

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-546954

(P2024-546954A)

(43)公表日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全280頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2024-535970(P2024-535970)	(71)出願人	517271175
(86)(22)出願日	令和4年12月15日(2022.12.15)		メイラグティーエックス ユーケー アイ
(85)翻訳文提出日	令和6年8月9日(2024.8.9)		アイ リミティド
(86)国際出願番号	PCT/IB2022/000762		イギリス国, ロンドン エヌ1 7エヌキ
(87)国際公開番号	WO2023/111686		ュー, ブリタニア ウォーク 9 2
(87)国際公開日	令和5年6月22日(2023.6.22)	(74)代理人	100099759
(31)優先権主張番号	63/361,400		弁理士 青木 篤
(32)優先日	令和3年12月15日(2021.12.15)	(74)代理人	100123582
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 三橋 真二
(81)指定国・地域	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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74)代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
		(74)代理人	100138210
			弁理士 池田 達則
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アプタマー及び小分子リガンド

(57)【要約】

本開示は、ある特定の小分子に結合するアプタマーを提供する。標的遺伝子の発現を調節するためのリボスイッチ及びポリヌクレオチドカセットも企図され、ここで、ポリヌクレオチドカセットは本明細書に開示されるアプタマーを含む。本明細書に開示されるアプタマーに結合し、かつ標的遺伝子発現のモジュレーターである小分子が更に提供され、ここで、標的遺伝子は本明細書に記載のアプタマーを含むリボスイッチを含む。

【選択図】 図 1 a

Figure 1a

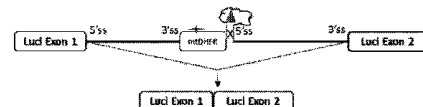
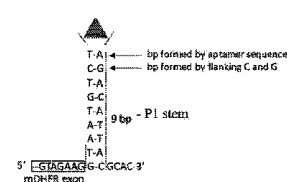


Figure 1b



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G X₁
X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T X₁₃
X₁₄ X₁₅ C C G G X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ C C G G X₂₂ X₂₃ C A G G
G A G (配列番号 2) を含み、ここで、

X₁ が、C または T であり、

X₂ が、任意のヌクレオチドであり、

X₃ が、任意のヌクレオチドであり、

X₄ が、G または T であり、

X₅ が、A、G、または T であり、

X₆ が、A または G であり、

X₇ が、A または T であり、

X₈ が、A、C、または T であり、

X₉ が、A、C、または T であり、

X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂ が、A であり、

X₁₃ が、A、C、または G であり、

X₁₄ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₅ が、C、G、または T であり、

X₁₆ が、G または T であり、

X₁₇ が、A または T であり、

X₁₈ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₉ が、A または G であり、

X₂₀ が、A、G、T であり、

X₂₁ が、C、G、T であり、

X₂₂ が、T であり、

X₂₃ が、A、G、または T である、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 2】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T G A T C C G G A
T C A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 4) を含み、ここで、

X₇ が、A、G、または T であり、

X₈ が、任意のヌクレオチドであり、

X₉ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂ が、A、C、または T である、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 3】

前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T G A T C C G G A

T C A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 4) を含み、ここで、
X₇ が、A または T であり、
X₈ が、A、C、または T であり、
X₉ が、A、C、または T であり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、A である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 4】

前記アプタマーをコードする配列が、
C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A 10
A T C G A C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T G A T C C G G A
T C A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 4) を含み、ここで、
X₇ が、A であり、
X₈ が、A、C、または T であり、
X₉ が、A、C、または T であり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、A である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 5】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G X₁
X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G A T C
A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 3) を含み、ここで、
X₁ が、C、G、または T であり、
X₂ が、任意のヌクレオチドであり、
X₃ が、任意のヌクレオチドであり、
X₄ が、任意のヌクレオチドであり、
X₅ が、任意のヌクレオチドであり、
X₆ が、任意のヌクレオチドである、前記ポリヌクレオチドカセット。 30

【請求項 6】

前記アプタマーをコードする配列が、
C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G X₁
X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G A T C
A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 3) を含み、ここで、
X₁ が、C または T であり、
X₂ が、任意のヌクレオチドであり、
X₃ が、任意のヌクレオチドであり、
X₄ が、任意のヌクレオチドであり、
X₅ が、A、G、または T であり、
X₆ が、任意のヌクレオチドである、請求項 5 に記載のポリヌクレオチドカセット。 40

【請求項 7】

前記アプタマーをコードする配列が、
C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G X₁
X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G A T C
A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 3) を含み、ここで、
X₁ が、C または T であり、
X₂ が、任意のヌクレオチドであり、
X₃ が、任意のヌクレオチドであり、 50

X₄ が、G または T であり、

X₅ が、A、G、または T であり、

X₆ が、A または G である、請求項 5 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 8】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAGCA
ATCGACCATCGACCCCATTTGCACCTX₁₃X₁₄X₁₅CCGGATC
ATGCCGGX₂₂X₂₃CAGGGAG (配列番号 5) を含み、ここで、

X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及び X₂₃ が、任意のヌクレオチドである、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 9】

前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAGCA
ATCGACCATCGACCCCATTTGCACCTX₁₃X₁₄X₁₅CCGGATC
ATGCCGGX₂₂X₂₃CAGGGAG (配列番号 5) を含み、ここで、

X₁₃ が、A、C、または G であり、

X₁₄ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₅ が、C、G、または T であり、

X₂₂ が、T であり、

X₂₃ が、A、G、または T である、請求項 8 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 10】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAGCA
ATCGACCATCGACCCCATTTGCACCTGATCCGGX₁₆X₁₇X₁₈
X₁₉X₂₀X₂₁CCGGCGCAGGGAG (配列番号 6) を含み、ここで、

X₁₆ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₇ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₈ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₉ が、任意のヌクレオチドであり、

X₂₀ が、任意のヌクレオチドであり、

X₂₁ が、C、G、T である、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 11】

前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAGCA
ATCGACCATCGACCCCATTTGCACCTGATCCGGX₁₆X₁₇X₁₈
X₁₉X₂₀X₂₁CCGGCGCAGGGAG (配列番号 6) を含み、ここで、

X₁₆ が、G または T であり、

X₁₇ が、A または T であり、

X₁₈ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₉ が、A または G であり、

X₂₀ が、A、G、T であり、

X₂₁ が、C、G、T である、請求項 10 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 12】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 1 及び 7～558 からなる群から選択される配列と少

10

20

30

40

50

なくとも 95% 同一であるか、または少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 13】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 1 及び 7～558 からなる群から選択される、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 14】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 7～17、89～96、174～349、及び 358～583 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一であるか、または少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 15】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーコードが、配列番号 7～17、89～96、174～349、及び 358～583 からなる群から選択される配列である、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 16】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 7～11、89～94、174～349、及び 358～447 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一であるか、または少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 17】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 7～11、89～94、174～349、及び 358～447 からなる群から選択される、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 18】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 174、358、363、及び 378 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一であるか、または少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 19】

標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 174、358、363、及び 378 からなる群から選択される、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 20】

アプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGA G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G X₁
X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T X₁₃
X₁₄ X₁₅ C C G G X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ C C G G X₂₂ X₂₃ C A G G
G A G (配列番号 2) を含み、ここで、

X₁ が、C または T であり、

X₂ が、任意のヌクレオチドであり、

X₃ が、任意のヌクレオチドであり、

X₄ が、G または T であり、

X₅ が、A、G、またはTであり、
X₆ が、AまたはGであり、
X₇ が、Aであり、
X₈ が、A、C、またはTであり、
X₉ が、A、C、またはTであり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、Aであり、
X₁₃ が、A、C、またはGであり、
X₁₄ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₅ が、C、G、またはTであり、
X₁₆ が、GまたはTであり、
X₁₇ が、AまたはTであり、
X₁₈ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₉ が、AまたはGであり、
X₂₀ が、A、G、Tであり、
X₂₁ が、C、G、Tであり、
X₂₂ が、Tであり、
X₂₃ が、A、G、またはTである、前記核酸配列。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

アダマーをコードする核酸配列であって、前記アダマーをコードする配列が、
C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T G A T C C G G A
T C A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 4) を含み、ここで、

X₇ が、A、G、またはTであり、
X₈ が、任意のヌクレオチドであり、
X₉ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、A、C、またはTであり、
ここで、X₇ ~ X₁₂ が、それぞれ、同時に A、T、T、G、C、及び A ではない、前記核酸配列。

【請求項 2 2】

前記アダマーをコードする配列が、
C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T G A T C C G G A
T C A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 4) を含み、ここで、

X₇ が、AまたはTであり、
X₈ が、A、C、またはTであり、
X₉ が、A、C、またはTであり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、Aであり、
ここで、X₇ ~ X₁₂ が、それぞれ、同時に A、T、T、G、C、及び A ではない、請求項 2 1 に記載の核酸配列。

【請求項 2 3】

前記アダマーをコードする配列が、
C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T G A T C C G G A
T C A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号 4) を含み、ここで、

X₇ が、A であり、

X₈ が、A、C、または T であり、

X₉ が、A、C、または T であり、

X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂ が、A であり、

ここで、X₇ ~ X₁₂ が、それぞれ、同時に A、T、T、G、C、及び A ではない、請求項 2 1 に記載の核酸配列。

【請求項 2 4】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGAAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATC
ATGCCGGCGCGCAGGGAG (配列番号 3) を含み、ここで、

X₁ が、C、G、または T であり、

X₂ が、任意のヌクレオチドであり、

X₃ が、任意のヌクレオチドであり、

X₄ が、任意のヌクレオチドであり、

X₅ が、任意のヌクレオチドであり、

X₆ が、任意のヌクレオチドであり、

ここで、X₁ ~ X₆ が、それぞれ、同時に C、A、T、C、G、及び A ではない、前記核酸配列。

【請求項 2 5】

前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGAAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATC
ATGCCGGCGCGCAGGGAG (配列番号 3) を含み、ここで、

X₁ が、C または T であり、

X₂ が、任意のヌクレオチドであり、

X₃ が、任意のヌクレオチドであり、

X₄ が、任意のヌクレオチドであり、

X₅ が、A、G、または T であり、

X₆ が、任意のヌクレオチドであり、

ここで、X₁ ~ X₆ が、それぞれ、同時に C、A、T、C、G、及び A ではない、請求項 1 5 に記載の核酸配列。

【請求項 2 6】

前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGAAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATC
ATGCCGGCGCGCAGGGAG (配列番号 3) を含み、ここで、

X₁ が、C または T であり、

X₂ が、任意のヌクレオチドであり、

X₃ が、任意のヌクレオチドであり、

X₄ が、G または T であり、

X₅ が、A、G、または T であり、

X₆ が、A または G である、請求項 1 5 に記載の核酸配列。

【請求項 2 7】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGAAAGCA

10

20

30

40

50

A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T X₁₃ X₁₄ X₁₅ C C G G A T C
A T G C C G G X₂₂ X₂₃ C A G G G A G (配列番号5) を含み、ここで、

X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及びX₂₃が、任意のヌクレオチドであり、
ここで、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及びX₂₃が、それぞれ、同時にG、A、T、
C、及びGではない、前記核酸配列。

【請求項28】

前記アプタマーをコードする配列が、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T X₁₃ X₁₄ X₁₅ C C G G A T C
A T G C C G G X₂₂ X₂₃ C A G G G A G (配列番号5) を含み、ここで、

10

X₁₃が、A、C、またはGであり、
X₁₄が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₅が、C、G、またはTであり、
X₂₂が、Tであり、
X₂₃が、A、G、またはTである、請求項21に記載の核酸配列。

【請求項29】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコード
する配列が、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G X₁₆ X₁₇ X₁₈
X₁₉ X₂₀ X₂₁ C C G G C G C A G G G A G (配列番号6) を含み、ここで、

20

X₁₆が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₇が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₈が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₉が、任意のヌクレオチドであり、
X₂₀が、任意のヌクレオチドであり、
X₂₁が、C、G、Tであり、
ここで、X₁₆～X₂₁が、それぞれ、同時にA、T、C、A、T、及びGではない、
前記核酸配列。

【請求項30】

30

前記アプタマーをコードする配列が、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G X₁₆ X₁₇ X₁₈
X₁₉ X₂₀ X₂₁ C C G G C G C A G G G A G (配列番号6) を含み、ここで、

X₁₆が、GまたはTであり、
X₁₇が、AまたはTであり、
X₁₈が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₉が、AまたはGであり、
X₂₀が、A、G、Tであり、
X₂₁が、C、G、Tである、請求項23に記載の核酸配列。

40

【請求項31】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコード
する配列が、配列番号1及び7～558からなる群から選択される配列と少なくとも95
%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む、前記核酸配列。

【請求項32】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコード
する配列が、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコ
ードする配列が、配列番号1及び7～558からなる群から選択される、前記核酸配列。

【請求項33】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコード

50

する配列が、配列番号 7～17、89～96、174～349、及び 358～583 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一であるか、または少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記核酸配列。

【請求項 34】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーコードが、配列番号 7～17、89～96、174～349、及び 358～583 からなる群から選択される配列である、前記核酸配列。

【請求項 35】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 7～11、89～94、174～349、及び 358～447 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一であるか、または少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記核酸配列。

【請求項 36】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 7～11、89～94、174～349、及び 358～447 からなる群から選択される、前記核酸配列。

【請求項 37】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 174、358、363、及び 378 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一であるか、または少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記核酸配列。

【請求項 38】

小分子に結合するアプタマーをコードする核酸配列であって、前記アプタマーをコードする配列が、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 174、358、363、及び 378 からなる群から選択される、前記核酸配列。

【請求項 39】

小分子に応答して標的遺伝子の発現を調節するための組換えリボスイッチをコードする核酸配列であって、前記リボスイッチが、配列番号 1 及び 7～558 によってコードされるアプタマー、または配列番号 1 及び 7～558 と少なくとも 95% もしくは少なくとも 99% 同一である配列を含む、前記核酸配列。

【請求項 40】

小分子に応答して標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットであって、前記ポリヌクレオチドカセットが、

(c) リボスイッチと、

(d) 5'イントロン及び 3'イントロンに隣接する、選択的にスプライシングされたエクソンと、を含み、

前記リボスイッチが、(i) 前記 3'イントロンの 5'スプライス部位配列を含むステムを含むエフェクター領域と、(ii) 配列番号 1 及び 7～558 の配列、または配列番号 1 及び 7～558 と少なくとも 95% もしくは少なくとも 99% 同一である配列を含むアプタマーとを含み、

前記選択的にスプライシングされたエクソンが、前記選択的にスプライシングされたエクソンが前記標的遺伝子の mRNA へとスプライシングされたときに前記標的遺伝子とインフレームになる終止コドンを含む、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 41】

前記ポリヌクレオチドカセットが、前記標的遺伝子のタンパク質コード配列に位置する、請求項 40 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 42】

10

20

30

40

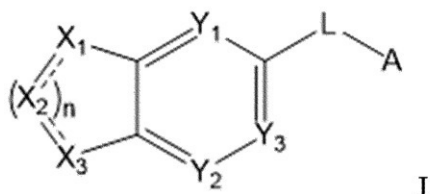
50

前記ポリヌクレオチドカセットが、前記標的遺伝子の非翻訳領域または前記標的遺伝子のイントロンに位置する、請求項 40 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 43】

前記アダプターが、式 I に従う構造であって、

【化 1】



10

式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 が、各事例において、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、ここで、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同時に O または S であるように選択されず、

破線が、任意選択の二重結合を表し、

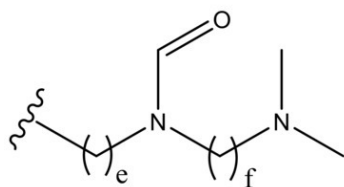
Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 が、各事例において、独立して、 CR_2 及び N から選択され、

n が、1 または 2 であり、ここで、 n が 1 である場合、破線の一つのみが二重結合であり、

20

$L-A$ が、

【化 2】



30

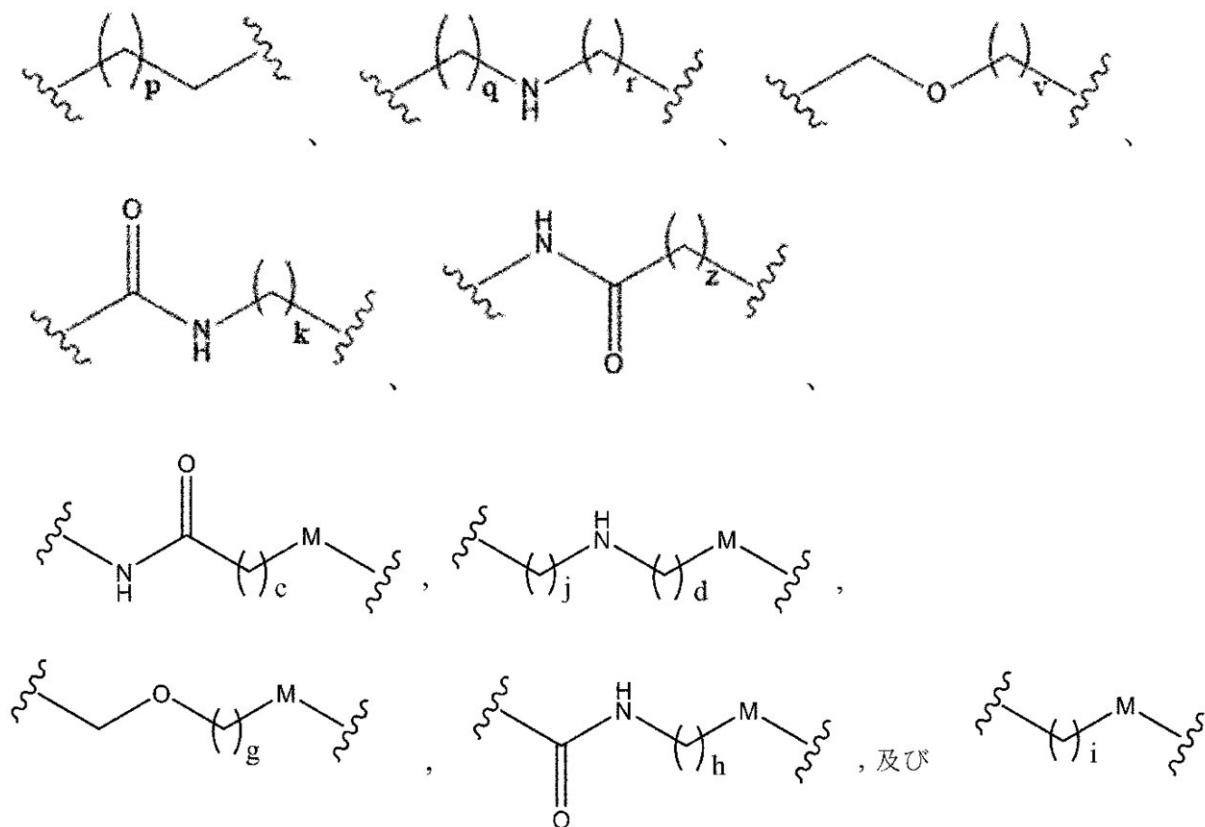
であるか、または

L が、

40

50

【化 3】



10

20

から選択され、

式中、 k 、 p 、 q 、 r 、及び v が独立して、整数 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、 z が、整数 1、2、3、4、及び 5 から選択され、

c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、及び i が独立して、整数 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、 j が、整数 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

30

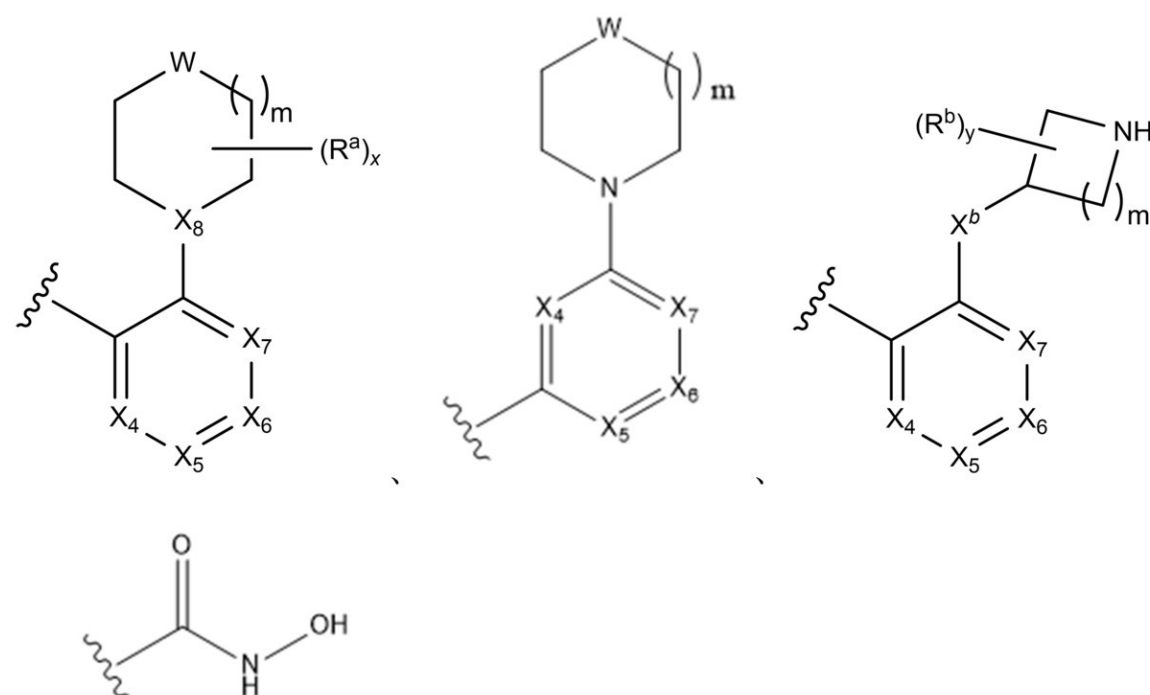
M が、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NH-$ 、 $-S-$ 、及び $-C(=O)-$ から選択され、

A が、

40

50

【化 4】



10

20

及び

から選択され、

式中、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 が独立して、 CR_3 及び N から選択され、 X_8 が、 N または CH であり、 X^b が、 O 、 NH 、及び NCH_3 から選択され、

ここで、 R_1 、 R_2 、及び R_3 が各々独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-N$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル) $_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-CO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-O$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-OCO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-NCO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-CONH$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、及び置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

30

それに加えて、またはその代替として、隣接する環位置上の2個の R_3 が一緒になって、 O 、 S 、 N 、及び NH から選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、

 m が、1または2であり、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^a がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^a が、 O 及び NH から選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

40

 x が、0、1、2または3であり、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^b がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^b が、 O 及び NH から選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

 y が、0、1、2または3であり、

W が、 O または NR_4 であり、ここで、 R_4 が、 $-H$ 、 $-CO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換または非置換アリール、置換または

50

非置換ヘテロアリール、置換または非置換シクロアルキル、 $-CO$ （アリール）、 $-CO$ （ヘテロアリール）、及び $-CO$ （シクロアルキル）から選択されるが、

但し、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 のうちの少なくとも2個がNであることを条件とする、前記構造、

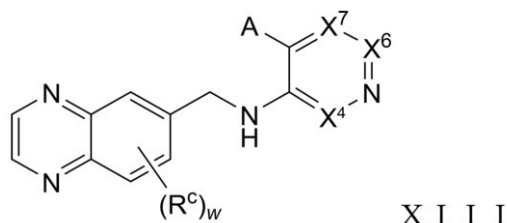
またはその薬学的に許容される塩を有する小分子に結合するか、または別様にその存在に応答する、請求項1～19及び40～42のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドカセット、または請求項20～39のいずれか1項に記載の核酸配列。

【請求項44】

前記小分子が、式XIIIに従う構造、

【化5】

10



またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

X^4 が、 CH 、 CR^d 、及びNから選択され、

20

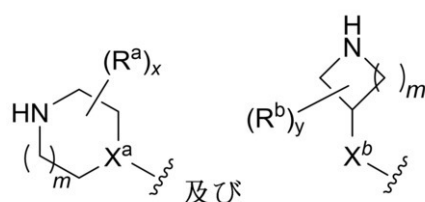
X^6 が、 CH 、 CR^d 、及びNから選択され、

X^7 が、 CH 、 CR^d 、及びNから選択され、

ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの0個または1個がNであり、

Aが、

【化6】



30

からなる群から選択され、

X^a が、N及び CH から選択され、

X^b が、O、NH、及び NCH_3 から選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^a がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^a が、O及びNHから選択される1個もしくはは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくはは4～6員複素環を形成し、

40

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^b がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^b が、O及びNHから選択される1個もしくはは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくはは4～6員複素環を形成し、

mが、1または2であり、

xが、0、1、2または3であり、

yが、0、1、2または3であり、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$

50

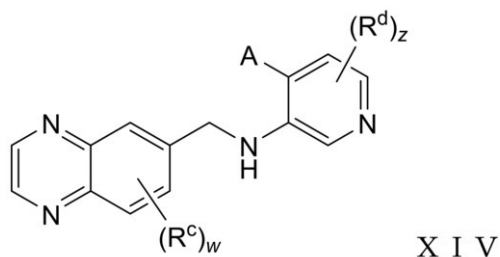
、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、
 R^d が各々独立して、ハロ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、
 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、
 その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び N
 H から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく
 、
 w が、0、1、または 2 である、請求項 43 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 45】

前記小分子が、式 X I V に従う構造、

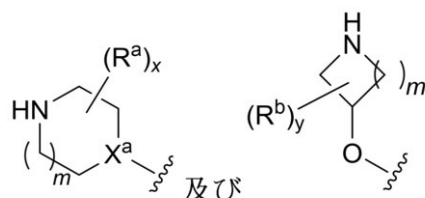
【化 7】

10



またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、
 またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、
 A が、
 【化 8】

20



30

からなる群から選択され、
 X^a が、N 及び CH から選択され、
 R^a が各々独立して、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^a が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、
 R^b が各々独立して、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、
 m が、1 または 2 であり、
 x が、0、1、2 または 3 であり、
 y が、0、1、2 または 3 であり、
 R^c が各々独立して、ハロ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、
 R^d が各々独立して、ハロ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、その代替として、隣接

40

50

する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

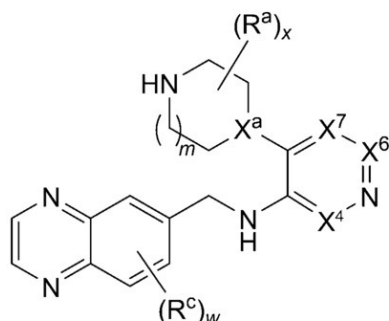
w が、0、1、または 2 であり、

z が、0、1、または 2 である、請求項 44 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 46】

前記小分子が、式 XVI に従う構造、

【化 9】



XVI

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

X^4 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^6 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^7 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの 0 個または 1 個が N であり、

X^a が、N 及び CH から選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^a が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、

m が、1 または 2 であり、

x が、0、1、2 または 3 であり、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

w が、0、1、または 2 である、請求項 44 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 47】

前記小分子が、式 XVII に従う構造、

10

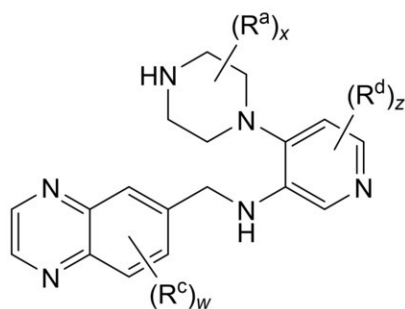
20

30

40

50

【化 1 0】



XVI I

10

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^a が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4～6 員炭素環もしくは 4～6 員複素環を形成し、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

20

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0～2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

w が、0、1、または 2 であり、

x が、0、1、2 または 3 であり、

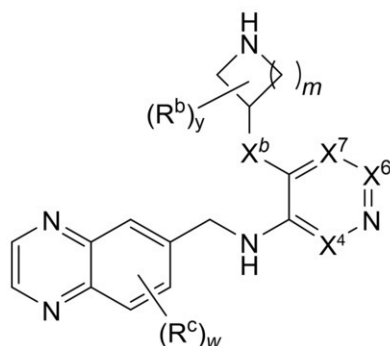
z が、0、1、または 2 である、請求項 4 4 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 4 8】

前記小分子が、式 XX に従う構造、

30

【化 1 1】



XX

40

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

X^4 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^6 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^7 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの 0 個または 1 個が N であり、

X^b が、O、NH、及び NCH_3 から選択され、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-C$

50

H F₂、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している2個のR^bがオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個のR^bが、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

mが、1または2であり、

yが、0、1、2または3であり、

R^cが各々独立して、ハロ、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^dが各々独立して、ハロ、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

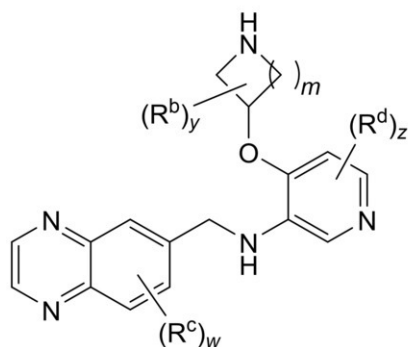
その代替として、隣接する環位置上の2個のR^dが一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、

wが、0、1、または2である、請求項44に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項49】

前記小分子が、式XXIに従う構造、

【化12】



XXI

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

R^bが各々独立して、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している2個のR^bがオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個のR^bが、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

R^cが各々独立して、ハロ、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^dが各々独立して、ハロ、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の2個のR^dが一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、

mが、1または2であり、

wが、0、1、または2であり、

yが、0、1、または2であり、

zが、0、1、または2である、請求項44に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項50】

請求項1～19及び40～49のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドカセット、請求項20～39のいずれか1項に記載の核酸配列、または請求項x～xのいずれか1項に記載のポリヌクレオチドカセットを含む、ベクター。

【請求項 5 1】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項 4 4 に記載のベクター。

【請求項 5 2】

前記ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、アデノアデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 4 5 に記載のベクター。

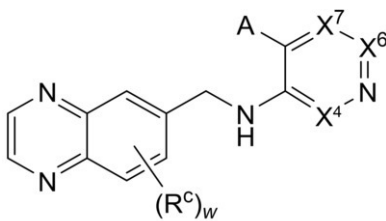
【請求項 5 3】

請求項 4 4 ～ 4 6 のいずれか 1 項に記載のベクター、請求項 1 ～ 1 9 及び 4 0 ～ 4 2 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドカセット、または請求項 2 0 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載の核酸配列を含む、細胞。

【請求項 5 4】

式 X I I I に従う構造を有する化合物であって、

【化 1 3】



X I I I

式中、

X^4 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、

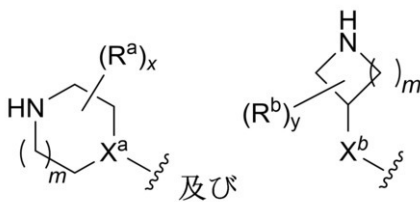
X^6 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、

X^7 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、

ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの 0 個または 1 個が N であり、

A が、

【化 1 4】



からなる群から選択され、

X^a が、 N 及び CH から選択され、

X^b が、 O 、 NH 、及び NCH_3 から選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^a が、 O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、 O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、

m が、1 または 2 であり、

x が、0、1、2 または 3 であり、

y が、0、1、2 または 3 であり、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び N H から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

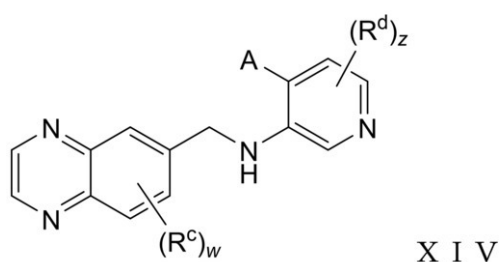
w が、0、1、または 2 である、前記化合物、またはその薬学的に許容される塩。

10

【請求項 55】

式 X I V に従う構造を有し、

【化 15】

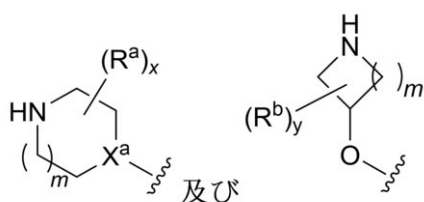


20

式中、

A が、

【化 16】



30

からなる群から選択され、

X^a が、N 及び CH から選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^a が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、

40

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、

m が、1 または 2 であり、

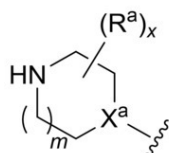
x が、0、1、2 または 3 であり、

y が、0、1、2 または 3 であり、

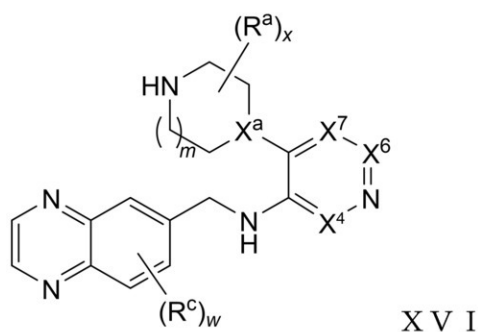
R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

50

【化 17】



【化 1 8】



R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$

、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の２個の R^d が一緒になって、 O 、 S 、 N 、及び N
 H から選択される０～２個のヘテロ原子を有する５員または６員芳香環を形成してもよく

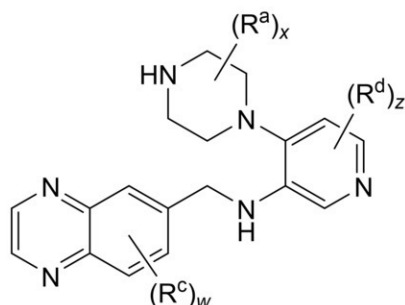
、
 w が、０、１、または２である、請求項５４に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項５７】

式 XVII に従う構造を有し、

【化１９】

10



XVII

20

式中、

R^a が各々独立して、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している２個の R^a がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している２個の R^a が、 O 及び NH から選択される１個もしくはは２個のヘテロ原子を有する４～６員炭素環もしくはは４～６員複素環を形成し、

R^c が各々独立して、ハロ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

30

その代替として、隣接する環位置上の２個の R^d が一緒になって、 O 、 S 、 N 、及び N
 H から選択される０～２個のヘテロ原子を有する５員または６員芳香環を形成してもよく

、
 w が、０、１、または２であり、

x が、１、２または３であり、

z が、０、１、または２である、請求項５４に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

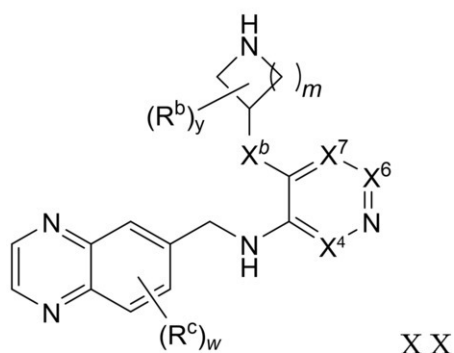
【請求項５８】

式 XX に従う構造を有し、

40

50

【化 2 0】



10

式中、

 X^4 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、 X^6 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、 X^7 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの 0 個または 1 個が N であり、 X^b が、 O 、 NH 、及び NCH_3 から選択され、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、 O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4～6 員炭素環もしくは 4～6 員複素環を形成し、

20

 m が、1 または 2 であり、 y が、0、1、2 または 3 であり、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

30

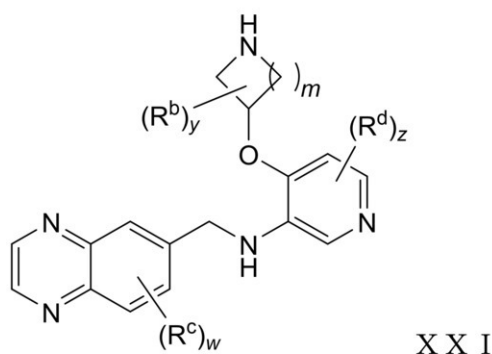
その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、 O 、 S 、 N 、及び NH から選択される 0～2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

w が、0、1、または 2 である、請求項 54 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 59】

式 XXI に従う構造を有し、

【化 2 1】



40

50

式中、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4～6 員炭素環もしくは 4～6 員複素環を形成し、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0～2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

m が、1 または 2 であり、

w が、0、1、または 2 であり、

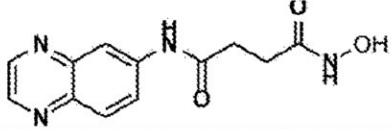
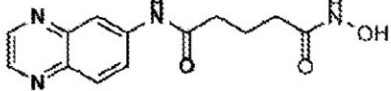
y が、0、1、または 2 であり、

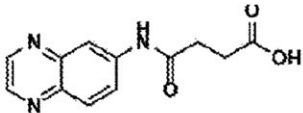
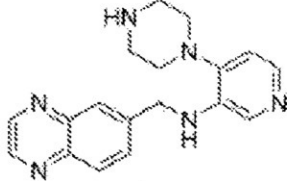
z が、0、1、または 2 である、請求項 54 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 60】

以下のうちの 1 つに従う構造を有する、請求項 54 に記載の化合物。

【表 1-1】

参照 番号	構造
001	
002	

003	
004	

10

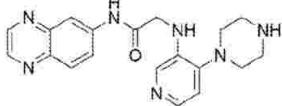
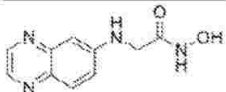
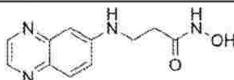
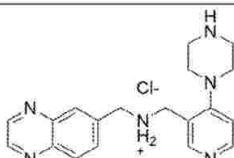
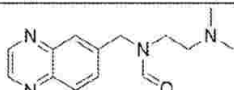
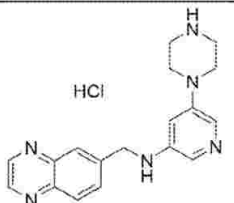
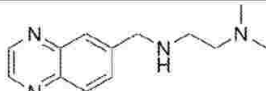
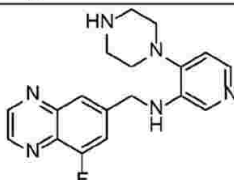
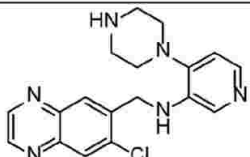
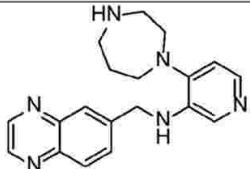
20

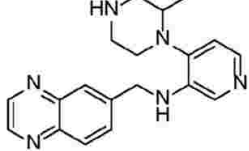
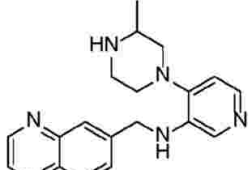
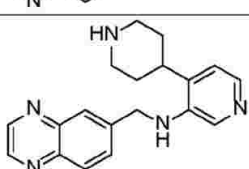
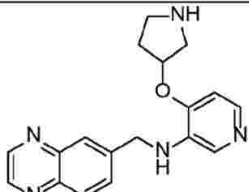
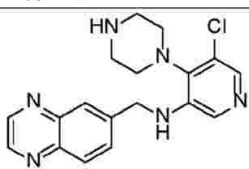
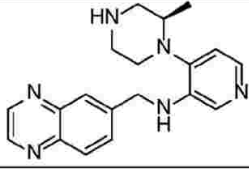
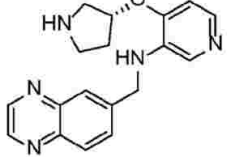
30

40

50

【表 1 - 2】

005	
006	
007	
008	
009	
010	
011	
012	
013	
014	

015	
016	
017	
018	
019	
020	
021	

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

022	
023	
024	
025	
026	
027	
028	

029	
030	
031	
032	
033	
034	
035	

10

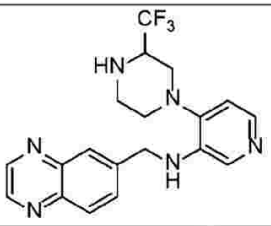
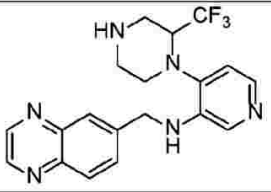
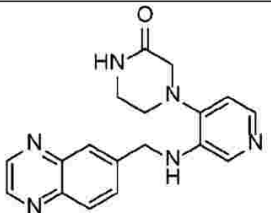
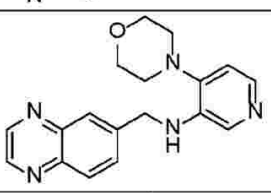
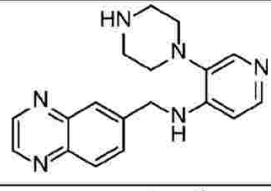
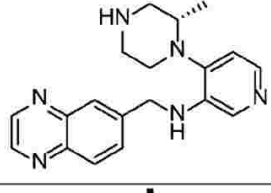
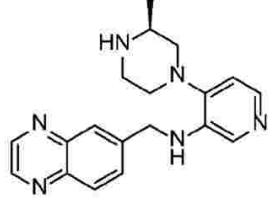
20

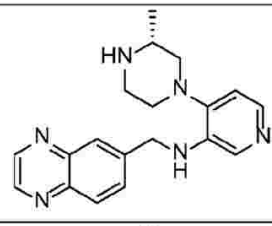
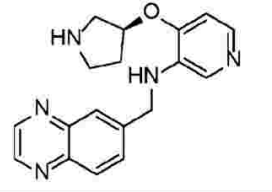
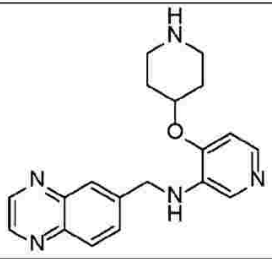
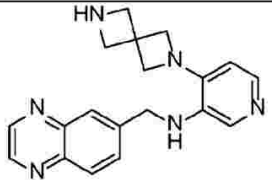
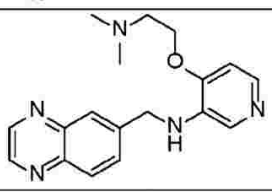
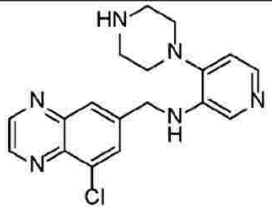
30

40

50

【表 1 - 4】

036	
037	
038	
039	
040	
041	
042	

043	
044	
045	
046	
047	
048	
049	

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

050	
051	
052	
053	
054	
055	
056	

057	
058	
059	
060	
061	
062	
063	

10

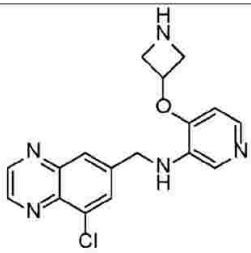
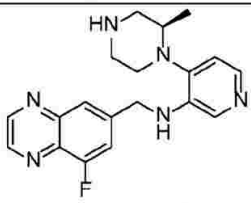
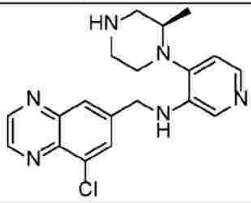
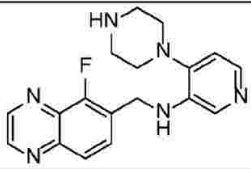
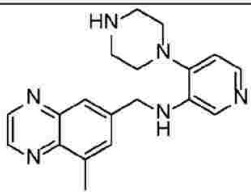
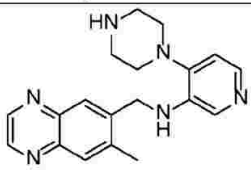
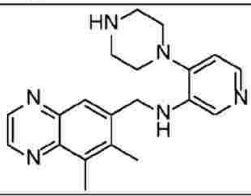
20

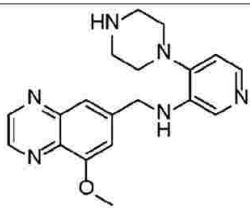
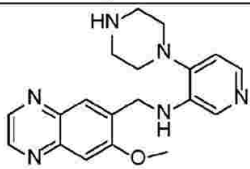
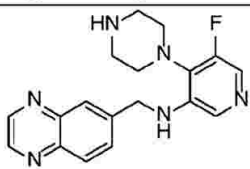
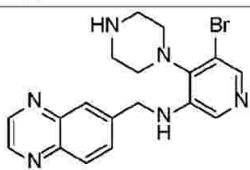
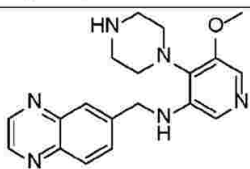
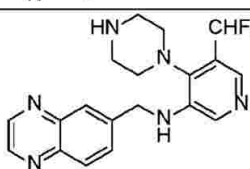
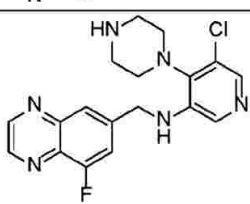
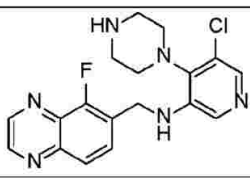
30

40

50

【表 1 - 6】

064	
065	
066	
067	
068	
069	
070	

071	
072	
073	
074	
075	
076	
077	
078	

10

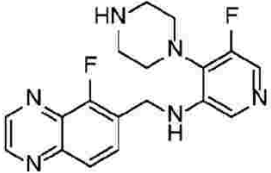
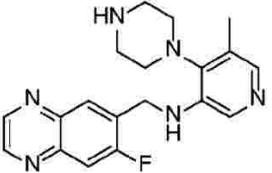
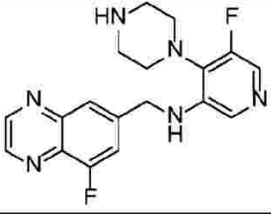
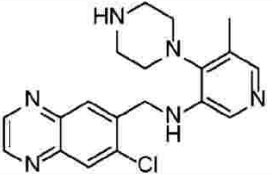
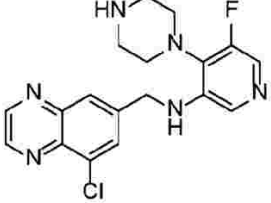
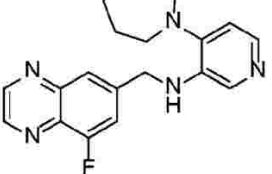
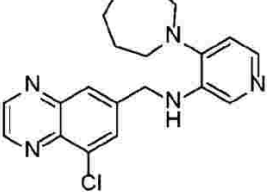
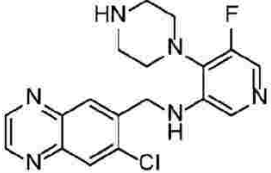
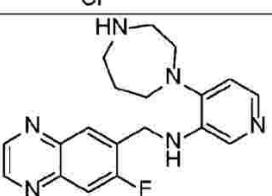
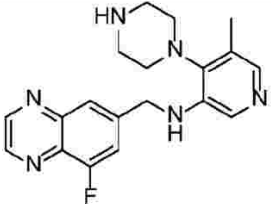
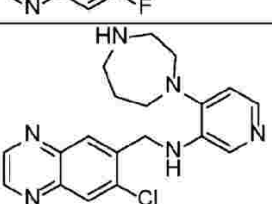
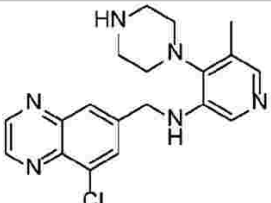
20

30

40

50

【表 1 - 7】

079		086	
080		087	
081		088	
082		089	
083		090	
084		091	
085		092	

10

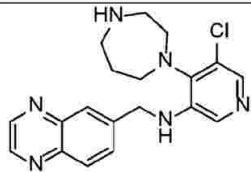
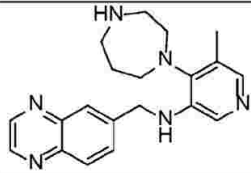
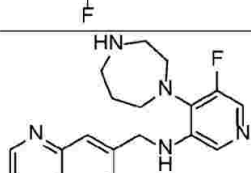
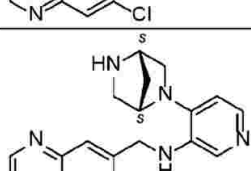
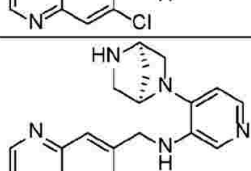
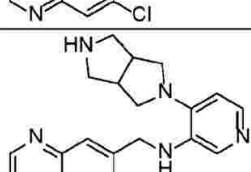
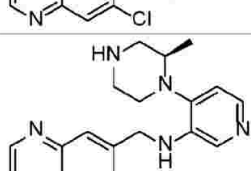
20

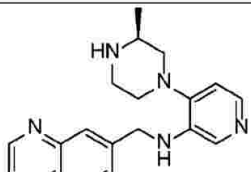
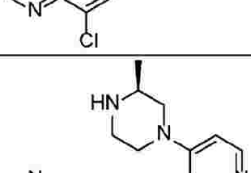
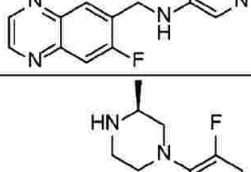
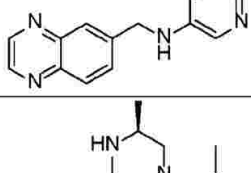
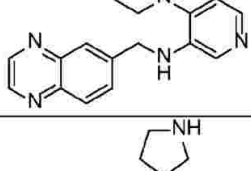
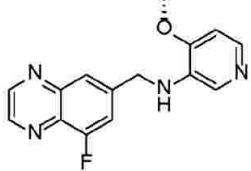
30

40

50

【表 1 - 8】

093	
094	
095	
096	
097	
098	
099	
100	

101	
102	
103	
104	
105	
106	

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

107	
108	
109	
110	
111	
112	

113	
114	
115	
116	
117	
118	
119	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 0】

120	
121	
122	
123	
124	
125	

126	
127	
128	
129	
130	
131	
132	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

133	
134	
135	
136	
137	
138	
139	
140	

141	
142	
143	
144	
145	
146	
147	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

148	
149	
150	
151	
152	
153	
154	
155	

156	
157	
158	
159	
160	
161	
162	

10

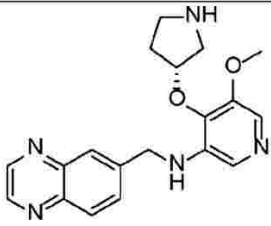
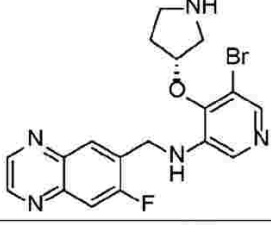
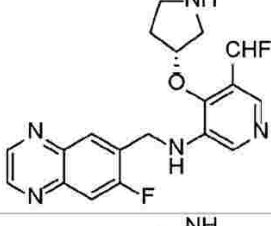
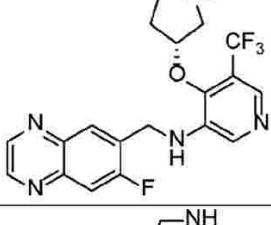
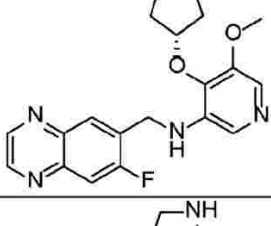
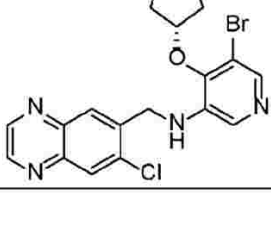
20

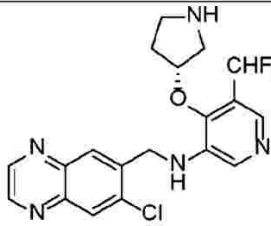
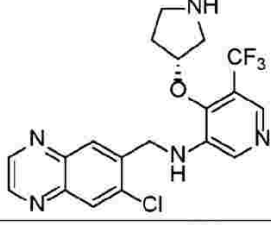
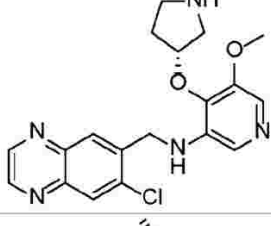
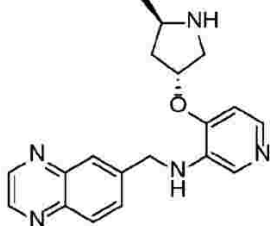
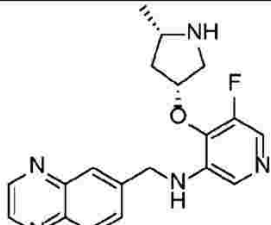
30

40

50

【表 1 - 1 3】

163	
164	
165	
166	
167	
168	

169	
170	
171	
172	
173	
174	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 4】

175	
176	
177	
178	
179	
180	

181	
182	
183	
184	
185	

10

20

30

40

【請求項 6 1】

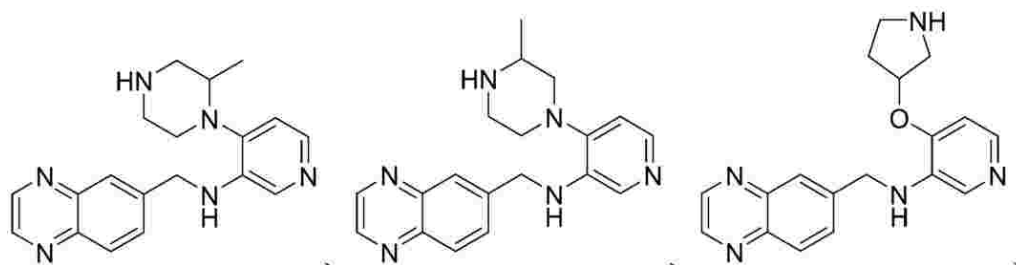
以下、

50

【化 2 2 - 1】



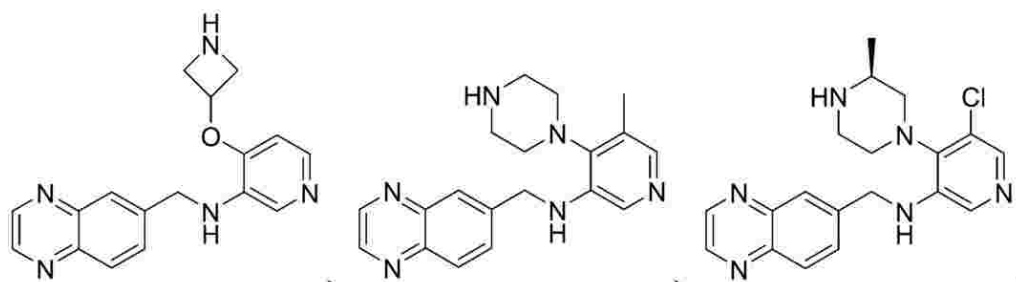
10



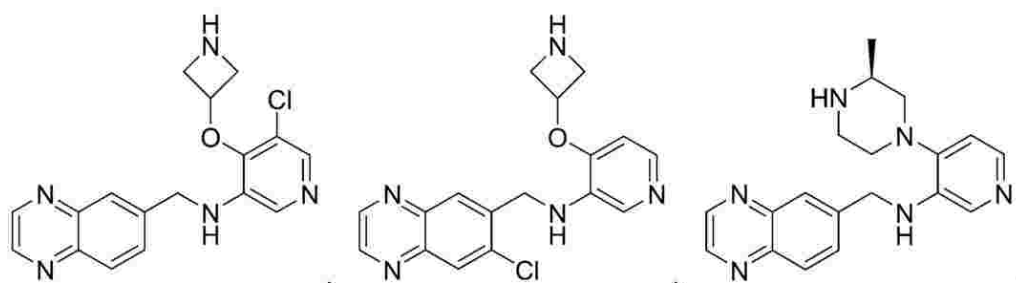
20



30

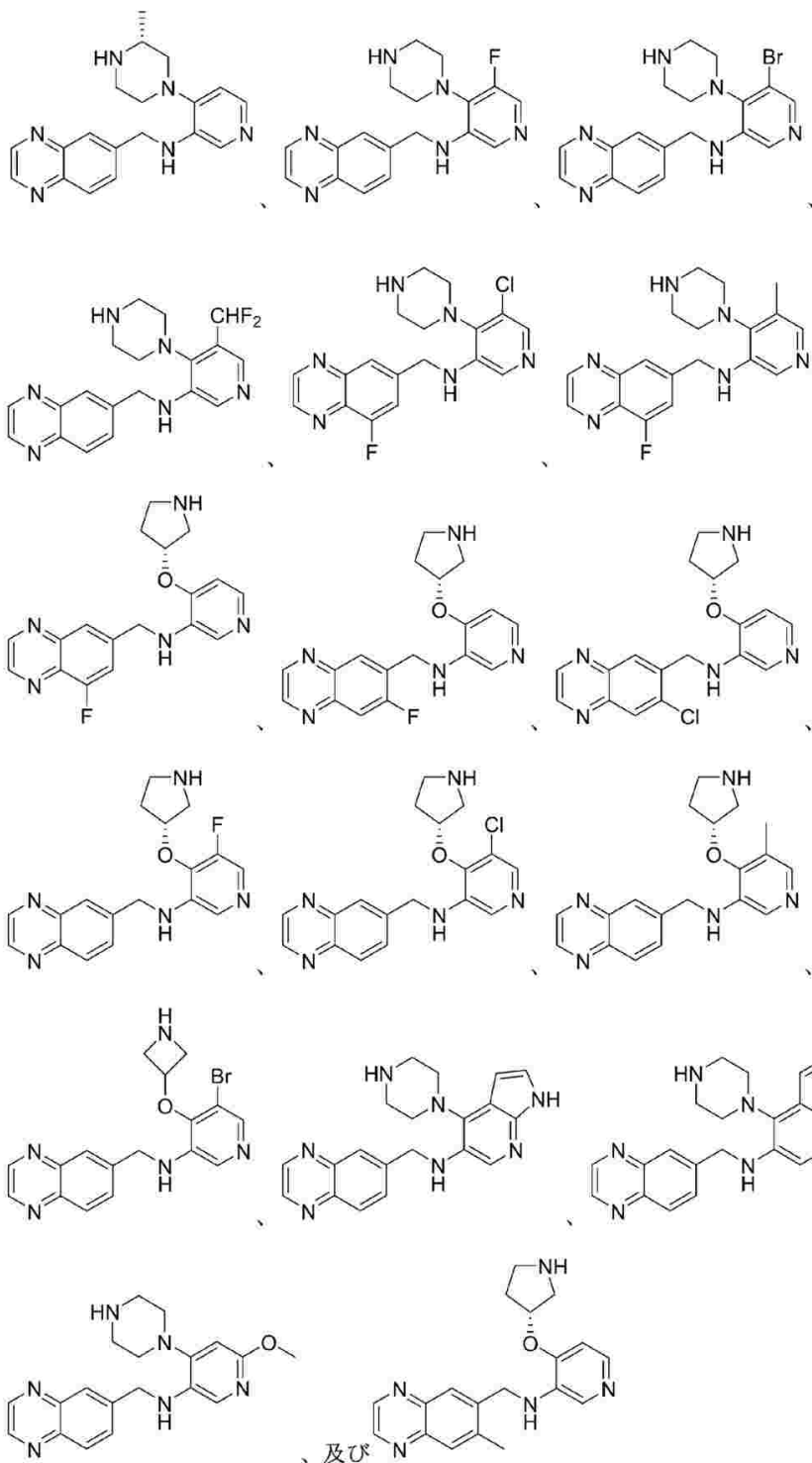


40



50

【化 2 2 - 2】



10

20

30

40

のうちの1つに従う構造を有する、請求項54に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、ある特定の小分子に結合するオリゴヌクレオチドアプタマー、及びその小分子に結合するアプタマーを生成する方法に関する。標的遺伝子の発現を調節するためのリボスイッチ及びポリヌクレオチドカセットも企図され、ここで、ポリヌクレオチドカセットは本明細書に開示されるアプタマーを含む。標的遺伝子発現のモジュレーターである小分子が更に提供され、ここで、標的遺伝子は本明細書に記載のアプタマーを含むリボスイ

50

ッチを含む。

【背景技術】

【0002】

アプタマーは、高い親和性及び特異性を有する標的リガンドに結合するオリゴヌクレオチドである。これらの核酸配列は、最初のアプタマー薬及び臨床パイプラインにおける追加のアプタマー薬の最近のFDA承認により、高い治療的価値及び診断的価値を有することが証明されている。それらの高度な特異性及び多用途性は、がん、ウイルス感染症、及び他の疾患を含むヒト疾患との闘いにおける新興RNAナノテクノロジー分野の重要なツールのうちの1つとしてRNAアプタマーを確立している。

【0003】

加えて、アプタマーは、アプタマーリガンドの存在下または不在下である特定の影響を及ぼすリボスイッチの一部として利用され得る。例えば、リボスイッチは、アプタマーリガンドの存在または不在に応答して遺伝子発現を調節するために使用され得る。

【0004】

しかしながら、原核生物源に由来するか、またはインビトロ選択法を使用して生成されたアプタマー／リガンドは、多くの場合、真核生物系における治療標的遺伝子の発現に必要な機能性を実証することができない。例えば、アプタマーのリガンドは、例えば、リガンドの存在が標的遺伝子発現の調節を妨げるため、またはリガンドがその他の点で細胞もしくは組織への投与に適切でないため、治療遺伝子産物を調節するための系での使用に適切ではないであろう細胞分子である場合がある。したがって、小分子リガンドの存在または不在に応答して遺伝子発現を調節することができる新たなアプタマー配列、小分子リガンド、及びアプタマー／リガンド組み合わせが必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

表Aに列記されるもの、及びそれらの類似体または誘導体を含む、式I～XXIIの小分子に結合するアプタマー配列が本明細書に提供される。標的遺伝子の発現を調節するためのリボスイッチ及びポリヌクレオチドカセットも企図され、ここで、ポリヌクレオチドカセットは本明細書に開示されるアプタマーを含む。治療遺伝子を含む標的遺伝子を調節するために、当該アプタマー、当該リボスイッチ、及び／または当該ポリヌクレオチドカセットを使用する方法が更に提供される。標的遺伝子の発現のモジュレーターである小分子も本明細書に提供され、ここで、標的遺伝子は本明細書に記載のアプタマーを含むリボスイッチを含む。

【0006】

一態様では、本開示は、本明細書に開示されるアプタマーをコードする配列を含むアプタマーを提供する。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G X₁
X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ C C T X₁₃
X₁₄ X₁₅ C C G G X₁₆ X₁₇ X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ C C G G X₂₂ X₂₃ C A G G
G A G (配列番号2)を含み、ここで、

X₁が、CまたはTであり、

X₂が、任意のヌクレオチドであり、

X₃が、任意のヌクレオチドであり、

X₄が、GまたはTであり、

X₅が、A、G、またはTであり、

X₆が、AまたはGであり、

X₇が、AまたはTであり、

X₈が、A、C、またはTであり、

X₉が、A、C、またはTであり、

X₁₀が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X_{12} が、A であり、
 X_{13} が、A、C、または G であり、
 X_{14} が、任意のヌクレオチドであり、
 X_{15} が、C、G、または T であり、
 X_{16} が、G または T であり、
 X_{17} が、A または T であり、
 X_{18} が、任意のヌクレオチドであり、
 X_{19} が、A または G であり、
 X_{20} が、A、G、T であり、
 X_{21} が、C、G、T であり、
 X_{22} が、T であり、
 X_{23} が、A、G、または T である（統合して、配列番号 681）。

10

【0007】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGX₁
 X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTX₁₃
 X₁₄X₁₅CCGGX₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁CCGGX₂₂X₂₃CAGG
 GAG（配列番号 2）を含み、ここで、

X_1 が、C または T であり、
 X_2 が、任意のヌクレオチドであり、
 X_3 が、任意のヌクレオチドであり、
 X_4 が、G または T であり、
 X_5 が、A、G、または T であり、
 X_6 が、A または G であり、
 X_7 が、A であり、
 X_8 が、A、C、または T であり、
 X_9 が、A、C、または T であり、
 X_{10} が、任意のヌクレオチドであり、
 X_{11} が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
 X_{12} が、A であり、
 X_{13} が、A、C、または G であり、
 X_{14} が、任意のヌクレオチドであり、
 X_{15} が、C、G、または T であり、
 X_{16} が、G または T であり、
 X_{17} が、A または T であり、
 X_{18} が、任意のヌクレオチドであり、
 X_{19} が、A または G であり、
 X_{20} が、A、G、T であり、
 X_{21} が、C、G、T であり、
 X_{22} が、T であり、
 X_{23} が、A、G、または T である（統合して、配列番号 682）。

20

30

40

【0008】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
 ATCGACCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTGATCCGGA
 TCAATGCCGGCGCAGGGAG（配列番号 4）を含み、ここで、

X_7 が、A、G、または T であり、
 X_8 が、任意のヌクレオチドであり、
 X_9 が、任意のヌクレオチドであり、
 X_{10} が、任意のヌクレオチドであり、

50

X₁₁が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂が、A、C、またはTである（統合して、配列番号683）。

【0009】

複数の実施形態では、X₇～X₁₂は、それぞれ、同時にA、T、T、G、C、及びAではない。

【0010】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTGATCCGGGA
TCATGCCGCGCGCAGGGAG（配列番号4）を含み、ここで、

10

X₇が、AまたはTであり、

X₈が、A、C、またはTであり、

X₉が、A、C、またはTであり、

X₁₀が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂が、Aである（統合して、配列番号684）。

【0011】

複数の実施形態では、X₇～X₁₂は、それぞれ、同時にA、T、T、G、C、及びAではない。

【0012】

20

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTGATCCGGGA
TCATGCCGCGCGCAGGGAG（配列番号4）を含み、ここで、

X₇が、Aであり、

X₈が、A、C、またはTであり、

X₉が、A、C、またはTであり、

X₁₀が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂が、Aである（統合して、配列番号685）。

30

【0013】

複数の実施形態では、X₇～X₁₂は、それぞれ、同時にA、T、T、G、C、及びAではない。

【0014】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATC
ATGCCGCGCGCAGGGAG（配列番号3）を含み、ここで、

X₁が、C、G、またはTであり、

X₂が、任意のヌクレオチドであり、

X₃が、任意のヌクレオチドであり、

X₄が、任意のヌクレオチドであり、

X₅が、任意のヌクレオチドであり、

X₆が、任意のヌクレオチドである（統合して、配列番号686）。

40

【0015】

複数の実施形態では、X₁～X₆は、それぞれ、同時にC、A、T、C、G、及びAではない。

【0016】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGX₁

50

X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G A T C
A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号3)を含み、ここで、

- X₁が、CまたはTであり、
- X₂が、任意のヌクレオチドであり、
- X₃が、任意のヌクレオチドであり、
- X₄が、任意のヌクレオチドであり、
- X₅が、A、G、またはTであり、
- X₆が、任意のヌクレオチドである(統合して、配列番号687)。

【0017】

複数の実施形態では、X₁～X₆は、それぞれ、同時にC、A、T、C、G、及びAではない。

10

【0018】

複数の実施形態では、アダマーをコードする配列は、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G X₁
X₂ A X₃ X₄ X₅ X₆ C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G A T C
A T G C C G G C G C A G G G A G (配列番号3)を含み、ここで、

- X₁が、CまたはTであり、
- X₂が、任意のヌクレオチドであり、
- X₃が、任意のヌクレオチドであり、
- X₄が、GまたはTであり、
- X₅が、A、G、またはTであり、
- X₆が、AまたはGである(統合して、配列番号688)。

20

【0019】

複数の実施形態では、アダマーをコードする配列は、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T X₁₃ X₁₄ X₁₅ C C G G A T C
A T G C C G G X₂₂ X₂₃ C A G G G A G (配列番号5)を含み、ここで、

- X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及びX₂₃が、任意のヌクレオチドである。

【0020】

複数の実施形態では、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及びX₂₃は、それぞれ、同時にG、A、T、C、及びGではない。

30

【0021】

複数の実施形態では、アダマーをコードする配列は、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T X₁₃ X₁₄ X₁₅ C C G G A T C
A T G C C G G X₂₂ X₂₃ C A G G G A G (配列番号5)を含み、ここで、

- X₁₃が、A、C、またはGであり、
- X₁₄が、任意のヌクレオチドであり、
- X₁₅が、C、G、またはTであり、
- X₂₂が、Tであり、
- X₂₃が、A、G、またはTである(統合して、配列番号689)。

40

【0022】

複数の実施形態では、アダマーをコードする配列は、

C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A
A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G X₁₆ X₁₇ X₁₈
X₁₉ X₂₀ X₂₁ C C G G C G C A G G G A G (配列番号6)を含み、ここで、

- X₁₆が、任意のヌクレオチドであり、
- X₁₇が、任意のヌクレオチドであり、
- X₁₈が、任意のヌクレオチドであり、
- X₁₉が、任意のヌクレオチドであり、

50

X₂₀が、任意のヌクレオチドであり、

X₂₁が、C、G、Tである（統合して、配列番号690）。

【0023】

複数の実施形態では、X₁₆～X₂₁は、それぞれ、同時にA、T、C、A、T、及びGではない。

【0024】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAGCA
ATCGACCATCGACCCCATTTGCACCTGATCCGGGX₁₆X₁₇X₁₈
X₁₉X₂₀X₂₁CCGGCGCAGGGAG（配列番号6）を含み、ここで、

X₁₆が、GまたはTであり、

X₁₇が、AまたはTであり、

X₁₈が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₉が、AまたはGであり、

X₂₀が、A、G、Tであり、

X₂₁が、C、G、Tである（統合して、配列番号691）。

【0025】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号1及び7～558からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号1

【0026】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～17、89～96、174～349、及び358～583からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～17、89～96、174～349、及び358～583からなる群から選択される配列を含む。

【0027】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～11、89～94、174～349、及び358～447からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～11、89～94、174～349、及び358～447からなる群から選択される配列を含む。

【0028】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号174、358、363、及び378からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号174、358、363、及び378からなる群から選択される配列を含む。

【0029】

複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマー配列は、5'末端及び3'末端に、相補的であり、かつアプタマーP1ステムの一部を形成することができる追加の配列を更に含む。複数の実施形態では、アプタマーのこのP1ステムは、本明細書に開示されるリボスイッチのエフェクター領域であるか、それを含むか、またはそれと重複する。複数の実施形態では、アプタマーP1ステムは、3'イントロンの5'スプライス部位配列及びそれに相補的な配列を含む。例えば、P1ステムは、A G G G T G A G T、A A A G T A A G C、G C A G T A A G T、G A G G T G T G G、A/C A G G T A/G A G T、N A G G T A/G A G T、N A G G T A A G T、A/C A/T G G T A N G T、またはN A G/A G T A A G T（ここで、Nは、A

、G、C、またはTとすることができる)を含み得る。

【0030】

複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーは、表Aに列記されるものを含む、式I～XXIIの小分子のうちの1つ以上に結合する。

【0031】

一態様では、本開示は、本明細書に開示されるアプタマーをコードする配列によってコードされるRNAアプタマーを提供する。

【0032】

一態様では、本開示は、小分子に応答して標的遺伝子発現を調節するための組換えリボスイッチをコードする核酸配列を提供し、ここで、リボスイッチは本明細書に開示されるアプタマーを含む。

10

【0033】

別の態様では、本開示は、標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットを提供し、ここで、ポリヌクレオチドカセットは、小分子に結合するアプタマーをコードする配列を含み、アプタマーをコードする配列は、本明細書に開示されるアプタマーをコードする配列を含む。

【0034】

複数の実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、

(a) リボスイッチと、

(b) 5'イントロン及び3'イントロンに隣接する、選択的にスプライシングされたエクソンと、をコードする配列を含み、

20

ここで、リボスイッチが、(i) 3'イントロンの5'スプライス部位配列(及び3'イントロンの5'スプライス部位配列に相補的な配列)を含むステム形成配列を含むエフェクター領域を含み、(ii) アプタマーが、本明細書に開示されるアプタマー配列を含み、

選択的にスプライシングされたエクソンが、選択的にスプライシングされたエクソンが標的遺伝子のmRNAへとスプライシングされたときに標的遺伝子とインフレームになる終止コドンを含む。

【0035】

複数の実施形態では、エフェクターシステムは、本明細書に開示されるアプタマーのP1システムであるか、またはそれを含む。言い換えれば、エフェクターシステムは、本明細書に開示されるアプタマーの5'末端に連結された第1の配列と、本明細書に開示されるアプタマーの3'末端に連結された第2の配列とを含む。

30

【0036】

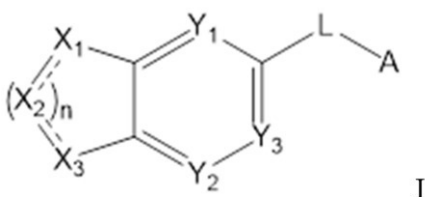
複数の実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、標的遺伝子のタンパク質コード配列に位置する。複数の実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、標的遺伝子の非翻訳領域または標的遺伝子のイントロンに位置する。

【0037】

複数の実施形態では、小分子は、式Iに従う構造であって、

【化1】

40



式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 が、各事例において、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、N、NH

50

、O、及びSから選択され、ここで、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同時にOまたはSであるように選択されず、

破線が、任意選択の二重結合を表し、

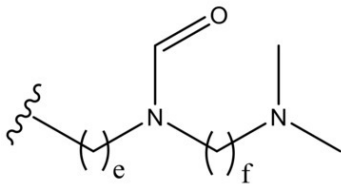
Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 が、各事例において、独立して、CR₂及びNから選択され、

n が、1または2であり、ここで、 n が1である場合、破線の方のみが二重結合であり、

L-Aが、

【化2】

10

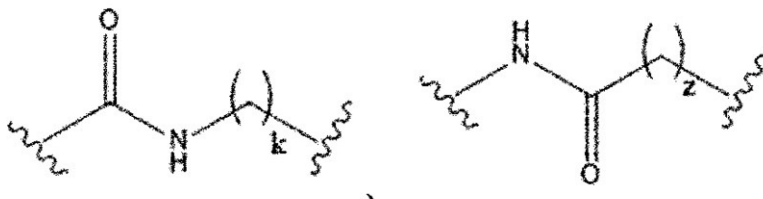
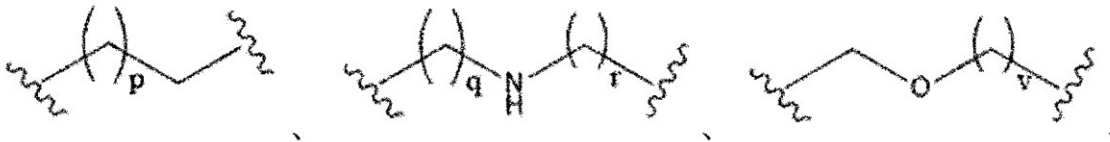


であるか、または

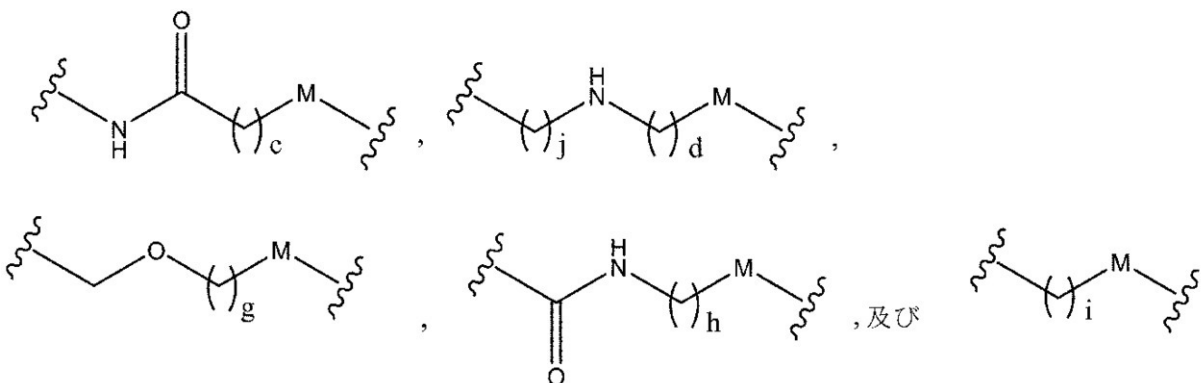
Lが、

【化3】

20



30



40

から選択され、

式中、 k 、 p 、 q 、 r 、及び v が独立して、整数0、1、2、3、4、5、6、7、8、

9、及び10から選択され、 z が、整数1、2、3、4、及び5から選択され、

c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、及び i が独立して、整数1、2、3、4、5、6、7、8、9、

及び10から選択され、 j が、整数0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び1

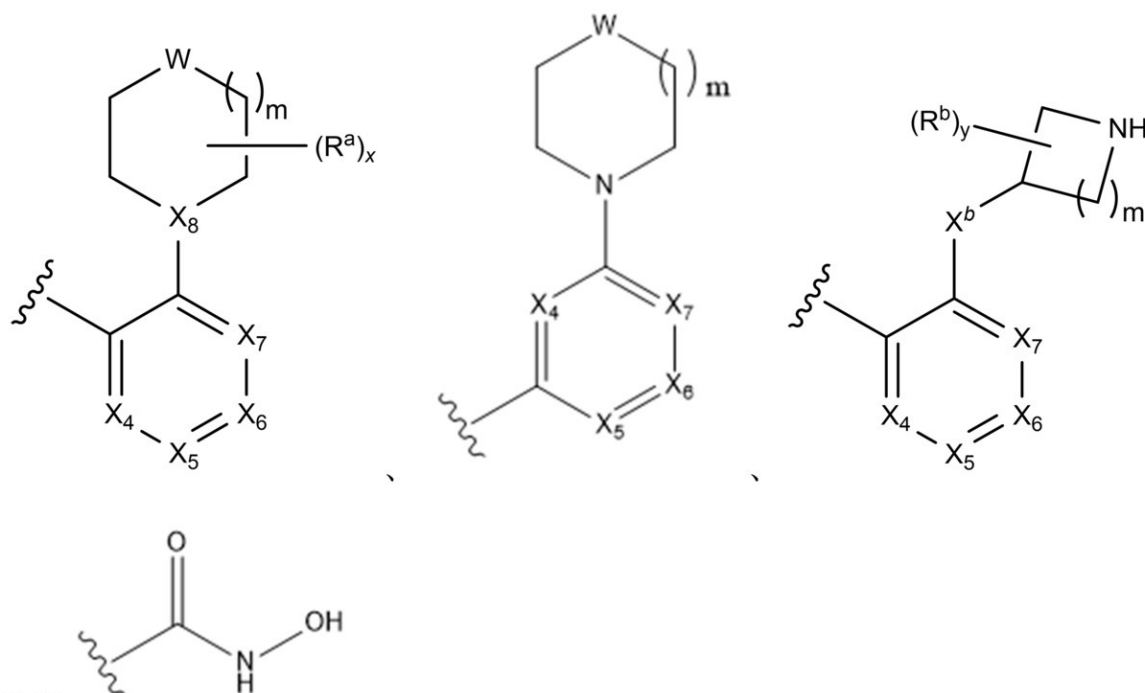
0から選択され、

50

Mが、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び
 $-\text{C}(=\text{O})-$ から選択され、

Aが、

【化4】



及び

から選択され、

式中、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 が独立して、 CR_3 及びNから選択され、

X_8 が、NまたはCHであり、

X^b が、O、NH、及び NCH_3 から選択され、

ここで、 R_1 、 R_2 、及び R_3 が各々独立して、 $-\text{H}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{COO}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{CO}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{O}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{OCO}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{NCO}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{CONH}(\text{C}_1\sim\text{C}_6\text{アルキル})$ 、及び置換または非置換 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルから選択され、

それに加えて、またはその代替として、隣接する環位置上の2個の R_3 が一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、

mが、1または2であり、

R^a が各々独立して、 $\text{C}_1\sim\text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^a がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^a が、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

xが、0、1、2または3であり、

R^b が各々独立して、 $\text{C}_1\sim\text{C}_3$ アルキル、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^b がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^b が、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

y が、0、1、2 または 3 であり、

W が、O または NR_4 であり、ここで、 R_4 が、 $-H$ 、 $-CO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換シクロアルキル、 $-CO$ (アリール)、 $-CO$ (ヘテロアリール)、及び $-CO$ (シクロアルキル) から選択されるが、

但し、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 のうちの少なくとも 2 個が N であることを条件とする、構造、

またはその薬学的に許容される塩を有する。

【0038】

複数の実施形態では、小分子は、例えば、表 A に提供される構造を含む、式 $II \sim XX$ 10
II に従う構造を有する。

【0039】

一態様では、本開示は、本明細書に開示されるポリヌクレオチドカセット、アプタマーをコードする配列／アプタマー配列、またはリボスイッチを含むベクターを提供する。複数の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである。複数の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターである。

【0040】

一態様では、本開示は、本明細書に開示されるベクター、ポリヌクレオチドカセット、アプタマーをコードする配列／アプタマー配列、またはリボスイッチを含む細胞を提供する。 20

【0041】

本開示は、例えば、表 A に示される小分子を含む、式 $I \sim XXII$ の小分子を細胞または組織に提供することにより、本明細書に開示されるポリヌクレオチドカセット、アプタマーをコードする配列／アプタマー配列、またはリボスイッチを使用して標的遺伝子の発現を調節する方法も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図 1 a】TPP アプタマー相同配列は、TPP 及びフルスルチアミンに応答して遺伝子発現を調節する。イントロンー選択的エクソンーアプタマーーイントロンを含む合成リボスイッチカセットの概略図。 30

【図 1 b】TPP アプタマー相同配列は、TPP 及びフルスルチアミンに応答して遺伝子発現を調節する。アプタマーリガンドの存在下で、アプタマーリガンド結合は、選択的エクソンの 5' スプライス部位 (5' ss) のアクセシビリティを隔絶するヘアピンステムの形成を容易にし、これにより、選択的エクソン及び標的遺伝子発現を含む終止コドンの排除がもたらされる。リボスイッチ 12C6-1 は、TPP 処理 (図 1 c) 及びフルスルチアミン処理 (図 1 d) に応答してルシフェラーゼ遺伝子発現を調節する。HEK293 細胞に、12C6-1 リボスイッチを含むルシフェラーゼ構築物をトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を、指示した濃度の TPP またはフルスルチアミンで処理した。誘導倍率 (fold induction) を、化合物で処理した細胞から得られたルシフェラーゼ活性を、化合物で処理していない細胞から得られたルシフェラーゼ活性で割った商として計算した。 40

【図 1 c】TPP アプタマー相同配列は、TPP 及びフルスルチアミンに応答して遺伝子発現を調節する。アプタマーリガンドの存在下で、アプタマーリガンド結合は、選択的エクソンの 5' スプライス部位 (5' ss) のアクセシビリティを隔絶するヘアピンステムの形成を容易にし、これにより、選択的エクソン及び標的遺伝子発現を含む終止コドンの排除がもたらされる。リボスイッチ 12C6-1 は、TPP 処理 (図 1 c) 及びフルスルチアミン処理 (図 1 d) に応答してルシフェラーゼ遺伝子発現を調節する。HEK293 細胞に、12C6-1 リボスイッチを含むルシフェラーゼ構築物をトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を、指示した濃度の TPP またはフルスルチアミンで処理した。誘 50

導倍率 (fold induction) を、化合物で処理した細胞から得られたルシフェラーゼ活性を、化合物で処理していない細胞から得られたルシフェラーゼ活性で割った商として計算した。

【図 1 d】 T P P アプタマー相同配列は、 T P P 及びフルスルチアミンに応答して遺伝子発現を調節する。アプタマーリガンドの存在下で、アプタマーリガンド結合は、選択的エクソンの 5' スプライス部位 (5' ss) のアクセシビリティを隔絶するヘアピンシステムの形成を容易にし、これにより、選択的エクソン及び標的遺伝子発現を含む終止コドンの排除がもたらされる。リボスイッチ 1 2 C 6 - 1 は、 T P P 処理 (図 1 c) 及びフルスルチアミン処理 (図 1 d) に応答してルシフェラーゼ遺伝子発現を調節する。 H E K 2 9 3 細胞に、 1 2 C 6 - 1 リボスイッチを含むルシフェラーゼ構築物をトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を、指示した濃度の T P P またはフルスルチアミンで処理した。誘導倍率 (fold induction) を、化合物で処理した細胞から得られたルシフェラーゼ活性を、化合物で処理していない細胞から得られたルシフェラーゼ活性で割った商として計算した。

【図 2】 化合物 0 0 4 は、 H E K 2 9 3 細胞におけるルシフェラーゼ発現を調節する際に T P P アプタマーリボスイッチを活性化する。指示したリボスイッチ構築物を細胞にトランスフェクトし、様々な濃度の化合物 0 0 4 で処理した。化合物で処理した 2 0 時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、誘導倍率を、化合物で処理した細胞から得られたルシフェラーゼ活性を、処理していない細胞から得られたルシフェラーゼ活性で割った商として計算した。 E . C o l i t h i m もしくは A l i s h e w a n e l l a t a b r i z i c a t h i C アプタマー (a 、 b) または 1 2 C 6 - 1 アプタマー (c 、 d) を含むリボスイッチは、化合物 0 0 4 処理に応答してルシフェラーゼ発現を調節する。

【図 3】 a : それぞれ、 5' 末端に隣接 C 及び U 1 結合配列を有し、 3' 末端に隣接 G 及び U 1 結合部位の相補的配列を有する、 1 2 C 6 - 1 アプタマー配列の予測二次構造。 b : 1 2 C 6 - 1 親配列、及び N がランダム塩基を示す各アプタマーライブラリのテンプレート配列。

【図 4 a】 1 2 C - 1 に由来するアプタマーを含むリボスイッチは、化合物 0 0 4 (図 4 a 、図 4 b 、及び図 4 c) ならびに類似体 (図 4 d 及び図 4 e) での処理に応答して、 H E K 2 9 3 細胞におけるルシフェラーゼ発現を調節する。

【図 4 b】 1 2 C - 1 に由来するアプタマーを含むリボスイッチは、化合物 0 0 4 (図 4 a 、図 4 b 、及び図 4 c) ならびに類似体 (図 4 d 及び図 4 e) での処理に応答して、 H E K 2 9 3 細胞におけるルシフェラーゼ発現を調節する。

【図 4 c】 1 2 C - 1 に由来するアプタマーを含むリボスイッチは、化合物 0 0 4 (図 4 a 、図 4 b 、及び図 4 c) ならびに類似体 (図 4 d 及び図 4 e) での処理に応答して、 H E K 2 9 3 細胞におけるルシフェラーゼ発現を調節する。

【図 4 d】 1 2 C - 1 に由来するアプタマーを含むリボスイッチは、化合物 0 0 4 (図 4 a 、図 4 b 、及び図 4 c) ならびに類似体 (図 4 d 及び図 4 e) での処理に応答して、 H E K 2 9 3 細胞におけるルシフェラーゼ発現を調節する。化合物 0 0 4 (化合物 0 0 3 、 0 0 5 、 0 0 8 、 0 0 9 、及び 0 1 1) に類似した化合物は、ルシフェラーゼ発現を調節する際に、 1 2 C 6 - 1 に結合し、誘導体リボスイッチを活性化する。誘導倍率を、化合物で処理した細胞から得られたルシフェラーゼ活性を、処理していない細胞から得られたルシフェラーゼ活性で割った商として計算した。

【図 4 e】 1 2 C - 1 に由来するアプタマーを含むリボスイッチは、化合物 0 0 4 (図 4 a 、図 4 b 、及び図 4 c) ならびに類似体 (図 4 d 及び図 4 e) での処理に応答して、 H E K 2 9 3 細胞におけるルシフェラーゼ発現を調節する。追加の類似体 (化合物 0 1 2 、 0 1 3 、 0 1 4 、 0 1 5 、 0 1 6 、 0 1 8 、及び 0 1 9) は、用量依存的に発現を調節する。

【図 5 a】 哺乳類細胞におけるマウス E p o 遺伝子及びヒト成長ホルモン遺伝子のリボスイッチ調節発現。リボスイッチカセット N 4 - 1 C 1 1 または N 5 - 1 2 G 6 を含む指示した構築物をトランスフェクトした細胞を、指示した濃度の化合物 0 0 4 で処理するか、

または処理せず、分泌mE p oまたはh G Hを検出し、E L I S Aで定量した。リボスイッチ1 2 G 6及び1 C 1 1は、化合物0 0 4処理に応答して、A M L 1 2細胞におけるmE p o発現を調節する。

【図5 b】哺乳類細胞におけるマウスE p o遺伝子及びヒト成長ホルモン遺伝子のリボスイッチ調節発現。リボスイッチカセットN 4 - 1 C 1 1またはN 5 - 1 2 G 6を含む指示した構築物をトランスフェクトした細胞を、指示した濃度の化合物0 0 4で処理するか、または処理せず、分泌mE p oまたはh G Hを検出し、E L I S Aで定量した。化合物0 0 4によるmE p oの誘導倍率。誘導倍率を、化合物0 0 4で処理した細胞から得られたmE p oレベルを、化合物で処理していない細胞から得られたmE p oレベルで割った商として計算した。

10

【図5 c】哺乳類細胞におけるマウスE p o遺伝子及びヒト成長ホルモン遺伝子のリボスイッチ調節発現。リボスイッチカセットN 4 - 1 C 1 1またはN 5 - 1 2 G 6を含む指示した構築物をトランスフェクトした細胞を、指示した濃度の化合物0 0 4で処理するか、または処理せず、分泌mE p oまたはh G Hを検出し、E L I S Aで定量した。リボスイッチは、化合物0 0 4処理に応答して、C 1 C 1 2細胞におけるmE p o発現を調節する。

【図5 d】哺乳類細胞におけるマウスE p o遺伝子及びヒト成長ホルモン遺伝子のリボスイッチ調節発現。リボスイッチカセットN 4 - 1 C 1 1またはN 5 - 1 2 G 6を含む指示した構築物をトランスフェクトした細胞を、指示した濃度の化合物0 0 4で処理するか、または処理せず、分泌mE p oまたはh G Hを検出し、E L I S Aで定量した。リボスイッチは、化合物0 0 4処理に応答して、H E K 2 9 3細胞におけるmE p o発現を調節する。

20

【図6 a】マウスの筋肉及び肝臓におけるリボスイッチによって調節されたルシフェラーゼ発現。B a l b / cマウス (n = 5) にA A V 8 . L u c i . C o n 1 (調節不能) を静脈内 (I . V .) 注射し、指示した用量の化合物0 0 4を経口投与した。ルシフェラーゼ活性を、化合物の経口投薬後の指示した時点で測定した。化合物0 0 4処理前及び処理後の各A A V注射群からの代表的なマウスの生物発光画像。

【図6 b】マウスの筋肉及び肝臓におけるリボスイッチによって調節されたルシフェラーゼ発現。B a l b / cマウス (n = 5) にA A V 8 . L u c i . 1 2 G 6 (調節可能) を静脈内 (I . V .) 注射し、指示した用量の化合物0 0 4を経口投与した。ルシフェラーゼ活性を、化合物の経口投薬後の指示した時点で測定した。化合物0 0 4処理前及び処理後の各A A V注射群におけるマウス (n = 5) からの全身イメージングのルシフェラーゼ発光シグナル。

30

【図6 c】マウスの筋肉及び肝臓におけるリボスイッチによって調節されたルシフェラーゼ発現。B a l b / cマウスに、指示した量のA A V 8 . L u c i . C o n 1 (調節不能) またはA A V 8 . L u c i . 1 2 G 6 (調節可能) を静脈内 (I . V .) 注射し、指示した用量の化合物0 0 4を経口投与した。

【図6 d】マウスの筋肉及び肝臓におけるリボスイッチによって調節されたルシフェラーゼ発現。3 0 m g / k gの化合物0 0 4の投与後のA A V 8 . L u c i . C o n 1及びA A V 8 . L u c i . 1 2 G 6からの肝臓におけるルシフェラーゼ発現を示す。

40

【図7 a】マウスの筋肉におけるリボスイッチによって調節されたルシフェラーゼ発現。B a l b / cマウスにA A V 8 . L u c i . C o n 1 (調節不能) を筋肉内 (I . M .) 注射し、指示した用量の化合物0 0 4を経口投与した。ルシフェラーゼ活性を、化合物の経口投薬後の指示した時点で測定した。化合物0 0 4処理前及び処理後の各A A V注射群からの代表的なマウスの生物発光画像。

【図7 b】マウスの筋肉におけるリボスイッチによって調節されたルシフェラーゼ発現。B a l b / cマウスにA A V 8 . L u c i . 1 2 G 6 (調節可能) を筋肉内 (I . M .) 注射し、指示した用量の化合物0 0 4を経口投与した。ルシフェラーゼ活性を、化合物の経口投薬後の指示した時点で測定した。化合物0 0 4処理前及び処理後の各A A V注射群におけるマウス (n = 5) からの全身イメージングのルシフェラーゼ発光シグナル。

50

【図 7 c】マウスの筋肉におけるリボスイッチによって調節されたルシフェラーゼ発現。
B a l b / c マウスに、指示した量の A A V 8 . L u c i . C o n 1 (調節不能) または
A A V 8 . L u c i . 1 2 G 6 (調節可能) を筋肉内注射し、指示した用量の化合物 0 0
4 を経口投与した。

【図 8】インビボでの筋肉におけるリボスイッチによって調節されたマウス E p o 発現。
マウスに、指示した量の A A V 8 . m E p o - 1 2 G 6 ベクターを注射し、経口投与によ
り指示した用量の化合物 0 0 4 で処理した。血清マウス E p o 発現を、マウス E p o 特異
的 E L I S A を使用して測定した。

【図 9】エリスロポエチン (E p o) の発現は、経口小分子に対する用量応答で、慢性腎
疾患 (C K D) 関連貧血におけるヘモクリットを回復させる。ヘマトクリットに対する E
p o のリボスイッチ調節発現の影響を、慢性腎疾患 (C K D) 関連貧血のマウスモデルで
評価した。経口投与により化合物 0 0 4 を 2 0 回投与した後、貧血マウスのヘマトクリッ
トが増加し、1 0 0 m g / k g 用量群で最大の増加が見られた。しかしながら、A A V 8
. m E p o . 1 2 G 6 を注射したが、化合物 0 0 4 で処理しなかった貧血マウスのヘマト
クリットは増加せず、A A V 8 . m E p o . 1 2 G 6 を送達しなかった貧血マウスのヘマ
トクリットと同じままであった (a)。3 0 0 m g / k g での 1 5 日間にわたるより高い
化合物用量の 1 0 回投与で処理したマウスにおいて、ヘマトクリットは、より低い A A V
用量 (1 マウス当たり 1×10^{10} v g) を注射したマウス群において正常レベルに回復
した。対照的に、比較的高い A A V 用量 (マウス当たり 2.5×10^{10} v g) を注射し
たマウスのヘマトクリットは、正常ヘマトクリットレベルを超えた。(b)。これらの結
果は、リボスイッチ誘導剤処理後に送達した A A V ベクターから E p o が誘導され、誘導
された E p o が赤血球生成を刺激し、貧血動物におけるヘマトクリットの増加をもたらした
ことを示す。

【図 1 0 a】副甲状腺ホルモン (P T H) の制御分泌は、血清カルシウムを増加させる。
リボスイッチ 1 2 G 6 は、用量依存的に h P T H 発現を調節した (図 1 0 a)。この調節
された h P T H を A A V ベクターを介してマウスに送達した際に、化合物 0 0 4 処理がマ
ウスにおける h P T H の用量依存的産生を誘導し (図 1 0 b)、それ故に、血清カルシウ
ム濃度の増加を誘導した (図 1 0 c)。

【図 1 0 b】副甲状腺ホルモン (P T H) の制御分泌は、血清カルシウムを増加させる。
リボスイッチ 1 2 G 6 は、用量依存的に h P T H 発現を調節した (図 1 0 a)。この調節
された h P T H を A A V ベクターを介してマウスに送達した際に、化合物 0 0 4 処理がマ
ウスにおける h P T H の用量依存的産生を誘導し (図 1 0 b)、それ故に、血清カルシウ
ム濃度の増加を誘導した (図 1 0 c)。

【図 1 0 c】副甲状腺ホルモン (P T H) の制御分泌は、血清カルシウムを増加させる。
リボスイッチ 1 2 G 6 は、用量依存的に h P T H 発現を調節した (図 1 0 a)。この調節
された h P T H を A A V ベクターを介してマウスに送達した際に、化合物 0 0 4 処理がマ
ウスにおける h P T H の用量依存的産生を誘導し (図 1 0 b)、それ故に、血清カルシウ
ム濃度の増加を誘導した (図 1 0 c)。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 3】

本明細書では、式 I ~ X X I I の小分子に結合するか、または別様にその存在に応答す
るアプタマー配列が提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるアプタ
マー配列は、小分子リガンドの存在または不在に応答した標的遺伝子の発現の調節に有用
である。本明細書に開示されるアプタマー配列を含む組換えリボスイッチ、ならびに標的
遺伝子の発現を調節するための組換えポリヌクレオチドカセットも企図され、ここで、ポ
リヌクレオチドカセットは本明細書に開示されるリボスイッチをコードする配列を含む。
治療遺伝子を含む標的遺伝子を調節するために、かつ治療を必要とする対象を治療するた
めに、アプタマー、リボスイッチ、及び／またはポリヌクレオチドカセットを使用する方
法も本明細書に提供される。

【0 0 4 4】

アプタマー

アプタマーは、三次元構造に折り畳むことによって、高い親和性及び特異性を有する特定のリガンドに非共有結合する一本鎖核酸分子である。アプタマーリガンドとしては、イオン、小分子、タンパク質、ウイルス、及び細胞が挙げられる。

【0045】

アプタマーリガンドは、例えば、有機化合物、アミノ酸、ステロイド、炭水化物、またはヌクレオチドとすることができる。小分子アプタマーリガンドの非限定的な例としては、抗生物質、治療薬、色素、補因子、代謝物、分子マーカー、神経伝達物質、汚染物質、毒素、食品混和物、発がん性物質、乱用薬物が挙げられる。したがって、アプタマーは、小分子の検出に有用である。アプタマーによる小分子検出の適用には、環境モニタリング、食品安全、医学（診断を含む）、微生物学、分析化学、法科学、農業、及び基礎生物学研究が含まれる。

【0046】

本明細書で使用される場合「アプタマー」という用語は、リガンドのクラスに特異的に結合するRNAポリヌクレオチド（またはRNAポリヌクレオチドをコードするDNA配列）を指す。「リガンド」という用語は、アプタマーによって特異的に結合される分子を指す。アプタマーは、意図された標的分子（すなわち、リガンド）と複合体を形成することができる結合領域を有する。アプタマーは、典型的には、約15～約200ヌクレオチド長である。より一般的には、アプタマーは、約30～約100ヌクレオチド長、例えば、70～90ヌクレオチド長である。アプタマーは、典型的には、アプタマーがステムを形成する複数の対（P）領域と、アプタマーが連結（J）領域またはループ（L）領域を形成する不對領域とを含む。対領域は、5'末端から開始して連続して番号付けすることができ（P1）、各ステムを連続して番号付けすることができる（P2、P3など）。ループ（L1、L2など）は、隣接する対領域に基づいて番号付けされ、連結領域は、それらが結合する対領域に従って番号付けされる。

【0047】

一態様では、本開示は、小分子（例えば、本明細書に開示される小分子のうちの1つ以上）に結合するアプタマーを提供し、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTX₁₃
X₁₄X₁₅CCGGX₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁CCGGX₂₂X₂₃CAGG
GAG（配列番号2）を含み、ここで、

X₁が、C、G、またはTであり、

X₂～X₅が、任意のヌクレオチドであり、

X₆が、任意のヌクレオチドであり、X₇が、A、G、またはTであり、

X₈～X₁₀が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂が、A、C、またはTであり、

X₁₃～X₂₀、

X₂₁が、C、G、Tであり、

X₂₂及びX₂₃が、任意のヌクレオチドである。

【0048】

複数の実施形態では、X₁～X₆は、それぞれ、同時にC、A、T、C、G、及びAではなく、X₇～X₁₂は、それぞれ、同時にA、T、T、G、C、及びAではなく、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及びX₂₃は、それぞれ、同時にG、A、T、C、及びGではない、及び／またはX₁₆～X₂₁は、それぞれ、同時にA、T、C、A、T、及びGではない。複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマー配列の5'末端及び3'末端が、それぞれ、C及びGでない場合、上記の制限のうちの1つ以上がアプタマーに適用される。

【0049】

一態様では、本開示は、小分子に結合するアプタマーを提供し、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTX₁₃
X₁₄X₁₅CCGGX₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁CCGGX₂₂X₂₃CAGG
GAG（配列番号2）を含み、ここで、

X₁が、CまたはTであり、

X₂が、任意のヌクレオチドであり、

X₃が、任意のヌクレオチドであり、

X₄が、GまたはTであり、

10

X₅が、A、G、またはTであり、

X₆が、AまたはGであり、

X₇が、AまたはTであり、

X₈が、A、C、またはTであり、

X₉が、A、C、またはTであり、

X₁₀が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂が、Aであり、

X₁₃が、A、C、またはGであり、

20

X₁₄が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₅が、C、G、またはTであり、

X₁₆が、GまたはTであり、

X₁₇が、AまたはTであり、

X₁₈が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₉が、AまたはGであり、

X₂₀が、A、G、Tであり、

X₂₁が、C、G、Tであり、

X₂₂が、Tであり、

X₂₃が、A、G、またはTである（統合して、配列番号681、すなわち、配列番号681が、この段落に列挙されているX₁～X₂₃に対して列挙された制限を有する）。

30

【0050】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTX₁₃
X₁₄X₁₅CCGGX₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁CCGGX₂₂X₂₃CAGG
GAG（配列番号2）を含み、ここで、

X₁が、CまたはTであり、

X₂が、任意のヌクレオチドであり、

X₃が、任意のヌクレオチドであり、

X₄が、GまたはTであり、

40

X₅が、A、G、またはTであり、

X₆が、AまたはGであり、

X₇が、Aであり、

X₈が、A、C、またはTであり、

X₉が、A、C、またはTであり、

X₁₀が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、

X₁₂が、Aであり、

X₁₃が、A、C、またはGであり、

X₁₄が、任意のヌクレオチドであり、

50

X₁₅ が、C、G、またはTであり、
X₁₆ が、GまたはTであり、
X₁₇ が、AまたはTであり、
X₁₈ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₉ が、AまたはGであり、
X₂₀ が、A、G、Tであり、
X₂₁ が、C、G、Tであり、
X₂₂ が、Tであり、
X₂₃ が、A、G、またはTである（統合して、配列番号682）。

【0051】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTGATCCGGA
TCATGCCGGCGCGCAGGGAG（配列番号4）を含み、ここで、

X₇ が、A、G、またはTであり、
X₈ が、任意のヌクレオチドであり、
X₉ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、A、C、またはTである（統合して、配列番号683）。

【0052】

複数の実施形態では、X₇～X₁₂は、それぞれ、同時にA、T、T、G、C、及びAではない。

【0053】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTGATCCGGA
TCATGCCGGCGCGCAGGGAG（配列番号4）を含み、ここで、

X₇ が、AまたはTであり、
X₈ が、A、C、またはTであり、
X₉ が、A、C、またはTであり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、Aである（統合して、配列番号684）。

【0054】

複数の実施形態では、X₇～X₁₂は、それぞれ、同時にA、T、T、G、C、及びAではない。

【0055】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTGATCCGGA
TCATGCCGGCGCGCAGGGAG（配列番号4）を含み、ここで、

X₇ が、Aであり、
X₈ が、A、C、またはTであり、
X₉ が、A、C、またはTであり、
X₁₀ が、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ が、任意のヌクレオチドであるか、またはヌクレオチドではなく、
X₁₂ が、Aである（統合して、配列番号685）。

【0056】

複数の実施形態では、X₇～X₁₂は、それぞれ、同時にA、T、T、G、C、及びA

10

20

30

40

50

ではない。

【0057】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGGAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATC
ATGCCGGCGCGCAGGGAG (配列番号3) を含み、ここで、

X₁が、C、G、またはTであり、

X₂が、任意のヌクレオチドであり、

X₃が、任意のヌクレオチドであり、

X₄が、任意のヌクレオチドであり、

X₅が、任意のヌクレオチドであり、

X₆が、任意のヌクレオチドである (統合して、配列番号686)。

【0058】

複数の実施形態では、X₁～X₆は、それぞれ、同時にC、A、T、C、G、及びAではない。

【0059】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGGAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATC
ATGCCGGCGCGCAGGGAG (配列番号3) を含み、ここで、

X₁が、CまたはTであり、

X₂が、任意のヌクレオチドであり、

X₃が、任意のヌクレオチドであり、

X₄が、任意のヌクレオチドであり、

X₅が、A、G、またはTであり、

X₆が、任意のヌクレオチドである (統合して、配列番号687)。

【0060】

複数の実施形態では、X₁～X₆は、それぞれ、同時にC、A、T、C、G、及びAではない。

【0061】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGGAAGX₁
X₂AX₃X₄X₅X₆CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATC
ATGCCGGCGCGCAGGGAG (配列番号3) を含み、ここで、

X₁が、CまたはTであり、

X₂が、任意のヌクレオチドであり、

X₃が、任意のヌクレオチドであり、

X₄が、GまたはTであり、

X₅が、A、G、またはTであり、

X₆が、AまたはGである (統合して、配列番号688)。

【0062】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGGCTGAGAGGGATGGGAAGCA
ATCGACCATCGACCCATTGCACCTX₁₃X₁₄X₁₅CCGGATC
ATGCCGGX₂₂X₂₃CAGGGAG (配列番号5) を含み、ここで、

X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及びX₂₃が、任意のヌクレオチドである。

【0063】

複数の実施形態では、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₂、及びX₂₃は、それぞれ、同時にG、A、T、C、及びGではない。

【0064】

10

20

30

40

50

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCATTGCACTCTX₁₃X₁₄X₁₅CCGGATC
ATGCCGGX₂₂X₂₃CAGGGAG (配列番号5) を含み、ここで、

X₁₃ が、A、C、またはGであり、

X₁₄ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₅ が、C、G、またはTであり、

X₂₂ が、Tであり、

X₂₃ が、A、G、またはTである (統合して、配列番号689)。

【0065】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCATTGCACTCTGATCCGGX₁₆X₁₇X₁₈
X₁₉X₂₀X₂₁CCGGCGCAGGGAG (配列番号6) を含み、ここで、

X₁₆ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₇ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₈ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₉ が、任意のヌクレオチドであり、

X₂₀ が、任意のヌクレオチドであり、

X₂₁ が、C、G、Tである (統合して、配列番号690)。

【0066】

複数の実施形態では、X₁₆～X₂₁は、それぞれ、同時にA、T、C、A、T、及びGではない。

【0067】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、

CTGGGGAGTCTTTCATGCGGGGGCTGAGAGGATGGAAAGCA
ATCGACCATCGACCCATTGCACTCTGATCCGGX₁₆X₁₇X₁₈
X₁₉X₂₀X₂₁CCGGCGCAGGGAG (配列番号6) を含み、ここで、

X₁₆ が、GまたはTであり、

X₁₇ が、AまたはTであり、

X₁₈ が、任意のヌクレオチドであり、

X₁₉ が、AまたはGであり、

X₂₀ が、A、G、Tであり、

X₂₁ が、C、G、Tである (統合して、配列番号691)。

【0068】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号1及び7～558からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号1及び7～558からなる群から選択される配列を含む。

【0069】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～17、89～96、174～349、及び358～583からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～17、89～96、174～349、及び358～583からなる群から選択される配列を含む。

【0070】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～11、89～94、174～349、及び358～447からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一であるか、または少なくとも99%同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号7～11、89～94、174～349、及び

10

20

30

40

50

3 5 8 ~ 4 4 7 からなる群から選択される配列を含む。

【0071】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号 1 7 4、3 5 8、3 6 3、及び 3 7 8 からなる群から選択される配列と少なくとも 9 5 % 同一であるか、または少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、配列番号 1 7 4、3 5 8、3 6 3、及び 3 7 8 からなる群から選択される配列を含む。

【0072】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列の最初のヌクレオチド及び最後のヌクレオチドは、任意のヌクレオチドであってもよく、ヌクレオチドでなくてもよい。複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列の最初の 2 個のヌクレオチド及び最後の 2 個のヌクレオチドは、任意のヌクレオチドであってもよく、ヌクレオチドでなくてもよい。これらの実施形態では、アプタマーをコードする配列の 5' 及び 3' である追加の配列が存在してもよく、リボスイッチのステム形成配列の一部を形成してもよい。

10

【0073】

一態様では、本開示は、本明細書に開示されるアプタマーをコードする配列によってコードされるアプタマーを提供する。

【0074】

当業者であれば、本明細書に記載のアプタマーがリボ核酸 (RNA) 分子であり得ることを理解するであろう。複数の実施形態では、本明細書に記載のアプタマーは、例えば、hnRNA、mRNA、siRNA、または miRNA を含む、より長い RNA ポリヌクレオチドの一部である。

20

【0075】

アプタマーリガンド

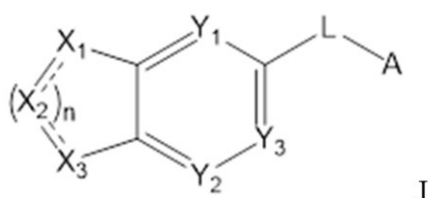
複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーは、表 A の小分子を含む、式 I ~ XXII に従う構造を有する小分子を含む、本明細書に開示される小分子 (リガンド) に結合するか、または別様にその存在もしくは付加に応答する。

【0076】

複数の実施形態では、小分子は、式 I に従う構造であって、

【化 5】

30



I

式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 が、各事例において、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、ここで、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同時に O または S であるように選択されず、

40

破線が、任意選択の二重結合を表し、

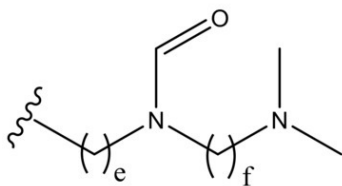
Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 が、各事例において、独立して、 CR_2 及び N から選択され、

n が、1 または 2 であり、ここで、 n が 1 である場合、破線の一つのみが二重結合であり、

$L-A$ が、

50

【化 6】

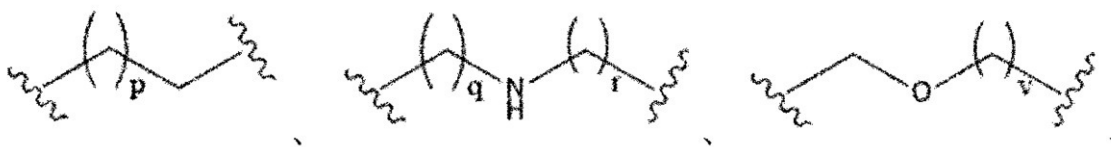


10

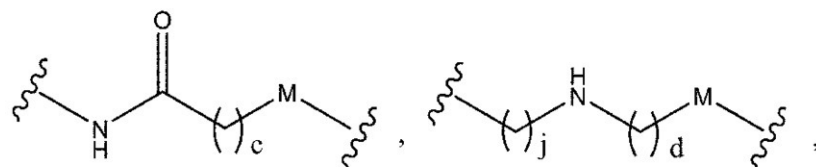
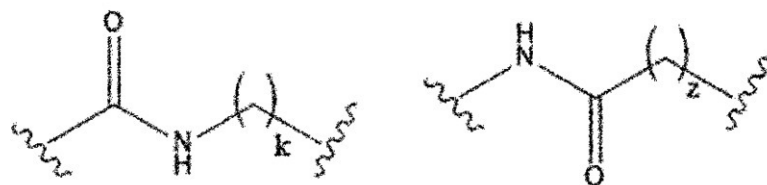
であるか、または

L が、

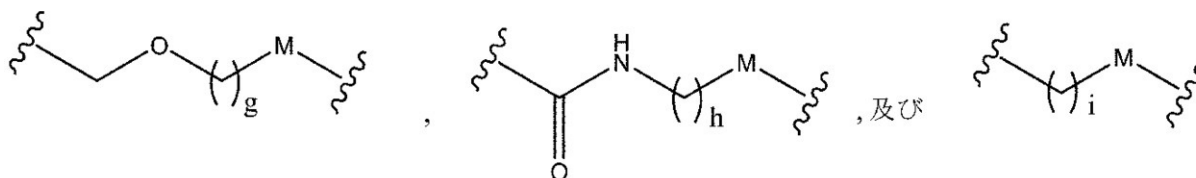
【化 7】



20



30



から選択され、

式中、k、p、q、r、及びvが独立して、整数0、1、2、3、4、5、6、7、8、

40

9、及び10から選択され、zが、整数1、2、3、4、及び5から選択され、

c、d、e、f、g、h、及びiが独立して、整数1、2、3、4、5、6、7、8、9

、及び10から選択され、jが、整数0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び1

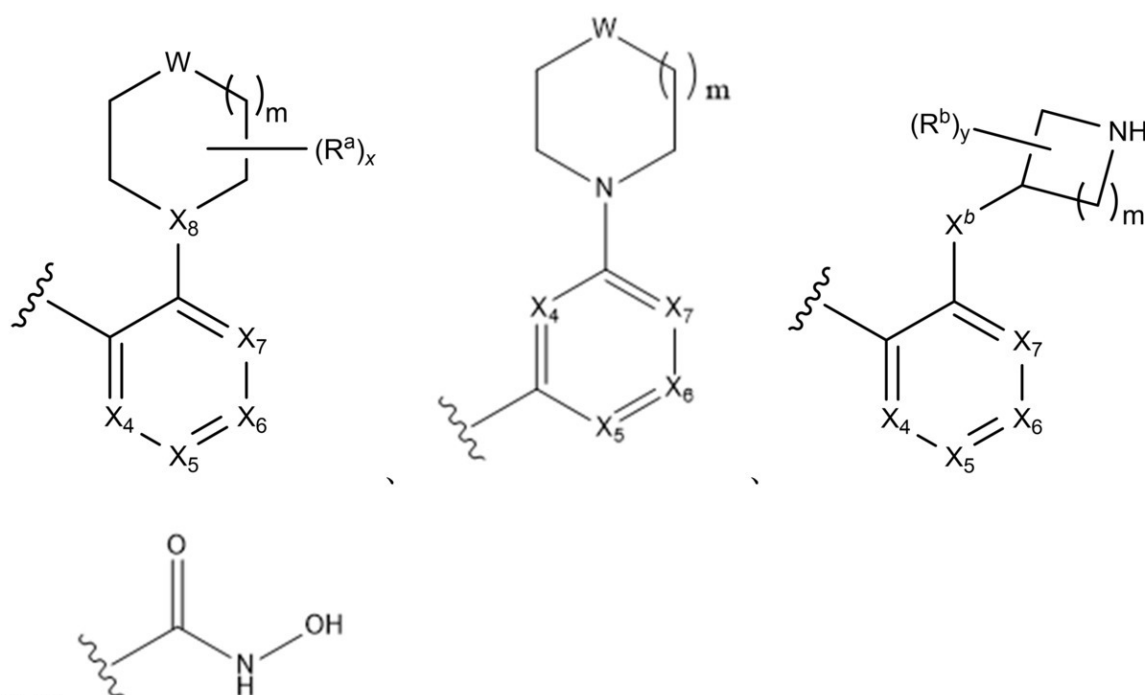
0から選択され、

Mが、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-$ 、及び
 $-\text{C}(=\text{O})-$ から選択され、

Aが、

50

【化 8】



10

20

及び

から選択され、

式中、X₄、X₅、X₆、及びX₇が独立して、C R₃及びNから選択され、

X₈が、NまたはCHであり、

X^bが、O、NH、及びNCH₃から選択され、

ここで、R₁、R₂、及びR₃が各々独立して、-H、-Cl、-Br、-I、-F、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-OH、-CN、-NO₂、-NH₂、-NH(C₁~C₆アルキル)、-N(C₁~C₆アルキル)₂、-COOH、-COO(C₁~C₆アルキル)、-CO(C₁~C₆アルキル)、-O(C₁~C₆アルキル)、-OCO(C₁~C₆アルキル)、-NCO(C₁~C₆アルキル)、-CONH(C₁~C₆アルキル)、及び置換または非置換C₁~C₆アルキルから選択され、

30

それに加えて、またはその代替として、隣接する環位置上の2個のR₃が一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0~2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、

mが、1または2であり、

R^aが各々独立して、C₁~C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個のR^aがオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個のR^aが、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4~6員炭素環もしくは4~6員複素環を形成し、

40

xが、0、1、2または3であり、

R^bが各々独立して、C₁~C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個のR^bがオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個のR^bが、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4~6員炭素環もしくは4~6員複素環を形成し、

yが、0、1、2または3であり、

Wが、OまたはNR₄であり、ここで、R₄が、-H、-CO(C₁~C₆アルキル)、置換または非置換C₁~C₆アルキル、置換または非置換アリール、置換または

50

非置換ヘテロアリール、置換または非置換シクロアルキル、 $-CO$ （アリール）、 $-CO$ （ヘテロアリール）、及び $-CO$ （シクロアルキル）から選択されるが、

但し、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 のうちの少なくとも2個がNであることを条件とする、構造、

またはその薬学的に許容される塩を有する。

【0077】

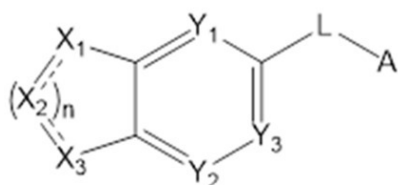
上記の式の複数の実施形態では、 y は0である。

【0078】

複数の実施形態では、小分子は、式IIに従う構造であって、

【化9】

10



式 (I I)

式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 が、各事例において、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、N、NH、O、及びSから選択され、ここで、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同時にOまたはSであるように選択されず、

20

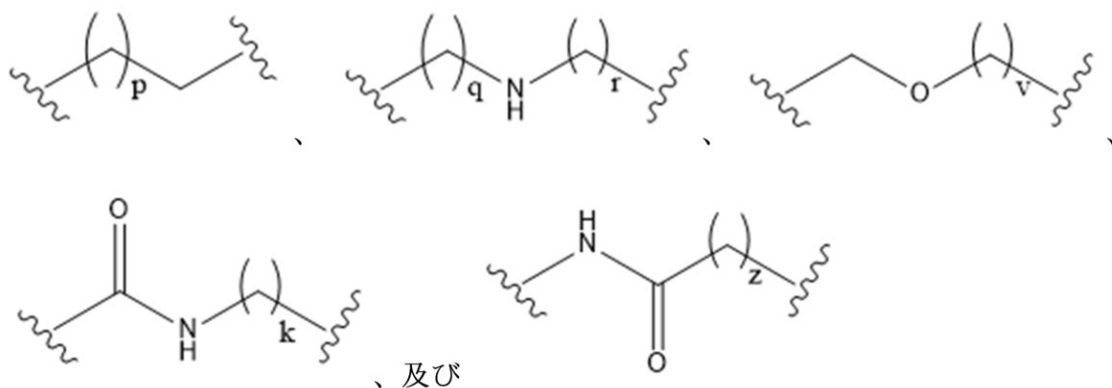
破線が、任意選択の二重結合を表し、

Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 が、各事例において、独立して、 CR_2 及びNから選択され、 n が、1または2であり、ここで、 n が1である場合、破線的一方のみが二重結合であり、

Lが、

【化10】

30



40

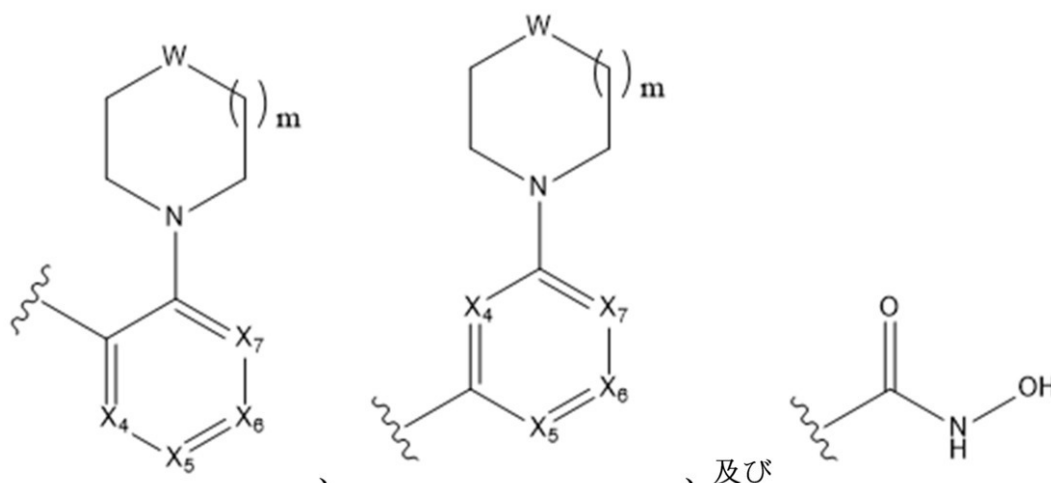
から選択され、

式中、 k 、 p 、 q 、 r 、及び v が独立して、整数0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10から選択され、 z が、整数1、2、3、4、及び5から選択され、

Aが、

50

【化 1 1】



10

から選択され、

式中、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 が独立して、 CR_3 及びNから選択され、

ここで、 R_1 、 R_2 、及び R_3 が各々独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-N$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-N$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル) $_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-CO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-O$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-OCO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-NCO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $-CONH$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、及び置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

20

m が、1または2であり、

W が、Oまたは NR_4 であり、ここで、 R_4 が、 $-H$ 、 $-CO$ ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換シクロアルキル、 $-CO$ (アリール)、 $-CO$ (ヘテロアリール)、及び $-CO$ (シクロアルキル)から選択されるが、

但し、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 のうちの少なくとも2個がNであることを条件とする、構造、

30

またはその薬学的に許容される塩を有する。

【0079】

上記の式のある実施形態では、 X_1 、 X_2 、または X_3 のうちの少なくとも1個はNである。

【0080】

上記の式のある実施形態では、 X_1 はNである。

【0081】

上記の式のある実施形態では、 X_2 はNである。

【0082】

上記の式のある実施形態では、 X_3 はNである。

40

【0083】

上記の式のある実施形態では、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のうちの2個はNである。

【0084】

上記の式のある実施形態では、 X_1 及び X_3 はNである。

【0085】

上記の式のある実施形態では、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1個はNである。

【0086】

上記の式のある実施形態では、 Y_1 はNである。

50

【0087】

上記の式のある実施形態では、 Y_2 は N である。

【0088】

上記の式のある実施形態では、 Y_3 は N である。

【0089】

上記の式のある実施形態では、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも 1 個は CR_2 である。

【0090】

上記の式のある実施形態では、 Y_1 は CR_2 である。

【0091】

上記の式のある実施形態では、 Y_2 は CR_2 である。

【0092】

上記の式のある実施形態では、 Y_3 は CR_2 である。

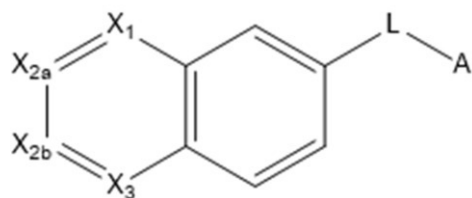
【0093】

上記の式のある実施形態では、 n は 2 である。

【0094】

複数の実施形態では、小分子は、式 III に従う構造を有し、

【化 12】



式 (III)

式中、

X_{2a} 及び X_{2b} が独立して、 CR_1 及び N から選択され、

X_1 及び X_3 が独立して、 CR_1 及び N から選択され、

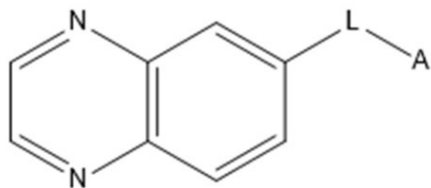
L 及び A が、式 (II) について提供されたとおりであり、

X_1 、 X_{2a} 、 X_{2b} 、及び X_3 のうちの 2 個が、N である。

【0095】

複数の実施形態では、小分子は、式 (IV) に従う構造を有し、

【化 13】



式 (IV)

式中、

L 及び A が、式 (II) について提供されたとおりである。

【0096】

本化合物の上記のいずれかの実施形態において、L は、

10

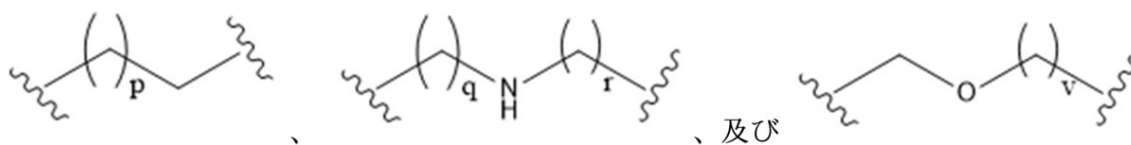
20

30

40

50

【化 1 4】



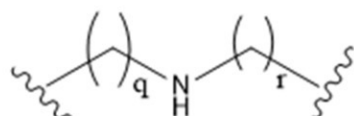
から選択され得る。

【0097】

10

化合物の上記のいずれかの実施形態にあるように、Lは、

【化 1 5】



であるように選択され得る。

【0098】

20

上記の実施形態のいずれかにおいて、q及びrが0または1である、化合物。

【0099】

上記の実施形態のいずれかにおいて、qが1である、化合物。

【0100】

上記の実施形態のいずれかにおいて、rが1である、化合物。

【0101】

上記の実施形態のいずれかにおいて、rが0である、化合物。

【0102】

上記の実施形態のいずれかにおいて、q及びrが1である、化合物。

【0103】

30

上記の実施形態のいずれかにおいて、qが1であり、rが0である、化合物。

【0104】

上記の実施形態のいずれかにおいて、mが1である、化合物。

【0105】

上記の実施形態のいずれかにおいて、Wが、NH、O、及びN(C₁～C₆アルキル)から選択される、化合物。

【0106】

上記の実施形態のいずれかにおいて、WがNHである、化合物。

【0107】

上記の実施形態のいずれかにおいて、X₄、X₅、X₆、及びX₇のうちの少なくとも1個がNである、化合物。

40

【0108】

上記の実施形態のいずれかにおいて、X₄がNである、化合物。

【0109】

上記の実施形態のいずれかにおいて、X₅がNである、化合物。

【0110】

上記の実施形態のいずれかにおいて、X₆がNである、化合物。

【0111】

上記の実施形態のいずれかにおいて、X₇がNである、化合物。

【0112】

50

上記の実施形態のいずれかにおいて、 X_4 及び X_6 が N である、化合物。

【0113】

上記の実施形態のいずれかにおいて、 X_5 及び X_7 が N である、化合物。

【0114】

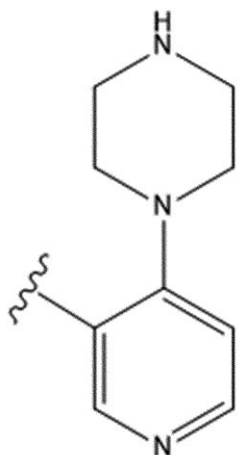
上記の実施形態のいずれかにおいて、 X_5 または X_6 が N であり、 X_4 及び X_7 の両方が独立して、 CR_2 である、化合物。

【0115】

上記の実施形態のいずれかにおいて、A が、

【化16】

10



20

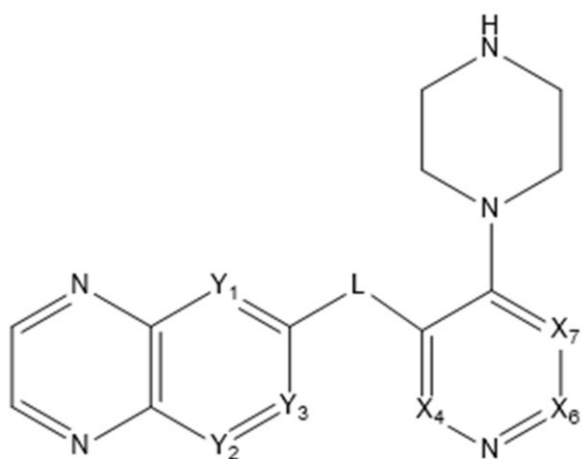
である、化合物。

【0116】

上記の実施形態のいずれかにおいて、式Vの構造を有する化合物。

【化17】

30



(V)

40

【0117】

上記の実施形態のいずれかにおいて、L が、

50

【化 1 8】



である、化合物。

10

【0 1 1 8】

上記の実施形態のいずれかにおいて、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 が、各事例において、独立して、 CR_2 及び N から選択され、 R_1 が、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-OH$ 、及び $-NH_2$ から選択される、化合物。

【0 1 1 9】

上記の実施形態のいずれかにおいて、 z が2である、化合物。

【0 1 2 0】

上記の実施形態のいずれかにおいて、 Y_2 が N である、化合物。

【0 1 2 1】

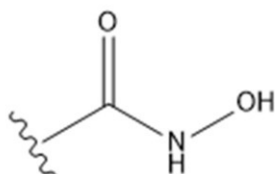
上記の実施形態のいずれかにおいて、 Y_2 が CR_2 であり、 R_1 が、 $-H$ 、 $-F$ 、 $-OH$ 、及び $-NH_2$ から選択される、化合物。

20

【0 1 2 2】

上記の実施形態のいずれかにおいて、 A が、

【化 1 9】



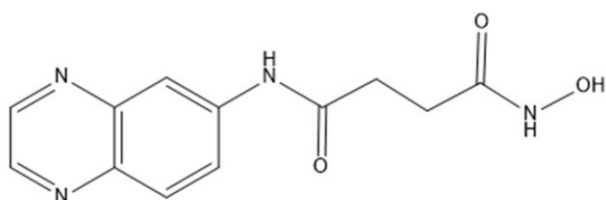
30

である、化合物。

【0 1 2 3】

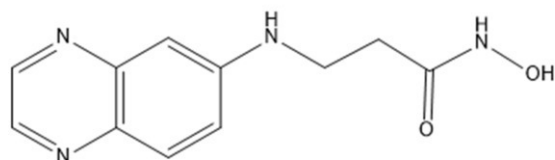
複数の実施形態では、小分子は、以下の式：

【化 2 0】



40

または



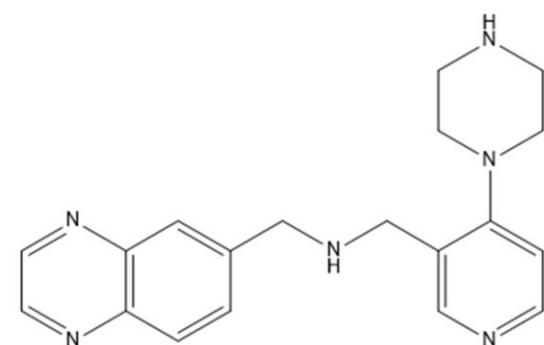
50

に従う構造を有する。

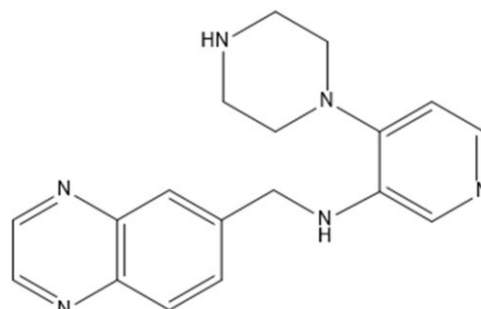
【 0 1 2 4 】

他の実施形態では、小分子は、以下の式：

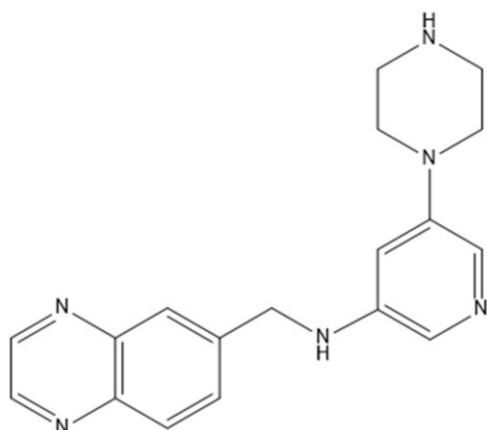
【化 2 1】



,



、または

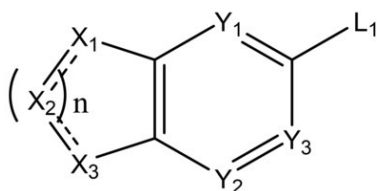


に従う構造を有する。

【 0 1 2 5 】

他の実施形態では、小分子は、式 V I の構造であって、

【化 2 2】



式 (V I)

式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 が、各事例において、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、ここで、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同時に O または S であるように選択されず、

破線が、任意選択の二重結合を表し、

Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 が、各事例において、独立して、 CR_2 及び N から選択され、

n が、1 または 2 であり、ここで、 n が 1 である場合、破線の方のみが二重結合であり、

L_1 が、

10

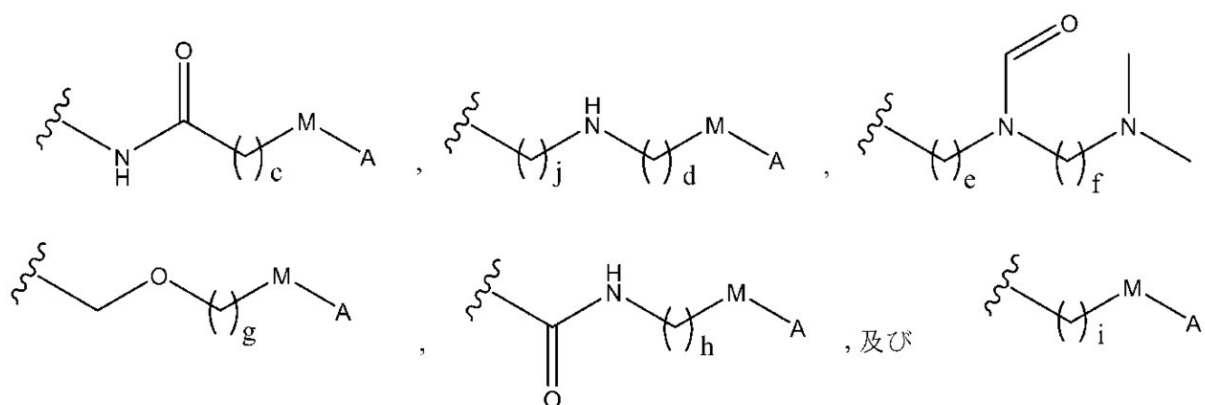
20

30

40

50

【化 2 3】



10

から選択され、

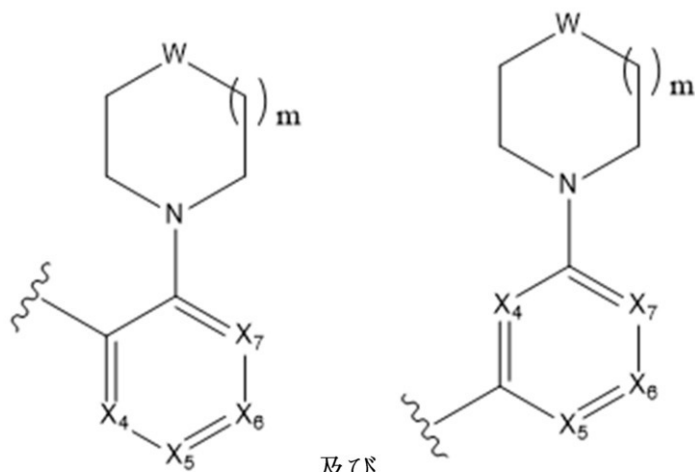
式中、 c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、及び i が独立して、整数 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、 j が、整数 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

M が、 $-NH-$ 、 $-O-$ 、 $-NHC(=O)-$ 、 $-C(=O)NH-$ 、 $-S-$ 、及び $-C(=O)-$ から選択され、

20

A が、

【化 2 4】



30

から選択され、

式中、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 が独立して、 CR_3 及び N から選択され、

ここで、 R_1 、 R_2 、及び R_3 が各々独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-N(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-O(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-OCO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-NCO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、及び置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

40

m が、1 または 2 であり、

W が、 $-O-$ または $-N(R_4)-$ であり、ここで、 R_4 が、 $-H$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換または非置換アリール、置換または非置換ヘテロアリール、置換または非置換シクロアルキル、 $-CO(\text{アリール})$ 、 $-CO(\text{ヘテロアリール})$ 、及び $-CO(\text{シクロアルキル})$ から選択されるが、

50

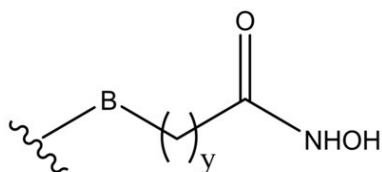
但し、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 のうちの少なくとも2個がNであることを条件とする、構造、

またはその薬学的に許容される塩を有する。

【0126】

追加の実施形態では、Lは

【化25】



10

であり、式中、Bが、 $-NH-$ 及び $-NHC(=O)-$ から選択され、yが、1、2、3、4、及び5から選択される整数である。

【0127】

上記の実施形態において、 X_1 、 X_2 、または X_3 のうちの少なくとも1個がNである、化合物。

【0128】

上記の実施形態において、 X_1 がNである、化合物。

【0129】

上記の実施形態において、 X_2 がNである、化合物。

【0130】

上記の実施形態において、 X_3 がNである、化合物。

【0131】

上記の実施形態において、各事例において、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のうちの2個がNである、化合物。

【0132】

上記の実施形態において、 X_1 及び X_3 がNである、化合物。

30

【0133】

上記の実施形態において、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1個がNである、化合物。

【0134】

上記の実施形態において、 Y_1 がNである、化合物。

【0135】

上記の実施形態において、 Y_2 がNである、化合物。

【0136】

上記の実施形態において、 Y_3 がNである、化合物。

【0137】

上記の実施形態において、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1個が CR_2 である、化合物。

40

【0138】

上記の実施形態において、 Y_1 が CR_2 である、化合物。

【0139】

上記の実施形態において、 Y_2 が CR_2 である、化合物。

【0140】

上記の実施形態において、 Y_3 が CR_2 である、化合物。

【0141】

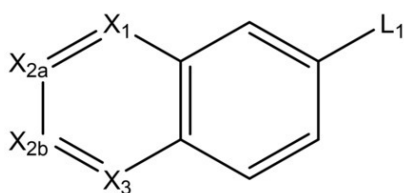
上記の実施形態において、nが2である、化合物。

50

【 0 1 4 2 】

上記のいずれかの実施形態にあるように、式 (V I I) の構造を有する化合物であって、

【化 2 6 】



10

式 (V I I)

式中、

X_{2a} 及び X_{2b} が独立して、 CR_1 及び N から選択され、

X_1 及び X_3 が独立して、 CR_1 及び N から選択され、

L_1 及び R_1 が、式 (I) について提供されたとおりであり、

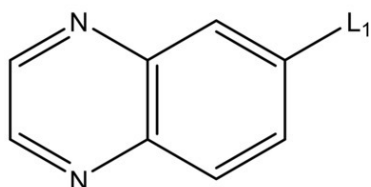
X_1 、 X_{2a} 、 X_{2b} 、及び X_3 のうちの 2 個が、 N である、化合物、またはその薬学的に許容される塩。

20

【 0 1 4 3 】

上記の実施形態において、式 (V I I I) の構造を有する化合物であって、

【化 2 7 】



式 (V I I I)

30

式中、

L_1 が、式 (V I) について提供されたとおりである、化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【 0 1 4 4 】

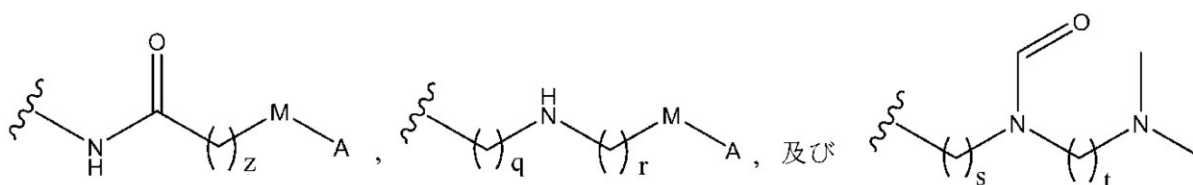
上記の実施形態において、 c 、 d 、 e 、 f 、 g 、 h 、及び i が独立して、整数 1、2、及び 3 から選択される、化合物。

【 0 1 4 5 】

上記の実施形態において、 L_1 が、

【化 2 8 】

40



から選択される、化合物。

【 0 1 4 6 】

上記の実施形態において、 c 、 d 、 e 、及び f が独立して、整数 1、2、及び 3 から選

50

択される、化合物。

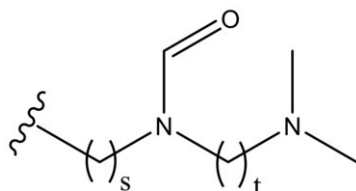
【0147】

上記の実施形態において、c、d、及びeが1である、化合物。

【0148】

上記の実施形態において、L₁が、

【化29】



10

である、化合物。

【0149】

上記の実施形態において、e及びfが独立して、1、2、及び3から選択される、化合物。

【0150】

上記の実施形態において、e及びfが1または2である、化合物。

20

【0151】

上記の実施形態において、eが1である、化合物。

【0152】

上記の実施形態において、fが2である、化合物。

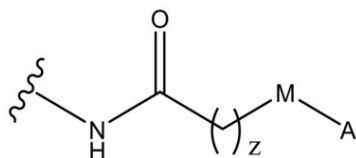
【0153】

上記の実施形態において、eが1であり、fが2である、化合物。

【0154】

上記の実施形態において、L₁が、

【化30】



30

である、化合物。

【0155】

上記の実施形態において、cが1、2、または3である、化合物。

【0156】

上記の実施形態において、cが1である、化合物。

40

【0157】

上記の実施形態において、cが2である、化合物。

【0158】

上記の実施形態において、cが3である、化合物。

【0159】

上記の実施形態において、Mが-NH-、-O-、及び-S-から選択される、化合物。

【0160】

上記の実施形態において、Mが-NH-である、化合物。

50

【0161】

上記の実施形態において、 c が1であり、 M が $-NH-$ である、化合物。

【0162】

上記の実施形態において、 m が1である、化合物。

【0163】

上記の実施形態において、 W が $-NH-$ 、 $-O-$ 、及び $-N(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})-$ から選択される、化合物。

【0164】

上記の実施形態において、 W が $-NH-$ である、化合物。

【0165】

上記の実施形態において、 X_4 、 X_5 、 X_6 、及び X_7 のうちの少なくとも1個が N である、化合物。

【0166】

上記の実施形態において、 X_4 が N である、化合物。

【0167】

上記の実施形態において、 X_5 が N である、化合物。

【0168】

上記の実施形態において、 X_6 が N である、化合物。

【0169】

上記の実施形態において、 X_7 が N である、化合物。

【0170】

上記の実施形態において、 X_4 及び X_6 が N である、化合物。

【0171】

上記の実施形態において、 X_5 及び X_7 が N である、化合物。

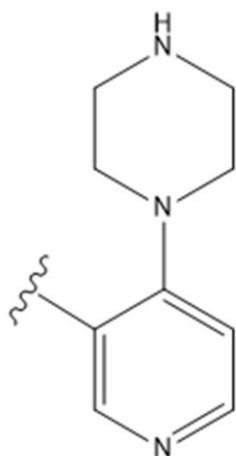
【0172】

上記の実施形態において、 X_5 または X_6 が N であり、 X_4 及び X_7 の両方が独立して、 CR_2 である、化合物。

【0173】

上記の実施形態において、 A が、

【化31】



である、化合物。

【0174】

上記の実施形態において、以下の構造：

10

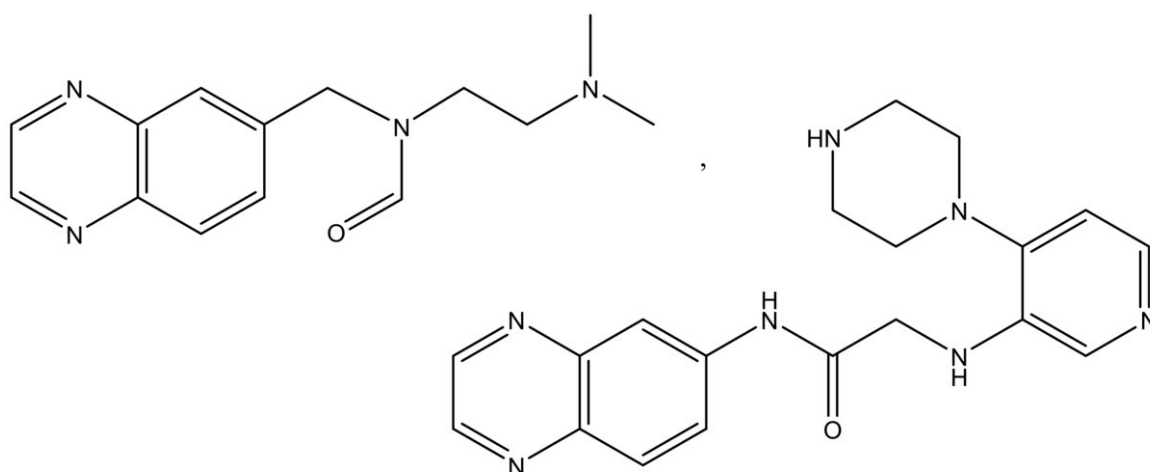
20

30

40

50

【化 3 2】



10

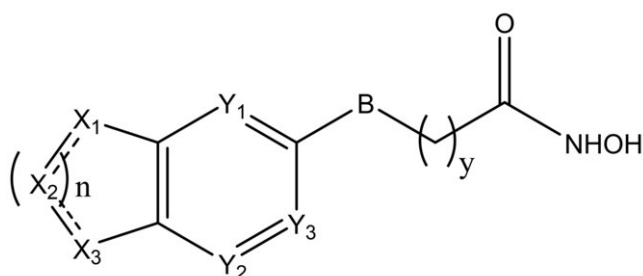
を有する化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【0175】

他の実施形態では、小分子は、式 (IX) の構造であって、

【化 3 3】

20



式 (IX)

30

式中、 X_1 、 X_2 、及び X_3 が、各事例において、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、ここで、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 が、同時に O または S であるように選択されず、

破線が、任意選択の二重結合を表し、

Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 が、各事例において、独立して、 CR_2 及び N から選択され、 R_1 及び R_2 が独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-N(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-O(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-OCO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-NCO(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6 \text{ アルキル})$ 、及び置換または非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

40

n が、1 または 2 であり、ここで、 n が 1 である場合、破線の方のみが二重結合であり、

y が、1、2、3、4、及び 5 から選択される整数であり、

B が、 $-NH-$ 及び $-NHC(=O)-$ から選択される、構造、またはその薬学的に許容される塩を有する。

【0176】

上記の実施形態において、 B が $-NH-$ である、化合物。

【0177】

50

上記の実施形態において、Bが —NH C(=O)— である、化合物。

【0178】

上記の実施形態において、yが1、2、及び3から選択される整数である、化合物。

【0179】

上記の実施形態において、yが1または3である、化合物。

【0180】

上記の実施形態において、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1個がNである、化合物。

【0181】

上記の実施形態において、 Y_1 がNである、化合物。

10

【0182】

上記の実施形態において、 Y_2 がNである、化合物。

【0183】

上記の実施形態において、 Y_3 がNである、化合物。

【0184】

上記の実施形態において、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1個が C R_2 である、化合物。

【0185】

上記の実施形態において、 Y_1 が C R_2 である、化合物。

【0186】

上記の実施形態において、 Y_2 が C R_2 である、化合物。

20

【0187】

上記の実施形態において、 Y_3 が C R_2 である、化合物。

【0188】

上記の実施形態において、 X_1 、 X_2 、または X_3 のうちの少なくとも1個がNである、化合物。

【0189】

上記の実施形態において、各事例において、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のうちの2個がNである、化合物。

【0190】

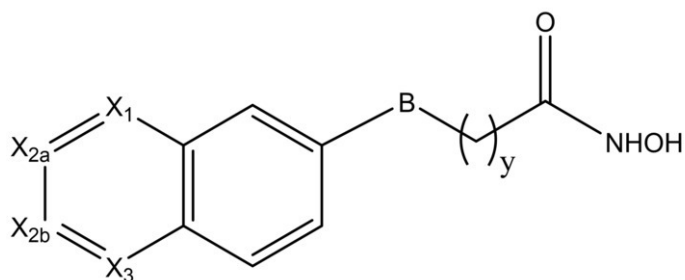
上記の実施形態において、nが2である、化合物。

30

【0191】

上記の実施形態において、式(X)の構造を有する化合物であって、

【化34】



40

式(X)

X_{2a} 及び X_{2b} が独立して、 C R_1 及びNから選択され、

X_1 及び X_3 が独立して、 C R_1 及びNから選択され、

ここで、 X_1 、 X_{2a} 、 X_{2b} 、及び X_3 のうちの2個が、Nであり、

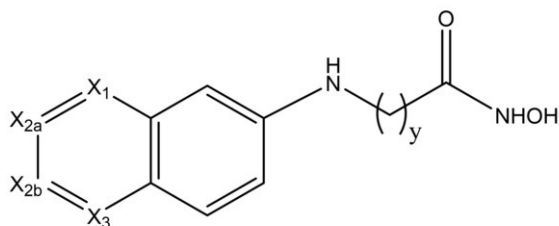
B、 R_1 、及びyが、式(VII)に記載されたとおりである、化合物、またはその薬学的に許容される塩。

50

【0192】

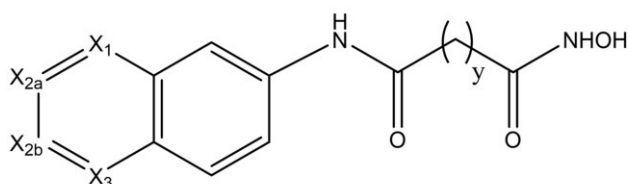
上記の実施形態において、式（X I a）または式（X I b）の構造を有する化合物であって、

【化35】



10

式（X I a）または



式（X I b）

式中、

X_{2a} 及び X_{2b} が独立して、 CR_1 及び N から選択され、

X_1 及び X_3 が独立して、 CR_1 及び N から選択され、

ここで、 X_1 、 X_{2a} 、 X_{2b} 、及び X_3 のうちの2個が、 N であり、

y が、1、2、及び3から選択される整数であり、 R_1 が、式（I X）に記載されたとおりである、化合物、またはその薬学的に許容される塩。

20

【0193】

上記の実施形態において、 y が1である、化合物。

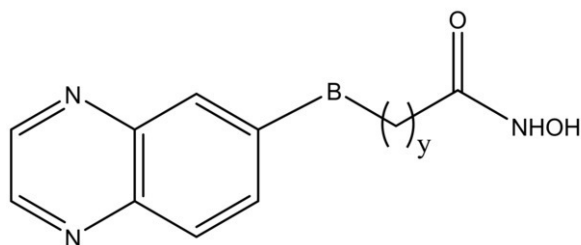
【0194】

上記の実施形態において、 y が3である、化合物。

【0195】

上記の実施形態において、式（X I I）の構造を有する化合物であって、

【化36】



式（X I I）

40

式中、 B 及び y が、式（I X）に記載されたとおりである、化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【0196】

上記の実施形態において、 B が $-NH-$ である、化合物。

【0197】

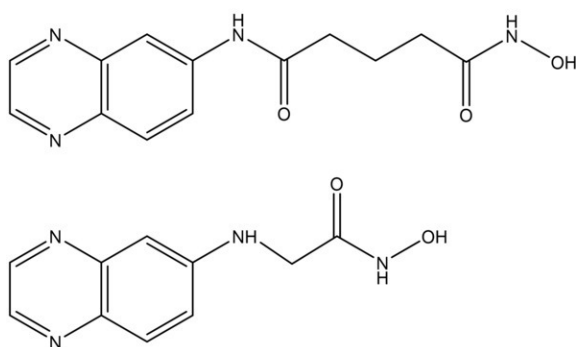
上記の実施形態において、 B が $-NHC(=O)-$ である、化合物。

【0198】

上記の実施形態において、当該化合物が以下の構造：

50

【化 3 7】



10

を有する、化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【0199】

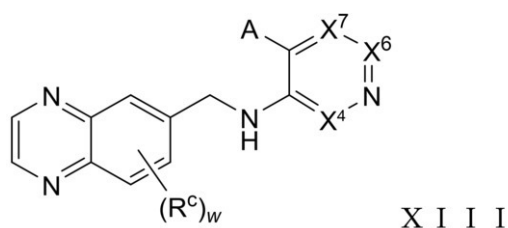
上記の式及び実施形態に従う化合物は、例えば、PCT/US2020/45022に提供されている方法、及び2021年6月2日に出願された米国仮出願第63/195779号の方法に従って調製されてもよく、それらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0200】

他の実施形態では、小分子は、式XIIIに従う構造、

20

【化 3 8】



XIII

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

30

X^4 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、

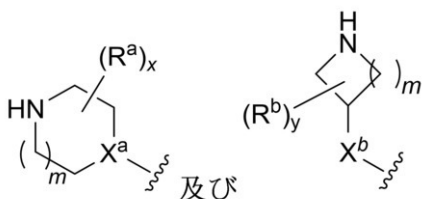
X^6 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、

X^7 が、 CH 、 CR^d 、及び N から選択され、

ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの 0 個または 1 個が N であり、

A が、

【化 3 9】



40

からなる群から選択され、

X^a が、 N 及び CH から選択され、

X^b が、 O 、 NH 、及び NCH_3 から選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキソ基を形成するか

50

、または異なる炭素原子に結合している2個の R^a が、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^b がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^b が、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

m が、1または2であり、

x が、0、1、2または3であり、

y が、0、1、2または3であり、

10

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の2個の R^d が一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、 w が、0、1、または2である。

【0201】

式XIIIIに従う化合物について、 x は、1、2、もしくは3であるように選択されてもよい、 x は、1もしくは2であるように選択されてもよい、または x は、1であるように選択されてもよい。 R^a は、メチル、フルオロ、もしくはクロロであるように選択されてもよい、または R^a は、メチルであるように選択されてもよい。その代替として、 x は0であってもよい。

20

【0202】

式XIIIIに従う化合物について、 y は、0または1であるように選択されてもよい。 R^b は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^b は、メチルであるように選択されてもよい。

【0203】

式XIIIIに従う化合物について、 w は、0または1から選択されてもよい。 R^c は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

30

【0204】

式XIIIIに従う化合物について、 R^d は各々、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、及び $-CHF_2$ から選択されてもよい、または R^d は、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、F、Cl、Br、及び OCH_3 から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の2個の R^d が一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよい。

【0205】

式XIIIIに従う化合物について、 X^a は、Nであってもよい。

40

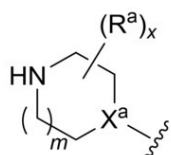
【0206】

式XIIIIに従う化合物について、 X^b は、Oであってもよい。

【0207】

式XIIIIの化合物のいくつかの実施形態では、Aが

【化 4 0】



であるように選択された場合、

x は、1、2、もしくは3である、及び／または

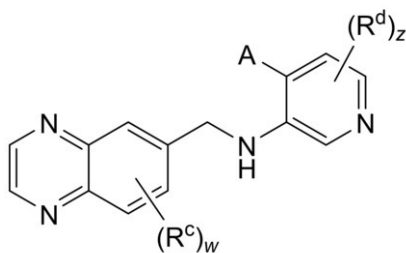
隣接する環位置上の2個の R^d が一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成する。

10

【0208】

他の実施形態では、小分子は、式XIVに従う構造、

【化 4 1】



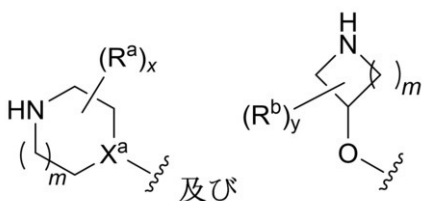
XIV

20

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

Aが、

【化 4 2】



30

からなる群から選択され、

X^a が、N及びCHから選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^a がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^a が、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

40

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個の R^b がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個の R^b が、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

m が、1または2であり、

x が、0、1、2または3であり、

y が、0、1、2または3であり、

50

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、
 R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、
 w が、0、1、または 2 であり、
 z が、0、1、または 2 である。

【0209】

式 X I V に従う化合物について、 x は、1、2、もしくは 3 であるように選択されてもよいが、 x は、1 もしくは 2 であるように選択されてもよいが、または x は、1 であるように選択されてもよい。 R^a は、メチル、フルオロ、もしくはクロロであるように選択されてもよいが、または R^a は、メチルであるように選択されてもよい。その代替として、 x は 0 であってもよい。

10

【0210】

式 X I V に従う化合物について、 y は、0 または 1 であるように選択されてもよい。 R^b は、ハロもしくはメチルから選択されてもよいが、または R^b は、メチルであるように選択されてもよい。

【0211】

式 X I V に従う化合物について、 w は、0 または 1 から選択されてもよい。 R^c は、ハロもしくはメチルから選択されてもよいが、または R^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

20

【0212】

式 X I V に従う化合物について、 z は、1 もしくは 2 であるように選択されてもよいが、または z は、1 であるように選択されてもよい。 R^d は各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、及び $-CHF_2$ から選択されてもよいが、または R^d は、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、F、Cl、Br、及び OCH_3 から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよい。その代替として、 z は 0 であってもよい。

30

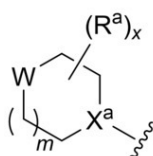
【0213】

式 X I V に従う化合物について、 X^a は、N であってもよい。

【0214】

式 X I V の化合物のいくつかの実施形態では、A が

【化 4 3】



40

であるように選択された場合、

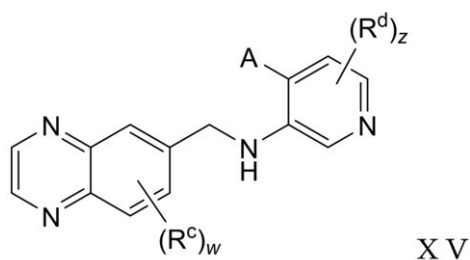
x は、1、2、もしくは 3 である、及び／または隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成する。

【0215】

他の実施形態では、小分子は、式 X V に従う構造、

50

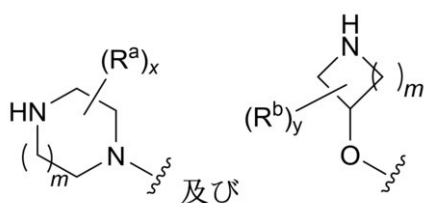
【化 4 4】



10

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、
A が、

【化 4 5】



20

からなる群から選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^a が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4～6 員炭素環もしくは 4～6 員複素環を形成し、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくははその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキシ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4～6 員炭素環もしくは 4～6 員複素環を形成し、

30

m が、1 または 2 であり、

x が、0、1、2 または 3 であり、

y が、0、1、2 または 3 であり、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0～2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

40

w が、0、1、または 2 であり、

z が、0、1、または 2 である。

【0 2 1 6】

式 X V に従う化合物について、x は、1、2、もしくは 3 であるように選択されてもよい、x は、1 もしくは 2 であるように選択されてもよい、または x は、1 であるように選択されてもよい。 R^a は、メチル、フルオロ、もしくはクロロであるように選択されてもよい、または R^a は、メチルであるように選択されてもよい。その代替として、x は 0 であってもよい。

【0 2 1 7】

50

式 X V に従う化合物について、 y は、0 または 1 であるように選択されてもよい。 R^b は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^b は、メチルであるように選択されてもよい。

【0218】

式 X V に従う化合物について、 w は、0 または 1 から選択されてもよい。 R^c は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

【0219】

式 X V に従う化合物について、 z は、1 もしくは 2 であるように選択されてもよい、または z は、1 であるように選択されてもよい。 R^d は各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、及び $-CHF_2$ から選択されてもよい、または R^d は、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、F、Cl、Br、及び OCH_3 から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ~ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよい。その代替として、 z は 0 であってもよい。

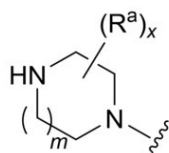
10

【0220】

式 X V の化合物のいくつかの実施形態では、A が

【化 46】

20



であるように選択された場合、

x は、1、2、もしくは 3 である、及び／または

隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ~ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成する。

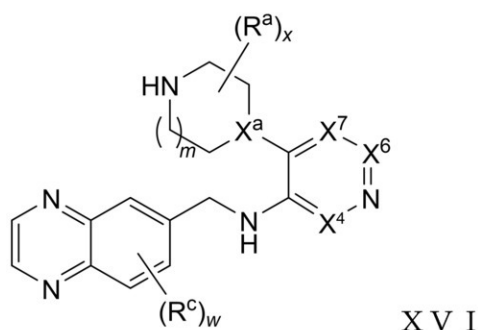
【0221】

30

他の実施形態では、小分子は、式 X V I に従う構造、

【化 47】

40



X V I

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

X^4 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^6 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^7 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの 0 個または 1 個が N であり、

X^a が、N 及び CH から選択され、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CH$

50

F₂、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個のR^aがオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個のR^aが、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

mが、1または2であり、

xが、0、1、2または3であり、

R^cが各々独立して、ハロ、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^dが各々独立して、ハロ、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の2個のR^dが一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、wが、0、1、または2である。

10

【0222】

式XVIに従う化合物について、xは、1、2、もしくは3であるように選択されてもよい、xは、1もしくは2であるように選択されてもよい、またはxは、1であるように選択されてもよい。R^aは、メチル、フルオロ、もしくはクロロであるように選択されてもよい、またはR^aは、メチルであるように選択されてもよい。その代替として、xは0であってもよい。

【0223】

20

式XVIに従う化合物について、wは、0または1から選択されてもよい。R^cは、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、またはR^cは、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

【0224】

式XVIに従う化合物について、R^dは各々、ハロ、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、及び-CHF₂から選択されてもよい、またはR^dは、CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃、F、Cl、Br、及びOCH₃から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の2個のR^dが一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよい。

30

【0225】

式XVIに従う化合物について、X^aは、Nであってもよい。

【0226】

式XVIに従う化合物について、X^bは、Oであってもよい。

【0227】

式XVIの化合物のいくつかの実施形態では、xは、1、2、もしくは3である、及び/または

隣接する環位置上の2個のR^dが一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成する。

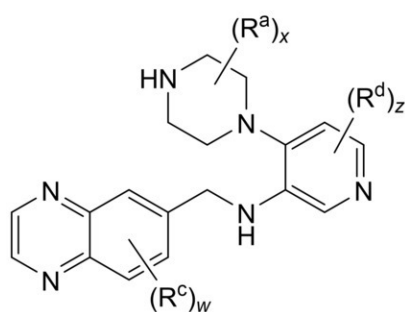
【0228】

40

他の実施形態では、小分子は、式XVIIに従う構造、

50

【化 4 8】



XVI I

10

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

R^a が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^a がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^a が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4～6 員炭素環もしくは 4～6 員複素環を形成し、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

20

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0～2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、

w が、0、1、または 2 であり、

x が、0、1、2 または 3 であり、

z が、0、1、または 2 である。

【0229】

式 XVI I に従う化合物について、 x は、1、2、もしくは 3 であるように選択されてもよい、 x は、1 もしくは 2 であるように選択されてもよい、または x は、1 であるように選択されてもよい。 R^a は、メチル、フルオロ、もしくはクロロであるように選択されてもよい、または R^a は、メチルであるように選択されてもよい。その代替として、 x は 0 であってもよい。

30

【0230】

式 XVI I に従う化合物について、 w は、0 または 1 から選択されてもよい。 R^c は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

【0231】

式 XVI I に従う化合物について、 z は、1 もしくは 2 であるように選択されてもよい、または z は、1 であるように選択されてもよい。 R^d は各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、及び $-CHF_2$ から選択されてもよい、または R^d は各々独立して、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、F、Cl、Br、及び OCH_3 から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0～2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよい。

40

【0232】

式 XVI I の化合物のいくつかの実施形態では、 x は、1、2、もしくは 3 である、及び／または

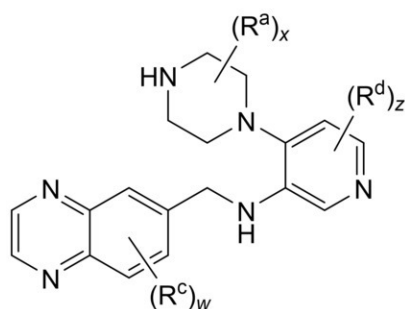
隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0～2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成する。

50

【0233】

他の実施形態では、小分子は、式XVIIIIに従う構造、

【化49】



XVIIII

10

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

R^a が各々独立して、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^c が各々独立して、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

x が、0、1、2または3であり、

w が、0、1、または2であり、

z が、0、1、または2である。

20

【0234】

式XVIIIIに従う化合物について、 x は、1、2、もしくは3であるように選択されてもよい、 x は、1もしくは2であるように選択されてもよい、または x は、1であるように選択されてもよい。 R^a は、メチル、フルオロ、もしくはクロロであるように選択されてもよい、または R^a は、メチルであるように選択されてもよい。その代替として、 x は0であってもよい。

【0235】

式XVIIIIに従う化合物について、 w は、0または1から選択されてもよい。 R^c は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

30

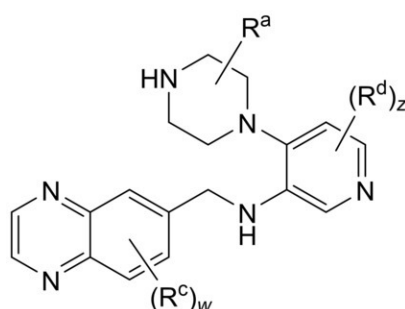
【0236】

式XVIIIIに従う化合物について、 z は、0もしくは1であるように選択されてもよい、または z は、1であるように選択されてもよい。

【0237】

他の実施形態では、小分子は、式XIXに従う構造、

【化50】



XIX

40

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

R^a が、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、

50

ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、 w が、0、1、または 2 であり、

z が、0、1、または 2 である。

10

【0238】

式 X I X に従う化合物について、 R^a は、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されてもよいが、 R^a は、メチル、フルオロ、もしくはクロロであるように選択されてもよいが、または R^a は、メチルであるように選択されてもよい。

【0239】

式 X I X に従う化合物について、 R^c は各々独立して、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されてもよい。

【0240】

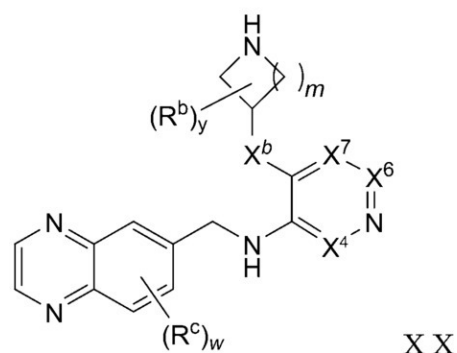
式 X I X に従う化合物について、 R^d は各々独立して、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されてもよい。

20

【0241】

他の実施形態では、小分子は、式 X X に従う構造、

【化 5 1】



30

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

X^4 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^6 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

X^7 が、CH、 CR^d 、及び N から選択され、

ここで、 X^4 、 X^6 、または X^7 のうちの 0 個または 1 個が N であり、

40

X^b が、O、NH、及び NCH_3 から選択され、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、

m が、1 または 2 であり、

y が、0、1、2 または 3 であり、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

50

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、 w が、0、1、または 2 である。

【0242】

式 XX に従う化合物について、 y は、0 または 1 であるように選択されてもよい。 R^b は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^b は、メチルであるように選択されてもよい。

【0243】

式 XX に従う化合物について、 w は、0 または 1 から選択されてもよい。 R^c は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

【0244】

式 XX に従う化合物について、 R^d は各々、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、及び $-CHF_2$ から選択されてもよい、または R^d は、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、F、Cl、Br、及び OCH_3 から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよい。

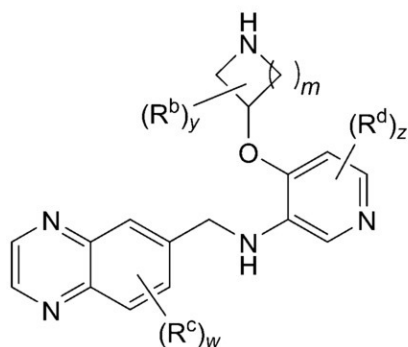
【0245】

式 XX に従う化合物について、 X^b は、O であってもよい。

【0246】

他の実施形態では、小分子は、式 XXI に従う構造、

【化 5 2】



XXI

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

R^b が各々独立して、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している 2 個の R^b がオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している 2 個の R^b が、O 及び NH から選択される 1 個もしくは 2 個のヘテロ原子を有する 4 ～ 6 員炭素環もしくは 4 ～ 6 員複素環を形成し、

R^c が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

R^d が各々独立して、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CN$ 、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよく、 m が、1 または 2 であり、

w が、0、1、または 2 であり、

y が、0、1、または2であり、
z が、0、1、または2である。

【0247】

式XXIに従う化合物について、y は、0または1であるように選択されてもよい。R^b は、ハ口もしくはメチルから選択されてもよい、またはR^b は、メチルであるように選択されてもよい。

【0248】

式XXIに従う化合物について、w は、0または1から選択されてもよい。R^c は、ハ口もしくはメチルから選択されてもよい、またはR^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

10

【0249】

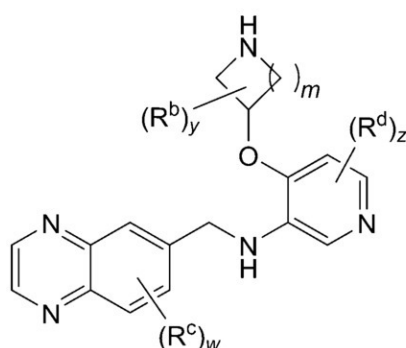
式XXIに従う化合物について、R^d は各々、ハ口、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、及び-CHF₂から選択されてもよい、またはR^d は、CH₃、CH₂F、CHF₂、CF₃、F、Cl、Br、及びOCH₃から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の2個のR^dが一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよい。

【0250】

他の実施形態では、小分子は、式XXIIに従う構造、

【化53】

20



XXII

30

またはその薬学的に許容される塩を有し、式中、

R^b が各々独立して、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、ハ口、ヒドロキシル、及びアミノから選択されるか、またはそれに加えて、もしくはその代替として、同じ炭素原子に結合している2個のR^bがオキソ基を形成するか、または異なる炭素原子に結合している2個のR^bが、O及びNHから選択される1個もしくは2個のヘテロ原子を有する4～6員炭素環もしくは4～6員複素環を形成し、

R^c が各々独立して、ハ口、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

40

R^d が各々独立して、ハ口、C₁～C₃アルキル、-OCH₃、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CN、ヒドロキシル、及びアミノから選択され、

その代替として、隣接する環位置上の2個のR^dが一緒になって、O、S、N、及びNHから選択される0～2個のヘテロ原子を有する5員または6員芳香環を形成してもよく、mが、1または2であり、

wが、0、1、または2であり、

y が、0、1、または2であり、

z が、0、1、または2である。

【0251】

式XXIIに従う化合物について、y は、0または1であるように選択されてもよい。

50

R^b は、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されてもよい、 R^b は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^b は、メチルであるように選択されてもよい。

【0252】

式 $XXII$ に従う化合物について、 w は、0 または 1 から選択されてもよい。 R^c は、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されてもよい、 R^c は、ハロもしくはメチルから選択されてもよい、または R^c は、F、Cl、もしくはメチルから選択されてもよい。

【0253】

式 $XXII$ に従う化合物について、 R^d は各々、ハロ、 $C_1 \sim C_3$ アルキル、 $-OCH_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2F$ 、及び $-CHF_2$ から選択されてもよい、 R^d は、メチル、ハロ、ヒドロキシル、及びアミノから選択されてもよい、または R^d は、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、F、Cl、Br、及び OCH_3 から選択されてもよい。その代替として、隣接する環位置上の 2 個の R^d が一緒になって、O、S、N、及び NH から選択される 0 ～ 2 個のヘテロ原子を有する 5 員または 6 員芳香環を形成してもよい。

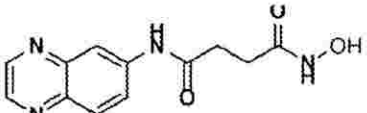
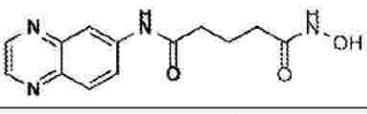
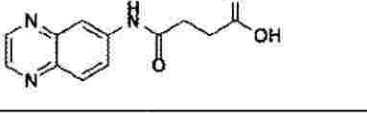
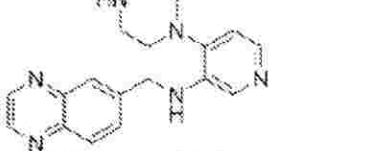
【0254】

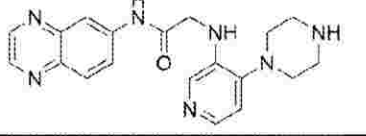
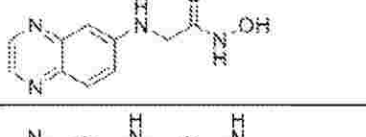
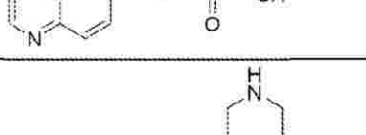
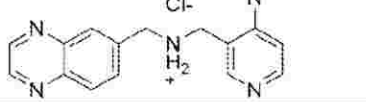
他の実施形態では、小分子は、表 A の化合物（またはその薬学的に許容される塩）に従う構造を有する。

【0255】

【表 1-1】

表 A.

参照番号	構造
001	
002	
003	
004	

005	
006	
007	
008	

10

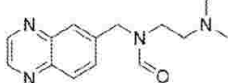
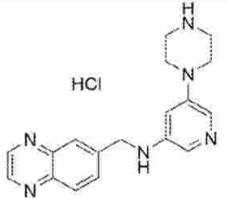
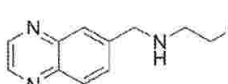
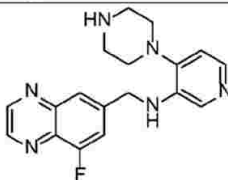
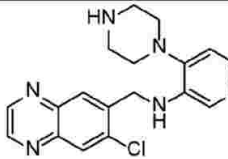
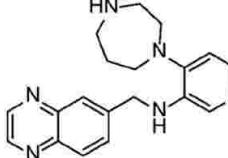
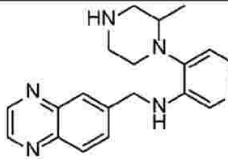
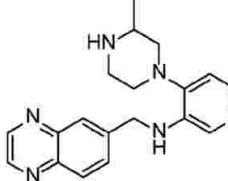
20

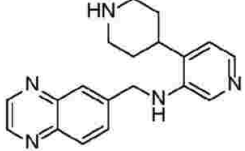
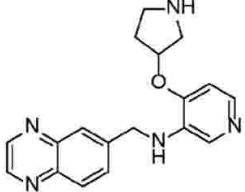
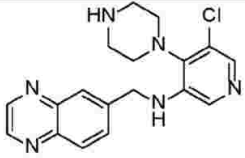
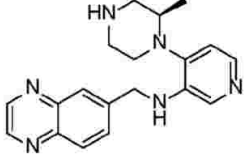
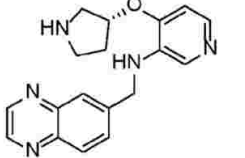
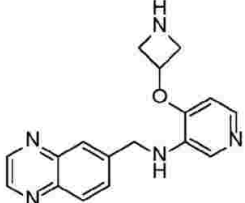
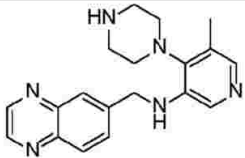
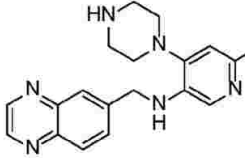
30

40

50

【表 1 - 2】

009	
010	
011	
012	
013	
014	
015	
016	

017	
018	
019	
020	
021	
022	
023	
024	

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

025	
026	
027	
028	
029	
030	
031	

032	
033	
034	
035	
036	
037	
038	

10

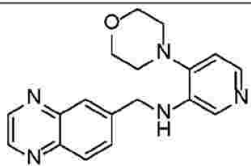
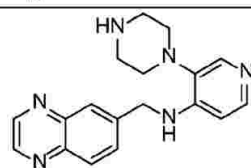
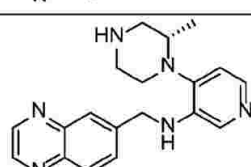
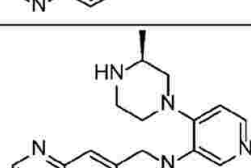
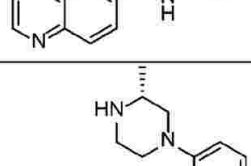
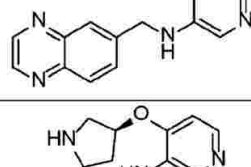
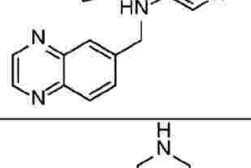
20

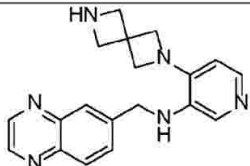
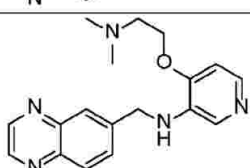
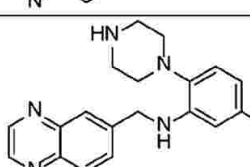
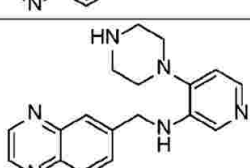
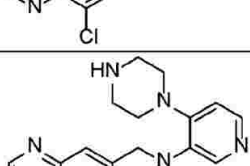
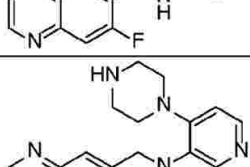
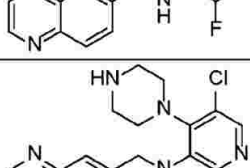
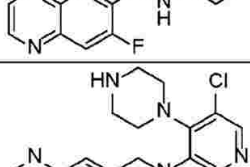
30

40

50

【表 1 - 4】

039	
040	
041	
042	
043	
044	
045	

046	
047	
048	
049	
050	
051	
052	
053	

10

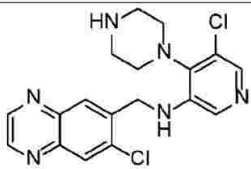
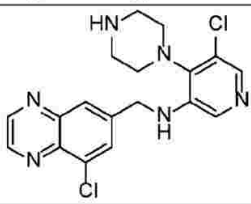
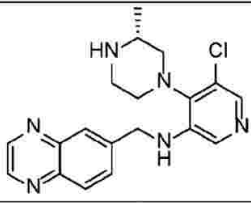
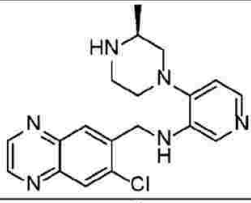
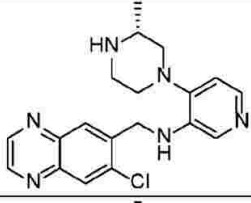
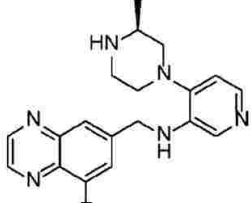
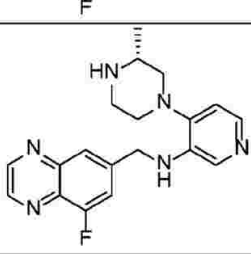
20

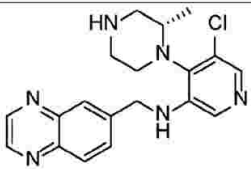
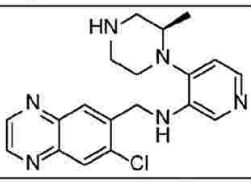
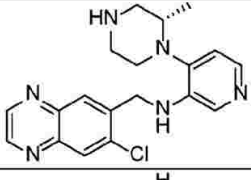
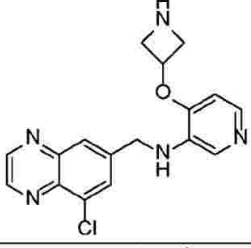
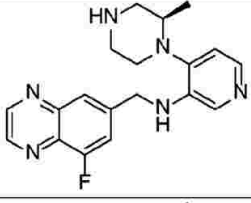
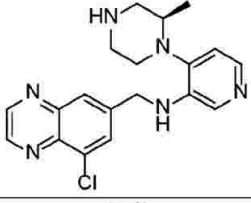
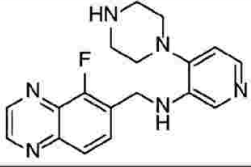
30

40

50

【表 1 - 5】

054	
055	
056	
057	
058	
059	
060	

061	
062	
063	
064	
065	
066	
067	

10

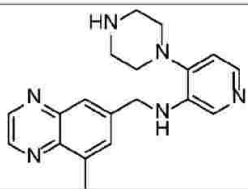
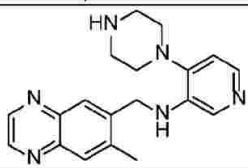
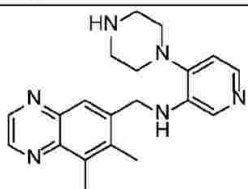
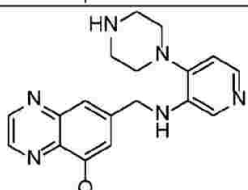
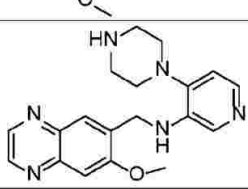
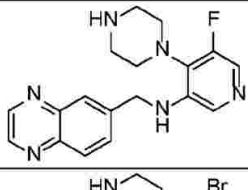
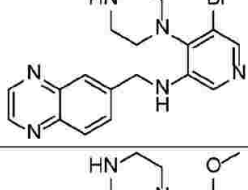
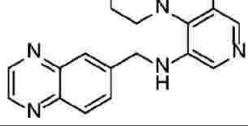
20

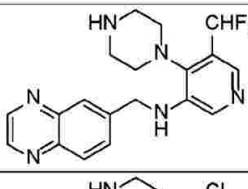
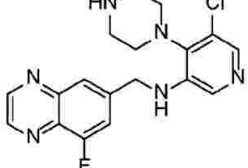
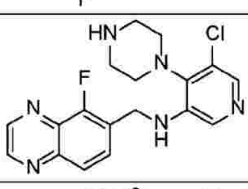
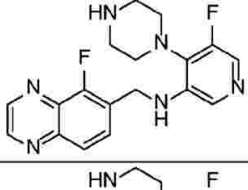
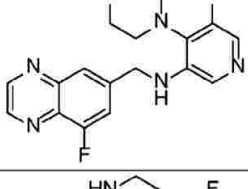
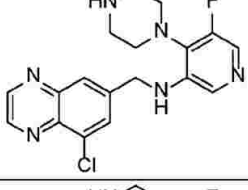
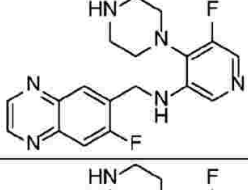
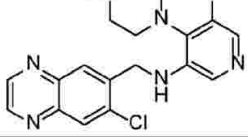
30

40

50

【表 1 - 6】

068	
069	
070	
071	
072	
073	
074	
075	

076	
077	
078	
079	
080	
081	
082	
083	

10

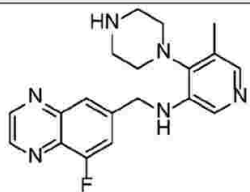
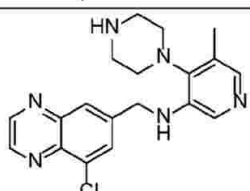
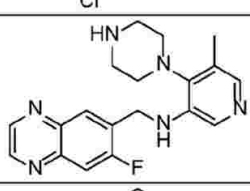
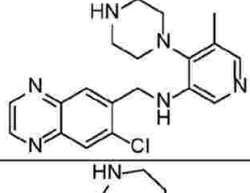
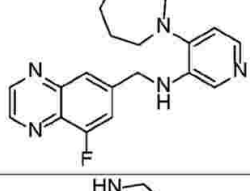
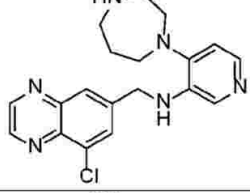
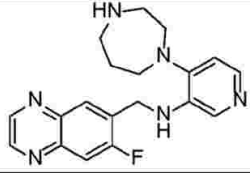
20

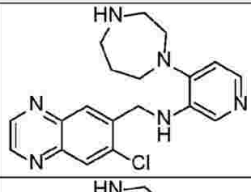
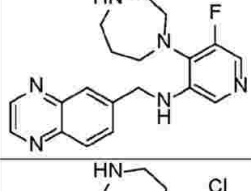
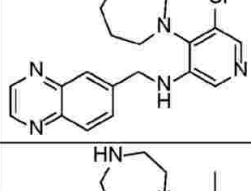
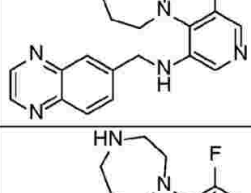
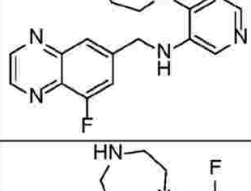
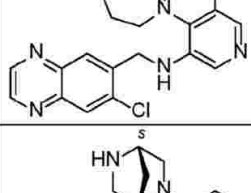
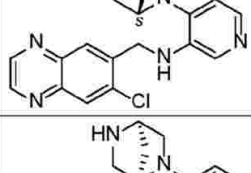
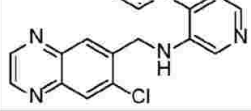
30

40

50

【表 1 - 7】

084	
085	
086	
087	
088	
089	
090	

091	
092	
093	
094	
095	
096	
097	
098	

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

099	
100	
101	
102	
103	
104	
105	

106	
107	
108	
109	
110	
111	

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

112	
113	
114	
115	
116	
117	
118	

119	
120	
121	
122	
123	
124	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 0】

125	
126	
127	
128	
129	
130	
131	

132	
133	
134	
135	
136	
137	
138	
139	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

140	
141	
142	
143	
144	
145	
146	

147	
148	
149	
150	
151	
152	
153	
154	

10

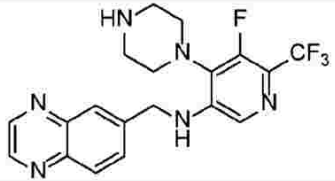
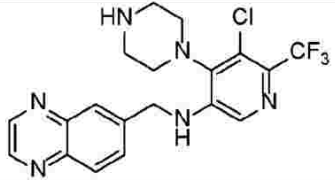
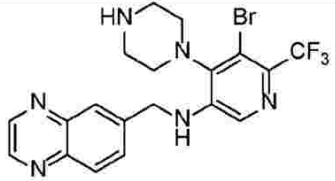
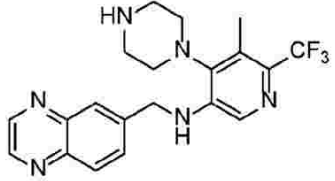
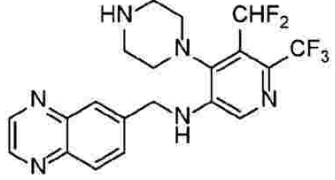
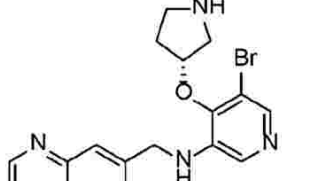
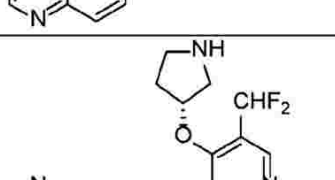
20

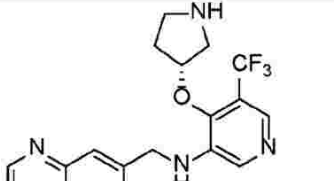
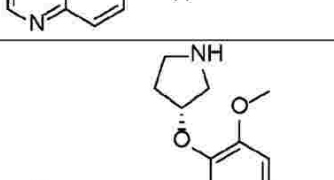
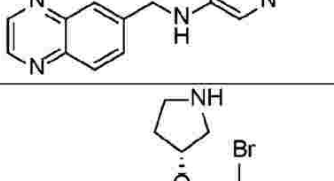
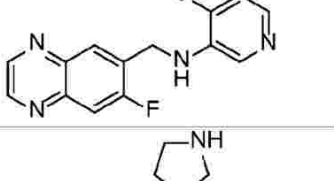
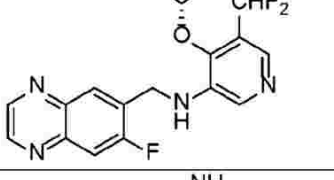
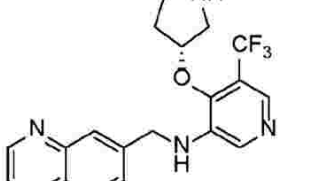
30

40

50

【表 1 - 1 2】

155	
156	
157	
158	
159	
160	
161	

162	
163	
164	
165	
166	
167	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 3】

168	
169	
170	
171	
172	
173	

174	
175	
176	
177	
178	
179	

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 4】

180	
181	
182	
183	
184	
185	

10

20

【0 2 5 6】

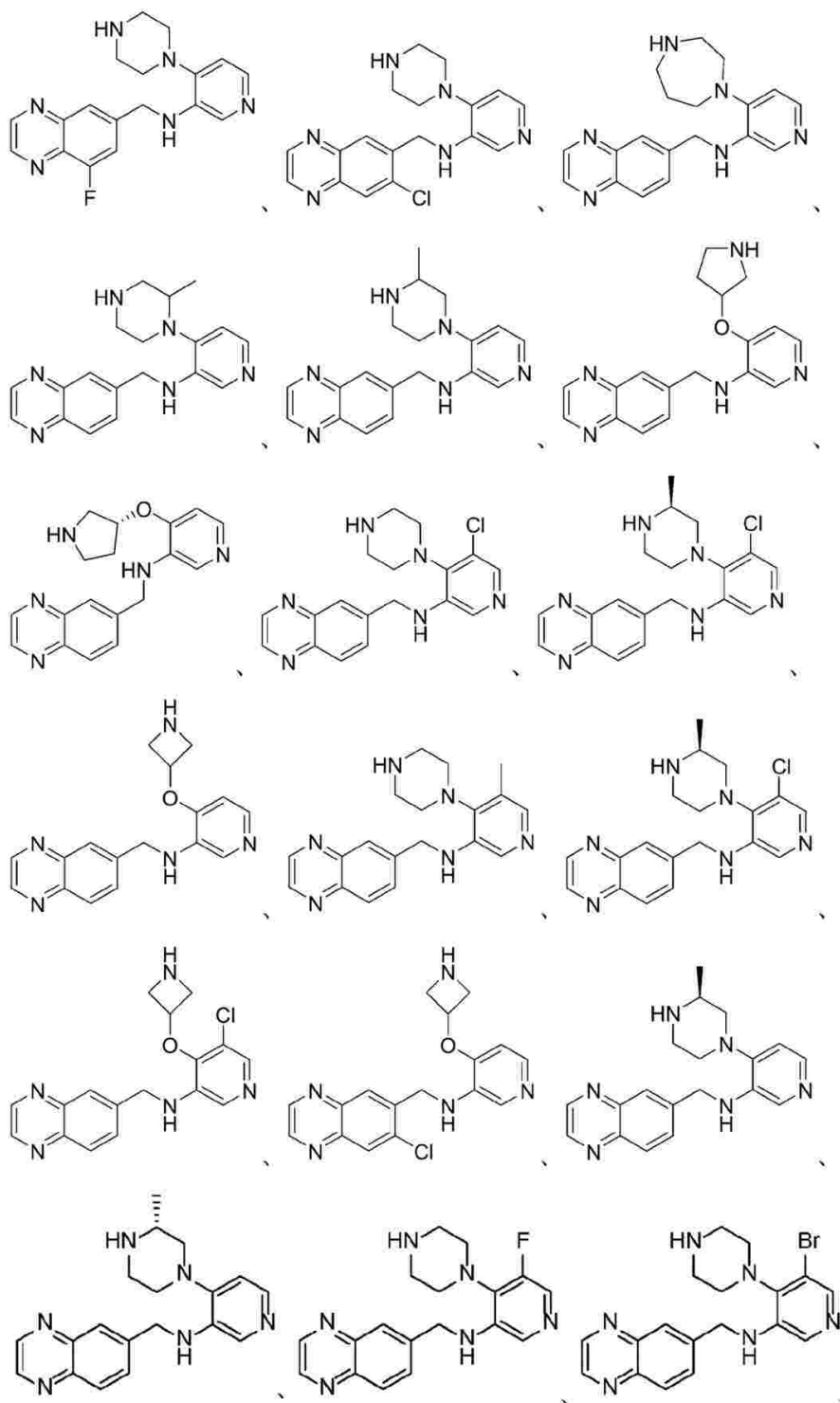
複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーは、以下の化合物（またはその薬学的に許容される塩）：

30

40

50

【化 5 4 - 1】



10

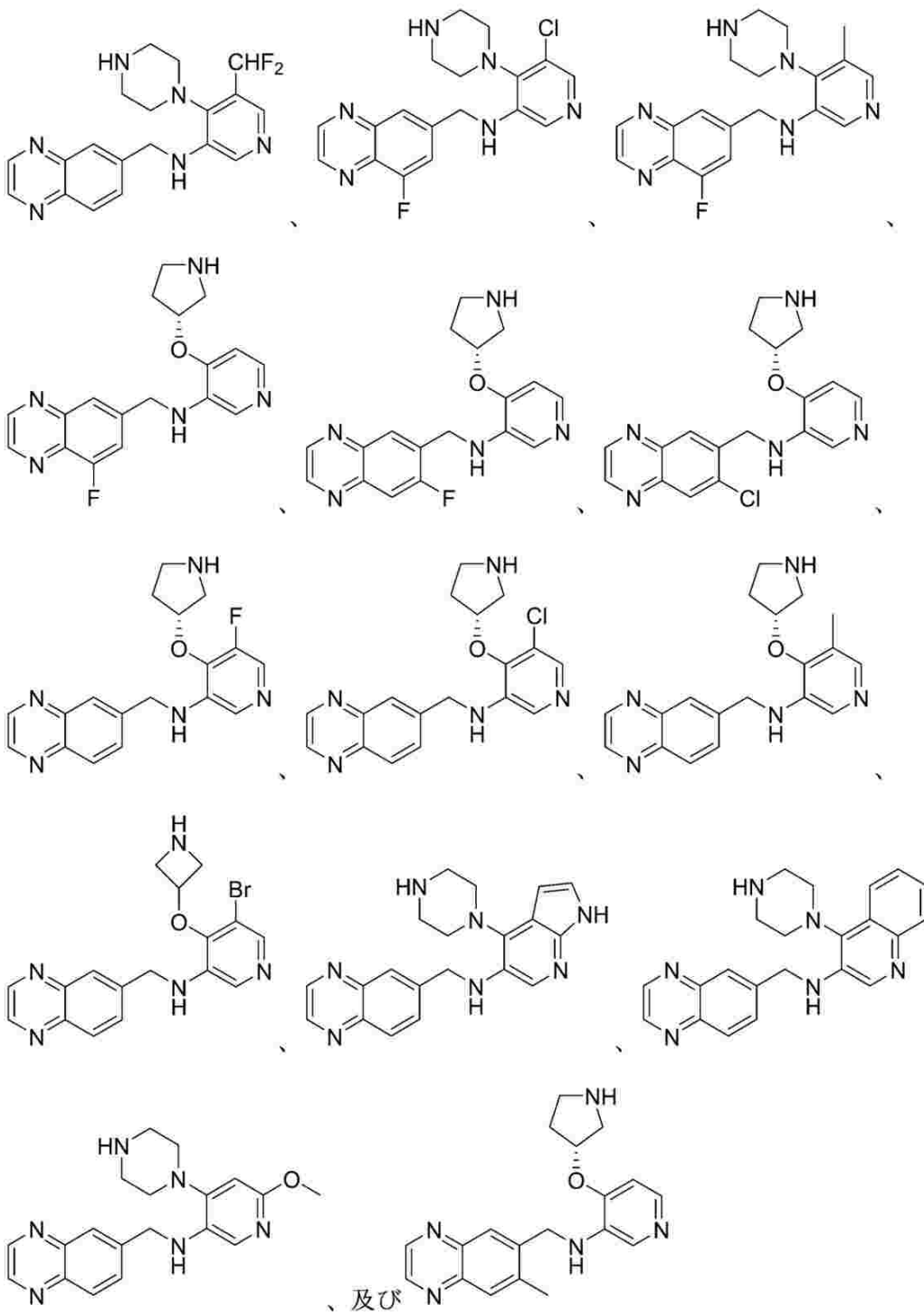
20

30

40

50

【化 5 4 - 2】



のうちの1つ以上に結合するか、または別様にその存在に応答する。

【0257】

「アルキル」という用語は、直鎖アルキル基及び分枝鎖アルキル基を含む、飽和脂肪族基のラジカルを指す。好ましい実施形態では、直鎖アルキルまたは分枝鎖アルキルは、その骨格に6個以下の炭素原子を有する（例えば、直鎖の場合は $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 、分枝鎖の場合は $\text{C}_3 \sim \text{C}_6$ ）。アルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ヘキシルなどが挙げられる。「置換アルキル」という用語は、ハロ、アミノ、アミド、スルホンアミド、 OH 、 OCH_3 、ニトロ、及び CN から独立して選択される1～4個の置換基を有するアル

キル基を指す。

【0258】

「シクロアルキル」という用語は、環内に3～6個の炭素を有する飽和炭素環式基を指す。シクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、及びシクロヘキシルが挙げられる。

【0259】

「ビスクリル」という用語は、縮合または架橋され得る2個の連結された環系を有する飽和炭素環式基を指す。二環式基としては、二環式〔2.1.1〕ヘキサン、二環式〔2.2.1〕ヘプタン、デカリンなどが挙げられる。「トリシクリル」という用語は、縮合及び／または架橋され得る3個の連結された環系を有する飽和炭素環式基を指す。三環式基としては、アダマンタンなどが挙げられる。

10

【0260】

炭素環式とは、環原子として炭素原子のみを含む環系を指す（すなわち、この環系は、環原子としてヘテロ原子を有しない）。炭素環系は不飽和であってもよいが、好ましい炭素環は芳香族ではない。

【0261】

「アルケニル」という用語は、少なくとも1個の炭素－炭素二重結合を有する、直鎖アルケニル基及び分枝鎖アルケニル基を含む不飽和脂肪族基を指す。好ましい実施形態では、アルケニル基は、2～6個の炭素原子を有する（例えば、 $C_2 \sim C_6$ アルケニル）。

【0262】

本明細書で使用される場合、「ハロゲン」または「ハロ」という用語は、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、または $-I$ を示し、好ましくは、 $-F$ 、 $-Cl$ 、または $-Br$ を示す。

20

【0263】

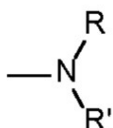
本明細書で使用される「アルコキシル」または「アルコキシ」という用語は、上で定義されたように、酸素原子を介して結合しているアルキル基を指す。代表的なアルコキシル基としては、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、*tert*-ブトキシなどが挙げられる。

【0264】

「アミン」及び「アミノ」という用語は、非置換アミン及び置換アミンの両方、例えば、以下の一般式によって表すことができる部分を指し、

30

【化55】



【0265】

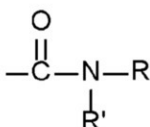
式中、 R 及び R' が各々独立して、 H 及び $C_1 \sim C_3$ アルキルから選択される。

40

【0266】

「アミド」という用語は、非置換アミド置換基及び置換アミド置換基の両方、例えば、以下の一般式によって表すことができる部分を指し、

【化56】



50

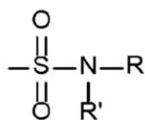
【0267】

式中、R 及び R' が各々独立して、H 及び C₁ ~ C₃ アルキルから選択される。

【0268】

「スルホンアミド (sulfonamide)」または「スルホンアミド (sulfonamido)」という用語は、非置換スルホンアミド置換基及び置換スルホンアミド置換基の両方、例えば、例えば、以下の一般式によって表すことができる部分を指し、

【化57】



10

【0269】

式中、R 及び R' が各々独立して、H 及び C₁ ~ C₃ アルキルから選択される。

【0270】

本明細書で使用される「アリール」という用語は、0 ~ 4 個のヘテロ原子を含み得る 5 員及び 6 員単環芳香族基、例えば、ベンゼン、ピレン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、及びピリミジンを含む。環構造内にヘテロ原子を有するそれらのアリール基は、「アリール複素環」または「ヘテロアリール」基とも呼ばれ得る。「アリール」という用語は、2 個以上の炭素が 2 個の隣接する環（これらの環は「縮合環」である）（環の少なくとも一方が芳香族である）に共通である 2 個以上の環式環を有する多環式環系も含む。したがって、アリールには、0 ~ 5 個のヘテロ原子を含み得る 8 ~ 10 員縮合二環式芳香族基（一方の環または両方の環が芳香族である）、例えば、ナフチレン、キノロン、イソキノリン、ベンゾ [b] チオフェン、テトラヒドロナフタレン (tetrahydronaphthalene) などが含まれる。各々のアリール基は、非置換であってもよいが、またはハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、シアノ、アミド、スルホンアミド、ニトロ、-SH、C₁ ~ C₆ アルキル、C₂ ~ C₆ アルケニル、C₃ ~ C₇ シクロアルキル、C₆ ~ C₁₀ ビシクリル、C₁ ~ C₆ ハロアルキル、C₁ ~ C₆ ペルハロアルキル、-O- (C₁ ~ C₆ アルキル)、O- (C₃ ~ C₇ シクロアルキル)、-O- (C₁ ~ C₆ ハロアルキル)、-O- (C₁ ~ C₆ ペルハロアルキル)、アリール、-O- アリール、- (C₁ ~ C₆ アルキル) - アリール、-O- (C₁ ~ C₆ アルキル) - アリール、-S- (C₁ ~ C₆ アルキル)、-S- (C₃ ~ C₇ シクロアルキル)、-S- (C₁ ~ C₆ ハロアルキル)、-S- (C₁ ~ C₆ ペルハロアルキル)、-S- アリール、-S- (C₁ ~ C₆ アルキル) - アリール、ヘテロアリール、及びヘテロシクリルから選択される 1 ~ 5 個の置換基で置換されてもよい。

20

30

【0271】

「複素環」または「ヘテロシクリル」という用語は、1 ~ 3 個の環ヘテロ原子を有する非芳香族複素環を指す。好ましい複素環は、O、N、及び S からなる群から選択される 1 ~ 3 個のヘテロ原子を有する 5 員及び 6 員複素環基である。

40

【0272】

本明細書で使用される「ヘテロ原子」という用語は、炭素または水素以外のあらゆる元素の原子を意味する。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、及び硫黄である。

【0273】

本明細書で使用される場合、各々の出現、例えば、アルキル、R¹、R² などの定義は、それが任意の構造内で 2 回以上生じた場合、同じ構造内の他の場所でのその定義とは無関係であるよう意図されている。

【0274】

「置換」または「で置換された」が、かかる置換が置換された原子及び置換基の許容さ

50

れる原子価に従い、かつこの置換により、安定した化合物、例えば、再配置、環化、排除などの変換を自発的に受けない化合物がもたらされる暗黙の条件を含むことが理解されるであろう。

【0275】

本明細書に開示されるアプタマーリガンドは、特定の幾何学形態または立体異性体形態、ならびにそれらの混合物に存在し得る。かかる幾何学形態または立体異性体形態としては、シス及びトランス異性体、R-及びS-エナンチオマー、ジアステレオマー、(D)-異性体、(L)-異性体、それらのラセミ混合物、ならびにそれらの他の混合物が挙げられるが、これらに限定されない。追加の不斉炭素原子がアルキル基などの置換基に存在し得る。

10

【0276】

式I~XXIIに従う化合物は、酸性または塩基性官能基を含んでもよく、それ故に、塩形態で存在してもよい。好ましくは、塩形態は、薬学的に許容される塩である。この点において「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書に開示される化合物の比較的非毒性の無機酸及び有機酸ならびに塩基付加塩を指す。

【0277】

式I~XXIIに従う化合物は、アミノまたはアルキルアミノなどの1つ以上の塩基性官能基を含んでもよく、それ故に、薬学的に許容される酸で薬学的に許容される塩を形成することができる。これらの塩は、投与ビヒクルもしくは剤形製造プロセスにおいて、または遊離塩基形態の本明細書に開示される精製された化合物を好適な有機酸もしくは無機酸と別個に反応させ、このように形成された塩をその後の精製中に単離することによって、インサイツで調製することができる。代表的な塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、硝酸塩、酢酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩、ラウリン酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、トシル酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、ナフチル酸塩、メシル酸塩、グルコヘプトン酸塩、ラクトビオン酸塩、及びラウリルスルホン酸塩などが挙げられる(例えば、Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照されたい)。

20

【0278】

主題の化合物の薬学的に許容される塩には、本化合物の従来の非毒性塩または四級アンモニウム塩、例えば、非毒性有機酸または無機酸由来のものが含まれる。例えば、かかる従来の非毒性塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などの無機酸に由来するもの、ならびに酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パルミチン酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、シュウ酸、イソチオン酸などの有機酸から調製される塩が挙げられる。

30

【0279】

他の事例では、式I~XXIIに従う化合物は、1つ以上の酸性官能基を含んでもよく、それ故に、薬学的に許容される塩基で薬学的に許容される塩を形成することができる。これらの塩は、同様に、投与ビヒクルもしくは剤形製造プロセスにおいて、または遊離塩基形態の精製された化合物を、薬学的に許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩、もしくは重炭酸塩などの好適な塩基と、アンモニアと、または薬学的に許容される有機一級、二級、もしくは三級アミンと別個に反応させることによって、インサイツで調製することができる。代表的なアルカリまたはアルカリ土類塩には、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、及びアルミニウム塩などが含まれる。塩基付加塩の形成に有用な代表的な有機アミンとしては、エチルアミン、ジエチルアミン、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペラジンなどが挙げられる(例えば、Berge et al. (上記参照)を参照されたい)。

40

50

【0280】

複数の実施形態では、本明細書に提供されるアプタマーは、本明細書に提供される式Ⅰ～ⅩⅩⅠⅠの1つ以上の化合物に結合するか、もしくは別様にそれに応答する、及び／または式Ⅰ～ⅩⅩⅠⅠの化合物の代謝物類似体もしくは誘導体に結合するか、もしくはそれに別様に応答する。

【0281】

アプタマーのそのリガンドへの結合の特異性は、無関係の分子に対するアプタマーの解離定数と比較して、アプタマーのそのリガンドに対する比較解離定数 (K_d) の観点から定義することができる。したがって、リガンドは、無関係の物質よりも高い親和性でアプタマーに結合する分子であるとみなされ得る。典型的には、アプタマーのそのリガンドに対する K_d は、無関係の分子を有するアプタマーの K_d の少なくとも約10分の1である。他の実施形態では、 K_d は、無関係の分子を有するアプタマーの K_d の少なくとも約20分の1、少なくとも約50分の1、少なくとも約100分の1、及び少なくとも約200分の1、少なくとも約500分の1、少なくとも約1000分の1、または少なくとも約10,000分の1である。

【0282】

遺伝子発現を調節するためのアプタマー

いくつかの実施形態では、本開示によって企図されるアプタマーは、遺伝子発現の調節のために使用される。標的遺伝子（例えば、治療導入遺伝子）の発現の調節は、様々な状況で有利である。治療的遺伝子発現の文脈で、例えば、小分子の存在に応答して導入遺伝子の調節発現を可能にする技法は、標的遺伝子発現のレベル及びそのタイミングの調節を可能にすることによって、安全性及び有効性を高めることができる。研究状況下では、遺伝子発現の調節は、異なる実験条件の系統的調査を可能にする。

【0283】

複数の実施形態では、アプタマーをコードする配列は、本明細書に記載の小分子の存在または不在に応答して標的遺伝子の発現レベルを調節する能力を提供する遺伝子調節カセットの一部である。複数の実施形態では、遺伝子調節カセットは、標的遺伝子を更に含む。本明細書で使用される場合、「標的遺伝子」とは、小分子が本明細書に開示されるアプタマーに結合することにより、本明細書に開示される小分子リガンドの存在または不在に応答して発現される導入遺伝子を指す。複数の実施形態では、標的遺伝子は、タンパク質（例えば、治療用タンパク質）、*miRNA*、または*siRNA*のコード配列を含む。標的遺伝子は、標的遺伝子発現の調節に使用されるアプタマーに対して異種である、標的遺伝子の調節に使用されるポリヌクレオチドカセットに対して異種である、及び／または標的遺伝子の調節に使用されるポリヌクレオチドカセットの一部に対して異種である。

【0284】

リガンドの存在／不在に応答して標的遺伝子の発現を調節するために使用される場合、本明細書に記載のアプタマーは、リボスイッチの一部としてアプタマーをコードするポリヌクレオチドカセットの一部とすることができる。「遺伝子調節カセット」、「調節カセット」、または「ポリヌクレオチドカセット」という用語は、本明細書では同義に使用される。

【0285】

複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーに結合する小分子の存在は、小分子の不在下での標的遺伝子の発現と比較して、標的遺伝子の発現の増加をもたらす。かかる実施形態では、アプタマーは、「オン」スイッチとなる。複数の実施形態では、標的遺伝子の発現は、本明細書に開示されるアプタマーに結合する小分子の存在下で、小分子の不在下と比較して、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、または少なくとも10,000倍増加する。複数の実施形態では、標的遺伝子の発現は、本明細書に開示されるアプタマーに結合する小分子の存在下で、小分子の不在下と比較して、2倍～10倍、5

倍～10倍、5倍～15倍、5倍～20倍、5倍～25倍、5倍～30倍、10倍～20倍、10倍～30倍、10倍～40倍、10倍～50倍、10倍～100倍、10倍～500倍、10倍～1,000倍、50倍～100倍、50倍～500倍、50倍～1000倍、50倍～1,000倍、100倍～1,000倍、または100倍～10,000倍増加する。

【0286】

複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーに結合する小分子の存在は、小分子の不在下での標的遺伝子の発現と比較して、標的遺伝子の発現の減少をもたらす。かかる実施形態では、アプタマーは、「オフ」スイッチとなる。複数の実施形態では、標的遺伝子の発現は、本明細書に開示されるアプタマーに結合する小分子の存在下で、小分子の不在下と比較して、少なくとも3分の1、少なくとも5分の1、少なくとも10分の1、少なくとも15分の1、少なくとも20分の1、少なくとも25分の1、少なくとも30分の1、少なくとも40分の1、少なくとも50分の1、少なくとも100分の1、少なくとも1000分の1、または少なくとも10,000分の1になる。一実施形態では、標的遺伝子の発現は、本明細書に開示されるアプタマーに結合する小分子の存在下で、小分子の不在下と比較して、2分の1～10分の1、5分の1～10分の1、5分の1～15分の1、5分の1～20分の1、5分の1～25分の1、5分の1～30分の1、10分の1～20分の1、10分の1～30分の1、10分の1～40分の1、10分の1～50分の1、10分の1～100分の1、10分の1～500分の1、10分の1～1,000分の1、50分の1～1000分の1、50分の1～5000分の1、50分の1～10000分の1、50分の1～1,0000分の1、1000分の1～1,0000分の1、または1000分の1～10,0000分の1になる。

【0287】

複数の実施形態では、アプタマーは、リボスイッチの一部である。リボスイッチは、アプタマー特異的リガンド分子の存在または不在に応答して、RNAポリヌクレオチドの安定性を調節する及び／またはRNAポリヌクレオチドからのタンパク質の産生を調節する、RNAポリヌクレオチドの調節セグメントである。複数の実施形態では、リボスイッチは、リガンド（例えば、小分子）の存在を感知し、かつ標的遺伝子の発現の増加または減少につながる影響を引き起こすことを一緒に担うセンサー領域（例えば、アプタマー領域）及びエフェクター領域を含む。本明細書に記載のリボスイッチは、2個以上の源由来のポリヌクレオチドを利用する、組換え体である。複数の実施形態では、センサー領域とエフェクター領域は、ポリヌクレオチドリンカーによって連結される。複数の実施形態では、ポリヌクレオチドリンカーは、RNAステムまたは対領域（すなわち、二本鎖であるRNAポリヌクレオチドの領域）を形成する。複数の実施形態では、アプタマーをエフェクター領域に結合する対領域は、アプタマーシステムの全てまたは一部（例えば、アプタマーP1システムの全てまたは一部）を含む。

【0288】

アプタマー配列を含むリボスイッチは、例えば、早期転写終結をもたらすrho非依存性転写終結ヘアピンの形成を制御するために使用され得る。アプタマー配列を含むリボスイッチは、RNAの構造変化も誘導し、リボソーム結合部位の隔離及び翻訳の阻害をもたらし得る。本明細書に開示されるアプタマー配列を含む代替のリボスイッチ構造は、小分子リガンドの存在に応答してmRNAのスプライシングに更に影響を及ぼすことができる。

【0289】

選択的スプライシングリボスイッチ

一実施形態では、本明細書に記載のアプタマーは、結果として得られたRNA（例えば、プレmRNA）のアプタマー／リガンド媒介選択的スプライシングによる標的遺伝子の調節のための遺伝子調節カセットの一部としてコードされる。この文脈で、遺伝子調節カセットは、小分子リガンドの存在を感知し、かつ選択的エクソンへのスプライシングを変化させることを一緒に担うセンサー領域（例えば、本明細書に記載のアプタマー）及びエ

フェクター領域を含むリボスイッチを含む。スプライシングとは、イントロン配列が新生プレメッセンジャーRNA（プレmRNA）から除去され、エクソンと一緒に連結されてmRNAを形成するプロセスを指す。スプライス部位は、エクソンとイントロンとの間の接合部であり、イントロンの5'末端及び3'末端の異なるコンセンサス配列（すなわち、それぞれ、スプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位）によって定義される。スプライシングは、小さい核リボ核タンパク質（snRNP）と多種多様な補助タンパク質の集合体であるスプライソソームと呼ばれる大きい多成分構造によって行われる。様々なシス調節配列を認識することにより、スプライソソームは、エクソン／イントロン境界を定義し、イントロン配列を除去し、エクソンと一緒にスプライスして最終メッセージ（例えば、mRNA）にする。選択的スプライシングの場合、ある特定のエクソンを包

10

【0290】

一実施形態では、標的遺伝子発現の調節は、参照により全体が本明細書に組み込まれるWO2016/126747に開示されているDNA構築物のうちのいずれかを使用することによって達成される。本開示の複数の実施形態では、WO2016/126747に開示されているリボスイッチ及びポリヌクレオチドカセットは、WO2016/126747に開示されているアプタマー配列の代わりに、本明細書に記載のアプタマーをコードする配列を含む。

【0291】

一実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、（a）リボスイッチと、（b）5'イントロン及び3'イントロンに隣接する選択的にスプライスされたエクソンとを含み、ここで、リボスイッチが、（i）3'イントロンの5'スプライス部位配列（及びそれに相補的な配列）を含むステム形成配列を含むエフェクター領域と、（ii）本明細書に開示されるアプタマーとを含む。複数の実施形態では、エフェクター領域は、アプタマーのP1ステムを形成するステム形成領域である（例えば、12C6-1アプタマー配列が、アプタマーのP1ステムを形成する追加の配列に隣接し、スプライス部位配列及びそれに相補的な配列を含む、図1b及び図3aを参照されたい）。したがって、複数の実施形態では、エフェクターステムは、本明細書に開示されるアプタマーのP1ステムであるか、またはそれを含む。言い換えれば、エフェクターステムは、本明細書に開示されるアプタマーの5'末端に連結された第1の配列と、本明細書に開示されるアプタマーの3'末端に連結された第2の配列とを含み、ここで、第1の配列または第2の配列が3'イントロンの5'スプライス部位配列を含み、他方が3'イントロンの5'スプライス部位配列に相補的な配列を含む。複数の実施形態では、エフェクター領域は、選択的エクソンのすぐ3'にあるイントロンのイントロン5'スプライス部位（「5'ss」）配列、ならびに3'イントロンの5'ss配列に相補的な配列を含む。

20

30

【0292】

5'スプライス部位配列は、当該技術分野で周知である。異なる5'スプライス部位配列間にいくらかのばらつきがあり、このばらつきも当該技術分野で十分に理解されている。例えば、Shapiro and Senapathy（全体が本明細書に組み込まれる、Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. Nucleic Acid Res. 1987 Sep 11; 15(17): 7155-74またはZhang MQ. Statistical features of human exons and their flanking regions. Hum Mol Genet. 1998 May; 7(5): 919-32）は、スプライス部位配列のどの位置がいくらかのばらつきを有し、どの位置が一定しているかを様々な真核生物について説明している。同様に、Zhang（全体が本明細書に組み込まれる、Zhang MQ. Sta

40

50

tistical features of human exons and the
 ir flanking regions. Hum Mol Genet. 1998 M
 ay; 7 (5) : 919-32) も、スプライス部位配列のどの位置がいくらかのばらつきを有し得、どの位置が一定しているかを示す。したがって、当業者であれば、既知のコンセンサス配列に基づいて、かつエクソン／イントロン境界に対するその位置に基づいて、スプライス部位配列を容易に認識することができる。例示的なスプライス部位配列としては、A G G | | G T G A G T、A A A | | G T A A G C、G C A | | G T A A G T、G A G | | G T G T G G、A / C A G | | G T A / G A G T、N A G | | G T A / G A G T、N A G | | G T A A G T、A / C A / T G | | G T A N G T、及び N A G / A | | G T A A G T (ここで、| | は、エクソン／イントロン境界を意味し、N は、A、G、C、または T を表す) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0293】

アプタマーがそのリガンドに結合すると、エフェクター領域がステムを形成し、ひいては、選択的エクソンの 3' 末端のスプライスドナー部位へのスプライシングを防止する。ある特定の条件下で (例えば、アプタマーがそのリガンドに結合していない場合)、エフェクター領域は、選択的エクソンの 3' 末端のスプライスドナー部位へのアクセスを提供する状況下であり、選択的エクソンの標的遺伝子の mRNA への包含をもたらす。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、リガンドに応答して標的遺伝子の発現を調節するために標的遺伝子に配置される。一実施形態では、選択的にスプライシングされたエクソンは、選択的にスプライシングされたエクソンが標的遺伝子の mRNA へとスプライシングされたときに標的遺伝子とインフレームになる終止コドンを含む。

【0294】

一実施形態では、遺伝子調節カセットは、配列番号 676 の配列を含み、ここで、-X- は、本明細書に開示されるアプタマーをコードする配列を表す。小文字は、アプタマーをリボスイッチの残りの部分に結合する対ステム配列を示す。一実施形態では、選択的エクソン (以下の配列番号 676 で下線が引かれている) は、別の選択的エクソン配列と置き換えられる。

【0295】

【化 58】

配列番号 676 :

GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTT
 TCTATGGTTAAGTTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAG
 GGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTTGTA
 TTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAAATATACTTTTTTTGTTTA
 TCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCA
 ATAATGATACAATGTATCATGCCGAGTAACGCTGTTTCTCTA
 ACTTGTAGGAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAAA
AAATCTTCAGTAGAAG g t a a t g t - X - a c a t t a c G C A C C A T T C
 T A A A G A A T A A C A G T G A T A A T T T C T G G G T T A A G G C A A T A G C A A
 T A T T T C T G C A T A T A A A T A T T T C T G C A T A T A A A T T G T A A C T G A
 T G T A A G A G G T T T C A T A T T G C T A A T A G C A G C T A C A A T C C A G C T
 A C C A T T C T G C T T T T A T T T T A T G G T T G G G A T A A G G C T G G A T T A
 T T C T G A G T C C A A G C T A G G C C C T T T T G C T A A T C A T G T T C A T A C
 C T C T T A T C T T C C T C C C A C A G .

【0296】

選択的エクソンは、5'イントロン配列及び3'イントロン配列に隣接している。本明細書に開示される遺伝子調節カセットで 사용할 ことができる5'イントロン配列及び3'イントロン配列は、アダプターに結合するリガンドの存在または不在に応じて、標的遺伝子のmRNAまたはmRNAに選択的エクソンを含む標的遺伝子のいずれかを作製する標的遺伝子からスプライスすることができる任意の配列とすることができる。5'イントロン配列及び3'イントロン配列は各々、スプライシングが生じるのに必要な配列、すなわち、スプライスドナー配列、スプライスアクセプター配列、及び分岐点配列を有する。一実施形態では、遺伝子調節カセットの5'イントロン配列及び3'イントロン配列は、1つ以上の天然に存在するイントロンまたはその一部に由来する。一実施形態では、5'イントロン配列及び3'イントロン配列は、切断されたヒトベータグロビンイントロン2 (IVS2Δ)、ヒトβ3-グロビン遺伝子のイントロン2、SV40 mRNAイントロン (Clontech Laboratories, Inc. 製のpCMV-LacZベクターで使用される)、ヒトリオースホスフェートイソメラーゼ (TPI) 遺伝子のイントロン6 (Nott Ajit, et al. RNA. 2003, 9:6070617)、ヒト第IX因子のイントロン (Sumiko Kurachi, et al. J. Bio. Chem. 1995, 270(10), 5276)、標的遺伝子自体の内因性イントロン、または調節されたスプライシングに十分なエレメント (Thomas A. Cooper, Methods 2005(37):331) を含む任意のゲノム断片もしくはは合成イントロン (Yi Lai, et al. Hum Gene Ther. 2006:17(10):1036) に由来する。

10

20

【0297】

一実施形態では、選択的エクソン及びリボスイッチは、標的遺伝子の内因性イントロンに存在するように設計される。すなわち、イントロン（または実質的に同様のイントロン配列）は、標的遺伝子のその位置に天然に存在する。この場合、選択的エクソンのすぐ上流のイントロン配列は、5'イントロンまたは5'イントロン配列と呼ばれ、選択的エクソンのすぐ下流のイントロン配列は、3'イントロンまたは3'イントロン配列と呼ばれる。この場合、内因性イントロンは、選択的エクソンの5'末端及び3'末端に隣接するスプライスアクセプター配列及びスプライスドナー配列を含むように修飾される。一実施形態では、5'イントロン及び／または3'イントロンは、標的遺伝子に対して外因性である。

30

【0298】

選択的スプライシング遺伝子調節カセット内のスプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位は、強化または弱化されるように修飾することができる。すなわち、スプライス部位は、標準のクロニング法、部位特異的変異誘発などによって、スプライスドナーまたはスプライスアクセプターのコンセンサスに近くなるように修飾することができる。スプライスコンセンサスにより類似したスプライス部位は、スプライシングを促進する傾向があり、それ故に、強化される。スプライスコンセンサスにあまり類似していないスプライス部位は、スプライシングを妨げる傾向があり、それ故に、弱化される。最も一般的なクラスのイントロン (U2) のスプライスドナーのコンセンサスは、A/C A G || G T A/G A G T (ここで、|| は、エクソン／イントロン境界を示す) である。スプライスアクセプターのコンセンサスは、C A G || G (ここで、|| は、エクソン／イントロン境界を示す) である。スプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位における特定のヌクレオチドの頻度は、当該技術分野で説明されている (例えば、Zhang, M. Q., Hum Mol Genet. 1988. 7(5):919-932を参照されたい)。5'スプライス部位及び3'スプライス部位の強度を調整して、選択的エクソンのスプライシングを調節することができる。

40

【0299】

スプライシングを調節するように作製することができる選択的スプライシング遺伝子調節カセット内に存在する5'イントロン及び3'イントロンへの追加の修飾には、イントロンスプライシングエンハンサーエレメント、イントロンスプライシングサプレッサーエ

50

メント、及び／またはスプライシング部位の修飾、欠失、及び／または付加、及び／または分岐部位配列の修飾が含まれる。

【0300】

一実施形態では、5'イントロンは、標的遺伝子とインフレイムになる終止コドンを含むように修飾されている。5'イントロン配列及び3'イントロン配列は、公的に利用可能なソフトウェアで同定することができる隠れたスライス部位を除去するように修飾することもできる（例えば、Kapustin, Y. et al. *Nucl. Acids Res.* 2011. 1-8を参照されたい）。

【0301】

例えば、ウイルス発現構築物のサイズ要件を満たすために、5'イントロン配列及び3'イントロン配列の長さを調整することができる。一実施形態では、5'イントロン配列及び／または3'イントロン配列は、約50～約300ヌクレオチド長である。一実施形態では、5'イントロン配列及び／または3'イントロン配列は、約125～約240ヌクレオチド長である。

【0302】

エフェクター領域のステム部分は、リガンドがアプタマーに結合したときに選択的エクソンの選択的スプライシングを実質的に防止する一方で、リガンドが十分な量で存在しない場合にスライス部位へのアクセスを可能にするのに十分な長さ（及びGC含量）を有さなければならない。複数の実施形態では、エフェクター領域のステム部分は、3'イントロンの5'スライス部位配列及び5'スライス部位配列のその相補的配列に加えて、ステム配列を含む。複数の実施形態では、この追加のステム配列は、アプタマーステム由来の配列を含む。リガンドが存在しない場合に標的遺伝子の許容されるバックグラウンド発現を可能にし、かつリガンドが存在する場合に標的遺伝子の許容される発現レベルを可能にするステムを同定するために、ステム部分の長さ及び配列を、既知の技法を使用して修飾することができる。一実施形態では、リボスイッチのエフェクター領域ステムは、約7～約20塩基対長である。一実施形態では、エフェクター領域ステムは、8～11塩基対長である。ステムの長さに加えて、ステムのGC塩基対含量を変化させて、ステムの安定性を修正することができる。

【0303】

一実施形態では、本明細書に開示される選択的スプライシング遺伝子調節カセットの一部である選択的エクソンは、プレmRNAに転写され、かつ標的遺伝子のmRNAへと選択的にスプライシングされることができるポリヌクレオチド配列である。一実施形態では、選択的エクソンは、選択的エクソンが標的遺伝子のmRNAに含まれたときに、そのmRNAからの標的遺伝子の発現が防止または低減されるように、翻訳を阻害する少なくとも1個の配列を含む。好ましい実施形態では、選択的エクソンは、選択的エクソンがスプライシングによって標的遺伝子のmRNAに含まれたときに標的遺伝子とインフレイムになる終止コドン（TGA、TAA、TAG）を含む。複数の実施形態では、選択的エクソンは、終止コドンに加えて、または終止コドンの代替として、選択的エクソンが、スプライシングにより、例えば、マイクロRNA結合部位を含む標的遺伝子のmRNAに組み込まれたときに、翻訳を低減または実質的に防止する別の配列を含み、この配列により、mRNAの分解がもたらされる。一実施形態では、選択的エクソンは、mRNAの分解をもたらすmiRNA結合配列を含む。一実施形態では、選択的エクソンは、ポリペプチド配列であって、このポリペプチド配列を含むタンパク質の安定性を低下させる、ポリペプチド配列をコードする。一実施形態では、選択的エクソンは、ポリペプチド配列であって、このポリペプチド配列を含むタンパク質を分解に向けて指示する、ポリペプチド配列をコードする。

【0304】

選択的エクソンのスプライシングの基礎レベルまたはバックグラウンドレベルは、エクソンスプライスエンハンサー（ESE）配列及びエクソンスプライスサプレッサー（ESS）配列を変化させることによって、及び／またはESE配列もしくはESS配列を選択

的エクソンに導入することによって最適化することができる。選択的エクソンの配列に対するかかる変化は、部位特異的変異誘発を含むが、これに限定されない、当該技術分野で既知の方法を使用して達成することができる。その代替として、所望の配列を有する（例えば、選択的エクソンの全てまたは一部を含む）オリゴヌクレオチドを商業的供給源から入手して、遺伝子調節カセットにクローニングすることができる。ESS配列及びESE配列の同定は、例えば、ESEfinder 3.0 (Cartegni, L. et al. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. Nucleic Acid Research, 2003, 31 (13): 3568-3571) 及び／または他の利用可能なリソースの使用を含む、当該技術分野で既知の方法によって達成することができる。

【0305】

10

一実施形態では、選択的エクソンは、天然に存在するエクソンである。別の実施形態では、選択的エクソンは、既知のエクソンの全てまたは一部に由来する。この文脈で、「由来する」とは、天然に存在するエクソンまたはその一部と実質的に相同であるが、エクソンスプライスエンハンサー (ESE) 配列及びエクソンスプライスサプレッサー (ESS) 配列を変化させることによって、及び／またはESE配列もしくはESS配列を選択的エクソンに導入することによって生成された変異などの様々な変異を含み得る、選択的エクソンを含む配列を指す。本明細書で使用される「相同性」及び「相同」とは、2個のポリヌクレオチド配列間または2個のポリペプチド配列間の同一性パーセントを指す。ある配列と別の配列との間の一致は、当該技術分野で既知の技法によって決定することができる。例えば、相同性は、2個のポリペプチド分子の配列を整列させ、かつ容易に入手可能なコンピュータプログラムを使用することによる、2個のポリペプチド分子の直接比較によって決定することができる。その代替として、相同性は、相同領域間に安定した二本鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続いて、一本鎖特異的ヌクレアーゼ（複数可）による消化、及び消化断片のサイズ決定によって決定することができる。2個のポリヌクレオチド配列または2個のポリペプチド配列は、それらを適切な挿入または欠失を伴って最適に整列させた後、上記の方法を使用して決定されるように、それぞれ、ヌクレオチドまたはアミノ酸の少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、及び少なくとも約95%が、それらの分子の規定された長さにわたって一致する場合、互いに「実質的に相同」である。

20

30

【0306】

一実施形態では、選択的エクソンは、標的遺伝子に対して外因性であるが、標的遺伝子が発現される生物起源の配列に由来し得る。本明細書で使用される場合、「外因性」とは、比較される、または導入もしくは組み込まれる実体の残りの実体の遺伝子型的に異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子工学技法によって異なる細胞型に導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（発現されると、異種ポリペプチドをコードすることができる）。一実施形態では、選択的にスプライシングされたエクソンは、ヒトジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (DHFR) のエクソン2、変異型ヒトウィルス腫瘍1エクソン5、マウスカルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼIIデルタエクソン16、またはSIRT1エクソン6に由来する。複数の実施形態では、選択的にスプライシングされたエクソンは、配列番号677 (GAATGAATTCA GATATTTCCAGAGAATGA A A A A A A A A T C T T C A G T A G A A G) の修飾DHFRエクソン2であるか、またはそれを含む。複数の実施形態では、選択的にスプライシングされたエクソンは、配列番号678 (GAATGAATTCA G A T A T T T C C A G A G A A T G A A A A A A A A T C T T C A G T A G A A G) の修飾DHFRエクソン2であるか、またはそれを含む。

40

【0307】

自己切断リボザイムによるアプタマー媒介切断

一実施形態では、標的遺伝子のアプタマー媒介発現は、小エンドヌクレアーゼ分解リボザイムのアプタマー媒介調節によって調節される。リボザイムは、化学反応を触媒するR

50

NA 酵素である。本明細書に開示される核酸及び方法では、リボザイムは、ハンマーヘッド、ヘアピン、肝炎デルタウイルス、Varkud サテライト、ツイスター、ツイスターシスター、ピストル、またはハチエトリボザイムを含むが、これらに限定されない、標的細胞型において自己切断する任意の小エンドヌクレアーゼ分解リボザイムであり得る。したがって、一実施形態では、リボスイッチ、及び本明細書に開示されるアダプターに結合したリボザイムを含むリボスイッチを含む遺伝子発現カセットが提供される。参照により全体が本明細書に組み込まれる WO 2017/136608 は、アダプターリガンドの存在下でリボザイム自己切断を活性化するリボスイッチ（「オフ」スイッチ）またはアダプターの存在下でリボザイム自己切断を阻害するリボスイッチ（「オン」スイッチ）について説明している。

10

【0308】

「オフ」スイッチシナリオでは、アダプター／リガンド結合により、リボザイムのリボヌクレアーゼ機能が増加し、ポリヌクレオチドカセットを含む標的遺伝子 RNA の切断がもたらされ、それにより、標的遺伝子発現が低下する。かかるオフスイッチの例としては、ステムによりアダプターに結合したツイスターリボザイムを含むリボスイッチを含む標的遺伝子の発現を調節するためのポリヌクレオチドカセットが挙げられ、ここで、ツイスターリボザイムをアダプターに結合するステムは、ツイスターリボザイムの P3 システムの位置でリボザイムに結合しており、標的遺伝子は、ツイスターリボザイムの P1 システムに結合している（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO 2017/136608 の図 1a、図 1b、または図 3a、及び関連文書を参照されたい）。

20

【0309】

「オン」スイッチシナリオでは、アダプター／リガンド結合により、リボザイムのリボヌクレアーゼ機能が阻害され、ポリヌクレオチドカセットを含む標的遺伝子 RNA の切断が減少し、それにより、リガンドの存在下で標的遺伝子発現が増加する。オンスイッチの例としては、アダプターに結合したツイスターリボザイムを含むリボスイッチが挙げられ、ここで、アダプターは、ツイスターリボザイム P1 システムの 3' 末端または 5' 末端に結合しており、アダプターがツイスターリボザイム P1 システムの 3' 末端に結合している場合、ツイスターリボザイム P1 システムの 3' アームの一部分は、代替として、アダプター P1 システムの 5' アームであり、アダプターがツイスターリボザイム P1 システムの 5' 末端に結合している場合、ツイスターリボザイム P1 システムの 5' アームの一部分は、代替として、アダプター P1 システムの 3' アームである（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO 2017/136608 の図 6a～6b 及び関連文書を参照されたい）。

30

【0310】

ポリアデニル化のアダプター調節

複数の実施形態では、標的遺伝子の発現は、アダプター調節ポリアデニル化によって調節される。ほぼ全ての真核生物 mRNA の 3' 末端は、20～250 個のアデノシン残基のホモポリマーであるポリ（A）テールを含む。ポリ（A）テールの mRNA への付加により、それが分解から保護されるため、遺伝子の発現は、対応する mRNA のポリアデニル化を調節することによって影響を受けることができる。

【0311】

一実施形態では、標的遺伝子の発現は、参照により全体が本明細書に組み込まれる WO 2018/156658 号に記載されているように、ポリアデニル化配列のアダプター調節アクセシビリティによって調節される。かかる実施形態では、リボスイッチは、エフェクターステムループ及び本明細書に記載のアダプターを含み、ここで、エフェクターステムループは、ポリアデニル化シグナルを含み、アダプター及びエフェクターステムループは、アダプターシステムの非共有アーム（例えば、アダプター P1 システム）及びエフェクターステムループの非共有アームに相補的な配列を含む選択的共有ステムアームにより結合している（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO 2018/156658 の図 1a、図 1b、図 2a、及び図 5a、ならびに関連文書を参照されたい）。一実施形態では、エフェクターステムループは、選択的共有ステムアームが、3' アダプターシステム

40

50

アームの全てまたは一部及びエフェクターシステムの5'アームの全てまたは一部を含むように、アプタマーの3'に配置される。一実施形態では、エフェクターシステムループは、選択的共有ステムアームが、5'アプタマーシステムアームの全てまたは一部及びエフェクターシステムの3'アームの全てまたは一部を含むように、アプタマーの5'に配置される。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、AATAAまたはATTAAを含む。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、AATAAAまたはATTAAAである。複数の実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、下流エレメント(DSE)である。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、上流配列エレメント(USE)である。一実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、2個のリボスイッチを含み、ここで、第1のリボスイッチのエフェクターシステムループがポリアデニル化シグナルAATAAAまたはATTAAAの全てまたは一部を含み、第2のリボスイッチのエフェクターシステムループが下流エレメント(DSE)の全てまたは一部を含む。一実施形態では、2個のリボスイッチは各々、同じリガンドに結合するアプタマーを含む。一実施形態では、2個のリボスイッチは、異なるリガンドに結合する異なるアプタマーを含む。

10

20

30

40

50

【0312】

いくつかの実施形態では、リボスイッチは、感知領域(例えば、本明細書に記載のアプタマー)と、スプライソソームの一部である小核リボ核タンパク質(snRNP)U1の結合部位を含むエフェクター領域とを含む。WO2017/136591は、エフェクター領域がU1 snRNP結合部位(及びそれに相補的な配列)を含むリボスイッチについて説明しており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。アプタマーがそのリガンドに結合すると、エフェクター領域はステムを形成し、U1 snRNP結合部位をU1 snRNPへの結合から隔絶する。ある特定の条件下で(例えば、アプタマーがそのリガンドに結合していない場合)、エフェクター領域は、U1 snRNP結合部位へのアクセスを提供する状況下であり、U1 snRNPがmRNAに結合し、ポリアデニル化を阻害して、メッセージの分解をもたらすことを可能にする。U1 snRNP結合部位は、U1 snRNPに結合することができ、それにより、U1 snRNPを標的遺伝子の3'UTRに動員し、標的遺伝子メッセージのポリアデニル化を抑制する任意のポリヌクレオチド配列とすることができる。一実施形態では、U1 snRNP結合部位は、CAGGTAAGTA(mRNA中にある場合、CAGGUAAGUA)である。いくつかの実施形態では、U1 snRNP結合部位は、このコンセンサス配列が変化したものであり、例えば、コンセンサス配列よりも短い配列、またはコンセンサス配列から変化した1つ以上のヌクレオチドを有する配列を含む。一実施形態では、U1 snRNP結合部位は、配列CAGGTAAGを含む。いくつかの実施形態では、結合部位は、CAGGTAAGTA、CAGGTAAGT、及びCAGGTAAGから選択される配列によってコードされる。U1 snRNP結合部位は、遺伝子由来の任意の5'スプライス部位配列、例えば、ヒトDHFRエクソン2由来の5'スプライス部位とすることができる。

【0313】

リボヌクレアーゼ切断のアプタマー媒介調節

一実施形態では、標的遺伝子の発現は、アプタマー調節リボヌクレアーゼ切断によって調節される。リボヌクレアーゼ(RNase)は、特定のリボヌクレアーゼ基質配列を認識し、切断する。標的遺伝子のDNAに組み込まれると、結果として生じるRNAのアプタマー/リガンド媒介リボヌクレアーゼ切断によって標的遺伝子の発現を調節する能力を提供する組換えDNA構築物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のアプタマーをコードする配列は、リボヌクレアーゼ基質配列と、アプタマーがリガンドに結合すると標的遺伝子発現が生じるように、エフェクター領域及びアプタマーを含むリボスイッチとを含むか、またはそれらをコードする構築物の一部である(参照により全体が本明細書に組み込まれるWO2018/161053に記載されているように)。複数の実施形態では、RNase P基質配列はリボスイッチに結合しており、ここで、リボスイッチは、エフェクター領域及び本明細書に記載のアプタマーを含み、エフェ

クター領域は、RNase P 基質配列の一部に相補的な配列を含む。好適なリガンドのアプタマーへの結合により、アプタマー及びエフェクター領域の構造変化が誘導され、リボヌクレアーゼによる切断のためのリボヌクレアーゼ基質配列のアクセシビリティを変化させる。

【0314】

一実施形態では、アプタマー配列は、RNase P 基質配列の5'に位置し、エフェクター領域は、RNase P 基質配列のリーダー配列の全てまたは一部及び5'アクセプターシステム配列の全てまたは一部を含む。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO2018/161053の図1a、図1b、及び図3b、ならびに関連文書を参照されたい。更なる実施形態では、RNase P 基質のアクセプターシステム及びリボスイッチエフェクター領域は、0、1、2、3、または4ヌクレオチド分だけ離れている。他の実施形態では、エフェクター領域システムは、リーダー配列（及びその相補体）に加えて、RNase P 基質のアクセプターシステムの1つ以上のヌクレオチドと、アクセプターシステムの1つ以上のヌクレオチドに相補的な配列とを含む。

10

【0315】

一実施形態では、ポリヌクレオチドカセットのアプタマー配列は、RNase P 基質配列の3'に位置し、エフェクター領域は、RNase P 基質配列の3'アクセプターシステムの全てまたは一部に相補的な配列を含む。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、WO2018/161053の図3a及び関連文書を参照されたい。更なる実施形態では、RNase P 基質の3'アクセプターシステムに相補的なエフェクター領域配列は、1〜7個のヌクレオチドである。言い換えれば、エフェクター領域システムは、アクセプターシステムの1〜7個のヌクレオチドを含み、アクセプターシステムのこの1〜7個のヌクレオチドに相補的な配列を含む。複数の実施形態では、リボスイッチは、RNase P 基質のエフェクター領域システムとアクセプターシステムが重複しないように、RNase P 基質の3'に位置する。複数の実施形態では、RNase P 基質のエフェクター領域及びアクセプターシステムは、直接隣接している（すなわち、重複していない）。他の実施形態では、RNase P 基質のエフェクター領域及びアクセプターシステムは、1、2、3、4、5、またはそれ以上のヌクレオチド分だけ離れている。

20

【0316】

標的遺伝子

本明細書に開示されるアプタマー及び遺伝子調節カセットを使用して、標的細胞、組織、または生物で発現され得る任意の標的遺伝子の発現を調節することができる。「標的遺伝子」という用語は、細胞に導入され、RNAに転写され、適切な条件下で翻訳及び／または発現することができるポリヌクレオチドを指す。その代替として、標的遺伝子は、標的細胞に対して内因性であり、遺伝子調節カセットは、標的遺伝子内（例えば、内因性標的遺伝子の既存の非翻訳領域またはイントロン内）に配置される。

30

【0317】

標的遺伝子の一例は、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。一実施形態では、標的遺伝子は、組換えDNA構築物が転写される細胞に対して外因性である。別の実施形態では、標的遺伝子は、組換えDNA構築物が転写される細胞に対して内因性である。標的遺伝子は、タンパク質をコードする遺伝子、または非タンパク質コードRNAをコードする配列であり得る。標的遺伝子は、例えば、構造タンパク質、酵素、細胞シグナル伝達タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、ジンクフィンガータンパク質、ホルモン、輸送タンパク質、成長因子、サイトカイン、細胞内タンパク質、細胞外タンパク質、膜貫通タンパク質、細胞質タンパク質、核タンパク質、受容体分子、RNA結合タンパク質、DNA結合タンパク質、転写因子、翻訳機構、チャネルタンパク質、モータータンパク質、細胞接着分子、ミトコンドリアタンパク質、代謝酵素、キナーゼ、ホスファターゼ、交換因子、シャペロンタンパク質、及びこれらのうちのいずれかの調節因子をコードする遺伝子であり得る。複数の実施形態では、標的遺伝子は、エリスロポエチン（Epo）、ヒト成長ホルモン（hGH）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TA

40

50

LEN)、ヒトインスリン、CRISPR関連タンパク質9(cas9)、または免疫グロブリン(もしくはその一部)(例えば、治療用抗体を含む)をコードする。

【0318】

複数の実施形態では、標的遺伝子は、Cas9またはCasRxであり、発現構築物は、ガイドRNA(gRNA)標的の発現を調節するために使用することができる、gRNA、例えば、PCSK9を標的とするgRNAをコードする配列を更に含む。

【0319】

複数の実施形態では、標的遺伝子は、PTHである。複数の実施形態では、標的遺伝子は、糖尿病を治療するための小分子に応答してインスリンレベルを調節するために使用するためのインスリン(例えば、A鎖、B鎖、及びCペプチドを含む配列を含む)である。

【0320】

複数の実施形態では、標的遺伝子は、抗PCSK9抗体、抗VEGFR2抗体(例えば、眼科用)、抗アミロイドAβp3-42抗体、抗IL-17抗体、抗PD1抗体、及び抗HER2抗体を含む治療用抗体である。標的遺伝子が抗体である複数の実施形態では、重鎖及び軽鎖は、タンパク質切断部位(フランなど)またはペプチド自己切断部位(例えば、T2AまたはP2Aなどの2Aペプチド)によって分離された単一のメッセージから発現することができる。

【0321】

複数の実施形態では、標的遺伝子は、SARS-CoV-2ウイルスタンパク質または抗原(スパイクタンパク質など)に対する抗体(例えば、カシリビマブ及び／またはイムデビマブ(Regeneron)、またはバムラニビマブ及び／またはエテセビマブ(Eli Lilly))をコードする。複数の実施形態では、標的遺伝子は、SARS-CoV-2スパイクタンパク質の全てまたは一部をコードし、ここで、発現の誘導によりmRNAが産生され、それ故に、誘導性mRNAワクチン(mRNA-1273、Moderna、またはComirnaty、Pfizer-BioNTech)のように機能する。

【0322】

複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマー及び遺伝子調節カセットは、真核生物細胞、例えば、哺乳類細胞、より具体的には、ヒト細胞における標的遺伝子の発現を調節するために使用される。複数の実施形態では、本明細書に開示されるアプタマー及び遺伝子調節カセットは、眼(角膜及び網膜を含む)、中枢神経系(脳を含む)、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、気道、筋肉、皮膚、肺、軟骨、睾丸、動脈、胸腺、骨髄、または腫瘍における標的遺伝子の発現を調節するために使用される。

【0323】

一態様では、標的遺伝子及び遺伝子調節カセットを含むポリヌクレオチドの導入のための組換えベクター及びそれらの使用が提供され、ここで、遺伝子調節カセットは、本明細書に開示されるアプタマーを含む。いくつかの実施形態では、組換えDNA構築物は、適切なレベルで宿主細胞におけるDNAの複製及び標的細胞における標的遺伝子の発現を提供するDNAセグメントを含む追加のDNAエレメントを含む。当業者であれば、発現制御配列(プロモーター、エンハンサーなど)が、標的細胞における標的遺伝子の発現を促進するそれらの能力に基づいて選択されることを理解する。「ベクター」とは、インビトロまたはインビボのいずれかで、宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む組換えプラスミド、酵母人工染色体(YAC)、ミニ染色体、DNAミニサークル、またはウイルス(ウイルス由来配列を含む)を意味する。一実施形態では、組換えベクターは、ウイルスベクターまたは複数のウイルスベクターの組み合わせである。

【0324】

標的細胞、組織、または生物における標的遺伝子の発現のためのウイルスベクターは、当該技術分野で既知であり、それには、アデノウイルス(AV)ベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レトロウイルス及びレンチウイルスベクター、ならびに単純ヘルペス1型(HSV1)ベクターが含まれる。

10

20

30

40

50

【0325】

アデノウイルスベクターには、例えば、E1領域及びE3領域内の欠失により複製欠損になったヒトアデノウイルス2型及びヒトアデノウイルス5型に基づくものが含まれる。転写カセットをE1領域に挿入して、E1／E3欠失組換えAVベクターを得ることができる。アデノウイルスベクターには、ウイルスコード配列を含まないヘルパー依存性大容量アデノウイルスベクター（別名、大容量「ガットレス（gutless）」または「ガッテッド（guttled）」ベクター）も含まれる。これらのベクターは、ウイルスDNA複製及びパッケージングに必要なシス作用エレメント、主に、逆位末端反復配列（ITR）及びパッケージングシグナル（CY）を含む。これらのヘルパー依存性AVベクターゲノムは、数百個の塩基対から最大およそ36kbの外来DNAを保有する可能性を有する。

10

【0326】

組換えアデノ随伴ウイルス「rAAV」ベクターには、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-7及びAAV-8、AAV-9、AAV-10などを含むが、これらに限定されない、あらゆるアデノ随伴ウイルス血清型に由来する任意のベクターを含む。rAAVベクターは、全体的または部分的に欠失したAAV野生型遺伝子、好ましくはRep及び／またはCap遺伝子のうちの1つ以上を有するが、機能的隣接ITR配列を保持することができる。機能的ITR配列は、AAVゲノムのレスキュー、複製、パッケージング、及び潜在的な染色体組み込みのために保持される。ITRは、野生型ヌクレオチド配列である必要はなく、配列が機能的レスキュー、複製、及びパッケージングを提供する限り、改変されてもよい（例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換により）。

20

【0327】

その代替として、レンチウイルスベクターなどの他の系を使用することもできる。レンチウイルス系の系は、非分裂細胞のみならず分裂細胞も形質導入することができ、例えば、CNSの非分裂細胞を標的とする用途に有用になる。レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルスに由来し、そのウイルスと同様に、宿主ゲノムに組み込まれ、非常に長期の遺伝子発現の可能性を提供する。

【0328】

遺伝子調節カセットを含む標的遺伝子を保有する、プラスミド、YAC、ミニ染色体、及びミニサークルを含むポリヌクレオチドは、例えば、カチオン性脂質、ポリマー、またはそれらの両方を担体として使用して非ウイルスベクター系によって細胞または生物に導入することもできる。コンジュゲートポリ-LL-リシン（PLL）ポリマー及びポリエチレニミン（PEI）ポリマー系を使用して、ベクターを細胞に送達することもできる。ベクターを細胞に送達する他の方法には、細胞培養及び生物の両方に対する、流体力学的注入及びエレクトロポレーション、ならびに超音波の使用が含まれる。遺伝子送達のためのウイルス送達系及び非ウイルス送達系の概説については、参照により本明細書に組み込まれるN. et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1: 27)を参照されたい。

30

【0329】

一態様では、本開示は、標的遺伝子（例えば、治療遺伝子）の発現を調節する方法であって、（a）本明細書に開示されるアプタマーを含むポリヌクレオチドカセットを標的遺伝子に挿入することと、（b）ポリヌクレオチドカセットを含む標的遺伝子を細胞に導入することと、（c）細胞を、標的遺伝子の発現を誘導するのに有効な量で、アプタマーに特異的に結合する小分子リガンドに曝露することと、を含む、方法を提供する。複数の態様では、標的細胞における標的遺伝子の発現は、それが導入された細胞に所望の特性を付与するか、または別様に所望の治療結果をもたらす。

40

【0330】

一実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーを含む遺伝子調節カセットは、（5'または3'非翻訳領域ではなく）標的遺伝子のタンパク質コード配列に挿入される。一

50

実施形態では、本明細書に開示されるアプタマーを含む単一の遺伝子調節カセットが標的遺伝子に挿入される。他の実施形態では、2、3、4、またはそれ以上の遺伝子調節カセットが標的遺伝子に挿入され、ここで、1つ以上の遺伝子調節カセットは本明細書に開示されるアプタマーを含む。一実施形態では、2個の遺伝子調節カセットが標的遺伝子に挿入され、ここで、一方または両方の遺伝子調節カセットが本明細書に開示されるアプタマーを含む。複数の遺伝子調節カセットが標的遺伝子に挿入されると、それらは各々、単一のリガンドを使用して標的遺伝子発現を調節することができるように、同じアプタマーを含むことができる。他の実施形態では、複数の異なる小分子リガンドへの曝露により標的遺伝子発現が調節されるように、各々異なるアプタマーを含むことができる複数の遺伝子調節カセットが標的遺伝子に挿入される。

10

【0331】

治療方法及び医薬組成物

一態様では、遺伝子療法によって送達される治療用タンパク質のレベルを調節する方法が提供される。本明細書に開示されるアプタマーを含む調節カセットを含む治療遺伝子配列が、例えば、ベクターによって、体内の標的細胞に送達される。標的遺伝子発現の細胞特異性は、ベクター内のプロモーター及び／または他のエレメント及び／またはウイルスベクターのキャプシドによって制御され得る。標的遺伝子を含むベクター構築物の送達、及び調節された標的遺伝子の安定したトランスフェクションをもたらす標的組織のトランスフェクションは、治療用タンパク質を産生する際の最初のステップである。しかしながら、標的遺伝子配列にアプタマーが存在するため、標的遺伝子は、有意なレベルで発現されない、すなわち、それは、調節カセットリボスイッチ内に含まれるアプタマーに結合する特異的リガンドの不在下で「オフ状態」である。アプタマー特異的リガンドが投与されたときにのみ、標的遺伝子発現が活性化される。

20

【0332】

標的遺伝子を含むベクター構築物の送達及び活性化リガンドの送達は、概して、時間的な隔たりがある。活性化リガンドの送達は、標的遺伝子が発現されたときに制御され、タンパク質発現のレベルも制御される。リガンドは、硝子体内、眼内、吸入、皮下、筋肉内、皮内、病変内、局所、腹腔内、静脈内（IV）、動脈内、血管周囲、脳内、脳室内、経口、舌下、下位唇、頬側、経鼻、胸腔内、心臓内、髄腔内、硬膜外、骨内、または関節内を含むが、これらに限定されない、いくつかの経路によって送達され得る。

30

【0333】

リガンドの送達のタイミングは、標的遺伝子の活性化の必要性に依存する。例えば、標的遺伝子によってコードされる治療用タンパク質が常に必要とされる場合、経口小分子リガンドが毎日または1日複数回送達されて、標的遺伝子の継続的な活性化、ひいては治療用タンパク質の継続的な発現を確実にすることができる。標的遺伝子が長時間作用効果を有する場合、誘導リガンドは、より少ない頻度で、例えば、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回投薬されてもよい。

【0334】

リボスイッチを含む遺伝子調節カセットの文脈で本明細書に記載されるこのアプタマーは、アプタマーに特異的なリガンドの時間的投薬によって決定される様式で、治療導入遺伝子の発現を時間的に制御することを可能にする。リガンド投与のみでの治療導入遺伝子の発現は、リガンドの不在下で標的遺伝子がオフになることを可能にすることにより、遺伝子治療法の安全性を高める。

40

【0335】

異なるアプタマーを複数のリボスイッチに使用して、異なるリガンドが標的遺伝子の発現を上方調節または下方調節することを可能にすることができる。ある特定の実施形態では、調節カセットを含む治療遺伝子は各々、特定の小分子によって活性化される特異的なアプタマーをカセット内に有する。これは、治療遺伝子が各々、その中に収容されているアプタマーに特異的なリガンドによってのみ活性化され得ることを意味する。これらの実施形態では、リガンドは各々、1つの治療遺伝子のみを活性化する。これにより、いくつか

50

の異なる「標的遺伝子」が1つの個体に送達され得、各々が各々の標的遺伝子に收容された調節カセット内に含まれるアプタマーに特異的なリガンドの送達時に活性化される可能性が可能になる。

【0336】

リボスイッチの文脈で本明細書に開示されるアプタマーは、活性化リガンドが送達されたときに、遺伝子が身体に送達され得るあらゆる治療用タンパク質（エリスロポエチン（EPO）または治療用抗体など）が身体によって産生されることを可能にする。この治療用タンパク質送達方法は、後に注射または注入される体外でのかかる治療用タンパク質、例えば、がんで使用される抗体、または炎症性もしくは自己免疫疾患を阻止するための抗体の製造に取って代わることができる。調節された標的遺伝子を含む身体は、遺伝子特異的なリガンドが投与されたときにオンにスイッチされる生物製剤製造工場になる。

10

【0337】

一実施形態では、標的タンパク質は、特定のDNA配列を標的とし、かつ編集することができるヌクレアーゼであり得る。かかるヌクレアーゼには、CasRx、Cas9、ジンクフィンガー含有ヌクレアーゼ、またはTALENが含まれる。これらのヌクレアーゼの場合、ヌクレアーゼタンパク質は、標的内因性遺伝子を編集するのに十分な短い期間だけ必要とされ得る。しかしながら、調節されていないヌクレアーゼ遺伝子が身体に送達された場合、このタンパク質は、細胞の残りの寿命にわたって存在し得る。ヌクレアーゼの場合、ヌクレアーゼが長く存在するほど、オフターゲット編集のリスクが増加する。かかるタンパク質の発現の調節は、有意な安全性利点を有する。この場合、調節カセットを含むヌクレアーゼ標的遺伝子を含むベクターを体内の適切な細胞に送達することができる。標的遺伝子はカセット特異的なリガンドの不在下で「オフ」状態にあるため、ヌクレアーゼは産生されない。活性化リガンドが投与されたときにのみ、ヌクレアーゼが産生される。十分な編集が起こるのを可能にするのに十分な時間が経過すると、リガンドは取り出され、再度投与されない。したがって、ヌクレアーゼ遺伝子はその後「オフ」状態になり、更なるヌクレアーゼは産生されず、編集が停止する。このアプローチを使用して、CEP290の変異によって引き起こされるLCA10及びABCA4の変異によって引き起こされるスターガルト病などのいくつかの遺伝性網膜症を含む遺伝性状態を修正することができる。

20

【0338】

特異的なリガンドが投与されたときにのみ活性化される治療用タンパク質をコードする調節された標的遺伝子の投与を使用して、治療用遺伝子を調節して、多くの異なるタイプの疾患、例えば、がん（治療用抗体を用いて）、免疫障害（免疫調節タンパク質もしくは抗体を用いて）、代謝疾患、PNHなどの希少疾患（調節された遺伝子として抗C5抗体または抗体断片を用いて）、または眼血管新生（治療用抗体を用いて）、及び乾燥AMD（免疫調節タンパク質を用いて）を治療することができる。

30

【0339】

多種多様な特定の疾患及び状態の治療を可能にする多種多様な特定の標的遺伝子は、本明細書に記載のアプタマー／リガンドを使用して発現が調節され得る標的遺伝子としての使用に好適である。例えば、インスリンまたはインスリン類似体（好ましくは、ヒトインスリンまたはヒトインスリン類似体）は、I型糖尿病、II型糖尿病、または代謝症候群を治療するための標的遺伝子として使用されてもよく、ヒト成長ホルモンは、成長障害を有する小児または成長ホルモン欠乏成人を治療するための標的遺伝子として使用されてもよく、エリスロポエチン（好ましくは、ヒトエリスロポエチン）は、慢性腎臓病に起因する貧血、骨髄異形成に起因する貧血、またはがん化学療法に起因する貧血を治療するための標的遺伝子として使用されてもよい。本明細書に開示されるアプタマー及び遺伝子発現カセットと適合性のある更なる標的遺伝子としては、色盲の治療用の環状ヌクレオチドゲートカチオンチャンネルアルファ-3（CNGA3）及び環状ヌクレオチドゲートカチオンチャンネルベータ-3（CNGB3）、網膜色素変性症またはレーバー先天性黒内障の治療用のレチノイドイソメロヒドロラーゼ（RPE65）、X連鎖網膜色素変性症の治療用の

40

50

X連鎖網膜色素変性症GTPaseレギュレーター（RPGR）、パーキンソン病の治療用を含むグルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）、筋萎縮性側索硬化症の治療用のナンセンス転写物1（UPF1）レギュレーター、ならびに放射線誘発性セロストミア及びシェーグレン症候群の治療用のアクアポリンが挙げられるが、これらに限定されない。追加の標的遺伝子としては、ArchT（Halorubrum株TP009由来のアーキロドプシン）、Jaws（Halobacterium salinarum（Shark株）由来のクルクスハロロドプシン）、iC1C2（Chlamydomonas reinhardtii由来のチャネルロドプシンChR1とChR2との間のC1C2キメラのバリエーション）、または光伝達カスケードの不活性化を媒介するGTPase複合体の重要な成分であるRgs9アンカータンパク質（R9AP）が挙げられる。

10

【0340】

本明細書に開示されるアプタマーを含む発現構築物は、嚢胞性線維症、血友病、筋ジストロフィー、サラセミア、または鎌状赤血球貧血などの単一の遺伝子欠損によって引き起こされる疾患の治療に特に好適であり得る。したがって、ヒト β -、 γ -、 δ -、または ϵ -グロブリンは、 β -サラセミアまたは鎌状赤血球貧血を治療するための標的遺伝子として使用されてもよく、ヒト第VII因子または第IX因子は、血友病Aまたは血友病Bを治療するための標的遺伝子として使用されてもよい。

【0341】

複数の実施形態では、本明細書に開示される発現構築物／小分子を使用して、ウイルス疾患を治療する、予防する、またはその重症度を軽減することができる。複数の実施形態では、本開示は、小分子リガンドの投与に応答して、SARS-CoV-2ウイルスタンパク質または抗原（例えば、スパイクタンパク質）に対する抗体を発現させることによって、COVID-19を治療する、予防する、またはその重症度を軽減するための方法を提供する。複数の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の遺伝子調節カセットを使用して、スパイクタンパク質（もしくは複数の血清型スパイクタンパク質）またはその一部を発現させ、リガンドを投与することによって、SARS-CoV-2による感染を予防する（またはその重症度を軽減する）ための方法を提供する。複数の実施形態では、標的遺伝子は、SARS-CoV-2ウイルスタンパク質または抗原（スパイクタンパク質など）に対する抗体である。他の実施形態では、標的遺伝子は、1つ以上のSARS-CoV-2スパイクタンパク質の全てまたは一部をコードし、ここで、発現の誘導によりmRNAが産生され、それ故に、誘導性mRNAワクチンのように機能する。複数の実施形態では、発現構築物は、AAVウイルスゲノムの一部であり、発現構築物を含むAAVベクターは、例えば、対象の筋肉に投与され、続いて、リガンドが投与される。

20

30

【0342】

複数の実施形態では、本開示は、ヘモクリットを回復させる方法、及び本明細書に記載の遺伝子調節構築物からのEpoの発現によって貧血を治療する方法を提供し、ここで、Epo遺伝子調節構築物を含むベクターが、それを必要とする対象に投与され、続いて、本明細書に記載の小分子リガンドが投与される。複数の実施形態では、貧血は、対象における慢性腎疾患に起因する。

40

【0343】

複数の実施形態では、本開示は、ヘモクリットを回復させる方法、及び本明細書に記載の遺伝子調節構築物からのEpoの発現によって慢性腎疾患を治療する方法を提供し、ここで、Epo遺伝子調節構築物を含むベクターが、それを必要とする対象に投与され、続いて、本明細書に記載の小分子リガンドが投与される。

【0344】

本明細書に記載の小分子は、概して、1つ以上の薬学的に許容される担体と組み合わせられて、患者への投与に好適な医薬組成物を形成する。薬学的に許容される担体としては、薬学分野で一般に使用されている溶媒、結合剤、希釈剤、崩壊剤、滑沢剤、分散媒、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが挙げられる。医薬組成

50

物は、錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤、点眼剤などの形態であってもよく、それらの意図される投与経路と適合するように製剤化されている。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、鼻腔内、皮下、経口、吸入、経皮（局所）、経粘膜、及び眼が挙げられる。

【0345】

I～XVIの化合物を含む医薬組成物は、標的遺伝子を望ましく調節するのに十分な量の化合物が患者に送達されるように、ある投薬スケジュールで患者に投与される。剤形が錠剤、丸剤などである場合、好ましくは、本医薬組成物は、0.1mg～10gの化合物、0.5mg～5gの化合物、1mg～1gの化合物、2mg～750mgの化合物、5mg～500mgの化合物、10mg～250mgの化合物、または150mg～300mgの化合物を含む。

10

【0346】

本医薬組成物は、1日1回または1日複数回（例えば、1日2回、3回、4回、5回、またはそれ以上）投薬されてもよい。その代替として、本医薬組成物は、1日に1回未満の頻度で、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、もしくは14日に1回、または1ヶ月に1回もしくは数ヶ月に1回投薬されてもよい。いくつかの実施形態では、本医薬組成物は、例えば、1回、2回、3回などのわずかな回数のみ患者に投与され得る。

【0347】

標的遺伝子によってコードされる治療用タンパク質の発現の増加を必要とする患者を治療する方法であって、本明細書に開示されるアプタマーが結合するか、または別様に応答するリガンドを含む医薬組成物を患者に投与することを含み、ここで、患者に、標的遺伝子を含む組換えDNAが以前に投与されており、標的遺伝子が、アプタマーのリガンドによって標的遺伝子の発現を調節する能力を提供する本明細書に開示される遺伝子調節カセットを含む、方法が本明細書に提供される。標的遺伝子によってコードされる治療用タンパク質の発現の増加を必要とする患者を治療する方法に使用するための、本明細書に開示されるアプタマーが結合するか、または別様に応答するリガンドを含む医薬組成物であって、ここで、患者に、標的遺伝子を含む組換えDNAが以前に投与されており、標的遺伝子が、アプタマーのリガンドによって標的遺伝子の発現を調節する能力を提供する本明細書に開示される遺伝子調節カセットを含む、方法が本明細書に提供される。

20

30

【0348】

検出及び／または診断用途のためのアプタマー

広範囲の検出剤及び診断剤は、キメラまたは物理的コンジュゲーションによりアプタマーに結合することができる。更に、アプタマーは、バイオセンサー、マイクロ流体デバイス、及び他の検出プラットフォームに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、アプタマーは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、ポリオキシエチル化グリセロール（POG）及び他のポリオキシエチル化ポリオール、ポリビニルアルコール（PVA）及び他のポリアルキレンオキシド、ポリオキシエチル化ソルビトール、またはポリオキシエチル化グルコースを含むが、これらに限定されないポリアルキレングリコール部分にコンジュゲートされる。

40

【0349】

いくつかの実施形態では、アプタマーは、蛍光部分または標識、造影剤、放射性同位体部分、放射線不透過性部分などを含むが、これらに限定されない検出可能な部分、例えば、ビオチン、フルオロフォア、発色団、スピン共鳴プローブ、ナノ粒子（金、磁性、及び超常磁性ナノ粒子を含むが、これらに限定されない）、量子ドット、放射性標識などの検出可能な標識にコンジュゲートされる。例示的なフルオロフォアとしては、蛍光色素（例えば、フルオロセイン、ローダミンなど）及び他の発光分子（例えば、ルミナル）が挙げられる。フルオロフォアは、基質（例えば、ダンシルプローブ）に結合したときに構造的変化を受ける修飾タンパク質中の1つ以上の残基の近くに位置する場合、その蛍光が変化するような環境感受性であり得る。例示的な放射性標識としては、1つ以上の低感度核を

50

有する原子を含む小分子 (^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In など) が挙げられる。他の有用な部分は、当該技術分野で既知である。

【0350】

いくつかの実施形態では、アプタマーは、抗炎症剤、抗がん剤、抗神経変性剤、抗感染剤、または一般的な治療剤を含むが、これらに限定されない治療部分にコンジュゲートされる。

【0351】

化合物に結合するアプタマーを同定するための方法

式 I ~ X X I I の化合物の添加または曝露に応答して、式 I ~ X X I I の化合物に結合するか、または別様にリボスイッチの一部である場合に標的遺伝子発現を調節するアプタマーを同定する方法が本明細書に開示される。一実施形態では、本方法は、

(i) 親アプタマー配列を選択するステップと、

(ii) (i) で選択されたアプタマーをコードする配列を含むアプタマーライブラリを生成するステップであって、アプタマーをコードする配列内の 1 つ以上のヌクレオチドが、アプタマー内の 1 つ以上の不對領域に対応する 1 つ以上の位置でランダムに変異し、変異したアプタマー配列が、レポーター遺伝子の発現を制御するリボスイッチの状況下にある、生成するステップと、

(iii) 親アプタマー配列と比較して、本明細書に開示される化合物に応答して標的遺伝子発現の調節の増加 (例えば、より高い誘導または抑制倍率) を有するアプタマーについて、(ii) からのライブラリをスクリーニングするステップと、

(iv) 任意選択で、ステップ (i) で選択されたアプタマーではなく、ステップ (ii) で同定されたアプタマーにステップ (ii) 及びステップ (iii) を繰り返すステップと、を含む。

【0352】

親アプタマー配列は、既知の T P P アプタマー配列を含む T P P アプタマーであってもよく、または利用可能なデータベースで相同配列を検索することによって同定された推定 T P P アプタマーであってもよい。親アプタマー配列は、本明細書に開示されるアプタマー配列、例えば、C T G G G G A G T C C T T C A T G C G G G G C T G A G A G G A T G G A A G C A A T C G A C C A T C G A C C C A T T G C A C C T G A T C C G G A T C A T G C C G G C G C A G G G A G (12C6-1、配列番号1) であり得る。

【0353】

親アプタマー配列を選択するステップは、例えば、(i) 推定 T P P アプタマーを同定することと、(ii) アプタマーを、標的遺伝子 (例えば、レポーター遺伝子) の発現を調節するリボスイッチに挿入することと、(iii) リボスイッチ／標的遺伝子構築物をチアミンまたは T P P 類似体もしくは誘導體 (例えば、本明細書に記載の化合物) に曝露することとを伴うことができる。

【0354】

推定 T P P アプタマーは、各々複数の配列アラインメント、コンセンサス二次構造、及び共分散モデル (C M) によって表される、R N A ファミリーの集合である R f a m データベースなどの適切な配列データベースから同定することができる。複数の実施形態では、推定 T P P アプタマーは、R f a m T P P リボスイッチファミリー R F 0 0 0 5 9 から同定される。複数の実施形態では、推定 T P P アプタマーは、t h i C

(G U A A U G U G U C G G A G U G C C U U A G G G A U U A U U C C C C U A A A G C U G A G A C C G C A U U G C G G G A U C C G U U G A A C C U G A U C A G G C U A A U A C C U G C G A A G G G A A C A C A U U A C、配列番号 6 7 9) または t h i M (G U A A U G U C U C G G G G U G C C C U U C U G C G U G A A G G C U G A G A A A U A C C C G U A U C A C C U G A U C U G G A U A A U G C C A G C G U A G G G A A G A C A U U A C、配列番号 6 8 0) と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または

少なくとも99%同一の配列を有する。

【0355】

推定TPPアプタマーは、当業者に既知の技法を使用してリボスイッチに挿入することができる。TPP及び1つ以上のチアミンまたはTPP類似体もしくは誘導体（例えば、本明細書に記載の化合物）の存在に対するアプタマーの応答性は、細胞培養系及び／または無細胞系で試験することができる。具体的には、細胞培養系は、例えば、哺乳類、植物、または昆虫細胞培養物を含む真核細胞培養物である。

【0356】

本明細書に記載の化合物に応答するアプタマーを同定するために、アプタマー（すなわち、親アプタマー）をコードする配列の1つ以上のヌクレオチド位置がランダム化される。ランダム化することができる配列の領域には、J2-4、L3a、P4/J4-5～J5-4、及びL5が含まれる。

【0357】

ランダム化のためのヌクレオチド位置は、親アプタマー配列の構造に基づいて選択することができる。予測される二次構造は、RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) などの利用可能なプログラムを使用して、及び／または関連アプタマー（例えば、Edwards, TE & Ferre-D'Amaré, AR, Structure. 2006 Sep; 14(9): 1459-68のE. coli tHIMリボスイッチ）の結晶構造と比較して得ることができる。例えば、ループ（L）領域（例えば、L3及び／またはL5）及び結合（J）領域（例えば、J3-2（対領域P3及びP2を結合）、J2-4、及び／またはJ4-5）を含む、アプタマーの不對領域を同定することができる。1つ以上の不對領域内の1つ以上のヌクレオチドをランダム化して、アプタマーのライブラリを生成することができる。複数の実施形態では、1つ以上の不對領域に隣接する1つ以上のヌクレオチドがランダム化される。加えて、対（P）領域内の1つ以上のヌクレオチドをランダム化することができる。更に、不對領域または対領域内の1つ以上のヌクレオチドを付加するまたは欠失させることができる。変異誘発されたアプタマー配列は、リボスイッチの状況下でアプタマー配列のライブラリとして提供することができる。複数の実施形態では、アプタマーライブラリは、本明細書に開示される遺伝子発現カセットの一部としてリボスイッチの状況下で提供される。

【0358】

1つ以上の変異を含むアプタマーをコードする配列は、本明細書に記載の1つ以上の化合物の存在に対する応答性について試験することができる。

【0359】

所望の化合物に応答性であるアプタマーは、ヌクレオチドをランダム化することによって更に変異誘発することができる。上述のように、選択された位置、例えば、不對領域のヌクレオチドをランダム化することができ、ライブラリが作製され得る。

【0360】

本明細書に開示される方法に使用されるレポーター遺伝子によってコードされるレポータータンパク質は、酵素活性もしくは分光光度特性などのレポータータンパク質の特性を検出することによってアッセイすることができるか、または抗体ベースのアッセイなどを用いて間接的にアッセイすることができるタンパク質である。容易に検出可能なレポーター遺伝子産物の例としては、ピューロマイシン耐性マーカー（pac）、3-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ（URA3）、アルギニンペルメアーゼCAN1、ガラクトキナーゼ（GAL1）、ベクターガラクトシダーゼ（LacZ）、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）が挙げられるが、これらに限定されない。検出可能なシグナルの他の例としては、CD4を含むが、これに限定されない細胞表面マーカーが挙げられる。本明細書に開示されるアプタマーを同定するための方法における使用に好適なレポーター遺伝子には、蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）及びその誘導体）、または蛍光タグに融合

したタンパク質も含まれる。蛍光タグ及びタンパク質の例としては、(3-F) Tyr-EGFP、A44-KR、aacuGFP1、aacuGFP2、aceGFP、aceGFP-G222E-Y220L、aceGFP-h、AcGFP1、AdRed、AdRed-C148S、aeurGFP、afraGFP、alajGFP1、alajGFP2、alajGFP3、amCyan1、amFP486、amFP495、amFP506、amFP515、amilFP484、amilFP490、amilFP497、amilFP504、amilFP512、amilFP513、amilFP593、amilFP597、anm1GFP1、anm1GFP2、anm2CP、anobCFP1、anobCFP2、anobGFP、apulFP483、AQ14、AQ143、Aquamarine、asCP562、asFP499、AsRed2、asulCP、atenFP、avGFP、avGFP454、avGFP480、avGFP509、avGFP510、avGFP514、avGFP523、AzamiGreen、Azurite、BDFP1.6、bfloGFPa1、bfloGFPc1、BFP、BFP.A5、BFP5、bsDronpa(オン)、ccalGFP1、ccalGFP3、ccalOFP1、ccalRFP1、ccalYFP1、ceGFP、cerFP505、Cerulean、CFP、cFP484、cfSGFP2、cgfmKate2、CGFP、cgfTagRFP、cgigGFP、cgreGFP、CheGFP1、CheGFP2、CheGFP4、Citrine、Citrine2、Clomeleon、Clover、cp-mKate、cpCitrine、cpT-Sapphire174-173、CyOFP1、Cypet、CyRFP1(CyRFP1)、d-RFP618、D10、d1EosFP(緑色)、d1EosFP(赤色)、d2EosFP(緑色)、d2EosFP(赤色)、deGFP1、deGFP2、deGFP3、deGFP4、dendFP(緑色)、dendFP(赤色)、Dendra(緑色)、Dendra(赤色)、Dendra2(緑色)、Dendra2(赤色)、Dendra2-M159A(緑色)、Dendra2-M159A(オレンジ色)、Dendra2-T69A(緑色)、Dendra2-T69A(オレンジ色)、dfGFP、ダイマー1、ダイマー2、dis2RFP、dis3GFP、dKeima、dKeima570、dLanYFP、DrCBD、Dreiklang(オン)、Dronpa(オン)、Dronpa-2(オン)、Dronpa-3(オン)、dsFP483、Dspr1、DsRed、DsRed-Express、DsRed-Express2、DsRed-Max、DsRed.M1、DsRed.T3、DsRed.T4、DsRed2、DstC1、dTFP0.1、dTFP0.2、dTG、dTomato、dVFP、E2-Crimson、E2-Orange、E2-Red/Green、EaGFP、EBFP、EBFP1.2、EBFP1.5、EBFP2、ECFP、ECFPH148D、ECGFP、eechGFP1、eechGFP2、eechGFP3、eechRFP、efasCFP、efasGFP、eforCP、EGFP、eGFP203C、eGFP205C、Emerald、増強シアン発光GFP、EosFP(緑色)、EosFP(赤色)、eqFP578、eqFP611、eqFP611V124T、eqFP650、eqFP670、EYFP、EYFP-Q69K、fabdGFP、ffDronpa(オン)、フォールディングレポーターGFP、FP586、FPrfl2.3、FR-1、FusionRed、FusionRed-M、G1、G2、G3、Gamilus(オン)、Gamilus0.1、Gamilus0.2、Gamilus0.3、Gamilus0.4、GCaMP2、gfasGFP、GFP(S65T)、GFP-151pyTyrCu、GFP-Tyr151pyz、GFPmut2、GFPmut3、GFPxm16、GFPxm161、GFPxm162、GFPxm163、GFPxm18、GFPxm181uv、GFPxm18uv、GFPxm19、GFPxm191uv、GFPxm19uv、H9、HcRed、HcRed-Tandem、HcRed7、hcriGFP、hmGFP、HriCFP、HriGFP、iFP1.4、iFP2.0、iLov、iq-EBFP2、iq-mApple、iq-mCerulean3、iq-mEmerald、iq-mKate2、iq-m

10

20

30

40

50

Venus、iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP713、iRFP720、IrisFP（緑色）、IrisFP（オレンジ色）、IrisFP-M159A（緑色）、Jred、Kaede（緑色）、Kaede（赤色）、Katushka、Katushka-9-5、Katushka2S、KCY、KCY-G4219、KCY-G4219-38L、KCY-R1、KCY-R1-158A、KCY-R1-38H、KCY-R1-38L、KFP1（オン）、KikGR1（緑色）、KikGR1（赤色）、KillerOrange、KillerRed、KO、Kohinoor（オン）、laesGFP、laGFP、LanFP1、LanFP2、lanRFP-ΔS83l、LanYFP、laRFP、LSS-mKate1、LSS-mKate2、LSSmOrange、M355NA、mAmetrine、mApple、Maroon0.1、mAzamiGreen、mBanana、mBeRFP、mBlueberry1、mBlueberry2、mc1、mc2、mc3、mc4、mc5、mc6、McaG1、McaG1ea、McaG2、mCardinal、mCarmine、mcavFP、mcavGFP、mcavRFP、mCCFP、mCerulean、mCerulean.B、mCerulean.B2、mCerulean.B24、mCerulean2、mCerulean2.D3、mCerulean2.N、mCerulean2.N(T65S)、mCerulean3、mCherry、mCherry2、mCitrine、mClavGR2（緑色）、mClavGR2（赤色）、mClover3、mCyRFP1、mECFP、meffCFP、meffGFP、meffRFP、mEGFP、meleCFP、meleRFP、mEmerald、mEos2（緑色）、mEos2（赤色）、mEos2-A69T（緑色）、mEos2-A69T（オレンジ色）、mEos3.1（緑色）、mEos3.1（赤色）、mEos3.2（緑色）、mEos3.2（赤色）、mEos4a（緑色）、mEos4a（赤色）、mEos4b（緑色）、mEos4b（赤色）、mEosFP（緑色）、mEosFP（赤色）、mEosFP-F173S（緑色）、mEosFP-F173S（赤色）、mEosFP-M159A（緑色）、mEYFP、MfaG1、mGarnet、mGarnet2、mGeos-C（オン）、mGeos-E（オン）、mGeos-F（オン）、mGeos-L（オン）、mGeos-M（オン）、mGeos-S（オン）、mGinger1、mGinger2、mGrape1、mGrape2、mGrape3、mHoneydew、MiCy、mIFP、miniSOG、miniSOGQ103V、miniSOG2、miRFP、miRFP670、miRFP670nano、miRFP670v1、miRFP703、miRFP709、miRFP720、mIrisFP（緑色）、mIrisFP（赤色）、mK-GO（初期）、mK-GO（後期）、mKalamal1、mKate、mKateM41GS158C、mKateS158A、mKateS158C、mKate2、mKeima、mKelly1、mKelly2、mKG、mKikGR（緑色）、mKikGR（赤色）、mKillerOrange、mKO、mKO2、mKOκ、mLumin、mMaple（緑色）、mMaple（赤色）、mMaple2（緑色）、mMaple2（赤色）、mMaple3（緑色）、mMaple3（赤色）、mMaroon1、mmGFP、mMiCy、mmilCFP、mNectarine、mNeonGreen、mNeptune、mNeptune2、mNeptune2.5、mNeptune681、mNeptune684、Montiporasp.#20-9115、mOrange、mOrange2、moxBFP、moxCerulean3、moxDendra2（緑色）、moxDendra2（赤色）、moxGFP、moxMaple3（緑色）、moxMaple3（赤色）、moxNeonGreen、moxVenus、mPapaya、mPapaya0.7、mPlum、mPlum-E16P、mRaspberry、mRed7、mRed7Q1、mRed7Q1S1、mRed7Q1S1BM、mRFP1、mRFP1-Q66C、mRFP1-Q66S、mRFP1-Q66T、mRFP1.1、mRFP1.2、mRojoa、mRojob、mRouge、mRtms5、mRuby、mRuby2、mRuby3、mScarlet、mScarlet-H、mScarlet-I、mS

table、mStrawberry、mT-Sapphire、mTagBFP2、mTangerine、mTFP0.3、mTFP0.7 (オン)、mTFP1、mTFP1-Y67W、mTurquoise、mTurquoise2、muGFP、mUkG、mVenus、mVenus-Q69M、mVFP、mVFP1、mWasabi、Neptune、NijiFP (緑色)、NijiFP (オレンジ色)、NowGFP、obeCFP、obeGFP、obeYFP、OFP、OFPxm、oxBFP、oxCerulean、oxGFP、oxVenus、P11、P4、P4-1、P4-3E、P9、PA-GFP (オン)、Padron (オン)、Padron (スター) (オン)、Padron0.9 (オン)、PAmCherry1 (オン)、PAmCherry2 (オン)、PAmCherry3 (オン)、PAmKate (オン)、PATagRFP (オン)、PATagRFP1297 (オン)、PATagRFP1314 (オン)、pcDronpa (緑色)、pcDronpa (赤色)、pcDronpa2 (緑色)、pcDronpa2 (赤色)、PdaC1、pdae1GFP、phiYFP、phiYFPv、イクリプティックpHluorin、イクリプティックpHluorin (酸性)、レシオメトリックpHluorin (酸性)、レシオメトリックpHluorin (アルカリ性)、pHluorin2 (酸性)、pHluorin2 (アルカリ性)、pHuiji
 、PlamGFP、pmeaGFP1、pmeaGFP2、pmimGFP1、pmimGFP2、Pp2FbFP、Pp2FbFPL30M、ppluGFP1、ppluGFP2、pporGFP、pporRFP、PS-CFP (シアン)、PS-CFP (緑色)、PS-CFP2 (シアン)、PS-CFP2 (緑色)、psamCFP、PSmOrange (遠赤色)、PSmOrange (オレンジ色)、PSmOrange2 (遠赤色)、PSmOrange2 (オレンジ色)、ptilGFP、R3-2+PCB、RCaMP、RDSmCherry0.1、RDSmCherry0.2、RDSmCherry0.5、RDSmCherry1、rfloGFP、rfloRFP、RFP611、RFP618、RFP630、RFP637、RFP639、roGFP1、roGFP1-R1、roGFP1-R8、roGFP2、rrenGFP、RRvT、rsCherry (オン)、rsCherryRev (オン)、rsCherryRev1.4 (オン)、rsEGFP (オン)、rsEGFP2 (オン)、rsFastLime (オン)、rsFolder (緑色)、rsFolder2 (緑色)、rsFusionRed1 (オン)、rsFusionRed2 (オン)、rsFusionRed3 (オン)、rsTagRFP (ON)、Sander cyanin、Sapphire、sarcGFP、SBFP1、SBFP2、SCFP1、SCFP2、SCFP3A、SCFP3B、scubGFP1、scubGFP2、scubRFP、secBFP2、SEYFP、sg11、sg12、sg25、sg42、sg50、SGFP1、SGFP2、SGFP2 (206A)、SGFP2 (E222Q)、SGFP2 (T65G)、SHardonnay、shBFP、shBFP-N158S/L173I、ShG24、Sirius、SiriusGFP、Skylan-NS (オン)、Skylan-S (オン)、smURFP、SNIFFP、SOPP、SOPP2、SOPP3、SPOON (オン)、stylGFP、SuperfolderGFP、SuperfoldermTurquoise2、SuperfoldermTurquoise2ox、SuperNovaGreen、SuperNovaRed、SYFP2、T-Sapphire、TagBFP、TagCFP、TagGFP、TagGFP2、TagRFP、TagRFP-T、TagRFP657、TagRFP675、TagYFP、td-RFP611、td-RFP639、tダイマー2 (12)、tdKatushka2、TDsmURFP、tdTomato、tKeima、Topaz、TurboGFP、TurboGFP-V197L、TurboRFP、Turquoise-GL、Ultramarine、UnaG、usGFP、Venus、VFP、vsfGFP-0、vsfGFP-9、W1C、W2、W7、WasCFP、Wi-Phy、YPet、zFP538、zoan2RFP、ZsGreen、ZsYellow1、αGFP、10B、22G、5B、6C

10

20

30

40

50

、A1a、aacuCP、acanFP、ahyaCP、amilCP、amilCP580、amilCP586、amilCP604、apulCP584、BFPsol、Blue102、CFP4、cgigCP、CheGFP3、Clover1.5、cpasCP、Cy11.5、dClavGR1.6、dClover2、dClover2A206K、dhorGFP、dhorRFP、dPapaya0.1、Dronpa-C62S、DsRed-Timer、echFP、echiFP、EYFP-F46L、fcFP、fcomFP、Fpaagar、Fpag_frag、Fpcondchrom、FPmann、Fpmcavgr7.7、Gamillus0.5、gdjiCP、gfascCP、GFPhal、gtencP、hcriCP、hfriFP、KikG、LEA、mcFP497、mcFP503、mcFP506、mCherry1.5、mClavGR1、mClavGR1.1、mClavGR1.8、mClover1.5、mcRFP、mefFP、mEos2-NA、meruFP、mKate2.5、mOFP.T.12、mOFP.T.8、montFP、moxEos3.2、mPA-GFP、mPapaya0.3、mPapaya0.6、mRFP1.3、mRFP1.4、mRFP1.5、mTFP0.4、mTFP0.5、mTFP0.6、mTFP0.8、mTFP0.9、mTFP1-Y67H、mTurquoise-146G、mTurquoise-146S、mTurquoise-DR、mTurquoise-GL、mTurquoise-GV、mTurquoise-RA、mTurquoise2-G、NpR3784g、PDM1-4、psupFP、Q80R、rfloGFP2、RpBphP1、RpBphP2、RpBphP6、rrGFP、RSGFP1、RSGFP2、RSGFP3、RSGFP4、RSGFP6、RSGFP7、Rtms5、sclFP1、sclFP2、spisCP、stylCP、sympFP、TeAPCα、tPapaya0.01、Trp-lessGFP、vsGFP、Xpa、yEGFP、YFP3、zGFP、及びzRFPが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0361】

本明細書に開示されるアプタマーライブラリをスクリーニングするための方法は、アプタマーの制御下でのレポーター遺伝子の活性を測定すること、及び／またはスクリーニングに使用されるチアミンもしくはTPP類似体の存在下でのレポーター遺伝子の活性を、スクリーニングに使用されるチアミンもしくはTPP類似体の不在下でのレポーター遺伝子の活性と比較することを含み得る。

【0362】

製造品及びキット

本明細書に記載の方法に使用するためのキットまたは製造品も提供される。複数の態様では、本キットは、好適なパッケージ内に本明細書に記載の組成物（例えば、遺伝子調節カセットを含む標的遺伝子を含むベクターを送達するための組成物）を含む。本明細書に記載の組成物（注射用の眼用組成物など）に好適なパッケージは当該技術分野で既知であり、これには、例えば、バイアル（密封バイアルなど）、容器、アンプル、ボトル、ジャー、柔らかいパッケージ（例えば、密封マイラーまたはプラスチック袋）などが含まれる。これらの製造品は、更に滅菌及び／または密封されてもよい。

【0363】

本明細書に記載の組成物を含むキットも提供される。これらのキットは、本明細書に記載の使用などの本組成物の使用方法に関する説明書（複数可）を更に含んでもよい。本明細書に記載のキットは、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び本組成物の投与を行うためのまたは本明細書に記載の任意の方法を行うための説明書を含む添付文書を含む、商業的観点及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。例えば、いくつかの実施形態では、本キットは、本明細書に記載のアプタマー配列を含む遺伝子調節カセットと、注射に好適な薬学的に許容される担体と、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び注射を行うための説明書を有する添付文書のうちの1つ以上とを含む、標的遺伝子の発現のためのrAAVを含む。いくつかの実施形態では、本キットは、眼内注射、筋肉内注射、静脈内注射などに好適である。

【0364】

本明細書に開示される組成物及び方法に当業者により変更が加えられてもよいことが理解及び予期されるべきであり、かかる修正が本開示の範囲内に含まれるよう意図されている。以下の実施例は、本発明を更に例証するが、本発明の範囲を限定するものと決して解釈されるべきではない。

【0365】

本明細書で引用される全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に提供される全てのヌクレオチド配列は、別途明記されない限り、5'から3'への配向である。配列表が本明細書とともに出願され、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0366】

実施例1：TPPアプタマー相同配列は、チアミンピロリン酸（TPP）及びビタミンB1類似体に応答して哺乳類細胞における遺伝子発現を調節する

実験手順：

リボスイッチ構築物：アプタマーは、Integrated DNA Technologies, Inc. が合成した。合成したアプタマー配列を、本明細書ではアプタマー配列12C6-1と呼び、推定TPPアプタマー配列（AP008955.1/944373~944459、CP030117.1/954080~954166、CP023474.1/977011~977097）を含み、Cが5'末端にあり、相補的Gが3'末端にあり、推定TPPアプタマー配列に隣接している：CTGGGGAGTCCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATGGGAAGCAATCGACCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATCATGCCGGCGCGCAGGGAG（配列番号1）。Golden Gateクローニング戦略（New England Biolabs、NEB）を使用して、合成したアプタマー配列をイントロン-エクソン-イントロンカセットにクローニングし、G17リボスイッチカセット内のグアニンアプタマーを置き換えて（全体が本明細書に組み込まれるWO2016/126747に列挙されている配列番号15を参照されたい）、リボスイッチ構築物Luci-12C6-1を生成した。

【0367】

トランスフェクション：3.5×10⁴ヒト胎児腎臓（HEK）293細胞を、トランスフェクションの前日に96ウェル平底プレートにプレーティングした。プラスミドDNA（500ng）を、チューブまたは96ウェルU底プレートに添加した。別個に、TransIT-293試薬（Mirus、1.4μL）を、50μLのOptimum I培地（Life Technologies）に添加し、室温（RT）で5分間静置させた。その後、50μLのこの希釈トランスフェクション試薬をDNAに添加し、混合し、室温で20分間インキュベートした。最後に、7μLのこの溶液を96ウェルプレート中の細胞ウェルに添加した。トランスフェクションの4時間後、トランスフェクション溶液を含む培地を、アプタマーリガンドとしてTPPまたはフルスルチアミンのいずれかを有する培地に置き換えた。

【0368】

培養細胞のホタルルシフェラーゼアッセイ：培地交換の24時間後、プレートをインキュベーターから取り出し、実験台上で数分間かけて室温に平衡化し、その後、吸引した。Glo-Lysis緩衝液（Promega、100μL、室温）を添加し、プレートを室温で少なくとも5分間保持させた。その後、ウェル内容物を50μLの粉碎によって混合し、20μLの各試料を、glo-Lysis緩衝液中で10%に希釈した20μLのbright-glo試薬（Promega）と混合した。不透明な白色の384ウェルプレート上に96個のウェルを間隔を空けて配置した。室温で5分間インキュベートした後、発光を、500ミリ秒の読み取り時間でTecan機器を使用して測定した。ルシフェラーゼ活性を平均任意光単位（ALU）±標準偏差として表し、誘導倍率を、TPPま

10

20

30

40

50

たは類似体化合物処理した細胞から得られたルシフェラーゼ活性を、TPPまたは類似体化合物処理していない細胞から得られたルシフェラーゼ活性で割った商として計算した。

【0369】

結果：

TPPアプタマー相同配列 (AP008955.1/944373~944459、CP030117.1/954080~954166、CP023474.1/977011~977097) をRNAファミリーデータベースRF00059 (<http://rfam.xfam.org/family/RF00059>) から同定し、TPP処理に
10 応答して標的遺伝子発現を調節するための選択的スプライシングベースの合成アプタマー
リボスイッチ系で試験した。この合成リボスイッチ系は、WO2016/126747 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) に記載されているように、リボスイッチ
のアプタマー部分へのリガンド結合が3'イントロンの5'スプライス部位のアクセシビリ
ティを制御し、それ故に、選択的スプライシングを調節することによる標的遺伝子の発現
の調節を可能にする、イントロン-選択的エクソン-リボスイッチ-イントロンカセット
を含む (図1a)。推定TPPアプタマー配列を、隣接する5'末端のC及び3'末端のG
と一緒に、インフレーム終止コドンを含む選択的エクソンのイントロン下流に挿入し、リ
ボスイッチ12C6-1を生成した。この構成 (図1b) では、リガンド結合は、恐らく
、隣接するU1結合部位及びその相補的配列を含むアプタマー配列の5'末端と3'末端を
20 近づけ、5'スプライス部位のアクセシビリティを隔絶する9bpステム構造を安定化し
、導入遺伝子のエクソン間でスプライシングが生じ、その後に導入遺伝子発現が生じるこ
とを可能にする。HEK293細胞に12C6-1リボスイッチ (Luci-12C6-1) を含むルシフェラーゼ構築物をトランスフェクトし、ルシフェラーゼ発現の増加のため
にTPPで処理した。図1cに示すように、Luci-12C6-1構築物をトランス
フェクトした細胞は、TPP処理なしの細胞からのルシフェラーゼ発現と比較して、TP
P処理時に増加したルシフェラーゼ発現を発現した。ルシフェラーゼ発現は、TPPの濃
度の増加に伴って増加し、TPP処理に対する用量依存的応答を示した。これらの結果は
、推定TPPアプタマーが実際にTPP処理に応答し、哺乳類細胞における合成リボス
イッチカセット内での遺伝子発現を調節することを示す。

【0370】

我々は、以前、TPP応答性アプタマーがビタミンB1類似体にも応答することを見出
30 した (62/994, 135 PTC出願に記載のように)。同様に、我々は、12C6
-1リボスイッチもフルスルチアミンなどのB1類似体に応答し、用量依存的にルシフェ
ラーゼ遺伝子発現を誘導したことを見出した (図1d)。したがって、このTPPアプタ
マー相同配列を使用して、TPP及び合成ビタミンB1類似体の有無にかかわらず導入遺
伝子発現を調節することができる合成哺乳類アプタマーリボスイッチを構築した。

【0371】

実施例2：チアミンピロリン酸 (TPP) 応答性アプタマーを含む合成リボスイッチは
、化合物004に応答して遺伝子発現を調節する

実験手順：実施例1に記載したとおりである。

結果：

哺乳類細胞において潜在的に12C6-1リボスイッチに結合し、活性化する追加の合
成小分子を同定するために、我々は、断片ベースのアプタマーリガンド発見アプローチを
使用してWeeksらによって生成された新規のTPPアプタマー結合化合物である化合
物004 (KW-62、PCT出願番号または引用する出版物) を試験した。

【0372】

最初に、化合物004を生成する際にWeeksの研究で使用されたアプタマーである
E.coli thim TPPアプタマーを、遺伝子発現の誘導における化合物004
への応答についてTPPmリボスイッチ構築物 (62/994, 135に記載の配列番号
87) で試験した。この新規のTPPアプタマー結合剤が異なるTPPアプタマーに結合
することができるかを評価するために、Alishewanella tabrizi c

10

20

30

40

50

a t h i C 遺伝子由来の T P P アプタマー (M i c r o b i o l R e s . 2 0 1 7 J a n ; 1 9 5 : 7 1 - 8 0) を、T P P z リボスイッチ構築物 (6 2 / 9 9 4 , 1 3 5 に記載の配列番号 8 6) で試験した。図 2 に示すように、T P P m リボスイッチ及び T P P z リボスイッチの両方が、化合物 0 0 4 処理に応答して用量依存的にルシフェラーゼ発現を調節する。この観察は、化合物 0 0 4 が哺乳類細胞内の T P P アプタマーに結合することを示す。しかしながら、これらの 2 個のリボスイッチは、異なる化合物 0 0 4 誘導リボスイッチ活性を有し、T P P z リボスイッチ構築物が化合物 0 0 4 処理に応答してはるかにより高い遺伝子調節活性を示す。図 2 a に示すように、T P P z リボスイッチ構築物は、5 0 μ M の化合物 0 0 4 で処理したときに 2 6 倍のルシフェラーゼ発現の増加をもたらした一方で、T P P m 構築物は、同じ濃度の化合物 0 0 4 で 4 . 1 倍のルシフェラーゼ発現の増加しかもたらさなかった。これらの結果は、化合物 0 0 4 が T P P アプタマーリボスイッチを活性化することができることを実証する。更に、遺伝子発現を調節する際の T P P z のより高いダイナミックレンジは、化合物 0 0 4 が、T P P m リボスイッチ中の E . C o l i t h i M T P P アプタマーよりも高い親和性で T P P z リボスイッチ中の A l i s h e w a n e l l a t a b r i z i c a t h i C アプタマーに結合することを示唆する。

10

【0373】

次に、化合物 0 0 4 を哺乳類細胞における遺伝子発現の調節について 1 2 C 6 - 1 リボスイッチで試験した。H E K 2 9 3 細胞に 1 2 C 6 - 1 リボスイッチ構築物をトランスフェクトし、様々な濃度の化合物 0 0 4 で処理した。図 2 c 及び図 2 d に示すように、ルシフェラーゼ発現は化合物 0 0 4 処理時に増加し、ルシフェラーゼの誘導発現は用量依存的である。L u c i - 1 2 C 6 - 1 からの誘導遺伝子発現のダイナミックレンジは、T P P z リボスイッチ構築物のダイナミックレンジよりも更に高く、5 0 μ M の化合物 0 0 4 の存在下で 3 6 0 倍のルシフェラーゼ発現の増加をもたらした。これらの結果は、化合物 0 0 4 が、高いダイナミックレンジで哺乳類細胞における遺伝子発現を調節する際にこの新たに開発されたリボスイッチ 1 2 C 6 - 1 を活性化することができることを示す。

20

【0374】

実施例 3 : 化合物 0 0 4 に対する増強された反応性を有する再設計したアプタマー配列を含むリボスイッチの生成

実験手順 :

30

1 2 C 6 - 1 バリエーションアプタマー配列を含むリボスイッチ構築物のクローニング : 1 2 C 6 - 1 アプタマー配列を鋳型として使用し、核酸塩基を配列内のある特定の位置でランダム化した。ランダム変異誘発を組み込んだアプタマーを I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s , I n c . によって合成した。G o l d e n G a t e クローニング戦略 (N e w E n g l a n d B i o l a b s , N E B) を使用して、合成したアプタマー配列をイントロン-エクソン-イントロンカセットにクローニングし、L u c i - 1 2 C 6 - 1 リボスイッチ構築物中の 1 2 C 6 - 1 アプタマーを置き換えて、バリエーションアプタマー配列を含むリボスイッチ構築物を生成した。

【0375】

結果 :

40

化合物 0 0 4 及び関連化合物に応答したリボスイッチ活性を更に改善するために、アプタマー配列 1 2 C 6 - 1 を変異誘発に供してアプタマーバリエーションを生成し、バリエーションアプタマーを含むリボスイッチを、親リボスイッチ構築物 L u c i - 1 2 C 6 - 1 による誘導倍率と比較して改善された誘導遺伝子発現のダイナミックレンジ (誘導倍率) を有するものについて、化合物 0 0 4 に対してスクリーニングした。1 2 C 6 - 1 アプタマーの予測二次構造 (R N A f o l d , <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) の図 3 a に示すように、らせん形成に関与しているようには見えないループ領域または接合領域は、リガンド結合時に三次構造に関与している可能性がある。これらのループ領域または接合領域を単独で、または近接するステム領域と一緒にランダム変異誘発のために選択して、

50

改善された活性を有する再設計したアプタマー配列を有するリボスイッチを生成した。

【0376】

5個のアプタマーライブラリN1、N2、N3、N4、及びN5を、それぞれ、親12C6-1配列のJ2-4領域、J2-3/J3-3a/J3a-2/P3領域、L3a領域、J4-5/J5-4/P4領域、及びL5領域内の位置でヌクレオチドをランダム化することによって生成した（図3a及び図3bを参照されたい）。単一細菌コロニーを選択し、バリエントリボスイッチ構築物を含むプラスミドを、親リボスイッチ構築物Luci-12C6-1と比較して改善された、25µMの化合物004に応答した遺伝子調節活性について、HEK293細胞中でスクリーニングした。

【0377】

P2とP4を結合する接合領域（J2-4）内の核酸塩基をランダム化し、ライブラリN1内に4096個のバリエント配列を生成した。82個のバリエントアプタマーを同定し、化合物004に対してスクリーニングした（J2-4内のバリエント配列については表1を参照されたい）。同定したリボスイッチ構築物のおよそ93.9%がリボスイッチ活性の低下（250倍未満の誘導）を示し、これらの82個のリボスイッチ構築物の17.1%が、ルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導において、約300倍の平均誘導倍率を有する親12C6-1と比較して、最小（2~2.5倍の誘導）またはリボスイッチ活性なし（誘導なし）を示した。アプタマーN1__1F1__2及びN1__2H3を有する構築物は、300倍を超えるルシフェラーゼ遺伝子発現の増加をもたらし、親12C6-1と比較して増強されたリボスイッチ活性を示した（表1）。

【0378】

P2とP3とP3aを結合する領域であるJ2-3/J3-3a/J3a-2/P3内の6位の核酸塩基をランダム化し、ライブラリN2内に4096個のバリエント配列を生成した。192個のバリエントをリボスイッチ活性についてスクリーニングし、化合物004処理に応答してルシフェラーゼ発現を誘導するリボスイッチ活性を示すと特定された構築物は存在しなかった（J2-3/J3-3a/J3a-2/P3内の配列バリエントについては表5を参照されたい）。したがって、選択領域を変化させても増強された遺伝子調節活性を有するリボスイッチは生成されず、むしろ、化合物004に応答したリボスイッチ活性を無効にした。

【0379】

L3a領域内の6個の位置の核酸塩基をランダム化し、ライブラリN3内に4096個のバリエント配列を生成した。85個のバリエントリボスイッチを同定し、化合物004に対してスクリーニングし（L3a内のバリエント配列については表2を参照されたい）、そのうちの94%が、ルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導において、親12C6-1と比較して低下したリボスイッチ活性を示し、そのうちの37.4%が、最小（2~2.5倍の誘導）またはリボスイッチ活性なし（誘導なし）を示した。85個の構築物のうちの1個（N3__G6）がルシフェラーゼ遺伝子発現の858倍の誘導を示し、85個のうちの2個が400倍超の誘導を示し、親12C6-1よりも増強されたリボスイッチ活性を示した（表2を参照されたい）。

【0380】

P4/J4-5/J5-4領域内の5個の位置の核酸塩基をランダム化し、ライブラリN4内に1024個のバリエントアプタマー配列を生成した。部分的ライブラリスクリーニング時に、864個のリボスイッチを化合物004処理に対してスクリーニングし、スクリーニングしたリボスイッチ構築物のおよそ46.2%が、化合物004処理に応答して500倍超のルシフェラーゼ発現の増加を誘導した。183個の配列が検証された特有のバリエントのうち、1個のリボスイッチ（N4-1C11）が化合物004処理に応答したルシフェラーゼ遺伝子発現の2000倍超の増加を誘導し、19個のリボスイッチが1000倍超の増加を誘導した一方で、33個のリボスイッチ構築物が約300の平均誘導倍率を提供する親12C6-1と比較して低下したリボスイッチ活性を示した（P4/J4-5/J5-4内のバリエント配列については表3を参照されたい）。

【0381】

L5領域内の6個の位置の核酸塩基をランダム化し、ライブラリN5内に4096個のバリエーション配列を生成した。部分的N5ライブラリスクリーニング時に、1222個のリボスイッチを化合物004処理に対してスクリーニングし、スクリーニングしたリボスイッチ構築物のおよそ77.1%が、化合物004処理に反応して500倍超のルシフェラーゼ発現の増加を誘導した。同定した231個の特有のバリエーション配列のうち、5個のリボスイッチが化合物004処理に反応したルシフェラーゼ遺伝子発現の2000倍超の増加を誘導し、89個のリボスイッチが1000倍超の増加を誘導した一方で、10個のリボスイッチ構築物が親12C6-1と比較して低下したリボスイッチ活性を示した（L5内のバリエーション配列については表4を参照されたい）。

10

【0382】

再設計したアプタマー配列N4-1C11、N5-12E5、及びN5-12G6を含むリボスイッチ構築物を、それらの増強したリボスイッチ活性について更に検証した。図4aに示すように、3個全てのリボスイッチが、0.01μMの化合物004で処理したときにルシフェラーゼ活性を増加させ、0.1μMの化合物004処理に反応して、それぞれ、16倍、8倍、及び36倍のルシフェラーゼ発現の増加を誘導した。ルシフェラーゼの誘導発現は、用量依存的に増加した（図4b、図4c）。

【0383】

親リボスイッチ12C-1及びその誘導体は化合物004に類似する一連の化合物にも反応し、N5-12G6リボスイッチはより強い反応を示す（図4d）。化合物004の追加の類似体を、HEK293細胞におけるルシフェラーゼ発現の誘導について、12G6リボスイッチに対して試験した（以下の図4e及び表B）。これらの化合物の構造を表Aに提供し、合成を本明細書に記載する。

20

【0384】

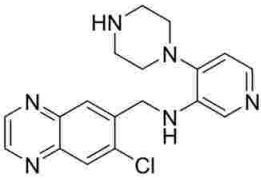
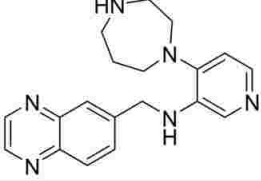
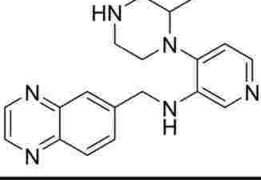
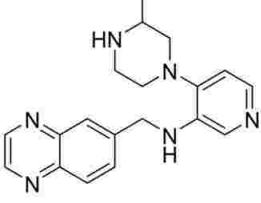
30

40

50

【表 2 - 1】

表B.

参照 番号	構造	誘導倍率		
		25μM(HEK)	3.3μ M(HE K)	2μM(HEK)
012		383.1		
013		314.1		
014		251.1		
015		329.4		
016		287.1		
017		130.3		

10

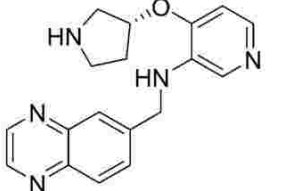
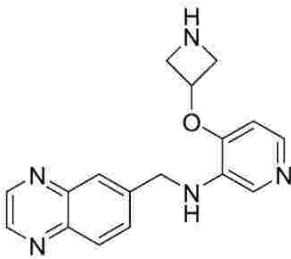
20

30

40

50

【表 2 - 2】

018		286.0		
019		452.6		60.2
020			52	31.2
021			62	68.4
022				43.2
023				67.4

10

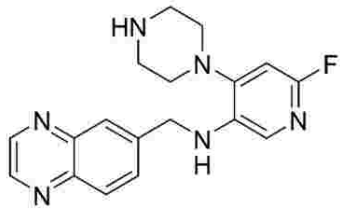
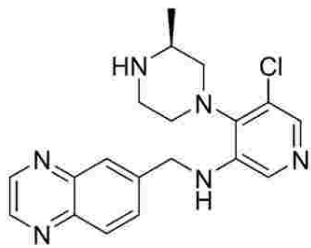
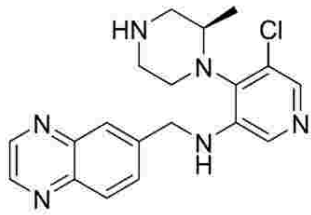
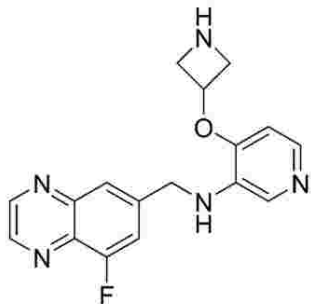
20

30

40

50

【表 2 - 3】

024				35.1
025				42.6
026				27.2
027				49.4
028				33.0

10

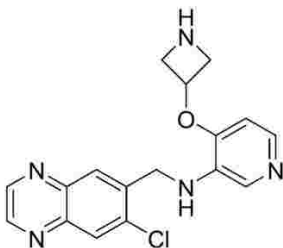
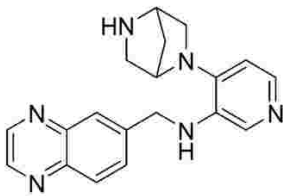
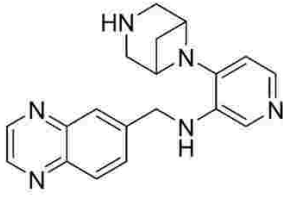
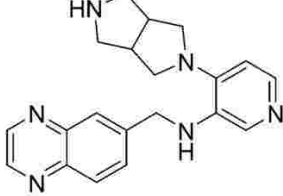
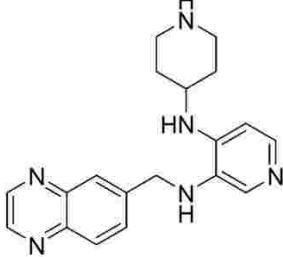
20

30

40

50

【表 2 - 4】

029				41.3
030		82.9		
031		17.9		
032		69.4		
033		7.8		
034		53.2		

10

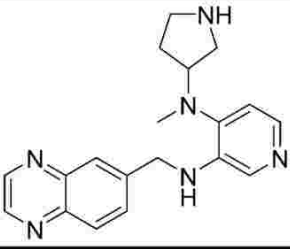
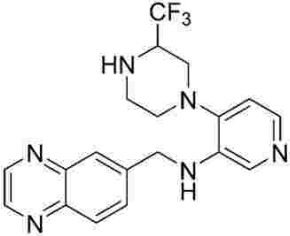
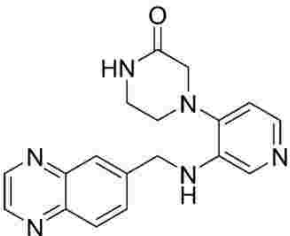
20

30

40

50

【表 2 - 5】

035		86.4		
036		8.2		
037		6.1		
038		2.9		
039		6		
040		69		

10

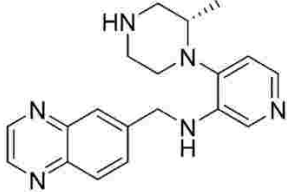
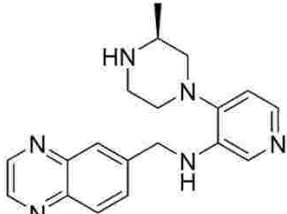
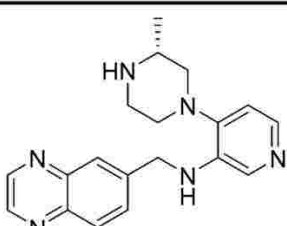
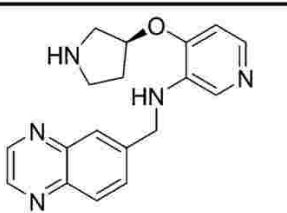
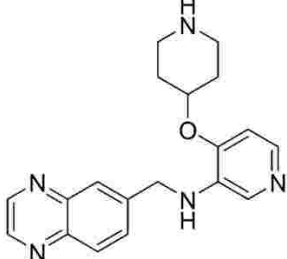
20

30

40

50

【表 2 - 6】

041			3.3uM で 5	
042			3.3uM で 29	
043			3.3uM で 31	
044			3.3uM で 22	
045				12.0
046				1.6

10

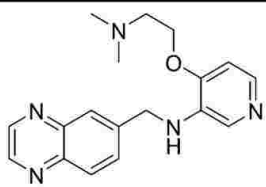
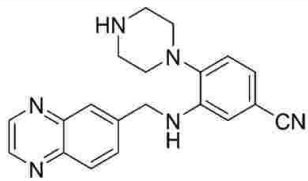
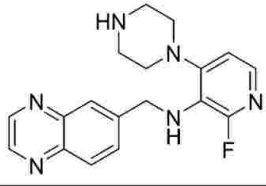
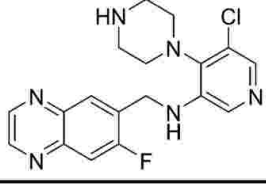
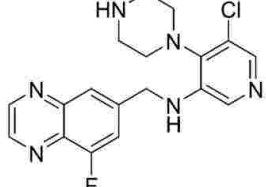
20

30

40

50

【表 2 - 7】

047				2.7
048				1.0
049				5.7
050				23.5
051				2.7
052				18.9
053				16.8

10

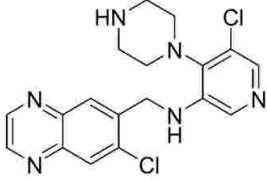
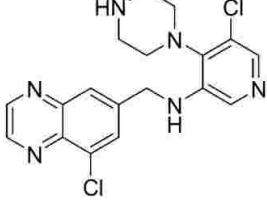
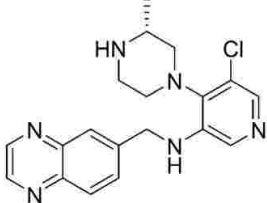
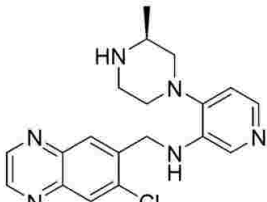
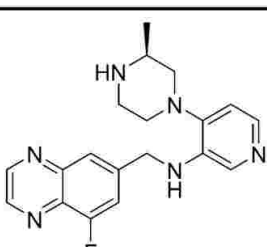
20

30

40

50

【表 2 - 8】

054				10.6
055				4.1
056				12.9
057				22.3
058				6.1
059				15.8

10

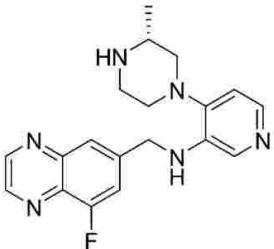
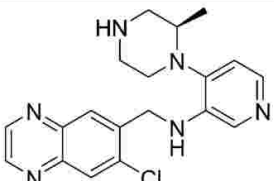
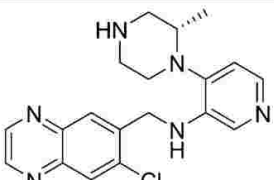
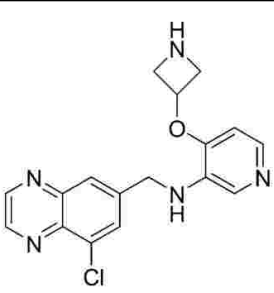
20

30

40

50

【表 2 - 9】

060				1.7
061				6.0
062				8.0
063				2.7
064				15.0
065				21.7

10

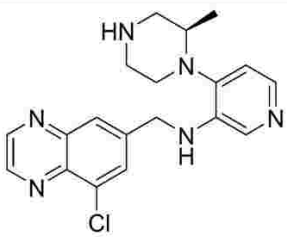
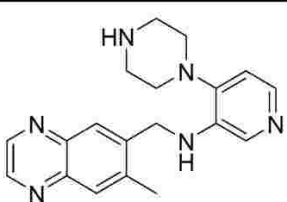
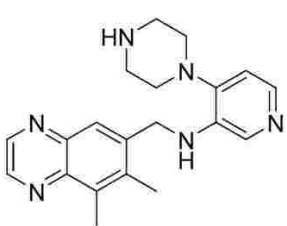
20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

066				2.0
067				3.4
068				4.4
069				28.3
070				2.9
071				6.1

10

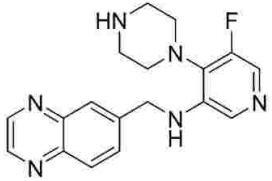
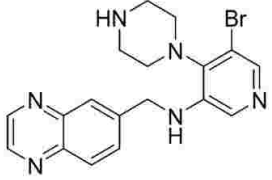
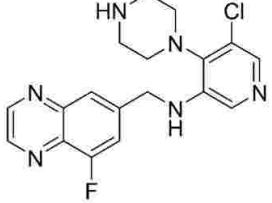
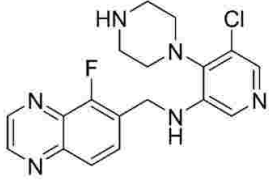
20

30

40

50

【表 2 - 1 1】

072				19.6
073				43.9
074				48.6
075				18.6
076				117.4
077				43.5
078				6.1

10

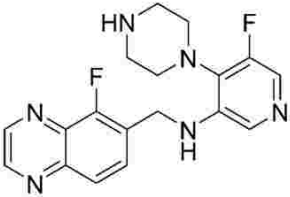
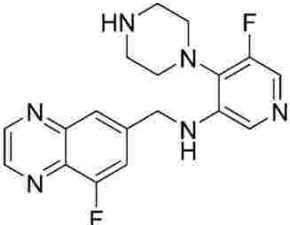
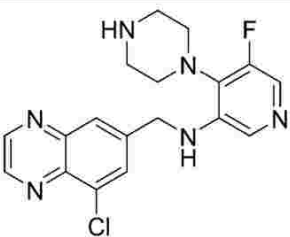
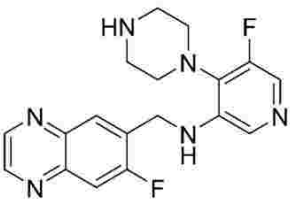
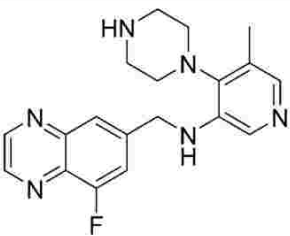
20

30

40

50

【表 2 - 1 2】

079				4.4
080				31.2
081				3.9
082				24.7
083				12.8
084				66.4

10

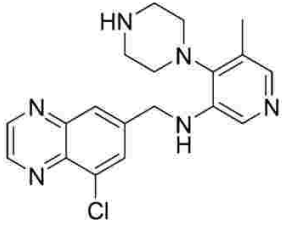
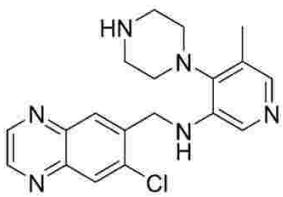
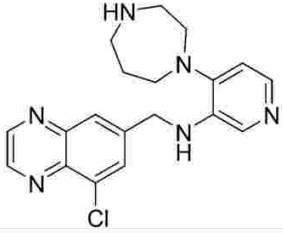
20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

085				5.4
086				17.3
087				20.9
088				2.6
089				4.8
090				15.0

10

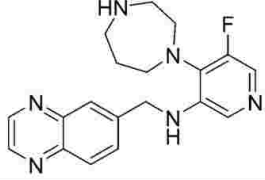
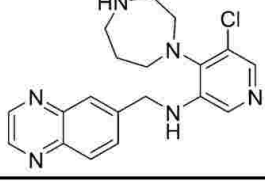
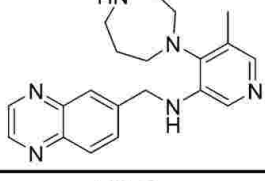
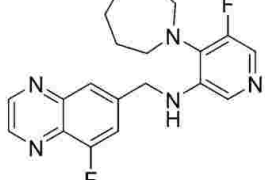
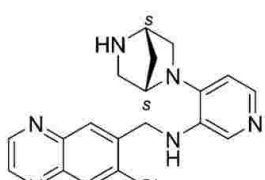
20

30

40

50

【表 2 - 1 4】

091				28.4
092				34.9
093				30.7
094				35.1
095				8.9
096				16.2
097				2.6

10

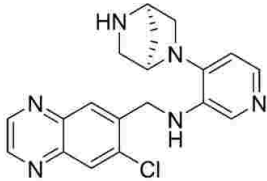
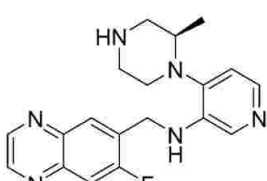
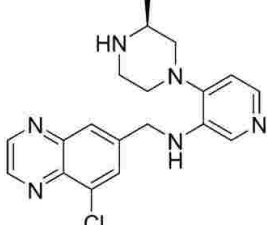
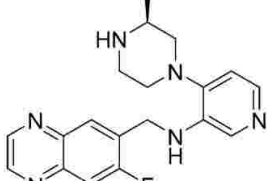
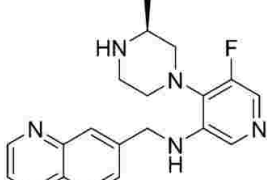
20

30

40

50

【表 2 - 1 5】

098				4.5
099				8.2
100				3.5
101				2.2
102				13.6
103				23.3

10

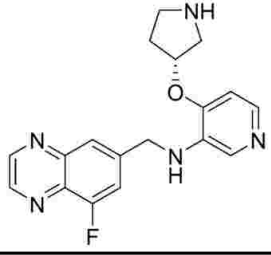
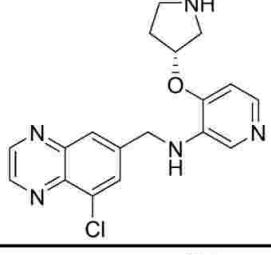
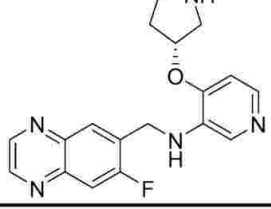
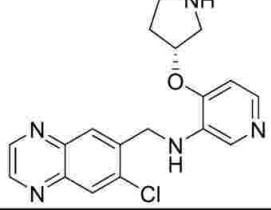
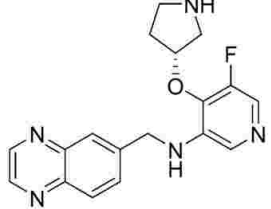
20

30

40

50

【表 2 - 1 6】

104				33.3
105				37.7
106				22.2
107				48.7
108				37.5
109				54.6

10

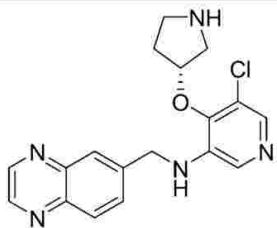
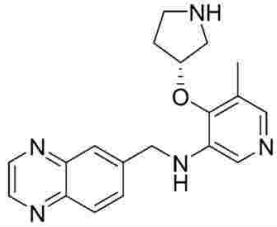
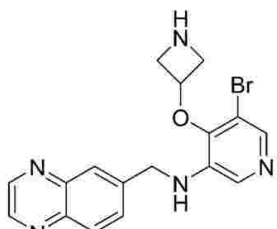
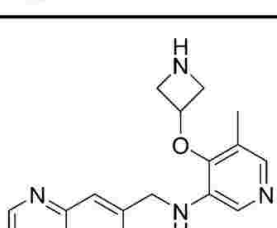
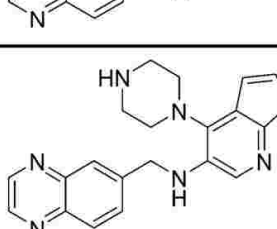
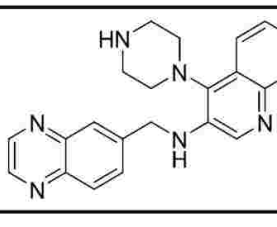
20

30

40

50

【表 2 - 1 7】

110				43.1
111				74.0
112				40.9
113				31.9
114				60.1
115				79.0

10

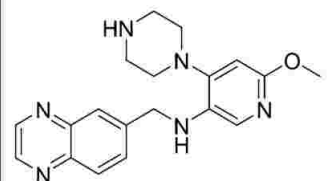
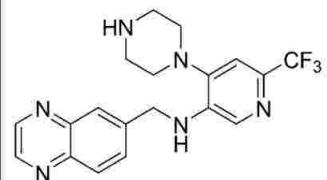
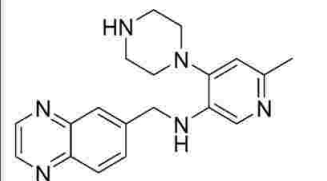
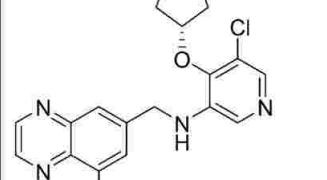
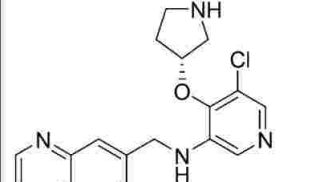
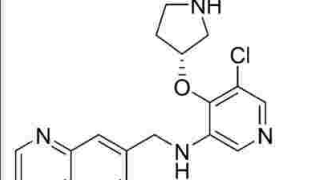
20

30

40

50

【表 2 - 1 8】

116				50.0
117				30.6
118				26.2
119				32.5
120				24.7
121				28.2

10

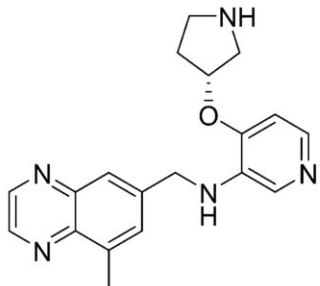
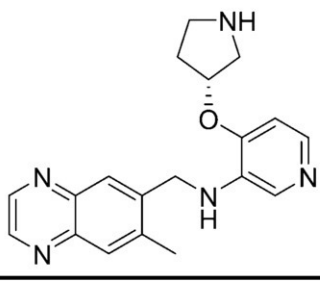
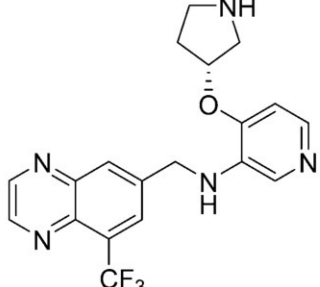
20

30

40

50

【表 2 - 1 9】

122				35.8
123				83.9
124				3.0

【0385】

これらの結果は、P4 / J4 - 5 / J5 - 4 領域または L5 領域に導入した配列変化により、化合物 004 に対するリボスイッチ活性が有意に改善されたことを示す。広範囲の変化がリボスイッチ活性を改善した（46.2%（N4 ライブラリ）及び 77.1%（N5 ライブラリ）が 500 倍超の誘導を示した）という観察は、これらの領域内の核酸塩基がリガンドと直接接触しておらず、むしろ、三次構造の形成に関与していることを示唆している。したがって、天然配列の選択した領域におけるランダム変異誘発により、我々は、合成化合物 004 及びその類似体化合物に高度に応答し、かつ哺乳類細胞において高いダイナミックレンジで遺伝子発現を調節する再設計したアプタマー配列を有するリボスイッチを開発した。

【0386】

実施例 4：合成リボスイッチは、哺乳類細胞において化合物 004 に応答して様々な標的遺伝子の発現を調節する

実験手順：

リボスイッチ構築物：アプタマー N5 - 12G6 または N4 - 1C11 を含む選択的スプライシングリボスイッチカセットを、マウスエリスロポエチン cDNA 配列内のヌクレオチド 307 位と 308 位との間に挿入し、構築物 mEpo - 12G6 及び mEpo - 1C11 を生成した。エリスロポエチン遺伝子の発現は、CASI プロモーターによって駆動された。アプタマー配列を含まないイントロン - エクソン - イントロンカセットを、mEpo 遺伝子の cDNA 内の同じ位置に挿入して、構築物 mEpo - Con1 を作製し、構成的標的遺伝子発現のための対照として機能した。N5 - 12G6 リボスイッチカセッ

トを、CMVプロモーター下で駆動されるヒト成長ホルモン（hGH）遺伝子のcDNAのヌクレオチド424位と425位との間に挿入した。

【0387】

マウスエリスロポエチン（mEpo）の酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）：AML-12細胞またはC2C12細胞に、実施例1に記載したようにTransIT-X2トランスフェクション試薬（Mirus Bio）をトランスフェクトした。トランスフェクトした4時間後、トランスフェクト細胞を、指示した用量で化合物004ありまたはなしで処理した。トランスフェクト細胞由来の上清を化合物処理の24時間後に収集し、製造業者の指示（R&D）に従って上清中のmEpoの検出のためにELISAに供した。

10

【0388】

ヒト成長ホルモン（hGH）のELISA：HEK293細胞に、実施例1に記載したようにTransIT-293トランスフェクション試薬（Mirus Bio）をトランスフェクトした。トランスフェクトした4時間後、トランスフェクト細胞を、指示した用量で化合物004ありまたはなしで処理した。トランスフェクト細胞由来の上清を化合物004処理の24時間後に収集し、製造業者の指示（R&D Systems）に従って上清中のhGHの検出のためにELISAに供した。

【0389】

結果：

実施例3で考察したように、再設計したアプタマー配列を含む単離されたリボスイッチは、様々な濃度の化合物004に応答して、レポータータンパク質ルシフェラーゼの発現を効率的に調節する。新たに単離されたアプタマーリボスイッチが他の標的遺伝子の発現を調節する能力を試験するために、再設計したアプタマー配列N5-12G6及びN4-1C11を含むリボスイッチカセットを、マウスエリスロポエチン（mEpo）のcDNA配列及びヒト成長ホルモン遺伝子（hGH）のcDNA配列に挿入し、これらの2個の遺伝子の調節可能な構築物を生成した。

20

【0390】

最初に、アプタマーN5-12G6及びN4-1C11を含むリボスイッチがmEpo発現を調節する能力を、マウス肝細胞株AML12で調べた。図5aに示すように、化合物004の不在下で、構築物mEpo-12G6または構築物mEpo-1C11をトランスフェクトした細胞は、非常に低レベルのmEpoを発現した。しかしながら、化合物004での処理時に、mEpoの発現は、AML12細胞において用量依存的に増強された。1.85 μ Mの化合物004の処理に応答して、mEpoの発現は、化合物004の不在下での発現と比較して、構築物mEpo-12G6を発現する細胞から約148倍誘導され、構築物mEpo-1C11を発現する細胞から71倍誘導された（図5bを参照されたい）。リボスイッチ調節可能なmEpo構築物もマウス筋芽細胞株C2C12細胞で試験した。AML12細胞における観察と一致して、mEpo発現は、化合物004の不在下で非常に低く、化合物004での処理時に用量依存的に誘導された（図5c）。

30

【0391】

導入遺伝子発現を調節する際のリボスイッチ活性を、HEK293細胞におけるヒト成長ホルモン（hGH）遺伝子で更に試験した。化合物004の不在下で、hGH-12G6構築物をトランスフェクトした細胞は、約0.83 ng/mlのhGHを発現した。対照的に、化合物004で処理したトランスフェクト細胞では、hGH発現レベルが有意に増加する。3.1 μ Mの化合物004処理では、細胞は202 ng/mlのhGHを発現し、化合物処理なしの細胞からのhGH発現のおよそ243倍であった（図5d）。この増強された発現は、化合物004の濃度の増加に伴って増加し、ヒト細胞におけるリボスイッチ調節遺伝子発現の用量依存性を示している。

40

【0392】

これらの結果は、再設計したアプタマー配列を含むリボスイッチが小分子に応答して遺伝子発現を誘導する能力が、特定の標的遺伝子配列または特定の細胞型に制限されないこ

50

とを実証し、標的遺伝子発現の調節におけるこれらのアプタマーリボスイッチの一般的適用可能性を示している。

【0393】

実施例5：合成リボスイッチは、マウスにおける遺伝子発現をインビボで調節する

設計したアプタマーが遺伝子発現をインビボで誘導及び調節する能力を評価するために、マウスに、設計したリボスイッチを保有するアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を形質導入し、これをレポータータンパク質ルシフェラーゼの遺伝子に挿入した。

【0394】

実験手順：

AAV2.8ウイルス粒子産生：マウスの形質導入に使用したAAV8粒子は、AAV2に由来するウイルスゲノム及びAAV8に由来するキャプシドを含んだ。それぞれ、（1）アプタマーを含まない調節不能なイントロンカセット（「Luci-Con1」）、（2）アプタマーN5-12G6を含むリボスイッチカセット（「Luci-12G6」）を有する、イントロン-エクソン-イントロンカセットを含むホタルルシフェラーゼ遺伝子を、AAV2プラスミドベクターにクローニングした。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、CMV及びユビキチンCエンハンサーエレメント、ならびにニワトリβ-アクチンプロモーターを含むCASIプロモーターによって駆動された。ウイルスベクターをAAV8キャプシドにパッケージングし、製造者のプロトコル（Vigene Biosciences）に従って産生した。

【0395】

動物試験：誘導性ルシフェラーゼ研究のために、雌Balb/cマウスに、受容性AAV8ウイルス粒子の 5×10^{10} 、 1.0×10^{11} 、または 2.5×10^{11} ゲノムコピー（GC）を後肢大腿四頭筋に単回尾静脈注射または単回筋肉内注射した。化合物004を0.5%メチルセルロース（MC）：0.25%Tween（登録商標）80/脱イオン（DI）水溶液中に配合し、経口投与した。AAVベクター送達の30日後、マウスを経口強制投与により10mg/kgの化合物004で経口処理した。ルシフェラーゼ活性を、投薬の前日、ならびに投薬の6時間、24時間、48時間後に測定した。化合物004の最初の経口投与後、マウスを以下のように2回の追加の投薬ラウンド及びイメージングサイクルに供した：37日目（AAV投与後）：30mg/kg、44日目：100mg/kg。

【0396】

調節マウスエリスロポエチン（mEpo）研究のために、各々の雌Balb/cマウスに、リボスイッチN5-12G6調節mEpo遺伝子を含むAAV8ベクター（AAV8.mEpo.12G6）の 1.0×10^{11} 、 5×10^{10} 、 1×10^{10} 、または 5×10^9 GCを大腿四頭筋に注射した。AAV注射の5週間後、マウスを経口強制投与により0.5%メチルセルロース（MC）：0.25%Tween（登録商標）80/脱イオン（DI）水溶液中に配合した化合物004で処理した。経口投薬の16時間後、マウスを下顎下血液採取に供した。10倍希釈血清を、ELISA（Invitrogen）を使用したマウス血清Epoの測定に使用した。

【0397】

慢性腎疾患関連動物：雄C57Bl/6マウスに、1マウスあたり 2.5×10^{10} vgまたは 1.0×10^{10} vgのAAV8.mEpo.12G6を筋肉内注射した。AAV注射の1週間後、マウスを経口強制投与により50mg/kgのアデニン（Sigma）で毎日処理し、5週間で合計28回処理した。ヘマトクリットを、アデニン処理後及び小分子誘導剤処理前に測定し、毎日の小分子誘導剤経口投薬後7～10日毎にモニタリングした。

【0398】

非侵襲的生動物生物発光イメージング：イメージング前に、マウスを2%イソフルランで麻酔し、150mg/kg体重のD-ルシフェリンルシフェラーゼ基質を注射した。投薬後の指示した時点で、IVIS（登録商標）SpectrumCT（Perkin E

10

20

30

40

50

lmer, MA) を使用して、ルシフェリン注射後 10 分以内に画像を撮影した。ルシフェラーゼ活性を平均光子/秒±標準偏差で表した ($n=5$)。ルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導倍率を、化合物 004 で処理したマウスから得られた光子/秒を、化合物処理の前日にマウスから得られた値で割った商として計算した。

【0399】

結果：

動物における遺伝子発現する調節の際のリボスイッチを試験するために、リボスイッチありまたはなしのルシフェラーゼ遺伝子を有する AAV8 ベクターをマウスに静脈内送達した。AAV 注射の 4 週間後、マウスを経口強制投与により化合物で処理した。単回用量の化合物 (10 mg/kg) 処理の 6 時間後、ルシフェラーゼ活性が、リボスイッチ 12G6 を含むルシフェラーゼ遺伝子を含む AAV ベクターを注射したマウスにおいて、化合物処理前のルシフェラーゼシグナルと比較して有意に増加した一方で、同じ用量の調節不能な対照ベクター Con1 を注射したマウス群において、ルシフェラーゼ発現は化合物投与後に有意に変化しなかった (図 6 a 及び図 6 b を参照されたい)。化合物誘導剤の単回投与では、誘導されたルシフェラーゼ活性は、投与後 6 時間時点で最も高く、24 時間時点で低下した。48 時間までに、ルシフェラーゼシグナルはベースラインレベル (投与前) に戻り、化合物誘導剤の存在下及び不在下での導入遺伝子発現のオン・オフ状態、ならびにリボスイッチ遺伝子調節系の可逆性を示している。同じマウスにおけるその後のより高い用量の投与によりルシフェラーゼシグナルの更なる上昇が誘導され、用量依存性を示している。同様の結果が、AAV8. Luc1. 12G6 ベクターを筋肉内注射したマウスで観察された (図 7 a 及び図 7 b)。

【0400】

AAV8. Luc1. 12G6 からのルシフェラーゼ発現が、化合物 004 の不在下で、より低いバックグラウンド発現レベルでより堅固な調節を示した一方で、AAV8. Luc1. 1B6 からのルシフェラーゼ発現は、化合物 004 の不在下で、より高いバックグラウンド発現レベルでより緩い調節を示したが、化合物 004 に応答してより高いピークルシフェラーゼ発現も示した (図 6 c 及び図 7 c)。

【0401】

動物における遺伝子発現を調節する際のリボスイッチの能力を、マウスエリスロポエチン遺伝子 (mEpo) を使用して更に評価した。マウスに、12G6 リボスイッチカセットを有する mEpo 遺伝子を含む AAV8 ベクターの $1 \times 10^{11}\text{ GC}$ を筋肉に注射した。 30 mg/kg の化合物 004 で処理したマウスにおいて、血清ベクター発現 mEpo が化合物投与なしのマウスと比較して上昇した。更に、血清ベクター発現 mEpo レベルは、より高い用量の化合物での処理及び AAV の投与量に伴って更に上昇し、化合物誘導剤の増加に伴う導入遺伝子発現の用量依存的増加を示している (図 8)。ヘマトクリットに対する Epo のリボスイッチ調節発現の影響を、慢性腎疾患 (CKD) 関連貧血のマウスモデルで評価した。経口投与により化合物 004 を 20 回投与した後、貧血マウスのヘマトクリットが増加し、 100 mg/kg 用量群で最大の増加が見られた。しかしながら、AAV8. mEpo. 12G6 を注射したが、化合物誘導剤で処理しなかった貧血マウスのヘマトクリットは増加せず、AAV8. mEpo. 12G6 を送達しなかった貧血マウスのヘマトクリットと同じままであった (図 9 a)。 300 mg/kg での 15 日間にわたるより高い化合物用量の 10 回投与で処理したマウスにおいて、ヘマトクリットは、より低い AAV 用量 ($1\text{ マウス当たり } 1 \times 10^{10}\text{ v g}$) を注射したマウス群において正常レベルに回復した。対照的に、比較的高い AAV 用量 (マウス当たり $2.5 \times 10^{10}\text{ v g}$) を注射したマウスのヘマトクリットは、正常ヘマトクリットレベルを超えた。これらの結果は、リボスイッチ誘導剤処理後に Epo が送達した AAV ベクターから誘導され、誘導された Epo が赤血球生成を刺激し、貧血動物におけるヘマトクリットの増加をもたらしたことを示す。

【0402】

これらの結果は、再設計したアプタマー配列を含むリボスイッチが、経口投与した小分

子誘導剤を介して肝臓及び筋肉においてインビボで用量依存的に標的遺伝子発現を調節することができることを実証する。これらの結果は、新たに開発したアプタマーリボスイッチが、エリスロポエチンなどの治療遺伝子の調節に機能することを更に実証する。

【0403】

実施例6．合成リボスイッチは、マウスにおける副甲状腺ホルモンをインビボで調節する。

実験手順：

リボスイッチ構築物：アプタマーN5-12G6を含む選択的スプライシングリボスイッチカセットを、ヒト副甲状腺ホルモン(hPTH)cDNA配列のヌクレオチド181位と182位との間に挿入し、構築物hPTH-12G6を生成した。エリスロポエチン遺伝子の発現は、CASIプロモーターによって駆動された。

10

【0404】

ヒトPTHの酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)：HEK293細胞に、実施例1に記載したようにTransIT-293トランスフェクション試薬(Mirus Bio)をトランスフェクトした。トランスフェクトした4時間後、トランスフェクト細胞を、指示した用量で化合物004ありまたはなしで処理した。トランスフェクト細胞由来の上清を化合物処理の48時間後に収集し、製造業者の指示(Abcam)に従って上清中のヒトPTHの検出のためにELISAに供した。

【0405】

AAV2．9ウイルス粒子産生：マウスの形質導入に使用したAAV9粒子は、AAV2に由来するウイルスゲノム(ITR)及びAAV9に由来するキャプシドを含んだ。hPTH-12G6を、CASIプロモーターを用いてAAVプラスミド骨格にクローニングし、AAVプラスミドをAAV9キャプシドにパッケージングし、ベクターAAV9．hPTH-12G6(Signagen)を生成した。

20

【0406】

動物試験：C57BL/6マウスに、1マウスあたり 2.5×10^{11} ウイルスゲノム(VG)のAAV9ウイルス粒子のAAV9．hPTH-12G6を両方の大腿四頭筋に筋肉内注射した。化合物004を0.5%メチルセルロース(MC)：0.25%Tween(登録商標)80/脱イオン(DI)水溶液中に配合し、経口投与した。AAVベクター送達の30日後、マウスを経口強制投与により0mg/kg、30mg/kg、100mg/kg、または300mg/kgの化合物004で3日間経口処理した。

30

【0407】

結果：

ルシフェラーゼ遺伝子またはEpo遺伝子と同様に、リボスイッチ12G6は、用量依存的にhPTH発現を調節した(図10a)。この調節されたhPTHをAAVベクターを介してマウスに送達した際に、化合物004処理がマウスにおけるhPTHの用量依存的産生を誘導し(図10b)、それ故に、血清カルシウム濃度の増加を誘導した(図10c)。これらの結果は、CKD貧血における調節されたEpo発現とともに、本明細書に開示されるアプタマーを含むリボスイッチが、本明細書に開示される小分子リガンド(誘導剤)に応答して、動物における治療遺伝子の発現を制御することができることを実証する。

40

【0408】

実施例7～24。

実験的

全ての溶媒及び試薬を商業的に入手し、受け取ったまま使用した。 ^1H NMRスペクトルを、前述の重水素化溶媒中のBruker機器(300MHzまたは400MHz)で記録した。化学シフトをppmで提供し、結合定数はヘルツ単位である。全ての最終化合物を、溶媒として CH_3CN /水を用いた220～400メッシュのシリカゲルまたは逆相HPLCを使用してフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。薄層クロマトグラフィーを、シリカゲル60 F-254(0.25nm厚)プレート上で行った。可視

50

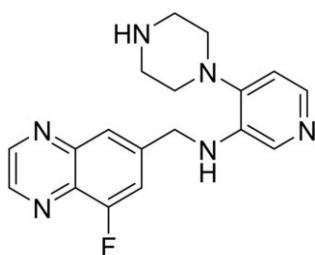
化を、UV光及び／または10%リンモリブデン酸／エタノール溶液で達成した。公称（低分解能）質量スペクトルを、Waters LCTまたはApplied Biosystems API 3000質量分析計のいずれかで取得した。高分解能質量スペクトル（HRMS）を、Waters LCTまたはAgilent TOF質量分析計のいずれかで取得した。全ての他のLC-MS実験を、Agilentシングル四重極質量分析計と一体になったAgilent 1100 HPLCで行った。化合物純度を、230nm及び254nmの波長でLC-MSにより決定した。ここで報告した全ての最終化合物は、95%以上の純度を有する。

【0409】

実施例7

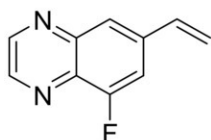
N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン(化合物012)

【化59】



ステップ1. 5-フルオロ-7-ビニルキノキサリン

【化60】

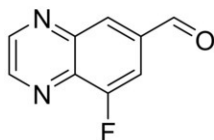


7-ブロモ-5-フルオロキノキサリン(814mg、3.59mmol、1.00当量)、カリウムトリフルオロ(ビニル)ボラヌイド(961mg、7.17mmol、2.00当量)、Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂(586mg、717μmol、0.20当量)、Cs₂CO₃(2.34g、7.17mmol、2.00当量)のジオキサン(8.00mL)及びH₂O(1.60mL)混合物を脱気し、N₂で3回パージし、その後、混合物をN₂雰囲気下で、100℃で1時間攪拌し、水(5.00mL)でクエンチし、EtOAc(5.00mL×2)で抽出した。反応有機層をブライン(5.00mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル=1：0～5：1、R_f=0.60)により精製して、白色の固体として表題化合物(0.536g、85.8%)を得た。MS (ES+) m/e 175.1 (M+H)⁺.

【0410】

ステップ2. 8-フルオロキノキサリン-6-カルバルデヒド

【化61】

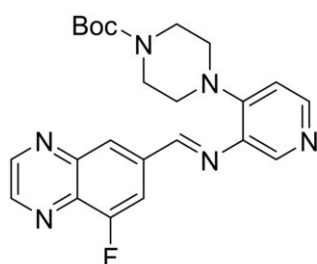


5-フルオロ-7-ビニルキノキサリン (536 mg、3.08 mmol、1.00 当量) の THF (10.7 mL) 及び H₂O (5.36 mL) 溶液に、OsO₄ (117 mg、462 μmol、24.0 μL、0.15 当量) 及び NaIO₄ (3.29 g、15.4 mmol、853 μL、5.00 当量) を添加した。混合物を 15℃ で 2 時間攪拌した。不溶沈殿物をセライトカラムに通して除去し、濾液を酢酸エチル (5.00 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (5.00 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、真空下で濃縮して、残渣を得た。残渣をカラムクロマトグラフィー (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル = 1 : 0 ~ 5 : 1) により精製して、黄色の固体として表題化合物 (516 mg、95.2%) を得た。MS (ES+) m/e 177.1 (M+H)⁺.

10

【0411】

ステップ 3. tert-ブチル (E)-4-(3-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチレン)アミノ)ピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート【化 6 2】



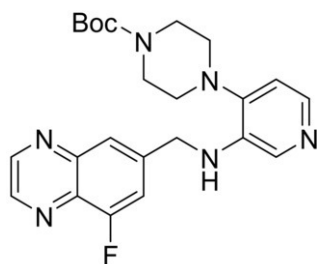
20

8-フルオロキノキサリン-6-カルバルデヒド (250 mg、1.42 mmol、1.00 当量) の EtOH (10 mL) 溶液に、tert-ブチル 4-(3-アミノピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート (435 mg、1.56 mmol、1.10 当量)、CH₃COOH (128 mg、2.13 mmol、122 μL、1.50 当量)、及び 4A MS (400 mg) を添加した。混合物を 80℃ で 3 時間攪拌し、減圧下で濃縮して AcOH 及び EtOH を除去して、黄色の油として表題化合物 (619 mg、粗物) を得た。MS (ES+) m/e 437.2 (M+H)⁺.

30

【0412】

ステップ 4. tert-ブチル 4-(3-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)アミノ)ピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート【化 6 3】



40

tert-ブチル (E)-4-(3-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチレン)アミノ)ピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート (619 mg、1.42 mmol、1.00 当量) の MeOH (10 mL) 溶液に、NaBH₄ (107 mg、2.84 mmol、2.00 当量) を添加した。混合物を 0℃ ~ 5℃ で 0.5 時間攪拌し、飽和 NH₄Cl (10.0 mL) でクエンチした。濾液を真空下で濃縮した。残渣を酢酸エチル (10.0 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (5 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、真空下で濃縮して、残渣を得た。残渣を分取 HP

50

LC (カラム: YMC Triart C18 250×50mm×7μm、移動相: [水 (FA) - ACN]、B%: 22%~52%、10分) により精製した。白色の固体として表題化合物 (400mg、64.3%) を得た。MS (ES+) m/e 439.2 (M+H)⁺.

【0413】

ステップ5. N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン

tert-ブチル 4-(3-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)アミノ)ピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート (200mg、456.1μmol、1.00当量) の MeOH (4.00mL) 溶液に、HCl/MeOH (4M、4.00mL) を 20℃ で滴加した。混合物を 3 時間攪拌し、その後、減圧下で濃縮して、暗色の固体として表題化合物 (174mg、96.6%) を得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 9.62 (br s, 2H), 8.99 (dd, J = 14.4, 1.8 Hz, 2H), 8.09 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.84 - 7.77 (m, 2H), 7.40 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.87 (br s, 1H), 4.74 (br d, J = 4.8 Hz, 2H), 3.50 (br s, 4H), 3.41 (br s, 4H). MS (ES+) m/e 339.1 (M+H)⁺.

10

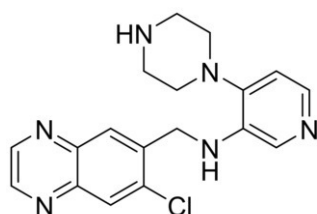
【0414】

実施例 8

20

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 013)

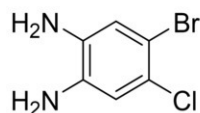
【化 64】



30

ステップ1. 4-ブロモ-5-クロロベンゼン-1,2-ジアミン

【化 65】



4-ブロモ-5-クロロ-2-ニトロアニリン (5.00g、20.0mmol、1.00当量) の EtOH (120mL) 溶液に、SnCl₂ (18.0g、79.5mmol、4.00当量) を添加した。混合物を 70℃ で 3 時間攪拌し、室温まで冷却し、氷水 (200mL) に注いだ。飽和 NaOH (200mL) を添加して混合物の pH を塩基性に調整し、その後、混合物を EtOAc (200mL×2) で抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、乾燥させ (Na₂SO₄)、濾過し、真空中で濃縮して、白色の固体として表題化合物 (4.11g、粗物) を得た。MS (ES+) m/e 222.9 (M+H)⁺.

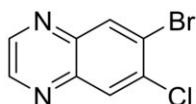
40

【0415】

ステップ2. 6-ブロモ-7-クロロキノキサリン

50

【化 6 6】



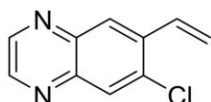
4-ブロモ-5-クロロシクロヘキサ-3,5-ジエン-1,2-ジアミン (4.11 g、18.6 mmol、1.00 当量) の EtOH (164 mL) 溶液に、オキサアルデヒド (5.38 g、37.1 mmol、40% 純度、2.00 当量) を添加した。混合物を 15℃ で 12 時間攪拌し、15℃ まで冷却し、濾過した。濾過ケーキを EtOH (10 mL × 2) で洗浄し、乾燥させて、黄色の固体として表題化合物 (2.70 g、粗物) を得た。MS (ES+) m/e 452.0 (M+H)⁺.

10

【0416】

ステップ 3. 6-クロロ-7-ビニルキノキサリン

【化 6 7】



6-ブロモ-7-クロロキノキサリン (1.00 g、4.11 mmol、1.00 当量)、カリウムトリフルオロ(ビニル)ボラヌイド (1.10 g、8.21 mmol、2.00 当量)、Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (671 mg、821 μmol、0.200 当量)、及び Cs₂CO₃ (2.68 g、8.21 mmol、2.00 当量) のジオキサン (10.0 mL) 及び H₂O (2.00 mL) 混合物を脱気し、N₂ で 3 回パージし、N₂ 雰囲気下で、100℃ で 1 時間攪拌し、水 (5.00 mL) でクエンチし、EtOAc (5.00 mL × 2) で抽出した。有機層をブライン (5.00 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮した。残渣を分取 TLC (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル = 5 : 1、R_f = 0.60) により精製して、黄色の油として表題化合物 (0.634 g、81.0%) を得た。MS (ES+) m/e 191.1 (M+H)⁺.

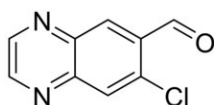
20

30

【0417】

ステップ 4. 7-クロロキノキサリン-6-カルバルデヒド

【化 6 8】



6-クロロ-7-ビニルキノキサリン (534 mg、2.80 mmol、1.00 当量) の THF (10.7 mL) 及び H₂O (5.34 mL) 溶液に、OsO₄ (107 mg、420 μmol、21.80 μL、0.15 当量) 及び NaIO₄ (3.00 g、14.0 mmol、776 μL、5.00 当量) を添加した。混合物を 15℃ で 0.5 時間攪拌した。不溶物をセライトカラムに通して除去し、濾液を酢酸エチル (5.00 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (5.00 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、真空中で濃縮して、残渣を得た。残渣を分取 TLC (SiO₂、石油エーテル：酢酸エチル = 1 : 1、R_f = 0.4) により精製して、白色の固体として表題化合物 (164 mg、30.4%) を得た。MS (ES+) m/e 193.2 (M+H)⁺.

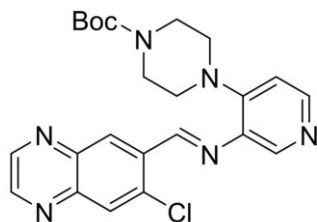
40

【0418】

ステップ 5. tert-ブチル(E)-4-(3-((7-クロロキノキサリン-6

50

－イル) メチレン) アミノ) ピリジン－４－イル) ピペラジン－１－カルボキシレート
【化６９】



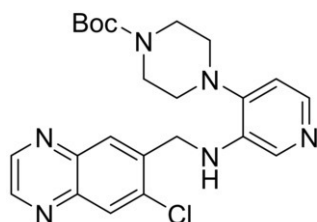
10

７－クロロキノキサリン－６－カルバルデヒド（２０８ｍｇ、１．０８ｍｍｏｌ、１．００当量）のＥｔＯＨ（８．３０ｍＬ）溶液に、ｔｅｒｔ－ブチル４－（３－アミノピリジン－４－イル）ピペラジン－１－カルボキシレート（３３１ｍｇ、１．１９ｍｍｏｌ、１．１０当量）、ＣＨ₃ＣＯＯＨ（９７．３ｍｇ、１．６２ｍｍｏｌ、９２．６μＬ、１．５０当量）、及び４ＡＭＳ（５９４ｍｇ）を添加した。混合物を８０℃で３時間攪拌し、減圧下で濃縮してＡｃＯＨ及びＥｔＯＨを除去して、黄色の油として表題化合物（４８９ｍｇ、粗物）を得た。ＭＳ（ＥＳ＋）*m/e* ４５３．３（Ｍ＋Ｈ）⁺。

【０４１９】

ステップ６．ｔｅｒｔ－ブチル４－（３－（（（７－クロロキノキサリン－６－イル）メチル）アミノ）ピリジン－４－イル）ピペラジン－１－カルボキシレート
【化７０】

20



ｔｅｒｔ－ブチル（Ｅ）－４－（３－（（（７－クロロキノキサリン－６－イル）メチレン）アミノ）ピリジン－４－イル）ピペラジン－１－カルボキシレート（４８９ｍｇ、１．０８ｍｍｏｌ、１．００当量）のＭｅＯＨ（８．０ｍＬ）溶液に、ＮａＢＨ₄（８１．７ｍｇ、２．１６ｍｍｏｌ、２．００当量）を添加した。混合物を０～５℃で０．５時間攪拌し、飽和ＮＨ₄Ｃｌ（１０．０ｍＬ）でクエンチし、濾過して、濾液を得た。濾液を真空下で濃縮した。残渣をＥｔＯＡｃ（１０ｍＬ×３）で抽出した。合わせた有機層をブライン（５ｍＬ）で洗浄し、Ｎａ₂ＳＯ₄で乾燥させ、濃縮して、残渣を得た。残渣を分取ＨＰＬＣ（Ｗａｔｅｒｓ×ｂｒｉｄｇｅ １５０×２５ｍｍ×１０μｍ、移動相：【水（ＮＨ₄ＨＣＯ₃）－ＡＣＮ】、Ｂ％：３５％～６５％、１１分）により精製して、黄色の固体として表題化合物（１７０ｍｇ、３４．６％）を得た。ＭＳ（ＥＳ＋）*m/e* ４５５．２（Ｍ＋Ｈ）⁺。

30

【０４２０】

ステップ７．Ｎ－（（（７－クロロキノキサリン－６－イル）メチル）－４－（ピペラジン－１－イル）ピリジン－３－アミン

ｔｅｒｔ－ブチル４－（３－（（（７－クロロキノキサリン－６－イル）メチル）アミノ）ピリジン－４－イル）ピペラジン－１－カルボキシレート（１７０ｍｇ、３７４μｍｏｌ、１．００当量）のジオキサン（２．００ｍＬ）溶液に、ＨＣｌ／ジオキサン（４Ｍ、１５７μＬ、１．６８当量）を添加した。混合物を１５℃で０．５時間攪拌し、濾過した。濾過ケーキを真空中で濃縮して、茶色の固体として表題化合物（６４．３ｍｇ、４０．９％）を得た。¹Ｈ ＮＭＲ（４００ ＭＨｚ， Ｄ₂Ｏ） δ ８．８６－８．７９（*m*， ２Ｈ）， ８．２０－８．１３（*m*， １Ｈ）， ８．０４－７．９６（*m*， １

40

50

H), 7.88 (br s, 1H), 7.69 (d, $J = 0.88$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 3.68 – 3.60 (m, 4H), 3.56 – 3.52 (m, 4H). MS (ES+) m/e 355.2 (M+H)⁺.

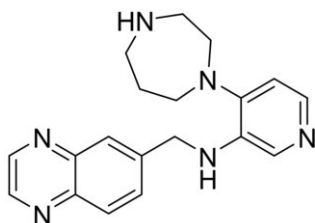
【0421】

実施例 9

4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物014)

【化71】

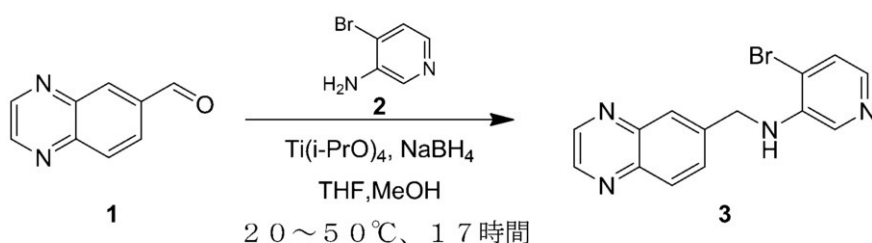
10



ステップ1. 4-ブロモ-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン

【化72】

20



キノキサリン-6-カルバルデヒド(5.00g、28.9mmol、1.00当量)及び4-ブロモピリジン-3-アミン(5.94g、37.6mmol、1.30当量)のTHF(100mL)溶液に、Ti(i-PrO)₄(16.4g、57.8mmol、17.1mL、2.00当量)を添加した。反応混合物を50℃で16時間攪拌し、20℃まで冷却した。MeOH(100mL)及びNaBH₄(4.37g、115.6mmol、4.00当量)を添加し、結果として得られた溶液を20℃で1時間攪拌し、氷水(400mL)を0℃で添加してクエンチし、EtOAc(200mL×3)で抽出した。合わせた有機層をブライン200mLで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、残渣を得た。粗生成物をEtOAc(50.0mL)で、20℃で30分間粉碎し、その後、濾過し、黄色の固体を回収した。黄色の固体として表題化合物(6.00g、65.8%)を得た。¹H NMR(400MHz, D₂O) δ 8.94 – 8.90 (m, 2H), 8.09 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 7.91 – 7.86 (m, 2H), 7.64 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.52 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H). MS (ES+) m/e 315.1 (M+H)⁺.

【0422】

ステップ2. 4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(M173)

4-ブロモ-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(200mg、634.6μmol、1.00当量)及びtert-ブチル1,4-ジアゼパン-1

30

40

50

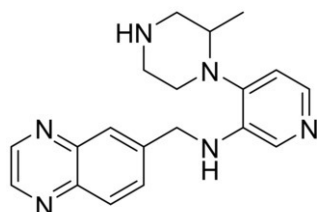
ーカルボキシレート（1.90mmol、3.00当量）のNMP（2.00mL）溶液に、DIPEA（328.1mg、2.54mmol、442.1 μ L、4.00当量）を添加した。混合物を180℃で8時間攪拌した。反応混合物を後処理なしで分取HPLC（HCl条件）により直接精製した。精製した生成物をMeOH（1.00mL）中で溶解させ、その後、HCl/MeOH（4.0M、1.00mL、35.7当量）を添加した。混合物を20℃で1時間攪拌し、分取HPLC（HCl条件）により精製して、茶色の固体として表題化合物（116.8mg、36.5%）を得た。¹H NMR（400 MHz, D₂O） δ 8.81（s, 2H）, 8.05 – 8.03（m, 1H）, 7.97（s, 1H）, 7.87 – 7.84（m, 2H）, 7.58（s, 1H）, 7.26 – 7.24（m, 1H）, 4.63（s, 2H）, 3.88 – 3.86（m, 2H）, 3.66 – 3.57（m, 4H）, 3.47 – 3.45（m, 2H）, 3.44 – 3.40（m, 2H）, 2.20 – 2.17（m, 2H）。MS（ES+）m/e 435.2（M+H）⁺。

10

実施例 10

4-（2-メチルピペラジン-1-イル）-N-（キノキサリン-6-イルメチル）ピリジン-3-アミン（化合物015）

【化73】



20

4-ブロモ-N-（キノキサリン-6-イルメチル）ピリジン-3-アミン（200mg、634 μ mol、1.00当量）及びtert-ブチル3-メチルピペラジン-1-カルボキシレート（1.90mmol、3.00当量）のNMP（2.00mL）溶液に、DIPEA（328mg、2.54mmol、442.1 μ L、4.00当量）を添加した。混合物を180℃で8時間攪拌した。反応混合物を後処理なしで直接精製して、茶色の固体として表題化合物（94.0mg、43.3%）を得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆） δ 8.84（s, 2H）, 8.13 – 8.11（m, 1H）, 8.07（s, 1H）, 8.01 – 7.99（m, 1H）, 7.89（s, 1H）, 7.80 – 7.78（m, 1H）, 6.87（d, J = 5.6 Hz, 1H）, 4.78 – 4.75（m, 1H）, 4.68 – 4.66（m, 2H）, 4.02 – 3.90（m, 1H）, 3.28 – 3.22（m, 3H）, 3.18 – 3.04（m, 1H）, 2.77 – 2.74（m, 1H）, 2.50 – 2.44（m, 1H）, 1.18（d, J = 6.4 Hz, 3H）。MS（ES+）m/e 335.3（M+H）⁺。

30

【0423】

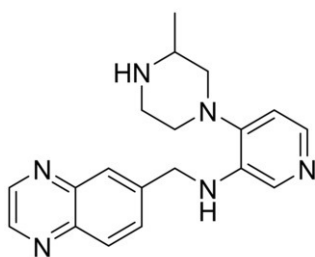
40

実施例 11

4-（3-メチルピペラジン-1-イル）-N-（キノキサリン-6-イルメチル）ピリジン-3-アミン（化合物016）

50

【化 7 4】



10

4-ブロモ-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (500 mg、1.59 mmol、1.00 当量) 及び tert-ブチル 2-メチルピペラジン-1-カルボキシレート (476 mg、2.38 mmol、1.50 当量) の NMP (2.00) 溶液に、DIPEA (328 mg、2.54 mmol、442 μ L、4.00 当量) を添加した。混合物を 180℃で8時間攪拌した。反応混合物を後処理なしで直接精製して、茶色の固体として表題化合物 (403.5 mg、39.6%) を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.85 – 8.83 (m, 2H), 8.08 – 7.99 (m, 1H), 7.97 – 7.95 (m, 2H), 7.89 – 7.86 (m, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.37 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.76 – 4.73 (m, 2H), 3.94 – 3.91 (m, 2H), 3.71 – 3.64 (m, 1H), 3.61 – 3.60 (m, 1H), 3.47 – 3.44 (m, 1H), 3.26 – 3.24 (m, 1H), 3.10 – 3.04 (m, 1H), 1.40 (d, J = 6.4 Hz, 3H). MS (ES+) m/e 335.2 (M+H)⁺.

20

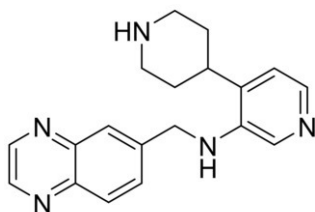
【0424】

実施例 12

4-(ピペリジン-4-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 017)

【化 7 5】

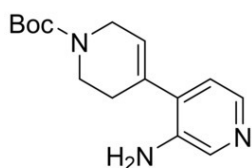
30



ステップ 1. tert-ブチル 3'-アミノ-3,6-ジヒドロ-[4,4'-ビピリジン]-1(2H)-カルボキシレート

【化 7 6】

40



4-ブロモピリジン-3-アミン (1.00 g、5.78 mmol、1.00 当量)、tert-ブチル 4-(4,4,5,5-テトラメチル-1,3,2-ジオキサボロラン-2-イル)-3,6-ジヒドロピリジン-1(2H)-カルボキシレート (1.97 g

50

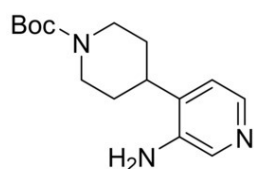
、6.36 mmol、1.10 当量)、Pd(OAc)₂ (129 mg、578 μmol、0.10 当量)、キサントホス (668 mg、1.16 mmol、0.20 当量)、及び K₃PO₄ (1.60 g、11.6 mmol、2.00 当量) のジオキサン (10.0 mL) 及び H₂O (2.00 mL) の混合物を 80 °C で 12 時間、その後、110 °C で 12 時間攪拌した。反応混合物を水 (50.0 mL) でクエンチし、EtOAc (50.0 mL × 2) で抽出した。合わせた有機層を Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (石油エーテル: EtOAc = 1:1 ~ 0:1 で溶出、R_f = 0.3) により精製して、黄色の油として表題化合物 (0.70 g、43.9 %) を得た。MS (ES+) m/e 276.2 (M+H)⁺。

【0425】

10

ステップ2. tert-ブチル 4- (3-アミノピリジン-4-イル) ピペリジン-1-カルボキシレート

【化77】



20

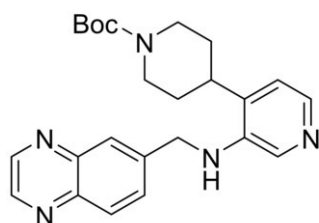
tert-ブチル 3'-アミノ-3,6-ジヒドロ-[4,4'-ビピリジン]-1 (2H)-カルボキシレート (0.70 g、2.54 mmol、1.00 当量) 及び Pd/C (0.10 g、2.54 mmol、10 % 純度、1.00 当量) の MeOH (10.0 mL) の混合物を H₂ (15 psi) 下で、25 °C で 2 時間攪拌した。混合物を濾過し、MeOH (10 mL) で洗浄した。濾液を濃縮して、黄色の油として表題化合物 (550 mg、78.0 %) を得た。MS (ES+) m/e 278.2 (M+H)⁺。

【0426】

ステップ3. tert-ブチル 4- (3- ((キノキサリン-6-イルメチル) アミノ) ピリジン-4-イル) ピペリジン-1-カルボキシレート

【化78】

30



tert-ブチル 4- (3-アミノピリジン-4-イル) ピペリジン-1-カルボキシレート (200 mg、718.5 μmol、1.00 当量)、キノキサリン-6-カルバルデヒド (113.6 mg、718.5 μmol、1.00 当量)、及び Ti(i-PrO)₄ (224 mg、790 μmol、233 μL、1.10 当量) の THF (5.00 mL) の混合物を 70 °C で 36 時間攪拌した。NaBH₃CN (90.3 mg、1.44 mmol、2.00 当量) を添加し、混合物を 25 °C で 0.5 時間攪拌し、飽和 NaHCO₃ (20.0 mL) に注いだ。結果として得られた溶液を EtOAc (10.0 mL × 2) で抽出した。有機層を水 (20.0 mL × 2) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濃縮した。残渣を逆相 HPLC (ギ酸条件) により精製して、黄色の固体として表題化合物 (62.0 mg、20.5 %) を得た。MS (ES+) m/e 421.2 (M+H)⁺。

40

【0427】

50

ステップ４．４－（ピペリジン－４－イル）－Ｎ－（キノキサリン－６－イルメチル）ピリジン－３－アミン

tert-ブチル 4-（3-（（キノキサリン－６－イルメチル）アミノ）ピリジン－４－イル）ピペリジン－１－カルボキシレート（４８．３ mg、１１５ μmol、１．００当量）の MeOH（１．００ mL）溶液に、HCl／MeOH（４．００ M、１．００ mL、３４．７当量）を添加した。混合物を ２０℃で １時間攪拌し、濃縮して、茶色の油として表題化合物（３５．０ mg、８２．０％）を得た。¹H NMR（４００ MHz，D₂O）δ ８．８５（s，２H），８．１０－８．０８（m，１H），７．９９（s，１H），７．９４－７．９２（m，１H），７．８９－７．８７（m，１H），７．７０－７．６６（m，２H），４．８２（m，２H），３．６５－３．６２（m，２H），３．３１－３．２２（m，３H），２．３３－２．３０（m，２H），１．９９－１．９５（m，２H）。MS（ES⁺）m/e ３２０．１（M+H）⁺。

10

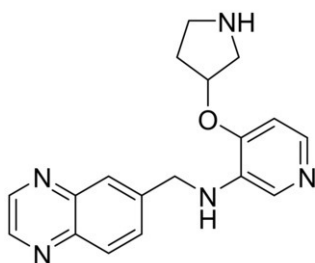
【０４２８】

実施例 １３

４－（ピロリジン－３－イルオキシ）－Ｎ－（キノキサリン－６－イルメチル）ピリジン－３－アミン（化合物 ０１８）

【化 ７ ９】

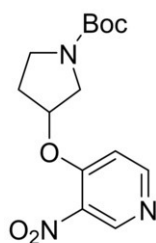
20



ステップ１．tert-ブチル 3-（（3-ニトロピリジン－４－イル）オキシ）ピロリジン－１－カルボキシレート

【化 ８ ０】

30



４-クロロ-３-ニトロピリジン（１．００ g、６．３１ mmol、１．００当量）及び tert-ブチル 3-ヒドロキシピロリジン－１－カルボキシレート（１．１８ g、６．３１ mmol、１．００当量）の THF（１０．０ mL）混合物に、t-BuOK（２．１２ g、１８．９ mmol、３．００当量）を ０℃で添加した。混合物を ２５℃で １２時間攪拌し、NH₄Cl（３０ mL）でクエンチし、EtOAc（３０．０ mL×２）で抽出した。合わせた有機層を水（３０．０ mL）で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮して、黄色の固体として表題化合物（１．５０ g、粗物）を得た。MS（ES⁺）m/e ３１０．１（M+H）⁺。

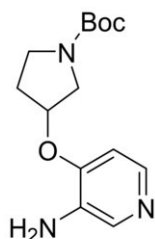
40

【０４２９】

ステップ２．tert-ブチル 3-（（3-アミノピリジン－４－イル）オキシ）ピロリジン－１－カルボキシレート

50

【化 8 1】



10

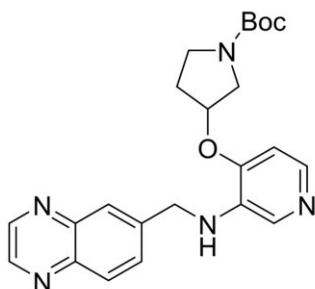
tert-ブチル 3-((3-アミノピリジン-4-イル)オキシ)ピロリジン-1-カルボキシレート (1.50 g、4.85 mmol、1.00 当量) 及び NH_4Cl (1.30 g、24.3 mmol、5.00 当量) の EtOH (25.0 mL) 及び H_2O (25.0 mL) 溶液に、 Fe (1.35 g、24.3 mmol、5.00 当量) を添加した。混合物を 45℃ で 1 時間攪拌し、濾過した。濾液を EtOAc (100 mL $\times$ 2) で抽出した。合わせた有機層を水 (100 mL) で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮して、茶色の固体として表題化合物 (900 mg、粗物) を得た。MS (ES+) m/e 280.2 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

【0430】

ステップ 3. tert-ブチル 3-((3-((キノキサリン-6-イルメチル)アミノ)ピリジン-4-イル)オキシ)ピロリジン-1-カルボキシレート

20

【化 8 2】



30

tert-ブチル 3-((3-アミノピリジン-4-イル)オキシ)ピロリジン-1-カルボキシレート (450 mg、1.61 mmol、1.00 当量)、キノキサリン-6-カルバルデヒド (254 mg、1.61 mmol、1.00 当量)、 AcOH (145 mg、2.42 mmol、138 μL 、1.50 当量)、及び 4 Å MS (1.00 g、1.61 mmol、1.00 当量) の EtOH (2.00 mL) の混合物を 80℃ で 12 時間攪拌した。 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1.50 g) を添加し、混合物を 25℃ で 12 時間攪拌し、 NaHCO_3 (40.0 mL) でクエンチし、DCM (30.0 mL $\times$ 2) で抽出した。合わせた有機層を Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、濃縮して、黄色の油として表題化合物 (500 mg、粗物) を得た。MS (ES+) m/e 422.2 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

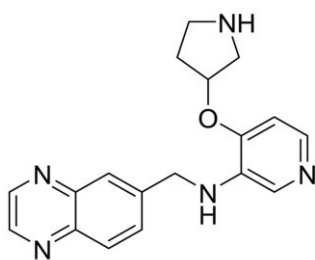
40

【0431】

ステップ 4. 4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン

50

【化 8 3】



10

tert-ブチル 3-((3-((キノキサリン-6-イルメチル)アミノ)ピリジン-4-イル)オキシ)ピロリジン-1-カルボキシレート (100 mg、237 μmol 、1.00 当量) のジオキサン (2.00 mL) 溶液に、HCl/ジオキサン (2.00 mL) を添加した。混合物を 20℃で1時間攪拌し、濃縮して、暗色の固体として表題化合物 (50.0 mg、64.2%) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.87 – 8.86 (m, 2H), 8.10 – 8.07 (m, 1H), 8.0 – 7.98 (m, 2H), 7.96 – 7.89 (m, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.37 – 7.35 (m, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.84 – 3.58 (m, 6H), 2.53 – 2.48 (m, 2H). MS (ES+) m/e 322.2 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

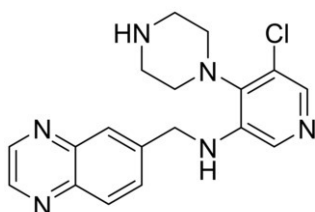
20

【0432】

実施例 14

5-クロロ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 019)

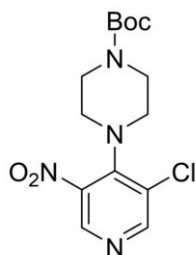
【化 8 4】



30

ステップ 1. tert-ブチル 4-(3-クロロ-5-ニトロピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート

【化 8 5】



40

3,4-ジクロロ-5-ニトロピリジン (1.00 g、5.18 mmol、1.00 当量)、tert-ブチルピペラジン-1-カルボキシレート (965 mg、5.18 mmol、1.00 当量) 及び DIEA (736 mg、5.70 mmol、992 μL 、1.10 当量) の i-PrOH (10.0 mL) の混合物を 25℃で12時間攪拌した。反応溶液を濃縮して、黄色の固体として表題化合物 (1.78 g、粗物) を得た。MS (E

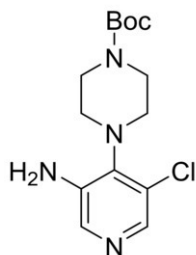
50

S+) m/e 343.1 (M+H)⁺.

【0433】

ステップ2. tert-ブチル4-(3-アミノ-5-クロロピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート

【化86】



10

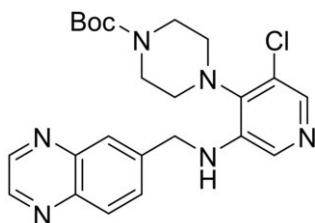
tert-ブチル4-(3-クロロ-5-ニトロピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート (1.78 g、5.19 mmol、1.00 当量) 及び NH₄Cl (4.17 g、77.9 mmol、15.0 当量) の EtOH (20.0 mL) 及び H₂O (15.0 mL) 溶液に、Fe (1.45 g、25.9 mmol、5.00 当量) を添加した。混合物を 25℃ で 4 にわたって攪拌し、濾過した。濾液を DCM (100 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層を水 (50.0 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮して、黄色の固体として表題化合物 (1.53 g、94.1%) を得た。MS (ES+) m/e 355.1 (M+H)⁺.

20

【0434】

ステップ3. tert-ブチル4-(3-クロロ-5-((キノキサリン-6-イルメチル)アミノ)ピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート

【化87】



30

tert-ブチル4-(3-アミノ-5-クロロピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート (200 mg、639 μmol、1.00 当量)、キノキサリン-6-カルバルデヒド (101 mg、639 μmol、1.00 当量)、AcOH (57.6 mg、959 μmol、54.8 μL、1.50 当量)、及び 4 Å MS (0.5 g) の EtOH (1.00 mL) の混合物を 80℃ で 12 時間攪拌した。NaBH₃CN (90.3 mg、1.44 mmol、2.00 当量) を添加し、混合物を 25℃ で 1 時間攪拌した。反応溶液を濃縮して、黄色の固体として表題化合物 (250 mg、粗物) を得た。

40

【0435】

ステップ4. 5-クロロ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン

tert-ブチル4-(3-クロロ-5-((キノキサリン-6-イルメチル)アミノ)ピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート (250 mg、549 μmol、1.00 当量) のジオキサン (5.00 mL) 溶液に、HCl/ジオキサン (4.00 M、1.00 mL、7.28 当量) を添加した。混合物を 25℃ で 12 時間攪拌した。生じた固体を濾過により回収し、ジオキサン (1.00 mL) で洗浄し、乾燥させて、茶色の固体として表題化合物 (180 mg、83.7%) を得た。¹H NMR (400

50

MHz, DMSO- d_6) δ 9.5 (br s, 2H), 8.95–8.90 (m, 2H), 8.11–8.06 (m, 2H), 7.93–7.90 (m, 1H), 7.87 (s, 2H), 7.25 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.43 (br s, 8H). MS (ES+) m/e 355.1 (M+H)⁺.
【0436】

以下の化合物を、適切な出発材料を用いて前述の化合物について記載した本質的に同じ手順を使用して合成した。

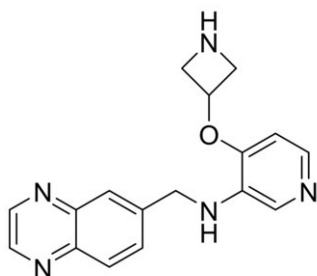
【0437】

実施例 15

4-(アゼチジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 022)

10

【化88】



20

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.90 (q, J = 2.0 Hz, 2H), 8.07 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.89 (dd, J_1 = 1.6 Hz, J_2 = 8.4 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.16 (br s, 1H), 5.14–5.06 (m, 1H), 4.66 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.41–4.17 (m, 1H), 3.82–3.41 (m, 6H). MS (ES+) m/e 308.2 (M+H)⁺.

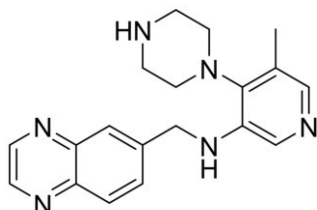
【0438】

30

実施例 16

5-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 023)

【化89】



40

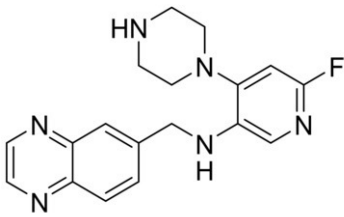
¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.84 (s, 2H), 8.12 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.82–7.76 (m, 2H), 7.74 (br s, 1H), 5.53 (br t, J = 5.80 Hz, 1H), 4.66 (d, J = 5.60 Hz, 2H), 3.45–3.23 (m, 2H), 3.22–2.78 (m, 7H), 2.35 (s, 3H). MS (ES+) m/e 335.1 (M+H)⁺.

【0439】

実施例 17

50

6-フルオロ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物024)
【化90】



10

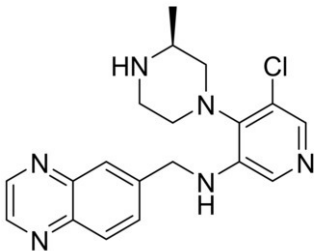
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.86 (s, 2H), 8.14 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.85–7.74 (m, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 4.63 (br d, $J = 5.50$ Hz, 2H), 4.48 (br t, $J = 4.90$ Hz, 1H), 3.11 (s, 8H). MS (ES+) m/e 339.1 (M+H) $^+$.

【0440】

実施例18

(S)-5-クロロ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物025)
【化91】

20



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.85 (s, 2H), 8.13 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.76 (dd, $J = 1.80, 8.80$ Hz, 1H), 5.70 (br s, 1H), 4.68 (d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.58–3.45 (m, 1H), 3.22–3.11 (m, 2H), 3.03–2.81 (m, 4H), 1.12 (br d, $J = 6.00$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369.0 (M+H) $^+$.

【0441】

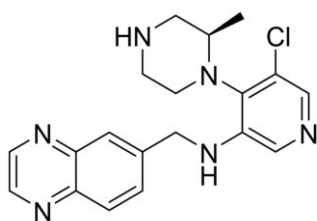
実施例19

(R)-5-クロロ-4-(2-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物026)

40

50

【化 9 2】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.85 (s, 2H), 8.12 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.74 (dd, $J = 1.60, 8.80$ Hz, 1H), 5.94 (br t, $J = 5.80$ Hz, 1H), 4.69 (br d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.87 – 3.76 (m, 1H), 3.51 (br t, $J = 10.60$ Hz, 1H), 3.23 – 3.06 (m, 2H), 2.95 (br t, $J = 11.00$ Hz, 1H), 2.85 – 2.70 (m, 1H), 2.57 (br t, $J = 10.40$ Hz, 1H), 0.88 (d, $J = 6.00$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369.0 ($M+H$) $^+$.

10

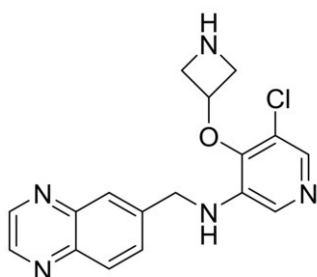
【0442】

実施例 20

20

4-(アゼチジン-3-イルオキシ)-5-クロロ-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 027)

【化 9 3】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.90 – 8.74 (m, 2H), 8.14 – 8.01 (m, 2H), 7.97 (br s, 1H), 7.85 (br d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 5.61 (br t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.79 – 4.77 (m, 2H), 4.69 – 4.57 (m, 4H). MS (ES+) m/e 342.1 ($M+H$) $^+$.

【0443】

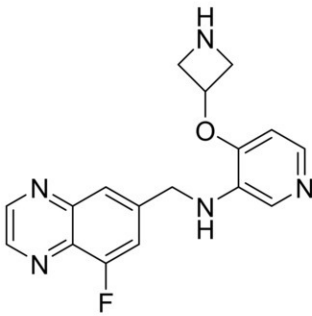
実施例 21

40

4-(アゼチジン-3-イルオキシ)-N-(8-フルオロキノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 028)

50

【化 9 4】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.48 – 9.10 (m, 2 H), 9.00 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 14.0$ Hz, 2 H), 8.12 (d, $J = 6.4$ Hz, 1 H), 7.93 (s, 2 H), 7.74 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, 1 H), 7.45 – 7.31 (m, 1 H), 7.22 (d, $J = 6.4$ Hz, 1 H), 5.45 (br s, 1 H), 4.76 (br d, $J = 6.0$ Hz, 2 H), 4.66 – 4.49 (m, 2 H), 4.29 (br d, $J = 8.8$ Hz, 2 H). MS (ES+) m/e 426.2 ($M+H$) $^+$.

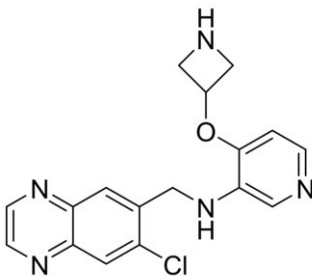
20

【0444】

実施例 22

4-((アゼチジン-3-イルオキシ)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン (化合物 029)

【化 9 5】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.57 (s, 2 H), 8.95 (d, $J = 10.0$ Hz, 2 H), 8.29 (s, 1 H), 8.19 (d, $J = 6.0$ Hz, 1 H), 7.99 (s, 1 H), 7.94 (s, 1 H), 7.33 – 7.32 (m, 2 H), 5.53 – 5.51 (m, 1 H), 4.77 (d, $J = 4.8$ Hz, 2 H), 4.62 – 4.58 (m, 2 H), 4.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H). MS (ES+) m/e 342.0 ($M+H$) $^+$.

40

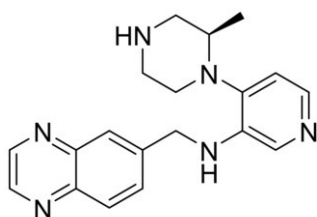
【0445】

実施例 23

(R)-4-((2-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 020)

50

【化 9 6】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.89 (s, 2H), 8.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.86 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H), 7.80 – 7.73 (m, 2H), 6.95 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.01 (br t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.83 – 4.59 (m, 2H), 3.20 (br s, 1H), 3.05 – 2.91 (m, 3H), 2.91 – 2.81 (m, 1H), 0.82 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 335.2 (M+H) $^+$.

10

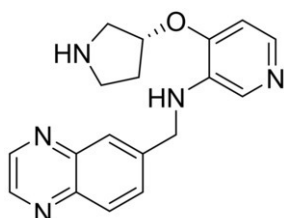
【0446】

実施例 24

(R)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 021)

20

【化 9 7】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.81 (s, 2H), 8.03 – 7.91 (m, 3H), 7.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.33 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.61 (br d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.85 – 3.77 (m, 1H), 3.75 – 3.66 (m, 1H), 3.59 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.52 – 2.43 (m, 2H). MS (ES+) m/e 322.3 (M+H) $^+$.

30

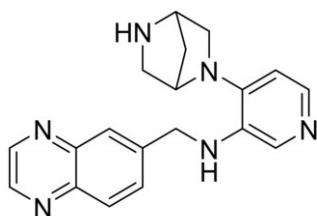
【0447】

実施例 25

4-(2,5-ジアザビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 030)

40

【化 9 8】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D $_2$ O) δ 8.85 (s, 2H), 8.10 – 8

50

. 08 (m, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.91 – 7.89 (m, 1H), 7.86 – 7.84 (m, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.01 – 7.00 (m, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.65 – 4.59 (m, 3H), 4.20 – 4.16 (m, 1H), 3.87 – 3.84 (m, 1H), 3.65 – 3.62 (m, 1H), 3.53 – 3.50 (m, 1H), 2.35 – 2.32 (m, 1H), 2.18 – 2.15 (m, 1H). MS (ES+) m/e 333 (M+H)⁺.

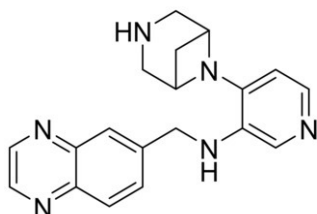
【0448】

実施例 26

4-((3,6-ジアザビシクロ[3.1.1]ヘプタン-6-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物031)

10

【化99】



20

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.79 (s, 2H), 8.00 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.86 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 8.8, 1.60 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 6.82 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.93 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.53 (s, 2H), 3.77 (d, J = 13.6 Hz, 2H), 3.60 (d, J = 13.2 Hz, 2H), 3.15 – 3.09 (m, 1H), 1.98 (d, J = 10.4 Hz, 1H). MS (ES+) m/e 333 (M+H)⁺.

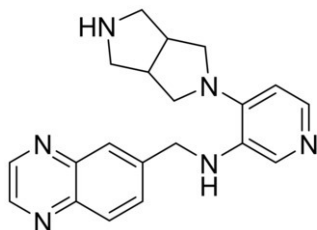
【0449】

実施例 27

4-((ヘキサヒドロピロロ[3,4-c]ピロール-2(1H)-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物032)

30

【化100】



40

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.85 (s, 2H), 8.10 – 8.08 (m, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.92 – 7.90 (m, 1H), 7.93 – 7.81 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.02 – 7.00 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 3.78 – 3.75 (m, 4H), 3.63 – 3.62 (m, 2H), 3.32 – 3.30 (m, 4H). MS (ES+) m/e 347 (M+H)⁺.

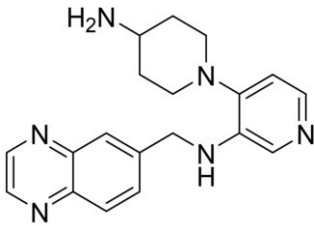
【0450】

実施例 28

4-((4-アミノピペリジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピ

50

リジン-3-アミン（化合物033）
【化101】

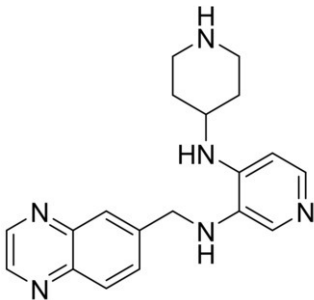


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.86 (s, 2H), 8.09 – 8.07 (m, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.91 – 7.87 (m, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.28 – 7.27 (m, 1H), 4.77 – 4.72 (m, 2H), 3.89 – 3.86 (m, 2H), 3.53 – 3.46 (m, 1H), 3.00 (t, $J = 12.0 \text{ Hz}$, 2H), 2.21 – 2.18 (m, 2H), 1.93 – 1.84 (m, 2H). MS (ES+) m/e 335 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

【0451】

実施例29

N^4 -(ピペリジン-4-イル)- N^3 -(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3,4-ジアミン（化合物034）
【化102】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.85 (s, 2H), 8.08 – 8.06 (m, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.90 – 7.87 (m, 1H), 7.79 – 7.77 (m, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.91 – 6.89 (m, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.04 – 3.98 (m, 1H), 3.56 – 3.52 (m, 2H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 2.34 – 2.30 (m, 2H), 1.88 – 1.85 (m, 2H). MS (ES+) m/e 335 ($\text{M} + \text{H}$)⁺.

【0452】

実施例30

N^4 -メチル- N^4 -(ピロリジン-3-イル)- N^3 -(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3,4-ジアミン（化合物035）

10

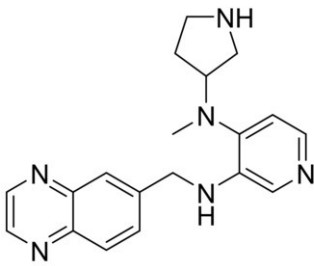
20

30

40

50

【化 1 0 3】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.83 (s, 2H), 8.06 – 8.04 (m, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.90 – 7.87 (m, 1H), 7.83 – 7.81 (m, 1H), 7.52 (s, 1H), 6.94 – 6.92 (m, 1H), 4.70 – 4.69 (m, 2H), 4.09 – 3.95 (m, 4H), 3.74 – 3.70 (m, 1H), 2.77 (s, 3H), 2.58 – 2.51 (m, 1H), 2.30 – 2.25 (m, 1H). MS (ES+) m/e 335 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

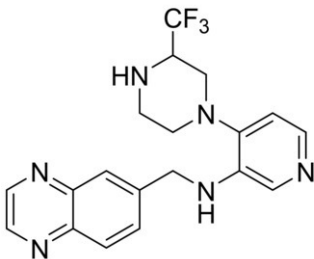
【0 4 5 3】

実施例 3 1

N-(キノキサリン-6-イルメチル)-4-(3-(トリフルオロメチル)ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 3 6)

20

【化 1 0 4】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.85 (s, 2H), 8.15 – 8.12 (m, 1H), 8.06 – 8.03 (m, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.81 – 7.78 (m, 1H), 6.93 – 6.91 (m, 1H), 4.76 – 4.72 (m, 1H), 4.68 – 4.67 (m, 2H), 3.51 – 3.48 (m, 1H), 3.41 – 3.37 (m, 1H), 3.29 – 3.27 (m, 2H), 3.05 – 2.99 (m, 1H), 2.97 – 2.94 (m, 1H), 2.86 – 2.84 (m, 1H). MS (ES+) m/e 389 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【0 4 5 4】

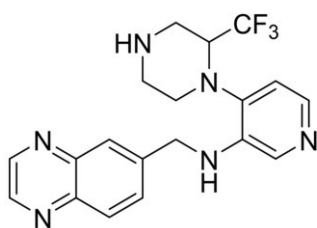
40

実施例 3 2

N-(キノキサリン-6-イルメチル)-4-(2-(トリフルオロメチル)ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 3 7)

50

【化 1 0 5】



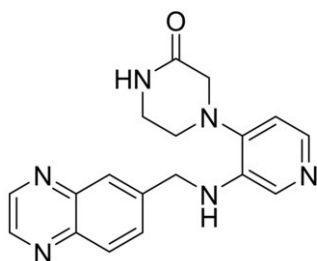
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.85 (s, 2H), 8.15 – 8.13 (m, 1H), 8.05 – 8.03 (m, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.80 – 7.78 (m, 1H), 6.94 – 6.92 (m, 1H), 4.74 – 4.73 (m, 1H), 4.68 – 4.67 (m, 2H), 3.51 – 3.48 (m, 1H), 3.41 – 3.37 (m, 1H), 3.29 – 3.27 (m, 2H), 3.05 – 2.95 (m, 2H), 2.88 – 2.85 (m, 1H), 1.98 – 1.96 (m, 1H). MS (ES+) m/e 389 (M+H)⁺. 10

【0 4 5 5】

実施例 3 3

4 – (3 – ((キノキサリン – 6 – イルメチル) アミノ) ピリジン – 4 – イル) ピペラジン – 2 – オン (化合物 0 3 8) 20

【化 1 0 6】



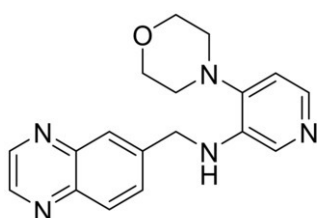
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.87 (s, 2H), 8.14 – 8.11 (m, 1H), 8.02 – 8.00 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.84 – 7.82 (m, 2H), 7.10 – 7.08 (m, 1H), 5.48 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 3.94 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.40 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H). MS (ES+) m/e 335 (M+H)⁺. 30

【0 4 5 6】

実施例 3 4

4 – モルホリノ – N – ((キノキサリン – 6 – イルメチル) ピリジン – 3 – アミン (化合物 0 3 9) 40

【化 1 0 7】



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.85 – 8.84 (m, 2H), 8.14 – 8.12 (m, 1H), 8.06 – 8.05 (m, 1H), 8.03 – 8.02 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.80 – 7.78 (m, 1H), 6.91 – 6.90 (m, 1H), 4.79 – 4.78 (m, 1H), 4.68 – 4.67 (m, 2H), 3.90 – 3.87 (m, 4H), 3.09 – 3.07 (m, 4H). MS (ES+) m/e 322 ($M+H$)⁺.

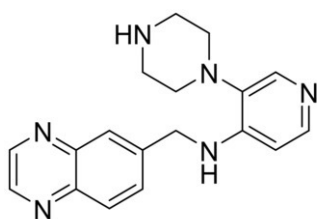
【0457】

実施例 35

3-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-4-アミン (化合物040)

10

【化108】



^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.86 (s, 2H), 8.09 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.88 – 7.83 (m, 2H), 6.82 – 6.80 (m, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.49 – 3.42 (m, 4H), 3.27 – 3.18 (m, 4H). MS (ES+) m/e 321 ($M+H$)⁺.

20

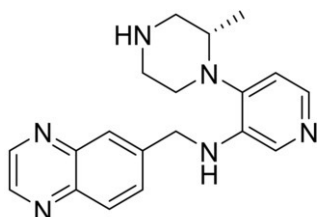
【0458】

実施例 36

(S)-4-(2-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物041)

【化109】

30



^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.90 (s, 2H), 8.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.90 – 7.85 (m, 1H), 7.79 – 7.74 (m, 1H), 6.96 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.00 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.78 – 4.61 (m, 2H), 3.24 – 3.16 (m, 1H), 3.06 – 2.82 (m, 4H), 2.58 – 2.52 (m, 2H), 2.50 – 2.46 (m, 2H), 0.83 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 335 ($M+H$)⁺.

40

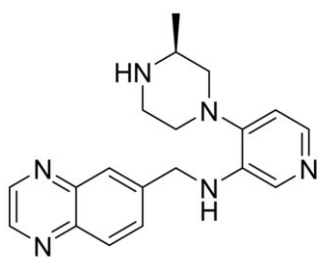
【0459】

実施例 37

(S)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物042)

50

【化 1 1 0】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.90 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.84 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.65 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.68 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.21 – 3.12 (m, 2H), 3.02 – 2.92 (m, 3H), 2.52 (br s, 1H), 2.21 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H), 1.01 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 335 (M+H) $^+$.

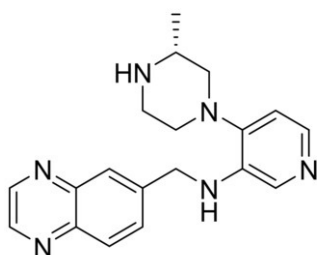
20

【0 4 6 0】

実施例 38

(R)-4-((3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 4 3)

【化 1 1 1】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.90 (s, 2H), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 6.83 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 5.65 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.68 (br d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.17 (br t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.03 – 2.92 (m, 3H), 2.57 – 2.52 (m, 1H), 2.22 (t, $J = 10.4$ Hz, 1H), 1.01 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 335 (M+H) $^+$.

40

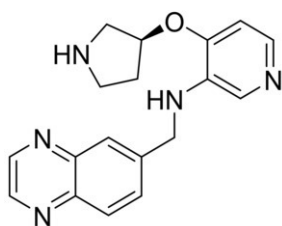
【0 4 6 1】

実施例 39

(S)-4-((ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 4 4)

50

【化 1 1 2】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.85 (s, 2H), 8.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.01 – 7.94 (m, 2H), 7.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.36 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.65 – 5.61 (m, 1H), 4.86 – 4.81 (m, 1H), 3.85 – 3.78 (m, 1H), 3.77 – 3.68 (m, 1H), 3.59 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.53 – 2.46 (m, 2H). MS (ES+) m/e 322 ($M+H$) $^+$.

10

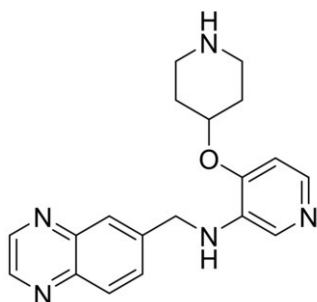
【0 4 6 2】

実施例 4 0

4- (ピペリジン-4-イルオキシ) -N- (キノキサリン-6-イルメチル) ピリジン-3-アミン (化合物 0 4 5)

20

【化 1 1 3】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.96 – 8.84 (m, 2H), 8.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.88 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.90 (br d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.07 – 5.82 (m, 1H), 4.66 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 3.76 – 3.65 (m, 1H), 3.34 – 3.26 (m, 1H), 3.02 (br s, 1H), 2.74 – 2.59 (m, 1H), 2.06 – 1.81 (m, 2H), 1.62 (br s, 2H). MS (ES+) m/e 336 ($M+H$) $^+$.

40

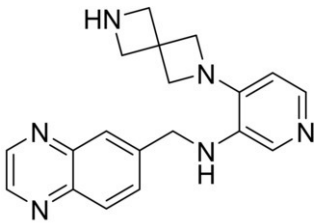
【0 4 6 3】

実施例 4 1

N- (キノキサリン-6-イルメチル) -4- (2, 6-ジアザスピロ [3.3] ヘプタン-2-イル) ピリジン-3-アミン (化合物 0 4 6)

50

【化 1 1 4】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.94 (s, 2H), 8.72 (br s, 2H), 8.15 – 8.05 (m, 2H), 7.94 – 7.87 (m, 2H), 7.49 (s, 1H), 6.59 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 6.00 (br t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.62 (s, 4H), 4.58 (br d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.21 (br s, 4H). MS (ES+) m/e 333 ($M+H$)⁺.

10

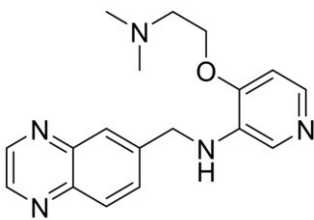
【0 4 6 4】

実施例 4 2

4 – (2 – (ジメチルアミノ) エトキシ) – N – (キノキサリン – 6 – イルメチル) ピリジン – 3 – アミン (化合物 0 4 7)

【化 1 1 5】

20



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.91 (s, 2H), 8.27 (br s, 1H), 8.14 – 8.08 (m, 2H), 8.02 – 7.95 (m, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.89 – 4.61 (m, 4H), 3.66 (br d, $J = 4.4$ Hz, 3H), 2.88 (d, $J = 4.8$ Hz, 6H). MS (ES+) m/e 324 ($M+H$)⁺.

30

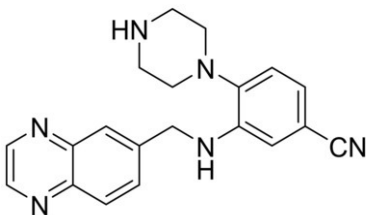
【0 4 6 5】

実施例 4 3

4 – (ピペラジン – 1 – イル) – 3 – ((キノキサリン – 6 – イルメチル) アミノ) ベンゾニトリル (化合物 0 4 8)

【化 1 1 6】

40



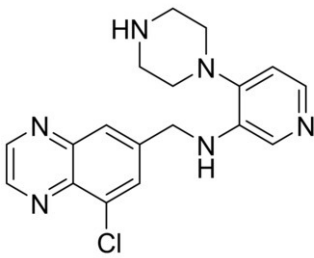
【0 4 6 6】

実施例 4 4

N – ((8 – クロロキノキサリン – 6 – イル) メチル) – 4 – (ピペラジン – 1 – イル

50

）ピリジン－３－アミン（化合物０４９）
【化１１７】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.03 (dd, $J = 2.00, 7.20$ Hz, 2H), 8.94 (br s, 2H), 8.12 (d, $J = 1.60$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 6.00$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.33 (d, $J = 6.00$ Hz, 1H), 6.67 – 6.48 (m, 1H), 4.73 (br d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.41 (br s, 8H). MS (ES+) m/e 355 ($M+H$) $^+$.

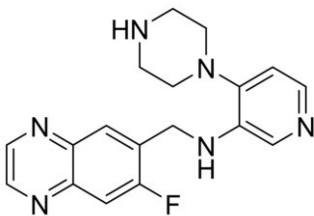
【０４６７】

実施例４５

N－（（７－フルオロキノキサリン－６－イル）メチル）－４－（ピペラジン－１－イル）ピリジン－３－アミン（化合物０５０）

【化１１８】

20



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.83 (d, $J = 1.60$ Hz, 1H), 8.80 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 7.60$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 10.40$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.84 (br d, $J = 6.00$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.11 – 2.95 (m, 9H). MS (ES+) m/e 339 ($M+H$) $^+$.

【０４６８】

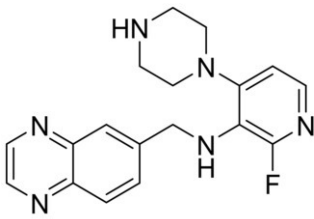
実施例４６

２－フルオロ－４－（ピペラジン－１－イル）－N－（キノキサリン－６－イルメチル）ピリジン－３－アミン（化合物０５１）

40

50

【化 1 1 9】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (s, 2H), 8.08 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.74 (dd, $J = 2.00, 8.80$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 0.80, 4.40$ Hz, 1H), 6.76 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H), 4.41 (br d, $J = 2.80$ Hz, 1H), 3.18–3.00 (m, 8H). MS (ES+) m/e 339 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

10

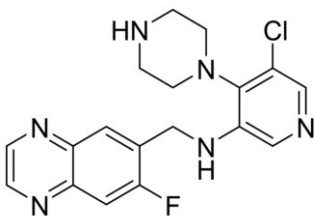
【0 4 6 9】

実施例 4 7

5-クロロ-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 5 2)

【化 1 2 0】

20



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.87–8.77 (m, 2H), 8.02 (d, $J = 7.60$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 10.40$ Hz, 1H), 5.77 (br t, $J = 6.00$ Hz, 1H), 4.73 (br d, $J = 6.40$ Hz, 2H), 3.76–2.70 (m, 9H). MS (ES+) m/e 373 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

30

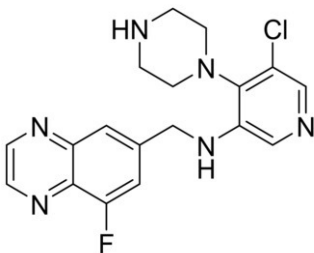
【0 4 7 0】

実施例 4 8

5-クロロ-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 5 3)

【化 1 2 1】

40



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.89 (d, $J = 3.60$ Hz, 2H), 7.91–7.83 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.46

50

(d, $J = 10.40$ Hz, 1H), 5.77 (br t, $J = 6.00$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.64 (br s, 2H), 3.15 (br s, 2H), 2.99 (br s, 2H), 2.90 (br s, 2H). MS (ES+) m/e 373 ($M+H$)⁺.

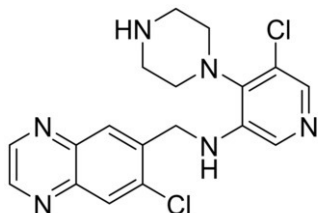
【0471】

実施例 49

5-クロロ-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物054)

【化122】

10



¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.85 (d, $J = 4.80$ Hz, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 4.82 (s, 2H), 3.69 (br s, 4H), 3.51 (br t, $J = 4.80$ Hz, 4H). MS (ES+) m/e 389 ($M+H$)⁺.

20

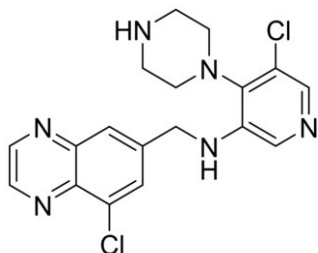
【0472】

実施例 50

5-クロロ-N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物055)

【化123】

30



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.96 (d, $J = 1.60$ Hz, 1H), 8.91 (d, $J = 1.20$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.89 (s, 2H), 7.77 (s, 1H), 5.78 (br t, $J = 5.80$ Hz, 1H), 4.67 (d, $J = 6.40$ Hz, 2H), 3.68 - 3.52 (m, 2H), 3.21 - 2.75 (m, 7H). MS (ES+) m/e 389 ($M+H$)⁺.

40

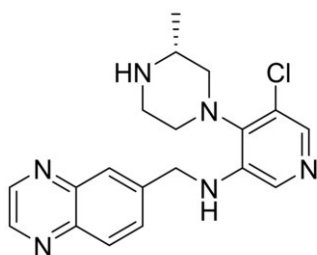
【0473】

実施例 51

(R)-5-クロロ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物056)

50

【化 1 2 4】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.95–8.80 (m, 2H), 8.13 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.87 (br s, 1H), 7.83–7.70 (m, 2H), 5.70 (br s, 1H), 4.67 (br d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.54 (br t, $J = 10.80$ Hz, 1H), 3.36–2.75 (m, 7H), 1.13 (br d, $J = 5.60$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$) $^+$.

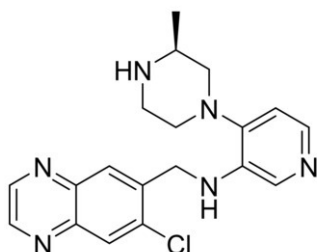
【0 4 7 4】

実施例 5 2

(S)-N-((7-chloroquinolin-6-yl)methyl)-4-(3-methylpiperidin-1-yl)pyridin-3-amine (化合物 0 5 7)

20

【化 1 2 5】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 8.82 (d, $J = 1.60$ Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 4.80$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.94–4.85 (m, 1H), 4.73 (d, $J = 5.60$ Hz, 2H), 3.32–3.19 (m, 3H), 3.18–3.05 (m, 2H), 2.90–2.77 (m, 1H), 2.58–2.45 (m, 1H), 1.22 (d, $J = 6.40$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$) $^+$.

【0 4 7 5】

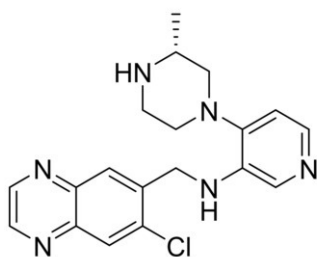
実施例 5 3

(R)-N-((7-chloroquinolin-6-yl)methyl)-4-(3-methylpiperidin-1-yl)pyridin-3-amine (化合物 0 5 8)

40

50

【化 1 2 6】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.83 (dd, $J = 1.60$, 9.60 Hz, 2H), 8.22 (s, 1H), 8.10 – 8.06 (m, 1H), 8.01 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.94 – 4.86 (m, 1H), 4.73 (d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.32 – 3.19 (m, 3H), 3.18 – 3.07 (m, 2H), 2.89 – 2.79 (m, 1H), 2.52 (br t, $J = 10.8$ Hz, 1H), 1.22 (d, $J = 6.40$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$) $^+$.

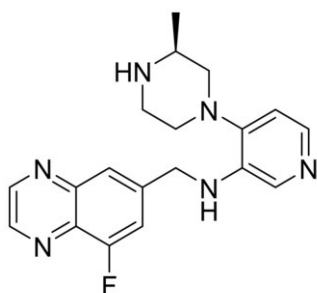
【0 4 7 6】

実施例 5 4

20

(S)-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 5 9)

【化 1 2 7】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.90 (dd, $J = 2.00$, 6.00 Hz, 1H), 8.95 – 8.76 (m, 1H), 8.02 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 7.94 – 7.84 (m, 2H), 7.52 (dd, $J = 1.20$, 10.40 Hz, 1H), 6.92 – 6.85 (m, 1H), 4.85 – 4.78 (m, 1H), 4.66 (d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.24 (br d, $J = 12.00$ Hz, 3H), 3.15 – 3.05 (m, 2H), 2.87 – 2.70 (m, 1H), 2.49 (br t, $J = 10.40$ Hz, 1H), 1.20 (d, $J = 6.40$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 353 ($M+H$) $^+$.

40

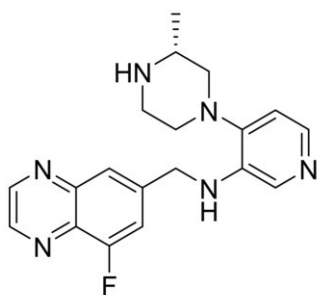
【0 4 7 7】

実施例 5 5

(R)-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 6 0)

50

【化 1 2 8】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.95 – 8.85 (m, 2H), 8.03 (d, $J = 4.80$ Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.51 (dd, $J = 1.20, 10.40$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.84 – 4.75 (m, 1H), 4.66 (d, $J = 6.00$ Hz, 2H), 3.34 – 3.24 (m, 3H), 3.22 – 3.09 (m, 2H), 2.94 – 2.85 (m, 1H), 2.60 (br t, $J = 10.80$ Hz, 1H), 1.28 (d, $J = 6.40$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 353 ($M+H$) $^+$.

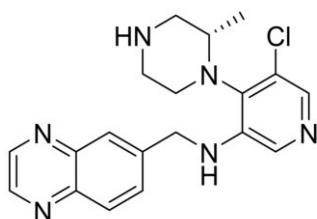
20

【0 4 7 8】

実施例 5 6

(S) – 5 – クロロ – 4 – (2 – メチルピペラジン – 1 – イル) – N – (キノキサリン – 6 – イルメチル) ピリジン – 3 – アミン (化合物 0 6 1)

【化 1 2 9】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.84 (s, 2H), 8.12 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.74 (dd, $J = 2.00, 8.80$ Hz, 1H), 5.95 (br t, $J = 6.00$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 6.40$ Hz, 2H), 3.83 – 3.79 (m, 1H), 3.49 (dt, $J = 2.80, 11.60$ Hz, 1H), 3.12 (br t, $J = 10.40$ Hz, 2H), 2.94 (br d, $J = 2.80$ Hz, 1H), 2.78 (br d, $J = 12.00$ Hz, 1H), 2.56 (br t, $J = 11.20$ Hz, 1H), 0.87 (d, $J = 6.40$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$) $^+$.

40

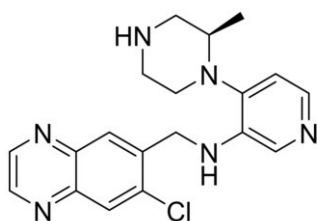
【0 4 7 9】

実施例 5 7

(R) – N – ((7 – クロロキノキサリン – 6 – イル)メチル) – 4 – (2 – メチルピペラジン – 1 – イル) ピリジン – 3 – アミン (化合物 0 6 2)

50

【化 1 3 0】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.83 (dd, $J = 2.00$, 9.50 Hz, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.07 – 8.00 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 7.04 – 6.99 (m, 1H), 5.43 – 5.34 (m, 1H), 4.80 – 4.67 (m, 2H), 3.52 – 3.44 (m, 1H), 3.35 (br s, 2H), 3.18 (s, 2H), 3.01 – 2.94 (m, 1H), 2.89 – 2.83 (m, 1H), 1.00 (d, $J = 6.00$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$)⁺.

10

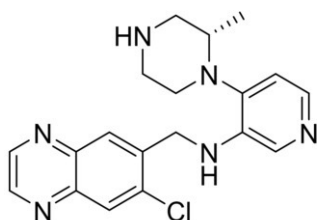
【0 4 8 0】

実施例 5 8

(S)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(2-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 6 3)

20

【化 1 3 1】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.88 – 8.77 (m, 2H), 8.20 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 6.98 (d, $J = 5.20$ Hz, 1H), 5.46 (br t, $J = 6.40$ Hz, 1H), 4.73 (t, $J = 6.40$ Hz, 2H), 3.30 – 3.22 (m, 1H), 3.19 (br dd, $J = 2.40$, 12.40 Hz, 1H), 3.16 – 3.08 (m, 2H), 3.07 – 3.00 (m, 1H), 2.72 (br dd, $J = 9.20$, 11.20 Hz, 2H), 0.94 (d, $J = 6.00$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$)⁺.

30

【0 4 8 1】

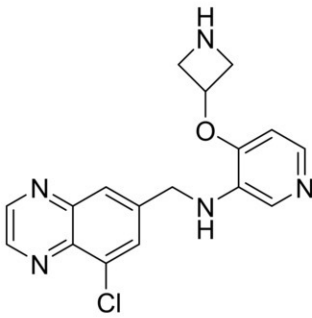
実施例 5 9

4-(アゼチジン-3-イルオキシ)-N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 6 4)

40

50

【化 1 3 2】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.00 (s, 2H), 8.09 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.73 – 7.65 (m, 2H), 6.59 – 6.53 (m, 1H), 6.16 (br s, 1H), 5.09 (br d, $J = 6.00$ Hz, 1H), 4.65 (br d, $J = 6.40$ Hz, 2H), 3.84 (br s, 2H), 3.67 – 3.58 (m, 2H). MS (ES+) m/e 342 ($M+H$)⁺.

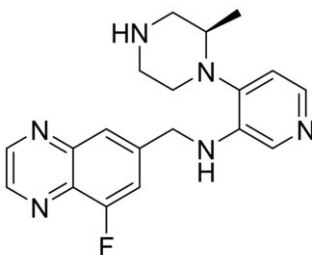
【0 4 8 2】

実施例 6 0

(R)-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(2-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 6 5)

20

【化 1 3 3】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.89 (d, $J = 5.60$ Hz, 2H), 8.01 (br d, $J = 4.00$ Hz, 1H), 7.90 (s, 2H), 7.49 (d, $J = 10.40$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 4.80$ Hz, 1H), 5.38 (br t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.67 (t, $J = 5.60$ Hz, 2H), 3.33–2.88 (m, 5H), 2.68 (br d, $J = 10.00$ Hz, 2H), 0.94 (d, $J = 6.00$ Hz, 3H). MS (ES+) m/e 353 ($M+H$)⁺.

【0 4 8 3】

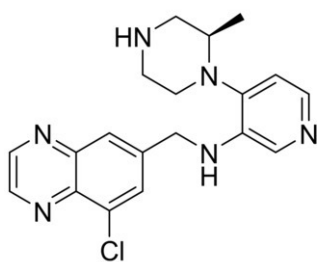
40

実施例 6 1

(R)-N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(2-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 6 6)

50

【化 1 3 4】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.95 (d, $J = 1.60$ Hz, 1H), 8.90 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 8.07–7.97 (m, 2H), 7.95–7.86 (m, 2H), 6.99 (br d, $J = 4.80$ Hz, 1H), 5.37 (br t, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.67 (t, $J = 5.20$ Hz, 2H), 3.41–3.26 (m, 1H), 3.25–2.96 (m, 4H), 2.84–2.66 (m, 2H), 1.02–0.92 (m, 3H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$) $^+$.

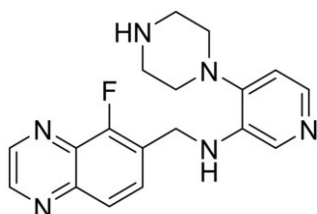
【0 4 8 4】

実施例 6 2

N-((5-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 6 7)

20

【化 1 3 5】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.74 (s, 2H), 9.03 (s, 2H), 8.12 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.82–7.87 (m, 2H), 7.41 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 4.78 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 3.49 (s, 4H), 3.39 (s, 4H). MS (ES+) m/e 339 ($M+H$) $^+$.

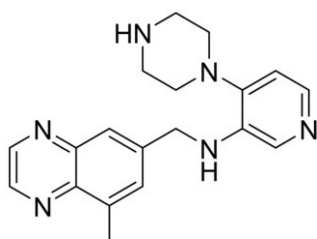
【0 4 8 5】

実施例 6 3

N-((8-メチルキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 6 8)

40

【化 1 3 6】



50

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 15.8 – 14.5 (m, 1 H), 9.77 (s, 2 H), 9.08 (d, J = 6.4 Hz, 2 H), 8.55 (s, 1 H), 8.15 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 8.02 (s, 1 H), 7.68 (s, 1 H), 7.47 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 6.92 (m, 1 H), 4.84 – 4.83 (m, 2 H), 3.54 (s, 4 H), 3.41 (s, 4 H), 2.73 (s, 3 H). MS (ES+) m/e 335 ($M+H$) $^+$.

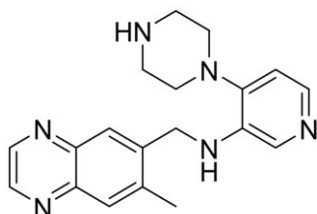
【0486】

実施例 64

N-((7-メチルキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 069)

10

【化137】



20

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.61 (br d, J = 2.1 Hz, 1 H), 8.88 (d, J = 1.8 Hz, 1 H), 8.82 (d, J = 1.8 Hz, 1 H), 8.12 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 7.98 (s, 1 H), 7.78 (s, 1 H), 7.70 (s, 1 H), 7.45 (d, J = 6.2 Hz, 1 H), 6.75 (br t, J = 5.4 Hz, 1 H), 4.68 (br d, J = 5.0 Hz, 2 H), 3.52 (br d, J = 4.9 Hz, 4 H), 3.41 (br s, 4 H), 3.16 (s, 2 H), 2.62 (s, 3 H). MS (ES+) m/e 335 ($M+H$) $^+$.

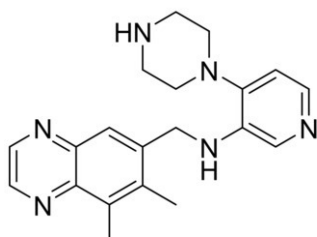
【0487】

実施例 65

N-((7,8-ジメチルキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 070)

30

【化138】



40

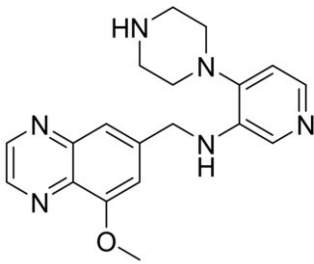
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.68 (dd, J_1 = 14.8 Hz, J_1 = 1.6 Hz, 2 H), 8.00 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 7.60 (s, 1 H), 7.98 (s, 1 H), 7.50 (s, 1 H), 7.42 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 4.60 (s, 2 H), 3.60 – 3.54 (m, 8 H), 2.48 (s, 3 H), 2.38 (s, 3 H). MS (ES+) m/e 349 ($M+H$) $^+$.

【0488】

実施例 66

50

N-((8-メトキシキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン(化合物071)
【化139】



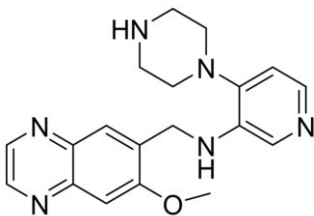
10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14.65 – 15.30 (m, 1 H) 9.74 (br s, 2 H) 8.73 – 9.07 (m, 2 H) 8.08 (br d, $J=6$ Hz, 1 H) 7.78 (s, 1 H) 7.55 (s, 1 H) 7.40 (br d, $J=4.89$ Hz, 2 H) 6.87 (br s, 1 H) 4.71 (br s, 2 H) 4.01 (s, 3 H) 3.34 – 3.62 (m, 8 H). MS (ES+) m/e 351 ($M+H$) $^+$.

【0489】

実施例67

N-((7-メトキシキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン(化合物072)
【化140】



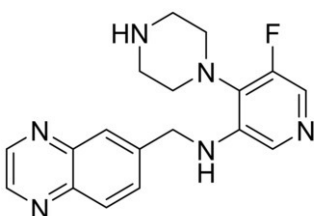
30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.79 (s, 2 H), 8.84 (s, 1 H), 8.73 (s, 1 H), 8.09 (d, $J=6$ Hz, 1 H), 7.75 (d, $J=9.2$ Hz, 2 H), 7.54 (s, 1 H), 7.42 (d, $J=6$ Hz, 1 H), 6.73 (br s, 1 H), 4.64 (s, 2 H), 3.51 (s, 4 H), 3.40 (s, 4 H). MS (ES+) m/e 351 ($M+H$) $^+$.

【0490】

実施例68

5-フルオロ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物073)
【化141】



50

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.77 (br s, 2H), 8.93 (s, 2H), 8.34 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.14 – 8.02 (m, 2H), 7.92 (dd, $J = 1.6, 8.6$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.45 – 7.16 (m, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.66 – 3.22 (m, 9H). MS (ES+) m/e 339 (M+H) $^+$.

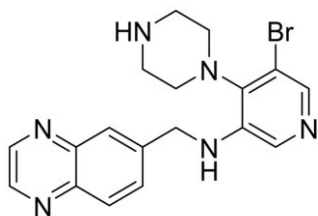
【0491】

実施例 69

5-ブromo-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 074)

10

【化142】



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.03 – 8.88 (m, 2H), 8.28 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.02 – 7.96 (m, 1H), 7.92 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 4.91 – 4.91 (m, 2H), 3.74 (br s, 4H), 3.62 (br s, 4H). MS (ES+) m/e 390 (M+H) $^+$.

20

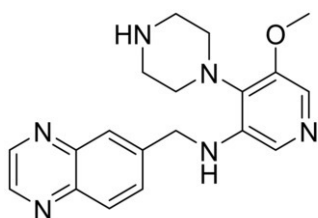
【0492】

実施例 70

5-メトキシ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 075)

30

【化143】



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.57 (br d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 8.92 (s, 2H), 8.09 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.90 (dd, $J = 1.8, 8.7$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.28 (br s, 1H), 4.79 (br s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.37 (br s, 8H). MS (ES+) m/e 351 (M+H) $^+$.

40

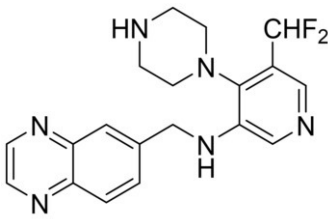
【0493】

実施例 71

5-(ジフルオロメチル)-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 076)

50

【化 1 4 4】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.67 (br s, 2 H) 8.93 (s, 2 H) 8.22 (s, 1 H) 8.06 – 8.12 (m, 2 H) 8.04 (s, 1 H) 7.93 (dd, $J=8.62, 1.77$ Hz, 1 H) 7.26 – 7.63 (m, 1 H) 7.18 (br s, 1 H) 4.84 (br s, 2 H) 3.40 – 3.52 (m, 8 H). MS (ES+) m/e 371 (M+H) $^+$.

10

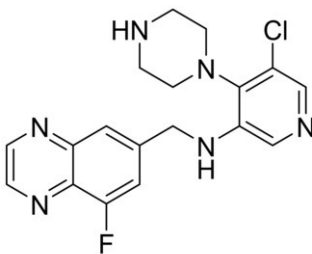
【0 4 9 4】

実施例 7 2

5-クロロ-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 7 7)

【化 1 4 5】

20



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.84 – 9.38 (m, 2 H), 9.01 (d, $J=1.6$ Hz, 1 H), 8.97 (d, $J=1.6$ Hz, 1 H), 8.13 (s, 1 H), 7.94 (s, 1 H), 7.88 (s, 1 H), 7.80 (d, $J=11.2$ Hz, 1 H), 7.54 – 7.12 (m, 1 H), 4.78 (s, 2 H), 3.45 (br s, 8 H). MS (ES+) m/e 373 (M+H) $^+$.

30

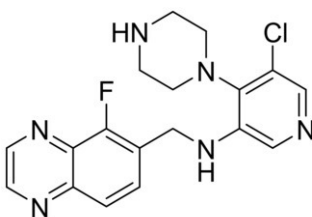
【0 4 9 5】

実施例 7 3

5-クロロ-N-((5-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 7 8)

【化 1 4 6】

40



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.84 – 8.87 (m, 2 H), 8.06 (s, 1 H), 7.78 – 7.80 (m, 3 H), 4.81 (s,

50

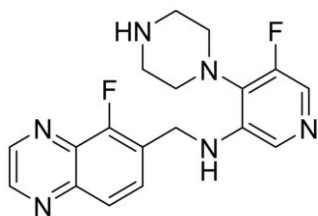
2 H), 3.64 (s, 4 H), 3.49 – 3.52 (m, 4 H). MS (ES+) m/e 373 (M+H)⁺.

【0496】

実施例 74

5-フルオロ-N-((5-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 079)

【化147】



10

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.36 (s, 2 H), 9.03 (s, 2 H), 8.19 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 7.93 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 7.86 (d, J = 7.6 Hz, 1 H), 7.83 (s, 1 H), 6.94 (s, 1 H), 4.80 (s, 2 H), 3.38 (s, 8 H). MS (ES+) m/e 357 (M+H)⁺.

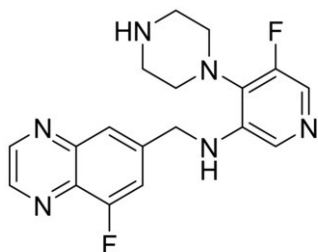
20

【0497】

実施例 75

5-フルオロ-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 080)

【化148】



30

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.77 (s, 2 H), 9.01 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 8.97 (s, 1 H), 8.35 (d, J = 5.2 Hz, 1 H), 7.94 (s, 1 H), 7.80 – 7.83 (m, 2 H), 7.33 (s, 1 H), 4.79 (s, 2 H), 3.49 (s, 4 H), 3.41 (s, 4 H). MS (ES+) m/e 357 (M+H)⁺.

40

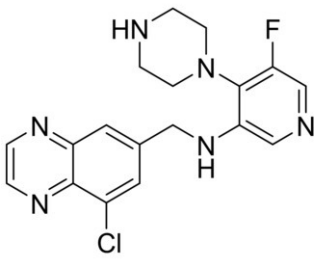
【0498】

実施例 76

N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-フルオロ-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 081)

50

【化 1 4 9】



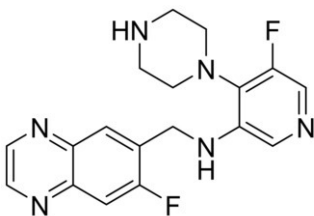
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.73 (s, 2H), 9.03 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 8.33 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.48–3.41 (m, 8H). MS (ES+) m/e 373 ($M+H$) $^+$.

【0 4 9 9】

実施例 7 7

5-フルオロ-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 8 2)

【化 1 5 0】



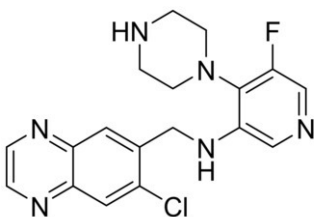
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.69 (br s, 2H), 8.93 (dd, $J = 1.8, 15.9$ Hz, 2H), 8.38 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.02–7.88 (m, 3H), 7.22–7.06 (m, 1H), 4.82 (br s, 2H), 3.56–3.31 (m, 8H). MS (ES+) m/e 357 ($M+H$) $^+$.

【0 5 0 0】

実施例 7 8

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-フルオロ-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 8 3)

【化 1 5 1】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.62 (br s, 2H), 8.96 (dd, $J = 1.7, 10.4$ Hz, 2H), 8.36 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.30–8.30 (m, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.12 (br s, 1H)

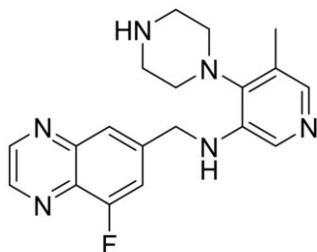
), 4.79 (br s, 2H), 3.50 (br s, 4H), 3.38 (br s, 4H) MS (ES+) m/e 373 (M+H)⁺.

【0501】

実施例 79

N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 084)

【化152】



10

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.74 (br d, J = 1.8 Hz, 2H), 9.07 – 8.92 (m, 2H), 8.04 – 7.88 (m, 2H), 7.81 (br d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.18 (br s, 1H), 4.77 (br s, 2H), 3.46 (br s, 9H), 2.45 – 2.34 (m, 3H). MS (ES+) m/e 353 (M+H)⁺.

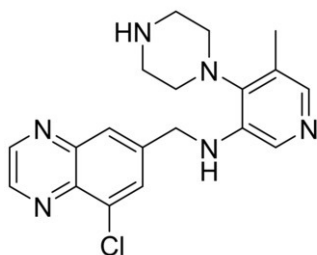
20

【0502】

実施例 80

N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 085)

【化153】



30

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.90 (s, 2H), 9.01 – 9.03 (m, 2H), 8.15 – 8.17 (m, 1H), 8.00 – 8.02 (s, 1H), 7.95 – 7.95 (m, 1H), 7.82 – 7.784 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.47 (s, 8H), 2.39 – 2.42 (m, 3H). MS (ES+) m/e 369 (M+H)⁺.

40

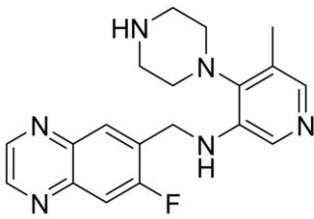
【0503】

実施例 81

N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 086)

50

【化 1 5 4】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 15.86 – 15.10 (m, 1H), 9.74 (br s, 2H), 8.92 (dd, J = 1.7, 17.6 Hz, 2H), 8.09 – 7.81 (m, 4H), 7.03 (br s, 1H), 4.80 (br d, J = 3.9 Hz, 2H), 3.61 – 3.22 (m, 8H), 2.42 (s, 3H). MS (ES+) m/e 353 (M+H) $^+$.

10

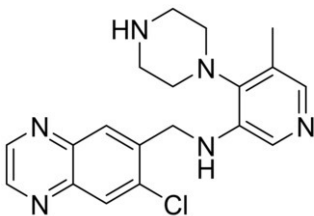
【0504】

実施例 8 2

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 8 7)

【化 1 5 5】

20



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.82 – 9.44 (m, 2H), 8.96 (dd, J = 1.9, 12.6 Hz, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.90 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 7.00 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.77 (br d, J = 5.0 Hz, 2H), 3.59 – 3.30 (m, 8H), 2.44 (s, 3H). MS (ES+) m/e 369 (M+H) $^+$.

30

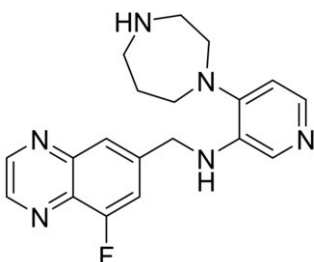
【0505】

実施例 8 3

4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン (化合物 0 8 8)

【化 1 5 6】

40



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14.99 (s, 1H), 9.88 (s, 2H), 8.98 (d, J = 16 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 6 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.85 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 3.59 – 3.30 (m, 8H), 2.44 (s, 3H). MS (ES+) m/e 369 (M+H) $^+$.

50

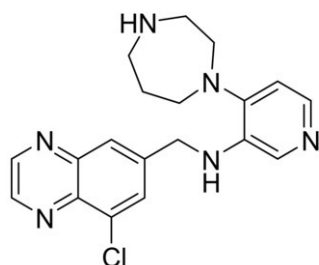
z, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.33 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.37 (s, 2H), 3.29 (s, 2H), 2.20 (s, 2H). MS (ES+) m/e 353 (M+H)⁺.

【0506】

実施例 84

N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)ピリジン-3-アミン(化合物089)

【化157】



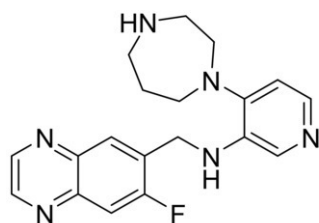
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.00 – 8.94 (m, 2H), 8.11 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 1.1, 6.5 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.01 – 3.92 (m, 2H), 3.77 – 3.69 (m, 2H), 3.63 – 3.55 (m, 2H), 3.53 – 3.45 (m, 2H), 2.38 – 2.30 (m, 2H). MS (ES+) m/e 369 (M+H)⁺.

【0507】

実施例 85

4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン(化合物090)

【化158】



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 15.05 – 14.55 (m, 1H), 9.69 (br s, 2H), 8.93 (dd, J = 2.0, 15.6 Hz, 2H), 8.06 (dd, J = 7.2, 17.2 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.36 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.68 (br s, 1H), 4.69 (br s, 2H), 3.93 – 3.76 (m, 2H), 3.57 (br t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.41 – 3.18 (m, 4H), 2.18 (s, 2H). MS (ES+) m/e 284 (M+H)⁺.

【0508】

実施例 86

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(1,4-ジアゼパン-

10

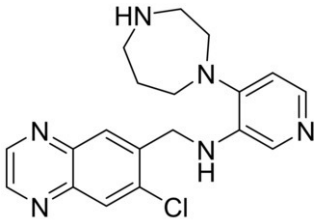
20

30

40

50

1-イル) ピリジン-3-アミン (化合物091)
【化159】



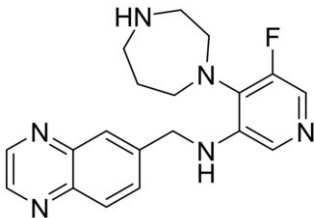
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14.77 – 14.04 (m, 1H), 9.65 – 9.36 (m, 2H), 8.97 (dd, J = 1.8, 10.8 Hz, 2H), 8.32 (s, 1H), 8.11 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.37 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.63 (br t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.72 – 4.62 (m, 2H), 3.84 (br s, 2H), 3.63 – 3.59 (m, 2H), 3.41 – 3.21 (m, 5H), 2.17 (br s, 2H). MS (ES+) m/e 369 (M+H) $^+$.

【0509】

実施例87

4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-5-フルオロ-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物092)

【化160】



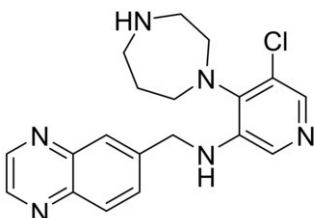
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.85 (br s, 2H) 8.92 (q, J = 1.83 Hz, 2H) 8.30 (d, J = 4.28 Hz, 1H) 8.09 (dd, J = 4.83, 3.61 Hz, 2H) 7.97 (dd, J = 8.68, 1.83 Hz, 1H) 7.83 (s, 1H) 4.82 (s, 2H) 3.57 (br d, J = 4.40 Hz, 2H) 3.26 – 3.39 (m, 6H) 2.21 (br s, 2H). MS (ES+) m/e 353 (M+H) $^+$.

【0510】

実施例88

5-クロロ-4-(1,4-ジアゼパン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物093)

【化161】



10

20

30

40

50

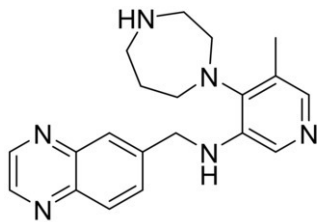
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.19–9.80 (m, 2H), 8.93–8.90 (m, 2H), 8.22 (s, 1H), 8.08 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.97 (dd, J = 1.6, 8.7 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 3.57 (br t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.30 (br s, 6H), 2.24 (br s, 2H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$) $^+$.

【0511】

実施例 89

4-((1,4-ジアゼパン-1-イル)-5-メチル-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物094)

【化162】



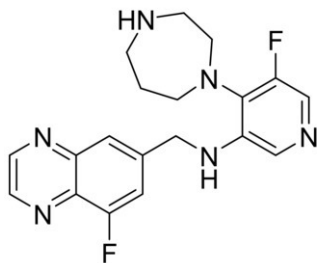
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14.77 (s, 1H), 10.33–9.60 (m, 2H), 8.91 (s, 2H), 8.11–8.03 (m, 2H), 7.99–7.91 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.62 (br t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.70–7.51 (m, 1H), 5.05 (br s, 8H), 4.82 (br d, J = 4.8 Hz, 2H), 3.53 (br t, J = 5.1 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H). MS (ES+) m/e 349 ($M+H$) $^+$.

【0512】

実施例 90

4-((1,4-ジアゼパン-1-イル)-5-フルオロ-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン (化合物095)

【化163】



^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.81–8.96 (m, 2H) 8.02 (d, J = 4.77 Hz, 1H) 7.82 (br s, 1H) 7.55–7.70 (m, 2H) 4.86–4.96 (m, 2H) 3.68–3.83 (m, 2H) 3.50 (q, J = 5.50 Hz, 6H) 2.23 (quin, J = 5.59 Hz, 2H). MS (ES+) m/e 371 ($M+H$) $^+$.

【0513】

実施例 91

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-((1,4-ジアゼパン-1-イル)-5-フルオロピリジン-3-アミン (化合物096)

10

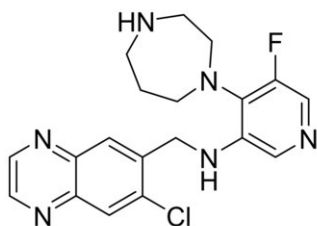
20

30

40

50

【化 1 6 4】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.83 (dd, $J=9.17$, 1.83 Hz, 2 H) 8.21 (s, 1 H) 8.03 (br d, $J=1.22$ Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 7.60 – 7.71 (m, 1 H) 4.72 (s, 1 H) 4.70 – 4.73 (m, 1 H) 3.60 (br s, 2 H) 3.34 (br d, $J=5.50$ Hz, 6 H) 2.00 – 2.18 (m, 1 H) 1.99 – 2.20 (m, 1 H). MS (ES+) m/e 387 (M+H) $^+$.

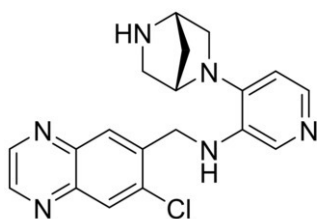
【0514】

実施例 9 2

4-((1S, 4S)-2,5-ジアザビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2-イル)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン (化合物 097)

20

【化 1 6 5】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.93 (dd, $J=1.6$, 9.2 Hz, 2 H), 8.27 (s, 1 H), 8.02 (s, 1 H), 7.71 (d, $J=5.4$ Hz, 1 H), 7.49 (s, 1 H), 6.67 (d, $J=5.2$ Hz, 1 H), 5.30 (br t, $J=6.0$ Hz, 1 H), 4.56 (br dd, $J=6.0$, 9.6 Hz, 2 H), 4.28 (s, 1 H), 3.70 (dd, $J=2.0$, 8.8 Hz, 1 H), 3.61 (br s, 1 H), 3.15 (br d, $J=8.8$ Hz, 1 H), 3.08 (br d, $J=10.0$ Hz, 1 H), 2.86 (br d, $J=8.4$ Hz, 1 H), 1.79 (br d, $J=8.8$ Hz, 1 H), 1.65 (br d, $J=9.2$ Hz, 1 H). MS (ES+) m/e 467 (M+H) $^+$.

40

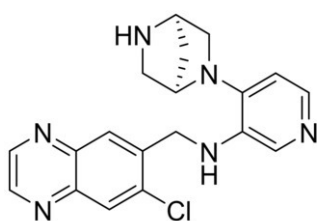
【0515】

実施例 9 3

4-((1R, 4R)-2,5-ジアザビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2-イル)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン (化合物 098)

50

【化 1 6 6】



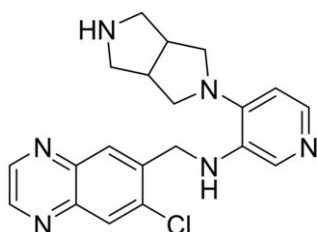
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8.91 (dd, $J = 1.8$, 10.4 Hz, 2H), 8.26 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.04 – 7.95 (m, 1H), 7.77 – 7.67 (m, 1H), 7.26 – 7.14 (m, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.87 – 4.86 (m, 2H), 4.78 – 4.58 (m, 3H), 4.30 (dd, $J = 2.6$, 11.7 Hz, 1H), 3.93 (dd, $J = 1.2$, 11.6 Hz, 1H), 3.73 – 3.63 (m, 1H), 3.57 – 3.48 (m, 1H), 2.40 (br d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.28 – 2.13 (m, 1H). MS (ES+) m/e 367 ($M+H$)⁺.

【0516】

実施例 94

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ヘキサヒドロピロロ[3,4-c]ピロール-2(1H)-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 099)

【化 1 6 7】



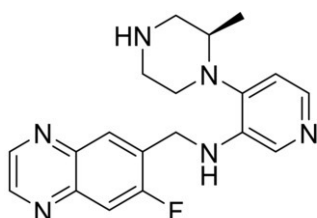
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.88 – 8.77 (m, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.89 – 7.81 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.03 (br d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 3.80 (br s, 4H), 3.64 (br d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.33 (br d, $J = 8.6$ Hz, 4H). MS (ES+) m/e 381 ($M+H$)⁺.

【0517】

実施例 95

(R)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(2-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 100)

【化 1 6 8】



10

20

30

40

50

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.79 – 10.02 (m, 2 H), 8.94 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 8.90 (s, 1 H), 8.10 (d, J = 6 Hz, 1 H), 7.99 (s, 1 H), 7.95 (d, J = 10.8 Hz, 1 H), 7.87 (d, J = 8 Hz, 1 H), 7.53 (d, J = 6 Hz, 1 H), 7.09 (s, 1 H), 4.45 – 4.87 (m, 2 H), 4.06 (s, 1 H), 3.61 – 3.51 (m, 1 H), 3.46 – 3.49 (m, 2 H), 3.16 – 3.22 (m, 2 H), 3.14 (d, J = 6 Hz, 1 H), 1.10 (d, J = 6 Hz, 3 H). MS (ES+) m/e 353 ($M+H$) $^+$.

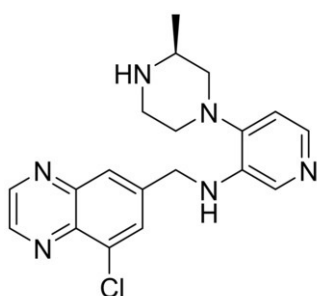
【0518】

10

実施例 96

(S)-N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 101)

【化169】



20

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 15.19 (s, 1 H), 10.18 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 9.80 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 9.00 – 9.00 (m, 1 H), 9.02 (d, J = 2.8 Hz, 1 H), 8.16 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 8.10 – 8.00 (m, 2 H), 7.85 (s, 1 H), 7.39 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 6.93 (br s, 1 H), 4.93 – 4.62 (m, 2 H), 3.92 – 3.61 (m, 3 H), 3.56 – 3.35 (m, 2 H), 3.33 – 3.20 (m, 1 H), 3.14 – 3.00 (m, 1 H), 1.36 (d, J = 6.3 Hz, 3 H). MS (ES+) m/e 369 ($M+H$) $^+$.

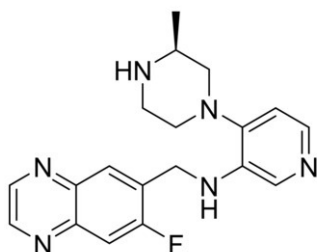
30

【0519】

実施例 97

(S)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 102)

【化170】



40

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 15.1 (s, 1 H), 10.0 – 10.1 (m, 1 H), 9.64 (s, 1 H), 8.95 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 8.91 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 8.12 (d, J =

50

6.4 Hz, 1H), 7.98 – 7.94 (m, 3H), 7.44 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.75 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 4.78 (d, J = 3.6 Hz, 2H), 3.78 – 3.75 (m, 2H), 3.66 – 3.62 (m, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.33 – 3.23 (m, 1H), 3.09 – 3.04 (m, 1H), 1.34 (d, J = 6.4 Hz, 3H). MS (ES+) m/e 353 (M+H)⁺.

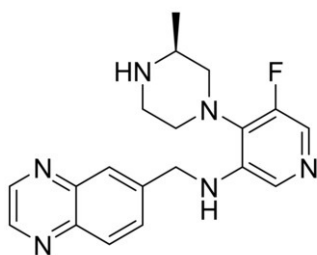
【0520】

実施例 98

(S)-5-フルオロ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 103)

10

【化171】



20

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.07 (br d, J = 9.7 Hz, 1H), 9.41 (br d, J = 9.8 Hz, 1H), 9.01 – 8.86 (m, 2H), 8.27 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.14 – 8.04 (m, 2H), 7.92 (dd, J = 1.8, 8.7 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.26 – 7.05 (m, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.76 – 3.62 (m, 2H), 3.57 – 3.32 (m, 6H), 3.31 – 3.20 (m, 1H), 1.31 (d, J = 6.6 Hz, 3H). MS (ES+) m/e 353 (M+H)⁺.

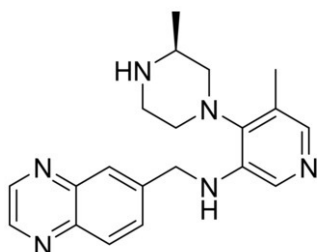
【0521】

実施例 99

(S)-5-メチル-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 104)

30

【化172】



40

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 15.80 – 14.91 (m, 1H), 10.10 (br d, J = 9.5 Hz, 1H), 9.64 – 9.32 (m, 1H), 8.92 (s, 2H), 8.18 – 8.02 (m, 2H), 7.98 – 7.88 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.09 (br s, 1H), 4.78 (br s, 2H), 3.92 – 3.76 (m, 2H), 3.42 (br t, J = 11.6 Hz, 1H), 3.36 – 3.18 (m, 3H), 2.40 (s, 3H), 1.32 (br d, J = 6.4 Hz, 3H). MS (ES+) m/e 349 (M+H)⁺.

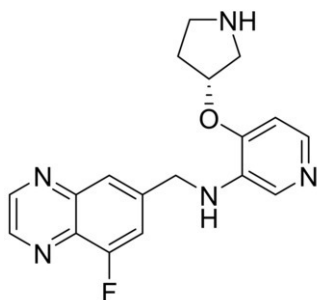
50

【0522】

実施例100

(R)-N-((8-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン(化合物105)

【化173】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 15.16 (br s, 1 H) 10.47 (br s, 1 H) 9.90 (br d, $J=1.96$ Hz, 1 H) 8.88 – 9.08 (m, 2 H) 8.11 (br d, $J=6.24$ Hz, 1 H) 7.99 (s, 1 H) 7.75 – 7.96 (m, 3 H) 7.47 – 7.58 (m, 1 H) 5.65 (br s, 1 H) 4.71 (br s, 2 H) 3.61 – 3.75 (m, 1 H) 3.31 – 3.55 (m, 3 H) 2.19 – 2.32 (m, 2 H). MS (ES+) m/e 340 ($M+H$) $^+$.

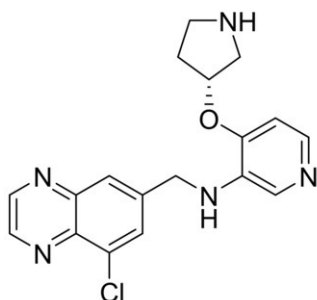
20

【0523】

実施例101

(R)-N-((8-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン(化合物106)

【化174】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 15.00 (br d, $J=3.18$ Hz, 1 H) 10.41 (br s, 1 H) 9.75 (br d, $J=2.45$ Hz, 1 H) 9.02 (q, $J=1.79$ Hz, 2 H) 8.21 (d, $J=1.71$ Hz, 1 H) 8.06 – 8.16 (m, 2 H) 7.78 – 7.97 (m, 2 H) 7.54 (d, $J=6.48$ Hz, 1 H) 5.64 (br s, 1 H) 4.72 (br s, 2 H) 3.69 (br dd, $J=12.35$, 4.89 Hz, 1 H) 3.47 – 3.54 (m, 1 H) 3.32 – 3.45 (m, 2 H) 2.20 – 2.34 (m, 2 H). MS (ES+) m/e 356 ($M+H$) $^+$.

40

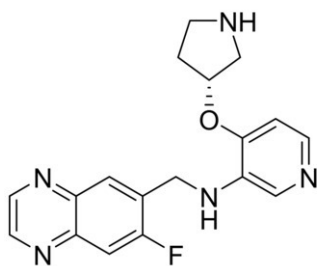
【0524】

実施例102

(R)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン(化合物107)

50

【化 1 7 5】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.04 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.89–9.93 (m, 2H), 8.15 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.91–7.94 (m, 3H), 7.72 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 4.71–4.80 (m, 2H), 3.65–3.68 (m, 1H), 3.39–3.50 (m, 3H), 2.27–2.32 (m, 2H). MS (ES+) m/e 340 ($M+H$) $^+$.

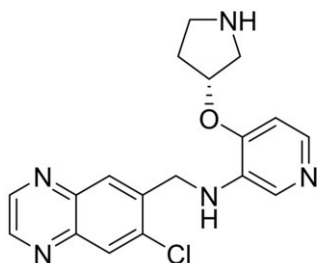
【0 5 2 5】

実施例 1 0 3

(R)-N-((7-chloroquinolin-6-yl)methyl)-4-(pyrrolidin-3-yl)pyridin-3-amine (化合物 1 0 8)

20

【化 1 7 6】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14.98–15.25 (m, 1H) 10.36 (br s, 1H) 9.85 (br s, 1H) 8.75–9.17 (m, 1H) 8.94 (dd, $J = 13.02, 1.77$ Hz, 1H) 8.28 (s, 1H) 8.17 (d, $J = 6.36$ Hz, 1H) 7.85 (d, $J = 12.10$ Hz, 2H) 7.75 (br s, 1H) 7.68–7.81 (m, 1H) 7.60 (d, $J = 6.48$ Hz, 1H) 5.67 (br s, 1H) 4.64–4.84 (m, 2H) 3.68 (br dd, $J = 12.53, 5.07$ Hz, 1H) 3.49 (td, $J = 8.07, 3.91$ Hz, 1H) 3.33–3.44 (m, 2H) 2.21–2.39 (m, 2H). MS (ES+) m/e 356 ($M+H$) $^+$.

40

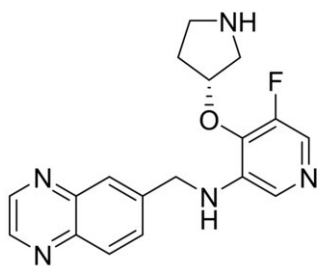
【0 5 2 6】

実施例 1 0 4

(R)-5-fluoro-4-(pyrrolidin-3-yl)-N-((7-chloroquinolin-6-yl)methyl)pyridin-3-amine (化合物 1 0 9)

50

【化 1 7 7】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.50 (br s, 1H), 9.76 (br d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.92 (q, $J = 1.8$ Hz, 2H), 8.40 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.02 – 7.95 (m, 1H), 7.87 (s, 1H), 5.74 (br d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.77 (s, 2H), 3.72 (br dd, $J = 5.9, 13.0$ Hz, 2H), 3.52 – 3.35 (m, 4H), 2.34 – 2.22 (m, 2H). MS (ES+) m/e 340 ($M+H$) $^+$.

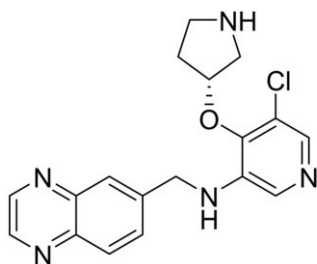
【0 5 2 7】

実施例 1 0 5

20

(R)-5-クロロ-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 1 0)

【化 1 7 8】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.60 – 10.28 (m, 1H), 9.78 – 9.52 (m, 1H), 8.92 (q, $J = 1.8$ Hz, 2H), 8.22 (s, 1H), 8.15 – 8.05 (m, 2H), 7.97 (s, 2H), 5.59 (br s, 1H), 4.78 (br s, 2H), 3.66 (br dd, $J = 5.8, 13.4$ Hz, 1H), 3.58 – 3.32 (m, 3H), 2.31 – 2.15 (m, 2H). MS (ES+) m/e 356 ($M+H$) $^+$.

【0 5 2 8】

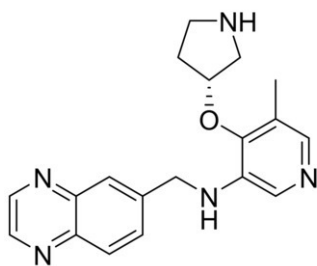
40

実施例 1 0 6

(R)-5-メチル-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 1 1)

50

【化 1 7 9】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.61 (br s, 1 H) 10.44 – 10.80 (m, 1 H) 9.61 – 10.04 (m, 1 H) 9.59 – 9.87 (m, 1 H) 9.59 – 10.02 (m, 1 H) 8.92 (br s, 2 H) 8.06 – 8.12 (m, 1 H) 8.05 – 8.15 (m, 1 H) 7.96 – 8.05 (m, 1 H) 7.95 – 8.00 (m, 1 H) 7.87 – 7.93 (m, 1 H) 7.87 – 7.92 (m, 1 H) 7.80 – 7.93 (m, 1 H) 7.85 (br s, 1 H) 5.35 – 5.48 (m, 1 H) 5.42 (br s, 1 H) 4.76 – 4.77 (m, 1 H) 4.77 (br s, 1 H) 3.32 – 3.70 (m, 4 H) 2.38 (s, 1 H) 2.34 – 2.42 (m, 1 H) 2.22 (br s, 2 H). MS (ES+) m/e 336 (M+H) $^+$.

10

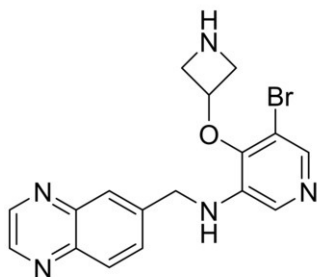
20

【0 5 2 9】

実施例 1 0 7

4- (アゼチジン-3-イルオキシ) -5-ブロモ-N- (キノキサリン-6-イルメチル) ピリジン-3-アミン (化合物 1 1 2)

【化 1 8 0】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.87 (s, 2 H), 8.17 – 8.09 (m, 2 H), 8.03 (s, 1 H), 7.91 – 7.86 (m, 2 H), 5.44 – 5.30 (m, 1 H), 4.79 (s, 2 H), 4.70 – 4.62 (m, 2 H), 4.61 – 4.51 (m, 2 H). MS (ES+) m/e 388 (M+H) $^+$.

30

40

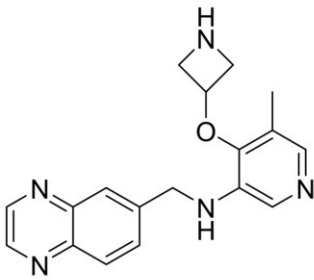
【0 5 3 0】

実施例 1 0 8

4- (アゼチジン-3-イルオキシ) -5-メチル-N- (キノキサリン-6-イルメチル) ピリジン-3-アミン (化合物 1 1 3)

50

【化 1 8 1】



10

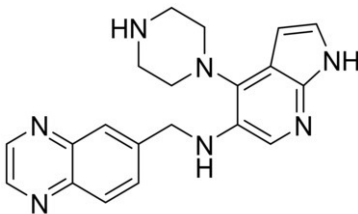
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.39 – 9.10 (m, 1 H), 9.04 – 8.76 (m, 3 H), 8.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 8.06 – 8.00 (m, 2 H), 7.95 (s, 1 H), 7.88 (dd, $J = 1.9, 8.8$ Hz, 1 H), 7.25 (br s, 1 H), 5.20 (quin, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 4.74 (br d, $J = 4.9$ Hz, 2 H), 4.40 (br dd, $J = 5.4, 11.8$ Hz, 5 H), 2.27 (s, 3 H). MS (ES+) m/e 322 ($M+H$)⁺.

【0 5 3 1】

実施例 1 0 9

4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-5-アミン (化合物 1 1 4)

【化 1 8 2】



30

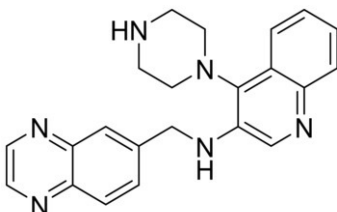
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.1 (s, 1 H), 9.53 (s, 2 H), 8.92 (s, 2 H), 8.11 – 8.08 (m, 2 H), 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 7.50 (s, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 4.69 (s, 2 H), 3.66 (s, 8 H). MS (ES+) m/e 360 ($M+H$)⁺.

【0 5 3 2】

実施例 1 1 0

4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)キノリン-3-アミン (化合物 1 1 5)

【化 1 8 3】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.72 (s, 2 H), 8.9

50

0 (s, 2H), 8.65 (s, 1H), 8.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.14 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.96 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.71–7.68 (m, 2H), 7.17 (s, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.69 (s, 8H). MS (ES+) m/e 371 (M+H)⁺.

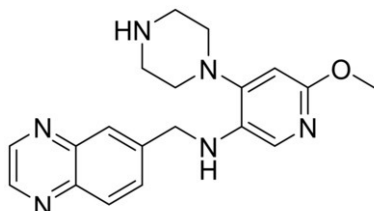
【0533】

実施例 111

6-メトキシ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物116)

【化184】

10



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.87 (s, 2H), 8.92 (s, 2H), 8.08 (d, J = 8.4, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.8, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.63 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.59 (s, 4H), 3.39 (s, 4H). MS (ES+) m/e 351 (M+H)⁺.

20

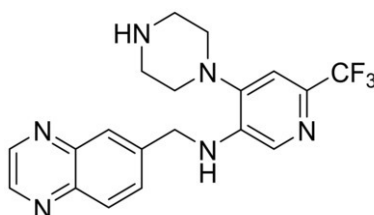
【0534】

実施例 112

4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-6-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン(化合物117)

【化185】

30



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.60 (s, 2H), 8.91 (s, 2H), 8.09 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 8.03 (s, 1H), 7.90 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.26 (m, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.37 (s, 4H), 3.24 (s, 4H). MS (ES+) m/e 389 (M+H)⁺.

40

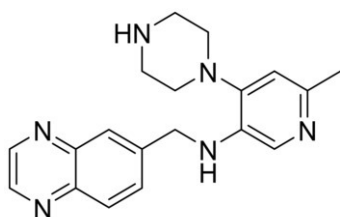
【0535】

実施例 113

6-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物118)

50

【化 1 8 6】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.89 (s, 2 H), 8.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 8.95 (s, 2 H), 7.97 (s, 1 H), 7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 7.53 (s, 1 H), 6.71 (s, 1 H), 5.46 (s, 1 H), 4.64 (d, $J = 6$ Hz, 2 H), 2.89 – 3.24 (m, 8 H), 2.23 (s, 3 H). MS (ES+) m/e 335 ($M+H$) $^+$.

10

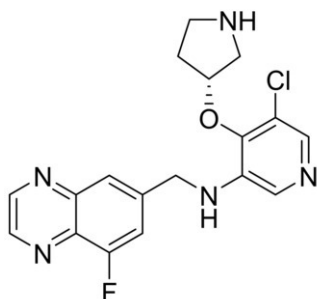
【0 5 3 6】

実施例 1 1 4

(R) – 5 – クロロ – N – ((8 – フルオロキノキサリン – 6 – イル) メチル) – 4 – (ピロリジン – 3 – イルオキシ) ピリジン – 3 – アミン (化合物 1 1 9)

【化 1 8 7】

20



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.45 (s, 1 H), 9.63 (s, 1 H), 8.98 (d, $J = 15.6$ Hz, 2 H), 8.17 (s, 1 H), 7.99 (s, 1 H), 7.97 (s, 1 H), 7.88 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H), 7.76 (s, 1 H), 5.55 (s, 1 H), 4.79 (s, 3 H), 3.64 – 3.68 (m, 1 H), 3.41 – 3.45 (m, 3 H), 2.51 (m, 1 H), 2.26 – 2.29 (m, 2 H). MS (ES+) m/e 374 ($M+H$) $^+$.

30

【0 5 3 7】

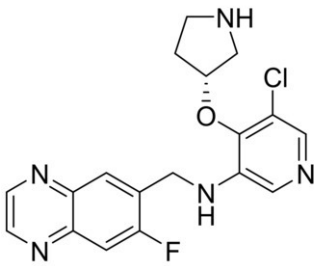
実施例 1 1 5

(R) – 5 – クロロ – N – ((7 – フルオロキノキサリン – 6 – イル) メチル) – 4 – (ピロリジン – 3 – イルオキシ) ピリジン – 3 – アミン (化合物 1 2 0)

40

50

【化 1 8 8】



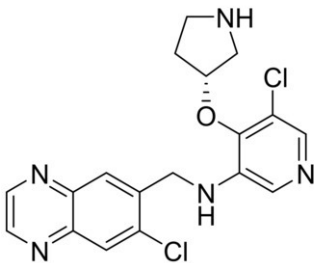
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.24 (s, 1 H), 9.55 (s, 1 H), 8.92 (d, $J = 14$ Hz, 2 H), 8.14 (s, 1 H), 7.92–7.98 (m, 3 H), 7.41 (s, 1 H), 5.49 (s, 1 H), 4.75 (s, 2 H), 3.50–3.67 (m, 1 H), 3.38–3.45 (m, 3 H), 2.52 (m, 1 H), 2.25–2.28 (m, 2 H). MS (ES+) m/e 374 ($M+H$)⁺.

【0538】

実施例 116

(R)-5-クロロ-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 121)

【化 1 8 9】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.77–8.78 (m, 2 H), 8.17 (d, $J = 0.8$ Hz, 1 H), 8.00 (s, 1 H), 7.82 (s, 1 H), 7.79 (s, 1 H), 5.86–5.88 (m, 1 H), 4.75–4.80 (m, 3 H), 3.88 (d, $J = 13.6$ Hz, 1 H), 3.58–3.71 (m, 3 H), 2.43–2.49 (m, 2 H). MS (ES+) m/e 390 ($M+H$)⁺.

【0539】

実施例 117

(R)-N-((8-メチルキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 122)

10

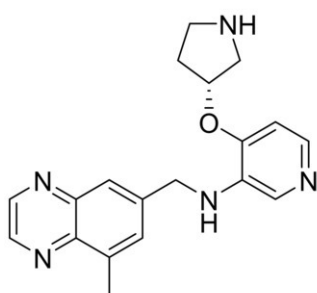
20

30

40

50

【化 1 9 0】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.53 – 10.28 (m, 1H), 9.91 – 9.65 (m, 1H), 8.91 (q, $J = 2.0$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.81 (m, 3H), 7.53 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.64 (m, 1H), 4.68 (m, 2H), 3.57 – 3.36 (m, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.38 – 2.18 (m, 2H). MS (ES+) m/e 366 ($M+H$) $^+$.

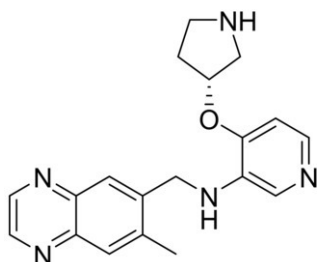
【0540】

実施例 118

20

(R)-N-((7-メチルキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 123)

【化 1 9 1】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8.98 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.94 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.11 (m, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 5.74 (m, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.92 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 3.79 – 3.56 (m, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.61 – 2.50 (m, 2H). MS (ES+) m/e 336 ($M+H$) $^+$.

【0541】

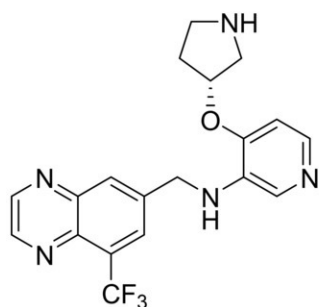
40

実施例 119

(R)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-((8-(トリフルオロメチル)キノキサリン-6-イル)メチル)ピリジン-3-アミン (化合物 124)

50

【化 1 9 2】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.62 – 10.21 (m, 1H), 9.77 – 9.57 (m, 1H), 9.07 (s, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (br s, 1H), 7.54 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 5.70 – 5.57 (m, 1H), 4.79 (br s, 2H), 3.68 (br dd, $J = 4.8, 12.2$ Hz, 1H), 3.57 – 3.33 (m, 3H), 2.33 – 2.21 (m, 2H). MS (ES+) m/z 389 (M+H) $^+$.

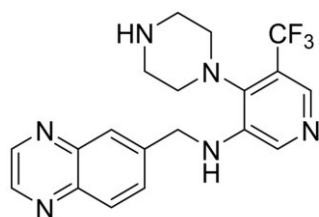
20

【0 5 4 2】

実施例 1 2 0

4- (ピペラジン-1-イル) -N- (キノキサリン-6-イルメチル) -5- (トリフルオロメチル) ピリジン-3-アミン (化合物 1 2 5)

【化 1 9 3】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.94 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 8.44 (s, 1H), 8.20 – 8.15 (m, 2H), 8.12 (s, 1H), 8.01 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.64 (s, 8H), MS (ES+) m/z 389.3 (M+H) $^+$.

【0 5 4 3】

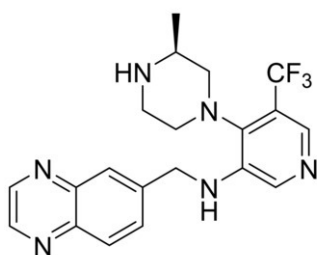
実施例 1 2 1

(S) - 4- (3-メチルピペラジン-1-イル) -N- (キノキサリン-6-イルメチル) -5- (トリフルオロメチル) ピリジン-3-アミン (化合物 1 2 6)

40

50

【化 1 9 4】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.90 (s, 2H), 8.44 (s, 1H), 8.19–8.13 (m, 2H), 8.08 (s, 1H), 8.00–7.94 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.89 (dt, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, 1H), 3.75–3.66 (m, 1H), 3.64–3.55 (m, 4H), 3.37 (br d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 6.40$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 403 ($M+H$)⁺.

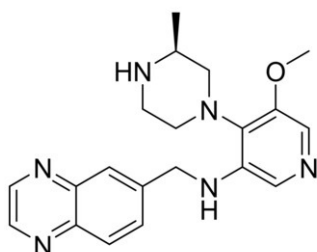
【0 5 4 4】

実施例 1 2 2

(S)-5-メトキシ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 2 7)

20

【化 1 9 5】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 9.04–8.82 (m, 2H), 8.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.99–7.91 (m, 2H), 7.69 (s, 1H), 4.86–4.85 (m, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.87–3.74 (m, 1H), 3.73–3.57 (m, 2H), 3.55–3.42 (m, 2H), 3.42–3.33 (m, 2H), 1.41 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), MS (ES+) m/z 365.3 ($M+H$)⁺.

【0 5 4 5】

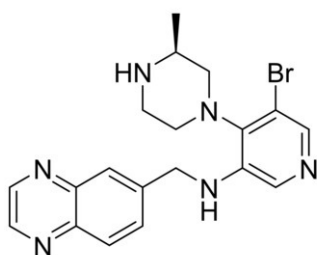
実施例 1 2 3

(S)-5-ブロモ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 2 8)

40

50

【化 1 9 6】



10

$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.94 (q, $J = 2.0$ Hz, 2H), 8.28 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.99 (dd, $J = 1.8$, 8.7 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 5.01–4.92 (m, 2H), 4.04–3.90 (m, 2H), 3.84–3.68 (m, 2H), 3.62–3.41 (m, 3H), 1.44 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) MS (ES+) m/z 415 ($M+H$)⁺

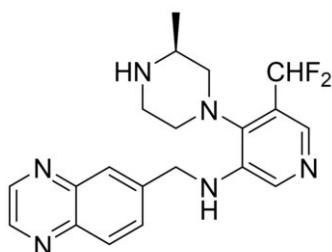
【0 5 4 6】

実施例 1 2 4

(S)-5-(ジフルオロメチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 2 9)

20

【化 1 9 7】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.96–8.85 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 15.5$ Hz, 2H), 7.98 (dd, $J = 1.8$, 8.8 Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 54.2$ Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 3.92 (dddd, $J = 3.4$, 6.6, 10.2 Hz, 1H), 3.81–3.70 (m, 1H), 3.68–3.58 (m, 3H), 3.56–3.45 (m, 2H), 1.43 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H) MS (ES+) m/z 385 ($M+H$)⁺

【0 5 4 7】

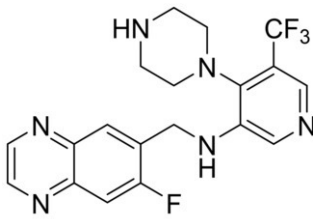
40

実施例 1 2 5

N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 3 0)

50

【化 1 9 8】



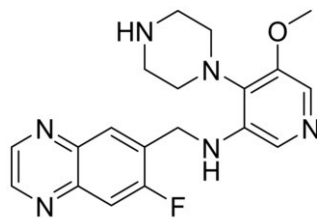
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.89 (dd, $J = 1.8, 17.3$ Hz, 2H), 8.48 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.63 (s, 8H), MS (ES+) m/z 407.3 ($M+H$)⁺. 10

【0 5 4 8】

実施例 1 2 6

N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メトキシ-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 3 1)

【化 1 9 9】



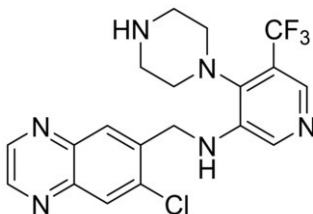
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.87 (br d, $J = 19.9$ Hz, 2H), 8.03–7.96 (m, 2H), 7.87–7.79 (m, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.53 (br s, 8H), MS (ES+) m/z 369.3 ($M+H$)⁺. 30

【0 5 4 9】

実施例 1 2 7

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 3 2)

【化 2 0 0】



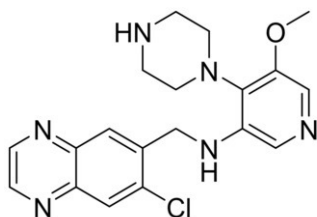
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.91 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.88 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.60 (br d, $J = 2.8$ Hz, 8H). MS (ES+) m/z 423 ($M+H$)⁺. 40

【0 5 5 0】

50

実施例 128

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メトキシ-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 133)
【化 201】



10

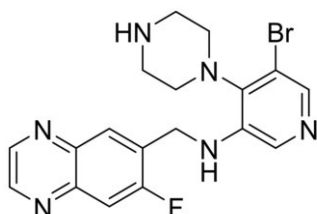
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.90 (dd, $J = 1.8, 16.3$ Hz, 2H), 8.25 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 4.88–4.87 (m, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.61–3.49 (m, 8H), MS (ES+) m/z 385.1 ($M+H$)⁺.

【0551】

実施例 129

5-ブromo-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 134)
【化 202】

20



30

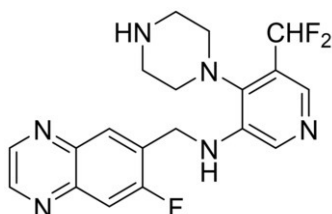
$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.90 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H), 8.08–7.99 (m, 2H), 7.86 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.93 (s, 2H), 3.74 (br s, 4H), 3.60 (br t, $J = 4.6$ Hz, 4H) MS (ES+) m/z 417 ($M+H$)⁺

【0552】

実施例 130

5-(ジフルオロメチル)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 135)
【化 203】

40



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 8.92 (s, 1H), 8.89 (s,

50

1 H), 8.32 (s, 1H), 8.13 – 8.03 (m, 2H), 7.88 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 54 Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.61 (br d, J = 4.8 Hz, 8H). MS (ES⁺) m/z 389 (M+H)⁺.

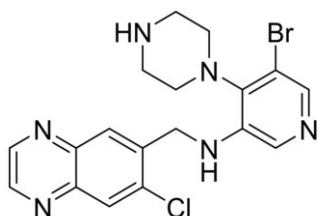
【0553】

実施例 131

5-ブromo-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 136)

【化204】

10



¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8.92 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.88 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.74 (br s, 4H), 3.58 (br t, J = 4.9 Hz, 4H). MS (ES⁺) m/z 345 (M+H)⁺.

20

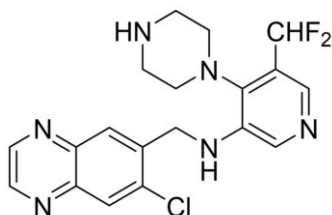
【0554】

実施例 132

N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-(ジフルオロメチル)-4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 137)

【化205】

30



¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.93 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.90 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.03 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 54.0 Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 3.62 (s, 8H). MS (ES⁺) m/z 405 (M+H)⁺.

40

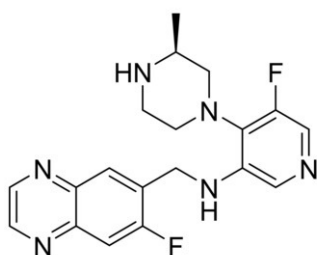
【0555】

実施例 133

(S)-5-フルオロ-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 138)

50

【化 2 0 6】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.22–10.06 (m, 1H), 9.49 (br d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.95 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.91 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.98–7.94 (m, 2H), 4.82 (br s, 2H), 3.73–3.63 (m, 1H), 3.52–3.42 (m, 4H), 3.35 (br d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 3.31–3.23 (m, 1H), 1.30 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 371 ($M+H$) $^+$

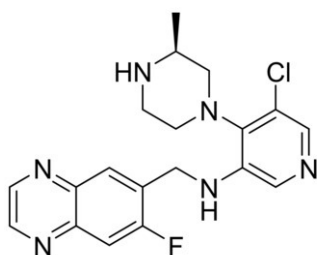
【0556】

実施例 134

20

(S)-5-クロロ-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 139)

【化 2 0 7】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ = 8.93 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.89 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 4.97–4.94 (m, 2H), 3.99–3.86 (m, 2H), 3.79–3.63 (m, 2H), 3.61–3.47 (m, 3H), 1.43 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 387 ($M+H$) $^+$.

【0557】

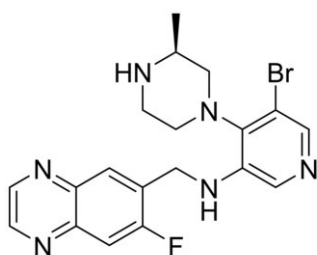
40

実施例 135

(S)-5-ブロモ-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 140)

50

【化 2 0 8】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.90 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.07–8.01 (m, 2H), 7.86 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.01–3.80 (m, 2H), 3.71 (br dd, $J = 10.8, 13.1$ Hz, 2H), 3.59–3.41 (m, 3H), 1.42 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) MS (ES+) m/z 432 (M+H) $^+$

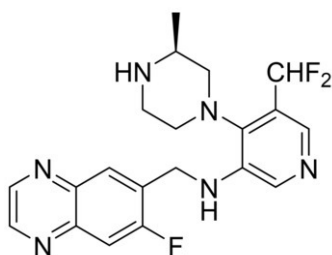
【0558】

実施例 136

(S)-5-(ジフルオロメチル)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 141)

20

【化 2 0 9】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.90 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.51–7.19 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.94 (ddd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, $J_3 = 10.4$ Hz, 1H), 3.81–3.70 (m, 1H), 3.66–3.50 (m, 4H), 3.30–3.24 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 403 (M+H) $^+$.

40

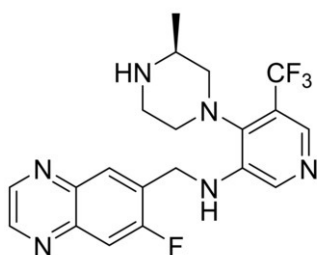
【0559】

実施例 137

(S)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 142)

50

【化 2 1 0】



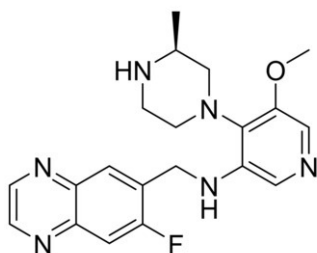
10

【0 5 6 0】

実施例 1 3 8

(S)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メトキシ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 4 3)

【化 2 1 1】



20

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.98–8.82 (m, 2H), 8.08–7.96 (m, 2H), 7.89–7.78 (m, 2H), 4.90 (br s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.80 (dt, $J = 3.6, 6.6$ Hz, 1H), 3.74–3.59 (m, 2H), 3.53–3.44 (m, 2H), 3.41–3.32 (m, 2H), 1.40 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), MS (ES+) m/z 383.4 ($M+H$)⁺.

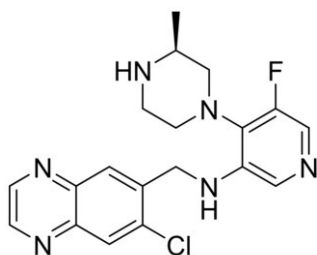
30

【0 5 6 1】

実施例 1 3 9

(S)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-フルオロ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 1 4 4)

【化 2 1 2】



40

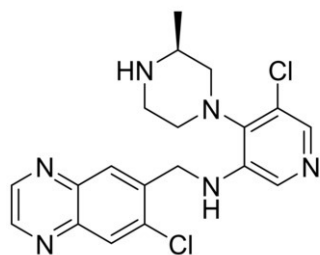
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.92 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.88 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 4.90 (s, 2H), 3.78 (dt, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, 1H), 3.75–3.67 (m, 2H), 3.62–3.55 (m, 3H), 3.42–3.34 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 6$

50

. 8 H z , 3 H) . M S (E S +) m / z 387 (M + H) +
【 0 5 6 2 】

実施例 1 4 0

(S) - 5 - クロロ - N - ((7 - クロロキノキサリン - 6 - イル) メチル) - 4 - (3 - メチルピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 3 - アミン (化合物 1 4 5)
【 化 2 1 3 】



10

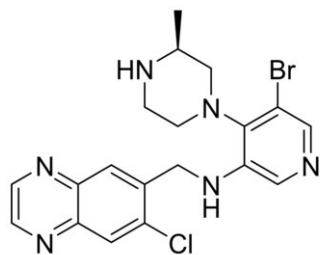
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz , D_2O) δ 8.91 (d , $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1 H) , 8.88 (d , $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1 H) , 8.26 (s , 1 H) , 8.19 (s , 1 H) , 8.02 (s , 1 H) , 7.92 (s , 1 H) , 4.90 (s , 2 H) , 3.91 - 3.78 (m , 2 H) , 3.71 - 3.55 (m , 3 H) , 3.55 - 3.47 (m , 2 H) , 1.42 (d , $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3 H) . M S (ES^+) m / z 403 (M + H) + .

20

【 0 5 6 3 】

実施例 1 4 1

(S) - 5 - ブロモ - N - ((7 - クロロキノキサリン - 6 - イル) メチル) - 4 - (3 - メチルピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 3 - アミン (化合物 1 4 6)
【 化 2 1 4 】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz , $\text{MeOD}-d_4$) δ 8.92 (d , $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H) , 8.88 (d , $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H) , 8.32 (d , $J = 0.6 \text{ Hz}$, 1 H) , 8.26 (s , 1 H) , 8.01 (s , 1 H) , 7.97 (s , 1 H) , 4.92 (s , 2 H) , 4.02 - 3.92 (m , 1 H) , 3.86 (b r d d , $J = 3.4 , 6.3 \text{ Hz}$, 1 H) , 3.73 (d d , $J = 10.6 , 13.1 \text{ Hz}$, 2 H) , 3.60 - 3.47 (m , 3 H) , 1.42 (d , $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3 H) M S (ES^+) m / z 449 (M + H) +

40

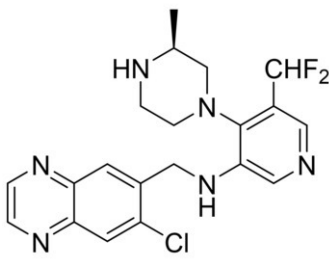
【 0 5 6 4 】

実施例 1 4 2

(S) - N - ((7 - クロロキノキサリン - 6 - イル) メチル) - 5 - (ジフルオロメチル) - 4 - (3 - メチルピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 3 - アミン (化合物 1 4 7)

50

【化 2 1 5】



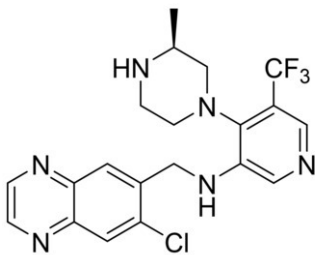
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.92 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.88 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.52–7.20 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 3.92 (ddd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, $J_3 = 10.0$ Hz, 1H), 3.80–3.71 (m, 1H), 3.69–3.61 (m, 2H), 3.60–3.51 (m, 2H), 3.26 (s, 1H), 1.42 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H).
MS (ES+) m/z 419 ($M+H$) $^+$.

【0565】

実施例 143

(S)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 148)

【化 2 1 6】

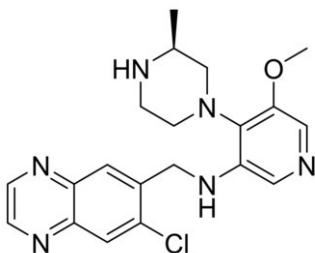


【0566】

実施例 144

(S)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メトキシ-4-(3-メチルピペラジン-1-イル)ピリジン-3-アミン (化合物 149)

【化 2 1 7】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.91 (dd, $J = 1.8, 16.5$ Hz, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.00 (s, 2H), 7.73 (s, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.89–3.

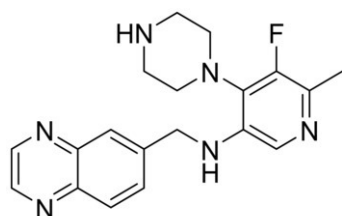
7.7 (m, 1H), 3.76–3.58 (m, 2H), 3.55–3.45 (m, 2H), 3.45–3.34 (m, 2H), 1.41 (d, J = 6.6 Hz, 3H), MS (ES+) m/z 399.1 (M+H)⁺.

【0567】

実施例 145

5-フルオロ-6-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物150)

【化218】



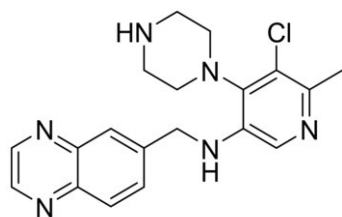
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.08 (dd, J = 2.1, 10.5 Hz, 2H), 8.27–8.16 (m, 2H), 8.13–8.06 (m, 1H), 7.63 (s, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.70 (br d, J = 3.6 Hz, 4H), 3.66–3.55 (m, 4H), 2.52 (d, J = 2.6 Hz, 3H). MS (ES+) m/z 353.2 (M+H)⁺.

【0568】

実施例 146

5-クロロ-6-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物151)

【化219】



¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.05–8.98 (m, 2H), 8.20 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.04 (dd, J = 1.8, 8.7 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 4.90 (br s, 2H), 3.71 (br s, 4H), 3.62 (br s, 4H), 2.60 (s, 3H), MS (ES+) m/z 369.2 (M+H)⁺.

【0569】

実施例 147

5-ブromo-6-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン(化合物152)

10

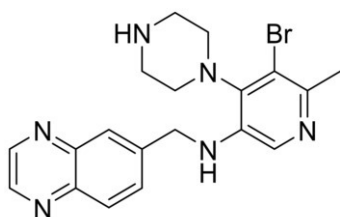
20

30

40

50

【化 2 2 0】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 9.02–8.91 (m, 2H), 8.17 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 8.01 (dd, $J = 1.9, 8.6$ Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 4.90–4.89 (m, 2H), 3.97–3.49 (m, 8H), 2.65 (s, 3H), MS (ES+) m/z 413.3 (M+H) $^+$.

10

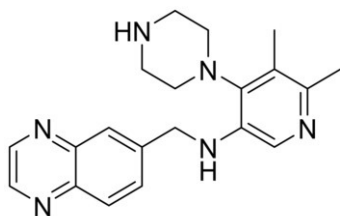
【0570】

実施例 148

5, 6-ジメチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 153)

【化 2 2 1】

20



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 9.07–8.90 (m, 2H), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.03 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 4.86 (s, 2H), 3.61 (br s, 8H), 2.51 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), MS (ES+) m/z 349.2 (M+H) $^+$.

30

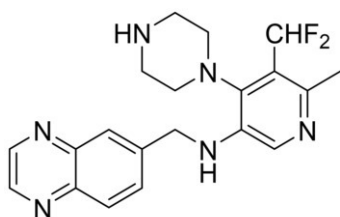
【0571】

実施例 149

5-(ジフルオロメチル)-6-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 154)

【化 2 2 2】

40



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.97–8.88 (m, 2H), 8.21–8.13 (m, 1H), 8.12–8.07 (m, 1H), 8.03–7.93 (m, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.48–7.11 (m, 1H), 4.90–4.89 (m, 2H), 3.69 (br d, $J = 3.6$ Hz, 4H), 3.61 (br d, $J = 3.2$ Hz, 4H), 2.68 (s, 3H).

50

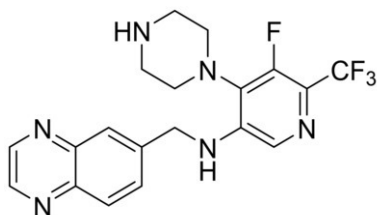
MS (ES+) m/z 385 (M+H)⁺.

【0572】

実施例150

5-フルオロ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-6-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン(化合物155)

【化223】



10

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.96–8.90 (m, 2H), 8.17 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.99–7.94 (m, 1H), 7.71 (s, 1H), 4.90 (s, 2H), 3.54–3.52 (m, 4H), 3.46 (br s, 4H). MS (ES+) m/z 407 (M+H)⁺.

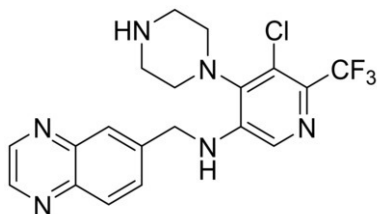
【0573】

20

実施例151

5-クロロ-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-6-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン(化合物156)

【化224】



30

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 9.01 (dd, J_1 = 2.0 Hz, J_2 = 12.6 Hz, 2H), 8.20 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.03 (dd, J_1 = 2.0 Hz, J_2 = 8.8 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 4.93 (s, 2H), 3.96 (br t, J = 12.0 Hz, 2H), 3.73–3.62 (m, 2H), 3.52–3.44 (m, 2H), 3.24 (br d, J = 12.6 Hz, 2H). MS (ES+) m/z 423 (M+H)⁺.

【0574】

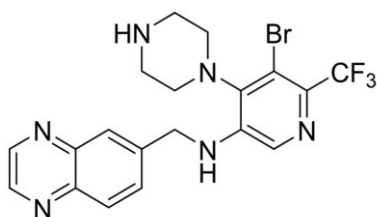
40

実施例152

5-ブromo-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-6-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン(化合物157)

50

【化 2 2 5】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 9.05 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 15.0$ Hz, 2H), 8.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.06 (dd, dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.08 (br t, $J = 12.0$ Hz, 2H), 3.69 (br t, $J = 12.0$ Hz, 2H), 3.53–3.44 (m, 2H), 3.25–3.21 (m, 2H). MS (ES+) m/z 467 ($M+H$)⁺.

10

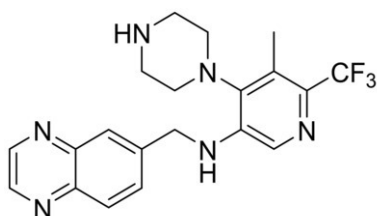
【0575】

実施例 153

5-メチル-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-6-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 158)

20

【化 2 2 6】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8.96–8.90 (m, 2H), 8.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.97 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 4.93 (s, 2H), 3.57 (br s, 8H), 2.50 (d, $J = 0.8$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 403 ($M+H$)⁺.

30

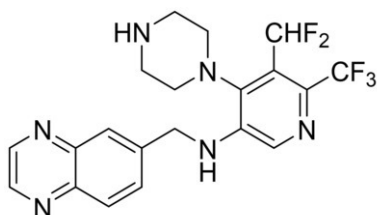
【0576】

実施例 154

5-(ジフルオロメチル)-4-(ピペラジン-1-イル)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-6-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 159)

【化 2 2 7】

40



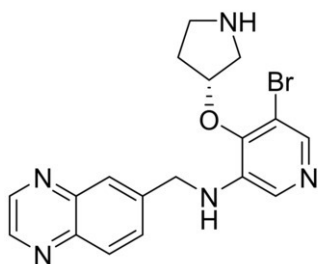
【0577】

実施例 155

(R)-5-ブromo-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6

50

－イルメチル) ピリジン－3－アミン (化合物 160)
【化 228】



10

$^1\text{H NMR}$: (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.97–8.83 (m, 2H), 8.36 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.97–7.94 (m, 2H), 5.83 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.90 (br d, $J = 0.9$ Hz, 2H), 3.93 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 3.80 (dt, $J = 7.5, 11.0$ Hz, 1H), 3.71 (dd, $J = 4.4, 13.6$ Hz, 1H), 3.60 (ddd, $J = 3.4, 9.0, 12.0$ Hz, 1H), 2.72–2.31 (m, 2H) MS (ES+) m/z 402 (M+H) $^+$

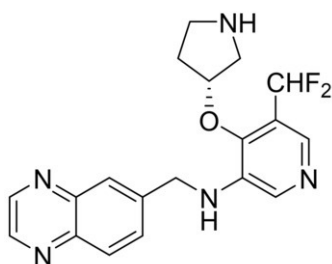
20

【0578】

実施例 156

(R)-5-(ジフルオロメチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 161)

【化 229】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.91 (s, 2H), 8.35 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.10 (s, 2H), 7.99 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1H), 7.48–7.18 (m, 1H), 5.70 (br s, 1H), 4.90–4.90 (m, 2H), 3.93 (br d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.78–3.67 (m, 2H), 3.62–3.54 (m, 1H), 2.56–2.36 (m, 2H). MS (ES+) m/z 372.3 (M+H) $^+$.

40

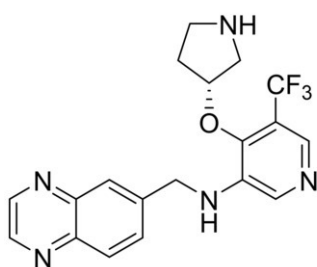
【0579】

実施例 157

(R)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 162)

50

【化 2 3 0】



10

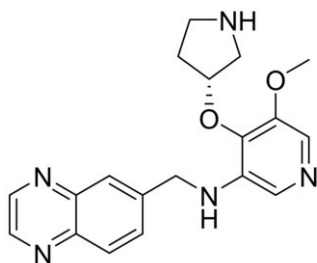
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.88–8.84 (m, 2H), 8.12 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 8.04 (s, 2H), 8.00 (s, 1H), 7.92 (dd, J_1 = 2.00, J_2 = 8.6 Hz, 1H), 5.24 (br t, J = 5.20 Hz, 1H), 4.77 (s, 2H), 3.30–3.19 (m, 2H), 3.02 (dd, J = 4.80, 12.9 Hz, 1H), 2.94 (ddd, J = 5.40, 8.6, 11.3 Hz, 1H), 2.19–2.01 (m, 2H). MS (ES+) m/z 390 (M+H) $^+$ [0580]

実施例 158

(R)-5-メトキシ-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 163)

20

【化 2 3 1】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 9.08–9.01 (m, 2H), 8.20 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.08 (dd, J = 1.8, 8.8 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.70 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 5.99–5.91 (m, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.88 (br d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.75–3.62 (m, 2H), 3.60–3.53 (m, 1H), 2.53–2.34 (m, 2H), MS (ES+) m/z 352.2 (M+H) $^+$. [0581]

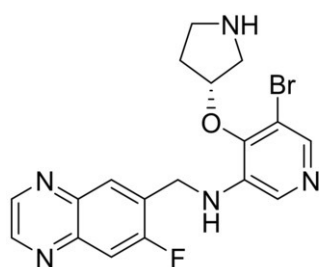
実施例 159

40

(R)-5-ブロモ-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 164)

50

【化 2 3 2】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.90 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.41 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.11–8.01 (m, 2H), 7.86 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 5.84 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.92 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.84–3.66 (m, 2H), 3.58 (dddd, $J = 3.5, 8.9, 11.9$ Hz, 1H), 2.62–2.53 (m, 1H), 2.52–2.41 (m, 1H) MS (ES+) m/z 419 (M+H) $^+$

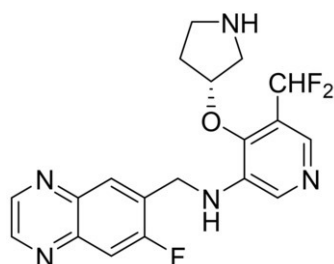
【0582】

実施例 160

20

(R)-5-(ジフルオロメチル)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 165)

【化 2 3 3】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.88 (dd, $J = 1.8, 18.4$ Hz, 2H), 8.40 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 7.45–7.16 (m, 1H), 5.68 (t, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.90 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 3.74–3.66 (m, 2H), 3.60–3.55 (m, 1H), 2.51–2.38 (m, 2H). MS (ES+) m/z 390.2 (M+H) $^+$.

【0583】

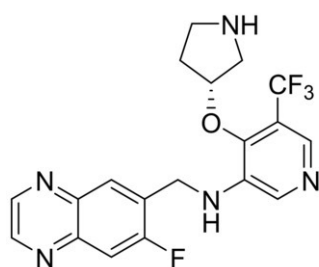
40

実施例 161

(R)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 166)

50

【化 2 3 4】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.87 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 8.83 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 7.60$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 5.23 (br t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.30–3.15 (m, 2H), 3.00 (dd, $J = 4.6, 12.9$ Hz, 1H), 2.91 (ddd, $J_1 = 5.60$ Hz, $J_2 = 8.60$ Hz, $J_3 = 11.1$ Hz, 1H), 2.20–2.01 (m, 2H). MS (ES+) m/z 408 ($M+H$) $^+$

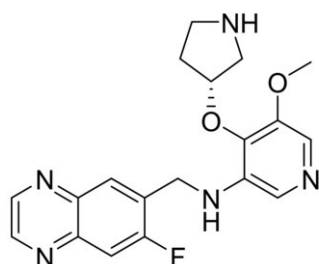
【0584】

実施例 162

20

(R)-N-((7-フルオロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メトキシ-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 167)

【化 2 3 5】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.89 (dd, $J = 1.8, 19.5$ Hz, 2H), 8.07 (s, 1H), 8.05–8.00 (m, 1H), 7.87–7.80 (m, 1H), 7.80–7.76 (m, 1H), 5.95 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.89–4.87 (m, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.87 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 3.74–3.60 (m, 2H), 3.56 (ddd, $J = 3.3, 9.0, 11.8$ Hz, 1H), 2.54–2.34 (m, 2H), MS (ES+) m/z 370.4 ($M+H$) $^+$.

40

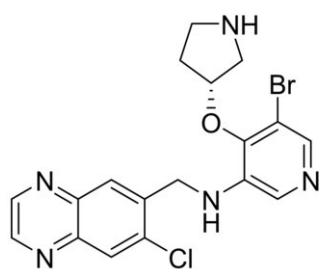
【0585】

実施例 163

(R)-5-ブロモ-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 168)

50

【化 2 3 6】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.91 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.87 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.02–7.97 (m, 2H), 5.88 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 3.94 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H), 3.85–3.66 (m, 2H), 3.59 (ddd, $J = 3.4, 9.0, 11.9$ Hz, 1H), 2.66–2.57 (m, 1H), 2.54–2.42 (m, 1H) MS (ES+) m/z 436 ($M + H$)⁺

10

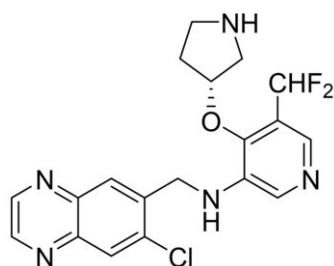
【0586】

実施例 164

(R)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-(ジフルオロメチル)-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 169)

20

【化 2 3 7】



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.90 (dd, $J = 1.9, 15.8$ Hz, 2H), 8.41 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.50–7.16 (m, 1H), 5.71 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.91 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 3.75–3.65 (m, 2H), 3.61–3.54 (m, 1H), 2.59–2.37 (m, 2H). MS (ES+) m/z 390.2 ($M + H$)⁺.

30

【0587】

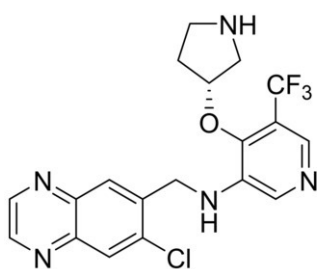
実施例 165

(R)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-4-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 170)

40

50

【化 2 3 8】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.89 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 8.85 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 5.26 (br t, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.33 (br s, 1H), 3.22 (td, $J_1 = 7.60$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J_1 = 4.80$ Hz, $J_2 = 12.8$ Hz, 1H), 2.94 (ddd, $J_1 = 5.60$ Hz, $J_2 = 8.80$ Hz, $J_3 = 11.2$ Hz, 1H), 2.21–2.04 (m, 2H). MS (ES+) m/z 424 ($M+H$) $^+$.

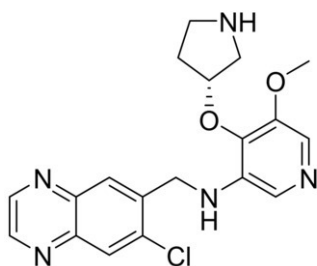
20

【0588】

実施例 166

(R)-N-((7-クロロキノキサリン-6-イル)メチル)-5-メトキシ-4-(ピロリジン-3-イルオキシ)ピリジン-3-アミン (化合物 171)

【化 2 3 9】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.90 (dd, $J = 1.8, 16.9$ Hz, 2H), 8.22 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 5.97 (t, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.88 (br d, $J = 13.3$ Hz, 1H), 3.76–3.62 (m, 2H), 3.61–3.51 (m, 1H), 2.67–2.30 (m, 2H), MS (ES+) m/e 386.2 ($M+H$) $^+$.

40

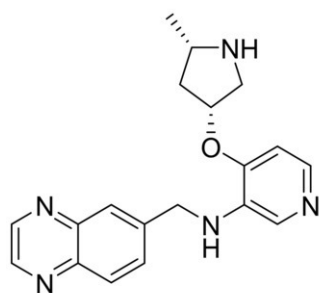
【0589】

実施例 167

4-(((3R, 5S)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 172)

50

【化 2 4 0】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 9.03 (s, 2H), 8.22–8.15 (m, 2H), 8.11–8.04 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.67 (m, 1H), 4.99–4.93 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.08–3.90 (m, 2H), 3.79 (dd, $J = 5.2, 13.2$ Hz, 1H), 2.97 (ddd, $J = 6.4, 8.5, 14.8$ Hz, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 336.2 ($M+H$) $^+$.

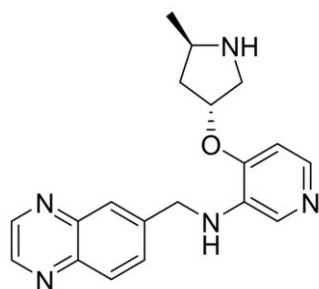
20

【0590】

実施例 168

4-((3R, 5R)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 173)

【化 2 4 1】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 15.18 (s, 1H), 10.74–10.34 (m, 1H), 9.60 (s, 1H), 8.91 (s, 2H), 8.14–8.03 (m, 3H), 7.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.59 (m, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.04–3.87 (m, 1H), 3.82–3.66 (m, 1H), 3.64–3.53 (m, 1H), 2.42 (dd, $J = 5.9, 14.3$ Hz, 1H), 2.05–1.90 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 336.2 ($M+H$) $^+$.

40

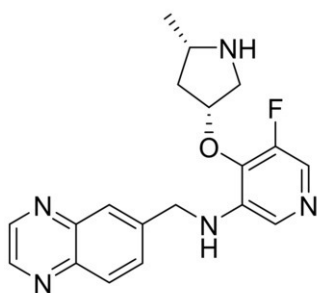
【0591】

実施例 169

5-フルオロ-4-((3R, 5S)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 174)

50

【化 2 4 2】



10

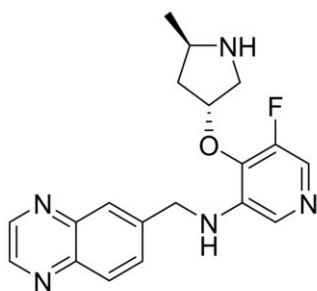
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.95 (s, 2H), 8.30 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.17–8.11 (m, 2H), 8.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 4.90 (s, 4H), 4.09–3.92 (m, 2H), 3.75 (dd, $J = 5.1, 13.4$ Hz, 1H), 2.95 (td, $J = 7.5, 15.0$ Hz, 1H), 2.28 (dd, $J = 7.5, 14.9$ Hz, 1H), 1.63 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 354.2 (M+H) $^+$.
【0592】

実施例 170

20

5-フルオロ-4-((3R, 5R)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 175)

【化 2 4 3】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 9.01 (s, 2H), 8.30 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.22–8.14 (m, 2H), 8.06 (dd, $J = 1.7, 8.7$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 5.93 (q, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.91 (s, 4H), 4.34–4.19 (m, 1H), 4.02–3.85 (m, 2H), 2.78 (dd, $J = 6.1, 14.8$ Hz, 1H), 2.20 (ddd, $J = 4.4, 11.2, 15.1$ Hz, 1H), 1.57 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H). MS (ES+) m/z 354.2 (M+H) $^+$.

40

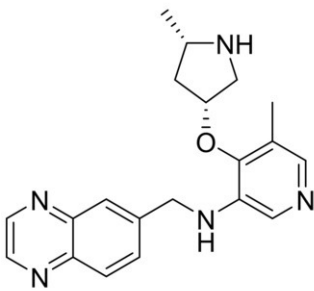
【0593】

実施例 171

5-メチル-4-((3R, 5S)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 176)

50

【化 2 4 4】



10

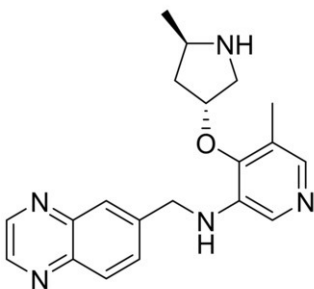
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD-d_4) δ 8.90 (s, 2H), 8.14 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.99 – 7.94 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 5.52 – 5.45 (m, 1H), 4.89 – 4.86 (m, 2H), 3.91 – 3.76 (m, 2H), 3.73 – 3.61 (m, 1H), 2.88 (td, $J = 7.5, 14.5$ Hz, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.23 – 2.11 (m, 1H), 1.61 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) MS (ES+) m/z 350 ($M+H$)⁺
【0594】

実施例 172

20

5-メチル-4-((3R, 5R)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 177)

【化 2 4 5】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD-d_4) δ 8.94 (s, 2H), 8.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.01 – 7.97 (m, 2H), 7.82 (s, 1H), 5.56 (br s, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.36 – 4.23 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 2.60 (dd, $J = 6.1, 14.8$ Hz, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.08 (ddd, $J = 4.6, 11.0, 15.1$ Hz, 1H), 1.53 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) MS (ES+) m/z 350 ($M+H$)⁺
【0595】

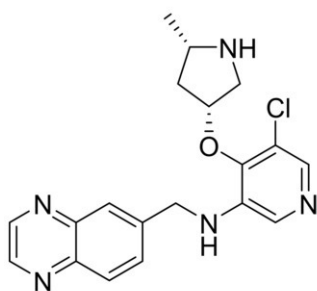
40

実施例 173

5-クロロ-4-((3R, 5S)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 178)

50

【化 2 4 6】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 9.98–8.53 (m, 2H), 8.45–8.06 (m, 3H), 8.05–7.77 (m, 2H), 5.86 (br s, 1H), 3.97–3.80 (m, 2H), 3.71 (br dd, $J = 5.4, 13.2$ Hz, 1H), 2.95 (td, $J = 7.5, 14.6$ Hz, 1H), 2.36–2.21 (m, 1H), 1.62 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), MS (ES+) m/z 370.0 ($M+H$) $^+$.

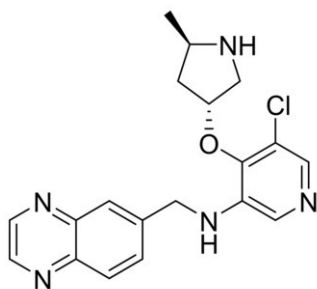
【0596】

実施例 174

5-クロロ-4-((3R, 5R)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 179)

20

【化 2 4 7】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ 8.97–8.91 (m, 2H), 8.27 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 8.00 (dd, $J = 1.9, 8.6$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 5.90 (br s, 1H), 4.89 (br s, 2H), 4.30 (td, $J = 6.2, 11.9$ Hz, 1H), 3.97–3.82 (m, 2H), 2.71 (dd, $J = 6.0, 14.9$ Hz, 1H), 2.23–2.08 (m, 1H), 1.54 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), MS (ES+) m/z 370.2 ($M+H$) $^+$.

40

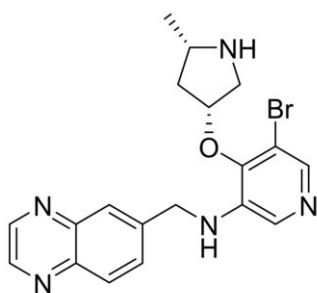
【0597】

実施例 175

5-ブromo-4-((3R, 5S)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)ピリジン-3-アミン (化合物 180)

50

【化 2 4 8】



10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.90 (s, 2H), 8.34 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 8.14–8.09 (m, 2H), 8.01–7.96 (m, 2H), 5.81 (dddd, $J = 1.8, 3.9, 5.6, 7.3$ Hz, 1H), 4.89 (br s, 2H), 3.97–3.80 (m, 2H), 3.71 (dd, $J = 5.9, 13.4$ Hz, 1H), 2.97 (td, $J = 7.6, 14.8$ Hz, 1H), 2.40–2.24 (m, 1H), 1.64 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) MS (ES+) m/z 414 ($M + H$) $^+$

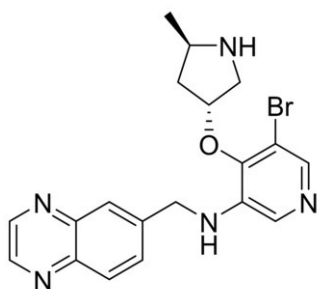
20

【0598】

実施例 176

5-ブロモ-4-(((3R, 5R) -5-メチルピロリジン-3-イル) オキシ) -N-(キノキサリン-6-イルメチル) ピリジン-3-アミン (化合物 181)

【化 2 4 9】



30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.89 (s, 2H), 8.36 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.97–7.93 (m, 2H), 5.81 (br d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.89 (br s, 2H), 4.33 (td, $J = 6.1, 11.9$ Hz, 1H), 3.89 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 2.71 (dd, $J = 6.1, 14.9$ Hz, 1H), 2.12 (ddd, $J = 4.8, 11.3, 15.0$ Hz, 1H), 1.54 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H) MS (ES+) m/z 416 ($M + H$) $^+$

40

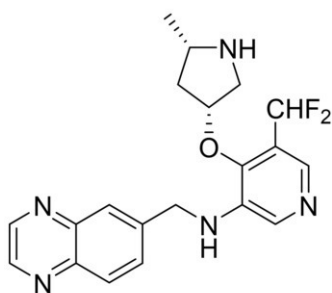
【0599】

実施例 177

5-(ジフルオロメチル)-4-(((3R, 5S) -5-メチルピロリジン-3-イル) オキシ) -N-(キノキサリン-6-イルメチル) ピリジン-3-アミン (化合物 182)

50

【化 2 5 0】



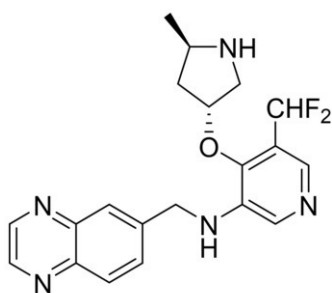
10

【 0 6 0 0】

実施例 1 7 8

5 - (ジフルオロメチル) - 4 - (((3 R , 5 R) - 5 - メチルピロリジン - 3 - イル) オキシ) - N - (キノキサリン - 6 - イルメチル) ピリジン - 3 - アミン (化合物 1 8 3)

【化 2 5 1】



20

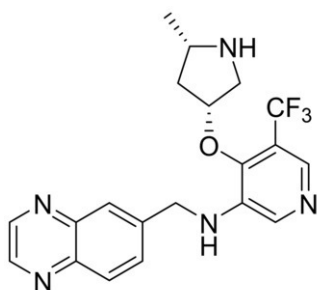
【 0 6 0 1】

実施例 1 7 9

4 - (((3 R , 5 S) - 5 - メチルピロリジン - 3 - イル) オキシ) - N - (キノキサリン - 6 - イルメチル) - 5 - (トリフルオロメチル) ピリジン - 3 - アミン (化合物 1 8 4)

30

【化 2 5 2】



40

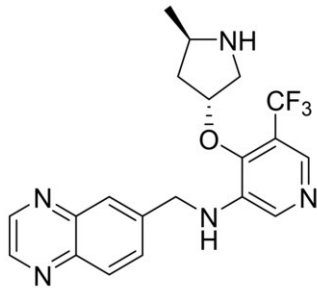
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.89 (s, 2H), 8.14 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 1.20$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 5.21–5.06 (m, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.39 (br d, $J = 12.8$ Hz, 2H), 3.21–3.10 (m, 1H), 2.96 (dd, $J_1 = 5.20$ Hz, $J_2 = 12.8$ Hz, 1H), 2.48 (td, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 14.3$ Hz, 1H), 1.77–1.66 (m, 1H), 1.33 (d, $J =$

50

6.4 Hz, 3H). MS (ES+) m/z 404 (M+H)⁺.
【0602】

実施例 180

4-((3R,5R)-5-メチルピロリジン-3-イル)オキシ)-N-(キノキサリン-6-イルメチル)-5-(トリフルオロメチル)ピリジン-3-アミン(化合物 185)
【化253】



10

配列情報：
【0603】

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1. 配列 CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATGGAAG
CAATCGACCATCGACCCX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CCTGATCCGGATC
ATGCCGGCGCAGGGAG (配列番号 4) に提供されるように X₇~X₁₂ 位のヌクレ
オチドをランダム化した、ライブラリ N1 から同定されたアプタマー配列。J 2-4 (X₇X₈
X₉X₁₀X₁₁X₁₂) に対して以下の表 1 に提供される配列は、配列番号 4 に提供される状況下
にある。

配列番号	アプタマー 名	配列 J2-4	倍率
4		X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂	
1	12C6-1	ATTGCA	
7	N1_1F1_2	ACACCA	356.65
8	N1_2H3	ATCGA	338.25
9	N1_1A10_5	ACTGCA	289.89
10	N1_1D6_5	ATAAAA	277.63
11	N1_1H8_1	ATTGTA	253.58
12	N1_2F6	AAAATA	185.92
13	N1_2F11	ATAATA	150.18
14	N1_1H4_1	ATATGA	133.71
15	N1_2C7	TTCAAA	109.60
16	N1_2D2	AACGTA	102.23
17	N1_2G1	ATCCTA	100.11
18	N1_1G9	AGACGT	57.55
19	N1_2A10	AGACTT	43.14
20	N1_2F7	AACTGA	41.88
21	N1_2B8	TTTTTC	41.84
22	N1_2G3	GTACGA	36.58
23	N1_2D5	TTTCAC	35.71
24	N1_2E5	TTCAAC	35.05
25	N1_2G9	TTTCGC	30.93
26	N1_2E6	TTCACC	30.39
27	N1_1H4_4	GTTTGT	27.89
28	N1_1A10_2	TATATA	25.13
29	N1_2B6	ACGAGT	24.49
30	N1_2A3	ACTTAT	22.20
31	N1_1D6_2	TTAAGT	20.22
32	N1_2E7	TCCTAA	19.91

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

33	N1_2C9	TCGACA	19.52
34	N1_2A7	ATGGTC	17.13
35	N1_2C6	ATTTTG	17.04
36	N1_2H10	TTATGT	16.82
37	N1_2F3	TCTGTA	15.56
38	N1_2D10	AATTAG	15.53
39	N1_2E11	ATCACG	15.45
40	N1_2D6	GTATTG	13.57
41	N1_2B11	TTTGTG	12.85
42	N1_2B3	TACCCC	12.35
43	N1_2A11	TTCGTG	11.48
44	N1_2E9	TCTGAT	11.27
45	N1_2G6	AGAGGC	11.00
46	N1_2F10	TTACTG	10.84
47	N1_2E4	TCAATG	10.44
48	N1_2B2	TTTTAG	10.02
49	N1_2D9	AGTAAA	9.74
50	N1_2A12	GGACTA	9.72
51	N1_2B7	AATCGT	9.58
52	N1_2H1	GTGTAG	9.41
53	N1_2G4	GGTGAA	9.06
54	N1_2C3	GTTGAT	8.87
55	N1_2C10	GAGTGT	8.74
56	N1_2G8	AGTTAC	8.46
57	N1_2F1	AAATCT	8.34
58	N1_2E2	ATGCGT	7.86
59	N1_2E8	AATGCT	5.81
60	N1_2E3	TTCCCG	5.79
61	N1_2D3	GCGAGA	5.40
62	N1_2F4	TCTTAG	4.74
63	N1_2G10	GAAGGG	4.40
64	N1_2D1	AGGGAA	4.38
65	N1_1D6_1	AGTTTC	4.13
66	N1_2C4	GCGCAT	3.80
67	N1_2B12	ATGGGG	3.79
68	N1_2A9	TTCCTC	3.41

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

69	N1_2D12	TGGCAG	3.26
70	N1_2E10	TCTTGG	2.86
71	N1_2H2	CCGTTC	2.85
72	N1_2H11	CTTTCC	2.83
73	N1_2C8	GACAAG	2.67
74	N1_2B5	GGAGGT	2.51
75	N1_2A8	GCCTGG	2.24
76	N1_2D7	CCACGG	2.16
77	N1_2G7	AGGTTG	2.06
78	N1_2D11	GGCGGG	1.96
79	N1_1A10_3	TTTCGG	1.93
80	N1_2H9	CTTTTA	1.91
81	N1_2F12	CGCACA	1.83
82	N1_2F9	CTCCGG	1.71
83	N1_2A5	CTCTCA	1.65
84	N1_2H5	CCTGCG	1.62
85	N1_2H8	CCGCCC	1.45
86	N1_1F1_1	CCCCCA	1.22
87	N1_1F7	CGGACC	1.22
88	N1_2H7	GGTCGG	1.16

10

20

30

40

50

【 0 6 0 4 】

【表 4 - 1】

表 2. 配列CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATGGAAG
 $X_1X_2AX_3X_4X_5X_6$ CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATCAT
 GCCGGCGCAGGGAG (配列番号 3) に提供されるように $X_1X_2AX_3X_4X_5X_6$ 位
 のヌクレオチドをランダム化した、ライブラリ N 3 から同定されたアプタマー配列。J 2 - 4
 ($X_1X_2AX_3X_4X_5X_6$) に対して以下の表 2 に提供される配列は、配列番号 3 に提供され
 る状況下にある。

配列番号	アプタマ ー名	配列 L3a	倍率
3		$X_1X_2AX_3X_4X_5X_6$	
1	12C6-1	CAATCGA	
89	N3_G6	CGATGAG	858.1
90	N3_B2	CTATTGA	435.1
91	N3_C1	CTATTGA	418.7
92	N3_B8	CCAAGAG	301.6
93	N3_B11	TAACGTG	299.6
94	N3_F2	CCACGGA	207.3
95	N3_F8	TAAGTGG	155.6
96	N3_G11	CGAAGGA	128.2
97	N3_B12	TAAAGGC	70.0
98	N3_B1	TAACAAT	67.1
99	N3_A1	TTATCAT	28.2
100	N3_B5	TTAAAGC	20.5
101	N3_E1	TTACTGT	18.9
102	N3_C7	TTATTCT	15.2
103	N3_B9	GTAAAAT	13.2
104	N3_A12	CTATCAT	13.2
105	N3_F9	TTACCGT	12.7
106	N3_B7	TTATAGC	10.5
107	N3_C2	AAACCGA	9.9
108	N3_G2	CAAGGTT	9.8
109	N3_C8	GTATTGT	8.6
110	N3_G12	TTAGTTA	7.6
111	N3_F12	CTACTAG	7.5
112	N3_H3	CAACGTC	7.2
113	N3_A3	GTACAGT	7.1
114	N3_E7	TCATTCT	6.6

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

115	N3_F5	TGATGGC	6.5
116	N3_E8	TCATGTG	6.3
117	N3_H9	ATAATGT	5.9
118	N3_H5	GTATTGT	5.9
119	N3_F6	GCATAGA	5.9
120	N3_H8	GTATGTT	5.6
121	N3_G5	AGACGCC	5.1
122	N3_D1	CGAACCC	4.4
123	N3_D4	TCAACTG	4.3
124	N3_D5	TCATGGC	4.3
125	N3_F10	GTATACT	4.1
126	N3_C4	TCAGCGG	3.9
127	N3_E2	CAAATTG	3.7
128	N3_B6	GCAGTGT	3.7
129	N3_E9	ATATGTG	3.5
130	N3_G8	GAAAGTT	3.5
131	N3_D10	GAATAGT	3.5
132	N3_F3	ACAGGCC	3.3
133	N3_G10	GTATTCTG	3.2
134	N3_H6	GCAGGAA	3.1
135	N3_G4	GTACAGC	3.0
136	N3_E12	TGATTTG	3.0
137	N3_C9	TCATACC	2.9
138	N3_B4	GTAGTTC	2.8
139	N3_C5	TGAAGCT	2.7
140	N3_H7	GAAAGTT	2.7
141	N3_D11	GGAATAT	2.7
142	N3_E6	ACAACCT	2.5
143	N3_C10	AAACTTG	2.5
144	N3_D7	TGAGACT	2.4
145	N3_C3	CCAGTTG	2.3
146	N3_A11	ACAAATG	2.2
147	N3_E4	AGAATGG	2.1
148	N3_H4	AGAAAAC	2.1
149	N3_E10	ATAGTGG	2.1
150	N3_H2	CCAAGGG	2.1

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

151	N3_C6	AGAACAG	2.1
152	N3_H12	ATAGGCG	2.1
153	N3_H11	TGACTTG	2.1
154	N3_D6	TGACTTA	2.1
155	N3_D8	TGAGCAG	2.0
156	N3_A4	TTATCTT	2.0
157	N3_G9	GAAGCAA	2.0
158	N3_D9	AGAAGTT	1.9
159	N3_G1	GAAGGAG	1.9
160	N3_A8	GAATATC	1.9
161	N3_F7	TCAGGTA	1.9
162	N3_E3	TCAGCTT	1.8
163	N3_H10	TCATGGG	1.7
164	N3_E5	AGAGTAA	1.6
165	N3_F11	GGAGCGT	1.5
166	N3_H1	CGAATTC	1.4
167	N3_A10	CAATGGG	1.4
168	N3_B3	GGATAGT	1.4
169	N3_B10	GGACGCT	1.3
170	N3_G7	GGATCAT	1.3
171	N3_A2	GGACCAA	1.2
172	N3_A7	GAAGGGA	1.2
173	N3_F1	TGATGCG	1.1

10

20

30

40

50

【 0 6 0 5 】

【表 5 - 1】

表3. 配列CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATGGAAGCAATCGACCATCGACCCATTGCACCT $X_{13}X_{14}X_{15}$ CCGGATCATGCCGG $X_{22}X_{23}$ CAGGGAG (配列番号5) に提供されるように $X_{13}X_{14}X_{15}$ 位及び $X_{22}X_{23}$ 位のヌクレオチドをランダム化した、ライブラリN4から同定されたアプタマー配列。P4/J4-5~J5-4 ($X_{13}X_{14}X_{15}$ CCGGATCATGCCGG $X_{22}X_{23}$) に対して以下の表3に提供される配列は、配列番号5に提供される状況下にある。

配列番号	アプタマー名	配列 P4/J4-5~J5-4	倍率
5		$X_{13}X_{14}X_{15}$ CCGGATCATGCCGG $X_{22}X_{23}$	
1	12C6-1	GATCCGGATCATGCCGGCG	
174	N4_1C11	CGTCCGGATCATGCCGGTA	2096.5
175	N4_1E10	GATCCGGATCATGCCGGTG	1405.5
176	N4_1B04	ACGCCGGATCATGCCGGTG	1347.4
177	N4_6D7	GACCCGGATCATGCCGGTA	1227.9
178	N4_3A3	GGTCCGGATCATGCCGGTA	1147.0
179	N4_2C6	GTGCCGGATCATGCCGGTT	1115.8
180	N4_4F10	CGTCCGGATCATGCCGGAA	1092.2
181	N4_3E4	GGTCCGGATCATGCCGGCT	1086.5
182	N4_7A9	CGGCCGGATCATGCCGGTA	1075.9
183	N4_7A10	CGACCCGGATCATGCCGGGT	1049.9
184	N4_1H9	AGCCCGGATCATGCCGGGT	1044.8
185	N4_7B3	TTCCCGGATCATGCCGGGA	1042.5
186	N4_2B6	GATCCGGATCATGCCGGTA	1030.5
187	N4_9B7	GAGCCGGATCATGCCGGTT	1021.6
188	N4_9B9	AGGCCGGATCATGCCGGTC	1009.4
189	N4_5F12	GGCCCGGATCATGCCGGAG	1009.3
190	N4_7B8	GCGCCGGATCATGCCGGTA	1009.2
191	N4_1B10	GACCCGGATCATGCCGGAG	1002.5
192	N4_7B12	GGACCCGGATCATGCCGGCT	1000.4
193	N4_9B7	TGCCCGGATCATGCCGGCG	989.9
194	N4_6B3	GTCCCGGATCATGCCGGTA	988.7
195	N4_2E5	GCCCGGATCATGCCGGTG	980.6
196	N4_2A10	GCACCCGGATCATGCCGGGC	979.3
197	N4_9E4	AGCCCGGATCATGCCGGTG	972.3
198	N4_9C7	GGACCCGGATCATGCCGGTT	969.3
199	N4_9A3	GTCCCGGATCATGCCGGCT	960.2

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

200	N4_5B12	GCTCCGGATCATGCCGGAT	956.4
201	N4_1E8	GCACCGGATCATGCCGGGT	954.3
202	N4_1F12	TCCCCGGATCATGCCGGGG	947.8
203	N4_1C03	CAGCCGGATCATGCCGGTT	941.1
204	N4_A62	GTACCGGATCATGCCGGAT	933.7
205	N4_1G02	GTGCCGGATCATGCCGGTG	929.0
206	N4_1C02	GCACCGGATCATGCCGGAA	927.7
207	N4_1G5	AGTCCGGATCATGCCGGGA	927.6
208	N4_1D6	CGGCCGGATCATGCCGGGC	927.0
209	N4_8G4	GTGCCGGATCATGCCGGCG	926.3
210	N4_1G7	GAGCCGGATCATGCCGGTA	924.9
211	N4_8E2	GACCCGGATCATGCCGGTG	917.8
212	N4_2C5	GGACCGGATCATGCCGGAG	915.5
213	N4_2G2	GGTCCGGATCATGCCGGTT	908.3
214	N4_7F3	CGACCGGATCATGCCGGAT	905.6
215	N4_2D3	CGTCCGGATCATGCCGGGA	897.4
216	N4_2G5	GGGCCGGATCATGCCGGCG	896.8
217	N4_1C10	GATCCGGATCATGCCGGAA	886.8
218	N4_1F7	GGTCCGGATCATGCCGGAG	884.7
219	N4_5E4	GGGCCGGATCATGCCGGTT	884.6
220	N4_1E6	GTACCGGATCATGCCGGGT	878.6
221	N4_1B12	GATCCGGATCATGCCGGGA	878.0
222	N4_7B2	GTACCGGATCATGCCGGGG	876.1
223	N4_8B3	CTACCGGATCATGCCGGTA	875.0
224	N4_1F6	GCTCCGGATCATGCCGGCA	868.3
225	N4_7H9	GCACCGGATCATGCCGGTC	865.6
226	N4_1F10	TACCCGGATCATGCCGGGG	865.5
227	N4_1C5	GGTCCGGATCATGCCGGCC	863.5
228	N4_8F1	GACCCGGATCATGCCGGAC	858.6
229	N4_3B2	GGCCCGGATCATGCCGGAT	850.6
230	N4_1A11	CACCCGGATCATGCCGGGG	849.3
231	N4_1H6	GGCCCGGATCATGCCGGCG	838.4
232	N4_6B3	GGACCGGATCATGCCGGTA	828.1
233	N4_1E3	GCACCGGATCATGCCGGCC	819.8
234	N4_1H1	TAGCCGGATCATGCCGGCT	818.7
235	N4_1G11	TGGCCGGATCATGCCGGCT	817.0

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

236	N4_1D10	GAGCCGGATCATGCCGGCT	813.1
237	N4_1C7	GCCCCGGATCATGCCGGGC	809.0
238	N4_2G9	CATCCGGATCATGCCGGTA	798.5
239	N4_1E10	GGTCCGGATCATGCCGGGC	797.0
240	N4_6F6	GGGCCGGATCATGCCGGTC	796.6
241	N4_3D3	AATCCGGATCATGCCGGTA	792.4
242	N4_1D1	GTTCCGGATCATGCCGGGG	790.8
243	N4_4D4	ATGCCGGATCATGCCGGTA	777.1
244	N4_7D10	GTTCCGGATCATGCCGGTC	765.6
245	N4_3F3	GGGCCGGATCATGCCGGTA	759.8
246	N4_1A12	AGGCCGGATCATGCCGGCT	755.5
247	N4_3A4	TGCCCGGATCATGCCGGGC	754.4
248	N4_7D1	GTGCCGGATCATGCCGGAT	751.6
249	N4_4F5	GCCCCGGATCATGCCGGTA	751.2
250	N4_3G11	GAGCCGGATCATGCCGGAG	743.9
251	N4_7H7	TTGCCGGATCATGCCGGTA	742.8
252	N4_7E12	TCTCCGGATCATGCCGGAG	740.1
253	N4_7G7	GAACCGGATCATGCCGGCG	736.8
254	N4_1H7	TGACCGGATCATGCCGGTA	728.2
255	N4_7G5	CGGCCGGATCATGCCGGCT	727.2
256	N4_1E2	GAACCGGATCATGCCGGCC	724.9
257	N4_3F8	GGACCGGATCATGCCGGGT	723.6
258	N4_4H1	GTACCGGATCATGCCGGGA	719.6
259	N4_4H4	GCACCGGATCATGCCGGGA	719.3
260	N4_3F4	GTTCCGGATCATGCCGGTT	713.7
261	N4_4B5	GGTCCGGATCATGCCGGCG	703.4
262	N4_5A7	GAACCGGATCATGCCGGGT	701.3
263	N4_7C11	GTGCCGGATCATGCCGGCT	692.4
264	N4_5H7	GAGCCGGATCATGCCGGAA	687.0
265	N4_7H1	TGGCCGGATCATGCCGGCC	681.4
266	N4_1A4	AAGCCGGATCATGCCGGCG	679.6
267	N4_7D7	GGACCGGATCATGCCGGCG	674.8
268	N4_4E3	GTGCCGGATCATGCCGGGA	660.7
269	N4_7G9	AGACCGGATCATGCCGGTT	658.4
270	N4_1A7	GGGCCGGATCATGCCGGGT	648.6
271	N4_7H10	AGTCCGGATCATGCCGGAA	648.2

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

272	N4_1B1	CTGCCGGATCATGCCGGCG	645.9
273	N4_3C2	GGGCCGGATCATGCCGGTG	633.8
274	N4_7D5	GACCCGGATCATGCCGGGC	633.1
275	N4_7E11	GCCCCGGATCATGCCGGGA	629.2
276	N4_5G7	GTTCCGGATCATGCCGGGT	621.4
277	N4_1D11	TGCCCCGGATCATGCCGGCA	620.4
278	N4_7A11	GGTCCGGATCATGCCGGGT	617.9
279	N4_1B2	GTACCCGGATCATGCCGGTT	617.8
280	N4_5B9	GAACCCGGATCATGCCGGGA	612.3
281	N4_1E4	GGTCCGGATCATGCCGGAC	609.9
282	N4_7A3	GGACCCGGATCATGCCGGAT	604.3
283	N4_3B11	ACACCCGGATCATGCCGGTG	597.1
284	N4_7B10	CGTCCGGATCATGCCGGAG	593.9
285	N4_7D9	CTGCCGGATCATGCCGGCA	592.8
286	N4_1B5	TAACCCGGATCATGCCGGCA	590.8
287	N4_3C7	AGTCCGGATCATGCCGGTC	582.5
289	N4_7B11	GAACCCGGATCATGCCGGTT	555.1
290	N4_7B7	GACCCGGATCATGCCGGGA	552.6
291	N4_7C7	CCACCCGGATCATGCCGGTG	534.4
292	N4_1H2	CATCCGGATCATGCCGGTG	528.5
293	N4_7B1	TAGCCGGATCATGCCGGTT	518.2
294	N4_7A2	TACCCGGATCATGCCGGTA	518.2
295	N4_1A2	AAGCCGGATCATGCCGGCC	512.7
296	N4_7G4	GTACCCGGATCATGCCGGAA	500.9
297	N4_7E6	GGGCCGGATCATGCCGGAG	493.4
298	N4_1D12	TTACCCGGATCATGCCGGTG	489.6
299	N4_1D5	ACGCCGGATCATGCCGGTT	488.4
300	N4_1C12	TGGCCGGATCATGCCGGAA	471.2
301	N4_1C8	CTACCCGGATCATGCCGGCA	467.1
302	N4_3F10	AGCCCGGATCATGCCGGGA	464.5
303	N4_1H11	TTCCCGGATCATGCCGGAA	452.0
304	N4_1B7	TCGCCGGATCATGCCGGTA	445.0
305	N4_7F5	AGCCCGGATCATGCCGGGG	436.3
306	N4_7G11	CGGCCGGATCATGCCGGCG	430.4
307	N4_7A6	TCACCCGGATCATGCCGGTA	424.0
308	N4_7E3	ATGCCGGATCATGCCGGCG	414.2

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

309	N4_7A5	AGACCGGATCATGCCGGCA	402.4
310	N4_7E8	ACTCCGGATCATGCCGGAT	393.6
311	N4_7D2	AAGCCGGATCATGCCGGTG	388.9
312	N4_2E10	TGACCGGATCATGCCGGCG	361.5
313	N4_7E4	TCACCGGATCATGCCGGCG	348.8
314	N4_1H12	ATACCGGATCATGCCGGGA	344.8
315	N4_1C1	AAGCCGGATCATGCCGGAC	342.9
316	N4_7H5	ATCCCGGATCATGCCGGGG	341.6
317	N4_1A10	ATACCGGATCATGCCGGCG	337.4
318	N4_1F3	CCCCCGGATCATGCCGGGA	333.5
319	N4_7F10	GGTCCGGATCATGCCGGTG	319.6
320	N4_1A3	CGGCCGGATCATGCCGGAG	317.2
321	N4_7F2	TATCCGGATCATGCCGGAA	302.5
322	N4_1G1	AATCCGGATCATGCCGGTC	282.3
323	N4_1H10	TATCCGGATCATGCCGGTG	279.0
324	N4_7H8	TGCCCCGGATCATGCCGGCC	276.6
325	N4_1H8	TAGCCGGATCATGCCGGAA	246.1
326	N4_1F4	CAACCGGATCATGCCGGGT	245.3
327	N4_1C9	TGGCCGGATCATGCCGGAG	241.2
328	N4_7E10	AGTCCGGATCATGCCGGTT	238.9
329	N4_7C1	TTGCCGGATCATGCCGGGA	238.8
330	N4_1E5	TGACCGGATCATGCCGGAT	235.5
331	N4_1E7	TATCCGGATCATGCCGGGC	232.9
332	N4_7G6	CGCCCCGGATCATGCCGGCA	218.0
333	N4_7F12	TCACCGGATCATGCCGGGA	215.9
334	N4_1H4	GTCCCCGGATCATGCCGGGG	214.7
335	N4_7H11	ATGCCGGATCATGCCGGAG	207.8
336	N4_7E7	GTTCCGGATCATGCCGGAA	205.9
337	N4_1F1	TGTCCGGATCATGCCGGTT	199.3
338	N4_1G9	AAACCGGATCATGCCGGCC	174.6
339	N4_7E1	TCACCGGATCATGCCGGAG	170.7
340	N4_7C10	ACTCCGGATCATGCCGGGA	153.8
341	N4_1B3	TCGCCGGATCATGCCGGGA	151.6
342	N4_7D3	TGTCCGGATCATGCCGGGG	150.9
343	N4_1D4	TTTCCGGATCATGCCGGGT	144.5
344	N4_7D6	TCTCCGGATCATGCCGGTG	144.4

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

345	N4_1A8	TTTCCGGATCATGCCGGTC	135.7
346	N4_1B11	TAGCCGGATCATGCCGGGA	135.0
347	N4_7A7	AAGCCGGATCATGCCGGGG	120.1
348	N4_1G4	TAGCCGGATCATGCCGGGT	115.8
349	N4_7B5	GTCCCGGATCATGCCGGTG	108.9
350	N4_7F6	AGGCCGGATCATGCCGGTG	84.5
351	N4_1F9	CCACCGGATCATGCCGGCT	82.6
352	N4_1D8	ATTCCGGATCATGCCGGTG	80.7
353	N4_1A5	CAGCCGGATCATGCCGGGT	73.5
354	N4_7A4	ATTCCGGATCATGCCGGGT	58.9
355	N4_1G10	CTCCCGGATCATGCCGGTG	54.5
356	N4_1B9	ATTCCGGATCATGCCGGAC	21.1
357	N4_1D3	AGGCCGGATCATGCCAGAT	6.5

10

20

【 0 6 0 6 】

30

40

50

【表 6 - 1】

表 4. 配列CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATGGAAG
CAATCGACCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGX₁₆X₁₇X₁₈X₁₉
X₂₀X₂₁CCGGCGCAGGGAG (配列番号 6) に提供されるようにX₁₆X₁₇X₁₈X₁₉
X₂₀X₂₁位のヌクレオチドをランダム化した、ライブラリ N 5 から同定されたアプタマー配
列。L 5 (X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁) に対して以下の表 4 に提供される配列は、配列番号
6 に提供される状況下にある。

配列番号	アプタマー 名	配列 L5	倍率
6		X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁	
1	12C6-1	ATCATG	
358	N5_12G6	TATGTC	2750.8
359	N5_6D12	TAGGAC	2318.1
360	N5_13E8	TACGGT	2096.6
361	N5_12F4	GTGAGG	2096.2
362	N5_7B1	GTAAGG	2062.3
363	N5_12E5	TAGGCT	1898.6
364	N5_14G11	TCGGTC	1775.3
365	N5_7F1	ATGTTC	1744.2
366	N5_7E1	AGAGTG	1733.0
367	N5_11D10	AAATAG	1719.3
368	N5_6F5	GTGATG	1665.4
369	N5_3F11	TATGGT	1628.3
370	N5_13G10	TGGCGG	1604.0
371	N5_11B9	TCAGTC	1595.4
372	N5_1E12	CAGCCG	1588.2
373	N5_7G11	GTTGAT	1533.8
374	N5_9H1	GTACGT	1494.7
375	N5_6H10	GTAAGA	1466.1
376	N5_9E12	TGGACG	1458.4
377	N5_6B4	ACGTTG	1435.7
378	N5_1B6	TATGTG	1381.8
379	N5_7C4	TTGGTA	1363.2
380	N5_7B10	TCAGTT	1361.5
381	N5_5B7	GTTGGG	1317.2
382	N5_7C8	ATCGAG	1313.8
383	N5_1G6	TATGGC	1311.6

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

384	N5_13H3	GTGAGT	1288.5
385	N5_8F11	AGTTAG	1282.8
386	N5_7F8	TTGGGA	1279.7
387	N5_6G10	GTTGCA	1262.0
388	N5_7C3	ACTTCA	1258.4
389	N5_6A8	CAAGTA	1252.2
390	N5_2G10	GCTGGT	1249.7
391	N5_7F4	ATGTAC	1239.0
392	N5_5C4	GATTAG	1235.2
393	N5_7E2	GTACAG	1234.5
394	N5_1G9	GTTTAG	1230.3
395	N5_11F4	AACAGT	1230.1
396	N5_6F4	AGAGAT	1226.6
397	N5_7A7	GCTTGT	1226.2
398	N5_3D3	TATAGA	1222.7
399	N5_8H7	GTGAGC	1218.5
400	N5_7D6	TCGTTG	1210.5
401	N5_13G12	GCTTCG	1199.4
402	N5_13G5	CGGTTA	1198.5
403	N5_7H12	CATGCG	1194.5
404	N5_8H1	TAGGTT	1191.9
405	N5_11G11	GGTAGT	1186.4
406	N5_7D5	TGGTCG	1182.3
407	N5_12F12	CGCATA	1169.8
408	N5_7E6	TAACCG	1153.2
409	N5_7D4	GCTGTC	1144.9
410	N5_13C10	AACGTA	1144.6
411	N5_8D1	ACTGTG	1139.6
412	N5_7F3	TAGAGC	1139.0
413	N5_14B10	AATGCA	1133.0
414	N5_5E4	AGAGTT	1116.0
415	N5_7F5	GTACTA	1115.4
416	N5_7D2	GTTCCG	1114.3
417	N5_7A10	TAGTCG	1108.5
418	N5_2B5	GCATAA	1107.3
419	N5_7H11	TAACAC	1105.2

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

420	N5_2F12	GGCAGC	1100.0
421	N5_1E11	TGTGAA	1095.6
422	N5_9C12	ATTGGA	1094.3
423	N5_7C10	CTGTTT	1090.7
424	N5_8A9	CGATAT	1090.4
425	N5_7D3	ATGGTC	1075.7
426	N5_12G2	AATGTT	1074.1
427	N5_1F10	TCTACG	1071.3
428	N5_5B6	TAAAGC	1068.3
429	N5_8G9	GCGTTG	1066.5
430	N5_3A3	TAACAG	1066.3
431	N5_1F12	TAAATT	1057.8
432	N5_2C5	AAAGAG	1055.1
433	N5_2D8	TAGCGA	1047.3
434	N5_7B7	TGAATG	1046.3
435	N5_12G11	TGGTAG	1043.8
436	N5_2E11	ATGCTA	1038.1
437	N5_6E6	CAGTCA	1032.8
438	N5_1H7	TGATGG	1032.1
439	N5_9C2	GTTGAG	1027.6
440	N5_1E10	GTTGTA	1026.1
441	N5_6A6	CCTGAA	1024.4
442	N5_9E6	GTTTGG	1020.7
443	N5_2F10	AGTAGT	1014.6
444	N5_1B10	AGTTTG	1013.6
445	N5_2B11	GGTTCA	1009.4
446	N5_6G6	ACAGTG	1004.4
447	N5_1G10	CGCATG	1000.2
448	N5_7A4	GGTATC	988.3
449	N5_1C5	ACACTA	966.1
450	N5_1F4	AAATGT	958.5
451	N5_7E9	GCAGGT	955.3
452	N5_6F6	CGGTTG	953.0
453	N5_7G7	AATTCC	952.9
454	N5_8F1	ACAGTA	951.8
455	N5_14D10	GTCAAT	950.5

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

456	N5_1B9	ATCAGG	941.5
457	N5_7A11	GACCTA	941.2
458	N5_9G7	TTGCTT	937.7
459	N5_7F2	GCAGTT	937.4
460	N5_7G1	TCAAGA	935.4
461	N5_7E12	TTGAAG	933.3
462	N5_11G4	CGGGGG	931.9
463	N5_12F11	GAATGG	926.7
464	N5_14H11	CACACA	918.4
465	N5_1C9	GTGAAT	915.3
466	N5_3F9	AAAGGT	909.7
467	N5_7D1	AGTTTT	909.3
468	N5_7B12	GTGTCA	908.4
469	N5_7G6	TAAACT	902.8
470	N5_7F6	GAATCT	898.5
471	N5_14B9	ATATGG	897.5
472	N5_7A1	CACTCT	897.3
473	N5_2C2	GTTAGG	894.7
474	N5_7G12	GTTCCA	894.6
475	N5_3F10	ATAGGG	894.3
476	N5_1G8	AATGTG	888.7
477	N5_2D10	CTCAGG	884.5
478	N5_7E8	AAGTGG	879.9
479	N5_9F1	TTGTGT	875.6
480	N5_7B6	CATGTG	875.4
481	N5_7E7	TTGCTG	870.2
482	N5_7E5	CCGGTT	867.4
483	N5_8F3	GGTAAT	862.0
484	N5_7H9	CGTGAA	860.0
485	N5_7H5	CGCTTG	848.4
486	N5_1D5	ATTAGG	841.7
487	N5_7G9	AGCGGT	841.7
488	N5_3C8	GACAGA	835.1
489	N5_1E4	CAACGA	834.9
490	N5_3D8	CATGGA	824.4
491	N5_8C7	GTCTCC	817.6

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

492	N5_1A9	AGTCCT	804.7
493	N5_1G5	GGGATC	804.6
494	N5_7G3	GAGTTG	799.3
495	N5_1A11	GAGACC	793.5
496	N5_9B8	GAACGG	792.8
497	N5_1B3	CCGTTG	792.0
498	N5_1G11	TGGCAG	789.0
499	N5_7A5	TCATTA	785.5
500	N5_1H10	TGGAAT	781.1
501	N5_1B5	AACCGC	780.8
502	N5_7B5	TGCGTG	779.9
503	N5_7G8	TTGCCC	775.6
504	N5_5D7	TTCGGG	769.4
505	N5_1H3	GATGCA	764.7
506	N5_1D10	TTCCAA	762.7
507	N5_7D11	TATCTA	759.2
508	N5_3G12	AAGTTA	756.5
509	N5_7B3	TTCCGT	756.3
510	N5_3C10	TAGTCA	751.6
511	N5_13D5	CACCAT	749.4
512	N5_1B2	GATTAC	747.7
513	N5_2D9	GTTCTA	735.9
514	N5_7E11	CAAATT	732.1
515	N5_1E2	AGTATC	728.6
516	N5_9G5	TGTAAA	725.3
517	N5_6E1	TTTGGT	725.2
518	N5_13D1	AGGCAG	722.9
519	N5_3A2	ACAGGT	718.0
520	N5_2G5	TTAATT	715.9
521	N5_4H7	ACGTAG	714.3
522	N5_1H9	TCTTGG	714.2
523	N5_7H10	TTAAGA	713.9
524	N5_5D9	GCCAAG	712.5
525	N5_1E9	TCTAAG	699.7
526	N5_1D3	CGAATA	697.1
527	N5_6A3	ACTTAG	696.0

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

528	N5_1C10	GCCATC	693.8
529	N5_7B8	TGCCAT	693.7
530	N5_7A9	TGTATT	692.6
531	N5_1E8	TTGTAA	691.8
532	N5_1C2	GTTTCT	687.2
533	N5_2E6	TCAAAC	685.6
534	N5_1F9	TTTATT	685.1
535	N5_1D6	ATATAA	684.9
536	N5_1E5	GCGTCA	681.3
537	N5_1A10	GCGCTC	674.4
538	N5_1A2	CCAGCG	672.2
539	N5_1A1	ACTGCA	670.2
540	N5_1C4	GTGGCA	665.0
541	N5_1C3	TCAATG	664.1
542	N5_1B7	CGGTGC	662.1
543	N5_1A7	GTTGCG	659.9
544	N5_6B6	CACCGA	659.7
545	N5_1H6	TTGCAC	654.9
546	N5_1B8	GGATGA	645.1
547	N5_7F9	ACTTGT	642.4
548	N5_1A6	TCGAGA	638.8
549	N5_7C12	GGCTCC	628.9
550	N5_7C2	CCCCTT	627.0
551	N5_1H8	GTCCAG	622.6
552	N5_1A8	GATAAG	589.4
553	N5_4D7	GCTACA	588.1
554	N5_7F10	TTCTCA	572.7
555	N5_1E1	GTTATG	566.4
556	N5_4D8	ATGTAA	565.6
557	N5_1D2	TCGTGG	561.3
558	N5_7H4	CTAATG	560.0
559	N5_1F1	TTTGTC	557.2
560	N5_7G10	CTGCGT	530.8
561	N5_1D4	TCGGAG	522.9
562	N5_1G2	GCCATG	517.7
563	N5_7C7	AGGCGA	489.1

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

564	N5_1C7	TAGTCT	485.7
565	N5_1C11	AGTGGG	484.2
566	N5_1H4	CTAGAA	482.5
567	N5_1B11	TGCACA	477.1
568	N5_7C11	GGCGGT	459.9
569	N5_1F2	TCTAAA	415.1
570	N5_1H11	ACCCGC	413.6
571	N5_1H2	GGGACA	386.6
572	N5_1D8	ATATTT	383.5
573	N5_1E6	CTTGTT	365.1
574	N5_7H3	TGGGGG	360.5
575	N5_7F11	GTCGGG	339.7
576	N5_1D1	AAGACG	321.6
577	N5_7A6	TGCATT	314.5
578	N5_1A5	GGGAGT	291.5
579	N5_1F6	TTATTG	247.6
580	N5_1A3	ACGGGA	228.1
581	N5_1F3	ATAATG	212.8
582	N5_7H1	GGGTCG	158.5
583	N5_7D7	TGCGAC	105.5
584	N5_7C1	AGGGGG	87.5
585	N5_1G4	CGCCCA	86.0
586	N5_1H1	AAGGAT	84.1
587	N5_1D11	GGACGC	4.8
588	N5_1D12	CGGTAA	3.6

10

20

30

40

50

【 0 6 0 7 】

【表 7 - 1】

表5. 配列CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATGGAAGCAATCGACCATCGACCCNNNNNNNCCTGATCCGGATCATGCCGGCGCAGGGAG (配列番号589) に提供されるようにNで示した位置のヌクレオチドをランダム化した、ライブラリN2から同定されたアプタマー配列。J2-3、P3-J3-3a、及びJ3a-2に対して以下の表5に提供される配列は、配列番号589に提供される状況下にある。

配列番号	アプタマー名	配列			倍率
		J2-3	P3-J3-3a	J3a-2	
589		NN	NGAGAN	NN	
1	12C6-1	GA	TGAGAG	GA	
590	N2_2A1	AG	CGAGAA	CT	1.0
591	N2_2B1	GA	TGAGAA	CT	1.0
592	N2_2C1	TA	TGAGAA	AG	1.1
593	N2_2D1	TT	AGAGAG	GT	1.1
594	N2_2F1	AG	CGAGAT	CA	1.1
595	N2_2G1	GA	AGAGAT	TA	1.7
596	N2_2H1	GT	GGAGAC	CC	1.1
597	N2_2A2	TC	GGAGAT	TA	0.7
598	N2_2C2	GG	GAGATG	GC	0.8
599	N2_2D2	TG	GAGAGG	GC	1.1
600	N2_2E2	GA	TGAGAA	GG	1.1
601	N2_2F2	GA	GGAGAA	GG	1.0
602	N2_2G2	AA	TGAGAA	AC	1.3
603	N2_2H2	TA	TGAGAA	GG	0.8
604	N2_2A3	CG	CGAGAT	TA	0.8
605	N2_2B3	CG	AGAGAA	TT	1.2
606	N2_2C3	TG	TGAGAC	TT	1.1
607	N2_2D3	AT	TGAGAA	CA	0.9
608	N2_2E3	GA	CGAGAA	TA	1.3
609	N2_2F3	AC	AGAGAA	AG	0.9
610	N2_2G3	AC	TGAGAA	TG	1.1
611	N2_2H3	AG	GGAGAC	AG	1.0
612	N2_2B4	TA	GGAGAG	GA	0.8
613	N2_2C4	GT	TGAGAC	TA	2.0
614	N2_2D4	AG	AGAGAG	GG	0.8
615	N2_2E4	TC	TGAGAC	GA	0.7

【表 7 - 2】

616	N2_2F4	GG	GAGAGG	GC	1.2
617	N2_2G4	CT	GGAGAG	TG	1.1
618	N2_2H4	TA	CGAGAT	GC	1.0
619	N2_2A5	TC	CGAGAA	TG	1.0
620	N2_2B5	TT	GGAGAG	AC	1.0
621	N2_2C5	TC	AGAGAA	CT	1.0
622	N2_2D5	TG	AGAGAT	GG	0.6
623	N2_2E5	AG	TGAGAC	AG	1.2
624	N2_2G5	TG	TGAGAT	GA	1.0
625	N2_2A6	GA	GGAGAT	AC	1.2
626	N2_2B6	AT	TGAGAC	TG	0.8
627	N2_2C6	GA	AGAGAT	GT	0.9
628	N2_2D6	TC	AGAGAA	GG	1.1
629	N2_2E6	TG	GGAGAA	TG	0.9
630	N2_2F6	TT	GGAGAA	GT	1.0
631	N2_2G6	TT	TGAGAA	AT	1.1
632	N2_2H6	CC	CGAGAG	GA	1.0
633	N2_2A7	AT	AGAGAT	TT	0.9
634	N2_2B7	GT	TGAGAC	GG	1.2
635	N2_2C7	AT	TGAGAG	GG	0.8
636	N2_2D7	CG	AGAGAT	AG	1.0
637	N2_2E7	GC	CGAGAG	TC	1.1
638	N2_2F7	TA	TGAGAT	AG	1.0
639	N2_2G7	TC	TGAGAT	AT	1.0
640	N2_2H7	AA	GGAGAA	CT	0.8
641	N2_2A8	TG	GGAGAT	GA	1.0
642	N2_2B8	TG	GGAGAG	TT	1.1
643	N2_2C8	GC	AGAGAG	CA	0.9
644	N2_2D8	GT	CGGAGA	CT	1.1
645	N2_2E8	GT	CGAGAG	CC	0.9
646	N2_2F8	AC	AGAGAA	CT	1.0
647	N2_2G8	AT	GGAGAT	TA	1.1
648	N2_2H8	GC	AGAGAG	TT	1.4
649	N2_2A9	TA	TGAGAG	GC	1.1
650	N2_2B9	AG	GGAGAT	GG	1.1
651	N2_2C9	GA	CAGAGA	CA	1.2

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

652	N2_2D9	GG	CAGAGA	CG	1.0
653	N2_2G9	TT	GGAGAT	TA	1.3
654	N2_2H9	GT	TGAGAG	AT	0.9
655	N2_2A10	TT	AGAGAT	AA	1.1
656	N2_2B10	AC	AGAGAA	GC	1.1
657	N2_2C10	AA	AGAGAC	TG	1.2
658	N2_2D10	GT	AGAGAA	TA	1.2
659	N2_2E10	GA	AGAGAT	TC	1.2
660	N2_2F10	TA	GGAGAG	GG	1.1
661	N2_2G10	TT	CGAGAC	GG	1.0
662	N2_2H10	TT	GGAGAG	TT	1.0
663	N2_2A11	AA	CGAGAG	AT	1.1
664	N2_2B11	AT	AGAGAG	TC	1.2
665	N2_2D11	GG	AGAGAA	GA	1.3
666	N2_2F11	GT	CGAGAG	AT	1.1
667	N2_2G11	GT	AGAGAT	GT	0.9
668	N2_2H11	TT	GGAGAG	GT	1.2
669	N2_2A12	TT	GGAGAA	GA	1.1
670	N2_2B12	GG	CGAGAT	AG	1.0
671	N2_2C12	TC	AGAGAC	CT	1.1
672	N2_2D12	TC	CGAGAT	AG	1.1
673	N2_2E12	AA	TGAGAA	GG	1.3
674	N2_2F12	TA	TGAGAG	CC	1.0

10

20

30

40

50

【 0 6 0 8 】

【表 8 - 1】

表 6. 追加の配列。

配列番号	説明	配列
1	12C6-1 アプタマー	CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATG GAAGCAATCGACCATCGACCCATTGCACCTGAT CCGGATCATGCCGGCGCAGGGAG
2	ランダム化ヌクレオチドを有する 12C6-1 アプタマー(N1、N3~N5 ライブラリの組み合わせ)	CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATG GAAGX ₁ X ₂ AX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ CCATCGACCCX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ CCTX ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ CCGGX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ CCGGX ₂₂ X ₂₃ CAGGGAG
3	ランダム化ヌクレオチドを有する 12C6-1 アプタマー(N3 ライブラリ)	CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATG GAAGX ₁ X ₂ AX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ CCATCGACCCATTGCACCT GATCCGGATCATGCCGGCGCAGGGAG
4	ランダム化ヌクレオチドを有する 12C6-1 アプタマー(N1 ライブラリ)	CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATG GAAGCAATCGACCATCGACCCX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ CCTGATCCGGATCATGCCGGCGCAGGG AG
5	ランダム化ヌクレオチドを有する 12C6-1 アプタマー(N4 ライブラリ)	CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATG GAAGCAATCGACCATCGACCCATTGCACCTX ₁₃ X ₁₄ X ₁₅ CCGGATCATGCCGGX ₂₂ X ₂₃ CAGGGAG
6	ランダム化ヌクレオチドを有する 12C6-1 アプタマー(N5 ライブラリ)	CTGGGGAGTCCTTCATGCGGGGCTGAGAGGATG GAAGCAATCGACCATCGACCCATTGCACCTGAT CCGGX ₁₆ X ₁₇ X ₁₈ X ₁₉ X ₂₀ X ₂₁ CCGGCGCAGGGAG
675	12C6-1 選択的スプライシング遺伝子調節カセット 大文字:12C6 アプタマー、 灰色:選択的エクソン、 下線:リボスイッチステム形成配列、 斜体:5' イントロン及び 3' イントロン	<i>gtgagtcctatgggaccccttgatgtttctttcccttctttctatggtaagttcat</i> <i>gtcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaaatacagg</i> <i>gtaattttgcatgtgtaattttaaaaaatgctttctttctttaataactttttgtttat</i> <i>cttatttctaataactttccctaactctttctttcaggggaataatgatacaatgtat</i> <i>catgccgagtaacgctgtttcttaactgttaggaatgaattcagatattccag</i> <i>agaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggaatgtCTGGGGAGTCCT</i> <i>TCATGCGGGGCTGAGAGGATGGAAGCAATCGA</i> <i>CCATCGACCCATTGCACCTGATCCGGATCATGC</i> <i>CGGCGCAGGGAGacattacgcaccattctaagaataaacgtgat</i> <i>aatttctgggttaaggcaatagcaataatttctgcatalaaatatttctgcatala</i> <i>aattgtaactgatgtaagagggttcatattgctaatagcagctacaatccagct</i> <i>accatttctgttttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtcgaagc</i> <i>taggcccttttgctaatacatgttcataccttcttcttctccacag</i>

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

676	選択的スプライシング 遺伝子調節カセット -X-は、本明細書に開示 されるアプタマーをコ ードする配列を表し、 選択的エクソンには下 線が引かれている	GTGAGTCTATGGGACCCCTTGATGTTTTCTTTCCC CTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAA GGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCA AATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAA AATGCTTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTAT CTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTC AGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCGAGT AACGCTGTTTCTCTAACTTGTAGGAATGAATTC <u>AGATATTTCCAGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCA</u> <u>GTAGAAG</u> gtaatgt-X- acattacGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAAT TTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATTTCTGCAT ATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAC TGATG TAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAA TCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGG GATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGG CCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTT CCTCCACAG.
677	修飾 DHFR エクソン 2	GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAA AAAATCTTCAGTAGAAG
678	修飾 DHFR エクソン 2	GAATGAATTCAGATATTTCCAGAGAATGAAAAA AAATCTTCAGTAGAAG
679	thiC	GUAAUGUGUCGGAGUGCCUUAAGGGAUUAUUC CCCUAAAGCUGAGACCGCAUUGCGGGAUCCGU UGAACCUGAUCAGGCUAAUACCUGCGAAGGGA ACACAUUAC
680	thiM	GUAAUGUCUCGGGGUGCCCUUCUGCGUGAAGG CUGAGAAAUAACCCGUAUCACCUGAUCUGGAUA AUGCCAGCGUAGGGAAGACAUUAC

10

20

30

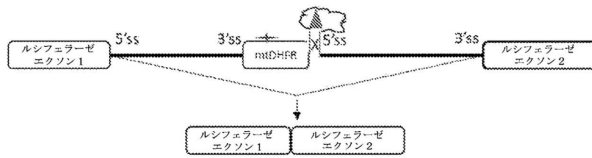
40

50

【図面】

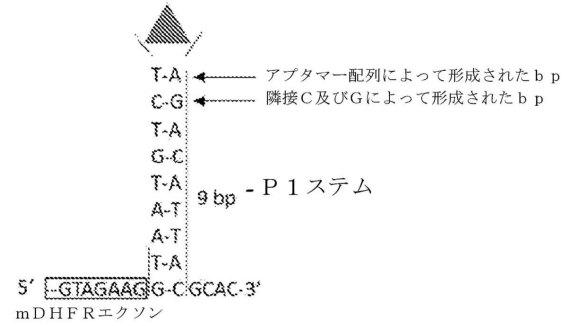
【図 1 a】

図 1 a



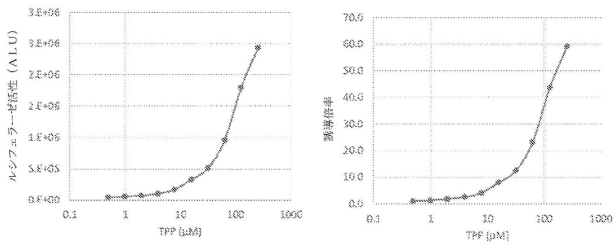
【図 1 b】

図 1 b



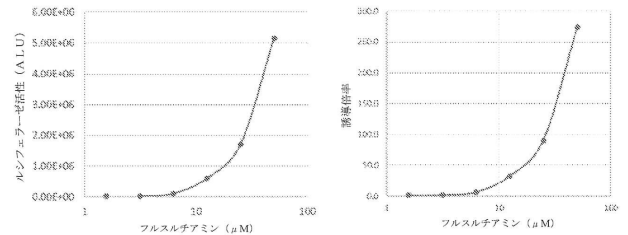
【図 1 c】

図 1 c



【図 1 d】

図 1 d



10

20

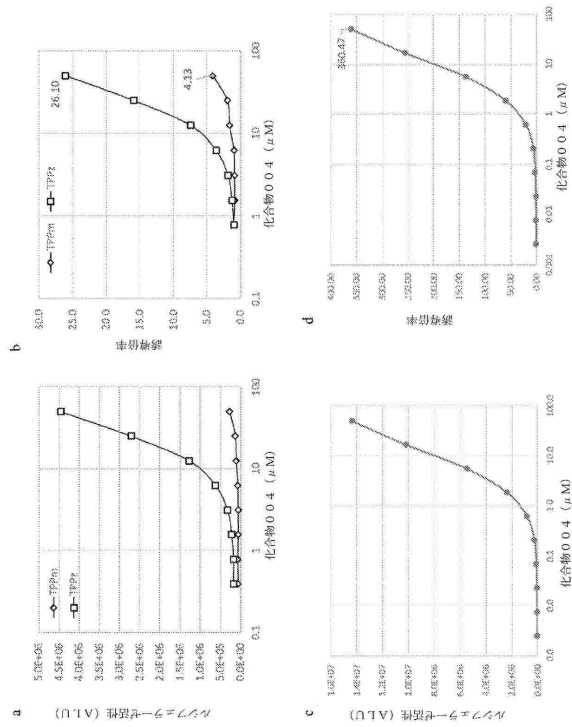
30

40

50

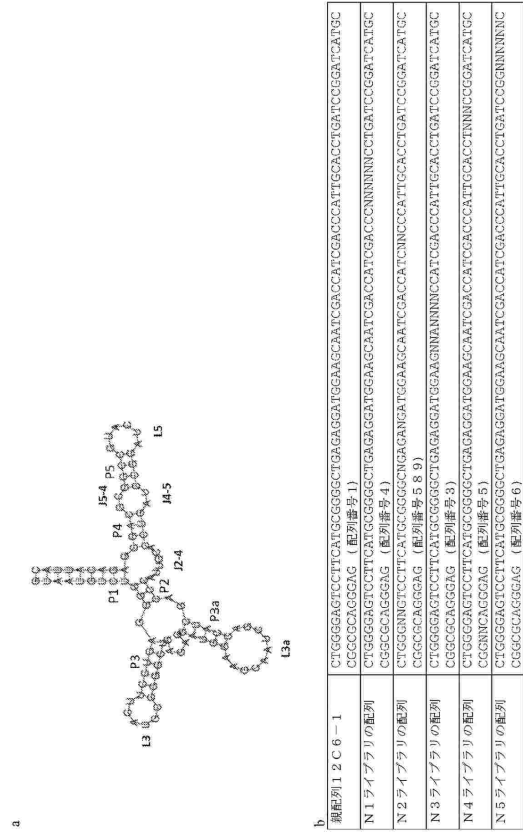
【圖 2】

图 2



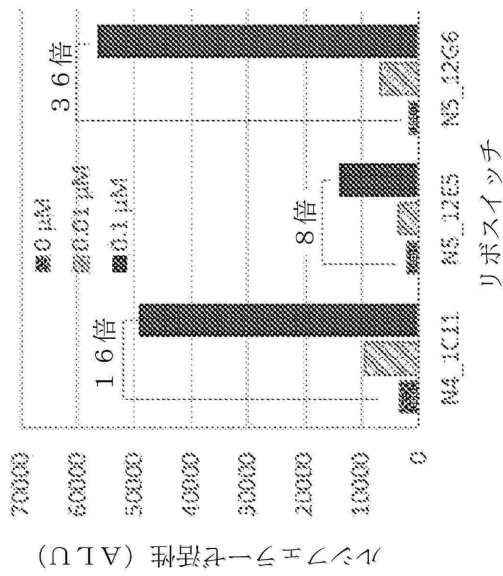
【圖 3】

图 3



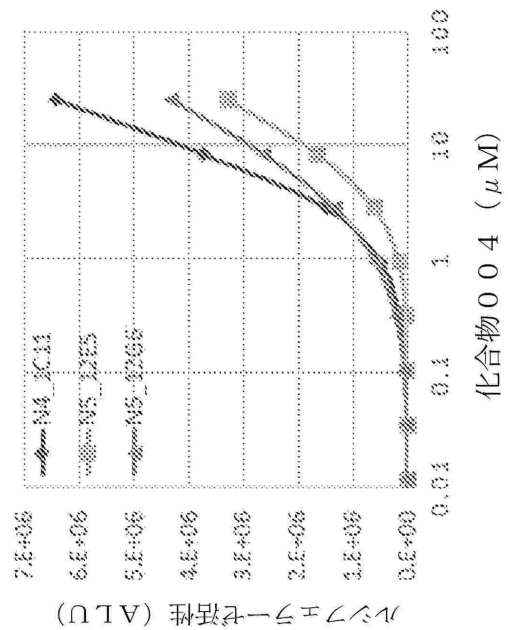
【図 4 a】

图 4 a



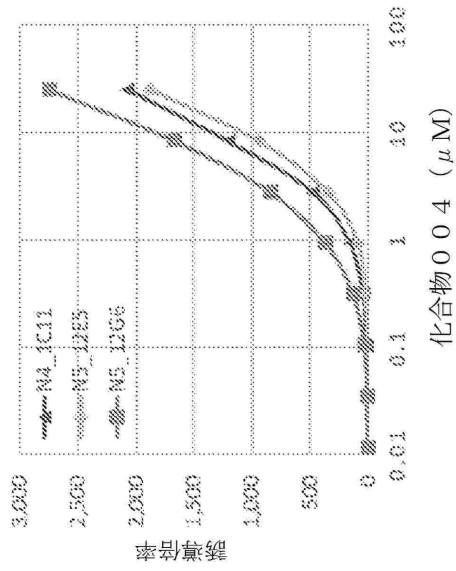
【図 4 b】

图 4 b



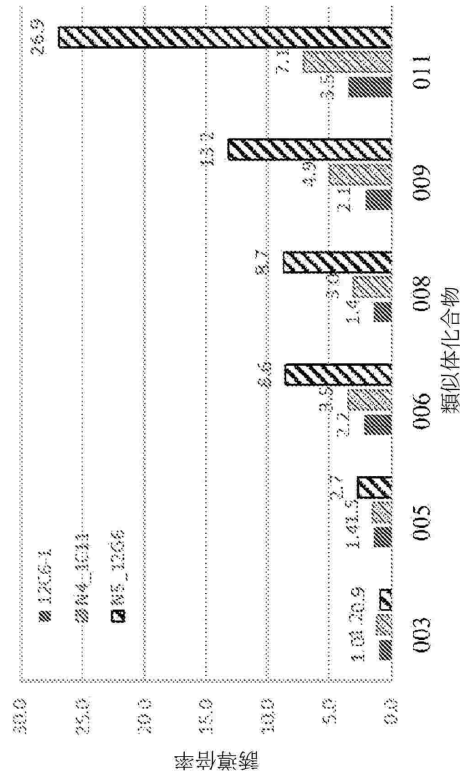
【図 4 c】

図 4 c



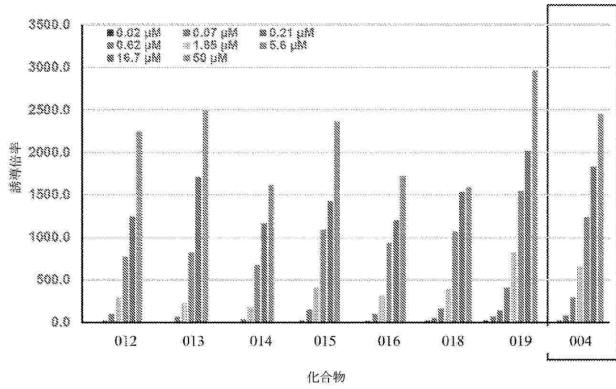
【図 4 d】

図 4 d



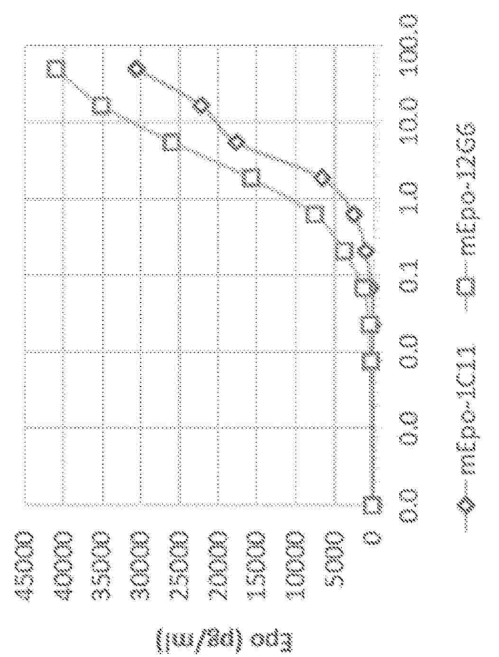
【図 4 e】

図 4 e



【図 5 a】

図 5 a



10

20

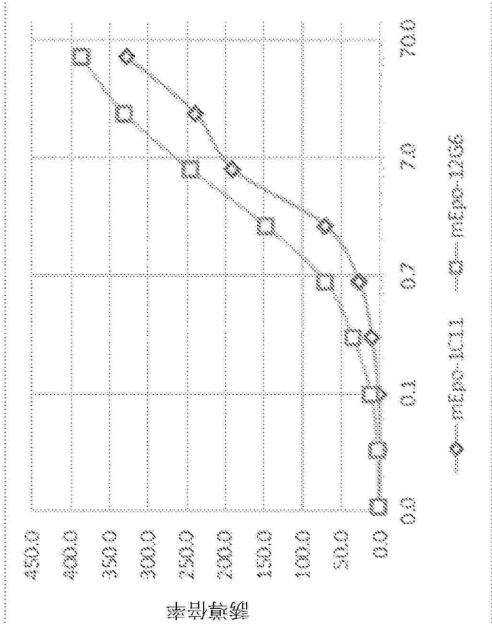
30

40

50

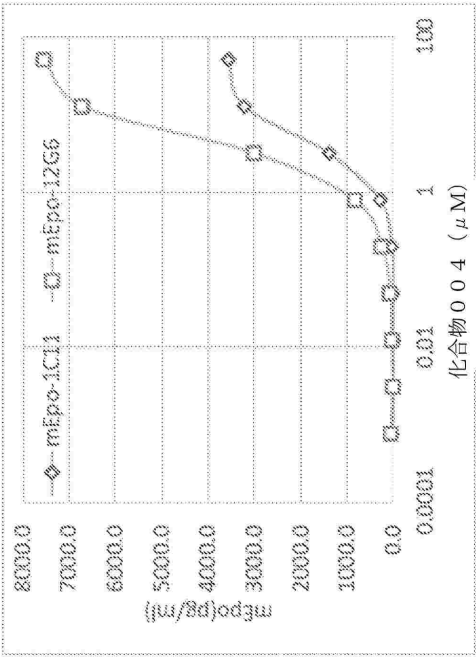
【図 5 b】

図 5 b



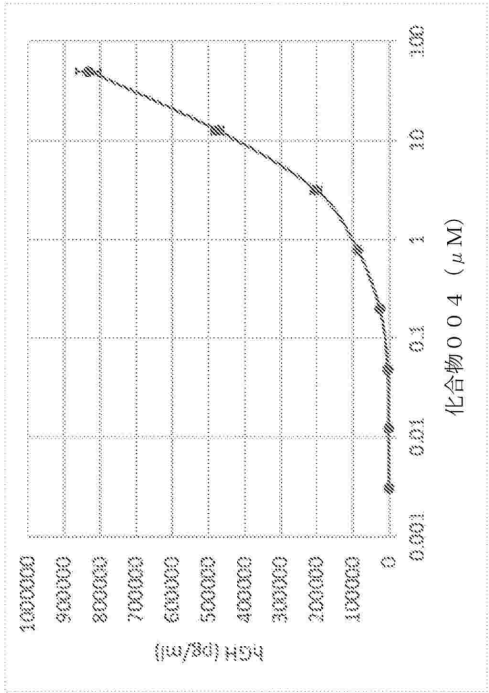
【図 5 c】

図 5 c



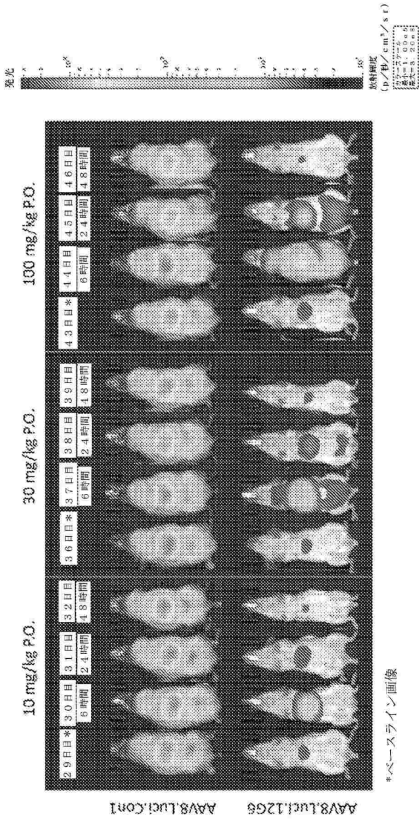
【図 5 d】

図 5 d



【図 6 a】

図 6 a



10

20

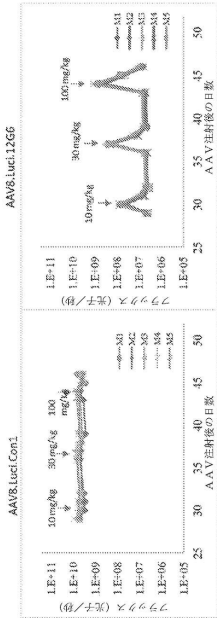
30

40

50

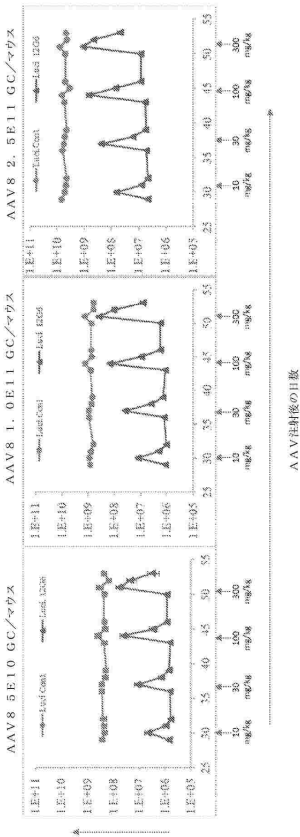
【図 6 b】

図 6 b



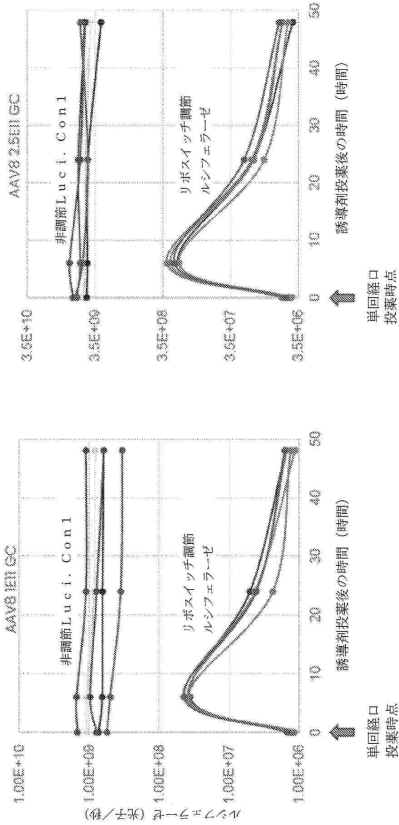
【図 6 c】

図 6 c



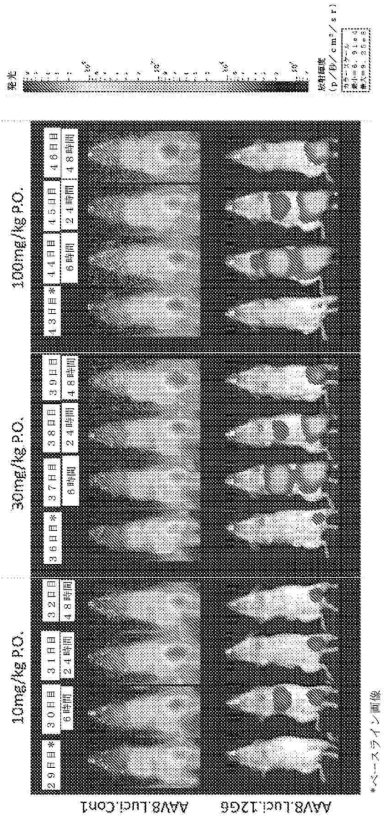
【図 6 d】

図 6 d



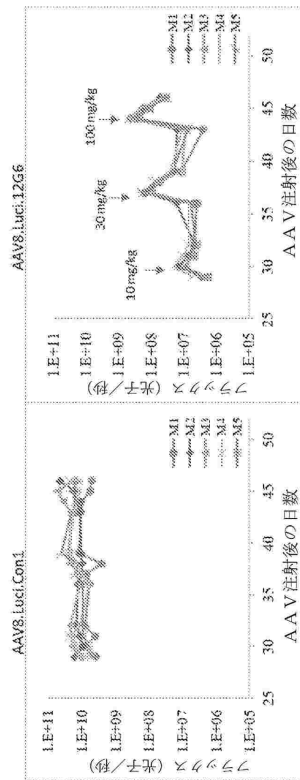
【図 7 a】

図 7 a



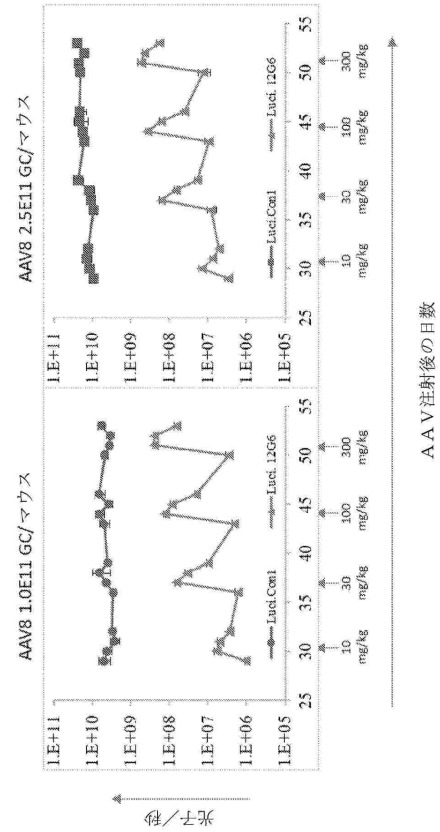
【図 7 b】

図 7 b



【図 7 c】

図 7 c

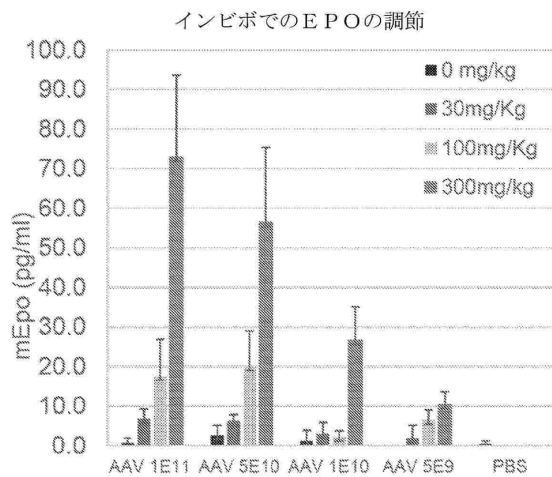


10

20

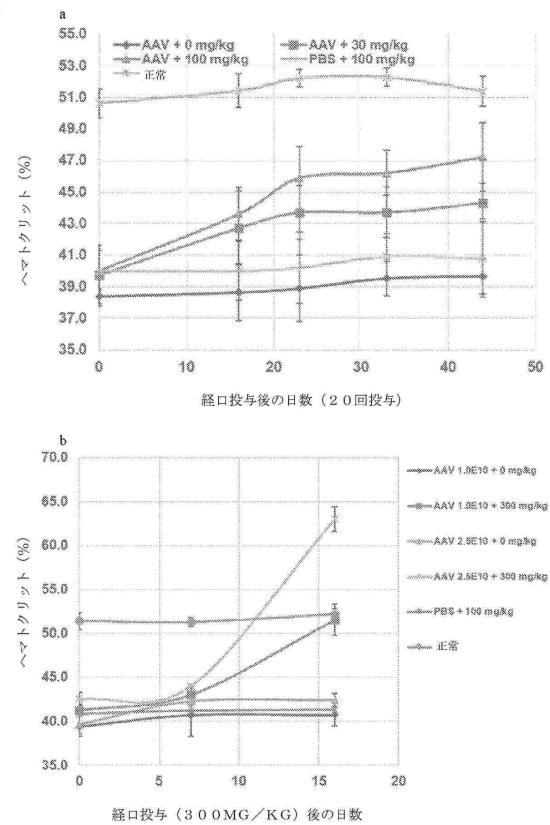
【図 8】

図 8



【図 9】

図 9



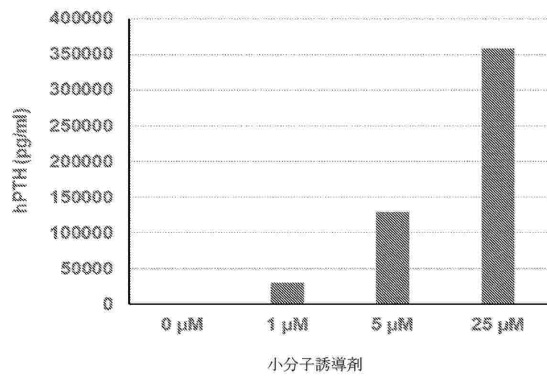
30

40

50

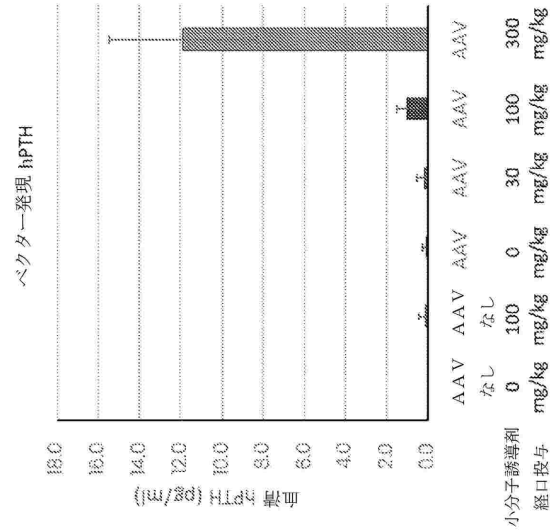
【図 10 a】

図 10 a



【図 10 b】

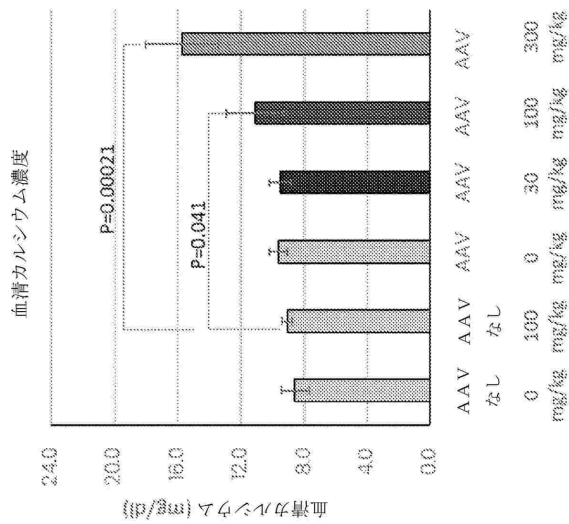
図 10 b



10

【図 10 c】

図 10 c



30

【配列表】

2024546954000001.xml

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/115 C12N15/63
ADD.

B. FIELDS SEARCHED

EPO-Internal, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

Bonello, Steve

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2022/000762

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2022/000762**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1, 20 (completely); 12-19, 21-23, 25, 26, 28-61 (partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/000762

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020/056182 A1 (GUO XUECUI [US]) 20 February 2020 (2020-02-20) par.4, 40, 43, 48, 54 -----	1, 12-23, 25, 26, 28-61
A	US 2013/198900 A1 (AHARONI ASAPH [IL] ET AL) 1 August 2013 (2013-08-01) par.6 -----	1, 12-23, 25, 26, 28-61

International Application No. PCT/IB2022/000762

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 20(completely); 12-19, 21-23, 25, 26, 28-61(partially)

A polynucleotide cassette for regulating the expression of a target gene, comprising a sequence encoding an aptamer based on SEQ ID NO.2, and having substitutions as defined in claim 1.

2. claims: 2-4(completely); 12-19, 21-23, 25, 26, 28-61(partially)

A polynucleotide cassette for regulating the expression of a target gene, comprising a sequence encoding an aptamer based on SEQ ID NO.4, and having substitutions as defined in claim 2.

3. claims: 5-7, 24(completely); 12-19, 21-23, 25, 26, 28-61(partially)

A polynucleotide cassette for regulating the expression of a target gene, comprising a sequence encoding an aptamer based on SEQ ID NO.3, and having substitutions as defined in claim 5.

4. claims: 8, 9, 27(completely); 12-19, 21-23, 25, 26, 28-61(partially)

A polynucleotide cassette for regulating the expression of a target gene, comprising a sequence encoding an aptamer based on SEQ ID NO.5, and having substitutions as defined in claim 8.

5. claims: 10, 11(completely); 12-19, 21-23, 25, 26, 28-61(partially)

A polynucleotide cassette for regulating the expression of a target gene, comprising a sequence encoding an aptamer based on SEQ ID NO.6, and having substitutions as defined in claim 10.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/000762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021191680 A1	30-09-2021	AU 2021243743 A1	24-11-2022
		BR 112022019284 A2	14-02-2023
		CA 3172864 A1	30-09-2021
		CN 115698292 A	03-02-2023
		EP 4127176 A1	08-02-2023
		IL 296711 A	01-11-2022
		JP 2023519266 A	10-05-2023
		KR 20230019816 A	09-02-2023
		WO 2021191680 A1	30-09-2021
US 2020032253 A1	30-01-2020	AU 2017213845 A1	06-09-2018
		BR 112018015815 A2	02-01-2019
		CA 3048625 A1	10-08-2017
		CN 109476697 A	15-03-2019
		EP 3411506 A2	12-12-2018
		JP 7222715 B2	15-02-2023
		JP 2019503205 A	07-02-2019
		KR 20180118650 A	31-10-2018
		PH 12018501651 A1	03-06-2019
		SG 11201806589U A	27-09-2018
		US 2020032253 A1	30-01-2020
		WO 2017136608 A2	10-08-2017
WO 2016126747 A1	11-08-2016	AU 2016215454 A1	21-09-2017
		AU 2022215190 A1	01-09-2022
		BR 112017016639 A2	19-06-2018
		CA 2975735 A1	11-08-2016
		CN 107849563 A	27-03-2018
		CN 114990143 A	02-09-2022
		DK 3265563 T3	31-05-2021
		EA 201791751 A1	28-02-2018
		EA 202092665 A2	31-03-2021
		EP 3265563 A1	10-01-2018
		EP 3892726 A1	13-10-2021
		ES 2873400 T3	03-11-2021
		HK 1248760 A1	19-10-2018
		HR P20210854 T1	09-07-2021
		HU E054624 T2	28-09-2021
		IL 284796 A	31-08-2021
		JP 6871174 B2	12-05-2021
		JP 7288478 B2	07-06-2023
		JP 2018504929 A	22-02-2018
		JP 2021112198 A	05-08-2021
		KR 20170121745 A	02-11-2017
		LT 3265563 T	25-06-2021
		MY 186203 A	30-06-2021
		NZ 735054 A	30-09-2022
		PH 12017501389 A1	15-01-2018
		PL 3265563 T3	13-09-2021
		PT 3265563 T	03-06-2021
		RS 61924 B1	30-06-2021
		SG 11201706297R A	28-09-2017
		SI 3265563 T1	31-08-2021
		US 2018010146 A1	11-01-2018
		US 2020087683 A1	19-03-2020
		US 2022282278 A1	08-09-2022
		WO 2016126747 A1	11-08-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2022/000762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020056182 A1	20-02-2020	AU 2018227057 A1	19-09-2019
		AU 2023200240 A1	30-03-2023
		BR 112019018240 A2	28-07-2020
		CA 3055100 A1	07-09-2018
		CN 110582571 A	17-12-2019
		EA 201992011 A1	27-01-2020
		EP 3589734 A1	08-01-2020
		IL 268977 A	31-10-2019
		JP 7179744 B2	29-11-2022
		JP 2020508680 A	26-03-2020
		KR 20190129903 A	20-11-2019
		PH 12019502001 A1	06-07-2020
		SG 11201908043U A	27-09-2019
		US 2020056182 A1	20-02-2020
		WO 2018161053 A1	07-09-2018

US 2013198900 A1	01-08-2013	EP 2614150 A1	17-07-2013
		US 2013198900 A1	01-08-2013
		WO 2012032522 A1	15-03-2012

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10

テーマコード (参考)

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,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,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100203828

弁理士 喜多村 久美

(72)発明者 シュエツイ クオ

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 1 7 7 1, オイスター ベイ, ウッドランド ドライブ 6 2

(72)発明者 アレクサンドリア フォーブズ

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 0 0 0 3, ニューヨーク, イースト テンス ストリート 1 4

(72)発明者 ケビン ジー. リウ

アメリカ合衆国, ニュージャージー 0 8 5 5 0, ウェスト ウィンザー, ノース, グリーンフィー
ルド ドライブ 7

(72)発明者 チーイン キム

アメリカ合衆国, ニュージャージー 0 8 5 4 0, プリンストン, ギャラップ ロード 2 6 0

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA44