

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7542644号
(P7542644)

(45)発行日 令和6年8月30日(2024.8.30)

(24)登録日 令和6年8月22日(2024.8.22)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/115(2010.01)	C 1 2 N	15/115
C 1 2 N	15/861(2006.01)	C 1 2 N	15/861
C 1 2 N	15/864(2006.01)	C 1 2 N	15/864
C 1 2 N	15/867(2006.01)	C 1 2 N	15/867
			Z Z N A
			Z
			1 0 0 Z
			Z
請求項の数 37 (全155頁)			
(21)出願番号	特願2022-557797(P2022-557797)	(73)特許権者	517271175
(86)(22)出願日	令和3年3月24日(2021.3.24)		メイラグティーエックス ユーケー アイ
(65)公表番号	特表2023-519266(P2023-519266		アイ リミティド
	A)		イギリス国, ロンドン エヌ1 7エヌキ
(43)公表日	令和5年5月10日(2023.5.10)		ュー, ブリタニア ウォーク 9 2
(86)国際出願番号	PCT/IB2021/000163	(74)代理人	100099759
(87)国際公開番号	WO2021/191680		弁理士 青木 篤
(87)国際公開日	令和3年9月30日(2021.9.30)	(74)代理人	100123582
審査請求日	令和6年3月22日(2024.3.22)		弁理士 三橋 真二
(31)優先権主張番号	62/994,135	(74)代理人	100117019
(32)優先日	令和2年3月24日(2020.3.24)		弁理士 渡辺 陽一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100141977
早期審査対象出願			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】 チアミンの類似体及び誘導体と結合するアプタマー

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

アプタマーをコードする配列を含む、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であって、前記アプタマーをコードする配列が、
A C X₁ G G G G T C C G G C X₂ T X₃ T T C A T T T G G C X₄ C C G G T G A G A X₅ X₆ A X₇ A C C C T T X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ C C T G T T X₁₂ A C G G A T A A T G C C G C X₁₃ G C A G G G A G T (配列番号1) を含み、ここで、
X₁ は、A または G であり、
X₂ は、C であるかまたはヌクレオチドがなく、
X₃ は、T であるかまたはヌクレオチドがなく、
X₄ は、A または G であり、
X₅ は、任意のヌクレオチドであり、
X₆ は、任意のヌクレオチドであり、
X₇ は、任意のヌクレオチドであり、
X₈ は、任意のヌクレオチドであり、
X₉ は、C、G、または T であり、
X₁₀ は、任意のヌクレオチドであり、
X₁₁ は、A または T であり、
X₁₂ は、C または T であり、かつ
X₁₃ は、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 2】

アプタマーをコードする配列を含む、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であって、前記アプタマーをコードする配列が、

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCAATTTGGCGCCGGTGAGAX₅
X₆AX₇ACCCCTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGC
CGCX₁₃GCAGGGAGT（配列番号 2）を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Tであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₅は、GまたはTであり、

X₆は、CまたはTであり、

X₇は、CまたはTであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、GまたはTであり、

X₁₀は、A、G、またはTであり、

X₁₁は、AまたはTであり、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、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】

アプタマーをコードする配列を含む、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であって、前記アプタマーをコードする配列が、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCAATTTGGCGCCGGTGAGAGCAC
ACCCCTTTGAACCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCCGCX₁₃GCAGG
GAGT（配列番号 3）を含み、ここで、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、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 4】

アプタマーをコードする配列を含む、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であって、前記アプタマーをコードする配列が、

ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTCAATTTGGCGCCGGTGAGAGCA
CACCCCTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTTACGGATAATGCCGCCGC
AGGGAGT（配列番号 4）を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、GまたはTであり、

X₁₀は、A、G、またはTであり、かつ

X₁₁は、AまたはTである、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 5】

アプタマーをコードする配列を含む、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であって、前記アプタマーをコードする配列が、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCAATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆
AX₇ACCCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGG
GAGT（配列番号 5）を含み、ここで、

X₅は、GまたはTであり、

X₆は、CまたはTであり、かつ

X₇は、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 6】

アプタマーをコードする配列を含む、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であって、前記アプタマーをコードする配列が、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCAATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆

10

20

30

40

50

A X₇ A C C C T T X₈ X₉ X₁₀ A C C T G T T C A C G G A T A A T G C C G C T G C
A G G G A G T (配列番号 6) を含み、ここで、

X₄ は、A または G であり、

X₅ は、任意のヌクレオチドであり、

X₆ は、任意のヌクレオチドであり、

X₇ は、任意のヌクレオチドであり、

X₈ は、任意のヌクレオチドであり、

X₉ は、C または G であり、かつ

X₁₀ は、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 7】

アプタマーをコードする配列を含む、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 7～36 からなる群から選択される配列と少なくとも 95% 同一である配列を含む、前記ポリヌクレオチドカセット。

【請求項 8】

前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 7～36 からなる群から選択される、請求項 7 に記載の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、配列番号 8、9、14～18、21、25、26、及び 30 からなる群から選択される、請求項 8 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 10】

前記アプタマーをコードする配列が、配列番号 9、14、及び 26 からなる群から選択される配列を含む、請求項 9 に記載の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、X₁ が A ではない；X₂ が C ではない；X₃ が T ではない；X₄ が G ではない；X₅ が G ではない；X₆ が C ではない；X₇ が C ではない；X₈ が T ではない；X₉ が G ではない；X₁₀ が A ではない；X₁₁ が A ではない；X₁₂ が T ではない；及び X₁₃ が C ではない、という特性のうちの 1 つ以上を有する、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 12】

X₁ が A である；X₂ が C である；X₃ が T である；X₄ が G である；X₅ が G である；X₆ が C である；X₇ が C である；X₈ が T である；X₉ が G である；X₁₀ が A である；X₁₁ が A である；X₁₂ が T である；及び X₁₃ が C である、の全てが前記アプタマーをコードする配列中に同時に存在することはない、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 13】

前記アプタマーをコードする配列が、X₁ が A ではない；X₂ が C ではない；X₃ が T ではない；X₅ が G ではない；X₆ が C ではない；X₇ が C ではない；X₈ が T ではない；X₉ が G ではない；X₁₀ が A ではない；X₁₁ が A ではない；X₁₂ が T ではない；及び X₁₃ が C ではない、という特性のうちの 1 つ以上を有する、請求項 2 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 14】

X₁ が A である；X₂ が C である；X₃ が T である；X₅ が G である；X₆ が C である；X₇ が C である；X₈ が T である；X₉ が G である；X₁₀ が A である；X₁₁ が A である；X₁₂ が T である；及び X₁₃ が C である、の全てが前記アプタマーをコードする配列中に同時に存在することはない、請求項 2 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 15】

前記アプタマーをコードする配列が、X₁₂ が T ではない；及び X₁₃ が C ではない、という特性のうちの 1 つ以上を有する、請求項 3 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 16】

X_{12} がTである、及び X_{13} がCである、の全てが前記アプタマーをコードする配列中に同時に存在することはない、請求項3に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項17】

前記アプタマーをコードする配列が、 X_1 がAではない； X_8 がTではない； X_9 がGではない； X_{10} がAではない； X_{11} がAではない、という特性のうちの1つ以上を有する、請求項4に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項18】

X_1 がAである； X_8 がTである； X_9 がGである； X_{10} がAである；及び X_{11} がAである、の全てが前記アプタマーをコードする配列中に同時に存在することはない、請求項4に記載のポリヌクレオチドカセット。

10

【請求項19】

前記アプタマーをコードする配列が、 X_5 がGではない； X_6 がCではない；及び X_7 がCではない、という特性のうちの1つ以上を有する、請求項5に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項20】

X_5 がGである； X_6 がCである；及び X_7 がCである、の全てが前記アプタマーをコードする配列中に同時に存在することはない、請求項5に記載のポリヌクレオチドカセット。

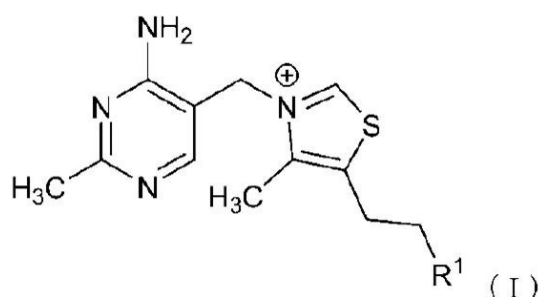
【請求項21】

前記アプタマーが、

a) 式I

20

【化1】



30

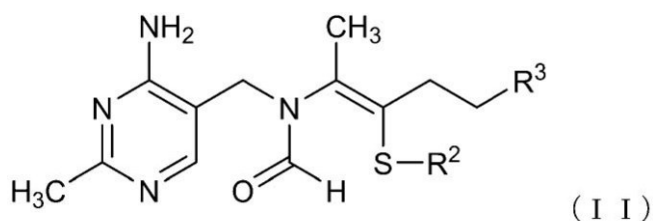
【式中、

R^1 は、OH、アミノ、F、Cl、Br、ホスファート、ピロホスファート、 $-O-C(=O)-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-C_2-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-$ フェニル、 $-O-C(=O)-$ 複素環、 $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-O-C_2-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-O-$ フェニル、及び $-O-C(=O)-O-$ 複素環からなる群から選択される]、

b) 式II

【化2】

40



(II)

【式中、

R^2 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 $-(CH_2)_n-R^6$ 、 $-C(=O)-R^4$ 、 $-C(=O)-O-R^4$ 、 $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$ 、 $-S-C_1$

50

—C₆アルキル、—S—C₂—C₆アルケニル、—S—複素環、及び—S—CH₂—複素環からなる群から選択されるか、

または、R²は、前記化合物が、ジスルフィド（—S—S—）結合を介して接続されている2つの式ⅠⅠの分子の二量体を形成するよう—S—〔式ⅠⅠ〕であり、

R³は、OH、アミノ、F、Cl、Br、ホスファート、ピロホスファート、—O—C(=O)—C₁—C₆アルキル、—O—C(=O)—C₁—C₆アルケニル、—O—C(=O)—フェニル、—O—C(=O)—複素環、—O—C(=O)—O—C₁—C₆アルキル、—O—C(=O)—O—C₁—C₆アルケニル、—O—C(=O)—O—フェニル、—O—C(=O)—O—複素環からなる群から選択され、

R⁴は、H、C₁—C₆アルキル、C₂—C₆アルケニル、C₃—C₇シクロアルキル、C₆—C₁₀ビスクリル、C₉—C₁₄トリシクリル、—(C₁—C₆アルキル)—アリール、—(C₂—C₆アルケニル)—アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

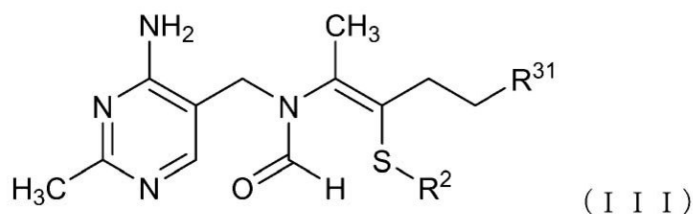
R⁵は、H、C₁—C₆アルキル、C₂—C₆アルケニル、C₃—C₇シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R⁶は、ヒドロキシル、アミノ、アミド、C₁—C₆アルコキシ、C₃—C₇シクロアルキル、C₆—C₁₀ビスリル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルであり、かつnは、1～8であり、

前記アルキル基、前記アルケニル基、前記シクロアルキル基、前記ビスクリル基、前記トリシクリル基、前記アリール基、前記ヘテロアリール基及び前記ヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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ビスクリル、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なる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい]、

c) 式ⅠⅠⅠ

〔化3〕



〔式中、

R²は、H、C₁—C₆アルキル、C₂—C₆アルケニル、—(CH₂)_n—R⁶、—C(=O)—R⁴、—C(=O)—O—R⁴、—CHR⁵—O—C(=O)—R⁴、—S—C₁—C₆アルキル、—S—C₂—C₆アルケニル、—S—複素環、及び—S—CH₂—複素環からなる群から選択され、

R³¹は、OH及びホスファートからなる群から選択され、

R⁴は、H、C₁—C₆アルキル、C₂—C₆アルケニル、C₃—C₇シクロアルキル、C₆—C₁₀ビスクリル、C₉—C₁₄トリシクリル、—(C₁—C₆アルキル)—アリール、—(C₂—C₆アルケニル)—アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

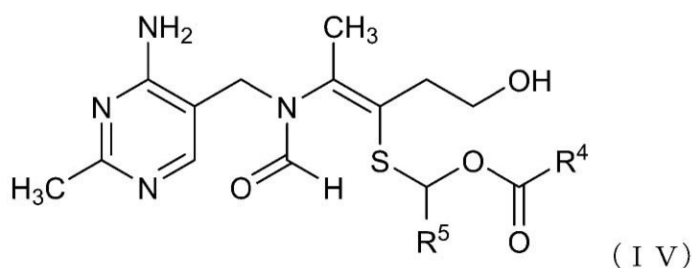
R^5 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R^6 は、ヒドロキシル、アミノ、アミド、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルであり、かつ n は、 $1 \sim 8$ であり、

前記アルキル基、前記アルケニル基、前記シクロアルキル基、前記ビシクリル基、前記トリシクリル基、前記アリール基、前記ヘテロアリール基及び前記ヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される $1 \sim 3$ つの置換基により置換されてもよい]、

d) 式 I V

【化 4】



[式中、

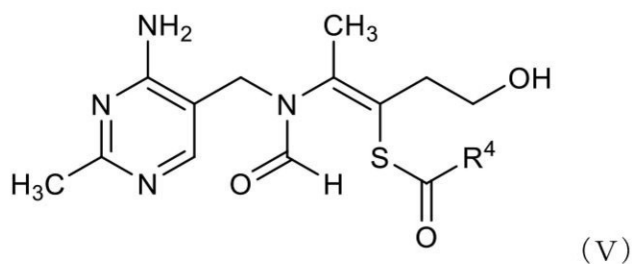
R^4 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R^5 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

前記アルキル基、前記アルケニル基、前記シクロアルキル基、前記ビシクリル基、前記トリシクリル基、前記アリール基、前記ヘテロアリール基及び前記ヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される $1 \sim 3$ つの置換基により置換されてもよい]、

e) 式 V

【化 5】



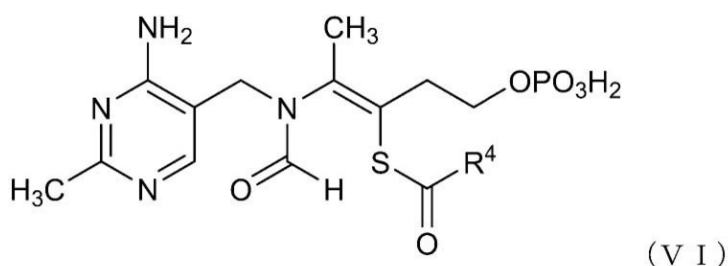
[式中、

R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

前記アルキル基、前記アルケニル基、前記シクロアルキル基、前記ビシクリル基、前記トリシクリル基、前記アリール基、前記ヘテロアリール基及び前記ヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい]、

f) 式 V I

【化 6】



[式中、

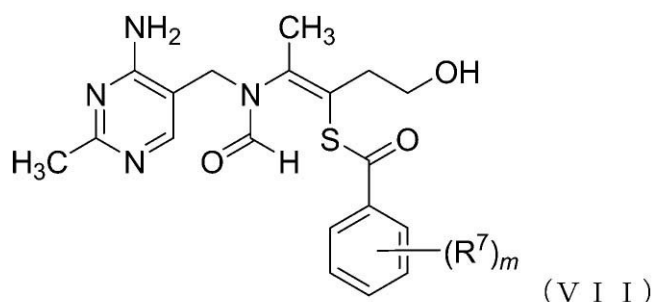
R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

前記アルキル基、前記アルケニル基、前記シクロアルキル基、前記ビシクリル基、前記トリシクリル基、前記アリール基、前記ヘテロアリール基及び前記ヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリ

ール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい]、

g) 式VII

【化7】



[式中、

各 R^7 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -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、

追加または別法として、2つの隣接する R^7 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0～2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -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最大4つの置換基により置換されており、

m は、0、1、2、3または4である]、及び

h) 式VIII

10

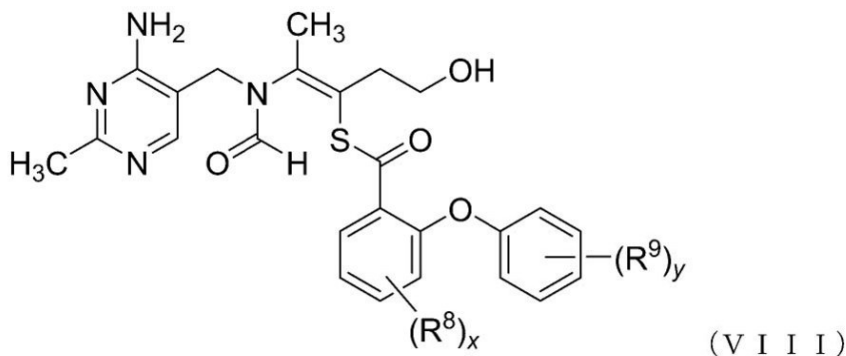
20

30

40

50

【化 8】



〔式中、

各 R^8 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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、

追加または別法として、2つの隣接する R^8 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0～2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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最大4つの置換基により置換されており、

各 R^9 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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、

追加または別法として、2つの隣接する R^9 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0～2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール

、－（ C_1-C_6 アルキル）－アリール、－ O －（ C_1-C_6 アルキル）－アリール、－ S －（ C_1-C_6 アルキル）、－ S －（ C_3-C_7 シクロアルキル）、－ S －（ C_1-C_6 ハロアルキル）、－ S －（ C_1-C_6 ペルハロアルキル）、－ S －アリール、－ S －（ C_1-C_6 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最大４つの置換基により置換されており、

x は、０、１、２または３であり、

y は、０、１、２、３、または４である」、

のうちのいずれか１つによる構造を有する小分子に結合するか、そうでなければその存在に応答する、請求項１～２０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２２】

前記アプタマーが、アセフルチアミン、アセチアミン、アリチアミン、アンプロリウム、ベクロチアミン、ベンフォチアミン、ベンチアミン、ビスベンチアミン、セトチアミン、シコチアミン、フルスルチアミン、モノホスホチアミン、オクトチアミン、オキシチアミン、プロスルチアミン、スルブチアミン、チアミン、チアミンピロリン酸、及びビンチアモールからなる群から選択される小分子に結合するか、そうでなければその存在に応答する、請求項１～２０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２３】

前記アプタマーが、ベンフォチアミン、フルスルチアミン、及びプロスルチアミンからなる群から選択される小分子に結合するか、そうでなければその存在に応答する、請求項２２に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項２４】

前記アプタマーが、ベンフォチアミンに結合するか、そうでなければその存在に応答する、請求項２３に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項２５】

前記アプタマーが、フルスルチアミンに結合するか、そうでなければその存在に応答する、請求項２３に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項２６】

前記アプタマーが、プロスルチアミンに結合するか、そうでなければその存在に応答する、請求項２３に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項２７】

前記アプタマーが、等モル量のフルスルチアミン、ベンフォチアミンまたはプロスルチアミンと比較してチアミンピロリン酸（ＴＰＰ）に対して低結合性を有する、及び／または低応答性を示す、請求項１～２０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２８】

前記アプタマーが、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の一部としてコードされるリボスイッチとの関連にある、請求項２７に記載の、ポリヌクレオチドカセット。

【請求項２９】

小分子に応答した、標的遺伝子発現の調節のためのリボスイッチであって、請求項１～２８のいずれか１項に記載のアプタマーを含む、前記リボスイッチ。

【請求項３０】

前記リボスイッチが配列番号３７の配列を含む、請求項２９に記載のリボスイッチ。

【請求項３１】

小分子に応答した、標的遺伝子の発現の調節のためのポリヌクレオチドカセットであって、

（ｃ）リボスイッチと、

（ｄ）５′イントロン及び３′イントロンが隣接する選択的にスプライスされるエクソンと、を含み、

ここで、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が含まれるステムを含むエフェクター領域、及び（ｉｉ）請求項１～２８のいずれか１項に記載

10

20

30

40

50

のアプタマーを含み、かつ

前記選択的にスプライスされるエクソンが、前記選択的にスプライスされるエクソンがスプライスされて前記標的遺伝子のmRNAとなる際に、前記標的遺伝子と共にインフレームにあ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 3 2】

前記リボスイッチが、配列番号 3 7 の配列を含む、請求項 3 1 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 3 3】

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中に位置する、請求項 3 1 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 3 4】

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内または前記標的遺伝子のイントロン内に位置する、請求項 3 1 に記載のポリヌクレオチドカセット。

【請求項 3 5】

請求項 1 ～ 2 0 又は 3 1 ～ 3 4 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 9 もしくは 3 0 のいずれか 1 項に記載のリボスイッチ、を含むベクター。

【請求項 3 6】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項 3 5 に記載のベクター。

【請求項 3 7】

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 3 6 に記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年3月24日に提出された米国特許出願第62／994，135号に対する優先権を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

技術分野

本開示は、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かかる小分子に結合するアプタマーを作製する方法に関する。また、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。さらに、標的遺伝子が本明細書に記載されるアプタマーを含むリボスイッチを含有している、標的遺伝子発現のモジュレーターである小分子が提供される。

【背景技術】

【0003】

アプタマーは、標的リガンドに高い親和性及び特異性で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が最近FDAにより承認されたこと、及び臨床パイプラインでアプタマー薬が追加されたことにより、治療上及び診断上の価値が高いことが証明されている。それらの高度な特異性及び汎用性により、RNAアプタマーは、がん、ウイルス感染症及び他の疾患を含めたヒトの疾患との闘いにおいて、新たなRNAナノテクノロジー分野の極めて重要なツールの一つとして確立された。

【0004】

さらに、アプタマーは、アプタマーリガンドの存在下または非存在下で特定の効果を有するリボスイッチの一部として利用され得る。例えば、アプタマーリガンドの存在または非存在に応答して遺伝子発現を調節するためにリボスイッチを使用してよい。

【0005】

しかしながら、原核生物供給源に由来するかまたはインビトロでの選択方法を使用して作製されるアプタマーは、真核生物系での治療標的遺伝子の発現に必要な機能を実証でき

10

20

30

40

50

ないことがよくある。そのため、小分子リガンドの存在または非存在に応答して遺伝子発現を調節することができる新規アプタマー配列が必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本明細書では、チアミンピロリン酸（TPP）及びその類似体または誘導体等の小分子に結合するアプタマー配列を提供する。また、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。さらに、治療遺伝子等の標的遺伝子の調節のために前記のアプタマー、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が提供される。また、本明細書では、標的遺伝子発現のモジュレーターである小分子も提供され、ここで、標的遺伝子は、本明細書に記載されるアプタマーを含むリボスイッチを含有する。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCA TTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCC TTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃G CAGGGAGT（配列番号1）

20

を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Tであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₄は、AまたはGであり、

X₅は、任意のヌクレオチドであり、

X₆は、任意のヌクレオチドであり、

X₇は、任意のヌクレオチドであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

30

X₉は、C、G、またはTであり、

X₁₀は、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁は、AまたはTであり、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、CまたはTである。

【0008】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCA TTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCC TTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃G CAGGGAGT（配列番号2）

40

を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Tであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₅は、GまたはTであり、

X₆は、CまたはTであり、

X₇は、CまたはTであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

50

X₉は、GまたはTであり、
X₁₀は、A、G、またはTであり、
X₁₁は、AまたはTであり、
X₁₂は、CまたはTであり、かつ
X₁₃は、CまたはTである。

【0009】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCAC
ACCCCTTTGAACCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCX₁₃GCAGG
GAGT（配列番号3）

を含み、ここで、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ
X₁₃は、CまたはTである。

【0010】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、

ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCA
CACCCCTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTTACGGATAATGCCGCCGC
AGGGAGT（配列番号4）

を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、
X₈は、任意のヌクレオチドであり、
X₉は、GまたはTであり、
X₁₀は、A、G、またはTであり、かつ
X₁₁は、AまたはTである。

【0011】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆
AX₇ACCCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGG
GAGT（配列番号5）

を含み、ここで、

X₅は、GまたはTであり、
X₆は、CまたはTであり、かつ
X₇は、CまたはTである。

【0012】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTTCATTTGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆
AX₇ACCCCTTX₈X₉X₁₀ACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGC
AGGGAGT（配列番号6）

を含み、ここで、

X₄は、AまたはGであり、
X₅は、任意のヌクレオチドであり、
X₆は、任意のヌクレオチドであり、

10

20

30

40

50

X₇は、任意のヌクレオチドであり、
 X₈は、任意のヌクレオチドであり、
 X₉は、CまたはGであり、かつ
 X₁₀は、任意のヌクレオチドである。

【0013】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、配列番号7～36（表1を参照のこと）からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一である配列を含む。一態様では、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が提供され、ここで、ポリヌクレオチド

10

【0014】

一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、配列番号8、9、14～18、21、25、26、及び30からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一である配列を含む。一態様では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、配列番号8、9、14～18、21、25、26、及び30からなる群から選択される配列を含む。

20

【0015】

好ましい実施形態では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、配列番号9、14、及び26からなる群から選択される配列と少なくとも95%同一である配列を含む。さらに好ましい実施形態では、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が提供され、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、アプタマーコード配列は、配列番号9、14、及び26からなる群から選択される配列を含む。

30

【0016】

一態様では、小分子に結合するアプタマーをコードする配列が提供され、ここで、アプタマーコード配列は、

A C X₁ G G G G T C C G G C X₂ T X₃ T T C A T T T G G C X₄ C C G G T G A G A X₅ X₆ A X₇ A C C C T T X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ C C T G T T X₁₂ A C G G A T A A T G C C G C X₁₃ G C A G G G A G T（配列番号1）

を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、
 X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、
 X₃は、Tであるかまたはヌクレオチドがなく、
 X₄は、AまたはGであり、
 X₅は、任意のヌクレオチドであり、
 X₆は、任意のヌクレオチドであり、
 X₇は、任意のヌクレオチドであり、
 X₈は、任意のヌクレオチドであり、
 X₉は、C、G、またはTであり、
 X₁₀は、任意のヌクレオチドであり、
 X₁₁は、AまたはTであり、
 X₁₂は、CまたはTであり、かつ
 X₁₃は、CまたはTである。

40

50

【0017】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁がAではない；X₂がCではない；X₃がTではない；X₄がGではない；X₅がGではない；X₆がCではない；X₇がCではない；X₈がTではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；X₁₁がAではない；X₁₂がTではない；及びX₁₃がCではない。

【0018】

実施形態では、以下の全てがアプタマーコード配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₂がCである；X₃がTである；X₄がGである；X₅がGである；X₆がCである；X₇がCである；X₈がTである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がTである；及びX₁₃がCである。

【0019】

一態様では、小分子に結合するアプタマーをコードする配列が提供され、ここで、アプタマーコード配列は、

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCA TTTGGCGCCGGTGAGAX₅
X₆AX₇ACCC TTX₈X₉X₁₀X₁₁CC TGT TX₁₂ACGGATAATGC
CGCX₁₃G CAGGGAGT (配列番号2)

を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Tであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₅は、GまたはTであり、

X₆は、CまたはTであり、

X₇は、CまたはTであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、GまたはTであり、

X₁₀は、A、G、またはTであり、

X₁₁は、AまたはTであり、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、CまたはTである。

【0020】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁がAではない；X₂がCではない；X₃がTではない；X₄がGではない；X₅がGではない；X₆がCではない；X₇がCではない；X₈がTではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；X₁₁がAではない；X₁₂がTではない；及びX₁₃がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマーコード配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₂がCである；X₃がTである；X₅がGである；X₆がCである；X₇がCである；X₈がTである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がTである；及びX₁₃がCである。

【0021】

一態様では、小分子に結合するアプタマーをコードする配列が提供され、ここで、アプタマーコード配列は、

ACAGGGGTCCGGCC TTTTCA TTTGGCGCCGGTGAGAGCAC
ACCC TTTGAACCTGT TX₁₂ACGGATAATGCCCGCX₁₃G CAGG
GAGT (配列番号3)

を含み、ここで、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、CまたはTである。

【0022】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁₂がTではない；及びX₁₃がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマーコード

配列中に同時に存在することはない： X_{12} がTである、及び X_{13} がCである。

【0023】

一態様では、小分子に結合するアプタマーをコードする配列が提供され、ここで、アプタマーコード配列は、

AC X_1 GGGGTCCGGCCTTTTCAATTTGGCGCCGGTGAGAGCA
CACCCCTT $X_8X_9X_{10}X_{11}$ CCTGTTTACGGATAATGCCGCCGC
AGGGAGT（配列番号4）

を含み、ここで、

X_1 は、AまたはGであり、

X_8 は、任意のヌクレオチドであり、

X_9 は、GまたはTであり、

X_{10} は、A、G、またはTであり、かつ

X_{11} は、AまたはTである。

【0024】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する： X_1 がAではない； X_8 がTではない； X_9 がGではない； X_{10} がAではない； X_{11} がAではない。実施形態では、以下の全てがアプタマーコード配列中に同時に存在することはない： X_1 がAである； X_8 がTである； X_9 がGである； X_{10} がAである； X_{11} がAである； X_{12} がTである；及び X_{13} がCである。

【0025】

一態様では、小分子に結合するアプタマーをコードする配列が提供され、ここで、アプタマーコード配列は、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCAATTTGGCGCCGGTGAGAX $_5X_6$
AX $_7$ ACCCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGG
GAGT（配列番号5）

を含み、ここで、

X_5 は、GまたはTであり、

X_6 は、CまたはTであり、かつ

X_7 は、CまたはTである。

【0026】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する： X_5 がGではない； X_6 がCではない；及び X_7 がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマーコード配列中に同時に存在することはない： X_5 がGである； X_6 がCである；及び X_7 がCである。

【0027】

一態様では、小分子に結合するアプタマーをコードする配列が提供され、ここで、アプタマーコード配列は、

ACAGGGGTCCGGCCTTTTCAATTTGGCX $_4$ CCGGTGAGAX $_5X_6$
AX $_7$ ACCCCTT $X_8X_9X_{10}$ ACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGC
AGGGAGT（配列番号6）

を含み、ここで、

X_4 は、AまたはGであり、

X_5 は、任意のヌクレオチドであり、

X_6 は、任意のヌクレオチドであり、

X_7 は、任意のヌクレオチドであり、

X_8 は、任意のヌクレオチドであり、

X_9 は、CまたはGであり、かつ

X_{10} は、任意のヌクレオチドである。

【0028】

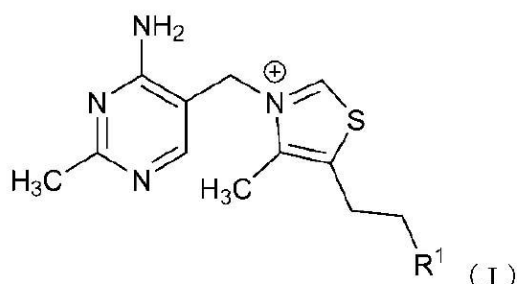
一態様では、小分子に結合するアプタマーをコードする配列が提供され、ここで、アプ

タマーコード配列は、配列番号 7 ～ 36（表 1 を参照のこと）からなる群から選択される配列と少なくとも 95 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、アプタマーコード配列は、配列番号 8、9、14 ～ 18、21、25、26、及び 30 からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、アプタマーコード配列は、配列番号 9、14、及び 26 からなる群から選択される配列を含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、アプタマーは、式 I ～ V I I I による構造を有する小分子が含まれる、本明細書に開示される小分子に結合するか、そうでなければその存在に応答する。実施形態では、小分子は、式 I

【化 1】



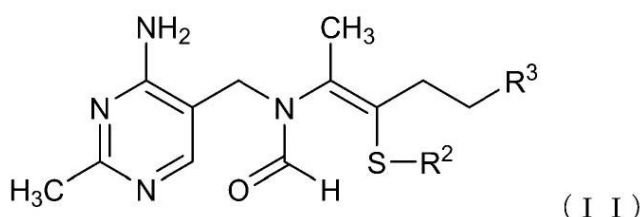
による構造を有し、式中、

R^1 は、OH、アミノ、F、Cl、Br、ホスファート、ピロホスファート、 $-O-C(=O)-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-C_2-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-$ フェニル、 $-O-C(=O)-$ 複素環、 $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-O-C_2-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-O-$ フェニル、及び $-O-C(=O)-O-$ 複素環からなる群から選択される。

【0030】

実施形態では、小分子は、式 I I

【化 2】



による構造を有し、式中、

R^2 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 $-(CH_2)_n-R^6$ 、 $-C(=O)-R^4$ 、 $-C(=O)-O-R^4$ 、 $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$ 、 $-S-C_1-C_6$ アルキル、 $-S-C_2-C_6$ アルケニル、 $-S-$ 複素環、及び $-S-CH_2-$ 複素環からなる群から選択されるか、

または、 R^2 は、化合物が、ジスルフィド ($-S-S-$) 結合を介して接続されている 2 つの式 I I の分子の二量体を形成するよう $-S-$ [式 I I] であり、

R^3 は、OH、アミノ、F、Cl、Br、ホスファート、ピロホスファート、 $-O-C(=O)-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-C_1-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-$ フェニル、 $-O-C(=O)-$ 複素環、 $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-O-$ フェニル、 $-O-C(=O)-O-$ 複素環からなる群から選択され、

R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6$ アルキル) - アリール

、 $-(C_2-C_6\text{アルケニル})-アリール$ 、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R^5 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

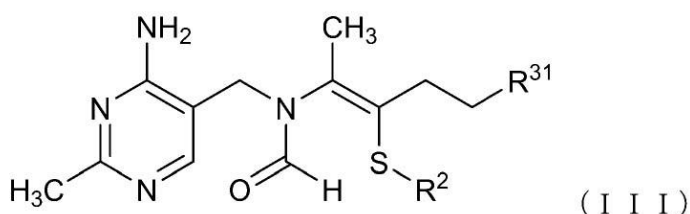
R^6 は、ヒドロキシル、アミノ、アミド、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルであり、かつ n は、 $1\sim 8$ であり、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6\text{アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7\text{シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6\text{ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6\text{ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O-アリール$ 、 $-(C_1-C_6\text{アルキル})-アリール$ 、 $-O-(C_1-C_6\text{アルキル})-アリール$ 、 $-S-(C_1-C_6\text{アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7\text{シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6\text{ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6\text{ペルハロアルキル})$ 、 $-S-アリール$ 、 $-S-(C_1-C_6\text{アルキル})-アリール$ 、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される $1\sim 3$ つの置換基により置換されてもよい。

【0031】

実施形態では、小分子は、式 I I I

【化3】



による構造を有し、式中、

R^2 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 $-(CH_2)_n-R^6$ 、 $-C(=O)-R^4$ 、 $-C(=O)-O-R^4$ 、 $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$ 、 $-S-C_1-C_6$ アルキル、 $-S-C_2-C_6$ アルケニル、 $-S$ -複素環、及び $-S-CH_2$ -複素環からなる群から選択され、

R^{31} は、 OH 及びホスファートからなる群から選択され、

R^4 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6\text{アルキル})-アリール$ 、 $-(C_2-C_6\text{アルケニル})-アリール$ 、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R^5 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R^6 は、ヒドロキシル、アミノ、アミド、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルであり、かつ n は、 $1\sim 8$ であり、

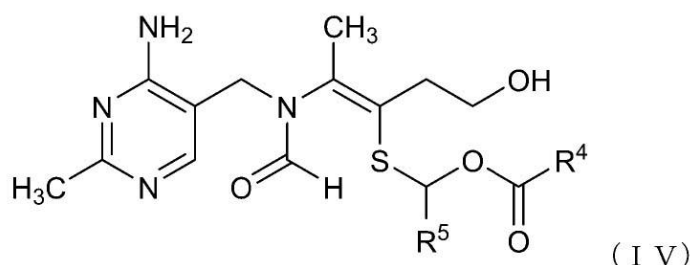
ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、またはハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、シアノ、アミド、スルホンアミド、ニトロ、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$

アルキル)、 $\text{O}-(\text{C}_3-\text{C}_7\text{シクロアルキル})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ハロアルキル})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-\text{O}-\text{アリール}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})-\text{アリール}$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})-\text{アリール}$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_3-\text{C}_7\text{シクロアルキル})$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ハロアルキル})$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ペルハロアルキル})$ 、 $-\text{S}-\text{アリール}$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})-\text{アリール}$ 、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい。

【0032】

実施形態では、小分子は、式 I V

【化4】



による構造を有し、式中、

R^4 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})-\text{アリール}$ 、 $-(\text{C}_2-\text{C}_6\text{アルケニル})-\text{アリール}$ 、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

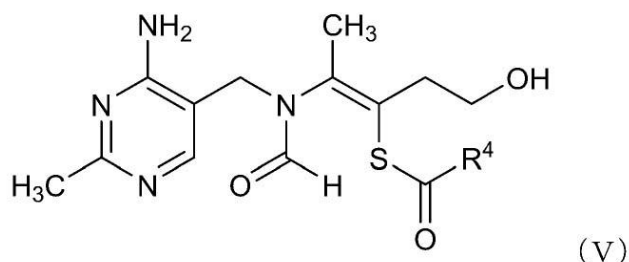
R^5 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-\text{SH}$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $\text{O}-(\text{C}_3-\text{C}_7\text{シクロアルキル})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ハロアルキル})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-\text{O}-\text{アリール}$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})-\text{アリール}$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})-\text{アリール}$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_3-\text{C}_7\text{シクロアルキル})$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ハロアルキル})$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{ペルハロアルキル})$ 、 $-\text{S}-\text{アリール}$ 、 $-\text{S}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{アルキル})-\text{アリール}$ 、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい。

【0033】

実施形態では、小分子は、式 V

【化5】



による構造を有し、式中、

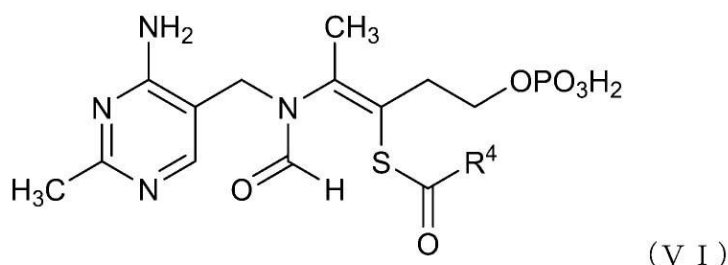
R^4 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される 1～3 つの置換基により置換されてもよい。

【0034】

実施形態では、小分子は、式 V I

【化 6】



による構造を有し、式中、

R^4 は、 H 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される 1～3 つの置換基により置換されてもよい。

【0035】

いくつかの実施形態では、小分子は、式 V I I

10

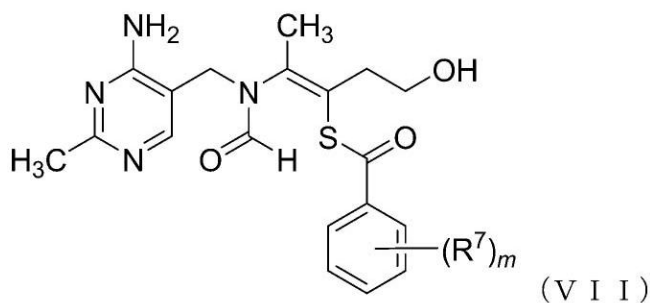
20

30

40

50

【化 7】



による構造を有し、式中、

各 R^7 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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、

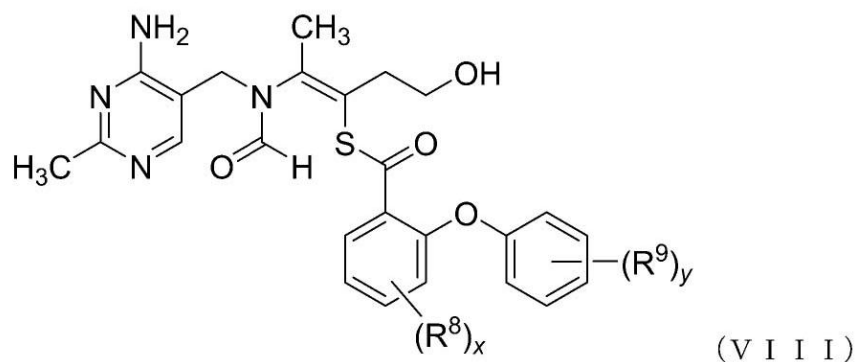
追加または別法として、2つの隣接する R^7 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0~2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、またはハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、シアノ、アミド、スルホンアミド、ニトロ、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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最大4つの置換基により置換されており、

m は、0、1、2、3または4である。

【0036】

いくつかの実施形態では、小分子は、式VII I

【化 8】



による構造を有し、式中、

各 R^8 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアル

キル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル、 $O-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ アルキル、 $-S-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ 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、

追加または別法として、2つの隣接する R^8 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0~2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル、 $O-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ アルキル、 $-S-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ 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最大4つの置換基により置換されており、

各 R^9 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル、 $O-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ アルキル、 $-S-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ 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、

追加または別法として、2つの隣接する R^9 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0~2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル、 $O-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-O-(C_1-C_6)$ アルキル-アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ アルキル、 $-S-(C_3-C_7)$ シクロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ハロアルキル、 $-S-(C_1-C_6)$ ペルハロアルキル、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6)$ 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最大4つの置換基により置換されており、

xは、0、1、2または3であり、

yは、0、1、2、3、または4である。

【0037】

いくつかの実施形態では、アブタマーは、アセフルチアミン、アセチアミン、アリチアミン、アンプロリウム、ベクロチアミン、ベンフォチアミン、ベンチアミン、ビスベンチアミン、セトチアミン、シコチアミン、フルスルチアミン、モノホスホチアミン、オクトチアミン、オキシチアミン、プロスルチアミン、スルブチアミン、チアミン、チアミンピロリン酸、及びビンチアモールからなる群から選択される小分子に結合するか、そうでなければその存在に応答する。好ましい実施形態では、アブタマーは、ベンフォチアミン、フルスルチアミン、及びプロスルチアミンからなる群から選択される小分子に結合するか

、そうでなければその存在に応答する。いくつかの実施形態では、アプタマーは、ベンフォチアミンに結合するか、そうでなければその存在に応答する。実施形態では、アプタマーは、フルスルチアミンに結合するか、そうでなければその存在に応答する。実施形態では、アプタマーは、プロスルチアミンに結合するか、そうでなければその存在に応答する。
【0038】

いくつかの実施形態では、アプタマーは、等モル量のフルスルチアミン、ベンフォチアミンまたはプロスルチアミンと比較してチアミンピロリン酸（TPP）に対して低結合性を有する、及び／または低応答性を示す。アプタマーが、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の一部としてコードされるリボスイッチとの関連にあるいくつかの実施形態では、アプタマーは、等モル量のフルスルチアミン、ベンフォチアミンまたはプロスルチアミンと比較してTPPに対しては低応答性を有する。

10

【0039】

また、小分子に応答した、標的遺伝子発現の調節のためのリボスイッチも提供され、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。一実施形態では、リボスイッチコード配列は、配列番号37の配列を含む。

【0040】

また、小分子に応答した、標的遺伝子の発現の調節のためのポリヌクレオチドカセットも提供され、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'イントロンが隣接する選択的にスプライスされるエクソンと、を含む、

20

ここで、リボスイッチは、(i) 3'イントロンの5'スプライス部位配列が含まれるステムを含むエフェクター領域、及び(ii) 本明細書に開示されるアプタマーを含み、選択的にスプライスされるエクソンは、選択的にスプライスされるエクソンがスプライスされて標的遺伝子のmRNAとなる際に、標的遺伝子と共にインフレーンにある終止コドンを含む。

【0041】

一実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、配列番号37の配列を含み、かつ、アプタマーコード配列をさらに含む、リボスイッチコード配列を含み、ここで、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から選択される。

30

【0042】

一実施形態では、本明細書に開示されるアプタマー、リボスイッチ、及び／またはポリヌクレオチドカセットを含む核酸分子が提供される。また、本明細書に開示されるリボスイッチまたはポリヌクレオチドカセットを含有する標的遺伝子を含む核酸分子も提供される。一実施形態では、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中に位置する。一実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、標的遺伝子の非翻訳領域内または標的遺伝子のイントロン内に位置する。

【0043】

また、本明細書に開示される核酸分子のうちのいずれかを含むベクターも提供される。一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、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からなる群から選択される。

40

【0044】

一態様では、目的の化合物（例えば、式I~VIIによる化合物等の、チアミンの類似体または誘導体）に応答して標的遺伝子発現を調節するアプタマーを同定するための方法が提供され、かかる方法は、

(i) 親アプタマー配列を選択するステップ、

(ii) ステップ(i)で選択されたアプタマーの全部または一部をコードする配列を含むリボスイッチライブラリーを生成するステップであって、アプタマーコード配列が、アプタマーの1つ以上の不対領域において1つ以上のランダムに変異させたヌクレオチドを

50

含み、変異アプタマー配列が、レポーター遺伝子の発現を制御するリボスイッチとの関連にある、リボスイッチライブラリーを生成するステップ、

(iii) (ii) からのライブラリーを、目的化合物への曝露に応答した標的遺伝子発現の調節が親アプタマー配列と比較して増大している（例えば、誘導または抑制の倍率がより高い）アプタマーについてスクリーニングするステップ、

(iv) ステップ (i) において選択されたアプタマーの代わりにステップ (iii) で同定されたアプタマーでステップ (ii) 及び (iii) を任意選択で繰り返すステップ、を含む。

【0045】

実施形態では、親アプタマー配列は、TTPアプタマーである（推定TPPアプタマーまたは既知のTPPアプタマー）。実施形態では、親アプタマー配列は、Rfam TPPリボスイッチファミリーRF00059から選択される。実施形態では、アプタマー配列の1つ以上の不對領域は、接合部（J）領域である。追加または別法として、不對領域は、ループ（L）領域であってよい。さらなる実施形態では、1つ以上の不對領域における1つ以上のヌクレオチドがランダムに変異しているアプタマーをコードする配列はまた、対（P）領域において、例えば、不對領域に隣接する1つ以上の対ヌクレオチドにおいて、1つ以上のヌクレオチドが変異している。

【0046】

実施形態では、目的化合物は、チアミンの類似体または誘導体である。実施形態では、チアミン類似体は、フルスルチアミン、ベンフォチアミンまたはプロスルチアミンである。一実施形態では、アプタマーは、等モル量のフルスルチアミン、ベンフォチアミンまたはプロスルチアミンと比較してチアミンピロリン酸（TPP）に対して低結合性を有する、及び／または低応答性を示す。実施形態では、目的化合物は、式I～VIIによる化合物である。実施形態では、目的化合物は、式I～IIIによる化合物である。

【0047】

態様では、本開示は、式I～VIIの化合物を提供する。実施形態では、本開示は、式I～VIIの化合物を医薬組成物で提供する。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1A】 thiC TPPアプタマー及び thiM TPPアプタマーをそれぞれ含む合成リボスイッチTPPzまたはTPPmが、チアミンピロリン酸（TPP）またはチアミン類似体での処理に応答してルシフェラーゼ発現を誘導することを示す。HEK293細胞に、TPPzリボスイッチまたはTPPmリボスイッチを含有するルシフェラーゼ遺伝子を含有するコンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を示されている用量にて、TPPで処理するか、または未処理で放置した。ルシフェラーゼ活性は、平均任意光単位（ALU） $\pm$ S.D. として表され、誘導倍率は、TPPまたはチアミン類似体に曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、TPPまたはチアミン類似体に曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

【0049】

【図1B】 thiC TPPアプタマー及び thiM TPPアプタマーをそれぞれ含む合成リボスイッチTPPzまたはTPPmが、チアミンピロリン酸（TPP）またはチアミン類似体での処理に応答してルシフェラーゼ発現を誘導することを示す。HEK293細胞に、TPPzリボスイッチまたはTPPmリボスイッチを含有するルシフェラーゼ遺伝子を含有するコンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を示されている用量にて、フルスルチアミンで処理するか、または未処理で放置した。ルシフェラーゼ活性は、平均任意光単位（ALU） $\pm$ S.D. として表され、誘導倍率は、TPPまたはチアミン類似体に曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、TPPまたはチアミン類似体に曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

【0050】

【図1C】 *thiC* TPPアプタマー及び *thiM* TPPアプタマーをそれぞれ含む合成リボスイッチTPPzまたはTPPmが、チアミンピロリン酸（TPP）またはチアミン類似体での処理に応答してルシフェラーゼ発現を誘導することを示す。HEK293細胞に、TPPzリボスイッチまたはTPPmリボスイッチを含有するルシフェラーゼ遺伝子を含有するコンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を示されている用量にて、プロスルチアミンで処理するか、または未処理で放置した。ルシフェラーゼ活性は、平均任意光単位（ALU） $\pm$ S.D.として表され、誘導倍率は、TPPまたはチアミン類似体に曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、TPPまたはチアミン類似体に曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

10

【0051】

【図1D】 *thiC* TPPアプタマー及び *thiM* TPPアプタマーをそれぞれ含む合成リボスイッチTPPzまたはTPPmが、チアミンピロリン酸（TPP）またはチアミン類似体での処理に応答してルシフェラーゼ発現を誘導することを示す。HEK293細胞に、TPPzリボスイッチまたはTPPmリボスイッチを含有するルシフェラーゼ遺伝子を含有するコンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を示されている用量にて、ビスベンチアミン、ベクロチアミンまたはスルブチアミンで処理するか、または未処理で放置した。ルシフェラーゼ活性は、平均任意光単位（ALU） $\pm$ S.D.として表され、誘導倍率は、TPPまたはチアミン類似体に曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、TPPまたはチアミン類似体に曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

20

【0052】

【図2A】 TPPアプタマーのファミリー（RfamファミリーRF00059）から差し引かれた推定アプタマー配列（14G4）が、フルスルチアミンに応答してルシフェラーゼ発現を調節することを示す。細胞に、推定TPPアプタマーである14G4（受託番号AACY023654033.1/Rfam RF00059からの903-800）を含むルシフェラーゼリボスイッチコンストラクトをトランスフェクトした。HEK293細胞において、トランスフェクトされた細胞を示されている用量にてフルスルチアミンで処理した。誘導倍率は、フルスルチアミンに曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、フルスルチアミンに曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

30

【0053】

【図2B】 TPPアプタマーのファミリー（RfamファミリーRF00059）から差し引かれた推定アプタマー配列（14G4）が、フルスルチアミンに応答してルシフェラーゼ発現を調節することを示す。細胞に、推定TPPアプタマーである14G4（受託番号AACY023654033.1/Rfam RF00059からの903-800）を含むルシフェラーゼリボスイッチコンストラクトをトランスフェクトした。他の種類のヒト及びマウスの細胞株において、トランスフェクトされた細胞を示されている用量にてフルスルチアミンで処理した。誘導倍率は、フルスルチアミンに曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、フルスルチアミンに曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

40

【0054】

【図3A】 天然のP1ステムを有する親アプタマー14G4（配列番号38）の予測される構造を示す。14G4アプタマーの予測される構造は、ステムの位置及び不對領域を含めて本明細書に記載のように決定された。各塩基の周りの構造の陰影は、その塩基対合する確率を示し、陰影が濃いほど確率が高い。不對領域の場合、濃い陰影は、不對である確率を示す。

【0055】

【図3B】 アプタマー14G4コード配列（配列番号7）及びそこから派生したライブラ

50

リーを示す。アプタマーライブラリー A 1（配列番号 39）、A 2（配列番号 40）、または A 3（配列番号 41）を取得するためにランダムに変異させたヌクレオチドはそれぞれ、図 3 B のアプタマーコード配列において「N」で示されており、不對であるかまたは不對領域に隣接するヌクレオチドに対応する。

【0056】

【図 4 A】リボスイッチ内に含有されたアプタマーの変異誘発を介した、遺伝子調節活性の改善を示す。ランダムに変異させたアプタマー（アプタマーライブラリー A 1、A 2、または A 3 から派生）を含むリボスイッチコンストラクトを、H E K 細胞での遺伝子調節活性の改善についてスクリーニングした。トランスフェクトされた H E K 細胞を、50 μ M のフルスルチアミンで処理するかまたは未処理で放置した。スクリーニングで単離され、リボスイッチ 1 4 G 4 と比較して改善された遺伝子調節活性を示す、再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチの例を図 4 A に示す。誘導倍率は、T P P またはチアミン類似体に曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、T P P またはチアミン類似体に曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

10

【0057】

【図 4 B】リボスイッチ内に含有されたアプタマーの変異誘発を介した、遺伝子調節活性の改善を示す。ランダムに変異させたアプタマー（アプタマーライブラリー A 1、A 2、または A 3 から派生）を含むリボスイッチコンストラクトを、H E K 細胞での遺伝子調節活性の改善についてスクリーニングした。トランスフェクトされた H E K 細胞を、50 μ M のフルスルチアミンで処理するかまたは未処理で放置した。再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが様々な種類の細胞において標的遺伝子の用量依存的誘導に有用であることを示す。T r a n s I T - X 2 試薬を使用して、A M L 1 2 細胞、C 2 C 1 2 細胞及び A R P E - 1 9 細胞に再設計されたリボスイッチコンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、示されている用量にてフルスルチアミンで処理した。誘導倍率は、T P P またはチアミン類似体に曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、T P P またはチアミン類似体に曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

20

【0058】

【図 4 C】リボスイッチ内に含有されたアプタマーの変異誘発を介した、遺伝子調節活性の改善を示す。ランダムに変異させたアプタマー（アプタマーライブラリー A 1、A 2、または A 3 から派生）を含むリボスイッチコンストラクトを、H E K 細胞での遺伝子調節活性の改善についてスクリーニングした。トランスフェクトされた H E K 細胞を、50 μ M のフルスルチアミンで処理するかまたは未処理で放置した。再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが、異なる T P P 類似体に応答してルシフェラーゼ発現を調節することを示す。A M L 1 2 細胞は、再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチをトランスフェクトされ、示されている用量にてフルスルチアミン、ベンフォチアミン、またはプロスルチアミンで処理された。誘導倍率は、T P P またはチアミン類似体に曝露された細胞で記録されたルシフェラーゼ活性を、T P P またはチアミン類似体に曝露されなかった細胞で記録されたルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

30

【0059】

【図 5】1 4 G 4 の変異誘発を介して取得された、3 H 4 アプタマーコード配列のヌクレオチド配列（配列番号 9）を示す。アプタマーライブラリー A 4（配列番号 42）を取得するためにランダムに変異させたヌクレオチドは、アプタマーコード配列において「N」で示されている。

40

【0060】

【図 6 A】アプタマー／リガンド結合に関与する選択アプタマーヌクレオチドの変異誘発が、哺乳類細胞においてアプタマーベースのリボスイッチの遺伝子調節活性を改善することができることを示す。H E K 2 9 3 細胞、A R P E - 1 9 細胞及び A M L 1 2 細胞に、アプタマーライブラリー A 4 から単離された再設計されたアプタマー配列を含む、リボスイッチコンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、示され

50

ている用量にてフルスルチアミンで処理するかまたは未処理で放置した。

【0061】

【図6B】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが、チアミンと化学構造上の特徴を共有する様々なチアミン誘導体に応答してルシフェラーゼの発現を誘導する能力を示す。AML12細胞に、示されているリボスイッチコンストラクトをトランスフェクトし、示されている用量にてフルスルチアミン、ベンフォチアミン、またはプロスルチアミンで処理するかまたは未処理で放置した。誘導倍率は、チアミン類似体化合物で処理した細胞から取得したルシフェラーゼ活性を、チアミン類似体で処理していない細胞から取得したルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

【0062】

【図7A】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが、リガンドに応答して様々な標的遺伝子の発現を誘導する能力を示す。アプタマー6B4を含むリボスイッチが、フルスルチアミン処理に応答して高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）の発現を調節することを示す。EGFP-6B4コンストラクトを含有する、安定的にトランスフェクトされたHEK293細胞を、50 μMにてフルスルチアミンで24時間処理するかまたは未処理で放置した。

【0063】

【図7B】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが、リガンドに応答して様々な標的遺伝子の発現を誘導する能力を示す。アプタマー6B4を含むリボスイッチが、フルスルチアミン処理に応答して高感度緑色蛍光タンパク質（EGFP）の発現を調節することを示す。EGFP-6B4コンストラクトを含有する、安定的にトランスフェクトされたHEK293細胞を、示されている用量（図7B）にてフルスルチアミンで24時間処理した。

【0064】

【図7C】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが、リガンドに応答して様々な標的遺伝子の発現を誘導する能力を示す。3H4または15D10を含むリボスイッチがそれぞれ、フルスルチアミン処理に応答してマウスエリスロポエチン（mEpo）の発現を調節することを示す。AML12細胞に、Epo-3H4またはEpo-15D10コンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、示されている用量にてフルスルチアミンで処理するかまたは未処理で放置した。mEpo ELISAを使用してmEpoの発現を検出及び定量し、平均±S.D.として表した。

【0065】

【図7D】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが、リガンドに応答して様々な標的遺伝子の発現を誘導する能力を示す。3H4または15D10を含むリボスイッチがそれぞれ、フルスルチアミン処理に応答してマウスエリスロポエチン（mEpo）の発現を調節することを示す。AML12細胞に、Epo-3H4またはEpo-15D10コンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、示されている用量にてフルスルチアミンで処理するかまたは未処理で放置した。誘導倍率は、フルスルチアミンで処理した細胞から産生されたmEpoの量を、フルスルチアミンで処理していない細胞から産生されたmEpoの量で割った商として計算された。

【0066】

【図8A】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。（1）アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ（「対照1」）、（2）アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ3H4」もしくは「3H4」）、または（3）アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ6B4」もしくは「6B4」）を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス（各群n=5匹）に、マウス1匹あたり 1.0×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50 mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与

10

20

30

40

50

の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った：36日目（AAV投与後）：100mg/kg；43日目：200mg/kg；及び51日目：400mg/kg。再設計されたりボスイッチ3H4または6B4を持つルシフェラーゼ遺伝子を含むAAVベクターをトランスフェクトされたマウスの、示されている時点及びプロスルチアミンの用量でのルシフェラーゼ発現を示す。

【0067】

【図8B-1】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1)アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ（「対照1」）、(2)アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ3H4」もしくは「3H4」）、または(3)アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ6B4」もしくは「6B4」）を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス（各群n=5匹）に、マウス1匹あたり 1.0×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った：36日目（AAV投与後）：100mg/kg；43日目：200mg/kg；及び51日目：400mg/kg。薬物投与の前日、ならびに投与の6時間後、24時間後、48時間後及び72時間後に異なる群で観察されたルシフェラーゼの蛍光強度を示す。

【0068】

【図8B-2】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1)アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ（「対照1」）、(2)アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ3H4」もしくは「3H4」）、または(3)アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ6B4」もしくは「6B4」）を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス（各群n=5匹）に、マウス1匹あたり 1.0×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った：36日目（AAV投与後）：100mg/kg；43日目：200mg/kg；及び51日目：400mg/kg。薬物投与の前日、ならびに投与の6時間後、24時間後、48時間後及び72時間後に異なる群で観察されたルシフェラーゼの蛍光強度を示す。

【0069】

【図8B-3】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1)アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ（「対照1」）、(2)アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ3H4」もしくは「3H4」）、または(3)アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット（「スイッチ6B4」もしくは「6B4」）を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス（各群n=5匹）に、マウス1匹あたり 1.0×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った：36日目（AAV投与後）：100mg/kg；43日目：200mg/kg；及び51日目：400mg/kg。薬物投与の前日、ならびに投与の6時間後、24時間後、48時

間後及び72時間後に異なる群で観察されたルシフェラーゼの蛍光強度を示す。

【0070】

【図8C-1】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1)アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ(「対照1」)、(2)アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ3H4」もしくは「3H4」)、または(3)アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ6B4」もしくは「6B4」)を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス(各群n=5匹)に、マウス1匹あたり 2.5×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った:36日目(AAV投与後):100mg/kg;43日目:200mg/kg;及び51日目:400mg/kg。薬物投与の前日、ならびに投与の6時間後、24時間後、48時間後及び72時間後に異なる群で観察されたルシフェラーゼの蛍光強度を示す。

10

【0071】

【図8C-2】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1)アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ(「対照1」)、(2)アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ3H4」もしくは「3H4」)、または(3)アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ6B4」もしくは「6B4」)を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス(各群n=5匹)に、マウス1匹あたり 2.5×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った:36日目(AAV投与後):100mg/kg;43日目:200mg/kg;及び51日目:400mg/kg。薬物投与の前日、ならびに投与の6時間後、24時間後、48時間後及び72時間後に異なる群で観察されたルシフェラーゼの蛍光強度を示す。

20

30

【0072】

【図8C-3】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1)アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ(「対照1」)、(2)アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ3H4」もしくは「3H4」)、または(3)アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ6B4」もしくは「6B4」)を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス(各群n=5匹)に、マウス1匹あたり 2.5×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った:36日目(AAV投与後):100mg/kg;43日目:200mg/kg;及び51日目:400mg/kg。薬物投与の前日、ならびに投与の6時間後、24時間後、48時間後及び72時間後に異なる群で観察されたルシフェラーゼの蛍光強度を示す。

40

【0073】

【図8D】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1)アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ(「対照1」)、(2)アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ3H4」もし

50

くは「3H4」）、または(3) アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ6B4」もしくは「6B4」)を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス(各群n=5匹)に、マウス1匹あたり 1.0×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った: 36日目(AAV投与後): 100mg/kg; 43日目: 200mg/kg; 及び51日目: 400mg/kg。異なる薬物用量及び群について、薬物投与後のプロスルチアミン処置時のルシフェラーゼ発現の相対的増加を示す。ルシフェラーゼ発現の誘導倍率は、プロスルチアミンで処置したマウスから得た光子/秒を、プロスルチアミン処置の1日前にマウスから得た値で割った商として計算された。

【0074】

【図8E】再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチによるインビボでのルシフェラーゼの誘導発現を示す。(1) アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ(「対照1」)、(2) アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ3H4」もしくは「3H4」)、または(3) アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット(「スイッチ6B4」もしくは「6B4」)を有する、イントロン-選択的エクソン-イントロンのカセットを含有する、アデノ随伴AAV2/8ウイルス粒子を作製した。Balb/cマウス(各群n=5匹)に、マウス1匹あたり 2.5×10^{11} のウイルス粒子を単回尾静脈注射により注射した。AAV送達の28日後、マウスに50mg/kgのプロスルチアミンを腹腔内に注射した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の6時間後、24時間後、48時間後、及び72時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに以下のとおり追加の3回の投与及び撮像サイクルを行った: 36日目(AAV投与後): 100mg/kg; 43日目: 200mg/kg; 及び51日目: 400mg/kg。異なる薬物用量及び群について、薬物投与後のプロスルチアミン処置時のルシフェラーゼ発現の相対的増加を示す。ルシフェラーゼ発現の誘導倍率は、プロスルチアミンで処置したマウスから得た光子/秒を、プロスルチアミン処置の1日前にマウスから得た値で割った商として計算された。

【0075】

【図9A】追加の式IV、V、及びVIのチアミン類似体と比較してフルスルチアミンまたはベンフォチアミンに対して応答した、ルシフェラーゼ標的遺伝子発現の誘導を示す。ルシフェラーゼ標的遺伝子は、15D10アプタマーを含むリボスイッチをコードする配列を含有していた。群IVの化合物を、それらがHEK293細胞でルシフェラーゼ発現を誘導する能力について試験した。

【0076】

【図9B】追加の式IV、V、及びVIのチアミン類似体と比較してフルスルチアミンまたはベンフォチアミンに対して応答した、ルシフェラーゼ標的遺伝子発現の誘導を示す。ルシフェラーゼ標的遺伝子は、15D10アプタマーを含むリボスイッチをコードする配列を含有していた。群IVの化合物を、それらがAML12細胞でルシフェラーゼ発現を誘導する能力について試験した。

【0077】

【図9C】追加の式IV、V、及びVIのチアミン類似体と比較してフルスルチアミンまたはベンフォチアミンに対して応答した、ルシフェラーゼ標的遺伝子発現の誘導を示す。ルシフェラーゼ標的遺伝子は、15D10アプタマーを含むリボスイッチをコードする配列を含有していた。群V及び群VIの化合物を、それらがHEK293細胞でルシフェラーゼ発現を誘導する能力について試験した。

【0078】

【図9D】追加の式IV、V、及びVIのチアミン類似体と比較してフルスルチアミンま

たはベンフォチアミンに対して応答した、ルシフェラーゼ標的遺伝子発現の誘導を示す。ルシフェラーゼ標的遺伝子は、15D10アプタマーを含むリボスイッチをコードする配列を含有していた。群V及び群VIの化合物を、それらがAML12細胞でルシフェラーゼ発現を誘導する能力について試験した。

【0079】

【図9E】追加の式IV、V、及びVIのチアミン類似体と比較してフルスルチアミンまたはベンフォチアミンに対して応答した、ルシフェラーゼ標的遺伝子発現の誘導を示す。ルシフェラーゼ標的遺伝子は、15D10アプタマーを含むリボスイッチをコードする配列を含有していた。最も強力な化合物を、それらがARPE-19細胞でルシフェラーゼ発現を誘導する能力についてさらに試験した。

10

【0080】

【図9F】追加の式IV、V、及びVIのチアミン類似体と比較してフルスルチアミンまたはベンフォチアミンに対して応答した、ルシフェラーゼ標的遺伝子発現の誘導を示す。ルシフェラーゼ標的遺伝子は、15D10アプタマーを含むリボスイッチをコードする配列を含有していた。最も強力な化合物を、それらがHepG2細胞でルシフェラーゼ発現を誘導する能力についてさらに試験した。

【発明を実施するための形態】

【0081】

本明細書では、チアミンまたはTPP、及びチアミンまたはTPPの類似体もしくは誘導体等の小分子に結合するか、そうでなければその存在に応答するアプタマー配列を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるアプタマー配列は、チアミンまたはTPPの類似体もしくは誘導体に応答した、標的遺伝子の発現の調節に有用である。また、本明細書に開示されるアプタマー配列を含むリボスイッチ、及び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も企図され、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。また、本明細書では、治療遺伝子等の標的遺伝子の調節のため、及びそれを必要とする対象の治療のために、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提供される。

20

【0082】

アプタマー

【0083】

アプタマーは、三次元構造に折り畳まれることにより、高い親和性及び特異性で特定のリガンドに非共有結合で結合する一本鎖核酸分子である。アプタマーリガンドには、イオン、小分子、タンパク質、ウイルス、及び細胞が含まれる。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であり得る。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、食品偽和剤、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。アプタマーによる低分子検出の用途としては、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挙げられる。

30

【0084】

本明細書で使用する用語「アプタマー」とは、あるクラスのリガンドに特異的に結合するRNAポリヌクレオチド（またはそのRNAポリヌクレオチドをコードするDNA配列）を指す。用語「リガンド」とは、アプタマーが特異的に結合する分子を指す。アプタマーは、意図される標的分子（すなわち、リガンド）と複合体を形成する能力がある結合領域を有する。アプタマーは典型的には、長さが約15～約200ヌクレオチドである。より一般的には、アプタマーは、長さが約30～約100ヌクレオチド、例えば、長さが70～90ヌクレオチドである。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、及びアプタマーが連結（J）領域またはループ（L）領域を形成する不對領域を含む。対領域には、5'末端（P1）から出発して順に番号付けし、各ステムに順に番号付けしていくことができる（P2、P3等）。ループ（L1、L2等）には、

40

50

隣接する対領域に基づいて番号付けされ、連結領域は、それらが連結する対領域に従って番号付けされる。

【0085】

一実施形態では、アプタマーコード配列は、

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCA TTTGGGCX₄CCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCC TTX₈X₉X₁₀X₁₁CC TGT TX₁₂ACGGATAATGC
CGCX₁₃GCAGGGAGT (配列番号1)

を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Tであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₄は、AまたはGであり、

X₅は、任意のヌクレオチドであり、

X₆は、任意のヌクレオチドであり、

X₇は、任意のヌクレオチドであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、C、G、またはTであり、

X₁₀は、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁は、AまたはTであり、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、CまたはTである。

【0086】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁がAではない；X₂がCではない；X₃がTではない；X₄がGではない；X₅がGではない；X₆がCではない；X₇がCではない；X₈がTではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；X₁₁がAではない；X₁₂がTではない；及びX₁₃がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマーコード配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₂がCである；X₃がTである；X₅がGである；X₆がCである；X₇がCである；X₈がTである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がTである；及びX₁₃がCである。

【0087】

一実施形態では、アプタマーコード配列は、

ACX₁GGGGTCCGGCX₂TX₃TTCA TTTGGCGCCGGTGAGAX₅
X₆AX₇ACCC TTX₈X₉X₁₀X₁₁CC TGT TX₁₂ACGGATAATGC
CGCX₁₃GCAGGGAGT (配列番号2)

を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Tであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₅は、GまたはTであり、

X₆は、CまたはTであり、

X₇は、CまたはTであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、GまたはTであり、

X₁₀は、A、G、またはTであり、

X₁₁は、AまたはTであり、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、CまたはTである。

【0088】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁

がAではない；X₂がCではない；X₃がTではない；X₄がGではない；X₅がGではない；X₆がCではない；X₇がCではない；X₈がTではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；X₁₁がAではない；X₁₂がTではない；及びX₁₃がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₂がCである；X₃がTである；X₅がGである；X₆がCである；X₇がCである；X₈がTである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がTである；及びX₁₃がCである。

【0089】

一実施形態では、アプタマーコード配列は、ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTTGAACCTGTTX₁₂ACGGATAATGCCGCGCX₁₃GCAGGGAGT（配列番号3）を含み、ここで、

X₁₂は、CまたはTであり、かつ

X₁₃は、CまたはTである。

【0090】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁₂がTではない；及びX₁₃がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₁₂がTである、及びX₁₃がCである。

【0091】

一実施形態では、アプタマーコード配列は、ACX₁GGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACCCTTX₈X₉X₁₀X₁₁CCTGTTTACGGATAATGCCGCGCGCAGGGAGT（配列番号4）を含み、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、GまたはTであり、

X₁₀は、A、G、またはTであり、かつ

X₁₁は、AまたはTである。

【0092】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁がAではない；X₈がTではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；X₁₁がAではない。実施形態では、以下の全てがアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₈がTである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がTである；及びX₁₃がCである。

【0093】

一実施形態では、アプタマーコード配列は、ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAX₅X₆AX₇ACCCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCGCGCAGGGAGT（配列番号5）

を含み、ここで、

X₅は、GまたはTであり、

X₆は、CまたはTであり、かつ

X₇は、CまたはTである。

【0094】

実施形態では、アプタマーコード配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₅がGではない；X₆がCではない；及びX₇がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₅がGである；X₆がCである；及びX₇がCである。

【0095】

一実施形態では、アプタマーコード配列は、ACAGGGGTCCGGCCTTTTC

10

20

30

40

50

A T T T G G C X₄ C C G G T G A G A X₅ X₆ A X₇ A C C C T T X₈ X₉ X₁₀ A C C
T G T T C A C G G A T A A T G C C G C T G C A G G G A G T (配列番号 6) を含み、
ここで、

X₄ は、A または G であり、

X₅ は、任意のヌクレオチドであり、

X₆ は、任意のヌクレオチドであり、

X₇ は、任意のヌクレオチドであり、

X₈ は、任意のヌクレオチドであり、

X₉ は、C または G であり、かつ

X₁₀ は、任意のヌクレオチドである。

【0096】

一実施形態では、アプタマーコード配列は、配列番号 7～36 (表 1 を参照のこと) からなる群から選択される配列を含む。一実施形態では、アプタマーコード配列は、配列番号 7～36 からなる群から選択される配列と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % 同一である配列を含む。参照ポリペプチドまたは核酸配列に関して「配列同一性パーセント」は、配列を整列させ、配列同一性パーセントが最大となるよう、必要に応じてギャップを導入した後、参照ポリペプチドまたは核酸の配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドと同一である、候補配列中のアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。アミノ酸または核酸の配列同一性パーセントを決定することを目的としたアラインメントは、当業者に既知の方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN または Megalign (DNASTAR) ソフトウェア等の公的に利用可能なコンピュータソフトウェアプログラムを使用して達成することができる。

【表 1-1】

表 1. アプタマーコード配列

配列番号	アプタマー	アプタマーコード配列
7	14G4 (親)	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
8	1D10	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTATACC CTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
9	3H4	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTTGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
10	3F10	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

11	3H9	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACC CTTATGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
12	4G2	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
13	6D2	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTTGTTCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
14	6B4	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTGTGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
15	4H2	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
16	6C4	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTCGAACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
17	6G12	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
18	8F1	ACGGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACACC CTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCCGCAGGGAGT
19	10A7	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATGATAC CCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
20	12D5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGCACAC CCTTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
21	12G7	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTATACC CTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
22	12H3	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCACAC CCTTACTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
23	13H7	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAACAGAC CCTTTGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
24	13B6	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAACACAC CCTTTGTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
25	15A5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTATACC CTTACTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
26	15D10	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCACCGGTGAGAACATAC CCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
27	15F9	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTACACC CTTAGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
28	16E5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCAAAC CCTTGGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
29	16G8	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGTACAC CCTTCGCACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
30	16G6	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCACAC CCTTGGTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
31	17E2	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATTACACC CCTTGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
32	17G1	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGATCACAC CCTTGGAACTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
33	17D3	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGGATAC CCTTCGGACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
34	17F5	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGTATAC CCTTAGTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT

10

20

30

40

【表 1 - 3】

35	17G3	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCACCGGTGAGACAATAC CCTTGGTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT
36	18G9	ACAGGGGTCCGGCCTTTTCATTTGGCGCCGGTGAGAGAATAC CCTTGGTACCTGTTTACGGATAATGCCGCTGCAGGGAGT

【 0 0 9 7 】

当業者であれば、本明細書に記載されるアプタマーがリボ核酸（RNA）分子であり得

50

ることを理解するであろう。実施形態では、本明細書に記載されるアプタマーは、例えば、h nRNA、mRNA、s iRNA、またはm iRNAが含まれる、より長いRNAポリヌクレオチドの一部である。

【0098】

一態様では、配列

A C X₁ G G G G U C C G G C X₂ U X₃ U U C A U U U G G C X₄ C C G G U G A G A X₅ X₆ A X₇ A C C C U U X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ C C U G U U X₁₂ A C G G A U A A U G C C G C X₁₃ G C A G G G A G U (配列番号43)、

を含むアプタマーが提供され、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Uであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₄は、AまたはGであり、

X₅は、任意のヌクレオチドであり、

X₆は、任意のヌクレオチドであり、

X₇は、任意のヌクレオチドであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、C、G、またはUであり、

X₁₀は、任意のヌクレオチドであり、

X₁₁は、AまたはUであり、

X₁₂は、CまたはUであり、かつ

X₁₃は、CまたはUである。

【0099】

実施形態では、アプタマー配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁がAではない；X₂がCではない；X₃がUではない；X₄がGではない；X₅がGではない；X₆がCではない；X₇がCではない；X₈がUではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；X₁₁がAではない；X₁₂がUではない；及びX₁₃がCではない。

【0100】

実施形態では、以下の全てがアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₂がCである；X₃がUである；X₄がGである；X₅がGである；X₆がCである；X₇がCである；X₈がUである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がUである；及びX₁₃がCである。

【0101】

一態様では、配列

A C X₁ G G G G U C C G G C X₂ U X₃ U U C A U U U G G C G C C G G U G A G A X₅ X₆ A X₇ A C C C U U X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ C C U G U U X₁₂ A C G G A U A A U G C C G C X₁₃ G C A G G G A G U (配列番号44)、

を含むアプタマーが提供され、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₂は、Cであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₃は、Uであるかまたはヌクレオチドがなく、

X₅は、GまたはUであり、

X₆は、CまたはUであり、

X₇は、CまたはUであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、GまたはUであり、

X₁₀は、A、G、またはUであり、

X₁₁は、AまたはUであり、

X₁₂は、CまたはUであり、かつ

X₁₃は、CまたはUである。

【0102】

実施形態では、アプタマー配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁がAではない；X₂がCではない；X₃がUではない；X₄がGではない；X₅がGではない；X₆がCではない；X₇がCではない；X₈がUではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；X₁₁がAではない；X₁₂がUではない；及びX₁₃がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₂がCである；X₃がUである；X₅がGである；X₆がCである；X₇がCである；X₈がUである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がUである；及びX₁₃がCである。

【0103】

一態様では、配列

ACAGGGGUGCCGGCCUUUUCAUUUGGCGCCGGUGAGAGCAC
ACCCUUUGAACCCUGUUX₁₂ACGGGAUAAUGCCGCGCX₁₃GCAGG
GAGU（配列番号45）、

を含むアプタマーが提供され、ここで、

X₁₂は、CまたはUであり、かつ

X₁₃は、CまたはUである。

【0104】

実施形態では、アプタマー配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁₂がUではない；及びX₁₃がCではない。実施形態では、以下のうちのいずれもアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₁₂がUである、及びX₁₃がCである。

【0105】

一態様では、配列

ACX₁GGGGUGCCGGCCUUUUCAUUUGGCGCCGGUGAGAGCA
CACCCUUX₈X₉X₁₀X₁₁CCUGUUUACGGGAUAAUGCCGCGCGC
AGGGAGU（配列番号46）、

を含むアプタマーが提供され、ここで、

X₁は、AまたはGであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、GまたはUであり、

X₁₀は、A、G、またはUであり、かつ

X₁₁は、AまたはUである。

【0106】

実施形態では、アプタマー配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₁がAではない；X₈がUではない；X₉がGではない；X₁₀がAではない；及びX₁₁がAではない。実施形態では、以下の全てがアプタマー配列中に同時に存在することはない：X₁がAである；X₈がUである；X₉がGである；X₁₀がAである；X₁₁がAである；X₁₂がUである；及びX₁₃がCである。

【0107】

一態様では、配列

ACAGGGGUGCCGGCCUUUUCAUUUGGCGCCGGUGAGAX₅X₆
AX₇ACCCUUUGAACCCUGUUUACGGGAUAAUGCCGCGCGCAGG
GAGU（配列番号47）、

を含むアプタマーが提供され、ここで、

X₅は、GまたはUであり、

X₆は、CまたはUであり、かつ

X₇は、CまたはUである。

【0108】

実施形態では、アプタマー配列は、以下の特性のうちの1つ以上を有する：X₅がGではない；X₆がCではない；及びX₇がCではない。実施形態では、以下の全てがアプタ

10

20

30

40

50

マー配列中に同時に存在することはない：X₅がGである；X₆がCである；及びX₇がCである。

【0109】

一態様では、配列

ACAGGGGUCCGGCCUUUUCAUUUGGCX₄CCGGUGAGAX₅X₆
AX₇ACCCUUX₈X₉X₁₀ACCUGUUCACGGGAUAAUGCCGCUGC
AGGGAGU（配列番号48）、

を含むアプタマーが提供され、ここで、

X₄は、AまたはGであり、

X₅は、任意のヌクレオチドであり、

X₆は、任意のヌクレオチドであり、

X₇は、任意のヌクレオチドであり、

X₈は、任意のヌクレオチドであり、

X₉は、CまたはGであり、かつ

X₁₀は、任意のヌクレオチドである。

【0110】

一態様では、小分子に結合するアプタマーが提供され、ここで、アプタマーは、配列番号49～78からなる群から選択される配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、アプタマー配列は、配列番号49～78からなる群から選択される配列を含む。実施形態では、アプタマー配列は、配列番号51、56、及び68からなる群から選択される配列を含む。

【0111】

アプタマーリガンド

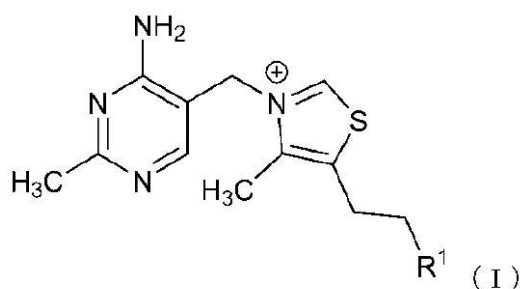
【0112】

一実施形態では、アプタマーリガンドは、チアミン（ビタミンB₁）である、あるいはチアミン類似体である、及び／またはチアミンの誘導体である。本明細書で使用される場合、用語「チアミン類似体」とは、チアミンと比較して同様の物理的、化学的、生化学的、または薬理学的な特性を有する分子を指し、例えば、アンプロリウムまたはシコチアミンが挙げられる。チアミン類似体は、チアミン誘導体であってよい。本明細書で使用される場合、用語「チアミン誘導体」とは、修飾または置換によって、チアミンから誘導される、またはそのチアゾール環が開環形態である化合物を指す。チアミン誘導体として、例えば、アセフルチアミン、アセチアミン、アリチアミン、ベクロチアミン、ベンフォチアミン、ベンチアミン、ビスベンチアミン、セトチアミン、フルスルチアミン、モノホスホチアミン、オクトチアミン、プロスルチアミン、スルブチアミン、チアミン、チアミンピロリン酸、またはピンチアモールが挙げられ得る。

【0113】

いくつかの実施形態では、アプタマーは、式I～VIIによる構造を有する小分子が含まれる、本明細書に開示される小分子に結合するか、そうでなければその存在または付加に応答する。実施形態では、小分子は、式I

【化9】



10

20

30

40

50

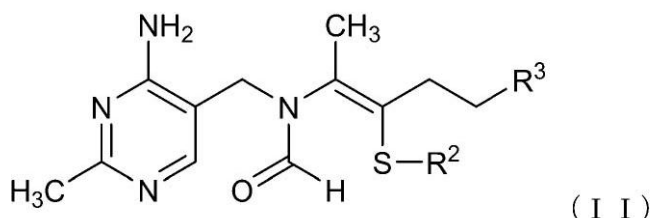
による構造を有し、式中、

R^1 は、OH、アミノ、F、Cl、Br、ホスファート、ピロホスファート、 $-O-C(=O)-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-C_2-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-$ フェニル、 $-O-C(=O)-$ 複素環、 $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-O-C_2-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-O-$ フェニル、及び $-O-C(=O)-O-$ 複素環からなる群から選択される。

【0114】

実施形態では、小分子は、式II

【化10】



による構造を有し、式中、

R^2 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 $-(CH_2)_n-R^6$ 、 $-C(=O)-R^4$ 、 $-C(=O)-O-R^4$ 、 $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$ 、 $-S-C_1-C_6$ アルキル、 $-S-C_2-C_6$ アルケニル、 $-S-$ 複素環、及び $-S-CH_2-$ 複素環からなる群から選択されるか、

または、 R^2 は、化合物が、ジスルフィド($-S-S-$)結合を介して接続されている2つの式IIの分子の二量体を形成するよう $-S-$ 【式II】であり、

R^3 は、OH、アミノ、F、Cl、Br、ホスファート、ピロホスファート、 $-O-C(=O)-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-C_1-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-$ フェニル、 $-O-C(=O)-$ 複素環、 $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ アルキル、 $-O-C(=O)-O-C_1-C_6$ アルケニル、 $-O-C(=O)-O-$ フェニル、 $-O-C(=O)-O-$ 複素環からなる群から選択され、

R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-(C_2-C_6$ アルケニル) $-$ アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R^5 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

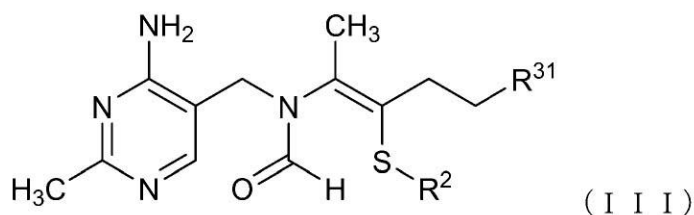
R^6 は、ヒドロキシル、アミノ、アミド、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルであり、かつnは、1~8であり、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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なる群から選択される1~3つの置換基により置換されてもよい。

【0115】

実施形態では、小分子は、式ⅠⅠⅠ

【化11】



10

による構造を有し、式中、

R^2 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 $-(CH_2)_n-R^6$ 、 $-C(=O)-R^4$ 、 $-C(=O)-O-R^4$ 、 $-CHR^5-O-C(=O)-R^4$ 、 $-S-C_1-C_6$ アルキル、 $-S-C_2-C_6$ アルケニル、 $-S$ -複素環、及び $-S-CH_2$ -複素環からなる群から選択され、

R^{31} は、OH及びホスファートからなる群から選択され、

R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-(C_2-C_6$ アルケニル) $-$ アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

20

R^5 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

R^6 は、ヒドロキシル、アミノ、アミド、 C_1-C_6 アルコキシ、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルであり、かつ n は、1～8であり、

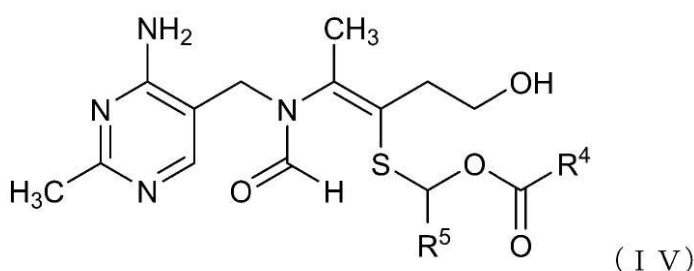
ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、またはハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、シアノ、アミド、スルホンアミド、ニトロ、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル) $-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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なる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい。

30

【0116】

実施形態では、小分子は、式ⅠⅣ

【化12】



40

による構造を有し、式中、

50

R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

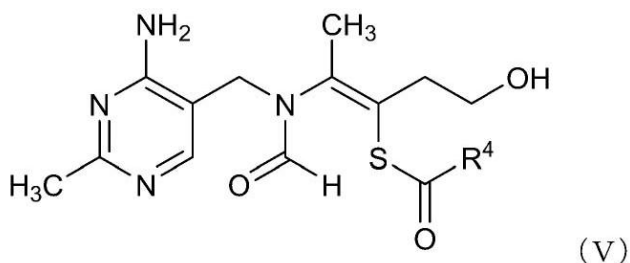
R^5 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい。

【0117】

実施形態では、小分子は、式V

【化13】



による構造を有し、式中、

R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される1～3つの置換基により置換されてもよい。

【0118】

実施形態では、小分子は、式VI

10

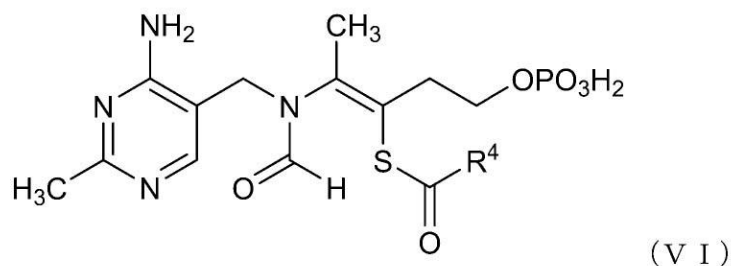
20

30

40

50

【化 1 4】



による構造を有し、式中、

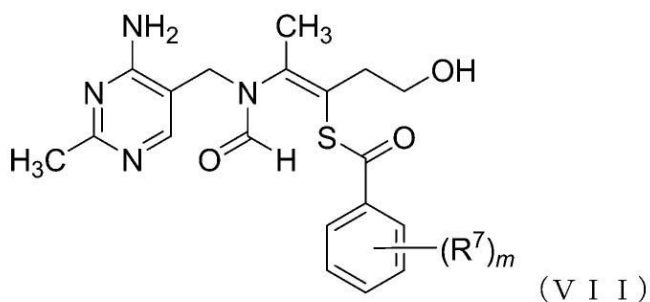
R^4 は、H、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_9-C_{14} トリシクリル、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-(C_2-C_6 \text{ アルケニル})$ -アリール、アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択され、

ここで、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、ビシクリル基、トリシクリル基、アリール基、ヘテロアリール基及びヘテロシクリル基の各々は、非置換であっても、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、ヘテロアリール及びヘテロシクリルからなる群から選択される 1～3 つの置換基により置換されてもよい。

【0119】

実施形態では、小分子は、式 VII

【化 1 5】



による構造を有し、式中、

各 R^7 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O$ -アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -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、

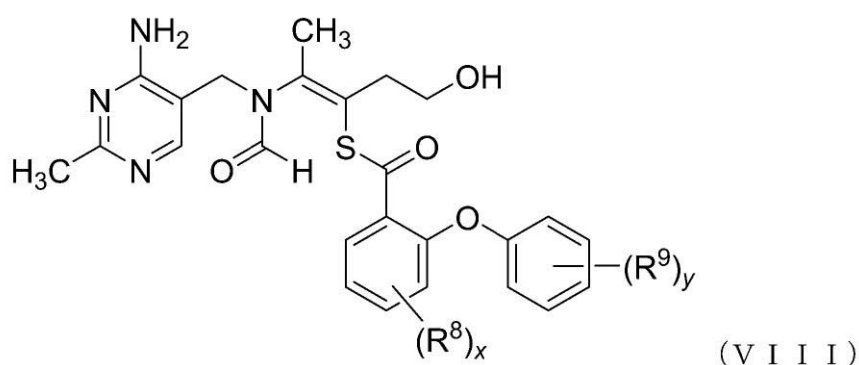
追加または別法として、2つの隣接する R^7 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0～2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、またはハロゲン、ヒドロキシル、アミノ、シアノ、アミド、スルホンアミド、ニトロ、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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最大4つの置換基により置換されており、

m は、0、1、2、3または4である。

【0120】

いくつかの実施形態では、小分子は、式VII I

【化16】



による構造を有し、式中、

各 R^8 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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、

追加または別法として、2つの隣接する R^8 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0～2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)、 $O-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-O-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-O-(C_1-C_6$ アルキル)-アリール、 $-S-(C_1-C_6$ アルキル)、 $-S-(C_3-C_7$ シクロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ハロアルキル)、 $-S-(C_1-C_6$ ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-(C_1-C_6$ 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最大4つの置換基により置換されており、

各 R^9 は、独立して、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -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、

追加または別法として、2つの隣接する R^9 基が一緒になって5員または6員の芳香族または非芳香族の縮合環を形成してよく、これが、0～2個の環ヘテロ原子を含有し、かつ、非置換であるか、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、 $-SH$ 、 C_1-C_6 アルキル、 C_2-C_6 アルケニル、 C_3-C_7 シクロアルキル、 C_6-C_{10} ビシクリル、 C_1-C_6 ハロアルキル、 C_1-C_6 ペルハロアルキル、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $O-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-O-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、アリール、 $-O-$ アリール、 $-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-O-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ 、 $-S-(C_3-C_7 \text{ シクロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ハロアルキル})$ 、 $-S-(C_1-C_6 \text{ ペルハロアルキル})$ 、 $-S$ -アリール、 $-S-(C_1-C_6 \text{ アルキル})$ -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最大4つの置換基により置換されており、

x は、0、1、2または3であり、

y は、0、1、2、3、または4である。

【0121】

用語「アルキル」とは、飽和脂肪族基のラジカルを指し、直鎖アルキル基及び分岐鎖アルキル基が含まれる。好ましい実施形態では、直鎖または分岐鎖のアルキルは、その骨格に6個以下の炭素原子を有する（例えば、直鎖では C_1-C_6 、分岐鎖では C_3-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、ヘキシル等が挙げられる。

【0122】

用語「シクロアルキル」とは、環に3～6個の炭素を有する飽和炭素環基を指す。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。

【0123】

用語「ビシクリル」とは、2つの連結環系を有する飽和炭素環基を指し、縮合または架橋してよい。二環式基としては、ビシクル[2.1.1]ヘキサン、ビシクル[2.2.1]ヘプタン、デカリン等が挙げられる。用語「トリシクリル」とは、3つの連結環系を有する飽和炭素環基を指し、縮合及び／または架橋してよい。三環式基としては、アダマンタン等が挙げられる。

【0124】

用語「アルケニル」とは、不飽和脂肪族基を指し、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する、直鎖アルケニル基及び分岐鎖アルケニル基が含まれる。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-C_6 アルケニル）。

【0125】

本明細書で使用される場合、用語「ハロゲン」または「ハロ」により、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ または $-I$ 、及び好ましくは $-F$ 、 $-Cl$ または $-Br$ が指定される。

【0126】

本明細書で使用される場合、用語「アルコキシル」または「アルコキシ」とは、酸素原子を介して結合している、上記で定義されているようなアルキル基を指す。代表的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、 $tert$ -ブトキシ等が挙げ

10

20

30

40

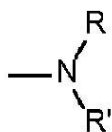
50

られる。

【0127】

用語「アミン」及び「アミノ」とは、非置換及び置換の両方のアミン、例えば、以下の一般式で表すことができる部分を指し、

【化17】

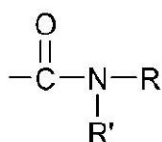


式中、R 及び R' は、それぞれ独立して、H 及び $\text{C}_1 - \text{C}_3$ アルキルから選択される。

【0128】

用語「アミド」とは、非置換及び置換の両方のアミド置換基、例えば、以下の一般式で表すことができる部分を指し、

【化18】

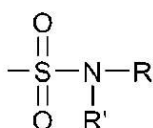


式中、R 及び R' は、それぞれ独立して、H 及び $\text{C}_1 - \text{C}_3$ アルキルから選択される。

【0129】

用語「スルホンアミド (sulfonamide)」または「スルホンアミド (sulfonamido)」とは、非置換及び置換の両方のスルホンアミド置換基、例えば、以下の一般式で表すことができる部分を指し、

【化19】



式中、R 及び R' は、それぞれ独立して、H 及び $\text{C}_1 - \text{C}_3$ アルキルから選択される。

【0130】

本明細書で使用される場合、用語「アリール」には、0～4個のヘテロ原子が含まれ得る、5員及び6員の単環式芳香族基、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が含まれる。環構造にヘテロ原子を有するアリール基は、「アリール複素環」または「ヘテロアリール」基と呼ばれる場合もある。用語「アリール」にはまた、2つ以上の炭素が2つの隣接する環（環は、「縮合環」である）に共通している環式環を2つ以上有し、環のうちの少なくとも1つが芳香族である、多環式環系も含まれる。したがって、アリールには、0～5個のヘテロ原子が含まれ得る8員～10員の縮合二環式芳香族基が含まれ、それにおいて、一方または両方の環が芳香族、例えば、ナプチレン、キノロン、イソキノリン、ベンゾ [b] チオフェン、テトラヒドロナプチレン等である。各アリール基は、非置換であっても、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、 $-\text{SH}$ 、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル、 $\text{C}_2 - \text{C}_6$ アルケニル、 $\text{C}_3 - \text{C}_7$ シクロアルキル、 $\text{C}_6 - \text{C}_{10}$ ビシクリル、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ ハロアルキル、 $\text{C}_1 - \text{C}_6$ ペルハロアルキル、 $-\text{O}-$ ($\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル)、 $\text{O}-$ ($\text{C}_3 - \text{C}_7$ シクロアルキル)、 $-\text{O}-$ ($\text{C}_1 - \text{C}_6$ ハロアルキル)、 $-\text{O}-$ ($\text{C}_1 - \text{C}_6$ ペルハロアルキル)、アリール、 $-\text{O}-$ アリール、 $-(\text{C}_1 - \text{C}_6 \text{ アルキル}) -$ アリール、 $-\text{O}-$ ($\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル) - アリール、 $-\text{S}-$ ($\text{C}_1 - \text{C}_6$ アルキル)、 $-\text{S}-$ ($\text{C}_3 - \text{C}$

10

20

30

40

50

7シクロアルキル)、 $-S-$ (C_1-C_6 ハロアルキル)、 $-S-$ (C_1-C_6 ペルハロアルキル)、 $-S-$ アリール、 $-S-$ (C_1-C_6 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つの置換基で置換されてもよい。

【0131】

「ヘテロシクリル」の「複素環」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員の複素環基である。

【0132】

本明細書で使用される場合、用語「ヘテロ原子」とは、炭素または水素以外の任意の元素の原子を意味する。好ましいヘテロ原子は、窒素、酸素、及びイオウである。

【0133】

本明細書で使用される場合、それぞれの表現の定義、例えば、アルキル、 R^1 、 R^2 等は、それが任意の構造で2回以上現れる場合、同じ構造の他の箇所でのその定義とは独立していることが意図される。

【0134】

そのような置換が、置換される原子と置換基の許容される価数に従っていること、及びその置換が、安定な化合物、例えば、転位、環化、脱離等によるような変換を自発的に起こさない化合物をもたらすこと、という暗黙の条件が含まれることが理解されるであろう。

【0135】

本明細書に開示されるアプタマーリガンドは、特定の幾何学的形態または立体異性体形態、及びその混合物で存在し得る。そのような幾何学的形態または立体異性体形態としては、シスー及びトランスーの異性体、 $R-$ 及び $S-$ の鏡像異性体、ジアステレオマー、(D)-異性体、(L)-異性体、そのラセミ混合物、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は、アルキル基等の置換基で存在し得る。

【0136】

式I~VIIによる化合物は、酸性または塩基性の官能基を含有してよく、したがって、塩形態で存在してよい。好ましくは、塩形態は、薬学的に許容される塩である。これに関し、用語「薬学的に許容される塩」とは、本明細書に開示される化合物の、比較的無毒な無機及び有機の酸付加塩及び塩基付加塩を指す。

【0137】

式I~VIIによる化合物は、アミノまたはアルキルアミノ等の1つ以上の塩基性官能基を含有してよく、したがって、それらは、薬学的に許容される酸と共に薬学的に許容される塩を形成する能力がある。これらの塩は、投与ビヒクルもしくは剤形製造工程においてインサイチュで調製するか、またはその遊離塩基形態にある精製された本明細書に開示の化合物を、好適な有機酸または無機酸と別々に反応させ、こうして形成された塩をその後の精製時に単離することによって調製することができる。代表的塩としては、臭化水素酸塩、塩酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、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、ナプチラート(napthylate)、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等が挙げられる(例えば、Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと)。

【0138】

対象化合物の薬学的に許容される塩には、例えば無毒な有機酸または無機酸からの、化合物の従来の無毒性塩または第四級アンモニウム塩が含まれる。例えば、そのような従来の無毒性塩としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸等のような無機酸に由来するもの；及び酢酸、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

10

20

30

40

50

、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、イセチオン酸 (I s o t h i o n i c) 等のような有機酸から調製される塩が挙げられる。

【0139】

この場合には、式Ⅰ～ⅤⅠⅠⅠによる化合物は、1つ以上の酸性官能基を含有してよく、したがって、薬学的に許容される塩基と共に薬学的に許容される塩を形成する能力がある。これらの塩は同様に、投与ビヒクルもしくは剤形製造工程においてインサイチュで調製するか、あるいはその遊離酸形態にある精製された化合物を、薬学的に許容される金属陽イオンの水酸化物、炭酸塩もしくは重炭酸塩等の好適な塩基と別々に反応させるか、アンモニアと別々に反応させるか、または薬学的に許容される有機の第一級、第二級もしくは第三級アミンと別々に反応させることによって調製することができる。代表的アルカリまたはアルカリ土類の塩としては、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、及びアルミニウム塩等が挙げられる。塩基付加塩の形成に有用な代表的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、ピペラジン等が挙げられる（例えば、B e r g e e t a l. (上掲)を参照のこと）。

【0140】

実施形態では、本明細書で提供されるアプタマーは、本明細書で提供される1つ以上のチアミン類似体もしくはTPP類似体に結合するか、そうでなければその存在に応答する、及び／または本明細書で提供されるチアミンもしくはTPPの類似体もしくは誘導体の代謝物、例えば、TPP及び／またはチアミンに結合するか、そうでなければそれに応答する。

【0141】

アプタマーの自身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た、自身のリガンドに対するアプタマーの比較解離定数 (K_d) の点から定義することができる。したがって、リガンドは、アプタマーに対して、無関係の物質に対するよりも高い親和性で結合する分子である。典型的には、自身のリガンドに関するアプタマーの K_d は、無関係の分子とのアプタマーの 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、無関係の分子とのアプタマーの 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。

【0142】

一実施形態では、アプタマーは、TPPに対し、式Ⅰ～ⅤⅠⅠの化合物に対する前記アプタマーの親和性、またはアセフルチアミン、アセチアミン、アリチアミン、ベクロチアミン、ベンフォチアミン、ベンチアミン、ビスベンチアミン、セトチアミン、シコチアミン、フルスルチアミン、モノホスホチアミン、オクトチアミン、プロスルチアミン、スルブチアミン、もしくはピンチアモールに対する前記アプタマーの親和性の少なくとも5分の1、少なくとも10分の1、少なくとも約20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500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の低親和性で結合する。一実施形態では、アプタマーは、TPPに対し、式Ⅰ～ⅤⅠⅠの化合物に対する前記アプタマーの親和性、またはアセフルチアミン、アセチアミン、アリチアミン、ベクロチアミン、ベンフォチアミン、ベンチアミン、ビスベンチアミン、セトチアミン、シコチアミン、フルスルチアミン、モノホスホチアミン、オクトチアミン、プロスルチアミン、スルブチアミン、もしくはピンチアモールに対する前記アプタマーの親和性の少なくとも5分の1、少なくとも10分の1、少なくとも約20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500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の低親和性で結合する。

【0143】

遺伝子発現調節のためのアプタマー

【0144】

いくつかの実施形態では、本開示により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、治療用導入遺伝子）の発現の調節は、様々な状況において都合がよい。遺伝子の治療的発現との関連において、例えば、小分子の存在に
10 応答して導入遺伝子の調節された発現を可能にする技術は、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増強させることができる。研究の場では、遺伝子発現の調節により、様々な実験条件の体系的な調査が可能になる。

【0145】

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非存在に
20 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。実施形態では、遺伝子調節カセットはさらに、標的遺伝子を含む。本明細書で使用される場合、「標的遺伝子」とは、本明細書に開示されるアプタマーに結合する小分子のため、本明細書に開示される小分子リガンドの存在または非存在に
20 応答して発現される導入遺伝子を指す。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り、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。

【0146】

本明細書に記載されるアプタマーは、リガンドの存在／非存在に
25 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、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であり得る。用語「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」は、本明細書では同じ意味で使用される。

【0147】

実施形態では、本明細書に開示のアプタマーに結合する小分子の存在は、小分子非存在
30 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。そのような実施形態では、アプタマーは「オン」スイッチを構成する。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、かかる小分子の非存在下の場合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
30 倍、000倍増加する。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、かかる小分子の非存在下の場合と比較して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。

【0148】

実施形態では、本明細書に開示のアプタマーに結合する小分子の存在は、小分子非存在
40 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。そのような実施形態では、アプタマーは「オフ」スイッチを構成する。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、かかる小分子の非存在下の場合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
40 倍、000倍減少する。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

10

20

30

40

50

タマーに結合する小分子の存在下で、かかる小分子の非存在下の場合と比較して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、100倍～500倍、100倍～1,000倍、50倍～100倍、50倍～500倍、50倍～100倍、50倍～1,000倍、100倍～1,000倍、または100倍～10,000倍減少する。

【0149】

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非存在に応答して、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生成を調節する、RNAポリヌクレオチドの調節セグメントである。実施形態では、リボスイッチは、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み、これらは一緒になって、リガンド（例えば、小分子）の存在の感知すること、及び標的遺伝子の発現の増加または減少をもたらす効果を引き起こすことに関与する。本明細書に記載されるリボスイッチは組換えであり、2つ以上の供給源からのポリヌクレオチドを利用する。実施形態では、センサー及びエフェクター領域は、ポリヌクレオチドリンカーにより連結されている。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。実施形態では、アプタマーとエフェクター領域を連結する対領域は、アプタマーステムの全部または一部（例えば、例としてアプタマーP1ステムの全部または一部）を含む。

【0150】

アプタマー配列を含むリボスイッチを使用して、例えば、未成熟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してよい。アプタマー配列を含むリボスイッチはまた、RNAの構造変化を誘導して、リボソーム結合部位の隔絶及び翻訳の阻害をもたらす場合もある。本明細書に開示されるアプタマー配列を含む代替的リボスイッチ構造はさらに、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影響を与えることができる。

【0151】

選択的スプライシングリボスイッチ

【0152】

一実施形態では、本明細書に記載されるアプタマーは、生じたRNA（例えば、mRNA前駆体）の、アプタマー／リガンドに仲介される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。この文脈において、遺伝子調節カセットは、センサー領域（例えば、本明細書に記載されるアプタマー）及びエフェクター領域を含むリボスイッチを含み、それらの領域は、小分子リガンドの存在を感知すること、及び選択的エクソンへのスプライシングを変化させることに一緒になって関与する。スプライシングとは、新生メッセンジャーRNA前駆体（mRNA前駆体）からイントロン配列が除去され、エクソンが一緒に連結されてmRNAが形成されるプロセスを指す。スプライス部位は、エクソンとイントロンの間の接合部であり、イントロンの5'末端及び3'末端（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）における異なるコンセンサス配列により定義される。スプライシングは、核内低分子リボ核タンパク質（snRNP）と多様な補助タンパク質の集まりである、スプライセオソームと呼ばれる大きな多成分構造体により行われる。スプライセオソームは、様々なシス調節配列を認識することによってエクソン／イントロンの境界を定義し、イントロン配列を除去し、エクソンを継ぎ合わせて最終メッセージ（例えば、mRNA）にする。選択的スプライシングの場合、特定のエクソンが含まれるかまたは除外されて最終コードメッセージが変更され、それにより、生じる発現タンパク質を変えることができる。

【0153】

一実施形態では、標的遺伝子発現の調節は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2016/126747に開示のDNAコンストラクトのいずれを使用して達成

成される。本開示の実施形態では、WO 2016 / 126747に開示のリボスイッチ及びポリヌクレオチドカセットは、WO 2016 / 126747に開示のアプタマー配列の代わりに本明細書に記載されるアプタマーコード配列を含む。

【0154】

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、及び(b) 5'イントロン及び3'イントロンが隣接する選択的にスプライスされるエクソン、を含み、リボスイッチは、(i) 3'イントロンの5'スプライス部位配列が含まれるステムを含むエフェクター領域、及び(ii) 本明細書に開示されるアプタマーを含む。実施形態では、エフェクター領域は、選択的エクソンの3'に隣接するイントロンのイントロン内5'スプライス部位(「5'ss」)配列、及び3'イントロンの5'ss配列に相補的な配列を含む。アプタマーがそのリガンドと結合すると、エフェクター領域はステムを形成し、したがって、選択的エクソンの3'末端にあるスプライスドナー部位へのスプライシングを阻止する。ある種の条件下では(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'末端にあるスプライスドナー部位へのアクセスを提供するという状況にあり、標的遺伝子のmRNA内への選択的エクソンの包含がもたらされる。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、標的遺伝子内に配される。一実施形態では、選択的にスプライスされるエクソンは、選択的にスプライスされるエクソンがスプライスされて標的遺伝子のmRNAとなる際に、標的遺伝子と共にインフレームにある終止コドンを含む。

【0155】

一実施形態では、遺伝子調節カセットは、配列番号37の配列を含み、ここで、-X-は、本明細書に開示のアプタマーコード配列を表す。小文字は、アプタマーとリボスイッチの残りの部分とを連結する対のステムの配列を示す。一実施形態では、選択的エクソン(以下の配列番号37では下線が引かれている)は、別の選択的エクソンの配列で置き換えられる。

【0156】

配列番号37-

【化20】

GTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCA
TGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAA
TTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAATACTTTTTTGTTTAT
CTIATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGT
ATCATGCCGAGTAACGCTGTTTCTCTAACTTGTAAGGAATGAATTCAGATATTTCC
AGAGAATGAAAAAAAAAATCTTCAGTAGAAGGtaatgt-X-
acattacGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGGCAATAGCA
ATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTC
ATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGG
GATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCAT
ACCTCTTATCTTCCTCCCACAG。

【0157】

選択的エクソンには、5'イントロン配列及び3'イントロン配列が隣接している。本明細書に開示の遺伝子調節カセットに使用され得る5'イントロン配列及び3'イントロン配列は、標的遺伝子から切り出されて、アプタマーと結合するリガンドの存在または非存在に応じて標的遺伝子のmRNAかまたはmRNAに選択的エクソンを含む標的遺伝子のいずれかを作ることができる、任意の配列であり得る。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ために必要な配列、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部位配列を有する。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れらの部分に由来する。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、切断型ヒトベータグロビンイントロン2 (IVS2Δ)、ヒト03-グロビン遺伝子のイントロン2、SV40 mRNAイントロン (Clontech Laboratories, Inc. からのpCMV-LacZベクターで使用される)、ヒトトリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) 遺伝子のイントロン6 (Nott Ajit, et al. RNA. 2003, 9:6070617)、ヒト第IX因子からのイントロン (Sumiko Kurachi, et al. J. Bio. Chem. 1995, 270 (10), 5276)、標的遺伝子自身の内因性イントロン、または任意のゲノム断片もしくは調節されたスプライシングに十分であるエレメントを含有する (Thomas A. Cooper, Methods 2005 (37):331) 合成イントロン (Yi Lai, et al. Hum Gene Ther. 2006:17 (10):1036) に由来する。

【0158】

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内にあるよう操作される。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、天然では、標的遺伝子のその位置で生じる。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改変されて、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有する。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、標的遺伝子にとって外因性である。

【0159】

選択的スプライシング遺伝子調節カセット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を修飾して、強化または減弱することができる。すなわち、標準的クローニング法、部位特異的変異導入等により、スプライス部位を、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づくよう改変することができる。スプライスの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、したがって、強化される。スプライスのコンセンサスにあまり類似し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、したがって、減弱される。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である (|| は、エクソン/イントロン境界を示す)。スプライスアクセプターのコンセンサスは、C A G || Gである (|| は、エクソン/イントロン境界を示す)。スプライスドナー及びスプライスアクセプターの部位における特定のヌクレオチドの頻度が、当該技術分野で報告されている (例えば、Zhang, M. Q., Hum Mol Genet. 1988. 7 (5):919-932を参照のこと)。5'及び3'の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。

【0160】

スプライシングを調節するために行うことができる、選択的スプライシング遺伝子調節カセットに存在する5'イントロン及び3'イントロンに対する追加の改変としては、イントロン内スプライシングエンハンサーエレメント、イントロン内スプライシングサプレッサーエレメント及び／またはスプライス部位を改変、除去、及び／または追加すること、及び／または分岐部位配列を改変することが挙げられる。

【0161】

一実施形態では、5'イントロンは、標的遺伝子と共にインフレームにある終止コドン含有するよう改変されてある。5'イントロン配列及び3'イントロン配列はまた、潜在的スライス部位が除去されるよう改変することもでき、これは、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 (例えば、Kapustin, Y. et al. Nucl.

10

20

30

40

50

Acids Res. 2011. 1-8を参照のこと)。

【0162】

5'イントロン配列及び3'イントロン配列の長さは、例えば、ウイルス発現コンストラクトのサイズ要件を満たすために、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、長さが約50～約300ヌクレオチドである。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、長さが約125～約240ヌクレオチドである。

【0163】

エフェクター領域のステム部分は、リガンドのアプタマー結合時に選択的エクソンの選択的スプライシングを実質的に阻止し、一方で、リガンドが十分な量で存在しない場合にスプライス部位へのアクセスも可能にするよう、十分な長さ(かつ、GC含量)であるべきである。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'スプライス部位配列、及びその5'スプライス部位配列のその相補配列に加え、ステム配列を含む。実施形態では、この追加のステム配列は、アプタマーステムからの配列を含む。ステム部分の長さとは配列は、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の発現を可能にし、リガンドが存在する場合は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、既知の技術を使用して改変することができる。一実施形態では、リボスイッチのエフェクター領域のステムは、長さが約7～約20塩基対である。一実施形態では、エフェクター領域のステムは、長さが8～11塩基対である。ステムの長さに加え、ステムのGC塩基対含量を変化させてステムの安定性を改変することができる。

【0164】

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、転写されてmRNA前駆体になり、選択的にスプライスされて標的遺伝子のmRNAになる能力があ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に含まれる場合に、そのmRNAからの標的遺伝子の発現が阻止または低減されるよう、翻訳を阻害する少なくとも1つの配列を含有する。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に含まれる場合に標的遺伝子と共にインフレームにある終止コドン(TGA、TAA、TAG)を含有する。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って標的遺伝子のmRNA内、例えば、マイクロRNA結合部位等に組み込まれている場合に翻訳を低減もしくは実質的に阻止する、mRNAの分解をもたらす別の配列を含む。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、このポリペプチド配列を含有する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、このポリペプチド配列を含有するタンパク質を分解に誘導するポリペプチド配列をコードする。

【0165】

基底レベルまたはバックグラウンドレベルの選択的エクソンのスプライシングは、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、及び／またはESE配列もしくはESS配列を選択的エクソン内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そのような変更は、部位特異的変異導入が挙げられるがこれに限定されない、当該技術分野で公知の方法を使用して達成することができる。別法として、所望の配列(例えば、選択的エクソンの全部または一部を含む)の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, 2

003, 31(13): 3568-3571) 及び／または利用可能な他の資源を使用することを含め、当該技術分野で公知の方法によって達成することができる。

【0166】

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部または一部に由来する。この文脈において、「由来する」とは、選択的エクソンが、天然に存在するエクソン、もしくはその一部と実質的に相同ではあるが、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、及び／またはESE配列もしくはESS配列を選択的エクソン内に導入することによって生じた変異等の様々な変異が含有され得る配列を含有していることを指す。本明細書で使用される場合、「相同性」及び「相同な」とは、2つのポリヌクレオチド配列間または2つのポリペプチド配列間の同一性のパーセントを指す。ある配列と別の配列の間の対応は、当該技術分野で公知の技術によって決定することができる。例えば、相同性は、2つのポリペプチド分子の配列を整列させ、容易に入手可能なコンピュータプログラムを使用してそれらを直接比較することによって決定することができる。別法として、相同性は、相同領域間での安定な二重鎖が形成され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、その後の、一本鎖特異的ヌクレアーゼ（複数可）での消化、及び消化された断片のサイズ決定によって決定することができる。2つのポリヌクレオチドまたは2つのポリペプチド配列はそれぞれ、適切な挿入または欠失により最適に整列させた後に、上記の方法を使用して決定したその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%が分子の定義された長さにわたり一致する場合、互いに「実質的に相同」である。

【0167】

一実施形態では、選択的エクソンは、標的遺伝子にとって外因性であるが、標的遺伝子が発現される生物に由来する配列に由来し得る。本明細書で使用される場合、「外因性」とは、遺伝子型が、比較される対象となるかまたは導入もしくは組み込みの対象となる実体の残りの部分の遺伝子型とは異なる実体に由来することを意味する。例えば、異なる細胞型に遺伝子工学技術によって導入されるポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである（また、発現された場合、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、選択的にスプライスされるエクソンは、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。実施形態では、選択的にスプライスされるエクソンは、配列番号79 (GAATGAATTTCAGATATTTCCAGAGAAATGAAAAAATCTTCAGTAGAAG) の改変DHFRエクソン2であるかまたはそれを含む。実施形態では、選択的にスプライスされるエクソンは、配列番号98: GAATGAATTTCAGATATTTTCAGAGAAATGAAAAAATCTTCAGTAGAAGの改変DHFRエクソン2であるかまたはそれを含む。

【0168】

自己切断リボザイムによるアプタマー媒介性の切断

【0169】

一実施形態では、アプタマー媒介性の標的遺伝子の発現は、小さなエンドヌクレアーゼ的リボザイムのアプタマー媒介性の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RNA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、標的細胞型において自己切断する任意の小さなエンドヌクレアーゼ的リボザイムであってよく、ハンマーヘッド型、ヘアピン型、デルタ肝炎ウイルス型、Varkudサテライト型、ツイスター (twister) 型、ツイスター・シスター (twister sister) 型、ピストル型またはハチエット (hatchet) 型リボザイムが挙げられるが、これらに限定されない。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プタマーに連結されたリボザイムを含有するリボスイッチを含む遺伝子発現

カセットが提供される。参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO 2017/136608には、アプタマーリガンドの存在下でリボザイムの自己切断を活性化するようなりボスイッチ（「オフ」スイッチ）またはアプタマーの存在下でリボザイムの自己切断を阻害するようなりボスイッチ（「オン」スイッチ）が記載されている。

【0170】

「オフ」スイッチのシナリオでは、アプタマー／リガンド結合は、リボザイムのリボヌクレアーゼ機能を増大させて、ポリヌクレオチドカセットを含有する標的遺伝子RNAの切断をもたらし、それにより標的遺伝子発現を低下させる。そのようなオフスイッチの例としては、ステムによりアプタマーに連結されているツイスターリボザイムを含むリボスイッチを含む、標的遺伝子の発現の調節の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とアプタマーを連結するステムは、ツイスターリボザイムのP3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ステムに連結している、（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、及び関連する本文を参照のこと）。

【0171】

「オン」スイッチのシナリオでは、アプタマー／リガンド結合は、リボザイムのリボヌクレアーゼ機能を阻害して、ポリヌクレオチドカセットを含有する標的遺伝子RNAの切断を減少させ、それによりリガンドの存在下での標的遺伝子発現を増大させる。オンスイッチの例としては、アプタマーに連結され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、アプタマーは、ツイスターリボザイムのP1ステムの3'末端または5'末端に連結されており、アプタマーが、ツイスターリボザイムのP1ステムの3'末端に連結されている場合は、ツイスターリボザイムのP1ステムの3'アームの一部分は、選択的にアプタマーP1ステムの5'アームであり、アプタマーが、ツイスターリボザイムのP1ステムの5'末端に連結されている場合は、ツイスターリボザイムのP1ステムの5'アームの一部分は、選択的にアプタマーP1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、及び図6bならびに関連する本文を参照のこと）。

【0172】

ポリアデニル化のアプタマー調節

【0173】

実施形態では、標的遺伝子の発現は、アプタマーにより調節されるポリアデニル化によって調節される。ほぼすべての真核生物のmRNAの3'末端は、20～250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。mRNAへのポリ（A）テールの付加はmRNAを分解から保護するため、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り影響を受け得る。

【0174】

一実施形態では、標的遺伝子の発現は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO 2018/156658に記載のように、アプタマーにより調節される、ポリアデニル化シグナルの接近可能性を介して調節される。そのような実施形態では、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されるアプタマーを含み、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、かつ、アプタマーとエフェクターステムループは、アプタマーステムの非共有アー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、選択的な共有ステムアームにより連結されている（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ならびに関連する本文を参照のこと）。一実施形態では、エフェクターステムループは、選択的な共有ステムアームが、3'アプタマーステムアームの全部または一部分、及びエフェクターステムの5'アームの全部または一部分を含むよう、アプタマーの3'に位置する。一実施形態では、エフェクターステムループは、選択的な共有ステムアームが、5'アプタマーステムアームの全部または一部分、及びエフェクターステムの3'アームの全部または一部分を含むよう、アプタマーの5'に位置する。一実施形態

では、ポリアデニル化シグナルは、A A T A A AまたはA T T A A Aである。一実施形態では、ポリアデニル化シグナルは、下流エレメント（D S E）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（U S E）である。一実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、2つのリボスイッチを含み、第1のリボスイッチのエフェクターステムループは、ポリアデニル化シグナルA A T A A AまたはA T T A A Aの全部または一部を含み、第2のリボスイッチのエフェクターステムループは、下流エレメント（D S E）の全部または一部を含む。一実施形態では、2つのリボスイッチは各々、同じリガンドと結合するアプタマーを含む。一実施形態では、2つのリボスイッチは、異なるリガンドと結合する異なるアプタマーを含む。

【0175】

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、本明細書に記載されるアプタマー）と、スプライセオソームの一部である核内低分子リボ核タンパク質（s n R N P）U1の結合部位を含むエフェクター領域とを含む。WO2017/136591には、エフェクター領域がU1 s n R N P結合部位を含むリボスイッチが記載されており、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と結合すると、エフェクター領域はステムを形成し、U1 s n R N P結合部位をU1 s n R N Pとの結合から隔絶する。ある種の条件下では（例えば、アプタマーが、自身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 s n R N P結合部位へのアクセスを提供するという状況にあり、U1 s n R N PがmRNAと結合し、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 s n R N P結合部位は、U1 s n R N Pと結合し、それによりU1 s n R N Pを標的遺伝子の3' UTRに動員して、標的遺伝子メッセージのポリアデニル化を抑制する能力がある、任意のポリヌクレオチド配列であり得る。一実施形態では、U1 s n R N P結合部位は、コンセンサス部位C A G G T A A G T A（配列番号80）（mRNA内にある場合はC A G G U A A G U A（配列番号81））である。いくつかの実施形態では、U1 s n R N P結合部位は、このコンセンサス配列の変異であり、例えば、コンセンサス配列よりも短いかまたは1つ以上のヌクレオチドが変更されている配列が含まれる。一実施形態では、U1 s n R N P結合部位は、配列C A G G T A A Gを含む。いくつかの実施形態では、結合部位は、C A G G T A A G T A（配列番号80）、C A G G T A A G T、及びC A G G T A A Gから選択される配列によってコードされる。U1 s n R N P結合部位は、遺伝子からの任意の5' スプライス部位、例えば、ヒトD H F Rエクソン2からの5' スプライス部位であり得る。

【0176】

リボヌクレアーゼ切断のアプタマー媒介性の調節

【0177】

一実施形態では、標的遺伝子の発現は、アプタマーにより調節されるリボヌクレアーゼ切断を介して調節される。リボヌクレアーゼ（R N a s e）は、特定のリボヌクレアーゼ基質配列を認識して切断する。本明細書では、標的遺伝子のDNA内に組み込まれた場合に、アプタマー／リガンドにより媒介される、生じたRNAの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コンストラクトを提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるアプタマーコード配列は、リボヌクレアーゼ基質配列、及びエフェクター領域と、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なアプタマー（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2018/161053に記載のとおり）とを含むリボスイッチを含むかまたはコードするコンストラクトの一部である。実施形態では、R N a s e P基質配列は、リボスイッチに連結され、リボスイッチは、エフェクター領域及び本明細書に記載されるアプタマーを含み、エフェクター領域は、R N a s e P基質配列の一部分に相補的な配列を含む。アプタマーへの好適なリガンドの結合は、アプタマーとエフェクター領域の構造変化を誘導し、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接近可能性を変化させる。

【0178】

一実施形態では、アプタマー配列は、RNase P基質配列に対して5'に位置し、エフェクター領域は、リーダー配列の全部または一部、及びRNase P基質配列の5'アクセプターステム配列の全部または一部を含む。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ならびに関連する本文を参照のこと。さらなる実施形態では、RNase Pの基質のアクセプターステムとリボスイッチエフェクター領域とは、0、1、2、3、または4のヌクレオチドにより区切られている。他の実施形態では、エフェクター領域のステムには、リーダー配列（及びその補体）に加え、RNase Pの基質のアクセプターステムの1つ以上のヌクレオチド、及びアクセプターステムの1つ以上のヌクレオチドに相補的な配列が含まれる。

10

【0179】

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基質配列に対して3'に位置し、エフェクター領域は、RNase P基質配列の3'アクセプターステムの全部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及び関連する本文を参照のこと。さらなる実施形態では、RNase Pの基質の3'アクセプターステムに相補的なエフェクター領域配列は、1〜7ヌクレオチドである。言い換えれば、エフェクター領域のステムには、アクセプターステムの1〜7ヌクレオチドが含まれ、また、このアクセプターステムの1〜7ヌクレオチドに相補的な配列が含まれる。実施形態では、リボスイッチは、RNase Pの基質の3'に位置するため、エフェクター領域ステムとRNase Pの基質のアクセプターステムとは重ならない。実施形態では、エフェクター領域とRNase Pの基質のアクセプターステムとが直接隣接している（すなわち、重なっていない）。他の実施形態では、エフェクター領域とRNase Pの基質のアクセプターステムとは、1、2、3、4、5以上のヌクレオチドにより区切られている。

20

【0180】

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。用語「標的遺伝子」とは、細胞に導入されるポリヌクレオチドであり、かつ、転写されてRNAになり、適切な条件下で翻訳及び／または発現される能力があるポリヌクレオチドを指す。別法として、標的遺伝子は、標的細胞にとって内因性であり、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）に配される。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コンストラクトを転写させる細胞にとって外因性である。別の実施形態では、標的遺伝子は、組換えDNAコンストラクトを転写させる細胞にとって内因性である。標的遺伝子は、タンパク質をコードする遺伝子、またはタンパク質非コードRNAをコードする配列であってよい。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、増殖因子、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モジュレーター、をコードする遺伝子であってよい。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（TALEN）、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（またはその部分）、例えば治療用抗体等をコードする。

30

40

【0181】

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、真核細胞、例えば哺乳類細胞、より具体的にはヒト細胞での標的遺伝子の発現を調節するために使

50

用される。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、膵臓、心臓、気道、筋肉、皮膚、肺、軟骨、精巣、動脈、胸腺、骨髄、または腫瘍での標的遺伝子の発現を調節するために使用される。

【0182】

一態様では、組換えベクター、及びそれらの、標的遺伝子と遺伝子調節カセットとを含むポリヌクレオチドの導入のための使用を提供し、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コンストラクトには、宿主細胞でのDNAの複製と、標的細胞における標的遺伝子の適切なレベルでの発現とをもたらすDNAセグメントが含まれる、追加のDNAエレメントが含まれる。当業者は、発現制御配列（プロモーター、エンハンサー等）が、標的細胞において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で、宿主細胞内へ送達されるべき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、ウイルスベクターであるかまたは複数のウイルスベクターの組み合わせである。

【0183】

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公知であり、それらとして、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のベクター、ならびに単純ヘルペス1型（HSV1）ベクターが挙げられる。

【0184】

アデノウイルスベクターには、例えば、E1領域及びE3領域における欠失を介して複製欠損にされてある、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領域内に挿入して、組換えE1/E3欠失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また、ウイルスコード配列を含有しないヘルパー依存性高容量アデノウイルスベクター（高容量「ガットレス（gutless）」または「ガットド（guttled）」ベクターとしても知られる）も含まれる。これらのベクターは、ウイルスのDNA複製とパッケージングに必要なシス作用エレメント、主に、末端逆位反復配列（ITR）及びパッケージングシグナル（CY）を含有する。これらのヘルパー依存性AVベクターのゲノムには、数百塩基対から最大約36kbの外来DNAを運ぶ可能性がある。

【0185】

組換えアデノ随伴ウイルス「rAAV」ベクターには、任意のアデノ随伴ウイルス血清型に由来する任意のベクターが含まれ、それらとしては、限定することなく、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-7及びAAV-8、AAV-9、AAV-10等が挙げられる。rAAVベクターは、AAV野生型遺伝子のうちの1つ以上、好ましくは、Rep及び/またはCap遺伝子が、全部または一部欠失していてよいが、機能的な隣接ITR配列は保持されている。機能的な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、配列により機能的なレスキュー、複製及びパッケージングがもたらされる限り、（例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって）変化させてよい。

【0186】

別法として、レンチウイルスベクター等の他の系を使用することもできる。レンチウイルスベースの系は、非分裂でも分裂細胞でも遺伝子導入が可能であるため、それらは、例えば、CNSの非分裂細胞を標的とする用途に有用となる。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、そのウイルスのよう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。

【0187】

遺伝子調節カセットを含有する標的遺伝子を保持する、プラスミド、YAC、ミニ染色体及びミニサークル等のポリヌクレオチドはまた、例えば、カチオン性脂質、ポリマー、または両方を担体として使用する、非ウイルスベクター系によって細胞または生物内に導入することもできる。結合ポリ-L-リジン（PLL）ポリマー系及びポリエチレンイミン（PEI）ポリマー系もまた、細胞にベクターを送達するために使用され得る。細胞にベクターを送達するための他の方法としては、ハイドロダイナミック法（hydrodynamic injection）及び電気穿孔ならびに超音波の使用が挙げられ、いずれも細胞培養及び生物を対象とする。遺伝子送達のためのウイルス及びウイルス以外の送達システムのレビューについては、参照により本明細書に組み込まれる Nayerossadat, N. et al. (Adv Biomed Res. 2012; 1: 27) を参照のこと。

10

【0188】

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を提供し、（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内に挿入すること、（b）ポリヌクレオチドカセットを含む標的遺伝子を細胞内に導入すること、及び（c）細胞を、標的遺伝子の発現を誘導するための有効量で、アプタマーと特異的に結合する小分子リガンドに曝露すること、を含む。態様では、標的細胞での標的遺伝子の発現は、標的遺伝子が導入された細胞に所望の特性を付与するか、そうでなければ所望の治療結果をもたらす。

【0189】

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' の非翻訳領域内というよりむしろ）標的遺伝子のタンパク質コード配列内に挿入される。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単一の遺伝子調節カセットが標的遺伝子内に挿入される。他の実施形態では、2つ、3つ、4つ、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、1つ以上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。一実施形態では、2つの遺伝子調節カセットが標的遺伝子内に挿入され、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内に挿入される場合、それら各々が、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同じアプタマーを含有することができる。他の実施形態では、複数の遺伝子調節カセットが標的遺伝子内に挿入され、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、各々が異なるアプタマーを含有することができる。

20

30

【0190】

治療方法及び医薬組成物

【0191】

一態様では、遺伝子治療により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有する治療遺伝子配列は、体内の標的細胞に、例えば、ベクターによって送達される。標的遺伝子発現の細胞特異性は、プロモーター及び／またはベクター内の他の要素によって、及び／またはウイルスベクターのカプシドによって制御され得る。標的遺伝子を含有するベクターコンストラクトの送達、及び調節された標的遺伝子の安定な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生成する際の最初のステップである。しかしながら、標的遺伝子配列内にあるアプタマーのため、標的遺伝子は顕著なレベルでは発現されない、すなわち、調節カセットリボスイッチ内に含有されるアプタマーに結合する特定のリガンドの非存在下では、標的遺伝子は「オフ状態」にある。アプタマー特異的リガンドが投与された場合にのみ、標的遺伝子発現が活性化される。

40

【0192】

標的遺伝子を含有するベクターコンストラクトの送達と活性化リガンドの送達には一般に、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る時期、及びタンパク質発現レベルを制御する。リガンドは、数多くの経路によって送達され得、そ

50

れには、硝子体内、眼球内、吸入、皮下、筋肉内、皮内、病巣内、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、唇下、口腔、経鼻、胸腔内、心臓内、髄腔内、硬膜外、骨内、または関節内が含まれるが、これらに限定されない。

【0193】

リガンドの送達のタイミングは、標的遺伝子の活性化についての要件によって異なる。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は、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ために、経口小分子リガンドを連日、または1日複数回送達してよい。標的遺伝子に長時間作用効果がある場合は、誘導リガンドを、より少ない頻度で、例えば、週1回、2週に1回、月1回で投与してよい。

10

【0194】

リボスイッチを含む遺伝子調節カセットとの関連において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与によって決定される方法で、治療用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。リガンド投与時のみの治療用導入遺伝子の発現では、リガンドの非存在下で標的遺伝子をオフにできることにより、遺伝子治療の処置の安全性が高まる。

【0195】

異なるアプタマーを複数のリボスイッチで使用して、異なるリガンドに標的遺伝子の発現を上方制御または下方制御させることができる。特定の実施形態では、調節カセットを含有する各治療遺伝子は、特定の分子により活性化される特定のアプタマーをカセット内に有する。これは、各治療遺伝子が、その内部に収容された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、各リガンドは、1つの治療遺伝子を活性化するだけである。これにより、いくつかの異なる「標的遺伝子」を一個体に送達できる可能性が許容され、各標的遺伝子は、各々に収容された調節カセット内に含有されたアプタマーに対する特定リガンドの送達時に活性化される。

20

【0196】

リボスイッチとの関連において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際に、遺伝子が身体に送達され得る任意の治療用タンパク質（エリスロポエチン（EPO）または治療用抗体等）を身体に産生させることを可能にする。この治療用タンパク質送達方法は、後で注射または注入される、体外でのそのような治療用タンパク質（例えば、がん、または炎症性疾患もしくは自己免疫性疾患を阻害するために使用される抗体）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有する身体は、遺伝子特異的なリガンドが投与されるとスイッチがオンになる生物製剤製造工場となる。

30

【0197】

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ってよい。そのようなヌクレアーゼとしては、Cas9、ジungkフィンガー含有ヌクレアーゼ、またはTALENが挙げられる。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、標的内在性遺伝子を編集するのに十分である短期間しか必要とされない場合がある。しかしながら、調節されないヌクレアーゼ遺伝子が身体に送達された場合、このタンパク質が細胞の残りの寿命の間存在し得る。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高くなる。そのようなタンパク質の発現の調節には、安全面での大きな利点がある。この場合、調節カセットを含有するヌクレアーゼ標的遺伝子を含有するベクターが、体内の適切な細胞に送達され得るであろう。標的遺伝子は、カセット特異的なリガンドの非存在下では「オフ」状態にあるので、ヌクレアーゼは何も産生されない。活性化リガンドが投与された場合にのみ、ヌクレアーゼが産生される。十分な編集が行われるだけの十分な時間が経過すると、リガンドは取り除かれ、再び投与されることはない。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、それ以上のヌクレアーゼは産生されず、編集は停止する。この手法は、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シュタルガルト病等の、多くの遺伝性網膜症を含め、遺伝的状态

40

50

を修正するために使用され得る。

【0198】

特定のリガンド投与時のみ活性化される、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は、例えば、治療用抗体によるがん、免疫調節性タンパク質もしくは抗体による免疫障害、調節された遺伝子としての抗C5抗体もしくは抗体断片による代謝性疾患、PNH等の希少疾患、または治療用抗体による眼血管新生、及び免疫調節性タンパク質による萎縮型AMD等、多くの異なる種類の疾患を治療するための治療遺伝子を調節するために使用されてよい。

【0199】

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、本明細書に記載されるアプタマー／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の類似体）を標的遺伝子として使用して、I型糖尿病、II型糖尿病、またはメタボリックシンドロームを治療してよく、ヒト成長ホルモンを標的遺伝子として使用して、成長障害を有する小児または成長ホルモン分泌不全の成人を治療してよく、エリスロポエチン（好ましくはヒトエリスロポエチン）を標的遺伝子として使用して、慢性腎臓病による貧血、骨髄異形成による貧血、またはがん化学療法による貧血を治療してよい。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に適合する追加の標的遺伝子としては、色盲の治療のための環状ヌクレオチド依存性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依存性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のためのレチノイドイソメロヒドロラーゼ（RPE65）、X連鎖性網膜色素変性症の治療のためのX連鎖性網膜色素変性症GTPase調節因子（RPGR）、パーキンソン病の治療等のためのグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）、筋萎縮性側索硬化症の治療のためのナンセンス転写産物調節因子1（UPF1）、及び放射線誘発性口内乾燥症及びシェーグレン症候群の治療のため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からのアーキロドプシン）、Jaws（Halobacterium salinarum（Shark株）由来のクラックスハロロドプシン）、iC1C2（Chlamydomonas reinhardtiiからのチャンネルロドプシンChR1とChR2間のキメラC1C2のバリエーション）、または光伝達カスケードの非活性化を仲介するGTPase複合体の重要な構成成分であるRgs9-アンカー型タンパク質（R9AP）が挙げられる。

【0200】

本明細書に開示されるアプタマーを含む発現コンストラクトは特に、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症等の単一遺伝子欠損によって生じる疾患の治療に好適であり得る。したがって、ヒトβ-、γ-、δ-、またはζ-グロビンを標的遺伝子として使用して、β-サラセミアまたは鎌状赤血球貧血症を治療してよく、ヒト第VII因子または第IX因子を標的遺伝子として使用して、血友病Aまたは血友病Bを治療してよい。

【0201】

本明細書に記載の小分子は一般に、患者への投与に好適な医薬組成物を形成するために1つ以上の薬学的に許容される担体と組み合わせられる。薬学的に許容される担体としては、一般に製薬分野で使用される溶媒、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等が挙げられる。医薬組成物は、錠剤、ピル、カプセル、トローチ等の形態であってよく、それらが意図される投与経路に適合するよう製剤化される。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（局所的）、経粘膜が挙げられる。

【0202】

チアミンの類似体または誘導体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チアミンの類似体または誘導体が患者に送達されるような投与スケジュール

10

20

30

40

50

で患者に投与される。剤形が、錠剤、ピル等である場合、好ましくは、医薬組成物は、0.1mg～10gのチアミンの類似体もしくは誘導体、0.5mg～5gのチアミンの類似体もしくは誘導体、1mg～1gのチアミンの類似体もしくは誘導体、2mg～750mgのチアミンの類似体もしくは誘導体、5mg～500mgのチアミンの類似体もしくは誘導体、10mg～250mgのチアミンの類似体もしくは誘導体、または150mg～300mgのチアミンの類似体もしくは誘導体を含む。

【0203】

医薬組成物は、1日1回または1日複数回（例えば、1日に2回、3回、4回、5回、またはそれ以上の回数）投与してよい。別法として、医薬組成物は、1日1回よりも低頻度で、例えば、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、もしくは14日ごとに1回、または月1回もしくは数か月ごとに1回で投与してよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少ない回数だけ、例えば、1回、2回、3回等だけ患者に投与してよい。

【0204】

本明細書では、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増加を必要とする患者を治療する方法を提供し、かかる方法は、本明細書に開示されるアプタマーが結合するか、そうでなければ応答する対象である、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、患者は、標的遺伝子を含む組換えDNAを以前に投与されており、標的遺伝子は、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有する。本明細書では、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、そうでなければ応答する対象である、リガンドを含む医薬組成物を提供し、ここで、患者は、標的遺伝子を含む組換えDNAを以前に投与されており、標的遺伝子は、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有する。

【0205】

検出及び／または診断での使用のためのアプタマー

【0206】

キメラまたは物理的なコンジュゲーションを介して、広範囲な検出薬及び診断用薬をアプタマーに連結することができる。さらに、アプタマーを、バイオセンサー、マイクロ流体デバイス及び他の検出用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、アプタマーを、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が含まれる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結合させる。

【0207】

いくつかの実施形態では、アプタマーを、蛍光部分またはラベル、造影剤、放射性同位体部分、放射線不透過性部分等が含まれるがこれらに限定されない検出可能部分、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が挙げられるが、これらに限定されない）、量子ドット、放射能標識体等の検出可能な標識に結合させる。例示的フルオロフォアとしては、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、ローダミン等）及び他の発光分子（例えば、管腔）が挙げられる。フルオロフォアは、環境感受性である場合があり、基質との結合時に構造変化を受ける改変タンパク質の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（例えば、ダンシルプローブ）。例示的放射能標識体としては、1つ以上の低感受性核を有する原子を含有する小分子が挙げられる（ ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{99}Tc 、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{111}In 等）。他の有用な部分は、当該技術分野で公知である。

【0208】

いくつかの実施形態では、アプタマーを、抗炎症剤、抗がん剤、抗神経変性剤、抗感染剤、または一般的に治療剤が含まれるがこれらに限定されない、治療用部分に結合させる。

【0209】

化合物に結合するアプタマーを同定するための方法

【0210】

本明細書では、目的化合物（チアミン類似体、TPP類似体、またはそれらの誘導体が含まれる小分子）に結合するか、そうでなければその目的化合物の付加、もしくはそれに対する曝露に応答して、リボスイッチの一部である場合の標的遺伝子発現を調節する、アプタマーを同定するための方法を開示する。一実施形態では、方法は、

(i) 親アプタマー配列を選択するステップ、

(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ーを生成するステップであって、アプタマーコード配列中の1つ以上のヌクレオチドを、アプタマー中の1つ以上の不対領域に対応する1つ以上の位置でランダムに変異させ、変異アプタマー配列が、レポーター遺伝子の発現を制御するリボスイッチとの関連にある、アプタマーライブラリーを生成するステップ、

(iii) (ii) からのライブラリーを、チアミン類似体に応答した標的遺伝子発現の調節が親アプタマー配列と比較して増大している（例えば、誘導または抑制の倍率がより高い）アプタマーについてスクリーニングするステップ、

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

【0211】

親アプタマー配列は、既知のTPPアプタマー配列等のTPPアプタマーであっても、または利用可能なデータベースで相同配列の検索によって同定される推定TPP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であってよい。

【0212】

親アプタマー配列を選択するステップでは、例えば、(i) 推定TPPアプタマーを同定すること、(ii) 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内にアプタマーを挿入すること、及び(iii)、リボスイッチ／標的遺伝子コンストラクトを、チアミンまたはTPPの類似体もしくは誘導体（例えば、本明細書に記載される化合物）に曝露すること、を伴い得る。

【0213】

推定TPPアプタマーは、RNAファミリーのコレクションである、それぞれが多重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(CM)により表されているRfamデータベース等の、適切な配列データベースから同定することができる。実施形態では、推定TPPアプタマーは、Rfam TPPリボスイッチファミリーRF00059から同定される。実施形態では、推定TPPアプタマーは、配列番号94または配列番号95（それぞれ、ステムを有するthiCアプタマーまたはthiMアプタマー）と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%少なくとも98%または少なくとも99%同一な配列を有する。

配列番号94：

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95：

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

【0214】

推定TPPアダプターは、当業者に既知の技術を使用してリボスイッチ内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の類似体もしくは誘導体（例えば、本明細書に記載される化合物）の存在に対するアダプターの反応性は、細胞培養及び／または無細胞系で試験することができる。特に、細胞培養系は、真核細胞培養であり、例えば、哺乳類、植物、または昆虫の細胞培養が含まれる。

【0215】

チアミンまたはTPPの類似体もしくは誘導体（例えば、本明細書に記載される化合物）に応答するアダプターを同定するために、アダプターをコードする配列（すなわち、親アダプター）の1つ以上のヌクレオチド位置をランダム化する。ランダム化のためのヌクレオチド位置は、親アダプタ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>) 等の利用可能なプログラムを使用すること、及び／または関連アダプターの結晶構造との比較によって（例えば、E. coli thimリボスイッチ、Edwards, TE & Ferre-D'Amare, AR, Structure. 2006 Sep; 14 (9): 1459-68）取得することができる。例えば、ループ（L）領域（例えば、L3及び／またはL5）、及び連結（J）領域（例えば、J3-2（対領域P3とP2を連結）、J2-4、及び／またはJ4-5）等のアダプターの不對領域を同定することができ、1つ以上の不對領域の1つ以上のヌクレオチドをランダム化して、アダプターのライブラリーを生成することができる。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。さらに、対（P）領域の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。さらに、不對領域または対領域の1つ以上のヌクレオチドを付加または除去することができる。変異誘発されたアダプター配列は、リボスイッチとの関連においてアダプター配列のライブラリーとして提供され得る。実施形態では、アダプターライブラリーは、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との関連において提供される。

【0216】

1つ以上の変異を含有するアダプターコード配列は、TPPもしくは1つ以上のチアミンまたはTPPの類似体もしくは誘導体の存在に対する反応性について上記のように試験することができる。実施形態では、1つ以上の変異を含有するアダプターは、類似体または誘導体に対して応答性であるが、それが由来する親アダプターよりも、（同じリボスイッチ／遺伝子発現カセットとの関連において）チアミン及び／またはTPPに対する反応性が低下している。

【0217】

所望の化合物に対して応答性であるアダプターは、ヌクレオチドをランダム化することによってさらに変異誘発させることができる。選択された位置、例えば、不對領域におけるヌクレオチドをランダム化して、上記のようにライブラリーを作製することができる。

【0218】

いくつかの実施形態では、目的化合物は、アセフルチアミン、アセチアミン、アリチアミン、アンプロリウム、ベクロチアミン、ベンフォチアミン、ベンチアミン、ビスベンチアミン、セトチアミン、シコチアミン、フルスルチアミン、モノホスホチアミン、オクトチアミン、オキシチアミン、プロスルチアミン、スルブチアミン、またはピンチアモール等のチアミン類似体である。実施形態では、チアミンまたはTPPの類似体は式I～VIIの化合物であり、これには化合物M10～M99が含まれるが、これらに限定されない。実施形態では、チアミンまたはTPPの類似体は、M10、M16、M18、M19、M21、M26、M27、M28、M29、M30、M31、M32、M33、及びM34のうちの1つである。

【0219】

本明細書で開示される方法で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、酵素活性または分光光度特性等のレポータータンパク質の特性を検出

することによりアッセイするか、または抗体ベースのアッセイの場合のように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'-リン酸脱炭酸酵素 (URA3)、アルギニンパーミアーゼ CAN1、ガラクトキナーゼ (GAL1)、ベー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。検出可能シグナルの他の例としては、細胞表面マーカーが挙げられ、例えば、CD4が挙げられるが、これに限定されない。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での使用に好適なレポーター遺伝子にはまた、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させ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、aeuGFP、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 (On)、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-Sapphires174-173、CyOFP1、CyPet、CyRFP1 (CyRFP1)、d-RFP618、D10、d1EosFP (緑)、d1EosFP (赤)、d2EosFP (緑)、d2EosFP (赤)、deGFP1、deGFP2、deGFP3、deGFP4、dendFP (緑)、dendFP (赤)、Dendra (緑)、Dendra (赤)、Dendra2 (緑)、Dendra2 (赤)、Dendra2-M159A (緑)、Dendra2-M159A (オレンジ)、Dendra2-T69A (緑)、Dendra2-T69A (オレンジ)、dfGFP、dimer1、dimer2、dis2RFP、dis3GFP、dKeima、dKeima570、dLanYFP、DrCBD、Dreiklang (On)、Dronpa (On)、Dronpa-2 (On)、Dronpa-3 (On)、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、Enhanced Cyan-Emitting GFP、EosFP (緑)、EosFP (赤)、eqFP578、eqFP611、eqFP611V124T、eqFP650、eqFP670、EYFP、EYFP-Q69K、fabdGFP、ffDronpa (On)、FoldingReporterGFP、FP586、FPrl2.

10

20

30

40

50

3、FR-1、FusionRed、FusionRed-M、G1、G2、G3、Gamil
 lus (On)、Gamil lus 0. 1、Gamil lus 0. 2、Gamil
 lus 0. 3、Gamil lus 0. 4、GCaMP2、gfasGFP、GFP (S6
 5T)、GFP-151pyTyrCu、GFP-Tyr151pyz、GFPmut2
 、GFPmut3、GFPxm16、GFPxm161、GFPxm162、GFPxm
 163、GFPxm18、GFPxm181uv、GFPxm18uv、GFPxm19
 、GFPxm191uv、GFPxm19uv、H9、HcRed、HcRed-Tan
 dem、HcRed7、hcriGFP、hmGFP、HriCFP、HriGFP、i
 FP1. 4、iFP2. 0、iLov、iq-EBFP2、iq-mApple、iq-
 mCerulean3、iq-mEmerald、iq-mKate2、iq-mVen
 us、iRFP670、iRFP682、iRFP702、iRFP713、iRFP7
 20、IrisFP (緑)、IrisFP (オレンジ)、IrisFP-M159A (緑
)、Jred、Kaede (緑)、Kaede (赤)、Katushka、Katush
 ka-9-5、Katushka2S、KCY、KCY-G4219、KCY-G421
 9-38L、KCY-R1、KCY-R1-158A、KCY-R1-38H、KCY-
 R1-38L、KFP1 (On)、KikGR1 (緑)、KikGR1 (赤)、Kill
 erOrange、KillerRed、KO、Kohinoor (On)、laesG
 FP、laGFP、LanFP1、LanFP2、LanRFP-ΔS83L、LanY
 FP、LaRFP、LSS-mKate1、LSS-mKate2、LSSmOrang
 e、M355NA、mAmetrine、mApple、Maroon0. 1、mAza
 miGreen、mBanana、mBeRFP、mBlueberry1、mBlue
 berry2、mc1、mc2、mc3、mc4、mc5、mc6、McaG1、Mca
 Glea、McaG2、mCardinal、mCarmine、mcavFP、mca
 vGFP、mcavRFP、mCCFP、mCerulean、mCerulean. B
 、mCerulean. B2、mCerulean. B24、mCerulean2、m
 Cerulean2. D3、mCerulean2. N、mCerulean2. N (T
 65S)、mCerulean3、mCherry、mCherry2、mCitrin
 e、mClavGR2 (緑)、mClavGR2 (赤)、mClover3、mCyRF
 P1、mECFP、meffCFP、meffGFP、meffRFP、mEGFP、m
 eleCFP、mleRFP、mEmerald、mEos2 (緑)、mEos2 (赤
)、mEos2-A69T (緑)、mEos2-A69T (オレンジ)、mEos3. 1
 (緑)、mEos3. 1 (赤)、mEos3. 2 (緑)、mEos3. 2 (赤)、mEo
 s4a (緑)、mEos4a (赤)、mEos4b (緑)、mEos4b (赤)、mEo
 sFP (緑)、mEosFP (赤)、mEosFP-F173S (緑)、mEosFP-
 F173S (赤)、mEosFP-M159A (緑)、mEYFP、MfaG1、mGa
 rnet、mGarnet2、mGeos-C (On)、mGeos-E (On)、mGe
 os-F (On)、mGeos-L (On)、mGeos-M (On)、mGeos-
 S (On)、mGinger1、mGinger2、mGrape1、mGrape2、
 mGrape3、mHoneydew、MiCy、mIFP、miniSOG、mini
 SOGQ103V、miniSOG2、miRFP、miRFP670、miRFP67
 0nano、miRFP670v1、miRFP703、miRFP709、miRFP
 720、mIrisFP (緑)、mIrisFP (赤)、mK-GO (初期)、mK-G
 O (後期)、mKalama1、mKate、mKateM41GS158C、mKat
 eS158A、mKateS158C、mKate2、mKeima、mKelly1、
 mKelly2、mKG、mKikGR (緑)、mKikGR (赤)、mKillerO
 range、mKO、mKO2、mKOκ、mLumin、mMaple (緑)、mMa
 ple (赤)、mMaple2 (緑)、mMaple2 (赤)、mMaple3 (緑)、
 mMaple3 (赤)、mMaroon1、mmGFP、mMiCy、mmilCFP、
 mNectarine、mNeonGreen、mNeptune、mNeptune2
 、mNeptune2. 5、mNeptune681、mNeptune684、Mon

10

20

30

40

50

tiporasp. #20-9115、mOrange、mOrange2、moxBFP、moxCerulean3、moxDendra2 (緑)、moxDendra2 (赤)、moxGFP、moxMaple3 (緑)、moxMaple3 (赤)、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、mStable、mStrawberry、mT-Sapphire、mTagBFP2、mTangerine、mTFP0.3、mTFP0.7 (On)、mTFP1、mTFP1-Y67W、mTurquoise、mTurquoise2、muGFP、mUkG、mVenus、mVenus-Q69M、mVFP、mVFP1、mWasabi、Neptune、NijiFP (緑)、NijiFP (オレンジ)、NowGFP、obeCFP、obeGFP、obeYFP、OFP、OFPxm、oxBFP、oxCerulean、oxGFP、oxVenus、P11、P4、P4-1、P4-3E、P9、PAGFP (On)、Padron (On)、Padron (star) (On)、Padron0.9 (On)、PAmCherry1 (On)、PAmCherry2 (On)、PAmCherry3 (On)、PAmKate (On)、PATagRFP (On)、PATagRFP1297 (On)、PATagRFP1314 (On)、pcDronpa (緑)、pcDronpa (赤)、pcDronpa2 (緑)、pcDronpa2 (赤)、PdaC1、pdae1GFP、phiYFP、phiYFPv、pHluorin、ecliptic、pHluorin、ecliptic (酸性)、pHluorin、ratiometric (酸性)、pHluorin、ratiometric (アルカリ性)、pHluorin2 (酸性)、pHluorin2 (アルカリ性)、pHujii、PlamGFP、pmeaGFP1、pmeaGFP2、pmimGFP1、pmimGFP2、Pp2FbFP、Pp2FbFPL30M、ppluGFP1、ppluGFP2、pporGFP、pporRFP、PS-CFP (シアン)、PS-CFP (緑)、PS-CFP2 (シアン)、PS-CFP2 (緑)、psamCFP、PSmOrange (Far-red)、PSmOrange (オレンジ)、PSmOrange2 (Far-red)、PSmOrange2 (オレンジ)、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 (On)、rsCherryRev (On)、rsCherryRev1.4 (On)、rseGFP (On)、rseGFP2 (On)、rsFastLime (On)、rsFolder (緑)、rsFolder2 (緑)、rsFusionRed1 (On)、rsFusionRed2 (On)、rsFusionRed3 (On)、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 (On)、Skylan-S (On)、smURFP、SNIFP、SOPP、SOPP2、SOPP3、SPOON (on)、stylGFP、SuperfolderGFP、SuperfoldermTurquoise2、SuperfoldermTurquoise2ox、SuperNovaGreen、SuperNovaRed、SYFP2、T-Sapphir

10

20

30

40

50

e、TagBFP、TagCFP、TagGFP、TagGFP2、TagRFP、TagRFP-T、TagRFP657、TagRFP675、TagYFP、td-RFP611、td-RFP639、tdimer2(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、 α GFP、10B、22G、5B、6C、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、gfasCP、GFPhal、gtenCP、hcriCP、hfriFP、KikG、LEA、mcFP497、mcFP503、mcFP506、mCherry1.5、mClavGR1、mClavGR1.1、mClavGR1.8、mClover1.5、mcRFP、meffCP、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、TeAPC α 、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。

【0220】

本明細書に開示されるアプタマーライブラリーをスクリーニングするための方法としては、レポーター遺伝子の活性をアプタマー制御下で測定すること、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の類似体の非存在下でのレポーター遺伝子の活性と比較した、スクリーニングに使用されるチアミンもしくはTPPの類似体の存在下でのレポーター遺伝子の活性を比較すること、が挙げられ得る。

【0221】

製造物品及びキット

【0222】

本明細書に記載される方法で使用するためのキットまたは製造物品もまた提供される。態様では、キットは、好適な包装に入った本明細書に記載される組成物（例えば、遺伝子調節力セットを含有する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。本明細書に記載される組成物（眼科用の注射用組成物等）のための好適な包装は、当該技術分野で公知であり、例えば、バイアル（密封バイアル等）、容器、アンプル、ボトル、広口瓶、フレキシブル包装（例えば、密封マイラー（Mylar）または密封ビニール袋）等が挙げられる。これらの製造物品をさらに滅菌及び／または密封してよい。

【0223】

本明細書に記載される組成物を含むキットもまた提供される。これらのキットはさらに、本明細書に記載される使用等の、組成物の使用方法に関する説明書（複数可）を含んでよい。本明細書に記載されるキットにはさらに、商業的及び使用者の立場から望ましい他の材料が含まれてよく、これには、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び組成物の投与を実施するため、または本明細書に記載される任意の方法を実施するための指示を記載した添付文書が含まれる。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載されるアプタマー配列を含有する遺伝子調節カセットを含む、標的遺伝子の発現のための rAAV、注射に好適な薬学的に許容される担体を含み、かつ、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び、注射を実施するための指示を記載した添付文書のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、キットは、眼内注射、筋肉内注射、静脈内注射等に好適である。

10

【0224】

本明細書で開示されている組成物及び方法の変形が当業者により作成され得ることが理解かつ予想されるべきであり、また、そのような変更が本開示の範囲内に含まれるべきであることが意図される。以下の実施例では本発明がさらに説明されるが、どのような形でも本発明の範囲を制限すると解釈されるべきではない。

【0225】

本明細書で引用されているすべての参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書で提供されるすべてのヌクレオチド配列は、特に断らない限り、5' から3' 方向である。配列表は、本明細書と共に提出され、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。

20

【実施例】

【0226】

実施例1. 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、TPP 及びチアミン類似体に応答して遺伝子発現を調節することができる

【0227】

実験手順

【0228】

リボスイッチコンストラクト: Integrated DNA Technologies, Inc. でアプタマーを合成してもらい、Golden Gate クローニング戦略 (New England Biolabs, NEB) を使用して合成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て、G17 リボスイッチカセットのグアニンアプタマー (全体が本明細書に組み込まれる WO2016/126747 に記述の配列番号15を参照のこと) を、*Alishewanella tabrizica* *thiC* 遺伝子 (Microbiol Res. 2017 Jan; 195: 71-80) からの TPP アプタマー、または *Escherichia coli thiM* 遺伝子 (Structure. 2006 Sep; 14 (9): 1459-68) からの TPP アプタマーで置き換え、それぞれのリボスイッチである TPPz 及び TPPm を作製した。

30

【0229】

TPPz リボスイッチをルシフェラーゼレポーター遺伝子に挿入することにより、配列番号82を得た。大文字は、ルシフェラーゼコード配列を示す。小文字は、イントロン/選択的エクソン/イントロンとリボスイッチの配列を示す。thiC アプタマーコード配列 (配列番号96) には下線が引かれている。一実施形態では、配列番号82を含むリボスイッチが提供され、ここで、配列番号82におけるアプタマーコード配列 (配列番号96) は、本明細書に開示される別のアプタマー配列で置き換えられる。

40

【0230】

配列番号82

【0231】

50

【化 2 1 - 1】

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCG
CTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCC
CTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTT
ACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGG
GCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTT
ATGCCGGTGTGTTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACA
TTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGT
GTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCC
AATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAG
TCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTT
TGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCT
GGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGA
GATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGC
GATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGAT
ATTTGATATGTGGATTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTT
TCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTA
TTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACA
CGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCC

10

20

30

40

50

【化 2 1 - 2】

AAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttcttccccctctttctatggtt
aagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggtaatgttcattgtaattttaaaaaatgctttct
tctttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaactctctttcttcagggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctg
tttctctaactgttaggaatgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtgtcggagtgcccttagggat
tattcccctaaagctgagaccgcattgcgggatccgttgaacctgatcaggctaatacctgcgaaggggaacacattacgcaccattcta
aagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttt
catattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtccaagctaggccct
tttgctaatacatgttcatacctcttatcttctctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGC
TATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTT
CCATTTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTA
ATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGTTATGTAAA
CAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGG
AGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAG
TCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCT
TGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGA
CGCCGGTGAACCTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACG
GAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTG
CGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAATC
GACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGAT
CGCCGTGTAA

10

20

【0 2 3 2】

TPPmリボスイッチをルシフェラーゼレポーター遺伝子に挿入することにより、配列番号 83 を得た。大文字は、ルシフェラーゼコード配列を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。thiM アプタマーコード配列（配列番号 97）には下線が引かれている。一実施形態では、配列番号 83 を含むリボスイッチが提供され、ここで、配列番号 83 におけるアプタマーコード配列（配列番号 97）は、本明細書に開示される別のアプタマー配列で置き換えられる。

30

【0 2 3 3】

配列番号 83

【0 2 3 4】

【化 2 2 - 1】

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCG
CTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCC
CTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTT
ACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGG
GCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTT
ATGCCGGTGTGTTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACA
TTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTCGCAGCCTACCGTGGT

40

50

【化 2 2 - 2】

GTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCC
 AATCATCCAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAG
 TCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTT
 TGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCT
 GGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGA
 GATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGC
 GATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTTACTACACTCGGAT
 ATTTGATATGTGGATTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTT
 TCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCTTA
 TTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACA
 CGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCC
 AAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgttttcttcccttctttctatggtt
 aagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacataattgaccaaatacagggttaatttgcattgttaatttaaaaaatgctttct
 tctttaatafatacttttgtttatcttatttctaactttccctaatactcttcttctcagggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctg
 ttctctaactgttaggaatgaattcagataattccagagaatgaaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtctcgggtgcccttctgcgt
gaaggctgagaaatacccgatcacctgatctggataatgccagcgtagggaagacattacgcaccattctaagaataacagtata
 atttctgggtaaggaatagcaatatttctgcatataaatttctgcatataaattgtaactgatgaagaggttcatattgctaatagcag
 ctacaatccagctaccattctgctttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtcgaagctaggccctttgctaatacatgttcat
 acctcttattcttctccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATT
 ACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTG
 AAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAACCGCTGGGCGTTAATCAAAGAG
 GCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGA
 AGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGC
 TTAAGTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATT
 AAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAAC
 ACCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGA
 ACTTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGA
 GATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGG
 AGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAACTCGACGCAAG
 AAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGT
 AA

10

20

30

40

【0 2 3 5】

トランスフェクション：トランスフェクション前日、 3.5×10^4 のヒト胎児由来腎臓（HEK）293細胞を96ウェル平底プレートに播種した。プラスミドDNA（500 ng）を、チューブまたは96ウェルU底プレートに加えた。別途、TransIT-293試薬（Mirus；1.4 μL）を、50 μLのOptimem I培地（Life Technologies）に加え、室温（RT）で5分間静置した。その後、この希釈したトランスフェクション試薬を50 μLにてDNAに加えて混合し、室温で20分間インキュベートした。最後に、この溶液を7 μLにて96ウェルプレートのウェルの細胞に加えた。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有する培地を

50

、アプタマー誘導物質としてTPP、フルスルチアミン、プロスルチアミン、ビスベンチアミン、ベクロチアミン塩酸塩、またはスルブチアミンいずれかを含有する培地に置き換えた。

【0236】

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、インキュベーターからプレートを取り外し、実験台で数分間RTに平衡化し、その後吸引した。Glo-Lysisバッファー（Promega、100μL、RT）を加え、プレートを少なくとも5分間室温のまま置いた。その後、ウェルの内容物を50μLのトリチュレーションで混合し、各試料の20μLを、glo-Lysisバッファーで10%に希釈してあった20μLのbright-glo試薬（Promega）と混合した。96のウェルを、不透明な白色384ウェルプレートに間隔をあけて配した。RTでの5分間のインキュベーションの後、Tecan機器を500msの読み取り時間で使用して発光を測定した。ルシフェラーゼ活性は、平均任意光単位（ALU）±S.D.として表され、誘導倍率は、TPPまたは類似体で処理した細胞から取得したルシフェラーゼ活性を、TPPまたは類似体で処理しなかった細胞から取得したルシフェラーゼ活性で割った商として計算された。

【0237】

結果

【0238】

A. tabrizica thiCリボスイッチ（リボスイッチTPPz用）またはE. coli thiMリボスイッチ（リボスイッチTPPm用）からのTPPアプタマーをそれぞれ、合成リボスイッチ遺伝子発現カセット内に挿入することによって、TPP応答性リボスイッチを含む遺伝子発現カセットが作製された。ここでは、アプタマー配列は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2016/126747に記載のように、インフレームにある終止コドンを含む選択的エクソンの下流のイントロンに挿入した。アプタマーへのリガンドの結合は、3'イントロンの5'スプライス部位の接近可能性を制御し、したがって、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。

【0239】

図1Aに示すように、合成リボスイッチのTPPz及びTPPmの両方ともTPPにตอบสนองしてルシフェラーゼ発現を調節する。TPPzは、TPPmより低濃度でも標的遺伝子発現を誘導し、これは、A. tabrizica thiCアプタマーが、E. coli thiMアプタマーと比較して哺乳類細胞での高いTPP結合親和性を有することを示している。

【0240】

合成リボスイッチTPPz及びTPPmがチアミンにも応答するかどうかを決定するため、チアミン類似体の一群を調査した。図1B及び図1Cに示すように、TPPz及びTPPmは、フルスルチアミン及びプロスルチアミンの処理にตอบสนองしてルシフェラーゼ発現を誘導するが、ビスベンチアミン、ベクロチアミン塩酸塩、及びスルブチアミンによる処理では、ルシフェラーゼ発現に対する効果が弱いまたはまったくない（図1Dを参照のこと）。いずれの場合でも、リボスイッチTPPzは、TPPmよりも低濃度で標的遺伝子発現を誘導した。

【0241】

これらのデータは、哺乳類細胞において、異種アプタマー配列を含む合成リボスイッチが、多種多様なチアミン関連分子に用量依存的にตอบสนองして標的遺伝子発現を効果的に誘導することができることを示す。

【0242】

実施例2. TPPアプタマー相同配列は、チアミン類似体にตอบสนองして哺乳類細胞での遺伝子発現を調節する。

【0243】

実験手順：

【0244】

リボスイッチの構築：TPPアプタマー相同配列をRfam 12.0 (<https://rfam.xfam.org/>) から取得して合成した (Twister Biotech)。TPPアプタマー相同配列を含有するリボスイッチコンストラクトを作製するため、合成したオリゴをPCRのテンプレートとして使用し、Golden Gateクローニング (NEB) を使用してG17リボスイッチコンストラクト (WO2016/126747) のグアニンアプタマーを置き換えた。

【0245】

トランスフェクション及びホタルルシフェラーゼアッセイを実施例1に記載のように実施した。

10

【0246】

結果：

【0247】

例えばヒト対象での、治療を目的とした遺伝子の調節には、治療される対象に天然には存在しない合成化合物 (フルスルチアミン等) と組み合わせた合成リボスイッチの使用が特に有用である。これは、患者に調節性化合物が存在しないことで、治療遺伝子の厳密に制御された発現が可能になるためである。

【0248】

TPPz及びTPPmと比較して、チアミン類似体に対して応答した遺伝子調節活性が増大しているアプタマーを同定するため、相同配列を有する推定TPPアプタマーをRfam 12.0 (RNAファミリーのデータベースRF00059、<http://rfam.xfam.org/family/RF00059>) から取得した。この推定TPPアプタマー (受託番号AACY023654033.1、895位で始まり、815位で終わる配列を有し、本明細書では14G4と呼ばれる) を、実施例1に記載のように選択的スプライシングに基づく遺伝子調節カセットに挿入して、アプタマーリボスイッチ14G4を作製した。

20

【0249】

14G4リボスイッチをルシフェラーゼレポーター遺伝子に挿入することにより、配列番号84を得た。大文字は、ルシフェラーゼコード配列を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。14G4アプタマーコード配列 (配列番号7) には下線が引かれている。一実施形態では、配列番号84を含むリボスイッチが提供され、ここで、配列番号84におけるアプタマーコード配列 (配列番号7) は、本明細書に開示される別のアプタマー配列で置き換えられる。

30

【0250】

配列番号84

【0251】

40

50

【化 2 3 - 1】

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCG
CTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCC
CTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTT
ACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGG
GCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTCAATTCTTT
ATGCCGGTGTTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACA
TTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGT
GTTTCGTTTCCAAAAAGGGGTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCC
AATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAG
TCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTT
TGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCT
GGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGA
GATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGC
GATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGAT
ATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTT
TCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTA
TTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACA
CGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCC
AAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttctttcccttctttctatgggt
aagttcatgtcataggaaggggagaaagtaacagggtacacataattgacaaatcagggttaatttgcatgttaatttaaaaaatgctttct
tctttaataatactttttgttatcttatttctaatactttccctaattctctttcagggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctg
tttctctaactgttaggaatgaattcagataattccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggtaattgtacaggggtccggccttttc
atttggcggcggtgagagcacacccttgaacctgtttacggataatgcccgcgaggagtagcattacgcaccattctaagaataac
agtataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcataattgctaa
tagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggctggattattctgagccaagctaggcccttttgctaatcat
gttcataacctcttatcttctccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTG
ATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCGTAAAGTTGTTCCATTTT
TTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAACGCTGGGCGTTAATCAA
GAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCC
GGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACAT

10

20

30

40

50

【化 2 3 - 2】

AGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTG
ATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCC
AACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGG
TGAACCTCCCGCCGCGGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAA
AGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGG
AGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGC
AAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCG
TGTAAT

10

【0 2 5 2】

このリボスイッチを、それがルシフェラーゼ遺伝子発現を調節する能力について H E K 2 9 3 細胞で試験した。図 2 に示すように、ルシフェラーゼ発現は、フルスルチアミンによる処理時に用量依存的に 1 0 0 倍増加した。さらに、1 4 G 4 リボスイッチは、複数の型の細胞において、フルスルチアミンによる処理に応答してルシフェラーゼ遺伝子発現を調節した。

【0 2 5 3】

この実験は、哺乳類細胞において合成小分子に応答して標的遺伝子発現を顕著に誘導する能力があるアプタマーを含む、哺乳類リボスイッチの作製成功を示す。

20

【0 2 5 4】

実施例 3 . チアミン類似体に対する感受性が増大している再設計アプタマー配列を含むリボスイッチの作製。

【0 2 5 5】

リボスイッチ 1 4 G 4 は、T P P と比較してフルスルチアミンに対して選択性があることから、さらなる改善のために選択された。1 4 G 4 リボスイッチの予測される二次構造 (RNA fold、<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) と、E. coli thi M リボスイッチの結晶学による構造とを比較した後、1 4 G 4 配列において、らせん形成に関与するとは考えられないがリガンド結合時に三次構造に関与し得る 3 つの領域を同定した。これらの 3 つの領域を配列ランダム化のために選択し、活性が改善された再設計アプタマー配列を有するリボスイッチを作製した。

30

【0 2 5 6】

3 つのアプタマライブラリー A 1、A 2 及び A 3 はそれぞれ、領域 J 4 - 5、J 2 - 4 及び J 3 - 2 の 6 位かまたは隣接するヌクレオチドをランダム化することにより作製された (図 3 を参照のこと)。単一の細菌コロニーをピックし、リボスイッチコンストラクトを含有するプラスミドを、リボスイッチ 1 4 G 4 と比較した、5 0 μ M のフルスルチアミンに応答した遺伝子調節活性改善について H E K 2 9 3 細胞でスクリーニングした。図 4 A に示すように、1 D 1 0、3 H 4、4 H 2、6 B 4、6 C 4、及び 6 G 1 2 を含め、単離されたアプタマーコンストラクトのうちのいくつかは、親コンストラクトの 1 4 G 4 と比較して、フルスルチアミン依存性の誘導の増大を示している。これらの再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチはまた、アルファマウス肝 1 2 (A M L 1 2)、C 2 C 1 2 (マウス筋芽細胞株)、及び成体網膜色素上皮細胞株 - 1 9 (A R P E - 1 9) 等の他の細胞型でも標的遺伝子発現の顕著な増強をもたらす (図 4 B を参照のこと)。さらに、再設計されたアプタマー配列を含む選択されたリボスイッチはまた、(A M L 1 2 細胞で) プロスルチアミン及びベンフォチアミンによる処理に応答して標的遺伝子発現を増加させた (図 4 C を参照のこと)。

40

【0 2 5 7】

50

このデータは、再設計されたアプタマー配列を含む単離されたりボスイッチが、多種多様な合成小分子に応答して多種多様な細胞型での標的遺伝子発現を誘導するのに有用であることを示している。

【0258】

遺伝子調節活性をさらに増強させるため、ライブラリー A 4 を使用して 2 回目の変異誘発を実施した（図 5 を参照のこと）。このライブラリーでは、3 H 4 のバリエーションリボスイッチコンストラクトのアプタマー配列を 6 つのヌクレオチド位置、すなわち、3 H 4 アプタマーの予測される二次構造の J 3 - 2 領域の 3 塩基及び J 2 - 4 領域の 3 塩基にてランダム化した。単一の細菌コロニーをピックし、リボスイッチコンストラクトを含有するプラスミドを、リボスイッチ 3 H 4 と比較した遺伝子調節活性改善について 50 μ M のフルスルチアミンを使用して H E K 2 9 3 細胞でスクリーニングした。

【0259】

ライブラリー A 4 から単離された異なるアプタマーバリエーションを含むいくつかのリボスイッチは、1 4 G 4 と 3 H 4 の両方と比較して、フルスルチアミンに対してさらなる感受性改善を示し、アプタマー／リガンド結合に関与する選択ヌクレオチドの変異誘発が、哺乳類細胞においてアプタマーベースのリボスイッチの遺伝子調節活性を改善することができることを示している（図 6 A を参照のこと）。

【0260】

次に、アプタマーライブラリー A 4 から単離された、再設計アプタマー配列を含むリボスイッチが、チアミンと化学構造上の特徴を共有する他のチアミン類似体に応答する能力を決定した。図 6 B に示すように、アプタマー 1 5 A 5 及び 1 5 D 1 0 を含む 3 H 4 由来リボスイッチは、合成分子であるフルスルチアミン、プロスルチアミン、及びベンフォチアミンに応答してルシフェラーゼ発現を強力に調節するが、天然に存在する T P P に対してはほとんど応答しない。さらに、再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチである 1 5 A 5 及び 1 5 D 1 0 は、親リボスイッチの 3 H 4 と比較して、フルスルチアミン、プロスルチアミン、及びベンフォチアミンに応答した動的範囲の顕著な改善を示す。

【0261】

この例は、複数回の変異誘発を介して、いくつかの合成チアミン類似体による処理に応答して標的遺伝子発現を増強させる、再設計されたアプタマー配列を含む改善されたりボスイッチが作製可能であることを示している。

【0262】

実施例 4 . 合成チアミン類似体リボスイッチは、フルスルチアミンに応答して様々な標的遺伝子の発現を調節することができる

【0263】

実施例 3 で考察されているように、再設計されたアプタマー配列を含む単離されたりボスイッチは、様々なチアミン類似体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誘導する。単離されたアプタマー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、再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチのうちのいくつかを、マウスエリスロポエチン (m E p o) の c D N A 配列及び高感度緑色蛍光タンパク質 (E G F P) の c D N A 配列内に挿入した。

【0264】

実験手順：

【0265】

リボスイッチコンストラクト：アプタマー 3 H 4 または 1 5 D 1 0 を含有する選択的スプライシングリボスイッチを、それぞれ、コンストラクト C o n 8 - E p o (配列番号 8 5) のマウスエリスロポエチン c D N A 配列に 3 0 8 位にて挿入し、コンストラクト E p o - 3 H 4 (配列番号 8 6) 及び E p o - 1 5 D 1 0 (配列番号 8 7) を得た。サイトメガロウイルス (C M V) プロモーターによってエリスロポエチン遺伝子の発現の誘導された。アプタマー 6 B 4 を含有するリボスイッチカセットを、ベクター p E G F P - C 1 の高感度緑色蛍光タンパク質 (E G F P) をコードする c D N A 配列内に 2 7 6 位に

て挿入し、EGFP-6B4コンストラクト（配列番号88）を作製した。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Con8-Epo内に挿入して、構成的標的遺伝子発現の対照としての役割を果たすコンストラクトEpo-Con1（配列番号89）を作製した。

【0266】

3H4リボスイッチをエリスロポエチン遺伝子に挿入することにより、配列番号86を得た。大文字は、エリスロポエチンコード配列（配列番号85を参照のこと）を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。3H4アプタマーコード配列（配列番号9）には下線が引かれている。

【0267】

配列番号86

【0268】

【化24】

ATGGGGGTGCCCCGAACGTCCCACCCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTAC
TGATTCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTCTGTGCTCCCCACGCCTCATCTGCGACAGT
CGAGTTCTGGAGAGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCAGAAAATGTCACGATG
GGTTGTGCAGAAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTACAGTCCCAGATACCAAA
GTCAACTTCTATGCTTGGAAGAAGTGGAGGTGGAAGAACAGGCCATAGAAGTT
TGGCAAGGCCTGTCCCTGCTCTCAGAAGCCATCCTGCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtt
tcttccccctctttctatgggtaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggtaatgttcatt
tgtaattttaaaaaatgcttctcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaatactcttttccagggaataatgatacaat
gtatcatgccgagtaacgctgtttcttaactgttaggaatgaattcagatattccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggtaatg
tacaggggtccggccttttcatttggcgccggtgagagcacaccctttgaacctgttcacggataatgccgctgcagggagtacattac
gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaatgttaactgat
gtaagagggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttttttatgggtgggataaggctggattattctgagcca
agctaggcccttttgctaatacatgttcatactcttatcttctctccacagCCCAGGCCCTGCTAGCCAATTCTCTCC
CAGCCACCAGAGACCCTTCAGCTTCATATAGACAAAGCCATCAGTGGTCTACGTA
GCCTCACTTCACTGCTTCGGGTACTGGGAGCTCAGAAGGAATTGATGTGCGCTCC
AGATACCACCCACCTGCTCCACTCCGAACACTCACAGTGGATACTTTCTGCAAG
CTCTTCCGGGTCTACGCCAACTTCCTCCGGGGGAACTGAAGCTGTACACGGGAG
AGGTCTGCAGGAGAGGGGACAGGTGA

【0269】

15D10リボスイッチをエリスロポエチン遺伝子に挿入することにより、配列番号87を得た。大文字は、エリスロポエチンコード配列（配列番号85を参照のこと）を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。15D10アプタマーコード配列（配列番号26）には下線が引かれている。

【0270】

配列番号87

10

20

30

40

50

【化 2 5】

ATGGGGGTGCCCCGAACGTCCCACCCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTACTGATTCC
TCTGGGCCTCCCAGTCCTCTGTGCTCCCCACGCCTCATCTGCGACAGTCGAGTTC
TGGAGAGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCAGAAAATGTCACGATGGGTGTG
CAGAAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTACAGTCCCAGATACCAAAGTCAACT
TCTATGCTTGGAAGAATGGAGGTGGAAGAACAGGCCATAGAAGTTTGGCAAG
GCCTGTCCCTGCTCTCAGAAGCCATCCTGCAGGgtgagtctatgggaccctgatgttttcttcccttctt
ttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaaatacagggaattttgcatttgaattttaaa
aatgctttctctttaataatactttttgttatcttatttctaatactttccctaatactctttcttccagggaataatgataaatgtatcatgccga
gtaacgctgtttcttaactttaggaatgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggtcc
ggccttttcatttggcaccggtgagaacatacccttcggacctgttcacggataatgccgctgcagggaagtagcattacgcaccattctaa
agaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatafaaataatttctgcataaaattgtaactgatgtaagaggttct
atattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttaggttgggataaggctggattattctgagccaagctaggccctt
tgctaatacatgttcatactcttattctctccacagCCCAGGCCCTGCTAGCCAATTCCTCCCAGCCAC
CAGAGACCCTTCAGCTTCATATAGACAAAGCCATCAGTGGTCTACGTAGCCTCAC
TTCCTGCTTCGGGTACTGGGAGCTCAGAAGGAATTGATGTCGCCTCCAGATACC
ACCCACCTGCTCCACTCCGAACACTCACAGTGGATACTTTCTGCAAGCTCTTCC
GGGTCTACGCCAACTTCCTCCGGGGGAACTGAAGCTGTACACGGGAGAGGTCT
GCAGGAGAGGGGACAGGTGA

10

20

【0 2 7 1】

6 B 4 リボスイッチを E G F P 遺伝子に挿入することにより、配列番号 8 8 を得た。大文字は、E G F P コード配列を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。6 B 4 アプタマーコード配列（配列番号 1 4）には下線が引かれている。

30

【0 2 7 2】

配列番号 8 8

【0 2 7 3】

40

50

【化 2 6】

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTG
GTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGC
AAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCACT
GCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCAT
GCCCCAAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttctttcccttctttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagta
acagggtacacatatgaccaaatacagggtaatgttcattgtaatgtttaaaaaatgccttcttttaataatactttttgttatcttatttctaa
tactttccctaatactctttctttcagggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttctctaactgttaggaatgaattcagata
ttccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggtccggccttttcatttggcgccggtgagagcacacccttg
acctgtttacggataatgccgccgagggagtacattacgcaccattctaaagaataacagtataattctgggttaaggcaatagcaa
tatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgaagaggttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgctt
ttattttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgcataatcatgttcataaccttattcttctctccacagCT
ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG
CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA
TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACA
ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA
ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACT
ACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
TGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT
GTACAAGTAA

10

20

30

【0 2 7 4】

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エリスロポエチン遺伝子に挿入することにより、配列番号 8 9 を得た。大文字は、エリスロポエチンコード配列（配列番号 8 5 を参照のこと）を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロン配列を示す。

【0 2 7 5】

配列番号 8 9

【0 2 7 6】

40

50

【化 2 7】

ATGGGGGTGCCCCAACGTCCCACCCTGCTGCTTTTACTCTCCTTGCTAC
 TGATTCCTCTGGGCCTCCCAGTCCTCTGTGCTCCCCACGCCTCATCTGCGACAGT
 CGAGTTCTGGAGAGGTACATCTTAGAGGCCAAGGAGGCAGAAAAATGTCACGATG
 GGTTGTGCAGAAGGTCCCAGACTGAGTGAAAATATTACAGTCCCAGATACCAA
 GTCAACTTCTATGCTTGGAAAAGAATGGAGGTGGAAGAACAGGCCATAGAAGTT
 TGGCAAGGCCTGTCCCTGCTCTCAGAAGCCATCCTGCAGGgtgagtctatgggacccttgatggtt
 tcttccccctcttttctatggtaagftcatgtcataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaaatacagggtaatftgcatt
 tgtaattttaaaaaatgctttctcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaattctttcttcagggaataatgatacaat
 gtatcatgcctctttgcaccattctaaagaataacagtataatftctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatat
 aaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttatttttggttgggataaggctgga
 ttattctgagtgccaagctaggcccttttctaatcatgttcatactcttattctctccacagCCCAGGCCCTGCTAGCCA
 ATTCCTCCCAGCCACCAGAGACCCTTCAGCTTCATATAGACAAAGCCATCAGTGG
 TCTACGTAGCCTCACTTCACTGCTTCGGGTACTGGGAGCTCAGAAGGAATTGATG
 TCGCCTCCAGATACCACCCACCTGCTCCACTCCGAACACTCACAGTGGATACTT
 TCTGCAAGCTCTTCCGGGTCTACGCCAACTTCCTCCGGGGGAAACTGAAGCTGTA
 CACGGGAGAGGTCTGCAGGAGAGGGGACAGGTGA。

10

20

【0 2 7 7】

マウスエリスロポエチンについての酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) : A M L 1
 2細胞にT r a n s I T - X 2トランスフェクション試薬 (M i r u s B i o) を実施
 例 1 に記載のようにトランスフェクトした。トランスフェクションの 4 時間後、A M L 1
 2細胞をフルスルチアミンを用いて、または用いずに、示されている用量にて処理した。
 トランスフェクトされた細胞からの上清を、フルスルチアミン処理の 2 4 時間後に採取し
 、上清中のm E p o の検出のため、製造者 (R & D) の指示に従ってE L I S A にかけた。

30

【0 2 7 8】

E G F P - 6 B 4 を発現する細胞株の作製 : G e n e P u l s e r X c e l l (B i
 o - R a d) を使用し、H E K 2 9 3 細胞のデフォルトのパラメータを適用して、H E K
 2 9 3 細胞に 1 0 0 n g のプラスミド D N A で電気穿孔することにより、E G F P - 6 B
 4 コンストラクトを含有する安定な細胞株を作製した。電気穿孔の 4 8 時間後、細胞培養
 物を 8 0 0 μ g / m l の抗生物質 G 4 1 8 で 2 週間処理し、G 4 1 8 耐性遺伝子を担持す
 る、E G F P - 6 B 4 カセットを安定して発現する細胞を選択した。細胞をトリプシン処
 理した。細胞懸濁液中の E G F P の蛍光強度を、G u a v a E a s y C y t e 8 H T 装
 置を使用してフローサイトメトリーにより決定した。得られたデータを、G u a v a S o
 f t 3 . 3 を使用して分析した。誘導の倍率増加は、フルスルチアミンで処理した細胞
 から取得された平均蛍光強度 (M F I) を、フルスルチアミンで処理しなかった細胞から
 取得された M F I で割った商として計算された。

40

【0 2 7 9】

フローサイトメトリー分析 : 安定的に E G F P - 6 B 4 コンストラクトを形質導入され
 た 1.5×10^5 の H E K 2 9 3 細胞を、フルスルチアミン処理の 1 日前に 2 4 ウェルプ
 レートに播種した。細胞をフルスルチアミンで 2 4 時間処理した。E G F P の蛍光強度を
 上記のようにフローサイトメトリーによって決定した。

【0 2 8 0】

結果 :

【0 2 8 1】

50

コンストラクトEGFP-6B4を発現する細胞は、フルスルチアミン処理の非存在下ではレポータータンパク質EGFPの低発現を示したが、フルスルチアミンの存在下ではEGFP発現の14倍の増加を示し（図7Aを参照のこと）、これは、再設計されたアプタマー6B4を含むリボスイッチが、合成リガンドのフルスルチアミンに応答してルシフェラーゼ以外のレポータータンパク質の発現を誘導する能力を示している。さらに、フルスルチアミン処理に応答したEGFP発現の誘導は、用量依存的であった（図7Bを参照のこと）。

【0282】

次に、アプタマー3H4及び15D10を含むリボスイッチがmEpoの遺伝子発現を調節する能力を調べた。フルスルチアミンの非存在下では、mEpo-3H4またはmEpo-15D10を含有する細胞は、非常に低いレベルのmEpoを発現した。しかしながら、フルスルチアミンでの処理時には、mEpo-3H4コンストラクトまたはmEpo-15D10コンストラクトを含有する細胞において、mEpoの発現が用量依存的に増強した。予想したとおり、対照コンストラクトmEpo-Con1は、フルスルチアミンの有無にかかわらずmEpoを恒常的に発現した（図7Cを参照のこと）。12.5μMのフルスルチアミンでの処理に応答して、mEpoの発現は、フルスルチアミン非存在下での発現と比較して約40倍（Epo-15D10）または9倍（Epo-3H4）誘導され（図7Dを参照のこと）、誘導物質が12.5μMでのmEpo-15D10からのmEpoのレベルは、構成的で調節不可能なmEpo-Con1コンストラクトからのレベルの約61.3%である。

【0283】

これらの結果は、再設計され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は、特定の標的遺伝子配列に限定されないことを実証しており、標的遺伝子発現の調節にこれらのアプタマーリボスイッチを一般に適用できることを示している。

【0284】

実施例5：合成リボスイッチは、マウスにおいてインビボで遺伝子発現を調節する

【0285】

再設計されたアプタマーがインビボで遺伝子発現を誘導する能力を評価するため、レポータータンパク質ルシフェラーゼの遺伝子に挿入された、再設計されたリボスイッチを保持するアデノ関連ウイルスベクター（AAV）をマウスにトランスフェクトした。プロスルチアミンを、ルシフェラーゼ発現を誘導するためのアプタマーリガンドとして使用した。

【0286】

実験手順：

【0287】

AAV2.8ウイルス粒子の生成：マウスのトランスフェクションに使用されたAAV2.8粒子は、AAV2に由来するウイルスゲノム及びAAV8に由来するカプシドを含んだ。（1）アプタマーを含まない調節不可能リボスイッチ（「Luci-Con1」、配列番号90）、（2）アプタマー3H4を含むリボスイッチカセット（「Luci-3H4」、配列番号91）、または（3）アプタマー6B4を含むリボスイッチカセット（「Luci-6B4」、配列番号92）と共にイントロン-エクソン-イントロンカセットを含有するルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれ、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の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が含まれる、CASIプロモーターにより制御された。ウイルスベクターをAAV8カプシド内にパッケージングし、製造者のプロトコル（Vigene Biosciences）に従って作製した。

【0288】

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ルシフェラーゼレポーター遺伝子に挿入することにより、配列番号90を得た。大文字は、ルシフェラーゼコード配列を示す。小文字は、イントロン/選択的エクソン/イントロン配列を示す。

【 0 2 8 9 】

配列番号 9 0

【化 2 8 - 1】

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAA
GATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTT
CCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTG
AGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGA
ATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCC
GGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTAT
AATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCG
TTTCCAAAAAGGGGTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAGCTCCCAATCA
TCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGAT
GTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGC
CAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATC
TACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTC
TCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTT
AAGTGTGTTCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGA
TATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAG
GAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCC
TTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAA
TTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAG
GTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttcttccctctttctatggttaagtcatgt
cataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggttaatttgcatgttaatttaaaaaatgcttctctttaatat
actttttgtttatcttatttctaatactttccctaatactcttcttccagggaataatgatacaatgtatcatgcctcttgcaccattctaagaat
aacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaataatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattg
ctaatagcagctacaatccagctaccattctgctttattttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctaggccctttgcta
atcatgttcatacctcttattctctctccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATT
CTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCA

10

20

30

40

50

【化 28-2】

TTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATC
AAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACA
ATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAG
ACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTC
TCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTG
CTCCAACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACG
CCGGTGAACCTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGA
AAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCG
CGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGA
CGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCG
CCGTGTAA

10

【0290】

3H4リボスイッチをルシフェラーゼ Reporter 遺伝子に挿入することにより、配列番号91を得た。大文字は、ルシフェラーゼコード配列を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。3H4アプタマーコード配列（配列番号9）には下線が引かれている。

20

【0291】

配列番号91

【化 29-1】

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAA
GATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTT
CCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTG
AGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGA
ATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCC
GGTGTGTTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTAT
AATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTTCG
TTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCA
TCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGAT
GTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGC
CAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATC
TACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTC
TCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTT
AAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGA
TATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAG
GAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCC
TTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAA
TTGCTTCTGGTGGCGCTCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAG

30

40

50

【化 2 9 - 2】

GTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttcttcccccttctttctatggttaagttcatgt
cataggaaggggagaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggtaatgttcatttgtaattttaaaaaatgctttctctttaatat
actttttgtttatcttatttctaatactttccctaatactctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttcttaac
ttgtaggaatgaattcagatattccagagaatgaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggtccggccttttcatttggcgcc
ggtgagagcacacccttgaacctgttcacggataatgccgctgcagggagtacattacgcaccattctaagaataacagtgataatt
ctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggttcatattgctaatagcagcta
caatccagctaccattctgcttttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgctaatacatgttcataacc
tcttatcttctcccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTAC
ACCCGAGGGGGATGATAAACC GGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGA
GCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGC
GAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAG
CGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTA
CTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAG
TACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACC
CCAACATCTTCGACGCAGGTGTGCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGA
ACTTCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGAT
CGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGT
TGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAA
AATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

10

20

【0 2 9 2】

6 B 4 ボススイッチをルシフェラーゼレポーター遺伝子に挿入することにより、配列番号 9 2 を得た。大文字は、ルシフェラーゼコード配列を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。6 B 4 アプタマーコード配列（配列番号 1 4）には下線が引かれている。

30

【0 2 9 3】

配列番号 9 2

40

50

【化 3 0 - 1】

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAA
GATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTT
CCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTG
AGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGA
ATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCC
GGTGTGGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACATTTAT
AATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCG
TTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCCAATCA
TCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAGTCGAT
GTACACGTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGC

10

20

30

40

50

【化 3 0 - 2】

CAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATC
TACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTC
TCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTT
AAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGA
TATGTGGATTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAG
GAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCC
TTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAA
TTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAG
GTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttcttccccctctttctatgggtaagttcatgt
cataggaaggggagaagtaacaggggtacacatattgaccaaatacagggtaatgttcatttgaatttataaaaaatgcttcttctttaatat
actttttgtttatcttatttctaatactttccctaatacttcttcttcaggggcaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctgtttcttaac
ttgtaggaatgaattcagatatttccagagaatgaaaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggtccggccttttcatttggcgcc
ggtgagagcacacccttgtagcctgttacggataatgccgccgagggagtagacattacgcaccattctaaagaataacagtataattt
ctgggtaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagcta
caatccagctaccattctgcttttatttattggttgggalaaggctggattattctgagtccaagctaggcccttttgcataatcatgttcatacc
tcttatcttctccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTAC
ACCCGAGGGGGATGATAAACC GGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGA
GCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGC
GAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAG
CGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTA
CTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAG
TACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACC
CCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACT
TCCCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGAT
CGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGT
TGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGACGCAAGAAA
AATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA

10

20

30

【0 2 9 4】

動物試験：雄 B a l b / c マウスに、 1.0×10^{11} または 2.5×10^{11} のゲノム
コピーの受容 A A V 2 . 8 ウイルス粒子を単回尾静脈注射により投与した。A A V ベク
ター送達の 2 8 日後、マウスを 5 0 m g / k g のプロスルチアミンで腹腔内（I . P . ）処
置した。ルシフェラーゼ活性を、薬物投与の前日、ならびに薬物投与の 6 時間後、2 4 時
間後、4 8 時間後及び 7 2 時間後に測定した。プロスルチアミンの初回投与後、マウスに
以下のとおり追加の 3 回の投与及び撮像サイクルを行った：3 6 日目（A A V 投与後）：
1 0 0 m g / k g ； 4 3 日目：2 0 0 m g / k g ；及び 5 1 日目：4 0 0 m g / k g 。

40

【0 2 9 5】

生きた動物の非侵襲的生物発光イメージング：イメージング前、マウスを 2 % イソフル
ランで麻酔し、1 5 0 m g / k g 体重のルシフェリンを注射した。薬物投与後の示されて

50

いる時点で、ルシフェリン注射の2～5分以内にBruker Xtremeシステムを使用して撮像した。ルシフェラーゼ活性を、平均光子／秒±S.D.として表した。(n=5)。ルシフェラーゼ遺伝子発現の誘導倍率は、プロスルチアミンで処置したマウスから得た光子／秒を、プロスルチアミン処置の前日にマウスから得た値で割った商として計算された。

【0296】

結果：

【0297】

動物での遺伝子発現の調節におけるリボスイッチを試験するため、リボスイッチを含むかまたは含まないルシフェラーゼ遺伝子を有するAAVベクターを、マウスに静脈内送達した。マウスを、AAV注射の4週間にプロスルチアミンで腹腔内(I.P.)処置した。単一用量(50mg/kg)のプロスルチアミン処置の6時間後、ルシフェラーゼ活性は、リボスイッチ3H4または6B4を含むルシフェラーゼ遺伝子を含有するAAVベクターを注射されたマウスでは顕著に増大したが、同用量の調節不可能な対照ベクターCon1を注射されたマウス群では増大しなかった(図8A～図8Eを参照のこと)。さらに、プロスルチアミン処置時のルシフェラーゼ活性の増大は用量依存的であった。50mg/kgの単一用量または50mg/kg及び100mg/kgの2用量のプロスルチアミンで処置したマウスの群では、それぞれ、誘導されたルシフェラーゼ活性は、単一用量処置の24時間後、誘導物質処置前のレベルまで減弱した。しかしながら、より高用量の誘導物質プロスルチアミン(すなわち、200mg/kg及び400mg/kg)により追加で処置されたマウスでは、誘導されたルシフェラーゼ活性は48時間以上そのままであった。

【0298】

これらの結果は、再設計されたアプタマー配列を含むリボスイッチが、インビボでの用量依存的なチアミン類似体での処置時に標的遺伝子発現を選択的に誘導することを示す。

【0299】

実施例6～99：チアミン類似体リボスイッチは、新規チアミン類似体に応答して哺乳類細胞での遺伝子発現を調節する

【0300】

実験手順：

【0301】

チアミン類似体の生成

【0302】

溶媒及び試薬はすべて商業的に入手し、受領した状態のまま使用した。1H NMRスペクトルを、言及された重水素化溶媒でのBruker装置(300MHzまたは400MHz)で記録した。化学シフトはppmで、また結合定数はhertzで表される。最終化合物はすべて、220～400メッシュシリカゲルを使用するフラッシュクロマトグラフィーまたはCH3CN/水を溶媒として用いる逆相HPLCによって精製した。薄層クロマトグラフィーを、シリカゲル60 F-254(厚さ0.25nm)プレートで行った。可視化は、UV光及び/または10%リンモリブデン酸含有エタノールを用いて達成した。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。他のLC-MS実験はすべて、Agilent 1100 HPLCにAgilent四重極型質量分析を組み合わせて行った。化合物の純度は、230nm及び254nmの波長でのLC-MSにより決定した。ここに報告する最終化合物はすべて純度が95%以上である。

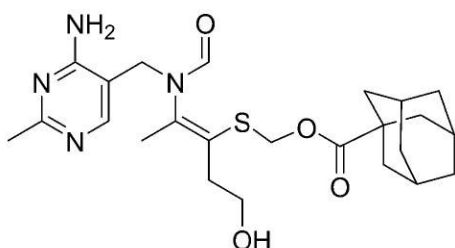
【0303】

実施例6(M19)

【0304】

(((Z) - 2 - (N - ((4 - アミノ - 2 - メチルピリミジン - 5 - イル) メチル)
ホルムアミド) - 5 - ヒドロキシペンタ - 2 - エン - 3 - イル) チオ) メチル (3 r , 5
r , 7 r) - アダマンタン - 1 - カルボキシラート

【化 3 1】



10

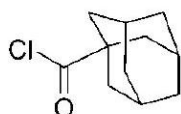
【 0 3 0 5 】

ステップ 1

【 0 3 0 6 】

(3 r , 5 r , 7 r) - アダマンタン - 1 - カルボニルクロリド

【化 3 2】



20

【 0 3 0 7 】

(3 r , 5 r , 7 r) - アダマンタン - 1 - カルボン酸 (1 0 . 0 g 、 5 5 . 4 m m o l) 及び SOCl_2 (3 2 . 8 g 、 2 7 5 m m o l 、 2 0 . 0 m L) の混合物を 2 5 ° C で 1 時間攪拌した。TLC (ジクロロメタン：メタノール = 1 0 : 1 、ブロモクレゾールグリーン、 $R_f = 0 . 6 2$) は、出発物質が完全に消費されたことを示した。混合物を濃縮し、表題化合物 (1 1 . 0 g 、 9 9 . 7 %) を無色結晶として得、これをそれ以上精製せずに次ステップの反応に直接使用した。

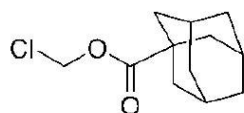
【 0 3 0 8 】

ステップ 2

【 0 3 0 9 】

クロロメチル (3 r , 5 r , 7 r) - アダマンタン - 1 - カルボキシラート

【化 3 3】



30

【 0 3 1 0 】

(3 r , 5 r , 7 r) - アダマンタン - 1 - カルボン酸 (1 5 g 、 8 3 . 2 m m o l 、 1 当量) 、臭化テトラブチルアンモニウム (T B A B) (2 . 6 8 g 、 8 . 3 2 m m o l 、 0 . 1 当量) 及び NaHCO_3 (2 1 . 0 g 、 2 5 0 . 0 m m o l 、 3 当量) の混合物の、DCM (1 5 0 m L) 及び H_2O (1 5 0 m L) の溶液に、クロロ (クロロスルホニルオキシ) メタン (1 6 . 5 g 、 9 9 . 9 m m o l 、 1 . 2 当量) を 2 0 ° C で滴加した。混合物を 2 0 ° C で 1 5 時間攪拌した (気体発生) 。放置すると、混合物は 2 層に分離し、水層を二塩化メチレンで抽出した (1 0 0 m L で 2 回) 。合わせた有機相を無水 Na_2SO_4 で乾燥させてろ過し、濃縮して、無色の粗油として得た。粗生成物を石油エーテル (5 0 0 m L) で希釈し、シリカゲルパッドを通してろ過した。ろ液を濃縮し、表題化合物 (1 5 . 5 g 、 8 1 . 4 %) を無色の油として得た。 $^1\text{H NMR}$ (4 0 0 M H z , D M

40

50

S O - d₆) δ 5.72 (s, 2H), 2.05-1.92 (m, 6H), 1.74-1.70 (m, 2H)。

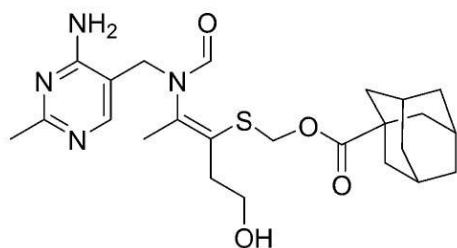
【0311】

ステップ3

【0312】

((Z)-2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)チオ)メチル(3r, 5r, 7r)-アダマンタン-1-カルボキシラート

【化34】



【0313】

ビタミンB1(10g、33.2mmol、1当量)及びKI(551.0mg、3.32mmol、0.1当量)の混合物の、H₂O(150mL)及びTHF(150mL)の溶液にNaOH(2.66g、66.5mmol、2当量)を少しずつ加え、混合物を20℃で0.5時間攪拌した。クロロメチル(3r, 5r, 7r)-アダマンタン-1-カルボキシラート(15.2g、66.5mmol、2当量)を混合物に滴加し、得られた混合物を20℃でさらに12時間攪拌した。LCMSは、反応の完了を示した。反応混合物は2層に分離した。水層を酢酸エチルで抽出した(200mLで3回)。合わせた有機相を無水Na₂SO₄で乾燥させてろ過し、濃縮して粗生成物を得た(TLC:酢酸エチル/エタノール=10/1、生成物R_f=0.2)。粗生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(二塩化メチレン/メタノール=10/1)で精製し、生成物を黄色固体として得、それをpre-HPLC(カラム:Waters Xbridge BEH C18 250×50mm、10μm;移動相:水-アセトニトリル、0.05%アンモニアヒドロキシド(v/v)添加、20分)によってさらに精製し、表題化合物(580.24mg、4%)を白色固体として得た。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 7.93(s, 1H), 7.82(s, 1H), 6.96(br, 2H), 4.95(s, 2H), 4.68(t, J=5.2Hz, 1H), 4.32(s, 2H), 3.52-3.48(m, 2H), 2.58(m, 2H), 2.28(s, 3H), 1.94(s, 6H), 1.80-1.78(m, 6H), 1.68-1.62(m, 6H)。MS(ES⁺) m/e 475.2(M+H)⁺。

【0314】

実施例7(M10)

【0315】

(Z)-((2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)チオ)ピバル酸メチル

10

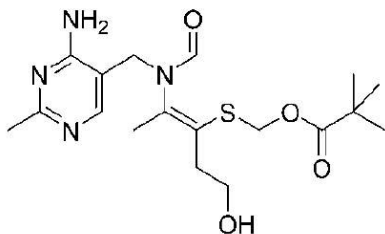
20

30

40

50

【化 3 5】



【0 3 1 6】

ビタミンB1 (1.00 g、3.78 mmol、1.00 当量) のEtOH溶液 (10.0 mL) に、NaOEt (257 mg、3.78 mmol、1.00 当量)、ピバル酸クロロメチル (569 mg、3.78 mmol、547 μ L、1.00 当量) 及びNaOH (45.4 mg、1.13 mmol、0.30 当量) を加えた。混合物を20℃で2時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、残渣を得た。残渣を分取HPLCで精製し、表題化合物 (61.0 mg、3.4%) を淡黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.93 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 6.71 (br d, J = 0.9 Hz, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.69 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.34 (br s, 2H), 3.60 – 3.42 (m, 2H), 2.59 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.12 (s, 9H)。MS (ES⁺) m/e 397.3 (M+H)⁺.

【0 3 1 7】

実施例 8 (M16)

【0 3 1 8】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンター – 2 – エン – 3 – イル) チオ) イソ酪酸メチル

【化 3 6】



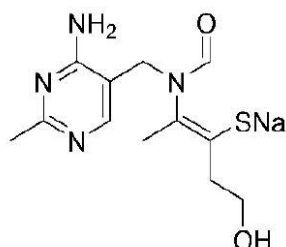
【0 3 1 9】

ステップ 1

【0 3 2 0】

ナトリウム (Z) – 2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンター – 2 – エン – 3 – チオラート

【化 3 7】



【0321】

ビタミンB1 (40.0 g、132 mmol) の EtOH 溶液 (80.0 mL) に、NaOEt (40.0 g、123 mmol) の EtOH 溶液を -10℃ で加えた。混合物を 10℃ で 30 分間攪拌した。形成された固体をろ過により回収して乾燥させ、表題化合物 (36.0 g、88.9%) を黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.51 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.18 (s, 2H), 5.41 (s, 3H), 3.65–3.62 (m, 2H), 3.01–2.95 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)。

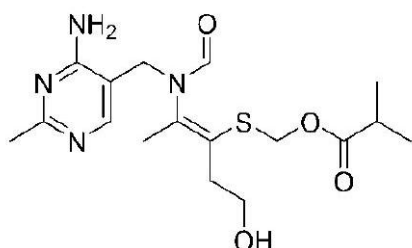
【0322】

ステップ2

【0323】

(Z) - ((2 - (N - ((4 - アミノ - 2 - メチルピリミジン - 5 - イル) メチル) ホルムアミド) - 5 - ヒドロキシペンタ - 2 - エン - 3 - イル) チオ) イソ酪酸メチル

【化38】



【0324】

ナトリウム (Z) - 2 - (N - ((4 - アミノ - 2 - メチルピリミジン - 5 - イル) メチル) ホルムアミド) - 5 - ヒドロキシペンタ - 2 - エン - 3 - チオラート (3.00 g、9.86 mmol) の混合物の EtOH 溶液 (30.0 mL) に、NaOH (120 mg、3.00 mmol) を 25℃ で加え、続いてイソ酪酸クロロメチル (1.35 g、9.88 mmol) を加えた。混合物を 25℃ で 1 時間攪拌し、濃縮して残渣を得た。残渣を分取 HPLC (塩基性条件) で精製し、凍結乾燥させて 150 mg の茶色粗固体を得、それを分取 HPLC (NH₄HCO₃ で緩衝) によってさらに精製した後、凍結乾燥して表題化合物 (50.1 mg、29%) を黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.92 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 6.70 (br, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.69 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.41–3.52 (m, 2H), 2.58 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.50–2.40 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.08 (d, J = 7.2 Hz, 6H)。MS (ES⁺) m/e 383.3 (M+H)⁺。

【0325】

実施例 9 (M18)

【0326】

(Z) - 1 - ((2 - (N - ((4 - アミノ - 2 - メチルピリミジン - 5 - イル) メチル) ホルムアミド) - 5 - ヒドロキシペンタ - 2 - エン - 3 - イル) チオ) ピバル酸エチル

10

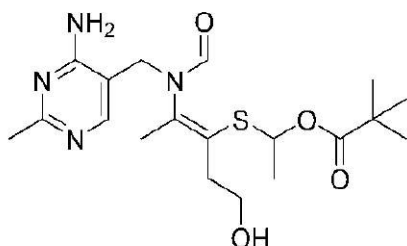
20

30

40

50

【化 3 9】



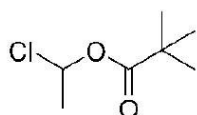
【0 3 2 7】

ステップ 1

【0 3 2 8】

1-クロロエチルピバレート

【化 4 0】



【0 3 2 9】

塩化ピバロイル (9.80 g、81.2 mmol、10.0 mL) 及び 2, 4, 6-トリメチル-1, 3, 5-トリオキサン (4.95 g、37.4 mmol、5.00 mL) の混合物に $ZnCl_2$ (1 M、2.50 mL) を加え、混合物を 90°C で 1 時間攪拌した。反応混合物を室温まで冷却し、EtOAc (100 mL) で希釈した。得られた有機溶液を、氷冷した $NaHCO_3$ 溶液 (20.0 mL × 3) 及びブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させて、ろ過し、濃縮して残渣を得た。残渣を 90°C で蒸留し (ゲージ圧: -0.09 MPa)、表題化合物 (1.60 g) を無色の油として得た。 ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.52–6.56 (m, 1H), 1.80 (d, J = 5.6 Hz, 3H), 1.22 (s, 9H)。

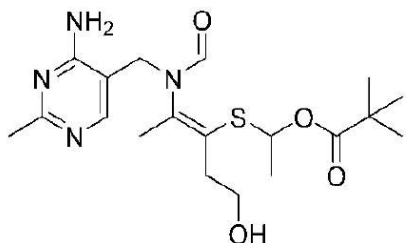
【0 3 3 0】

ステップ 2

【0 3 3 1】

(Z)-1-((2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)チオ)ピバル酸エチル

【化 4 1】



【0 3 3 2】

ナトリウム (Z)-2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-チオラート (3.00 g、9.86 mmol) の混合物の EtOH 溶液 (30.0 mL) に、 $NaOEt$ (3.20 g、9.88 mmol) の EtOH 溶液を 25°C で加え、続いて 1-クロロエチルピバレート (1.60 g、9.72 mmol) 及び $NaOH$ (120 mg、3.00 mmol) を加えた。混合物を 25°C で 12 時間攪拌し、濃縮して残渣を得た。残渣を分取 HPL

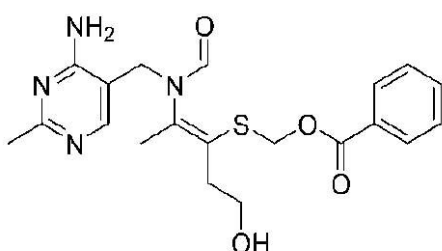
Cで精製した後、凍結乾燥させ、表題化合物（60.0mg、収率2%）を黄色固体として得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆）δ 7.92（s, 1H）, 7.85（s, 1H）, 6.48（br, 2H）, 5.74–5.79（m, 1H）, 4.46（d, J = 15.2 Hz, 1H）, 4.37（s, 1H）, 4.28（d, J = 15.2 Hz, 1H）, 3.53–3.55（m, 2H）, 2.52–2.57（m, 2H）, 2.30（s, 3H）, 1.95（s, 3H）, 1.29（d, J = 6.4 Hz, 3H）, 1.33（s, 9H）。MS（ES⁺）m/e 411.3（M+H）⁺。

【0333】

実施例10（M21）

【0334】

（Z）－（（2－（N－（（4－アミノ－2－メチルピリミジン－5－イル）メチル）ホルムアミド）－5－ヒドロキシペンター－2－エン－3－イル）チオ）安息香酸メチル【化42】



【0335】

ビタミンB1（5g、16.6mmol、1当量）及びKI（138.0mg、831.0μmol、0.05当量）の混合物のH₂O溶液（25mL）に、NaOH（1.33g、33.2mmol、2当量）を少しずつ加えた。混合物を20℃で0.5時間攪拌し、次いで、安息香酸クロロメチル（2.84g、16.6mmol、1当量）のTHF溶液（25mL）を滴加した。その後、反応混合物をさらに10時間20℃にて攪拌した。LCMSは、新たな生成物が形成されたことを示した。5mLのメタノールを加えて混合物をクエンチし、飽和重炭酸ナトリウム水溶液でpHを約7に調整した。その後、水相を酢酸エチルで抽出した（200mLで2回）。合わせた有機相を無水Na₂SO₄で乾燥させてろ過し、濃縮して粗生成物を得、それを酢酸エチル（50mL）でトリチュレートし、表題化合物（700mg、10%）を白色固体として得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆）δ 7.96–7.92（m, 3H）, 7.81（s, 1H）, 7.73–7.67（m, 1H）, 7.57–7.53（m, 2H）, 6.76（brs, 2H）, 5.28（s, 2H）, 4.74–4.70（m, 1H）, 4.32（s, 2H）, 3.54–3.48（m, 2H）, 2.69–2.66（m, 2H）, 2.26（s, 3H）, 1.96（s, 3H）。MS（ES⁺）m/e 417.2（M+H）⁺。

【0336】

実施例11（M34）

【0337】

（Z）－S－（2－（N－（（4－アミノ－2－メチルピリミジン－5－イル）メチル）ホルムアミド）－5－ヒドロキシペンター－2－エン－3－イル）ナフタレン－1－カルボチオアート

10

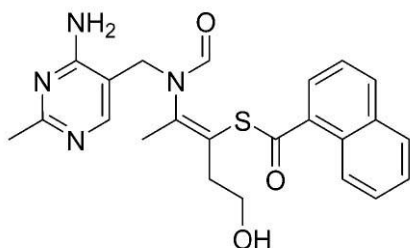
20

30

40

50

【化 4 3】



【0338】

ビタミンB1 (9 g、29.9 mmol、1当量) 及びKI (497.0 mg、2.99 mmol、0.1当量) の混合物の、H₂O (150 mL) 及びTHF (150 mL) の溶液に、NaOH (2.39 g、59.8 mmol、2当量) を加えた。混合物を20℃で0.5時間攪拌した。塩化1-ナフトイル (11.1 g、58.0 mmol、8.71 mL、1.94当量) を滴加した。反応混合物を20℃でさらに12時間攪拌した。LCMSは、反応の完了を示した。反応混合物を酢酸エチルで抽出した (100 mLで3回)。水相を飽和重炭酸ナトリウム溶液でpH 7~8に調整し、酢酸エチルで抽出した (100 mLで3回)。合わせた有機相を無水Na₂SO₄で乾燥させてろ過し、濃縮して粗生成物を得、それを酢酸エチル (10 mL) でトリチュレートし、表題化合物 (420 mg、962 μmol、収率3%) をオフホワイトの固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.21–8.20 (m, 2H), 8.05–8.02 (m, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.92–7.91 (m, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.68–7.59 (m, 3H), 6.74 (brs, 2H), 4.70–4.68 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.53 (m, 2H), 2.70–2.68 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.13 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 437.1 (M+H)⁺。

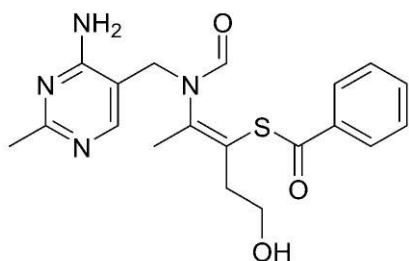
【0339】

実施例12 (M26)

【0340】

(Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)ベンゾチオアート

【化 4 4】



【0341】

ビタミンB1 (1.00 g、3.32 mmol、1.00当量) 及びNaOH (133.0 mg、3.32 mmol、1.00当量) の、H₂O (50.0 mL) 及びTHF (5.00 mL) の溶液に、塩化ベンゾイル (935.0 mg、6.65 mmol、772.0 μL、2.00当量) を0℃で加えた。反応混合物を0℃で0.5時間攪拌した。LCMSは、出発物質が消費され、所望の質量を有する生成物が検出されたことを示した。反応混合物をMeOH (5.00 mL) でクエンチし、pH=7に調整し、10:1のDCM:MeOHで抽出した (25.0 mLで2回)。合わせた有機層をNa₂SO₄で乾燥させてろ過し、減圧下で濃縮して粗生成物を得、それをEtOAc/EtOH/DCM (2:2:1) でトリチュレートすると、表題化合物 (251 mg、18.6%) が白色

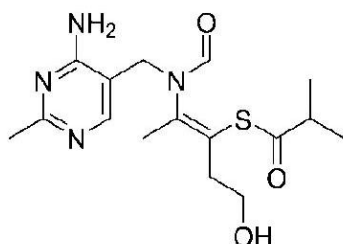
固体として得られた。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.89 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.68 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.53 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.65 (brs, 2H), 4.64 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.46 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H)。MS (ES^+) m/e 387.0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。
【0342】

実施例13 (M27)

【0343】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-メチルプロパンチオアート

【化45】



【0344】

ビタミンB1 (1.00 g、3.32 mmol、1.00当量) 及びNaOH (266 mg、6.65 mmol、2.00当量) の、 H_2O (50.0 mL) 及びTHF (5.00 mL) の溶液に、塩化イソブチリル (708 mg、6.65 mmol、695.0 μL 、2.00当量) を0℃で加えた。反応混合物を0℃で0.5時間攪拌し、MeOH (5.00 mL) でクエンチし、 $\text{pH} = 7$ に調整した。混合物を10:1のDCM:MeOHで抽出した (25.0 mLで2回)。合わせた有機層を Na_2SO_4 で乾燥させてろ過し、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物をEtOAc/EtOH/DCM (2:2:1) でトリチュレートし、表題化合物 (224.0 mg、19.0%) を白色固体として得た。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.79 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 6.68 (brs, 2H), 4.61 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.40 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.60–2.50 (m, 1H), 2.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.00 (s, 3H)。MS (ES^+) m/e 353.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

【0345】

実施例14 (M28)

【0346】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2,2-ジメチルプロパンチオアート

10

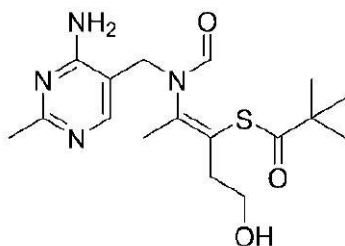
20

30

40

50

【化 4 6】



【0347】

ナトリウム (Z) - 2 - (N - ((4 - アミノ - 2 - メチルピリミジン - 5 - イル) メチル) ホルムアミド) - 5 - ヒドロキシペンタ - 2 - エン - 3 - チオラート (0.50 g、1.64 mmol、1.00 当量) 及び NaOH (65.7 mg、1.64 mmol、1.00 当量) の混合物の H₂O 溶液 (5.00 mL) に、塩化ピバロイル (198 mg、1.64 mmol、202 µL、1 当量) を 0℃ で加え、得られた混合物を 0℃ で 1 時間攪拌した。混合物を濃縮して、カラムクロマトグラフィー (SiO₂、ジクロロメタン : メタノール = 100 : 1 から 10 : 1、TLC : ジクロロメタン : メタノール = 10 : 1、R_f = 0.4) で精製し、表題化合物 (110 mg、18.2%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.79 (s, 1 H) 7.75 (s, 1 H) 6.70 (br s, 2 H) 4.60 (t, J = 5.6 Hz, 1 H) 4.35 (br s, 2 H) 3.39 (q, J = 6.8 Hz, 2 H) 2.42 (br t, J = 6.8 Hz, 2 H) 2.26 (s, 3 H) 2.08 (s, 3 H) 1.07 (s, 9 H)。MS (ES⁺) m/e 367.2 (M+H)⁺。

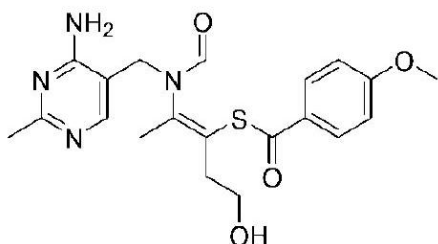
【0348】

実施例 15 (M29)

【0349】

(Z) - S - (2 - (N - ((4 - アミノ - 2 - メチルピリミジン - 5 - イル) メチル) ホルムアミド) - 5 - ヒドロキシペンタ - 2 - エン - 3 - イル) 4 - メトキシベンゾチオアート

【化 4 7】



【0350】

ナトリウム (Z) - 2 - (N - ((4 - アミノ - 2 - メチルピリミジン - 5 - イル) メチル) ホルムアミド) - 5 - ヒドロキシペンタ - 2 - エン - 3 - チオラート (0.50 g、1.64 mmol、1.00 当量) 及び NaOH (65.7 mg、1.64 mmol、1.00 当量) の混合物の H₂O 溶液 (4 mL) に、化合物 4 - メトキシベンゾイルクロリド (280 mg、1.64 mmol、226 µL、1.00 当量) を 0℃ で加え、得られた混合物を 0℃ で 1 時間攪拌した。LCMS は、出発物質が消費され、所望の質量を有する生成物が検出されたことを示した。その後、混合物を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (100 : 0 から 20 : 1 ジクロロメタン : メタノール) で精製して表題化合物 (60.0 mg、9%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.87 (s, 1 H), 7.81 (s, 1 H), 7.7

2 (b r d, J = 8.8 Hz, 2 H), 7.05 (b r d, J = 8.8 Hz, 2 H), 6.64 (m, 2 H), 4.64 (b r s, 1 H), 4.37 (b r s, 2 H), 3.84 (s, 3 H), 3.46 (b r d, J = 4.0 Hz, 2 H), 2.58 (m, 2 H), 2.19 (s, 3 H), 2.12 (s, 3 H)。MS (ES⁺) m/e 417.1 (M+H)⁺。

【0351】

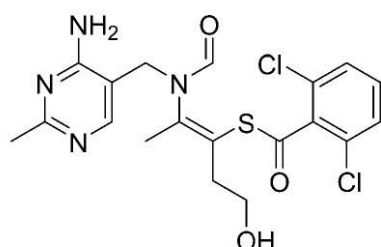
実施例16 (M30)

【0352】

(Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2,6-ジクロロベンゾチオアート

10

【化48】



20

【0353】

ナトリウム (Z)-2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-チオラート (0.50 g、1.64 mmol、1.00 当量) 及び NaOH (65.7 mg、1.64 mmol、1.00 当量) の混合物の H₂O 溶液 (4.00 mL) に、2,6-ジクロロベンゾイルクロリド (344 mg、1.64 mmol、235 μL、1.00 当量) を 0℃ で加えた。得られた混合物を 0℃ で 1 時間攪拌し、その後、濃縮して残渣を得た。残渣を分取 HPLC で精製し、表題化合物 (150 mg、20.1%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.96 (s, 1 H), 7.84 (s, 1 H), 7.60 - 7.54 (m, 3 H), 6.68 (m, 2 H), 4.68 - 4.75 (m, 1 H), 4.41 (b r s, 2 H), 3.46 - 3.52 (m, 2 H), 2.62 - 2.69 (m, 2 H), 2.26 (s, 3 H), 2.14 (s, 3 H)。MS (ES⁺) m/e 455.1 (M+H)⁺。

30

【0354】

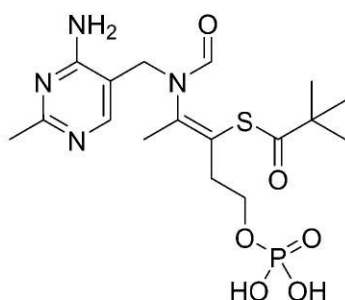
実施例17 (M31)

【0355】

(Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-(ホスホノオキシ)ペンタ-2-エン-3-イル)2,2-ジメチルプロパンチオアート

40

【化49】



50

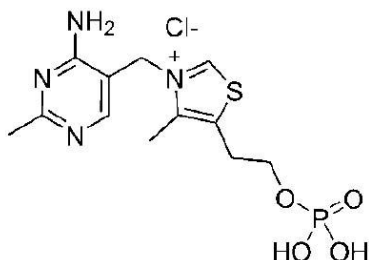
【0356】

ステップ1

【0357】

3-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)-4-メチル-5-(2-(ホスホノオキシ)エチル)チアゾール-3-イウムクロリド

【化50】



10

【0358】

130℃のポリリン酸(150g、49.8mmol、1.00当量)の溶液に、ビタミンB1(15.0g、49.8mmol、1.00当量)を少しずつ加えた。混合物を100~130℃で2時間攪拌した。水(250mL)を加え、混合物を100℃でさらに2時間攪拌し、25℃に冷却し、トリオクチルアミン/MTBE(1:1、250mLで2回)により抽出した。水層を分離し、400mLのEtOHで希釈し、25℃で2時間攪拌した。形成された白色固体をろ過により回収し、EtOH(200mLで2回)で洗浄して乾燥させ、表題化合物(17.0g、98.7%)を得た。

20

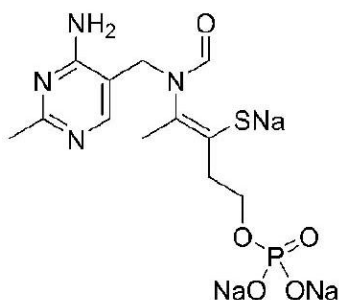
【0359】

ステップ2

【0360】

ナトリウム(Z)-4-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-3-スルフィドペンタ-3-エン-1-イルホスファート

【化51】



30

【0361】

3-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)-4-メチル-5-(2-(ホスホノオキシ)エチル)チアゾール-3-イウム(2.00g、5.79mmol、1.00当量)の混合物のH₂O溶液(20mL)に、NaOH(5.64g、42.3mmol、7.30当量)を0~5℃でゆっくりと加えた。混合物を5~10℃で0.5時間攪拌し、濃縮して、表題化合物(2.40g、97%)を黄色固体として得、これをそれ以上精製せずに次ステップの反応に直接使用した。

40

【0362】

ステップ3

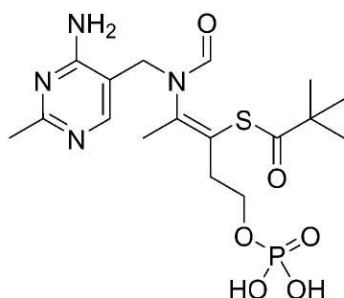
【0363】

(Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル

50

）ホルムアミド）－５－（ホスホノオキシ）ペンター２－エン－３－イル）２，２－ジメチルプロパンチオアート

【化５２】



10

【０３６４】

ナトリウム（Ｚ）－４－（Ｎ－（（４－アミノ－２－メチルピリミジン－５－イル）メチル）ホルムアミド）－３－スルフィドペンター３－エン－１－イルホスファート（０．８００ｇ、１．８７ｍｍｏｌ、１．００当量）の混合物のＮａＯＨ溶液（１Ｍ、３．７４ｍＬ、２．００当量）に、塩化ピバロイル（８４０ｍｇ、６．９７ｍｍｏｌ、８５７μＬ、３．７３当量）を加えた。得られた混合物を２５℃で２時間撹拌した。ＴＬＣ（酢酸エチル：ジクロロメタン＝２：１）は、出発物質が消費され、新たなスポットが形成されたことを示した。反応混合物を濃縮し、逆相ＨＰＬＣで精製して表題化合物（１３２ｍｇ、１５．７％）を白色固体として得た。¹H NMR（４００ＭＨｚ，ＭｅＯＤ）δ ７．９９（ｓ，１Ｈ），７．７９（ｓ，１Ｈ），３．９３（ｂｒ ｄ，Ｊ＝５．６ Ｈｚ，２Ｈ），２．５６（ｓ，３Ｈ），２．２５（ｓ，３Ｈ），１．１４（ｓ，９Ｈ）。ＭＳ（ＥＳ⁺）ｍ／ｅ ４４７．１（Ｍ＋Ｈ）⁺。

20

【０３６５】

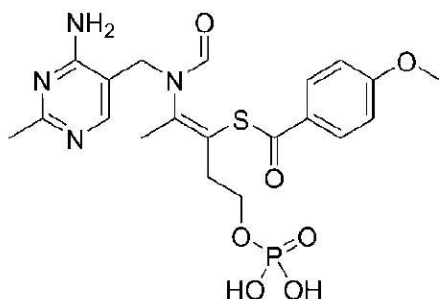
実施例１８（Ｍ３２）

【０３６６】

（Ｚ）－Ｓ－（２－（Ｎ－（（４－アミノ－２－メチルピリミジン－５－イル）メチル）ホルムアミド）－５－（ホスホノオキシ）ペンター２－エン－３－イル）４－メトキシベンゾチオアート

30

【化５３】



40

【０３６７】

ナトリウム（Ｚ）－４－（Ｎ－（（４－アミノ－２－メチルピリミジン－５－イル）メチル）ホルムアミド）－３－スルフィドペンター３－エン－１－イルホスファート（０．８０ｇ、１．８７ｍｍｏｌ、１．００当量）の混合物のＮａＯＨ溶液（１Ｍ、３．７４ｍＬ、２．００当量）に、４－メトキシベンゾイルクロリド（１．１９ｇ、６．９７ｍｍｏｌ、９５８μＬ、３．７３当量）を加えた。得られた混合物を２５℃で２時間撹拌した。ＴＬＣ（酢酸エチル：ジクロロメタン＝２：１）は、出発物質が消費され、新たなスポットが形成されたことを示した。混合物を濃縮し、逆相ＨＰＬＣで精製して表題化合物（１７４ｍｇ、１８．１％）を白色固体として得た。¹H NMR（４００ＭＨｚ，ＭｅＯＤ

50

) δ 8.04 (s, 1 H), 7.99 (s, 1 H), 7.75 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 4.74 – 4.35 (m, 2 H), 4.03 (q, $J = 5.6$ Hz, 2 H), 3.88 (s, 3 H), 2.81 (m, 2 H), 2.40 (s, 3 H), 2.30 (s, 3 H). MS (ES⁺) m/e 497.1 (M+H)⁺.

【0368】

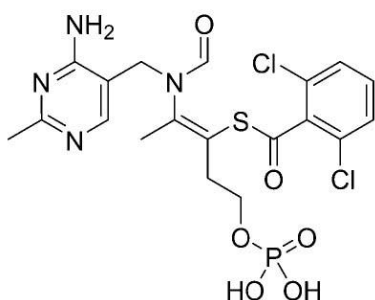
実施例 19 (M33)

【0369】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-(ホスホノオキシ)ペンタ-2-エン-3-イル)2,6-ジクロロベンゾチオアート

10

【化54】



20

【0370】

ナトリウム (Z)-4-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-3-スルフィドペンタ-3-エン-1-イルホスファート (0.800 g、1.87 mmol、1.00 当量) の混合物の NaOH 溶液 (1 M、3.74 mL、2.00 当量) に、2,6-ジクロロベンゾイルクロリド (391 mg、1.87 mmol、268 μ L、1.00 当量) を加えた。混合物を 25℃ で 2 時間攪拌した。TLC (酢酸エチル：ジクロロメタン = 2 : 1) は、出発物質が消費され、新たなスポットが形成されたことを示した。混合物を濃縮し、逆相 HPLC で精製して表題化合物 (72.0 mg、7.20%) を白色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.06 (s, 1 H), 8.02 (s, 1 H), 7.44 (s, 3 H), 4.07 – 4.04 (m, 2 H), 2.49 (s, 3 H), 2.32 (s, 3 H)。MS (ES⁺) m/e 535.0 (M+H)⁺.

30

【0371】

実施例 20～59：以下の化合物を、適切な出発物質を用いて M34 (実施例 11) の調製手順に従って合成した。

【0372】

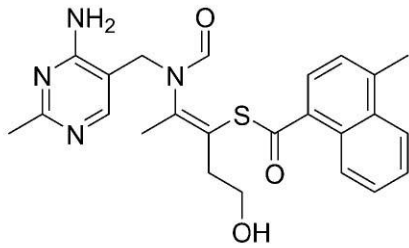
実施例 20 (M37)

【0373】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)4-メチルナフタレン-1-カルボチオアート

40

【化 5 5】



【0374】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.30 – 8.25 (m, 1H), 8.13 (dd, $J = 3.2, 6.6$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.88 – 7.80 (m, 2H), 7.69 – 7.64 (m, 2H), 7.47 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.71 (br s, 2H), 4.69 (br t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.43 (br s, 2H), 3.55 – 3.47 (m, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.66 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H). MS (ES^+) m/e 451 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

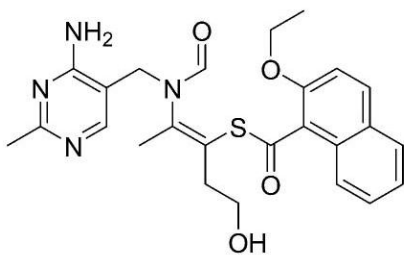
【0375】

実施例 21 (M38)

【0376】

(Z)-5-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-エトキシナフタレン-1-カルボチオアート

【化 5 6】



【0377】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.06 – 7.92 (m, 4H), 7.57 – 7.42 (m, 4H), 6.67 (br s, 2H), 4.73 (br t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.42 (br s, 2H), 4.23 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.62 – 3.51 (m, 2H), 2.73 (br s, 2H), 2.23 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.32 (br t, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (ES^+) m/e 481 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【0378】

実施例 22 (M39)

【0379】

(Z)-5-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)4-ブロモナフタレン-1-カルボチオアート

10

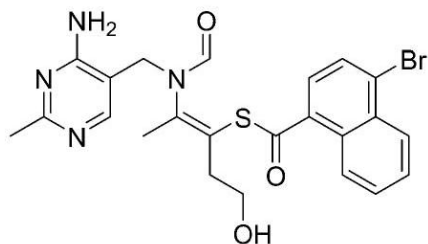
20

30

40

50

【化 5 7】



【0380】

10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.27 – 8.23 (m, 2H), 8.02 – 7.98 (m, 2H), 7.86 – 7.78 (m, 4H), 6.72 (br d, $J = 1.2$ Hz, 2H), 4.71 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.44 (br s, 2H), 3.53 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.67 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.08 (s, 3H). MS (ES^+) m/e 515 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

【0381】

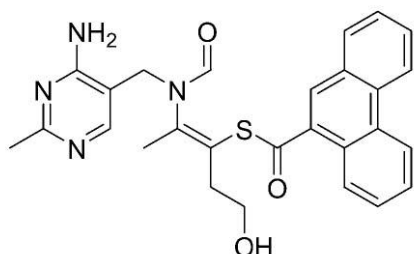
実施例 23 (M40)

【0382】

(Z)-5-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)フェナントレン-9-カルボチオアート

20

【化 5 8】



30

【0383】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.26 – 8.19 (m, 3H), 8.03 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 – 7.75 (m, 1H), 7.80 – 7.77 (m, 2H), 7.74 – 7.72 (m, 1H), 6.80 (s, 2H), 4.74 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.47 (s, 2H), 4.11 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H), 3.58 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.17 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.72 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.09 (s, 3H). MS (ES^+) m/e 487 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

40

【0384】

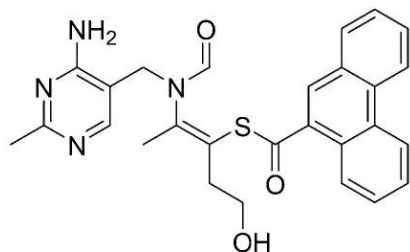
実施例 24 (M43)

【0385】

(Z)-5-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)フェナントレン-9-カルボチオアート

50

【化59】



【0386】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.88 – 7.83 (m, 2H), 7.32 – 7.20 (m, 3H), 6.73 (br d, $J = 1.2$ Hz, 2H), 4.66 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.40 (br s, 2H), 3.47 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.75 (br s, 2H), 2.67 (br s, 2H), 2.58 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.70 (m, 4H)。MS (ES $^+$) m/e 441 (M+H) $^+$.

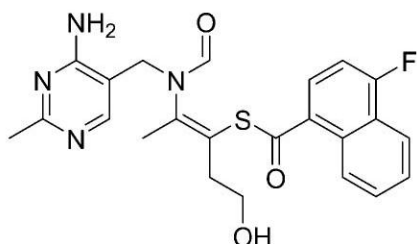
【0387】

実施例25 (M44)

【0388】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)-5-hydroxypent-2-en-3-yl)-4-fluoronaphthalene-1-carboxamide

【化60】



【0389】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.33 (br d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.16 (br d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.08 – 7.94 (m, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.82 – 7.70 (m, 2H), 7.45 (dd, $J = 8.0, 10.1$ Hz, 1H), 6.71 (br s, 2H), 4.69 (br t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.43 (br s, 2H), 3.66 – 3.47 (m, 2H), 2.66 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.25 – 2.15 (m, 3H), 2.13 – 1.96 (m, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 455 (M+H) $^+$.

【0390】

実施例26 (M45)

【0391】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)-5-hydroxypent-2-en-3-yl)-8-fluoronaphthalene-1-carboxamide

10

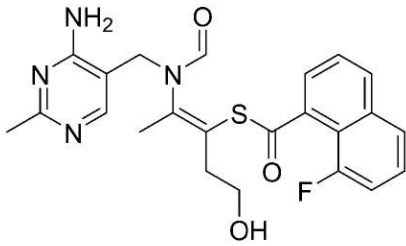
20

30

40

50

【化 6 1】



【0392】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.20 (br d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.91 – 7.83 (m, 2H), 7.73 – 7.58 (m, 2H), 7.56 – 7.29 (m, 2H), 6.81 (br s, 2H), 4.73 (br s, 1H), 4.46 (br s, 2H), 3.55 (br s, 2H), 2.69 (br t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.18 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 455 (M+H) $^+$.

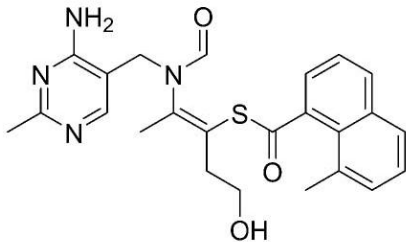
【0393】

実施例 27 (M46)

【0394】

(Z)-5-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)8-メチルナフタレン-1-カルボチオアート

【化 6 2】



【0395】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.14 (dd, $J_1 = 1.6$, $J_2 = 8.0$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.91 – 7.86 (m, 2H), 7.59 – 7.47 (m, 4H), 6.83 (br s, 2H), 4.75 (br t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.46 (br s, 2H), 3.54 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.70 – 2.64 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.19 (d, $J = 5.6$ Hz, 6H)。MS (ES $^+$) m/e 451 (M+H) $^+$.

【0396】

実施例 28 (M47)

【0397】

(Z)-5-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)4-メトキシナフタレン-1-カルボチオアート

10

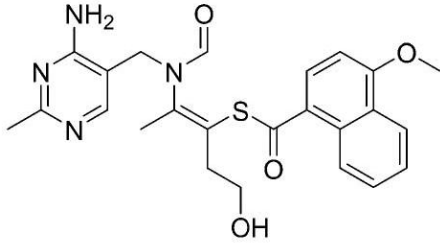
20

30

40

50

【化 6 3】



【0398】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 0.4$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.68 – 7.65 (m, 1H), 7.65 – 7.61 (m, 1H), 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.71 (br s, 2H), 4.69 (br t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.43 (br s, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.55 – 3.50 (m, 2H), 2.66 – 2.63 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 467 (M+H) $^+$.

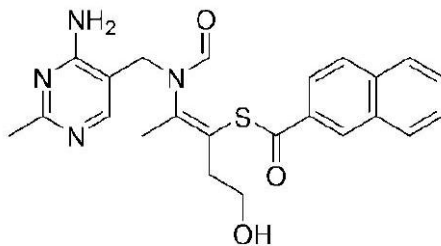
【0399】

実施例 29 (M49)

【0400】

(Z)-S-(2-((N-((4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)ナフタレン-2-カルボチオアート

【化 6 4】



【0401】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.41 (s, 1H), 8.18 (br d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.06 – 8.02 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.76 – 7.64 (m, 3H), 6.64 (br s, 2H), 4.67 (br t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.41 (br s, 2H), 3.52 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.62 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 437 (M+H) $^+$.

【0402】

実施例 30 (M50)

【0403】

(Z)-S-(2-((N-((4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)ホルムアミド)-5,5,8,8-テトラヒドロナフタレン-2-カルボチオアート

10

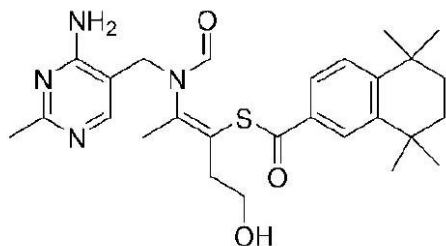
20

30

40

50

【化 6 5】



10

【0404】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.84 (d, $J = 14.4$ Hz, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.51–7.46 (m, 2H), 6.63 (s, 2H), 4.63 (t, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.38 (s, 2H), 3.45 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.20 (s, 2H), 2.13 (s, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.25 (s, 12H)。MS (ES $^+$) m/e 497 (M+H) $^+$ 。

【0405】

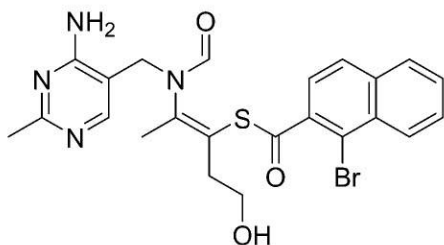
実施例 31 (M51)

【0406】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)holmamide)-5-hydroxypent-2-en-3-yl 1-bromonaphthalen-2-carboxylate

20

【化 6 6】



30

【0407】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.12–8.09 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.80–7.76 (m, 1H), 7.74–7.72 (m, 1H), 7.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.75 (s, 2H), 4.72 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.55 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.68 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.17 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 516 (M+H) $^+$ 。

40

【0408】

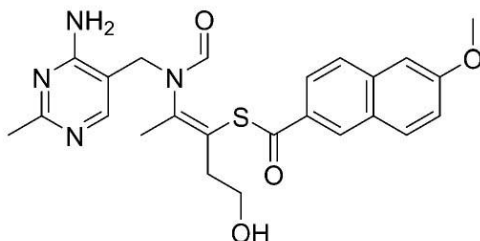
実施例 32 (M52)

【0409】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)holmamide)-5-hydroxypent-2-en-3-yl 6-methoxynaphthalen-2-carboxylate

50

【化 6 7】



【0 4 1 0】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.33 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.94 – 7.83 (m, 3H), 7.70 (dd, $J_1 = 1.6$, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J_1 = 2.4$, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 6.76 – 6.55 (m, 2H), 4.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.40 (br s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.53 – 3.46 (m, 2H), 2.60 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H). MS (ES^+) m/e 467 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

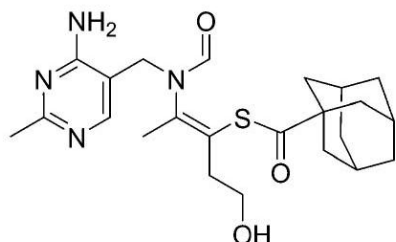
【0 4 1 1】

実施例 33 (M53)

【0 4 1 2】

S – ((Z) – 2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) (3r, 5r, 7r) – アダマンタン – 1 – カルボチオアート

【化 6 8】



【0 4 1 3】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.79 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 6.75 (br s, 2H), 4.60 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.35 (br s, 2H), 3.44 – 3.38 (m, 2H), 2.41 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.98 (br s, 3H), 1.84 – 1.75 (m, 1H), 1.71 – 1.62 (m, 11H). MS (ES^+) m/e 445 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

【0 4 1 4】

実施例 34 (M54)

【0 4 1 5】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 2 – フェニルプロパンチオアート

10

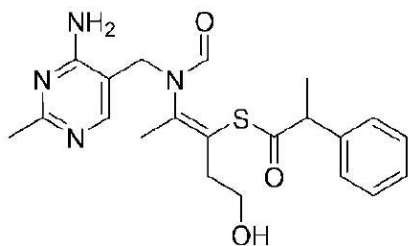
20

30

40

50

【化 6 9】



10

【0 4 1 6】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.77 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.34 – 7.24 (m, 5H), 6.64 (s, 2H), 4.55 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.40 – 4.24 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 3.29 – 3.28 (m, 2H), 2.48 – 2.39 (m, 1H), 2.32 – 2.28 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.34 – 1.30 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H)。MS (ES^+) m/e 415 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

【0 4 1 7】

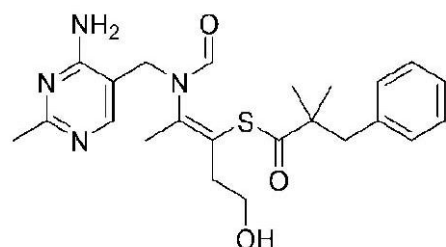
実施例 35 (M 5 5)

【0 4 1 8】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 2, 2 – ジメチル – 3 – フェニルプロパンチオアート

20

【化 7 0】



30

【0 4 1 9】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.78 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.27 – 7.20 (m, 3H), 7.09 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 4.61 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.34 (s, 1H), 3.42 – 3.36 (m, 2H), 2.73 (s, 2H), 2.43 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.25 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.02 (s, 6H)。MS (ES^+) m/e 443 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

【0 4 2 0】

実施例 36 (M 5 7)

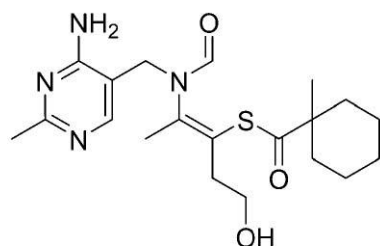
【0 4 2 1】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 1 – メチルシクロヘキサン – 1 – カルボチオアート

40

50

【化 7 1】



10

【0 4 2 2】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.79 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.61 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.45 – 3.35 (m, 2H), 2.43 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.78 (dd, $J = 6.8, 9.8$ Hz, 2H), 1.49 – 1.24 (m, 8H), 1.05 (s, 3H)。MS (ES^+) m/e 407 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

【0 4 2 3】

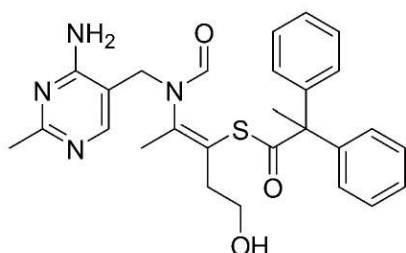
実施例 37 (M 5 8)

【0 4 2 4】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 2, 2 – ジフェニルプロパンチオアート

20

【化 7 2】



30

【0 4 2 5】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.77 (d, $J = 3.2$ Hz, 2H), 7.35 – 7.25 (m, 6H), 7.16 – 7.08 (m, 4H), 6.73 (br s, 2H), 4.58 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.31 (br s, 2H), 3.32 – 3.28 (m, 2H), 2.41 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.84 (s, 3H)。MS (ES^+) m/e 491 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

【0 4 2 6】

実施例 38 (M 5 9)

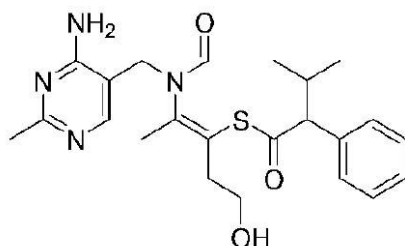
【0 4 2 7】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 3 – メチル – 2 – フェニルブタンチオアート

40

50

【化 7 3】



10

【0 4 2 8】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.77 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 2H), 7.29 – 7.21 (m, 3H), 6.64 (s, 2H), 4.55 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.25 (s, 2H), 3.45 – 3.41 (m, 1H), 3.29 – 3.17 (m, 2H), 2.48 – 2.39 (m, 1H), 2.27 – 2.20 (m, 5H), 1.99 (s, 3H), 0.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.61 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (ES^+) m/e 443 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【0 4 2 9】

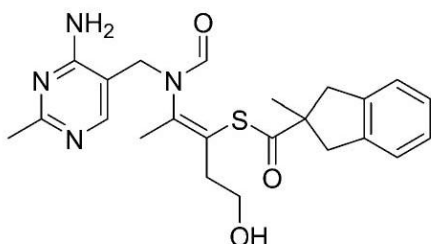
実施例 39 (M 6 2)

20

【0 4 3 0】

(Z)-S-(2-((N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-メチル-2,3-ジヒドロ-1H-インデン-2-カルボチオアート

【化 7 4】



30

【0 4 3 1】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.79 (s, 2H), 7.21 – 7.13 (m, 4H), 6.72 (s, 2H), 4.62 – 4.59 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.35 (s, 1H), 3.43 – 3.38 (m, 2H), 3.20 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H), 2.73 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H), 2.44 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.21 (s, 3H). MS (ES^+) m/e 441 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

40

【0 4 3 2】

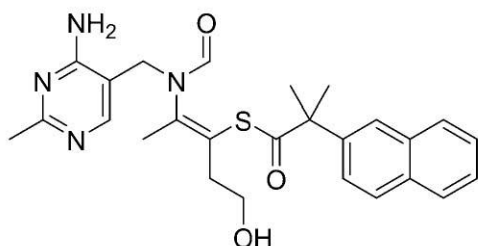
実施例 40 (M 6 3)

【0 4 3 3】

(Z)-S-(2-((N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-メチル-2-(ナフタレン-2-イル)プロパンチオアート

50

【化 7 5】



【0 4 3 4】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.90–7.89 (m, 1H), 7.88–7.85 (m, 3H), 7.77 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.53–7.51 (m, 2H), 7.35–7.33 (m, 1H), 6.71 (s, 2H), 4.50 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.31 (s, 2H), 3.26 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.38 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.53 (s, 6H). MS (ES $^+$) m/e 479 (M+H) $^+$.

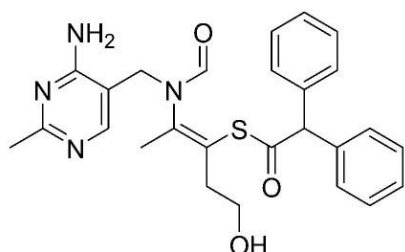
【0 4 3 5】

実施例 4 1 (M 6 4)

【0 4 3 6】

(Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2,2-ジフェニルエタンチオアート

【化 7 6】



【0 4 3 7】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.77 (d, $J = 3.2$ Hz, 2H), 7.39–7.23 (m, 12H), 6.78–6.57 (m, 2H), 5.29 (s, 1H), 4.63–4.51 (m, 1H), 4.31 (br s, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.02 (s, 3H). MS (ES $^+$) m/e 477 (M+H) $^+$.

【0 4 3 8】

実施例 4 2 (M 6 5)

【0 4 3 9】

(Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)1-(3-ブロモフェニル)シクロプロパン-1-カルボチオアート

10

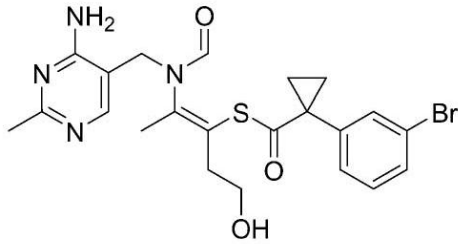
20

30

40

50

【化 7 7】



【0 4 4 0】

10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.74 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.55–7.52 (m, 2H), 7.39–7.37 (m, 2H), 6.71 (s, 2H), 4.55–4.52 (m, 1H), 4.31 (s, 2H), 3.37–3.35 (m, 1H), 2.41–2.34 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.40–1.37 (m, 2H), 1.22–1.19 (s, 2H)。MS (ES $^+$) m/e 506 (M+H) $^+$ 。

【0 4 4 1】

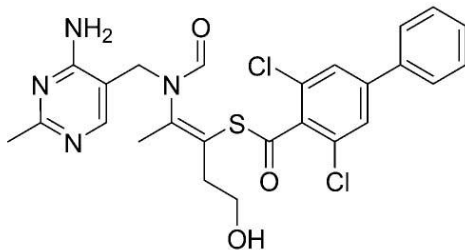
実施例 4 3 (M 6 6)

【0 4 4 2】

(Z)-5-(2-((4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)carbamoyl)-2-hydroxypent-3-en-1-yl 3,5-dichloro-4-(1,1'-biphenyl-4-carboxy)benzoate

20

【化 7 8】



30

【0 4 4 3】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.98 (s, 1H), 7.89 (s, 3H), 7.78 (dd, $J_1 = 1.6$, $J_2 = 8.0$ Hz, 2H), 7.58–7.45 (m, 3H), 6.92 (m, 2H), 4.74 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.43 (br s, 2H), 3.55–3.48 (m, 2H), 2.67 (br d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.15 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 532 (M+H) $^+$ 。

【0 4 4 4】

実施例 4 4 (M 6 7)

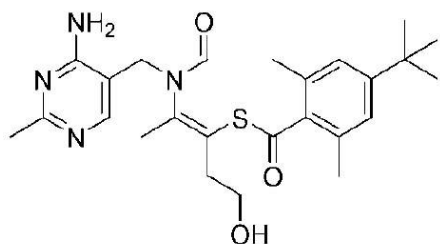
40

【0 4 4 5】

(Z)-5-(2-((4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)carbamoyl)-2-hydroxypent-3-en-1-yl 4-(tert-butyl)-2,6-dimethylbenzoate

50

【化 7 9】



【0 4 4 6】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.95 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.13–7.08 (m, 2H), 6.75 (s, 2H), 4.75–4.72 (m, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.49–3.44 (m, 2H), 2.68 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.20 (s, 6H), 2.15 (s, 3H), 1.24 (s, 9H)。MS (ES $^+$) m/e 471 (M+H) $^+$.

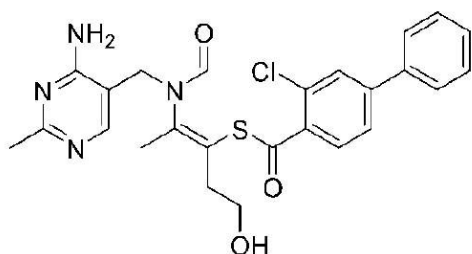
【0 4 4 7】

実施例 45 (M 6 8)

【0 4 4 8】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)-5-hydroxypent-2-en-3-yl) 3-chloro-1,1'-biphenyl-4-carboxylate

【化 8 0】



【0 4 4 9】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.92 (s, 1H), 7.90–7.84 (m, 2H), 7.80–7.73 (m, 3H), 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.57–7.45 (m, 3H), 6.96–6.56 (m, 2H), 4.70 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.43 (br s, 2H), 3.53–3.46 (m, 2H), 2.61 (br t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.16 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 498 (M+H) $^+$.

【0 4 5 0】

実施例 46 (M 7 0)

【0 4 5 1】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)-5-hydroxypent-2-en-3-yl) 3,5-tert-butylbenzoate

10

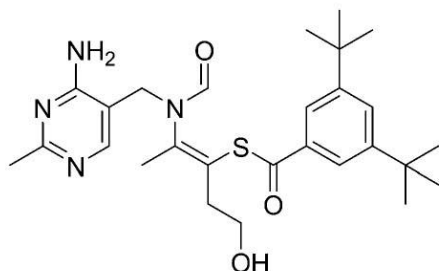
20

30

40

50

【化 8 1】



10

【0452】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.88 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.74 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.60 (s, 2H), 4.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.57 – 3.42 (m, 2H), 2.57 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.32 (s, 18H)。MS (ES $^+$) m/e 499 (M+H) $^+$ 。

【0453】

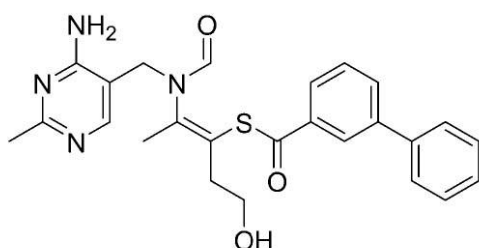
実施例 47 (M72)

【0454】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)-N-holmamide)-5-hydroxypent-2-en-3-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxate

20

【化 8 2】



30

【0455】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.98 (m, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.91–7.90 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.73–7.71 (m, 3H), 7.63 (m, 1H), 7.55–7.51 (m, 2H), 7.44 (m, 1H), 6.64 (s, 2H), 4.64–4.65 (m, 2H), 4.40 (s, 2H), 3.52–3.48 (m, 2H), 2.61–2.51 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.13 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 463 (M+H) $^+$ 。

40

【0456】

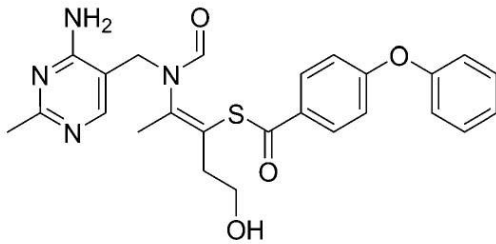
実施例 48 (M73)

【0457】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)-N-holmamide)-5-hydroxypent-2-en-3-yl)-4-phenoxypent-2-en-3-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxate

50

【化 8 3】



【0 4 5 8】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.87 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.50–7.46 (m, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.15 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.04 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 6.64 (s, 2H), 4.64–4.61 (m, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.48–3.43 (m, 2H), 2.58–2.52 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H)。MS (ES^+) m/e 463 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

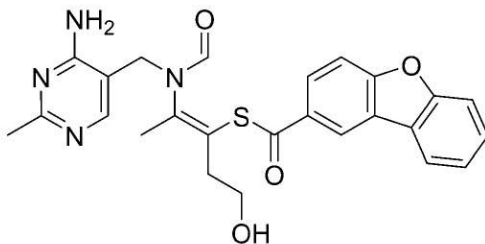
【0 4 5 9】

実施例 49 (M 7 6)

【0 4 6 0】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)holmamido)-5-hydroxypent-2-en-3-yl dibenzofuran-2-carboxylate

【化 8 4】



【0 4 6 1】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.57 (s, 1H), 8.35–8.34 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 7.96–7.90 (m, 5H), 7.79–7.77 (m, 1H), 7.61–7.48 (m, 1H), 6.65 (m, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.54 (m, 2H), 2.63 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 6H)。MS (ES^+) m/e 477 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【0 4 6 2】

実施例 50 (M 7 9)

【0 4 6 3】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)holmamido)-5-hydroxypent-2-en-3-yl benzofuran-2-carboxylate

10

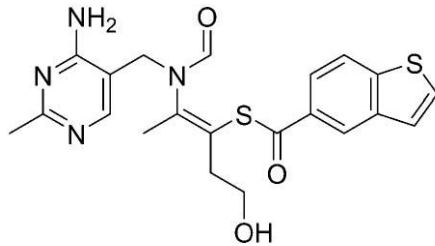
20

30

40

50

【化 8 5】



10

【0 4 6 4】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.31 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.94–7.93 (m, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.67–7.65 (m, 2H), 6.63 (s, 2H), 4.67–4.64 (m, 2H), 4.40 (s, 2H), 3.51–3.47 (m, 2H), 2.67–2.58 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H). MS (ES $^+$) m/e 443 (M+H) $^+$.

【0 4 6 5】

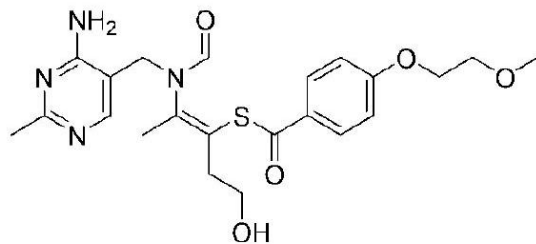
実施例 51 (M 8 2)

【0 4 6 6】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)holmamido)-5-hydroxypent-2-en-3-yl 4-(2-methoxyethoxy)benzoate

20

【化 8 6】



30

【0 4 6 7】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.88 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.73–7.69 (m, 2H), 7.08–7.04 (m, 2H), 6.64 (s, 2H), 4.66–4.63 (m, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.21–4.18 (m, 2H), 3.69–3.68 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.56 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.20 (s, 3H). MS (ES $^+$) m/e 461 (M+H) $^+$.

40

【0 4 6 8】

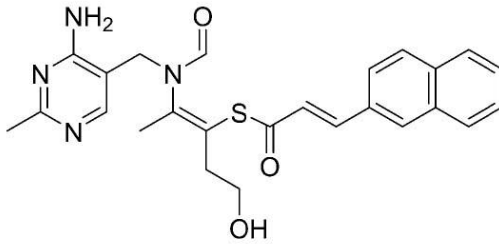
実施例 52 (M 8 8)

【0 4 6 9】

S-((Z)-2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)holmamido)-5-hydroxypent-2-en-3-yl (E)-3-(naphthalen-2-yl)propanoate

50

【化 8 7】



【0 4 7 0】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.26 (s, 1H), 8.00–7.94 (m, 4H), 7.90 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.59–7.56 (m, 3H), 6.95 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 6.68 (s, 2H), 4.69 (s, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.57 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.12 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 463 (M+H) $^+$.

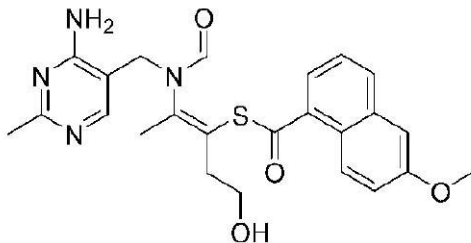
【0 4 7 1】

実施例 53 (M108)

【0 4 7 2】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンター-2-エン-3-イル) 6-メトキシナフタレン-1-カルボチオアート

【化 8 8】



【0 4 7 3】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.13 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.29 (dd, $J_1 = 2.8$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz, 1H), 6.73 (s, 2H), 4.71 (s, 1H), 4.43 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.52 (s, 2H), 2.66 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 467 (M+H) $^+$.

【0 4 7 4】

実施例 54 (M109)

【0 4 7 5】

(Z)-S-(2-(N-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンター-2-エン-3-イル) 4-エトキシナフタレン-1-カルボチオアート

10

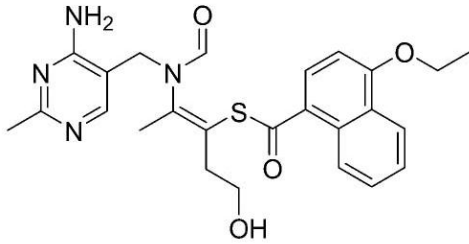
20

30

40

50

【化 89】



【0476】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.67 (t, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.65–7.60 (m, 1H), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.70 (s, 2H), 4.68 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.32 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.51 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.50 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 481 (M+H) $^+$.

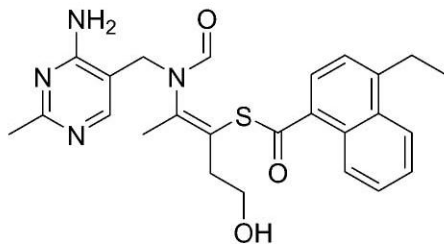
【0477】

実施例 55 (M110)

【0478】

(Z)-5-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)4-エチルナフタレン-1-カルボチオアート

【化 90】



【0479】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.28–8.26 (m, 1H), 8.19–8.18 (m, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.87–7.85 (m, 1H), 7.67–7.64 (m, 1H), 7.48 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.74 (s, 2H), 4.70 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.52 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.14 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.66 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.31 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 465 (M+H) $^+$.

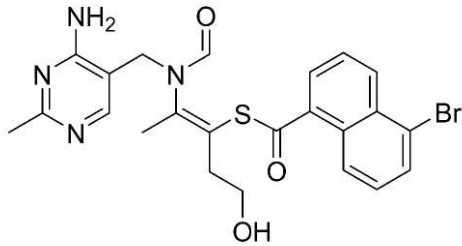
【0480】

実施例 56 (M111)

【0481】

(Z)-5-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)5-ブロモナフタレン-1-カルボチオアート

【化 9 1】



【0482】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.06 – 7.95 (m, 3H), 7.88 (s, 1H), 7.79 (dd, $J_1 = 7.2$, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J_1 = 7.6$, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 6.74 (br s, 2H), 4.70 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.45 (br s, 2H), 3.56 – 3.49 (m, 2H), 2.68 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.21 – 2.16 (m, 3H), 2.11 (s, 3H)。MS (ES^+) m/e 516 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

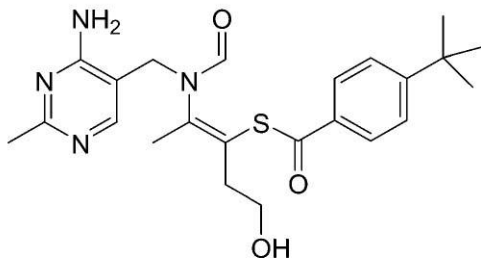
【0483】

実施例 57 (M114)

【0484】

(Z)-5-(2-((4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)carbamoyl)-2-hydroxypent-3-en-1-yl 4-(tert-butyl)benzoate

【化 9 2】



【0485】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.90 – 7.82 (m, 2H), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.59 – 7.52 (m, 2H), 6.84 – 6.54 (m, 2H), 4.67 (br s, 1H), 4.38 (br s, 2H), 4.03 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.45 (br s, 2H), 2.56 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.27 – 2.07 (m, 6H), 1.30 (s, 9H)。MS (ES^+) m/e 443 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

【0486】

実施例 58 (M115)

【0487】

(Z)-5-(2-((4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl)carbamoyl)-2-hydroxypent-3-en-1-yl 2-ethoxybenzoate

10

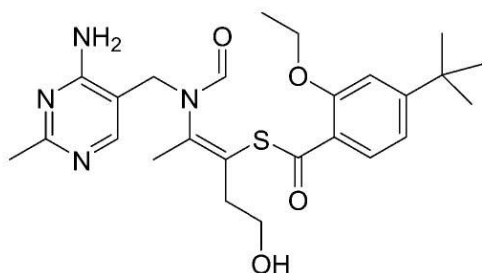
20

30

40

50

【化 9 3】



10

【0 4 8 8】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.83–7.82 (m, 2H), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.06–7.03 (m, 2H), 6.68 (s, 2H), 4.62 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.36 (s, 1H), 4.17 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.44 (q, J = 5.6 Hz, 2H), 2.54–2.52 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.32 (t, J = 6.8 Hz, 3H), 1.28 (s, 9H)。MS (ES $^+$) m/e 487 (M+H) $^+$ 。

【0 4 8 9】

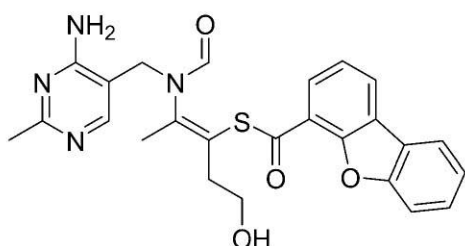
20

実施例 59 (M148)

【0 4 9 0】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) ジベンゾ [b, d] フラン – 4 – カルボチオアート

【化 9 4】



30

【0 4 9 1】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.47 (d, J = 6.80 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 7.60 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.90 – 7.86 (m, 3H), 7.62 (t, J = 8.00 Hz, 1H), 7.58 – 7.47 (m, 2H), 6.64 (s, 2H), 4.67 (t, J = 5.60 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.54 – 3.48 (m, 2H), 2.65 (t, J = 6.80 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 477 (M+H) $^+$ 。

40

【0 4 9 2】

実施例 60～68：以下の化合物を、適切な出発物質を用いて M19 (実施例 6) の調製手順に従って合成した。

【0 4 9 3】

実施例 60 (M97)

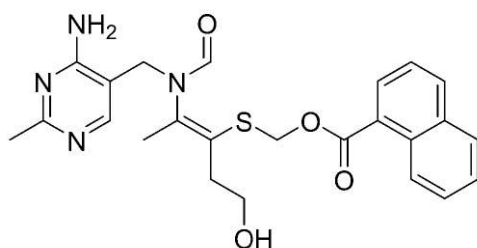
【0 4 9 4】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチル 1 – ナフト

50

アート

【化 9 5】



10

【0 4 9 5】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.75 (d, 1H), 8.29 – 8.22 (m, 1H), 8.14 – 8.12 (m, 1H), 8.12 – 8.05 (m, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.69 – 7.63 (m, 3H), 6.74 – 6.71 (m, 2H), 5.37 (s, 2H), 4.73 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.34 (br s, 2H), 3.57 – 3.52 (m, 2H), 2.73 – 2.69 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.95 (s, 3H). MS (ES^+) m/e 467 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

【0 4 9 6】

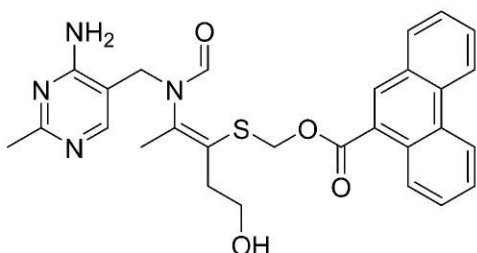
実施例 6 1 (M 9 8)

20

【0 4 9 7】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンター – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチルフenantレン – 9 – カルボキシラート

【化 9 6】



30

【0 4 9 8】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.97 – 8.87 (m, 2H), 8.77 – 8.70 (m, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.90 – 7.81 (m, 2H), 7.80 – 7.73 (m, 3H), 6.74 (br s, 2H), 5.41 (s, 2H), 4.78 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.35 (br s, 2H), 3.63 – 3.50 (m, 2H), 2.74 (br t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.98 (s, 3H). MS (ES^+) m/e 517 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

40

【0 4 9 9】

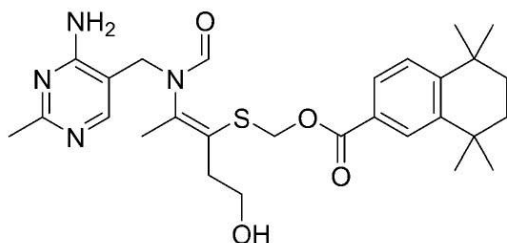
実施例 6 2 (M 9 9)

【0 5 0 0】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンター – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチル 5, 5, 8, 8 – テトラメチル – 5, 6, 7, 8 – テトラヒドロナフタレン – 2 – カルボキシラート

50

【化 9 7】



【0501】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.93 (s, 1H), 7.89 – 7.85 (m, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.66 (dd, $J_1 = 2.0$, 1H), 7.51 – 7.46 (m, 1H), 6.73 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.69 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.44 – 4.18 (m, 2H), 3.57 – 3.44 (m, 2H), 2.67 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.29 – 2.24 (m, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.66 (s, 4H), 1.25 (s, 12H)。MS (ES $^+$) m/e 527 (M+H) $^+$.

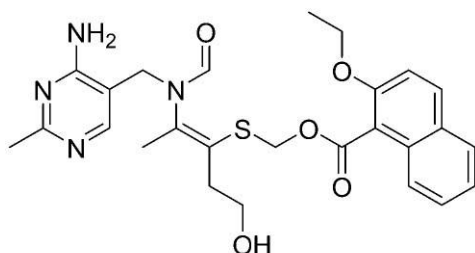
【0502】

実施例 63 (M100)

【0503】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチル 2 – エトキシ – 1 – ナフトアート

【化 9 8】



【0504】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.95 – 7.90 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.62 – 7.49 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 6.73 (br s, 2H), 5.33 (s, 2H), 4.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.35 (br s, 2H), 4.27 – 4.21 (m, 2H), 3.55 – 3.44 (m, 2H), 2.61 (br t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 511 (M+H) $^+$.

【0505】

実施例 64 (M101)

【0506】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチル 2, 2 – ジメチル – 3 – (ナフタレン – 2 – イル) プロパノアート

10

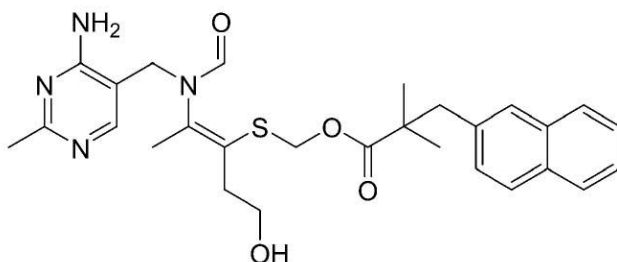
20

30

40

50

【化 9 9】



10

【0507】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.90 (s, 1H), 7.88 – 7.78 (m, 4H), 7.64 – 7.58 (m, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 2H), 7.28 – 7.19 (m, 1H), 6.78 (m, 2H), 4.95 (br s, 2H), 4.66 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.33 (br s, 2H), 3.50 – 3.41 (m, 2H), 3.01 – 2.92 (m, 2H), 2.48 (br s, 2H), 2.28 (m, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.16 – 1.12 (m, 6H). MS (ES $^+$) m/e 523 (M+H) $^+$.

【0508】

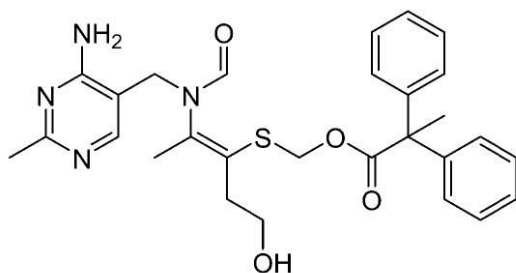
実施例 65 (M103)

20

【0509】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチル 2, 2 – ジフェニルプロパノアート

【化 100】



30

【0510】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.78 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.28 – 7.34 (m, 6H), 7.12 – 7.36 (m, 4H), 6.72 – 6.70 (m, 2H), 5.04 (br s, 2H), 4.60 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.27 (br s, 2H), 3.28 – 3.32 (m, 2H), 2.38 – 2.35 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.88 – 1.85 (m, 6H). MS (ES $^+$) m/e 521 (M+H) $^+$.

40

【0511】

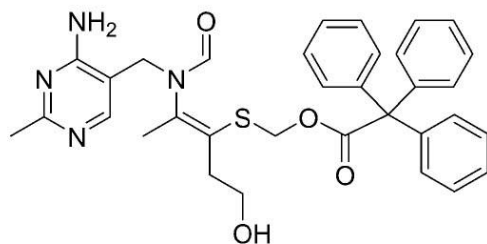
実施例 66 (M105)

【0512】

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル)ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチル 2, 2, 2 – トリフェニルアセタート

50

【化101】



【0513】

10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.89 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.34 – 7.28 (m, 11H), 7.11 – 7.09 (m, 7H), 6.77 – 6.72 (m, 2H), 5.39 (br s, 2H), 4.56 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.33 (br s, 2H), 3.20 – 3.19 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.08 – 1.99 (m, 2H), 1.89 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 583 (M+H) $^+$ 。

【0514】

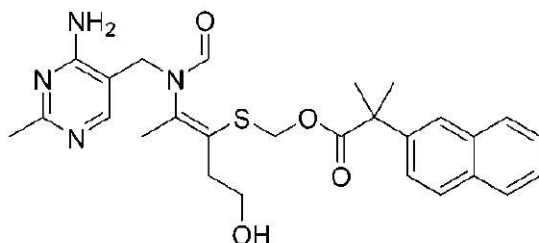
実施例67 (M107)

【0515】

20

(Z) – ((2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) チオ) メチル 2 – メチル – 2 – (ナフタレン – 2 – イル) プロパノアート

【化102】



30

【0516】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.92 – 7.82 (m, 4H), 7.76 (s, 1H), 7.70 – 7.64 (m, 1H), 7.53 – 7.46 (m, 2H), 7.44 – 7.37 (m, 1H), 6.69 (br d, J = 12.4 Hz, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.59 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.35 – 4.12 (m, 2H), 3.32 – 3.25 (m, 2H), 2.34 (br t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.29 – 2.20 (m, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.64 – 1.57 (m, 6H)。MS (ES $^+$) m/e 509 (M+H) $^+$ 。

40

【0517】

実施例68 (M126)

【0518】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 2 – フルオロ – 6 – フェノキシベンゾチオアート

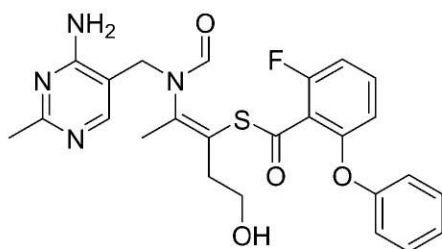
50

2-フルオロ-6-フェノキシ安息香酸 (500 mg、2.15 mmol、1.00 当量) の DCM (10.0 mL) 及び DMF (1.57 mg、21.5 μ mol、1.66 μ L、0.01 当量) の溶液に、(COCl)₂ (328 mg、2.58 mmol、226 μ L、1.20 当量) を 25℃ で滴加した。反応混合物を 25℃ で 0.5 時間攪拌した。反応を無水 MeOH でクエンチし、減圧下で濃縮して、表題化合物 (540 mg、粗) を黄色の油として得、それをそれ以上精製せずに次ステップに直接使用した。

【0523】

ステップ 3. (Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-フルオロ-6-フェノキシベンゾチオアート

【化106】



【0524】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.93 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.58 – 7.48 (m, 1H), 7.46 – 7.39 (m, 1H), 7.24 – 7.17 (m, 1H), 7.13 – 7.02 (m, 1H), 6.78 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.42 (s, 2H), 4.47 – 4.25 (m, 1H), 3.47 (br d, J = 5.20 Hz, 1H), 2.58 (br t, J = 6.80 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.05 (s, 1H). MS (ES⁺) m/e 497 (M+H)⁺.

【0525】

実施例 69～99：以下の化合物を、M126 の調製と本質的に同じ手順及び適切な出発物質を用いて合成した。

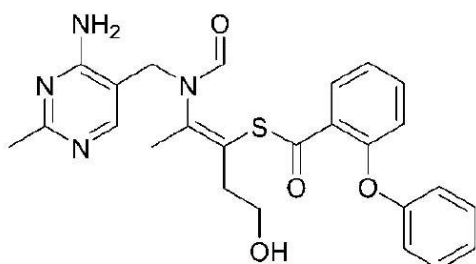
【0526】

実施例 69 (M113)

【0527】

(Z)-S-(2-(N-((4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-フェノキシベンゾチオアート

【化107】



【0528】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.83 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.66 – 7.56 (m, 2H), 7.43 – 7.36 (m, 2

H), 7.27 (dt, $J_1 = 0.8$, $J_2 = 7.6$ Hz, 1H), 7.19 – 7.12 (m, 1H), 7.01 – 6.95 (m, 3H), 6.78 – 6.59 (m, 2H), 4.57 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 4.34 (br s, 2H), 3.36 (br d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.43 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.08 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 479 (M+H)⁺.

【0529】

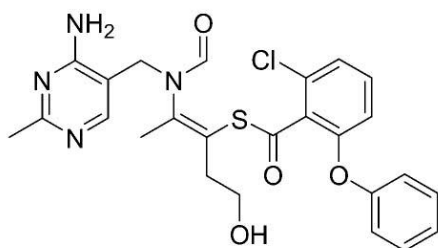
実施例70 (M127)

【0530】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-クロロ-6-フェノキシベンゾチオアート

10

【化108】



20

【0531】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.91 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.53 – 7.45 (m, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 2H), 7.33 (br d, $J = 8.00$ Hz, 1H), 7.19 (br t, $J = 8.00$ Hz, 1H), 7.08 – 6.97 (m, 2H), 6.90 (br d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 6.83 – 6.58 (m, 2H), 4.62 (br t, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.35 (br s, 2H), 3.41 – 3.37 (m, 2H), 2.59 – 2.54 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.07 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 514 (M+H)⁺.

30

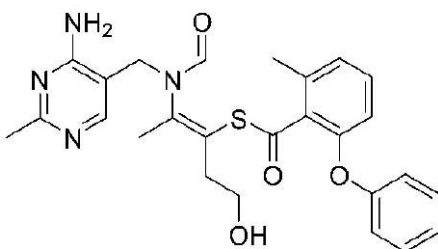
【0532】

実施例71 (M128)

【0533】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-メチル-6-フェノキシベンゾチオアート

【化109】



40

【0534】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.91 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.40 – 7.31 (m, 3H), 7.16 – 7.05 (m, 2H), 6.98 – 6.92 (m, 2H), 6.80 – 6.60 (m, 3H), 4

50

. 57 (t, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.34 (br s, 2H), 3.37 – 3.33 (m, 2H), 2.53 – 2.51 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.06 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 493 (M+H)⁺.

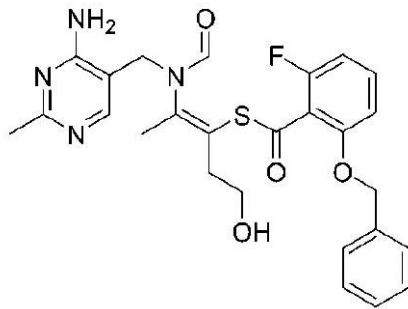
【0535】

実施例72 (M129)

【0536】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(ベンジルオキシ)-6-フルオロベンゾチオアート

【化110】



【0537】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.91 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.50 – 7.25 (m, 7H), 7.04 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 6.89 (t, $J = 8.80$ Hz, 1H), 6.77 – 6.52 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.63 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.33 (s, 2H), 3.43 – 3.38 (m, 2H), 2.59 – 2.55 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 511 (M+H)⁺.

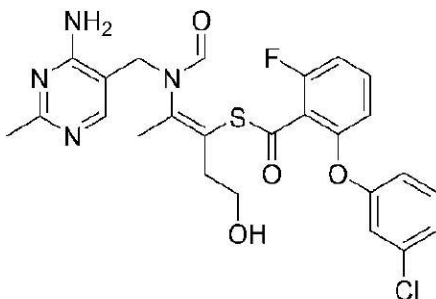
【0538】

実施例73 (M130)

【0539】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(3-クロロフェノキシ)-6-フルオロベンゾチオアート

【化111】



【0540】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.63 – 7.55 (m, 1H), 7.46 – 7.40 (m, 1H), 7.28 – 7.18 (m, 2H), 7.13 (t, $J = 2.00$ Hz, 1

H), 6.98 (dd, $J_1 = 2.00$ Hz, $J_2 = 8.40$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 6.73 – 6.57 (m, 2H), 4.64 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.40 (br s, 2H), 2.60 – 2.58 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.06 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 532 (M+H)⁺。

【0541】

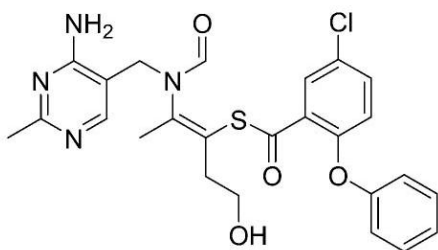
実施例74 (M131)

【0542】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)5-クロロ-2-フェノキシベンゾチオアート

10

【化112】



20

【0543】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.85 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.61 (dd, $J = 12.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 4.00$ Hz, 1H), 7.45 – 7.39 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 7.04 (d, $J = 7.60$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 6.76 – 6.73 (m, 2H), 4.61 – 4.56 (m, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.43 – 3.38 (m, 2H), 2.49 – 2.45 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.10 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 514 (M+H)⁺。

【0544】

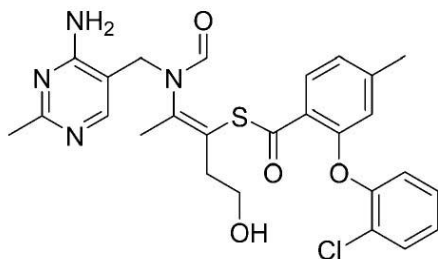
30

実施例75 (M133)

【0545】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(2-クロロフェノキシ)-4-メチルベンゾチオアート

【化113】



40

【0546】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.82 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 2H), 7.35 (dt, $J_1 = 1.60$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, 1H), 7.21 (dt, $J = 1.60$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 8.00$ Hz, 1H), 6.99 (dd, $J_1 = 1.60$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 6.70 – 6

50

. 60 (m, 3H), 4.57 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.33 (br s, 2H), 3.43 – 3.37 (m, 2H), 2.45 – 2.41 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.06 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 528 (M+H)⁺。

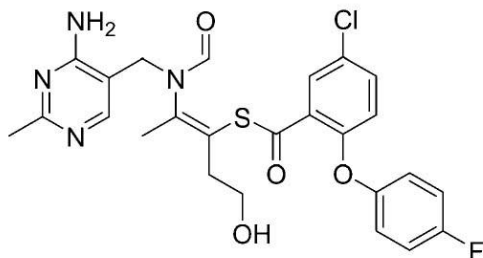
【0547】

実施例76 (M134)

【0548】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)5-クロロ-2-(4-フルオロフェノキシ)ベンゾチオアート

【化114】



【0549】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.84 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.65 – 7.63 (m, 2H), 7.29 – 7.24 (m, 2H), 7.13 – 7.11 (m, 2H), 6.66 (d, $J = 7.20$ Hz, 1H), 6.64 (br s, 2H), 5.60 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.42 – 3.39 (m, 2H), 2.56 – 2.55 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.11 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 532 (M+H)⁺。

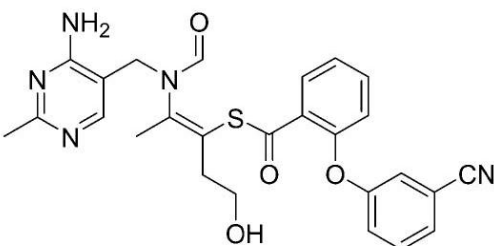
【0550】

実施例77 (M135)

【0551】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(3-シアノフェノキシ)ベンゾチオアート

【化115】



【0552】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.81 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.72 – 7.62 (m, 2H), 7.61 – 7.54 (m, 2H), 7.46 – 7.35 (m, 2H), 7.28 – 7.20 (m, 1H), 7.14 (d, $J = 7.60$ Hz, 1H), 6.69 (br s, 2H), 4.58 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.34 (br s, 2H), 3.45 – 3.38 (m, 2H), 2.42 – 2.35 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.08 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 504 (M+H)⁺。

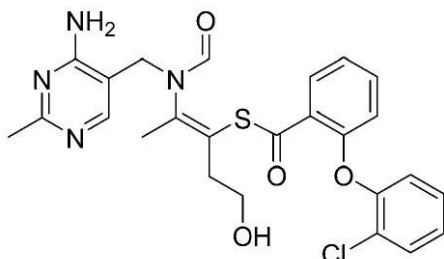
【0553】

実施例78 (M136)

【0554】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(2-クロロフェノキシ)ベンゾチオアート

【化116】



10

【0555】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.85 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.64 (dd, $J_1 = 1.60$ Hz, $J_2 = 7.60$ Hz, 1H), 7.61 – 7.55 (m, 2H), 7.40 – 7.33 (m, 1H), 7.31 – 7.25 (m, 1H), 7.24 – 7.19 (m, 1H), 7.06 – 7.00 (m, 1H), 6.86 (d, $J = 7.60$ Hz, 1H), 6.67 (br s, 2H), 4.59 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.35 (br s, 2H), 3.42 – 3.35 (m, 2H), 2.46 – 2.44 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.08 (s, 3H)。MS (ES^+) m/e 514 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

20

【0556】

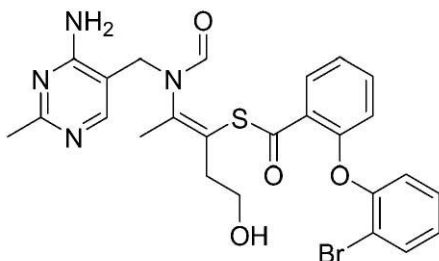
実施例79 (M137)

【0557】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(2-ブロモフェノキシ)ベンゾチオアート

30

【化117】



40

【0558】

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.85 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.73 (dd, $J_1 = 1.60$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J_1 = 1.60$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 1H), 7.28 (t, $J = 7.60$ Hz, 1H), 7.18 – 7.12 (m, 1H), 7.00 (dd, $J_1 = 1.60$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 6.75 – 6.60 (m, 2H), 4.59 (t, J

50

= 6.00 Hz, 1H), 4.35 (br s, 2H), 3.40 (q, J = 6.80 Hz, 2H), 2.47 – 2.43 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.08 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 558 (M+H)⁺。

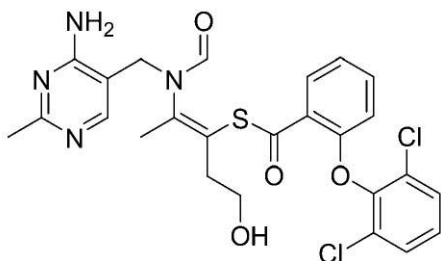
【0559】

実施例80 (M138)

【0560】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(2,6-ジクロロフェノキシ)ベンゾチオアート

【化118】



【0561】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.30 – 8.25 (m, 1H), 8.13 (dd, J₁ = 3.20 Hz, J₂ = 6.4 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.88 – 7.80 (m, 2H), 7.69 – 7.64 (m, 2H), 7.47 (d, J = 7.60 Hz, 1H), 6.71 (br s, 2H), 4.69 (br t, J = 5.60 Hz, 1H), 4.43 (br s, 2H), 3.55 – 3.47 (m, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.66 (br t, J = 6.80 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 457 (M+H)⁺。

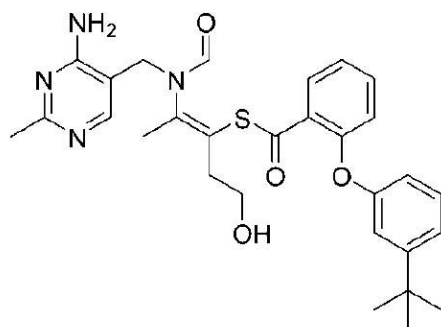
【0562】

実施例81 (M139)

【0563】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(3-(tert-ブチル)フェノキシ)ベンゾチオアート

【化119】



【0564】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.66 – 7.54 (m, 2H), 7.34 – 7.23 (m, 2H), 7.19 (br d, J = 8.00 Hz, 1H), 7.05 – 6.93 (m, 2H), 6.79 – 6.56 (m, 3H), 4.58 (t, J = 5.60 Hz

, 1H), 4.34 (br s, 2H), 3.40 – 3.37 (m, 2H), 2.44 (br t, J = 6.80 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.26 (s, 9H)。MS (ES⁺) m/e 535 (M+H)⁺。

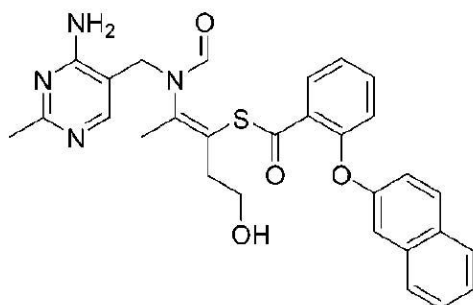
【0565】

実施例82 (M140)

【0566】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 2 – (ナフタレン – 2 – イルオキシ) ベンゾチオアート

【化120】



10

【0567】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.97 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 7.60 Hz, 1H), 7.86 – 7.81 (m, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 1H), 7.65 – 7.58 (m, 1H), 7.54 – 7.41 (m, 2H), 7.37 – 7.29 (m, 2H), 7.26 (dd, J₁ = 2.40 Hz, J₂ = 8.80 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.70 (br s, 2H), 4.50 (t, J = 5.60 Hz, 1H), 4.32 (br s, 2H), 3.23 (q, J = 6.40 Hz, 2H), 2.35 (br t, J = 6.40 Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 529 (M+H)⁺。

20

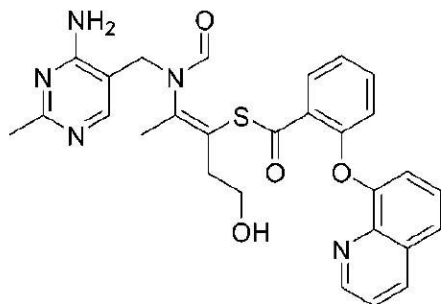
【0568】

実施例83 (M141)

【0569】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 2 – (キノリン – 8 – イルオキシ) ベンゾチオアート

【化121】



40

【0570】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.86 (s, 1H), 7.84 – 7.72 (m, 2H), 7.68 – 7.59 (m, 1H), 7.49 – 7.3

50

2 (m, 3H), 7.32 – 7.17 (m, 2H), 7.11 – 6.84 (m, 1H), 6.83 – 6.47 (m, 3H), 6.44 – 6.06 (m, 1H), 4.64 – 4.40 (m, 2H), 4.13 – 3.95 (m, 1H), 3.56 – 3.48 (m, 2H), 2.80 – 2.70 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.83 (br s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 530 (M+H)⁺。

【0571】

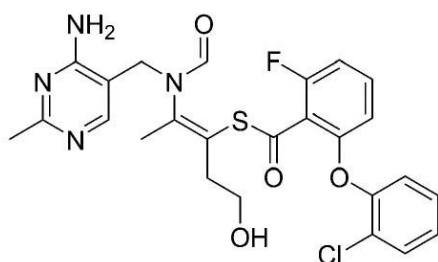
実施例84 (M142)

【0572】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(2-クロロフェノキシ)-6-フルオロベンゾチオアート

10

【化122】



20

【0573】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.89 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.58 (dd, J₁ = 1.60 Hz, J₂ = 8.00 Hz, 1H), 7.51 – 7.45 (m, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 7.29 – 7.23 (m, 1H), 7.18 – 7.08 (m, 2H), 6.87 – 6.61 (m, 2H), 6.55 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 4.61 (t, J = 5.60 Hz, 1H), 4.33 (s, 2H), 3.42 – 3.38 (m, 2H), 2.57 – 2.55 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.06 (d, J = 1.60 Hz, 3H)。MS (ES⁺) m/e 532 (M+H)⁺。

30

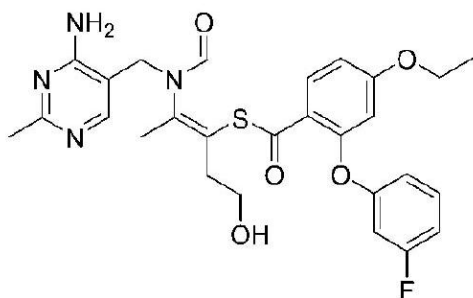
【0574】

実施例85 (M143)

【0575】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)4-エトキシ-2-(3-フルオロフェノキシ)ベンゾチオアート

【化123】



40

【0576】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.79 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 7.44 – 7.36

50

(m, 1H), 6.98 (dt, $J_1 = 2.40$ Hz, $J_2 = 8.40$ Hz, 1H), 6.91 – 6.85 (m, 1H), 6.76 (dd, $J_1 = 2.00$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 6.65 (br d, $J = 2.00$ Hz, 2H), 6.54 (d, $J = 2.40$ Hz, 1H), 4.55 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.31 (br s, 2H), 4.06 (q, $J = 7.20$ Hz, 2H), 3.37 – 3.33 (m, 2H), 2.40 (br t, $J = 6.80$ Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.30 (t, $J = 6.80$ Hz, 3H)。MS (ES⁺) m/e 541 (M+H)⁺。

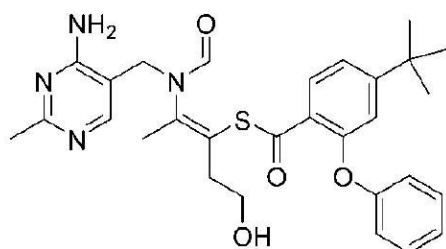
【0577】

実施例 86 (M145)

【0578】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 4 – (tert – ブチル) – 2 – フェノキシベンゾチオアート

【化124】



【0579】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.89 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.64 (br d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 2H), 7.32 (br d, $J = 7.20$ Hz, 1H), 7.19 – 7.08 (m, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.96 (d, $J = 8.40$ Hz, 2H), 6.30 (br s, 2H), 4.35 (s, 2H), 4.21 – 4.06 (m, 1H), 3.50 – 3.43 (m, 2H), 2.55 (br s, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.26 (s, 9H)。MS (ES⁺) m/e 535 (M+H)⁺。

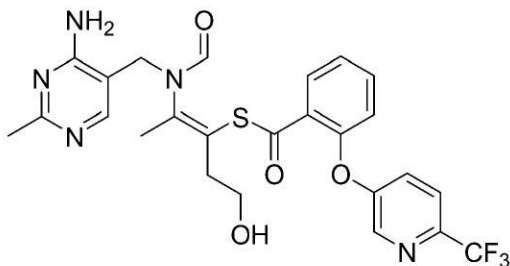
【0580】

実施例 87 (M146)

【0581】

(Z) – S – (2 – (N – ((4 – アミノ – 2 – メチルピリミジン – 5 – イル) メチル) ホルムアミド) – 5 – ヒドロキシペンタ – 2 – エン – 3 – イル) 2 – ((6 – (トリフルオロメチル) ピリジン – 3 – イル) オキシ) ベンゾチオアート

【化125】



【0582】

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.50 (d, $J = 2.40$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 7.85 – 7.63 (m, 4H), 7.50 – 7.40 (m, 2H), 7.39 – 7.27 (m, 1H), 6.71 (br s, 2H), 4.59 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.35 (br s, 2H), 2.59 (br d, $J = 6.80$ Hz, 2H), 2.40 (br t, $J = 6.40$ Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.09 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 548 (M+H) $^+$ 。

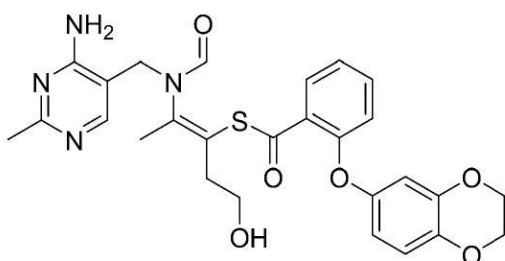
【0583】

実施例 88 (M147)

【0584】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-((2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-イル)オキシ)ベンゾチオアート

【化126】



【0585】

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.85 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.65 – 7.51 (m, 2H), 7.22 (t, $J = 7.60$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 6.67 (br s, 2H), 6.56 (d, $J = 2.40$ Hz, 1H), 6.48 (dd, $J_1 = 2.80$ Hz, $J_2 = 8.80$ Hz, 1H), 4.67 – 4.54 (m, 1H), 4.35 (br s, 2H), 4.25 – 4.23 (br d, $J = 2.40$ Hz, 4H), 3.41 (q, $J = 6.40$ Hz, 2H), 2.48 – 4.46 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.09 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 537 (M+H) $^+$ 。

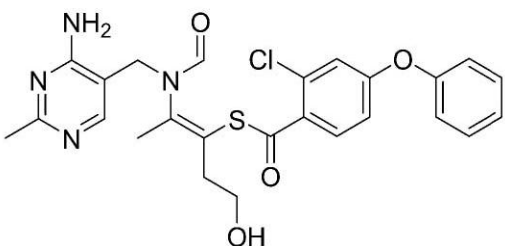
【0586】

実施例 89 (M149)

【0587】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-クロロ-4-フェノキシベンゾチオアート

【化127】



【0588】

10

20

30

40

50

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.88 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 8.00$ Hz, 2H), 7.33 – 7.28 (m, 1H), 7.22 – 7.15 (m, 3H), 6.98 (dd, $J_1 = 2.40$ Hz, $J_2 = 8.80$ Hz, 1H), 6.79 – 6.68 (m, 2H), 4.67 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.45 – 4.41 (m, 2H), 3.49 – 3.45 (m, 2H), 2.60 – 2.58 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.15 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 514 (M+H) $^+$ 。

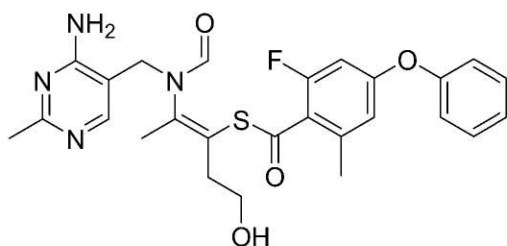
【0589】

実施例90 (M150)

【0590】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-フルオロ-6-メチル-4-フェノキシベンゾチオアート

【化128】



【0591】

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.91 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.49 – 7.42 (m, 2H), 7.29 – 7.22 (m, 1H), 7.14 (d, $J = 8.00$ Hz, 2H), 6.79 – 6.57 (m, 4H), 4.71 (t, $J = 5.20$ Hz, 1H), 4.39 (br s, 2H), 3.49 – 3.43 (m, 2H), 2.60 (br s, 2H), 2.26 (m, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.12 (s, 3H)。MS (ES $^+$) m/e 511 (M+H) $^+$ 。

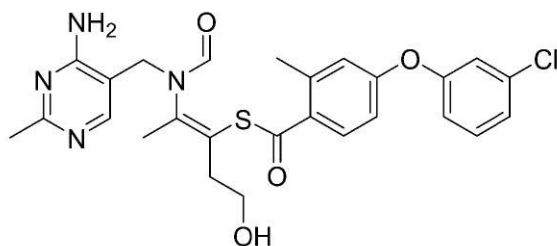
【0592】

実施例91 (M151)

【0593】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)4-(3-クロロフェノキシ)-2-メチルベンゾチオアート

【化129】



【0594】

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.88 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 7.47 (t, $J =$

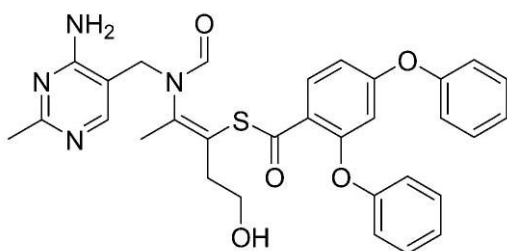
8.00 Hz, 1H), 7.30 (dd, $J_1 = 0.80$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 7.23 (t, $J = 2.00$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J_1 = 2.00$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 7.00 (br d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 6.90 (br dd, $J = 2.40$ Hz, $J_2 = 8.80$ Hz, 1H), 6.82 – 6.59 (m, 2H), 4.65 (br t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.40 (br s, 2H), 3.46 (q, $J = 6.40$ Hz, 2H), 2.58 – 2.55 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.14 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 528 (M+H)⁺.
【0595】

実施例92 (M152)

【0596】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2,4-ジフェノキシベンゾチオアート

【化130】



【0597】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.13 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.71 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 7.43 – 7.41 (m, 5H), 7.28 – 7.18 (m, 2H), 7.09 (m, 5H), 6.79 – 6.77 (m, 1H), 6.38 (d, $J = 2.40$ Hz, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 3.42 (t, $J = 6.00$ Hz, 2H), 2.448 – 2.44 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.16 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 571 (M+H)⁺.

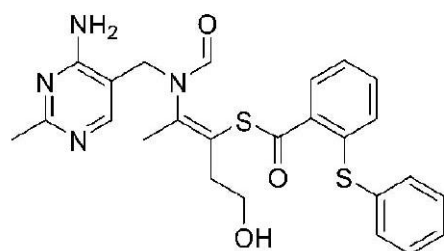
【0598】

実施例93 (M153)

【0599】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(フェニルチオ)ベンゾチオアート

【化131】



【0600】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.92 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.69 (dd, $J_1 = 1.20$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 7.53 – 7.40 (m, 7H), 7.34 – 7.28 (m, 1H), 6

. 90 (d, $J = 8.00$ Hz, 1H), 6.86 – 6.60 (m, 2H), 4.67 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.44 – 4.33 (m, 2H), 3.49 – 3.44 (m, 2H), 2.62 – 2.55 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.14 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 495 (M+H)⁺。

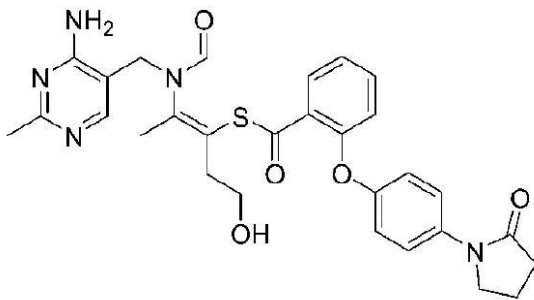
【0601】

実施例94 (M155)

【0602】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(4-(2-オキソピロリジン-1-イル)フェノキシ)ベンゾチオアート

【化132】



【0603】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.84 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.69 – 7.63 (m, 3H), 7.62 – 7.54 (m, 1H), 7.31 – 7.22 (m, 1H), 7.04 – 6.99 (m, 2H), 6.96 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H), 6.69 (br s, 2H), 4.59 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.34 (br s, 2H), 3.82 (t, $J = 7.20$ Hz, 2H), 3.42 – 3.37 (m, 2H), 2.49 – 2.44 (m, 4H), 2.17 (s, 3H), 2.11 – 2.02 (m, 5H)。MS (ES⁺) m/e 562 (M+H)⁺。

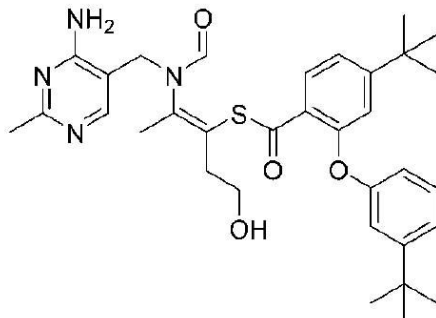
【0604】

実施例95 (M156)

【0605】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)4-(tert-ブチル)-2-(3-(tert-ブチル)フェノキシ)ベンゾチオアート

【化133】



【0606】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.83 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 8.00$ Hz, 1H), 7.39 – 7.30

(m, 2H), 7.16 (d, $J = 7.20$ Hz, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.74 – 6.66 (m, 3H), 4.62 – 4.54 (m, 1H), 4.42 – 4.39 (s, 2H), 2.45 – 2.40 (m, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.24 (s, 9H), 1.21 (s, 9H)。MS (ES⁺) m/e 591 (M+H)⁺。

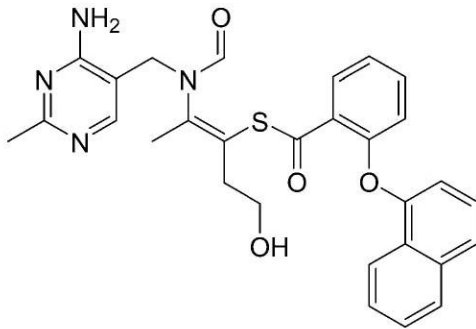
【0607】

実施例96 (M157)

【0608】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(ナフタレン-1-イルオキシ)ベンゾチオアート

【化134】



【0609】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.09 – 8.04 (m, 1H), 8.01 – 7.96 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.80 – 7.71 (m, 2H), 7.68 (dd, $J_1 = 1.60$ Hz, $J_2 = 8.00$ Hz, 1H), 7.62 – 7.52 (m, 3H), 7.47 (t, $J = 8.00$ Hz, 1H), 7.32 – 7.24 (m, 1H), 6.97 – 6.88 (m, 2H), 6.69 (br s, 2H), 4.52 (t, $J = 5.60$ Hz, 1H), 4.33 (br s, 2H), 3.29 – 3.26 (m, 2H), 2.39 (br t, $J = 6.40$ Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 529 (M+H)⁺。

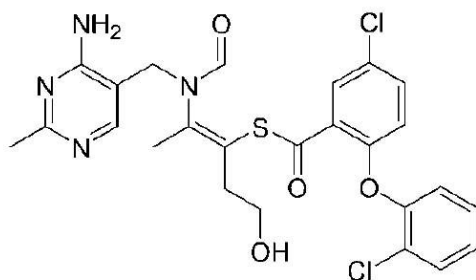
【0610】

実施例97 (M158)

【0611】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)5-クロロ-2-(2-クロロフェノキシ)ベンゾチオアート

【化135】



【0612】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.87 (s, 1H), 7.81

(s, 1H), 7.64 – 7.58 (m, 3H), 7.39 (t, J = 7.20 Hz, 1H), 7.27 (t, J = 7.20 Hz, 1H), 7.14 (t, J = 8.00 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 4.63 – 4.59 (m, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.46 – 3.41 (m, 2H), 2.46 – 2.44 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.10 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 548 (M+H)⁺.

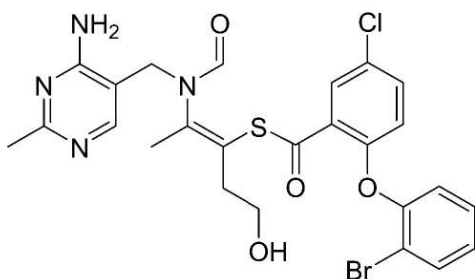
【0613】

実施例98 (M159)

【0614】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(2-ブロモフェノキシ)-5-クロロベンゾチオアート

【化136】



【0615】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.87 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.78 – 7.74 (m, 1H), 7.65 – 7.58 (m, 2H), 7.48 – 7.42 (m, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 7.16 – 7.13 (m, 1H), 6.86 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.63 (s, 2H), 4.62 – 4.58 (m, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.45 – 3.40 (m, 2H), 2.46 – 2.42 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.10 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 592 (M+H)⁺.

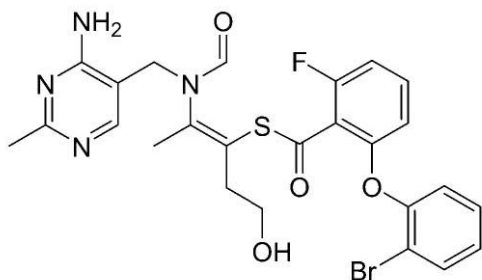
【0616】

実施例99 (M160)

【0617】

(Z)-S-(2-(N-(4-アミノ-2-メチルピリミジン-5-イル)メチル)ホルムアミド)-5-ヒドロキシペンタ-2-エン-3-イル)2-(2-ブロモフェノキシ)-6-フルオロベンゾチオアート

【化137】



【0618】

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.89 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.75 (dd, J₁ = 1.20 Hz, J₂ = 7.60 Hz, 1H), 7.56 – 7.41 (m, 2H), 7.23 – 7.19 (m, 1H), 7

. 18 – 7.08 (m, 2H), 6.63 – 6.61 (m, 2H), 6.56 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 4.64 – 4.61 (m, 1H), 4.35 (s, 2H), 3.47 – 3.36 (m, 2H), 2.06 (s, 3H)。MS (ES⁺) m/e 576 (M+H)⁺.

【0619】

実施例100：結果

【0620】

哺乳類細胞においてこれらのチアミン類似体リボスイッチをオンにすることがより強力である化合物、及び／または薬物動態パラメータの改善等の他の特性を有する化合物を同定するため、追加の化合物（例えば、式ⅠV～ⅠⅡⅡの化合物）を作り、チアミン類似体リボスイッチの調節におけるそれらの活性について、15D10リボスイッチを有するルシフェラーゼコンストラクト（Luci-15D10、配列番号93）を使用して試験した。

【0621】

15D10リボスイッチをルシフェラーゼレポーター遺伝子に挿入することにより、配列番号93を得た。大文字は、ルシフェラーゼコード配列を示す。小文字は、イントロン／選択的エクソン／イントロンとリボスイッチの配列を示す。15D10アプタマーコード配列（配列番号26）には下線が引かれている。

【0622】

配列番号93：

【0623】

【化138-1】

```
ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCG
CTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCC
CTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTT
ACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGG
GCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTCTTCAATTCTTT
ATGCCGGTGTTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCGAACGACA
TTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGT
GTTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTGCAAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAAGCTCCC
AATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAG
TCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACGATTT
TGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCT
GGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGA
GATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCGGGATACTGC
GATTTTAAGTGTTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGAT
ATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTT
TCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTA
TTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACA
CGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCC
AAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGgtgagtctatgggacccttgatgtttctttcccttctttctatggtt
aagttcatgtcataggaaggggagaaagtaacagggtacacatattgaccaaatacagggttaatttgcatttgtaattttaaaaaatgctttct
```

10

20

30

40

50

【化 1 3 8 - 2】

tcttttaataatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaactcttttcttcagggaataatgatacaatgtatcatgccgagtaacgctg
tttctctaactttaggaatgaattcagatattccagagaatgaaaaaaatcttcagtagaaggtaatgtacaggggtccggcctttcat
ttggcaccggtgagaacatacccttcggacctgttcacggataatgccgctgcagggaatcattacgcaccattctaagaataacag
tgataatttctgggttaaggcaatagcaatatcttgcataaaatatttctgcataaaattgtaactgatgaagaggttcatttgctaata
gcagctacaatccagctaccattctgcctttattttatgggtgggataaggctggattattctgagtcgaagcaggcccttttgctaatacatg
ttcatactcttattcttctctccacagCAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTG
ATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTT
TTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAA
GAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCC
GGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACAT
AGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTG
ATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCC
AACACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCTGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGG
TGAACCTCCCGCCGCGCTTGTGTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAA
AGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGG
AGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGC
AAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCG
TGTAAT

10

20

【0 6 2 4】

式ⅠⅤの化合物を最初にHEK293細胞で試験した。図9Aに示すように、ルシフェラーゼ遺伝子発現は、HEK293細胞において化合物M10、M16、M18、M19またはM21による処理時、用量依存的に増加した。フルスルチアミンの活性と比較すると、M19は、ルシフェラーゼ発現を誘導する上でより強力であり、HEK293細胞において、12.5 μMの濃度でのルシフェラーゼ発現の168.7倍の増加を生じた。さらに、これらの新たな化合物をマウス肝細胞株AML12細胞で試験した。図9Bに示すように、HEK293細胞からの所見と一致して、すべての化合物が、15D10リボスイッチを有するコンストラクトからのルシフェラーゼ発現を用量依存的に増加させた。リボスイッチ15D10に対するフルスルチアミンの活性と比較すると、化合物M10、M16、M19及びM21はフルスルチアミンよりも強力である。M19及びM21は、この種の細胞でリボスイッチ15D10により調節されたルシフェラーゼ発現の誘導において同程度強力である。

30

40

【0 6 2 5】

式Ⅴ及び式ⅤⅠの化合物を、対照化合物としてのベンフォチアミンと共に、HEK293細胞及びAML12細胞の両方で試験した。図9Cに示すように、化合物M30、M31、M32及びM33、ならびにベンフォチアミンには、ルシフェラーゼ発現に対する効果はなかったが、M26、M27、M28、M29及びM34は、Luci-15D10コンストラクトからのルシフェラーゼ発現を増加させ、HEK293細胞ではM34が最も強力な化合物であった。対照的に、AML12細胞では、M30及びM33を除くすべての化合物が、Luci-15D10コンストラクトからのルシフェラーゼ発現を増加させた。これらの2つの細胞型内で一貫して、リボスイッチをオンにする上で、これらの2群の化合物中でM34が最も強力な誘導物質である(図9D)。

50

【0626】

比較的強力な化合物を、リボスイッチの調節におけるそれらの活性について、追加のヒト細胞株でさらに試験した。図9Eに示すように、ヒトARPE-19細胞では、ベンフォチアミンとM32の両方とも、リボスイッチ15D10により調節されたルシフェラーゼ発現の増加における活性を示さなかったが、M10、M19及びM21には、Luci-15D10コンストラクトからのルシフェラーゼ発現の増加においてフルスルチアミンと同等の効力がある。同様に、ベンフォチアミン及びM32にはHepG2細胞での活性はないが、M19、M21及びM10には、12.5 μ Mの濃度で同様の効力がある（図9F）。

【0627】

化合物M34～M123及び化合物M126～M160を、15D10リボスイッチを有するルシフェラーゼコンストラクト（Luci-15D10、配列番号93）を使用するチアミン類似体リボスイッチの調節におけるそれらの活性について、フルスルチアミンを対照化合物として用いてHEK293細胞とAML12細胞の両方で試験した。これらの化合物に应答した、Luci-15D10コンストラクトからのルシフェラーゼ発現の増加を表2及び表3に示す。

【表2】

表2. 50 μ Mでの化合物M34～M123の、リボスイッチ15D10により調節されたルシフェラーゼ発現の倍率増加（同定された化合物で処理した細胞からのルシフェラーゼシグナルを、未処理細胞からのルシフェラーゼシグナルで割った比として計算）。#＝化合物番号。HEK＝HEK293細胞。AML＝AML12細胞。対照＝フルスルチアミン。

#	HEK	AML	#	HEK	AML	#	HEK	AML
M19	676.3	329.5	M59	1.1	1.0	M101	88.6	128.0
M21	618.3	228.6	M62	49.0	109.9	M103	0.9	0.5
M34	163.5	290.6	M63	1.7	19.0	M105	0.2	0.2
M37	76.2	134.3	M64	2.0	3.9	M106	1.2	294.4
M38	1.2	1.0	M65	3.2	67.1	M107	26.0	40.2
M39	102.7	127.2	M66	1.1	0.4	M108	75.8	129.2
M40	83.1	206.0	M67	2.1	0.9	M109	22.6	87.3
M43	10.2	95.3	M68	303.0	209.0	M110	65.7	145.6
M44	176.8	314.1	M70	51.0	235.9	M111	180.7	174.7
M45	1.3	2.9	M72	235.9	295.1	M113	212.9	272.5
M46	1.3	6.0	M73	205.1	200.3	M114	50.1	88.8
M47	25.3	85.1	M76	60.7	134.3	M115	19.9	52.1
M49	414.0	202.3	M79	352.8	358.2	M116	1.3	0.8
M50	93.5	141.8	M82	89.2	73.9	M117	0.8	3.4
M51	392.5	188.6	M88	215.7	355.2	M118	9.3	140.3
M52	363.9	195.1	M91	13.1	150.3	M119	0.9	0.7
M53	2.4	57.0	M92	0.9	23.7	M120	0.5	30.5
M54	3.0	13.9	M97	298.9	126.2	M121	0.9	0.5
M55	2.1	9.0	M98	13.6	57.7	M122	1.3	0.5
M57	1.2	24.4	M99	0.2	0.4	M123	0.4	0.6
M58	1.1	1.5	M100	1.1	0.4	対照	446.2	314.6

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. $50 \mu\text{M}$ でのM126～M160の、リボスイッチ15D10により調節されたルシフェラーゼ発現の倍率増加（同定された化合物で処理した細胞からのルシフェラーゼシグナルを、未処理細胞からのルシフェラーゼシグナルで割った比として計算。＃＝化合物番号。HEK＝HEK293細胞。AML＝AML12細胞。

#	HEK	AML	#	HEK	AML
M113	265.00	348.35	M143	138.05	299.80
M126	147.00	305.39	M145	156.06	60.62
M127	0.46	7.39	M146	53.27	96.56
M128	0.56	7.87	M147	193.36	266.56
M129	10.91	167.48	M148	152.89	288.05
M130	110.40	328.65	M149	175.93	382.94
M131	740.64	508.85	M150	12.27	11.96
M133	99.97	273.22	M151	20.51	231.00
M134	556.94	407.79	M152	68.89	36.62
M135	87.55	44.49	M153	441.91	534.59
M136	132.20	262.53	M155	7.71	117.46
M137	139.56	287.66	M156	0.06	10.13
M138	227.96	195.26	M157	117.52	315.57
M139	37.02	188.39	M158	96.94	235.31
M140	174.69	192.16	M159	85.50	205.55
M141	1.61	3.46	M160	79.51	131.03
M142	85.27	183.85			

10

20

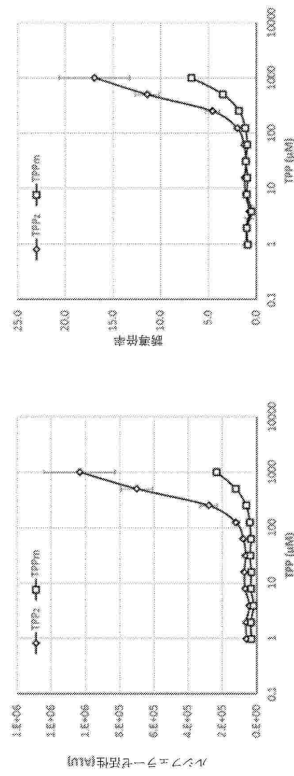
30

40

50

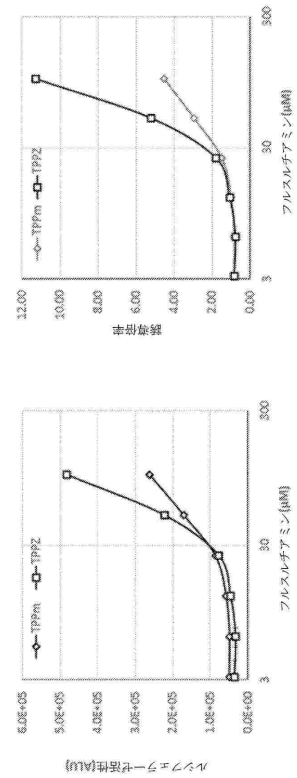
【図面】
【図 1 A】

図 1 A



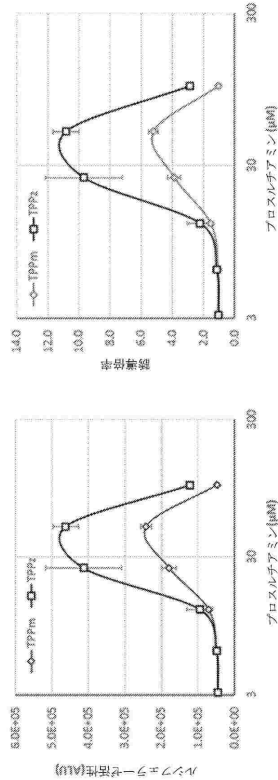
【図 1 B】

図 1 B



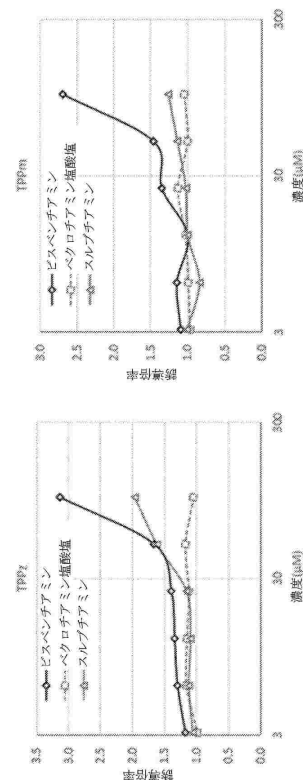
【図 1 C】

図 1 C



【図 1 D】

図 1 D



10

20

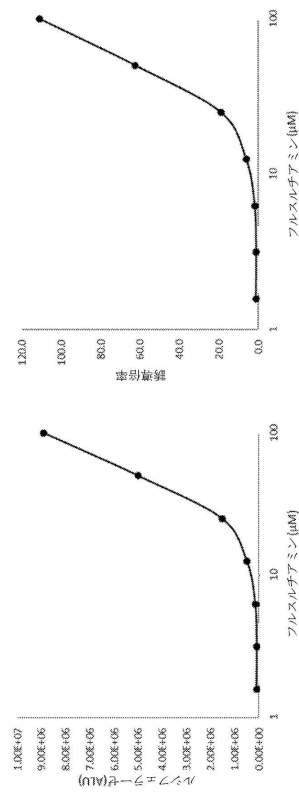
30

40

50

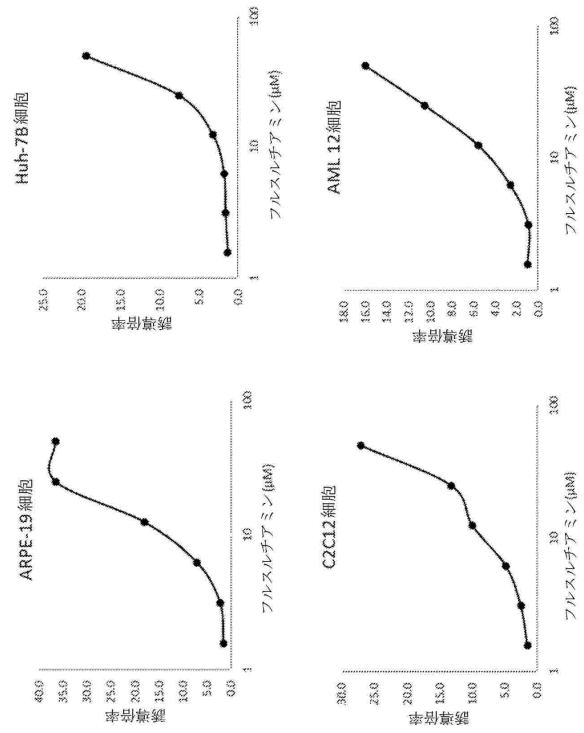
【図 2 A】

図 2 A



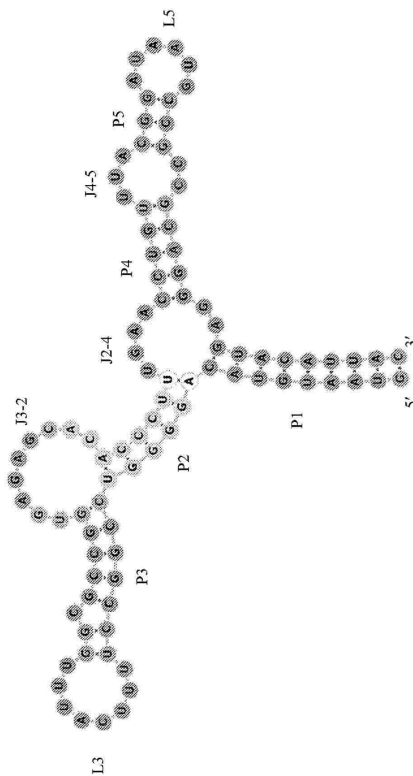
【図 2 B】

図 2 B



【図 3 A】

図 3 A



【図 3 B】

図 3 B

1464 アプタマー ACAGGGGTCGGGCTTTTCATTTGGGCGCGGTGAGACACACCCCTTTGAACTGTGTTACGGATATGCGCGCGAGGAGT
ライブラリー-A1 ACAGGGGTCGGGCTTTTCATTTGGGCGCGGTGAGACACACCCCTTTGAACTGTGTTACGGATATGCGCGCGAGGAGT
ライブラリー-A2 ACNCGGGGTCGGGCTTTTCATTTGGGCGCGGTGAGACACACCCCTTTNNNNCCCTGTGTTACGGATATGCGCGCGAGGAGT
ライブラリー-A3 ACAGGGGTCGGGCTTTTCATTTGGGCGCGGTGAGNNNNCCCTTTGAACTGTGTTACGGATATGCGCGCGAGGAGT

10

20

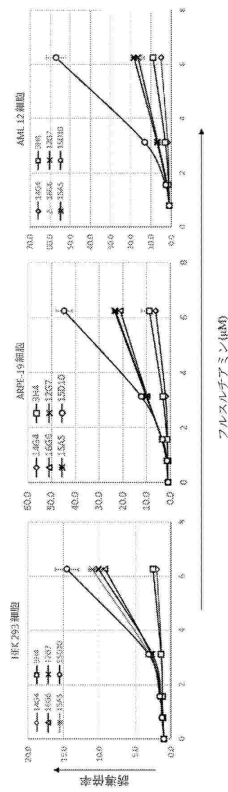
30

40

50

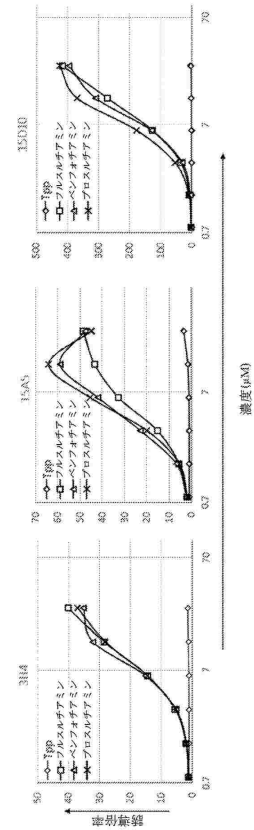
【図 6 A】

図 6 A



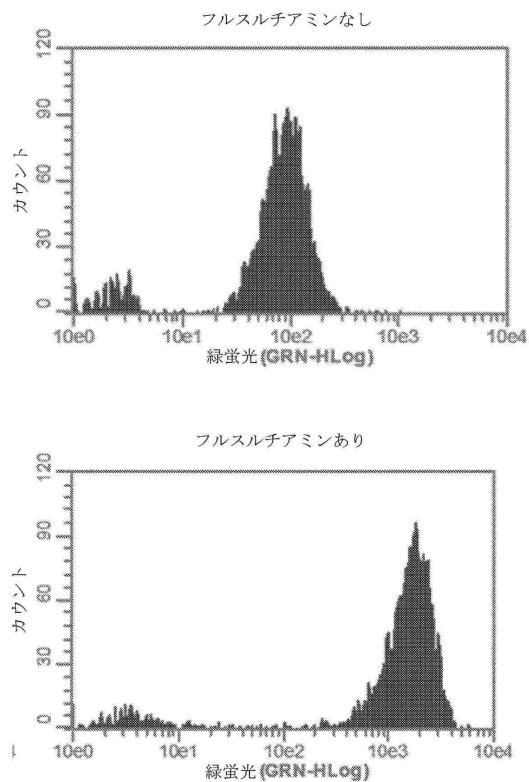
【図 6 B】

図 6 B



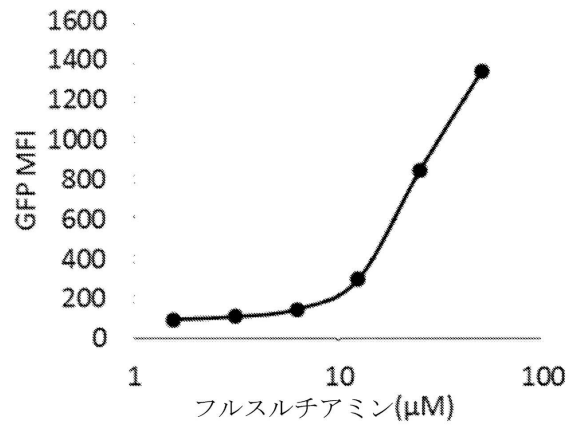
【図 7 A】

図 7 A



【図 7 B】

図 7 B



10

20

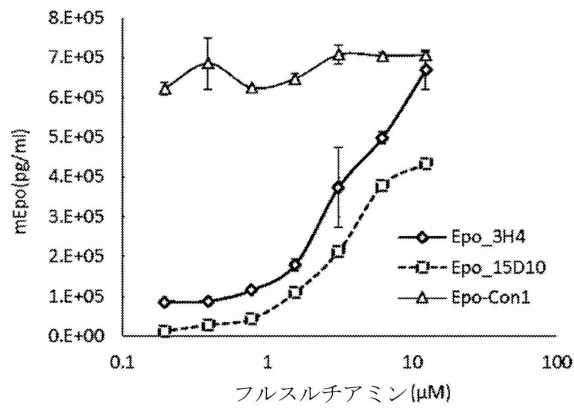
30

40

50

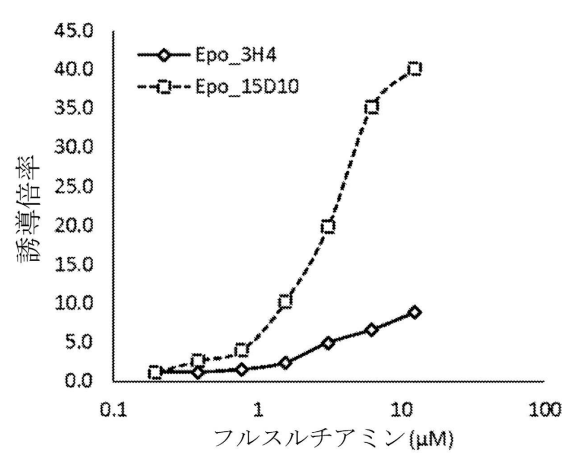
【図 7 C】

図 7 C



【図 7 D】

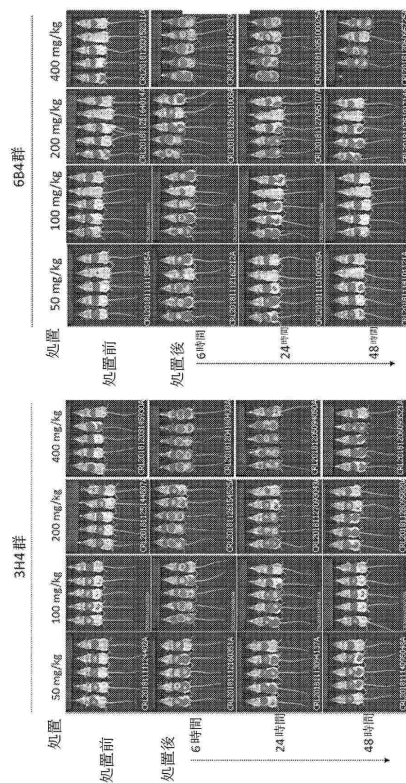
図 7 D



10

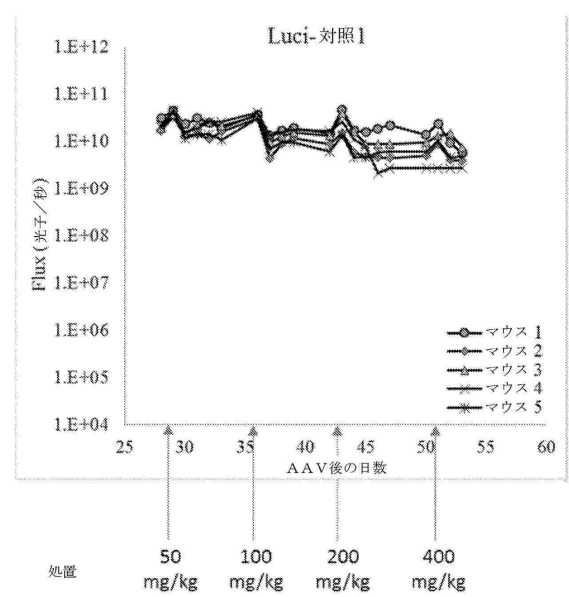
【図 8 A】

図 8 A



【図 8 B - 1】

図 8 B - 1



20

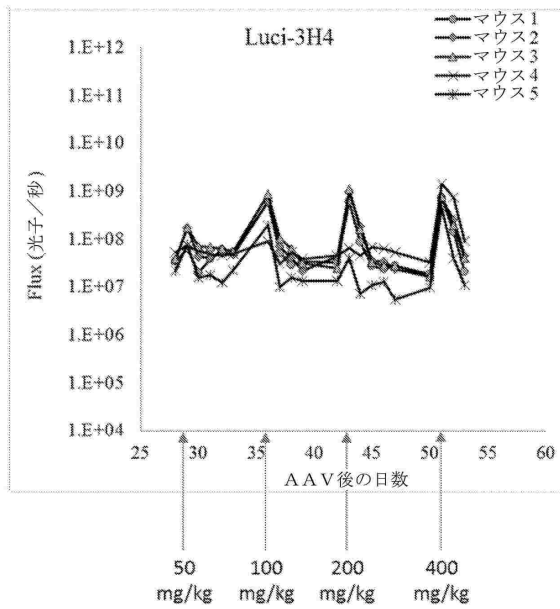
30

40

50

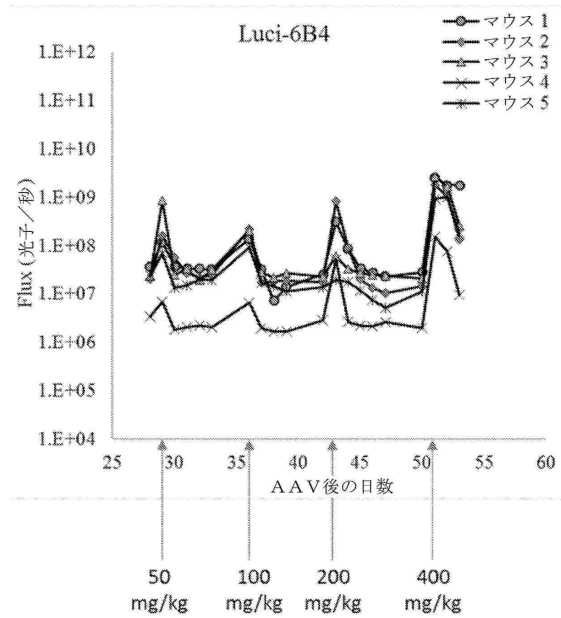
【図 8 B - 2】

図 8 B - 2



【図 8 B - 3】

図 8 B - 3

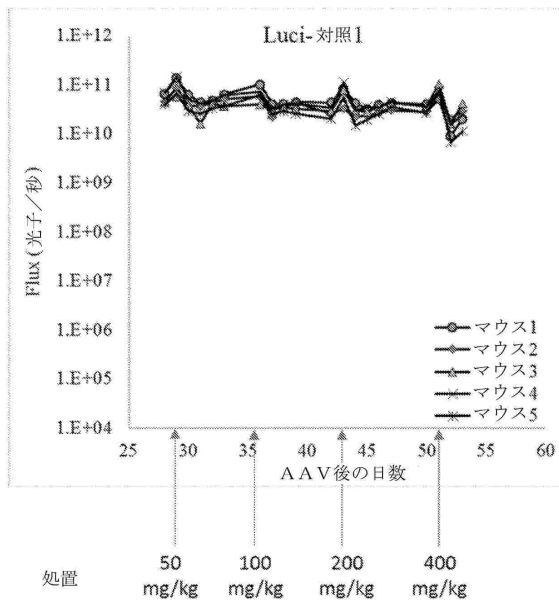


10

20

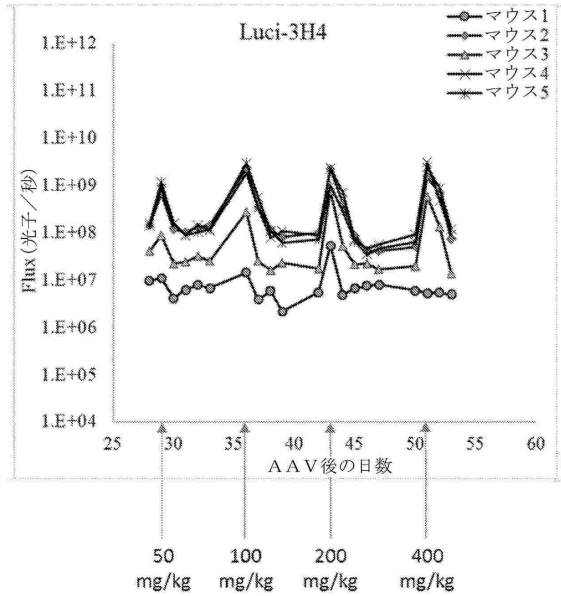
【図 8 C - 1】

図 8 C - 1



【図 8 C - 2】

図 8 C - 2



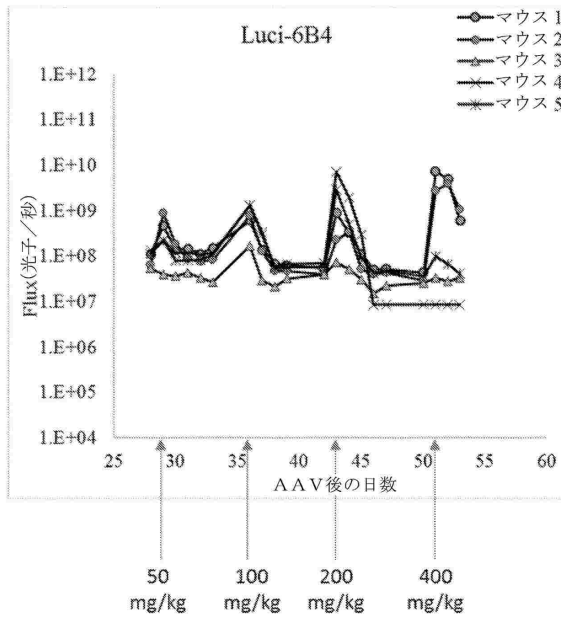
30

40

50

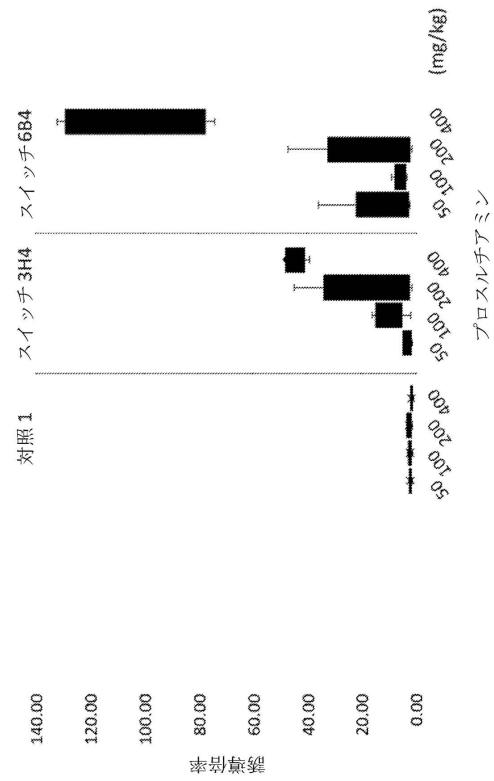
【図 8 C - 3】

図 8 C - 3



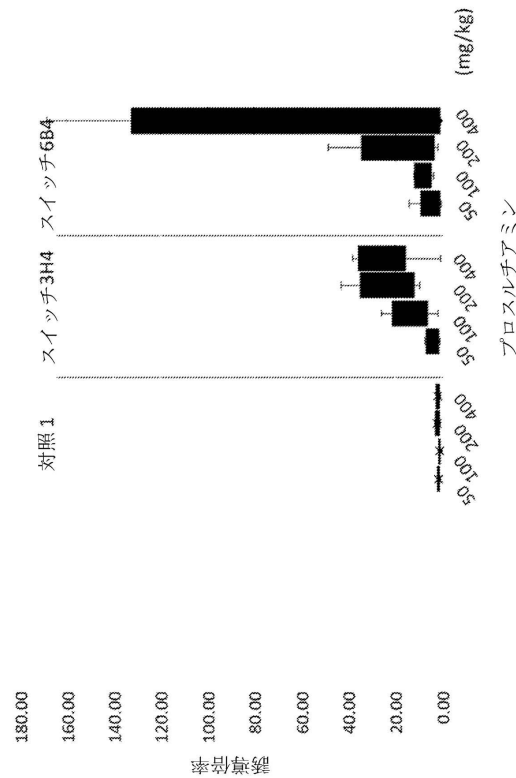
【図 8 D】

図 8 D



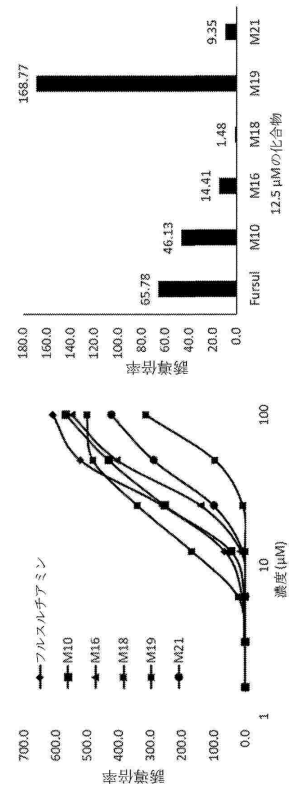
【図 8 E】

図 8 E



【図 9 A】

図 9 A



10

20

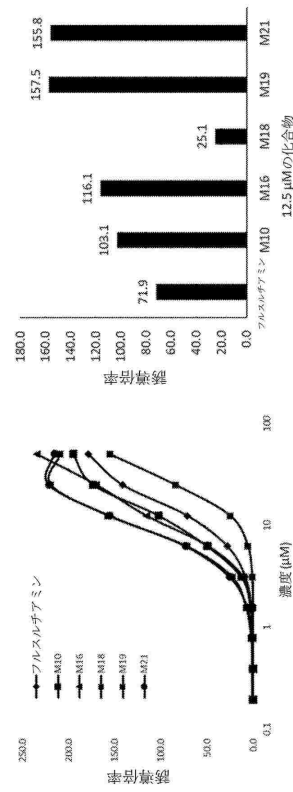
30

40

50

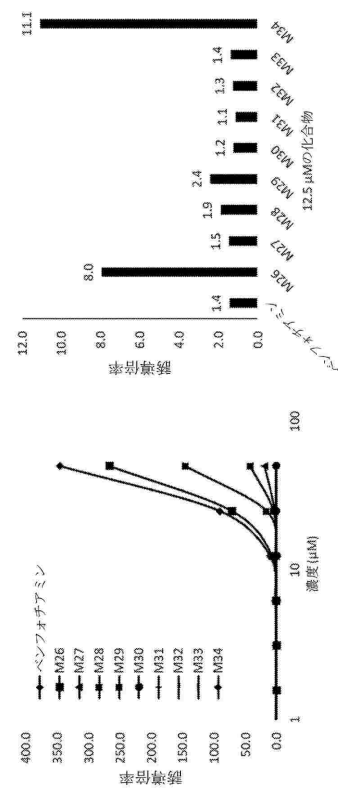
【図 9 B】

図 9 B



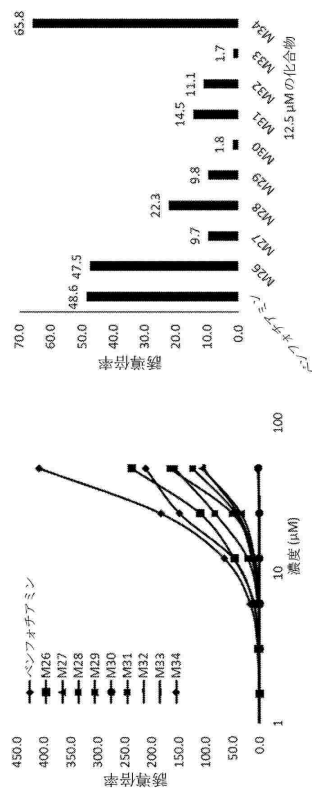
【図 9 C】

図 9 C



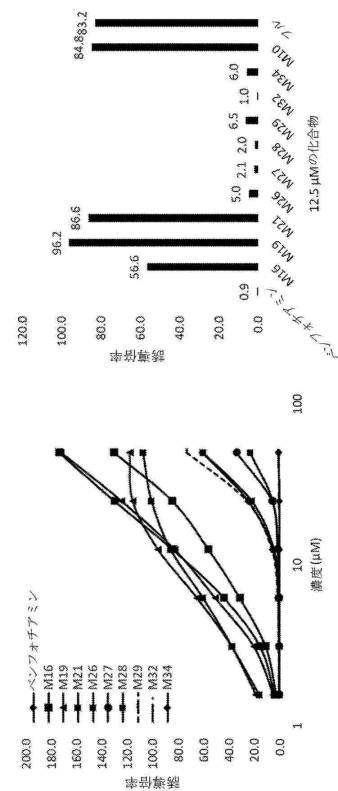
【図 9 D】

図 9 D



【図 9 E】

図 9 E



10

20

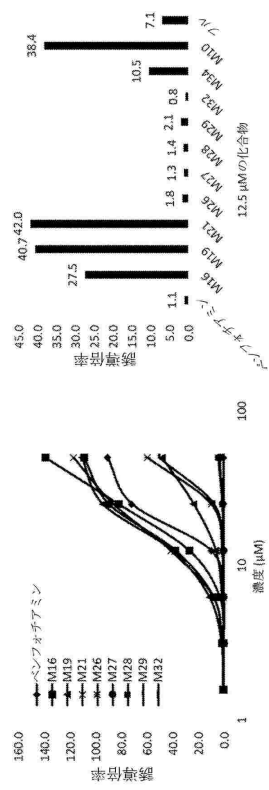
30

40

50

【図 9 F】

図 9 F



【配列表】

0007542644000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100182730
弁理士 大島 浩明
- (72)発明者 シュエツイ クオ
アメリカ合衆国, ニューヨーク 11771, オイスター ベイ, ウッドランド ドライブ 62
- (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 10003, ニューヨーク, イースト テンス ストリート 14
- (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 08550, ウェスト ウィンザー, グリーンフィールド ドライブ ノース 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 08540, プリンストン, ギャラップ ロード 260
- 審査官 松本 淳
- (56)参考文献 EDWARDS, T. et al, Crystal Structures of the Thi-Box Riboswitch Bound to Thiamine Pyrophosphate Analogs Reveal Adaptive RNA-Small Molecule Recognition, Structure, 2006年, Vol.14, pp.1459-1468
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/00-1/70
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq