

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-513957
(P2024-513957A)

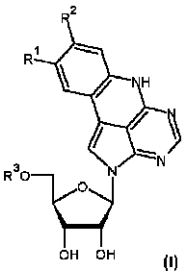
(43)公表日 令和6年3月27日(2024.3.27)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 F 9/6558(2006.01)	C 0 7 F 9/6558	C S P 4 B 0 6 4
C 0 7 H 19/23 (2006.01)	C 0 7 H 19/23	4 B 0 6 5
C 0 7 H 1/02 (2006.01)	C 0 7 H 1/02	4 C 0 5 7
C 1 2 P 19/34 (2006.01)	C 1 2 P 19/34	A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	4 H 0 5 0
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全59頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-562564(P2023-562564)	(71)出願人	522499829
(86)(22)出願日	令和4年4月11日(2022.4.11)		ステルス・レイベルズ・バイオテック・
(85)翻訳文提出日	令和5年12月8日(2023.12.8)		アクチエボラグ
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/059666		S T E A L T H L A B E L S B I O T
(87)国際公開番号	WO2022/218943		E C H A B
(87)国際公開日	令和4年10月20日(2022.10.20)		スウェーデン412 96ヴェストラ・
(31)優先権主張番号	2105194.1		イエータランド・カウンティ、イエーテ
(32)優先日	令和3年4月12日(2021.4.12)		ボリ、ヴェラ・サンドベリス・アレ8、
(33)優先権主張国・地域又は機関			シャルマーズ・ベンチャーズ・アクチエ
	英国(GB)		ボラグ内
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100145403
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 山尾 憲人
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100156144
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 落合 康
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100103230
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛍光ヌクレオシドホスフェート

(57)【要約】
本明細書は、インセルロでRNAを標識するのに有用な式 (I)で示される新規ホスフェート化合物を開示する。該ホスフェートは細胞に自発的に取り込まれ、細胞膜を通過するとRNA合成の基質として使用され得る。したがって、この技術は、RNAを基礎とする薬物を含む、関心のあるRNAの生物学的挙動を理解するための一般的な経路を提供する。

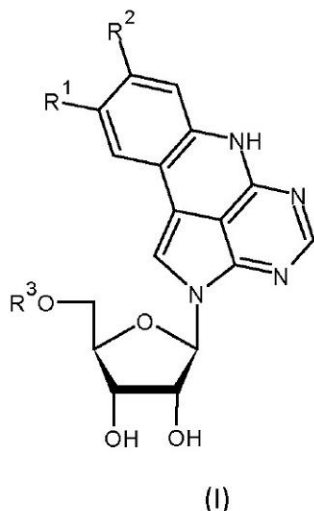


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(I)：

【化 1】



10

[式中、

20

 R^1 はヒドロから選択され、そして、 R^2 はシアノから選択されるか、または R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒にあって、6-員カルボ芳香環を形成し、そして、 R^3 は、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ および $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ から選択される]

で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩。

【請求項 2】

 R^1 がヒドロであり、 R^2 がシアノである、請求項1に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩。

30

【請求項 3】

 R^1 および R^2 が、それらが結合している原子と一緒にあって、6-員カルボ芳香環を形成する、請求項1に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩。

【請求項 4】

 R^3 が、 $-P(O)(OH)_2$ および $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩。

【請求項 5】

 R^3 が、 $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ である、請求項1～4のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩。

40

【請求項 6】

請求項1～5のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物。

【請求項 7】

ナトリウム塩、カリウム塩またはアンモニウム塩である、請求項1～6のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物。

【請求項 8】

一ナトリウム塩、二ナトリウム塩、三ナトリウム塩、一アンモニウム塩、二アンモニウム塩または三アンモニウム塩である、請求項7に記載の式(I)で示される化合物。

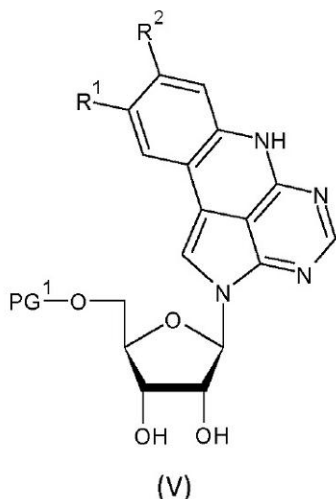
【請求項 9】

50

請求項1～8のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法であって、

i. 式(V)：

【化2】



10

[式中、 R^1 はヒドロから選択され、そして、

R^2 はシアノから選択されるか、または

R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成し、そして、

PG^1 は適当な保護基である]

で示される化合物またはその塩を提供すること；

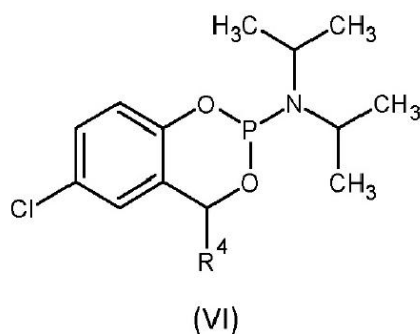
ii. 式(V)で示される化合物またはその塩を、その第二級アルコール基の一つを適当な支持体に結合させることによって固定化すること；

iii. 遊離の第二級アルコール基を適当な保護基 PG^2 でキャッピングすること；

iv. 保護基 PG^1 を除去すること；

v. 曝露された第一級アルコール基を、式(VI)：

【化3】



30

[式中、 R^4 は、ヒドロ基および C_{1-3} アルキル基から選択される]

で示される化合物と反応させること；

vi. 得られたリン(III)化合物をリン(V)化合物に酸化させること；

そして、任意に、

vii. 得られたリン(V)化合物をピロリン酸テトラアルキルアンモニウムと反応させることで、トリホスフェートを生成すること；

viii. 保護基 PG^2 を除去すること；

ix. 得られたホスフェートを支持体から切断することで、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること；そして、任意に

x. 式(I)で示される化合物の遊離酸、生理学的に開裂可能な前駆体または様々な塩を

40

50

形成すること、
を含む方法。

【請求項 10】

R^4 が、メチル基である、請求項9に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

【請求項 11】

支持体が、固体ポリマーである、請求項9または10に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

【請求項 12】

支持体が、制御多孔質ガラスおよびポリスチレンから選択される、請求項11に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

10

【請求項 13】

支持体が、制御多孔質ガラスである、請求項12に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

【請求項 14】

PG^1 が、トリチル、ジメトキシトリチルおよびトリメトキシトリチルから選択される、請求項9～13のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

【請求項 15】

PG^2 が、アセチル、ベンゾイル、2,2,2-トリクロロエチルカルボニル、パラメトキシベンジル、メチル、テトラヒドロピラニル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、トリメチルシリル、tert-ブチルジメチルシリルおよびメトキシエチルから選択される、請求項9～14のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

20

【請求項 16】

PG^1 がジメトキシトリチルであり、 PG^2 がアセチルである、請求項9～15のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

【請求項 17】

ピロリン酸テトラアルキルアンモニウムが、ピロリン酸テトラブチルアンモニウムである、請求項9～16のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法。

30

【請求項 18】

標識RNA分子を調製するための組成物であって、請求項1～8のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩、および天然リボヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 19】

標識RNA分子を調製するための、請求項1～8のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用。

【請求項 20】

R^1 がヒドロから選択され、 R^2 がシアノから選択され、前記RNA分子が2CNqAで標識されている、請求項19に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用。

40

【請求項 21】

R^1 および R^2 が、それらが結合している原子と一緒にあって、6-員カルボ芳香環を形成し、RNA分子が、pAで標識されている、請求項19に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用。

【請求項 22】

RNA分子が、mRNAおよびリボソームRNAから選択される、請求項19～20のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使

50

用。

【請求項 2 3】

RNA分子が、インセル口で調製される、請求項19～22のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用。

【請求項 2 4】

インビトロで標識RNA分子を調製する方法であって、

i. DNA鋳型を、請求項1～8のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩および天然リボヌクレオチドを含む組成物に与えること；

ii. 得られた混合物をRNAポリメラーゼで処理すること；

任意に、

iii. 顕微鏡を用いて標識RNA分子をモニタリングすること；そして、

任意に、

iv. 標識RNA分子を単離すること、

を含む、方法。

【請求項 2 5】

インセル口で標識RNA分子を調製する方法であって、

i. 請求項1～8のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を、真核生物または原核細胞に与えること；

ii. 前記生物が前記化合物を自発的にインターナライズするようにすること；

iii. 前記生物が標識RNA分子を調製するようにすること；任意に、

iv. 顕微鏡を用いて前記標識RNA分子モニタリングすること；そして、任意に、

v. 前記標識RNA分子を単離すること、

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、修飾蛍光ヌクレオシドホスフェート、および生物学的メカニズムを解明するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

RNAは、生物学において基本的な役割を果たしている。RNAは、生化学のセントラルドグマの主役であり、例えば、マイクロRNAや低分子干渉RNAを介する、ならびに内在性の触媒活性を介する、遺伝子発現の重要な調節物質である。このような理由から、RNAはまた、非常に有望で汎用性の高い新薬として登場した。これらの理由から、RNA療法は非常に有望で汎用性の高い新薬治療法としても浮上している：RNA療法により翻訳レベルで細胞機能を改変する可能性があるため、これまで創薬不可能(undruggable)であったターゲットに対処する新たな機会を開くかもしれない。

【0003】

したがって、RNAが関与する生物学的プロセスに関する分子的・機構的知識を深めることは、疾患を理解し処置するために重要である。例えば、RNAを基礎とする薬物の可能性を最大限に引き出す鍵は、細胞取り込みとエンドソーム放出のプロセスを理解することにあることを示唆する証拠が増えつつある(Dowdy, S. F., Nat. Biotechnol. 35, 222-229, [2017])。エンドサイトーシスのメカニズムにかかわらず、核酸カーゴの細胞質への送達には常にエンドソーム脱出に依存しており、その理解は広範な研究にもかかわらず、依然としてとらえどころのないままである(Crooke, S. T. et al., Nat. Biotechnol. 35, 230 [2017]; Pei, D. & Buyanova, M., Bioconjugate Chem. [2018])。このような背景から、細胞内における内在性および外来性(治療用)RNAの追跡(転位、局在化、スプライシング、分解を含む)は非常に重要である。

【0004】

最近の進歩により、RNAを分析し定量できるツールやプローブが幅広く開発されるようになったが、それらは一般に、天然のものとは大きく異なる性質を持つ、高度に修飾されたオリゴヌクレオチドを含んでおり、その結果、細胞の酵素装置によって認識・処理される能力が失われる可能性がある。例えば、RNAの細胞内局在化を研究するための既存の蛍光を基礎とする技術の欠点は、主に、運動性を損ない、RNAの局在化や(例えば)膜構成成分との分子相互作用を乱し得る、両親媒性の高いおよび／またはかさばった外部蛍光コンストラクトに依存していることである。さらに、これらの技術の大半はライブセルイメージングと互換性がない(Li, Y., Ke, K. & Spitale, R. C., Biochemistry 58, 379-386 [2019])。

【0005】

このような問題を克服し、RNA介在メカニズムを調べる改善された方法を提供するために、本明細書では、非細胞毒性であり、したがって細胞内での使用に適した蛍光性ヌクレオシドホスフェートを開示する。このホスフェートは、培養ヒト細胞において、エネルギー依存的な経路で取り込まれた後、核酸塩基の分子構造に応じて異なる細胞局在化(例えば、核に優先的に蓄積するリン酸もあれば、細胞質ゾルに蓄積するリン酸もある)で自発的に蓄積する。これにより、下流の細胞の内在性標識プロセスを制御することができる。

【0006】

本発明者らの知る限り、このような特性の組み合わせは、他の蛍光性ヌクレオチドではこれまで観察されたことがない。

【0007】

酵素は、細胞に入ると、合成ホスフェートを標準基質として受け入れ、最終的には外部トランスフェクション技術を必要とせずに内在性細胞RNAに合成ホスフェートを取り込む。標識された残基は、一度取り込まれると混乱が最小限に抑えられるため、観察中のプロセスに対する標識の影響を最小限に抑えながら機構の研究が可能になる。このように標識された処理細胞からその後RNAを単離することが可能であるため、本明細書に記載の技術は、RNAを「インセルロ(in-cellulo)」(すなわち、生細胞を含む細胞内)で蛍光標識する独自の機会を与える。

【0008】

したがって、要約すると、本明細書は内在性RNAを蛍光標識する非侵襲的で非遺伝的な方法を提供する。これは、RNAの産生、輸送、プロセッシング、分泌およびタンパク質相互作用が関与する生化学反応を、生細胞で可視化するために用いることができる。これは、新規核酸を基礎とする療法を研究開発する新しい方法の扉を開くものである。

【発明の概要】

【0009】

本明細書の第一の目的は、蛍光標識RNAをインセルロ(in-cellulo)で簡便に内在的に調製するために使用できる修飾ヌクレオシドホスフェートを提供することである。

【0010】

したがって、本明細書は、部分的に、請求項1に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を記載する。

【0011】

本明細書はまた、部分的に、請求項9に記載の式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法を記載する。

【0012】

本明細書はまた、部分的に、請求項18に記載の標識RNA分子を調製するための組成物を記載する。

【0013】

本明細書はまた、部分的に、請求項19に記載の標識RNA分子を調製するための、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用を記載する。

【0014】

10

20

30

40

50

本明細書はまた、部分的に、請求項24に記載のインビトロで標識RNA分子を調製する方法を記載する。

【0015】

本明細書はまた、部分的に、請求項25に記載のインセルロで標識RNA分子を調製する方法を記載する。

【0016】

例示的な実施態様

本明細書で詳述する本発明は、引用した実施態様または実施例に限定して解釈されるべきではない。他の実施態様は、当業者には容易に明らかであろう。

【0017】

全般的な定義

「A」または「an」は「少なくとも一つ」を意味する。「a」または「an」が所定の材料または要素を示すために使用される任意の実施態様において、「a」または「an」は、一つを意味し得る。「a」または「an」が所定の材料または要素を示すために使用される任意の実施態様において、「a」または「an」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、100、1000、10000、100000または1000000(100万)を意味し得る。

【0018】

ある実施形態が「a」または「an」特徴Xを含む場合、その後の「the」特徴Xへの言及は、その特徴のうちの一つだけが存在することを意味するものではない。代わりに、「a」または「an」の上記の解釈が引き続き適用され、「the」は「少なくとも一つ」も意味する。換言すれば、「特徴X、ここで、特徴Xが・・・である」を含む実施態様は、「少なくとも一つの特徴X、ここで少なくとも一つの特徴Xが・・・である」と解釈されるべきである。

【0019】

「含む」とは、所定の実施態様が他の特徴を含み得ることを意味する。例えば、特定の材料または要素を「含む」材料が言及される任意の実施態様において、所定の材料は、少なくとも10%w/w、少なくとも20%w/w、少なくとも30%w/w、または少なくとも40%w/wの材料または要素(または材料または要素の組み合わせ)で形成され得る。

【0020】

「含む」が言及される任意の実施態様において、「含む」は、「からなる(consisting of)」(または「からなる(consists of)」)または「本質的に・・・からなる(consisting essentially of)」(または「本質的に・・・からなる(consists essentially of)」)を意味することもある。

【0021】

材料の実施態様に関して、「～からなる(consisting of)」または「～からなる(consists of)」とは、材料または要素全体がその材料または要素(または材料または要素の組み合わせ)で形成されていることを意味する。「～からなる(consisting of)」または「～からなる(consists of)」と記載されている実施態様において、所定の材料または要素は、100%w/wのその材料または要素で形成されていてもよい。

【0022】

材料の実施形態に関して、「本質的に・・・からなる(consisting essentially of)」または「本質的に・・・からなる(consists essentially of)」とは、所与の材料または要素がほぼ完全にその材料または要素(または材料または要素の組み合わせ)からなることを意味する。「本質的に・・・からなる(consisting essentially of)」または「本質的に・・・からなる(consists essentially of)」が言及される任意の実施態様において、所定の材料または要素は、少なくとも50%w/w、少なくとも60%w/w、少なくとも70%w/w、少なくとも80%w/w、少なくとも90%w/w、少なくとも95%w/w、または少なくとも99%w/wの材料または要素で形成され得る。

【0023】

「である」または「であり得る」が材料または要素を定義するために使用されるいずれ

10

20

30

40

50

かの実施態様において、「である」または「であり得る」は、材料または要素が「からなる」または「本質的に・・・からなる」ことを意味し得る。

【0024】

「いくつかの実施態様において...」とある要素が存在し得ると言及されている場合、その要素は、明細書の同じ部分またはテキスト領域における適当な実施対象だけでなく、明細書のどの部分における適当な実施態様においても存在し得る。

【0025】

リストから「選択」される場合、その特徴は、指定された選択肢からなるリスト(すなわち、指定された選択肢のリストであり、それ以外はない)から選択される。

【0026】

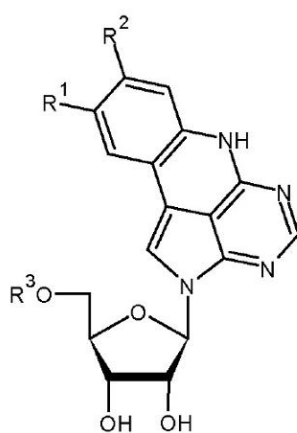
特許請求の範囲は実施態様である。

修飾ヌクレオシドモノホスフェート、修飾ヌクレオシドジホスフェートおよび修飾ヌクレオシドトリホスフェート

【0027】

一実施態様において、式(I)：

【化1】



(I)

[式中、

R^1 はヒドロから選択され、そして、

R^2 はシアノから選択されるか、または

R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒にあって、6-員カルボ芳香環を形成し、そして、

R^3 は、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ および $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ から選択される]

で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩が提供される。

【0028】

「ヒドロ」基は水素原子に相当する。ヒドロ基が結合している原子は、非置換とみなしてもよい。

【0029】

「 R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒にあって、6-員カルボ芳香族環を形成する」と記載されている場合、これは、以下の方式：

10

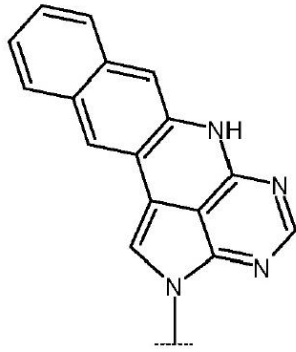
20

30

40

50

【化 2】



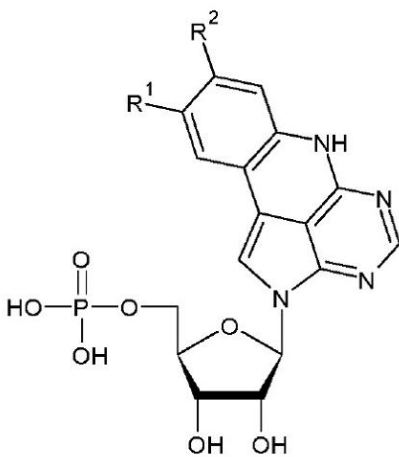
10

で四環式ヘテロ芳香族系に縮合したフェニル環を意味すると考えられる。

【0030】

式(I) [式中、 R^3 は $-P(O)(OH)_2$ である] で示される化合物は、いかの構造を有する：

【化 3】



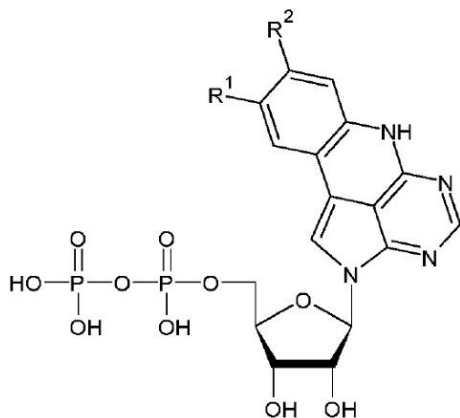
20

【0031】

式(I) [式中、 R^3 は $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ である] で示される化合物は、以下の構造を有する：

30

【化 4】



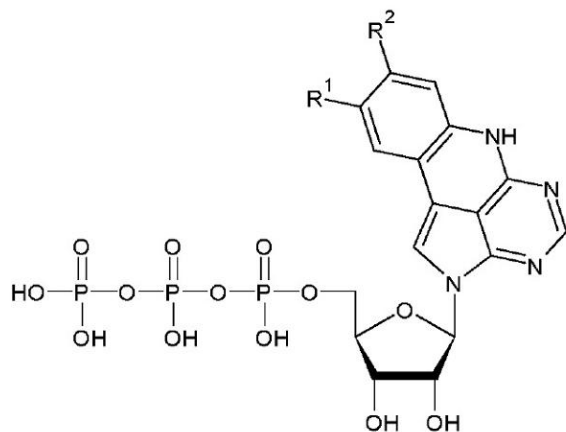
40

【0032】

式(I) [式中、 R^3 は $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ である] で示される化合物は、いかの構造を有する：

50

【化 5】

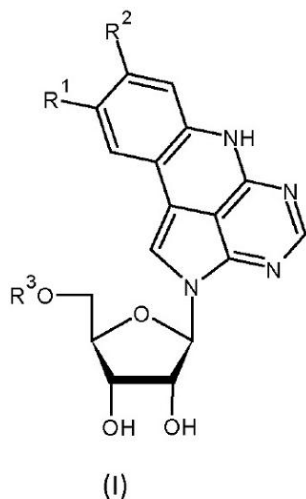


10

【 0 0 3 3】

一実施態様において、式(I)：

【化 6】



20

30

〔式中、

 R^1 はヒドロであり、そして、 R^2 はシアノであるか、または

R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成し、そして

R^3 は、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ および $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ から選択される]

で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩が提供される。

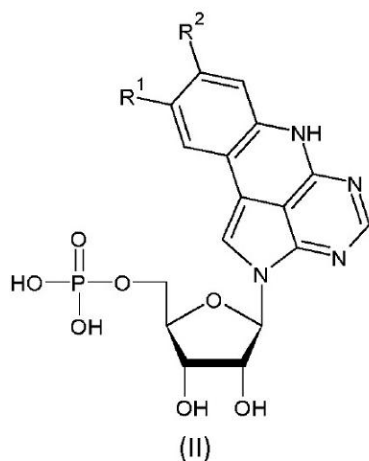
40

【 0 0 3 4】

一実施態様において、式(II)：

50

【化 7】



10

[式中、

R¹はヒドロから選択され、そして、R²はシアノから選択されるか、またはR¹およびR²は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成する]

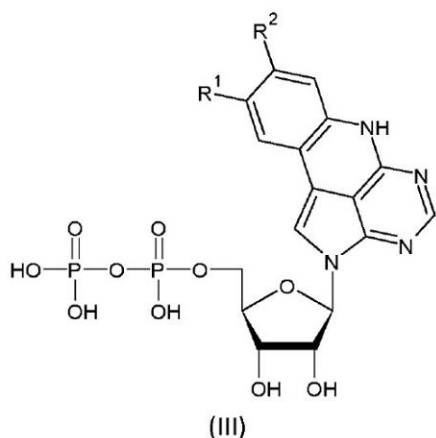
20

で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩が提供される。

【0035】

一実施態様において、式(III)：

【化 8】



30

[式中、

R¹はヒドロから選択され、そして、R²はシアノから選択されるか、またはR¹およびR²は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成する]

40

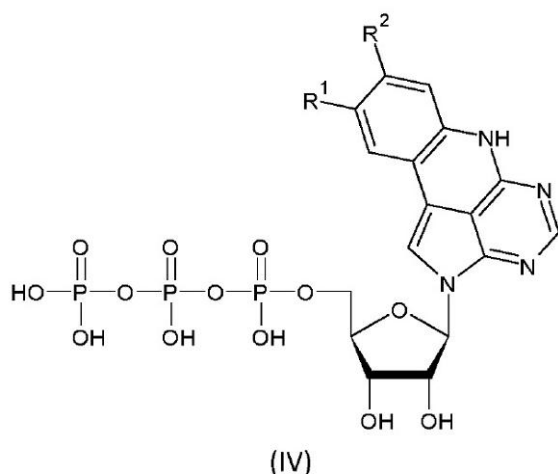
で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩が提供される。

【0036】

一実施態様において、式(IV)：

50

【化 9】



10

〔式中、

 R^1 はヒドロから選択され、そして、 R^2 はシアノから選択されるか、または

R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成する〕

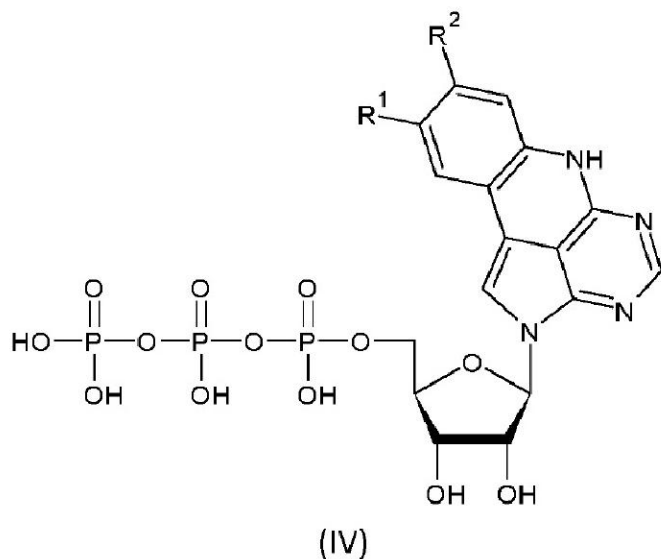
20

で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩が提供される。

【0037】

一実施態様において、式(IV)：

【化10】



30

〔式中、

 R^1 はヒドロから選択され、そして、 R^2 はシアノから選択されるか、または

R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成する〕

で示される化合物またはその塩が提供される。

【0038】

式(I)で示される化合物が特定の特徴または特性を有し得ると言及される任意の実施態

50

様において、それらの特徴または特性は、式(II)、(III)または(IV)で示される化合物にも適用され得る。

【0039】

いくつかの実施態様において、 R^1 はヒドロであり、 R^2 はシアノである。

【0040】

いくつかの実施態様において、 R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒にあって、6-員カルボ芳香環を形成する。

【0041】

いくつかの実施態様において、 R^3 は、 $-P(O)(OH)_2$ および $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ から選択される。

【0042】

いくつかの実施態様において、 R^3 は、 $-P(O)(OH)_2$ および $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ から選択される。

【0043】

いくつかの実施態様において、 R^3 は、 $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ および $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ から選択される。

【0044】

いくつかの実施態様において、 R^3 は、 $-P(O)(OH)_2$ である。

【0045】

いくつかの実施態様において、 R^3 は、 $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ である。

【0046】

いくつかの実施態様において、 R^3 は、 $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ である。

【0047】

一実施態様において、((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル二水素ホスフェート7a(化合物7a、2CNqAMP)、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩、((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェート(化合物7、2CNqATP)、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩、および((2R,3S,4R,5R)-5-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェート(化合物17、pATP)、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩から選択される、式(I)で示される化合物が提供される。

【0048】

「2CNAqMP」とは、化合物7aとして記載されるモノホスフェートを意味する。「2CNAqDP」とは、化合物7aのジホスフェートアナログ(すなわち、 R^3 が $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ である式(I)で示される類似化合物)を意味する。「2CNAqTP」とは、化合物7として記載されるトリホスフェートを意味する。これらの化合物のRNAへの取り込みから誘導される標識残基は、「2CNqA標識」である。

【0049】

「pATP」とは、化合物17として記載されるトリホスフェートを意味する。「pAMP」とは、化合物17のモノホスフェートアナログ(すなわち、 R^3 が $-P(O)(OH)_2$ である式(I)で示される類似化合物)を意味する。「pADP」は、化合物17のジホスフェート(すなわち、 R^3 が $-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2$ である式(I)で示される類似化合物)を意味する。これらの化合物のRNAへの取り込みから誘導される標識残基は「pA標識」である。

【0050】

一実施態様において、((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェート(化合物7、2CNqATP)またはその塩および((2R,3S,4R,5R)-5-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロ

10

20

30

40

50

フラン-2-イル)メチル水素トリホスフェート(化合物17、pATP)またはその塩から選択される、式(1)で示される化合物が提供される。

【0051】

一実施態様において、((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェートである、式(1)で示される化合物またはその塩が提供される。

【0052】

一実施態様において、((2R,3S,4R,5R)-5-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェートまたはその塩である、式(1)で示される化合物またはその塩が提供される。

10

【0053】

一実施態様において、((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェートである、式(1)で示される化合物が提供される。

【0054】

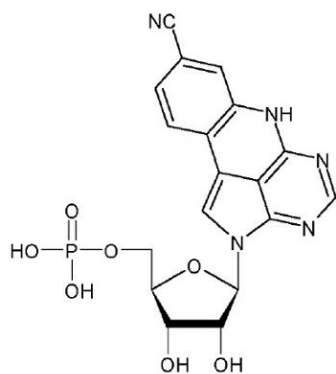
一実施態様において、((2R,3S,4R,5R)-5-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェートである、式(1)で示される化合物が提供される。

【0055】

一実施態様において、

20

【化11】



(化合物 7a, 2CNqAMP)

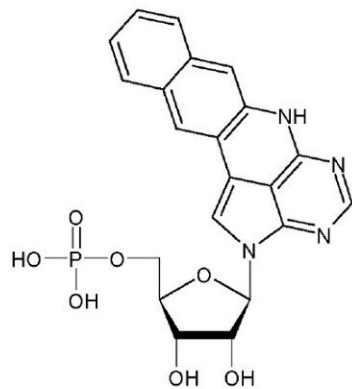
30

である、式(1)で示される化合物またはその生理学的に開裂可能な前駆体もしくは塩が提供される。

【0056】

一実施態様において、

【化12】



(pAMP)

40

である、式(1)で示される化合物またはその生理学的に開裂可能な前駆体もしくは塩が提

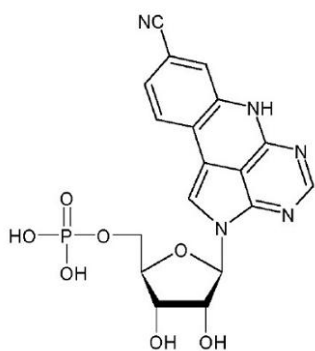
50

供される。

【0057】

一実施態様において、

【化13】



(化合物 7a, 2CNqAMP)

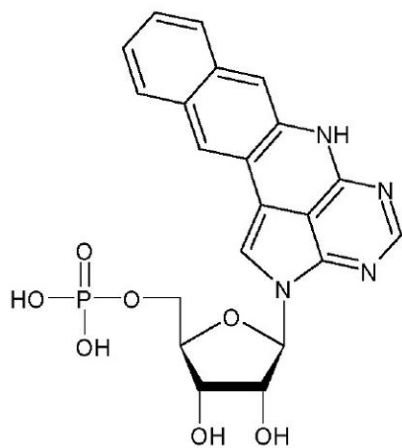
10

である、式(I)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体が提供される。

【0058】

一実施態様において、

【化14】



(化合物 7a, 2CNqAMP)

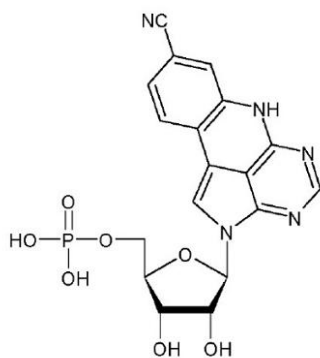
20

である、式(I)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体が提供される。

【0059】

一実施態様において、

【化15】



(化合物 7a, 2CNqAMP)

40

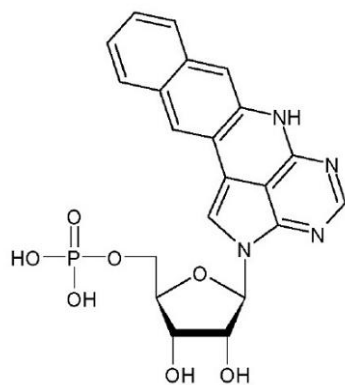
である、式(I)で示される化合物の塩が提供される。

【0060】

一実施態様において、

50

【化 1 6】



(化合物 7a, 2CNqAMP)

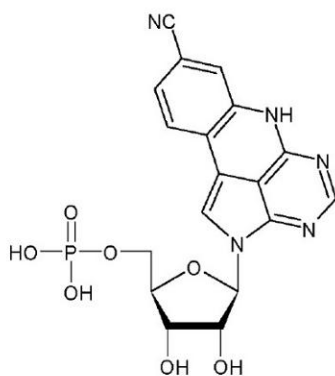
10

である、式(I)で示される化合物の塩が提供される。

【0061】

一実施態様において、

【化 1 7】



(化合物 7a, 2CNqAMP)

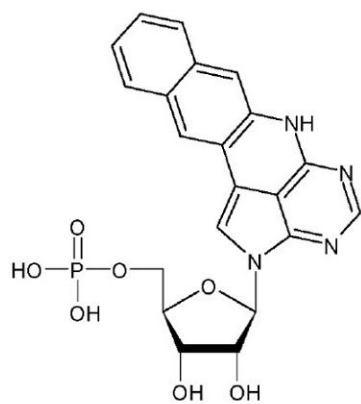
20

である、式(I)で示される化合物が提供される。

【0062】

一実施態様において、

【化 1 8】



(pAMP)

40

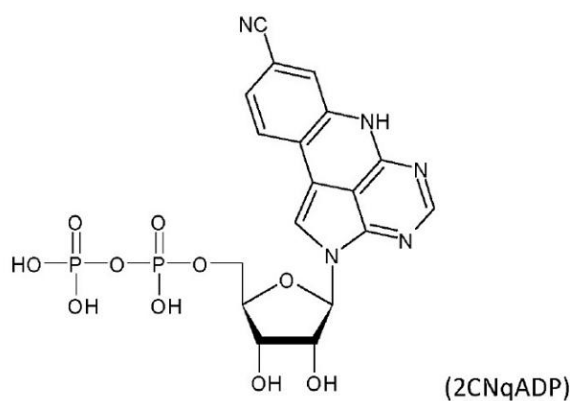
である、式(I)で示される化合物が提供される。

【0063】

一実施態様において

50

【化 1 9】



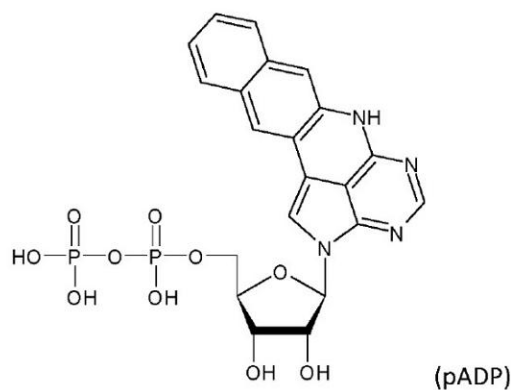
10

である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0064】

一実施態様において、

【化 2 0】



20

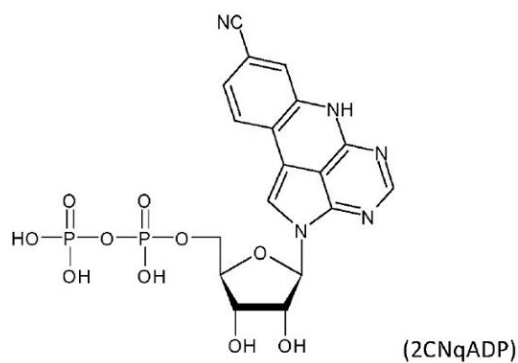
である、式(1)で示される化合物またはその生理学的に開裂可能な前駆体もしくは塩が提供される。

30

【0065】

一実施態様において、

【化 2 1】



40

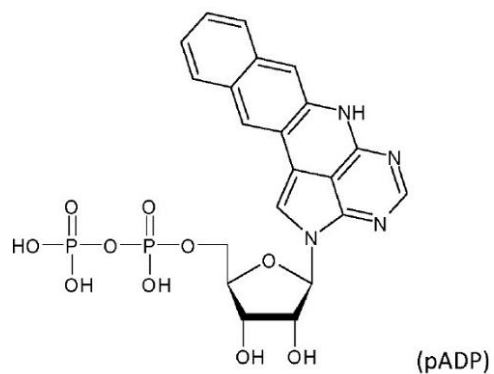
である、式(1)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体が提供される。

【0066】

一実施態様において、

50

【化 2 2】



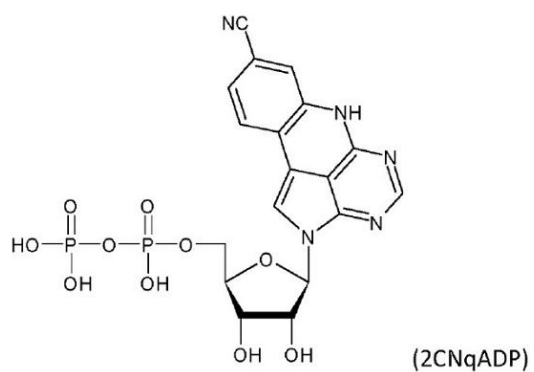
10

である、式(1)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体が提供される。

【0067】

一実施態様において、

【化 2 3】



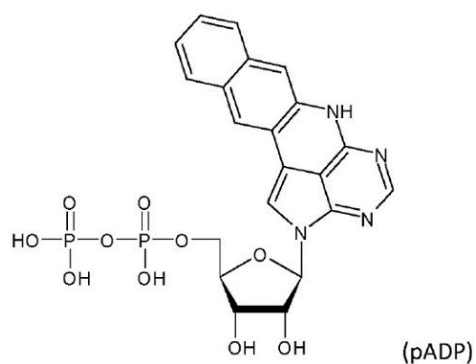
20

である、式(1)で示される化合物の塩が提供される。

【0068】

一実施態様において、

【化 2 4】



40

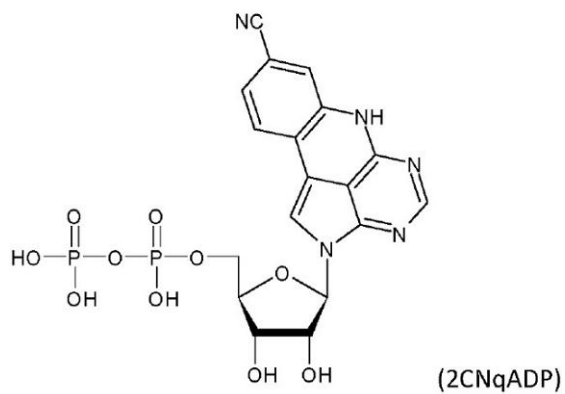
である、式(1)で示される化合物の塩が提供される。

【0069】

一実施態様において、

50

【化 2 5】



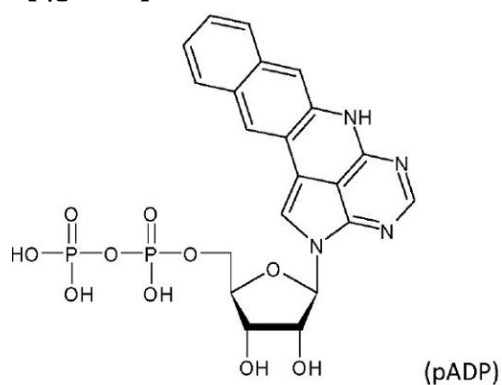
10

である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0070】

一実施態様において、

【化 2 6】



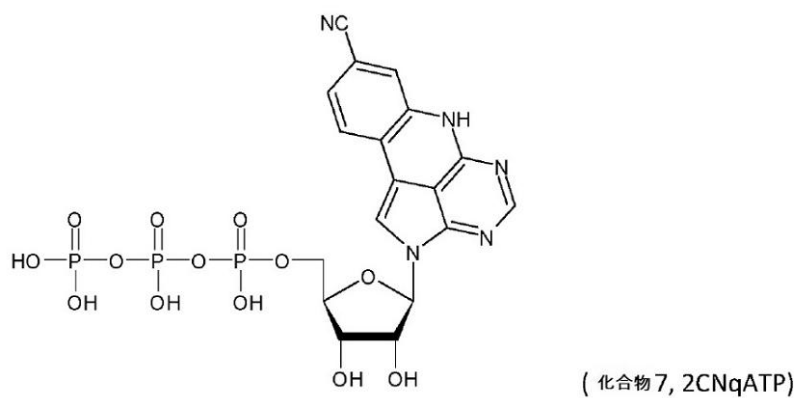
20

である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0071】

一実施態様において、

【化 2 7】



40

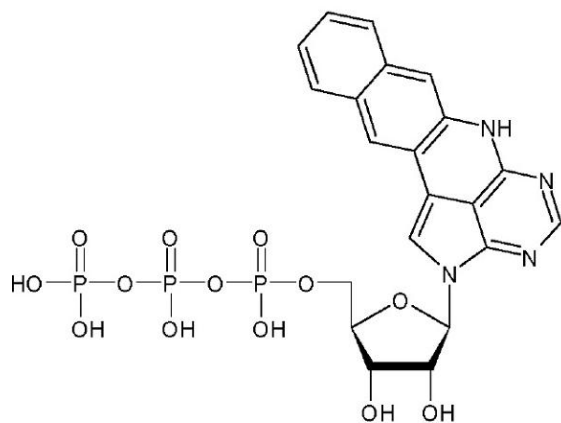
である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0072】

一実施態様において、

50

【化 2 8】



(化合物 17, pATP)

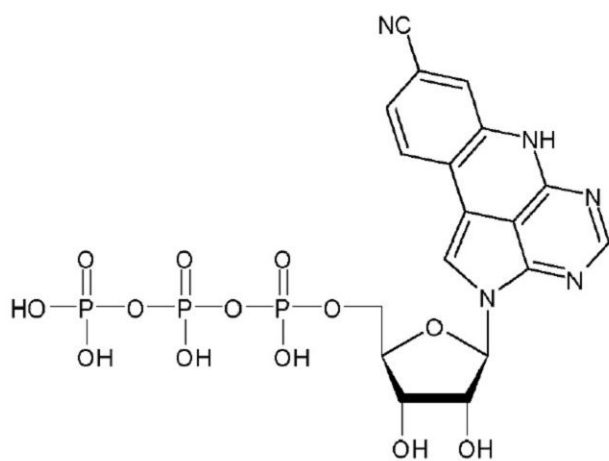
10

である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0073】

一実施態様において、

【化 2 9】



(化合物 7, 2CNqATP)

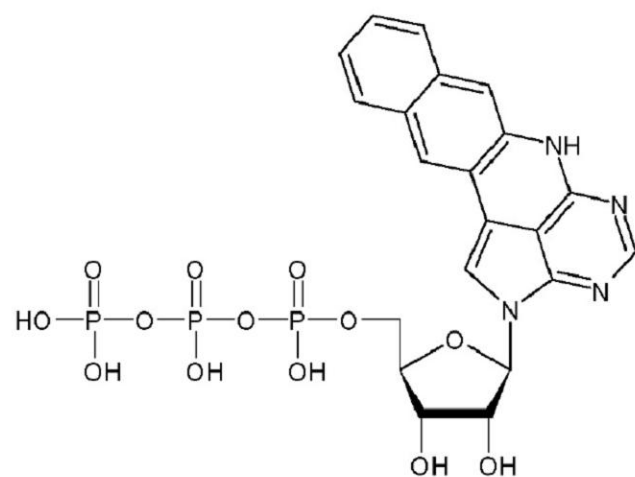
20

である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0074】

一実施態様において、

【化 3 0】



(化合物 17, pATP)

40

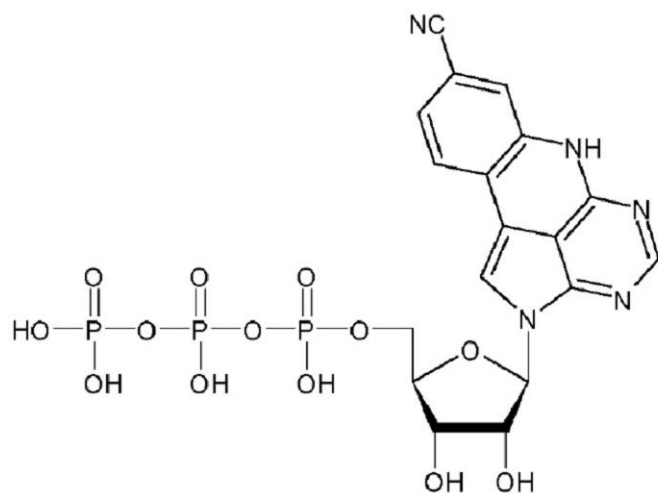
である、式(1)で示される化合物が提供される。

50

【 0 0 7 5 】

一実施態様において、

【 化 3 1 】



(化合物 7, 2CNqATP)

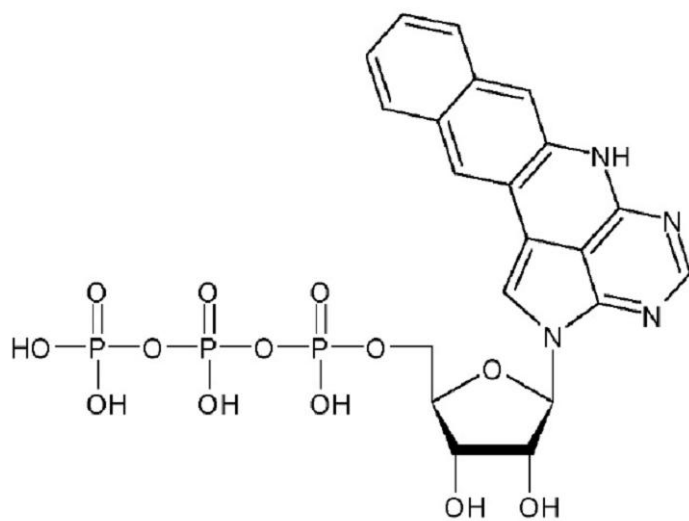
10

である、式(1)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体が提供される。

【 0 0 7 6 】

一実施態様において、

【 化 3 2 】



(化合物 17, pATP)

20

30

である、式(1)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体が提供される。

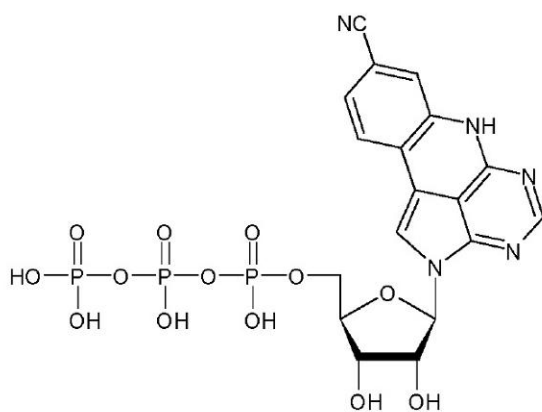
【 0 0 7 7 】

一実施態様において、

40

50

【化 3 3】



(化合物 7, 2CNqATP)

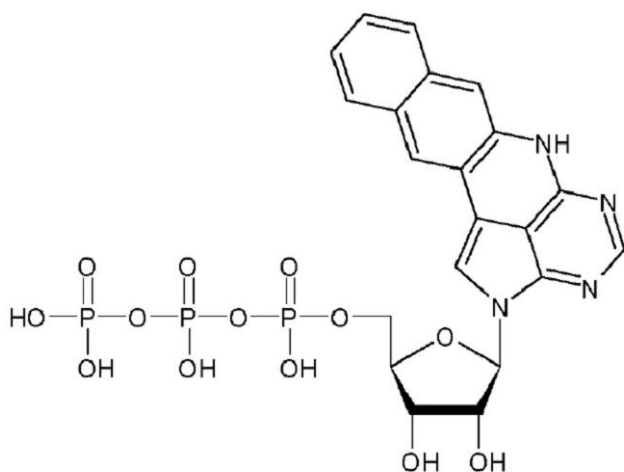
10

である、式(1)で示される化合物の塩が提供される。

【0078】

一実施態様において、

【化 3 4】



(化合物 17, pATP)

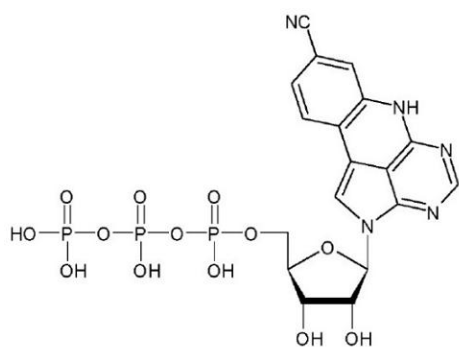
20

である、式(1)で示される化合物の塩が提供される。

【0079】

一実施態様において、

【化 3 5】



(化合物 7, 2CNqATP)

40

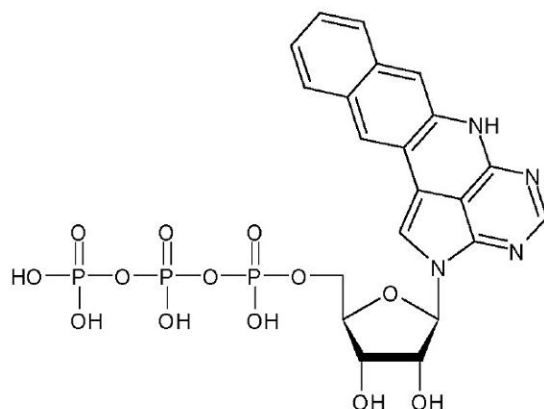
である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0080】

一実施態様において、

50

【化 3 6】



(化合物 17, pATP)

10

である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0081】

本明細書に記載の化合物および塩は、互変異性体(平衡状態で存在する水素原子の移動に起因する構造異性体)の混合物として存在し得る。関連する実施態様には、式(1)で示される化合物またはその塩のすべての互変異性体が含まれる。

【0082】

本明細書に記載の化合物および塩の原子は、その同位体として存在してもよい。実施態様には、原子が一つまたはその同位体で置換され式(1)で示される全ての化合物(例えば、一つまたはそれ以上の炭素原子が ^{11}C または ^{13}C 炭素同位体である式(1)で示される化合物、または一つまたはそれ以上の水素原子が ^2H または ^3H 同位体である式(1)で示される化合物)が含まれる。

20

【0083】

式(1)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体は、例えば、分子のヌクレオシド部分に結合したモノホスフェート基、ジホスフェート基またはトリホスフェート基が、生理学的条件下で除去され得る適当な保護基(例えば、ホスフェート基の酸素原子またはリン原子に結合した基)でマスクされているものである。本明細書に記載のプロセスにおいて使用される場合(例えば、細胞に供給される場合)、式(1)で示される化合物の生理学的に開裂可能な前駆体は、(例えば、代謝により)式(1)で示される化合物に変換され、次に、細胞内プロセス(細胞局在化およびRNA合成など)に参加し得る。

30

【0084】

いくつかの実施態様において、生理学的に開裂可能な前駆体は、式(1) [式中、 R^3 は $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ である] で示される化合物である。

【0085】

いくつかの実施態様において、生理学的に開裂可能な前駆体は、式(1) [式中、 R^3 は $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ である] で示される化合物である。

【0086】

いくつかの実施態様において、生理学的に開裂可能な前駆体は、式(1) [式中、 R^3 は $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OH})-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ である] で示される化合物である。

40

【0087】

式(1)で示される化合物の適当な生理学的に開裂可能な前駆体は、例えば、Pradere, U. et al., Chem. Rev. 2014, 114, 18, 9154-9218 (for example in Figure 3); Wiemer, A. J. et al., Top. Curr. Chem. 2015 (for example in Table 1); 360: 115-160 and/or Wiemer, A. J.; ACS Pharmacol. Transl. Sci. 2020, 3, 4, 613-626における、

ヌクレオシドホスフェートおよび/またはホスホネートプロドラッグを調製するために使用される基のいずれかである。これらの文献の内容は、引用により本明細書に包含される。

50

【0088】

式(1)で示される化合物の適当な塩は、例えば、塩基付加塩である。塩基付加塩は、式(1)で示される化合物を適当な有機塩基または無機塩基と接触させることにより形成される。塩基付加塩は、例えば、窒素塩基のような適当な有機塩基、アンモニアまたはトリエチルアミンのようなトリアルキルアミンを用いて形成することができる。塩基付加塩は、例えば、アルカリ金属または希土類水酸化物、例えば水酸化カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化マグネシウムまたは水酸化マンガンのような適当な無機塩基を用いて形成することもできる。

【0089】

一実施態様において、遊離酸である、式(1)で示される化合物が提供される。

10

【0090】

一実施態様において、塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0091】

一実施態様において、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩またはアンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0092】

一実施態様において、ナトリウム塩、カリウム塩またはアンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0093】

一実施態様において、ナトリウム塩またはアンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

20

【0094】

一実施態様において、ナトリウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0095】

一実施態様において、一カリウム塩、二カリウム塩、三カリウム塩、四カリウム塩、一ナトリウム塩、二ナトリウム塩、三ナトリウム塩、四ナトリウム塩、一アンモニウム塩、二アンモニウム塩、三アンモニウム塩または四アンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0096】

一実施態様において、一ナトリウム塩、二ナトリウム塩、三ナトリウム塩、四ナトリウム塩、一アンモニウム塩、二アンモニウム塩、三アンモニウム塩または四アンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

30

【0097】

一実施態様において、一ナトリウム塩、二ナトリウム塩、三ナトリウム塩または四ナトリウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0098】

一実施態様において、一ナトリウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0099】

一実施態様において、二ナトリウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0100】

一実施態様において、三ナトリウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

40

【0101】

一実施態様において、一アンモニウム塩、二アンモニウム塩、三アンモニウム塩または四アンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0102】

一実施態様において、一アンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0103】

一実施態様において、二アンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

【0104】

一実施態様において、三アンモニウム塩である、式(1)で示される化合物が提供される。

50

【0105】

一実施態様において、実施例に開示される式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩が提供される。

【0106】

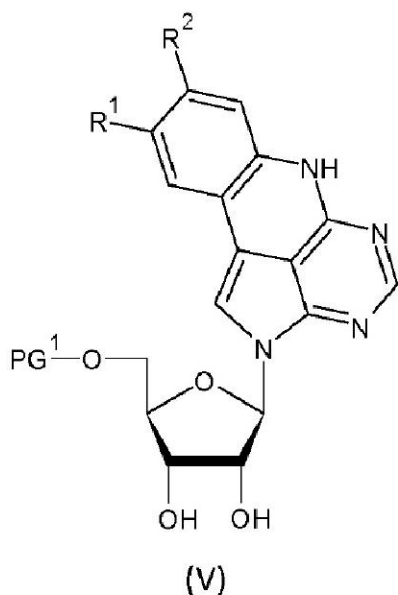
合成プロセス

一実施態様において、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法であって、

i. 式(V)：

【化37】

10



20

[式中、 R^1 はヒドロから選択され、そして、 R^2 はシアノから選択されるか、または R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒になって6-員カルボ芳香環を形成し、そして、

30

PG^1 は、適当な保護基である]で示される化合物またはその塩を提供すること；

ii. 式(II)で示される化合物またはその塩を、その第二級アルコール基の一つを適当な支持体に結合させることによって固定化すること；

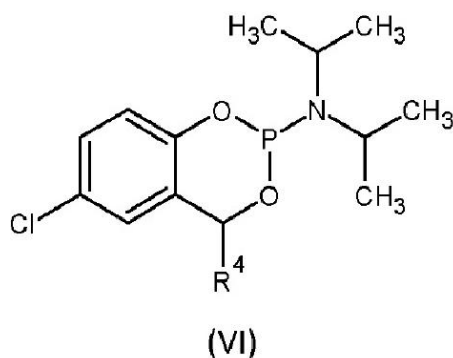
iii. 残りの第二級アルコール基を適当な保護基 PG^2 でキャッピングすること；

iv. 保護基 PG^1 を除去すること；

v. 曝露された第一級アルコール基を、式(VI)：

【化38】

40



[式中、 R^4 は、ヒドロ基および C_{1-3} アルキル基から選択される]

50

で示される化合物と反応させること；

vi. 得られたリン(III)化合物をリン(V)化合物に酸化させること；

任意に、

vii. 得られたリン(V)化合物を、ピロリン酸テトラアルキルアンモニウムと反応させることで、トリホスフェートを生成すること；

viii. 保護基PG²を除去すること；

ix. 得られたホスフェートを支持体から切断することで、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること；および、そして、任意に、

x. 式(I)で示される化合物の遊離酸、生理学的に開裂可能な前駆体または様々な塩を形成すること、
を含む、方法が提供される。

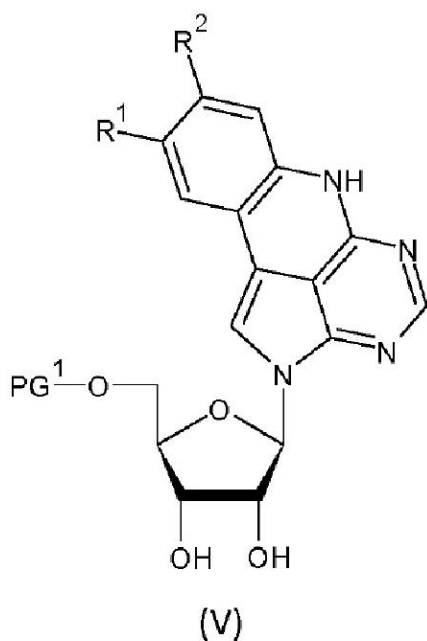
10

【0107】

一実施態様において、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法であって、

i. 式(V)：

【化39】



20

30

[式中、

R¹はヒドロから選択され、そして、

R²はシアノから選択されるか、または

R¹およびR²は、それらが結合している原子と一緒にあって、6-員カルボ芳香環を形成し、そして、PG¹は適当な保護基である]で示される化合物またはその塩を提供すること；

40

ii. 式(II)で示される化合物またはその塩を、その第二級アルコール基の一つを適当な支持体に結合させることによって固定化すること；

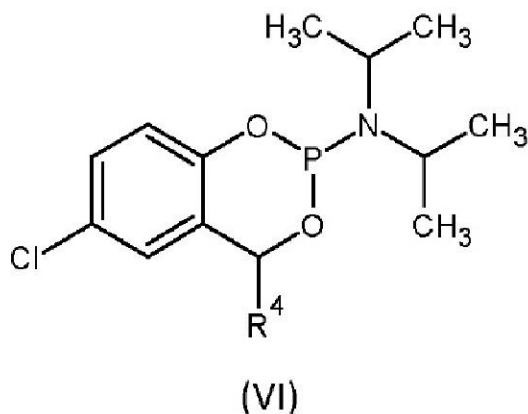
iii. 残りの第二級アルコール基を適当な保護基PG²でキャッピングすること；

iv. 保護基PG¹を除去すること；

v. 曝露された第一級アルコール基を、式(VI)：

50

【化 4 0】



10

【式中、 R^4 は、ヒドロキおよび C_{1-3} アルキル基から選択される】

で示される化合物と反応させること；

vi. 得られたリン(III)化合物をリン(V)化合物に酸化させること；

vii. 得られたリン(V)化合物を、ピロリン酸テトラアルキルアンモニウムと反応させることで、トリホスフェートを生成すること；

viii. 保護基 PG^2 を除去すること；

ix. 得られたホスフェートを支持体から切断することで、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること；そして、任意に

20

xi. 式(I)で示される化合物の遊離酸、生理学的に開裂可能な前駆体または様々な塩を形成すること、

を含む、方法が提供される。

【0108】

保護基(「PG」、例えば PG^1 または PG^2)は、反応中心を一時的に保護するのに適した任意の基であり、例えばヒドロキシル基である。本明細書で開示される反応中心に対して適当な保護基は、例えば、“Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition”, Greene T. W., Wuts P. G. M.; John Wiley & Sons, Inc. 2007, doi: 10.1002/0470053488)(その全ての内容は引用により本明細書に包含される)で確認できる。

30

【0109】

「 C_{1-3} アルキル基」とは、示される炭素数を有する直鎖または分岐の飽和アルキル基である。例示的な C_{1-3} アルキル基としては、メチル、エチル、プロピルおよびイソプロピルがある。

【0110】

上記工程iii)において、キャップされる第二級アルコールは、分子のリボース部分にあるものであってもよい。

【0111】

この全体的なプロセスは、いくつかの理由から、式(I)で示される化合物の有利な調製法である：

40

- 出発保護ヌクレオシド上の第二級アルコール基を事前に保護する必要がない；
- 工程1の後、未反応のヌクレオシドを回収することができ、これは材料の損失を最小にする；
- 固体支持型ヌクレオシドは、分解することなく3ヵ月まで保存できる；
- このルートは自動合成に適している；
- プロセスは頑健で、全体的な再現性が高い；
- クリーンなホスフェート化粗生成物が生成し、精製が容易である。
- 高いホスフェート化収率(通常、ヌクレオシド担持の樹脂から約60%)が得られる。

【0112】

50

いくつかの実施態様において、 R^4 は、ヒドロ基であり得る。

【0113】

いくつかの実施態様において、 R^4 は C_{1-3} アルキル基であってもよい。 R^1 が C_{1-3} アルキル基である場合、ホスホルアミダイト試薬の調製はより容易であり、より高い収率であるが、少なくとも、 R^4 がヒドロ基である上記工程vの場合と同様に機能することが観察されている。

【0114】

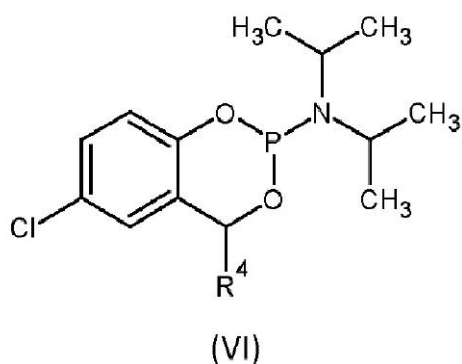
いくつかの実施態様において、 R^4 は、メチルであり得る。

【0115】

一実施態様において、式(VI):

10

【化41】



20

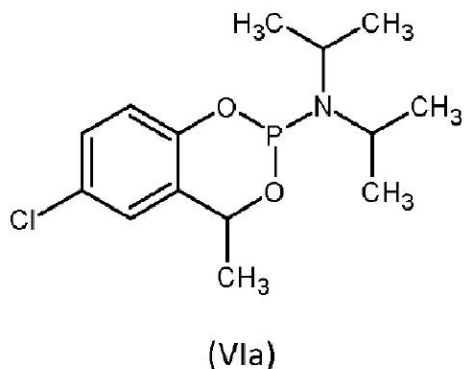
【式中、 R^4 は、 C_{1-3} アルキル基である】

で示される化合物が提供される。

【0116】

一実施態様において、式(VIa):

【化42】



30

で示される化合物が提供される。

40

【0117】

いくつかの実施態様において、支持体は、固体ポリマーであり得る。

【0118】

いくつかの実施態様において、支持体は、制御多孔質ガラス(controlled-porosity glass)およびポリスチレンから選択される固体ポリマーであり得る。

【0119】

いくつかの実施態様において、支持体は、ポリスチレンであり得る。

【0120】

いくつかの実施態様において、支持体は、制御多孔質ガラス(controlled-porosity glass)であり得る。

50

【0121】

いくつかの実施態様において、支持体は第一級アミノ基で官能化されていてもよい。これは、支持体への結合の反応点を形成し得る。

【0122】

いくつかの実施態様において、支持体は、第一級アミノ基で官能化された制御多孔質ガラス(controlled-porosity glass)(例えば、アミノ-SynBase™)であり得る。

【0123】

いくつかの実施態様において、PG¹は、トリチル、ジメトキシトリチルおよびトリメトキシトリチルから選択され得る。

【0124】

いくつかの実施態様において、PG²は、アセチル、ベンゾイル、2,2,2-トリクロロエチルカルボニル、パラメトキシベンジル、メチル、テトラヒドロピラニル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、トリメチルシリル、tert-ブチルジメチルシリルおよびメトキシエチルから選択される。

【0125】

いくつかの実施態様において、PG²はアセチルである。固定化分子が塩基に不安定である場合、これにより、PG²基の除去と樹脂からの切断が一段階で達成され得る効率的な合成が可能になる。

【0126】

いくつかの実施態様において、PG¹はジメトキシトリチルであり得て、PG²はアセチルであり得る。

【0127】

いくつかの実施態様において、工程i)における式(II)で示される化合物の固定化は、主に2'-ヒドロキシ位で起こり得る。

【0128】

固定化が主に2'-ヒドロキシ位で起こる場合、これは全固定化(すなわち、支持体への両二級ヒドロキシル基の全共有結合)の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超または100%であり得る。

【0129】

いくつかの実施態様において、ピロリン酸テトラアルキルアンモニウムは、ピロリン酸テトラブチルアンモニウムであり得る。

【0130】

一実施態様において、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法であって、

i. 式(II)：

10

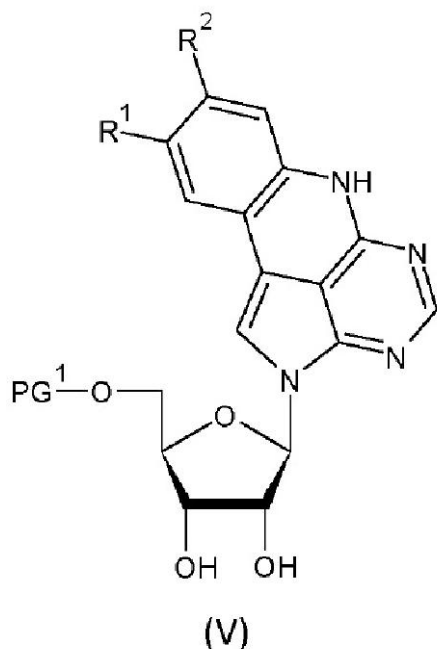
20

30

40

50

【化 4 3】



10

20

[式中、 R^1 はヒドロから選択され、そして、

R^2 はシアノから選択されるか、または

R^1 および R^2 は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成し、そして、 PG^1 は、トリチル、ジメトキシトリチルおよびトリメトキシトリチルから選択される]で示される化合物またはその塩を提供すること；

ii. 式(V)で示される化合物またはその塩を、その第二級アルコール基の一つを制御多孔質ガラス(controlled-porosity glass)支持体に結合させることによって固定化すること；

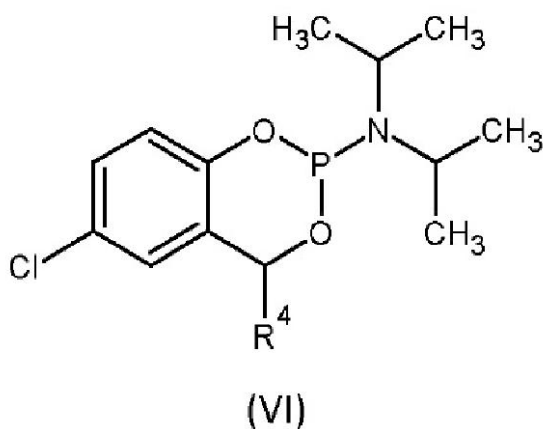
iii. 残りの第二級アルコール基を、アセチル、ベンゾイル、2,2,2-トリクロロエチルカルボニル、パラメトキシベンジル、メチル、テトラヒドロピラニル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、トリメチルシリル、tert-ブチルジメチルシリルおよびメトキシエチルから選択される保護基 PG^2 でキャッピングすること；

30

iv. 保護基 PG^1 を除去すること；

v. 曝露された第一級アルコール基を、式(VI)：

【化 4 4】



40

[式中、 R^4 は、 C_{1-3} アルキル基である]で示される化合物と反応させること；

vi. 得られたリン(III)化合物をリン(V)化合物に酸化させること；

50

任意に、

vii. 得られたリン(V)化合物を、ピロリン酸テトラブチルアンモニウムと反応させることで、トリホスフェートを生成すること；

viii. 保護基PG²を除去すること；

ix. 得られたホスフェートを支持体から切断することで、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること；そして、任意に

x. 式(I)で示される化合物の遊離酸、生理学的に開裂可能な前駆体または様々な塩を形成すること、

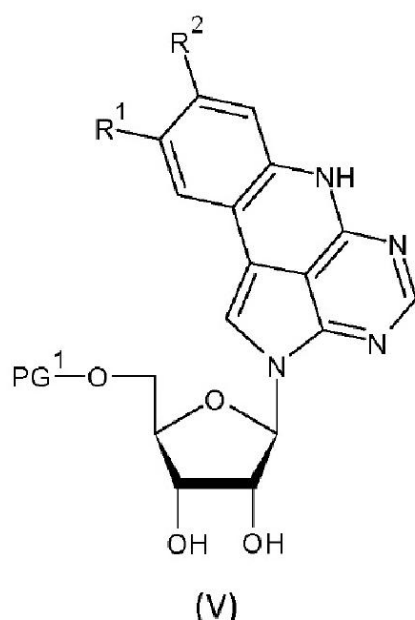
を含む、方法が提供される。

【0131】

一実施態様において、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を調製する方法であって、

i. 式(V)：

【化45】



[式中、

R¹はヒドロから選択され、そして、

R²はシアノから選択されるか、または

R¹およびR²は、それらが結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成し、そして、PG¹はジメトキシトリチルである]で示される化合物またはその塩を提供すること；

ii. 式(II)で示される化合物またはその塩を、その第二級アルコール基の一つを制御多孔質ガラス(controlled-porosity glass)支持体に結合させることによって固定化すること；

iii. いずれかの残りの第二級アルコール基を、アセチルである保護基PG²でキャッピングすること；

iv. 保護基PG¹を除去すること；

v. 曝露された第一級アルコール基を、式(VI)：

10

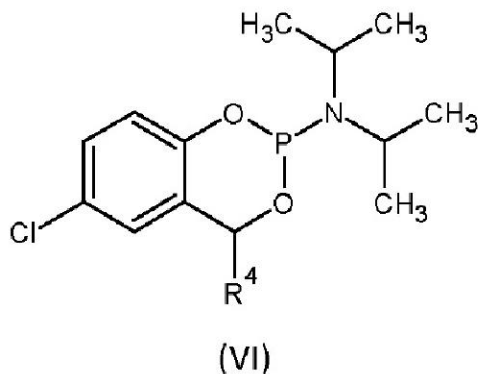
20

30

40

50

【化 4 6】



10

[式中、 R^4 は、メチル基である]で示される化合物と反応させること；

vi. 得られたリン(III)化合物をリン(V)化合物に酸化させること；任意に、

vii. 得られたリン(V)化合物を、ピロリン酸テトラブチルアンモニウムと反応させることで、トリホスフェートを生成すること；

viii. 保護基 PG^2 を除去すること；

ix. 得られたホスフェートを支持体から切断することで、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること；そして、任意に

x. 式(I)で示される化合物の遊離酸、生理学的に開裂可能な前駆体または様々な塩を形成すること、を含む、方法が提供される。

20

【0132】

上記のi)からix)の各工程を実施するための適当な条件および試薬は、当業者に公知であるか、または詳細な説明に記載されている。

【0133】

いくつかの実施態様において、工程ii)における式(II)で示される化合物またはその塩の固定化は、カップリング剤(例えば、支持体が第一級アミノ基で官能化されている場合、ジメチルアミノピリジンによって触媒される無水コハク酸)によって達成され得る。

【0134】

いくつかの実施形態において、曝露された第一級アルコール基と式(III)で示される化合物との反応は、アクティベーター(例えば、BTTアクティベーターまたはアクティベーター4(登録商標))を使用して達成され得る。

30

【0135】

いくつかの実施態様において、工程vi)においてリン(III)化合物を、水性ピリジンおよびヨウ素を用いてリン(V)化合物に酸化させ得る。

【0136】

いくつかの実施態様において、支持体からのトリホスフェートの切断は、塩基性条件を用いて(例えば、AMAで処理することによって)達成され得る。塩基に不安定な支持体があり、 PG^2 として塩基に不安定な保護基が選択されている場合、これらの条件を使用すると、脱保護と切断を同時に行うことができる。

40

【0137】

RNA合成組成物

式(I)で示される化合物は、他の天然および合成RNA構成要素とともにRNA合成の基質として使用され得る。

【0138】

一実施態様において、式(I)で示される化合物および天然リボヌクレオチドを含む、標識RNA分子を調製するための組成物が提供される。

【0139】

「天然リボヌクレオチド」は、5'ヒドロキシ位に結合したホスフェート基(例えば、本

50

明細書のR³の定義によって記載されるものなどのモノホスフェート基、ジホスフェート基またはトリホスフェート基)を有する適切な天然リボヌクレオシドを含む。いくつかの実施態様において、「天然リボヌクレオチド」とは、天然リボヌクレオシドトリホスフェートを意味する。

【0140】

いくつかの実施態様において、天然リボヌクレオチド(例えば、天然リボヌクレオシドトリホスフェート)は、シチジン5'-トリホスフェート、ウリジン5'-トリホスフェート、アデノシン5'-トリホスフェートおよびグアニジン5'-トリホスフェートから選択され得る。天然リボヌクレオチドの組成物(例えば、天然ヌクレオシドトリホスフェートの組成物)は、様々な量のこれらの構成要素の組み合わせを、標的RNA分子を構築するのに十分な量(例えば、NTPミックスで提供されるような)で含み得る。

10

【0141】

標識RNAの合成

一実施態様において、標識RNA分子(例えば、2CNqAまたはpA標識RNA分子)を調製するための、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

【0142】

標識RNA分子は、少なくとも一つの修飾蛍光残基(例えば、修飾残基が2CNqAまたはpA残基であるような式(I)で示される化合物から誘導される残基)を含むが、それ以外の点では天然のRNA分子と類似している(すなわち、2CNqAまたはpA残基と同じ位置に未修飾アデノシン残基を有するもの)。

20

【0143】

いくつかの実施態様において、標識RNA分子は、2CNqAまたはpA標識mRNA(メッセンジャーRNA)分子であり得る。

【0144】

一実施態様において、2CNqAで標識されたRNA分子を調製するための、式(I) [式中、R¹ヒドロから選択され、R²はシアノから選択される] で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

【0145】

一実施態様において、pAで標識されたRNA分子を調製するための、式(I) [式中、R¹およびR²は、それらと結合している原子と一緒に、6-員カルボ芳香環を形成する] で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

30

【0146】

一実施態様において、標識RNA分子を酵素的に調製するための、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

【0147】

一実施態様において、インビトロで標識RNA分子を酵素的に調製するための、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

【0148】

一実施態様において、インビトロで標識RNA分子を調製する方法であって、
i. DNA鋳型を、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩および天然リボヌクレオチドを含む組成物に与えること；
ii. 得られた混合物をRNAポリメラーゼで処理すること；任意に、
iii. 顕微鏡を用いて標識RNA分子をモニタリングすること；そして、任意に、
iv. 標識RNA分子を単離すること、
を含む、方法が提供される。

40

【0149】

一実施態様において、インビトロで標識RNA分子を調製する方法であって、
v. DNA鋳型を、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩および天然リボヌクレオチドを含む組成物に与えること；

50

- vi. 得られた混合物をRNAポリメラーゼで処理すること；
 - vii. 顕微鏡を用いて標識RNA分子をモニタリングすること；および、
 - viii. 標識RNA分子を単離すること、
- を含む、方法が提供される。

【0150】

いくつかの実施態様において、顕微鏡は、共焦点レーザ走査蛍光顕微鏡であってもよい。

【0151】

いくつかの実施態様において、インビトロで標識RNA分子を調製する方法は、転写緩衝液(例えば、5X転写緩衝液)、マグネシウム塩(例えば、マグネシウム(II)クロライド)および／またはRNase阻害剤(例えば、Ribolock)の存在下で実施され得る。

10

【0152】

一実施態様において、標識RNA分子を調製するためのキットであって、

- i. 式(I)で示される化合物；
- ii. 天然リボヌクレオチドの組成物；
- iii. RNAポリメラーゼ；任意に
- iv. DNA鋳型；そして、任意に
- v. 使用のための使用説明書、

を含む、キットが提供される。

20

【0153】

一実施態様において、内在性標識RNA分子を調製するための、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

【0154】

一実施態様において、内在性標識RNA分子を調製するための、生細胞における式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

【0155】

一実施態様において、インセルロ(in-cellulo)で標識RNA分子を調製するための、式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩の使用が提供される。

【0156】

一実施態様において、インセルロ(in-cellulo)で標識RNA分子を調製する方法であって、

- i. 式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を、真核生物または原核細胞に与えること；
- ii. 前記生物が前記化合物を自発的にインターナライズするようにすること；
- iii. 前記生物が標識RNA分子を調製するようにすること；任意に、
- iv. 顕微鏡を用いて前記標識RNA分子モニタリングすること；そして、任意に、
- v. 前記標識RNA分子を単離すること、

を含む、方法が提供される。

30

【0157】

一実施態様において、インセルロ(in-cellulo)で標識RNA分子を調製する方法であって、

- vi. 式(I)で示される化合物、その生理学的に開裂可能な前駆体または塩を、真核生物または原核細胞に与えること；
- vii. 前記生物が前記化合物を自発的にインターナライズするようにすること；
- viii. 前記生物が標識RNA分子を調製するようにすること；
- ix. 顕微鏡を用いて標識RNA分子をモニタリングすること；そして
- x. 前記標識RNA分子を単離すること、

を含む、方法が提供される。

40

【0158】

いくつかの実施態様において、真核生物細胞は、C.エレガンス(c.elegans)またはゼ

50

ブラフィッシュに含まれているものであってもよい。

【0159】

いくつかの実施態様において、標識RNA分子は、非修飾アデノシン残基の代わりに、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超または100%の修飾残基(例えば、修飾残基が2CNqAまたはpA残基であるような式(I)で示される化合物から誘導されるもの)を含み得る。

【0160】

いくつかの実施態様において、標識RNA分子は、未修飾アデノシン残基の代わりに、10%~20%、10%~30%、10%~40%、20~50%、30~60%、40~70%、50%~80%または50%~90%の修飾残基(例えば、修飾残基が2CNqAまたはpA残基であるような式(I)で示される化合物から誘導されるもの)を含み得る。

10

【0161】

いくつかの実施態様において、標識RNA分子は、mRNAおよびリボソームRNAから選択され得る。

【0162】

一実施態様において、本質的に詳細な説明に記載されているように、インセルロ(in-cellulo)で標識RNA分子を調製する方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0163】

【図1】式(I)で示される化合物の一般的な調製スキーム。

20

【0164】

【図2】ヌクレオシドの調製。

【0165】

【図3】細胞毒性評価。(A)alarBlueアッセイを用いて代謝活性の低下として測定した細胞生存率(B)乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)漏出アッセイにより測定した細胞膜の完全性評価。Huh-7細胞を指定用量の化合物で24時間処理した。エラーバーは3回の独立した実験の標準偏差を表す。

【0166】

【図4】完全な細胞培養液中の2.5 μ Mの2CNqATPまたはpATPに(A)37°Cで20時間、(B)37°Cで1.5時間、または(C)4°Cで1.5時間曝露した生きたHuh-7細胞の共焦点蛍光顕微鏡画像。

30

【0167】

【図5】指定時間後に2.5 μ MのpATPまたは2CNqATPに曝露した後の単一生細胞内の2CNqATPまたはpATPの平均蛍光強度(MFI)の測定。細胞を洗浄し、トリプシン処理し、405nmで励起したフローサイトメトリーを用いて分析した。A)未処理細胞、ならびに2CNqATPおよびpATPで処理した細胞について測定した細胞試料のMFI分布。B)曝露時間に対してプロットした単一生細胞における2CNqATPの平均MFI。C)曝露時間に対してプロットした単一生細胞におけるpATPの平均MFI。線は視線を誘導するものである。

【0168】

【図6】様々な濃度のA)2CNqATPまたはB)pATPに24時間曝露したHuh-7細胞培養物から採取した細胞溶解物における正規化蛍光強度として測定した細胞取り込みの用量反応。バンドパスフィルターを用いて2CNqATPを355nmで励起し、460nmで発光を検出した。pATPの場合、380nmでの励起および410nmでの発光用のバンドパスフィルターを使用した。エラーバーは標準偏差を表す。

40

【0169】

【図7】増加する濃度のATP(黒色の実線)またはアデノシン(灰色の点線)の存在下で2.5 μ Mの2CNqATP(上のグラフ)またはpATP(下のグラフ)に曝露した後の生きているHuh-7細胞の正規化平均蛍光強度。細胞を4時間曝露し、洗浄し、励起に405nmレーザーを用いるフローサイトメトリーによって分析した。線は視線を誘導するものであり；エラーバーは3回の独立した実験の標準偏差を表す。線は視線を誘導するものである。

50

【0170】

【図8】2.5 μ Mの(A)2CNqATPまたは(B)pATPで24時間処理したHuh-7細胞から細胞抽出し精製したRNAの蛍光発光スペクトルは、細胞機構が活性であり、特定のヌクレオチドアナログを内在的に産生したRNAに取り込むことができることを示している。黒色の実線は細胞から抽出した標識RNAを表し；灰色の点線は以下の対照を表す：(薄い黒色の破線)RNA精製前に非処理細胞の細胞溶解液に添加した化合物；最終カラム精製前にRNAに添加した化合物(濃い灰色の点線)；RNA精製カラムに直接添加した化合物(薄い灰色の破線)。スペクトルは、溶液中の全RNA濃度を反映し、対応する260nmでの吸収に対応して正規化する。

【0171】

【図9】2CNqATPで処理したHuh-7細胞から抽出したRNAと、2CNqATPおよびインビトロ2CNqA-修飾RNA鎖とのスペクトル比較。A)2.5 μ Mの2CNqATPに24時間曝露させたHuh-7細胞から抽出したRNAの正規化励起スペクトル(黒色の太線)であって、2CNqATP(灰色の点線)およびssRNA(黒色の細線)またはハイブリダイズした相補鎖を含むdsRNA(灰色の細線)の25:mer(5'-CGA CAA AAU CAA [2CNqA]AU GCG UGA UUG G -3')に取り込まれた2CNqAの吸収スペクトルと重ねたもの。各スペクトルはピーク最大値に正規化している。励起スペクトルを記録するために、発光波長を443nmに固定した。B)2.5 μ M 2CNqATP(黒色の太線)、2CNqATP(灰色の破線)、25:mer ssRNA(Aと同様)(黒色の細線)およびdsRNA(灰色の細線)に組み込まれた2CNqAに曝露した細胞から抽出したRNAの正規化発光スペクトル)。

【0172】

【図10】2CNqAMPを使用した細胞毒性評価。(A)alamarBlueアッセイを用いて代謝活性の低下として測定した細胞生存率(B)乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)漏出アッセイによって測定した細胞膜の完全性評価。Huh-7細胞を、指定用量の化合物で24時間処理した。エラーバーは、3回の露光の標準偏差を表す。

【0173】

【図11】完全細胞培養培地中の2.5 μ Mの2CNqAMPまたはDPBS(対照として)に(A)37°Cで24h(B)37°Cで1.5h(C)4°Cで1.5h曝露した生きているHuh-7細胞の共焦点蛍光顕微鏡画像。

【0174】

【図12】指定時間後に2.5 μ Mの2CNqAMPに曝露した後、単一生細胞内の2CNqAMPの平均蛍光強度(MFI)の測定。細胞を洗浄し、トリプシン処理し、405nmで励起したフローサイトメトリーを用いて分析した。単一生細胞における2CNqAMPの平均MFIを曝露時間に対してプロットした。二つの独立した実験が示されている(空白/充填された正方形)。エラーバーは、3回の曝露の標準偏差を表す。

【0175】

【図13】2.5 μ M 2CNqAMPで37°Cで24時間処理したHuh-7細胞から細胞抽出および精製したRNAのスペクトル読み取りでは、細胞機構が活性化しており、内因的に産生されたRNAに特定のヌクレオチドアナログを取り込むことができることを示している。(A)2CNqAMPで処理したHuh-7細胞から抽出したRNAと、2CNqATP、2CNqATPで処置したHuh-7細胞からのRNA、およびインビトロ2CNqA修飾RNA鎖とのスペクトル比較。2.5 μ Mの2CNqAMPに24時間曝露させたHuh-7細胞から抽出したRNAの励起スペクトル(黒色の実線)であって、2CNqATP(黒色の破線)、ssRNA(灰色の破線)またはハイブリダイズした相補鎖を含むdsRNA(灰色の破線)の25:mer(5'-CGA CAA AAU CAA [2CNqA]AU GCG UGA UUG G -3')に取り込まれた2CNqAの吸収スペクトルと重ねたもの、および2CNqATPで処理したHuh-7細胞からのRNAの励起スペクトル(灰色の実線)。各スペクトルはピーク最大値に正規化されている。励起スペクトルを記録するために、発光波長を443nmに固定した。(B)2.5 μ Mの2CNqAMPで24時間処理したHuh-7細胞から細胞抽出および精製したRNAの蛍光発光スペクトル。黒色の実線は細胞抽出された標識RNAを表し；灰色の実線は、RNA精製前に化合物を未処理細胞の細胞溶解物に

添加する対照を表す。スペクトルは、260nmでの対応する吸収に正規化しており、溶液中の総RNA濃度を反映している。明るい灰色の破線は、比較のために超純水(milliQ)の発光スペクトルを示すものである。

【0176】

詳細な説明

式(I)で示される化合物は、図1に示す合成スキームおよび以下に記載する方法に従って調製することができる。特に断らない限り、試薬は市販されているものであり、さらに精製することなく使用した。トリホスフェート化に使用した以下の試薬はSigma-Aldrichから購入した：AKTA用DCAデブロック、AKTA用CAP A、AKTA用CAP B1およびB2、BTアクトベーター。¹H(500MHz)および¹³C(126MHz)NMRスペクトルは、Cryo Probeを装備したBruker 500 MHzシステムで300Kで記録した。³¹P(202MHz)NMRスペクトルは、Bruker 500MHzシステムを用いて300Kで記録した。すべてのシフトは重水素化溶媒(DMSO-d₆、CDCl₃またはD₂O)に対するppmで記録されている。

10

【0177】

実施例1:修飾ヌクレオシドホスフェート-2CNqATPの合成

2-(5-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-β-D-リボフラノシル)-2,6-ジヒドロ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-8-カルボニトリル1

化合物1を文献(Wypijewska del Nogal et al., Nucleic Acids Research 48, 7640-7652 [2020])に従って調製した。分析データは報告されているものと一致した。

20

【0178】

CPG固体支持体3

LinkTechからのAmino-SynBaseTM CPG 500/110(LCAA)2(Nu.1397-C025、1g、0.08mmol)を、DCE(8mL、0.08mmol)中のトリクロロ酢酸3%中で18時間振盪することにより活性化した。次に、活性化支持体を濾別し、9:1のトリエチルアミン:ジイソプロピルエチルアミン(20mL)、ジクロロメタン(20mL)およびジエチルエーテル(20mL)で洗浄した。活性化支持体を使用前に真空中で2日間乾燥させた。その後、支持体(1g、0.08mmol)、無水コハク酸(0.345g、3.44mmol)およびN,N-ジメチルピリジン-4-アミン(0.070g、0.57mmol)をN²下で乾燥ピリジン(3mL)に懸濁した。反応混合物をRTで4h穏やかに振盪した。4時間後、溶媒を濾別し、支持体を、ピリジン(20mL)、ジクロロメタン(20mL)、ジエチルエーテル(20mL)で連続的に洗浄し、風乾させた。支持体のごく一部がニンヒドリン試験で陰性であったことから、完全なサクシニル化が証明された。サクシニル化CPG3はその後、室温で数ヶ月間保存することができた。

30

【0179】

CPG-支持型2-(5-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-P-D-リボフラノシル)-2,6-ジヒドロ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-8-カルボニトリル4

PTFEフィルターを備えた10mLシリンジに、サクシニル化支持体3(0.400g、82gmol/g、0.03mmol)、DMAP(8mg、0.07mmol)、DIC(203μl、1.31mmol)、ヌクレオシド1(0.022g、0.03mmol)およびトリエチルアミン(14μl、0.10mmol)をピリジン(3mL)に懸濁した。混合物をRTで18h穏やかに振盪した。18h後、シリンジをパージし、支持体をピリジン(5ml)、ジクロロメタン(5mL)およびジエチルエーテルで洗浄した。その後、同じシリンジ中で、DMAP(8mg、0.07mmol)、DIC(203μl、1.31mmol)、トリエチルアミン(14μl、0.10mmol)および2,3,4,5,6-ペンタクロロフェノール(0.87g、0.33mmol)を支持体に添加し、ピリジン(3mL)に懸濁した。混合物をRTで4時間穏やかに振盪した後、ピペリジン溶液(2mL、DMF中20%-支持体上の未反応カルボン酸のキャッピング用)を1分間添加し(ピペリジンがヌクレオシドとのエステル結合を切断するため、暴露時間が長くなると負荷が減少する)、次に、DMF(3x5mL)、ジクロロメタン(5mL)およびジエチルエーテル(5mL)で素早く洗い流した。最後に、樹脂をアルゴン雰囲気下、CAP A + CAP Bの混合物(50/50v/v)中で2時間振盪し、次に、DMF(5ml)、ジクロロメタン(5ml)、ジエチルエーテル(5mL)で洗浄し、アルゴンで乾燥させた(最終負荷：16μmol/g-秤量した量の支持体から切断されたDMT溶液の光学密度

40

50

を読み取ることによって決定した-498nmで $\varepsilon = 70000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)。最終負荷は、カップリング前に同じ条件で1との2回目のカップリングを行うことによって増加できる(2回目のカップリング後の典型的負荷は $20 \sim 25 \mu\text{mol/g}$)。反応混合物を濃縮し、残渣を水とジエチルエーテルで複数回洗浄すると、未反応のヌクレオシド1をほぼ85%回収できる。

【0180】

6-クロロ-N,N-ジイソプロピル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニン-2-アミン5

化合物5を文献(Ducho, C. et al., J. Med. Chem. 50, 1335-1346 [2007])に従って調製した。簡単に述べると、5-クロロサリチル酸を -20°C でLAH(0.5equiv.)で還元させ、得られた5-クロロサリチルアルコールを、アルゴン下、 -20°C で PCl_3 (1.2equiv.)およびトリエチルアミン(2.3 equiv.)を用いて2,6-ジクロロ-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニンに環化させた。低温およびトリエチルアミンを塩基として使用することは、所望の生成物が、より安定な2,5-ジクロロ-3H-ベンゾ[d][1,2]オキサホスホール2-オキシドへと迅速かつ定量的にアルブゾフ転位することを回避する上で決定的であった。その後、粗製2,6-ジクロロ-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニンを室温でジイソプロピルアミン(3equiv.)で2時間処理した。次に、混合物をアルゴン下で濾過し、濃縮乾固させ、ヘプタン中の20%ジイソプロピルアミンに入れた。小さなシリカゲルプラグで素早く濾過して、所望の化合物5を無色のオイルとして得て、 -20°C で時間をかけて結晶化させた。化合物5に対してより徹底的なカラムクロマトグラフィーを試みた場合、定量的なアルブゾフ転位につながるだろう。

10

20

【0181】

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.23 (dd, J = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.06 (dd, J = 14.7, 5.2 Hz, 1H), 4.89 (dd, J = 19.6, 14.8 Hz, 1H), 3.53 - 3.63 (m, 2H), 1.15 - 1.19 (dd, J = 8.0, 7.0 Hz, 12H). ^{31}P NMR (202 MHz, DMSO- d_6) δ = 136.00 (s, 1P).

【0182】

ビス(テトラブチルアンモニウム)二水素ジホスフェート6

化合物6を文献(Warnecke, S. & Meier, C., J. Org. Chem. 74, 3024-3030 [2009])に従って調製した。

【0183】

^1H NMR (500 MHz, D $_2$ O) δ 3.04 - 3.13 (m, 16H), 1.53 (bs, 16H), 1.24 (h, J =7.3, 16H), 0.83 (t, J =7.4, 24H). ^{31}P NMR (202 MHz, D $_2$ O) δ = -10.78 (s, 2P).

30

【0184】

((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェート(2CNqATP)7

反応は、CPG結合2CNaAヌクレオシド4(400mg、0.0064mmol)を装填したPTFEフィルター付き5mLシリンジで、アルゴン雰囲気下、振盪しながら行った。手順は以下のように行った：

- 5'-DMTの除去：濾液が無色になるまで支持体をDCAデブロックで洗浄し、次にACN(5×5mL)で洗浄した。
- カップリング：N,N-ジイソプロピル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニン-2-アミン5(345mg、1.36mmol)を4.8mL-ACNに溶解し、支持体と部分的に反応させた(それぞれ反応時間60秒-60秒-90秒の3回等しいカップリング)。各カップリングに、BTTアクティベーター(2.4mL)も添加した。その後、支持体をACN(3×5mL)で洗浄した。
- 酸化：ピリジン/水/ロジン(9/1/12.7v/v/w、5mL)を45秒間、続いてACN洗浄(3×5mL)を行い、アルゴン流中で支持体を乾燥させた。
- トリホスフェート化：ビス(テトラブチルアンモニウム)二水素ジホスフェート6(0.5M、5mL)をそれぞれ15分間と18時間、2回注入した。その後、支持体を、DMF(5mL)

40

50

、水(3×5 mL)、ACN(5 mL)で洗浄し、次に、アルゴン流中で乾燥させた。

e. 切断および精製：トリホスフェートの切断は、AMA(23% aq.NH₄OHと40% aq.メチルアミンの50/50 v/v混合物、5 mL)を用いて室温で2時間で行った。2時間後、AMA濾液を丸底フラスコ中でパージし、支持体を23% aq.NH₄OH溶液で3回すすいだ。混合物を凍結乾燥させた後、HPLC(Waters Acquity HSS T3カラム、2.1×50 mm、0.4 mL/分、水80:20 EtOH中2~99% 50 mM NH₄OAc)による精製を行い、2CNqATP(2.3 mg、UV吸光度から決定した55%)を淡黄色の固体(アンモニウム塩)として得た。

【0185】

HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₁₈H₁₉N₅O₁₃P₃ [M+H]⁺: 606.0192, found: 606.0170.

【0186】

((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェートは、カップリング工程(上記のb)を6-クロロ-N,N-ジイソプロピル-4-メチル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニン-2-アミン8(上記の化合物(IIIa))のような修飾ホスホルアミダイトを用いてカップリングするような少し変更した経路によって調製することもできる。この試薬は、より容易に調製できることが判明されている：本明細書の条件下で化合物5を調製した場合の収率が約3~10%であるのに対し、化合物8は60%で得られる。

【0187】

実施例1a:修飾ヌクレオシドホスフェート-2CNqAMPの合成

((2R,3S,4R,5R)-5-(8-シアノ-2,3,5,6-テトラアザアセアントリレン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチルニ水素ホスフェート7a

反応は、上記で調製したCPG結合2CNaヌクレオシド4(400 mg、0.0064 mmol)を装填したPTFEフィルター付き5 mL-シリンジ中で、アルゴン雰囲気下、振盪しながら行った。手順は以下のように行った：

a. 5'-DMTの除去：濾液が無色になるまで支持体をDCAデブロックで洗浄し、次に、ACN(5×5 mL)で洗浄した。

b. カップリング：N,N-ジイソプロピル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニン-2-アミン5(345 mg、1.36 mmol)を4.8 mL-ACNに溶解し、支持体と部分的に反応させた(それぞれ反応時間60秒-60秒-90秒の3回等しいカップリング)。各カップリングに、BTtアクティベーター(2.4 mL)も添加した。その後、支持体をACN(3×5 mL)で洗浄した。

c. 酸化：ピリジン/水/ロジン(9/1/12.7 v/v/w、5 mL)を45秒間、続いてACN洗浄(3×5 mL)を行い、アルゴン流中で支持体を乾燥させた。

d. 切断および精製：トリホスフェートの切断は、AMA(23% aq.NH₄OHおよび40% aq.メチルアミンの50/50 v/v混合物、5 mL)を用いて室温で2時間で行った。2時間後、AMA濾液を丸底フラスコ中でパージし、支持体を23% aq.NH₄OH溶液で3回洗浄した。混合物を凍結乾燥させた後、HPLC(Waters Acquity HSS T3カラム、2.1×50 mm、0.4 mL/分、水80:20 EtOH中2~99% 50 mM NH₄OAc)により精製を行い、2CNqAMP(2.3 mg、UV吸光度から決定した55%)を淡黄色の固体(アンモニウム塩)として得た。

【0188】

6-クロロ-N,N-ジイソプロピル-4-メチル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニン-2-アミン8

5-クロロ-2-ヒドロキシベンズアルデヒドを-20℃でメチルマグネシウムブロマイド(2.5 equiv.)と反応させ、得られた4-クロロ-2-(1-ヒドロキシエチル)フェノールをアルゴン下-20℃でPCl₃(1.2 equiv.)およびトリエチルアミン(2.3 equiv.)を用いて2,6-ジクロロ-4-メチル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニンに環化させた。その後、粗製の

2,6-ジクロロ-4-メチル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニンを室温でジイソプロピルアミン(3 equiv.)で2時間処理した。次に、混合物をアルゴン下で濾過し、濃縮乾

10

20

30

40

50

燥させ、ヘプタン中の20%ジイソプロピルアミンに入れた。小さなシリカゲルプラグで素早く濾過して、所望の化合物8を無色のオイルとして得た。

【0189】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 6.96 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.19 - 5.26 (m, 1H), 5.16 (dq, J = 10.4, 6.6 Hz, 1H), 3.57 (tdt, J = 13.6, 10.6, 6.8 Hz, 2H), 1.63 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.55 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 1.16 - 1.19 (m, 24H). ³¹P NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ = 137.63 (s, 1P), 127.90 (s, 1P).

【0190】

実施例2:修飾ヌクレオシドホスフェート-pATPの合成

(2R,3R,4R,5R)-2-((ベンゾイルオキシ)メチル)-5-(4-クロロ-5-ヨード-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)テトラヒドロフラン-3,4-ジイルジベンゾエート9

4-クロロ-5-ヨード-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン(20g、71.6mmol)をMeCN(480 mL)に溶解し、トリメチルシリル(E)-N-(トリメチルシリル)アセトイミデート(19.5 mL、78.7mmol)を滴下した。混合物をRTで20分間攪拌した。(2S,3R,4R,5R)-2-アセトキシ-5-((ベンゾイルオキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3,4-ジイルジベンゾエート(46.9g、93.0mmol)を一度添加し、次いで、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート(15.2 mL、78.7mmol)を滴下した。反応混合物を80℃で2時間攪拌した。反応混合物を室温まで放冷し、EtOAc(200 mL)で希釈した。有機相をaq.satd.NaHCO₃(100 mL)および塩水(100 mL)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、セライトに吸収させ、フラッシュカラムクロマトグラフィー(Hept:EtOAc 90:10 から70:30、KP-Sil 330g)により精製して、3(31.0g、60%)を白色の固体として得た。

【0191】

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (s, 1H), 8.09 - 8.13 (m, 2H), 7.99 (d, J = 8.3, 1.2 Hz, 2H), 7.92 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.49 - 7.64 (m, 6H), 7.39 (dt, J = 22.8, 7.8, 7.8 Hz, 4H), 6.67 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 6.09 - 6.17 (m, 2H), 4.90 (dd, J = 12.3, 3.1 Hz, 1H), 4.80 (q, J = 3.5, 3.5, 3.4 Hz, 1H), 4.68 (dd, J = 12.3, 3.6 Hz, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 166.2, 165.5, 165.2, 153.3, 151.4, 151.1, 133.94, 133.91, 133.7, 132.1, 129.98, 129.96, 129.8, 129.4, 128.9, 128.8, 128.71, 128.66, 128.5, 117.9, 86.9, 80.8, 74.3, 71.6, 63.6, 53.8. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₃₂H₂₃ClIN₃O₇ [M + H]⁺: 724.0347, found: 724.0384.

【0192】

(2R,3R,4R,5R)-2-((ベンゾイルオキシ)メチル)-5-(4-クロロ-5-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)テトラヒドロフラン-3,4-ジイルジベンゾエート10

化合物9(31g、42.8mmol)およびテトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)(0.99g、0.86mmol)をTHF(360 mL)に溶解し、それにトリエチルアミン(59 mL、428mmol)を添加した。反応混合物を-78℃に冷却し、5分間攪拌した後、4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン(9.3 mL、64.2mmol)を混合物に滴下した。次に、反応混合物をRTまで温め、連続的に80℃まで36時間加熱した。反応混合物をRTまで放冷し、減圧下で濃縮し、セライトに吸収させ、フラッシュクロマトグラフィー(KP-Sil、330g、Hept:EtOAc、95:5から70:30)により精製し、所望の化合物(10、23.5g、76%)を白色の固体として得た。

【0193】

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.58 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.98 (ddd, J = 11.8, 8.3, 1.2 Hz, 4H), 7.83 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 2H), 7.59 - 7.69 (m, 3H), 7.50 (dt, J = 9.8, 8.1, 8.1 Hz, 4H), 7.39 - 7.43 (m, 2H), 6.76 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 6.35 - 6.39 (m, 1H), 6.14 - 6.18 (m, 1H), 4.79 - 4.89 (m, 2

H), 4.69 (dd, $J = 12.1, 5.0$ Hz, 1H), 1.28 (s, 12H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 165.4, 164.7, 164.4, 152.8, 152.5, 150.9, 138.7, 133.94, 133.87, 133.5, 129.4, 129.3, 129.23, 129.17, 128.75, 128.72, 128.71, 128.6, 128.2, 119.8, 86.7, 83.6, 79.3, 73.3, 70.8, 63.5, 54.9, 24.5. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{BClN}_3\text{O}_9$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 724.2233, found: 724.2245.

【0194】

tert-ブチル(3-ヨードナフタレン-2-イル)カルバメート11

磁気攪拌棒備えたオープン乾燥した3つ口1L丸底フラスコに、トルエン(320ml)に溶解した3-ヨード-2-ナフトエ酸(24.8g、83.2mmol)を装入し、トリエチルアミン(14mL、100.0mmol)を添加した。フラスコに還流コンデンサーおよび添加漏斗を取り付けた。反応物を還流まで加熱し、トルエン(80mL)中のジフェニルホスホラジレート(21.6ml、100.0mmol)を合計60分間かけて反応混合物に滴下した。添加速度は2~5秒ごとに1滴に保ち、添加の5分後に泡が観察された。添加漏斗をさらにトルエン(20mL)ですすいだ。還流で15分間攪拌した後、泡の形成は止まった。さらに15分後、添加漏斗にトルエン(60mL)中の2-メチルプロパン-2-オール(40mL、416.0mmol)を装填し、これを慎重に(注意: 生成された中間体は非常に反応性であり、取り扱いに注意しなければならない)還流で反応混合物に滴下した。反応物を還流でさらに3h攪拌した。反応混合物を室温まで放冷し、分液漏斗に移し、材料を水(3×500mL)、aq. satd. NaHCO_3 (3×250mL)、塩水(1×500mL)で順次洗浄した。得られた橙色の溶液を MgSO_4 で乾燥させ、濾過し、減圧下濃縮して、5(20.0g、65%)をベージュ色の固体として得た。

【0195】

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.63 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.86 (dd, $J = 14.9, 8.1$ Hz, 2H), 7.46 - 7.54 (m, 2H), 1.48 (s, 9H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 153.4, 138.1, 136.1, 132.7, 132.2, 127.3, 126.8, 126.4, 126.1, 123.5, 96.7, 79.2, 28.1. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{INO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 370.0304, found: 370.0295.

【0196】

(2R,3R,4R,5R)-2-((ベンゾイルオキシ)メチル)-5-(5-(3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ナフタレン-2-イル)-4クロロ-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)テトラヒドロフラン-3,4-ジイルジベンゾエート12

化合物10(22g、30.4mmol)、tert-ブチル(3-ヨードナフタレン-2-イル)カルバメート11(10.7g、29.0mmol)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロリド(1.02g、1.45mmol)および炭酸カリウム(10.0g、72.4mmol)をDME(300ml)に溶解し、反応物を80℃で24時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、セライトに吸収させ、フラッシュ-クロマトグラフィー(KP-Sil 330g、Hept:EtOAc 90:10から40:60)により精製し、6(18.2g、75%)を黄色の固体として得た。

【0197】

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.64 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.88 - 7.94 (m, 5H), 7.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 7.63 - 7.68 (m, 2H), 7.57 (t, $J = 7.3, 7.3$ Hz, 1H), 7.4 - 7.53 (m, 8H), 6.87 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 6.39 (t, $J = 5.1, 5.1$ Hz, 1H), 6.23 (t, $J = 5.9, 5.9$ Hz, 1H), 4.91 (q, $J = 5.1, 5.0, 5.0$ Hz, 1H), 4.82 (dd, $J = 12.1, 3.5$ Hz, 1H), 4.71 (dd, $J = 12.1, 5.0$ Hz, 1H), 1.27 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 165.4, 164.6, 164.5, 153.2, 151.5, 151.3, 150.5, 135.6, 134.0, 133.9, 133.5, 133.1, 130.6, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.17, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 127.4, 127.0, 126.5, 125.5, 125.1, 116.6, 112.9, 86.6, 78.8, 73.8, 31.2, 27.9, 22.1, 13.9. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $\text{C}_{47}\text{H}_{39}\text{ClN}_4\text{O}_9$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 839.2484, found: 839.2485.

【0198】

(2R,3R,4R,5R)-2-((ベンゾイルオキシ)メチル)-5-(5-(3-((tert-ブトキシカルボニル)アミノ)ナフタレン-2-イル)-4クロロ-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-7-イル)テトラヒドロフラン-3,4-ジイルジベンゾエート13

化合物10(22g、30.4mmol)、tert-ブチル(3-ヨードナフタレン-2-イル)カルバメート11(10.7g、29.0mmol)、ビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロリド(1.02g、1.45mmol)および炭酸カリウム(10.0g、72.4mmol)をDME(300ml)に溶解し、反応物を80℃で24時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、セライトで吸収させ、フラッシュクロマトグラフィー(KP-Sil 330g、Hept:EtOAc 90:10から40:60)により精製し、6(18.2g、75%)を黄色の固体として得た。

10

【0199】

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.64 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.99 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.88 - 7.94 (m, 5H), 7.84 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.63 - 7.68 (m, 2H), 7.57 (t, J = 7.3, 7.3 Hz, 1H), 7.4 - 7.53 (m, 8H), 6.87 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 6.39 (t, J = 5.1, 5.1 Hz, 1H), 6.23 (t, J = 5.9, 5.9 Hz, 1H), 4.91 (q, J = 5.1, 5.0, 5.0 Hz, 1H), 4.82 (dd, J = 12.1, 3.5 Hz, 1H), 4.71 (dd, J = 12.1, 5.0 Hz, 1H), 1.27 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 165.4, 164.6, 164.5, 153.2, 151.5, 151.3, 150.5, 135.6, 134.0, 133.9, 133.5, 133.1, 130.6, 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.17, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 127.4, 127.0, 126.5, 125.5, 125.1, 116.6, 112.9, 86.6, 78.8, 73.8, 31.2, 27.9, 22.1, 13.9. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₄₇H₃₉ClN₄O₉ [M + H]⁺: 839.2484, found: 839.2485.

20

【0200】

(2R,3R,4S,5R)-2-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3,4-ジオール14

化合物6(7g、8.3mmol)をDMF(18ml)に溶解し、これに1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン(7.5mL、16.7mmol)および2,3,4,6,7,8,9,10-オクタヒドロピリミド[1,2-a]アゼピン(2.5mL、16.7mmol)を添加した。反応混合物を75℃で17時間攪拌した。反応混合物をRTまで放冷し、その後、トルエン(5×15mL)で共蒸発させた。粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー(KP-Sil 100g、DCM:MeOH 100:0から95:5)により精製し、Boc-および脱Boc保護された生成物(7aおよび7b、3.1g)からなる生成物の混合物を得た。得られた材料は、さらに精製することなく次の工程でを使用した。化合物7aおよび7bの混合物(2.85g)をMeCN(32mL)に溶解し、メタノール酸ナトリウム(3.9ml、21.3mmol)を添加した。反応混合物をRTで1時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、セライトに吸収させ、フラッシュクロマトグラフィー(KP-Sil 25g、DCM:MeOH 100:0から90:10)により精製し、8(二段階にわたって0.55g、17%)を白色の固体として得た。

30

【0201】

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.90 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.80 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.33 - 7.43 (m, 2H), 5.95 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.40 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 4.55 (q, J = 6.3, 6.3, 6.3 Hz, 1H), 4.15 (q, J = 4.6, 4.6, 4.6 Hz, 1H), 3.97 (q, J = 3.8, 3.8, 3.8 Hz, 1H), 3.68 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.55 - 3.61 (m, 1H), 2.54 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 155.2, 153.6, 147.2, 137.4, 132.6, 129.6, 129.2, 128.5, 127.2, 126.6, 126.3, 124.7, 122.4, 120.3, 113.4, 113.3, 110.4, 106.7, 88.5, 85.6, 74.1, 70.9, 61.9. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₂₁H₁₈N₄O₄ [M + H]⁺: 391.1406, found: 391.1405.

40

【0202】

(2R,3R,4S,5R)-2-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-5

50

-((ビス(4メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3,4-ジオール15

(2R,3R,4S,5R)-2-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-5-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロフラン-3,4-ジオール(150mg、0.38mmol)をピリジン(25mL)で3回共蒸発させた後、ピリジン(3mL)を添加し、フラスコを氷浴(0℃)に置いた。次に、DMTr-Cl(143mg、0.42mmol)を一度添加し、反応混合物を5分間攪拌した後、RTに戻させ、18時間攪拌した。その後、メタノール(3mL)を添加し、反応混合物をEtOAc(50mL)で抽出し、水(20mL)および塩水(10mL)で洗浄した。有機層をMgSO₄で乾燥させ、濃縮乾燥させ、セライトに吸収させ、フラッシュクロマトグラフィー(KP-Sil 25g、使用前にDCM中2%Et₃Nでフラッシュし、DCM中EtOAc:0~50%)により精製し、化合物9(60mg、23%)を淡褐色の固体として得た。

10

【0203】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.90 (bs, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.71 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 9.9 Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 7.33 - 7.39 (m, 2H), 7.28 (t, J = 8.3 Hz, 6H), 7.20 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.84 (dd, J = 8.9, 6.9 Hz, 4H), 6.03 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 5.57 (bs, 1H), 4.67 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.39 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 4.07 (q, J = 4.4 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.22 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 158.1, 158.0, 155.5, 153.6, 147.6, 144.8, 137.6, 135.7, 135.6, 132.7, 129.8, 129.7, 129.5, 127.9, 127.8, 127.1, 126.7, 126.6, 126.4, 124.7, 122.2, 120.3, 113.3, 113.2, 112.8, 110.7, 106.5, 88.4, 85.6, 82.8, 74.2, 70.6, 63.7, 55.0, 54.9. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₄₂H₃₆N₄O₆ [M+H]⁺: 693.2713, found: 693.2729.

20

【0204】

CPG-支持型(2R,3R,4S,5R)-2-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-5-((ビス(4メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3,4-ジオール16

PTFEフィルター付き10mLシリンジ中で、サクシニル化支持体3(400mg、82μmol/g、0.03mmol)、DMAP(0.008g、0.07mmol)、DIC(203μl、1.31mmol)およびテトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-5-(ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)テトラヒドロフラン-3,4-ジオール(0.023g、0.03mmol)およびトリエチルアミン(14μl、0.10mmol)をピリジン(5mL)に懸濁した。混合物をRTで18時間穏やかに振盪した。18時間後、シリンジをパージし、支持体をピリジン(5mL)、ジクロロメタン(5mL)およびジエチルエーテルで洗浄した。次に、2回目のカップリングを1回目と全く同じ条件で行うことで、固体支持体への負荷量を増加させた。その後、同じシリンジで、DMAP(0.008g、0.07mmol)、DIC(203μl、1.31mmol)、トリエチルアミン(14μl、0.10mmol)および2,3,4,5,6-ペンタクロロフェノール(0.087g、0.33mmol)を支持体に加え、ピリジン(4mL)に懸濁した。ピペリジン(4mL、DMF中20%-支持体上の未反応カルボン酸のキャッピング用)の溶液を1分間添加する前に、混合物をRTで4時間穏やかに振盪し(ピペリジンがヌクレオシドとのエステル結合を切断するため、暴露時間が長くなると負荷が減少する)、DMF(3×5mL)、ジクロロメタン(5mL)およびジエチルエーテル(5mL)で素早く洗浄した。最後に、樹脂をアルゴン雰囲気下、CAP A + CAP B混合物(50/50 v/v)中で2時間振盪し、DMF(5mL)、ジクロロメタン(5mL)、ジエチルエーテル(5mL)で洗浄し、アルゴン乾燥を行った(最終負荷量: 18μmol/g-秤量した支持体から切断したDMT溶液の光学密度を読み取ることによって決定-ε = 70000M⁻¹.cm⁻¹ (498nmで))。

30

40

【0205】

((2R,3S,4R,5R)-5-(2,3,5,6-テトラアザシクロペンタ[de]テトラセン-2(6H)-イル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)メチル水素トリホスフェート(pATP)17

反応は、CPG結合pAヌクレオシド(400mg、0.007mmol)を装填したPTFEフィルタ

50

ー付き5 mLシリンジで、アルゴン雰囲気下、振盪しながら行った。手順は以下のように行った：

a. 5'-DMTの除去：濾液が無色になるまで支持体をDCAデブロックで洗浄し、次に、ACN(5×5 mL)で洗浄した。

b. カップリング：N,N-ジイソプロピル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニン-2-アミン5(345 mg、1.36 mmol)を4.8 mLのACNに溶解し、支持体と部分的に反応させた(反応時間60秒-60秒-90秒でそれぞれ3回等しくカップリング)。各カップリングに、BTアクティベーター(2.4 mL)も添加した。その後、支持体をACN(3×5 mL)で洗浄した。

c. 酸化：ピリジン/水/ロジン(9/1/12.7 v/v/w、5 mL)を45秒間、続いてACN洗浄(3×5 mL)を行い、アルゴン流中で支持体を乾燥させた。

d. トリホスフェート化：ビス(テトラブチルアンモニウム)二水素ジホスフェート6(0.5 M、5 mL)をそれぞれ15分間と18時間、2回注入した。その後、支持体をDMF(5 mL)、水(3×5 mL)、ACN(5 mL)で洗浄し、次に、アルゴン流中で乾燥させた。

e. 切断および精製：トリホスフェートの切断は、室温でAMA(23% aq. NH₄OHおよび40% aq. メチルアミンの50/50 v/v混合物、5 mL)を用いて2時間で行った。2時間後、AMA濾液を丸底フラスコ中でパージし、支持体を23% aq. NH₄OH溶液で3回すすいだ。混合物を凍結乾燥した後、HPLC(Waters Acquity HSS T3カラム、2.1×50 mm、0.4 mL/分、80:20 EtOH中2~99% 50 mMのNH₄OAc)による精製を行い、pATP(2.7 mg、UV吸光度から決定した60%)を淡黄色の固体(アンモニウム塩)として得た。

【0206】

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ -22.88 (t, J=17.7 Hz, 1P), -11.14 (d, J=19.7 Hz, 1P), -10.21 (bs, 1P). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for C₂₁H₂₁N₄O₁₃P₃ [M+H]⁺: 631.0396, found: 631.0416.

【0207】

pATP17は、カップリング工程(上記b)において、6-クロロ-N,N-ジイソプロピル-4-メチル-4H-ベンゾ[d][1,3,2]ジオキサホスフィニン-2-アミン8(上記化合物(IIIa))のような修飾ホスホルアミダイトを用いて実施するといったわずかに変更した経路によっても製造することができる。

【0208】

実施例3:物理学的特徴付け

吸収スペクトルは、Cary 4000スペクトロメーター(Agilent Technologies)で記録した。発光スペクトルは、SPEX Fluorolog 3分光蛍光光度計(Jobin Yvon Horiba)で測定した。600 nm min⁻¹のスキャンレートで記録された3つの連続した発光スペクトルを収集し、平均化した。DPBS中の化合物7および17のスペクトルは、355 nmで励起し、360 nmから695 nmまで記録した。退色を避けるため、励起側のモノクロメータースリットを0.8 nmに、発光側のスリットを2.5 nmに設定した。

【0209】

モル吸光度のスペクトル(E単位: M⁻¹cm⁻¹)は、方程式1:

【数1】

$$\varepsilon(\lambda) = A(\lambda) * \frac{\varepsilon_{260}}{A_{260}} \quad [1]$$

〔式中、Aは測定された吸収であり、A₂₆₀およびε₂₆₀は、それぞれ260 nmでの吸収またはモル吸光度である〕を用いて計算した。

【0210】

蛍光量子収率は、0.5 MのH₂SO₄中のキニンスルフェートの量子収率(Φ_F=0.5464²、参照と称する)に対する相対値として求め、方程式2:

10

20

30

40

50

【数 2】

$$\Phi_{F,S} = \frac{I_s/A_s}{I_r/A_r} \frac{n_s^2}{n_r^2} * \Phi_{F,r} \quad [2]$$

〔式中、Iは積分蛍光強度であり、Aは励起波長における蛍光体の測定吸収であり、nは溶媒(それぞれH₂OまたはH₂SO₄; Eaton D. F.; Pure Appl. Chem. 60, 1107-1114 [1988])の屈折率である〕を用いて計算した。

【0211】

化合物7および17のスペクトル性質は、細胞研究のための実験準備を決定するために、生理的条件下で測定し、哺乳類細胞内のイオン強度と塩組成を模倣するために、吸収スペクトルと発光スペクトルをDPBS中で記録した。発光スペクトルを記録するため、励起波長を355nmに設定し、測定は室温(約22℃)で行った。モル吸光度(ε)は、Beer-Lambertの法則を用いて計算した。

【0212】

一般的な核酸塩基が吸収する吸収(<300nm)とは別に、化合物7および17は350~400nmの範囲で吸収し、2CNqATPは352nmで吸収極大を示す(表2)。一方、pATP吸収バンドには、それぞれ370nmおよび386nmに2つのピークがあり、後者の方がわずかに強度が高い。発光ピークは、2CNqATPおよびpATPについてそれぞれ463nmおよび420nmに中心がある。FBAは「蛍光塩基アナログ」意味する。

表1：化合物7および17のDPBS中、室温における分光学的パラメータ

【表1】

化合物	ε ₂₆₀ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ _F (%)	λ _{abs, max} (nm)	λ _{em, max} (nm)	ε _{max, FBA} × Φ _F (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ε _{405, FBA} × Φ _F (M ⁻¹ cm ⁻¹)
2CNqATP	14600 ²⁶	47	352	463	4900	504
pATP	22300 ²⁷	49	386	420	6000	909

【0213】

実施例4:細胞培養

Huh-7ヒト肝細胞株を使用した。Huh-7は、上皮様形態を持つ高分化ヒト肝細胞株である。⁴³ 細胞を、4.5g/lのグルコースを含むダルベッコ改変イーグル培地(フェノールレッドを添加したDMEM GlutaMax、Gibco)に、10%ウシ胎児血清(FBS、Gibco、原産国Brazil)、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウムを添加した培地(以下、CCM、完全細胞培養培地と称する)中で、5% CO₂下、37℃で培養した。亜培養は、接着細胞をカルシウムまたはマグネシウムを含まないDPBSで2回洗浄し、0.25%トリプシンエチレンジアミンテトラ酢酸1×(トリプシン-EDTA、Gibco、フェノールレッド付き)で剥離した。播種は、トリプシン中和後に細胞をカウントし、所望の細胞数に希釈し(表2)、その後実験前に5% CO₂、37℃で24時間インキュベートした。

表2：Huh-7細胞の播種に使用したリザーバー、細胞数および作業量

10

20

30

40

50

【表 2】

容器	ウェルあたりの細胞数	ウェルあたりの作業量
96ウェルプレート	18000	100 μ L
48ウェルプレート	45000	250 μ L
12ウェルプレート	106	1mL
ガラス底付き4室ディッシュ (Greiner Bio-One)	45000	250 μ L

10

【0214】

実施例5:細胞毒性

化合物7および17の細胞毒性を調べるため、Huh-7細胞を上記のように96ウェルプレートに播種した。処理に先立ち、Huh-7細胞から調整培地を除去し、化合物(CCMで希釈したDPBS中のストック溶液)を様々な曝露時間で細胞に添加した。未曝露の細胞も同様に処理し、化合物の代わりに同量のDPBSをCCMに添加した。2種類の細胞毒性アッセイ(代謝活性を測定するalarBlueと細胞膜の完全性を測定するLDH漏出)を、それぞれ各試料の細胞と培養液を用いて並行して行った。処理は3連で行い、実験は2回繰り返した。

20

【0215】

化合物7または17に24時間曝露した後、コンディショニングメEDIUMを細胞から除去し、LDH漏出アッセイ(下記参照)に使用した。新しく調製したalarBlue細胞生存率試薬(Invitrogen、CCMで1:10に希釈)を添加し、次いで、37℃、5%CO₂で3時間インキュベートした。得られたレゾルフィン蛍光は、Optima Fluostarプレートリーダー(BMG Labtech)を用いてEx:544nm/Em:590nmで読み取った。ジメチルスルホキシド5%およびCCM単独(すなわち化合物7および17 0 μ M)を、それぞれ細胞死の陽性対照と陰性対照として使用した。

30

【0216】

乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)漏出アッセイ:放出されたLDHを調べるために、CyQUANT LDH細胞毒性アッセイキット(Invitrogen)を使用した。反応ミックスおよび酵素対照(LDH、純粋酵素)は、製造業者の使用説明書に従って調製した。最大LDH放出量は、無血清培地中の溶解緩衝液の1:10希釈液で細胞を37℃、5%CO₂で30分間処理することにより決定した。

【0217】

結果:alarBlueアッセイは、細胞の代謝活性を報告し、それゆえ、細胞生存率について情報を提供するものである。LDH漏出アッセイは、細胞膜の完全性を報告し、細胞毒性(膜損傷)を補完的な読み取りを構成するものである。図3は、2CNqATPおよびpATPは、試験した2つの最高濃度10 μ Mで最大20%の細胞死を誘導したことを示している(図3A)。より低用量での細胞生存率の比較では、2CNqATPはpATPよりもわずかに毒性が高いことが示唆している。放出されたLDHのレベルは、すべての曝露条件で約10%であり、未処理の対照細胞で得られた値と同等であったことから、細胞の完全性が保持されていることが示された。この結果に基づき、細胞取り込み実験を2.5 μ Mの濃度で行ったところ、信頼性の高い細胞内蛍光シグナルとインセルロ(in-cellulo)RNA取り込みが得られ、24時間曝露後の細胞生存率への影響は低かった。

40

【0218】

生存性に関するさらなる観察として、ライブセルイメージング中に、形態学的変化または細胞死の他の兆候(血管表面からの剥離など)はなかった。このことは、生細胞内の化合

50

物を追跡するために使用される励起光が、試験された条件下で細胞に害を与えないことを示している。

【0219】

実施例6：蛍光顕微鏡を用いた細胞取り込みのモニタリング

化合物7および17の細胞取り込みスクリーニングは、以下の方法で行った。

【0220】

細胞溶解液での定量：化合物7および17の取り込みの用量反応実験では、曝露された細胞の全細胞溶解液を集め、溶解緩衝液をバックグラウンドとして、Optima Blue Fluostarプレートリーダー(BMG Labtech)で測定した。2CNqATPは、355nm(± 20 nm)フィルターを用いて励起し、発光は460nm(± 12 nm)を中心とするバンドパスフィルターで収集した。pATPは380nm(± 5 nm)フィルターで励起し、発光は410nm(± 5 nm)を中心とするバンドパスフィルターで収集した。溶解緩衝液の蛍光はバックグラウンドとして差し引き、三回の蛍光強度を平均にした。蛍光強度は化合物の最高添加濃度(10 μ M)で正規化した。

10

【0221】

共焦点レーザ走査蛍光顕微鏡：画像は、Nikon C2plusスキャナー、2つの平行なガリウムヒ素リン化物(GaAsP)検出器およびApo 60x Oil λ S DIC N2対物レンズを備えたNikon eclipse Ti顕微鏡を用いて撮影した。蛍光ヌクレオシドトリホスフェートを励起するために405nmのレーザーラインを使用し、発光は407~607nmで収集した。化合物の光退色を避けつつシグナルを最適化するため、レーザ出力を2%、検出器ゲインを4%とした。ライブセル-イメージングのために、Huh-7細胞をガラス底の4コンパートメントディッシュ(CELLview ディッシュes、Greiner Bio-One)に上記のように播種した。イメージング中、ディッシュは37°C、5%CO₂に維持したステージトッピンキューベーションチャンバー(OKO lab)に置いておいた。

20

【0222】

タイムラプス撮影：化合物7および17の経時的な取り込みを画像化するために、NISソフトウェアのタイムラプスセットアップを使用した。ディッシュのコンパートメントごとに1つの視野を選び、そこから最初の2時間は15分ごとに、その後18時間にわたって1時間ごとに画像をキャプチャーした(すなわち、合計20時間)。曝露時間は、あらかじめ温めた(37°C)CCMに2.5 μ MのFBA-TPを含むCCMを細胞に添加することから、曝露時間が始まった。対照細胞用の新鮮なCCMは、化合物溶液の代わりに等容量のDPBSを含んでいた。

30

【0223】

結果：化合物7および17の細胞取り込みを調べるため、CCM中でHuh-7細胞に添加し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて取り込みを時間の関数としてモニターした(図4)。CCMだけに暴露した対照細胞も同じ顕微鏡設定で撮像し、細胞の自家蛍光レベルをプローブする参照として記録した。20時間の連続連続的に取り込みの後、化合物の蓄積と局在に明らかな違いが観察された。

【0224】

2CNqATP(化合物7)は、一見、細胞質ゾルと細胞核に均一に分布している。個々の核の内側に明るい斑点があることは、核小体にも蓄積していることをさらに示す。対照的にpATPは細胞質ゾルに蓄積するが、細胞核には蓄積しない。さらに、細胞質内の分布は均一ではなく、小胞体やゴルジ体の一部である可能性のある、核に近い細胞内構造物に優先的に局在しているように見える。

40

【0225】

Huh-7細胞を4°Cに保った場合、化合物の取り込みは観察されなかったことから、修飾トリホスフェートは、細胞膜を通過する受動的拡散ではなく、エネルギー依存的なメカニズムで細胞に進入することが示された。

【0226】

実施例7：フローサイトメトリーによる取り込み速度のモニター

50

フローサイトメトリー実験では、上記のように細胞を48ウェルプレートに播種した。取り込みの速度論実験のために、CCM中の $2.5\mu\text{M}$ の化合物7または17の溶液を添加した。対照試料は、FBA-TPの代わりに等容量のDPBSを含むCCMとした。すべての処理は3回行った。実験は、実験終了時にすべての試料を同時に採取できるように設定した。したがって、FBA-TP溶液は異なる時点で添加した。実験終了時、細胞をDPBSで2回洗浄し、その後0.25%トリプシン-EDTAを添加した細胞を回収した。トリプシンは、2%FBSを加えたDPBSを添加することで中和させ、試料はハイスループット読み取り用の96 U底ウェルプレートに移した。

【0227】

測定は通常、BD LSRFortessaフローサイトメーターとBDハイスループットサンプラー(HTS)を用いて行った。システムはソフトウェアBD FACSDivaに接続させた。試料は405nmのレーザーで励起し、発光は450nm($\pm 20\text{nm}$)を中心とするバンドパスフィルターを通過させた。取り込み速度実験は2回繰り返した。モノホスフェート化合物については、CellStream Acquisitionソフトウェアに接続したハイスループットサンプラー(HTS)付きLuminex CellStreamフローサイトメーターを使用した。励起波長は405nmで、発光は456/51nmのバンドパスフィルターを通過させた。

【0228】

結果：細胞は化合物7および17に5分から4時間の範囲で設定された時間暴露した。フローサイトメトリー解析の前に、細胞を洗浄し、トリプシン処理をして、潜在的な細胞外化合物7および17を除去した。各時点と処理条件について、個々の細胞の細胞内蛍光強度を記録した(図5A)。強度ヒストグラムは、2CNqATPに比べpATPの方が有意に遅いものの、両化合物について細胞内蛍光の連続的な増加を示している。取り込みの速度論的トレース(図5B、C)から、2CNqATP蛍光は5分後にすでに初期($t=0$)レベルを大幅に超えており、その後、取り込みは急速に増加し、曝露時間2時間後にプラトーに達することが明らかになった(図5B)。pATP取り込みは、最初の15分間はラグ相を示し、その後3時間にわたってほぼ一定の割合でインターナライズした(図5C)。pATP取り込みは、4時間の実験時間枠内では飽和に達しなかった。この所見は、化合物7および17の取り込み速度の違いを明らかに示している。

【0229】

細胞内FBA-TP取り込みの濃度依存性を調べるため、ある選択した時点(24時間)で用量反応実験を行った。曝露終了後、細胞を洗浄し、溶解した。インターナライズしたFBAを反映する溶解液中の化合物の蛍光を、プレートリーダーを用いて測定した。pATPおよび2CNqATPでは、添加化合物の濃度が高くなるにつれて、溶解液中の蛍光発光の増加が観察された(図6)。化合物7および17は、全く異なる取り込み特性を示した。2CNqATPの細胞取り込みは、わずかな濃度上昇で劇的に増加し、 $2.5\mu\text{M}$ のFBA-TPを細胞に添加すると、取り込み飽和を示す最大値にすでに達した。対照的に、0~ $2.5\mu\text{M}$ のpATP発光の増加は非常に小さく、2CNqATPの4%に過ぎないが、FBA-TP濃度を2倍にすると約7倍に増加する。 $10\mu\text{M}$ のFBA-TPを添加すると、 $2.5\mu\text{M}$ の化合物を添加した場合に比べて、蛍光は約25倍に増加する。

【0230】

実施例8：標準的なヌクレオシドトリホスフェートとヌクレオシドとの取り込み競争

2CNqATPおよびpATPの取り込みは、天然アデノシントリホスフェート(ATP)またはアデノシン(いずれもSigma-Aldrichから購入)と比較した。読み取りは、天然ATPまたはアデノシンの濃度を増加させながら共投与した後、フローサイトメトリーによって生細胞で、またはマイクロプレートリーダーを使って細胞溶解液で検出される化合物の蛍光に基づいている。

【0231】

細胞を96ウェルプレートに播種した。ATPまたはアデノシン処理液は、図7に示す濃度になるようにCCMで段階希釈して調製した。2CNqATPまたはpATPを $2.5\mu\text{M}$ の濃度で添加した。細胞を 37°C 、5% CO_2 で4時間インキュベートした。細胞形態を光学顕微

10

20

30

40

50

鏡でチェックした。

【0232】

フローサイトメトリーでは、処理した細胞をDPBSで3回洗浄し、0.25%トリプシン-EDTAで剥離し、次に、CCMで中和した。試料を96 Uウェルプレートに移し、BD LSRFortessaフローサイトメーターでハイスループット読み取りを行った。試料を405nmのレーザで励起し、発光は450nm(±20nm)を中心とするバンドパスフィルターを通過した。

【0233】

溶解液を読み取るために、細胞を5×passive lysis buffer(Promega)で室温(約22℃)で1時間ロッキングして溶解した。Optima Blue Fluostarプレートリーダー(BMG Labtech)で蛍光を記録した。2CNqATPは355nm(±20nm)で励起し、発光は460nm(±12nm)を中心とするバンドパスフィルターを用いて検出した。pATPは励起波長を380nm(±5nm)、発光波長を410nm(±5nm)とした。二重試料の平均発光を平均し、競合物質(ATPまたはアデノシン)無添加の細胞の蛍光強度に対して正規化した。

【0234】

結果:結果を図7に示す。化合物の細胞(またはライセート)の蛍光は、競合物質としてのATPまたはアデノシンの(超化学量論的)添加の増加に伴って減少するが、応答は異なっている。2CNqATPは、ATPおよびアデノシンの両方と競合し、低濃度ではATPに対してより強力な競合効果を示す。pATPの取り込みもATPやアデノシンと競合するが、その効果はかなり弱い。

【0235】

この結果は、この化合物が、部分的には、通常のATPやアデノシンと取り込み経路を共有していることを示唆している。

【0236】

実施例9:RNAへの細胞組み込み

RNA抽出:細胞は上記のように12ウェルプレートに播種した。処理液は、化合物7および17をCCMで2.5 μMまたは5 μMの濃度に希釈することによって調製した。培養上清を細胞から除去し、処理液を添加した。対照細胞にはCCMのみを添加した。細胞を37℃、5%CO₂で24時間インキュベートした。RNAの抽出と精製には、QIAGEN RNeasy Mini Kitを用い、メーカーのプロトコールに従った。簡単に説明すると、細胞をDPBSで洗浄し、溶解し、20ゲージの針(外径0.9mm)に12回通してホモジナイズし、等容量のエタノールを添加した。得られた溶液をRNeasyスピンカラムに移し、遠心分離した。次に、結合緩衝液をカラムの上に加え、その後、再度遠心分離した。カラムに結合したRNAを洗浄緩衝液で5回洗浄し、それぞれの添加の間に遠心分離工程を入れた。抽出されたRNAを溶出させるため、付属のRNaseを含まない水30 μLをカラムに添加し、遠心分離した。この工程を2回繰り返す、抽出RNAの収量を増加させた。

【0237】

3つの対照試料を調製して、抽出手順に対するFBA-TPの干渉の可能性、およびFBA-TPとRNAとの間の非共有結合を試験した。1)FBA-TPをキットのライセート緩衝液に2.5 μMの濃度になるように添加し、ホモジナイズ工程から出発して同様に処理した。2)未暴露細胞を播種し、上記のように溶解し、その後FBA-TPをライセートに直接添加し、最終濃度を2.5 μMとした。3)未暴露細胞からあらかじめ抽出したRNAにFBA-TPを添加したものを含ませた。未暴露細胞から抽出したRNAの濃度と純度をNanoDrop 2000分光光度計(Thermo Scientific)を用いて測定し、溶液中の最終濃度が2.5 μMになるようにFBA-TPを添加した。すべての対照試料をRNeasyスピンカラムに適用し、上述の精製プロトコールに従い、化合物曝露細胞試料と同様に処理した。

【0238】

細胞RNAの吸収と発光の読み取り:抽出して精製したRNA試料と対照の吸収スペクトルを、Cary 4000 Readout(Agilent Technologies)を用いて200nm~600nmで記録した。発光スペクトルは、SPEX Fluorolog 3分光蛍光光度計(Jobin Yvon Hori

10

20

30

40

50

ba)で測定した。2CNqAは350nmで励起し、pAは370nmで励起した。励起と発光のバンドパスはそれぞれ2nmと3nmであった。励起スペクトルの発光波長はnmに設定した。

【0239】

結果：細胞内在性RNAへの化合物の取り込みは、市販のRNA抽出精製キットを用いて、曝露細胞からRNAを採取することによって試験した。対照試料を調製することで、(精製RNAとの受動的相互作用による)非取り込み化合物による読み取りの妨害を排除した。

【0240】

精製後、抽出した細胞内RNAの発光スペクトルと吸収スペクトルを記録した(図8)。化合物の発光スペクトルを、対応する260nmの吸収値に正規化することで、RNA濃度のばらつきを補正した。すべての対照試料は非常に低い発光を示し、これは、化合物7および17とRNAとの非共有結合的相互作用、あるいはRNA精製カラム材料への結合がほとんどないことを示している。さらに、この精製法がRNAと遊離トリホスフェートを効果的に分離することを示している。

【0241】

pATPに曝露した細胞のRNA試料の発光は、対照と同レベルであり、明瞭なピークを示さなかった(図8、右グラフ)。2CNqATPに曝露した細胞のRNA試料は、350nmで励起すると、460nmに極大を持つ顕著な発光ピークを示し(図8、左のグラフ)、これは、RNAのインセルロ(in-cellulo)標識を証明している。

【0242】

2CNqATPを取り込んだ結果は、RNAを取り込んだ2CNqAと遊離の2CNqATPのスペクトルとの間の違いを分析することで検証した(図9)。励起/吸収スペクトル(図9A)は、抽出した2CNqA-RNAについて、遊離の2CNqATPと比較して約10nmの明確な赤方偏移が観察されることを示しているが(図9A；黒色の太線対灰色の破線)、2CNqAを含む一本鎖RNA(ssRNA)および二本鎖RNA(dsRNA)固相合成25量体の吸収とよく重なっている(図9A；黒色および灰色の細線)。

【0243】

抽出2CNqA-RNA、遊離2CNqATPおよび人工RNAの発光スペクトルも比較した(図9B)。抽出した2CNqA-RNA(図9B；黒色の太線)の最大発光は、遊離2CNqATP(図9B；灰色の破線)に比べて約20nmブルーシフトしている。合成短鎖ssRNAとdsRNAのピークもブルーシフトしているが、細胞から抽出した2CNqA-RNA(図9B；それぞれ黒色の細線と灰色の細線)よりも大きくシフトしている。細胞から抽出した2CNqA-RNAの発光はssRNAの発光と最もよく一致し、これは、一本鎖である可能性が高いことを示している。

【0244】

実施例10:モノホスフェート実験

化合物7および／または17の代わりに化合物7a(2CNqAMP)を基質として用いて、上述と同様の実験も行った(図10～13参照)。これらにより、同等のモノホスフェート化合物も無毒性であり、自発的な細胞取り込みとRNA取り込みに関して、トリホスフェートの関係と同様の特性を示すことが示された。

【0245】

結論

本明細書で開示する式(I)で示される化合物は、生細胞に自発的にインターナライズし、内在性RNAへのインセルロ(in-cellulo)取り込みをもたらしことを示している。alarBlueアッセイによる細胞毒性試験では、式(I)で示される化合物は、測定された最高濃度(10μM)で細胞代謝活性の約20%減少を示すが、LDHアッセイでは、未処理の細胞と比較して細胞膜の完全性の破壊はないことを示した。このことは、共焦点蛍光顕微鏡で細胞内の位置を容易に画像化し、インセルロ(in-cellulo)RNA組み込みを達成するのに必要な濃度(2.5μM)の化合物が、細胞状況での実験に適していることを示している。

【0246】

化合物7と17は両方とも、Huh-7細胞に20時間曝露した後、強い細胞内蛍光を生じた

10

20

30

40

50

。40℃では細胞取り込みが見られなかったことから、リン脂質二重膜を通過する単純な受動的拡散ではなく、タンパク質トランスポーター、エンドサイトーシス、または同様のエネルギー依存性メカニズムが関与するなど、能動的なプロセスによって細胞内への取り込みが進行していることが示された。化合物の取り込みは、部分的に天然のATP/アデノシンによって競合される。共焦点顕微鏡画像(図4)を見ると、化合物7および17が細胞質ゾル全体に均一に分布していることを示しているため、取り込みが小胞を介している可能性は低い。この結果は、標準ヌクレオチドと比較してFBAの化学修飾がFBAの取り込みを強化することも示している。

【0247】

pATPと2CNqATPは細胞内の異なる場所に蓄積される。pATPは細胞質ゾルに優先的に蓄積するが(核周辺の細胞内構造物には顕著な局在が見られる)、2CNqATPは一見、細胞質ゾルと核に均等に分布している。つまり、2CNqATPは、能動的なメカニズムで細胞膜を通過する以外に、核小体に特に集積して核内に効果的に保持される。核小体はリボソーム生成(リボソームRNAの転写、形成および成熟; Hadjiolov, A. A. "The Nucleolus and Ribosome Biogenesis" vol. 12 (Springer Vienna, 1985)を参照)の場所であることから、2CNqATPが細胞内で合成されたRNAに自発的に取り込まれた場合、リボソームRNAを蛍光標識するために使用できる可能性が示唆された。

【0248】

トリホスフェートアナログではなく、7a(2CNqAMP)などのモノホスフェート化合物を使用した場合にも、同様の結果が得られた。

【0249】

上に要約した結果は、式(1)で示される化合物が予想に反して自発的に(製剤またはトランスフェクション試薬を必要とせずに)適当な細胞に取り込まれることを示している。その取り込みおよびプロセッシングの特性は、分子の塩基部分の構造修飾に大きく依存し、化合物は、細胞内局在、取り込み速度論、用量応答、および対応するカノニカルヌクレオシドとの競合における挙動が異なる。式(1)で示される化合物から誘導された標識で処理された細胞からRNAを単離することが可能であることから、この技術は、細胞内内在性RNAの新規蛍光標識のためのユニークな機会を提供する。

10

20

30

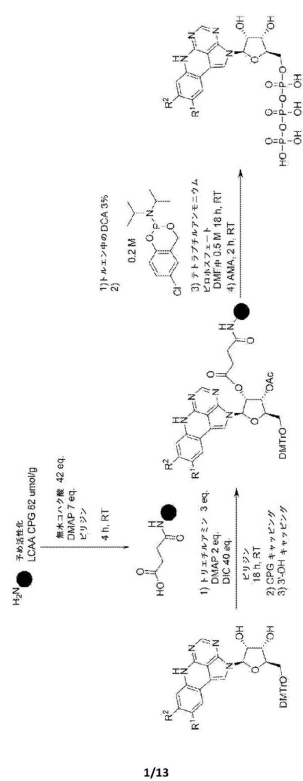
40

50

【図面】

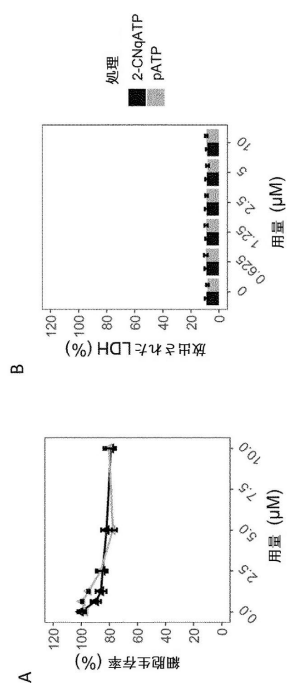
【図 1】

Figure 1



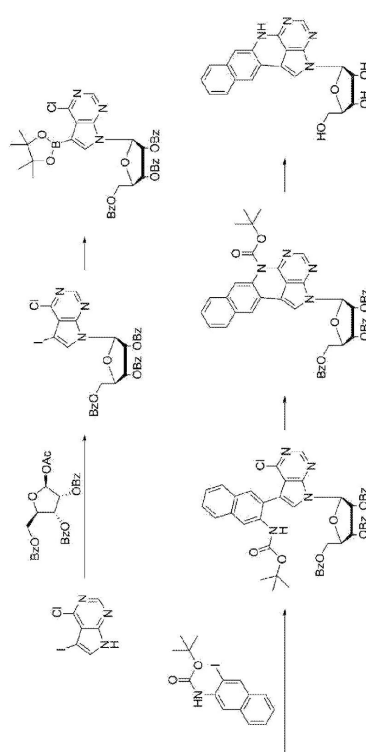
【圖 3】

Figure 3



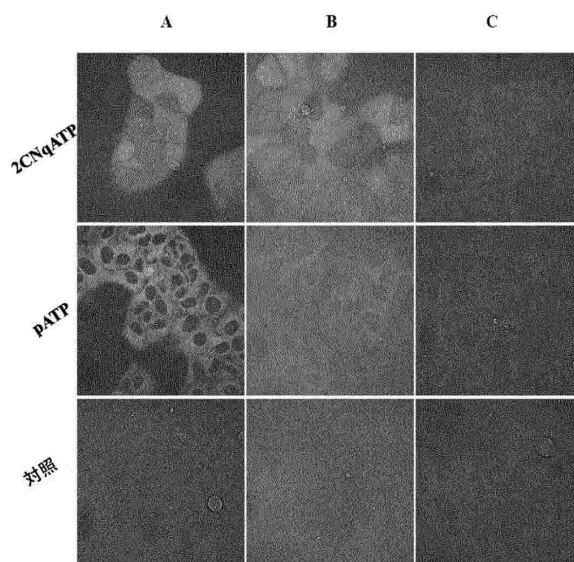
【図 2】

Figure 2

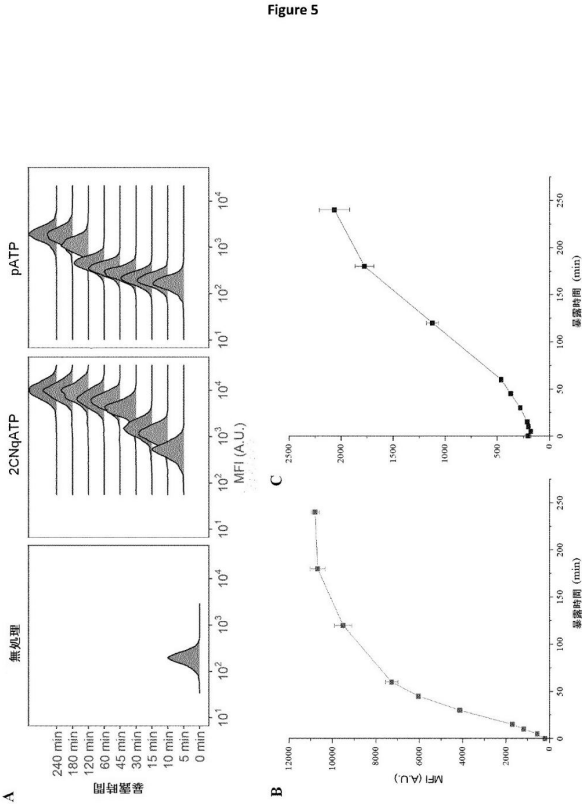


【圖 4】

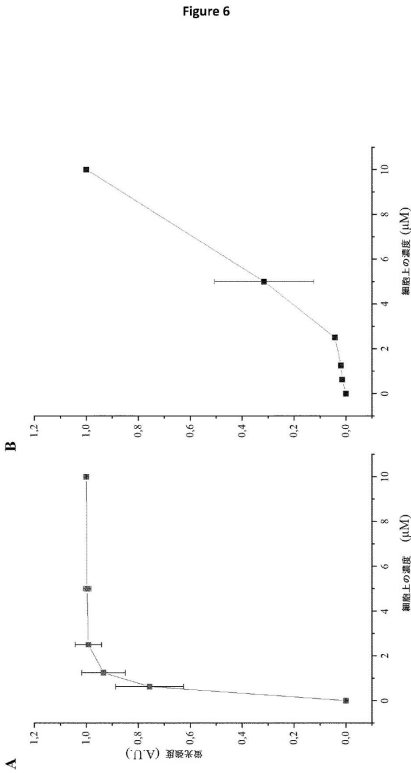
Figure 4



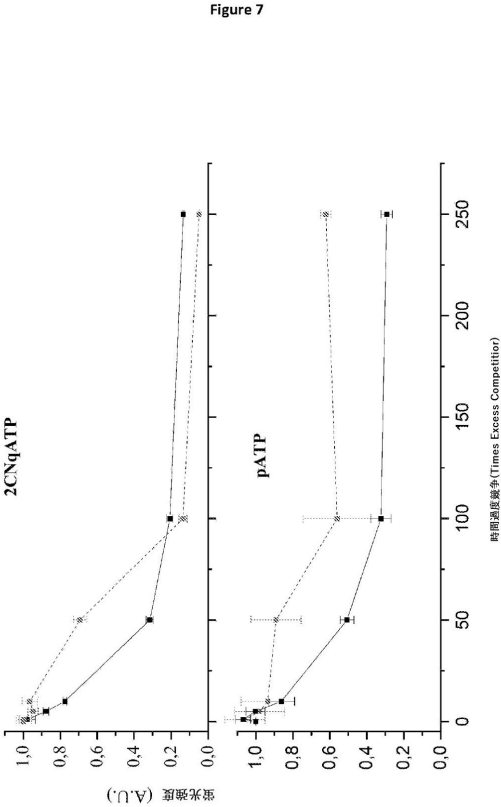
【図 5】



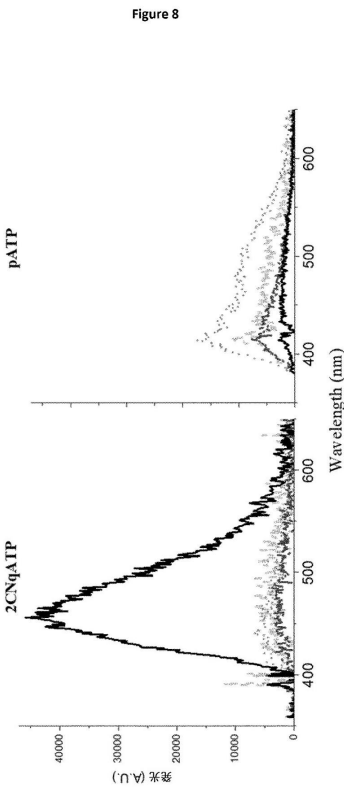
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

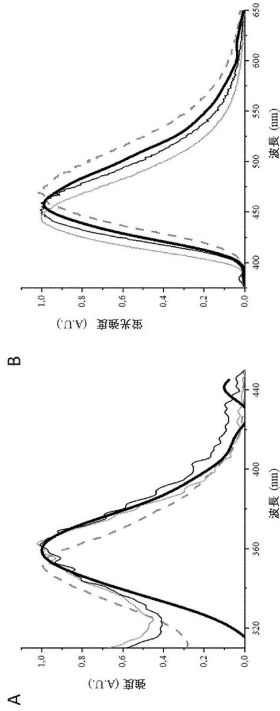
30

40

50

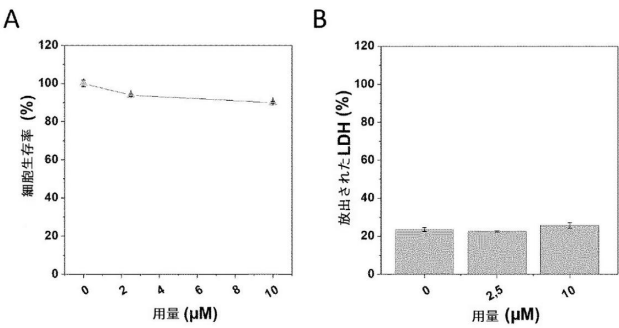
【図 9】

Figure 9



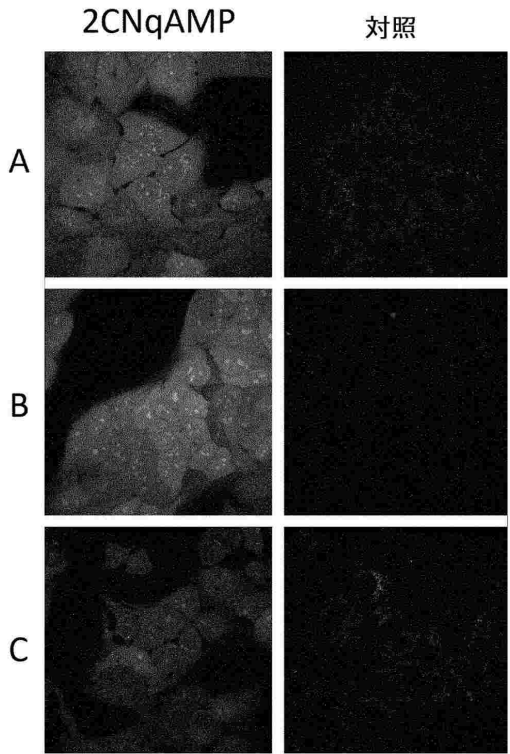
【図 10】

Figure 10



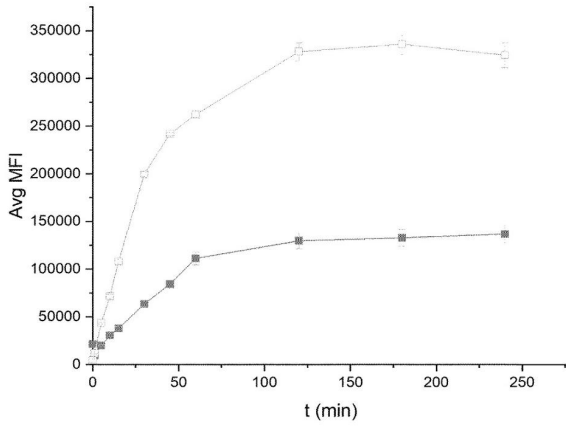
【図 11】

Figure 11



【図 12】

Figure 12



10

20

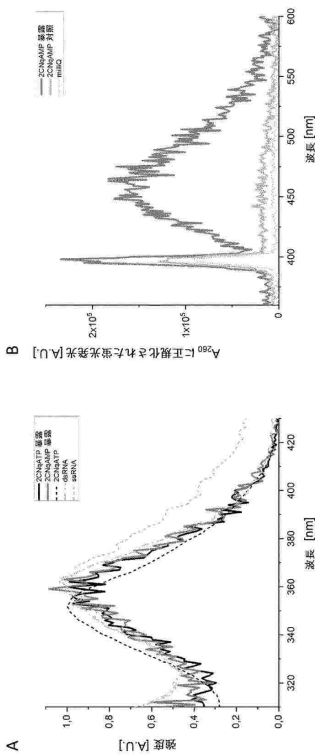
30

40

50

【図 13】

Figure 13



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/059666

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07H19/04 C12Q1/68 G01N33/58
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07H C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WYPIJEWSKA&#160;DEL&#160;NOGAL ANNA ET AL: "Abstract", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 48, no. 14, 20 August 2020 (2020-08-20), pages 7640-7652, XP055788318, GB ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkaa525 Retrieved from the Internet: URL: <http://academic.oup.com/nar/article-pdf/ f/48/14/7640/34131452/gkaa525.pdf> scheme 1 table 3 ----- -/--	1-8, 18-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 July 2022

Date of mailing of the international search report

02/08/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fanni, Stefano

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/059666

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FISHER RACHEL S. ET AL: "Pulse-shaped two-photon excitation of a fluorescent base analogue approaches single-molecule sensitivity", PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS, vol. 20, no. 45, 21 November 2018 (2018-11-21), pages 28487-28498, XP055916199, ISSN: 1463-9076, DOI: 10.1039/C8CP05496G chart 1 -----	1-8, 18-25
X	WO 94/24144 A2 (GILEAD SCIENCES INC [US]; FROEHLER BRIAN [US]; MATTEUCCI MARK [US]) 27 October 1994 (1994-10-27) claims 1,40 -----	1-8, 18-25
X	EP 2 948 467 A1 (UNIVERSITÄT HAMBURG [DE]) 2 December 2015 (2015-12-02) claim 6 -----	9-17
X	SARAC IVO ET AL: "Efficient Automated Solid-Phase Synthesis of DNA and RNA 5'-Triphosphates", CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, vol. 21, no. 46, 25 August 2015 (2015-08-25), pages 16421-16426, XP055945776, DE ISSN: 0947-6539, DOI: 10.1002/chem.201502844 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/chem.201502844> scheme 2 -----	9-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/059666

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9424144	A2	27-10-1994	AU 6632094 A	08-11-1994
			EP 0695306 A1	07-02-1996
			WO 9424144 A2	27-10-1994

EP 2948467	A1	02-12-2015	EP 2948467 A1	02-12-2015
			US 2015361124 A1	17-12-2015
			WO 2014114326 A1	31-07-2014

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 高山 裕貢

- (72)発明者 エスビョルナル ヴィンテシュ, エリン
スウェーデン、エスアー 4 1 2 9 6 イェーテボリ、シャルマーズ・ユニバーシティ・オブ・テ
クノロジー内
- (72)発明者 ウィルヘルムソン, マルクス
スウェーデン、エスアー 4 1 2 9 6 イェーテボリ、シャルマーズ・ユニバーシティ・オブ・テ
クノロジー内
- (72)発明者 ファイフェル, パウリーネ
スウェーデン、エスアー 4 1 2 9 6 イェーテボリ、シャルマーズ・ユニバーシティ・オブ・テ
クノロジー内
- (72)発明者 ガリユー, オドレイ
スウェーデン、エスアー 4 1 2 9 6 イェーテボリ、シャルマーズ・ユニバーシティ・オブ・テ
クノロジー内
- (72)発明者 ニルソン, イェスペル
スウェーデン、エスアー 4 1 2 9 6 イェーテボリ、シャルマーズ・ユニバーシティ・オブ・テ
クノロジー内

F ターム (参考)	4B064 AF27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24
	4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
	AB01 AC14 CA23
	4C057 AA20 AA22 BB02 DD01 LL50
	4C085 HH11 KA27 KB92
	4H050 AA01 AB20