(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106714908 A
(43)申请公布日 2017.05.24

(21)申请号 201580050560.0
(22)申请日 2015.07.17
(30)优先权数据
62/026,266 2014.07.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.03.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/040902 2015.07.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/011348 EN 2016.01.21
(71)申请人 斯克利普斯研究院
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 马修·D·迪斯尼
苏珊娜·G·勒祖茨泽克
(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
代理人 樊英如 张静
(51)Int.Cl.
A61P 21/00(2006.01)

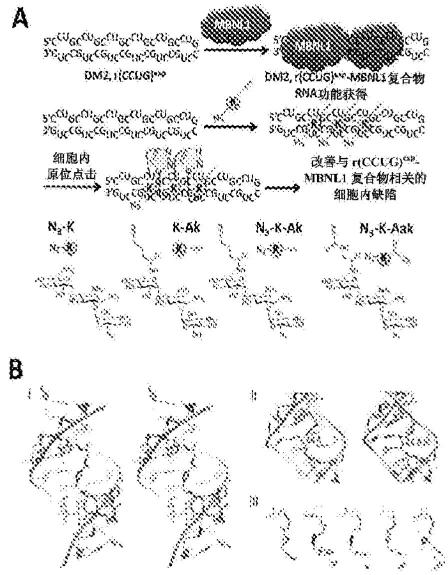
权利要求书2页 说明书23页 附图38页

(54)发明名称

原位自组装的毒性RNA抑制剂

(57)摘要

通过使用细胞作为反应容器和引起疾病的RNA作为催化剂,可以细胞内组装RNA功能的有效调节剂。当设计功能的小分子效应物时,必须在渗透性和效力之间达到平衡。低分子量化合物更具渗透性,而较高分子量化合物更有效。如果低分子量分子可以通过经由在表达遗传缺陷的细胞中与靶结合所催化的反应转化成有效的多价配体,则两种类型的化合物的优点可以协同。我们证明这种方法在细胞内确实可行。具有精确定位的炔和叠氮化物部分的小分子模块结合r(CCUG)^{exp}(强直性肌营养不良2型(DM2)的致病因子)的相邻内部环,并且通过1,3Huisgen偶极环加成反应转化成DM2 RNA功能障碍的低聚的有效抑制剂,点击化学的变体。此外,我们显示这种方法适用于导致强直性肌营养不良1型(DM1)的r(CUG)重复RNA。点击化学方法还允许通过使用r(CUG)重复作为催化剂在现场合成FRET传感器。此外,显示可以通过使用称为Chem-CLIP和Chem-CLIP-Map的反应性方法来鉴定患者来源的细胞中的小分子结合位点。最后,显示靶向r(CUG)扩增的小分子可以被设计为通过用核酸切割模块附加小分子来切割这种RNA。



CN 106714908 A

1.一种毒性疾病诱导RNA的功能的调节剂,其中所述RNA包含扩增的重复序列,所述调节剂包含RNA结合寡聚体,所述RNA结合寡聚体从细胞可渗透的RNA扩增的重复序列结合模块的缩合反应在活细胞内原位形成,其中所述细胞可渗透的模块包含炔烃和叠氮化物部分,或者所述RNA结合寡聚体从一对细胞可渗透的RNA扩增的重复序列结合模块的缩合反应在活细胞内原位形成,其中第一模块包含炔烃部分和第二模块包含叠氮化物部分,所述缩合反应通过炔烃和叠氮化物部分之间的1,3Hisgen偶极环加成反应在RNA扩增的重复结合模块之间发生。

2.如权利要求1所述的调节剂,其中所述毒性RNA包含由RNA扩增的重复序列r(CCUG)^{exp}形成的相邻的内部环。

3.如权利要求2所述的调节剂,其中每个细胞可渗透的模块包含修饰的卡那霉素部分。

4.如权利要求3所述的调节剂,其中所述细胞可渗透的模块是N_3-K-Ak、或N_3-K-AaK,或一起使用的一对细胞可渗透的模块是N_3-K和K-Ak。

5.如权利要求2-4中任一项所述的调节剂,其用于治疗强直性肌营养不良2型(DM2)。

6.一种形成与所述毒性RNA结合的权利要求2所述的调节剂的方法,其包括将包含所述毒性RNA的所述活细胞暴露于细胞可渗透的RNA扩增的重复序列结合模块,其中所述细胞可渗透的模块包含炔烃和叠氮化物部分,或者将包含所述毒性RNA的所述活细胞暴露于一对细胞可渗透的RNA扩增的重复序列结合模块,其中第一模块包含炔烃部分和第二模块包含叠氮化物部分。

10.如权利要求1所述的调节剂,其中所述毒性RNA包含由RNA扩增的重复r(CUG)^{exp}形成的相邻的内部环。

11.如权利要求10所述的调节剂,其中每个细胞可渗透的模块包含双杂芳基部分,优选双-苯并咪唑部分。

12.如权利要求11所述的调节剂,其中所述细胞可渗透的模块是N_3-2H-K4NMeS-Aak。

13.如权利要求10-12中任一项所述的调节剂,其用于治疗强直性肌营养不良1型(DM1)。

14.一种形成与所述毒性RNA结合的权利要求11所述的调节剂的方法,其包括将包含所述毒性RNA的所述活细胞暴露于细胞可渗透的RNA扩增的重复序列结合模块,其中所述细胞可渗透的模块包含炔烃和叠氮化物部分,或者将包含所述毒性RNA的所述活细胞暴露于一对细胞可渗透的RNA扩增的重复序列结合模块,其中第一模块包含炔烃部分和第二模块包含叠氮化物部分。

15.一种切割毒性疾病诱导RNA的方法,其中所述RNA包含扩增的重复序列,包含进一步包含核酸切割部分的权利要求1-4或10-12中任一项所述的调节剂的调节剂。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述核酸切割部分是博来霉素的衍生物。

17.一种治疗患者的疾病的方法,其中所述疾病是由具有扩增的重复序列的毒性RNA的存在诱导的,所述方法包括在患者的细胞内形成权利要求1所述的调节剂。

18.如权利要求17所述的方法,其中所述疾病是强直性肌营养不良2型(DM2),所述毒性RNA包含r(CCUG)^{exp}扩增的重复序列,并且所述调节剂是从以下模块原位形成的:包含带有炔烃和叠氮基团的卡那霉素衍生物的一个细胞可渗透的模块,或者各自包含卡那霉素衍生物的一对细胞可渗透的模块,第一模块带有炔基和第二模块带有叠氮基团。

19.如权利要求17所述的方法，其中所述疾病是强直性肌营养不良1型(DM1)，所述毒性RNA包含r(CUG)^{exp}扩增的重复序列，并且所述调节剂是从以下模块原位形成的：带有炔烃和叠氮基团的一个细胞可渗透的模块，或者各自包含双-苯并咪唑衍生物的一对细胞可渗透的模块，第一模块带有炔基和第二模块带有叠氮基团。

20.如权利要求18或19所述的方法，其中所述调节剂还包含核酸切割部分。

原位自组装的毒性RNA抑制剂

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2014年7月18日提交的美国临时申请序列号62/026,266的优先权，其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0002] RNA功能障碍通过各种机制引起疾病，该机制包括促凋亡蛋白的微RNA沉默、[1]异常蛋白的翻译、[2]和功能获得。[3]然而，很难设计RNA功能或先导物治疗的小分子化学探针。如果广泛适用的方法被开发用于给药具有小分子的非核糖体RNA，它可能在化学生物学和药物化学中具有重要的应用。[4]一类RNA介导的疾病是由扩增的重复RNA或微卫星疾病引起的。有多于20种已知的微卫星疾病，包括强直性肌营养不良(DM)和肌萎缩性侧索硬化(Lou Gehrig病；ALS)。[5]重复的细胞后果是多样的并且可以包括蛋白质、RNA和DNA水平的改变。强直性肌营养不良2型(DM2)是由r(CCUG)重复扩增(r(CCUG)^{exp})的毒性功能获得引起的。强直性肌营养不良1型(DM1)是由r(CUG)重复扩增(r(CUG)^{exp})的毒性功能获得引起的。

发明内容

[0003] 我们设计了引起基于RNA基序-小分子相互作用的强直性肌营养不良2型(DM2)的RNA抑制剂或调节剂。[6]DM2由位于锌指蛋白9(ZNF9)前mRNA的内含子1中的r(CCUG)重复扩增(r(CCUG)^{exp})的毒性功能获得引起。[7]RNA折叠成为在茎中含有5’CCUG/3’GUCC(2×2个核苷酸内部环)的重复单元的发夹结构。所述环形成盲肌样(muscleblind-like)1蛋白(MBNL1)的高亲和力结合位点，其是选择性前mRNA剪接的调节剂，其在结合后失活(图1A)。我们设计的r(CCUG)^{exp}抑制剂是基于在6’位被酰化的卡那霉素A衍生物，其以高亲和力结合5’CCUG/3’GUCC。值得注意的是，所述6’胺的酰化消除结合到rRNA。[8]实际上，卡那霉素衍生物和其模块化组装的(或多价)化合物改善细胞模型中的DM2相关的缺陷。[6a]如观察的其他重复扩增，模块化组装的化合物是细胞功能障碍的更有效的抑制剂，可能是由于它们的高亲和力、高选择性和它们螯合在靶标上的较大表面积。[6a]即使多价化合物在体外更有效和更有选择性，在一些情况下，细胞内(in cellulo)效力的下降与价态(valency)成函数关系，因为它们具有较低的细胞渗透性。[9]因此，必须仔细平衡配体大小、效力和渗透性。

[0004] 我们还使用类似的方法设计引起强直性肌营养不良1型(DM1)的RNA抑制剂或调节剂。在这种情况下，DM1是由位于强直性肌营养不良蛋白激酶(DMPK)mRNA的3’非翻译区(UTR)中的r(CUG)重复扩增(r(CUG)^{exp})的毒性功能获得引起。[7]用于DM1的本发明的其它方面包括：(i)设计靶向r(CUG)^{exp}的优化的二聚化合物；(ii)靶向r(CUG)^{exp}并允许靶标确认(结合RNA)的共价小分子和结合所述小分子的在所述RNA中的位点；(iii)使用细胞内点击化学来原位合成高度有效且选择性的抑制剂；(iv)荧光共振能量转移(FRET)方法以使用r(CUG)^{exp}作为合成FRET传感器的催化剂；和(v)设计靶向于r(CUG)^{exp}的在来源于患者的细胞中切割r(CUG)^{exp}的小分子。

[0005] 在各种实施方式中，本发明提供了在活细胞内形成RNA功能调节剂的方法，该方法

包括将细胞暴露于细胞可渗透的一个或两个小分子模块，单个模块带有炔和叠氮基团，或两个模块分别包含分别结合强直性肌营养不良2型(DM2)和1型(DM1)的致病因子r(CCUG)^{exp}或r(CUG)^{exp}中相邻内部环的炔烃和叠氮化物部分(Day,J.W.,和Ranum,L.P.(2005)RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies,Neuromuscul.Disord.15,5-16.;Miller,J.W.,Urbinati,C.R.,Teng-Umnuay,P.,Stenberg,M.G.,Byrne,B.J.,Thornton,C.A.,和Swanson,M.S.(2000)Recruitment of human muscleblind proteins to(CUG)$_{(n)}$ expansions associated with myotonic dystrophy,EMBO J.19,4439-4448;Mankodi,A.,Takahashi,M.P.,Jiang,H.,Beck,C.L.,Bowers,W.J.,Moxley,R.T.,Cannon,S.C.,和Thornton,C.A.(2002)Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of Clcn-1chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy,Mol.Cell 10,35-44)，使得所述一个模块或所述两个模块经由1,3Huisgen偶极环加成反应通过炔和叠氮基在1,3Huisgen偶极环加成反应中的缩合转化为低聚的、有效的DM1或DM2RNA功能障碍抑制剂。因此，低聚调节剂的单体前体可以是在同一分子上显示叠氮化物和炔单元的单一化合物，所述单一化合物可以结合相邻位点并进行1,3-Huisgen偶极环加成反应，或者是一对分子结构，其中之一具有炔基并且另一个具有叠氮基。

[0006] 在各种实施方式中，本发明还提供在活细胞内形成RNA功能调节剂的方法，该方法包括将所述细胞暴露于细胞可渗透的小分子模块，其中所述模块含有炔烃和叠氮化物部分两者。在各种实施方式中，本发明还提供RNA功能调节剂，其通过将分别含有强直性肌营养不良2型(DM2)和1型(DM1)的致病因子RNA扩增重复序列r(CCUG)^{exp}或r(CUG)^{exp}的细胞暴露于细胞可渗透的一个或多个RNA延伸重复结合模块而形成，所述两个模块分别包含炔和叠氮化物部分，其可通过Huisgen 1,3-偶极环加成反应缩合以形成干扰毒性RNA的功能的低聚调节剂。对于用于治疗DM2的r(CCUG)^{exp}调节剂，细胞可渗透模块可以包含卡那霉素类似物。对于用于治疗DM1的r(CUG)^{exp}调节剂，细胞可渗透模块可包含双苯并咪唑或其它杂芳基化合物。

附图说明

[0007] 图1.细胞内，原位点击化学以合成引起DM2的RNA的有效抑制剂。A，DM2是由结合并螯合盲肌样1蛋白(MBNL1)的r(CCUG)重复引起的。含有叠氮和炔官能团的小分子(N_3-K、K-Ak、N_3-K-Ak和N_3-K-AaK)结合r(CCUG)^{exp}中的相邻位点并进行Huisgen偶极环加成反应。B，结合模拟r(CCUG)^{exp}的可点击模块的分子动力学(MD)模拟模型。BI，构象搜索揭示由结合到相邻位点的K模块呈现的叠氮基和炔基之间的紧密接近。BII，来自N_3-K和K-Aak的1,4-三唑加合物的MD模拟中的低能态显示在立体视图中。RNA和K之间的氢键以虚线显示。BIII，显示其他接头模型的MD模拟的低能态快照。

[0008] 图2.鉴定细胞内点击反应的程度和可点击小分子的靶标。A，ChemReactBIP的示意图，一种鉴定小分子的细胞靶标的方法。通过使用具有单个N_3基团的生物素化单体参与点击反应进行研究，或通过使用N_3-K-生物素进行研究，其允许通过使细胞裂解物通过链霉亲和素(streptavidin)树脂而分离点击的低聚体和结合的RNA靶标。B，仅在表达r(CCUG)$_{300}$的细胞中合成的牵出的(pulled-down)、模板化的小分子产物的ChemReactBIP质谱分析的结

果。C,ChemReactBIP的结果,其中点击的产物的RNA靶标被分离并通过qRT-PCR分析。如通过双尾学生t检验(n=3)所确定的:“*”表示$p<0.05$;“**”表示$p<0.01$;“***”表示$p<0.001$。

[0009] 图3.评价细胞内原位点击对DM2相关缺陷的作用的细胞研究的结果。A,在用各种化合物处理后评价用于抑制$r(CCUG)_{300}$的细胞核聚集点(nuclear foci)形成的点击化合物。B,桥连整合因子1(BIN1)前mRNA外显子11在健康细胞和表达$r(CCUG)_{300}$的细胞中的选择性剪接的示意图。C,通过模板化点击反应来拯救BIN1剪接缺陷。顶部,在存在和不存在$r(CCUG)_{300}$的情况下,BIN1剪接产品的有代表性的凝胶图像。底部,在处理的和未处理的细胞中BIN1剪接模式的定量。每种化合物的浓度以μM表示在相应的柱上方。对于N_3-K+K-Ak,5μM表示每种化合物的浓度。如通过双尾学生t检验(n≥3)所确定的:“*”表示$p<0.05$;“**”表示$p<0.01$;“***”表示$p<0.001$。

[0010] 图4.用于N_3-K和K-Ak的体外点击反应的RNA的二级结构。

[0011] 图5.在存在和不存在$r(CCUG)_{12}$的情况下,N_3-K和K-Ak之间的体外点击反应的LC-MS分析的结果。这些数据显示在$r(CCUG)_{12}$存在下,而非在其不存在下,形成K二聚体。

[0012] 图6.在存在和不存在$r(CCUG)_{12}$、$r(AUUCU)_{12}$、$r(CAG)_{12}$、$r(CGG)_{12}$、$r(CUG)_{12}$、具有完全配对茎的RNA发夹和啤酒酵母tRNA的情况下,N_3-K和K-Ak之间的体外点击反应的LC-MS分析的结果。这些数据表明K二聚体的形成由$r(CCUG)_{12}$(n=3)选择性催化。

[0013] 图7.在存在和不存在$r(CCUG)_{300}$的情况下,N_3-K和K-Ak之间的细胞内点击反应的LC-MS分析的结果。这些数据显示在$r(CCUG)_{300}$存在下,而非在其不存在下,形成K二聚体。如通过双尾学生t检验(n=3)所确定的:“*”表示$p<0.05$。

[0014] 图8.在存在和不存在$r(CCUG)_{300}$的情况下,N_3-K和N_3-K-Ak之间的细胞内点击反应的LC-MS分析的结果。这些数据显示在$r(CCUG)_{300}$存在下,而非在其不存在下,形成二聚体和三聚体。N_3-K用于限制聚合的程度以促进LC-MS分析(参见“Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry”)。如通过双尾学生t检验(n=3)所确定的:“*”表示$p<0.05$;“**”表示$p<0.01$。

[0015] 图9.在存在和不存在$r(CCUG)_{300}$的情况下,N_3-K和N_3-K-Aak之间的细胞内点击反应的LC-MS分析的结果。这些数据显示在$r(CCUG)_{300}$存在下,而非在其不存在下,形成二聚体和三聚体。N_3-K用于限制聚合的程度以促进LC-MS分析(参见“Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry”)。如通过双尾学生t检验(n=3)所确定的:“*”表示$p<0.05$;“**”表示$p<0.01$。

[0016] 图10.在存在和不存在$r(CCUG)_{300}$的情况下,来自N_3-K-生物素和K-Ak之间的细胞内点击反应的牵出的、生物素标记的化合物的LC-MS分析的结果。这些数据显示在$r(CCUG)_{300}$存在下,而非在其不存在下,形成生物素化的K二聚体。如通过双尾学生t检验(n=3)所确定的:“**”表示$p<0.01$。

[0017] 图11.在存在和不存在$r(CCUG)_{300}$的情况下,来自N_3-K-生物素和N_3-K-Ak之间的细胞内点击反应的牵出的、生物素标记的化合物的LC-MS分析的结果。这些数据显示在$r(CCUG)_{300}$存在下,而非在其不存在下,形成二聚体和三聚体。N_3-K-生物素用于限制聚合物形成的程度并促进LC-MS分析(参见“Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry”)。如通过双尾学生t检验(n=3)所确定的:“*”表示$p<0.05$。

[0018] 图12.在存在和不存在$r(CCUG)_{300}$的情况下,来自N_3-K-生物素和N_3-K-Aak之间的细

胞内点击反应的牵出的、生物素标记的化合物的LC-MS分析的结果。这些数据显示在r(CCUG)$_{300}$存在下，而非在其不存在下，形成二聚体和三聚体。N_3-K-生物素用于限制聚合物形成的程度并促进LC-MS分析(参见“Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry”)。如通过双尾学生t检验(n＝3)所确定的："*"表示p<0.05；"**"表示p<0.01。

[0019]　图13.顶部，显示K衍生物对BIN1选择性剪接模式的影响的代表性的凝胶图像。N_3-K和K-Ak的1:1混合物将BIN1模式改善至与预合成二聚体类似的程度。底部，在经处理的和未处理的细胞中BIN1选择性剪接模式的定量。将单体N_3-K和K-Ak的活性与预合成的二聚体的活性以及每种单体的等摩尔混合物的活性进行比较。预合成的二聚体最大程度地改善剪接，而叠氮化物和炔单体的混合物比单独的每种单体更大程度地改善剪接。如通过双尾学生t检验(n≥3)所确定的："*"表示p<0.05；"***"表示p<0.001。

[0020]　图14.顶部，用N_3-K-Ak处理的细胞中BIN1剪接模式的代表性的凝胶图像。当用10μM和1μM N_3-K-Ak处理细胞时，观察到剪接模式的改善。中间，用N_3-K-Aak处理的细胞中BIN1剪接模式的代表性的凝胶图像。当用10μM、1μM和100nM N_3-K-Ak处理细胞时，观察到剪接模式的改善。底部，未处理的细胞和用可低聚体化的K化合物处理的细胞中BIN1剪接模式的定量。N_3-K-Aak是评价的最有效的化合物。它在纳摩尔浓度下显著改善BIN1前mRNA剪接缺陷，并且比K单体有效1000倍。如通过双尾学生t检验(n≥3)所确定的："*"表示p<0.05；"**"表示p<0.01；"***"表示p<0.001。

[0021]　图15.顶部，显示K衍生物不影响不表达r(CCUG)$_{300}$的细胞中的BIN1剪接模式的代表性的凝胶图像。底部，在不表达r(CCUG)$_{300}$的细胞中BIN1剪接模式的定量。在不存在r(CCUG)$_{300}$的情况下，评估的化合物没有对BIN1前mRNA剪接模式产生统计学显著的影响，如通过双尾学生t检验(n≥3)所确定的。测试化合物的浓度在括号中提供(mM)。

[0022]　图16显示了K 1,4二聚体的合成方案。

[0023]　图17显示了K 1,5二聚体的合成方案。

[0024]　图18显示了N_3-K-Ak的合成方案。

[0025]　图19显示了N_3-K-Aak的合成方案。

[0026]　图20显示了N_3-K-生物素的合成方案。

[0027]　图21.DM1的毒性RNA-蛋白复合致病因子和用于改善和研究疾病相关的细胞功能障碍和细胞内靶标选择性的设计小分子。

[0028]　图22.用于代谢稳定性的化合物的先导物优化。化合物2H-K4NMe在微粒体中不稳定(右下图)，并且不稳定性被追踪至亚氨基质子，其通过N-甲基化除去以提供2H-K4NMeS，其在微粒体中是稳定的。

[0029]　图23.设计小分子2H-K4NMeS改善了源于患者的细胞系(左)和DM1小鼠模型(右)中与DM1相关的前mRNA剪接缺陷。Mankodi,A.,Logigian,E.,Callahan,L.,McClain,C.,White,R.,Henderson,D.,Krym,M.,and Thornton,C.A.(2000)Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat.Science 289,1769-1773。

[0030]　图24.将设计小分子2H-K4NMeS附加有反应性模块(CA)和纯化标签(生物素)以产生2H-K4NMeS-CA-生物素。该化合物与细胞中结合的RNA形成交联(共价键)，并允许它们被纯化和定量以通过使用称为化学交联和通过牵出分离的方法(Chem-CLIP)来验证所述小分

子的靶标。A，探针化合物的结构。B，显示探针选择性地与r(CUG)^{exp}反应的体外数据。C，2H-K4NMeS-CA-生物素改善细胞中与DM1相关的前mRNA剪接缺陷。D，如通过竞争性Chem-CLIP (C-Chem-CLIP)确定的，非共价化合物2H-K4NMeS在与r(CUG)^{exp}靶标的反应中可与2H-K4NMeS-CA-生物素竞争。E，通过2H-K4NMeS-CA-生物素牵出的RNA靶标显示化合物结合引起疾病的扩增的转录物，而不是具有较短(非致病性长度)r(CUG)重复的其它RNA。

[0031] 图25.化学交联和通过牵出分离以及配体结合位点绘制(Chem-CLIP-Map)。与2H-K4NMeS-CA-生物素反应的DMPK mRNA通过使用与mRNA中不同区域互补的寡核苷酸用核糖核酸酶H位点特异性消化。消化后，与2H-K4NMeS-CA-生物素反应的RNA的区域被捕获在链霉亲和素树脂上，并通过使用qRT-PCR定量。数据显示2H-K4NMeS-CA-生物素结合到DMPK mRNA中的r(CUG)^{exp}。

[0032] 图26.测试以验证原位体外药物合成的化合物的结构。

[0033] 图27.通过使用核酸作为催化剂的体外寡聚药物合成的数据。A，探测接头长度以确定反应的最佳距离的结果；B，在各种RNA存在下，在N_3-2H-K4NMeS和2H-K4NMeS-氨基己酸酯Aak之间的体外药物合成的评价。

[0034] 图28.可以形成在单个r(CUG)^{exp}结合配体上具有叠氮和炔位点的寡聚体物质的设计化合物N_3-2H-K4NMeS-Aak。

[0035] 图29.通过使用N_3-2H-K4NMeS-Aak(图28)和Chem-React-BIP方案以牵出和定量靶标的细胞内点击化学。

[0036] 图30.细胞内点击化合物改善A，前mRNA剪接，B，细胞核聚集点和C，与DM1相关的翻译缺陷的能力。

[0037] 图31.与博莱霉素缀合以允许在DM1患者来源的细胞中靶向切割r(CUG)^{exp}的2H-K4NMeS衍生物。A，化合物的结构；B，qRT-PCR数据以显示靶标被切割；C，竞争性切割数据，其中将2H-K4NMeS-博来霉素A5和2H-K4NMeS共同添加至细胞，表明2H-K4NMeS可抑制靶向r(CUG)^{exp}切割。D，下游DM1相关的前mRNA剪接缺陷的改善。

[0038] 图32.通过使用r(CUG)^{exp}作为催化剂合成荧光共振能量转移(FRET)传感器的FRET实验方案。A，方法的示意图。B，用于这些实验的化合物。C，代表性数据。

[0039] 图33.2H-K4NMeS的合成方案。

[0040] 图34.2H-K4NMeS-CA-生物素的合成方案。

[0041] 图35.2NAc-K4NMeS-CA-生物素的合成方案。

[0042] 图36.2H-K4NMeS-博来霉素A5的合成方案。

[0043] 图37.N_3-2H-K4NMeS的合成方案。

[0044] 图38.N_3-2H-K4NMeS-生物素的合成方案。

[0045] 图39.2H-K4NMeS活化炔的合成方案。

[0046] 图40.N_3-2H-K4NMeS-Aak的合成方案。

[0047] 图41.生物素N_3-2H-K4NMeS-Aak的合成方案。

[0048] 图42.N_3-2H-K4NMeS-TAMRA的合成方案。

[0049] 图43.FAM-2H-K4NMeS-Aak的合成方案。

具体实施方式

[0050] 鉴于上述考虑，我们寻求开发一种策略来靶向RNA重复扩增，其可以利用小分子“模块”的细胞通透性以及较高分子量、多价化合物的效力和选择性。原位点击化学，通过1，3Huisgen偶极环加成反应(HDCR)，可以提供这样的策略。也就是说，两个模块将结合靶标中的相邻位点，使另外的未反应的基团紧密接近以形成共价键；特别是叠氮化物和炔部分反应形成稳定的三唑。[10]实际上，该方法已经在体外用于靶向乙酰胆碱酯酶和DNA小沟槽。[10-11]将这种方法转化到细胞系统可以是高度有效的，使得能够开发高选择性的化学生物学探针，但是这在之前还没有得到证明。扩增的重复RNA可能是这种方法的理想靶标，因为它们是模块化的，像它们将模板化的化合物一样(图1A)。

[0051] 通过使用二聚6’-N-酰化卡那霉素A化合物(2K-4)与r(CCUG)重复的结合的模型实现r(CCUG)^{exp}的细胞内、原位点击方法的发展。该模型的分析显示6″位的叠氮基(N_3-K)和6’位的炔基(K-Ak)可以在足够接近的范围内，以在结合到r(CCUG)^{exp}中的相邻的2x2核苷酸内部环后反应(图1B)。因此，当N_3-K和K-Ak以相等的量混合时，可形成二聚体；同样，显示6″叠氮化物和6’炔两者的衍生物(N_3-K-Ak；图1B)可以形成寡聚体。我们还合成了具有活化的缺电子炔的化合物N_3-K-Aak(图1A)，其由Dervan基团(Dervan group)使用以使用DNA作为模板来组装聚酰胺。[11b]所有化合物通过使用已知路线的变体合成(参见实施例部分)。

[0052] 我们首先测试了r(CCUG)$_{12}$(图4)对K寡聚体的体外模板组装的能力。孵育后，通过质谱法分析反应产物。实际上，在r(CCUG)$_{12}$存在下，而非在其不存在下，形成较高价态的化合物(图5)。为了确定这种模板化反应是否对r(CCUG)$_{12}$具有特异性，我们研究了其他RNA催化寡聚体形成的能力，该寡聚体包括r(CUG)$_{12}$、r(AUUCU)$_{12}$、r(CGG)$_{12}$、具有完全配对茎的RNA发夹和tRNA(图4)。重要的是，除了在r(CUG)$_{12}$中观察到少量二聚体(<10％；图6)之外，没有观察到所有RNA的显著反应产物。这是不奇怪的，r(CUG)$_{12}$模板化少量的二聚体，因为它结合K，虽然亲和力远远低于r(CCUG)$_{12}$。[13]此外，相比于r(CCUG)$_{12}$，r(CUG)$_{12}$分离多价化合物中的K个RNA结合模块的最佳距离要短得多。[13]总之，这些研究说明模板化反应对r(CCUG)$_{12}$是选择性的，并且通过功能基团、RNA结合模块和RNA靶标的定位来控制(图6)。这些研究提供了动力在细胞系统中测试这种方法，并研究模板化的化合物对DM2相关的缺陷的生物影响，该DM2相关的缺陷包括选择性前mRNA剪接缺陷和细胞核聚集点的形成。[3a]

[0053] 为了证实多价化合物确实是细胞内模板化的，使用在其中表达r(CCUG)$_{300}$的细胞模型系统。[14]细胞用N_3-K和N_3-K-Ak或N_3-K-Aak共同处理。N_3-K用于毒害所述反应，以限制产物的分子量，从而允许质谱分析。处理后，通过用有机溶剂沉淀细胞物质和蛋白质而从细胞裂解物中部分纯化反应产物。纯化的部分的质谱分析显示，表达r(CCUG)$_{300}$的细胞中发生寡聚化，因为当用N_3-K-Ak或N_3-K-Aak处理细胞时，观察到二聚体和三聚体反应产物两者(图7-9)。重要的是，在不表达RNA的细胞中未观察到寡聚化(图7-9)。因此，模板化合成仅发生在受疾病影响的细胞中，表明r(CCUG)$_{300}$催化其自身抑制剂的合成。

[0054] 为了证实模板化反应的程度以及r(CCUG)$_{300}$确实是寡聚化的催化剂，我们开发并实施了称为ChemReactBIP(化学反应性和通过牵出结合分离(Chemical Reactivity and Binding Isolated by Pull Down)；图2A)的方法。在6’位包含生物素部分的卡那霉素类似物(N_3-K-生物素；图20和图10-12)存在下，用K-Ak、N_3-K-Ak或N_3-K-Aak处理细胞。N_3-K-生物素终止细胞内聚合反应，并允许在温和裂解后用链霉亲和素珠捕获寡聚化合物及其结合的细胞靶标(图2B和C)。与上述用N_3-K完成的研究一致，寡聚化产物仅在表达r(CCUG)$_{300}$的细

胞中形成，并且如预期的，对于N_3-K-Aak，单体向产物的转化比N_3-K-Ak的单体向产物的转化大。[11b]ChemReactBIP还允许我们识别模板化反应的细胞靶标。牵出部分的qRT-PCR分析证实r(CCUG)$_{300}$是N_3-K-生物素和K-Ak、N_3-K-Ak或N_3-K-Aak产物的主要靶标(图2C)。牵出的r(CCUG)$_{300}$靶标的量的增加与效力成函数关系：N_3-K+K-Ak<N_3-K-Ak<N_3-K-Aak，参看下文。如在我们的其他实验中观察到的，仅当细胞表达r(CCUG)$_{300}$时观察到多价化合物(图2C)。

[0055] 如在其他微卫星疾病中观察到的，各种蛋白质与r(CCUG)^{exp}的结合导致细胞核聚集点的形成。[3a]使用利用染料标记的寡核苷酸的荧光原位杂交(FISH)来确定我们的化合物是否抑制包含细胞核聚集点的r(CCUG)^{exp}的形成(图3A)。在未处理的细胞中，每个细胞的聚焦点(foci)的平均数为9±2。用N_3-K或K-Ak处理将每个细胞的聚焦点平均数分别减少到6±2和6±1。用K-Ak和N_3-K(K-Ak+N_3-K)的等摩尔混合物的处理使聚焦点减少至每个细胞1±1，类似于模拟K-Ak和N_3-K的反应产物的预合成二聚体(K1,4二聚体和K1,5二聚体，图16和17)。N_3-K-Ak和N_3-K-Aak，点击以细胞内自身寡聚化的衍生物，是甚至更有效的，并观察到每个细胞<<1个聚焦点。因此，寡聚化的有效程度与生物活性相关。

[0056] 细胞核聚集点的破坏表明被r(CCUG)^{exp}螯合的蛋白质被释放。因此，该化合物还可能改善由聚焦点中MBNL1的螯合引起的选择性前mRNA剪接缺陷。[3a]我们研究了我们的化合物改善桥连整合因子1(BIN1)前mRNA的失调的能力(图3B-C、13和14)[14]。当r(CCUG)$_{300}$存在于细胞中时，外显子11跳读太频繁，导致在成熟mRNA中包含率(inclusion rate)为～20％。相反，外显子11在未受影响的细胞中的包含率为～60％。有趣的是，观察到的如通过聚焦点破坏测量的化合物效力趋势反映在我们的改善BIN1选择性剪接缺陷的结果上(图2和图3)。例如，预合成的二聚体和N_3-K+K-Ak以类似的程度改善BIN1选择性剪接模式，而N_3-K-Ak和N_3-K-Aak更有效(图3C)。值得注意的是，N_3-K-Aak保留了在纳摩尔浓度下改善剪接缺陷的能力，比我们的第一代模块化组装的化合物的改善能力提高>100倍[6a]，并且比单体N_3-K和K-Ak的改善能力提高>1000倍。重要的是，化合物不影响不表达r(CCUG)$_{300}$的细胞中的BIN1剪接模式(图15)。总的来说，我们的参与模板化点击反应的化合物是迄今已知的改善DM2相关的剪接病变(spliceopathy)的最有效的非共价化合物。此外，前mRNA剪接的改善是由于结合r(CCUG)$_{300}$而不是由于非特异性效应。

[0057] 总之，这些研究建立了HDCR可用于模板化细胞内和仅在受疾病影响的细胞中的RNA抑制剂的合成。这种技术可能有许多应用，如Sharpless和同事们先前所阐述的。[10]RNA重复的疾病可以是特别有吸引力的应用。靶标的性质，其可能有成千上万的重复单元，可以产生高产量的模板化产物。此外，许多RNA功能获得障碍，例如ALS、DM1和DM2引起脑功能障碍，使得开发具有穿过血脑屏障的潜力的低分子量化合物是重要的。总之，点击反应可以在疾病的细胞和组织模型两者中产生具有多价化合物的效力的高度可渗透的低分子量单体。

[0058] 该方法也适用于靶向DM1的致病因子(r(CUG)^{exp})，其具有与针对DM2观察到的相似的疾病机制。DM1由位于DMPK的3'UTR中的r(CUG)^{exp}引起，其还结合并螯合参与RNA生物合成的蛋白质，例如MBNL1(图21)。

[0059] 我们先前描述了一种二聚化合物，其包含展示在N-甲基肽主链上的H RNA结合模块，2H-K4NMe，其结合r(CUG)^{exp}并改善细胞和DM1小鼠模型中的DM1功能障碍。(图22；Rzuczek SG,Gao Y,Tang ZZ,Thornton CA,Kodadek T,Disney MD.ACS Chem Biol.2013Oct 18;8(10):2312-21)。在暴露于大鼠微粒体2小时后，仅35％的化合物是完整

的。所述化合物的检查表明酰胺键可以是代谢倾向性的(metabolic liability);从而用N-甲基酰胺代替所述酰胺以产生2H-K4NMeS,其被发现对大鼠微粒体是稳定的(图22)。

[0060] 测试该稳定化合物2H-K4NMeS对DM1患者来源的成纤维细胞中的前mRNA剪接缺陷的改善(参见:Konieczny,P.;Stepniak-Konieczna,E.;Sobczak,K.Nucleic Acids Research 2014,42,10873),并发现该化合物在大于100nM的浓度下拯救>50%的缺陷(图23)。接下来在HSA^{LR}小鼠模型中测试2H-K4NMeS(代谢稳定的)和2H-K4NMe(代谢不稳定的)对前mRNA剪接缺陷的改善(参见:Mankodi,A.,Logigian,E.,Callahan,L.,McClain,C.,White,R.,Henderson,D.,Krym,M.,和Thornton,C.A.(2000)Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat.Science 289,1769-1773.)。结果显示,2H-4NMeS在改善小鼠模型中的Clcn1前mRNA剪接缺陷方面的效力比2H-K4NMe高>7倍(图23)。

[0061] 考虑到2H-K4NMeS的良好活性,通过使用化学交联和通过牵出分离(Chem-CLIP)来探测该分子的细胞靶标。在该方法中,包含反应性模块(CA)和纯化标签(生物素)的母体化合物2H-K4NMeS-CA-生物素的反应性衍生物。Chem-CLIP探针的结构如图24A所示。完成了该化合物与RNA靶标的体外反应的测试,其表明该化合物最有效地与$r(CUG)_{109}$反应(图24B)。

[0062] 然后完成将该化合物施用于DM1患者来源的成纤维细胞以分析该化合物的RNA靶标。在化合物暴露和细胞裂解后,将总RNA捕获到链霉亲和素树脂上。结合的生物素化材料从树脂释放并通过使用qRT-PCR定量。这些研究表明,在3'UTR中含有$r(CUG)^{exp}$的DMPK mRNA在牵出物中显著富集(图24C)。非反应性的且比2H-K4NMeS-CA-生物素过量的2H-K4NMeS和重复Chem-CLIP—该实验称为竞争性化学交联和通过牵出分离(C-Chem-CLIP)—的添加表明未反应的化合物耗尽在牵出的部分中的DMPK的量(图24D)。

[0063] 接下来,进行化学交联和通过牵出分离以绘制配体结合位点(Chem-CLIP-Map)以鉴定在DMPK mRNA中2H-K4NMeS-CA-生物素的结合位点(Yang,W.-Y.,Wilson,H.D.,Velagapudi,S.P.,和Disney,M.D.(2015)Inhibition of non-ATG translational events in cells via covalent small molecules targeting RNA,J.Am.Chem.Soc.137,5336-5345.)。这通过用反义寡核苷酸和核糖核酸酶H精确切割由2H-K4NMeS-CA-生物素牵出的DMPK mRNA来完成。通过与2H-K4NMeS-CA-生物素反应而生物素化的切割的片段被捕获到链霉亲和素树脂上并纯化。定量显示DMPK mRNA的含3'UTR $r(CUG)^{exp}$的片段在牵出部分中显著富集,从而验证所述化合物的预期结合位点。

[0064] 接下来,合成2H-K4NMeS的衍生物,使得其可以用于细胞点击反应,以通过类似于本文提供的DM2RNA的实验原位合成靶向$r(CUG)^{exp}$的二聚化合物。合成一系列化合物,其中:(i)显示单个叠氮化物(N_3-2H-K4NMeS);和(ii)在距N-甲基骨架不同的距离处显示活化的炔(2H-K4N MeS-活化的炔)。这些结构如图26所示。

[0065] 最初,我们研究了$r(CUG)_{12}$是否可以通过结合到相邻位点的两个化合物之间的HDCR催化图26所示的结构的寡聚化。结果显示2H-K4NMeS-Aak提供了最好的炔烃间隔单元,以在$r(CUG)_{12}$存在下与N_3-2H-K4NMeS反应(图27A)。然后测试最佳化合物的通过使用其他核酸催化的它们的联合(union)(图27B),并且显示只有$r(CUG)_{12}$提供显著的反应产率。

[0066] 接下来,使用上面研发的间隔方面的经验教训来设计在单个小分子中具有反应性叠氮化物和炔烃部分的小分子。由此合成化合物N_3-2H-K4NMeS-Aak(图28)。该化合物应该

能够相比于相应的叠氮化物和炔烃标记的化合物的混合物在r(CUG)^{exp}的存在下形成较大的低聚体。

[0067] 通过使用ChemReactBIP测试源于患者的细胞中N_3-2H-K4NMeS-Aak寡聚化的程度。在该方法中,合成了N_3-2H-K4NMeS-Aak的一种形式(version)(生物素-N_3-2H-K4NMeS-Aak,图29A),其允许起始物质和反应产物两者通过链霉亲和素捕获从细胞中纯化(图29B)。这些研究表明,仅在DM1来源的成纤维细胞中观察到寡聚产物(图29C)。由于上述数据显示DM1的原位药物合成是可行的(图29),所以评估该化合物(N_3-2H-K4NMeS-Aak)的生物活性。以10nM的剂量添加N_3-2H-K4NMeS-Aak使DM1相关的前mRNA剪接缺陷改善>50%,比单独使用N_3-2H-K4NMeS处理或使用N_3-2H-K4NMeS和2H-K4NMeS-Aak共同处理更有效(图30A)。接下来,测量所述化合物对RNA聚集点的影响,显示当将可点击化合物N_3-2H-K4NMeS-Aak加入细胞时,观察到远远较少的聚焦点(图30B)。最后,含有r(CUG)^{exp}的DMPK mRNA的翻译水平低得多,因为它保留在细胞核中(Childs-Disney,J.L.;Hoskins,J.;Rzuczek,S.G.;Thornton,C.A.;Disney,M.D.ACS Chemical Biology 2012.)。因此,N_3-2H-K4NMeS-Aak可以通过减少聚焦点中的螯合并刺激翻译来改变DMPK的亚细胞定位。以纳摩尔浓度添加的N_3-2H-K4NMeS-Aak改善了在具有长的毒性r(CUG)重复的细胞中的DMPK翻译缺陷,但对没有致病性重复的细胞没有影响。

[0068] 总之,这些数据表明,化合物的先导物优化可以通过改变所述骨架使其更稳定来完成。使这些化合物配备有叠氮化物和炔部分允许在DM1患者来源的细胞中的原位药物合成,并提供非常高的效力。

[0069] 接下来,开发了切割r(CUG)^{exp}的方法。已经显示天然产物博来霉素(bleomcyin)可以切割DNA,但是也已经显示在体外切割RNA靶标(Carter,B.J.;de Vroom,E.;Long,E.C.;van der Marel,G.A.;van Boom,J.H.;Hecht,S.M.Proceedings of the National Academy of Sciences 1990,87,9373.)。因此,博来霉素附加到2H-K4NMeS可以使这些化合物具有在源于患者的细胞中切割r(CUG)^{exp}的能力。由此完成2H-K4NMeS-博来霉素A5的合成(图31A)。将该化合物应用于DM1患者来源的成纤维细胞导致如通过qRT-PCR评估的DMPK mRNA水平降低,但对健康成纤维细胞中的DMPK mRNA水平没有影响(图31B)。为了进一步测试该化合物选择性切割DMPK mRNA的能力,将与2H-K4NMeS-博来霉素A5相比过量4倍的2H-K4NMeS与加入到细胞中。如所预期的,非反应性化合物与反应性化合物竞争结合,减少切割量并表明选择性(图31C)。这些切割实验也与前mRNA剪接缺陷的改善相关(图31D)。

[0070] 还基于RNA催化的点击反应原位合成荧光报道分子。在该方法中,可以经历点击反应的化合物用FRET对标记(图32A),使得可以在点击反应后观察到FRET。使用FAM(荧光素)和TAMARA(5-羧基四甲基罗丹明)FRET染料对,提供FAM-2H-K4NMeS-Aak和N_3-2H-K4NMeS-TAMARA。所述化合物的添加显示了仅在r(CUG)$_{12}$的存在下FRET的增强。因此,该方法允许现场合成将具有广泛适用性的FRET报道分子。

引用文件

[1]M.L.Yeung,Y.Bennasser,K.T.Jeang,Curr.Med.Chem.2007,14,191-197.

[2]M.E.MacDonald,J.F.Gusella,Curr.Opin.Neurobiol.1996,6,638-643.

[3]a)A.Mankodi,P.Teng-Umnuay,M.Krym,D.Henderson,M.Swanson,C.A.Thornton,Ann.Neurol.2003,54,760-768;b)H.T.Orr,H.Y.Zoghbi,Annu.Rev.Neurosci.2007,30,

575-621.

[4]a)J.R.Thomas,P.J.Hergenrother,Chem.Rev.2008,108,1171-1224;b)L.Guan,M.D.Disney,ACS Chem.Biol.2012,7,73-86.

[5]J.R.Brouwer,R.Willemsen,B.A.Oostra,BioEssays 2009,31,71-83.

[6]a)J.L.Childs-Disney,I.Yildirim,H.Park,J.R.Lohman,L.Guan,T.Tran,P.Sarkar,G.C.Schatz,M.D.Disney,ACS Chem.Biol.2014,9,538-550;b)M.D.Disney,L.P.Labuda,D.J.Paul,S.G.Poplawski,A.Pushechnikov,T.Tran,S.P.Velagapudi,M.Wu,J.L.Childs-Disney,J.Am.Chem.Soc.2008,130,11185-11194.

[7]C.L.Liquori,K.Ricker,M.L.Moseley,J.F.Jacobsen,W.Kress,S.L.Naylor,J.W.Day,L.P.Ranum,Science 2001,293,864-867.

[8]B.Llano-Sotelo,E.F.Azucena,Jr.,L.P.Kotra,S.Mobashery,C.S.Chow,Chem.Biol.2002,9,455-463.

[9]J.L.Childs-Disney,J.Hoskins,S.G.Rzuczek,C.A.Thornton,M.D.Disney,ACS Chem.Biol.2012,7,856-862.

[10]W.G.Lewis,L.G.Green,F.Grynszpan,Z.Radic,P.R.Carlier,P.Taylor,M.G.Finn,K.B.Sharpless,Angew.Chem.Int.Ed,Engl.2002,41,1053-1057.

[11]a)A.Krasinski,Z.Radic,R.Manetsch,J.Raushel,P.Taylor,K.B.Sharpless,H.C.Kolb,J.Am.Chem.Soc.2005,127,6686-6692;b)A.T.Poulin-Kerstien,P.B.Dervan,J.Am.Chem.Soc.2003,125,15811-15821.

[12]M.D.Disney,J.L.Childs-Disney,Chembiochem 2007,8,649-656.

[13]M.M.Lee,J.L.Childs-Disney,A.Pushechnikov,J.M.French,K.Sobczak,C.A.Thornton,M.D.Disney,J.Am.Chem.Soc.2009,131,17464-17472.

[14]C.Fugier,A.F.Klein,C.Hammer,S.Vassilopoulos,Y.Ivarsson,A.Toussaint,V.Tosch,A.Vignaud,A.Ferry,N.Messaddeq,Y.Kokunai,R.Tsuburaya,P.de la Grange,D.Dembele,V.Francois,G.Precigout,C.Boulade-Ladame,M.C.Hummel,A.L.de Munain,N.Sergeant,A.Laquerriere,C.Thibault,F.Deryckere,D.Auboeuf,L.Garcia,P.Zimmermann,B.Udd,B.Schoser,M.P.Takahashi,I.Nishino,G.Bassez,J.Laporte,D.Furling,N.Charlet-Berguerand,Nat.Med.201 1,77,720-725.

实施例

计算分析方法

[0071] 我们先前公开了2K-4，由拟肽连接的两个K RNA结合模块，与含有两个5’CCUG/3’GUCC环的RNA的结合模型[1]。去除拟肽并编辑K RNA结合模块以包括接头：(i)一个K中的环I的C6’包含己-5-炔酰胺或N-(2-氨基-2-氧代乙基)丙炔酰胺；和(ii)向另一个K的环III的C6″添加叠氮基。进行接头的构象扫描以检查两个K的反应性末端是否彼此紧密接近。使用采用QPLS_2005力场[2]的MacroModel(Schrödinger,LLC)进行穷尽的非冗余构象扫描。结果显示多个构象分别使己-5-炔酰胺和N-(2-氨基-2-氧代乙基)丙炔酰胺接头中的两个反应性基团紧密接近，其中最短的乙炔基C到叠氮基N的距离为2.61埃和2.37埃(图1,BI)。

[0072] 在每个结构中具有最接近的反应性基团的接头组用于产生环加成终产物，K 1,4-二聚体和K 1,5-二聚体，的模型。每个接头组合(己-5-炔酰胺+N_3或N-(2-氨基-2-氧代乙

基)丙炔酰胺+N_3)的K 1,5-二聚体具有一个构象。每个接头组合的K 1,4-二聚体显示两个主要构象是可能的,三唑环C_5H指向溶剂(C_5H-外)或朝向RNA大沟(C_5H-内)。因此产生了总共六个模型(图1,BII和BIII)。每个结构短暂地能量最小化,然后分子动力学(MD)模拟,以观察复合物的稳定性和接头对结合的K的影响。使用利用OPLS_2005力场[2]的Desmond[3]进行MD模拟。每个模型结构在正交箱(orthorhombic box)中用TIP3水和150mM NaCl溶剂化,其在每个方向上缓冲10埃。加入另外的离子以中和所述系统。在MD模拟之前,使用NPT松弛方案预先平衡所述系统,其包括限制的/无限制的最小化和具有等温等压系综的短模拟。在恒温(300K)和压强(1.01325巴)下进行10ns MD模拟。在整个模拟中将位置约束应用于RNA。短程和长程库仑相互作用被设置为具有9埃半径的Cutoff方法(短)和具有容差为o 1×10^{-9}的光滑粒子网格Ewald容限方法(长)。使用Maestro图形界面完成模拟的分析。

[0073] 没有观察到系统体积、压强、温度和势能的显著波动。在大多数模拟中,约4～6ns之后系统的总能量稳定,除了在其中所述值连续增加的两种情况以外。然而,在模拟期间,斜率小于0.05kcal/ps。在整个模拟中保持K部分和RNA之间的氢键。使用PyMol(Schrödinger,LLC)制备图。

化合物合成和化合物表征的方法

[0074] 缩写。DIC,N,N'-二异丙基碳二亚胺;DIEA,N,N-二异丙基乙胺;DMF,N,N-二甲基甲酰胺;HPLC,高效液相色谱;HRMS,高分辨率质谱;LC-MS,液相色谱-质谱;MeOH,甲醇;MALDI ToF/ToF,基质辅助激光解吸/电离飞行时间/飞行时间;MS,质谱;NBD,7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基;TFA,三氟乙酸。

[0075] 合成。Fmoc-Rink酰胺树脂(0.59mmol/g)购自Advanced ChemTech。N,N-二甲基甲酰胺(DMF,无水)购自EMD并且无需进一步纯化即可使用。哌啶,三氟乙酸(TFA),N,N-二异丙基乙胺(DIEA)和2-溴乙酸购自Sigma Aldrich。N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)、1-1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)和Fmoc-β-丙氨酸购自Advanced ChemTech。Fmoc-N-甲基-L-丙氨酸和N-(4-氨基丁基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯购自Combi-Blocks。N-(4-氨基乙基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯购自Oakwood Products。苯丁酸氮芥购自MP Biomedicals。博来霉素A5购自LKT Laboratories。Hoechst羧酸酯(Pushechnikov A,Lee MM,Childs-Disney JL,Sobczak K,French JM,Thornton CA,Disney MD.J Am Chem Soc.2009Jul 22;131(28):9767-79)、2H-K4NMe(Rzuczek SG,Gao Y,Tang ZZ,Thornton CA,Kodadek T,Disney MD.ACS Chem Biol.2013Oct 18;8(10):2312-21)、和生物素胺(Yamada,M.;Harada,K.;Maeda,Y.;Hasegawa,T.New Journal of Chemistry 2013,37,3762.)如先前报道的合成。使用Biotage Initiator+SP Wave微波合成N-甲基肽。

[0076] 化合物纯化和分析。使用配备有Waters 2487双吸收检测器系统和Waters Sunfire C18OBD 5μm 19×150mm柱的Waters 1525二元HPLC泵进行制备型HPLC。在280和220nm处监测吸光度。使用0-100%MeOH水溶液与0.1%TFA的梯度在60分钟内纯化化合物。使用Waters Symmetry C185μm 4.6×150mm柱进行分析型HPLC。如通过分析型HPLC测定的,所有评价的化合物具有>95%的纯度。使用Applied Biosystems MALDI ToF/ToF Analyzer 4800Plus使用α-羟基肉桂酸基质进行质谱分析。使用Biotage引发剂+SP Wave微波进行所有微波反应。高分辨率质谱分析由伊利诺伊大学香槟分校化学科学质谱中心进行。

[0077] K 1,4二聚体的合成。参见图16。将N_3-K(50mg,50μmol)和K-Ak(45mg,50μmol)溶解

在DMF和水(3mL)的1:1混合物中，并用聚三唑Cu(I)催化剂(10mg,16μmol)[4]和Et_3N(500μL,3.6mmol)处理。将反应混合物在100℃下微波处理2.5小时，之后将反应混合物浓缩并通过如上所述的反相HPLC纯化。产率:11%;6.2mg白色固体，为TFA盐。H^1NMR(700mHz,D_2O,TSP):δ 4.31(m,2H),3.99(m,2H),3.92(m,2H),3.75(m,9H),3.54(m,7H),3.41(t,2H,J=10Hz),3.31(m,2H),3.24(dd,2H,J=7,13),2.73(t,2H,J=8Hz),2.52(m,2H),2.34(t,2H,J=8Hz),1.92(m,4H),1.25(m,4H);C^{13}NMR(175mHz,D_2O,TSP):δ=179.8,166.2,166.0,165.8,165.6,150.3,132.1,127.8,121.8,120.1,118.4,116.8,103.7,103.5,101.2,100.3,86.6,82.4,81.7,76.0,75.7,75.0,74.9,74.1,74.0,73.7,73.6,72.9,72.5,71.6,71.1,70.9,69.5,68.2,62.6,57.9,53.1,52.9,52.6,51.2,50.9,43.2,42.1,38.0,31.2,30.7,30.6,28.1,27.0ppm;HRMS(ESI)m/z $C_{42}H_{79}N_{12}O_{11}$(M+H)计算值1087.5483;实测值1087.5453。

[0078] K 1,5二聚体的合成。参见图17。将BcC-N_3-K(20mg,20μmol)和Boc-K-Ak(23mg,20μmol)溶于甲苯(2mL)中并置于氩气下。用五甲基环戊二烯基双(三苯基膦)氯化钌(II)(6mg,0.8μmol)处理样品，并在130℃下微波处理3小时。然后将反应混合物过滤并浓缩。残余物用TFA在CH_2Cl_2中的1:1混合物在0℃处理2小时。将反应混合物浓缩，并通过如上所述的反相HPLC纯化。产率:0.5%;1mg白色固体，为TFA盐。^{1}H NMR(700mHz,D_2O,TSP):δ7.66(s,1H),3.52(m,32H),2.53(m,2H),2.37(m,2H),2.24(m,2H),1.98(m,2H),1.87(m,4H),1.34(m,4H);^{13}C NMR(175mHz,D_2O,TSP):δ=179.8,166.2,166.0,165.8,165.6,121.8,120.1,118.4,116.8,103.5,103.4,101.0,98.4,87.6,86.5,82.3,81.2,76.0,75.9,75.8,75.7,75.1,74.1,74.0,73.6,73.0,72.9,71.7,71.6,71.1,68.2,62.6,57.9,57.3,52.6,51.1,51.0,50.8,50.5,45.5,43.2,42.1,37.5,30.9,30.6,27.0,20.6,19.9,19.2,15.1ppm;HRMS(ESI)m/z $C_{42}H_{78}N_{11}O_{22}$(M+H)计算值1088.5323;实测值1088.5316。

[0079] N_3-K-Ak的合成。参见图18。将N_3-K(25mg,49μmol)溶解在丙酮和水(2mL)的1:1混合物中，并加入NBD活化的6-氨基己炔酸(6mg,49μmol)。将反应在室温下搅拌过夜，然后真空除去溶剂。所得残余物如上所述通过反相HPLC纯化。产率:20%;5mg白色固体，为TFA盐。^{1}H NMR(700mHZ,D_2O,TSP):δ=4.05(m,1H),3.91(m,4H),3.78(t,2H,J=9),3.74(dd,2H,J=4,14),3.70(m,4H),3.66(m,2H),3.61(dd,1H,J=5,15),3.55(dd,2H,J=5,12),3.48(m,2H),3.34(t,1H,J=10),2.71(s,1H),2.50(d,2H,J=12),1.86(m,2H),1.44(t,1H,J=7);^{13}C NMR(175mHz,D_2O,TSP):δ=166.2,166.0,165.8,165.6,162.2,121.8,120.1,119.6,118.4,118.0,116.8,103.6,102.0,86.5,76.1,75.2,74.3,73.9,73.5,71.1,69.1,57.7,53.3,52.9,43.2,41.6,19.4,19.0ppm;HRMS(ESI)m/z $C_{24}H_{42}N_7O_{11}$(M+H)计算值604.2942;实测值604.2938。

[0080] 合成N_3-K-Aak。参见图19。将2-丙酰氨基乙酸(175mg,1.36mmol)溶于无水DMF中并用DIC(213μL,1.4mmol)、N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺(243mg,1.36mmol)和DIEA(600μL,3.4mmol)处理。将反应混合物在氩气下在室温下搅拌过夜。接下来，将N_3-K(20mg,40μmol)溶解在丙酮和水(2mL)的1:1混合物中，并在4小时内逐渐加入500μL的NBD活化的酸。然后真空除去溶剂，所得残余物通过如上所述的反相HPLC纯化。产率:2%,600μmol。^{1}H NMR(700mHz,D_2O,TSP):δ=4.06(m,1H),3.98(d,1H,J=5),3.94(dd,1H,J=3,11),3.83(t,2H,J=10),3.52(m,14H),2.43(d,2H,J=11),1.73(m,2H);^{13}C NMR(175mHz,D_2O,TSP):δ=169.8,166.3,166.0,165.8,165.6,131.9,126.0,121.8,120.1,118.4,116.8,103.4,76.5, 75.2,74.2,74.2,74.1,73.8,73.7,73.4,71.6,71.2,69.4,69.2,57.7,53.6,53.3,53.2,53.0,51.5,45.5,43.2,42.7ppm;HRMS(ESI)m/z $C_{23}H_{39}N_8O_{12}$(M+H)计算值619.2687;实测值619.2680。

[0081] 合成N_3-K-生物素。参见图20。将N_3-K(17mg,30μmol)溶解在丙酮和水(2mL)的1:1混合物中,并加入NBD-生物素(12mg,30μmol)。将反应在室温下搅拌过夜,然后真空除去溶剂。所得残余物如上所述通过反相HPLC纯化。产率:7%;1.6mg白色固体,为TFA盐。^{1}H NMR(700mHz,D_2O,TSP):δ=4.60(m,1H),4.41(m,1H),4.05(m,1H),3.91(dd,2H,J=4,11),3.83(m,2H),3.67(m,5H),3.55(dd,2H,J=5,14),3.45(m,2H),3.31(m,2H),3.19(m,1H),2.98(dd,1H,J=8,13),2.77(d,1H,J=13),2.38(m,1H),2.28(t,2H,J=7),1.65(m,5H),1.39(m,2H),1.32(m,2H);^{13}CNMR(175mHz,D_2O,TSP):δ=177.4,177.0,165.3,163.3,162.9,162.5,162.2,134.3,120.5,117.6,114.7,111.8,100.5,98.3,83.4,79.9,73.0,72.2,71.4,71.2,71.1,70.1,68.1,66.2,62.0,60.2,55.4,54.7,51.1,50.4,49.8,48.1,44.3,42.6,39.6,39.1,35.3,27.8,27.6,25.1ppm;HRMS(ESI)m/z $C_{28}H_{50}N_9O_{12}S$(M+H)计算值736.3300;实测值736.3297。

小分子二聚体的合成。

[0082] 2H-K4NMeS的合成。参见图33。将Rink酰胺树脂(500mg,0.3mmol)在DMF中在室温下溶胀10分钟,然后用20%哌啶的DMF溶液(5mL,2×20分钟)脱保护。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(4mL)在DMF和DIC(250μL,1.6mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基丁基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(121mg,0.6mmol)在DMF(4mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。然后将Fmoc-N-甲基-L-丙氨酸(264mg,0.81mmol)、DIC(250μL,1.6mmol)、HOAt(110mg,0.81mmol)和DIEA(141μL,0.81mmol)于DMF(4mL)中的溶液加入,将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。用DMF洗涤树脂,然后用20%哌啶/DMF(2×10分钟)除去Fmoc。该循环总共重复四次。接下来,用DMF和DCM洗涤树脂,然后用30%TFA/DCM(5mL)处理10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(80mg,0.16mmol),HOAt(22mg,0.16mmol),DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(100μL)在DMF(2mL)中的溶液处理并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩,并使用反相HPLC,用20-100%MeOH/H_2O+0.1%(v/v)TFA经1小时纯化。分离640纳摩尔2H-K4NMeS;0.2%。2H-K4NMeS($C_{81}H_{101}N_{19}O_9$)MS计算值(M+H)1484.81,MS实测值1484.93(M+H);t_R=32分钟。

[0083] 用于官能化的2H-K4NMeS中间体的合成。将Rink酰胺树脂(500mg,0.3mmol)在DMF中在室温下溶胀10分钟,然后用20%哌啶的DMF溶液(5mL,2×20分钟)脱保护。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(4mL)在DMF和DIC(250μL,1.6mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基丁基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(121mg,0.6mmol)在DMF(4mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。然后加入Fmoc-N-甲基-L-丙氨酸(264mg,0.81mmol)、DIC(250μL,1.6mmol)、HOAt(110mg,0.81mmol)和DIEA(141μL,0.81mmol)于DMF(4mL)中的溶液,并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。用DMF洗涤树脂并用20%哌啶/DMF(2×10分钟)除去

Fmoc。该循环总共重复三次。用DMF(3×5mL)洗涤树脂,使用设定为10%功率的700W微波并通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(4mL)在DMF和DIC(250μL,1.6mmol)中的溶液反应两次。用DMF(3×5mL)洗涤树脂并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基乙基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(105mg,0.6mmol)在DMF(4mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。

[0084]　2H-K4NMeS-CA-生物素的合成。参见图34。使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)使上面制备的2H-K4NMeS中间体树脂与1M溴乙酸(4mL)在DMF和DIC(250μL,1.6mmol)中的溶液反应两次。用DMF(3×5mL)洗涤树脂并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与生物素胺(200mg,0.6mmol)在DMF(4mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。然后加入Fmoc-β-丙氨酸(252mg,0.81mmol)、DIC(250μL,1.6mmol)、HOAt(110mg,0.81mmol)和DIEA(141μL,0.81mmol)于DMF(4mL)中的溶液并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。将树脂用DMF和DCM洗涤,然后用30%TFA/DCM(5mL)处理10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(80mg,0.16mmol)、HOAt(22mg,0.16mmol)、DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(100μL)在DMF(2mL)中的溶液处理并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩并使用反相HPLC用20-100%MeOH/H_2O+0.1%(v/v)TFA经1小时纯化。然后用20%哌啶/DMF(1×10分钟)除去Fmoc,然后真空浓缩。分离143纳摩尔(0.05%)游离胺二聚体,其用苯丁酸氮芥(1mg,3μmol)、DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(25μL)在DMF(200μL)中的溶液在室温下处理3小时。然后将溶液真空浓缩并使用反相HPLC用20-100%MeOH/H_2O+0.1%(v/v)TFA经1小时纯化。分离119纳摩尔2H-K4NMeS-CA-生物素;0.04%。2H-K4NMeS-CA-生物素($C_{113}H_{149}Cl_2N_{26}O_{14}S$)MS计算值2196.08(M+H),MS实测值2195.96(M+H);t_R=30分钟。

[0085]　2NAc-K4NMeS-CA-生物素的合成。参见图35。如上面针对2H-K4NMeS-CA-生物素所述的进行合成,但是不是与Hoechst羧酸酯偶联,而是在室温下用1:1的乙酸酐和DIEA溶液(400μL总体积)处理肽1小时。分离800纳摩尔的2NAc-K4NMeS;0.3%)。2NAc-K4NMeS($C_{59}H_{96}Cl_2N_{14}O_{12}SNa$)MS计算值1317.63(M+Na),MS实测值1317.28(M+Na);t_R=18min。

[0086]　2H-K4NMeS-博来霉素AS的合成。参见图36。上面制备的2H-K4NMeS中间体树脂与添加的6-(Fmoc-氨基)己酸(286mg,0.81mmol)、DIC(250μL,1.6mmol)、HOAt(110mg,0.81mmol)和DIEA(141μL,0.81mmol)于DMF(4mL)中的溶液反应,并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。将树脂用DMF和DCM洗涤,然后用30%TFA/DCM(5mL)处理10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(80mg,0.16mmol)、HOAt(22mg,0.16mmol)、DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(100μL)在DMF(2mL)中的溶液处理并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩,并使用反相HPLC用20-100%MeOH/H_2O+0.1%(v/v)TFA经1小时纯化。然后用20%哌啶/DMF(1×10分钟)除去Fmoc,然后真空浓缩。分离450nmol(0.2%)游离胺二聚体,其用N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(450nmol,LKT Labs)和DIEA(100μL)在无水DMF(50μL)中的溶液处理。将反应在室温下搅拌,并且周期性地加入另外的N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯直到80-90%的起始物质被消耗。然后加入博莱霉素A5-铜络合物(450nmol)在无水DMF中的溶液,并在室温下搅拌反应物过夜。然后将溶液真空浓缩,并使用反相HPLC纯化,首先使用0.1mM EDTA的水溶液(pH6.3)历时15分钟,然后使用0-100%CH_3CN/H_2O+0.1%TFA经1小时纯化。分离52纳摩尔的2H-K4NMeS-博来霉素A5(0.02%)。

2H-K4NMeS-博来霉素A5($C_{146}H_{203}N_{40}O_{32}S_2$)MS计算值3092.49(M+H),MS实测值3092.18(M+H);t_R=35分钟。

[0087] 合成N_3-2H-K4NMeS。参见图37。将Rink酰胺树脂(200mg,0.12mmol)在DMF中在室温下溶胀10分钟,然后用20%哌啶的DMF溶液(3mL,2×20分钟)去保护。将树脂用DMF(3×3mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(2mL)在DMF和DIC(250μL,0.8mmol)中的溶液反应两次。用DMF(3×3mL)洗涤树脂,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与3-叠氮基丙胺(60mg,0.6mmol)在DMF(2mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×3mL)洗涤。使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)使树脂再次与1M溴乙酸(2mL)在DMF和DIC(250μL,0.8mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×3mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基丁基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(60mg,0.3mmol)在DMF(2mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×3mL)洗涤。然后加入Fmoc-N-甲基-L-丙氨酸(132mg,0.4mmol)、DIC(125μL,0.8mmol)、HOAt(55mg,0.4mmol)和DIEA(70μL,0.4mmol)在DMF(2mL)中的溶液,并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。用DMF洗涤树脂并用20%哌啶/DMF(2×10分钟)除去Fmoc。该循环总共重复四次。接下来,用DMF和DCM洗涤树脂,然后用30%TFA/DCM(5mL)处理10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(40mg,0.08mmol)、HOAt(11mg,0.08mmol)、DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(50μL)在DMF(1mL)中的溶液处理并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩,使用反相HPLC用20-100%MeOH/H_2O+0.1%(v/v)TFA经1小时纯化。分离640纳摩尔的N_3-2H-K4NMeS;0.5%。N_3-2H-K4NMeS($C_{85}H_{108}N_{23}O_{10}$)MS计算值(M+H)1610.87,MS实测值1610.96(M+H);t_R=34min。

[0088] 合成N_3-2H-K4NMeS生物素。参见图38。将Rink酰胺树脂(500mg,0.3mmol)在DMF中在室温下溶胀10分钟,然后用20%哌啶的DMF溶液(3mL,2×20分钟)脱保护。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(4mL)在DMF和DIC(250μL,1.6mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与3-叠氮基丙胺(120mg,1.2mmol)在DMF(5mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)使树脂再次与1M溴乙酸(4mL)在DMF和DIC(250μL,1.6mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基丁基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(121mg,0.6mmol)在DMF(4mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。然后加入Fmoc-N-甲基-L-丙氨酸(264mg,0.81mmol)、DIC(250μL,1.6mmol)、HOAt(110mg,0.81mmol)和DIEA(140μL,0.81mmol)在DMF(5mL)中的溶液,并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。用DMF洗涤树脂,并用20%哌啶/DMF(2×10分钟)除去Fmoc。该循环总共重复三次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(4mL)在DMF和DIC(250μL,1.6mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤并使用设定为10%功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基乙基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(105mg,0.6mmol)在DMF(4mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。接下来,将树脂用D-生物素(195mg,0.81mmol)、 DIC(250μL,1.6mmol)、HOAt(110mg,0.81mmol)和DIEA(140μL,0.81mmol)在DMF(5mL)中的溶液处理,并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。接下来,用DMF和DCM洗涤树脂,然后用30％TFA/DCM(5mL)处理10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(40mg,0.08mmol)、HOAt(11mg,0.08mmol)、DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(50μL)在DMF(1mL)中的溶液处理,并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩,并使用反相HPLC用20-100％MeOH/H_2O+0.1％(v/v)TFA经1小时纯化。分离640纳摩尔的N_3-2H-K4NMeS-生物素;0.2％。N_3-2H-K4NMeS-生物素($C_{97}H_{127}N_{26}O_{12}S$)MS计算值(M+H)1879.98,MS实测值1879.87(M+H);t_R＝31min。

[0089] 2H-K4NMeS活化炔烃的合成。参见图39。对于每个炔烃衍生物,用加入的N-Fmoc羧酸酯接头(0.6mmol)、DIC(125μL,0.8mmol)、HOAt(72mg,0.6mmol)和DIEA(80μL,0.6mmol)在DMF(2mL)中的溶液处理300mg具有2H-K4NMeS中间体的树脂(0.18mmol),并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。用DMF洗涤树脂,并用20％哌啶/DMF(2×10分钟)除去Fmoc。然后用DMF洗涤树脂,然后悬浮于具有DIEA(80μL,0.6mmol)的2mL DMF中。将悬浮液用氩气冲洗并冷却至0℃。然后加入DIC(125μL,0.8mmol),然后缓慢加入丙炔酸(37μL,0.6mmol)在DMF(500μL)中的溶液。将反应在低温下搅拌1小时,然后用DMF和DCM洗涤。然后用30％TFA/DCM(5mL)处理树脂10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(40mg,0.08mmol)、HOAt(11mg,0.08mmol)、DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(50μL)在DMF(1mL)中的溶液处理并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩,并使用反相HPLC用20-100％MeOH/H_2O+0.1％(v/v)TFA经1小时纯化。2H-K4NMeS丙炔酸酯(n＝0)900纳摩尔(0.5％)($C_{85}H_{105}N_{20}O_{10}$)MS计算值(M+H)1565.83,MS实测值1565.61(M+H);t_R＝31min。2H-K4NMeS甘氨酸(n＝1)600纳摩尔(0.3％)($C_{87}H_{108}N_{21}O_{11}$)MS计算值(M+H)1622.854,MS实测值1622.854(M+H);t_R＝30分钟。2H-K4NMeSβ-丙氨酸(n＝2)750纳摩尔(0.4％)($C_{88}H_{110}N_{21}O_{11}$)MS计算值(M+H)1636.87,MS实测值1636.7(M+H);t_R＝31min。2H-K4NMeS氨基己酸酯(n＝5,Aak)4.93μmol(3％)($C_{91}H_{116}N_{21}O_{11}$)MS计算值(M+H)1678.92,MS实测值1678.7(M+H);t_R＝31min。2H-K4NMeS氨基辛酸酯(n＝7)1.6μmol(0.9％)($C_{93}H_{120}N_{21}O_{11}$)MS计算值(M+H)1706.95,MS实测值1707.0(M+H);t_R＝33分钟。2H-K4NMeS氨基十二烷酸酯(n＝11)4.49μmol(3％)($C_{97}H_{128}N_{21}O_{11}$)MS计算值(M+H)1763.01,MS实测值1763.2(M+H);t_R＝34min。

[0090] N_3-2H-K4NMeS-Aak的合成。参见图40。将Rink酰胺树脂(800mg,0.47mmol)在DMF中在室温下溶胀10分钟,然后用20％哌啶的DMF溶液(5mL,2×20分钟)脱保护。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(5mL)在DMF和DIC(500μL,3.2mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与3-叠氮基丙胺(300mg,3mmol)在DMF(5mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)使树脂再次与1M溴乙酸(5mL)在DMF和DIC(500μL,3.2mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤,并使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基丁基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(240mg,1.2mmol)在DMF(5mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时,然后用DMF(3×5mL)洗涤。然后加入Fmoc-N-甲基-L-丙氨酸(528mg,1.6mmol)、DIC(500μL,3.2mmol)、HOAt(220mg,1.6mmol)和DIEA(280μL,1.6mmol)在DMF(5mL)中的溶液,并将反应通过微波加热至

75℃持续30分钟。将树脂用DMF洗涤，并用20％哌啶/DMF(2×10分钟)除去Fmoc。该循环总共重复三次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤，并使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(5mL)在DMF和DIC(500μL，3.2mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×5mL)洗涤，并使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(4-氨基乙基)-N-甲基氨基甲酸叔丁酯(210mg，1.2mmol)在DMF(5mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时，然后用DMF(3×5mL)洗涤。然后用加入的N-Fmoc氨基已酸(565mg，1.6mmol)、DIC(500μL，3.2mmol)、HOAt(220mg，1.6mmol)和DIEA(280μl，1.6mmol)在DMF(5mL)中的溶液处理树脂，并将反应通过微波加热至75℃持续30分钟。用DMF洗涤树脂，并用20％哌啶/DMF(2×10分钟)除去Fmoc。然后将树脂用DMF洗涤，然后悬浮于具有DIEA(280μL，1.6mmol)的5mL DMF中。将悬浮液用氩气冲洗并冷却至0℃。然后加入DIC(500μL，3.2mmol)，然后缓慢加入丙炔酸(148μL，3.2mmol)在DMF(500μL)中的溶液。将反应在低温下搅拌1小时，然后用DMF和DCM洗涤。然后用30％TFA/DCM(5mL)处理树脂10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(40mg，0.08mmol)、HOAt(11mg，0.08mmol)、DIC(25μL，0.16mmol)和DIEA(50μL)在DMF(1mL)中的溶液处理，并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩，并使用反相HPLC用20-100％MeOH/H_2O+0.1％(v/v)TFA经1小时纯化。分离523nmol(0.1％)的N_3-2H-K4NMeS-Aak。N_3-2H-K4NMeS Aak($C_{96}H_{124}N_{25}O_{12}$)MS计算值(M+H)1818.9861，MS实测值1819.0081(M+H)；t_R＝32分钟。

[0091] 生物素-N_3-2H-K4NMeS-Aak的合成。参见图41。将Rink酰胺树脂(250mg，0.15mmol)在DMF中在室温下溶胀10分钟，然后用20％哌啶的DMF溶液(3mL，2×20分钟)脱保护。将树脂用DMF(3×3mL)洗涤，并使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与1M溴乙酸(2mL)在DMF和DIC(125μL，0.8mmol)中的溶液反应两次。将树脂用DMF(3×3mL)洗涤，并使用设定为10％功率的700W微波通过微波辐射(3×15s)与N-(2-(D-生物素基氨基)乙基]胺[3](100mg，0.3mmol)在DMF(3mL)中的溶液反应。将树脂与该溶液在室温下振荡1小时，然后用DMF(3×5mL)洗涤。剩余的合成如上面针对N_3-2H-K4NMeS-Aak所述的进行。分离230nmol生物素-N_3-2H-K4NMeS-Aak；(0.2％)。生物素-N_3-2H-K4NMeS-Aak($C_{110}H_{146}N_{29}O_{15}S$)MS计算值(M+H)2145.13，MS实测值2145.07(M+H)；t_R＝34min。

[0092] N_3-2H-K4NMeS-TAMRA(羧基四甲基罗丹明)的合成。参见图42。将含有具有Fmoc 6-氨基已酸的N_3-2H-K4NMeS的250mg树脂用30％TFA/DCM(5mL)从珠上切割，持续10分钟。将溶液真空浓缩并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(40mg，0.08mmol)、HOAt(11mg，0.08mmol)、DIC(25μL，0.16mmol)和DIEA(50μL)在DMF(1mL)中的溶液处理，并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩，并使用反相HPLC用20-100％MeOH/H_2O+0.1％(v/v)TFA经1小时纯化。分离2.95μmol产物，通过用1mL 20％哌啶/DMF在室温下处理20分钟除去Fmoc，并将溶液真空浓缩。使用上述条件通过反相HPLC再次纯化残余物。通过用微波辐射加热至75℃持续1.5小时，在DMF(500μL)中用DIC(25μL，0.16mmol)使二聚体的一部分(315nmol)与5-TAMRA(0.4mg，0.95μmol)偶联。将反应混合物浓缩并如上所述纯化以得到216nmol N_3-2H-K4NMeS-TAMRA；(0.1％)。N_3-2H-K4NMeS-TAMRA($C_{118}H_{144}N_{27}O_{15}$)MS计算值(M+H)2179.1335，MS实测值2179.0483(M+H)；t_R＝34min。

[0093] FAM-2H-K4NMeS-Aak(荧光素)的合成。参见图43。用30％TFA/DCM(5mL)将含有具有Fmoc 6-氨基已酸的N_3-2H-K4NMeS的500mg树脂从珠上切割，持续10分钟。将溶液真空浓缩

并与甲苯共沸三次。将得到的浅黄色油状物用Hoechst羧酸酯(40mg,0.08mmol)、HOAt(11mg,0.08mmol)、DIC(25μL,0.16mmol)和DIEA(50μL)在DMF(1mL)中的溶液处理,并通过微波加热至75℃持续1.5小时。然后将溶液真空浓缩,并使用反相HPLC用20-100%MeOH/H_2O+0.1%(v/v)TFA经1小时纯化。将产物分离,并通过用1mL 20%哌啶/DMF在室温下处理20分钟除去Fmoc,并将溶液真空浓缩。使用上述条件通过反相HPLC再次纯化残余物以得到8μmol二聚体。然后使其通过在具有三甲胺(250μL)的DMF(2mL)和H_2O(1mL)中在120℃下加热3小时,用FAM炔(25mg,6μmol)和铜催化剂(1mg,1.6μmol)点击。然后将反应混合物如上所述浓缩并纯化,得到550nmol FAM二聚体。将其与甲苯共沸3次,然后用丙炔酸琥珀酰亚胺酯[4](1mg,6μmol)和DIEA(25μL)在DMF(250μL)中的溶液处理。将反应在室温下搅拌4小时,然后如上所述纯化。分离5.9nmol FAM-2H-K4NMeS-Aak;(0.002%)。FAM-2H-K4NMeS-Aak($C_{120}H_{139}N_{26}O_{18}$)MS计算值(M+H)2232.0761,MS实测值2232.0827(M+H);t_R=35min。

生物化学和细胞分析的方法

[0094] 通过液相色谱-质谱法(LC-MS)评价体外点击。为了确定导致DM2的重复NA是否用作通过HDCR进行寡聚化的模板,将含炔和含叠氮化物的化合物与含12个CCUG重复的RNA一起孵育。将$rCCUG_{12}$(50μM终浓度)在60℃下在1×折叠缓冲液(8mM Na_2HPO_4,pH 7.0,185mM NaCl和1mM EDTA)中折叠5分钟。冷却至室温后,加入N_3-K和K-Ak(各自为500μM终浓度),并将反应混合物在37℃下孵育48小时。使用Thermo Scientific LTQ-ETD质谱仪通过LC-MS分析每个样品。使用0-100%乙腈水溶液+0.1%甲酸的梯度,历时10分钟,进行分析。将每种组分的总离子计数归一化为如通过使用含有N_3-K、K-Ak和K 1,4二聚体的等摩尔混合物的对照注射所测量的每种组分的电离百分比。还类似地评价使用$r(CUG)_{12}$、$r(AUUCU)_{12}$、$r(CAG)_{12}$、$r(CGG)_{12}$、具有完全配对茎的RNA发夹和啤酒酵母tRNA(罗氏)的对照反应。

[0095] DM2细胞培养模型中的DM2相关的前mRNA剪接缺陷的评价。为了确定可点击化合物对DM2相关的选择性前mRNA剪接缺陷的影响,采用先前报道的细胞培养模型[5]。简言之,在37℃和5%CO_2下,将C2C12细胞在生长培养基(1×DMEM,10%FBS和1×Glutamax(Invitrogen))中保持为单层。一旦96孔板中的细胞达到60-70%汇合,根据制造商的标准方案,使用1μL Lipofectamine 2000(Invitrogen)用200ng总质粒转染每个样品。使用等量的表达具有300个CCTG重复[1]和BIN1报告小基因的DM2小基因的质粒[5]。5小时后,除去转染混合物,并替换为含有目的化合物的分化培养基(1×DMEM,2%马血清和1×Glutamax)。72小时后,使用Zymo Quick RNA小量制备试剂盒收获总RNA。约150ng的总RNA进行RT-PCR。用于BIN1小基因的RT-PCR引物是5’CATTCACCACATTGGTGTGC(正向)和5’AAGTGATCCTAGACTAGCCGCC(反向)。使用在200V下在1×TBE缓冲液中运行90分钟的变性8%聚丙烯酰胺凝胶分离RT-PCR产物。通过用SYBR Gold(Molecular Probes)染色使产物可视化,并使用Bio-Rad Gel Doc XR+成像系统扫描。

[0096] 通过荧光原位杂交(FISH)评价细胞内点击对细胞核聚集点的破坏。FISH用于确定可点击化合物对细胞核聚集点形成的影响。将C2C12继代培养到Mat-Tek 96孔玻璃底板的生长培养基中。在细胞达到60-70%汇合后,根据制造商的标准方案,使用1μL Lipofectamine 2000用200ng总质粒转染每个孔。使用等量的表达DM2小基因[1]和EGFP的质粒,用作转染的阳性标记。5小时后,除去转染混合物,并用含有目的化合物的分化培养基代替。将细胞用化合物处理72小时,接着使用1ng/μl DY547-2’OMe-$(CAGG)_5$[6]进行如前所述

的FISH。使用Olympus FluoView 1000共聚焦显微镜以100×放大倍数将细胞在1×DPBS中成像。

[0097] 通过质谱鉴定细胞内点击产物。C2C12细胞在T-75皿中在生长培养基中生长。一旦细胞达到60-70％汇合，根据制造商的标准方案，使用Lipofectamine 2000用10μg的表达DM2小基因的质粒转染每个皿。5小时后，除去转染混合物，并用含有目的化合物的分化培养基代替。在转染后立即用12.5μM N_3-K和12.5μM K-Ak、12.5μM N_3-K-Ak或12.5μM N_3-K-Aak的混合物处理细胞。加入N_3-K以限制低聚产物的分子量，以便能够通过LC-MS检测。72小时后，通过用在乙腈中的10％水冷冻和解冻来裂解细胞。将解冻的裂解物浓缩并重悬浮于1mL的在乙腈中的10％水中。将不溶性细胞碎片沉淀，并将上清液用于质谱分析。使用Thermo Scientific LTQ-ETD质谱仪通过LC-MS分析大约20μL的每个样品。使用0-100％乙腈的水溶液+0.1％甲酸的梯度，历时10分钟进行分析。将每种组分的总离子计数归一化为含有N_3-K、K-Ak和K 1,4二聚体的等摩尔混合物的对照注射中的每种组分的电离百分比。

[0098] 通过qRT-PCR分析靶标牵出。C2C12细胞在T-25烧瓶中在生长培养基中生长为单层，并在60-70％汇合下转染。根据制造商的标准方案，使用Lipofectamine 2000用3.4μg的表达DM2小基因的质粒转染每个皿。5小时后，除去转染混合物，并用含有目的化合物的分化培养基代替。在转染后立即用5μM N_3-K-生物素和5μM K-Ak、5μM N_3-K-Ak或5μM N_3-K-Aak的混合物处理细胞。加入N_3-K-生物素以限制低聚产物的分子量，以便能够通过LC-MS检测。72小时后，用1×DPBS洗涤细胞并用胰蛋白酶处理。通过用500μL裂解缓冲液(2％Triton X-100,2％NP40,1/25RNAsecure(Ambion)和1μg/μL RQ1DNAse(Promega))[7]在室温下处理5分钟来裂解沉淀的细胞，然后在75℃孵育5分钟。

[0099] 使用15nmol链霉亲和素蛋白-琼脂糖珠(Sigma,15μg/mL生物素负载)将约90％的细胞裂解物牵出。裂解物与所述珠在室温下以500rpm振摇孵育1小时。除去溶液，并用500μL等分的1×PBS洗涤珠。通过在30μL含有10mM EDTA的pH 8.2的95％甲酰胺中在95℃下加热5分钟，从珠中释放结合的材料。

[0100] 根据制造商的方案，使用qScript cDNA合成试剂盒通过加入约10％体积的细胞裂解物或洗脱物质进行逆转录反应。然后，每个cDNA样品的30％用于每个引物组的实时PCR(qPCR)分析。使用SYBR Green I在7900HT Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)上进行qPCR。含有r(CCUG)^{exp}的mRNA的PCR引物是5’GTGAGTTTGGGGACCCTTGA(正向)和5’CACCCTGAAAACTTTGCCCC(反向)。18S核糖体RNA的PCR引物是5’GTAACCCGTTGAACCCCATT(正向)和5’CCATCCAATCGGTAGTAGCG(反向)。

[0101] 通过LC-MS分析牵出的反应产物。为了检测牵出的产物，将约4μL洗脱物质稀释在5体积含有0.1％TFA的水中，并使用Thermo Scientific LTQ-ETD质谱仪通过LC-MS分析。将这些样品与来自不表达r(CCUG)$_{300}$的化合物处理的细胞的牵出的样品进行比较。使用0-100％乙腈水溶液+0.1％甲酸的梯度，历时10分钟进行分析。

[0102] 患者来源的成纤维细胞中DM1剪接缺陷的评价。小分子二聚体的生物活性通过使用含有500个CTG重复的DM1患者来源的成纤维细胞(GM03987)和健康成纤维细胞(GM07492)来评估。细胞在12孔板中在生长培养基(1X EMEM(隆萨)、10％FBS、1X glutagro(Corning)、1X MEM非必需氨基酸(Corning)和1X抗生素/抗霉菌剂(Corning))中生长为单层。一旦细胞达到～80％汇合，就用含有目的化合物(10、1、0.1和0.01μM 2H-K4NMeS;100、10和1nM 2H-

K4NMeS-CA-生物素;1μM N_3-2H-K4NMeS;500nM N_3-2H-K4NMeS+500nM 2H-K4NMeS-氨基己酸;1000、10和0.1nM N_3-2H-K4NMeS-Aak;250、100和50nM 2H-K4NMeS-博来霉素A5)的生长培养基处理该细胞。48小时后,裂解细胞,并使用Zymo Quick RNA小量制备试剂盒收获总RNA。根据制造商推荐的方案完成柱上DNA消化。使用100单位Superscript III逆转录酶(美国生命技术公司)在50℃下逆转录大约150ng的总RNA。然后使用GoTaq DNA聚合酶(Promega)对20%的RT反应进行PCR。在95℃30秒、58℃30秒、72℃1分钟和72℃最终延伸1分钟的25个循环后观察RT-PCR产物。在1X TAE缓冲液中在100V下运行1小时的2%琼脂糖凝胶上分离产物。通过用溴化乙锭染色显现产物,并使用Bio-Rad Gel Doc XR+成像系统扫描。MBNL1的RT-PCR引物是5'GCTGCCCAATACCAGGTCAAC(正向)和5'TGGTGGGAGAAATGCTGTATG(反向)。

[0103] 使用DM1小鼠模型评价剪接缺陷。所有实验程序、小鼠处理和饲养均根据实验动物管理评估和认证委员会完成。使用DM1[8]、在品系20b中的HSA^{LR}的小鼠模型。HSA^{LR}小鼠表达在3' URT中具有250个CUG重复的人骨骼肌动蛋白RNA。用100mg/kg 2H-K4NMe水溶液或13.3mg/kg 2H-K4NMeS(用于治疗)和用0.9%NaCl(用于对照)腹膜内注射年龄和性别匹配的HSA^{LR}小鼠,每天一次,持续7天。在最后一次注射后1天处死小鼠,并获得股肌。从股肌组织中提取RNA,并如前所述合成cDNA。

[0104] 通过使用化合物靶向$r(CUG)^{exp}$来进行小分子二聚体与RNA的体外反应和牵出。生长培养基((1X EMEM(隆萨)、10%FBS、1X glutagro(Corning)、1X MEM非必需氨基酸(Corning)和1X抗生素/抗霉菌剂(Corning)2mL)在95℃下加热灭活15分钟,然后缓慢冷却至室温。然后加入~10,000计数的γ^{32}P标记的RNA($rCUG_{109}$,基于GC的配对的RNA和tRNA),并在95℃下折叠1分钟。然后在50μL RNA溶液中制备2倍稀释的化合物(800、400、200和100nM最终浓度),并在37℃下孵育过夜。然后用1X PBS洗涤400μL链霉亲和素-琼脂糖珠(Sigma)的浆液,然后重悬于2mL 1X PBS中。然后向每个样品中加入30μL的该浆液,并在室温下孵育1小时。然后将样品离心,并将上清液转移到单独的管中。然后将珠用1X PBST洗涤并离心。将上清液转移到含有未结合的RNA的管中。通过闪烁计数测量结合的和未结合的RNA的总放射性计数。

[0105] 使用DM1系统通过Chem-CLIP进行靶标鉴定和牵出。使用含有500个CTG重复的DM1患者来源的成纤维细胞(GM03987)和健康成纤维细胞(GM07492)评估小分子二聚体的靶标鉴定。细胞在$100mm^2$的生长培养基(1X EMEM(隆萨)、10%FBS、1X glutagro(Corning)、1X MEM非必需氨基酸(Corning)和1X抗生素/抗霉菌剂(Corning))中生长为单层。一旦细胞达到~80%汇合,就用含有目的化合物(100nM 2H-K4NMeS-CA-生物素)的生长培养基处理细胞。48小时后,裂解细胞,并使用Trizol试剂(美国生命技术公司)收获总RNA。将大约10μg的总RNA用链霉亲和素-琼脂糖珠(100μL,Sigma)在室温下孵育1小时。然后用1X PBS洗涤珠,通过在60℃下加入100μL的95%甲酰胺、10mM EDTA pH 8.2洗脱结合的RNA 10分钟。使用Zymo Quick RNA微量制备试剂盒清理结合的RNA。大约100ng的RNA用于RT qScript cDNA合成试剂盒(Quanta Biosciences)。将10%的RT反应用于在7900HT快速实时PCR系统(Applied Biosystems)上进行的具有SYBR green master mix(美国生命技术公司)的实时PCR(qPCR)。监测含rCUG的mRNA DMPK(500个重复)、SUPT20HL1(17个重复)、CASK(16个重复)、LRP8(11个重复)、MAP3K4(11个重复)、SCUBE(7个重复)和SORCS2(7个重复)。相对于GAPDH通过$\triangle\triangle C_t$定量。

[0106] 通过Chem-CLIP-Map进行靶标鉴定和牵出。使用含有500个CTG重复的DM1患者来源的成纤维细胞(GM03987)评估小分子二聚体的结合位点的靶标鉴定。细胞在100mm^{2}的生长培养基(1X EMEM(隆萨)、10%FBS、1X glutagro(Corning)、1X MEM非必需氨基酸(Corning)和1X抗生素/抗霉菌剂(Corning))中生长为单层。一旦细胞达到～80%汇合,就用含有目的化合物(100nM 2H-K4NMeS-CA-生物素)的生长培养基处理细胞。48小时后,裂解细胞,并使用Trizol试剂(美国生命技术公司)收获总RNA。通过加热至95℃1分钟,然后在冰上冷却,将约6μg总RNA与8μM反义寡核苷酸在1X RNA酶H缓冲液中折叠。然后加入5单位的RNase H(美国生命技术公司),并将反应在37℃下孵育1.5小时,随后在65℃下热灭活20分钟。然后将切割的RNA用DNA酶在37℃下处理30分钟,然后加入终止缓冲液并在65℃下孵育10分钟。将切割的RNA溶液用链霉亲和素-琼脂糖珠(100μL,Sigma)在室温下孵育1小时。然后用1X PBS洗涤珠子,并通过在60℃下加入100μL的95%甲酰胺、10mM EDTA pH8.2洗脱结合的RNA 10分钟。使用Zymo Quick RNA微量制备试剂盒清理结合的RNA。大约150ng RNA用于RT qScript cDNA合成试剂盒(Quanta Biosciences)。将40%的RT反应用于在7900HT快速实时PCR系统(Applied Biosystems)上进行的具有SYBR green master mix(美国生命技术公司)的实时PCR(qPCR)。相对于GAPDH通过△△C_t定量。

[0107] 通过液相色谱-质谱法(LC-MS)评价体外点击。为了确定导致DM1的重复RNA是否用作通过HDCR进行寡聚化的模板,将2H-K4NMeS叠氮化物和各2H-K4NMeS活化的炔衍生物用含有12个CUG重复的RNA孵育。将$rCUG_{12}$(100μM终浓度)在60℃下在1×折叠缓冲液(8mM Na_2HPO_4,pH 7.0,185mM NaCl和1mM EDTA)中折叠5分钟。冷却至室温后,加入叠氮化物和炔二聚体(各自25μM最终浓度),并将反应混合物在37℃下孵育24小时,使用Thermo Scientific LTQ-ETD质谱仪通过LC-MS分析每个样品。使用0-100%乙腈的水溶液加0.1%甲酸的梯度,历时10min进行分析。接下来通过分析在其它RNA靶标存在下形成的二聚体的量来评价与$r(CUG)_{12}$发生最大反应的炔2H-K4NMeS-氨基己酸酯Aak的选择性。评价的其他RNA为$r(CCUG)_{12}$、$r(CAG)_{12}$、$r(CGG)_{12}$和啤酒酵母tRNA(罗氏),各自为100μM的终浓度。

[0108] 使用DM1成纤维细胞通过质谱法鉴别细胞内点击的产物。为了确定引起DM1的重复RNA是否用作细胞内的寡聚化的模板,使含有500个CTG重复的DM1患者来源的成纤维细胞(GM03987)和健康成纤维细胞(GM07492)在T25皿中的生长培养基(1X EMEM(隆萨)、10%FBS、1X glutagro(Corning)、1X MEM非必需氨基酸(Corning)和1X抗生素/抗霉菌剂(Corning))中生长至80%的汇合,并用等摩尔量的N_3-2H-K4NMeS生物素和2H-K4NMeS-Ahx炔(每种500nM)处理2天。用1X DPBS洗涤细胞,然后用胰蛋白酶处理。然后用生长培养基淬灭并旋转下来。将细胞用1X DPBS洗涤2次,然后通过在室温下加入0.25mL裂解缓冲液(总共2mL=2%Triton X 100,2%NP40,80μL RNAsecure(1/25)和50uL DNAse)裂解5分钟,然后加热至75℃持续5分钟。将200μL裂解物用链霉亲和素-琼脂糖珠(100μL,Sigma)在室温下孵育1小时。然后用1X PBST洗涤珠,并通过在60℃下加入20μL的95%甲酰胺、10mM EDTA pH 8.2洗脱结合的RNA 5分钟。将约4μL的每种样品稀释在20μL的水+0.1%甲酸中并使用Thermo Scientific LTQ-ETD质谱仪通过LC-MS分析。使用0-100%乙腈水溶液+0.1%甲酸的梯度,历时10分钟进行分析。

[0109] 使用荧光原位杂交(FISH)评价细胞核聚集点。FISH用于确定小分子二聚体对细胞核聚集点的形成和破坏的影响。使含有500个CTG重复的DM1患者来源的成纤维细胞

(GM03987)在Mat-Tek 96孔玻璃底板的生长培养基中生长至约80%汇合。在生长培养基中用目的化合物处理细胞48小时,然后如前所述[6]使用1ng/μL DY547-2'OMe-$(CAG)_6$进行FISH。如前所述[7],使用MB1a抗体(稀释1:4)完成MBNL1的免疫染色,MB1a抗体由教授Glenn E.Morris大量提供(Wolfson Center for Inherited Neuromuscular Disease[9]。这使用1:200稀释的山羊抗小鼠IgG DyLight 488缀合物进行荧光标记。使用1μg/μL DAPI在1X DPBS中的溶液对未处理的对照进行染色。使用Olympus FluoView 1000共聚焦显微镜以100×放大倍数将细胞在1×DPBS中成像。

[0110] 使用荧光素酶报告基因测定法对翻译缺陷进行评价。表达在荧光素酶的3'UTR中的800或0 CTG重复的C2C12细胞系在96孔板的生长培养基(1X DMEM、10%FBS、1X glutagro (Corning)和1X抗生素/抗霉菌剂(Corning))中生长为单层[10]。一旦细胞是70%汇合,就将点击功能化二聚体加入100μL生长培养基(1000nM N_3-2H-K4NMeS和1000、10和0.1nM N_3-2H-K4NMeS-Aak)中。将细胞用化合物处理48小时,然后使用WST-1试剂(罗氏)归一化细胞计数。然后用1X DPBS洗涤细胞并通过用50μL的PPBT裂解缓冲液在室温下处理10分钟裂解细胞。然后加入50μL荧光素酶底物并测量发光。

[0111] 如通过FRET测量的体外点击的评价。为了确定引起DM1的重复RNA是否作为通过HDCR进行寡聚化的模板,将FAM-2H-K4NMeS Aak和N_3-2H-K4NMeS Aak用含有12个CUG重复的RNA孵育。将$rCUG_{12}$(80μM终浓度)在1×折叠缓冲液(20mM HEPES,pH 7.5,100M KCl和10mM NaCl)中折叠。冷却至室温后,加入FAM-2H-K4NMeS Aak(60nM终浓度)和N_3-2H-K4NMeS Aak(40nM终浓度),并将反应混合物在37℃下孵育总共48小时。通过在485nm激发并在590nm测量发射来测量FRET。通过在不存在RNA的情况下与具有FAM-2H-K4NMeS Aak(60nM终浓度)和N_3-2H-K4NMeS Aak(40nM最终浓度)的对照进行比较来定量FRET中的增强。还使用碱基配对的对照RNA($r(GC)_{20}$)作为阴性对照测量FRET。

实施例部分的引用文件

[1]J.L.Childs-Disney,I.Yildirim,H.Park,J.R.Lohman,L.Guan,T.Tran,P.Sarkar,G.C.Schatz,M.D.Disney,ACS Chem.Biol.2014,9,538-550.

[2]J.L.Banks,H.S.Beard,Y.Cao,A.E.Cho,W.Damm,R.Farid,A.K.Felts,T.A.Halgren,D.T.Mainz,J.R.Maple,R.Murphy,D.M.Philipp,M.P.Repasky,L.Y.Zhang,B.J.Berne,R.A.Friesner,E.Gallicchio,R.M.Levy,J.Comput.Chem.2005,26,1752-1780.

[3]K.J.Bowers,E.Chow,H.Xu,R.O.Dror,M.P.Eastwood,B.A.Gregersen,J.L.Klepeis,I.Kolossváry,M.A.Moraes,F.D.Sacerdoti,J.K.Salmon,Y.Shan,D.E.Shaw,Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing(SC06),Tampa,FL 2006.

[4]T.R.Chan,R.Hilgraf,K.B.Sharpless,V.V.Fokin,Org.Lett.2004,6,2853-2855.

[5]C.Fugier,A.F.Klein,C.Hammer,S.Vassilopoulos,Y.Ivarsson,A.Toussaint,V.Tosch,A.Vignaud,A.Ferry,N.Messaddeq,Y.Kokunai,R.Tsuburaya,P.de la Grange,D.Dembele,V.Francois,G.Precigout,C.Boulade-Ladame,M.C.Hummel,A.L.de Munain,N.Sergeant,A.Laquerriere,C.Thibault,F.Deryckere,D.Auboeuf,L.Garcia,P.Zimmermann,B.Udd,B.Schoser,M.P.Takahashi,I.Nishino,G.Bassez,J.Laporte,D.Furling,N.Charlet-Berguerand,Nat.Med.2011,17,720-725.

[6]M.B.Warf,M.Nakamori,C.M.Matthys,C.A.Thornton,J.A.Berglund,Proc.Natl

Acad.Sci.U.S.A.2009,106,18551-18556.

[7]Y.K.Ho,W.T.Xu,H.P.Too,PLoS ONE 2013,8,e72463.

[8]Mankodi,A.,Logigian,E.,Callahan,L.,McClain,C.,White,R.,Henderson,D.,Krym,M.,and Thornton,C.A.(2000)Myotonicdystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat.Science 289,1769-1773.

[9]Holt,I.;Mittal,S.;Furling,D.;Butler-Browne,G.S.;David Brook,J.;Morris,G.E.Genes to Cells 2007,12,1035.

[10]Childs-Disney,J.L.;Hoskins,J.;Rzuczek,S.G.;Thornton,C.A.;Disney,M.D.ACS Chemical Biology 2012.

[0112] 虽然已经以足够详细的方式描述和示例了本发明以使本领域技术人员制造和使用本发明,但是在不脱离权利要求的精神和范围的情况下,各种替代、修改和改进对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0113] 本文提及的所有专利和出版物通过引用并入本文,如同每个单独的出版物被具体地和单独地指示通过引用整体并入本文。

[0114] 已经使用的术语和表达被用作描述而不是限制的术语,并且不意图在使用这些术语和表达时排除所示和所描述的特征或其部分的任何等同物,而是应认识到在所要求保护的本发明的范围内的各种修改是可能的。因此,应当理解,虽然本发明已经通过优选实施方式和任选特征具体公开,但是本文公开的概念的修改和变化可以由本领域技术人员采取,并且这样的修改和变化被认为是在由所附权利要求限定的本发明的范围内。

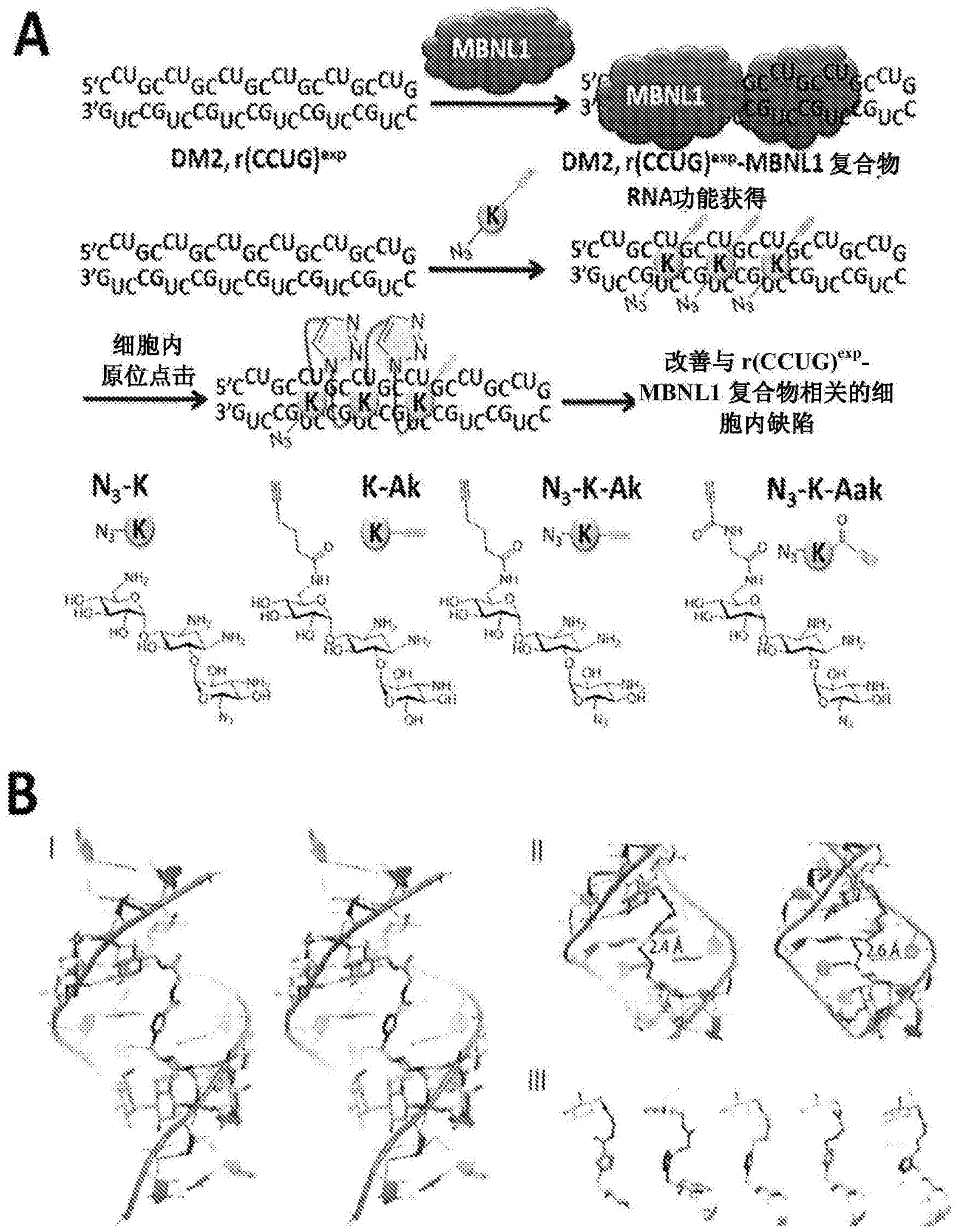

A
MBNL1
5'CCUGCCUGCCUGCCUGCCUGCCUG
3'GUCCGUCCGUCCGUCCGUCCGUCC
DM2, r(CCUG)exp
DM2, r(CCUG)exp-MBNL1 复合物
RNA功能获得
K
N3
细胞内
原位点击
改善与 r(CCUG)exp-
MBNL1 复合物相关的细
胞内缺陷
N3-K
K-Ak
N3-K-Ak
N3-K-Aak
B
I
II
III
2.4 Å

图1

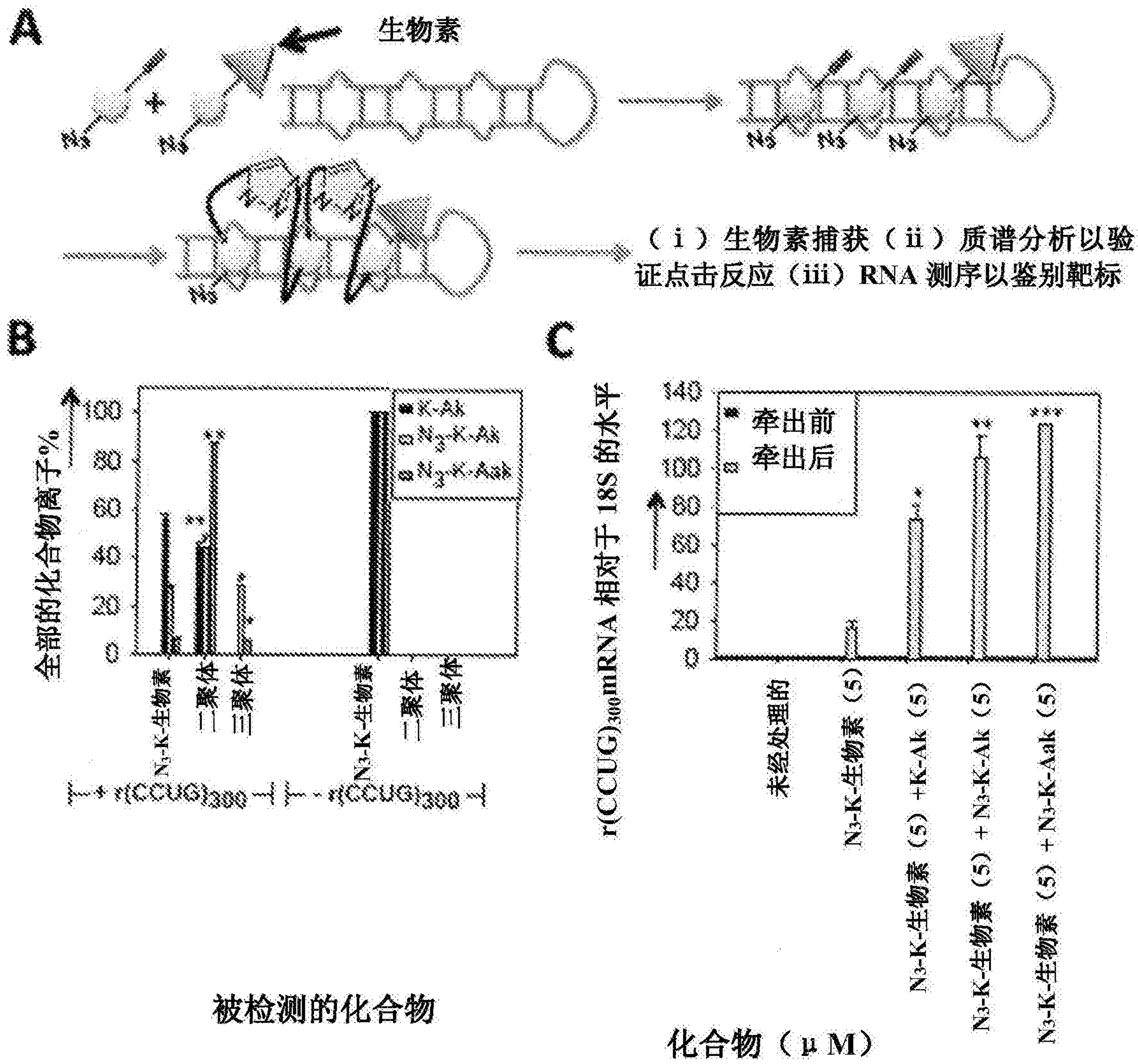

A
生物素
（i）生物素捕获（ii）质谱分析以验证点击反应（iii）RNA 测序以鉴别靶标
B
全部的化合物离子%
K-Ak
N3-K-Ak
N3-K-Aak
N3-K-生物素
二聚体
三聚体
+ r(CCUG)300
- r(CCUG)300
被检测的化合物
C
r(CCUG)300mRNA 相对于 18S 的水平
牵出前
牵出后
未经处理的
N3-K-生物素（5）
N3-K-生物素（5）+K-Ak（5）
N3-K-生物素（5）+ N3-K-Ak（5）
N3-K-生物素（5）+ N3-K-Aak（5）
化合物（μM）

图2

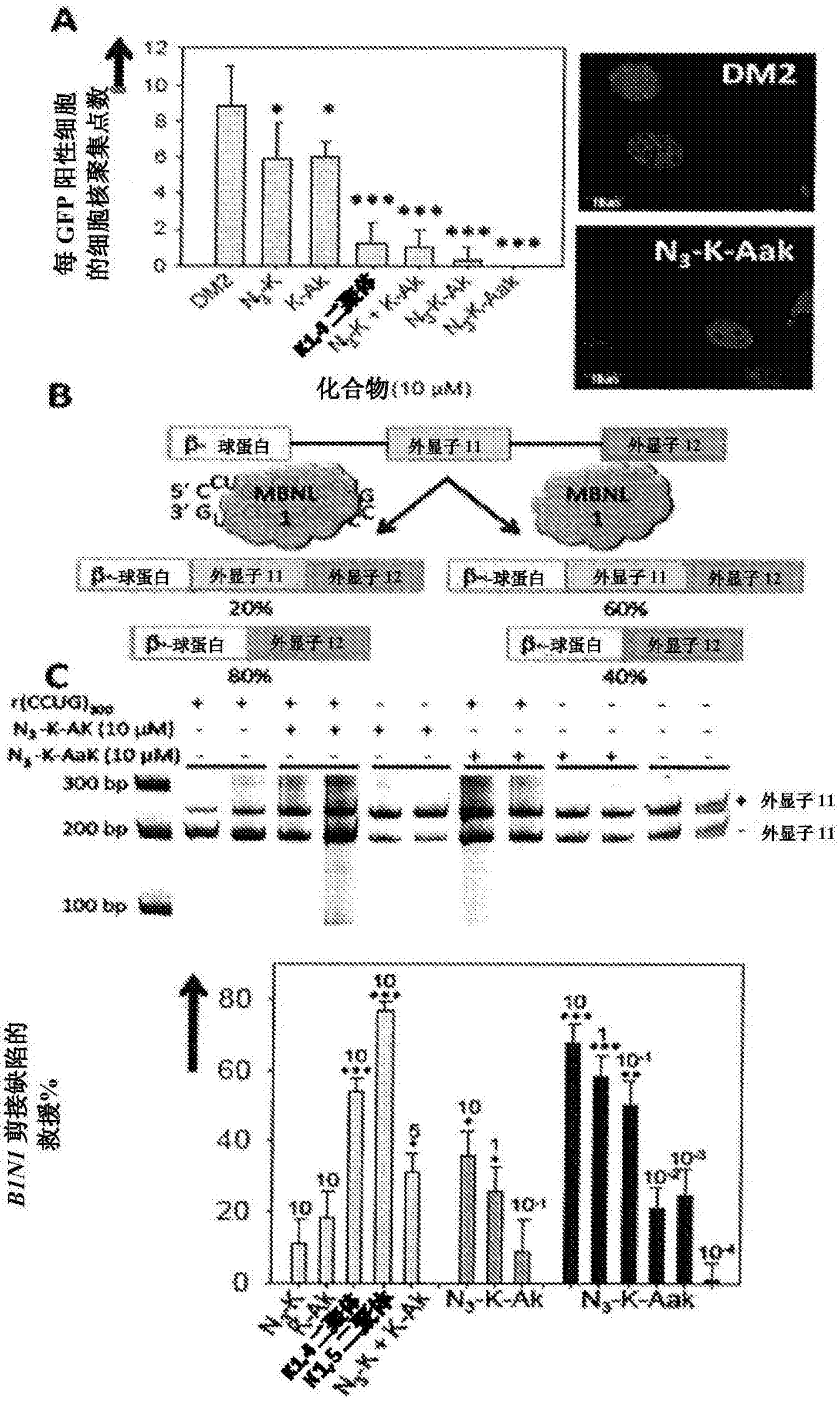

A
每 GFP 阳性细胞的细胞核聚集点数
DM2
N3-K-Aak
化合物(10 μM)
B
β-球蛋白
外显子 11
外显子 12
MBNL 1
20%
80%
60%
40%
C
r(CCUG)
N3-K-AK (10 μM)
N3-K-AaK (10 μM)
300 bp
200 bp
100 bp
+ 外显子 11
- 外显子 11
B1N1 剪接缺陷的救援%
N3-K-Ak
N3-K-Aak

图3

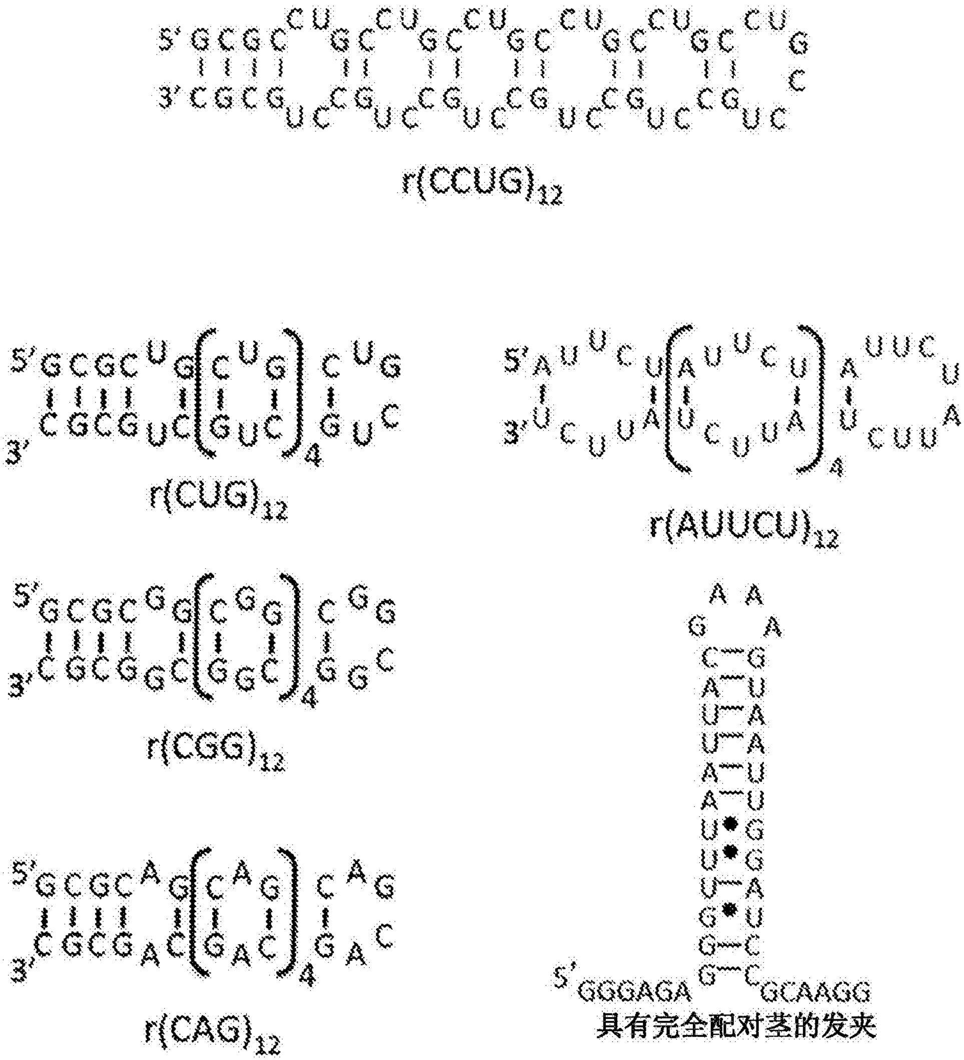

r(CCUG)12
r(CUG)12
r(AUUCU)12
r(CGG)12
r(CAG)12
5'GGGAGA
GCAAGG
具有完全配对茎的发夹

图4

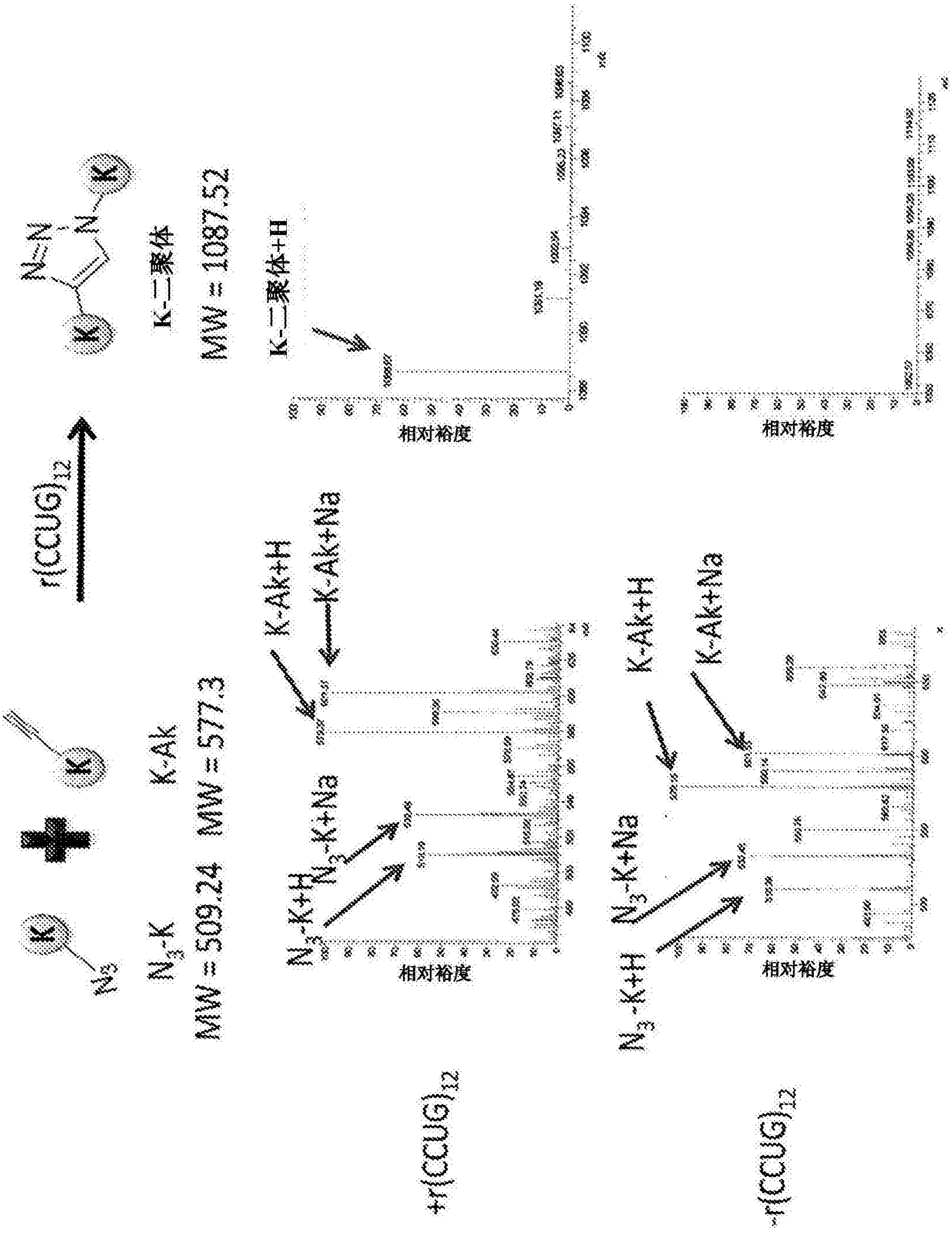
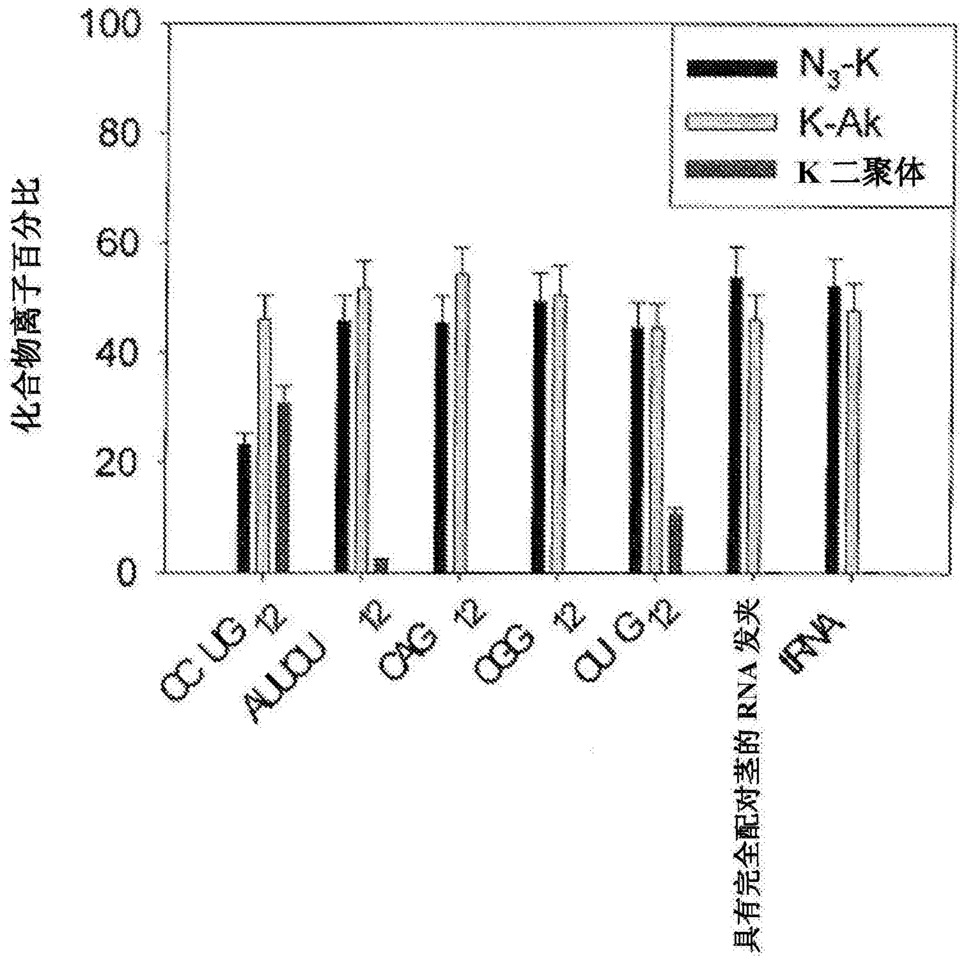
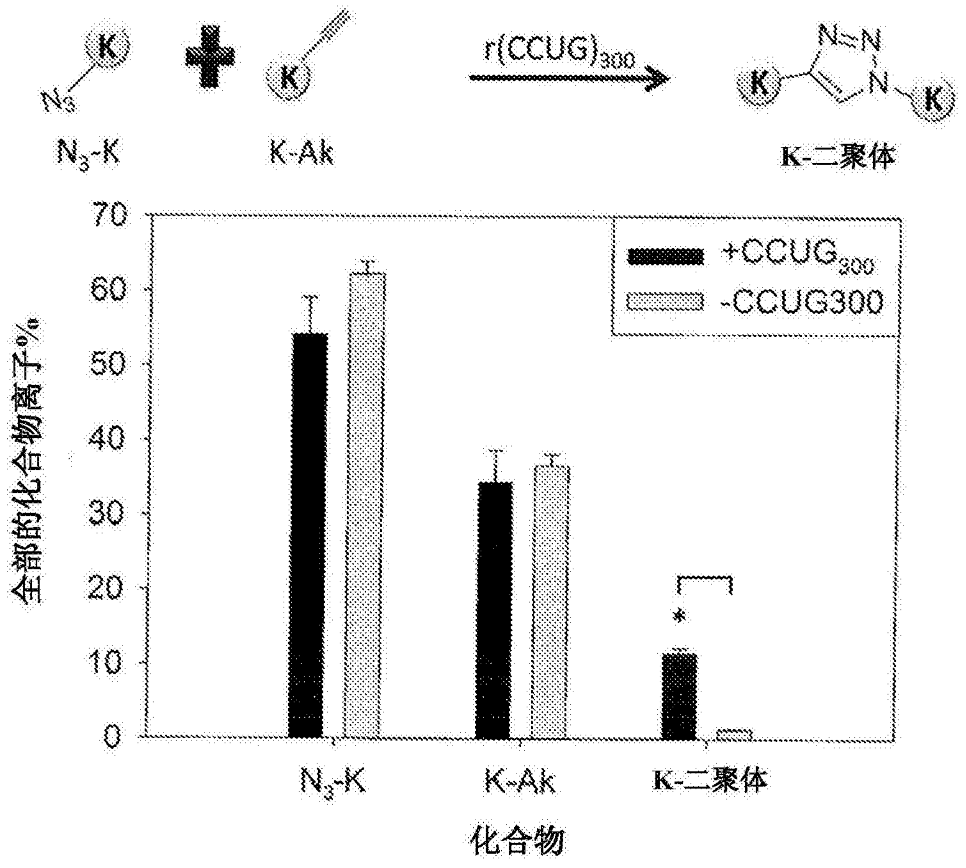

N$_3$-K
MW = 509.24
K-Ak
MW = 577.3
r(CCUG)$_{12}$
K-二聚体
MW = 1087.52
K-二聚体+H
N$_3$-K+H
N$_3$-K+Na
K-Ak+H
K-Ak+Na
相对裕度
+r(CCUG)$_{12}$
-r(CCUG)$_{12}$

图5



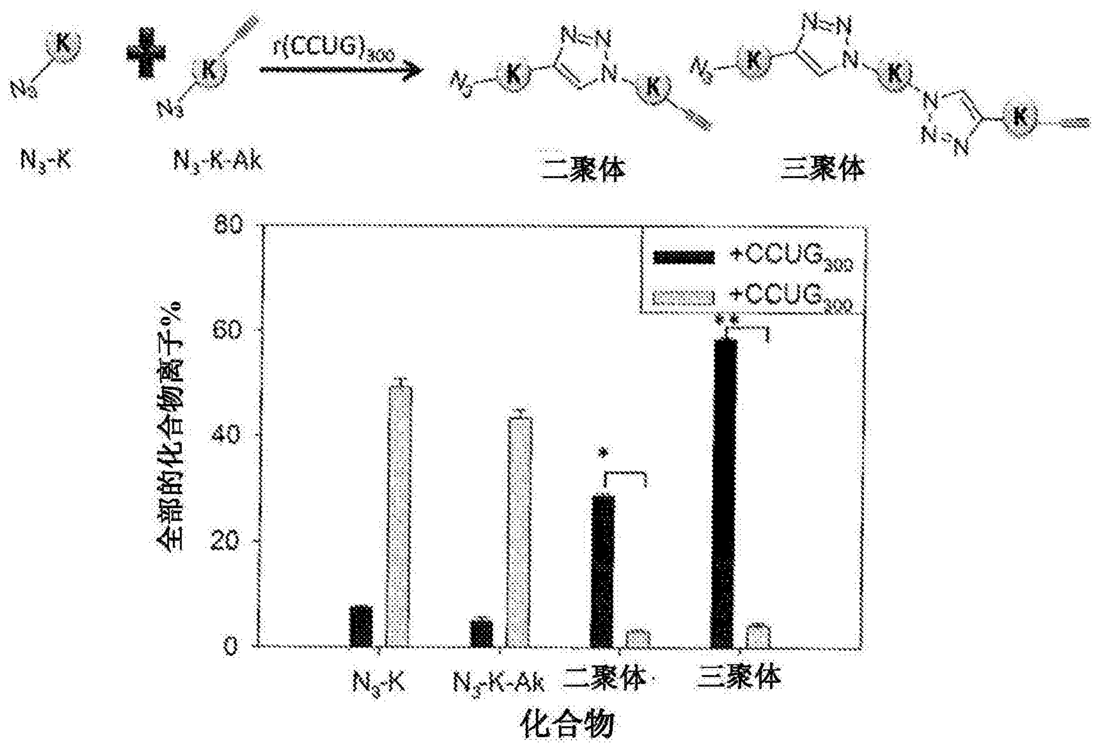
100
80
60
40
20
0
化合物离子百分比
N_3-K
K-Ak
K 二聚体
CCUG 12
AUUCU 12
CAG 12
CGG 12
CUG 12
具有完全配对茎的 RNA 发夹
tRNA

图6



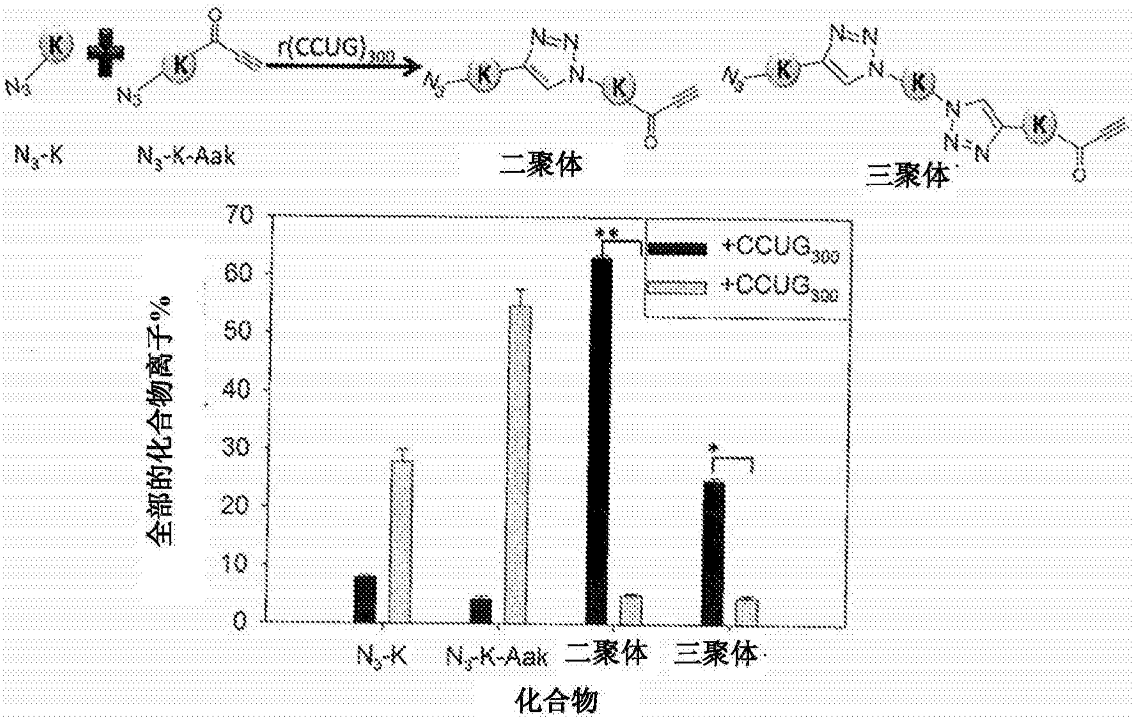
N3-K
K-Ak
r(CCUG)300
K-二聚体
+CCUG300
-CCUG300
全部的化合物离子%
化合物

图7



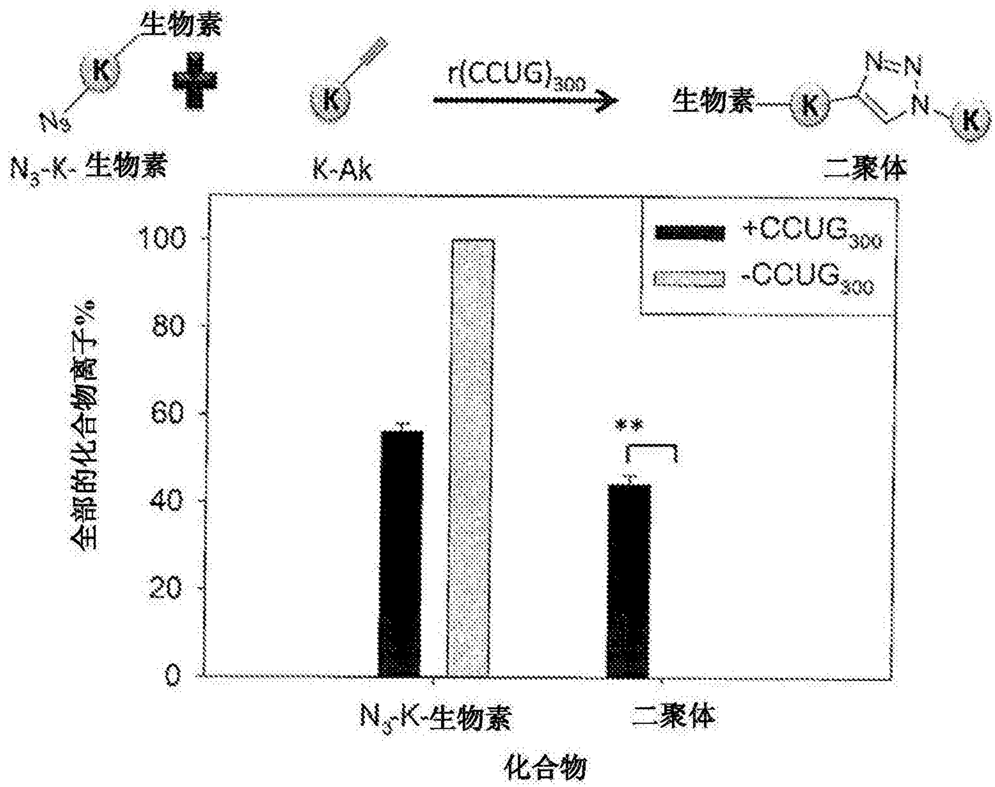
N3-K
N3-K-Ak
r(CCUG)300
二聚体
三聚体
+CCUG300
全部的化合物离子%
化合物

图8



N3-K
N3-K-Aak
r(CCUG)300
二聚体
三聚体
+CCUG300
+CCUG300
全部的化合物离子%
0
10
20
30
40
50
60
70
N3-K
N3-K-Aak
二聚体
三聚体
化合物

图9



生物素
N3-K-生物素
K-Ak
r(CCUG)300
二聚体
+CCUG300
-CCUG300
全部的化合物离子%
0
20
40
60
80
100
N3-K-生物素
二聚体
化合物

图10

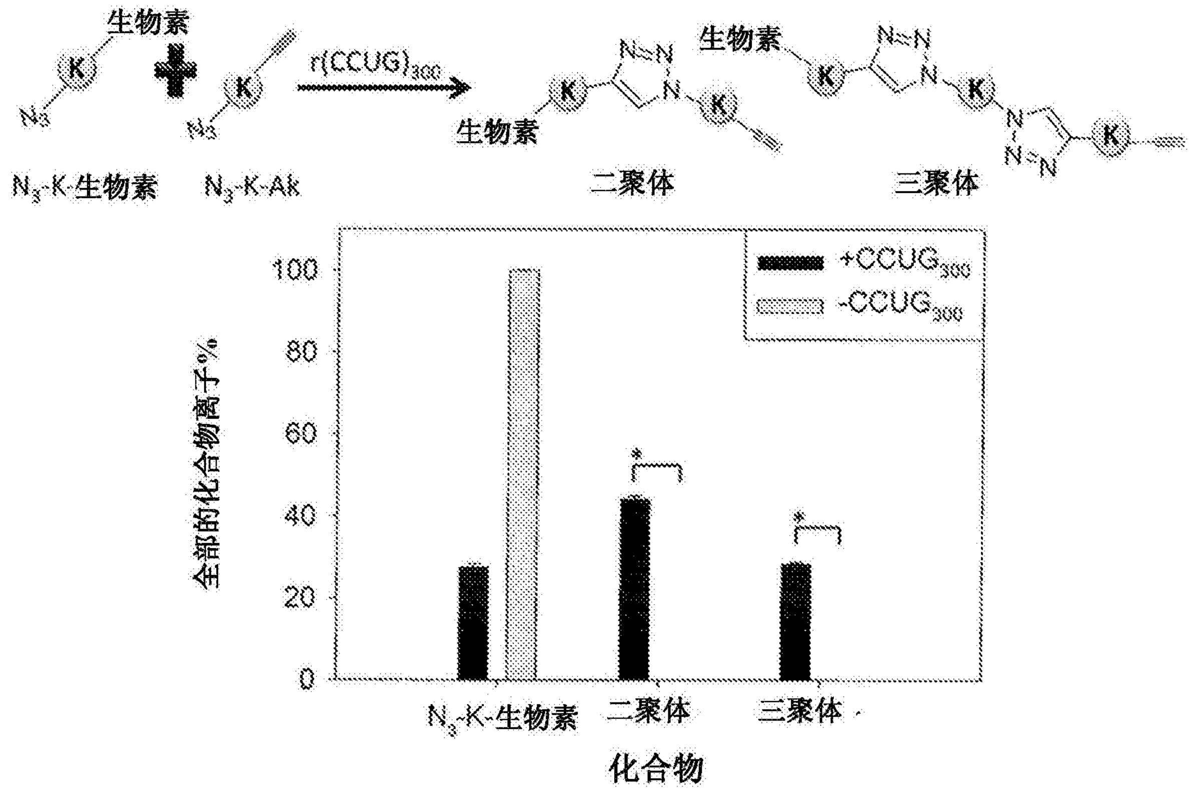

生物素
r(CCUG)$_{300}$
生物素
二聚体
三聚体
N$_3$-K-生物素
N$_3$-K-Ak
+CCUG$_{300}$
-CCUG$_{300}$
全部的化合物离子%
化合物

图11

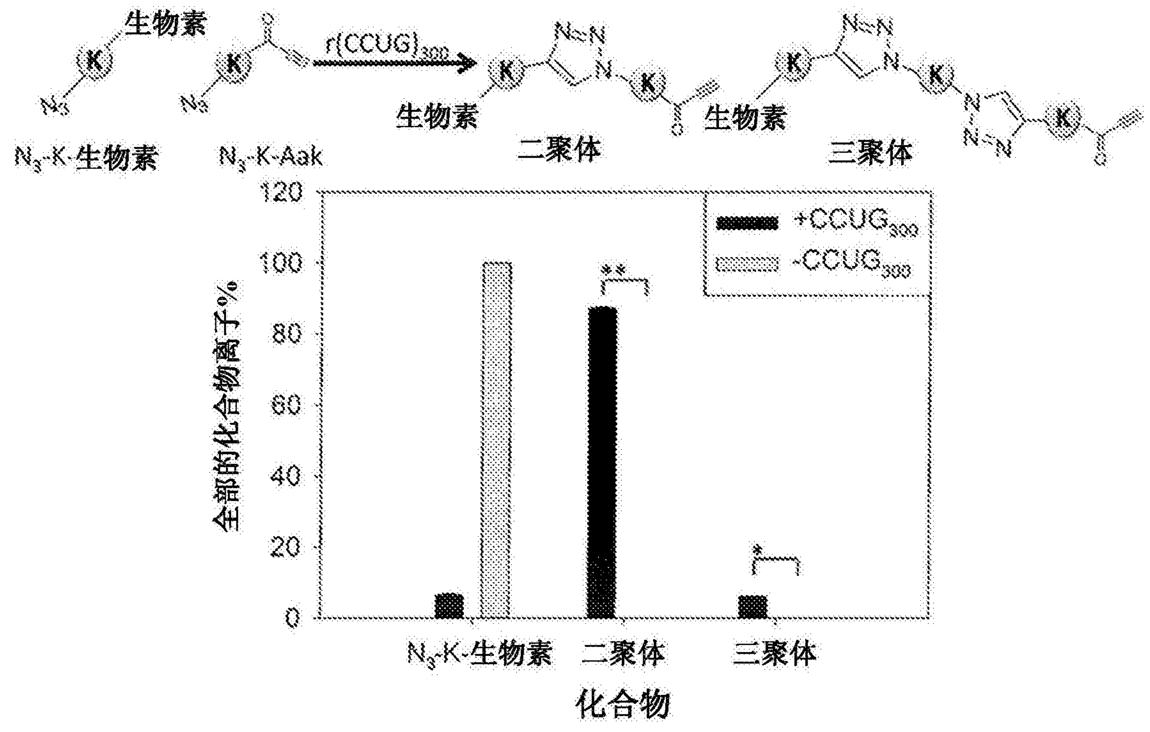

生物素
r(CCUG)$_{300}$
生物素
二聚体
三聚体
N$_3$-K-生物素
N$_3$-K-Aak
+CCUG$_{300}$
-CCUG$_{300}$
全部的化合物离子%
化合物

图12

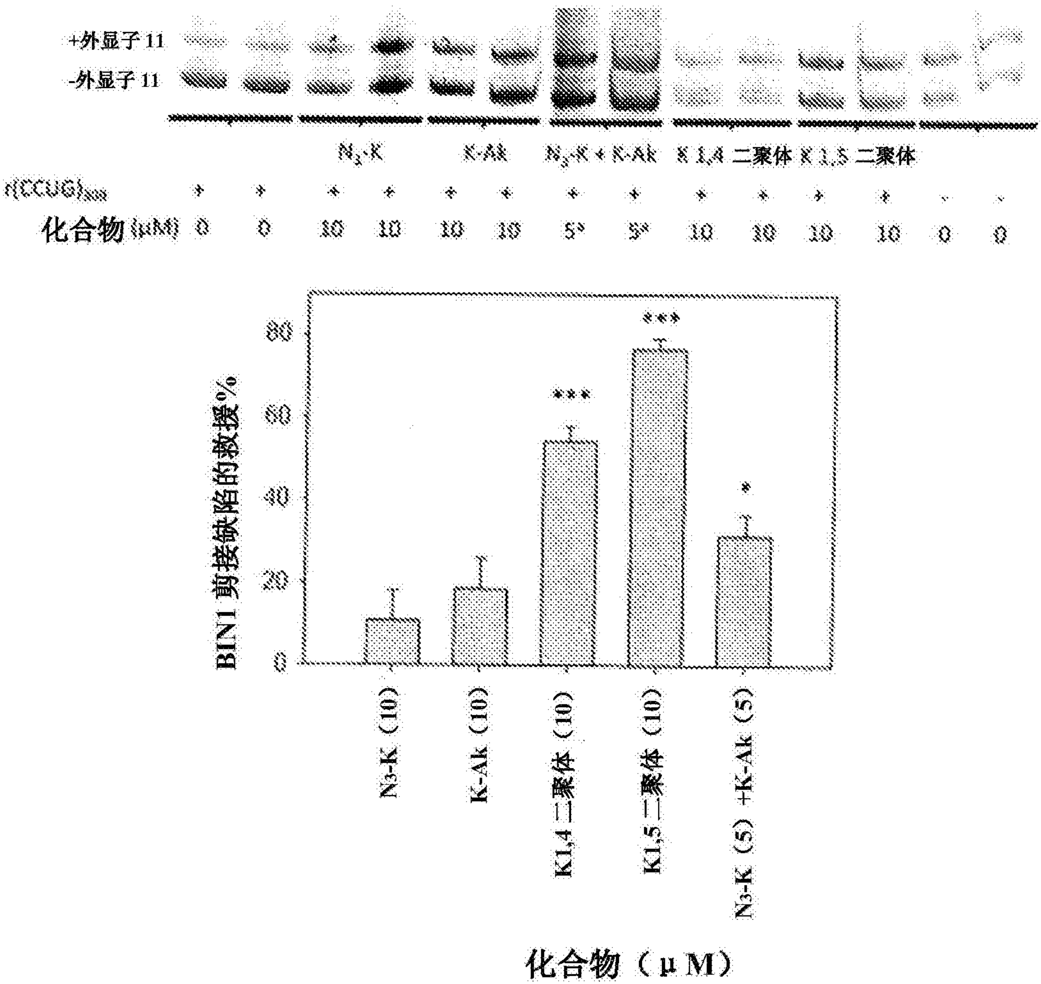
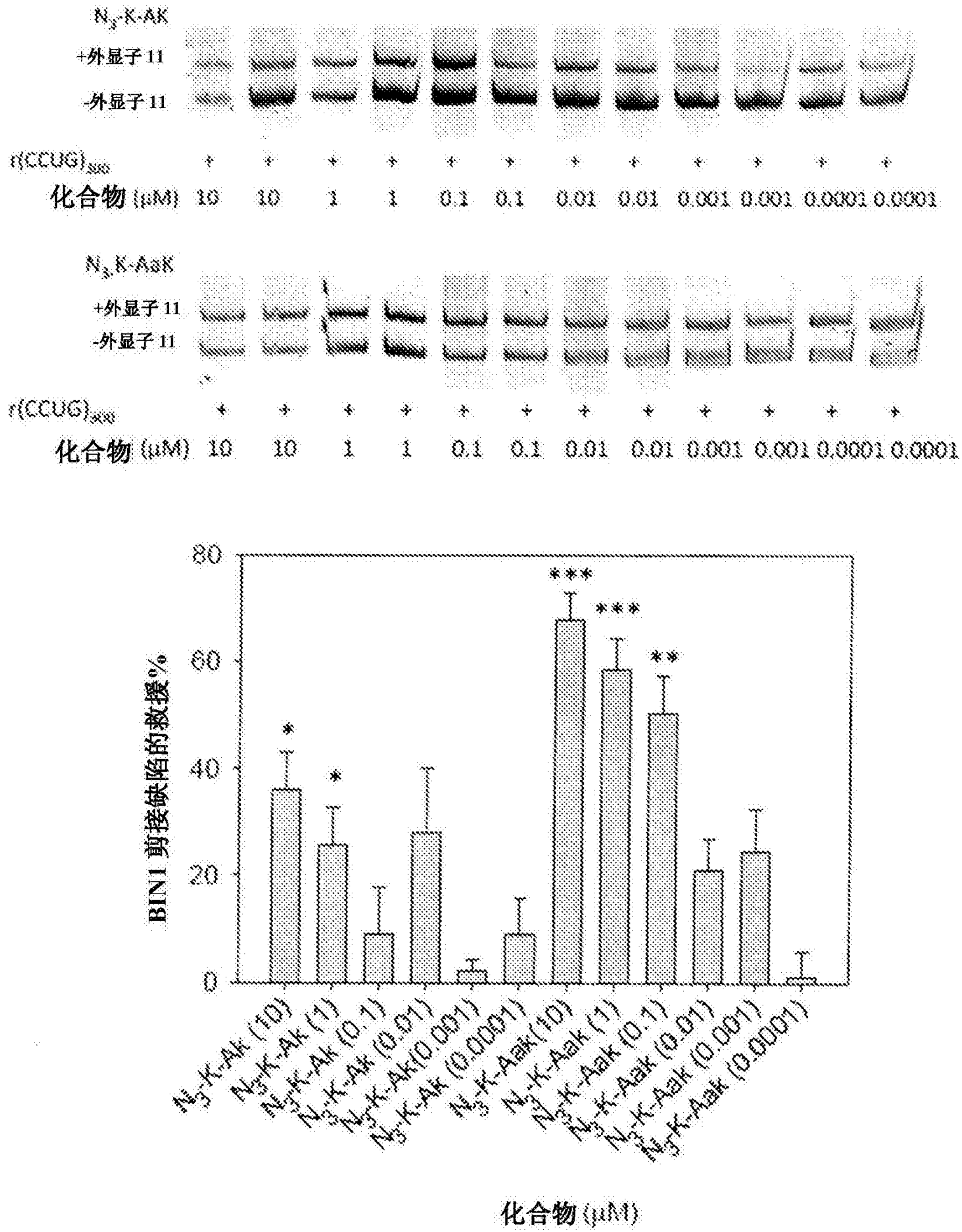

+外显子 11
-外显子 11
N3-K
K-Ak
N3-K + K-Ak
K 1,4 二聚体
K 1,5 二聚体
r(CCUG)300
化合物(μM)
0 0 10 10 10 10 5* 5* 10 10 10 10 0 0
BIN1 剪接缺陷的救援%
0
20
40
60
80
N3-K (10)
K-Ak (10)
K1,4 二聚体 (10)
K1,5 二聚体 (10)
N3-K (5) +K-Ak (5)
化合物 (μM)

图13



N3-K-AK
+外显子11
-外显子11
r(CCUG)300 + + + + + + + + + + + +
化合物(μM) 10 10 1 1 0.1 0.1 0.01 0.01 0.001 0.001 0.0001 0.0001
N3-K-AaK
+外显子11
-外显子11
r(CCUG)300 + + + + + + + + + + + +
化合物(μM) 10 10 1 1 0.1 0.1 0.01 0.01 0.001 0.001 0.0001 0.0001
BIN1剪接缺陷的救援%
0
20
40
60
80
*
*
***
***
**
N3-K-Ak (10)
N3-K-Ak (1)
N3-K-Ak (0.1)
N3-K-Ak (0.01)
N3-K-Ak(0.001)
N3-K-Ak (0.0001)
N3-K-Aak(10)
N3-K-Aak (1)
N3-K-Aak (0.1)
N3-K-Aak (0.01)
N3-K-Aak (0.001)
N3-K-Aak (0.0001)
化合物(μM)

图14

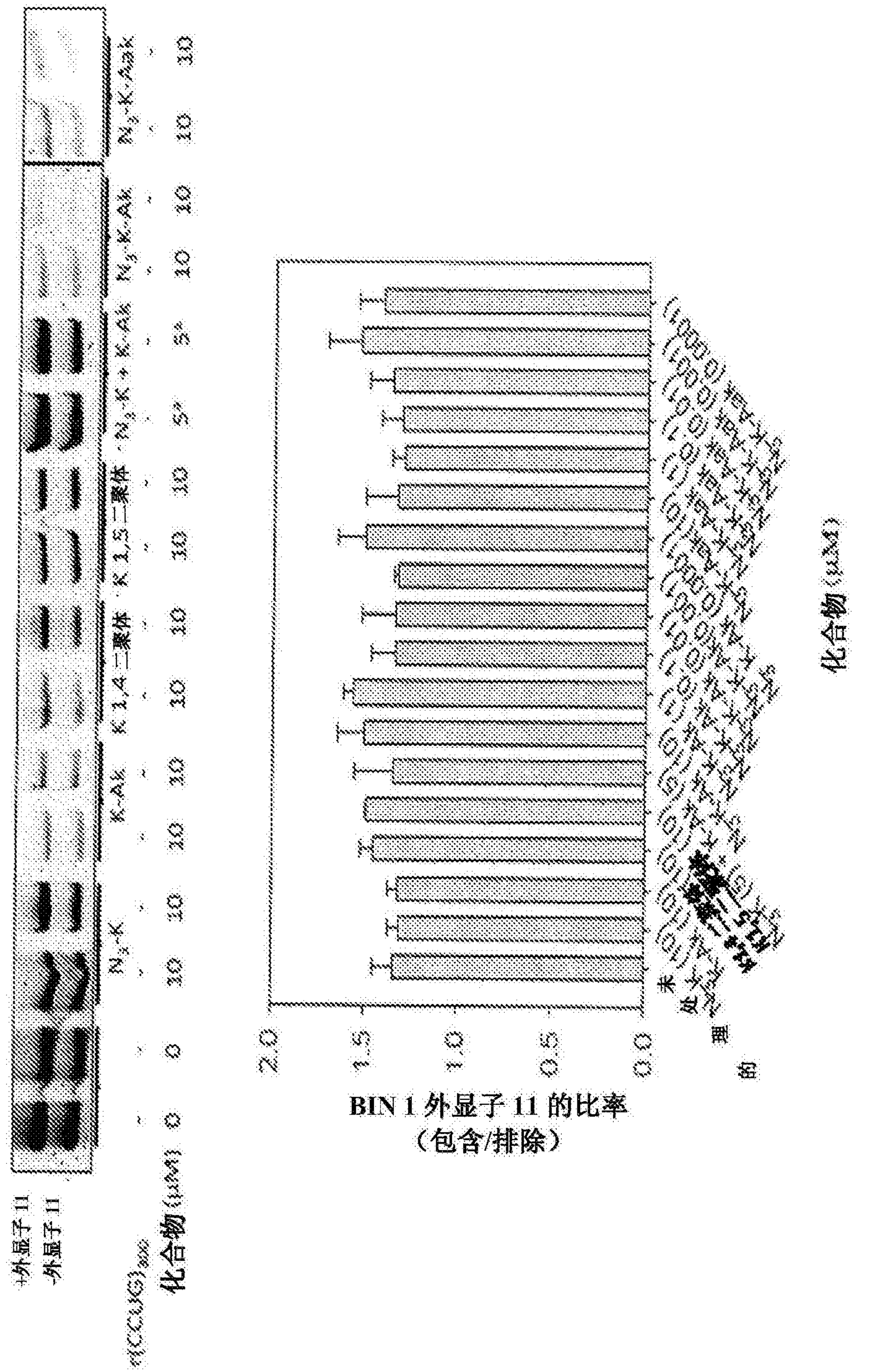


图15

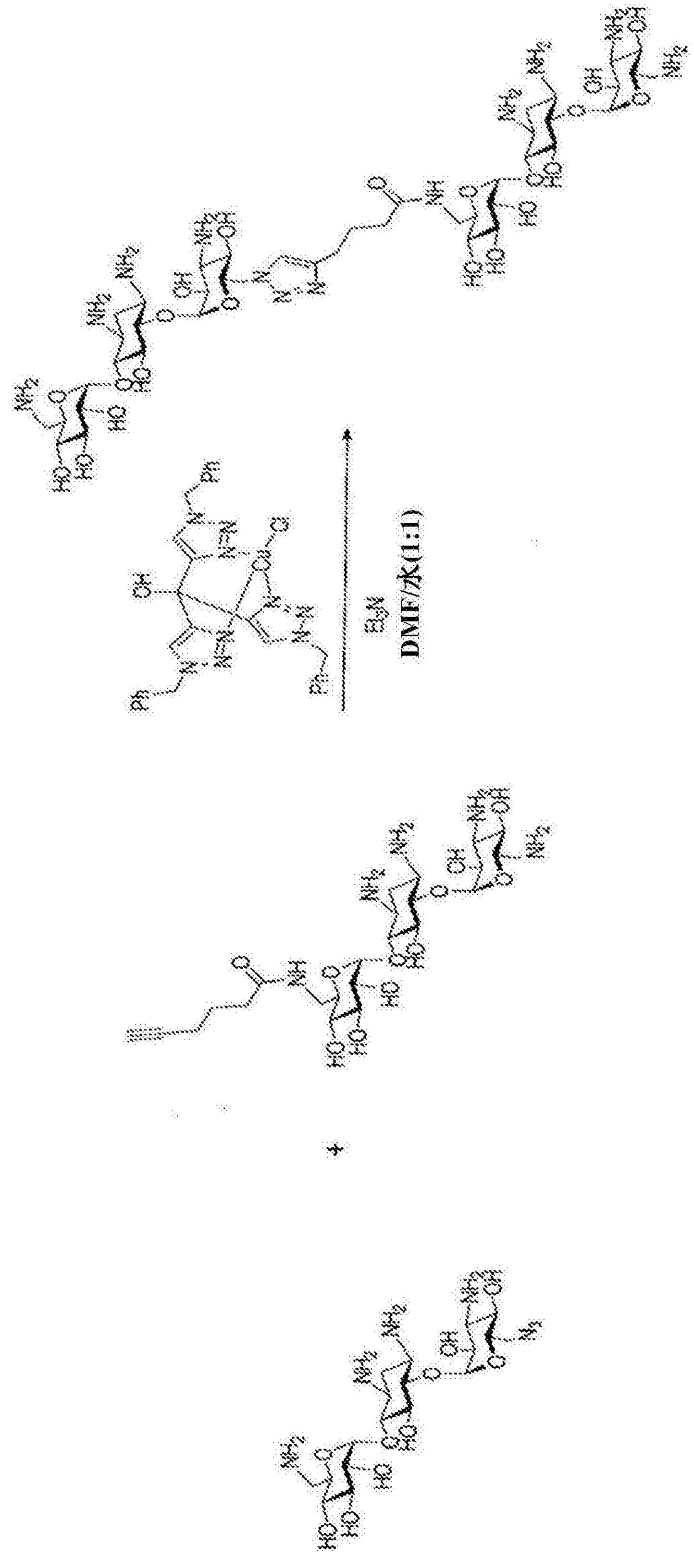


图16

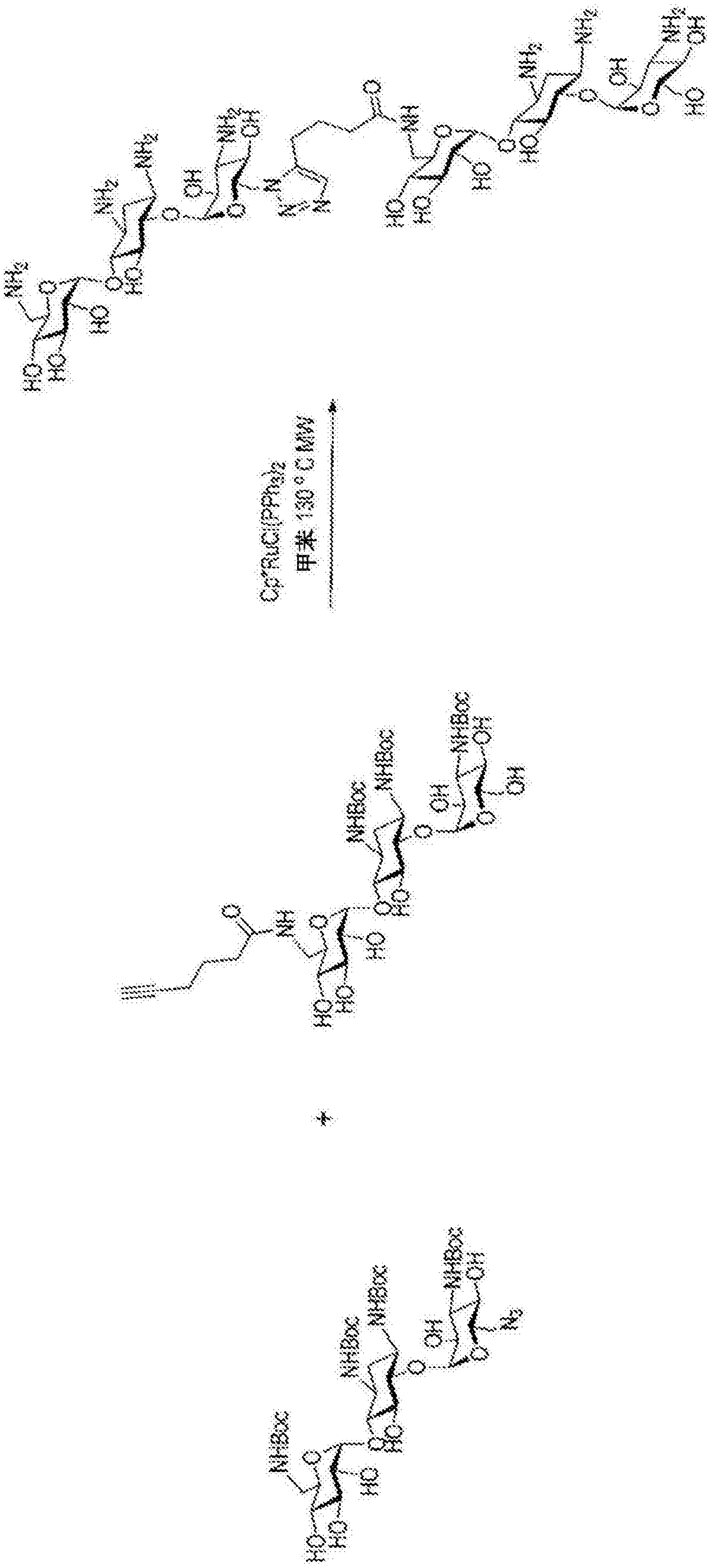


图17

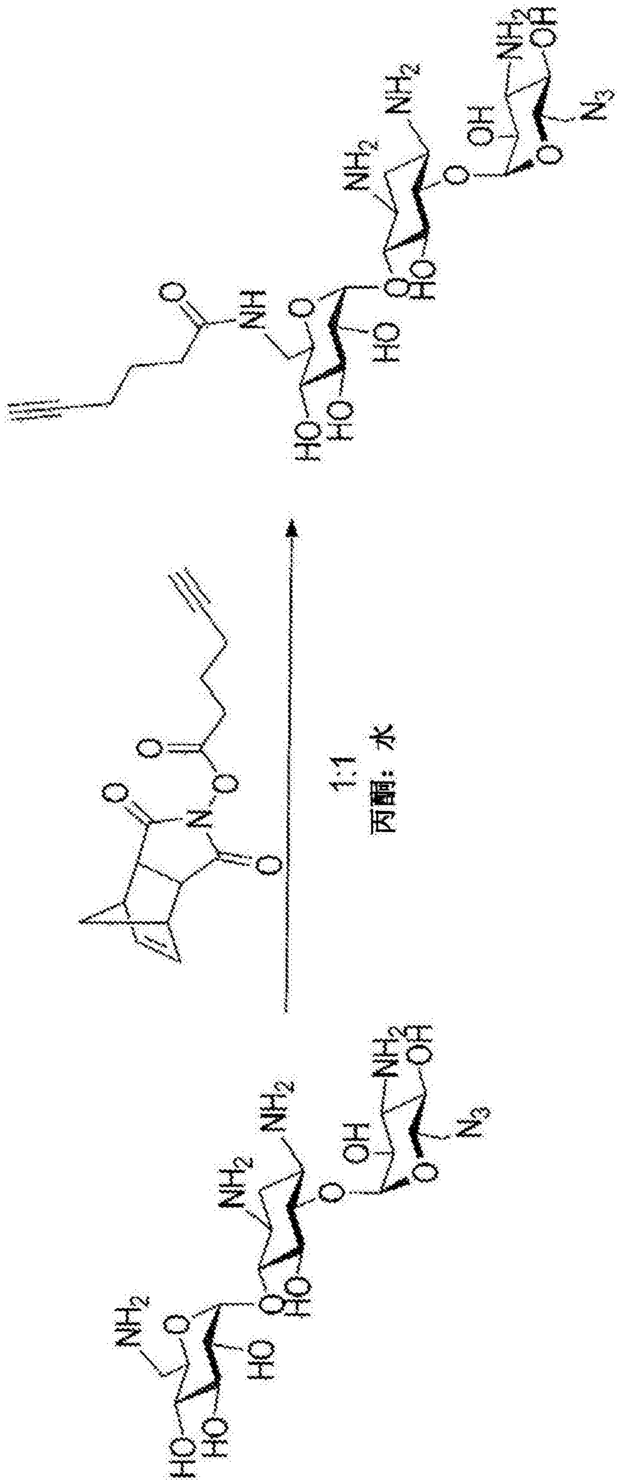


图18

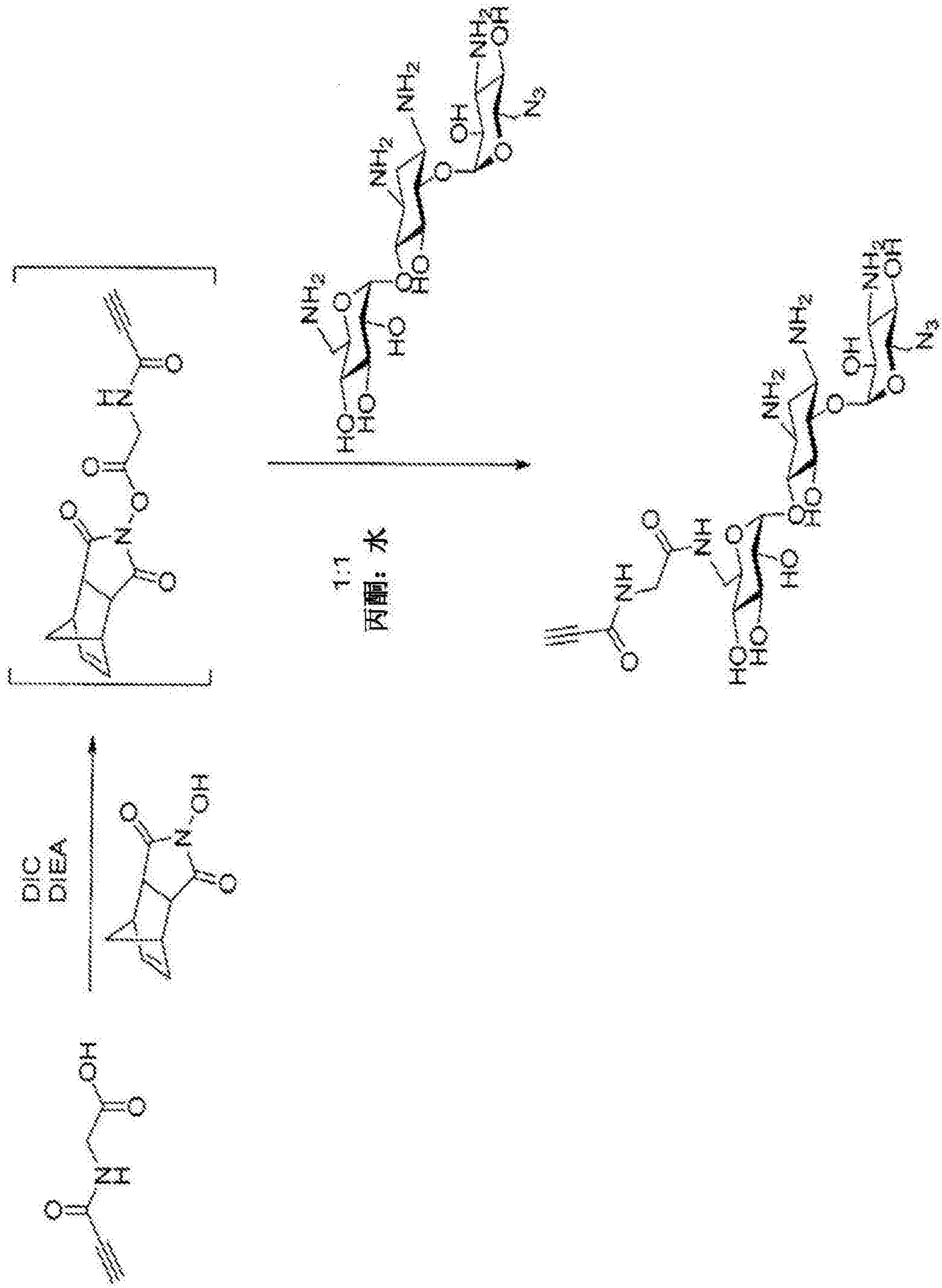


图19

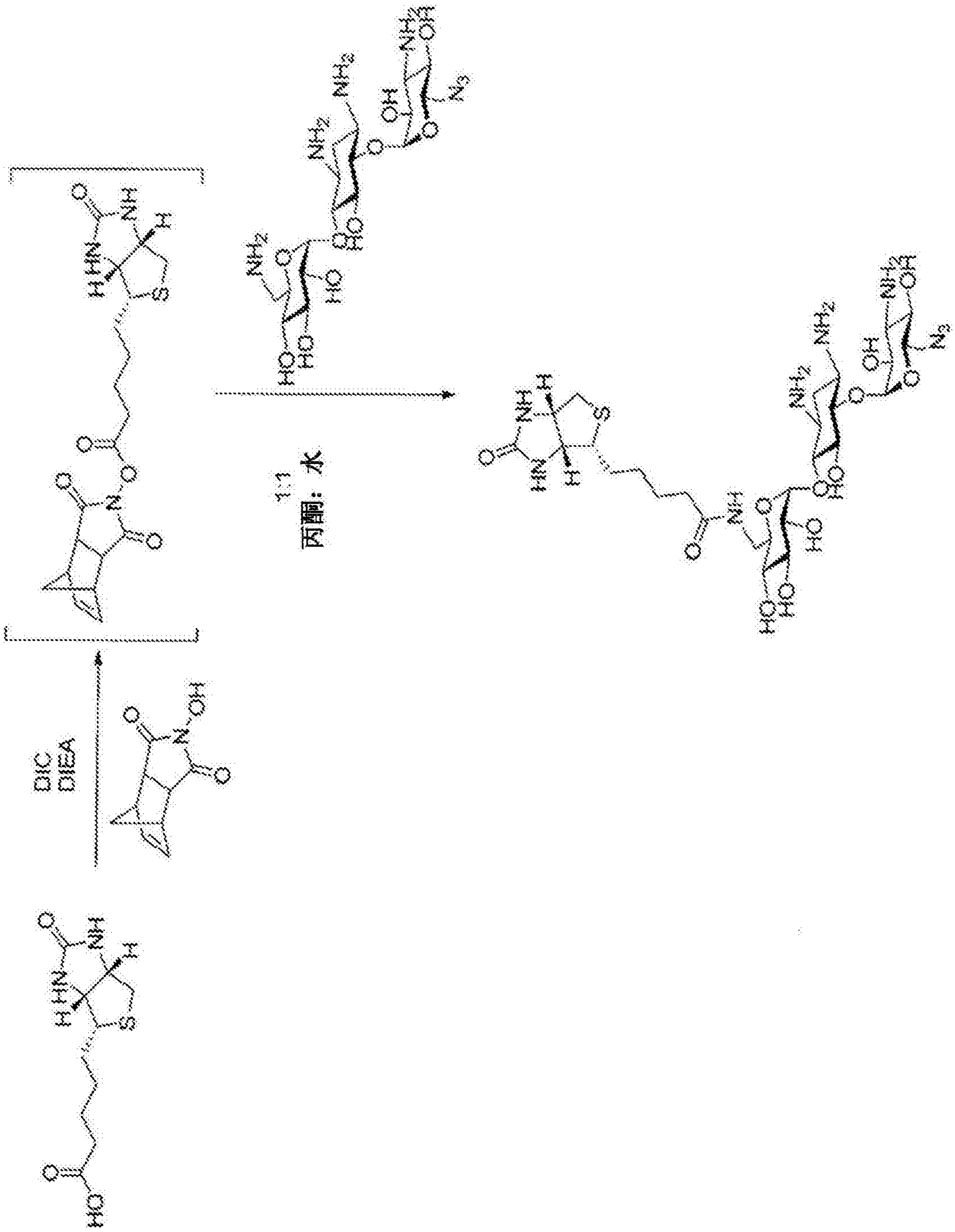


图20

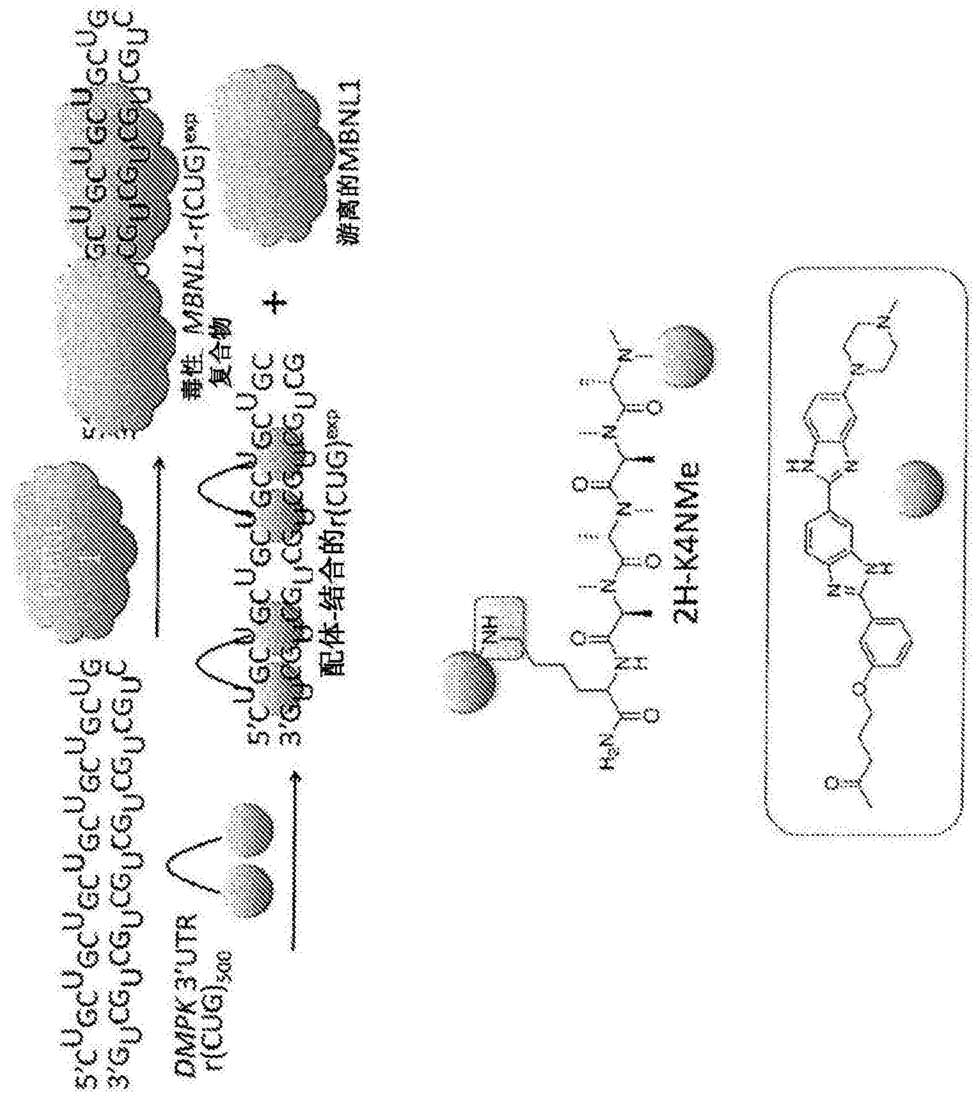

DMPK 3'UTR
r(CUG)500
毒性 MBNL1-r(CUG)exp
复合物
配体-结合的r(CUG)exp
游离的MBNL1
2H-K4NMe

图21

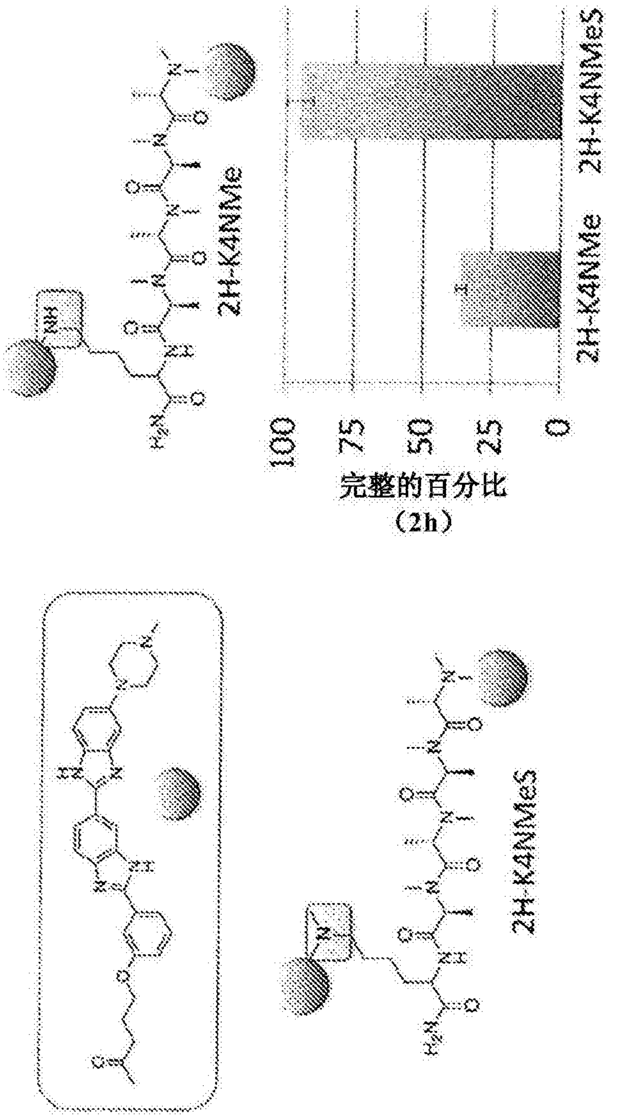

2H-K4NMe
完整的百分比
（2h）
100
75
50
25
0
2H-K4NMe
2H-K4NMeS
2H-K4NMeS

图22

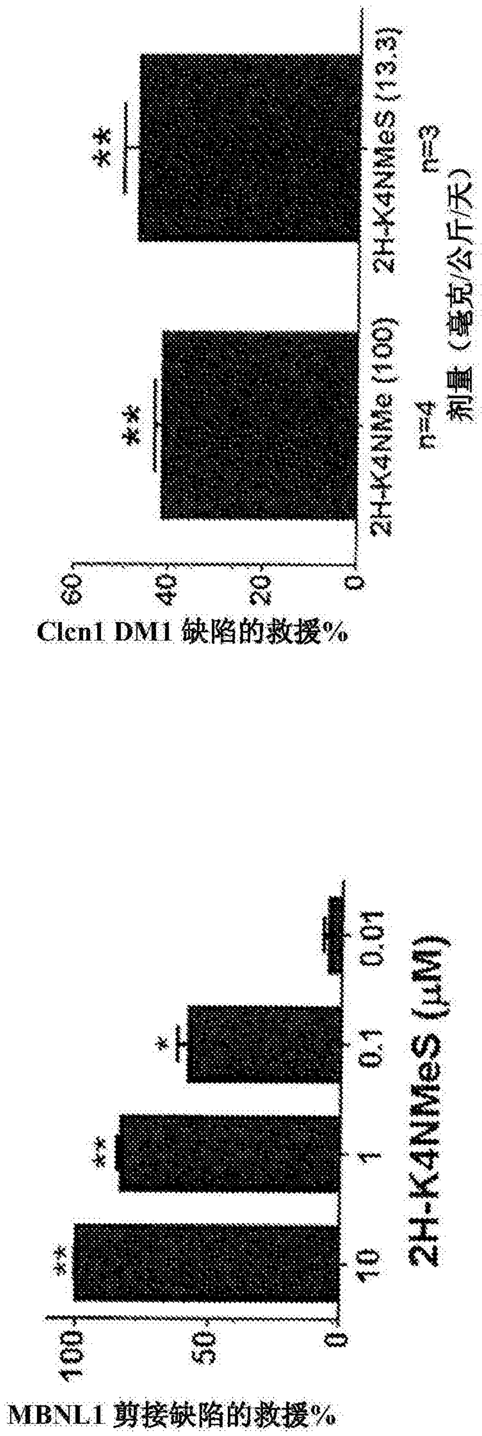

Clcn1 DM1 缺陷的救援%
60
40
20
0
**
**
2H-K4NMe (100)
2H-K4NMeS (13.3)
n=4
n=3
剂量（毫克/公斤/天）
MBNL1 剪接缺陷的救援%
100
50
0
**
**
*
10
1
0.1
0.01
2H-K4NMeS (μM)

图23

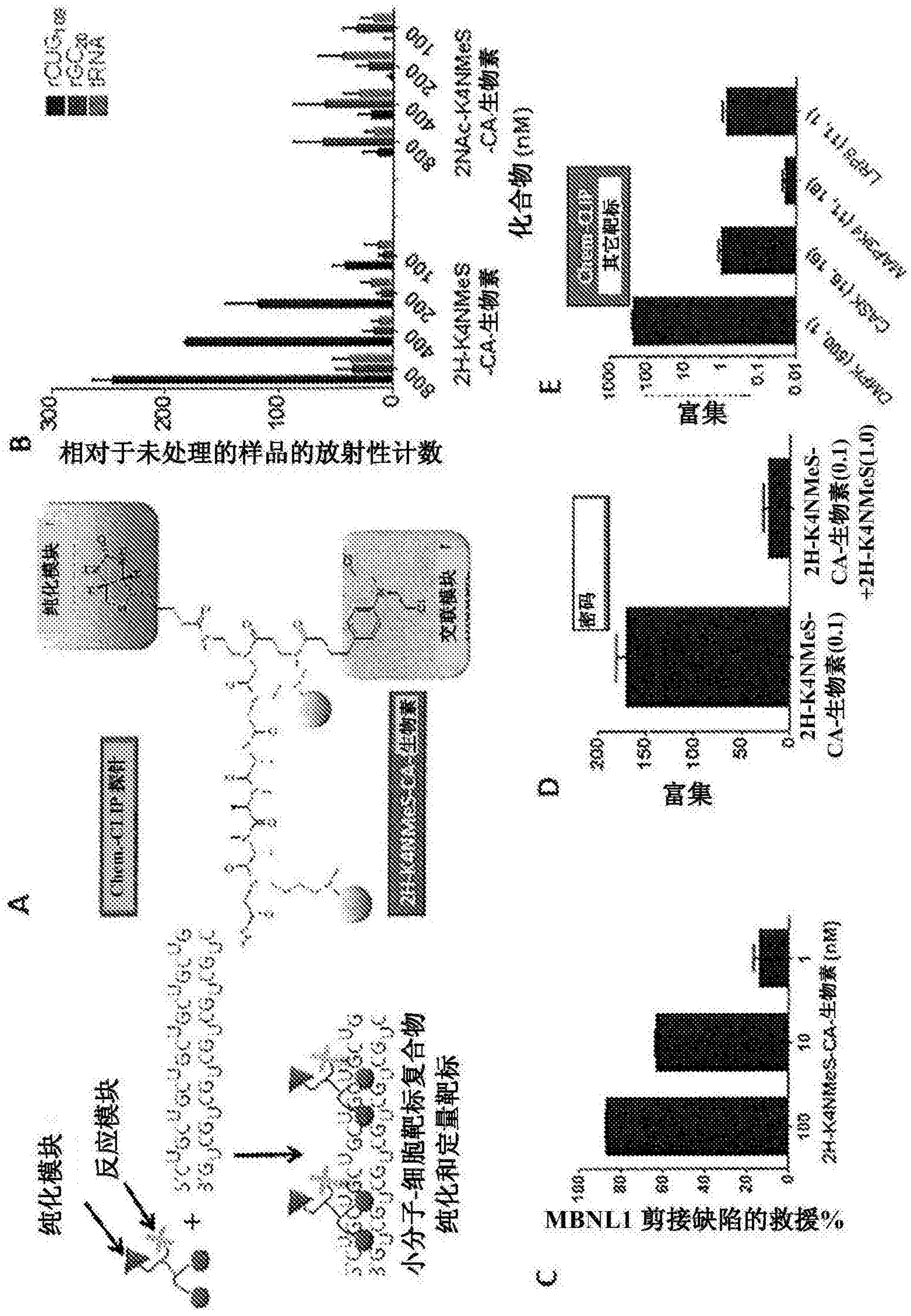

A
纯化模块
反应模块
小分子-细胞靶标复合物纯化和定量靶标
纯化模块
交联模块
B
相对于未处理的样品的放射性计数
2H-K4NMeS-CA-生物素
2NAc-K4NMeS-CA-生物素
化合物 (nM)
C
MBNL1 剪接缺陷的救援%
2H-K4NMeS-CA-生物素 (nM)
D
富集
2H-K4NMeS-CA-生物素(0.1)
2H-K4NMeS-CA-生物素(0.1) +2H-K4NMeS(1.0)
化合物 (μM)
E
富集
其它靶标
含 CUGd 的 mRNA (重复#，相对裕度)

图24

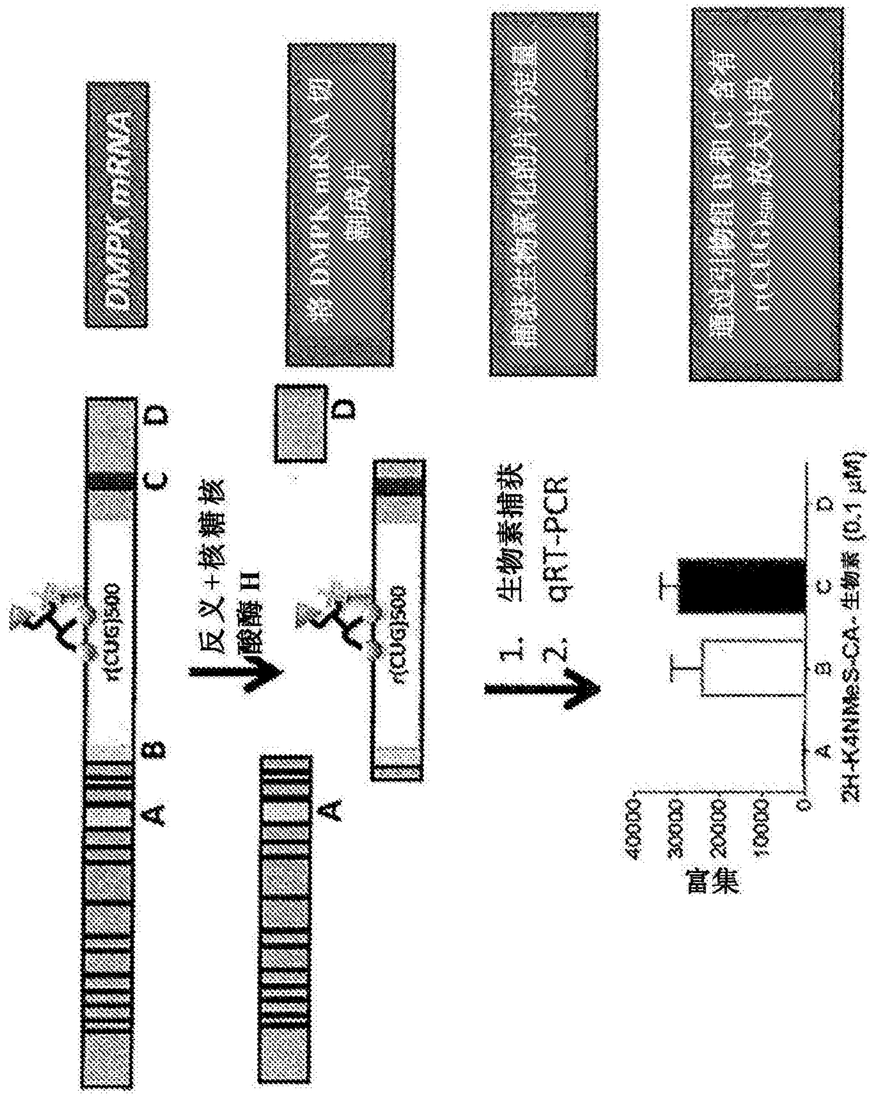

DMPK mRNA
r(CUG)500
A
B
C
D
反义+核糖核酸酶H
1. 生物素捕获
2. qRT-PCR
富集
40000
30000
20000
10000
0

图25

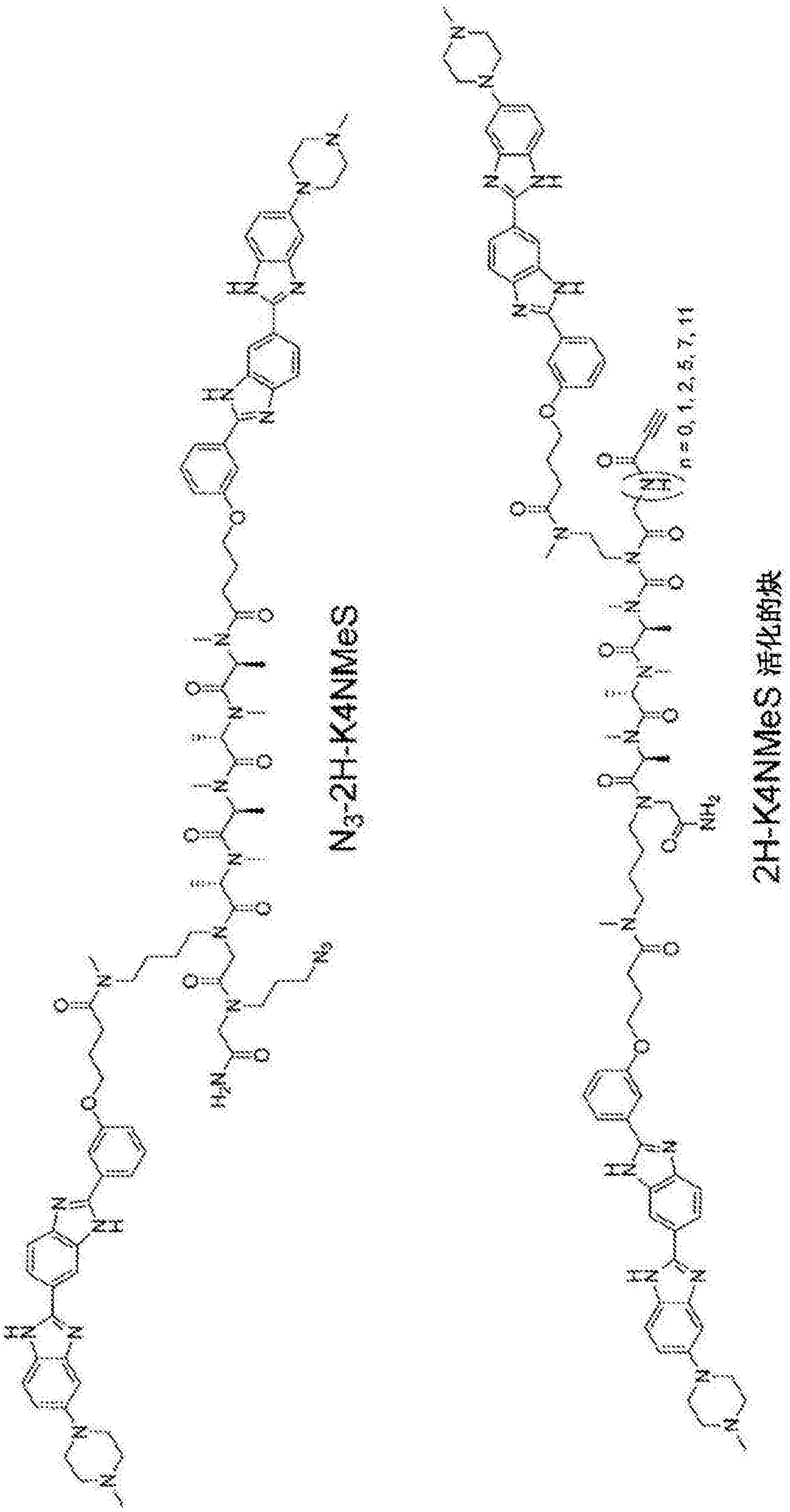


图26

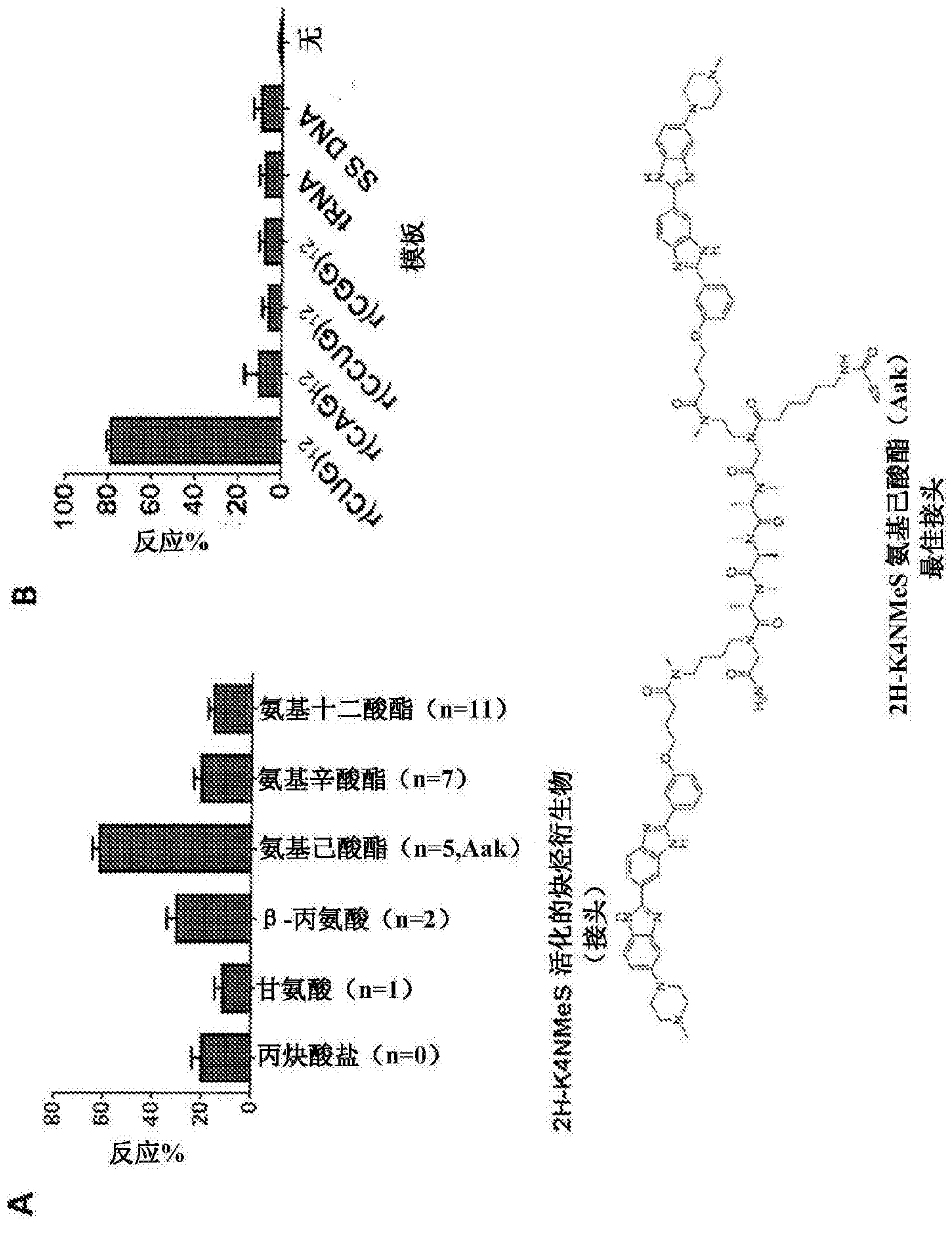

A
反应%
80
60
40
20
0
丙炔酸盐（n=0）
甘氨酸（n=1）
β-丙氨酸（n=2）
氨基己酸酯（n=5,Aak）
氨基辛酸酯（n=7）
氨基十二酸酯（n=11）
2H-K4NMeS 活化的炔烃衍生物
（接头）
2H-K4NMeS 氨基己酸酯（Aak）
最佳接头
B
反应%
100
80
60
40
20
0
rCUG)12
rCAG)12
rCCUG)12
rCGG)12
tRNA
SS DNA
无
模板

图27

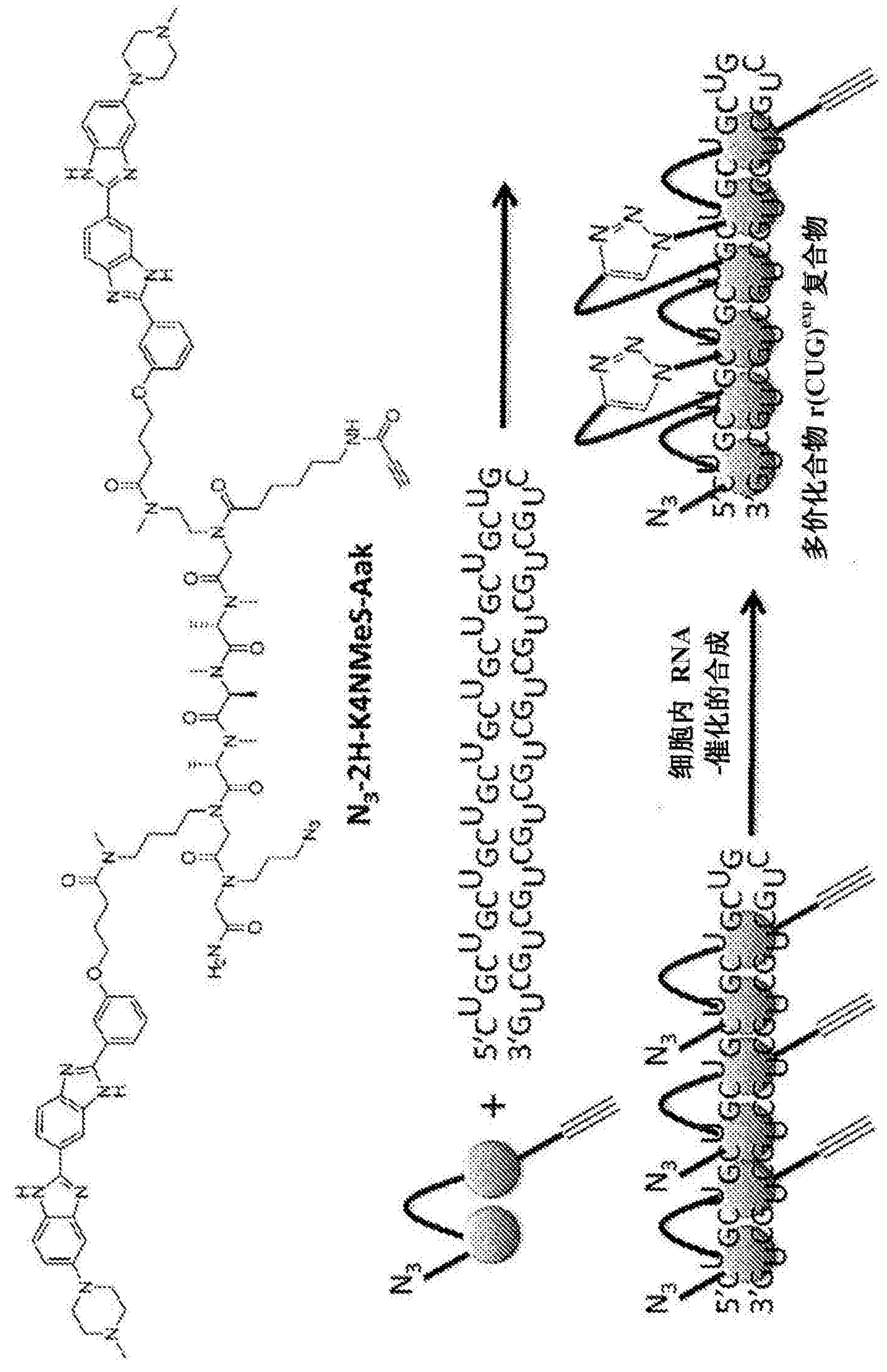


图28

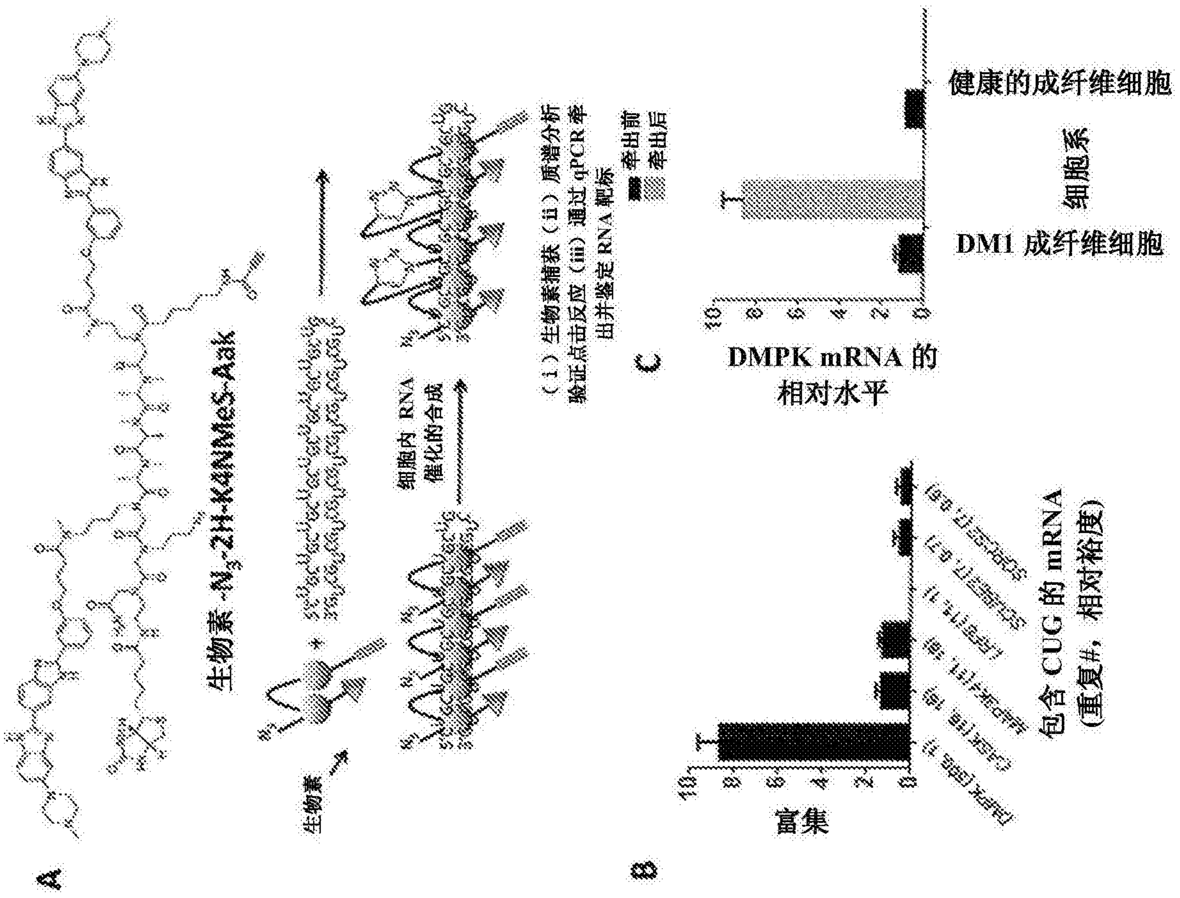

A
生物素-N_3-2H-K4NMeS-Aak
生物素
细胞内 RNA 催化的合成
（i）生物素捕获（ii）质谱分析验证点击反应（iii）通过 qPCR 牵出并鉴定 RNA 靶标
牵出前
牵出后
B
富集
包含 CUG 的 mRNA (重复#，相对裕度)
C
DMPK mRNA 的相对水平
DM1 成纤维细胞
健康的成纤维细胞
细胞系

图29

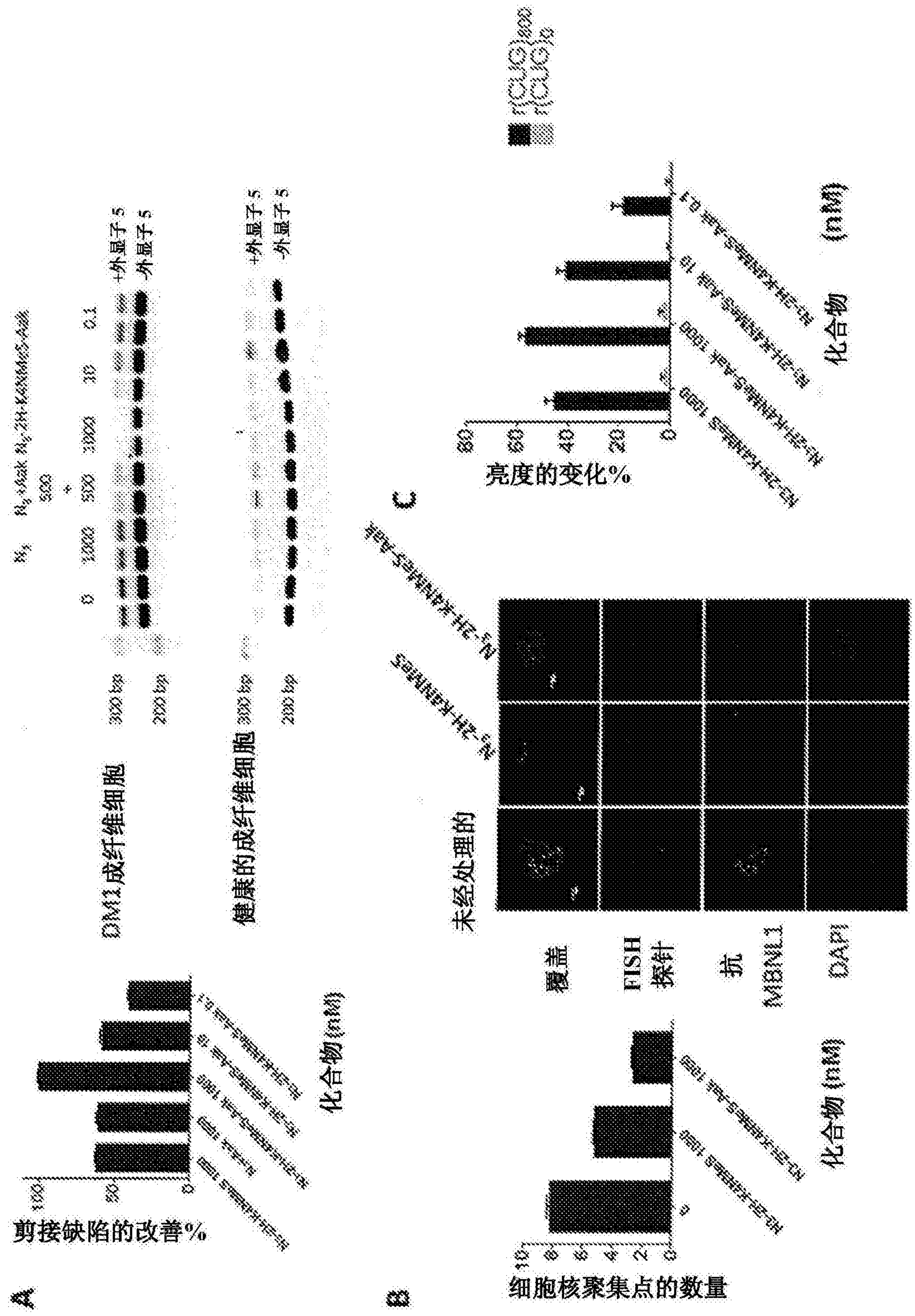

A
剪接缺陷的改善%
化合物(nM)
DM1成纤维细胞
健康的成纤维细胞
+外显子5
-外显子5
3000 bp
2000 bp
B
细胞核聚集点的数量
化合物(nM)
未经处理的
覆盖
FISH
探针
抗
MBNL1
DAPI
C
亮度的变化%
化合物
(nM)

图30

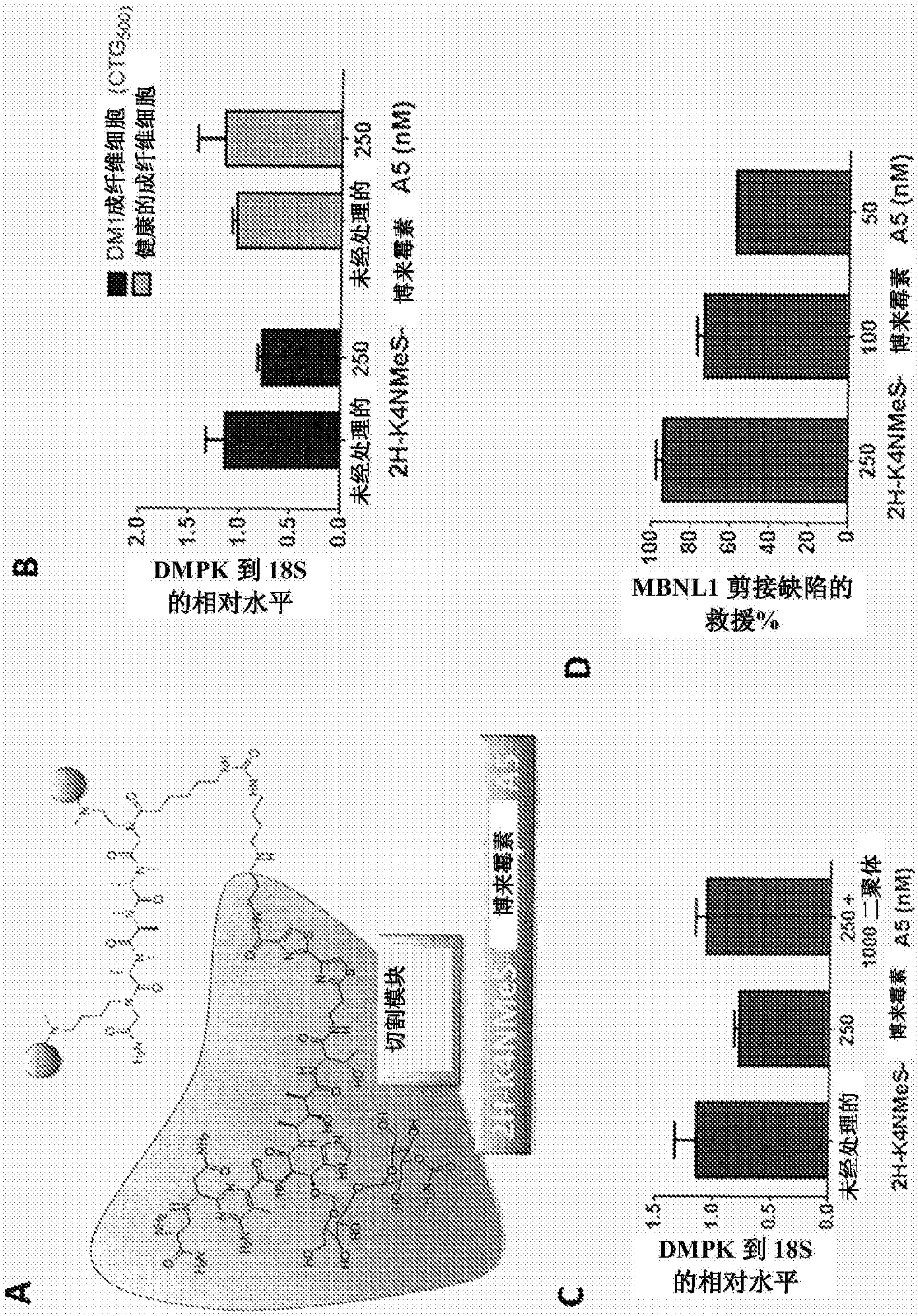

A
切割模块
博来霉素
B
DM1成纤维细胞 (CTG500)
健康的成纤维细胞
DMPK 到 18S 的相对水平
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
未经处理的
250
未经处理的
250
2H-K4NMeS-
博来霉素
A5 (nM)
C
DMPK 到 18S 的相对水平
1.5
1.0
0.5
0.0
未经处理的
250
250 + 1000 二聚体
2H-K4NMeS-
博来霉素
A5 (nM)
D
MBNL1 剪接缺陷的救援%
100
80
60
40
20
0
250
100
50
2H-K4NMeS-
博来霉素
A5 (nM)

图31

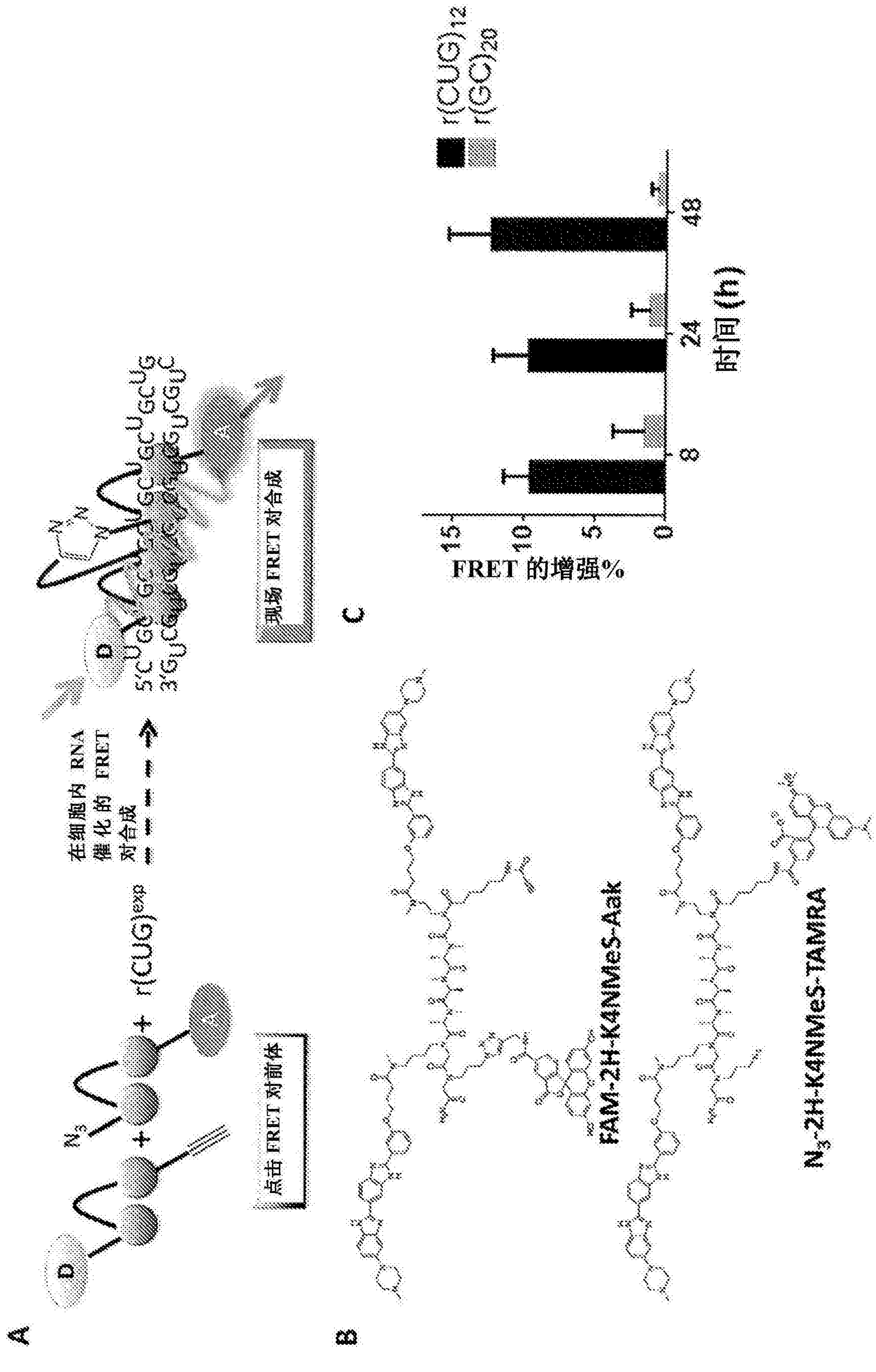

A
B
C
D
N_3
r(CUG)exp
在细胞内 RNA 催化的 FRET 对合成
点击 FRET 对前体
现场 FRET 对合成
FAM-2H-K4NMeS-Aak
N_3-2H-K4NMeS-TAMRA
FRET 的增强%
时间 (h)
$r(CUG)_{12}$
$r(GC)_{20}$
0
5
10
15
8
24
48

图32

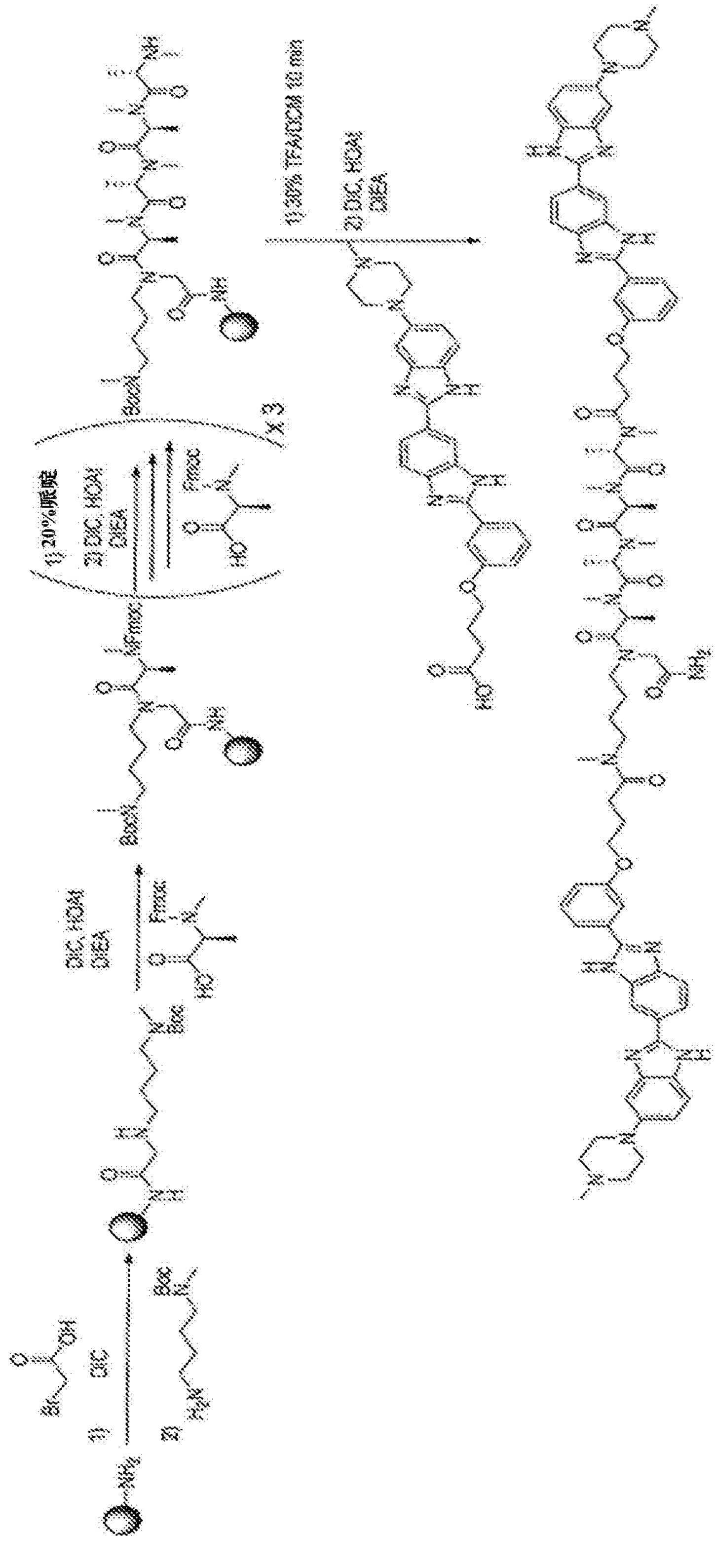


图33

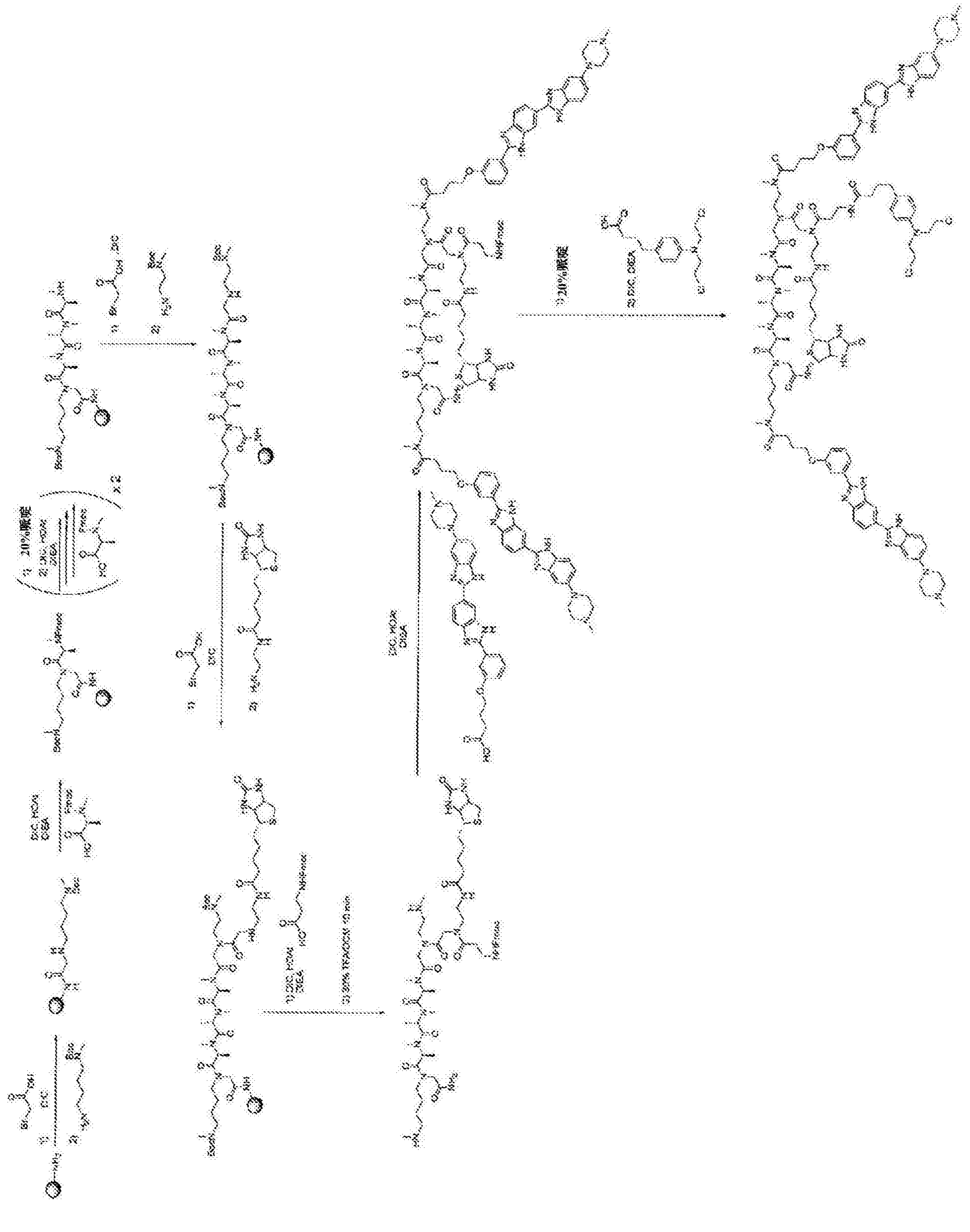


图34

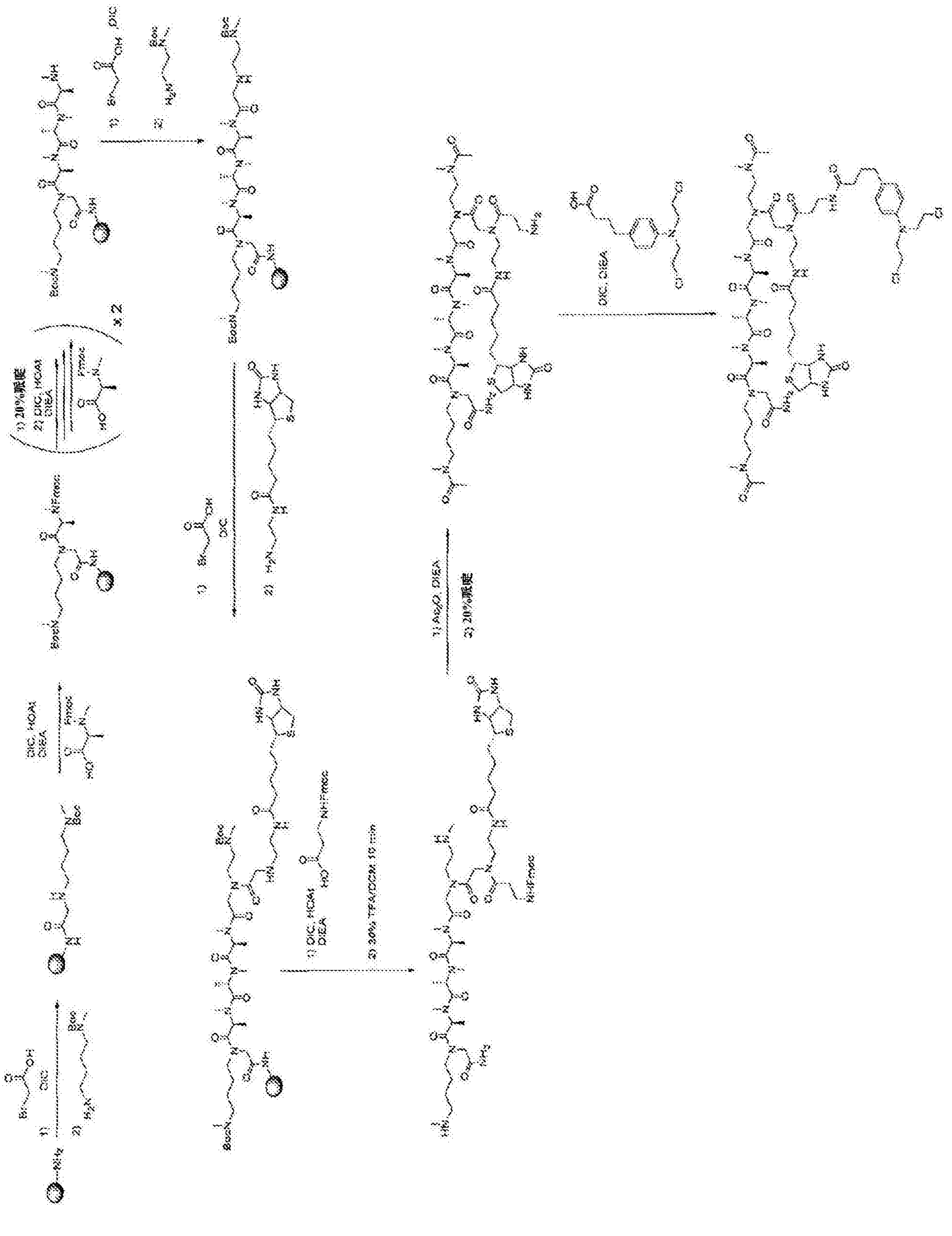


图35

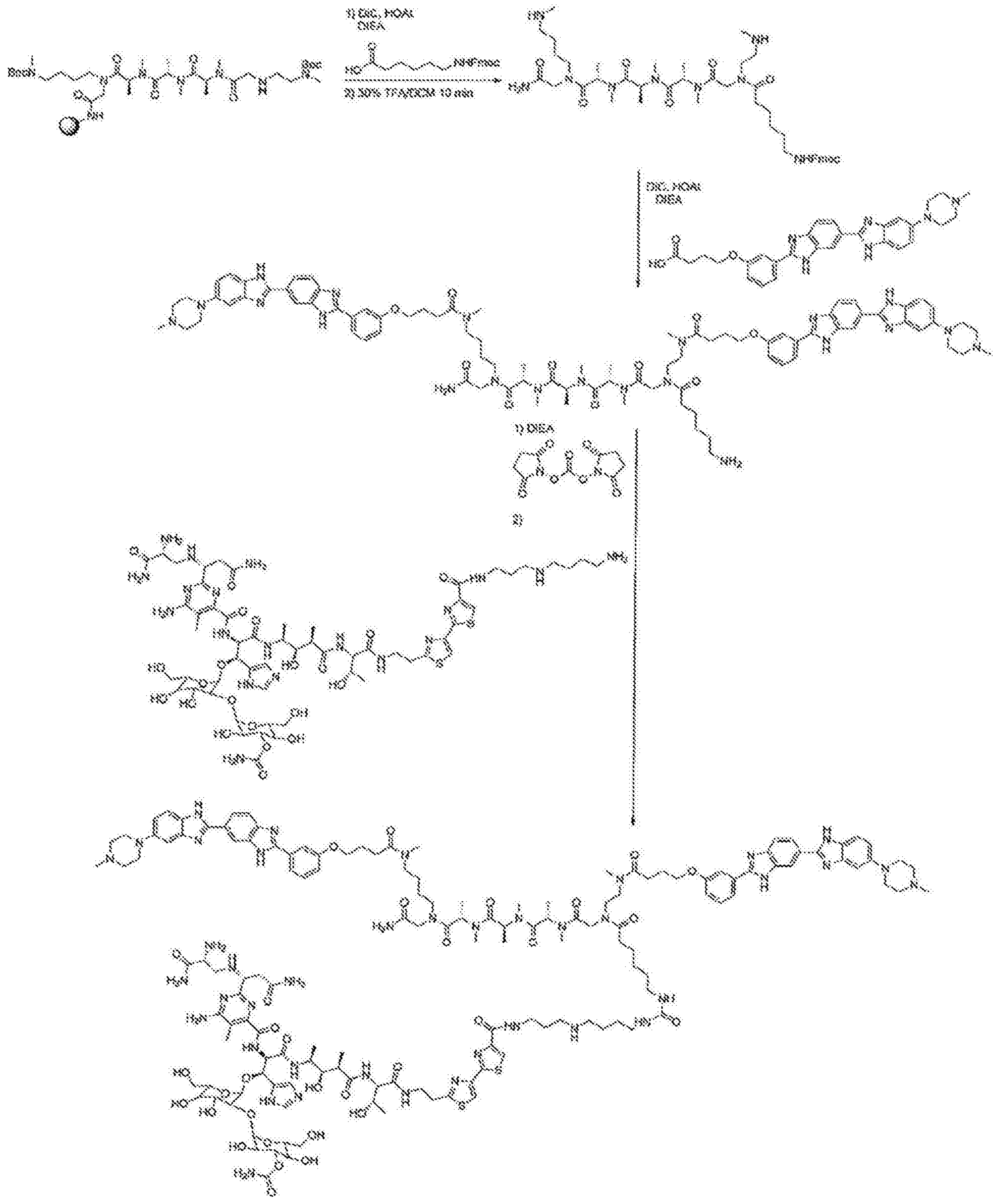


图36

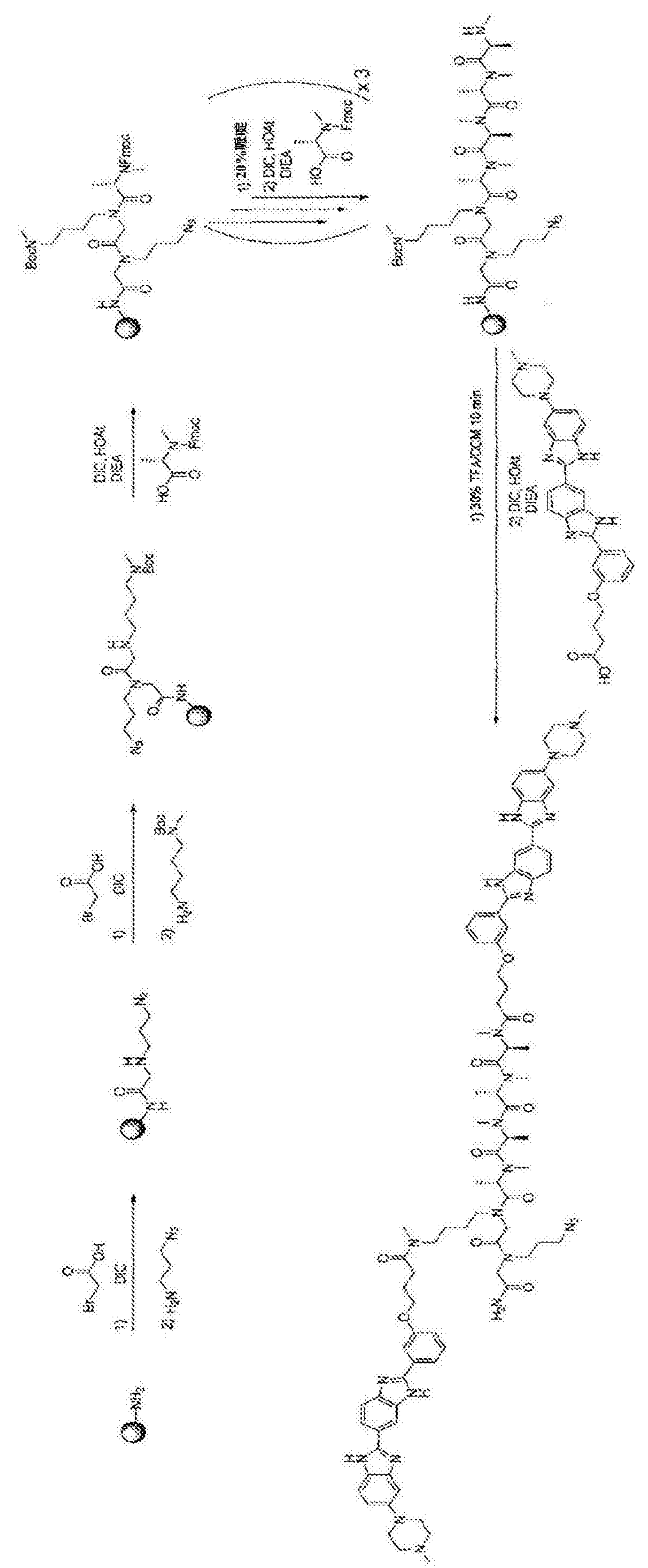


图37

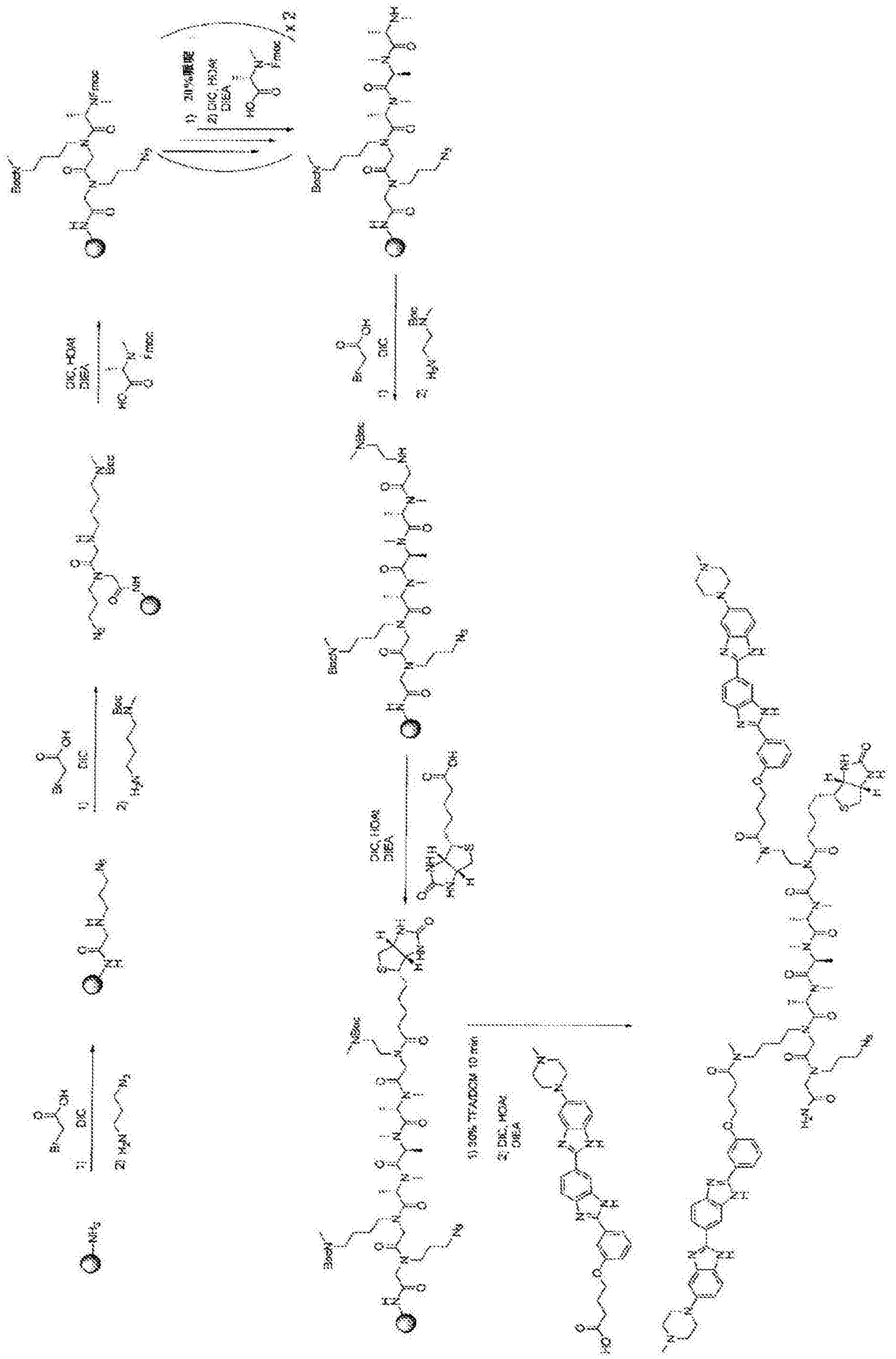


图38

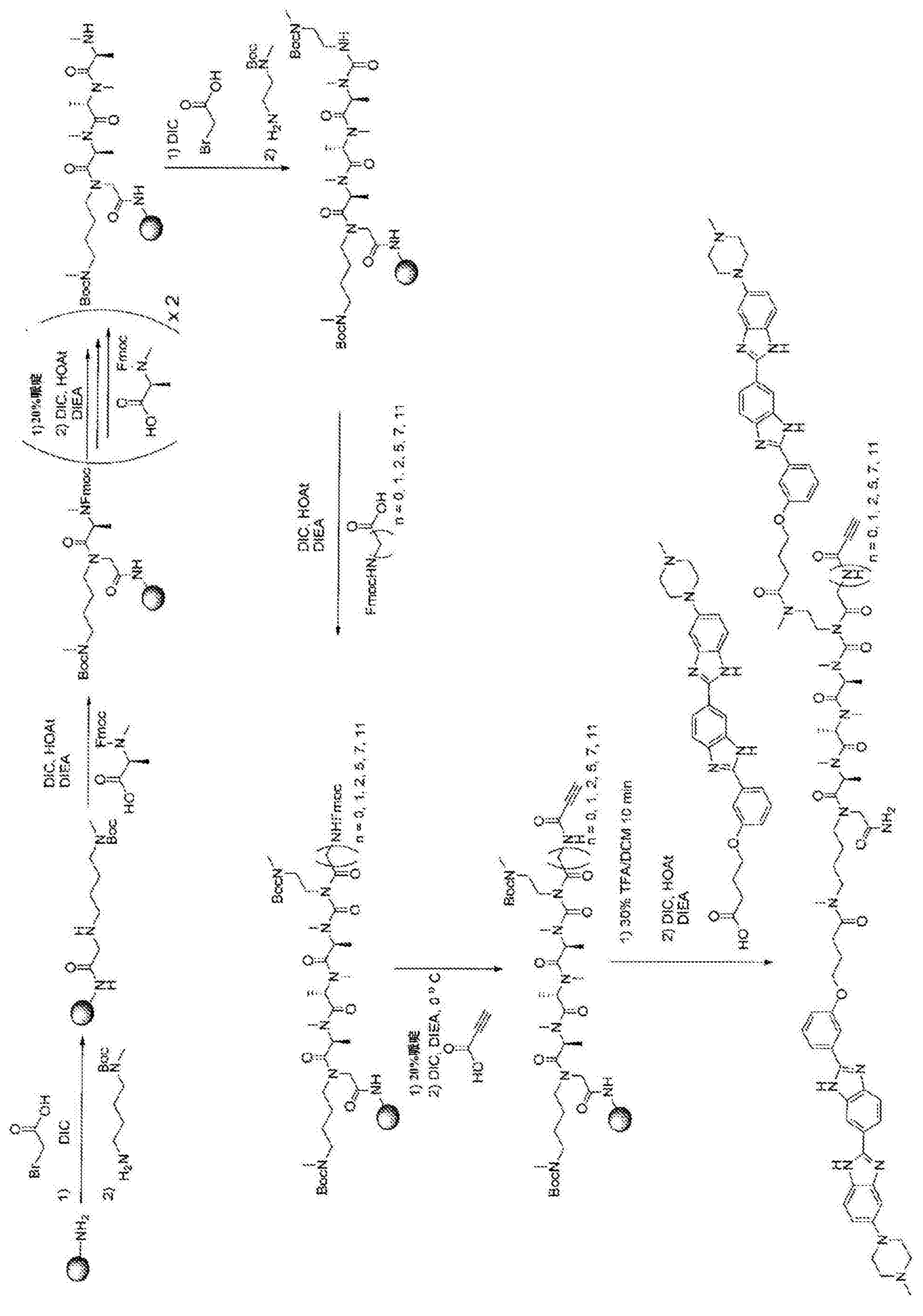

DIC
DIC, HOAt
DIEA
1) 20%哌啶
2) DIC, HOAt
DIEA
x 2
1) DIC
2)
n = 0, 1, 2, 5, 7, 11
1) 20%哌啶
2) DIC, DIEA, 0° C
1) 35% TFA/DCM 10 min
2) DIC, HOAt
DIEA

图39

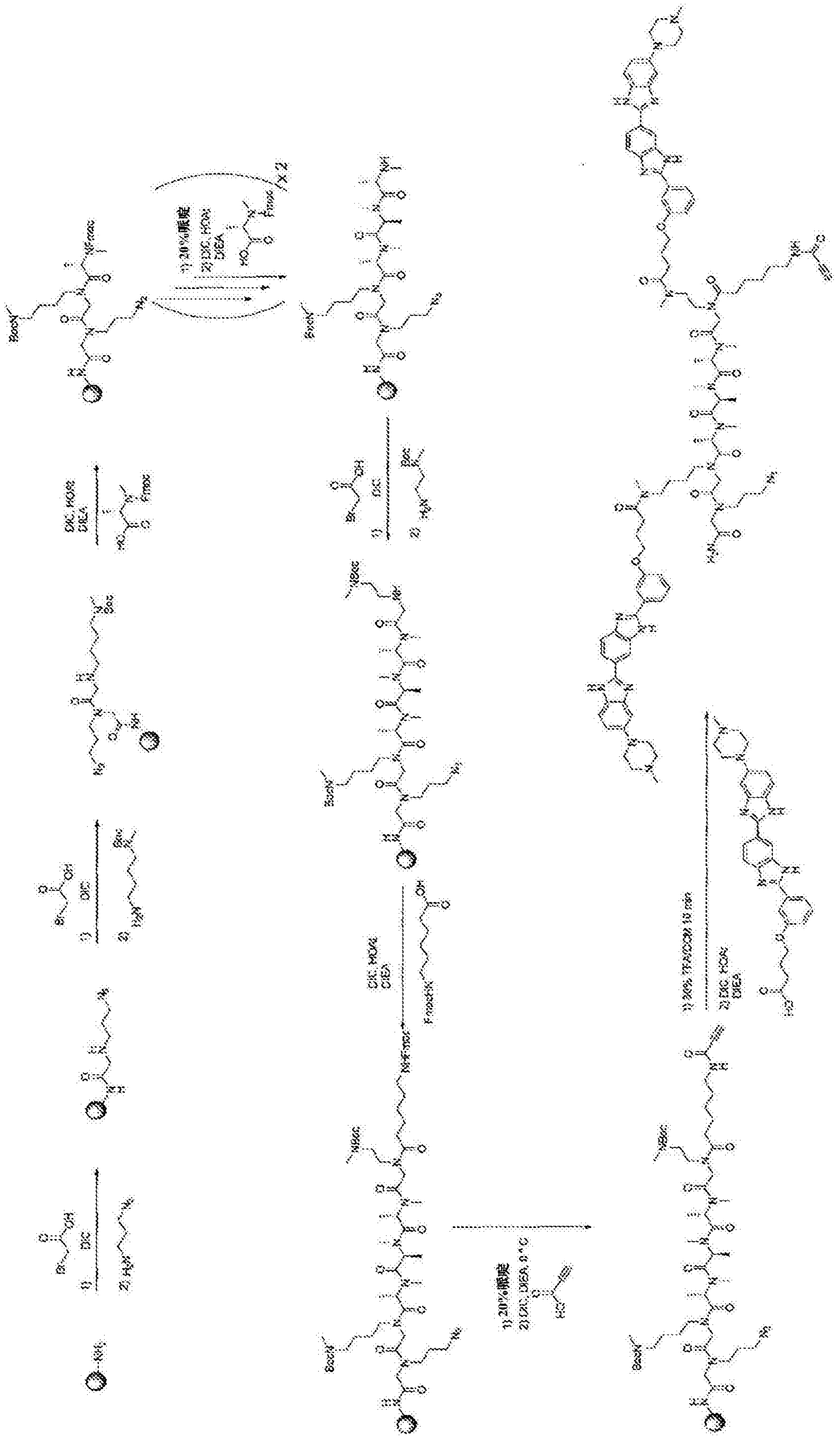


图40

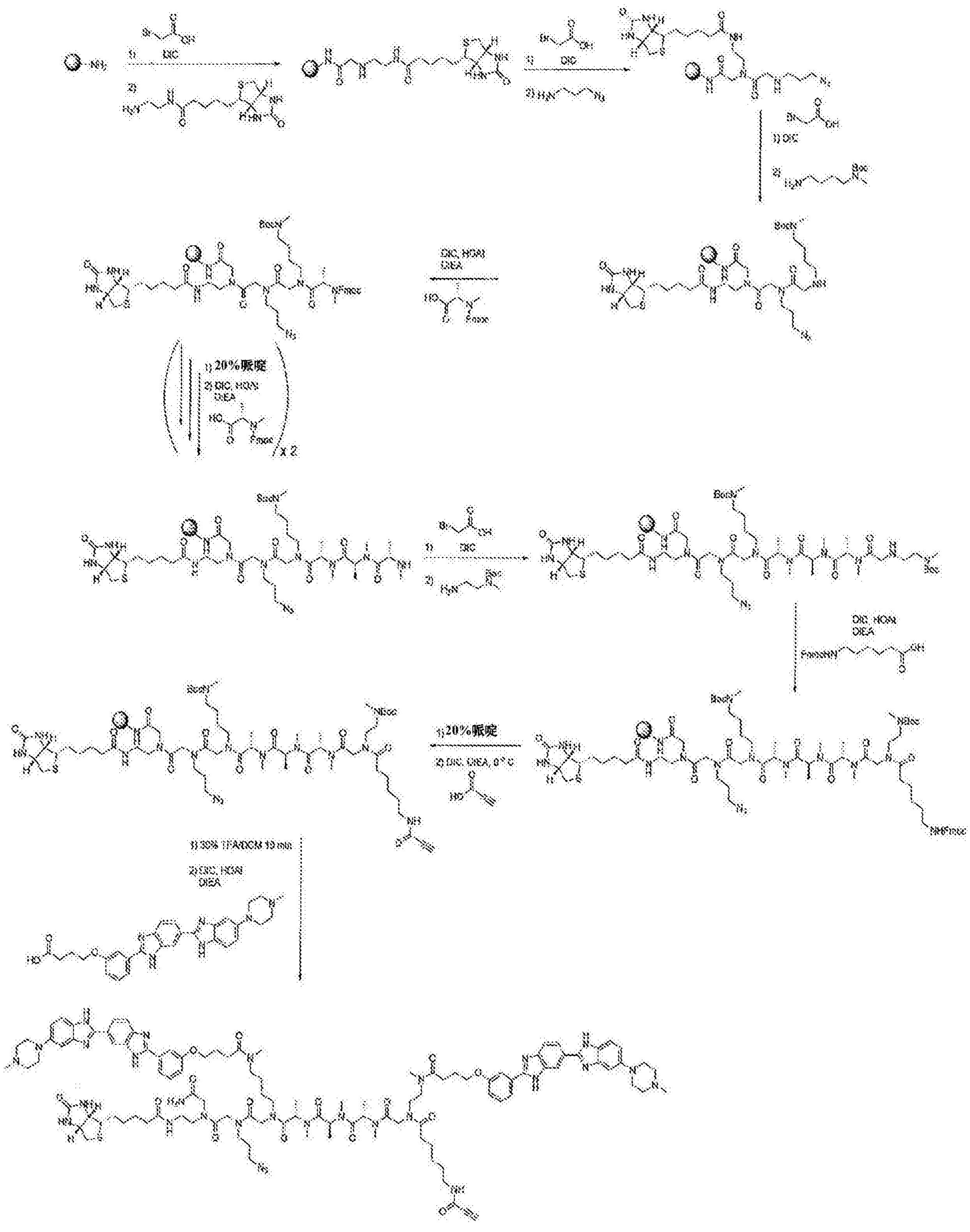


图41

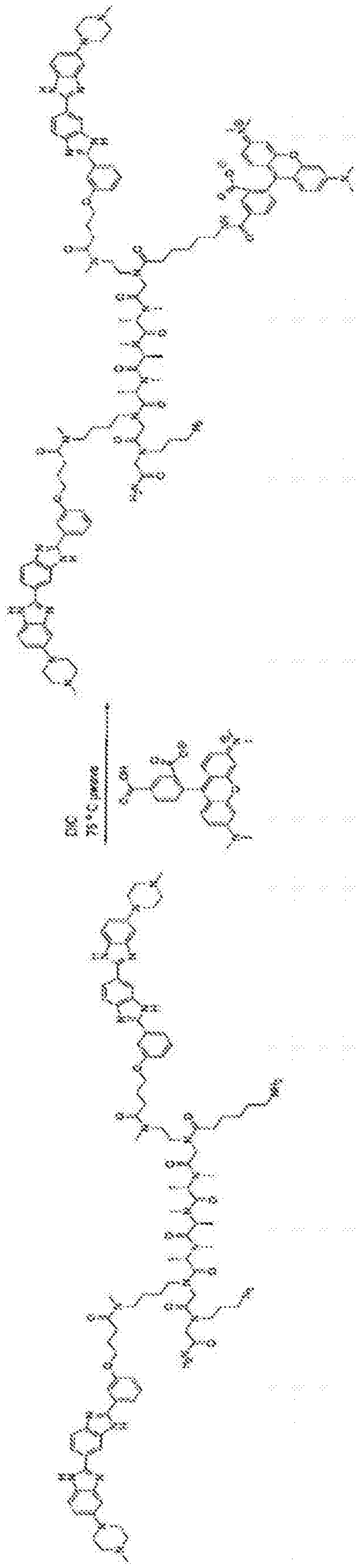


图42

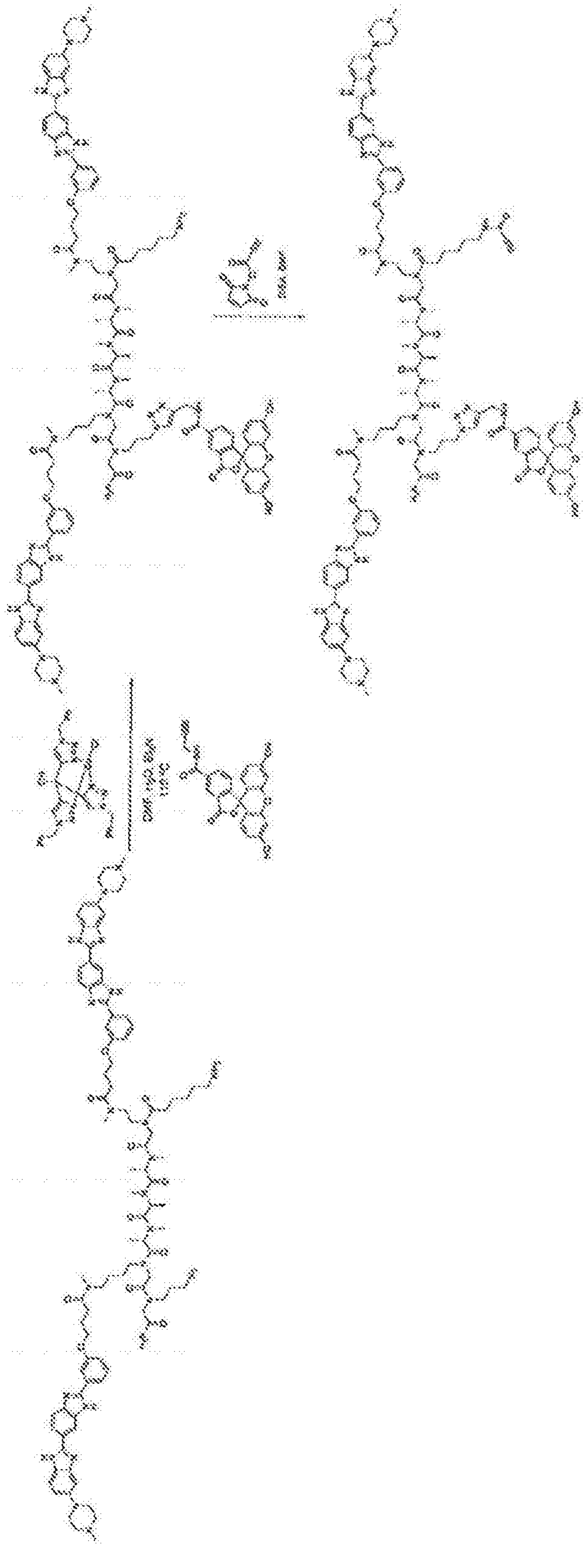


图43