



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년06월25일
(11) 등록번호 10-0904598
(24) 등록일자 2009년06월17일

(51) Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01) A61K 31/4375 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7000647

(22) 출원일자 2003년01월16일

심사청구일자 2006년06월21일

변역문제출일자 2003년01월16일

(65) 공개번호 10-2003-0025272

(43) 공개일자 2003년03월28일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2001/006150

국제출원일자 2001년07월17일

(87) 국제공개번호 WO 2002/06282

국제공개일자 2002년01월24일

(30) 우선권주장

JP-P-2000-00216376 2000년07월17일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

Chiarelotto et al., Farmaco, 1993, Vol. 48(6), pp835-855

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이상미

(73) 특허권자

도꾸리쯔교세이호징 가가꾸 기쥬쯔 신키 기꼬

일본 사이따마켄 가와구쨌시 혼쵸 4쵸메 1방 8고

(72) 발명자

사이토이사오

일본쿄토607-8242

쿄토시야마시나쿠칸쥬지시바야마1-21

나카타니카즈히코

일본쿄토611-0013우지시토도타니사가리8-10-605

산도신쓰케

일본쿄토606-8163쿄토시사쿄쿠이쨌조지나카노타마치13코포미야비101

(74) 대리인

이병현

(54) 텔로미어 등에 결합할 수 있는 분자, 이를 이용한 방법

(57) 요약

본 발명은, 다음 일반식 (I),

[화학식 1]

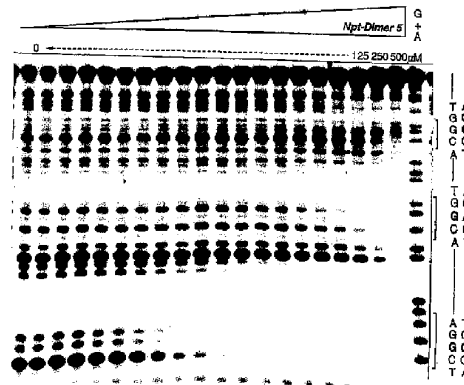
A-L-B

(I)

(식중, A는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, B는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 다른 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, L은 화학구조 부분 A 및 B를 결합하는 링커 구조를 나타낸다.)

로 표시되는 화합물을 이용하여, 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에서 상호의 염기의 쌍에 있어서 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍(미스매치의 염기쌍)에 의사적인 염기쌍을 형성시켜 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에 헤어핀 구조나 4 가닥 사슬 구조 등의 자기결합적인 구조를 형성시키는 방법, 상기 방법에 의해 효소의 활성을 저해하는 방법 등에 관련된다.

실험예



(81) 지정국

국내특허 : 대한민국, 미국

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일,
덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드,
이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투
갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

다음 일반식 (I)로 표시되는 화합물.



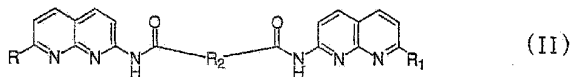
여기에서, A는 2-R-1,8-나프틸리딘기, 2-아미노나프틸리딘기, 2-아미노나프틸리딘-4-온기, 3-(2-아미노에틸)-2-퀴놀린기, 또는 2-아미노나프틸리딘-7-온기로, R은 수소원자, 하나 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~15의 알킬기, 하나 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~15의 알콕시기, 또는 알킬 부분의 하나 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~15의 모노 또는 디알킬아미노기이고,

B는 (2-메틸-1,8-나프틸리딘-7-일)-아미노카보닐기이고,

L은 하나 이상의 탄소원자가 산소원자, 질소원자 또는 카보닐기로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~20의 알킬렌기이다.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 일반식 (I)로 표시되는 화합물이 다음 일반식 (II)의 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물.



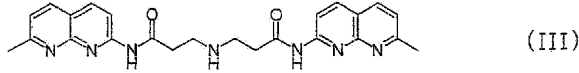
여기에서, R은 수소원자, 하나 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~15의 알킬기, 하나 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~15의 알콕시기, 또는 알킬 부분의 하나 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~15의 모노 또는 디알킬아미노기이고,

R₁은 메틸기이고,

R₂는 하나 이상의 탄소원자가 산소원자, 질소원자 또는 카보닐기로 치환되거나 치환되지 않은 탄소수 1~20의 알킬렌기이다.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 일반식 (II)로 표시되는 화합물이 다음 일반식 (III)의 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물.



청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 다음 일반식 (I),

화학식 1

<2> A-L-B (I)

<3> (식중, A는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, B는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 다른 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, L은 화학구조 부분 A 및 B를 결합하는 링커 구조를 나타낸다.),

<4> 로 표시되는 염기쌍의 미스매치 인식분자 화합물을 이용하여, 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에서 상호의 염기의 쌍에 있어서 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍(미스매치의 염기쌍)에 의사적인 염기쌍을 형성시켜 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에 헤어핀 구조와 같은 자기결합적인 구조를 형성시키는 방법, 당해 방법에 의해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에서 헤어핀 구조나 4 가닥 사슬 구조 등과 같은 자기결합적인 구조를 안정화시키는 방법, 이를 위한 안정화제, 상기 방법에 의해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에서 헤어핀 구조와 같은 자기결합적인 구조를 형성시켜 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬의 상보적 사슬을 합성하는 효소의 활성을 저해하는 방법, 이 효소활성 저해제, 및 상기 일반식 (I)로 표시되는 화합물로부터 이루어지는 의약조성물에 관련된다.

<5> 보다 구체적으로는, 염색체의 3' 말단에서의 1 가닥 사슬 DNA의 부분에 본 발명의 일반식 1로 나타낸 염기쌍의 미스매치 인식분자를 작용시켜, 당해 1 가닥 사슬 DNA의 부분에 안정한 헤어핀 구조와 같은 자기결합적인 구조를 형성시키고, 텔로머라제에 의한 텔로미어의 신장 반응을 저해하는 것으로 되는, 암세포에서 세포분열을 억제하는 방법, 및 이를 위한 의약조성물에 관련된다.

배경기술

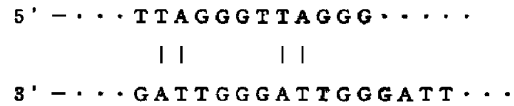
<6> 텔로미어(telomere)는 염색체의 말단에 존재하는 DNA의 부분으로, 사람 염색체 유전자의 경우에는 TTAGGG의 반복적인 배열이 계속되는 초기의 상태로는 약 10 kb 정도 길이의 DNA이다. 텔로미어에는 여러 가지 결합 단백질이 결합하여, DNA의 말단끼리 결합해서 환상의 DNA로 되는 것을 억제한다거나, 핵막과 결합하는 등의 기능을 하고 있다. 이 중의 대부분은 2 가닥 사슬이지만, 최말단의 수십 염기는 3' 말단측이 1 가닥 사슬로 돌출하고 있다.

<7> 세포분열의 경우에는 DNA가 복제되지만, 이 복제기구에서 복제 때마다 복제시의 RNA 프라이머 일부분이 DNA로 치

환되지 않기 때문에 5' 말단측의 텔로미어가 단축한다. 그래서 동시에 복제의 주형이 된 모체 DNA도 포함하여 5' 말단이 수정된 결과, DNA의 복제후에는 모체 DNA도 자손 DNA도 텔로미어 부분의 단축이 일어나게 된다. 이것은 이론적으로는 1972년에 보고되어 있지만, 1989년이 되어 DNA가 복제될 때 약 50~150 염기 정도의 텔로미어 부분이 단축되는 것이 이해될 수 있었다. 따라서, 텔로미어 부분의 길이가 약 5 kb 정도 되면 세포는 분열수명을 맞아(M 1 기) 세포의 분열을 정지한다. 정상세포에서는 텔로미어의 2 가닥 사슬 부분에 텔로미어 결합단백질의 일종인 TRF1이 결합하여 텔로미어의 연장을 억제하고, 분열수명을 맞은 세포는 텔로미어 DNA가 점차 불안정하게 되어 결국 염색체의 안정성을 유지하는 것이 불가능하게 되고, 따라서 자연사(apoptosis)(M 2 기)한다.

- <8> 한편, 암세포에서는 텔로미어 배열을 신장시키는 효소 「텔로메라제 (telomerase)」가 존재하고, 세포분열에 의해 단축된 텔로미어 배열을 연장하기 위해 무한히 세포증식을 반복하는 것이 가능하게 된다. 이것이 암세포가 정상세포와는 달리, 상기한 M 1 기나 M 2 기를 맞이하는 일 없이 비정상적으로 증식을 반복하는 것이 가능한 이유라고 생각되고 있다. 이로부터, 암세포 특유의 텔로메라제에 의한 텔로미어 배열의 신장 반응을 저해하는 화합물이 다음 세대의 항암제로서 주목될 수 있다.
- <9> 텔로메라제는 텔로미어 DNA의 1 가닥 사슬 부분을 연장하는 역전사효소로, TTAGGG의 1.5 회분에 상당하는 상보적 사슬의 주형 RNA를 내재하고 있어, 이것을 프라이머로서 신장 반응을 행한다.
- <10> 텔로미어 배열은 4 가닥의 DNA가 모인 4 중 사슬(쿼드플렉스; quadplex)를 형성하는 것이 알려져 있고, 이 쿼드플렉스 구조를 안정화시킬 수 있으면 텔로메라제에 의한 텔로미어 배열의 신장을 저해할 수 있다고 생각되어, 전세계적으로 많은 연구 그룹이 이 방면의 연구를 진행하고 있다.
- <11> 또한 텔로메라제가 결과적으로 상기한 바와 같이 텔로미어 DNA의 1 가닥 사슬 부분을 연장하는 것으로부터, 텔로미어 DNA의 1 가닥 사슬 부분을 헤어핀 구조 등에 의해 2 가닥 사슬로서 안정화시키는 것에 의해 텔로메라제의 작용을 저해하는 것이 가능한 것은 아닐까하고 본 발명자들은 생각하였다. 이와 같은 생각은 상기한 쿼드플렉스 구조의 안정화와는 근본적으로 다른 신규한 발상이다.
- <12> 그러나, 1 가닥 사슬의 텔로미어 배열에 있어서, 헤어핀 구조를 형성하는데 필요한 상보적인 배열은 TA의 부분만이 아니고, 다음에 나타내는 바와 같이 이 「TA」의 부분에서 상보적 사슬을 형성해도 그 전후에 있어서 G-G 미스매치 등의 염기의 미스매치가 생기게 된다.

화학식 2



- <13>
- <14> 상기한 배열은 텔로미어의 3' 말단측의 1 가닥 사슬 부분이 헤어핀 구조를 형성한 경우를 모식적으로 나타낸 것으로, 상기 배열의 우측은 헤어핀 구조의 루프 부분으로 전체로서는 1 가닥 사슬이다. 이 1 가닥 사슬의 텔로미어 말단의 5' 측이 2 가닥 사슬 DNA로 되어 있고, 3' 측은 텔로미어의 말단, 즉 염색체의 말단이다. 상기 배열의 종선부분은 상보적인 배열인 것을 나타내고, 그 외의 부분은 미스매치의 배열로 되어 있는 것을 나타낸다.
- <15> 이와 같이, 텔로미어의 1 가닥 사슬 부분에서 안정한 헤어핀 구조를 형성시키는 것은 통상은 곤란한데, 암세포에서는 여기에 텔로메라제가 작용하여 텔로미어의 신장반응이 야기되게 된다. 그러나, 텔로미어의 1 가닥 사슬 부분에서 G-G 미스매치 등의 염기의 미스매치를 해소하는 것이 가능하면, 텔로미어의 1 가닥 사슬 부분에서 안정한 헤어핀 구조를 형성시키는 것이 가능하고, 텔로메라제의 작용을 저해하는 것이 가능하다.
- <16> 여기에서, 본 발명자들은 2 가닥 사슬 DNA 중에 생성한 부대염기(벌지 염기)를 갖는 DNA(벌지 DNA)에 특이적으로 결합하여, 안정화하는 분자인 벌지 DNA 인식분자를 개발할 수 있었다(특개평11-262205호). 이 벌지 인식분자는 부대염기와 수소결합을 할 뿐 아니라, 벌지 염기의 존재에 의해 생기는 공간에 방향족 환과 벌지 근방의 염기와의 스택킹 상호작용을 이용하여 인터칼레이션하여 안정화되어 있는 것이다.
- <17> 본 발명자들은 이와 같은 주변 염기의 존재에 의한 스택킹 효과를 이용한 부대염기에 대한 작용에 관하여 더욱 연구를 행한 바, 염기쌍의 미스매치가 생겨 있는 장소에서도 염기와 쌍을 형성할 수 있는 분자종을 2 개 갖는 화합물이 이와 같은 스택킹 효과에 의해 비교적 안정하게 도입될 수 있음을 발견하여, 미스매치의 염기서열을 검출, 동정할 수 있는 시약을 제공할 수 있었다(특원평11-336620호).

발명의 상세한 설명

- <18> 본 발명은 이와 같은 염기쌍의 미스매치를 검출, 동정할 수 있는 시약을 이용하여 미스매치의 배열을 갖는 1 가닥 사슬의 DNA나 RNA 등의 핵산류에 안정한 헤어핀 구조나 4 가닥 사슬 구조 등을 형성시키는 방법을 제공하는 것이다.
- <19> 또한, 본 발명은 1 가닥 사슬의 텔로미어 배열에 안정한 헤어핀 구조나 4 가닥 사슬 구조 등을 형성시켜 텔로메라제의 활성을 저해하는 방법, 그리고 암세포의 증식을 억제하는 방법 및 암 증식 억제제를 제공하는 것이다.

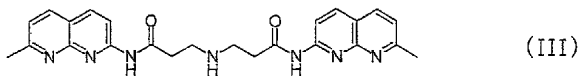
실시예

- <25> 본 발명자들은 텔로미어 DNA의 1 가닥 사슬 부분을 헤어핀 구조 등에 의해 2 가닥 사슬로 하여 안정화시키는 것에 의해 텔로메라제의 작용을 저해하는 것이 가능한 것은 아닌가 하는 신규한 발상에 기초한 것으로, 텔로미어 DNA의 1 가닥 사슬 부분이 헤어핀 구조나 4 가닥 사슬 구조 등을 갖는 경우의 염기의 미스매치, 특히 G-G 미스매치의 안정화에 착안하여, 먼저 보고한 G-G 등의 염기의 미스매치 인식분자가 텔로미어 배열에 높은 친화력으로 결합하는 것은 아닌가 하고 생각하여 실험하였다. 그 결과, G-G 미스매치 인식분자인 나프틸리딘 이중쌍은 예상한 대로 텔로미어 배열에 높은 결합을 나타낸 동시에, 텔로미어 배열의 구조가 크게 변화하는 것을 발견하였다.
- <26> 본 발명은 다음 일반식 (I)
- <27> [화학식 1]
- <28> A-L-B (I)
- <29> (식중, A는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, B는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 다른 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, L은 화학구조 부분 A 및 B를 결합하는 링커 구조를 나타낸다.),
- <30> 로 표시되는, 그 각각의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분 A 및 화학구조 부분 B, 및 당해 화학구조 부분 A 및 B를 결합하는 링커 부분 L을 갖는 화합물을 이용하여, 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬에서 상호의 염기의 쌍에 있어서 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍에 의사적으로 염기쌍을 형성시키는 방법에 관련된다. 또한, 본 발명은 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬에 상기한 의사적인 염기쌍을 형성시키는 것에 의해 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 불안정한 염기의 쌍을 안정화시키는 방법, 및 당해 화합물로부터 되는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 불안정한 염기의 쌍을 안정화시키는 안정화제에 관련된다.
- <31> 또한, 본 발명은 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬에서 상호의 염기의 쌍에 있어서 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍에 의사적인 염기쌍을 형성시킬 수 있는 다음 일반식 (I)
- <32> [화학식 1]
- <33> A-L-B (I)
- <34> (식중, A는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, B는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 다른 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, L은 화학구조 부분 A 및 B를 결합하는 링커 구조를 나타낸다.)
- <35> 로 표시되는 화합물로 되는, 올리고뉴클레오타이드 사슬의 상보적 사슬을 합성하는 효소의 활성저해제, 및 당해 효소저해제를 이용하여 효소활성을 저해하는 방법에 관련된다.
- <36> 또한, 본 발명은 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬에서 상호의 염기의 쌍에 있어서, 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍에 의사적인 염기쌍을 형성시킬 수 있는 다음 일반식 (I)
- <37> [화학식 1]
- <38> A-L-B (I)
- <39> (식중, A는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분, B는 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 다른 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는

화학구조 부분, L은 화학구조 부분 A 및 B를 결합하는 링커 구조를 나타낸다.)

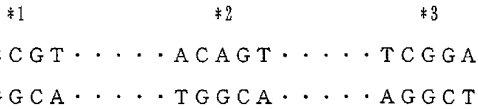
- <40> 로 표시되는 화합물, 및 약학적으로 허용될 수 있는 담체로부터 되는 의약조성물, 바람직하게는 올리고뉴클레오티드 사슬의 상보적 사슬을 합성하는 효소의 활성을 저해하는 것에 의해 치료, 예방 또는 처치하는 것이 가능한 질환을 치료, 예방 또는 처치하기 위한 의약 조성물에 관련된다.
- <41> 이하의 설명에 있어서는, 상기한 「정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍의 한쪽의 염기와 쌍을 형성할 수 있는 화학구조 부분(일반식 (I)에서 A 및/또는 B의 부분)」의 것을 단순히 「염기인식부위」로 하는 것도 있다.
- <42> 본 발명자들은 2 가닥 사슬 DNA 중에 생성하는 부대염기(별지 염기)를 갖는 DNA(별지 DNA)에 특이적으로 결합하고, 안정화하는 분자인 별지 DNA 인식분자를 개발할 수 있었다(특원평11-262205호). 이 별지 인식분자는, 별지 염기의 존재에 의해 생기는 공간에 방향족 환과 별지 근방의 염기와의 스택킹 상호작용을 이용하여 인터칼레이션하여 안정화되어 있는 것이지만, 본 발명자들은 이와 같은 별지 인식분자의 2 분자를 링커와 같은 결합 사슬로 결합시키는 것에 의해, 각각의 별지 인식분자가 염기쌍의 미스매치 부분에 있어서 별지 염기와 마찬가지로 염기쌍을 형성하고, 더우기 이들의 별지 인식분자의 양면이 2 가닥 사슬을 형성하고 있는 DNA나 RNA 사슬의 가운데에 비교적 안정하게 받아들이는 것을 발견하여, 이 특성을 이용하는 것에 의해 하이브리다이징하고 있는 핵산의 가운데 염기쌍이 미스매치를 형성하고 있는 개소를 간편하게 특정할 수 있는 미스매치 인식분자를 개발할 수 있었다(특원평11-336620호).
- <43> 본 발명은, 본 발명자들이 개발할 수 있었던 이 미스매치 인식분자의 응용에 관한 것으로, 본 발명은 당해 미스매치 인식분자를 이용하여 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에서, 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍이 존재하도록 하기 위하여 안정한 헤어핀 구조와 같은 2 가닥 사슬 구조를 취하는 것이 가능하지 않은 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬의 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기쌍(미스매치의 염기쌍)을 안정화시켜 안정한 의사적인 염기쌍을 형성시키는 방법을 제공하는 것이다. 또한, 이와 같은 의사적인 염기쌍을 형성시켜 비교적 안정한 헤어핀 구조와 같은 2 가닥 사슬 구조를 형성시키는 것에 의해, 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬의 상보적인 올리고뉴클레오티드 사슬을 합성하는 효소의 활성을 저해하는 방법을 제공하는 것이다. 그리고, 당해 상보적인 올리고뉴클레오티드 사슬을 합성하는 효소의 활성을 저해하는 것에 의해, 거기에 관련된 각종의 질환을 치료, 예방, 처치하기 위한 의약조성물을 제공하는 것이다.
- <44> 다음에, 본 발명의 방법을 설명하는데, 그 전에 미스매치 인식분자에 관하여 설명해두고자 한다.
- <45> 예를 들어, 본 발명자들은 구아닌과 수소결합을 형성하고, 또한 주위의 염기와 스택킹 효과에 의해 안정화될 수 있는 1,8-나프틸리딘 유도체를 이용하여, 이것을 링커에 의해 결합시킨 다음 식 (III)으로 표시되는 이량체를 합성하였다.

화학식 3



- <46>
- <47> 이 화합물은 1,8-나프틸리딘 부분에서 구아닌과 쌍을 형성한다. 구아닌과 별지 염기로 되어 있는 경우에는 당해 구아닌과 1,8-나프틸리딘 유도체가 쌍을 형성하기 위한 공간이 충분하게 되므로, 이 1,8-나프틸리딘 유도체와 별지 염기와의 쌍의 형성은 양자의 안정성을 검토하면 충분하지만, 미스매치의 경우에는 쌍을 형성하기 위한 장소에 다른 염기가 이미 존재하고 있는 것으로부터 공간적인 여유가 충분하지는 않고, 염기와 인접하는 염기와의 근소한 공간에 이와 같은 비교적 큰 분자종이 안정하게 들어가는가 아닌가가 큰 문제로 된다.
- <48> 따라서, 핵산의 2 가닥 사슬 중에서 구아닌-구아닌의 미스매치가 존재하고 있는 경우에 있어서, 이와 같은 1,8-나프틸리딘 부분을 2 개 갖는 화합물이 미스매치하고 있는 각각의 구아닌과 쌍을 형성하여 핵산의 사슬의 가운데에 도입되는가 아닌가를 검토하였다.
- <49> 2 가닥 사슬의 DNA 중에 GC 염기쌍, GA 미스매치 염기쌍, 및 GG 미스매치 염기쌍을 갖는 5'-³²P로 라벨링한 52 메르(mer)의 2 가닥 사슬 DNA를 조제하였다. 이 해당하는 부분의 부분배열을 다음에 나타낸다.

화학식 4



- <50>
- <51> 상기의 2 가닥 사슬 DNA에 있어서, *1로 표시한 부분은 정상인 G-C의 염기쌍이고, *2로 표시한 부분은 G-A의 미스매치 부분이고, *3 부분은 G-G 미스매치 부분이다.
- <52> 이 2 가닥 사슬의 DNA를 이용하여, 여러 가지 농도의 식 (III)의 화합물의 존재 하에 있는 DNaseI(DNA 가수분해효소) 풋프린팅 적정에 의해, DNaseI에 의한 DNA의 절단의 저해 장소를 조사하였다.
- <53> 이 결과를 도 1에 나타낸다. 도 1은 전기영동의 결과를 나타낸 도면에 대신하는 사진이다.
- <54> 도 1의 좌측으로부터 우측에 이름에 따라, 식 (III)의 화합물의 농도가 0으로부터 500 μM까지 서서히 높게 되어 있다. DNaseI(DNA 가수분해효소)에 의해 절단된 경우에는 검게 보이고, DNaseI에 의한 절단이 저해된 곳은 희게 되어 보이고 있다.
- <55> 예를 들어, G-C의 정상인 염기쌍인 경우에는, 식 (III)의 화합물의 농도를 높게 하여도 검은 그대로, 즉 DNaseI에 의해 절단이 생기는 것으로 나타낸다. 그러나, G-G와 같은 미스매치의 영역에는 식 (III)의 나프틸리딘 유도체의 농도를 높게 한 경우에는 점차 백색으로, 즉 그 절단이 저해될 수 있는 것을 알 수 있다. 이와 같은 변화는 G-A 미스매치의 영역에서도 고농도의 부분에서 생길 수 있는 것도 알 수 있다.
- <56> 이와 같은 DNA 가수분해효소에 대한 DNA의 절단 저해작용은 식 (III)의 화합물의 존재(농도를 포함하여)에 의존하고 있어, 식 (III)의 화합물에 의한 특이적인 작용으로 생각된다.
- <57> 도 1에 있어서 절단 밴드의 강도와 가해진 나프틸리딘의 농도와의 관계를 그래프로 한 것이 도 2이다. 도 2의 종축은 절단 밴드의 강도로부터 얻어진 절단의 저해비로, 0.0은 거의 완전히 절단되어 있는 상황이고, 1.0은 거의 완전히 절단이 저해되어 있는 상황을 보여주고 있다. 도 2의 그래프 중의 검은 원(●)은 G-G의 미스매치 영역의 것이고, 검은 삼각(▲)은 G-A의 미스매치 영역의 것이다.
- <58> 이 도 2의 그래프로부터도 명백한 바와 같이, 식 (III)의 화합물에 의한 G-G의 미스매치 영역에 대한 절단 저해작용은 비교적 저농도로부터 생기고, 약 10⁻⁵ M의 농도 이상에서는 거의 완전히 G-G 미스매치에 대한 절단이 저해되어 있는 것을 알 수 있다. 또한, G-A 미스매치 영역에 있어서도, 약 10⁻⁶ M의 농도 부근으로부터 절단의 저해작용이 시작되어, 5×10⁻³ M(500 μM) 부근에서는 약 90%의 절단저해가 생기는 것을 알 수 있다.
- <59> 그 결과, 식 (III)의 화합물의 G-G 미스매치의 결합상수(Ka(GGmis))는 1.13×10⁷ M⁻¹로 얻어지고, 마찬가지로 G-A의 미스매치의 결합상수(Ka(GAmis))는 1.63×10⁴ M⁻¹로 얻어진다,
- <60> 양자의 결합상수의 비((Ka(GGmis))/(Ka(GAmis)))는 696이고, 식 (III)이 G-G 미스매치에 대하여 특이적으로 작용하고 있는 것을 알 수 있다. 또한, 식 (III)의 화합물의 G-G 미스매치 염기쌍에 대한 결합상수가 10⁷의 차수로 비교적 크다고 하는 것은, 식 (III)의 화합물이 상상할 수 있는 이상으로 안정하게 G-G 미스매치 염기쌍 부분에 도입되어 있는 것을 나타낸다.
- <61> DNA의 2 가닥 사슬에 도입된 본 발명의 미스매치 염기 인식분자는 비교적 안정한 쌍을 형성하고, 이와 같은 쌍의 형성에 의해 친연의 효소가 인식하는 것이 가능하지 않은 염기의 배열을 새롭게 형성하고 있다고 생각된다.
- <62> 본 발명의 일반식 (I)로 표시되는 화합물(미스매치 인식분자)이 비교적 안정하게 염기의 미스매치 부분에 도입되는 양상을 모식적으로 나타낸 것이 도 3이다.
- <63> 도 3의 좌측은 2 가닥 사슬의 DNA에서 G-A의 미스매치가 있는 부분을 나타내고 있다. 다른 장소에서는 정상인 염기쌍이 형성되어 있고, G-A의 부분에서 미스매치가 있음에도 불구하고 전체로서는 하이브리다이즈하고 있는 DNA이다. 여기에, N_A-N_G로 표시되는 본 발명의 미스매치 인식분자가 더해지면, 도 3의 우측과 같은 상태로 되는 것으로 생각된다. 즉, 미스매치하고 있는 염기인 구아닌(G)은 미스매치 인식분자의 구아닌 인식부위(N_G)와 쌍을 형성하고, 미스매치하고 있는 다른 쪽의 염기인 아데닌(A)은 미스매치 인식분자의 아데닌 인식부위(N_A)와 쌍을

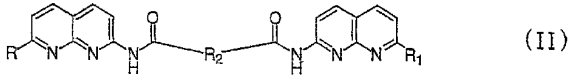
형성하고, 그리고 미스매치 인식분자의 구아닌 인식부위(N_G)와 아데닌 인식부위(N_A)는 적당한 길이 및 적당한 자유도가 있는 링커(-)로 결합되어 있어, 2 가닥 사슬의 DNA의 사슬의 가운데에 거의 다른 정상인 염기쌍과 마찬가지로 모양으로 도입되어 있다고 생각된다(도 3의 우측 참조).

- <64> 그리고, 본 발명의 미스매치 인식분자가 2 가닥 사슬의 DNA의 사슬의 가운데에 비교적 안정하게 도입되는 다른 하나의 큰 이유는, 미스매치 인식분자의 염기 인식부위 (예를 들어, 조금 전 예에서의 구아닌 인식부위(N_G)나 아데닌 인식부위(N_A))가 전후의 염기에 의한 스택킹 효과(염기끼리의 분자간 힘과 같은 것)에 의해 안정화되어 있다는 것이다. 도 3의 우측에서의 점선은 이와 같은 염기에 의한 스택킹 효과를 보여주고 있다. 이와 같은 스택킹 효과가 생기는 요인의 하나로 π 전자계의 상호작용(파이 스택킹 효과)이 생각될 수 있는 것으로부터, 전후의 염기의 종류에 의해 스택킹 효과에 정도의 차이가 생기는 것도 있지만, 본 발명의 분자와 미스매치 영역의 결합을 극단적으로 저하시키는 것은 없다.
- <65> 따라서, 본 발명의 미스매치 인식분자의 염기인식부위(일반식 (I)에서는 A 및 B의 화학구조 부분)는 단독으로 목적의 염기와 수소결합이 가능하다고 하는 곳에서만이 아니라, 전후 또는 주위의 염기에 의한 스택킹 효과가 얻어지는 화학구조인 것이 필요하다.
- <66> 이와 같이, 본 발명의 일반식 (I)로 표시되는 화합물은 2 개의 염기 인식부위를 적당한 크기 및 적당한 자유도를 갖는 링커로 결합시킨 화합물로, 상기에 예시한 G-G 미스매치에 한정되는 것은 아니다.
- <67> 상기한 예에서는, 구아닌(G)-구아닌(G)의 미스매치를 예로 들어 구아닌 염기와 안전한 수소결합을 형성하는 1,8-나프틸리딘 유도체를 염기 인식부위로 이용한 미스매치 인식분자를 나타내었지만, 미스매치의 인식은 G-G 미스매치에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 미스매치 인식분자에서 염기 인식부위는 미스매치의 염기의 한쪽을 인식하여 당해 염기와 왓슨-크릭(Watson-Crick) 형의 염기쌍을 형성하는 것이 가능하고, 주위의 염기에 의한 스택킹 효과를 얻을 수 있는 분자종을 선택하는 것에 의해, 예시한 구아닌에 한정되지 않고, 각종의 염기와 염기쌍을 형성할 수 있는 것이면 좋다.
- <68> 예를 들어, 미스매치의 염기가 시토신인 경우에는 염기 인식부위로서 2-아미노나프틸리딘-4-온 또는 그의 유도체 등이, 미스매치의 염기가 아데닌인 경우에는 2-퀴놀론 유도체, 예를 들어 3-(2-아미노에틸)-2-퀴놀론 또는 그의 유도체 등이, 또한 미스매치의 염기가 티민인 경우에는 2-아미노나프틸리딘-7-온 또는 그의 유도체 등이 이용될 수 있다.
- <69> 특정의 미스매치 염기에 특이적으로 인식되는 본 발명의 미스매치 인식분자에서 염기 인식부위는, 수소결합을 형성하기 위한 수소결합 부위와, 근방의 염기에 스택킹되기 위한 평면구조를 갖고 있는 복소환식 방향족기를 갖는 것이 바람직하지만, 또한 염기에 대한 선택성을 증강하기 위하여 어느 정도의 입체 장애를 갖는 치환기를 갖는 복소환식 방향족기가 바람직하다.
- <70> 이와 같은 치환기로서는, 예를 들어 탄소수 1~15, 바람직하게는 1~10, 더욱 바람직하게는 1~7의 직쇄상 또는 분지상의 알킬기, 탄소수 1~15, 바람직하게는 1~10, 더욱 바람직하게는 1~7의 직쇄상 또는 분지상의 알킬기로부터 되는 알콕시기, 탄소수 1~15, 바람직하게는 1~10, 더욱 바람직하게는 1~7의 직쇄상 또는 분지상의 알킬기로 모노- 또는 디-치환되어 있는 모노- 또는 디-알킬 아미노기 등이 권장된다.
- <71> 이들 알킬기, 알콕시기 또는 모노- 또는 디-알킬 아미노기에서 1 개 또는 그 이상의 탄소원자는 산소원자 또는 질소원자로 치환되어 있어도 좋다.
- <72> 또한, 본 발명의 일반식 (I)로 표시되는 화합물에서 링커부 L로서는, 2 개의 염기 인식부위를 적당한 크기로 적당한 자유도를 부여하는 것이면 특히 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어 탄소수 1~20, 바람직하게는 1~15, 더욱 바람직하게는 1~12의 직쇄상 또는 분지상의 포화 또는 불포화의 알킬렌기이고, 당해 알킬렌기 중의 1 개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자, 질소원자 또는 카보닐기로 치환되어 있어도 좋은 알킬렌기가 권장된다. 바람직한 링커로서는, 상기한 식 (III)의 화합물과 같이 양단이 아미드 결합 부분을 갖고, 중앙부에 질소원자를 갖는 것이 권장된다.
- <73> 이 링커 부분은, 2 개의 염기 인식부위를 결합시키는 것만은 아니고, 이 링커 부분으로부터 담체에 고정화하기 위한 가지를 결합시키는 것도 가능하다. 예를 들어, 링커 중앙부 부근의 질소원자의 개소로부터 더욱 말단에 담체와 결합하기 위한 관능기 등을 갖는 알킬렌기와 같은 가지를 연장하여, 필요에 따라 담체에 고정화하는 것도 가능하다.

<74> 본 발명의 일반식 (I)에서 염기 인식부위 A 또는 B와 링커부 L의 결합은 탄소-탄소 결합이어도 좋는데, 합성의 간편성으로는 관능기에 의한 결합이 바람직하다. 관능기에 의한 결합으로서는 에테르 결합, 에스테르 결합, 아마이드 결합, 인산에 의한 결합 등 여러 가지 타입의 것을 선택하는 것이 가능한데, 아마이드 결합이 바람직하다.

<75> 본 발명의 미스매치 염기 인식분자에 있어서, G-G 미스매치에 대한 바람직한 일반식 (I)의 화합물로서 다음 일반식 (II),

화학식 5



<76>

<77> (식중, R, R₁는 수소원자, 탄소수 1~15의 알킬기로 당해 알킬기 중의 1 개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알킬기, 탄소수 1~15의 알콕시기로 당해 알콕시기 중의 1 개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 알콕시기, 또는 탄소수 1~15의 모노 또는 디알킬아미노기로 당해 알킬아미노기 중의 1 개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자 또는 질소원자로 치환되어도 좋은 모노 또는 디알킬아미노기를 나타내고,

<78> R₂는 탄소수 1~20의 알킬렌기로 당해 알킬렌기 중의 1 개 또는 그 이상의 탄소원자가 산소원자, 질소원자 또는 카보닐기로 치환되어도 좋은 알킬렌기를 나타낸다.)

<79> 로 표시되는 화합물 또는 이의 고정화물이 권장된다. 여기에서, 「고정화물」은 다음 화합물이 담체에 고정화되어 있는 상태의 것 또는 고정화될 수 있도록 상기한 「가지」를 연장시킨 상태의 화합물을 말한다.

<80> R₂에서 알킬렌기는 일반식 (II)로 표시되어 있는 바와 같이 2 개의 알킬렌기이다.

<81> 또한, 본 발명의 미스매치 염기 인식분자는 이를 단독으로 사용하는 것도 가능하지만, 분자중의 적당한 위치에 예를 들어 링커 부분이나 링커로부터 고정화 등을 위하여 연장된 가지 등에 방사성원소를 도입하거나, 화학발광 또는 형광을 발하는 분자종을 도입하는 등, 표식화하여 사용하는 것도 가능하다. 측정수단으로서의 표식화는 검출대상의 DNA나 RNA 등 핵산부분의 표식화에 의한 것도 가능하다.

<82> 또한, 본 발명의 미스매치 염기 인식분자의 적당한 위치에서 폴리스티렌 등의 고분자 재료와 직접 또는 알킬렌기 등을 이용하여 결합시키고, 이것을 고정화하여 사용하는 것도 가능하다.

<83> 본 발명의 미스매치 염기 인식분자는 저분자 유기화합물로, 통상의 유기합성법에 의해 적의 제조하는 것이 가능하다. 예를 들어 상기한 1,8-나프틸리딘 유도체는 2-아미노-1,8-나프틸리딘 또는 2-아미노-7-메틸-1,8-나프틸리딘을 N-보호-4-아미노-부티르산의 반응성 유도체, 예를 들어 산염화물을 반응시키고, 2 위치의 아미노기를 아실화한 후, 보호기를 탈보호하여 아미노기를 제조하는 것이 가능하다. 이 경우의 보호기로서는 염산염이나 아실기나 알콕시카보닐기 등의 펩티드 합성에서 사용되는 아미노 보호기를 사용하는 것이 가능하다.

<84> 이와 같이 하여 얻어진 염기 인식부위를, 양 말단에 카복실기 또는 그의 반응성 유도체기를 갖는 링커용의 화합물과 반응시키는 것에 의해 목적의 미스매치 염기 인식분자를 얻는 것이 가능하다. 이 경우에, 링커용 화합물의 분자 중에 질소원자 등의 반응성 기가 존재하고 있는 경우에는, 상기한 보호기 등으로 적의 보호하여 사용하는 것이 가능하다.

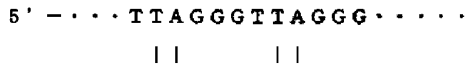
<85> 본 발명은 당해 미스매치 인식분자를 이용하여 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에서, 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍이 존재하도록 안정화 헤어핀 구조와 같은 2 가닥 사슬 구조를 하는 것이 가능하지 않은 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬의 정상인 염기쌍을 형성하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍(미스매치 염기쌍)을 안정화시켜 안정한 의사적인 염기쌍을 형성시키는 방법을 제공하는 것이다. 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬로서는 mRNA나 rRNA 등 전체가 1 가닥 사슬의 것이어도 좋고, 말단이 평활단이 아닌 2 가닥 사슬 DNA의 말단 부분의 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬이어도 좋다.

<86> 예를 들어, 진핵세포에서 염색체의 말단부분인 텔로미어 영역에서는, 그 말단의 수십 염기가 1 가닥 사슬 상태로 있고, 이 부분을 본 발명에서 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬로서 사용하는 것이 가능하다.

<87> 이 1 가닥 사슬의 텔로미어 배열에서, 헤어핀 구조를 형성하는데 필요한 상보적인 배열은 TA 부분만 아니라, 다음에 나타내는 바와 같이 이 「TA」의 부분에서 상보적 사슬을 형성하여도 그 전후에서 G-G 미스매치 등 염기의

미스매치가 생기는 것으로 된다.

<88> [화학식 2]



<89> $3' \text{ - } \cdot \cdot \cdot \text{ GATTGGGATTGGGATT } \cdot \cdot \cdot$

<90> 상기한 배열은 텔로미어의 3' 말단측의 1 가닥 사슬 부분이 헤어핀 구조를 형성한 경우를 모식적으로 나타낸 것으로, 상기 배열의 우측은 헤어핀 구조의 루프 부분으로 전체로서는 1 가닥 사슬이다. 이 1 가닥 사슬의 텔로미어 말단의 5' 측이 2 가닥 사슬 DNA로 되어 있고, 3' 측은 텔로미어의 말단, 즉 염색체의 말단이다. 상기 배열의 종선부분은 상보적인 배열인 것을 나타내며, 그밖의 부분은 미스매치의 배열로 되어 있는 것을 나타낸다.

<91> 이 텔로미어 배열의 1 가닥 사슬 부분에 있어서, 미스매치로 되어 있는 G-G 미스매치 및/또는 G-T 미스매치에서 상기한 미스매치 인식분자를 이용하여 의사적인 염기쌍을 형성시키는 것이 가능하면, 이 텔로미어 배열의 1 가닥 사슬 부분에서 안정한 헤어핀 구조를 형성시키는 것이 가능하게 되는 것으로 본 발명자들은 생각하였다. 그래서, 사람 텔로미어를 이용하여 상기 식 (III)의 미스매치 인식분자에 의한 실험을 행하였다.

<92> 1 가닥 사슬의 사람 텔로미어 배열의 DNA를 이용하여, 여러 가지 농도에서 식 (III)의 화합물(이하, 나프틸리딘 이량체) 또는 단독으로 ND의 존재 하에 있는 DNaseI(DNA 가수분해효소) 풋프린팅 적정에 의해 DNaseI에 의한 DNA의 절단의 저해장소를 조사하였다.

<93> 이 결과를 도 4에 나타낸다. 도 4는 도 2와 마찬가지로의 실험 결과를 보여주는데, 도 4의 종축은 절단 밴드의 강도로부터 얻어진 절단의 저해비로, 0.0은 거의 완전히 절단되어 있는 상황이고, 1.0은 거의 완전히 절단이 저해되어 있는 상황을 보여주고 있다. 도 4의 횡축은 가해진 식 (III)의 화합물의 농도(M)와 G-G 미스매치 농도의 비 $([GG]/[ND])(ND$ 는 식 (III)의 화합물을 나타낸다)를 나타낸다.

<94> 이러한 도 4의 그래프로부터도 명백한 바와 같이, 식 (III)의 화합물에 의한 G-G의 미스매치 영역에 대한 절단 저해작용은 비교적 저농도 $([GG]/[ND]=0.5)$ 로부터 생기고, 농도비 $[GG]/[ND]$ 가 약 3 이상에서 거의 완전히 G-G 미스매치에 대한 절단이 저해되어 있는 것을 알 수 있다.

<95> 이 결과, 식 (III)의 화합물의 G-G 미스매치로의 결합상수($K_a(GGmis)$)는 $4.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 로 얻어졌다.

<96> 이 결과는 식 (III)의 화합물이 상상할 수 있는 이상으로 안정하게 G-G 미스매치 염기쌍 부분에 도입되어 있는 것을 나타내는데, 1 가닥 사슬의 텔로미어에 있어서 G-G 미스매치 부분에서 비교적 안정한 쌍을 형성하고, 이와 같은 쌍의 형성에 의해 천연의 효소가 인식하는 것이 가능하지 않은 염기의 쌍을 형성한 것을 알 수 있다.

<97> 다음에 CD 스펙트럼에 의해, 식 (III)의 화합물(나프틸리딘 이량체)의 첨가에 의한 텔로미어의 구조변화를 측정하였다. 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5에서 1은 사람 텔로미어 단독의 경우의 CD 스펙트럼이고, 2는 사람 텔로미어에 나프틸리딘 이량체를 첨가한 경우의 CD 스펙트럼이다. 종축은 각도 Θ (도 $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)이고, 횡축은 파장(nm)이다.

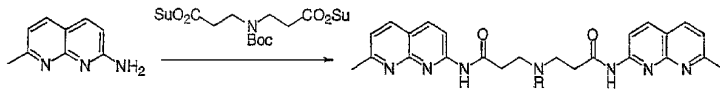
<98> 도 5에 나타낸 바와 같이 사람 텔로미어에 나프틸리딘 이량체를 첨가하는 것에 의해 CD 스펙트럼이 크게 변화하는데, 이것은 나프틸리딘 이량체의 첨가에 의해 텔로미어의 구조가 크게 변화한 것을 가리키는 것이다.

<99> 사람 텔로미어의 구조, 특히 1 가닥 사슬의 부분이 통상은 어떠한 구조로 되어 있는가 하는 것은 충분하게는 해석될 수 없지만, 헤어핀 구조와 같은 형태나 4중 사슬 구조(쿼드플렉스)와 같은 형태를 하고 있다고 생각되고 있다. 그러나, 이와 같은 구조에 있어서도, 이러한 구조를 안정하게 유지하기 위해 필요한 충분한 염기쌍을 형성하는 것은 가능하지 않고, 텔로메라제 등의 작용에 의해 간단하게 1 가닥 사슬 구조로 되돌아가는 것이 가능하여, 텔로메라제에 의해 말단의 텔로미어의 신장반응이 진행하게 된다.

<100> 진술한 바와 같이 텔로미어의 말단 부분에, 본 발명의 미스매치 인식분자를 첨가하는 것에 의해 통상은 미스매치인 염기쌍에서도(예를 들어 G-G 미스매치) 의사적으로 염기쌍을 형성시키는 것이 가능하여, 일부의 염기쌍에 의해 형성되어 있는 헤어핀 구조나 4중 사슬 구조(쿼드플렉스)를 당해 의사적인 염기쌍의 형성에 의해 효소가 작용할 수 없는 정도로 안정한 구조로 하는 것이 가능하다. 그리고, 그 결과로서 텔로메라제에 의한 텔로미어 말단의 신장반응을 저해하는 것이 가능하여, 텔로미어의 신장이 행하여지지 않는 세포는 곧 증식의 수명이 끝나게 된다. 그 결과 암세포도 통상 세포와 마찬가지로 증식이 정지하여 사멸하게 된다.

- <101> 이상의 설명에서는, 본 발명에서 미스매치 인식분자로서 G-G 미스매치의 경우를 구체적으로 설명하여 왔는데, 일반식 (I)로 표시되는 미스매치 인식분자의 A 및 B의 부분을 다른 염기와 쌍을 형성할 수 있는 것으로 대신하는 것에 의해, T-G 미스매치에 있어서도 같은 수법에 의해 행하는 것이 가능하다.
- <102> 본 발명에서 일반식 (I)로 표시되는 미스매치 인식분자가 비교적 안정하게 염기의 미스매치 부분에 도입되는 상태를 모식적으로 나타낸 것이 도 3이다.
- <103> 도 3의 좌측은 2 가닥 사슬의 DNA에서 G-A의 미스매치가 있는 부분을 보여주고 있다. 다른 개소에서는 정상인 염기쌍이 형성되어 있어, G-A의 부분에서 미스매치가 있음에도 불구하고 전체로서는 하이브리다이즈하고 있는 DNA이다. 이것에, N_A-N_G 로 표시되는 본 발명의 미스매치 인식분자가 가해지면, 도 3의 우측과 같은 상태로 되는 것으로 생각된다. 즉, 미스매치하고 있는 염기의 구아닌(G)은 미스매치 인식분자의 구아닌 인식부위(N_G)와 쌍을 형성하고, 미스매치하고 있는 다른 쪽 염기의 아데닌(A)은 미스매치 인식분자의 아데닌 인식부위(N_A)와 쌍을 형성하는데, 미스매치 인식분자의 구아닌 인식부위(N_G)와 아데닌 인식부위(N_A)는 적절한 길이 및 적절한 자유도를 갖는 링커(-)로 결합되어 있어, 2 가닥 사슬의 DNA의 사슬 가운데 대체로 다른 정상인 염기쌍과 마찬가지로인 형상으로 도입되어 있다고 생각된다(도 3의 우측 참조).
- <104> 본 명세서에서 사용하고 있는 「의사적인 염기쌍」이라고 하는 것은, 천연적으로 존재하는 염기의 쌍과는 다른 염기의 쌍이라는 의미로, 염기쌍의 강도를 의미하는 것은 아니다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 「정상인 염기쌍」이라는 것은 천연적으로 존재하는 염기의 쌍으로, G-C, A-T, 또는 A-U의 염기쌍을 말한다.
- <105> 본 발명은 텔로미어의 말단과 같이 1 가닥 사슬 상태의 올리고뉴클레오티드 사슬에 있어서, 통상의 상태로는 생기지 않는 의사적인 염기쌍을 형성시키는 것에 의해, 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드의 상보적 사슬을 합성하는 효소의 활성을 저해한다는 신규한 생각에 기초한 것이다. 상보적 사슬을 합성하는 효소의 활성을 저해할 수 있는 것이라면, 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬의 어느 부분에 의사적인 염기쌍을 형성시켜도 좋다. 예를 들어, 프라이머 영역이나 신장반응이 진행되는 영역이어도 좋다. 또한, 상보적 사슬을 합성하는 효소로서는 DNA 폴리머라제와 같은 DNA 합성효소이어도 좋고, RNA 폴리머라제와 같은 RNA 합성효소이어도 좋고, 또한 역전사효소이어도 좋다.
- <106> 본 발명의 효소활성 저해제로서는, 상기한 일반식 (I)로 표시되는 화합물의 1 종 또는 2 종 이상을 그대로 사용하여도 좋고, 적당한 담체와 함께 사용하는 것도 가능하다. 또한, 표적세포에 특이적으로 작용하도록 표적세포에 친화성을 갖는 물질로 수식하여 사용하는 것도 가능하다. 그리고, 사용 상황을 예측하기 위하여 적당한 표지로 수식하여 사용하는 것도 가능하다.
- <107> 또한, 본 발명의 의약조성물로서는, 상기한 일반식 (I)로 표시되는 화합물의 1 종 또는 2 종 이상을 그대로 사용하여도 좋고, 적당한 담체와 함께 사용하는 것도 가능하다. 또한, 담체로서는 약학적으로 허용되는 담체라면 좋다. 본 발명의 의약조성물은 경구 또는 비경구 투여된다.
- <108> 본 발명은 염기쌍의 미스매치에 의해 안정한 2 가닥 사슬 또는 4 중 사슬의 구조를 취하는 것이 가능하지 않은 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬에서 당해 미스매치 부분에 일반식 (I)로 표시되는 미스매치 인식분자를 이용하여 「의사적인 염기쌍」을 형성시켜 안정한 2 가닥 사슬 또는 4 중 사슬의 구조를 형성시키고, 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬이 갖는 기능, 예를 들어 그 상보 사슬을 합성하는 효소에 의한 상보 사슬의 합성 등을 저해하는 것에 의해, 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오티드 사슬의 기능에 기인하는 각종 질환을 치료, 예방 및/또는 치치하는 것이 가능하다고 하는 신규한 개념을 제공하는 것으로, 본 발명은 당해 개념을 이용하는 각종 구체적인 수법을 포함하는 것이고, 본 발명은 각각의 구체적인 수법에 한정되는 것은 아니다.
- <109> 다음에, 구체적인 시험예에 의해 본 발명을 상세히 설명하는데, 본 발명은 이들의 구체예에 한정되는 것은 아니다.
- <110> 실시예
- <111> 실시예 1 (식 (III)의 화합물의 합성)
- <112> 다음 식으로 표시되는 화학반응에 따라 표기의 화합물을 합성하였다.

반응식 1



<113>

<114>

(식중의 Boc는 t-부톡시카보닐기를 나타낸다)

<115>

N-Boc화 디카본산의 숙신이미딜에스테르(313 mg, 0.74 mmol)를 클로로포름(15 ml)에 용해하고, 2-아미노-7-메틸-1,8-나프틸리딘(294 mg, 1.85 mmol)을 가하였다. 실온에서 48 시간 반응후 후처리에 의해 Boc화 디나프틸리딘 아미드를 얻었다. 이것을 4 N의 염산을 포함하는 초산에틸에 용해하고 실온에서 2 시간 반응시키면, 표기의 디나프틸리딘 아미드가 통산수율 13%로 얻어졌다.

<116>

¹H NMR (CD₃OD, 400 Mhz) δ :

<117>

8.26(d, 2H, J=8.8Hz), 8.14(d, 2H, J=8.8Hz), 8.11(d, 2H, J=8.0Hz),

<118>

7.34(d, 2H, J=8.0Hz), 3.20(t, 4H, J=6.0Hz), 2.84(t, 4H, J=6.0Hz),

<119>

2.68(s, 6H);

<120>

FABMS (NBA), m/e (%): 444 [(M+H)⁺, 10], 246 (40), 154 (100);

<121>

HRMS 계산치: C₂₄H₂₆O₂N₇ [(M+H)⁺] 444.2146

<122>

실측치: 444.2148

<123>

실시에 2

<124>

5' 말단을 ³²P로 표지한 52 염기의 DNA를 G-G 및 G-A의 미스매치가 생기도록 하이브리다이즈시켜 2 가닥 사슬 DNA로 하였다(도 1의 우측 참조).

<125>

이 2 가닥 사슬의 DNA에 여러 가지 농도의 실시에 1에서 얻어진 화합물을 가하고, DNaseI 풋프린팅 적정에 의해 조사하였다.

<126>

즉, 이 2 가닥 사슬의 DNA(<4 nM 스트랜드 농도)를, NaCl(100 mM) 및 MgCl₂(5 mM)를 포함하는 트리스 염산 완충액(10 mM, pH 7.6)으로 여러 가지 농도로 조정된 실시에 1에서 얻어진 화합물과 함께, 4 °C로 12 시간 인큐베이션하였다. 이것에 0.2 U의 DNaseI(DNA 가수분해효소)를 가하고, 25 °C에서 8 분간 인큐베이션하였다. 그 후 에탄올 침전에 의해 DNA를 회수하고, 이것을 12% 폴리아크릴아미드 및 7 M 요소를 함유하는 겔을 이용하여 전기영동하였다.

<127>

이 결과를 도 1에 나타낸다.

<128>

실시에 3

<129>

다음의 염기서열을 갖는 22 메르(mer)의 올리고뉴클레오티드,

<130>

5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'

<131>

를 포함하는 카코딜산나트륨 완충(10 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM) 용액을 70 °C에서 5 분 가열하고, 올리고머가 4 중 사슬을 이루도록 천천히 냉각하였다 (Structure, 263, 1 (1993)). 이 용액에 여러 가지 농도의 나프틸리딘 이량체 용액을 적하하고, 360 nm의 흡광도 변화에 기초하여 나프틸리딘 이량체의 결합량을 구하였다.

<132>

그 결과를 도 4에 나타낸다. 또한, 스카차드 플롯으로부터 결합정수를 구한 결과, 결합정수가 4.2×10⁵ M⁻¹인 것을 알 수 있었다.

<133>

실시에 4

<134>

다음의 염기서열을 갖는 22 메르(mer)의 올리고뉴클레오티드,

<135>

5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'

- <136> 를 포함하는 카코딜산나트륨 완충(10 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM) 용액을 70 °C에서 5 분 가열하고, 올리고머가 4 중 사슬을 이루도록 천천히 냉각하였다 (Structure, 263, 1 (1993)). 이 용액에 여러 가지 농도의 나프틸리딘 이량체 용액(0~50 μM)을 가한 후, 7 °C에서 5 분간 방치하고, 그 온도에서 원이색성 스펙트럼(CD 스펙트럼)을 측정하였다.
- <137> 결과를 도 5에 나타낸다. 얻어진 스펙트럼은 나프틸리딘 이량체의 첨가에 의해 도 5의 화살표 방향으로 크게 변화하는 것을 알 수 있다. 이 스펙트럼 변화로부터, 나프틸리딘 이량체를 첨가하지 않은 경우에 4 중 사슬 구조를 취하고 있는 올리고머 DNA가, 나프틸리딘 이량체를 첨가하는 것에 의해 그 구조를 크게 변화시키는 것을 알 수 있었다.

산업상 이용 가능성

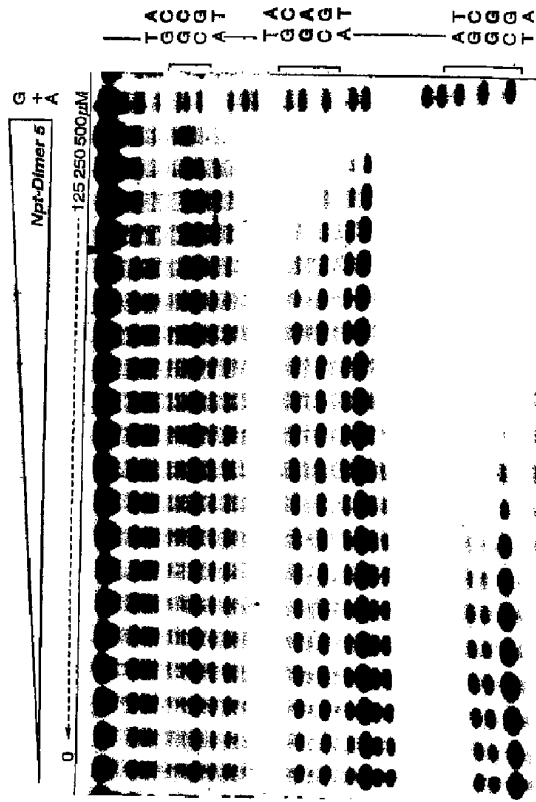
- <138> 본 발명의 방법에 의해, 일반식 (1)로 표시되는 미스매치 인식분자를 이용하여 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬에 의사적인 염기쌍을 형성시키는 것에 의해, 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬 중에 비교적 안정한 2 가닥 사슬 또는 4 가닥 사슬의 구조를 간단히 형성시키는 것이 가능하다. 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬 중에 이와 같은 비교적 안정한 구조를 형성시키는 것에 의해, 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬이 갖는 기능을 저해하는 것이 가능하여, 예를 들어 염색체 말단의 텔로미어 영역의 신장반응을 저해하는 것이 가능하여, 당해 1 가닥 사슬의 올리고뉴클레오타이드 사슬이 갖는 기능에 기인하는 각종의 질환, 예를 들어 암 등의 치료, 예방, 처치에 유용하게 된다.

도면의 간단한 설명

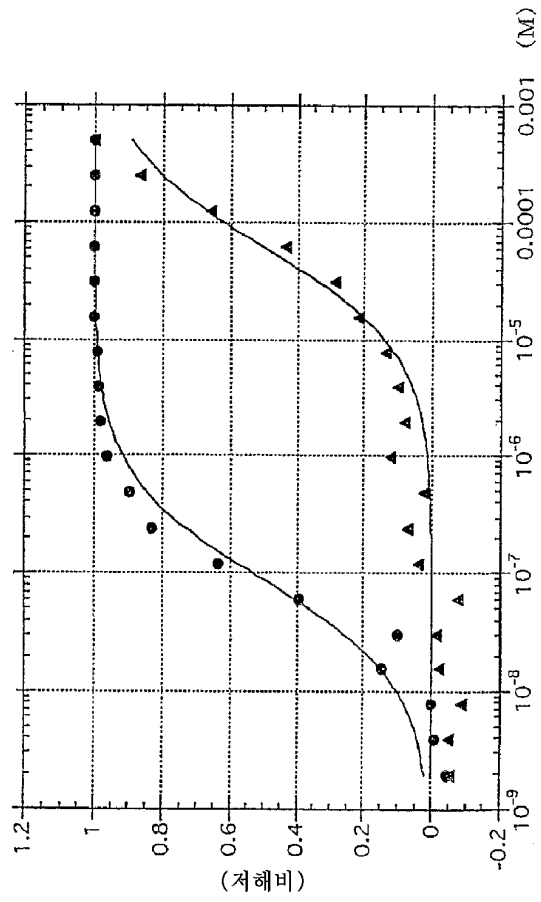
- <20> 도 1은 본 발명의 미스매치 인식분자에 의한 미스매치 부위의, DNaseI에 의한 절단의 저해효과를 나타낸 도면을 대신하는 사진이다.
- <21> 도 2는 본 발명의 미스매치 인식분자를 이용한 경우의 DNaseI에 의한 절단의 저해효과를 나타낸 그래프이다.
- <22> 도 3은 본 발명의 미스매치 인식분자의 미스매치 부분에서의 작용을 모식적으로 나타낸 것이다.
- <23> 도 4는 텔로미어 배열을 갖는 1 가닥 사슬 DNA를 이용하여, 본 발명의 미스매치 인식분자를 첨가한 경우의 DNaseI에 의한 절단의 저해효과를 나타낸 그래프이다.
- <24> 도 5는 텔로미어 배열을 갖는 1 가닥 사슬 DNA를 이용하여, 여러 가지 농도의 본 발명의 미스매치 인식분자를 첨가한 경우 및 첨가하지 않은 경우의 CD 스펙트럼의 변화를 나타낸 것이다. 도 5의 1은 첨가하지 않은 경우를, 2는 첨가한 경우를 나타내고, 화살표는 첨가한 경우 스펙트럼의 변화하는 방향을 나타내고 있다.

123

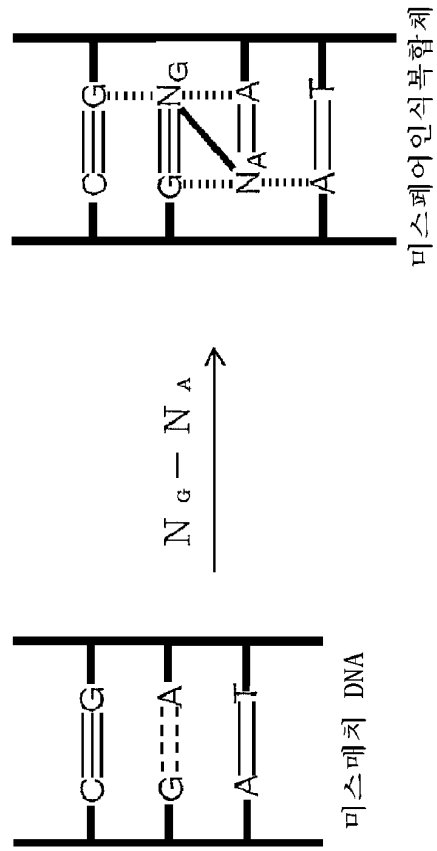
123



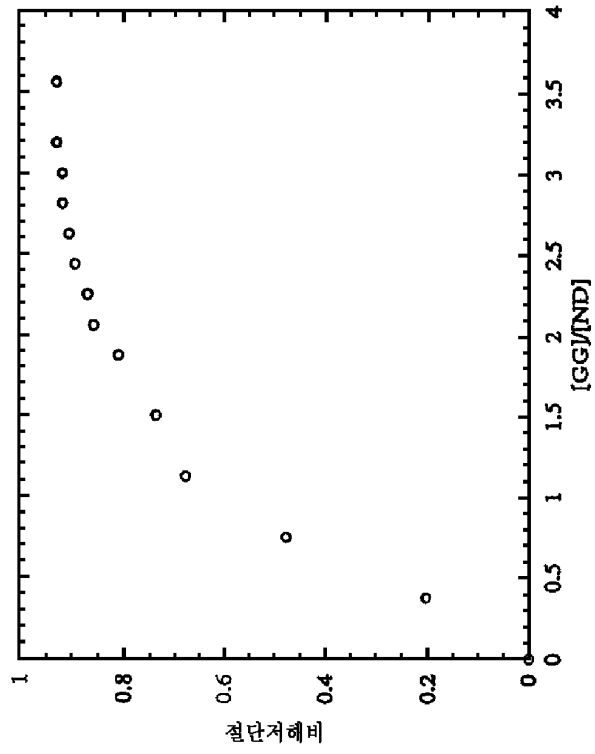
도면2



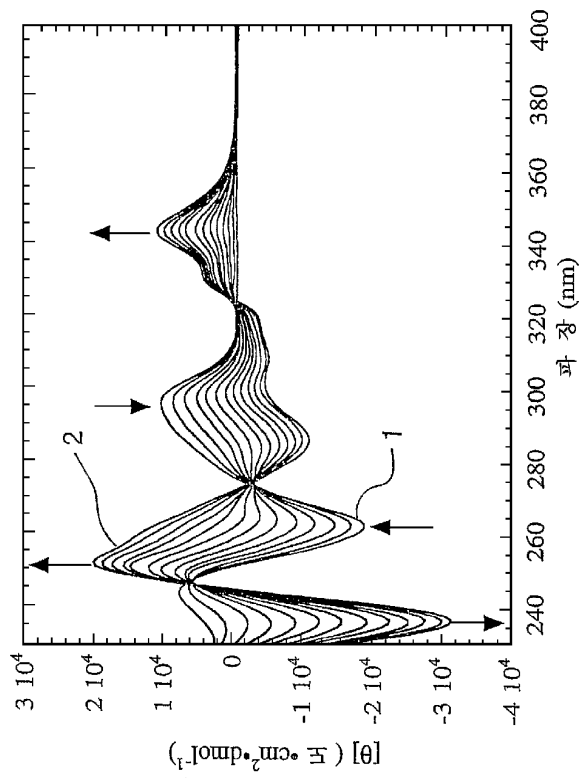
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION
 <120> MOLECULES CAPABLE OF BINDING TO TELOMERE AND THE LIKE AND METHOD WITH THE USE OF THE SAME
 <130> P1021059/PCT/JP
 <150> JP2000-216376
 <151> 2000-07-17
 <160> 4
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> telomere sequence
 <400> 1
 ttagggtttag gg 12
 <210> 2
 <211> 5
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Single-stranded oligonucleotide chain to form normal G-C pair
 <400> 2
 accgt 5
 <210> 3
 <211> 5
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Single-stranded oligonucleotide chain to form G-A mismatch pair
 <400> 3
 acagt 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Single-stranded oligonucleotide chain to form G-G mismatch pair
 <400> 4
 tcgga 5