



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117858885 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 09

(21) 申请号 202280056963.6

中嶋裕子

(22) 申请日 2022.07.05

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

(30) 优先权数据

2021-111420 2021.07.05 JP

专利代理师 龙淳 狄茜

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.20

(51) Int.Cl.

C07H 21/02 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/026665 2022.07.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/282245 JA 2023.01.12

(71) 申请人 国立研究开发法人科学技术振兴机构

地址 日本

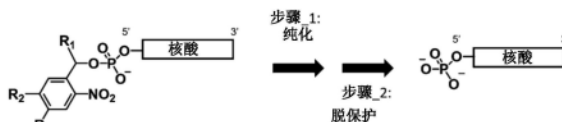
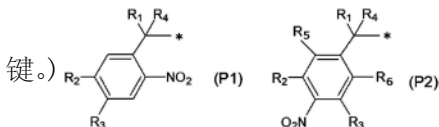
(72) 发明人 阿部洋 阿部奈保子 稻垣雅仁
木村康明 桥谷文贵 Z·李权利要求书12页 说明书115页
序列表(电子公布) 附图40页

(54) 发明名称

核苷酸类的纯化方法和核苷酸类的纯化装置以及疏水性试剂和疏水性底物

(57) 摘要

本发明为一种核苷酸类的纯化方法,其包括:将下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入核苷酸类,生成疏水性核苷酸类的保护基导入工序;在疏水性环境下将疏水性核苷酸类分离纯化的分离纯化工序;和从疏水性核苷酸类将疏水性保护基脱保护,生成核苷酸类的脱保护工序。
(R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基等,可以相同或不同。*表示与核苷酸类的价键。)

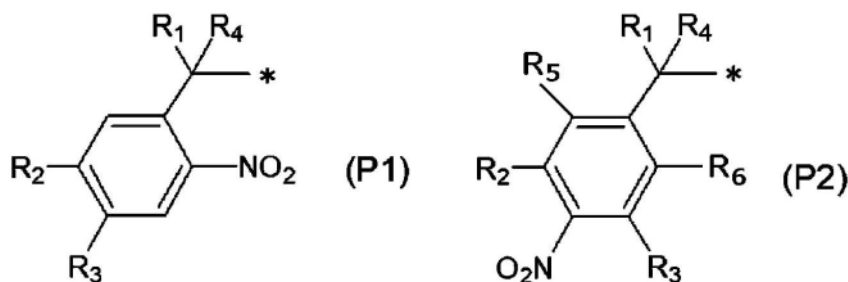


1. 一种以至少1个核苷酸和/或其衍生物作为结构单元的核苷酸类的纯化方法,其特征在于,包括:

将下述式 (P1) 或 (P2) 所示的疏水性保护基导入所述核苷酸类,生成疏水性核苷酸类的保护基导入工序;

在疏水性环境下将所述疏水性核苷酸类分离纯化的分离纯化工序;和

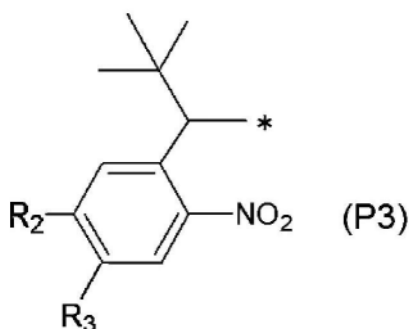
从所述疏水性核苷酸类将所述疏水性保护基脱保护,生成所述核苷酸类的脱保护工序,



其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 相同或不同,*是与核苷酸类的价键,直接或经由选自-O-C-和-O-C(=O)-中的连结基与构成核苷酸类的原子结合。

2. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

所述疏水性保护基由下述式 (P3) 表示,



其中, R_2 和 R_3 如权利要求1中所规定。

3. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

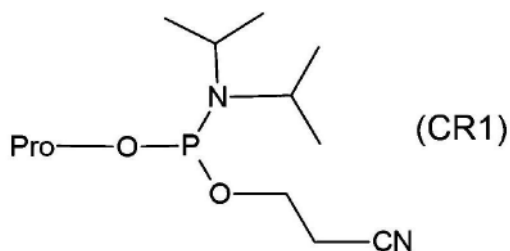
所述保护基导入工序在位于所述核苷酸类的5'末端的核苷酸上导入所述疏水性保护基。

4. 如权利要求3所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

所述保护基导入工序在构成所述核苷酸的糖的5'磷酸基、2'羟基或碱基上导入所述疏水性保护基。

5. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

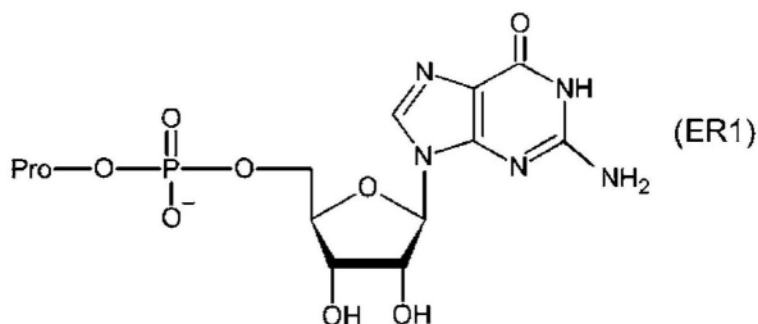
所述保护基导入工序将下述式 (CR1) 所示的亚磷酰胺试剂导入核苷酸,合成保护基导入核苷酸,通过固相合成在所述保护基导入核苷酸的3'末端侧依次连接单核苷酸,合成所述疏水性核苷酸类,



其中,Pro表示所述疏水性保护基。

6. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

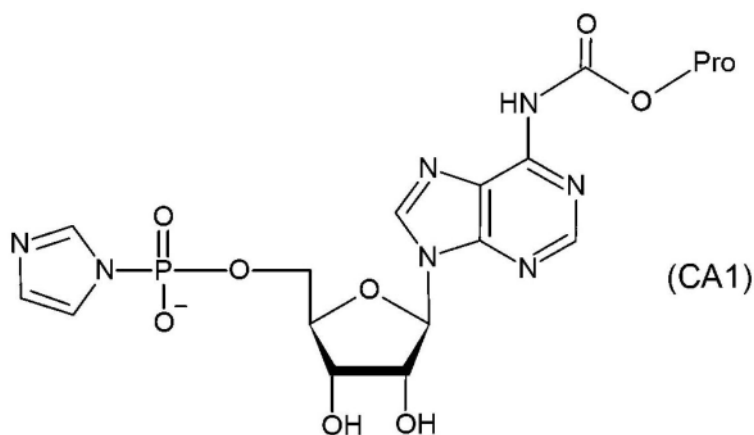
所述保护基导入工序通过以具有与所述核苷酸类互补的序列的核酸为模板,以下述式(ER1)所示的疏水性底物和核苷三磷酸为底物,利用RNA聚合酶转录所述模板,合成所述疏水性核苷酸类,



其中,Pro表示所述疏水性保护基。

7. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

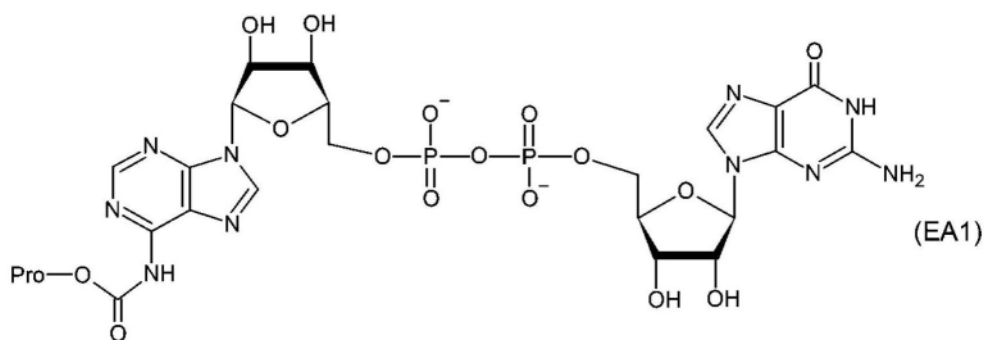
所述保护基导入工序使下述式(CA1)所示的腺苷化试剂与包含所述核苷酸类的寡核苷酸的5'末端的磷酸基反应,合成所述疏水性核苷酸类,



其中,Pro表示所述疏水性保护基。

8. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

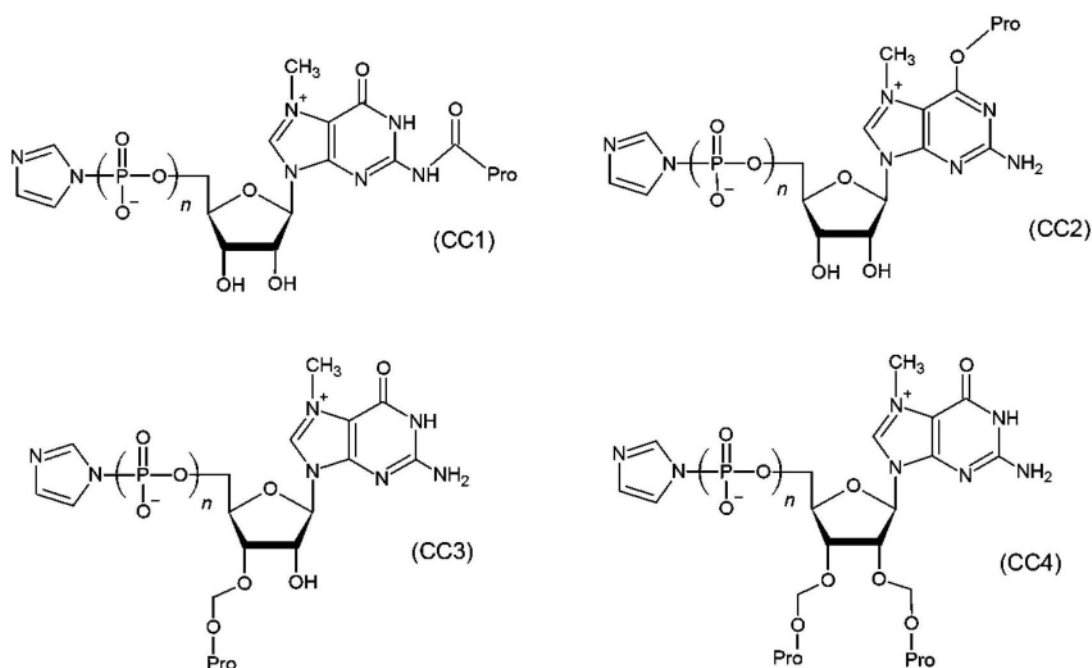
所述保护基导入工序通过以具有与所述核苷酸类互补的序列的核酸为模板,以下述式(EA1)所示的疏水性底物和核苷三磷酸为底物,利用RNA聚合酶转录所述模板,合成所述疏水性核苷酸类,



其中,Pro表示所述疏水性保护基。

9. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

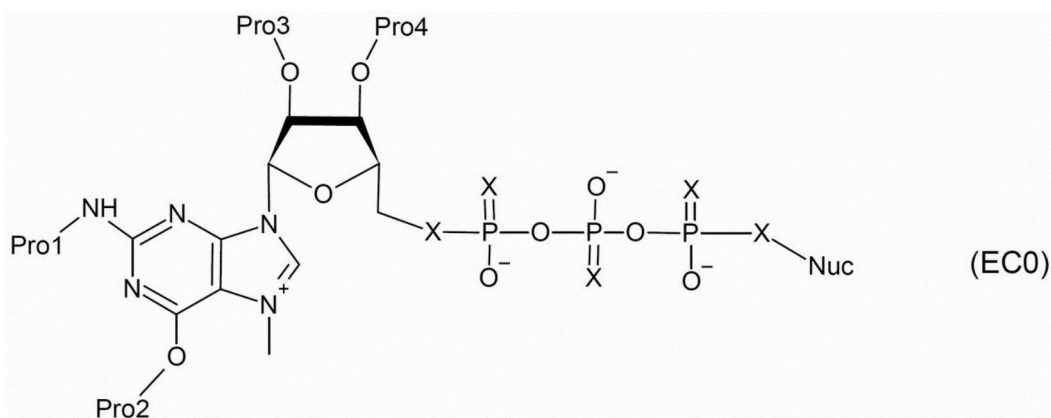
所述保护基导入工序使选自下述式(CC1)~(CC4)中的加帽化试剂与包含所述核苷酸类的寡核苷酸的5'末端的磷酸基反应,合成所述疏水性核苷酸类,



其中,Pro表示所述疏水性保护基,n表示1或2的整数。

10. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

所述保护基导入工序通过以具有与所述核苷酸类互补的序列的核酸为模板,以包含下述式(EC0)的结构的疏水性底物和核苷三磷酸为底物,利用RNA聚合酶转录所述模板,合成所述疏水性核苷酸类,



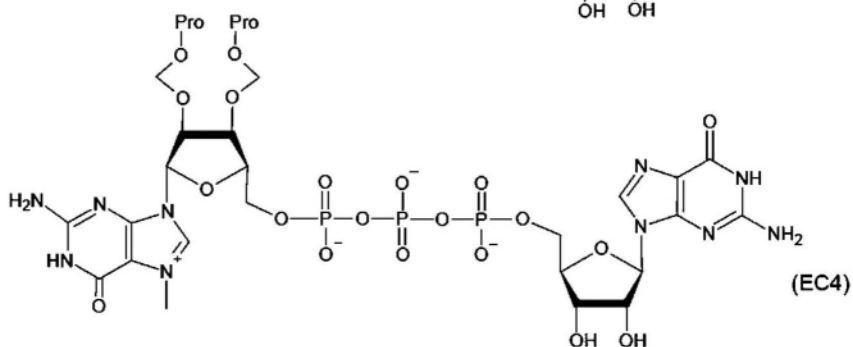
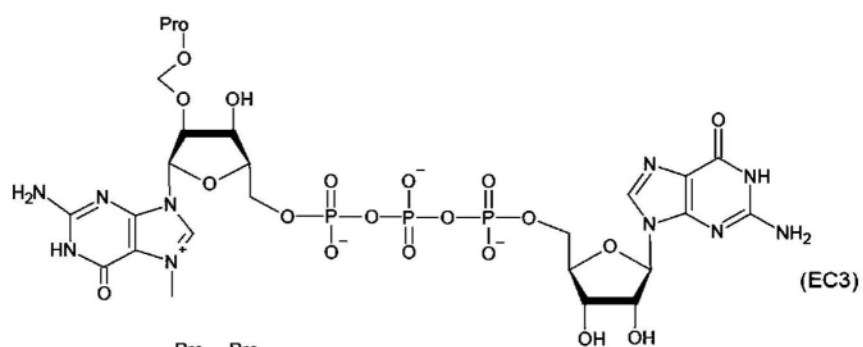
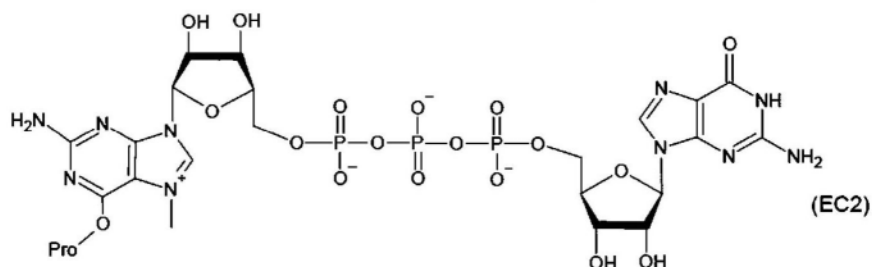
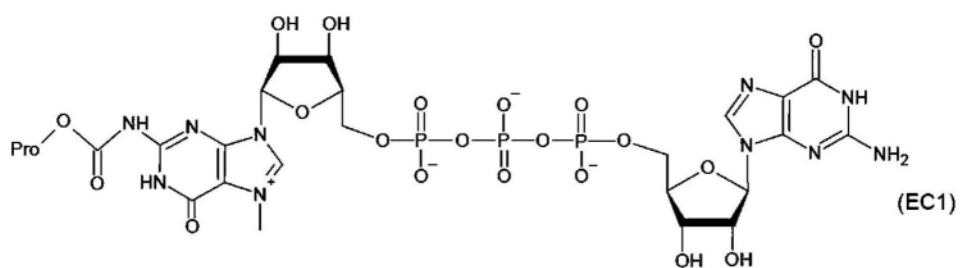
其中,Pro1~Pro4表示所述疏水性保护基或氢,Pro1~Pro4彼此相同或不同,X选自氧、硫和硒原子,Nuc表示天然或非天然型的核苷或在其3'位碳上连接有1个或多个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。

11.如权利要求10所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

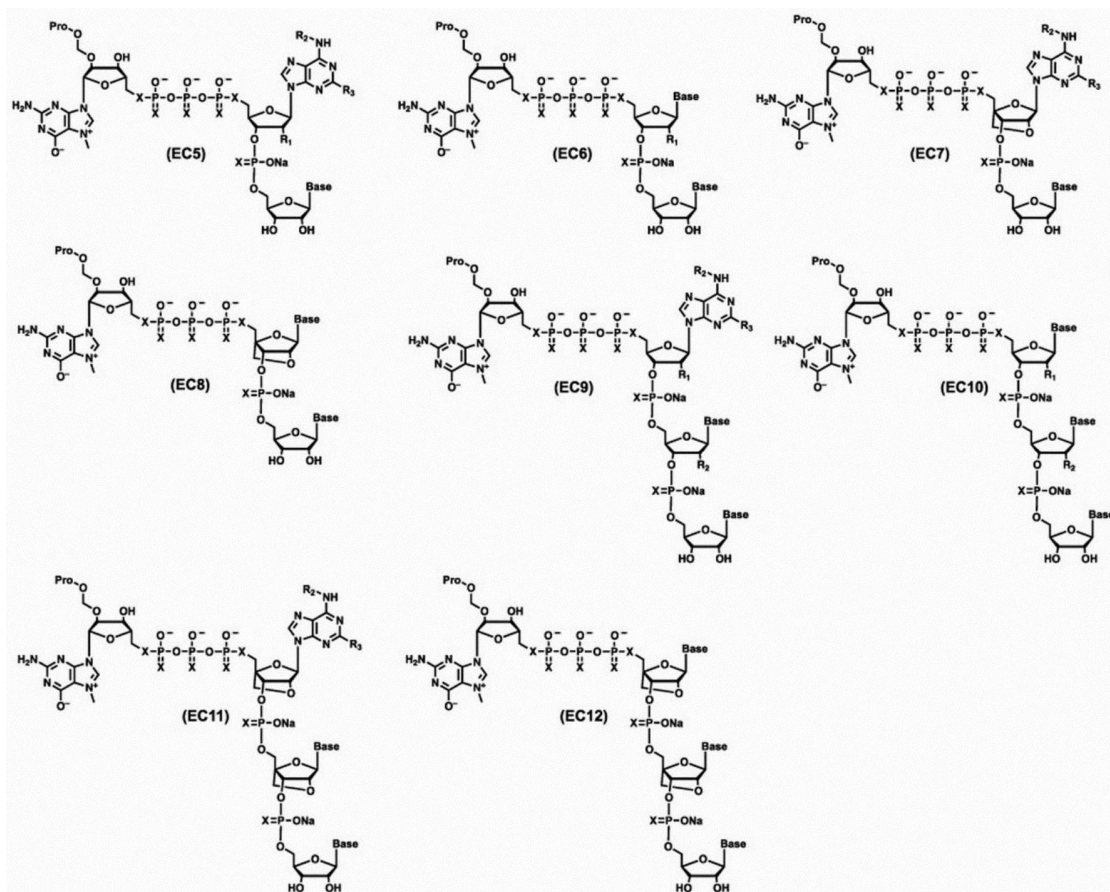
所述Nuc为天然或非天然型的核苷或者在其3'位碳上连接有1个或2个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。

12.如权利要求10所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:

包含所述式(EC0)的结构 of 所述疏水性底物选自下述式(EC1)~(EC4)、下述式(EC5)~(EC12),



其中,Pro表示所述疏水性保护基,



式中, R_1 表示选自羟基(OH)、甲氧基(OCH_3)、甲氧基乙基($-OCH_2OCH_3$)、氟(F)、甲酰胺基($-NHCHO$)中的取代基, R_2 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_3 表示氢或氨基($-NH_2$), 式中, Base表示选自腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤中的天然型核酸碱基、或者非天然碱基, 式中, X选自氧、硫和硒原子, 式中, Pro表示所述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基。

13. 如权利要求10所述的核苷酸类的纯化方法, 其特征在于:

所述疏水性底物为所述式(EC0)所示的加帽衍生物,

在所述脱保护工序之前, 使用结合有所述疏水性保护基的状态的所述疏水性核苷酸类进行翻译。

14. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法, 其特征在于:

所述分离纯化工序通过高效液相色谱将所述疏水性核苷酸类分离纯化。

15. 如权利要求1所述的核苷酸类的纯化方法, 其特征在于:

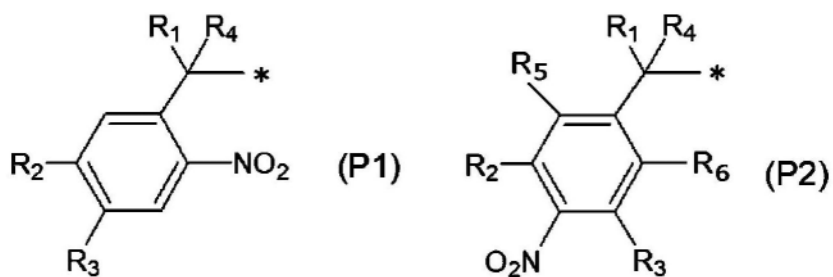
所述脱保护工序通过光照射对所述疏水性保护基进行脱保护。

16. 一种以至少1个核苷酸和/或其衍生物作为结构单元的核苷酸类的纯化装置, 其特征在于, 包括:

将下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入核苷酸类, 生成疏水性核苷酸类的保护基导入单元;

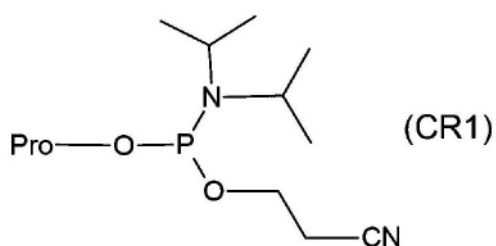
在疏水性环境下将所述疏水性核苷酸类分离纯化的分离纯化单元; 和

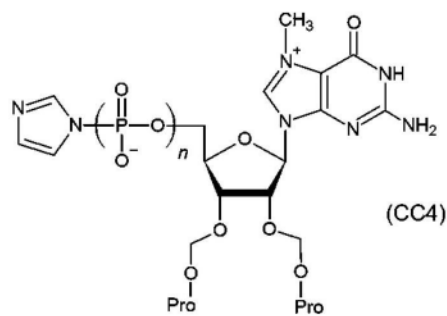
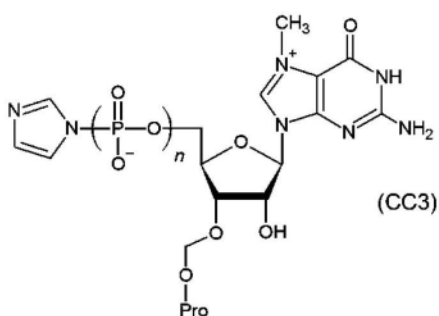
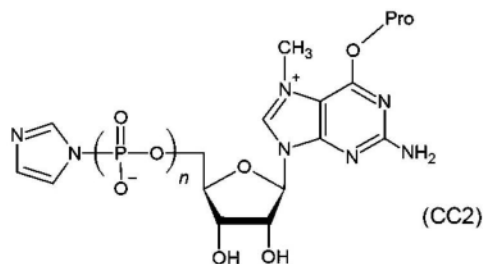
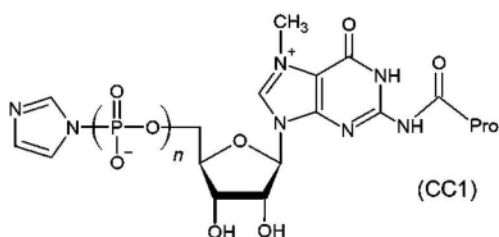
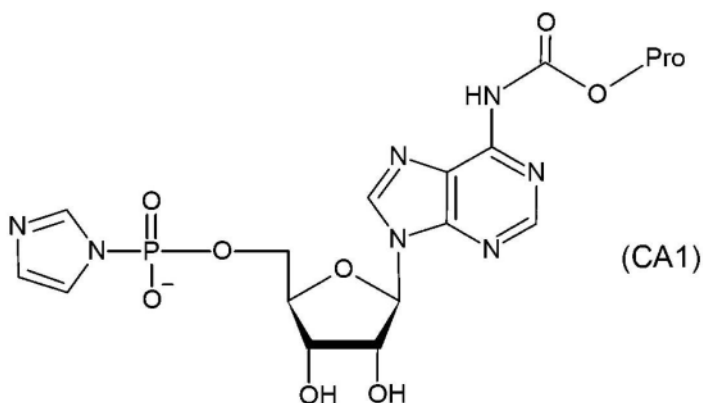
从所述疏水性核苷酸类将所述疏水性保护基脱保护, 生成所述核苷酸类的脱保护单元,



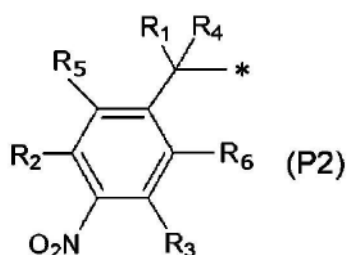
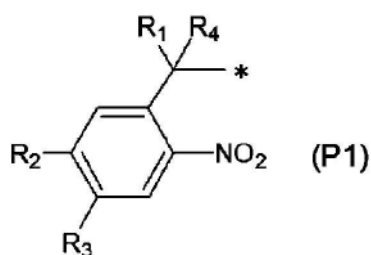
其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 相同或不同, *是与核苷酸类的价键, 直接或经由选自 $-O-C-$ 和 $-O-C(=O)-$ 中的连结基与构成核苷酸类的原子结合。

17. 一种用于通过化学合成来合成疏水性核苷酸类的疏水性试剂, 其特征在于:
其选自下述式 (CR1)、式 (CA1) 和式 (CC1) ~ (CC4),



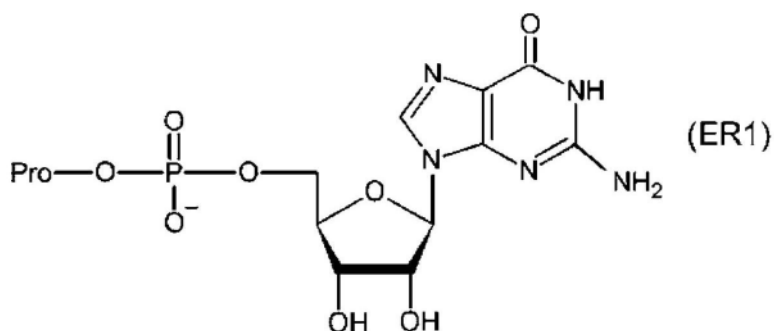


其中,Pro表示下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基,n表示1或2的整数;

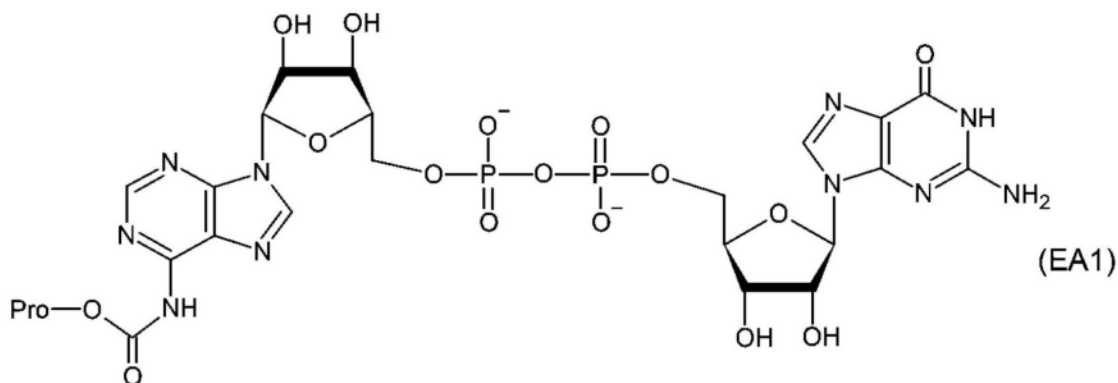


其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 相同或不同,*是价键。

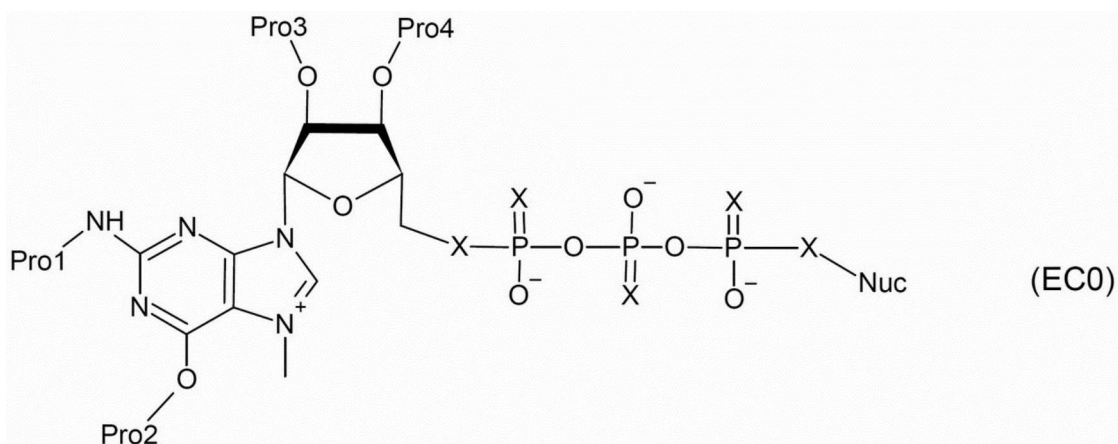
18. 一种用于利用RNA聚合酶生成疏水性核苷酸类的疏水性底物,其特征在于:
其选自下述式(ER1)、下述式(EA1)和下述式(EC0),



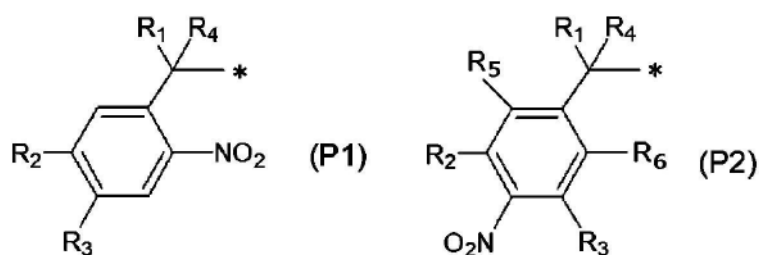
其中,Pro表示下述式 (P1) 或 (P2) 所示的所述疏水性保护基;



其中,Pro表示下述式 (P1) 或 (P2) 所示的所述疏水性保护基;



其中,Pro1~Pro4表示下述式 (P1) 或 (P2) 所示的疏水性保护基或氢,它们中的任意至少1个为疏水性保护基,Pro1~Pro4彼此相同或不同,X选自氧、硫和硒原子,Nuc表示天然或非天然型的核苷或在其3'位碳上连接有1个或多个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷;



其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或

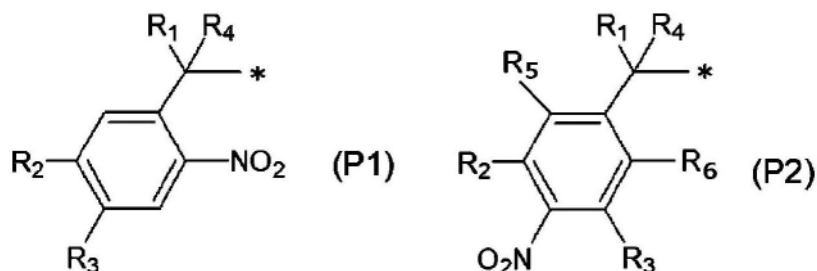
支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 相同或不同,*是价键。

19. 如权利要求18所述的疏水性底物, 其特征在于:

所述Nuc是天然或非天然型的核苷或在其3' 位碳上连接有1个或2个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。

20. 一种mRNA医药品, 其特征在于:

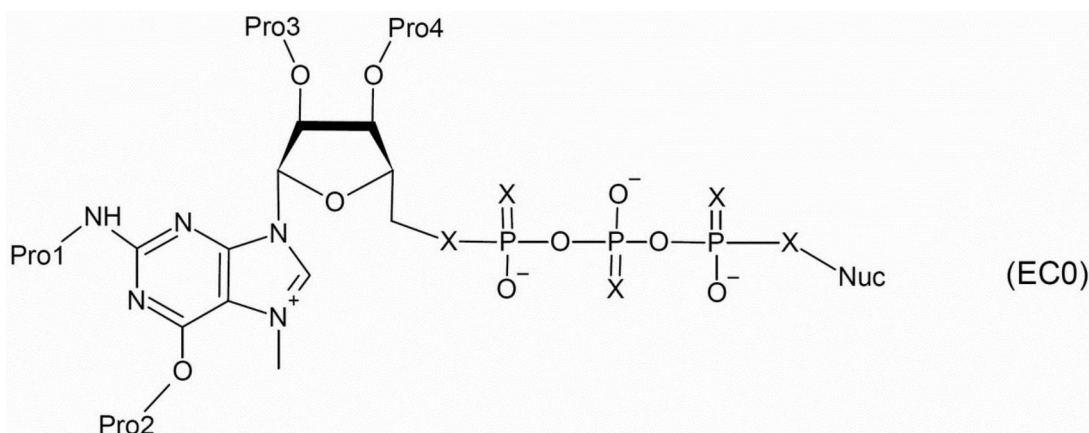
包含在以至少1个核苷酸和/或其衍生物作为结构单元的核苷酸类上导入有下述式(P1) 或 (P2) 所示的疏水性保护基的疏水性核苷酸类,



其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 相同或不同,*是与核苷酸类的价键, 直接或经由选自 -O-C- 和 -O-C(=O)- 的连结基与构成核苷酸类的原子结合。

21. 如权利要求20所述的mRNA医药品, 其特征在于:

具有在包含下述式 (EC0) 的结构疏水性底物的3' 末端侧的核苷酸的3' 位碳上连接有RNA的结构,



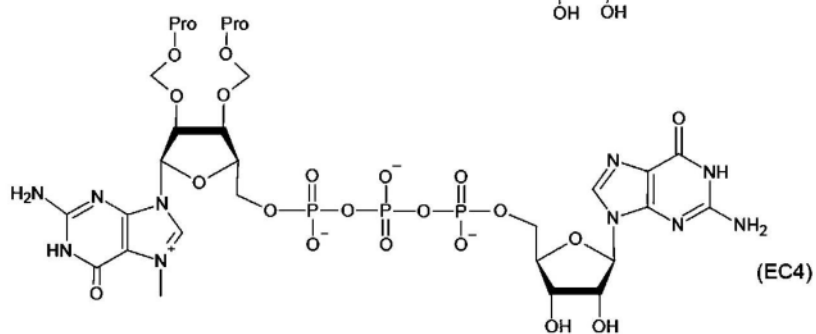
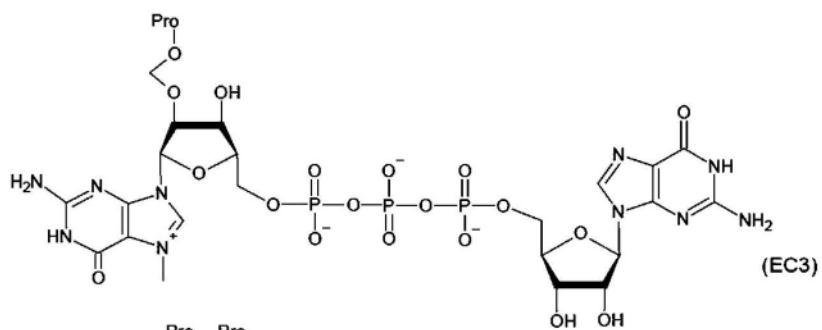
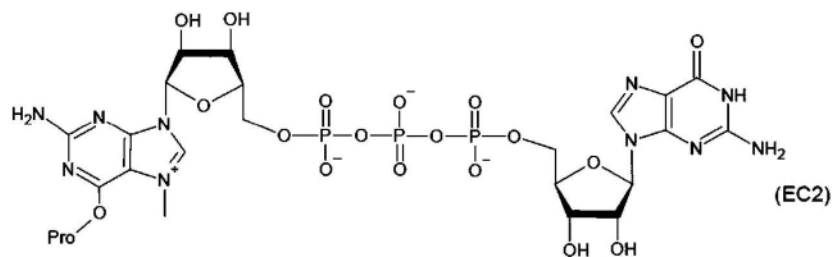
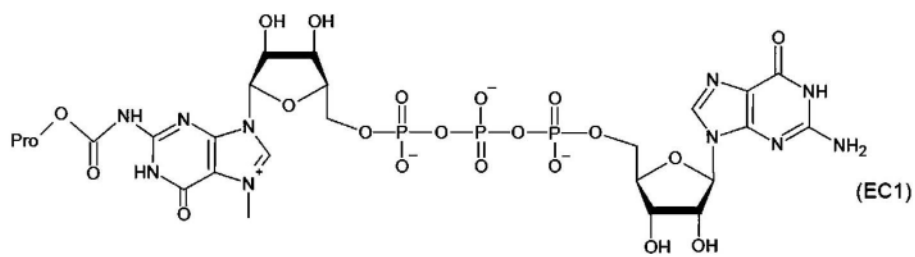
其中, $\text{Pro1} \sim \text{Pro4}$ 表示所述疏水性保护基或氢, 它们的任意至少1个为疏水性保护基, $\text{Pro1} \sim \text{Pro4}$ 彼此相同或不同, X 选自氧、硫和硒原子, Nuc 表示天然或非天然型的核苷或在其3' 位碳上连接有1个或多个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。

22. 如权利要求20所述的mRNA医药品, 其特征在于:

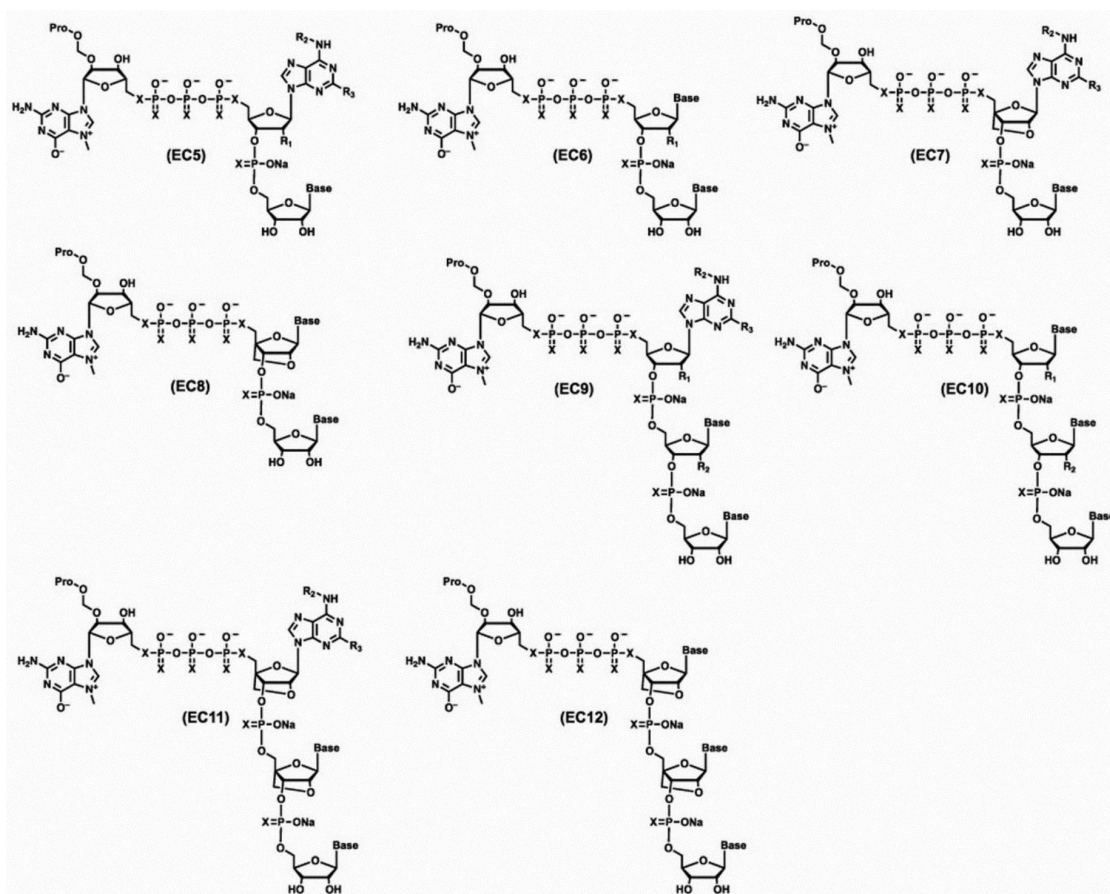
所述Nuc为天然或非天然型的核苷或在其3' 位碳上连接有1个或2个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。

23. 如权利要求21所述的mRNA医药品, 其特征在于:

包含所述式 (EC0) 的结构疏水性底物选自下述式 (EC1) ~ (EC12),



其中,Pro表示所述疏水性保护基;



式中, R_1 表示选自羟基(OH)、甲氧基(OCH_3)、甲氧基乙基($-OCH_2OCH_3$)、氟(F)、甲酰胺基($-NHCHO$)中的取代基, R_2 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_3 表示氢或氨基($-NH_2$), 式中, Base表示选自腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤中的天然型核酸碱基、或非天然碱基, 式中, X选自氧、硫和硒原子, 式中, Pro表示所述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基。

24. 一种mRNA医药品的制造方法, 其用于制造权利要求20所述的mRNA医药品, 该制造方法的特征在于, 包括:

将所述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入所述核苷酸类, 生成疏水性核苷酸类的保护基导入工序。

25. 一种mRNA医药品的纯化方法, 其用于纯化权利要求21所述的mRNA医药品, 该纯化方法的特征在于:

所述保护基导入工序通过以具有与所述核苷酸类互补的序列的核酸为模板, 以具有所述式(EC0)的结构的疏水性底物和核苷三磷酸为底物, 利用RNA聚合酶转录所述模板, 来合成所述疏水性核苷酸类。

核苷酸类的纯化方法和核苷酸类的纯化装置以及疏水性试剂和疏水性底物

技术领域

[0001] 本发明涉及核苷酸类的纯化方法和核苷酸类的纯化装置以及疏水性试剂和疏水性底物。

背景技术

[0002] DNA, RNA等核酸是生命科学中的重要分子, 已在医疗领域等中研究多年。近年来, mRNA的医药品应用引起了特别的关注。与抑制蛋白质的合成的反义核酸、或引起RNA干扰的siRNA(小干扰RNA, small interfering RNA)等不同, mRNA医药品是通过在细胞内合成蛋白质来获得治疗效果。因此, 不仅能够抑制异常蛋白质, 还能够补充正常蛋白质, mRNA医药品的实现导致使用核酸药物的治疗策略的扩展。另外, mRNA不需要输送到细胞核中, 也没有向基因组中的插入突变风险, 因此在安全性上也具有优异的一面。此外, 近年来, 通过核酸递送相关技术的开发进展, 已被广泛认为mRNA的细胞膜透过性低是可克服的, 并且mRNA医药品是能够实现的。

[0003] mRNA的分离纯化中使用着高效液相色谱(HPLC)或变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。目前为止, 已知利用疏水性的RNA纯化法。例如, 有报告根据亚磷酸胺法, 在固相上合成的RNA末端导入作为疏水性标签的二硝基苄保护基, 通过反相HPLC纯化RNA的方法(例如参照非专利文献1、参照后述的图5的c))。在该方法中, 将疏水性修饰RNA分离纯化后, 通过紫外光照射将光保护基除去, 得到天然型的RNA。根据该文献, 成功地将67mer的RNA分离纯化, 以95%以上的高收率实现了二硝基苄基的脱保护。

[0004] 另一方面, 到目前为止, 本发明的发明人开发出了用于核酸扩增的具有分解性保护基的引物(例如参照专利文献1)。该分解性保护基由硝基苄基等构成, 导入到构成核酸的核苷酸中的中间位置的核苷酸的3'位磷酸基, 而不是导入到构成核酸的核苷酸中的5'末端或3'末端等的末端位置。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1: 国际公开第2021/020562号(权利要求1、权利要求4、权利要求5、第0073~0088段、图9、图10等)

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1: Pradere, U. et al., Chem. Eur. J. 2017, 23, 5210-5213

发明内容

[0010] 发明所要解决的技术问题

[0011] 非专利文献1的方法仅在化学合成的RNA90残基程度的纯化中使用。非专利文献1的二硝基苄保护基虽然有2个硝基苄基, 但位于它们之间的碳是亲电子性的且反应性高。因此, 二硝基苄保护基容易受铵等的攻击而被分解, 因此保护基导入后缺乏稳定性, 目标核苷

酸类的收率低。另外,本文的二硝基苯保护基在分子内具有2个反应性高的硝基苄基,因此具有爆炸性,不容易操作,很危险。进而,在该文献中,并没有记载100个碱基以上的长RNA的纯化、以及通过使用聚合酶的转录法的纯化。

[0012] 本发明的目的在于提供导入了保护基的状态的核苷酸类稳定、脱保护后的核苷酸类的收率高、且安全性高的核苷酸类的纯化方法和核苷酸类的纯化装置。另外,本发明的另一个目的在于提供用于在这样的核苷酸类的纯化方法和纯化装置中使用的疏水性试剂和疏水性底物。

[0013] 用于解决技术问题的技术方案

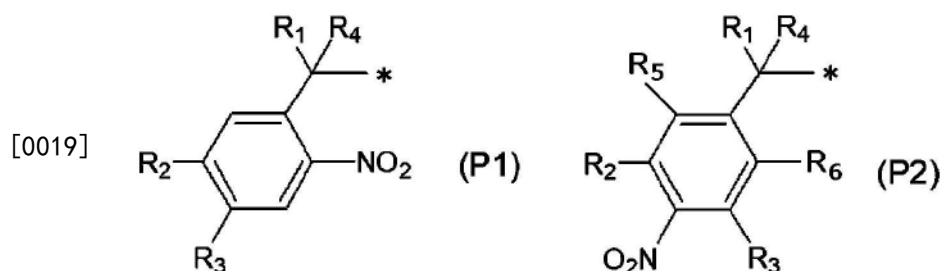
[0014] 本发明的发明人为了解决上述问题反复进行了深入研究。其结果发现,通过将单硝基苯作为保护基,导入了保护基的核苷酸类变得稳定,通过光或还原反应的脱保护带来的核苷酸类的收率也提高,从而完成了本发明。本发明如下所述。

[0015] (1)一种以至少1个核苷酸和/或其衍生物作为结构单元的核苷酸类的纯化方法,其特征在于,包括:

[0016] 将下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入核苷酸类,生成疏水性核苷酸类的保护基导入工序;

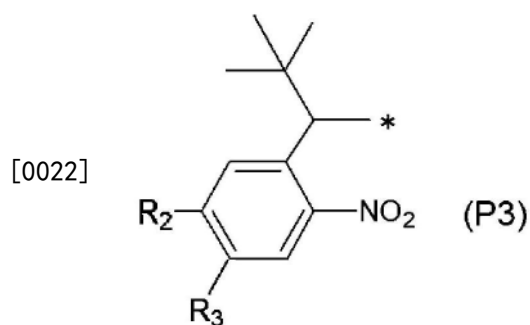
[0017] 在疏水性环境下将上述疏水性核苷酸类分离纯化的分离纯化工序;和

[0018] 从上述疏水性核苷酸类将上述疏水性保护基脱保护,生成上述核苷酸类的脱保护工序。



[0020] (其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 可以相同或不同。*是与核苷酸类的价键,直接或经由选自-O-C-和-O-C(=O)-的连结基与构成核苷酸类的原子结合。)

[0021] (2)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述疏水性保护基由下述式(P3)表示。



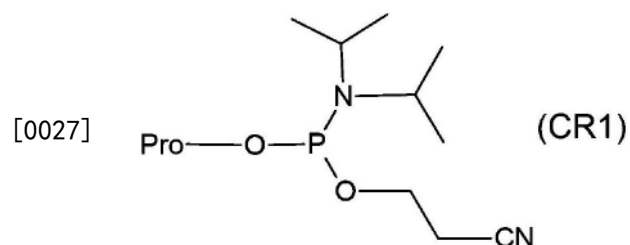
[0023] (其中, R_2 和 R_3 如(1)中所规定。)

[0024] (3)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序在

位于上述核苷酸类的5'末端的核苷酸导入上述疏水性保护基。

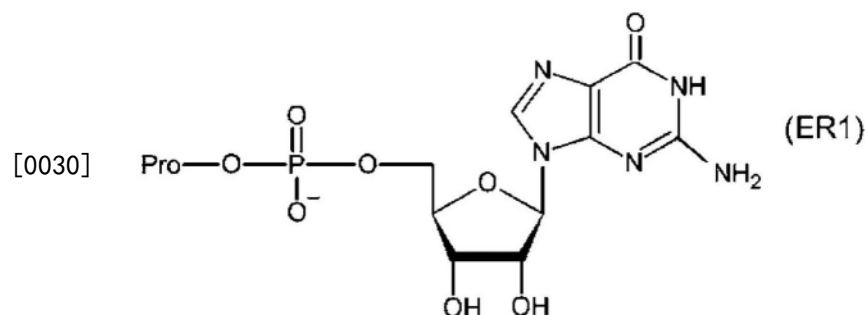
[0025] (4)如上述(3)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序在构成上述核苷酸的糖的5'磷酸基、2'羟基或碱基上导入上述疏水性保护基。

[0026] (5)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序将下述式(CR1)所示的亚磷酰胺试剂导入核苷酸,合成保护基导入核苷酸,通过固相合成在上述保护基导入核苷酸的3'末端侧依次连接单核苷酸,合成上述疏水性核苷酸类。



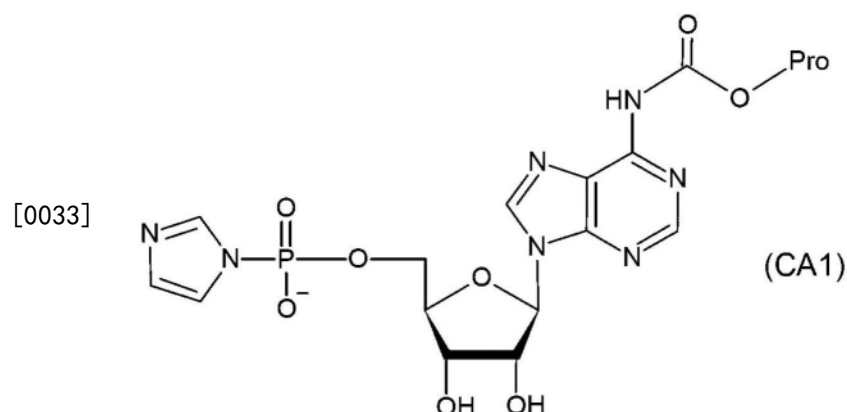
[0028] (其中,Pro表示上述疏水性保护基。)

[0029] (6)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序通过以具有与上述核苷酸类互补的序列的核酸为模板,以下述式(ER1)所示的疏水性底物和核苷三磷酸为底物,利用RNA聚合酶转录上述模板,从而合成上述疏水性核苷酸类。



[0031] (其中,Pro表示上述疏水性保护基。)

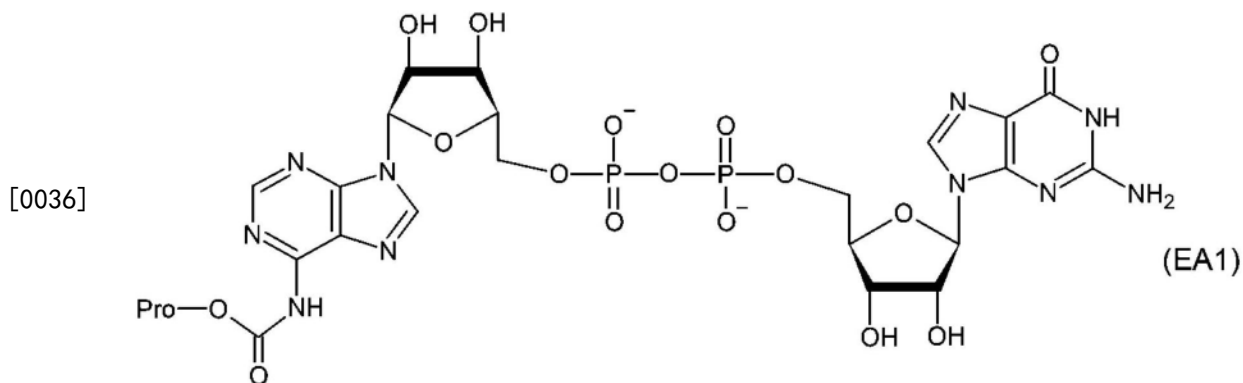
[0032] (7)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序使下述式(CA1)所示的腺苷化试剂与包含上述核苷酸类的寡核苷酸的5'末端的磷酸基反应,合成上述疏水性核苷酸类。



[0034] (其中,Pro表示上述疏水性保护基。)

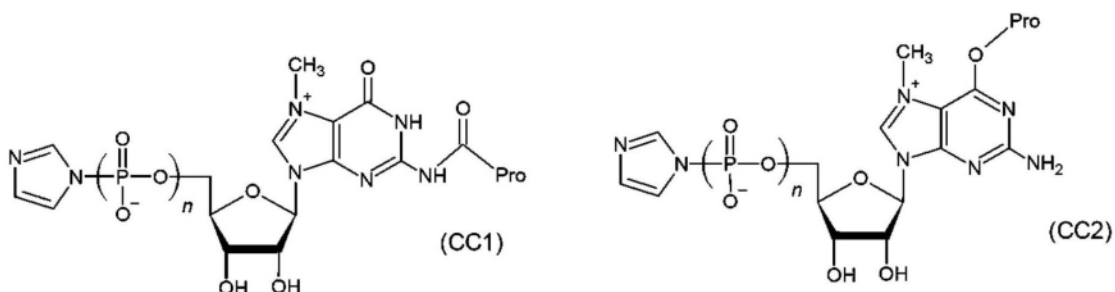
[0035] (8)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序通过以具有与上述核苷酸类互补的序列的核酸为模板,以下述式(EA1)所示的疏水性底物和

核苷三磷酸为底物,利用RNA聚合酶转录上述模板,从而合成上述疏水性核苷酸类。

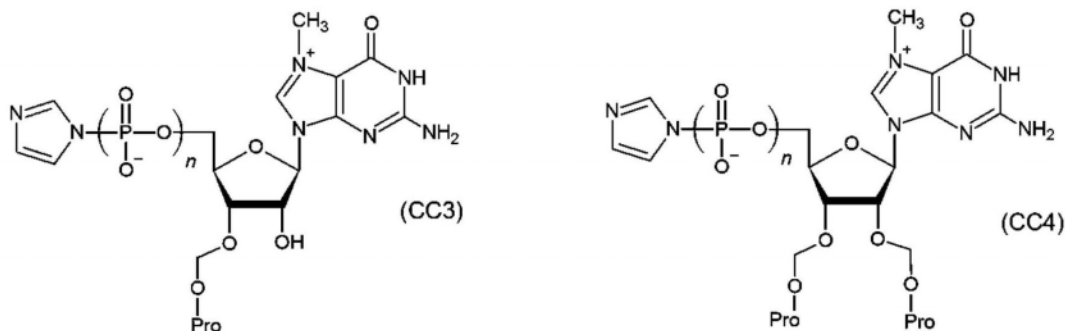


[0037] (其中,Pro表示上述疏水性保护基。)

[0038] (9)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序使选自下述式(CC1)~(CC4)中的加帽化试剂与包含上述核苷酸类的寡核苷酸的5'末端的磷酸基反应,合成上述疏水性核苷酸类。



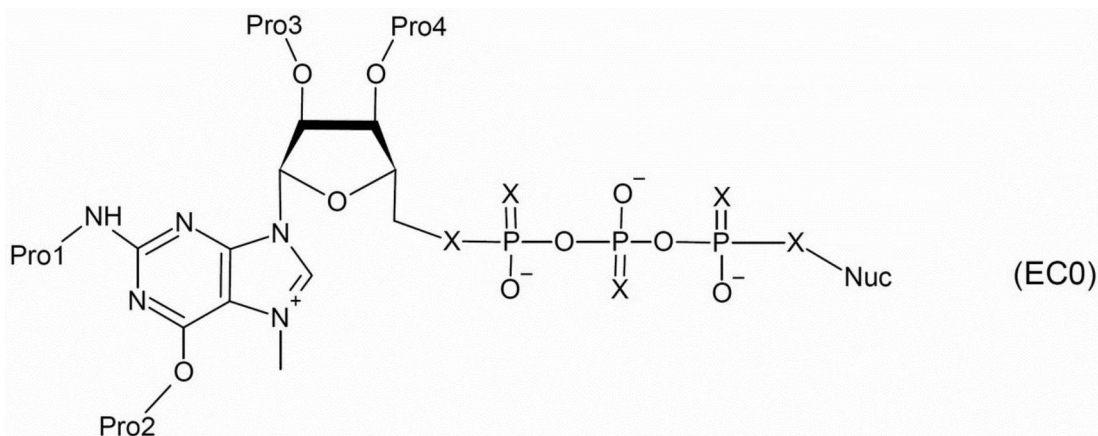
[0039]



[0040] (其中,Pro表示上述疏水性保护基,n表示1或2的整数。)

[0041] (10)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述保护基导入工序通过以具有与上述核苷酸类互补的序列的核酸为模板,以包含下述式(EC0)的结构的疏水性底物和核苷三磷酸为底物,利用RNA聚合酶转录上述模板,合成上述疏水性核苷酸类。

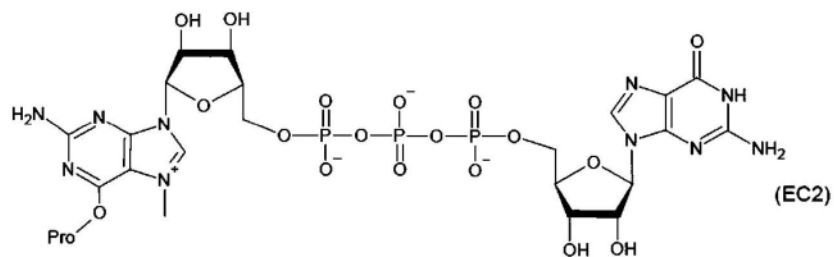
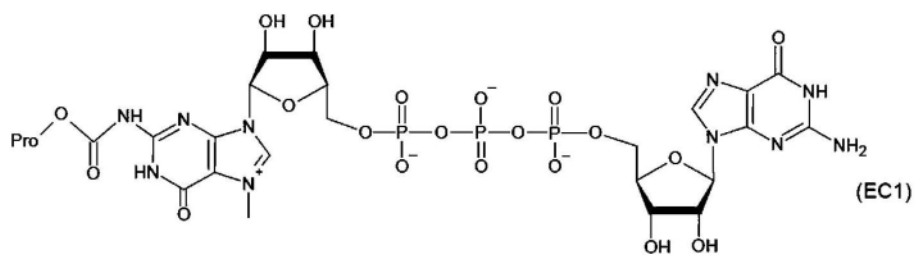
[0042]



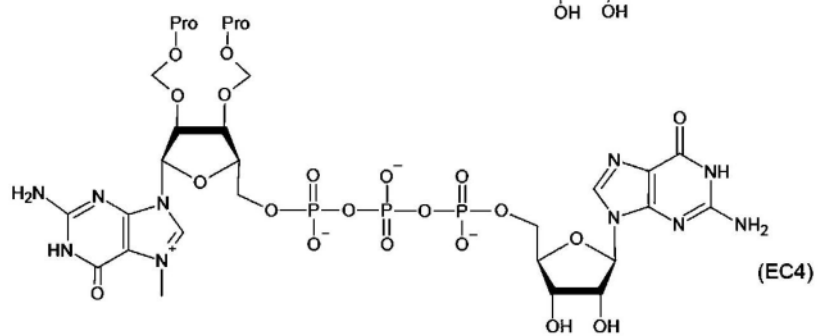
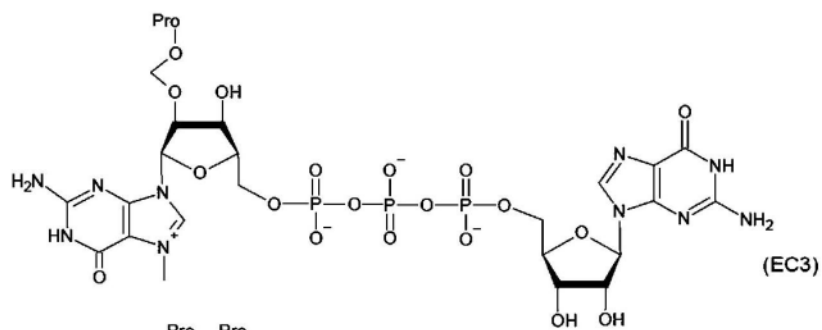
[0043] (其中, Pro1 ~ Pro4表示上述疏水性保护基或氢, 它们中的任意至少1个为疏水性保护基, Pro1 ~ Pro4彼此可以相同或不同。X选自氧、硫和硒原子。Nuc表示天然或非天然型的核苷或者在其3' 位的碳上连接有1个或多个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。)

[0044] (11)如上述(10)所述的核苷酸类的纯化方法, 其特征在于: 上述Nuc为天然或非天然型的核苷或者在其3' 位的碳连接有1个或2个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。

[0045] (12)如上述(10)所述的核苷酸类的纯化方法, 其特征在于: 包含上述式 (EC0) 的结构的上述疏水性底物选自下述式 (EC1) ~ (EC4)、下述式 (EC5) ~ (EC12)。

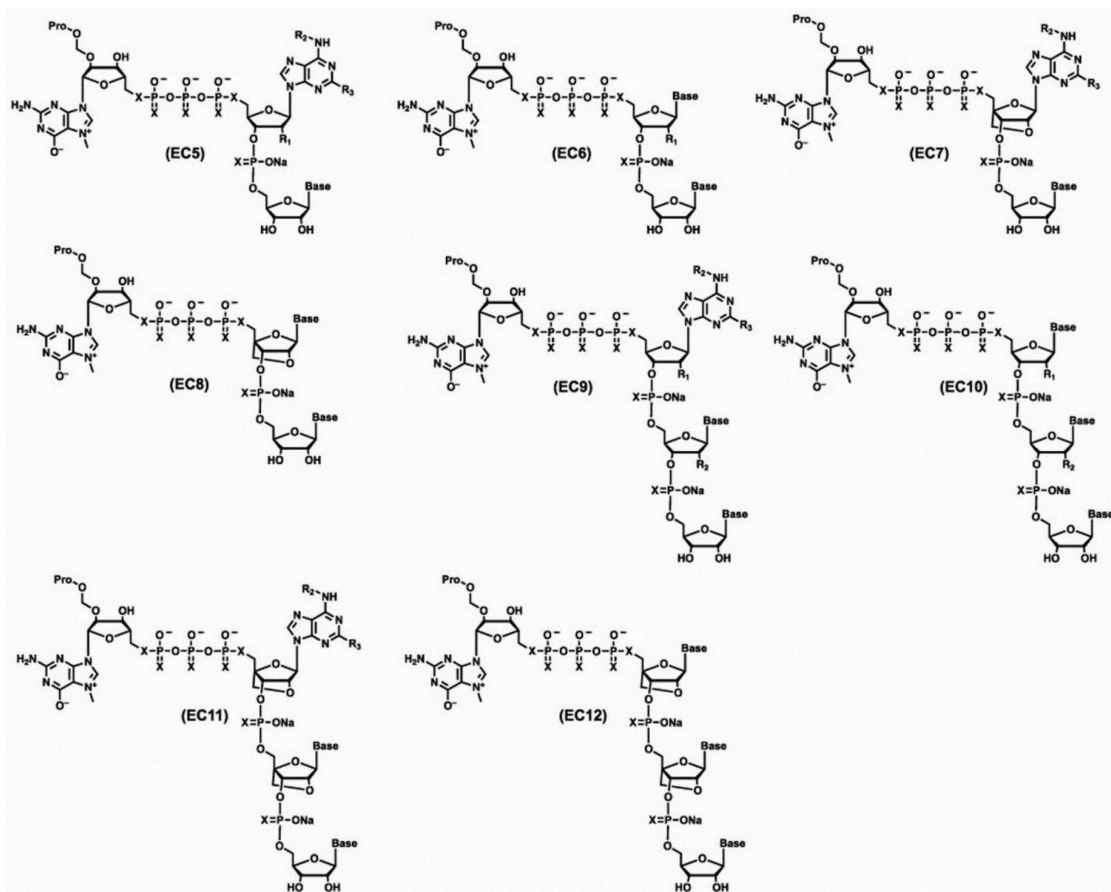


[0046]



[0047] (其中,Pro表示上述疏水性保护基。)

[0048]



[0049] (其中, R_1 表示选自羟基(OH)、甲氧基(OCH_3)、甲氧基乙基($-OCH_2OCH_3$)、氟(F)、甲酰胺基($-NHCHO$)中的取代基, R_2 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_3 表示氢或氨基($-NH_2$)。其中, Base表示选自腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤中的天然型核酸碱基、或者非天然碱基。其中, X选自氧、硫和硒原子。其中, Pro表示上述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基。)

[0050] (13)如上述(10)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述疏水性底物为上述式(EC0)所示的加帽衍生物,在上述脱保护工序之前,使用结合有上述疏水性保护基的状态的上述疏水性核苷酸类进行翻译。

[0051] (14)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述分离纯化工序通过高效液相色谱将上述疏水性核苷酸类分离纯化。

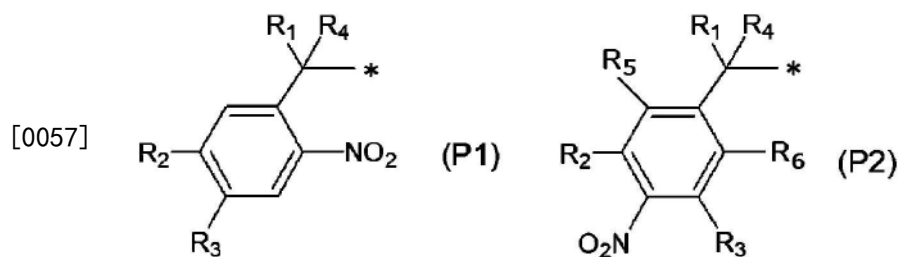
[0052] (15)如上述(1)所述的核苷酸类的纯化方法,其特征在于:上述脱保护工序通过光照对上述疏水性保护基进行脱保护。

[0053] (16)一种以至少1个核苷酸和/或其衍生物作为结构单元的核苷酸类的纯化装置,其特征在于,包括:

[0054] 将下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入核苷酸类,生成疏水性核苷酸类的保护基导入单元;

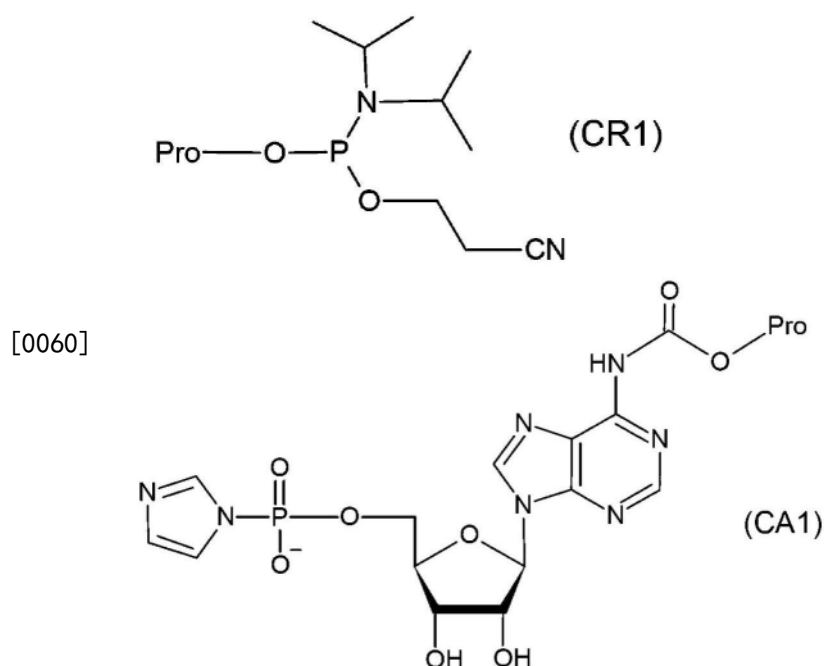
[0055] 在疏水性环境下将上述疏水性核苷酸类分离纯化的分离纯化单元;和

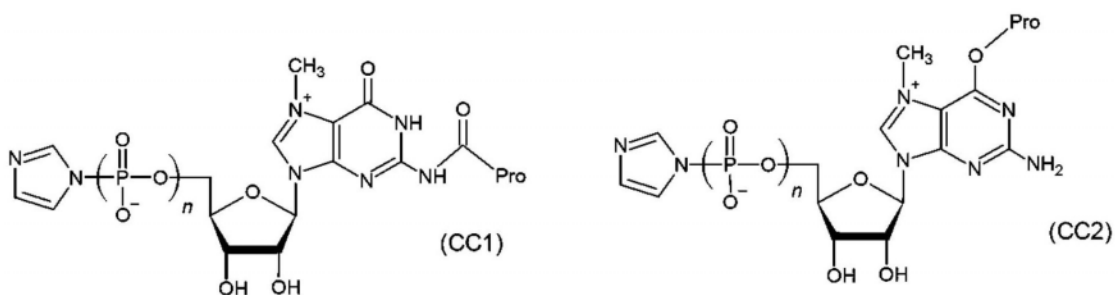
[0056] 从上述疏水性核苷酸类将上述疏水性保护基脱保护,生成上述核苷酸类的脱保护单元。



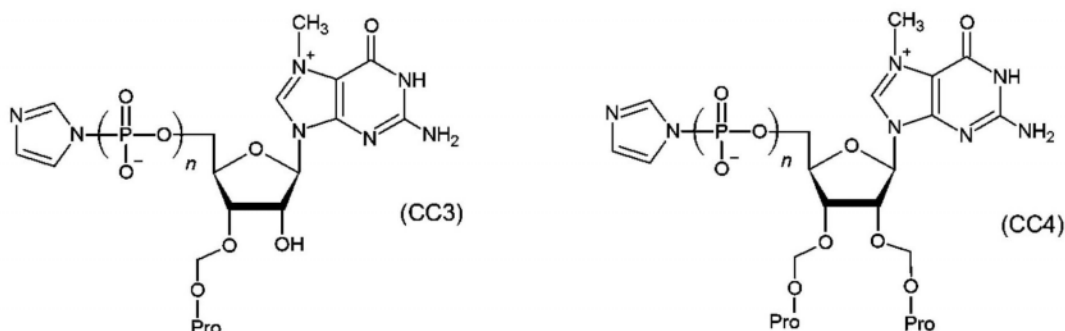
[0058] (其中, R_1 表示碳原子数 1 ~ 30 的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数 1 ~ 10 的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数 1 ~ 10 的直链或支链烷基或碳原子数 1 ~ 10 的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 可以相同或不同。* 是与核苷酸类的价键, 直接或经由选自 -O-C- 和 -O-C(=O)- 中的连结基与构成核苷酸类的原子结合。)

[0059] (17) 一种用于通过化学合成来合成疏水性核苷酸类的疏水性试剂, 其特征在于, 其选自下述式 (CR1)、式 (CA1) 和式 (CC1) ~ (CC4)。

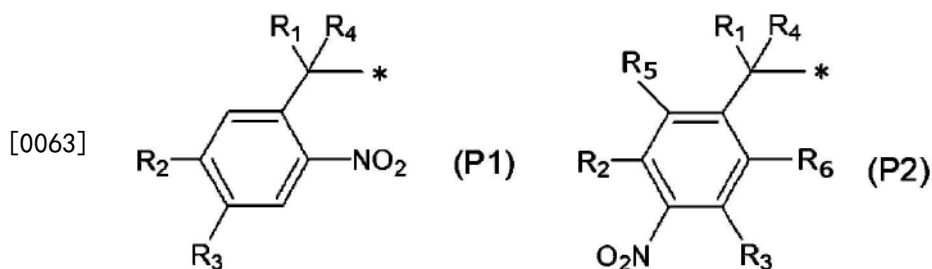




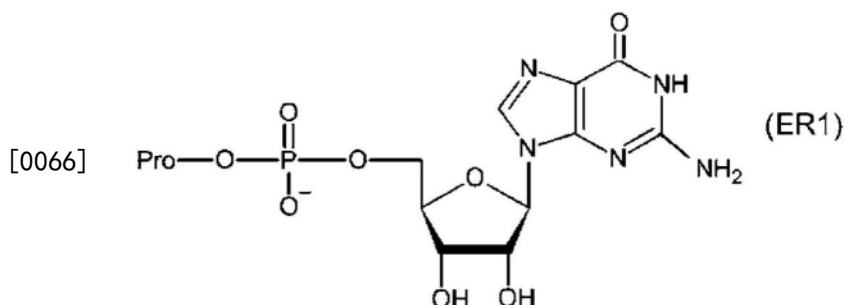
[0061]



[0062] (其中,Pro表示下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基,n表示1或2的整数。)

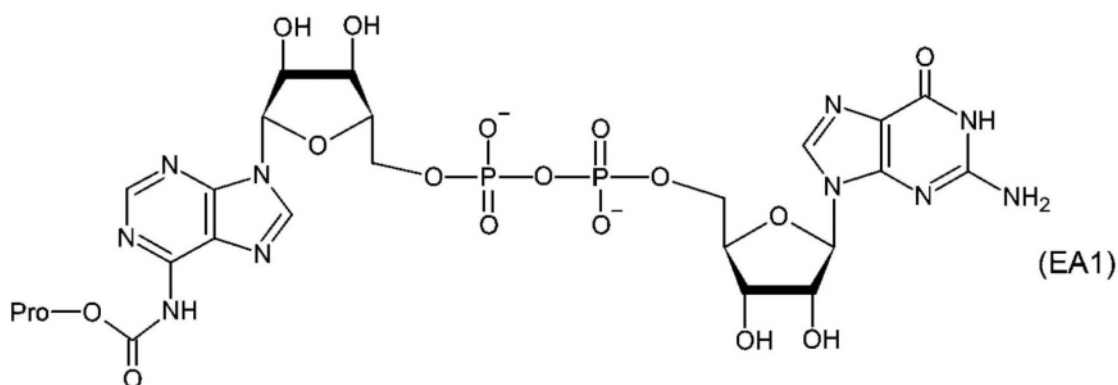
[0064] (其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 可以相同或不同。*是价键。)

[0065] (18)一种用于利用RNA聚合酶生成疏水性核苷酸类的疏水性底物,其特征在于:其选自下述式(ER1)、下述式(EA1)和下述式(EC0)。



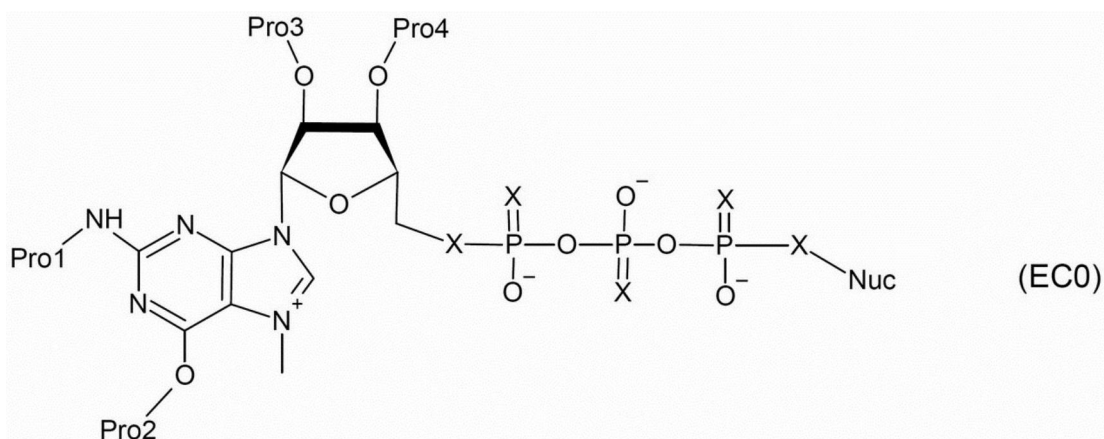
[0067] (其中,Pro表示下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基。)

[0068]



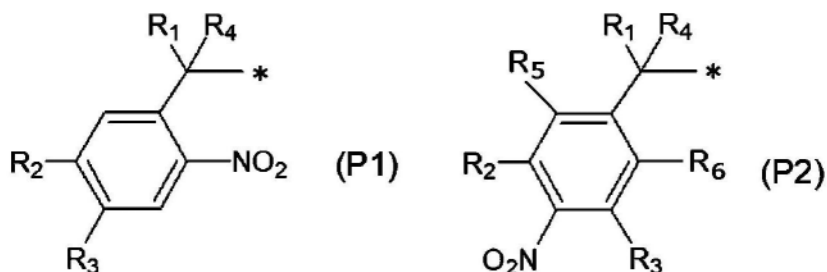
[0069] (其中,Pro表示下述式 (P1) 或 (P2) 所示的上述疏水性保护基。)

[0070]



[0071] (其中,Pro1~Pro4表示下述式 (P1) 或 (P2) 所示的疏水性保护基或氢,它们的任意至少1个为疏水性保护基,Pro1~Pro4彼此可以相同或不同。X选自氧、硫和硒原子。Nuc表示核苷,在其3'位的碳上可以连接有1或2个天然或非天然型的核苷酸。)

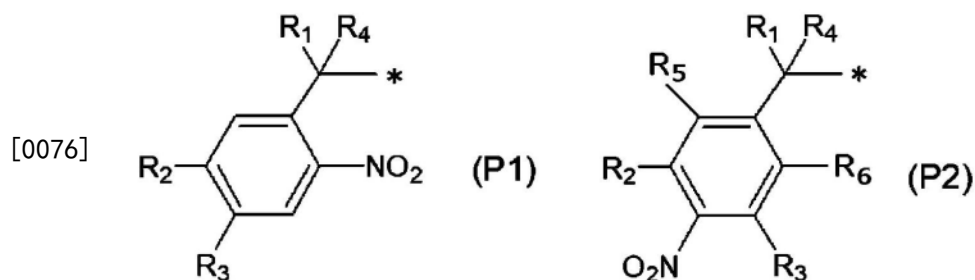
[0072]



[0073] (其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 可以相同或不同。*是价键。)

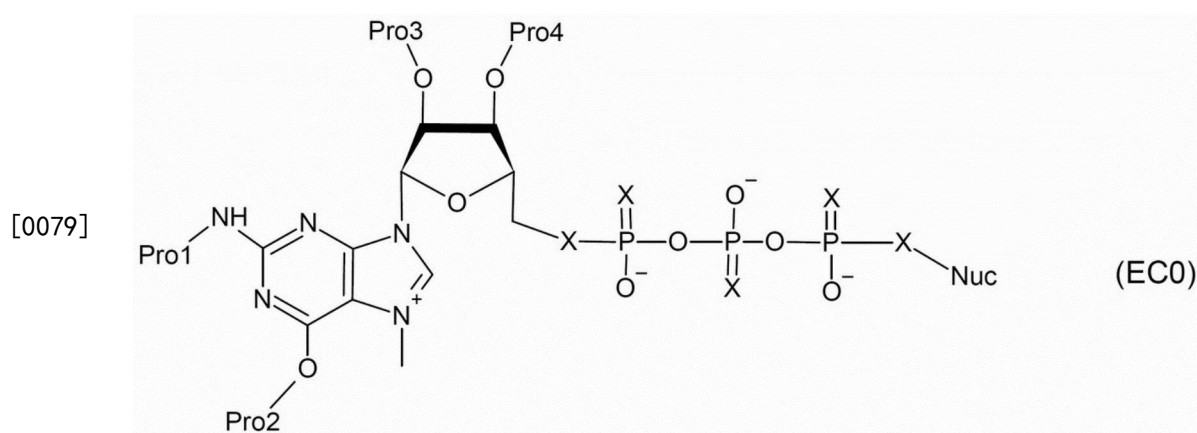
[0074] (19)如上述(18)所述的疏水性底物,其特征在于:上述Nuc是天然或非天然型的核苷或者在其3'位的碳上连接有1个或2个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。

[0075] (20)一种mRNA医药品,其包含在以至少1个核苷酸和/或其衍生物作为结构单元的核苷酸类上导入有下述式 (P1) 或 (P2) 所示的疏水性保护基的疏水性核苷酸类。



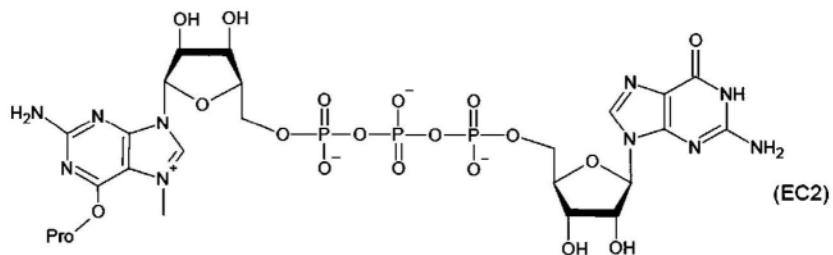
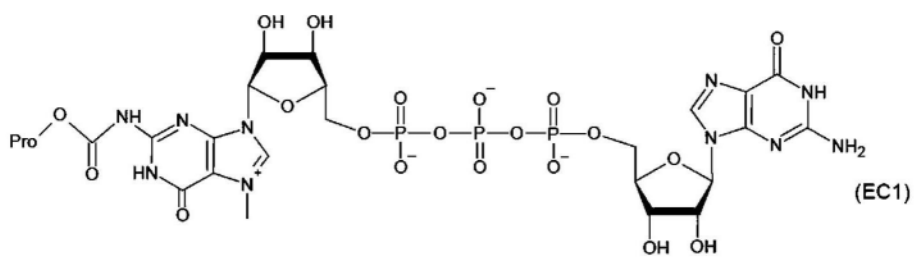
[0077] (其中, R_1 表示碳原子数 1 ~ 30 的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数 1 ~ 10 的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数 1 ~ 10 的直链或支链烷基或碳原子数 1 ~ 10 的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 可以相同或不同。* 是与核苷酸类的价键, 直接或经由选自 -O-C- 和 -O-C(=O)- 的连结基与构成核苷酸类的原子结合。)

[0078] (21) 如 (20) 所述的 mRNA 医药品, 其具有在包含下述式 (EC0) 的结构的疏水性底物的 3' 末端侧的核苷酸的 3' 位的碳上连接有 RNA 的结构。

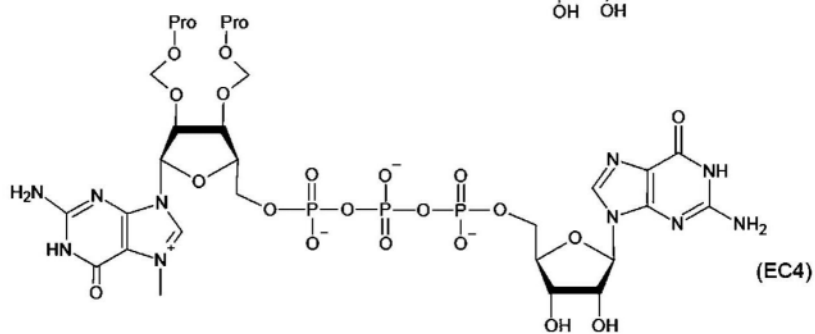
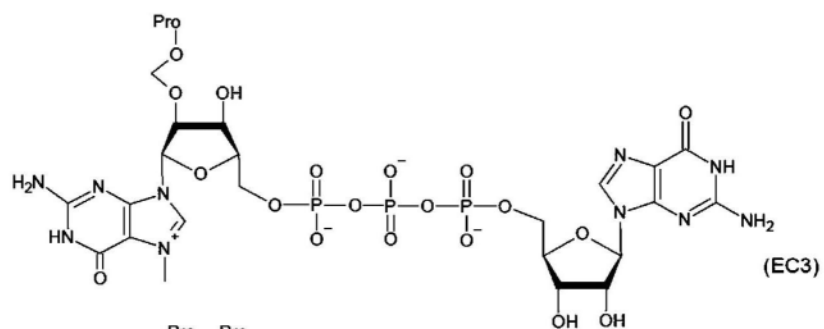


[0080] (其中, Pro1 ~ Pro4 表示上述疏水性保护基或氢, 它们的任意至少 1 个为疏水性保护基, Pro1 ~ Pro4 彼此可以相同或不同。X 选自氧、硫和硒原子。Nuc 表示天然或非天然型的核苷或者在其 3' 位的碳上连接有 1 个或多个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。)

[0081] (23) 如上述 (21) 所述的 mRNA 医药品, 其特征在于: 包含上述式 (EC0) 的结构的上述疏水性底物选自下述式 (EC1) ~ (EC12)。

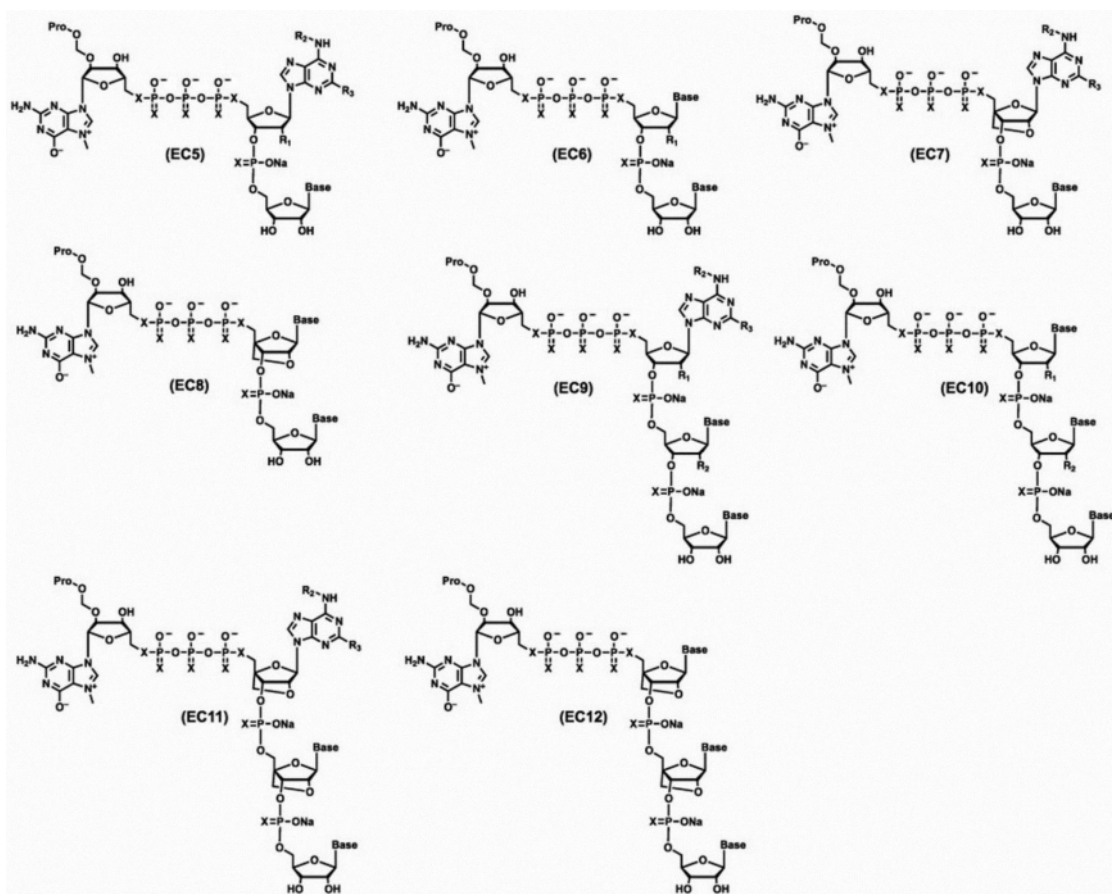


[0082]



[0083] (其中,Pro表示上述疏水性保护基。)

[0084]



[0085] (其中, R_1 表示选自羟基(OH)、甲氧基(OCH_3)、甲氧基乙基($-OCH_2OCH_3$)、氟(F)、甲酰胺基($-NHCHO$)中的取代基, R_2 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_3 表示氢或氨基($-NH_2$)。其中, Base表示选自腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤中的天然型核酸碱基、或非天然碱基。其中, X选自氧、硫和硒原子。其中, Pro表示上述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基。)

[0086] (24)一种mRNA医药品的制造方法,其用于制造上述(20)所述的mRNA医药品,该制造方法的特征在于,包括:

[0087] 将上述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入上述核苷酸类,生成疏水性核苷酸类的保护基导入工序。

[0088] (25)一种mRNA医药品的纯化方法,其用于纯化上述(21)所述的mRNA医药品,该纯化方法的特征在于:

[0089] 上述保护基导入工序通过以具有与上述核苷酸类互补的序列的核酸为模板,以具有上述式(EC0)的结构的疏水性底物和核苷三磷酸为底物,利用RNA聚合酶转录上述模板,来合成上述疏水性核苷酸类。

[0090] (Opt1)一种mRNA医药品,在上述(21)中,包含上述式(EC0)的结构的疏水性底物被脱保护,上述Pro1~Pro4为氢。

[0091] (Opt2)如上述(Opt1)所述的mRNA医药品,其特征在于:包含上述式(EC0)的结构的上述疏水性底物选自上述式(EC1)~(EC12),该疏水性保护基被脱保护,上述Pro为氢。

[0092] 发明的效果

[0093] 根据本发明,能够提供导入了保护基的状态的核苷酸类稳定、脱保护后的核苷酸

类的收率高、且安全性高的核苷酸类的纯化方法和核苷酸类的纯化装置。另外,根据本发明,能够提供用于在这样的稳定、高收率、安全的核苷酸类的纯化方法或纯化装置中使用的疏水性试剂和疏水性底物。

附图说明

[0094] 图1是表示本发明的核苷酸类的纯化方法和制造装置的概念的图。

[0095] 图2是表示使用亚磷酰胺(amidite)试剂_1的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果的图。

[0096] 图3是表示使用亚磷酰胺试剂_2的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果的图。

[0097] 图4是表示使用亚磷酰胺试剂_3的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果的图。

[0098] 图5是表示使用亚磷酰胺试剂_1、2的5'磷酸化寡核苷酸利用反相HPLC分析的合成收率比较的结果的图。

[0099] 图6是表示使用亚磷酰胺试剂_1的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果的图。

[0100] 图7是表示使用亚磷酰胺试剂_1合成的5'末端磷酸化RNA通过光照射定量地脱保护的图。

[0101] 图8是表示使用亚磷酰胺试剂_1合成的5'末端磷酸化RNA能够由反相HPLC分离纯化、且通过之后的光照射能够定量地脱保护的图。

[0102] 图9是表示本发明和现有技术中的转录合成RNA的方法的概略的图。

[0103] 图10是表示通过HPLC的GMP和R-pG反应液的分析结果的图。

[0104] 图11是表示对转录反应中合成的RNA进行电泳的结果的图。

[0105] 图12是表示利用C18柱的34nt RNA的分析结果的图。

[0106] 图13是表示利用C4柱的34nt RNA的分析结果的图。

[0107] 图14是表示利用C18柱的100nt RNA的分析结果的图。

[0108] 图15是表示利用C18柱的250nt RNA的分析结果的图。

[0109] 图16是表示利用C4柱的250nt RNA的分析结果的图。

[0110] 图17是表示利用C18柱的650nt RNA的分析结果的图。

[0111] 图18是表示利用C4柱的650nt RNA的分析结果的图。

[0112] 图19是表示利用C18柱的1078nt RNA的分析结果的图。

[0113] 图20是表示利用C4柱的1078nt RNA的分析结果的图。

[0114] 图21是表示34nt RNA的HPLC分析和质谱分析的结果的图。

[0115] 图22是表示34nt RNA的脱保护前后的HPLC分析的结果的图。

[0116] 图23是表示250nt RNA的脱保护前后的HPLC分析的结果的图。

[0117] 图24是表示支化型加帽类似物化合物(前体)的合成结果的图。

[0118] 图25是表示在使用T7RNA聚合酶的试管内转录反应中添加化合物11,能够得到含保护基的腺苷化RNA的结果的图。

[0119] 图26是表示转录反应中制备的含保护基的腺苷化RNA通过光照射被脱保护,转化

为目标腺苷化RNA的结果的图。

[0120] 图27是表示合成的作为新型加帽类似物化合物的加帽类似物_1的各种分析结果的图。

[0121] 图28是表示合成的作为新型加帽类似物化合物的加帽类似物_2的各种分析结果的图。

[0122] 图29是表示导入了新型加帽类似物的RNA能够由反相HPLC分离纯化的图。

[0123] 图30是表示反相HPLC分离纯化后的NanoLuc荧光素酶mRNA的翻译活性评价的图。

[0124] 图31是表示反相HPLC分离纯化后的NanoLuc荧光素酶mRNA的翻译活性评价、特别是与使用ARCA时的活性比较的图。

[0125] 图32是表示使用疏水性化学加帽化试剂的RNA的化学加帽化反应的结果的图。

[0126] 图33是表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。

[0127] 图34是表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。

[0128] 图35是表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。

[0129] 图36是表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。

[0130] 图37是表示使用加帽类似物转录合成得到的RNA在HeLa细胞内的翻译活性评价的结果的图。

[0131] 图38是表示使用加帽类似物转录合成得到的RNA在JAWS II细胞内的翻译活性评价的结果的图。

[0132] 图39是表示使用含疏水性保护基的二核苷酸型加帽类似物 (DiPure, DiPure/3' ome, DiPure/2' ome) 和现有型加帽类似物 (ARCA) 制备得到的650个碱基长度的NanoLuc荧光素酶 (NanoLuc luciferase) (Nluc)mRNA的翻译活性比较的图。

[0133] 图40是表示使用含疏水性保护基的三核苷酸型 (TriPure_0, TriPure_1) • 四核苷酸型加帽类似物 (TetraPure_2, TetraPure_2/m6A, TetraPure_2/G) 和现有型加帽类似物 (Tri_1, Tetra_2) 制备得到的650个碱基长度的NanoLuc荧光素酶 (Nluc)mRNA的翻译活性比较的图。

[0134] 图41是表示在4247个碱基长度的RNA链的转录时加入含疏水性保护基的加帽类似物 (DiPure) 制备得到的加帽化mRNA的利用反相HPLC的分析结果的图。

[0135] 图42是表示PureCap型mRNA没有导入甲基假尿嘧啶核苷而显示高的蛋白质合成量的结果的图。

[0136] 图43是表示进行细胞内的免疫应答的评价 (HEK293NF-kB细胞) 的结果的图。

[0137] 图44是表示纯度高的PureCap型mRNA比ARCA型mRNA在动物个体内显示更高的蛋白质表达能力的结果的图。

[0138] 图45是表示进行细胞内的免疫应答的评价 (HEK293NF-kB细胞) 的结果的图。

具体实施方式

[0139] 1. 核苷酸类的纯化方法

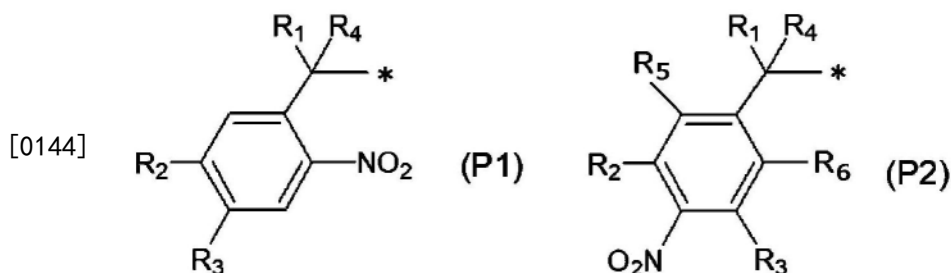
[0140] 以下,对本发明的核苷酸类的纯化方法进行说明。本发明的核苷酸类的纯化方法是对作为纯化对象的核苷酸类进行纯化的方法,包括保护基导入工序、分离纯化工序、脱保护工序。以下,对于它们分别进行说明。此外,本发明中的“核苷酸类”是以至少1个核苷酸

和/或其衍生物作为结构单元的化合物。核苷酸由糖、碱基、磷酸构成。核苷酸类包含1个核苷酸构成的单核苷酸、多个核苷酸连结而成的寡核苷酸和多核苷酸(均称为“核酸”)、以及它们的衍生物。其中,寡核苷酸是指核苷酸的数量为2~20个碱基的核酸,多核苷酸是指核苷酸的数量为21个碱基以上的核酸(DNA、RNA)。另外,核苷酸类也包含具有核苷酸的5'末端分支为2个以上的分支结构的物质,作为分支结构能够列举2支化型、3支化型等。

[0141] 另外,至少1个核苷酸的衍生物包含对单核苷酸或核酸(寡核苷酸、多核苷酸)进行了修饰等的物质,例如包含这些核苷酸被甲基化等修饰后的产物、5'末端被腺苷化或加帽化的产物。作为构成本发明的核苷酸类的糖,能够列举核糖或脱氧核糖。另外,作为构成本发明的核苷酸类的碱基,能够列举腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、N-甲基腺嘌呤、N-苯甲酰基腺嘌呤、2-甲基硫基腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、N-异丁酰基鸟嘌呤、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、4-N-甲基胞嘧啶、4-N,N-二甲基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、或5,6-二氢尿嘧啶等。此外,作为构成本发明的核苷酸类的磷酸,能够列举单磷酸、二磷酸、三磷酸等。

[0142] (1) 保护基导入工序

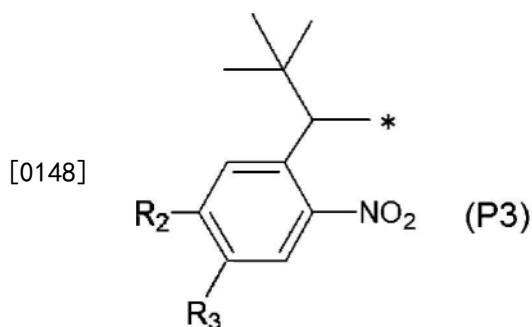
[0143] 保护基导入工序是将下述的式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基(也称为“脂溶性保护基”、“纯化标签”)导入核苷酸类生成疏水性核苷酸类的工序。



[0145] (其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 可以相同或不同。*是与核苷酸类的价键,直接或经由选自-O-C-和-O-C(=O)-的连结基与构成核苷酸类的原子结合。)

[0146] 这些之中,优选 R_1 为碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 为氢的情况。此外,从疏水性保护基稳定的观点出发, R_1 优选为支链烷基,更优选为仲烷基或叔烷基,特别优选为叔烷基。另一方面,从疏水性保护基的疏水性高且容易与其他化合物分离的观点出发, R_1 的碳原子数优选为5以上,更优选为10以上。特别是从疏水性保护基的分解效率高的观点出发,在疏水性保护基为光分解性的情况下, R_4 优选为氢,在疏水性保护基为还原剂分解性的情况下, R_4 为烷基时较为优选。

[0147] 特别是作为疏水性保护基,优选下述的式(P3)所示的具有叔丁基的基团。



[0149] (其中, R_2 和 R_3 如上述所规定。)

[0150] 在该情况下, 特别优选 R_2 和 R_3 为氢。

[0151] 疏水性保护基在核苷酸类为寡核苷酸或多核苷酸等的高分子化合物的情况下, 能够导入任意的核苷酸, 但特别优选导入到位于核苷酸类的5'末端的核苷酸。位于5'末端的核苷酸在DNA或RNA等的情况下, 对应于位于5'侧的最末端的核苷酸。另外, 在后述的腺苷化(AMP化)或加帽化(CAP化)的情况下, 位于5'末端的核苷酸分别相当于与DNA或RNA的5'末端的核苷酸结合的腺苷或帽(7-甲基鸟苷酸)。

[0152] 另外, 疏水性保护基能够导入核苷酸的任意的位点, 但特别优选导入糖的5'磷酸基、2'羟基或碱基。

[0153] 如专利文献1那样, 疏水性保护基不导入位于末端的核苷酸, 而导入中间位置的核苷酸的3'磷酸基时, 由于在由寡核酸构成的亲水性区域中存在疏水性保护基, 所以不易表现出疏水性效果, 纯化易于变得困难。另外, 如专利文献1那样, 疏水性保护基不导入位于末端的核苷酸, 而被导入中间位置的核苷酸的3'磷酸基时, 在疏水性条件下到纯化核苷酸类为止的过程中疏水性保护基分解的话, 核苷酸类有时在其中间位置会被切断。因此, 疏水性保护基的导入位置优选在5'末端的核苷酸且5'磷酸基或2'羟基、碱基等不构成核酸的链结构的官能团上导入。通过在这样的核酸的末端的位置上导入疏水性保护基, 对于1000个碱基以上的长链RNA这样的亲水性部分长的核酸, 也能够利用疏水性保护基容易地纯化。

[0154] 在磷酸基或羟基上导入疏水性保护基的情况下, 优选与构成磷酸基或羟基的氧原子直接结合, 或者经由选自-O-C-和-O-C(=O)-中的连结基结合。另外, 在碱基上导入疏水性保护基的情况下, 优选经由选自-O-C-和-O-C(=O)-中的连结基与构成碱基的氨基的氮原子结合。更详细而言, 从导入了疏水性保护基的化合物的稳定性高和容易合成的观点出发, 更优选上述的导入疏水性保护基的位置如下所示。

[0155] • 在将疏水性保护基向碱基的氧(=O)(鸟嘌呤碱基O6位等)导入的情况下, 直接导入。

[0156] • 在将疏水性保护基向碱基的氨基(-NH₂)(鸟嘌呤碱基N2位等)导入的情况下, 直接、或经由-(O)=C-O-导入。

[0157] • 在将疏水性保护基导入糖部(核糖、脱氧核糖)的羟基(-OH)的情况下, 经由-O-C-导入(※这是因为经由-(O)=C-O-导入时, 会进行相邻羟基间的重排反应)。

[0158] • 在将疏水性保护基导入到磷酸基的氧(-O-P(=O)(-OH)-O-)的情况下, 直接导入、或者经由-O-C-和-O-C(=O)-导入。

[0159] (2) 分离纯化工序

[0160] 分离纯化工序是在疏水性环境下将疏水性核苷酸类分离纯化的工序。图1表示了

将导入了疏水性保护基的核酸 (Nucleic Acid) 分离的工序 (Step_1: Purification, 工序_1: 纯化)。分离纯化工序只要是在疏水性条件下就没有特别限制, 能够列举液相色谱、膜分离等, 其中优选反相高效液相色谱 (反相HPLC)。反相HPLC是在色谱的柱中装入填充剂利用与流动相之间的疏水性相互作用的差异将分离对象分离的方法。作为填充剂的固定相支持体能够使用硅胶等, 作为填充剂表面的结合相能够使用碳原子数C4~C18左右的烷基。另外, 作为反相HPLC的流动相, 能够使用水或甲醇、乙腈等有机溶剂, 能够通过使水/有机溶剂 (例如乙腈) 的组成连续变化的梯度洗脱将分离对象根据疏水性进行分离。分离纯化工序的温度在10~40℃的范围内, 特别优选为室温 (25℃)。

[0161] (3) 脱保护工序

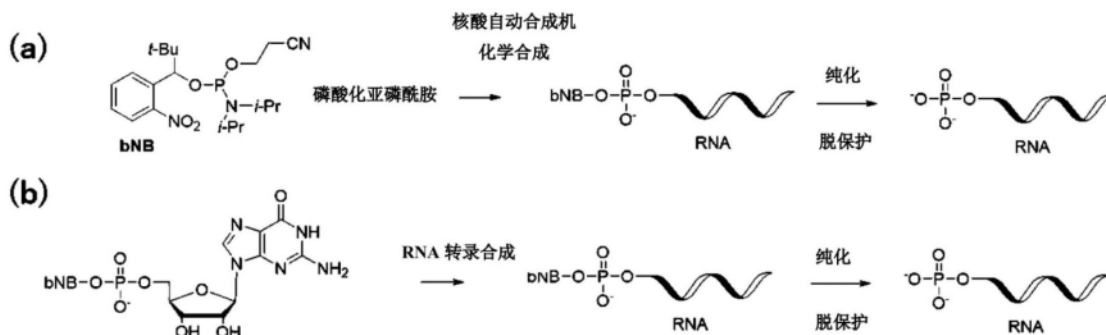
[0162] 脱保护工序是从疏水性核苷酸类将疏水性保护基脱保护而生成核苷酸类的工序。图1表示了将在分离纯化工序中纯化的疏水性核苷酸类脱保护的工序 (Step_2: Deprotection, 工序_2: 脱保护)。作为将疏水性保护基脱保护的方法, 能够列举光照射、还原、碱分解等, 特别优选光照射。光照射的条件可以根据疏水性保护基的性质等适当设定, 例如优选波长为300~400nm、光量为0.5~10mW/cm²、照射时间为1~60分钟照射的范围内。还原反应的条件可以根据疏水性保护基的性质等适当设定, 例如在1~100mM的连二亚硫酸钠水溶液在37℃反应30分钟之后, 在65℃反应10分钟进行脱保护。

[0163] 在后述的实施例中, 作为疏水性保护基, 列举了磷酸化纯化、腺苷化纯化、加帽化纯化的3种纯化方法的例子。另外, 保护基导入工序能够列举使用具有疏水性保护基的疏水性试剂通过化学合成来合成疏水性核苷酸类的方法 (化学合成)、以及使用模板和底物利用聚合酶通过酶反应来合成疏水性核苷酸类的方法 (酶合成)。以下, 对上述3种纯化方法, 分别说明化学合成和酶合成。

[0164] 2. 磷酸化纯化

[0165] 磷酸化纯化是在核苷酸类的5' 侧的最末端的核苷酸的5' 位的磷酸基上结合疏水性保护基 (磷酸化标签), 利用其疏水性来纯化核苷酸类的方法。

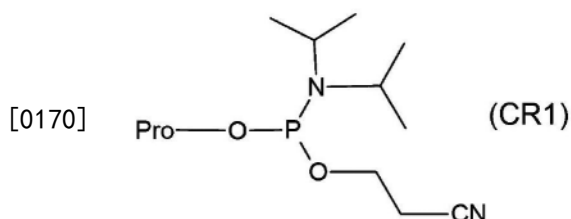
[0166] 磷酸化纯化标签是与核苷酸类的5' 侧的最末端的核苷酸的5' 位的磷酸基结合的疏水性保护基。磷酸化纯化能够列举通过化学合成来导入疏水性保护基的方法、和通过酶合成来导入疏水性保护基的方法。在以下的合成方案 (scheme) (以下, 称为“磷酸化纯化方案”) 中, 作为疏水性保护基的一例, 表示了在式 (P1) 中, R₁使用叔丁 (t-Bu) 基、R₂~R₄使用氢的“bNB”的例子。其中, bNB仅仅为本发明的疏水性保护基的一例, 本发明并不限于此, 也可以适当置换成式 (P1) 或式 (P2) 所含的其他化合物。



[0168] (1) 化学合成

[0169] 磷酸化纯化方案的上段 (a) 表示了将疏水性核苷酸类通过化学方法合成、纯化的

方案。在该方法中,作为疏水性试剂,使用下述式 (CR1) 所示的亚磷酰胺试剂,合成了具有式 (P1) 或式 (P2) 的疏水性保护基的疏水性核苷酸类。



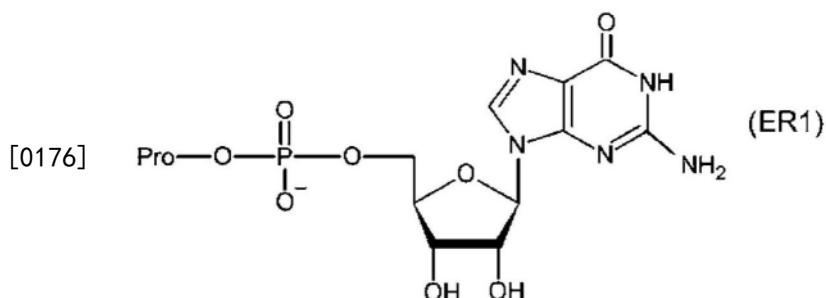
[0171] (其中,Pro表示上述的疏水性保护基(即式 (P1) 或 (P2))。)

[0172] 式 (CR1) 所示的亚磷酰胺试剂能够通过以硝基苯甲醇为起始物质,与2-氰基乙基-N,N'-二异丙基氯代亚磷酰胺等的亚磷酰胺化合物反应而得到。

[0173] 在使用上述的亚磷酰胺试剂的方法中,在保护基导入工序中,将亚磷酰胺试剂导入核苷酸来合成保护基导入核苷酸。接着,通过固相合成在保护基导入核苷酸的3'末端侧依次连接单核苷酸来合成疏水性核苷酸类。固相合成能够使用公知的DNA合成装置进行。合成后的疏水性核苷酸类能够通过反相HPLC等利用疏水性(脂溶性)从其他核酸分离纯化,进而能够通过光照射等进行脱保护。

[0174] (2) 酶合成

[0175] 磷酸化纯化方案的下段 (b) 表示了将疏水性核苷酸类通过酶法合成的方案。在核苷酸类为RNA的情况下,所使用的酶优选为RNA聚合酶,特别优选为T7RNA聚合酶。此外,在上述的方案中,表示了使用T7RNA聚合酶合成RNA的例子。在该情况下,在保护基导入工序中,将在T7启动子序列的下游侧具有与核苷酸类互补的序列的核酸(DNA)作为模板。并且,作为T7RNA聚合酶的底物,使用下述的式 (ER1) 的疏水性底物(鸟苷单磷酸衍生物)和核苷三磷酸(NTP,即ATP,GTP,CTP、UTP)。



[0177] (其中,Pro表示上述的疏水性保护基。)

[0178] 在T7RNA聚合酶的反应中,从GTP开始转录,所以如果以鸟苷单磷酸衍生物和鸟苷三磷酸(GTP)为底物,则以5'末端为鸟苷单磷酸衍生物和鸟苷三磷酸这2种RNA混合存在的状态生成。这2种RNA能够通过使用反相HPLC等根据疏水性进行分离,能够仅将来自鸟苷单磷酸衍生物的疏水性核苷酸类分离纯化。利用T7RNA聚合酶的模板的转录能够在适当设定的条件下进行,例如反应温度能够设为30~45℃,反应时间设为1~5小时的范围。此外,T7、T3、SP6RNA聚合酶通常从GTP开始转录,在T7RNA聚合酶的情况下,识别GTP在其2'羟基,RNA链逐渐延长。因此,在使用上述的式 (ER1) 的疏水性底物(鸟苷单磷酸衍生物)的情况下,不仅能够使用T7RNA聚合酶,还能够使用T3、SP6RNA聚合酶。另一方面,由New England Biolabs公司等市售的大肠杆菌RNA聚合酶也从ATP开始转录。如果使用该酶,则能够使用

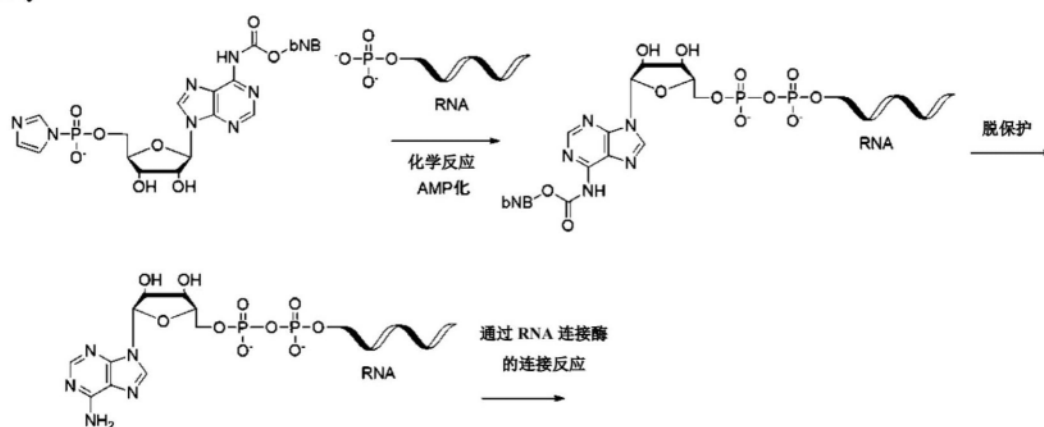
ER1的鸟嘌呤成为腺嘌呤的腺苷单磷酸衍生物,从2' 羟基使RNA链延长。

[0179] 3.腺苷化纯化

[0180] 腺苷化纯化是使用腺苷化纯化标签,以转录反应制作腺苷化RNA,将其高纯度地分离的方法。能够在RNA转录物的5' 末端共转录地导入腺苷化位点,利用导入了腺苷基位点的疏水性保护基(腺苷化纯化标签)的疏水性,通过反相HPLC等与共存RNA分离。然后,通过光照照射等将保护基除去,能够得到作为目标物的腺苷化RNA。

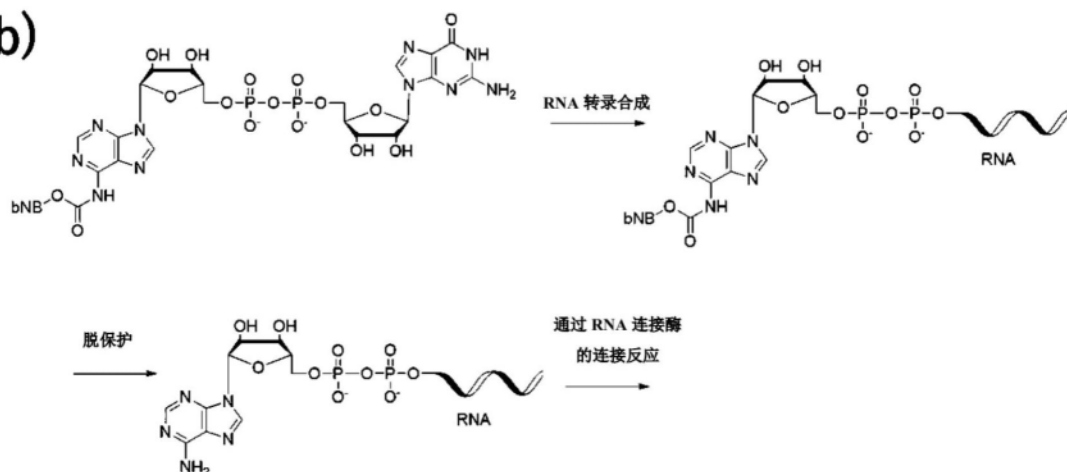
[0181] 腺苷化纯化标签是用于得到腺苷化核酸的疏水性保护基。腺苷化核酸具有导入了疏水性保护基的腺苷单磷酸衍生物与3' 侧的核苷酸经由2个磷酸基结合的结构。腺苷化纯化中也可以列举通过化学合成来导入疏水性保护基的方法、和通过酶合成来导入疏水性保护基的方法。以下的合成方案(以下,称为“腺苷化纯化方案”)中,也表示了使用“bNB”的例子。在该例子中,可以将bNB适当置换为式(P1)或式(P2)的其他化合物。

(a)



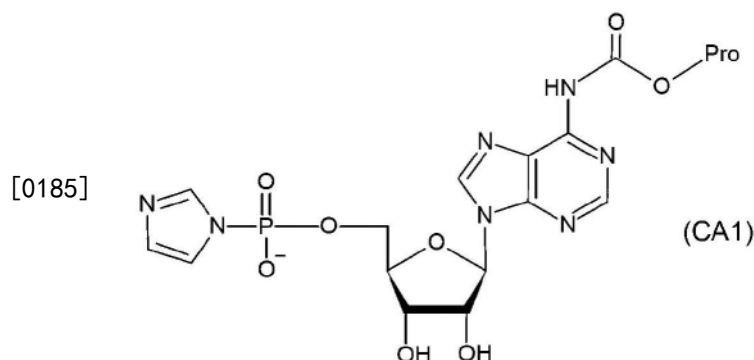
[0182]

(b)



[0183] (1) 化学合成

[0184] 腺苷化纯化方案的(a)表示了将疏水性核苷酸类通过化学方法合成、纯化的方案。在该方法中,作为疏水性试剂,使用下述式(CA1)所示的腺苷化试剂合成了疏水性核苷酸类。

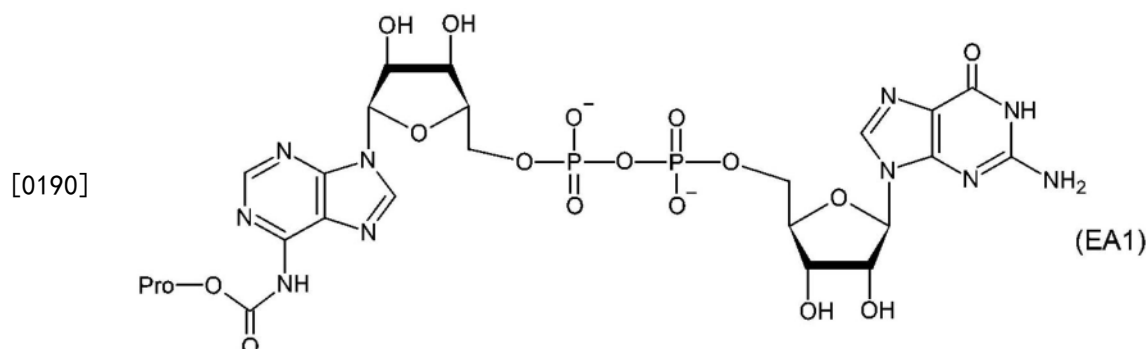


[0186] (其中,Pro表示上述的疏水性保护基(即式(P1)或(P2))。)

[0187] 式(CA1)所示的腺苷化试剂能够通过以下步骤合成。首先,以碘硝基苯为起始物质,合成硝基苯基咪唑化合物,使其与由叔丁基二甲基硅烷等的保护基保护了羟基等的腺苷反应后,脱保护,合成结合了疏水性保护基的腺苷衍生物。使咪唑、二硫代二吡啶等与该腺苷衍生物反应,能够得到式(CA1)所示的腺苷化试剂。

[0188] (2) 酶合成

[0189] 腺苷化纯化方案的(b)表示了将疏水性核苷酸类通过酶法合成、纯化的方案。在该方案中,表示了使用T7RNA聚合酶来合成RNA的例子。在该情况下,在保护基导入工序中,以在T7启动子序列的下游侧具有与核苷酸类互补的序列的核酸(DNA)为模板。并且,作为T7RNA聚合酶的底物,使用下述的式(EA1)的疏水性底物(二核苷酸衍生物)、和核苷三磷酸(NTP,即ATP、GTP、CTP、UTP)。



[0191] (其中,Pro表示上述的疏水性保护基(即式(P1)或(P2))。)

[0192] 式(EA1)所示的二核苷酸衍生物能够通过使鸟苷5'-磷酸咪唑与上述的“(1)化学合成”的腺苷衍生物反应而得到。

[0193] 如果以上述的二核苷酸衍生物和鸟苷三磷酸(GTP)作为底物,则通过从鸟苷类开始转录反应的T7RNA聚合酶的机理,生成5'末端具有含保护基的腺苷化结构的RNA、和具有三磷酸结构的RNA的2种RNA。5'末端具有含保护基的腺苷化结构的RNA中,5'末端的腺苷衍生物与其3'末端侧的核苷酸之间经由二磷酸基结合。这2种RNA通过使用反相HPLC等能够根据疏水性分离,能够仅将具有含保护基的腺苷化结构的RNA分离纯化。利用T7RNA聚合酶的模板的转录能够在适当设定的条件下进行,例如反应温度能够设为30~45℃、反应时间设为1~5小时的范围。

[0194] 作为公开了关于腺苷化纯化的现有技术的文献,能够列举以下文献。

[0195] Yangming Wang and Scott K.Silverman“Efficient RNA5'-adenylation by

T4DNA ligase to facilitate practical applications”RNA 2006,12,1142-1146.doi:10.1261/rna.33106

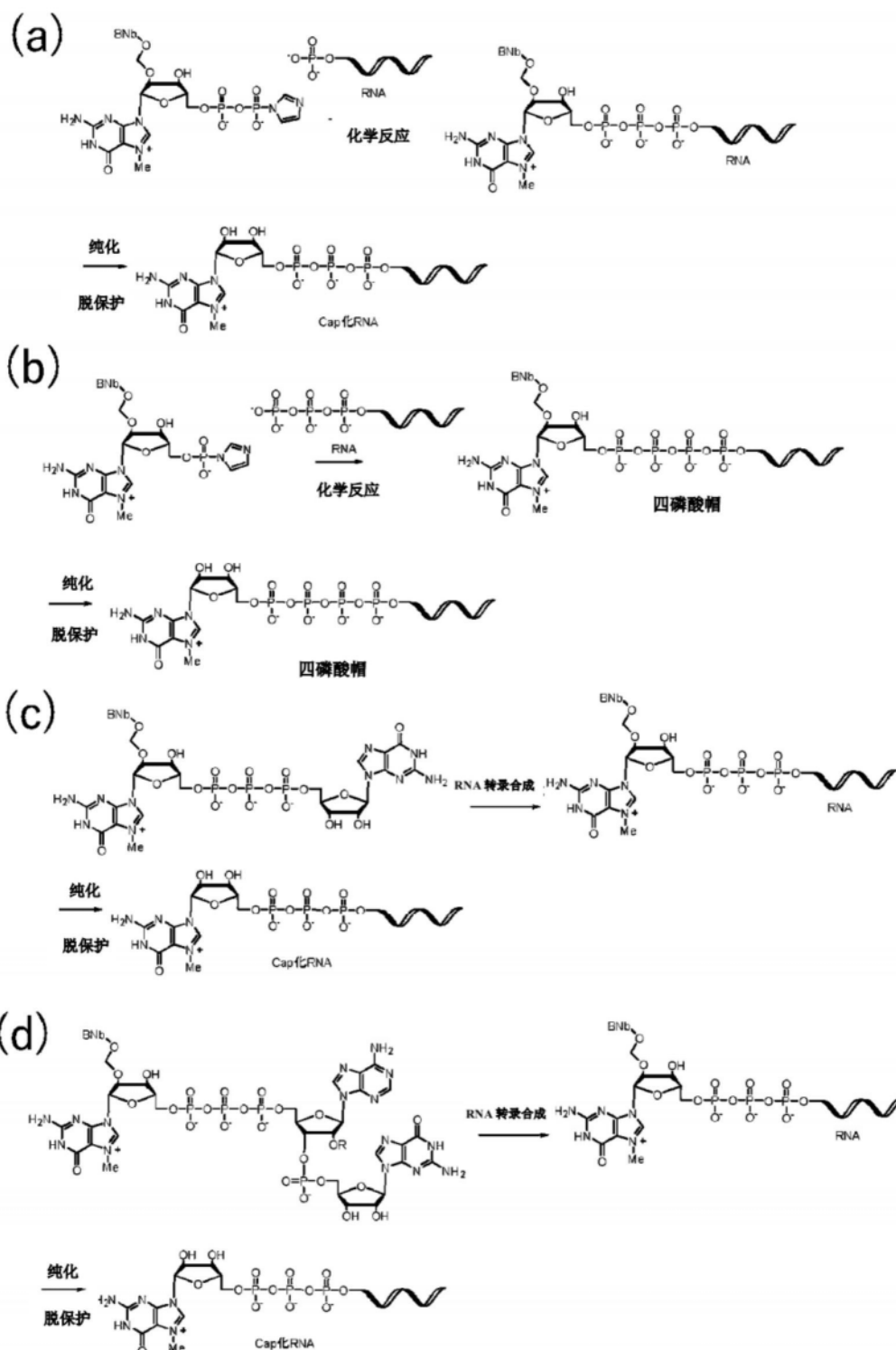
[0196] 4.加帽化纯化

[0197] 真核生物的mRNA在5'末端具有帽(CAP)结构。通过核糖体与帽结构结合,强烈促进mRNA的翻译开始。因此,在人工制作mRNA分子时,在其5'末端赋予帽结构是必要不可或缺的。数千个碱基长度的mRNA分子通常通过由RNA聚合酶从模板DNA转录来酶法合成。转录反应中通过添加作为二核苷酸的加帽类似物化合物,能够共转录地将帽结构导入mRNA的5'末端。然而,从共存的转录底物的GTP也开始转录,因此产物的RNA转录体成为所需的在5'末端具有加帽类似物的产物(5' cap-RNA)和具有三磷酸基的产物(5' ppp-RNA)的混合物。在5'末端具有三磷酸基的RNA已知在生物体内具有不希望的免疫应答诱导活性,需要将其除去。

[0198] 使用现有的加帽化合物制成的5' cap-RNA和5' ppp-RNA的物性非常类似,利用色谱法等将两者分离非常困难。在末端具有三磷酸基的RNA(5' ppp-RNA)会被对其具有分解活性的酶(RNA 5'多磷酸酶(epicentre,RP8092H)、RNA 5'焦磷酸酶(RppH)(New England Biolabs,M0356)等)分解,因此能够使用这些酶将其转化成5'单磷酸化RNA。此外,单磷酸化RNA也可以用XRN-1(New England Biolabs,M0338)等的酶分解、除去(参考文献:Chem.Sci.,2021,12,4383-4388)。迄今为止,这样5' cap-RNA的分离纯化耗费时间和精力。

[0199] 因此,在本发明中,能够使用具有光分解性或还原分解性的疏水性保护基的新型加帽类似物化合物,使得共转录制成的作为目标物的加帽化RNA能够从上述的夹杂物利用反相HPLC分离。本方法特别是与酶法除去反应相比较,能够更简便地得到纯度高的目标物。

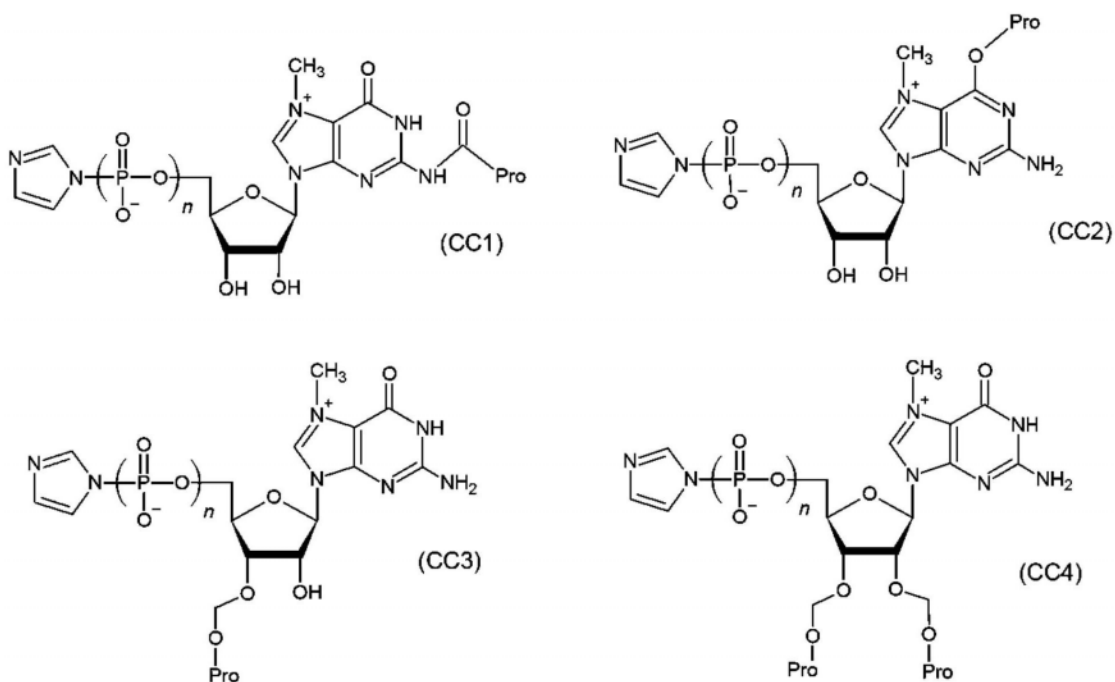
[0200] 加帽化纯化标签是用于得到加帽化核酸的疏水性标签。加帽化核酸具有导入了疏水性保护基的帽结构经由3个或4个磷酸基与3'侧的核苷酸结合的结构。加帽化纯化中也可以列举通过化学合成来导入疏水性保护基的方法、和通过酶合成来导入疏水性保护基的方法。以下的合成方案(以下,称为“加帽化纯化方案”)中也表示了使用“bNB”的例子。在该例子中,能够将bNB适当置换成式(P1)或式(P2)的其他化合物。另外,在下述的加帽化纯化方案中,仅例示了使用后述的式(CC3)的加帽化试剂的方案。然而,本方案不限于于此,使用式(CC1)、式(CC2)、式(CC4)的加帽化试剂也能够用同样的方案进行核酸的加帽化和疏水性核苷酸类的纯化。



[0201]

[0202] (1) 化学合成

[0203] 加帽化纯化方案的(a)、(b)表示了将疏水性核苷酸类利用化学方法合成、纯化的方案。在该方法中,作为疏水性试剂,使用下述式(CC1)~式(CC4)所示的加帽化试剂,合成了疏水性核苷酸类。



[0205] (其中,Pro表示上述的疏水性保护基(即式(P1)或(P2)),n表示1或2的整数。)

[0206] 式(CC1~CC4)所示的加帽化试剂能够由以下的步骤合成。首先,以碘硝基苯为起始物质,合成硝基苯基咪唑化合物,使其与由叔丁基二甲基硅烷等保护基保护了羟基等的鸟苷反应后,脱保护,合成结合了疏水性保护基的鸟苷衍生物。使碘甲烷、二甲基亚砜(DMSO)等与该鸟苷衍生物反应,将鸟苷的7'位点甲基化,使其与咪唑、二硫代二吡啶等反应,使咪唑与磷酸基结合,由此能够得到式(CC1~CC4)所示的加帽化试剂。此外,在咪唑以外也能够使用各种脱离基,作为这样的脱离基,能够列举例如1-甲基咪唑和4-甲基咪唑等、日本特愿2020-032889所记载的各种咪唑衍生物和含氮杂芳香族化合物。

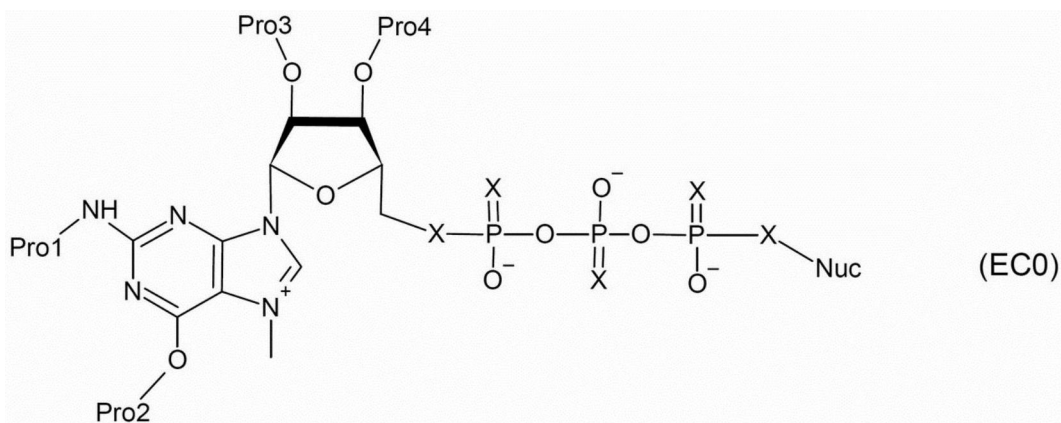
[0207] 在加帽化纯化方案的(a)中,表示了使5'末端为单磷酸的RNA与二磷酸体的加帽化试剂(上述式(CC1)~(CC4)的n为2的整数)反应的方案。在该情况下,生成的疏水性核苷酸类成为5'末端的加帽衍生物与其3'末端侧的核苷经由3个磷酸基结合的结构。另一方面,在加帽化纯化方案的(b)中,表示了使5'末端为三磷酸的RNA与单磷酸体的加帽化试剂(上述式(CC1)~(CC4)的n为1的整数)反应的方案。在该情况下,生成的疏水性核苷酸类成为5'末端的加帽衍生物与其3'末端侧的核苷经由4个磷酸基结合的结构。

[0208] (2) 酶合成

[0209] 加帽化纯化方案的(c)表示了将疏水性核苷酸类用酶法合成、纯化的方案。在该方案中,使用T7RNA聚合酶来合成RNA的例子。在该情况下,在保护基导入工序中,以在T7启动子序列的下游侧具有与核苷酸类互补的序列的核酸(DNA)为模板。并且,作为T7RNA聚合酶的底物,使用包含下述的式(ECO)的结构的疏水性底物(加帽衍生物)和核苷三磷酸(NTP,即ATP、GTP、CTP、UTP)。

[0210] 在US20180273576A1[Compositions and methods for synthesizing 5'-capped RNAs:用于合成5'-加帽RNA的组合物和方法]中,使用三核苷酸组成的Cap类似物进行了转录反应。在该类似物中能够导入疏水性标签。方案(d)表示了通过以三核苷酸为底物的转录反应,导入加帽纯化标签的方法。

[0211]



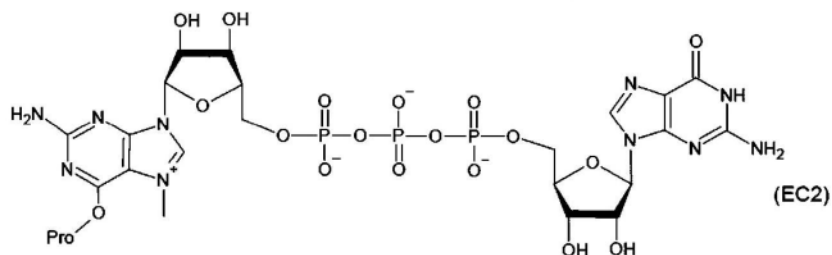
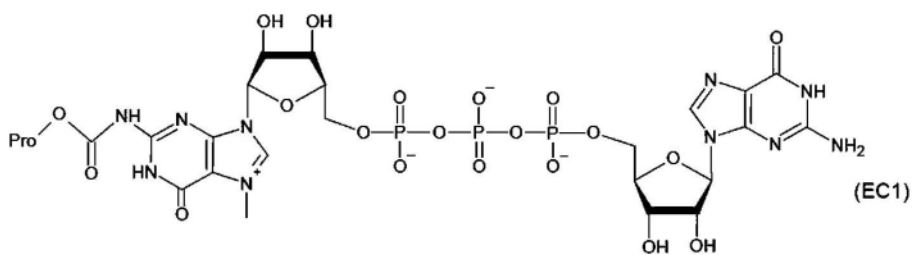
[0212] (其中, Pro1 ~ Pro4表示上述的疏水性保护基或氢, 它们的任意至少1个为疏水性保护基, Pro1 ~ Pro4彼此可以相同或不同。X选自氧、硫和硒原子。Nuc表示天然或非天然型的核苷或在其3'位的碳上连接有1个或多个天然或非天然型的核苷酸的天然或非天然型的核苷。)

[0213] Pro1 ~ Pro4的至少1个为上述式 (P1) 或式 (P2) 所示的疏水性保护基, 剩余的为氢。Pro1 ~ Pro4的疏水性保护基的数量优选为1个或2个。

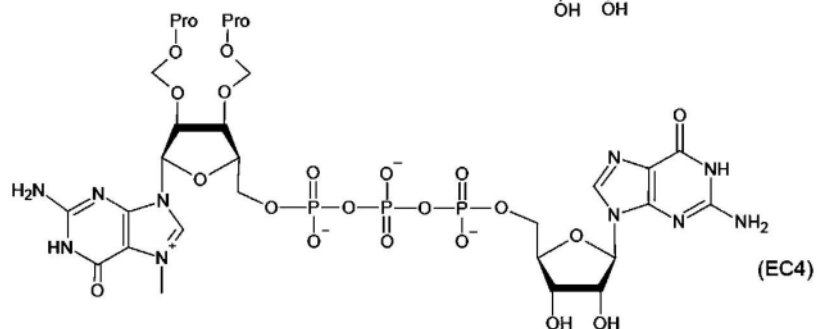
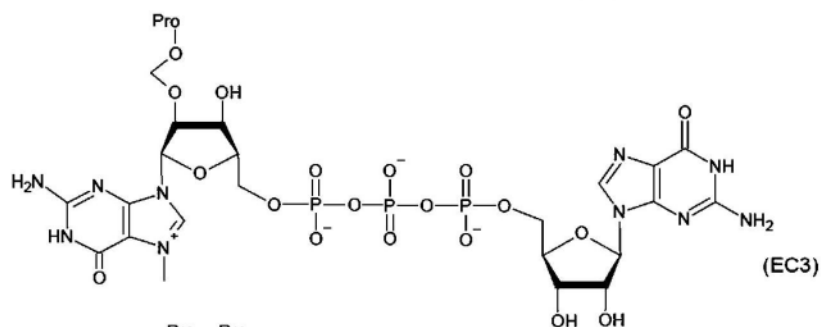
[0214] 另外, 构成Nuc的核苷具有在作为糖的核糖或其衍生物的1'位的碳上结合有碱基的结构。虽然在该核糖的2'位的碳上结合有羟基, 但作为核糖衍生物, 可以列举羟基被取代为烷基的衍生物、和在2'位的碳上结合的氧与在4'位的碳上结合的碳结合而形成杂环的衍生物等。作为碱基, 与后述的Base同样, 为天然型核酸碱基、或非天然碱基。作为天然型核酸碱基, 可以列举腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤。另外, 作为非天然碱基, 可以列举N-甲基腺嘌呤、N-苯甲酰基腺嘌呤、2-甲硫基腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、N-异丁酰基鸟嘌呤、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、4-N-甲基胞嘧啶、4-N,N-二甲基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、或5,6-二氢尿嘧啶等。

[0215] 在构成Nuc的核苷的3'位的碳上可以连接有1个或多个(优选为2个)核苷酸。在该情况下, 优选核苷的3'位的碳与核苷酸的5'位的碳通过磷酸二酯键连结。在核苷酸为2个的情况下, 优选核苷酸间通过5'-3'磷酸二酯键结合。核苷酸与上述构成Nuc的核苷同样, 由糖和碱基构成, 糖由核糖或其衍生物构成, 碱基由天然型核酸碱基或非天然碱基构成。作为Nuc的具体例, 可以列举DNA、RNA、LNA、2'-OMe-RNA、2'甲氧基乙基RNA、非环状核苷、包含杂原子的接头等。

[0216] 此外, 作为式 (EC0) 所示的疏水性底物, 能够例示选自下述式 (EC1) ~ 式 (EC4)、和下述式 (EC5) ~ (EC12) 的疏水性底物。



[0217]

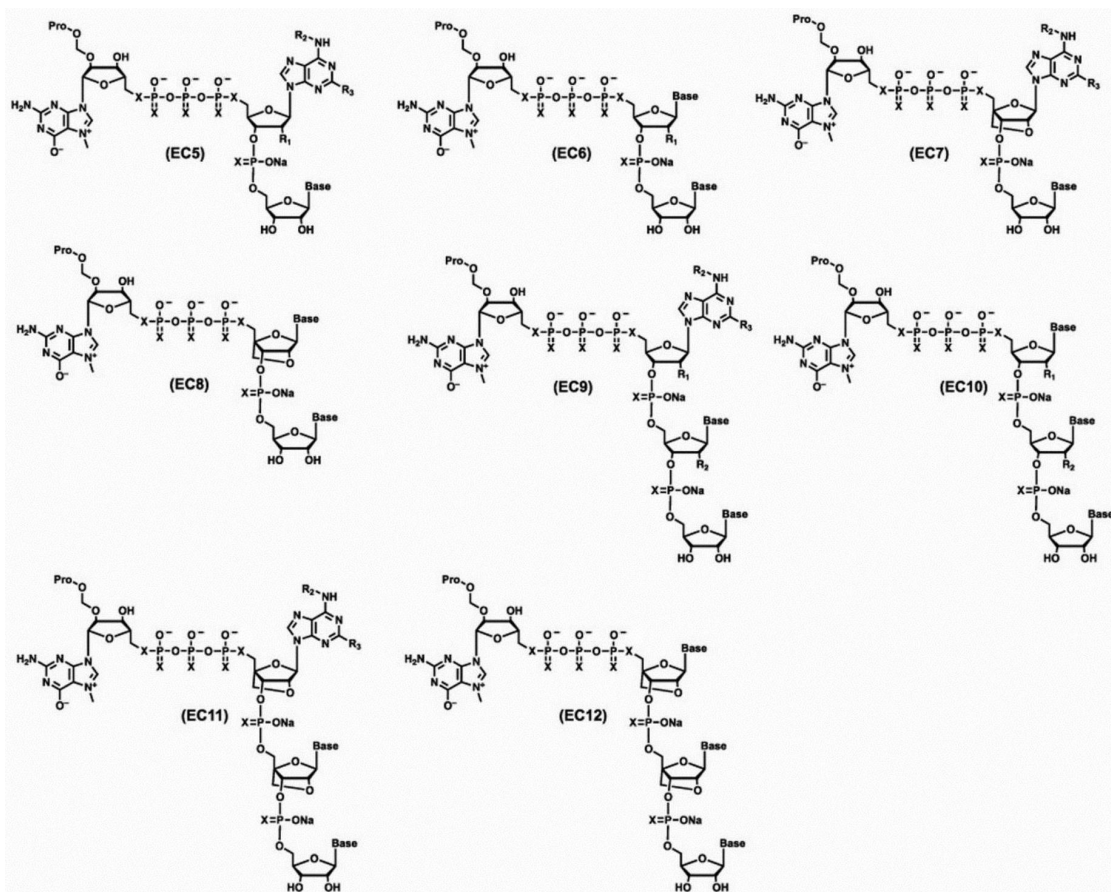


[0218] (其中,Pro表示上述的疏水性保护基(即式(P1)或(P2))。)

[0219] 式(EC1)~式(EC4)所示的加帽衍生物能够分别通过使鸟苷5'-磷酸咪唑与作为上述的“(1)化学合成”的加帽化试剂的式(CA1)~式(CA4)反应而获得。

[0220] 另外,作为加帽衍生物,也可以使用下述式(EC5)~(EC12)所示的化合物。

[0221]



[0222] (其中, R_1 表示选自羟基(OH)、甲氧基(OCH_3)、甲氧基乙基($-OCH_2OCH_3$)、氟(F)、甲酰胺基($-NHCHO$)的取代基, R_2 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R_3 表示氢或氨基($-NH_2$)。其中, Base表示选自腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤的天然型核酸碱基、或非天然碱基。其中, X选自氧、硫和硒原子。其中, Pro表示上述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基。)

[0223] 其中, 作为天然型核酸碱基和非天然碱基, 可以列举腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、N-甲基腺嘌呤、N-苯甲酰基腺嘌呤、2-甲硫基腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、N-异丁酰基鸟嘌呤、5-氟胞嘧啶、5-溴胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、4-N-甲基胞嘧啶、4-N,N-二甲基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、或5,6-二氢尿嘧啶等。

[0224] 如果以上述加帽衍生物和鸟苷三磷酸(GTP)为底物, 则生成5'末端具有含保护基的加帽化结构的RNA、和5'末端为三磷酸基的RNA这2种RNA。5'末端具有含保护基的加帽化结构的RNA中, 5'末端的帽结构与其3'末端侧的核苷酸之间经由三磷酸基结合。这2种RNA能够通过使用反相HPLC等根据疏水性进行分离, 能够仅将具有含保护基的加帽化结构的RNA分离纯化。利用T7RNA聚合酶的模板的转录可以在适当设定的条件下进行, 例如反应温度设为30~45℃、反应时间设为1~5小时的范围。

[0225] 上述的加帽衍生物中, 关于式(EC3)和式(EC5)~(EC12), 如后述的实施例所示, 结合有疏水性保护基的状态的mRNA显示与没有结合疏水性保护基的状态的mRNA同等或同等以上的高的翻译活性。因此, 在使用式(EC3)的加帽衍生物的情况下, 可以在脱保护工序之前, 使用结合有疏水性保护基的状态的核苷酸类进行翻译。

[0226] 5. 核苷酸类的纯化装置

[0227] 接下来,对本发明的核苷酸类的纯化装置进行说明。核苷酸类的纯化装置是用于实施上述的核苷酸类的纯化方法的装置,具有:保护基导入单元、分离纯化单元、和脱保护单元。

[0228] 保护基导入单元是用于实施上述的保护基导入工序的单元,将式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入核苷酸类而生成疏水性核苷酸类。保护基导入单元在上述的磷酸化纯化的“化学合成”中,可以列举式(CR1)所示的亚磷酰胺试剂、和在磷酸化纯化中使用的各种试剂和反应装置等。另外,保护基导入单元在上述的磷酸化纯化的“酶合成”中,可以列举式(ER1)所示的疏水性底物和NTP、磷酸化纯化中使用的各种试剂、反应装置等。

[0229] 另外,保护基导入单元在上述的腺苷化纯化的“化学合成”中,可以列举式(CA1)~式(CA4)所示的腺苷化试剂、和腺苷化纯化中使用的各种试剂和反应装置等。另外,保护基导入单元在上述的腺苷化纯化的“酶合成”中,可以列举式(EA1)所示的疏水性底物和NTP、腺苷化纯化中使用的各种试剂、反应装置等。

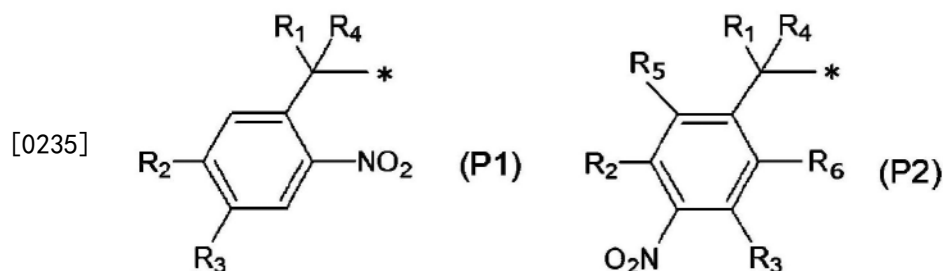
[0230] 此外,保护基导入单元在上述的加帽化纯化的“化学合成”中,可以列举式(CA1)所示的加帽化试剂、和加帽化纯化中使用的各种试剂和反应装置等。另外,保护基导入单元在上述的加帽化纯化的“酶合成”中,可以列举具有式(EC0)的结构的疏水性底物、例如、式(EC1)~式(EC4)、和式(EC5)~(EC12)所示的疏水性底物、和NTP、加帽化纯化中使用的各种试剂、反应装置等。

[0231] 分离纯化单元是用于实施上述分离纯化工序的单元,在疏水性环境下将疏水性核苷酸类分离纯化。作为分离纯化装置,只要为疏水性条件就没有特别限制,可以列举液相色谱、膜分离装置等,作为液相色谱可以列举反相高效液相色谱。

[0232] 脱保护单元是用于实施上述脱保护工序的单元,从疏水性核苷酸类将疏水性保护基脱保护而生成核苷酸类。作为脱保护单元,可以列举进行光照射处理、还原处理等的装置。作为进行光照射处理的装置,可以列举例如照射300~400nm的波长的光1~30分钟的光源装置。另外,作为进行还原处理的装置,可以列举例如连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)等的还原剂、和以该还原剂对疏水性核苷酸类在25~80℃处理1~30分钟的反应装置。此外,如果反应温度过高(50℃以上),则先进行连二亚硫酸钠的分解,还原反应效率容易降低。因此,反应温度更优选25~50℃的范围,特别优选例如25℃或37℃。关于其他处理也同样,使用对分解性保护基脱保护的装置(脱保护装置)进行脱保护。

[0233] 6.mRNA医药品及其制造方法

[0234] 本发明的疏水性核苷酸类作为mRNA医药品也有用。即,本发明的mRNA医药品为包含在至少1个核苷酸和/或其衍生物作为结构单元的核苷酸类上导入了下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基的疏水性核苷酸类的mRNA医药品。

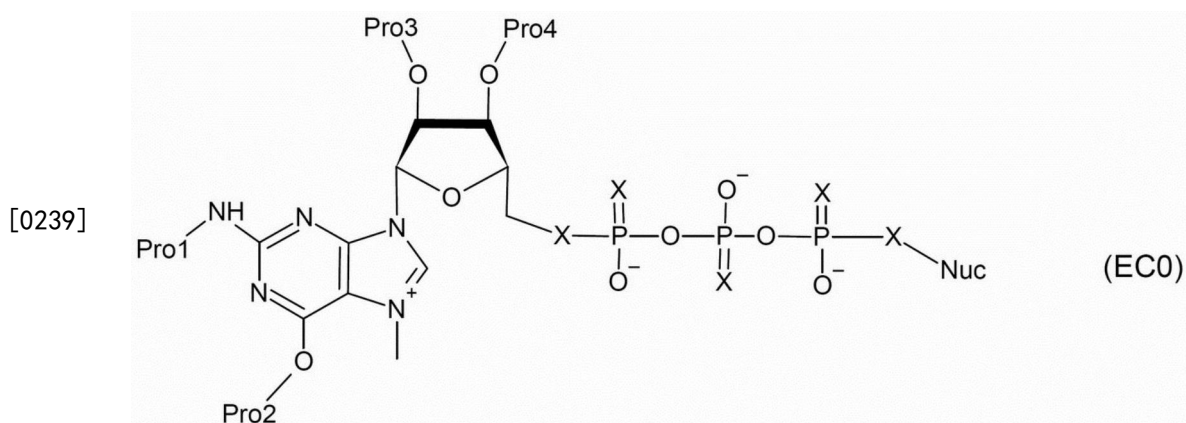


[0236] (其中, R_1 表示碳原子数1~30的直链或支链烷基, R_4 表示氢、碳原子数1~10的直链

或支链烷基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基或碳原子数1~10的直链或支链烷氧基, R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 可以相同或不同。*是与核苷酸类的价键,直接或经由选自-O-C-和-O-C(=O)-的连结基与构成核苷酸类的原子结合。)

[0237] 作为mRNA医药品,从翻译活性高的观点出发,特别优选包含具有帽结构的mRNA(后述实施例的PureCap型的mRNA)。另外,PureCap型的mRNA中,如后述实施例的图42所记载的那样,具有比现有的导入了甲基假尿嘧啶核苷的mRNA在细胞内显示更高的翻译活性的mRNA(使用式(EC5)~式(EC6)和式(EC9)~式(EC10)、优选使用式(EC10)、式(EC9)的mRNA)。此外,PureCap型的mRNA中,如图43和图45所示,还有比ARCA(抗反向帽类似物, Anti-Reverse Cap Analog)等现有型的mRNA显示低的免疫应答的mRNA(使用式(EC1)~式(EC12),优选使用式(EC3)、式(EC6)、式(EC5)、式(EC10)、式(EC9)的mRNA)。从这些观点出发,PureCap型的mRNA相比于现有的mRNA作为医药品特别有用。

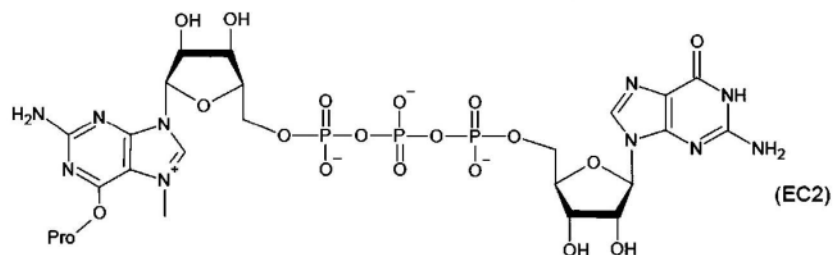
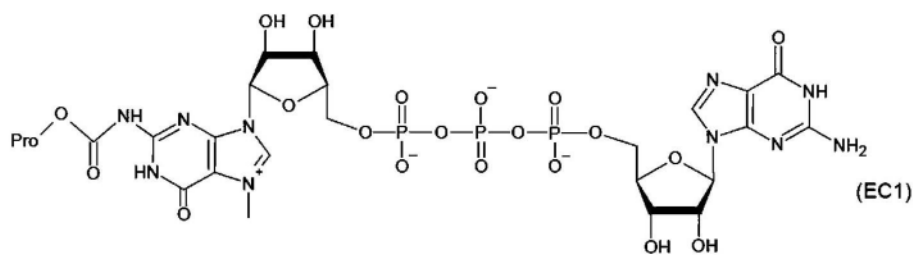
[0238] 具有帽结构的mRNA医药品具有在包含上述式(EC0)的结构的疏水性底物的3'末端侧的核苷酸的3'位的碳上连接有RNA的结构。



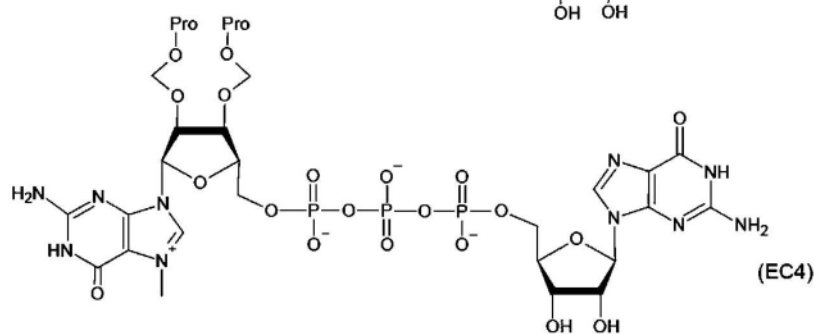
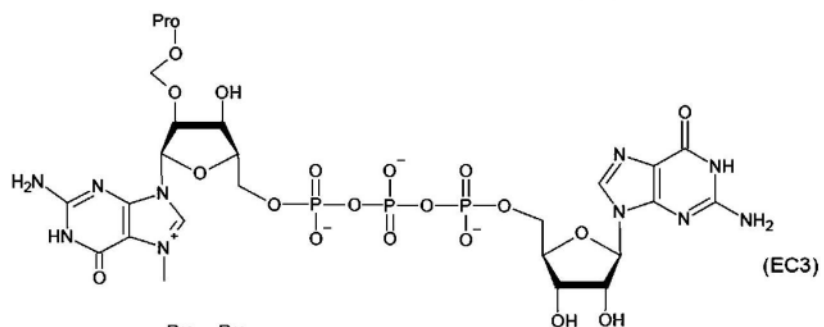
[0240] (其中,Pro1~Pro4表示上述的疏水性保护基或氢,它们中的至少任意1个为疏水性保护基,Pro1~Pro4彼此可以相同或不同。X选自氧、硫和硒原子。Nuc表示天然或非天然型的核苷或者在其3'位的碳上的1个或多个天然或非天然型的核苷酸。)。Nuc为天然或非天然型的核苷或者在其3'位的碳上可以连接有1个或2个天然或非天然型的核苷酸。此外,关于式(EC0)的详细情况与上述同样,因此这里省略详细说明。

[0241] RNA具有编码作为医药品有效的蛋白质或肽的序列,通过核糖体翻译而生成这些有用的蛋白质或肽。

[0242] 此外,作为式(EC0)所示的疏水性底物,可以例示选自式(EC1)~(EC12)的疏水性底物。

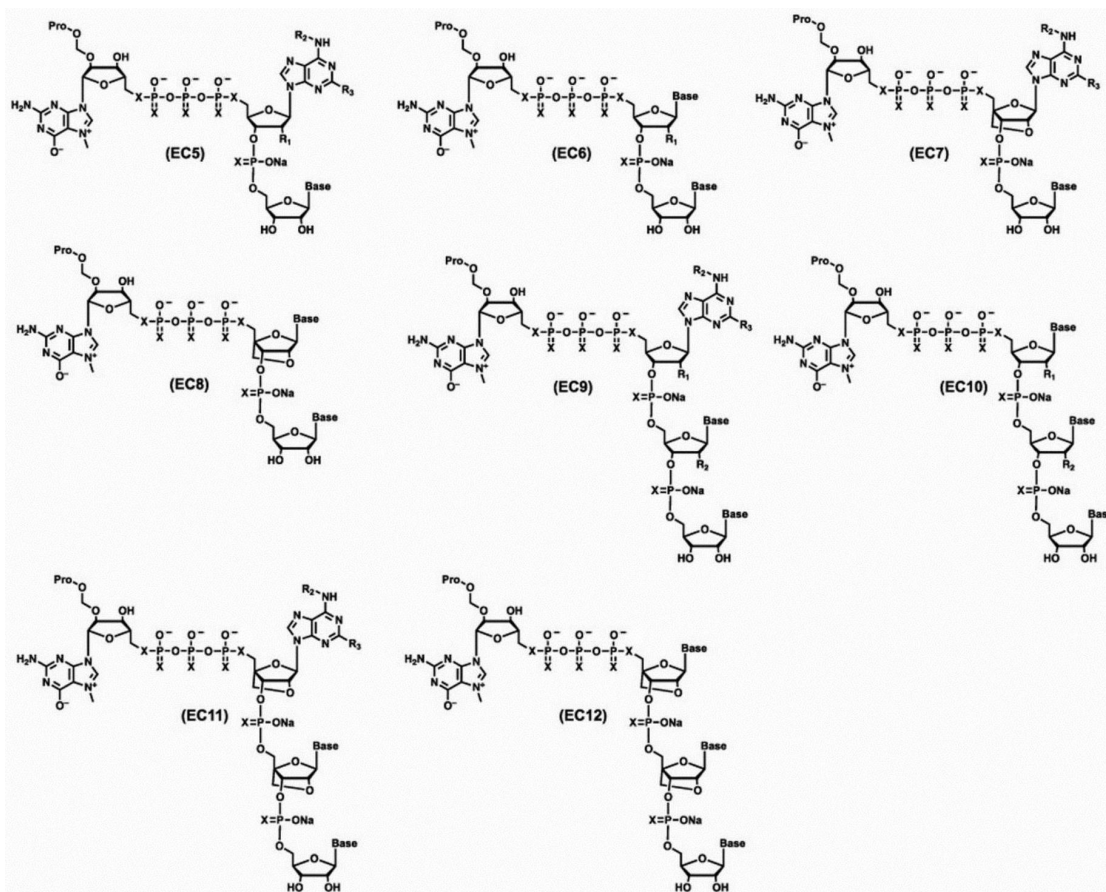


[0243]



[0244] (其中,Pro表示上述的疏水性保护基。)

[0245]



[0246] (其中, R₁表示选自羟基(OH)、甲氧基(OCH₃)、甲氧基乙基(-OCH₂OCH₃)、氟(F)、甲酰胺基(-NHCHO)的取代基, R₂表示氢、碳原子数1~10的直链或支链烷基, R₃表示氢或氨基(-NH₂)。其中, Base表示选自腺嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤的天然型核酸碱基、或非天然碱基。其中, X选自氧、硫和硒原子。其中, Pro表示上述的式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基。)

[0247] 从上述的结合有疏水性保护基的状态的疏水性核苷酸类上疏水性保护基脱保护后的核苷酸类也作为医药品有用。即, 本发明的mRNA医药品包括疏水性核苷酸类、和疏水性保护基从其脱保护的状态的核苷酸类这两者。后者的核苷酸类具体而言, 为以至少1个核苷酸和/或其衍生物为结构单元的核苷酸类, 是式(P1)、(P2)或(P3)所示的疏水性保护基被脱保护, 在与核苷酸类的价键的*上结合有氢或取代基的核苷酸类。

[0248] 作为这样的疏水性保护基脱保护后的核苷酸类, 从翻译活性高和免疫应答性低的观点出发, 优选上述具有帽结构的mRNA医药品。具体而言, 在上述的包含式(EC0)的结构的疏水性底物的3'末端侧的核苷酸的3'位的碳上连接有RNA的核苷酸类中, 该疏水性保护基被脱保护, 结果得到的式(EC0)的Pro1~Pro4均为氢的核苷酸类。

[0249] 作为式(EC0)所示的式(EC1)~(EC12)脱保护的状态的核苷酸类, 具体而言, 可以例示在结合有式(EC1)~(EC12)的疏水性保护基的核苷酸类中, 该疏水性保护基被脱保护, 结果得到的Pro为氢的核苷酸类。

[0250] 此外, 本发明包括上述的mRNA医药品的制造方法, 该制造方法包括将下述式(P1)或(P2)所示的疏水性保护基导入核苷酸类而生成疏水性核苷酸类的保护基导入工序。

[0251] 在mRNA医药品具有帽结构的情况下, 保护基导入工序是通过以具有与核苷酸类互

补的序列的核酸为模板、以具有上述式 (EC0) 的结构的水溶性底物和核苷三磷酸为底物, 利用RNA聚合酶转录模板, 来合成水溶性核苷酸类的方法。作为具有式 (EC0) 的结构的水溶性底物, 能够例示例如选自 (EC1) ~ (EC12) 的水溶性底物。关于保护基导入工序已经详细说明, 因此这里省略详细说明。

[0252] 本发明的mRNA医药品能够通过通过在固体脂质纳米颗粒 (SNP) 或脂质纳米颗粒 (LNP) 等的载体中内包的方法等对细胞或组织施用。脂质纳米颗粒由阳离子性脂质; ALC-0159、DSPE-mPEG、DMG-mPEG等的PEG化脂质; DSPC、DPPC、DOPE等的中性磷脂质、和胆固醇构成。

[0253] 在通常的利用转录的mRNA合成中, 没有加帽化的RNA或由转录产生的副产物有时会引起免疫应答, 蛋白质合成量降低。本发明的mRNA医药品如实施例的图39、图40所示, 能够通过使用水溶性标签将副产物高效率地除去, 因此显示高的蛋白质合成量。

[0254] 如上所述, 水溶性保护基脱保护后的核苷酸类也作为医药品有用, 因此本发明的mRNA医药品的制造方法也包括经过上述分离纯化工序、脱保护工序而制造脱保护后的核苷酸类的方法。在脱保护工序中, 式 (P1)、(P2) 或 (P3) 所示的水溶性保护基被脱保护, 生成在与核苷酸类的价键的*上结合有氢或取代基的核苷酸类。在具有帽结构的mRNA的情况下, 生成式 (EC0) 的Pro1 ~ Pro4均为氢的核苷酸类, 在作为其具体例的式 (EC1) ~ (EC12) 脱保护后的状态的核苷酸类的情况下, 生成Pro为氢的核苷酸类。

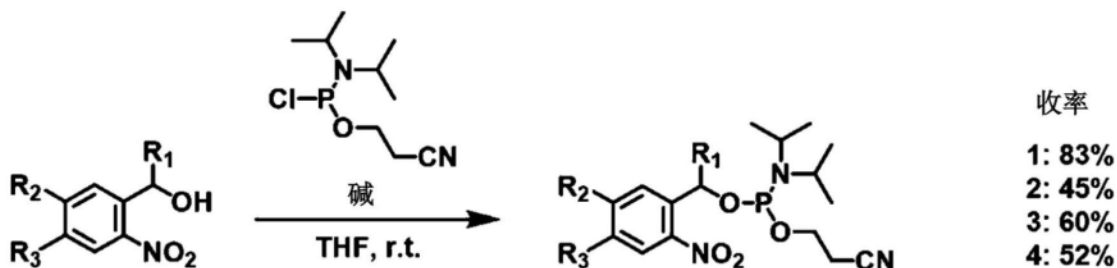
[0255] 实施例

[0256] 以下, 基于实施例具体说明本发明, 但这些并不是要限定本发明的目的。另外, 在以下的实施例中“%”的表示只要没有特别规定, 就是指质量基准 (质量百分数)。

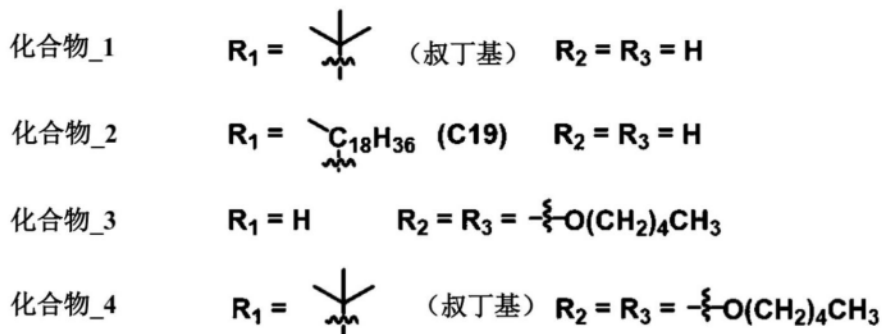
[0257] 1. 通过亚磷酰胺试剂的合成和19-nt寡脱氧核苷酸 (ODN) 合成的验证

[0258] 1-1. 亚磷酰胺试剂的合成

[0259] 合成具有下述结构的4种化学磷酸化亚磷酰胺试剂 (化合物1 ~ 4)。



[0260]



[0261] <相关现有研究>

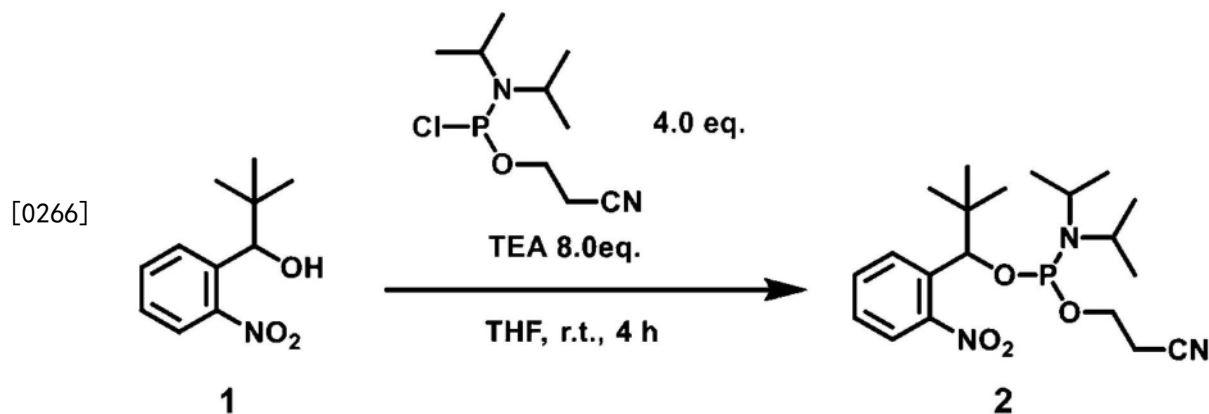
[0262] • Chemical synthesis of long RNAs with terminal 5' -phosphate groups

(具有末端5'-磷酸基的长RNA的化学合成).Ugo Pradere,Francois Halloy,Jonathan Hall.Chem Eur J 23,5210(2017)

[0263] • Novel phosphorylation reagents and uses thereof (新型磷酸化试剂及其用途).W02018/162610A1

[0264] (1) 亚磷酰胺试剂_1的合成

[0265] 下述表示亚磷酰胺试剂_1的合成方案。



[0267] (a) 2,2-二甲基-1-(2-硝基苯基)丙烷-1-醇 (化合物1)

[0268] 为已知化合物,用W02009152353第76-77页的方法合成。

[0269] (b) 2-氰基乙基 (2,2-二甲基-1-(2-硝基苯基)丙基) 二异丙基氨基磷酸酯 (化合物2)

[0270] 在干燥THF (19mL) 中的硝基苯甲醇1 (1.0g, 4.8mmol) 的溶液中,加入三乙胺 (5.3mL, 3.9g, 38mmol) 和2-氰基乙基-N,N'-二异丙基氯代亚磷酰胺 (4.3mL, 4.5g, 11mmol), 在室温搅拌4小时。将反应混合物用饱和碳酸氢钠水 (100mL) 猝灭。将该溶液用乙酸乙酯 (100mL) 萃取3次。使有机相在硫酸钠上干燥,过滤,用硅胶柱色谱 (己烷/乙酸乙酯=3/1、含有1%三乙胺) 纯化,作为黄色的油得到对应的亚磷酰胺2 (1.6g、收率83%)。

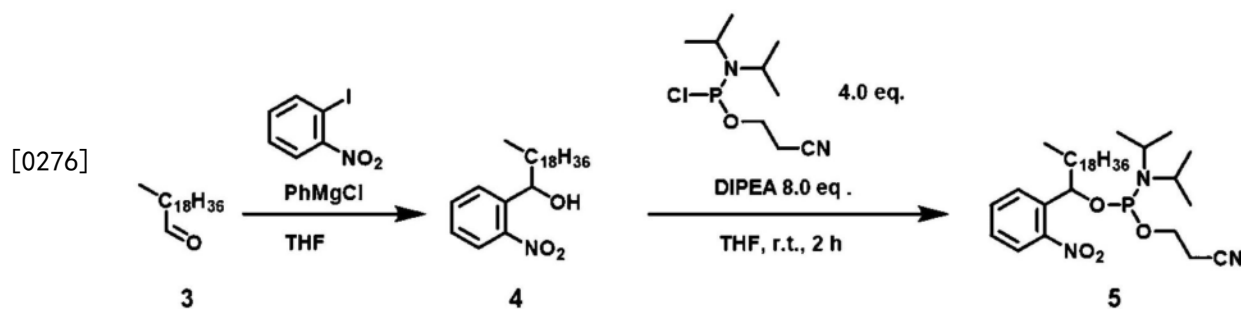
[0271] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 7.77-7.70 (m, 2H), 7.61-7.53 (m, 1H), 7.41-7.36 (m, 1H), 5.45-5.40 (m, 1H), 3.90-3.49 (m, 4H), 2.76-2.62 (m, 1H), 2.36-2.17 (m, 1H), 1.28-1.16 (m, 2H), 1.18-1.13 (m, 6H), 1.00-0.98 (m, 9H), 0.87-0.86 (m, 4H) ppm。

[0272] ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): δ 149.78, 149.44, 135.63, 135.51, 131.78, 131.68, 131.07, 130.86, 128.09, 127.87, 123.86, 123.59, 117.75, 77.36, 77.21, 75.83, 75.71, 58.99, 58.76, 58.14, 57.91, 43.57, 43.42, 43.29, 37.23, 37.18, 37.12, 37.05, 25.89, 25.77, 24.83, 24.78, 24.73, 24.70, 24.67, 24.34, 24.27, 20.59, 20.53, 20.17, 20.10 ppm。

[0273] ^{31}P NMR (400MHz, CDCl_3): δ 152.95, 148.78 ppm. ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{P}$, 432.2028 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found, 432.1818.

[0274] (2) 亚磷酰胺试剂_2的合成

[0275] 下述表示亚磷酰胺试剂_2的合成方案。



[0277] (a) 1-(2-硝基苯基)二十烷-1-醇(化合物4)

[0278] 使1-碘-2-硝基苯(2.65g, 10.66mmol, 1.0eq.)溶解于THF(25mL)。在-48℃滴加THF中的苯基氯化镁2M(5.86mL, 11.73mmol, 1.1eq.)，在-35℃搅拌10分钟。滴加溶解在THF(15mL)中的原料3(3.00g, 10.12mmol, 0.95eq.)，将反应温度缓慢升高至室温，在室温搅拌15分钟。加入饱和NH₄Cl水溶液(10mL)，用乙酸乙酯(100mL)、饱和食盐水(50mL)进行分液。将有机层回收、浓缩。用中性快速柱色谱(己烷/乙酸乙酯=15/1→10/1)纯化，得到3.44g的中间体4(8.65mmol, 收率81%)。

[0279] ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) δ7.89(dd, J=8.2Hz, 1.6Hz, 1H), 7.80(dd, J=6.4Hz, 1.6Hz, 1H), 7.63(td, J=6.4Hz, 1.2Hz, 1H), 7.41(td, J=6.0Hz, 1.6Hz, 1H), 5.23(q, J=4.0Hz, 1H), 2.09-1.78(m, 3H), 1.31-1.21(m, 33H), 0.88(t, J=7.2Hz, 3H)。

[0280] ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃) δ148.1, 140.3, 133.5, 128.1, 128.0, 124.4, 69.5, 38.3, 32.0, 29.8-29.4, 26.2, 22.8, 14.2。

[0281] ESI MS-HR calcd for C₂₆H₄₅NO₃ (M+Na)⁺ 442.3297 found 442.3421。

[0282] (b) 2-氰基乙基(1-(2-硝基苯基)二十烷基)二异丙基氨基磷酸酯(化合物5)

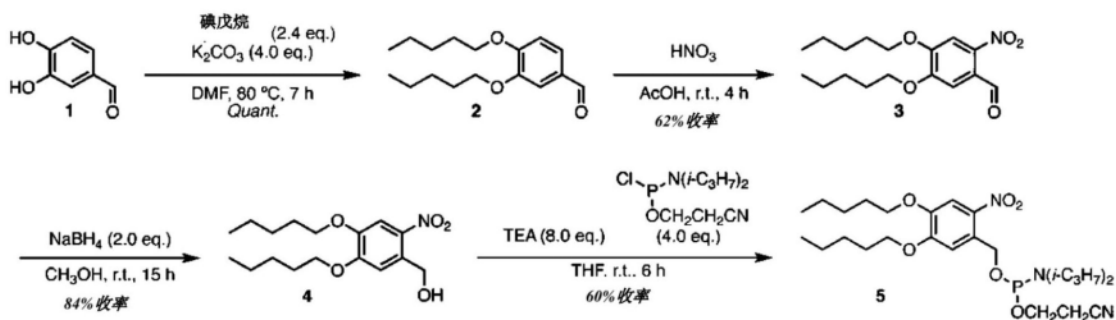
[0283] 在干燥THF(1.0mL)中的硝基苯甲醇3(100mg, 0.24mmol)的溶液中，加入二异丙基乙基胺(2.5mL, 250mg, 1.3mmol)和2-氰基乙基-N,N'-二异丙基氯代亚磷酰胺(0.21mL, 230mg, 0.96mmol)，在室温搅拌2小时。将反应混合物用饱和碳酸氢钠水(20mL)猝灭。将该溶液用乙酸乙酯(20mL)萃取3次。使有机相在硫酸钠上干燥，进行过滤，用硅胶柱色谱(己烷/乙酸乙酯=3/1、含有1%三乙胺)纯化，作为黄色的油得到对应的亚磷酰胺5(66mg、收率45%)。

[0284] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) : δ7.89-7.77(m, 2H), 7.66-7.58(m, 1H), 7.42-7.36(m, 1H), 5.44-5.33(m, 1H), 3.94-3.80(m, 1H), 3.67-3.42(m, 3H), 2.72-2.61(m, 1H), 2.45-2.30(m, 1H), 1.86-1.70(m, 2H), 1.55(s, 2H), 1.36-1.08(m, 40H), 0.90-0.86(m, 7H) ppm。

[0285] ³¹P NMR(400MHz, CDCl₃) : δ150.68, 148.83 ppm. ESI-TOF-MS calcd. for C₃₅H₆₂KN₃O₄P, 658.4115 [M+K]⁺; found, 658.4246。

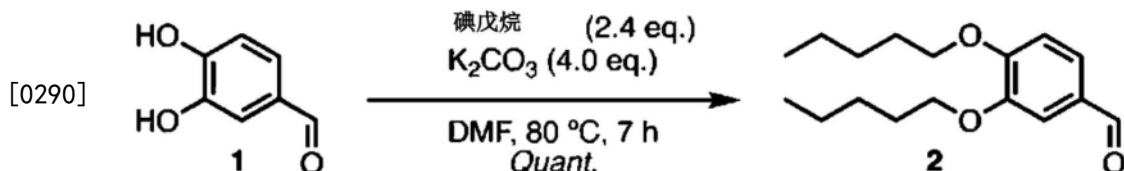
[0286] (3) 亚磷酰胺试剂_3的合成

[0287] 下述表示亚磷酰胺试剂_3的合成方案。



[0288]

[0289] (a) 3,4-双(戊基氧基)苯甲醛(2)



[0290]

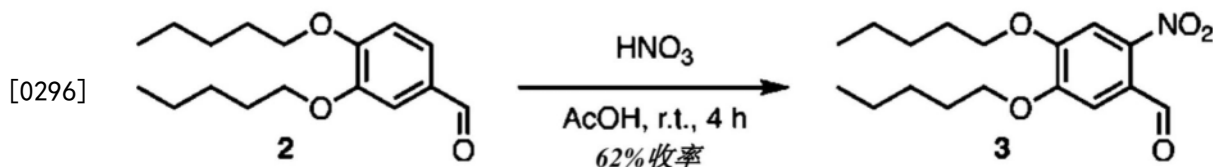
[0291] 在干燥DMF (50mL) 中的3,4-二羟基苯甲醛1 (3.0g, 22mmol) 和 K_2CO_3 (12g, 88mmol) 的混合物中, 加入碘戊烷 (6.9mL, 11g, 53mmol), 加热到80℃。在80℃搅拌7小时后, 将反应混合物冷却到室温。将DMF在减压下除去, 将残渣溶解于乙酸乙酯, 进行水洗。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥, 进行浓缩。将粗材料通过由13→56%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化, 作为茶色固体得到中间体2 (6.2g, quant.)。

[0292] ^1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 9.80 (s, 1H), 7.39-7.36 (m, 2H), 6.92 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.09-4.01 (m, 4H), 1.86-1.79 (m, 4H), 1.46-1.35 (m, 8H), 0.92-0.89 (m, 6H) ppm。

[0293] ^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$): δ 191.05, 154.73, 149.49, 129.93, 126.69, 111.78, 110.94, 69.16, 60.44, 28.83, 28.74, 28.24, 28.20, 22.51, 22.49, 14.25, 14.09ppm。

[0294] ESI-TOF-MS calcd. for $C_{17}H_{26}NaO_3$, 301.1774 $[M+Na]^+$; found, 301.2054。

[0295] (b) 2-硝基-4,5-双(戊基氧基)苯甲醛(化合物3)



[0296]

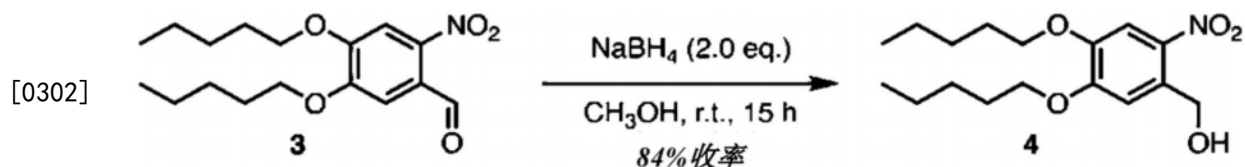
[0297] 在乙酸 (15mL) 中的中间体2 (4.3g, 16mmol) 的溶液中用17分钟滴加 HNO_3 (15mL, ~70%纯度)。在室温搅拌4小时后, 加入冰使反应混合物骤冷。将所得到的沉淀物过滤并回收, 用水清洗。将所得到的固体悬浮于乙醇, 将所得到的沉淀物过滤并回收, 用乙醇清洗, 作为黄色粉末得到中间体3 (3.1g、收率62%)。

[0298] ^1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ 10.41 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 4.13-4.08 (m, 4H), 1.90-1.83 (m, 5H), 1.49-1.36 (m, 11H), 0.94-0.91 (m, 8H) ppm。

[0299] ^{13}C NMR (151MHz, $CDCl_3$): δ 188.01, 153.27, 152.37, 151.85, 143.67, 125.34, 110.69, 108.20, 107.94, 70.26, 69.92, 69.78, 28.55, 28.52, 28.46, 28.11, 28.06, 22.42, 22.38, 14.05ppm。

[0300] ESI-TOF-MS calcd. for $C_{17}H_{25}NNaO_5$, 346.1630 $[M+Na]^+$; found, 346.1862。

[0301] (c) (2-硝基-4,5-双(戊基氧基)苯基)甲醇(化合物4)



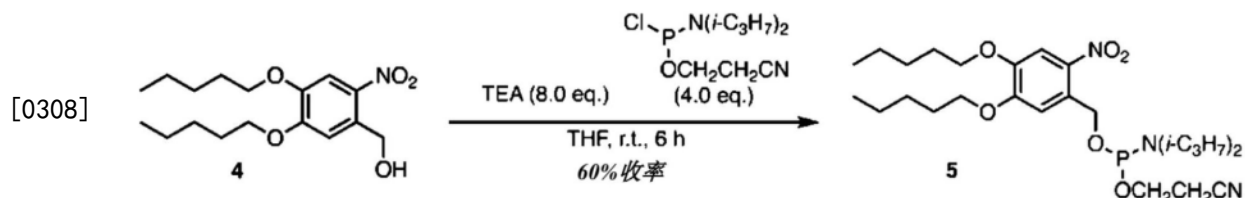
[0303] 在干燥甲醇(40mL)中的醛3(2.5g、7.7mmol)的悬浮液中缓慢加入NaBH₄(0.58g、15mmol)。在室温搅拌15小时后,将反应混合物浓缩。将残留物溶解于二氯甲烷,用水清洗。将水性层用二氯甲烷萃取2次。使合并得到的有机层在Na₂SO₄上干燥,进行浓缩。将残渣通过由己烷、接着由12→24%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为褐色固体得到硝基苯甲醇4(2.1g、收率84%)。

[0304] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ7.65(s, 1H), 7.10(s, 1H), 4.89(d, J=6.0Hz, 2H), 4.10-4.01(m, 4H), 1.87-1.81(m, 4H), 1.47-1.36(m, 8H), 0.93-0.90(m, 6H) ppm。

[0305] ¹³C NMR (151MHz, CDCl₃): δ154.23, 147.81, 139.52, 132.19, 112.21, 109.86, 69.65, 69.51, 62.97, 28.70, 28.67, 28.17, 28.14, 22.48, 22.45, 14.07 ppm。

[0306] ESI-TOF-MS calcd. for C₁₇H₂₇NNaO₅, 348.1787 [M+Na]⁺; found, 348.1994.

[0307] (d) 2-氰基乙基(2-硝基-4,5-双(戊基氧基)苄基)二异丙基氨基磷酸酯(化合物5)



[0309] 在干燥THF(5.0mL)中的硝基苯甲醇4(350mg, 1.1mmol)的溶液中,加入三乙胺(1.2mL, 870mg, 8.6mmol)和2-氰基乙基-N,N'-异丙基氯代亚磷酰胺(0.94mL, 1.0g, 4.3mmol)。在室温搅拌6小时后,将反应混合物用乙酸乙酯稀释,用饱和NaHCO₃的水溶液清洗2次。使有机层在Na₂SO₄上干燥,进行浓缩。将残渣通过由含1%三乙胺的己烷、接着由含1%三乙胺的2→6%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为黄色的油得到对应的亚磷酰胺5(340mg、收率60%)。

[0310] ¹H NMR (600MHz, CD₃CN): δ7.64(s, 1H), 7.28(s, 1H), 5.06-4.99(m, 2H), 4.10-4.00(m, 4H), 3.87-3.75(m, 2H), 3.70-3.64(m, 2H), 2.64-2.62(m, 2H), 1.92-1.91(m, 1H), 1.80-1.73(m, 4H), 1.44-1.33(m, 8H), 1.19-1.17(m, 12H), 0.91-0.86(m, 6H) ppm。

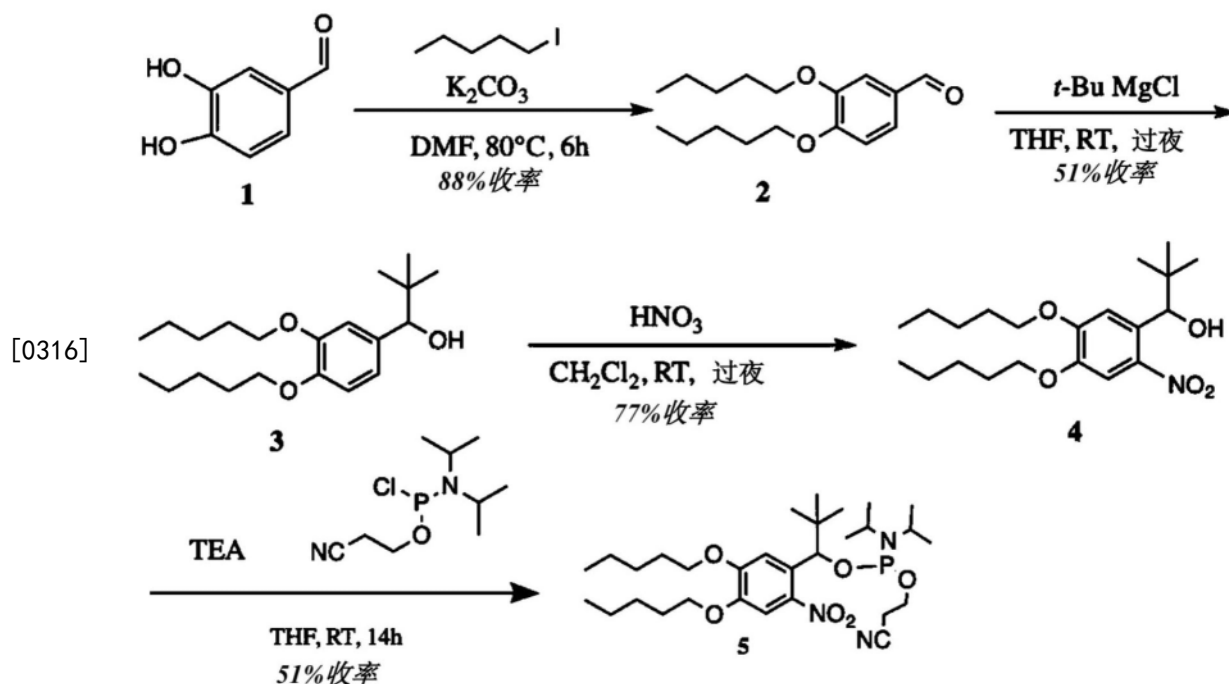
[0311] ¹³C NMR (151MHz, CD₃CN): δ153.78, 147.33, 138.93, 130.88, 130.82, 118.52, 110.90, 109.64, 69.39, 69.23, 62.69, 62.56, 58.69, 58.55, 43.23, 43.16, 28.53, 28.46, 27.97, 27.90, 24.16, 24.11, 23.96, 23.91, 22.20, 20.16, 20.11, 13.42 ppm。

[0312] ³¹P NMR (243MHz, CD₃CN): δ149.03 ppm。

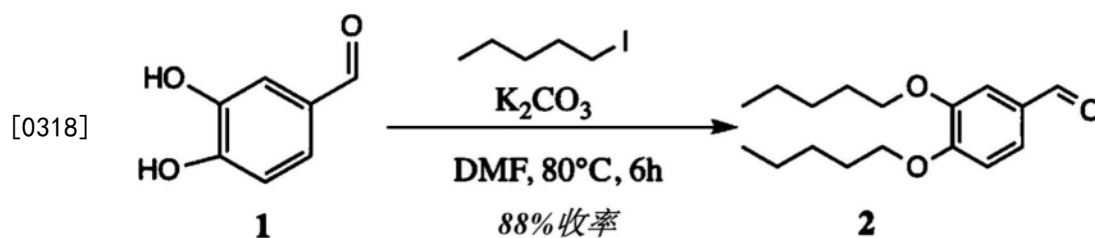
[0313] ESI-TOF-MS calcd. for C₂₆H₄₅N₃O₆P, 526.3041 [M+H]⁺; found, 526.3320; calcd. for C₂₆H₄₄N₃NaO₆P, 548.2865 [M+Na]⁺; found, 548.3153.

[0314] (4) 亚磷酰胺试剂_4的合成

[0315] 下述表示亚磷酰胺试剂_4的合成方案。



[0317] (a) 3,4-双(戊基氧基)苯甲醛(化合物2)

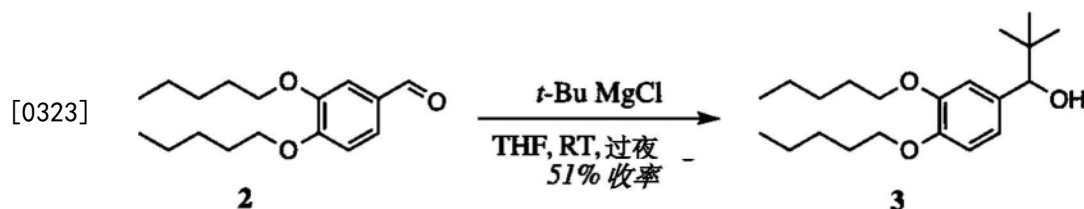


[0319] 在干燥DMF (50mL) 中的3,4-二羟基苯甲醛1 (3.0g, 22mmol) 和 K_2CO_3 (12g, 88mmol) 的混合物中, 加入碘戊烷 (6.9mL, 11g, 53mmol), 加热到80°C。在80°C搅拌6小时后, 将反应混合物冷却到室温。将DMF在减压下除去, 将残渣溶解于乙酸乙酯, 进行水洗。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥, 进行浓缩。将粗材料通过由2→10%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化, 作为黄色固体得到中间体2 (6.0g、收率88%)。

[0320] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 9.89 (s, 1H), 7.61-7.12 (m, 2H), 6.98-6.88 (m, 1H), 4.25-3.83 (m, 4H), 2.06-1.18 (m, 14H), 1.02-0.84 (m, 6H) ppm。

[0321] ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NaO}_3$, 301.1774 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found, 301.1832.

[0322] (b) 1-(3,4-双(戊基氧基)苯基)-2,2-二甲基丙烷-1-醇(化合物3)



[0324] 在干燥THF (60mL) 中的醛(化合物2) (5g, 18mmol) 的悬浮液中, 以0°C缓慢加入叔丁基氯化镁 (2.4g, 1.0M, 20mmol)。在0°C搅拌30分钟, 在室温搅拌20小时后, 加入50mL的水溶液 (sat. (饱和) NH_4Cl)。将混合溶剂用乙酸乙酯萃取, 用盐水 (brine) 清洗2次。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥, 进行浓缩。将残渣通过由50%苯/己烷并接着由苯洗脱的硅胶柱色谱纯化, 作

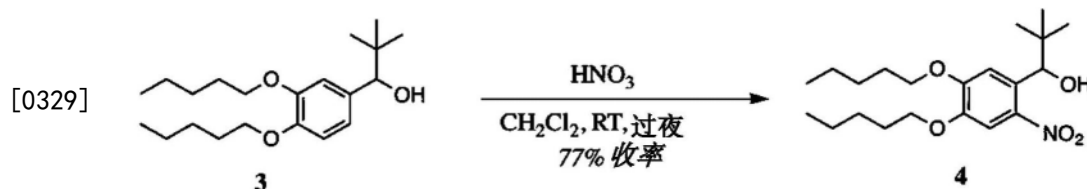
为黄色液体得到醇(化合物3) (3.2g、收率54%)。

[0325] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 6.85-6.76 (m, 3H) , 4.30 (s, 1H) , 4.02-3.91 (m, 4H) , 1.84-1.76 (m, 4H) , 1.54-1.19 (m, 9H) , 1.01-0.85 (m, 15H) ppm。

[0326] ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) : δ 148.45, 148.33, 135.13, 120.20, 113.70, 112.91, 82.23, 77.47, 76.83, 69.39, 69.32, 35.75, 29.13, 28.33, 26.09, 22.59, 14.14 ppm。

[0327] ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{NaO}_3$, 359.2664 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found, 359.2709.

[0328] (c) 2,2-二甲基-1-(2-硝基-4,5-双(戊基氧基)苯基)丙烷-1-醇(化合物4)



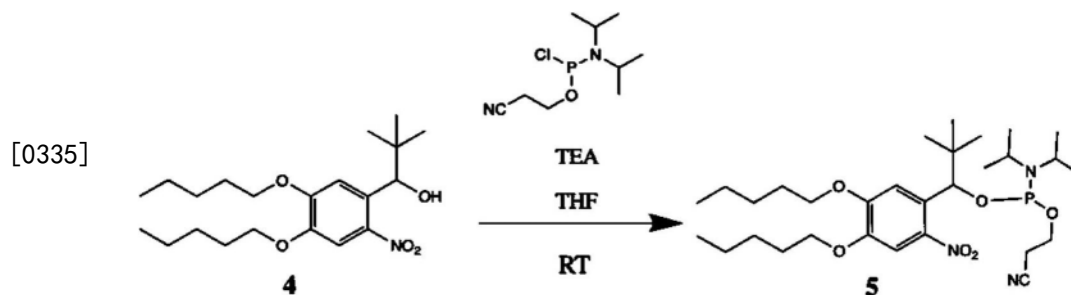
[0330] 在醇(化合物3) (1g, 3mmol) 的干燥 CH_2Cl_2 (30mL) 中的悬浮液中, 以 0°C 缓慢加入 HNO_3 (0.5mL, ~70%纯度)。在室温搅拌24小时后, 加入水50mL。将混合溶剂用 CH_2Cl_2 萃取, 用盐水清洗2次。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥, 进行浓缩。将残渣通过由苯洗脱的硅胶柱色谱纯化, 作为黄色液体得到硝基苯甲醇(化合物4) (0.87g、收率77%)。

[0331] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 7.41 (s, 1H) , 7.18 (s, 1H) , 5.59 (s, 1H) , 5.29 (s, 1H) , 4.12-4.00 (m, 4H) , 1.87-1.78 (m, 4H) , 1.49-1.34 (m, 8H) , 0.94-0.84 (m, 15H) ppm。

[0332] ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) : δ 152.23, 147.39, 141.43, 131.67, 112.35, 109.01, 77.48, 76.83, 74.08, 69.47, 69.31, 53.54, 37.05, 28.73, 28.19, 25.72, 22.49, 14.22, 14.06 ppm。

[0333] ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{NNaO}_5$, 404.2515 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found, 404.2754.

[0334] (d) 2-氰基乙基(2,2-二甲基-1-(2-硝基-4,5-双(戊基氧基)苯基)丙基)二异丙基亚磷酰胺(化合物5)



[0336] 在干燥THF (10.0mL) 中的硝基苯甲醇(4) (300mg, 0.79mmol) 的溶液中, 加入三乙胺 (0.26mL, 191mg, 1.89mmol) 和2-氰基乙基-N,N'-二异丙基氯代亚磷酰胺 (0.23mL, 223mg, 1.9mmol)。在室温搅拌14小时后, 将反应混合物用乙酸乙酯稀释, 用饱和 NaHCO_3 水溶液清洗2次。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥, 进行浓缩。将残渣通过由含1%三乙胺的3→10%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化, 作为黄色的油得到对应的亚磷酰胺(化合物5) (238mg、收率52%)。

[0337] ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{PNaO}_6$, 604.3594 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found, 604.3533.

[0338] 1-2. 使用亚磷酰胺试剂_1~亚磷酰胺试剂_3的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化

[0339] (1) 实验

[0340] (a) DNA合成

[0341] 使用亚磷酰胺试剂_1,2,3,和市售的亚磷酰胺试剂(ChemGenes),按照常规方法利用核酸自动合成机NR-2A 7MX(Nihon Techno Service Co.,Ltd.),合成在5'末端具有磷酸基保护体的19个碱基长度的寡脱氧核糖核苷酸5' R-p-TAATACGACTCACTATAGG3' (序列编号2)。合成结束后,在固相载体中加入浓氨水1mL,在55℃加热16小时进行脱保护。将上清液用Millex LH过滤器(0.45μm,Merck)过滤后,用离心蒸发器在减压下干燥固化。将寡核苷酸再溶解于超去离子水中,测定260nm的吸收,由此算出浓度。寡核苷酸的MALDI-TOF分子量测定作为基质使用3-羟基吡啶甲酸,利用UltrafleXtreme(Bruker)的正离子模式进行。

[0342] (b) 利用反相HPLC的目标物分离、纯化

[0343] 将上述合成的19个碱基长的寡脱氧核糖核苷酸用反相HPLC分离、纯化。HPLC的条件等如后述“(2)结果”中记载。

[0344] (c) 利用光照射的脱保护

[0345] 利用光照射的5'磷酸基的脱保护反应如下进行。将寡核苷酸(10μM)溶解于包含20mM Tris-HCl(pH8.5)的缓冲液中,将本溶液10μL加到透明96孔多孔板,利用MAX-305光源装置(朝日分光)以4mW/cm²的光量照射365nm光10分钟。

[0346] (2) 结果

[0347] (a) 亚磷酰胺试剂_1的结果

[0348] 图2表示了使用亚磷酰胺试剂_1的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果。

[0349] 图的(a)中,使用亚磷酰胺试剂_1合成在5'末端具有磷酸基保护体的19个碱基长的寡脱氧核糖核苷酸5' R-p-TAATACGACTCACTATAGG3' (序列编号2),用反相HPLC分离、纯化目标物。表示了纯化前的混合物的分析结果、和分离纯化后的分析结果。

[0350] 图的(b)表示了分离纯化后的寡脱氧核糖核苷酸的MALDI-TOF分子量解析结果。在确认到目标物的峰的同时,确认到了因测定时的激光照射而保护基脱离后的产物作为主峰。

[0351] 图的(c)表示了反相HPLC分离纯化后的寡脱氧核糖核苷酸、和照射365nm光后的寡核苷酸的反相HPLC分析结果。确认到了脱保护反应的定量进程。

[0352] 图的(a)和(c)的HPLC分析条件如下所示。使用系统,Chromaster(日立高新技术公司);柱,YMC Hydrosphere C18(250×4.6mm I.D.,YMC)洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,0-60%B(0-20分钟);流速,1.0mL/分钟;柱温,室温;检测波长,260nm。

[0353] (b) 亚磷酰胺试剂_2的结果

[0354] 图3表示了使用亚磷酰胺试剂_2的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果。

[0355] 图的(a)中,使用亚磷酰胺试剂_2合成在5'末端具有磷酸基保护体的19个碱基长的寡脱氧核糖核苷酸5' R-p-TAATACGACTCACTATAGG3' (序列编号2),利用反相HPLC分离、纯化目标物。表示了纯化前的混合物的分析结果、和分离纯化后的分析结果。

[0356] 图的(b)表示了分离纯化后的寡脱氧核糖核苷酸的MALDI-TOF分子量解析结果。在确认到目标物的峰的同时,确认到了因测定时的激光照射而保护基脱离后的产物作为主峰。

[0357] 图的(c)表示了反相HPLC分离纯化后的寡脱氧核糖核苷酸、和照射365nm光后的寡核苷

酸的反相HPLC分析结果。确认到脱保护反应的定量进程。

[0358] 图的(a)和(c)的HPLC分析条件如下所示。使用系统,Chromaster(日立高新技术公司);柱,YMC Hydrosphere C18(250×4.6mm I.D., YMC)洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,0-100%B(0-20分钟);流速,1.0mL/分钟;柱温,室温;检测波长,260nm。

[0359] (c)亚磷酰胺试剂_3的结果

[0360] 图4表示了使用亚磷酰胺试剂_3的5'磷酸化寡核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果。

[0361] 图的(a)中,使用亚磷酰胺试剂_3合成在5'末端具有磷酸基保护体的19个碱基长的寡脱氧核糖核苷酸5' R-p-TAATACGACTCACTATAGG3' (序列编号2),利用反相HPLC将目标物分离、纯化。表示了纯化前的混合物的分析结果、和分离纯化后的分析结果。

[0362] 图的(b)表示了分离纯化后的寡脱氧核糖核苷酸的MALDI-TOF分子量解析结果。在确认到目标物的峰的同时,确认到了因测定时的激光照射而保护基脱离后的产物作为主峰。

[0363] 图的(a)的HPLC分析条件如下所示。使用系统,Chromaster(日立高新技术公司);柱,YMC Hydrosphere C18(250×4.6mm I.D., YMC)洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,0-100%B(0-20分钟);流速,1.0mL/分钟;柱温,室温;检测波长,260nm。

[0364] (d)亚磷酰胺试剂_1,2的结果与已知化合物(比较例)的比较

[0365] 图5表示了使用亚磷酰胺试剂_1,2得到的5'磷酸化寡核苷酸利用反相HPLC分析得到的合成收率比较的结果。

[0366] 图的(a)~(e):使用市售的CPRI(a),市售的CPRII(b),文献已知化合物(Chem.Eur.J.23,5210(2017)),亚磷酰胺试剂_1(d),亚磷酰胺试剂_2(e),合成在5'末端具有磷酸基保护体的19个碱基长的寡脱氧核糖核苷酸5' R-p-TAATACGACTCACTATAGG3' (序列编号2),按照常规方法使用浓氨水进行脱树脂、脱保护(55℃,16小时)。用反相HPLC分析包含磷酸基保护的目标物的纯化前的混合物,求出目标物含量。HPLC分析条件如下所示。使用系统,Chromaster(日立高新技术公司);柱,YMC Hydrosphere C18(250×4.6mm I.D., YMC)洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,0-100%B(0-20分钟);流速,1.0mL/分钟;柱温,室温;检测波长,260nm。图中记载了表示目标物的化学结构的示意图、及其洗脱时间、含量%。

[0367] 图的(f)是由(a)~(e)所示的结果汇总了作为目标的5'末端磷酸基保护体的洗脱时间和生成收量(%)的。*Chem.Eur.J.23,5210(2017)。从该结果可知,本申请发明的亚磷酰胺试剂_1和亚磷酰胺试剂_2与现有的化合物相比,目标核酸的收率高。特别是如果比较亚磷酰胺试剂_1和亚磷酰胺试剂_2,则R₁为叔丁基的亚磷酰胺试剂_1的收率比R₁为C19直链烷基的亚磷酰胺试剂_2的收率高,可知相比于亚磷酰胺试剂_2,亚磷酰胺试剂_1在收率方面更为优选。

[0368] 2.在长链RNA寡核苷酸合成中的应用

[0369] (1)实验

[0370] (a)RNA合成

[0371] 使用亚磷酰胺试剂_1和市售的亚磷酰胺试剂(ChemGenes),按照常规方法利用核

酸自动合成机NR-2A 7MX(Nihon Techno Service Co.,Ltd.)合成了图中表示序列的107个碱基长或131个碱基长的寡核糖核苷酸。合成结束后,在固相载体中加入浓氨水和40%甲基胺水溶液的1:1混合液1mL,在65℃加热15分钟进行脱保护。将上清液用Millex LH过滤器(0.45μm,Merck)过滤后,用离心蒸发器在减压下干燥固化。在残渣中加入1mL的1M TBAF的THF溶液使其溶解,35℃加热过夜。加入1mL的1M Tris-HCl(pH7.5)缓冲液进行混合,用离心蒸发器浓缩后,使用NAP-25柱(GE HealthCare)进行脱盐。在洗脱液3mL中加入0.3mL的3M乙酸铵水溶液(pH5.2),3.3mL的2-丙醇,在-30℃冷却过夜后,将析出的RNA离心分离并回收。将RNA再溶解在超去离子水中,测定在260nm的吸收,由此算出核酸浓度。

[0372] (b) 用反相HPLC进行目标物的分离、纯化

[0373] 将上述合成的RNA用反相HPLC分离、纯化。HPLC的条件等记载于后述的“(2)结果”中。

[0374] (c) 通过光照射进行脱保护

[0375] 通过光照射进行的5'磷酸基的脱保护反应如下进行。将RNA的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0)溶液(10μL)加到透明96孔多孔板,通过MAX-305光源装置(朝日分光)以4mW/cm²的光量照射365nm光10分钟。

[0376] (2) 结果

[0377] (a) 亚磷酰胺试剂_1的结果

[0378] 图6表示了使用亚磷酰胺试剂_1的5'磷酸化寡核糖核苷酸的合成和纯化、纯化后脱保护反应的反相HPLC分析结果。5'末端磷酸化107个核苷酸长度RNA在脱保护后能够由反相HPLC纯化。

[0379] 图的(a)表示了化学合成RNA序列,mG表示2'位的羟基被甲基化。

[0380] 图的(b)表示了包含脱保护后的107-ntRNA的混合物的反相HPLC解析结果。将洗脱物分成3组进行分离制备(峰_1、2、3)。

[0381] 图的(c)表示了(b)中分离制备的3组5%变性聚丙烯酰胺(包含7M尿素)分析结果。峰_2中包含作为目标的全长107-ntRNA。峰_1中包含没有延长至全长的合成时的副产物,峰_3中包含未鉴定的副产物。将电泳后的聚丙烯酰胺凝胶用SYBR GreenII核酸染色试剂染色,将RNA可视化。

[0382] 图的(d)表示了使用反相HPLC纯化后的目标物(107-ntRNA)的反相HPLC分析结果。

[0383] 图的(b)、(d)中使用的HPLC分析条件如下所示。使用系统,LaChrom Elite(日立高新技术公司):柱,YMC Triat Bio C4(250×4.6mmI.D.);洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,5-20%B(0-20分钟);流速1.0mL/分钟;柱温,50℃;检测波长,260nm。

[0384] 图7是表示使用亚磷酰胺试剂_1合成的5'末端磷酸化107个核苷酸长度RNA通过光照射定量地脱保护的图。

[0385] 图的(a)表示了脱保护反应的概念图,照射365nm光去除了5'磷酸基的保护基。

[0386] 图的(b)、(c)表示了107-ntRNA的光照射前(脱保护前)的反相HPLC分析结果,(b)表示了光照射前(脱保护前)的反相HPLC分析结果,(c)表示了光照射(脱保护后)的反相HPLC分析结果。从该结果确认到通过光照射的定量的脱保护。

[0387] 图的(b)、(c)中使用的HPLC分析条件如下所示。使用系统,LaChrom Elite(日立高

新技术公司):柱, YMC Hydrosphere C18 (250×4.6mm I.D.);洗脱液A, 包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵 (pH7.0);洗脱液B, 乙腈;梯度条件, 5-20%B (0-20分钟):流速1.0mL/分钟:柱温, 50℃;检测波长, 260nm。

[0388] 图8是表示使用亚磷酸胺试剂_1合成的5'末端磷酸化131个核苷酸长度RNA脱保护后能够由反相HPLC分离纯化, 且能够由之后的光照射定量地脱保护的图。

[0389] 图的(a)表示了化学合成RNA序列, mG表示2'位的羟基被甲基化。

[0390] 图的(b)表示了包含脱保护后的131-ntRNA的混合物的反相HPLC解析结果。将洗脱物分成3组进行分离制备、纯化(峰_1、2、3)。

[0391] 图的(c)表示了(b)中分离制备的3组变性聚丙烯酰胺分析结果。峰_2包含作为目标的全长131-ntRNA。峰_1中包含没有延伸至全长的合成时的副产物, 峰_3包含未鉴定的副产物。将电泳后的聚丙烯酰胺凝胶用SYBR GreenII核酸染色试剂染色, 将RNA可视化。

[0392] 图的(d)表示了使用反相HPLC纯化后的5'磷酸基保护体(131-ntRNA)的反相HPLC分析结果。

[0393] 图的(e)表示了使用反相HPLC纯化后, 通过365-nm光照射而脱保护的目标物(131-ntRNA)的反相HPLC分析结果。

[0394] 图的(b)中使用的HPLC分析条件如下所示。使用系统, LaChromElite (日立高新技术公司):柱, YMC TriatBio C4 (250×4.6mm I.D.);洗脱液A, 包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵 (pH7.0);洗脱液B, 乙腈;梯度条件, 5-20%B (0-20分钟):流速1.0mL/分钟:柱温, 50℃;检测波长, 260nm。

[0395] 图的(d、e)中使用的HPLC分析条件如下所示。

[0396] 使用系统, Chromaster (日立高新技术公司):柱, YMC Hydrosphere C18 (250×4.6mm I.D.);洗脱液A, 包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵 (pH7.0);洗脱液B, 乙腈;梯度条件, 5-15%B (0-20分钟):流速1.0mL/分钟:柱温, 50℃;检测波长, 260nm。

[0397] 3.5'末端单磷酸化RNA的转录合成和分离

[0398] (1) 概要

[0399] 图9对本实验的概要进行了表示。将包含T7启动子序列的双链DNA片段作为模板, 使用T7RNA聚合酶转录合成RNA。在底物的NTP (ATP、UTP、GTP、CTP) 的基础上, 在反应液中添加GMP的情况下, 转录反应从GTP或GMP的任意一者都可以开始。因此, 根据GTP/GMP的混合比, RNA的5'末端羟基成为三磷酸、单磷酸的混合物, 但它们用HPLC等难以分离(图的上段的反应方案)。

[0400] 相对于此, 在本发明中, 使用在鸟苷的5'末端结合有保护基的R-pG。而且, 如果在转录反应中使底物NTP和转录底物R-pG共存, 则根据GTP/R-pG的混合比, 转录物成为5'末端三磷酸、保护(R)-单磷酸的混合物。利用保护基的疏水性, 能够通过反相HPLC等将保护(R)-单磷酸化RNA从混合物分离。通过分离后的光照射, 磷酸基的保护基能够定量地除去, 由此, 表明5'末端被单磷酸化的RNA转录物(34、100、250、650、1000个碱基长)能够高纯度地纯化。实验及其结果如下所示。

[0401] (2) 实验条件

[0402] (a) HPLC分析条件

[0403] 本实验中使用的HPLC的分析条件如下所示。

[0404] 柱:Hydrosphere C18(YMC)4.6×250mm或Triart C4(YMC)4.6×250mm

[0405] 流动相:A) 包含5%乙腈的50mM TEAA缓冲液(pH7.0)

[0406] B) 乙腈

[0407] (b) 转录底物R-pG的合成

[0408] CPG使用3'-TOM-核糖-鸟苷 **CPG1000Å**, 利用核酸合成机合成。合成后, 将CPG移到装有1.5mL O-环的螺纹管(SARSTEDT)中, 加入40%aq. 甲基胺/28%aq. 氨溶液(1:1) 1.0mL并在65℃孵育10分钟。放置冷却到室温后使用Millex LH 0.45μm过滤器过滤, 用灭菌水(500μL)冲洗, 用离心蒸发器使其干燥固化。使其溶解在DMSO 115μL中, 加入三乙胺60μL。在其中加入三乙胺三氢氟酸盐75μL并在65℃孵育2小时。通过HPLC分析、纯化反应液后, 通过离心蒸发器浓缩, 在260nm进行吸光度测定, 确定浓度(3.62mM)。

[0409] MS (ESI-MS, 负离子模式(negativemode)), [M-H]⁻计算值: 611.14 实测值: 611.1318

[0410] HPLC条件; 柱: C18, 梯度: B 0-80%, 流速: 3mL

[0411] (c) RNA的转录合成

[0412] 使用各模板DNA进行体外(in vitro)转录反应。制备转录反应液(模板DNA 5mg/L、1×T7RNA聚合酶缓冲液(Takara) (Tris-HCl (pH8.0) 40mM、MgCl₂ 28mM、亚精胺2mM), T7RNA聚合酶(Takara) 2.5U/μL、DTT 5mM、ATP 2mM、UTP 2mM、GTP 0.5mM、GMP 2mM或R-pG 2mM、CTP 2mM), 在37℃孵育2小时。将反应液通过变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 确认RNA的生成。反应后, 利用苯酚-氯仿提取去除蛋白质, 通过氯仿萃取去除苯酚。使用Amicon Ultra (Merck Millipore, 0.5mL, 10K) 进行脱盐、浓缩。所得到的RNA溶液在260nm进行吸光度测定, 确定浓度。

[0413] (3) 结果

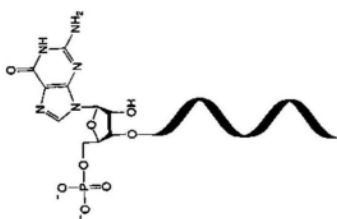
[0414] (a) 转录底物的合成

[0415] 使用亚磷酰胺试剂₁和载持脱氧鸟苷的CPG树脂(Glen Research), 利用核酸自动合成机按照亚磷酰胺法的常规方法进行转录底物R-pG的合成。在合成后进行脱保护, 之后利用HPLC进行分析、纯化。将其结果表示于图10。

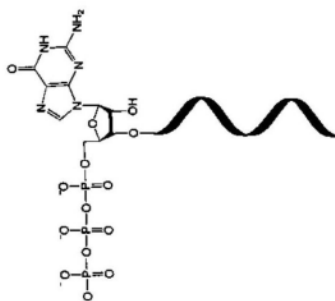
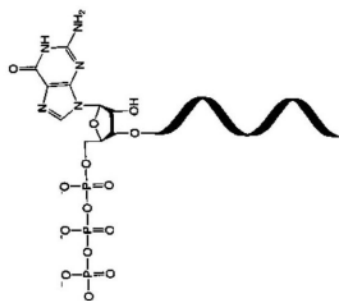
[0416] 使用纯化的RpG, 通过转录反应合成5种长度的RNA。通过转录合成的RNA分别为34nt、100nt、250nt、650nt、1078nt的长度。通过利用变性聚丙烯酰胺凝胶的电泳分析反应液, 确认目标链长的RNA。将其结果表示于图11。

[0417] (b) 通过HPLC的分析

[0418] 将通过转录得到的RNA纯化后, 通过HPLC进行分析。将RNA的分析结果表示于图12~图20。此外, HPLC的各峰(峰1~3)中的RNA的结构如下所示。峰1表示没有保护基的三磷酸型和单磷酸型的混合物, 峰2表示没有保护基的三磷酸型, 峰3表示有保护基的单磷酸型。



[0419]

**1 (混合物)****2****3**

[0420] 将各数据的汇总结果表示于下述表。

[0421] [表1]

C18 柱				p-RNA, ppp-RNA	Rp-RNA		
梯度 (MeCN/50 mM TEAA, 5% MeCN)	柱温 (°C)	长度 (nt)	保留时间 (min)	保留时间 (min)	空隙 (min)	收率 (%)	
0-60%	r.t.	34	8.07	9.89	1.82	66.7	
0-30%	50	100	10.2	12.5	2.26	74.1	
0-30%	50	250	10.9	11.9	1.02	74.1	
0-30%	50	650	10.9	11.3	0.327	74	
0-30%	50	1078	10.9	11.1	0.206	68.1	

[0422]

C4 柱				p-RNA, ppp-RNA	Rp-RNA		
梯度 (MeCN/50 mM TEAA, 5% MeCN)	柱温 (°C)	长度 (nt)	保留时间 (min)	保留时间 (min)	空隙 (min)	收率 (%)	
0-30%	50	34	6.69	10.2	3.54	68.8	
0-20%	50	250	11.4	13.9	2.45	76.9	
0-20%	50	650	10.3	11.5	1.16	71.1	
0-20%	50	1078	14.0	15.2	1.25	70	

[0423] (c) 通过光照射的脱保护和HPLC分析

[0424] 通过HPLC,将导入了光保护基的RNA进行纯化,对RNA溶液照射10分钟365nm的光,由此进行脱保护,通过HPLC进行分析。将其结果表示于图21~图23。

[0425] 4. 支化型加帽类似物化合物(前体)的合成

[0426] 图24是表示使用新型磷酸化试剂的支化型加帽类似物化合物的合成实验的图。

[0427] 图的(a)、(b)表示了2和3支化型加帽类似物化合物的合成方案。通过核酸自动合成机合成1、4,利用新型磷酸化试剂的疏水性保护基通过反相HPLC将它们纯化。通过光照射将磷酸部的保护基除去,得到加帽化前体2、5。

[0428] 图的(c)、(d)表示了包含脱保护、透析后的化合物1、4的混合物的反相HPLC分析结果。目标物包含在保留时间12.17分钟(c)、12.96分钟、(d)的峰中,因此将其分离。

[0429] 图的(e)、(f)表示化合物2、5的反相HPLC分析结果。

[0430] (实验部分)

[0431] 按照亚磷酰胺法的常规方法,通过核酸合成机以1微摩尔规模合成鸟苷衍生物1、4。在载持有鸟苷保护体的CPG固相载体(ChemGenes, cat#N-3203-10)上分别结合市售的支化型亚磷酰胺试剂(Symmetric Doubler Phosphoramidite, Glen Research, cat#10-1920:

Treble Phosphoramidite, Glen Research, cat#10-1922)。接着,结合rG核苷酸和新型化学磷酸化试剂(化合物1),得到作为目标的2支化型化合物(1)和3支化型化合物(4)。在固相载体上加入1mL的浓氨水和40%甲基胺水溶液的等量混合液,在65℃加热15分钟。将上清液在减压下干燥固化,将残渣溶解于二甲基亚砜100μL,添加三乙胺三氢氟酸盐125μL并在65℃加热2小时。在反应液中加入1mL的0.1M乙酸三乙胺缓冲液(pH7.0),使用透析膜(Spectra/Pore公司制、Biotech CE Tubing;MWC0 500-1000Da)透析过夜。将内液回收,通过反相HPLC分离目标物。分析、纯化条件如下所示。

[0432] 使用系统,LaChrom Elite(日立高新技术公司):柱, YMC Triart Bio C4 (250×4.6mm I.D.);洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH 7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,5-80%B(0-20分钟):流速1.0mL/分钟:柱温,25℃;检测波长,260nm。

[0433] 通过反相HPLC分离的目标物在浓缩后,照射365-nm光进行脱保护。使用透析膜(Spectra/Pore公司制、Biotech CE Tubing;MWC0500-1000Da)透析过夜,分别以72nmol、96nmol的收量得到目标化合物2和5。所得到的目标化合物2和5通过反相HPLC确认其纯度。分析条件如下所示。

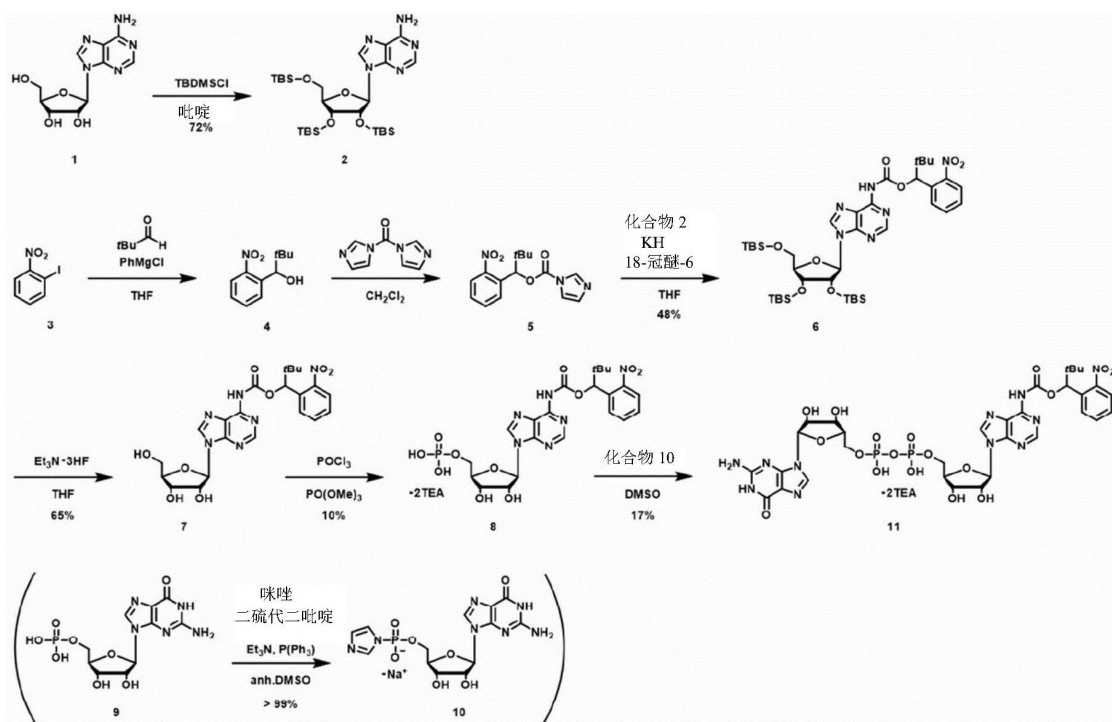
[0434] 使用系统,LaChrom Elite(日立高新技术公司):柱, YMC Hydroshere C18 250×4.6mm I.D.);洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,0-20%B(0-20分钟):流速、1.0mL/分钟:柱温,25℃;检测波长,260nm。

[0435] 使用3-羟基吡啶甲酸作为基质、使用Bruker公司制UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF质谱仪的正离子模式测定所得到的化合物的分子量。解析结果如下所示。

[0436] 2支化型鸟苷衍生物2; $[M+H]^+$ 计算值1486.9, 实测值1486.3 (-0.6) . 3支化型鸟苷衍生物5; $[M+H]^+$ 计算值1932.2, 实测值1931.3 (-0.9) .

[0437] 5.能够分离纯化的腺苷化RNA制备方法的开发:具有光分解性疏水性保护基的AppG核苷酸类似物的合成和使用RNA聚合酶在RNA链中的导入

[0438] 具有光分解性疏水性保护基的AppG二核苷酸化合物(化合物11)的合成方案如下所示。



[0439]

[0440] (1) 2', 3', 5' -三-O-[叔丁基(二甲基)甲硅烷基]-腺苷(化合物2)

[0441] 将腺苷(2.00g, 7.48mmol, 1.0eq.)、叔丁基二甲基硅烷(5.64g, 37.4mmol, 5.0eq.)和咪唑(6.11g, 89.9mmol, 12eq.)溶解在DMF(75.0mL)中,在室温搅拌过夜。使反应溶液溶解于乙酸乙酯,用水、饱和食盐水进行清洗后,用无水硫酸钠使有机层干燥,将溶剂在减压下进行溶剂蒸馏去除。通过中性快速柱色谱(己烷/乙酸乙酯=3/1)纯化,得到3.30g的化合物2(5.42mmol, 收率72%)。

[0442] [¹H NMR] (400MHz, DMSO-d₆, ppm) δ8.29(s, 1H), 8.09(s, 1H), 7.27(s, 2H), 5.89(d, 1H, J=6.4Hz), 4.87(dd, 1H, J=4.4, 6.4Hz), 4.28(d, 1H, J=4.4Hz), 3.99~3.94(m, 2H), 3.70(q, 1H, J=6.8Hz), 0.87(d, 18H, J=10.8Hz), 0.67(s, 9H), 0.08(d, 6H, J=7.6Hz), 0.04(s, 6H), -0.15(s, 3H), -0.40(s, 3H)

[0443] [HRMS] (ESI)m/z Cal. for C₂₈H₅₅N₅O₄Si₃Na⁺[M+Na]⁺; 632.3454 found 632.3486

[0444] (2) 2,2-二甲基-1-(2-硝基苯基)丙烷-1-醇(化合物4)

[0445] 将加入了1-碘-2-硝基苯(5.0g, 20mmol, 1.0eq.)的THF(50mL)冷却到-40℃,缓慢滴加2M氯化苯基镁THF溶液(11mL, 22mmol, 1.1eq.)并在-40℃搅拌30分钟。缓慢滴加新戊醛(2.2mL, 20mmol, 1.0eq.)并在-40℃搅拌3小时。加入饱和氯化铵水(100mL)和水(100mL),一边搅拌一边恢复室温。加入饱和食盐水(200mL),用乙酸乙酯(200mL×3)萃取。用无水硫酸钠使有机层干燥,进行减压蒸馏除去。通过中性快速柱色谱(己烷/二氯甲烷=2/1→1/1→1/5)纯化,得到目标化合物4(2.9g, 14mmol, 收率69%)。

[0446] [¹H NMR] (400MHz, CDCl₃, ppm) δ7.78(dd, 1H, J=8.0, 1.5Hz), 7.71(dd, 1H, J=8.2, 1.2Hz), 7.54~7.59(m, 1H), 7.38(ddd, 1H, J=8.4, 7.1, 1.0Hz), 5.33(d, 1H, J=3.1Hz), 2.35(d, 1H, J=3.6Hz), 0.85(s, 9H)。

[0447] (3) 2', 3', 5' -三-O-[叔丁基(二甲基)甲硅烷基]-N⁶-[2-硝基苄基(叔丁基)氧基羰基]-腺苷(化合物6)

[0448] 将化合物4 (0.300g, 1.43mmol, 1.0eq.) 用苯共沸3次。在其中加入1,1'-羰基二咪唑 (0.626g, 3.86mmol, 2.7eq.), 溶解于二氯甲烷 (7.00mL), 在室温搅拌6.5小时。用水、饱和食盐水进行清洗后, 用无水硫酸钠使有机层干燥, 将溶剂在减压下进行溶剂蒸馏除去。在其中加入化合物2 (0.962g, 1.58mmol, 1.1eq.)、18-冠醚-6 (0.455g, 1.72mmol, 1.2eq.), 溶解于脱水THF (7.0mL) 中。进而缓慢加入KH (0.0689g, 1.72mmol, 1.2eq.), 在50℃搅拌过夜。将溶剂在减压下进行溶剂蒸馏除去后, 使残渣溶解于乙酸乙酯中, 用水、饱和食盐水进行清洗。用无水硫酸钠使有机层干燥, 将溶剂在减压下进行溶剂蒸馏除去。通过中性快速柱色谱 (己烷/乙酸乙酯=3/1) 纯化, 得到0.585g的化合物6 (0.692mmol, 收率48%)。

[0449] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6 , ppm) (非对映异构体混合物) diastereomer mixture δ 10.91 (s, 1H), 8.64~8.57 (m, 2H), 7.96~7.93 (m, 1H), 7.83~7.81 (m, 1H), 7.63~7.50 (m, 2H), 6.22 (s, 1H), 6.01~6.00 (m, 1H), 4.88~4.84 (m, 1H), 4.32~4.30 (m, 1H), 4.01~3.93 (m, 2H), 3.75~3.72 (m, 1H), 0.88~0.85 (m, 27H), 0.664~0.661 (m, 9H), 0.11~0.07 (m, 6H), 0.041~0.039 (m, 6H), -0.14 (s, 3H), -0.415~0.42 (m, 3H)

[0450] ^{13}C NMR (151MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 152.30, 152.07, 149.42, 143.14, 137.35, 133.62, 133.42, 133.08, 132.36, 131.81, 130.43, 130.10, 129.98, 129.80, 129.66, 128.97, 128.89, 128.52, 125.21, 125.15, 124.89, 123.74, 123.63, 87.60, 85.97, 80.23, 76.83, 74.93, 72.97, 72.68, 62.94, 36.64, 36.29, 18.55, 18.30, 17.98, -4.15, -4.31, -4.91, -5.01

[0451] [HRMS] (ESI) m/z Cal. for $\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_8\text{Si}_3\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$; 867.4299 found 867.4305

[0452] (4) N^6 -[2-硝基苄基(叔丁基)氧基羰基]-腺苷(化合物7)

[0453] 将化合物6 (0.585g, 0.692mmol, 1.0eq.) 溶解于THF (7.00mL), 在其中加入三乙胺·三盐酸盐 (0.282mL, 1.73mmol, 2.5eq.), 在室温搅拌过夜。使反应溶液溶解于乙酸乙酯, 用水、饱和食盐水进行清洗后, 用无水硫酸钠使有机层干燥, 将溶剂在减压下进行溶剂蒸馏除去。通过中性快速柱色谱 (二氯甲烷/MeOH=10/1) 纯化, 得到0.226g的化合物7 (0.450mmol, 收率65%)。

[0454] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6 , ppm) 非对映异构体混合物 δ 9.57~9.53 (m, 1H), 8.35~8.33 (m, 1H), 8.07~8.05 (m, 1H), 7.81~7.79 (m, 1H), 7.61~7.51 (m, 2H), 7.35~7.31 (m, 1H), 6.48~6.46 (m, 1H), 5.83~5.76 (m, 2H), 5.34 (s, 1H), 4.87~4.72 (m, 2H), 4.33~4.14 (m, 2H), 3.78~3.62 (m, 2H), 0.90~0.85 (m, 9H)

[0455] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 151.87, 150.89, 149.95, 149.49, 149.43, 149.18, 149.07, 143.15, 132.91, 132.65, 129.26, 128.76, 124.63, 122.46, 90.42, 87.04, 77.44, 74.25, 71.70, 62.57, 36.29, 25.77

[0456] [HRMS] (ESI) m/z Cal. for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_8\text{Na}^+[\text{M}+\text{Na}]^+$; 525.1704 found 525.1709

[0457] (5) N^6 -[2-硝基苄基(叔丁基)氧基羰基]-腺苷(化合物7)的摩尔吸光系数计算

[0458] 使用UV-vis(紫外线可见光)光谱, 计算化合物7的摩尔吸光系数(ϵ_{260})。首先, 制备0.990、1.960、2.913、 3.846×10^{-4} [mol/L]的化合物7, 测定UV-vis光谱。从各浓度下的 ϵ_{260} 算出平均值, 确定化合物7的 ϵ_{260} 为18717L/mol·cm。

[0459] (6) N^6 -[2-硝基苄基(叔丁基)氧基羰基]-腺苷5'-单磷酸三乙胺盐(化合物8)

[0460] 将化合物7 (0.100g, 0.199mmol, 1.0eq.) 溶解于磷酸三甲酯 (2.00mL) 中, 在其中加入磷酰氯 (22.3 μ L, 0.239mmol, 1.2eq.), 在室温搅拌6小时。在其中加入TEAB缓冲液 (2M,

10.0mL),用氯仿清洗后,将溶剂在减压下进行溶剂蒸馏除去。使用DEAE Sephadex A-25(溶剂:(A)水,(B)1.5M碳酸三乙基铵缓冲液10%ACN,梯度:B conc.0-200min.,0-100%,流速:1.0mL/min.,检测波长:260nm,sizeS)进行纯化,得到8.82mg的化合物8(11.2 μ mol,收率6%)。

[0461] ^1H NMR (600MHz,DMSO- d_6 ,ppm) 非对映异构体混合物 δ 8.80(s,1H),8.57(s,1H),7.94~7.93(m,1H),7.80~7.74(m,2H),7.57~7.54(m,1H),6.23~6.22(m,1H),6.01~5.99(m,1H),4.68~4.66(m,1H),4.20~4.19(m,1H),4.06~4.05(m,1H),3.85~3.81(m,2H),2.47~2.46(m,1H),1.19(s,2H),1.02~0.89(m,9H)

[0462] ^{13}C NMR (151MHz,DMSO- d_6 ,ppm) δ 152.52,152.25,151.75,149.91,149.41,143.22,133.50,133.10,129.79,129.64,124.88,123.38,87.45,85.15,76.72,74.70,71.73,64.63,36.42,29.53,25.98

[0463] ^{31}P NMR (243MHz,DMSO- d_6 ,ppm) δ 0.79

[0464] [HRMS] (ESI)m/zCal.for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_{11}^{-}[\text{M}-\text{H}]^{-}$;581.1403found581.1381

[0465] (7) 鸟苷5'-磷酸咪唑的钠盐(化合物10)

[0466] 将鸟苷5'-磷酸二钠盐(0.500g,1.23mmol,1.0eq.)溶解于水中,上样到设为 H^+ 型的DOWEX 50W-X8柱上,将柱用水清洗。洗脱液滴加到三乙胺(0.685mL,4.92mmol,4.0eq.)的乙醇溶液,将溶剂在减压下进行溶剂蒸馏除去。在其中加入咪唑(0.837g,12.3mmol,10eq.)、2,2'-二硫二吡啶(0.811g,3.68mmol,3.0eq.),溶解于DMSO(10.0mL)。进而加入三乙胺(0.372mL,3.68mmol,3.0eq.)、三苯基膦(0.965g,3.68mmol,3.0eq.),在室温搅拌过夜。另外,反应追踪用HPLC(柱:CoresepSB,溶剂:(A)20mM乙酸铵5%ACN,(B)400mM乙酸铵5%ACN,梯度:B conc.2-22min.,0-100%,流速:1.0mL/min.,检测波长:260nm)进行。在其中加入高氯酸钠(4.51g,36.8mmol,30eq.)的脱水丙酮(200mL)溶液,在冰浴中进行冰冷。将析出的沉淀通过抽吸过滤进行回收,得到白色的粉状化合物10(0.530g,1.22mmol,收率>99%)。各种光谱显示与文献值^[1]高度一致。

[0467] (8) P^1 -鸟苷-5' P^3 -(N^6 -[2-硝基苄基(叔丁基)氧基羰基]-腺苷-5')二磷酸三乙胺盐(化合物11)

[0468] 将化合物8(8.81mg,11.2 μ mol,1.0eq.)溶解于DMSO(1.00mL),加入鸟苷5'-磷酸咪唑(24.4mg,56.0 μ mol,5.0eq.)、1-甲基咪唑(4.42 μ L,56.0 μ mol,5.0eq.)、 CaCl_2 (12.4mg,112 μ mol,10eq.),在室温搅拌过夜。另外,反应追踪通过HPLC(柱:Hydrosphere C18,溶剂:(A)20mM乙酸三乙基铵(pH7.0),(B)ACN,梯度:B conc.0-30min.,0-80%,流速:1.0mL/min.,检测波长:260nm)进行。确认反应进程的结束后,使用HPLC(柱:HydrosphereC18,溶剂:(A)20mM乙酸三乙基铵(pH7.0),(B)ACN,梯度:B conc.0-30min.,0-80%,流速:10mL/min.,检测波长:260nm)进行纯化,得到2.15mg的化合物11(1.90 μ mol,收率17%)。

[0469] ^1H NMR (600MHz,DMSO- d_6 ,ppm) 非对映异构体混合物 δ 8.34~8.33(m,2H),7.83~7.81(m,1H),7.69~7.64(m,2H),7.62~7.57(m,1H),7.43~7.40(m,1H),6.25~6.24(m,1H),5.96~5.95(m,1H),5.61~5.57(m,1H),4.50~4.48(m,1H),4.46~4.43(m,1H),4.33~4.31(m,1H),4.27~4.26(m,1H),4.23~4.17(m,2H),4.14~4.11(m,2H),4.08~4.04(m,2H),0.83~0.82(m,9H)

[0470] ^{13}C NMR (151MHz,DMSO- d_6 ,ppm) δ 157.35,154.15,152.14,151.64,149.82,

149.39, 142.97, 136.61, 133.52, 133.06, 129.80, 129.62, 124.85, 123.30, 88.12, 87.93, 83.84, 76.74, 74.81, 73.96, 70.57, 70.17, 64.62, 31.23, 27.59, 26.05, 25.97, 22.413

[0471] ^{31}P NMR] (243MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ -10.66

[0472] [HRMS] (ESI)m/zCal.for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_{11}\text{O}_{18}\text{P}_2$ $^-[M-H]^-$; 926.1877found 926.1916

[0473] <参考文献>

[0474] 1.Marcin Z., Mariusz S., Maciej L., Anna N., Edward D., Robert E. Rhoads, Zbigniew W., Jacek J., RSC Adv. 2013, 3, 20943-20958.

[0475] (9) 利用T7RNA聚合酶的转录

[0476] 对于上述合成的化合物11, 利用T7RNA聚合酶进行转录反应。通过将以下记载的反应液在37度加热2小时制成1078个碱基长的含保护基的腺苷化RNA。反应液: 5ng/ μL dsDNA 转录模板 (包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAG3' (序列编号1) 的1105-bp的PCR产物)、2mM ATP、2mM UTP、2mM CTP、0.5mM GTP、2mM化合物11 (具有光分解性疏水性保护基的AppG二核苷酸化合物)、40mM Tris-HCl (pH8.0)、8mM MgCl_2 、2mM亚精胺、5mM DTT、2.5单位/ μL T7RNA聚合酶 (Takara Bio)。转录反应后, 将任何一种情况的反应液都与TE饱和苯酚和氯仿的等量混合液混合, 剧烈混合, 将产生的蛋白质性不溶物除去。将水层用氯仿萃取后, 使用Amicon Ultra 10K超滤过滤器单元进行纯化, 通过反相HPLC进行分析。

[0477] 图25表示了在使用T7RNA聚合酶的试管内转录反应中添加化合物11, 能够得到含保护基的腺苷化RNA。

[0478] 图的(a)表示了实验的概要。转录RNA以在5'末端具有三磷酸结构的RNA (ppp-RNA)、和作为目标的含保护基的腺苷化结构 (R-App-RNA) 的混合物的形式得到。后者具有与前者不同的高的疏水性, 因此能够利用本性质通过反相HPLC进行分离。

[0479] 图的(b)表示了1078个碱基长的RNA转录反应物的反相HPLC分析结果。

[0480] 柱, YMC-Triart Bio C4 (250mm $\times$ 4.6mm I.D.); 溶剂A, 50mM乙酸三乙基铵 (pH7.0), 5%乙腈; 溶剂B, 乙腈; 线性梯度0-20%溶剂B (0-20分钟); 流速: 1mL/分钟; 检测波长, 260nm; 柱温, 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0481] (10) 利用光照射的脱保护

[0482] 通过将以下记载的反应液在37度加热2小时来制成250个碱基长的含保护基的腺苷化RNA。反应液: 5ng/ μL dsDNA转录模板 (包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAG3' (序列编号1) 的276-bp的PCR产物)、2mM ATP、2mM UTP、2mM CTP、0.5mM GTP、2mM化合物11 (具有光分解性疏水性保护基的AppG二核苷酸化合物)、40mM Tris-HCl (pH8.0)、8mM MgCl_2 、2mM亚精胺、5mM DTT、2.5单位/ μL T7RNA聚合酶 (Takara Bio)。将转录反应后的反应液与TE饱和苯酚和氯仿的等量混合液混合, 剧烈混合, 将产生的蛋白质性不溶物除去。将水层用氯仿萃取后, 使用Amicon Ultra 10K超滤过滤器单元进行纯化。将其通过反相HPLC进行分析, 将含光分解性疏水性保护基的腺苷化RNA分离制备、纯化。包含目标RNA的洗脱液使用Amicon Ultra 10K超滤过滤器单元脱盐。通过光照射对上述得到的含保护基的腺苷化RNA进行脱保护。将RNA溶液 (16.5ng RNA/ μL , 100 μL) 加入到透明96孔多孔板, 通过MAX-305光源装置 (朝日分光) 以4mW/ cm^2 的光量照射365nm光15分钟。

[0483] 图26表示了转录反应中制备的含保护基的腺苷化RNA通过光照射被脱保护, 能够转化为目标腺苷化RNA。

[0484] 图的(a)表示了实验的概要。

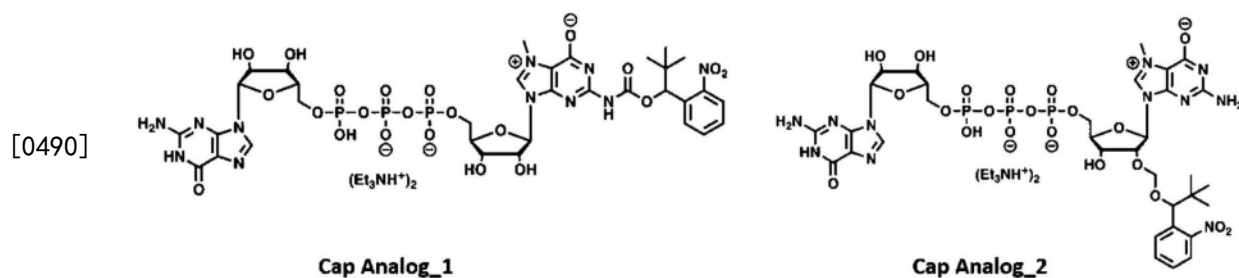
[0485] 图的(b)表示了含保护基的腺苷化RNA(分离后)的反相HPLC分析结果。

[0486] 图的(c)表示了含保护基的腺苷化RNA(分离后)照射365-nm光后的反相HPLC分析结果。

[0487] (b)、(c)的柱,YMC-Triart Bio C4(250mm×4.6mm I.D.);溶剂A,50mM乙酸三乙基铵(pH7.0),5%乙腈;溶剂B,乙腈;线性梯度0-20%溶剂B(0-20分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,260nm;柱温,50℃。

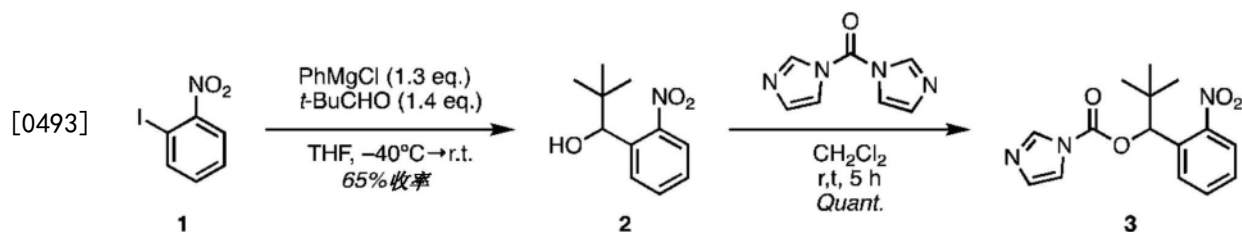
[0488] 5.具有光分解性疏水性保护基的加帽类似物化合物

[0489] 合成了具有光分解性疏水性保护基的新型加帽类似物化合物(加帽类似物_1(Cap Analog_1),加帽类似物_2(Cap Analog_2))。

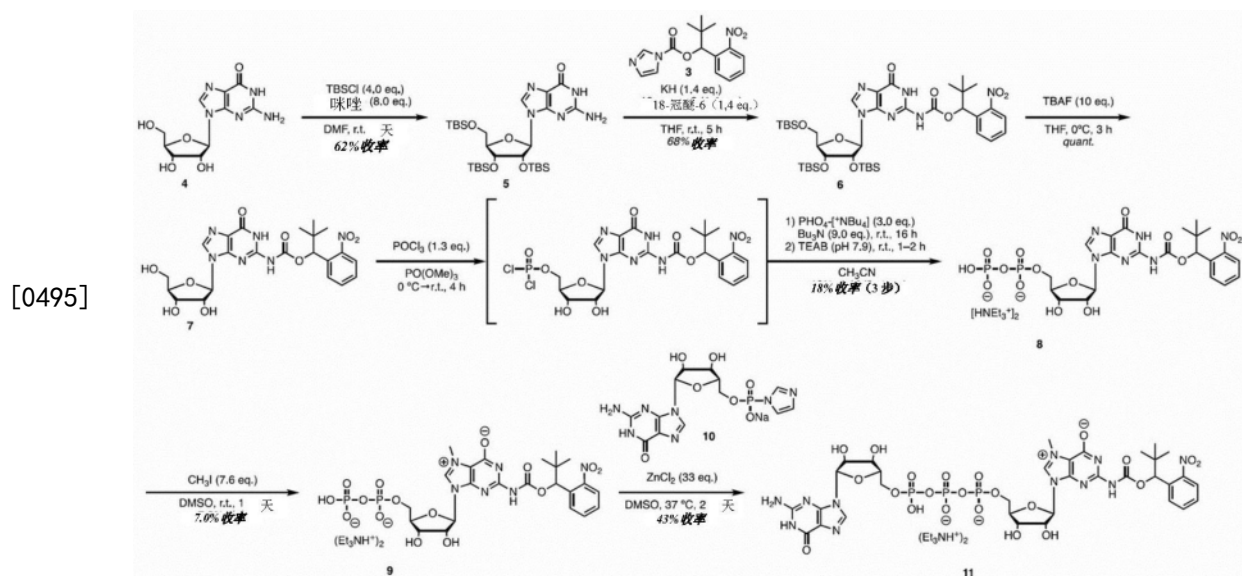


[0491] (1) 加帽类似物_1(N^2 修饰)的合成

[0492] 方案1.2,2-二甲基- (R/S) -1- (2-硝基苯基) 丙基1H-咪唑-1-羧酸酯(化合物3)的合成



[0494] 方案1. N^2 修饰加帽类似物的合成



[0496] (a) (R/S) -1- (2-硝基苯基) -2,2-二甲基-1-丙醇(化合物2)

[0497] (R/S)-*t*Bu-(2-硝基苄基)醇(化合物2)的合成按照文献进行。将THF(150mL)中的1-碘-2-硝基苯(20g,80mmol)的混合物冷却到-40℃。加入THF中的氯化苄基镁的溶液(2M、52mL、0.10mol),在-40℃搅拌1小时。将三甲基乙醛(12mL,9.6g,0.11mol)加入到反应混合物中,在-40℃搅拌36分钟。将反应混合物缓慢加热到室温。搅拌4小时后,加入饱和NH₄Cl水溶液使反应停止。加入NH₄Cl的水溶液停止反应。将混合物用乙酸乙酯萃取3次。使有机层在Na₂SO₄上干燥,进行浓缩。将残渣用由己烷、接着17→25%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为暗褐色的固体得到化合物2(11g、收率65%)。化合物的光谱数据均与文献一致。

[0498] (b)2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苄基)丙基1H-咪唑-1-羧酸酯(化合物3)

[0499] 在二氯甲烷(60mL)中的(R/S)-1-(2-硝基苄基)-2,2-二甲基-1-丙醇(化合物2)(5.8g、28mmol)的溶液中加入1,1'-羰基二咪唑(6.8g、42mmol)。在室温搅拌5小时后,将反应混合物用二氯甲烷稀释,用盐水清洗。使有机层在Na₂SO₄上干燥,进行浓缩。将残渣用由50→67%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为褐色的油得到化合物3(8.5g,quant.)。

[0500] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ8.11(t,J=1.1Hz,1H),7.87(dd,J=8.2,1.3Hz,1H),7.59-7.48(m,2H),7.46-7.35(m,2H),7.05-6.98(m,1H),6.62(s,1H),0.96(s,9H) ppm。

[0501] ¹³C NMR(101MHz,CDCl₃) δ149.22,147.85,136.97,132.83,131.71,131.01,129.35,128.58,124.97,117.09,80.39,36.51,25.84.ESI-TOF-MS calcd.for C₁₅H₁₇N₃NaO₄,326.1111[M+Na]⁺;found,326.1076。

[0502] (c)2',3',5'-O-三(叔丁基二甲基甲硅烷基)鸟苷(化合物5)

[0503] 2',3',5'-O-三TBDMS-鸟苷(化合物5)的合成按照文献进行。在N,N-二甲基甲酰胺(70mL)中的鸟苷(化合物4:10g,35mmol)和咪唑(19g,0.28mol)的悬浮液中加入叔丁基二甲基氯硅烷(21g,0.14mol)。在室温搅拌2天后,将反应混合物用乙酸乙酯稀释,用NH₄Cl水溶液清洗2次,用盐水清洗2次。使有机层在Na₂SO₄上干燥,进行浓缩。将残渣用由二氯甲烷、接着由1→3%甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为白色固体得到化合物5(14g、收率62%)。化合物5的光谱数据均与文献一致。

[0504] (d)N²-{[*t*Bu-(2-硝基苄基)氧基]羰基}-2',3',5'-O-三(叔丁基二甲基甲硅烷基)鸟苷(化合物6)

[0505] 在THF(40mL)中的2',3',5'-O-三TBDMS-鸟苷(化合物5)(4.9g,7.9mmol)、化合物3(2.7g,8.7mmol)和18-冠醚-6(2.8g,11mmol)的溶液中,加入在矿物油中的30%氢化钾(1.4g,11mmol)。在室温搅拌5小时后,将反应混合物用乙酸乙酯稀释,用盐水和饱和NH₄Cl水溶液的1:1混合液清洗。使有机层在Na₂SO₄上干燥,进行浓缩。将残渣用由25→50%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为茶色的泡沫得到化合物6(4.6g、收率68%)。

[0506] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ11.17,11.15(2s,1H),8.22,8.15(2s,1H),8.00(d,J=2.4Hz,1H),7.90(d,J=8.2Hz,1H),7.62-7.50(m,2H),7.49-7.42(m,1H),6.53(d,J=6.2Hz,1H),5.83(dd,J=5.9,1.6Hz,1H),4.37(dd,J=5.8,4.3,1.6Hz,1H),4.22(dd,J=4.4,2.7Hz,1H),4.06-4.03(m,1H),3.87(dt,J=11.5,3.0Hz,1H),3.74(dd,J=11.4,2.5Hz,1H),0.96-0.88(m,28H),0.75(d,J=12.9Hz,9H),0.12-0.04(m,13H),-0.08(d,J=6.9Hz,3H),-0.30(d,J=14.6Hz,3H) ppm。

[0507] ¹³C NMR(151MHz,CDCl₃) δ155.39,152.80,149.27,149.23,148.54,146.38,137.13,132.65,132.60,132.11,129.16,128.77,128.73,124.90,120.86,87.24,86.22,

79.15, 77.02, 72.57, 62.99, 60.52, 36.32, 26.15, 25.92, 25.77, 25.69, 21.17, 18.59, 18.16, 17.91, 14.27, -4.35, -4.50, -4.58, -5.11, -5.30, -5.38 ppm. ESI-TOF-MS calcd. for $C_{40}H_{68}N_6NaO_9Si_3$, 883.4248 $[M+Na]^+$; found, 883.4555.

[0508] (e) N^2 -{[tBu-(2-硝基苄基)氧基]羰基}鸟苷(化合物7)

[0509] 在THF(11mL)中的完全被保护的核苷6(2.0g, 2.3mmol)的冰冷的溶液中,在冰浴中加入1M四丁基氟化铵/THF(23mL, 23mmol)。在冰浴中,以0℃搅拌3小时后,将反应混合物用二氯甲烷稀释,用水清洗3次。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥,进行浓缩。用由二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化残留物,接着用1→17%甲醇/二氯甲烷洗脱。将产物悬浮于二氯甲烷,将该溶液在搅拌下通过滴加添加到二乙醚中。将所得到的沉淀物过滤回收,用二乙醚清洗,作为白色固体得到化合物7(1.2g、定量)。

[0510] ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ 11.65(s, 1H), 11.13(s, 1H), 8.20(s, 1H), 7.96(dd, J =8.0, 1.3Hz, 1H), 7.77(td, J =7.6, 1.3Hz, 1H), 7.65-7.52(m, 2H), 6.23(s, 1H), 5.75(dd, J =5.7Hz, 1H), 5.46(dd, J =5.8, 3.1Hz, 1H), 5.16(d, J =4.6Hz, 1H), 5.01(t, J =5.4Hz, 1H), 4.39(q, J =5.5Hz, 1H), 4.09(q, J =4.3Hz, 1H), 3.86(q, J =4.0Hz, 1H), 3.60(dt, J =12.0, 4.8Hz, 1H), 3.50(dt, J =12.0, 4.6Hz, 1H), 0.88(s, 9H) ppm。

[0511] ^{13}C NMR(101MHz, DMSO- d_6) δ 155.56, 154.36, 149.53, 149.31, 147.68, 138.15, 133.69, 132.07, 130.01, 129.33, 125.10, 120.42, 87.15, 85.83, 77.67, 74.46, 70.72, 61.67, 36.46, 25.83 ppm. ESI-TOF-MS calcd. for $C_{22}H_{26}N_6NaO_9$, 541.1654 $[M+Na]^+$; found, 541.1887。

[0512] (f) N^2 -{[tBu-(2-硝基苄基)氧基]羰基}鸟苷-5'-二磷酸三乙基铵盐(化合物8)

[0513] 在磷酸三甲酯(7mL)中的鸟苷衍生物7(400mg, 0.77mmol)的溶液中,在冰冷的状态下加入磷酰氯(83 μ L, 153mg, 1.0mmol)。将混合物缓慢加热到室温,在室温下搅拌。在室温搅拌4小时后,在反应混合物中在冰浴中加入0.5M四丁基磷酸二氢铵/ CH_3CN (4.6mL、2.3mmol)和三乙基胺(1.6mL、1.3g、6.9mmol)的混合物。将反应混合物加热到室温,在室温搅拌16小时。然后,加入0.2M TEAB缓冲液(pH7.9、10mL)将反应混合物猝灭。在室温搅拌1~2小时后,将透明的溶液用水稀释,用二氯甲烷清洗5次。将水层用50℃的旋转蒸发器浓缩。以包含0-10%的 CH_3CN 的TEAB缓冲液的线性0-1.5M梯度,用QAE-Sephadex上的离子交换色谱纯化残渣。以三乙基铵盐的形式作为白色固体得到鸟苷-5'-二磷酸(化合物8)(121mg、收率18%)。

[0514] ^1H NMR(600MHz, D_2O) δ 8.15(s, 1H), 7.84(dd, J =8.1Hz, 1H), 7.60(dd, J =7.3, 3.6Hz, 2H), 7.44(dt, J =8.4, 4.3Hz, 1H), 6.25(s, 1H), 5.92(dd, J =6.1, 2.1Hz, 1H), 4.73-4.68(m, 1H), 4.43(dt, J =6.1, 3.1Hz, 1H), 4.26-4.22(m, 1H), 4.09(q, J =4.0Hz, 2H), 3.06(q, J =7.4Hz, 1H), 1.14(t, J =7.3Hz, 17H), 0.82(s, 9H) ppm。

[0515] ^{13}C NMR(151MHz, D_2O) δ 157.47, 154.72, 149.98, 148.55, 147.48, 139.55, 133.45, 133.41, 131.75, 129.33, 129.05, 124.69, 119.49, 87.22, 87.14, 84.11, 84.05, 79.23, 73.94, 73.85, 70.51, 65.17, 58.68, 46.71, 35.78, 24.80, 8.26 ppm。

[0516] ^{31}P NMR(243MHz, D_2O) δ -10.25(1P), -10.69(1P) ppm. ESI-TOF-MS calcd. for $C_{22}H_{27}N_6O_{15}P_2$, 677.1015 $[M-H]^-$; found, 677.1162。

[0517] (g) N^2 -{[tBu-(2-硝基苄基)氧基]羰基}- N^7 -甲基-鸟苷-5'-二磷酸三乙基铵盐(化合物9)

[0518] 在DMSO (1.82mL) 中的鸟苷-5'-二磷酸(化合物8) (72.0mg, 82.0 μ mol) 的溶液中加入碘甲烷(88.0mg, 39.0 μ L, 623 μ mol)。在室温搅拌24小时后, 将反应混合物用水稀释, 用二乙醚清洗5次。将水相浓缩, 将残渣溶解于水中。将该粗制品用YMC-Triart C8柱(250 $\times$ 10.0mm I.D., S-5 μ m, 12nm, 流速3mL/min, 温度50 $^{\circ}$ C), 通过用25分钟进行在0.1M碳酸三乙基铵缓冲液(pH7.9) 中添加10~80%CH₃CN的线性梯度的反相HPLC来纯化。收集包含产物的级分, 加入数滴乙酸, 酸化至pH4.0。在减压下将CH₃CN除去后, 将产物用Wakosil(注册商标) 25C18(15-30 μ m, 球形) 脱盐, 进行冻结干燥, 作为白色固体得到N⁷-甲基-鸟苷-5'-二磷酸(化合物9) (5.10mg, 收率7.0%)。

[0519] ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ 7.84 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.60 (s, 2H), 7.44 (d, J=7.2Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 6.03 (d, J=4.9Hz, 1H), 4.52 (d, J=15.6Hz, 1H), 4.37 (s, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.19 (d, J=11.7Hz, 1H), 4.08 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.05 (q, J=7.1Hz, 13H), 1.13 (t, J=7.3Hz, 20H), 0.81 (s, 9H) ppm。

[0520] ¹³C NMR (151MHz, D₂O) δ 154.19, 148.63, 148.05, 133.34, 131.98, 129.23, 129.00, 124.64, 111.87, 89.95, 84.20, 78.79, 75.14, 69.16, 63.98, 46.69, 36.06, 35.73, 24.83, 8.25 ppm。

[0521] ³¹P NMR (243MHz, D₂O) δ -9.24 (1P), -10.67 (1P) ppm. ESI-TOF-MS calcd. for C₂₃H₂₉N₆O₁₅P₂, 691.1172 [M-H]⁻; found, 691.1395。

[0522] (h) 鸟苷5'-磷酸咪唑一钠盐(化合物10)

[0523] 鸟苷-5'-磷酸咪唑(化合物10)的合成按照文献进行。在N,N-二甲基甲酰胺(7.5mL) 中的鸟苷5'-一磷酸(300mg, 0.53mmol)、咪唑(290mg, 4.2mmol)、2,2'-二硫代二吡啶(350mg, 1.6mmol) 的溶液中加入三乙胺(150 μ L, 110mg, 1.1mmol) 后, 加入三苯基膦(420mg, 1.6mmol)。在室温搅拌2小时后, 将反应混合物在搅拌下通过滴加添加到丙酮(60mL) 中的高氯酸钠(65mg, 0.53mmol) 的溶液中。将所得到的悬浮液移到离心分离管, 以4,500rpm离心分离10分钟。弃掉上清液, 将沉淀物用丙酮清洗5次。将该固体在P₂O₅上的干燥器中在减压下干燥, 作为白色固体得到鸟苷5'-磷酸咪唑单钠盐(化合物10) (230mg, quant.)。

[0524] ³¹P NMR (243MHz, DMSO-d₆) δ 1.80 ppm。

[0525] (i) P1-(N²-tBu-硝基苄基氧基羰基-N⁷-甲基鸟苷-5'-基) P3-鸟苷-5'-基三磷酸(N²-tBu-NB-m⁷GpppG) (化合物11)

[0526] 将N⁷-甲基-鸟苷-5'-二磷酸(化合物9) (1.30mg, 1.45 μ mol) 和鸟苷5'-磷酸咪唑(化合物10) (2.10mg, 4.79 μ mol) 溶解于0.59M氯化锌DMSO溶液(80 μ L, ZnCl₂:47.2 μ mol)。将该混合物在37 $^{\circ}$ C孵育2天。加入3mM aq. EDTA(1.6mL, 60 μ mol) 将反应混合物猝灭, 用0.2M碳酸三乙基铵缓冲液(pH7.9, 600 μ L, 将pH调节到4.0附近) 稀释。将该混合物用YMC-Triart C8柱(250 $\times$ 4.6mm I.D., S-5 μ m, 12nm, 流量1mL/min, 温度50 $^{\circ}$ C), 通过用25分钟进行0.1M碳酸三乙基铵缓冲液(pH7.9) 中的CH₃CN的5~80%的线性梯度的反相HPLC来纯化。收集包含产物的级分, 加入数滴乙酸, 酸化至pH4.0。在减压下将CH₃CN除去后, 将产物用Wakosil(注册商标) 25C18(15-30 μ m, 球形) 脱盐, 进行冻结干燥, 作为白色固体得到N²-tBu-NB-m⁷GpppG(化合物11) (0.50mg, 收率43%)。

[0527] ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ 7.86-7.81 (m, 2H), 7.60 (dt, J=5.4Hz, 2H), 7.43 (dt, J=8.5, 4.5Hz, 1H), 6.23 (d, J=2.8Hz, 1H), 5.90 (t, J=2.9Hz, 1H), 5.64 (t, J=7.1Hz, 1H),

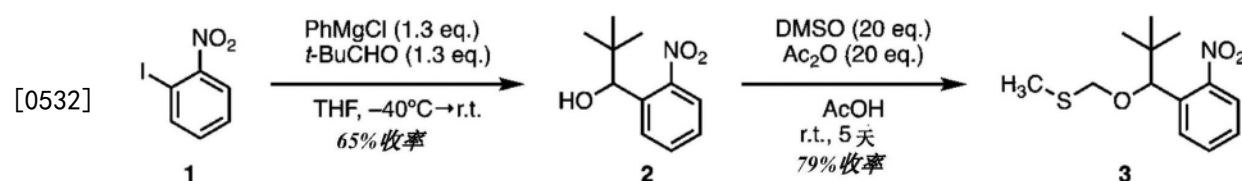
4.57-4.51 (m, 1H), 4.44 (dt, $J=13.6, 4.1$ Hz, 1H), 4.31 (tt, $J=9.6, 5.1$ Hz, 2H), 4.25-4.20 (m, 2H), 4.18-4.04 (m, 5H), 3.95 (s, 3H), 3.06 (q, $J=7.4$ Hz, 16H), 1.13 (t, $J=7.3$ Hz, 24H), 0.82 (s, 9H) ppm。

[0528] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O) δ 158.52, 154.16, 153.87, 151.55, 148.53, 147.63, 137.35, 133.35, 131.77, 129.27, 129.01, 124.60, 115.94, 111.35, 89.88, 87.44, 86.60, 84.06, 83.81, 79.01, 75.14, 73.65, 70.46, 69.16, 65.47, 64.30, 46.67, 36.18, 35.76, 24.82, 8.24 ppm。

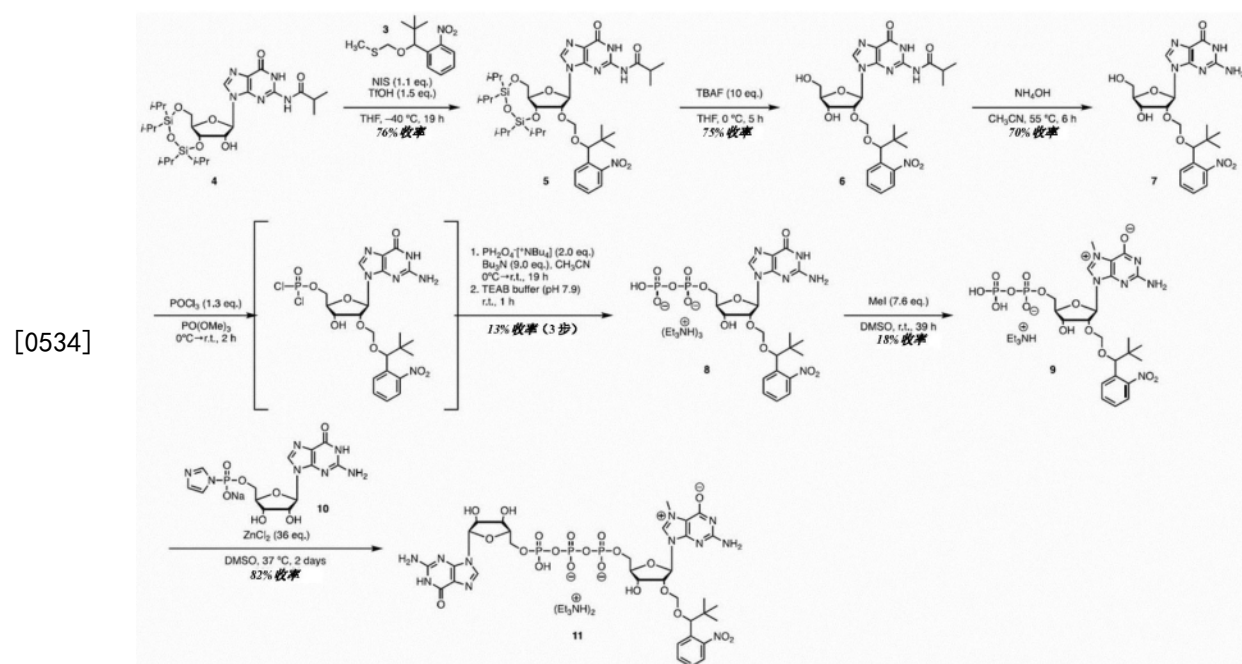
[0529] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -11.02 (2P), -22.60 (1P) ppm. ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_{11}\text{O}_{22}\text{P}_3$, 1036.1646 [M-H] $^-$; found, 1036.1643。

[0530] (2) 加帽类似物₂ (2'-O-修饰) 的合成

[0531] 方案1.2, 2,2-二甲基- (R/S) -1- (2-硝基苯基) 丙基甲基硫基缩醛 (化合物3)



[0533] 方案1.2'-O-修饰加帽类似物 (化合物11) 的合成



[0535] (a) (R/S) -1- (2-硝基苯基) -2,2-二甲基-1-丙醇 (化合物2)

[0536] (R/S) -tBu- (2-硝基苄基) 醇 (2) 的合成按照文献进行。将THF (150mL) 中的1-碘-2-硝基苯 (20g, 80mmol) 的混合物冷却到-40°C。加入THF中的氯化苄基镁的溶液 (2M, 52mL, 0.10mol), 在-40°C搅拌1小时。将三甲基乙醛 (12mL, 9.6g, 0.11mol) 加入到反应混合物中, 在-40°C搅拌36分钟。将反应混合物缓慢加热到室温。搅拌4小时后, 加入饱和 NH_4Cl 水溶液使反应停止。将混合物用乙酸乙酯萃取3次。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥, 进行浓缩。通过由己烷、接着由17→25%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化残渣, 作为暗褐色的固体得到化合物2 (11g、收率65%)。化合物的光谱数据均与文献一致。

[0537] (b) 2,2-二甲基- (R/S) -1- (2-硝基苯基) 丙基甲基硫基乙缩醛 (化合物3)

[0538] 在乙酸(34.4g, 33.0mL, 572mmol)中的(R/S)-1-(2-硝基苯基)-2,2-二甲基-1-丙醇(化合物2)(3.00g, 14.3mmol)的溶液中加入DMSO(22.3g, 20.0mL, 286mmol)和乙酸酐(29.2g, 27.0mL, 286mmol)。在室温搅拌5天后,在反应混合物中在冰浴中滴加加入10M KOH水溶液(130mL, 1.29mol)。将混合物在室温搅拌2小时后,用乙酸乙酯萃取。将有机层用盐水清洗,使其在 Na_2SO_4 上干燥。将残渣通过由己烷洗脱、接着由0-6.3%的乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱,作为黄色的油得到甲基硫基乙缩醛3(3.1g、收率79%)。

[0539] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.71 (dd, $J=8.2, 1.3\text{Hz}$, 1H), 7.64 (dd, $J=7.9, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.57-7.51 (m, 1H), 7.40-7.33 (m, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.62 (d, $J=11.6\text{Hz}$, 1H), 4.27 (d, $J=11.6\text{Hz}$, 1H), 2.11 (s, 3H), 0.83 (s, 9H) ppm。

[0540] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 151.20, 133.97, 131.94, 130.07, 128.35, 123.94, 79.15, 74.16, 36.41, 26.00, 14.58 ppm. ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NNaO}_3\text{S}$, 292.0978 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found, 292.0981。

[0541] (c) N^2 -异丁酰基-3', 5'-O-(1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷-1,3-二基)-2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基氧基]甲基鸟苷(化合物5)

[0542] 在 N^2 -异丁酰基-3', 5'-O-(1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷-1,3-二基)鸟苷(化合物4)(2.96g, 4.97mmol)的悬浮液中, 2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基甲基硫基乙缩醛(化合物3)(1.47g, 5.47mmol)、和粉末状的分子筛3埃(2.00g)加入到四氢呋喃(50.0mL)中,加入N-碘代琥珀酰亚胺(1.23g, 5.47mmol)后,冷却到 -40°C 。在冷却的悬浮液中加入三氟甲烷磺酸(1.12g, 662 μL , 7.46mmol),在 -40°C 搅拌19小时。将反应混合物通过添加三乙胺(24.0mL)进行猝灭,用乙酸乙酯稀释,用饱和aq. NaHCO_3 清洗2次。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥,进行浓缩。用由0-3.2%甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化残渣,作为黄色的泡沫得到化合物5(3.12g、收率76%)。

[0543] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 12.08 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.74 (dd, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.61-7.52 (m, 2H), 7.40 (dd, $J=8.3, 4.3\text{Hz}$, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.19 (d, $J=6.7\text{Hz}$, 1H), 4.61 (d, $J=6.7\text{Hz}$, 1H), 4.52 (dd, $J=9.4, 4.4\text{Hz}$, 1H), 4.28 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 4.16 (d, $J=13.4\text{Hz}$, 1.5H), 4.02 (dd, $J=9.5, 2.3\text{Hz}$, 1.5H), 3.93 (dd, $J=13.4, 2.5\text{Hz}$, 2H), 2.73 (p, $J=6.9\text{Hz}$, 1H), 1.23 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H), 1.18 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.12-0.91 (m, 78H), 0.91-0.82 (m, 7H), 0.65 (s, 9H) ppm。

[0544] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 179.11, 155.65, 150.82, 147.80, 147.47, 136.43, 133.14, 132.35, 130.10, 128.64, 124.11, 121.15, 91.47, 88.01, 80.98, 77.42, 77.21, 76.99, 76.25, 70.30, 59.48, 50.81, 36.54, 36.45, 25.78, 19.13, 18.92, 17.51, 17.44, 17.39, 17.35, 17.31, 17.27, 17.24, 17.17, 17.13, 17.02, 16.89, 13.47, 13.25, 13.10, 12.94, 12.70, 12.57 ppm. ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{Si}_2$, 817.3982 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found, 817.3921。

[0545] (d) N^2 -异丁酰基-2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基氧基]甲基鸟苷(化合物6)

[0546] 将化合物5(850mg, 1.04mmol)的四氢呋喃(4.80mL)溶液在冰浴中冷却,加入1M TBAF/THF(10.0mL, 10.4mmol)。在 0°C 搅拌5小时后,将反应混合物用二氯甲烷稀释,用水清洗。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥,进行浓缩。用由0-9.1%甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯

化残渣,作为无色的非晶质固体得到化合物6(450mg、收率75%)。

[0547] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3 , 立体异构体的混合物) δ 12.40 (s, 0.5H), 12.36 (s, 0.5H), 10.27 (m, 0.5H), 10.21 (m, 0.5H), 8.21 (s, 0.5H), 8.00 (s, 0.5H), 7.66 (d, $J=8.8$ Hz, 0.5H), 8.00 (s, 0.5H), 7.66 (d, $J=8.1$ Hz, 0.5H), 7.61 (d, $J=7.9$ Hz, 0.5H), 7.53-7.45 (m, 2H), 7.35 (q, $J=8.3$ Hz, 1.5H), 7.25 (t, $J=7.7$ Hz, 0.5H), 5.98 (d, $J=4.7$ Hz, 0.5H), 5.80 (d, $J=4.6$ Hz, 0.5H), 5.10 (s, 0.5H), 4.99 (s, 0.5H), 4.84-4.71 (m, 2.5H), 4.67 (t, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.58 (t, $J=10.7$ Hz, 1.5H), 4.13 (dd, $J=10.4, 3.8$ Hz, 1H), 3.91-3.84 (m, 1H), 3.76 (t, $J=13.2$ Hz, 1H), 3.39 (t, $J=4.1$ Hz, 1H), 2.90 (h, $J=6.8$ Hz, 1H), 1.24 (td, $J=4.3, 2.0$ Hz, 6H), 0.71 (s, 4.5H), 0.59 (s, 4.5H) ppm。

[0548] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3 , 立体异构体混合物) δ 180.28, 180.22, 155.67, 155.60, 150.52, 149.79, 148.38, 148.27, 148.16, 147.86, 139.26, 133.87, 133.51, 132.14, 131.81, 130.01, 129.92, 128.51, 128.32, 123.95, 123.77, 121.00, 120.94, 95.02, 93.66, 88.27, 86.19, 86.05, 80.47, 79.49, 79.41, 79.23, 77.38, 77.17, 76.96, 70.68, 70.50, 70.25, 62.00, 36.66, 36.21, 36.16, 26.57, 25.65, 25.60, 19.14, 19.06, 19.03 ppm. ESI-TOF-M Scalded for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_9$, 573.2315 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found 573.2333。

[0549] (e) N^2 -异丁酰基-2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基氧基]甲基鸟苷(化合物6)

[0550] 将化合物5 (850mg, 1.04mmol) 的四氢呋喃 (4.80mL) 溶液用冰浴冷却, 加入1M TBAF/THF (10.0mL, 10.4mmol)。在0℃搅拌5小时后, 将反应混合物用二氯甲烷稀释, 用水清洗。使有机层在 Na_2SO_4 上干燥, 进行浓缩。用由0-9.1%甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化残渣, 作为无色的非晶质固体得到化合物6(450mg、收率75%)。

[0551] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3 , 立体异构体混合物) δ 12.40 (s, 0.5H), 12.36 (s, 0.5H), 10.27 (m, 0.5H), 10.21 (m, 0.5H), 8.21 (s, 0.5H), 8.00 (s, 0.5H), 7.66 (d, $J=8.8$ Hz, 0.5H), 8.00 (s, 0.5H), 7.66 (d, $J=8.1$ Hz, 0.5H), 7.61 (d, $J=7.9$ Hz, 0.5H), 7.53-7.45 (m, 2H), 7.35 (q, $J=8.3$ Hz, 1.5H), 7.25 (t, $J=7.7$ Hz, 0.5H), 5.98 (d, $J=4.7$ Hz, 0.5H), 5.80 (d, $J=4.6$ Hz, 0.5H), 5.10 (s, 0.5H), 4.99 (s, 0.5H), 4.84-4.71 (m, 2.5H), 4.67 (t, $J=4.8$ Hz, 1H), 4.58 (t, $J=10.7$ Hz, 1.5H), 4.13 (dd, $J=10.4, 3.8$ Hz, 1H), 3.91-3.84 (m, 1H), 3.76 (t, $J=13.2$ Hz, 1H), 3.39 (t, $J=4.1$ Hz, 1H), 2.90 (h, $J=6.8$ Hz, 1H), 1.24 (td, $J=4.3, 2.0$ Hz, 6H), 0.71 (s, 4.5H), 0.59 (s, 4.5H) ppm。

[0552] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3 , 立体异构体混合物) δ 180.28, 180.22, 155.67, 155.60, 150.52, 149.79, 148.38, 148.27, 148.16, 147.86, 139.26, 133.87, 133.51, 132.14, 131.81, 130.01, 129.92, 128.51, 128.32, 123.95, 123.77, 121.00, 120.94, 95.02, 93.66, 88.27, 86.19, 86.05, 80.47, 79.49, 79.41, 79.23, 77.38, 77.17, 76.96, 70.68, 70.50, 70.25, 62.00, 36.66, 36.21, 36.16, 26.57, 25.65, 25.60, 19.14, 19.06, 19.03 ppm. ESI-TOF-M Scalded for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_9$, 573.2315 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found 573.2333。

[0553] (f) 2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基氧基]甲基鸟苷(化合物7)

[0554] 在化合物6 (1.08g, 1.88mmol) 的乙腈 (14.4mL) 溶液中加入28%氢氧化铵溶液 (36.0mL)。将该混合物加热到55℃。在55℃搅拌6小时后, 将反应混合物浓缩, 使其与苯共沸。在二氯甲烷与二乙醚的1:3混合液中悬浮残留物。将所得到的沉淀物通过过滤回收, 用

二氯甲烷与二乙醚的1:3混合液清洗。使所得到的固体在P₂O₅上的干燥器中在真空下干燥,作为白色泡沫得到化合物7(666mg、收率70%)。

[0555] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆, 立体异构体混合物) δ10.61, 10.58 (2s, 1H), 7.88 (s, 0.5H), 7.79 (dd, J=8.0, 1.3Hz, 0.5H), 7.70-7.62 (m, 1.5H), 7.53-7.46 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.31 (ddd, J=8.6, 6.6, 2.1Hz, 0.5H), 6.37 (d, J=10.1Hz, 2H), 5.81 (d, J=6.0Hz, 0.5H), 5.59 (d, J=5.6Hz, 0.5H), 5.21 (d, J=5.4Hz, 0.5H), 5.15 (d, J=5.3Hz, 0.5H), 5.10 (t, J=5.6Hz, 0.5H), 5.03 (t, J=5.5Hz, 0.5H), 4.95 (s, 0.5H), 4.82 (s, 0.5H), 4.71-4.67 (m, 1H), 4.67-4.61 (m, 1H), 4.47 (t, J=5.2Hz, 0.5H), 4.38 (d, J=7.2Hz, 0.5H), 4.23 (td, J=5.1, 3.8Hz, 1H), 3.87 (q, J=3.6Hz, 0.5H), 3.82 (q, J=3.7Hz, 0.5H), 3.63-3.52 (m, 1H), 3.52-3.42 (m, 1H), 0.68 (s, 4.5H), 0.53 (s, 4.5H) ppm。

[0556] ¹³C NMR (151MHz, DMSO-d₆, 立体异构体混合物) δ157.25, 154.15, 154.11, 151.61, 151.48, 150.98, 150.00, 136.35, 135.70, 133.46, 133.00, 132.82, 132.39, 130.10, 129.99, 129.45, 128.93, 124.35, 124.11, 117.38, 117.18, 94.57, 92.51, 86.37, 86.04, 85.85, 85.39, 80.21, 78.95, 78.84, 78.72, 70.25, 70.06, 69.75, 62.05, 61.81, 40.46, 40.32, 40.19, 40.04, 39.91, 39.76, 39.62, 36.64, 36.04, 25.88, 25.83 ppm. ESI-TOF-M Scalded for C₂₂H₂₈N₆NaO₈, 527.1861 [M+Na]⁺; found 527.1758。

[0557] (g) 2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基氧基]甲基鸟苷-5'-二磷酸三乙基铵盐(化合物8)

[0558] 在磷酸三甲酯(3.70mL)中的鸟苷衍生物7(200mg, 0.396mmol)的溶液中,一边进行冰冷一边加入磷酰氯(48.0μL, 79.0mg, 0.515mmol)。将混合物逐渐升温到室温,在室温下搅拌。在室温搅拌2小时后,在冰浴中将0.44M四丁基磷酸二氢铵/CH₃CN(1.80mL, 0.792mmol)和三丁基胺(846μL, 660mg, 3.56mmol)的混合物加入到反应混合物中。将反应混合物温热到室温,在室温搅拌19小时。然后,加入0.2M碳酸三乙基铵缓冲液(pH7.9, 5.0mL)将反应混合物猝灭。以室温搅拌1小时后,将混合物用水稀释,用二氯甲烷清洗5次。用50℃的旋转蒸发器将水层浓缩。残留物以包含0-10%的CH₃CN的碳酸三乙基铵缓冲液的线性0-1.5M梯度利用QAE-Sephadex上的离子交换色谱纯化。将鸟苷-5'-二磷酸(化合物8)以三乙基铵盐的形式以白色固体得到(51.0mg, 13%收率)。

[0559] ¹H NMR (600MHz, D₂O, 立体异构体混合物) δ7.87 (s, 0.5H), 7.58 (s, 0.5H), 7.52 (d, J=8.1Hz, 0.5H), 7.47-7.38 (m, 1H), 7.38-7.29 (m, 1H), 7.28-7.17 (m, 1H), 7.01 (t, J=7.8Hz, 0.5H), 5.73 (d, J=5.8Hz, 0.5H), 5.48 (d, J=5.0Hz, 0.5H), 4.96, 4.94 (2s, 1H), 4.82 (d, J=7.5Hz, 0.5H), 4.76 (s, 0.5H), 4.71 (d, J=7.3Hz, 0.5H), 4.62 (dd, J=18.0, 6.6Hz, 1.5H), 4.52 (t, J=5.1Hz, 0.5H), 4.45 (t, J=5.0Hz, 1H), 4.14 (d, J=4.1Hz, 0.5H), 4.10-4.03 (m, 1.5H), 3.99 (d, J=4.8Hz, 1H), 3.02 (q, J=7.3Hz, 15H), 1.10 (t, J=7.3Hz, 24H), 0.52 (s, 4.5H), 0.41 (s, 4.5H) ppm。

[0560] ¹³C NMR (151MHz, D₂O, 立体异构体混合物) δ158.95, 158.75, 153.89, 153.59, 151.59, 151.01, 149.74, 148.09, 138.02, 137.37, 133.49, 132.57, 132.47, 132.21, 129.86, 129.66, 128.65, 128.06, 123.80, 123.30, 116.33, 115.96, 95.44, 93.71, 86.20, 84.26, 84.20, 83.73, 83.67, 81.61, 80.72, 78.55, 76.97, 69.07, 68.94, 64.84, 64.81, 64.46, 46.63, 36.55, 35.65, 24.78, 24.68, 8.24 ppm。

[0561] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O , 立体异构体混合物) δ -8.54 (1P), -10.61 (1P) ppm. ESI-TOF-M Scalcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{P}_2$, 663.1223 [M-H] $^-$; found 663.1378.

[0562] (h) N^7 -甲基-2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基氧基]甲基鸟苷-5'-二磷酸三乙基铵盐(化合物9)

[0563] 在DMSO (100 μL) 中的鸟苷-5'-二磷酸(化合物8) (4.3mg, 4.4 μmol) 的溶液中加入碘甲烷(4.7mg, 2.1 μL , 33 μmol)。在室温搅拌39小时后, 将反应混合物用水稀释, 用二乙醚清洗5次。将水相浓缩, 使残渣溶解于水中。粗纯化通过使用YMC-Triart C8柱(250 $\times$ 4.6mm I.D., S-5 μm , 12nm, 流速1mL/min, 温度50 $^\circ\text{C}$), 且以0.1M三乙基铵碳酸氢盐缓冲液(pH7.9) 中的 CH_3CN 以5~80%的浓度用25分钟以线性梯度的反相HPLC进行。收集包含产物的级分, 加入数滴乙酸, 酸化至pH4.0。在减压下将 CH_3CN 除去后, 将产物用Wakosil (注册商标) 25C18 (15-30 μm , 球形) 脱盐, 进行冻结干燥, 作为白色固体得到 N^7 -甲基-鸟苷-5'-二磷酸(化合物9) (0.60mg, 收率18%、2种立体异性体的混合物)。

[0564] ^1H NMR (600MHz, D_2O , 通过HPLC分离单一立体异构体) δ 8.93 (s, 1H), 7.60 (d, J =8.2Hz, 1H), 7.49 (dd, J =15.2, 8.1Hz, 2H), 7.29 (t, J =7.6Hz, 1H), 5.82 (s, 1H), 5.00 (d, J =4.1Hz, 1H), 4.93 (d, J =8.0Hz, 1H), 4.86 (d, J =7.2Hz, 1H), 4.54-4.50 (m, 1H), 4.42 (t, J =5.2Hz, 1H), 4.25 (s, 1H), 4.10 (d, J =11.2Hz, 1H), 3.94 (d, J =3.7Hz, 3H), 3.05 (t, J =7.3Hz, 4H), 1.13 (t, J =7.1Hz, 6H), 0.61 (s, 10H) ppm.

[0565] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O , 通过HPLC分离单一立体异构体) δ 155.41, 154.99, 149.37, 148.61, 136.68, 133.90, 132.44, 130.24, 128.15, 123.51, 107.91, 95.16, 87.76, 85.95, 82.16, 79.32, 68.89, 64.78, 46.70, 36.52, 36.07, 24.76, 8.25 ppm.

[0566] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O , 通过HPLC分离单一立体异构体) δ -10.03 (1P), -10.71 (1P) ppm. ESI-TOF-M Scalcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{P}_2$, 677.1379 [M-H] $^-$; found 677.1374.

[0567] (i) 鸟苷5'-磷酸咪唑一钠盐(化合物10)

[0568] 鸟苷-5'-磷酸咪唑(化合物10)的合成按照文献进行。在N,N-二甲基甲酰胺(7.5mL) 中的鸟苷5'-磷酸(300mg, 0.53mmol)、咪唑(290mg, 4.2mmol)、2,2'-二硫代二吡啶(350mg, 1.6mmol) 的溶液中加入三乙胺(150 μL , 110mg, 1.1mmol) 后, 加入三苯基膦(420mg, 1.6mmol)。在室温搅拌2小时后, 将反应混合物在搅拌下滴加添加到丙酮(60mL) 中的高氯酸钠(65mg, 0.53mmol) 的溶液中。将所得到的悬浮液移至离心分离管, 以4,500rpm离心分离10分钟。弃掉上清液, 将沉淀物用丙酮清洗5次。使该固体在 P_2O_5 上的干燥器中在减压下干燥, 作为白色固体得到鸟苷5'-磷酸咪唑单钠盐(化合物10) (230mg, quant.)。

[0569] ^{31}P NMR (243MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.80 ppm.

[0570] (j) P1-{ N^7 -甲基-2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙基氧基]甲基鸟苷-5'-基}P3-鸟苷-5'-基三磷酸(2'-O-tBu-NB-m7GpppG) (化合物11)

[0571] 将 N^7 -甲基-鸟苷-5'-二磷酸(化合物9) (1.1mg, 1.3 μmol) 和鸟苷5'-磷酸咪唑(化合物10) (1.9mg, 4.3 μmol) 溶解于0.59M氯化锌DMSO溶液(80 μL , ZnCl_2 :47 μmol) 中。将该混合物在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育2天。加入38mM aq. EDTA (1.6mL, 60 μmol) 将反应混合物猝灭, 用0.2M TEAB缓冲液(pH7.9, 600 μL , 将pH调节至4.0附近) 稀释。将该混合物通过使用YMC-Triart C8柱(250 $\times$ 4.6mm I.D., S-5 μm , 12nm, 流量1mL/min, 温度50 $^\circ\text{C}$), 通过用25分钟进行0.1M碳酸三乙基铵缓冲液(pH 7.9) 中的 CH_3CN 的5~80%的线性梯度的反相HPLC来纯化。收集包含产物的

级分,加入数滴乙酸,酸化至pH4.0。在减压下将CH₃CN除去后,将产物用Wakosil(注册商标)25C18(15-30 μ m、球形)脱盐,进行冻结干燥,作为白色固体得到2'-O-^tBu-NB-m⁷GpppG(化合物11)(0.90mg、收率82%)。

[0572] ¹H NMR(600MHz,D₂O,立体异构体混合物) δ 7.85,7.82(2s,1H),7.66(dd,J=8.1,1.3Hz,0.5H),7.57-7.51(m,1H),7.49-7.41(m,1.5H),7.38-7.32(m,0.5H),7.24(dd,J=8.4,4.1Hz,0.5H),5.81(d,J=4.8Hz,0.5H),5.66-5.59(m,1.5H),4.95(s,0.5H),4.87(d,J=7.8Hz,1H),4.80-4.70(m,1H),4.55-4.45(m,2H),4.41(t,J=4.9Hz,0.5H),4.35-4.25(m,2H),4.25-4.04(m,8.5H),3.95(s,1.5H),3.90(s,1.5H),3.06(q,J=7.4Hz,13H),1.14(t,J=7.3Hz,20H),0.56(s,5H),0.53(s,6H)ppm。

[0573] ¹³C NMR(151MHz,D₂O,立体异构体混合物) δ 158.25,155.45,155.20,154.66,154.51,153.89,149.73,149.40,148.93,148.54,137.38,136.90,136.48,133.82,132.74,132.41,130.14,130.00,128.82,128.08,123.88,123.40,107.73,107.39,94.91,93.58,87.60,87.04,86.94,85.62,84.87,83.72,81.98,80.56,79.67,79.24,73.84,73.74,70.26,68.68,68.24,65.37,64.96,64.56,62.55,46.68,36.42,36.18,35.74,24.84,24.71,8.25ppm。

[0574] ³¹P NMR(243MHz,D₂O,立体异构体混合物) δ -10.96(2P),-22.54(1P)ppm。ESI-TOF-M Scald.for C₃₃H₄₃N₁₁O₂₁P₃,1022.1853[M-H]⁻;found 1022.1851。

[0575] (3)合成的加帽类似物的各种分析

[0576] 对于上述合成的加帽类似物(加帽类似物_1和加帽类似物_2)进行各种分析。

[0577] 图27是表示作为合成的新型加帽类似物化合物的加帽类似物_1的各种分析结果的图。这些分析结果表明所有目标化合物都可以高纯度地获得。

[0578] 图的(a)表示了加帽类似物_1的化学结构。

[0579] 图的(b)表示了加帽类似物_1的分离纯化后的反相HPLC分析结果。分析条件如下所示。

[0580] 柱,YMC-Triart C8(250mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A,0.1M碳酸三乙基铵缓冲液(pH7.9);溶剂B,乙腈;线性梯度5-80%溶剂B(0-25分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,280nm;柱温,50 $^{\circ}$ C

[0581] 图的(c)表示了ESI-TOF MS分子量测定结果。

[0582] 图的(d)表示了¹H-NMR的分析结果,图的(e)表示了³¹P-NMR的分析结果。

[0583] 图28是表示作为合成的新型加帽类似物化合物的加帽类似物_2的各种分析结果的图。这些分析结果表明所有目标化合物都可以高纯度地获得。

[0584] 图的(a)表示了加帽类似物_2的化学结构。

[0585] 图的(b)表示了分离纯化后的反相HPLC分析结果。分析条件如下所示。

[0586] 柱,YMC-Triart C8(250mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A,0.1M碳酸三乙基铵缓冲液(pH7.9);溶剂B,乙腈;线性梯度5-80%溶剂B(0-25分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,280nm;柱温,50 $^{\circ}$ C

[0587] 图的(c)表示了ESI-TOF MS分子量测定结果。

[0588] 图的(d)表示了¹H-NMR的分析结果,图的(e)表示了³¹P-NMR的分析结果。

[0589] (4)导入了新型加帽类似物的RNA的分离纯化

[0590] 图29是表示导入了新型加帽类似物的RNA能够通过反相HPLC分离纯化的图。

[0591] 图的(A)中,添加加帽类似物化合物,使用T7RNA聚合酶转录合成NanoLuc荧光素酶mRNA(650个碱基长),用变性聚丙烯酰胺凝胶(5%,作为变性剂包含7.5M尿素)电泳分析转录反应。将转录反应液组成和反应条件如下所示。

[0592] 15ng/ μ L dsDNA转录模板(为包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAG3' (序列编号1)的676-bp的PCR产物,且包含来自pNL1.1TK载体(Promega)的NanoLuc荧光素酶基因编码区域)、2mM ATP、2mM UTP、2mM CTP、2mM GTP或[0.5mM GTP+2mM加帽类似物]、40mM Tris-HCl(pH8.0)、8mM $MgCl_2$ 、2mM亚精胺、5mM DTT、10单位/ μ L T7RNA聚合酶(Takara Bio)。

[0593] 将反应液在37℃加温2小时。电泳后,将凝胶用SYBR Green II染色剂染色,用ChemiDoc MP成像仪(Bio-Rad)拍摄,使RNA可视化。

[0594] 图的(B)是表示转录RNA的反相HPLC分析、纯化结果的图。

[0595] (a)、(d)表示添加(a)加帽类似物_1(CA1)、(d)加帽类似物_2(CA2)实施转录反应,将RNA进行粗纯化(除蛋白、醇沉淀、超滤)后,用反相HPLC分析的结果。将在15分钟附近出现的峰、和其之后出现峰分别分离制备、纯化。

[0596] 图的(b)表示将(a)所示的17.9分钟附近的洗脱RNA分离制备后,再分析的结果。

[0597] 图的(e)表示将(d)所示的16.8分钟附近的洗脱RNA分离制备后,再分析的结果。

[0598] 图的(c)表示将(a)所示的17.9分钟附近的洗脱RNA分离制备后,以4mW/ cm^2 照射365-nm光10分钟后的RNA分析结果。RNA的洗脱时间从17.9分钟附近完全位移到15分钟附近,因此能够判断加帽类似物部位的疏水性保护基完全被脱保护。

[0599] 图的(f)表示将(d)所示的16.8分钟附近的洗脱RNA分离制备后,以4mW/ cm^2 照射365-nm光10分钟后的RNA分析结果。RNA的洗脱时间从16.8分钟附近完全位移到15分钟附近,因此能够判断加帽类似物部位的疏水性保护基被完全脱保护。

[0600] HPLC的分析条件如下所示。

[0601] 柱,YMC-Triart Bio C4(250mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A,50mM乙酸三乙基铵(pH7.0),5%乙腈;溶剂B,乙腈;直线梯度0-20%溶剂B(0-20分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,260nm;柱温,50℃。

[0602] 图30是表示反相HPLC分离纯化后的NanoLuc荧光素酶mRNA的翻译活性评价的图。将不添加加帽类似物制备的mRNA的表达量表示为1。将HPLC分离后的mRNA(20ng/孔)通过脂质体转染法(Lipofectamine MessengerMAX,0.3 μ L/孔)导入HeLa细胞(在前一天以 1×10^4 个/孔接种到96孔多孔板中),培养7小时后裂解,使用Nano-Glo荧光素酶检测系统(Nano-Glo Luciferase Assay System,Promega测定裂解液中所含的表达蛋白(NanoLuc荧光素酶)量。使用新型加帽类似物化合物加帽化的mRNA显示高的翻译活性。由加帽类似物_1修饰的mRNA如果不进行光照射、脱保护,则不显示高的翻译活性,但由加帽类似物_2修饰的mRNA在光照射、脱保护前后,显示了同样高的翻译活性。

[0603] 加帽类似物_1保护了碱基部的氢键,在保护状态下能够完全抑制翻译活性。通过照射光,能够应用于在生物体内使翻译活化的mRNA。

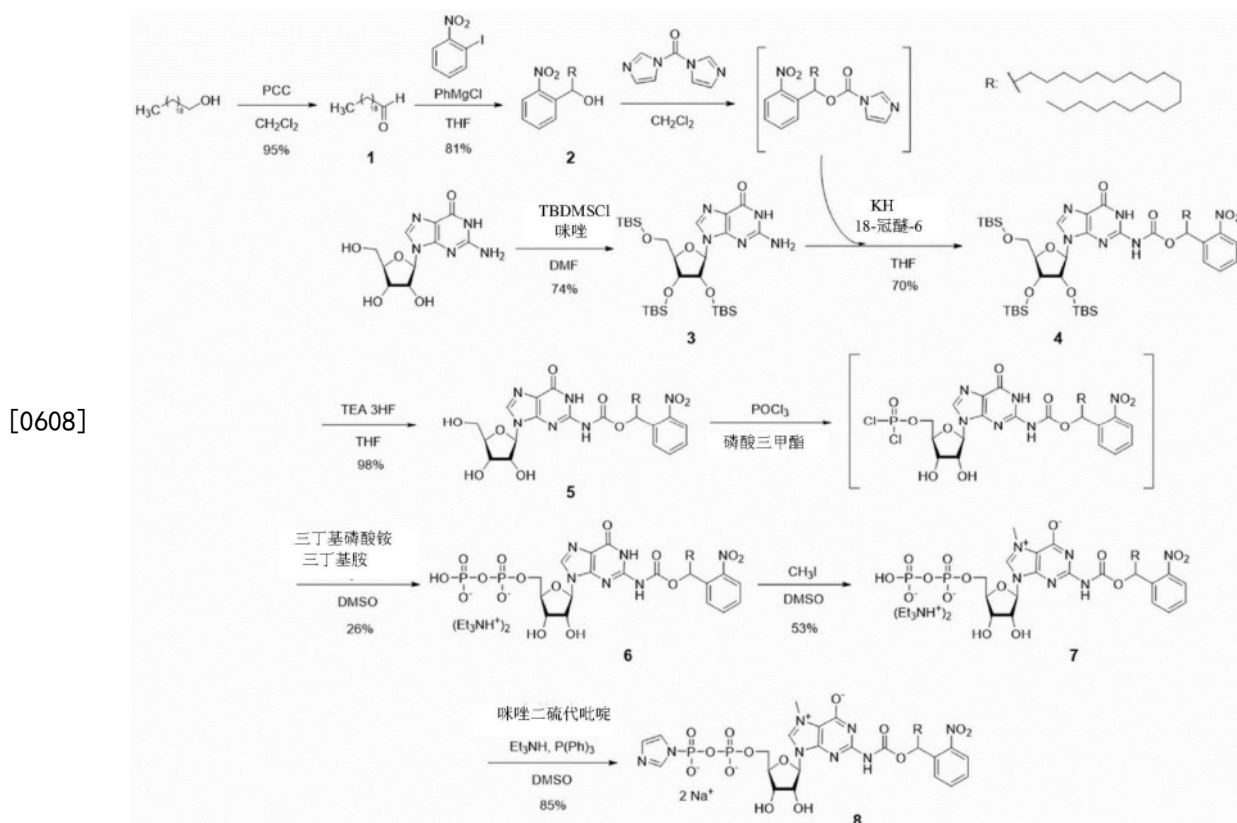
[0604] 图31是表示反相HPLC分离纯化后的NanoLuc荧光素酶mRNA的翻译活性评价的图。将不添加加帽类似物所制备的mRNA的表达量表示为1。与使用市售的ARCA加帽类似物(JENA BIOSCIENCE、cat#78862)同样制备的mRNA比较翻译活性。将HPLC分离后的mRNA(5ng/孔)通

过脂质体转染法 (Lipofectamine MessengerMAX, 0.3 μ L/孔) 导入HeLa细胞 (在前一天以1 $\times$ 10⁴个/孔接种于96孔多孔板), 培养23小时后裂解, Nano-Glo荧光素酶检测系统 (Promega) 测定裂解液中所含的表达蛋白 (NanoLuc荧光素酶) 量。使用加帽类似物_2加帽化的mRNA与使用ARCA加帽化的RNA相比显示了更高的翻译活性。该高的翻译活性推测是由利用疏水性保护基的纯化而得到了加帽化率100%的mRNA的缘故。

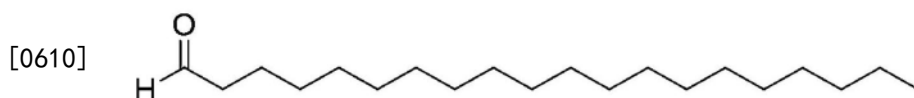
[0605] 6.疏水性化学加帽化化合物的合成

[0606] (1) 疏水性化学加帽化合物的合成

[0607] 疏水性化学加帽化合物(化合物8)的合成方案如下所示。



[0609] (a) 化合物1的合成

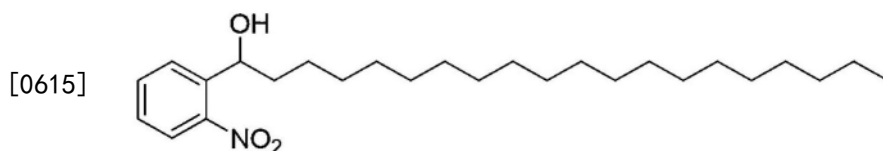


[0611] 将1-二十烷醇(3.00g,0.010mmol,1.0当量)、硅藻土(4.0g)在0℃悬浮于脱水二氯甲烷(20mL)。加入氯铬酸吡啶鎓(3.23g,0.015mmol,1.5当量),在室温搅拌2小时。反应结束后,通过硅藻土过滤将滤液回收、浓缩。通过柱色谱(中性快速氧化硅、二氯甲烷)纯化,作为白色固体得到2.80g(0.095mmol,收率95%)的化合物1。

[0612] ^1H -NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.76 (t, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 1.29-1.25 (m, 36H), 0.88 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H) ppm.

[0613] 此外,光谱数据显示与文献值(Gray G.M.,Macfarlane M.G.,Biochem.J.,1961, 81,480-488)良好的一致。

[0614] (b) 化合物2的合成



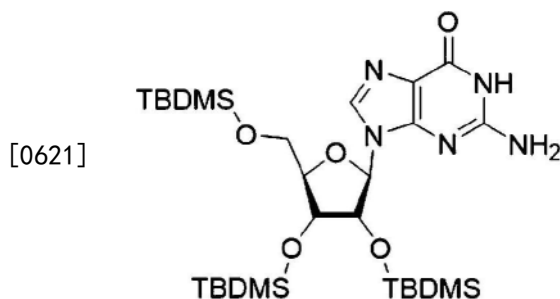
[0616] 使1-碘-2-硝基苯(2.65g, 10.7mmol, 1.0当量)溶解于THF (25mL)。在-48℃滴加苯基氯化镁(2.0M THF溶液, 5.86mL, 11.7mmol, 1.1当量), 在-35℃搅拌10分钟。滴加溶解于THF (15mL)的化合物1(3.00g, 10.1mmol, 0.95当量), 将反应温度缓慢升高至室温, 在室温搅拌15分钟。加入饱和氯化铵水溶液(10mL), 用乙酸乙酯(100mL)进行2次分液, 用饱和食盐水(50mL)进行1次分液。将有机层回收、浓缩。用柱色谱(中性快速氧化硅、乙酸乙酯/己烷=1/15→1/10)纯化, 作为褐色固体得到3.44g (8.65mmol, 收率81%)的化合物2。

[0617] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.89 (dd, $J=8.2\text{Hz}, 1.6\text{Hz}, 1\text{H}$), 7.80 (dd, $J=6.4\text{Hz}, 1.6\text{Hz}, 1\text{H}$), 7.63 (td, $J=6.4\text{Hz}, 1.2\text{Hz}, 1\text{H}$), 7.41 (td, $J=6.0\text{Hz}, 1.6\text{Hz}, 1\text{H}$), 5.23 (q, $J=4.0\text{Hz}, 1\text{H}$), 2.09-1.78 (m, 3H), 1.31-1.21 (m, 33H), 0.88 (t, $J=7.2\text{Hz}, 3\text{H}$) ppm。

[0618] $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3) δ 148.1, 140.3, 133.5, 128.1, 128.0, 124.4, 69.5, 38.3, 32.0, 29.8-29.4, 26.2, 22.8, 14.2 ppm。

[0619] ESI MS-HR calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NNaO}_3^+ (\text{M}+\text{Na})^+ 442.3297$, found 442.3421。

[0620] (c) 化合物3的合成



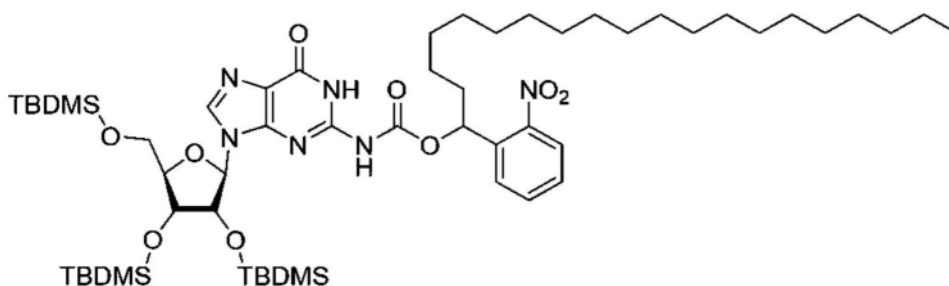
[0622] 使鸟苷(2.00g, 7.06mmol, 1.0当量)、叔丁基二甲基氯硅烷(6.58g, 43.6mmol, 6.2当量)溶解于脱水DMF (25mL)中, 在0℃搅拌10分钟。加入咪唑(3.75g, 55.1mmol, 7.8当量), 在室温搅拌3小时。加入乙酸乙酯(200mL), 用水(50mL)进行2次清洗, 将有机层回收、浓缩。用柱色谱(中性快速氧化硅、己烷/乙酸乙酯=2/1→1/2)纯化, 作为白色固体得到3.29g (5.26mmol, 收率74%)的化合物3。

[0623] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.61 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 6.45 (s, 2H), 5.74 (d, $J=6.8\text{Hz}, 1\text{H}$), 4.59 (dd, $J=4.8\text{Hz}, 2.4\text{Hz}, 1\text{H}$), 4.17 (dd, $J=1.2\text{Hz}, 3.2\text{Hz}, 1\text{H}$), 3.95 (t, $J=3.6\text{Hz}, 1\text{H}$), 3.85 (dd, $J=1.6\text{Hz}, 2.0\text{Hz}, 1\text{H}$), 3.71 (dd, $J=3.6\text{Hz}, 8.0\text{Hz}, 1\text{H}$), 0.87 (s, 18H), 0.73 (s, 9H), 0.09-0.11 (m, 12H), -0.08 (s, 3H), -0.28 (s, 3H) ppm。

[0624] 其他光谱数据显示与文献值(Ogilvie K.K., Schifman A.L., Penney C.L., Can. J. Chem., 1979, 57(17), 2230-2238)良好的一致。

[0625] (d) 化合物4的合成

[0626]



[0627] 使硝基苯甲醇衍生物2 (1.25g, 2.98mmol, 1.0当量)、1,1'-羰基二咪唑 (966mg, 5.96mmol, 2.0当量) 溶解于脱水二氯甲烷 (12mL), 在室温搅拌2小时。用饱和食盐水进行1次分液, 将有机层回收、浓缩。在同一烧瓶内加入化合物3 (2.23g, 3.58mmol, 1.2当量)、18-冠醚-6 (1.18g, 4.47mmol, 1.5当量), 溶解于脱水THF (15mL)。在0℃缓慢加入氢化钾 (35%的矿物油中的分散液, 179mg, 4.47mmol, 1.5当量), 在40℃搅拌2小时。将溶剂蒸馏除去后, 加入乙酸乙酯, 用饱和食盐水: 饱和氯化铵水溶液: 水 (2:2:1) 清洗。将有机层回收、浓缩后, 用柱色谱 (中性快速氧化硅、乙酸乙酯/己烷=1/5→1/2) 纯化, 作为白色固体得到2.24g (2.09mmol, 收率70%) 的化合物4。

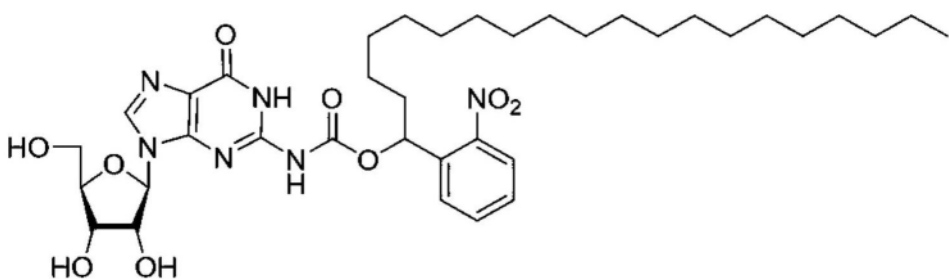
[0628] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 11.14 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.00 (dt, $J=8.4\text{Hz}$, 1.6Hz, 1H), 7.65 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.58 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.49 (t, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 6.32 (m, 1H), 5.86 (dd, $J=4.8\text{Hz}$, 1.2Hz, 1H), 4.41 (q, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 4.24 (t, $J=3.2\text{Hz}$, 1H), 4.09 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 3.91 (dt, $J=11.2\text{Hz}$, 2.8Hz, 1H), 3.77 (dd, $J=10.0\text{Hz}$, 1.6Hz, 1H), 2.04-1.96 (m, 1H), 1.29-1.25 (m, 36H), 0.94 (s, 18H), 0.87 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 3H), 0.80 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 9H), 0.15-0.11 (m, 12H), -0.04 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 3H), -0.25 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 3H) ppm。

[0629] $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CDCl_3) δ 154.4, 148.1, 137.0, 135.8, 133.5, 129.0, 127.2, 124.8, 87.5, 86.2, 75.1, 72.5, 62.9, 36.1, 32.0, 29.7-29.4, 26.1-25.7, 22.7, 18.6, 18.1, 14.1 ppm。

[0630] ESI MS-HR calcd. for $\text{C}_{55}\text{H}_{98}\text{N}_6\text{NaO}_9\text{Si}_3^+ (\text{M}+\text{Na})^+$ 1093.6601, found 1093.6626。

[0631] (e) 化合物5的合成

[0632]



[0633] 使化合物4 (2.20g, 2.05mmol, 1.0当量) 溶解于脱水THF (20mL)。在0℃滴加三乙胺三氟化氢 (2.18mL, 13.4mmol, 6.5当量), 在室温搅拌2天。加入乙酸乙酯 (50mL) 用饱和食盐水 (25mL) 清洗1次, 将有机层回收、浓缩。用柱色谱 (中性快速氧化硅、甲醇/氯仿=1/15→1/8) 纯化, 作为白色固体得到1.46g (2.00mmol, 收率98%) 的化合物5。

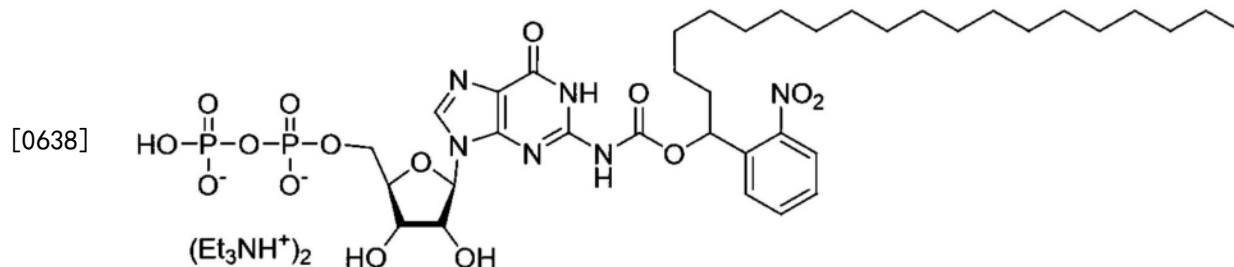
[0634] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ 11.56 (s, 1H), 11.10 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.00 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.79 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 7.68 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.57 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 6.08 (t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 5.72 (d, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 5.42 (br, 1H), 5.14 (br, 1H), 4.96 (br, 1H), 4.40 (q, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 4.09 (t, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 3.85 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 3.54 (dd, $J=22.8\text{Hz}$, 7.6Hz,

2H), 1.22-1.13 (m, 36H), 0.84-0.77 (m, 3H) ppm。

[0635] ^{13}C -NMR (100MHz, CDCl_3) δ 154.4, 148.1, 138.2, 136.0, 133.6, 128.9, 127.2, 124.2, 88.4, 85.5, 75.1, 75.0, 73.7, 70.4, 61.2, 35.7, 31.7, 29.4-29.2, 28.7, 25.4, 22.4, 13.1 ppm。

[0636] ESI MS-HR calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{NaO}_9^+ (\text{M}+\text{Na})^+$ 751.4001, found 751.4091。

[0637] (f) 化合物6的合成



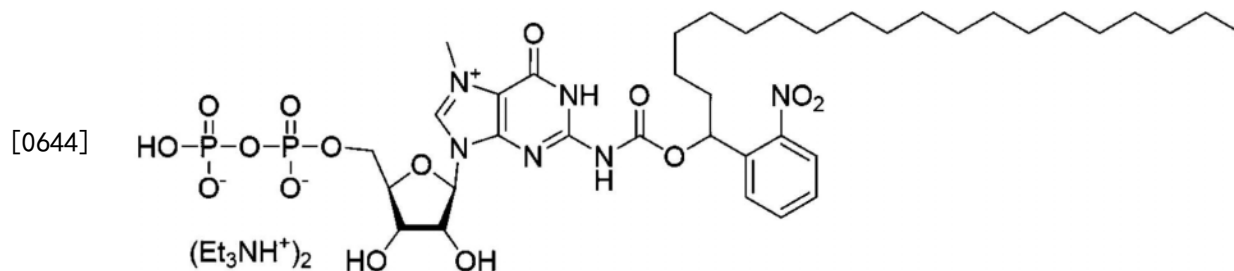
[0639] 使化合物5 (100mg, 0.137mmol, 1.0当量) 溶解于磷酸三甲酯 (2.5mL)。在0℃滴加磷酰氯 (23.0μL, 0.237mmol, 1.8当量), 在-5℃搅拌过夜。滴加0.35m三丁基铵磷酸盐DMF溶液 (2.34mL, 0.824mmol, 6.0当量) 和三丁基胺 (294μL, 1.24mmol, 9.0当量) 的混合溶液, 在-10℃搅拌6小时。反应后, 加入0.2M碳酸三乙基铵缓冲液 (5mL, pH7.9), 在室温搅拌30分钟。利用反相HPLC (YMC Triart C8 (250×10mm 1.D., S-5μm, 12nm, T012S05-2510WT), 溶剂:A) 0.1M碳酸三乙基铵缓冲液 (pH7.97), B) 乙腈, 梯度: 40-100%B (0-35分钟), 柱温: 室温, 流量: 3mL/分钟, 检测波长: 260nm) 进行纯化, 作为白色固体, 得到31.1mg (35.0μmol, 收率26%, 三乙基铵盐) 的化合物6。

[0640] ^1H -NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.11 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 8.01 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.81 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 7.57 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 6.13 (td, $J=9.0\text{Hz}$, 4.2Hz, 1H), 5.71 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 4.77 (dt, $J=34.2\text{Hz}$, 6.0Hz, 1H), 4.32 (dt, $J=13.8\text{Hz}$, 3.0Hz, 1H), 3.97 (t, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 3.88 (m, 1H), 1.97-1.80 (m, 2H), 1.26-1.13 (m, 36H), 0.84 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 3H) ppm。

[0641] ^{31}P -NMR (241MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ -9.63 (d), -9.98 (d) ppm。

[0642] ESIMS-HR calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2^- (\text{M}-\text{H})^-$ 887.3363, found 887.3563。

[0643] (g) 化合物7的合成



[0645] 使二磷酸体6 (18.6mg, 21.0μmol, 1.0当量, 三乙基铵盐) 溶解于脱水DMSO (270μL)。滴加硫酸二甲酯 (39.7μL, 0.419mmol, 20当量), 在室温搅拌过夜。反应后, 加入2M碳酸三乙基铵缓冲液 (2.0mL, pH7.97), 在室温搅拌15分钟。在反应溶液中加入水, 用反相HPLC (YMC Triart C8 (250×10mm 1.D., S-5μm, 12nm, T012S05-2510WT), 溶剂:A) 0.1M碳酸三乙基铵缓冲液 (pH7.97), B) 乙腈, 梯度: 40-100%B (0-35分), 100%B (35-40分), 柱温: 室温, 流速: 3mL/分钟, 检测波长: 260nm) 进行纯化, 作为白色固体得到9.99mg (11.0μmol, 收率53%, 三

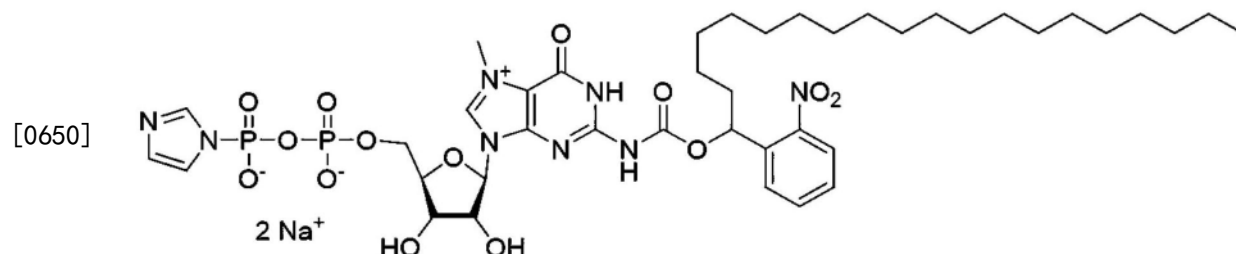
乙基铵盐)的化合物21。

[0646] $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ 9.67 (s, 1H), 7.82-7.78 (m, 2H), 7.76 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 1H), 6.01 (br, 1H), 5.87 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.27 (q, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 4.08 (s, 1H), 4.06 (s, 3H), 4.02 (s, 1H), 1.83-1.82 (m, 2H), 1.22-1.13 (m, 36H), 0.85 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。

[0647] $^{31}\text{P-NMR}$ (241MHz, DMSO- d_6) δ -9.90 (d), -10.61 (d) ppm。

[0648] ESI MS-HR calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2^-$ (M-2H) $^-$ 901.3519, found 901.3562。

[0649] (h) 化合物8的合成



[0651] 使化合物7 (11.0mg, 11.1 μmol , 1.0当量, 三乙基铵盐)、咪唑 (9.97mg, 111 μmol , 10当量) 和2,2'-二硫代二吡啶 (9.47mg, 38.8 μmol , 3.5当量) 溶解于脱水DMSO (400 μL)。加入三乙胺 (5.99 μL , 38.8 μmol , 3.5当量)、三苯基膦 (11.28mg, 38.8 μmol , 3.5当量), 在室温搅拌4小时。反应后, 加入溶解于脱水丙酮 (1.5mL) 中的高氯酸钠 (5.51mg, 44.4 μmol , 4.0当量), 在0 $^\circ\text{C}$ 冷却15分钟。将产生的沉淀通过离心分离回收, 用脱水丙酮 (2.0mL) 清洗5次。通过冻结干燥使沉淀干燥固化, 作为白色固体得到9.90mg (10.1 μmol , 收率85%, Na盐) 的化合物8。

[0652] $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6) δ 9.66 (s, 1H), 7.98 (d, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 7.79 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.54 (t, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.00 (br, 1H), 5.87 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 5.61 (m, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.20 (q, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.05 (s, 3H), 1.81 (q, $J=4.4\text{Hz}$, 2H), 1.27-1.14 (m, 36H), 0.85 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 3H) ppm。

[0653] $^{13}\text{C-NMR}$ (101MHz, CDCl_3) δ 154.8, 153.7, 148.0, 147.9, 138.6, 136.0, 133.7, 128.8, 127.2, 124.5, 74.6, 70.5, 61.5, 36.1, 31.8, 29.8-29.0, 25.7, 22.5, 13.9 ppm。

[0654] $^{31}\text{P-NMR}$ (241MHz, DMSO- d_6) δ -9.90 (d, $J=16.6\text{Hz}$), -10.61 (d, $J=19.8$) ppm。

[0655] ESI MS-HR calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{61}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{P}_2^-$ (M-2H) $^-$ 951.3788, found 951.4272。

[0656] (2) 使用疏水性化学加帽化试剂的RNA的化学加帽化反应

[0657] 图32表示了使用疏水性化学加帽化试剂的RNA的化学加帽化反应。

[0658] 图的(a)表示反应的概念图。

[0659] 图的(b)表示了5'单磷酸化19个碱基长RNA与疏水性化学加帽化试剂的反应的反相HPLC解析的结果。

[0660] 图的(c)表示了变性PAGE分析结果。

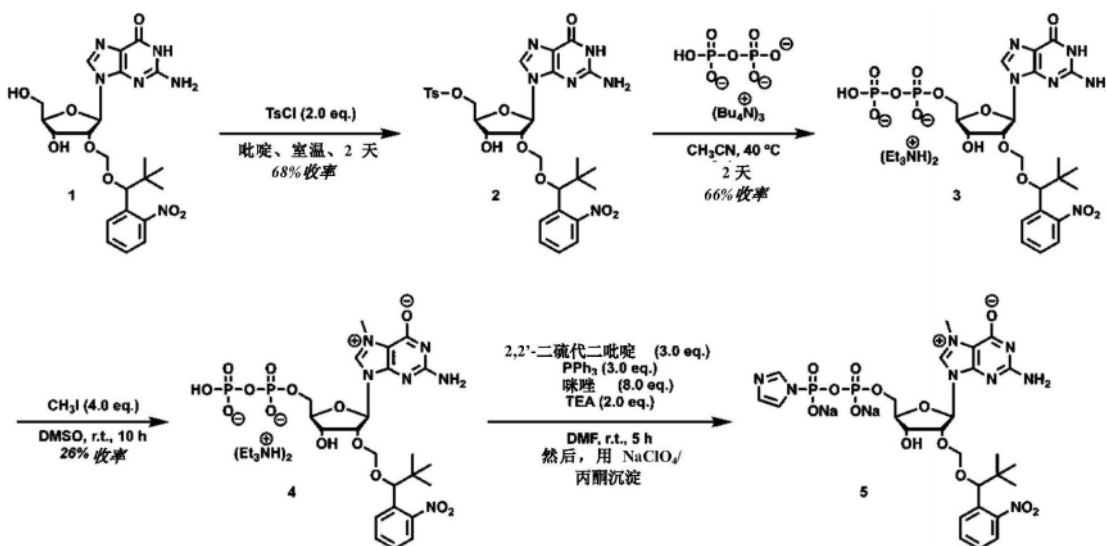
[0661] (实验部分)

[0662] 使疏水性加帽化试剂(化合物8)与19个碱基长的5'末端磷酸化RNA (5'-p-GAACGUGCGAAAGUCCACA-3'; 序列编号15) 如下反应。将包含RNA 2nmol和氯化钙500nmol的水溶液38 μL 冻结, 通过冻结干燥法进行干燥固化。在其中加入二甲基亚砜(DMSO) 18.5 μL 、疏水性加帽化试剂DMSO溶液 (19mM) 26.5 μL 、1-甲基咪唑5 μL 进行混合, 将其在55 $^\circ\text{C}$ 加温5小时。DMSO溶液中的各成分的终浓度如下所示。40 μM RNA、10mM疏水性加帽化化合物、10mM氯化

钙、1.25M1-甲基咪唑。反应结束后,通过醇沉淀来回收RNA,通过反相HPLC和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)进行解析。图的(b)中所示的HPLC分析条件如下所示。使用系统,Chromaster(日立高新技术公司);柱,YMC Hydrosphere C18(250×4.6mm I.D.,YMC)洗脱液A,包含5%乙腈的50mM乙酸三乙基铵(pH7.0);洗脱液B,乙腈;梯度条件,0-100%B(0-20分钟);流速,1.0mL/分钟;柱温,50℃;检测波长,260nm。在图的(c)中作为变性剂用包含7.5M尿素的15%丙烯酰胺(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=19:1)对RNA进行电泳,利用核酸染色剂SYBR Green II对凝胶染色,通过ChemiDoc XRS+成像仪(Bio-Rad)进行拍摄。

[0663] 7. N^7 -Methyl-GDP的改良合成和带疏水性标签的化学加帽化试剂的合成

[0664] 下述表示了2'-O-修饰- N^7 -甲基-GDP(化合物4)的改良的合成法和化学加帽试剂(5)的合成方案。



[0665]

[0666] (1) 2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙氧基]甲基-5'-O-对甲苯磺酰基-鸟苷(化合物2)的合成

[0667] 在2'-修饰鸟苷(1)(294mg, 0.583mmol)的吡啶(6.00mL)溶液中,在冰浴中滴加对甲苯磺酰氯(214mg, 1.12mmol)的吡啶(1.40mL)溶液。将混合物在室温搅拌3~4天。在反应混合物中添加冰冷水使反应停止,用二氯甲烷萃取3次。用 Na_2SO_4 使有机层干燥,进行蒸馏除去。将残渣上样于硅胶柱色谱,用24~91%甲醇/二氯甲烷洗脱,作为黄色的泡状物质得到化合物2(260mg、收率68%)。

[0668] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3 , 立体异构体混合物) δ 11.92(br, s), 7.76-7.63(m, 4H), 7.57(d, $J=11.9\text{Hz}$, 1.5H), 7.46-7.35(m, 2H), 7.27-7.23(m, 2.5H), 6.03-5.76(m, 1H), 5.68(s, 1H), 5.26-5.02(m, 2H), 4.90(d, $J=16.1\text{Hz}$, 2H), 4.76(s, 2H), 4.47-4.30(m, 1.5H), 4.21(s, 2.5H), 2.37(s, 3H), 0.77(s, 4.5H), 0.74(s, 4.5H) ppm。

[0669] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3 , 立体异构体混合物) δ 158.75, 154.18, 151.28, 151.01, 150.38, 145.30, 136.63, 133.76, 132.27, 131.92, 130.36, 130.10, 130.06, 129.95, 128.51, 128.02, 123.87, 117.14, 94.78, 81.80, 79.86, 78.56, 77.91, 70.70, 70.13, 69.94, 53.56, 36.68, 36.50, 29.78, 25.73, 25.67, 25.56, 21.72 ppm。

[0670] ESI-MS calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}$, 657.2[M-H] $^-$; found 657.4。

[0671] (2) 2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙氧基]甲基鸟苷-5'-二磷酸三乙

基铵盐(化合物3)的合成

[0672] 在5'-O-对甲苯磺酰基-2'-修饰鸟苷(2)(458mg、0.695mmol)和粉末3A分子筛(500mg)的CH₃CN(500μL)中的悬浮液加入0.475M三-四丁基焦磷酸铵。在CH₃CN(2.63mL、1.25毫摩尔)中,以40℃搅拌2天后,将反应混合物用水稀释,用膜过滤器过滤,将不溶物除去。将滤液在包含0~10%乙腈的碳酸三乙基铵缓冲液(pH7.9)的0~1.5M直线梯度中通过QAE-Sephadex($\phi=3\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ 、 70cm^3 、 6mL/min)的离子交换色谱进行纯化。以三乙基铵盐(441mg、66%收率)的形式作为黄色的无定形固体得到鸟苷-5'-二磷酸衍生物(3)。

[0673] ¹H NMR(600MHz, D₂O, 立体异构体混合物) δ 7.87(s, 0.5H), 7.58(s, 0.5H), 7.52(d, J=8.1Hz, 0.5H), 7.47-7.38(m, 1H), 7.38-7.29(m, 1H), 7.28-7.17(m, 1H), 7.01(t, J=7.8Hz, 0.5H), 5.73(d, J=5.8Hz, 0.5H), 5.48(d, J=5.0Hz, 0.5H), 4.96, 4.94(2s, 1H), 4.82(d, J=7.5Hz, 0.5H), 4.76(s, 0.5H), 4.71(d, J=7.3Hz, 0.5H), 4.62(dd, J=18.0, 6.6Hz, 1.5H), 4.52(t, J=5.1Hz, 0.5H), 4.45(t, J=5.0Hz, 1H), 4.14(d, J=4.1Hz, 0.5H), 4.10-4.03(m, 1.5H), 3.99(d, J=4.8Hz, 1H), 3.02(q, J=7.3Hz, 15H), 1.10(t, J=7.3Hz, 24H), 0.52(s, 4.5H), 0.41(s, 4.5H) ppm。

[0674] ¹³C NMR(151MHz, D₂O, 立体异构体混合物) δ 158.95, 158.75, 153.89, 153.59, 151.59, 151.01, 149.74, 148.09, 138.02, 137.37, 133.49, 132.57, 132.47, 132.21, 129.86, 129.66, 128.65, 128.06, 123.80, 123.30, 116.33, 115.96, 95.44, 93.71, 86.20, 84.26, 84.20, 83.73, 83.67, 81.61, 80.72, 78.55, 76.97, 69.07, 68.94, 64.84, 64.81, 64.46, 46.63, 36.55, 35.65, 24.78, 24.68, 8.24 ppm。

[0675] ³¹P NMR(243MHz, D₂O, 立体异构体混合物) δ -9.09(d, J=20.8Hz, 1P), -10.29(d, J=22.4Hz, 1P) ppm。

[0676] ESI-TOF-MS calcd. for C₂₂H₂₉N₆O₁₄P₂, 663.1223[M-H]⁻; found 663.1378。

[0677] (3)N⁷-甲基-2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙氧基]甲基鸟苷-5'-二磷酸三乙基铵盐(化合物4)

[0678] 在鸟苷-5'-二磷酸衍生物(3)(441mg、0.509mmol)的DMSO(4.24mL)溶液中,加入碘甲烷(290mg、127μL、2.04毫摩尔)。在室温搅拌10小时后,将反应混合物用水稀释,用二氯甲烷清洗4次。将水层用包含DEAE-SephadexTMA-25($\phi=3\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ 、 70cm^3 、 6mL/min)的0~10%CH₃CN的0-1.0M的乙酸三乙基铵缓冲液(pH6.0)的直线梯度纯化。在减压下将CH₃CN除去后,用WakosilTM25C18(15-30μm、球状)脱盐,进行冻结干燥,作为白色固体得到N⁷-甲基-鸟苷-5'-二磷酸衍生物(4)(118mg、收率26%、2种立体异性体的混合物)。

[0679] ¹H NMR(600MHz, D₂O, 通过HPLC分离单一立体异构体) δ 8.93(s, 1H), 7.60(d, J=8.2Hz, 1H), 7.49(dd, J=15.2, 8.1Hz, 2H), 7.29(t, J=7.6Hz, 1H), 5.82(s, 1H), 5.00(d, J=4.1Hz, 1H), 4.93(d, J=8.0Hz, 1H), 4.86(d, J=7.2Hz, 1H), 4.54-4.50(m, 1H), 4.42(t, J=5.2Hz, 1H), 4.25(s, 1H), 4.10(d, J=11.2Hz, 1H), 3.94(d, J=3.7Hz, 3H), 3.05(t, J=7.3Hz, 4H), 1.13(t, J=7.1Hz, 6H), 0.61(s, 10H) ppm。

[0680] ¹³C NMR(151MHz, D₂O, 通过HPLC分离单一立体异构体) δ 155.41, 154.99, 149.37, 148.61, 136.68, 133.90, 132.44, 130.24, 128.15, 123.51, 107.91, 95.16, 87.76, 85.95, 82.16, 79.32, 68.89, 64.78, 46.70, 36.52, 36.07, 24.76, 8.25 ppm。

[0681] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O , 通过HPLC分离单一立体异构体) δ -10.03 (1P), -10.71 (1P) ppm。

[0682] ESI-TOF-MS calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{P}_2$, 677.1379 [M-H] $^-$; found 677.1374。

[0683] (4) N^7 -甲基-2'-O-[2,2-二甲基-(R/S)-1-(2-硝基苯基)丙氧基]甲基鸟苷-5'-二磷酸咪唑二钠盐(化合物5)

[0684] N^7 -甲基-GDP衍生物(4) (118mg、0.134mmol)、咪唑 (72.8mg、1.07mmol)、2,2'-二硫代二吡啶 (88.6mg、0.402mmol) 的 N,N -二甲基甲酰胺 (1.60mL) 溶液中, 加入三乙胺 (37.5 μL 、27.1mg、0.268mmol), 接着加入三苯基膦 (105mg、0.402mmol)。在室温搅拌5小时后, 将反应混合物一边搅拌一边滴加到高氯酸钠 (39.4mg、0.322mmol) 的丙酮 (15mL) 溶液中。将所得到的悬浮液移到离心管中, 以3,500rpm离心10分钟。将上清除去, 将沉淀物用丙酮清洗5次。在干燥器中在减压下使固体在 P_2O_5 上干燥, 作为白色的固体得到鸟苷5'-二磷酸衍生物咪唑二钠盐(5)。

[0685] ^1H NMR (600MHz, D_2O , 立体异构体混合物) δ 8.10 (s, 1H), 7.82 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.68-7.01 (m, 6H), 6.88 (d, $J=10.1\text{Hz}$, 1H), 5.98-5.63 (m, 1H), 5.03-4.71 (m, 3H), 4.52-4.08 (m, 3H), 3.95 (s, 1H), 3.93-3.80 (m, 3H), 0.70-0.19 (m, 9H) ppm。

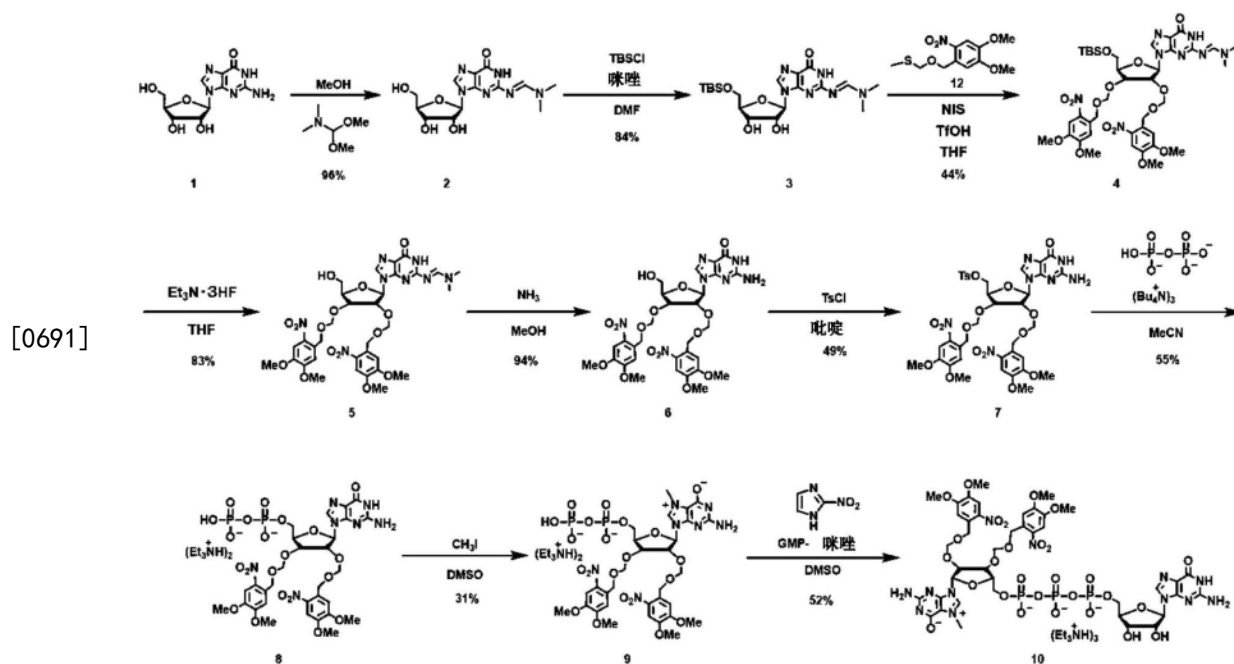
[0686] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O , 立体异构体混合物) δ 159.27, 149.76, 149.32, 148.44, 139.84, 134.64, 133.79, 132.74, 132.18, 130.00, 128.79, 128.33, 127.97, 123.79, 123.52, 120.43, 120.25, 108.52, 108.26, 95.13, 87.30, 85.53, 85.01, 81.91, 80.60, 79.17, 68.99, 68.59, 65.00, 36.45, 36.41, 35.88, 35.72, 30.25, 24.85, 24.75 ppm。

[0687] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O , 立体异构体混合物) δ -11.18 (d, $J=19.7\text{Hz}$, 1P), -19.39 (d, $J=19.7\text{Hz}$, 1P) ppm。

[0688] ESI-MS calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{P}_2$, 727.2 [M-H] $^-$; found 727.3。

[0689] 8. 新型加帽化合物的合成

[0690] 下述表示了新型加帽化合物(化合物10)的合成方案。



[0692] (1) 化合物2的合成

[0693] 在鸟苷(化合物1)(6.00g,21.2mmol)中加入甲醇(80.0mL)使其悬浮后,加入N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛(18.9mL,159mmol)。在室温搅拌22小时后,将反应溶液过滤,用冰冷的甲醇(80.0mL)清洗。通过用冻结干燥机使过滤分离的固体干燥,作为白色固体得到化合物2。(6.81g,20.1mmol,收率95%)

[0694] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.35 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 5.79 (d, $J=6.1\text{Hz}$, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 5.04 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 4.48 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.90 (q, $J=3.7\text{Hz}$, 1H), 3.58 (m, 2H), 3.15 (s, 3H), 3.03 (s, 3H) ppm

[0695] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 157.96, 157.63, 157.32, 150.02, 136.97, 119.79, 86.72, 85.45, 73.80, 70.51, 61.52, 40.68, 34.67 ppm HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{NaO}_5^+$ ($M+\text{Na}$) $^+=361.1231$, found 361.1221

[0696] (2) 化合物3的合成

[0697] 在化合物2(3.00g,8.87mmol)中加入二甲基甲酰胺(90.0mL)使其溶解后,加入咪唑(1.40g,21.3mmol)和叔丁基甲基氯硅烷(1.60g,10.6mmol)。在室温搅拌20小时后,将反应溶液用氯仿稀释,用水清洗。将有机层在无水硫酸钠上干燥后进行浓缩。将残渣用硅胶柱色谱(展开溶剂:氯仿/甲醇=10/1)纯化,作为白色固体得到化合物3。(3.38g,7.47mmol,收率84%)

[0698] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.33 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 5.82 (d, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 5.51 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 5.22 (d, $J=3.4\text{Hz}$, 1H), 4.42 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.91 (d, $J=3.9\text{Hz}$, 1H), 3.77 (m, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.04 (s, 6H) ppm

[0699] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 157.91, 157.62, 157.31, 150.07, 136.28, 119.59, 86.45, 84.51, 73.94, 70.07, 63.09, 40.70, 34.71, 25.85, 18.08, -5.40, -5.43 ppm

[0700] HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{NaO}_5\text{Si}^+$ ($M+\text{Na}$) $^+=475.2096$, found 475.2097

[0701] (3) 化合物4的合成

[0702] 在化合物3(2.00g,4.35mmol)和化合物12(2.62g,9.57mmol)中加入四氢呋喃(45mL)使其溶解。然后,加入粉末状分子筛 $3\text{\AA}$ (2.10g)和N-碘琥珀酰亚胺(2.15g,9.57mmol),冷却到 -40°C 。在该反应溶液中加入三氟甲烷磺酸(0.85mL,9.57mmol),在 -40°C 搅拌2小时。然后,加入三乙胺(2.89mL,15.2mmol)使反应停止。将所得到的反应溶液用硅藻土过滤,由此去除粉末状分子筛 $3\text{\AA}$ 。将滤液用乙酸乙酯稀释,用水清洗。将有机层在无水硫酸钠上干燥后,进行浓缩。将残渣用硅胶柱色谱(展开溶剂:乙酸乙酯/甲醇=100/3 $\rightarrow$ 20/1)纯化,作为茶色固体得到化合物4。(1.72g,1.90mmol,收率44%)

[0703] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.15 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.01 (d, $J=5.7\text{Hz}$, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.91 (m, 6H), 4.71 (s, 2H), 4.49 (d, $J=4.3\text{Hz}$, 1H), 4.11 (t, $J=4.1\text{Hz}$, 1H), 3.81 (m, 16H), 3.08 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 0.82 (s, 9H), 0.01 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 6H) ppm

[0704] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 157.73, 157.16, 153.37, 153.24, 147.42, 147.20, 139.00, 138.13, 129.03, 128.92, 110.13, 109.93, 108.90, 108.78, 107.92, 107.78, 94.88, 94.41, 94.26, 85.40, 85.20, 83.87, 83.01, 79.06, 74.26, 66.50, 66.33, 66.22, 61.00,

59.75, 55.98, 55.93, 55.78, 40.58, 34.64, 25.81, 25.67, 20.76, 17.89, 14.09, -3.20, -5.61, -5.64ppm

[0705] HRMS (ESI) m/z calcd. for $C_{39}H_{54}N_8NaO_{15}Si^+(M+Na)^+=925.3370$, found 925.3337

[0706] (4) 化合物5的合成

[0707] 在化合物4 (0.69g, 0.76mmol) 中加入四氢呋喃 (10.0mL) 使其溶解。然后, 加入三乙胺 (0.32mL, 2.29mmol) 和三乙胺-三氢氟酸盐 (0.37mL, 2.29mmol), 在室温搅拌17小时。将所得到的反应溶液用乙酸乙酯稀释, 用水清洗。将有机层在无水硫酸钠上干燥后, 进行浓缩。将残渣用硅胶柱色谱 (展开溶剂: 乙酸乙酯/甲醇=20/1→10/1) 纯化, 作为黄色固体得到化合物5。 (0.50g, 0.63mmol, 收率83%)

[0708] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 11.10 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 5.99 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 5.22 (t, $J=5.3$ Hz, 1H), 4.98 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 4.89 (m, 6H), 4.67 (dd, $J_1=20.3$ Hz, $J_2=15.3$ Hz, 2H), 4.51 (m, 1H), 4.10 (q, $J=3.5$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.63 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.98 (s, 3H) ppm

[0709] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 157.77, 157.25, 157.14, 153.42, 153.24, 149.61, 147.40, 147.17, 139.05, 138.06, 136.41, 129.05, 128.97, 119.63, 110.12, 108.80, 107.89, 107.79, 94.89, 94.41, 85.29, 83.84, 79.34, 79.19, 74.99, 66.42, 66.22, 61.06, 56.04, 55.99, 55.93, 55.79, 40.53, 34.55ppm

[0710] HRMS (ESI) m/z calcd. for $C_{33}H_{40}N_8NaO_{15}^+(M+Na)^+=811.2505$, found 811.2489

[0711] (5) 化合物6的合成

[0712] 在化合物5 (0.50g, 0.63mmol) 中加入二氯甲烷 (6.00mL) 使其溶解。在该反应溶液中加入7M氨的甲醇溶液 (6.30mL, 44.4mmol), 在50℃搅拌15小时。将所得到的反应溶液用氯仿稀释, 用水清洗。将有机层在无水硫酸钠上干燥、浓缩。将残渣用硅胶柱色谱 (展开溶剂: 氯仿/甲醇=20/1→10/1) 纯化, 作为淡黄色固体得到化合物6。 (0.43g, 0.59mmol, 收率94%)

[0713] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10.41 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.35 (s, 2H), 5.88 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 5.24 (t, $J=5.5$ Hz, 1H), 4.96 (m, 4H), 4.88 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J=6.7$ Hz, 2H), 4.61 (dd, $J_1=35.9$ Hz, $J_2=15.3$ Hz, 2H), 4.45 (dd, $J_1=4.9$ Hz, $J_2=2.0$ Hz, 1H), 4.09 (dd, $J_1=5.9$ Hz, $J_2=3.7$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 6H), 3.61 (m, 2H) ppm

[0714] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 156.36, 153.62, 153.38, 153.25, 151.03, 147.38, 147.17, 139.03, 138.16, 135.04, 129.04, 128.97, 116.53, 110.11, 108.99, 107.90, 107.80, 94.65, 94.44, 84.40, 84.13, 79.18, 79.03, 75.30, 66.24, 61.27, 56.06, 55.99, 55.92ppm

[0715] HRMS (ESI) m/z calcd. for $C_{30}H_{35}N_7NaO_{15}^+(M+Na)^+=756.2083$, found 756.2067

[0716] (6) 化合物7的合成

[0717] 在化合物6 (0.10g, 0.14mmol) 中加入吡啶 (2.00mL) 使其溶解, 在冰冷下加入对甲苯磺酰氯 (0.04g, 0.21mmol)。在室温搅拌3天后, 用氯仿稀释, 用水清洗。将有机层在无水硫酸钠上干燥、浓缩。将残渣用硅胶柱色谱 (展开溶剂: 氯仿/甲醇=100/3) 纯化, 作为黄色固体得到化合物7。 (61.2mg, 68.9 μ mol, 收率49%)

[0718] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10.48 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.36 (s, 2H), 5.84 (d, J=6.3Hz, 1H), 4.92 (m, 4H), 4.86 (d, J=7.0Hz, 1H), 4.79 (m, 2H), 4.64 (dd, J1=33.8Hz, J2=15.1Hz, 2H), 4.47 (m, 1H), 4.31 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 2.35 (s, 3H) ppm

[0719] ^{13}C NMR (101MHz, DMSO- d_6) δ 156.40, 153.61, 153.33, 153.26, 150.95, 147.42, 147.21, 145.11, 139.01, 138.28, 134.95, 131.91, 129.98, 128.89, 128.82, 127.49, 116.61, 110.05, 109.14, 107.87, 94.81, 84.92, 80.08, 79.18, 78.01, 74.86, 69.77, 66.43, 56.03, 55.91, 21.06 ppm

[0720] HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{NaO}_{17}\text{S}^+ (\text{M}+\text{Na})^+ = 910.2172$, found 910.2181

[0721] (7) 化合物8的合成

[0722] 在化合物7 (50.0mg, 56.3 μmol) 中加入乙腈 (0.13mL) 使其溶解。加入粉末状分子筛 $3\text{\AA}$ (50.0mg) 后, 加入双焦磷酸四铵的乙腈溶液 (0.475M, 0.21mL), 在室温下搅拌21小时。用水稀释后, 将沉淀物通过离心分离 (3500rpm, 15分钟) 除去, 将上清通过使用QAE-Sephadex的离子交换色谱 (展开溶剂: 0-1.5M 碳酸三乙基铵缓冲液) 纯化。然后, 通过用冻结干燥机干燥, 以黄色固体的形式得到作为三乙基铵盐的化合物8。 (34.1mg, 31.1 μmol , 收率55%)

[0723] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.01 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.82 (d, J=6.3Hz, 1H), 5.04 (d, J=6.5Hz, 1H), 4.92 (m, 6H), 4.66 (s, 1H), 4.53 (d, J=15.9Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 4.33 (d, J=15.0Hz, 1H), 4.18 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.46 (d, J=6.5Hz, 2H), 3.16 (q, J=7.0Hz, 10H), 1.24 (t, J=7.2Hz, 18H) ppm

[0724] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O) δ 157.70, 153.27, 153.13, 151.10, 146.90, 146.50, 138.65, 137.00, 129.75, 129.20, 115.51, 109.94, 107.59, 107.29, 95.05, 94.94, 85.57, 82.89, 79.89, 76.06, 66.95, 66.38, 65.20, 56.14, 56.03, 55.87, 46.62, 8.22 ppm

[0725] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -10.12 (d, J=21.2Hz, 1P), -10.86 (d, J=21.2Hz, 1P) ppm

[0726] HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_{21}\text{P}_2^+ (\text{M}-\text{H})^- = 892.1445$, found 892.1431

[0727] (8) 化合物9的合成

[0728] 在化合物8 (0.10g, 91.2 μmol) 中加入二甲基亚砜 (0.76mL) 使其溶解。然后, 加入碘甲烷 (46.0 μL , 0.73mmol) 在室温搅拌2天。在反应溶液中加入乙酸三乙基铵缓冲液 (pH7.0), 由此使反应停止, 用水稀释。然后, 用氯仿清洗, 将水层通过使用QAE-Sephadex的离子交换色谱 (展开溶剂: 0-1.0M 乙酸三乙基铵缓冲液) 纯化。然后, 通过用冻结干燥机干燥, 以淡黄色固体的形式得到作为三乙基铵盐的化合物9。 (31.8mg, 28.6 μmol , 收率31%)

[0729] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 7.28 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.95 (d, J=24.1Hz, 4H), 4.74 (s, 1H), 4.65 (d, J=16.0Hz, 1H), 4.56 (m, 4H), 4.47 (s, 1H), 4.26 (dd, J1=69.2Hz, J2=8.0Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.16 (q, J=7.3Hz, 10H), 1.24 (t, J=7.3Hz, 15H) ppm

[0730] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O) δ 155.49, 154.46, 153.08, 152.99, 149.40, 146.77, 146.65, 138.27, 137.51, 129.46, 129.02, 109.63, 107.88, 107.48, 107.30, 95.66, 94.63, 87.40, 83.35, 80.01, 75.17, 66.97, 66.58, 56.13, 56.06, 55.85, 55.78, 46.64, 35.91, 23.18,

8.24ppm

[0731] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -9.26 (d, $J=19.7\text{Hz}$, 1P), -10.72 (d, $J=26.3\text{Hz}$, 1P) ppm

[0732] HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_{21}\text{P}_2^-(\text{M}-\text{H})^- = 906.1601$, found 906.1628

[0733] (9) 化合物10的合成

[0734] 在化合物9 (30.0mg, 27 μmol) 和鸟苷5'-磷酸咪唑 (35.0mg, 81.1 μmol) 中加入二甲基亚砜 (0.27mL) 使其溶解。然后, 在反应溶液中加入2-硝基咪唑 (9.20mg, 81.1 μmol), 在37 $^\circ\text{C}$ 搅拌2天。用水稀释后, 用氯仿清洗, 将水层用反相色谱 (Chromatorex C8MB100-40/75) 纯化。(展开溶剂: 0-60% 乙腈/100-40% 50mM 乙酸三乙基铵缓冲液) 然后, 用冻结干燥机干燥, 由此以淡黄色固体的形式得到作为三乙基铵盐的化合物10。(21.5mg, 13.8 μmol , 收率51%)

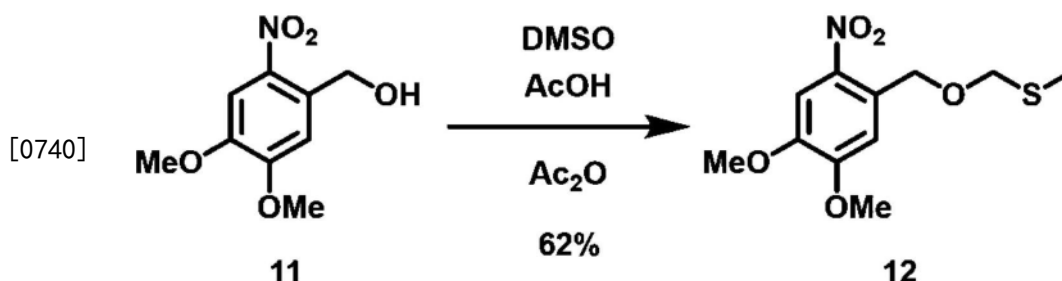
[0735] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 7.88 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.66 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.62 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 5.11 (d, $J=12.9\text{Hz}$, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.64 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.49 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 4.47 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 4.41 (d, $J=3.7\text{Hz}$, 4H), 4.23 (d, $J=10.5\text{Hz}$, 4H), 3.97 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.16 (q, $J=7.3\text{Hz}$, 15H), 1.23 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 23H) ppm

[0736] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O) δ 158.05, 155.10, 153.52, 153.03, 152.86, 150.97, 149.08, 146.63, 146.47, 138.08, 137.40, 136.85, 129.67, 128.87, 115.63, 109.50, 107.77, 107.59, 107.24, 96.03, 94.13, 87.53, 86.80, 83.49, 83.43, 82.50, 79.10, 74.55, 74.09, 70.11, 67.09, 66.75, 65.27, 64.01, 56.03, 55.94, 55.74, 46.65, 36.02, 23.25, 8.24ppm

[0737] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -10.87 (d, $J=19.7\text{Hz}$, 1P), -11.09 (d, $J=19.7\text{Hz}$, 1P), -22.41 (t, $J=19.7\text{Hz}$, 1P) ppm

[0738] HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{50}\text{N}_{12}\text{O}_{28}\text{P}_3^-(\text{M}-\text{H})^- = 1251.2081$, found 1251.2123

[0739] (10) 化合物12的合成



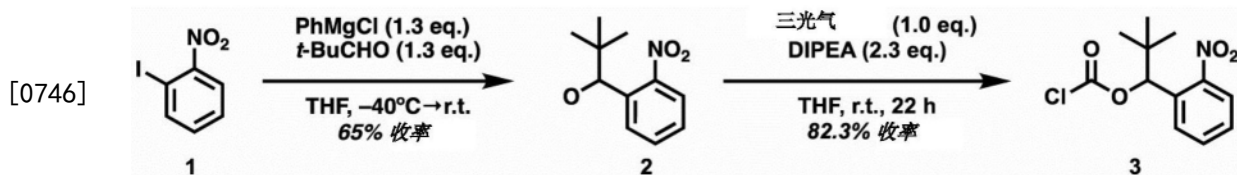
[0741] 在化合物11 (1.50g, 7.04mmol) 中加入乙酸 (16.1mL, 281mmol) 和二甲基亚砜 (10.0mL, 141mmol) 使其溶解。在反应溶液中加入乙酸酐 (13.3mL, 141mmol), 在室温搅拌3天后, 在0 $^\circ\text{C}$ 加入氢氧化钾 (10.0M, 63.3mL, 633mmol) 搅拌2小时, 由此使反应停止。使反应溶液溶解于二乙醚, 用水清洗。将有机层用无水硫酸钠干燥, 进行减压溶剂蒸馏除去。使所得到的残渣悬浮于乙酸乙酯与己烷的1:3混合液进行过滤。用 P_2O_5 上的干燥器使所得到的固体在真空中干燥, 作为淡黄色固体得到化合物12。(1.20g, 4.39mmol, 收率62%)

[0742] ^1H NMR (400MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.71 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 2.22 (s, 3H) ppm

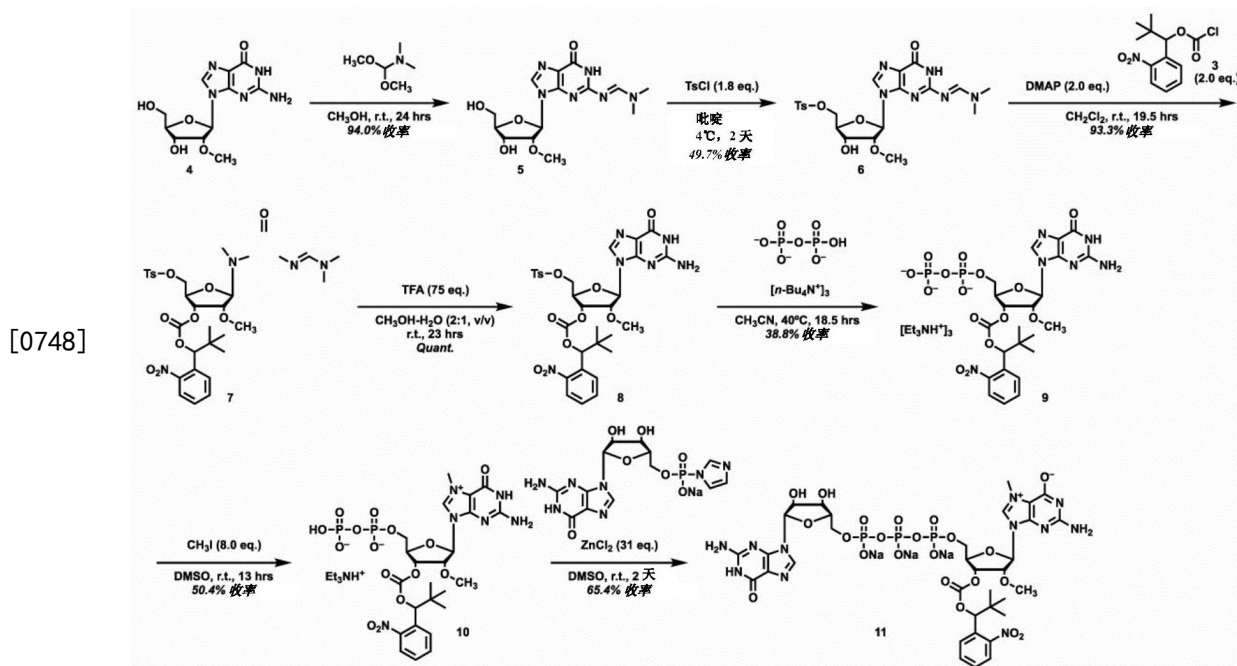
[0743] ^{13}C NMR (101MHz, CHLOROFORM-D) δ 153.80, 147.76, 130.22, 109.71, 108.04, 77.48, 76.84, 75.68, 67.15, 56.57, 56.49, 14.54ppm HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NNaO}_5\text{S}^+(\text{M}+\text{Na})^+ = 296.0563$, found 296.0567

[0744] 9. 2'-O-甲基化二核苷酸加帽化合物的合成

[0745] 下述表示了2'-O-甲基化二核苷酸加帽化合物的合成中使用的硝基苄基衍生物的合成方案。



[0747] 下述表示了2'-O-甲基化二核苷酸加帽化合物的合成方案。



[0749] (1) 化合物2的合成

[0750] 化合物(2)的合成按照文献进行。在THF (150mL) 中, 将1-碘-2-硝基苯(1) (20g、80mmol) 冷却到-40℃。将氯化苄基镁的THF溶液(2M、52mL、0.10mol) 加入到混合物中, 在-40℃搅拌1小时。将三甲基乙醛(12mL、9.6g、0.11mol) 加入到反应混合物中, 在-40℃搅拌36分钟。将反应混合物缓慢温热到室温。搅拌4小时后, 加入饱和氯化铵水溶液, 由此将反应猝灭。将混合物用乙酸乙酯萃取3次。将有机层用Na₂SO₄干燥、浓缩。将残留物用硅胶柱色谱(17→25%乙酸乙酯/己烷) 纯化, 作为暗褐色的固体得到化合物2(11g、收率65%)。制品的所有光谱数据与文献一致(V.A.Litosh, et al., Nucleic Acids Res., 2011, 29(6), e39)。

[0751] (2) 化合物3的合成

[0752] 在化合物2(639mg、3.05mmol) 的THF(10.2mL) 溶液中, 连续加入N,N-二异丙基乙基胺(986mg、1.30mL、7.63mmol) 和三光气(997mg、3.36mmol)。在室温搅拌23小时后, 将三光气(200mg) 和N,N-二异丙基乙基胺(1.00mL) 加入到混合物中, 在室温搅拌24小时。将反应混合物用二氯甲烷稀释, 用水清洗。用Na₂SO₄使有机层干燥, 用旋转蒸发器浓缩, 作为暗褐色的油得到氯甲酸盐(3) (1.64g、粗产物)。将粗产物用硅胶柱色谱(己烷:AcOEt=1.0、6:1) 纯化, 作为黄色的油状物得到化合物3(601mg、72.6%收率)。

[0753] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.90 (ddd, J=8.2, 3.3, 1.4Hz, 1H), 7.70-7.54 (m, 2H), 7.46 (dddd, J=9.8, 7.1, 2.6, 1.5Hz, 1H), 6.56 (d, J=1.5Hz, 1H), 0.94 (d, J=2.5Hz, 9H)

ppm。

[0754] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 149.97, 149.95, 149.04, 132.99, 131.13, 129.52, 128.80, 124.93, 84.30, 36.60, 25.56ppm。

[0755] (3) 化合物5的合成

[0756] 在甲醇 (61.0mL) 中的2'-O-甲基鸟苷 (4) (3.63g、12.2mmol) 的悬浮液中, 加入N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛 (7.27g、8.17mL、61.0mmol)。在室温搅拌21小时后, 将反应混合物用旋转蒸发器浓缩。将油性残留物溶解于甲醇 (10.0mL), 加入数滴乙醚。对混合物进行超声波处理, 接着, 通过添加乙醚 (150mL) 使其悬浮。将所得到的沉淀物通过过滤收集, 用乙醚清洗。使固体在减压下干燥, 作为白色的粉末得到目标化合物5 (4.08g、94.0)。全部光谱数据与已有报道一致 (T.Mukobata et al., Bioorg.Med.Chem.Lett., 2010, 20, 129-131)。

[0757] (4) 化合物6的合成

[0758] 在吡啶 (22.7mL) 中的化合物 (5) (1.00g、2.84毫摩尔) 的冷却溶液中, 在冰浴上滴加对甲苯磺酰氯 (812mg、4.26毫摩尔) 的吡啶 (5.70mL) 溶液。将混合物在4℃的冰箱中放置17小时后, 加入对甲苯磺酰氯 (271mg、1.42mmol) 的吡啶 (1.00mL) 溶液。将混合物在4℃的冰箱中放置17小时。通过注入水使反应混合物猝灭。将混合物用二氯甲烷萃取2次。用 Na_2SO_4 使有机层干燥, 使其蒸发。将残留物供于用1.6~9.1% 甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱, 作为白色泡状物得到5'-O-对甲苯磺酰基化合物6 (682mg、收率47.4%)。

[0759] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.21-10.00 (m, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.63 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.17 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 5.93 (d, $J=4.1\text{Hz}$, 1H), 5.24 (s, 1H), 4.60 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 4.33-4.15 (m, 4H), 3.44 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 2.30 (s, 3H) ppm。

[0760] ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ 158.44, 158.38, 157.14, 150.29, 145.36, 136.69, 132.27, 129.94, 127.88, 120.31, 86.32, 83.03, 81.66, 69.41, 69.02, 58.82, 58.59, 53.62, 41.66, 41.48, 35.27, 31.00, 21.75, 21.65ppm。

[0761] ESI-TOF-MS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$, 507.1656 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found 507.1675, calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{NaO}_7\text{S}$, 529.1476 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found 529.1495。

[0762] (5) 化合物7的合成

[0763] 在二氯甲烷 (985 μL) 中的硝基苄基衍生物 (3) (107mg、0.394mmol) 的冷却溶液中, 在冰中添加化合物6 (100mg、0.197mmol) 和DMAP (48.1mg、0.394mmol)。在室温搅拌19.5小时后, 将反应混合物用二氯甲烷稀释, 用饱和 NH_4Cl 水溶液清洗。用 Na_2SO_4 使有机层干燥, 进行浓缩。将残留物供于用2.0~4.8% 的甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱, 作为白色的固体得到靶标 (目标) 化合物7 (126mg、收率93.3%)。

[0764] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 9.73-9.60 (m, 1H), 8.61 (s, 0.5H), 8.58 (s, 0.5H), 7.88 (ddd, $J=8.8, 4.0, 1.2\text{Hz}$, 1H), 7.67-7.49 (m, 7H), 7.49-7.40 (m, 1H), 7.40-7.27 (m, 1H), 7.21-7.09 (m, 3H), 6.41 (s, 0.5H), 6.32 (s, 0.5H), 5.71 (td, $J=11.0, 4.5\text{Hz}$, 1H), 5.67-5.61 (m, 1H), 4.68 (dd, $J=5.7, 3.1\text{Hz}$, 0.5H), 4.58 (dd, $J=5.7, 3.5\text{Hz}$, 0.5H), 4.33-4.13 (m, 4H), 3.37 (s, 2H), 3.21 (s, 1.5H), 3.08 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 3H), 3.03 (s, 1.5H), 2.92 (s, 1.5H), 2.33 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 3H), 0.95 (s, 4.5H), 0.93 (s, 4.5H) ppm。

[0765] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 158.71, 158.66, 158.47, 158.15, 158.09, 157.24, 154.28, 154.02, 149.90, 149.31, 149.09, 145.91, 145.62, 145.51, 137.64, 132.93, 132.72,

132.59, 132.37, 132.13, 130.19, 129.93, 129.80, 129.76, 129.68, 129.26, 129.04, 129.00, 128.77, 128.01, 127.86, 127.80, 127.74, 124.81, 124.58, 121.22, 120.92, 88.19, 88.01, 87.36, 81.02, 80.93, 80.83, 80.78, 80.69, 80.60, 80.49, 80.16, 79.10, 78.94, 78.52, 78.20, 78.11, 75.84, 75.59, 75.20, 74.58, 74.07, 73.89, 67.70, 67.61, 67.55, 66.08, 65.30, 59.58, 59.40, 59.20, 58.94, 58.88, 53.58, 41.56, 41.43, 41.36, 41.05, 36.59, 36.34, 36.29, 36.25, 35.40, 35.34, 25.78, 25.74, 25.71, 25.60, 21.79, 21.68 ppm。

[0766] ESI-TOF-MS calcd for $C_{33}H_{40}N_7O_{11}S$, 742.2502 $[M+H]^+$; found 742.2562, calcd for $C_{33}H_{39}N_7NaO_{11}S$, 764.2321 $[M+Na]^+$; found 764.2313。

[0767] (6) 化合物8的合成

[0768] 在甲醇 (13.3 μ L) 和水 (6.63 mL) 中的化合物7 (591 mg、0.797 mmol) 的悬浮液中, 添加三氟乙酸 (6.82 g、4.68 mL、59.8 mmol)。在室温搅拌23小时后, 将反应混合物浓缩, 除去甲醇。将残留物用二氯甲烷稀释, 用水清洗。用 Na_2SO_4 使有机层干燥后浓缩, 作为灰色的泡沫得到目标化合物8 (576 mg、定量的)。

[0769] ^1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91-7.86 (m, 1H), 7.75-7.66 (m, 3H), 7.66-7.60 (m, 2H), 7.29-7.21 (m, 3H), 6.43 (s, 0.5H), 6.30 (s, 0.5H), 5.75 (dd, $J=6.3, 3.7$ Hz, 1H), 5.29-5.21 (m, 1H), 4.73 (t, $J=5.8$ Hz, 0.5H), 4.63 (t, $J=5.7$ Hz, 0.5H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.31 (dd, $J=7.9, 3.9$ Hz, 1H), 4.29-4.20 (m, 1H), 3.31 (s, 1.5H), 2.97 (s, 1.5H), 2.36 (d, $J=9.7$ Hz, 3H), 0.95 (d, $J=11.2$ Hz, 9H) ppm。

[0770] ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 159.21, 154.10, 153.77, 151.66, 149.39, 149.25, 145.58, 136.77, 132.81, 132.70, 132.56, 132.41, 132.09, 130.17, 130.13, 130.10, 129.69, 129.27, 128.97, 128.89, 128.82, 128.07, 128.02, 127.99, 127.96, 126.45, 124.66, 120.91, 117.56, 86.95, 86.86, 80.88, 80.67, 80.54, 80.16, 80.10, 79.75, 79.69, 74.36, 74.21, 68.40, 59.66, 59.39, 59.21, 36.59, 36.32, 36.24, 35.44, 25.81, 25.73, 25.70, 25.61, 21.80, 21.71, 21.68 ppm。

[0771] ESI-TOF-MS calcd for $C_{30}H_{35}N_6O_{11}S$, 687.2079 $[M+H]^+$; found 687.2091。

[0772] (7) 化合物9的合成

[0773] 使化合物8 (53.3 mg、71.9 μ mol) 和粉末3A分子筛 (55.0 mg) 悬浮于乙腈 (80.0 μ L), 加入616 mM 焦磷酸三(四丁基) 铵乙腈溶液 (175 μ L、108 μ mol)。在40 $^{\circ}C$ 搅拌18.5小时后, 将反应混合物用水稀释。将所得到的悬浮液以4,500 rpm 离心分离30分钟。收集上清液, 将沉淀物重悬于水中。将所得到的悬浮液以4,500 rpm 离心分离30分钟。回收上清, 通过使用QAE-Sephadex ($\phi=3.0$ cm、 $h=10$ cm、 70 cm³、 6 mL/min) 的离子交换色谱进行纯化 (A: 水、B: 1.5 M TEAB 缓冲液 (pH 7.9、包含10%的 CH_3CN)、梯度: 0~100% B (270分钟)。收集包含产物的组分, 进行浓缩, 以三乙基铵盐的形式得到修饰鸟苷二磷酸9 (56.9 mg、57.1 μ mol、79.7% 收率)。通过260 nm 下的UV的产物的定量: 27.9 μ mol (收率38.8%)。在计算中使用吸光系数 (ϵ_{260}) = 15, 780 M⁻¹ $\cdot$ cm⁻¹。

[0774] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.23-8.02 (m, 1H), 7.92 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.69 (q, $J=6.3$ Hz, 2H), 7.62-7.47 (m, 1H), 6.36 (s, 0.5H), 6.23 (s, 0.5H), 5.83 (dd, $J=7.6, 2.9$ Hz, 1H), 5.49 (dd, $J=15.8, 5.0$ Hz, 1H), 4.48-4.08 (m, 4H), 3.32 (s, 3H), 3.15 (q, $J=7.3$ Hz, 18H), 1.28 (q, $J=11.2$ Hz, 40H), 0.97 (d, $J=8.8$ Hz, 9H) ppm。

[0775] ^{13}C NMR (101MHz, CD_3OD) δ 158.15, 154.23, 153.93, 153.86, 149.52, 132.55, 132.16, 129.13, 129.05, 128.85, 126.03, 125.62, 124.27, 122.87, 85.84, 81.96, 80.80, 80.70, 80.23, 79.94, 75.54, 64.94, 58.41, 58.14, 58.03, 45.98, 42.24, 41.75, 36.10, 35.71, 30.37, 24.94, 24.77, 19.24, 10.25, 10.05, 7.75, 6.88ppm。

[0776] ^{31}P NMR (162MHz, CD_3OD) δ -9.04(1P), -9.44(0.5P), -10.75(0.5P) ppm。

[0777] ESI-TOF-MS calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2$, 691.1172[M-H] $^-$; found 691.1270。

[0778] (8) 化合物10的合成

[0779] 在DMSO (1.50mL) 中的化合物9 (180 μmol) 的溶液中添加碘甲烷 (204mg、89.6 μL 、1.44mmol)。在室温搅拌13小时后, 将反应混合物用水稀释, 用二氯甲烷清洗3次。粗产物通过使用QAE-SephadexTM A-25 (ϕ =4.5cm、 h =8.4cm、140cm³、12mL/min) 的离子交换色谱进行纯化(梯度、0 $\rightarrow$ 0.8M TEAA缓冲液 (pH6.0、包含0 $\rightarrow$ 8%的 CH_3CN (270分钟))。在减压下将 CH_3CN 除去后, 将产物用Wakosil (注册商标) 25C18 (颗粒尺寸: 15~30 μm (球形)、柱尺寸: ϕ =4.80cm、 h =10.2cm、184cm³ (12mL/min)、溶剂A: 水 (20分钟)、溶剂B: 90% CH_3CN /水 (20分钟)) 脱盐。将包含产物的组分浓缩, 以三乙基铵的形式得到目标化合物10 (73.3mg、90.8 μmol 、50.4%收率)。收量由260nm下的吸收计算。在计算中使用吸光系数 (ϵ_{260}) = 15, 100M $^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

[0780] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 7.89-7.70 (m, 1H), 7.66-7.33 (m, 3H), 6.18 (s, 0.5H), 6.00 (d, J =11.2Hz, 1.5H), 5.47 (s, 0.5H), 4.62 (d, J =5.6Hz, 0.5), 4.67 (m, 0.5H), 4.55 (s, 0.5H), 4.50-4.38 (m, 1H), 4.18 (s, 0.5H), 4.06 (s, 1.5H), 3.99 (s, 3H), 3.30 (s, 1.5H), 3.07 (qd, J =7.4, 2.1Hz, 6H), 2.99 (s, 1.5H), 1.14 (td, J =7.3, 2.2Hz, 9H), 0.74 (d, J =12.1Hz, 9H) ppm。

[0781] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O) δ 155.70, 155.63, 155.09, 154.94, 154.35, 153.94, 150.05, 149.87, 148.91, 148.65, 133.38, 133.05, 131.87, 131.18, 129.43, 129.22, 128.59, 124.70, 124.63, 108.16, 108.01, 87.55, 86.87, 83.55, 83.02, 82.51, 82.20, 81.55, 81.15, 75.27, 74.81, 69.65, 64.65, 64.44, 59.06, 58.99, 46.71, 36.20, 36.13, 35.58, 24.95, 24.92, 8.28ppm。 ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -9.64(1P), -10.72(1P) ppm。

[0782] ESI-TOF-MS calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2$, 705.1328[M-H] $^-$; found 705.1404。

[0783] (9) 化合物11的合成

[0784] 将化合物10 (7.60mg、9.40 μmol) 和鸟苷5'-单磷酸咪唑 (12.3mg、28.2 μmol) 溶解于0.59M氯化锌/DMSO溶液 (493 μL 、 ZnCl_2 : 291 μmol)。在37 $^\circ\text{C}$ 搅拌2天后, 添加200mM EDTA水溶液 (pH7.0、1.60mL), 将反应混合物猝灭。用2.0M TEAB缓冲液 (pH7.9、100 μL) 稀释后, 将混合物通过使用YMC-Triart-C8柱 (250x4.6mm I.D.、 S -5 μm 、12nm、流速1.0mL/min、温度: 50 $^\circ\text{C}$) 的反相HPLC纯化。将包含产物的组分浓缩, 以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物11 (8.33mg、6.15 μmol 、65.4%的收率)。将产物冻结干燥, 将固体再溶解于甲醇 (2.0mL) 中。将丙酮中的190mM NaClO_4 (10mL) 溶液加入到混合物中, 将所得到的悬浮液离心分离 (4,000rpm、20分钟)。将上清液废弃, 使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥, 以钠盐的形式得到靶标加帽化合物11 (3.46mg、3.10 μmol 、33.0%收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。在计算中使用吸光系数

(ϵ_{260}) = $26,300\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

[0785] [三乙基铵盐]

[0786] ^1H NMR (600MHz, CD_3OD , 三乙基铵盐) δ 7.99 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 7.92 (q, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.77-7.61 (m, 2H), 7.59-7.49 (m, 1H), 6.41-6.29 (m, 0.5H), 6.27-6.17 (m, 0.5H), 6.04-5.93 (m, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.76-4.67 (m, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.58-4.38 (m, 4H), 4.27 (s, 2H), 4.23-4.13 (m, 3H), 4.13-3.99 (m, 3H), 3.53-3.43 (m, 1.5H), 3.08 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1.5H), 0.96 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 9H) ppm。

[0787] ^{13}C NMR (151MHz, CD_3OD , 三乙基铵盐) δ 159.34, 157.66, 155.50, 155.17, 155.02, 153.03, 150.94, 150.78, 138.22, 133.97, 133.82, 133.27, 130.47, 130.35, 130.12, 125.63, 117.77, 108.69, 89.71, 89.29, 85.29, 84.35, 84.11, 84.02, 81.73, 81.48, 75.66, 75.20, 71.92, 66.63, 65.32, 60.04, 59.78, 47.43, 37.51, 37.09, 36.97, 26.28, 26.13, 23.46, 9.14 ppm。

[0788] ^{31}P NMR (243MHz, CD_3OD , 三乙基铵盐) δ -10.53 ~ -11.77 (m, 2P), -22.19 (s, 1P) ppm。

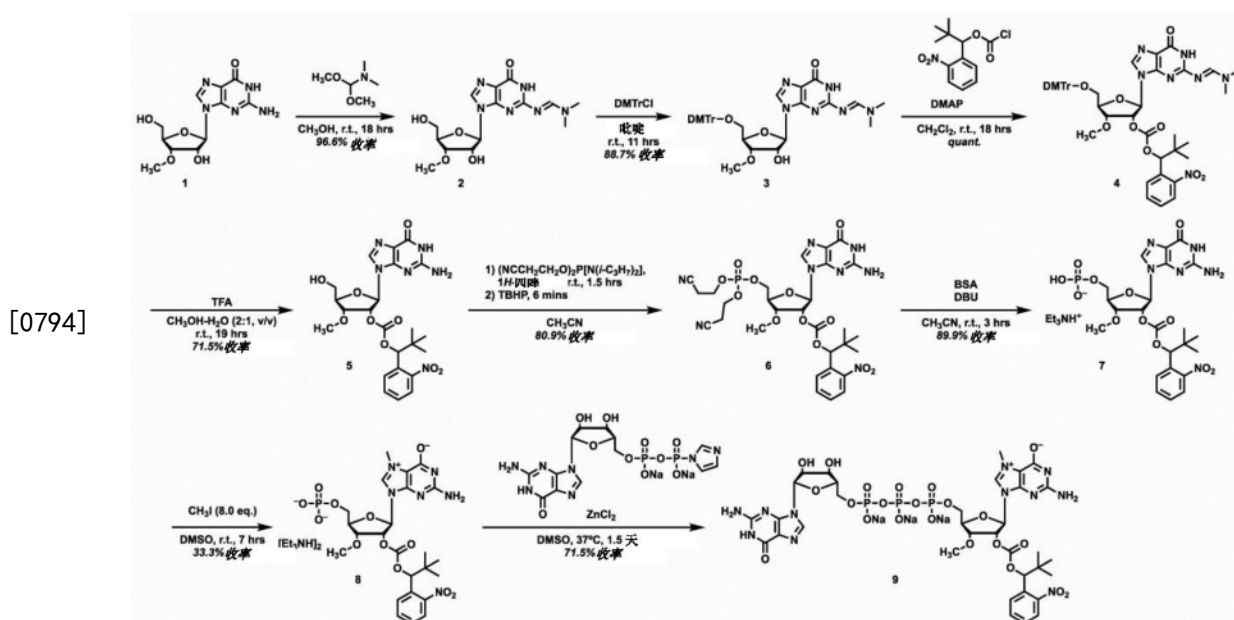
[0789] [钠盐]

[0790] ^1H NMR (600MHz, D_2O , 钠盐) δ 7.87-7.80 (m, 2H), 7.68-7.54 (m, 2H), 7.45 (t, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 6.19 (s, 0.5H), 6.04 (s, 0.5H), 5.78 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 5.62 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 5.27-5.22 (m, 0.5H), 5.17 (t, $J=4.3\text{Hz}$, 0.5H), 4.54-4.47 (m, 1H), 4.45-4.38 (m, 1H), 4.35 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 0.5H), 4.31 (q, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 4.25-4.04 (m, 5.5H), 3.95 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 3H), 3.21 (s, 1.5H), 2.95 (s, 1.5H), 0.82 (d, $J=13.4\text{Hz}$, 9H) ppm。

[0791] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O , 钠盐) δ -10.97 (dd, $J=36.2, 19.7\text{Hz}$), -22.56 (t, $J=19.7\text{Hz}$) ppm。

[0792] 10. 3'-O-甲基化二核苷酸加帽化合物的合成

[0793] 下述表示了3'-O-甲基化二核苷酸加帽化合物的合成方案。



[0795] (1) 化合物2的合成

[0796] 在甲醇 (25.3mL) 中的2'-O-甲基鸟苷 (1.50g, 5.05mmol) 的悬浮液中加入N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛 (3.01g, 3.39mL, 25.3mmol)。在室温搅拌18小时后,将反应混合物通过

旋转蒸发器浓缩。将油性残留物溶解于二氯甲烷(10.0mL),通过添加乙醚使其悬浮。通过过滤收集所得到的沉淀物,用乙醚清洗。使固体在减压下干燥,作为白色的粉末得到目标化合物2(1.72g、收率96.6%)。

[0797] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 11.35 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 5.78 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.68-4.63 (m, 1H), 3.99 (q, $J=4.0\text{Hz}$, 1H), 3.84 (dd, $J=5.0, 3.3\text{Hz}$, 1H), 3.66-3.60 (m, 1H), 3.53 (d, $J=13.3\text{Hz}$, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.16 (s, 3H), 3.03 (s, 3H) ppm。

[0798] ^{13}C NMR (151MHz, DMSO- d_6) δ 157.97, 157.45, 150.02, 136.87, 119.85, 86.88, 82.96, 79.86, 73.02, 64.93, 61.47, 57.61, 40.64, 34.65 ppm。

[0799] (2) 化合物3的合成

[0800] 在吡啶(2.77mL)中的N2-保护-3'-O-甲基鸟苷2(195mg、0.553mmol)的溶液中加入DMTrCl(244mg、0.719mmol)。在室温搅拌12小时后,加入DMTrCl(93.9mg、0.277mmol)。将反应混合物在室温搅拌3.5小时,接着通过添加甲醇(1.00mL)进行猝灭。将混合物用二氯甲烷稀释,用饱和碳酸氢钠水溶液清洗。将有机层用 Na_2SO_4 干燥,用旋转蒸发器浓缩。将粗产物供于用含有1.0%三乙胺的1.6~4.8%甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱,作为白色泡状物得到靶标化合物3(337mg、收率93.1%)。

[0801] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , 含有三乙胺) δ 8.37 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.36-7.29 (m, 2H), 7.25-7.04 (m, 7H), 6.75-6.67 (m, 4H), 5.91 (d, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 4.73 (t, $J=5.7\text{Hz}$, 1H), 4.17 (q, $J=4.1\text{Hz}$, 1H), 3.93-3.87 (m, 1H), 3.66 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 6H), 3.37 (s, 3H), 3.32 (dd, $J=10.6, 4.0\text{Hz}$, 1H), 3.22 (dd, $J=10.6, 4.5\text{Hz}$, 1H), 2.87 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 6H), 2.43 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 15H), 0.92 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 22H) ppm。

[0802] ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3 , 含有三乙胺) δ 158.56, 158.16, 156.99, 150.69, 144.65, 136.21, 135.69, 130.04, 128.10, 127.95, 126.93, 120.26, 113.21, 87.65, 86.46, 81.54, 80.25, 73.84, 63.68, 58.29, 55.20, 46.15, 41.27, 35.09, 11.51 ppm。

[0803] (3) 化合物4的合成

[0804] 在二氯甲烷(4.06mL)中的保护鸟苷3(531mg、0.811毫摩尔)和氯甲酸酯(439mg、1.62毫摩尔)的冷却溶液中,在冰浴中加入DMAP(198mg、1.62毫摩尔)。在室温搅拌18小时后,将反应混合物用二氯甲烷稀释,用饱和氯化铵水溶液清洗。用 Na_2SO_4 干燥有机层,加入三乙胺(4.00mL、4%)进行碱性化。溶剂蒸馏除去后,将残留物供于用包含三乙胺的2.4~6.3%的甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱,作为白色的无定形固体得到靶标化合物(745mg、定量的)。

[0805] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 10.20 (s, 1H), 8.56 (s, 0.4H), 8.47 (s, 0.6H), 7.87-7.80 (m, 1H), 7.70 (s, 0.4H), 7.66 (s, 0.6H), 7.60-7.53 (m, 0.8H), 7.52-7.49 (m, 1.2H), 7.42-7.34 (m, 3H), 7.28-7.24 (m, 4H), 7.23-7.19 (m, 2H), 7.17-7.12 (m, 1H), 6.79-6.73 (m, 4H), 6.45 (s, 0.6H), 6.30 (s, 0.4H), 6.03 (dd, $J=6.8, 4.3\text{Hz}$, 1H), 6.02-5.94 (m, 1H), 4.23 (dt, $J=5.6, 3.7\text{Hz}$, 1H), 4.13 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 0.6H), 4.00 (dd, $J=6.1, 4.9\text{Hz}$, 0.4H), 3.72 (d, $J=1.1\text{Hz}$, 6H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.33 (s, 1.8H), 3.27 (td, $J=11.3, 4.1\text{Hz}$, 1H), 3.09 (s, 1.2H), 3.06-3.05 (m, 1.2H), 3.01-2.99 (m, 1.8H), 2.97 (s, 1.2H), 2.94 (s, 1.8H), 0.91 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 9H) ppm。

[0806] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 158.75, 158.63, 158.51, 158.29, 158.26, 157.13, 157.08, 153.75, 153.56, 150.03, 149.80, 149.10, 148.91, 144.28, 136.42, 136.19, 135.48, 132.67, 132.45, 132.05, 129.96, 129.74, 129.08, 128.95, 128.71, 128.56, 128.07, 127.88, 126.90, 124.55, 124.35, 120.84, 120.76, 113.16, 86.47, 86.44, 86.15, 85.55, 81.74, 81.58, 80.77, 80.41, 78.23, 77.94, 76.31, 76.21, 62.84, 62.68, 58.83, 58.65, 55.17, 46.12, 41.33, 41.14, 36.51, 36.11, 35.12, 35.05, 25.72, 25.64, 25.44, 11.47ppm。

[0807] ESI-TOF-MS calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{NaO}_{11}$, 912.3539 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found 912.3644。

[0808] (4) 化合物5的合成

[0809] 在鸟苷衍生物4 (56.9mg、63.9 μmol) 的甲醇 (1.07mL) 和水 (533 μL) 的悬浮液中, 添加三氟乙酸 (546mg、367 μL 、4.79mmol)。在室温搅拌19小时后, 将反应混合物用甲醇/水的混合物 (2:1、v/v、5.00mL) 稀释。将混合物浓缩, 用由1.9~9.1%的甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化, 作为白色的固体得到目标化合物 (24.3mg、71.5%的收率)。

[0810] ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.73 (d, $J=9.5\text{Hz}$, 1H), 8.01-7.93 (m, 2H), 7.81-7.68 (m, 1H), 7.64-7.52 (m, 2H), 6.54 (s, 2H), 6.18 (s, 0.6H), 6.02 (s, 0.4H), 5.96 (d, $J=5.5\text{Hz}$, 1H), 5.48 (q, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 4.22 (t, $J=4.7\text{Hz}$, 0.5H), 4.08-3.95 (m, 1.5H), 3.68-3.60 (m, 1H), 3.58-3.50 (m, 2H), 3.35 (s, 2H), 2.98 (s, 1H), 0.87 (d, $J=3.7\text{Hz}$, 9H) ppm。

[0811] ^{13}C NMR (151MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 156.61, 156.57, 153.91, 153.88, 153.10, 152.99, 150.98, 150.92, 149.08, 148.86, 135.66, 135.55, 133.05, 131.36, 130.78, 129.60, 129.47, 128.89, 128.51, 124.51, 124.48, 116.54, 116.47, 84.03, 82.96, 82.89, 79.93, 79.65, 77.90, 77.75, 77.27, 77.23, 60.91, 60.86, 58.05, 57.71, 36.02, 35.59, 25.44, 25.21ppm。

[0812] (5) 化合物6的合成

[0813] 在化合物5 (290mg、0.545mmol) 中加入在乙腈 (5.45mL) 中的双 (2-氰基乙基) N,N-二异丙基亚磷酰胺 (222mg、0.818mmol) 的溶液。将1H-四唑 (57.3mg、0.818mmol) 加入到混合物中后, 在室温搅拌1.5小时, 接着在反应混合物中加入在癸烷溶液 (218 μL 、1.09~1.31mmol) 中的5~6M的叔丁基过氧化氢。将反应混合物进一步在室温搅拌6分钟, 用二氯甲烷稀释。将混合物用饱和碳酸氢钠水溶液清洗。用 Na_2SO_4 将有机层干燥、浓缩。将残留物用由4.8~17%甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化, 作为褐色的无定形固体得到目标化合物 (317mg、收率80.9%)。

[0814] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 12.25 (s, 0.5H), 7.88 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 0.5H), 7.81 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 0.5H), 7.74 (d, $J=16.2\text{Hz}$, 1H), 7.66-7.60 (m, 1H), 7.59-7.50 (m, 1H), 7.46 (ddd, $J=8.5, 5.9, 2.9\text{Hz}$, 0.5H), 7.40 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 0.6H), 6.60 (s, 1.5H), 6.35 (s, 0.5H), 6.22 (s, 0.5H), 5.95 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 5.73 (dd, $J=10.3, 5.4\text{Hz}$, 1H), 4.53-4.32 (m, 2.5H), 4.25 (tq, $J=11.5, 5.4\text{Hz}$, 5.5H), 3.44 (s, 1.5H), 3.03 (s, 1.5H), 2.75 (dq, $J=12.6, 6.8\text{Hz}$, 4H), 0.94 (s, 9H) ppm。

[0815] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 158.89, 154.01, 153.97, 153.81, 153.60, 151.23, 149.48, 149.26, 137.08, 132.74, 132.58, 131.98, 129.35, 129.10, 128.90, 124.62, 124.52, 117.55, 117.50, 117.12, 117.00, 86.69, 86.57, 80.98, 80.74, 78.01, 77.77, 76.37, 67.07, 62.85, 62.81, 59.18, 58.94, 36.52, 36.16, 25.83, 25.63, 19.69, 19.63ppm。

[0816] ^{31}P NMR (243MHz, CDCl_3) δ -1.83 and 1.87ppm。

[0817] HRESIMS calcd. for $C_{29}H_{35}N_8NaO_{12}P$, 741.2005 $[M+Na]^+$; found 741.1980.

[0818] (6) 化合物7的合成

[0819] 在核苷一磷酸6 (317mg、0.441mmol) 的乙腈 (4.41mL) 溶液中连续加入N,0-双(三甲基硅烷基)乙酰胺 (897mg、1.08mmol、4.41mmol) 和1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯 (268mg、263 μ L、1.76mmol)。在室温搅拌3小时后,通过加入1M TEAA缓冲液 (pH6.0、1.50mL) 将反应混合物猝灭。将混合物用水 (25.0mL) 稀释,用二氯甲烷 (20.0mL) 清洗3次。水层使用Wakosil (注册商标) 25C18 (粒度:15~30 μ m (球形)、柱尺寸: $\phi=4.80$ cm、 $h=10.2$ cm、 184 cm³ (12mL/min)) 纯化 (溶剂A:50mM TEAA+0.5%CH₃CN (pH6.0)、溶剂B:CH₃CN、60分钟0~80%B梯度)。将包含目标产物的组分合并、浓缩、冻结干燥,作为褐色粉末得到目标化合物7 (347mg、89.9%收率、单三乙基铵盐包含3当量的TEAA盐)。

[0820] ¹H NMR (600MHz, CD₃OD) δ 8.11-8.01 (m, 1H), 7.96-7.85 (m, 1H), 7.73 (t, J=7.7Hz, 0.5H), 7.65 (dt, J=8.0, 5.8Hz, 1H), 7.60-7.49 (m, 1.5H), 6.26 (s, 0.5H), 6.17 (s, 0.5H), 6.07 (dd, J=11.3, 5.6Hz, 1H), 5.61 (q, J=5.1Hz, 1H), 4.37 (t, J=4.4Hz, 0.5H), 4.33-4.21 (m, 1.5H), 4.16 (q, J=7.3Hz, 1H), 4.12-4.00 (m, 1H), 3.47 (s, 1.5H), 3.15 (q, J=7.4Hz, 24H, 三乙铵), 3.11 (s, 1.5H), 1.93 (s, 9H, 乙酸盐), 1.27 (t, J=7.4Hz, 36H, 三乙铵), 0.92 (d, J=6.3Hz, 9H) ppm。

[0821] ¹³C NMR (151MHz, CD₃OD) δ 179.20, 159.53, 159.46, 155.91, 155.84, 154.88, 154.79, 152.96, 152.92, 150.76, 150.55, 138.06, 137.93, 133.90, 133.52, 133.15, 130.40, 130.34, 130.05, 130.03, 125.56, 125.51, 117.74, 117.53, 86.77, 86.50, 83.77, 83.72, 81.68, 81.53, 80.21, 79.86, 78.97, 78.80, 65.80, 65.77, 65.64, 59.17, 59.01, 47.10, 47.07, 37.24, 36.99, 26.19, 26.09, 23.81, 23.79, 9.05ppm。

[0822] ³¹P NMR (243MHz, CD₃OD) δ -1.53 and 1.48ppm。

[0823] HRESIMS calcd. for $C_{23}H_{28}N_6O_{12}P$, 611.1508 $[M-H]^-$; found 611.1504.

[0824] (7) 化合物8的合成

[0825] 在DMSO (630 μ L) 中的2' 修饰鸟苷一磷酸7 (61.6mg、75.6 μ mol) 的溶液中添加碘甲烷 (85.9mg、37.7 μ L、605 μ mol)。在室温搅拌7小时后,将反应混合物用水稀释,然后用二氯甲烷清洗3次。水层使用Wakosil (注册商标) 25C18 (粒度:15~30 μ m (球形)、柱尺寸: $\phi=4.80$ cm、 $h=10.2$ cm、 184 cm³ (12mL/min)) 纯化 (溶剂A:50mM TEAA+0.5%CH₃CN (pH6.0)、溶剂B:CH₃CN、60分钟0~80%B梯度)。将包含目标产物的组分合并、浓缩、冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到目标化合物8 (18.3mg、33.3%收率)。

[0826] ¹H NMR (600MHz, D₂O, 三乙基铵盐) δ 7.86 (dd, J=8.2, 1.3Hz, 0.4H), 7.79 (dd, J=8.2, 1.4Hz, 0.6H), 7.73-7.67 (m, 0.4H), 7.64-7.59 (m, 1H), 7.57-7.44 (m, 1.6H), 6.19 (d, J=3.7Hz, 0.4H), 6.09 (d, J=5.7Hz, 0.6H), 6.04 (s, 0.5H), 5.96 (s, 0.5H), 5.62-5.55 (m, 1H), 4.44 (dt, J=8.8, 3.1Hz, 1H), 4.35 (dd, J=5.0, 3.0Hz, 1H), 4.27 (t, J=5.1Hz, 0.5H), 4.16-4.10 (m, 0.5H), 4.08-4.02 (m, 3H), 3.98-3.92 (m, 1H), 3.49 (s, 2H), 3.17 (q, J=7.4Hz, 18H 三乙铵), 3.14 (s, 1H), 1.89 (s, 3H, 乙酸盐), 1.25 (t, J=7.4Hz, 27H, 三乙铵), 0.86 (d, J=7.0Hz, 9H) ppm。

[0827] ¹³C NMR (151MHz, D₂O, 三乙基铵盐) δ 181.47, 160.00, 159.51, 154.23, 153.75,

149.74, 149.55, 149.03, 148.80, 133.35, 132."8, 1' 1.59, 131.05, 129.58, 129.39, 128.73, 128.50, 124.58, 124.16, 108.63, 108.02, 86.78, 85.62, 83.82, 83.76, 83.25, 81.89, 81.60, 78.86, 78.80, 78.09, 77.64, 63.23, 62.59, 58.52, 58.39, 46.68, 36.01, 35.95, 35.62, 24.92, 24.87, 23.32, 8.26ppm。

[0828] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O , 三乙基铵盐) δ 4.17, 4.13ppm。

[0829] HRESIMS calcd. For $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{P}$, 625.1664 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found 625.1693。

[0830] (8) 化合物9的合成

[0831] 在DMSO (372 μL) 中的2'-Nb-3'-OMe-N7m-鸟苷一磷酸8 (18.4mg、18.6 μmol) 的溶液中, 加入鸟苷5'-二磷酸磷酸咪唑 (30.0mg、55.8 μmol) 和氯化锌 (50.7mg、372 μmol)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌1.5天后, 添加500mM EDTA水溶液 (pH8.0、968 μL 、EDTA: 484毫摩尔) 将反应混合物猝灭。将混合物用水 (14.0mL) 稀释, 用反相HPLC纯化 (装置: Shimadzu Prep、柱: YMC-Actus Triart C8 (制备型 (Preparative)、250x20.0mm I.D.、溶剂A: 50mM TEAA缓冲液 (pH6.0、包含0.5% CH_3CN)、溶剂B: CH_3CN 、5~80% B梯度 (25分钟)、流速: 10ml/min、检测: 254nm)。收集包含靶标产物的组分、浓缩、冻结干燥, 以三乙基铵盐的形式得到PureCap类似物。将产物再溶解于甲醇 (2.00mL)。将丙酮中的190mM NaClO_4 (12.0mL) 加入到混合物中, 将所得到的悬浮液离心分离 (4,000rpm、20分钟)。将上清液废弃, 使沉淀物重悬于丙酮。将悬浮液离心分离过程进一步重复4次。使沉淀物在减压下干燥, 以钠盐的形式得到加帽类似物9 (14.9mg、13.3 μmol 、71.5% 收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数 (ϵ_{260}) = 26, 300 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

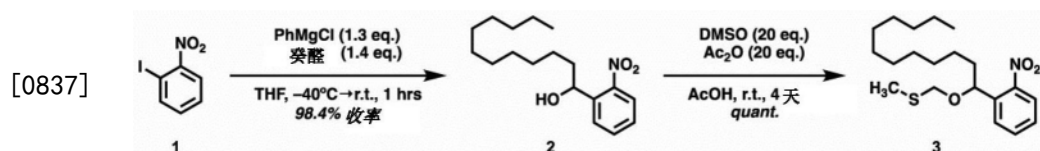
[0832] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 7.93 (s, 1H), 7.80 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.68-7.40 (m, 3H), 5.99 (s, 1H), 5.92 (d, $J=5.7\text{Hz}$, 0.5H), 5.79 (s, 0.5H), 5.72 (d, $J=5.9\text{Hz}$, 0.5H), 5.43 (s, 0.5H), 4.60 (s, 1H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.39-4.14 (m, 8H), 4.08 (s, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.51-3.39 (m, 2H), 0.93-0.77 (m, 9H) ppm。

[0833] ^{13}C NMR (151MHz, D_2O) δ 158.67, 154.06, 153.84, 151.39, 149.23, 148.87, 137.33, 133.00, 131.59, 130.94, 129.55, 129.27, 128.77, 124.21, 115.98, 108.52, 107.89, 86.67, 85.49, 83.68, 83.62, 82.51, 81.65, 78.20, 77.97, 73.79, 70.33, 65.53, 64.94, 58.55, 36.05, 35.67, 30.29, 24.80ppm。

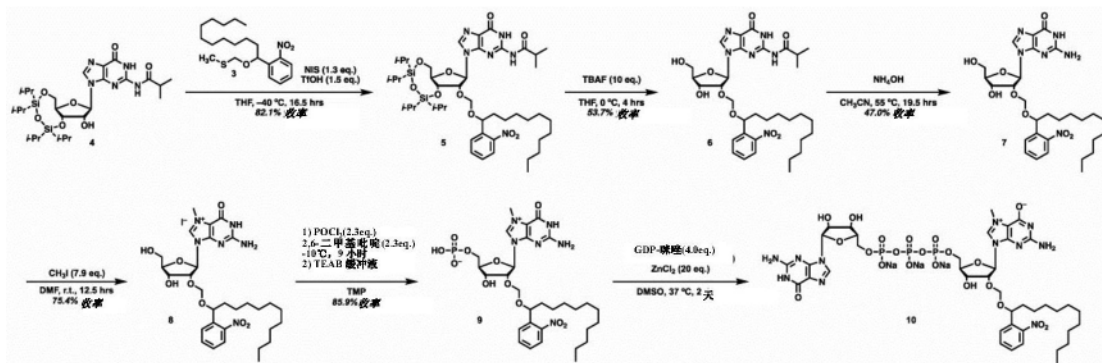
[0834] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -10.96 (2P, dt, $J=88.8, 23.0\text{Hz}$), -22.44 (1P, t, $J=19.7\text{Hz}$) ppm。

[0835] 11. 长链烷基修饰硝基苄基二核苷酸加帽化合物的合成

[0836] 下述表示了在长链烷基修饰硝基苄基二核苷酸加帽化合物的合成中使用的硝基苄基衍生物的合成方案。



[0838] 下述表示了长链烷基修饰硝基苄基二核苷酸加帽化合物的合成方案。



[0839]

[0840] (1) 化合物2的合成

[0841] 将THF (41.9mL) 中的1-碘-2-硝基苯1 (5.00g、20.1mmol) 的混合物冷却到-40℃。将氯化苄基镁的THF溶液 (2M、13.1mL、26.1mmol) 加入到混合物中,在-40℃搅拌1小时。将癸醛 (5.18g、6.24mL、28.1mmol) 加入到反应混合物中,在-40℃搅拌1小时。通过加入饱和氯化铵水溶液 (20.0mL) 将反应混合物猝灭。将混合物用二氯甲烷 (20.0mL) 萃取3次。用Na₂SO₄干燥有机层,进行浓缩。将残留物通过由17→50%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为褐色油状物得到目标化合物2 (6.08g、收率98.4%)。

[0842] ¹H NMR (60MHz, CDCl₃) δ8.09-6.79 (m, 5H, 与CHCl₃的信号重叠), 5.59-4.86 (m, 1H), 1.34 (s, 20H), 0.99 (d, J=4.8Hz, 3H) ppm。

[0843] ¹³C NMR (15MHz, CDCl₃) δ147.46, 140.76, 137.30, 133.11, 130.05, 129.25, 127.92, 127.57, 123.94, 119.79, 115.41, 68.96, 60.50, 38.59, 31.88, 29.63, 29.33, 26.10, 22.62, 13.97, 13.88ppm。

[0844] (2) 化合物3的合成

[0845] 加入硝基苯甲醇衍生物2 (6.08g、19.8mmol) 的乙酸 (47.6g、45.3mL、792mmol)、DMSO (30.9g、28.1mL、396mmol) 和乙酸酐 (40.4g、37.4mL、396毫摩尔)。在室温搅拌4天后,将反应混合物滴加到10M KOH水溶液中。(178mL、1.78mol) 冰浴中。将混合物在室温搅拌4小时,接着用乙酸乙酯萃取。将有机层用盐水清洗,用Na₂SO₄干燥。将残留物溶解于己烷中,供于由4.8~17%乙酸乙酯/己烷洗脱的硅胶柱色谱,作为黄色的油得到甲基硫基缩醛3 (10.6g、>100%收率)。

[0846] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.88 (dd, J=8.2, 1.3Hz, 1H), 7.70 (dd, J=7.9, 1.5Hz, 1H), 7.64-7.58 (m, 1H), 7.39 (ddd, J=8.2, 7.3, 1.5Hz, 1H), 5.26 (dd, J=8.9, 3.4Hz, 1H), 4.60 (d, J=11.6Hz, 1H), 4.23 (d, J=11.6Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.81-1.67 (m, 2H), 1.58-1.41 (m, 2H), 1.39-1.33 (m, 1H), 1.29-1.21 (m, 15H), 0.85 (t, J=7.1Hz, 3H) ppm。

[0847] ¹³C NMR (151MHz, CDCl₃) δ148.81, 138.49, 133.35, 128.35, 128.10, 124.33, 73.92, 73.60, 37.92, 31.96, 29.70, 29.66, 29.64, 29.61, 29.38, 29.30, 26.18, 22.73, 14.23, 14.15ppm。

[0848] (3) 化合物5的合成

[0849] 在N2-异丁酰基-3', 5'-O- (1,1,3,3-四氢呋喃二硅氧烷-1,3-二基) 鸟苷4 (2.00g、3.36mmol)、甲基硫基缩醛衍生物3 (1.61g、4.37mmol) 和粉末分子筛3Å (1.50g) 的四氢呋喃 (33.6mL) 悬浮液中加入N-碘琥珀酰亚胺 (983mg、4.37mmol), 冷却到-40℃。在-40℃20分钟后,在悬浮液中加入三氟甲烷磺酸 (756mg、448μL、5.04mmol), 在-40℃搅拌16.5小时。通过

加入三乙胺(16.8mL)将反应混合物淬灭,接着用乙酸乙酯(100mL)稀释。将混合物用饱和碳酸氢钠水溶液(100mLx2)、硫基硫酸钠(100mLx2)和盐水(100mLx1)清洗。用 Na_2SO_4 干燥有机层,进行浓缩。将残留物通过由0~4.8%的甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为褐色的泡沫得到目标化合物5(2.53g、82.1%收率)。

[0850] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3 , 目标化合物和起始原料的混合物) δ 12.32-12.08(m, 1.5H), 10.79(s, 0.7H), 9.70(s, 0.5H), 9.39(s, 0.3H), 7.99(s, 0.3H), 7.93-7.88(m, 1H), 7.82(s, 0.3H), 7.70(dd, $J=8.2, 1.4\text{Hz}$, 0.4H), 7.63(dd, $J=5.4, 2.0\text{Hz}$, 0.6H), 7.54(dd, $J=7.9, 1.5\text{Hz}$, 0.3H), 7.41(dddd, $J=10.6, 9.0, 6.9, 2.1\text{Hz}$, 0.6H), 7.23(td, $J=7.9, 1.5\text{Hz}$, 0.3H), 5.79(s, 0.4H), 5.73(s, 0.9H), 5.58(s, 0.4H), 5.29(dd, $J=8.6, 3.3\text{Hz}$, 0.4H), 5.24(s, 1.5H), 5.21(dd, $J=7.6, 4.6\text{Hz}$, 0.5H), 5.13(d, $J=6.5\text{Hz}$, 0.3H), 5.03(d, $J=6.6\text{Hz}$, 0.4H), 4.63(d, $J=6.6\text{Hz}$, 0.4H), 4.58(d, $J=6.5\text{Hz}$, 0.3H), 4.48(dd, $J=9.4, 4.2\text{Hz}$, 0.3H), 4.38(dt, $J=10.5, 5.4\text{Hz}$, 1.2H), 4.25(d, $J=5.2\text{Hz}$, 0.8H), 4.20-4.05(m, 3.3H), 4.03-3.87(m, 3.3H), 3.44(s, 0.4H), 3.36(d, $J=5.9\text{Hz}$, 0.4H), 2.92(p, $J=6.8\text{Hz}$, 0.8H), 2.81(p, $J=6.9\text{Hz}$, 0.2H), 2.69(p, $J=6.8\text{Hz}$, 0.4H), 1.78-1.59(m, 2H), 1.25-1.14(m, 24H), 1.13-1.09(m, 3H), 1.08-0.84(m, 54H), 0.79(t, $J=7.1\text{Hz}$, 4H) ppm。

[0851] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3 , 目标化合物和起始原料的混合物) δ 180.13, 179.64, 179.13, 156.03, 155.80, 155.72, 148.50, 148.38, 148.02, 147.97, 147.58, 147.45, 138.31, 137.95, 136.56, 136.43, 136.37, 133.94, 133.27, 128.57, 128.51, 128.45, 128.07, 124.52, 124.00, 121.45, 121.35, 121.23, 93.62, 91.30, 89.08, 88.14, 87.38, 81.66, 81.25, 81.07, 79.04, 76.60, 75.30, 74.74, 72.28, 70.63, 70.03, 69.50, 69.37, 60.55, 59.57, 59.50, 53.55, 50.39, 37.93, 37.87, 36.45, 36.24, 36.05, 31.92, 29.68, 29.65, 29.62, 29.59, 29.55, 29.51, 29.49, 29.46, 29.43, 29.37, 29.33, 26.54, 25.81, 25.64, 22.69, 19.21, 19.08, 18.97, 18.95, 18.90, 17.49, 17.46, 17.40, 17.33, 17.26, 17.20, 17.17, 17.11, 17.08, 17.05, 17.00, 16.98, 16.96, 16.88, 16.84, 14.12, 13.44, 13.39, 13.08, 13.00, 12.93, 12.67, 12.54 ppm

[0852] (4) 化合物6的合成

[0853] 将四氢呋喃(13.8mL)中的起始物质5(2.53g、2.76毫摩尔)的溶液用冰浴冷却,加入1M TBAF/THF(27.6mL、27.6毫摩尔)。以0℃搅拌4小时后,将反应混合物用二氯甲烷(120mL)稀释,用水(120mL)清洗。将水层用二氯甲烷(120mL)萃取。将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥,进行浓缩。将残留物通过由0~9.1%的甲醇/二氯甲烷洗脱的硅胶柱色谱纯化,作为白色的泡沫得到靶标化合物6(1.00g、53.7%的收率)。

[0854] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 12.15(d, $J=17.5\text{Hz}$, 1H), 10.71-10.47(m, 1H), 7.81(s, 0.5H), 7.69(d, $J=8.0\text{Hz}$, 0.5H), 7.62(dd, $J=8.2, 1.4\text{Hz}$, 0.5H), 7.49-7.42(m, 2H), 7.28-7.19(m, 1H), 7.16-7.10(m, 0.5H), 5.71(d, $J=3.2\text{Hz}$, 0.5H), 5.30(d, $J=2.9\text{Hz}$, 0.5H), 5.10(t, $J=6.4\text{Hz}$, 0.5H), 5.02-4.92(m, 1.5H), 4.82(d, $J=6.8\text{Hz}$, 0.5H), 4.76(d, $J=6.9\text{Hz}$, 0.5H), 4.72(d, $J=7.1\text{Hz}$, 0.5H), 4.60(t, $J=4.2\text{Hz}$, 0.5H), 4.50(dd, $J=4.9, 3.0\text{Hz}$, 0.5H), 4.44(d, $J=7.2\text{Hz}$, 0.5H), 4.23(s, 1H), 3.92(dt, $J=6.5, 3.3\text{Hz}$, 0.5H), 3.87(dt, $J=7.0, 3.5\text{Hz}$, 0.5H), 3.78-3.59(m, 2H), 3.27(d, $J=5.5\text{Hz}$, 0.5H), 3.24-3.17(m, 6.5H), 3.05-2.93(m, 1H), 1.56(dq, $J=16.3, 7.9\text{Hz}$, 8H), 1.50-1.39(m, 1.5H), 1.30(h, $J=6.9\text{Hz}$, 7H), 1.17-

1.01 (m, 23H), 1.01-0.92 (m, 3H), 0.92-0.88 (m, 1H), 0.85 (td, $J=7.4, 1.3\text{Hz}$, 10H), 0.71 (td, $J=7.1, 1.4\text{Hz}$, 3H) ppm。

[0855] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 180.47, 180.28, 155.49, 155.47, 148.15, 147.87, 147.77, 147.73, 147.55, 147.51, 147.10, 138.97, 138.76, 138.44, 137.71, 133.25, 132.77, 128.26, 128.18, 127.97, 127.74, 123.89, 123.56, 121.42, 121.21, 94.72, 93.07, 88.61, 88.47, 84.22, 83.86, 78.84, 78.60, 74.87, 73.51, 70.30, 69.29, 69.11, 61.01, 60.87, 58.63, 37.49, 37.37, 35.53, 35.42, 31.59, 29.31, 29.29, 29.17, 29.08, 29.01, 26.22, 25.41, 25.26, 23.76, 22.37, 19.46, 18.97, 18.94, 18.83, 18.79, 13.84, 13.40 ppm。

[0856] (5) 化合物7的合成

[0857] 将乙腈 (9.40mL) 中的起始物质6 (970mg、1.44mmol) 的溶液加入到28%氢氧化铵溶液 (18.8mL) 中。将混合物加热到55℃。在55℃搅拌19.5小时后, 将反应混合物浓缩, 用苯 (x1) 使其共沸。将残留物溶解于甲醇 (6.00mL), 加入二乙醚 (200mL), 由此使其悬浮。通过过滤收集所得到的沉淀物, 用二乙醚冲洗。使所得到的固体在真空下干燥, 作为白色的固体得到目标化合物7 (408mg、收率47.0%)。

[0858] ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.23 (s, 0.5H), 7.93 (s, 0.5H), 7.88 (dd, $J=8.2, 1.3\text{Hz}$, 0.5H), 7.84 (dt, $J=8.1, 0.9\text{Hz}$, 0.5H), 7.78 (s, 0.5H), 7.70 (td, $J=7.6, 1.4\text{Hz}$, 0.5H), 7.57 (dd, $J=7.9, 1.5\text{Hz}$, 0.5H), 7.55-7.50 (m, 1.5H), 7.40 (ddd, $J=8.1, 5.2, 3.6\text{Hz}$, 0.5H), 6.43 (s, 1.5H), 5.82 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 0.5H), 5.68 (d, $J=5.9\text{Hz}$, 0.5H), 5.23 (d, $J=5.3\text{Hz}$, 0.5H), 5.16 (d, $J=5.0\text{Hz}$, 0.5H), 5.11 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 0.5H), 5.08 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 0.5H), 5.04 (dd, $J=7.8, 4.4\text{Hz}$, 0.5H), 4.78 (dd, $J=7.6, 4.9\text{Hz}$, 0.5H), 4.69-4.62 (m, 1.5H), 4.57 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 0.5H), 4.52-4.47 (m, 0.5H), 4.34 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 0.5H), 4.22 (dtd, $J=16.7, 5.0, 3.4\text{Hz}$, 1H), 3.89 (q, $J=3.7\text{Hz}$, 0.5H), 3.85 (q, $J=3.7\text{Hz}$, 0.5H), 3.61 (tdd, $J=12.5, 5.1, 3.6\text{Hz}$, 1H), 3.51 (dtd, $J=12.0, 6.3, 3.9\text{Hz}$, 1H), 3.20-3.14 (m, 2H), 1.60-1.53 (m, 2H), 1.31 (p, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 1.28-1.15 (m, 13H), 0.93 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H), 0.85 (td, $J=7.1, 0.9\text{Hz}$, 3H) ppm。

[0859] ^{13}C NMR (151MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 156.71, 153.69, 153.64, 151.13, 151.02, 148.51, 147.69, 137.19, 136.43, 135.59, 135.17, 133.42, 133.24, 128.74, 128.34, 128.10, 123.97, 123.91, 116.89, 116.67, 93.20, 91.53, 85.92, 85.60, 85.05, 84.77, 78.82, 77.97, 74.07, 73.01, 69.60, 69.09, 61.49, 61.27, 57.54, 37.09, 36.76, 31.31, 31.28, 29.01, 28.96, 28.93, 28.83, 28.72, 28.69, 28.63, 24.98, 24.92, 23.06, 22.10, 19.21, 13.96, 13.49 ppm。

[0860] (6) 化合物8的合成

[0861] 在DMF (1.33mL) 中的2' 修饰鸟苷7 (100mg、0.166mmol) 的溶液中添加碘甲烷 (186mg、81.6 μL 、1.31mmol)。在室温搅拌12.5小时后, 在反应混合物中加入水 (15.0mL), 用二氯甲烷 (15.0mL) 萃取4次。将有机层浓缩, 将残留物溶解于丙酮 (2.00mL) 中。将溶液滴加到乙醚 (150mL) 中, 通过过滤收集所得到的沉淀物。使固体在减压下干燥, 作为黄色的固体得到目标化合物8 (107mg、75.4%的收率)。

[0862] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 9.56 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 0.5H), 9.45 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 0.5H), 7.98 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 0.2H), 7.82 (q, $J=8.7\text{Hz}$, 0.5H), 7.75 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 0.5H), 7.64 (dq, $J=10.5, 5.5\text{Hz}$, 2H), 7.40 (dtd, $J=14.8, 8.7, 5.4\text{Hz}$, 0.8H), 7.31-7.23 (m, 0.5H), 6.72 (s, 1H),

6.04 (q, J=3.6Hz, 0.5H), 5.89 (q, J=3.4Hz, 0.5H), 5.18-5.12 (m, 0.5H), 5.06 (q, J=6.6Hz, 0.5H), 4.96 (t, J=7.0Hz, 0.5H), 4.89 (t, J=7.1Hz, 0.5H), 4.78 (t, J=7.1Hz, 0.5H), 4.73 (t, J=7.0Hz, 0.5H), 4.56 (qt, J=8.5, 4.8Hz, 1H), 4.45 (dt, J=10.2, 5.0Hz, 0.5H), 4.23-4.11 (m, 3H), 4.00-3.91 (m, 1H), 3.79 (dt, J=12.7, 5.9Hz, 1H), 3.28 (dd, J=10.8, 6.2Hz, 1.5H), 3.02-2.81 (m, 1H), 1.76-1.62 (m, 4H), 1.44 (hept, J=7.4Hz, 2H), 1.27-1.13 (m, 14H), 1.00 (q, J=7.4Hz, 2.5H), 0.82 (q, J=7.1Hz, 2.5H) ppm。

[0863] ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ 162.91, 156.24, 155.98, 154.16, 153.87, 148.90, 148.65, 148.53, 147.91, 137.62, 137.37, 136.28, 136.15, 133.73, 133.56, 128.68, 128.60, 128.45, 124.30, 124.02, 108.76, 108.55, 94.32, 94.12, 88.95, 86.85, 86.38, 80.38, 80.27, 75.20, 74.77, 69.30, 68.87, 60.50, 60.23, 59.26, 50.06, 49.91, 49.77, 49.63, 49.48, 37.63, 37.55, 37.04, 36.97, 36.74, 31.98, 29.73, 29.58, 29.54, 29.41, 25.70, 25.43, 24.29, 22.75, 19.88, 14.19, 13.80 ppm。

[0864] (7) 化合物9的合成

[0865] 将磷酸三甲酯 (312 μL) 中的2'-C11Nb-N7-甲基-鸟苷 (8) (53.2mg、62.3 μmol) 的悬浮液冷却到-10 $^{\circ}\text{C}$ 。将2,6-二甲基吡啶 (15.3mg、16.7 μL 、143 μmol) 和磷酰氯 (21.9mg、13.4 μL 、143 μmol) 连续加入到混合物中。在-10 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌9小时后,在-10 $^{\circ}\text{C}$ 添加0.2M TEAB缓冲液 (pH7.9、500 μL) 将反应混合物猝灭。温热到室温后,将混合物用甲醇 (9.00mL) 稀释。将混合物进一步用50%甲醇/水 (~50mL) 稀释,使用CHROMATREX C8MB-100-40/75柱 (柱尺寸: $\phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ 、70 cm^3 (7mL/min) 进行纯化 (溶剂A:50mM TEAA缓冲液 (pH6.0、包含0.5% CH_3CN)、溶剂B: CH_3CN 、60分钟0-90%B梯度)。将包含靶标产物的组分合并、浓缩、冻结干燥,作为白色的固体得到靶标化合物9 (37.3mg、收率85.9%)。

[0866] ^1H NMR (600MHz, CD_3OD) δ 7.88-7.79 (m, 1H), 7.74-7.62 (m, 2H), 7.49-7.41 (m, 1H), 6.12 (d, J=3.5Hz, 0.5H), 5.96 (d, J=3.5Hz, 0.5H), 5.22 (dd, J=7.6, 4.5Hz, 0.5H), 5.12 (dd, J=7.6, 4.8Hz, 0.5H), 5.01 (d, J=7.1Hz, 0.5H), 4.77 (d, J=7.1Hz, 0.5H), 4.70 (d, J=7.0Hz, 0.5H), 4.61 (ddd, J=16.9, 4.8, 3.4Hz, 1H), 4.47 (t, J=5.1Hz, 0.5H), 4.41-4.34 (m, 0.5H), 4.24-4.16 (m, 1.5H), 4.13 (d, J=4.6Hz, 2H), 4.06 (d, J=1.4Hz, 1H), 4.04 (dd, J=4.7, 1.7Hz, 0.5H), 4.02 (dt, J=4.7, 1.4Hz, 0.5H), 3.24-3.19 (m, 3H), 3.16 (q, J=7.4Hz, 16H, 三乙铵), 1.91 (s, 10H, acetate), 1.67-1.61 (m, 4H), 1.39 (h, J=7.4Hz, 4H), 1.28 (t, J=7.4Hz, 25H, 三乙铵), 1.22 (d, J=13.0Hz, 14H), 1.00 (t, J=7.4Hz, 5H), 0.86 (dd, J=7.6, 6.5Hz, 3H) ppm。

[0867] ^{13}C NMR (151MHz, CD_3OD) δ 178.42 (acetate), 158.23, 158.05, 156.05, 155.91, 151.05, 150.87, 150.18, 149.47, 139.09, 138.56, 138.40, 134.49, 134.37, 129.79, 129.73, 129.67, 129.62, 129.37, 125.14, 125.06, 109.30, 109.10, 94.72, 94.62, 89.68, 89.63, 86.64, 86.40, 86.35, 81.47, 81.33, 80.84, 79.51, 79.29, 79.07, 75.88, 75.39, 69.89, 69.76, 64.26, 64.08, 59.49, 47.48, 38.63, 38.54, 36.70, 36.64, 33.04, 30.73, 30.70, 30.68, 30.64, 30.54, 30.49, 30.44, 26.64, 26.51, 24.76, 23.71, 22.96, 20.70, 14.45, 13.93, 9.10 ppm。

[0868] ^{31}P NMR (243MHz, CD_3OD) δ 1.65 ppm。

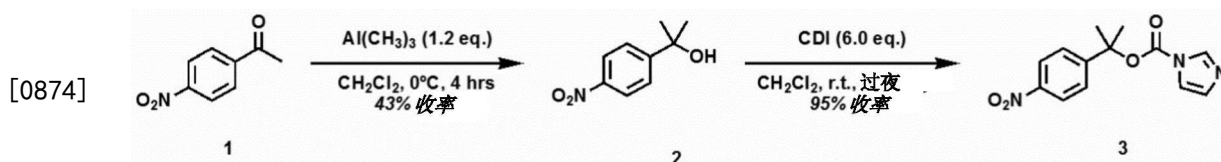
[0869] (8) 化合物10的合成

[0870] 在DMSO (1.07mL) 中的2'-Nb-N7-甲基-鸟苷-5'-一磷酸 (9) (37.3mg、53.5 μ mol) 的溶液中,加入鸟苷5'-二磷酸咪唑 (115mg、214 μ mol) 和氯化锌 (146mg、1.07毫摩尔)。将混合物在37 $^{\circ}$ C孵育2天。通过加入500mM的EDTA水溶液 (pH8.0、2.78mL、EDTA:1.39mmol) 将反应混合物猝灭后,用水 (10.0mL) 稀释。粗产物使用CHROMATREX C8MB-100-40/75柱 (柱尺寸: $\phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ 、 70cm^3 (7mL/min)、溶剂A:50mM TEAA缓冲液 (pH6.0、包含0.5%CH₃CN)、溶剂B:CH₃CN、60分钟0-90%B梯度) 纯化。将包含靶标产物的组分合并、浓缩、冻结干燥,以三乙基铵形态得到靶标化合物。将目标物的三乙基铵盐溶解于甲醇 (1.00mL) 中。将丙酮 (12.0mL) 中的0.19M NaClO₄的溶液加入到甲醇溶液中,得到白色的沉淀物。将悬浮液以4,500rpm离心分离15分钟。将上清液废弃,将沉淀物重悬于丙酮。进一步重复3次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标加帽化合物10。

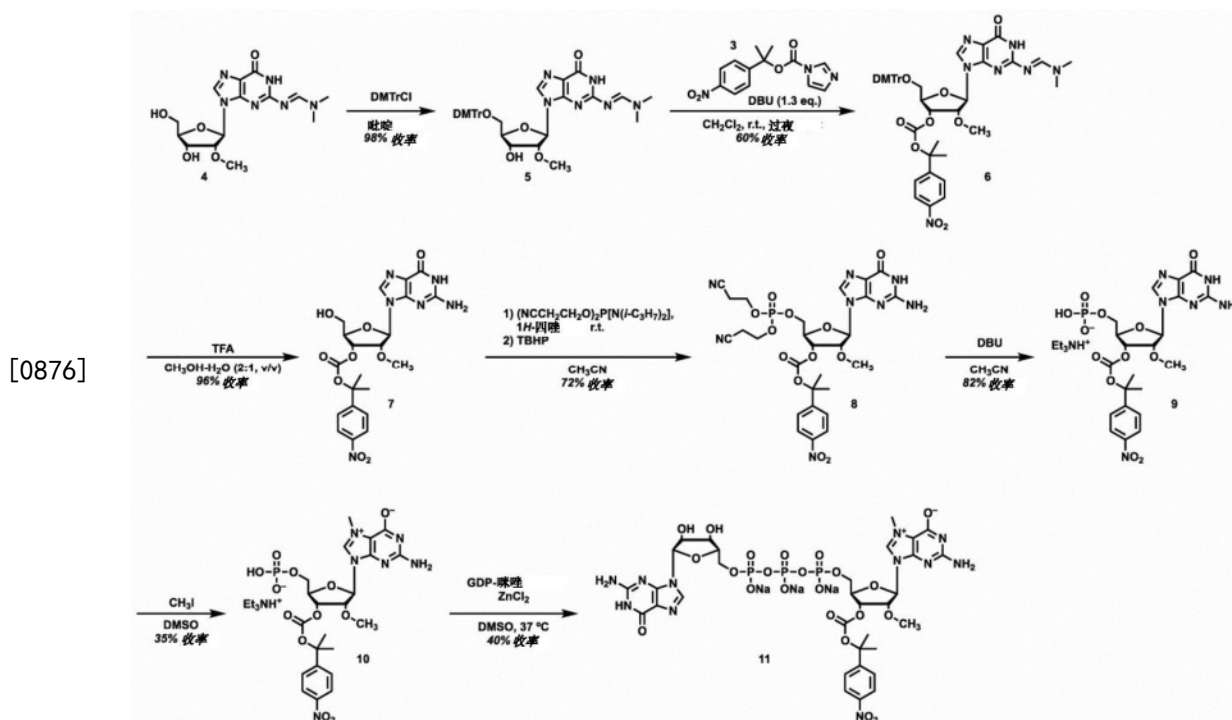
[0871] ESI-TOF-MS C₄₀H₅₆N₁₁O₂₁P₃ (M-2H)²⁻ calcd.m/z 559.6438, found m/z 559.6

[0872] 12. 能够通过还原条件除去的硝基苄基修饰二核苷酸加帽化合物的合成

[0873] 下述表示了能够通过还原条件除去的硝基苄基修饰二核苷酸加帽化合物的合成中使用的硝基苄基衍生物的合成方案。



[0875] 下述表示了能够通过还原条件除去的硝基苄基修饰二核苷酸加帽化合物的合成方案。



[0877] (1) 化合物2的合成

[0878] 将1-(4-硝基苯基)乙-1-酮(1)用甲苯 (25.0mL) 共沸3次,将残留物溶解于二氯甲烷 (100mL)。在混合物中以0 $^{\circ}$ C加入Al(CH₃)₃ (15.6mL、21.8mmol)。在0 $^{\circ}$ C搅拌4小时后,将反应

混合物通过添加丙酮(15.0mL)来猝灭,然后用饱和氯化铵水溶液(100mL)清洗。将混合物用二氯甲烷稀释,用水、饱和NaHCO₃水溶液、盐水清洗。将有机层用Na₂SO₄干燥、浓缩。将粗产物通过由1→3%甲醇/氯仿洗脱的硅胶柱色谱纯化,得到靶标化合物2(1.41g、7.78mmol、43%收率)。

[0879] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ8.19 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.67-7.64 (2H), 1.61 (s, 6H) ppm

[0880] (2) 化合物3的合成

[0881] 在二氯甲烷(40.8mL)中的硝基苯甲醇2(740mg、4.08毫摩尔)中加入1,1'-羰基咪唑(3.97g、24.5毫摩尔)。在室温搅拌过夜后,将反应混合物用二氯甲烷稀释,用水、饱和氯化铵水溶液清洗。将有机层用Na₂SO₄干燥、浓缩,得到靶标化合物3(1.08g、3.80mmol、95%收率)。

[0882] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.25 (dd, J=6.8, 2.0Hz, 2H), 8.13 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.59 (dd, J=7.1, 2.0Hz, 2H), 7.39 (t, J=1.4Hz, 1H), 7.09 (q, J=0.8Hz, 1H), 1.98 (s, 6H) ppm。

[0883] (3) 化合物5的合成

[0884] 在吡啶(34.6mL)中的N2保护-2'-O-甲基鸟苷(4)(1.20g、3.50毫摩尔)的溶液中加入DMTrCl(1.40g、4.20毫摩尔)。在室温搅拌过夜后,将反应混合物用二氯甲烷稀释,用水和盐水清洗。将有机层用Na₂SO₄干燥,用旋转蒸发器浓缩。将粗物质供于通过含有1.0%三乙胺的4.7%甲醇/氯仿洗脱的硅胶柱色谱,得到靶标化合物5(2.22g、3.40mmol、98%收率)。

[0885] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ11.39 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.19-7.37 (m, 9H), 6.82-6.86 (m, 4H), 5.96 (d, J=4.7Hz, 1H), 5.29 (d, J=5.8Hz, 1H), 4.33 (t, J=5.4Hz, 1H), 4.26 (t, J=5.0Hz, 1H), 4.01-4.03 (m, 1H), 3.73 (s, 6H), 3.38 (s, 3H), 3.24 (dd, J=10.4, 5.9Hz, 1H), 3.15 (dd, J=7.4, 2.7Hz, 1H), 3.10 (s, 3H), 3.03 (s, 3H) ppm

[0886] (4) 化合物6的合成

[0887] 将保护核苷5(2.0g、3.1毫摩尔)加入到二氯甲烷(31mL)和DBU(0.59mL、4.0毫摩尔)中的羰基咪唑化合物(1.1g、4.0毫摩尔)的溶液中。在室温搅拌过夜后,将反应混合物用二氯甲烷稀释,用水、饱和氯化铵水溶液清洗。将有机层用Na₂SO₄干燥、浓缩。将粗产物通过由4.8%甲醇/乙酸乙酯洗脱的硅胶柱色谱纯化,得到靶标化合物6(1.6g、1.9mmol、60%收率)。

[0888] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ11.43 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.17-8.18 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 7.65-7.61 (2H), 7.27 (dd, J=8.3, 1.5Hz, 2H), 7.19-7.23 (m, 3H), 7.13-7.15 (m, 4H), 6.77-6.80 (m, 4H), 5.98 (d, J=4.1Hz, 1H), 5.44 (t, J=5.6Hz, 1H), 4.74 (t, J=4.9Hz, 1H), 4.17 (d, J=4.1Hz, 1H), 3.72 (d, J=6.1Hz, 6H), 3.28 (s, 3H), 3.13-3.21 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.89-2.82 (3H), 1.82-1.78 (3H), 1.75 (s, 3H) ppm。

[0889] (5) 化合物7的合成

[0890] 在THF(17.8mL)和水(8.9mL)中的保护鸟苷6(2.1g、2.4mmol)的混合物中加入三氟乙酸(12.3L、160mmol)。在室温搅拌5小时后,将反应混合物用氯仿稀释,用水、饱和碳酸氢钠水溶液清洗。将有机层浓缩,通过由7.4%甲醇/氯仿洗脱的硅胶柱色谱进行纯化,得到靶标化合物7(1.1g、2.2mmol、92%收率)。

[0891] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ10.76 (s, 1H), 8.24 (dt, J=9.5, 2.3Hz, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.66 (dt, J=9.5, 2.3Hz, 2H), 6.57 (s, 2H), 5.79 (d, J=7.1Hz, 1H), 5.17 (q, J=2.3Hz,

1H), 4.51 (dd, $J=7.3, 4.9\text{Hz}$, 1H), 4.12 (td, $J=4.0, 1.9\text{Hz}$, 1H), 3.56-3.61 (m, 2H), 3.18 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 1.75 (s, 3H) ppm

[0892] (6) 化合物8的合成

[0893] 在鸟苷衍生物 (7) (290mg、570 μmol) 中, 添加在 CH_3CN (5.70mL) 中的双 (2-氰基乙基) N,N-二异丙基亚磷酰胺 (230mg、850 μmol) 的溶液。将1H-四唑 (60.0mg、850 μmol) 加入到混合物中, 以室温搅拌3小时后, 在反应混合物中加入在癸烷溶液 (320 μL 、1.6~1.9毫摩尔) 中的5~6M的叔丁基过氧化氢。将反应混合物进一步在室温搅拌1小时, 用二氯甲烷稀释。将混合物用饱和碳酸氢钠水溶液清洗。将有机层用 Na_2SO_4 干燥、浓缩。将残留物通过由9.1%甲醇/氯仿洗脱的硅胶柱色谱纯化, 得到目标化合物8 (280mg、410 μmol 、72%收率)。

[0894] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.73 (s, 1H), 8.23-8.25 (m, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.67 (dd, $J=7.0, 2.0\text{Hz}$, 2H), 6.53 (s, 2H), 5.83 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 5.25 (q, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 4.54 (dd, $J=7.2, 5.2\text{Hz}$, 1H), 4.34-4.37 (m, 1H), 4.28-4.31 (m, 2H), 4.14-4.21 (m, 4H), 3.21-3.16 (3H), 2.90 (ddd, $J=16.4, 5.8, 0.9\text{Hz}$, 4H), 1.83 (s, 3H), 1.76 (s, 3H) ppm。

[0895] ^{31}P NMR (161MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -1.60 (s, 1P) ppm

[0896] (7) 化合物9的合成

[0897] 在核苷一磷酸衍生物 (8) (250mg、0.360mmol) 的乙腈 (3.60mL) 溶液中, 连续加入N, O-双 (三甲基甲硅烷基) 乙酰胺 (0.890mL、3.60mmol) 和1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯 (0.220mL、1.45mmol)。在室温搅拌1小时后, 通过加入2M TEAB缓冲液 (pH7.7、0.730mL) 将反应混合物猝灭。将混合物用水稀释, 用氯仿清洗3次。水层使用DEAE Sephadex A-25、 $\Phi=4.5\text{cm}$ 、 $h=8.4\text{cm}$ (140 cm^3)、流量: 12mL/min、溶剂A: 水、溶剂B: 1.5M TEAB缓冲液 (pH7.7、包含10%的 CH_3CN) 纯化。收集包含目标产物的组分, 用Wakosil (注册商标) 25C18 (粒度: 15~30 μm (球形)、柱尺寸: $\Phi=1.3\text{cm}$ 、 $h=4.0\text{cm}$ 、21 cm^3)、溶剂A: 水、溶剂B: 甲醇) 脱盐。将包含产物的组分合并浓缩, 得到靶标化合物9 (221mg、0.310mmol、86%收率)。

[0898] ^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 8.25 (dd, $J=7.0, 2.0\text{Hz}$, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.68 (dd, $J=7.1, 2.1\text{Hz}$, 2H), 5.84 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 5.40 (dd, $J=5.0, 1.9\text{Hz}$, 1H), 4.66 (dd, $J=7.3, 5.0\text{Hz}$, 1H), 4.46 (d, $J=3.8\text{Hz}$, 1H), 4.04 (dd, $J=4.7, 3.4\text{Hz}$, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.19 (q, $J=7.3\text{Hz}$, 8H), 1.90 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.27 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 12H) ppm。

[0899] ^{31}P NMR (161MHz, D_2O) δ 1.66 ppm。

[0900] (8) 化合物10的合成

[0901] 在DMSO (1.22mL) 中的修饰鸟苷一磷酸三乙基铵盐9 (100mg、0.150mmol) 的溶液中加入碘甲烷 (73.0 μL 、1.17mmol)。在室温搅拌过夜后, 将反应混合物用水稀释, 用氯仿清洗3次。将水层使用DEAE Sephadex A-25、 $\Phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ (70 cm^3)、流速: 6mL/min、溶剂A: 水、溶剂B: 1.0M TEAA缓冲液 (pH7.0、包含10% CH_3CN) 纯化。收集包含目标产物的组分, 用Wakosil (注册商标) 25C18 (粒度: 15~30 μm (球形)、柱尺寸: $\Phi=1.3\text{cm}$ 、 $h=4.0\text{cm}$ 、21 cm^3)、溶剂A: 水、溶剂B: 甲醇) 脱盐。将包含产物的组分合并浓缩, 得到靶标化合物10 (28.6mg、43.0 μmol 、33%收率)。

[0902] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.27 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.69 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 6.07 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.55 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 2H), 4.12 (s, 1H), 4.10 (s, 3H), 3.99 (d, $J=$

10.5Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.19 (q, J=7.4Hz, 4H), 1.89 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.27 (t, J=7.5Hz, 6H) ppm。

[0903] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ 2.49 (s, 1P) ppm

[0904] (9) 化合物11的合成

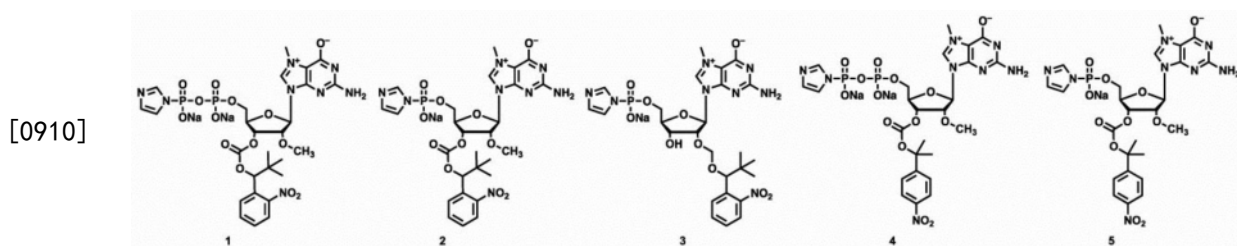
[0905] 在DMSO (300 μL) 中的2'-OMe-3'-Nb-N7m-鸟苷一磷酸10 (20mg、30 μmol) 和GDP-咪唑 (48mg、90 μmol) 中加入2-硝基咪唑 (10mg、90 μmol)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌2天后, 将反应混合物用水稀释, 用氯仿清洗。水层使用DEAE Sephadex A-25、 $\Phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ (70 cm^3)、流速: 6mL/min、溶剂A: 水、溶剂B: 1.0M TEAA缓冲液 (pH7.0、包含10% CH_3CN) 纯化。收集包含目标产物的组分, 用Wakosil (注册商标) 25C18 (粒度: 15~30 μm (球形)、柱尺寸: $\phi=1.3\text{cm}$ 、 $h=4.0\text{cm}$ 、21 cm^3)、溶剂A: 水、溶剂B: 甲醇) 脱盐。将包含产物的组分合并浓缩, 以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将作为目标化合物的三乙基铵型的水溶液通过由H型的Dowex (注册商标) 50W-X2树脂填满的柱子, 滴加到三乙胺 (10当量) 和乙醇 (0.5M 三乙胺) 的混合物中。用水清洗直到洗脱液的pH达到中性后, 将混合物浓缩并冻结干燥, 以钠盐形态得到靶标化合物11 (11.4mg、11.0 μmol 、37% 收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数 (ϵ_{260}) = 28,293 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

[0906] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.25 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.67 (d, J=9.0Hz, 2H), 5.86 (d, J=5.4Hz, 1H), 5.73 (d, J=6.1Hz, 1H), 5.24 (dd, J=4.9, 3.6Hz, 1H), 4.62 (t, J=5.6Hz, 1H), 4.52 (t, J=2.8Hz, 1H), 4.43 (dd, J=5.2, 3.6Hz, 1H), 4.38 (t, J=5.3Hz, 1H), 4.31-4.35 (m, 1H), 4.28 (t, J=4.2Hz, 1H), 4.23-4.25 (m, 1H), 4.21 (t, J=2.9Hz, 1H), 4.17-4.19 (m, 1H), 4.07 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.79 (d, J=7.6Hz, 3H) ppm。

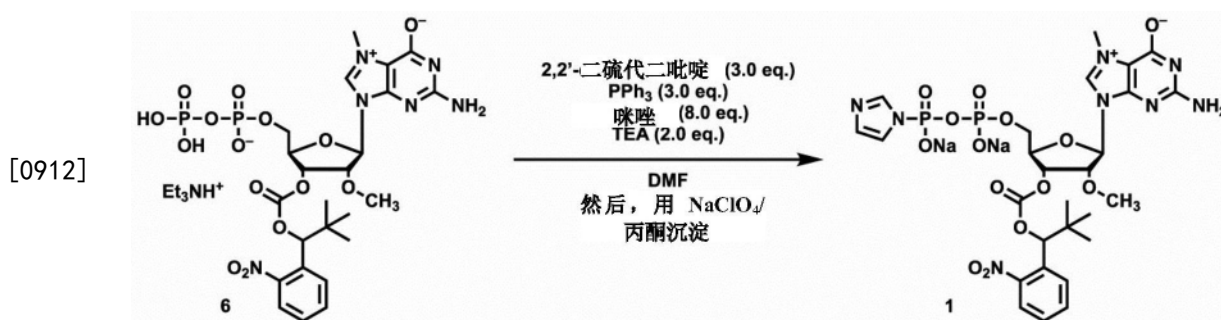
[0907] ^{31}P NMR (161MHz, D_2O) δ -10.97 (t, J=23.3Hz, 2P), -22.56 (t, J=21.2Hz, 1P) ppm

[0908] 13. 化学加帽化中使用的新型硝基苄基修饰核苷酸磷酰咪唑的合成

[0909] 下述表示了新型硝基苄基修饰核苷酸磷酰咪唑化合物的结构。



[0911] (1) 化合物1的合成



[0913] 在N,N-二甲基甲酰胺中的N7-甲基-鸟苷-5'-二磷酸6 (73.3mg、90.8 μmol)、咪唑 (49.4mg、726 μmol) 和2,2'-二硫代二吡啶 (59.9mg、272 μmol) 的溶液 (1.08mL) 中加入三乙胺

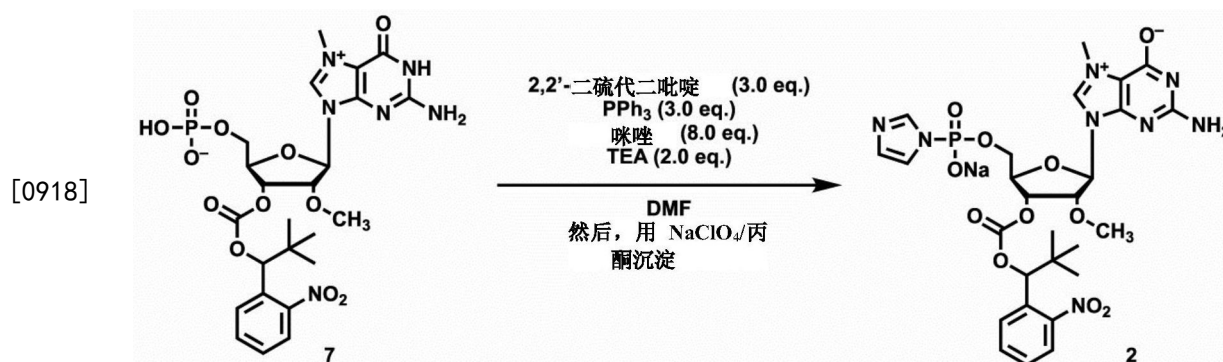
(25.4 μ L、18.4mg、182 μ mol),接着加入三苯基膦(71.3mg、272 μ mol)。以室温搅拌23小时后,将反应混合物一边搅拌一边滴加在4%三乙胺/干燥丙酮(27.3mL)中的高氯酸钠(66.7mg、545 μ 摩尔)的溶液。将所得到的悬浮液以4,000rpm离心分离20分钟。将上清液废弃,将沉淀物用干燥丙酮冲洗4次。使固体在减压下干燥,作为白色的固体得到N7-甲基-鸟苷5'-二磷酸咪唑二钠盐1(65.0mg、收率89.4%)。

[0914] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 9.82 (d, $J=16.7\text{Hz}$, 1H), 7.98 (dd, $J=8.4, 3.9\text{Hz}$, 1H), 7.81 (q, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.69 (d, $J=11.5\text{Hz}$, 1.5H), 7.62 (q, $J=8.1\text{Hz}$, 1.5H), 7.17 (s, 1H), 6.78 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 1H), 6.25 (s, 0.5H), 6.10 (s, 0.5H), 5.95 (dd, $J=14.7, 6.2\text{Hz}$, 1H), 5.36-5.23 (m, 1H), 4.76 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 0.2H), 4.66-4.55 (m, 0.8H), 4.41-4.31 (m, 1H), 4.02 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 3.92-3.75 (m, 2H), 3.45 (s, 1.5H), 3.00 (s, 1.5H), 0.92 (d, $J=16.3\text{Hz}$, 9H) ppm。

[0915] ^{13}C NMR (151MHz, DMSO- d_6) δ 160.96, 153.28, 153.19, 149.91, 149.08, 148.90, 139.29, 134.79, 133.15, 131.57, 130.98, 129.62, 129.46, 129.12, 128.41, 127.94, 127.88, 124.61, 124.52, 120.14, 107.50, 85.74, 82.94, 82.08, 81.78, 79.82, 79.51, 75.71, 75.46, 68.54, 63.74, 58.67, 58.35, 55.85, 36.07, 35.67, 35.44, 32.14, 30.72, 29.62, 29.57, 25.53, 25.26 ppm。

[0916] ^{31}P NMR (243MHz, DMSO- d_6) δ -10.50 (d, 1P), -19.02 (d, 1P) ppm。

[0917] (2) 化合物2的合成



[0919] 在N,N-二甲基甲酰胺中的N7-甲基-鸟苷-5'-一磷酸7(12.3mg、19.6 μ mol)、咪唑(10.7mg、157 μ mol)和2,2'-二硫代二吡啶(13.0mg、58.8 μ mol)的溶液(233 μ L)中加入三乙胺(5.48 μ L、3.97mg、39.2 μ mol),接着加入三苯基膦(15.4mg、58.8 μ mol)。以室温搅拌23小时后,将反应混合物一边搅拌一边滴加在4%三乙胺/干燥丙酮(5.90mL)中的高氯酸钠(14.4mg、118 μ 摩尔)的溶液。将所得到的悬浮液以4,000rpm离心分离20分钟。将上清液废弃,将沉淀物用干燥丙酮冲洗5次。使固体在减压下干燥,作为白色的固体得到N7-甲基-鸟苷5'-二磷酸咪唑二钠盐2(11.6mg、收率85.0%)。

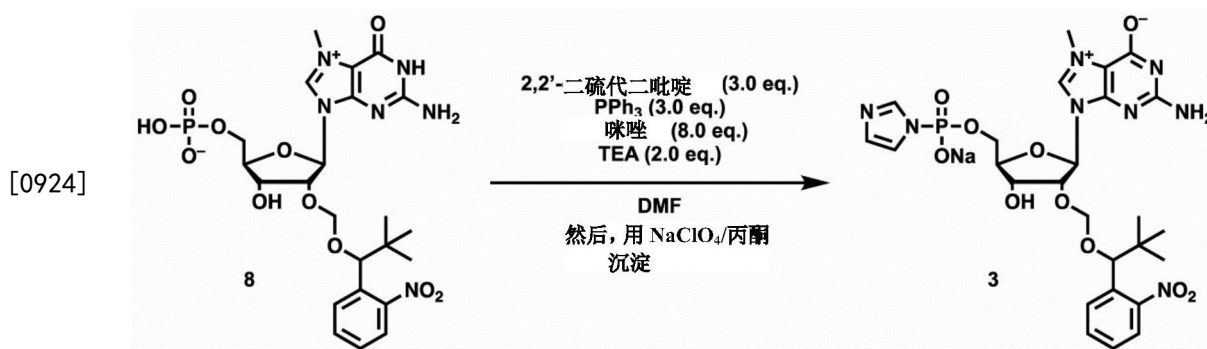
[0920] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 9.47-9.31 (m, 1H), 7.94 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.77 (dt, $J=15.4, 7.8\text{Hz}$, 1H), 7.69 (d, $J=9.9\text{Hz}$, 1H), 7.65-7.51 (m, 3H), 7.14-7.00 (m, 1H), 6.87-6.77 (m, 1H), 6.18 (s, 0.5H), 6.03 (s, 0.5H), 5.91 (dd, $J=16.4, 6.0\text{Hz}$, 1H), 5.13-5.02 (m, 1H), 4.54 (d, $J=11.6\text{Hz}$, 1H), 4.41 (t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 4.32-4.21 (m, 1H), 4.13-4.05 (m, 1H), 4.01-3.95 (m, 3H), 3.72 (s, 1H), 3.37 (s, 1.5H), 2.92 (s, 1.5H), 0.92-0.82 (2s, 6H), 0.75-0.62 (2s, 3H) ppm。

[0921] ^{13}C NMR (151MHz, DMSO- d_6) δ 161.78, 153.56, 149.58, 139.69, 133.64, 130.14,

129.04, 128.92, 125.03, 120.34, 108.52, 83.59, 81.93, 81.65, 80.36, 69.05, 59.28, 58.50, 56.37, 36.56, 36.16, 35.90, 32.65, 31.24, 30.14, 26.03, 25.92, 25.76 ppm。

[0922] ^{31}P NMR (243MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -9.63 ppm。

[0923] (3) 化合物3的合成



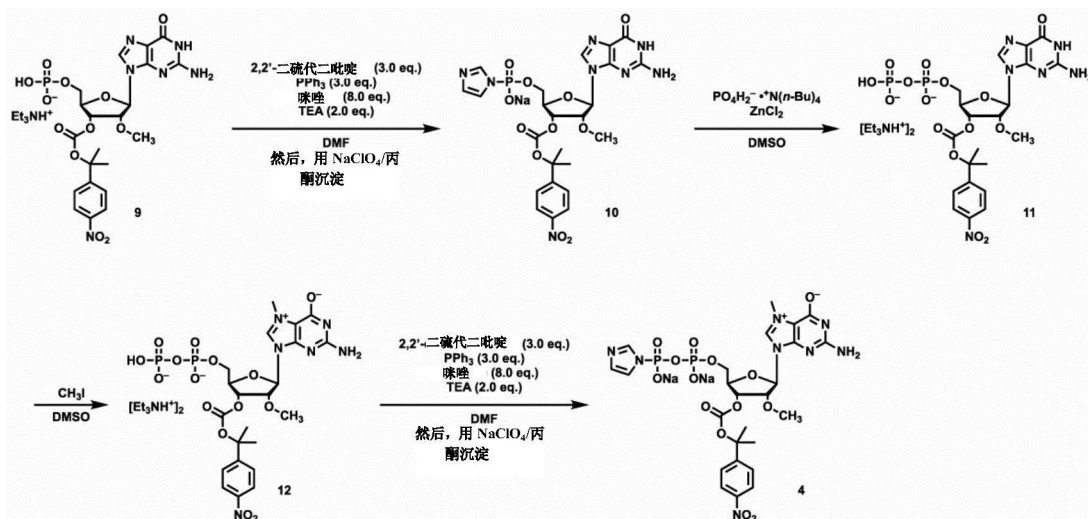
[0925] 在N,N-中的N7-甲基-鸟苷-5'-一磷酸8 (19.2mg、32.1 μmol)、咪唑 (17.5mg、257 μmol) 和2,2'-二硫代二吡啶 (21.2mg、96.3 μmol) 的溶液中,加入二甲基甲酰胺 (382 μL) 中的三乙胺 (9.00 μL 、6.50mg、64.2 μmol),接着加入三苯基膦 (25.3mg、96.3 μmol)。在室温搅拌16.5小时后,将反应混合物一边搅拌一边滴加在4%三乙胺/干燥丙酮 (9.65mL) 中的高氯酸钠 (23.6mg、193 μmol) 的溶液。将所得到的悬浮液以4,500rpm离心分离20分钟。将上清液废弃,将沉淀物用干燥丙酮冲洗4次。使固体在减压下干燥,作为淡黄色的固体得到N7-甲基-鸟苷5'-一磷酰咪唑一钠盐3 (18.5mg、收率86.0%)。

[0926] ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.50 (s, 0.5H), 9.28 (s, 0.5H), 7.80 (dd, $J=8.1, 1.4\text{Hz}$, 0.5H), 7.73-7.62 (m, 1H), 7.60 (dt, $J=9.5, 1.1\text{Hz}, 1.5\text{Hz}$, 1.5H), 7.60-7.49 (m, 2.5H), 7.50 (ddd, $J=8.5, 7.4, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.39 (ddd, $J=8.4, 6.6, 2.1\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 7.07 (dq, $J=17.3, 1.4\text{Hz}$, 1H), 6.82 (dq, $J=9.4, 1.3\text{Hz}, 1\text{H}$), 6.46 (s, 2.5H), 5.95 (d, $J=5.4\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 5.72 (d, $J=4.3\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 5.41 (d, $J=5.9\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 5.34 (d, $J=4.8\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 4.99 (s, 0.5H), 4.87-4.78 (m, 1H), 4.73-4.61 (m, 1.5H), 4.45 (d, $J=7.1\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 4.41 (t, $J=4.5\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 4.17 (q, $J=5.0\text{Hz}, 0.5\text{H}$), 4.08-3.85 (m, 6.5H), 3.74-3.62 (m, 1H), 0.70 (s, 4H), 0.62 (s, 5H) ppm。

[0927] ^{31}P NMR (243MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -9.53, -9.57 ppm。

[0928] HRESIMS calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{P}$, 647.1984 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found 647.2036.

[0929] 下述表示了能够通过还原条件除去的确基苄基修饰核苷酸磷酰咪唑化合物的合成方案。



[0930]

[0931] (4) 化合物10的合成

[0932] 向3'-Nb-鸟苷-5'-一磷酸三乙基铵盐9 (85mg、0.14mmol)、咪唑 (79mg、1.16mmol) 和2,2'-二硫代二吡啶 (96mg、0.47mmol) 的N溶液中,加入N-二甲基甲酰胺(1.45mL)中的三乙胺(41μL、70.29mmol),接着加入三苯基膦(110mg、0.47mmol)。在室温搅拌过夜后,将反应混合物一边搅拌一边滴加4%三乙胺/干燥丙酮(44mL)中的高氯酸钠(110mg、0.87mmol)的溶液。将悬浮液以4,500rpm离心分离20分钟。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复3次悬浮离心分离过程。使固体在减压下干燥,得到3'-Nb-鸟苷5'-一磷酸磷酰咪唑二钠盐10 (70mg、0.11mmol、79%的收率)。

[0933] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 10.71 (s, 1H), 8.23 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 8.00 (s, 1H), 7.66 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.63-7.65 (m, 2H), 7.08 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.67 (s, 2H), 5.75-5.76 (m, 1H), 5.08 (dd, $J=4.8, 1.0\text{Hz}$, 1H), 4.60 (dd, $J=7.5, 4.8\text{Hz}$, 1H), 4.13 (t, $J=4.1\text{Hz}$, 1H), 3.73-3.86 (m, 2H), 3.12 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.74 (s, 3H) ppm。

[0934] ^{31}P NMR (243MHz, DMSO- d_6) δ -9.90ppm。

[0935] (5) 化合物11的合成

[0936] 在DMSO (0.51mL) 中的3'-Nb-鸟苷-一磷酸磷酰咪唑10 (34mg、51μmol) 的溶液中连续加入三乙胺 (58μL、0.41mmol)、氯化锌 (56mg、0.41mmol) 和四丁基铵二氢磷酸盐 CH_3CN 溶液 (0.1M、5.1mL、0.51毫摩尔)。在室温搅拌2天后,将反应混合物通过添加50mM的EDTA来猝灭,用水稀释。将混合物用氯仿清洗,将水层使用DEAE Sephadex A-25、 $\Phi=4.5\text{cm}$ 、 $h=8.4\text{cm}$ (140 cm^3)、流速:12mL/min、溶剂A:水、溶剂B:1.5M TEAB缓冲液 (pH7.7、包含10%的 CH_3CN) 进行纯化。收集包含目标产物的组分,用Wakosil (注册商标) 25C18 (粒度:15~30μm (球形)、柱尺寸: $\Phi=1.3\text{cm}$ 、 $h=4.0\text{cm}$ 、21 cm^3)、溶剂A:水、溶剂B:甲醇) 脱盐。将包含产物的组分合并浓缩,作为三乙基铵盐11得到靶标化合物 (20mg、23μmol、46%收率)。

[0937] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.19 (s, 1H), 8.16 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.62 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 5.81 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 5.41 (dd, $J=4.9, 1.5\text{Hz}$, 1H), 4.63 (dd, $J=7.3, 4.9\text{Hz}$, 1H), 4.48 (s, 1H), 4.16 (d, $J=3.7\text{Hz}$, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.16 (q, $J=7.4\text{Hz}$, 12H), 1.86 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.24 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 18H) ppm。

[0938] ^{31}P NMR (241MHz, D_2O) δ -10.19 (s, 1P), -10.92 (d, $J=19.7\text{Hz}$, 1P) ppm。

[0939] (6) 化合物12的合成

[0940] 在DMSO(0.58mL)中的修饰鸟苷二磷酸三乙基铵盐11(60mg、69 μ mol)的溶液中添加碘甲烷(43 μ L、0.69mmol)。在室温搅拌过夜后,将反应混合物用水稀释,用氯仿清洗3次。水层使用QAE Sephadex A-25、 $\Phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ (70 cm^3)、流速:6mL/min、溶剂A:水、溶剂B:1.0M TEAA缓冲液(pH7.0、包含10%的 CH_3CN)纯化。收集包含目标产物的组分,用Wakosil(注册商标)25C18(粒度:15~30 μm (球形)、柱尺寸: $\phi=1.3\text{cm}$ 、 $h=4.0\text{cm}$ 、21 cm^3)、溶剂A:水、溶剂B:甲醇)脱盐。将包含产物的组分合并浓缩,得到靶标化合物12(30.5mg、39.0 μ mol、56%收率)。

[0941] ^1H NMR(400MHz, D_2O) δ 8.26(d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 7.68(d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 6.06(d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H), 5.34(dd, $J=4.8, 3.3\text{Hz}$, 1H), 4.58(d, $J=3.8\text{Hz}$, 1H), 4.56(d, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 4.14-4.30(m, 2H), 4.10(s, 3H), 3.34(s, 3H), 3.19(q, $J=7.3\text{Hz}$, 7H), 1.89(s, 3H), 1.79(s, 3H), 1.26(t, $J=7.3\text{Hz}$, 10H) ppm。

[0942] ^{31}P NMR(161MHz, D_2O) δ -9.96(d, $J=21.2\text{Hz}$, 1P), -10.84(d, $J=21.2\text{Hz}$, 1P) ppm。

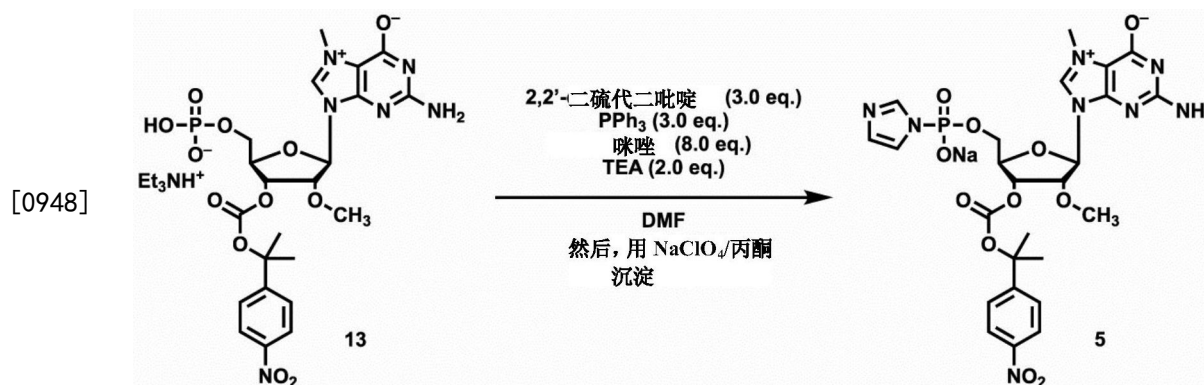
[0943] (7) 化合物4的合成

[0944] 在3'-Nb-N7-甲基-鸟苷-5'-二磷酸三乙基铵盐12(19mg、24 μ mol)、咪唑(13mg、0.19mmol)和2,2'-二硫代二吡啶(16mg、71 μmol , N-二甲基甲酰胺(0.24mL)中的 μmol)中加入三乙胺(6.6 μL 、47 μmol),接着加入三苯基膦(19mg、71 μmol)。在室温搅拌过夜后,将反应混合物一边搅拌一边滴加4%三乙胺/干燥丙酮(7.1mL)中的高氯酸钠(17mg、71 μmol)的溶液。将悬浮液以4,500rpm离心分离20分钟。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复3次悬浮离心分离过程。使固体在减压下干燥,得到3'-Nb-N7-甲基-鸟苷5'-二磷酸磷酰咪唑二钠盐4(20mg、24 μmol 、定量的)。

[0945] ^1H NMR(600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.78(s, 1H), 8.24(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.71(s, 1H), 7.68(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.17(s, 1H), 6.85(s, 2H), 6.80(s, 1H), 5.97(d, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 5.17-5.19(m, 1H), 4.60(t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 4.34(s, 1H), 4.02(s, 3H), 3.77-3.92(m, 2H), 3.28(s, 3H), 1.83(s, 3H), 1.76(s, 3H) ppm。

[0946] ^{31}P NMR(243MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -10.44(d, $J=21.2\text{Hz}$, 1P), -18.99(d, $J=21.2\text{Hz}$, 1P) ppm。

[0947] (7) 化合物5的合成



[0949] 在3'-Nb-N7-甲基-鸟苷-5'-一磷酸三乙基铵盐13(22mg、36 μmol)、咪唑(20mg、0.11mmol)和2,2'-二硫代二吡啶(24mg、0.11)的N,N-二甲基甲酰胺(0.37mL)中的毫摩尔

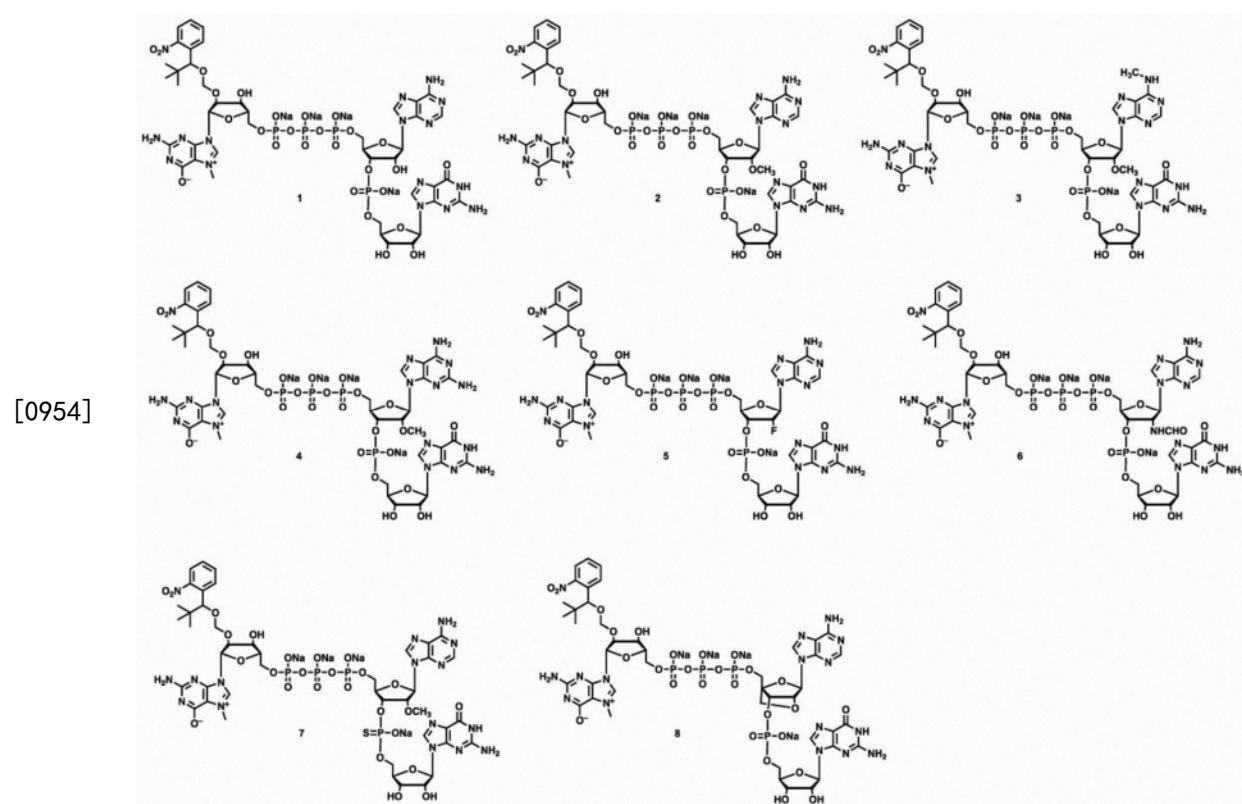
的溶液中加入三乙胺(10 μ L、72 μ mol),接着加入三苯基膦(29mg、0.11毫摩尔)。在室温搅拌过夜后,将反应混合物一边搅拌一边滴加在4%三乙胺/干燥丙酮(11mL)中的高氯酸钠(27mg、0.22mmol)的溶液。将悬浮液以4,500rpm离心分离20分钟。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复3次悬浮离心分离过程。使固体在减压下干燥,得到3'-Nb-N7-甲基-鸟苷5'-一磷酸磷酰咪唑二钠盐(21.4mg、32 μ mol、89%收率)。

[0950] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 9.42 (s, 1H), 8.23 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.65 (d, J=8.5Hz, 3H), 7.12-7.09 (1H), 6.86 (s, 1H), 6.71 (s, 2H), 5.97 (d, J=5.4Hz, 1H), 5.02 (t, J=4.1Hz, 1H), 4.50 (d, J=10.2Hz, 1H), 4.29 (d, J=3.4Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 3.99 (dd, J=7.1, 4.4Hz, 1H), 3.76-3.79 (m, 1H), 3.26-3.24 (3H), 1.81 (s, 3H), 1.74 (s, 3H) ppm。

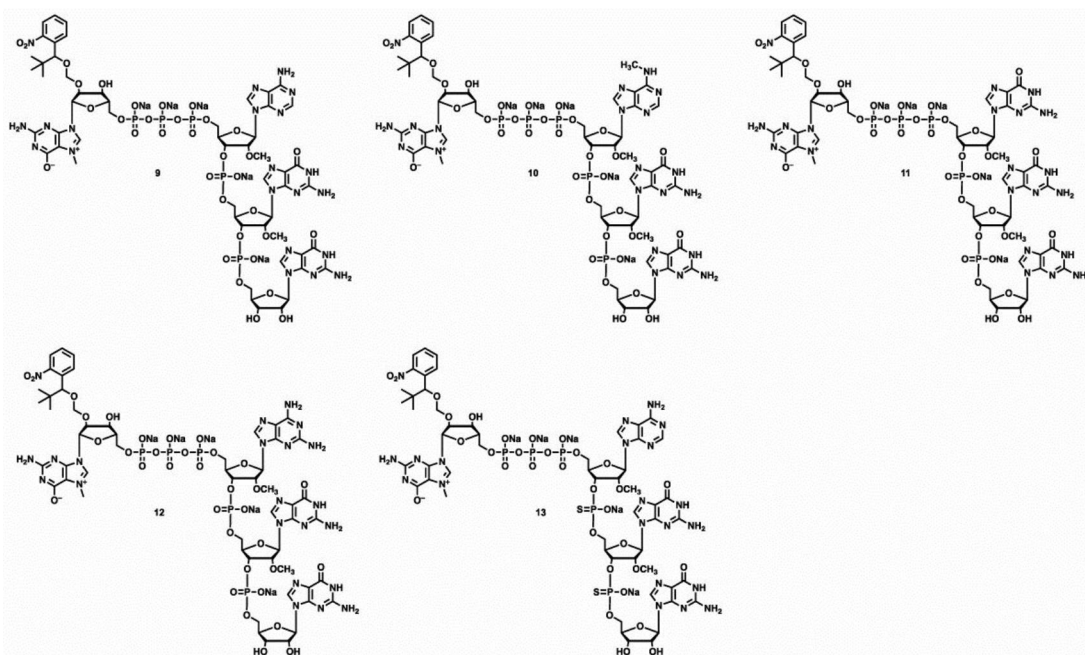
[0951] ^{31}P NMR (243MHz, DMSO- d_6) δ -9.64 (s, 1P) ppm。

[0952] 14. 三核苷酸-四核苷酸型加帽化合物的合成

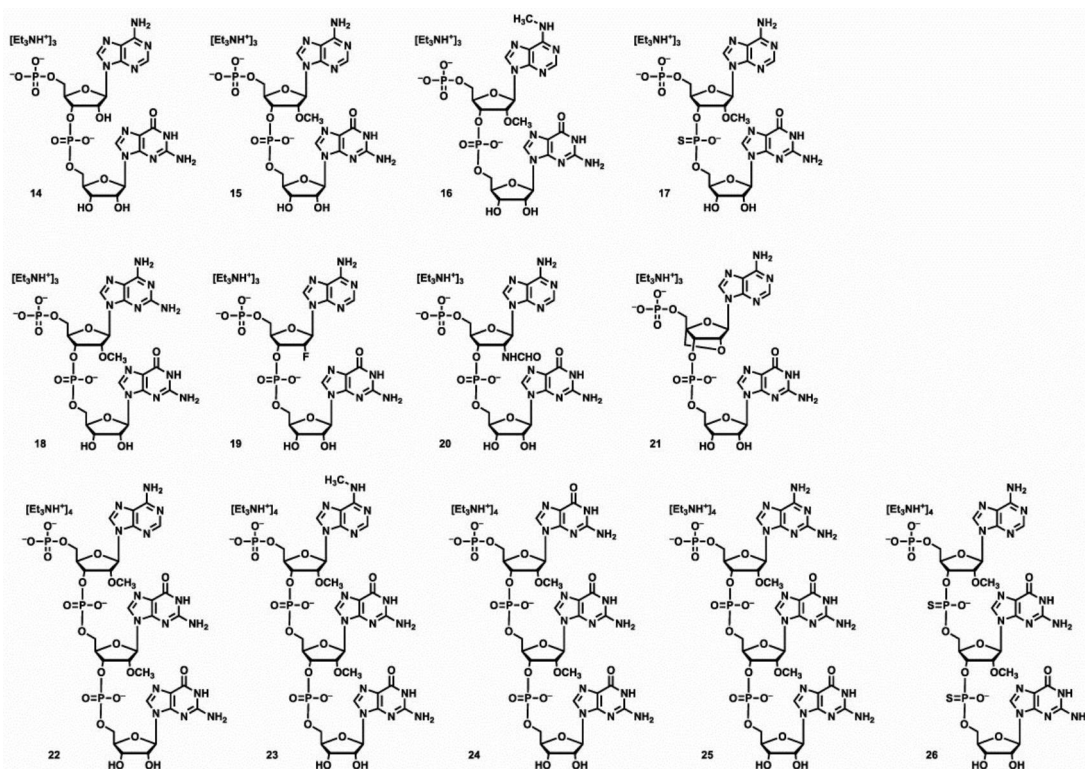
[0953] 下述表示了硝基苄基修饰三核苷酸型加帽化合物的结构。



[0955] 下述表示了硝基苄基修饰四核苷酸型加帽化合物的结构。



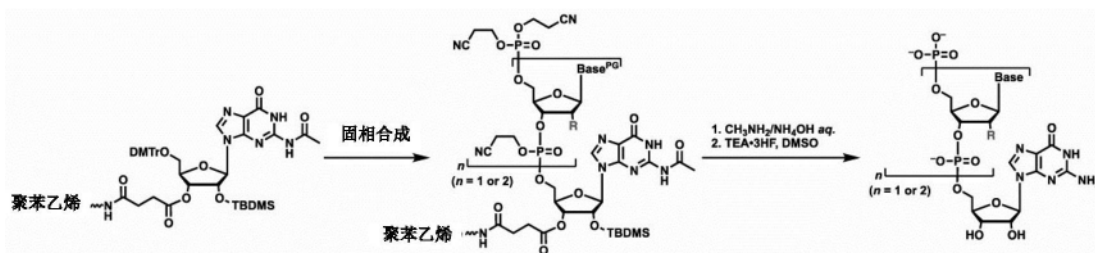
[0957] 下述表示了硝基苄基修饰三核苷酸-四核苷酸型加帽化合物的合成所需的二核苷酸-三核苷酸的结构。



[0959] (1) 二核苷酸-三核苷酸(化合物14~26)的合成

[0960] 下述表示了二核苷酸-三核苷酸(化合物14~26)的合成方案。R包含各种化学修饰。

[0961]

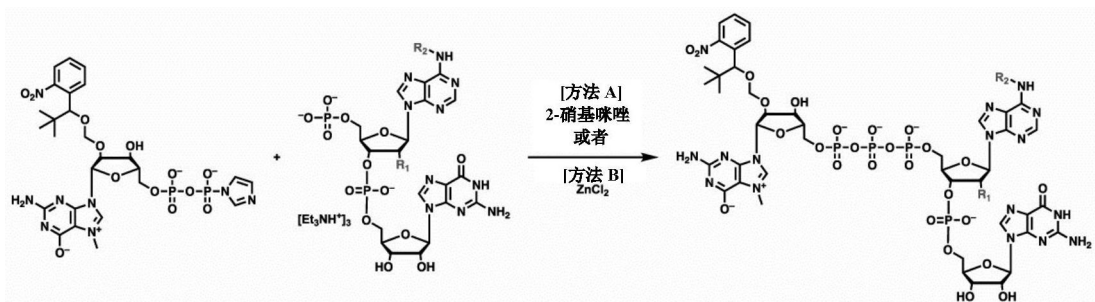


[0962] 二核苷酸和三核苷酸的合成利用Primer Support 5GriboG300 (Cytiva、15.0 μ mol规模的合成)通过DNA/RNA合成仪NR-2A_7MX (Nihon Techno Service Co., Ltd.、牛久、茨城、日本)实行。在偶联步骤中,使CH₃CN中的100mM 2'-O-甲基-腺苷(n-苯甲酰基)-CE-亚磷酰胺(ChemGenes)、CH₃CN中的100mM 2'-O-甲基-N6-甲基-腺苷(n-苯甲酰基)-CE-亚磷酰胺(按照文献合成:Nucleic acid res., 2020, 48(4)、1607-1626)、100mM 2'-O-甲基-鸟苷(n-i-Bu)-CE-亚磷酰胺(ChemGenes) CH₃CN、10mM 2'-F-腺苷(n-苯甲酰基)-CE-亚磷酰胺(ChemGenes)、CH₃CN、100mM LNA(MBN)腺苷(n-苯甲酰基)-CE-亚磷酰胺(ChemGenes)、CH₃CN、100mM CH₃CN中的2'-甲酰胺-腺苷(n-苯甲酰基)-CE-亚磷酰胺、CH₃CN中的100mM 2'-OMe-2,6-二氨基嘌呤-CE亚磷酰胺(Glen Research)、50~70mM 5'-DMTr-2CH₃CN中的'-TOM-核糖腺苷(n-乙酰基)OP(ChemGenes)、CH₃CN中的150mM双(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺、和CH₃CN中的0.3M 5-(苄基硫基)-1H-四唑(活性剂)在柱中循环。使用184mM三氯乙酸/二氯甲烷的溶液作为脱三苯甲基化试剂,氧化中,使用吡啶/H₂O(9:1、v/v)中的0.05M I₂、THF/吡啶中的10%Ac₂O(8:1、v/v)作为CapA,作为CapB使用THF中的10%1-甲基咪唑。合成利用10 μ mol规模的标准RNA合成步骤进行。合成的最后循环之后,将固体支撑体用28%氢氧化铵/40%甲基胺水溶液的1:1混合物在65℃处理1~2小时(1.00mL/15.0 μ mol的固体支撑体),从固体支撑体切下核苷酸,将保护基除去。将所得到的核苷酸浓缩干燥固化,再溶解于DMSO(1.00mL/60.0 μ mol)。在该溶液中加入TEA·3HF(1.00mL/60.0 μ mol),以65℃孵育3~5小时,除去2'-O-甲硅烷基保护基。通过添加250mM Na₂CO₃水溶液,将反应混合物中和(10.0mL/60.0 μ mol)。粗产物通过DEAE-Sephadex(ϕ =4.5cm、h=8.4cm、140cm³、12.0mL/min、溶剂:0~8M TEAB缓冲液(pH7.9、包含0~8%CH₃CN)纯化。收集包含产物的组分,进行浓缩,得到二-/三-核苷酸。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算使用吸光系数(ϵ_{260})=25,000或18,100M⁻¹·cm⁻¹(二核苷酸的情况)、35,100、31,700或28,200M⁻¹·cm⁻¹(三核苷酸的情况)。

[0963] (2) 三核苷酸型加帽化合物(化合物1~8)的合成方法

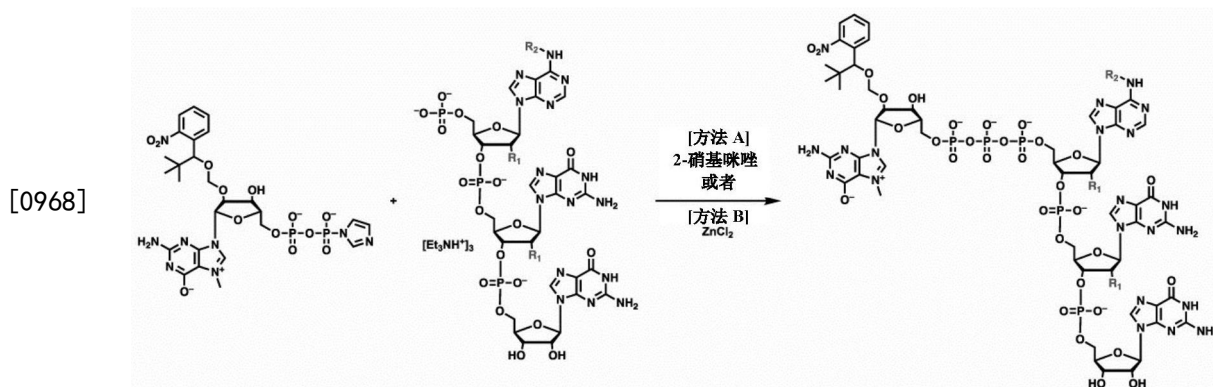
[0964] 下述表示了三核苷酸型加帽化合物(化合物1~8)的合成方案。R₁和R₂包含各种化学修饰。

[0965]



[0966] (3) 四核苷酸型加帽化合物(化合物9~13)的合成方法

[0967] 下述表示了四核苷酸型加帽化合物(化合物9~13)的合成方案。 R_1 和 R_2 包含各种化学修饰。



[0969] (4) 三核苷酸-四核苷酸型加帽化合物的合成(Method A)

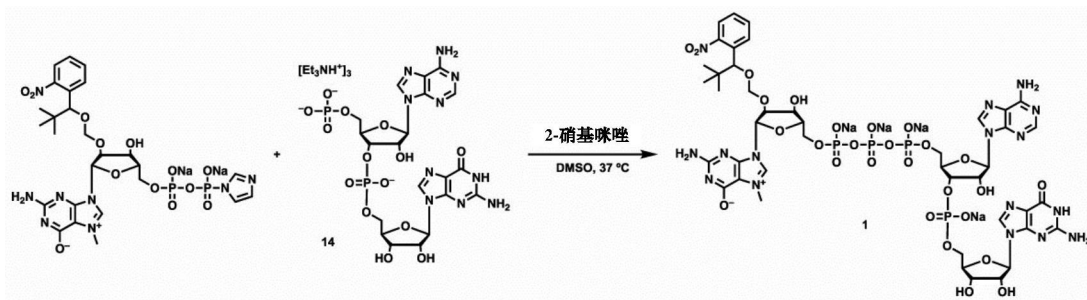
[0970] 在DMSO (79.5mM) 中的二-/三核苷酸三乙基铵盐(17.2~43.6 μ mol)的溶液中加入2'-Nb-N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐(2.00eq.)和2-硝基咪唑(3.00eq.)。在37 $^{\circ}$ C孵育1~2天后,添加2'-Nb-N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐(2.00eq.)和2-硝基咪唑(3.00eq.)。将混合物在37 $^{\circ}$ C孵育2~3天,将反应混合物用18.5~38.6倍量的水稀释。粗产物通过用QAE-Sephadex($\phi=3.0$ cm、 $h=10$ cm、70cm³、6mL/min)的离子交换色谱纯化。收集包含产物的组分进行浓缩。将产物用Wakosil(注册商标)25C18脱盐(粒度:15~30 μ m(球形)、柱尺寸: $\phi=4.80$ cm、 $h=10.2$ cm、184cm³(12mL/min))。将包含产物的组分浓缩,以三乙基铵盐的形式得到目标三/四核苷酸加帽类似物。将产物再溶解于甲醇(2.0mL)中。将丙酮中的190mM NaClO₄(12mL)溶液加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离(4,500rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复3~4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标的三-/四核苷酸加帽类似物。使用由NanoDrop测定的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数($\epsilon_{260}=40,100$ 或33,200M⁻¹·cm⁻¹(三核苷酸加帽类似物的情况)和50,200、46,800或43,300M⁻¹·cm⁻¹(四核苷酸加帽类似物的情况)。

[0971] (5) 三核苷酸-四核苷酸型加帽化合物的合成(Method B)

[0972] 在DMSO (50mM) 中的二-/三核苷酸三乙基铵盐(~106 μ mol)的溶液中加入2'-Nb-N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐(3.00eq.)和氯化锌(20.0eq.)。在37 $^{\circ}$ C搅拌3天后,添加500mM EDTA水溶液(pH8.0、EDTA:ZnCl₂的每单位摩尔量为1.30当量)将反应混合物猝灭。将混合物用5.24容量的水稀释,用反相HPLC纯化。收集包含靶标化合物的组分、浓缩、冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到靶标三/四核苷酸加帽类似物。将产物再溶解于甲醇(2.00mL)中。将丙酮中的190mM NaClO₄(24.0mL)溶液加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离(4,000rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复3~4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标的三-/四核苷酸加帽类似物。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数($\epsilon_{260}=40,100$ 或33,200M⁻¹·cm⁻¹(三核苷酸加帽类似物的情况)和50,200、46,800或43,300M⁻¹·cm⁻¹(四核苷酸加帽类似物的情况)。(6) 三核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppApG的合

成(Method A)

[0973]



[0974] 在DMSO(331 μ L)中的二核苷酸三乙基铵盐14(26.2mg、26.3 μ mol)溶液中加入2'-硝基苄基修饰N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐(40.6mg、52.6 μ mol)和2-硝基咪唑(8.92mg、78.9 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C孵育1天后,添加2'-硝基苄基修饰N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐(40.6mg、52.6 μ mol)和2-硝基咪唑(8.92mg、78.9 μ mol)。将混合物在37 $^{\circ}$ C孵育3天,将反应混合物用水(10.0mL)稀释。粗产物通过用QAE-Sephadex($\phi=3.0$ cm、 $h=10$ cm、70cm³、6mL/min)的离子交换色谱纯化。收集包含产物的组分进行浓缩。将产物用Wakosil(注册商标)25C18脱盐(粒度:15~30 μ m(球形)、柱尺寸: $\phi=4.80$ cm、 $h=10.2$ cm、184cm³(12mL/min)。将包含产物的组分浓缩,以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将产物再溶解于甲醇(2.0mL)中。将丙酮中的190mM NaClO₄(12mL)加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离(4,500rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标加帽类似物1(23.6mg、16.4 μ mol、62.3%收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数(ϵ_{260})=40,100M⁻¹·cm⁻¹。

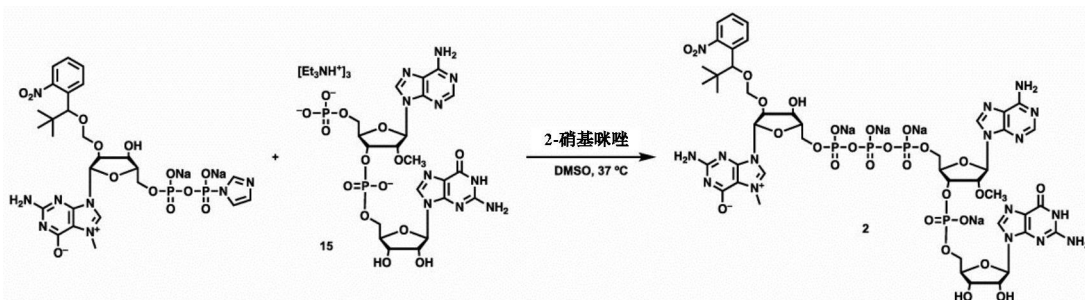
[0975] ¹H NMR(600MHz,D₂O) δ 8.36(s,1H),8.14-7.85(m,2H),7.62-7.36(m,4H),7.22(s,1H),5.98-5.87(m,1.5H),5.77(s,1H),5.71(s,0.5H),5.04-4.83(m,3H),4.71(s,3H),4.57(s,1H),4.49(d,J=14.2Hz,3H),4.39-4.21(m,10H),4.17(s,1H),4.10(t,J=7.0Hz,1H),4.05-3.96(m,3H),0.49(s,9H)ppm。

[0976] ¹³C NMR(151MHz,D₂O) δ 158.30,155.43,155.24,154.54,154.35,153.63,151.85,151.26,149.67,149.25,149.06,148.85,148.72,148.50,139.66,137.26,133.59,132.70,132.51,132.21,129.97,129.80,128.71,128.09,123.75,123.34,118.19,116.01,107.57,107.29,94.61,93.70,87.76,87.40,87.10,86.99,85.08,84.43,83.41,82.79,81.24,80.16,79.56,79.10,74.53,73.82,70.19,68.48,68.13,65.21,64.98,64.71,64.37,61.76,48.96,36.24,36.20,36.15,35.68,30.31,25.10,24.95,24.84,20.58,13.32,8.30ppm。

[0977] ³¹P NMR(243MHz,D₂O) δ 0.07(1P),-10.70(2P),-21.98(1P)ppm。

[0978] (7) 三核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppA(2' OCH₃)pG的合成(方法A)

[0979]



[0980] 在DMSO (216 μ L) 中的2'-O-甲基修饰二核苷酸三乙基铵盐15 (17.4mg、17.2 μ mol) 的溶液中加入2'-硝基苄基修饰N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (26.6mg、34.4 μ mol) 和2-硝基咪唑 (5.83mg、51.6 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C 孵育2天后, 将反应混合物用水 (4.00mL) 稀释。粗产物通过用DEAE-Sephadex (ϕ =4.5cm、h=8.4cm、140cm³、12mL/min) 的离子交换色谱纯化。CH₃CN (270分钟)。收集包含产物的组分进行浓缩。在减压下将CH₃CN除去后, 将产物用Wakosil (注册商标) 25C18 (粒子尺寸: 15~30 μ m (球形)、柱尺寸: ϕ =4.80cm、h=10.2cm、184cm³ (12mL/min)) 脱盐。将包含产物的组分浓缩, 以三乙基铵盐的形式得到目标化合物。将产物再溶解于甲醇 (2.0mL) 中。将丙酮中的190mM NaClO₄ (12mL) 加入到混合物中, 将所得到的悬浮液离心分离 (4,500rpm、20分钟)。将上清液废弃, 使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥, 以钠盐的形式得到靶标加帽类似物2 (8.02mg、5.51 μ mol、32.0%收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数 (ϵ_{260}) = 40,100M⁻¹ · cm⁻¹。

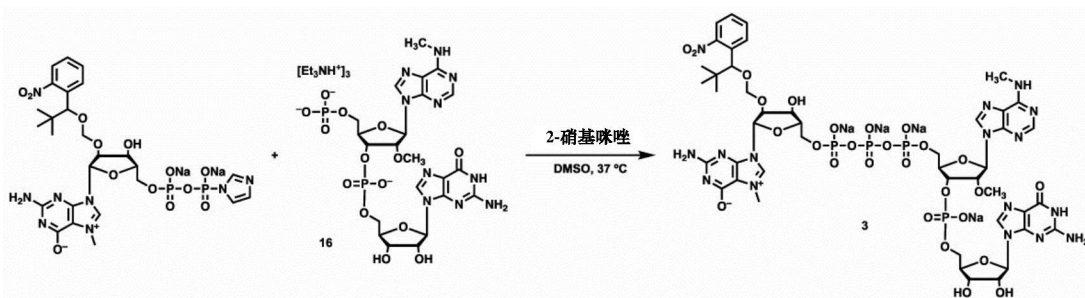
[0981] ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ 8.51-8.28 (m, 1H), 8.17-7.88 (m, 2H), 7.63 (s, 0.5H), 7.54 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.44 (s, 1.5H), 7.37 (s, 0.5H), 7.28 (s, 0.5H), 5.98 (dd, J=17.3, 6.4Hz, 1H), 5.88 (s, 1H), 5.79 (d, J=6.6Hz, 1H), 5.70 (s, 1H), 5.00-4.87 (m, 3H), 4.72 (s, 1H), 4.61-4.55 (m, 0.5H), 4.49 (s, 2.5H), 4.42-4.14 (m, 10H), 4.11 (dt, J=15.6, 7.5Hz, 1H), 4.08-3.94 (m, 3H), 3.39 (d, J=10.7Hz, 3H), 0.72-0.46 (2s, 9H) ppm。

[0982] ¹³C NMR (151MHz, D₂O) δ 158.52, 155.75, 155.19, 154.97, 153.66, 152.74, 149.69, 149.27, 148.83, 148.62, 139.49, 133.63, 132.61, 132.25, 129.99, 129.86, 128.77, 128.08, 123.78, 123.35, 118.27, 116.26, 107.62, 107.30, 94.76, 93.54, 87.62, 87.37, 85.31, 85.03, 84.92, 84.67, 83.59, 83.53, 83.13, 82.16, 82.03, 81.66, 80.38, 79.49, 79.16, 73.53, 72.84, 70.32, 68.60, 68.24, 65.11, 64.84, 64.46, 61.77, 57.97, 36.31, 36.15, 36.12, 35.67, 35.54, 30.29, 24.87, 24.82, 24.74, 24.66, 20.56, 13.29 ppm。

[0983] ³¹P NMR (243MHz, D₂O) δ -0.23 (1P), -10.81 (2P), -22.01 (1P) ppm。

[0984] (8) 三核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}Gppp^{m6}A (2' OCH₃) pG的合成 (方法A)

[0985]



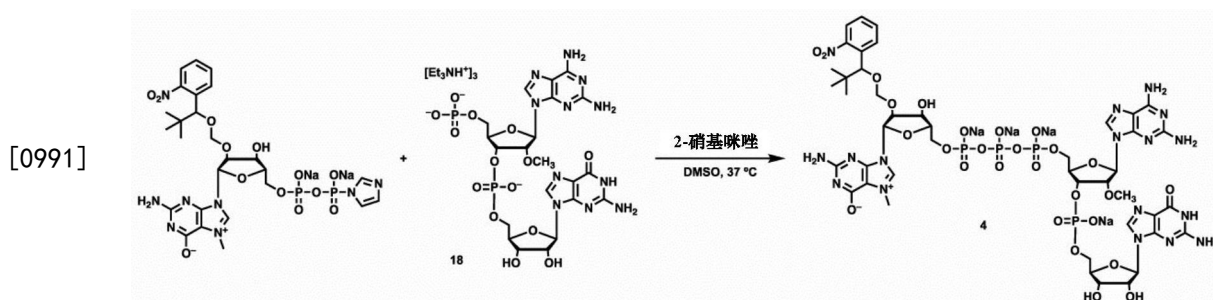
[0986] 在DMSO (548 μ L) 中的二核苷酸三乙基铵盐16 (43.6 μ mol) 的溶液中添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (67.4mg、87.2 μ mol) 和2-硝基咪唑 (14.8mg、131 μ mol)。以37 $^{\circ}$ C 孵育1.5 天后,添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (67.4mg、87.2 μ mol) 和2-硝基咪唑 (14.8mg、131 μ mol)。将混合物以37 $^{\circ}$ C 孵育3天,将反应混合物用水 (14.0mL) 稀释。粗产物通过用QAE-Sephadex ($\phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ 、 70cm^3 、 6mL/min) 的离子交换色谱纯化。收集包含产物的组分进行浓缩。将产物用Wakosil (注册商标) 25C18脱盐 (粒度:15~30 μm (球形)、柱尺寸: $\phi=4.80\text{cm}$ 、 $h=10.2\text{cm}$ 、 184cm^3 (12mL/min))。将包含产物的组分浓缩,以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将产物再溶解于甲醇 (2.0mL)。将丙酮中的190mM NaClO_4 (12mL) 加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离 (4,500rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标加帽类似物3 (37.9mg、25.8 μ mol、59.2% 收率)。使用由NanoDrop测定的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算使用吸光系数 (ϵ_{260}) = $40,100\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

[0987] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 9.14 (s, 0.6H), 8.94 (s, 0.3H), 8.35 (d, $J=17.1\text{Hz}$, 1H), 8.17-7.85 (m, 2H), 7.64-7.35 (m, 4H), 6.09-5.68 (m, 3H), 4.95 (s, 3H), 4.82 (s, 3H), 4.76 (s, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.61-3.96 (m, 16H), 3.41 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 3.05-2.91 (m, 1H), 0.59-0.38 (m, 9H) ppm. ^{13}C NMR (151MHz, D_2O) δ 158.30, 155.42, 155.22, 154.51, 154.39, 154.30, 153.64, 151.31, 149.89, 149.70, 149.26, 148.88, 148.80, 147.14, 139.20, 137.29, 136.32, 133.57, 132.75, 132.54, 132.25, 129.98, 128.72, 128.16, 123.75, 123.38, 118.63, 116.03, 107.89, 107.57, 107.28, 94.62, 93.76, 87.74, 87.49, 85.08, 84.44, 83.52, 83.09, 82.12, 81.26, 80.26, 79.62, 79.21, 73.71, 72.73, 70.28, 68.45, 68.13, 65.09, 64.66, 64.27, 61.76, 57.99, 57.49, 36.24, 36.20, 35.79, 35.70, 25.24, 25.14, 24.96, 24.86, 20.57, 16.85, 13.31 ppm.

[0988] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -0.26 (1P), -10.84 (2P), -21.96 (1P) ppm.

[0989] ESI-TOF-MS calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{57}\text{N}_{16}\text{O}_{27}\text{P}_4$, 459.0849 $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$; found 459.0837.

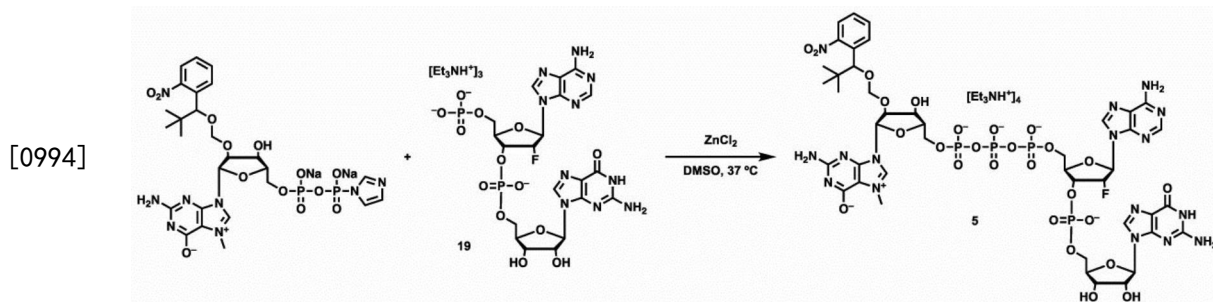
[0990] (9) 三核苷酸型加帽化合物Nb- $^{\text{m}7}\text{GpppD}$ (2' OCH_3) pG的合成 (方法A)



[0992] 在DMSO (95.0 μ L) 中的二核苷酸三乙基铵盐18 (7.74mg、7.55 μ mol) 的溶液中添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (11.7mg、15.1 μ mol) 和2-硝基咪唑 (2.57mg、22.7 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C 孵育4天后,添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (11.7mg、15.1 μ mol) 和2-硝基咪唑 (2.57mg、22.7 μ mol)。将混合物在37 $^{\circ}$ C 孵育2.5天,将反应混合物用水 (14.0mL) 稀释。粗产物通过用QAE-Sephadex ($\phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ 、 70cm^3 、 6mL/min) 的离子交换色谱纯化。收集包含产物的组分进行浓缩。产物由Wakosil (注册商标) 25C18脱盐 (粒度:15~30 μm (球形)、柱

尺寸： $\phi=4.80\text{cm}$ 、 $h=10.2\text{cm}$ 、 184cm^3 (12mL/min)。收集包含靶标化合物的组分，进行冻结干燥，以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将产物再溶解于甲醇 (1.0mL)。将丙酮中的 190mM NaClO_4 (12mL) 加入到混合物中，将所得到的悬浮液离心分离 (4,000rpm、20分钟)。将上清液废弃，使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥，以钠盐的形式得到靶标加帽类似物4。

[0993] (10) 三核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppA (2' F) pG的合成 (方法B)

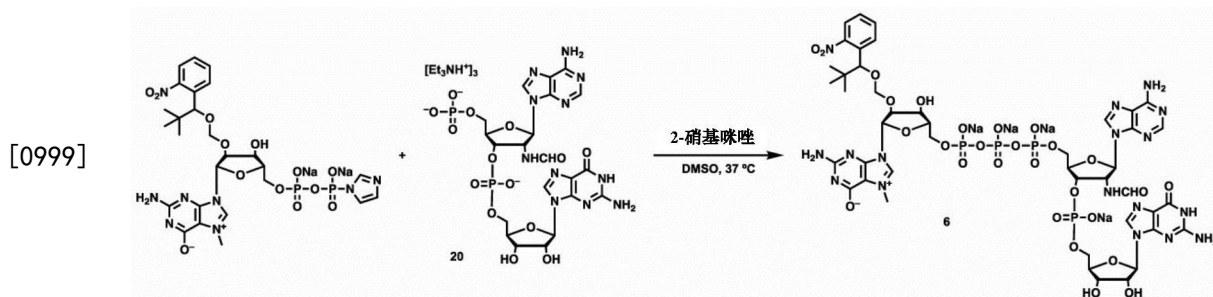


[0995] 在DMSO (400 μL) 中的5' -p-A (2' F) PG二核苷酸19 (20.0mg、20.0 μmol 、粗制) 的溶液中添加2' -Nb-鸟苷5' -二磷酸磷酰咪唑 (46.4mg、60.0 μmol)、氯化锌 (54.5mg、400 μmol)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌1.5天后，添加500mM EDTA水溶液 (pH8.0、1.04mL、EDTA:520 μmol) 将反应混合物猝灭。将混合物用水 (13.0mL) 稀释，用反相HPLC纯化 (装置:Shimadzu Prep、柱:YMC-ActusTriartC8 (制备型、250x20.0mm I.D.)、溶剂A:50mM TEAA缓冲液 (pH6.0、0.5% CH_3CN)、溶剂B: CH_3CN 、线性梯度5~80%B (25分钟)、流速:10ml/min、检测:254nm)。收集包含目标产物的组分、浓缩、冻结干燥，以三乙基铵盐的形式得到PureCap类似物5 (1.58mg、0.900 μmol 、4.50%收率、 $\epsilon_{260}=40, 100\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。

[0996] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.15 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.54-7.40 (m, 4H), 7.25 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 5.98 (d, $J=16.3\text{Hz}$, 1H), 5.69-5.66 (m, 1H), 5.63 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 5.39 (s, 0.5H), 5.30 (s, 0.5H), 5.02 (s, 1H), 4.94 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 4.90 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 4.69 (t, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.46 (d, $J=12.7\text{Hz}$, 2H), 4.39 (s, 1H), 4.34-4.25 (m, 4.5H), 4.21 (d, $J=10.5\text{Hz}$, 3.5H), 4.11 (d, $J=10.5\text{Hz}$, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.19 (qd, $J=7.3, 1.2\text{Hz}$, 52H, 三乙铵), 1.89 (t, $J=1.2\text{Hz}$, 12H, acetate), 1.26 (tt, $J=7.3, 1.1\text{Hz}$, 80H, 三乙铵), 0.61 (s, 9H) ppm。

[0997] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -0.63 (1P), -10.98 (2P), -22.33 (1P) ppm。

[0998] (11) 三核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppA (NHCHO) pG的合成 (方法A)



[1000] 在DMSO (111 μL) 中的二核苷酸三乙基铵盐20 (8.82 μmol) 的溶液中添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (13.6mg、17.6 μmol) 和2-硝基咪唑 (3.00mg、26.5 μmol)。以37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育

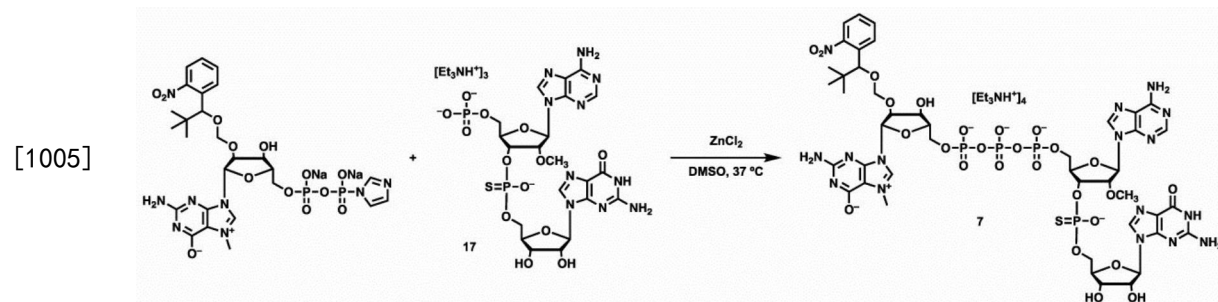
1.5天后,添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐(13.6mg、17.6 μ mol)和2-硝基咪唑(3.00mg、26.5 μ mol)。将混合物在37 $^{\circ}$ C孵育2.5天,将反应混合物用水(10.0mL)稀释。粗产物通过用QAE-Sephadex($\phi=3.0$ cm、 $h=10$ cm、70cm³、6mL/min)的离子交换色谱纯化。收集包含产物的组分进行浓缩。产物用Wakosil(注册商标)25C18脱盐(粒度:15~30 μ m(球形)、柱尺寸: $\phi=4.80$ cm、 $h=10.2$ cm、184cm³(12mL/min)。收集包含产物的组分,通过使用YMC-TriartC8柱(250x4.6mm I.D.、S-5 μ m、12nm、流速1mL/min、温度50 $^{\circ}$ C)的反相HPLC进一步纯化。收集包含靶标化合物的组分,进行冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将产物再溶解于甲醇(1.0mL)。将丙酮中的190mM NaClO₄(12mL)加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离(4,000rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标加帽类似物6(2.42mg、1.65 μ mol、18.7%收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数(ϵ_{260})=40,100M⁻¹·cm⁻¹。

[1001] ¹H NMR(600MHz, D₂O) δ 8.25(s, 0.5H), 8.20(s, 0.5H), 7.95(s, 0.5H), 7.90(s, 0.5H), 7.85(s, 1H), 7.71(d, J=5.6Hz, 1H), 7.51(s, 0.5H), 7.44(s, 0.5H), 7.36(s, 1H), 7.33-7.30(m, 1H), 7.26(s, 0.5H), 7.11(s, 0.5H), 5.73(s, 3.5H), 5.53(s, 0.5H), 4.89(s, 1.5H), 4.82(s, 1.5H), 4.77(s, 3H), 4.46(s, 1H), 4.40(s, 1H), 4.34(s, 0.5H), 4.28(s, 0.5H), 4.19(s, 2.6H), 4.12(s, 2.4H), 4.09-4.06(m, 3H), 3.91(d, J=5.1Hz, 1.5H), 3.86(d, J=5.1Hz, 1.5H), 0.47(s, 5H), 0.39(s, 4H) ppm。

[1002] ³¹P NMR(243MHz, D₂O) δ -0.30(1P), -10.81(2P), -21.96(1P) ppm。

[1003] ¹³C NMR(151MHz, D₂O) δ 163.92, 160.09, 158.75, 155.35, 153.79, 152.81, 151.62, 149.63, 148.84, 148.17, 139.75, 137.70, 133.82, 132.53, 132.02, 129.91, 128.72, 127.74, 123.70, 123.42, 118.15, 116.39, 108.30, 107.99, 95.24, 93.61, 87.41, 86.98, 86.80, 85.06, 84.04, 83.36, 82.28, 80.68, 79.98, 79.23, 73.32, 70.25, 69.08, 68.71, 65.63, 65.42, 65.22, 54.24, 36.43, 35.93, 35.61, 30.29, 24.67, 24.61, 23.32 ppm。

[1004] (12) 三核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppA(2' OCH₃)psG的合成(方法B)

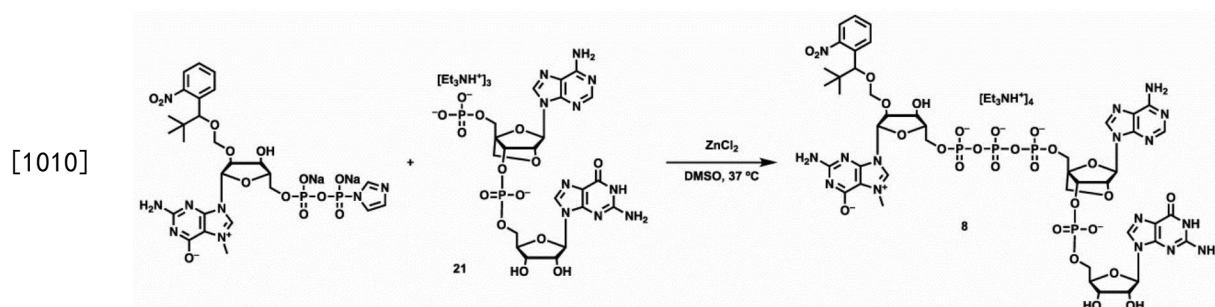


[1006] 在DMSO(294 μ L)中的5'-p-A(2' OMe)PSG二核苷酸17(14.7 μ mol)的溶液中加入2'-Nb-鸟苷5'-二磷酸磷酸咪唑(34.1mg、44.1 μ mol)和氯化锌(40.1mg、294 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C搅拌1.5天后,添加500mM EDTA水溶液(pH8.0、764 μ L、EDTA:382 μ mol)将反应混合物猝灭。将混合物用水(14.0mL)稀释,通过反相HPLC纯化(装置:Shimadzu Prep.、柱:YMC-Actus Triart C8(制备型、250x20.0mm I.D.))。收集包含目标产物的组分,进行浓缩、冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到加帽类似物7(3.18mg、1.78 μ mol、12.1%收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数(ϵ_{260})=40,100M⁻¹·cm⁻¹。

[1007] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.24 (s, 1H), 8.01-7.85 (m, 2H), 7.43 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.35 (s, 2H), 7.16 (s, 1H), 5.84 (d, $J=12.2\text{Hz}$, 1H), 5.73-5.65 (m, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.92 (d, $J=9.4\text{Hz}$, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.83 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 4.76 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.49-4.33 (m, 3H), 4.32-4.25 (m, 1H), 4.24-4.16 (m, 4H), 4.15-4.05 (m, 5H), 3.88 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 3H), 3.27 (d, $J=15.4\text{Hz}$, 3H), 3.10-3.02 (m, 33H, 三乙铵), 1.80-1.74 (m, 7H, CH_3COO^-), 1.18-1.09 (m, 51H, 三乙铵), 0.54-0.47 (m, 9H) ppm。

[1008] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ 56.60 (1P, d, $J=131.5\text{Hz}$), -10.81 (2P), -21.86 (1P) ppm。

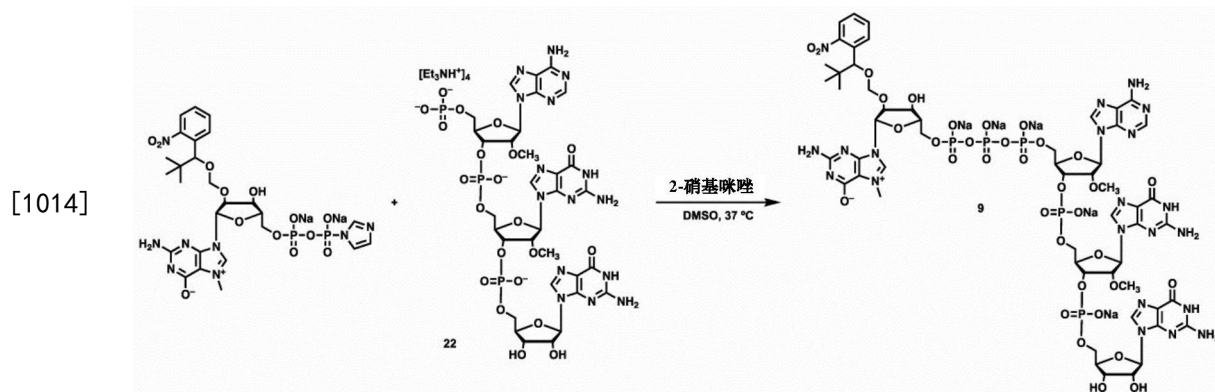
[1009] (13) 三核苷酸型加帽化合物 $\text{Nb}^{-m7}\text{GpppA}$ (LNA) pG的合成(方法B)



[1011] 在DMSO (524 μL) 中的5' -p-A (LNA) PG二核苷酸21 (26.4mg、26.2 μmol) 的溶液中添加2' -Nb-鸟苷5' -二磷酸磷酰咪唑 (60.7mg、78.6 μmol) 和氯化锌 (71.4mg、524 μmol)。在37 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌2天后,添加500mM EDTA水溶液 (pH8.0、1.36mL、EDTA:681 μmol) 将反应混合物猝灭。将混合物用水 (13.0mL) 稀释,用反相HPLC纯化(装置:Shimadzu Prep.、柱:YMC-Actus Triart C8(制备型、250x20.0mm I.D.))。收集包含目标产物的组分,浓缩、冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到PureCap类似物8 (2.44mg、1.38 μmol 、5.27%收率、 $\epsilon_{260}=40,100\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

[1012] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.78 (s, 1H), 7.97-7.90 (m, 1H), 7.84 (d, $J=4.6\text{Hz}$, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.48 (dd, $J=8.3, 4.0\text{Hz}$, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.22 (s, 1H), 5.60-5.54 (m, 2H), 5.52 (d, $J=3.9\text{Hz}$, 1H), 4.90 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 4.83 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 1.5H), 4.77 (dd, $J=7.7, 3.8\text{Hz}$, 1.5H), 4.74 (d, $J=4.6\text{Hz}$, 1.5H), 4.55 (s, 0.5H), 4.48 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 0.5H), 4.38 (s, 1H), 4.35 (s, 1H), 4.28 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 2.5H), 4.20 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 2H), 4.17-4.08 (m, 4H), 4.00-3.91 (m, 5H), 3.06 (dt, $J=11.5, 7.4\text{Hz}$, 15H), 1.14 (td, $J=7.4, 3.9\text{Hz}$, 23H), 0.53 (d, $J=4.2\text{Hz}$, 9H) ppm。 ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ -1.37 (1P), -11.02 (2P), -22.30 (1P) ppm。

[1013] (14) 四核苷酸型加帽化合物 $\text{Nb}^{-m7}\text{GpppA}$ (2' OCH_3) pG (2' OCH_3) pG的合成(方法A)



[1015] 在DMSO (259 μL) 中的2' -O-甲基修饰三核苷酸三乙基铵盐22 (30.3mg、20.6 μmol) 的溶液中加入2' -硝基苄基修饰N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (31.8mg、41.2 μmol) 和2-硝基

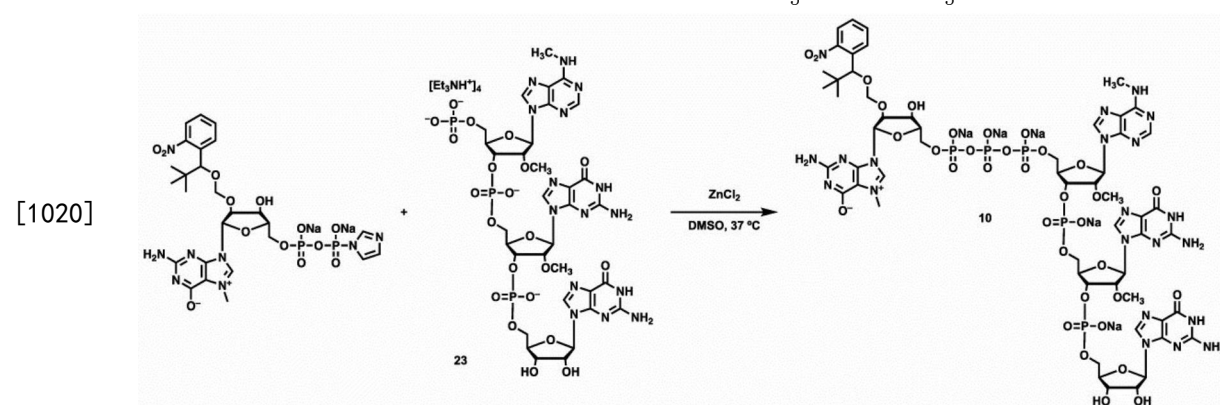
咪唑 (6.99mg、61.8 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C孵育1天后,添加2'-硝基苄基修饰N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (31.8mg、41.2 μ mol) 和2-硝基咪唑 (6.99mg、61.8 μ mol)。将混合物在37 $^{\circ}$ C孵育3天,将反应混合物用水 (10.0mL) 稀释。粗产物通过用QAE-Sephadex ($\phi=3.0\text{cm}$ 、 $h=10\text{cm}$ 、 70cm^3 、 6mL/min) 的离子交换色谱纯化。将产物用Wakosil (注册商标) 25C18脱盐 (粒度: $15\sim 30\mu\text{m}$ (球形)、柱尺寸: $\phi=4.80\text{cm}$ 、 $h=10.2\text{cm}$ 、 184cm^3 (12mL/min))。将包含产物的组分浓缩,以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将产物再溶解于甲醇 (2.0mL)。将丙酮中的190mM NaClO₄ (12mL) 加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离 (4,500rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标加帽类似物9 (16.0mg、8.70 μ mol、42.2% 收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数 (ϵ_{260}) = $50,200\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

[1016] ^1H NMR (600MHz, D₂O) δ 8.42-8.34 (m, 1H), 8.06 (d, $J=12.4\text{Hz}$, 1.5H), 7.97 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.67 (s, 0.5H), 7.57 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.51-7.36 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 5.94 (dd, $J=11.6, 5.1\text{Hz}$, 2H), 5.88-5.80 (m, 1.5H), 5.73 (s, 1H), 5.68 (d, $J=4.3\text{Hz}$, 0.5H), 4.89 (s, 4H), 4.58 (s, 2.5H), 4.52 (s, 0.5H), 4.46 (s, 3H), 4.38 (s, 3H), 4.34-4.24 (m, 8H), 4.21-4.08 (m, 11H), 4.05 (s, 1.5H), 4.00 (s, 1.5H), 3.83-3.47 (m, 6H), 0.64-0.46 (m, 9H) ppm。

[1017] ^{13}C NMR (151MHz, D₂O) δ 159.70-158.2 (m), 153.71-150.8 (m), 149.70-148.00 (m), 132.07, 129.36, 128.17, 123.14, 117.26, 114.91, 107.66, 87.66, 84.99, 82.62, 80.56, 79.37, 75.68, 72.44, 68.13, 65.01, 61.77, 58.27, 57.91, 56.82, 48.94, 46.69, 36.13, 35.36, 30.30, 28.25, 24.76, 20.57, 16.84, 13.30, 8.32 ppm。

[1018] ^{31}P NMR (243MHz, D₂O) δ -0.26 (2P), -10.84 (2P), -22.09 (1P) ppm。

[1019] (15) 四核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}Gppp^{m6}A (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG的合成 (方法B)

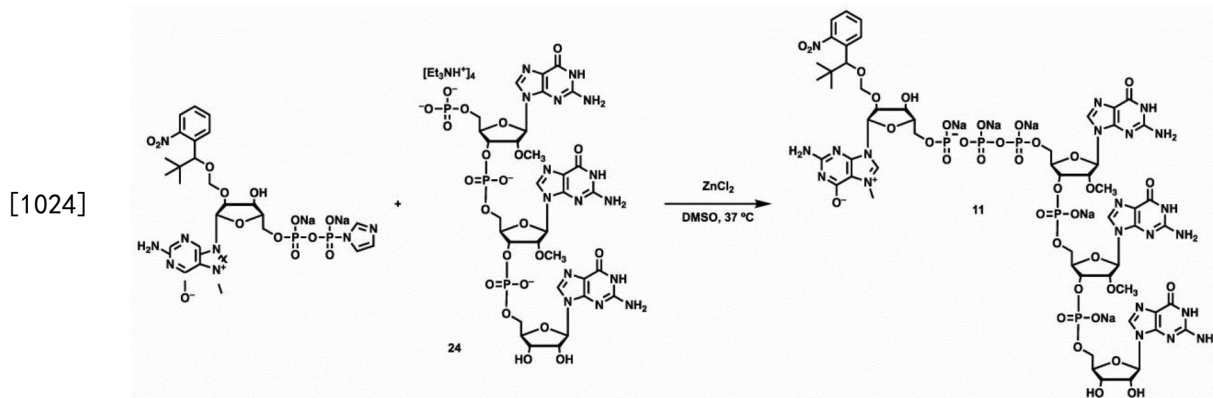


[1021] 在DMSO (2.12mL) 中的5'-p-m6A (2' OMe) PG (2' OMe) PG三核苷酸23 (158mg、0.106mmol) 的溶液中加入鸟苷5'-二磷酸磷酸咪唑 (246mg、0.318mmol) 和氯化锌 (289mg、2.12毫摩尔)。在37 $^{\circ}$ C搅拌3天后,添加500mM EDTA水溶液 (pH8.0、5.52mL、EDTA:2.76毫摩尔) 将反应混合物猝灭。将混合物用水 (40.0mL) 稀释,用反相HPLC纯化 (装置:Shimadzu Prep.、柱:YMC-Actus Triart C8 (制备型、250x20.0mm I.D.))。收集包含靶标产物的组分,浓缩、冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到PureCap类似物10。将产物再溶解于甲醇 (2.00mL)。将丙酮中的190mM NaClO₄ (24.0mL) 溶液加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离 (4,

000rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到加帽类似物10(70.7mg、38.2 μ mol、36.0%收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数(ϵ_{260})=50,200M⁻¹·cm⁻¹。

[1022] ³¹P NMR (243MHz, D₂O) δ -0.38, -10.60, -21.60ppm。

[1023] (16) 四核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppG(2' OCH₃)pG(2' OCH₃)pG的合成(方法B)



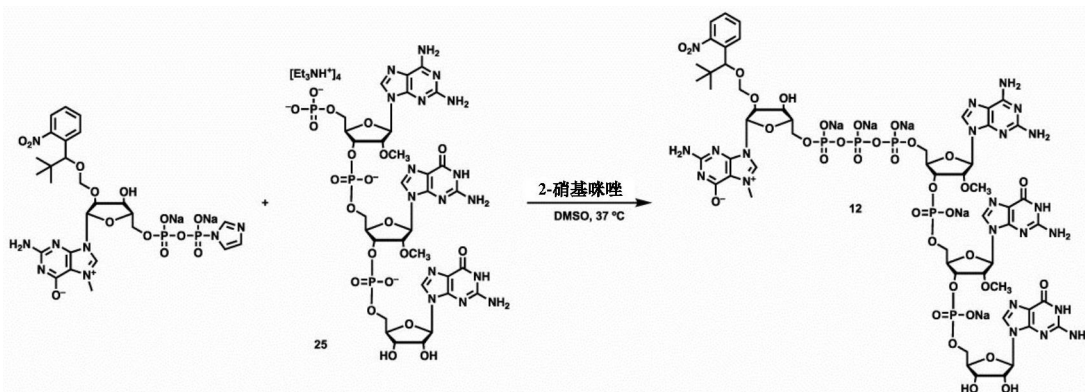
[1025] 在DMSO(300 μ L)中的5'-p-G(2' OMe)PG(2' OMe)PG三核苷酸24(21.0mg、15.0 μ mol)的溶液中加入2'-Nb-鸟苷5'-二磷酸磷酰咪唑(35.0mg、45.5 μ mol)和氯化锌(41.0mg、300 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C搅拌2天后,添加38mM EDTA-NaOH水溶液(pH8.0、10.3mL、EDTA:391 μ mol)将反应混合物猝灭。混合物通过使用QAE-Sephadex(Φ =3.0cm、h=10cm、70cm³、6mL/min)的离子交换色谱纯化。收集包含产物的组分进行浓缩。将产物用Wakosil(注册商标)25C18脱盐(粒度:15~30 μ m(球形)、柱尺寸: Φ =4.80cm、h=10.2cm、184cm³(12mL/min)。浓缩包含产物的组分,以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将产物再溶解于甲醇(2.0mL)。将丙酮中的190mM NaClO₄(12mL)加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离(4,500rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标加帽类似物11(1.87 μ mol、12.5%收率)。使用由NanoDrop测定得到的在260nm的产物的吸光度来计算收量。计算中使用吸光系数(ϵ_{260})=46,800M⁻¹·cm⁻¹。

[1026] ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ 7.95-7.81(m, 3H), 7.55(d, J=6.8Hz, 0.5H), 7.47(t, J=7.0Hz, 0.5H), 7.43-7.27(m, 2.5H), 7.14(t, J=7.4Hz, 0.5H), 5.84-5.73(m, 2.5H), 5.66(dd, J=13.9, 6.5Hz, 1H), 5.58(d, J=5.8Hz, 0.5H), 4.94(s, 0.5H), 4.86(s, 1.5H), 4.61(s, 1H), 4.55(s, 1H), 4.42-4.26(m, 5.5H), 4.25-4.02(m, 12H), 3.99(t, J=1.6Hz, 1H), 3.94-3.92(m, 1.5H), 3.26(dt, J=13.7, 1.7Hz, 3H), 3.20(dt, J=9.0, 1.7Hz, 3H), 2.99(q, J=7.4Hz, 三乙铵), 1.12(t, J=7.3Hz, 三乙铵), 0.52-0.49(m, 4.5H), 0.42-0.40(m, 4.5H) ppm。

[1027] ³¹P NMR (243MHz, D₂O, 三乙铵form) δ -0.22(d, J=32.9Hz), -11.00(d, J=16.4Hz), -22.43(t, J=18.1Hz) ppm。

[1028] (17) 四核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppD(2' OCH₃)pG(2' OCH₃)pG的合成(方法A)

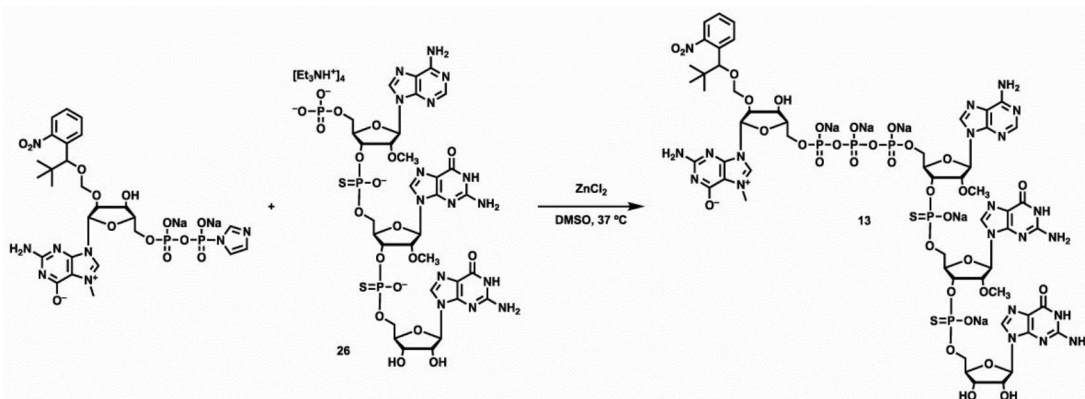
[1029]



[1030] 在DMSO (98.7 μ L) 中的三核苷酸三乙基铵盐25 (11.7mg、7.85 μ mol) 的溶液中添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (12.1mg、15.7 μ mol) 和2-硝基咪唑 (2.67mg、23.6 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C孵育4天后,添加N7-甲基鸟苷二磷酸咪唑二钠盐 (12.1mg、15.7 μ mol) 和2-硝基咪唑 (2.67mg、23.6 μ mol)。将混合物在37 $^{\circ}$ C孵育2.5天,将反应混合物用水 (14.0mL) 稀释。粗产物通过用QAE-Sephadex (ϕ =3.0cm、h=10cm、70cm³、6mL/min) 的离子交换色谱纯化。收集包含产物的组分进行浓缩。制品用Wakosil (注册商标) 25C18脱盐 (粒度:15~30 μ m (球形)、柱尺寸: ϕ =4.80cm、h=10.2cm、184cm³ (12mL/min))。收集包含靶标化合物的组分,进行冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到靶标化合物。将产物再溶解于甲醇 (1.0mL) 中。将丙酮中的190mM NaClO₄ (12mL) 加入到混合物中,将所得到的悬浮液离心分离 (4,000rpm、20分钟)。将上清液废弃,使沉淀物重悬于丙酮中。进一步重复4次悬浮离心分离过程。使沉淀物在减压下干燥,以钠盐的形式得到靶标加帽类似物12。

[1031] (18) 四核苷酸型加帽化合物Nb-^{m7}GpppA (2' OCH₃) psG (2' OCH₃) psG的合成 (方法B)

[1032]



[1033] 在DMSO (402 μ L) 中的5'-p-A (2' OMe) PSG (2' OMe) PSG三核苷酸26 (30.1mg、20.1 μ mol) 的溶液中加入2'-Nb-鸟苷5'-二磷酸磷酸咪唑 (46.6mg、60.3 μ mol) 和氯化锌 (54.8mg、402 μ mol)。在37 $^{\circ}$ C搅拌2天后,添加500mM EDTA水溶液 (pH8.0、1.05mL、EDTA:523 μ mol) 将反应混合物猝灭。将混合物用水 (13.0mL) 稀释,用反相HPLC (装置:ShimadzuPrep、柱:YMC-ActusTriartC8 (制备型、250x20.0mm I.D.)) 纯化。收集包含目标产物的组分,进行浓缩、冻结干燥,以三乙基铵盐的形式得到加帽类似物13 (3.31mg、1.46 μ mol、7.26%收率、 ϵ_{260} =50, 200M⁻¹·cm⁻¹)。

[1034] ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ 8.97 (d, J=7.5Hz, 1H), 8.51-8.40 (m, 1H), 8.09 (d, J=2.7Hz, 1H), 8.06-8.02 (m, 1H), 7.99-7.94 (m, 1H), 7.59 (q, J=7.0Hz, 1H), 7.54-7.43 (m,

2H) , 7.30 (t, J=6.9Hz, 1H) , 6.06-5.94 (m, 1H) , 5.88-5.67 (m, 3H) , 5.20-5.04 (m, 2H) , 5.01 (t, J=5.7Hz, 1H) , 4.94 (d, J=7.1Hz, 1H) , 4.89-4.83 (m, 1.5H) , 4.75-4.72 (m, 1H) , 4.63-4.55 (m, 3H) , 4.53-4.40 (m, 4.5H) , 4.35-4.12 (m, 11H) , 4.03 (dd, J=6.4, 3.4Hz, 3H) , 3.42-3.34 (m, 5H) , 3.32 (d, J=5.5Hz, 1H) , 3.18 (qd, J=7.3, 2.1Hz, 23H) , 1.26 (td, J=7.3, 2.3Hz, 36H) , 0.66-0.52 (m, 9H) ppm.

[1035] ^{31}P NMR (243MHz, D_2O) δ 57.92-55.14 (2P) , -10.98 (2P) , -22.24 (1P) ppm.

[1036] 15. 通过使用合成的新型加帽类似物的试管内转录法的mRNA合成及其翻译活性评价

[1037] (1) 通过T7RNA聚合酶的转录反应

[1038] 序列编号7是Luc2mRNA的转录合成模板的DNA序列。序列编号8是使用序列编号7的模板DNA转录得到的Luc2mRNA的序列。

[1039] 图33表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。该图的(a)表示使用三核苷酸型加帽类似物(Nb-m7GpppApG)的共转录反应后的HPLC纯化结果。在保留时间14分钟时未加帽化体被洗脱,在15分钟时加帽化体被洗脱。该图的(b)是利用光照射的脱保护后的HPLC纯化结果。通过利用光照射的脱保护反应,峰位移到了保留时间14分钟处,因此表明光分解性保护基被除去,高纯度地得到了加帽化mRNA。

[1040] 图34是表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。该图的(a)表示使用三核苷酸型加帽类似物(Nb-m7GpppA(2' OCH3) pG)的共转录反应后的HPLC纯化结果。在保留时间14分钟时未加帽化体被洗脱,在15分钟时加帽化体被洗脱。该图的(b)是利用光照射的脱保护后的HPLC纯化结果。通过利用光照射的脱保护反应,峰位移到了保留时间14分钟处,因此表明光分解性保护基被除去,高纯度地得到了加帽化mRNA。

[1041] 图35是表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。该图的(a)表示使用四核苷酸型加帽类似物(Nb-m7GpppA(2' OCH₃)pG(2' OCH₃)pG)的共转录反应后的HPLC纯化结果。在保留时间14分钟时未加帽化体被洗脱,在15分钟时加帽化体被洗脱。该图的(b)是利用光照射的脱保护后的HPLC纯化结果。通过利用光照射的脱保护反应,峰位移到了保留时间14分钟处,因此表明光分解性保护基被除去,高纯度地得到了加帽化mRNA。

[1042] 图36是表示使用合成的加帽类似物的共转录反应产物mRNA的HPLC纯化结果的图。该图的 (a) 表示使用四核苷酸型加帽类似物 (Nb-m7Gpppm6A (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG) 的共转录反应后的HPLC纯化结果。在保留时间14分钟时未加帽化体被洗脱, 在15分钟时加帽化体被洗脱。该图的 (b) 是利用光照射的脱保护后的HPLC纯化结果。通过利用光照射的脱保护反应, 峰位移到了保留时间14分钟处, 因此表明光分解性保护基被除去, 高纯度地得到了加帽化mRNA。

[1043] RNA是以双链DNA为模板通过T7RNA聚合酶进行转录合成的。模板的双链DNA通过将编码Luc2基因的pSP73-a-luc2(在实验部分的末尾记载序列)使用KOD-Plus-Neo(TOYOBO)、正向引物(cgcgcggttgccgatcatt;序列编号3)、反向引物(ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttcagtttagacgtt gatcctgg;序列编号4)通过PCR反应进行扩增而得到(1.0ng/ μ L DNA载体、 $1\times$ KOD-Plus-Neo缓冲液、0.2mM dNTPs、0.3 μ M引物、1.5mM MgSO₄、0.02units/ μ L聚合酶)。

[1044] 制备转录反应液(模板DNA15ng/ μ L、 $1\times$ T7RNA聚合酶缓冲液(Takara) (40mM Tris-HCl (pH8.0)、8mM $MgCl_2$ 、2mM亚精胺)、10U/ μ L T7RNA聚合酶(Takara)、5mM DTT、2mM ATP、2mM UTP、2mM CTP、2mM GTP、2mM Nb- m^7 GpppApG、或Nb- m^7 GpppA (2' OCH₃) pG、或Nb- m^7 GpppA (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG、或Nb- m^7 Gppp m^6 A (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG), 在37℃孵育2小时。在反应液中加入重组DNA酶(Takara)使其达到0.1U/ μ L,以37℃孵育30分钟,由此将模板DNA分解。反应后,进行苯酚-氯仿提取,进行醇沉淀。用反相HPLC纯化。

[1045] 柱,YMC-TriartBioC4 (250mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A,50mM乙酸三乙基铵(pH7.0),5%乙腈;溶剂B,乙腈;线性梯度5-15%溶剂B(0-20分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,260nm;柱温,50℃

[1046] 利用光照射的脱保护:将RNA溶液加入到透明96孔多孔板中,利用MAX-305光源装置(朝日分光)以4mW/cm²的光量照射365nm光15分钟。进行HPLC纯化。柱,YMC-TriartBioC4 (250mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A,50mM乙酸三乙基铵(pH7.0),5%乙腈;溶剂B,乙腈;线性梯度5-15%溶剂B(0-20分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,260nm;柱温,50℃

[1047] pSP73-a-luc2的序列信息如序列编号5所示。

[1048] (2) 表达Luc2的mRNA的翻译活性评价

[1049] 图37是表示使用加帽类似物转录合成的RNA在HeLa细胞内的翻译活性评价的结果的图。将RNA通过脂质体转染法转染到HeLa细胞。24小时后,将细胞裂解,测定萤火虫荧光素酶的发光。TriPure_0为Nb-m7GpppApG, TriPure_1为Nb-m7GpppA (2' OCH₃) pG, TetraPure_2为Nb-m7GpppA (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG, m6A_TetraPurte_2为Nb-m7Gpppm6A (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG, Tri_1为将具有与CleanCap (注册商标) Rreagent AG (Trilink) 同等结构的化合物共转录合成的mRNA。翻译活性为以Cap2>Cap1>Cap0的顺序从高到低的结果。另外,相比于使用现有的CleanCap (注册商标) Rreagent AG的Tri_1,通过Nb标签纯化的TriPure_1显示高2倍左右的活性。

[1050] HeLa细胞(RIKEN Cell Bank)在添加有10%胎牛血清(fetal bovine serum) (FBS; Invitrogen)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM; WAKO)中培养(37℃、5%CO₂)。在转染前一天,将HeLa细胞接种在96孔板中(1.0×10^4 细胞/孔)。第二天将培养基除去,替换成90 μ L/孔Opti-MEM (注册商标) (Thermo Fisher SCIENTIFIC)。将0.15 μ L Lipofectamine (注册商标) Messenger MAX (注册商标)、25ng mRNA用10 μ L Opti-MEM (注册商标) 稀释,导入细胞。在37℃孵育5小时后,加入20 μ L/孔 $1\times$ 细胞裂解缓冲液(Cell Lysis Buffer) (Promega)将细胞裂解。使用ONE-Glo (注册商标) luciferase assay (注册商标) (Promega) 进行发光测定。

[1051] 图38是表示使用加帽类似物转录合成的RNA在JAWS II细胞内的翻译活性评价的结果的图。将RNA通过脂质体转染法转染到JAWS II细胞中。在24小时后将细胞裂解,测定萤火虫荧光素酶的发光。TriPure_0为Nb-m7GpppApG, TriPure_1为Nb-m7GpppA (2' OCH₃) pG, TetraPure_2为Nb-m7GpppA (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG, m6A_TetraPurte_2为Nb-m7Gpppm6A (2' OCH₃) pG (2' OCH₃) pG, Tri_1为将具有与CleanCap (注册商标) Rreagent AG (Trilink) 同等的结构的化合物共转录合成的mRNA。翻译活性为以Cap_2>Cap_1>Cap_0的顺序从高到低的结果。另外,相比于使用现有的CleanCap (注册商标) Rreagent AG的Tri_1,通过Nb标签纯化的TriPure_1显示高24倍左右的活性。

[1052] 细胞内的翻译活性的评价(JAWSII细胞):JAWSII细胞(ATCC)在添加有10%胎牛血清(FBS;Invitrogen)和GM-CSF(5ng/mL)的最小必须培养基(Minimum Essential Medium)α(MEMα;Thermo Fisher SCIENTIFIC)中培养(37℃、5%CO₂)。在转染前一天,在96孔板中接种JAWS II细胞(3.0×10^4 细胞/孔)。第二天将培养基除去,替换成90μL/孔Opti-MEM(注册商标)(Thermo Fisher SCIENTIFIC)。将0.15μL Lipofectamine(注册商标)MessengerMAX(注册商标)、50ng mRNA用10μL Opti-MEM(注册商标)稀释,导入细胞中。在37℃孵育5小时后,加入20μL/孔1×细胞裂解缓冲液(Promega)将细胞裂解。使用ONE-Glo(注册商标)luciferase assay(注册商标)(Promega)进行发光测定。

[1053] Luc2的氨基酸序列信息如序列编号6所示。

[1054] (3)使用二核苷酸型加帽类似物合成的NanoLuc荧光素酶(Nluc)mRNA的翻译活性比较

[1055] 图39是表示使用含疏水性保护基的二核苷酸型加帽类似物(DiPure,DiPure/3'ome,DiPure/2'ome)和现有型加帽类似物(ARCA)制备的650个碱基长的NanoLuc荧光素酶(Nluc)mRNA的翻译活性比较的图。为显示了前者的翻译活性高的实验结果。该图的A表示使用的加帽类似物的化学结构和简称。该图的B表示利用疏水性保护基纯化后的mRNA的5'末端解析结果。将全长mRNA在距5'末端23个碱基的位置用DNA酶切断,将该切断产物通过变性聚丙烯酰胺电泳解析。其结果得知,使用含疏水性保护基的加帽衍生物纯化的mRNA全都仅包含加帽化的5'末端。该图的C表示使用HeLa细胞的Nluc mRNA的活性比较结果。该图的D表示使用JAWS II细胞的Nluc mRNA的活性比较结果。使用含疏水性保护基的加帽类似物DiPure、DiPure/3'ome、DiPure/2'ome制备的mRNA比使用现有型加帽类似物ARCA制备的mRNA显示更高的翻译活性。ARCA/AP表示通过对含ARCA的mRNA作用南极磷酸酶(Antarctic phosphatase)而将共存的未加帽化RNA的5'末端脱磷酸化。

[1056] NLuc mRNA的模板DNA序列如序列编号9所示。NLuc mRNA的序列(转录物)的序列如序列编号10所示。

[1057] 图39中使用的加帽化mRNA是从DNA模板使用T7RNA聚合酶在以下的反应液中转录合成的。反应液:15ng/μL dsDNA转录模板(为包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAG3'(序列编号1)的676-bp的PCR产物且包含源自pNL1.1TK载体(Promega)的NanoLuc荧光素酶基因编码区域)、2mM ATP、2mM UTP、2mM CTP、2mM GTP、2mM加帽类似物、40mM Tris-HCl(pH8.0)、8mM MgCl₂、2mM亚精胺、5mM DTT、10单位/μL T7RNA聚合酶(Takara Bio)。在不含疏水性保护基的ARCA加帽类似物(Jena Bio-Sciences)的转录反应中,相对于ARCA的终浓度2mM,GTP终浓度设为0.5mM。将反应液在37℃加温2小时后,添加DNase(Takara Bio)使其终浓度为0.1单位/μL,在37℃加温20分钟。加入与反应液相同体积的TE饱和苯酚:氯仿的等量混合液,剧烈搅拌后离心分离,分离获取水层。在其中加入等量的氯仿,剧烈搅拌后离心分离,分离获取水层。在水层中添加10分之一量的3M乙酸钠缓冲液(pH5.2)、等量的2-丙醇在负30℃冷却1小时后离心分离,由此得到RNA的粗纯化物。所得到的RNA的粗纯化物通过反相HPLC在以下条件下纯化。柱,YMC-TriartBioC4(250mm×4.6mm I.D.);溶剂A,50mM乙酸三乙基铵(pH7.0),5%乙腈;溶剂B,乙腈;线性梯度0-20%溶剂B(0-20分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,260nm;柱温,50℃。

[1058] 包含含疏水性保护基的加帽类似物的RNA转录体的洗脱时间为13.7分钟至14.0分

钟,不含含疏水性保护基的加帽类似物的RNA转录体的洗脱时间为15.5分钟至15.8分钟,两者明显不同。由此,能够将包含含疏水性保护基的加帽类似物的mRNA分离纯化。包含实施了脱磷酸化处理的ARCA的RNA (ARCA_AP) 如下制备。将反应液(250ng/ μ L ARCA-mRNA、50mM Bis-Tris-丙烷HCl、1mM $MgCl_2$ 、0.1mM $ZnCl_2$ 、pH6.0@25 $^{\circ}C$, 0.25U/ μ L 南极磷酸酶(New England Biolabs),反应液量20 μ L) 在37 $^{\circ}C$ 加温30分钟后,用TE饱和苯酚与氯仿的等量混合液提取,接着用氯仿提取后,添加1/10量的3M NaOAc (pH5.2) 缓冲液和等量的2-丙醇。在-30 $^{\circ}C$ 冷却1小时后,离心,将RNA作为沉淀回收。

[1059] 利用光照射的脱保护:将HPLC纯化后的包含RNA的水溶液加入到透明96孔多孔板,通过MAX-305光源装置(朝日分光)以4mW/ cm^2 的光量照射365nm光10分钟。接着脱保护后的mRNA通过反相HPLC分离纯化。柱, YMC-TriartBioC4 (250mm $\times$ 4.6mm I.D.); 溶剂A, 50mM 乙酸三乙基铵 (pH7.0), 5% 乙腈; 溶剂B, 乙腈; 线性梯度0-20% 溶剂B (0-20分钟); 流速: 1mL/分钟; 检测波长, 260nm; 柱温, 50 $^{\circ}C$ 。

[1060] 末端解析实验:将纯化后的Nluc mRNA用DNA酶(DNAzyme) (35个碱基长的DNA寡核苷酸) 切断,转化成23个碱基长的包含5' 末端片段的混合物,将其用变性PAGE解析。使用的DNA酶序列如下: 5' TTCGAGGCCAGGCTAGCTACAACGAACGCGTCACC 3' (序列编号11)。切断反应的反应液组成如下: 104ng/ μ L (0.5 μ M) Nluc mRNA、1 μ M DNA、5mM Tris-HCl (pH8.0)、5mM 氯化镁、反应液量35 μ L。将反应液在37 $^{\circ}C$ 加温1小时后,加入1/10量的3M 乙酸钠缓冲液 (pH5.2)、等量的2-丙醇、14ng的糖原(共沉淀剂),在-30 $^{\circ}C$ 冷却1小时,通过离心分离将RNA作为沉淀回收。将所得到的RNA溶解于3.5 μ L的水中,将其中2.5 μ L通过作为变性剂包含7.5M的尿素的15% 变性丙烯酰胺凝胶电泳解析。电泳后的凝胶通过核酸染色试剂SYBR Gold染色,通过ChemiDoc MP凝胶成像系统(BioRad) 拍照,将RNA条带可视化。5' 末段RNA切断产物的分子量将上述的醇沉淀后的RNA溶液1 μ L作为底物,使用MALDI-TOF质量分析计ultrafleXtreme (Bruker) 算出。作为基质使用3-羟基吡啶甲酸(3-Hydroxy picolinic acid),使用线性正离子模式(Linear positive mode) 测定。

[1061] 翻译实验(HeLa细胞):HeLa细胞(RIKEN Cell Bank)在添加有10% 胎牛血清(FBS; Invitrogen)的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM; WAKO)中培养(37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2)。从在转染前一天接种于96孔板的HeLa细胞(5×10^3 细胞/孔) 去除培养基,替换成40 μ L/孔Opti-MEM(注册商标)(Thermo Fisher SCIENTIFIC),在其中将mRNA (5ng/孔) 与Lipofectamine(注册商标) MessengerMAX(注册商标) (0.15 μ L/孔) 和Opti-MEM(注册商标) (10 μ L/孔) 混合添加。在37 $^{\circ}C$ 孵育3小时后,以100 μ L/孔添加包含10% FBS的DMEM培养基,进一步培养。在12、24、48小时后使用NanoGlo(注册商标) 荧光素酶检测系统(Promega) 制备细胞溶解液,通过发光测定法评价溶解液所含的NanoLuc荧光素酶蛋白质的量。

[1062] 翻译实验(JAWSII细胞系):JAWSII细胞(ATCC)在添加有10% 胎牛血清(FBS; Invitrogen)、5ng/mL GM-CSF的MEM α 、核苷(nucleosides) (Gibco)的培养基中培养(37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2)。从在转染前一天接种于96孔板的JAWS II细胞(5×10^3 细胞/孔) 除去培养基,替换成40 μ L/孔Opti-MEM(注册商标)(Thermo Fisher SCIENTIFIC),在其中将mRNA (5ng/孔) 与Lipofectamine(注册商标) MessengerMAX(注册商标) (0.15 μ L/孔)、Opti-MEM(注册商标) (10 μ L) 混合添加。在37 $^{\circ}C$ 孵育3小时后,以100 μ L/孔添加包含10% FBS、5ng/mL GM-CSF的MEM α 、nucleosides培养基,进一步培养。24、48、72、120小时后使用NanoGlo(注册商标) 荧光素

酶检测系统(Promega)制备细胞溶解液,通过发光测定法评价溶解液所含的NanoLuc荧光素酶蛋白质的量。

[1063] NLuc的氨基酸序列信息如序列编号12所示。

[1064] (3) 使用三核苷酸型加帽类似物和四核苷酸型加帽类似物合成的NanoLuc荧光素酶(Nluc)mRNA的翻译活性比较

[1065] 图40是表示使用含疏水性保护基的三核苷酸型(TriPure_0,TriPure_1)-四核苷酸型加帽类似物(TetraPure_2,TetraPure_2/m6A,TetraPure_2/G)和现有型加帽类似物(Tri_1,Tetra_2)制备的650个碱基长的NanoLuc荧光素酶(Nluc)mRNA的翻译活性比较的图。为显示前者的翻译活性高的实验结果。该图的A表示使用的加帽类似物的化学结构和简称。该图的B是表示通过利用疏水性保护基的反相HPLC的加帽化mRNA的纯化过程的分析结果。图中的i)、ii)、iii)依次表示转录后反应液的分析结果、从转录后反应液进行HPLC分离后的分析结果、对从转录后反应液分离得到的目标RNA照射365-nm光脱保护后的分析结果。图40的C是使用HeLa细胞的Nluc mRNA的活性比较结果。该图的D是使用JAWS II细胞的Nluc mRNA的活性比较结果。由图的C、D的结果可知,使用含疏水性保护基的加帽类似物(TetraPure_2,TetraPure_2/m6A,TetraPure_2/G)制备的mRNA比使用现有型加帽类似物(Tri_1,具有与TriLink公司售卖的CleanCap AG-相同结构的化合物。和Tetra_2)制备的mRNA显示更高的翻译活性。Tri_1/AP和Tetra_2/AP分别表示通过使南极磷酸酶作用于使用Tri_1和Tetra_2制备的mRNA而将共存的未加帽化RNA的5'末端脱磷酸化得到的mRNA。这些脱磷酸化RNA如下制备。将反应液(250ng/ μ L mRNA、50mM Bis-Tris-丙烷HCl、1mM $MgCl_2$ 、0.1mM $ZnCl_2$ 、pH6.0@25 $^{\circ}C$ 、0.25U/ μ L南极磷酸酶(New England Biolabs),反应液量20 μ L)在37 $^{\circ}C$ 加温30分钟后,用TE饱和苯酚和氯仿的等量混合液萃取,接着用氯仿萃取后,添加1/10量的3M NaOAc (pH5.2)缓冲液和等量的2-丙醇。在-30 $^{\circ}C$ 冷却1小时后,进行离心,将RNA作为沉淀回收。

[1066] 图40中使用的加帽化mRNA如下制备。从DNA模板使用T7RNA聚合酶反应按照以下的条件转录合成mRNA。15ng/ μ L dsDNA转录模板(为包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAG3' (序列编号1)的676-bp的PCR产物且包含来自pNL1.1TK载体(Promega)的NanoLuc荧光素酶基因编码区域)、2mM ATP、2mM UTP、2mM CTP、2mM GTP或[0.5mM GTP+2mM加帽类似物]、40mM Tris-HCl(pH8.0)、8mM $MgCl_2$ 、2mM亚精胺、5mM DTT、10单位/ μ L T7RNA聚合酶(Takara Bio)。在不含疏水性保护基的加帽类似物(Tri_1,Tetra_2)的转录反应中使用了已知它们的导入效率较高的、改变了启动子序列的不同的DNA模板(包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAAG3'的677-bp的PCR产物)。将反应液在37 $^{\circ}C$ 加温2小时后,添加DNase(Takara Bio)使其终浓度为0.1单位/ μ L,在37 $^{\circ}C$ 加温20分钟。在反应液中加入与反应液等量的TE饱和苯酚:氯仿的等量混合液,剧烈搅拌后离心分离,分离获取水层。在其中加入等量的氯仿,再次剧烈搅拌后离心分离,分离获取水层。在水层中添加10分之1量的3M乙酸钠缓冲液(pH5.2)、等量的2-丙醇,在负30 $^{\circ}C$ 冷却1小时后离心分离,由此得到RNA的粗纯化物。所得到的RNA的粗纯化物通过反相HPLC在以下的条件下纯化。柱,YMC-TriartBioC4(250mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A,50mM乙酸三乙基铵(pH7.0),5%乙腈;溶剂B,乙腈;线性梯度0-20%溶剂B(0-20分钟);流速:1mL/分钟;检测波长,260nm;柱温,50 $^{\circ}C$ 。

[1067] 包含含疏水性保护基的加帽类似物的RNA转录体的洗脱时间为13.7分钟至14.0分

钟,不含含疏水性保护基的加帽类似物的RNA转录体的洗脱时间为15.5分钟至15.8分钟,两者不同。由此能够将包含含疏水性保护基的加帽类似物的mRNA分离纯化。

[1068] 利用光照射的脱保护:将由反相HPLC分离的包含含疏水性保护基的加帽类似物的RNA的水溶液加入到透明96孔多孔板中,使用MAX-305光源装置(朝日分光)以 $4\text{mW}/\text{cm}^2$ 的光量照射10分钟365nm光。接着,通过反相HPLC在以下的条件下纯化。柱, YMC-TriartBioC4 (250mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A, 50mM乙酸三乙基铵 (pH7.0), 5%乙腈;溶剂B, 乙腈;线性梯度 0-20%溶剂B (0-20分钟);流速:1mL/分钟;检测波长, 260nm;柱温, 50 $^{\circ}\text{C}$ 。

[1069] 末端解析:将纯化后的Nluc mRNA用DNAzyme (35个碱基长的DNA寡核苷酸) 切断, 转换成23个碱基长的包含5'末端片段的混合物, 将其用变性PAGE解析。使用的DNAzyme序列如下: 5' TTCGAGGCCAGGCTAGCTACAACGAACGCGTCACC 3' (序列编号11)。切断反应的反应液组成如下: 104ng/ μL (0.5 μM) Nluc mRNA、1 μM DNAzyme、5mM Tris-HCl (pH8.0)、5mM氯化镁, 反应液量40 μL 。将反应液在37 $^{\circ}\text{C}$ 加温1小时后, 加入1/10量的3M乙酸钠缓冲液 (pH5.2)、等量的2-丙醇、14ng的糖原 (共沉淀剂) 在-30 $^{\circ}\text{C}$ 冷却1小时后, 通过离心分离将RNA作为沉淀回收。将所得到的RNA溶解于4 μL 的水中, 将其中3 μL 通过作为变性剂包含7.5M的尿素的15%变性丙烯酰胺凝胶电泳解析。电泳后的凝胶通过核酸染色试剂SYBR Gold染色, 利用ChemiDoc MP凝胶成像系统 (BioRad) 拍照, 将RNA的条带可视化。

[1070] 翻译实验 (HeLa细胞系): HeLa细胞 (RIKEN Cell Bank) 在添加有10%胎牛血清 (FBS; Invitrogen) 的Dulbecco改良Eagle培养基 (DMEM; WAKO) 中培养 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)。从在转染前一天接种于96孔板的HeLa细胞 (5×10^3 细胞/孔) 除去培养基, 替换为40 μL /孔Opti-MEM (注册商标) (Thermo Fisher SCIENTIFIC), 在其中将mRNA (5ng/孔) 与Lipofectamine (注册商标) MessengerMAX (注册商标) (0.15 μL /孔) 和Opti-MEM (注册商标) (10 μL /孔) 混合添加。在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3小时后, 以100 μL /孔添加包含10%FBS的DMEM培养基进一步培养。在12、24、48小时后使用NanoGlo (注册商标) 荧光素酶检测系统 (Promega) 制备细胞溶解液, 通过发光测定法评价溶解液所含的NanoLuc荧光素酶蛋白质的量。

[1071] 翻译实验 (JAWSII细胞): JAWSII细胞 (ATCC) 在添加有10%胎牛血清 (FBS; Invitrogen)、5ng/mL GM-CSF的MEM α , nucleosides (Gibco) 培养基中培养 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)。从在转染前一天接种于96孔板的JAWS II细胞 (5×10^3 细胞/孔) 去除培养基, 替换为40 μL /孔Opti-MEM (注册商标) (Thermo Fisher SCIENTIFIC), 在其中将mRNA (5ng/孔) 与Lipofectamine (注册商标) MessengerMAX (注册商标) (0.15 μL /孔)、Opti-MEM (注册商标) (10 μL) 混合添加。在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3小时后, 以100 μL /孔添加包含10%FBS、5ng/mL GM-CSF的MEM α , nucleosides培养基进一步培养。在24、48、72、120小时后使用NanoGlo (注册商标) 荧光素酶检测系统 (Promega) 制备细胞溶解液, 通过发光测定法评价溶解液所含的NanoLuc荧光素酶蛋白质的量。

[1072] (4) 链长更长的加帽化mRNA的利用反相HPLC的分离纯化

[1073] 图41表示了4247个碱基长的RNA链的转录时加入含疏水性保护基的加帽类似物 (DiPure) 制备的加帽化mRNA的利用反相HPLC的分析结果。如果比较不添加本加帽类似物的情况 (a) 和添加本加帽类似物的情况 (b), 则可知未加帽化体的洗脱时间为31.3分钟, 加帽化RNA的洗脱时间为34.0分钟。这两个具有不同的洗脱时间, 可知由此能够将加帽化RNA和未加帽化RNA分离。使用DNAzyme将分离后的mRNA的距5'末端23个碱基的位置切断, 将该切

断产物通过变性PAGE解析的结果表示于(c)。得知通过利用帽结构的疏水性保护基的纯化,能够分离加帽化mRNA。

[1074] 刺突蛋白mRNA的模板DNA序列(4375-bp)如序列编号13所示。刺突蛋白mRNA的序列(转录物)4247base如序列编号14所示。

[1075] 图41中使用的加帽化mRNA从DNA模板使用T7RNA聚合酶在以下的反应液中转录合成。反应液:5ng/ μ L dsDNA转录模板(包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAG3' (序列编号1)的4375-bp的PCR产物)、2mM ATP、2mM UTP、2mM CTP、2mM GTP、2mM Pure加帽类似物(DiPure)、40mM Tris-HCl(pH8.0)、8mM $MgCl_2$ 、2mM亚精胺、5mM DTT、10单位/ μ L T7RNA聚合酶(Takara Bio)。将反应液在37℃加温2小时后,添加DNase(Takara Bio)使其终浓度为0.1单位/ μ L,在37℃加温20分钟。加入与反应液相同体积的TE饱和苯酚:氯仿的等量混合液,剧烈搅拌后,离心分离,分离获取水层。在其中加入等量的氯仿,剧烈搅拌后离心分离,分离获取水层。在水层中添加10分之1量的3M乙酸钠缓冲液(pH5.2)、等量的2-丙醇,在负30℃冷却1小时后离心分离,由此得到RNA的粗纯化物。将所得到的RNA的粗纯化物通过反相HPLC在以下的条件下分析。柱,Nacalai Tesque Cosmosil RNA RP-1(200mm $\times$ 4.6mm I.D.);溶剂A,100mM乙酸三乙基铵(pH7.0),5%乙腈;溶剂B,100mM乙酸三乙基铵(pH7.0),50%乙腈;线性梯度10-25%溶剂B(0-60分);流速:1mL/分钟;检测波长,254nm;柱温,50℃。

[1076] 将纯化后的mRNA用DNAzyme(39个碱基长的DNA寡核苷酸)切断,转化成23个碱基长的包含5'末端片段的混合物,将其用变性PAGE解析。使用DNAzyme序列如下:5' TCTGTGGGGA GGCTAGCTACAACGACAGAAGAATACTAG 3' (序列编号19)。切断反应的反应液组成如下:688ng/ μ L mRNA(DiPure)、1 μ M DNAzyme、5mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM氯化镁,反应液量9 μ L。将反应液在37℃加温1小时后,加入2 μ L的3M乙酸钠缓冲液(pH5.2)、20 μ L的2-丙醇、20ng的糖原(共沉淀剂),在-30℃冷却1小时后,通过离心分离将RNA作为沉淀回收。将所得到的RNA溶解于3 μ L的水中,将其中3 μ L通过作为变性剂包含7.5M的尿素的15%变性丙烯酰胺凝胶电泳解析。电泳后的凝胶通过核酸染色试剂SYBR Gold染色,利用ChemiDoc MP凝胶成像系统(BioRad)拍照,将RNA的条带可视化。

[1077] (5)与现有型mRNA比较的PureCap型mRNA的优点

[1078] 图42是表示PureCap型mRNA不导入甲基假尿嘧啶核苷(参照日本特开2021-35979)而显示高的蛋白质合成量的结果。以往的ARCA(Cap_0)和CleanCap(Cap_1)通过导入甲基假尿嘧啶核苷而使蛋白质合成量提高。另一方面,PureCap通过导入甲基假尿嘧啶核苷而使蛋白质合成量下降。考虑整体,表明PureCap型mRNA的蛋白质合成量高。

[1079] 1甲基假尿嘧啶核苷修饰mRNA、未修饰mRNA如下制备。

[1080] 从DNA模板使用T7RNA聚合酶反应按照以下的条件转录合成mRNA。15ng/ μ L dsDNA转录模板(包含T7启动子序列5' TAATACGACTCACTATAG3' (序列编号1)的676-bp的PCR产物且包含来自pNL1.1TK载体(Promega)的NanoLuc荧光素酶基因编码区域)、2mM ATP、2mM 1甲基伪UTP或UTP、2mM CTP、2mM GTP、2mM PureCap型加帽类似物或[0.5mM GTP+2mM ARCA加帽类似物(Jena Biosciences)]、40mM Tris-HCl(pH8.0)、8mM $MgCl_2$ 、2mM亚精胺、5mM DTT、10单位/ μ L T7RNA聚合酶(Takara Bio)。将反应液在37℃加温2小时后,添加DNase(Takara Bio)使得终浓度为0.1单位/ μ L,在37℃加温20分钟。在反应液中加入与反应液等量的TE饱和苯酚:氯仿的等量混合液,剧烈搅拌后离心分离,分离获取水层。在其中加入等量的氯仿,再次

剧烈搅拌后离心分离,分离获取水层。在水层中添加10分之1量的3M乙酸钠缓冲液(pH5.2)、等量的2-丙醇,以负30℃冷却1小时后离心分离,由此得到RNA的粗纯化物。所得到的RNA的粗纯化物通过反相HPLC在以下的条件下纯化。柱, YMC-TriartBioC4(250mm×4.6mm I.D.); 溶剂A, 50mM乙酸三乙基铵(pH7.0), 5%乙腈; 溶剂B, 乙腈; 线性梯度0-20%溶剂B(0-20分钟); 流速: 1mL/分钟; 检测波长, 260nm; 柱温, 50℃。

[1081] 包含含疏水性保护基的加帽类似物的RNA转录体的洗脱时间为16.0分钟至16.8分钟, 不含含疏水性保护基的加帽类似物的RNA转录体的洗脱时间为13.4分钟至14.0分钟, 两者不同。由此能够将包含含疏水性保护基的加帽类似物的mRNA分离纯化。

[1082] 如下制备的mRNA的翻译活性评价如下。JAWS II细胞(ATCC)在添加有10%胎牛血清(FBS; Invitrogen)、5ng/mL GM-CSF的MEM α , nucleosides(Gibco)培养基中培养(37℃、5%CO₂)。在转染前一天接种于96孔板的JAWS II细胞(5×10^3 细胞/孔)除去培养基, 替换成40 μ L/孔Opti-MEM(注册商标)(Thermo Fisher SCIENTIFIC), 在其中将mRNA(5ng/孔)与Lipofectamine(注册商标) MessengerMAX(注册商标)(0.15 μ L/孔)、Opti-MEM(注册商标)(10 μ L)混合添加。在37℃孵育3小时后, 以100 μ L/孔添加包含10%FBS、5ng/mL GM-CSF的MEM α , nucleosides培养基进一步培养。在24、48、72、120小时后使用NanoGlo(注册商标)荧光素酶检测系统(Promega)制备细胞溶解液, 通过发光测定法评价溶解液所含的NanoLuc荧光素酶蛋白质的量。

[1083] 图43是进行细胞内的免疫应答的评价(HEK293NF-kB细胞)的结果, 可知PureCap型mRNA比ARCA等的现有型mRNA显示更低的免疫应答。

[1084] NF- κ B reporter(Luc)-HEK293细胞(BPS Bioscience Inc.)在添加有10%胎牛血清(FBS; Invitrogen)、100 μ g/ml潮霉素B的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM; WAKO)中培养(37℃、5%CO₂)。在转染前一天, 在48孔板中接种NF- κ B reporter(Luc)-HEK293细胞(7.5×10^4 cell/孔)。第二天将培养基除去, 替换成225 μ L/孔Opti-MEM(注册商标)(Thermo Fisher SCIENTIFIC)。将0.375 μ L Lipofectamine(注册商标) MessengerMAX(注册商标)、12.5ng mRNA(DiPure)用25 μ L Opti-MEM(注册商标)稀释, 导入细胞。在37℃孵育5小时后, 加入50 μ L/孔1×细胞裂解缓冲液(Promega)将细胞裂解。使用ONE-Glo(注册商标) luciferase assay(注册商标)(Promega)进行发光测定。使用Pierce(注册商标) BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher SCIENTIFIC)对蛋白质量定量, 将发光值用细胞数校正。

[1085] 图44是纯度高的PureCap型mRNA在动物个体内相比于ARCA型mRNA显示更高的蛋白质表达能力的结果。单独使用递送向小鼠导入luc mRNA的结果得知, PureCap型mRNA具有高的蛋白质表达能力。作为mRNA向小鼠的授予方法, 通过封装在脂质纳米颗粒(LNP)中进行。mRNA封装LNP使用超高速纳米医药品制作装置(nanoAssemblr Spark)来制备(Nitrogen/phosphate比(N/P比)=5、D-Lin-MC3-DMA: DSPC: 胆固醇: DMG-PEG2000=50:10:38.5:1.5(摩尔比))。制备的mRNA封装LNP在balb/c雌7w中以成为2 μ g mRNA/小鼠的方式通过尾静脉授予。4小时后将其杀死, 将脏器浸在被动裂解液(Passive Lysis Buffer)(Promega)中, 进行匀浆。使用NanoLuc(注册商标) Luciferase Technology(Promega)检测发光。

[1086] 图45是进行细胞内的免疫应答的评价(HEK293NF-kB细胞)的结果。图45(a)表示将50ng和100ng的mRNA授予给HEK293NF-kB细胞时的免疫应答的结果, 图45(b)表示将100ng的

mRNA授予给HEK293NF- κ B细胞时的免疫应答的结果。得知PureCap型mRNA (DiPure、TriPure_0、TriPure_1、TetraPure_2、TetraPure_2/m6A) 比使用ARCA合成的现有型mRNA显示更低的免疫应答。

[1087] NF- κ B reporter (Luc) -HEK293细胞 (BPS Bioscience Inc.) 在添加有10%胎牛血清 (FBS; Invitrogen)、100 μ g/ml潮霉素B的Dulbecco改良Eagle培养基 (DMEM; WAKO) 中培养 (37 $^{\circ}$ C、5%CO₂)。在转染前一天, 在48孔板中接种NF- κ B reporter (Luc) -HEK293细胞 (1.0 $\times$ 10⁵ cell/孔)。第二天除去培养基, 替换成240 μ L/孔Opti-MEM (注册商标) (Thermo Fisher SCIENTIFIC)。将0.15 μ L Lipofectamine (注册商标) MessengerMAX (注册商标)、100ng mRNA用10 μ L Opti-MEM (注册商标) 稀释, 导入细胞。在37 $^{\circ}$ C孵育24小时后, 加入50 μ L/孔1 $\times$ 细胞裂解缓冲液 (Promega) 将细胞裂解。使用ONE-Glo (注册商标) luciferase assay (注册商标) (Promega) 测定发光。使用Pierce (注册商标) BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC), 对蛋白质量进行定量, 将发光值用细胞数校正。

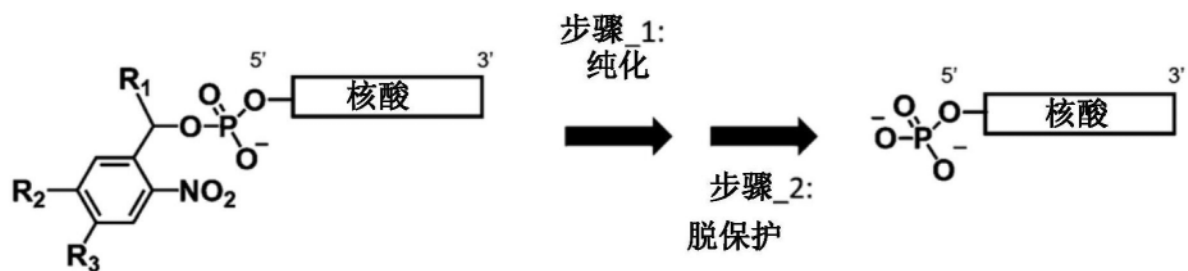


图1

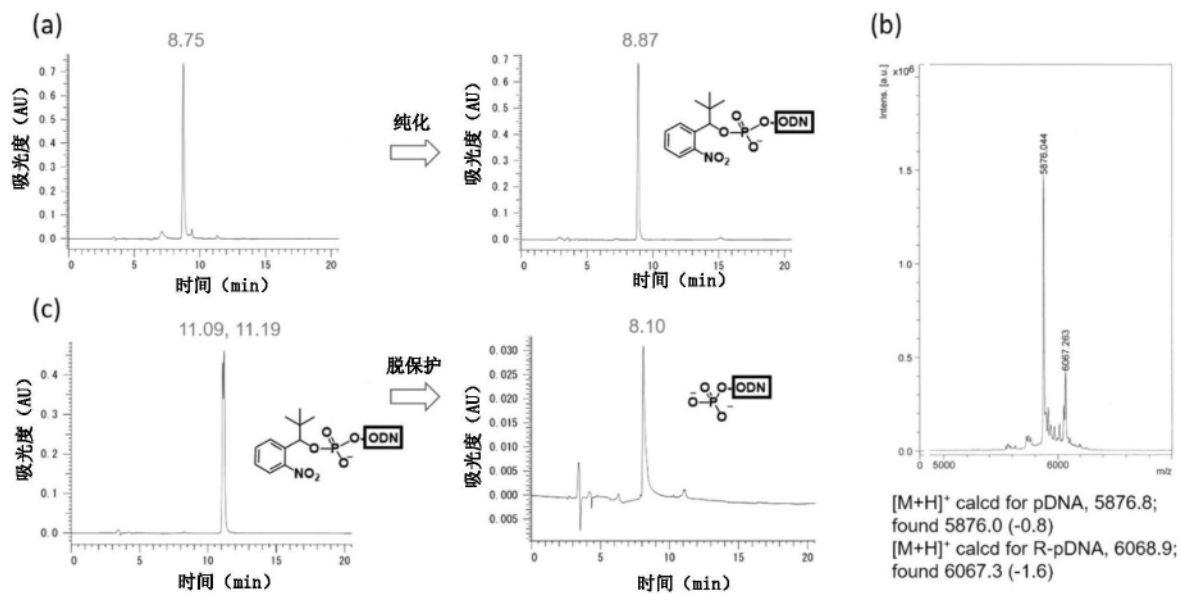


图2

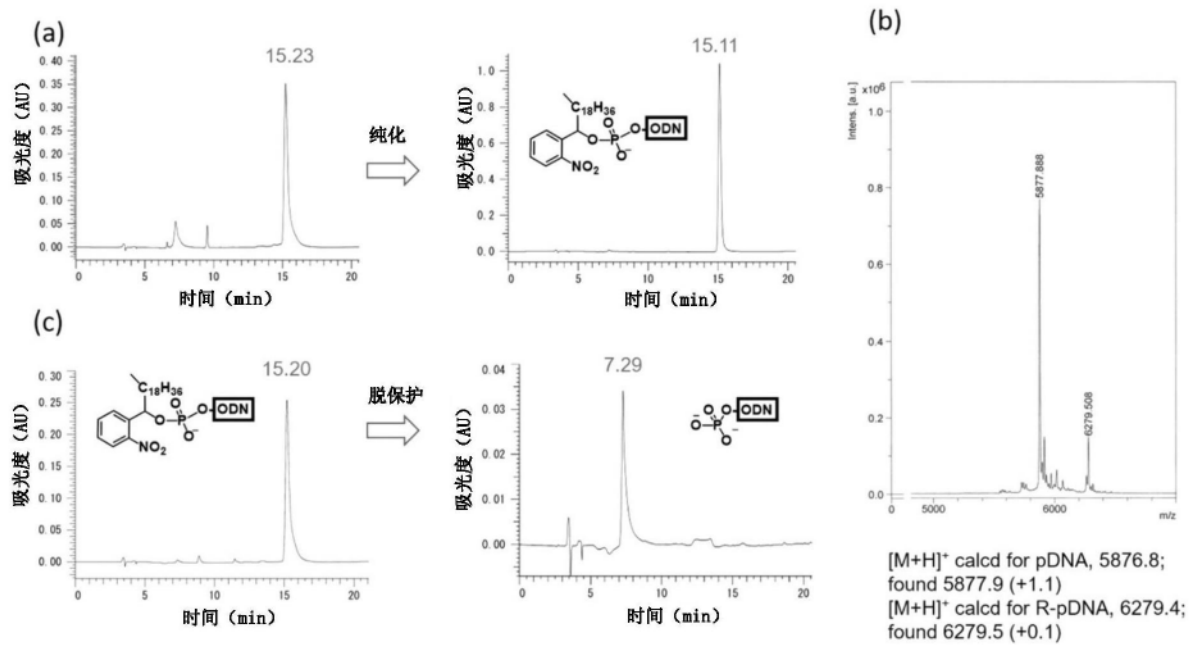


图3

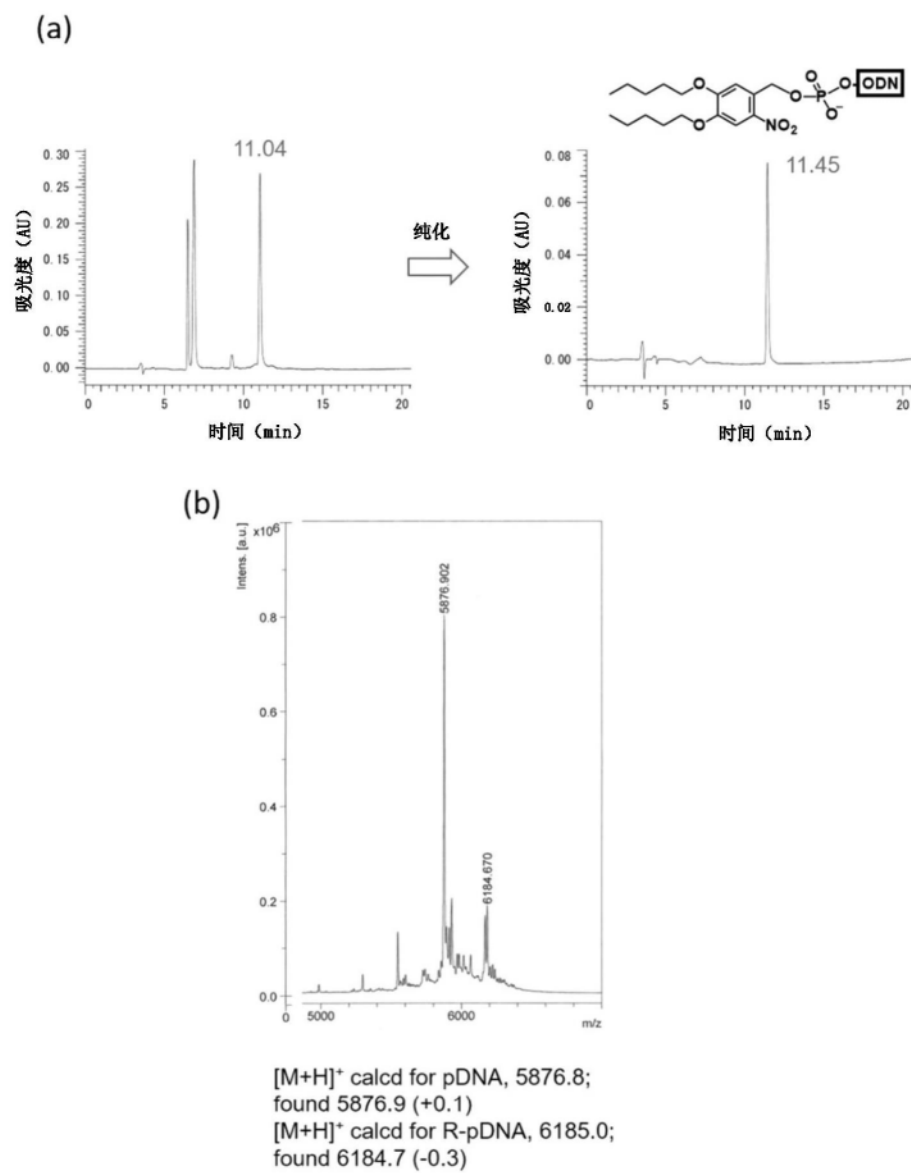
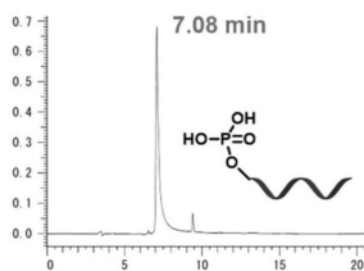
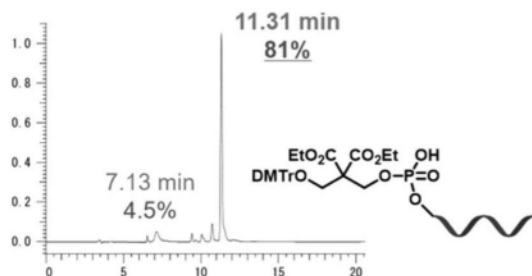


图4

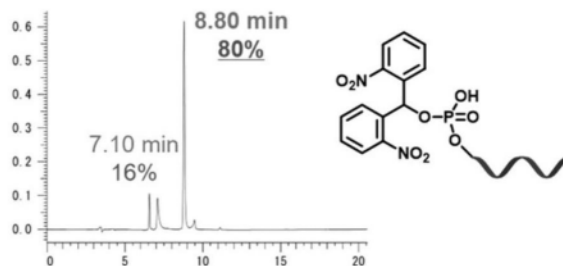
a) CPR I (市售)



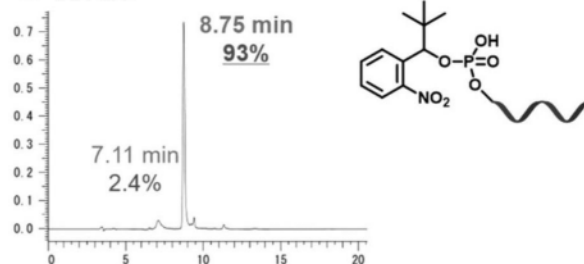
b) CPR II (市售)



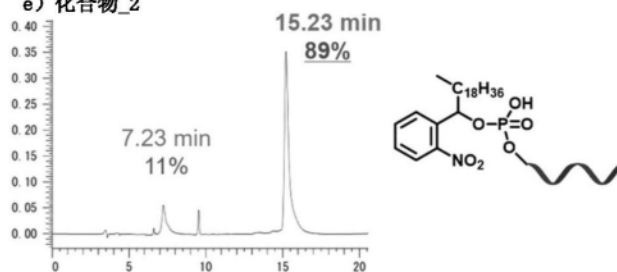
c) Chem Eur J 23, 5210 (2017) 中的试剂



d) 化合物_1



e) 化合物_2

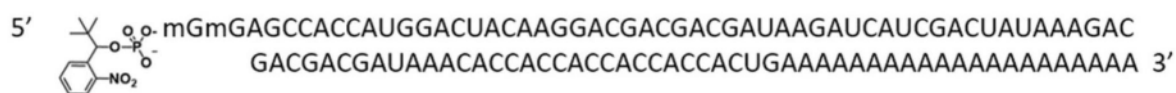


f) 该研究的总结

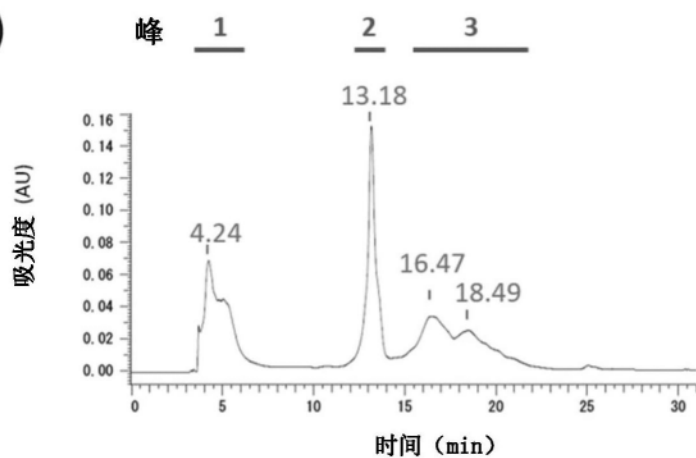
试剂名称	RP-HPLC中的保留时间 (min)	收率 (%)
CPR II	11.31	81
文献中的试剂*	8.80	80
化合物_1	8.75	93
化合物_2	15.23	89

图5

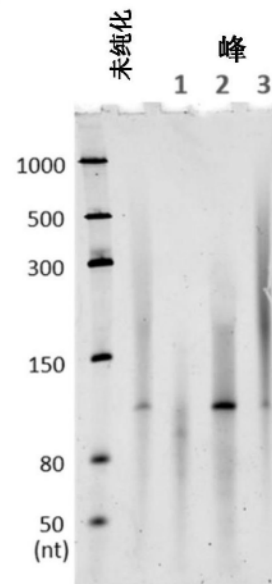
a) 107-nt RNA的序列 (5' -O-保护)



b)



c)



d)

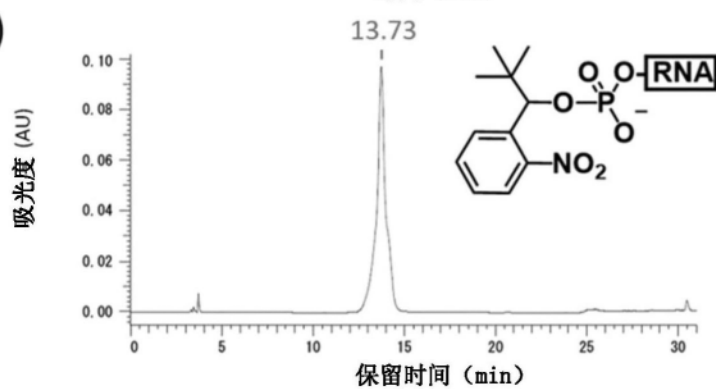


图6

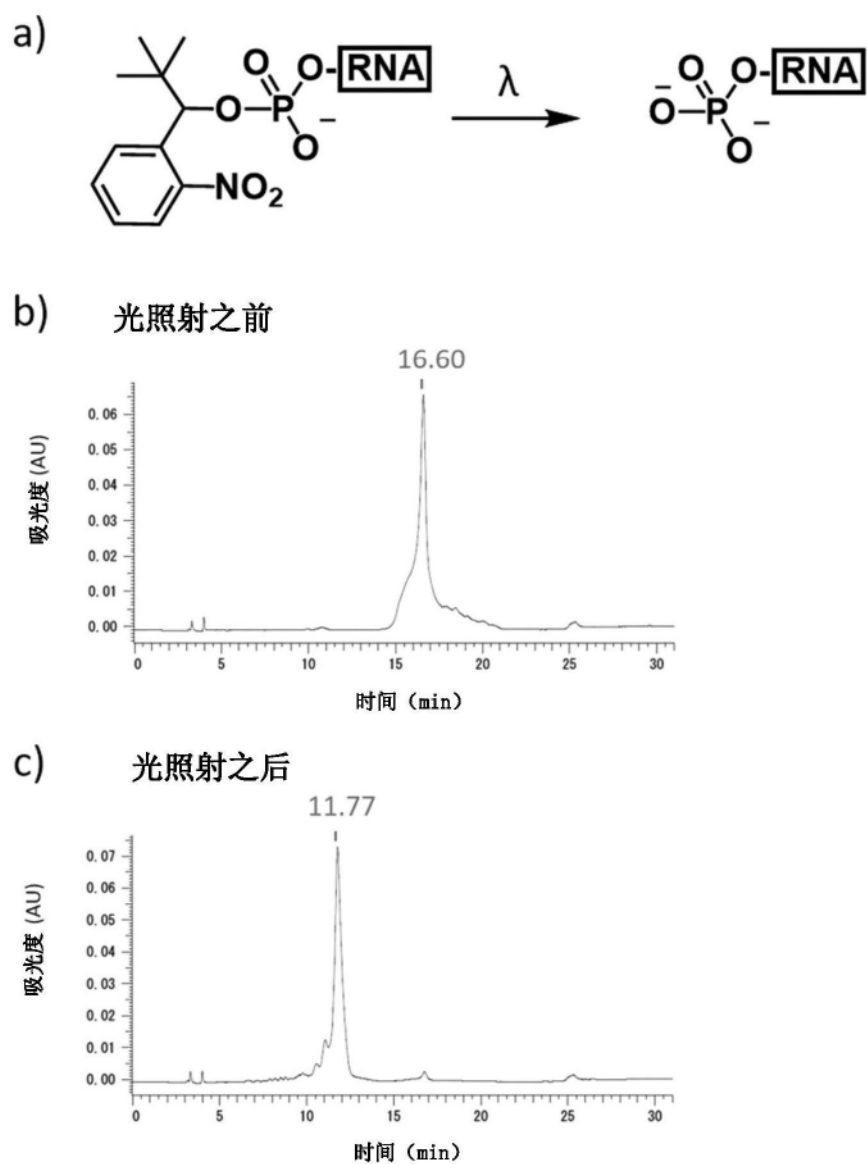
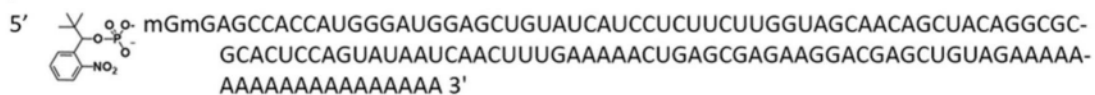
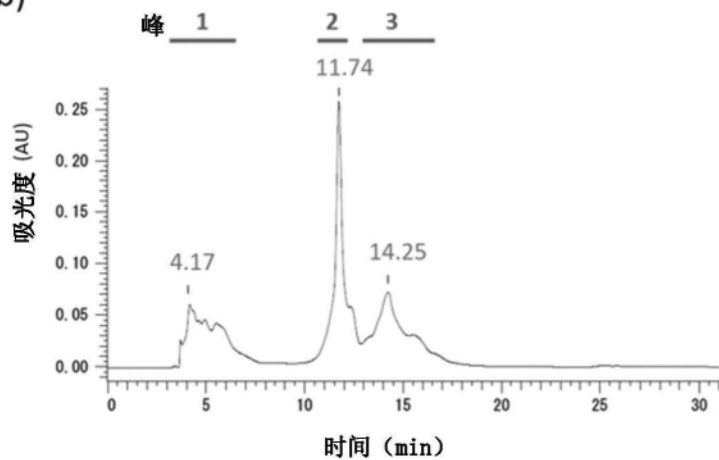


图7

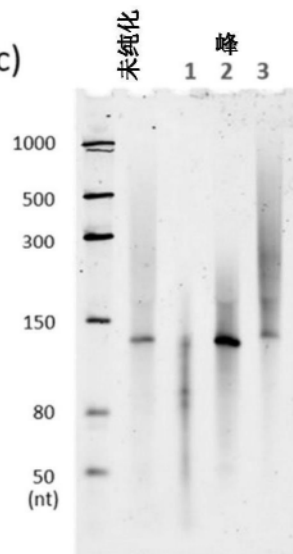
a) 131-nt RNA的序列 (5' -OP-保护)



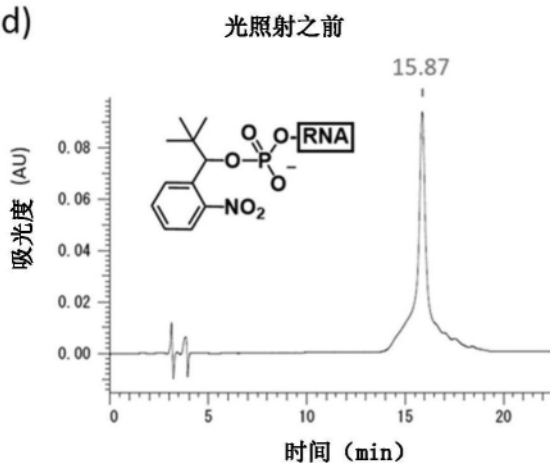
b)



c)



d)



e)

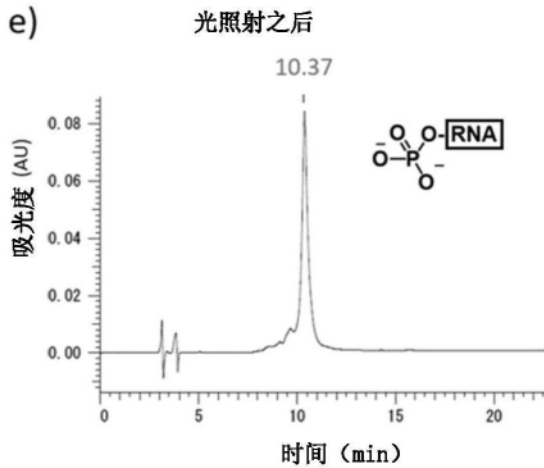


图8

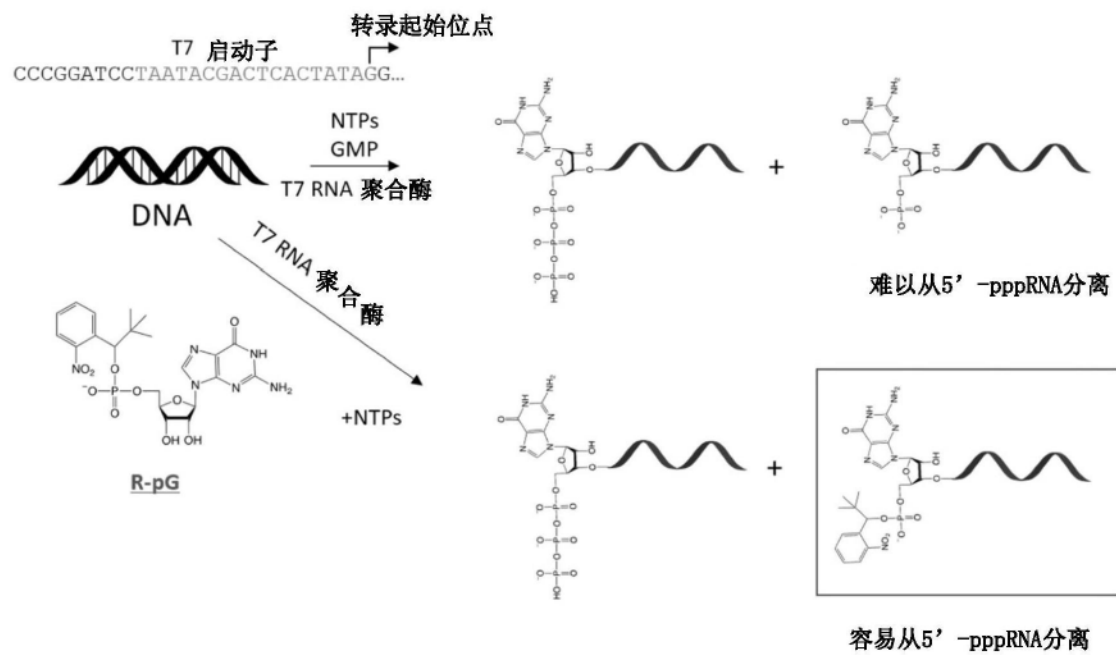
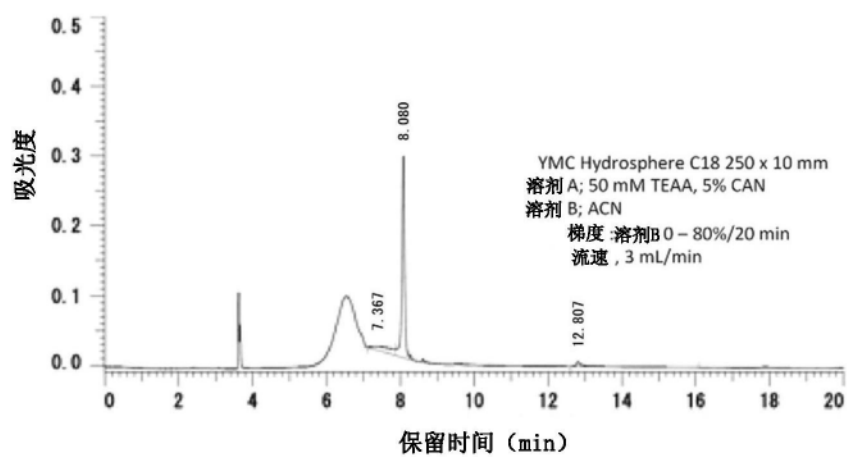


图9

(a) pG (GMP)



(b) R-pG

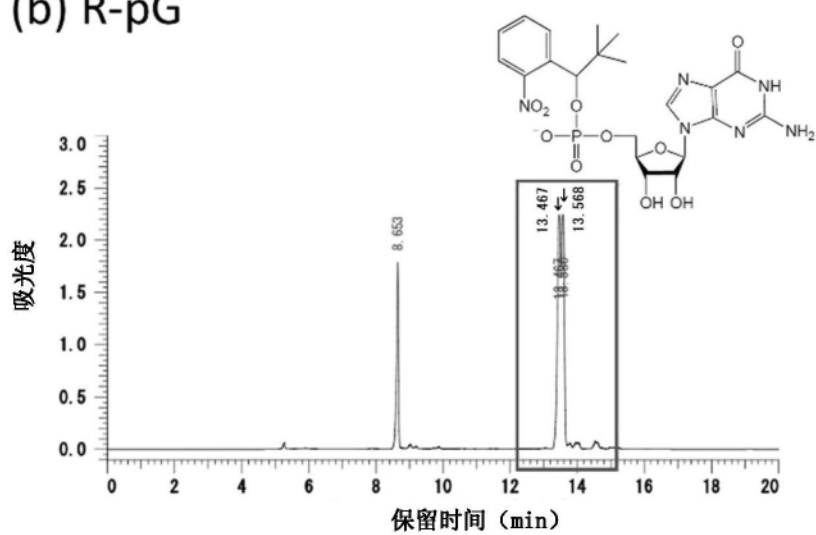


图10

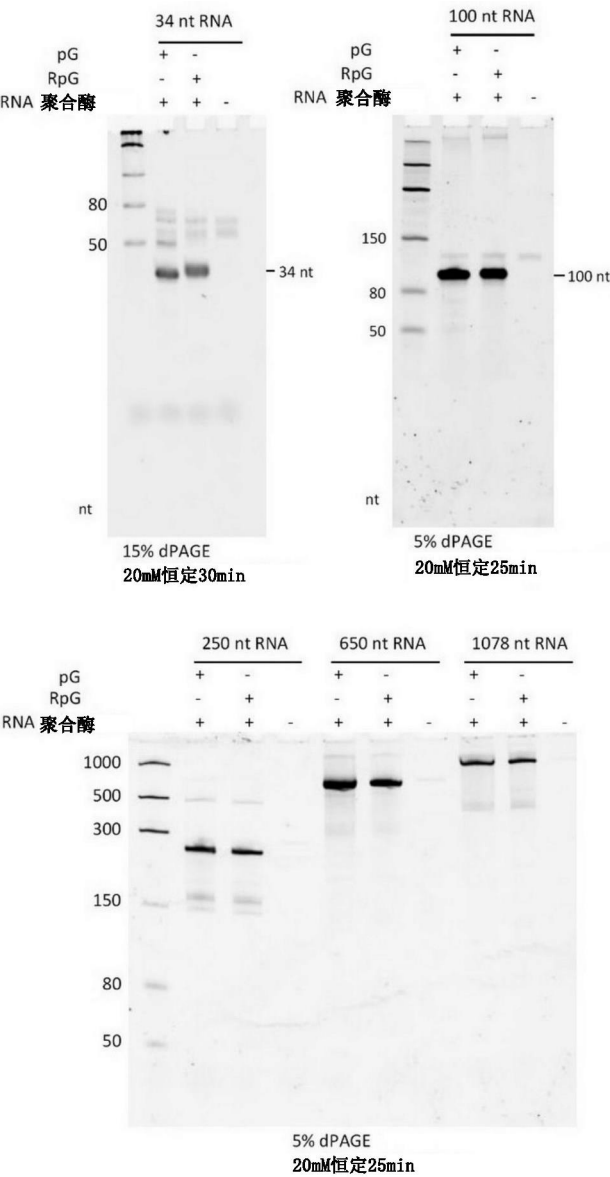


图11

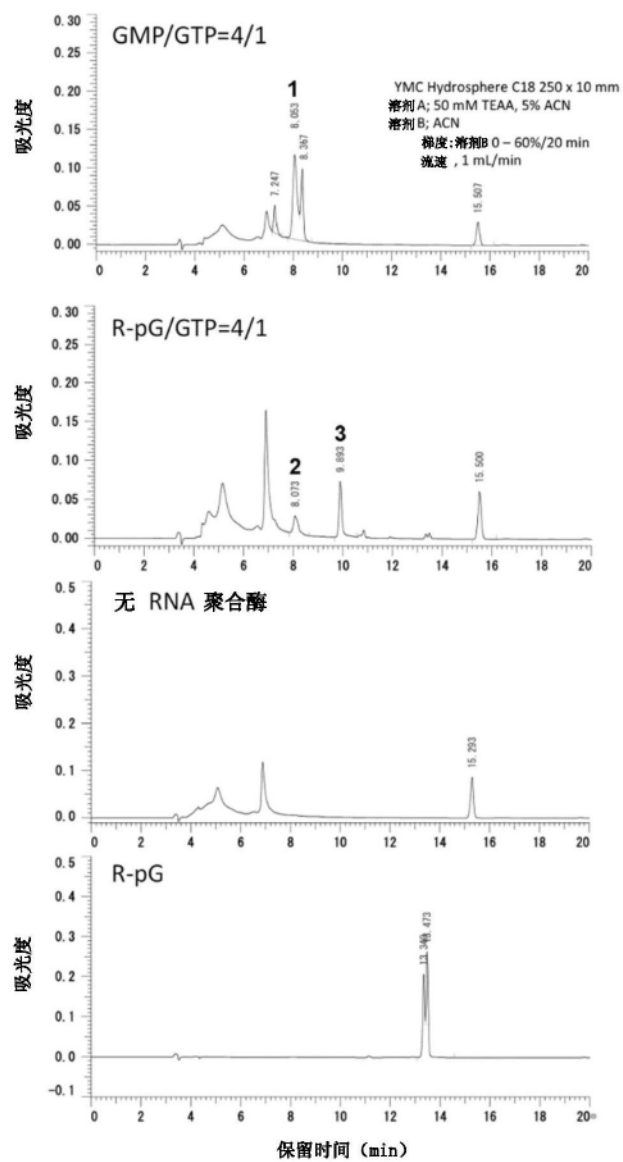


图12

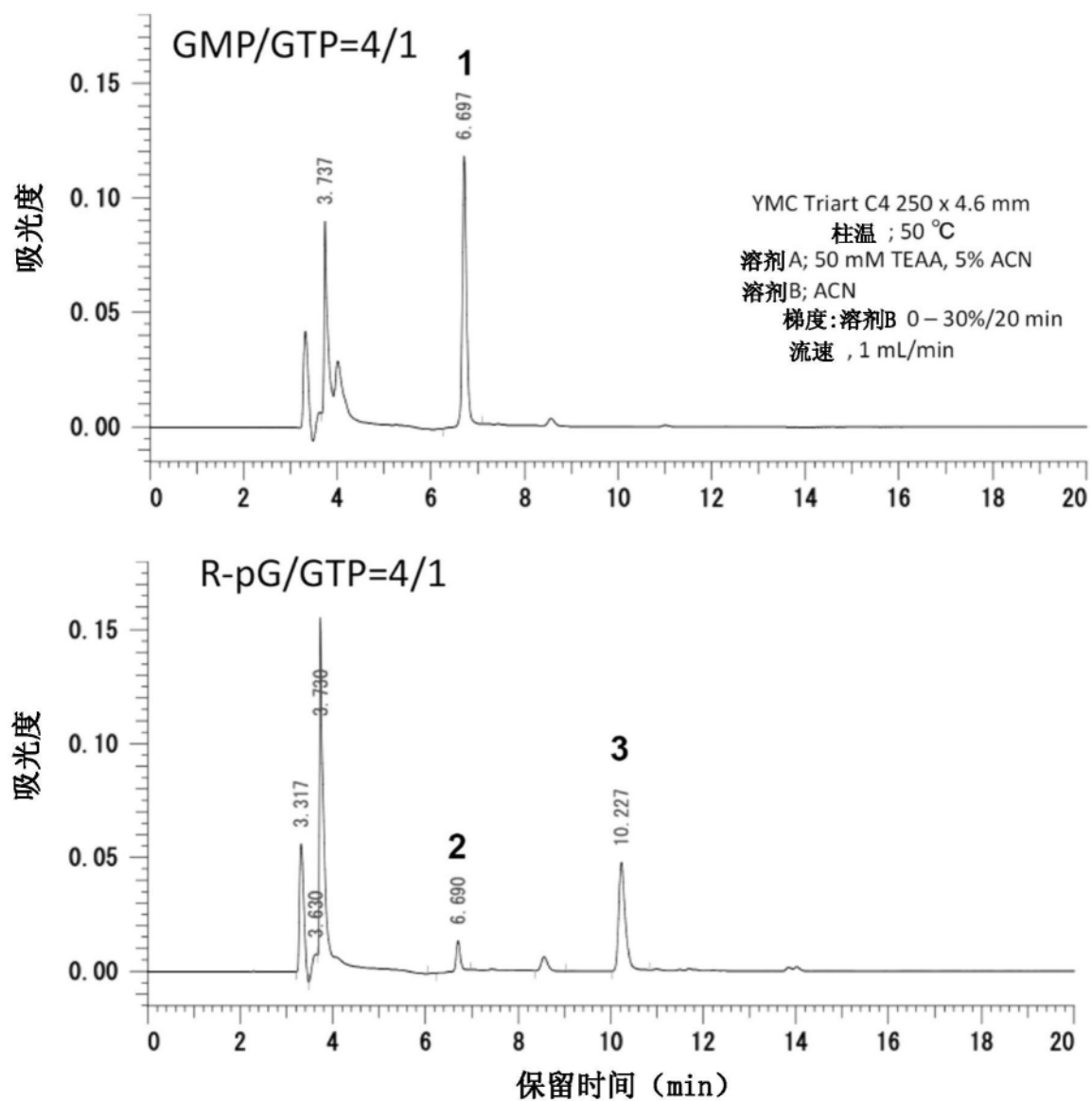


图13

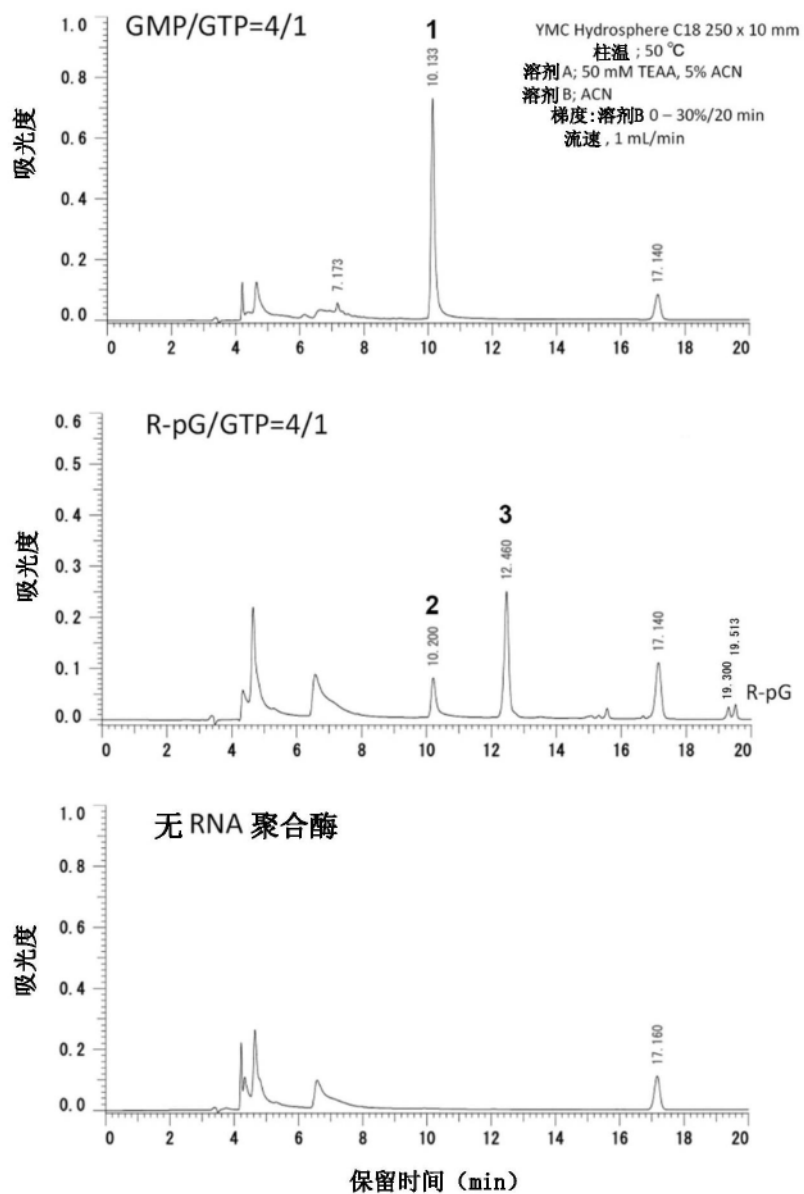


图14

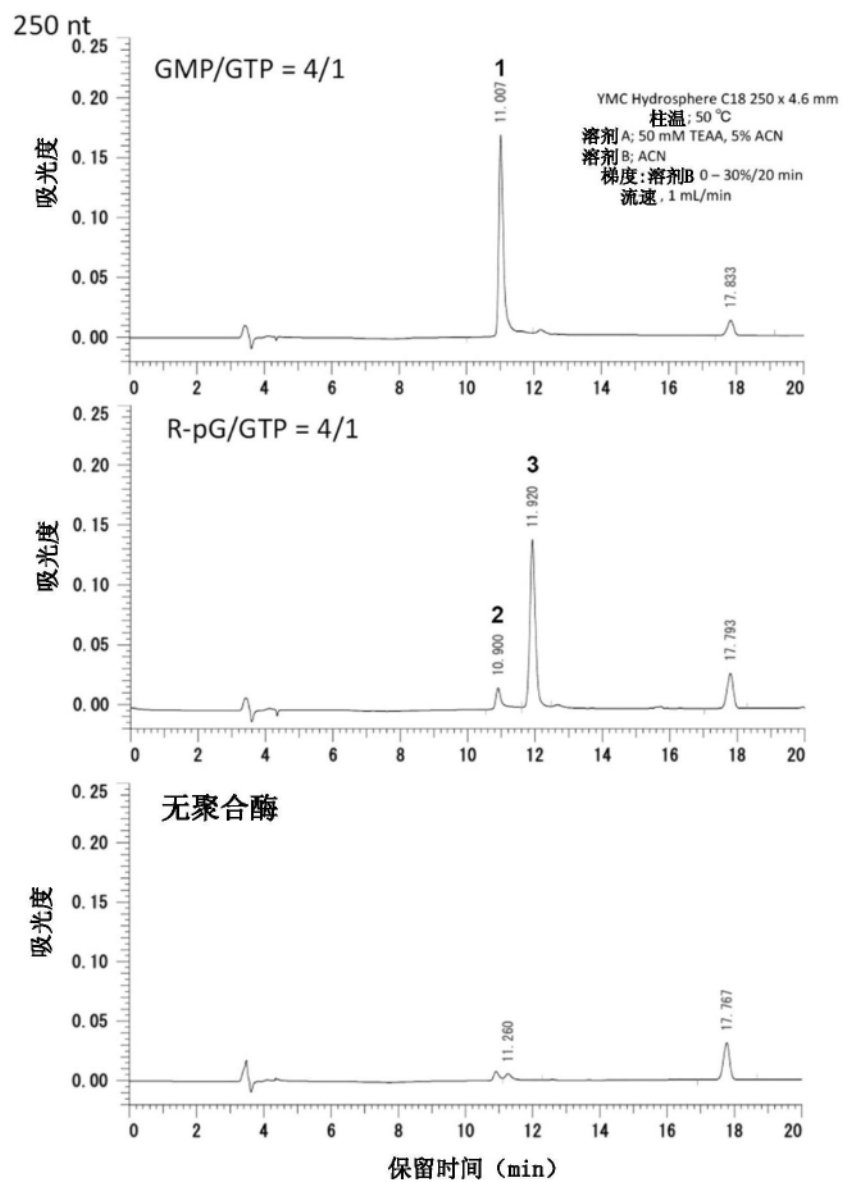


图15

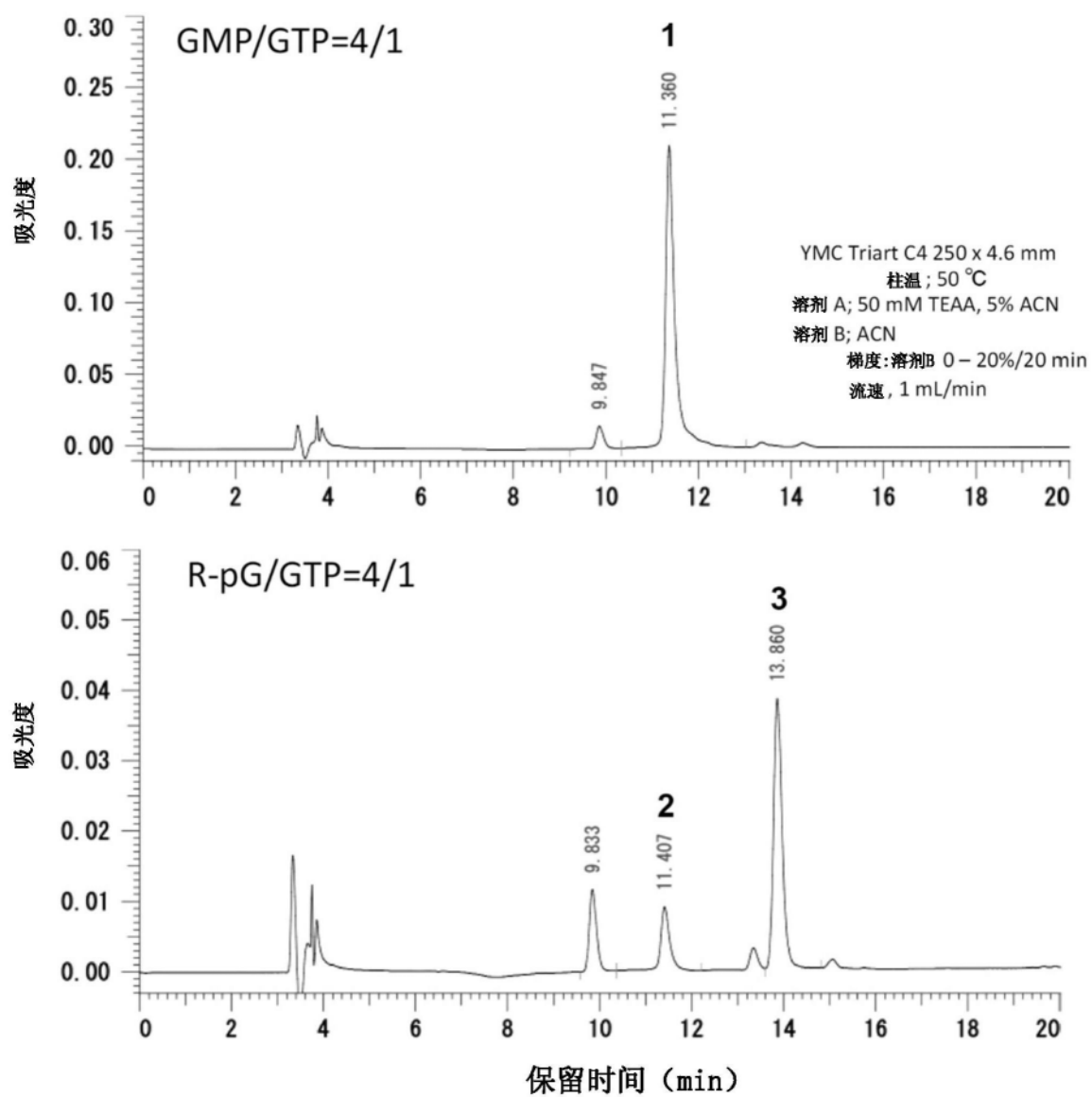


图16

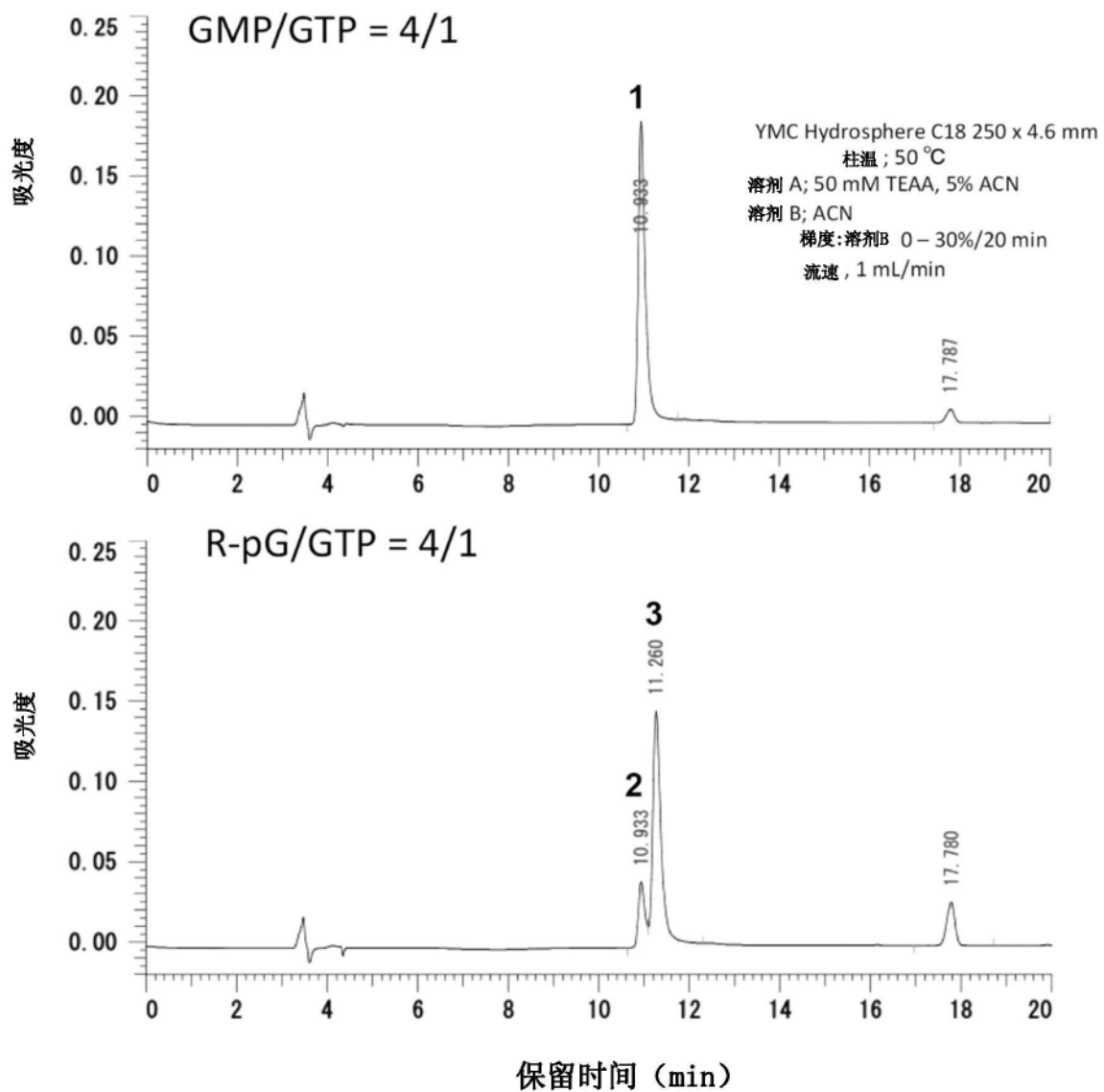


图17

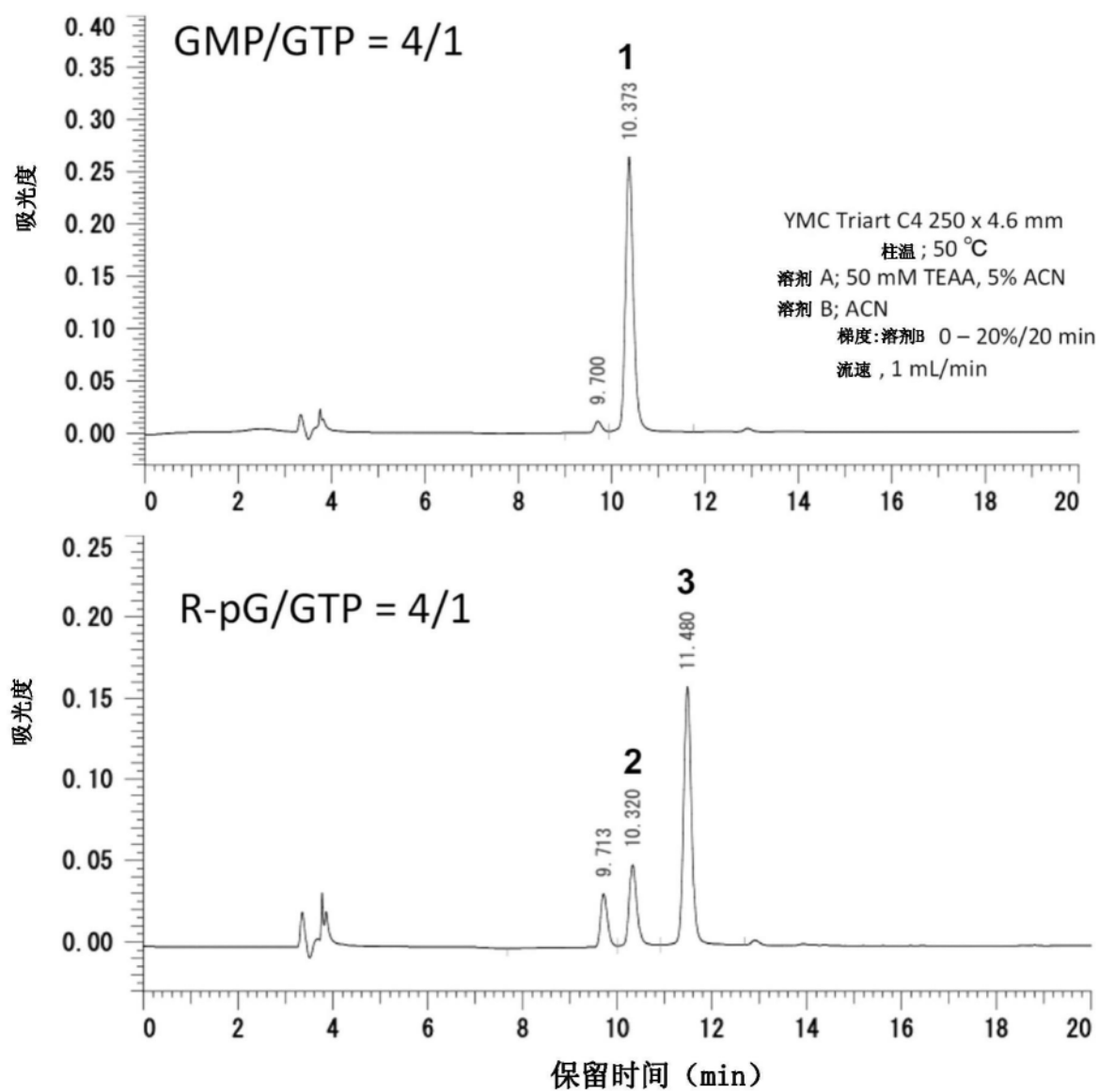


图18

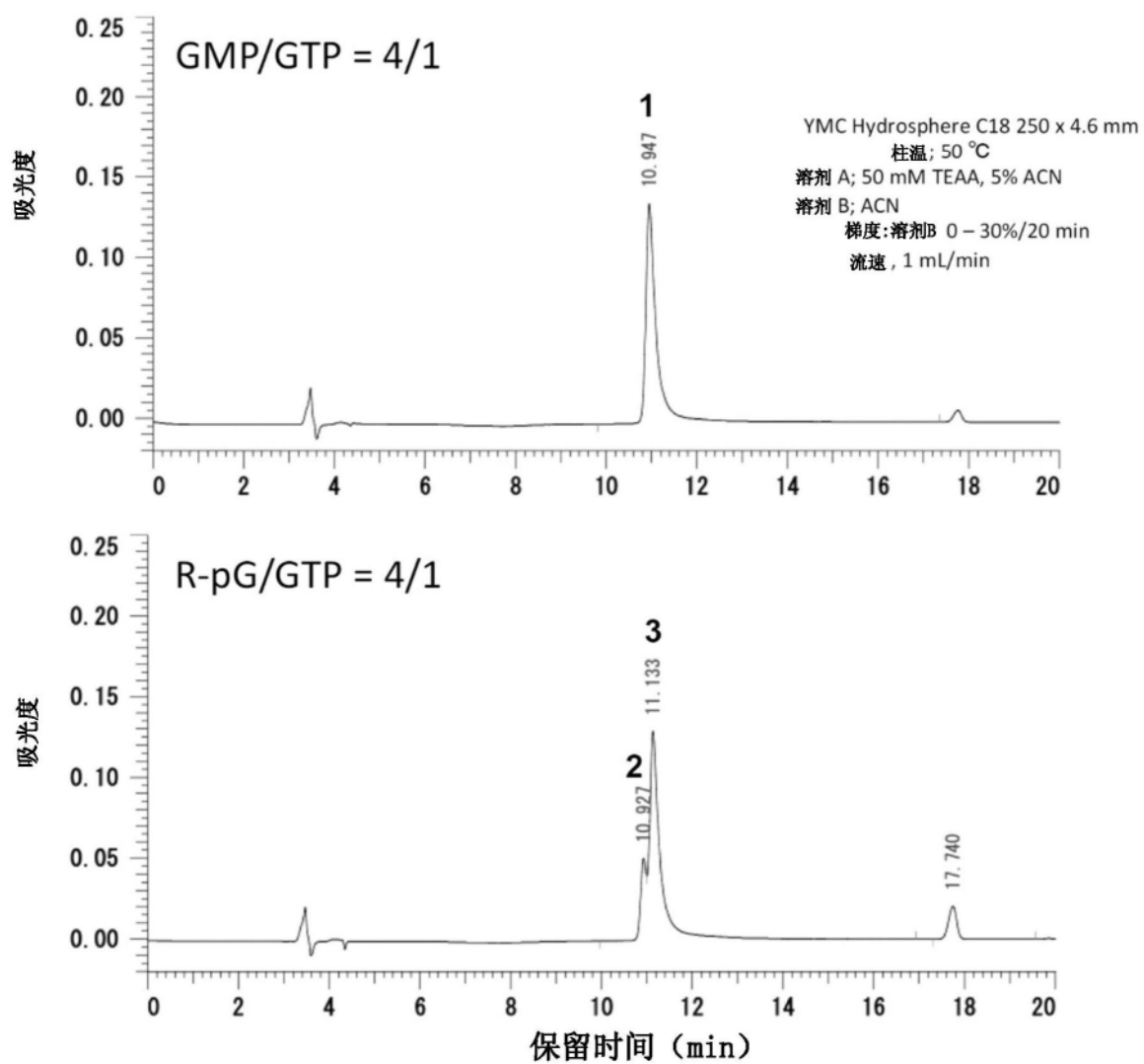


图19

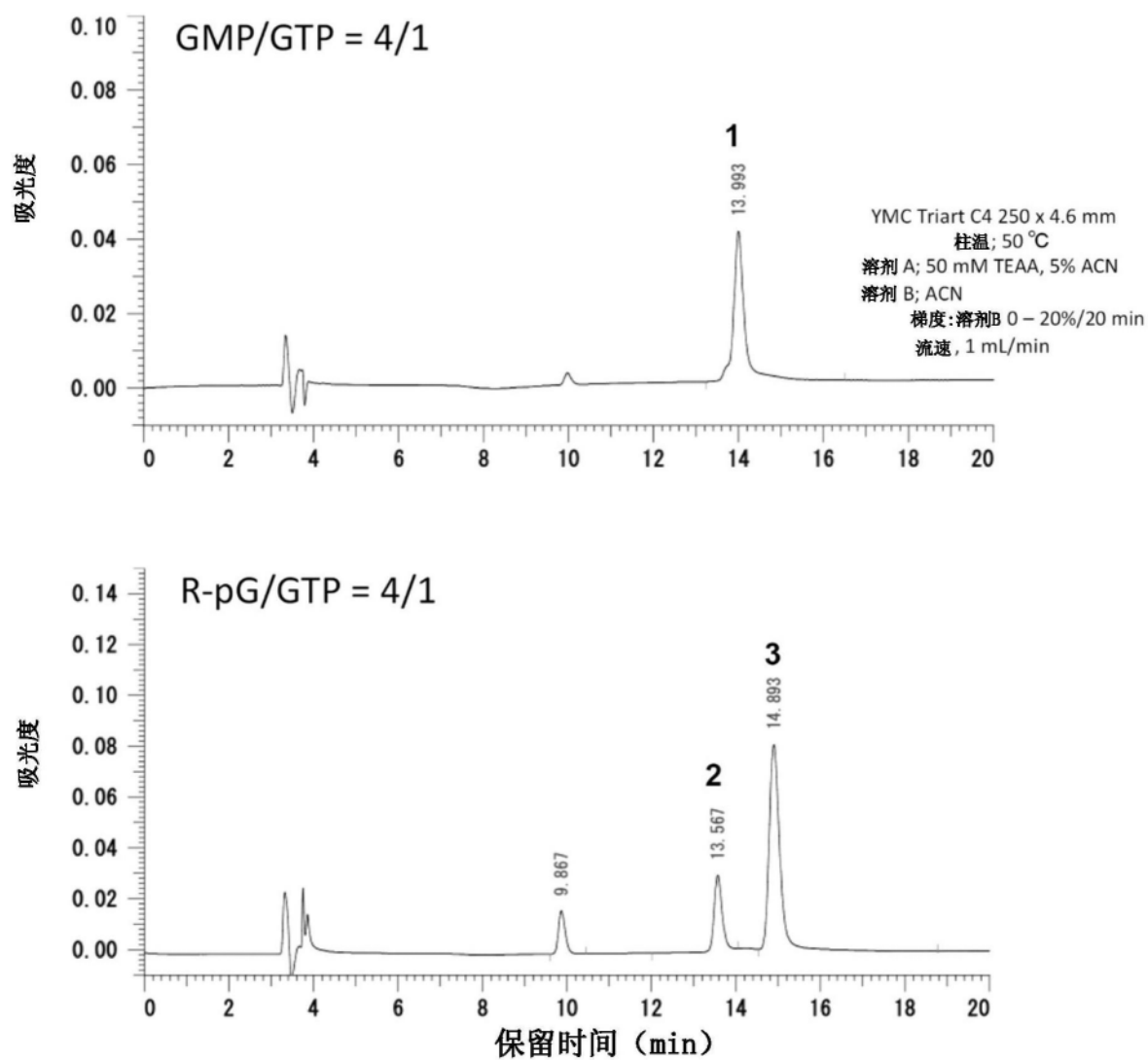


图20

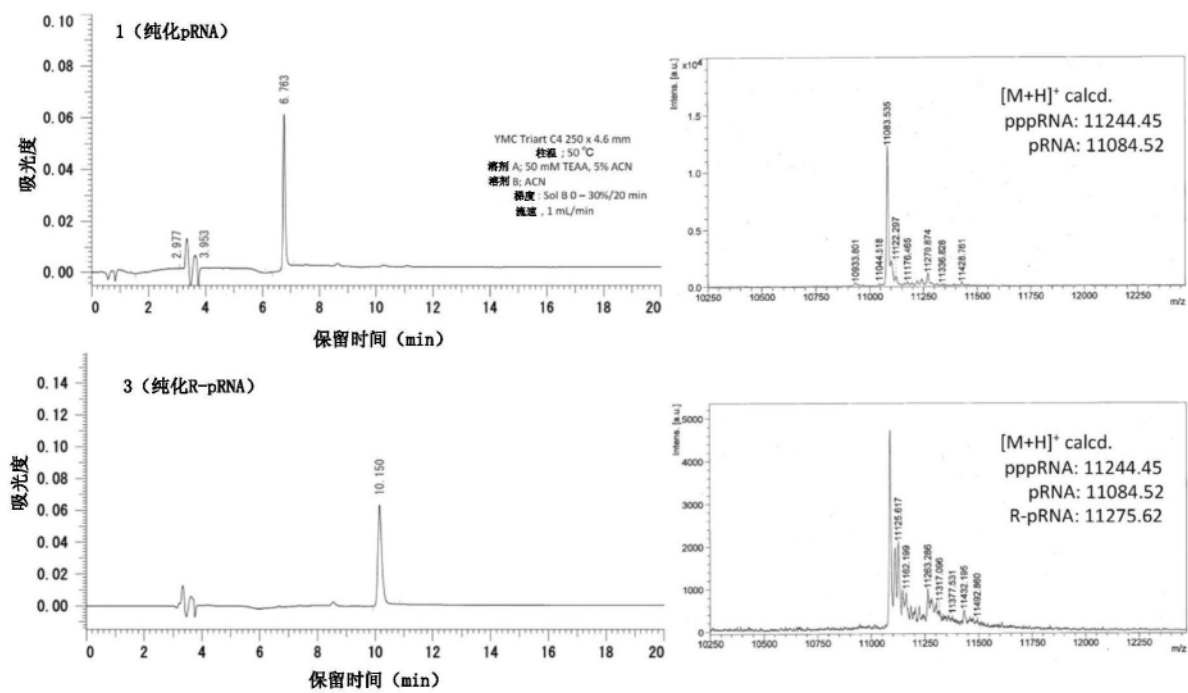


图21

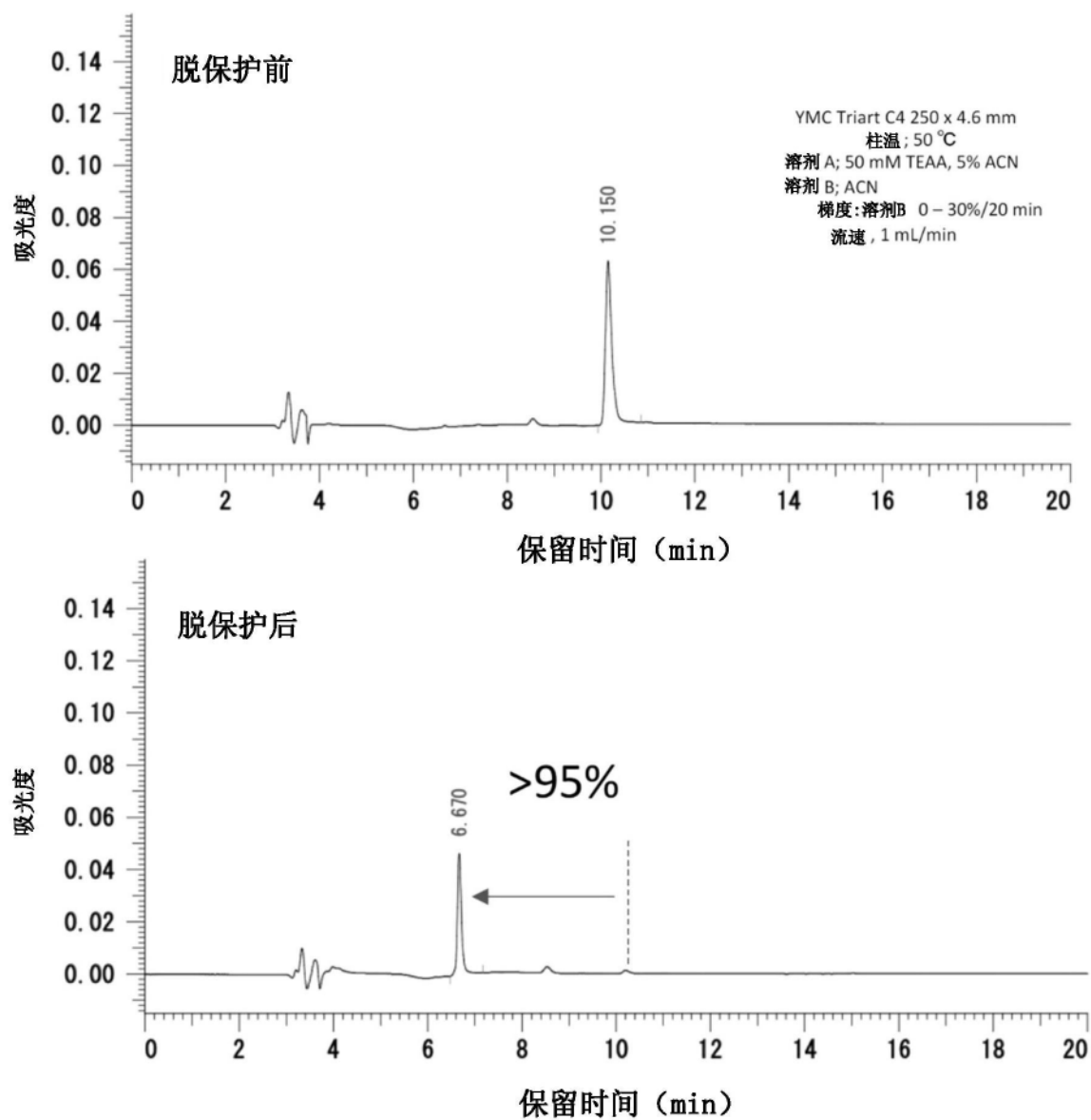


图22

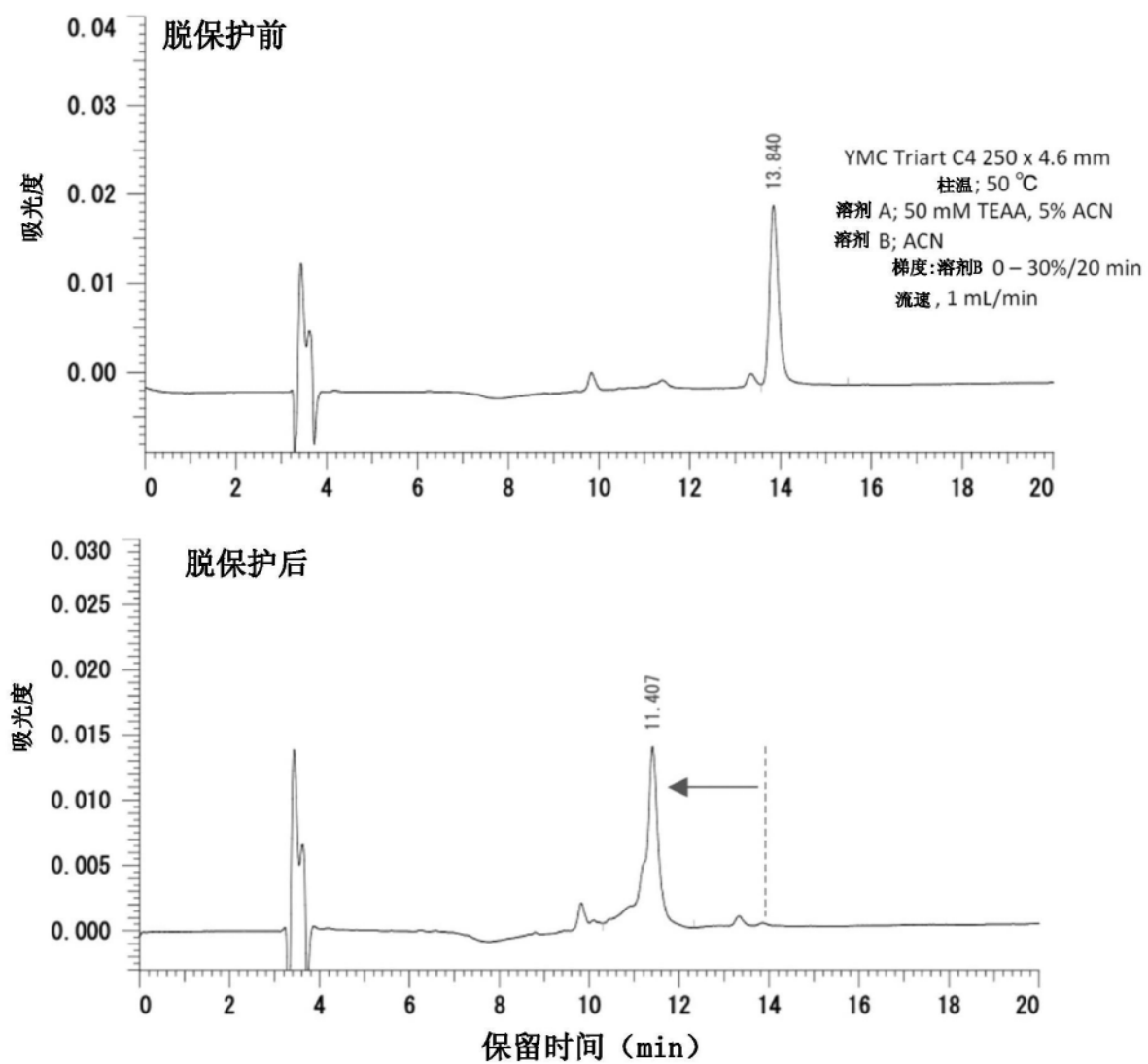
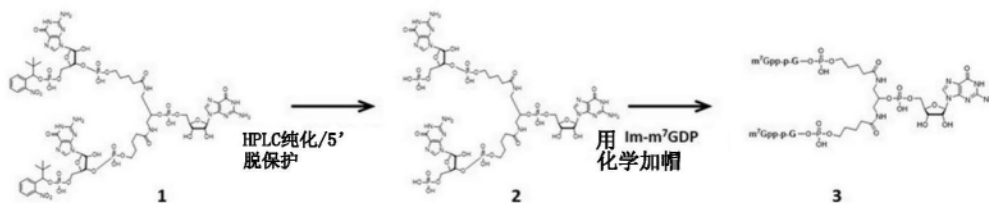
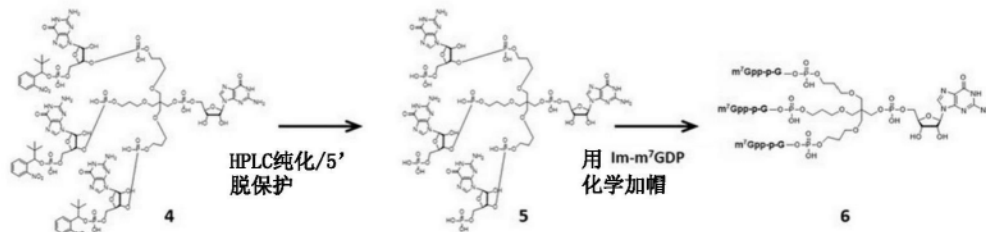


图23

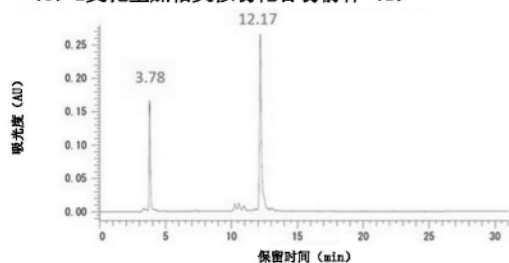
(a) 2支化型加帽类似物化合物



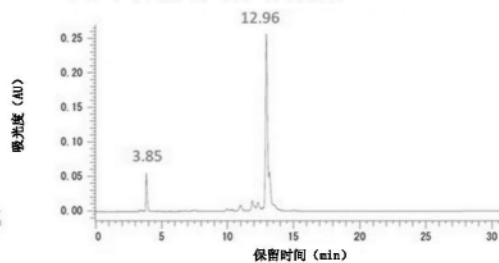
(b) 3支化型加帽类似物化合物



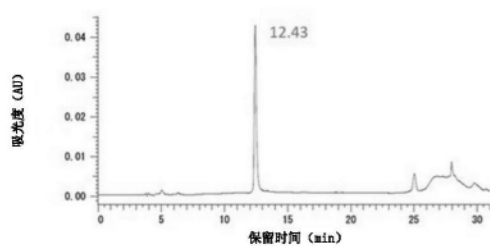
(c) 2支化型加帽类似物化合物前体 (1)



(d) 3支化型加帽类似物化合物前体 (4)



(e) 2支化型加帽类似物化合物前体 (2)



(f) 3支化型加帽类似物化合物前体 (5)

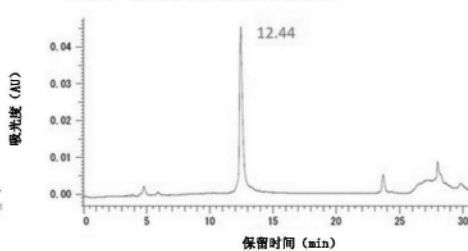


图24

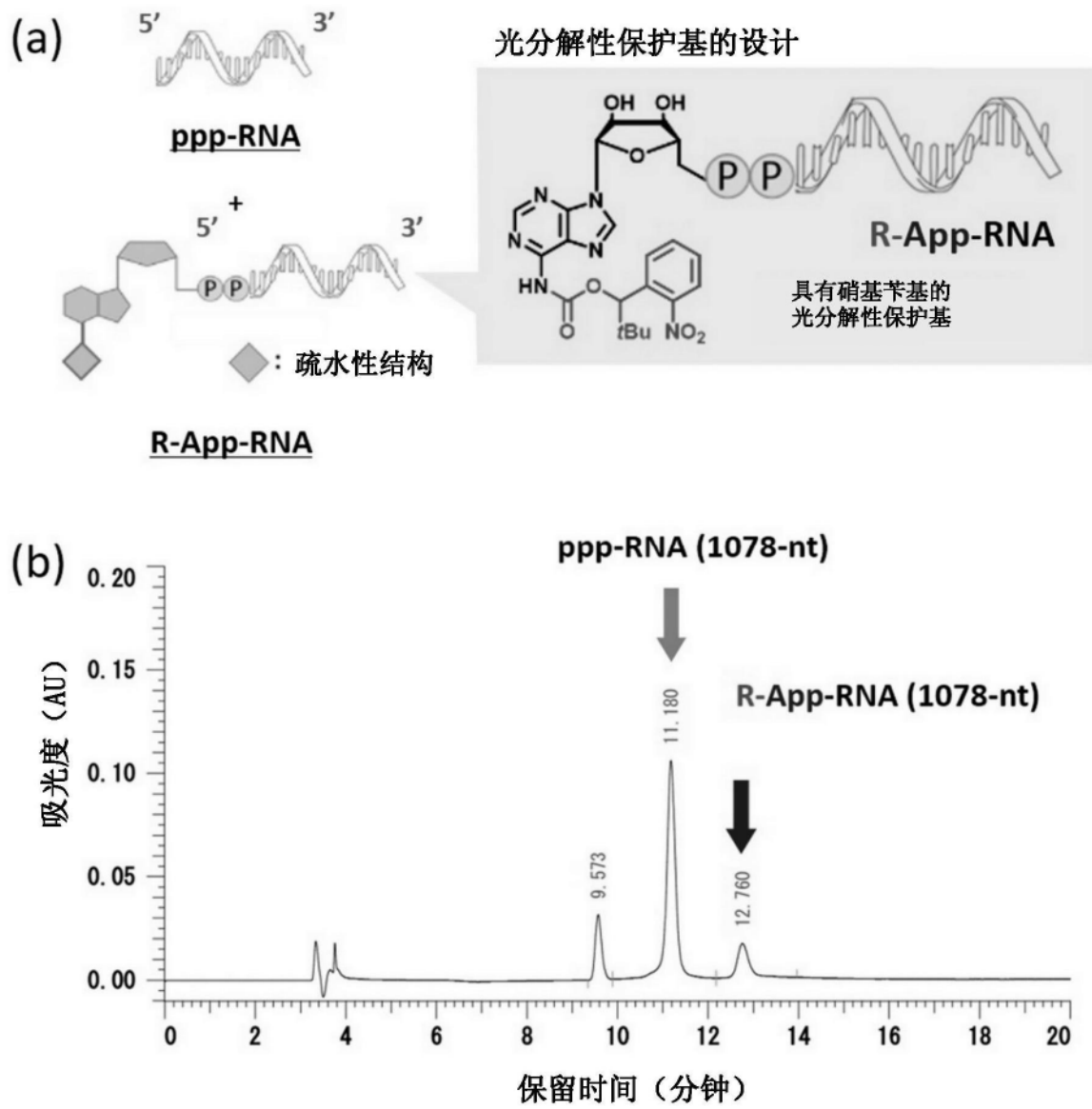


图25

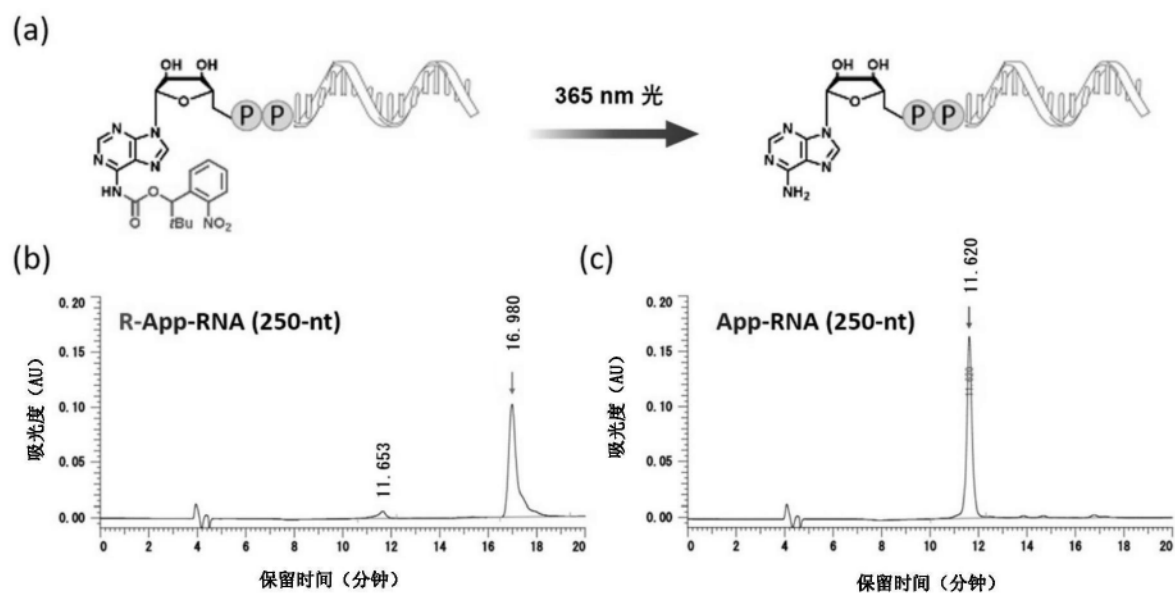


图26

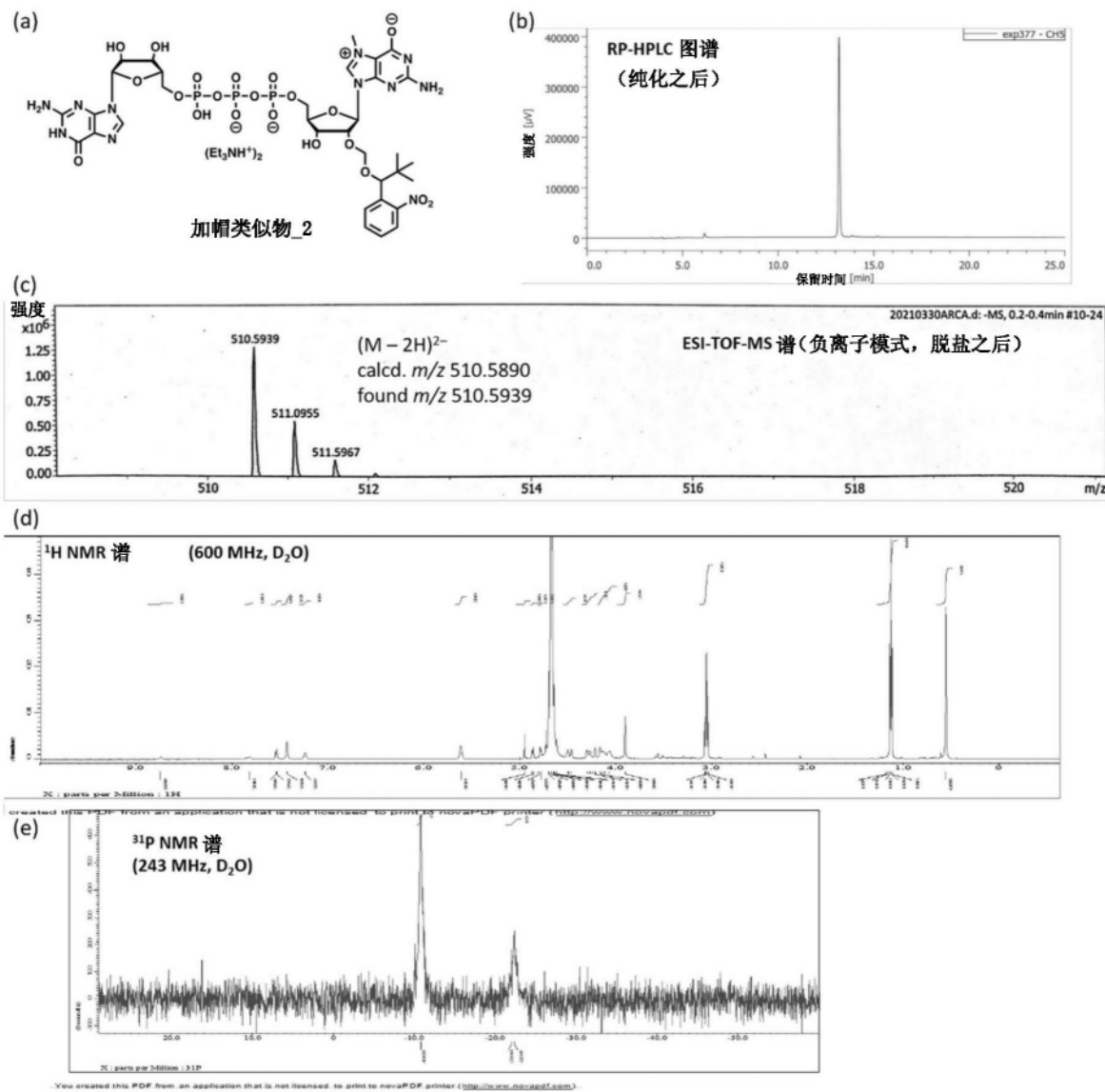


图28

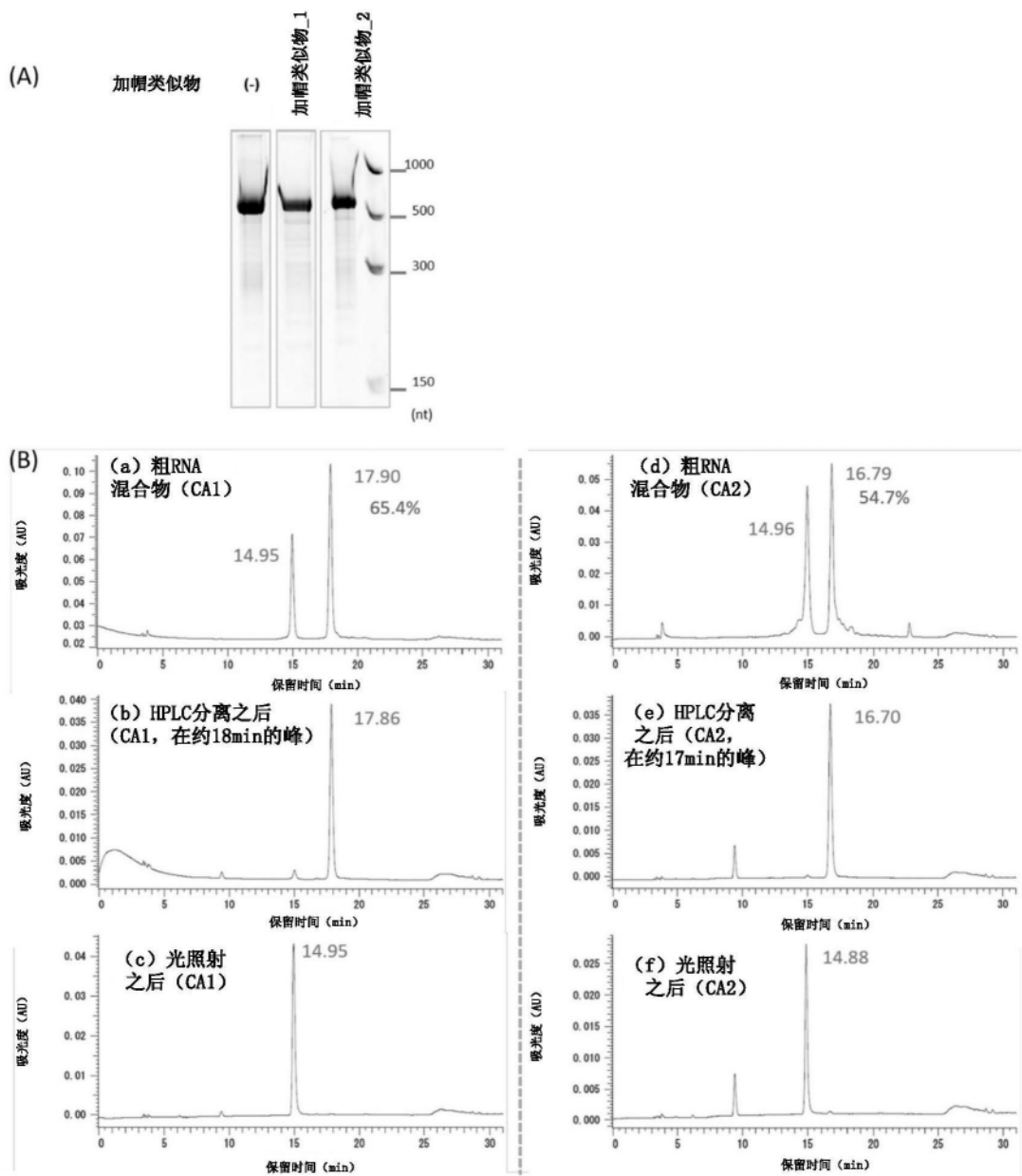


图29

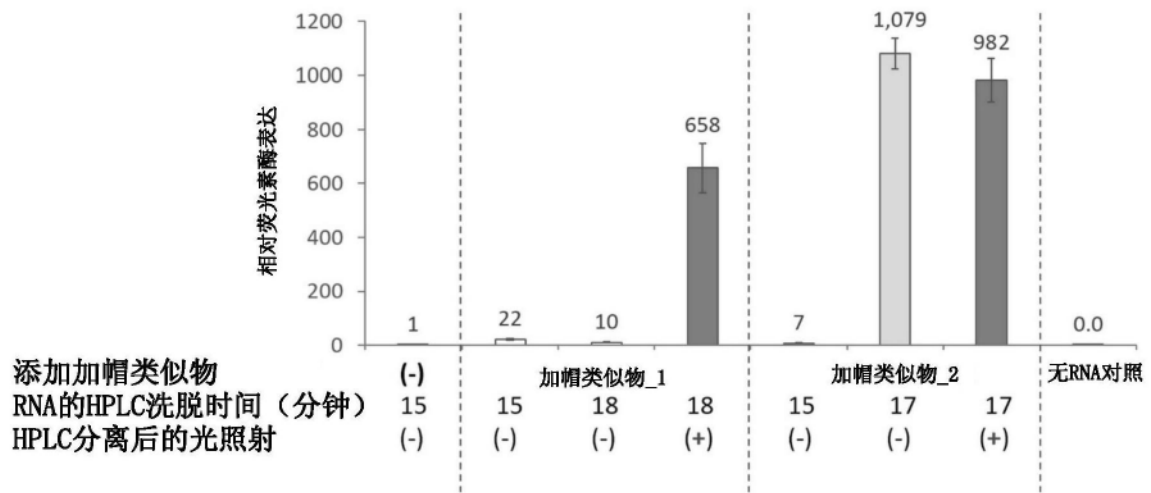


图30

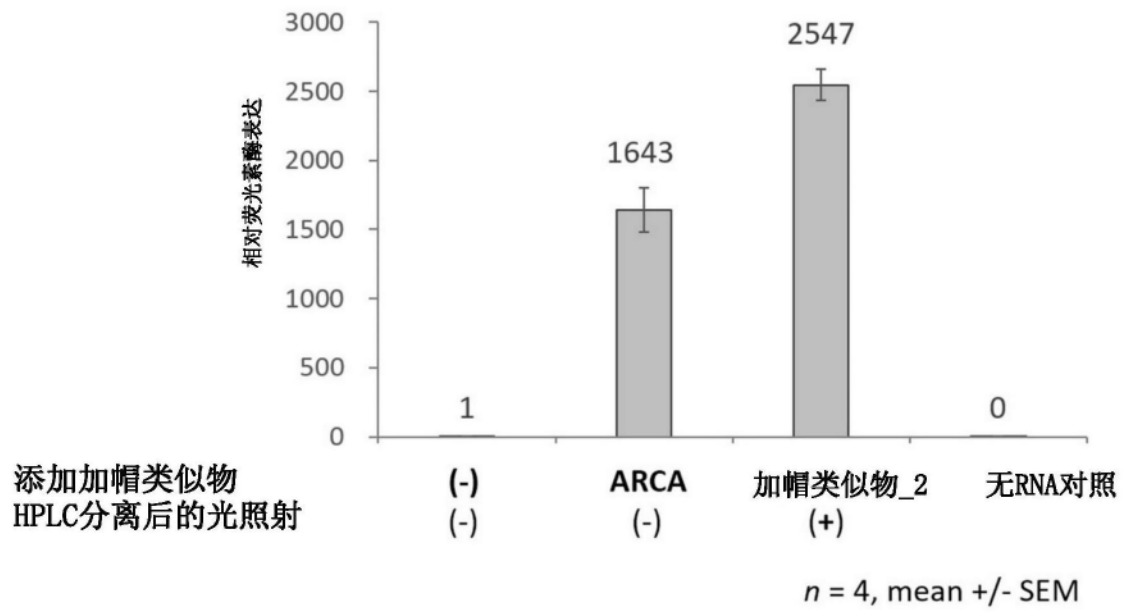


图31

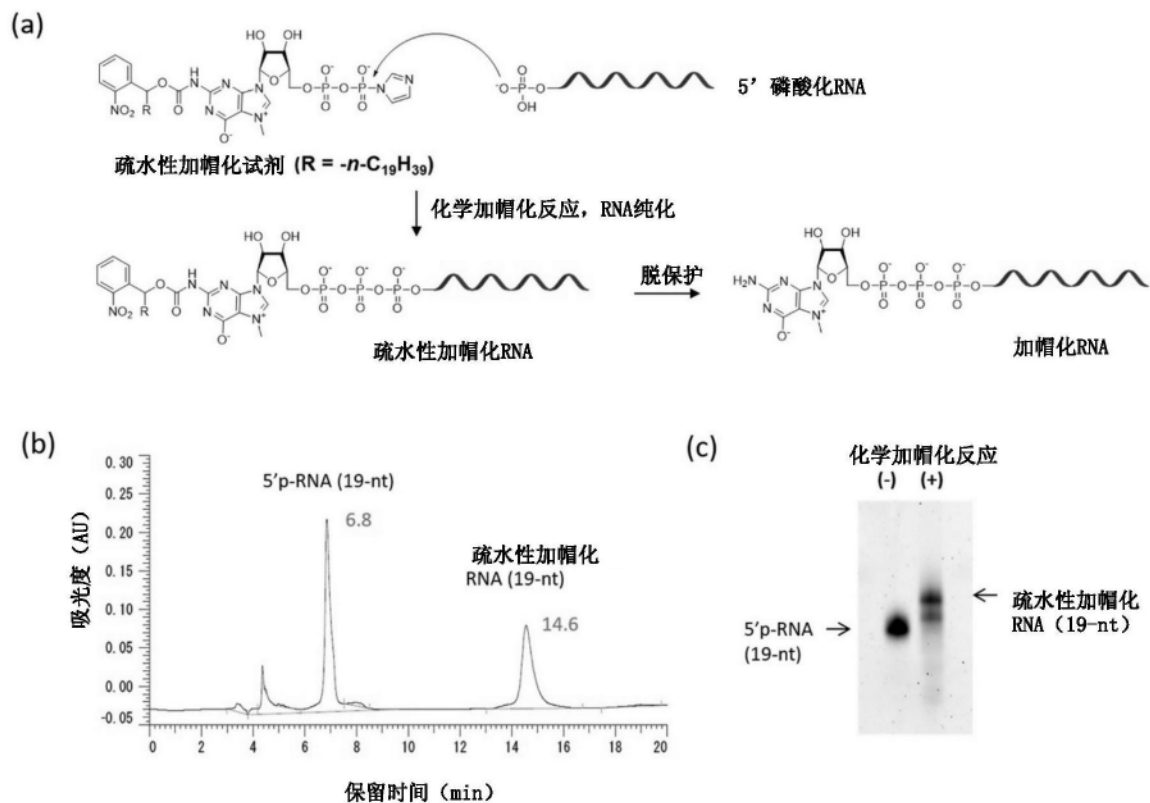


图32

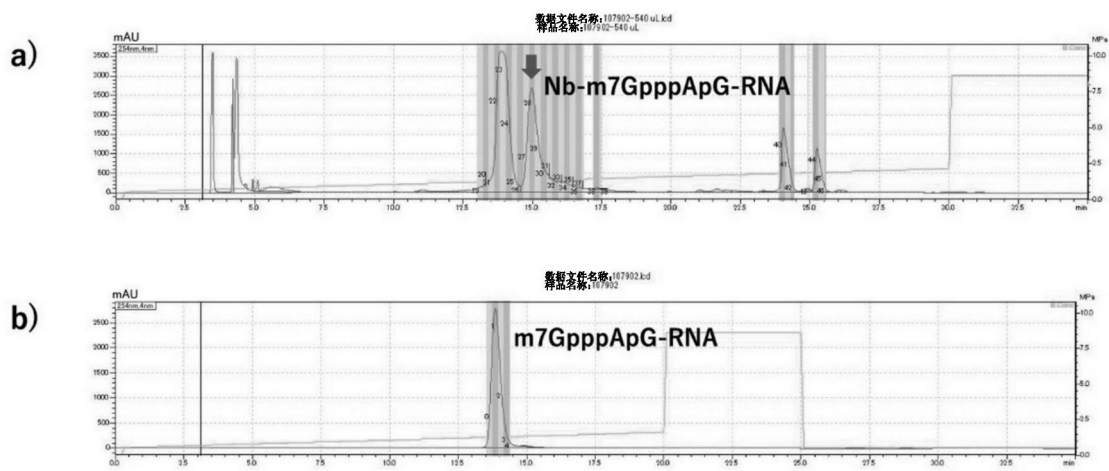


图33

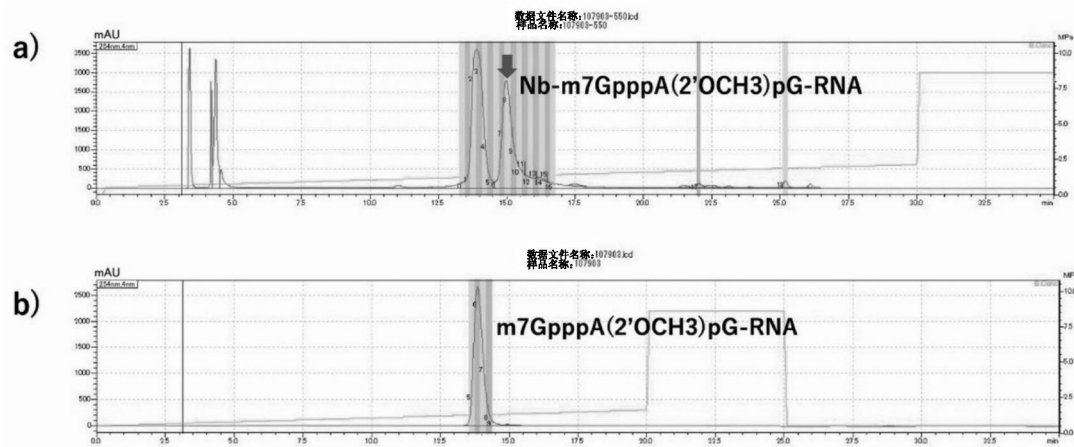


图34

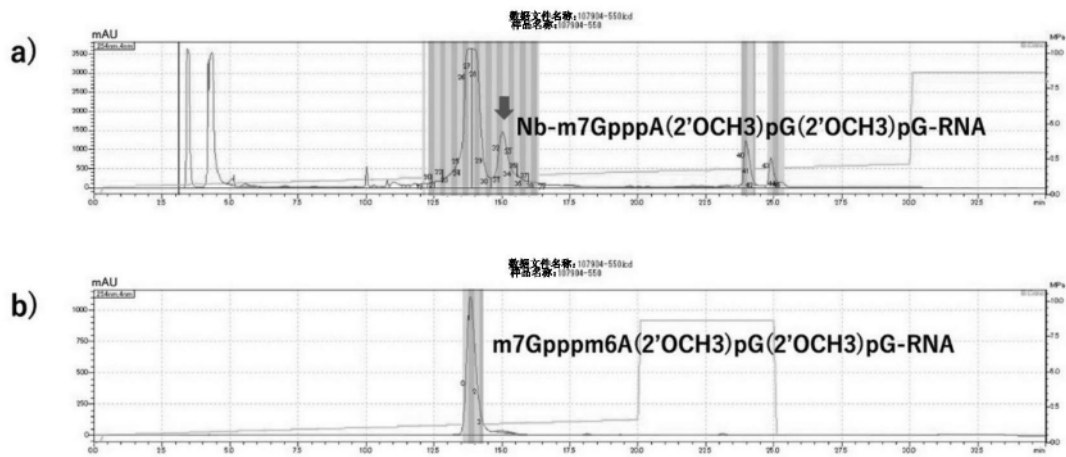


图35

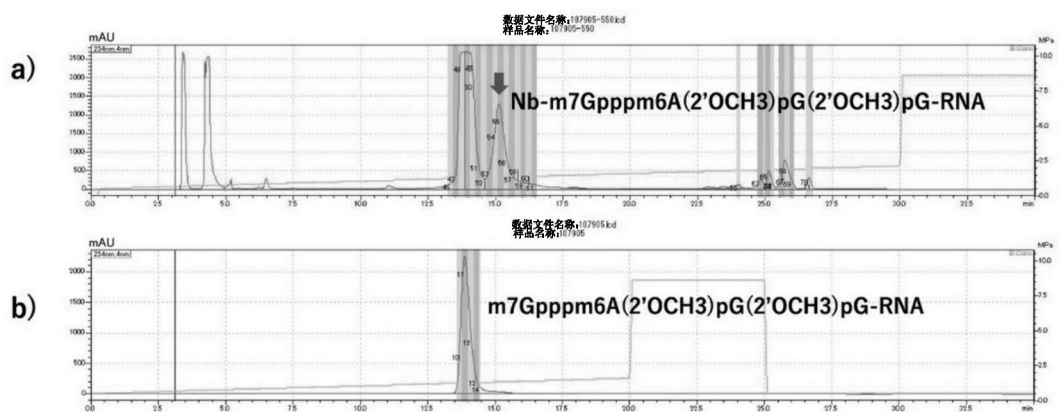


图36

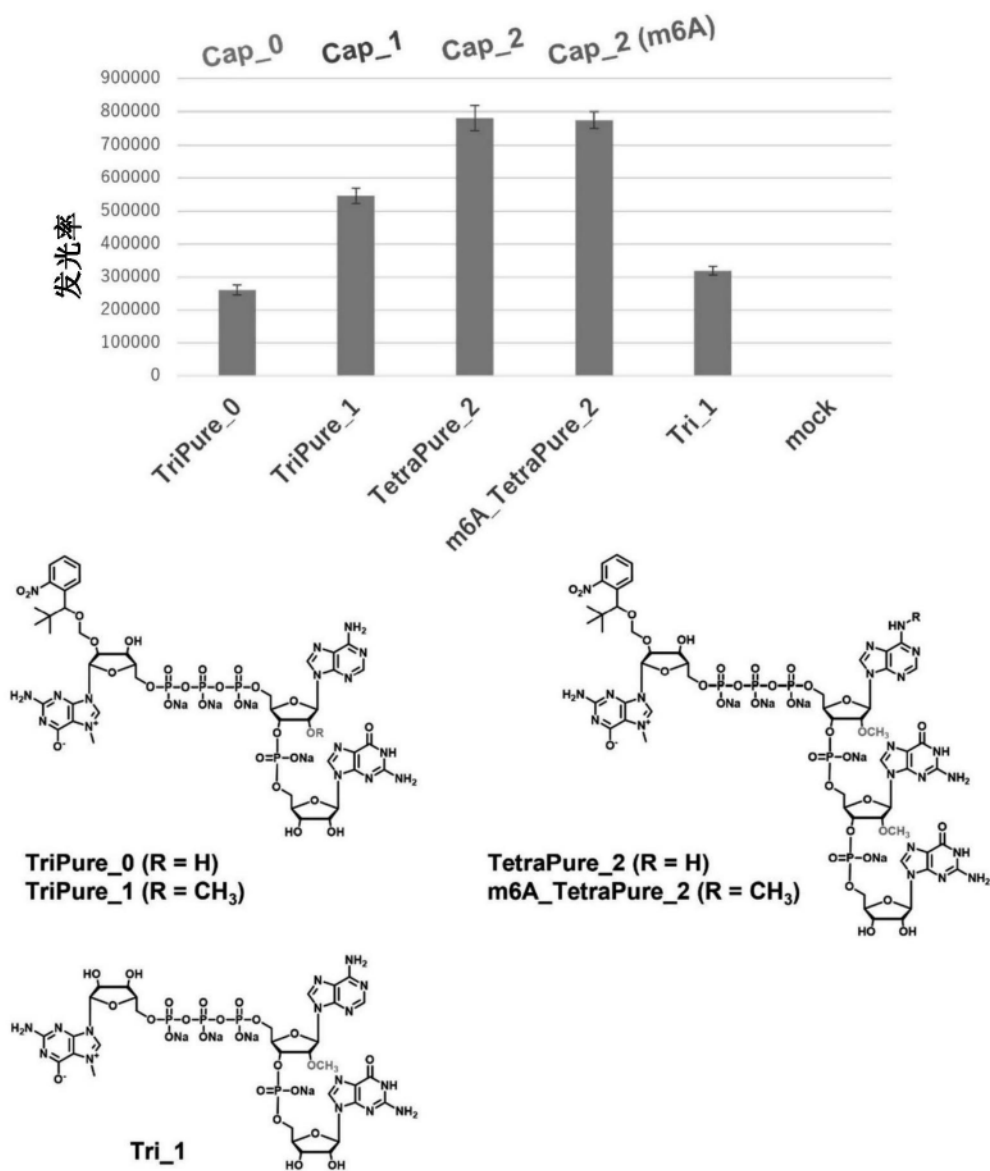


图37

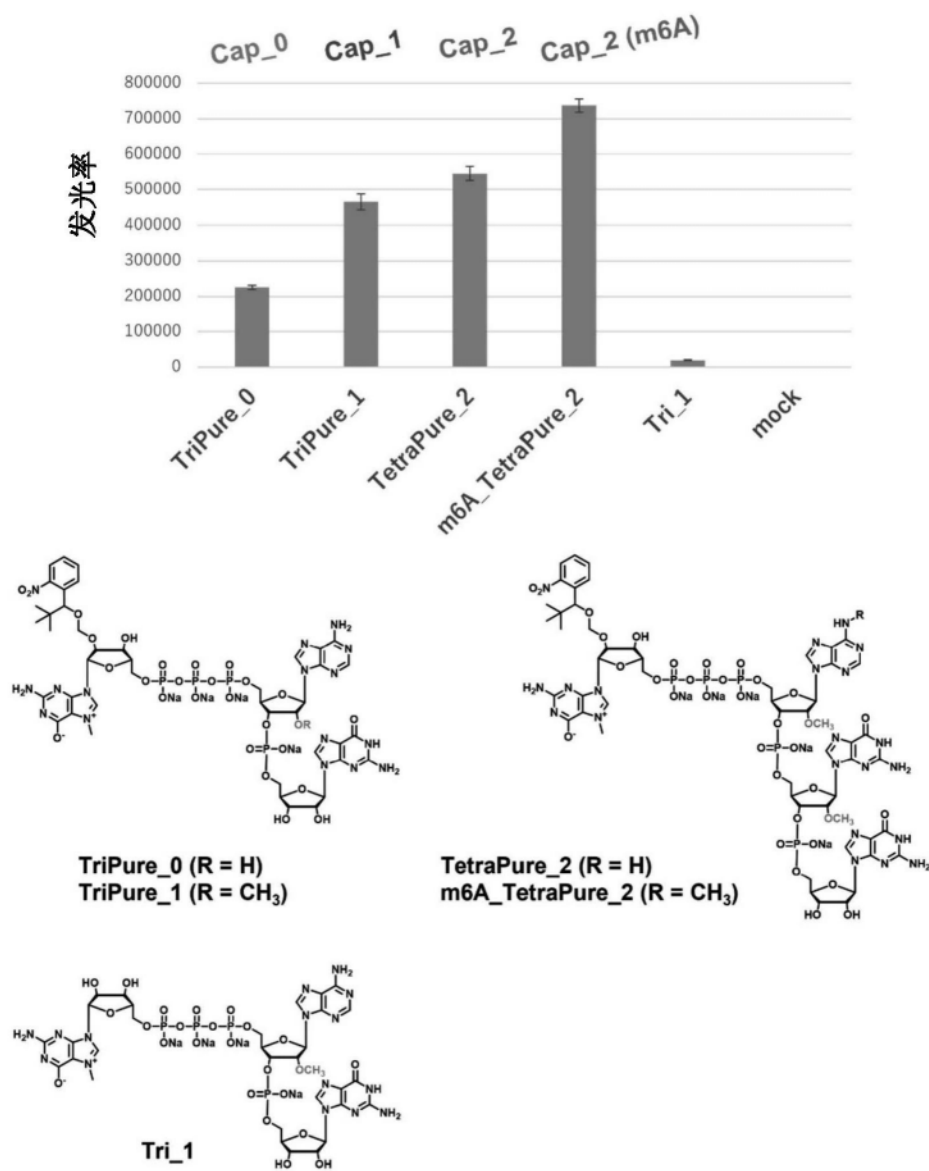


图38

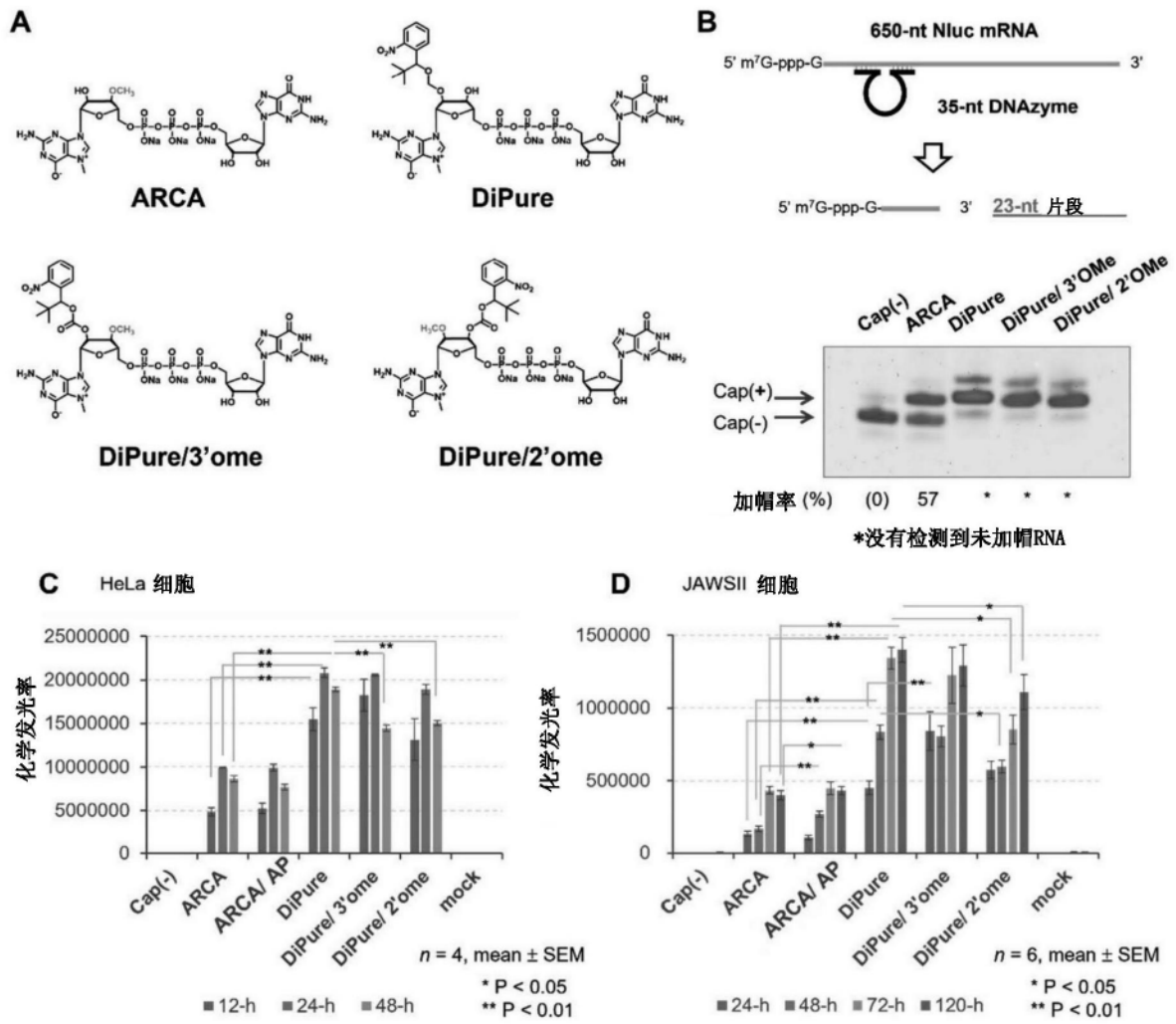


图39

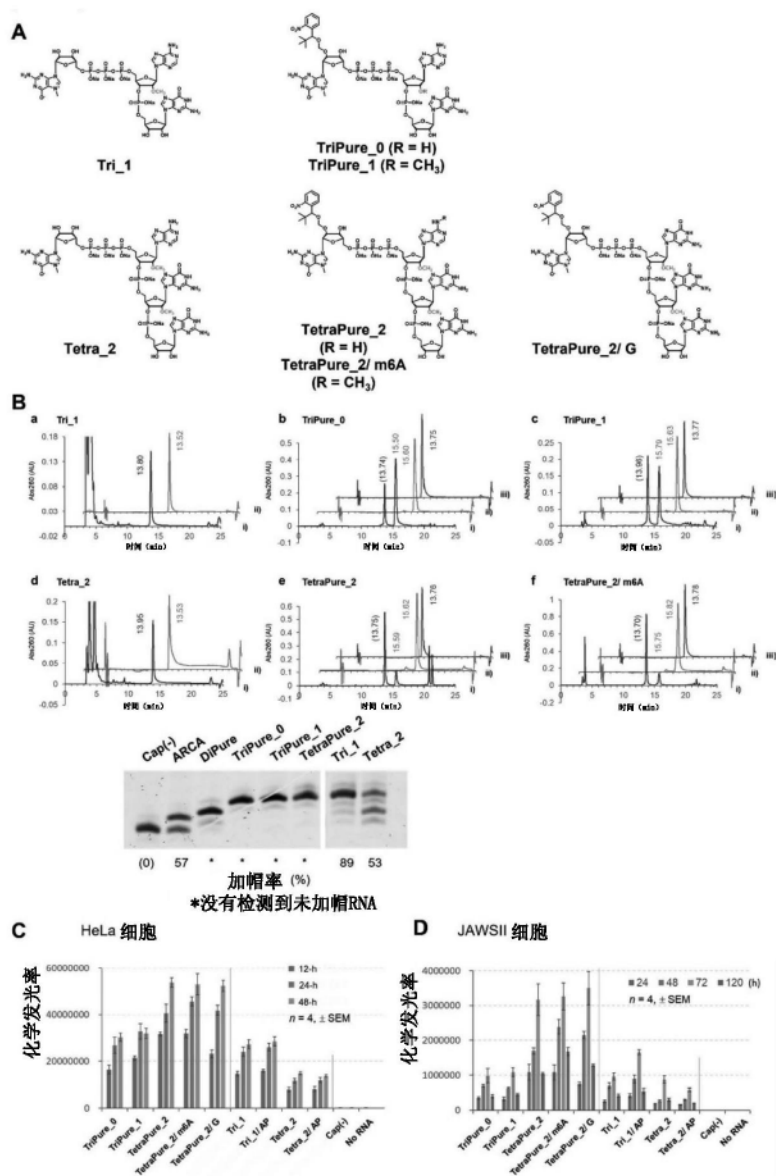
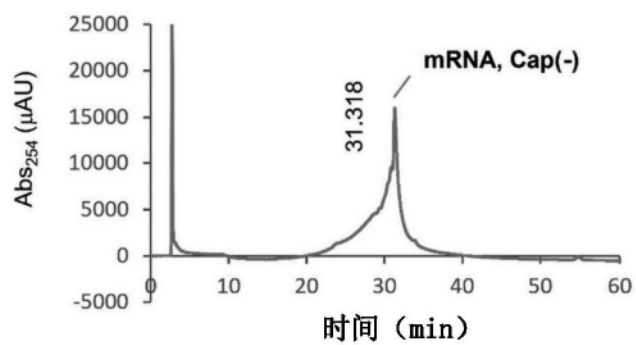
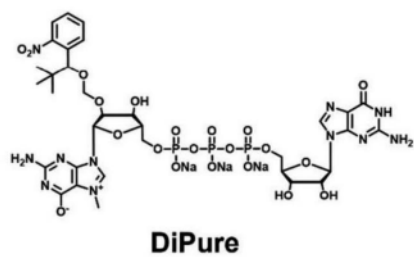
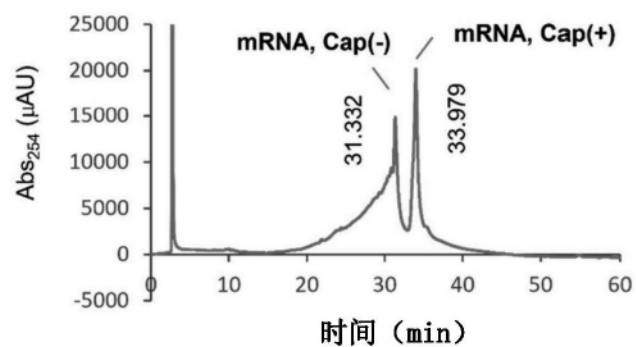


图40

(a) Cap(-)



(b) DiPure(+)



(c)

反相HPLC纯化

前	后
Cap(-)	Cap(+)
Cap(+)	Cap(+)

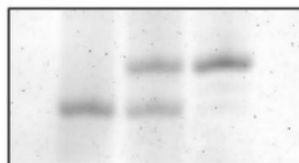


图41

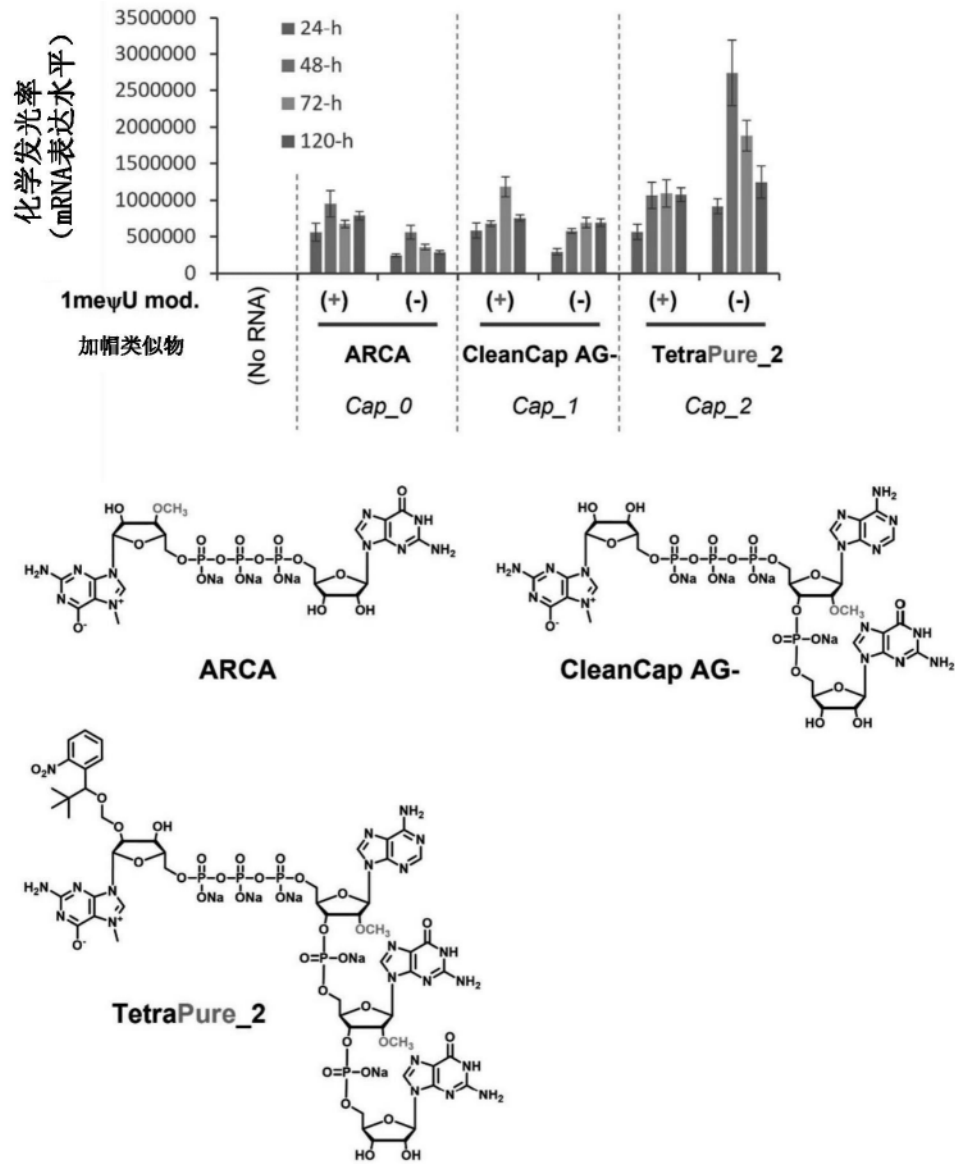
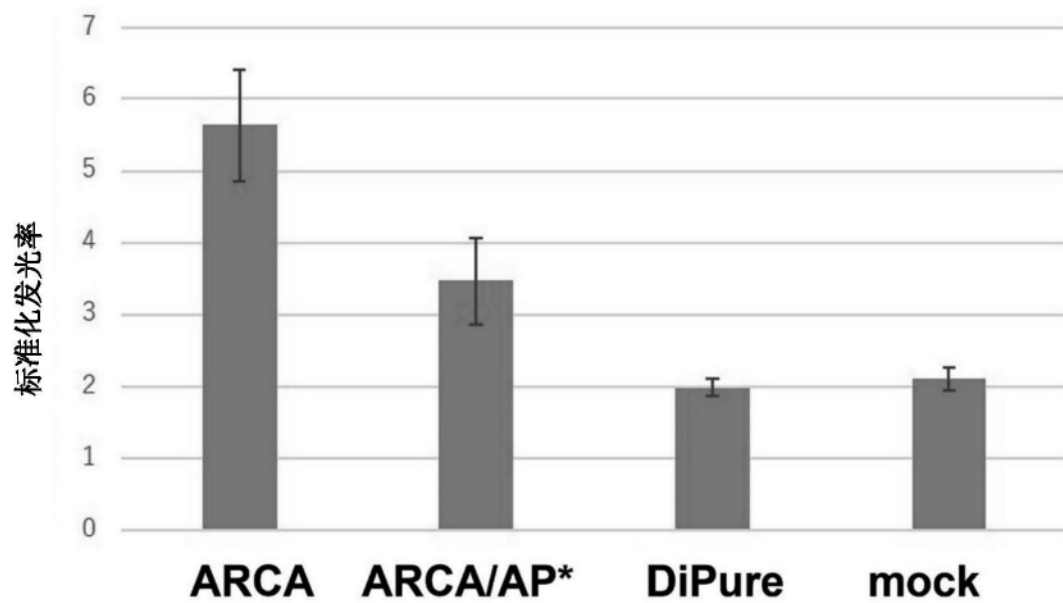


图42



*AP、mRNA使用南极磷酸酶被脱磷酸化

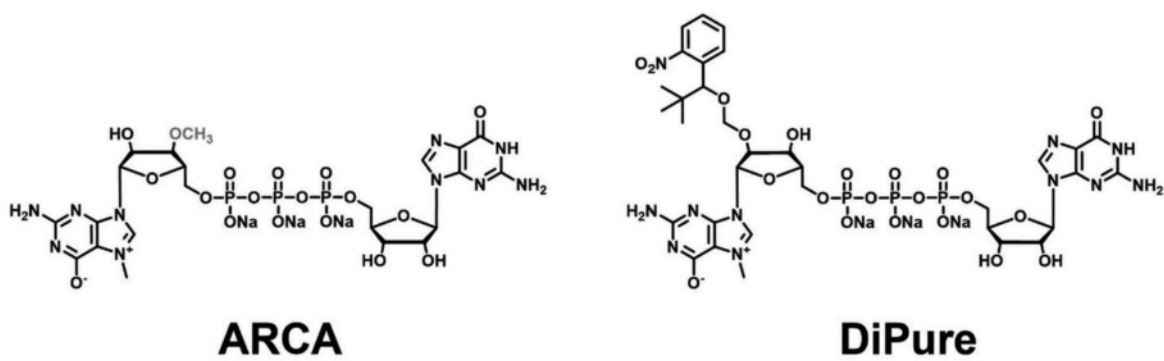


图43

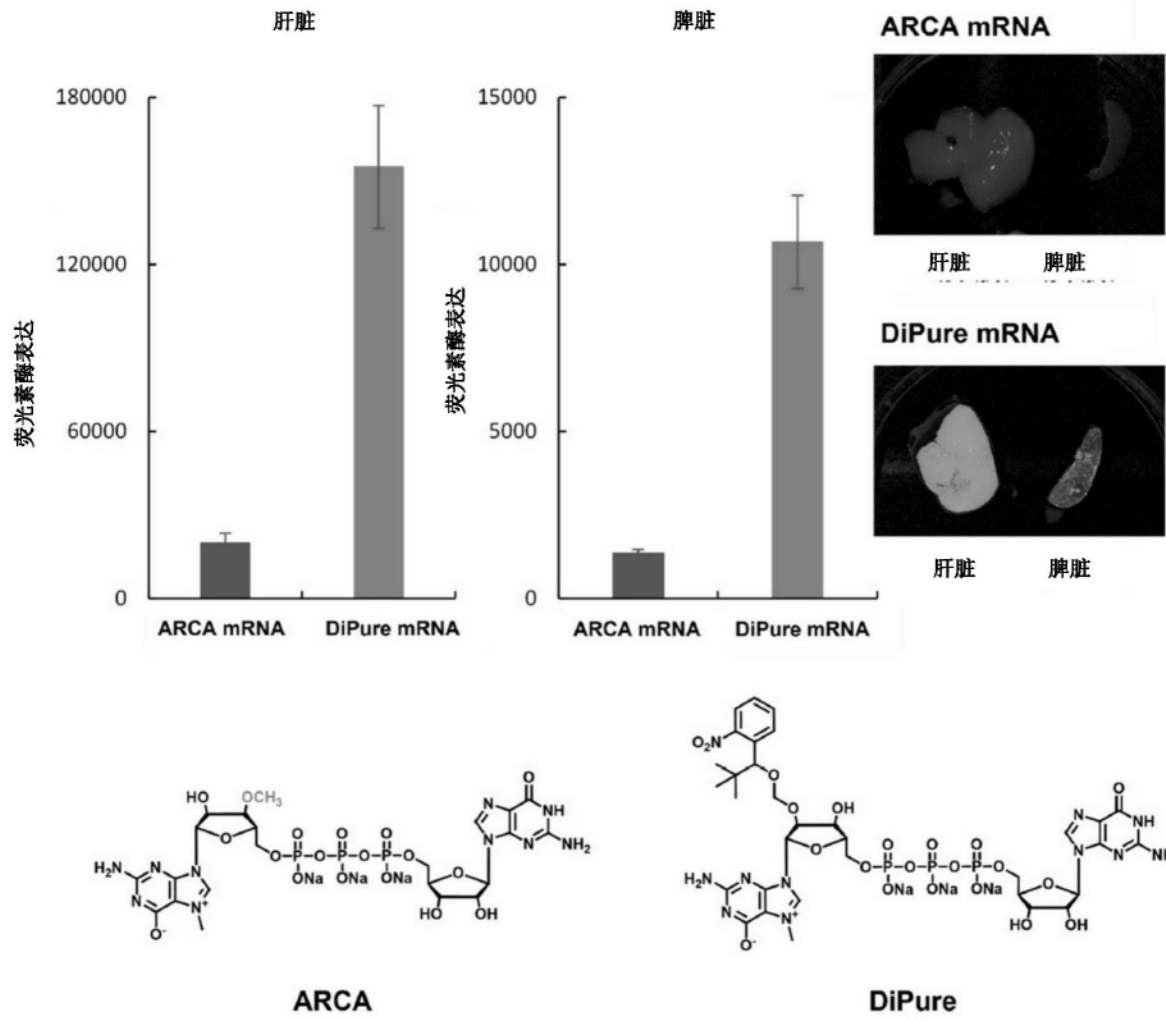


图44

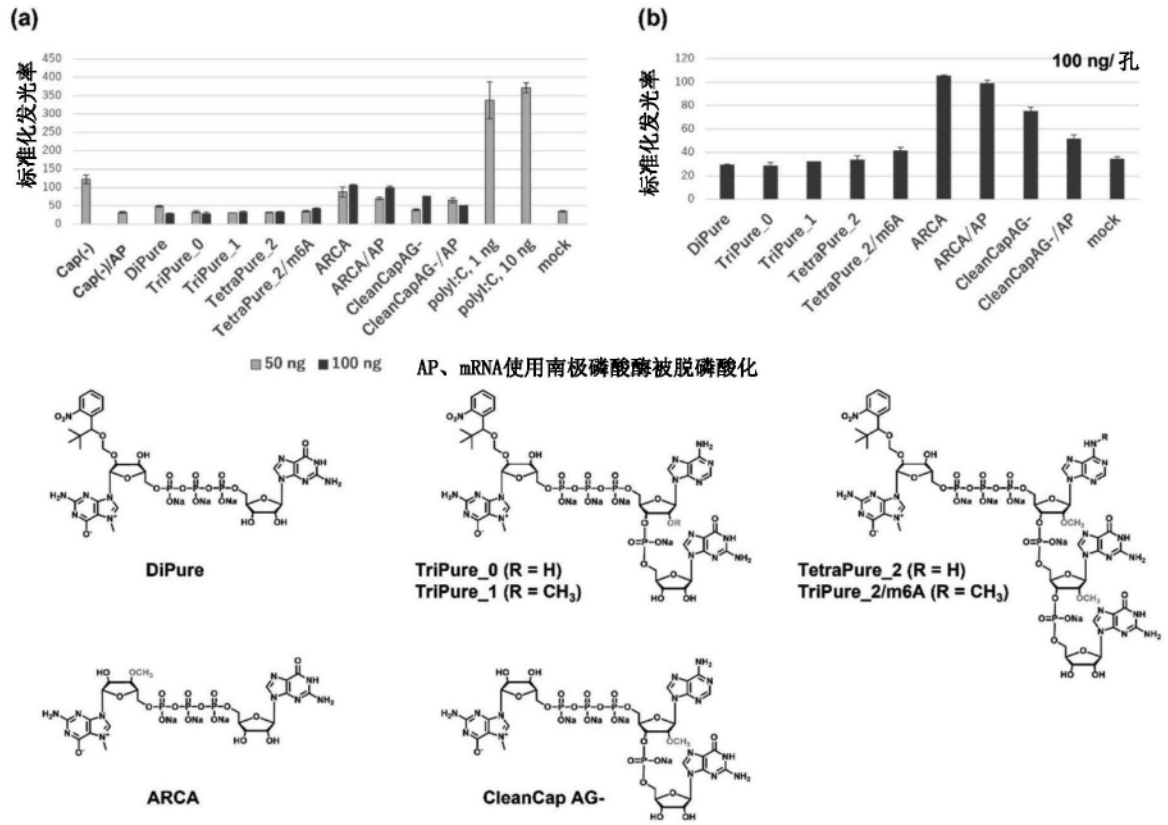


图45