

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 038834

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.10.26

(21) Номер заявки

201891429

(22) Дата подачи заявки

2017.01.27

(51) Int. Cl. C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7084 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

## (54) 5'-ФОСФОРОТИОАТНЫЕ АНАЛОГИ 5'-КОНЦА (КЭПА) МРНК, СОДЕРЖАЩАЯ ИХ МРНК, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PL415967

(32) 2016.01.29

(33) PL

(43) 2019.02.28

(86) PCT/IB2017/050447

(87) WO 2017/130151 2017.08.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

УНИВЕРСИТЕТ ВАРШАВСКИЙ  
(PL)

(72) Изобретатель:

Емелиты Яцек, Фац-Домбровская  
Кая, Войтчак Блажей, Барановский  
Марек, Новицкая Анна, Ковальская  
Иоанна, Сикорский Павел,  
Варминьский Марцин (PL)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

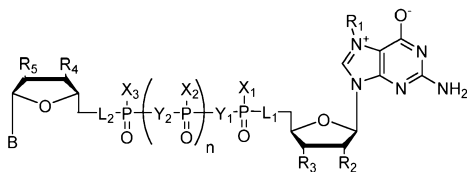
(56) WO-A2-2008157688

EP-A1-2281579

WO-A2-2009149253

ANNA WYPIJEWSKA DEL NOGAL ET  
AL.: "Analysis of decapping scavenger cap complex  
using modified cap analogs reveals molecular  
determinants for efficient cap binding", FEBS  
JOURNAL, vol. 280, no. 24, 23 December 2013  
(2013-12-23), pages 6508-6527, XP055367414, GB  
ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/febs.12553KOWALSKA JOANNA ET AL.: "Synthesis  
and characterization of mRNA cap analogs containing  
phosphorothioate substitutions that bind tightly  
to eIF4E and are resistant to the decapping  
pyrophosphatase DcpS", RNA, COLD SPRING  
HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol.  
14, no. 6, 1 June 2008 (2008-06-01), pages  
1119-1131, XP002554206, ISSN: 1355-8382, DOI:  
10.1261/RNA.990208

(57) Изобретение относится к нуклеотидам, аналогам 5'-конца (кэпа) мРНК, содержащим атом серы в положении 5' нуклеозида 7-метилгуанозина. Описанные соединения распознаются (связываются, но не подвергаются гидролизу) ферментом DcpS (decapping scavenger) и таким образом могут найти терапевтическое применение в качестве ингибиторов указанного фермента. DcpS представляет собой кэп-специфический фермент с пирофосфатазной активностью, который, как было определено, является терапевтической мишенью при лечении спинальной мышечной атрофии (СМА). Некоторые описанные соединения имеют дополнительные модификации в фосфатной цепи, которые модулируют их сродство к ферменту DcpS. Настоящее изобретение также относится к мРНК, модифицированным с 5'-конца аналогами 5'-конца (кэпа) мРНК, содержащими 5'-фосфоротиаотный фрагмент, обладающим повышенной стабильностью и трансляционной активностью в условиях клетки, к способу их получения, их применению и содержащему их фармацевтическому составу, где  $L^1$  и  $L^2$  независимо выбраны из группы, включающей O и S, где по меньшей мере один из  $L^1$  и  $L^2$  не является O.



Формула 1

B1

038834

038834

B1

### Область техники

Изобретение относится к аналогам 5'-конца (кэпа) мРНК, содержащим 5'-фосфоротиоатный фрагмент, способу их получения, промежуточным соединениям и их применению.

5'-Фосфоротиоатные аналоги кэпа применяют в качестве ингибиторов фермента DcpS (decapping enzyme scavenger), что делает возможным их применение в качестве лекарственных средств, в частности для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА). Настоящее изобретение также относится к мРНК, модифицированной с 5'-конца содержащими 5'-фосфоротиоатный фрагмент аналогами 5'-конца (кэпа) мРНК в соответствии с настоящим изобретением, где указанная модификация направлена на получение транскриптов мРНК с повышенной стабильностью и трансляционной активностью в условиях клетки. Транскрипты с такими свойствами применимы в новых видах генной терапии на основе мРНК.

### Уровень техники

Химически полученные аналоги 5'-конца мРНК имеют различное применение, и модификации, осуществленные в такой структуре, могут значительно изменять биологические свойства этих соединений (Ziemniak, Strenkowska et al., 2013). Среди различных применений аналогов кэпа наиболее частое включает их использование в качестве низкомолекулярных ингибиторов кэп-зависимых процессов в терапевтических целях (например, ингибирование фермента DcpS - лечение спинальной мышечной атрофии). С другой стороны, подходящим образом модифицированные динуклеотидные аналоги кэпа применяют для модификации информационной мРНК путем совместной транскрипции *in vitro* с целью получения транскриптов с улучшенной стабильностью и трансляционной активностью в условиях клетки. Транскрипты с такими свойствами все чаще исследуют в контексте новых видов генной терапии на основе мРНК. В последнем случае устойчивость структуры кэпа к действию другого декэпирующего фермента, Dcp2, является ключевым фактором.

Фермент DcpS (decapping scavenger) представляет собой фермент, вовлеченный в процесс деградации мРНК у эукариот. Существует два основных пути деградации мРНК в эукариотических клетках: 5'→3' деградация и 3'→5' деградация (Rydzik, Lukaszewicz et al., 2009). Оба пути деградации инициируются деаденилированием. После деградации в направлении 5'→3' происходит декэпирование мРНК в результате расщепления связи между α- и β-фосфатами и деградация 5'-эндонуклеазой. 3'→5' деградация включает деградацию мРНК экзосомой, начинающуюся с 3'-конца. Такая деградация приводит к высвобождению динуклеотидных остатков кэпа или коротких олигонуклеотидов с кэпом на конце, которые затем разрушаются ферментом DcpS. DcpS принадлежит к пиррофосфатазам семейства HIT и гидролизует кэп между γ- и β-фосфатами с высвобождением 7-метилгуанозин-5'-монофосфата (m<sup>7</sup>GMP) и второго продукта, который, соответственно, представляет собой нуклеозид-5'-дифосфат или короткий олигонуклеотид. Более длинные мРНК с кэпом на конце не являются субстратами DcpS. Также 7-метилгуанозин-5'-дифосфат (m<sup>7</sup>GDP), который является продуктом 5'→3' деградации мРНК, не является субстратом DcpS. Активность фермента DcpS считается жизненно важной для гомеостаза клетки, поскольку более не нужные остатки кэпа, высвобождаемые из мРНК при 3'→5' деградации, могут неблагоприятно влиять на другие кэп-зависимые клеточные процессы. DcpS локализован как в цитоплазме, так и в ядре, где он может участвовать в регуляции сплайсинга (Shen, Liu et al., 2008). Таким образом, есть основания предполагать, что роль DcpS в клетке не ограничивается хорошо изученными функциями в 3'→5' деградации мРНК (Bail and Kiledjian 2008).

В 2008 году сообщалось, что ингибирование DcpS может оказывать терапевтический эффект при спинальной мышечной атрофии. СМА является распространенным нейродегенеративным заболеванием, встречающимся в среднем у одного из 6000 новорожденных (Akagi and Campbell 1962). Она обусловлена низкими уровнями белка SMN (белок выживаемости мотонейронов), кодируемого генами SMN. Два гена SMN, а именно, SMN1 и SMN2, присутствуют у людей. Основное различие между ними заключается в изменении последовательности в экзоне 7, влияющем на сплайсинг пре-мРНК. В результате экспрессия гена SMN1 приводит к образованию стабильного и функционального белка, в то время как белок, образуемый при экспрессии SMN2, является укороченным. Мутации в обеих копиях гена SMN1, включая делеции, конверсию в SMN2-подобный ген и точечные мутации, приводят к заболеванию СМА. Люди, имеющие только одну дефектную копию SMN1, являются носителями СМА, но не демонстрируют никаких симптомов заболевания.

Гомологичный ген SMN2 не может обеспечить достаточное количество функционального белка SMN, но было отмечено, что большее количество копий гена SMN2 сопровождается более мягким течением заболевания. Таким образом, считается, что соединения, которые увеличивают количество кодируемого геном SMN2 белка в клетке, могут являться терапевтическими средствами против СМА. Было обнаружено, что некоторые 5-замещенные хиназолины могут повышать экспрессию гена SMN2 до двух раз (Akagi and Campbell, 1962). Пытаясь раскрыть молекулярный механизм, лежащий в основе этой активации, в другом исследовании с использованием введения радиоактивной метки авторы установили, что DcpS представляет собой белок, связывающийся с 5-замещенным хиназолином.

Эти эксперименты позволили установить, что DcpS является терапевтической мишенью при лечении СМА.

Дальнейшие исследования показали, что различные C5-замещенные хиназолины являются эффективными ингибиторами фермента DcpS (уже в наномолярных концентрациях) и что эффективность ингибитора коррелирует с уровнем активации промотора гена SMN2. Затем терапевтический потенциал этих соединений был продемонстрирован *in vivo* на модели с использованием мышей (Butchbach, Singh et al., 2010). Недавно сообщалось, что один из ингибиторов DcpS, соединение RG3039, улучшает моторную функцию у мышей с СМА (Van Meerbeke, Gibbs et al.).

Несмотря на продолжающиеся доклинические и клинические исследования, до сих пор отсутствует эффективное лечение СМА, следовательно, существует неудовлетворенная потребность в новых соединениях с терапевтическим потенциалом.

Динуклеотидные аналоги кэпа с модификациями в трифосфатном мостике и рибозе 7-метилгуанозина могут быть применены для синтеза кэпированных молекул РНК *in vitro*. Указанный способ пригоден для применения, поскольку он позволяет получать молекулы РНК с улучшенными биологическими свойствами, в частности, повышенной трансляционной активностью и пролонгированным временем полужизни в клетке (Grudzien, Kalek et al., 2006). Эти два свойства обуславливают получение значительно большего количества белка при использовании того же количества мРНК. Это может найти широкое применение как в исследованиях, так и для коммерческого получения пептидов и белков, включая терапевтическое применение, например, в иммунотерапии рака (Sahin, Kariko et al., 2014).

Наиболее распространенным способом, используемым для получения кэпированной мРНК *in vitro*, является синтез мРНК на матрице ДНК с использованием РНК-полимеразы бактерий или бактериофагов в присутствии всех четырех рибонуклеозидтрифосфатов и кэпирующего динуклеотида, такого как ( $m^7GpppG$ ). Полимераза инициирует транскрипцию путем нуклеофильной атаки 3'-ОН фрагмента Guo в  $m^7GpppG$  в отношении альфа-фосфата следующего транскрибируемого нуклеозидтрифосфата, что приводит к образованию  $m^7GpppGpN$  в качестве первичного продукта (Contreras and Fiers 1981, Konarska, Padgett et al., 1984).

Количество белка, получаемого с помощью синтетической мРНК, введенной в культуру клеток млекопитающих, ограничено деградацией мРНК в условиях клетки. Деградация мРНК *in vivo* в основном инициируется удалением кэпа с 5'-конца мРНК специфической пирозифосфатазой Dcp1/Dcp2, которая расщепляет связь между альфа- и бета-фосфатами (Mildvan, Xia et al., 2005). Фермент Dcp2, который образует комплекс с регуляторным белком Dcp1, ответственен за отщепление кэп-структуры от полноразмерных транскриптов или их фрагментов, содержащих по меньшей мере 20 нуклеотидов (Lykke-Andersen 2002). Комплекс Dcp1/Dcp2 играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Получение транскриптов мРНК, содержащих кэп, устойчивый к активности этого фермента, приводит к увеличению экспрессии белка, кодируемого такой модифицированной мРНК (Ziemniak, Strenkowska et al., 2013). В случае, когда модификация не влияет одновременно на взаимодействие с фактором, инициирующим трансляцию, это приводит к повышению трансляционной активности мРНК. мРНК, обладающие такими свойствами, подходят для терапевтического применения, включая иммунотерапию рака (Kuhn, Diken et al., 2010), перепрограммирование стволовых клеток (Wagten, Manos et al., 2010) или восполнение белков, образующихся в клетках в дефектной форме или в недостаточных количествах. Модификации в трифосфатном мостике кэп-структуры известны из литературы, и они повышают устойчивость к ферменту Dcp2. К ним относятся, среди прочего, аналоги, где атомы кислорода в альфа-бета-положении мостика замещены метиленовой группой, аналоги, где немостиковый кислород в бета-положении заменен на атом серы или боранофосфатную группу. В случае метиленового аналога повышенная устойчивость мРНК не приводила к повышению эффективности синтеза белка в клетках, что, вероятно, связано с уменьшением сродства к белку eIF4E (Grudzien, Kalek et al., 2006). В случае немостиковых модификаций в бета-положении повышенная устойчивость к Dcp2 и повышенное сродство к eIF4E приводили к увеличению трансляционной активности такой модифицированной мРНК в клетках (Grudzien-Nogalska, Jemielity et al., 2007) (Kowalska, Wypijewska del Nogal et al., 2014). Общим свойством всех аналогов кэпа, которые после встраивания в мРНК демонстрировали сниженную подверженность деградации, вызываемой Dcp2, являлась локализация модификации вблизи сайта расщепления кэпа ферментом, то есть альфа-бета-положение в трифосфатном мостике.

#### Описание изобретения

Принимая во внимание описанное состояние уровня техники, задачей настоящего изобретения является преодоление указанных недостатков и обеспечение нового класса нуклеотидных аналогов 5'-конца мРНК, влияющих на активность DcpS, их применения, в том числе для лечения СМА, а также способов их синтеза.

Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение мРНК, модифицированной с 5'-конца аналогами 5'-конца (кэпа) мРНК, содержащими 5'-фосфоротиоатный фрагмент, с повышением таким образом стабильности мРНК и эффективности биосинтеза белка, кодируемого такой мРНК, в клетках. Другой задачей настоящего изобретения является обеспечение мРНК, модифицированной с 5'-конца аналогами 5'-конца (кэпа) мРНК, содержащими 5'-фосфоротиоатный фрагмент, транскрипты которой предназначены для применения в качестве лекарственного средства, в том числе для применения в новых видах генной терапии на основе мРНК.

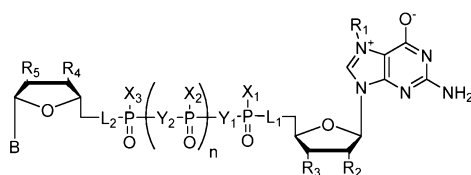
Настоящее изобретение относится к новому классу нуклеотидных аналогов 5'-конца мРНК. Указанные новые аналоги содержат атом серы в положении 5' нуклеозида, то есть по меньшей мере один из атомов кислорода в положении 5' заменен на атом серы. Неожиданно авторами изобретения было обнаружено, что новые аналоги, содержащие модификацию с атомом серы в положении 5' со стороны 7-метилгуанозина, устойчивы к гидролитической активности фермента DcpS и являются ингибиторами фермента DcpS, оказывая таким образом влияние на экспрессию белков SMN, что имеет терапевтическое значение для лечения СМА. Такие соединения, устойчивые к активности DcpS и/или влияющие на активность DcpS, также будут применяться для регуляции деградации мРНК, а также для модуляции и регуляции сплайсинга. Было обнаружено, что следующие аналоги являются особенно предпочтительными с точки зрения ингибирующих свойств: m<sup>7</sup>GSpppG (№ 24), m<sup>7</sup>GSpppSG (№ 32), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pG D1 (№ 30), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pG D2 (№ 31), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D1 (№ 33), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D2 (№ 34), и наиболее предпочтительным является m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D2 (№ 34). В равной степени эффективными являлись аналоги m<sup>7</sup>GSpp (№ 12), m<sup>7</sup>GSppG (№ 23), m<sup>7</sup>GSppCH<sub>2</sub>pG (№ 25), m<sup>7,2</sup>O GSpppG (№ 26), m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>ppSG (№ 37).

Настоящее изобретение также относится к мРНК, модифицированной с 5'-конца аналогами 5'-конца (кэпа) мРНК, содержащими 5'-фосфоротиоатный фрагмент, с повышением таким образом стабильности мРНК и эффективности биосинтеза белка, кодируемого такой мРНК, в клетках. Настоящее изобретение также относится к мРНК, модифицированной с 5'-конца аналогами 5'-конца (кэпа) мРНК, содержащими 5'-фосфоротиоатный фрагмент, где указанная модифицированная мРНК предназначена для применения в качестве лекарственного средства, в том числе для применения в новых видах генной терапии на основе мРНК.

Неожиданно авторами изобретения было обнаружено, что новые аналоги в соответствии с настоящим изобретением, содержащие модификации с атомом серы в положении 5' со стороны 7-метилгуанозина, после встраивания в мРНК методом транскрипции *in vitro* становятся устойчивыми к гидролитической активности фермента Dcp1/2 и таким образом влияют на стабильность мРНК и эффективность биосинтеза белка, кодируемого такой мРНК, в клетках, включая линию клеток HeLa. Это первый случай, когда модификация, расположенная в отдалении от сайта расщепления трифосфатного мостика в кэпе под действием Dcp1/2, делает кэп-структуру устойчивой к процессу ее удаления, приводя к увеличению времени полужизни мРНК. Этот неожиданный результат имеет важное терапевтическое значение в генной терапии, включающей экспрессию желаемого белка на основе вводимой синтетической мРНК, как и в случае специфической активации иммунной системы при иммунотерапии рака. Таким образом модифицированные транскрипты мРНК, например, кодирующие белок, специфичный для данного типа рака, могут быть применены для активации иммунной системы против раковых клеток, содержащих этот конкретный антиген. Было обнаружено, что следующие аналоги являются особенно предпочтительными с точки зрения трансляционных свойств модифицированной мРНК: m<sup>7</sup>GSpppG (№ 24), m<sup>7,2</sup>O GSpppG (№ 26), m<sup>7</sup>GSpppSG (№ 32), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pG D1 (№ 30), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pG D2 (№ 31), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D1 (№ 33), m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D2 (№ 34), и наиболее предпочтительными является m<sup>7,2</sup>O GSpppG (№ 26).

Настоящее изобретение относится к 5'-фосфоротиоатному аналогу кэпа в соответствии с формулой

1



Формула 1

где L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup> независимо выбраны из группы, включающей O и S, где по меньшей мере один из L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup> не является O;

n = 0, 1 или 2;

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> независимо выбраны из группы, включающей O, S;

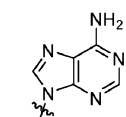
R<sup>1</sup> выбран из группы, включающей CH<sub>2</sub>Ph, C<sub>1-10</sub> алкил;

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> независимо выбраны из группы, включающей H, OH, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -COOH, CH<sub>2</sub>COOH, N<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, C<sub>1-10</sub> алкил, C<sub>2-10</sub> алкенил или C<sub>2-10</sub> алкинил;

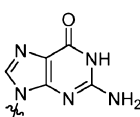
R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> независимо выбраны из группы, включающей H, OH, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -COOH, CH<sub>2</sub>COOH, N<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, C<sub>1-10</sub> алкил, C<sub>2-10</sub> алкенил или C<sub>2-10</sub> алкинил;

Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> независимо выбраны из группы, включающей CH<sub>2</sub>, CHCl, CCl<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>, CHF, NH, O; и

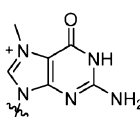
B представляет собой группу в соответствии с формулой 3, 4, 5, 6 или 7



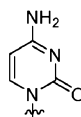
формула 3



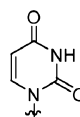
формула 4



формула 5



формула 6



формула 7

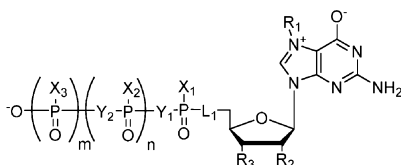
Предпочтительный 5'-фосфотиоатный аналог кэпа выбран из группы, состоящей из

No	Соединение	Структурная формула	Химическое наименование
21	m <sup>7</sup> GppSG		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P2-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-дифосфат
22	m <sup>7</sup> GpppSG		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат
23	m <sup>7</sup> GSppG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P2-гуанозин-5'-ил)-дифосфат
24	m <sup>7</sup> GSpppG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил)-трифосфат
25	m <sup>7</sup> GSppCH <sub>2</sub> pG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил)-2,3-метилтрифосфат
26	m <sup>7</sup> 2'-O-GSpppG		P1-(2'-O-метил-7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил)-трифосфат
30	m <sup>7</sup> GSpppG D1		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил)-трифосфат D1
31	m <sup>7</sup> GSpppG D2		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D2
32	m <sup>7</sup> GSpppSG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат
33	m <sup>7</sup> GSpppSG D1		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D1
34	m <sup>7</sup> GSpppSG D2		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D2
35	m <sup>7</sup> GpppSG D1		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D1
36	m <sup>7</sup> GpppSG D2		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D2
37	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> ppSG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил)-1,2-метилтрифосфат
38	m <sup>7</sup> 2'-O-GpppSG		P1-(2'-O-метил-7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат

Еще более предпочтительное соединение - 5'-фосфоротиоатный аналог кэпа выбрано из группы, состоящей из

No	Соединение	Структурная формула	Химическое наименование
23	m <sup>7</sup> GSppG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P2-гуанозин-5'-илдифосфат
24	m <sup>7</sup> GSpppG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат
25	m <sup>7</sup> GSppCH <sub>2</sub> pG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2,3-метилентрифосфат
26	m <sup>7</sup> 2'-O-GSpppG		P1-(2'-O-метил-7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат
30	m <sup>7</sup> GSpppG D1		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-трифосфат D1
31	m <sup>7</sup> GSpppG D2		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-тиотрифосфат D2
32	m <sup>7</sup> GSpppSG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат
33	m <sup>7</sup> GSpppSG D1		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D1
34	m <sup>7</sup> GSpppSG D2		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D2
37	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> ppSG		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-1,2-метилентиотрифосфат

Настоящее изобретение также относится к 5'-фосфоротиоатному аналогу в соответствии с формулой 2



Формула 2

где m=0, 1;

n = 0, 1 или 2;

L<sup>1</sup> представляет собой S;

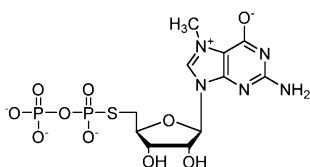
X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> независимо выбраны из группы, включающей O, S;

R<sup>1</sup> выбран из группы, включающей CH<sub>2</sub>Ph, C<sub>1-10</sub> алкил;

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> независимо выбраны из группы, включающей H, OH, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -COOH, N<sub>3</sub>, C<sub>1-10</sub> алкил;

Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub> независимо выбраны из группы, включающей CH<sub>2</sub>, CHCl, CCl<sub>2</sub>, CHF, CF<sub>2</sub>, NH и O;

Предпочтительный 5'-фосфоротиоатный аналог представляет собой 7-метилгуанозин-5'-дезоксигуанозин-5'-дифосфоротиоат формулы 13, приведенной ниже



Формула 13.

Настоящее изобретение также относится к 5'-фосфоротиоатному аналогу кэпа в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к 5'-фосфоротиоатному аналогу кэпа в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве лекарственного средства для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) и/или облегчения симптомов СМА.

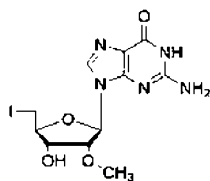
Настоящее изобретение также относится к применению 5'-фосфоротиоатного аналога кэпа в соответствии с настоящим изобретением для получения лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к применению 5'-фосфоротиоатного аналога кэпа в соответствии с настоящим изобретением для получения лекарственного средства для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) и/или облегчения симптомов СМА.

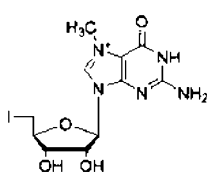
Настоящее изобретение также относится к применению 5'-фосфоротиоатного аналога кэпа в соответствии с настоящим изобретением в качестве регулятора активности DcpS, предпочтительно в качестве ингибитора активности фермента DcpS, более предпочтительно hDcpS.

Настоящее изобретение также относится к применению 5'-фосфоротиоатного аналога кэпа в соответствии с настоящим изобретением для регуляции деградации мРНК и/или регуляции сплайсинга мРНК.

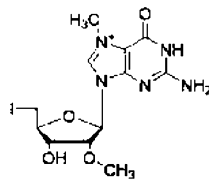
Настоящее изобретение дополнительно относится к аналогам 5'-дезоксид-5'-иодгуанозина, имеющим структуры в соответствии с формулами 10, 11 и 12, представленными ниже.



формула 10

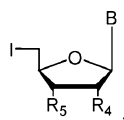


формула 11



формула 12

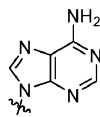
Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения соединения в соответствии с формулой 1, включающему стадии, где 5'-иоднуклеозид в соответствии с формулой 8



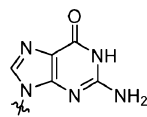
Формула 8

где  $R^4$  и  $R^5$  независимо выбраны из группы, включающей Н, ОН,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил; и

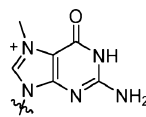
В представляет собой группу в соответствии с формулой 3, 4, 5, 6 или 7



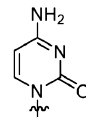
формула 3



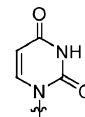
формула 4



формула 5

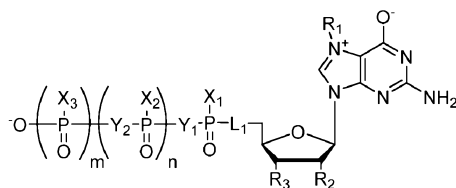


формула 6



формула 7

приводят во взаимодействие с 5'-фосфоротиоатным аналогом в соответствии с формулой 2, содержащим концевой тиофосфатный фрагмент



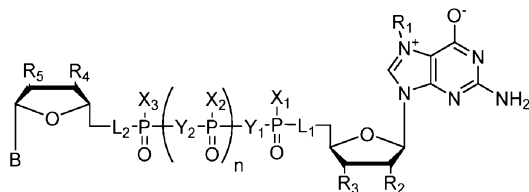
Формула 2

где  $m=0, 1$ ;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;

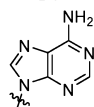
$L^1$  представляет собой О или S;

$X_1, X_2, X_3$  независимо выбраны из группы, включающей O, S;  
 $R^1$  выбран из группы, включающей  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил;  
 $R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ -COOH,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил;  
 $Y_1$  и  $Y_2$  независимо выбраны из группы, включающей  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CHCl}$ ,  $\text{CCl}_2$ ,  $\text{CHF}$ ,  $\text{CF}_2$ ,  $\text{NH}$  и O;  
 где если  $n = 0$  и  $m = 1$ , то  $X_3$  представляет собой S, а  $X_1$  представляет собой O;  
 если  $n = 1$  и  $m = 0$ , то  $X_2$  представляет собой S; а  $X_1$  представляет собой O;  
 если  $n = 1$  и  $m = 1$ , то  $X_3$  представляет собой S; а  $X_1$  и  $X_2$  представляют собой O;  
 с получением 5'-фосфоротиоатного аналога кэпа в соответствии с формулой 1

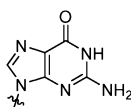


Формула 1

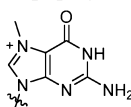
где  $L^1$  и  $L^2$  независимо выбраны из группы, включающей O и S, где по меньшей мере один из  $L_1$  и  $L_2$  не является O;  
 $n = 0, 1$  или  $2$ ;  
 $X_1, X_2, X_3$  независимо выбраны из группы, включающей O, S;  
 $R^1$  выбран из группы, включающей  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил;  
 $R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ , -COOH,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил,  $\text{C}_{2-10}$  алкенил или  $\text{C}_{2-10}$  алкинил;  
 $R^4$  и  $R^5$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ , -COOH,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил,  $\text{C}_{2-10}$  алкенил или  $\text{C}_{2-10}$  алкинил;  
 $Y_1, Y_2$  независимо выбраны из группы, включающей  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CHCl}$ ,  $\text{CCl}_2$ ,  $\text{CF}_2$ ,  $\text{CHF}$ ,  $\text{NH}$ , O; и  
 В представляет собой группу в соответствии с формулой 3, 4, 5, 6 или 7



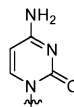
формула 3



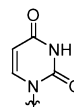
формула 4



формула 5



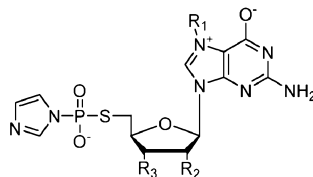
формула 6



формула 7

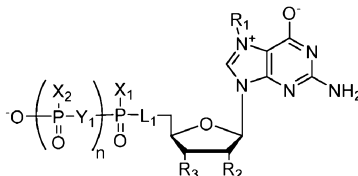
Предпочтительно указанный выше способ синтеза включает использование эквимольных количеств соединения в соответствии с формулой 2, соединения в соответствии с формулой 8 и DBU (1,8-дизабицикло(5.4.0)ундец-7-ена) в форме основания.

Настоящее изобретение также относится к способу получения 5'-фосфоротиоатного аналога в соответствии с формулой 2a, где производное имидазолида в соответствии с формулой 9



Формула 9

где  $R^1$  выбран из группы, включающей  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил;  
 $R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ -COOH,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил;  
 приводят во взаимодействие с триэтиламония фосфатной солью или натрия тиофосфатом с получением 5'-фосфоротиоатного аналога в соответствии с формулой 2a



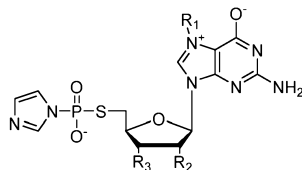
Формула 2a

где  $n = 0, 1$  или  $2$ ;  
 $L^1$  представляет собой O или S;  
 $X_1$  и  $X_2$  независимо выбраны из группы, включающей O, S;  
 $R^1$  выбран из группы, включающей  $\text{CH}_2\text{Ph}$ , Смо алкил;  
 $R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{OC}_2\text{H}_5$ -COOH,  $\text{N}_3$ ,  $\text{C}_{1-10}$  алкил;



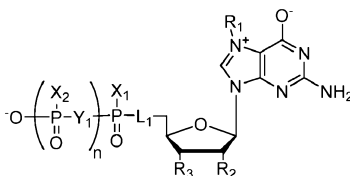
$Y^1$  независимо выбран из группы, включающей  $CH_2$ ,  $CHCl$ ,  $CCl_2$ ,  $CHF$ ,  $CF_2$ ,  $NH$  или  $O$ .

Настоящее изобретение также относится к способу получения соединения в соответствии с формулой 1, включающему стадии, где производное имидазолида в соответствии с формулой 9



Формула 9

где  $R^1$  выбран из группы, включающей  $CH_2Ph$ , Смо алкил;  
 $R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей  $H$ ,  $OH$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $-COOH$ ,  $N_3$ ,  $C_{1-10}$  алкил;  
 приводят во взаимодействие с 5'-фосфоротиоатным аналогом в соответствии с формулой 2а, содержащим концевой тиофосфатный фрагмент



Формула 2а

где  $n = 1$ ;

$L^1$  представляет собой  $O$  или  $S$ ;

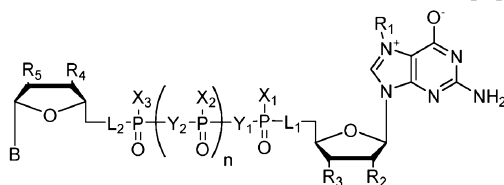
$X_1$  и  $X_2$  независимо выбраны из группы, включающей  $O$ ,  $S$ ;

$R^1$  выбран из группы, включающей  $CH_2Ph$ ,  $C_{1-10}$  алкил;

$R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей  $H$ ,  $OH$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $-COOH$ ,  $N_3$ ,  $C_{1-10}$  алкил;

$Y_1$  независимо выбран из группы, включающей  $CH_2$ ,  $CHCl$ ,  $CCl_2$ ,  $CHF$ ,  $CF_2$ ,  $NH$  или  $O$ ;

с получением 5'-фосфоротиоатного аналога кэпа в соответствии с формулой 1



Формула 1

где  $L^1$  и  $L^2$  независимо выбраны из группы, включающей  $O$  и  $S$ , где по меньшей мере один из  $L_1$  и  $L_2$  не является  $O$ ;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;

$X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  независимо выбраны из группы, включающей  $O$ ,  $S$ ;

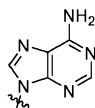
$R^1$  выбран из группы, включающей  $CH_2Ph$ ,  $C_{1-10}$  алкил;

$R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей  $H$ ,  $OH$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $-COOH$ ,  $CH_2COOH$ ,  $N_3$ ,  $CH_2N_3$ ,  $C_{1-10}$  алкил,  $C_{2-10}$  алкенил или  $C_{2-10}$  алкинил;

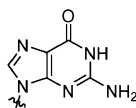
$R^4$  и  $R^5$  независимо выбраны из группы, включающей  $H$ ,  $OH$ ,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $-COOH$ ,  $CH_2COOH$ ,  $N_3$ ,  $CH_2N_3$ ,  $C_{1-10}$  алкил,  $C_{2-10}$  алкенил или  $C_{2-10}$  алкинил;

$Y_1$ ,  $Y_2$  независимо выбраны из группы, включающей  $CH_2$ ,  $CHCl$ ,  $CCl_2$ ,  $CF_2$ ,  $CHF$ ,  $NH$ ,  $O$ ; и

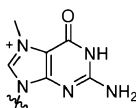
$B$  представляет собой группу в соответствии с формулой 3, 4, 5, 6 или 7



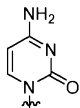
формула 3



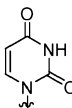
формула 4



формула 5



формула 6



формула 7

В способе синтеза с производным имидазолида реакцию предпочтительно проводят в присутствии хлорида двухвалентного металла, причем предпочтительным хлоридом двухвалентного металла является хлорид цинка  $ZnCl_2$ .

В способе синтеза с производным имидазолида предпочтительно используют 1,5-кратный избыток имидазолида в соответствии с формулой 9 по отношению к фосфатной группе, тиофосфатной группе или соединению в соответствии с формулой 2а в присутствии 8-кратного избытка хлорида двухвалентного металла.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическому составу, содержащему 5'-фосфоро-

тиоатный аналог кэпа в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтический состав в соответствии с настоящим изобретением, содержащий 5'-фосфоротиаотный аналог кэпа в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель, обладает способностью ингибировать активность DcpS, предпочтительно ингибировать активность hDcpS, и предназначен для применения для лечения СМА.

Выбор фармацевтически приемлемого носителя будет зависеть от способа введения фармацевтического состава и необходимости защиты 5'-фосфоротиаотного аналога в соответствии с настоящим изобретением от инактивации или деградации перед доставкой в клетки, ткани или организм. Фармацевтически приемлемые носители включают растворители, диспергирующие среды и вспомогательные агенты (материалы для покрытия, поверхностно-активные вещества, ароматизаторы и вещества, корректирующие вкус и запах, антиоксиданты и другие). Фармацевтический состав в соответствии с настоящим изобретением может быть введен различными путями, включая инъекционное, пероральное, местное и ректальное введение. Дозу фармацевтического состава устанавливают с учетом пути введения, состояния, требующего лечения или профилактики, и других сопутствующих обстоятельств.

Настоящее изобретение также относится к мРНК, содержащей на 5'-конце новый 5'-фосфоротиаотный аналог кэпа в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительная мРНК характеризуется содержанием в ней 5'-фосфоротиаотного аналога кэпа, выбранного из группы, включающей  $m^7\text{GSpppG}$  (№ 24),  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (№ 26),  $m^7\text{GSpppSG}$  (№ 32),  $m^7\text{GSppspG D1}$  (№ 30),  $m^7\text{GSppspG D2}$  (№ 31),  $m^7\text{GSppspSG D1}$  (№ 33),  $m^7\text{GSppspSG D2}$  (№ 34), более предпочтительно представляющего собой  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (№ 26).

Настоящее изобретение также относится к способу получения мРНК, содержащей 5'-фосфоротиаотный аналог кэпа на 5'-конце молекулы, включающему встраивание 5'-фосфоротиаотного аналога кэпа в соответствии с настоящим изобретением в молекулу мРНК в процессе синтеза.

В предпочтительном способе получения мРНК 5'-фосфоротиаотный аналог кэпа выбран из группы, включающей  $m^7\text{GSpppG}$  (№ 24),  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (№ 26),  $m^7\text{GSpppSG}$  (№ 32),  $m^7\text{GSppspG D1}$  (№ 30),  $m^7\text{GSppspG D2}$  (№ 31),  $m^7\text{GSppspSG D1}$  (№ 33),  $m^7\text{GSppspSG D2}$  (№ 34), более предпочтительно он представляет собой  $m^{7,2'}\text{GSpppG}$  (№ 26).

В предпочтительном способе получения мРНК синтез мРНК осуществляют путем транскрипции *in vitro*.

Настоящее изобретение также относится к мРНК, полученной способом получения мРНК, содержащей 5'-фосфоротиаотный аналог кэпа в соответствии с настоящим изобретением на 5'-конце молекулы.

Настоящее изобретение также относится к применению мРНК, содержащей 5'-фосфоротиаотный аналог кэпа в соответствии с настоящим изобретением на 5'-конце молекулы, для получения белков.

Применение мРНК для получения белков предпочтительно осуществляют в клеточной или неклеточной системе.

Настоящее изобретение также относится к мРНК в соответствии с настоящим изобретением и мРНК, полученной в соответствии со способом получения мРНК, содержащей 5'-фосфоротиаотный аналог кэпа в соответствии с настоящим изобретением на 5'-конце молекулы, для применения в качестве лекарственного средства.

Такую мРНК предпочтительно применяют в качестве лекарственного средства для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) и/или для облегчения симптомов СМА.

Предпочтительно такую мРНК используют для применения в качестве противоракового лекарственного средства, более предпочтительно в качестве лекарственного средства для противораковой иммунотерапии.

Настоящее изобретение также относится к применению мРНК в соответствии с настоящим изобретением и мРНК, полученной в соответствии со способом получения мРНК, содержащей 5'-фосфоротиаотный аналог в соответствии с настоящим изобретением на 5'-конце молекулы, для получения лекарственного средства.

В предпочтительном варианте применения мРНК применяют для получения лекарственного средства для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) и/или для облегчения симптомов СМА, в качестве противоракового лекарственного средства, более предпочтительно в качестве лекарственного средства для противораковой иммунотерапии.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическому составу, содержащему мРНК в соответствии с настоящим изобретением и мРНК, полученную в соответствии со способом получения мРНК, содержащей 5'-фосфоротиаотный аналог в соответствии с настоящим изобретением на 5'-конце молекулы, и фармацевтически приемлемый носитель.

Неметирированные соединения ( $\text{GppSG}$  и  $\text{GpppSG}$ ) были синтезированы в качестве контролей для биологических исследований.

В табл. 1 перечислены алкилирующие агенты, используемые для синтеза подходящим образом модифицированных нуклеотидов, которые были впервые получены авторами изобретения. В табл. 2 и 3

перечислены 5'-фосфоротиоатные аналоги кэпа, полученные и впоследствии охарактеризованные биофизическими и биохимическими методами.

Среди соединений, перечисленных в табл. 2 и 3, особенно предпочтительными с точки зрения лечения СМА являются 5'-фосфоротиоатные аналоги, содержащие серу в 5'-положении со стороны 7-метилгуанозина (соединения № 12, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 34 и 37), которые характеризуются стабильностью в присутствии фермента DcpS.

Таблица 1. Аналоги 5'-дезоксидгуанозина (номера соединений указаны рядом со структурами)

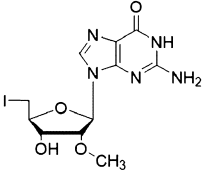
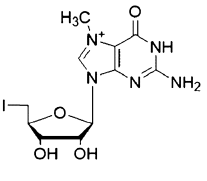
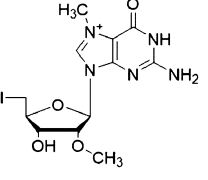
		
4	5	6
Формула 10	Формула 11	Формула 12

Таблица 2. Аналоги мононуклеотид-5'-тиофосфата: панель А - гуанозин, панель В - 7-метилгуанозин

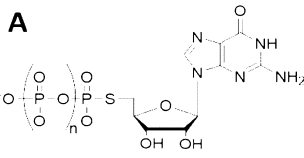
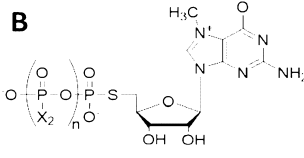
<b>A</b>	<b>B</b>
	
7: n=0 11: n=1	8: n=0 X <sub>2</sub> = O 12: n=1 X <sub>2</sub> = O 13: n=1 X <sub>2</sub> = S

Таблица 3. 5'-Тиофосфатные аналоги кэпа

19: n=0

20: n=1

Номер соединения	Соединение	n	R	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>
21	m <sup>7</sup> GppSG	0	H	O	S	O	O	O
22	m <sup>7</sup> GpppSG	1	H	O	S	O	O	O
23	m <sup>7</sup> GSppG	0	H	S	O	O	O	O
24	m <sup>7</sup> GSpppG	1	H	S	O	O	O	O
25	m <sup>7</sup> GSppCH <sub>2</sub> pG	1	H	S	O	O	CH <sub>2</sub>	O
38	m <sup>7,2'</sup> O <sup>+</sup> GpppSG	1	CH <sub>3</sub>	O	S	O	O	O
26	m <sup>7,2'</sup> O <sup>+</sup> GSpppG	1	CH <sub>3</sub>	S	O	O	O	O
32	m <sup>7</sup> GSpppSG	1	H	S	S	O	O	O
35	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D1	1	H	O	S	O	O	S
36	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D2	1	H	O	S	O	O	S
30	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D1	1	H	S	O	O	O	S
31	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D2	1	H	S	O	O	O	S
33	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D1	1	H	S	S	O	O	S
34	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D2	1	H	S	S	O	O	S
37	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> ppSG	1	H	O	S	CH <sub>2</sub>	O	O

Документы, цитируемые в настоящем описании и документах, упоминаемых в них, также включены в настоящее описание в качестве ссылки.

### Краткое описание графических материалов

Для лучшего понимания настоящее изобретение проиллюстрировано примерами и прилагаемыми чертежами.

На фиг. 1 представлен синтез аналогов 5'-дезоксид-5'-иодгуанозина.

На фиг. 2 представлен синтез 5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-тиофосфатов. А - синтез производного гуанозина; В - синтез производных 7-метилогуанозина.

На фиг. 3 представлен синтез 5'-тиофосфатных аналогов кэпа путем S-алкилирования. А - концевые тиофосфаты, используемые в реакции алкилирования; В - схемы реакции алкилирования с использованием 5'-дезоксид-5'-иодгуанозина (фиг. 1) и концевых тиофосфатов, представленных на панели А.

На фиг. 4 представлен синтез 5'-тиофосфатных аналогов кэпа с использованием имидазолидов. А - соединения, используемые в способе; В - синтез конечных соединений с использованием двух различных активированных производных № 9 и 29.

На фиг. 5 представлен гидролиз природного динуклеотидного субстрата под действием DcpS и исследование устойчивости 5'-S-модифицированных аналогов: панель А - исследование устойчивости природного аналога кэпа  $m^7GpppG$  к действию DcpS; панель В - исследование устойчивости аналога кэпа № 20 к действию фермента DcpS (табл. 3); панель С - исследование устойчивости аналога кэпа № 21 к действию фермента DcpS (табл. 3).

На фиг. 7 представлена кристаллическая структура активного сайта фермента AN37hDcpS в комплексе с  $m^7GSp_{ppSG} D2$ .

На фиг. 8 показана подверженность коротких 26-нуклеотидных РНК, кэпированных различными аналогами кэпа (транскрипты без кэпа на 5'-конце имеют длину 25 нуклеотидов), действию фермента Dcp1/2 при инкубировании с декэпирующим ферментом SpDcp1/2. Реакцию проводили в течение 0, 5, 15, 30 мин, после ее окончания реакционную смесь разделяли в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, после окончания электрофоретического разделения гель окрашивали с помощью SYBR-Gold (Invitrogen). На каждой панели крайняя слева дорожка относится к контролю, который представляет собой некэпированную РНК.

На фиг. 9 показана относительная подверженность действию фермента Dcp1/2, определенная на основе данных, приведенных на фиг. 8. Относительную подверженность действию Dcp1/2 рассчитывали в виде отношения интенсивности бэнда, относящегося к РНК, кэпированной с 5'-конца, к сумме интенсивностей бэндов, относящихся к копированной и некэпированной РНК. Все значения были нормированы относительно времени 0 мин для отдельных РНК.

На фиг. 10 показана относительная эффективность трансляции, полученная на основе определения эффективности трансляции мРНК, кодирующей люциферазу Renilla, кэпированной различными аналогами кэпа с 5'-конца, в экстракте ретикулоцитов кролика.

На фиг. 11 показана относительная эффективность трансляции в клетках HeLa, определенная на основе активности люциферазы в выбранные моменты времени. Результаты представлены в виде отношения активности люциферазы, определенной для лизата клеток, трансфицированных мРНК, кэпированной  $m2^{7,2-O}GSp_{ppSG}$  или  $m2^{7,2-O}GpppSG$  с 5'-конца, к активности люциферазы, определенной для лизата клеток, трансфицированных мРНК, кэпированной  $m^7GpppG$ . На гистограммах представлено среднее значение из трех повторностей биологических экспериментов.

Химический синтез 5'-тиофосфатных аналогов кэпа представляет собой инновационное сочетание трех способов синтеза нуклеотидов, основанных на химии:

1) нуклеотидных производных имидазолида (см. (Abrams and Schiff 1973); (Barnes, Waldrop et al. 1983); (Kalek, Jemielity et al. 2006) и (Kalek, Jemielity et al. 2005));

2) S-алкилирования галогенсодержащими производными нуклеозидов (см. (Arakawa, Shiokawa et al. 2003));

3) синтеза концевых нуклеозид-β-тиоди- и γ-тиотрифосфатов (см. (Zuberek, Jemielity et al. 2003)).

Для синтеза серосодержащих аналогов кэпа в 5'-положении авторы изобретения разработали два дополнительных подхода, которые в целом позволяют синтезировать целый ряд 5'-фосфоротиоатных аналогов моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов и динуклеотидных аналогов кэпа (фиг. 2-4). Подход 1 (фиг. 2 и первая стадия на фиг. 3) включает реакцию S-алкилирования с использованием реакции нуклеофильного замещения 5'-дезоксид-5'-иоднуклеозида β- или γ-тиофосфатами. Во втором подходе (фиг. 4), приводящем к получению динуклеотидных соединений, содержащих атом серы в положении 5', используют реакцию сочетания между предварительно активированной формой подходящего имидазолидного нуклеотида и дифосфатом (в обоих случаях на выбранной стадии использовали реакцию S-алкилирования) в присутствии  $ZnCl_2$  в качестве катализатора.

В первом подходе используют соответствующие фосфоротиоаты (моно-, ди-, три-), содержащие в концевом положении фосфоротиоатный фрагмент. Оптимальные условия для этой реакции включают применение эквимольных количеств фосфоротиоата, 5'-иоднуклеозида и DBU (1,8-дизабицикло

(5.4.0)ундец-7-ена) в форме основания. К настоящему времени с применением этого способа авторы изобретения получили 9 различных динуклеотидных аналогов кэпа, включая два, содержащих модификации с метиленовой группой в положениях  $\alpha$ - $\beta$  и  $\beta$ - $\gamma$  трифосфатного мостика (фиг. 3).

Во втором способе для эффективного выхода требуется присутствие хлоридов двухвалентных металлов, таких как  $ZnCl_2$ , который также улучшает растворимость в органической среде, защищает производное имидазола от гидролиза и повышает скорость реакции за счет сближения производного имидазола и фосфата другой молекулы. Оптимальными условиями для этой реакции было использование 1,5 эквивалентов производного имидазола по отношению к дифосфату в присутствии 8-кратного избытка  $ZnCl_2$  в ДМФА. С применением второго способа авторы изобретения дополнительно получили девять 5'-фосфоротиоатных аналогов кэпа, содержащих два атома серы в положении 5' и атом серы в р-немостиковом положении трифосфатной цепи (фиг. 4). До настоящего времени не было описано применение 5'-фосфоротиоатных аналогов нуклеотидов в этом типе реакций. Вследствие наличия стереоцентрического центра, расположенного на атоме фосфора, каждый аналог, содержащий  $\beta$ -S-атом серы, был получен в виде смеси диастереомеров (называемых D1 и D2 в соответствии с порядком их элюирования с колонки для ОФ-ВЭЖХ). Отдельные диастереомеры разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Полученные аналоги кэпа очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE Sephadex A-25, и в случае, если чистота была недостаточной, посредством препаративной ВЭЖХ. Затем очищенные соединения исследовали в отношении их биохимических и биологических свойств.

Пути синтеза для получения аналогов кэпа, содержащих атом серы в положении 5', представлены на фиг. 1-4.

Затем полученные аналоги кэпа исследовали в качестве субстратов фермента DcpS (hDcpS) человека. При определении с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) только четыре из аналогов -  $m^7GppSG$  (№ 21),  $m^7GpppSG$  (№ 22)  $m^{7,2'-O}GpppSG$  (№ 38) и  $m^7Gpp,pSG$  D1/D2 (№ 35-36) - подвергаются гидролизу под действием DcpS. Другие аналоги, содержащие атом серы в положении 5' со стороны 7-метилированного гуанозина, устойчивы к гидролизу под действием hDcpS (сравнение стабильности двух различных аналогов - (№ 22) и (№ 24) - фиг. 5, табл. 4). В отличие от соединений № 21, 22, 38 и 35-36, аналог 37 ( $m^7GpCH_2PpSG$ ) был дополнительно модифицирован метиленбисфосфонатным фрагментом и также был устойчив к гидролизу под действием фермента hDcpS (табл. 5). Затем использовали флюоресцентный метод и флюорогенный зонд для определения способности этих соединений ингибировать фермент hDcpS с одновременным определением для соединений, устойчивых к действию фермента, параметра  $IC_{50}$  (см. заявку на патент PL406893). В результате исследований было обнаружено, что полученные соединения являются очень хорошими ингибиторами фермента DcpS человека.

Аналог № 34, демонстрирующий наилучшие ингибирующие свойства в отношении фермента hDcpS из всех исследованных аналогов кэпа, подвергали сокристаллизации с укороченной формой фермента (AN37hDcpS; полноразмерный фермент не образовывал кристаллы), и структуру полученного комплекса с разрешением 2,05 Å определяли с помощью рентгеноструктурной кристаллографии (фиг. 7). Конформация аналога № 34, наблюдаемая в структуре указанного комплекса, значительно отличается от конформации немодифицированного аналога кэпа  $m^7GpppG$  (соединение № 0) в комплексе с каталитически неактивным мутантом H277N hDcpS (Gu, Fabrega et al. 2004). В частности, существенные различия между этими двумя лигандами наблюдали при выравнивании трифосфатного мостика, приводящем к исключению  $\gamma$ -фосфата аналога № 34 из каталитического центра. Дополнительно, помимо типичных взаимодействий комплекса кэп/фермент DcpS с С-концевым доменом, аналог № 34 посредством водородных связей взаимодействует с остатком лизина 142 и остатком тирозина 143. Эти аминокислоты расположены в так называемой шарнирной области, соединяющей С- и N-концевые домены, которые перемещаются друг относительно друга в ходе каталитического цикла.

Структуру и чистоту полученных соединений подтверждали с помощью масс-спектрометрии и  $^1H$  и  $^{31}P$  ЯМР.

Наблюдение, что  $m^7GSpppG$  (соединение № 24) и его аналоги устойчивы к hDcpS, является неожиданным, поскольку гидролиз полученных соединений протекает через стадию нуклеофильной атаки на фосфатную группу, смежную с 7-метилгуанозином, что согласуется с каталитическим механизмом, установленным для природных субстратов.

Таким образом, в настоящем изобретении описаны структуры и способы синтеза различных аналогов 5'-конца мРНК (кэпа), содержащих 5'-фосфоротиоатный фрагмент. Ни какие-либо из описанных аналогов кэпа, ни их свойства в отношении фермента DcpS, ни способы их применения, в частности для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) и/или облегчения симптомов СМА, не были ранее описаны в литературе.

Выбранные аналоги применяли для синтеза мРНК с использованием метода транскрипции *in vitro* с участием РНК-полимеразы SP6 (New England BioLabs). Было определено, какой процент пула транскриптов, имеющих длину 35 нуклеотидов, содержит кэп-структуру, и затем была исследована подверженность этих транскриптов деградации под действием рекомбинантного фермента Dcp1/2 из *Schizosaccharomyces pombe* (пример 2, тест 4, фиг. 8, фиг. 9, табл. 6). Полноразмерные транскрипты, кодирующие

люциферазу (в качестве репортерного гена), подвергали трансляции в лизате ретикулоцитов кролика (фиг. 10, пример 2, тест 5) и в клетках HeLa, трансфицированных модифицированной мРНК (фиг. 11, пример 2, тест 6). В обоих случаях эффективность трансляции мРНК в обеих системах трансляции определяли путем оценки активности синтезированного белка (люциферазы) (табл. 6).

Термины, используемые в настоящем описании, имеют следующие значения. Термины, не определенные в настоящем описании, имеют представленное значение и понятны специалисту в данной области техники в свете настоящего описания и контекста описания настоящей патентной заявки. Следующие условные обозначения, если не указано иное, были использованы в настоящем описании, причем термины имеют значения, указанные в определениях ниже.

Термин "алкил" относится к насыщенному линейному или разветвленному углеводородному заместителю, имеющему указанное число атомов углерода. Примерами алкильного заместителя являются -метил, -этил, -н-пропил, -н-бутил, -н-пентил, -н-гексил, -н-гептил, -н-октил, -н-нонил и -н-децил. Иллюстративные разветвленные  $-(C_1-C_{10})$  алкилы включают -изопропил, -втор-бутил, -изобутил, -трет-бутил, -изопентил, -неопентил, -1-метилбутил, -2-метилбутил, -3-метилбутил, -1,1-диметилпропил, -1,2-диметилпропил, -1-метилпентил, -2-метилпентил, -3-метилпентил, -4-метилпентил, -1-этилбутил, -2-этилбутил, -3-этилбутил, -1,1-диметилбутил, -1,2-диметилбутил, -1,3-диметилбутил, -2,2-диметилбутил, -2,3-диметилбутил, -3,3-диметилбутил, -1-метилгексил, -2-метилгексил, -3-метилгексил, -4-метилгексил, -5-метилгексил, -1,2-диметилпентил, -1,3-диметилпентил, -1,2-диметилгексил, -1,3-диметилгексил, -3,3-диметилгексил, -1,2-диметилгептил, -1,3-диметилгептил и -3,3-диметилгептил и другие.

Термин "алкенил" относится к насыщенному линейному или разветвленному ациклическому углеводородному заместителю, имеющему указанное число атомов углерода и содержащему по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод. Примерами алкенильного заместителя являются -винил, -аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутиленил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил, -2,3-диметил-2-бутенил, -1-гексенил, -2-гексенил, -3-гексенил, -1-гептенил, -2-гептенил, -3-гептенил, -1-октенил, -2-октенил, -3-октенил, -1-ноненил, -2-ноненил, -3-ноненил, -1-деценил, -2-деценил, -3-деценил и другие.

Термин "алкинил" относится к насыщенному линейному или разветвленному ациклическому углеводородному заместителю, имеющему указанное число атомов углерода и содержащему по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод. Примерами алкинильного заместителя являются ацетиленил, пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил, -3-метил-1-бутинил, -4-пентинил, -1-гексинил, -2-гексинил, -5-гексинил и другие.

Термин "гетероатом" относится к атому, выбранному из группы, состоящей из кислорода, серы, азота, фосфора и других.

Термин "ВЭЖХ" относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии, а растворители, обозначенные как растворители для "ВЭЖХ", означают растворители подходящей чистоты для анализа методом ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Термин "ЯМР" означает ядерный магнитный резонанс.

Термин "клеточная система" относится к клеткам, способным осуществлять процесс биосинтеза белка на матрице РНК.

Термин "неклеточная система" означает биологическую смесь, содержащую все ингредиенты, необходимые для биосинтеза белка на основе матрицы РНК, как правило лизат животных или растительных клеток.

### Способы осуществления настоящего изобретения

Следующие примеры приведены только для иллюстрации настоящего изобретения и для объяснения различных его аспектов, а не для его ограничения, и не должны быть отождествлены со всем его объемом, который определен в прилагаемой формуле изобретения. Следующие примеры, если не указано иное, включают применение стандартных материалов и способов, используемых в данной области, или методик, рекомендованных производителем для конкретных материалов и способов.

### Примеры

Общая информация о синтезе, выделении и определении характеристик новых аналогов кэпа.

Нуклеотиды, которые являлись промежуточными соединениями, очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE Sephadex A-25 ( $\text{HCO}_3^-$  форма) с использованием линейного градиента бикарбоната триэтиламмония (TEAB) в деионизированной воде. После выпаривания при пониженном давлении, в процессе которого несколько раз добавляли 96% этанол для разложения TEAB буфера, промежуточные соединения выделяли в виде солей триэтиламмония. Конечные продукты (аналоги кэпа) очищали таким же образом, а затем очищали с помощью полупрепаративной ВЭЖХ и несколько раз подвергали лиофилизации, и выделяли в виде солей аммония. Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) проводили на приборе Agilent Technologies Series 1200 с колонкой Supelcosil LC-18 RP-T (4,6×250 мм, скорость потока 1,3 мл/мин) с использованием линейного градиента 0-25% метанола (программа А) в 0,05 М ацетате аммония (рН 5,9) или 0-50% метанола (программа В) в 0,05 М ацетате аммония (рН 5,9). Элюированные соединения обнаруживали с помощью детектора ультрафиолетовой и видимой части спектра (UV-VIS) (при длине волны 260 нм) и флуоресцентного детектора (возбуждение при

длине волны 260 нм, испускание при длине волны 370 нм). Препаративную ОФ ВЭЖХ проводили на том же приборе с использованием колонки Discovery RP Amide C16 (21,2×250 мм, скорость потока 5,0 мл/мин) и линейного градиента ацетонитрила в 0,05 М ацетате аммония (pH 5,9) в качестве подвижной фазы. Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР и  $^{31}\text{P}$  ЯМР регистрировали при 25°C на приборе Varian UNITY-plus с частотой 399,94 МГц и 161,90 МГц соответственно. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  ЯМР приведены относительно TSP (3-триметилсилил[2,2,3,3-D<sub>4</sub>]пропионата натрия) в D<sub>2</sub>O (внутренний стандарт). Химические сдвиги  $^{31}\text{P}$  ЯМР приведены относительно 20% фосфорной кислоты в D<sub>2</sub>O (внешний стандарт). Масс-спектры высокого разрешения в режиме детекции отрицательно [MS ESI (-)] или положительно заряженных ионов [MS ESI (+)] регистрировали на приборе Micromass QToF 1 MS. Считывание флуоресценции в планшетах проводили на приборе Tecan Infini<sup>®</sup> 200 PRO с возбуждением при длине волны 480 нм и испусканием при длине волны 535 нм. Образцы помещали в черный 96-луночный планшет (Greiner). Кристаллизацию проводили в 96-луночных планшетах с лунками, снабженными 3 линзами (Swissci), с использованием дозирующего устройства Mosquito Crystal (ТТр Labtech). Растворители и другие реагенты приобретали у Sigma-Aldrich и использовали без дополнительной очистки, если ниже не указано иное. Коммерчески доступные натриевые соли гуанозинмонофосфата (GMP) и гуанозиндифосфата (GDP) превращали в соли триэтиламмония с использованием ионообменной хроматографии на Dowex 50 WX8. Соли триэтиламмония и натриевые соли m<sup>7</sup>GMP и m<sup>7</sup>GDP, m<sup>7</sup>GMP-Im и m<sup>7</sup>GDP-Im получали, как описано в литературе ((Kalek, Jemielity et al. 2005), (Jemielity, Fowler et al. 2003)). 5'-Дезокси-5'-иодгуанозин, 5'-дезоксигуанозин-5'-монофосфат и триэтиламинфосфоритат получали, как описано в литературе ((Arakawa, Shiokawa et al. 2003), (Zuberek, Jemielity et al. 2003)). Соль триэтиламмония m<sup>7</sup>GpCH<sub>2</sub>p получали, как описано в литературе (Kalek, Jemielity et al. 2006). GpCH<sub>2</sub>ppS получали, как описано в источнике (Kowalska, Ziemniak et al. 2008).

В приведенных ниже примерах для конкретных соединений в скобках приведена ссылка на фигуру и номер, указывающий на определенные заместители, соответствующий конкретному номеру для конкретного аналога кэпа.

Пример 1. Синтез и выделение новых аналогов кэпа.

Общий способ синтеза 5'-иоднуклеозидных производных (фиг. 1, № 3, 4).

К перемешиваемой с помощью магнитной мешалки суспензии соответствующего нуклеозида (1 ммоль), трифенилфосфина (3 ммоль, M=262,29 г/моль) и имидазола (6 ммоль, M=68,08 г/моль) в N-метил-2-пирролидиноне (до концентрации нуклеозида 0,25 моль/л) добавляли иод (3 ммоль, M=253,81 г/моль) в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию проводили в течение 3 ч, и ход реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ. Затем реакционную смесь вливали в раствор CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (3:1, об./об.), разбавляя реакционную смесь в 12 раз. В течение 24 ч при 4°C на границе раздела двух слоев образовывался белый кристаллический осадок. Осадок отфильтровывали при пониженном давлении, промывали метилхлоридом и сушили в вакууме над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

5'-Дезокси-5'-иодгуанозин (фиг. 1, № 3).

5'-Дезокси-5'-иодгуанозин (фиг. 1, № 3) (10,4 г, 26,5 ммоль, 75%) получали, используя в качестве исходного вещества гуанозин (фиг. 1, № 1) (10 г, 35,3 ммоль), в соответствии с общей методикой. t<sub>R</sub> (B) = 12,36 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 10,65 (s, 1H, H-1), 7,89 (s, 1H, H-8), 6,47 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,68 (d, 1H, J = 6,26 Гц, H-1'), 5,51 (d, 1H, J = 6,26 Гц, 2'-OH), 5,35 (d, 1H, J = 4,70 Гц, 3'-OH), 4,59 (q, 1H, J = 5,48 Гц, H-2'), 4,03 (q, 1H, J = 5,09, 3,13 Гц, H-3'), 3,90 (dt, 1H, J = 6,26, 3,13 Гц, H-4'), 3,53 (dd, 1H, J = 6,26, 5,87 Гц, H-5'), 3,39 (dd, 1H, J = 10,17, 6,65 Гц, H-5'); МСВР, ИЭР (-) расчетное значение m/z для C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup> (M-H)<sup>-</sup>: 391,9861, экспериментальное значение: 391,98610.

5'-Дезокси-5'-иод-2'-О-метилгуанозин (фиг. 1, №4).

2'-О-Метил-5'-дезоксигуанозин (фиг. 1, № 4) (328,8 мг, 0,81 ммоль, 80%) получали, используя в качестве исходного вещества 2'-О-метилгуанозин (фиг. 1, № 2) (300 мг, 1,0 ммоль), в соответствии с общей методикой. t<sub>R</sub> (B) = 14,44 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 7,95 (s, 1H, H-8), 6,50 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,81 (d, 1H, J = 6,41 Гц, H-1'), 5,50 (d, 1H, J = 5,34 Гц, 3'-OH), 4,41, 4,40 (2d, 1H, J = 6,26, 6,41 Гц, H-2'), 4,28-4,25 (m, 1H, H-3'), 3,97, 3,96 (2t, 1H, J = 6,56, 3,05 Гц, H-4'), 3,56 (dd, 1H, J = 6,41, 10,38 Гц, H-5'), 3,43 (dd, 1H, J = 10,53, 6,87, 6,71 Гц, H-5'), 3,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение m/z для C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 406,0090, экспериментальное значение: 406,0021.

5'-Дезокси-5'-иод-7-метилгуанозин (фиг. 1, № 5).

5'-Дезокси-5'-иодгуанозин (фиг. 1, № 3) (2 г, 5,09 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (20 мл) и добавляли MeI (2,5 мл, 40,7 ммоль). Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре. Ход реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ. Когда исходное вещество переставало обнаруживаться, реакцию останавливали путем добавления воды (10 мл), избыток метилиодида упаривали под вакуумом и концентрировали реакционную смесь при пониженном давлении. Затем к оставшемуся неочищенному продукту добавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 мл) и получали желтый осадок. Осадок

отфильтровывали при пониженном давлении, промывали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 20$  мл) и сушили в течение 24 ч в вакууме над  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ . Выход: 1,6 г (77,0%).  $t_R$  (B) = 11,94 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 5,98 (d, 1H,  $J = 3,91$  Гц, H-1'), 4,81 (dd, 1H,  $J = 4,70$  Гц, H-2'), 4,31 (t, 1H,  $J = 5,09$ , H-3'), 4,15 (q, 1H,  $J = 5,48$ , H-4'), 4,07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,50-3,62 (m, 2H,  $J = 4,70$ , 5,87 Гц, H-5').

МСВР, ИЭР (+) расчетное значение  $m/z$   $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 408,01687, экспериментальное значение: 408,01163.

5'-Дезокси-5'-иод-2'-О-метил-7-метилгуанозин (фиг. 1, № 6).

5'-Дезокси-5'-иод-2'-О-метилгуанозин (фиг. 1, № 4) (200,8 мг, 0,49 ммоль) растворяли в безводном ДМСО (3,3 мл) и добавляли MeI (0,25 мл, 3,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре. Ход реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ. Когда исходное вещество переставало обнаруживаться, реакцию останавливали водой (10 мл) и подводили pH до нейтрального значения с помощью  $\text{NaHCO}_3$ , избыток метилиодида подвергали экстракции диэтиловым эфиром и объединяли водные фазы с последующим концентрированием полученной смеси и очисткой с помощью препаративной ВЭЖХ с получением 45,8 мг соединения (77%).  $t_R$ (B) = 11,94 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  ppm 9,03 (s, 1H, H-8), 6,39 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,95 (d, 1H,  $J = 4,27$  Гц, H-1'), 4,40 (t, 1H,  $J = 4,58$  Гц, H-2'), 4,24 (t, 1H,  $J = 4,88$  Гц, H-3'), 4,08-4,06 (m, 1H, H-4'), 4,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,59 (dd, 1H,  $J = 5,19$ , 4,88, 10,68 Гц, H-5'), 3,50 (dd, 1H,  $J = 7,93$ , 7,63, 10,68 Гц, H-5'), 3,41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$   $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{IN}_5\text{O}_4^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 420,01741, экспериментальное значение: 420,01758.

Гуанозин-5'-дезоксигуанозин-5'-монофосфотриоат (фиг. 2, № 7).

К суспензии 5'-дезоксигуанозина (фиг. 2, № 3) (2,0 г, 5,1 ммоль) в 100 мл смеси ДМФА: $\text{H}_2\text{O}$  (1:1, об./об.) добавляли трехзамещенный тиофосфат натрия (4,6 г, 25,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Осадок удаляли путем фильтрации, фильтрат упаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в 50 мл воды и осаждали избыток трехзамещенного тиофосфата натрия путем добавления 100 мл метанола. После отделения неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии на Sephadex. Продукт подвергали сублимационной сушке. Выход: 1,9 г, (64%).  $t_R$  (B) = 4,24 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8,05 (s, 1H, H-8), 5,89 (d, 1H,  $J = 5,73$  Гц, H-1'), 4,85 (dd, 1H,  $J = 5,48$  Гц, H-2'), 4,51 (2d, 1H,  $J = 4,98$ , 4,23 Гц, H-3'), 4,33-4,39 (m, 1H, H-4'), 3,16-3,08 (m, 2H, Гц, H-5');  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 15,42 (s, 1P).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$   $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 378,02788, экспериментальное значение: 378,02828.

Гуанозин-5'-дезоксигуанозин-5'-монофосфотриоат (фиг. 2, № 8).

К суспензии 5'-дезоксигуанозина (фиг. 2, № 6) (2,0 г, 4,92 ммоль) в 100 мл ДМФА добавляли трехзамещенный тиофосфат натрия (4,43 г, 24,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 48 ч при комнатной температуре. Осадок удаляли, а фильтрат упаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в 50 мл воды и осаждали избыток трехзамещенного тиофосфата натрия путем добавления метанола (100 мл). После отделения неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии на Sephadex. Продукт подвергали сублимационной сушке. Выход: 1,55 г, (53%).  $t_R$  (B) = 4,64 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7,85 (s, 1H, H-8), 5,89 (d, 1H,  $J = 3,74$  Гц, H-1'), 4,78-4,75 (m, 1H, H-2'), 4,43-4,39 (m, 2H, H-3', H-4'), 4,09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,08-2,94 (m, 2H, Гц, H-5');  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 14,45 (s, 1P).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$   $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 392,04353, экспериментальное значение: 392,04378.

Общая методика синтеза гуанозин-5'-дезоксигуанозин-5'-монофосфотриоатимидазолидов (фиг. 2, № 9, 10).

Подходящее исходное соединение (триэтиламонийная (ТЕА) соль нуклеотида) (1 ммоль) смешивали с имидазолом (10 ммоль) и 2,2'-дитиодипиридином (3 ммоль) в ДМФА (до концентрации нуклеотида 0,15 М). Затем добавляли триэтиламин (3 ммоль) и трифенилфосфин (3 ммоль) и перемешивали смесь в течение 24 ч при комнатной температуре. Добавление безводного раствора  $\text{NaClO}_4$  (4 ммоль на каждый фосфатный фрагмент) в сухом ацетоне (по объему в 10 раз больше, чем объем добавленного ДМФА) приводило к осаждению продукта из реакционной смеси. После охлаждения до  $4^\circ\text{C}$  осадок отфильтровывали, промывали холодным сухим ацетоном и сушили в вакууме над  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ .

Гуанозин-5'-дезоксигуанозин-5'-монофосфотриоатимидазол (фиг. 2, № 9).

Гуанозин-5'-дезоксигуанозин-5'-монофосфотриоатимидазол (фиг. 2, № 9) (352 мг, 0,75 ммоль, 89%) получали, используя в качестве исходного вещества 5'-дезоксигуанозин-5'-монофосфотриоат (фиг. 2, № 7) (500 мг, 0,86 ммоль), в соответствии с общей методикой.  $t_R$  (B) = 8,27 мин.

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 11,69 (m, 1P).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 428,05476, экспериментальное



значение: 428,05452.

5'-Дезокси-5'-тиогуанозин-7-метилгуанозин-5'-монофосфороатимидазолид (фиг. 2, № 10).

5'-Дезокси-5'-тиогуанозин-7-метилгуанозин-5'-монофосфороатимидазолид (фиг. 2, № 10) (321 мг, 0,69 ммоль, 82%) получали, используя в качестве исходного вещества 5'-дезокси-5'-тио-7-метилгуанозин-5'-монофосфороат (фиг. 2, № 8) (500 мг, 0,84 ммоль), в соответствии с общей методикой.  $t_R$  (В)=8,39 мин.

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{14}H_{17}N_7O_6P_2S^-$  [М-Н] $^-$ : 442,07041, экспериментальное значение: 442,07070.

Гуанозин-5'-дезокси-5'-тиогуанозин-5'-дифосфороат (фиг. 2, № 11).

Гуанозин-5'-дезокси-5'-тиогуанозин-5'-монофосфороатимидазолид (фиг. 2, № 9) (100 мг, 0,22 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (2 мл) и добавляли трис(триэтиламмония) фосфат (100 мг, 0,26 ммоль), затем добавляли  $ZnCl_2$  (235,84 мг, 1,76 ммоль). Ход реакции контролировали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до исчезновения исходного вещества. Затем реакцию останавливали путем добавления водного раствора ЭДТА (513,92 мг, 1,76 ммоль, 50 мл) и нейтрализовали с помощью 1М  $NaHCO_3$ . Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sephadex и выделяли в форме соли TEA. Выход: 108,5 мг (0,14 ммоль, 65%).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{10}H_{14}N_5O_{10}P_2S^-$  [М-Н] $^-$ : 457,99421, экспериментальное значение: 457,99481.

5'-Дезокси-5'-тиогуанозин-7-метилгуанозиндифосфат (фиг. 2, № 12).

5'-Дезокси-5'-тиогуанозин-7-метилгуанозин-5'-монофосфороатимидазолид (фиг. 2, № 10) (100 мг, 0,21 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (2 мл) и добавляли трис(триэтиламмония) фосфат (100 мг, 0,26 ммоль), затем добавляли  $ZnCl_2$  (224,54 мг, 1,68 ммоль). Ход реакции контролировали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до исчезновения исходного вещества. Затем реакцию останавливали путем добавления водного раствора ЭДТА (490,56 мг, 1,68 ммоль, 50 мл) и нейтрализовали с помощью 1М  $NaHCO_3$ . Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sephadex и выделяли в форме соли TEA. Выход: 91 мг (0,12 ммоль, 54%),  $t_R$  (В) = 5,07 мин.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $P_2O$ )  $\delta$  ppm 8,11 (s, 1H, H-8 медленно обменивающийся), 5,97 (d, 1H, J = 3,91 Гц, H-1'), 4,50, 4,49 (2d, 1H, J = 5,09 Гц, H-2'), 4,41 (q, 1H, J = 5,48, 5,09 Гц, H-3'), 4,07 (s, 3H,  $CH_3$ ), 3,34-3,13 (m, 3H, H-4', H-5');  $^{31}P$  ЯМР (162 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 6,71 (d, 1P, J = 30,81 Гц), 8,21 (d, 1P, J = 30,81 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{11}H_{16}N_5O_{10}P_2S^-$  [М-Н] $^-$ : 472,00986, экспериментальное значение: 472,00967.

Гуанозин-5'-дезокси-5'-тио-7-метилгуанозин-2'-дифосфороат (фиг. 2, № 13).

5'-Дезокси-5'-тиогуанозин-7-метилгуанозин-5'-монофосфороатимидазолид (фиг. 2, № 10) (100 мг, 0,21 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (2 мл) и добавляли тиофосфат натрия (47 мг, 0,26 ммоль), затем добавляли  $ZnCl_2$  (224,54 мг, 1,68 ммоль). Ход реакции контролировали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до исчезновения исходного вещества. Затем реакцию останавливали путем добавления водного раствора ЭДТА (490,56 мг, 1,68 ммоль, 50 мл) и нейтрализовали с помощью 1М  $NaHCO_3$ . Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sephadex и выделенную соль TEA сразу же использовали в реакции сочетания. Выход: 110 мг (0,13 ммоль, 64%); МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{11}H_{16}N_5O_9P_2S_2^-$  [М-Н] $^-$ : 487,98702, экспериментальное значение: 487,98724.

Синтез 5'-S-аналогов кэпа путем S-алкилирования.

Общая методика.

Соль TEA концевое тиофосфата нуклеозида (1 эквив.) суспендировали в ДМСО (до концентрации примерно 0,1-0,2 М). Затем добавляли DBU (1,8-диазабицикло(5.4.0)ундец-7-ен) (1 эквив.) и производное 5'-иодгуанозина (1 эквив.). Ход реакции контролировали с помощью ОФ ВЭЖХ. После исчезновения сигнала концевое тиофосфата реакцию останавливали путем добавления 1% уксусной кислоты до pH=7, реакционную смесь разбавляли водой и промывали этилацетатом. Продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sephadex и выделяли в форме соли триэтиламмония. Продукт очищали с помощью полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ.

P1-(Гуанозин-5'-ил)-P2-(5'-дезокси-5'-тиогуанозин-5'-ил)-дифосфат - GppSG (фиг. 3, №19).

GppSG (207 мЕОП, 0,009 ммоль, 24%) получали, используя в качестве исходного вещества GDPpS (фиг. 3, № 14) (506 мЕОП, 0,042 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (А) = 6,9 мин.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 7,96 (s, 1 H), 7,81 (s, 1 H), 5,77 (d, 1 H, J = 5,48 Гц), 5,70 (d, 1 H, J = 5,87 Гц), 4,80-4,70 (m, 2H, перекрывается с сигналом воды), 4,64 (t, 1 H, J = 5,48 Гц), 4,43 (t, 1 H, J = 3,91 Гц), 4,37 (t, 1 H, J = 3,91 Гц), 4,30-4,15 (m, 4H), 3,30-3,13 (m, 2 H);  $^{31}P$  ЯМР (162 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 7,63 (d, 1P, J = 32,28, 12,5 Гц), -12,02 (d, 1P, J = 30,81 Гц); МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{20}H_{25}N_{10}O_{14}P_2S^-$  [М-Н] $^-$ : 723,07531, экспериментальное значение: 723,07546.

P1-(7-Метилгуанозин-5'-ил)-P2-(5'-дезокси-5'-тиогуанозин-5'-ил)-дифосфат  $m^7$ GppSG (фиг. 3, № 21).

$m^7GppSG$  (1028 мЕОП, 0,045 ммоль, 9%) получали, используя в качестве исходного вещества  $m^7GDPpS$  (фиг. 3, № 17, 5830 мЕОП, 0,51 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (А) = 5,9 мин.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 8,98 (s, 1 H, H-8  $m^7G$ ), 7,87 (s, 1 H, H-8 G), 5,88 (d, 1 H, J = 2,0 Гц, H-1'  $m^7G$ ), 5,73 (d, 1 H, J = 5,7 Гц, H-1' G), 4,69 (t, 1 H, J = 5,5 Гц, H-2' G), 4,51 (bs., 1 H, H-2'  $m^7G$ ), 4,32 - 4,44 (m, 5 H, H-3' G, H-3'  $m^7G$ , H-4' G, H-4'  $m^7G$ , H-5'  $m^7G$ ), 4,24 (dd, 1 H, J = 11,3, 5,4 Гц, H5"  $m^7G$ ), 4,04 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 3,24 - 3,41 (m, 2 H, H5', 5" G).

$^{31}P$  ЯМР (162 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 7,38 (dt, 1P, J = 29,0, 11,5 Гц), -12,00 (d, 1P, J = 32,23 Гц); МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{21}H_{27}N_{10}O_{14}P_2S^-$  [M-H] $^-$ : 737,09096, экспериментальное значение: 737,09052.

P1-(7-Метил-5'-дезоксип-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P2-гуанозин-5'-илдифосфат  $m^7GSppG$  (фиг. 3, № 23).

$m^7GSppG$  (1660 мЕОП, 0,073 ммоль, 35%) получали, используя в качестве исходного вещества  $GDPpS$  (фиг. 3, № 14; 2532 мЕОП, 0,21 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (А) = 7,75 мин.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 7,99 (s, 1 H, H-8 G), 5,83 (d, 1 H, J = 4,2 Гц, H-1'  $m^7G$ ), 5,80 (d, 1 H, J = 6,0 Гц, H-1' G), 4,65-4,70 (2 H, т, H-2' G, H-2'  $m^7G$ ), 4,45 (t, 1 H, J = 4,1 Гц, H-3' G), 4,19 - 4,41 (5 H, т, H-3'  $m^7G$ , H-4' G, H-4'  $m^7G$ , H5', 5" G), 4,05 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 3,35 - 3,43 (m, 2 H, H5', 5"  $m^7G$ ).

$^{31}P$  ЯМР (162 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 7,32 (dt, 1P, J = 29,0, 11,0 Гц), -11,84 (d, 1P, J = 29,00 Гц); МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{21}H_{27}N_{10}O_{14}P_2S^-$  [M-H] $^-$ : 737,09096, экспериментальное значение: 737,09146.

P1-(Гуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-5'-тиогуанозин-5'-ил)-трифосфат-GpppSG (фиг. 3, № 20).

GpppSG (1149 мЕОП, 0,051 ммоль, 51%) получали, используя в качестве исходного вещества  $GTP_\gamma S$  (фиг. 3, № 15; 1233 мЕОП, 0,10 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (А) = 5,50 мин.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 8,02 (s, 1 H, H-8 G), 7,90 (s, 1 H, H-8 G), 5,82 (d, 1 H, J = 6,0 Гц, H-1' G), 5,78 (d, 1 H, J = 6,2 Гц, H-1' G), 4,84 (t, 1 H, J = 5,7 Гц, H-2' G), 4,74 (t, 1 H, J = 5,7 Гц, H-2' G), 4,52 (t, 1 H, J = 4,2 Гц, H-3' G), 4,47 (t, 1 H, J = 4,3 Гц, H-3' G), 4,30 - 4,38 (m, 2 H, H-4', 5' G), 4,27 (m, 2 H, H-4', 5" G), 3,25 - 3,35 (m, 2 H, H5', 5" G).

$^{31}P$  ЯМР (162 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 8,21 (dt, 1P, J = 27,00, 13,3 Гц), -11,34 (d, 1P, J = 19,30 Гц), -23,78 (dd, 1P, J = 27,00, 19,30 Гц);

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{20}H_{26}N_{10}O_{17}P_3S^-$  [M-H] $^-$ : 803,04164, экспериментальное значение: 803,04135.

P1-(7-Метил-5'-дезоксип-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат  $m^7GSpppG$  (фиг. 3, № 24).

$m^7GSpppG$  (729 мЕОП, 0,032 ммоль, 13%) получали, используя в качестве исходного вещества  $GTP_\gamma S$  (фиг. 3, № 15; 3000 мЕОП, 0,25 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (А) = 5,36 мин.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 8,92 (s, 1 H, H-8  $m^7G$ ), 7,96 (s, 1 H, H-8 G), 5,78 (d, 1 H, J = 4,30 Гц, H-1'  $m^7G$ ), 5,74 (d, 1 H, J = 5,87 Гц, H-1' G), 4,63 (m, 2 H, H-2' G, H2'  $m^7G$ ), 4,48 (dd, 1 H, J = 4,43, 3,52 Гц, H-3'  $m^7G$ ), 4,36 - 4,26 (m, 4 H, H-3' G, H-4' G, H-4'  $m^7G$ , H-5' G), 4,24-4,19 (m, 1H, H-5" G), 4,00 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 3,33-3,24 (2 H, m, H-5', 5"  $m^7G$ ).

$^{31}P$  ЯМР (162 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 7,57 (d, 1P, J = 27,88 Гц), -11,68 (d, 1P, J = 20,54 Гц), -24,00 (dd, 1P, J = 29,35, 22,01 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{21}H_{28}N_{10}O_{17}P_3S^-$  [M-H] $^-$ : 817,05729, экспериментальное значение: 817,05494.

P1-(7-Метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-5'-тиогуанозин-5'-ил)-трифосфат  $m^7GpppSG$  (фиг. 3, № 22).

$m^7GpppSG$  (1582 мЕОП, 0,07 ммоль, 32%) получали, используя в качестве исходного вещества  $m^7GTP_\gamma S$  (фиг. 3, № 18; 2616 мЕОП, 0,23 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (А) = 6,06 мин.

$^1H$  ЯМР (400 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 9,02 (s, 1 H, H-8  $m^7G$ ), 7,87 (s, 1 H, H-8 G), 5,84 (d, 1 H, J = 3,52 Гц, H1'  $m^7G$ ), 5,70 (d, 1 H, J = 6,65 Гц, H-1' G), 4,80-4,67 (m, 1 H, H-2' G), 4,52 (t, 1 H, J = 4,30 Гц, H-2'  $m^7G$ ), 4,41 (dd, 2 H, J = 4,70, 4,30 Гц, H3' G, H3'  $m^7G$ ), 4,38 - 4,30 (m, 2 H, H-4' G, H-4'  $m^7G$ ), 4,36-4,31 т, 2H, H5'  $m^7G$ ), 4,02 (s, 3 H,  $CH_3$ ), 3,30-3,20 (m, 2 H, J = 12,6, 6,3 Гц, H5', 5" G).

$^{31}P$  ЯМР (162 МГц,  $D_2O$ )  $\delta$  ppm 7,66 (d, 1P, J = 29,35 Гц), -11,73 (d, 1P, J = 22,01 Гц), -23,95 (dd, 1P, J = 22,01, 27,88 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $C_{21}H_{28}N_{10}O_{17}P_3S^-$  [M-H] $^-$ : 817,05729, экспериментальное значение: 817,05748.

P1-(2'-О-Метил-7-метил-5'-дезоксип-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат  $m_2^{7,2'-O}GSpppG$  (фиг. 3, № 26).

$m_2^{7,2'-O}GSpppG$  (140 мЕОП, 0,006 ммоль, 5%) получали, используя в качестве исходного вещества  $GTP_\gamma S$  (фиг. 3, № 15; 1500 мЕОП, 0,12 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (А) =

7,89 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7.93 (s, 1H, G), 5.81 (d, 1H,  $J = 3.91$  Гц, H-1'  $m^7\text{G}$ ), 5.72 (d, 1H,  $J = 6.26$  Гц, H-1' G), 4.65 (t, 1H,  $J = 5.48$  Гц, H-2'  $m^7\text{G}$ ), 4.43-4.40 (m, 1H, H-2', G, H-3'  $m^7\text{G}$ ), 4.32-4.18 (m, 6H, H-3' G, H-4', H-5', G,  $m^7\text{G}$ ), 4.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.52 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7.35 (d, 1P,  $J = 26.41$  Гц), -11.68 (d, 1P,  $J = 19.07$  Гц), -24.02, -24.18 (2d, 1P,  $J = 26.41$ , 19.07 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}^-$  [M-H] $^-$ : 831,07294, экспериментальное значение: 831,07477.

P1-(7-Метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2,3-метилентрифосфат -  
 $m^7\text{GSppCH}_2\text{pG}$  (фиг. 3, № 25).

$m^7\text{GSppCH}_2\text{pG}$  (353 мЕОП, 0,016 ммоль, 27%) получали, используя в качестве исходного вещества  $m^7\text{GpCH}_2\text{PPyS}$  (фиг. 3, № 16; 717 мЕОП, 0,06 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 6,36 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.03 (s, 1H, H-8,  $m^7\text{G}$ ), 8.17 (s, 1H, G), 5.83 (d, 1H,  $J = 4.30$  Гц, H-1'  $m^7\text{G}$ ), 5.78 (d, 1H,  $J = 4.48$  Гц, H-1' G), 4.70-4.66 (m, 2H, H-2'  $m^7\text{G}$ , H-2' G), 4.46 (d, 1H,  $J = 3.91$ , 5.09 Гц, H-3' G), 4.38-4.33 (m, 2H, H-3'  $m^7\text{G}$ , H-4' G), 4.32-4.28 (m, 1H, H-4'  $m^7\text{G}$ ), 4.26-4.20 (m, 1H, H-5' G), 4.19-4.13 (m, 1H, H-5" G), 4.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.34-3.22 (m, 4H, H-5' G,  $m^7\text{G}$ );  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm;

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 17.03 (d, 1P,  $J = 10.27$  Гц), 7.47-6.97 (m, 2P); МСВР, ИЭР (-): расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}^-$  [M-H] $^-$ : 815,07803, экспериментальное значение: 815,07923.

Синтез 5'-S-аналогов кэпа с использованием имидазолидов.

#### Общая методика

5'-S-GMP-Im (фиг. 2, № 9) (натриевая соль, 50 мг, 0,11 ммоль) и подходящий дифосфат (1 ммоль) -  $m_2^{7,2'-0}\text{GDP}$  (фиг. 4, № 28),  $m^7\text{GpCH}_2\text{p}$  (фиг. 4, № 27),  $m^7\text{-5'S GDP}$  (фиг. 2, № 12),  $m^7\text{GSppBS}$  (фиг. 2, № 13) или  $m^7\text{GDPBS}$  (фиг. 3, № 17) - суспендировали в безводном ДМФА (1,0 мл), затем добавляли безводный  $\text{ZnCl}_2$  (95 мг, 10 экв., 0,7 ммоль). Реакционную смесь энергично перемешивали до растворения реагентов. Ход реакции контролировали с помощью ОФ-ВЭЖХ. После окончания реакции (24 ч) добавляли подходящее количество раствора ЭДТА ( $\text{Na}_2$  ЭДТА, 237 мг, 0,7 ммоль), подводили pH до 6 с помощью сухого  $\text{NaHCO}_3$ , затем неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Sephadex и выделяли в виде солей ТЕА (или непосредственно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ). Затем полученные продукты дополнительно очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ.

P1-(2'-О-Метил-7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат -  
 $m_2^{7,2'-0}\text{GpppSG}$  (фиг. 4, № 38).

$m_2^{7,2'-0}\text{GpppSG}$  (122 мЕОП, 0,005 ммоль, 6%) получали, используя в качестве исходного вещества  $m_2^{7,2'-0}\text{GDP}$  (фиг. 4, № 28; 912 мЕОП, 0,08 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 6,29 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.00 (s, 1H, H-8  $m^7\text{G}$ ), 7.88 (s, 1H, G), 5.87 (d, 1H,  $J = 2.74$  Гц, H-1'  $m^7\text{G}$ ), 5.69 (d, 1H,  $J = 6.65$  Гц, H-1' G), 4.64 (t, 1H,  $J = 5.48$  Гц, H-2'  $m^7\text{G}$ ), 4.48 (dd, 1H,  $J = 4.48$  Гц, H-2' G), 4.43-4.38 (m, 2H, H-3' G, H-3'  $m^7\text{G}$ ), 4.36-4.32 (m, 1H, H-4' G), 4.30-4.26 (m, 1H, H-4'  $m^7\text{G}$ ), 4.25-4.16 (m, 2H, H-5' G), 4.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.53 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.30-3.22 (m, 2H, H-5'  $m^7\text{G}$ );

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7.68 (d, 1P,  $J = 27.88$  Гц), -11.68 (d, 1P,  $J = 20.54$  Гц), -23.78, -23.94 (2d, 1P,  $J = 27.88$ , 19.07 Гц);

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}^-$  [M-H] $^-$ : 831,07294, экспериментальное значение: 831,07350.

P1-(7-Метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-1,2-метилентрифосфат -  
 $m^7\text{GpCH}_2\text{ppSG}$  (фиг. 4, № 37).

$m^7\text{GpCH}_2\text{ppSG}$  (1002 мЕОП, 0,044 ммоль, 25%) получали, используя в качестве исходных веществ  $m^7\text{GpCH}_2\text{p}$  (фиг. 4, № 27; 2052 мЕОП, 0,18 ммоль) и 5'-S-GMP-Im (122 мг, 0,27 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 6,26 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.31 (s, 1H, H-8,  $m^7\text{G}$ ), 8.02 (s, 1H, G), 5.90 (d, 1H,  $J = 3.13$  Гц, H-1'  $m^7\text{G}$ ), 5.75 (d, 1H,  $J = 5.87$  Гц, H-1' G), 4.80-4.70 (m, 2H, перекрывается с сигналом растворителя, H-2'  $m^7\text{G}$ , H-2' G), 4.58 (dd, 1H,  $J = 3.91$ , 3.48 Гц, H-3' G), 4.48 (t, 1H, H-3'  $m^7\text{G}$ ), 4.40 (dd, 1H,  $J = 3.91$ , 4.06, H-4' G), 4.37-4.29 (m, 3H, H-4'  $m^7\text{G}$ , H-5' G), 4.19-4.13 (m, 2H, H-5' G), 4.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.30-3.19 (m, 2H, H-5' G,  $m^7\text{G}$ ), 2.40 (t, 2H,  $J = 20.35$  Гц,  $\text{CH}_2$ ).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 17.11 (d, 1P,  $J = 8.80$  Гц), 7.64-6.76 (m, 2P).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}^-$  [M-H] $^-$ : 815,07803, экспериментальное значение: 815,07906.

P1-(7-Метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат -  
 $m^7\text{GSpppSG}$  (фиг. 4, № 32).

$m^7\text{GSpppSG}$  (768 мЕОП, 32 мг, 0,028 ммоль, 40%) получали, используя в качестве исходных веществ  $m^7\text{-5'S-GPP}$  (57 мг, 0,07 ммоль) и 5'-S-GMP-Im (50 мг, 0,11 ммоль), в соответствии с общей методикой. ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 6,80 мин;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8,38 (s, 1H, H-8  $\text{m}^7\text{G}$  медленно обменивающийся), 7,84 (s, 1H, G), 5,78 (d, 1H, J = 4,70 Гц, H-1'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 5,69 (d, 1H, J = 6,65 Гц, H-1' G), 4,64 (t, 1H, J = 4,70 Гц, H-2'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 4,40, 4,39 (2d, 1H, J = 2,74, 3,52, 4,40 Гц, H-3', G), 4,36-4,29 (m, 3H, H-4' G, H-5', G), 3,99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,37-4,28 (m, 3H, H-4', H-5',  $\text{m}^7\text{G}$ ).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 7,74 (t, 2P, J = 27,88), -24,61 (t, 1P, J = 29,35 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2^-$  [M-H] $^-$ : 833,03445, экспериментальное значение: 833,03550.

P1-(7-Метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-тиотрифосфат -  $\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{pG}$  D1/D2 (фиг. 4, № 30, 31 соответственно).

$\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{pG}$  (1080 мЕОП, 45 мг, 0,039 ммоль, 56%) получали в виде смеси диастереоизомеров D1/D2, используя в качестве исходных веществ  $\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{BS}$  (56 мг, 0,07 ммоль) и 5'S-GMP-Im (50 мг, 0,11 ммоль), в соответствии с общей методикой.

Диастереоизомеры разделяли с использованием ОФ-ВЭЖХ и выделяли в виде солей аммония. D1 (фиг. 4, № 30): (438 мЕОП, 18 мг, 0,016 ммоль, 23%) ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 6,56 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8,98 (s, 1H, H-8,  $\text{m}^7\text{G}$ ), 8,08 (s, 1H, G), 5,82 (d, 1H, J = 4,27 Гц, H-1'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 5,77 (d, 1H, J = 5,80 Гц, H-1' G), 4,67-4,65 (m, 2H, H-2'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-2' G), 4,49-4,47 (m, 1H, H-3' G), 4,39-4,35 (m, 1H, H-3'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-4' G), 4,33-4,23 (m, 3H, H-4'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-5' G), 4,02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,38-3,25 (m, 2H, H-5'  $\text{m}^7\text{G}$ ).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 29,18 (dd, 1P, J = 34,83, 27,37 Гц), 6,96 (dt, 1P, J = 34,83, 12,44 Гц), -12,37 (d, 1P, J = 27,37 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2^-$  [M-H] $^-$ : 833,03445, экспериментальное значение: 833,03549.

D2 (фиг. 4, № 31):  $\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{pG}$  D2 (380 мЕОП, 16 мг, 0,014 ммоль, 20%) ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 6,71 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8,98 (s, 1H, H-8,  $\text{m}^7\text{G}$ ), 8,14 (s, 1H, G), 5,82 (d, 1H, J = 4,27 Гц, H-1'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 5,77 (d, 1H, J = 5,49 Гц, H-1' G), 4,69-4,65 (m, 2H, H-2'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-2' G), 4,49-4,45 (m, 1H, H-3' G), 4,40-4,35 (m, 1H, H-3'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-4' G), 4,34-4,21 (m, 3H, H-4'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-5' G), 4,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,39-3,24 (m, 2H, H-5'  $\text{m}^7\text{G}$ );  $^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 29,44-28,67 (m, 1P), 7,17-6,54 (m, 1P), -12,09-(-12,72) (m, 1P);

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2^-$  [M-H] $^-$ : 833,03445, экспериментальное значение: 833,03606.

P1-(7-Метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат -  $\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{pSG}$  D1/D2 (фиг. 4, № 33, 34 соответственно).

$\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{pSG}$  (942 мЕОП, 39 мг, 0,003 ммоль, 48%) получали в виде смеси диастереоизомеров D1/D2, используя в качестве исходных веществ  $\text{m}^7\text{GSpp}_3\text{BS}$  (56 мг, 0,07 ммоль) и 5'S-GMP-Im (50 мг, 0,11 ммоль), в соответствии с общей методикой.

Диастереоизомеры разделяли с использованием ОФ-ВЭЖХ и выделяли в виде солей аммония. D1 (фиг. 4, № 33) (510 мЕОП, 21 мг, 0,018 ммоль, 26%) ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 7,53 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9,00 (s, 1H, H-8,  $\text{m}^7\text{G}$ ), 7,99 (s, 1H, G), 5,83 (d, 1H, J = 4,27 Гц, H-1'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 5,75 (d, 1H, J = 6,10 Гц, H-1' G), 4,79-4,68 (m, 2H, перекрывается с сигналом растворителя, H-2'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-2' G), 4,44 (dd, 1H, J = 4,58 Гц, H-3' G), 4,41-4,33 (m, 3H, H-3'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-4' G,  $\text{m}^7\text{G}$ ), 4,03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,39-3,26 (m, 4H, H-5' G,  $\text{m}^7\text{G}$ ).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 28,25 (t, 1P, J = 34,83 Гц), 7,31-6,74 (m, 2P).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}_3^-$  [M-H] $^-$ : 849,01161, экспериментальное значение: 849,01213.

D2 (фиг. 4, № 34) (274 мЕОП, 11 мг, 0,0098 ммоль, 14%), ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 7,62 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 8,99 (s, 1H, H-8,  $\text{m}^7\text{G}$ ), 8,04 (s, 1H, G), 5,83 (d, 1H, J = 4,58 Гц, H-1'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 5,75 (d, 1H, J = 6,10 Гц, H-1' G), 4,78-4,66 (m, 2H, перекрывается с сигналом растворителя, H-2'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-2' G), 4,46-4,42 (m, 1H, H-3' G), 4,41-4,34 (m, 3H, H-3'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-4' G,  $\text{m}^7\text{G}$ ), 4,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,39-3,24 (m, 4H, H-5' G,  $\text{m}^7\text{G}$ ).

$^{31}\text{P}$  ЯМР (162 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 28,29 (t, 1P, J = 34,83 Гц), 7,32-6,68 (m, 2P);

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение  $m/z$  для  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}_3^-$  [M-H] $^-$ : 849,01161, экспериментальное значение: 849,01217.

P1-(7-Метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат -  $\text{m}^7\text{Gpp}_3\text{pSG}$  D1/D2 (фиг. 4, № 35, 36 соответственно).

$\text{m}^7\text{Gpp}_3\text{pSG}$  (1941 мЕОП, 0,086 ммоль, 28%) получали в виде смеси диастереоизомеров D1/D2, используя в качестве исходных веществ  $\text{m}^7\text{GPP}_3\text{BS}$  (3492 мЕОП, 0,31 ммоль) и 5'S-GMP-Im (5550 мЕОП, 0,46 ммоль), в соответствии с общей методикой. Диастереоизомеры разделяли с использованием ОФ-ВЭЖХ и выделяли в виде солей аммония. D1 (фиг. 4, № 35): (888 мЕОП, 0,039 ммоль, 13%) ОФ-ВЭЖХ:  $t_R$  (A) = 7,12 мин.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9,07 (s, 1H, H-8,  $\text{m}^7\text{G}$ ), 7,95 (s, 1H, G), 5,88 (d, 1H, J = 3,52 Гц, H-1'  $\text{m}^7\text{G}$ ), 5,74 (d, 1H, J = 6,26 Гц, H-1' G), 4,80-4,70 (m, 2H, H-2'  $\text{m}^7\text{G}$ , H-2' G перекрывается с сигналом  $\text{P}_2\text{O}$ ),

4,56 (dd, 1H, J = 4,70, 3,52 Гц, H-3', G), 4,47-4,40 (m, 2H, H-3', m<sup>7</sup>G, H-4', G), 4,39-4,33 (m, 3H, H-4', m<sup>7</sup>G, H-5', G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,35-3,20 (m, 2H, H-5', m<sup>7</sup>G).

<sup>31</sup>P ЯМР (162 МГц, D<sub>2</sub>O) δ ppm 29,00 (dd, 1P, J = 33,75, 26,41 Гц), 6,98 (d, 1P, J = 33,75, Гц), -12,56 (d, 1P, J = 24,94 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение m/z для C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 833,03445, экспериментальное значение: 833,03514.

D2 (фиг. 4, № 36): m<sup>7</sup>GppspG D2 (1053 мЕОП, 0,046 ммоль, 15%) ОФ-ВЭЖХ: t<sub>R</sub> (A) = 7,42 мин.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, D<sub>2</sub>O) δ ppm 9,04 (s, 1H, H-8, m<sup>7</sup>G), 7,95 (s, 1H, G), 5,85 (d, 1H, J = 3,52 Гц, H-1' m<sup>7</sup>G), 5,73 (d, 1H, J = 6,26 Гц, H-Г G), 4,80-4,70 (m, 2H, H-2' m<sup>7</sup>G, H-2', G перекрывается с сигналом D<sub>2</sub>O), 4,54 (dd, 1H, J = 4,30, 3,91 Гц, H-3', G), 4,45 (t, 1H, J = 5,09 Гц, H-3', m<sup>7</sup>G), 4,43-4,40 (m, 1H, H-4', G), 4,39-4,32 (m, 3H, H-4', m<sup>7</sup>G, H-5', G), 4,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,37-3,21 (m, 2H, H-5', m<sup>7</sup>G).

<sup>31</sup>P ЯМР (162 МГц, D<sub>2</sub>O) δ ppm 28,99 (dd, 1P, J = 33,75, 26,41, 24,94 Гц), 6,94 (d, 1P, J = 35,21, Гц), -12,48 (d, 1P, J = 24,94 Гц).

МСВР, ИЭР (-) расчетное значение m/z для C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>P<sub>3</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 833,03445, экспериментальное значение: 833,03494.

Таблица 4. Представлены синтезированные и исследованные новые аналоги кэпа

Номер	Соединение	Структурная формула	Химическое наименование
12	m <sup>7</sup> GSpp		5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-7-метилгуанозиндифосфат
21	m <sup>7</sup> GppSG		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P2-(5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-дифосфат
22	m <sup>7</sup> GpppSG		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-трифосфат
23	m <sup>7</sup> GSpG		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-P2-гуанозин-5'-илдифосфат
24	m <sup>7</sup> GSpppG		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат
25	m <sup>7</sup> GSppCH <sub>2</sub> pG		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2,3-метилентрифосфат
26	m <sup>7,2'</sup> GSpppG		P1-(2'-O-метил-7-метил-5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат
30	m <sup>7</sup> GSpp <sub>2</sub> pG D1		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-трифосфат D1
31	m <sup>7</sup> GSpp <sub>2</sub> pG D2		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-метилтиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-трифосфат D2

32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-метил-5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-трифосфат
33	$m^7GSpppSG D1$		P1-(7-метил-5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-2-трифосфат D1
34	$m^7GSpppSG D2$		P1-(7-метил-5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-2-трифосфат D2
35	$m^7GpppSG D1$		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-2-трифосфат D1
36	$m^7GpppSG D2$		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-2-трифосфат D2
37	$m^7GpCH_2ppSG$		P1-(7-метил-5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-1,2-метилентрифосфат
38	$m^{7,2O}GpppSG$		P1-(2'-O-метил-7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксип-3-тиогуанозин-5'-ил)-трифосфат

Пример 2. Характеристики новых аналогов кэпа.

Тест 1. Исследование подверженности аналогов деградации под действием фермента DcpS.

Задача теста заключалась в том, чтобы проверить, подвергаются ли новые 5'-тиофосфатные аналоги кэпа гидролизу под действием фермента DcpS человека (hDcpS). Экспрессию рекомбинантного белка человека, кодирующего фермент DcpS, осуществляли, как описано ранее (Kowalska, Lewdorowicz et al. 2008). Подверженность новых аналогов гидролизу под действием hDcpS оценивали в 50 mM Tris-HCl буфере, содержащем 200 mM KCl и 0,5 mM ЭДТА. Реакционная смесь содержит исследуемый аналог кэпа (20 мкМ) и фермент hDcpS (100 нМ) в 400 мкл буфера. Через установленные промежутки времени из реакционной смеси отбирают образец объемом 100 мкл. Образец инкубируют при 98°C в течение 2,5 мин, а затем охлаждают до 0°C и анализируют с помощью ОФ-ВЭЖХ в условиях, описанных в общей методике. В тестах также исследовали коммерчески доступный ингибитор DcpS - соединение RG3039 (№ 000) (<https://www.fda.gov/oc/oc/quest/fda-approves-phase-1-clinical-trial-rg3039-sma>), GppSG (№ 19), GpppSG (№ 20), а также  $m^7GpppG$  (№ 0) и  $m^7Gpp$  (№ 00) в качестве контролей. Иллюстративные полученные результаты представлены на фиг. 5 и в табл. 5.

Тест 2. Определение  $IC_{50}$  для выбранных ингибиторов.

Задача теста заключалась в определении концентрации, при которой данный ингибитор подавляет активность DcpS до 50% от максимального значения в конкретных условиях. В этом тесте использовали тот же буфер, что и в тесте 1. Одновременно готовили десять реакционных смесей, каждая из которых содержала  $m^7GMPF$  (60 мкМ), фермент hDcpS (50 нМ) и исследуемое соединение в диапазоне концентраций 0-50 мкМ в 200 мкл буфера. По истечении установленного времени, когда при отсутствии ингибитора 30% субстрата было превращено в продукт, реакцию останавливали путем смешивания со 100 мкл ацетонитрила (ACN). Для анализа отбирали образцы объемом 25 мкл, затем смешивали с 90 мкл раствора TBDS-флюоресцеина с концентрацией 2,5 мкМ в ДМСО и инкубировали в течение 60 мин. Затем к образцам добавляли 100 мкл 200 mM HEPES буфера, pH = 7,0, и измеряли флюоресценцию, как описано в общей методике. На основании полученных результатов строили график зависимости флюоресценции от концентрации ингибитора и определяли значения  $IC_{50}$  путем аппроксимации теоретической кривой к данным. Полученные результаты представлены в таблице 5 и на фиг. 5.

Таблица 5. Значения IC<sub>50</sub> и подверженность деградации под действием фермента DcpS для выбранных соединений

№	Соединение	Подверженность действию DcpS	IC <sub>50</sub> [мкМ]
0	m <sup>7</sup> GpppG	подвергается гидролизу	н/о
00	m <sup>7</sup> Gpp	<b>устойчиво/ингибитор</b>	4,30 ± 0,78
000	RG3039	<b>устойчиво/ингибитор</b>	0,041 ± 0,012
12	m <sup>7</sup> GSpp	<b>устойчиво/ингибитор</b>	1,93 ± 0,38
19	GppSG	подвергается гидролизу	более 100
20	GpppSG	подвергается гидролизу	более 100
21	m <sup>7</sup> GppSG	подвергается гидролизу	н/о
22	m <sup>7</sup> GpppSG	подвергается гидролизу	н/о
23	m <sup>7</sup> GSppG	<b>устойчиво/ингибитор</b>	2,81 ± 0,51
24	m <sup>7</sup> GSpppG	<b>устойчиво/ингибитор</b>	0,84 ± 0,07
25	m <sup>7</sup> GSppCH <sub>2</sub> pG	<b>устойчиво/ингибитор</b>	6,25 ± 1,22
26	m <sup>7,20</sup> GSpppG	<b>устойчиво/ингибитор</b>	12,57 ± 5,22
30	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D1	<b>устойчиво/ингибитор</b>	0,23 ± 0,04
31	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pG D2	<b>устойчиво/ингибитор</b>	0,17 ± 0,02
32	m <sup>7</sup> GSpppSG	<b>устойчиво/ингибитор</b>	0,33 ± 0,09
33	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D1	<b>устойчиво/ингибитор</b>	0,26 ± 0,04
34	m <sup>7</sup> GSpp <sub>s</sub> pSG D2	<b>устойчиво/ингибитор</b>	<b>0,051 ± 0,008</b>
35	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D1	подвергается гидролизу	н/о
36	m <sup>7</sup> Gpp <sub>s</sub> pSG D2	подвергается гидролизу	н/о
37	m <sup>7</sup> GpCH <sub>2</sub> ppSG	<b>устойчиво/ингибитор</b>	5,67 ± 1,01
38	m <sup>7,20</sup> GpppSG	подвергается гидролизу	72 ± 17

Тест 3. Определение структуры фермента DcpS человека (ΔN37hDcpS) в комплексе с аналогом № 34 (m<sup>7</sup>GSpp<sub>s</sub>pSG D2).

Задача этого теста заключалась в исследовании механизма взаимодействия аналога № 34 с ферментом DcpS человека. Рекомбинантный фермент DcpS человека, усеченный с N-конца (ΔN37 - остатки с Ala38 по Ser337), получали, как описано ранее (Singh et al. 2008). Кристаллизацию методом диффузии паров в сидячей капле проводили с использованием 0,2 мкл образца, содержащего 0,1 М аналога 34 и 7,3 мг/мл фермента DcpS (инкубировали на льду в течение 15 мин, затем начинали кристаллизацию) и 0,2 мл резервуарного раствора. Кристаллы комплекса появлялись в смеси, содержащей 29% ПЭГ 4000 и 0,1М Tris-HCl, pH 7,6, примерно через неделю. К капле, содержащей кристалл, добавляли смесь резервуарного раствора и глицерина (1:1 об./об.), а затем кристаллы собирали и быстро замораживали в жидком азоте. Данные о дифракции получали при 100K на источнике синхротронного излучения (Beamline 14.1, Bessy II, Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany) с использованием детектора Dectris PILATUS 6M, а затем данные обрабатывали с помощью программного обеспечения XDS (Kabsch 2010). Решение структуры осуществляли методом молекулярного замещения с помощью программного обеспечения Phaser (McCoy, Grosse-Kunstleve et al. 2007) с использованием структуры DcpS, связанного с ингибитором DG157493 (pdb: 3BL9) (Singh, Salcius et al. 2008), в качестве поисковой модели. Модель лиганда и словарь (dictionary) получали с помощью инструмента ProDRG (Schuttelkopf and van Aalten 2004). Построение модели и подбор лигандов выполняли с помощью программного обеспечения Coot (Emsley & Cowtan 2004). Уточнение структуры осуществляли с помощью программного обеспечения phenix.refine (Adams, Afonine et al. 2010).

Тест 4. Исследование подверженности коротких молекул РНК, содержащих аналоги кэпа на 5'-конце, деградации под действием фермента Dcp1/2.

Задача этого исследования заключалась в том, чтобы проверить, может ли встраивание выбранных 5'-фосфоротиоатных аналогов кэпа в 5'-конец РНК оказывать влияние на подверженность полученных таким образом транскриптов декэпирующему действию фермента Dcp1/2. Рекомбинантный белок Schizosaccharomyces pombe в форме гетеродимерного Dcp1/2 получали, как описано ранее (Floor, Jones et al. 2010). Используемые в данном анализе транскрипты получали путем транскрипции in vitro с использованием РНК-полимеразы SP6 (New England BioLabs). В качестве матрицы в транскрипции in vitro использовали отожденные олигонуклеотиды ATACGATTTAGGTGACACTATAGAAGAAGCGGGCATGC GGCCAGCCATAGCCGATCA (SEQ ID NO: 1) и TGATCGGCTATGGCTGGCCGCATGCCCGCTTCTTC TATAGTGTACCTAAATCGTAT (SEQ ID NO: 2), олигонуклеотиды, содержащие промоторную последовательность для полимеразы SP6 (ATTTAGGTGACACTATAGA (SEQ ID NO: 3)), позволяют получать РНК длиной 35 нуклеотидов, имеющие последовательность GAAGAAGCGGGCAUGCGG CCAGCCAUAGCCGAUCA (SEQ ID NO: 4), однако РНК с кэпом на 5'-конце имеют длину 36 нуклеотидов. Типичную реакцию транскрипции in vitro проводили в объеме 20 мкл с инкубированием при 40°C в течение 2 часов, реакционная смесь содержала следующие компоненты: 1 ед. полимеразы SP6, 1 ед. ингибитора РНКазы RiboLock (ThermoFisher Scientific), 0,5 мМ ATP/CTP/UTP, 0,125 мМ GTP, 1,25 мМ динуклеотидного аналога кэпа и 0,1 мкМ матрицы. После 2 часов инкубирования к реакционной смеси добавляли 1 ед. ДНКазы I (Ambion) и продолжали инкубирование в течение 30 мин при 37°C, после чего добавляли ЭДТА до конечной концентрации 25 мМ. Полученные РНК очищали с помощью набора RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research). Затем определяли качество синтезированной РНК в 15% поли-

акриламидном геле в денатурирующих условиях. Концентрацию РНК, в свою очередь, оценивали спектрофотометрически. Полученная таким образом РНК характеризуется значительной гетерогенностью 3'-конца, поэтому для устранения указанной проблемы полученные РНК инкубировали с дезоксирибозимом (DNAzyme) 10-23 (TGATCGGCTAGGCTAGCTACAACGAGGCTGGCCGC (SEQ ID NO: 5)), что приводило к получению РНК длиной 25 нуклеотидов. РНК, имеющая кэп на 5'-конце, имела длину 26 нуклеотидов. Реакцию расщепления 3'-концов проводили следующим образом: 1 мкМ РНК инкубировали с 1 мкМ дезоксирибозима 10-23 в смеси, содержащей 50 мМ MgCl<sub>2</sub> и 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, в течение 1 ч при 37°C (Coleman et al., 2004).

Для ферментативного анализа использовали 20 нг каждой РНК, которые инкубировали с 3,5 нМ фермента Dcp1/2 в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0,01% NP-40, 1 мМ ДТТ и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Реакцию проводили при 37°C в конечном объеме 25 мкл. Реакцию останавливали через 0, 5, 15 и 30 мин путем добавления равного количества смеси 5 М мочевины, 44% формамида, 20 мМ ЭДТА, 0,03% бромфенолового синего, 0,03% ксиленианола. Продукты реакции разделяли в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, после завершения электрофоретического разделения гель окрашивали с помощью SYBR Gold (Invitrogen) и проявляли с использованием прибора Storm 860 PhosphorImager (GE Healthcare). Количественную оценку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения ImageQuant (Molecular Dynamics). Иллюстративные результаты этого анализа представлены на фиг. 8, фиг. 9, а также в табл. 6.

Таблица 6. Биологические свойства мРНК, содержащих на 5'-конце выбранные аналоги кэпа

	эффективность экспирования <sup>a</sup>	подверженность действию Dcp1/2 <sup>b</sup>	относительная эффективность трансляции <sup>c</sup>
GpppG	0,91	0	0,05 ± 0,01
m <sup>7</sup> GpppG	0,93	0,69	1,00
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GpppG	0,84	0,52	1,56 ± 0,14
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GpppG D2	0,82	0,43	3,45 ± 0,42
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GSpppG	0,70	0,07	1,73 ± 0,24
m <sub>2</sub> <sup>7,2'-O</sup> GpppSG	0,76	0,52	2,23 ± 0,31

<sup>a</sup> Для расчета эффективности экспирования использовали данные, представленные на фиг. 8 (момент времени 0').

<sup>b</sup> Для расчета подверженности действию Dcp1/2, представленной в виде отношения экспированных РНК к сумме неэкспированных и экспированных РНК в один момент времени 15 мин и после нормализации относительно момента времени 0' для отдельных РНК, использовали данные, представленные на фиг. 8.

<sup>c</sup> Относительная эффективность трансляции показывает среднюю эффективность трансляции мРНК люциферазы Renilla из трех повторностей биологических экспериментов после нормализации относительно значений, полученных для мРНК, экспированной m<sup>7</sup>GpppG с 5'-конца.

Тест 5. Исследование влияния присутствия новых аналогов кэпа на эффективность трансляции мРНК в лизате ретикулоцитов кролика.

Задача этого исследования заключалась в том, чтобы оценить влияние введения новых аналогов кэпа в 5'-конец мРНК на эффективность трансляции. Для этого получали серии мРНК, кодирующих люциферазу Renilla и отличающихся кэп-структурой на 5'-конце.

Транскрипты, используемые для этого теста, получали с помощью реакции транскрипции *in vitro* с использованием РНК-полимеразы SP6. В качестве матрицы для транскрипции *in vitro* использовали продукт ПЦР, полученный с использованием праймеров ATTTAGGTGACACTATAGAACAGATCTCG AGCTCAAGCTT (SEQ ID NO: 6) и GTTTAAACATTTAAATGCAATGA (SEQ ID NO: 7) и плазмиду hRLuc-pRNA2(A)128 (Williams et al. 2010). Проводимая таким образом реакция ПЦР позволяла вводить промоторную последовательность для полимеразы SP6 перед последовательностью, кодирующей люциферазу Renilla. Сама реакция транскрипции была аналогична описанному выше синтезу коротких РНК (тест 4). Реакцию проводили в течение 2 часов в 20 мкл при 40°C, реакционная смесь содержала следующие компоненты: 1 ед. полимеразы SP6, 1 ед. ингибитора РНКазы RiboLock (ThermoFisher Scientific), 0,5 мМ АТФ/СТР/УТР, 0,125 мМ ГТР, 1,25 мМ динуклеотидного аналога кэпа и 100 мкг матрицы. После 2 часов инкубирования добавляли 1 ед. ДНКазы I (Ambion) и продолжали инкубирование в течение 30 мин при 37°C, после чего добавляли ЭДТА до конечной концентрации 25 мМ. Полученные мРНК очищали с помощью набора NucleoSpin RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel). Качество синтезированной РНК оценивали в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически.

Реакцию трансляции *in vitro* проводили в лизате ретикулоцитов кролика (RRL, Promega) в условиях, определенных для кэп-зависимой трансляции (Rydzik et al., 2009). Типичная реакционная смесь (10 мкл) содержала: 40% лизат RRL, 0,01 мМ смеси аминокислот (Promega), 1,2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 170 мМ ацетата калия



и мРНК, кодирующую люциферазу Renilla, с подходящим аналогом кэпа на 5'-конце, указанную смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. В эксперименте использовали четыре разных концентрации мРНК 0,1 нг/мкл, 0,25 нг/мкл, 0,5 нг/мкл, 0,75 нг/мкл. Активность синтезированной люциферазы определяли с помощью набора Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) на устройстве для считывания микропланшетов Synergy H1 (BioTek). Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения Origin (Gambit) и проводили аппроксимацию теоретической кривой к экспериментальным данным, где наклон полученной кривой соответствует эффективности трансляции. Иллюстративные результаты представлены на фиг. 10, тогда как средняя эффективность трансляции, полученная для трех повторностей биологических экспериментов, представлена в табл. 6.

Тест 6. Исследование влияния присутствия новых аналогов кэпа на эффективность трансляции мРНК в клетках HeLa.

Клетки HeLa карциномы шейки матки человека выращивали в DMEM (Gibco) с добавлением 10% ЭБС (Sigma-Aldrich), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco) и L-глутамина с конечной концентрацией 2 mM при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C. За день до планируемого эксперимента в каждую лунку 96-луночного планшета высевали 10<sup>4</sup> клеток, суспендированных в 100 мкл среды без антибиотиков. Трансфекцию клеток осуществляли следующим образом: в каждую лунку добавляли 0,3 мкл реагента для трансфекции Lipofectamine MessengerMAX (Invitrogen), 0,1 мкг мРНК и 10 мкл Opti-MEM (Gibco). Трансфекцию проводили в инкубаторе в течение 1 ч. После трансфекции клетки три раза промывали ФСБ и добавляли свежую среду без антибиотиков. Через 2, 3, 4,5, 6,5, 10,5 и 24 ч после начала трансфекции клетки три раза промывали ФСБ, лизировали и определяли активность люциферазы с помощью набора Luciferase Reporter Assay System (Promega) с использованием устройства для считывания микропланшетов Synergy H1. Иллюстративные результаты представлены на фиг. 11.

Для трансфекции использовали мРНК, кодирующую люциферазу светлячка и имеющую на 3'-конце 2 повтора 3'UTR β-глобина и поли(А)-хвост из 128 аденинов. Эту мРНК, содержащую различные аналоги кэпа на 5'-конце, получали путем транскрипции *in vitro*. В качестве матрицы для синтеза использовали плазмиду pJET\_luc\_128A, расщепленную с помощью AarI (ThermoFisher Scientific). Типичную реакцию транскрипции *in vitro* проводили в течение 2 ч в объеме 20 мкл при 40°C, реакционная смесь содержала следующие компоненты: 1 ед. полимеразы SP6, 1 ед. ингибитора РНКазы RiboLock (ThermoFisher Scientific), 0,5 mM АТР/СТР/УТР, 0,125 mM GTP, 1,25 mM динуклеотидного аналога кэпа и 0,1 мкг матрицы. Следующие стадии получения мРНК проводили, как описано выше для мРНК, кодирующей люциферазу Renilla (тест 5). Дополнительно после очистки мРНК с использованием колонки NucleoSpin RNA Cleanup XS транскрипты осаждали этанолом в присутствии 2 мкг гликогена и ацетата натрия, затем растворяли в деионизованной воде.

## Перечень последовательностей

<110> УНИВЕРСИТЕТ ВАРШАВСКИЙ  
 <120> 5'-фосфоротиоатные аналоги 5'-конца мРНК (кэпа), содержащая их мРНК, способ их получения и применения  
 <130> PZ/3566/AGR/PCT  
 <160> 7  
 <170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид 1  
 <400> 1  
 atacgattta ggtgacacta tagaagaagc gggcatgcgg ccagccatag ccgatca 57

<210> 2  
 <211> 57  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид 2  
 <400> 2  
 tgatcggtta tggctggcgg catgcccgt tttctatag tgtcaccta atcgat 57

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> промоторная последовательность полимеразы SP6  
 <400> 3  
 atttaggtga cactataga 19

<210> 4  
 <211> 35  
 <212> РНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> Короткий транскрипт РНК  
 <400> 4  
 gaagaagcgg gcaugcggcc agssauagcc gausa 35

<210> 5  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> Дезоксирибозим 10-23  
 <400> 5  
 tgatcggtta ggctagctac aacgaggctg gccgc 35

<210> 6  
 <211> 40  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид 3  
 <400> 6  
 atttaggtga cactatagaa cagatctcga gtcgaagctt 40

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная  
 <220>  
 <223> Олигонуклеотид 4  
 <400> 7  
 gtttaaacaat ttaaatgcaa tga

### Список литературы

- Abrams, W. R. and J. A. Schiff (1973). "Studies of sulfate utilization by algae. II. An enzyme-bound intermediate in the reduction of adenosine-5'-phosphosulfate (APS) by cell-free extracts of wild-type *Chlorella* and mutants blocked for sulfate reduction." Arch Mikrobiol**94**(1): 1-10.
- Adams, P., P. Afonine, G. Bunkoczi, V. Chen, I. Davis, N. Echols, J. Headd, L. Hung, G. Kapral, R. Grosse-Kunstleve, A. McCoy, N. Moriarty, R. Oeffner, R. Read, D. Richardson, J. Richardson, T. Terwilliger and P. Zwart (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**66**: 213-221.
- Akagi, J. M. and L. L. Campbell (1962). "STUDIES ON THERMOPHILIC SULFATE-REDUCING BACTERIA III. : Adenosine Triphosphate-sulfurylase of *Clostridium nigrificans* and *Desulfovibrio desulfuricans*." J Bacteriol**84**(6): 1194-1201.
- Arakawa, H., M. Shiokawa, O. Imamura and M. Maeda (2003). "Novel bioluminescent assay of alkaline phosphatase using adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate as substrate and the luciferin-luciferase reaction and its application." Anal Biochem**314**(2): 206-211.
- Bail, S. and M. Kiledjian (2008). "DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes?" Rna Biology**5**(4): 216-219.
- Barnes, S., R. Waldrop and A. S. Neighbors (1983). "Alkaline butanol extraction of bile salt and steroid sulfate esters: application to the assay of sulfotransferases." Anal Biochem**133**(2): 470-475.
- Butchbach, M. E. R., J. Singh, M. Þorsteinsdóttir, L. Saieva, E. Slominski, J. Thurmond, T. Andrésson, J. Zhang, J. D. Edwards, L. R. Simard, L. Pellizzoni, J. Jarecki, A. H. M. Burghes and M. E. Gurney (2010). "Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy." Human Molecular Genetics**19**(3): 454-467.
- Contreras, R. and W. Fiers (1981). "Initiation of transcription by rna polymerase-II in permeable, SV40-infected or noninfected, CV1 cells - evidence for multiple promoters of SV40 late transcription." Nucleic Acids Research**9**(2): 215-236.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**60**: 2126-2132.
- Floor, S., B. Jones, G. Hernandez and J. Gross (2010). "A split active site couples cap recognition by Dcp2 to activation." Nature Structural & Molecular Biology**17**(9): 1096-U1099.
- Grudzien, E., M. Kalek, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads (2006). "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs." Journal of Biological Chemistry**281**(4): 1857-1867.

Grudzien-Nogalska, E., J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads (2007). "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells." Rna-a Publication of the Rna Society**13**(10): 1745-1755.

Gu, M. G., C. Fabrega, S. W. Liu, H. D. Liu, M. Kiledjian and C. D. Lima (2004). "Insights into the structure, mechanism, and regulation of scavenger mRNA decapping activity." Molecular Cell**14**(1): 67-80.

Jemielity, J., T. Fowler, J. Zuberek, J. Stepinski, M. Lewdorowicz, A. Niedzwiecka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads (2003). "Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties." Rna-a Publication of the Rna Society**9**(9): 1108-1122.

Kabsch, W. (2010). "XDS." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**66**: 125-132.

Kalek, M., J. Jemielity, Z. M. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis and E. Darzynkiewicz (2006). "Enzymatically stable 5' mRNA cap analogs: Synthesis and binding studies with human DcpS decapping enzyme." Bioorganic & Medicinal Chemistry**14**(9): 3223-3230.

Kalek, M., J. Jemielity, E. Grudzien, J. Zuberek, E. Bojarska, L. S. Cohen, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, R. E. Rhoads and E. Darzynkiewicz (2005). "Synthesis and biochemical properties of novel mRNA 5' cap analogs resistant to enzymatic hydrolysis." Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids**24**(5-7): 615-621.

Konarska, M. M., R. A. Padgett and P. A. Sharp (1984). "Recognition of Cap Structure in Splicing In Vitro of Messenger-Rna Precursors." Cell**38**(3): 731-736.

Kowalska, J., M. Lewdorowicz, J. Zuberek, E. Grudzien-Nogalska, E. Bojarska, J. Stepinski, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, R. E. Davis and J. Jemielity (2008). "Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS." RNA-a Publication of the RNA Society**14**(6): 1119-1131.

Kowalska, J., A. Wypijewska del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zuberek, M. Strenkowska, M. Ziemniak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin and J. Jemielity (2014). "Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes." Nucleic Acids Research**42**(16): 10245-10264.

Kowalska, J., M. Ziemniak, M. Lukaszewicz, J. Zuber, M. Strenkowska, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity (2008). "Phosphorothioate analogs of m7GTP: Strong inhibitors of translation with increased resistance towards enzymatic degradation." Chemistry of Nucleic Acid Components**10**: 487-490.

Kuhn, A. N., M. Diken, S. Kreiter, A. Selmi, J. Kowalska, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, C. Huber, O. Tureci and U. Sahin (2010). "Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo." Gene Therapy**17**(8): 961-971.

Lykke-Andersen, J. (2002). "Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay." Molecular and Cellular Biology**22**(23): 8114-8121.

Mccoy, A., R. Grosse-Kunstleve, P. Adams, M. Winn, L. Storoni and R. Read (2007). "Phaser crystallographic software." Journal of Applied Crystallography**40**: 658-674.

Mildvan, A., Z. Xia, H. Azurmendi, V. Saraswat, P. Legler, M. Massiah, S. Gabelli, M. Bianchet, L. Kang and L. Amzel (2005). "Structures and mechanisms of Nudix hydrolases." Archives of Biochemistry and Biophysics**433**(1): 129-143.

Rydzik, A. M., M. Lukaszewicz, J. Zuberek, J. Kowalska, Z. M. Darzynkiewicz, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity (2009). "Synthetic dinucleotide mRNA cap analogs with tetraphosphate 5' ,5' bridge containing methylenebis(phosphonate) modification." Organic & Biomolecular Chemistry**7**(22): 4763-4776.

Sahin, U., K. Kariko and O. Tureci (2014). "mRNA-based therapeutics - developing a new class of drugs." Nature Reviews Drug Discovery**13**(10): 759-780.

Schuttelkopf, A. and D. van Aalten (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**60**: 1355-1363.

Shen, V., H. D. Liu, S. W. Liu, X. F. Jiao and M. Kiledjian (2008). "DcpS scavenger decapping enzyme can modulate pre-mRNA splicing." Rna-a Publication of the Rna Society**14**(6): 1132-1142.

Singh, J., M. Salcius, S. W. Liu, B. L. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. R. Mattoon, J. Printen, J. Christensen, J. M. Bjornsson, B. A. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki and M. E. Gurney (2008). "DcpS as a Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy." Acs Chemical Biology**3**(11): 711-722.

Van Meerbeke, J. P., R. M. Gibbs, H. L. Plasterer, W. Miao, Z. Feng, M.-Y. Lin, A. A. Rucki, C. D. Wee, B. Xia, S. Sharma, V. Jacques, D. K. Li, L. Pellizzoni, J. R. Rusche, C.-P. Ko and C. J. Sumner (2013). "The DcpS inhibitor RG3039 improves motor function in SMA mice." Human Molecular Genetics**22**(20): 4074-4083.

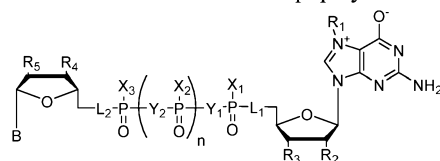
Warren, L., P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger and D. J. Rossi (2010). "Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA." Cell Stem Cell**7**(5): 618-630.

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

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

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. 5'-Фосфоториботный аналог кэпа в соответствии с формулой 1



Формула 1

где  $L^1$  и  $L^2$  независимо выбраны из группы, включающей O и S, где по меньшей мере один из  $L^1$  и  $L^2$  не является O;

$n = 0, 1$  или  $2$ ;

$X_1, X_2, X_3$  независимо выбраны из группы, включающей O, S;

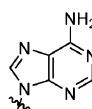
$R^1$  выбран из группы, включающей  $CH_2Ph$ ,  $C_{1-10}$  алкил;

$R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $-COOH$ ,  $N_3$ ,  $C_{1-10}$  алкил,  $C_{2-10}$  алкенил или  $C_{2-10}$  алкинил;

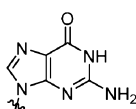
$R^4$  и  $R^5$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $-COOH$ ,  $CH_2COOH$ ,  $N_3$ ,  $CH_2N_3$ ,  $C_{1-10}$  алкил,  $C_{2-10}$  алкенил или  $C_{2-10}$  алкинил;

$Y_1, Y_2$  независимо выбраны из группы, включающей  $CH_2$ ,  $CHCl$ ,  $CCl_2$ ,  $CF_2$ ,  $CHF$ ,  $NH$ , O; и

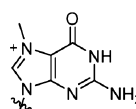
B представляет собой группу в соответствии с формулой 3, 4, 5, 6 или 7



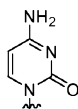
формула 3



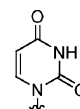
формула 4



формула 5



формула 6



формула 7

## 2. Соединение по п.1, выбранное из группы, состоящей из

№	Соединение	Структурная формула	Химическое наименование
21	$m^7GppSG$		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P2-(5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-ил)-дифосфат
22	$m^7GpppSG$		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-ил)-трифосфат
23	$m^7GSppG$		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P2-гуанозин-5'-илдифосфат
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2,3-метилентрифосфат
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-О-метил-7-метил-5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат
30	$m^7GSpppG$ D1		P1-(7-метил-5'-дезоксид-5'-тиогуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат D1

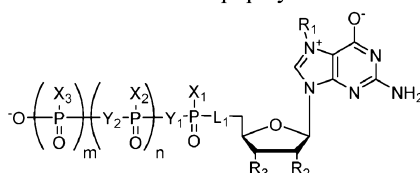
31	$m^7GSpp_pG$ $D_2$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-тиотрифосфат $D_2$
32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат
33	$m^7GSpp_pSG$ $D_1$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат $D_1$
34	$m^7GSpp_pSG$ $D_2$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат $D_2$
35	$m^7Gpp_pSG$ $D_1$		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат $D_1$
36	$m^7Gpp_pSG$ $D_2$		P1-(7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат $D_2$
37	$m^7GpCH_2ppS$ $G$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-1,2-метилентрифосфат
38	$m^{7,2'O}GpppSG$		P1-(2'-O-метил-7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат

## 3. Соединение по пп.1-2, выбранное из группы, состоящей из

№	Соединение	Структурная формула	Химическое наименование
23	$m^7GSppG$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P2-гуанозин-5'-илдифосфат
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат
25	$m^7GSppCH_2p$ $G$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2,3-метилентрифосфат
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-метил-7-метилгуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-илтрифосфат

30	$m^7GSpp_pG$ $D1$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-трифосфат D1
31	$m^7GSpp_pG$ $D2$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-2-тиотрифосфат D2
32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-трифосфат
33	$m^7GSpp_pSG$ $D1$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D1
34	$m^7GSpp_pSG$ $D2$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-(5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-2-тиотрифосфат D2
37	$m^7GpCH_2ppSG$ $G$		P1-(7-метил-5'-дезоксигуанозин-5'-ил)-P3-гуанозин-5'-ил-1,2-метилентиотрифосфат

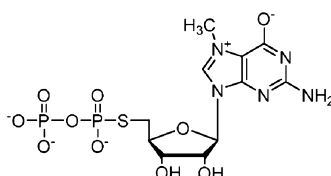
## 4. 5-Фосфоротиоатный аналог в соответствии с формулой 2



Формула 2

где  $m = 0, 1$ ; $n = 0, 1$  или  $2$ ; $L^1$  представляет собой S; $X_1, X_2, X_3$  независимо выбраны из группы, включающей O, S; $R^1$  выбран из группы, включающей  $CH_2Ph$ ,  $C_{1-10}$  алкил; $R^2$  и  $R^3$  независимо выбраны из группы, включающей H, OH,  $OCH_3$ ,  $OC_2H_5$ ,  $-COOH$ ,  $N_3$ ,  $C_{1-10}$  алкил; $Y_1, Y_2$  независимо выбраны из группы, включающей  $CH_2$ ,  $CHCl$ ,  $CCl_2$ ,  $CHF$ ,  $CF_2$ ,  $NH$  и O.

5. Соединение по п.4, где указанный 5'-фосфоротиоатный аналог согласно формуле 2 представляет собой 5'-дезоксигуанозин-5'-ил-2-тиотрифосфат в соответствии с формулой



6. Применение соединения по пп.1-5 в качестве лекарственного средства для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) и/или для облегчения симптомов СМА.

7. Применение соединения по пп.1-5 в качестве ингибитора активности фермента DcpS.

8. Применение соединения по пп.1-5 для регуляции деградации мРНК и/или регуляции сплайсинга мРНК.

9. мРНК, содержащая на 5'-конце 5'-фосфоротиоатный аналог кэпа по пп.1-3.

10. мРНК по п.9, где указанный 5'-фосфоротиоатный аналог кэпа выбран из группы, включающей



$m^7\text{GSpppG}$  (№ 24),  $m^{7,2^{10}}\text{GSpppG}$  (№ 26),  $m^7\text{GSpppSG}$  (№ 32),  $m^7\text{GSpp}_s\text{pG D1}$  (№ 30),  $m^7\text{GSpp}_s\text{pG D2}$  (№ 31),  $m^7\text{GSpp}_s\text{pSG D1}$  (№ 33),  $m^7\text{GSpp}_s\text{pSG D2}$  (№ 34).

11. Способ получения мРНК, содержащей на 5'-конце молекулы мРНК 5'-фосфоротиоатный аналог кэпа, характеризующийся тем, что 5'-фосфоротиоатный аналог кэпа по пп.1-3 вводят в процессе синтеза молекулы мРНК; причем синтез мРНК осуществляют путем транскрипции *in vitro*.

12. мРНК, полученная способом по п.11.

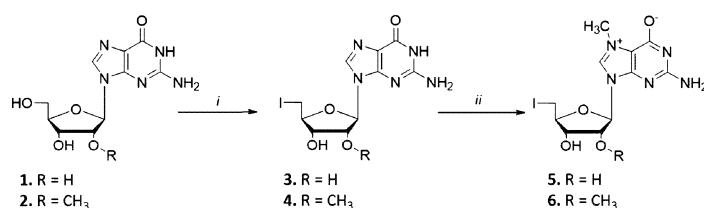
13. Применение мРНК, содержащей 5'-фосфоротиоатный аналог кэпа по пп.9-10 и 12 на 5'-конце, для получения белков; причем получение белков проводят в клеточной или неклеточной системе.

14. Применение мРНК по пп. 9-10 или мРНК по п.12 в качестве лекарственного средства для лечения спинальной мышечной атрофии (СМА) и/или для облегчения симптомов СМА.

15. Применение мРНК по пп. 9-10 или мРНК по п.12 в качестве лекарственного средства для противораковой иммунотерапии.

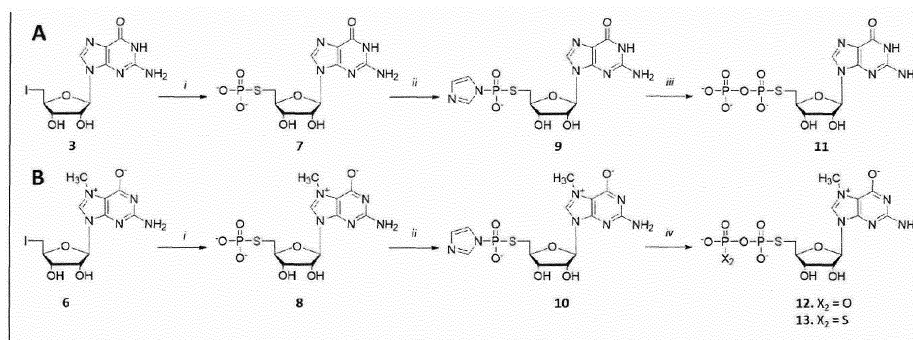
16. Фармацевтический состав, содержащий соединение по пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Фармацевтический состав, содержащий мРНК по пп.9-10 или мРНК по п.12; и фармацевтически приемлемый носитель.



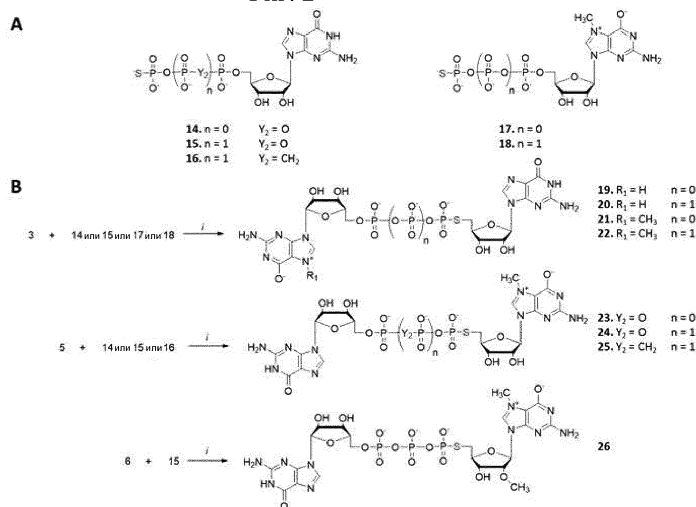
i). I<sub>2</sub>, имидазол, PPh<sub>3</sub>, NMP; ii). MeI, ДМСО

Фиг. 1



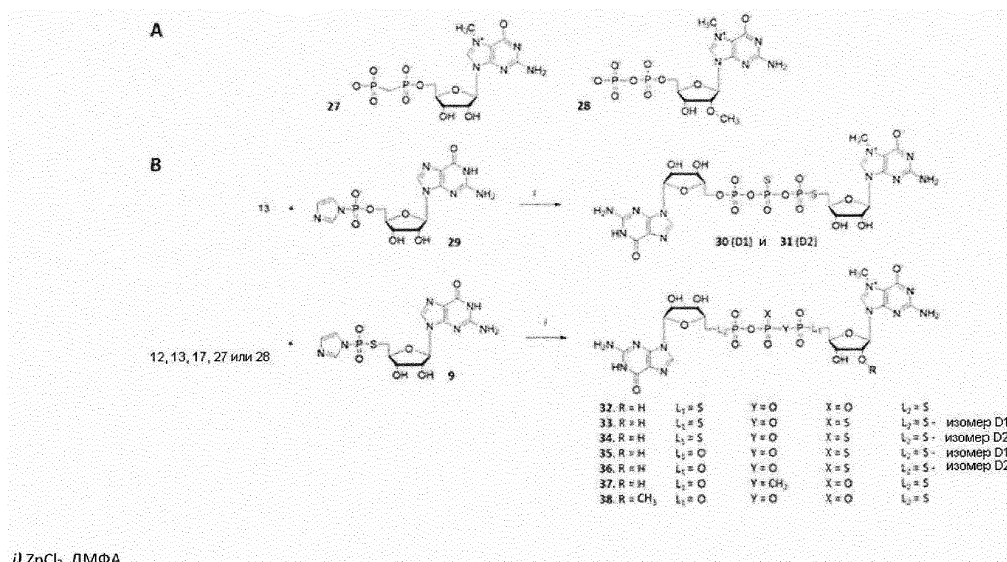
i). PO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>; ДМФА; ii). Имидазол, PPh<sub>3</sub>, TEA, ДТДФ, ДМФА; iii). PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/TEA, ZnCl<sub>2</sub>, ДМФА; iv) PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/TEA, ZnCl<sub>2</sub>, ДМФА

Фиг. 2

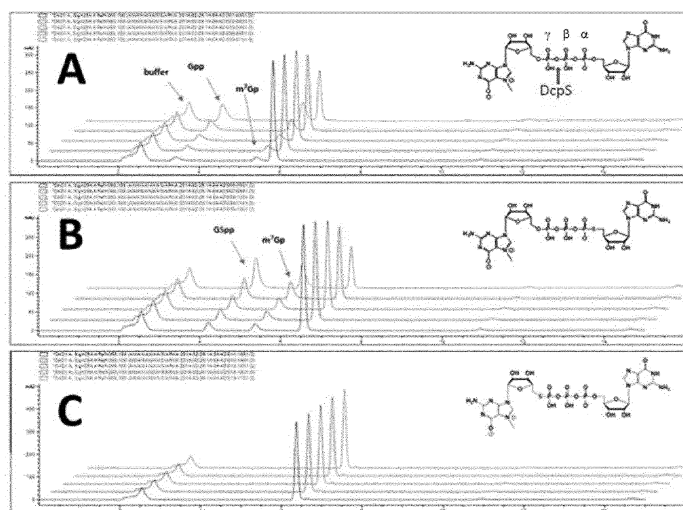


i) DBU, ДМФА, комнатная температура

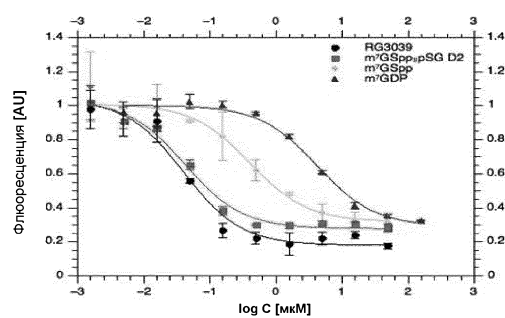
Фиг. 3



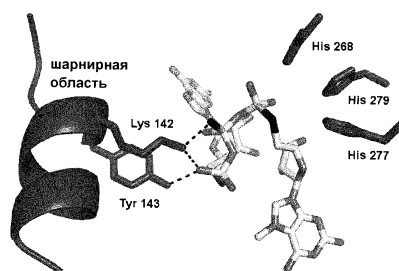
Фиг. 4



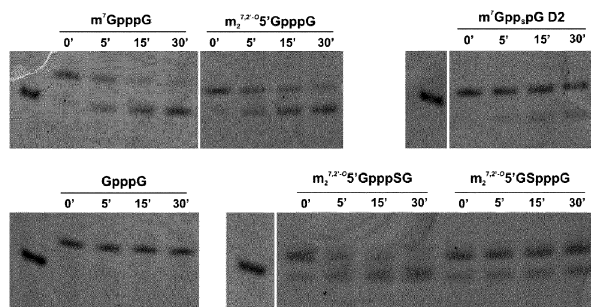
Фиг. 5



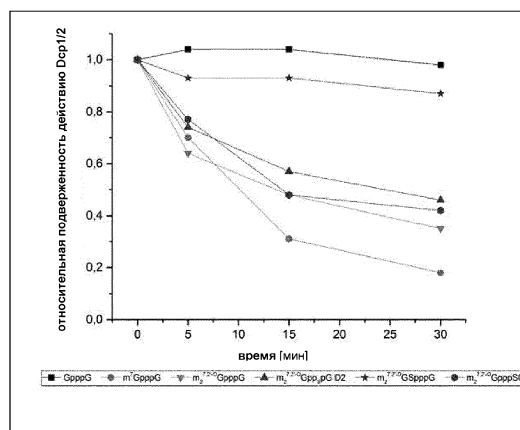
Фиг. 6



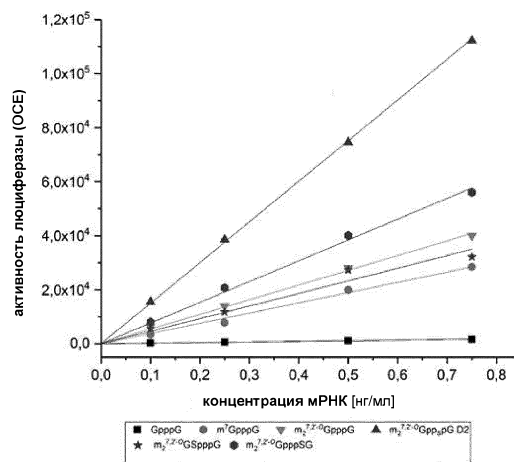
Фиг. 7



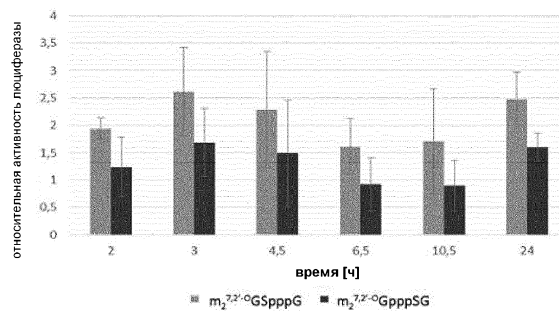
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2