

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7144050号
(P7144050)

(45)発行日 令和4年9月29日(2022.9.29)

(24)登録日 令和4年9月20日(2022.9.20)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 H 21/02 (2006.01)

C 0 7 H 21/02

C S P

C 0 7 H 19/20 (2006.01)

C 0 7 H 19/20

A 6 1 K 31/7084(2006.01)

A 6 1 K 31/7084

A 6 1 K 31/708 (2006.01)

A 6 1 K 31/708

A 6 1 P 21/02 (2006.01)

A 6 1 P 21/02

請求項の数 14 (全63頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-537845(P2018-537845)

(86)(22)出願日 平成29年1月27日(2017.1.27)

(65)公表番号 特表2019-504837(P2019-504837
A)

(43)公表日 平成31年2月21日(2019.2.21)

(86)国際出願番号 PCT/IB2017/050447

(87)国際公開番号 WO2017/130151

(87)国際公開日 平成29年8月3日(2017.8.3)

審査請求日 令和1年11月29日(2019.11.29)

(31)優先権主張番号 PL415967

(32)優先日 平成28年1月29日(2016.1.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
ポーランド(PL)

(73)特許権者 518251778

ユニヴェルシテット ワルシャウスキ
ポーランド 0 0 - 9 2 7 ワルシャワ
クラコフスキエ・プシェドミエシチェ
2 6 / 2 8

(74)代理人 100082072

弁理士 清原 義博

(74)復代理人 100208292

弁理士 清原 直己

(72)発明者 ジェミエリティ, ヤセク

ポーランド 0 1 - 4 5 1 ワルシャワ
ウリツァ・ロマンスカ 1 / 7 8

(72)発明者 ファク・ドンブロスカ, カジャ

ポーランド 0 1 - 0 0 2 ワルシャワ
ウリツァ・ノボリビエ 2 1 / 6 0

最終頁に続く

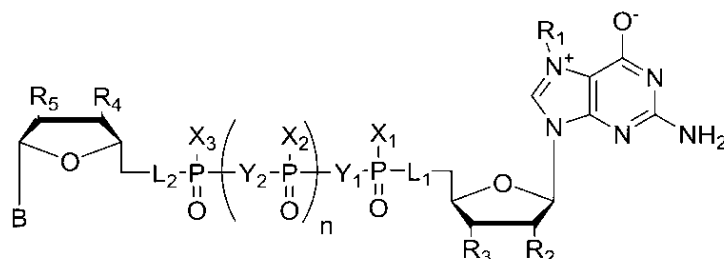
(54)【発明の名称】 5' - ホスホロチオラート mRNA 5' - 末端(キャップ)類似体、それを含むmRNA
、それらを得る方法およびそれらの使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式1に記載の5' - ホスホロチオラートキャップ類似体であって、

【化1】



式1

式中、

L¹とL²は、OまたはSから独立して選択され、L¹とL²の少なくとも1つはOではなく；

n = 0, 1, または2であり；

X₁、X₂、X₃は、OまたはSから独立して選択され；R¹は、CH₂Ph、C₁₋₁₀アルキルを含む群から選択され；

R^2 と R^3 は、H、OH、OCH₃、OC₂H₅、-COOH、N₃、C₁-10アルキル、C₁-10アルケニルまたはC₁-10アルキニルを含む群から独立して選択され；

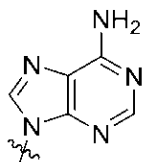
R^4 と R^5 は、H、OH、OCH₃、OC₂H₅、-COOH、CH₂COOH、N₃、CH₂N₃、C₁-10アルキル、C₁-10アルケニルまたはC₁-10アルキニルを含む群から独立して選択され；

Y_1 と Y_2 は、CH₂、CHCl、CCl₂、CF₂、CHF、NH、Oを含む群から独立して選択され；

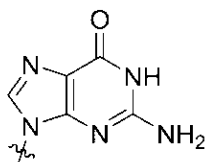
およびBは、以下の式3、4、5、6、または7に記載の基である、
5'-ホスホロチオラートキャップ類似体。

【化2】

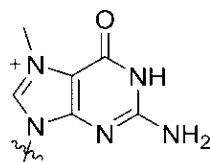
10



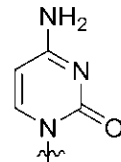
式3



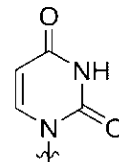
式4



式5



式6



式7

【請求項2】

次の化合物から選択される、請求項1に記載の化合物。

20

30

40

50

【表 1 - 1】

No.	化合物	構造式	化学名
21	m^7GppSG		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P2-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) ニリン酸
22	$m^7GpppSG$		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) ミリン酸
23	m^7GSppG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P2-グアノシン-5'-イル ニリン酸
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル ミリン酸
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2,3-メチレノミリン酸
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-メチル-7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル ミリン酸
30	$m^7GSppspGD1$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル-チオミリン酸 D1

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

31	$m^7GSppspG_{D2}$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2-チオミリン酸 D2
32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) ミリン酸
33	$m^7GSppspSG_{D1}$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-チオミリン酸 D1
34	$m^7GSppspSG_{D2}$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-チオミリン酸 D2
35	$m^7GppspSG_{D1}$		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-チオミリン酸 D1
36	$m^7GppspSG_{D2}$		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-チオミリン酸 D2
37	m^7GpCH_2ppSG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 1,2-メチレノミリン酸

【表 1 - 3】

38	$m^{7,2'O}GpppSG$		P1-(2'-O-メチル-7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) ミリン酸
----	-------------------	--	--

10

20

30

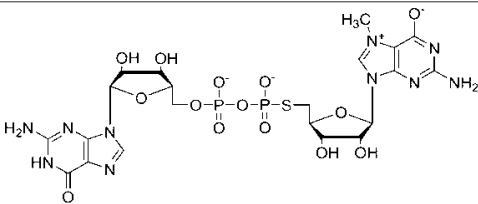
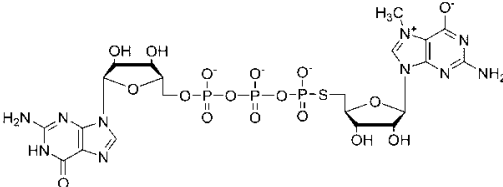
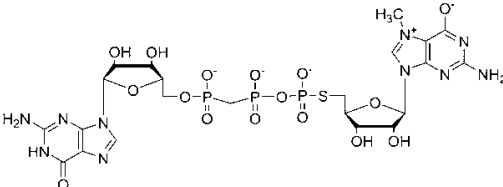
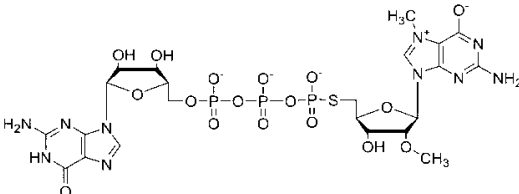
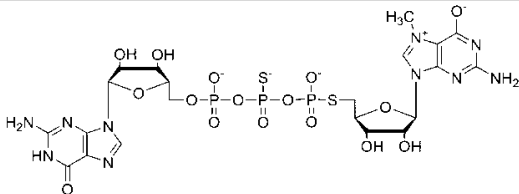
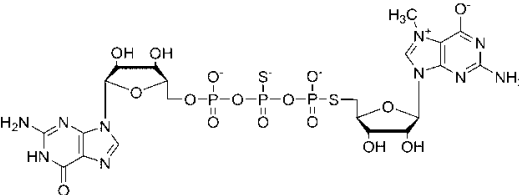
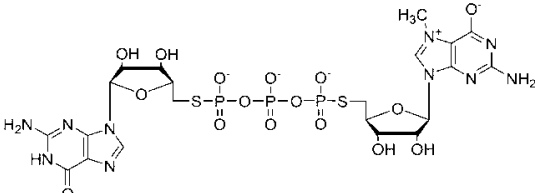
40

50

【請求項 3】

次の化合物から選択される、請求項 1 - 2 に記載の化合物。

【表 2 - 1】

No.	化合物	構造式	化学名
23	m^7GSppG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P2-グアノシン-5'-イル ニリン酸
24	$m^7GSpppG$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 三リン酸
25	$m^7GSppCH_2pG$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2,3-メチレノ三リン酸
26	$m^{7,2'O}GSpppG$		P1-(2'-O-メチル-7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 三リン酸
30	$m^7GSppspG D1$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2-三リン酸 D1
31	$m^7GSppspG D2$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2-チオ三リン酸 D2
32	$m^7GSpppsG$		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 三リン酸

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

33	$m^7\text{GSpp}_s\text{pS}$ G D1		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-チオ三リン酸 D1
34	$m^7\text{GSpp}_s\text{pS}$ G D2		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-チオ三リン酸 D2
37	$m^7\text{GpCH}_2\text{p}$ pSG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 1,2-メチレンチオ三リン酸

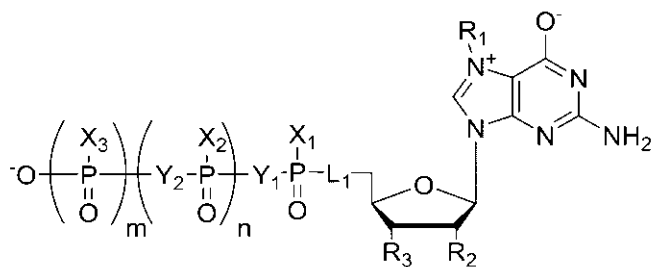
10

20

【請求項 4】

式 2 に記載の 5' - ホスホロチオラート類似体、および薬学的に許容可能な担体を含む組成物であって、

【化 3】



式 2

30

式中、

$m = 0, 1$ であり；

$n = 0, 1$, または 2 であり；

L^1 は S であり；

X_1, X_2, X_3 は、O、S を含む基から独立して選択され；

R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルを含む基から選択され；

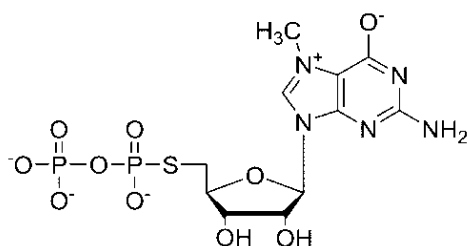
R^2 と R^3 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-\text{COOH}$ 、 N_3 、アルキル、または置換アルキルを含む基から独立して選択され；

Y_1 と Y_2 は、 CH_2 、 CHCl 、 CCl_2 、 CHF 、 CF_2 、NH および O を含む基から独立して選択され、

ここで、式 2 に記載の 5' - ホスホロチオラート類似体は、式 13 に記載の 5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 7 - メチルグアノシン 5' - ジホスホロチオラートであり、

50

【化 4】



式 13.

10

前記組成物は薬剤として使用される、組成物。

【請求項 5】

請求項 1 - 3 に記載の化合物および薬学的に許容可能な担体を含む組成物であって、薬剤として使用される、組成物。

【請求項 6】

脊髄筋萎縮症（SMA）の処置および/またはSMAの症状の緩和において薬剤として使用される、請求項 4 または 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

mRNA 分解の調整および/またはmRNA スプライシングの調整に使用される薬剤の製造における、請求項 1 - 3 に記載の化合物の使用。

20

【請求項 8】

5' 末端に、請求項 1 - 3 に記載の 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体を含む mRNA。

【請求項 9】

前記 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体は、m⁷G S p p p G（24 番）、m⁷, 2' Q G S p p p G（26 番）、m⁷G S p p p S G（32 番）、m⁷G S p p s p G D 1（30 番）、m⁷G S p p s p G D 2（31 番）、m⁷G S p p s p S G D 1（33 番）、m⁷G S p p s p S G D 2（34 番）を含む基から選択され、または m⁷, 2' Q G S p p p G（26 番）である、請求項 8 に記載の mRNA。

30

【請求項 10】

mRNA 分子の 5' 末端に 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体を含む mRNA の調製方法であって、請求項 1 - 3 に記載の 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体が mRNA 分子の合成中に組み込まれ、mRNA の合成がインビトロ転写を介して進むことを特徴とする、mRNA の調製方法。

【請求項 11】

前記 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体は、m⁷G S p p p G（24 番）、m⁷, 2' Q G S p p p G（26 番）、m⁷G S p p p S G（32 番）、m⁷G S p p s p G D 1（30 番）、m⁷G S p p s p G D 2（31 番）、m⁷G S p p s p S G D 1（33 番）、m⁷G S p p s p S G D 2（34 番）を含む基から選択され、または m⁷, 2' Q G S p p p G（26 番）である、請求項 10 に記載の mRNA の調製方法。

40

【請求項 12】

薬剤として使用される請求項 8、または請求項 9 に記載の mRNA。

【請求項 13】

脊髄筋萎縮症（SMA）の処置、および/またはSMAの症状の緩和のための薬剤として使用する、および/または、癌治療の薬剤として、または抗癌免疫療法の薬剤として使用するための、請求項 8 または請求項 9 に記載の mRNA。

【請求項 14】

a) 請求項 1 - 3 に記載の化合物、または

b) 請求項 8、もしくは請求項 9 に記載の mRNA、および

50

c) 薬学的に許容可能な担体を含む医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、5' - ホスホリチオラート部分を含むmRNA 5' - 末端(キャップ)の類似体、その調製方法、その中間体とその使用に関する。5' - ホスホリチオラートキャップ類似体は、特に脊髄筋萎縮症(SMA)処置のための薬剤としての適用を可能にするDcpS酵素抑制因子として使用される。本発明はさらに、本発明に係る5' - ホスホリチオラート部分を含むmRNA 5' - 末端(キャップ)類似体によって、5'末端において修飾されたmRNAに関し、当該修飾は、細胞状態下において安定性と翻訳活性が増加したmRNA転写物を得ることを目的とする。そのような特性を有する転写物は、mRNAに基づいた新規性のある遺伝子治療に適用可能である。

【背景技術】

【0002】

化学的に抽出されたmRNA 5' - 末端類似体には様々な用途があり、また、その構造内で実施された修飾は、これらの化合物の生物学的特性を著しく修飾しうる(Ziemniak, Strenkowska et al., 2013)。キャップ類似体の様々な用途の中でも、最も頻繁なものには、治療目的でのキャップ依存プロセスの低分子の阻害剤としての使用が含まれる(例えばDcpS酵素抑制 - 脊髄筋萎縮症治療)。他方で、適切に修飾されたジヌクレオチドキャップ類似体は、細胞状態下において安定性と翻訳活性の改善された転写物を得るために、インビトロでの共転写によってメッセンジャーmRNAを修飾するために使用される。そのような特性を備えた転写物は、mRNAに基づいた新規性のある遺伝子治療の文脈においてますます研究されている。後者の場合では、別のデキャッピング酵素であるDcp2に対するキャップ構造の耐性が主要問題である。

【0003】

DcpS酵素(デキャッピングスカベンジャー)は真正核細胞中のmRNA分解プロセスに関与する酵素である。真核細胞には、mRNA分解の主要な2つの経路、5' → 3'分解および3' → 5'分解がある(Rydzik, Lukaszewicz et al., 2009)。両分解経路は脱アデニル化によって開始される。5' → 3'方向の分解に続いて、リン酸塩とリン酸塩との間の結合の切断の結果としてのmRNAデキャッピング、および5' - エキソヌクレアーゼによる分解が起こる。3' → 5'の分解は、3' - 末端から始まるエキソソームによるmRNA分解を含む。そのような分解は結果として、ジヌクレオチドキャップ残基またはキャップ末端の短いオリゴヌクレオチドの放出をもたらし、その後、それはDcpS酵素によって分解される。DcpSはHITファミリーピロホスファターゼに属し、7 - メチルグアノシン 5' - リン酸塩(m⁷GMP)および第二の生成物、従ってヌクレオシド5' - ニリン酸塩または短いオリゴヌクレオチドを放出する、リン酸塩とリン酸塩との間のキャップを加水分解する。より長いキャップ末端のmRNAは、DcpSの基質ではない。さらに、5' → 3' mRNA分解の生成物である7 - メチルグアノシン 5' - ニリン酸塩(m⁷GDP)は、DcpSの基質ではない。3' → 5'分解中にmRNAから放出された不要なキャップ残基が他のキャップ依存細胞プロセスに影響し得るため、DcpS酵素の活性は細胞恒常性にとって重要であると考えられる。DcpSは細胞質と核の両方に位置し、そこでスプライシングの調整に関与しうる(Shen, Liu et al., 2008)。したがって、細胞におけるDcpSの役割は、3' → 5' mRNA分解におけるその十分に特徴づけられた機能を越えることが示唆された(Bail and Killedjian 2008)。

【0004】

2008年には、DcpS抑制は脊髄筋萎縮症における治療効果を提供し得ると報告された。SMAは、平均で出生6000人に対して1人に現われる一般的な神経変性疾患である(Akagi and Campbell 1962)。それは、SMN(運動神経

10

20

30

40

50

胞生存) 遺伝子によってコードされた低レベルの S M N タンパク質によって引き起こされる。ヒトには2つの S M N 遺伝子、すなわち S M N 1 と S M N 2 が存在する。それらの主な違いは、エクソン7の配列の変化であり、それは m R N A 前駆体のスプライシングに影響する。その結果、S M N 1 遺伝子の発現は、安定した機能タンパク質をもたらし、一方で S M N 2 から発現したタンパク質は短縮されている。両方の S M N 1 遺伝子コピーにおける、欠失、S M N 2 などの遺伝子への転換、および点突然変異を含む突然変異は、結果として S M A 疾患をもたらす。不完全な S M N 1 コピーを1つだけ有する人々は S M A 保有者であるが、疾病のいかなる症状も示さない。

【0005】

同種の S M N 2 遺伝子は十分な量の機能性 S M N タンパク質を提供することができないが、S M N 2 遺伝子コピーの数が多いほど、疾病の経過はより良性であることが認められた。したがって、細胞の S M N 2 遺伝子によってコードされるタンパク質の量を増加させる化合物は、S M A に対する治療となり得ると信じられている。いくつかの5-置換されたキナゾリンは S M N 2 遺伝子発現を2倍にも増加させ得ることが発見された (A k a g i a n d C a m p b e l l , 1962)。放射活性標識を使用した別の研究では、この活性化の基礎となる分子構造を解明すべく、著者は、タンパク質結合5-置換されたキナゾリンとして D c p S を特定した。

【0006】

これらの実験は、S M A 処置における治療の標的として D c p S を特定することを可能にした。

【0007】

さらなる研究により、様々な C 5 - 置換されたキナゾリンが D c p S 酵素 (既にナノモル濃度の) の有力な阻害剤であり、その阻害剤候補は S M N 2 遺伝子プロモーター活性化のレベルと関連していることが示された。その後、これらの化合物の治療上の潜在力は、マウスモデルのインビボで実証された (B u t c h b a c h , S i n g h e t a l . , 2010)。最近では、D c p S 阻害剤の1つである R G 3 0 3 9 化合物は、S M A を有するマウスの運動機能を改善することが報告された。

【0008】

進行中の前臨床試験と臨床試験にもかかわらず、S M A の有効な処置は依然としてなく、したがって、治療上の潜在力を有する新しい化合物が引き続き求められている。

【0009】

三リン酸架橋および7-メチルグアノシンリボースにおける修飾を伴うジヌクレオチドキャップ類似体は、インビトロでのキャップ R N A 分子の合成に使用され得る。該方法は、改善された生物特性、とりわけ増加した翻訳活性と細胞内での延長された半減期を伴う R N A 分子を得ることを可能にするため、有用である (G r u d z i e n , K a l e k e t a l . , 2006)。これらの両特徴によって、同量の m R N A を使用しながらも有意により多いタンパク質量が得られる。これには、研究および、例えば癌免疫療法などの治療用途を含むペプチドとタンパク質の商業生産の両方における、幅広い用途を見出すことができる (S a h i n , K a r i k o e t a l . , 2014)。

【0010】

インビトロでキャップ m R N A を得るために使用される最も一般的な方法は、(m ⁷ G p p p G) などの4つの全てのリボヌクレオシド三リン酸塩および1つのキャップジヌクレオチドの存在下において、バクテリアまたはバクテリオファージ R N A ポリメラーゼを使用した、D N A 鋳型による m R N A の合成である。ポリメラーゼは、次に転写されるヌクレオシド三リン酸塩の リン酸塩の、 m ⁷ G p p p G 内の G u o 部分の 3' - O H の求核攻撃によって、転写を開始させ、結果として初期生成物としての m ⁷ G p p p G p N をもたらす (C o n t r e r a s a n d F i e r s 1981, K o n a r s k a , P a d g e t t e t a l . , 1984)。

【0011】

哺乳動物細胞の培養に導入された合成 m R N A によって生成されるタンパク質の量は、

細胞状態のmRNA分解によって制限される。インビボでのmRNA分解は主として、リン酸塩とリン酸塩間の結合を切断する特定のピロホスファターゼDcp1/Dcp2によって、mRNAの5'末端から取り除かれたキャップによって開始される(Mildvan, Xia et al., 2005)。調節タンパク質Dcp1を有する複合体を形成するDcp2酵素は、完全長の転写物またはその少なくとも20のヌクレオチド断片からの、キャップ構造の切断の原因である(Lykke-Andersen 2002)。Dcp1/Dcp2複合体は遺伝子発現の調整において重要な役割を果たす。この酵素活性に抵抗力のあるキャップ内のmRNA転写物を作ることによって、そのような修飾されたmRNAによってコードされたタンパク質発現の増加をもたらされる。修飾が同時に、翻訳開始因子との相互作用を損なわない場合、これはその後mRNAの翻訳活性の増加をもたらす。そのような特性を有するmRNAは、免疫療法(Kuhn, Diken et al., 2010)、幹細胞リプログラミング(Warren, Manos et al., 2010)、または細胞で形成された欠損のある形態の、または不十分な量のタンパク質の補充を含む治療用途に望まれる。キャップ構造の三リン酸架橋での修飾は、文献において知られており、Dcp2酵素に対する抵抗を増大させる。これらはとりわけ、 β -架橋位置の酸素原子がメチレン基と置き換えられる類似体、 γ -位置の非架橋酸素が硫黄原子またはボラノリン酸塩基と置き換えられる類似体を含む。メチレン類似体の場合、mRNAの安定性の増加は、細胞内のタンパク質合成の効率を増加させることはなく、それは恐らくeIF4Eタンパク質への親和性の低下によるものであった(Grudzien, Kalk et al., 2006)。 γ -位置の非架橋修飾の場合、Dcp2に対する耐性の増加と、eIF4Eに対する親和性の増加は、結果として、細胞内のそのような修飾されたmRNAの翻訳活性の増加をもたらした(Grudzien-Nogalska, Jemielity et al., 2007)(Kowalska, Wypijewska del Nogal et al., 2014)。mRNAへの取り込みに際して、Dcp2による分解に対する感受性の減少を示した全てのキャップ類似体の一般的特徴は、酵素によるキャップ切断部位の近く、すなわち三リン酸架橋の β -位置における修飾の局在であった。

【発明の開示】

【0012】

技術の記載された情勢を考慮し、本発明の目的は、指摘された不都合を克服し、およびDcpS活性に影響を与える新しい種類のヌクレオチドmRNA 5'-末端類似体、SMA処置における使用を含むその使用、さらにその合成方法を提供することである。

【0013】

本発明の別の目的は、5'末端において、5'-ホスホロチオラート部分を含むmRNA 5'-末端(キャップ)類似体で修飾されたmRNAを提供することであり、それによってmRNAの安定性、および細胞内におけるそのmRNAによってコードされたタンパク質の生合成効率を増加させることである。本発明の別の目的は、5'末端において、5'-ホスホロチオラート部分を含むmRNA 5'-末端(キャップ)類似体で修飾されたmRNAを提供することであり、転写物は、mRNAに基づいた新規性のある遺伝子治療で使用するための使用を含む、薬剤としての使用を意図されている。

【0014】

本発明は新規性のある種類のヌクレオチドmRNA 5'-末端類似体に関する。新しい類似体は、5'-ヌクレオチドの位置に硫黄原子を含み、つまり5'位の酸素原子の少なくとも1つが硫黄原子によって置換された。我々は意外にも、7-メチルグアノシンの側から5'位の硫黄原子による修飾を含んだ新しい類似体が、DcpS酵素の加水分解活性に対して抵抗力があり、およびDcpS酵素の阻害剤であり、したがってSMNタンパク質の発現に影響し、それはSMA処置において治療上適切であることを発見した。DcpS活性に対して安定しており、および/またはDcpS活性に影響を与えるそのような化合物は、スプライシングの調節と調整に加えてmRNA分解の調整においても使用されるだろう。以下の類似体が、阻害特性の観点から特に好ましいことが分かった： m^7GSp

G (2 4 番)、 m^7 G S p p p S G (3 2 番)、 m^7 G S p p s p G D 1 (3 0 番)、 m^7 G S p p s p G D 2 (3 1 番)、 m^7 G S p p s p S G D 1 (3 3 番)、 m^7 G S p p s p S G D 2 (3 4 番)、および最も好ましいのは m^7 G S p p s p S G D 2 (3 4 番)であった。同様に有用なものは、類似体 m^7 G S p p (1 2 番)、 m^7 G S p p G (2 3 番)、 m^7 G S p p C H ₂ p G (2 5 番)、 $m^{7,2'}$ G S p p p G (2 6 番)、 m^7 G p C H ₂ p p S G (3 7 番)であった。

【 0 0 1 5 】

本発明はさらに、5'末端において、5'-ホスホロチオラート部分を含むmRNA 5'-末端(キャップ)類似体で修飾されたmRNAに関し、それによってmRNAの安定性、および細胞内におけるそのmRNAによってコードされたタンパク質の生合成効率を増加させることに関する。本発明はさらに、5'末端において、5'-ホスホロチオラート部分を含むmRNA 5'-末端(キャップ)類似体で修飾されたmRNAに関し、修飾されたmRNAは、mRNAに基づいた新規性のある遺伝子治療で使用するための使用を含む、薬剤としての使用を意図されている。

【 0 0 1 6 】

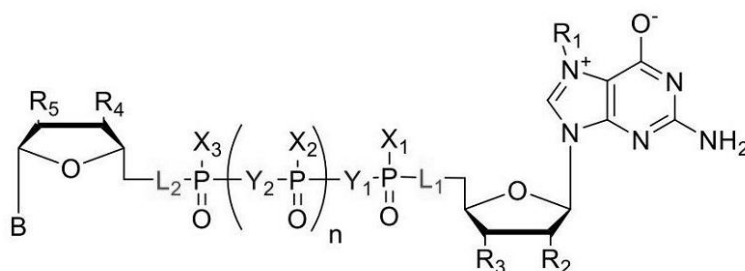
驚いたことに、インビトロ転写法によってmRNAへと取り込まれた後に、7-メチルグアノシンの側から5'位に硫黄原子での修飾を含む、本発明に係る新しい類似体が、酵素Dcp1/2の加水分解活性に抵抗力を有するようになり、したがって、それらがmRNAの安定性、および、ヒュー細胞株を含む細胞のこのmRNAによってコードされたタンパク質の生合成の効率に影響すること、本発明者らは発見した。Dcp1/2によってキャップの三リン酸架橋の切断部位から遠ざけられた修飾が、キャップ構造をその除去プロセスに抵抗力を有するようにし、mRNAの半減期の増加をもたらされたのは、これが最初である。癌免疫療法における免疫系の特異的活性化の場合のように、供給された合成mRNAに基づいた所望のタンパク質の発現を含む遺伝子治療において、この予期せぬ発見は治療上極めて重要である。したがって、例えば所与の癌タイプに特有のタンパク質をコードする修飾されたmRNA転写物は、この特異性抗原を含む癌細胞に対して免疫系を活性化させるために使用され得る。以下の類似体が、修飾されたmRNAの翻訳特性の観点から特に好ましいことが分かった： m^7 G S p p p p G (2 4 番)、 $m^{7,2'}$ G S p p p p G (2 6 番)、 m^7 G S p p p p S G (3 2 番)、 m^7 G S p p s p G D 1 (3 0 番)、 m^7 G S p p s p G D 2 (3 1 番)、 m^7 G S p p s p S G D 1 (3 3 番)、 m^7 G S p p s p S G D 2 (3 4 番)、および最も好ましいのは $m^{7,2'}$ G S p p p p G (2 6 番)であった。

【 0 0 1 7 】

本発明は、式1に係る5'-ホスホロチオラートキャップ類似体に関し、

【 0 0 1 8 】

【 化 1 】



式1

【 0 0 1 9 】

式中、

L^1 と L^2 は、OとSを含む基から独立して選択され、 L^1 と L^2 の少なくとも1つはO

ではなく；

$n = 0, 1$, または 2 であり；

X_1 、 X_2 、 X_3 は、O、S を含む基から独立して選択され；

R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルから独立して選択され；

R^2 と R^3 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 CH_2COOH 、 N_3 、 CH_2N_3 、アルキル、アルケニルまたはアルキニルを含む基から独立して選択され；

R^4 と R^5 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 CH_2COOH 、 N_3 、 CH_2N_3 、アルキル、アルケニルまたはアルキニルを含む基から独立して選択され；

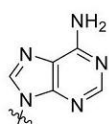
Y_1 と Y_2 は、 CH_2 、 $CHCl$ 、 CCl_2 、 CF_2 、 CHF 、NH、O を含む基から独立して選択され；

10

および B は、以下の式 3、4、5、6、または 7 に係る基である。

【 0 0 2 0 】

【 化 2 】

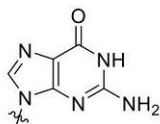


式3

20

【 0 0 2 1 】

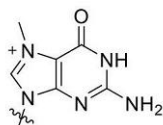
【 化 3 】



式4

【 0 0 2 2 】

【 化 4 】

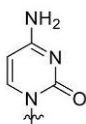


式5

30

【 0 0 2 3 】

【 化 5 】



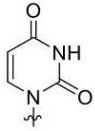
式6

40

【 0 0 2 4 】

50

【化 6】



式7

【 0 0 2 5】

好ましい5'-ホスホロチオラートキャップ類似体は、以下から成る基から選択される：

【 0 0 2 6】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

No	化合物	構造式	化学名
21	m ⁷ GppSG		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P2-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) ニリン酸塩
22	m ⁷ GpppSG		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) ミリン酸塩
23	m ⁷ GSppG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P2-グアノシン-5'-イル ニリン酸塩
24	m ⁷ GSpppG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル ミリン酸塩
25	m ⁷ GSppCH ₂ pG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2,3-メチレノミリン酸塩
26	m ^{7,2'} OGSpppG		P1-(2'-0-メチル-7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル ミリン酸塩
30	m ⁷ GSppspG D1		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル-チオミリン酸塩 D1
31	m ⁷ GSppspG D2		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2-チオミリン酸塩 D2

【 0 0 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

32	$m^7GSpppSG$		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イル)-P3-(5' - デオ キシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル) 三リン酸塩
33	$m^7GSppspSG$ D1		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イル)-P3-(5' - デオ キシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル) 2-チオ三リン酸塩 D1
34	$m^7GSppspSG$ D2		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イル)-P3-(5' - デオ キシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル) 2-チオ三リン酸塩 D2
35	$m^7GppspSG$ D1		P1-(7-メチル-グア ノシン-5' -イル)- P3-(5' - デオキシ 5' -チオグアノシ ン-5' -イル) 2-チオ 三リン酸塩 D1
36	$m^7GppspSG$ D2		P1-(7-メチル-グア ノシン-5' -イル)- P3-(5' - デオキシ 5' -チオグアノシ ン-5' -イル) 2-チオ 三リン酸塩 D2
37	m^7GpCH_2ppSG		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イル)-P3-グアノシン- 5' -イル 1,2-メチ レノ三リン酸塩
38	$m^{7,2'}OGpppSG$		P1-(2' -O-メチル- 7-メチル-グアノシ ン-5' -イル)-P3- (5' -デオキシ-5' - チオグアノシン- 5' -イル) 三リン酸 塩

【 0 0 2 8 】

より好ましい5' - ホスホロチオラートキャップ類似体化合物は、以下から成る基から選
択される：

【 0 0 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

No	化合物	構造式	化学名
23	m ⁷ GSppG		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イ ル)-P2-グアノシン- 5' -イル ニリン酸 塩
24	m ⁷ GSpppG		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イ ル)-P3-グアノシン- 5' -イル ミリン酸 塩
25	m ⁷ GSppCH ₂ p G		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イ ル)-P3-グアノシン- 5' -イル 2,3-メチ レノミリン酸塩
26	m ^{7,2'} O GSpppG		P1-(2' -O-メチル- 7-メチル-5' -デオ キシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル)- P3-グアノシン-5' - イル ミリン酸塩
30	m ⁷ GSpp _s pG D1		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イ ル)-P3-グアノシン- 5' -イル 2- ミリン 酸塩 D1
31	m ⁷ GSpp _s pG D2		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イ ル)-P3-グアノシン- 5' -イル 2-チオミ リン酸塩 D2
32	m ⁷ GSpppSG		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イ ル)-P3-(5' -デオ キシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル) ミリン酸塩

【 0 0 3 0 】

40

50

【表 2 - 2】

33	$m^7\text{GSppspSG}$ D1		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イル)-P3-(5' - デオ キシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル) 2- チオ三リン酸塩 D1
34	$m^7\text{GSppspSG}$ D2		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオ グアノシン-5' -イル)-P3-(5' - デオ キシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル) 2- チオ三リン酸塩 D2
37	$m^7\text{GpCH}_2\text{ppSG}$ G		P1-(7-メチル-5' - デオキシ-5' -チオグア ノシン-5' -イル)-P3- グアノシン-5' -イル 1,2-メチレンチオ三リ ン酸塩

10

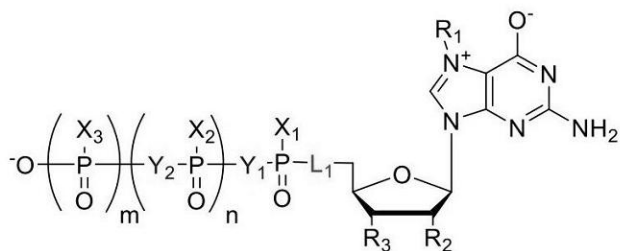
20

【0031】

本発明はさらに、式2に係る5'-ホスホロチオラート類似体に関し、

【0032】

【化7】



式2

30

【0033】

式中、

 $m = 0, 1$ であり； $n = 0, 1$, または 2 であり； L^1 は S であり、 X_1, X_2, X_3 は、O、S を含む基から独立して選択され； R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルから独立して選択され； R^2 と R^3 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-\text{COOH}$ 、 N_3 、アルキル、または置換アルキニルを含む基から独立して選択され； Y_1 と Y_2 は、 CH_2 、 CHCl 、 CCl_2 、 CHF 、 CF_2 、NH および O を含む基から独立して選択され；

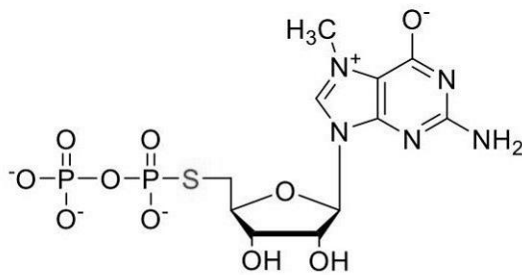
40

50

好ましい 5' - 干すほろちおらーと類似体は、以下の式 13 に係る 7' - メチルグアノシン 5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン 5' - ジホスホロチオラートである。

【 0 0 3 4 】

【 化 8 】



10

式13

【 0 0 3 5 】

本発明はさらに、薬剤として使用するための、本発明に係る 5' - ホスホロチオラートキ ャップ類似体に関する。

【 0 0 3 6 】

本発明はさらに、脊髄筋萎縮症 (SMA) の処置および / または SMA の症状の緩和の ための薬剤として使用するための、本発明に係る 5' - ホスホロチオラートキ ャップ類似体 に関する。

20

【 0 0 3 7 】

本発明はさらに、薬剤の調製における、本発明に係る 5' - ホスホロチオラートキ ャップ 類似体の使用に関する。

【 0 0 3 8 】

本発明はさらに、脊髄筋萎縮症 (SMA) の処置および / または SMA の症状の緩和の ための薬剤の調製における、本発明に係る 5' - ホスホロチオラートキ ャップ類似体の使用 に関する。

【 0 0 3 9 】

本発明はさらに、DcpS 活性の調整剤として、好ましくは DcpS 酵素活性の阻害剤 として、より好ましくは hDcpS の阻害剤としての、本発明に係る 5' - ホスホロチオラ ートキ ャップ類似体の使用に関する。

30

【 0 0 4 0 】

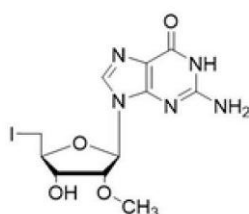
本発明はさらに、mRNA 分解の調整および / または mRNA スプライシングの調整に おける、本発明に係る 5' - ホスホロチオラートキ ャップ類似体の使用に関する。

【 0 0 4 1 】

本発明は加えて、以下に示される式 10、11 および 12 に係る構造を有する 5' - デオ キシ - 5' - ヨードグアノシンの類似体に関する。

【 0 0 4 2 】

【 化 9 】



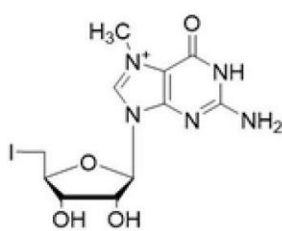
式10

40

50

【 0 0 4 3 】

【 化 1 0 】

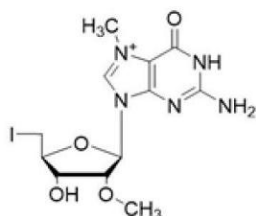


式11

10

【 0 0 4 4 】

【 化 1 1 】



式12

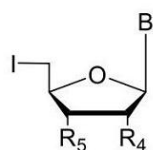
20

【 0 0 4 5 】

本発明はさらに、式 1 に係る化合物の調製方法に関し、該方法は：式 8 に係る 5' - ヨードヌクレオシドであり、

【 0 0 4 6 】

【 化 1 2 】



式8

30

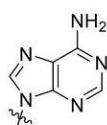
【 0 0 4 7 】

式中、 R^4 と R^5 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 N_3 、アルキル、または置換アルキルを含む基から独立して選択され；

および B は、以下の式 3、4、5、6、または 7 に係る基である 5' - ヨードヌクレオシドは、

【 0 0 4 8 】

【 化 1 3 】



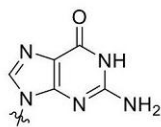
式3

40

【 0 0 4 9 】

50

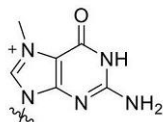
【化 1 4】



式4

【 0 0 5 0】

【化 1 5】

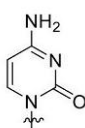


式5

10

【 0 0 5 1】

【化 1 6】

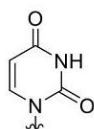


式6

20

【 0 0 5 2】

【化 1 7】



式7

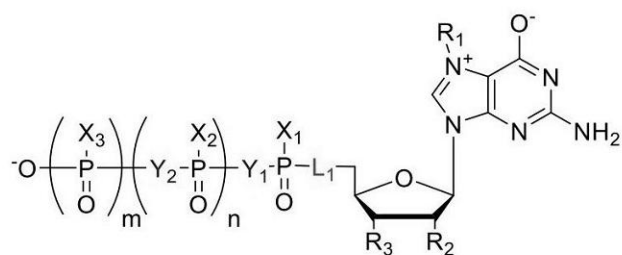
30

【 0 0 5 3】

末端チオリン酸部分を含む、式 2 に係る 5' - ホスホロチオラート類似体に反応し、

【 0 0 5 4】

【化 1 8】



式2

40

【 0 0 5 5】

式中、

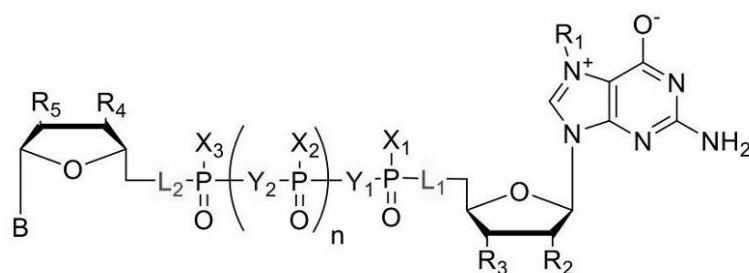
$m = 0, 1$ であり；

$n = 0, 1$, または 2 であり；

50

L^1 は O または S であり、
 X_1 、 X_2 、 X_3 は、O、S を含む基から独立して選択され；
 R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルを含む基から選択され、
 R^2 と R^3 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 N_3 、アルキル、または置換アルキルを含む基から独立して選択され；
 Y_1 と Y_2 は、 CH_2 、 $CHCl$ 、 CCl_2 、 CHF 、 CF_2 、NH および O を含む基から独立して選択され；
 ここで、 $n = 0$ および $m = 1$ ならば、 X_3 は S であり、および X_1 は O であり；
 $n = 1$ および $m = 0$ ならば、 X_2 は S である；および X_1 は O であり；
 $n = 1$ および $m = 1$ ならば、 X_3 は S である；および X_1 、 X_2 は O であり；
 式 1 に示されるホスホロチオラートキャップ類似体を形成する工程であって、
 【0056】
 【化19】

10



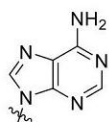
式1

20

【0057】
 式中、
 L^1 と L^2 は、O と S を含む群から独立して選択され、 L^1 と L^2 の少なくとも 1 つは O ではなく；
 $n = 0, 1$, または 2 であり；
 X_1 、 X_2 、 X_3 は、O、S を含む基から独立して選択され；
 R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルを含む基から選択され；
 R^2 と R^3 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 CH_2COOH 、 N_3 、 CH_2N_3 、アルキル、アルケニルまたはアルキニルを含む基から独立して選択され；
 R^4 と R^5 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 CH_2COOH 、 N_3 、 CH_2N_3 、アルキル、アルケニルまたはアルキニルを含む基から独立して選択され；
 Y_1 と Y_2 は、 CH_2 、 $CHCl$ 、 CCl_2 、 CF_2 、 CHF 、NH、O を含む基から独立して選択され；
 および B は、以下の式 3、4、5、6、または 7 に示される基である；工程を含む。
 【0058】
 【化20】

30

40

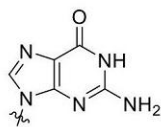


式3

【0059】

50

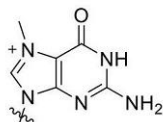
【化 2 1】



式4

【 0 0 6 0 】

【化 2 2】

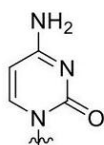


式5

10

【 0 0 6 1 】

【化 2 3】

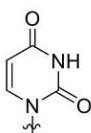


式6

20

【 0 0 6 2 】

【化 2 4】



式7

30

【 0 0 6 3 】

好ましくは、上述の合成法は、式 2 に係る化合物、式 8 に係る化合物、および D B U (1 , 8 - ジアザビシクロ (5 . 4 . 0) ウンデカ - 7 - エンの等モル量を塩基として使用する工程を含む。

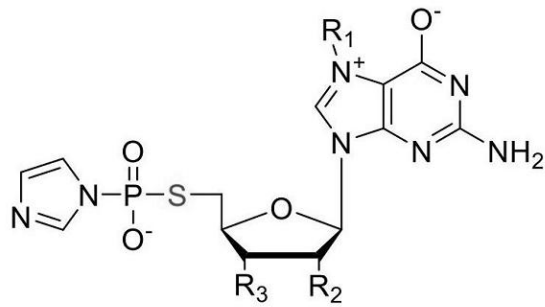
【 0 0 6 4 】

本発明はさらに、式 2 a に係る 5 ' - ホスホロチオラート類似体の調製方法に関し、式 9 に係るイミダゾリド誘導体は、

【 0 0 6 5 】

40

【化 2 5】



式9

10

【0066】

式中、

R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルを含む基から選択され；

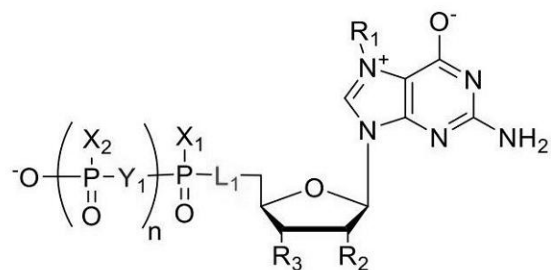
R^2 と R^3 は、 H 、 OH 、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 CH_2COOH 、 N_3 、アルキル、または置換アルキルを含む基から独立して選択され；

式 2 a に示される 5' - ホスホロチオラート類似体を形成するために、リン酸トリエチルアンモニウムまたはチオリン酸ナトリウムと反応し、

20

【0067】

【化 2 6】



式2a

30

【0068】

式中、

$n = 0, 1$, または 2 であり；

L^1 は O または S であり、

X_1 と X_2 は、 O 、 S を含む基から独立して選択され；

R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルを含む基から選択され；

40

R^2 と R^3 は、 H 、 OH 、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 N_3 、アルキル、または置換アルキルを含む基から独立して選択され；

Y^1 は、 CH_2 、 $CHCl$ 、 CCl_2 、 CHF 、 CF_2 、 NH および O を含む基から選択される；工程を含む

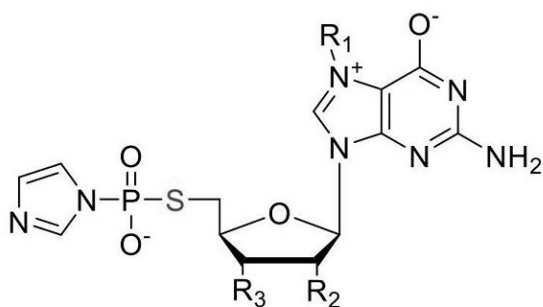
【0069】

本発明はさらに、式 1 に係る化合物の調製方法に関し、該方法は：式 9 に係るイミダゾリド誘導体であって

【0070】

50

【化 2 7】



式9

10

【 0 0 7 1】

式中、

R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルを含む基から選択され；

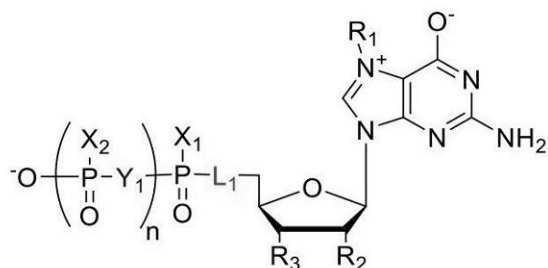
R^2 と R^3 は、 H 、 OH 、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 N_3 、アルキル、または置換アルキルを含む基から独立して選択される；

イミダゾリド誘導体が、末端チオリン酸部分を含む、式 2 a に示される 5' - ホスホロチオラート類似体に反応し、

20

【 0 0 7 2】

【化 2 8】



式2a

30

【 0 0 7 3】

式中、

 $N = 1$ であり、 L^1 は O または S であり； X_1 と X_2 は、 O 、 S を含む基から独立して選択され；

R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルを含む基から選択され；

40

R^2 と R^3 は、 H 、 OH 、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 N_3 、アルキル、または置換アルキルを含む基から独立して選択され；

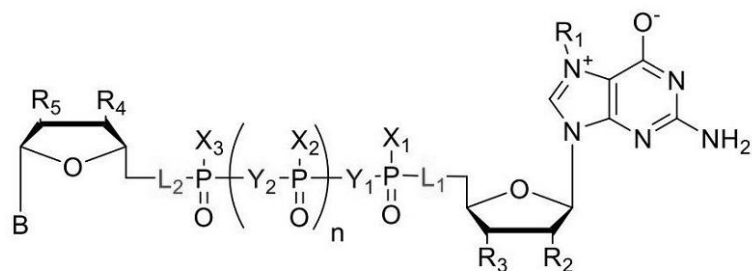
Y_1 は、 CH_2 、 $CHCl$ 、 CCl_2 、 CHF 、 CF_2 、 NH および O を含む基から独立して選択され、

式 1 に示される 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体を形成し；

【 0 0 7 4】

50

【化 2 9】



式1

10

【 0 0 7 5】

式中、

L^1 と L^2 は、OとSを含む群から独立して選択され、 L^1 と L^2 の少なくとも1つはOではなく；

$n = 0, 1$, または2であり；

X_1, X_2, X_3 は、O、Sを含む基から独立して選択され；

R^1 は、 CH_3 、 C_2H_5 、 CH_2Ph 、アルキルまたは置換アルキルから独立して選択され；

20

R^2 と R^3 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 CH_2COOH 、 N_3 、 CH_2N_3 、アルキル、アルケニルまたはアルキニルを含む基から独立して選択され；

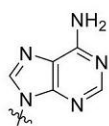
R^4 と R^5 は、H、OH、 OCH_3 、 OC_2H_5 、 $-COOH$ 、 CH_2COOH 、 N_3 、 CH_2N_3 、アルキル、アルケニルまたはアルキニルを含む基から独立して選択され；

Y_1 と Y_2 は、 CH_2 、 $CHCl$ 、 CCl_2 、 CF_2 、 CHF 、NH、Oを含む基から独立して選択され；

およびBは、以下の式3、4、5、6、または7に示される基である；工程を含む。

【 0 0 7 6】

【化 3 0】

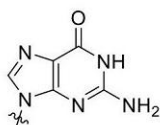


式3

30

【 0 0 7 7】

【化 3 1】

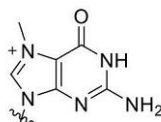


式4

40

【 0 0 7 8】

【化 3 2】

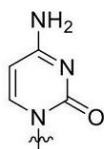


式5

50

【 0 0 7 9 】

【 化 3 3 】

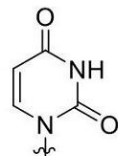


式6

【 0 0 8 0 】

10

【 化 3 4 】



式7

【 0 0 8 1 】

好ましくは反応は二価金属塩化物の存在下において行なわれ、好ましい二価金属塩化物は塩化亜鉛 $ZnCl_2$ である。

20

【 0 0 8 2 】

イミダゾリド誘導体を用いた合成方法では、好ましくは、リン酸塩基、チオリン酸基、または式 2 a に示される化合物の 1 . 5 倍過剰な、式 9 に示されるイミダゾリド誘導体を、8 倍過剰な二価金属塩化物の存在下において使用する。

【 0 0 8 3 】

本発明はさらに、本発明に係る 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体を含む医薬製剤および薬学的に許容可能な担体に関する。

【 0 0 8 4 】

本発明に係る 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体を含んだ、本発明に係る医薬製剤、および薬学的に許容可能な担体は、h D c p S 活性の阻害特性、好ましくは D c p S 活性の阻害特性を有し、および S M A 処置での使用を意図されている。

30

【 0 0 8 5 】

薬学的に許容可能な担体の選択は、医薬製剤の投与法、および本発明に係る 5' - ホスホロチオラート類似体を細胞、組織または有機体に送達する前に分解の不活性化から保護する必要性に依存するだろう。薬学的に許容可能な担体は、溶媒、分散培地および補助的薬剤（被覆剤、界面活性剤、芳香および着香料、酸化防止剤など）を含む。本発明に係る医薬製剤は、注射、経口、局所的投与および直腸投与を含む種々の経路によって投与することができる。医薬製剤の用量は、投与経路、処置または予防薬を要する疾病、および他の関連する状況を考慮して設定される。

40

【 0 0 8 6 】

本発明はさらに、5' 末端に、本発明に係る新規性のある 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体を含む m R N A に関する。好ましい m R N A は、 $m^7 G S p p p G$ (2 4 番)、 $m^{7,2'} Q G S p p p G$ (2 6 番)、 $m^7 G S p p p S G$ (3 2 番)、 $m^7 G S p p s p G D 1$ (3 0 番)、 $m^7 G S p p s p G D 2$ (3 1 番)、 $m^7 G S p p s p S G D 1$ (3 3 番)、 $m^7 G S p p s p S G D 2$ (3 4 番) を含む基から選択され、より好ましくは $m^{7,2'} Q G S p p p G$ (2 6 番) である、5' - ホスホロチオラートキャップ類似体に特徴付けられる。

【 0 0 8 7 】

本発明はさらに、分子の 5' - 末端に 5' - ホスホロチオラートキャップ類似体を含む m

50

R N Aの調製方法に関し、該方法は：合成中に、本発明に係る5' - ホスホロチオラートキヤップ類似体をm R N A分子に取り込む工程を含む。

【0088】

m R N Aの好ましい調製方法では、5' - ホスホロチオラートキヤップ類似体は、m⁷G S p p p G (24番)、m^{7,2'}Q G S p p p G (26番)、m⁷G S p p p S G (32番)、m⁷G S p p s p G D1 (30番)、m⁷G S p p s p G D2 (31番)、m⁷G S p p s p S G D1 (33番)、m⁷G S p p s p S G D2 (34番)を含む基から選択され、より好ましくはm^{7,2'}Q G S p p p G (26番)である。

【0089】

m R N Aの好ましい調製方法では、m R N Aの合成はインビトロ転写を通じて行われる。

10

【0090】

本発明はさらに、分子の5' - 末端に、本発明に係る5' - ホスホロチオラートキヤップ類似体を含むm R N Aの調製方法によって調製されたm R N Aに関する。

【0091】

本発明はさらに、タンパク質産生のための、分子の5' - 末端に本発明に係る5' - ホスホロチオラートキヤップ類似体を含むm R N Aの使用に関する。タンパク質産生のためのm R N Aの使用は、好ましくは細胞系または非細胞系で行われる。

【0092】

本発明はさらに、薬剤として使用するための、本発明に係るm R N A、および、分子の5' 末端に本発明に係る5' - ホスホロチオラートキヤップ類似体を含むm R N Aの調製方法に従って調製されたm R N Aに関する。そのようなm R N Aは好ましくは、脊髄筋萎縮症(S M A)の処置および/またはS M Aの症状の緩和のための薬剤として使用される。好ましくは、そのようなm R N Aは、癌治療の薬剤として、より好ましくは抗癌免疫療法の薬剤として使用するために利用される。

20

【0093】

本発明はさらに、薬剤の製造における、本発明に係るm R N Aの使用、および分子の5' 末端に本発明に係る5' - ホスホロチオラート類似体を含むm R N Aの調製方法に従って調製されたm R N Aの使用に関する。好ましい使用では、m R N Aは、脊髄筋萎縮症(S M A)の処置、および/またはS M Aの症状の緩和のための、癌治療の薬剤として、より好ましくは抗癌免疫療法の薬剤として、薬剤を調製するために使用される。

30

【0094】

本発明はさらに、医薬製剤に関し、それは本発明に係るm R N A、および、分子の5' 末端に本発明に係る5' - ホスホロチオラート類似体を含むm R N Aの調製方法に従って調製されたm R N A、および薬学的に許容可能な担体を含む。

【0095】

メチル化されていない化合物(G p p S GとG p p p S G)は、生物学的研究のための対照として合成された。

【0096】

表1は、発明者らによって初めて得られた、適切に修飾されたヌクレオチドの合成に使用されたアルキル化剤を表記する。表2と表3は、得られた後、生物物理的および生化学的な方法で特徴づけられた5' - ホスホロチオラートキヤップ類似体を表記する。

40

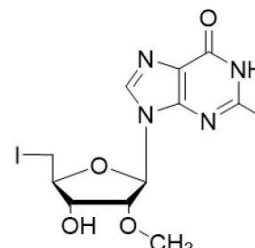
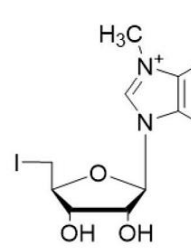
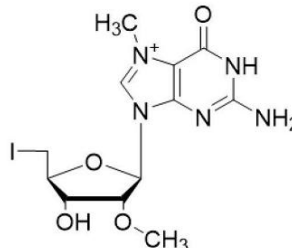
【0097】

表2および表3に表記された化合物のうち、S M A処置に関して特に好ましいものは、7 - メチルグアノシンの側から5' 位に硫黄を含む5' - ホスホロチオラート類似体(化合物12、23、24、25、26、30、31、32、33、34および37番)であり、それはD c p S 酵素の存在下における安定性が特徴である。

【0098】

【表 3】

表 1. 5'-デオキシ-5'-ヨード-グアノシン類似体 (化合物 No.は構造の横に示す)

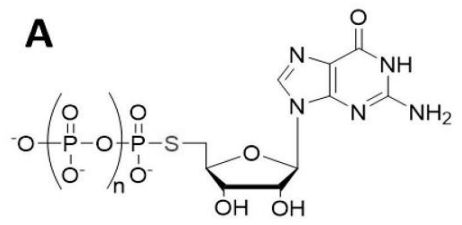
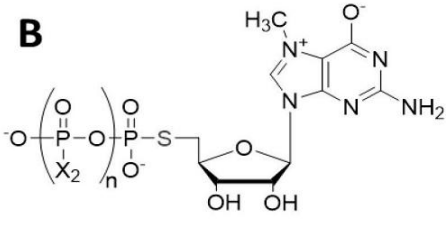
 <p>4</p>	 <p>5</p>	 <p>6</p>
式 10	式 11	式 12

10

【 0 0 9 9 】

【表 4】

表 2. モノヌクレオチド 5'-チオリン酸類似体: パネル A: グアノシン、パネル B: 7-メチルグアノシン

<p>A</p>  <p>7: n=0 11: n=1</p>	<p>B</p>  <p>8: n=0 X₂ = O 12: n=1 X₂ = O 13: n=1 X₂ = S</p>
--	---

20

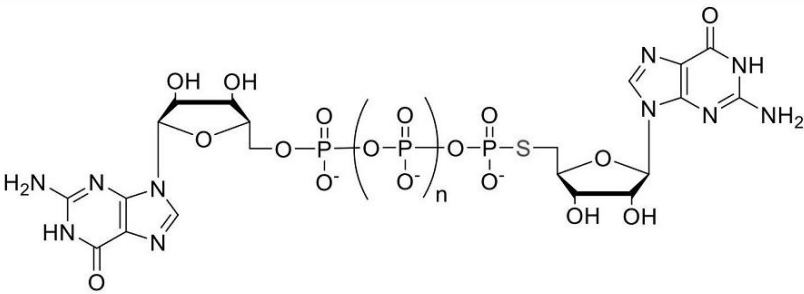
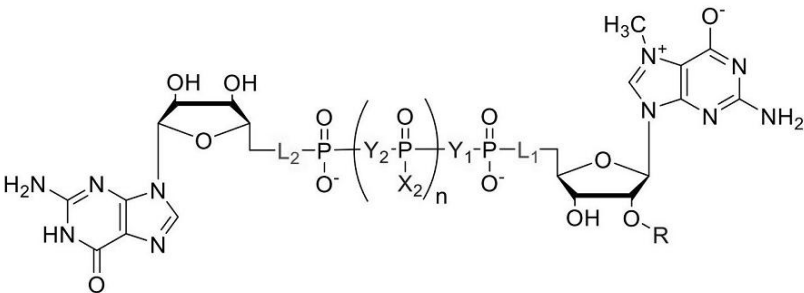
30

【 0 1 0 0 】

40

50

【表 5】

表 3 5'-チオリン酸キャップ類似体								
								
19: n=0 20: n=1								
								
化合物 No.	化合物	n	R	L ₁	L ₂	Y ₁	Y ₂	X ₂
21	m ⁷ GppSG	0	H	O	S	O	O	O
22	m ⁷ GpppSG	1	H	O	S	O	O	O
23	m ⁷ GSppG	0	H	S	O	O	O	O
24	m ⁷ GSpppG	1	H	S	O	O	O	O
25	m ⁷ GSppCH ₂ pG	1	H	S	O	O	CH ₂	O
38	m ^{7,2'} OGpppSG	1	CH ₃	O	S	O	O	O
26	m ^{7,2'} OGSpppG	1	CH ₃	S	O	O	O	O
32	m ⁷ GSpppSG	1	H	S	S	O	O	O
35	m ⁷ Gpp _s pSG D1	1	H	O	S	O	O	S
36	m ⁷ Gpp _s pSG D2	1	H	O	S	O	O	S
30	m ⁷ GSpp _s pG D1	1	H	S	O	O	O	S
31	m ⁷ GSpp _s pG D2	1	H	S	O	O	O	S
33	m ⁷ GSpp _s pSG D1	1	H	S	S	O	O	S
34	m ⁷ GSpp _s pSG D2	1	H	S	S	O	O	S
37	m ⁷ GpCH ₂ ppSG	1	H	O	S	CH ₂	O	O

【0101】

本明細書に引用された文書、および本明細書で参照された文書もまた、引用によって本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0102】

本発明のよりよい理解のために、本発明は実施例および添付の図により例示された。

【図1】5'-デオキシ-5'-ヨード-グアノシン類似体の合成を例示する。

【図2】5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-チオリン酸の合成を例示する。A：グアノシン誘導体の合成、B：7-メチルグアノシン誘導体の合成。

【図3】S-アルキル化を介した5'-チオリン酸キャップ類似体の合成を例示する。A：

アルキル化反応で使用する末端チオリン酸、B：5'-デオキシ-5'-ヨード-グアノシン（図1）およびAに示される末端チオリン酸を使用したアルキル化反応の体系。

【図4】イミダゾリドによる5'-チオリン酸キャップ類似体の合成を例示する。A：該方法で使用する化合物、B：2つの異なる活性化誘導体9番および29番を使用した最終化合物の合成。

【図5】DcpSによる天然のジヌクレオチド基質の加水分解、および5' S修飾類似体の安定性試験を例示する。パネルA：DcpSに対する天然のキャップ類似体m⁷GpppGの安定性試験、パネルB：DcpS酵素に対するキャップ類似体20番の安定性試験（表3）、パネルC：DcpS酵素に対するキャップ類似体21番の安定性試験（表3）。

【図6】化合物に関するIC₅₀判定の結果を例示する。

10

【図7】m⁷GSp₅SG-D2を有する複合体内の酵素 N37hDcpSの活性部位の結晶構造を例示する。

【図8】SpDcp1/2デキャッピング酵素でインキュベートされている、様々なキャップ類似体でキャップされた短い26ntのRNA（その5'末端にキャップのない転写物は25nt長である）のDcp1/2酵素活性に対する感受性を例示する。反応は0、5、15、30分間行なわれ、その終了後に、反応混合物は15%の変性のポリアクリルアミドゲル上で分解され、電気泳動の分離が完了した後、ゲルはSYBR-Gold（Invitrogen）で染色された。各パネルでは、左端のレーンが対照を指し、それはキャップされていないRNAである。

【図9】図8のデータから判定されたDcp1/2酵素活性に対する相対的な感受性を例示する。Dcp1/2活性に対する相対的な感受性は、5'末端でキャップされたRNAに対応するバンドの強度と、キャップされたおよびキャップされていないRNAに対応するバンドの強度の合計の比率として算出された。全ての数値は、個々のRNAについて0分の時間に対して標準化された。

20

【図10】ウサギの網状赤血球抽出物の5'末端の様々なキャップ類似体でキャップされたウミシイタケルシフェラーゼをコードするmRNAの翻訳効率の測定から得た、相対的な翻訳効率を例示する。

【図11】選択された時点における、ルシフェラーゼ活性に基づいて判定されたヒラー細胞の相対的な翻訳効率を例示する。結果は、5'末端のm₂^{7,2'}-GSp₅pppGまたはm₂^{7,2'}-GpppSGでキャップされたmRNAでトランスフェクトされた細胞の溶解産物に関して測定されたルシフェラーゼ活性と、m⁷GpppGでキャップされたmRNAでトランスフェクトされた細胞の溶解産物に関して測定されたルシフェラーゼ活性の比率として示される。ヒストグラムは、3つの生物学的反復からの平均値を表す。

30

【0103】

5'-チオリン酸キャップ類似体の化学合成は、以下の化学に基づいた3つのヌクレオチド合成方法の独創的な組み合わせである：

1) イミダゾリドヌクレオチド誘導体（（Abrams and Schiff 1973）；（Barnes, Waldrop et al. 1983）；（Kalek, Jemielity et al. 2006）および（Kalek, Jemielity et al. 2005）を参照）

40

2) ヌクレオシド誘導体を含むハロゲンによるS-アルキル化（（Arakawa, Shiokawa et al. 2003）を参照）

3) 末端ヌクレオシド - チオ - ジおよび - チオ - トリン酸塩の合成（（Zuberek, Jemielity et al. 2003）を参照）

【0104】

5'位に硫黄含有キャップ類似体を合成するために、我々は2つの相補的なアプローチを開発し、それは全体として、ヌクレオシドおよびジヌクレオチドキャップ類似体のリン酸塩、二リン酸塩、および三リン酸塩の5'-ホスホロチオエート類似体の全種類の合成を可能にする（図2-4）。アプローチ1（図2、および図3の第1工程）は、 - または - チオリン酸による、5'-デオキシ-5'-ヨードヌクレオシドの求核置換反応を使用す

50

る S - アルキル化の反応を含む。5' 位に硫黄原子を有するジヌクレオチド化合物を産する第 2 のアプローチ (図 4) は、適切なイミダゾリドヌクレオチドの事前に活性化された形態と三リン酸塩との間の、触媒としての $ZnCl_2$ の存在下における共役反応を使用する (いずれの場合も、望まれた段階で S - アルキル化の反応が使用された)。

【0105】

第 1 のアプローチは、末端位置にホスホロチオエート部分を有する、対応するホスホロチオエート (モノ -、ジ -、トリ -) を使用する。この反応のための最適条件は、塩基として等モル量のホスホロチオエート、5' - ヨードヌクレオシドおよび DBU (1, 8 - ジアザビシクロ (5.4.0) ウンデカ - 7 - エン) を使用することである。現在までに、我々はこの方法を使用して、三リン酸架橋の - および - 位にメチレン修飾を有する 2 つのユニットを含む、9 つの異なるジヌクレオチドキャップ類似体を得た (図 3)。

【0106】

効率的な産生のための第 2 の方法は、 $ZnCl_2$ などの二価金属塩化物の存在を必要としたが、それはさらに有機培地の溶解度を向上させ、イミダゾール誘導体の加水分解から保護し、および、イミダゾール誘導体および互いに近接した他の分子のリン酸塩を得ることによって反応速度を加速する。この反応のための最適条件は、DMF における 8 倍過剰な $ZnCl_2$ の存在下における三リン酸塩に対して、イミダゾール誘導体の 1.5 等量の使用であった。第 2 の方法を使用して、我々はさらに、三リン酸鎖の 5' 位の 2 つの硫黄、および - 非架橋位置の硫黄を含む 9 つの 5' - ホスホロチオエートキャップ類似体を得た (図 4)。これまでに、この種の反応におけるヌクレオチドの 5' - ホスホロチオエート類似体の使用が記述されたことはなかった。リン原子に位置する不斉中心の存在により、- S - 硫黄原子を含む各類似体は、ジアステレオマー混合物 (RP - HPLC カラムからの分離順序に従って D1 および D2 と呼ぶ) として得られた。個々のジアステレオマーは RP - HPLC によって分離された。

【0107】

得られたキャップ類似体は、イオン交換クロマトグラフィー、Sephadex A - 25、および精製が十分でない場合は分取 HPLC によって精製された。その後、精製された化合物は、その生化学的および生物学的特性に関して試験された。

【0108】

5' 位に硫黄原子を含むキャップ類似体をもたらす合成経路は、図 1 - 4 に示される。

【0109】

その後、得られたキャップ類似体は、ヒト酵素 DcpS (hDcpS) の基質として試験された。逆相 HPLC (RP - HPLC) によって判定されるように、類似体のうち 4 つのみ: m^7GppSG (21 番)、 $m^7GpppSG$ (22 番)、 $m^7, 2' - OGpppSG$ (38 番)、および $m^7GppspSG$ D1 / D2 (35 - 36 番) が DcpS によって加水分解される。7 - メチル化されたグアノシンの側から 5' 位に硫黄原子を含む他の類似体は、hDcpS による加水分解に抵抗力がある (2 つの異なる類似体 (22 番) と (24 番) の安定性の比較、図 5、表 4)。化合物 21、22、38 番および 35 - 36 番とは対照的に、類似体 37 (m^7GpCH_2ppSG) は、メチレンビスホスホナート部分でさらに修飾され、さらに酵素 hDcpS による加水分解に抵抗力があった (表 5)。その後、蛍光法および蛍光発生的なプローブは、酵素 hDcpS を抑制するこれらの化合物の能力の判定のために使用され、同時に酵素活性パラメータ IC_{50} に対して抵抗力のある化合物を判定するためにも使用された (特許出願 PL 406893 を参照)。試験後、結果として得た化合物がヒト酵素 DcpS の非常に阻害剤であることが発見された。

【0110】

類似体 34 番は試験されたすべてのキャップ類似体の中で、hDcpS 酵素に対する最良の阻害特性を示し、酵素の短縮版で共結晶化され ($N37hDcpS$; 完全長の酵素は結晶を形成しなかった)、および複合体の 2.05 融解構造が X 線結晶解析で判定された (図 7)。複合体構造において観察された類似体 34 番の構造は、触媒現象的に不活

性の H 2 7 7 N h D c p S 突然変異体を伴う複合体における非修飾キャップ類似体 m⁷ G p p p G (化合物 0 番) の構造とはかなり異なっている (Gu, F a b r e g a e t a l . 2 0 0 4) 。それらの 2 つのリガンド間の特に実体的な相違は、三リン酸架橋の配列で観察され、結果として触媒中心からの類似体 3 4 番の リン酸塩の排除をもたらした。さらに、C 末端領域との典型的なキャップ / D c p S 酵素複合体の相互作用に加えて、類似体 3 4 は水素結合を介してリジン 1 4 2 およびチロシン 1 4 3 残基と相互に作用する。それらのアミノ酸は、C - と N - 末端領域が結合するいわゆるヒンジ領域に位置し、それは触媒回路中で互いに対して移動する。

【 0 1 1 1 】

得られた化合物の構造および純度は質量分析法および ¹H と ³¹P N M R によって確認された。

10

【 0 1 1 2 】

得られた化合物の加水分解が 7 - メチルグアノシンに隣接しているリン酸基に対する求核攻撃を通じて進むため、m⁷ G S p p p G (化合物 2 4 番) およびその類似体が h D c p S に抵抗力があるという所見は予期しないものであり、これは天然の基質に関して確立された触媒のメカニズムと矛盾しない。

【 0 1 1 3 】

まとめると、本発明は、5' - ホスホロチオエート部分を含む m R N A (キャップ) の 5' 末端の様々な類似体の構造および合成方法を記載する。記載されるキャップ類似体、酵素 D c p S に対するそれらの特性、およびそれらの使用法、特に脊髄筋萎縮症 (S M A) の処置および / または S M A の症状の緩和のための使用のいずれも、これまでに文献に記載されたことはなかった。

20

【 0 1 1 4 】

選択された類似体は、R N A S P 6 ポリメラーゼ (New England Biol a b s) を用いたインビトロ転写法を用いた m R N A 合成に使用された。35 のヌクレオチドの長さを有する転写物のプールのどのパーセンテージがキャップ構造を有するのかを検査し、そして次に分裂酵母からの組換え酵素 D c p 1 / 2 による分解に対するこれらの転写物の感受性を検査した (実施例 2、試験 4、図 8、図 9、表 6)。ルシフェラーゼを (レポーター遺伝子として) コードする完全長の転写物は、ウサギ網状赤血球の溶解産物 (図 10、実施例 2、試験 5)、および修飾された m R N A でトランスフェクトされたヒーラー細胞 (図 11、実施例 2、試験 6) における翻訳を受けた。いずれの場合も、双方の翻訳系統における m R N A 翻訳の効率は、合成されたタンパク質 (ルシフェラーゼ) の活性を検査することによって判定された (表 6)。

30

【 0 1 1 5 】

本明細書で使用される用語は、以下の意味を持つ。本明細書に定義されない用語は、本開示および特許出願の明細書の文脈に照らして、当業者によって提示され、および理解される意味を持つ。他で指示されない限り、以下の約束事が本明細書において使用され、用語は以下の定義で示される意味を持つ。

【 0 1 1 6 】

用語「アルキル」は、指示された数の炭素原子を有する、飽和した、または直鎖、または分岐したヒドロカルボニル置換基を指す。アルキル置換基の例は、- メチル、- エチル、- n プロピル、- n ブチル、- n ペンチル、- n ヘキシル、- n ヘプチル、- n オクチル、- n ノニルおよび - n デシルである。代表的な分岐した - (C 1 - C 10) アルキルは、- イソプロピル、- s e c - ブチル、- イソブチル、- t e r t - ブチル、- イソペンチル、- ネオペンチル、- 1 - - メチルブチル、- 2 - メチルブチル、- 3 - メチルブチル、- 1, 1 - ジメチルプロピル、- 1, 2 - ジメチルプロピル、- 1 - メチルペンチル、- 2 - メチルペンチル、- 3 - メチルペンチル、- 4 - メチルペンチル、- 1 - エチルブチル、- 2 - エチルブチル、- 3 - エチルブチル、- 1, 1 - ジメチルブチル、- 1, 2 - ジメチルブチル、- 1, 3 - ジメチルブチル、- 2, 2 - ジメチルブチル、- 2, 3 - ジメチルブチル、- 3, 3 - ジメチル - ブチル、- 1 - メチルヘキシル、2 - メチルヘ

40

50

キシル、 - 3 - メチルヘキシル、 - 4 - メチルヘキシル、 - 5 - メチルヘキシル、 - 1 , 2 - ジメチルペンチル、 - 1 , 3 - ジメチルペンチル、 - 1 , 2 - ジメチルヘキシル、 - 1 , 3 - ジメチルヘキシル、 - 3 , 3 - ジメチルヘキシル、 1 , 2 - ジ - メチルヘプチル、 - 1 , 3 - ジメチルヘプチル、および - 3 , 3 - ジメチルヘプチル、およびその他を含む。

【 0 1 1 7 】

用語「アルケニル」は、飽和した、または直鎖、または分岐した非環式ヒドロカルビル置換基を指し、それは指示された数の炭素原子を有し、および少なくとも1つの炭素 - 炭素二重結合を含む。アルケニル置換基の例は、 - ビニル、 - アリル、 - 1 - ブテニル、 - 2 - ブテニル、 - イソブチレニル、 - 1 - ペンテニル、 - 2 - ペンテニル、 - 3 - メチル - 1 - ブテニル、 - 2 - メチル - 2 - ブテニル、 - 2 , 3 - ジメチル - 2 - ブテニル、 - 1 - ヘキセニル、 - 2 - ヘキセニル、 - 3 - ヘキセニル、 - 1 - ヘプテニル、 - 2 - ヘプテニル、 - 3 - ヘプテニル、 - 1 - オクテニル、 - 2 - オクテニル、 - 3 - オクテニル、 - 1 - ノネニル、 - 2 - ノネニル、 - 3 - ノネニル、 - 1 - デケニル、 - 2 - デケニル、 - 3 - デケニル、およびその他である。

10

【 0 1 1 8 】

用語「アルキニル」は、飽和した、または直鎖、または分岐した非環式ヒドロカルビル置換基を指し、それは指示された数の炭素原子を有し、および少なくとも1つの炭素 - 炭素三重結合を含む。アルキニル置換基の例は、アセチレニル、プロピニル、 - 1 - ブチニル、 - 2 - ブチニル、 - 1 - ペンチニル、 - 2 - ペンチニル、 - 3 - メチル - 1 - ブチニル、 4 - ペンチニル、 - 1 - ヘキシニル、 - 2 - ヘキシニル、 - 5 - ヘキシニル、およびその他である。

20

【 0 1 1 9 】

用語「異種原子」は、酸素、硫黄、窒素、リン、およびその他の基から選択された原子を指す。

【 0 1 2 0 】

用語「HPLC」は高速液体クロマトグラフィーを指し、および「HPLC」用の溶媒として指定された溶媒は、HPLC解析（高速液体クロマトグラフィー）に適した純度の溶媒を指す。

【 0 1 2 1 】

用語「NMR」は核磁気共鳴を意味する。

30

【 0 1 2 2 】

用語「細胞系」は、RNA鋳型でタンパク質生合成プロセスを行なうことができる細胞を指す。

【 0 1 2 3 】

用語「非細胞系」は、RNA鋳型に基づいたタンパク質生合成に必要な全ての成分、通常は動物または植物の細胞の溶解産物を含む生物混合物を意味する。

【発明を実施するための形態】

【 0 1 2 4 】

以下の実施例は、本発明を例示し、およびその様々な態様について説明するためだけに提供され、本発明を制限するためのものではなく、および添付された特許請求の範囲において定義されるその全ての範囲と同一視されるべきでない。以下の実施例は、他で指示されない限り、当分野で使用される標準的な物質および方法、または特定の物質と方法に関してメーカーによって推奨される手順の使用を含んだ。

40

【実施例】

【 0 1 2 5 】

<新たなキャップ類似体の合成、単離および特性評価に関する一般的な情報>

中間物であるヌクレオチドは、脱イオン水中で重炭酸トリエチルアンモニウム (TEAB) の直線勾配を使用し、DEAE Sephadex A - 25 (HCO₃ - form) におけるイオン交換クロマトグラフィーによって精製された。減圧下での蒸発の間にTE

50

A B 緩衝液を分解するために 96 % のエタノールを数回添加し、その後に中間物はトリエチルアンモニウムの塩として単離された。最終的な生成物 (キャップ類似体) は同じ方法で精製され、次にセミ分取 HPLC によって精製され、および凍結乾燥を数回受け、アンモニウム塩として単離された。分析逆相 HPLC (RP HPLC) は Agilent Technologies Series 1200 の装置で、0.05 M の酢酸アンモニウム (pH 5.9) 中の 0 % - 25 % のメタノール (プログラム A) または 0.05 M の酢酸アンモニウム (pH 5.9) 中の 0 % - 50 % のメタノール (プログラム B) の直線勾配を備える、Supelcosil LC-18 RPT カラム (4.6 ラ 250 mm、フロー 1.3 ml / 分) を用いて行われた。溶出された化合物は、UV-VIS 検出器 (260 nm で) および蛍光検出器 (励起 260 nm、放射 370 nm) を使用して検知された。分取 RP HPLC は、移動相として 0.05 M の酢酸アンモニウム (pH 5.9) 中のアセトニトリルの直線勾配を使用し、Discovery RP Amide C16 カラム (21.2 mm x 250 mm、フロー 5.0 ml / 分) を使用して、同じ装置で行われた。1H NMR および 31P NMR スペクトルはそれぞれ、399.94 MHz および 161.90 MHz の周波数で、Varian UNITY-plus において 25

で記録された。1H NMR 化学シフトは、D2O (内部標準) の TSP (3 - トリメチルシリル [2, 2, 3, 3 - D4] プロピオン酸ナトリウム) に伝えられた。31P NMR 化学シフトは、D2O (外部標準) の 20 % のリン酸塩に伝えられた。陰イオンモード [MS ESI (-)] または陽イオンモード [MS ESI (+)] における高解像度質量スペクトルを、Micromass QToF 1 MS に記録した。蛍光プレート読取り機の読取りを、480 nm の励起および 535 nm の放射で、Tecan Infinite 200 (登録商標) PRO で行なった。サンプルは黒色 96 ウェルプレート (Greiner) に置かれた。結晶は、分注ロボット Mosquito Crystal (TTP Labtech) を利用して、3 つのレンズウェル (SwisSCI) を備えた 96 ウェルプレート上で行なわれた。溶媒および他の試薬はシグマ・オールドリッチから購入し、以下で指示されない限り、さらなる精製を行うことなく使用した。GMP と GDP の市販されているナトリウム塩は、Dowex 50 WX8 で、イオン交換クロマトグラフィーを使用して、トリエチルアンモニウム塩に変えられた。トリエチルアンモニウム塩、および m^7 GMP と m^7 GDP のナトリウム塩、 m^7 GMP - Im と m^7 GDP - Im を、文献に記載のようにして得た (Kalek, Jemielity et al. 2005), (Jemielity, Fowler et al. 2003)。5' - デオキシ - 5' - ヨード - グアノシン、5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - モノチオホスファート、およびトリエチルアミンホスホロチオエートを、文献に記載のようにして得た (Arakawa, Shiokawa et al. 2003), (Zubersek, Jemielity et al. 2003)。 m^7 GpCH₂p トリエチルアンモニウム塩を、文献に記載のように調製した (Kalek, Jemielity et al. 2006)。GpCH₂ppS を、記載されているように調製した (Kowalska, Ziemiak et al. 2008)。

【 0126 】

以下の実施例において、特定の化合物に対する括弧内に、特定の置換基を示す図と数への参照が与えられ、それは特定のキャップ類似体に対する特定の数に一致する。

【 0127 】

< 実施例 1 >

新しいキャップ類似体の合成および単離

5' - ヨードヌクレオシド誘導体 (図 1、3 番、4 番) の合成の一般的な方法

ヨウ素 (3 mmol、M = 253.81 g/mol) を、室温で、N - メチル - 2 - ピロリジノン (ヌクレオシド 0.25 mol / l 濃度まで) 中の、対応するヌクレオシド (1 mmol)、トリフェニルホスフィン (3 mmol、M = 262.29 g/mol) およびイミダゾール (6 mmol、M = 68.08 g/mol) の磁氣的に攪拌された懸濁液に、5 分以上加えた。その反応は 3 時間以上行なわれ、反応の進行は RP HPLC を

使用してモニタリングされた。次いで、反応混合物を $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (3:1、v/v)の溶液に注ぎ、反応混合物を12回希釈した。白色の結晶性の沈殿物が、2つの層の界面で4で24時間のあいだに形成された。沈殿物を減圧下で濾過し、塩化メチレンで洗浄し、 P_2O_5 上で真空中で乾燥した。

【0128】

5'-デオキシ-5'-ヨード-グアノシン(図1、3番)

グアノシン(図1、1番)(10g、35.3mmol)から出発して、一般的な手順に従い、5'-デオキシ-5'-ヨード-グアノシン(図1、3番)、(10.4g、26.5mmol、75%)を得た。 $t_R(B)=12.36$ 分;

$^1\text{H NMR}$ (400MHz、 $\text{DMSO}-d_6$) ppm 10.65(s、1H、H-1)、7.89(s、1H、H-8)、6.47(bs、2H、 NH_2)、5.68(d、1H、 $J=6.26$ Hz、H-1')、5.51(d、1H、 $J=6.26$ Hz、2'-OH)、5.35(d、1H、 $J=4.70$ Hz、3'-OH)、4.59(q、1H、 $J=5.48$ Hz、H-2')、4.03(q、1H、 $J=5.09$ 、3.13 Hz、H-3')、3.90(dt、1H、 $J=6.26$ 、3.13 Hz、H-4')、3.53(dd、1H、 $J=6.26$ 、5.87 Hz、H-5')、3.39(dd、1H、 $J=10.17$ 、6.65 Hz、H-5') ; HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{IN}_5\text{O}_4^-$ 、(M-H) $^-$; 391.9861、found 391.98610

【0129】

5'-デオキシ-5'-ヨード-2'-O-メチル-グアノシン(図1、4番)

2'-O-メチルグアノシン(図1、2番)(300mg、1.0mmol)から出発して、一般的な手順に従い、2'-O-メチル-5'-デオキシ-5'-ヨード-グアノシン(図1、4番)、(328.8mg、0.81mmol、80%)を得た。 $t_R(B)=14.44$ 分;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz、 $\text{DMSO}-d_6$) ppm 7.95(s、1H、H-8)、6.50(bs、2H、 NH_2)、5.81(d、1H、 $J=6.41$ Hz、H-1')、5.50(d、1H、 $J=5.34$ Hz、3'-OH)、4.41、4.40(2d、1H、 $J=6.26$ 、6.41 Hz、H-2')、4.28-4.25(m、1H、H-3')、3.97、3.96(2t、1H、 $J=6.56$ 、3.05 Hz、H-4')、3.56(dd、1H、 $J=6.41$ 、10.38 Hz、H-5')、3.43(dd、1H、 $J=10.53$ 、6.87、6.71 Hz、H-5')、3.30(s、3H、 CH_3);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{IN}_5\text{O}_4^-$ [M-H] $^-$: 406.0090、found 406.0021.

【0130】

5'-デオキシ-5'-ヨード-7-メチルグアノシン(図1、5番)

5'-デオキシ-5'-ヨード-グアノシン(図1、3番)(2g、5.09mmol)を無水DMF(20mL)に溶解し、MeI(2.5mL、40.7mmol)を加えた。反応混合物を室温でマグネチックスターラーにて攪拌した。反応の進行をRP HPLCによってモニタリングした。出発物質が観察されなかった場合、水(10mL)を加えることにより反応を停止させ、過剰なヨウ化メチルを真空下で蒸発させ、反応混合物を減圧下で濃縮した。その後、残る粗生成物に、 CH_2Cl_2 (100mL)を加え、黄色の沈殿物を形成した。沈殿物を減圧下で濾過し、 CH_2Cl_2 (3×20mL)で洗浄し、 P_4O_{10} 上で真空中で24時間乾燥した。収量1.6g(77.0%)。 $t_R(B)=11.94$ 分;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz、 D_2O) ppm 5.98(d、1H、 $J=3.91$ Hz、H-1')、4.81(dd、1H、 $J=4.70$ Hz、H-2')、4.31(t、1H、 $J=5.09$ 、H-3')、4.15(q、1H、 $J=5.48$ 、H-4')、4.07(s、3H、 CH_3)、3.50-3.62(m、2H、 $J=4.70$ 、5.87

H z、H - 5') ;

HRMS ESI (+) calcd . m / z C¹¹H¹⁵IN⁵O⁴ + [M + H]⁺
: 408 . 01687、found 408 . 01163 .

【 0131 】

5' - デオキシ - 5' - ヨード - 2' - O - メチル - 7 - メチルグアノシン (図 1、6 番)

5' - デオキシ - 5' - ヨード - 2' - O - メチルグアノシン (図 1、4 番) (200 . 8 mg、0 . 49 mmol) を無水 DMSO (3 . 3 mL) に溶解し、MeI (0 . 25 mL、3 . 9 mmol) を加えた。反応混合物を室温でマグネチックスターラーにて攪拌した。反応の進行を RP HPLC によってモニタリングした。出発物質が観察されなかった時、水 (10 mL) を加えることにより反応をクエンチさせ、pH を NaHCO₃ を用いて中性に調整し、過剰なヨウ化メチルをジエチルエーテルで抽出し、水相をプールの (pooled)、続いて混合物を濃縮し、分取 HPLC で精製して、45 . 8 mg の化合物 (77 %) を得た。t_R (B) = 11 . 94 分 ;

¹H NMR (400 MHz、DMSO - d₆) ppm 9 . 03 (s、1 H、H - 8)、6 . 39 (bs、2 H、NH₂)、5 . 95 (d、1 H、J = 4 . 27 Hz、H - 1')、4 . 40 (t、1 H、J = 4 . 58 Hz、H - 2')、4 . 24 (t、1 H、J = 4 . 88 Hz、H - 3')、4 . 08 - 4 . 06 (m、1 H、H - 4')、4 . 02 (s、3 H、CH₃)、3 . 59 (dd、1 H、J = 5 . 19、4 . 88、10 . 68 Hz、H - 5')、3 . 50 (dd、1 H、J = 7 . 93、7 . 63、10 . 68 Hz、H - 5')、3 . 41 (s、3 H、CH₃) ;

HRMS ESI (-) calcd . m / z C₁₂H₁₅IN₅O₄⁻ [M - H]⁻ : 420 . 01741、found : 420 . 01758 .

【 0132 】

グアノシン 5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - モノホスホロチオラート (図 2、7 番)

100 mL の DMF : H₂O 混合物 (1 : 1、v / v) 中の 5' - デオキシ - 5' - ヨードグアノシン (図 2、3 番) (2 . 0 g、5 . 1 mmol) の懸濁液に、チオリン酸三ナトリウム (4 . 6 g、25 . 5 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 24 時間攪拌した。沈殿物を濾過によって除去し、濾液を減圧下で蒸発させた。残留物を 50 mL の水に溶解し、過剰なチオリン酸三ナトリウムを 100 mL のメタノールを追加することにより沈殿させた。分離後、粗生成物を Sephadex のイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。生成物を凍結乾燥した。収量 1 . 9 g (64 %)。t_R (B) = 4 . 24 分 ;

¹H NMR (400 MHz、D₂O) ppm 8 . 05 (s、1 H、H - 8)、5 . 89 (d、1 H、J = 5 . 73 Hz、H - 1')、4 . 85 (dd、1 H、J = 5 . 48 Hz、H - 2')、4 . 51 (2 d、1 H、J = 4 . 98、4 . 23 Hz、H - 3')、4 . 33 - 4 . 39 (m、1 H、H - 4')、3 . 16 - 3 . 08 (m、2 H、H z、H - 5') ;

³¹P NMR (162 MHz、D₂O) ppm 15 . 42 (s、1 P) ;

HRMS ESI (-) calcd . m / z C₁₀H₁₃N₅O₇PS⁻ [M - H]⁻ : 378 . 02788、found : 378 . 02828 .

【 0133 】

グアノシン 5' - デオキシ - 5' - チオ - 7 - メチルグアノシン - 5' - モノホスホロチオラート (図 2、8 番)

100 mL の DMF 中の 5' - デオキシ - 5' - ヨード - 7 - メチルグアノシン (図 2、6 番) (2 . 0 g、4 . 92 mmol) の懸濁液に、チオリン酸三ナトリウム (4 . 43 g、24 . 6 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 48 時間攪拌した。沈殿物を除去し、濾液を減圧下で蒸発させた。残留物を 50 mL の水に溶解し、過剰なチオリン酸三ナトリウムをメタノール (100 mL) を追加することにより沈殿させた。分離後、粗生成物を Sephadex のイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。生成物を凍結乾燥した。収量 1 . 55 g (53 %)。t_R (B) = 4 . 64 分 ;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) ppm 7.85 (s, 1H, H-8), 5.89 (d, 1H, $J = 3.74$ Hz, H-1'), 4.78 - 4.75 (m, 1H, H-2'), 4.43 - 4.39 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.09 (s, 3H, ζH), 3.08 - 2.94 (m, 2H, H α , H-5');
 $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) ppm 14.45 (s, 1P);
 HRMS ESI(-) calcd. m/z $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{PS}^- [\text{M}-\text{H}]^-$: 392.04353, found: 392.04378.

【0134】

グアノシン5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-モノホスホロチオラートイミダゾリド(図2、9番、10番)の合成の一般的な手順

10

適切な出発化合物(ヌクレオチドTEA塩)(1 mmol)をDMF(ヌクレオチド濃度0.15 Mまで)中のイミダゾール(10 mmol)および2,2'-ジチオジピリジン(3 mmol)と混合した。次に、トリエチルアミン(3 mmol)およびトリフェニルホスフィン(3 mmol)を加え、混合物を室温で24時間撹拌した。乾燥アセトン(～添加したDMFよりも10倍大きい量)中の NaClO_4 の無水溶液(リン酸塩部分ごとに4 mmol)を添加した結果、反応混合物から生成物が沈殿した。4度まで冷却した後に、沈殿物を濾過し、冷たい乾燥アセトンで洗浄し、 P_4O_{10} 上で真空中で乾燥させた。

【0135】

グアノシン5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-モノホスホロチオラートイミダゾリド(図2、9番)

20

5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-モノホスホロチオエート(図2、7番)(500 mg, 0.86 mmol)から出発して、一般的な手順に従って、グアノシン5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-モノホスホロチオエートイミダゾリド(図2、9番)(352 mg, 0.75 mmol, 89%)を得た。 $t_R(\text{B}) = 8.27$ 分;

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) ppm 11.69 (m, 1P);
 HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_6\text{PS}^- [\text{M}-\text{H}]^-$: 428.05476, found 428.05452.

【0136】

5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-7-メチルグアノシン-5'-モノホスホロチオラートイミダゾリド(図2、10番)

30

5'-デオキシ-5'-チオ-7-メチルグアノシン-5'-モノホスホロチオエート(図2、8番)(500 mg, 0.84 mmol)から出発して、一般的な手順に従って、5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-7-メチルグアノシン-5'-モノホスホロチオエートイミダゾリド(図2、10番)(321 mg, 0.69 mmol, 82%)を得た。 $t_R(\text{B}) = 8.39$ 分;

HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_6\text{PS}^- [\text{M}-\text{H}]^-$: 442.07041, found 442.07070.

【0137】

グアノシン5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-ジホスホロチオラート(図2、11番)

40

グアノシン5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-モノホスホロチオエートイミダゾリド(図2、9番)(100 mg, 0.22 mmol)を無水DMF(2 mL)に溶解し、トリス(トリエチルアンモニウム)リン酸塩(100 mg, 0.26 mmol)を加え、続いて ZnCl_2 (235.84 mg, 1.76 mmol)を加えた。反応の進行をRP-HPLCで制御した。反応混合物を、出発物質が消失するまで室温で撹拌した。次いで、EDTAの水溶液(513.92 mg, 1.76 mmol, 50 mL)を加えることにより反応を停止させ、1 Mの NaHCO_3 で中和した。粗生成物をDEAE-Sephadexのイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、TEA塩類として単離した。収量: 108.5 mg (0.14 mmol, 65%);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}^-$

50

[M - H]⁻: 457.99421、found 457.99481.

【0138】

5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-7-メチルグアノシン-ニリン酸塩(図2、12番)

5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-7-メチルグアノシン-5'-モノホスホロチオエートイミダゾリド(図2、10番)(100mg、0.21mmol)を無水DMF(2mL)に溶解し、トリス(トリエチルアンモニウム)-リン酸塩(100mg、0.26mmol)を加え、続いてZnCl₂(224.54mg、1.68mmol)を加えた。反応の進行をRP-HPLCで制御した。反応混合物を、出発物質が消失するまで室温で撹拌した。その後、その反応は、EDTA(490.56mg、1.68mmol、50mL)の水溶液の追加によって止められ、1M NaHCO₃で中和された。粗生成物をDEAE-Sephadexのイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、TEA塩類として単離した。収量: 91mg(0.12mmol、54%)、t_R(B) = 5.07分、

¹H NMR(400 MHz、D₂O) ppm 8.11(s、1H、H-8 ゆっくりと交換可能)、5.97(d、1H、J = 3.91 Hz、H-1'), 4.50、4.49(2d、1H、J = 5.09 Hz、H-2'), 4.41(q、1H、J = 5.48, 5.09 Hz、H-3'), 4.07(s、3H、CH₃)、3.34-3.13(m、3H、H-4'、H-5');

³¹P NMR(162 MHz、D₂O) ppm 6.71(d、1P、J = 30.81 Hz)、8.21(d、1P、J = 30.81 Hz);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for C₁₁H₁₆N₅O₁₀P₂S - [M - H]⁻: 472.00986、found 472.00967.

【0139】

グアノシン5'-デオキシ-5'-チオ-7-メチルグアノシン-2'-ジホスホロチオレート(図2、13番)

5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-7-メチルグアノシン-5'-モノホスホロチオエートイミダゾリド(図2、10番)(100mg、0.21mmol)を無水DMF(2mL)に溶解し、チオリン酸ナトリウム(47mg、0.26mmol)を加え、続いてZnCl₂(224.54mg、1.68mmol)を加えた。反応の進行をRP-HPLCで制御した。反応混合物を、出発物質が消失するまで室温で撹拌した。その後、その反応は、EDTA(490.56mg、1.68mmol、50mL)の水溶液の追加によって止められ、1M NaHCO₃で中和された。粗生成物をDEAE-Sephadexのイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、単離されたTEA塩類を直ちに共役反応に使用した。収量: 110mg(0.13mmol、64%);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for C₁₁H₁₆N₅O₉P₂S₂ - [M - H]⁻: 487.98702、found 487.98724.

【0140】

Sアルキル化による5'-Sキャップ類似体の合成

一般的な手順

ヌクレオシド末端のチオリン酸TEA塩(1当量)をDMSO(濃度約0.1-0.2Mまで)中で懸濁させた。次いで、DBU(1, 8-ジアザビシクロ(5.4.0)ウンデカ-7-エン)(1当量)および5'-ヨードグアノシン(1当量)の誘導体を加えた。反応の進行をRP-HPLCによってモニタリングした。1%酢酸をpH = 7まで加えることによって末端チオリン酸塩からのシグナルがなくなった後に反応を停止させ、反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで洗浄した。生成物をDEAE-Sephadexのイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、トリエチルアンモニウム塩として単離した。生成物を半分取(semi-preparative)RP-HPLCにより精製した。

【0141】

P1-(グアノシン-5'-イル)-P2-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-

10

20

30

40

イル)ニリン酸塩 - GppSG (図3、19番)

GDP S (図3、14番)、(506mOD、0.042mmol)から出発して、一般的な手順に従って、GppSG (207mOD、0.009mmol、24%)を得た。RP-HPLC: t_R (A) = 6.9分;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) ppm 7.96 (s, 1 H)、7.81 (s, 1 H)、5.77 (d, 1 H, $J = 5.48$ Hz)、5.70 (d, 1 H, $J = 5.87$ Hz)、4.80 - 4.70 (m, 2 H、水シグナルと重なる)、4.64 (t, 1 H, $J = 5.48$ Hz)、4.43 (t, 1 H, t, $J = 3.91$ Hz)、4.37 (t, 1 H, $J = 3.91$ Hz)、4.30 - 4.15 (m, 4 H)、3.30 - 3.13 (m, 2 H);

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) ppm 7.63 (d, 1 P, $J = 32.28$ 、12.5 Hz)、-12.02 (d, 1 P, $J = 30.81$ Hz);

HRMS ESI (-) calcd. m/z for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 723.07531、found 723.07546.

【0142】

P1 - (7-メチル-グアノシン-5'-イル) - P2 - (5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) - ニリン酸塩 - $m^7\text{GppSG}$ (図3、21番)

$m^7\text{GDP S}$ (図3、17番)、(5830mOD、0.51mmol)から出発して、一般的な手順に従って、 $m^7\text{GppSG}$ (1028mOD、0.045mmol、9%)を得た。RP-HPLC: t_R (A) = 5.9分;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) ppm 8.98 (s, 1 H, H-8 $m^7\text{G}$)、7.87 (s, 1 H, H-8 G)、5.88 (d, 1 H, $J = 2.0$ Hz, H-1' $m^7\text{G}$)、5.73 (d, 1 H, $J = 5.7$ Hz, H-1' G)、4.69 (t, 1 H, $J = 5.5$ Hz, H-2' G)、4.51 (bs., 1 H, H-2' ^7mG)、4.32 - 4.44 (m, 5 H, H-3' G, H-3' ^7mG , H-4' G, H-4' $m^7\text{G}$, H-5' $m^7\text{G}$)、4.24 (dd, 1 H, $J = 11.3$, 5.4 Hz, H5" $m^7\text{G}$)、4.04 (s, 3 H, CH_3)、3.24 - 3.41 (m, 2 H, H5', 5" G);

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) ppm 7.38 (dt, 1 P, $J = 29.0$, 11.5 Hz)、-12.00 (d, 1 P, $J = 32.23$ Hz);

HRMS ESI (-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 737.09096、found 737.09052.

【0143】

P1 - (7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) - P2 - グアノシン-5'-イル - ニリン酸塩 - $m^7\text{GSppG}$ (図3、23番)

GDP S (図3、14番; 2532mOD、0.21mmol)から出発して、一般的な手順に従って、 $m^7\text{GSppG}$ (1660mOD、0.073mmol、35%)を得た。RP-HPLC: t_R (A) = 7.75分;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) ppm 7.99 (s, 1 H, H-8 G)、5.83 (d, 1 H, $J = 4.2$ Hz, H-1' $m^7\text{G}$)、5.80 (d, 1 H, $J = 6.0$ Hz, H-1' G)、4.65 - 4.70 (2 H, m, H-2' G, H-2' $m^7\text{G}$)、4.45 (t, 1 H, $J = 4.1$ Hz, H-3' G)、4.19 - 4.41 (5 H, m, H-3' $m^7\text{G}$, H-4' G, H-4' ^7mG , H5', 5" G)、4.05 (s, 3 H, CH_3)、3.35 - 3.43 (m, 2 H, H5', 5" ^7mG);

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O) ppm 7.32 (dt, 1 P, $J = 29.0$, 11.0 Hz)、-11.84 (d, 1 P, $J = 29.00$ Hz);

HRMS ESI (-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$: 737.09096、found 737.09146.

【0144】

P1 (グアノシン-5'-イル) - P3 (5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル 50

) - 三リン酸塩 - G p p p S G (図 3、20 番)

G T P S (図 3、15 番 ; 1233mOD、0.10mmol) から出発して、一般的な手順に従って、G p p p S G (1149mOD、0.051mmol、51%) を得た。R P - H P L C : $t_R(A) = 5.50$ 分 ;

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

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz、 D_2O) ppm 8.21 (d t、1 P、 $J = 27.00$ 、13.3 Hz)、- 11.34 (d、1 P、 $J = 19.30$ Hz)、- 23.78 (d d、1 P、 $J = 27.00$ 、19.30 Hz) ;

HRMS ESI (-) calcd. m/z for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}^-$ [M - H]⁻ : 803.04164、found 803.04135.

【 0145】

P1 - (7 - メチル - 5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - イル) - P3 - グアノシン - 5' - イル - 三リン酸塩 - $m^7\text{G S p p p G}$ (図 3、24 番)

G T P S (図 3、15 番 ; 3000mOD、0.25mmol) から出発して、一般的な手順に従って、 $m^7\text{G S p p p G}$ (729mOD、0.032mmol、13%) を得た。R P - H P L C : $t_R(A) = 5.36$ 分 ;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz、 D_2O) ppm 8.92 (s、1 H、H - 8 $m^7\text{G}$)、7.96 (s、1 H、H - 8 G)、5.78 (d、1 H、 $J = 4.30$ Hz、H - 1' $m^7\text{G}$)、5.74 (d、1 H、 $J = 5.87$ Hz、H - 1' G)、4.63 (m、2 H、H - 2' G、H 2' $m^7\text{G}$)、4.48 (d d、1 H、 $J = 4.43$ 、3.52 Hz、H - 3' $m^7\text{G}$)、4.36 - 4.26 (m、4 H、H - 3' G、H - 4' G、H - 4' $m^7\text{G}$ 、H - 5' G)、4.24 - 4.19 (m、1 H、H - 5" G)、4.00 (s、3 H、 CH_3)、3.33 - 3.24 (2 H、m、H - 5'、5" $m^7\text{G}$) ;

$^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz、 D_2O) ppm 7.57 (d、1 P、 $J = 27.88$ Hz)、- 11.68 (d、1 P、 $J = 20.54$ Hz)、- 24.00 (d d、1 P、 $J = 29.35$ 、22.01 Hz) ;

HRMS ESI (-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}^-$ [M - H]⁻ : 817.05729、found 817.05494.

【 0146】

P1 - (7 - メチル - グアノシン - 5' - イル) - P3 - (5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - イル) - 三リン酸塩 - $m^7\text{G p p p S G}$ (図 3、22 番)

$m^7\text{G T P S}$ (図 3、18 番 ; 2616mOD、0.23mmol) から出発して、一般的な手順に従って、 $m^7\text{G p p p S G}$ (1582mOD、0.07mmol、32%) を得た。R P - H P L C : $t_R(A) = 6.06$ 分 ;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz、 D_2O) ppm 9.02 (s、1 H、H - 8 $m^7\text{G}$)、7.87 (s、1 H、H - 8 G)、5.84 (d、1 H、 $J = 3.52$ Hz、H 1' $m^7\text{G}$)、5.70 (d、1 H、 $J = 6.65$ Hz、H - 1' G)、4.80 - 4.67 (m、1 H、H - 2' G)、4.52 (t、1 H、 $J = 4.30$ Hz、H - 2' $m^7\text{G}$)、4.41 (d d、2 H、 $J = 4.70$ 、4.30 Hz、H 3' G、H 3' $m^7\text{G}$)、4.38 - 4.30 (m、2 H、H - 4' G、H - 4' $m^7\text{G}$)、4.36 - 4.31 (m、2 H、H 5' $m^7\text{G}$)、4.02 (s、3 H、 CH_3)、3.30 - 3.20 (m、2 H、 $J = 12.6$ 、6.3 Hz、H 5'、5" G) ; $^{31}\text{P NMR}$

R (1 6 2 M H z、D₂O) p p m 7 . 6 6 (d、1 P、J = 2 9 . 3 5 H z)、
- 1 1 . 7 3 (d、1 P、J = 2 2 . 0 1 H z)、- 2 3 . 9 5 (d d、1 P、J = 2
2 . 0 1、2 7 . 8 8 H z) ;

H R M S E S I (-) c a l c d . m / z f o r C₂₁H₂₈N₁₀O₁₇P₃S⁻
[M - H]⁻ : 8 1 7 . 0 5 7 2 9、f o u n d 8 1 7 . 0 5 7 4 8 .

【 0 1 4 7 】

P 1 - (2 ' - O - メチル - 7 - メチル - 5 ' - デオキシ - 5 ' - チオグアノシン - 5 ' - イ
ル) - P 3 - グアノシン - 5 ' - イル 三リン酸塩 $m_2^{7,2'}\text{-}^Q\text{GSpppG}$ (図 3、2 6
番)

G T P S (図 3、1 5 番 ; 1 5 0 0 m O D、0 . 1 2 m m o l) から出発して、一般 10
的な手順に従って、 $m_2^{7,2'}\text{-}^Q\text{GSpppG}$ (1 4 0 m O D、0 . 0 0 6 m m o l、5
%) を得た。R P - H P L C : t_R (A) = 7 . 8 9 分 ;

¹ H N M R (4 0 0 M H z、D₂O) p p m 7 . 9 3 (s、1 H、G)、5 . 8 1
(d、1 H、J = 3 . 9 1 H z、H - 1 ' $m^7\text{G}$)、5 . 7 2 (d、1 H、J = 6 . 2 6
H z、H - 1 ' G)、4 . 6 5 (t、1 H、J = 5 . 4 8 H z、H - 2 ' $m^7\text{G}$)、4
. 4 3 - 4 . 4 0 (m、1 H、H - 2 '、G、H - 3 ' $m^7\text{G}$)、4 . 3 2 - 4 . 1 8 (m
、6 H、H - 3 ' G、H - 4 '、H - 5 '、G、 $m^7\text{G}$)、4 . 0 1 (s、3 H、CH₃)、
3 . 5 2 (s、3 H、OCH₃) ;

³¹ P N M R (1 6 2 M H z、D₂O) p p m 7 . 3 5 (d、1 P、J = 2 6 . 4 1
H z)、- 1 1 . 6 8 (d、1 P、J = 1 9 . 0 7 H z)、- 2 4 . 0 2、- 2 4 . 1 2 0
8 (2 d、1 P、J = 2 6 . 4 1、1 9 . 0 7 H z) ;

H R M S E S I (-) c a l c d . m / z f o r C₂₂H₃₀N₁₀O₁₇P₃S⁻
[M - H]⁻ 8 3 1 . 0 7 2 9 4、f o u n d 8 3 1 . 0 7 4 7 7 .

【 0 1 4 8 】

P 1 - (7 - メチル - 5 ' - デオキシ - 5 ' - チオグアノシン - 5 ' - イル) - P 3 - グアノ
シン - 5 ' - イル - 2 , 3 メチレン三リン酸塩 - $m^7\text{GSppCH}_2\text{pG}$ (図 3、2 5 番)

$m^7\text{GpCH}_2\text{ppS}$ (図 3、1 6 番 ; 7 1 7 m O D、0 . 0 6 m m o l) から出発
して、一般的な手順に従って、 $m^7\text{GSppCH}_2\text{pG}$ (3 5 3 m O D、0 . 0 1 6 m m
o l、2 7 %) を得た。R P - H P L C : t_R (A) = 6 . 3 6 分 ;

¹ H N M R (4 0 0 M H z、D₂O) p p m 9 . 0 3 (s、1 H、H - 8、 $m^7\text{G}$) 30
、8 . 1 7 (s、1 H、G)、5 . 8 3 (d、1 H、J = 4 . 3 0 H z、H - 1 ' $m^7\text{G}$)
G)、5 . 7 8 (d、1 H、J = 4 . 4 8 H z、H - 1 ' G)、4 . 7 0 - 4 . 6 6 (m、2 H、H - 2 ' $m^7\text{G}$ 、H - 2 '、G)、

4 . 4 6 (d、1 H、J = 3 . 9 1、5 . 0 9 H z、H - 3 '、G)、4 . 3 8 - 4 . 3
3 (m、2 H、H - 3 '、 $m^7\text{G}$ 、H - 4 '、G)、4 . 3 2 - 4 . 2 8 (m、1 H、H - 4
'、 $m^7\text{G}$)、4 . 2 6 - 4 . 2 0 (m、1 H、H - 5 '、G)、4 . 1 9 - 4 . 1 3 (m、
1 H、H - 5 ' G)、4 . 0 2 (s、3 H、CH₃)、3 . 3 4 - 3 . 2 2 (m、4 H、
H - 5 '、G、 $m^7\text{G}$) ;

³¹ P N M R (1 6 2 M H z、D₂O) p p m ³¹ P N M R (1 6 2 M H z、D₂
O) p p m 1 7 . 0 3 (d、1 P、J = 1 0 . 2 7 H z)、7 . 4 7 - 6 . 9 7 (m 40
、2 P) ;

H R M S E S I (-) c a l c d . m / z f o r C₂₂H₃₀N₁₀O₁₆P₃S⁻
[M - H]⁻ 8 1 5 . 0 7 8 0 3、f o u n d 8 1 5 . 0 7 9 2 3 .

【 0 1 4 9 】

イミダゾリドを介する 5 ' - S - キャップ類似体の合成

一般的な手順

5 ' S - G M P - I m (図 2、9 番) (N a 塩、5 0 m g、0 . 1 1 m m o l)、および適
切な二リン酸塩 (1 m m o l) :

$m_2^{7,2'}\text{-}^Q\text{GDP}$ (図 4、2 8 番)、 $m^7\text{GpCH}_2\text{p}$ (図 4、2 7 番)、 $m^7\text{-5}$
' S G D P (図 2、1 2 番)、 $m^7\text{GSppS}$ (図 2、1 3 番)、または $m^7\text{GDP}$ 50

S (図3、17番)を、無水DMF (1.0 mL)中に懸濁させ、続いて、無水ZnCl₂ (95 mg、1.0 eq、0.7 mmol)を追加した。試薬が溶解するまで、反応混合物を激しく振盪した。反応の進行をRP-HPLCによってモニタリングした。完了(24時間)後、適切な量のEDTA溶液(Na₂EDTA、237 mg、0.7 mmol)を加え、固体のNaHCO₃でpHを6に調節し、続いて、DEAE-Sephadexによるイオン交換クロマトグラフィーによる粗生成物を精製し、TEA塩として単離した(または分取HPLCにより直接精製した)。生成物をRP-HPLCによってさらに精製した。

【0150】

P1-(2'-O-メチル-7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-三リン酸塩 - $m_2^{7,2'}$ - Q GpppSG (図4、38番)

$m_2^{7,2'}$ - Q GDP (図4、28番; 912 mOD、0.08 mmol)から出発して、一般的な手順に従って、 $m_2^{7,2'}$ - Q GpppSG (122 mOD、0.005 mmol、6%)を得た。RP-HPLC: t_R (A) = 6.29分;

¹H NMR (400 MHz、D₂O) ppm 9.00 (s、1H、H-8、 m^7 G)、7.88 (s、1H、G)、5.87 (d、1H、J = 2.74 Hz、H-1'、 m^7 G)、5.69 (d、1H、J = 6.65 Hz、H-1'、G)、4.64 (t、1H、J = 5.48 Hz、H-2'、 m^7 G)、4.48 (dd、1H、J = 4.48 Hz、H-2'、G)、4.43 - 4.38 (m、2H、H-3'、G、H-3'、 m^7 G)、4.36 - 4.32 (m、1H、H-4'、G)、4.30 - 4.26 (m、1H、H-4'、 m^7 G)、4.25 - 4.16 (m、2H、H-5'、G)、4.03 (s、3H、CH₃)、3.53 (s、3H、OCH₃)、3.30 - 3.22 (m、2H、H-5'、 m^7 G); ³¹P NMR (162 MHz、D₂O) ppm 7.68 (d、1P、J = 27.88 Hz)、-11.68 (d、1P、J = 20.54 Hz)、-23.78、-23.94 (2d、1P、J = 27.88、19.07 Hz);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for C₂₂H₃₀N₁₀O₁₇P₃S⁻ [M-H]⁻ 831.07294、found 831.07350.

【0151】

P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル-1,2-メチレン三リン酸塩 - m^7 GpCH₂ppSG (図4、37番)

m^7 GpCH₂p (図4、27番; 2052 mOD、0.18 mmol)および5'-S-GMP-Im (122 mg、0.27 mmol)から出発して、一般的な手順に従い、 m^7 GpCH₂ppSG (1002 mOD、0.044 mmol、25%)を得た。RP-HPLC: t_R (A) = 6.26分;

¹H NMR (400 MHz、D₂O) ppm 9.31 (s、1H、H-8、 m^7 G)、8.02 (s、1H、G)、5.90 (d、1H、J = 3.13 Hz、H-1'、 m^7 G)、5.75 (d、1H、J = 5.87 Hz、H-1'、G)、4.80 - 4.70 (m、2H、溶媒シグナルと重なる、H-2'、 m^7 G、H-2'、G)、4.58 (dd、1H、J = 3.91、3.48 Hz、H-3'、G)、4.48 (t、1H、H-3'、 m^7 G)、4.40 (dd、1H、J = 3.91、4.06 Hz、H-4'、G)、4.37 - 4.29 (m、3H、H-4'、 m^7 G、H-5'、G)、4.19 - 4.13 (m、2H、H-5'、G)、4.03 (s、3H、CH₃)、3.30 - 3.19 (m、2H、H-5'、G、 m^7 G)、2.40 (t、2H、J = 20.35 Hz、CH₂);

³¹P NMR (162 MHz、D₂O) ppm 17.11 (d、1P、J = 8.80 Hz)、7.64 - 6.76 (m、2P);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for C₂₂H₃₀N₁₀O₁₆P₃S⁻ [M-H]⁻ 815.07803、found 815.07906.

【0152】

P1 - (7 - メチル - 5' - デオキシ - 5' - チオグアノジ - 5' - イル) - P3 - (5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - イル) - 三リン酸塩 - $^7\text{mGSpppSG}$ (図4、32番)

$\text{m}^7\text{-5'S-GDP}$ (57 mg、0.07 mmol) および $5'\text{-S-GMP-Im}$ (50 mg、0.11 mmol) から出発して、一般的な手順に従い、 $\text{m}^7\text{GSpppSG}$ (768 mOD、32 mg、0.028 mmol、40%) を得た。RP-HPLC: t_R (A) = 6.80 分;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz、 D_2O) ppm 8.38 (s、1H、H-8 m^7G ゆっくりと交換可能)、7.84 (s、1H、G)、5.78 (d、1H、 $J = 4.70$ Hz、H-1' m^7G)、5.69 (d、1H、 $J = 6.65$ Hz、H-1' G)、4.64 (t、1H、 $J = 4.70$ Hz、H-2' m^7G)、4.40、4.39 (2d、1H、 $J = 2.74$ 、3.52、4.40 Hz、H-3'、G)、4.36 - 4.29 (m、3H、H-4' G、H-5'、G)、3.99 (s、3H、 C_3H)、4.37 - 4.28 (m、3H、H-4'、H-5'、 ^7mG);

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

HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2$ - $[\text{M-H}]^-$ 833.03445、found 833.03550.

【0153】

P1 - (7 - メチル - 5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - イル) - P3 - グアノシン - 5' - イル - 2 チオ三リン酸塩 - $\text{m}^7\text{GSppspG}$ D1 / D2 (図4、それぞれ30番、31番)

m^7GSpppS (56 mg、0.07 mmol) および $5'\text{-S-GMP-Im}$ (50 mg、0.11 mmol) から出発して、一般的な手順に従い、 $\text{m}^7\text{GSppspG}$ (1080 mOD、45 mg、0.039 mmol、56%) をジアステレオ異性体 D1 / D2 の混合物として得た。ジアステレオ異性体を RP-HPLC を用いて分離し、アンモニウム塩として単離した。D1 (図4、30番):

(438 mOD、18 mg、0.016 mmol、23%) RP-HPLC: t_R (A) = 6.56 分;

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

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

HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2$ - $[\text{M-H}]^-$: 833.03445、found 833.03549;

D2 (図4、31番): $\text{m}^7\text{GSppspG}$ D2 (380 mOD、16 mg、0.014 mmol、20%) RP-HPLC: t_R (A) = 6.71 分;

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz、 D_2O) ppm 8.98 (s、1H、H-8、 m^7G)、8.14 (s、1H、G)、5.82 (d、1H、 $J = 4.27$ Hz、H-1' m^7G)、5.77 (d、1H、 $J = 5.49$ Hz、H-1' G)、4.69 - 4.65 (m、2H、H-2' m^7G 、H-2'、G)、4.49 - 4.45 (m、1H、H-3'、G)、4.40 - 4.35 (m、1H、H-3'、 m^7G 、H-4'、G)、4.34 - 4.21 (m、3H、H-4'、 m^7G 、H-5'、G)、4.03 (s、3H、 CH_3)、3.39 - 3.24 (m、2H、H-5'、 m^7G);

10

20

30

40

50

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) ppm 29.44 - 28.67 (m, 1P)、7.17 - 6.54 (m, 1P)、-12.09 - (-12.72) (m, 1P);
HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2$
[M-H]⁻: 833.03445, found 833.03606.

【0154】

P1 - (7 - メチル - 5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - イル) - P3 - (5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - イル) 2 - チオ三リン酸塩 - $^7\text{mGSpPs}$
 pSGD1/D2 (図4、それぞれ33番、34番)

m^7GSpPs (56mg、0.07mmol) および 5' S - GMP - Im (50mg、0.11mmol) から出発して、一般的な手順に従い、 $\text{m}^7\text{GSpPs pSG}$ (942mOD、39mg、0.003mmol、48%) をジアステレオ異性体 D1/D2 の混合物として得た。ジアステレオ異性体を RP - HPLC を用いて分離し、アンモニウム塩として単離した。D1 (図4、33番) (510mOD、21mg、0.018mmol、26%) RP - HPLC: t_R (A) = 7.53分;

^1H NMR (400 MHz, D_2O) ppm 9.00 (s, 1H, H-8, m^7G)、7.99 (s, 1H, G)、5.83 (d, 1H, $J = 4.27$ Hz, H-1' m^7G)、5.75 (d, 1H, $J = 6.10$ Hz, H-1' G)、4.79 - 4.68 (m, 2H、溶媒シグナルと重なる、H-2' m^7G 、H-2' G)、4.44 (dd, 1H, $J = 4.58$ Hz, H-3' G)、4.41 - 4.33 (m, 3H, H-3' ^7mG 、H-4' G、 m^7G)、4.03 (s, 3H, CH_3)、3.39 - 3.26 (m, 4H, H-5' G、 m^7G);

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) ppm 28.25 (t, 1P, $J = 34.83$ Hz)、7.31 - 6.74 (m, 2P);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}_3$
[M-H]⁻: 849.01161, found 849.01213.

D2 (図4、34番)、RP - HPLC (274 mOD、11mg、0.0098mmol、14%): t_R (A) = 7.62分;

^1H NMR (400 MHz, D_2O) ppm 8.99 (s, 1H, H-8, m^7G)、8.04 (s, 1H, G)、5.83 (d, 1H, $J = 4.58$ Hz, H-1' m^7G)、5.75 (d, 1H, $J = 6.10$ Hz, H-1' G)、4.78 - 4.66 (m, 2H、溶媒シグナルと重なる、H-2' m^7G 、H-2' G)、4.46 - 4.42 (m, 1H, H-3' G)、4.41 - 4.34 (m, 3H, H-3' ^7mG 、H-4' G、 m^7G)、4.04 (s, 3H, CH_3)、3.39 - 3.24 (m, 4H, H-5' G、 m^7G);

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) ppm 28.29 (t, 1P, $J = 34.83$ Hz)、7.32 - 6.68 (m, 2P);

HRMS ESI(-) calcd. m/z for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}_3$
[M-H]⁻: 849.01161, found 849.01217.

【0155】

P1 - (7 - メチル - グアノシン - 5' - イル) - P3 - (5' - デオキシ - 5' - チオグアノシン - 5' - イル) 2 - チオ三リン酸塩 - $\text{m}^7\text{GpPs pSGD1/D2}$ (図4、それぞれ35番、36番)

m^7GDP (3492mOD、0.31mmol) および 5' S - GMP - Im (5550mOD、0.46mmol) から出発して、一般的な手順に従い、 $\text{m}^7\text{GpPs pSG}$ (1941mOD、0.086mmol、28%) をジアステレオ異性体 D1/D2 の混合物として得た。ジアステレオ異性体を RP - HPLC を用いて分離し、アンモニウム塩として単離した。

D1 (図4、35番): (888 mOD、0.039mmol、13%) RP - HPLC: t_R (A) = 7.12分;

^1H NMR (400 MHz, D_2O) ppm 9.07 (s, 1H, H-8, m^7G)

、7.95 (s, 1H, G)、5.88 (d, 1H, J = 3.52 Hz, H-1', m⁷G)、5.74 (d, 1H, J = 6.26 Hz, H-1' G)、4.80 - 4.70 (m, 2H, H-2' m⁷G, H-2', G D₂Oシグナルと重なる)、4.56 (dd, 1H, J = 4.70, 3.52 Hz, H-3', G)、4.47 - 4.40 (m, 2H, H-3', m⁷G, H-4', G)、4.39 - 4.33 (m, 3H, H-4', m⁷G, H-5', G)、4.03 (s, 3H, CH₃)、3.35 - 3.20 (m, 2H, H-5', m⁷G) ;

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) ppm 29.00 (dd, 1P, J = 33.75, 26.41 Hz)、6.98 (d, 1P, J = 33.75, Hz)、-12.56 (d, 1P, J = 24.94 Hz) ;

HRMS ESI(-) calcd. m/z for C₂₁H₂₈N₁₀O₁₆P₃S⁻ [M-H]⁻ : 833.03445, found 833.03514. ;

D2 (図4、36番) : m⁷G p p s p G D2 (1053 mOD, 0.046 mmol, 15%) RP-HPLC : t_R (A) = 7.42分 ;

¹H NMR (400 MHz, D₂O) ppm 9.04 (s, 1H, H-8, m⁷G)、7.95 (s, 1H, G)、5.85 (d, 1H, J = 3.52 Hz, H-1' m⁷G)、5.73 (d, 1H, J = 6.26 Hz, H-1' G)、4.80 - 4.70 (m, 2H, H-2' m⁷G, H-2', D₂Oシグナルと重なるG)、4.54 (dd, 1H, J = 4.30, 3.91 Hz, H-3', G)、4.45 (t, 1H, J = 5.09 Hz, H-3', m⁷G)、4.43 - 4.40 (m, 1H, H-4', G)、4.39 - 4.32 (m, 3H, H-4', m⁷G, H-5', G)、4.03 (s, 3H, CH₃)、3.37 - 3.21 (m, 2H, H-5', m⁷G) ;

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) ppm 28.99 (dd, 1P, J = 33.75, 26.41, 24.94 Hz)、6.94 (d, 1P, J = 35.21, Hz)、-12.48 (d, 1P, J = 24.94 Hz) ;

HRMS ESI(-) calcd. m/z for C₂₁H₂₈N₁₀O₁₆P₃S₂⁻ [M-H]⁻ : 833.03445, found 833.03494.

【0156】

10

20

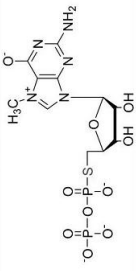
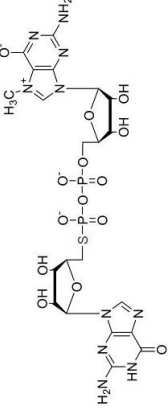
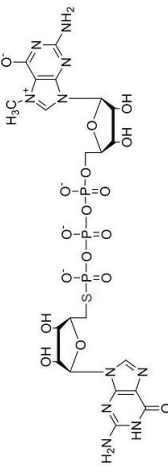
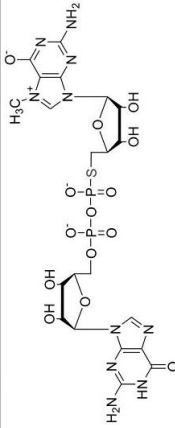
30

40

50

【表 6 - 1】

表 4. 合成され、研究された新しいキヤップ類似体が提示される。

番号	化合物	構造式	化学名
12	m ⁷ GSpp		5'-デオキシ-5'- チオグアノシン-5'-7- メチログアノシン ニリン酸塩
21	m ⁷ GppSG		P1-(7-メチル-グアノシン- 5'-イル)-P2-(5'-デオキシ- 5'-チオグアノシン-5'-イル) ニリン酸塩
22	m ⁷ GpppSG		P1-(7-メチル-グアノシン- 5'-イル)-P3-(5'-デオキシ- 5'-チオグアノシン-5'-イル) 三リン酸塩
23	m ⁷ GSppG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ- 5'-チオグアノシン-5'-イル)- P2-グアノシン-5'-イル ニリン酸塩

【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

24	m ⁷ GSpppG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 三リン酸塩
25	m ⁷ GSppCH ₂ pG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2,3-メチレン三リン酸塩
26	m ^{7,2'°} GSpppG		P1-(2'-O-メチル-7-メチロ-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 三リン酸塩
30	m ⁷ GSpp _s pG D1		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2-三リン酸塩 D1
31	m ⁷ GSpp _s pG D2		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 2-三リン酸塩 D2

【 0 1 5 8 】

10

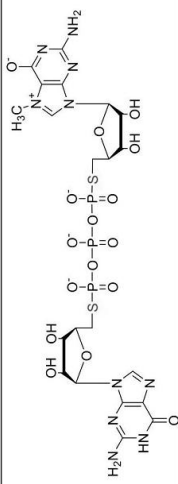
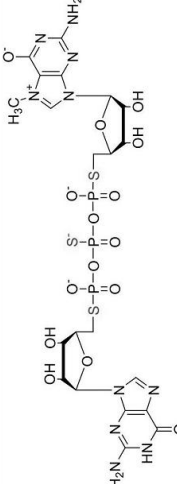
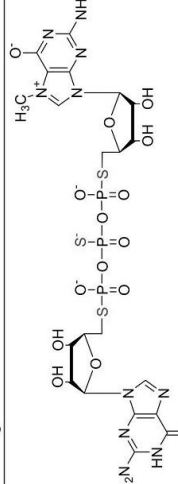
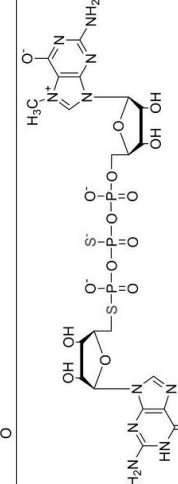
20

30

40

50

【表 6 - 3】

32	m ⁷ GSp _{pp} SG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 三リン酸塩
33	m ⁷ GSp _{pp} pSG D1		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-三リン酸塩 D1
34	m ⁷ GSp _{pp} pSG D2		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-三リン酸塩 D2
35	m ⁷ Gpp _s pSG D1		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-yl) 2-三リン酸塩 D1

【表 6 - 4】

36	m ⁷ Gpp ₃ pSG D2		P1-(7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 2-三リン酸塩 D2
37	m ⁷ GpCH ₄ ppSG		P1-(7-メチル-5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル)-P3-グアノシン-5'-イル 1,2-メチレン三リン酸塩
38	m ^{7,2} O-GppppSG		P1-(2'-O-メチル-7-メチル-グアノシン-5'-イル)-P3-(5'-デオキシ-5'-チオグアノシン-5'-イル) 三リン酸塩

10

20

30

40

【 0 1 6 0 】

< 实施例 2 >

新しいキャップ類似体の特性

試験 1 . D c p S 酵素による分解に対する類似体の感受性試験

この試験の目標は、新しい5'-チオリン酸塩キャップ類似体が、ヒトDcpS酵素(hDcpS)によって加水分解されるかどうかを調べることであった。DcpS酵素をコードする組換えヒトタンパク質がかつて記述されたように発現された(Kowalska, Lewdorowicz et al., 2008)。新しい類似体のhDcpS加水分解への感受性は、200mM KClおよび0.5mM EDTAを含む50mM Tris

50

- H C l 緩衝液中で試験される。反応混合物は、400 μ l の緩衝液中に、試験したキャップアナログ (20 μ M) および h D c p S 酵素 (100 n M) を含む。適切な間隔で、100 μ l のサンプルを反応混合物から集める。サンプルを2.5分の間98度でインキュベートし、次いで0度まで冷却し、一般的な情報に記載される条件下で R P - H P L C で分析した。試験では、商業的に入手可能な D c p S 阻害剤も試験し、化合物 R G 3 0 3 9 (000番) (<https://www.mda.org/quest/fda-approves-phase-1-clinical-trial-rg3039-sma>)、G p p S G (19番)、G p p p S G (20番) を試験し、その上、m⁷ G p p p G (0番) および m⁷ G p p (00番) を対照として試験した。

得られた典型的な結果は、図5と表5に示される。

10

【0161】

試験2. 選択された阻害剤についての I C₅₀ 判定

試験の目的は、所与の阻害剤が特定の条件下で最大値の50%まで D c p S 活性を阻害する濃度を判定することであった。この試験および試験1での緩衝液は同一である。同時に10個の混合反応物を調製し、それらの各々は、m⁷ G M P F (60 μ M)、h D c p S 酵素 (50 n M)、および試験化合物を200 μ l の緩衝液中0~50 μ Mの範囲の濃度で含有していた。適切な時間の後、基質の30%が阻害剤なしの生成物に変換されたとき、100 μ l の A C N と混合することによって反応を停止させた。分析のために25 μ l のサンプルを採取し、続いて D M S O 中濃度2.5 μ M の T B D S - フルオレセイン溶液90 μ l と混合し、60分間インキュベートした。次に、100 μ l の200 m M H E P E S 緩衝液 p H = 7.0 がサンプルに加えられ、一般的な情報に述べられるように蛍光を測定した。この結果に基づき、阻害剤濃度対蛍光の相関関係をプロットし、理論曲線をデータに当てはめることによって I C₅₀ 値を決定した。得られた結果は、表5および図5に示される。

20

【0162】

30

40

50

【表 7】

表 5. 選択された化合物に対する DcpS 酵素による分解についての IC₅₀ 値および分解の感受性

番号	化合物	DcpS 感受性	IC ₅₀ [μM]
0	m ⁷ GpppG	加水分解性	nd
00	m ⁷ Gpp	抵抗性 / 阻害剤	4.30 ± 0.78
000	RG3039	抵抗性 / 阻害剤	0.041 ± 0.012
12	m ⁷ GSpp	抵抗性 / 阻害剤	1.93 ± 0.38
19	GppSG	加水分解性	100 より上
20	GpppSG	加水分解性	100 より上
21	m ⁷ GppSG	加水分解性	nd
22	m ⁷ GpppSG	加水分解性	nd
23	m ⁷ GSppG	抵抗性 / 阻害剤	2.81 ± 0.51
24	m ⁷ GSpppG	抵抗性 / 阻害剤	0.84 ± 0.07
25	m ⁷ GSppCH ₂ pG	抵抗性 / 阻害剤	6.25 ± 1.22
26	m ^{7,2} °GSpppG	抵抗性 / 阻害剤	12.57 ± 5.22
30	m ⁷ GSpp _s pG D1	抵抗性 / 阻害剤	0.23 ± 0.04
31	m ⁷ GSpp _s pG D2	抵抗性 / 阻害剤	0.17 ± 0.02
32	m ⁷ GSpppSG	抵抗性 / 阻害剤	0.33 ± 0.09
33	m ⁷ GSpp _s pSG D1	抵抗性 / 阻害剤	0.26 ± 0.04
34	m ⁷ GSpp _s pSG D2	抵抗性 / 阻害剤	0.051 ± 0.008
35	m ⁷ Gpp _s pSG D1	加水分解性	nd
36	m ⁷ Gpp _s pSG D2	加水分解性	nd
37	m ⁷ GpCH ₂ ppSG	抵抗性 / 阻害剤	5.67 ± 1.01
38	m ^{7,2} °GpppSG	加水分解性	72 ± 17

【 0 1 6 3 】

試験 3 . 類似体 3 4 番 (m ⁷ G S p p _s p S G D 2) を備えた複合体中のヒト D c p S 酵素 (N 3 7 h D c p S) の構造の判定

この試験の目的は、ヒト D c p S 酵素を備えた類似体 3 4 番の相互作用のメカニズムを検討することであった。先に記載したように N 末端で切断された組換えヒト D c p S 酵素 (N 3 7 - 残基 A l a 3 8 から S e r 3 3 7) を得た (S i n g h e t a l . 2 0 0 8) 。液滴蒸気拡散 (d r o p v a p o r d i f f u s i o n) による結晶化を、0 . 1 M 類似体 3 4 および 7 . 3 m g / m L の D c p S 酵素 (結晶化セットアップの前に氷上で 1 5 分間インキュベートした) および 0 . 2 μ L のリザーバ溶液を含む 0 . 2 μ L のサンプルを用いて行った。約 1 週間後に、2 9 % P E G 4 0 0 0 および 0 . 1 M T r i s - H C l p H 7 . 6 を含む混合物中に複合体の結晶が現れた。結晶を含む液滴に、リザーバ溶液とグリセロール (1 : 1 v / v) との混合物を加え、次いで結晶を採取し、液体窒素中で急速凍結させた。回折データ (d i f f r a c t i o n d a t a) を、D e c t r i s P I L A T U S 6 M 検出器を用いてシンクロトロンソース (B e a m l i n e 1 4 . 1 、 B e s s y I I 、 H e l m h o l t z - Z e n t r u m B e r l i n 、 G e r m a n y) で 1 0 0 K で収集し、X D S ソフトウェア (K a b s c h 2 0 1 0) を用いてデータを処理した。構造を、検索モデルとして、D G 1 5 7 4 9 3 阻害剤 (p d b : 3 B L 9) (S i n g h 、 S a l c i u s r a 2 0 0 8) に結合した D c p S の構造を有する P h a s e r ソフトウェア (M c C o y 、 G r o s s e - K u n s t l e v e e t a l . 2 0 0 7) を用いる分子交換 (M o l e c u l a r R e p l a c e m e n t) によって解明した (s o l v e d) 。リガンドモデルおよびディクショナリを、P r o D R G (S c h u t t e l k o p f a n d v a n A a l t e n 2 0 0 4) を用いて生成した。モデル構築およびリガンド着装を、C o o t ソフトウェア (E m s l e y & C o w t a n 2 0 0 4) で行った。構造を p h e n i x . r e f i n e (A d a m s

、Afonine et al. 2010)を用いて精密化した。

【0164】

試験4. Dcp1/2酵素による分解に対する、5'末端でキャップ類似体を含む短いRNA分子の感受性の試験

この試験の目的は、選択された5'-ホスホチオエートキャップ類似体の5'末端への取り込みが、Dcp1/2デキャッピング酵素活性に対するこのように調製された転写物の感受性に影響を及ぼし得るかどうかを調べることであった。ヘテロ二量体Dcp1/2の形態のシゾサッカロミセス・ポンベ組換えタンパク質を、以前に記載されたようにして得た(Floor, Jonesら、2010)。このアッセイで利用された転写物は、RNA SP6ポリメラーゼ(New England Biolabs)を用いるインビトロ

転写により得られた。アニーリングされたオリゴヌクレオチド：ATACGATTTAG GTGACACTATAGAGAAGCGGGCATGCGGCCAGCCATAGC CGATCA(SEQ ID NO.:1)およびTGATCGGCTATGGCTGGC CGCATGCCCGCTTCTTCTATAGTGTACCTAAATCGTAT(SEQ ID NO.:2)をインビトロ転写において鋳型として使用し、SP6ポリメラーゼ(ATTTAGGTGACACTATAGAGA(SEQ ID NO.:3))についての

プロモーター配列を含むオリゴヌクレオチドは、GAAGAAGCGGGCAUGC GGCCAGCCAUAGCCGAUCA(SEQ ID NO.:4)の配列を有する35 nt長のRNAを得ることができるが、5'末端キャップRNA(5' end capped RNA)は36 nt長である。典型的なインビトロ転写反応を容量20 µlで行い、40

で2時間インキュベートし、以下を含有した：1U SP6ポリメラーゼ、1U Rib oLock RNase Inhibitor(ThermoFisher Scientific)、0.5 mM ATP/CTP/UTP、0.125 mM GTP、1.25 mMジヌクレオチドキャップ類似体、および、0.1 µM鋳型。2時間のインキュベーションに続き、1U DNase I(Ambion)を反応混合物に加え、37 °Cで30分間インキュベーションを続け、その後、EDTAを最終濃度25 mMまで加えた。得られたRNAを、RNA Clean & Concentrator-25(Zymo Research)を用いて精製した。次いで、変性した15%ポリアクリルアミドゲル上で合成RNAの品質を測定した。RNAの濃度を順に分光測光法で評価した。このようにして得られたRNAは、3'末端が実質的に不均一であることを特徴とし、したがって、問題を

排除するために、得られたRNAを、DNAzyme 10-23(TGATCGGCT AGGCTAGCTACAACGAGGCTGGCCGC(SEQ ID NO.:5))でインキュベートし、これは25 nt長のRNAを得ることにつながる。5'末端にキャップを有するRNAは26 nt長であった。3'末端を切断する反応は以下の通りであった：1 µMのRNAを、37 °Cで1時間、50 mM MgCl₂および50 mM Tris-HCl pH 8.0を含む混合物中で1 µMのDNAzyme 10-23と共にインキュベートした(Colemanら、2004)。

【0165】

酵素試験のために、50 mMのTris-HCl pH 8.0、50 mMのNH₄Cl、0.01%のNP-40、1 mMのDTTおよび5 mMのMgCl₂を含む緩衝液中の3.5 nMのDcp1/2酵素でインキュベートした20 ngの各RNAを使用した。反応は37 °Cで最終容量25 µlで行った。5 Mの尿素、44%のホルムアミド、20 mMのEDTA、0.03%のプロモフェノールブルー、0.03%のキシレンシアノールの混合物を同量加えることにより、反応を0、5、15および30分後に停止させた。変性15%ポリアクリルアミドゲル上で反応産物を分解し、電気泳動分離が完了した後、ゲルをSYBR Gold(Invitrogen)で染色し、Storm 860 PhosphorImager(GE Healthcare)を用いて可視化した。得られた結果の定量をImageQuantソフトウェア(Molecular Dynamics)を用いて行った。このアッセイの代表的な結果を図8、図9、および表6にも提示した。

【0166】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 6. 5'末端に選択されたキャップ類似体を含む mRNA の生物学的特性

	キャッピング効率 ^a	Dcp1/2 感受性 ^b	相対的翻訳効率 ^c
GpppG	0.91	0	0.05 ± 0.01
m ⁷ GpppG	0.93	0.69	1.00
m ₂ ^{7,2'-O} GpppG	0.84	0.52	1.56 ± 0.14
m ₂ ^{7,2'-O} GppspG D2	0.82	0.43	3.45 ± 0.42
m ₂ ^{7,2'-O} GSpppG	0.70	0.07	1.73 ± 0.24
m ₂ ^{7,2'-O} GpppSG	0.76	0.52	2.23 ± 0.31

^a 図 8 のデータ（0' 時点）を使用してキャッピング効率を計算した。

^b 図 8 のデータを用いて D a p 1 / 2 活性に対する感受性を計算し、個々の RNA について、15 分という 1 つの時点での、および、0 時までの正規化後の、キャップされた RNA と、キャップされていない RNA およびキャップされた RNA の合計と、の比として示される。

^c 相対的翻訳効率は、5' 末端において m⁷G p p p G でキャップされた mRNA について得られた値に対して正規化した後、生物学的な三通りのウミシタケルシフェラーゼ mRNA の平均翻訳効率を示す。

【0167】

試験 5 . ウサギ網状赤血球抽出液中の mRNA の翻訳効率に対する新しいキャップ類似体の存在の影響についての試験

この試験の目的は、翻訳効率に対する mRNA の 5' 末端における新規なキャップ類似体の導入の効果を調べることであった。この目的のために、mRNA をコードし、5' 末端におけるキャップ構造が異なる、一連のウミシタケルシフェラーゼを調製した。この試験に使用した転写物を、S P 6 RNA ポリメラーゼを用いたインビトロ転写反応によって得た。インビトロ転写のための鋳型として、P C R 生成物を使用し、プライマー A T T T A G G T G A C A C T A T A G A A C A G A T C T C G A G C T C A A G C T T (S E Q I D N O : 6) および G T T T A A A C A T T T A A A T G C A A T G A (S E Q I D N O : 7) および h R L u c - p R N A 2 (A) 1 2 8 p l a s m i d (W i l l i a m s e t a l . 2 0 1 0) を用いて調製した。このように行なわれた P C R 反応は、ウミシタケルシフェラーゼをコードする配列の上流の S P 6 ポリメラーゼのためのプロモーター配列を導入することを可能にした。転写反応自体は、上記（試験 4）の短い RNA 合成と同様であった。反応は 40 °C で 20 μl 中で 2 時間行われ、以下を含有した：1 U S P 6 ポリメラーゼ、1 U R i b o L o c k R N a s e I n h i b i t o r (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)、0.5 mM A T P / C T P / U T P、0.125 mM G T P、1.25 mM ジヌクレオチドキャップ類似体、および 100 μg の鋳型。2 時間のインキュベーションに続き、1 U D N a s e I (A m b i o n) を加え、インキュベーションを 37 °C で 30 分間続け、その後 E D T A を最終濃度 25 mM まで加えた。得られた mRNA を N u c l e o S p i n R N A C l e a n - u p X S (M a c h e r e y - N a g e l) を用いて精製した。合成された RNA の品質を、変性 15% ポリアクリルアミドゲルで調べた。RNA 濃度は分光測光法で決定された。

【0168】

インビトロ翻訳反応を、キャップ依存性翻訳のために決定された条件でウサギ網状赤血球抽出液（R R L、P r o m e g a）において行なった（R y d z i k ら、2009 年）。典型的な反応混合物（10 μl）は、40% の R R L 溶解物、0.01 mM のアミノ酸の混合物（P r o m e g a）、1.2 mM の M g C l ₂、170 mM の酢酸カリウム、5' 末端に適切なキャップ類似体を有する mRNA をコードするウミシタケルシフェラーゼ

を含み、混合物を37℃で1時間インキュベートする。実験では、4種類の濃度のmRNA: 0.1 ng/μl、0.25 ng/μl、0.5 ng/μl、0.75 ng/μlを使用した。合成したルシフェラーゼの活性を、マイクロプレートリーダーSynergy H1 (BioTek) 中のDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。得られた結果をOrigin (Gambit) ソフトウェアで分析し、理論曲線を実験データに当てはめ、ここにおいて、得られた曲線の傾きは翻訳効率を表す。代表的なデータを図10に示し、一方、生物学的な三通りについて得られた平均翻訳効率を表6に示す。

【0169】

試験6. HeLa細胞におけるmRNAの翻訳効率に対する新しいキャップ類似体の存在の効果についての試験

10

ヒト子宮頸癌HeLa細胞を、37℃および5%CO₂において、10%FBS (Sigma-Aldrich) と、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco) と、最終濃度2 mMのL-グルタミンと、を補充したDMEM (Gibco) 中で成長させた。計画された実験の1日前に、抗生物質を含まない100 μlの培地に懸濁した10⁴個の細胞を、96ウェルプレートの各ウェルに播種した。細胞トランスフェクションは以下のとおりであり、0.3 μlのLipofectamine Messenger MAXトランスフェクション試薬 (Invitrogen)、0.1 μgのmRNAおよび10 μlのOpti-MEM (Gibco) を各ウェルに添加した。トランスフェクションをインキュベータ中で1時間行った。トランスフェクション後、細胞をPBSで3回洗浄し、抗生物質のない新鮮な培地で補充した。トランスフェクションを始めてから2、3、4、5、6、5、10、5および24時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、溶解し、およびSynergy H1マイクロプレートリーダーを用いるルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。例示的なデータを図11に示す。

20

【0170】

ホタルルシフェラーゼをコードし、5'-グロビン3' UTRの2つの反復と3'末端に128つのアデニンのポリ(A)尾部とを有する、mRNAをトランスフェクションに用いた。5'末端に異なるキャップ類似体を含む、このmRNAは、インビトロ転写によって得られた。AarI (ThermoFisher Scientific) で消化したpJET-Luc-128Aプラスミドを合成のための鋳型として用いた。典型的なインビトロ転写反応を、40℃で20 μlの容量で2時間実施し、以下を含有した: 1 UのSP6ポリメラーゼ、1 UのRiboLock RNase Inhibitor (ThermoFisher Scientific)、0.5 mMのATP/CTP/UTP、0.125 mMのGTP、1.25 mMのジヌクレオチドキャップ類似体、および0.1 μgの鋳型。mRNA調製の続きの工程は、mRNAをコードするウミシイタケルシフェラーゼの場合の上記の通り(試験5)。さらに、NucleoSpin RNA Cleanup XSカラムを使用してmRNAを精製した後、2 μgのグリコーゲンおよび酢酸ナトリウムの存在下で転写物をエタノール沈殿させ、次いで脱イオン水に溶解した。

30

【0171】

40

<参考文献一覧>

Abrams, W. R. and J. A. Schiff (1973). "Studies of sulfate utilization by algae. II. An enzyme-bound intermediate in the reduction of adenosine-5'-phosphosulfate (APS) by cell-free extracts of wild-type *Chlorella* and mutants blocked for sulfate reduction." *Arch Mikrobiol* 94(1): 1-10.

Adams, P., P. Afonine, G. Bunkoczi, V. Chen, I. Davis, N. Echols, J. Headd, L. Hung,

50

- G. Kapral, R. Grosse-Kunstleve, A. McCoy, N. Moriarty, R. Oeffner, R. Read, D. Richardson, J. Richardson, T. Terwilliger and P. Zwart (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 66: 213-221.
- Akagi, J. M. and L. L. Campbell (1962). "STUDIES ON THERMOPHILIC SULFATE-REDUCING BACTERIA III. : Adenosine Triphosphate-sulfurylase of *Clostridium nigrificans* and *Desulfovibrio desulfuricans*." *J Bacteriol* 84 (6): 1194-1201. 10
- Arakawa, H., M. Shiokawa, O. Imamura and M. Maeda (2003). "Novel bioluminescent assay of alkaline phosphatase using adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate as substrate and the luciferin-luciferase reaction and its application." *Anal Biochem* 314 (2): 206-211. 20
- Bail, S. and M. Kiledjian (2008). "DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes?" *Rna Biology* 5 (4): 216-219.
- Barnes, S., R. Waldrop and A. S. Neighbors (1983). "Alkaline butanol extraction of bile salt and steroid sulfate esters: application to the assay of sulfotransferases." *Anal Biochem* 133 (2): 470-475. 30
- Butchbach, M. E. R., J. Singh, M. porstein sdottir, L. Saieva, E. Slominski, J. Thurmond, T. Andresson, J. Zhang, J. D. Edwards, L. R. Simard, L. Pellizzoni, J. Jarecki, A. H. M. Burghes and M. E. Gurney (2010). "Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy." *Human Molecular Genetics* 19 (3): 454-467.
- Contreras, R. and W. Fiers (1981). "Initiation of transcription by rna polymerase-II in permeable, SV40-infected or noninfected, CV1 cells - evidence for multiple promoters of SV40 late transcription." *Nucleic Acids Research* 9 (2): 215-236. 40
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 60: 2126-2132.
- Floor, S., B. Jones, G. Hernandez and J. G 50

- ross(2010). "A split active site couples cap recognition by Dcp2 to activation." *Nature Structural & Molecular Biology* 17(9): 1096 - U1099.
- Grudzien, E., M. Kalek, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads(2006). "Differential inhibition of mRNA degradation pathways by novel cap analogs." *Journal of Biological Chemistry* 281(4): 1857 - 1867.
- Grudzien-Nogalska, E., J. Jemielity, J. Kowalska, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads (2007). "Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells." *Rna - a Publication of the Rna Society* 13(10): 1745 - 1755. 10
- Gu, M. G., C. Fabrega, S. W. Liu, H. D. Liu, M. Kiledjian and C. D. Lima(2004). "Insights into the structure, mechanism, and regulation of scavenger mRNA decapping activity." *Molecular Cell* 14(1): 67 - 80. 20
- Jemielity, J., T. Fowler, J. Zuberek, J. Stepinski, M. Lewdorowicz, A. Niedzwiecka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz and R. E. Rhoads(2003). "Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties." *Rna - a Publication of the Rna Society* 9(9): 1108 - 1122.
- Kabsch, W.(2010). "XDS." *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 66: 125 - 132. 30
- Kalek, M., J. Jemielity, Z. M. Darzynkiewicz, E. Bojarska, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis and E. Darzynkiewicz(2006). "Enzymatically stable 5' mRNA cap analogs: Synthesis and binding studies with human DcpS decapping enzyme." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14(9): 3223 - 3230.
- Kalek, M., J. Jemielity, E. Grudzien, J. Zuberek, E. Bojarska, L. S. Cohen, J. Stepinski, R. Stolarski, R. E. Davis, R. E. Rhoads and E. Darzynkiewicz(2005). "Synthesis and biochemical properties of novel mRNA 5' cap analogs resistant to enzymatic hydrolysis." *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 24(5 - 7): 615 - 621. 40
- Konarska, M. M., R. A. Padgett and P. A. Sharp(1984). "Recognition of Cap Structure in Splicing Invitro of Messenger-Rna Precursors." *Cell* 38(3): 731 - 736.
- Kowalska, J., M. Lewdorowicz, J. Zuberek, 50

- E. Grudzien-Nogalska, E. Bojarska, J. Stepinski, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, R. E. Davis and J. Jemielity (2008). "Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS." *RNA - a Publication of the RNA Society* 14(6): 1119-1131.
- Kowalska, J., A. Wypijewska del Nogal, Z. M. Darzynkiewicz, J. Buck, C. Nicola, A. N. Kuhn, M. Lukaszewicz, J. Zubersek, M. Strenkowska, M. Ziemniak, M. Maciejczyk, E. Bojarska, R. E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, U. Sahin and J. Jemielity (2014). "Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes." *Nucleic Acids Research* 42(16): 10245-10264. 10
- Kowalska, J., M. Ziemniak, M. Lukaszewicz, J. Zubersek, M. Strenkowska, E. Darzynkiewicz and J. Jemielity (2008). "Phosphorothioate analogs of m7GTP: Strong inhibitors of translation with increased resistance towards enzymatic degradation." *Chemistry of Nucleic Acid Components* 10: 487-490.
- Kuhn, A. N., M. Diken, S. Kreiter, A. Selmi, J. Kowalska, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, C. Huber, O. Tureci and U. Sahin (2010). "Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo." *Gene Therapy* 17(8): 961-971. 30
- Lykke-Andersen, J. (2002). "Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay." *Molecular and Cellular Biology* 22(23): 8114-8121. 40
- Mccoy, A., R. Grosse-Kunstleve, P. Adams, M. Winn, L. Storoni and R. Read (2007). "Phaser crystallographic software." *Journal of Applied Crystallography* 40: 658-674.
- Mildvan, A., Z. Xia, H. Azurmendi, V. Saraswat, P. Legler, M. Massiah, S. Gabelli, M. Bianchet, L. Kang and L. Amzel (2005). "Structures and mechanisms of Nudix hydrolases." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 50

ics 433(1): 129-143.

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

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

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

Shen, V., H. D. Liu, S. W. Liu, X. F. Jiao and M. Kiledjian (2008). "DcpS scavenger decapping enzyme can modulate pre-mRNA splicing." *Rna-a Publication of the Rna Society* 14(6): 1132-1142. 20

Singh, J., M. Salcius, S. W. Liu, B. L. Staker, R. Mishra, J. Thurmond, G. Michaud, D. R. Mattoon, J. Printen, J. Christensen, J. M. Bjornsson, B. A. Pollok, M. Kiledjian, L. Stewart, J. Jarecki and M. E. Gurney (2008). "DcpS as a Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy." *Acs Chemical Biology* 3(11): 711-722. 30

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

Warren, L., P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandal, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger and D. J. Rossi (2010). "Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA." *Cell Stem Cell* 7(5): 618-630. 40

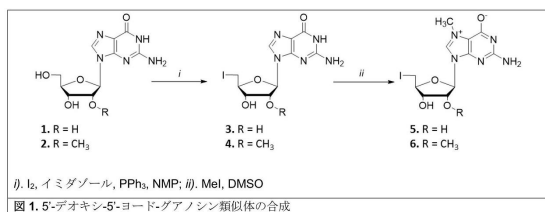
Ziemniak, M., M. Strenkowska, J. Kowalska and J. Jemielity (2013). "Potential therapeutic 50

utic applications of RNA cap analogs." Future medicinal chemistry 5(10): 1141-1172. Zuberek, J., J. Jemielity, A. Niedzwiecka, J. Stepinski, A. Wyslouch-Cieszyńska, R. Stolarski and E. Darzynkiewicz (2003). "Influence of the length of the phosphate chain in mRNA 5' cap analogs on their interaction with eukaryotic initiation factor 4E." Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids 22(5-8): 1707-1710.

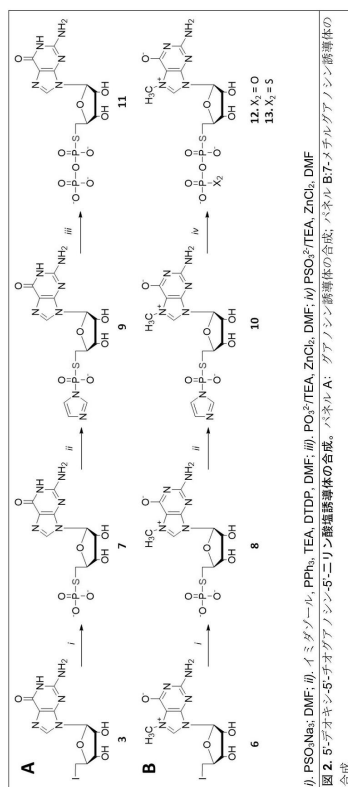
10

【図面】

【図1】



【図2】



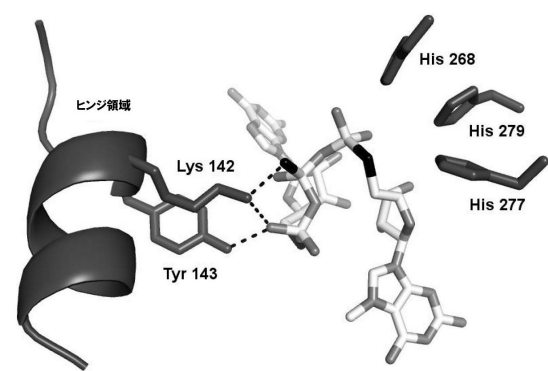
20

30

40

50

【 図 7 】



【 図 8 】

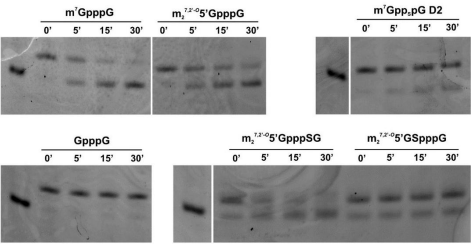


図 8. Dcp1/2 酵素活性に対する感受性

【 図 9 】

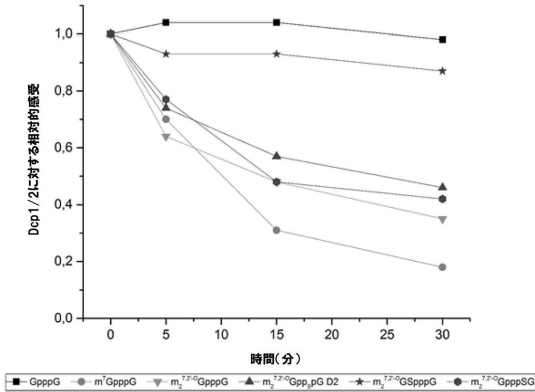


図 9. Dcp1/2 酵素活性に対する相対的感受性

【 図 10 】

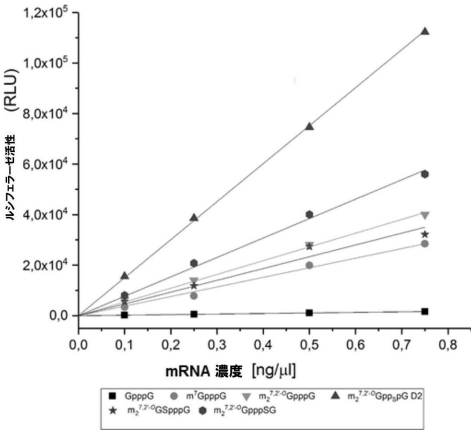


図 10. 相対的な翻訳効率

10

20

30

40

50

【 図 11 】

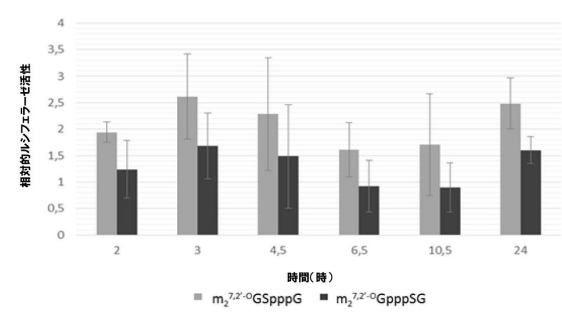


図 11. ヒーラー細胞の相対的な翻訳効率

10

【 配列表 】

0007144050000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 H	19/167 (2006.01)	C 0 7 H	19/167	
A 6 1 K	31/7125 (2006.01)	A 6 1 K	31/7125	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 N	15/87 (2006.01)	C 1 2 N	15/87	Z
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	B

(72)発明者 ボイチャック, ブラジェイ

ポーランド 9 5 - 2 0 0 パビヤニツェ ウリツァ・トルンスカ 1 3 / 1 5

(72)発明者 バラノフスキー, マレク

ポーランド 0 1 - 4 6 6 ワルシャワ ウリツァ・ポフスタンツフ・シロンスキフ 1 0 2 / 3 1

(72)発明者 ノヴィツカ, アンナ

ポーランド 0 5 - 1 2 0 レギオノボ ウリツァ・ミエジャナ 3 エー

(72)発明者 コヴァルスカ, ヨアンナ

ポーランド 0 2 - 1 0 9 ワルシャワ ウリツァ・クシェンチャ・トロイデナ 5 ディー / 8

(72)発明者 シコルスキ, パヴェル

ポーランド 0 0 - 7 2 8 ワルシャワ ポビロビエツカ 1 1 エー / 2 4

(72)発明者 ヴァルミンスキ, マルチン

ポーランド 0 3 - 1 3 3 ワルシャワ ウリツァ・ノボドボルスカ 2 7 / 5 0 4

審査官 東 裕子

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 0 1 0 1 4 (J P , A)

特表 2 0 1 1 - 5 2 2 5 4 2 (J P , A)

特表 2 0 0 8 - 5 4 6 4 2 4 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 5 / 0 2 1 4 3 2 (W O , A 1)

Tetrahedron Letters, 1997年, Vol.38, No.6, pp.1021-1024

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 0 7 H

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)