

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-533484
(P2023-533484A)

(43)公表日 令和5年8月3日(2023.8.3)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 19/24 (2006.01)	C 0 7 H 19/24	C S P 4 C 0 5 7
C 0 7 H 1/00 (2006.01)	C 0 7 H 1/00	
C 0 7 H 21/02 (2006.01)	C 0 7 H 21/02	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A

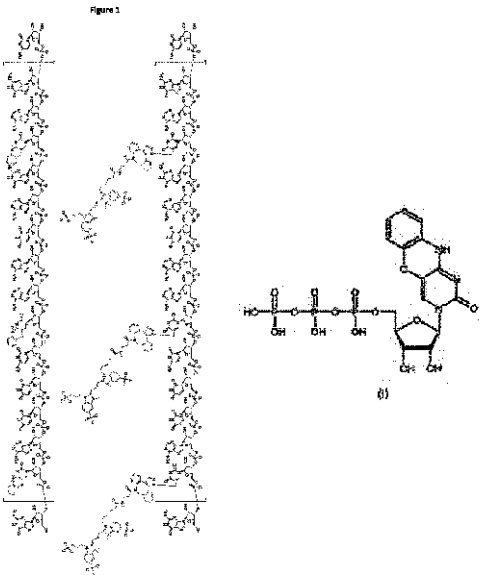
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全45頁)

(21)出願番号	特願2022-580419(P2022-580419)	(71)出願人	522499829
(86)(22)出願日	令和3年6月24日(2021.6.24)		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2月22日(2023.2.22)		アクチエボラグ
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/067342		S T E A L T H L A B E L S B I O T
(87)国際公開番号	WO2021/260107		E C H A B
(87)国際公開日	令和3年12月30日(2021.12.30)		スウェーデン41296ヴェストラ・
(31)優先権主張番号	2009705.1		イエータランド・カウンティ、イエーテ
(32)優先日	令和2年6月25日(2020.6.25)		ポリ、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】 蛍光シトシンアナログならびに転写および翻訳へのその適用

(57)【要約】

本明細書は、撹乱が最小の蛍光三環式シトシンアナログの酵素的取り込みを介してRNAを標識するための新規な方法論を開示する。このアナログは、例示的な転写物に100%組み込まれることが示され、インピトロおよびインセルの両方の転写に完全に適合している。分光特性評価により、このシトシンアナログの取り込み率は、天然型対応物と同等であることが示された。生細胞イメージングおよびフローサイトメトリーを用いて、標識mRNAは生細胞と無細胞系へのトランスフェクション時に効率的かつ正確に翻訳される。修飾転写物とその正しい翻訳産物のスペクトル特性により、それらを簡単かつ同時に可視化が可能である。したがって、この技術は、RNAを基礎とする薬物を含む、目的の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ことになる。

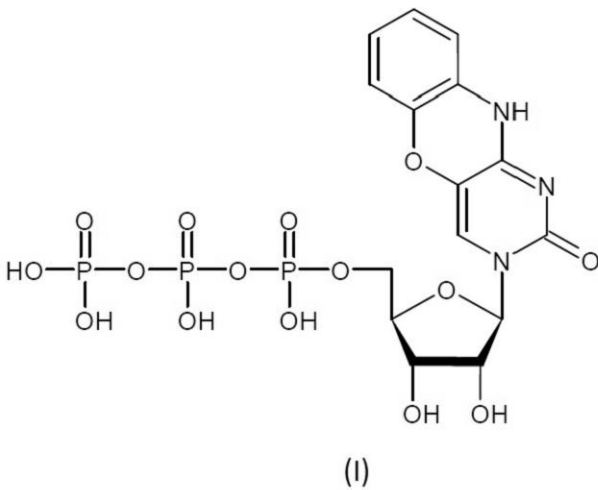


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(I)：

【化 1】



10

で示される化合物またはその塩。

20

【請求項 2】

請求項 1 に記載の式(I)で示される化合物。

【請求項 3】

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 に記載の式(I)で示される化合物。

【請求項 4】

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 3 に記載の式(I)で示される化合物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の式(I)で示される化合物またはその塩を調製する方法であって、

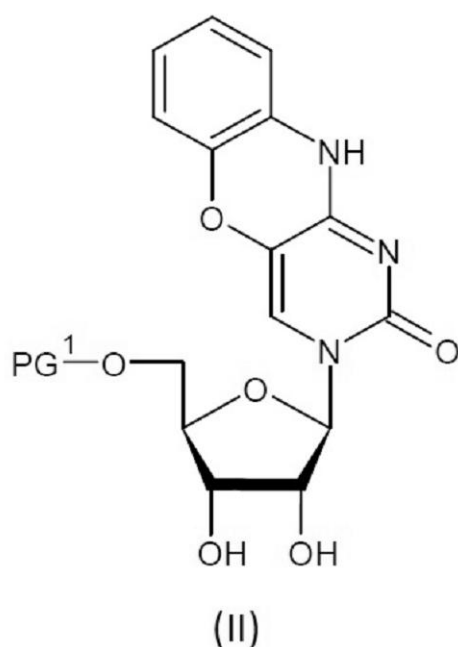
30

i. 式(II)：

40

50

【化 2】



10

20

[式中、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；

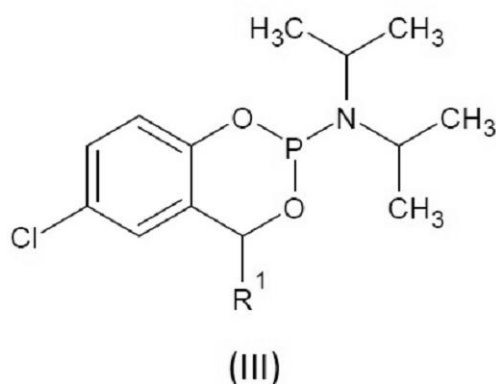
ii. 式(II)で示される化合物またはその塩を、その第二級アルコール基の一つを適当な支持体に結合させることによって固定化すること；

iii. いずれかの遊離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. PG¹を除去すること；

v. 露出した第一級アルコール基を式(III)：

【化 3】



30

40

[式中、R¹は、ヒドロ基およびC₁₋₃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)化合物を酸化させてリン(V)化合物にすること；

vii. リン(V)化合物をテトラアルキルアンモニウムピロリン酸と反応させて三リン酸を生成すること；

viii. 保護基PG²を除去すること；および

ix. 得られた三リン酸を支持体から切断して、式(I)で示される化合物またはその塩を

50

生成すること、
を含む方法。

【請求項 6】

R^1 が、メチル基である、請求項 5 に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩の調製方法。

【請求項 7】

支持体が、固体ポリマーである、請求項 5 または 6 に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。

【請求項 8】

支持体が、制御された多孔性ガラスおよびポリスチレンから選択される、請求項 7 に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。 10

【請求項 9】

支持体が、制御された多孔性ガラスである、請求項 8 に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。

【請求項 10】

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 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。

【請求項 11】

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 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。 20

【請求項 12】

PG^1 がジメトキシトリチルであり、そして、 PG^2 がアセチルである、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。

【請求項 13】

工程 i) における式 (II) で示される化合物の固定化が、主に 2'-ヒドロキシ位で起こる、請求項 5 ~ 12 のいずれか一項に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。 30

【請求項 14】

テトラアルキルアンモニウムピロリン酸が、テトラブチルアンモニウムピロリン酸である、請求項 5 ~ 13 のいずれか一項に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。

【請求項 15】

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酸化させてリン (V) 化合物にする、請求項 5 ~ 14 のいずれか一項に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩を調製する方法。

【請求項 16】

tC^O 標識 RNA 分子を調製するための組成物であって、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、および天然型リボヌクレオチド三リン酸を含む組成物。 40

【請求項 17】

tC^O 標識 RNA 分子を酵素的に調製するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩の使用。

【請求項 18】

RNA 分子が、mRNA である、請求項 17 に記載の式 (I) で示される化合物またはその塩の使用。

【請求項 19】

tC^O 標識 RNA 分子を調製する方法であって、DNA 鋳型を、式 (I) で示される化合物およ 50

び天然型リボヌクレオチド三リン酸を含む組成物に加え、次に、得られた混合物をRNAポリメラーゼで処理すること、を含む方法。

【請求項 20】

mRNAによってコードされるタンパク質を翻訳により調製するための、 tC^O 標識 mRNA 分子の使用。

【請求項 21】

コードされるタンパク質が蛍光タンパク質に融合している、請求項 20 に記載の tC^O 標識 mRNA 分子の使用。

【請求項 22】

tC^O 標識 mRNA およびコードされるタンパク質が、共焦点顕微鏡を用いて空間時間的に同時に分析される、請求項 21 に記載の tC^O 標識 mRNA 分子の使用。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、細胞内翻訳に適合している標識 RNA の生合成生産に使用できる修飾蛍光核酸塩基三リン酸に関する。これにより、標識メッセンジャー RNA とその対応する翻訳産物(蛍光融合タンパク質の場合)を同時に可視化できる生細胞のイメージングが可能になる。

【背景技術】

【0002】

RNA は、ヒト生物学において基本的な役割を果たす。RNA は、マイクロ RNA や低分子干渉 RNA などを介し、またその固有の触媒活性に拠る、生化学におけるセントラルドグマの主演であり、かつ遺伝子発現の重要な調節因子である。これらの理由から、RNA は、非常に有望で多用途の新薬モダリティとしても注目されている：RNA 療法は翻訳レベルで細胞機能を改変できる潜在力があるため、以前は創薬できなかった標的に対処できる新しい可能性を開くかもしれない。 20

【0003】

したがって、RNA が関与する生物学的プロセスの分子のおよび機構的知識を深めることは、疾患の理解や処置に不可欠である。例えば、RNA を基礎とする薬物の潜在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ている(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、核酸を細胞質へ輸送するためには、常にエンドソームの漏出に依存するしかなく、その理解は、広範な研究にもかかわらず、不明なままである(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、内因性および外因性(治療用)RNA の転位、局在、スプライシングおよび分解など、RNA の細胞内痕跡を辿ることは非常に重要である。 30

【0004】

最近の進歩により、RNA を分析および定量化することができる広範囲のツールおよびプローブが開発されたが、それらは一般に、天然型とは著しく異なる性質を有する大きく修飾されたオリゴヌクレオチドを利用するものであり、結局は、細胞の酵素機構によって認識および処理される能力を喪失する可能性がある。例えば、RNA の細胞局在を調べるための既存の蛍光ベース技術の欠点は、それらが主に、RNA の運動性を損ない、RNA の局在と(例えば)膜構成要素との分子相互作用を攪乱し得る、高い両親媒性および/または巨大(バルキー)な外部蛍光構築物に依存していることに拠る。さらに、これらの技術の大部分は、生細胞イメージングに適合しない(Li, Y., Ke, K. & Spitale, R. C., Biochemistry 58, 379-386 [2019])。 40

【0005】

これらの問題を克服し、RNA メカニズムを研究する改善された方法を提供するために、本明細書は、攪乱は最小限である内部の標識(「 tC^O 」)を機能的メッセンジャー RNA (50

「mRNA」)に取り込むのに使用でき、結果、生細胞イメージングおよび薬物送達の研究において活用できる修飾核酸塩基三リン酸(化合物(I))、「tC⁰TP」)を開示している。tC⁰の構造物はRNAに組込まれると、塩基対やスタッキングを維持することができ、そのため天然型生物学的プロセスをほとんど毀損することがない(図1、ここでは、上段の図式構造物が、下段における従来の外部的に標識されているRNAと対比している、tC⁰標識されているRNAである)。このように、この蛍光体は天然型に似た代替の標識物を構成し、それにより、目的の核酸を追跡するだけでなく、蛍光物の読出しによって核酸の構造や挙動に関する詳細な情報を得るといった、新しい可能性を提供するものである。

【0006】

本明細書では、tC⁰の可能な適用を例示するために、この蛍光核酸塩基アナログによって内部が標識されている完全長のmRNAがインビトロ転写で成功し、また細胞内で翻訳が有効であることについても記載している。さらに、本明細書は、核に局在する緑色蛍光タンパク質と融合したヒストンタンパク質H2B(「H2B:GFP」)をコードする転写物を用いることで、細胞内の標識mRNAを可視化すると同時に、発現したH2B:GFPタンパク質から発せられる蛍光を同時に記録できることを示している。このアプローチは一般に、あらゆる蛍光タンパク質に適用できるものである。

【0007】

Wilhelmsson, M. et al. Sci. Rep. 7, 2393 [2017]は、tC⁰で標識されているRNA分子を調製したことを報告しているが、これは、生合成によって達成できる全長のRNAではなく、非酵素的な固相オリゴ核酸合成によって調製された非常に短い蛍光RNAオリゴマーを開示しているに過ぎない。その調製方法からでは、標識RNA分子は、長い治療用RNA(mRNAを基本とする)の転写、翻訳または送達の細胞内「生(ライブ)」分析に適さず、従って同じレベルのメカニズム研究は不可能である。

【0008】

WO2011/034895は、DNAおよびRNAを標識するための方法に関する。そこでは、構造的に異なる蛍光性リボヌクレオチドアナログの1,3-ジアザ-2-オキソフェノチアジン-リボース-5'-三リン酸(「tCTP」)が記載され、これは、標識RNAを調製するためにインビトロ転写反応中に使用されている。しかし、本明細書とは異なり、そこでは、非コード標識RNAのみが調製され、細胞内での生合成や可視化については一切開示されていない。

【0009】

本明細書に開示される技術を用いて達成できる多様に標識される完全長コードRNAポリマーはまた、WO2011/034895における標識RNAよりも有利な特性、例えば1)改善された蛍光レベルおよびラベル光安定性、2)改善されたインビトロ転写の忠実性、および3)正しいタンパク質産物と局在をもたらすtC⁰-標識mRNAの細胞内翻訳の天然型に似たレベルを有する。

【0010】

したがって、要約すると、本明細書は、タグ付けされRNAの局在および追跡を可能にするだけでなく、重要な将来の薬物モダリティであるmRNAの生物学的機能および送達効率の分析も容易にする標識技術を開示する。内部tC⁰標識は、RNAが関与する生物学的プロセスと互換性があるため、細胞取り込み、エンドソーム放出、エキソソーム充填(loading)および輸送(trafficking)の詳細な検討など、生細胞顕微鏡における強力なイメージングツールとして使用される大きな可能性を秘めている。これらは、これらの重要な送達経路がどのように機能し、制御できるかを明瞭にする大きな可能性を有する。

【発明の概要】

【0011】

本明細書の主な目的は、インビトロおよびインビボ機構的研究に特に適した標識RNAの調製に使用できる修飾核酸塩基三リン酸を提供することである。

【0012】

したがって、本明細書は、部分的に、請求項1に記載の式(I)で示される化合物または

10

20

30

40

50

その塩を記載する。

【0013】

本明細書はまた、部分的に、請求項5に記載の式(I)で示される化合物またはその塩を調製する方法を記載する。

【0014】

本明細書はまた、部分的に、請求項16に記載の式(I)で示される化合物を含むtC[○]標識RNA分子を調製するための組成物を記載する。

【0015】

本明細書はまた、部分的に、請求項17に記載のtC[○]標識RNA分子を酵素的に調製するための、式(I)で示される化合物またはその塩の使用を記載する。

10

【0016】

本明細書はまた、部分的に、請求項19に記載のtC[○]標識RNA分子を調製する方法を記載する。

【0017】

本明細書はまた、部分的に、請求項20に記載のmRNAによってコードされたタンパク質を翻訳により調製するための、tC[○]標識mRNA分子の使用を記載する。

【0018】

例示的な実施態様

本明細書に詳述される発明は、引用された実施態様または例のいずれかに限定されるものと解釈されるべきではない。他の実施態様は、当業者である読者には容易に明らかになるであろう。

20

【0019】

一般定義

「A」または「an」は、「少なくとも一つ」を意味する。「a」または「an」が所定の材料物質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」が所定の材料物質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。

【0020】

実施態様が「a」または「an」の特徴Xを含む場合、「その」特徴Xへのその後の言及は、特徴の一つだけが存在することを意味しない。代わりに、上記の「a」または「an」の解釈が引き続き適用されるため、「the」は「少なくとも一つ」も意味する。換言すれば、「特徴Xが...である特徴X」を含む実施態様は、「少なくとも一つの特徴Xが...である少なくとも一つの特徴X」として解釈されるべきである。

30

【0021】

「含む」とは、所定の実施態様が他の特徴を含んでいてもよいことを意味する。例えば、ある材料物質または要素を「含む」材料物質が言及される任意の実施態様において、所定の材料物質は、材料物質または要素(または材料もしくは要素の組み合わせ)の少なくとも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からなり得る。

40

【0022】

「含む」が言及される任意の実施態様において、「含む」はまた、「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)」)」を意味し得る。

【0023】

材料物質の実施態様に関して、「からなる(consisting of)」または「からなる(consists of)」は、材料物質または要素が完全にその材料物質または要素(または材料物質もしくは要素の組み合わせ)からなることを意味する。「からなる(consisting of)」または「からなる(consists of)」が言及される任意の実施態様において、所定の材料物質

50

または要素は、100% w/w のその材料物質または要素のからなり得る。

【0024】

材料物質の実施態様に関して、「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、所定の材料物質または要素が、ほぼ完全にその材料物質または要素(または材料物質もしく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、所定の材料物質または要素は、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 のその材料物質または要素のからなり得る。

10

【0025】

材料物質または要素を定義するために「である」または「であり得る」が使用される任意の実施態様において、「である」または「であり得る」は、材料物質または要素が「からなる」または「本質的にからなる」ことを意味し得る。

【0026】

「いくつかの実施態様において...」と特定の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の適当な実施態様に限らず、明細書のどの部分においても存在し得る。

【0027】

特徴がリスト「から選択される」場合、特定された選択肢からなるリスト(すなわち、特定された選択肢とそれ以外の選択肢からなるリスト)から選択される。

20

【0028】

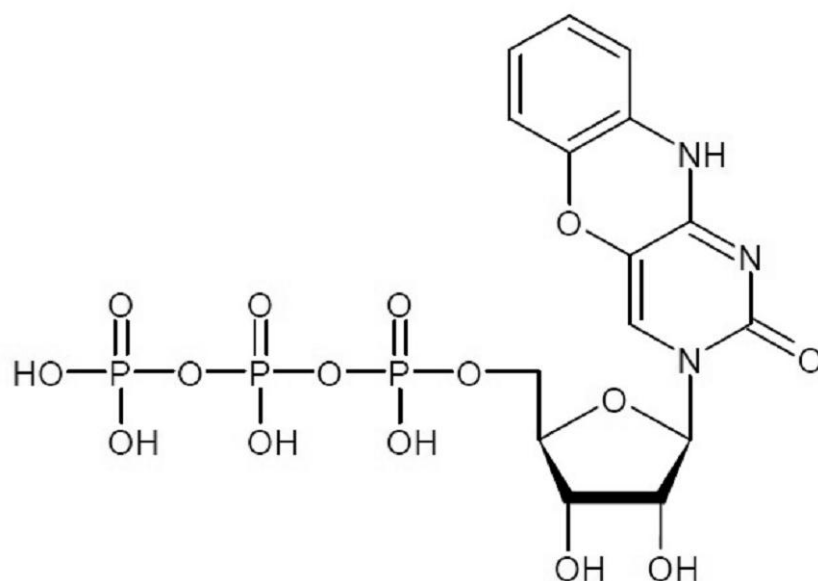
特許請求の範囲は実施形態である。

【0029】

修飾核酸塩基三リン酸

一実施態様において、式(I)：

【化1】



30

40

(I)

で示される化合物またはその塩が提供される。

【0030】

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

50

によって生じる構造異性体)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。

【0031】

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することがある。実施態様には、原子が一つまたはそれ以上のその同位体によって置き換えられた式(1)で示されるすべての化合物(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。

【0032】

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って形成される。塩基付加塩は、窒素塩基、例えば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のような適当な有機塩基を用いて形成され得る。塩基付加塩はまた、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切な無機塩基を使用して形成され得る。

【0033】

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。

【0034】

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。

【0035】

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。

【0036】

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。

【0037】

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。

【0038】

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、テトラナトリウム塩、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テトラ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。

【0039】

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テトラ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。

【0040】

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。

【0041】

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。

【0042】

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。

【0043】

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テトラ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。

【0044】

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。

【0045】

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。

【0046】

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。

10

20

30

40

50

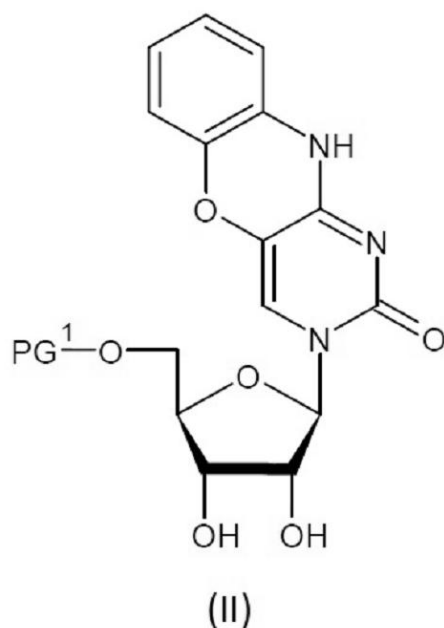
【 0 0 4 7 】

合成プロセス

一実施態様において、式(I)で示される化合物またはその塩を調製する方法であって、

i. 式(II)：

【化2】



10

20

[式中、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；

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；

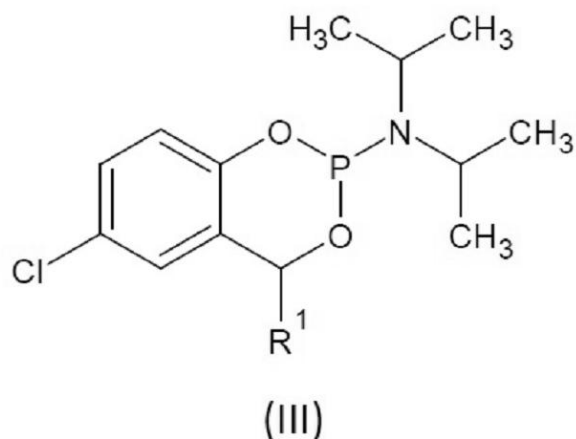
iii. いずれかの残りの第二級アルコール基を適当な保護基PG²でキャッピングすること；

iv. 保護基PG¹を除去すること；

v. 露出した第一級アルコール基を式(III)：

30

【化3】



40

[式中、R¹は、ヒドロ基およびC₁₋₃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)化合物を酸化させてリン(V)化合物にすること；

vii. リン(V)化合物をテトラアルキルアンモニウムピロリン酸と反応させて三リン酸を

50

生成すること；

viii. 保護基PG²を除去すること；および

ix. 得られた三リン酸を支持体から切断して、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること、
を含む方法が提供される。

【0048】

保護基(「PG」、例えばPG¹およびPG²)は、反応中心を一時的に保護するのに適したいずれかの基、例えばヒドロキシル基である。本明細書に開示される反応中心に適した保護基は、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)に記載されている。 10

【0049】

「ヒドロ」基は、水素原子に相当する。ヒドロ基が結合した原子は、非置換と見なすことができる。

【0050】

「C₁₋₃アルキル基」は、示された数の炭素を有する直鎖または分枝の飽和アルキル基である。C₁₋₃アルキル基の例として、メチル、エチル、プロピルおよびイソプロピルがある。

【0051】

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上のものであり得る。 20

【0052】

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：

- 出発保護ヌクレオシド上の第二級アルコール基の事前の保護は必要ない；
- 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、これは材料物質の損失を最小にする；
- 固体によって支持されるヌクレオシドは、分解することなく3ヶ月間保存できる；
- この経路は自動化合成に対応するものである； 30
- プロセスは堅牢であり、かつ全体的な再現性が良好である；
- クリーンなリン酸化粗生成物が生成され、それは精製が容易である；
- 高いリン酸化収率(ヌクレオシド担持樹脂から出発して、通常約60%)を得ることができる。

【0053】

いくつかの実施態様において、R¹は、ヒドロ基であり得る。

【0054】

いくつかの実施態様において、R¹はC₁₋₃アルキル基であり得る。R¹がC₁₋₃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簡単で収率が高いが、上記工程vではR¹がヒドロ基である場合と少なくとも同程度に機能することが観察されている。 40

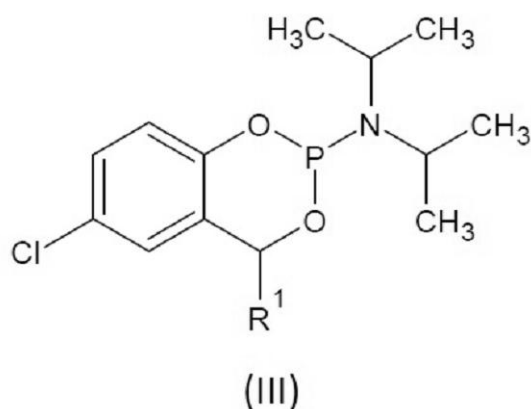
【0055】

いくつかの実施態様において、R¹は、メチルであり得る。

【0056】

一実施態様において、式(III)：

【化 4】



10

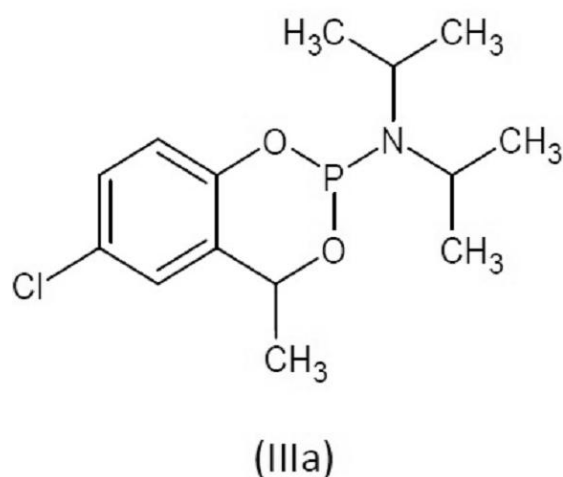
[式中、 R^1 は、 C_{1-3} アルキル基である]
 で示される化合物が提供される。

【 0 0 5 7 】

一実施態様において、式(IIIa):

【化 5】

20



30

で示される化合物が提供される。

【 0 0 5 8 】

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。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施態様において、支持体は、制御された多孔性ガラス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。

【 0 0 6 0 】

40

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。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施態様において、支持体は、制御された多孔性ガラスであり得る。

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施態様において、支持体は、第一級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。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施態様において、支持体は、第一級アミノ基(例えばAmino-SynBase™)で官能化された制御された多孔性ガラスであり得る。

【 0 0 6 4 】

50

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。

【0065】

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得る。

【0066】

いくつかの実施態様において、PG²はアセチルであり得る。固定化分子が塩基不安定である場合、これは、PG²基の除去および樹脂からの開裂が一つの段階で達成され得る効率的な合成を可能にする。

10

【0067】

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。

【0068】

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。

【0069】

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、支持体への両第二級ヒドロキシ基の全共有結合)の50%、60%、70%、80%、90%または100%であり得る。

20

【0070】

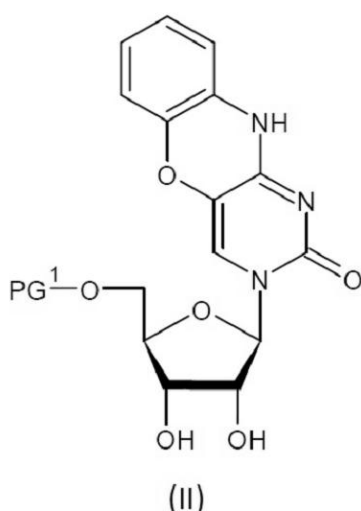
いくつかの実施態様において、テトラアルキルアンモニウムピロリン酸は、テトラブチルアンモニウムピロリン酸であり得る。

【0071】

一実施態様において、式(I)で示される化合物またはその塩を調製する方法であって、
i. 式(II)：

【化6】

30



40

[式中、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された多孔性ガラス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、ベンゾイル、2,2,2-トリク

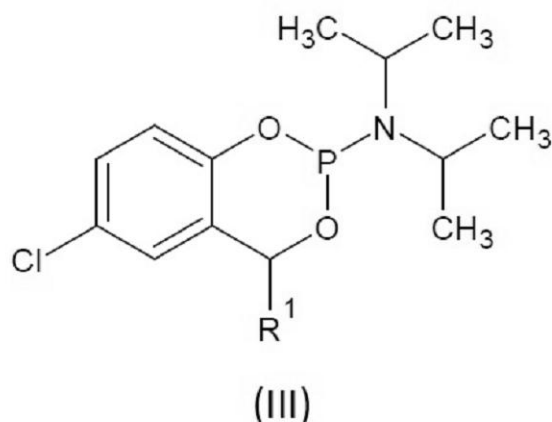
50

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PG²でカップリングすること；

iv. PG¹を除去すること；

v. 露出した第一級アルコール基を式(III)：

【化7】



10

20

[式中、R¹は、C₁₋₃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)化合物を酸化させてリン(V)化合物にすること；

vii. リン(V)化合物をテトラブチルアンモニウムピロリン酸と反応させて三リン酸を生成すること；

viii. 保護基PG²を除去すること；および

ix. 得られた三リン酸を支持体から切断して、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること、
を含む方法が提供される。

30

【0072】

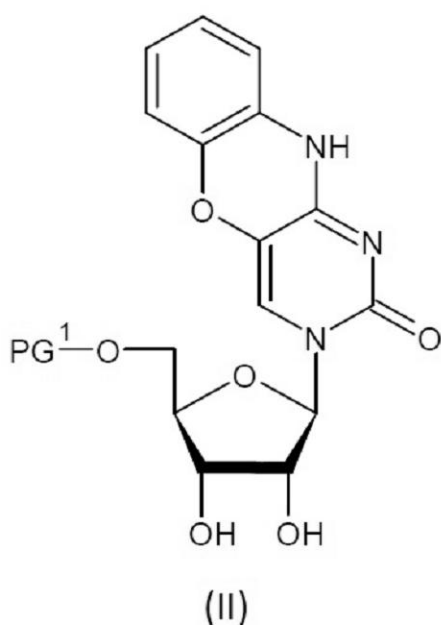
一実施態様において、式(I)で示される化合物またはその塩を調製する方法であって、

i. 式(II)：

40

50

【化 8】



10

20

[式中、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された多孔性ガラス支持体に結合させることによって固定化すること；

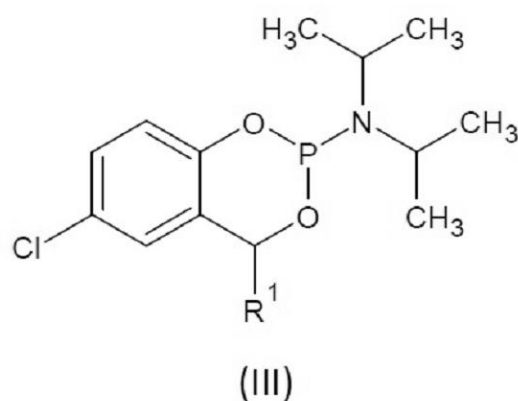
iii. いずれかの残りの第二級アルコール基を、アセチルである保護基PG²でキャッピングすること；

iv. PG¹を除去すること；

v. 露出した第一級アルコール基を式(III)；

【化 9】

30



40

[式中、R¹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)化合物を酸化させてリン(V)化合物にすること；

vii. リン(V)化合物をテトラブチルアンモニウムピロリン酸と反応させて三リン酸を生成すること；

viii. 保護基PG²を除去すること；および

ix. 得られた三リン酸を支持体から切断して、式(I)で示される化合物またはその塩を生成すること、

50

を含む方法が提供される。

【0073】

上記の工程i)~ix)のそれぞれを効果的に行うための適当な条件および試薬は、当業者に知られているか、または詳細な説明に見出すことができる。

【0074】

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た無水コハク酸)によって達成され得る。

【0075】

いくつかの実施態様において、露出し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Activator 42(登録商標))を用いて達成され得る。 10

【0076】

いくつかの実施態様において、工程vi)におけるリン(III)化合物は、水性ピリジンおよびヨウ素を用いてリン(V)化合物に酸化されてもよい。

【0077】

いくつかの実施態様において、三リン酸を支持体から切断することは、塩基性条件(例えば、AMAで処理することによって)を用いて達成され得る。塩基に不安定な支持体があり、塩基に不安定な保護基がPG²に対して選択される場合、これらの条件を使用することにより、脱保護と切断を同時に行うことが可能になる。 20

【0078】

標識RNAの合成

一実施態様において、式(I)で示される化合物および天然型リボヌクレオチド三リン酸を含むtC⁰標識RNA分子が提供される。

【0079】

「天然型リボヌクレオチド三リン酸」は、5'ヒドロキシ位に三リン酸基が結合した適切な天然型リボヌクレオシドを含む。これは、天然型リボヌクレオシド三リン酸に相当する。いくつかの実施態様において、天然型リボヌクレオチド三リン酸は、シチジン5'-三リン酸、ウリジン5'-三リン酸、アデノシン5'-三リン酸およびグアニジン5'-三リン酸から選択され得る。天然型リボヌクレオチド三リン酸の組成物(すなわち、本明細書に定義されるリボヌクレオチド三リン酸を含むもの)は、標的RNA分子を構築するのに十分な量の、これらの構成要素の様々な量の組み合わせ(例えばNTP mixで提供されるようなもの)を含み得る。 30

【0080】

一実施態様において、tC⁰標識RNA分子を酵素的に調製するための、式(I)で示される化合物またはその塩の使用が提供される。

【0081】

tC⁰標識RNA分子は、少なくとも一つのtC⁰残基を含むが、それ以外は天然型RNA分子(すなわち、tC⁰残基と同じ位置に未修飾シトシン残基を有するもの)に類似している。

【0082】

いくつかの実施態様において、tC⁰標識RNA分子は、非修飾シトシン残基の代わりに10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%のtC⁰残基を含み得る。 40

【0083】

いくつかの実施態様において、tC⁰標識RNA分子は、非修飾シト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tC⁰残基を含み得る。

【0084】

一実施態様において、tC⁰標識RNA分子を調製する方法であって、DNA鋳型を、式(I)で示される化合物および天然型リボヌクレオチド三リン酸(例えば、NTP mixで提供され 50

るような、標的RNA分子を構築するのに十分な量の、様々な量のシチジン5'-三リン酸、ウリジン5'-三リン酸、アデノシン5'-三リン酸および/またはグアニジン5'-三リン酸の組み合わせ)を含む組成物に加えること、次に、得られた混合物をRNAポリメラーゼで処理すること、を含む方法が提供される。

【0085】

いくつかの実施態様において、 tC^O 標識RNA分子は、 tC^O 標識mRNAであり得る。

【0086】

いくつかの実施態様において、 tC^O 標識RNA分子は、蛍光タンパク質に融合したタンパク質をコードし得る。例示的な融合型蛍光タンパク質には、緑色蛍光タンパク質(GFP)およびmFruitファミリータンパク質が含まれる。標的タンパク質が(本質的に、またはタグによって)蛍光性である場合、標識RNA分子とそれが合成に使用されているタンパク質の両方を同時に可視化することが可能であり、これは、より高度な機構的な知見を与える。

10

【0087】

いくつかの実施態様において、 tC^O 標識RNA分子は、H2B、カルモジュリン、H2B:GFPおよびカルモジュリン-3:GFPから選択されるタンパク質をコードするものであり得る。

【0088】

用語「:GFP」は、コロンに先行するタンパク質標的が緑色蛍光タンパク質(GFP)ファミリータンパク質と融合していることを意味する。

20

【0089】

いくつかの実施態様において、 tC^O 標識RNA分子は、H2B:GFPをコードし得る。

【0090】

いくつかの実施態様において、 tC^O 標識RNA分子は、カルモジュリン-3をコードし得る。

【0091】

いくつかの実施態様において、RNAポリメラーゼは、T7ポリメラーゼおよびSP6ポリメラーゼから選択され得る。

【0092】

いくつかの実施態様において、 tC^O 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阻害物質(例えばRibolock)の存在下で行われ得る。

30

【0093】

いくつかの実施態様において、 tC^O 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RNase阻害物質(例えばRibolock)の存在下で行われ得る。いくつかの実施態様において、 tC^O 標識RNA分子を調製する方法は、実質的に実験部分に記載されているように(例えば、「H2B:GFP RNA転写および精製」の見出しの部分に詳述されているように)行われ得る。

【0094】

一実施態様において、 tC^O 標識RNA分子を調製するためのキットであって、

40

- i. 式(I)で示される化合物;
- ii. 天然型リボヌクレオチド三リン酸の組成物;
- iii. RNAポリメラーゼ;任意に
- iv. DNA鋳型;および、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。

【0095】

標識RNAの翻訳

一実施態様において、mRNAによってコードされるタンパク質を翻訳により調製するための、 tC^O 標識mRNA分子の使用が提供される。

50

【0096】

「翻訳」とは、mRNAがリボソームで解読され、特定のポリペプチドを産生する中心的な生物学的プロセスを意味し、細胞内でその機能を果たす前に活性タンパク質に折り畳まれることがある。

【0097】

一実施態様において、インビトロ翻訳(例えば、実験部分の一部(例えば、見出し「無細胞翻訳」の下に詳述されているようなもの)に実質的に記載されているようなもの)によりmRNAによってコードされるタンパク質を調製するための、 tC^O 標識mRNA分子の使用が提供される。

【0098】

いくつかの実施態様において、インビトロ翻訳は、大腸菌のバクテリアライセートおよび/またはExpressway(登録商標)ミニ無細胞発現システムを用いて実施され得る。

【0099】

一実施態様において、mRNAによってコードされるタンパク質を細胞内翻訳(例えば、実験部分の一部(例えば、見出し「細胞培養」および「エレクトロポレーションまたは化学的トランスフェクション」の下に詳述されているようなもの)に実質的に記載されているようなもの)によって調製するための、 tC^O 標識mRNA分子の使用が提供される。

【0100】

いくつかの実施態様において、細胞内翻訳は、ヒト神経芽腫細胞(例えばSH-SY5Y細胞)内で実施され得る。

【0101】

一実施態様において、 tC^O 標識RNA分子のタンパク質への翻訳が提供される。

【0102】

一実施態様において、 tC^O 標識RNA分子のタンパク質へのインビトロ翻訳が提供される。

【0103】

一実施態様において、 tC^O 標識RNA分子のタンパク質への細胞内翻訳が提供される。

【0104】

いくつかの実施態様において、コード化タンパク質は、蛍光タンパク質(例えば、GFPまたはmFruitファミリータンパク質)と融合していてもよい。この場合、標識RNA分子と、それが合成に使用されているタンパク質の両方を同時に可視化することが可能であり、より高度な機構的な知見を与える。

【0105】

いくつかの実施態様において、 tC^O 標識mRNAおよびコード化タンパク質は、共焦点顕微鏡(例えば蛍光共焦点顕微鏡)を用いて空間時間的に同時に分析され得る。これは、標識RNAおよびタンパク質を同時にモニターする便利な方法であり、蛍光塩基アナログを含むRNAは、このような生細胞可視化においてこれまで使用されることがない。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】図1：一般的な外部的標識RNAと比較した、 tC^O 標識RNAの最小限の攪乱を示す模式図

【0107】

【図2】図2：化合物(I)の調製のための基本的な合成スキーム。

【0108】

【図3】図3:インビトロ転写を補助するT7 RNAポリメラーゼによる全長mRNAへの tC^O の取り込み。5種類の tC^O TP/CTP比(0~100%)で形成されたRNA転写物を示す変性アガロース漂白ゲル。 tC^O 蛍光の直接可視化(a)およびエチジウムブロマイド染色後(b)。RNA試料をロード前に熱変性させた(65℃、5分間、ゲル中1.5%漂白)。(c)より厳しい変性(70℃、10分間、ゲル中2%漂白)を行った場合の同じRNA転写物。RiboRulerハイレンジRNAラダーを使用した。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 9 】

【図4】図4:インビトロ転写を補助するT7 RNAポリメラーゼによる全長mRNAへの tC^O の取り込み。5種類の tC^O TP/CTP比(0~100%)で形成されたRNA転写物を示す変性アガロース漂白ゲル。生成したRNAは、 tC^O 蛍光により直接可視化(左画像)、エチジウムブロマイド染色後(右画像)に可視化された。RNA試料をロード前にゲル上で熱変性させた(65℃、5分間、ゲル中1.5%漂白)。(b) (A)と同じRNA転写物の、より強い変性条件(70℃、10分間、ゲル中2%漂白)での変性漂白ゲル。RiboRulerハイレンジRNAラダーを使用した。

【 0 1 1 0 】

【図5】図5:インビトロで合成した tC^O 修飾RNA転写物の分光学的特性評価。全シトシン三リン酸プール(tC^O TP+CTP)中の tC^O TPの異なるモル分率で荷電した4つの反応を実施した。生成した転写物は特性評価の前に精製して、未反応の三リン酸を洗い流した。すべての反応は独立した二重で行い、結果は平均±標準偏差で示した。a)RNAバンド(約260nm)においてA=1で正規化したUV-vis吸収スペクトル、 tC^O 対Cの比の増加に伴い360nmを中心とした tC^O 吸収が増加した。挿入図: tC^O -バンド λ_{max} (360nm)における tC^O TP吸収をA=1に正規化したもの。プレーンバー:転写物中に取り込まれた tC^O の割合(取り込まれたシトシンの総量、すなわち $tC^O + C$ に対する相対値)。市松模様のバー:CTP対 tC^O TP消費の一次反応速度定数の比。c)実線:368~369nmを中心とする tC^O バンドを示すUV-vis吸収スペクトル(RNAバンド、約260nmでA=1に正規化)。破線: λ_{max} (25%および100%転写物ではそれぞれ457nmおよび459nm)においてI=1に正規化した発光スペクトル。明瞭化のため、50%および75%反応の発光スペクトルは省略した。d)プレーン棒:蛍光量子収率。縞模様の棒:蛍光の寿命。

【 0 1 1 1 】

【図6】図6:カルモジュリン-3の無細胞翻訳。a)Coomassie染色およびb)インビトロ翻訳反応のウェスタンブロット(WB)。NTC:鋳型対照なし;+:キット鋳型DNA対照。PageRuler染色済みタンパク質ラダーを使用した。c)WBおよびデンシトメトリー分析による定量化(4反復の平均値)。

【 0 1 1 2 】

【図7】図7:ヒト細胞における修飾RNAコンストラクトの翻訳効率、および細胞内追跡プローブとしての tC^O の検証。H2B:GFPがコードするタンパク質を共焦点顕微鏡で観察し、各 tC^O を取り込んだRNAコンストラクトについてフローサイトメトリーで定量化した。代表的な画像(3倍拡大、スケールバー:10 μ m)、散布図およびヒストグラムは、エレクトロポレーション24h後、(c)化学的トランスフェクション48h後の(a, b)での単一生細胞におけるシグナル分布を示している。箱ひげ図は、3回の独立した実験から得られた72時間までのGFP平均蛍光強度(MFI GFP)を示している。(d)mRFP-Rab5(初期エンドソームバイオマーカー)を過剰発現している細胞に75% tC^O mRNAをトランスフェクトし、時間をかけて細胞内追跡プローブとしての tC^O (白矢印)を検証したが、翻訳には変化がなかった(スケールバー:10 μ m)。(e)細胞は、エレクトロポレーション24h後、または非標識(NL)またはシアニン5標識(Cy5)eGFPコード化mRNA(TriLink(登録商標))でのトランスフェクション後に分析した(スケールバー:10 μ m)。(f)RNAの翻訳に対する tC^O またはCy5の取込みの影響は、すべてのコンストラクトについて非標識RNAに対するMFI GFPの比率として表された。

【 0 1 1 3 】

【図8】図8:ヒト細胞における修飾RNAコンストラクトの翻訳効率および細胞毒性評価。(a, e)エレクトロポレーションまたは(b, f)化学的トランスフェクションでトランスフェクトしたRNA- tC^O コンストラクトおよびTriLink(登録商標)からのmRNAの代表的な共焦点画像(拡大図、スケールバー:10 μ m)。(c)RNA- tC^O コンストラクトのトランスフェクション24h後、48h後、72h後のH2B:GFP陽性細胞のパーセンテージ。(d)化学的トランスフェクションの48h後の単一生細胞におけるGFPシグナル分布の代表的なヒストグラム。細胞毒性評価は、LDH細胞膜完全性アッセイを用いて、(g)エレクトロポレ

ーション後または(h)化学的トランスフェクション24h後に実行した。

【0114】

詳細な説明

実施例1：修飾核酸塩基三リン酸の合成

化合物(1)は、図2に示すスキームに従って調製することができる。特に断りのない限り、試薬は市販のものを使用し、さらに精製することなく使用した。トリリン酸化に用いた以下の試薬は、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、BTTアクティベーター。¹H(500MHz)および¹³C(126MHz)NMRスペクトルは、クライオプローブを装備したBruker 500MHz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で記録する。

10

【0115】

3-((2R,3R,4S,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-3,4-ジヒドロキシテトラヒドロフラン-2-イル)-3H-ベンゾ[b]ピリミド[4,5-e][1,4]オキサジン-2(10H)-オン1

化合物1は文献(Fuchtbauer, A. F. et al., Sci. Rep. 7, 2393 [2017])に従って調製した。

【0116】

MS (ESI-) [M-H]⁻ = 634.5. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.61 (bs, 1H), 7.42 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.27 - 7.35 (m, 7H), 7.22 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.6, 4.2 Hz, 4H), 6.75 - 6.87 (m, 3H), 6.46 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.49 (bs, 1H), 5.18 (bs, 1H), 4.08 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.94 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.29 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 3.16 (d, J = 9.1 Hz, 1H).

20

【0117】

CPG固体支持体3

LinkTech(Nu. 1397-C025、1g、0.08mmol)からのAmino-SynBase™ CPG500/110(LCAA)をDCE(8mL、0.08mmol)中のトリクロロ酢酸3%で18時間振盪することによって活性化した。次に、活性化支持体を濾過して、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(20 mL)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2日間真空下で乾燥させた。その後、この支持体(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)に懸濁させた。次に、反応混合物をRTで4時間穏やかに振盪した。4時間後、溶媒を濾過し、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)で順次洗浄し、風乾させた。ごく一部の支持体に対するニンヒドリン試験が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。その後、サクシニル化CPGは室温で数ヶ月保存できた。

30

【0118】

CPG-支持体化(2R,3R,4R,5R)-5-((ビス(4-メトキシフェニル)(フェニル)メトキシ)メチル)-4-ヒドロキシ-2-(2-オキソ-2,10-ジヒドロ-3H-ベンゾ[b]ピリミド[4,5-e][1,4]オキサジン-3-イル)テトラヒドロフラン-3-イルアセテート4

40

PTFEフィルター付き10mLシリンジで、サクシニル化支持体3(1.420g、82 μmol/g、0.12mmol)、DMAP(0.028g、0.23mmol)、DIC(719 μl、4.64mmol)、1(0.076g、0.12mmol)およびトリエチルアミン(49 μl、0.35mmol)をピリジン(5mL)に懸濁させた。この混合物を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、同じシリンジで、DMAP(0.028g、0.23mmol)、ジイソプロピルカルボジイミド(719 μl、4.64mmol)、トリエチルアミン(49 μl、0.35mmol)および2,3,4,5,6-ペンタクロロフェノール(0.309g、1.16mmol)を支持体に添加し、ピリジン(4mL)に

50

懸濁させた。混合物をRTで4h穏やかに振盪した後、ピペリジンの溶液(2 mL、DMF中20%-支持体上の未反応カルボン酸をキャッピングするため)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、曝露時間が長くなると負荷量(ローディング)が減少する)、次に、DMF(3×5 mL)、ジクロロメタン(5 mL)およびジエチルエーテル(5 mL)で洗い流した。最後に、アルゴン雰囲気下で、樹脂をCAP A+CAP B混合物(50/50 v/v)中で2時間振盪し、次に、DMF(5 mL)、ジクロロメタン(5 mL)、ジエチルエーテル(5 mL)で洗浄し、アルゴン-乾燥させた(最後のローディング:13 μmol/g-秤量した量の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-498 nmで $\epsilon=70000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。最終のローディングは、キャッピ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することができる(2回目のカップリング後の典型的なローディングは20~25 μmol/g)。反応混合物を濃縮し、残留物を水およびジエチルエーテルで複数回洗浄することにより、未反応のヌクレオシド1を85%近く回収することができる。

10

【0119】

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は、文献(Ducho, C. et al., J. Med. Chem. 50, 1335-1346 [2007])に従って調製した。簡単に説明すると、5-クロロサリチル酸を-20℃でLAH(0.5equiv.)で還元し、得られた5-クロロサリチルアルコールをアルゴン下-20℃でPCl₃(1.2equiv.)およびトリエチルアミン(2.3equiv.)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。低温および塩基としてのトリエチルアミンの使用は、目的物のより安定な2,5-ジクロロ-3H-ベンゾ[d][1,2]オキサホスホール2-オキシドへの急速かつ定量的アルブーゾフ転位を避ける上で決定的であった。その後、粗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、濃縮乾燥し、ヘプタン中の20%ジイソプロピルアミン中に取り込んだ。小さなシリカゲルのプラグで急速に濾過すると、所望の化合物5が無色の油として得られ、-20℃で経時的に結晶化した。化合物5のより徹底的なカラムクロマトグラフィーの試みは、定量的なアルブーゾフ転位につながるだろう。

20

【0120】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.23 (dd, J = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 7.20 (dd, 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). ³¹P NMR (202 MHz, DMSO-d₆) δ = 136.00 (s, 1P).

30

【0121】

ビス(テトラブチルアンモニウム)二水素ニリン酸塩6

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

【0122】

¹H NMR (500 MHz, D₂O) 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). ³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ = -10.78 (s, 2P).

40

【0123】

((2R,3S,4R,5R)-3,4-ジヒドロキシ-5-(2-オキソ-2,10-ジヒドロ-3H-ベンゾ[b]ピリミド[4,5-e][1,4]オキサジン-3-イル)テトラヒドロフラン-2-イル)メチル三リン酸7

反応は、4(800mg、0.016mmol)を装填したPTFEフィルター付き5mLシリンジ中で、アルゴン雰囲気下で振盪しながら行った。

【0124】

工程は以下のように行った：

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

50

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(345mg、1.36mmol)を4.8mL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等分のカップリング)。各カップリングに、アクティベーター(例えば、BTアクトベーター(2.4mL)またはアクティベーター42)も添加した。その後、支持体をACN(3x5mL)で洗浄した。

c. 酸化: ピリジン/水/ヨウ素(9/1/12.7 v/v/w、5mL)を45秒、次いでACN洗浄(3x5mL)、アルゴン流で支持体を乾燥。

d. 三トリリン酸化: ビス(テトラブチルアンモニウム)二水素ニリン酸塩6(0.5M、5mL)を15分および18時間、それぞれ2回注入。その後、支持体をDMF(5mL)、水(3x5mL)、ACN(5mL)で洗浄し、アルゴン流で乾燥させた。

e. 開裂および精製: 三リン酸の開裂は、AMA(23%aq.NH₄OHおよび40%aq.メチルアミンの50/50 v/v混合、5mL)を用いて室温で2時間で行った。2時間後、丸底フラスコ中でAMA濾液をパージし、23%aq.NH₄OH溶液で支持体を3回すすいだ。混合物の凍結乾燥後、HPLC(Waters Acquity HSS T3カラム、2.1x50mm、0.4mL/min、水80:20EtOH中2~99%50mM NH₄OAc)による精製を行い、淡黄色の固体(アンモニウム塩)として化合物7(5.6mg、UV吸光度から決定した62.0%)を得ることができた。AKTA pure 25 HPLCシステムのセミ分取Dionex DNAPac PA100カラム(9x250mm)を用いて、水から20%1M NH₄HCO₄(pH7.8)への勾配を用いて4mL/分の流速で30分間行ないオン交換HPLCでも同レベルの純度を達成することができた。

10

20

【0125】

HRMS (ESI-TOF) m/z calc. for C₁₅H₁₈N₃O₁₅P₃ [M+H]⁺: 574.0029, found: 574.0013; m/z calc. for C₁₅H₁₈N₃O₁₅P₃ [M-H]⁻: 571.9878, found: 571.9872. ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7.44 (s, 1H), 6.84 - 6.94 (m, 3H), 6.79 (dd, J = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 5.91 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.36 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.29 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 4.25 (d, J = 4.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 155.8, 154.8, 142.4, 129.4, 124.9, 124.3, 122.3, 116.6, 88.8, 82.8, 73.4, 69.7, 64.5. ³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ -10.89 (d, J = 18.5 Hz, 1P), -11.46 (d, J = 19.7 Hz, 1P), -23.21 (t, J = 19 Hz, 1P).

【0126】

化合物(I)は、カップリング工程(上記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(上記化合物(IIIa))などの修飾ホスホラミダイトで実施する若干変更した経路でも製造することができる。この試薬は、より容易に調製できると見出されており、本明細書の条件下で化合物5を調製する場合の収率が3~10%程度であるのに対し、化合物8は60%程度で得ることが可能である。

30

【0127】

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(1.2equiv.)およびトリエチルアミン(2.3 equiv.)を用いて2,6-ジクロロ-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2時間、ジイソプロピルアミン(3equiv.)で処理した。次に、混合物をアルゴン下で濾過し、濃縮乾燥し、ヘプタン中の20%ジイソプロピルアミン中に取り込んだ。小さなシリカゲルプラグで急速に濾過すると、所望の化合物8を無色のオイルとして得た。

40

【0128】

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

50

MHz, DMSO-d₆) δ = 137.63 (s, 1P), 127.90 (s, 1P).

【0129】

実施例2:無細胞インビトロ転写

RNA標識における化合物(I)の有用性は、GFPと融合したH2Bヒストンタンパク質をコードするDNA鋳型(H2B:GFP)から蛍光全長メッセンジャーRNA(mRNA)を産生する無細胞インビトロ転写によって証明された。

【0130】

鋳型は、コドン最適化してC反復の数を制限し、これは自己消光を防止し、輝度を改善させた。T7およびSP6といった2種類のバクテリオファージRNAポリメラーゼを用い、tC⁰TP/標準的なCTP比が0~100%(完全置き換え)の範囲で効率的な転写およびtC⁰の組み込みが観察され、アガロース漂白ゲル電気泳動で証明された(図3a:T7、図4a:SP6)。

10

【0131】

すべてのRNA転写物はゲル上で1本のバンドとして流れ、予想される1247ntのmRNA産物(H2B:GFP)に相当する大きさとなり、これは、全長mRNAが形成されていることを示している。tC⁰を含むmRNAのバンドは、302nmの励起で直接可視化することができ(図4a); tC⁰TP/CTP反応比の増加とともにバンド強度が増加することから、tC⁰の濃度依存的な取り込みに成功したことが裏付けられた。エチジウムブロマイド染色後のゲルの再可視化(図3b)により、tC⁰の取り込みが反応収率を低下させないことが、さらに定性的に示された。

20

【0132】

さらに、短い転写物は観察されておらず、これは、T7がtC⁰TPを正しく、早すぎるアポーションなしに処理することを示唆している。高次のバンドはゲルのすべてのレーンに見られるが(図3bおよび4b)、熱変性により除去され、これはRNA二次構造の存在を示唆している。注目すべきは、この特徴がCTP/tC⁰TP比とは独立して現れ、これはこの作用が修飾シトシン塩基に特異的でないことを示している。

【0133】

したがって、これらの結果は、すべての標準的なCTPがtC⁰TPによって置き換えられテイル条件下でも(0%CTP; すなわち、100%C標識効率)、tC⁰が完全長RNA転写物にうまく取り込まれ得ることを証明している。

30

【0134】

実施例3:インビトロで合成したtC⁰-修飾RNA転写物の分光特性評価

スペクトルアプローチを用いて、tC⁰TPの取込み効率を標準的なCTPと比較して定量化する。これを可能にするため、すべてのRNA転写物をMonarch RNA Cleanupキットを用いて精製し、未反応のtC⁰TPを完全に除去した。吸収スペクトル(図5a)では、約370nmを中心としたバンドが出現していることが示された。シトシンアナログtC⁰を取り込んだサンプルでは、約370nmを中心としたバンドが出現しており、この蛍光塩基アナログのスペクトルプロファイルと一致していた(図5a)。

【0135】

精製したRNA転写物の260nmでの吸収(その総濃度を反映)を370nmでの吸収(tC⁰のみから発せられる)と関連付けることにより、CTPおよびtC⁰TPの取り込みの相対速度定数(それぞれk_Cおよびk_{tC⁰}、詳細は後述)。計算された商k_C/k_{tC⁰}(図5b)の値は上記のユニティーに近いかわずかに上回り(0.96~1.4、図5b)、これは、インビトロ反応において、T7ポリメラーゼはtC⁰TPよりも標準的なCTPを実質的に優先しないことを証明している。これは、シトシンの三環式化学修飾が転写プロセスにおいて実際に最小限の攪乱であることを裏付けている。

40

【0136】

tC⁰の発光挙動は、最初の反応混合物に加えられたtC⁰TP画分との関係を調べるためにmRNA転写物でも研究した。tC⁰の取り込みの増加につれて、蛍光量子収率の大幅な低下(0.18から0.09へ、図5d)が観察された。これは、蛍光寿命の減少(4.3nsから3.2ns

50

へ)および発光スペクトルのわずかな赤方偏移(約4nm、図5c)を伴っていた。

【0137】

これは、 tC^O 蛍光体の分子状態の電子的相互作用(カップリング)および、近接する tC^O の濃度が予想以上に高くなることによる自己消光効果に起因するかもしれない。重要なことは、高い tC^O 画分におけるこの消光効果は、取り込まれた全体の数の多さとバランスがとれた、すべてのCsが tC^O によって置き換えられた転写物であっても、mRNAの可視化を妨げないということである。

【0138】

実施例4：バクテリアライセート中の tC^O -標識mRNAの翻訳

tC^O 標識mRNA転写物の機能性を確認するために、バクテリアライセートを用いた無細胞条件下での tC^O 標識カルモジュリン-3 mRNAの翻訳を検討した。17kDaのタンパク質をコードする標識mRNAは、H2B:GFPをコードするmRNAと同じ tC^O TP/CTP比(0~100%の tC^O TP)を用いて、市販のカルモジュリン-3 DNA鋳型プラスミドから転写された。RNA精製および無細胞翻訳後、カルモジュリン-3の存在をCoomassie染色(図6a)およびウェスタンブロット(図6b)により確認した。転写物の tC^O 含有量を増加させると、市販の非標識DNA鋳型対照の80%~137%の範囲で安定な発現レベルが順調に観察された(図6c)。

【0139】

実施例5：ヒト細胞における tC^O 標識mRNAの翻訳効率

エレクトロポレーションを用いて、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に、インビトロで転写された tC^O 標識mRNAを導入した。核局在の蛍光融合タンパク質(H2B:GFP)をコードしていることを利用して、翻訳を蛍光で検出した(図7、図8)。安定性を向上させ、細胞質分解を減少させるために、mRNAは5'-Cap 0アナログでキャップし、ポリ-アデニル化によって3'-保護された(約300nt)。

【0140】

生細胞共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーでは、 tC^O を25%、50%、75%、100%含むmRNAにおいて、エレクトロポレーション24h後に、それぞれ32%、25%、18%、12%の細胞で細胞核のGFP蛍光が検出できたことが示された(図7aおよび図8a)。これに対し、非修飾mRNAでのトランスフェクション効率は46%であった。これは、蛍光塩基アナログで修飾RNA転写物が、ヒトのリボソームマシナリーによって正確かつ効率的に翻訳され、正しく局在化し折り畳まれたタンパク質産物になるといった、初めての観察結果をもたらすものである。

【0141】

フローサイトメトリーを用いて、細胞内のH2B:GFP蛍光レベルを定量したところ(図7b)、転写物中の tC^O の割合が増加すると、細胞内の平均H2B:GFP蛍光強度が減少した(0%と100%の tC^O の差はおおよそ1桁(図7aおよび図7f))。このことは、この条件下では、転写とは対照的に翻訳が、特に最も高い組み込み画分において、 tC^O 修飾によっていくらか妨げられていることを示唆している。

【0142】

重要なことは、エレクトロポレーション24h後、mRNAによって誘発された細胞毒性は確認されなかったことである(図8g)。重要なことは、UTPへのコンジュゲーションを介してCy5でタグ付けされた市販の強化型GFPコードmRNA(このmRNAの全U位置の約25%が標識されている)をエレクトロポレーションした細胞培養における翻訳タンパク質の平均蛍光強度が、対応する非標識配列をエレクトロポレーションした細胞培養における蛍光強度のわずか17%だったことである(図7f)。これは、50%~75%の標識 tC^O 転写物の効果と同等であり、これは、Cy5修飾が tC^O よりもリボソーム翻訳能力に影響を与えることを示唆している。

【0143】

図7aおよび図7eの画像から明らかなように、エレクトロポレーション後の細胞内では、蛍光 tC^O 標識mRNAもCy5標識mRNAも、細胞質濃度が低い/拡散しているため検出

10

20

30

40

50

できない。そこで、薬物送達の観点からもより適切な化学的トランスフェクション試薬(リポフェクタミン)を用いて、H2B:GFP転写物の送達を検討した。その結果、tC⁰含有量に関わらず、H2B:GFPの産生に成功したが(図7c、8b、8d)、送達効率は低かった(tC⁰標識転写物ではH2B:GFP陽性細胞の3.8~4.6%、エレクトロポレーション後は12~32%)。このことは、SH-SY5Y細胞が他の多くの細胞株と比較して、tC⁰標識コンストラクトのトランスフェクト能力よりもむしろ相対的に低いトランスフェクト能力を反映しており、非修飾mRNAをトランスフェクトした培養物が実質的に同一の反応を示した(H2B:GFPを発現する細胞の4.5%)ことから、さらに裏づけられた。

【0144】

H2B:GFPの蛍光は、24時間から72時間の間に時間とともに徐々に増加することが見出され(図7c)、これは、エレクトロポレーションした細胞(図7a)と比較して対照的な挙動であり、このことは、リポフェクタミン-mRNA複合体が継続的に内在化され、潜在的には、細胞内に取り込まれた複合体が時間とともに徐々に多くの転写物を放出し、サイトゾルにおける分解作用を妨害することを示唆している。

【0145】

リポフェクタミンを用いて送達した場合、tC⁰標識mRNAは、図7fの蛍光レベルによって示されるように、対応する非標識mRNAと比較して非常によく似たH2B:GFP翻訳を促進することが見出された。一方、Cy5タグ付きmRNAは、対応する非標識転写物と比較して、80%低い平均蛍光レベルとなった。これは、tC⁰が化学的トランスフェクション時にリボソームによって処理されるmRNAの能力を損なわないことを示唆しており、これは、おそらく電荷の不存在および立体障害の減少によるものであるが、現在mRNA標識用の最も一般的な市販の蛍光体であるCy5は、mRNAに大きな両親媒性物質が導入され、CY5-mRNAと親油性膜成分との間に非親水性相互作用が生じるため、mRNAの翻訳プロセスに大きな影響を与え、および/または天然様取り込みプロセスを阻害するからである。

【0146】

重要なことは、tC⁰標識mRNAをリポフェクタミンと複合化することで、生細胞共焦点顕微鏡を用いて細胞内の直接可視化が可能になった(図7c)。これは、細胞内での蛍光塩基アナログ標識核酸の初めての観察を示す。また、蛍光塩基アナログ修飾mRNAの取り込みおよびその後の翻訳を、タイムラプス記録によりリアルタイムで同時に可視化できることも見出された。tC⁰シグナルとmRFP標識Rab5タンパク質の共局在化が観察され、したがってmRNAが初期エンドソームを通過することを強調している(図7d)。したがって、本技術により、tC⁰含有量が50%という低い場合でも、内部標識mRNA転写物とその翻訳産物の両方をライブで追跡し、翻訳産物に関する空間時間的な情報を収集することが可能である。このことは、この新しい標識アプローチの柔軟性および汎用性を示しており、tC⁰含有量を微調整することで、特定の薬物送達適用にmRNAを最適化することができる。

【0147】

実施例6：生化学的方法

H2B:GFP DNA鋳型の作製

H2B:GFPの元来のコード配列は、pCS2-H2B:GFPプラスミド(Addgene、プラスミド#53744、追加のT7プロモーターと所望の特徴(翻訳を促進するためのShine-Dalgarno/Kozakコンセンサス配列、およびコード配列自体の5'および3'にそれぞれ位置する3xStop、ならびに連結傾向のある粘着末端を生成するのに必要なHindIII/SnaBI制限部位)を有するin silicoで組み立てられた、ポリCnストレッチの発現を最小にするよう(n<3)手動でコドン最適化している)から採取し、合成遺伝子ブロックとしてTwist Bioscience社に注文したものである。次に、得られた配列をPhusion Hot Start High-Fidelity Taq(Thermo Scientific)を用いてPCR増幅し、HindIII/SnaBIで消化された(Fast Digest enzymes, Thermo Scientific)空のpCS2バックボーンにサブクローニングした。T4リガーゼを用いて室温で1時間ライゲーションした後(Roche)、DH5

10

20

30

40

50

α 大腸菌コンピテント細胞(Invitrogen)を推奨プロトコルに従って形質転換させ、得られたコロニーをコロニーPCRでスクリーニングした。次に、選択したコロニーをmidiprepスケール量の液体Luria-Bertani成長培地(VWR)に接種し、PureLink Fast Low-Endotoxin Midiプラスミド精製キット(Thermo Scientific)を用いてプラスミドDNAを単離した。精製したプラスミドを最後に再度HindIII/SnaBIで消化し、ゲル精製を行い、所望のサイズの転写鋳型を作製した。

【0148】

プライマーs (Eurofins Genomics):

Twist-H2B.F: GAAGTGCCATTCCGCCTGAC

Twist-H2B.R: CACTGAGCCTCCACCTAGCC

10

【0149】

H2B:GFP RNAの転写および精製

T7およびSP6ポリメラーゼ(Thermo Scientific)用のインビトロ転写反応は、対応するプロトコルの推奨通りに組み立てたが、いくつかの修正を加えた結果、すべての条件で収量を一貫して増加させることができた:

1. 5X転写緩衝液-10 μ l
2. NTP Mix、各10mM(最終濃度2mM)-tC⁰TPのバッチに応じた容量
3. 直鎖化した鋳型DNA 1 μ g-濃度に応じた容量
4. RiboLock RNase阻害剤-1.25 μ l(50U)
5. T7/T3/SP6 RNAポリメラーゼ-3 μ l(60U、推奨値の2倍)
6. MgCl₂ 4mM最終濃度(Thomen, P. et al. Biophys. J. 95, 2423-2433 [2008]の推奨値より向上したもの)
7. DEPC処理水 qsp 50 μ l

20

【0150】

インビトロ転写は常に20 で14時間行い、次に、Monarch RNA Cleanupキット(NEB)またはホームメイドの同等の緩衝液を用いてRNAを精製し、同じ理論的根拠に従ってカラムを再生させた。転写混合物から未反応のtC⁰TPをHPLCで部分的に回収し、さらなるアッセイに再利用することが可能であった。細胞研究のために、次に、RNAの各バッチを、推奨される手順に従って、ポリAテール(ポリ(A)ポリメラーゼ、NEBプロトコル# M0276でインキュベーションを1時間に延長)およびCap 0アナログ(Vacciniaキヤッピングシステム、NEBプロトコル# M2080を使用)で酵素的に付加させた。

30

【0151】

変性漂白-アガロースゲル

すべてのインビトロ合成RNAを定性的に確認するため、Aranda, P. S., LaJoie, D. M. & Jorcyk, C. L., Electrophoresis 33, 366-369 [2012]で推奨されているように、変性アガロースゲルを1.5%漂白剤(Sigma Aldrich)の存在下で走査した。RNAは、まず6xDNAローディング染料(Invitrogen)と混合し、次に、加熱ブロックで70、10分間熱変性させ、次に、直ちに移動させて氷上に保持した。RiboRuler High Range RNAラダー(Thermo Scientific)も同様の処理を行い; 2 μ lのRNAラダーを試料に沿わせて、ゲルを定電圧(70V)で1時間作動させ、次に、ChemiDoc Touch(BioRad)を用いてUV透視(302nm)下、画像化した。ゲル全体、特にtC⁰TP含有試料のないレーンをカウンターステインするために、最後に標準的なエチジウムブロマイド染色を室温で10分間、穏やかにロッキングしながら行い、次いで、TAEで2回洗浄し、最後に蒸留水で(10分間ずつ)洗浄した。

40

【0152】

細胞培養

ヒト神経芽腫SH-SY5Y細胞(Sigma-Aldrich)を、10%ウシ胎仔血清(FBS)、1%非必須アミノ酸(Lonza)および2mMのL-グルタミンを添加した、最小必須培地(HyClone)と栄養混合物F-12 Ham(Sigma-Aldrich)の1:1混合物で増殖させた。追跡実験では、mRFP-Rab5を安定的に過剰発現しているヒト肝Huh-7細胞の社内生成モデルを、10%

50

FBSを添加したDMEM/GlutaMax/High glucose(Gibco)で培養した。細胞をトリプシン-EDTA 0.05%(Gibco)で剥離し、週2回継代した。

【0153】

エレクトロポレーションまたは化学的トランスフェクション

細胞を、Neonトランスフェクションシステム(Invitrogen, Carlsbad, CA, US)を用い、製造業者が提供した10 μ LのNeon Tipのプロトコルに沿って、1200Vのトリプルパルスと20msのパルス幅で、105細胞あたり9.7 μ gのtC⁰TP(インビトロ取り込み実験用)または100ngのtC⁰標識mRNA(インビトロ翻訳、細胞毒性評価、フローサイト分析、共焦点顕微鏡用)でエレクトロポレーションした。化学的トランスフェクションでは、トランスフェクションの前日に、SH-SY5Y細胞を0.8 $\times 10^6$ 細胞/s/mLの密度で、48ウェルプレートまたはガラス底の培養皿に播種し、それぞれフローサイトメトリーまたは共焦点顕微鏡分析に使用した。トランスフェクションのための化学試薬として、リポフェクタミンメッセンジャーMAX(Lipofectamine MessengerMAX)を製造業者の使用説明書に従って使用した。簡単に言えば、試薬を希釈し、Opti-MEM培地中で室温で10分間インキュベートした。tC⁰-mRNAコンストラクトを試薬に加え、試薬-mRNAの最終比率が1:1(v/w)になるようにし、その後、室温で5分間インキュベートして、mRNA-脂質の複合体が形成されるようにした。細胞をこの複合体とともに72時間までインキュベートした。RNA翻訳に対する色素取り込みの影響に対処するために、本明細に記載されているように、SH-SY5Y細胞をエレクトロポレーションするか、市販の非標識(NL)またはCyanine5標識(Cy5)eGFPをコードするmRNA(Trilink(登録商標))で化学トランスフェクトした。

【0154】

細胞毒性評価

細胞膜の完全性は、PierceTM LDH細胞毒性アッセイキット(Invitrogen)を用いて、製造業者の使用説明書に従って測定した。簡単に言えば、tC⁰標識mRNA、またはCy5-mRNAでエレクトロポレーションまたはトランスフェクション24h後細胞の上清中に放出されたLDHを、テトラゾリウム塩を赤色ホルマザン生成物に変換することになる結合酵素アッセイで測定した。吸光度は490nmと680nmで記録した。毒性は、最大LDH放出量(上清+細胞溶解物)と比較した上清中のLDH放出量の割合で示した。データは3回行った実験の平均値 $\pm$ SDである。

【0155】

フローサイトメトリー

tC⁰標識mRNAのエレクトロポレーション後、細胞を48ウェルプレートに播種し(2.105細胞/ウェル)、フローサイトメトリーにより細胞内のH2B:GFPの発現を定量化した。簡単に言うと、エレクトロポレーション、またはtC⁰-mRNA、非標識mRNA、Cy5-mRNAによるトランスフェクション24h後、48h後、72h後、細胞を採取し、Guava EasyCyte 8HTフローサイトメーター(Millipore)で分析した。データは、三重に行った3つの実験から得られたゲーティングされた単一生細胞の平均蛍光強度 $\pm$ SDである。平均蛍光強度は、RNaseフリー水でエレクトロポレーションまたはトランスフェクトした細胞のシグナルを差し引くことによってベースライン補正した。すべてのフローサイトメトリーデータは、Flowingソフトウェア(バージョン2.5.1)で分析し、R(<http://www.R-project.org/>)を用いて表示した。H2B:GFP:励起488nm; 発光525~530nm。

【0156】

共焦点顕微鏡

エレクトロポレーション後、細胞をガラス底の培養皿(MatTek社製ガラス底または4分割したCELLviewディッシュ; 2.105細胞/室)に播種した。追跡実験のために、mRFP-Rab5を安定的に過剰発現しているHuh-7細胞をリポフェクタミン/tC⁰-mRNA複合体とともにインキュベートし、化学的トランスフェクション後20hまでタイムラプスを記録した。共焦点画像は、C2-DUVB GaAsP Detector Unitを備え、油浸60 $\times$ 1.4 NA Nikon APO対物レンズを用いたNikon C2+共焦点顕微鏡で取得した(Nikon Instrume

nts, Amsterdam, Netherlands)。データはFijiソフトウェアで処理した。H2B:GFP:励起488nm;発光495~558nm。tC⁰標識mRNA:Exc.405nm;Em.447~486nm。Cy5標識mRNA:Exc.640nm、Em.652~700nm。mRFP-Rab5:Exc.561nm;Em.565~720nm。

【0157】

無細胞翻訳

無細胞翻訳反応は、大腸菌のバクテリアライセートおよびExpresswayTM Mini Cell-Free Expression System(Thermo Scientific)を用いて実施した。カルモジュリン様3タンパク質は、陽性対照プラスミド(pEXP5-NT/CALML3)としてキット自体に含まれており;このDNAベクターは、T7ポリメラーゼプロモーターおよび6xHisタグを含むため、まず所望濃度のtC⁰TP存在下でインビトロ転写した(vide supra)。得られたRNAを精製したら、製造業者の推奨に従って無細胞翻訳反応の鑄型として使用した:大腸菌slyD-抽出物-20μl;2.5X IVPS大腸菌反応緩衝液(-A.A.)-20μl;50mM アミノ酸(-Met)-1.25μl;75mM アミノ酸(-Met)-1.25μl;75mM Methionine*-1μl;T7 Enzyme Mix-1μl(tC⁰標識RNAを使用する場合は省略);DNA鑄型-1μg(tC⁰標識RNAを試験する場合は、代わりに同量のRNAを追加);DNase/RNaseフリーの蒸留水 qsp 50μl。

10

【0158】

Coomassie染色およびウェスタンブロット

インビトロ翻訳実験から得られたタンパク質試料を、Qubitタンパク質アッセイキット(Thermo Scientific)を用いて定量化し、6xSDS Laemmli還元緩衝液(Alfa Aesar)と混合し次に、85℃で10分間熱変性させ、必要になるまで室温に保った。試料は通常、1mmポリアクリルアミド4~20%Novex MES/SDSゲル(Thermo Scientific)で、PSUを定電圧(200V)に設定したMini Gel Tankを用いて実行した。Coomassie染色は、ゲルを沸騰水で3回洗浄し、過剰のSDSを除去し、卓上シェーカーで行い;1xCoomassie無毒性染色溶液をゲルに加え、最初の沸騰まで電子レンジにかけた。

20

【0159】

ゲルは、適切なインキュベーション時間の後、蒸留水で最終的に洗浄して過剰なバックグラウンドノイズを除去し、ChemiDoc Touchを用いて画像化した。ウェスタンブロットにおいて、ゲルをTransBlotセミドライシステム(BioRad)を用いてPVDF LFエタノール-活性化膜(BioRad)に製造業者の推奨に従ってブロットした(1mm厚ゲルおよび混合重量タンパク質用の設定)。PVDF膜をTBS-T(TBSおよび0.1%ツイーン-20、Sigma Aldrich)で5分間洗浄し、TBS中の5%牛乳で室温で1時間ブロッキングし、適切な一次抗体の希釈溶液とインキュベートした。

30

【0160】

TBSTで3x5分間洗浄し、対応するHRPコンジュゲート二次抗体で1時間インキュベートした後、膜をTBS-Tで3回、TBSで1回、蒸留水でもう1回洗浄した。最後に、膜を最小容量のSuperSignal West Pico PLUS(Thermo Scientific)でインキュベートし、ChemiDoc Touchで画像化した。一次抗体:マウスモノクローナル抗6xヒスチジンtag(Invitrogen)およびマウスモノクローナル抗GAPDH(ref.437000、Invitrogen)、両方とも3%BSA/TBS-T中で1:1000希釈したもの。二次抗体:HRPコンジュゲートポリクローナルヤギ抗Msおよび抗Rb 交差吸着したIgG(H+L)(ref.A16072およびA16104、Invitrogen)、TBS-T中で1:10000希釈で使用した。

40

【0161】

実施例8:スペクトル法

無細胞転写反応から得られたtC⁰-RNA産物(ポリアデニル化およびキャッピングの前、詳細はMethods: Bioを参照)は、受け取ったまま、すなわちRNaseフリーのMilli Q水中で測定した。すべての測定は、光路長3.0mmの石英キュベット内で室温(約22℃)で、試料容量は約60μLで行った。

【0162】

50

安定した状態の吸収

吸収スペクトルは、Cary 5000(Varian Technologies)分光光度計で、波長間隔1.0nm、積分時間0.1s、およびスペクトルバンド幅(SBW)1nmで記録した。すべてのスペクトルを、溶媒のみから対応する吸収を差し引くことによってベースライン補正した。2次多項式Savitzky-Golay(5点)平滑化フィルターを全スペクトルに適用した。長波長領域(ここでは $\lambda = 475\text{nm}$)に特徴的な吸収があることから証明されるように、有意な散乱を示す試料については、追加の補正を適用した。このような場合、吸収に対する散乱寄与(A_{scatter})を、 c を比例定数、 A_0 を定数とするレイリー散乱関数(式S1)に(550-475nmの吸収を入力として)フィッティングし、次に、すべての波長で引き算した。

【数 1】

10

$$A_{\text{散乱}}(\lambda) = \log\left(\frac{1}{1 - c \times \lambda^{-4}}\right) + A_0 \quad (\text{S1})$$

【0 1 6 3】

定常状態発光

発光スペクトルは、SPEX Fluorolog(Jobin Yvon Horiba)の蛍光光度計で356nmで励起し、記録した。発光は、積分時間0.1s、波長間隔1nmで直角に収集した。モノクロメータースリットを最適な信号出力を達成するように調整し、励起側と発光側の両方で1.5~2.5nmの間隔でSBWが得られるようになった。発光スペクトルは、溶媒のみを含む試料からの対応する発光を差し引くことによって、ラマン散乱を補正した。二次多項式Savitzky-Golay(5点)平滑化フィルターを全スペクトルに適用した。

20

【0 1 6 4】

蛍光量子収率の測定

試料の蛍光量子収率

【化 1 0】

(Φ_F)

は、0.5 M H_2SO_4 中の硫酸キニーネ(Sigma)の溶液

30

【化 1 1】

$(\Phi_{F,REF} = 0.546)$

に対して測定し、式S2に従って計算した。

【数 2】

$$\Phi_F = \Phi_{F,REF} \times \frac{\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I_S(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I_{REF}(\lambda) d\lambda} \times \frac{A_{REF}}{A_S} \times \frac{\eta_S^2}{\eta_{REF}^2} \quad (\text{S2})$$

40

【0 1 6 5】

試料

【化 1 2】

$I_S(\lambda)$

および参照用

50

【化 1 3】

$$I_{REF}(\lambda)$$

の発光スペクトルは、

【化 1 4】

$$\lambda_i = 365 \text{ nm}$$

と

【化 1 5】

$$\lambda_f = 700 \text{ nm}$$

の間で積分させた。試料

【化 1 6】

$$(A_S)$$

および参照用

【化 1 7】

$$(A_{REF})$$

の励起波長(356nm)における吸収は、すべての試料で0.05～0.11の間隔であった。試料(水)および参照用(0.5M H₂SO₄)の溶媒屈折率はそれぞれ、

【化 1 8】

$$\eta_S = 1.333$$

および

【化 1 9】

$$\eta_{REF} = 1.339$$

であった。すべての量子収率は、2回の独立した無細胞転写反応の平均±標準偏差で示した。

【0 1 6 6】

時間分解発光

蛍光寿命は、時間相関単一光子計数法(TCSPC)を用いて測定した。試料を、377nmを発光中心とするLDH-P-C-375(PicoQuant)パルスレーザーダイオード(波長および時間に対するFWHMパルス幅はそれぞれ1nmおよび70ps)を用いて励起し、PDL 800-B(PicoQuant)レーザードライバを用いて、繰り返し周波数10MHzで動作させた。試料発光(458nm、SBW=10nm)は、54.9°に設定した発光偏光子を介して直角に収集した(マジックアングル検出)。フォトンカウントはR3809U 50マイクロチャンネルプレートPMT(Hamamatsu)で記録し、2048アクティブチャンネル(24.4ps/チャンネル)のLifeSpecマルチチャンネル分析器(Edinburgh Analytical Instruments)に、トップチャンネルで104カウントの停止条件が満たされるまで供給した。装置応答関数(IRF)は、377nm(SBW=10nm)の発光を観察しながら、すりガラス(散乱)モジュールインサート

10

20

30

40

50

を用いて測定した。

【 0 1 6 7 】

蛍光寿命のフィッティング

強度減衰は、式S3に示す多重指数モデルにIRFリコンボリューションでフィッティングした。

【 数 3 】

$$I(t) = \int_0^t IRF(t') \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' \quad (S3)$$

10

【 0 1 6 8 】

最小二乗リコンボリューションフィッティング手順は、DecayFitソフトウェア(<http://www.fluortools.com/software/decayfit>)を用いて行った。すべての減衰は3重指数モデル(n=3)にフィットさせた。提示された寿命は振幅加重平均寿命：

【 化 2 0 】

($\bar{\tau}$)

で、式S4に従って前指数因子

【 化 2 1 】

20

α_i

および寿命：

【 化 2 2 】

(τ_i)

を用いて計算したものである。減衰のフィッティングパラメータは表2に示す。

【 数 4 】

30

$$\bar{\tau} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i \quad (S4)$$

【 表 1 】

	転写	α_1	τ_1 (ns)	α_2	τ_2 (ns)	α_3	τ_3 (ns)	$\bar{\tau}$ (ns)	χ^2
セット1	25%	0.19	0.67	0.49	3.2	0.31	5.6	3.5	1.09
	50%	0.28	0.71	0.43	2.8	0.30	5.2	2.9	1.06
	75%	0.33	0.68	0.45	2.6	0.23	5.2	2.5	1.12
	100%	0.33	0.48	0.44	2.1	0.23	4.8	2.2	1.00
セット2	25%	0.21	0.63	0.40	2.8	0.34	5.3	3.3	0.99
	50%	0.26	0.64	0.41	2.7	0.30	5.2	3.0	1.03
	75%	0.29	0.50	0.42	2.1	0.22	4.8	2.4	1.02
	100%	0.37	0.47	0.40	1.9	0.39	4.5	2.0	1.01

40

【 0 1 6 9 】

無細胞転写反応カイネティクス

シトシン対tC^Oの取り込みの比：

50

【数 5】

$$(k_C/k_{tC^0})$$

を、 tC^0 -RNA転写物(A_{260} および A_{369})の吸収スペクトルを用いて、三リン酸の初期濃度[CTP]および $[tC^0TP]$ を入力として計算した。式S5およびS6は、三リン酸種[CTP]および $[tC^0TP]$ に関して一次反応速度論を仮定した上で導かれる。

【数 6】

$$\frac{d[CTP]}{dt} = -k_C \times [CTP] \quad (S5)$$

10

【数 7】

$$\frac{d[tC^0TP]}{dt} = -k_{tC^0} \times [tC^0TP] \quad (S6)$$

【0 1 7 0】

S5およびS6をそれぞれの速度定数について解くとS7式となり、 $[C]$ および $[tC^0]$ はそれぞれ取り込まれたCおよび tC^0 の濃度を示す。

20

【数 8】

$$\frac{k_C}{k_{tC^0}} = \frac{\ln\left(\frac{[CTP]_0}{[CTP]_0 - [C]}\right)}{\ln\left(\frac{[tC^0TP]_0}{[tC^0TP]_0 - [tC^0]}\right)} \quad (S7)$$

【0 1 7 1】

Lambert-Beer法を用いて、Lambert-Beerの法則を使用すると、吸収を式S8およびS9に従って核酸塩基濃度に関連付けさせた。次のモル吸光係数(単位: $M^{-1}cm^{-1}$)を採用した:

【数 9】

30

$$\varepsilon_{260}^{tC^0} = 12200, \varepsilon_{260}^C = 7400, \varepsilon_{260}^G = 11800, \varepsilon_{260}^U = 9300, \varepsilon_{260}^A = 15300, \varepsilon_{369}^{tC^0} = 9370.$$

【数 1 0】

$$A_{260} = 0.9 \times l \times (\varepsilon_{260}^{tC^0} \times [tC^0] + \varepsilon_{260}^C \times [C] + \varepsilon_{260}^G \times [G] + \varepsilon_{260}^U \times [U] + \varepsilon_{260}^A \times [A]) \quad (S8)$$

【数 1 1】

$$A_{369} = l \times \varepsilon_{369}^{tC^0} \times [tC^0] \quad (S9)$$

40

【0 1 7 2】

生成されたRNAのサイズが均一であると仮定すると(1247ヌクレオチド)、その塩基組成(A:408、U:272、G:307、C:260)から式S10~S13が可能になる。

【数 1 2】

$$[tC^0] + [C] = [RNA] \times 260 \quad (S10)$$

$$[A] = [RNA] \times 408 \quad (S11)$$

$$[U] = [RNA] \times 272 \quad (S12)$$

$$[G] = [RNA] \times 307 \quad (S13)$$

【 0 1 7 3 】

S7 ~ S13で構成される方程式系を解くことで、

10

【 数 1 3 】

$$k_C/k_{tC^0}$$

、 $[tC^0]$ 、 $[RNA]$ 、 $[C]$ 、 $[A]$ 、 $[U]$ 、 $[G]$ の定量化が可能になる。平均ストランド tC^0 の
取り込み度：

【 化 2 3 】

$$(\theta_{tC^0})$$

20

は、式S14に従って計算できた。

【 数 1 4 】

$$\theta_{tC^0} = \frac{[tC^0]}{[C] + [tC^0]} \quad (S14)$$

【 0 1 7 4 】

無細胞反応液の容量(50 μ L)および得られた生成物溶液の容量(100 μ L)を用い、式S1
5を適用して tC^0 の取り込み収率：

30

【 化 2 4 】

$$(\eta_{tC^0})$$

を計算した。

【 数 1 5 】

$$\eta_{tC^0} = \frac{[tC^0] \times 100 \mu L}{[tC^0 TP]_0 \times 50 \mu L} \quad (S15)$$

【 0 1 7 5 】

40

その結果、RNA収率：

【 化 2 5 】

$$(\eta_{RNA})$$

は、式S16に従って計算した。

【 数 1 6 】

$$\eta_{RNA} = \frac{[RNA] \times 100 \mu L}{[tC^0 TP]_0 \times 50 \mu L} \quad (S16)$$

50

【 0 1 7 6 】

結論

本明細書は、シトシンの人工的なサイズ拡大アナログが天然型シトシンの役割を果たし、リボソームを含むいくつかの酵素マシナリーによって正しく認識されることを実証している。この蛍光塩基アナログであるtC⁰は、異なるサイズのRNAの適切な固有のイメージング標識であることが実証され、ネイティブな特性を最小限に抑え、酵素標識プロセスとの互換性がある。

【 0 1 7 7 】

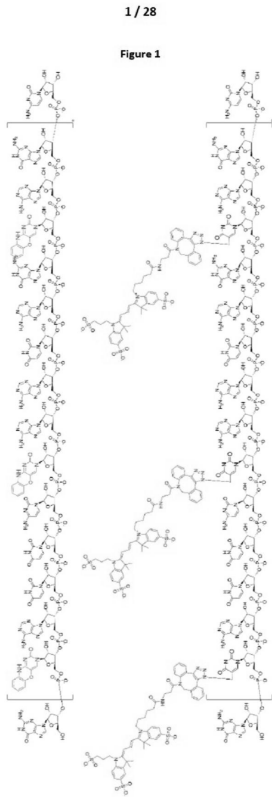
修飾転写物は、tC⁰の取り込みの程度にかかわらず、バクテリアライセートおよび真核生物系の両方において無毒で、翻訳活性がある。このため、選択的励起を用いた生細胞共焦点顕微鏡において、mRNAの取り込みとH2B:GFPへの翻訳を同時にモニターすることができ、このアプローチは、GFPファミリータンパク質で同様にタグ付けされたあらゆるタンパク質の翻訳に適用できるはずである。

【 0 1 7 8 】

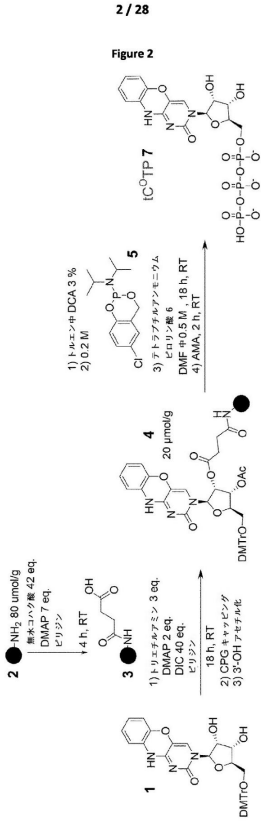
本明細書に開示されている内部蛍光RNA標識方法論は、エンドソーム逸脱またはエキソソーム形成などの細胞輸送メカニズムをリアルタイムで解明する優れた非侵襲的方法であり、いずれも医薬的適用にとって基本的に重要である。このように、生細胞イメージング技術は、次世代核酸ベースの医薬の新しい送達戦略を可能にするものである。

【 図 面 】

【 図 1 】



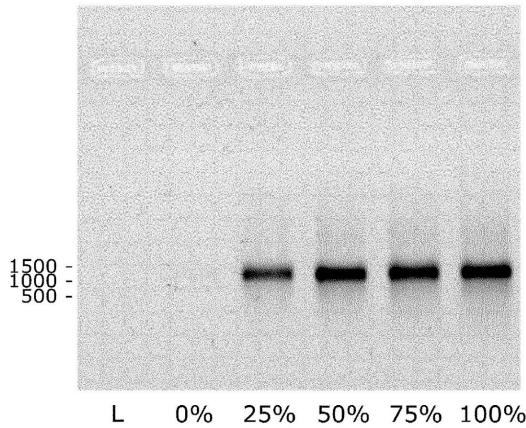
【 図 2 】



【 図 3 a 】

3 / 28

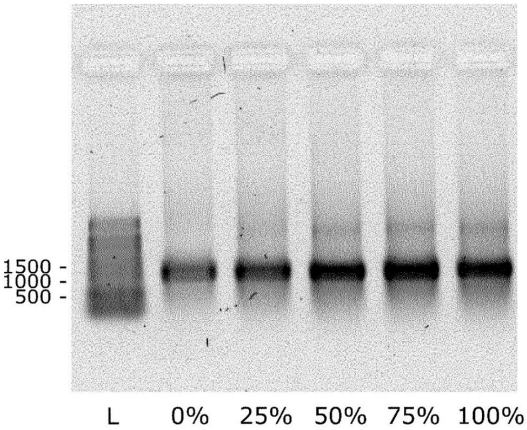
Figure 3a



【 図 3 b 】

4 / 28

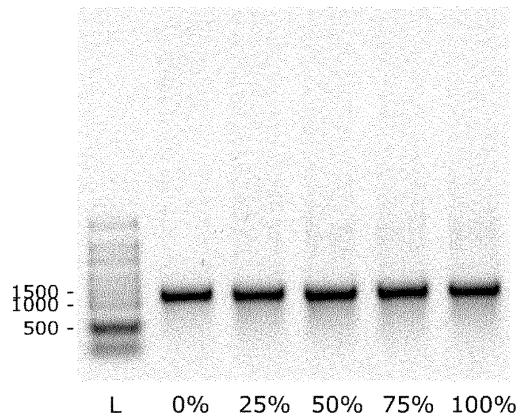
Figure 3b



【 図 3 c 】

5 / 28

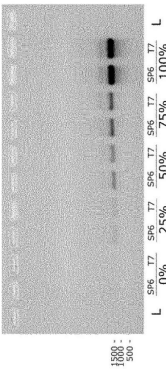
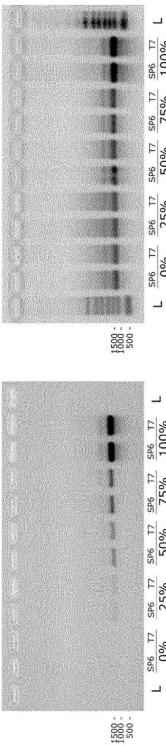
Figure 3c



【 図 4 a 】

6 / 28

Figure 4a



10

20

30

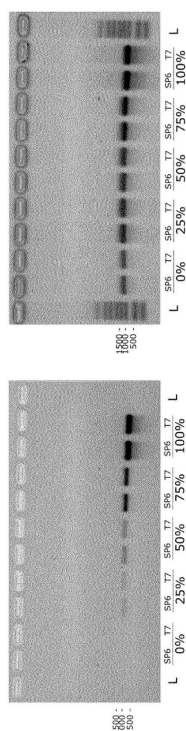
40

50

【 図 4 b 】

7 / 28

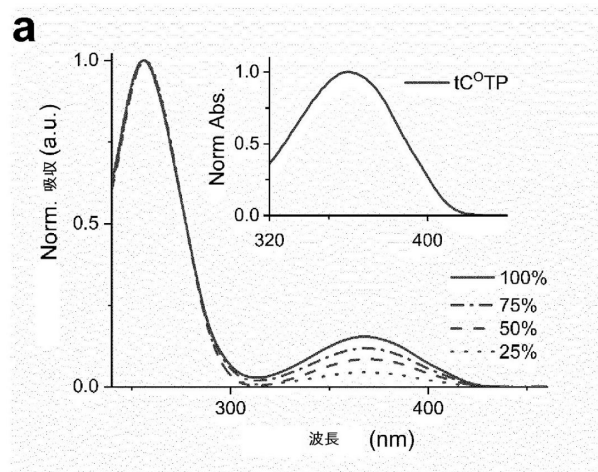
Figure 4b



【 図 5 a 】

8 / 28

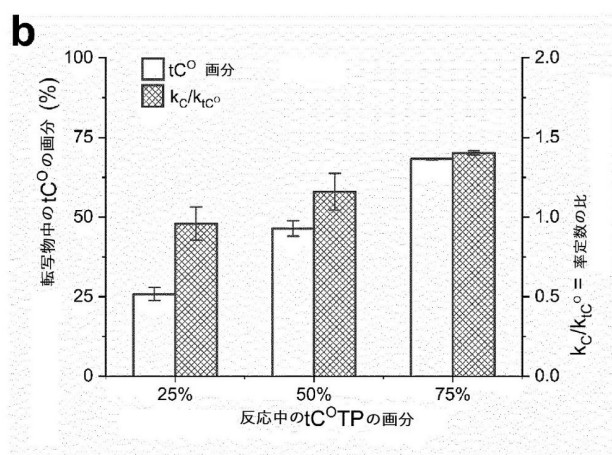
Figure 5a



【 図 5 b 】

9 / 28

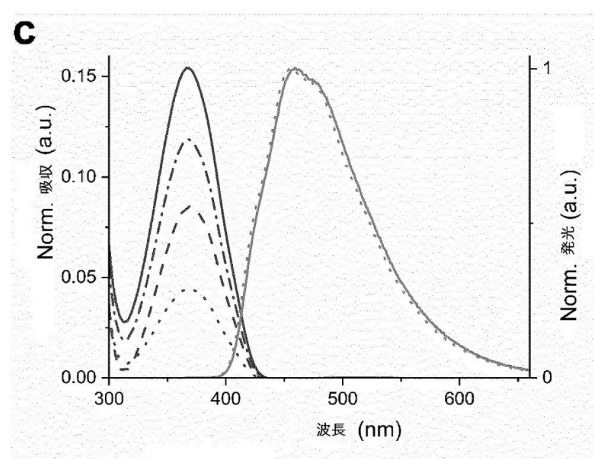
Figure 5b



【 図 5 c 】

10 / 28

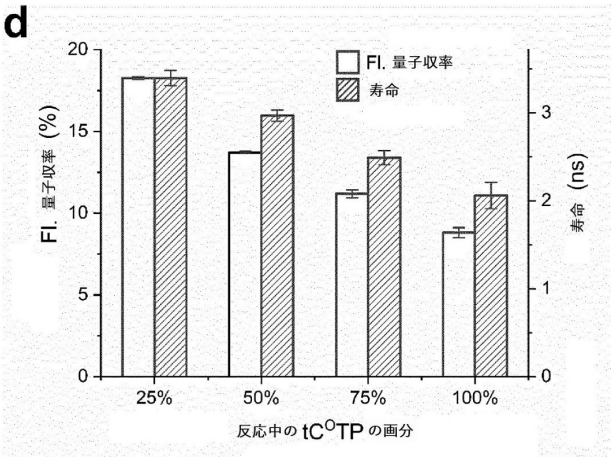
Figure 5c



【 図 5 d 】

11 / 28

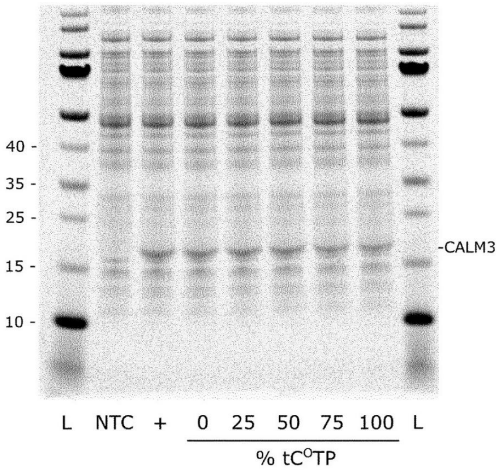
Figure 5d



【 図 6 a 】

12 / 28

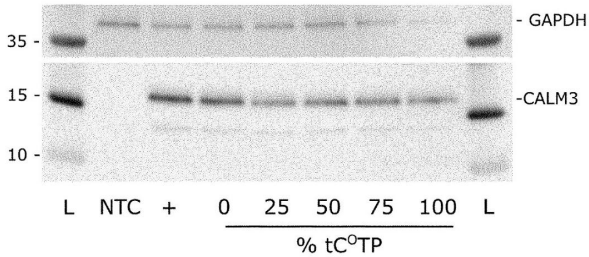
Figure 6a



【 図 6 b 】

13 / 28

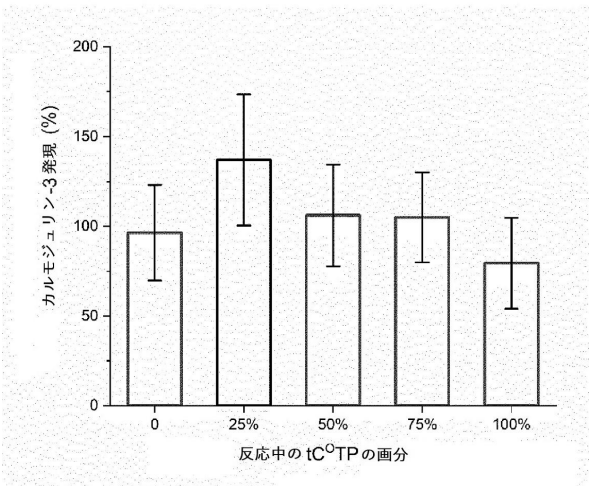
Figure 6b



【 図 6 c 】

14 / 28

Figure 6c



10

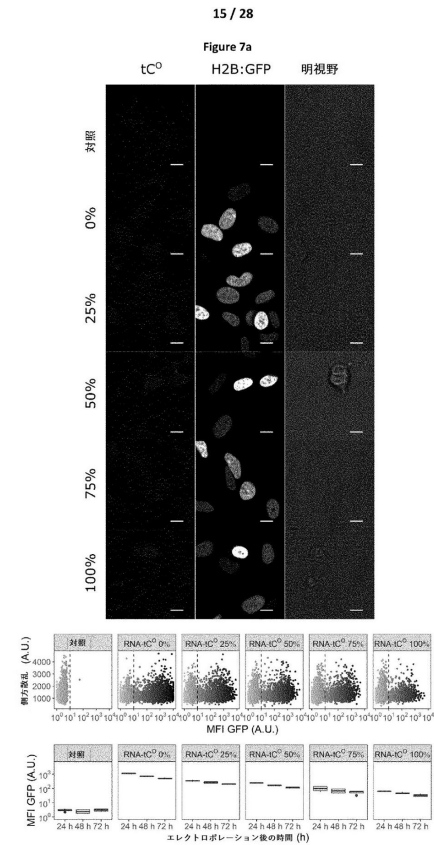
20

30

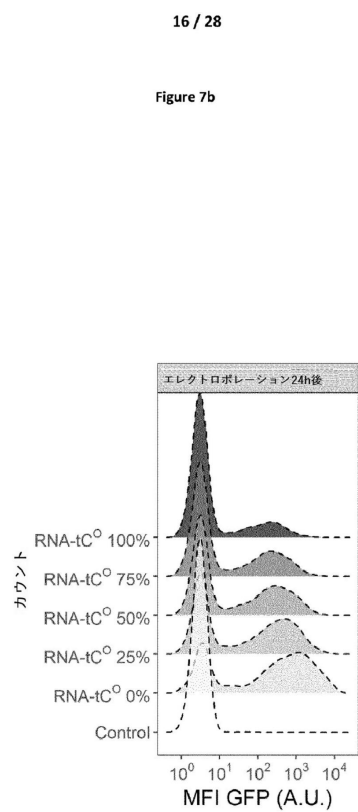
40

50

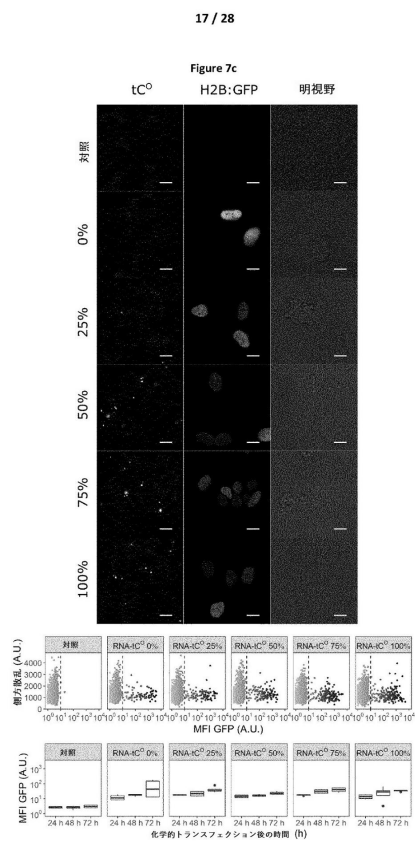
【図 7 a】



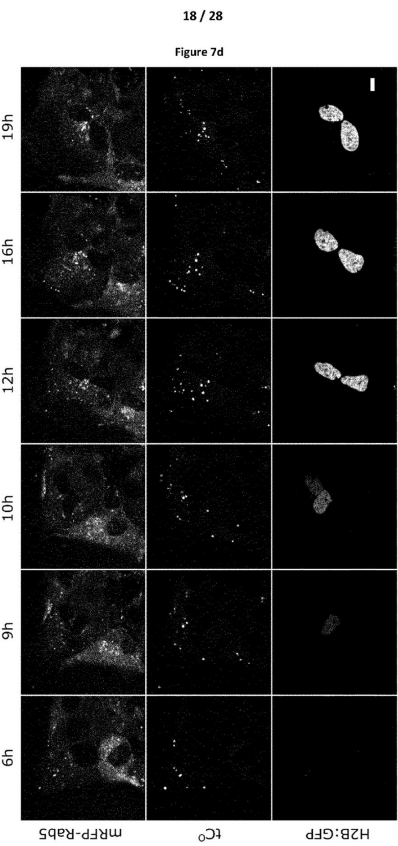
【図 7 b】



【図 7 c】



【図 7 d】



10

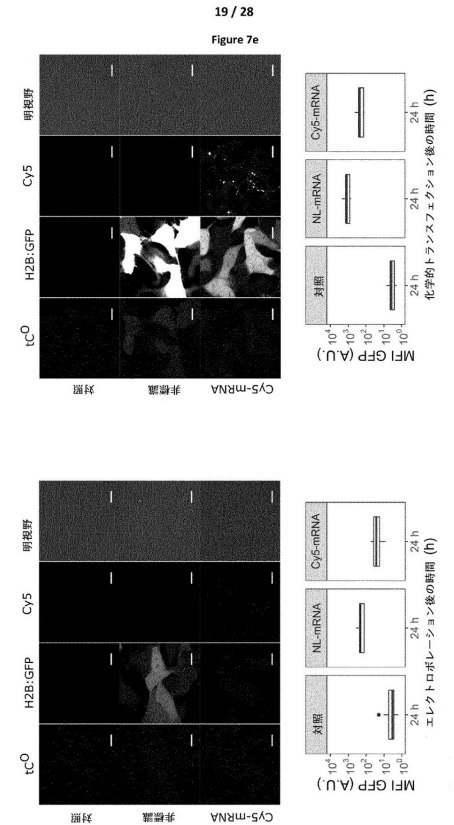
20

30

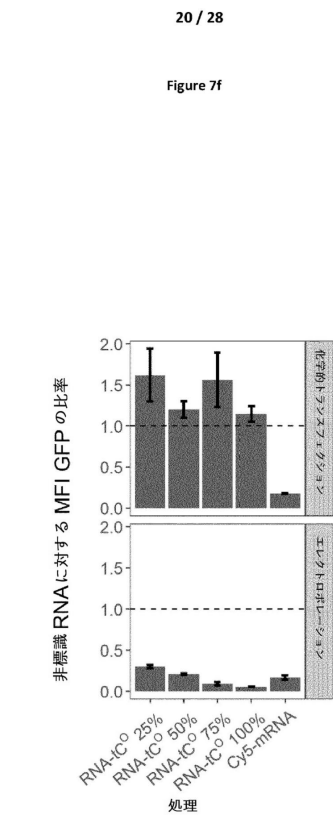
40

50

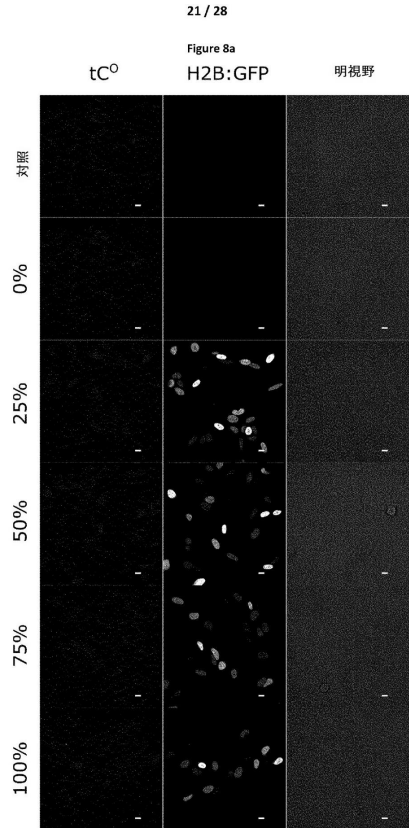
【 図 7 e 】



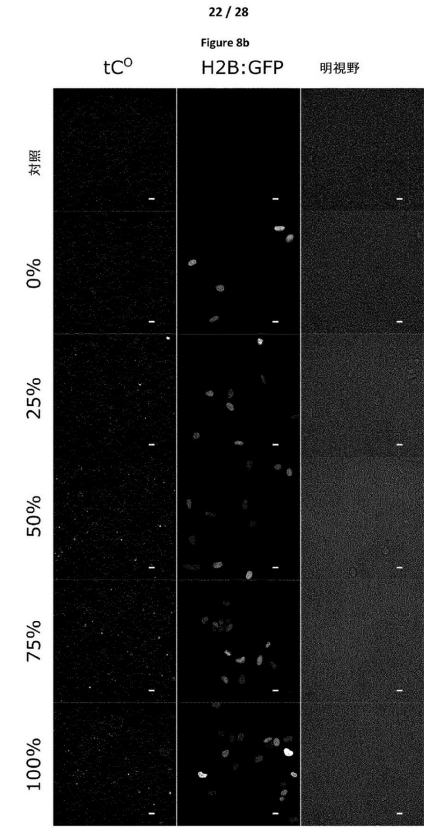
【 図 7 f 】



【 図 8 a 】



【 図 8 b 】



10

20

30

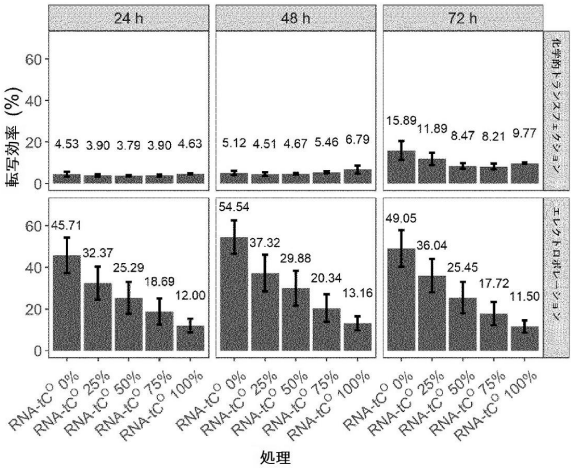
40

50

【 図 8 c 】

23 / 28

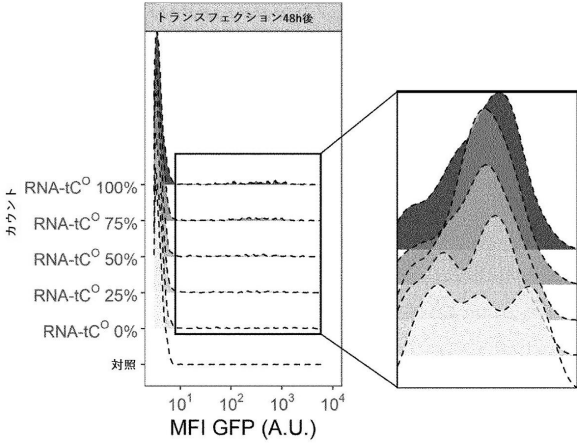
Figure 8c



【 図 8 d 】

24 / 28

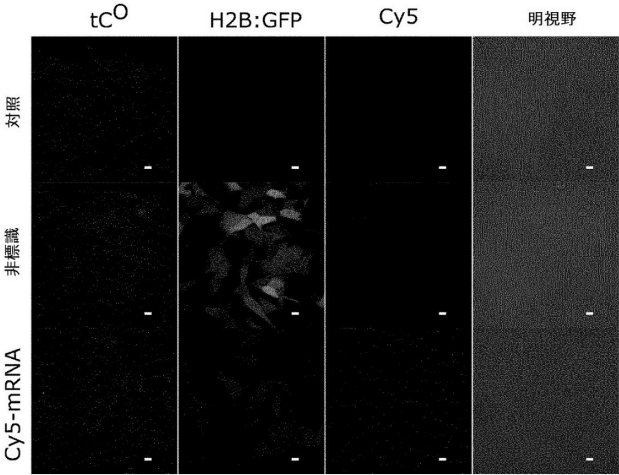
Figure 8d



【 図 8 e 】

25 / 28

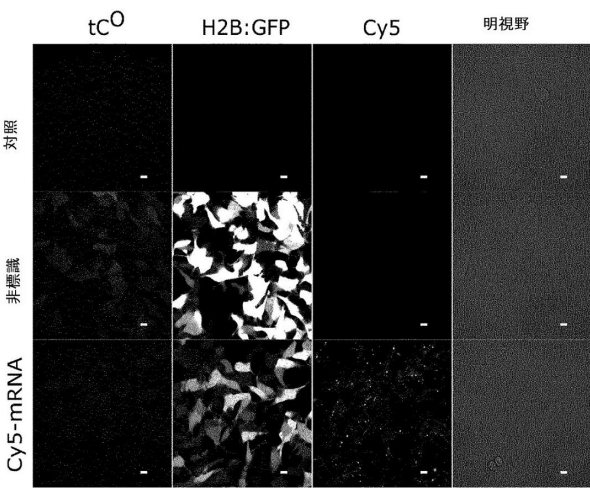
Figure 8e



【 図 8 f 】

26 / 28

Figure 8f



10

20

30

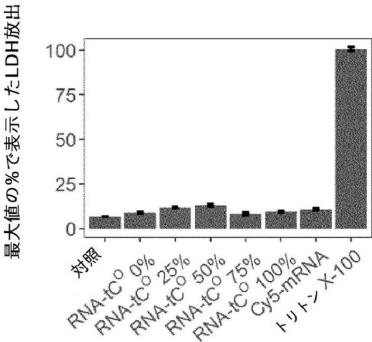
40

50

【 図 8 g 】

27 / 28

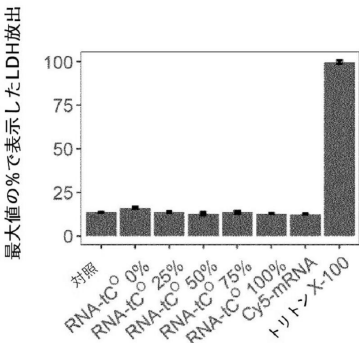
Figure 8g



【 図 8 h 】

28 / 28

Figure 8h



【 配列表 】

2023533484000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/067342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07H19/24 C07H1/00 C07H21/02 C12N15/10 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 C40B C12N 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, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/034895 A1 (UNIV COLORADO [US]; KUCHTA ROBERT D [US] ET AL.) 24 March 2011 (2011-03-24) cited in the application	1-22
Y	paragraph [00023] claims 1-17	1-22
Y	----- WO 2018/089582 A1 (SAN DIEGO STATE UNIV RESEARCH FOUNDATION [US] ET AL.) 17 May 2018 (2018-05-17) claim 1 -----	1-22
☐ 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		Date of mailing of the international search report
5 October 2021		15/10/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mezzato, Stefano

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/067342

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No	
Information on patent family members				PCT/EP2021/067342	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
W0 2011034895 A1		24-03-2011	NONE		
W0 2018089582 A1		17-05-2018	US	2020262862 A1	20-08-2020
			W0	2018089582 A1	17-05-2018

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,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 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 エスビョルネル, 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 バラディ, トム

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) 4C057 AA03 BB02 DD03 LL51