

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6461306号
(P6461306)

(45) 発行日 平成31年1月30日 (2019. 1. 30)

(24) 登録日 平成31年1月11日 (2019. 1. 11)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/7036 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7036

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 21/00 (2006. 01)

A 6 1 P 21/00

A 6 1 K 38/14 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

C O 7 H 19/056 (2006. 01)

A 6 1 K 38/14

請求項の数 6 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-502695 (P2017-502695)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月17日 (2015. 7. 17)
 (65) 公表番号 特表2017-522323 (P2017-522323A)
 (43) 公表日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/040902
 (87) 国際公開番号 W02016/011348
 (87) 国際公開日 平成28年1月21日 (2016. 1. 21)
 審査請求日 平成30年7月13日 (2018. 7. 13)
 (31) 優先権主張番号 62/026, 266
 (32) 優先日 平成26年7月18日 (2014. 7. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 501244222
 ザ スクリプス リサーチ インスティテ
 ユート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92
 037, ラ ホヤ, ノース トーリー
 パインズ ロード 10550
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
 (74) 代理人 100129713
 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インサイチュで自己組織化した、毒性のあるRNA阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一つの細胞透過性RNA伸長リピート配列結合モジュールまたは一对の細胞透過性RNA伸長リピート配列結合モジュールを含む医薬組成物であって、

前記モジュールは患者の細胞中で、毒性のある疾患誘導性RNAの機能のモジュレーターを形成し、

前記疾患が、筋緊張性ジストロフィー2型(DM2)または筋緊張性ジストロフィー1型(DM1)であり、

前記RNAが、各々、RNA伸長リピート配列 $r(C C U G)^{e \times p}$ またはRNA伸長リピート配列 $r(C U G)^{e \times p}$ によって形成される隣接する内部ループを含む、伸長したリピート配列を含み、

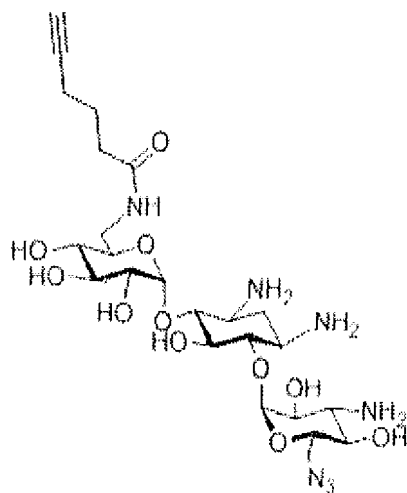
前記モジュレーターが、前記一つの細胞透過性RNA伸長リピート配列結合モジュールであって、アルキンとアジドの両方の部分を含む、細胞透過性RNA伸長リピート配列結合モジュールの縮合反応から、または、前記一对の細胞透過性RNA伸長リピート配列結合モジュールであって、第1のモジュールがアルキン部分を含み、第2のモジュールがアジド部分を含む、一对の細胞透過性RNA伸長リピート配列結合モジュールの縮合反応から、生細胞内でインサイチュで形成されるRNAに結合するオリゴマーを含み、

前記縮合反応が、前記RNA伸長リピートに結合したモジュール間で前記アルキン部分とアジド部分との間の1, 3ヒュスゲン双極子付加環化反応によって起こり、

前記細胞透過性モジュールが下記式で表される $N_3 - K - A k$ 、

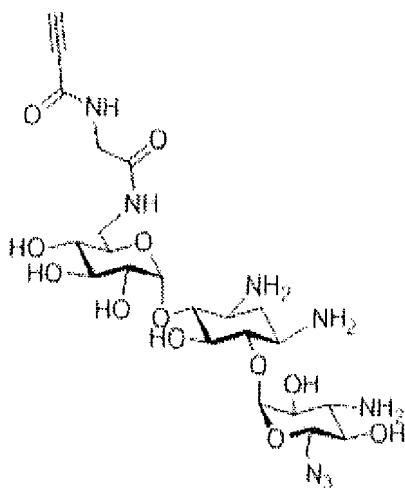
10

20



10

または下記式で表される N₃ - K - A a K

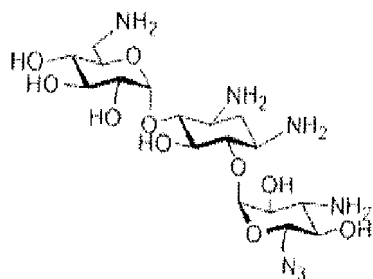


20

30

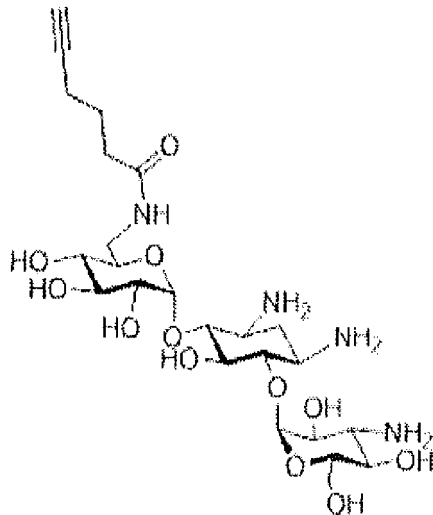
であるか、

あるいは、一緒に使用される一対の細胞透過性モジュールが下記式で表される N₃ - K



40

と下記式で表される K - A k



10

である、前記医薬組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の医薬組成物であって、

20

請求項 1 に記載の前記一つの細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールに、または、請求項 1 に記載の前記一対の細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールに、前記毒性のある RNA を含む前記生細胞を曝露することにより、前記毒性のある RNA と結合した請求項 1 に記載の前記モジュレーターを形成するための前記医薬組成物。

【請求項 3】

毒性のある疾患誘導性 RNA を切断するための請求項 1 に記載の医薬組成物であって、前記 RNA が伸長リピート配列を含み、

前記モジュレーターが、核酸切断部分をさらに含む、前記医薬組成物。

【請求項 4】

前記核酸切断部分がブレオマイシンの誘導体である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 5】

r (C C U G)^{e × p} 伸長リピート配列を含む毒性のある RNA の存在下で誘導される筋緊張性ジストロフィー 2 型 (D M 2)、または、r (C U G)^{e × p} 伸長リピート配列を含む毒性のある RNA の存在下で誘導される筋緊張性ジストロフィー 1 型 (D M 1) を患者において処置するための、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記モジュレーターが核酸切断部分をさらに含む、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

関連出願の相互参照

本願は、2014 年 7 月 18 日出願の米国特許仮出願第 62 / 026 , 266 号の優先権を主張し、その開示は参照によりその全文が本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

RNA 機能障害は、アポトーシス促進タンパク質のマイクロ RNA サイレンシング^[1]、欠損型タンパク質の翻訳^[2]および機能獲得^[3]をはじめとする様々な機構によって疾患を引き起こす。しかし、RNA 機能の小分子化学プローブを設計することも、治療法を導くこともこれまで困難であった。非リボソーム RNA に小分子薬を投与するための広く応用できる方法が開発されたならば、それは化学生物学および医薬品化学^[4]に

50

において重要な用途があり得る。RNA媒介性疾患の1つのクラスは、伸長した反復するRNA、またはマイクロサテライト障害によって引き起こされる。20を上回るマイクロサテライト障害が公知であり、それには筋緊張性ジストロフィー(DM)および筋萎縮性側索硬化症(ルー・ゲーリック病; ALS)が挙げられる^[5]。細胞におけるリピートの結果は様々であり、タンパク質、RNA、およびDNAレベルの変更を含み得る。筋緊張性ジストロフィー2型(DM2)は、r(C C U G)リピートの伸長(r(C C U G)^{e × p})による毒性機能獲得に起因する。筋緊張性ジストロフィー1型(DM1)は、r(C U G)リピートの伸長(r(C U G)^{e × p})による毒性機能獲得に起因する。

【発明の概要】

【0003】

本発明者らは、RNAモチーフ-小分子相互作用に基づいて筋緊張性ジストロフィー2型(DM2)を引き起こすRNAの阻害剤またはモジュレーターを設計した^[6]。DM2は、ジンクフィンガータンパク質9(ZNF9)プレ-mRNAのイントロン1に位置するr(C C U G)リピートの伸長(r(C C U G)^{e × p})による毒性機能獲得によって引き起こされる^[7]。RNAは、ステムに5' C C U G / 3' G U C C (2 × 2ヌクレオチド内部ループ)の繰り返し単位を含むヘアピン構造に折り畳まれる。ループは、選択的プレ-mRNAのスプライシングのレギュレーターである、muscleblind様1タンパク質(MBNL1)との高親和性結合部位を形成し、該タンパク質はその結合により不活化する(図1A)。本発明者らの設計したr(C C U G)^{e × p}の阻害剤は、カナマイシンA誘導体に基づいており、6'位でアシル化されており、5' C C U G / 3' G U C Cと高い親和性で結合する。特に、6'アミンのアシル化は、rRNAとの結合を除去する^[8]。実際に細胞モデルにおいて、カナマイシン誘導体およびそのモジュール的に組み立てた(または多価の)化合物は、DM2に関連する欠損を改善した^[6a]。その他のリピート伸長について観察されるように、モジュール的に組み立てた化合物は、おそらくそれらの高い親和性、選択性、およびそれらが標的を捕捉する表面積がより大きいことに起因して、細胞機能障害のより強力な阻害剤である^[6a]。たとえ多価化合物がインビトロでより強力で選択的であったとしても、一部の例ではそれらがあまり細胞透過性でないために、インセルロ(in cellulo)での効力は結合価の関数として減少する^[9]。従って、リガンドサイズ、効力、および透過性の間で慎重にバランスをとらなければならない。

【0004】

本発明者らはまた、筋緊張性ジストロフィー1型(DM1)を引き起こすRNAの阻害剤またはモジュレーターを設計するためにも同様のアプローチを使用した。この例では、DM1は、筋強直性ジストロフィー(dystrophin myotonia)プロテインキナーゼ(DMPK)mRNAの3'非翻訳領域(UTR)に位置するr(C U G)リピート伸長(r(C U G)^{e × p})による毒性機能獲得により引き起こされる^[7]。DM1についての本発明のその他の態様としては:(i)r(C U G)^{e × p}を標的とする最適化された二量体化合物の設計;(ii)r(C U G)^{e × p}を標的とし、標的(結合したRNA)および小分子と結合するRNA中の部位の検証を可能にする共有結合小分子、;(iii)非常に強力かつ選択的な阻害剤をオンサイトで合成するためのインセルロクリックケミストリーの使用;(iv)r(C U G)^{e × p}をFRETセンサを合成するための触媒として使用する蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)アプローチ;および(v)患者由来細胞においてr(C U G)^{e × p}を切断する、r(C U G)^{e × p}を標的化する小分子の設計が挙げられる。

【0005】

本発明は、様々な実施形態において、細胞がそれに透過性である1または2の小分子モジュール、すなわちアルキン基とアジド基の両方を有する単一のモジュール、または筋緊張性ジストロフィー2型(DM2)および1型(DM1)の原因物質であるr(C C U G)^{e × p}またはr(C U G)^{e × p}の隣接する内部ループに結合するアルキン部分とアジド部分をそれぞれ含む2つのモジュール(Day, J. W., and Ranum, L.

10

20

30

40

50

P. (2005) RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies, *Neuromuscul. Disord.* 15, 5-16.; Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., and 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., and Thornton, C. A. (2002) Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of Clcn-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy, *Mol. Cell* 10, 35-44) に細胞を曝露することを含む、生細胞内でRNA機能のモジュレーターを形成する方法を提供し、その結果、それぞれにおいて、1つのモジュール、または2つのモジュールは、1, 3ヒスゲン双極性環状付加反応を介して、1, 3ヒスゲン双極子付加環化反応でのアルキンおよびアジド基の縮合により、DM1またはDM2 RNA機能障害のオリゴマーの強力な阻害剤に変換される。従って、オリゴマーモジュレーターのモノマー前駆体は、隣接部位と結合し、1, 3ヒスゲン双極性環状付加反応を受けることのできる、同じ分子上にアジドおよびアルキン単位を提示する単一の化合物であり得るか、あるいは、一方がアルキン基を有し、他方がアジド基を有する一対の分子構造であり得る。

【0006】

本発明はまた、様々な実施形態において、モジュールがアルキン部分とアジド部分の両方を含む、細胞がそれに透過性である小分子モジュールに細胞を曝露することを含む、生細胞内でRNA機能のモジュレーターを形成する方法を提供する。本発明はさらに、様々な実施形態において、それぞれ筋緊張性ジストロフィー2型(DM2)および1型(DM1)の原因物質である、RNA伸張りピート配列 $r(C C U G)^{e \times p}$ または $r(C U G)^{e \times p}$ を含有する細胞を、細胞がそれに透過性である1または複数のRNA伸張りピート結合モジュールに曝露することにより形成される、RNA機能のモジュレーターを提供し、これら2つのモジュールは、ヒスゲン1, 3-双極性環状付加反応によって縮合して、毒性のあるRNAの機能を妨害するオリゴマーモジュレーターを形成することのできるアルキン部分とアジド部分をそれぞれ含む。DM2の処置用の $r(C C U G)^{e \times p}$ モジュレーターに関して、細胞透過性モジュールは、カナマイシン類似体を含むことができる。DM1の処置用の $r(C U G)^{e \times p}$ モジュレーターに関して、細胞透過性モジュールは、ビス-ベンズイミダゾールまたはその他のヘテロアリアル化合物を含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1A】インセル口での、DM2を引き起こすRNAの強力な阻害剤を合成するためのインサイチュ・クリックケミストリーを示す図である。DM2は、muscleblind様1タンパク質(MBNL1)と結合し、それを捕捉する $r(C C U G)$ リピートによって引き起こされる。アジドおよびアルキン官能基(N_3-K 、 $K-Ak$ 、 N_3-K-Ak 、および $N_3-K-AaK$)を含む小分子は、 $r(C C U G)^{e \times p}$ の隣接する部位と結合し、ヒスゲン双極性環状付加反応を受ける。

【図1B】 $r(C C U G)^{e \times p}$ の模倣物に結合しているクリック反応可能なモジュールの分子運動学(MD)シミュレーションモデルを示す図である。(BI)：立体構造検索により、隣接部位に結合したKモジュールによって表されるアジド基およびアルキン基が極めて近いことが明らかになる。(BII)： N_3-K および $K-AaK$ から得た1, 4

- トリアゾール付加物のMDシミュレーションで低エネルギー状態を示す立体図を示す図である。RNAとKの間の水素結合は、破線で示される。(BIII) : その他のリンカーモデルを示すMDシミュレーションの低エネルギーナップ写真を示す図である。

【図2】インセルロクリック反応およびクリック反応可能な小分子の標的の範囲の同定を示す図である。(A) : 小分子の細胞標的を同定するアプローチであるChemReact BIPの模式図を示す図である。クリック反応に関与する1つのN₃基を含むビオチン化モノマー、すなわちN₃-K-ビオチンを使用することによって研究が可能となった。このビオチン化モノマーは、細胞溶解物をストレプトアビジン樹脂の上に流すことによってクリック反応したオリゴマーおよび結合したRNA標的の単離を可能にする。(B) : r(C C U G)₃₀₀ 発現細胞においてのみ合成される、プルダウンされ、鋳型にされた小分子生成物のChemReact BIP質量スペクトル分析の結果を示す図である。(C) : クリック反応した生成物のRNA標的を単離し、qRT-PCRによって分析した、ChemReact BIPの結果を示す図である。「*」は、両側スチューデントt検定(n=3)によって求めた、p<0.05を示し;「**」はp<0.01を示し;「***」はp<0.001を示す。

10

【図3】インセルロでの、インサイチュクリックのDM2に関連する欠損への効果を評価する細胞研究の結果を示す図である。(A) : 様々な化合物で処置することによるr(C C U G)₃₀₀の核内フォーカスの生成抑制に対するクリック化合物の評価を示す図である。(B) : 健康な細胞とr(C C U G)₃₀₀発現細胞における、ブリッジングインテグレーター1(BIN1)プレ-mRNAエクソン11の選択的スプライシングの模式図を示す図である。(C) : 鋳型にされたクリック反応によるBIN1スプライシング欠損の救済を示す図である。上部、r(C C U G)₃₀₀の存在下および不在下のBIN1スプライシング産物の代表的なゲル画像を示す図である。下部、処理細胞および未処理細胞におけるBIN1スプライシングパターンの定量化を示す図である。各々の化合物の濃度は、上部の対応するバーにμMで示される。N₃-K+K-Akに関して、5μMが各々の化合物の濃度を示す。「*」は、両側スチューデントt検定(n=3)によって求めた、p<0.05を示し;「**」はp<0.01を示し;「***」はp<0.001を示す。

20

【図4】N₃-KおよびK-Akによるインビトロクリック反応に使用したRNAの二次構造を示す図である。

30

【図5】r(C C U G)₁₂の存在下および不在下でのN₃-KとK-Akのインビトロクリック反応のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、K二量体がr(C C U G)₁₂の存在下で形成されるが、不在下では形成されないことを示す。

【図6】r(C C U G)₁₂、r(A U U C U)₁₂、r(C A G)₁₂、r(C G G)₁₂、r(C U G)₁₂、完全に塩基対形成したステムを含むRNAヘアピン、およびビール酵母tRNAの存在下および不在下での、N₃-KとK-Akのインビトロクリック反応のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、K二量体の形成がr(C C U G)₁₂によって選択的に触媒されることを示す(n=3)。

【図7】r(C C U G)₃₀₀の存在下および不在下でのN₃-KとK-Akのインセルロクリック反応のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、K二量体がr(C C U G)₃₀₀の存在下で形成されるが、不在下では形成されないことを示す。「*」は、両側スチューデントt検定(n=3)により求めた、p<0.05を示す。

40

【図8】r(C C U G)₃₀₀の存在下および不在下でのN₃-KとN₃-K-Akのインセルロクリック反応のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、二量体および三量体がr(C C U G)₃₀₀の存在下で形成されるが、不在下では形成されないことを示す。N₃-Kを使用して重合の程度を制限して、LC-MS分析を容易にした(「インセルロでクリック反応した生成物の質量分析による同定(Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry)」参照)。「*」は、両側スチューデントt検定(n=3)により求めた、p<0.05を示し;「**」は、p<0.01を示す。

50

【図9】 $r(C C U G)_3$ の存在下および不在下での N_3-K と $N_3-K-Aak$ のインセルロクリック反応のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、二量体および三量体が $r(C C U G)_3$ の存在下で形成されるが、不在下では形成されないことを示す。 N_3-K を使用して重合の程度を制限して、LC-MS分析を容易にした(「インセルロでクリック反応した生成物の質量分析による同定(Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry)」参照)。「*」は、両側スチューデントt検定($n=3$)により求めた、 $p<0.05$ を示し;「**」は、 $p<0.01$ を示す。

【図10】 $r(C C U G)_3$ の存在下および不在下での N_3-K -ビオチンと $K-Aak$ のインセルロクリック反応から得た、ブルダウンし、ビオチン標識した化合物のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、ビオチン化 K 二量体が $r(C C U G)_3$ の存在下で形成されるが、不在下では形成されないことを示す。「**」は、両側スチューデントt検定($n=3$)により求めた、 $p<0.01$ を示す。

【図11】 $r(C C U G)_3$ の存在下および不在下での N_3-K -ビオチンと $N_3-K-Aak$ のインセルロクリック反応から得た、ブルダウンし、ビオチン標識した化合物のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、二量体および三量体が $r(C C U G)_3$ の存在下で形成されるが、不在下では形成されないことを示す。 N_3-K -ビオチンを使用してポリマー形成の程度を制限し、LC-MS分析を容易にした(「インセルロでクリック反応した生成物の質量分析による同定(Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry)」参照)。「*」は、両側スチューデントt検定($n=3$)により求めた、 $p<0.05$ を示す。

【図12】 $r(C C U G)_3$ の存在下および不在下での N_3-K -ビオチンと $N_3-K-Aak$ のインセルロクリック反応から得た、ブルダウンし、ビオチン標識した化合物のLC-MS分析の結果を示す図である。これらのデータは、二量体および三量体が $r(C C U G)_3$ の存在下で形成されるが、不在下では形成されないことを示す。 N_3-K -ビオチンを使用してポリマー形成の程度を制限し、LC-MS分析を容易にした(「インセルロでクリック反応した生成物の質量分析による同定(Identification of in cellulo clicked products by mass spectrometry)」参照)。「*」は、両側スチューデントt検定($n=3$)により求めた、 $p<0.05$ を示し;「**」は、 $p<0.01$ を示す。

【図13】上部、BIN1選択的スプライシングパターンへの K 誘導体の効果を示す代表的なゲル画像を示す図である。 N_3-K と $K-Aak$ の1:1混合物は、予め合成した二量体と同程度にBIN1パターンを改善する。下部、処理細胞および未処理細胞におけるBIN1選択的スプライシングパターンの定量化を示す図である。モノマー N_3-K および $K-Aak$ の活性を、予め合成した二量体ならびに各々のモノマーの等モル混合物と比較した。予め合成した二量体は、スプライシングを最も大きく改善し、一方、アジドおよびアルキンモノマーの混合物は、各々のモノマー単独よりもスプライシングを大きく改善した。「*」は、両側スチューデントt検定($n=3$)によって求めた、 $p<0.05$ を示し;「***」は $p<0.001$ を示す。

【図14】上部、 $N_3-K-Aak$ で処理した細胞におけるBIN1スプライシングパターンの代表的なゲル画像を示す図である。細胞を10および1 μ Mの $N_3-K-Aak$ で処理した場合に、スプライシングパターンの改善が観察された。中央、 $N_3-K-Aak$ で処理した細胞におけるBIN1スプライシングパターンの代表的なゲル画像を示す図である。細胞を10 μ M、1 μ M、および100nMの $N_3-K-Aak$ で処理した場合に、スプライシングパターンの改善が観察された。下部、未処理細胞およびオリゴマー形成可能な K 化合物で処理した細胞におけるBIN1スプライシングパターンの定量化を示す図である。 $N_3-K-Aak$ は、評価した最も強力な化合物であった。それはナノモル濃度でBIN1プレ-mRNAスプライシング欠損を有意に改善し、 K モノマーよりも1000倍強力である。「*」は、両側スチューデントt検定($n=3$)によって求めた、 $p<0.$

10

20

30

40

50

0.5を示し；「**」は $p < 0.01$ を示し；「***」は $p < 0.001$ を示す。

【図15】上部、K誘導体が、 $r(CUG)_{300}$ を発現しない細胞においてBIN1スプライシングパターンに影響を及ぼさないことを示す、代表的なゲル画像を示す図である。下部、 $r(CUG)_{300}$ を発現しない細胞におけるBIN1スプライシングパターンの定量化を示す図である。評価したいずれの化合物も、両側スチューデントt検定によって求めたとおり($n = 3$)、 $r(CUG)_{300}$ の不在下でBIN1プレ-mRNAスプライシングパターンに統計学的に有意な効果がなかった。試験した化合物の濃度は、括弧内に示される(mM)。

【図16】K1, 4二量体の合成のためのスキームを示す図である。

【図17】K1, 5二量体の合成のためのスキームを示す図である。

【図18】 N_3 -K-Akの合成のためのスキームを示す図である。

【図19】 N_3 -K-Aakの合成のためのスキームを示す図である。

【図20】 N_3 -K-ビオチンの合成のためのスキームを示す図である。

【図21】DM1を引き起こす毒性のあるRNA-タンパク質複合体、ならびに疾患関連細胞機能障害およびインセルロでの標的選択性を改善し、調べるために使用する、設計された小分子を示す図である。

【図22】代謝安定性のための化合物のリード最適化を示す図である。化合物2H-K4NMeは、ミクロソームにおいて不安定であり(右下のプロット)、不安定性の原因はイミノプロトンであることを突き止めた。イミノプロトンはN-メチル化によって除去されて、ミクロソームにおいて安定している2H-K4NMeSをもたらした。

【図23】設計された小分子2H-K4NMeSが、患者由来細胞株(左)およびDM1マウスモデル(右)においてDM1に関連するプレ-mRNAのスプライシング欠損を改善することを示す図である。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。

【図24】設計された小分子2H-K4NMeSが、反応性モジュール(CA)および精製タグ(ビオチン)を付加されて2H-K4NMeS-CA-ビオチンを生じることを示す図である。この化合物は、細胞において結合したRNAと架橋(共有結合)を形成し、化学的架橋およびプルダウンによる単離(Chemical Cross-Linking and Isolation by Pull Down)(Chem-CLIP)というアプローチを用いることにより、それらを精製および定量化させ小分子の標的を検証する。(A):プローブ化合物の構造を示す図である。(B):プローブが $r(CUG)^{exp}$ と選択的に反応することを示すインビトロデータを示す図である。(C):2H-K4NMeS-CA-ビオチンが、細胞においてDM1に関連するプレ-mRNAのスプライシング欠損を改善することを示す図である。(D):競合的(Competitive)Chem-CLIP(C-Chem-CLIP)により測定されるように、非共有結合性化合物2H-K4NMeSが、 $r(CUG)^{exp}$ 標的との反応から2H-K4NMeS-CA-ビオチンと競合することができることを示す図である。(E):2H-K4NMeS-CA-ビオチンによるRNA標的のプルダウンにより、化合物が疾患を引き起こす伸張した転写物と結合し、より短い(非病原性の長さの) $r(CUG)$ リピートを含む他のRNAと結合しないことが示されることを示す図である。

【図25】化学的架橋およびプルダウンによる単離ならびにリガンド結合部位のマッピング(Chem-CLIP-Map)を示す図である。2H-K4NMeS-CA-ビオチンと反応したDMPK mRNAは、mRNAの異なる領域と相補的なオリゴヌクレオチドを使用することにより、RNAアーゼHによって部位特異的に消化された。消化の後、2H-K4NMeS-CA-ビオチンと反応したRNAの領域をストレプトアビジン樹脂に捕捉し、qRT-PCRを使用することによって定量化した。データは、2H-K4NM

10

20

30

40

50

e S - C A - ビオチンが D M P K m R N A の r (C U G) ^{e x p} と結合することを示す。

【図 2 6】インビトロにおける、オンサイトでの薬剤合成を検証するために試験した化合物の構造を示す図である。

【図 2 7】核酸を触媒として使用することによるインビトロでのオリゴマー薬剤合成のデータを示す図である。(A)：反応に最適な距離を求めるためのリンカー長を調査した結果を示す図である。(B)：様々な RNA の存在下、N₃ - 2 H - K 4 N M e S と 2 H - K 4 N M e S - アミノヘキサノエート A a k とのインビトロでの薬剤合成の評価を示す図である。

【図 2 8】1つの r (C U G) ^{e x p} 結合リガンド上にアジドおよびアルキン部位を有するオリゴマー種を形成することのできる設計された化合物 N₃ - 2 H - K 4 N M e S - A a k を示す図である。

【図 2 9】標的をプルダウンし定量化するための、N₃ - 2 H - K 4 N M e S - A a k (図 2 8) および C h e m - R e a c t - B I P のスキームを使用することによるインセルロクリックケミストリーを示す図である。

【図 3 0】インセルロクリック化合物の、(A)プレ - m R N A スプライシング、(B)核内フォーカス、(C)および D M 1 に関連する翻訳欠損を改善させる能力を示す図である。

【図 3 1】D M 1 患者由来細胞において r (C U G) ^{e x p} の標的切断を可能にするために、プレオマイシンにコンジュゲートされた 2 H - K 4 N M e S 誘導体を示す図である。

(A)化合物の構造を示す図である。(B)標的が切断されていることを示す q R T - P C R データを示す図である。(C)2 H - K 4 N M e S が標的化された r (C U G) ^{e x p} 切断を阻害することができることを示す、2 H - K 4 N M e S - プレオマイシン A 5 および 2 H - K 4 N M e S が細胞に同時に添加される、競合切断データを示す図である。(D)下流の D M 1 関連プレ - m R N A スプライシング欠損の改善を示す図である。

【図 3 2】r (C U G) ^{e x p} を触媒として使用することによる、F R E T センサを合成するための蛍光共鳴エネルギー転移 (F R E T) 実験のスキームを示す図である。(A)アプローチの概要を示す図である。(B)これらの実験で使用した化合物を示す図である。(C)代表的なデータを示す図である。

【図 3 3】2 H - K 4 N M e S の合成スキームを示す図である。

【図 3 4】2 H - K 4 N M e S - C A - ビオチンの合成スキームを示す図である。

【図 3 5】2 N A c - K 4 N M e S - C A - ビオチンの合成スキームを示す図である。

【図 3 6】2 H - K 4 N M e S - プレオマイシン A 5 の合成スキームを示す図である。

【図 3 7】N₃ - 2 H - K 4 N M e S の合成スキームを示す図である。

【図 3 8】N₃ - 2 H - K 4 N M e S - ビオチンの合成スキームを示す図である。

【図 3 9】2 H - K 4 N M e S 活性化アルキンの合成スキームを示す図である。

【図 4 0】N₃ - 2 H - K 4 N M e S - A a k の合成スキームを示す図である。

【図 4 1】ビオチン N₃ - 2 H - K 4 N M e S - A a k の合成スキームを示す図である。

【図 4 2】N₃ - 2 H - K 4 N M e S - T A M R A の合成スキームを示す図である。

【図 4 3】F A M - 2 H - K 4 N M e S - A a k の合成スキームを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

上記の考慮点を考え合わせて、本発明者らは、小分子「モジュール」の細胞透過性ならびにより高分子量の多価化合物の効力および選択性を活用することのできる RNA リポート伸長を標的にする戦略を開発しようと試みた。インサイチュ・クリックケミストリーは、1, 3 ヒスゲン双極子付加環化反応 (H D C R) によって、そのような戦略をもたらすことができた。つまり、2つのモジュールは、標的において隣接部位を結合させ、そうでなければ非反応性の基を極めて接近させて共有結合を形成させる；特に、アジド部分とアルキン部分は反応して安定なトリアゾールを形成する^[10]。実際に、このアプローチは、アセチルコリンエステラーゼおよび DNA 小溝を標的にするために使用されてい

10

20

30

40

50

る^[10-11]。そのようなアプローチを細胞系に移すとそれは非常に影響力が強くなり得、高選択性の化学生物学プローブの開発を可能にし得るが、これはこれまでにまだ実証されていない。伸長した反復RNAは、それらが鋳型にする化合物のようにモジュール式であるので、おそらくこのアプローチに理想的な標的である(図1A)。

【0009】

$r(C C U G)^e \times p$ のインセル口での、インサイチュクリックアプローチの開発は、二量体 $6' - N -$ アシル化カナマイシンA化合物(2K-4)と $r(C C U G)$ リピートの結合モデルを使用することによって可能になった^[6a]。このモデルの分析により、 $6''$ 位のアジド基($N_3 - K$)と $6'$ 位のアルキン基($K - A k$)が、 $r(C C U G)^e \times p$ の隣接する 2×2 ヌクレオチド内部ループとの結合によって、反応するほど非常に近接し得ることが示された(図1B)。従って、 $N_3 - K$ および $K - A k$ が等量で混合される場合、二量体が形成されることができた；同様に、 $6''$ アジドと $6'$ アルキンの両方を提示する誘導体($N_3 - K - A k$ ；図1B)は、オリゴマーを形成することができた。本発明者らはまた、活性化された電子欠乏アルキン、 $N_3 - K - A a k$ を含む化合物も合成し(図1A)、それはDeravanのグループによってDNAを鋳型として使用してポリアミドを構築するのに用いられた^[11b]。全ての化合物は、既知経路の変形形態を用いることによって合成した(実施例の項参照)。

【0010】

本発明者らは最初に、 $r(C C U G)_{12}$ (図4)がインビトロでKオリゴマーの集合体を鋳型にする能力を試験した。インキュベーション後、反応生成物を質量分析によって分析した。実際に、原子価のより大きい化合物が $r(C C U G)_{12}$ の存在下で形成されたが、その不在下では形成されなかった(図5)。この鋳型にされた反応が $r(C C U G)_{12}$ に特異的であるか判断するために、本発明者らは、その他のRNAが $r(C U G)_{12}$ 、 $r(A U U C U)_{12}$ 、 $r(C G G)_{12}$ 、 $r(C A G)_{12}$ 、完全に塩基対形成したステムを含むRNAヘアピン、およびtRNAを含むオリゴマー形成を触媒する能力を調査した(図4)。重要なことに、少量の二量体が観察された $r(C U G)_{12}$ ($< 10\%$ ；図6)を除いて、全てのRNAについて重要な反応生成物は観察されなかった。親和性は $r(C C U G)_{12}$ よりもはるかに低い、 $r(C U G)_{12}$ が、Kと結合する時に少量の二量体を鋳型にしたことは驚くことではない^[13]。さらに、多価化合物においてK-RNA-結合モジュールを分離する最適な距離は、 $r(C C U G)_{12}$ よりも $r(C U G)_{12}$ の方がはるかに短い^[13]。総合すると、これらの研究は、鋳型にされた反応が、 $r(C C U G)_{12}$ に対して選択的であり、官能基の位置決め、RNA結合モジュール、およびRNA標的によって制御されることを示す(図6)。これらの研究は、細胞系においてこのアプローチを試験し、選択的プレ-mRNAスプライシング欠損および核内フォーカスの形成を含むDM2に関連する欠損への、鋳型にされた化合物の生物学的影響を調べるきっかけをもたらした^[3a]。

【0011】

多価化合物が実際にインセル口で鋳型にされたかを確認するために、 $r(C C U G)_{300}$ を発現している細胞モデル系を用いた^[14]。細胞を $N_3 - K$ と $N_3 - K - A k$ または $N_3 - K - A a k$ で同時に処理した。生成物の分子量を制限し、質量スペクトル分析を可能にするために、 $N_3 - K$ を使用して反応を妨害した。処理後、細胞材料およびタンパク質を有機溶媒に沈殿させることにより、反応生成物を細胞溶解物から部分的に精製した。精製画分の質量スペクトル分析により、オリゴマー化は、細胞を $N_3 - K - A k$ または $N_3 - K - A a k$ で処理した場合に二量体と三量体の両方の反応生成物が観察される時に $r(C C U G)_{300}$ を発現している細胞で起こることが示された(図7~9)。重要なことに、オリゴマー化は、RNAを発現しない細胞では観察されない(図7~9)。従って、鋳型にされた合成は、疾患に冒された細胞にしか起こらず、 $r(C C U G)_{300}$ がそれ自体の阻害剤の合成を触媒することが示唆される。

【0012】

鋳型にされた反応の程度と、 $r(C C U G)_{300}$ が実際にオリゴマー化の触媒であっ

たのかを確認するために、本発明者らは、ChemReactBIP (Chemical Reactivity and Binding Isolated by Pull Down; 図2A) というアプローチを開発し、実施した。ビオチン部分を6'位に含むカナマイシン類似体 (N_3 -K-ビオチン; 図20および10~12) の存在下、細胞をK-Ak、 N_3 -K-Ak、または N_3 -K-AaKで処理した。 N_3 -K-ビオチンは、インセルロで重合反応を終わらせ、オリゴマー形成した化合物とそれに結合した細胞標的を穏やかに溶解した後にストレプトアビジンビーズに捕捉させる。(図2BおよびC)。上記の N_3 -Kで達成した研究に一致して、オリゴマー形成した生成物は、r(CCUG)₃₀₀発現細胞だけに形成され、生成物へのモノマーの変換は、予測した通り N_3 -K-Akよりも N_3 -K-AaKの方が大きかった^[11b]。ChemReactBIPによっても本発明者らが鑄型にされた反応の細胞標的を同定することができた。プルダウンされた画分のqRT-PCR分析により、r(CCUG)₃₀₀が、 N_3 -K-ビオチンおよびK-Ak、 N_3 -K-Ak、または N_3 -K-AaKの生成物の主な標的であることを確認した(図2C)。プルダウンされたr(CCUG)₃₀₀標的の量は、効力の関数として増加する： N_3 -K + K-Ak < N_3 -K-Ak < N_3 -K-AaK (下記参照)。本発明者らのその他の実験で観察されるように、多価化合物は、細胞がr(CCUG)₃₀₀を発現した場合にのみ観察された(図2C)。

【0013】

その他のマイクロサテライトの障害で観察されるように、様々なタンパク質とr(CCUG)^{exP}の結合は、核内フォーカスの形成を引き起こす^[3a]。色素標識したオリゴヌクレオチドによる蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)を用いて、本発明者らの化合物が、r(CCUG)^{exP}を含有する核内フォーカスの形成を抑制するかどうか判定した(図3A)。未処理細胞では、細胞あたりのフォーカスの平均数は、 9 ± 2 である。 N_3 -KまたはK-Akで処理すると、細胞あたりのフォーカスの平均数は、それぞれ 6 ± 2 と 6 ± 1 に減少する。K-Akと N_3 -Kの等モル混合物(K-Ak + N_3 -K)で処理すると、フォーカスは細胞あたり 1 ± 1 に減少し、これはK-Akと N_3 -Kの反応生成物を模倣する予め合成した二量体に類似していた(K1, 4二量体およびK1, 5二量体; 図16および17)。インセルロでクリック反応して自己オリゴマー形成する誘導体である、 N_3 -K-Akおよび N_3 -K-AaKは、さらにより強力であり、観察した細胞あたりのフォーカスは1よりも非常に小さかった(<1)。このように、オリゴマー化の可能な程度は、生物活性に相関する。

【0014】

核内フォーカスの崩壊は、r(CCUG)^{exP}によって捕捉されたタンパク質が遊離していることを示唆する。従って、化合物は、フォーカスにおけるMBNL1の隔離によって引き起こされる選択的プレ-mRNAスプライシング欠損も改善する可能性がある^[3a]。本発明者らは、本発明者らの化合物が、ブリッジングインテグレーター1(BIN1)のプレ-mRNAの調節不全を改善する能力を調べた(図3B~C、13、および14)^[14]。r(CCUG)₃₀₀が細胞に存在する場合、エクソン11は非常に頻繁に読み飛ばされるので、包含率は成熟mRNA中約20%となった。対照的に、エクソン11の包含率は、影響を受けていない細胞で約60%である。興味深いことに、フォーカスの崩壊によって測定される化合物の効力について観察される傾向は、本発明者らのBIN1選択的スプライシング欠損の改善の結果においてそっくり再現される(図2および3)。例えば、予め合成した二量体および N_3 -K + K-Akは、BIN1選択的スプライシングパターンを同様の程度まで改善するが、 N_3 -K-Akおよび N_3 -K-AaKはさらに強力である(図3C)。特に、 N_3 -K-AaKは、ナノモル濃度でスプライシング欠損を改善する能力を保持し、本発明者らの第一世代のモジュール式に組み立てた化合物よりも100倍超改善し^[6a]、モノマー N_3 -KおよびK-Akよりも1000倍超良好である。重要なことに、化合物は、r(CCUG)₃₀₀を発現しない細胞ではBIN1スプライシングパターンに影響を及ぼさない(図15)。まとめると、鑄型にされたクリック反応に関与する本発明者らの化合物は、現在までに公知のDM2に関連する

スプライシング欠損 (spliceopathy) を改善する最も強力な非共有結合性化合物である。さらに、プレ-mRNA スプライシングの改善は、結合している $r(\text{CUG})_{300}$ に起因するものであり、非特異的作用によるものではない。

【0015】

要するに、これらの研究は、HDCRを使用してインセルロで疾患に冒された細胞においてのみRNA阻害剤の合成を鋳型にし得ることを確立する。Sharplessと同僚によって既に明確に表現されたように^[10]、この技術には多数の用途がある。RNA反復障害は、特に魅力的な用途であり得る。数千もの反復単位を有し得る標的の性質により、鋳型にされた産物を高収量で生成し得た。さらに、ALS、DM1、およびDM2などの多くのRNA機能獲得障害は、脳機能障害を引き起こすので、血液脳関門を通過する能力を有する低分子量化合物を開発することが重要になる。まとめると、クリック反応は、疾患の細胞と組織の両方のモデルにおいて多価化合物の効力をもつ高浸透性の低分子量モノマーを生じ得た。

【0016】

このアプローチは、DM2に観察されるものと同様の疾患機構を有する、DM1の原因物質 ($r(\text{CUG})^{\text{exP}}$) の標的にも適用された。DM1は、DMPKの3'UTRに位置する $r(\text{CUG})^{\text{exP}}$ によって引き起こされ、それはまた、MBNL1などのRNA生合成に関与するタンパク質と結合し、それを捕捉する (図21)。

【0017】

本発明者らは、細胞およびDM1マウスモデルにおいて $r(\text{CUG})^{\text{exP}}$ と結合し、DM1機能障害を改善させる、N-メチルペプチド骨格、2H-K4NMeに提示されるH-RNA結合モジュールを含む二量体化合物を既に記載している。(図22; Rzeczek SG, Gao Y, Tang ZZ, Thornton CA, Kodadek T, Disney MD. ACS Chem Biol. 2013 Oct 18; 8(10):2312-21)。ラットミクロソームに2時間曝した後、化合物の35%だけがインタクトであった。化合物を調べると、アミド結合が代謝的不安定性の原因 (metabolic liability) であり得ることが示唆された; 従ってアミドをN-メチルアミドに置き換えて2H-K4NMeSを生成した、これはラットミクロソームに安定性であることが分かった (図22)。

【0018】

この安定な化合物、2H-K4NMeSを、DM1患者由来線維芽細胞におけるプレ-mRNAスプライシング欠損の改善について試験し (Konieczny, P.; Stepniak-Konieczna, E.; Sobczak, K. Nucleic Acids Research 2014, 42, 10873参照)、100nMよりも高い濃度で欠損の50%超を救済することを見出した (図23)。2H-K4NMeS (代謝的に安定) および2H-K4NMe (代謝的に不安定) を、次にHSA^LRマウスモデルにおけるプレ-mRNAスプライシング欠損の改善について試験した (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, 1769-1773参照)。これらの結果は、2H-K4NMeSが、2H-K4NMeと比較してマウスモデルにおいてCln1プレ-mRNAスプライシング欠損の改善で7倍超強力であることを示す (図23)。

【0019】

2H-K4NMeSの良好な活性を考え合わせて、この分子の細胞標的を化学的架橋およびプルダウンによる単離 (Chem-CLIP) を用いて探索した。このアプローチでは、親化合物2H-K4NMeS-CA-ビオチンの反応性誘導体は、反応性モジュール (CA) および精製タグ (ビオチン) を含む。Chem-CLIPプローブの構造を図24Aに示す。この化合物のRNA標的とのインビトロ反応の試験を達成し、この化合物が

10

20

30

40

50

$r(CUG)_{109}$ と最も効果的に反応したことが示された (図 2 4 B)。

【 0 0 2 0 】

次に、この化合物の DM 1 患者由来線維芽細胞への適用を達成して、化合物の RNA 標的の特性を明らかにした。化合物の曝露および細胞の溶解の後、全 RNA をストレプトアビジン樹脂に捕捉した。結合したビオチン化物質を樹脂から遊離させ、qRT-PCR を使用することによって定量化した。これらの研究は、3' UTR に $r(CUG)^{exP}$ を含んだ DMPK mRNA がブルダウンで著しく濃縮されることを示した (図 2 4 C)。2H-K4NMeS-CA-ビオチンに対して過剰な非反応性 2H-K4NMeS を添加し、Chem-CLIP を繰り返すことにより この実験は、競合的化学的架橋およびブルダウンによる単離 (C-Chem-CLIP と呼ばれる 非反応性の化合物が、ブルダ 10

【 0 0 2 1 】

次に、リガンド結合部位の位置付けのための化学的架橋およびブルダウンによる単離 (Chemical Crosslinking and Isolation by Pull Down to Map Ligand Binding Sites) (Chem-CLIP-Map) を実施して、DMPK mRNA 中の 2H-K4NMeS-CA-ビオチンの結合部位を同定した (Yang, W.-Y., Wilson, H.D., Velagapudi, S.P., and 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)。これは、2H-K4NMeS-CA-ビオチンとアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび RNアーゼ H によってブルダウンした DMPK mRNA を正確に切断することによって達成された。2H-K4NMeS-CA-ビオチンによる反応によってビオチン化された切断された断片をストレプトアビジン樹脂に捕捉し、精製した。定量化により、DMPK mRNA の 3' UTR に $r(CUG)^{exP}$ を含有する断片が、ブルダウンされた画 20

【 0 0 2 2 】

次に、2H-K4NMeS の誘導体を、本明細書において DM 2 RNA について提示される実験との類似性によって、 $r(CUG)^{exP}$ を標的化する二量体化合物をオンサイトで合成する細胞のクリック反応でそれを使用することができるよう合成した。一連の化合物 (i) 1 つのアジドを提示した (N_3 -2H-K4NMeS) ; および (ii) N-メチル骨格から様々な距離で活性化アルキンを提示した (2H-K4NMeS-活性化アルキン) が合成された。これらの構造を図 2 6 に示す。

【 0 0 2 3 】

最初に、本発明者らは、隣接する部位に結合した 2 つの化合物間の HD CR によって、図 2 6 に示される構造のオリゴマー化を $r(CUG)_{12}$ が触媒することができるかを調べた。結果は、2H-K4NMeS-Aak が、 $r(CUG)_{12}$ の存在下で N_3 -2H-K4NMeS と反応する最も良いアルキンスペーサー単位をもたらしたことを示す (図 2 7 A)。最適な化合物は、次に、その他の核酸を使用することによって触媒されている 40

それらの結合 (union) について試験され (図 2 7 B)、 $r(CUG)_{12}$ だけが有意な反応収量をもたらしたことが示された。

【 0 0 2 4 】

次に、上で明らかになったスペーシングの教訓を用いて、単一の小分子に反応性のアジド部分とアルキン部分を有する小分子を設計した。化合物 N_3 -2H-K4NMeS-Aak をこのように合成した (図 2 8)。この化合物は、 $r(CUG)^{exP}$ の存在下で、対応するアジドおよびアルキンでタグ付けされた化合物の混合物よりも大きいオリゴマーを形成することができるはずである。

【 0 0 2 5 】

患者由来細胞における N_3 -2H-K4NMeS-Aak オリゴマー化の程度は、Ch 50

emReactBIPを使用することによって試験した。このアプローチでは、出発物質および反応生成物の両方をストレプトアビジン捕捉によって細胞から精製させる(図29B)、 N_3 -2H-K4NMeS-Aakの変形を合成した(ビオチン- N_3 -2H-K4NMeS-Aak、図29A)。これらの研究は、オリゴマー生成物がDM1由来線維芽細胞においてのみ見出されることを示した(図29C)。

【0026】

上記のデータは、DM1のオンサイトでの薬物合成が実行可能であることを示したので(図29)、この化合物(N_3 -2H-K4NMeS-Aak)の生物活性を評価した。 N_3 -2H-K4NMeS-Aakの添加は、DM1に関連するプレ-mRNAスプライシング欠損を10nMの投与量で50%超改善し、 N_3 -2H-K4NMeS単独による処理または N_3 -2H-K4NMeSおよび2H-K4NMeS-Aakの同時処理よりもはるかに強力であった(図30A)。次に、化合物のRNAフォーカスへの影響を測定し、クリック反応可能な化合物 N_3 -2H-K4NMeS-Aakが細胞に添加された場合に、より少ないフォーカスが観察されたことが示された(図30B)。最後に、 $r(CUG)^{exP}$ を含有するDMPK mRNAは、核内に保持されるほど十分に低いレベルで翻訳される(Childs-Disney, J. L.; Hoskins, J.; Rzuczek, S. G.; Thornton, C. A.; Disney, M. D. ACS Chemical Biology 2012)。従って、 N_3 -2H-K4NMeS-Aakは、フォーカスでの隔離を緩和することによってDMPKの細胞内局在を変え、翻訳を刺激することができる。 N_3 -2H-K4NMeS-Aakを添加することにより、長い毒性のある $r(CUG)$ リピートを含む細胞においてナノモル濃度でのDMPK翻訳欠損が改善されたが、病原性のリピートをもたない細胞には影響がなかった。

【0027】

要するに、これらのデータは、化合物のリード最適化が、それらをより安定にするために骨格を変えることによって達成され得ることを示す。これらの化合物がアジド部分およびアルキン部分を備えることにより、DM1患者由来細胞におけるオンサイトでの薬物合成が可能になり、非常に高い効力がもたらされる。

【0028】

次に、 $r(CUG)^{exP}$ を切断するアプローチを開発した。天然物ブレオマイシン(bleomycin)はDNAを切断できることが示されたが、インビトロでRNA標的を切断したことも示された(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)。従って、ブレオマイシンに2H-K4NMeSを付加することにより、これらの化合物に患者由来細胞において $r(CUG)^{exP}$ を切断する能力を与えることができ得る。2H-K4NMeS-ブレオマイシン(Bleomycin)A5の合成は、このように達成した(図31A)。この化合物をDM1患者由来線維芽細胞に適用すると、qRT-PCRによって評価されるDMPK mRNAのレベルは低下するが、健康な線維芽細胞ではDMPK mRNAレベルには影響がなかった(図31B)。この化合物がDMPK mRNAを選択的に切断する能力をさらに試験するため、4倍過剰の2H-K4NMeSに対して2H-K4NMeS-ブレオマイシン(Bleomycin)A5を細胞に添加した。予想した通り、非反応性の化合物は結合に関して反応性の化合物と競合し、切断の量を低下させ、選択性を示唆した(図31C)。これらの切断実験は、プレ-mRNAスプライシング欠損の改善とも関連した(図31D)。

【0029】

蛍光レポーターも、RNAに触媒されるクリック反応に基づいてオンサイトで合成した。このアプローチでは、クリック反応時にFRETを観察できるように、クリック反応を受けることのできる化合物をFRET対でタグ付けする(図32A)。FAM(フルオレセイン)およびTAMARA(5-カルボキシテトラメチルローダミン)FR

ET染料対を使用し、FAM-2H-K4NMeS-AakおよびN₃-2H-K4NMeS-TAMARAを得た。化合物の添加により、r(CUG)₁₂の存在下でのみ、FRETの強化が示された。従って、このアプローチは、広い適用性を有するFRETレポーターのオンサイトでの合成を可能にする。

【0030】

引用文献

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

【0031】

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

10

【0032】

[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。

【0033】

[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。

20

【0034】

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

【0035】

[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。

30

【0036】

[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。

【0037】

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

【0038】

40

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

【0039】

[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。

【0040】

[11] a) A. Krasinski, Z. Radic, R. Manetsch, J. R

50

auschel, 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.

【0041】

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

【0042】

[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.

【0043】

[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. 2011, 17, 720 - 725.

【0044】

[実施例]

コンピュータ解析のための方法

本発明者らは以前、2K-4、すなわちペプチドによって連結された2つのK RNA-結合モジュールと、2つの5'CCUG/3'GUCCループを含有するRNAとの結合のモデルを公開した^[1]。ペプチドを除去し、リンカーを含めるためにK RNA-結合モジュールを次のように編集した：(i) 1つのKの環IのC6'には、ヘキサ-5-インアミドかまたはN-(2-アミノ-2-オキソエチル)プロピオルアミドのいずれかを含めた；そして(ii) アジド基をもう一方のKの環IIIのC6"に付加した。リンカーの立体構造の走査を実施して、2つのKの反応性の終端が互いのすぐ近くにあるかどうかを調べた。非冗長性の立体構造の徹底的走査を、MacroModel (Schrodinger, LLC)でOPLS_2005力場を使用して実施した^[2]。結果は、複数の立体構造が2つの反応性基を非常に近接させていて、エチニルCとアジドNとの最も短い距離は、ヘキサ-5-インアミドおよびN-(2-アミノ-2-オキソエチル)プロピオルアミドリンカーにおいて、それぞれ2.61 および2.37 であることを示した(図1、BI)。

【0045】

各々の構造中で最も近い反応性基を有するこれらのリンカーの組を使用して、環化付加最終産物、K1,4-二量体およびK1,5-二量体のモデルを作製した。各々のリンカーの組み合わせ(ヘキサ-5-インアミド+N₃またはN-(2-アミノ-2-オキソエチル)プロピオルアミド+N₃)で、K1,5-二量体は、1つの立体構造を有する。各々のリンカーの組み合わせで、K1,4-二量体は、2つの主な立体構造、溶媒に向かうトリアゾール環C₅H(C₅H-out)かまたはRNA主溝に向かうトリアゾール環C₅H(C₅H-in)が可能であることを示した。合計6つのモデルをこのように作製した(図1、BIIおよびBIII)。複合体の安定性と、結合したKのリンカーの影響を観察するために、手短に各々の構造のエネルギー極小化、続いて分子運動学(MD)シミュレーションを実施した。

ュレーションを行った。MDシミュレーションは、Desmond^[3]とOPLS_2005力場^[2]を用いて実施した。各々のモデル構造を、各方向に10 Åを安定させる(buffer)、TIP3水および150 mM NaClを含む斜方晶の箱で溶媒和させた。追加のイオンを添加して系を中和させた。MDシミュレーションの前に、拘束/非拘束最小化および等温と等圧のアンサンブルを用いる短いシミュレーションからなる、NPT緩和プロトコルを用いて系を予め平衡させた。10ナノ秒のMDシミュレーションを、一定の温度(300 K)および圧力(1.01325 bar)で実施した。位置拘束がシミュレーションを通してRNAに適用された。短距離および長距離のクーロン力の相互作用を、9 Å半径(短い)を用いるカットオフ法および許容差 0.1×10^{-9} (長い)を用いる滑らかな粒子・メッシュ・エwald許容差法に設定した。シミュレーションの解析は、Maestroグラフィックインターフェースによって達成した。

10

【0046】

系の体積、圧力、温度および可能なエネルギーに顕著な変動がないことを観察した。値が連続的に増加した2つの例を除いて、シミュレーションの大部分で約4~6ナノ秒後に系の全エネルギーを安定化させた。しかし、シミュレーション期間中の勾配は0.05 kcal/ps未満であった。K部分とRNAとの水素結合は、シミュレーションを通して保存された。図は、PyMol(Schrodinger, LLC)を用いて準備された。

【0047】

化合物の合成方法および化合物の特徴づけ

20

略語。DIC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド; DIEA、N,N-ジイソプロピルエチルアミン; DMF、N,N-ジメチルホルムアミド; HPLC、高速液体クロマトグラフィー; HRMS、高解像度質量分析; LC-MS、液体クロマトグラフィー-質量分析; MeOH、メタノール; MALDI ToF/ToF、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型/飛行時間型; MS、質量分析; NBD、7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル; TFA、トリフルオロ酢酸

合成。Fmoc-Rinkアミド樹脂(0.59ミリモル/g)は、Advanced ChemTechより購入した。N,N-ジメチルホルムアミド(DMF、無水)は、EMDより購入し、さらなる精製を行わずに使用した。ピペリジン、トリフルオロ酢酸(TFA)、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、および2-プロモ酢酸は、シグマ・アルドリッチより購入した。N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、1-1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール(HOAt)、およびFmoc-L-アラニンは、Advanced ChemTechより購入した。Fmoc-N-メチル-L-アラニンおよびN-(4-アミノブチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステルは、Combi-Blocksより購入した。N-(4-アミノエチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステルは、Oakwood Productsより購入した。クロラムブシルは、MP Biomedicalsより購入した。ブレオマイシンA5は、LKT Laboratoriesより購入した。ヘキストカルボン酸塩(Pushechnikov A, Lee MM, Childs-Disney JL, Sobczak K, French JM, Thornton CA, Disney MD. J Am Chem Soc. 2009 Jul 22; 131(28): 9767-79)、2H-K4NMe(Rzuczek SG, Gao Y, Tang ZZ, Thornton CA, Kodadek T, Disney MD. ACS Chem Biol. 2013 Oct 18; 8(10): 2312-21)、およびビオチンアミン(Yamada, M.; Harada, K.; Maeda, Y.; Hasegawa, T. New Journal of Chemistry 2013, 37, 3762)は、これまでに報告されたように合成した。N-メチルペプチドは、Biotope Initiator+SP Waveマイクロ波を用いて合成した。

30

40

【0048】

化合物の精製および分析。分取HPLCは、Waters 2487二重波長吸光度検出

50

器およびWaters Sunfire C18 OBD 5 μ m 19 \times 150 mmカラムを備えたWaters 1525 Binary HPLCポンプを用いて実施した。吸光度は、280および220 nmでモニターした。60分で0.1% TFAを含むH₂O中0~100% MeOHの勾配を化合物の精製に使用した。分析用HPLCは、Waters Symmetry C18 5 μ m 4.6 \times 150 mmカラムを用いて実施した。評価した全ての化合物は、分析用HPLCにより測定して、95%以上の純度を有した。質量分析は、アプライドバイオシステムズMALDI ToF/ToF分析計4800プラスで - ヒドロキシ桂皮酸マトリックスを用いて実施した。全てのマイクロ波反応は、Biotage イニシエーター + SP Wave マイクロ波を用いて実施した。高解像度質量スペクトル分析は、ケミカルサイエンス質量分析センターのイリノイ大学アーバナ・シャンペーン校によって実施された。

10

【0049】

K1, 4二量体の合成。図16を参照されたい。N₃-K (50 mg、50 μ mol) およびK-Ak (45 mg、50 μ mol) を、DMFおよび水 (3 mL) の1:1混合物に溶解し、ポリトリアゾールCu (I) 触媒 (10 mg、16 μ mol) ^[4]、およびEt₃N (500 μ L、3.6 mmol) で処理した。反応混合物を、100 で2.5時間電子レンジにかけ、その後、反応混合物を濃縮し、上記のような逆相HPLCによって精製した。収率: 11%; 6.2 mgの白色の固体をTFA塩として得た。H¹NMR (700 MHz, D₂O, TSP): 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 = 10 Hz), 3.31 (m, 2H), 3.24 (dd, 2H, J = 7, 13), 2.73 (t, 2H, J = 8 Hz), 2.52 (m, 2H), 2.34 (t, 2H, J = 8 Hz), 1.92 (m, 4H), 1.25 (m, 4H); C¹³NMR (175 MHz, D₂O, TSP): = 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, 27.0 ppm; HRMS (ESI) m/z C₄₂H₇₉N₁₂O₁₁ についての計算値 (M+H) 1087.5483; 実測値 1087.5453。

20

30

【0050】

K1, 5二量体の合成。図17を参照されたい。Boc-N₃-K (20 mg、20 μ mol) およびBoc-K-Ak (23 mg、20 μ mol) を、トルエン (2 mL) に溶解し、アルゴン下に置いた。このサンプルをペンタメチルシクロペンタジエニルビス(トリフェニルホスフィン)ルテニウム (II) クロライド (6 mg、0.8 μ mol) で処理し、130 で3時間電子レンジにかけた。次に、反応混合物を濾過し、濃縮した。残渣をCH₂Cl₂中TFAの1:1混合物で0 で2時間処理した。反応混合物を濃縮し、上記のような逆相HPLCによって精製した。収率: 0.5%; 1 mgの白色の固体をTFA塩として得た。¹H NMR (700 MHz, D₂O, TSP): 7.66 (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); ¹³C NMR (175 MHz, D₂O, TSP): = 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

40

50

. 9 , 19 . 2 , 15 . 1 ppm ; HRMS (ESI) m/z $C_{42}H_{78}N_{11}O_2$ についての計算値 (M+H) 1088 . 5323 ; 実測値 1088 . 5316 。

【0051】

N_3 - K - Ak の合成。図18を参照されたい。 N_3 - K (25 mg、49 μ mol) を、アセトンおよび水 (2 mL) の1 : 1 混合物に溶解し、NBD - 活性化6 - アミノヘキシン酸 (6 mg、49 μ mol) を添加した。反応を室温で一晩撹拌した後、溶媒を真空除去した。得られる残渣を上記のような逆相HPLCによって精製した。収率：20 % ; 5 mg の白色の固体をTFA塩として得た。 1H NMR (700 MHz, D_2O , TSP) : = 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 (175 MHz, D_2O , TSP) : = 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 . 0 ppm ; HRMS (ESI) m/z $C_{24}H_{42}N_7O_{11}$ についての計算値 (M+H) 604 . 2942 ; 実測値 604 . 2938 。

【0052】

N_3 - K - Aak の合成。図19を参照されたい。2 - プロピオールアミド酢酸 (Propiolamidoacetic acid) (175 mg、1 . 36ミリモル) を、無水DMFに溶解し、DIC (213 μ L、1 . 4ミリモル)、N - ヒドロキシ - 5 - ノルボルネン (norbornene) - 2 , 3 - ジカルボキシイミド (243 mg、1 . 36ミリモル)、およびDIEA (600 μ L、3 . 4ミリモル) で処理した。反応混合物をアルゴン下、室温で一晩撹拌した。次に、 N_3 - K (20 mg、40 μ mol) を、アセトンおよび水 (2 mL) の1 : 1 混合物に溶解し、500 μ L のNBD - 活性化酸を4時間にわたって徐々に添加した。次に、溶媒を真空除去し、得られる残渣を上記のような逆相HPLCによって精製した。収率：2 %、600 μ mol。 1H NMR (700 MHz, D_2O , TSP) : = 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 (175 MHz, D_2O , TSP) : = 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 . 7 ppm ; HRMS (ESI) m/z $C_{23}H_{39}N_8O_{12}$ についての計算値 (M+H) 619 . 2687 ; 実測値 619 . 2680 。

【0053】

N_3 - K - ビオチンの合成。図20を参照されたい。 N_3 - K (17 mg、30 μ mol) を、アセトンおよび水 (2 mL) の1 : 1 混合物に溶解し、NBD - ビオチン (12 mg、30 μ mol) を添加した。反応を室温で一晩撹拌した後、溶媒を真空除去した。得られる残渣を上記のような逆相HPLCによって精製した。収率：7 % ; 1 . 6 mg の白色の固体をTFA塩として得た。 1H NMR (700 MHz, D_2O , TSP) : = 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}C NMR (175 MHz, D_2O , TSP): = 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, 25.1 ppm; HRMS (ESI) m/z $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{S}$ についての計算値 (M + H) 736.3300; 実測値 736.3297.

10

【0054】

小分子二量体の合成。

【0055】

2H-K4NMeSの合成。図33を参照されたい。Rinkアミド樹脂(500mg、0.3ミリモル)をDMF中で室温で10分間膨潤させ、次にDMF中20%ピペリジンの溶液で脱保護した(5mL、2×20分)。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、DMF中1Mプロモ酢酸の溶液(4mL)およびDIC(250μL、1.6ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、N-(4-アミノブチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステル(121mg、0.6ミリモル)のDMF(4mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した(3×5mL)。次に、Fmoc-N-メチル-L-アラニン(264mg、0.81ミリモル)、DIC(250μL、1.6ミリモル)、HOAt(110mg、0.81ミリモル)、およびDIEA(141μL、0.81ミリモル)のDMF(4mL)溶液を添加し、反応物をマイクロ波によって75℃に30分間加熱した。樹脂をDMFで洗浄し、Fmocを20%ピペリジン/DMFで除去した(2×10分)。このサイクルを合計4回繰り返した。次に、樹脂をDMFおよびDCMで洗浄し、その後、30%TFA/DCM(5mL)で10分間処理した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩(80mg、0.16ミリモル)、HOAt(22mg、0.16ミリモル)、DIC(25μL、0.16ミリモル)およびDIEA(100μL)のDMF(2mL)溶液で処理し、マイクロ波によって75℃に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20~100%MeOH/H₂O+0.1%(v/v)TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。640ナノモルの2H-K4NMeSを単離した; 0.2%。2H-K4NMeS($\text{C}_{81}\text{H}_{101}\text{N}_{19}\text{O}_9$)MS計算値(M+H)1484.81、MS実測値1484.93(M+H); t_R = 32分。

20

30

【0056】

2H-K4NMeS官能基化中間体の合成。Rinkアミド樹脂(500mg、0.3ミリモル)をDMF中で室温で10分間膨潤させ、次にDMF中20%ピペリジンの溶液で脱保護した(5mL、2×20分)。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、DMF中1Mプロモ酢酸の溶液(4mL)およびDIC(250μL、1.6ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、N-(4-アミノブチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステル(121mg、0.6ミリモル)のDMF(4mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した(3×5mL)。次に、Fmoc-N-メチル-L-アラニン(264mg、0.81ミリモル)、DIC(250μL、1.6ミリモル)、HOAt(110mg、0.81ミリモル)、およびDIEA(141μL、0.81ミリモル)のD

40

50

MF (4 mL) 溶液を添加し、反応物をマイクロ波によって75 に30分間加熱した。樹脂をDMFで洗浄し、Fmocを20%ピペリジン/DMFで除去した(2×10分)。このサイクルを合計3回繰り返した。樹脂をDMFで洗浄し(3×5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、DMF中1 Mプロモ酢酸の溶液(4 mL)およびDIC(250 μL、1.6ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し(3×5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、N-(4-アミノエチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステル(105 mg、0.6ミリモル)のDMF(4 mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した(3×5 mL)。

10

【0057】

2H-K4NMeS-CA-ピオチンの合成。図34を参照されたい。上で調製した2H-K4NMeS中間体樹脂を、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、DMF中1 Mプロモ酢酸の溶液(4 mL)およびDIC(250 μL、1.6ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し(3×5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、ピオチンアミン(200 mg、0.6ミリモル)のDMF(4 mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した(3×5 mL)。次に、Fmoc-アラニン(252 mg、0.81ミリモル)、DIC(250 μL、1.6ミリモル)、HOAt(110 mg、0.81ミリモル)、およびDIEA(141 μL、0.81ミリモル)のDMF(4 mL)溶液を添加し、反応物をマイクロ波によって75 に30分間加熱した。樹脂をDMFおよびDCMで洗浄し、その後、30%TFA/DCM(5 mL)で10分間で処理した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩(80 mg、0.16ミリモル)、HOAt(22 mg、0.16ミリモル)、DIC(25 μL、0.16ミリモル)およびDIEA(100 μL)のDMF(2 mL)溶液で処理し、マイクロ波によって75 に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20~100%MeOH/H₂O+0.1%(v/v)TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。次に、Fmocを20%ピペリジン/DMF(1×10分)によって除去し、その後真空濃縮した。143ナノモル(0.05%)の遊離アミン二量体を単離し、クロラムブシル(1 mg、3 μmol)、DIC(25 μL、0.16ミリモル)およびDIEA(25 μL)のDMF(200 μL)溶液で室温にて3時間処理した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20~100%MeOH/H₂O+0.1%(v/v)TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。119ナノモルの2H-K4NMeS-CA-ピオチンを単離した; 0.04%。2H-K4NMeS-CA-ピオチン(C₁₁₃H₁₄₉Cl₂N₂₆O₁₄S)MS計算値2196.08(M+H)、MS実測値2195.96(M+H); t_R=30分。

20

30

【0058】

2NAc-K4NMeS-CA-ピオチンの合成。図35を参照されたい。2H-K4NMeS-CA-ピオチンについて上記のように合成したが、ヘキストカルボン酸塩と結合する代わりに、ペプチドを無水酢酸およびDIEAの1:1溶液(合計量400 μL)で室温で1時間処理した。800ナノモルの2NAc-K4NMeSを単離した; 0.3%。2NAc-K4NMeS(C₅₉H₉₆Cl₂N₁₄O₁₂SNa)MS計算値1317.63(M+Na)、MS実測値1317.28(M+Na); t_R=18分。

40

【0059】

2H-K4NMeS-ブレオマイシンA5の合成。図36を参照されたい。上で調製した2H-K4NMeS中間体樹脂を、6-(Fmoc-アミノ)ヘキサン酸(286 mg、0.81ミリモル)DIC(250 μL、1.6ミリモル)、HOAt(110 mg、0.81ミリモル)、およびDIEA(141 μL、0.81ミリモル)のDMF(4 mL)溶液と反応させ、添加し、反応物をマイクロ波によって75 に30分間加熱した。

50

樹脂をDMFおよびDCMで洗浄し、その後、30% TFA / DCM (5 mL) で10分間で処理した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩 (80 mg、0.16ミリモル)、HOAt (22 mg、0.16ミリモル)、DIC (25 μ L、0.16ミリモル) およびDIEA (100 μ L) のDMF (2 mL) 溶液で処理し、マイクロ波によって75 に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20~100% MeOH / H₂O + 0.1% (v/v) TFA による逆相HPLCを用いて精製した。次に、Fmocを20% ピペリジン / DMF (1 x 10分) によって除去し、その後真空濃縮した。450 nmol (0.2%) の遊離アミン二量体を単離し、それをN, N'-ジスクシンイミジルカルボナート (450 nmol、LKT Labs) およびDIEA (10 μ L) の無水DMF (50 μ L) 中の溶液で処理した。反応物を室温で攪拌し、さらなるN, N'-ジスクシンイミジルカルボナートを、出発物質の80~90%が消費されるまで定期的に添加した。次に、プレオマイシンA5 - 銅錯体 (450 nmol) の無水DMF中の溶液を添加し、反応物を室温で一晩攪拌した。次に、溶液を真空濃縮し、逆相HPLCを用いて最初に水中0.1 mM EDTA (pH 6.3) を15分間使用した後、0~100%のCH₃CN / H₂O + 0.1% TFAを1時間にわたって使用することによって精製した。52ナノモルの2H-K4NMeS - プレオマイシンA5を単離した (0.02%)。2H-K4NMeS - プレオマイシンA5 (C₁₄₆H₂₀₃N₄₀O₃₂S₂) MS計算値3092.49 (M+H)、MS実測値3092.18 (M+H); t_R = 35分。
【0060】

N₃ - 2H-K4NMeSの合成。図37を参照されたい。Rinkアミド樹脂 (20 mg、0.12ミリモル) をDMF中で室温で10分間膨潤させ、次にDMF中20% ピペリジンの溶液で脱保護した (3 mL、2 x 20分)。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 3 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒) によって、DMF中1 Mプロモ酢酸の溶液 (2 mL) およびDIC (125 μ L、0.8ミリモル) と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 3 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒) によって、3-アジドプロピルアミン (60 mg、0.6ミリモル) のDMF (2 mL) 溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した (3 x 3 mL)。樹脂を再び、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒) によって、DMF中1 Mプロモ酢酸の溶液 (2 mL) およびDIC (125 μ L、0.8ミリモル) と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 3 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒) によって、N-(4-アミノブチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステル (60 mg、0.3ミリモル) のDMF (2 mL) 溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した (3 x 3 mL)。次に、Fmoc-N-メチル-L-アラニン (132 mg、0.4ミリモル)、DIC (125 μ L、0.8ミリモル)、HOAt (55 mg、0.4ミリモル)、およびDIEA (70 μ L、0.4ミリモル) のDMF (2 mL) 溶液を添加し、反応物をマイクロ波によって75 に30分間加熱した。樹脂をDMFで洗浄し、Fmocを20% ピペリジン / DMFで除去した (2 x 10分)。このサイクルを合計4回繰り返した。次に、樹脂をDMFおよびDCMで洗浄し、その後、30% TFA / DCM (5 mL) で10分間処理した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩 (40 mg、0.08ミリモル)、HOAt (11 mg、0.08ミリモル)、DIC (25 μ L、0.16ミリモル) およびDIEA (50 μ L) のDMF (1 mL) 溶液で処理し、マイクロ波によって75 に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20~100% MeOH / H₂O + 0.1% (v/v) TFA による逆相HPLCを用いて精製した。640ナノモルのN₃ - 2H-K4NMeSを単離した; 0.5%。N₃ - 2H-K4NMeS (C₈₅H₁₀₈N₂₃O₁₀) MS計算値 (M+H) 1610.87、MS実測値1610.96 (M+H); t_R = 34分。

【0061】

N_3 - 2H - K4NMeS ピオチンの合成。図38を参照されたい。Rinkアミド樹脂(500mg、0.3ミリモル)をDMF中で室温で10分間膨潤させ、次にDMF中20%ピペリジンの溶液で脱保護した(3mL、2×20分)。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、DMF中1Mプロモ酢酸の溶液(4mL)およびDIC(250μL、1.6ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、3-アジドプロピルアミン(120mg、1.2ミリモル)のDMF(5mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した(3×5mL)。樹脂を再び、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、DMF中1Mプロモ酢酸の溶液(4mL)およびDIC(250μL、1.6ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、N-(4-アミノブチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステル(121mg、0.6ミリモル)のDMF(4mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した(3×5mL)。次に、Fmoc-N-メチル-L-アラニン(264mg、0.81ミリモル)、DIC(250μL、1.6ミリモル)、HOAt(110mg、0.81ミリモル)、およびDIEA(140μL、0.81ミリモル)のDMF(5mL)溶液を添加し、反応物をマイクロ波によって75℃に30分間加熱した。樹脂をDMFで洗浄し、Fmocを20%ピペリジン/DMFで除去した(2×10分)。このサイクルを合計3回繰り返した。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、DMF中1Mプロモ酢酸の溶液(4mL)およびDIC(250μL、1.6ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し(3×5mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射(3×15秒)によって、N-(4-アミノエチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステル(105mg、0.6ミリモル)のDMF(4mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した(3×5mL)。次に、樹脂をD-ピオチン(195mg、0.81ミリモル)、DIC(250μL、1.6ミリモル)、HOAt(110mg、0.81ミリモル)、およびDIEA(140μL、0.81ミリモル)のDMF(5mL)溶液で処理し、添加し、反応物をマイクロ波によって75℃に30分間加熱した。次に、樹脂をDMFおよびDCMで洗浄し、その後、30%TFA/DCM(5mL)で10分間で処理した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩(40mg、0.08ミリモル)、HOAt(11mg、0.08ミリモル)、DIC(25μL、0.16ミリモル)およびDIEA(50μL)のDMF(1mL)溶液で処理し、マイクロ波によって75℃に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20~100%MeOH/H₂O+0.1%(v/v)TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。640ナノモルの N_3 - 2H - K4NMeS - ピオチンを単離した; 0.2%。 N_3 - 2H - K4NMeS - ピオチン(C₉₇H₁₂₇N₂₆O₁₂S)MS計算値(M+H)1879.98、MS実測値1879.87(M+H); t_R = 31分。

【0062】

2H - K4NMeS 活性化アルキンの合成。図39を参照されたい。各々のアルキン誘導体について、300mgの樹脂(0.18ミリモル)と2H - K4NMeS中間体を、N-Fmocカルボン酸塩リンカー(0.6ミリモル)、DIC(125μL、0.8ミリモル)、HOAt(72mg、0.6ミリモル)、およびDIEA(80μL、0.6ミリモル)のDMF(2mL)溶液で処理し、添加し、反応物をマイクロ波によって75℃に30分間加熱した。樹脂をDMFで洗浄し、Fmocを20%ピペリジン/DMFで除去した(2×10分)。次に樹脂をDMFで洗浄し、その後、DIEA(80μL、0

10

20

30

40

50

、6ミリモル)を含む2 mLのDMFに懸濁した。懸濁液にアルゴンを流し、0 に冷却した。次に、DIC (125 μ L、0.8ミリモル)を添加し、それに続いてプロピオール酸 (37 μ L、0.6ミリモル)のDMF (500 μ L)溶液をゆっくり添加した。反応物を低温で1時間攪拌し、その後、DMFおよびDCMで洗浄した。次に、樹脂を30% TFA / DCM (5 mL)で10分間処理した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩 (40 mg、0.08ミリモル)、HOAt (11 mg、0.08ミリモル)、DIC (25 μ L、0.16ミリモル)およびDIEA (50 μ L)のDMF (1 mL)溶液で処理し、マイクロ波によって75 に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20 ~ 100% MeOH / H₂O + 0.1% (v/v) TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。2H-K4NMeSプロピオール酸塩 (n=0) 900ナノモル (0.5%) (C₈₅H₁₀₅N₂₀O₁₀) MS計算値 (M+H) 1565.83、MS実測値 1565.61 (M+H); t_R = 31分。2H-K4NMeSグリシン (n=1) 600ナノモル (0.3%) (C₈₇H₁₀₈N₂₁O₁₁) MS計算値 (M+H) 1622.854、MS実測値 1622.854 (M+H); t_R = 30分。2H-K4NMeS -アラニン (n=2) 750ナノモル (0.4%) (C₈₈H₁₁₀N₂₁O₁₁) MS計算値 (M+H) 1636.87、MS実測値 1636.7 (M+H); t_R = 31分。2H-K4NMeSアミノヘキサン酸塩 (n=5、Aak) 4.93 μ モル (3%) (C₉₁H₁₁₆N₂₁O₁₁) MS計算値 (M+H) 1678.92、MS実測値 1678.7 (M+H); t_R = 31分。2H-K4NMeSアミノオクタン酸塩 (n=7) 1.6 μ モル (0.9%) (C₉₃H₁₂₀N₂₁O₁₁) MS計算値 (M+H) 1706.95、MS実測値 1707.0 (M+H); t_R = 33分。2H-K4NMeSアミノドデカン酸塩 (n=11) 4.49 μ モル (3%) (C₉₇H₁₂₈N₂₁O₁₁) MS計算値 (M+H) 1763.01、MS実測値 1763.2 (M+H); t_R = 34分。

【0063】

N₃-2H-K4NMeS-Aakの合成。図40を参照されたい。Rinkアミド樹脂 (800 mg、0.47ミリモル)をDMF中で室温で10分間膨潤させ、次にDMF中20%ピペリジンの溶液で脱保護した (5 mL、2 x 20分)。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒)によって、DMF中1 Mプロモ酢酸の溶液 (5 mL)およびDIC (500 μ L、3.2ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒)によって、3-アジドプロピルアミン (300 mg、3ミリモル)のDMF (5 mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した (3 x 5 mL)。樹脂を再び、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒)によって、DMF中1 Mプロモ酢酸の溶液 (5 mL)およびDIC (500 μ L、3.2ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒)によって、N-(4-アミノブチル)-N-メチルカルバミン酸tert-ブチルエステル (240 mg、1.2ミリモル)のDMF (5 mL)溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した (3 x 5 mL)。次に、Fmoc-N-メチル-L-アラニン (528 mg、1.6ミリモル)、DIC (500 μ L、3.2ミリモル)、HOAt (220 mg、1.6ミリモル)、およびDIEA (280 μ L、1.6ミリモル)のDMF (5 mL)溶液を添加し、反応物をマイクロ波によって75 に30分間加熱した。樹脂をDMFで洗浄し、Fmocを20%ピペリジン / DMFで除去した (2 x 10分)。このサイクルを合計3回繰り返した。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒)によって、DMF中1 Mプロモ酢酸の溶液 (5 mL)およびDIC (500 μ L、3.2ミリモル)と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し (3 x 5 mL)、10%電力に設定した700 Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 x 15秒)によって、

N - (4 - アミノエチル) - N - メチルカルバミン酸 *tert* - ブチルエステル (210 mg、1.2 ミリモル) の DMF (5 mL) 溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した (3 × 5 mL)。次に、樹脂を、N - Fmoc アミノヘキサン酸 (565 mg、1.6 ミリモル)、DIC (500 μ L、3.2 ミリモル)、HOAt (220 mg、1.6 ミリモル)、およびDIEA (280 μ L、1.6 ミリモル) の DMF (5 mL) 溶液で処理し、添加し、反応物をマイクロ波によって75℃に30分間加熱した。樹脂をDMFで洗浄し、Fmocを20%ピペリジン / DMFで除去した (2 × 10分)。次に樹脂をDMFで洗浄し、その後、DIEA (280 μ L、1.6 ミリモル) を含む5 mLのDMFに懸濁した。懸濁液にアルゴンを流し、0℃に冷却した。次に、DIC (500 μ L、3.2 ミリモル) を添加し、それに続いてプロピオン酸 (148 μ L、3.2 ミリモル) の DMF (500 μ L) 溶液をゆっくり添加した。反応物を低温で1時間攪拌し、その後、DMFおよびDCMで洗浄した。次に、樹脂を30%TFA / DCM (5 mL) で10分間処理した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩 (40 mg、0.08 ミリモル)、HOAt (11 mg、0.08 ミリモル)、DIC (25 μ L、0.16 ミリモル) およびDIEA (50 μ L) の DMF (1 mL) 溶液で処理し、マイクロ波によって75℃に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20 ~ 100% MeOH / H₂O + 0.1% (v / v) TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。523 ナノモル (0.1%) の N₃ - 2H - K4NMeS - Aak を単離した。N₃ - 2H - K4NMeS - Aak (C₉₆H₁₂₄N₂₅O₁₂) MS 計算値 (M + H) 1818.9861、MS 実測値 1819.0081 (M + H) ; t_R = 3.2 分。

【 0064 】

ピオチン - N₃ - 2H - K4NMeS - Aak の合成。図41を参照されたい。Rink アミド樹脂 (250 mg、0.15 ミリモル) をDMF中で室温で10分間膨潤させ、次にDMF中20%ピペリジンの溶液で脱保護した (3 mL、2 × 20分)。樹脂をDMFで洗浄し (3 × 3 mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 × 15秒) によって、DMF中1Mプロモ酢酸の溶液 (2 mL) およびDIC (125 μ L、0.8 ミリモル) と2回反応させた。樹脂をDMFで洗浄し (3 × 3 mL)、10%電力に設定した700Wのマイクロ波を用いるマイクロ波照射 (3 × 15秒) によって、N - [2 - (D - ピオチニルアミノ) エチル] アミン³ (100 mg、0.3 ミリモル) の DMF (3 mL) 溶液と反応させた。樹脂をこの溶液とともに室温で1時間振盪し、その後DMFで洗浄した (3 × 5 mL)。残りの合成は、N₃ - 2H - K4NMeS - Aak について上に記載されるように合成した。230 ナノモルのピオチン - N₃ - 2H - K4NMeS - Aak を単離した ; 0.2%)。ピオチン - N₃ - 2H - K4NMeS - Aak (C₁₁₀H₁₄₆N₂₉O₁₅S) MS 計算値 (M + H) 2145.13、MS 実測値 2145.07 (M + H) ; t_R = 3.4 分。

【 0065 】

N₃ - 2H - K4NMeS - TAMRA (カルボキシテトラメチルローダミン) の合成。図42を参照されたい。N₃ - 2H - K4NMeS を Fmoc6 - アミノヘキサン酸塩とともに含有する樹脂 250 mg を、10分間かけて30%TFA / DCM (5 mL) によってピーズから切断した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩 (40 mg、0.08 ミリモル)、HOAt (11 mg、0.08 ミリモル)、DIC (25 μ L、0.16 ミリモル) およびDIEA (50 μ L) の DMF (1 mL) 溶液で処理し、マイクロ波によって75℃に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20 ~ 100% MeOH / H₂O + 0.1% (v / v) TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。2.95 μ モルの生成物を単離し、室温で20分間1 mLの20%ピペリジン / DMFで処理することによってFmocを除去し、溶液を真空濃縮した。残渣を、上記の条件を用いる逆相HPLCによって再び精製した。二量体の一部 (315 ナノモル) を、マイクロ波照射に

よって1.5時間75℃に加熱することにより、DMF(500μL)中で5-TAMRA(0.4mg、0.95μmol)とDIC(25μL、0.16ミリモル)と結合させた。反応混合物を濃縮し、上記のように精製して、216ナノモルの N_3 -2H-K4NMeS-TAMRA($C_{118}H_{144}N_{27}O_{15}$)MS計算値(M+H)2179.1335、MS実測値2179.0483(M+H); t_R = 34分。

【0066】

FAM-2H-K4NMeS-Aak(フルオレセイン)の合成。図43を参照されたい。 N_3 -2H-K4NMeSをFmoc-アミノヘキサン酸塩とともに含有する樹脂500mgを、10分間かけて30%TFA/DCM(5mL)によってビーズから切断した。溶液を真空濃縮し、トルエンで3回共沸させた。結果として得られる淡黄色の油状物質を、ヘキストカルボン酸塩(40mg、0.08ミリモル)、HOAt(11mg、0.08ミリモル)、DIC(25μL、0.16ミリモル)およびDIEA(50μL)のDMF(1mL)溶液で処理し、マイクロ波によって75℃に1.5時間加熱した。次に、溶液を真空濃縮し、1時間にわたって20~100%MeOH/H₂O+0.1%(v/v)TFAによる逆相HPLCを用いて精製した。生成物を単離し、室温で20分間1mLの20%ピペリジン/DMFで処理することによってFmocを除去し、溶液を真空濃縮した。残渣を、上記の条件を用いる逆相HPLCによって再び精製して、8μmolの二量体を得た。次にこれをFAMアルキン(25mg、6μmol)および銅触媒(1mg、1.6μmol)とともに、DMF(2mL)およびH₂O(1mL)中でトリメチルアミン(250μL)とともに120℃で3時間加熱することによってクリック反応させた。次に、反応混合物を濃縮し、上記のように精製して550ナノモルのFAM二量体を得た。これをトルエンとともに3回共沸させた後、プロピオル酸スクシンイミジルエステル⁴(1mg、6μmol)およびDIEA(25μL)のDMF(250μL)溶液で処理した。反応物を室温で4時間攪拌し、その後上記のように精製した。5.9ナノモルのFAM-2H-K4NMeS-Aakを単離した;(0.002%)。FAM-2H-K4NMeS-Aak($C_{120}H_{139}N_{26}O_{18}$)MS計算値(M+H)2232.0761、MS実測値2232.0827(M+H); t_R = 35分。

【0067】

生化学および細胞アッセイの方法

液体クロマトグラフィー・質量分析(LC-MS)によるインビトロクリック反応の評価。DM2を引き起こす反復RNAが、HDCRによるオリゴマー化の銑型となるかどうかを判定するために、アルキンを含有する化合物およびアジドを含有する化合物を、12のCCUGリピートを含むRNAとともにインキュベートした。 $rCCUG_{12}$ (最終濃度50μM)は、5分間60℃の1×フォールディングバッファー(8mM Na₂HPO₄、pH7.0、185mM NaCl、および1mM EDTA)中で折り畳まれた。室温に冷却した後、 N_3 -KおよびK-Ak(各々の最終濃度500μM)を添加し、反応混合物を37℃で48時間インキュベートした。各々のサンプルを、Thermo Scientific LTQ-ETD質量分析計を用いるLC-MSによって分析した。10分にわたる、0.1%ギ酸を加えた水中0~100%アセトニトリルの勾配を分析に使用した。各成分の全イオン数を、 N_3 -K、K-Ak、およびK1,4二量体の等モル混合物を含む制御注入を使用することにより測定される、各々の成分のイオン化率に正規化した。 $r(CUG)_{12}$ 、 $r(AUUCU)_{12}$ 、 $r(CAG)_{12}$ 、 $r(CGG)_{12}$ 、完全に塩基対形成したステムを含むRNAヘアピン、およびビール酵母tRNA(ロシュ)を使用する制御反応も、同様に評価した。

【0068】

DM2細胞培養モデルにおけるDM2に関連するプレ-mRNAスプライシング欠損の評価。クリック反応可能な化合物のDM2に関連する選択的プレ-mRNAスプライシング欠損への効果を判定するために、既に報告された細胞培養モデルを用いた^[5]。手短に言えば、C2C12細胞を単層として増殖培地(1×DMEM、10%FBS、および

10

20

30

40

50

1 × グルタマックス (インビトロジェン)) で 37 °C および 5 % CO₂ で維持した。96 ウェルプレートの細胞が 60 ~ 70 % の集密度に達したら、1 μL のリポフェクタミン 2000 (インビトロジェン) を製造業者の標準プロトコルに従って用いて、各サンプルに 200 ng の全プラスミドをトランスフェクトした。300 個の C C T G リピートを含む DM2 ミニ遺伝子^[1] および BIN1 レポーターミニ遺伝子を発現する等量のプラスミドを使用した^[5]。5 時間後、トランスフェクションカクテルを除去し、目的の化合物を含有する分化培地 (1 × DMEM、2 % ウマ血清、および 1 × グルタマックス) に置き換えた。72 時間後、Zymo Quick RNA ミニプレップキットを用いて全 RNA を回収した。約 150 ng の全 RNA を、RT-PCR に供した。BIN1 ミニ遺伝子の RT-PCR プライマーは、5' C A T T C A C C A C A T T G G T G T G C (フォワード) および 5' A A G T G A T C C T A G A C T A G C C G C C (リバーズ) であった。RT-PCR 産物は、1 × TBE 緩衝液中 200 V で 90 分間実施する変性 8 % ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した。産物を、SYBR Gold (Molecular Probes) で染色することによって可視化し、Bio-Rad Gel Doc XR+ イメージングシステムを用いて走査した。

10

【0069】

蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) による、核内フォーカスの崩壊におけるインセルロクリック反応の評価。FISH を用いて、核内フォーカスの形成へのクリック反応可能な化合物の影響を判定した。C2C12 を、Mat-Tek 96 ウェルガラスボトムプレートの増殖培地で継代培養した。細胞が 60 ~ 70 % の集密度に達したら、1 μL のリポフェクタミン 2000 を製造業者の標準プロトコルに従って用いて、各ウェルに 200 ng の全プラスミドをトランスフェクトした。DM2 ミニ遺伝子^[1] およびトランスフェクションの陽性マーカーとして使用される EGFP を発現する等量のプラスミドを使用した。5 時間後、トランスフェクションカクテルを除去し、目的の化合物を含有する分化培地に置き換えた。細胞を化合物で 72 時間処理し、その後、1 ng / μL DY547-2' OMe - (CAGG)₅^[6] を用いて前に記載されるように FISH を行った。Olympus Fluoview 1000 共焦点顕微鏡を 100 倍の倍率で使用して、1 × DPBS 中で細胞を画像化した。

20

【0070】

インセルロでクリック反応した生成物の質量分析による同定。C2C12 細胞を増殖培地の T-75 ディッシュで増殖させた。細胞が 60 ~ 70 % の集密度に達したら、リポフェクタミン 2000 を製造業者の標準プロトコルに従って用いて、各ディッシュに 10 μg の DM2 ミニ遺伝子発現プラスミドをトランスフェクトした。5 時間後、トランスフェクションカクテルを除去し、目的の化合物を含有する分化培地に置き換えた。トランスフェクションの直後に、12.5 μM N₃-K と、12.5 μM K-Ak か、12.5 μM N₃-K-Ak か、12.5 μM N₃-K-Aak のいずれかとの混合物で細胞を処理した。LC-MS による検出を可能にするために、N₃-K を添加してオリゴマー産物の分子量を制限した。72 時間後、細胞をアセトニトリル中 10 % 水で凍結融解することによって溶解した。解凍した溶解物を濃縮し、1 mL のアセトニトリル中 10 % 水に再懸濁した。不溶性の細胞残屑をペレット化し、上清を質量スペクトル分析に使用した。約 20 μL の各サンプルを、Thermo Scientific LTQ-ETD 質量分析計を用いる LC-MS によって分析した。10 分にわたる、0.1 % ギ酸を加えた水中 0 ~ 100 % アセトニトリルの勾配を分析に使用した。各成分の全イオン数を、N₃-K、K-Ak、および K1, 4 二量体の等モル混合物を含む制御注入中の各成分のイオン化率に正規化した。

30

40

【0071】

qRT-PCR による標的ブルダウンの分析。C2C12 細胞を、T-25 フラスコで増殖培地中の単層として増殖させ、60 ~ 70 % の集密度でトランスフェクトした。リポフェクタミン 2000 を製造業者の標準プロトコルに従って用いて、各ディッシュに 3.4 μg の DM2 ミニ遺伝子発現プラスミドをトランスフェクトした。5 時間後、トランス

50

フェクションカクテルを除去し、目的の化合物を含有する分化培地に置き換えた。トランスフェクションの直後に、 $5 \mu\text{M}$ N_3 - K - ビオチンと、 $5 \mu\text{M}$ K - A k か、 $5 \mu\text{M}$ N_3 - K - A k か、 $5 \mu\text{M}$ N_3 - K - A a k のいずれかとの混合物で細胞を処理した。LC - MSによる検出を可能にするために、 N_3 - K - ビオチンを添加してオリゴマー産物の分子量を制限した。72時間後、細胞を $1 \times \text{DPBS}$ で洗浄し、トリプシン処理した。ペレット化した細胞を、 $500 \mu\text{L}$ の Lysis Buffer ($2\% \text{ Triton X-100}$ 、 $2\% \text{ NP40}$ 、 $1/25 \text{ RNasecure (Ambion)}$)、および $1 \text{ u}/\mu\text{L}$ RQ1 DNase (プロメガ)) [7]で5分間室温で処理することによって溶解し、その後、75 で5分間インキュベートした。

【0072】

10

15ナノモルのストレプトアビジン - アガロースビーズ (シグマ、ビオチン添加量 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$) を用いて約90%の細胞溶解物をブルダウンに使用した。溶解物を 500 rpm で振盪しながら室温で1時間ビーズとともにインキュベートした。溶液を除去し、ビーズを $1 \times \text{PBS}$ の $500 \mu\text{L}$ アリコートで洗浄した。結合した材料を、 10 mM EDTA を含有する95%ホルムアミド $30 \mu\text{L}$ 、 $\text{pH } 8.2$ 中で95 にて5分間加熱することにより、ビーズから遊離させた。

【0073】

逆転写反応を、 qScript cDNA 合成キットを用いて、製造業者のプロトコルに従って細胞溶解物かまたは溶離した材料のいずれかの約10%量を添加することにより実施した。次に、各cDNAサンプルの30%を、各プライマーセットに対するリアルタイムPCR (qPCR) 分析に使用した。qPCRは、 SYBR Green I を用いて7900HT Fast Real-Time PCR System (アプライドバイオシステムズ) で実施した。 $r(\text{CCUG})^{\text{ex p}}$ を含有するmRNAに対するPCRプライマーは、 $5' \text{ GTGAGTTTGGGGACCCCTTGA}$ (フォワード) および $5' \text{ CACCCCTGAAACTTTGCCCC}$ (リバース) であった。18SリボソームRNAに対するPCRプライマーは、 $5' \text{ GTAACCCGTTGAACCCCATTT}$ (フォワード) および $5' \text{ CCATCCAATCGGTAGTAGCG}$ (リバース) であった。

20

【0074】

ブルダウンした反応産物のLC - MSによる分析。ブルダウンした反応産物を検出するために、約 $4 \mu\text{L}$ の溶離材料を、 $0.1\% \text{ TFA}$ を含有する5体積の水に希釈し、Thermo Scientific LTQ - ETD質量分析計を用いるLC - MSによって分析した。

30

【0075】

これらのサンプルを、 $r(\text{CCUG})_{300}$ を発現しなかった、化合物で処理した細胞由来のブルダウンしたサンプルと比較した。10分にわたる、 0.1% ギ酸を加えた水中0~100%アセトニトリルの勾配を分析に使用した。

【0076】

患者由来神経芽細胞におけるDM1スプライシング欠損の評価。500個のCTGリピートを含むDM1患者由来線維芽細胞 (GM03987) および健康な線維芽細胞 (GM07492) を使用することによって、小分子二量体の生物活性を評価した。細胞を、12ウェルプレートで増殖培地 ($1 \times \text{EMEM (Lonza)}$)、 $10\% \text{ FBS}$ 、 $1 \times \text{glutagro}$ (コーニング)、 $1 \times \text{MEM}$ 非必須アミノ酸 (コーニング) および $1 \times$ 抗生物質/抗真菌薬 (コーニング) 中の単層として増殖させた。細胞が約80%の集密度に達したら、細胞を目的の化合物を含む増殖培地 (10 、 1 、 0.1 および $0.01 \mu\text{M}$ 2H-K4NMeS ; 100 、 10 および 1 nM 2H-K4NMeS-CA - ビオチン; $1 \mu\text{M}$ N_3 - 2H-K4NMeS ; 500 nM N_3 - $2 \text{H-K4NMeS} + 500 \text{ nM}$ 2H-K4NMeS - アミノヘキサ酸塩; 1000 、 10 および 0.1 nM N_3 - 2H-K4NMeS-Aak ; 250 、 100 、および 50 nM 2H-K4NMeS - プレオマイシンA5) で処理した。48時間後、細胞を溶解し、Zymo Q

40

50

u i c k RNAミニブレップキットを用いて全RNAを回収した。オンカラムDNA消化を、製造業者の推奨するプロトコルによって達成した。約150ngの全RNAを、100単位のスーパースクリプトIII逆転写酵素(ライフテクノロジーズ)を用いて50で逆転写した。次に、RT反応の20%を、GoTaq DNAポリメラーゼ(プロメガ)を用いるPCRに供した。RT-PCR産物は、25サイクルの95 30秒、58 30秒、72 1分、および72 1分の最終伸長の後に観察された。産物は、1×TAE緩衝液中100Vで1時間実施した2%アガロースゲルで分離した。産物を、臭化エチジウムで染色することにより可視化し、Bio-Rad Gel Doc XR+イメージングシステムを用いて走査した。MBNL1に対するRT-PCRプライマーは、5' GCTGCCCAATACCAAGGTCAAC(フォワード)および5' TGGTGGGAGAAATGCTGTATG(リバーズ)であった。

10

【0077】

DM1マウスモデルを用いるスプライシング欠損の評価。全ての試験手順、マウスの取り扱い、および飼育は、実験動物ケア評価認証協会(the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)に従って達成した。DM1^[8]のマウスモデルに、20b系統のHSA^{L^R}を使用した。HSA^{L^R}マウスは、3'UTRに250個のCUGリピートを含むヒト骨格アクチンRNAを発現する。年齢と性別の一致するHSA^{L^R}マウスに、処置用の100mg/kgの水中2H-K4NMeまたは13.3mg/kgの2H-K4NMeS、および対照用の0.9%NaClを1日1回、7日間腹腔内注射した。最後の注射の1日後にマウスを犠牲にし、広筋を入手した。RNAを広筋組織から抽出し、前に記載されるようにcDNAを合成した。

20

【0078】

r(CUG)^{e x p}を標的化するために化合物を使用することによる、小分子二量体とRNAのインビトロ反応およびブルダウン。増殖培地(1X EMEM(Lonza)、10% FBS、1X glutagro(コーニング)、1X MEM非必須アミノ酸(コーニング)および1X 抗生物質/抗真菌薬(コーニング)2mL)を95で15分間熱失活させ、その後、ゆっくりと室温まで冷却した。次に、約10,000カウントの³²P標識RNA(rCUG₁₀₉、GCに基づく塩基対形成したRNAおよびtRNA)を添加し、95で1分間折り畳んだ。次に、化合物の2倍希釈液(最終濃度800、400、200および100nM)を、50μLのRNA溶液中に調製し、37で一晩インキュベートした。次に、ストレプトアビジン-アガロースビーズ(シグマ)の400μLのスラリーを、1X PBSで洗浄し、その後、2mLの1X PBSに再懸濁した。次に、30μLのこのスラリーを各サンプルに添加し、室温で1時間インキュベートした。次に、サンプルを遠心し、上清を別の管に移した。次に、ビーズを1X PBSTで洗浄し、遠心した。上清を、非結合RNAを含む管に移した。結合RNAと非結合RNAの全放射線カウントを、シンチレーション計数によって測定した。

30

【0079】

DM1系を使用することによるChem-CLIPによる標的同定およびブルダウン。500個のCTGリピートを含むDM1患者由来線維芽細胞(GM03987)および健康な線維芽細胞(GM07492)を使用して、小分子二量体の標的同定を評価した。細胞を、増殖培地(1X EMEM(Lonza)、10% FBS、1X glutagro(コーニング)、1X MEM非必須アミノ酸(コーニング)および1X 抗生物質/抗真菌薬(コーニング)中、100mm²の単層として増殖させた。細胞が約80%の集密度になったら、それらを目的の化合物(100nM 2H-K4NMeS-CA-ピオチン)を含む増殖培地で処理した。48時間後、細胞を溶解させ、トリゾール試薬(ライフテクノロジーズ)を用いて全RNAを回収した。約10μgの全RNAをストレプトアビジン-アガロースビーズ(100μL、シグマ)とともに室温で1時間インキュベートした。次に、ビーズを1X PBSで洗浄し、結合したRNAを100μLの95%ホルムアミド、10mM EDTA、pH8.2を60で10分間添加することにより

40

50

溶離した。Zymo Quick RNAミニプレップキットを用いて結合したRNAを浄化した。約100 ngのRNAを、RT qScript cDNA合成キット(Quanta Biosciences)に使用した。RT反応の10%は、7900HT Fast Real-Time PCR System(アプライドバイオシステムズ)で実施したリアルタイムPCR(qPCR)に、SYBRグリーンマスターミックス(ライフテクノロジーズ)とともに使用した。rCUGを含有するmRNAである、DMPK(500リピート)、SUPT20HL1(17リピート)、CASK(16リピート)、LRP8(11リピート)、MAP3K4(11リピート)、SCUBE(7リピート)およびSORCS2(7リピート)をモニターした。GAPDHと比較する C_t により定量した。

10

【0080】

Chem-CLIP-Mapによる標的同定およびブルダウン。500個のCTGリピートを含むDM1患者由来線維芽細胞(GM03987)を使用して、小分子二量体の結合部位の標的同定を評価した。細胞を、増殖培地(1X EMMEM(Lonza)、10% FBS、1X glutagro(コーニング)、1X MEM非必須アミノ酸(コーニング)および1X 抗生物質/抗真菌薬(コーニング)中、100 mm²の単層として増殖させた。細胞が約80%の集密度になったら、それらを目的の化合物(100 nM 2H-K4NMeS-CA-ピオチン)を含有する増殖培地で処理した。48時間後、細胞を溶解し、トリゾール試薬(ライフテクノロジーズ)を用いて全RNAを回収した。約6 µgの全RNAを、1X RNアーゼH緩衝液中の8 µMアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて95 °Cに1分間加熱し、その後氷上で冷却することにより折り畳ませた。次に、5単位のRNアーゼH(ライフテクノロジーズ)を添加し、反応物を37 °Cで1.5時間インキュベートし、その後65 °Cで20分間熱失活させた。次に、切断したRNAをDNアーゼで37 °Cで30分間処理した後、停止緩衝液を添加し、65 °Cで10分間インキュベートした。切断したRNA溶液をストレプトアビジン-アガロースビーズ(100 µL、シグマ)とともに室温で1時間インキュベートした。次に、ビーズを1X PBSで洗浄し、結合したRNAを100 µLの95%ホルムアミド、10 mM EDTA、pH 8.2を60 °Cで10分間添加することにより溶離した。Zymo Quick RNAミニプレップキットを用いて結合したRNAを浄化した。約150 ngのRNAを、RT qScript cDNA合成キット(Quanta Biosciences)に使用した。RT反応の40%は、7900HT Fast Real-Time PCR System(アプライドバイオシステムズ)で実施したリアルタイムPCR(qPCR)に、SYBRグリーンマスターミックス(ライフテクノロジーズ)とともに使用した。GAPDHと比較する C_t により定量した。

20

30

【0081】

液体クロマトグラフィー・質量分析(LC-MS)によるインビトロクリック反応の評価。DM1を引き起こす反復RNAが、HDCRによるオリゴマー化の銕型となるかどうかを判定するために、2H-K4NMeSアジドおよび各々の2H-K4NMeS活性化アルキン誘導体を、12個のCUGリピートを含むRNAとともにインキュベートした。rCUG₁₂(最終濃度100 µM)は、5分間60 °Cの1xフォールディングバッファー(8 mM Na₂HPO₄、pH 7.0、185 mM NaCl、および1 mM EDTA)中で折り畳まれた。室温に冷却した後、アジドおよびアルキン二量体(各々の最終濃度25 µM)を添加し、反応混合物を37 °Cで24時間インキュベートした。各々のサンプルを、Thermo Scientific LTQ-ETD質量分析計を用いるLC-MSによって分析した。10分にわたる、0.1%ギ酸を加えた水中0~100%アセトニトリルの勾配を分析に使用した。r(CUG)₁₂との反応が最も大きかったアルキン、2H-K4NMeS-アミノヘキサ酸塩Aakを、次に、他のRNA標的の存在下で形成された二量体の量を分析することによって、選択性について評価した。評価した他のRNAは、各々100 µM最終濃度のr(CCUG)₁₂、r(CAG)₁₂、r(CGG)₁₂、およびビール酵母tRNA(ロシュ)であった。

40

50

【 0 0 8 2 】

DM1 線維芽細胞を用いる、インセルロでクリック反応した生成物の質量分析による同定。DM1 を引き起こす反復RNAが、細胞内でのオリゴマー化の鑄型となるかどうかを判定するために、500 個のCTGリピートを含むDM1 患者由来線維芽細胞 (GM03987) および健康な線維芽細胞 (GM07492) を、80 %の集密度までT25ディッシュ中の増殖培地 (1X MEM (Lonza)、10 % FBS、1X glutagro (コーニング)、1X MEM非必須アミノ酸 (コーニング) および1X 抗生物質/抗真菌薬 (コーニング)) で増殖させ、等モル量の N_3 -2H-K4NMeSビオチンおよび2H-K4NMeS-Ahx Alkyne (各500 nM) で2日間処理した。細胞を1X DPBSで洗浄した後、トリブシン処理した。次に、増殖培地でクエンチし、遠心沈殿させた。細胞を1X DPBSで2回洗浄し、その後0.25 mLの溶解緩衝液 (合計2 mL = 2 % Triton X 100、2 % NP40、80 μ L RNAsecure (1/25) および50 μ L DNase) を室温で5分間添加することにより溶解し、その後75 °Cに5分間加熱した。200 μ Lの溶解物を、ストレプトアビジン-アガロースビーズ (100 μ L、シグマ) とともに室温で1時間インキュベートした。次に、ビーズを1X PBS で洗浄し、20 μ Lの95 %ホルムアミド、10 mM EDTA、pH 8.2を60 °Cで5分間添加することによって、結合したRNAを溶解した。約4 μ Lの各々のサンプルを、0.1 %ギ酸を加えた水20 μ Lに希釈し、Thermo Scientific LTQ-ETD質量分析計を用いるLC-MSにより分析した。10分にわたる、0.1 %ギ酸を加えた水中0 ~ 100 %アセトニトリルの勾配を分析に使用した。

10

20

【 0 0 8 3 】

蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) を用いる核内フォーカスの評価。FISHを用いて、核内フォーカスの形成および崩壊への小分子二量体の影響を判定した。500 個のCTGリピートを含むDM1 患者由来線維芽細胞 (GM03987) を、Mat-Tek 96ウェルガラスボトムプレートの増殖培地で約80 %の集密度まで増殖させた。細胞を目的化合物で48時間増殖培地において処理し、その後、1 ng/ μ L DY547-2'OMe-(CAG)₆を用いて前に記載されるように^[6] FISHを行った。MBNL1の免疫染色を、前に記載されるように^[7] MB1a抗体 (1:4希釈) を用いて達成した。その抗体はGlenn E. Morris教授 (Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease)^[9] により寛大にも供給されたものである。1:200希釈のヤギ抗マウスIgG DyLight 488コンジュゲートを用いてこれを蛍光標識した。DAPIの1X DPBS中1 μ g/ μ L溶液を用いて未処理対照を染色した。Olympus Fluoview 1000共焦点顕微鏡を100倍の倍率で使用して、1x DPBS中で細胞を画像化した。

30

【 0 0 8 4 】

ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いる翻訳による欠損の評価。ルシフェラーゼの3'UTRにおいて800 個または0 個のCTGリピートを発現するC2C12細胞株を、96ウェルプレートで増殖培地 (1X DMEM、10 % FBS、1X glutagro (コーニング) および1X 抗生物質/抗真菌薬 (コーニング)) 中の単層として増殖させた^[10]。細胞が70 %の集密度になったら、クリック官能化二量体を、100 μ Lの増殖培地 (1000 nM N_3 -2H-K4NMeSおよび1000、10および0.1 nM N_3 -2H-K4NMeS-Aak) に添加した。細胞を化合物で48時間処理した後、細胞数を、WST-1試薬 (ロシュ) を用いて正規化した。次に、細胞を1X DPBSで洗浄し、50 μ LのPPBT溶解緩衝液で室温で10分間処理することによって溶解した。次に、50 μ Lのルシフェラーゼ基質を添加し、発光を測定した。

40

【 0 0 8 5 】

FRETによって測定するインビトロクリック反応の評価。DM1 を引き起こす反復RNAが、HDCRによるオリゴマー化の鑄型となるかどうかを判定するために、FAM-

50

2 H - K 4 N M e S A a k および N₃ - 2 H - K 4 N M e S A a k を、12 の C U G
リピートを含む RNA とともにインキュベートした。r C C U G₁₂ (最終濃度 80 μM)
は、1×フォールディングバッファー (20 mM H E P E S、pH 7.5、100 mM
K C l、および 10 mM N a C l) 中で折り畳まれた。室温まで冷却した後、F A M
- 2 H - K 4 N M e S A a k (最終濃度 60 nM) および N₃ - 2 H - K 4 N M e S
A a k (最終濃度 40 nM) を添加し、反応混合物を 37 °C で合計 48 時間インキュベ
ートした。F R E T は、485 nm で励起させ、590 nm での発光を測定することにより
測定した。F R E T の増強は、RNA の不在下で対照と F A M - 2 H - K 4 N M e S A
a k (最終濃度 60 nM) および N₃ - 2 H - K 4 N M e S A a k (最終濃度 40 nM)
(最終濃度 40 nM) を比較することによって定量された。また、F R E T は、塩基対対照 RNA (r (G C
)₂₀) を陰性対照として用いて測定された。

10

【0086】

実施例の項の引用文献

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

【0087】

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

20

【0088】

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

30

【0089】

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

【0090】

[5] C. Fugier, A. F. Klein, C. Hammer, S. Vassilo
poulos, Y. Ivarsson, A. Toussaint, V. Tosch, A.
Vignaud, A. Ferry, N. Messaddeq, Y. Kokunai, R.
Tsuburaya, P. de la Grange, D. Dembele, V. Fra
ncois, G. Precigout, C. Boulade-Ladame, M. C. H
ummel, A. L. de Munain, N. Sergeant, A. Laquer
riere, 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. 20
11, 17, 720 - 725。

40

【0091】

[6] M. B. Warf, M. Nakamori, C. M. Matthys, C. A. T
hornton, J. A. Berglund, Proc. Natl. Acad. Sci.
U. S. A. 2009, 106, 18551 - 18556。

50

【0092】

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

【0093】

[8] 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。

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

本発明は、当業者がそれを作製し使用するように十分に詳細に記載および例証されているが、特許請求の範囲の精神および範囲から逸脱しない様々な代替形態、変更形態、および改良形態が当業者には明らかであろう。

【0097】

本明細書において言及される全ての特許および刊行物は、各々の個々の刊行物が参照によりその全文が援用されると具体的かつ個別に示されるのと同程度に参照により本明細書に援用される。

【0098】

用いられている用語および表現は、記述の用語として使用されており、制限の用語として使用されているものではなく、そのような用語および表現の使用には、示され記載される特徴またはその一部分の等価物を排除する意図はなく、特許請求される本発明の範囲内で様々な変更が可能であることが理解される。従って、本発明は好ましい実施形態および任意選択の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書に開示される概念の変更および改変が当業者によってなされてよく、そのような変更および改変は添付される特許請求の範囲により規定される本発明の範囲内にあるとみなされることは当然理解される。

[項目 1]

毒性のある疾患誘導性 RNA の機能のモジュレーターであって、前記 RNA が伸長したリピート配列を含み、前記モジュレーターが、一つの細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールであって、アルキンとアジドの両方の部分を含む、細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールの縮合反応から、または、一对の細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールであって、第 1 のモジュールがアルキン部分を含み、第 2 のモジュールがアジド部分を含む、一对の細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールの縮合から、生細胞内でインサイチュで形成される RNA に結合するオリゴマーであり、前記縮合反応が、前記 RNA 伸長リピート結合モジュール間で前記アルキン部分とアジド部分との間の 1, 3 ヒスゲン双極子付加環化反応によって起こる、RNA に結合するオリゴマーを含む、モジュレーター。

[項目 2]

前記毒性のある RNA が、RNA 伸長リピート配列 $r(C C U G)^{e \times p}$ によって形成される隣接する内部ループを含む、項目 1 に記載のモジュレーター。

[項目 3]

各々の細胞透過性モジュールが、修飾されたカナマイシン部分を含む、項目 2 に記載の

モジュレーター。

[項目 4]

前記細胞透過性モジュールが $N_3 - K - A_k$ 、または $N_3 - K - A_a K$ であるか、あるいは、一緒に使用される一対の細胞透過性モジュールが $N_3 - K$ と $K - A_k$ である、項目 3 に記載のモジュレーター。

[項目 5]

筋緊張性ジストロフィー 2 型 (DM2) の処置のための項目 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のモジュレーター。

[項目 6]

前記毒性のある RNA と結合した項目 2 に記載のモジュレーターを形成する方法であって、一つの細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールであって、前記細胞透過性モジュールがアルキン部分とアジド部分の両方を含む、細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールに、または、一対の細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールであって、第 1 のモジュールがアルキン部分を含み、第 2 のモジュールがアジド部分を含む、一対の細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールに、前記毒性のある RNA を含む前記生細胞を曝露する工程を含む、方法。

10

[項目 10]

前記毒性のある RNA が、RNA 伸長リピート配列 $r(CUG)^{e \times p}$ によって形成される隣接する内部ループを含む、項目 1 に記載のモジュレーター。

[項目 11]

各々の細胞透過性モジュールが、ビス - ヘテロアリアル部分、好ましくはビス - ベンズイミダゾール部分を含む、項目 10 に記載のモジュレーター。

20

[項目 12]

前記細胞透過性モジュールが、 $N_3 - 2H - K4NMeS - A_a k$ である、項目 11 に記載のモジュレーター。

[項目 13]

筋緊張性ジストロフィー 1 型 (DM1) の処置のための、項目 10 ~ 12 のいずれか一項に記載のモジュレーター。

[項目 14]

前記毒性のある RNA と結合した項目 11 に記載のモジュレーターを形成する方法であって、一つの細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールであって、前記細胞透過性モジュールがアルキン部分とアジド部分の両方を含む、細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールに、または、一対の細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールであって、第 1 のモジュールがアルキン部分を含み、第 2 のモジュールがアジド部分を含む、一対の細胞透過性 RNA 伸長リピート配列結合モジュールに、前記毒性のある RNA を含む前記生細胞を曝露する工程を含む、方法。

30

[項目 15]

毒性のある疾患誘導性 RNA を切断する方法であって、前記 RNA が伸長リピート配列を含み、前記モジュレーターが、核酸切断部分をさらに含む、項目 1 ~ 4 または 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のモジュレーターを含む、方法。

40

[項目 16]

前記核酸切断部分がブレオマイシンの誘導体である、項目 15 に記載の方法。

[項目 17]

患者において疾患を処置する方法であって、前記疾患が伸長リピート配列を有する毒性のある RNA の存在下で誘導され、前記患者の細胞の中に項目 1 に記載のモジュレーターを形成することを含む、方法。

[項目 18]

前記疾患が筋緊張性ジストロフィー 2 型 (DM2) であり、前記毒性のある RNA が $r(CUG)^{e \times p}$ 伸長リピート配列を含み、前記モジュレーターが、アルキンおよびアジド基を有するカナマイシン誘導体を含む細胞透過性モジュール、または、各々がカナマ

50

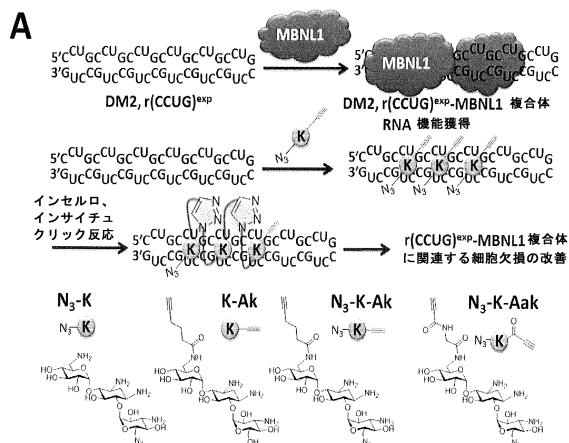
[項目 1 9]

10

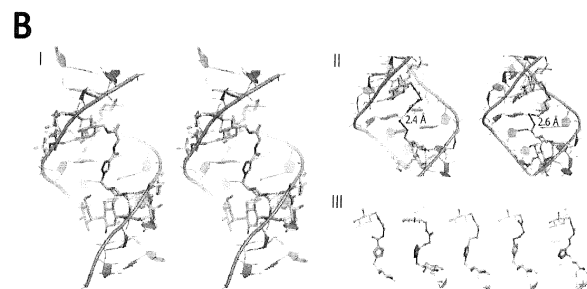
[項目 2 0]

【 図 1 A 】

Figure 1



【 ㄨ 1 B 】



【圖 2】

Figure 2

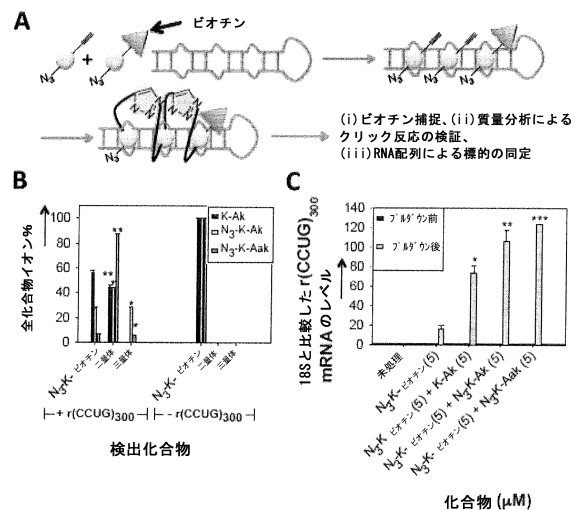


Figure 3

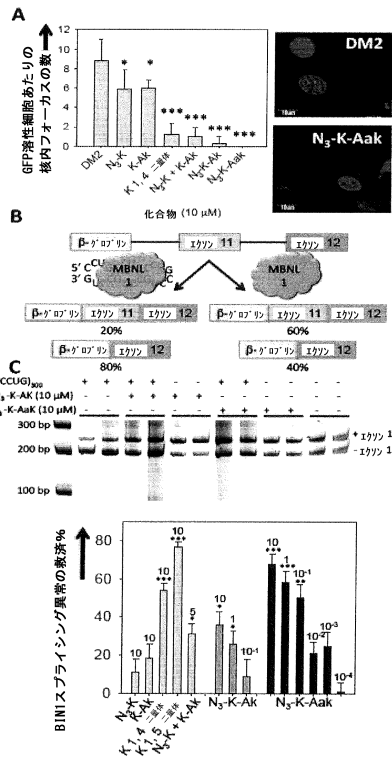
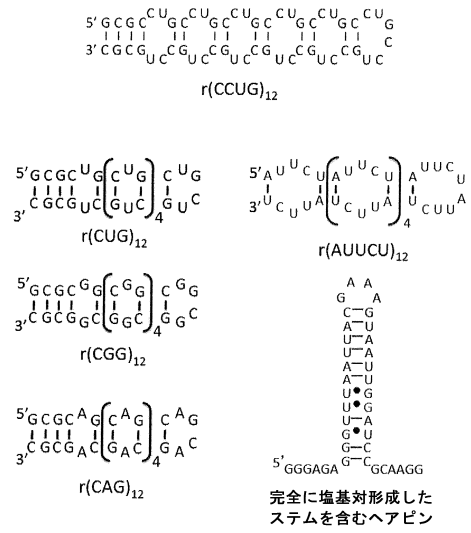
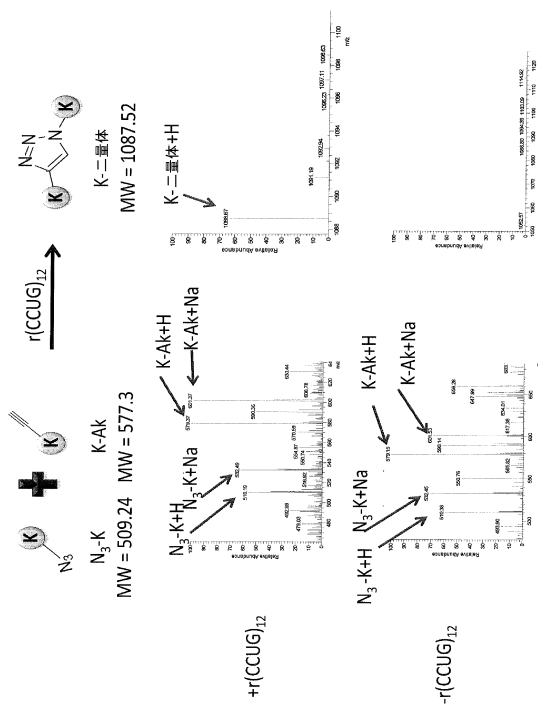


Figure 4

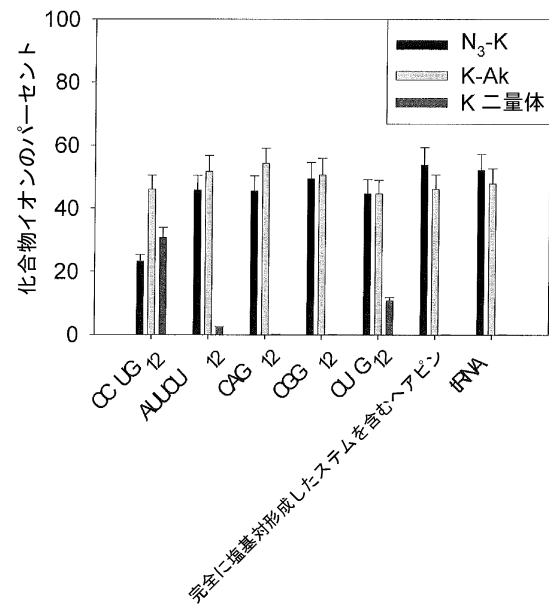


【 図 5 】



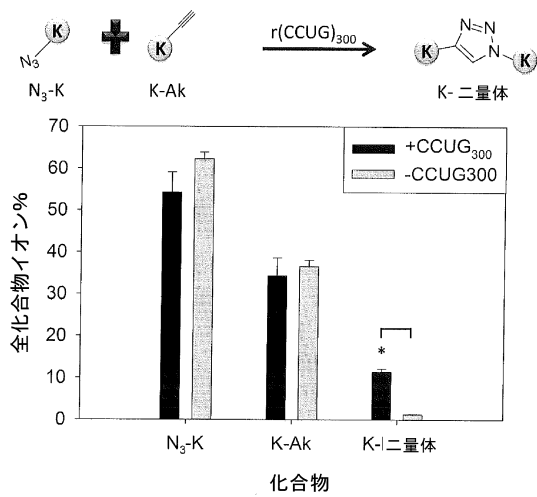
【 図 6 】

Figure 6



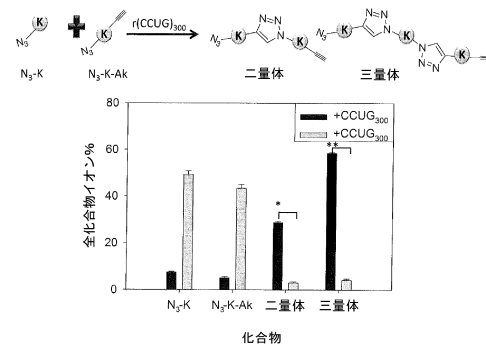
【図 7】

Figure 7



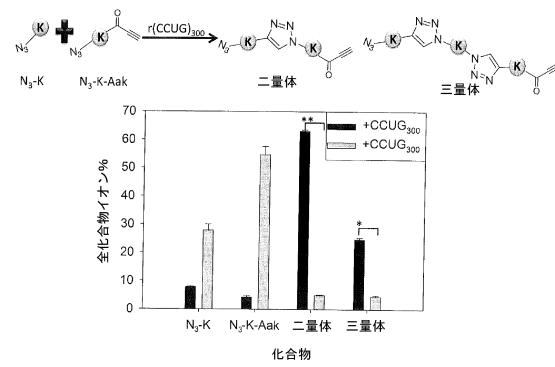
【図 8】

Figure 8



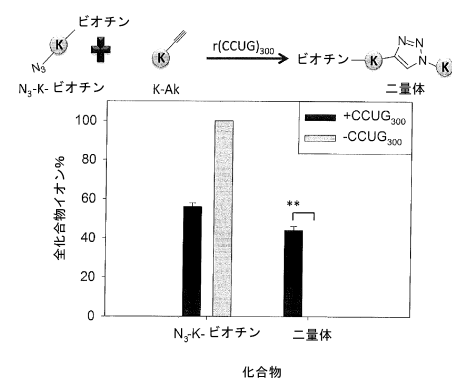
【図 9】

Figure 9



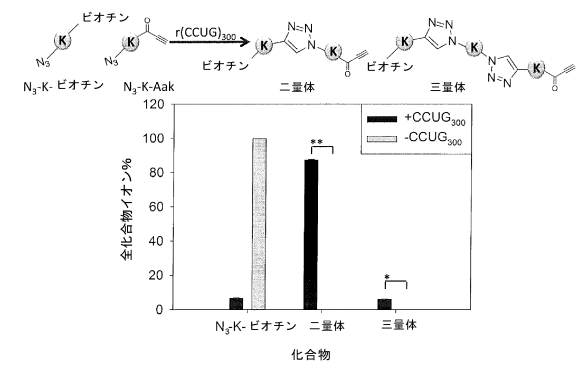
【図 10】

Figure 10



【図 12】

Figure 12



【図 11】

Figure 11

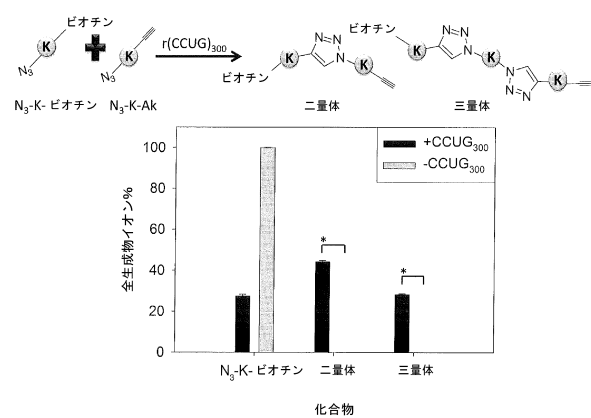


Figure 13

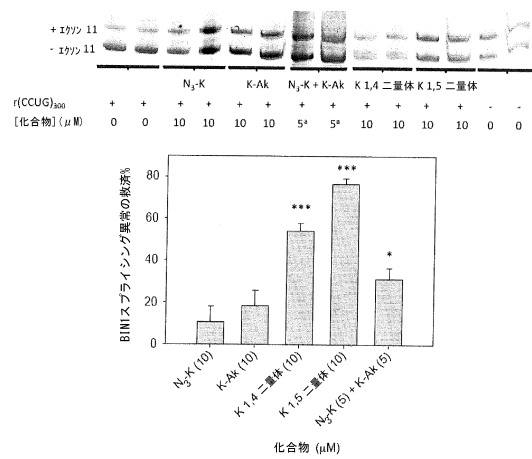


Figure 14

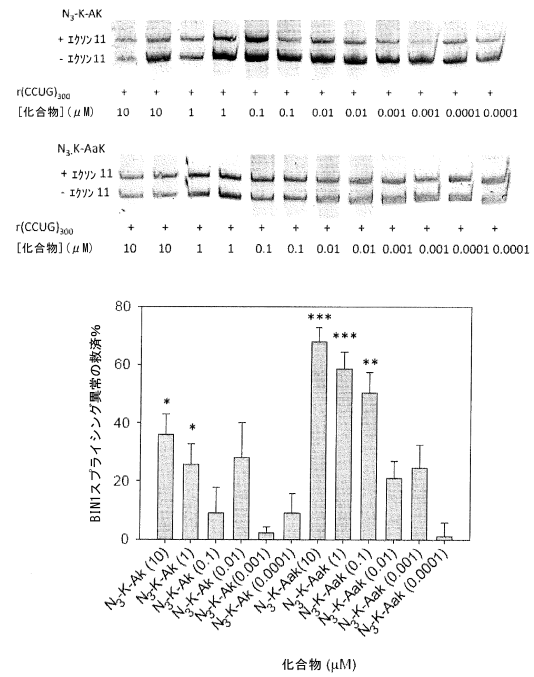


Figure 15

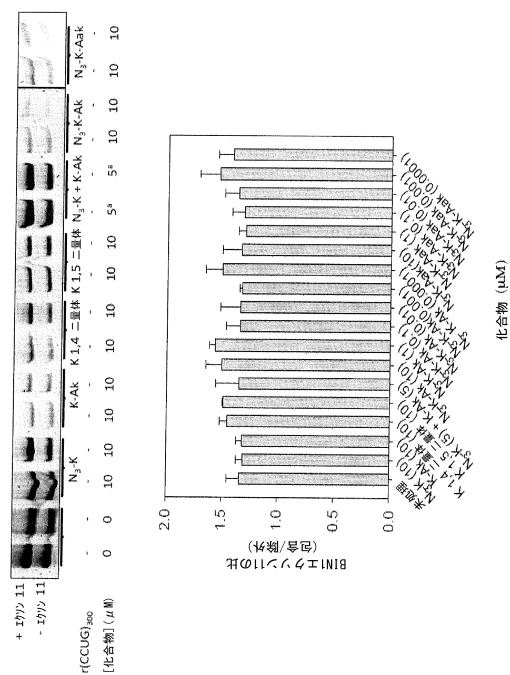
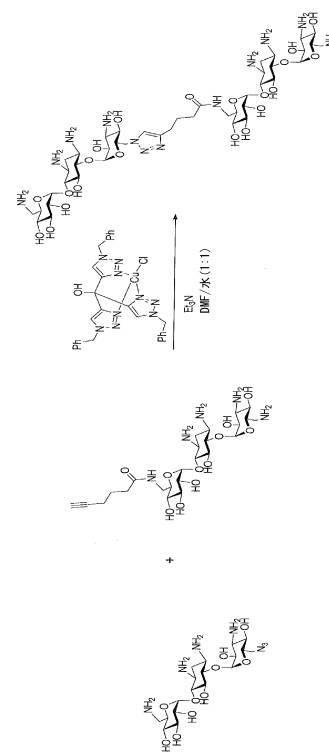


Figure 16



【図 17】

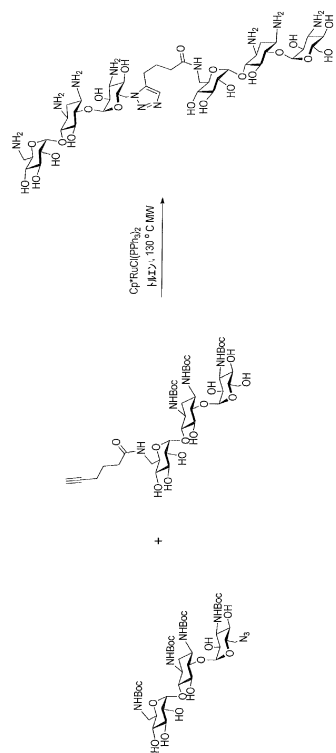


Figure 17

【図 18】

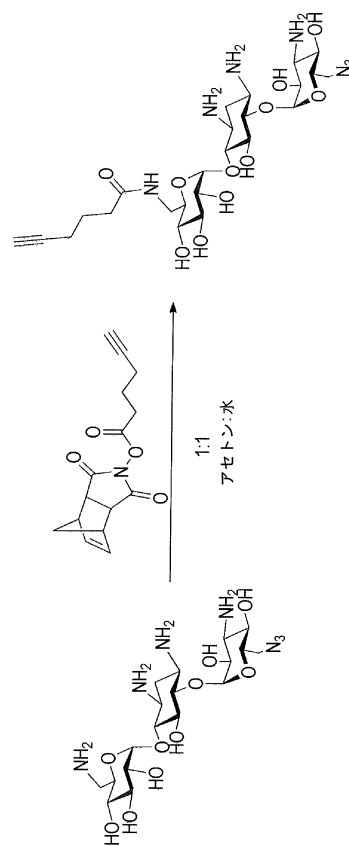


Figure 18

【図 19】

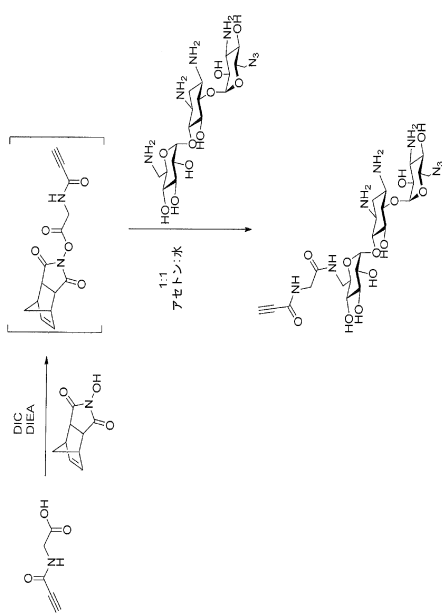


Figure 19

【図 20】

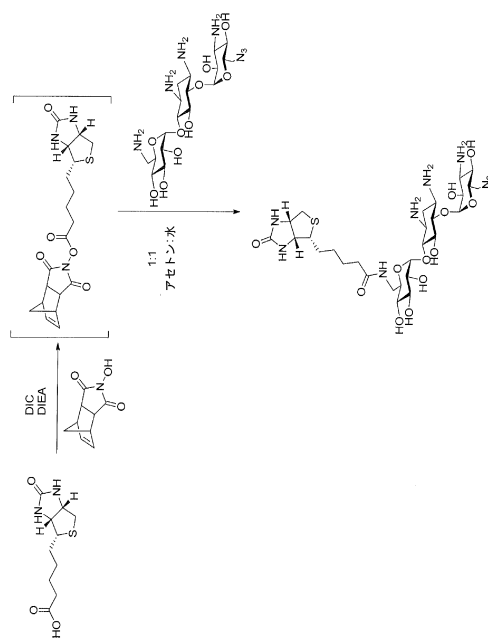


Figure 20

【図 25】

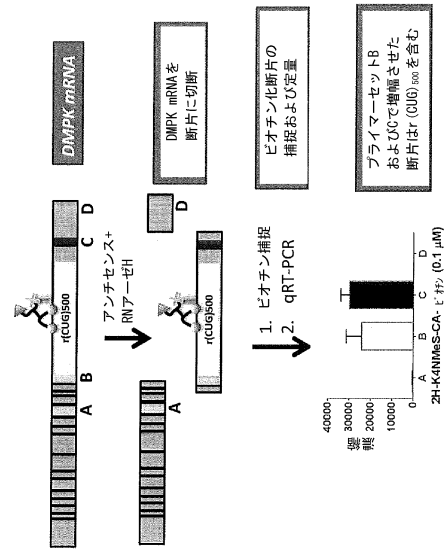


Figure 25

【図 27】

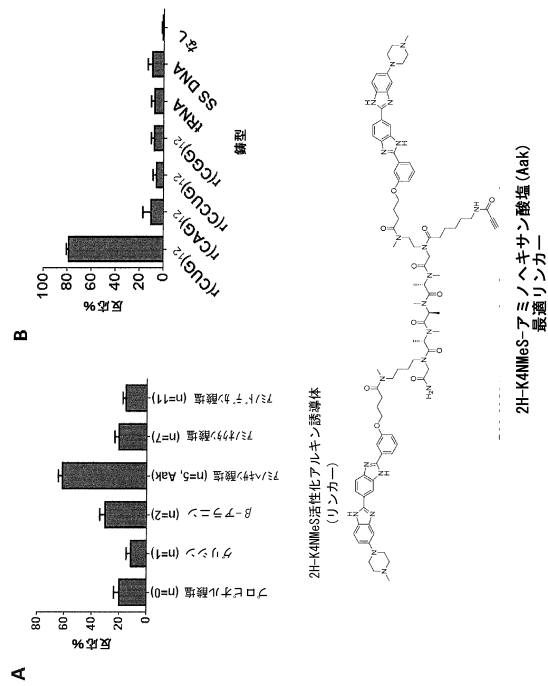


Figure 27

【図 26】

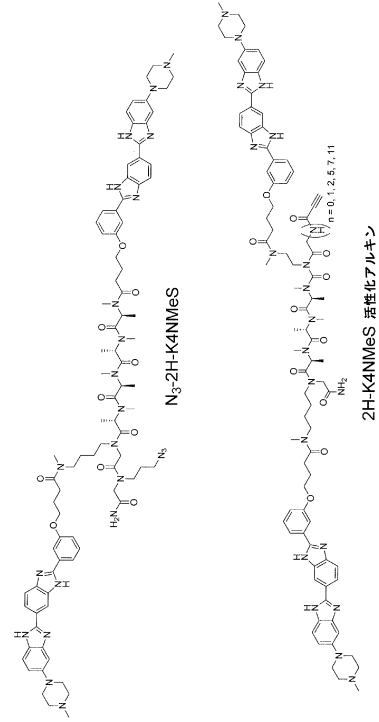


Figure 26

【図 28】

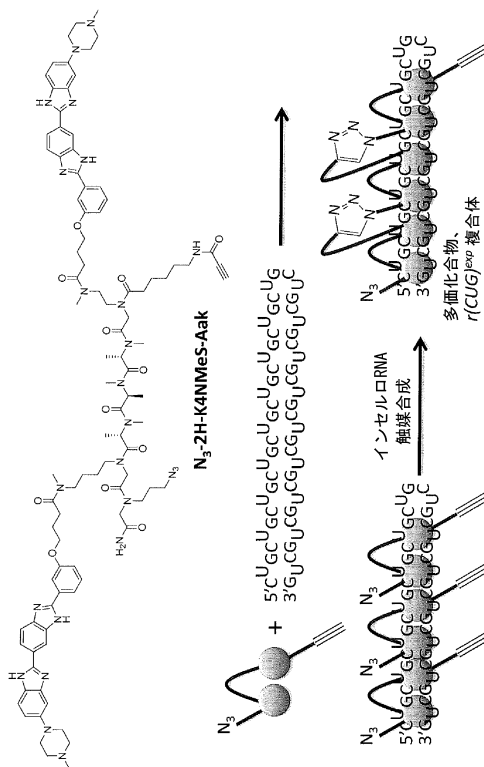
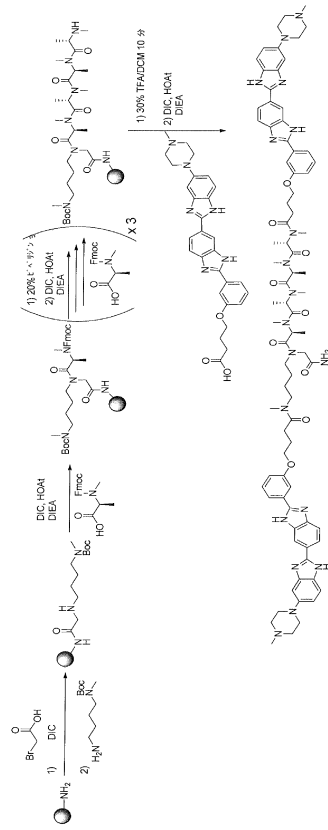


Figure 28

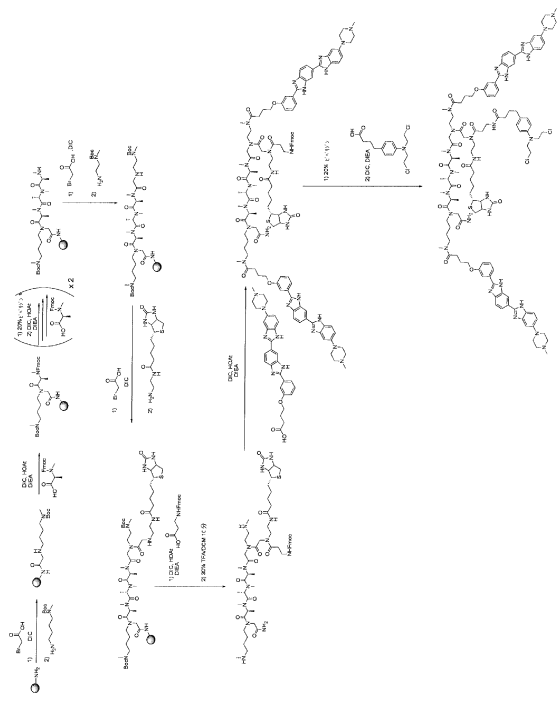
【図 3 3】

Figure 33



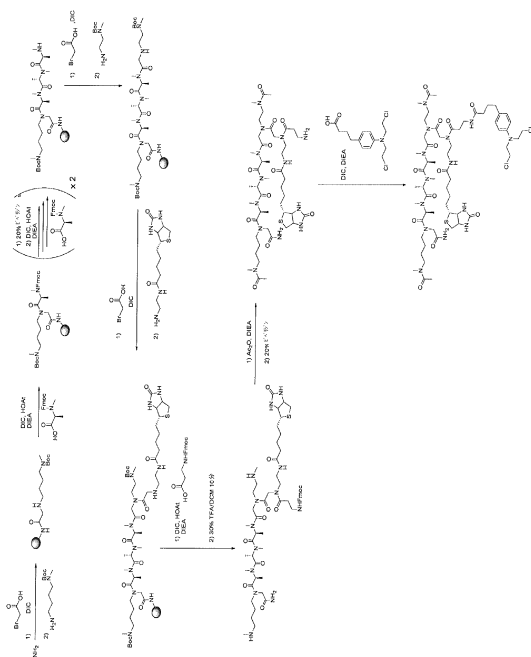
【図 3 4】

Figure 34



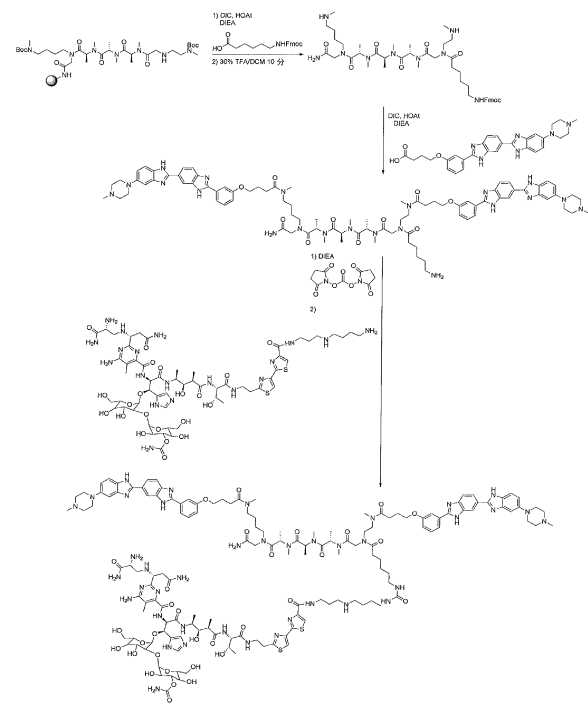
【図 3 5】

Figure 35



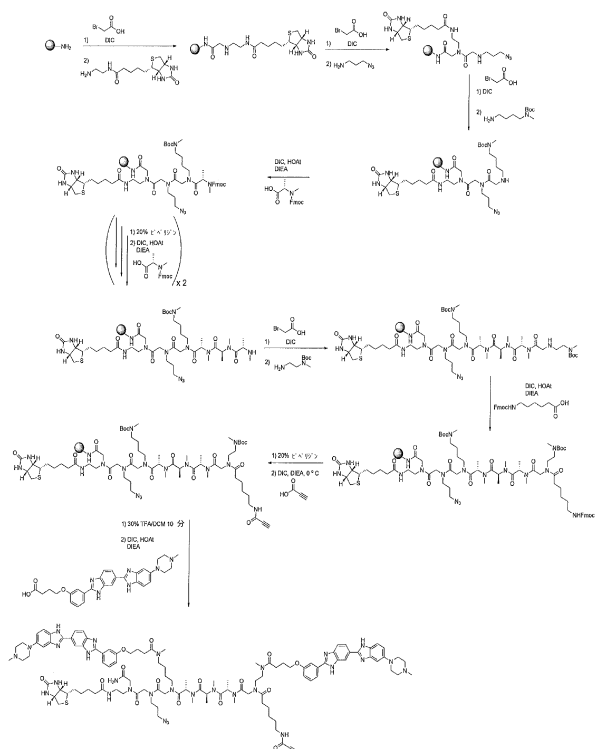
【図 3 6】

Figure 36



【 図 4 1 】

Figure 41



【 図 4 2 】

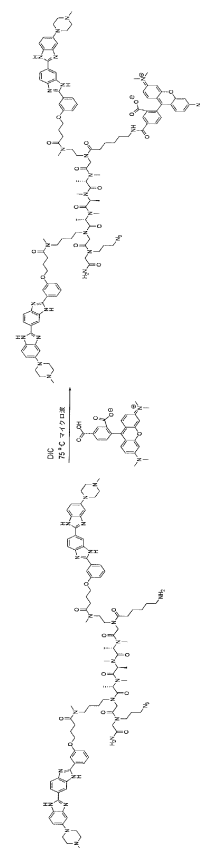


Figure 42

【 図 4 3 】

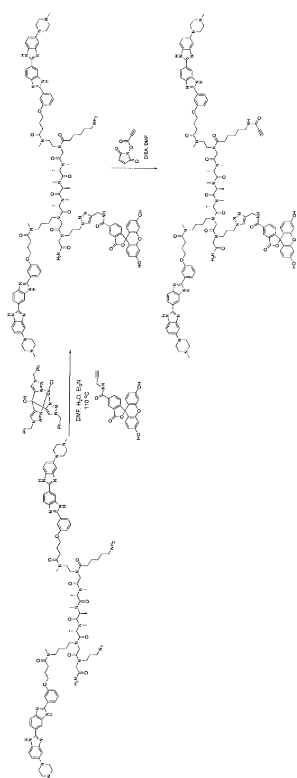


Figure 43

【配列表】

0006461306000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 0 7 H	19/056
A 6 1 K	31/7056 (2006.01)	C 1 2 N	15/10 Z N A
		A 6 1 K	31/7056

(74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文

(72)発明者 ディズニー, マシュー・ディー
アメリカ合衆国、フロリダ・33458、ジュピター、ノース、ピーコック・レーン・493

(72)発明者 ラズチェック, スザンヌ・ジー
アメリカ合衆国、フロリダ・33458、ジュピター、ユニバーシティ・ブルバード・843、
アパートメント・308

審査官 茅根 文子

(56)参考文献 国際公開第2014/036395(WO, A1)
国際公開第2013/138662(WO, A1)
米国特許出願公開第2014/0050778(US, A1)
Bioorg. Med. Chem. Lett., 2013年, Vol. 23, pp. 5689-5693
ACS Chem. Biol., 2014年 2月, Vol. 9, No. 2, pp. 538-550

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31/33 - 33/44
A 6 1 K 38/14
A 6 1 P 21/00
A 6 1 P 43/00

C07H 19/056

C12N 15/10

CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)