

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-522354

(P2024-522354A)

(43)公表日 令和6年6月18日(2024.6.18)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 D 241/42 (2006.01)	C 0 7 D 241/42	4 C 0 8 6
C 0 7 D 401/12 (2006.01)	C 0 7 D 401/12	C S P
C 0 7 D 241/44 (2006.01)	C 0 7 D 241/44	
A 6 1 K 31/498 (2006.01)	A 6 1 K 31/498	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z Z N A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全81頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2023-573457(P2023-573457)
 (86)(22)出願日 令和4年6月1日(2022.6.1)
 (85)翻訳文提出日 令和6年1月26日(2024.1.26)
 (86)国際出願番号 PCT/US2022/031736
 (87)国際公開番号 WO2022/256382
 (87)国際公開日 令和4年12月8日(2022.12.8)
 (31)優先権主張番号 63/195,779
 (32)優先日 令和3年6月2日(2021.6.2)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,
 ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(
 AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A
 T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR
 ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
 最終頁に続く

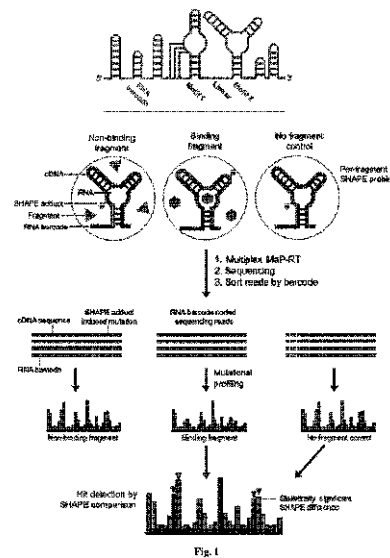
(71)出願人 501345323
 ザ ユニバーシティ オブ ノース カロラ
 イナ アット チャペル ヒル
 THE UNIVERSITY OF N
 ORTH CAROLINA AT CH
 APEL HILL
 アメリカ合衆国 2 7 5 1 4 ノースカロ
 ライナ州 チャペル ヒル スイート 1 0
 0 , イースト ローズマリー ストリート
 1 3 6 , オフィス オブ テクノロジー
 コマーシャリゼーション
 (74)代理人 110000659
 弁理士法人広江アソシエイツ特許事務所
 ウィークス, ケビン
 (72)発明者
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 RNAを標的とするリガンド、それらの組成物、及びそれらを作製し使用する方法

(57)【要約】

本開示は、TPPリボスイッチなどの標的RNA分子に結合する化合物、これらの化合物を含む組成物、及びそれらを作製し使用する方法を対象とする。本化合物は、2つの異なる結合部位において標的RNAと結合し、それによって、単一のRNA結合部位のみに結合する化合物と比較して、より高い親和性の結合リガンドを産生することを可能にする、2つの構造的に異なる断片を含む。

【選択図】図1



10

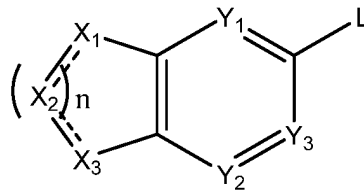
20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) の構造を有する化合物であって、

【化 1】



式 (I)

10

式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 は、同時に O 若しくは S であるように選択されず、

破線は、任意選択の二重結合を表し、

Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_2 及び N から選択され、

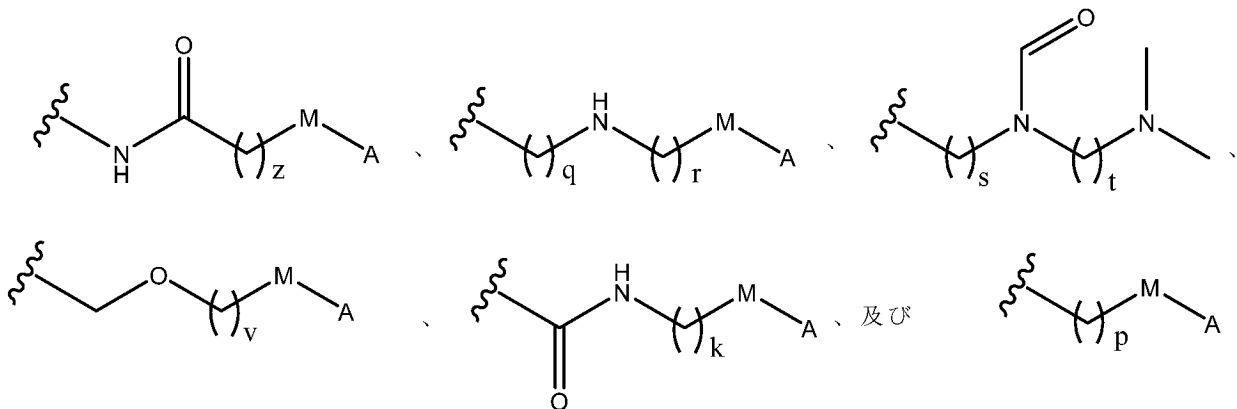
n は、1若しくは2であり、 n が1である場合、前記破線のうちの1つだけが二重結合

20

であり、

L は、

【化 2】



30

から選択され、

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

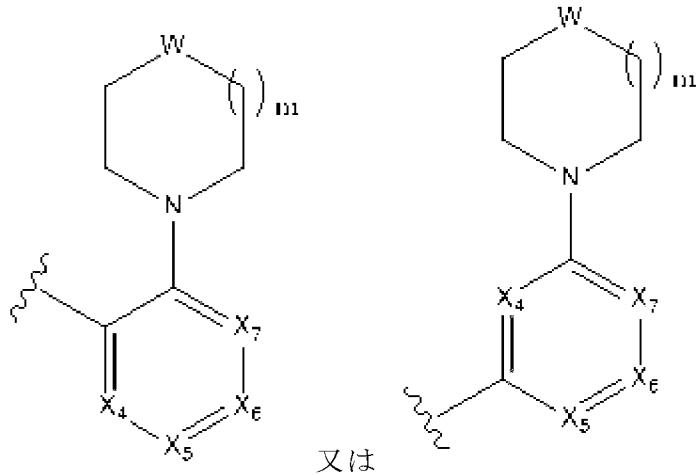
40

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

A は、

50

【化 3】



10

から選択され、

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

R_1 、 R_2 、及び R_3 は、独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-N(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-O(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-OCO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-NCO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、及び置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

20

m は、1若しくは2であり、

W は、 $-O-$ 若しくは $-N(R_4)-$ であり、 R_4 は、 $-H$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のシクロアルキル、 $-CO(\text{アリール})$ 、 $-CO(\text{ヘテロアリール})$ 、及び $-CO(\text{シクロアルキル})$ から選択され、

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

30

又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

X_1 、 X_2 、又は X_3 のうちの少なくとも1つが、Nである、請求項 1 に記載の化合物

【請求項 3】

n が2である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

それぞれの場合に、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のうちの2つが、Nである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

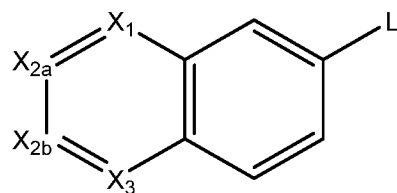
【請求項 5】

式 (I I) の構造を有し、

40

50

【化 4】



式 (I I)

10

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

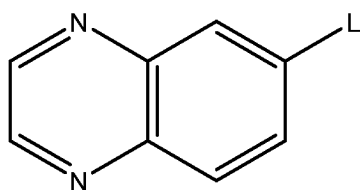
X_1 及び X_3 は、独立して、 CR_1 及び N から選択され、

X_1 、 X_{2a} 、 X_{2b} 、及び X_3 のうちの 2 つは、 N である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

式 (I I I) の構造を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【化 5】



式 (I I I)

20

【請求項 7】

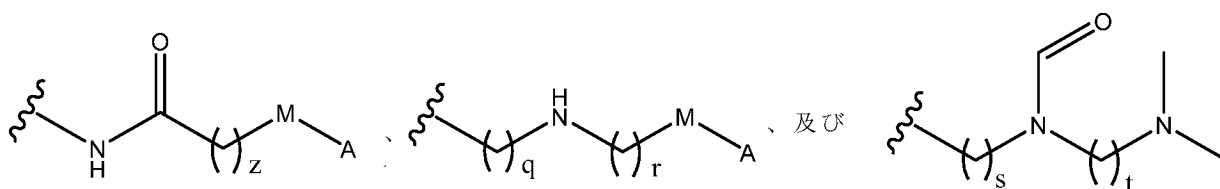
z 、 r 、 s 、 t 、 v 及び p が、独立して、整数 1、2、及び 3 から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 8】

L が、

30

【化 6】



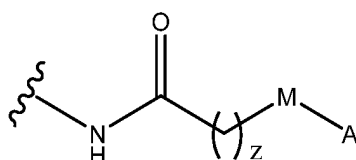
から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 9】

L が、

【化 7】



である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

50

【請求項 10】

z が、1、2、又は3である、請求項9に記載の化合物。

【請求項 11】

z が、2である、請求項9に記載の化合物。

【請求項 12】

M が、-NH-、-O-、及び-S-から選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 13】

M が、-NH-である、請求項1～12のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 14】

m が1である、請求項1～13のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 15】

W が、-NH-、-O-、及び-N(C₁～C₆アルキル)-から選択される、請求項1～14のいずれか一項に記載の化合物。

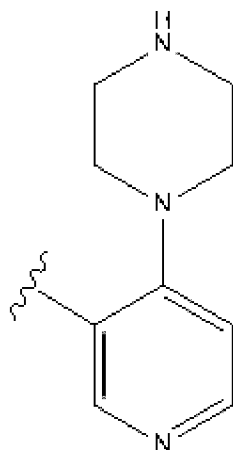
【請求項 16】

W が、-NH-である、請求項1～15のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 17】

A が、

【化8】

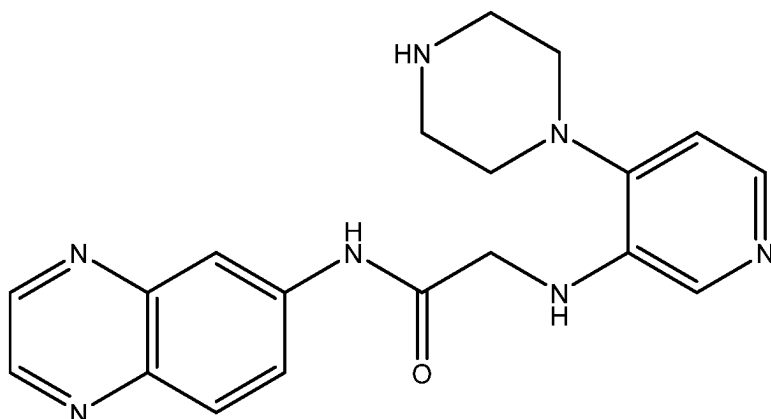


である、請求項1～16のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 18】

以下の構造

【化9】



10

20

30

40

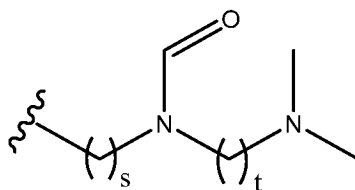
50

を有する、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 19】

L が、

【化 10】



10

である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 20】

s 及び t が、1 又は 2 である、請求項 19 に記載の化合物。

【請求項 21】

s が 1 であり、t が 2 である、請求項 19 に記載の化合物。

【請求項 22】

X₄、X₅、X₆、及び X₇ のうちの少なくとも 1 つが、N である、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の化合物。

20

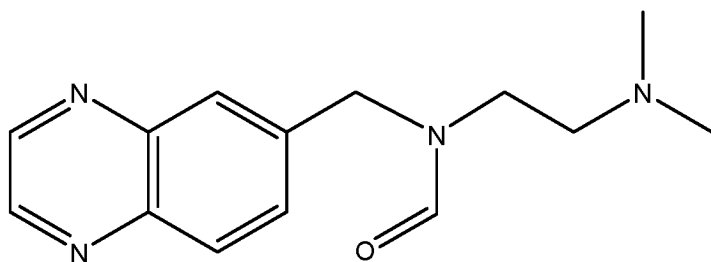
【請求項 23】

X₅ 又は X₆ が、N であり、X₄ 及び X₇ の両方が、独立して、CR₂ である、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 24】

以下の構造

【化 11】



30

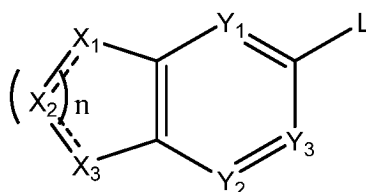
を有する、請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 25】

式 (I) の構造を有する化合物であって、

40

【化 12】



式 (I)

50

式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 は、同時に O 若しくは S であるように選択されず、

破線は、任意選択の二重結合を表し、

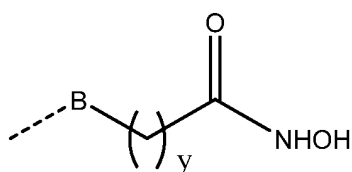
Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_2 及び N から選択され、 R_1 及び R_2 は、独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-N(C_1\sim C_6\text{アルキル})_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-CO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-O(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-OCO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-NCO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-CONH(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、及び置換若しくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキルから選択され、

10

n は、1若しくは2であり、 n が1である場合、前記破線のうちの1つだけが二重結合であり、

L は、

【化13】



20

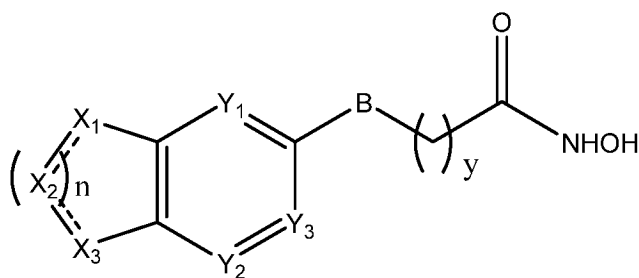
であり、 y は、1、2、3、4、及び5から選択される整数であり、

B は、 $-NH-$ 及び $-NHC(=O)-$ から選択される、化合物、又はその薬学的に許容される塩。

【請求項26】

式(IV)の構造を有し、

【化14】



式(IV)

30

式中、 B が、 $-NH-$ である、請求項25に記載の化合物。

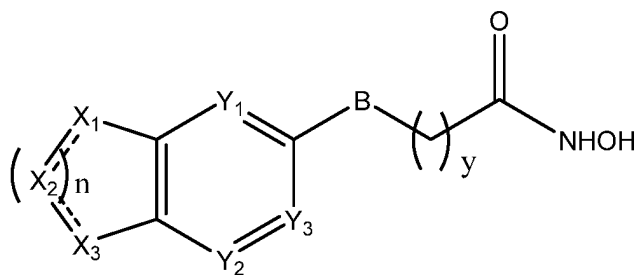
【請求項27】

式(IV)の構造を有し、

40

50

【化 1 5】



式 (IV)

10

式中、B が、 $-NHC(=O)-$ である、請求項 25 に記載の化合物。

【請求項 28】

y が、1 である、請求項 26 に記載の化合物。

【請求項 29】

y が、3 である、請求項 27 に記載の化合物。

【請求項 30】

Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも 1 つが、 CR_2 である、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 31】

X_1 、 X_2 、又は X_3 のうちの少なくとも 1 つが、N である、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 32】

それぞれの場合に、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のうちの 2 つが、N である、請求項 25 ~ 31 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 33】

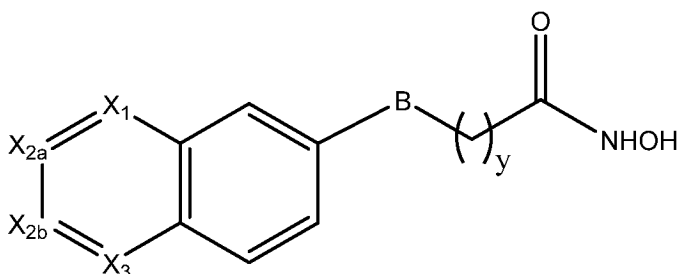
n が 2 である、請求項 25 ~ 32 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 34】

式 V の構造を有し、

30

【化 1 6】



式 (V)

40

式中、

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

X_1 及び X_3 が、独立して、 CR_1 及び N から選択され、

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

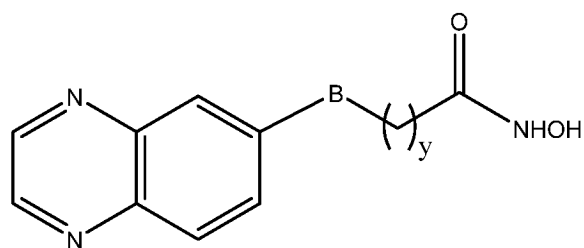
B が、 $-NH-$ 及び $-NHC(=O)-$ から選択され、

y が、1、2、3、4、及び 5 から選択される整数である、請求項 25 ~ 33 のいずれか一項に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 35】

50

式 V I の構造を有し、
【化 1 7】



式 (V I)

10

式中、B が、- NH 及び - NHC (= O) から選択され、y が、1、2、3、4、及び 5 から選択される整数である、請求項 2 5 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 3 6】

B が、- NH - である、請求項 3 5 に記載の化合物。

【請求項 3 7】

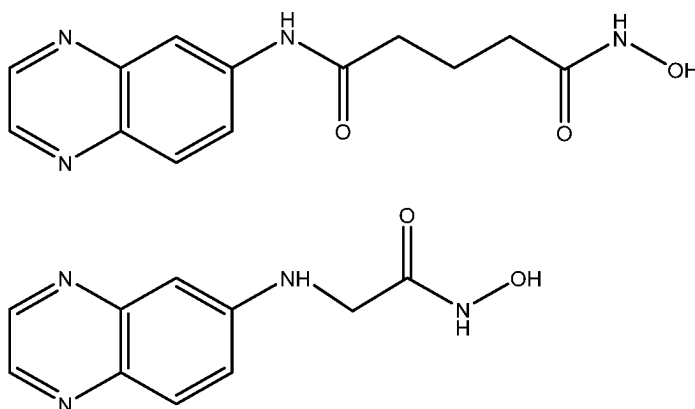
B が、- NHC (= O) - である、請求項 3 5 に記載の化合物。

【請求項 3 8】

前記化合物が、以下の構造

20

【化 1 8】



30

を有するか、又はその薬学的に許容される塩である、請求項 2 5 に記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、TPP リボスイッチなどの標的 RNA 分子に結合する化合物、これらの化合物を含む組成物、及びそれらを作製し使用方法を対象とする。本化合物は、2つの異なる結合部位において標的 RNA と結合し、それによって、単一の RNA 結合部位のみに結合する化合物と比較して、より高い親和性の結合リガンドを生成することを可能にする、2つの構造的に異なる断片を含有する。

40

【0002】

配列表の引用参照

添付の配列表内の材料は、参照により、その全体が本出願に組み込まれる。Sequence Listing 3939760002__ST25 という名称の添付ファイルは、2020年8月5日に作成され、4KBである。

【0003】

50

政府の支援

本発明は、National Institutes of Health (NIH) によって付与された許可番号 GM098662 及び AI068462 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

大部分の小分子リガンドは、主に、タンパク質を標的とすることによって生体系を操作するために開発される。タンパク質は、非常に複雑な三次元構造を有しており、このことは、タンパク質が適切に機能するために重要であり、小分子リガンドが結合することができる窪み及びポケットを含む^{1、2}。

10

【0005】

トランスクリプトームは、生物内で産生されるすべてのRNA分子のセットであり、生体系を研究し、操作するための有望な標的も含む。例えば、RNAトランスクリプトームは、哺乳動物系において重要な役割を果たすだけでなく、細菌及びウイルスの両方にも存在し、したがって、小分子が遺伝子発現を調節するための標的を表す。

【0006】

RNAは、高度に選択的なりガンドの開発に必要な主要な特徴である⁴、タンパク質に匹敵する複雑さを有する三次元構造を採用することができ³、RNAは、生体系の挙動を管理する際に一般的な役割を果たす⁵。元々は、単に、タンパク質コーディングのためのメッセージを伝達し、タンパク質合成のプロセスを導くためにのみ存在する遺伝情報の担体であるとみられていたが、RNAの現代の見解は、拡張された役割を包含するように進化しており、現在、多様な範囲のRNA分子は、様々な機構によって遺伝子発現及び他の生物学的プロセスを調節する、広範かつ深遠な役割を有することが理解されている。新たに発見された多数の非コードRNAでさえも、がん及び非腫瘍原性疾患などの疾患と関連することが見出されている。したがって、RNAが病原性タンパク質のコーディングとは別に疾患状態に寄与するという認識は、以前には認識されていない豊富な治療標的を提供する。

20

【0007】

しかしながら、小分子リガンドがmRNAに結合することができ、翻訳効率を上方調節又は下方調節する可能性を有するため、細胞中のタンパク質発現を調整することができることが示されている^{6、7}が、タンパク質を標的とするときに直面していない小分子RNAリガンドの識別には困難がある^{4、11、12}。これには、標的の豊富なプールも表す、非コードRNAを対象とする小分子の開発も含まれる^{8~10}。残念ながら、RNA構造の分析及び新たな機能の発見のための種々の技術の開発にもかかわらず、RNAに結合し、RNAの機能を乱す阻害剤を効率的かつ迅速に識別又は設計する能力は、はるかに遅れている。したがって、RNA分子を標的とする小分子リガンドの迅速かつ効率的な識別を可能にする新しい方法及び技術を開発することが当該技術分野において非常に必要である。

30

【発明の概要】

【0008】

上で既に述べたように、トランスクリプトームは、小分子リガンドのための、魅力的ではあるが、十分に活用していない標的のセットを表す。メッセンジャーRNA及び非コードRNAを標的とする小分子リガンド(及び最終的には薬物)は、細胞の状態及び疾患を調節する可能性を有する。本開示では、プライマー伸長(SHAPE)及びSHAPE変異プロファイリング(MaP)RNA構造プロービングによって分析された選択的2'-ヒドロキシルアシル化を使用する、断片に基づくスクリーニング戦略を使用して、標的RNA構造に結合する小分子断片を開発した。特に、ミリモル濃度からマイクロモル濃度の親和性でTPPリボスイッチに結合する断片及び協働して結合する断片対を識別した。高いナノモル濃度の親和性でTPPリボスイッチに結合する、連結した断片リガンドを効率的に設計するための情報を得るために、構造-活性関係(SAR)試験を実行した。本開

40

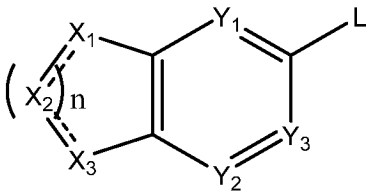
50

示からの原理は、TPPリボスイッチに限定されることを意味していないが、多様なRNA標的のための高品質リガンドを開発するための協働性及び多部位結合を利用する、他の標的RNA構造にも広く適用可能であり得る。

【0009】

そのため、本開示の主題の一態様は、式(I)の構造を有する化合物であって、

【化1】



式(I)

10

式中、

X_1 、 X_2 、及び X_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 は、同時に O 若しくは S であるように選択されず、

破線は、任意選択の二重結合を表し、

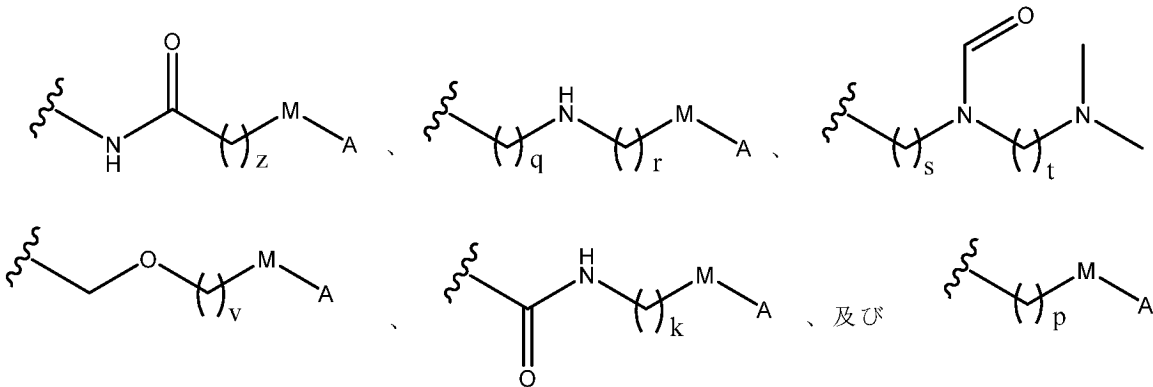
20

Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_2 及び N から選択され、

n は、1若しくは2であり、 n が1である場合、破線のうちの1つだけが二重結合であり、

L は、

【化2】



30

から選択され、

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

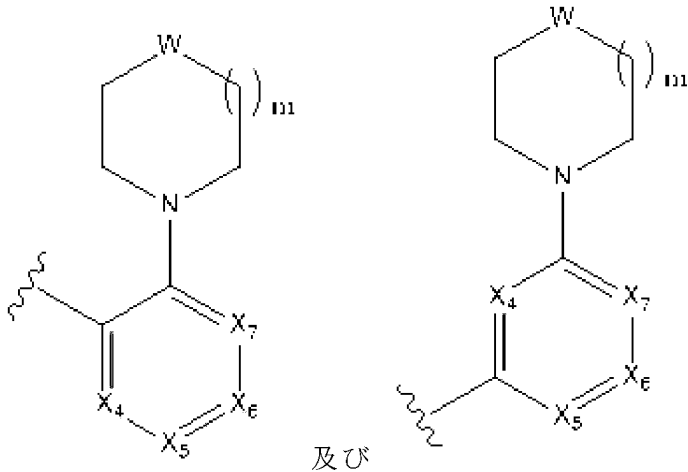
40

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

A は、

50

【化3】



10

から選択され、

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

R_1 、 R_2 、及び R_3 は、独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-N(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-O(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-OCO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-NCO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、及び置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

20

m は、1若しくは2であり、

W は、 $-O-$ 若しくは $-N(R_4)-$ であり、 R_4 は、 $-H$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のシクロアルキル、 $-CO(\text{アリール})$ 、 $-CO(\text{ヘテロアリール})$ 、及び $-CO(\text{シクロアルキル})$ から選択され、

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

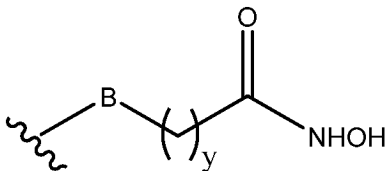
30

又はその薬学的に許容される塩である。

【0010】

追加の実施形態では、 L は

【化4】



40

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

【0011】

本開示の主題のさらなる態様は、本明細書に記載の化合物を作製するための方法を提供する。

【0012】

本開示の主題のなおさらなる態様は、以下に提示される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】RNAスクリーニング構築物及び断片スクリーニングワークフローのスキームを

50

示す。RNAモチーフ1及び2、バーコードヘリックス、並びに構造カセットヘリックスが示される。RNAは、小分子断片の存在下又は非存在下でSHAPEを使用してプローブされ、リガンド依存性構造情報に対応する化学修飾は、マルチプレックスMaP配列決定によって読み出される。

【図2】断片ヒット及び非ヒットについての代表的な変異率比較を示す。断片に曝露した試料についての正規化された変異率は、+リガンド、+2、又は+4とラベル付けされ、リガンドなしとラベル付けされたリガンドを含まないトレースと比較する。変異率の統計的に有意な変化は、三角形を付して示される(SHAPE確認データについては図7を参照)。(上)試験構築物に結合しない代表的な断片の変異率の比較。(中央)RNAのTPPリボスイッチ領域にヒットする断片。(下)試験構築物全体にわたって反応性の変化を誘発する、非特異的ヒット。モチーフ1及び2のランドマークは、SHAPEプロファイルの下に示される。

10

【図3A】(A)断片17によって結合されたTPPリボスイッチの構造の、(B)天然TPPリガンド(2HOJ^{28})との比較を示す。RNA構造は、各画像において、同様の配向で示される。リガンドとRNAとの間の水素結合は、破線として示される。 Mg^{2+} 及び Mn^{2+} カチオン並びに水分子を示す。(A)化合物17、(B)TPPによって結合されたリボスイッチの結晶構造。矢印は、17結合構造におけるG72の回転を示す。Py、ピリミジン；及びPP、TPPのピロリン酸部分。

【図3B】(A)断片17によって結合されたTPPリボスイッチの構造の、(B)天然TPPリガンド(2HOJ^{28})との比較を示す。RNA構造は、各画像において、同様の配向で示される。リガンドとRNAとの間の水素結合は、破線として示される。 Mg^{2+} 及び Mn^{2+} カチオン並びに水分子を示す。(A)化合物17、(B)TPPによって結合されたリボスイッチの結晶構造。矢印は、17結合構造におけるG72の回転を示す。Py、ピリミジン；及びPP、TPPのピロリン酸部分。

20

【図4】断片2及び31についての熱力学的サイクル及び段階的リガンド結合親和性を示す。

【図5】その連結係数(E)によって順序付けられた、断片に基づく方法によって開発された、断片-リンカー-断片リガンドの比較を示す。対数軸上に表示される値。協働性の連結は、より低いE値(垂直軸の上部)に対応する。断片37は、E値2.5、及びLE値0.34を示す。個々の断片(左、中央)及び連結されたリガンド(右)の解離定数を、構成要素の断片の下に示し、E値(上)及びリガンド効率(下)が示される。断片間に導入された共有結合性の連結は、淡灰色で強調表示されている。構成要素の断片の構造を表7に詳細に示す。

30

【図6A】スクリーニング構築物設計を示す。以下の構成要素を有するRNA配列(配列番号6)を示す。GGUCGCGAGUAUAUCGCGACC(配列番号7)は、構造カセットであり、

【数1】

GCUGCAAGAGAUUGUAGC (配列番号8)

40

は、RNAバーコード(バーコードNTは下線が引かれている)であり、GUGGGCA CUCGUGUCCAC(配列番号9)は、構造カセットであり、

【数2】

ACGCGAAGGAAACCGCGUGUCAACUGUGCAACAGCUGACAAAGAGAUUCCU
(配列番号10)

は、DENVシュードノット(変異は太字)であり、AAAACUは、リンカーであり、

【数3】

50

CAGUACUCGGGGUGCCCUUCUGCGUGAAGGCUGAGAAAUACCCGUAUCACCUGA
UCUGGAUAAUGCCAGCGUAGGGAAGUGCUG

(配列番号 1 1)

は、T P P リボスイッチ (変異は太字) であり、G A U C C G G U U C G C C G G A U C A A U C G G G C U U C G G U C C G G U U C (配列番号 1 2) は、構造カセットである。

【図 6 B】その自己折り畳みヘアピンの文脈で R N A 配列バーコードの二次構造を示す。 10

【図 7】非ヒット、ヒット、及び非特異的ヒット断片の S H A P E プロファイルを示す。曝露した断片に対応する変異率トレース及びリガンドなしの対照トレースは、それぞれ、実線の灰色網掛け及び黒色の輪郭である。断片対断片なしの試料において統計的に有意に異なると決定されたヌクレオチドは、三角形によって示される。同じ断片についての変異率トレースを、図 2 に概略的に示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

ここで、本開示の主題を、以下により完全に説明する。しかしながら、前述の記載に提示される教示の恩恵を受ける本開示の主題が関連する当業者は、本明細書に記載される本開示の主題の多くの変更例及び他の実施形態に想到するであろう。したがって、本開示の主題は、開示される特定の実施形態に限定されるべきではなく、修正及び他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されることを理解されたい。言い換えると、本明細書に記載の主題は、すべての代替物、修正、及び等価物を網羅する。組み込まれた文献、特許、及び類似の資料のうちの一つ以上が、定義された用語、用語の使用、記載された技術などを含むが、これらに限定されない本出願とは異なるか、又は矛盾する場合には、本出願が制御する。別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、この分野の当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。 20

【0015】

定義

本明細書で使用される場合、「アルキル基」という用語は、1 ~ 8 個、1 ~ 6 個、1 ~ 4 個、又は 5 ~ 8 個の炭素を含有する飽和炭化水素ラジカルを指す。いくつかの実施形態では、飽和ラジカルは、8 個より多い炭素を含有する。アルキル基は、非環状アルカンから 1 個の水素を除去し、したがって、非水素基又はラジカルの置換によって修飾された非環状アルカン化合物と構造的に類似している。アルキル基ラジカルは、分岐鎖状又は非分岐鎖状とすることができる。より低級のアルキル基ラジカルは、1 ~ 4 個の炭素原子を有する。より高級のアルキル基ラジカルは、5 ~ 8 個の炭素原子を有する。アルキル、より低級のアルキル、及びより高級のアルキル基ラジカルの例としては、限定されないが、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、sec ブチル、t ブチル、アミル、t アミル、n - ペンチル、n - ヘキシル、i - オクチルなどのラジカルが挙げられる。 40

【0016】

本明細書で使用される場合、「C (= O)」、「C O」及び「C (O)」という表記は、カルボニル部分を示すために使用される。好適なカルボニル部分の例としては、限定されないが、ケトン及びアルデヒドにおいて見出されるものが挙げられる。

【0017】

「シクロアルキル」という用語は、3 ~ 8 個の環員又は 3 ~ 7 個の環員又は 3 ~ 6 個の環員又は 3 ~ 5 個の環員又は 3 ~ 4 個の環員を有する炭化水素を指し、単環式又は二環式であり得る。環は、飽和していてもよく、又はある程度の不飽和度を有していてもよい。 50

シクロアルキル基は、任意選択で、1つ以上の置換基で置換されていてもよい。一実施形態では、シクロアルキル基の各環の0、1、2、3、又は4個の原子は、置換基によって置換されていてもよい。シクロアルキル基の代表的な例としては、シクロプロピル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロブチル、シクロヘプチル、シクロペンテニル、シクロペンタジエニル、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニルなどが挙げられる。

【0018】

「アリアル」という用語は、炭化水素の単環式、二環式又は三環式の芳香族環系を指す。アリアル基は、任意選択で、1つ以上の置換基で置換されていてもよい。一実施形態では、アリアル基の各環の0、1、2、3、4、5、又は6個の原子は、置換基によって置換されていてもよい。アリアル基の例としては、フェニル、ナフチル、アントラセニル、フルオレニル、インデニル、アズレニルなどが挙げられる。

10

【0019】

「ヘテロアリアル」という用語は、ヘテロ原子がO、N、又はSから選択され、残りの環原子が炭素である（別段の指示がない限り、適切な水素原子を有する）芳香族5～10員環系を指す。ヘテロアリアル基は、任意選択で、1つ以上の置換基で置換されていてもよい。一実施形態では、ヘテロアリアル基の各環の0、1、2、3、又は4個の原子は、置換基によって置換されていてもよい。ヘテロアリアル基の例としては、ピリジル、フランニル、チエニル、ピローリル、オキサゾリル、オキサジアゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、イソオキサゾリル、キノリニル、ピラゾリル、イソチアゾリル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、イソキノリニル、インダゾリルなどが挙げられる。

20

【0020】

本明細書で使用される場合、「置換」という用語は、その部分が、1つ以上の追加の有機又は無機の置換基ラジカルに結合している部分（例えば、ヘテロアリアル、アリアル、シクロアルキル、アルキル、及び/又はアルケニル）を指す。いくつかの実施形態では、置換部分は、1、2、3、4、又は5つの追加の置換基又はラジカルを含む。好適な有機及び無機の置換基ラジカルとしては、限定されないが、ハロゲン、ヒドロキシル、シクロアルキル、アリアル、置換アリアル、ヘテロアリアル、複素環式環、置換複素環式環、アミノ、単置換アミノ、二置換アミノ、アシルオキシ、ニトロ、シアノ、カルボキシ、カルボアルコキシ、アルキルカルボキサミド、置換アルキルカルボキサミド、ジアルキルカルボキサミド、置換ジアルキルカルボキサミド、アルキルスルホニル、アルキルスルフィニル、チオアルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、又はハロアルコキシラジカルが挙げられ、それらの用語は本明細書で定義される通りである。本明細書に別段の指示がない限り、有機の置換基は1～4個又は5～8個の炭素原子を含むことができる。置換された部分が、2つ以上の置換基ラジカルと結合している場合、置換基ラジカルは、同じであっても異なってもよい。

30

【0021】

本明細書で使用される場合、「非置換」という用語は、上記のような1つ以上の追加の有機又は無機の置換基ラジカルに結合していない（ヘテロアリアル、アリアル、アルケニル、及び/又はアルキルなどの）部分を指し、そのような部分が水素でのみ置換されていることを意味する。

40

【0022】

本明細書に提供される構造及び「置換」又は「～で置換される」の任意の列挙は、このような構造及び置換が、置換された原子及び置換基の許容される原子価に従い、かつ置換によって安定した化合物をもたらす、例えば、再配列、環化、脱離などによる変換を自然には受けないという暗黙の条件を含むことが理解されるであろう。

【0023】

本明細書で使用される場合、「RNA」という用語は、遺伝子のコーディング、デコーディング、調節及び発現における様々な生物学的役割に不可欠なポリマー分子であるリボ核酸を指す。RNA及びDNAは核酸であり、脂質、タンパク質及び炭水化物と共に、す

50

すべての既知の形態の生命に不可欠な4つの主要な巨大分子を構成する。DNAと同様に、RNAはヌクレオチドの鎖として組み立てられるが、DNAとは異なり、RNAは、対になった二本鎖ではなく、それ自体で折り畳まれた一本鎖として自然界に見出される。細胞生物は、メッセンジャーRNA (mRNA) を使用して、特定のタンパク質の合成を指令する遺伝情報を伝達する(文字G、U、A、及びCによって示される、グアニン、ウラシル、アデニン、及びシトシンの窒素塩基を使用して)。多くのウイルスは、RNAゲノムを使用して、その遺伝情報をコードする。いくつかのRNA分子は、生物学的反応を触媒するか、遺伝子発現を制御するか、又は細胞シグナルに対する応答を感知し、伝達することによって、細胞内で能動的な役割を果たす。これらの能動的なプロセスの1つは、RNA分子がリボソーム上のタンパク質の合成を指令する普遍的な機能であるタンパク質合成である。このプロセスは、トランスファーRNA (tRNA) 分子を使用して、リボソームにアミノ酸を送達し、リボソームRNA (rRNA) は、次いでアミノ酸と一緒に連結して、コードされたタンパク質を形成する。

10

【0024】

本明細書で使用される場合、「非コードRNA (ncRNA)」という用語は、タンパク質に翻訳されないRNA分子を指す。機能的非コードRNAが転写されるDNA配列は、RNA遺伝子と呼ばれることが多い。豊富であり、機能的に重要な種類の非コードRNAとしては、トランスファーRNA (tRNAs) 及びリボソームRNA (rRNAs)、並びに低分子RNA、例えば、マイクロRNA、siRNA、piRNA、snRNA、snoRNAs、exRNA、scaRNA、及び長鎖ncRNA、例えば、Xist及びHOTAIRが挙げられる。

20

【0025】

本明細書で使用される場合、「コードRNA」という用語は、タンパク質をコードするRNA、すなわち、メッセンジャーRNA (mRNA) を指す。かかるRNAは、トランスクリプトームを含む。

【0026】

本明細書で使用される場合、「リボスイッチ」という用語は、小分子に結合し、mRNAによってコードされるタンパク質の産生を変化させる、メッセンジャーRNA分子の調節セグメントを指す。したがって、リボスイッチを含有するmRNAは、そのエフェクター分子の濃度に応答して、自身の活性の調節に直接関与する。

30

【0027】

本明細書で使用される場合、「TPPリボスイッチ」という用語は、THIエレメント及びThi-boxリボスイッチとしても知られており、高度に保存されたRNA二次構造を指す。チアミンピロリン酸 (TPP) に直接的に結合して、古細菌、細菌及び真核生物における様々な機構を介して遺伝子発現を調節するリボスイッチとして機能する。TPPは、細菌中のピリミジン部分及びチアゾール部分のカップリングによって合成される必須補酵素である、チアミン (ビタミンB1) の活性形態である。

【0028】

本明細書で使用される場合、「シュードノット」という用語は、1つのステムの半分が、別のステムの2つの半分の間にインターカレーションされる、少なくとも2つのステム-ループ構造を含有する核酸二次構造を指す。シュードノットは、1982年にハクサイ黄化モザイクウイルスで初めて認められた。シュードノットは、ノット形状の三次元立体配座に折り畳まれるが、真のトポロジカルノットではない。

40

【0029】

「アプタマー」は、高い親和性及び特異性で目的の特定の分子に結合することができる核酸分子を指し (Tuerk and Gold, 1990, Ellington and Szostak, 1990)、ヒト遺伝子操作されているか、又は天然由来のいずれかであり得る。典型的にはRNAであるアプタマーに対するリガンドの結合は、アプタマー及びアプタマーが位置する中の核酸の立体配座を変化させる。いくつかの場合に、立体配座の変化は、アプタマーが位置するmRNAの翻訳を阻害するか、又は例えば、他の方

50

法で核酸の正常な活性を妨げる。アプタマーはまた、DNAから構成されてもよく、又は非天然ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体を含んでいてもよい。アプタマーは、最も典型的には、標的分子の結合についてのインビトロ選択によって得られるであろう。しかしながら、アプタマーのインビボ選択も可能である。アプタマーは、リポスイッチのリガンド結合ドメインでもある。アプタマーは、典型的には、約10～約300ヌクレオチド長である。より一般的には、アプタマーは、約30～約100ヌクレオチド長である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,949,379号を参照されたい。本開示に有用なアプタマーの例としては、限定されないが、PSMAアプタマー(McNamara et al., 2006)、CTLA4アプタマー(Santulli-Marotto et al., 2003)、及び4-1BBアプタマー(McNamara et al., 2007)が挙げられる。

10

【0030】

本明細書で使用される場合、「PCR」という用語は、ポリメラーゼ連鎖反応を表し、特定のDNA試料の数百～数十億のコピーを迅速に作製し、科学者がDNAの非常に小さな試料を採取し、それを詳細に研究するのに十分な多量まで増幅することを可能にするために、分子生物学で広く使用される方法を指す。

【0031】

「薬学的に許容される」という語句は、物質又は組成物が、化学的及び/又は毒性学的に、他の成分を含む製剤、及び/又はそれらを用いて治療される対象と適合性であることを示す。

20

【0032】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という語句は、本開示の化合物の薬学的に許容される有機塩又は無機塩を指す。例示的な塩としては、限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチジン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、糖酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩「メシル酸塩」、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、パモ酸塩(すなわち、1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸))塩、アルカリ金属(例えば、ナトリウム及びカリウム)塩、アルカリ土類金属(例えば、マグネシウム)塩、及びアンモニウム塩が挙げられる。薬学的に許容される塩は、酢酸イオン、コハク酸イオン、又は他の対イオンなどの別の分子の包含を伴ってもよい。対イオンは、親化合物上の電荷を安定化させる任意の有機又は無機部分であってもよい。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造中に1つより多い帯電した原子を有し得る。複数の帯電した原子が、薬学的に許容される塩の一部である場合、塩は、複数の対イオンを有し得る。したがって、薬学的に許容される塩は、1つ以上の帯電した原子及び/又は1つ以上の対イオンを有し得る。

30

【0033】

本明細書で使用される場合、「担体」は、使用される投薬量及び濃度でそれに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である、薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤を含む。多くの場合、生理学的に許容される担体は、pH緩衝水溶液である。生理学的に許容される担体の非限定的な例としては、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸を含む抗酸化剤、低分子量(約10残基未満)ポリペプチド、タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、又はリジンなどのアミノ酸、グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物、EDTAなどのキレート化剤、マンニトール又はソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの塩形成対イオン、及び/又はTWEEN(登録商標)、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS(登録商標)など

40

50

の非イオン性界面活性剤が挙げられる。特定の実施形態では、薬学的に許容される担体は、天然に存在しない薬学的に許容される担体である。

【0034】

「治療する」及び「治療」という用語は、治療的治療及び防止的若しくは予防的測定の両方を指し、その目的は、望ましくない生理学的変化又は障害、例えば、がんの発生又は拡散を予防するか、又は遅らせる（少なくする）ことである。本開示の目的のために、有益又は所望の臨床結果としては、限定されないが、検出可能であるか、検出不可能であるかにかかわらず、症状の軽減、疾患の程度の低下、疾患の安定した（すなわち、悪化しない）状態、疾患の進行の遅延又は遅れ、疾患の状態の改善若しくは緩和、及び寛解（部分的又は完全な）が挙げられる。「治療」はまた、治療を受けていない場合に予想される生存と比較して、生存を延長することを意味し得る。治療を必要とするものとしては、既に状態若しくは障害を有するもの、並びに状態若しくは障害を有する傾向があるもの、又は状態若しくは障害が予防されるべきものが含まれる。

10

【0035】

「投与」又は「投与すること」という用語は、化合物を対象に導入して、それらの意図される機能を発揮する経路を含む。使用され得る投与経路の例としては、注射（皮下、静脈内、非経口、腹腔内、くも膜下腔内を含むが、これらに限定されない）、局所、経口、吸入、直腸及び経皮が挙げられる。

【0036】

「有効量」という用語は、所望の結果を達成するために必要な投薬量及び期間で有効な量を含む。化合物の有効量は、対象の疾患状態、年齢、及び体重、並びに対象において所望の応答を誘発する化合物の能力などの因子に応じて変動し得る。投薬レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整されてもよい。

20

【0037】

「全身投与」、「全身投与される」、「末梢投与」及び「末梢投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、化合物、薬物、又は他の材料が、患者の系に入り、したがって、代謝及び他の同様のプロセスを受けるような投与を意味する。

【0038】

「治療有効量」という語句は、(i) 特定の疾患、状態、若しくは障害を治療若しくは予防する、(ii) 特定の疾患、状態、若しくは障害の1つ以上の症状を軽減するか、改善するか、若しくはなくす、又は(iii) 本明細書に記載の特定の疾患、状態、若しくは障害の1つ以上の症状の発症を予防するか、若しくは遅延させる、本開示の化合物の量を意味する。がんの場合、治療有効量の薬物は、がん細胞の数を減少させ、腫瘍のサイズを減少させ、末梢臓器へのがん細胞浸潤を阻害し（すなわち、ある程度遅くし、好ましくは停止させ）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度遅くし、好ましくは停止させ）、腫瘍成長をある程度まで阻害し、かつ/又はがんに関連する症状のうち1つ以上をある程度緩和し得る。薬物が、既に存在するがん細胞の成長を予防するか、かつ/又は死滅させ得る程度まで、薬物は、細胞増殖抑制性及び/又は細胞傷害性であり得る。がん療法の場合、有効性は、例えば、疾患進行までの時間（TTP）を評価すること、及び/又は奏効率（RR）を決定することによって測定することができる。

30

40

【0039】

「対象」という用語は、限定されないが、霊長類（例えば、ヒト）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどを含む、哺乳動物などの動物を指す。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0040】

本開示は、高い親和性で特定のRNA領域に結合する小分子の識別に適した、断片に基づくリガンド発見戦略を対象とする。以前、国際出願第PCT/2020/045022号は、特定のRNA結合領域を特異的に標的とする様々な小分子の識別に用いられるそのような断片ベースのリガンド発見戦略を記載し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。一般に、断片に基づくリガンド発見は、目的の標的に結合する低～中程度の親和

50

性の1つ以上の小分子「断片」の識別を可能にする。次いで、これらの断片を精製するか、又は連結するかのいずれかによって、より強力なリガンドを作成する¹³、¹⁴。典型的には、これらの断片は、300Da未満の分子質量を示し、検出可能に結合するために、目的の標的と実質的に高品質な接触を作製する。

【0041】

断片に基づくリガンド発見は、所与のRNAに対して結合する単一の断片ヒットである初期ヒット化合物を識別するために、これまで首尾良く用いられてきたに過ぎない¹⁵~¹⁹。同じRNAに結合する複数の断片の識別は、結合ポケット内の断片間の潜在的な相加的及び協働性の相互作用を利用することを可能にする²⁰、²¹。しかしながら、多くのRNAが、複数の「サブサイト」を介してそれらのリガンドに結合することが近年示されており、サブサイトは、独立した方法又は協働性の方法でリガンドに接触する結合ポケットの領域である²²。さらに、高親和性RNA結合は、サブサイトの結合が弱い協働性効果のみを示す場合であっても生じ得ることが示されている。これらの特徴は、RNA標的に適用される断片に基づくリガンド発見の有効性のための良好な前兆である。

10

【0042】

したがって、上に基づいて、本開示は、例えば、TPPリボスイッチなどの目的のRNAに結合する断片を識別する方法を対象とする。第二に、開示される方法は、RNA中の断片結合の位置を、おおよそヌクレオチド分解能で確立することを対象とする。第三に、開示される方法は、初期断片ヒットの部位付近に結合した第2の部位断片を識別することを対象とする。開示される方法は、断片に基づくリガンド発見アプローチと、SHAPE-MaP RNA構造プロービングとを融合させ²³、²⁴、これを両方とも使用して、RNA結合断片を識別し、断片結合の個々の部位を確立した。2つの断片を連結することによって最終的に作成されるリガンドは、天然リボスイッチリガンドとは類似性を有しておらず、構造的に複雑なTPPリボスイッチRNAと高い親和性で結合する。

20

【0043】

開示される方法、及びリガンドの識別は、以下により詳細に説明される。

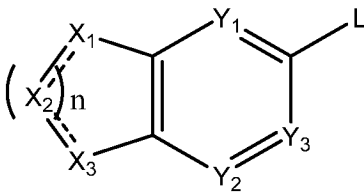
【0044】

A. 化合物

本開示の主題の第1の態様は、式(I)の構造を有する化合物であって、

【化5】

30



式(I)

式中、

40

X₁、X₂、及びX₃は、それぞれの場合に、独立して、CR₁、CHR₁、N、NH、O、及びSから選択され、隣接するX₁、X₂、及びX₃は、同時にO若しくはSであるように選択されず、

破線は、任意選択の二重結合を表し、

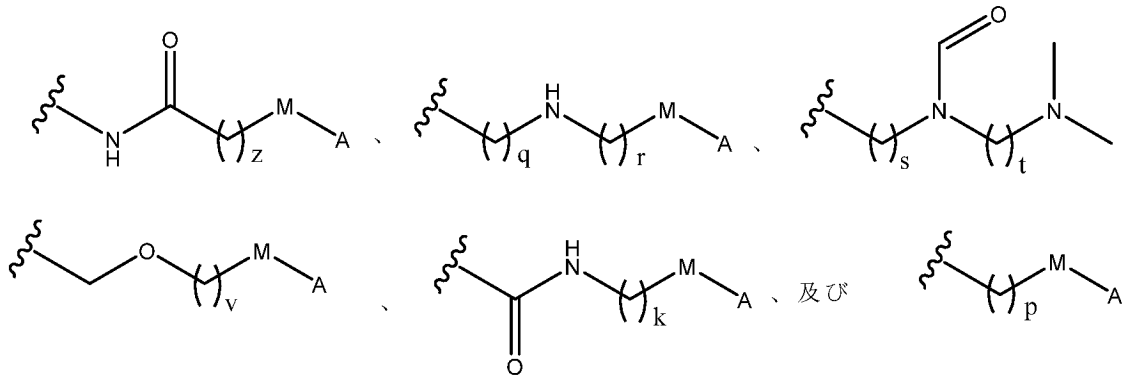
Y₁、Y₂、及びY₃は、それぞれの場合に、独立して、CR₂及びNから選択され、

nは、1若しくは2であり、nが1である場合、破線のうちの1つだけが二重結合であり、

Lは、

50

【化 6】



10

から選択され、

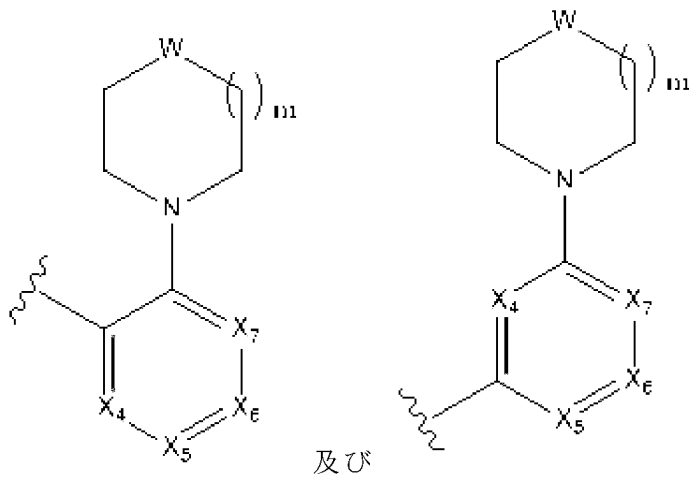
式中、 z 、 r 、 s 、 t 、 v 、 k 及び p は、独立して、整数 1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、 q は、整数 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から選択され、

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

A は、

20

【化 7】



30

から選択され、

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

R_1 、 R_2 、及び R_3 は、独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-N(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-O(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-OCO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-NCO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、 $-CONH(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、及び置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキルから選択され、

40

m は、1 若しくは 2 であり、

W は、 $-O-$ 若しくは $-N(R_4)-$ であり、 R_4 は、 $-H$ 、 $-CO(C_1 \sim C_6 \text{アルキル})$ 、置換若しくは非置換の $C_1 \sim C_6$ アルキル、置換若しくは非置換のアリール、置換若しくは非置換のヘテロアリール、置換若しくは非置換のシクロアルキル、 $-CO(\text{アリール})$ 、 $-CO(\text{ヘテロアリール})$ 、及び $-CO(\text{シクロアルキル})$ から選択され、

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

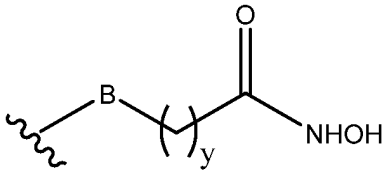
50

又はその薬学的に許容される塩である。

【0045】

追加の実施形態では、Lは

【化8】



10

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

【0046】

いずれかの上述の実施形態のように、 X_1 、 X_2 、又は X_3 のうちの少なくとも1つが、Nである、化合物。

【0047】

いずれかの上述の実施形態のように、 X_1 が、Nである、化合物。

【0048】

いずれかの上述の実施形態のように、 X_2 が、Nである、化合物。

【0049】

いずれかの上述の実施形態のように、 X_3 が、Nである、化合物。

20

【0050】

いずれかの上述の実施形態のように、それぞれの場合に、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のうちの2つが、Nである、化合物。

【0051】

いずれかの上述の実施形態のように、 X_1 及び X_3 が、Nである、化合物。

【0052】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1つが、Nである、化合物。

【0053】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 が、Nである、化合物。

30

【0054】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_2 が、Nである、化合物。

【0055】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_3 が、Nである、化合物。

【0056】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1つが、 CR_2 である、化合物。

【0057】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 が、 CR_2 である、化合物。

40

【0058】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_2 が、 CR_2 である、化合物。

【0059】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_3 が、 CR_2 である、化合物。

【0060】

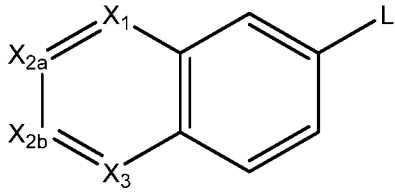
いずれかの上述の実施形態のように、nが2である、化合物。

【0061】

いずれかの上述の実施形態のように、式(II)の構造を有し、

50

【化9】



式 (I I)

10

式中、

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

X_1 及び X_3 が、独立して、 CR_1 及び N から選択され、

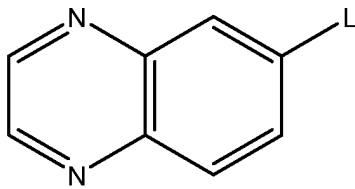
L 及び R_1 は、式 (I) について提供される通りであり、

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

【0062】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (I I I) の構造を有し、

【化10】



式 (I I I)

20

式中、

L が、式 (I) の化合物について提供される通りである、化合物、又はその薬学的に許容される塩。

30

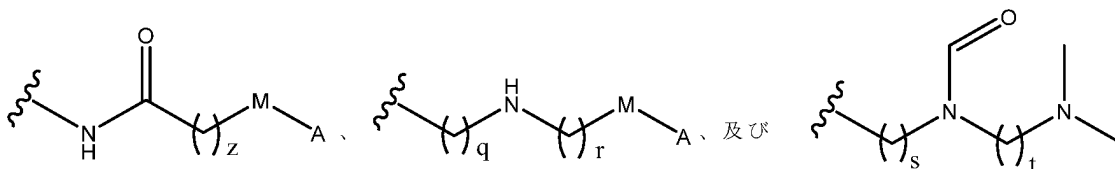
【0063】

いずれかの上述の実施形態のように、 z 、 r 、 s 、 t 、 v 、 k 及び p が、独立して、整数 1、2、及び 3 から選択される、化合物。

【0064】

いずれかの上述の実施形態のように、 L が、

【化11】



40

から選択される、化合物。

【0065】

いずれかの上述の実施形態のように、 z 、 r 、 s 、及び t が、独立して、整数 1、2、及び 3 から選択される、化合物。

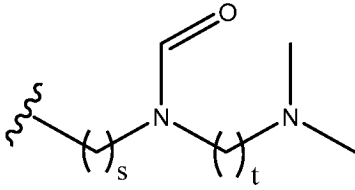
【0066】

いずれかの上述の実施形態のように、 z 、 r 、及び s が 1 である、化合物。

【0067】

50

いずれかの上述の実施形態のように、Lが、
【化12】



である、化合物。

10

【0068】

いずれかの上述の実施形態のように、s及びtが、独立して、1、2、及び3から選択される、化合物。

【0069】

いずれかの上述の実施形態のように、s及びtが、1又は2である、化合物。

【0070】

いずれかの上述の実施形態のように、sが1である、化合物。

【0071】

いずれかの上述の実施形態のように、tが2である、化合物。

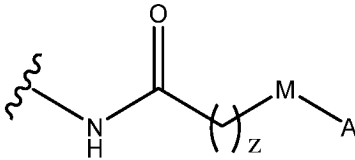
【0072】

20

いずれかの上述の実施形態のように、sが1であり、tが2である、化合物。

【0073】

いずれかの上述の実施形態のように、Lが、
【化13】



である、化合物。

30

【0074】

いずれかの上述の実施形態のように、zが、1、2、又は3である、化合物。

【0075】

いずれかの上述の実施形態のように、zが1である、化合物。

【0076】

いずれかの上述の実施形態のように、zが2である、化合物。

【0077】

いずれかの上述の実施形態のように、zが3である、化合物。

【0078】

40

いずれかの上述の実施形態のように、Mが、-NH-、-O-、及び-S-から選択される、化合物。

【0079】

いずれかの上述の実施形態のように、Mが、-NH-である、化合物。

【0080】

いずれかの上述の実施形態のように、zが1であり、Mが、-NH-である、化合物。

【0081】

いずれかの上述の実施形態のように、mが1である、化合物。

【0082】

いずれかの上述の実施形態のように、Wが、-NH-、-O-、及び-N(C₁~C₆

50

アルキル) - から選択される、化合物。

【0083】

いずれかの上述の実施形態のように、Wが、-NH-である、化合物。

【0084】

いずれかの上述の実施形態のように、X₄、X₅、X₆、及びX₇のうちの少なくとも1つが、Nである、化合物。

【0085】

いずれかの上述の実施形態のように、X₄が、Nである、化合物。

【0086】

いずれかの上述の実施形態のように、X₅が、Nである、化合物。

10

【0087】

いずれかの上述の実施形態のように、X₆が、Nである、化合物。

【0088】

いずれかの上述の実施形態のように、X₇が、Nである、化合物。

【0089】

いずれかの上述の実施形態のように、X₄及びX₆が、Nである、化合物。

【0090】

いずれかの上述の実施形態のように、X₅及びX₇が、Nである、化合物。

【0091】

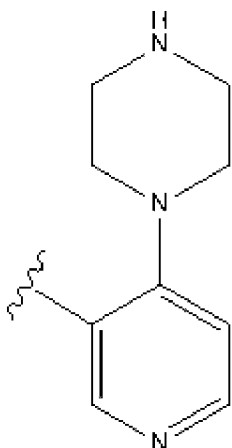
いずれかの上述の実施形態のように、X₅又はX₆が、Nであり、X₄及びX₇の両方が、独立して、CR₂である、化合物。

20

【0092】

いずれかの上述の実施形態のように、Aが、

【化14】



30

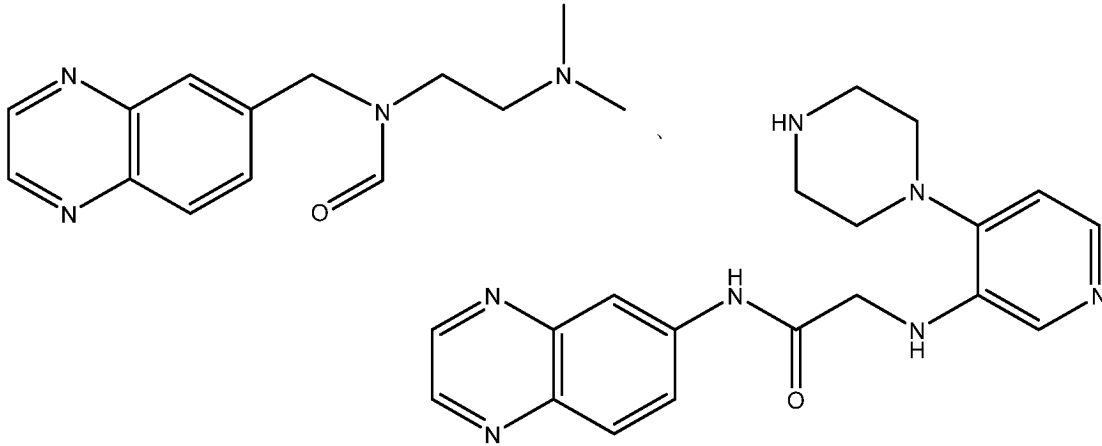
である、化合物。

【0093】

いずれかの上述の実施形態のように、以下の構造

40

【化15】



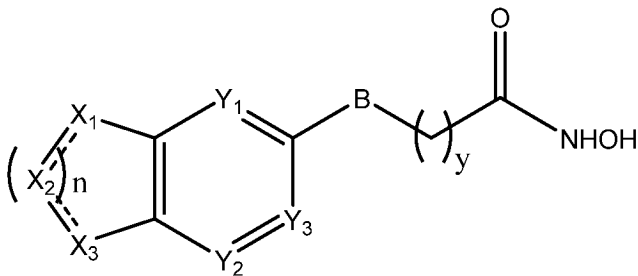
10

を有する化合物、又はその薬学的に許容される塩。

【0094】

本開示の主題の別の態様は、式(IV)の構造を有する化合物であって、

【化16】



式(IV)

20

30

式中、 X_1 、 X_2 、及び X_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_1 、 CHR_1 、 N 、 NH 、 O 、及び S から選択され、隣接する X_1 、 X_2 、及び X_3 は、同時に O 若しくは S であるように選択されず、

破線は、任意選択の二重結合を表し、

Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 は、それぞれの場合に、独立して、 CR_2 及び N から選択され、
 R_1 及び R_2 は、独立して、 $-H$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-F$ 、 $-CF_3$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-N(C_1\sim C_6\text{アルキル})_2$ 、 $-COOH$ 、 $-COO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-CO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-O(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-OCO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-NCO(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、 $-CONH(C_1\sim C_6\text{アルキル})$ 、及び置換若しくは非置換の $C_1\sim C_6$ アルキルから選択され、

40

n は、1若しくは2であり、 n が1である場合、破線のうちの1つだけが二重結合であり、

y は、1、2、3、4、及び5から選択される整数であり、

B は、 $-NH-$ 及び $-NHC(=O)-$ から選択される、化合物、又はその薬学的に許容される塩である。

【0095】

いずれかの上述の実施形態のように、式(IV)の構造を有し、式中、 B が、 $-NH-$ である、化合物。

【0096】

50

いずれかの上述の実施形態のように、式 (I V) の構造を有し、式中、B が、 $-NHC(=O)-$ である、化合物。

【0097】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (I V) の構造を有し、y が、1、2、及び3から選択される整数である、化合物。

【0098】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (I V) の構造を有し、式中、y が、1又は3である、化合物。

【0099】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1つが、Nである、化合物。 10

【0100】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 が、Nである、化合物。

【0101】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_2 が、Nである、化合物。

【0102】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_3 が、Nである、化合物。

【0103】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 、 Y_2 、及び Y_3 のうちの少なくとも1つが、 CR_2 である、化合物。 20

【0104】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_1 が、 CR_2 である、化合物。

【0105】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_2 が、 CR_2 である、化合物。

【0106】

いずれかの上述の実施形態のように、 Y_3 が、 CR_2 である、化合物。

【0107】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (I V) の構造を有し、式中、 X_1 、 X_2 、又は X_3 のうちの少なくとも1つが、Nである、化合物。

【0108】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (I V) の構造を有し、式中、それぞれの場合に、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のうちの2つが、Nである、化合物。 30

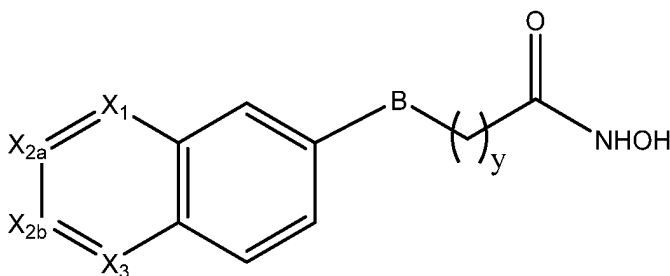
【0109】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (I V) の構造を有し、式中、n が2である、化合物。

【0110】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (V) の構造を有し、

【化17】



式 (V)

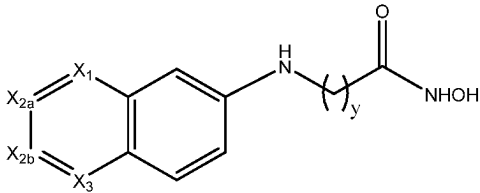
X_{2a} 及び X_{2b} が、独立して、 CR_1 及び N から選択され、

X_1 及び X_3 が、独立して、 CR_1 及び N から選択され、
 X_1 、 X_{2a} 、 X_{2b} 、及び X_3 のうちの 2 つが、 N であり、
 B 、 R_1 、及び y は、式 (IV) に記載されている通りである化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

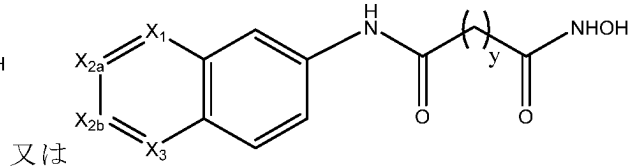
【0111】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (Va) 又は (Vb) の構造を有し、

【化18】



式 (Va)



式 (Vb)

10

X_{2a} 及び X_{2b} が、独立して、 CR_1 及び N から選択され、
 X_1 及び X_3 が、独立して、 CR_1 及び N から選択され、
 X_1 、 X_{2a} 、 X_{2b} 、及び X_3 のうちの 2 つが、 N であり、
 y が、1、2、及び 3 から選択される整数であり、 R_1 が、式 (IV) に記載される通りである、化合物、又はその薬学的に許容される塩。

20

【0112】

いずれかの上述の実施形態のように、 y は、1 である。

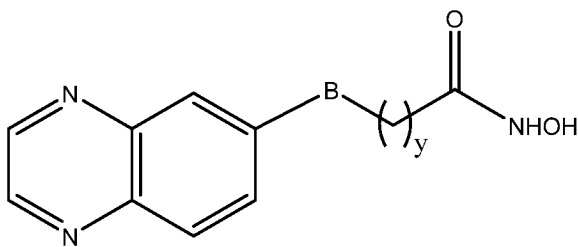
【0113】

いずれかの上述の実施形態のように、 y は、3 である。

【0114】

いずれかの上述の実施形態のように、式 (VI) の構造を有し、

【化19】



式 (VI)

30

式中、 B 及び y は、式 (IV) に記載されている通りである化合物、又はその薬学的に許容可能な塩。

40

【0115】

いずれかの上述の実施形態のように、 B が、 $-NH-$ である、化合物。

【0116】

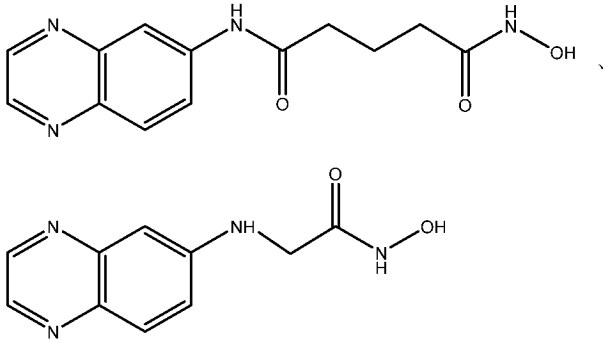
いずれかの上述の実施形態のように、 B が、 $-NH-C(=O)-$ である、化合物。

【0117】

いずれかの上述の実施形態のように、上述の化合物が、以下の構造

50

【化 2 0】



10

を有する化合物、又はその薬学的に許容される塩。

【0118】

B. スクリーニング方法

本開示は、プライマー伸長 (SHAPE) に基づく断片スクリーニング方法によって分析された、柔軟性のある選択的 2' - ヒドロキシル化の開発及び検証を対象とする。断片に基づくリガンド発見は、RNA を含む巨大分子と実質的に密接な接触を形成する化合物を識別するための有効なアプローチであることが証明されている^{13、14、17}。この発見戦略を成功させるための前提条件は、リガンド結合を検出するための適応可能で高品質の生物物理学的アッセイである。したがって、いくつかの実施形態では、SHAPE RNA 構造プロービングを利用して、リガンド結合を検出し^{23 ~ 25}、求電子試薬に対するリボース 2' - ヒドロキシル基の相対的反応性として局所的なヌクレオチド柔軟性を測定する。SHAPE を、任意の RNA 上で使用することができ、単一の実験において RNA 中の実質的にすべてのヌクレオチドに対するデータを提供し、結合を単純に検出することに加えて、ヌクレオチド当たりの構造情報を得て、これを以下により詳細に説明する。加えて、本開示はまた、SHAPE 変異プロファイリング (MaP) を適用することを対象とし^{23、24}、SHAPE と、高スループット配列決定による読み出しとを融合させ、何千もの試料の多重化及び効率的な高スループット分析を可能にする。

20

【0119】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、目的の RNA 分子に結合し、かつ / 又はそれと会合する小分子断片及び / 又は化合物を識別するための SHAPE 及び / 又は SHAPE - MaP を利用するスクリーニング方法を対象とする。本明細書に開示される方法は、別の小分子断片 (例えば、断片 1) で既に予めインキュベートされた RNA 分子に結合し、かつ / 又はそれと会合する小分子断片 (例えば、断片 2) を識別するための SHAPE 及び / 又は SHAPE - MaP を利用することをさらに含む。理論に束縛されるべきではないが、断片 1 は、第 1 の結合部位に結合し、断片 2 は、同じ RNA 分子中の第 2 の結合部位 (例えば、サブサイト) に結合すると考えられている。したがって、断片 1 及び断片 2 の構造的特徴を組み合わせ (例えば、この 2 つの断片をリンカー L で接続して)、本明細書に開示される化合物を生成することで、断片 1 及び / 又は断片 2 単独と比較して、RNA 結合親和性が増加した、連結した断片リガンドをもたらすと考えられる。

30

40

【0120】

スクリーニング方法 SHAPE 及び SHAPE - MaP を以下により詳細に説明する。

【0121】

I. SHAPE 化学

SHAPE 化学は、RNA リボースの 2' 位置の求核性が、隣接する 3' - ホスホジエステル基の電子的影響に感受性であるという観察結果に少なくとも部分的に基づく。拘束されていないヌクレオチドは、塩基対になっているが、又はその他の拘束されたヌクレオチドよりも、2' - ヒドロキシル基の求核性を増強する、より多くの立体配座をサンプリングする。したがって、ヒドロキシル選択的求電子剤 (例えば、限定されないが、N - メチルイサト酸無水物 (NMIA)) は、柔軟性のある RNA ヌクレオチドと共に安定な 2' 50

- O付加物をより迅速に形成する。局所的なヌクレオチド柔軟性は、すべてのRNAヌクレオチド（転写後修飾を有するいくつかの細胞RNAを除く）が2'-ヒドロキシル基を有するため、単一の実験において、RNA分子中のすべての位置で同時に調べることができる。2'-ヒドロキシル反応性が、塩基同一性に対して感受性がないため、絶対的なSHAPE反応性を、RNA中のすべての位置にわたって比較することができる。ヌクレオチドは、特定の2'-ヒドロキシルの求核性を増強する立体配座に拘束されているため、反応性であり得ることも可能である。この種類のヌクレオチドは、稀であると予想され、非標準的な局所幾何形状を伴い、対になっていない位置として正しくスコアリングされるであろう。

【0122】

10

本開示の主題は、いくつかの実施形態では、任意の長さ及び構造的複雑性を有するRNA分子中の構造的な拘束を調べることによって、RNA分子中の構造データを検出するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、2'-O-付加物を含有するRNA分子を、（標識された）プライマーでアニーリングすることと、2'-O-付加物を含有しないRNA分子を、陰性対照として（標識された）プライマーでアニーリングすることと、プライマーを伸長してcDNAのライブラリを生成することと、cDNAを分析することと、RNAについての構造データを含む出力ファイルを生成することと、を含む。

【0123】

20

RNA分子は、生体試料中に存在し得る。いくつかの実施形態では、RNA分子は、タンパク質又は他の小さい及び大きい生物学的リガンド及び/又は化合物の存在下で修飾され得る。プライマーは、任意選択で、放射性同位体、蛍光標識、重原子、酵素標識、化学発光基、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ、又はこれらの組み合わせで標識することができる。分析することは、分離すること、定量化すること、サイズ調整すること、又はそれらの組み合わせを含み得る。分析することは、トレースと呼ばれる、溶出時間データの関数として、蛍光又は染料の量データを抽出することを含み得る。例として、cDNAは、単一カラムのキャピラリー電気泳動機器で、又はマイクロ流体デバイスで分析することができる。

【0124】

30

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列に対する、2'-O-付加物を含有するRNA分子及び2'-O-付加物を含有しないRNA分子についてのトレースのピーク面積を計算することができる。トレースを、RNAの配列と比較し、アラインメントすることができる。配列決定によって生成された、これらのcDNAを観察し、説明するトレースは、2'-O-付加物を含有するRNA及び2'-O-付加物を含有しないRNA分子についてのトレース中の対応する位置よりも長い1ヌクレオチドである。各ピークの下側の面積は、全トレースのGaussianフィット積分を実施することによって決定することができる。

【0125】

40

したがって、いくつかの実施形態では、複雑な生体溶液のRNA分子と共有結合性のリボース2'-O-付加物を形成するための方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、求電子剤とRNA分子とを接触させることを含み、求電子剤は、RNA分子中の拘束されていないヌクレオチドを選択的に修飾し、共有結合したリボース1'-O-付加物を形成する。

【0126】

いくつかの実施形態では、求電子剤、例えば、限定されないが、N-メチルイサト酸無水物(NMIA)を、DMSOなどの無水極性非プロトン性溶媒に溶解する。試薬-溶媒溶液を、RNA分子を含有する複雑な生体溶液に添加する。この溶液は、異なる濃度及び量のタンパク質、細胞、ウイルス、脂質、単糖類及び多糖類、アミノ酸、ヌクレオチド、DNA、並びに異なる塩及び代謝産物を含有し得る。求電子剤の濃度は、RNA分子における所望の修飾度を達成するように調整することができる。求電子剤は、溶液中のすべて

50

の遊離ヒドロキシル基と反応する可能性を有しており、RNA分子上でリボース2'-O-付加物を産生する。さらに、求電子剤は、RNA分子中の対になっていないか、又は他の方法で拘束されていないヌクレオチドを選択的に修飾することができる。

【0127】

RNA分子を、2'-O-付加物を形成する少ないRNA修飾を得る濃度で求電子剤に曝露することができ、逆転写酵素によるプライマー伸長を阻害する能力によって検出することができる。この化学が、2'-ヒドロキシル基の一般的な反応性を標的とするため、すべてのRNA部位を単一の実験で調べることができる。いくつかの実施形態では、バックグラウンドを評価するために求電子剤を省いた対照伸長反応、及びヌクレオチド位置を割り当てるためのジデオキシ配列決定伸長を並行して実施することができる。これらの合わせたステップは、プライマー伸長、又はSHAPEによって分析される選択的2'-ヒドロキシルアシル化と呼ばれる。

10

【0128】

いくつかの実施形態では、本方法はさらに、1'-O-付加物を含有するRNA分子を、(標識された)プライマーと接触させることと、2'-O-付加物を含有しないRNA分子を、陰性対照として(標識された)プライマーと接触させることと、プライマーを伸長してcDNAの線形アレイを生成することと、cDNAを分析することと、RNAの構造データを含む出力ファイルを生成することと、を含む。

【0129】

単一のSHAPE実験で調べたヌクレオチドの数は、使用される分離技術の検出及び分解能だけでなく、RNA修飾の性質にも依存する。反応条件を考慮すると、ほぼすべてのRNA分子が少なくとも1つの修飾を有する長さが存在する。プライマー伸長が、これらの長さに達すると、伸長するcDNAの量は減少し、実験シグナルを減衰させる。修飾収率を低下させるように条件を調整すると、リード長さを増加させることができる。しかしながら、試薬収率を下げると、各cDNA長についての測定されたシグナルを減少させることもできる。これらの考慮事項を考慮すると、単一のSHAPEリードの好ましい最大長は、おそらく、約1キロベースのRNAであるが、これに限定されるべきではない。

20

【0130】**II. SHAPE - MaP**

SHAPE - MaPでは、SHAPE付加物は、逆転写酵素がSHAPE化学付加物の部位に非相補的なヌクレオチドを組み込むか、又は欠失を生成する能力を活用する変異プロファイリング(MaP)によって検出される。いくつかの実施形態では、SHAPE - MaPを、ライブラリ構築及び配列決定に使用することができる。いくつかの実施形態では、多重化技術をSHAPE - MaPに使用することができる。

30

【0131】

典型的には、RNAを、立体配座的に動的なヌクレオチドで反応するSHAPE試薬で処理する。逆転写の間、ポリメラーゼは、RNA中の化学付加物を通して読み取られ、元々の配列に非相補的なヌクレオチドをcDNAに組み込む。得られたcDNAを、任意の超並列アプローチを使用して配列決定し、変異プロファイル(MaP)を作成する。配列決定リードを参照配列とアラインメントし、ヌクレオチド分解能変異率を計算し、バックグラウンドについて補正し、正規化し、標準的なSHAPE反応性プロファイルを生成する。次いで、SHAPE反応性を使用して、二次構造をモデル化するか、競合構造及び代替構造を可視化するか、又は局所的なヌクレオチドRNA動態を調節する任意のプロセス若しくは機能を定量化することができる。RNA分子のSHAPE修飾の後、逆転写酵素を使用して、変異プロファイルを作成する。このステップは、cDNA中の変異としてのSHAPE付加物の位置及び相対頻度をコードする。当技術分野で既知の方法(例えば、PCR反応)を使用して、cDNAをdsDNAに変換し、dsDNAを第2のPCR反応でさらに増幅し、それによって、多重化のための配列決定を追加する。精製後、配列決定ライブラリは、均一なサイズを有し、各DNA分子は、目的の配列全体を含有する。

40

【0132】

50

したがって、本開示の主題のいくつかの実施形態によれば、核酸中の1つ以上の化学修飾を検出するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、化学修飾を有することが疑われる核酸を提供することと、ポリメラーゼ及び提供された核酸をテンプレートとして使用して核酸を合成することと、合成することが、ポリメラーゼが提供された核酸中の化学修飾を通じて読み取られ、それによって化学修飾の部位で得られた核酸中に正しくないヌクレオチドを産生する条件下で起こる、合成することと、正しくないヌクレオチドを検出することと、を含む。

【0133】

本開示の主題のいくつかの実施形態によれば、核酸中の構造データを検出するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、化学修飾を有することが疑われる核酸を提供することと、ポリメラーゼ及び提供された核酸をテンプレートとして使用して核酸を合成することと、合成することが、ポリメラーゼが提供された核酸中の化学修飾を通じて読み取られ、それによって化学修飾の部位で得られた核酸中に正しくないヌクレオチドを産生する条件下で起こる、合成することと、正しくないヌクレオチドを検出することと、提供された核酸についての構造データを含む出力ファイルを生成することと、を含む。

10

【0134】

本開示の主題のいくつかの実施形態では、提供された核酸は、RNA分子（例えば、コードRNA分子及び/又は非コードRNA分子）である。いくつかの実施形態では、方法は、2つ以上の化学修飾を検出することを含む。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、複数の化学修飾を通じて読み取られ、複数の正しくないヌクレオチドを産生し、本方法は、各々の正しくないヌクレオチドを検出することを含む。

20

【0135】

いくつかの実施形態では、核酸（例えば、RNA分子）は、化学修飾を提供する試薬に曝露されているか、又は化学修飾が、核酸（例えば、RNA分子）中に既に存在している。いくつかの実施形態では、既に存在している修飾は、2'-O-メチル基であり、かつ/又は核酸の由来となる細胞によって作成され、例えば、限定されないが、エピジェネティック修飾及び/又は複数の修飾は、1-メチルアデノシン、3-メチルシトシン、6-メチルアデノシン、3-メチルウリジン、及び/又は2-メチルグアノシンである。いくつかの実施形態では、RNA分子などの核酸は、タンパク質又は他の小さい及び大きい生物学的リガンド及び/又は化合物の存在下で修飾され得る。

30

【0136】

いくつかの実施形態では、試薬は、求電子剤を含む。いくつかの実施形態では、求電子剤は、RNA分子中の拘束されていないヌクレオチドを選択的に修飾し、共有結合したリポース2'-O-付加物を形成する。いくつかの実施形態では、試薬は、1 M7、1 M6、NMIA、DMS、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、核酸は、生体試料中に存在するか、又は生体試料に由来する。

【0137】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、逆転写酵素である。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、天然ポリメラーゼ又は変異体ポリメラーゼである。いくつかの実施形態では、合成核酸は、cDNAである。

40

【0138】

いくつかの実施形態では、正しくないヌクレオチドを検出することは、核酸を配列決定することを含む。いくつかの実施形態では、配列情報は、提供される核酸の配列とアラインメントされる。いくつかの実施形態では、正しくないヌクレオチドを検出することは、核酸に対して超並列配列決定を使用することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、核酸を増幅することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、特異的プライマー、ランダムプライミングを使用する全ゲノム、ランダムプライミングを使用する全トランスクリプトーム、又はそれらの組み合わせを使用する部位特異的アプローチを使用して核酸を増幅することを含む。

50

【0139】

本開示の主題のいくつかの実施形態によれば、本開示の主題の任意の実施形態の任意の方法ステップを含むステップを実施する際に、コンピュータ可読媒体に具体化されたコンピュータ実行可能命令を含むコンピュータプログラム製品が提供される。本開示の主題のいくつかの実施形態によれば、本開示の主題の任意の方法によって生成される核酸ライブラリが提供される。

【0140】

III. SHAPE 求電子剤

本明細書で上に開示されるように、SHAPE 化学は、リボース 2' - ヒドロキシル基の求核反応性が、局所的なヌクレオチド柔軟性によってゲート制御されるという発見を利用する。塩基対形成又は三次相互作用によって拘束されるヌクレオチドで、3' - ホスホジエステルアニオン及び他の相互作用は、2' - ヒドロキシルの反応性を低下させる。対照的に、柔軟性のある位置は、求電子剤（限定されないが、NMIAを含む）と反応して 2' - O - 付加物を形成する立体配座を優先的に採用する。例として、NMIA は、4つのヌクレオチドすべてと一般的に反応し、試薬は、並列な自己不活性化加水分解反応を受ける。実際に、本開示の主題は、本明細書に開示される核酸と反応することができる任意の分子を、本開示の主題のいくつかの実施形態に従って使用することができることを提供する。いくつかの実施形態では、求電子剤（SHAPE 試薬とも称される）は、限定されないが、イサト酸無水物誘導体、ベンゾイルシアニド誘導体、塩化ベンゾイル誘導体、フタル酸無水物誘導体、ベンジルイソシアネート誘導体、及びそれらの組み合わせから選択され得る。イサト酸無水物誘導体は、1 - メチル - 7 - ニトロイサト酸無水物（1M7）を含み得る。ベンゾイルシアニド誘導体は、限定されないが、ベンゾイルシアニド（BC）、3 - カルボキシベンゾイルシアニド（3 - CBC）、4 - カルボキシベンゾイルシアニド（4 - CBC）、3 - アミノメチルベンゾイルシアニド（3 - AMBC）、4 - アミノメチルベンゾイルシアニド、及びこれらの組み合わせを含む群から選択され得る。塩化ベンゾイル誘導体は、塩化ベンゾイル（BCI）を含み得る。フタル酸無水物誘導体は、4 - ニトロフタル酸無水物（4NPA）を含み得る。ベンジルイソシアネート（BIC）を含み得る。

【0141】

IV. RNA 分子設計

SHAPE 反応性を、1つ以上のプライマー伸長反応で評価することができるため、情報は、RNA 分子の 5' 末端及びプライマー結合部位付近の両方で失われ得る。典型的には、プライマー結合部位に隣接する 10 ~ 20 ヌクレオチドでの付加物形成は、プライマー伸長の初期段階中の逆転写酵素（RT）酵素による停留又は非テンプレート化伸長を反映する cDNA 断片の存在に起因して、定量化することが困難である。RNA の 5' 末端の 8 ~ 10 位置は、豊富な全長伸長産物の存在に起因して、可視化することが困難な場合がある。

【0142】

目的の配列の 5' 末端及び 3' 末端での SHAPE 反応性を監視するために、RNA 分子を、天然配列のより大きな断片内に埋め込むか、又は固有のプライマー結合部位を含有する強く折り畳まれた RNA 配列の間に配置することができる。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドの 5' 及び 3' 隣接配列を含有する構造カセットは、例えば、限定されないが、配列決定ゲル、キャピラリー電気泳動などの目的の RNA 分子内のすべての位置をヌクレオチド分解能を付与する任意の分離技術で評価することが可能なように設計することができる。いくつかの実施形態では、5' 及び 3' 伸長の両方を、多様な内部 RNA の折り畳みを妨害しない安定なヘアピン構造に折り畳むことができる。カセットのプライマー結合部位は、cDNA プライマーに効率的に結合することができる。任意の 5' 及び 3' 構造カセットエレメントの配列を調べ、それらが内部配列と安定した塩基対相互作用を形成しにくいことを確実にすることができる。

【0143】

いくつかの実施形態では、目的のRNA分子は、ヌクレオチドリンカーと接続されている2つの異なる標的モチーフを含む。標的モチーフは、目的の任意のヌクレオチド配列であり得る。例示的な標的モチーフとしては、限定されないが、リボスイッチ、ウイルス調節エレメント、mRNA中の構造化された領域、多重ヘリックス接合部、シュードノット及び/又はアプタマーが挙げられる。いくつかの実施形態では、第1の標的モチーフは、シュードノット、例えば、 Dengueウイルスゲノムの5'UTRからのシュードノットである。いくつかの実施形態では、第2の標的モチーフは、アプタマドメイン、例えば、TPPリボスイッチアプタマドメインである。ヌクレオチドリンカーについて、ヌクレオチドの数は、変動し得る。例えば、いくつかの実施形態では、リンカー中のヌクレオチドの数は、約1~約20ヌクレオチド、約1~約15ヌクレオチド、約1~約10ヌクレオチド、又は約5~約10ヌクレオチド(又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10ヌクレオチド)の範囲である。

10

【0144】

いくつかの実施形態では、RNA分子は、RNAバーコード領域をさらに含む。RNAバーコード領域は、(例えば、多重化の間に)RNA分子の混合物中の特定のRNA分子の識別を可能にする固有のバーコードである。RNAバーコード領域の位置は、様々であってもよいが、典型的には、RNA分子中に存在するカセットのうちの一つに隣接して見出される。いくつかの実施形態では、RNAバーコードは、RNA分子の任意の他の部分と相互作用しない、自己を含む構造に折り畳まれるように設計される。RNAバーコード領域の構造は、様々であり得る。いくつかの実施形態では、RNAバーコード領域の構造は、約1~約10塩基対(又は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10塩基対)を含む塩基対ヘリックスを含む。いくつかの実施形態では、RNAバーコード領域は、7塩基対を含む。いくつかの実施形態では、塩基対は、塩基対ヘリックスの末端塩基対に固定されたテトラループでキャップされる。塩基対ヘリックスをキャップすると、RNAバーコード領域の全体的なヘアピン安定性を維持する。いくつかの実施形態では、テトラループは、ヌクレオチド配列GNRAを含むが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、RNAバーコード領域は、任意の個々のバーコードが、別のバーコードとして誤って解釈される少なくとも2つの変異を受けると設計される。

20

【0145】

V. RNA分子の折り畳み

本開示の主題は、限定されないが、インビトロ転写を含む方法によって生成されるRNA分子、並びに細胞及びウイルス中で生成されるRNA分子を用いて実施され得る。いくつかの実施形態では、RNA分子は、ゲル電気泳動を変性させることによって精製され、生物学的に関連する立体配座を達成するために再生され得る。さらに、RNA分子を所望のpH(例えば、約pH8)で所望の立体配座に折り畳む任意の手順を置換することができる。まず、RNA分子を加熱し、低イオン強度緩衝液中で迅速冷却して、多量体形態を排除することができる。次いで、折り畳み溶液を添加して、RNA分子が適切な立体配座を達成し、求電子剤を用いた構造感受性プロービングのためにそれを調製することを可能にすることができる。いくつかの実施形態では、RNAは、単一の反応で折り畳まれ、その後で(+)及び(-)求電子剤反応に分離することができる。いくつかの実施形態では、RNA分子は、修飾前に自然には折り畳まれない。修飾は、RNA分子が熱条件及び/又は低塩条件によって変性されている間に行われ得る。

30

40

【0146】

VI. RNA分子修飾

求電子剤をRNAに添加して、柔軟性のあるヌクレオチド位置で2'-O-付加物を得ることができる。次いで、求電子剤の本質的にすべてが、RNAと反応するか、又は水による加水分解に起因して分解されるまで、反応物をインキュベートすることができる。特定のクエンチステップは必要とされない。修飾は、複合体リガンド及び生体分子の存在下、並びに様々な塩の存在下で行われ得る。RNAは、細胞及びウイルス内で同様に修飾されてもよい。これらの塩及び複合体リガンドは、マグネシウム、ナトリウム、マンガン、

50

鉄、及びノ又はコバルトの塩を含み得る。複合体リガンドとしては、限定されないが、タンパク質、脂質、他のRNA分子、DNA、又は小さな有機分子が挙げられ得る。いくつかの実施形態では、複合体リガンドは、本明細書に開示される小分子断片である。いくつかの実施形態では、複合体リガンドは、本明細書に開示される化合物である。修飾RNAは、例えば、エタノール沈殿によってプライマー伸長反応にとって有害であり得る反応生成物及び緩衝成分から精製され得る。

【0147】

VII. プライマー伸長及び重合

本開示の主題によるプライマー伸長によるRNA付加物の分析は、種々の実施形態では、最適化されたプライマー結合部位、熱安定性逆転写酵素、低MgCl₂濃度、高温、短い伸長時間、及び前述のいずれかの組み合わせの使用を含み得る。反応副生成物及び他の小分子汚染物質を含まない、無傷の分解していないRNAも、逆転写のためのテンプレートとして使用することができる。得られたRNA-cDNAハイブリッドのRNA成分は、塩基での処理によって分解することができる。次いで、cDNA断片を、例えば、ポリアクリルアミド配列決定ゲル、キャピラリー電気泳動、又は本開示のレビュー後に当業者に明らかになる他の分離技術を使用して分割することができる。

10

【0148】

デオキシリボヌクレオチド三リン酸dATP、dCTP、dGTP、及びdTTP及びノ又はデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)は、別々に、又はプライマーと共に、十分な量で合成混合物に添加することができ、得られた溶液を、約1~10分間かけて約50~100に加熱することができる。加熱時間の後、溶液を冷却することができる。いくつかの実施形態では、プライマー伸長反応をもたらすための適切な薬剤を、冷却した混合物に添加し、反応を当該技術分野で既知の条件下で生じさせることができる。いくつかの実施形態では、重合のための薬剤は、熱安定性である場合には、他の試薬と一緒に添加することができる。いくつかの実施形態では、合成(又は増幅)反応は、室温で生じ得る。いくつかの実施形態では、合成(又は増幅)反応は、重合のための薬剤が機能しなくなる温度まで生じ得る。

20

【0149】

重合のための薬剤は、例えば、酵素を含む、プライマー伸長産物の合成を達成するように機能する任意の化合物又は系であり得る。この目的のための好適な酵素としては、限定されないが、E. coli DNAポリメラーゼI、E. coli DNAポリメラーゼのKlenow断片、ポリメラーゼムテイン、逆転写酵素、並びに熱安定性酵素(すなわち、変性を引き起こすのに十分に高い温度にさらされた後にプライマー伸長を実施する酵素)、例えば、マウス若しくは鳥の逆転写酵素を含む他の酵素が挙げられる。好適な酵素は、ヌクレオチドの適切な方法での組み合わせを促進して、各多型遺伝子座核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物を形成することができる。いくつかの実施形態では、合成は、各プライマーの5'末端で開始し、合成がテンプレートの末端で終了するまで、3'方向に進むことができ、ジデオキシヌクレオチド三リン酸の組み込みによって、又は2'-O-付加物で、異なる長さの分子を生成することができる。

30

【0150】

新たに合成された鎖及びその相補的核酸鎖は、本明細書に記載されるハイブリダイゼーション条件下で二本鎖分子を形成することができ、このハイブリッドは、参照によりそれらの全体が本明細書に参照される米国特許第10,240,188号及び米国特許第8,318,424号に記載される開示された方法のように、後のステップで使用される。いくつかの実施形態では、新しく合成された二本鎖分子は、一本鎖分子を提供するための当該技術分野で既知の手順のいずれかを使用して、変性条件にさらすこともできる。

40

【0151】

VII. 生データの処理

RNA分子、化学修飾分析、及びノ又は核酸構造分析などの核酸のための本明細書に記載の主題は、コンピュータ可読媒体に具体化されたコンピュータ実行可能命令を含むコン

50

コンピュータプログラム製品を使用して実装することができる。本明細書に記載の主題を実装するのに好適な例示的なコンピュータ可読媒体としては、チップメモリデバイス、ディスクメモリデバイス、プログラマブルロジックデバイス、及び特定用途向け集積回路が挙げられる。加えて、本明細書に記載の主題を実装するコンピュータプログラム製品は、単一のデバイス又はコンピューティングプラットフォーム上に位置することができ、又は複数のデバイス又はコンピューティングプラットフォームにわたって分散され得る。したがって、本明細書に記載の主題は、コンピュータによって実行されたときに、RNA構造解析などの核酸のための特定の機能を発揮する、コンピュータ命令のセットを含み得る。

【0152】

上述の項目I~VIIを考慮して、モジュラーRNAスクリーニング構築物を、リガンド結合の読み出しのための高スループットアッセイとしてSHAPEを実装するように設計した(図1、上)。構築物は、その構造が破壊されたときにウイルス適合性を低下させる Deng ウイルスゲノムの5'UTRからのシュードノッド²⁶、及びTPPリボスイッチアプタマードメイン²⁷⁻²⁹などの2つの標的モチーフを含有するように設計された。単一の構築物に2つの異なる構造モチーフを含めることにより、各々が他方に対する内部特異性制御として機能することが可能となった。両方のRNA構造に結合する断片は、非特異的バインダーとして容易に識別された。これらの2つの構造は、2つのRNA構造が構造的に独立したまま保持されることを可能にするように、一本鎖であるように設計された6ヌクレオチドリンカーによって接続された。構築物の構造コアに隣接するのは、構造カセット²⁵であり、これらのステム-ループ形成領域は、スクリーニングワークフローで必要とされるステップのためのプライマー結合部位として使用され、構築物中の他の構造と相互作用しないように設計された(図6A)。

【0153】

スクリーニング構築物の別の構成要素は、RNAバーコードであり、バーコード化することで、下流のワークロードを実質的に低減する多重化を可能にする。断片ライブラリをスクリーニングするために使用される96ウェルプレート中の各ウェルは、それ以外は同一の構築物の観点で固有のバーコードを有するRNAを含有し、したがって、バーコード配列は、ウェル位置と、多重化後に存在する断片(又は複数の断片)とを識別する(図1)。RNAバーコード領域は、構築物の任意の他の部分と相互作用しない、自己を含む構造に折り畳まれるように設計された。バーコード構造は、GNRAテトラループでキャップされ、ヘアピンの安定性を維持するためにG-C塩基対で固定された、7塩基対のヘリックスである(図6B)。96個のバーコードの各セットは、任意の個々のバーコードが、別のバーコードとして誤って解釈される2つ以上の変異を受けるように設計された。

【0154】

この構築物は、リガンド結合をスクリーニングするためのRNA構造を選択する際の柔軟性を提供し、単純で直接的なスクリーニング実験を補助する(図1)。固有のRNAバーコードを有するそれ以外は同一のRNA構築物を含有する96ウェルプレート中の各ウェルを、1つ又は数個の小分子断片又は断片なしの対照(溶媒)でインキュベートし、次いで、SHAPE試薬に曝露する。得られたSHAPE付加物は、ヌクレオチド当たりの構造情報を化学的にコードする。SHAPEプロービングの後、断片同一性(RNAバーコード)及び断片結合(SHAPE付加物パターン)を決定するために必要な情報が各RNA鎖に永久的にコードされるため、プレートの96ウェルからのRNAを単一の試料にプールのすることができる。断片スクリーニング実験は、標準的なMaP構造プロービングワークフロー²⁴と非常に類似した方法で処理される。例えば、いくつかの実施形態では、特殊な緩和された忠実度逆転写反応を使用して、RNA上の任意のSHAPE付加物の位置に、非テンプレートコード配列の変化を含有するcDNAを作製する³⁰。次いで、これらのcDNAを使用して、高スループット配列決定のためのDNAライブラリを調製する。実験の複数のプレートを、DNAライブラリレベルでバーコード化し²⁴、単一の配列決定の試行において数千の化合物に関するデータを集めることができる(図1)。得られた配列決定データは、各々が特定のRNA鎖に対応する、数百万の個々のリードを含

10

20

30

40

50

有する。これらのリードは、バーコードによってソートされ、各々の小分子断片又は断片の組み合わせについてのデータの分析を可能にする。SHAPE及び/又はSHAPE-MaPなどの上述の方法を使用する小分子断片（例えば、断片1及び/又は断片2）の決定及び識別は、次のセクションでより詳細に説明される。

【0155】

C. リガンドの識別及び選択

上述のように、SHAPE及びSHAPE-MaPを使用して、目的のRNA分子に結合する、又は目的のRNA分子と会合する小分子断片を識別した。特にSHAPE-MaPを使用して小分子断片を試験する場合、1ヌクレオチド当たりのSHAPE-MaP変異率からの結合した断片シグネチャの検出は、大きな実験スクリーニングにわたってデータを正規化し、統計的厳密性を確保する複数のステップを伴う。SHAPEに基づくヒット分析戦略の鍵となる特徴は、(i)各断片に曝露したRNA、若しくは「実験試料」を、5つの陰性の断片に曝露していない対照試料と比較して、プレート間の変動性及びウェル間の変動性を説明すること、(ii)構築物中の2つの構造モチーフ、本開示ではシュードノット及びTPPリボスイッチの各々について独立して実施されるヒット検出、(iii)個々のヌクレオチドが、断片によって誘発される変化を示す可能性が低いため、すべての試料にわたって低い反応性を有する個々のヌクレオチドのマスキング、並びに(iv)断片に曝露した実験試料と、断片に曝露していない陰性対照試料との間の変異率のヌクレオチド当たりの差の計算を伴う。Zスコア分析のために、モチーフの1つと、断片を含まない対照との間の変異率の差が20%以上であるこれらのヌクレオチドを選択した。しかしながら、当業者であれば、変異率の差が変化し得ることを認識して、それに応じて変異率の差を調整することができるであろう。例えば、いくつかの実施形態では、変異率の差は、25%、30%、35%、45%、又は50%、又はそれより大きくてもよい。いくつかの実施形態では、変異率の差は、15%、10%、5%、又はそれより小さくてもよい。2つのモチーフのうちの一つにおける3つ以上のヌクレオチドが、2.7より大きなZ値を有する（2つのモチーフについてのPoisson数の比較31によって決定されるような、実施例2を参照）場合に、断片は、SHAPE反応性パターンを有意に変化させたと決定された。しかしながら、Z値は変化してもよく、当業者はそれに応じて調整することができるであろう。例えば、いくつかの実施形態では、Z値は、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、又は3.9より大きい。いくつかの実施形態では、Z値は、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、又は2.6より大きい。

【0156】

その後一緒に連結して本明細書に開示される化合物を生成するSHAPE及び/又はSHAPE-MaPを有する小分子断片を識別するために、一連のステップを実行する。まず、一次スクリーニングを実行し、多数の化合物（例えば、少なくとも100個の化合物）をスクリーニングして、標的RNA分子に対して好適な結合活性を示す任意の初期リード又はヒット化合物を識別する。ステップ2では、次いで、これらのヒット化合物を、構造-活性関係(SAR)試験でさらに調べ、標的RNAの結合親和性の変化を、修飾されるヒット化合物の構造として決定する。複数の小分子断片が、標的RNA分子に好適な結合リガンドであると識別される場合、追加の結合試験を実行し、各小分子断片についての結合部位をさらに調べてもよい（すなわち、ステップ3）。例えば、いくつかの実施形態では、標的RNAを、第1の断片（ステップ2において、SAR試験に従って標的RNA結合リガンドとして識別された）と共にプレインキュベートした後、標的RNAを、第2の断片（これもステップ2のSAR試験においてRNA結合リガンドとして識別された）に曝露して、第1の断片が既に結合しているときに、第2の断片が標的RNAに結合することができるかどうかを識別することができる。目的のRNAに対して好適な結合活性を有する第2の断片が識別されたら、第2の断片をリンカーを用いて第1の断片に連結して、本明細書に開示されるような化合物にすることができる（すなわち、ステップ4）。

上述の各ステップは、以下でより詳細に説明される。

【 0 1 5 7 】

ステップ 1 : 一次スクリーニング

一次スクリーニングでは、1,500個の断片が試験され、41個の断片がヒットとして検出され、初期ヒット率は2.7%であった。3複製物のSHAPE分析によりヒットの検証を実施し(図2、図7)、3複製物すべてにおいてバインダーとして検出された場合にのみ、化合物が真のヒットとして受け入れられた。次いで、これらの複製物のヒット化合物を、等温滴定カロリメトリー(ITC)によって分析し、標的モチーフにちょうど対応する(スクリーニング構築物中の隣接配列を省く)RNAに対する結合親和性を決定した。これらの初期ヒットのうち、複製物分析及びITCによって、8ヒットが検証された(表1)。ヒットのうちの7つが、試験構築物のTPPリボスイッチ領域内に大部分又は完全に局在化するそれらの変異シグネチャに基づいて、TPPリボスイッチに結合した。残りのヒットは、この断片がRNA構築物のすべての部分にわたってヌクレオチドに影響を及ぼしたため、非特異的であった。試験構築物の Dengue シュードノット領域に特異的に結合する化合物は検出されなかった。

10

20

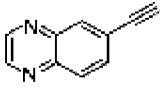
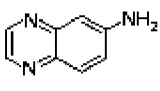
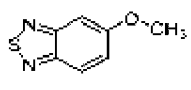
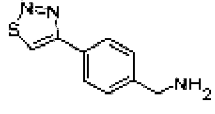
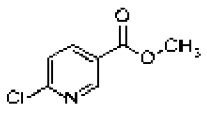
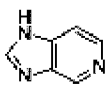
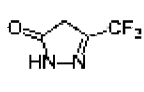
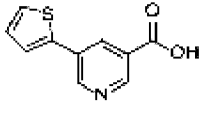
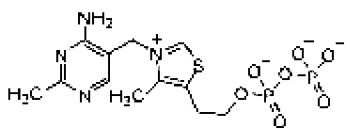
30

40

50

【表 1】

表 1. SHAPEプロベイングによって検出されるような、TPPリボスイッチに結合する断片

構造	ID	K_d (μM)
	1	11 ± 0.2
	2	$25 \pm 6^\ddagger$
	3	95 ± 3
	4	220 ± 10
	5	$265 \pm 80^\ddagger$
	6	650 ± 100
	7	不溶性
	8	不溶性
	9	0.028 ± 0.002

10

20

30

40

【0158】

SHAPE構造プロベイングによってヒットが検出され、それを複製物分析及びITCによって検証した。解離定数は、ITCによって決定され、 \ddagger でマークされた誤差値は、3複製物以上に由来する標準誤差を示し、他の誤差推定値は、結合曲線の最小二乗回帰の95%信頼区間に基づいて計算される。比較のために、天然のTPPリガンドが含まれる。

【0159】

ITCによって検証されるように、TPPリボスイッチに結合した7つの断片は、多様な化学型を有し、ほとんどの断片は、天然のTPPリガンドとの類似性をほとんど有しないか、又は全く有しない(表1)。全体的に、ヘテロ芳香族窒素を含有する環が優勢であ

50

り、これらが水素結合相互作用に關与している可能性が高い。3つの化合物は、ピリジン環を有しており、2つはピラジン環を有している。アゾール環部分は、2つのチアジアゾール及び1つのイミダゾールの3つの化合物中に存在している。天然のTPPリガンド中にチアゾール環が存在するが、この部分は、RNAとの結合相互作用に關与しない²⁸、²⁹、³³。加えて、多数の識別された断片は、水素結合受容体又は供与体として機能し得る一級アミン、エステル及びエーテル、並びにフッ素基を含有する。

【0160】

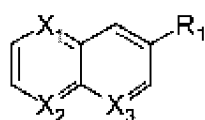
ステップ2：リボスイッチ結合断片の構造 - 活性関係 (SAR)

次に、結合親和性を増加させ、結合を妨げることなく断片ヒットがリンカーで修飾され得る位置を識別することを目的に、初期ヒットのいくつかの類似体を調べた。特に、化合物2及び5の類似体は、これら2つの断片が構造的に異なっており、類似体が市販されているため、検討された。ITCによって、類似体 - RNA結合を評価した。2の16の類似体を試験した。一方又は両方の環窒素を除去することによって、2のコアキノキサリン構造を変化させることにより、結合活性が変化した(表2A)。

10

【表2A】

表2A. 断片2類似体のSAR



20

分子	R ₁	X ₁ , X ₂ , X ₃	K _d (μM)
2		N, N, C	25
10		N, C, C	3500
11		C, N, C	2100
12		C, C, C	結合しない
13	H	N, N, N	354
14	H	N, N, C	120

30

【0161】

キノキサリンコアに対する修飾を調べ、解離定数をITCによって得た。

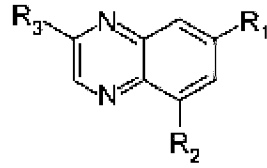
【0162】

結合親和性の改善は、メチレン連結水素結合供与体又は受容体の導入によってもたらされた(表2B、化合物16及び17)。キノキサリン環コア上の他の位置の置換基を変化させることにより、結合活性が低下した。化合物2は、C-6位置での置換基の修飾時に観察された、高度な柔軟性、及び結合のさらなる改善に基づいて、さらなる開発のための良好な候補であった。

40

【表 2 B】

表 2 B. TPP リボスイッチ RNA に対する断片 2 の類似体の結合についての構造-活性関係。キノキサリンコアのペンダント基に対する修飾。解離定数を ITC によって得た。



分子	R ₁	R ₂	R ₃	K _d (μM)
15		H	H	18
16		H	H	12
17		H	H	5.0
18		H	H	35
19		H	H	58
20		H	H	33
21	H		H	75
22	H		H	286
23	H		H	220
24	H	H		379
25	H	H		600

10

20

30

【0163】

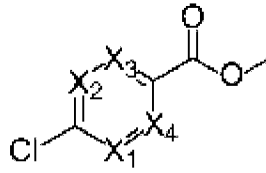
次に、断片 5 の 18 個の類似体を調べたところ、環窒素位置を変更すること、環窒素を付加する若しくは除去することがすべて、結合を低下させるか、又は結合を無効にするため、分子のコアピリジン官能性が結合にとって重要であるようであることを示唆していた (表 3)。

40

50

【表 3】

表 3. TPPリボスイッチRNAに対する断片5の類似体の結合についての構造-活性関係。ピリジンコアに対する修飾及び解離定数をITCによって得た。



分子	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄	K _d (μM)
6	N, C, C, C	265
S1	C, C, C, N	490
S2	N, N, C, C	420
S3	N, C, N, C	1200
S4	C, C, C, C	結合しない

10

20

【0164】

環置換基に対する修飾は、一般に、結合活性を著しく消失させた(表4)。唯一の親和性を増加させる類似体は、C-4位置の塩素を特徴としており(S12)、断片5よりもTPPリボスイッチに対して約3倍高い親和性を有する化合物が得られた。

30

40

50

【表 4】

表 4. TPPリボスイッチRNAに対する断片 5 の類似体の結合についての構造-活性関係。ピリジンコアのペンダント基に対する修飾。解離定数を ITC によって得た。

分子	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	K _d (μM)
S5		H	H		440
S6		H	H		390
S7		H	H		1800
S8		H	H		1100
S9		H	H		結合しない
S10		H	H		結合しない
S11			H		820
S12		H			93
S13		H	H		600
S14		H	H		1300
S15		H	H		1800
S16		H	H		1300
S17		H	H		結合しない
S18		H	H		結合しない

【0165】

ステップ 3 : TPPリボスイッチ上の第 2 の部位に結合する断片の識別

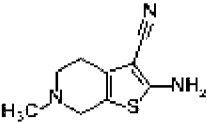
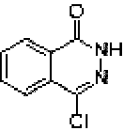
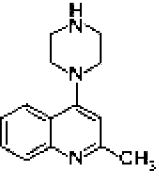
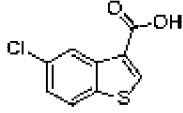
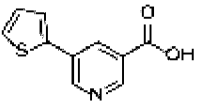
第 2 のラウンドのスクリーニングを用いて、化合物 2 又は S 1 2 に予め結合したスクリーニング構築物の TPPリボスイッチ領域に結合した断片を識別した。このスクリーニングは、協働性効果に起因して、又は新しい態様の結合が、一次リガンド結合時に生じる構造変化に起因して利用可能になるため、2 又は S 1 2 が既に結合しているときに TPPリボスイッチと優先的に相互作用する断片を識別した (図 4)。スクリーニングした 1, 500 個の断片のうち、5 個は、2 又は S 1 2 のいずれかと同時に結合することが検証された (表 5)。

40

50

【表 5】

表 5. SHAPE によって検出されるように、予め結合した断片パートナーの存在下で TPP リボスイッチに結合する断片。ヒットを、複製物 SHAPE 分析によって検証した。一次結合パートナー (2, 6) を表 1 に示す。

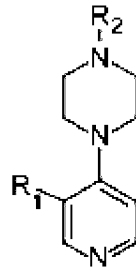
一次パートナー	ID	構造	
2	26		10
2	27		
2	28		20
6, 2	29		
6	30		30

【0166】

1つの第2のスクリーニングヒット29は、SHAPE 反応性シグナルにおける非常に安定した変化を誘発し、P1ヘリックスのアンフォールディングを含め、RNA構造のかなりの変化を引き起こすようであった。この断片は、非特異的相互作用と一致するRNAの他の領域の変化を引き起こしたため、この断片は、断片連結の候補としてさらに検討されなかった。断片28は、ITC分析に必要な濃度では不溶性であったため、キノリン環の代わりにピリジンを含む関連類似体をITCによって調べた(表6)。これらの化合物は、弱い親和性で結合したが、それにもかかわらず、31及び32は、2と明確ではあるが弱い結合協働性を示した。

【表 6】

表 6. 予め結合した断片 2 の存在下及び非存在下での T P P リボスイッチ R N A に対する断片 2 8 の類似体の結合についての構造-活性関係。*



10

分子			K_d (mM)		
	R_1	R_2	予め結合した 5	リガンド結合なし	
31	H	H	3	>10	
32		H	4	>10	20
33	H		und	>10	
34		H	und	>10	
28		H	不溶性	不溶性	30

* I T C 結合曲線にフィッティングすることができないことに起因して、u n d (決定されない)、不溶性、I T C に必要な濃度で不溶性な化合物。



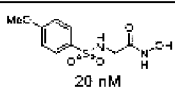


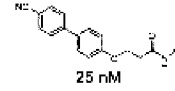


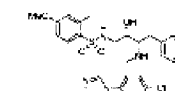


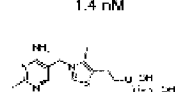


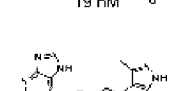


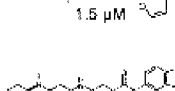


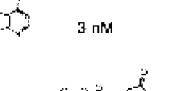
* I T C 結合曲線にフィッティングすることができないことに起因して、u n d (決定されない)、不溶性、I T C に必要な濃度で不溶性な化合物。

40

50

【表 7】

表 7. 断片に基づく方法によって開発された、代表的なタンパク質及び RNA 断片-リンカー-断片リガンドの詳細な比較。RNA の例は、アスタリスクで強調されている。各エントリは、2 つの構成要素の断片及びそれらの個々の K_d 値、連結される化合物及びその対応する K_d 値、並びに連結される化合物についてのリガンド効率 (LE) 及び連結係数 (E) を詳細に示す^{22, 38, 53, 54, 45~52}。

断片 1 K_d (μ M)	断片 2 K_d (μ M)	連結される化合物 K_d (μ M)	LE	E	参照
 6.2 mM	 1.5 mM	 20 nM	0.62	0.0021	[N]
 17 mM	 20 μ M	 25 nM	0.49	0.06	[N]
 330 μ M	 12 μ M	 1.4 nM	0.30	0.35	[N]
 11 μ M	 3 mM	 19 nM	0.40	0.60	[N] *
 1.5 mM	 1 mM	 1.5 μ M	0.31	1.0	[N]
 240 μ M	 9.0 μ M	 3 nM	0.40	1.4	[N]
 1 mM	 1.1 mM	 1.8 μ M	0.26	1.6	[N]



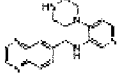
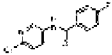
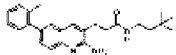
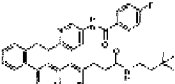


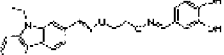

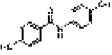
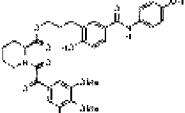

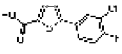
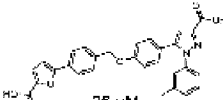
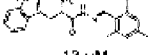
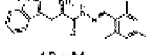

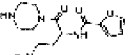
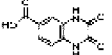
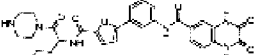
10

20

30

40

50

 25 μM	 >10 mM	 625 nM	0.34	2.5	[N] *	
 114 μM	 140 nM	 400 μM	0.28	25	[N]	
 40 μM	 41 μM	 64 nM	0.32	39	[N]	10
 2 μM	 100 μM	 3 μM - 49 nM	0.22	250	[N]	
 150 μM	 580 μM	 26 μM	0.17	300	[N]	
 13 μM	 13 μM	 54 nM	0.25	330	[N]	20
 >100 μM	 >100 μM	 6.5 μM	0.17	650	[N] *	

【 0 1 6 7 】

ステップ 4 : 協働性及び断片連結

2 と 3 1 との間の協働性結合相互作用を I T C によって定量化した。個々に、2 は、25 μM の K_d で結合し、3 1 は、はるかに高い 10 mM の K_d で結合した。二次スクリーニングと同様に、断片 3 1 の親和性も、2 が T P P リボスイッチ R N A と予め結合しており、2 - R N A 複合体を形成する場合に調べた。これらの条件下で、断片 3 1 は、約 3 mM の K_d で 2 - T P P R N A 複合体に結合した (図 4)。この実験はまた、2 による結合が飽和している場合、3 1 が T P P R N A に結合することも示しており、このことは、これら 2 つの断片が同じ位置に結合しないことを暗示している。2 及び 3 1 が、T P P R N A の異なる領域に対してそれぞれ優れた妥当な親和性で結合したため、この 2 つの断片は、高親和性リガンドを作成することを目的に連結された。

【 0 1 6 8 】

そのような類似体として、いくつかの S A R 断片の種々の連結した類似体に加えて、以下の表に示されるように、K W - 2 9 - 1 を調製した。

10

20

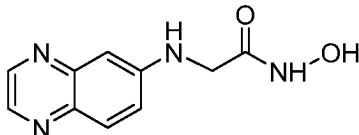
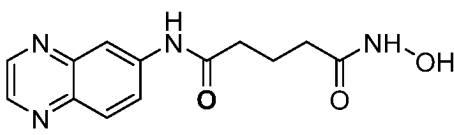
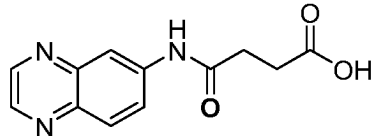
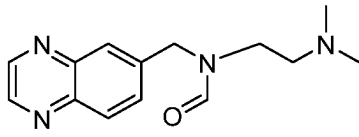
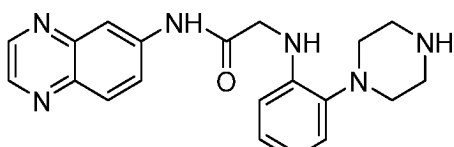
30

40

50

【表 8】

表 8. 連結した類似体

番号	化合物	Kd(μM)
KW-31-1		58.1
KW-5-1		477
KW-16-1		653
KW-79-1		69.1
KW-29-1		10.5

10

20

【0169】

当業者は、上のステップ I ~ IV が限定することを意味しておらず、単に例示的な実施形態として機能することを理解するであろう。当業者は、上述のステップ I ~ IV を適用して、一緒に連結して、TPP リボスイッチに対して好適な結合親和性を有する本明細書に開示される化合物にすることができる代替の断片を識別することができることが十分に理解されるであろう。さらに、当業者は、上述のステップ I ~ IV を適用して、一緒に連結して、目的の他の RNA 分子に結合する本明細書に開示される化合物にすることができる断片を識別することができることが十分に理解されるであろう。

30

【0170】

D. まとめ、及び追加の考慮事項

コード (mRNA) 及び非コード RNA の両方を潜在的に操作して、細胞調節及び疾患の経過を変化させることができるため、構造化 RNA の小分子リガンドを識別するための効率的な戦略を開発することが求められた。本明細書に開示される研究は、断片に基づく戦略と融合させた RNA に対するリガンド結合を検出する SHAPE スクリーニング読み出しを使用することの有望性を実証する。ここで、この戦略を使用して、10.5 ~ 653 μM の範囲の K_d で、天然リガンドとは構造的に無関係な TPP リボスイッチに結合する様々なリガンドを生成した。融合した SHAPE 及び断片に基づくスクリーニングのアプローチは、標的化され得る RNA 構造及び開発され得るリガンド化学型の両方に対して一般的である。この戦略は、複雑な構造を有する RNA のリガンドを発見するのに十分に適しており、これは、三次元ポケット中で結合する RNA モチーフを識別するのに不可欠であり得る⁴。加えて、MaP アプローチの使用及び RNA 及び DNA バーコード化の両方による多重化の適用に起因して、1000 を超えるメンバーの断片ライブラリをスクリーニングするのに必要な労力は少なめであり、多くの構造的に異なる標的の効率的なスクリーニングを可能にする。

40

50

【0171】

得られたリガンドの多くは、同様にTPPリボスイッチについて実施した1回のラウンドのスクリーニングについて既に報告されたものと同様であった^{15、17}。一次スクリーニングにおけるヒットは、より高い親和性の方にわずかに偏っているように思われ、その結果、SHAPEによって検出されたリガンドの大部分が、10~1,000 μMの範囲で結合した。使用されるヒット検出アッセイは、最も緊密な断片バインダー、及びSHAPE反応性において最も実質的な変化を誘発するバインダーの検出の方に偏っている可能性が高い。より低い親和性の断片は、見逃された可能性が高い。この緊密な結合断片に対する偏りが、全体的に利点であると考えられている。上述のスクリーニング基準を満たすために必要な親和性及び特異性に達した Deng シュードノットに結合した断片は、識別されなかった。Deng シュードノット RNA は、高度に構造化されており、ある断片がこの構造を乱す可能性は、低い可能性がある。別の可能性は、この特定のシュードノット構造が、リガンド結合可能なポケットを含有していないかもしれないことである。

10

【0172】

一次スクリーニングからの断片ヒットがRNAに予め結合され、追加の断片結合パートナーについてスクリーニングされた断片対識別戦略は、具体的には、SHAPEによって得ることができるヌクレオチド当たりの情報を活用し、これを首尾良く使用して、誘発された適合断片対を発見することであった。断片に基づくリガンド開発の核となる信条は、2つの断片間の協働性を、近接した結合によって達成することができることと、この相加的な結合を、この協働性の断片を最小限の侵襲性の共有結合性リンカーを用いて一緒に連結することによって利用することができることである^{20、21、36、37}。一次断片ヒット及び二次断片ヒットからの様々な連結した化合物の開発は、断片に基づくリガンド発見が、RNA標的に効率的に適用され得ることを示す。そのような化合物の開発の成功は、表8の化合物によって示されるように、断片間の協働性の程度、又はマイクロモル濃度未満のリガンドを効率的に開発するためのこれらを接続する共有結合性リンカーの構築のいずれかにおいて完璧を達成することが必要ではないことを明らかにしている。

20

【0173】

E. 組成物

本開示の化合物は、薬学的に許容される担体と共に、薬学的組成物に製剤化され得る。

【0174】

本明細書に開示される化合物は、薬学的組成物として標準的な医薬慣行に従って製剤化され得る。この態様によれば、薬学的に許容される希釈剤又は担体と関連して、本明細書に開示される化合物を含む薬学的組成物が提供される。

30

【0175】

典型的な製剤は、本明細書に開示される化合物と、担体、希釈剤、又は賦形剤とを混合することによって調製される。好適な担体、希釈剤及び賦形剤は、当業者に周知であり、炭水化物、ワックス、水溶性ポリマー及び/又は膨潤性ポリマー、親水性又は疎水性材料、ゼラチン、油、溶媒、水などの材料を含む。使用される特定の担体、希釈剤又は賦形剤は、化合物が適用される手段及び目的に依存する。溶媒は、一般に、哺乳動物に投与される、安全である(GRAS)として当業者に認識される溶媒に基づいて選択される。一般に、安全な溶媒は、水及び水に可溶性又は混和性である他の非毒性溶媒などの非毒性水性溶媒である。好適な水性溶媒としては、水、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール(例えば、PEG 400、PEG 300)など、及びそれらの混合物が挙げられる。製剤はまた、薬物(すなわち、本明細書に開示される化合物又はその薬学的組成物)の上品な提示を提供するか、又は薬剤製品(すなわち、医薬)の製造を補助するために、1つ以上の緩衝液、安定化剤、界面活性剤、湿潤剤、潤滑剤、乳化剤、懸濁剤、防腐剤、抗酸化剤、不透明化剤、滑剤、加工助剤、着色剤、甘味剤、芳香剤、香味剤、及び他の既知の添加剤を含み得る。

40

【0176】

製剤は、従来の溶解及び混合手順を使用して調製され得る。例えば、バルク原薬物質(

50

すなわち、本明細書に開示される化合物又は化合物の安定化形態（例えば、シクロデキストリン誘導体又は他の既知の複合体化剤との複合体）は、上述の賦形剤のうちの1つ以上の存在下で好適な溶媒中に溶解される。化合物は、典型的には、薬物の容易に制御可能な投薬量を提供し、処方されたレジメンに対する患者のコンプライアンスを可能にするために、薬学的剤形に製剤化される。

【0177】

適用のための薬学的組成物（又は製剤）は、薬物を投与するために使用される方法に応じて、様々な様式で包装され得る。一般に、分配のための物品は、医薬製剤を適切な形態でその中に堆積させた容器を含む。好適な容器は、当業者に周知であり、ボトル（プラスチック及びガラス）、小袋、アンプル、プラスチックバッグ、金属シリンダなどの材料を含む。容器はまた、パッケージの内容物への不注意なアクセスを防止するための不正開封防止アセンブリを含んでもよい。加えて、容器には、容器の内容物を記載したラベルが貼られている。ラベルは、適切な警告も含んでいてもよい。

10

【0178】

薬学的製剤は、様々な経路及び種類の投与のために調製されてもよい。例えば、所望の純度を有する本明細書に開示される化合物は、凍結乾燥製剤、粉碎された粉末、又は水溶液の形態で、薬学的に許容される希釈剤、担体、賦形剤、又は安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.）と任意選択で混合されてもよい。製剤化は、適切なpHで、所望の純度で、周囲温度で、生理学的に許容される担体（すなわち、使用される投薬量及び濃度でレシピエントに対して非毒性である担体）と混合することによって実施され得る。製剤のpHは、主に特定の使用及び化合物の濃度に依存するが、約3～約8の範囲であってもよい。pH5の酢酸緩衝液中の製剤は、好適な実施形態である。

20

【0179】

化合物は、滅菌され得る。特に、インビボ投与に使用される製剤は、滅菌されているべきである。このような滅菌は、滅菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。

【0180】

化合物は、通常、固体組成物、凍結乾燥製剤として、又は水溶液として保存することができる。

30

【0181】

本明細書に開示される化合物を含む薬学的組成物は、良好な医療行為と一致する様式、すなわち、量、濃度、スケジュール、経路、ピヒクル、及び投与経路で製剤化され、投薬され、投与され得る。この関連での考慮すべき因子には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与のスケジュール、及び医師に既知の他の因子が含まれる。投与される化合物の「治療有効量」は、そのような考慮事項によって管理され、凝固因子媒介性障害を予防するか、改善するか、又は治療するために必要な最小量である。かかる量は、好ましくは、宿主に対して毒性であるか、又は宿主が顕著に出血しやすくなる量を下回る。

【0182】

許容される希釈剤、担体、賦形剤、及び安定剤は、使用される投薬量及び濃度ではレシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸を含む緩衝液、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化物質、防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸、単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、

40

50

若しくはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTAなどのキレート化剤、スクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトールなどの糖類、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）、並びにノ又はTWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）若しくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。活性医薬成分はまた、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）に、又はマクロエマルジョンに、例えば、コアセルベーション技術により、又は界面重合により調製されたマイクロエマルジョン、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセルに封入されてもよい。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0183】

化合物の徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の好適な例としては、本明細書に開示される化合物を含有する固体疎水性ポリマーの半透明性マトリックスが挙げられ、マトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸及びガンマ-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性ビニレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOSIT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、並びにポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0184】

製剤には、本明細書に詳述される投与経路に好適なものが含まれる。製剤は、簡便には、単位剤形で提示されてもよく、薬学の分野で周知の方法のいずれかによって調製され得る。技術及び製剤は、一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.)に見出される。そのような方法としては、活性成分を、1つ以上の付属成分を構成する担体と会合させるステップが挙げられる。一般に、製剤は、活性成分を、液体担体又は微細に分割された固体担体、又はその両方と均一かつ密接に会合させ、次いで必要に応じて、製品を成形することによって調製される。

【0185】

経口投与に好適な本明細書に開示される化合物の製剤は、各々が所定量の化合物を含有する丸薬、カプセル、カシェ剤、又は錠剤などの個別の単位として調製され得る。

【0186】

圧縮錠剤は、任意選択でバインダー、潤滑剤、不活性希釈剤、防腐剤、表面活性剤又は分散剤と混合した、粉末又は顆粒などの自由に流動する形態で活性成分を好適な機械で圧縮することによって調製され得る。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末状活性成分の混合物を好適な機械で成形することによって作製され得る。錠剤は、任意選択で、コーティングされてもよく、又は分割錠化されてもよく、任意選択で、その錠剤から活性成分をゆっくりとした放出、又は制御放出を提供するように製剤化される。

【0187】

錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性又は油性懸濁液、分散性粉末又は顆粒、エマルジョン、ハードカプセル又はソフトカプセル、例えば、ゼラチンカプセル、シロップ、又はリキシル剤は、経口使用のために調製され得る。経口使用を意図した本明細書に開示される化合物の製剤は、薬学的組成物の製造のための当該技術分野に既知の任意の方法に従って調製されてもよく、かかる組成物は、口当たりの良い調製物を提供するために、甘味剤、香味剤、着色剤、及び保存剤を含む1つ以上の薬剤を含有し得る。錠剤の製造に適した、非毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物中に活性成分を含有する錠剤は許容される。

これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム若しくはナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム若しくはナトリウム、造粒剤及び崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン、若しくはアルギン酸、結合剤、例えば、デンプン、ゼラチン若しくはアカシア、及び潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸若しくはタルクであり得る。錠剤は、コーティングされていなくてもよく、又はマイクロカプセル化を含む既知の技術によってコーティングされ、胃腸管内の崩壊及び吸着を遅延させ、それによって、より長い期間にわたって持続的な作用を提供してもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリルのような時間遅延材料を、単独で、又はワックスと共に用いてもよい。

【0188】

10

眼又は他の外部組織、例えば、口及び皮膚の治療のために、製剤は、例えば、0.075 ~ 20重量/重量%の量で、活性成分を含有する局所軟膏又はクリームとして適用されてもよい。軟膏で製剤化される場合、活性成分は、パラフィン又は水混和性軟膏基剤のいずれかと共に用いられ得る。代替的に、活性成分は、水中油性クリーム基剤を有するクリームで製剤化されてもよい。

【0189】

所望な場合、クリーム基剤の水相は、多価アルコール、すなわち、プロピレングリコール、ブタン1,3-ジオール、マンニトール、ソルビトール、グリセロール及びポリエチレングリコール(PEG400を含む)などの2個以上のヒドロキシル基を有するアルコール、並びにそれらの混合物を含み得る。局所製剤は、皮膚又は他の患部を通る活性成分の吸収又は浸透を増強する化合物を含むことが望ましい場合がある。かかる皮膚浸透増強剤の例としては、ジメチルスルホキシド及び関連する類似体が挙げられる。

20

【0190】

エマルションの油性相は、公知の方法で公知の成分から構成され得る。相は、乳化剤のみを含んでもよいが、少なくとも1つの乳化剤と脂肪若しくは油、又は脂肪と油の両方の混合物を含んでもよい。親油性乳化剤と共に含まれる親水性乳化剤は、安定剤として機能し得る。合わせて、安定剤の有無にかかわらず、乳化剤は、いわゆる乳化ワックスを構成し、ワックスは、油及び脂肪と共に、クリーム製剤の油性分散相を形成するいわゆる乳化軟膏基剤を構成する。製剤に使用するのに好適な乳化剤及び乳剤安定剤としては、Tween(登録商標)60、Span(登録商標)80、セトステアリルアルコール、ベンジルアルコール、ミリスチルアルコール、モノステアリン酸グリセリル及びラウリル硫酸ナトリウムが挙げられる。

30

【0191】

化合物の水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤との混合物中に活性材料を含有する。そのような賦形剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、クロスカルメロース、ポビドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム及びアカシアガムなどの懸濁剤、並びに天然に存在するホスファチド(例えばレシチン)などの分散剤又は湿潤剤、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物(例えばポリオキシエチレンステアレート)、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物(例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール)、エチレンオキシドと脂肪酸に由来する部分エステル及びヘキシトール無水物との縮合生成物(例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート)が挙げられる。水性懸濁液はまた、1つ以上の防腐剤、例えば、エチル又はn-プロピルp-ヒドロキシベンゾエート、1つ以上の着色剤、1つ以上の香味剤、及び1つ以上の甘味剤、例えば、スクロース又はサッカリンを含有してもよい。

40

【0192】

化合物の薬学的組成物は、滅菌注射用水性又は油性懸濁液などの滅菌注射用調製物の形態であってもよい。この懸濁液は、上述したこれらの好適な分散剤又は湿潤剤並びに懸濁剤を使用して、既知の技術に従って製剤化され得る。滅菌注射用調製物はまた、1,3-ブタンジオールなどの非毒性の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒中の滅菌注射用溶液

50

又は懸濁液であってもよい。滅菌注射用調製物はまた、凍結乾燥粉末として調製され得る。使用され得る許容されるピヒクル及び溶媒の中には、水、リンゲル溶液及び等張塩化ナトリウム溶液がある。加えて、滅菌固定油は、溶媒又は懸濁媒体として慣例的に用いられ得る。この目的のために、合成モノグリセリド又はジグリセリドを含む任意のブランドの固定油が、用いられ得る。加えて、オレイン酸などの脂肪酸も同様に注射剤の調製に使用され得る。

【0193】

単一の剤形を生成するために担体材料と組み合わせてもよい活性成分の量は、治療される宿主及び特定の投与様式に応じて変化する。例えば、ヒトへの経口投与を意図する時間放出型製剤は、全組成物の約5～約95%（重量：重量）まで変動し得る適切かつ簡便な量の担体材料と混合した約1～1000mgの活性材料を含有し得る。薬学的組成物は、投与のために容易に測定可能な量を提供するように調製され得る。例えば、静脈内注入を目的とした水溶液は、約10mL/時間～約50mL/時間の速度での好適な体積の注入が生じ得るように、溶液1ミリリットル当たり約1～500µgの活性成分を含有し得る。

10

【0194】

非経口投与に適した製剤には、水性及び非水性の滅菌注射液があり、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤を意図するレシピエントの血液と等張にする溶質を含むことができ；及び水性及び非水性の滅菌懸濁液があり、懸濁剤及び増粘剤を含むこともできる。

【0195】

眼への局所投与に好適な製剤には、活性成分が好適な担体、特に活性成分のための水性溶媒に溶解又は懸濁される点眼剤も含まれる。活性成分は、好ましくは、そのような製剤中に、約0.5～20重量/重量%、例えば、約0.5～10重量/重量%、例えば、約1.5重量/重量%の濃度で存在する。

20

【0196】

口腔内の局所投与に好適な製剤としては、香味ベースの通常はスクロース及びアカシア若しくはトラガカント中に活性成分を含むロゼンジ錠、不活性ベースで例えばゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシア中に活性成分を含む香錠、並びに好適な液体担体中に活性成分を含むマウスウォッシュが挙げられる。

【0197】

直腸投与のための製剤は、例えば、カカオバター又はサリチレートを含む好適な塩基を有する座薬として提示されてもよい。

30

【0198】

肺内投与又は経鼻投与に好適な製剤は、例えば、0.1～500ミクロンの範囲の粒径（0.5、1、30ミクロン、35ミクロンなどのミクロンずつ増分した0.1～500ミクロンの範囲の粒径を含む）を有し、経鼻経路を通しての急速な吸入によって、又は肺胞嚢に到達するように、口腔を通しての吸入によって投与される。好適な製剤としては、活性成分の水溶液又は油性溶液が挙げられる。エアロゾル又は乾燥粉末投与に好適な製剤は、従来の方法に従って調製されてもよく、以下に記載される治療又は予防障害においてこれまで使用されてきた化合物などの他の治療剤と共に送達され得る。

40

【0199】

腔投与に好適な製剤は、活性成分に加えて、適切であることが当該技術分野で知られているような担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、又はスプレー製剤として提示され得る。

【0200】

製剤は、単位用量又は複数用量の容器、例えば、密封されたアンプル及びバイアルに包装されてもよく、使用直前に注射するために滅菌液体担体、例えば、水の添加のみを必要とする凍結させて乾燥した（凍結乾燥した）状態で保存されてもよい。即時注射溶液及び懸濁液は、前述の種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から調製される。好ましい単位投薬量製剤は、活性成分の1日用量又は1日単位の部分用量（本明細書で上に列挙される）、又は

50

その適切な部分を含有する製剤である。

【0201】

本主題はさらに、獣医用担体と共に上で定義した少なくとも1つの活性成分を含む獣医用組成物を提供する。獣医用担体は、組成物を投与する目的で有用な材料であり、別の方法で不活性であるか、又は獣医技術分野で許容され、活性成分と適合性である固体、液体、又は気体材料であり得る。これらの獣医用組成物は、非経口で、経口で、又は任意の他の所望の経路によって投与され得る。

【0202】

特定の実施形態では、本開示の化合物を含む薬学的組成物は、化学療法剤をさらに含む。これらの実施形態のうちいくつかでは、化学療法剤は、免疫療法剤である。

10

【0203】

F. 治療する方法

本明細書に開示される化合物及び組成物は、RNA発現及び/若しくは機能の機能障害、又はmRNAから産生されるタンパク質の発現及び/若しくは機能、又は小分子を使用してRNAの立体配座を切り替える有用な役割、又は感染性生物の成長を阻害する方法としてリボスイッチの天然の機能を変化させることに関連するとして識別された種々の疾患及び/又は障害を治療するための方法でも使用することができる。したがって、本開示の方法は、RNA発現及び/若しくは機能の機能障害に関連する疾患若しくは障害を治療すること、又は新しい切り替え可能な治療薬を作成することを対象とする。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2018/010146号を参照されたい。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される疾患若しくは障害（例えば、RNA発現及び/若しくは機能の機能障害に関連する）を治療するための方法は、それを必要とする対象に、本明細書に開示される治療有効量の化合物及び/又は組成物の用量を投与することを含む。

20

【0204】

RNA発現の機能障害は、1つ以上のRNA分子の過剰発現又は過小発現を特徴とする。いくつかの実施形態では、1つ以上のRNA分子は、治療される疾患及び/又は障害を促進することに関連している。いくつかの実施形態では、RNA分子は、健康な細胞の機能の一部であることを特徴とし、したがって、治療される疾患及び/又は障害を予防及び/又は改善する。いくつかの実施形態では、治療される疾患又は障害は、転写、プロセッシング、及び/又は翻訳に関連するRNA機能の機能障害と関連する。いくつかの実施形態では、治療される疾患又は障害は、機能障害のRNA分子機能の結果としてのタンパク質の不正確な発現と関連する。いくつかの実施形態では、治療される疾患又は障害は、遺伝子発現に関連するRNA機能の機能障害と関連する。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、分子をmRNAに結合させることによってタンパク質発現を低下させることが所望される疾患又は障害である。いくつかの実施形態では、疾患は、小分子を使用してオン又はオフに切り替えることができる療法によって有利に治療される。例えば、いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、治療遺伝子の発現をオン又はオフに切り替える能力を有することが所望される遺伝性疾患である。

30

【0205】

治療される疾患又は障害としては、限定されないが、変性障害、がん、糖尿病、自己免疫障害、心血管障害、凝固障害、眼の疾患、感染性疾患、及び1つ以上の遺伝子の変異によって引き起こされる疾患が挙げられる。

40

【0206】

例示的な変性疾患としては、限定されないが、アルツハイマー病（AD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS、ルー・ゲーリック病）、がん、シャルコー・マリー・トゥース病（CMT）、慢性外傷性脳症、嚢胞性線維症、いくつかのシトクロムcオキシダーゼ欠乏症（多くの場合に変性リー症候群の原因）、エーラス・ダンロス症候群、進行性骨化性線維異形成症、フリードライヒ運動失調症、前頭側頭型認知症（FTD）、いくつかの心血管疾患（例えば、冠動脈疾患、大動脈弁狭窄症などのアテローム性動脈硬化症）、ハンチント

50

ン病、乳児神経軸索ジストロフィー、円錐角膜（KC）、球状角膜、白質ジストロフィー、黄斑変性（AMD）、マルファン症候群（MFS）、いくつかのミトコンドリア筋症、ミトコンドリアDNA枯渇症候群、多発性硬化症（MS）、多系統萎縮症、筋ジストロフィー（MD）、神経セロイドリポフスチン症、ニーマン・ピック病、変形性関節症、骨粗鬆症、パーキンソン病、肺動脈性肺高血圧症、すべてのプリオン病（クロイツフェルト・ヤコブ病、致死性家族性不眠症など）、進行性核上性麻痺、網膜色素変性症（RP）、関節リウマチ、サンドホフ病、脊髄性筋萎縮症（SMA、運動ニューロン疾患）、亜急性硬化性全脳炎、テイ・サックス病、及び血管性認知症（それ自体が神経変性ではないが、多くの場合、変性性認知症の他の形態と一緒に現れる）が挙げられる。

【0207】

10

例示的ながんとしては、限定されないが、あらゆる形態のがん腫、黒色腫、芽細胞腫、肉腫、リンパ腫及び白血病が挙げられ、限定されないが、膀胱がん、膀胱がん腫、脳腫瘍、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、食道がん、子宮内膜がん、肝細胞がん、喉頭がん、肺がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、腎臓がん及び甲状腺がん、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、上衣腫、ユーイング肉腫、膠芽腫、髓芽腫、神経芽腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ラブドイドがん、及び腎芽腫（ウィルムス腫瘍）が挙げられる。

【0208】

例示的な自己免疫障害としては、限定されないが、成人スティル病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗GBM/抗TBM腎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性血管性浮腫、自己免疫性自立神経失調症、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性睾丸炎、自己免疫性膵炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性蕁麻疹、軸索神経ニューロパチー（AMAN）、パロ病、ベーチェット病、良性粘膜類天疱瘡、水疱性類天疱瘡、キャスルマン病（CD）、セリアック病、シャーガス病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIDP）、慢性再発性多発性骨髄炎（CRMO）、チャグ・ストラウス症候群（CSS）又は好酸球性肉芽腫症（EGPA）、癩痕性類天疱瘡、コーガン症候群、寒冷凝集素症、先天性心臓ブロック、コクサッキー心筋炎、CREST症候群、クローン病、疱疹状皮膚炎、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸球性食道炎（EoE）、好酸球性筋膜炎、結節性紅斑、本態性混合性クリオグロブリン血症、エバンス症候群、線維筋痛症、線維化性肺炎、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）、巨細胞性心筋炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、多発血管炎性肉芽腫症、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病（HSP）、妊娠性疱疹又は妊娠性類天疱瘡（PG）、化膿性汗腺炎（HS）（反対型ざ瘡）、低ガンマグロブリン血症、IgA腎症、IgG4関連硬化性疾患、免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）、封入体筋炎（IBM）、間質性膀胱炎（IC）、若年性関節炎、若年性糖尿病（1型糖尿病）、若年性筋炎（JM）、川崎病、ランバート・イートン症候群、白血球破碎性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質結膜炎、線状IgA病（LAD）、ループス、慢性ライム病、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎（MPA）、混合性結合組織病（MCTD）、モーレン潰瘍、ムッカ・ハーベルマン病、多巣性運動ニューロパチー（MMN）又はMMNCB、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、新生児ループス、視神経脊髄炎、好中球減少症、眼類癩痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ（PR）、PANDAS、腫瘍随伴性小脳変性症（PCD）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、パリーロンバーグ症候群、扁平部炎（末梢ぶどう膜炎）、パーソネイジ・ターナー症候群、天疱瘡、末梢ニューロパチー、静脈周囲性脳脊髄炎、悪性貧血（PA）、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、多腺性症候群I、II、III型、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、原発性胆汁性胆管炎、原発性硬化性胆管炎、プロゲステロン皮膚炎、乾癬、乾癬性関節炎、赤芽球癆（PRCA）、壊疽性膿皮症、レイノー現象、反応性関節炎、反射性交感神経性ジストロフィー、再発性多発軟骨炎、レストレスレッグス症候群（RLS）、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、シュミット症

20

30

40

50

候群、強皮症、シェーグレン症候群、自己免疫性精子精巣形成障害、スティッフパーソン症候群（SPS）、亜急性細菌性心内膜炎（SBE）、サザック症候群、交感性眼炎（SO）、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、血小板減少性紫斑病（TTP）、トロサ・ハント症候群（THS）、横断性脊髄炎、1型糖尿病、潰瘍性大腸炎（UC）、未分化結合組織病（UCTD）、ぶどう膜炎、血管炎、白斑、及びフォークト・小柳・原田病が挙げられる。

【0209】

例示的な心血管障害としては、限定されないが、冠動脈疾患（CAD）、狭心症、心筋梗塞、卒中、心臓発作、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患（rheumatic heart disease）、心筋症、異常な心調律、先天性心疾患、心臓弁膜症、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓性疾患、及び静脈血栓塞栓症が挙げられる。

10

【0210】

例示的な凝固障害としては、限定されないが、血友病、フォン・ヴィレブランド病、播種性血管内凝固、肝疾患、循環抗凝血素の過剰発生、ビタミンK欠乏症、血小板機能障害、及び他の凝固不全が挙げられる。

【0211】

例示的な眼の疾患としては、限定されないが、黄斑変性、眼球突出、白内障、CMV網膜炎、糖尿病黄斑浮腫、緑内障、円錐角膜、高眼圧症、眼性片頭痛、網膜芽細胞腫、結膜下出血、翼状片、角膜炎、ドライアイ、及び角膜剥離が挙げられる。

20

【0212】

例示的な感染性疾患としては、限定されないが、急性弛緩性脊髄炎（AFM）、アナプラズマ病、炭疽、バベシア症、ポツリヌス症、ブルセラ症、カンピロバクター症、カルバペネム耐性感染（CRE/CRPA）、軟性下疳、チクングニアウイルス感染（チクングニア）、クラミジア、シガテラ（有毒な藻類ブルーム（HAB））、Clostridium Difficile感染、Clostridium Perfringens（イブシロン毒素）、コクシジオイデス真菌感染（パレー熱）、COVID-19（コロナウイルス病2019）、クロイツフェルト・ヤコブ病、伝達性海綿状脳症（CJD）、クリプトスポリジウム症（クリプト）、サイクロスポラ症、デング1, 2, 3, 4（デング熱）、ジフテリア、E. coli感染、志賀毒素産生（STEC）、東部馬脳炎（EEE）、エボラ出血熱（Ebola）、エールリヒア症、脳炎、アルポウイルス又は傍感染性、エンテロウイルス感染、非ポリオ（非ポリオエンテロウイルス）、エンテロウイルス感染、D68（EV-D68）、ジアルジア症（ジアルジア）、鼻疽、淋菌感染（淋病）、鼠径部肉芽腫、ヘモフィルスインフルエンザ感染症、B型（Hib又はH-flu）、ハンタウイルス肺症候群（HPS）、溶血性尿毒症症候群（HUS）、A型肝炎（Hep A）、B型肝炎（Hep B）、C型肝炎（Hep C）、D型肝炎（Hep D）、E型肝炎（Hep E）、ヘルペス、帯状疱疹、水痘VZV（帯状疱疹）、ヒストプラズマ感染（ヒストプラズマ症）、ヒト免疫不全ウイルス/AIDS（HIV/AIDS）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、インフルエンザ（Flu）、鉛中毒、レジオネラ症（レジオネラ病）、レプトシー（ハンセン病）、レプトスピラ症、リステリア症（リステリア）、ライム病、Lymphogranuloma venereum感染（LGV）、マラリア、麻疹、類鼻疽、髄膜炎、ウイルス性（髄膜炎、ウイルス性）、髄膜炎菌感染症、細菌性（髄膜炎、細菌性）、中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）、ムンプス、ノロウイルス、麻痺性貝毒中毒（麻痺性貝毒中毒、シガテラ）、シラミ寄生症（シラミ、頭部及び身体シラミ）、骨盤内炎症性疾患（PID）、百日咳（Pertussis（Whooping Cough））ペスト、腺、敗血性、肺（ペスト）、肺炎球菌感染症（肺炎）、灰白髄炎（ポリオ）、ポワサン、オウム病（オウム熱）、乾癬（毛ジラミ、陰部シラミ感染）、膿疱性乾癬（天然痘、サル痘、牛痘）、Q熱、狂犬病、リシン中毒、リケッチア症（ロッキー山紅斑熱）、風疹、先天性を含む（三日はしか）、サルモネラ胃腸炎（サルモネラ）、疥癬感染（疥癬）、スコンプロイド、敗血症性ショック（敗

30

40

50

血症)、重症急性呼吸器症候群(SARS)、細菌性赤痢胃腸炎(赤痢菌)、天然痘、黄色ブドウ球菌感染、メチシリン耐性(MRSA)、黄色ブドウ球菌食中毒、エンテロトキシン-B中毒(黄色ブドウ球菌食中毒)、黄色ブドウ球菌感染、バンコマイシン中間耐性(VISA)、黄色ブドウ球菌感染、バンコマイシン耐性(VRSA)、レンサ球菌感染症、A群(侵襲性)(Strept A(侵襲性))、レンサ球菌感染症、B群(Strept-B)、レンサ球菌毒素性ショック症候群、STSS、毒素性ショック(STSS、TSS)、梅毒(第1期、第2期、早期潜伏、後期潜伏、先天性)、破傷風感染、破傷風(開口障害)、トリコモナス症(トリコモナス感染)、トリコノシス感染(トリヒナ症)、結核(TB)、結核(潜在性)(LTBI)、野兔病(野兔熱)、チフス熱(D群)、チフス、膣炎、細菌性(酵母感染)、ベイピング関連肺傷害(電子タバコ関連肺傷害)、水痘感染症(Chickenpox)、Vibrio cholerae(コレラ)、ピブリオ感染症(ピブリオ)、ウイルス性出血熱(エボラ、ラッサ、マールブルグ)、ウエストナイルウイルス、黄熱、エルシニア感染症(エルシニア)、及びジカウイルス感染(ジカ)が挙げられる。

10

【実施例】

【0213】

実施例1:RNAの構築物設計及び調製

多種多様な1つ以上の内部標的RNAモチーフの組み込みを可能にするように、スクリーニング構築物を設計した。以下の2つのモチーフが構築物中に存在した。TPPリボスイッチドメイン²⁷、及びデングウイルスの5'-UTRからのシュードノット²⁶。構造カセットと、RNAバーコードヘリックスと、2つの試験RNA構造(6ヌクレオチドリンカーによって分離された)とを含む、完全な構築物配列のための設計を、RNA構造を使用して評価した³⁹。2つの試験構造が相互作用する可能性を減少させるために、天然の折り畳みを保持しつつ、RNA構造によって予想される誤って折り畳まれた構造を阻止するために、少数の配列変化を作製した(図6A、図6B)。最終構築物の構造を、SHAPE-Mapによって確認した。

20

【0214】

RNAバーコードを、自己を含むヘアピンへと折り畳まれるように設計した(図6A、図6B)。RNAバーコードのすべての可能な置き換えを計算し、全構築配列の観点で折り畳み、RNA構築物の別の部分と相互作用する可能性を有していた任意のバーコードを、このセットから除去した。バーコード化された構築物を、「リガンドなし」プロトコルを使用して、SHAPE-Mapによってプロービングし、SHAPE反応性の拘束を有するRNA構造を使用して折り畳み、バーコードヘリックスが、所望な自己を含むヘアピンへと折り畳まれることを確認した。

30

【0215】

RNAの調製

インビトロ転写のためのDNAテンプレート(Integrated DNA Technologies)は、標的構築物配列(デングシュードノット配列、一本鎖リンカー、及びTPPリボスイッチ配列を含有する)及び隣接する構造カセット²⁵をコードした。

40

【数4】

5'-GTGGG CACTT CGGTG

TCCAC ACGCG AAGGA AACCG CGTGT CAACT GTGCA ACAGC TGACA AAGAG
 ATTCC TAAAA CTCAG TACTC GGGGT GCCCT TCTGC GTGAA GGCTG AGAAA
 TACCC GTATC ACCTG ATCTG GATAA TGCCA GCGTA GGGAA GTGCT GGATC
CGGTT CGCCG GATCA ATCGG GCTTC GGTCC GGTTTC-3'

(配列番号1)。

50

プライマー結合部位は、下線が引かれている。固有のRNAバーコード及びT7プロモーター配列を含有する順方向PCRプライマーを使用して、個々のPCR反応において、96個の構築物各々にRNAバーコードを個々に付加した。太字のバーコードヌクレオチドと、下線が引かれているプライマー結合部位とを有する、試料の順方向プライマー配列は、以下である。

【数5】

5'- GAAAT TACGA CTCAC TATAG GTCGC

GAGTA ATCGC GACCG **GCGCT** AGAGA TAGTG CCGTG GGCAC TTCGG TGTC -3'

(配列番号2)。

10

【0216】

200 μMのdNTPミックス(New England Biolabs)、500 nMの順方向プライマー、500 nMの逆方向プライマー、1 ngのDNAテンプレート、20% (v/v)のQ5反応緩衝液、及び0.02 U/μLのQ5ホットスタート高忠実度ポリメラーゼ(New England Biolabs)を使用したPCRによってDNAを増幅させ、インビトロ転写のためのテンプレートを作成した。DNAを精製し、(PureLink Pro 96 PCR Purification Kit、Invitrogen)、Tecan Infinite M1000 Proマイクロプレートリーダーで定量化した(Quant-iT dsDNA高感度アッセイキット、Invitrogen)。

20

【0217】

インビトロ転写を、各ウェルが100 μLの総反応体積を含有する96ウェルプレートフォーマットで実行した。各ウェルは、25 mMのMgCl₂、40 mMのTris (pH 8.0)、2.5 mMのスペルミジン、0.01%のTriton、10 mMのDTT、及び200~800 nMの固有にバーコード化されたDNAテンプレート(PCRによって生成された)中、5 mMのNTP(New England Biolabs)、0.02 U/μLの無機ピロホスファターゼ(酵母、New England Biolabs)、0.05 mg/mLのT7ポリメラーゼを含有していた。反応物を37 °Cで4時間インキュベートし、次いで、TurboDNase(RNaseを含まない、Invitrogen)で、最終濃度0.04 U/μLで処理し、37 °Cで30分間インキュベートし、その後、第2のDNaseを総最終濃度が0.08 U/μLになるまで添加し、さらに37 °Cで30分間インキュベートした。EDTAを最終濃度が50 mMになるまで添加することによって酵素反応を停止させ、氷上に置いた。RNAを、96ウェルフォーマットで精製し(Agencourt RNAClean XP磁気ビーズ、Beckman Coulter)、10 mMのTris (pH 8.0)、1 mMのEDTAに再懸濁させた。RNA濃度を、Tecan Infinite M1000 Proマイクロプレートリーダーで定量化し(Quant-iT RNA広範囲アッセイキット、Invitrogen)、各ウェル中のRNAを、個々に1 pmol/μLまで希釈した。RNAを-80 °Cで保管した。

30

40

【0218】

実施例2：小分子断片の化学修飾及びスクリーニング

それらのRo3多様性断片ライブラリのサブセットであり、50 mMでDMSOに溶解した1500個の化合物を含有する、Maybridgeからの断片スクリーニングライブラリとして、断片を得た。これらの化合物の大部分は、300 Da未満の分子質量を有する、3個以下の水素結合供与体及び3個以下の水素結合受容体を含有する、並びにClogP 3.0という断片化合物についての「3つのルール」を忠実に守っていた。実施例5に列挙されている化合物を除き、ITCに使用されるすべての化合物は、Millipore-Sigmaから購入され、さらに精製することなく使用された。スクリーニン

50

グ実験は、8チャンネル空気入れ替えピペッティングアームと、使い捨てフィルタチップと、ロボットマニピュレータアームとEchoTherm RIC20遠隔制御加熱/冷却乾燥浴(Torrey Pines Scientific)を取り付けたTecan Freedom Evo-150液体ハンドラ上で、96ウェルプレートフォーマット中、25 μ Lで実行した。スクリーニングに使用される液体ハンドラのプログラムは、要求に応じて利用可能である。

【0219】

第1の断片-リガンドスクリーニングについて、ウェル当たり5 pmolのRNAを、4の冷却ブロック上で、RNaseを含まない水中19.6 μ Lまで希釈した。プレートを95で2分間加熱し、直後に4で5分間、迅速冷却した。各ウェルに、19.6 μ Lの2倍の折り畳み緩衝液(最終濃度50 mM HEPES pH 8.0、200 mM 酢酸カリウム、及び10 mM MgCl₂)を加え、プレートを37で30分間インキュベートした。第2の断片-リガンドスクリーニングについて、ウェル当たり24.3 μ Lの折り畳まれたRNAを、DMSO中の2.7 μ Lの一次結合断片に最終濃度が断片のK_dの10倍になるまで加え、試料を37で10分間インキュベートした。標的RNAを断片と組み合わせるために、24.3 μ LのRNA溶液又はRNAと一次結合断片を、2.7 μ Lの10倍のスクリーニング断片を含有するウェルに加えた(DMSO中で、最終断片濃度1 mMが得られる)。溶液をピペッティングにより十分に混合し、37で10分間インキュベートした。SHAPEプロベリングについて、スクリーニングプレートの各ウェルからの22.5 μ LのRNA断片溶液を、37の加熱ブロック上で、2.5 μ LのDMSO中の10倍SHAPE試薬に加え、ピペッティングによって迅速に混合し、SHAPE試薬とRNAの均一な分布を達成した。適切な反応時間後、試料を氷上に置いた。第1の断片スクリーニングについて、1-メチル-7-ニトロイサト酸無水物(1 M7)を10 mMの最終濃度でSHAPE試薬として使用して、5分間反応させた。第2の断片スクリーニングについて、5-ニトロイサト酸無水物(5 NIA)⁴⁰を25 mMの最終濃度でSHAPE試薬として使用して、15分間反応させた。過剰な断片、溶媒、及び加水分解したSHAPE試薬を、AutoScreen-A 96-Well Plates(GE Healthcare Life Sciences)を使用して除去し、96ウェルプレートの各ウェルからの5 μ Lの修飾RNAを、配列決定ライブラリ調製のために、プレートごとに単一の試料にプールした。

【0220】

各スクリーニングは、19個の断片試験プレートと、陽性(断片2、最終濃度1 mM)及び陰性(溶媒、DMSO)対照の分布を含有する2つのプレートと、SHAPE試薬の代わりに溶媒(DMSO)で処理された1つの陰性SHAPE対照プレートとからなっていた。ヒット検証実験について、各ヒット断片のウェル位置を変更して、ウェル位置及びRNAバーコード効果を制御した。一次スクリーニングと二次スクリーニングの両方についてのプレートマップも同様に利用可能であった。

【0221】

試験断片のスクリーニングが完了したら、統計検定を実行し、所与のヌクレオチドの修飾率の差を識別する。具体的には、スクリーニング分析は、断片の存在下での所与のヌクレオチドの修飾率を、断片の非存在下と比較して、統計的に比較することを必要とする。各ヌクレオチドについて、所与の反応物における修飾の数は、既知の分散を有するPoissonプロセスであり、したがって、2つの試料間の修飾率の観察された差の統計的有意性は、Comparison of Two Poisson Counts検定³¹を実施することによって確認することができる。すなわち、試験したヌクレオチドのm₁修飾を試料1のn₁リードの中でカウントし、m₂修飾を試料2のn₂リードの中でカウントする場合、試験されたヌル仮説は、すべてのカウントされた修飾(m₁ + m₂)の中で、試料1における修飾の割合が、 $p_1 = n_1 / (n_1 + n_2)$ であることを予測する。この仮説のZ検定は、

【数6】

10

20

30

40

50

$$Z_p = \frac{m_1 - p_1(m_1 + m_2) + 0.5}{\sqrt{p_1(1 - p_1)(m_1 + m_2)}}$$

$$Z_n = \frac{m_1 - p_1(m_1 + m_2) - 0.5}{\sqrt{p_1(1 - p_1)(m_1 + m_2)}}$$

$$Z = \min(|Z_p|, |Z_n|)$$

10

である。

【0222】

Z値が、指定された有意性閾値を超える場合、試験されたヌクレオチドは、試験断片の存在によって統計的に有意に影響を受けると解釈される。

【0223】

次に、各断片について、Z検定は、偽陽性の確率が増加する、RNA配列を含む多数のヌクレオチドに対して実施される必要がある。ヌクレオチド当たりのSHAPE反応性の偽陽性の割り当て数は、Z有意性閾値を上げることによって最小限に抑えることができるが、このアプローチは、スクリーニングの感度を低下させる（より弱い結合リガンドを検出する能力を低下させることを意味する）。実施されるZ検定の数減らすために、このような検定を、RNAスクリーニング構築物中のすべてのヌクレオチドではなく、目的の領域中のヌクレオチドにのみ適用した。RNAの Dengueモチーフについて、目的の領域は、位置59～110であった。TPPモチーフについて、目的の領域は、位置100～199であった。両方の試料において低い修飾率を有するヌクレオチドを省くことによって、Z検定の数さらには減らした。ヌクレオチドが低い修飾率を有するとみなすための閾値を、所与のプレートのすべての96ウェル中のすべてのヌクレオチドにわたって計算したプレート平均修飾率の25%に設定した。Z検定は、2つの比較された試料のうちの少なくとも1つにおいて、この25%の閾値を超える修飾率を有するヌクレオチドに対してのみ実施された。

20

【0224】

理想的には、2つの比較された試料における条件間の唯一の差は、一方の試料には断片が存在するが、他方には存在しないことであろう。陰性対照試料を互いに対して試験することを利用して、ヌクレオチド修飾率の試料間変動を導入し得る制御できない因子の発生率を判断することができる。例えば、Z有意性閾値を2.7に設定した場合、任意のそのような因子が存在しない場合、陰性対照（断片なし）試料の対に適用されるZ検定は、理論的には、確率 $P = 0.0035$ で異なる反応性のヌクレオチドを識別するはずである。しかし、一次スクリーニングで試験した587個の陰性対照試料からランダムに選択した陰性対照試料の対にZ検定を適用すると、実際の確率は $P = 0.32$ であり、90倍高かった。したがって、個々のヌクレオチドにおいて、断片の非存在下でのSHAPE反応性に統計的に有意な変動があった。

30

40

【0225】

大部分の複製物は、本質的に同じプロファイルを共有していたが、異なるプロファイルを有する複製物が相当数存在した。いくつかの決定係数は、0.85と低かった。Z検定を異なる陰性対照試料に適用すると、多数の場合が生成され、ヌクレオチドが、反応性に差があると誤って分類された。この結果を回避するために、各試料を、最も相関性の高い5つの陰性対照試料と比較した。Z有意性閾値が2.7の陰性対照のこのような選択的な対に適用されるZ検定は、確率 $P = 0.067$ で異なる反応性のヌクレオチドを識別した。

【0226】

この確率は、理論上の $P = 0.0035$ より約20倍高く、このことは、試料処理に変

50

動があることを示している。この変動のいくつかは、試料中のすべてのRNAのすべてのヌクレオチドの反応性にわたって等しいスケールで存在する。この変動は、より反応性の低い試料中の全体的な反応性と一致するように、より反応性の高い試料中の全体的な反応性をスケールダウンすることによって除去することができる。このようなスケールリングは、(i) RNA配列中の各ヌクレオチドについて、より反応性の低い試料中の修飾率に対する、より反応性の高い試料中の修飾率の比率を計算し、(ii) より反応性の高い試料中のすべてのヌクレオチドの修飾率を、ステップ(i)で得られた比率の中央値で割り算することによって実施された。陰性対照ウェルの相関を最大化した対のこのようなスケールリングは、ヌクレオチドヒットを発見する確率を $P = 0.030$ まで下げ、これは理論的確率よりも9倍高かった。したがって、実際にすべての高スループットスクリーニングアッセイにおいて生じるため、断片の偽陽性識別が生じ、リガンド以外の変動からの実際の断片ヒットは、複製物SHAPE検証と、ITCを使用する直接的なリガンド結合測定によって区別された。

10

【0227】

有効なリガンドは、標的RNA中の複数のヌクレオチドの修飾率に影響を及ぼすと予想されるため、陰性対照とは異なる反応性を有するヌクレオチドの数が、2に設定された所定の閾値を超える場合にのみ、断片がヒットであると認識された。第二に、断片がRNAに及ぼす比較的安定した影響を探究する場合、ヌクレオチドの反応性における小さな相対的な差は、統計的に有意であっても、異なる反応性のヌクレオチドの総数から除外された。実際には、最小許容差は、平均の20%に設定され、

20

$$|r_1 - r_2| / (r_1 + r_2) / 2 = 0.2,$$

式中、 r_1 及び r_2 は、2つの試料中のヌクレオチド修飾率である。第三に、所与の試料を、最も相関性の高い5つの陰性対照試料に対して試験した。5つの試験はすべて、陰性対照試料に対して変化した試験試料を発見するために必要であった。

【0228】

最後に、スクリーニングの感度及び特異性を、Z有意性閾値の選択によって制御した。断片を含有する試料及びすべての陰性対照試料の評価を、複数のZ有意性閾値設定で実施した。かかる設定ごとに、偽陽性断片(FPF)を、変化したことが発見された陰性対照試料の分率として計算し、リガンド分率(LF)を、断片を含有する変化した試料の分率からFPFを引き算することによって概算した。LFとFPFのバランスは、それらの比率である LF / FPF によって定量化した。TPPリボスイッチRNAの最良のバランス

30

【数7】

$$(LF / FPF \approx 1.3)$$

は、 $2.5 \sim 2.7$ の範囲のZ有意性閾値($0.022 > FPF > 0.014$)で達成された。 Deng シールド ノット について、最良のバランス

【数8】

$$(LF / FPF \approx 4)$$

40

は、 $2.5 \sim 2.65$ の範囲のZ有意性閾値($0.007 > FPF > 0.005$)で達成された。

【0229】

実施例3：ライブラリ調製及び配列決定

100 μ Lの体積でプールされた修飾RNAに対して逆転写を実施した。71 μ LのプールしたRNAに、6 μ Lの逆転写プライマーを添加して、150 nMのプライマー最終濃度を達成し、試料を65 で5分間インキュベートし、次いで氷上に置いた。この溶液に、6 μ Lの10倍の第1の鎖緩衝液(500 mM Tris pH 8.0、750 mM KCl)、4 μ Lの0.4 M DTT、8 μ LのdNTPミックス(各々10 mM)、及

50

び15 μ Lの500 mM $MnCl_2$ を添加し、溶液を42 で2分間インキュベートした後、8 μ LのSuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)を添加した。反応物を42 で3時間インキュベートし、その後、70 の熱不活性化を10分間行った後、氷上に置いた。得られたcDNA産物を精製し(Agencourt RNAClean磁気ビーズ、Beckman Coulter)、RNaseを含まない水に溶出させ、-20 で保存した。逆転写プライマーの配列は、5' - CGGGC TTCGG TCCGG TTC - 3' (配列番号3)であった。

【0230】

DNAを増幅し、必要なTruSeqアダプター²⁴を添加するための2ステップPCR反応を使用して、配列決定のためにDNAライブラリを調製した。200 μ MのdNTPミックス(New England Biolabs)、500 nMの順方向プライマー、500 nMの逆方向プライマー、1 ngのcDNA若しくは二本鎖DNAテンプレート、20% (v/v)のQ5反応緩衝液(New England Biolabs)、及び0.02 U/ μ LのQ5ホットスタート高忠実度ポリメラーゼ(New England Biolabs)を使用したPCRによってDNAを増幅させた。過剰な組み込まれていないdNTP及びプライマーをアフィニティ精製(Agencourt Ampure XP磁気ビーズ、Beckman Coulter、試料とビーズの比率0.7:1)によって除去した。DNAライブラリをQubit蛍光計(Invitrogen)で定量化し(Qubit dsDNA High Sensitivityアッセイキット、Invitrogen)、品質をチェックし(Bioanalyzer 2100オンチップ電気泳動機器、Agilent)、Illumina NextSeq 550高スループットシーケンサで配列決定した。

【0231】

SHAPE - MaPライブラリ調製アンプリコン特異的順方向プライマーは、

【数9】

5'-CCCTA CACGA CGCTC TTCCG ATCTN NNNNG GCCTT CGGGC CAAGG A-3'

(配列番号4)

30

であった。SHAPE - MaPライブラリ調製アンプリコン特異的順方向プライマーは、

【数10】

5'-GACTG GAGTT CAGAC GTGTG CTCCT CCGAT CTNNN NNTTG AACCG GACCG AAGCC CGATT T-3'

(配列番号5)

であった。RNAスクリーニング構築物と重複する配列は、下線が引かれている。

【0232】

実施例4：等温滴定カロリメトリー

I TC実験は、RNaseを含まない条件下で、Microcal PEAQ - ITC自動化機器(Malvern Analytical)を使用して実施した⁴¹。インビトロ口で転写されたRNAを、遠心分離濃度(Amicon Ultra遠心分離フィルタ、10K MWCO、Millipore - Sigma)を使用して、100 mMのCHES (pH 8.0)、200 mMの酢酸カリウム、及び3 mMの $MgCl_2$ を含有する折り畳み緩衝液に交換した。リガンドを、RNAの所望の実験濃度の10~20倍の濃度で、同じ緩衝液に溶解した(リガンドをRNAに添加したときの混合の熱を最小限に抑えるために)。RNA濃度を定量化し(Nanodrop UV - VIS 分光計、ThermoFisher Scientific)、緩衝液中、予想されるKdの1~10倍まで希釈し、希釈されたRNAを再定量化し、最終的な実験RNA濃度を確認した。折り畳み緩衝液で希釈したRNAを65 で5分間加熱し、氷上に5分間置き、37 で15分

50

間かけて折り畳んだ。必要に応じて、一次結合リガンド（例えば、2）を、結合したリガンドの所望の最終濃度の10倍で0.1体積を添加することによってRNAに予め結合し、その後、室温で10分間インキュベートした。

【0233】

各ITC実験は、リガンドをRNAに滴定したもの（実験トレース）と、同じリガンドを緩衝液に滴定したもの（対照トレース）の2回の試行を伴っていた。ITC実験を、以下のパラメータを使用して実施した。25のセル温度、8 μ Cal/秒の参照電力、750RPMの攪拌速度、高フィードバックモード、0.2 μ Lの初期注射、続いて2 μ Lの19回の注射。各注射は、完了するのに4秒を必要とし、注射の間に180秒の間隔があった。

10

【0234】

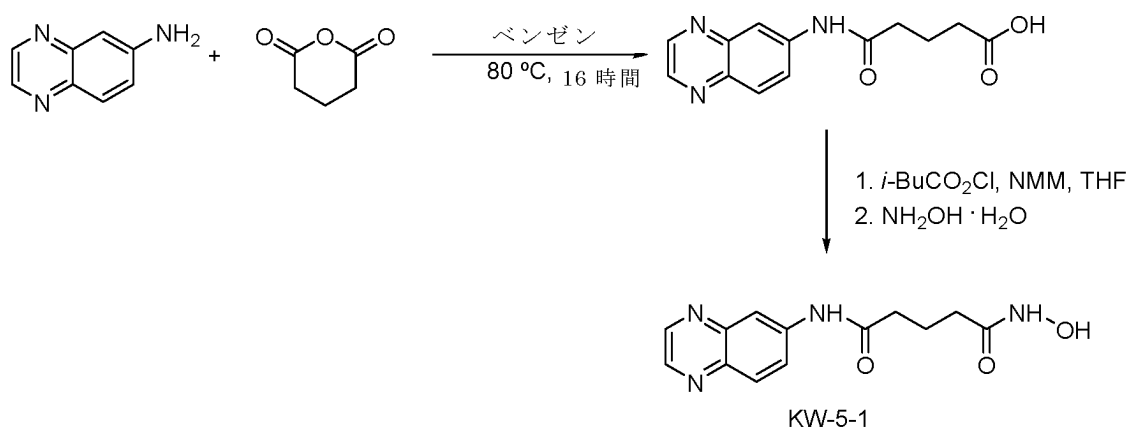
ITCデータを、MicroCal PEAQ - ITC Analysis Software (Malvern Analytical) を使用して分析した。まず、各注射ピークについてのベースラインを手動で調整して、誤って選択された注射エンドポイントを解消した。第二に、対照トレースを、点同士の引き算によって実験トレースから引き算した。第三に、最小二乗回帰線を、Levenberg - Marquardt アルゴリズムを使用して、データにフィッティングした。弱く結合したリガンド（500 μ Mを超える）の場合、Nを手動で1.0に設定し、低c値曲線のフィッティングを可能にした。

【0235】

実施例5：試験化合物KW-5-1の化学合成。

20

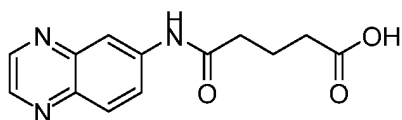
【化21】



30

5.1 中間体KW-2の調製：

【化22】



40

ジヒドロ-2H-ピラン-2,6(3H)-ジオン(173mg、1.52mmol)のベンゼン(2.8mL)溶液に、キノキサリン-6-アミン(200mg、1.38mmol)を加えた。混合物を80で16時間攪拌した。反応を、SMが消失するまで、TLCによって監視した。沈殿物を濾過し、ベンゼンで洗浄して、5-オキソ-5-(キノキサリン-6-イルアミノ)ペンタン酸(273.5mg、77%)を淡黄色の固体として得た。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) 12.12(s, 1H)、10.42(s, 1H)、8.86(d, J=1.9Hz, 1H)、8.79(d, J=1.9Hz, 1H)、8.51(d, J=2.3Hz, 1H)、8.02(d, J=9.1Hz, 1H)、7.91(dd, J=9.1, 2.3Hz, 1H)、2.47(t,

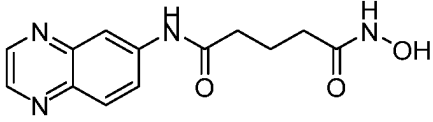
50

$J = 7.4 \text{ Hz}$, 2 H)、 2.32 (t , $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2 H)、 1.86 (p , $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2 H)。 ^{13}C NMR (151 MHz , DMSO) 174.2 、 171.6 、 145.9 、 143.9 、 143.1 、 140.4 、 139.1 、 129.5 、 123.8 、 115.3 、 35.6 、 33.0 、 20.3 。

【0236】

5.2 化合物 KW-5-1 の調製：

【化23】



10

5-オキソ-5-(キノキサリン-6-イルアミノ)ペンタン酸 (100.0 mg 、 $385.7 \mu\text{mol}$) のテトラヒドロフラン (1.9 mL) 溶液に、0 で、 N -メチルホルリン ($51 \mu\text{L}$ 、 $462.8 \mu\text{mol}$)、続いてクロロギ酸イソブチル ($60.49 \mu\text{L}$ 、 $462.8 \mu\text{mol}$) を添加した。混合物を 0 で 1 時間攪拌した。濾液をヒドロキシルアミン (0.24 mL 、50%水溶液、 3.857 mmol) に添加し、室温で 16 時間攪拌した。溶媒を除去し、残渣を RP MPLC を介して精製して、 N^1 -ヒドロキシ- N^5 -(キノキサリン-6-イル)グルタルアミド (5.0 mg 、5%) を白色の固体として得た。 ^1H NMR (400 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) 10.42 (s , 1 H)、 8.86 (d , $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H)、 8.80 (d , $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1 H)、 8.53 (d , $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1 H)、 8.03 (d , $J = 9.1 \text{ Hz}$, 1 H)、 7.91 (dd , $J = 9.1, 2.3 \text{ Hz}$, 1 H)、 7.30 (s , 1 H)、 6.75 (s , 1 H)、 2.43 (t , $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2 H)、 2.14 (t , $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2 H)、 1.85 (p , $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2 H)。 ^{13}C NMR (151 MHz , DMSO) 173.8 、 171.8 、 145.9 、 143.8 、 143.1 、 140.6 、 140.5 、 139.0 、 129.5 、 123.7 、 115.3 、 36.1 、 35.8 、 34.2 、 20.8 。

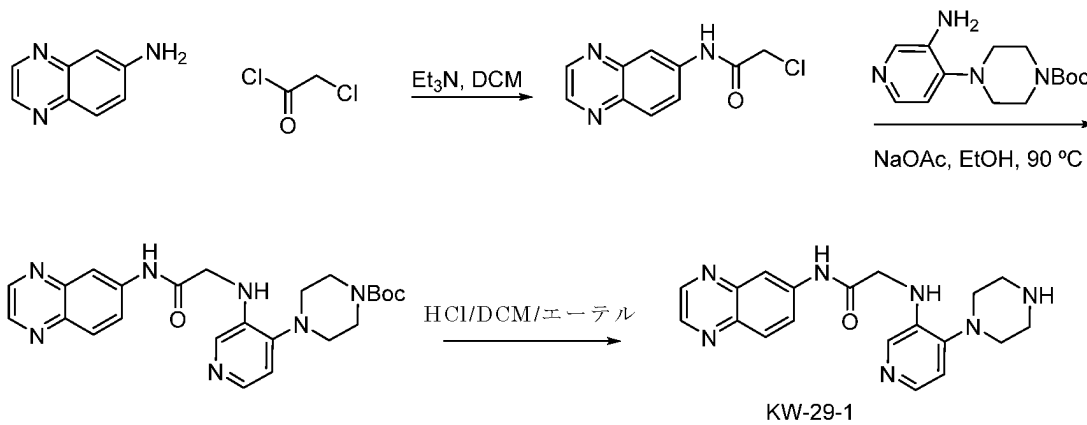
20

【0237】

実施例 6：試験化合物 KW-29-1 の化学合成。

30

【化24】

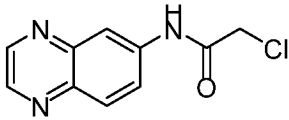


40

6.1 中間体 KW-20 の調製：

50

【化25】

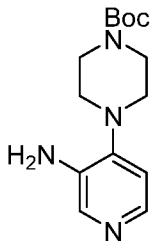


DCM (6.9 mL) 中のキノキサリン - 6 - アミン (200.0 mg、1.378 mmol) 及び Et₃N (0.95 mL、6.888 mmol) の懸濁液に、2 - クロロアセチルクロリド (164.6 μL、2.067 mmol) を加えた。混合物を室温で2時間攪拌した。溶媒を除去し、残渣を NP MPLC を介して精製して、2 - クロロ - N - (キノキサリン - 6 - イル) アセトアミド (194.8 mg, 64%) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) 8.83 (d, J = 1.9 Hz, 1H)、8.78 (d, J = 1.9 Hz, 1H)、8.60 (s, 1H)、8.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H)、8.09 (d, J = 9.0 Hz, 1H)、7.94 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H)、4.27 (s, 2H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) 164.3、145.8、144.4、143.6、140.8、138.1、130.6、123.8、118.0、43.1。MS - ER: [M + H]⁺。

【0238】

6.2 tert - ブチル 4 - (3 - アミノピリジン - 4 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキシレート の調製：

【化26】

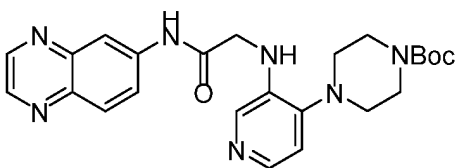


以下の報告された手順を使用して、tert - ブチル 4 - (3 - アミノピリジン - 4 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキシレート を合成した。Basso, Andrea Dawn; PCT 国際出願第 2009/017701 2009年2月05日
Burger, Matthew T. et al From ACS Medicinal Chemistry Letters, 4(12), 1193 - 1197; 2013。

【0239】

6.3 中間体 KW - 26 の調製：

【化27】



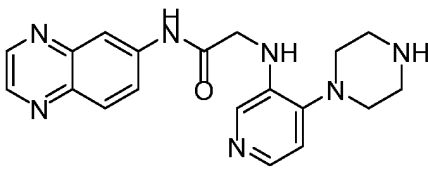
EtOH (37.6 μL) 中の 2 - クロロ - N - (キノキサリン - 6 - イル) アセトアミド (50.0 mg、226 μmol)、tert - ブチル 4 - (3 - アミノピリジン - 4 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキシレート (62.8 mg、226 μmol) 及び 酢酸ナトリウム (37.0 mg、451 μmol) の混合物を、90 で16時間攪拌した。蒸発させた残渣を RP MPLC を介して精製して、tert - ブチル 4 - (3 - ((2 - オキソ - 2 - (キノキサリン - 6 - イルアミノ)エチル)アミノ)ピリジン - 4

-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート(43.3mg、41%)を黄色の固体として得た。¹H NMR(400MHz, CDCl₃-d) 11.47(s, 1H)、8.56(d, J=2.0Hz, 1H)、8.52(d, J=2.1Hz, 2H)、8.16(d, J=2.2Hz, 1H)、8.06(d, J=6.4Hz, 1H)、7.84(dd, J=9.1, 2.2Hz, 1H)、7.62(d, J=9.0Hz, 1H)、6.72(d, J=6.7Hz, 1H)、5.74(s, br. 2H)、5.45(s, br. 2H)、3.45(d, J=5.2Hz, 4H)、3.03-2.96(m, 4H)、1.42(s, 9H)。¹³C NMR(101MHz, CDCl₃) 164.3、154.5、150.5、145.2、143.6、142.9、139.7、139.40、139.35、135.5、130.0、129.5、124.1、116.6、113.4、80.5、61.5、47.9、29.8、28.5。

【0240】

6.4 化合物KW-29-1の調製：

【化28】



20

tert-ブチル 4-(3-(2-オキソ-2-(キノキサリン-6-イルアミノ)エチル)アミノ)ピリジン-4-イル)ピペラジン-1-カルボキシレート(40.0mg、86.3μmol)のDCM(4.3mL)溶液に、HCl(431μL、863μmol)を添加した。混合物を室温で16時間攪拌した。固体Na₂CO₃を添加して酸を中和し、遊離塩基を得た。濾過したものを蒸発乾固させた。蒸発させた残渣をNPMPLCを介して精製して、2-(4-(ピペラジン-1-イル)ピリジン-3-イル)アミノ)-N-(キノキサリン-6-イル)アセトアミド(29.1mg、93%)を黄色の固体として得た。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) 11.95(s, 1H)、8.88(d, J=1.9Hz, 1H)、8.83(d, J=1.9Hz, 1H)、8.52(s, 1H)、8.24(dd, J=6.8, 1.8Hz, 1H)、8.13-8.03(m, 3H)、7.38(d, J=6.8Hz, 1H)、6.04(s, 2H)、5.54(s, 2H)、3.50(s, br. 4H)、3.28(s, br. 4H)。¹³C NMR(101MHz, DMSO) 164.8、149.3、146.1、144.3、142.9、139.7、139.3、139.1、135.4、129.8、129.3、123.6、115.9、114.1、60.6、44.7、42.3。

30

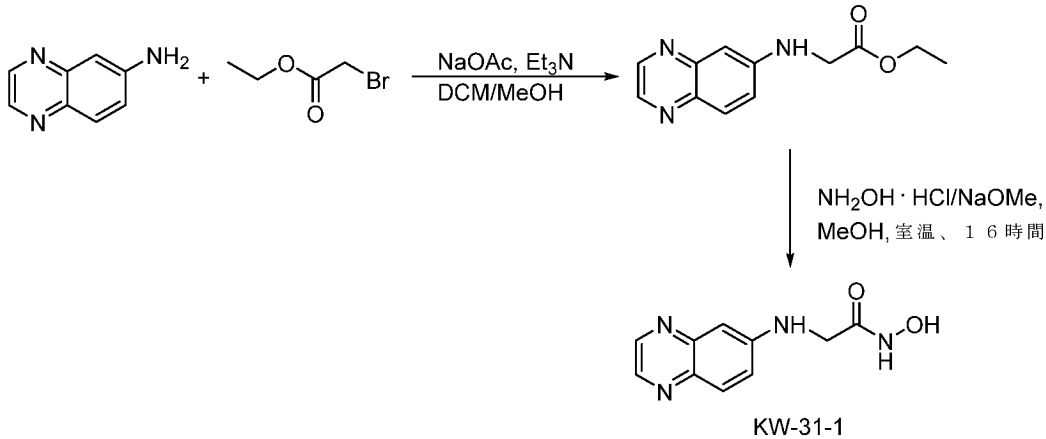
【0241】

実施例7：試験化合物KW-31-1の化学合成。

40

50

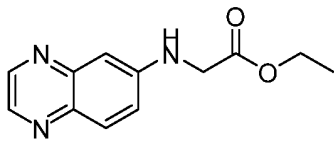
【化 2 9】



10

7.1 中間体 KW-24 の調製 :

【化 3 0】



20

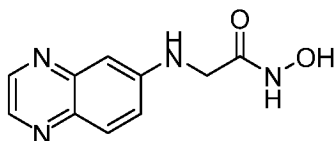
EtOH (6.9 mL) 中のキノキサリン-6-アミン (200.0 mg、1.378 mmol)、プロモ酢酸エチル (307 μ L、2.755 mmol) 及びトリエチルアミン (0.95 mL、6.888 mmol) の混合物に、酢酸ナトリウム (226 mg、2.755 mmol) を添加した。混合物を 90 で 60 分間攪拌した。追加のプロモ酢酸エチル (2 当量) 及び酢酸ナトリウム (2 当量) を添加し、混合物を 90 で 60 分間攪拌した。溶媒を除去し、残渣を MPLC (EtOAc) を介して精製して、キノキサリン-6-イルグリシン酸エチル (152.0 mg、48%) を褐色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 8.62 (d, J = 2.0 Hz, 1H)、8.51 (d, J = 2.0 Hz, 1H)、7.82 (d, J = 9.1 Hz, 1H)、7.17 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H)、6.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H)、4.99 (s, br, 1H)、4.25 (q, J = 7.1 Hz, 2H)、4.00 (d, J = 4.7 Hz, 2H)、1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) 170.4、148.1、145.4、145.0、140.8、138.3、130.3、122.3、104.2、61.8、45.3、14.3。

30

【0 2 4 2】

7.2 化合物 KW-31-1 の調製 :

【化 3 1】



40

ヒドロキシルアミン塩酸塩 (24.0 mg、346 μ mol) の MeOH (0.43 mL、173 μ mol) 溶液に、室温で、ナトリウムメトキシド (0.13 mL、571 μ mol) を添加した。混合物を室温で 0.5 時間攪拌した。その後、キノキサリン-6-イルグリシン酸エチル (40.0 mg、173 μ mol) を添加した。混合物を室温で 3 時間攪拌した。次いで、氷でクエンチし、1N HCl で中和し、EtOAc で抽出した

50

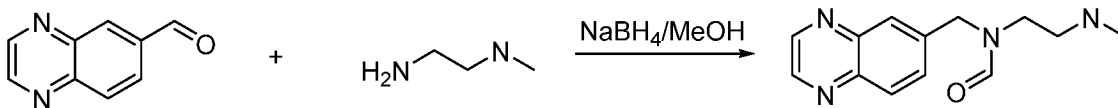
。蒸発させた残渣を、RP MPLCを介して精製し、N - ヒドロキシ - 2 - (キノキサリン - 6 - イルアミノ) アセトアミド (35.6 mg、94%、10 : 1 混合物) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆) 9.34 (s, br., 2H)、8.64 (d, J = 2.0 Hz, 1H)、8.48 (d, J = 2.0 Hz, 1H)、7.75 (d, J = 9.1 Hz, 1H)、7.36 (dd, J = 9.1, 2.6 Hz, 1H)、6.93 (t, J = 6.1 Hz, 1H)、6.75 (d, J = 2.6 Hz, 1H)、3.77 (d, J = 6.1 Hz, 2H)。少ない方の回転異性体：4.08 (d, J = 5.4 Hz, 2H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO - d₆) 166.3、149.7、145.00、144.91、140.1、137.05、129.33、122.77、102.20、44.08。少ない方の回転異性体：150.6、145.0、139.7、136.5、129.7、122.5、105.0。

10

【0243】

実施例 8 : 試験化合物 KW - 79 - 1 の化学合成。

【化32】



KW-79-1

20

MeOH (2.5 mL) 中のキノキサリン - 6 - カルバルデヒド (100 mg、632 μmol) 及び N¹, N¹ - ジメチルエタン - 1, 2 - ジアミン (55.7 mg、632 μmol) の混合物を室温で10分間攪拌した。テトラヒドロホウ酸ナトリウム (38.3 mg、1.01 mmol) を添加した。反応物を室温で1時間攪拌した。溶媒を除去し、残渣をRP MPLC (塩基性) を介して精製して、N - (2 - (ジメチルアミノ) エチル) - N - (キノキサリン - 6 - イルメチル) ホルムアミド (86.4 mg、53%、回転異性体の1 : 1 混合物) を白色の固体として得た。¹H NMR (400 MHz, MeOD - d₄) 8.88 (d, J = 2.0 Hz, 2H)、8.87 (d, J = 2.0 Hz, 2H)、8.86 - 8.83 (m, 2H)、8.43 (s, 1H)、8.32 (s, 1H)、8.09 (d, J = 8.7 Hz, 1H)、8.04 (d, J = 8.7 Hz, 1H)、8.00 (d, J = 1.8 Hz, 1H)、7.97 (d, J = 1.8 Hz, 1H)、7.78 - 7.74 (m, 2H)、4.87 - 4.77 (m, 4H)、3.46 = 3.39 (m, 4H)、2.48 - 2.43 (m, 4H)、2.21 (2つのs, 12H)。¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) 168.4、168.2、149.6、149.4、149.3、149.0、146.4、146.3、146.1、145.8、143.7、143.4、134.0、133.6、133.4、133.1、131.5、131.1、60.9、59.3、54.7、49.3、48.9、48.2、48.1、43.4。

30

【0244】

40

実施例 9 : X線結晶学

2の構造バリエーションが、TPPリボスイッチの良好な結合候補であるかどうかを評価するために、化合物17をX線結晶学的研究で調べた。TPPリボスイッチRNAは、記載されるようにインビトロ転写によって調製した²⁷。TPPリボスイッチRNA (0.2 mM) 及び17 (2 mM) を、50 mMの酢酸カリウム (pH 6.8) 及び5 mMのMgCl₂を含有する緩衝液中、60 °Cで3分間加熱し、砕いた氷で迅速冷却し、4 °Cで30分間インキュベートした後、結晶化した。結晶化のために、1.0 μLのRNA - 17複合体を、0.1 Mの酢酸ナトリウム (pH 4.8)、0.35 Mの酢酸アンモニウム、及び28% (v/v) のPEG 4000を含有する1.0 μLの貯蔵溶液と混合した。2週間にわたるハンギングドロップ蒸気拡散によって、291 Kで結晶化を実施した。結晶を

50

、15%のグリセロールを追加した母液中で凍結保護した後、液体窒素中で迅速凍結させた。NSLS - II (Brookhaven National Laboratory)、波長0.9202、17-ID-2 (FMX) ビームラインでデータを集めた。HKL200043でデータを処理した。Phenix44及び2GDIリボスイッチRNA構造を使用して、構造を分子置換によって解決した²⁷。構造をPhenixで精緻化した。有機リガンド、水分子及びイオンを、Fo-Fc及び2Fo-Fc電子密度マップに基づいて、精緻化の後期段階で添加した。

【0245】

結果は、化合物17が、J3/2接合部中のG42及びA43の間に積み重なって、TPPリガンドのチアミン部分と同様の様式でTPPリボスイッチに結合することを示した(図3)^{27, 28}。17は、RNAと、G40のリボース及びWatson-Crick面に対して各々1個、G19のリボースに対して1個の3個の水素結合を形成する。天然TPPリガンドとの複合体中のRNAと比較して、局所的なRNA構造に有意な変化がある。17結合構造では、G72は、TPPリガンドのピロリン酸部分が存在する結合部位内でひっくり返る。この結合モードは、リボスイッチ結合ポケットのチアミンサブサイトに結合された断片のためのひっくり返ったG72配向を可視化した従来の研究と一致する^{17, 34}。SAR分析と一致して、C-6置換基の配向は、RNAとの相互作用によって比較的妨げられていないように思われ、このことは、このベクターが断片精製のための良好な候補となることを暗示している。

【0246】

加えて、化合物16をX線結晶学的研究においても調査した。以下の表は、両方の化合物についてこれらの研究中に収集されたデータを示す。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. 断片及び薬物様リガンド 16 及び 17 と共結晶化したチアミンピロホスフェート (TPP) リボスイッチについての x 線結晶学データ収集及び精密化統計。

データ収集		
共結晶化した化合物	16	17
波長(Å)	0.9252	0.9184
空間群	C2	C2
セル寸法		
a、b、c(Å)	150.16、29.61、95.51	148.73、30.40、95.57
α 、 β 、 γ (°)	90.00 94.32 90.00	90.00 93.51 90.00
分解能(Å)	30.00~2.70(2.80~2.70)	29.78~2.21(2.27~2.21)
R_{merge}^b	0.152(0.581)	0.080(0.729)
R_{pim}^c	0.101(0.407)	0.069(0.623)
$CC_{1/2}$	0.981(0.656)	0.997(0.765)
$II\sigma(I)$	9.9(1.3)	10.4(1.6)
完全性(%)	95.2(92.3)	99.2(91.4)
冗長性	2.9(2.5)	4.0(3.7)
固有反射数	11,400(1,061)	21,835(1,447)
精密化		
分解能(Å)	29.05~2.70	29.78~2.21
R_{work}/R_{free} (%)	20.3/26.1	20.4/24.4
原子の数		
RNA	3335	3361
リード	48	24
その他のリガンド ^d	3	11
水	34	126
平均的な B 因子(Å ²)		
RNA	43.47	53.50
リード	35.13	39.14
リガンド	46.24	45.54
水	28.91	36.79
RMS 偏差		
結合長(Å)	0.003	0.005
結合角(°)	0.848	1.115
PDB コード	7TZR	7TZS

^a 高解像度シエル値を括弧内に示す。

^b $R_{merge} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I(h)_i$ 、ここで、 $I(h)$ は、反射 h の強度であり、 \sum_h は、すべての反射の合計であり、 \sum_i は、反射 h の i 測定値の合計である。

^c $R_{pim} = \sum_{hkl} \sqrt{(1/(n-1)) \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|} / \sum_{hkl} \sum_i I(hkl)_i$

^d リガンドは、鉛又は薬物分子を除く、結晶化溶液の構成要素 (緩衝液、カチオンなど) を示す。

10

20

30

40

50

【0247】

参考文献

1. Hajduk, P. J., Huth, J. R. & Tse, C. Predicting protein druggability. *Drug Discov. Today* 10, 1675 - 1682 (2005).
2. Vukovic, S. & Huggins, D. J. Quantitative metrics for drug-target ligandability. *Drug Discov. Today* 23, 1258 - 1266 (2018).
3. Batey, R. T., Rambo, R. P. & Doudna, J. A. Terti

- ary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 2326 - 2343 (1999).
4. Warner, K. D., Hajdin, C. E. & Weeks, K. M. Principles for targeting RNA with drug-like small molecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 547 - 558 (2018).
5. Sharp, P. A. The Centrality of RNA. *Cell* 136, 577 - 580 (2009).
6. Kozak, M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361, 13 - 37 (2005). 10
7. Corbino, K. A., Sherlock, M. E., McCown, P. J., Breaker, R. R. & Stav, S. Riboswitch diversity and distribution. *RNA* 23, 995 - 1011 (2017).
8. Cech, T. R. & Steitz, J. A. The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157, 77 - 94 (2014).
9. Parsons, C., Slack, F. J., Zhang, W. C., Adams, B. D. & Walker, L. Targeting noncoding RNAs in disease. *J. Clin. Invest.* 127, 761 - 771 (2017). 20
10. Matsui, M. & Corey, D. R. Non-coding RNAs as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 167 - 179 (2017).
11. Guan, L. & Disney, M. D. Recent advances in developing small molecules targeting RNA. *ACS Chem. Biol.* 7, 73 - 86 (2012).
12. Connelly, C. M., Moon, M. H. & Schneekloth, J. S. The Emerging Role of RNA as a Therapeutic Target for Small Molecules. *Cell Chem Biol.* 23, 1077 - 1090 (2016). 30
13. Murray, C. W. & Rees, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. *Nat. Chem.* 1, 187 - 92 (2009).
14. Doak, B. C., Norton, R. S. & Scanlon, M. J. The ways and means of fragment-based drug design. *Pharmacol. Ther.* 167, 28 - 37 (2016).
15. Cressina, E., Chen, L., Abell, C., Leeper, F. J. & Smith, A. G. Fragment screening against the thiamine pyrophosphate riboswitch th iM. *Chem. Sci.* 2, 157 - 165 (2011). 40
16. Moumne, R., Catala, M., Larue, V., Micouin, L. & Tisne, C. Fragment-based design of small RNA binders: Promising developments and contribution of NMR. *Biochimie* 94, 1607 - 1619 (2012).
17. Warner, K. D. et al. Validating fragment-based drug discovery for biological RNAs: Lead fragments bind and remodel the TPP riboswitch specifically. *Chem. Biol.* 21, 591 50

- 595 (2014) .
18. Zeiger, M. et al. Fragment based search for small molecule inhibitors of HIV-1 Tat-TAR. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24, 5576-5580 (2014) .
19. Bottini, A. et al. Targeting Influenza A Virus RNA Promoter. *Chem. Biol. Drug Des.* 86, 663-673 (2015) .
20. Hunter, C. A. & Anderson, H. L. What is cooperativity? *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48, 7488-7499 (2009) . 10
21. Ichihara, O., Barker, J., Law, R. J. & Whittaker, M. Compound design by fragment-linking. *Mol. Inform.* 30, 298-306 (2011) .
22. Zeller, M. J., Li, K., Aube, J. & Weeks, K. M. Multisite ligand recognition and cooperativity in the TPP riboswitch RNA. *Prep.* (2019) .
23. Siegfried, N. A., Busan, S., Rice, G. M., Nelson, J. A. E. & Weeks, K. M. RNA motif discovery by SHAPE and mutational profiling (SHAPE-Map). *Nat. Methods* 11, 959-65 (2014) . 20
24. Smola, M. J., Rice, G. M., Busan, S., Siegfried, N. A. & Weeks, K. M. Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension and mutational profiling (SHAPE-Map) for direct, versatile and accurate RNA structure analysis. *Nat. Protoc.* 10, 1643-1669 (2015) .
25. Merino, E. J., Wilkinson, K. A., Coughlan, J. L. & Weeks, K. M. RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.* 127, 4223-4231 (2005) . 30
26. Liu, Z.-Y. et al. Novel cis-acting element within the capsid-coding region enhances flavivirus viral-RNA replication by regulating genome cyclization. *J. Virol.* 87, 6804-18 (2013) .
27. Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A. T., Breakey, R. R. & Patel, D. J. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* 441, 1167-1171 (2006) . 40
28. Edwards, T. E. & Ferre-D'Amare, A. R. Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition. *Structure* 14, 1459-68 (2006) .
29. Thore, S., Frick, C. & Ban, N. Structural ba 50

- sis of thiamine pyrophosphate analogues binding to the eukaryotic riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8116 - 8117 (2008).
30. Busan, S. & Weeks, K. M. Accurate detection of chemical modifications in RNA by mutational profiling (MaP) with ShapeMapper 2. *RNA* 24, 143 - 148 (2018).
31. Woolson, R. *Statistical Methods for the Analysis of Biomedical Data.* (John Wiley & Sons, 1987). 10
32. Jhoti, H., Williams, G., Rees, D. C. & Murray, C. W. The 'rule of three' for fragment-based drug discovery: Where are we now? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 644 (2013).
33. Chen, L. et al. Probing riboswitch-ligand interactions using thiamine pyrophosphate analogues. *Org. Biomol. Chem.* 10, 5924 - 5931 (2012).
34. Warner, K. D. & Ferre-D'Amare, A. R. Crystallographic analysis of TPP riboswitch binding by small-molecule ligands discovered through fragment-based drug discovery approaches. *Methods Enzymol.* 549, 221 - 233 (2014). 20
35. Codd, R. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids. *Coord. Chem. Rev.* 252, 1387 - 1408 (2008).
36. Jencks, W. P. On the attribution and additivity of binding energies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4046 - 4050 (1981). 30
37. Olejniczak, E. T. et al. Stromelysin inhibitors designed from weakly bound fragments: Effects of linking and cooperativity. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5828 - 5832 (1997).
38. Borsari, V., Calderone, V., Fragai, M., Luchinat, C. & Sarti, N. Entropic contribution to the linking coefficient in fragment based drug design: A case study. *J. Med. Chem.* 53, 4285 - 4289 (2010). 40
39. Reuter, J. S. & Mathews, D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* 11, 129 (2010).
40. Busan, S., Weidmann, C. A., Sengupta, A. & Weeks, K. M. Guidelines for SHAPE Reagent Choice and Detection Strategy for RNA Structure Probing Studies. *Biochemistry* 58, 2655 - 2664 (2019).
41. Gilbert, S. D. & Batey, R. T. Monitoring RNA 50

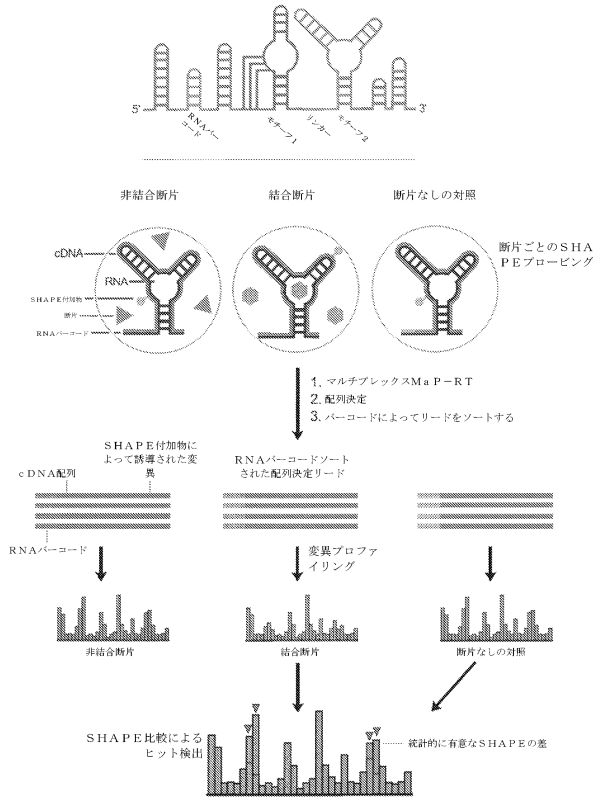
- ligand interactions using isothermal titration calorimetry. *Methods Mol. Biol.* 540, 97-114 (2009).
42. Turnbull, W. B. Divided We Fall? Studying low affinity fragments of ligands by ITC. *Microcal Application Notes* (2005).
43. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* (1997). doi:10.1016/S0076-6879(97)76066-X. 10
44. Liebschner, D. et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr.* 75, 861-877 (2019).
45. Hajduk, P. J. et al. Discovery of potent nonpeptide inhibitors of stromelysin using SAR by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5818-5827 (1997).
46. Howard, N. et al. Application of fragment screening and fragment linking to the discovery of novel thrombin inhibitors. *J. Med. Chem.* 49, 1346-1355 (2006). 20
47. Barker, J. J. et al. Discovery of a novel Hsp90 inhibitor by fragment linking. *Chem Med Chem* 5, 1697-1700 (2010).
48. Mobitz, H. et al. Discovery of Potent, Selective, and Structurally Novel Dot1L Inhibitors by a Fragment Linking Approach. *ACS Med. Chem. Lett.* 8, 338-343 (2017).
49. Hung, A. W. et al. Application of fragment growing and fragment linking to the discovery of inhibitors of mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 48, 8452-8456 (2009). 30
50. Jordan, J. B. et al. Fragment-Linking Approach Using ^{19}F NMR Spectroscopy to Obtain Highly Potent and Selective Inhibitors of α -Secretase. *J. Med. Chem.* 59, 3732-3749 (2016).
51. Maly, D. J., Choong, I. C. & Ellman, J. A. Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2419-2424 (2000). 40
52. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* (80-). 274, 1531-1534 (1996).
53. Mondal, M. et al. Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic 50

c Protease Endothiapepsin: Fragment - Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry. Angew. Chemie - Int. Ed. 55, 9422 - 9426 (2016).

54. Swayze, E. E. et al. SAR by MS: A ligand based technique for drug lead discovery against structured RNA targets. J. Med. Chem. 45, 3816 - 3819 (2002).

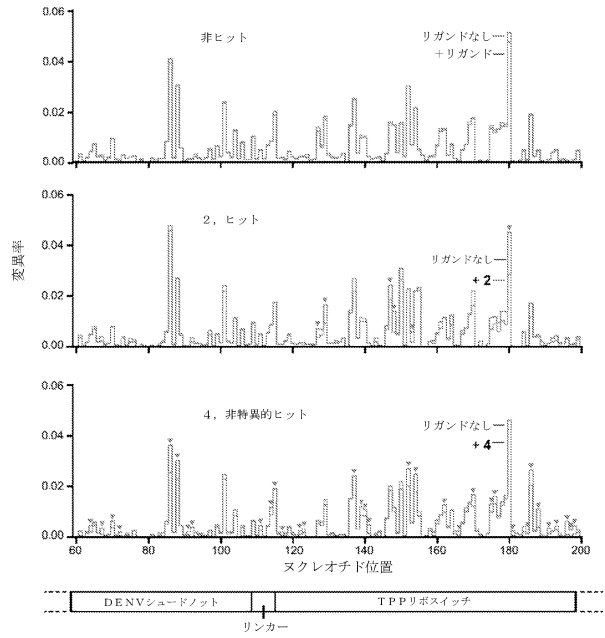
【図面】

【図1】



【図2】

10



20

30

40

50

【 3 A 】

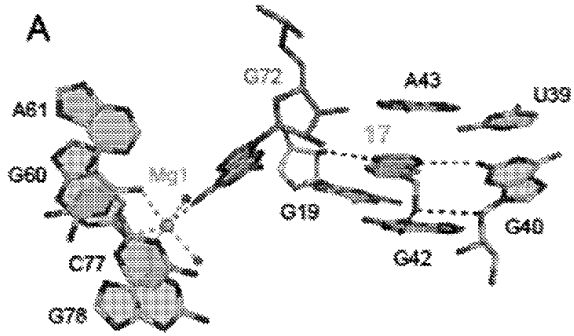
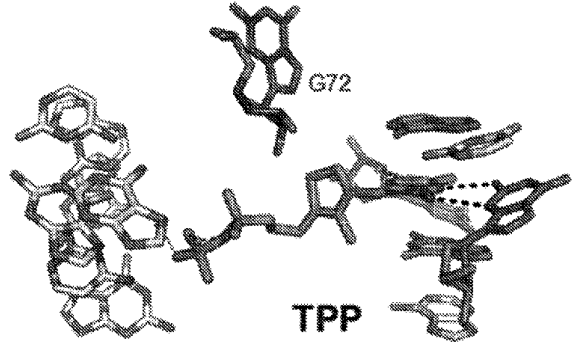


Fig. 3A

【 4 】



10

【 3 B 】

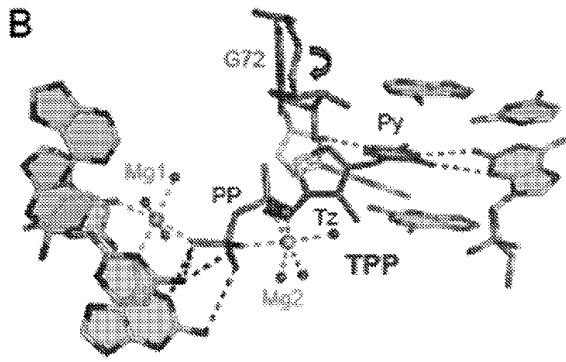
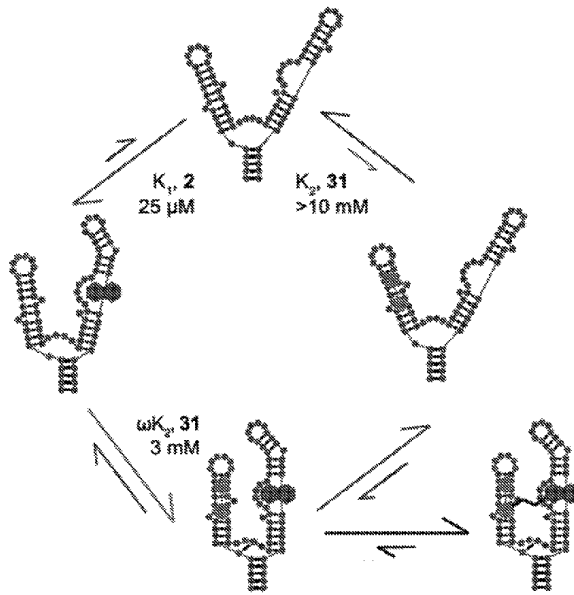


Fig. 3B

【 4 】



20

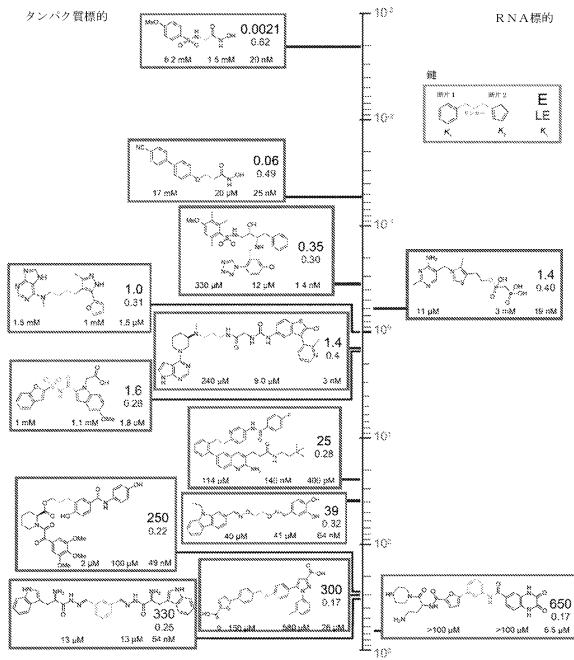
30

Fig. 4

40

50

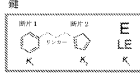
【 図 5 】



【 図 6 A 】

GGUCGCGAGUAALUCGCAEEGUGEAAGAGAUUSUAEGUGGCGACUUCGGUUCACACCGGAAGGAAC
 CGCGUGUCAAACUGGCAACAGCUGACAAAGAGAUUCCUAAAACUCAGUACUCGGGGCCUUCUGCGUGA
 AGGCUAGAGAAUJACCCGUUACCCUGAUCUGGUAUUGCCAGCGUAGGGAAGUGCUGAUCCGGUUGCGCG
 GAUCAAUCGGGCUUCGUGUCCGGUUC

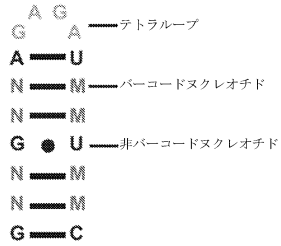
Fig. 6A



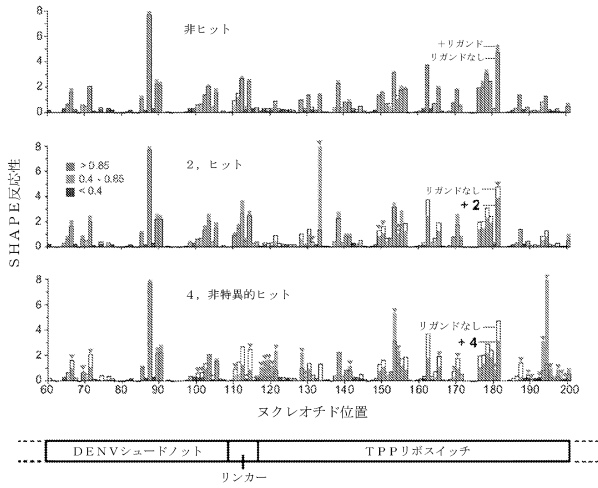
10

20

【 図 6 B 】



【 図 7 】



30

40

50

【配列表】

2024522354000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/031736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D 401/12(2006.01)i; C07D 241/12(2006.01)i; A61K 31/498(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D 401/12(2006.01); A61K 31/498(2006.01); A61K 31/506(2006.01); C07D 215/48(2006.01); C07D 217/26(2006.01); C07D 239/48(2006.01); C07D 333/66(2006.01); C07D 401/14(2006.01); C07D 405/14(2006.01); C07D 409/12(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), STN(Registry, CAplus) & Keywords: RNA, targeting, ligand, hetroaryl		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021-026245 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 11 February 2021 (2021-02-11) abstract; page 70	1-3,25-30,38
X	WO 2016-180536 A1 (SELVITA S.A.) 17 November 2016 (2016-11-17) page 382; example 216	1-3
A	CN 103980195 A (GUANGZHOU MEDICAL UNIVERSITY et al) 13 August 2014 (2014-08-13) the whole document	1-3,25-30,38
A	WO 2008-047883 A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 24 April 2008 (2008-04-24) the whole document	1-3,25-30,38
A	WO 2011-078143 A1 (SHIONOGI & CO. LTD.) 30 June 2011 (2011-06-30) the whole document	1-3,25-30,38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September 2022		Date of mailing of the international search report 19 September 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer HEO, Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-5373

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/031736

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
	<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="306 526 1345 582">1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:<li data-bbox="306 660 1345 806">2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 10, 11, 20, 21, 36, 37 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Claims 10, 11, 20, 21, 36 and 37 are regarded to be unclear because they refer to claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).<li data-bbox="306 828 1345 896">3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-9, 12-19, 22-24, 31-35 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2022/031736

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021-026245	A1	11 February 2021	AU	2020-326762	A1	11 February 2021
				EP	4010332	A1	15 June 2022
				IL	290331	A	01 April 2022
				KR	10-2022-0059472	A	10 May 2022
WO	2016-180536	A1	17 November 2016	AR	104627	A1	02 August 2017
				AU	2016-261031	A1	05 October 2017
				CA	2979302	A1	17 November 2016
				CN	107635986	A	26 January 2018
				EP	3294729	A1	21 March 2018
				JP	2018-515612	A	14 June 2018
				TW	201713641	A	16 April 2017
				US	2018-0148429	A1	31 May 2018
CN	103980195	A	13 August 2014	None			
WO	2008-047883	A1	24 April 2008	AR	063302	A1	21 January 2009
				JP	2008-115175	A	22 May 2008
				TW	200831498	A	01 August 2008
WO	2011-078143	A1	30 June 2011	None			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

7 5 1 0 , カーボロ , ボリン クリーク ドライブ 6 0 6

(72)発明者 オープ , ジェフリー

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 5 1 7 , チャペル ヒル , ライス 7 6 5 0 6

(72)発明者 リ , ケリン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 5 1 6 , チャペル ヒル , ジョーンズ クリーク プレイ
ス 1 0 3

(72)発明者 ゼラー , メレディス

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7 7 0 5 , ダラム , ステファン スカーレット レーン 5
9 0 1

F ターム (参考) 4C086 AA03 BC52 GA07 GA12 MA01 MA04 MA52 MA55 NA14 ZA02
ZA33 ZA36 ZA53 ZB21 ZB26 ZB31 ZC35