

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/047909

発行日 令和1年6月24日(2019.6.24)

(43) 国際公開日 平成30年3月15日(2018.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 19/207 (2006.01)	C 0 7 H 19/207	C S P 4 C 0 5 7
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z N A Z
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

出願番号 特願2018-538468 (P2018-538468)	(71) 出願人 504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/032310	
(22) 国際出願日 平成29年9月7日(2017.9.7)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-175758 (P2016-175758)	(74) 代理人 100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(32) 優先日 平成28年9月8日(2016.9.8)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100124800 弁理士 諏澤 勇司
	(74) 代理人 100140578 弁理士 沖田 英樹
	(72) 発明者 小笠原 慎治 北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大 学法人北海道大学内
	Fターム(参考) 4C057 BB02 DD03 LL39 LL40 LL45 LL46

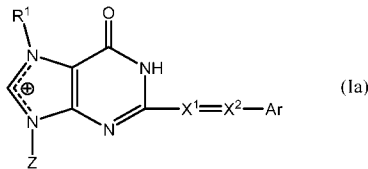
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリンヌクレオシド誘導体、ポリヌクレオチド及びRNA

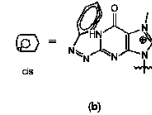
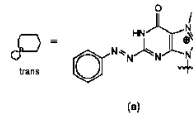
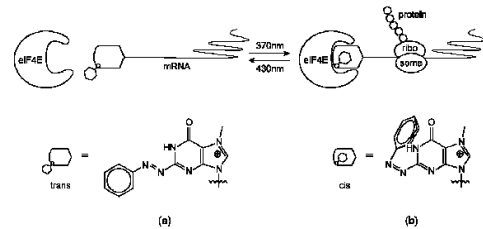
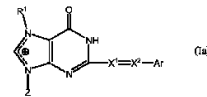
(57) 【要約】

下記式(Ia)等で表されるプリンヌクレオシド誘導体が開示される。

【化1】



X¹ 及び X² はそれぞれ独立に窒素原子、-CH= 又は -CR²= (R² はアルキル基を示す。) を示し、Ar は置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示し、R¹ は水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を示し、Z は糖残基を示す。

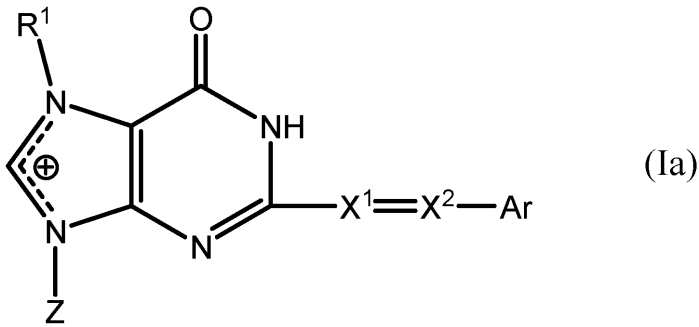


【特許請求の範囲】

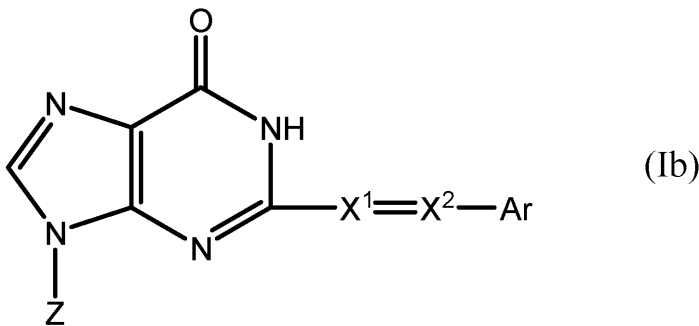
【請求項 1】

下記式 (I a)、(I b)、(I I a) 又は (I I b) :

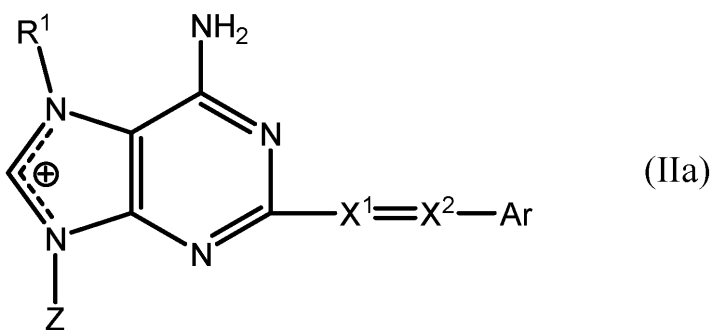
【化 1】



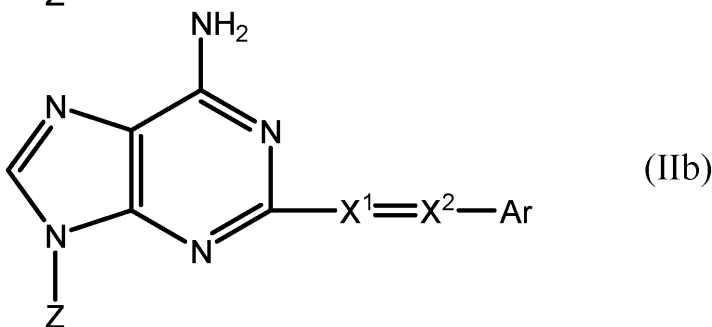
10



20



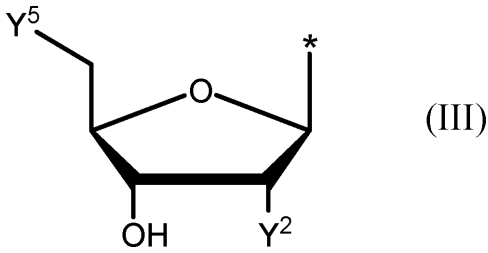
30



で表され、これら式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に窒素原子、 $-CH=$ 又は $-CR^2$ (R^2 はアルキル基を示す。) を示し、 Ar は置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示し、 R^1 は水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を示し、 Z は下記式 (I I I) :

40

【化2】



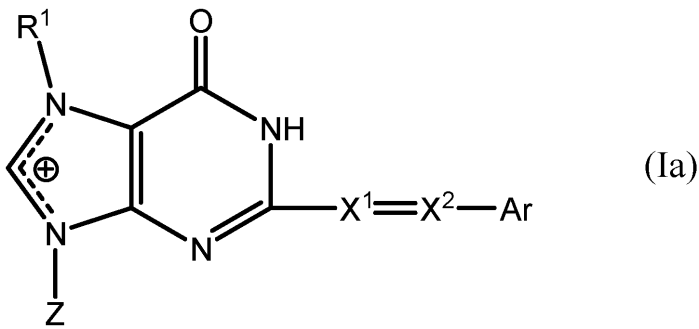
で表される糖残基を示し、式中、*は窒素原子との結合部位を示し、 Y^2 は水素原子又は水酸基を示し、 Y^5 は水酸基又はリン酸基を示し、式中の水酸基及びリン酸基はそれぞれ独立にアニオン化していても、化学修飾されていてもよい、プリンヌクレオシド誘導体。

10

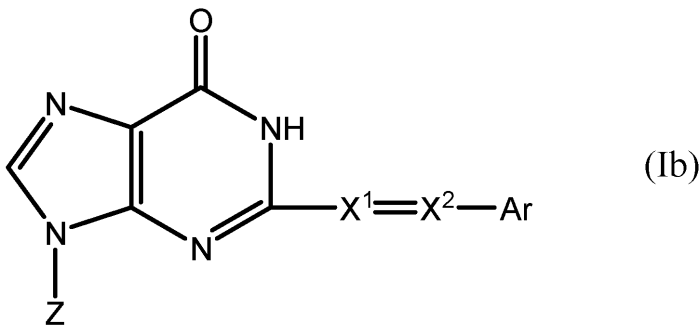
【請求項2】

下記式(Ia)、(Ib)、(IIa)又は(IIb)：

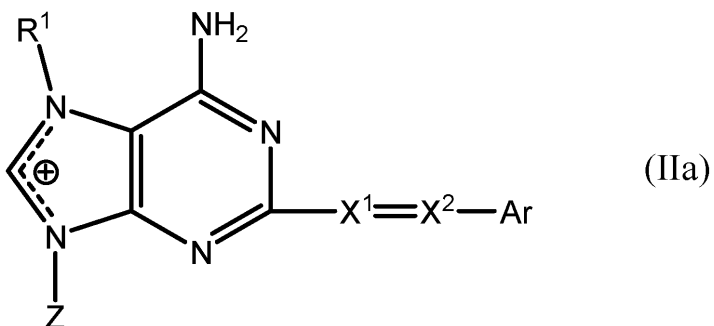
【化3】



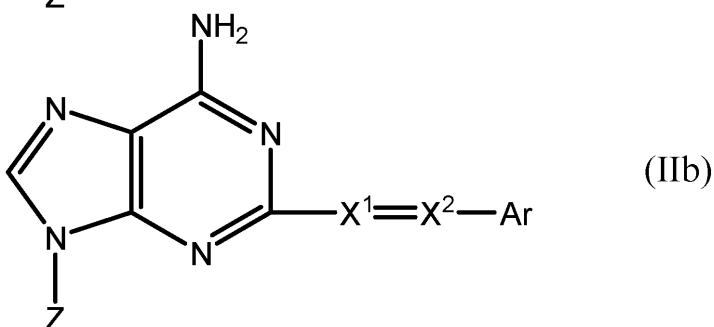
20



30



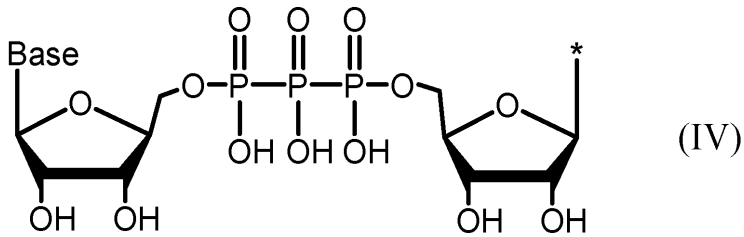
40



50

で表され、これら式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に窒素原子、 $-CH=$ 又は $-CR^2$ (R^2 はアルキル基を示す。)を示し、 Ar は置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示し、 R^1 は水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を示し、 Z は下記式 (IV) :

【化 4】



10

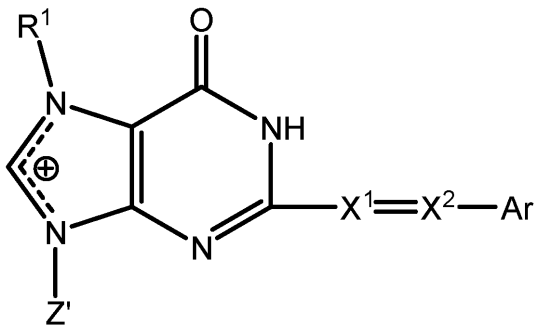
で表される基を示し、式中、* は窒素原子との結合部位を示し、 $Base$ は核酸塩基を示し、式中の水酸基及びリン酸基はそれぞれ独立にアニオン化していても、化学修飾されていてもよい、

プリンヌクレオシド誘導体。

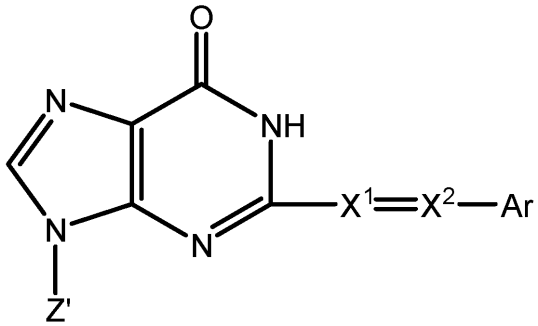
【請求項 3】

下記式 (Ia')、(Ib')、(IIa') 又は (IIb') :

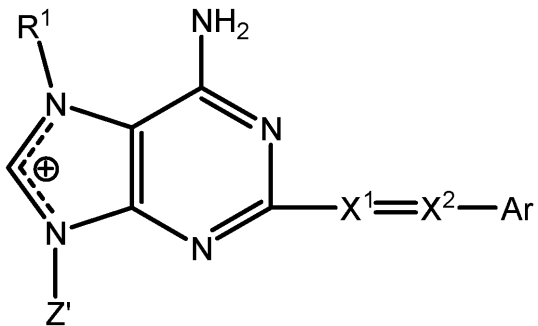
【化 5】



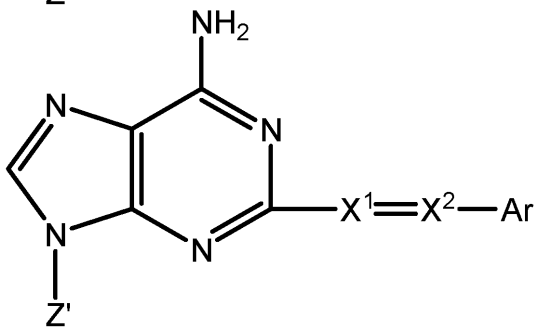
10



20



30



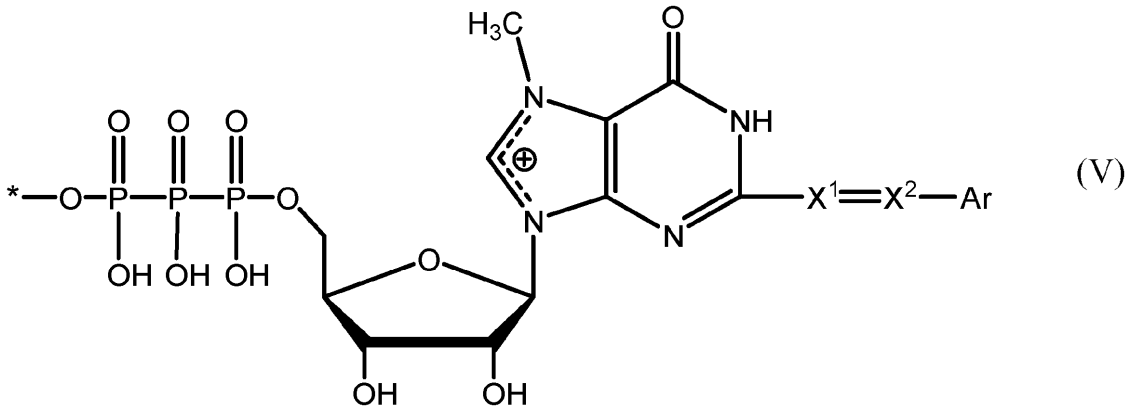
で表される塩基部分及びこれが結合した糖部分を有する修飾ヌクレオチド単位を含み、これら式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に窒素原子、 $-CH=$ 又は $-CR^2=$ (R^2 はアルキル基を示す。)を示し、 Ar は置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示し、 R^1 は水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を示し、 Z' は前記糖部分との結合部位を示す、ポリヌクレオチド。

40

【請求項 4】

下記式 (V) :

【化 6】



10

で表される 5' キャップ構造を有する RNA であって、式中、* はポリヌクレオチドの 5' 末端との結合部位を示し、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に窒素原子、 $-CH=$ 又は $-C$ ($R^2 =$ (R^2 はアルキル基を示す。)) を示し、Ar は置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示し、式中の水酸基及びリン酸基はアニオン化していても、化学修飾されていてもよい、RNA。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の RNA が導入された真核細胞に光を照射することを含む、タンパク質の産生量を制御する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プリンヌクレオシド誘導体、ポリヌクレオチド及び RNA に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献 1 は、特定の波長を有する光の照射によってタンパク質の産生量を制御し得る RNA を開示している。非特許文献 1 は、各種の核酸機能の光制御について記載している。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開 2011-207863 号公報

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】Chem. Rev. 2013, 113, 6114-6178

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

生体細胞中の各種核酸の作用を光の照射によって制御する場合、生体細胞の損傷又は死滅を防ぐために、短い照射時間で活性を制御できることが望ましい。例えば特許文献 1 に開示される RNA は、光照射によって作用を発現する構造に異性化しても、光の供給が途絶えると熱反応によって数 10 ミリ秒以内の極めて短時間で元の構造に戻るため、所望の機能を維持するためには長時間の継続的な光照射が必要となることがある。

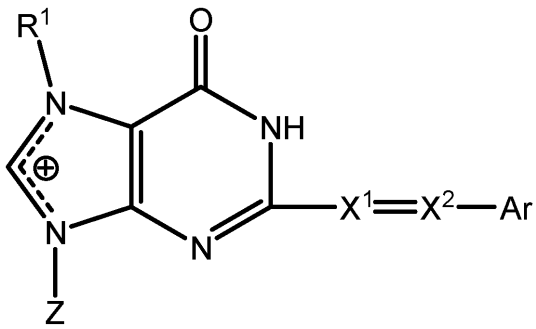
40

【課題を解決するための手段】

【0006】

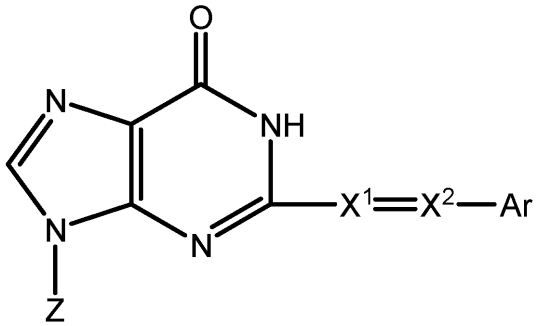
本発明の一側面は、下記式 (I a)、(I b)、(II a) 又は (II b) :

【化 1】

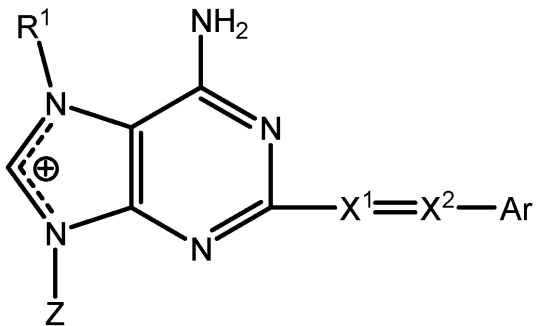


(Ia)

10

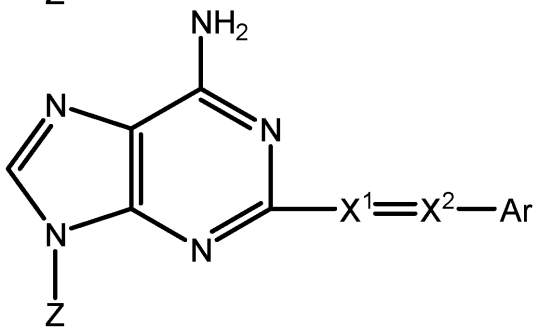


(Ib)



(IIa)

20

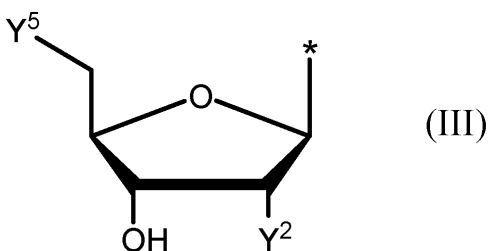


(IIb)

30

で表されるプリンヌクレオシド誘導体を提供する。これら式中、 X^1 及び X^2 はそれぞれ独立に窒素原子、 $-CH=$ 又は $-CR^2=$ (R^2 はアルキル基を示す。)を示し、 Ar は置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示し、 R^1 は水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を示す。 Z は下記式 (III) :

【化 2】



(III)

40

で表される糖残基を示す。式 (III) 中、 $*$ は式 (Ia)、(Ib)、(IIa) 又は (IIb) 中の窒素原子との結合部位を示し、 Y^2 は水素原子又は水酸基を示し、 Y^5 は

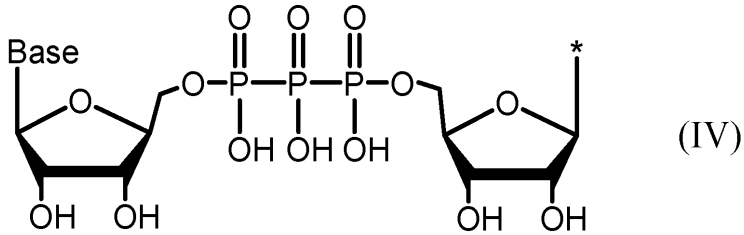
50

水酸基又はリン酸基を示す。式 (I I I) 中の水酸基及びリン酸基はそれぞれ独立に水素原子が脱離してアニオン化していてもよいし、化学修飾されていてもよい。

【 0 0 0 7 】

式 (I a)、(I b)、(I I a) 又は (I I b) 中の Z は、下記式 (I V) :

【 化 3 】



10

で表される基であってもよい。式 (I V) 中、* は式 (I a)、(I b)、(I I a) 又は (I I b) 中の窒素原子との結合部位を示し、B a s e は核酸塩基を示す。式 (I V) 中の水酸基及びリン酸基は水素原子が脱離してアニオン化していてもよいし、化学修飾されていてもよい。

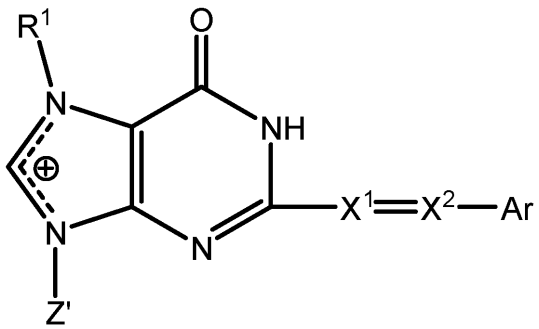
【 0 0 0 8 】

本発明の別の側面は、上記プリンヌクレオシド誘導体から誘導される構成単位を任意の位置に含む、ポリヌクレオチドを提供する。上記プリンヌクレオシド誘導体から誘導される構成単位は、下記式 (I a ')、(I b ')、(I I a ')、又は (I I b ') で表される塩基部分及びこれが結合した糖部分を有する修飾ヌクレオチド単位であることができる。これら式中、X¹、X²、A r 及び R¹ は式 (I a)、(I b)、(I I a) 及び (I I b) 中の X¹、X²、A r 及び R¹ と同義である。Z' は前記糖部分との結合部位を示す、

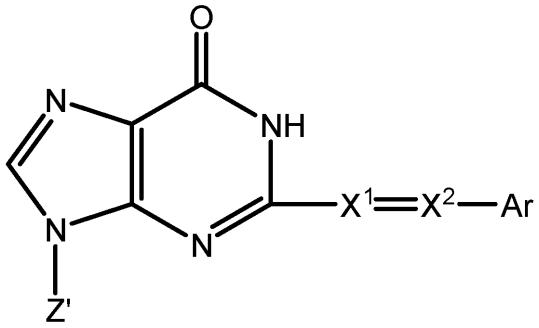
20

【 0 0 0 9 】

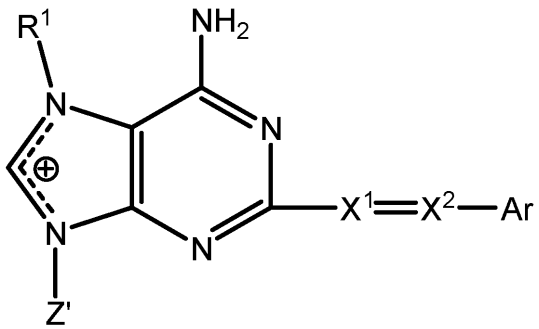
【化4】



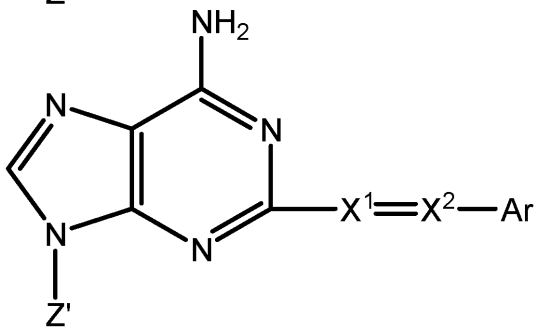
10



20



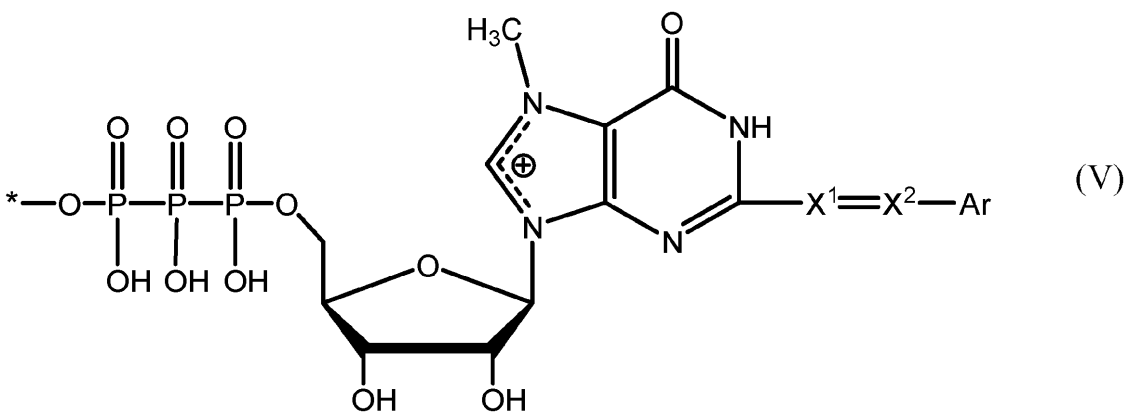
30



【0010】

上記修飾ヌクレオチド単位が導入されたポリヌクレオチドは、下記式(V)：

【化5】



40

50

で表される5'キャップ構造を有するRNAであってもよい。式(V)中、*は5'末端との結合部位を示し、 X^1 、 X^2 、及びArは式(Ia)、(Ib)、(IIa)及び(IIb)中の X^1 、 X^2 、及びArと同義である。式(V)中の水酸基及びリン酸基はそれぞれ独立にアニオン化していても、化学修飾されていてもよい。

【0011】

本発明の更に別の側面は、上記RNAが導入された真核細胞に光を照射することを含む、タンパク質の産生量を制御する方法を提供する。

【発明の効果】

【0012】

本発明の一側面に係るプリンヌクレオシド誘導体から誘導される構成単位を導入したポリヌクレオチド又はRNAは、短時間の光照射によりその活性を制御できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】タンパク質の産生量を制御するメカニズムを示す模式図である。

【図2】プリンヌクレオシド誘導体(2PA-cap)の吸収スペクトルである。

【図3】プリンヌクレオシド誘導体(pMe-2PA-cap)の吸収スペクトルである。

。

【図4】プリンヌクレオシド誘導体(mMe-2PA-cap)の吸収スペクトルである。

。

【図5】プリンヌクレオシド誘導体(oMe-2PA-cap)の吸収スペクトルである。

20

。

【図6】プリンヌクレオシド誘導体(pEt-2PA-cap)の吸収スペクトルである。

。

【図7】プリンヌクレオキシド誘導体(2PA-cap)の370nm又は430nmの光照射下でのトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図8】プリンヌクレオキシド誘導体(pMe-2PA-cap)の370nm又は430nmの光照射下でのトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図9】プリンヌクレオキシド誘導体(mMe-2PA-cap)の370nm又は430nmの光照射下でのトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図10】プリンヌクレオキシド誘導体(pEt-2PA-cap)の370nm又は430nmの光照射下でのトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

30

【図11】プリンヌクレオキシド誘導体(2PA-cap)の光平衡状態におけるトランス体の比率と照射光波長との関係を示すグラフである。

【図12】プリンヌクレオキシド誘導体(pMe-2PA-cap)の光平衡状態におけるトランス体の比率と照射光波長との関係を示すグラフである。

【図13】プリンヌクレオキシド誘導体(mMe-2PA-cap)の光平衡状態におけるトランス体の比率と照射光波長との関係を示すグラフである。

【図14】プリンヌクレオキシド誘導体(oMe-2PA-cap)の光平衡状態におけるトランス体の比率と照射光波長との関係を示すグラフである。

【図15】プリンヌクレオキシド誘導体(pEt-2PA-cap)の光平衡状態におけるトランス体の比率と照射光波長との関係を示すグラフである。

40

【図16】370nm及び430nmの光を交互に照射したときのプリンヌクレオキシド誘導体(2PA-cap)の可逆的なシス体-トランス体のスイッチングを示すグラフである。

【図17】370nm及び430nmの光を交互に照射したときのプリンヌクレオキシド誘導体(pMe-2PA-cap)の可逆的なシス体-トランス体のスイッチングを示すグラフである。

【図18】370nm及び430nmの光を交互に照射したときのプリンヌクレオキシド誘導体(mMe-2PA-cap)の可逆的なシス体-トランス体のスイッチングを示すグラフである。

50

【図19】370nmで2分間の照射後の、28.5におけるトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図20】370nmで2分間の照射後の、28.5におけるトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図21】370nmで2分間の照射後の、28.5におけるトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図22】370nmで2分間の照射後の、28.5におけるトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図23】370nmで2分間の照射後の、28.5におけるトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。

【図24】シス体又はトランス体が優勢なゼブラフィッシュ胚からの蛍光強度を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明のいくつかの実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

【0015】

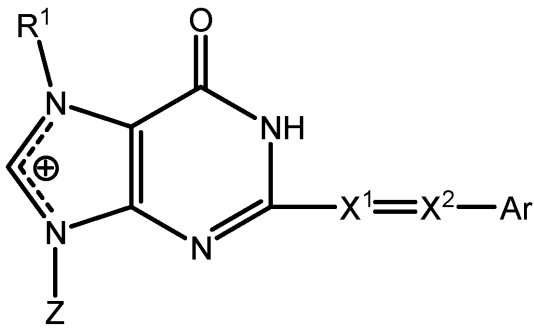
一実施形態に係るプリンヌクレオシド誘導体は、下記式(Ia)、(Ib)、(IIa)又は(IIb)で表される化合物である。

【0016】

10

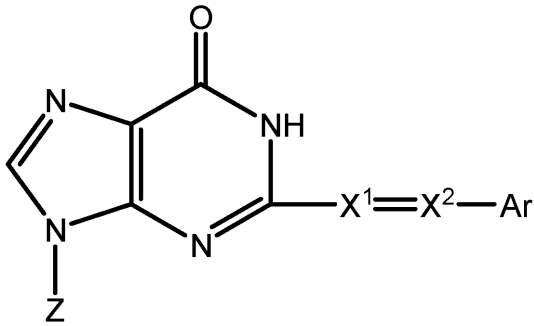
20

【化 6】



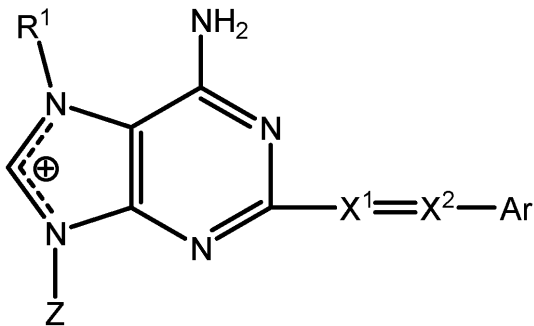
(Ia)

10



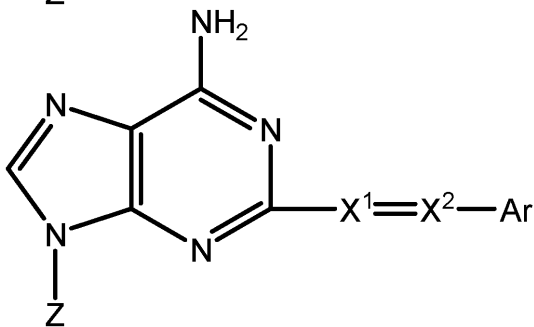
(Ib)

20



(IIa)

30



(IIb)

40

【0017】

式 (I a)、(I b)、(II a) 及び (II b) 中の X^1 及び X^2 は、それぞれ独立に窒素原子、 $-CH=$ 又は $-CR^2=$ (R^2 はアルキル基を示す。) を示す。 $-X^1=X^2-$ の基は、シス体又はトランス体のいずれであってもよく、所定の光の照射によりシス体からトランス体、又はトランス体からシス体に容易に異性化する。したがって、通常、シス体及びトランス体が混在しながら、一方の比率が他方の比率よりも大きい状態にあることが多い。

50

【0018】

生体細胞内に存在する翻訳開始因子等の各種のタンパク質との相互作用の強さがシス体とトランス体とで異なることに基づいて、生体細胞内での各種 RNA による翻訳等の作用の発現を制御することができる。式 (I a)、(I b)、(II a) 又は (II b) のプリンクレオシド誘導体は、光照射後、周囲温度によるシス体 - トランス体の異性化を生じ難い。そのため、例えば数秒 ~ 数分程度の短時間の光照射の後、数分から数時間にわたって異性化による活性状態が維持され得る。 X^1 及び X^2 が窒素原子であってもよい。言

い換えると、 $-X^1 = X^2 -$ がアゾ基 ($-N=N-$) であってもよい。これにより、より長波長の光によってシス体 - トランス体の異性を進行させることができる。

【0019】

式 (I a)、(I b)、(II a) 及び (II b) 中の Ar は、置換されていてもよいアリール基又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示し、これらは、単環又は複数の環から構成される縮合環であってもよい。

【0020】

Ar としてのアリール基の炭素数は 5 ~ 30、又は 6 ~ 13 であってもよい。炭素数 5 ~ 30 のアリール基の例としては、フェニル基、ナフチル基、*as*-インダセニル基、*s*-インダセニル基、アセナフチレニル基、9H-フルオレニル基、フェナントリル基、アントリル基、フルオランテニル基、アセフェナントリレニル基、アセアントリレニル基、トリフェニレニル基、ピレニル基、クリセニル基、テトラフェニル基、ナフタセニル基、ペリレニル基、ピセニル基、ペンタフェニル基、及びペンタセニル基が挙げられる。

10

【0021】

Ar としてのヘテロアリール基は、例えば、窒素原子、酸素原子及び硫黄原子から選ばれる 1 又は 2 以上のヘテロ原子を環構成原子として含む、5 ~ 10 員環の基であってもよい。ヘテロアリール基は、窒素原子を 1 個又は 2 個含む 5 員環又は 6 員環の基であってもよい。ヘテロアリール基の例として、ピロリル基、及びイミダゾリル基のような窒素原子を含む単環式ヘテロアリール基、インドリル基のような窒素原子を含む縮合環式ヘテロアリール基、キノリル基、2,7-ナフチリジニル基、2,6-ナフチリジニル基、1,6-ナフチリジニル基、1,5-ナフチリジニル基、キノキサリニル基、キナゾリニル基、シンノリニル基、9H-カルバゾリル基、9H-カルボリニル基、フェナントリジニル基、1H-ペリミジニル基、フェナントロリニル基 (4,7-フェナントロリニル基、3,8-フェナントロリニル基及び 2,9-フェナントロリニル基など)、フェナジニル基、テベニジニル基、並びに 10H-キンドリニル基が挙げられる。

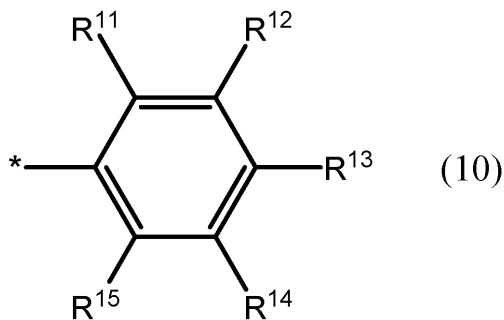
20

【0022】

Ar は特に、下記 (10) で表される置換又は無置換のフェニル基であってもよい。

【0023】

【化7】



30

【0024】

式 (10) 中、* は X^2 との結合部位を示し、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 及び R^{15} は、それぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、置換されていてもよいアルキル基、置換されていてもよいアリール基、又は置換されていてもよいヘテロアリール基を示す。

40

【0025】

R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 又は R^{15} としてのアルキル基は、例えば炭素数 1 ~ 20 のアルキル基であってもよく、その例としてはメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、ネオペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、ベンジル基、フェネチル基、ジフェニルメチル基、及びトリチル基が挙げられる。

【0026】

50

R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 又は R^{15} としてのアリール基は、炭素数 5 ~ 30 のアリール基であってもよく、その例としてはフェニル基、トリル基、キシリル基、メシチル基、ピフェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、フルオレニル基、及びピレニル基が挙げられる。

【0027】

R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 又は R^{15} としてのヘテロアリール基は、5 ~ 10 員環であってもよく、その例としては、ピロリル基、イミダゾリル基、インドリル基、フェナントロリニル基、フェナジニル基、テベニジニル基、及び 10H-キンドリニル基が挙げられる。

【0028】

R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 、 R^{14} 及び R^{15} は、それぞれ独立に水素原子、又は炭素数 1 ~ 10 若しくは 1 ~ 3 のアルキル基であってもよい。

【0029】

式 (I a) 及び (I I a) 中の R^1 は水素原子又は置換されていてもよいアルキル基を示す。 R^1 は炭素数 1 ~ 3 のアルキル基、特にメチル基であってもよい。

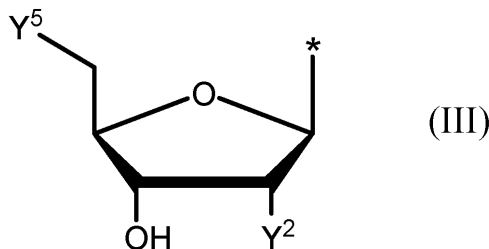
【0030】

以上説明した各置換基の種類及び組み合わせは、シス体とトランス体とでターゲットとするタンパク質との相互作用の差異が大きくなるなど、各種の核酸機能を光制御できるように、適宜選択することができる。

【0031】

式 (I a)、(I b)、(I I a) 及び (I I b) 中の Z は、下記式 (I I I) :

【化 8】



で表される糖残基であってもよい。式 (I I I) 中、* は窒素原子との結合部位を示し、 Y^2 は水素原子又は水酸基を示し、 Y^5 は水酸基又はリン酸基を示す。式 (I I I) 中の水酸基及びリン酸基はそれぞれ独立に水素原子が脱離してアニオン化していてもよく、化学修飾されていてもよい。

【0032】

本明細書において、水酸基及びリン酸基の化学修飾は、保護基による保護、及び反応性を付与するための活性化基との結合を含む。水酸基を保護する保護基の例としては、アセチル基、イソブチル基、tert-ブチルジメチルシリル基 (TBDMS)、及びジメトキシトリチル基 (DMTr) が挙げられる。

【0033】

本明細書において、リン酸基は、下記各式で表される一リン酸基、二リン酸基、三リン酸基、四リン酸基、五リン酸基、及び六リン酸基を含む。式中の -OH は、水素原子が脱離してアニオン化していてもよい。

【0034】

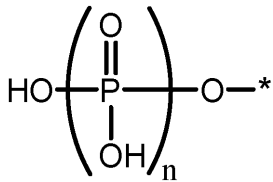
10

20

30

40

【化 9】



n = 1, 2, 3, 4, 5 or 6

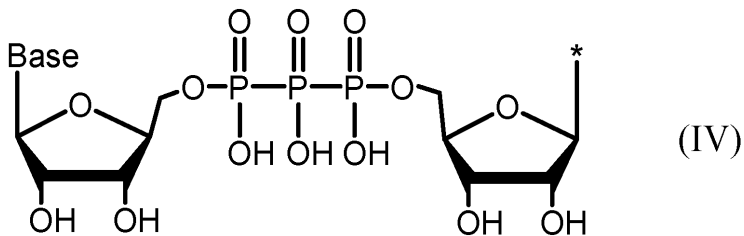
【0035】

式 (I a)、(I b)、(I I a) 又は (I I b) 中の Z は、下記式 (I V) :

10

【0036】

【化 10】



で表される基であってもよい。式 (I V) 中、* は式 (I a)、(I b)、(I I a) 又は (I I b) 中の窒素原子との結合部位を示し、B a s e は核酸塩基を示す。式 (I V) 中の水酸基及びリン酸基は水素原子が脱離してアニオン化していてもよい。式 (I V) 中の核酸塩基は、アデニン、グアニン、シトシン、チミン又はウラシルの残基であることができ、これら核酸塩基は必要により置換基の導入等によって化学的に修飾されていてもよい。式 (I V) で表される基を有するプリンヌクレオシド誘導体は、例えば、RNA (特に、mRNA) に光応答性の 5' キャップ構造を導入するために用いることができる。

20

【0037】

これらプリンヌクレオシド誘導体は、当業者に理解されるように、通常の種類素反応を組み合わせながら、商業的に利用可能な原料から合成することができる。

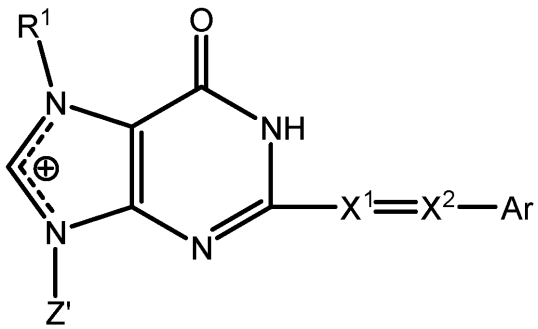
【0038】

以上説明した実施形態に係るプリンヌクレオシド誘導体は、ポリヌクレオチドの構成単位 (ヌクレオチド単位) として各種のポリヌクレオチド中に導入することができる。例えば、一実施形態に係るポリヌクレオチドは、下記式 (I a')、(I b')、(I I a')、又は (I I b') で表される塩基部分及びこれが結合した糖部分を有する修飾ヌクレオチド単位を任意の位置に含む。これら式中、X¹、X²、A r 及び R¹ は式 (I a)、(I b)、(I I a) 及び (I I b) 中の X¹、X²、A r 及び R¹ と同義である。Z' は糖部分との結合部位を示す、

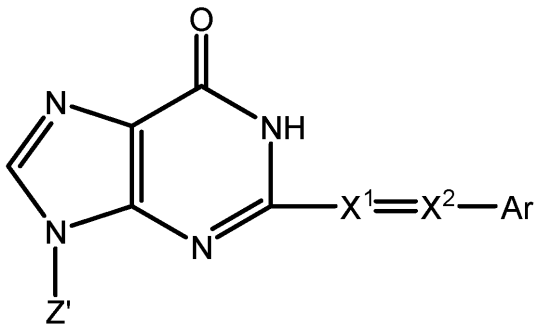
30

【0039】

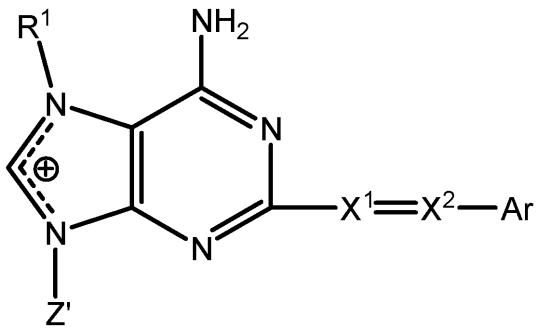
【化 1 1】



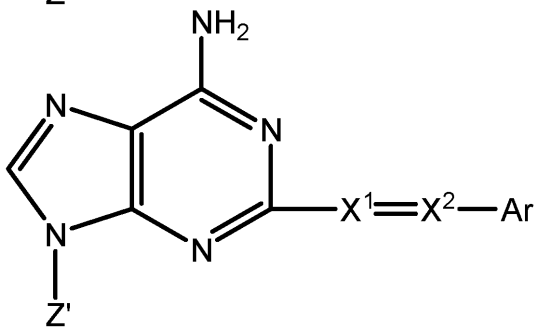
10



20



30



【 0 0 4 0】

修飾ヌクレオチド単位は、RNA又はDNAの任意の位置のヌクレオチド単位を置換していてもよいし、ポリヌクレオチドの5'末端又は3'末端に結合していてもよい。例えば、5'キャップ構造を有するRNAの場合、5'キャップ構造、又はポリヌクレオチドの5'末端から10塩基までの範囲の位置に修飾ヌクレオチド単位が導入されていてもよい。

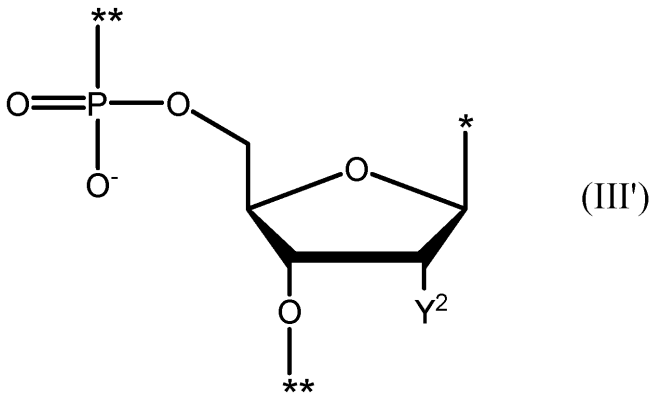
40

【 0 0 4 1】

上記修飾ヌクレオチド単位がRNAの中間部分の位置に導入される場合、式(Ia')、(Ib')、(IIa')、及び(IIb')中のZ'は例えば下記式(III')で表される糖部分であることができる。式(III')中、*は塩基部分との結合部位であり、**は隣接するヌクレオチド単位との結合部位である。

【 0 0 4 2】

【化 1 2】

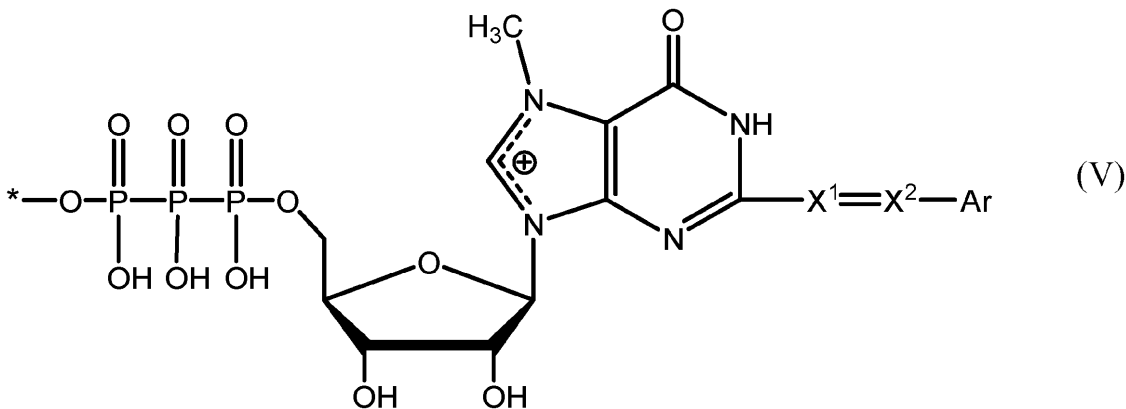


10

【0043】

上記修飾ヌクレオチド単位が導入された mRNA の 5' キャップ構造は、例えば、下記式 (V) :

【化 1 3】



20

で表される。式 (V) 中、* はポリヌクレオチドの 5' 末端との結合部位を示す。式 (V) 中の水酸基及びリン酸基はそれぞれ独立にアニオン化していても、化学修飾されていてもよい。

30

【0044】

上記修飾ヌクレオチド単位を含む 5' キャップ構造を有する mRNA を真核細胞の細胞質に導入し、真核細胞に光を照射することにより、当該 mRNA がコードするタンパク質の産生量を制御することができる。

【0045】

照射される光は、シス体又はトランス体の比率が大きくなる所定の波長を有することができる。タンパク質の産生量を制御する方法は、例えば、シス体の比率が大きくなる第一の波長の光を照射することと、トランス体の比率が大きくなる第二の波長の光を照射することを含んでもよい。これにより、タンパク質産生のオン/オフのスイッチングを任意のタイミングで行うことができる。図 1 は、式 (V) の 5' キャップ構造を有する mRNA を例とした、タンパク質の産生量を制御するメカニズムを示す模式図である。図中の (a) に示されるように、430 nm (第二の波長) の光照射により生じるトランス体は翻訳開始因子 eIF4E と結合しないことから、mRNA からの翻訳によるタンパク質の合成が抑制される。370 nm (第一の波長) の光照射によって生成するシス体は eIF4E と結合し、タンパク質の合成が促進される。なお、塩基部分の構造等によっては、シス体よりもトランス体のときにタンパク質産生が促進され得る。

40

【0046】

本実施形態に係るヌクレオチド単位中の塩基部分は、熱による異性化に対して安定であるため、光を長時間連続的に照射する必要がない。例えば、1 回あたりの照射時間を 1 秒 ~ 2 分とすることができる。このような短時間であれば、細胞の損傷又は死滅を抑制しな

50

から光を照射することができる。シス体又はトランス体の比率が大きい状態を長時間維持する必要がある場合、例えば、30分～10時間毎に1秒～2分、光を照射してもよい。照射される光は、例えば紫外線であることができる。

【実施例】

【0047】

以下、実施例を挙げて本発明についてさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

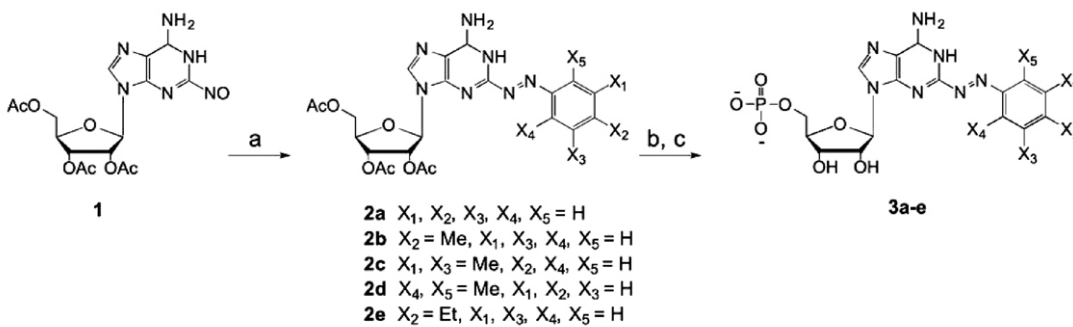
【0048】

1. 光応答性capアナログ(プリンヌクレオシド誘導体)の合成

真核生物翻訳開始因子eIF4Eとの相互作用を制御可能な光応答性capアナログとして、下記合成反応式に従って、反応式中に示す2PA-cap(6a)、pMe-2PA-cap(6b)、mMe-2PA-cap(6c)、oMe-2PA-cap(6d)及びpEt-2PA-cap(6e)の5種を合成した。

【0049】

【化14】



10

20

30

40

【0050】

1 - 1. 反応 a

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-p-メチル-フェニルアゾアデノシン(2b)

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-ニトロアデノシン(1)(500mg、1.18mmol)及び無水アセトニトリル(10mL)を含む懸濁液に、酢酸(0.79mL)及びp-トルイジン(0.15mL、1.42mmol)を加えた。得られた反応混合物を室温で3時間攪拌した後、真空下で濃縮した。残渣をトルエンに溶解し、3回同時蒸着し、シリカゲルカラムにより精製した。3~10%のグラジエントをかけたメタ

50

ノール/クロロホルムで生成物を溶出させて、578 mg (収率96%)の2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-p-メチル-フェニルアゾアデノシン(2b)(橙色固体)を得た。

^1H NMR (chloroform-d, 400 MHz) : 8.08 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.0, 2H), 7.30 (d, J = 8.0, 2H), 6.44 (s, 2H), 6.43 (d, J = 6.0, 1H), 5.80 (t, J = 6.0, 1H), 5.61 (dd, J = 6.0, 3.6, 1H), 4.45-4.41 (m, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.04 (s, 3H)

^{13}C NMR (chloroform-d, 400MHz) : 170.4, 169.7, 169.6, 162.7, 156.4, 151.0, 150.7, 139.7, 129.9, 124.0, 119.8, 85.3, 80.6, 77.3, 73.5, 70.8, 63.4, 21.8, 20.9, 20.7, 20.5

10

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₃H₂₅N₇O₇, Calculated: 510.17; Found: 510.22

【0051】

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-m-ジメチル-フェニルアゾアデノシン(2c)

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-ニトロアデノシン(1)(1.0g、2.37mmol)及び無水アセトニトリル(16mL)を含む懸濁液に、酢酸(1.58mL)及び3,5-キシリジン(0.36mL、2.84mmol)を加えた。得られた反応混合物を室温で3時間攪拌した後、真空下で濃縮した。残渣をトルエンに溶解し、3回同時蒸着し、シリカゲルカラムにより精製した。3~10%のメタノール/クロロホルムのグラジエントで生成物を溶出させて、881mg(収率71%)の2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-m-ジメチル-フェニルアゾアデノシン(2c)(赤色固体)を得た。

20

^1H NMR (chloroform-d, 400 MHz) : 8.10 (s, 1H), 7.70 (s, 2H), 7.17 (s, 1H), 6.46 (d, J = 6.0, 1H), 6.26 (s, 2H), 5.79 (t, J = 6.0, 1H), 5.61 (dd, J = 6.0, 3.6, 1H), 4.46-4.41 (m, 3H), 2.40 (s, 6H), 2.14 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.04 (s, 3H)

^{13}C NMR (chloroform-d, 400MHz) : 170.4, 169.7, 169.6, 162.7, 156.3, 152.8, 151.1, 139.7, 138.9, 134.5, 121.8, 119.8, 85.2, 80.6, 77.3, 73.5, 70.9, 63.4, 21.3, 20.9, 20.7, 20.5

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₄H₂₇N₇O₇, Calculated: 524.19; Found: 524.23

30

【0052】

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-o-ジメチル-フェニルアゾアデノシン(2d)

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-ニトロアデノシン(1)(1.0g、2.37mmol)及び無水アセトニトリル(16mL)を含む懸濁液に、酢酸(1.58mL)及び2,6-キシリジン(0.36mL、2.84mmol)を加えた。得られた反応混合物を室温で3時間攪拌した後、真空下で濃縮した。残渣をトルエンに溶解し、3回同時蒸着し、シリカゲルカラムにより精製した。3~10%のメタノール/クロロホルムのグラジエントで生成物を溶出させて、312mg(収率25%)の2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-o-ジメチル-フェニルアゾアデノシン(2d)(茶色固体)を得た。

40

^1H NMR (chloroform-d, 400 MHz) : 8.08 (s, 1H), 7.16 (d, J = 7.2, 1H), 7.12 (d, J = 7.2, 2H), 6.36 (d, J = 5.6, 1H), 6.11 (s, 2H), 5.84 (t, J = 5.6, 1H), 5.63 (dd, J = 5.6, 4.0, 1H), 4.47-4.41 (m, 3H), 2.36 (s, 6H), 2.12 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H)

^{13}C NMR (chloroform-d, 400MHz) : 170.4, 169.7, 169.6, 162.5, 156.2, 152.0, 150.9, 140.0, 131.0, 129.1, 120.0, 86.0, 80.5, 77.3, 73.6, 70.9, 63.3, 20.9, 20.6, 20.5, 18.9

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₄H₂₇N₇O₇, Calculated: 524.19; Found: 524.17

【0053】

50

2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - 2 - p - エチル - フェニルアゾアデノシン (2 e)

2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - 2 - ニトロアデノシン (1) (1 . 0 g、2 . 3 7 m m o l) 及び無水アセトニトリル (2 0 m L) を含む懸濁液に、酢酸 (1 . 5 8 m L) 及び 4 - エチルアニリン (0 . 3 6 m L、2 . 8 4 m m o l) を加えた。得られた反応混合物を室温で 3 時間攪拌した後、真空下で濃縮した。残渣をトルエンに溶解し、3 回同時蒸着し、シリカゲルカラムにより精製した。3 ~ 1 0 % のメタノール/クロロホルムのグラジエントで生成物を溶出させて、1 . 0 8 g (収率 8 7 %) の 2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - 2 - p - エチル - フェニルアゾアデノシン (2 e) (橙色固体) を得た。

^1H NMR (chloroform-d, 400 MHz) : 8.07 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.4, 2H), 7.29 (d, J = 8.4, 2H), 6.41 (d, J = 5.6, 1H), 5.79 (t, J = 5.6, 1H), 5.60 (dd, J = 5.6, 3.6, 1H), 4.43-4.39 (m, 3H), 2.67 (q, J = 7.6, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.23 (t, J = 7.6, 3H)

^{13}C NMR (chloroform-d, 400MHz) : 170.4, 169.7, 169.6, 162.8, 156.6, 150.9, 150.7, 149.8, 139.6, 128.7, 124.0, 119.7, 85.3, 80.5, 77.4, 73.5, 70.9, 63.4, 29.0, 20.9, 20.7, 20.5, 15.2

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₄H₂₇N₇O₇, Calculated: 524.19; Found: 524.28

【 0 0 5 4 】

1 - 2 . 反応 b , c

2 - フェニルアゾアデノシンーリン酸 (3 a)

常法に従って、2 - フェニルアゾアデノシン (2 a) を合成した。得られた 2 - フェニルアゾアデノシン (1 9 0 m g、0 . 5 1 m m o l) を、リン酸トリメチル (2 . 0 m L) 中で塩化ホスホリル (0 . 1 4 m L、1 . 5 4 m m o l) と混合した。得られた反応混合物を 0 で 1 6 時間攪拌した後、1 M 臭化テトラエチルアンモニウム (T E A B) で中和した。粗生成物を D E A E - S h e p h a d e x カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた T E A B で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、1 4 4 m g (収率 4 3 %) の 2 - フェニルアゾアデノシンーリン酸 (3 a) (橙色泡状物) を得た。

^1H NMR (D₂O, 400 MHz) : 8.15 (s, 1H), 7.18 (d, J = 7.6, 2H), 7.0 (t, J = 7.6, 1H), 6.93 (t, J = 7.6, 2H), 5.77 (d, J = 4.4, 1H), 4.34 (t, J = 4.4, 1H), 4.26 (t, J = 4.4, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.04-4.00 (m, 1H), 3.98-3.93 (m, 1H), 2.99 (q, J = 7.6, 12H), 1.07 (t, J = 7.6, 18H)

^{13}C NMR (D₂O, 400 MHz) : 159.8, 155.2, 150.2, 149.1, 140.6, 132.9, 128.7, 122.8, 118.4, 83.5, 83.4, 74.8, 69.9, 64.0, 46.6, 8.2

^{31}P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.57 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₆H₁₈N₇O₇P, Calculated: 451.08; Found: 451.05

【 0 0 5 5 】

2 - p - メチル - フェニルアゾアデノシンーリン酸 (3 b)

2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - 2 - p - メチル - フェニルアゾアデノシン (2 b) (5 7 0 m g、1 . 1 2 m m o l) 及び無水メタノール (2 0 m L) を含む溶液に、ナトリウムメトキシドの 2 8 % メタノール溶液 (0 . 8 2 m L、ナトリウムメトキシド 3 . 3 5 m m o l) を加えた。得られた反応混合物を室温で 3 時間攪拌した。その後混合物を酢酸で中和し、真空下で濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムにより精製した。生成物を 5 - 1 2 % のグラジエントをかけたメタノール/クロロホルムで溶出し、3 8 7 m g (収率 9 0 %) の 2 - p - メチル - フェニルアゾアデノシン (橙色固体) を得た。得られた生成物を更に精製することなく次のステップに用いた。2 - p - メチル - フェニルアゾアデノシン (3 8 0 m g、0 . 9 9 m m o l) を、リン酸トリメチル (5 . 0 m L) 中で

10

20

30

40

50

プロトンスポンジ (317 mg、1.48 mmol) 及び塩化ホスホリル (0.23 mL、2.47 mmol) と混合した。反応混合物を 0 で 16 時間攪拌し、1 M TEAB で中和した。粗生成物を DEAE-Sephadex カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、336 mg (収率 49%) の 2-p-メチル-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3b) (橙色泡状物) を得た。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 8.03 (s, 1H), 6.68 (d, J = 7.6, 2H), 6.31 (d, J = 7.6, 2H), 5.54 (d, J = 3.6, 1H), 4.19-4.13 (m, 3H), 4.03-3.99 (m, 1H), 3.94-3.91 (m, 1H), 2.97 (q, J = 7.2, 12H), 1.69 (s, 3H), 1.06 (t, J = 7.2, 18H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 159.3, 154.7, 148.5, 147.8, 144.1, 139.9, 128.6, 122.4, 118.1, 74.8, 69.6, 63.9, 46.6, 20.7, 8.2

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.42 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₇H₂₀N₇O₇P, Calculated: 464.11; Found: 464.11

【0056】

2-m-ジメチル-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3c)

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-m-ジメチル-フェニルアゾアデノシン (2c) (690 mg、1.31 mmol) 及び無水メタノール (20 mL) を含む溶液に、ナトリウムメトキシドの 28%メタノール溶液 (0.96 mL、ナトリウムメトキシド 3.94 mmol) を加えた。得られた反応混合物を室温で 3 時間攪拌した。その後混合物を酢酸で中和し、真空下で濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムにより精製した。生成物を 5-12%のグラジエントをかけたメタノール/クロロホルムで溶出し、440 mg (収率 84%) の 2-m-ジメチル-フェニルアゾアデノシン (橙色固体) を得た。得られた生成物を更に精製することなく次のステップに用いた。2-m-ジメチル-フェニルアゾアデノシン (112 mg、0.28 mmol) を、リン酸トリメチル (1.4 mL) 中でプロトンスポンジ (90 mg、0.42 mmol) 及び塩化ホスホリル (62 μL、0.67 mmol) と混合した。反応混合物を 0 で 16 時間攪拌し、1 M TEAB で中和した。粗生成物を DEAE-Sephadex カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、130 mg (収率 68%) の 2-m-ジメチル-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3c) (橙色泡状物) を得た。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 8.32 (s, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.81 (s, 1H), 5.90 (d, J = 4.8, 1H), 4.41 (t, J = 4.8, 1H), 4.31 (t, J = 4.8, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.06-4.01 (m, 1H), 3.99-3.94 (m, 1H), 3.03 (q, J = 7.2, 12H), 2.01 (s, 6H), 1.11 (t, J = 7.2, 18H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 160.2, 155.4, 150.8, 149.3, 140.8, 139.1, 120.7, 118.4, 117.7, 87.5, 75.0, 69.9, 63.9, 58.9, 46.6, 20.3, 8.2

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.83 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₈H₂₂N₇O₇P, Calculated: 478.12; Found: 478.17

【0057】

2-o-ジメチル-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3d)

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-o-ジメチル-フェニルアゾアデノシン (2d) (119 mg、0.227 mmol) 及び無水メタノール (5 mL) を含む溶液に、ナトリウムメトキシドの 28%メタノール溶液 (0.17 mL、ナトリウムメトキシド 0.68 mmol) を加えた。得られた反応混合物を室温で 3 時間攪拌した。その後混合物を酢酸で中和し、真空下で濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムにより精製した。生成物を 5-12%のグラジエントをかけたメタノール/クロロホルムで溶出し、53 mg (収率 58%) の 2-o-ジメチル-フェニルアゾアデノシン (赤色固体) を得た。得られた生成物を更に精製することなく次のステップに用いた。2-o-ジメチル-フェニルアゾアデノシン (53 mg、0.13 mmol) を、リン酸トリメチル (0.7 mL) 中

10

20

30

40

50

でプロトンスポンジ (43 mg、0.20 mmol) 及び塩化ホスホリル (0.03 mL、0.32 mmol) と混合した。反応混合物を 0 で 16 時間攪拌し、1 M TEAB で中和した。粗生成物を DEAE-Sephadex カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、61 mg (収率 67%) の 2-o-ジメチル-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3d) (橙色泡状物) を得た。

^1H NMR (D_2O , 400 MHz) : 8.29 (s, 1H), 6.75-6.67 (m, 3H), 5.90 (d, $J = 4.8$, 1H), 4.44 (t, $J = 4.8$, 1H), 4.32 (t, $J = 4.8$, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.02-3.97 (m, 1H), 3.00 (q, $J = 7.2$, 12H), 2.02 (s, 6H), 1.08 (t, $J = 7.2$, 18H)

^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) : 0.39 (s, 1P)

ESI-TOF MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}$, Calculated: 478.12; Found: 478.25

【0058】

2-p-エチル-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3e)

2', 3', 5'-トリ-O-アセチル-2-p-エチル-フェニルアゾアデノシン (2e) (1.08 mg、2.06 mmol) 及び無水メタノール (7 mL) を含む溶液に、アンモニアの 2 M メタノール溶液 (7 mL) を加えた。得られた反応混合物を 50 で 5 時間攪拌した。その後混合物を酢酸で中和し、真空下で濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムにより精製した。生成物を 5-12% のグラジエントをかけたメタノール/クロロホルムで溶出し、595 mg (収率 72%) の 2-p-エチル-フェニルアゾアデノシン (橙色固体) を得た。得られた生成物を更に精製することなく次のステップに用いた。2-p-エチル-フェニルアゾアデノシン (580 mg、1.45 mmol) を、リン酸トリメチル (6.0 mL) 中で塩化ホスホリル (1.33 mL、14.5 mmol) と混合した。反応混合物を 0 で 1 時間攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウムで中和した。粗生成物を DEAE-Sephadex カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、530 mg (収率 54%) の 2-p-エチル-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3e) (橙色泡状物) を得た。

^1H NMR (D_2O , 400 MHz) : 8.05 (s, 1H), 6.84 (d, $J = 8.4$, 2H), 6.44 (d, $J = 8.4$, 2H), 5.63 (d, $J = 4.0$, 1H), 4.18 (m, 2H), 4.12 (m, 1H), 3.98-3.89 (m, 2H), 2.92 (q, $J = 7.2$, 12H), 2.02 (q, $J = 7.2$, 2H), 1.05 (t, $J = 7.2$, 18H), 0.74 (t, $J = 7.2$, 3H)

^{13}C NMR (D_2O , 400 MHz) : 180.9, 159.7, 154.9, 150.0, 148.8, 148.2, 140.1, 127.4, 122.7, 118.1, 87.3, 83.3, 83.2, 74.8, 69.7, 64.0, 58.7, 48.4, 46.5, 42.2, 27.7, 13.3, 8.2, 7.3

^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) : 0.48 (s, 1P)

ESI-TOF MS $[\text{M}-\text{H}]^-$ for $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_7\text{O}_7\text{P}$, Calculated: 478.12; Found: 478.21

【0059】

1-3. 反応 d

2-フェニルアゾグアノシン-リン酸 (4a)

亜硝酸ナトリウム (2.0 g、29.0 mmol) を、2-フェニルアゾアデノシン-リン酸 (3a) (112 mg、0.17 mmol) が水 (50 mL) 及び酢酸 (10 mL) に溶解した溶液に加えた。反応混合物を室温で 20 時間攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。粗生成物を DEAE-Sephadex カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、102 mg (収率 90%) の 2-フェニルアゾグアノシン-リン酸 (4a) (橙色泡状物) を得た。

^1H NMR (D_2O , 400 MHz) : 8.35 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 6.8$, 2H), 7.21 (t, $J = 6.8$, 1H), 7.13 (t, $J = 6.8$, 2H), 5.93 (d, $J = 4.4$, 1H), 4.61 (t, $J = 4.4$, 1H), 4.47 (t, $J = 4.4$, 1H), 4.38 (m, 1H),

10

20

30

40

50

4.21-4.12 (m, 2H), 3.18 (q, J = 7.2, 12H), 1.27 (t, J = 7.2, 18H)
¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 157.0, 153.1, 149.8, 147.7, 140.8, 135.2, 129.5, 124.2, 123.8, 87.7, 84.3, 75.2, 70.5, 64.6, 46.9, 8.4
³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.21 (s, 1P)
 ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₆H₁₇N₆O₈P, Calculated: 451.08; Found: 451.05

【 0 0 6 0 】

2 - p - メチル - フェノルアゾグアノシンーリン酸 (4 b)

亜硝酸ナトリウム (2 . 8 2 g 、 4 0 . 9 m m o l) を、 2 - p - メチル - フェニルアゾアデノシンーリン酸 (3 b) (1 4 1 m g 、 0 . 2 0 m m o l) が水 (5 5 m L) 及び酢酸 (1 2 m L) に溶解した溶液に加えた。反応混合物を室温で 2 0 時間攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。粗生成物を D E A E - S h e p h a d e x カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた T E A B で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、1 2 0 m g (収率 8 5 %) の 2 - p - メチル - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 b) (橙色泡状物) を得た。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 8.14 (s, 1H), 6.83 (d, J = 7.6, 2H), 6.39 (d, J = 7.6, 2H), 5.59 (d, J = 4.8, 1H), 4.38 (t, J = 4.8, 1H), 4.47 (t, J = 4.8, 1H), 4.20 (m, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.04 (q, J = 7.2, 12H), 1.77 (s, 3H), 1.12 (t, J = 7.2, 18H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 181.1, 156.4, 152.7, 147.6, 147.2, 147.1, 140.2, 129.5, 123.6, 87.0, 84.2, 75.1, 70.5, 64.3, 46.7, 23.1, 8.3

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.44 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₇H₁₉N₆O₈P, Calculated: 465.09; Found: 465.15

【 0 0 6 1 】

2 - m - ジメチル - フェノルアゾグアノシンーリン酸 (4 c)

亜硝酸ナトリウム (5 . 0 g 、 7 2 . 5 m m o l) を、 2 - m - ジメチル - フェニルアゾアデノシンーリン酸 (3 c) (2 2 4 m g 、 0 . 3 3 m m o l) が水 (8 0 m L) 及び酢酸 (2 0 m L) に溶解した溶液に加えた。反応混合物を室温で 2 0 時間攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。粗生成物を D E A E - S h e p h a d e x カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた T E A B で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、2 0 8 m g (収率 9 3 %) の 2 - m - ジメチル - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 c) (橙色泡状物) を得た。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 8.34 (s, 1H), 6.86 (s, 2H), 6.6 (s, 1H), 5.77 (d, J = 5.2, 1H), 4.43 (t, J = 5.2, 1H), 4.33 (t, J = 5.2, 1H), 4.24 (m, 1H), 4.02-3.97 (m, 2H), 3.04 (q, J = 7.6, 12H), 1.84 (s, 6H), 1.12 (t, J = 7.6, 18H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 156.4, 152.5, 149.5, 147.1, 140.5, 139.5, 136.4, 123.5, 121.2, 87.2, 84.1, 75.3, 70.2, 63.9, 46.6, 19.9, 8.2

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.82 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₈H₂₁N₆O₈P, Calculated: 479.11; Found: 479.23

【 0 0 6 2 】

2 - o - ジメチル - フェノルアゾグアノシンーリン酸 (4 d)

亜硝酸ナトリウム (1 . 2 g 、 1 7 . 4 m m o l) を、 2 - o - ジメチル - フェニルアゾアデノシンーリン酸 (3 d) (6 0 m g 、 0 . 0 9 m m o l) が水 (2 0 m L) 及び酢酸 (5 m L) に溶解した溶液に加えた。反応混合物を室温で 2 0 時間攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。粗生成物を D E A E - S h e p h a d e x カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた T E A B で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、4 3 m g (収率 7 2 %) の 2 - o - ジメチル - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 d) (橙色泡状物) を得た。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 8.18 (s, 1H), 6.45-6.38 (m, 3H), 5.67 (d, J = 4.8, 1H), 4.43 (t, J = 4.8, 1H), 4.32 (t, J = 4.8, 1H), 4.

20 (m, 1H), 3.87-3.75 (m, 1H), 3.01 (q, J = 7.2, 12H), 2.01 (s, 6H), 1.09 (t, J = 7.2, 18H)

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.63 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₇H₁₉N₆O₈P, Calculated: 479.11; Found: 479.11

【 0 0 6 3 】

2 - p - エチル - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 e)

亜硝酸ナトリウム (5 . 0 g、7 2 . 5 m m o l) を、2 - p - エチル - フェニルアゾアデノシンーリン酸 (3 e) (5 3 0 m g、0 . 7 8 m m o l) が水 (1 0 0 m L) 及び酢酸 (2 0 m L) に溶解した溶液に加えた。反応混合物を室温で 2 0 時間攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した。粗生成物を D E A E - S e p h a d e x カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた T E A B で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、2 7 7 m g (収率 5 2 %) の 2 - p - エチル - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 e) (橙色泡状物) を得た。

10

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 8.14 (s, 1H), 6.93 (d, J = 8.4, 2H), 6.50 (d, J = 8.4, 2H), 5.64 (d, J = 5.6, 1H), 4.39 (t, J = 5.6, 1H), 4.25 (t, J = 8.0, 1H), 3.94 (m, 2H), 3.01 (q, J = 7.2, 12H), 2.01 (q, J = 7.2, 2H), 1.09 (t, J = 7.2, 18H), 0.74 (t, J = 7.2, 3H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 181.2, 156.5, 153.0, 152.9, 147.5, 147.3, 140.2, 128.1, 123.5, 87.0, 84.3, 84.2, 75.1, 70.5, 64.3, 46.6, 27.7, 23.2, 12.5, 8.2

20

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.49 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₇H₁₉N₆O₈P, Calculated: 479.11; Found: 479.16

【 0 0 6 4 】

1 - 4 . 反 応 e

2 - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 a)

2 - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 a) (1 2 2 m g、0 . 1 9 m m o l) を水 (1 0 m L) に溶解し、得られた溶液の pH を酢酸で 4 . 0 に調節した。そこに、硫酸ジメチル (0 . 1 8 m L、1 . 8 9 m m o l) を 1 時間かけて滴下し、室温で 4 時間攪拌した。0 . 2 M N a O H で中和した後、粗生成物をクロロホルムで 3 回洗浄し、D E A E S e p h a d e x カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた T E A B で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、4 3 m g (収率 3 4 %) の 2 - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 a) (橙色泡状物) を得た。

30

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 9.02 (s, 1H), 7.33 (d, J = 7.6, 2H), 7.25 (t, J = 7.6, 1H), 7.14 (t, J = 7.6, 2H), 5.88 (d, J = 2.8, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.26 (m, 2H), 4.17-4.13 (m, 1H), 4.01-3.97 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.02 (q, J = 7.2, 12H), 1.10 (t, J = 7.2, 18H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 150.3, 147.1, 133.6, 129.0, 123.2, 120.2, 114.4, 89.9, 83.9, 75.1, 68.6, 63.0, 46.6, 35.8, 8.2

40

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.50 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₇H₁₉N₆O₈P, Calculated: 465.09; Found: 465.05

【 0 0 6 5 】

2 - p - メチル - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 b)

2 - p - メチル - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 b) (1 1 0 m g、0 . 1 6 m m o l) を水 (1 0 m L) に溶解し、得られた溶液の pH を酢酸で 4 . 0 に調節した。そこに、硫酸ジメチル (0 . 1 5 m L、1 . 5 8 m m o l) を 1 時間かけて滴下し、室温で 4 時間攪拌した。0 . 2 M N a O H で中和した後、粗生成物をクロロホルムで 3 回洗浄し、D E A E S e p h a d e x カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた T E A B で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥し

50

て、56 mg (収率50%)の2-p-メチル-フェニルアゾ-7-メチル-グアノシン-
ーリン酸(5b)(橙色泡状物)を得た。

^1H NMR (D_2O , 400 MHz) : 9.41 (s, 1H), 7.52 (s, 2H), 6.07 (d, J = 2.4, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.34 (m, 2H), 4.18 (dd, J = 10.8, 4.4, 1H), 4.05 (s, 3H), 4.03 (dd, J = 10.8, 4.4, 1H), 3.05 (q, J = 7.2, 12H), 2.21 (s, 3H), 3.05 (q, J = 7.2, 12H), 1.13 (t, J = 7.2, 18H)

^{13}C NMR (D_2O , 400 MHz) : 153.2, 146.1, 136.6, 130.4, 124.8, 115.8, 110.8, 109.0, 90.7, 84.6, 75.6, 69.2, 63.4, 46.7, 42.3, 21.2, 8.3

^{31}P NMR (D_2O , 162 MHz) : 0.19 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$, Calculated: 479.11; Found: 479.12

【0066】

2-m-ジメチル-フェニルアゾ-7-メチル-グアノシン-リン酸(5c)

2-m-ジメチル-フェニルアゾグアノシン-リン酸(4c)(139 mg、0.20 mmol)を水(12 mL)に溶解し、得られた溶液のpHを酢酸で4.0に調節した。そこに、硫酸ジメチル(0.40 mL、4.22 mmol)を1時間かけて滴下し、室温で4時間攪拌した。0.2 M NaOHで中和した後、粗生成物をクロロホルムで3回洗浄し、DEAE Sephadexカラムで精製した。0~1 Mの直線的なグラジエントをかけたTEABで生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、38 mg (収率27%)の2-m-ジメチル-フェニルアゾ-7-メチル-グアノシン-リン酸(5c)(橙色泡状物)を得た。

^1H NMR (methanol- d_4 , 400 MHz) : 7.58 (s, 2H), 7.25 (s, 1H), 6.19 (d, J = 2.4, 1H), 4.55 (dd, J = 4.8, 2.4, 1H), 4.42 (dd, J = 6.4, 4.8, 1H), 4.32-4.27 (m, 1H), 4.26 (s, 3H), 4.12-4.09 (m, 1H), 3.18 (q, J = 7.2, 12H), 2.39 (s, 6H), 1.28 (t, J = 7.6, 18H)

^{13}C NMR (methanol- d_4 , 400 MHz) : 165.8, 163.6, 152.5, 148.3, 139.2, 134.3, 121.0, 114.5, 90.9, 84.4, 75.5, 68.7, 62.8, 46.2, 35.4, 19.9, 7.8

^{31}P NMR (methanol- d_4 , 162 MHz) : -0.35 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$, Calculated: 493.12; Found: 493.23

【0067】

2-o-ジメチル-フェニルアゾ-7-メチル-グアノシン-リン酸(5d)

2-o-ジメチル-フェニルアゾグアノシン-リン酸(4d)(40 mg、0.06 mmol)を水(5 mL)に溶解し、得られた溶液のpHを酢酸で4.0に調節した。そこに、硫酸ジメチル(0.11 mL、1.17 mmol)を1時間かけて滴下し、室温で4時間攪拌した。0.2 M NaOHで中和した後、粗生成物をクロロホルムで3回洗浄し、DEAE Sephadexカラムで精製した。0~1 Mの直線的なグラジエントをかけたTEABで生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、21 mg (収率52%)の2-o-ジメチル-フェニルアゾ-7-メチル-グアノシン-リン酸(5d)(橙色泡状物)を得た。

^1H NMR (Methanol- d_4 , 400 MHz) : 9.66 (s, 1H), 7.28 (d, J = 7.2, 1H), 7.21 (d, J = 7.2, 2H), 6.24 (d, J = 2.4, 1H), 4.61 (dd, J = 4.8, 2.4, 1H), 4.43 (dd, J = 4.8, 2.4, 1H), 4.28 (s, 3H), 3.17 (q, J = 7.2, 6H), 2.45 (s, 6H), 1.29 (t, J = 7.2, 12H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) : 167.2, 163.1, 151.1, 148.8, 137.1, 130.5, 129.6, 129.4, 113.8, 89.5, 84.6, 75.2, 70.3, 63.7, 45.8, 35.9, 18.8, 9.0

^{31}P NMR (Methanol- d_4 , 162 MHz) : 0.04 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_8\text{P}$, Calculated: 493.12; Found: 493.11

【0068】

10

20

30

40

50

2 - p - エチル - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 e)

2 - p - エチル - フェニルアゾグアノシンーリン酸 (4 d) (150 mg、0.22 mmol) を水 (10 mL) に溶解し、得られた溶液の pH を酢酸で 4.0 に調節した。そこに、硫酸ジメチル (0.21 mL、2.20 mmol) を 1 時間かけて滴下し、室温で 4 時間攪拌した。0.2 M NaOH で中和した後、粗生成物をクロロホルムで 3 回洗浄し、DEAE Sephadex カラムで精製した。0 ~ 1 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、76 mg (収率 50%) の 2 - p - エチル - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 e) (橙色泡状物) を得た。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 9.02 (s, 1H), 7.23 (d, J = 8.4, 2H), 6.95 (d, J = 8.4, 2H), 5.81 (d, J = 2.4, 1H), 4.28 (t, J = 3.2, 1H), 4.22-4.18 (m, 2H), 4.10-4.05 (m, 1H), 3.96-3.92 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.98 (q, J = 7.2, 12H), 2.36 (q, J = 7.2, 2H), 1.07 (t, J = 7.2, 18H), 0.95 (t, J = 7.2, 3H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 162.4, 162.1, 151.5, 148.7, 147.3, 128.4, 123.5, 114.3, 89.9, 83.8, 83.7, 75.1, 68.5, 62.8, 46.6, 35.9, 28.2, 14.1, 8.2

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : 0.70 (s, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₁₈H₂₁N₆O₈P, Calculated: 493.12; Found: 493.15

【 0 0 6 9 】

1 - 5 . 反応 f

2 - フェニルアゾ cap (2 PA - cap) (6 a)

2 - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 a) (43 mg、0.064 mmol)、及びグアノシンニリン酸イミダゾリド (66 mg、0.13 mmol) が 3 mL の無水 DMF に溶解している溶液に、塩化亜鉛 (53 mg、0.39 mmol) を加えた。得られた反応溶液を室温で 72 時間攪拌し、251 mg のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が 25 mL の水に溶解している 0 の溶液に注ぎ入れた。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した後、溶液を DEAE Sephadex カラムに装填した。0 ~ 1.2 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、2 PA - cap のテトラエチルアンモニウム (TEA) 塩 (橙色泡状物) を得た。2 PA - cap の TEA 塩を 10 mL の水に溶解し、得られた溶液を Strata - X - AW カラムに載せ、10 mL の水、及び 10 mL のメタノールの順で洗浄した。次いで、15 mL の NH₄OH / メタノール / 水 (2 / 25 / 73) で 2 PA - cap を溶出させ、回収した溶液を凍結乾燥機で乾燥して、26 mg の 2 PA - cap (6 a) を得た (収率 45%)。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 9.09 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.61 (d, J = 7.6, 2H), 7.39 (t, J = 7.6, 1H), 7.30 (t, J = 7.6, 2H), 5.91 (d, J = 2.8, 1H), 5.51 (d, J = 5.6, 1H), 4.40-4.35 (m, 2H), 4.31-4.24 (m, 4H), 4.19-4.14 (m, 2H), 4.09-4.06 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.03 (q, J = 7.2, 18H), 1.11 (t, J = 7.2, 27H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 161.9, 161.2, 158.1, 153.5, 151.1, 150.7, 147.2, 136.9, 134.1, 129.4, 123.6, 115.7, 114.7, 89.9, 86.7, 83.6, 75.2, 74.0, 70.3, 68.6, 65.4, 64.1, 46.6, 36.2, 8.2

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : -11.70 (d, J = 19.3, 2P), -23.19 (t, J = 19.3, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₇H₃₁N₁₁O₁₈P₃, Calculated: 890.11; Found: 890.11

【 0 0 7 0 】

2 - p - メチル - フェニルアゾ cap (p Me - 2 PA - cap) (6 b)

2 - p - メチル - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 b) (40 mg、0.056 mmol)、及びグアノシンニリン酸イミダゾリド (58 mg、0.11 mmol) が 3 mL の無水 DMF に溶解している溶液に、塩化亜鉛 (53 mg、0.39 mmol) を加えた。得られた反応溶液を室温で 72 時間攪拌し、251 mg のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が 25 mL の水に溶解している 0 の溶液に注ぎ入れた。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和した後、溶液を DEAE Sephadex カラムに装填した。0 ~ 1.2 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、2 PA - cap のテトラエチルアンモニウム (TEA) 塩 (橙色泡状物) を得た。2 PA - cap の TEA 塩を 10 mL の水に溶解し、得られた溶液を Strata - X - AW カラムに載せ、10 mL の水、及び 10 mL のメタノールの順で洗浄した。次いで、15 mL の NH₄OH / メタノール / 水 (2 / 25 / 73) で 2 PA - cap を溶出させ、回収した溶液を凍結乾燥機で乾燥して、26 mg の 2 PA - cap (6 a) を得た (収率 45%)。

mol) が 2 mL の無水 DMF に溶解している溶液に、塩化亜鉛 (46 mg、0.34 mmol) を加えた。得られた反応溶液を室温で 72 時間攪拌し、220 mg のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が 15 mL の水に溶解している 0 の溶液に注ぎ入れた。飽和炭酸水素ナトリウムで中和した後、溶液を DEAE Sephadex カラムに装填した。0 ~ 1.2 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、pMe-2PA-cap のテトラエチルアンモニウム塩 (橙色泡状物) を得た。pMe-2PA-cap のテトラエチルアンモニウム塩を 10 mL の水に溶解し、得られた溶液を Strata-X-AW カラムに載せ、10 mL の水、及び 10 mL のメタノールの順で洗浄した。次いで、15 mL の NH₄OH / メタノール / 水 (2 / 25 / 73) で 2-p-メチル-フェニルアゾ cap を溶出させ、回収した溶液を凍結乾燥機で乾燥して、23 mg の pMe-2PA-cap (6b) を得た (収率 44%)。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 7.75 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.4, 2H), 7.05 (d, J = 8.4, 2H), 5.86 (d, J = 2.8, 1H), 5.53 (d, J = 6.0, 1H), 4.43-4.38 (m, 2H), 4.31-4.26 (m, 4H), 4.21-4.16 (m, 2H), 4.10-4.07 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.05 (q, J = 7.2, 18H), 2.18 (s, 3H), 1.13 (t, J = 7.2, 27H)

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 158.0, 153.4, 151.0, 148.8, 147.0, 136.8, 129.9, 123.8, 115.6, 114.7, 90.0, 86.7, 83.7, 75.2, 74.0, 70.3, 68.6, 65.5, 64.1, 46.7, 36.2, 21.0, 8.2

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : -11.71 (d, J = 19.3, 2P), -23.18 (t, J = 19.3, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₈H₃₃N₁₁O₁₈P₃, Calculated: 904.12; Found: 904.16
【0071】

2-m-ジメチル-フェニルアゾ cap (mMe-2PA-cap) (6c)

2-m-ジメチル-フェニルアゾ-7-メチル-グアノシン-リン酸 (5c) (38 mg、0.055 mmol)、及びグアノシンニリン酸イミダゾリド (56 mg、0.11 mmol) が 2 mL の無水 DMF に溶解している溶液に、塩化亜鉛 (44 mg、0.33 mmol) を加えた。得られた反応溶液を室温で 72 時間攪拌し、214 mg のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が 15 mL の水に溶解している 0 の溶液に注ぎ入れた。飽和炭酸水素ナトリウムで中和した後、溶液を DEAE Sephadex カラムに装填した。0 ~ 1.2 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、mMe-2PA-cap のテトラエチルアンモニウム塩 (橙色泡状物) を得た。mMe-2PA-cap のテトラエチルアンモニウム塩を 10 mL の水に溶解し、得られた溶液を Strata-X-AW カラムに載せ、10 mL の水、及び 10 mL のメタノールの順で洗浄した。次いで、15 mL の NH₄OH / メタノール / 水 (2 / 25 / 73) で mMe-2PA-cap を溶出させ、回収した溶液を凍結乾燥機で乾燥して、26 mg の mMe-2PA-cap (6c) を得た (収率 44%)。

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 9.05 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.10 (s, 2H), 6.91 (s, 1H), 5.82 (d, J = 2.8, 1H), 5.47 (d, J = 5.6, 1H), 4.33-4.22 (m, 6H), 4.18-4.13 (m, 2H), 4.09-4.04 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.02 (q, J = 7.2, 18H), 2.05 (s, 6H), 1.10 (t, J = 7.2, 27H);

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 157.9, 153.3, 150.9, 146.8, 139.7, 136.7, 136.0, 121.3, 115.4, 114.6, 90.2, 86.7, 83.5, 75.1, 74.1, 70.3, 68.4, 65.4, 63.9, 46.6, 36.3, 20.2, 8.2;

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : -11.72 (d, J = 18.8, 2P), -23.15 (t, J = 18.8, 1P);

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₉H₃₅N₁₁O₁₈P₃, Calculated: 918.34; Found: 918.32
【0072】

10

20

30

40

50

2 - o - ジメチル - フェニルアゾ cap (o M e - 2 P A - c a p) (6 d)

2 - o - ジメチル - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 d) (21 mg、0.03 mmol)、及びグアノシンニリン酸イミダゾリド (31 mg、0.06 mmol) が 2 mL の無水 DMF に溶解している溶液に、塩化亜鉛 (25 mg、0.12 mmol) を加えた。得られた反応溶液を室温で 72 時間攪拌し、118 mg のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が 8 mL の水に溶解している 0 の溶液に注ぎ入れた。飽和炭酸水素ナトリウムで中和した後、溶液を DEAE Sephadex カラムに装填した。0 ~ 1.2 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、o M e - 2 P A - c a p のテトラエチルアンモニウム塩 (橙色泡状物) を得た。o M e - 2 P A - c a p のテトラエチルアンモニウム塩を 10 mL の水に溶解し、得られた溶液を Strata - X - AW カラムに載せ、10 mL の水、及び 10 mL のメタノールの順で洗浄した。次いで、15 mL の NH₄OH / メタノール / 水 (2 / 25 / 73) で o M e - 2 P A - c a p を溶出させ、回収した溶液を凍結乾燥機で乾燥して、16 mg の o M e - 2 P A - c a p (6 d) を得た (収率 56 %)。

10

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 7.87 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.06-7.03 (m, 1H), 6.95 (d, J = 7.2, 2H), 6.00 (d, J = 3.2, 1H), 5.64 (d, J = 5.6, 1H), 4.51-4.44 (m, 2H), 4.38-4.29 (m, 4H), 4.21-4.16 (m, 2H), 4.12-4.07 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.60 (q, J = 7.2, 18H), 2.20 (s, 6H), 1.14 (t, J = 7.2, 27H)

20

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : -11.73 (d, J = 19.3, 2P), -23.22 (t, J = 19.3, 1P)

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₈H₃₃N₁₁O₁₈P₃, Calculated: 918.14; Found: 918.17
【 0 0 7 3 】

2 - p - エチル - フェニルアゾ cap (p E t - 2 P A - c a p) (6 e)

2 - p - エチル - フェニルアゾ - 7 - メチル - グアノシンーリン酸 (5 e) (76 mg、0.11 mmol)、及びグアノシンニリン酸イミダゾリド (112 mg、0.22 mmol) が 2 mL の無水 DMF に溶解している溶液に、塩化亜鉛 (89 mg、0.66 mmol) を加えた。得られた反応溶液を室温で 72 時間攪拌し、425 mg のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) が 30 mL の水に溶解している 0 の溶液に注ぎ入れた。飽和炭酸水素ナトリウムで中和した後、溶液を DEAE Sephadex カラムに装填した。0 ~ 1.2 M の直線的なグラジエントをかけた TEAB で生成物を溶出させた。生成物を含む画分から溶媒を留去し、真空乾燥して、p E t - 2 P A - c a p のテトラエチルアンモニウム塩 (橙色泡状物) を得た。p E t - 2 P A - c a p のテトラエチルアンモニウム塩を 10 mL の水に溶解し、得られた溶液を Strata - X - AW カラムに載せ、10 mL の水、及び 10 mL のメタノールの順で洗浄した。次いで、15 mL の NH₄OH / メタノール / 水 (2 / 25 / 73) で p E t - 2 P A - c a p を溶出させ、回収した溶液を凍結乾燥機で乾燥して、16 mg の p E t - 2 P A - c a p (6 e) を得た (収率 73 %)。

30

¹H NMR (D₂O, 400 MHz) : 9.00 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.42 (d, J = 8.4, 2H), 7.05 (d, J = 8.4, 2H), 5.83 (d, J = 2.8, 1H), 5.51 (d, J = 6.0, 1H), 4.37 (t, J = 5.6, 1H), 4.33 (dd, J = 4.0, 2.8, 1H), 4.26-4.23 (m, 3H), 4.18-4.11 (m, 2H), 4.07-4.04 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.00 (q, J = 7.2, 18H), 2.43 (q, J = 7.6, 2H), 1.08 (t, J = 7.2, 27H), 1.01 (t, J = 7.6, 3H)

40

¹³C NMR (D₂O, 400 MHz) : 162.5, 161.9, 157.9, 153.4, 151.9, 151.0, 149.0, 147.4, 136.8, 128.6, 123.7, 115.6, 114.4, 89.9, 86.6, 75.1, 74.0, 70.4, 68.4, 65.4, 64.0, 46.6, 36.1, 28.3, 14.2, 8.2

³¹P NMR (D₂O, 162 MHz) : -11.91 (d, J = 20.1, 2P), -23.33 (t, J = 20.1, 1P)

50

ESI-TOF MS [M-H]⁻ for C₂₈H₃₃N₁₁O₁₈P₃, Calculated: 918.14; Found: 918.14

【0074】

2. 光応答性 cap アナログの評価

合成した光応答性 cap アナログについて、水溶液中での光異性化特性を、300 W のキセノンランプを光源として用いて評価した。

【0075】

図2、図3、図4、図5及び図6は、それぞれ、2PA-cap、pMe-2PA-cap、mMe-2PA-cap、oMe-2PA-cap及びpEt-2PA-capのシス体及びトランス体の吸収スペクトルである。2PA-cap、pMe-2PA-cap及びmMe-2PA-capのトランス体、oMe-2PA-cap及びpEt-2PA-capはそれぞれ、310 nm、331 nm、323 nm、339 nm及び337 nmに * 遷移に対応するピークを示し、シス体は416 nm、418 nm及び417 nm、412 nm及び417 nmに n * 遷移に対応するピークを示した。

10

【0076】

図7、図8、図9及び図10は、370 nm又は430 nmの光照射下でのトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。いずれの cap アナログも、およそ2分以内に光平衡状態に到達した。

【0077】

図11、図12、図13、図14及び図15は、光平衡状態におけるトランス体の比率と照射光波長との関係を示すグラフである。トランス体の比率は、370 nmにおいて23% (2PA-cap)、6% (pMe-2PA-cap)、21% (mMe-2PA-cap)、28% (oMe-2PA-cap)、13% (pEt-2PA-cap)と最も小さくなり、430 nmにおいて82% (2PA-cap)、74% (pMe-2PA-cap)、82% (mMe-2PA-cap)、89% (oMe-2PA-cap)、77% (pEt-2PA-cap)と最も大きくなった。ただし、pMe-2PA-capに関しては550 nmの光照射においてもトランス体の比率が27%であった。トランス体の比率は、310 nm (2PA-cap)、331 nm (pMe-2PA-cap)、又は323 nm (mMe-2PA-cap)、339 nm (oMe-2PA-cap)、又は337 nm (pEt-2PA-cap)での吸光度をモニターすることにより求めた(以下でも同様)。

20

30

【0078】

図16、図17及び図18は、370 nm及び430 nmの光を交互に照射したときの可逆的なシス体-トランス体のスイッチングを示すグラフである。2分毎の交互な光照射を40回繰り返したところ、良好な可逆性のシス体-トランス体の光異性化が確認された。

【0079】

図19、図20、図21、図22及び図23は、370 nmで2分間の光照射後の、28.5 におけるトランス体の比率の時間変化を示すグラフである。いずれの光応答性 cap についても、熱異性化の場合、シス体からトランス体への変換が数時間かけて緩慢に進行した。異性化の時定数は2.42時間(2PA-cap)、0.73時間(pMe-2PA-cap)、1.30時間(mMe-2PA-cap)、9.30時間(oMe-2PA-cap)、又は1.89時間(pEt-2PA-cap)であった。この結果から、光照射を継続することなく、シス体又はトランス体の比率が高い状態を長時間維持できることが確認された。

40

【0080】

3. mRNAの翻訳制御

3-1. テンプレートDNAの合成

T7プロモータを5'に含む黄色蛍光タンパク質であるvenus、及びnordal関連タンパク質であるsquintのテンプレートDNAと、グロビンの3'-UTR配列を、pCS2-venus又はpCS2-squintから、2段階のPCRで調製した

50

。第1段階ではvenus順方向プライマー（配列番号1）、venus逆方向プライマー（配列番号2）、squint順方向プライマー（配列番号3）、及びsquint逆方向プライマー（配列番号4）を用いた。第2段階では順方向プライマー（配列番号5）及び逆方向プライマー（配列番号6）をvenus及びsquintの両方に用いた。1x反応バッファー、300ngのプラスミド、200mMのdNTPs、1mMのMgSO₄、6μLのKOD-plus-DNAポリメラーゼ（東洋紡製）、及び3mMのプライマーを含む、全体積300mLの反応溶液を、35サイクルの増幅に供した。PCRの条件を以下のように設定した。

変性：98 で2分間

アニーリング：58 で3秒冷却

伸長反応：68 で60秒間の加熱

反応後、生成物をWizard SV Gel及びPCR Clean-upシステム（プロメガ製）を用いて精製した。

【0081】

3-2. 光応答性capを導入したmRNAの調製

in vitroでのRNA転写を、MEGAscript（登録商標）キット（Ambion社製）を用いて行った。1x反応バッファーと、0.5mgのテンプレートDNAと、それぞれ6mMのATP、CTP及びUTPと、1.2mMのGTPと、4.8mM capアナログと、50U/mLのT7 RNAポリメラーゼとを含む反応液（全体積20mL）を、37 で4時間インキュベートした。残存したDNAの加水分解のため、1mLのturbo DNAaseを反応液に加え、更に反応液を37 で15分インキュベートした。合成したmRNAを、ポリ(A)テーリングキット（Ambion製）を用いてポリアデニル化した。mRNA、1x反応バッファー、1mMのATP、2.5mMのMnCl₂、及び4mL（2U/mL）のE-PAPを含む反応液（全体積100mL）を37 で1時間インキュベートした。MEGAclear（登録商標）キット（Ambion社製）を用いて、5'キャップ構造として光応答性capが導入されたmRNAを反応液から精製した。

【0082】

3-3. ゼブラフィッシュ胚中でのmRNA翻訳

(1) 光応答性の検討

squintタンパク質に対応する配列を含み光応答性capが導入されたmRNA（5pg）、及びvenusタンパク質に対応する配列を含み光応答性capが導入されたmRNA（25pg）の混合物を、FemtoJet（ependorf社製）を用いて1細胞期のゼブラフィッシュ胚の細胞質に導入した。mRNAを導入した胚を0.01%のカナマイシン及びペニシリン/ステレオマイシンを含むリンゲル液中、28.5 で培養した。胚への導入の前に、光応答性capを導入したmRNAに対して430nmの光を照射し、トランス体が優勢な状態とした。また、capを導入していないmRNA、又は正常capを導入したmRNAも同様にゼブラフィッシュ胚に導入した。

【0083】

培養中、メタルハライドランプを光源とする370nmの光を、1時間毎に2分間、共焦点顕微鏡の視野内で胚に照射した。発現したvenusタンパク質による蛍光が観察されたことから、370nmで優勢となるシス体のcapを有するmRNAによる翻訳が進行したことが確認された。一方、培養中に370nmの光照射を行わなかった場合、トランス体が優勢な状態が維持され、venusタンパク質による蛍光がほとんど観察されなかった。図24は、培養中24hpfの時点でのシス体又はトランス体が優勢なゼブラフィッシュ胚からの蛍光強度を示すグラフである。シス体はトランス体と比較して明らかに多くのタンパク質を発現させており、光応答性capのシス体/トランス体の変換により、mRNA翻訳によるタンパク質発現が制御できることが確認された。ただし、oMe-2PA-capだけ、トランス体のときにタンパク質発現をより促進した。特に、2PA-cap又はmMe-2PA-capを導入したmRNAの場合、正常capの場合に近

10

20

30

40

50

いレベルでタンパク質が発現した。

【 0 0 8 4 】

(2) 光照射に基づく体軸形成制御

m M e - 2 P A - c a p を導入した m R N A を上記と同様にゼブラフィッシュ胚に導入し、培養を行った。培養中、8細胞期から50%エビボリー期(5.5 h p f)までの間、370 nmの光を1時間毎に2分間照射した。6 h p fにおいて430 nmの光を胚全体に照射した。その結果、24 h p fの時点で、発現した s q u i n t タンパク質の作用によって形成された完全な頭部を伴う2個目の体軸が観察された。完全な2個目の頭部を有する胚の割合は、全培養胚のうち12% (8 / 8 8)、2個目の体軸を発現した胚のうち73% (8 / 1 1)であった。また、(6 h p f)においてトランス体を優勢にする430 nmの光を照射しなかった場合、完全な2個目の頭部を有する胚の割合は、全培養胚のうち16% (1 1 / 7 0)、2個目の体軸を発現した胚のうち92% (1 1 / 1 2)であった。この結果から、s q u i n t タンパク質は、発生初期段階では体軸の形成を誘起するが、より後期の段階では頭部の発達を阻害することが示唆される。このように、所定の期間のみ短時間の光照射を行うことで、細胞の損傷を抑制しながらタンパク質の産生を制御することができた。

10

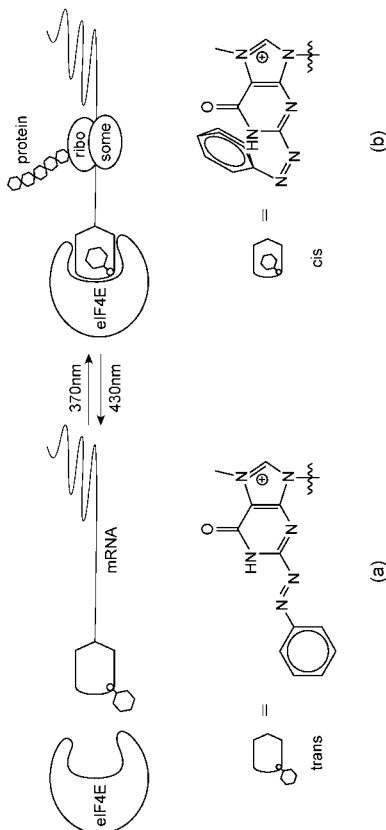
【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 8 5 】

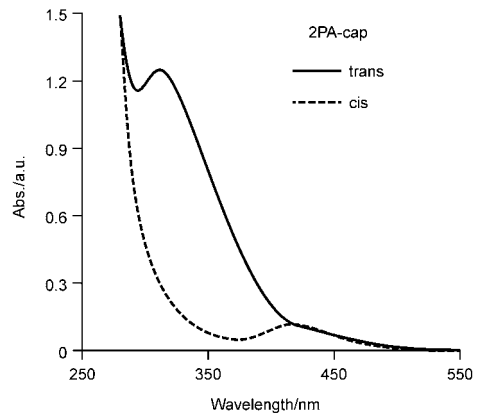
本発明に係るプリンヌクレオシド誘導体を利用して、タンパク質の生産、又は核酸機能などの各種の生体内で発現される機能を光制御することができる。例えば非特許文献1に記載されるような、核酸の二本鎖形成、リボザイムの触媒機能発現などの各種の核酸機能の光制御への応用が期待できる。また、本発明に係るプリンヌクレオシド誘導体は、ゲノム編集の光制御にも利用可能である。

20

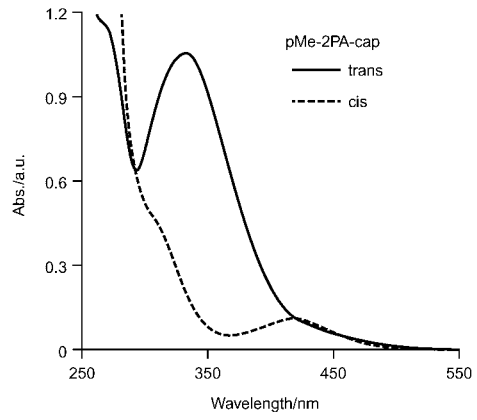
【 図 1 】



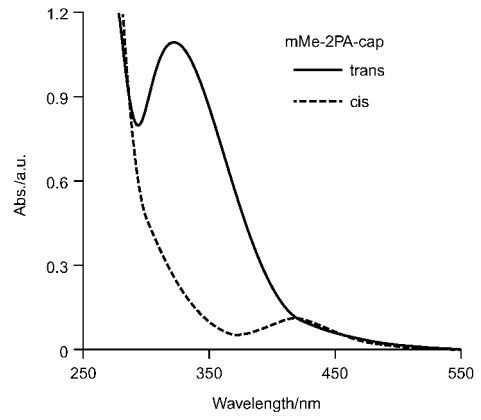
【 図 2 】



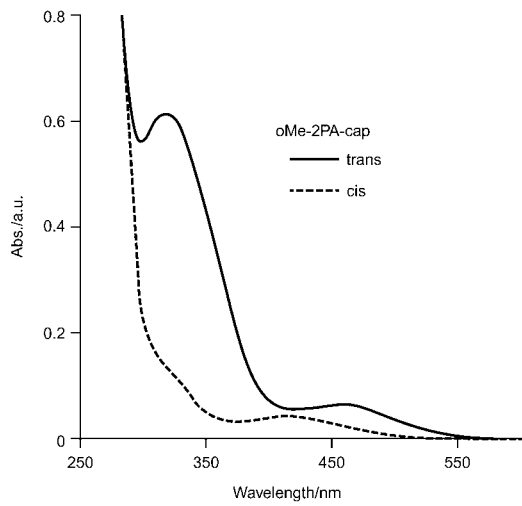
【 図 3 】



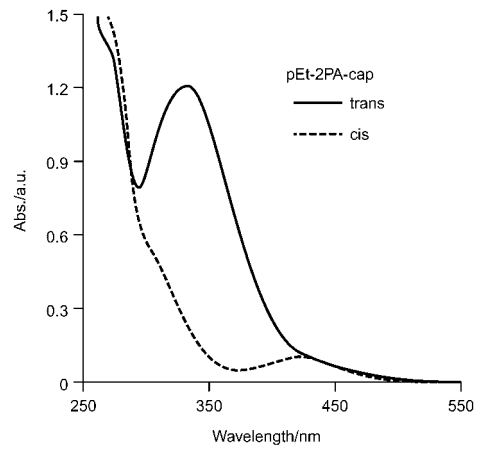
【 図 4 】



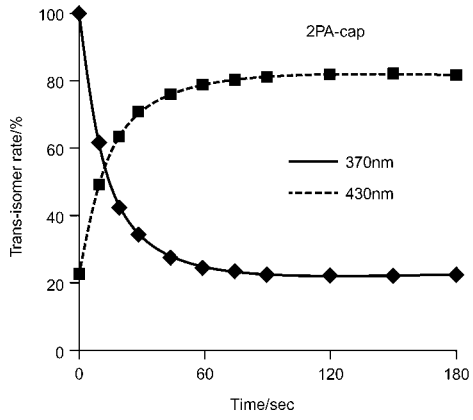
【 図 5 】



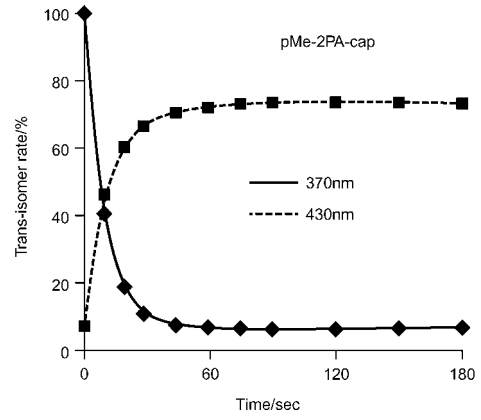
【 図 6 】



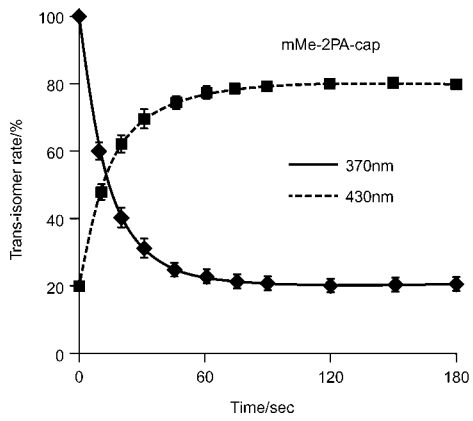
【 図 7 】



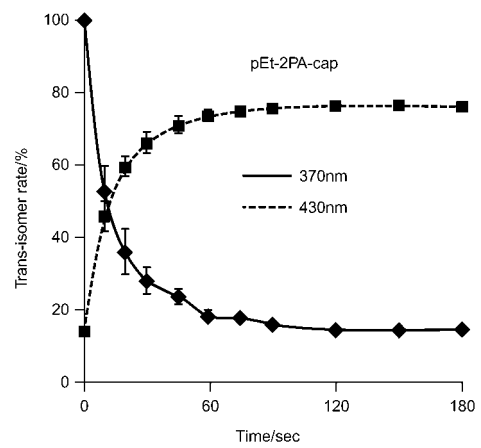
【 図 8 】



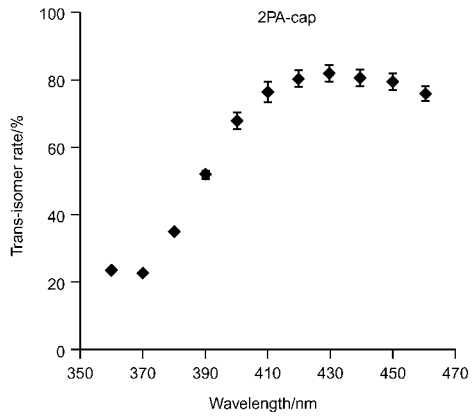
【 図 9 】



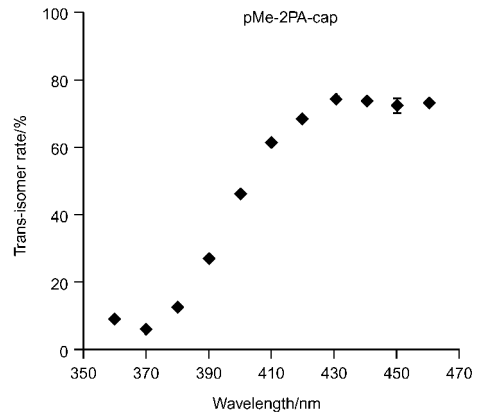
【 図 10 】



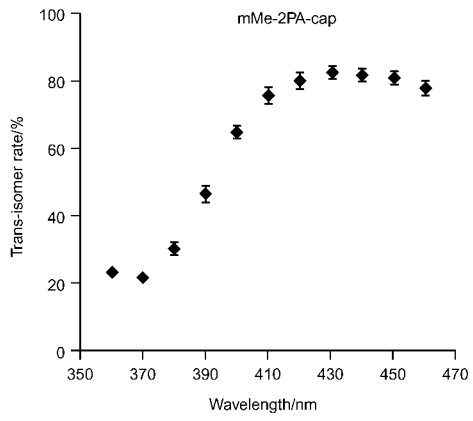
【 図 1 1 】



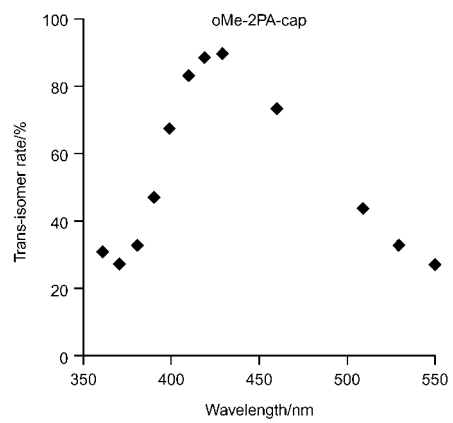
【 図 1 2 】



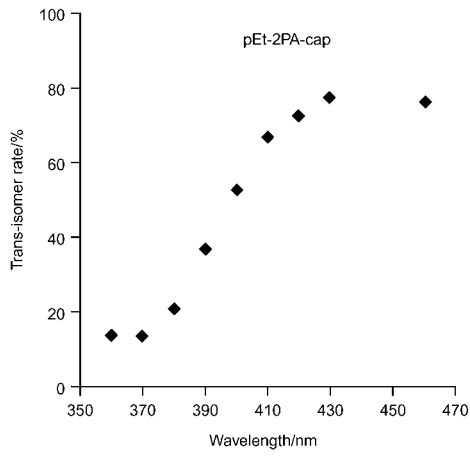
【 図 1 3 】



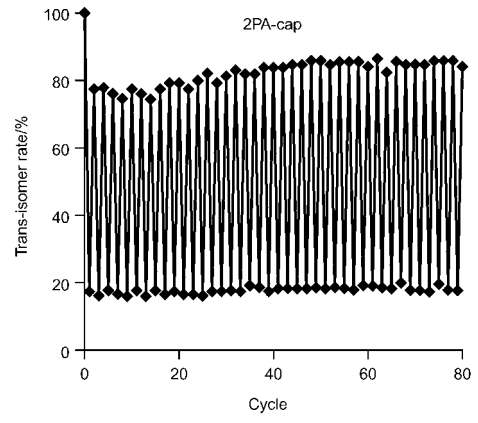
【 図 1 4 】



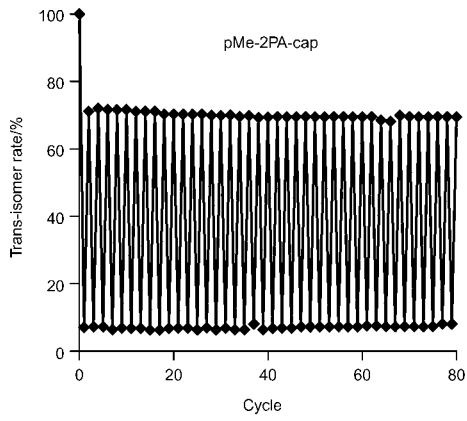
【 図 1 5 】



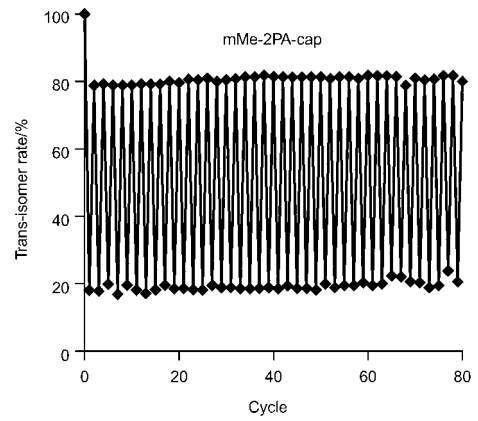
【 図 1 6 】



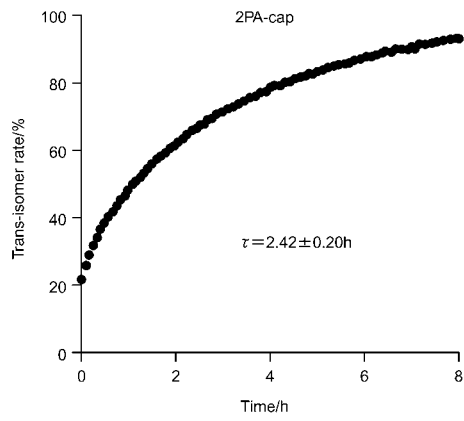
【 図 1 7 】



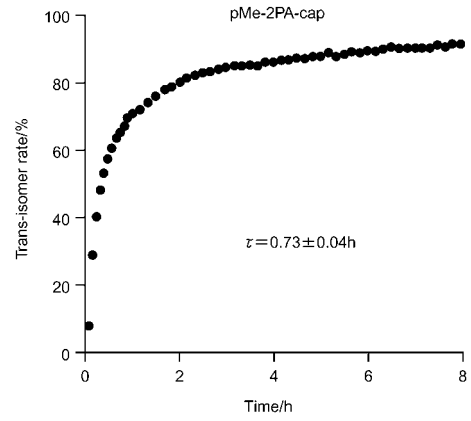
【 図 1 8 】



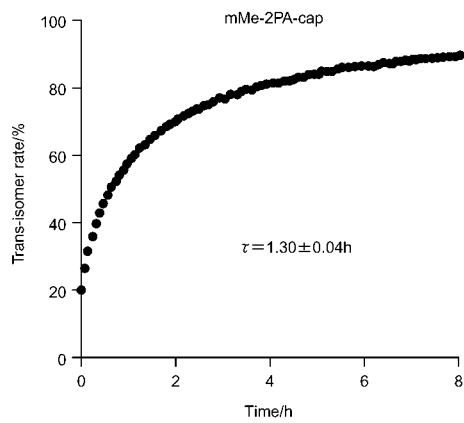
【 図 1 9 】



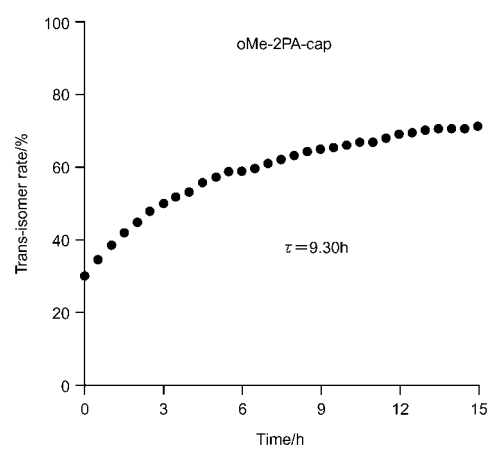
【 図 2 0 】



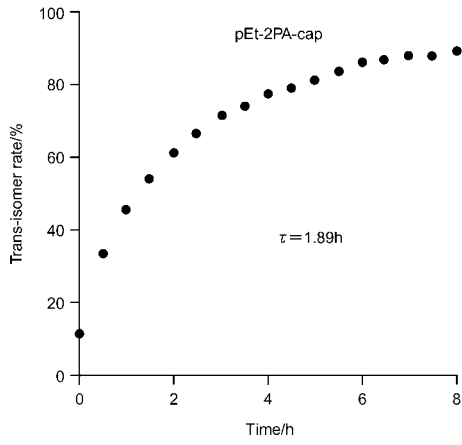
【 図 2 1 】



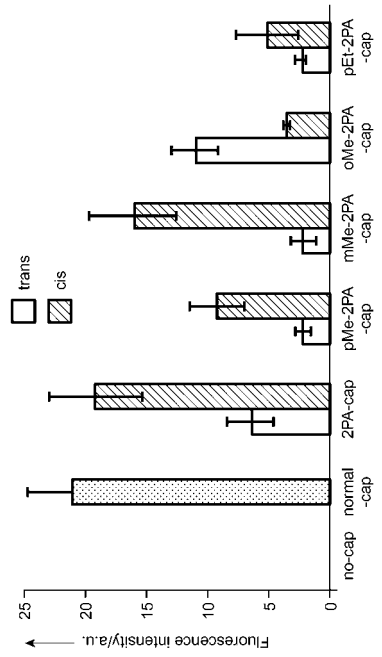
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 配列表 】

2018047909000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/032310
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07H19/207(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07H19/207, C07H21/02, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-59293 A (Yamasa Corp.), 04 March 1997 (04.03.1997), example 3 (Family: none)	1
X	JP 2008-516938 A (Astra Zeneca AB.), 22 May 2008 (22.05.2008), example 119 & US 2009/0048203 A1 & WO 2006/040558 A1 example 119 & EP 1805196 A1 & CN 101072787 A	1
X	LI, L. et al, Silica-based helical rod supporting guanosine compounds catalyzed asymmetric hetero-Diels-Alder reaction, Catalysis Communications, 2015, Vol.64, pp.6-11	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 October 2017 (03.10.17)		Date of mailing of the international search report 24 October 2017 (24.10.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/032310

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUTTAPPAN-NAIR, V. et al, Generation of 2'-Deoxyadenosine N6-Aminyl Radicals from the Photolysis of Phenylhydrazone Derivatives, Chemical Research in Toxicology, 2010, Vol.23, No.1, pp.48-54	1
X	HATCHER, J.F. et al, Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-azobiphenyl by 32P-postlabeling analyses of DNA in human uroepithelial cells exposed to proximate metabolites of the environmental carcinogen 4-aminobiphenyl, Environmental and Molecular Mutagenesis, 2002, Vol.39, No.4, pp.314-322	1
X	BOEGE, N. et al, First route to phosphoramidites of N2-hydrazinoaryl- and N2-azoaryl-dG adducts and their site-selective incorporation into DNA oligonucleotides, Synlett, 2008, No.7, pp.1066-1070	1
X	WANNER, M.J. et al, Synthesis and properties of 2-nitrosoadenosine, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 2001, No.16, pp.1908-1915	1
X	KATO, K. et al, A New Entry to 2-Substituted Purine Nucleosides Based on Lithiation-Mediated Stannyl Transfer of 6-Chloropurine Nucleosides, Journal of Organic Chemistry, 1997, Vol.62, No.20, pp.6833-6841	1
X	WONG, C.G. et al, Inhibitors of inosinic acid dehydrogenase. 2-Substituted inosinic acids, Journal of Medicinal Chemistry, 1984, Vol.27, No.4, pp.429-432	1
A	JP 2011-207863 A (Riken, Japan), 20 October 2011 (20.10.2011), entire text & US 2013/0052710 A1 & WO 2011/111501 A1	1-5
A	JP 2009-126789 A (Japan Advanced Institute of Science and Technology), 11 June 2009 (11.06.2009), entire text & US 2010/0298530 A1 & WO 2009/066642 A1	1-5
A	WO 2014/034934 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 06 March 2014 (06.03.2014), production methods 4 to 6; table 6 & US 2014/0330004 A1 & EP 2891717 A1	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/032310

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2017/066782 A1 (MODERNATX, INC.), 20 April 2017 (20.04.2017), claims; Schemes 1, 2; examples (Family: none)	1-5
P,X	OGASAWARA, S., Duration control of protein expression in vivo by light-mediated reversible activation of translation, ACS Chemical Biology, 2017.02, Vol.12, No.2, pp.351-356	1-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 2 3 1 0									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07H19/207(2006.01)i, C07H21/02(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07H19/207, C07H21/02, C12N15/09											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Caplus/REGISTRY (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X	JP 9-59293 A (ヤマサ醤油株式会社) 1997.03.04, 実施例3 (ファミリーなし)	1									
X	JP 2008-516938 A (アストラゼネカ アクチボラグ) 2008.05.22, 実施例119 & US 2009/0048203 A1 & WO 2006/040558 A1; Exapmle 119 & EP 1805196 A1 & CN 101072787 A	1									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 03.10.2017		国際調査報告の発送日 24.10.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三上 晶子 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4 P 4042								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 2 3 1 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	LI, L. et al, Silica-based helical rod supporting guanosine compounds catalyzed asymmetric hetero-Diels-Alder reaction, Catalysis Communications, 2015, Vol. 64, pp. 6-11	1
X	KUTTAPPAN-NAIR, V. et al, Generation of 2'-Deoxyadenosine N6-Aminyl Radicals from the Photolysis of Phenylhydrazone Derivatives, Chemical Research in Toxicology, 2010, Vol. 23, No. 1, pp. 48-54	1
X	HATCHER, J. F. et al, Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-azobiphenyl by 32P-postlabeling analyses of DNA in human uroepithelial cells exposed to proximate metabolites of the environmental carcinogen 4-aminobiphenyl, Environmental and Molecular Mutagenesis, 2002, Vol. 39, No. 4, pp. 314-322	1
X	BOEGE, N. et al, First route to phosphoramidites of N2-hydrazinoaryl- and N2-azoaryl-dG adducts and their site-selective incorporation into DNA oligonucleotides, Synlett, 2008, No. 7, pp. 1066-1070	1
X	WANNER, M. J. et al, Synthesis and properties of 2-nitrosoadenosine, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 2001, No. 16, pp. 1908-1915	1
X	KATO, K. et al, A New Entry to 2-Substituted Purine Nucleosides Based on Lithiation-Mediated Stannyl Transfer of 6-Chloropurine Nucleosides, Journal of Organic Chemistry, 1997, Vol. 62, No. 20, pp. 6833-6841	1
X	WONG, C. G. et al, Inhibitors of inosinic acid dehydrogenase. 2-Substituted inosinic acids, Journal of Medicinal Chemistry, 1984, Vol. 27, No. 4, pp. 429-432	1
A	JP 2011-207863 A (独立行政法人理化学研究所) 2011. 10. 20, 全文 & US 2013/0052710 A1 & WO 2011/111501 A1	1-5
A	JP 2009-126789 A (国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学) 2009. 06. 11, 全文 & US 2010/0298530 A1 & WO 2009/066642 A1	1-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 2 3 1 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2014/034934 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2014.03.06, 製造法 4-6、表 6 & US 2014/0330004 A1 & EP 2891717 A1	1-5
P, X	WO 2017/066782 A1 (MODERNATX, INC.) 2017.04.20, claims, Scheme 1, 2, Example (ファミリーなし)	1-5
P, X	OGASAWARA, S., Duration control of protein expression in vivo by light-mediated reversible activation of translation, ACS Chemical Biology, 2017.02, Vol.12, No.2, pp.351-356	1-5

フロントページの続き

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

(出願人による申告)平成27年度、国立研究開発法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業(さきがけ)「光で細胞内現象を完全再現する超精密タンパク質発現操技術の開発と応用」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。