M., R. A. Padgett and P. A. Sharp (1984). "Recognition of Cap Structure in Splicing

Invitro of Messenger-Rna Precursors." Cell **38**(3): 731-736.

- [0344] Kowalska, J., M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Grudzien-Nogalska, E. Bojarska, J. Stepinski, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, R. E. Davis and J. Jemielity (2008). "Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS." RNA-a Publication of the RNA Society **14**(6): 1119-1131.
- [0345] Kowalska, J., A. Wypijewska del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Strenkowska, M. Ziemniak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin and J. Jemielity (2014). "Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes." Nucleic Acids Research **42**(16): 10245-10264.
- [0346] Kowalska, J., M. Ziemniak, M. Lukaszewicz, J. Zuber, M. Strenkowska, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity (2008). "Phosphorothioate analogs of m7GTP: Strong inhibitors of translation with increased resistance towards enzymatic degradation." Chemistry of Nucleic Acid Components **10**: 487-490.
- [0347] Kuhn, A. N., M. Diken, S. Kreiter, A. Selmi, J. Kowalska, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, C. Huber, O. Tureci and U. Sahin (2010). "Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo." Gene Therapy **17**(8): 961-971.
- [0348] Lykke-Andersen, J. (2002). "Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay." Molecular and Cellular Biology **22**(23): 8114-8121.
- [0349] McCoy, A., R. Grosse-Kunstleve, P. Adams, M. Winn, L. Storoni and R. Read (2007). "Phaser crystallographic software." Journal of Applied Crystallography **40**: 658-674.
- [0350] Mildvan, A., Z. Xia, H. Azurmendi, V. Saraswat, P. Legler, M. Massiah, S. Gabelli, M. Bianchet, L. Kang and L. Amzel (2005). "Structures and mechanisms of Nudix hydrolases." Archives of Biochemistry and Biophysics **433**(1): 129-143.
- [0351] Rydzik, A. M., M. Lukaszewicz, J. Zuberek, J. Kowalska, Z. M. Darzynkiewicz, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity (2009). "Synthetic dinucleotide mRNA cap analogs with tetraphosphate 5',5' bridge containing methylenebis(phosphonate) modification." Organic & Biomolecular Chemistry **7**(22): 4763-4776.
- [0352] Sahin, U., K. Kariko and O. Tureci (2014). "mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs." Nature Reviews Drug Discovery **13**(10): 759-780.
- [0353] Schuttelkopf, A. and D. van Aalten (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **60**: 1355-1363.
- [0354] Shen, V., H. D. Liu, S. W. Liu, X. F. Jiao and M. Kiledjian (2008). "DcpS scavenger decapping enzyme can modulate pre-mRNA splicing." RNA-a Publication of the Rna Society **14**(6): 1132-1142.
- [0355] Singh, J., M. Salcius, S. W. Liu, B. L. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. R. Mattoon, J. Printen, J. Christensen, J. M. Bjornsson, B. A. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki and M. E. Gurney (2008). "DcpS as a Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy." Acs Chemical Biology **3**(11): 711-722.
- [0356] Van Meerbeke, J. P., R. M. Gibbs, H. L. Plasterer, W. Miao, Z. Feng, M.-Y. Lin, A. A. Rucki, C. D. Wee, B. Xia, S. Sharma, V. Jacques, D. K. Li, L. Pellizzoni, J. R. Rusche, C.-P. Ko and C. J. Sumner (2013). "The DcpS inhibitor RG3039 improves motor function in SMA mice." Human Molecular Genetics **22**(20): 4074-4083.
- [0357] Warren, L., P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger and D. J. Rossi (2010). "Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with

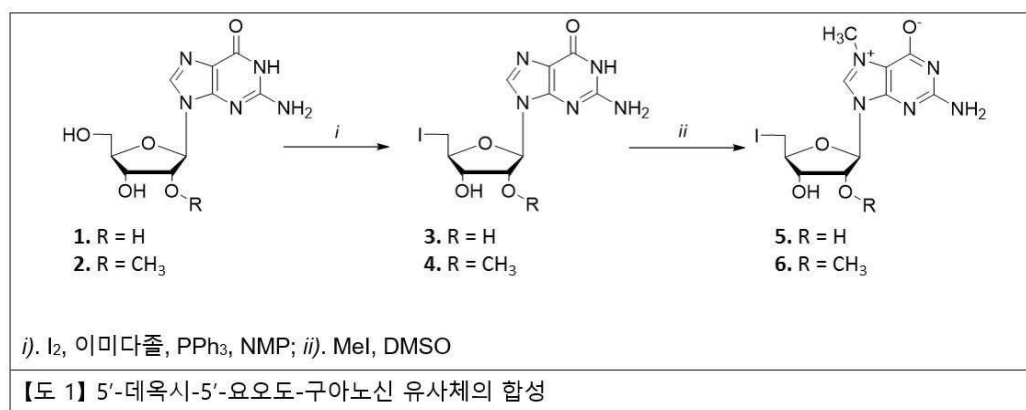
Synthetic Modified mRNA." *Cell Stem Cell* **7**(5): 618-630.

[0358] Ziemniak, M., M. Strenkowska, J. Kowalska and J. Jemielity (2013). "Potential therapeutic applications of RNA cap analogs." *Future medicinal chemistry* **5**(10): 1141-1172.

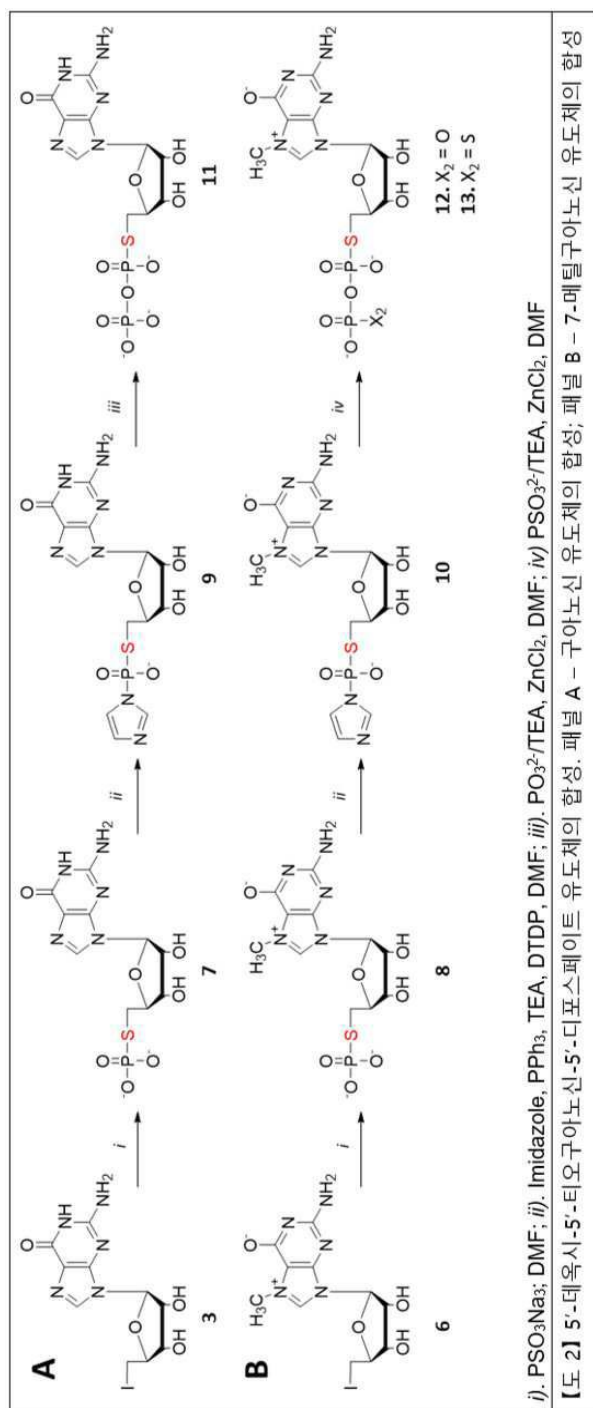
[0359] Zuberek, J., J. Jemielity, A. Niedzwiecka, J. Stepinski, A. Wyslouch-Cieszyńska, R. Stolarski and E. Darzynkiewicz (2003). "Influence of the length of the phosphate chain in mRNA 5' cap analogs on their interaction with eukaryotic initiation factor 4E." *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **22**(5-8): 1707-1710.

도면

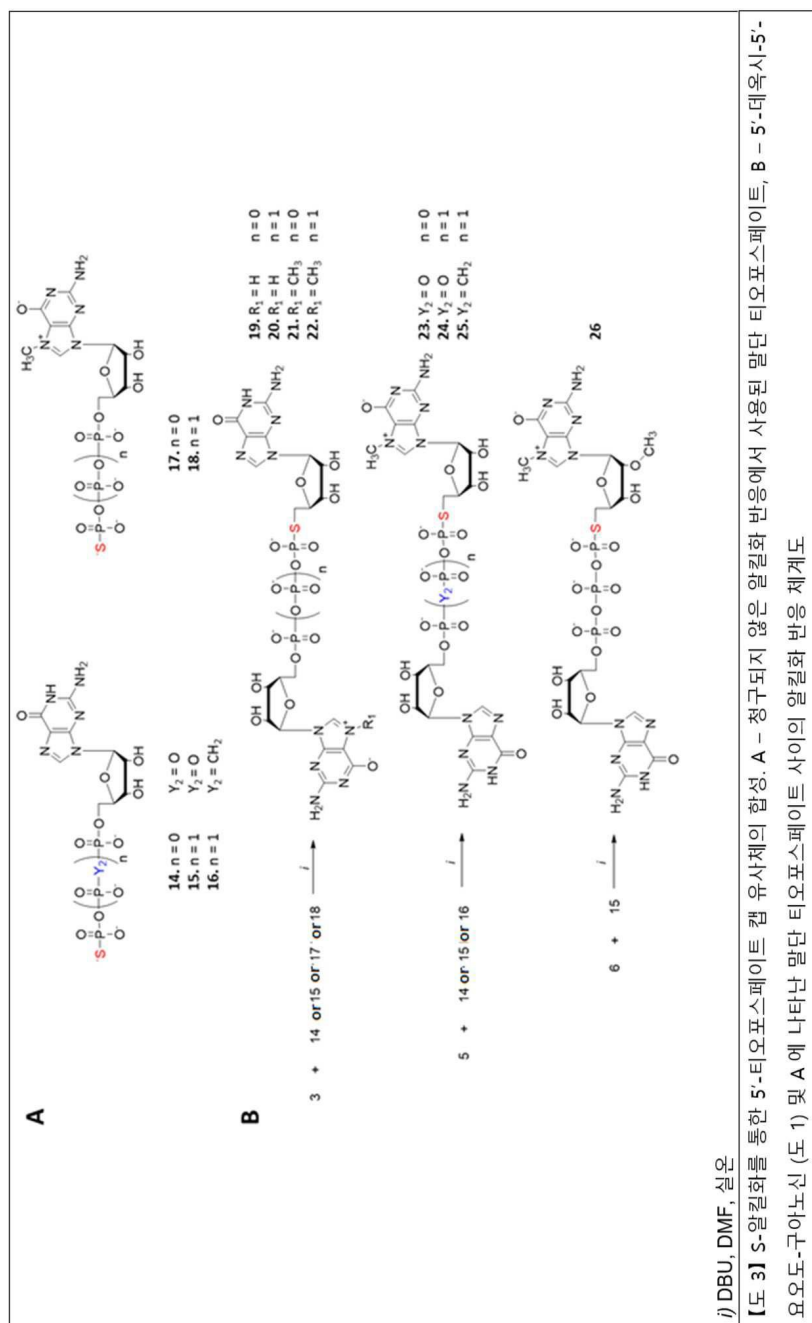
도면1



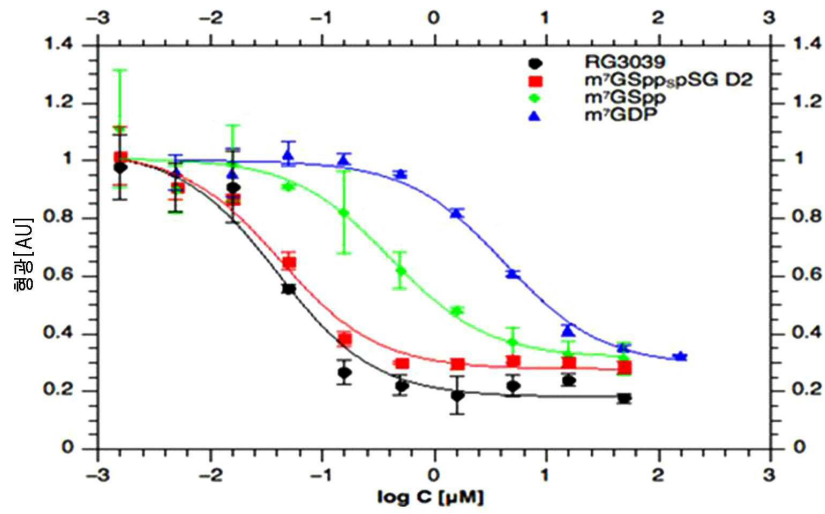
도면2



도면3

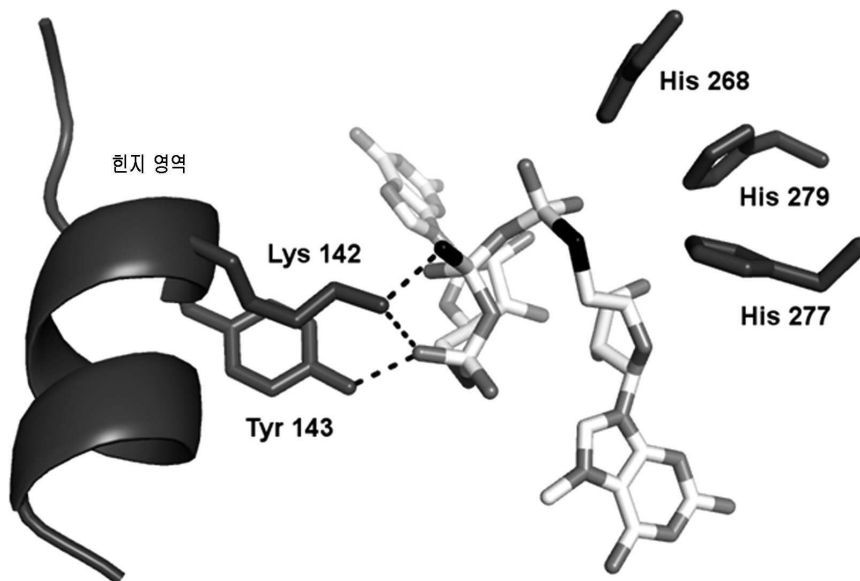


도면6

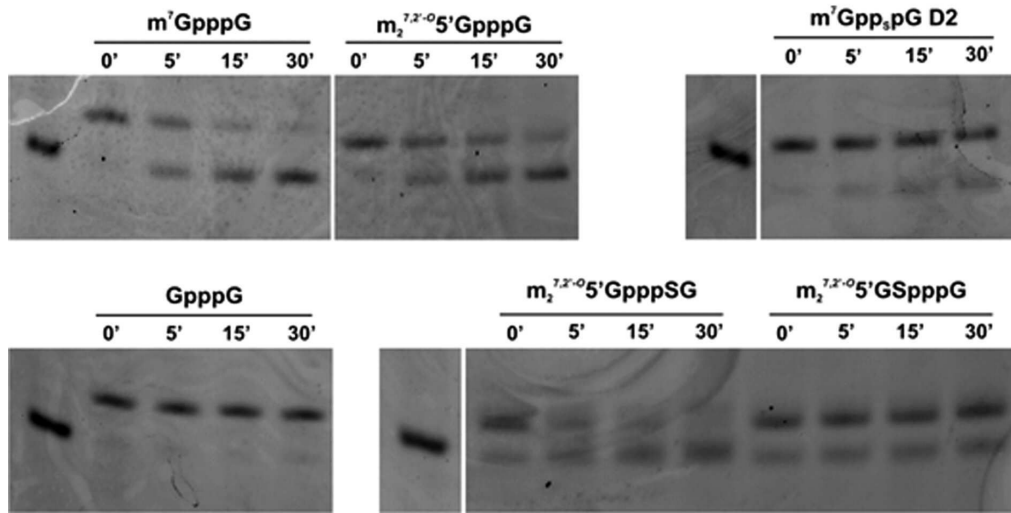


【도 6】 화합물 (m7GSppspSG D2, m7GSpp, m7GDP 및 RG3039)에 대한 IC50 결정 결과

도면7

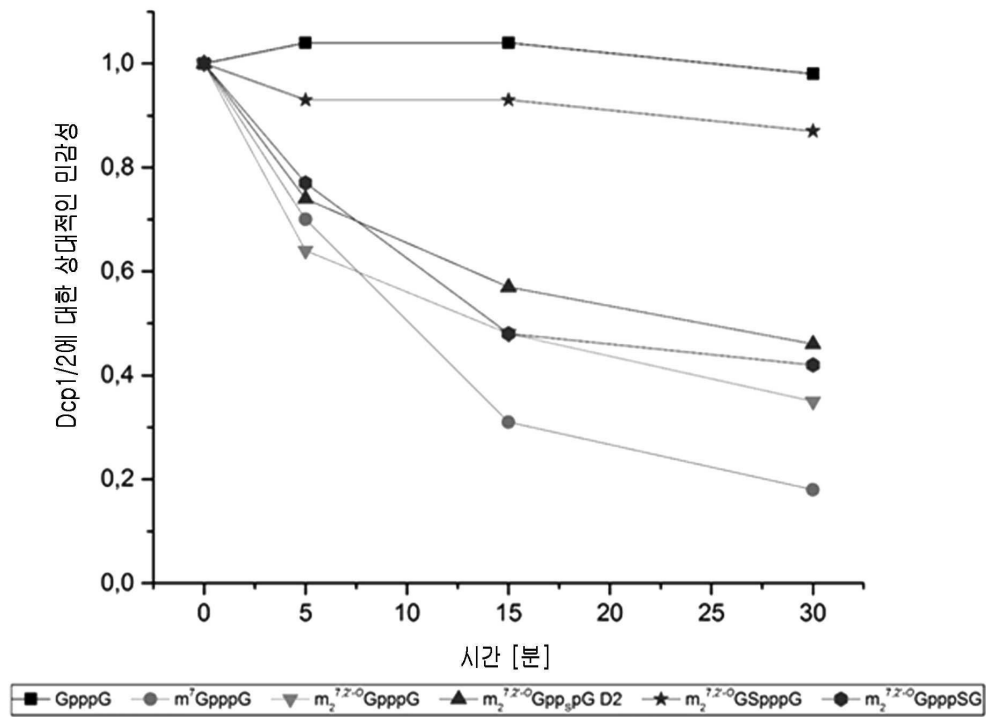


도면8



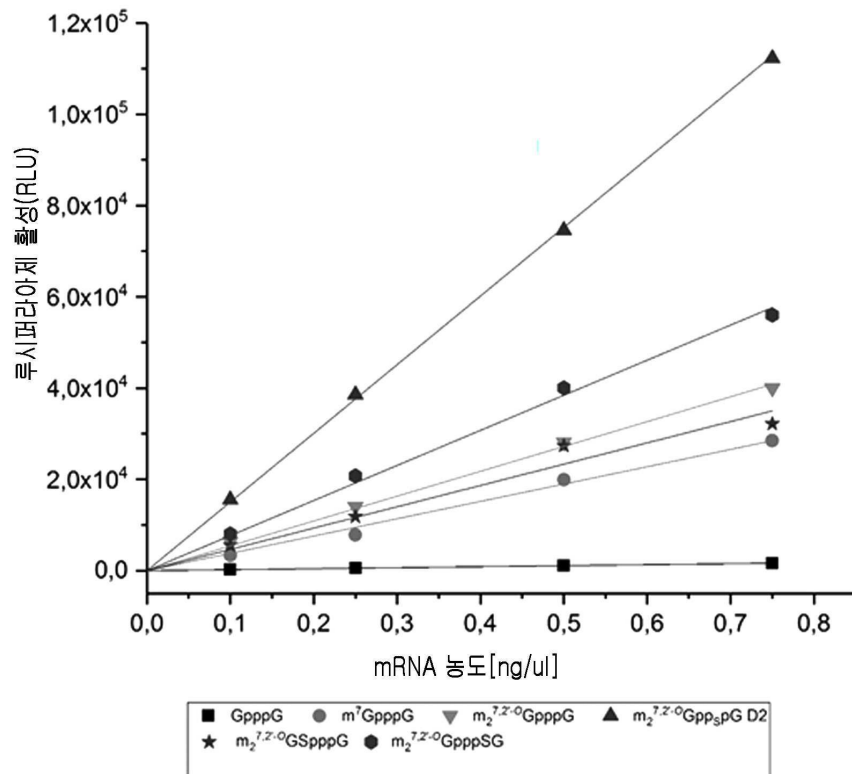
【도 8】 Dcp1/2 효소 활성에 대한 민감성

도면9



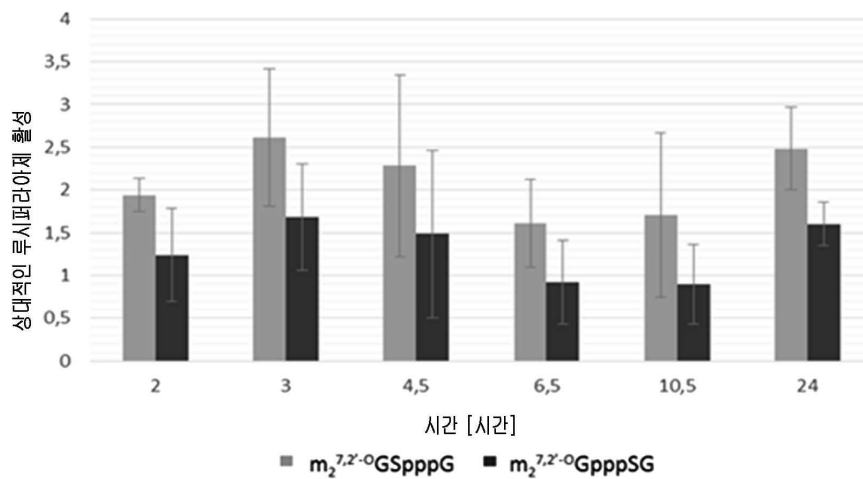
【도 9】 Dcp1/2 효소 활성에 대한 상대적인 민감성

도면10



【도 10】 상대적인 번역 효율

도면11



【도 11】 HeLa 세포 내 상대적인 번역 효율

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIWERSYTET WARSZAWSKI

<120> 5'-PHOSPHOROTHIOATE MRNA 5'-END (CAP) ANALOGS, MRNA

COMPRISING THE SAME, METHOD OF OBTAINING AND USES THEREOF

<130> IPA180818-PL

<150> PL415967

<151> 2016-01-29

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Oligonucleotide 1

<400> 1

atacgattta ggtgacacta tagaagaagc gggcatgcgg ccagccatag ccgatca 57

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Oligonucleotide 2

<400> 2

tgatcggcta tggctggcgg catgcccgt tcttctatag tgtcacctaa atcgat 57

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> SP6 polymerase promotor seq

<400> 3

atttaggtga cactataga 19

<210> 4

<211> 35

<212> RNA

<213> artificial

<220><223> Short RNA transcript

<400> 4

gaagaagcgg gcaugcggcc agccauagcc gauca 35

<210> 5

<211> 35

<212>

DNA

<213> artificial

<220><223> DNazym 10-23

<400> 5

tgatcggcta ggctagctac aacgaggtg gccgc 35

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Oligonucleotide 3

<400> 6

atttaggtga cactatagaa cagatctcga gctcaagctt 40

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

<220><223> Oligonucleotide 4

<400> 7

gtttaaacat ttaaatgcaa tga 23