

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-520988

(P2020-520988A)

(43) 公表日 令和2年7月16日 (2020.7.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 2/00 (2006.01)	C O 7 K 2/00	4 B O 5 O
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Z N A D	4 H O 4 5
G01N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531 Z	
C07K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00	
C07K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 191 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-504095 (P2020-504095)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月4日 (2018.4.4)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年11月26日 (2019.11.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/026014
 (87) 国際公開番号 W02018/187423
 (87) 国際公開日 平成30年10月11日 (2018.10.11)
 (31) 優先権主張番号 62/482,018
 (32) 優先日 平成29年4月5日 (2017.4.5)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

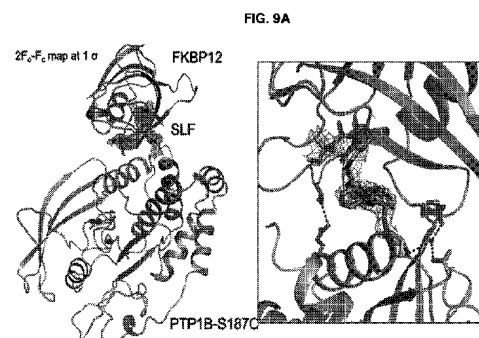
(71) 出願人 519359402
 レボリューション メディシNZ インコ
 ーポレイテッド
 REVOLUTION MEDICINE
 S, INC.
 アメリカ合衆国 94063 カリフォル
 ニア州 レッドウッド シティ サジナウ
 ドライブ 700
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質-タンパク質界面を分析するための方法及び試薬

(57) 【要約】

本開示は、タンパク質-タンパク質界面、例えばプレゼンタータンパク質 (例えば、FKBPファミリーのメンバー、シクロフィリンファミリーのメンバー、またはPIN1) 及び標的タンパク質間の界面を分析するのに有用な方法及び試薬を提供する。いくつかの実施形態では、標的及び/またはプレゼンタータンパク質は、細胞内タンパク質である。いくつかの実施形態では、標的及び/またはプレゼンタータンパク質は、哺乳類タンパク質である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンパク質結合部分及び架橋基を含む化合物。

【請求項 2】

前記架橋基が、アミノ酸と化学選択的に反応することができる部分である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記架橋基が、スルフヒドリル反応性架橋基、アミノ反応性架橋基、カルボキシル反応性架橋基、カルボニル反応性架橋基、またはトリアゾール形成架橋基である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

10

【請求項 4】

前記架橋基が、スルフヒドリル反応性架橋基である、請求項 3 に記載の化合物。

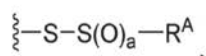
【請求項 5】

前記架橋基が、混合ジスルフィドを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

前記架橋基が、式 I :

【化 1】



式 I

20

の構造を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、

a が、0、1、または 2 であり、

R^A が、任意選択で置換された C₁ - C₆ アルキル、任意選択で置換された C₁ - C₆ ヘテロアルキル、任意選択で置換された C₆ - C₁₀ アリール、または任意選択で置換された C₂ - C₉ ヘテロアリールである、請求項 5 に記載の化合物。

30

【請求項 7】

R^A が、任意選択で置換された C₂ - C₉ ヘテロアリールである、請求項 6 に記載の化合物。

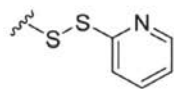
【請求項 8】

前記任意選択で置換された C₂ - C₉ ヘテロアリールが、ピリジルである、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 9】

前記架橋基が、構造：

【化 2】



40

を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 10】

R^A が、任意選択で置換された C₁ - C₆ ヘテロアルキルである、請求項 6 に記載の化

50

合物。

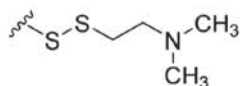
【請求項 1 1】

前記任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキルが、N，N－ジメチルーエチレンである、請求項 1 0 に記載の化合物。

【請求項 1 2】

前記架橋基が、構造：

【化 3】



10

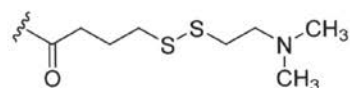
を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

前記架橋基が、構造：

【化 4】



20

を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 1 2 に記載の化合物。

【請求項 1 4】

R^A が、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキルである、請求項 6 に記載の化合物。

30

【請求項 1 5】

前記任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキルが、メチルである、請求項 1 0 に記載の化合物。

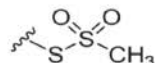
【請求項 1 6】

a が、2 である、請求項 1 4 または 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

前記架橋基が、構造：

【化 5】



40

を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 6 に記載の化合物。

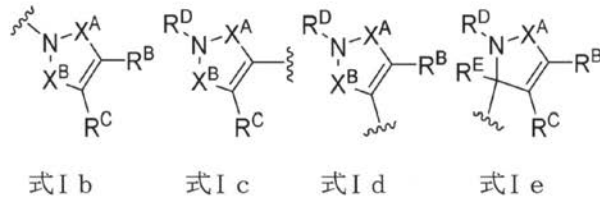
【請求項 1 8】

前記架橋基が、マレイミドを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 9】

50

前記架橋基が、式 I b、I c、I d、または I e：
【化 6】



の構造を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、

X^A が、 $-C(O)-$ または $-SO_2-$ であり、

X^B が、 $-C(O)-$ または $CR^E R^F$ であり、

R^B 及び R^C が、独立して、水素、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^D が、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^E 及び R^F が、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである、請求項 18 に記載の化合物。

【請求項 20】

前記架橋基が、式 I b の構造を含む、請求項 19 に記載の化合物。

【請求項 21】

X^A が、 $-C(O)-$ である、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 22】

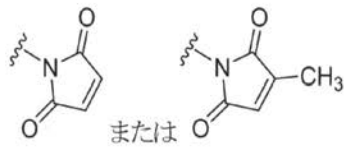
X^B が、 $-C(O)-$ である、請求項 20 または 21 に記載の化合物。

【請求項 23】

R^B 及び R^C が、水素または任意選択で置換された C_1-C_6 アルキルである、請求項 20～22 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 24】

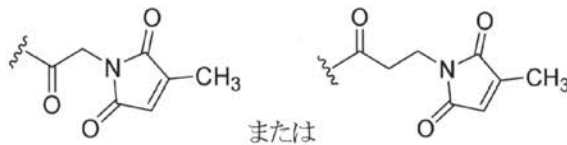
前記架橋基が、構造：
【化 7】



を含み、
式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 2 3 に記載の化合物。

【請求項 2 5】

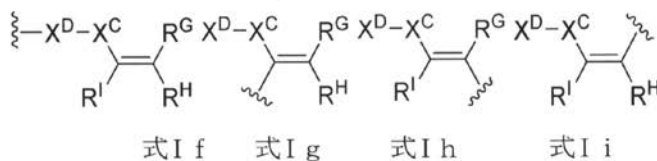
前記架橋基が、構造：
【化 8】



を含み、
式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 2 4 に記載の化合物。

【請求項 2 6】

前記架橋基が、式 I f、I g、I h、または I i：
【化 9】



の構造を含み、
式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、
 X^C が、 $-C(O)-$ または $-SO_2-$ であり、
 X^D が、存在しない、 $NR^J R^K$ 、または OR^L であり、
 R^G 、 R^H 、及び R^I が、独立して、水素、ニトリル、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、
 R^J 、 R^K 、及び R^L が、独立して、存在しない、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任

任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル、または任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル $C_1 - C_6$ アルキルである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 27】

前記架橋基が、式 I f の構造を含む、請求項 26 に記載の化合物。

10

【請求項 28】

X^D が、存在しない、請求項 26 または 27 に記載の化合物。

【請求項 29】

R^G 、 R^H 、及び R^I が、水素である、請求項 26 ～ 28 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 30】

X^C が、 $-SO_2-$ である、請求項 26 ～ 29 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 31】

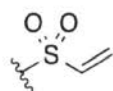
前記架橋基が、ビニルスルホンを含む、請求項 26 ～ 30 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 32】

前記架橋基が、構造：

【化 10】



を含み、

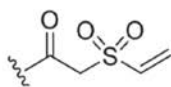
30

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 26 に記載の化合物。

【請求項 33】

前記架橋基が、構造：

【化 11】



40

を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 32 に記載の化合物。

【請求項 34】

X^C が、 $-C(O)-$ である、請求項 26 ～ 29 のいずれか一項に記載の化合物。

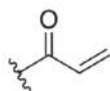
【請求項 35】

前記架橋基が、ビニルケトンを含む、請求項 26 ～ 29 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 36】

50

前記架橋基が、構造：
【化 1 2】

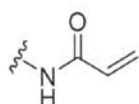


を含み、
式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 3 5 に記載の化合物。

10

【請求項 3 7】

前記架橋基が、構造：
【化 1 3】

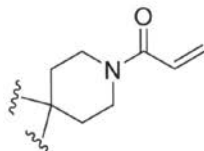


を含み、
式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 3 6 に記載の化合物。

20

【請求項 3 8】

前記架橋基が、構造：
【化 1 4】



30

を含み、
式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 3 6 に記載の化合物。

【請求項 3 9】

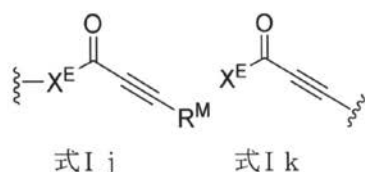
前記架橋基が、イオンを含む、請求項 2 6 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 4 0】

前記架橋基が、式 I j または I k :

【化 1 5】

40



の構造を含み、
式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、
 X^E が、存在しない、 $NR^N R^O$ 、または OR^P であり、
 R^M が、水素、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたア

50

ミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^N 、 R^O 、及び R^P が、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである、請求項 39 に記載の化合物。

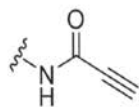
【請求項 41】

前記架橋基が、式 I j の構造を含む、請求項 40 に記載の化合物。

【請求項 42】

前記架橋基が、構造：

【化 16】



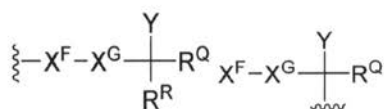
を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 40 または 41 に記載の化合物。

【請求項 43】

前記架橋基が、式 I m または I n：

【化 17】



式 I m

式 I n

の構造を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、

X^F が、存在しない、 $NR^S R^T$ 、または OR^U であり、

X^G が、存在しないまたは $-C(O)-$ であり、

Y が、脱離基であり、

R^Q 及び R^R が、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C

C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^S 、 R^T 、及び R^U が、独立して、存在しない、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の化合物。

10

【請求項 4 4】

Y が、ハロゲンである、請求項 4 3 に記載の化合物。

20

【請求項 4 5】

前記ハロゲンが、塩化物またはフッ化物である、請求項 4 4 に記載の化合物。

【請求項 4 6】

Y が、ニトリルである、請求項 4 3 に記載の化合物。

【請求項 4 7】

X^F 及び X^G が、存在しない、請求項 4 3～4 6 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 4 8】

R^Q 及び R^R が、水素である、請求項 4 3～4 7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 4 9】

前記架橋基が、ハロゲン化アルキルを含む、請求項 4 3 に記載の化合物。

30

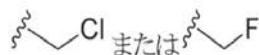
【請求項 5 0】

前記ハロゲン化アルキルが、塩化アルキルまたはフッ化アルキルである、請求項 4 9 に記載の化合物。

【請求項 5 1】

前記架橋基が、構造：

【化 1 8】



40

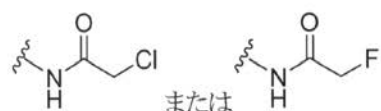
を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 5 0 に記載の化合物。

【請求項 5 2】

前記架橋基が、構造：

【化 1 9】



を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 5 1 に記載の化合物。

10

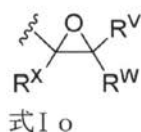
【請求項 5 3】

前記架橋基が、エポキシドを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5 4】

前記架橋基が、式 I o :

【化 2 0】



20

の構造を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、

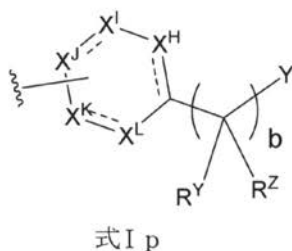
R^V 、 R^W 、及び R^X が、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリー

30

【請求項 5 5】

前記架橋基が、式 I p :

【化 2 1】



40

の構造を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、

点線が、前記構造が芳香族となるために必要に応じて含まれる任意選択の二重結合を表し、

b が、0、1、または 2 であり、

50

Yが、脱離基であり、

R^Y及びR^Zが、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロアリール、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロアリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルC₁－C₆アルキルであり、

X^H、X^I、X^J、X^K、及びX^Lのそれぞれが、独立して、存在しない、NR^{A A}、またはCR^{A B}であり、X^H、X^I、X^J、X^K、及びX^Lのうちの少なくとも5つが、NR^{A A}、またはCR^{A B}であり、

R^{A A}が、存在しない、または水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロアリール、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロアリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、もしくは任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルC₁－C₆アルキルであり、

R^{A B}が、水素、ニトリル、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロアリール、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロアリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、または任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルC₁－C₆アルキルである、請求項1～4のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項56】

少なくとも1つのR^{A B}が、電子吸引基である、請求項55に記載の化合物。

【請求項57】

1～3つのR^{A B}が、電子吸引基である、請求項56に記載の化合物。

【請求項58】

Yが、ニトリル、ハロゲン、メシレート、トシレート、またはトリフレートである、請求項55～57のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項59】

前記架橋基が、構造：

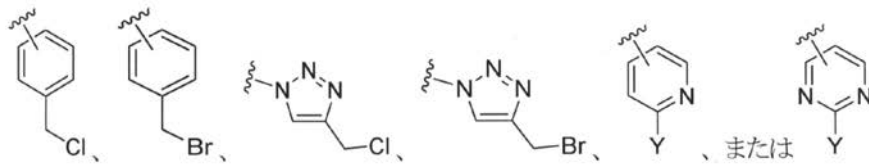
10

20

30

40

【化 2 2】



10

を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 5 5 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 0】

前記架橋基が、構造：

【化 2 3】



20

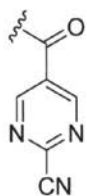
を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 5 9 に記載の化合物。

【請求項 6 1】

前記架橋基が、構造：

【化 2 4】



30

を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示する、請求項 6 0 に記載の化合物。

40

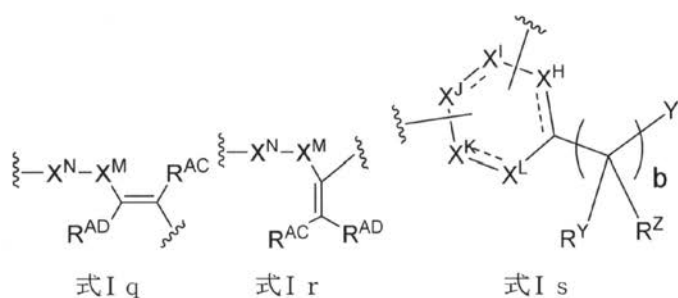
【請求項 6 2】

前記架橋基が、内部架橋基である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 3】

前記架橋基が、式 I q、I r、または I s：

【化 2 5】



10

の構造を含み、

式中、波線が、前記架橋基の、前記化合物の残部への付着点を図示し、

X^M が、 $-C(O)-$ または $-SO_2-$ であり、

X^N が、存在しない、 NR^{AE} 、または O であり、

R^{AC} 及び R^{AD} が、独立して、水素、ニトリル、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

20

R^{AE} が、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである、請求項 6 2 に記載の化合物。

30

【請求項 6 4】

X^N が、 NR^{AE} であり、 R^{AE} が、水素である、請求項 6 3 に記載の化合物。

【請求項 6 5】

R^{AC} 及び R^{AD} が、水素である、請求項 6 3 または 6 4 に記載の化合物。

【請求項 6 6】

X^M が、 $-C(O)-$ である、請求項 6 3 ～ 6 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 7】

X^M が、 $-SO_2-$ である、請求項 6 3 ～ 6 5 のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項 6 8】

前記タンパク質結合部分及びタンパク質間の相互作用が、非共有結合的である、請求項 1 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6 9】

前記タンパク質結合部分及びタンパク質間の相互作用が、共有結合的である、請求項 1 ～ 6 7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7 0】

プレゼンタータンパク質結合部分及び架橋基を含む、化合物。

【請求項 7 1】

50

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、表 1 に記載の遺伝子のいずれか 1 つによってコードされるタンパク質と結合することができる、請求項 70 に記載の化合物。

【請求項 72】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、プロリルイソメラーゼ結合部分である、請求項 70 に記載の化合物。

【請求項 73】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、FKBP 結合部分、シクロフィリン結合部分、または PIN1 結合部分である、請求項 70～72 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 74】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、FKBP 結合部分である、請求項 73 に記載の化合物。

【請求項 75】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP25、FKBP51、または FKBP52 と結合することができる、請求項 74 に記載の化合物。

【請求項 76】

前記 FKBP 結合部分が、選択的 FKBP 結合部分である、請求項 74 または 75 に記載の化合物。

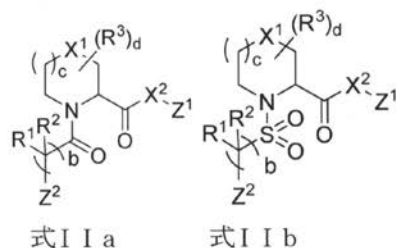
【請求項 77】

前記 FKBP 結合部分が、非選択的 FKBP 結合部分である、請求項 74 または 75 に記載の化合物。

【請求項 78】

前記 FKBP 結合部分が、式 I I a または I I b :

【化 26】



の構造を含み、

式中、Z¹ 及び Z² が、それぞれ、独立して、任意選択で置換された C₁ - C₆ アルキル、任意選択で置換された C₁ - C₆ ヘテロアルキルであるか、または Z¹ 及び Z² が、それらが付着している原子と、組み合わせあって、任意選択で置換された 10～40 員の大環状分子を形成し、Z¹ または Z² のうちの少なくとも 1 つが、前記架橋基への付着点を含み、

b 及び c が、独立して、0、1、または 2 であり、

d が、0、1、2、3、4、5、6、または 7 であり、

X¹ 及び X² が、それぞれ、独立して、存在しない、CH₂、O、S、SO、SO₂、または NR⁴ であり、

各 R¹ 及び R² が、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C₁ - C₆ アルキル、任意選択で置換された C₂ - C₆ アルケニル、任意選択で置換された C₂ - C₆ アルキニル、任意選択で置換された C₁ - C₆ ヘテロアルキル、任意選択で置換された C₂ - C₆ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C₂ - C₆ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C₃ - C₁₀ カルボシクリル、任意選択で置換された C₆ - C₁₀ アリール、任意選択で置換された C₆ - C

C_{10} アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル $C_1 - C_6$ アルキルであるか、あるいは R^1 及び R^2 が、それらが結合している炭素原子と組み合わせあって、 $C=O$ を形成するまたは R^1 及び R^2 が、組み合わせあって、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリルもしくは任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリルを形成し、

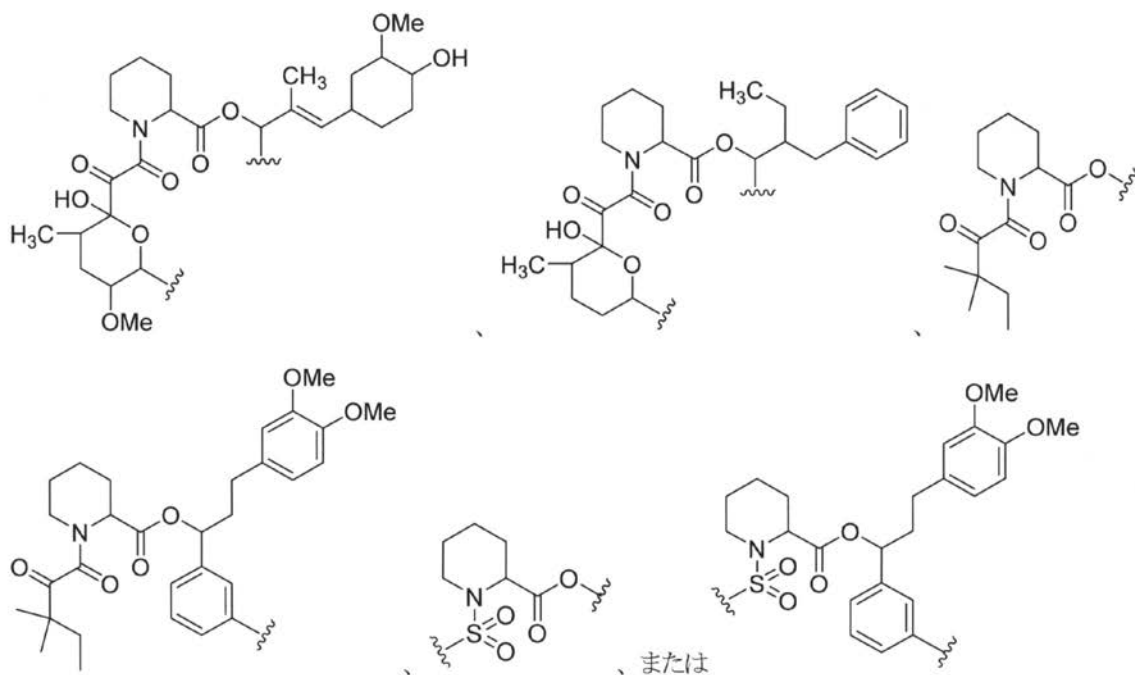
各 R^3 が、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル、もしくは任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル $C_1 - C_6$ アルキルであるか、または2つの R^8 が組み合わせあって、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、もしくは任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリールを形成し、

各 R^4 が、独立して、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 $C_3 - C_7$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、及び任意選択で置換された $C_3 - C_7$ カルボシクリル $C_1 - C_6$ アルキルである、請求項74～77のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項79】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、構造：

【化27】



を含む、請求項78に記載の化合物。

【請求項80】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、シクロフィリン結合部分である、請求項73に記載の化合物。

【請求項81】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、PP1A、CYPB、CYPC、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYPL1、CYP60、CYPJ、PPI L4、PPI L6、RANBP2、またはPPWD1と結合することができる、請求項80に記載の化合物。

【請求項82】

前記シクロフィリン結合部分が、選択的シクロフィリン結合部分である、請求項80または81に記載の化合物。

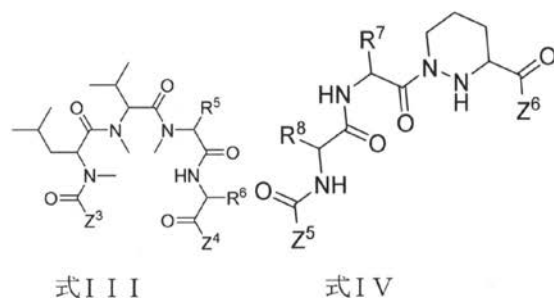
【請求項83】

前記シクロフィリン結合部分が、非選択的シクロフィリン結合部分である、請求項80または81に記載の化合物。

【請求項84】

前記シクロフィリン結合部分が、式IIIまたはIV：

【化28】



の構造を含み、

式中、Z³、Z⁴、Z⁵、及びZ⁶が、それぞれ、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキルであるか、またはZ³及びZ⁴もしくはZ⁵及びZ⁶が、それらが付着している原子と、組み合わさって、任意選択で置換された10～40員の大環状分子を形成し、

Z³、Z⁴、Z⁵、Z⁶、またはR⁵のうちの少なくとも1つが、前記架橋基への付着点を含み、

eが、0、1、2、3、または4であり、

R⁵が、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、または任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルC₁－C₆アルキルであり、

R⁶が、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキルであり、

各R⁷が、独立して、ヒドロキシル、シアノ、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、または任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルC₁－C₆アルキルであり、

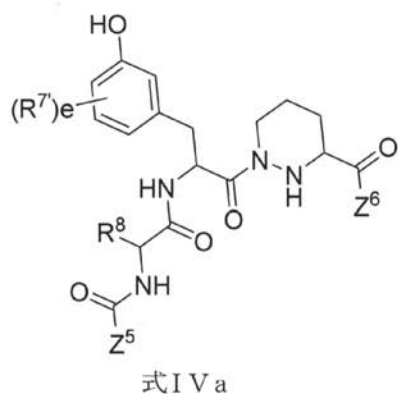
R⁸が、水素、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたアリール、C₃－C₇カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－

C₆ アルキル、及び任意選択で置換された C₃ - C₇ カルボシクリル C₁ - C₆ アルキルである、請求項 80 ~ 83 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 85】

前記シクロフィリン結合部分が、式 I V a :

【化 29】



10

の構造を含み、

式中、各 R⁷ が、独立して、ヒドロキシル、シアノ、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C₁ - C₆ アルキル、任意選択で置換された C₂ - C₆ アルケニル、任意選択で置換された C₂ - C₆ アルキニル、任意選択で置換された C₁ - C₆ ヘテロアルキル、任意選択で置換された C₂ - C₆ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C₂ - C₆ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C₃ - C₁₀ カルボシクリル、任意選択で置換された C₆ - C₁₀ アリール、任意選択で置換された C₆ - C₁₀ アリール C₁ - C₆ アルキル、任意選択で置換された C₂ - C₉ ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換された C₂ - C₉ ヘテロアリール）、または任意選択で置換された C₂ - C₉ ヘテロシクリル C₁ - C₆ アルキル（例えば、任意選択で置換された C₂ - C₉ ヘテロアリール C₁ - C₆ アルキル）である、請求項 84 に記載の化合物。

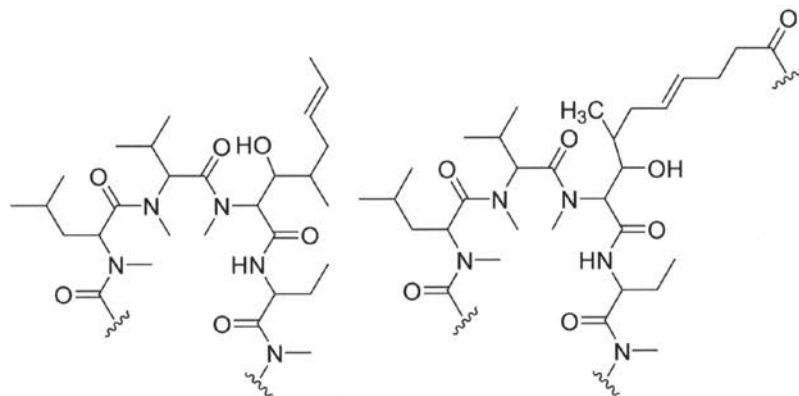
20

【請求項 86】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、構造：

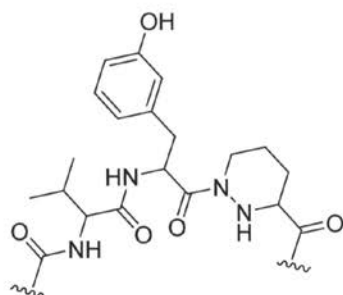
30

【化 3 0】



10

、または



20

を含む、請求項 8 4 または 8 5 に記載の化合物。

【請求項 8 7】

標的タンパク質結合部分及び架橋基を含む、化合物。

【請求項 8 8】

前記標的タンパク質が、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子、または古典的なタンパク質－タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを伴うタンパク質である、請求項 8 7 に記載の化合物。

30

【請求項 8 9】

前記標的タンパク質が、アンドラッグアブル表面を含む、請求項 8 7 または 8 8 に記載の化合物。

【請求項 9 0】

前記標的タンパク質が、従来型の結合ポケットを有さない、請求項 8 7 ～ 8 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 9 1】

前記タンパク質結合部分及び前記架橋基が、リンカーを通して接合する、請求項 1 ～ 9 0 のいずれか一項に記載の化合物。

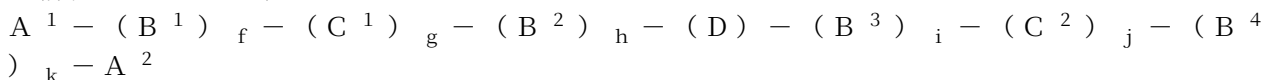
40

【請求項 9 2】

前記リンカーが、1 ～ 2 0 原子長である、請求項 9 1 に記載の化合物。

【請求項 9 3】

前記リンカーが、式 V：



式 V

の構造を有し、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、 A^2 が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、 B^1 、 B^2 、 B^3 、及び B^4 が、それぞれ、独立し

50

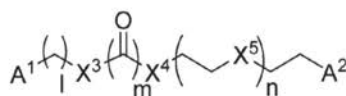
て、任意選択で置換された $C_1 - C_2$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 - C_3$ ヘテロアルキル、O、S、及び NR^N から選択され、 R^N が、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{12}$ アリール、または任意選択で置換された $C_1 - C_7$ ヘテロアルキルであり、 C^1 及び C^2 が、それぞれ、独立して、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、またはホスホリルから選択され、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、及び k が、それぞれ、独立して、0 または 1 であり、 D が、任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{12}$ アリール、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ ポリエチレングリコール、もしくは任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ ヘテロアルキルであるか、または $A^1 - (B^1)_f - (C^1)_g - (B^2)_h - (B^3)_i - (C^2)_j - (B^4)_k - A^2$ に連結する化学結合である、請求項 91 または 92 に記載の化合物。

10

【請求項 94】

前記リンカーが、式 VI :

【化 31】



式VI

20

の構造を含み、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、

A^2 が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、

l が、0、1、2、または 3 であり、

m が、0 または 1 であり、

30

n が、0、1、または 2 であり、

X^3 、 X^4 、及び X^5 が、それぞれ、独立して、存在しない、O、S、 $-C \equiv C-$ 、 CR^9 、 R^{10} または NR^{11} であり、

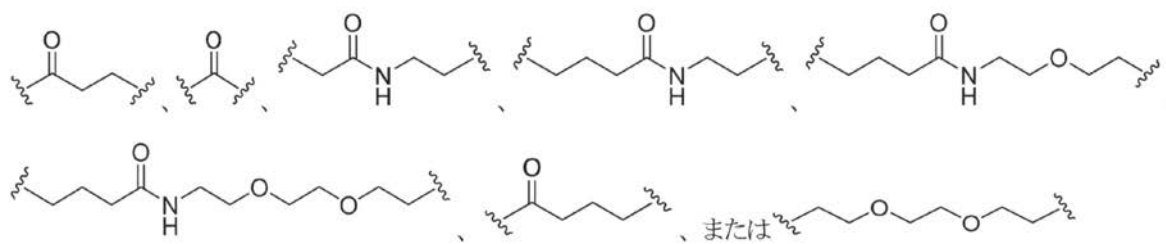
各 R^9 、 R^{10} 、及び R^{11} が、独立して、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 $C_3 - C_7$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、及び任意選択で置換された $C_3 - C_7$ カルボシクリル $C_1 - C_6$ アルキルである、請求項 91 ~ 93 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 95】

40

前記リンカーが、構造：

【化 3 2】



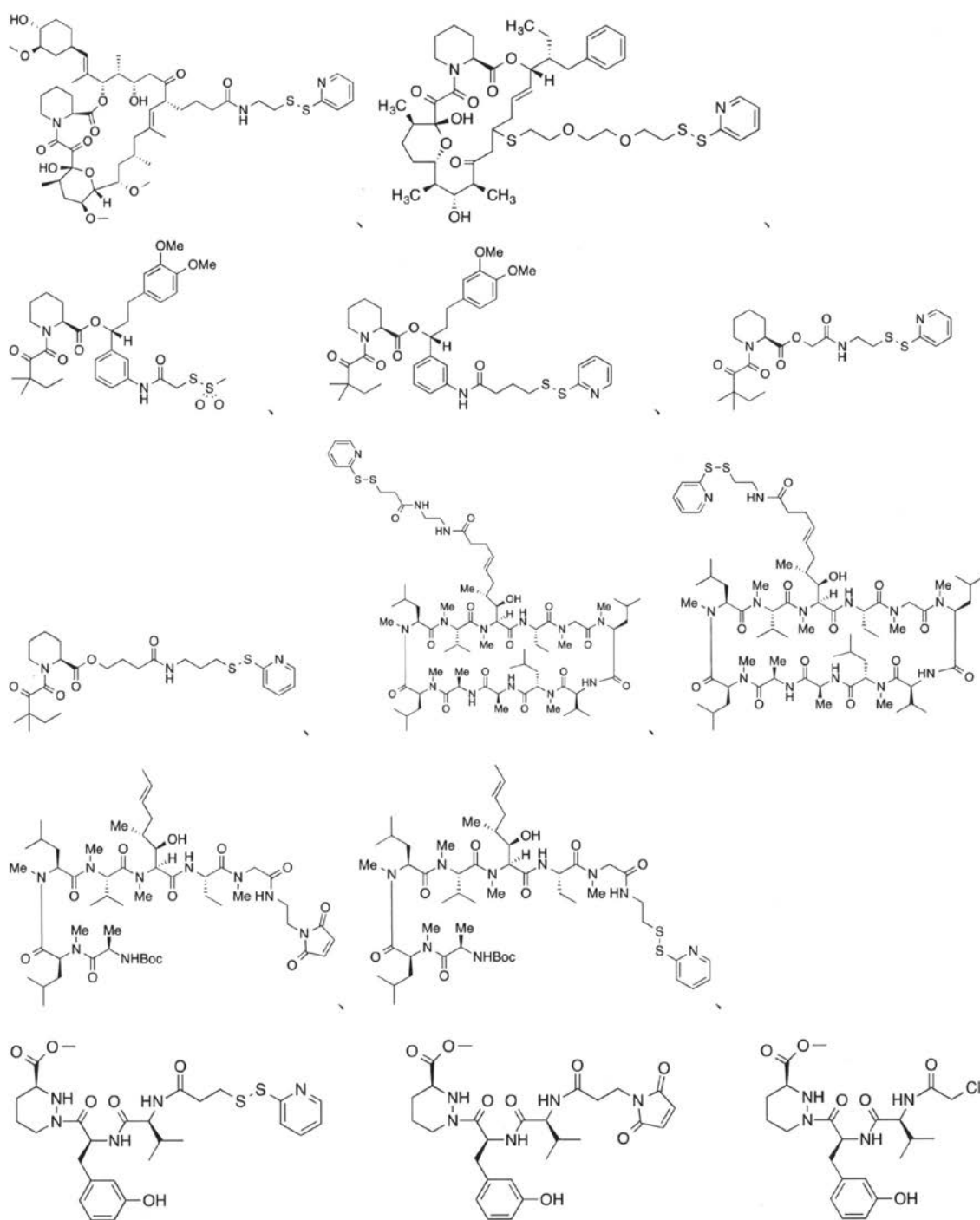
10

を含む、請求項 9 4 に記載の化合物。

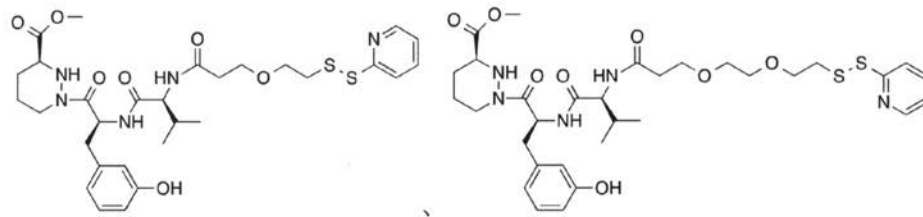
【請求項 9 6】

構造：

【化 3 3 - 1】



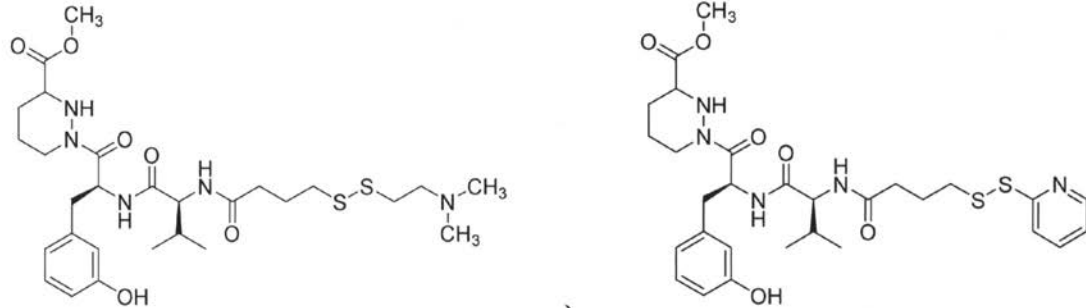
【化 3 3 - 2】



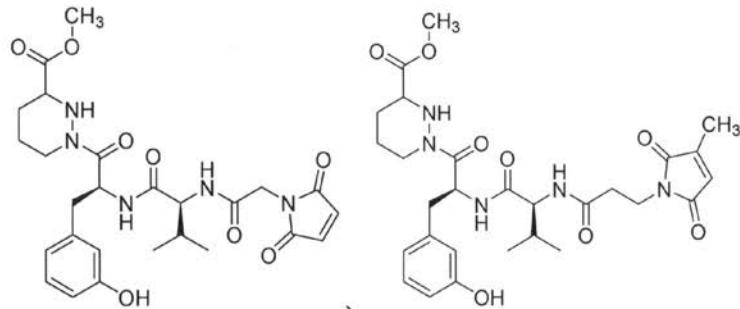
10



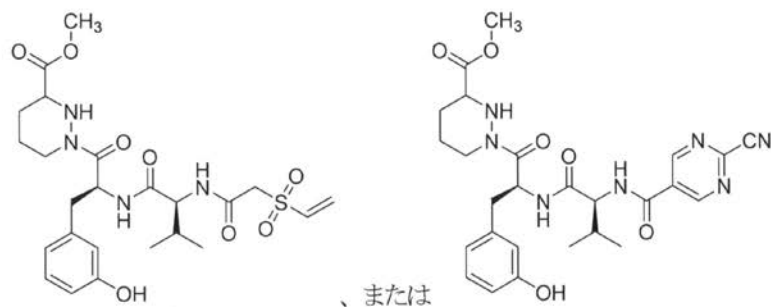
20



30



40



、または

を有する化合物。

【請求項 97】

標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュ

50

ゲート。

【請求項 98】

前記コンジュゲートの前記プレゼンタータンパク質結合部分の部位が、プレゼンタータンパク質と非共有結合的に相互作用することができる、請求項 97 に記載のコンジュゲート。

【請求項 99】

前記コンジュゲートの前記プレゼンタータンパク質結合部分の部位が、プレゼンタータンパク質と共有結合的に相互作用することができる、請求項 97 に記載のコンジュゲート。

【請求項 100】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、表 1 に記載の遺伝子のいずれか 1 つによりコードされるタンパク質と結合することができる、請求項 97 ～ 99 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 101】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、プロリルイソメラーゼ結合部分である、請求項 97 ～ 99 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 102】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、FKBP 結合部分、シクロフィリン結合部分、または PIN1 結合部分である、請求項 97 ～ 101 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 103】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、FKBP 結合部分である、請求項 102 に記載のコンジュゲート。

【請求項 104】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP25、FKBP51、または FKBP52 と結合することができる、請求項 103 に記載のコンジュゲート。

【請求項 105】

前記 FKBP 結合部分が、選択的 FKBP 結合部分である、請求項 103 または 104 に記載のコンジュゲート。

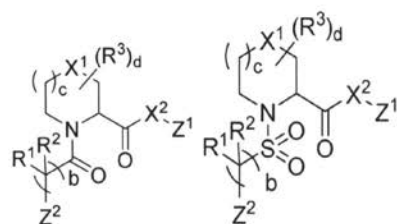
【請求項 106】

前記 FKBP 結合部分が、非選択的 FKBP 結合部分である、請求項 103 または 104 に記載のコンジュゲート。

【請求項 107】

前記 FKBP 結合部分が、式 I I a または I I b :

【化 34】



式 I I a 式 I I b

の構造を含み、

式中、Z¹ 及び Z² が、それぞれ、独立して、任意選択で置換された C₁ - C₆ アルキル、任意選択で置換された C₁ - C₆ ヘテロアルキルであるか、または Z¹ 及び Z² が、それらが付着している原子と、組み合わせあって、任意選択で置換された 10 ～ 30 員の大環

状分子を形成し、 Z^1 または Z^2 のうちの少なくとも 1 つが、前記標的タンパク質への付着点を含み、

b 及び c が、独立して、0、1、または 2 であり、

d が、0、1、2、3、4、5、6、または 7 であり、

X^1 及び X^2 が、それぞれ、独立して、存在しない、 CH_2 、O、S、SO、 SO_2 、または NR^{1-3} であり、

各 R^1 及び R^2 が、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであるか、あるいは R^1 及び R^2 が、それらが結合している炭素原子と組み合わせあって、 $C=O$ を形成する、または R^1 及び R^2 が、組み合わせあって、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリルもしくは任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリルを形成し、

各 R^3 が、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、もしくは任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであるか、または 2 つの R^8 が組み合わせあって、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、もしくは任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリアルを形成する、請求項 103～106 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 108】

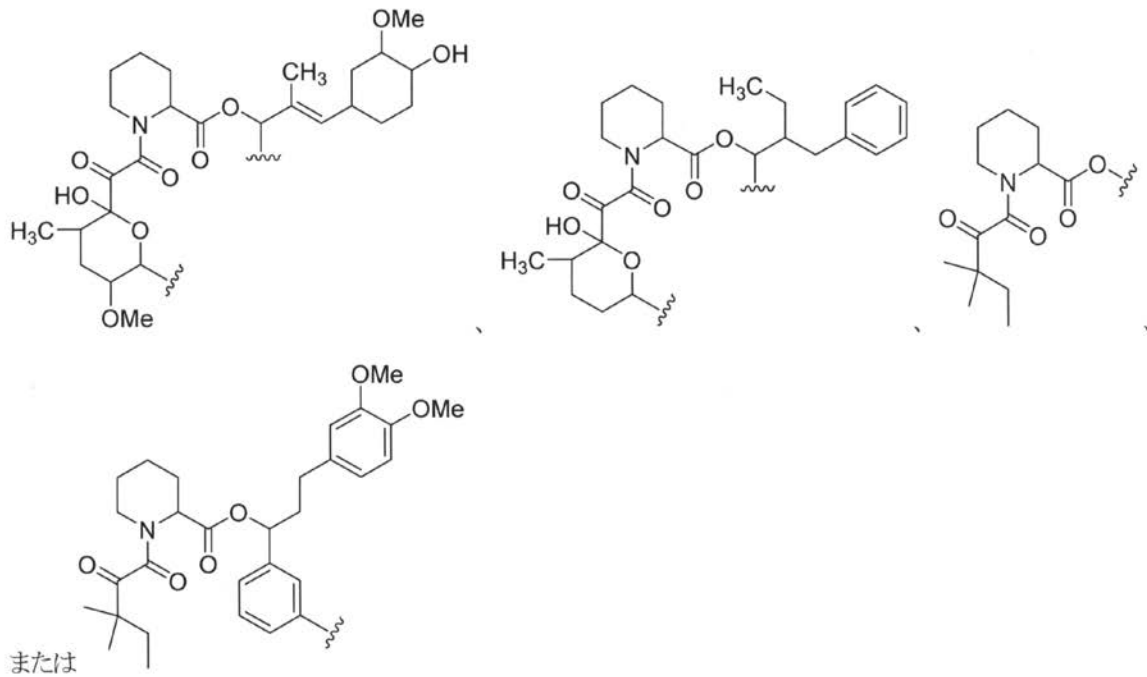
前記プレゼンタータンパク質結合部分が、構造：

10

20

30

【化 3 5】



10

20

を含む、請求項 107 に記載のコンジュゲート。

【請求項 109】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、シクロフィリン結合部分である、請求項 102 に記載の化合物。

【請求項 110】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、PP1A、CYPB、CYPC、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYPL1、CYP60、CYPJ、PPI L4、PPI L6、RANBP2、またはPPWD1と結合

30

【請求項 111】

前記シクロフィリン結合部分が、選択的シクロフィリン結合部分である、請求項 109 または 110 に記載の化合物。

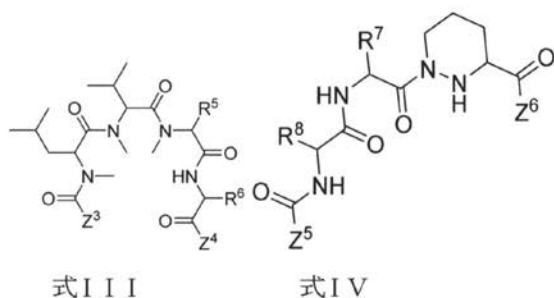
【請求項 112】

前記シクロフィリン結合部分が、非選択的シクロフィリン結合部分である、請求項 109 または 110 に記載の化合物。

【請求項 113】

前記シクロフィリン結合部分が、式 III または IV :

【化 3 6】



10

の構造を含み、

式中、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、及び Z^6 が、それぞれ、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキルであるか、または Z^3 及び Z^4 もしくは Z^5 及び Z^6 が、それらが付着している原子と、組み合わせて、任意選択で置換された10～40員の大環状分子を形成し、

Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^6 、または R^5 のうちの少なくとも1つが、前記架橋基への付着点を含み、

d が、0、1、2、3、または4であり、

R^5 が、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^6 が、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキルであり、

各 R^7 が、独立して、ヒドロキシル、シアノ、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^8 が、水素、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 C_3-C_7 カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、及び任意選択で置換された C_3-C_7 カルボシクリル C_1-C_6 アルキルである、請求項109～112のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項114】

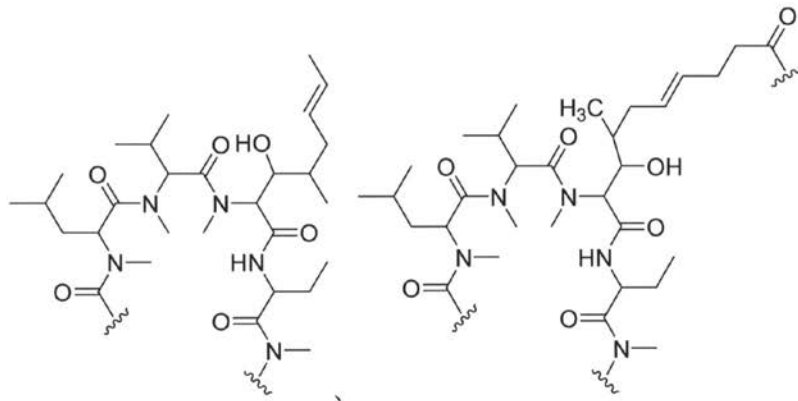
前記プレゼンタータンパク質結合部分が、構造：

20

30

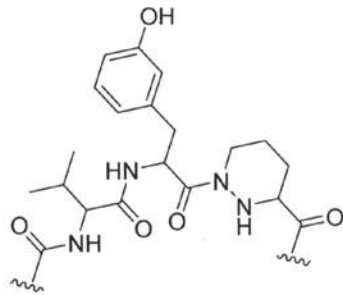
40

【化 3 7】



10

、または



20

を含む、請求項 1 1 3 に記載の化合物。

【請求項 1 1 5】

前記標的タンパク質が、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子、または古典的なタンパク質－タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを伴うタンパク質である、請求項 9 7～1 1 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 1 1 6】

前記標的タンパク質が、アンドラッグアブル表面を含む、請求項 9 7～1 1 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 7】

前記標的タンパク質が、従来型の結合ポケットを有さない、請求項 9 7～1 1 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 8】

前記標的タンパク質のアミノ酸配列が、少なくとも 1 個のネイティブアミノ酸を反応性アミノ酸で置換するように修飾されている、請求項 9 7～1 1 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 1 1 9】

前記反応性アミノ酸が、天然アミノ酸である、請求項 1 1 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 0】

前記反応性アミノ酸が、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリンである、請求項 1 1 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 1】

前記反応性アミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項 1 1 8 に記載のコンジュゲート。

。

【請求項 1 2 2】

前記標的タンパク質のアミノ酸配列が、少なくとも 1 個のネイティブ反応性アミノ酸を

50

非反応性アミノ酸で置換するように修飾されている、請求項 97～121 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 123】

前記少なくとも 1 個のネイティブ反応性アミノ酸が、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリンである、請求項 122 に記載のコンジュゲート。

【請求項 124】

前記少なくとも 1 個のネイティブ反応性アミノ酸が、溶媒に曝露されたアミノ酸である、請求項 122 または 123 に記載のコンジュゲート。

【請求項 125】

前記標的タンパク質のアミノ酸配列が、全ての反応性アミノ酸を非反応性アミノ酸で置換するように修飾される、請求項 122～124 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 126】

前記非反応性アミノ酸が、天然アミノ酸である、請求項 122～125 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 127】

前記置換が、保存的置換である、請求項 118～126 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 128】

前記反応性アミノ酸が、セリン、バリン、アラニン、イソロイシン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはロイシンで置換される、請求項 121～127 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 129】

前記非反応性アミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項 121～124 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 130】

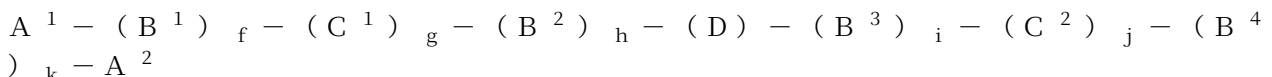
前記プレゼンタータンパク質結合部分及び前記標的タンパク質が、リンカーを通してコンジュゲートする、請求項 97～129 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 131】

前記リンカーが、1～20 原子長である、請求項 130 に記載のコンジュゲート。

【請求項 132】

前記リンカーが、式 I I I :



式 V

の構造を有し、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、 A^2 が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、 B^1 、 B^2 、 B^3 、及び B^4 が、それぞれ、独立して、任意選択で置換された $C_1 - C_2$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 - C_3$ ヘテロアルキル、O、S、及び NR^N から選択され、 R^N が、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{12}$ アリール、または任意選択で置換された $C_1 - C_7$ ヘテロアルキルであり、 C^1 及び C^2 が、それぞれ、独立して、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、またはホスホリルから選択され、f、g、h、I、j、及び k が、それぞれ、独立して、0 または 1 であり、D が、任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{12}$ アリール、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ ポリエチレングリコール、または任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ ヘテロ

10

20

30

40

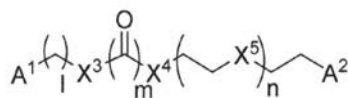
50

アルキルであるか、または $A^1 - (B^1)_f - (C^1)_g - (B^2)_h - (B^3)_i - (C^2)_j - (B^4)_k - A^2$ に連結する化学結合である、請求項 130 または 131 に記載のコンジュゲート。

【請求項 133】

前記リンカーが、式 I V :

【化 38】



式 I V

10

の構造を含み、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、

A^2 が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、

l が、0、1、2、または3であり、

m が、0 または 1 であり、

n が、0、1、または2であり、

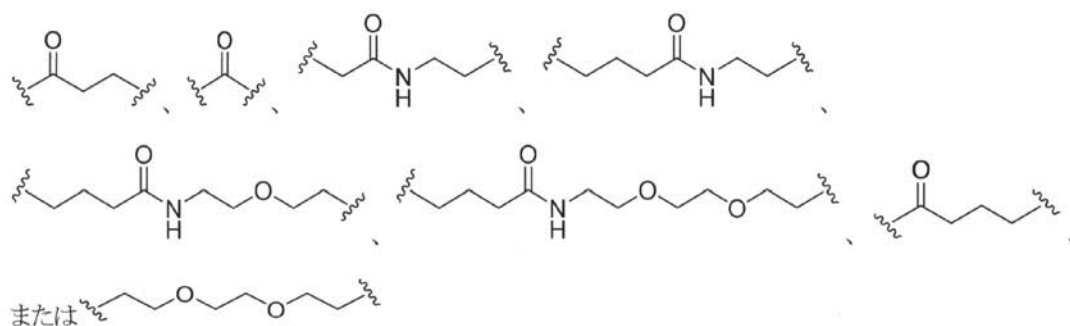
X^3 、 X^4 、及び X^5 が、それぞれ、独立して、存在しない、O、S、 $-C \equiv C-$ 、 CR^9 20

R^{10} または NR^{11} であり、
各 R^9 、 R^{10} 、及び R^{11} が、独立して、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 $C_3 - C_7$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、及び任意選択で置換された $C_3 - C_7$ カルボシクリル $C_1 - C_6$ アルキルである、請求項 130 ~ 132 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 134】

前記リンカーが、構造：

【化 39】



30

40

を含む、請求項 133 に記載のコンジュゲート。

【請求項 135】

標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートを生成する方法であって、(a) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物を (b) 標的タンパク質と、前記コンジュゲートの生成を可能とする条件下で、反応させることを含む、前記方法。

【請求項 136】

標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュ

50

ゲートを生成する方法であって、

(a) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) 標的タンパク質、及び(c) プレゼンタータンパク質を提供すること、ならびに前記化合物を前記標的タンパク質と、前記コンジュゲートの生成を可能とする条件下で、反応させることを含む、前記方法。

【請求項 1 3 7】

前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で前記化合物に結合する、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で前記化合物に実質的に結合しない、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記化合物及び前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で実質的に反応しない、請求項 1 3 6 ～ 1 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記化合物及び前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で反応する、請求項 1 3 6 ～ 1 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記条件が、還元試薬を含まない、請求項 1 3 5 ～ 1 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

(i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) プレゼンタータンパク質を含む、複合体。

【請求項 1 4 3】

前記プレゼンタータンパク質が、表 1 に記載の遺伝子のいずれか 1 つによりコードされるタンパク質である、請求項 1 4 2 に記載の複合体。

【請求項 1 4 4】

前記プレゼンタータンパク質が、プロリルイソメラーゼである、請求項 1 4 2 に記載の複合体。

【請求項 1 4 5】

前記プロリルイソメラーゼが、FKBP ファミリーのメンバー、シクロフィリンファミリーのメンバー、または PIN1 である、請求項 1 4 2 ～ 1 4 4 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 1 4 6】

FKBP ファミリーの前記メンバーが、FKBP 1 2、FKBP 1 2. 6、FKBP 1 3、FKBP 2 5、FKBP 5 1、または FKBP 5 2 である、請求項 1 4 5 に記載の複合体。

【請求項 1 4 7】

シクロフィリンファミリーの前記メンバーが、PP1A、CYPB、CYPC、CYP 4 0、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC 2 7、CYPL 1、CYP 6 0、CYPJ、PPI L 4、PPI L 6、RANBP 2、または PPWD 1 である、請求項 1 4 5 に記載の複合体。

【請求項 1 4 8】

(i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) プレゼンタータンパク質を含む複合体を生成する方法であって、標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、前記複合体の生成を可能にする条件下で、組み合わせることを含む、前記方法。

【請求項 1 4 9】

(i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコン

10

20

30

40

50

ジュゲート及び (i i) プレゼンタータンパク質を含む複合体を生成する方法であって、
(a) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) 標的タンパク質、
及び (c) プレゼンタータンパク質を提供すること、ならびに
前記化合物を前記標的タンパク質と、前記複合体の生成を可能にする条件下で、反応させることを含む、前記方法。

【請求項 150】

前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で前記化合物に結合する、請求項 149 に記載の方法。

【請求項 151】

前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で前記化合物に実質的に結合しない、請求項 149 に記載の方法。

10

【請求項 152】

前記化合物及び前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で実質的に反応しない、請求項 149～151 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 153】

前記化合物及び前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で反応する、請求項 149～151 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 154】

前記条件が、還元試薬を含まない、請求項 148～153 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 155】

前記条件が、過剰なプレゼンタータンパク質を含む、請求項 148～154 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 156】

プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含む、コンジュゲート。

【請求項 157】

前記コンジュゲートの前記標的タンパク質結合部分の部位が、標的タンパク質と非共有結合的に相互作用することができる、請求項 156 に記載のコンジュゲート。

【請求項 158】

前記コンジュゲートの前記標的タンパク質結合部分の部位が、標的タンパク質と共有結合的に相互作用することができる、請求項 156 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 159】

前記標的タンパク質が、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子、または古典的なタンパク質－タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを伴うタンパク質である、請求項 156～158 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 160】

前記標的タンパク質が、アンドラッグアブル表面を含む、請求項 156～159 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 161】

前記標的タンパク質が、従来型の結合ポケットを有さない、請求項 156～160 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 162】

前記プレゼンタータンパク質が、表 1 に記載の遺伝子のいずれか 1 つによりコードされるタンパク質である、請求項 156～161 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 163】

前記プレゼンタータンパク質が、プロリルイソメラーゼである、請求項 156～161 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

50

【請求項 164】

前記プレゼンタータンパク質が、FKBPファミリーのメンバー、シクロフィリンファミリーのメンバー、またはPIN1である、請求項156～163のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 165】

FKBPファミリーの前記メンバーが、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP25、FKBP51、またはFKBP52である、請求項164に記載のコンジュゲート。

【請求項 166】

シクロフィリンファミリーの前記メンバーが、PP1A、CYPB、CYPC、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYPL1、CYP60、CYPJ、PPI L4、PPI L6、RANBP2、またはPPWD1である、請求項164に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 167】

前記プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列が、少なくとも1個のアミノ酸を反応性アミノ酸で置換するように修飾されている、請求項156～166のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 168】

前記反応性アミノ酸が、天然アミノ酸である、請求項167に記載のコンジュゲート。

【請求項 169】

前記反応性アミノ酸が、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリンである、請求項168に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 170】

前記反応性アミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項167に記載のコンジュゲート。

【請求項 171】

前記プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列が、少なくとも1個のネイティブ反応性アミノ酸を非反応性アミノ酸で置換するように修飾されている、請求項156～170のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 172】

前記少なくとも1個のネイティブ反応性アミノ酸が、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリンである、請求項171に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 173】

前記少なくとも1個のネイティブ反応性アミノ酸が、溶媒に曝露されたアミノ酸である、請求項171または172に記載のコンジュゲート。

【請求項 174】

前記プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列が、全ての反応性アミノ酸を非反応性アミノ酸で置換するように修飾される、請求項171～173のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 175】

前記非反応性アミノ酸が、天然アミノ酸である、請求項171～174のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 176】

前記置換が、保存的置換である、請求項167～175のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 177】

前記反応性アミノ酸が、セリン、バリン、アラニン、イソロイシン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはロイシンで置換される、請求項171～176のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

50

【請求項 178】

前記非反応性アミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項 171～174 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 179】

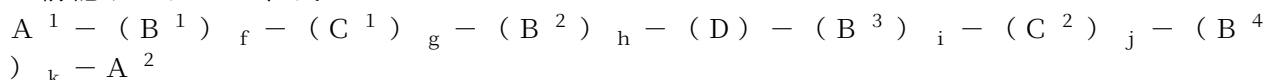
前記標的タンパク質結合部分及び前記プレゼンタータンパク質が、リンカーを通して接合する、請求項 156～178 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 180】

前記リンカーが、1～20 原子長である、請求項 179 に記載のコンジュゲート。

【請求項 181】

前記リンカーが、式 V：



式 V

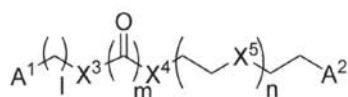
の構造を有し、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、 A^2 が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、 B^1 、 B^2 、 B^3 、及び B^4 が、それぞれ、独立して、任意選択で置換された $C_1 - C_2$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 - C_3$ ヘテロアルキル、O、S、及び NR^N から選択され、 R^N が、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された C_{6-12} アリール、または任意選択で置換された $C_1 - C_7$ ヘテロアルキルであり、 C^1 及び C^2 が、それぞれ、独立して、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、またはホスホリルから選択され、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、及び k が、それぞれ、独立して、0 または 1 であり、 D が、任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された C_{6-12} アリール、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ ポリエチレングリコール、または任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ ヘテロアルキルであるか、または $A^1 - (B^1)_f - (C^1)_g - (B^2)_h -$ を $-(B^3)_i - (C^2)_j - (B^4)_k - A^2$ に連結する化学結合である、請求項 179 または 180 に記載のコンジュゲート。

【請求項 182】

前記リンカーが、式 IV：

【化 40】



式VI

の構造を含み、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、

A^2 が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、

l が、0、1、2、または 3 であり、

m が、0 または 1 であり、

n が、0、1、または 2 であり、

X^3 、 X^4 、及び X^5 が、それぞれ、独立して、存在しない、O、S、 $-C \equiv C-$ 、 CR^9 、 R^{10} または NR^{11} であり、

各 R^9 、 R^{10} 、及び R^{11} が、独立して、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アル

10

20

30

40

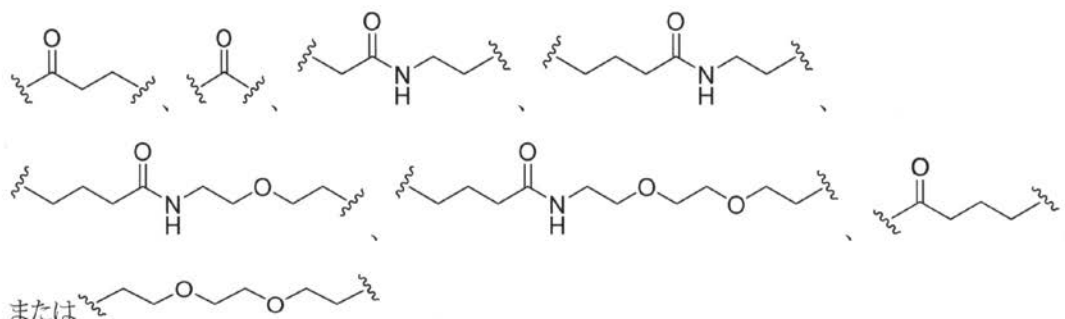
50

キル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 C_3-C_7 カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、及び任意選択で置換された C_3-C_7 カルボシクリル C_1-C_6 アルキルである、請求項 179～181 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 183】

前記リンカーが、構造：

【化 41】



10

を含む、請求項 182 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 184】

プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートを生成する方法であって、(a) 標的タンパク質結合部分と架橋基を含む化合物を (b) プレゼンタータンパク質と、前記コンジュゲートの生成を可能にする条件下で、反応させることを含む、前記方法。

【請求項 185】

プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートを生成する方法であって、

(a) 標的タンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) プレゼンタータンパク質、及び (c) 標的タンパク質を提供すること、ならびに

前記化合物を前記プレゼンタータンパク質と、前記コンジュゲートの生成を可能にする条件下で、反応させることを含む、前記方法。

30

【請求項 186】

前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で前記化合物に結合する、請求項 185 に記載の方法。

【請求項 187】

前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で前記化合物に実質的に結合しない、請求項 185 に記載の方法。

【請求項 188】

前記化合物及び前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で実質的に反応しない、請求項 185～187 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 189】

前記化合物及び前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で反応する、請求項 185～187 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 190】

前記条件が、還元試薬を含まない、請求項 184～189 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 191】

(i) プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (ii) 標的タンパク質を含む、複合体。

50

【請求項 192】

前記標的タンパク質が、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子、または古典的なタンパク質－タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを伴うタンパク質である、請求項 191 に記載の複合体。

【請求項 193】

前記標的タンパク質が、アンドラッグアブル表面を含む、請求項 191 または 192 に記載の複合体。

【請求項 194】

前記標的タンパク質が、従来型の結合ポケットを有さない、請求項 191 ～ 193 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 195】

(i) プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (ii) 標的タンパク質を含む複合体を生成する方法であって、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び標的タンパク質を、前記複合体の生成を可能にする条件下で、組み合わせることを含む、前記方法。

【請求項 196】

(i) プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (ii) 標的タンパク質を含む複合体を生成する方法であって、

(a) 標的タンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) プレゼンタータンパク質、及び (c) 標的タンパク質を提供すること、ならびに

前記化合物を前記プレゼンタータンパク質と、前記複合体の生成を可能にする条件下で、反応させることを含む、前記方法。

【請求項 197】

前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で前記化合物に結合する、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 198】

前記標的タンパク質が、前記プレゼンタータンパク質の不在下で前記化合物に実質的に結合しない、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 199】

前記化合物及び前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で実質的に反応しない、請求項 196 ～ 198 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 200】

前記化合物及び前記プレゼンタータンパク質が、前記標的タンパク質の不在下で反応する、請求項 196 ～ 198 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 201】

前記条件が、還元試薬を含まない、請求項 195 ～ 200 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 202】

前記条件が、過剰な標的タンパク質を含む、請求項 196 ～ 201 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 203】

式 V I I :

A - L - B

式 V I I

の構造を有し、

式中、A が、式 V I I I a または V I I I b :

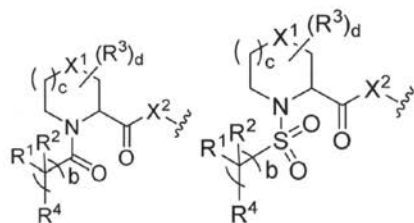
10

20

30

40

【化 4 2】



式VIIIa

式VIIIb

10

の構造を含み、

式中、b及びcが、独立して、0、1、または2であり、

dが、0、1、2、3、4、5、6、または7であり、

X¹及びX²が、それぞれ、独立して、存在しない、CH₂、O、S、SO、SO₂、またはNR¹⁻³であり、

各R¹及びR²が、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルC₁－C₆アルキルであるか、あるいはR¹及びR²が、それらが結合している炭素原子と組み合わせあって、C＝Oを形成するまたはR¹及びR²が、組み合わせあって、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリルもしくは任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルを形成し、

20

各R³が、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリールC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、もしくは任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリルC₁－C₆アルキルであるか、または2つのR⁸が組み合わせあって、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆－C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロシクリル、もしくは任意選択で置換されたC₂－C₉ヘテロアリールを形成し、

30

R⁴が、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキルであり、

Lが、任意選択のリンカーであり、

40

Bが、標的タンパク質結合部分である、化合物。

【請求項204】

前記標的タンパク質結合部分及び標的タンパク質間の相互作用が、非共有結合的である、請求項203に記載の化合物。

【請求項205】

前記標的タンパク質結合部分及び標的タンパク質間の相互作用が、共有結合的である、請求項203に記載の化合物。

【請求項206】

前記標的タンパク質が、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質

50

、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子、または古典的なタンパク質－タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを伴うタンパク質である、請求項 203～205 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 207】

前記標的タンパク質が、アンドラッグアブル表面を含む、請求項 203～206 のいずれか一項に記載の化合物。

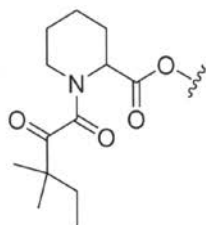
【請求項 208】

前記標的タンパク質が、従来型の結合ポケットを有さない、請求項 203～207 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 209】

A が、構造：

【化 43】



を含む、請求項 203～208 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 210】

前記標的タンパク質結合部分及び前記プレゼンタータンパク質が、リンカーを通してコンジュゲートする、請求項 203～209 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 211】

前記リンカーが、1～20 原子長である、請求項 210 に記載の化合物。

【請求項 212】

前記リンカーが、式 V：

$$A^1 - (B^1)_f - (C^1)_g - (B^2)_h - (D) - (B^3)_i - (C^2)_j - (B^4)_k - A^2 \quad 30$$

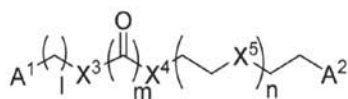
式 V

の構造を有し、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、 A^2 が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、 B^1 、 B^2 、 B^3 、及び B^4 が、それぞれ、独立して、任意選択で置換された $C_1 - C_2$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 - C_3$ ヘテロアルキル、O、S、及び NR^N から選択され、 R^N が、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{12}$ アリール、または任意選択で置換された $C_1 - C_7$ ヘテロアルキルであり、 C^1 及び C^2 が、それぞれ、独立して、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、またはホスホリルから選択され、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、及び k が、それぞれ、独立して、0 または 1 であり、 D が、任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{12}$ アリール、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ ポリエチレングリコール、もしくは任意選択で置換された $C_1 - C_{10}$ ヘテロアルキルであるか、または $A^1 - (B^1)_f - (C^1)_g - (B^2)_h - (B^3)_i - (C^2)_j - (B^4)_k - A^2$ に連結する化学結合である、請求項 210 または 211 に記載の化合物。

【請求項 213】

前記リンカーが、式 I V :
【化 4 4】



式VI

の構造を含み、

式中、 A^1 が、前記リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、

A²が、前記架橋基及び前記リンカー間の結合であり、

1 が、0、1、2、または3であり、

m が、 0 または 1 であり、

n が、 0 、 1 、または 2 であり、

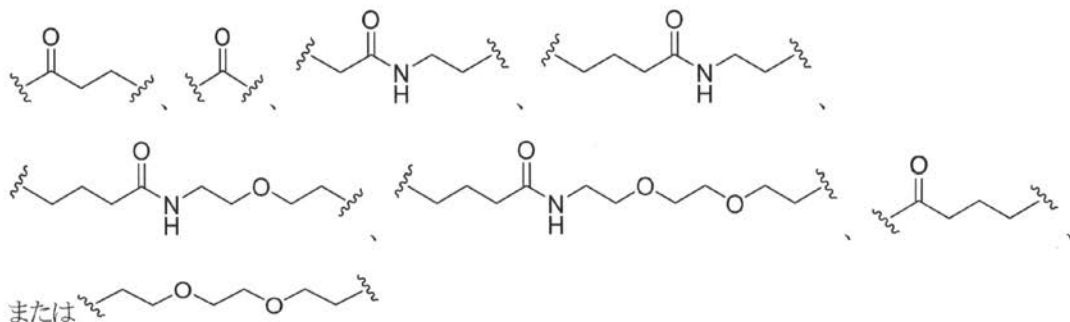
X³、X⁴、及びX⁵が、それぞれ、独立して、存在しない、O、S、 $-C \equiv C-$ 、 $C R^9 R^{10}$ または $N R^{11}$ であり、

各 R⁹、R¹⁰、及び R¹¹ が、独立して、水素、任意選択で置換された C₁ - C₆ アルキル、任意選択で置換された C₂ - C₆ アルケニル、任意選択で置換された C₂ - C₆ アルキニル、任意選択で置換されたアリール、C₃ - C₇ カルボシクリル、任意選択で置換された C₆ - C₁₀ アリール C₁ - C₆ アルキル、及び任意選択で置換された C₃ - C₇ カルボシクリル C₁ - C₆ アルキルである、請求項 210 ~ 212 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 2 1 4】

前記リンカーが、構造：

【化 4 5】



を含む、請求項 2 1 3 に記載の化合物。

【請求項 2 1 5】

(i) 請求項 203 に記載の化合物、(ii) 標的タンパク質、及び (iii) プレゼンタータンパク質を含む、複合体。

【請求項 2 1 6】

前記標的タンパク質が、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子、または古典的なタンパク質-タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを伴うタンパク質である、請求項215に記載の複合体。

【請求項 2 1 7】

前記標的タンパク質が、アンドラッグダブル表面を含む、請求項 215 または 216 に記

載の複合体。

【請求項 2 1 8】

前記標的タンパク質が、従来型の結合ポケットを有さない、請求項 2 1 5～2 1 7 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 1 9】

前記プレゼンタータンパク質が、表 1 に記載の遺伝子のいずれか 1 つによりコードされるタンパク質である、請求項 2 1 5～2 1 8 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 2 2 0】

前記プレゼンタータンパク質が、プロリルイソメラーゼである、請求項 2 1 5～2 1 8 のいずれか一項に記載の複合体。

10

【請求項 2 2 1】

前記プレゼンタータンパク質が、FKBP ファミリーのメンバー、シクロフィリンファミリーのメンバー、または PIN1 である、請求項 2 1 5～2 2 0 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 2 2 2】

FKBP ファミリーの前記メンバーが、FKBP 1 2、FKBP 1 2. 6、FKBP 1 3、FKBP 2 5、FKBP 5 1、または FKBP 5 2 である、請求項 2 2 1 に記載の化合物。

【請求項 2 2 3】

シクロフィリンファミリーの前記メンバーが、PP1A、CYPB、CYPC、CYP 4 0、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC 2 7、CYPL 1、CYP 6 0、CYPJ、PPI L 4、PPI L 6、RANBP 2、または PPWD 1 である、請求項 2 2 1 に記載の複合体。

20

【請求項 2 2 4】

プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートを同定する方法であって、

(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (ii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質を、前記コンジュゲートが前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

30

(c) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否かを決定することを含み、

前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に、前記コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートであると同定され、

それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートを同定する、前記方法。

40

【請求項 2 2 5】

プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する方法であって、

(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (ii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質を、前記コンジュゲートが前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記標的タンパク質が、前記複体内の前記プレゼンタータンパク質に結合するか否かを決定することを含み、

前記標的タンパク質が前記プレゼンタータンパク質に結合する場合に、前記標的タンパク

50

質が、前記プレゼンタータンパク質に結合すると同定され、
それにより、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する、前記方法。

【請求項 2 2 6】

プレゼンタータンパク質の存在下で化合物と反応することができる標的タンパク質を同定する方法であって、前記化合物が、プレゼンタータンパク質結合部分及び架橋部を含み、

(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び(iii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化合物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記標的タンパク質及び前記化合物が、コンジュゲートを形成するように前記複合体の形成中に反応するか否かを決定することを含み、

前記標的タンパク質及び前記化合物が、コンジュゲートを形成するように前記複合体の形成中に反応する場合に、前記標的タンパク質が、プレゼンタータンパク質の存在下で前記化合物と反応することができる標的タンパク質であると同定され、

それにより、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物と、プレゼンタータンパク質の存在下で反応することができる標的タンパク質を同定する、前記方法。

【請求項 2 2 7】

プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する方法であって、

(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び(iii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化合物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記標的タンパク質が、前記複体内の前記プレゼンタータンパク質に結合するか否かを決定することを含み、

前記標的タンパク質が前記プレゼンタータンパク質に結合する場合に、前記標的タンパク質が、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質であると同定され、

それにより、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する、前記方法。

【請求項 2 2 8】

プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定する方法であって、

(a) (i) 請求項 1 8 1 に記載の化合物、(ii) 標的タンパク質、及び(iii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化合物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否かを決定することを含み、

前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に、前記標的タンパク質が、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質として同定され、

それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定する、前記方法。

【請求項 2 2 9】

プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する方法であって、

(a) (i) 請求項 1 8 1 に記載の化合物、(ii) 標的タンパク質、及び(iii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化合

物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記標的タンパク質が、前記複体内の前記プレゼンタータンパク質に結合するか否かを決定することを含み、

前記標的タンパク質が前記プレゼンタータンパク質に結合する場合に、前記標的タンパク質が、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質として同定され、

それにより、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する、前記方法。

【請求項 230】

プレゼンタータンパク質結合部分とコンジュゲートを形成するための標的タンパク質上の場所を同定する方法であって、このコンジュゲートはプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる、

(a) (i) ある場所にて標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (ii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質を、前記コンジュゲートが前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、

(c) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否かを決定すること、ならびに

(d) コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が複合体を形成するまで、前記プレゼンタータンパク質結合部分を前記標的タンパク質上の異なる場所にてコンジュゲートさせてステップ (a) ~ (c) を反復することを含み、

プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる、プレゼンタータンパク質結合部分とのコンジュゲートを、形成するための標的タンパク質上の場所が、前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に同定され、それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートを形成するための標的タンパク質上の場所を同定する、前記方法。

【請求項 231】

プレゼンタータンパク質結合部分とコンジュゲートを形成するための標的タンパク質上の場所を同定する方法であって、このコンジュゲートはプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる、

(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び (iii) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物を前記標的タンパク質と、前記プレゼンタータンパク質の存在下で、ある場所にて標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートの形成を可能とする条件下で、組み合わせること、

(c) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否かを決定すること、ならびに

(d) コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が複合体を形成するまで、前記プレゼンタータンパク質結合部分を前記標的タンパク質上の異なる場所にてコンジュゲートさせてステップ (a) ~ (c) を反復することを含み、

プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートを形成するための標的タンパク質上の場所が、前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に同定され、

それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる、プレゼンタータンパク質結合部分とのコンジュゲートを、形成するための標的タンパク質上の場所を同定する、前記方法。

【請求項 232】

前記標的タンパク質のアミノ酸配列が、少なくとも 1 個のアミノ酸を反応性アミノ酸で置換するように修飾されている、請求項 230 または 231 に記載の方法。

【請求項 233】

前記反応性アミノ酸が、天然アミノ酸である、請求項 2 3 2 に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

前記反応性アミノ酸が、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリンである、請求項 2 3 3 に記載の方法。

【請求項 2 3 5】

前記反応性アミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項 2 3 2 に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

前記標的タンパク質のアミノ酸配列が、少なくとも 1 個のネイティブ反応性アミノ酸を非反応性アミノ酸で置換するように修飾されている、請求項 2 3 0 ～ 2 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 3 7】

前記少なくとも 1 個のネイティブ反応性アミノ酸が、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリンである、請求項 2 3 6 に記載の方法。

【請求項 2 3 8】

前記少なくとも 1 個のネイティブ反応性アミノ酸が、溶媒に曝露されたアミノ酸である、請求項 2 3 6 または 2 3 7 に記載の方法。

【請求項 2 3 9】

前記標的タンパク質のアミノ酸配列が、全ての反応性アミノ酸を非反応性アミノ酸で置換するように修飾される、請求項 2 3 6 ～ 2 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4 0】

前記非反応性アミノ酸が、天然アミノ酸である、請求項 2 3 6 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 4 1】

前記置換が、保存的置換である、請求項 2 3 0 ～ 2 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4 2】

前記反応性アミノ酸が、セリン、バリン、アラニン、イソロイシン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはロイシンで置換される、請求項 2 3 2 ～ 2 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

前記非反応性アミノ酸が、非天然アミノ酸である、請求項 2 3 2 ～ 2 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 4 4】

プレゼンタータンパク質の存在下で標的タンパク質に共有結合的に結合することができる化合物を同定する方法で、

(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び (iii) プレゼンタータンパク質を含む試料を提供すること、ならびに

(b) 前記化合物及び前記標的タンパク質が、前記試料中の前記化合物の前記架橋基を介して共有結合を形成するか否かを決定することを含み、

前記化合物及び前記標的タンパク質が前記試料中で反応する場合に、化合物が、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に共有結合的に結合すると同定される、前記方法。

40

【請求項 2 4 5】

プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に、選択的及び共有結合的に結合することができる化合物を同定する方法であって、

(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び (iii) プレゼンタータンパク質を含む第一の試料、ならびに (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む前記第一の試料におけるものと同じ化合物及び (ii) 前記第一の試料におけるものと同じ標的タンパク質を含む第二の試料を提供すること、

(b) 前記第二の試料と比較して、前記第一の試料において、前記化合物及び前記標的タ

50

ンパク質が反応する程度を決定することを含み、
前記化合物及び前記標的タンパク質が、前記第二の試料中よりも前記第一の試料中で多く
反応する場合に、化合物が、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に選択
的に共有結合的に結合すると同定される、前記方法。

【請求項 2 4 6】

前記化合物及び前記標的タンパク質が前記第二の試料中より少なくとも 5 倍多く前記第
一の試料中で反応する場合に、化合物が、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タン
パク質に選択的に共有結合的に結合すると同定される、請求項 2 4 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

前記化合物及び前記標的タンパク質が第一の試料中で反応するが前記第二の試料中で実
質的に反応しない場合に、化合物が、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク
質に選択的に共有結合的に結合すると同定される、請求項 2 4 5 または 2 4 6 に記載の方
法。

【請求項 2 4 8】

プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートを同定する方
法であって、

(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含
むコンジュゲート及び (i i) プレゼンタータンパク質を提供すること、ならびに

(b) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質を、前記コンジュゲートが前
記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能と
するのに好適な条件下で、組み合わせること、

(c) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否か
を決定することを含み、

前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に、コン
ジュゲートが、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができると同定され、
それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートを
同定する、前記方法。

【請求項 2 4 9】

プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造を決定する方
法であって、

(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含
むコンジュゲート及び (i i) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質を、前記コンジュゲートが前
記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能と
するのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記複合体の結晶構造を決定することを含み、
前記界面の構造が、少なくとも、前記プレゼンタータンパク質及び前記標的タンパク質間
の結晶構造の部位を含み、

それにより、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造が
決定される、前記方法。

【請求項 2 5 0】

プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造を決定する方
法であって、

(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(i i) 標的タ
ンパク質、及び (i i i) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化
合物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成
を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記複合体の結晶構造を決定することを含み、
前記界面の構造が、少なくとも、前記プレゼンタータンパク質及び前記標的タンパク質間

10

20

30

40

50

の結晶構造の部位を含み

それにより、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複合体内の界面の構造が決定される、前記方法。

【請求項 2 5 1】

プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複合体内の界面の構造を決定する方法であって、

(a) (i) 請求項 2 0 3 に記載の化合物、(i i) 標的タンパク質、及び(i i i) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化合物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記複合体の結晶構造を決定することを含み、
前記界面の構造が、少なくとも、前記プレゼンタータンパク質及び前記標的タンパク質間の結晶構造の部位を含み、

それにより、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複合体内の界面の構造が決定される、前記方法。

【請求項 2 5 2】

プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複合体における前記界面が、結合ポケットである、請求項 2 4 9 ~ 2 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

複合体に関する X 線結晶座標を得る方法であって、

(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(i i) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質を、前記コンジュゲートが前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記複合体の結晶構造を決定すること、
それにより、前記複合体に関する X 線結晶座標が得られる、前記方法。

【請求項 2 5 4】

複合体に関する X 線結晶座標を得る方法であって、

(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(i i) 標的タンパク質、及び(i i i) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化合物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記複合体の結晶構造を決定することを含み、
それにより、前記複合体に関する X 線結晶座標が得られる、前記方法。

【請求項 2 5 5】

複合体に関する X 線結晶座標を得る方法であって、

(a) (i) 請求項 2 0 3 に記載の化合物、(i i) 標的タンパク質、及び(i i i) プレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記化合物、前記標的タンパク質、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記化合物が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 前記複合体の結晶構造を決定することを含み、
それにより、前記複合体に関する X 線結晶座標が得られる、前記方法。

【請求項 2 5 6】

プレゼンタータンパク質との結合に関与する標的タンパク質上の残基を決定する方法であって、

(a) 請求項 2 5 3 ~ 2 5 5 のいずれか一項に記載の方法により得られる複合体の X 線結

10

20

30

40

50

晶座標を提供すること、

(b) 前記プレゼンタータンパク質上の原子の 4 Å 以内の原子を含む前記標的タンパク質の残基を同定することを含み、
それにより、プレゼンタータンパク質との結合に関与する標的タンパク質上の残基が決定される、前記方法。

【請求項 257】

請求項 142～147、191～194、または 215～223 のいずれか一項に記載の複合体の生物化学及び／または生物物理学の特性を決定する方法であって、

(a) 請求項 253～255 のいずれか一項に記載の方法により得られる、請求項 142～147、191～194、または 215～223 のいずれか一項に記載の複合体の X 線結晶座標を提供すること、

(b) 前記複合体の生物化学及び／または生物物理学の特性を算出することを含み、それにより、プレゼンタータンパク質／標的タンパク質複合体の生物化学及び／または生物物理学の特性が決定される、前記方法。

【請求項 258】

前記生物化学及び／または生物物理学の特性が、前記複合体の結合の自由エネルギー、前記複合体の K_d 、前記複合体の K_i 、前記複合体の $K_{i\text{ n a c t}}$ 、及び／または前記複合体の $K_i / K_{i\text{ n a c t}}$ を含む、請求項 257 に記載の方法。

【請求項 259】

前記生物化学及び／または生物物理学の特性が、前記複合体の結合の自由エネルギーを含む、請求項 258 に記載の方法。

【請求項 260】

前記複合体の結合の前記自由エネルギーが、等温滴定型熱量測定により決定される、請求項 259 に記載の方法。

【請求項 261】

前記生物化学及び／または生物物理学の特性が、前記複合体の K_d を含む、請求項 258 に記載の方法。

【請求項 262】

前記複合体の前記 K_d が、表面プラズモン共鳴により決定される、請求項 261 に記載の方法。

【請求項 263】

前記生物化学及び／または生物物理学の特性が、前記複合体の K_i 、前記複合体の $K_{i\text{ n a c t}}$ 、及び／または前記複合体の $K_i / K_{i\text{ n a c t}}$ を含む、請求項 258 に記載の方法。

【請求項 264】

前記複合体の前記 K_i 、前記複合体の前記 $K_{i\text{ n a c t}}$ 、及び／または前記複合体の前記 $K_i / K_{i\text{ n a c t}}$ が、質量分析により決定される、請求項 263 に記載の方法。

【請求項 265】

請求項 1～98 または 203～214 のいずれか一項に記載の化合物及び好適な担体を含む、組成物。

【請求項 266】

請求項 1～98 または 203～214 のいずれか一項に記載の化合物及び薬学的に許容され得る担体を含む、医薬組成物。

【請求項 267】

標的タンパク質を調節する方法であって、前記標的タンパク質を、調節量の請求項 1～98 もしくは 203～214 のいずれか一項に記載の化合物または請求項 265 もしくは 266 に記載の組成物と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 268】

標的タンパク質を調節する方法であって、細胞を有効量の請求項 1～98 もしくは 203～214 のいずれか一項または請求項 265 もしくは 266 に記載の組成物と接触させ

10

20

30

40

50

ることにより、前記細胞内で、請求項 1 4 2～1 4 7、1 9 1～1 9 4、または 2 1 5～2 2 3 のいずれか一項に記載の複合体を形成することを含む、前記方法。

【請求項 2 6 9】

標的タンパク質を調節する方法であって、前記標的タンパク質を、請求項 1 5 5～1 8 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲートと接触させることを含む、前記方法。

【請求項 2 7 0】

プロリルイソメラーゼ活性を阻害する方法であって、前記プロリルイソメラーゼを発現する細胞を、請求項 1～9 8 もしくは 2 0 3～2 1 4 のいずれか一項に記載の化合物または請求項 2 6 5 もしくは 2 6 6 に記載の組成物と、前記化合物及び前記プロリルイソメラーゼ間で複合体の形成を可能とする条件下で、接触させることを含む、それにより、プロ

10

【請求項 2 7 1】

請求項 1 4 2～1 4 7、1 9 1～1 9 4、または 2 1 5～2 2 3 のいずれか一項に記載の複合体を細胞内で形成する方法であって、プレゼンタータンパク質を発現する細胞を、請求項 1～9 8 もしくは 2 0 3～2 1 4 のいずれか一項に記載の化合物または請求項 2 6 5 もしくは 2 6 6 に記載の組成物と、前記化合物及び前記プレゼンタータンパク質間で複合体の形成を可能とする条件下で、接触させることを含む、前記方法。

【請求項 2 7 2】

プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定する方法であって、

20

(a) (i) 1つまたは複数の標的タンパク質、(i i) 請求項 1～9 8 のいずれか一項に記載の化合物、及び(i i i) タグを含むプレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記 1つまたは複数の標的タンパク質、前記化合物、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記標的タンパク質が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに

(c) 1つまたは複数の標的タンパク質が、前記化合物及び前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成するか否かを決定することを含む、前記化合物及び前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成する標的タンパク質が、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質として同定される、前記方法。

30

【請求項 2 7 3】

前記プレゼンタータンパク質が、親和性タグを含む、請求項 2 7 2 に記載の方法。

【請求項 2 7 4】

前記決定ステップが、前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成している標的タンパク質を選択的に単離するために、前記プレゼンタータンパク質の前記タグを利用することを含む、請求項 2 7 2 または 2 7 3 に記載の方法。

【請求項 2 7 5】

前記方法が、(d) 1つまたは複数の標的タンパク質及び前記プレゼンタータンパク質間で形成された複体内の前記標的タンパク質を同定することをさらに含む、請求項 2 7 2～2 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 7 6】

前記標的タンパク質の構造の前記同定が、前記複合体に対して質量分析を行うことを含む、請求項 2 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 7 7】

プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定する方法であって、

(a) (i) 2つ以上の標的タンパク質、(i i) 請求項 1～9 8 のいずれか一項に記載の化合物、及び(i i i) 親和性タグを含むプレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 前記 2つ以上の標的タンパク質、前記化合物、及び前記プレゼンタータンパク質を、前記標的タンパク質が前記プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場

50

合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、

(c) ステップ(b)において形成された標的タンパク質、前記化合物、及び前記プレゼンタータンパク質の1つまたは複数の複合体を選択的に単離すること、ならびに

(d) 質量分析によりステップ(c)において単離された前記1つまたは複数の複合体内の前記標的タンパク質の構造を決定することを含み、

それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定する、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、タンパク質－タンパク質界面を分析するための方法及び試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

低分子薬物の大多数は、標的タンパク質上の機能的に重要なポケットと結合することにより作用し、それにより、そのタンパク質の活性を調節する。例えば、コレステロール低下薬物のスタチンは、HMG-C o Aレダクターゼの酵素活性部位と結合し、ゆえに、酵素がその基質に結合することを防ぐ。多くのこのような薬物／標的相互作用対が知られているという事実から、適正量の時間、労力、及び資源をかければ全てではないにしてもほとんどのタンパク質に対する低分子モジュレータを発見可能であるという誤った考えに導かれる者が現れ得る。これは事実からはほど遠い。現在の推定値によれば、全ヒトタンパク質の約10%のみが低分子により標的可能である。残りの90%は、低分子薬物の発見が難しいまたは困難であると現在考えられている。このような標的は、一般に「アンドラッグアブル」と称される。これらのアンドラッグアブル標的には、医学的に重要なヒトタンパク質の莫大なほとんど未開発の宝庫が含まれる。ゆえに、このようなアンドラッグアブル標的の機能を調節することができる新しい分子モダリティーを発見することに大きな関心が存在する。

【発明の概要】

【0003】

低分子は、標的とのその相互作用が接着力により推進され、その強さは接触表面積に概ね比例するため、その標的化能力において制限されている。それらのサイズが小さいために、低分子が標的タンパク質と効果的に相互作用するのに十分な分子間接触表面積を構築する唯一の方法は、文字通りそのタンパク質により取り込まれることである。実際に、多数の実験及び計算上のデータの両方が、それらの表面上に疎水性「ポケット」を有するタンパク質のみが、低分子と結合できるという見解を支持する。その場合、結合は取り込みにより可能となる。

【0004】

自然は、低分子が、疎水性ポケット以外の部位にて標的タンパク質と相互作用することを可能とする戦略を進化させてきた。この戦略は、天然に生じる免疫抑制薬であるシクロスポリンA、ラパマイシン、及びFK506により例示される。これらの薬物の生物学的活性は、低分子と小さな提示タンパク質との高親和性複合体の形成に関与する。低分子及び提示タンパク質の複合表面は、標的に会合する。ゆえに、例えば、シクロスポリンA及びシクロフィリンA間で形成される二元複合体は、高親和性及び特異性を伴ってカルシニューリンを標的とするが、シクロスポリンAもシクロフィリンAも単独では測定可能な親和性を伴ってカルシニューリンに結合しない。

【0005】

本発明者らは、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質対を同定し、これらの相互作用を調節することができる低分子の開発において使用するためのこれらの間の界面を調査するのに有用な化合物及びコンジュゲートを開発した。

【0006】

したがって、本開示は、タンパク質－タンパク質界面、例えばプレゼンタータンパク質

10

20

30

40

50

(例えば、FKBPファミリーのメンバー、シクロフィリンファミリーのメンバー、またはPIN1)及び標的タンパク質間の界面の分析に有用な方法及び試薬を提供する。このような分析は、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質の両方に同時に結合することができる低分子の設計の補助において有用であり、結果得られる低分子-プレゼンタータンパク質複合体は、標的タンパク質に結合し、その活性を調節することができる。いくつかの実施形態では、標的及び／またはプレゼンタータンパク質は、細胞内タンパク質である。いくつかの実施形態では、標的及び／またはプレゼンタータンパク質は、哺乳類タンパク質である。

【0007】

いくつかの態様では、本開示は、架橋基質として使用され得る化合物を提供する。これらの化合物は、タンパク質(例えば、標的タンパク質またはプレゼンタータンパク質)に共有結合的または非共有結合的に結合することができるタンパク質結合部分及びタンパク質結合部分に結合するものとは異なるタンパク質のアミノ酸と化学選択的に反応することができる少なくとも1つの架橋基を含み得る。いくつかの実施形態では、化合物は、1つのみの架橋基を含む。

【0008】

したがって、ある態様では、本開示は、タンパク質結合部分(例えば、プレゼンタータンパク質結合部分または標的タンパク質結合部分)及び架橋基(例えば、タンパク質結合部分に結合するものとは異なるタンパク質のアミノ酸と化学選択的に反応することができる部分)を含む化合物を提供する。タンパク質結合部分は、タンパク質(例えば、それがプレゼンタータンパク質結合部分または標的タンパク質結合部分であるかによって、プレゼンタータンパク質または標的タンパク質)に(共有結合的にまたは非共有結合的に)結合することができ、一方で、架橋基は、タンパク質(例えば、プレゼンタータンパク質、標的タンパク質、またはこのような他のタンパク質と結合することができる別の化合物)と共有結合を形成することができる。いくつかの実施形態では、化合物がプレゼンタータンパク質結合部分を含むとき、該化合物は、標的タンパク質結合部分を含まない。いくつかの実施形態では、化合物が、標的タンパク質結合部分を含むとき、該化合物は、プレゼンタータンパク質結合部分を含まない。

【0009】

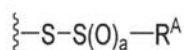
いくつかの実施形態では、架橋基は、スルフヒドリル反応性架橋基(例えば、架橋基は、混合ジスルフィド、マレイミド、ビニルスルホン、ビニルケトン、またはハロゲン化アルキルを含む)、アミノ反応性架橋基、カルボキシル反応性架橋基、カルボニル反応性架橋基、またはトリアゾール形成架橋基である。

【0010】

いくつかの実施形態では、架橋基は、混合ジスルフィドを含み、例えば、架橋基は、式Ia:

【0011】

【化1】



式Ia

の構造を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

aは、0、1、または2であり、

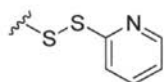
R^Aは、任意選択で置換されたC₁-C₆アルキル、任意選択で置換されたC₁-C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₆-C₁₀アリール、または任意選択で置換されたC₂-C₉ヘテロアリールである。

【0012】

いくつかの実施形態では、 R^A は、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール（例えば、ピリジル）である。いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0013】

【化2】



を含み、

10

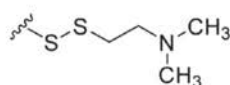
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0014】

いくつかの実施形態では、 R^A は、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキル（例えば、N, N-ジメチルエチル）である。いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0015】

【化3】



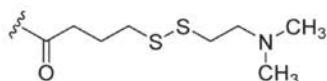
20

を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0016】

【化4】



30

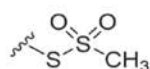
を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、 R^A は、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル（例えば、メチル）である。いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0018】

【化5】



40

を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0019】

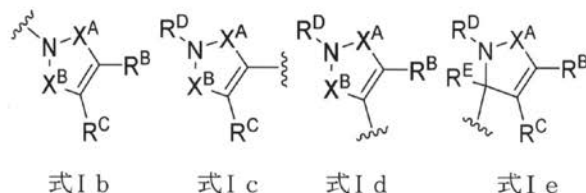
いくつかの実施形態では、架橋基は、炭素系架橋基（例えば、チオールとの反応の際に炭素-スルフィド結合を形成する架橋基）を含む。

いくつかの実施形態では、架橋基は、マレイミドを含み、例えば、架橋基は、式 I b、I c、I d、または I e：

【0020】

50

【化 6】



の構造を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

X^A は、 $-C(O)-$ または $-SO_2-$ であり、

X^B は、 $-C(O)-$ または $CR^E R^F$ であり、

R^B 及び R^C は、独立して、水素、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^D は、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^E 及び R^F は、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである。

【0021】

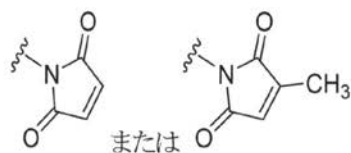
いくつかの実施形態では、架橋基は、式 I b の構造を含む。いくつかの実施形態では、 X^A は、 $-C(O)-$ である。いくつかの実施形態では、 X^B は、 $-C(O)-$ である。いくつかの実施形態では、 R^B 及び R^C は、水素または任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル（例えば、メチル）である。

【0022】

いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0023】

【化 7】



を含み、

10

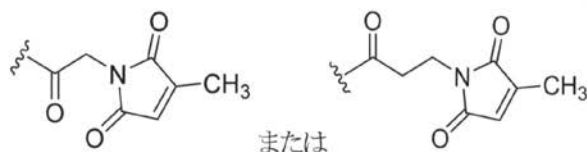
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0024】

いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0025】

【化 8】



20

を含み、

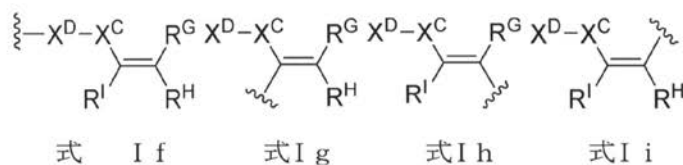
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0026】

いくつかの実施形態では、架橋基は、式 I f、I g、I h、または I i：

【0027】

【化 9】



30

の構造を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

40

X^C は、 $-C(O)-$ または $-SO_2-$ であり、

X^D は、存在しない、 $NR^J R^K$ 、または OR^L であり、

R^G 、 R^H 、及び R^I は、独立して、水素、ニトリル、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

50

R^J 、 R^K 、及び R^L は、独立して、存在しない、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換

されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル、または任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル $C_1 - C_6$ アルキルである。

【0028】

10

いくつかの実施形態では、架橋基は、式 I f の構造を含む。いくつかの実施形態では、 X^D は、存在しない。いくつかの実施形態では、 R^G 、 R^H 、及び R^I は、水素である。いくつかの実施形態では、 X^C は、 $-C(O)-$ である。いくつかの実施形態では、 X^C は、 $-SO_2-$ である。

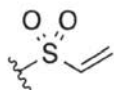
【0029】

いくつかの実施形態では、架橋基は、ビニルスルホンを含み、例えば、架橋基は、構造：

【0030】

【化10】

20



を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

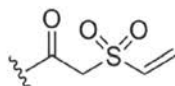
【0031】

いくつかの実施形態では、架橋基は、ビニルスルホンを含み、例えば、架橋基は、構造：

30

【0032】

【化11】



を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

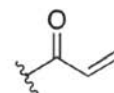
40

【0033】

いくつかの実施形態では、架橋基は、ビニルケトンを含み、例えば、架橋基は、構造：

【0034】

【化12】



50

を含み、

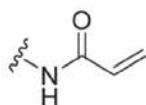
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0035】

いくつかの実施形態では、架橋基は、ビニルケトンを含み、例えば、架橋基は、構造：

【0036】

【化13】



10

を含み

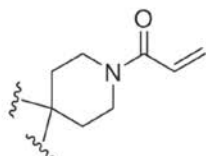
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0037】

いくつかの実施形態では、架橋基は、ビニルケトンを含み、例えば、架橋基は、構造：

【0038】

【化14】



20

を含み、

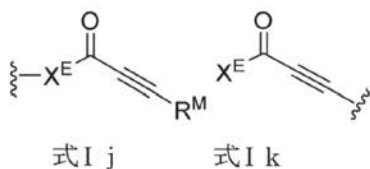
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0039】

いくつかの実施形態では、架橋基は、イノン、例えば式 I j または I k :

【0040】

【化15】



30

の構造を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

40

X^E は、存在しない、 $NR^N R^O$ 、または OR^P であり、

R^M は、水素、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル、または任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル $C_1 - C_6$ アルキルであり、

R^N 、 R^O 、及び R^P は、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ

50

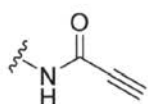
、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル、または任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル $C_1 - C_6$ アルキルである。

【0041】

いくつかの実施形態では、架橋基は、ビニルケトンを含み、例えば、架橋基は、構造：

【0042】

【化16】



を含み、

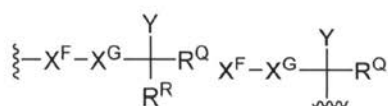
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0043】

いくつかの実施形態では、架橋基は、式 Im または In :

【0044】

【化17】



式Im

式In

の構造を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

X^F は、存在しない、 $NR^S R^T$ 、または OR^U であり、

X^G は、存在しない、または $-C(O)-$ であり、

Y は、脱離基であり、

R^Q 及び R^R は、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換された $C_3 - C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロアリール $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル、または任意選択で置換された $C_2 - C_9$ ヘテロシクリル $C_1 - C_6$ アルキルであり、

R^S 、 R^T 、及び R^U は、独立して、存在しない、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選

10

20

30

40

50

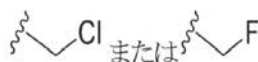
択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである。

【0045】

いくつかの実施形態では、Yは、ハロゲン（例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード）、メシレート、トシレート、またはトリフレートである。いくつかの実施形態では、Yは、ニトリルである。いくつかの実施形態では、 X^F 及び X^G は、存在しない。いくつかの実施形態では、 R^Q 及び R^R は、水素である。いくつかの実施形態では、架橋基は、ハロゲン化アルキル、例えば塩化アルキルを含み、例えば、架橋基は、構造：

【0046】

【化18】



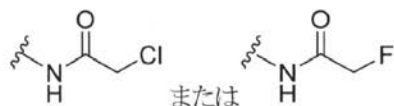
20

を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。いくつかの実施形態では、架橋基は、ハロゲン化アルキル、例えば塩化アルキルまたはフッ化アルキルを含み、例えば、架橋基は、構造：

【0047】

【化19】



30

を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0048】

いくつかの実施形態では、架橋基は、エポキシドを含み、例えば、架橋基は、式 I o：

【0049】

【化20】



40

の構造を含み

50

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

R^V 、 R^W 、及び R^X は、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである。

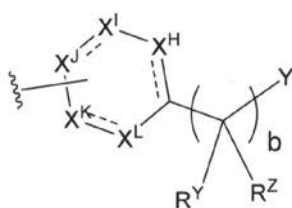
10

【0050】

いくつかの実施形態では、架橋基は、式I p：

【0051】

【化21】



式I p

20

の構造を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

点線は、該構造が芳香族となるために必要に応じて含まれる任意選択の二重結合を表し、
bは、0、1、または2であり、

Yは、脱離基であり、

R^Y 及び R^Z は、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

30

X^H 、 X^I 、 X^J 、 X^K 、及び X^L のそれぞれは、独立して、存在しない、 NR^{AA} 、または CR^{AB} であり、 X^H 、 X^I 、 X^J 、 X^K 、及び X^L のうちの少なくとも5つは、 NR^{AA} 、または CR^{AB} であり、

40

R^{AA} は、存在しない、または水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換され

50

た C_2-C_9 ヘテロシクリル、もしくは任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

$R^{A\ B}$ は、水素、ニトリル、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである。

10

【0052】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの $R^{A\ B}$ は、電子吸引基である。いくつかの実施形態では、1～3つの $R^{A\ B}$ は、電子吸引基である。

いくつかの実施形態では、 Y は、ニトリルである。いくつかの実施形態では、 Y は、ハロゲン（例えば、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード）、メシレート、トシレート、またはトリフレートである。

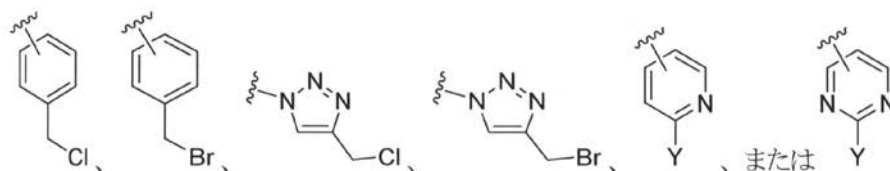
【0053】

いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0054】

【化22】

20



を含み、

30

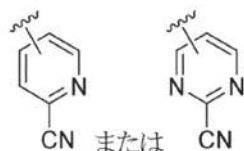
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0055】

いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0056】

【化23】



40

を含み、

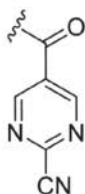
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0057】

いくつかの実施形態では、架橋基は、構造：

【0058】

【化 2 4】



10

を含み、

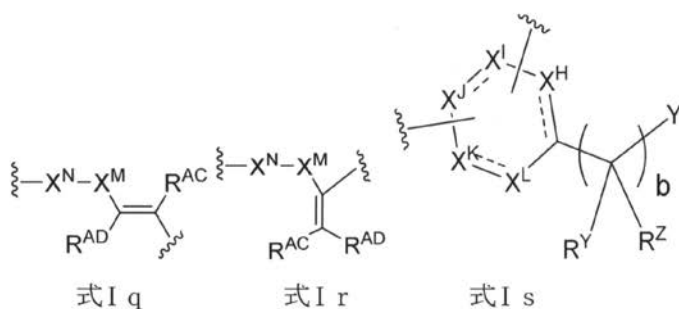
式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示する。

【0059】

いくつかの実施形態では、架橋基は、内的架橋基であり、例えば、架橋基は、式 I q、I r、または I s：

【0060】

【化 2 5】



20

の構造を含み、

式中、波線は、架橋基の、化合物の残部への付着点を図示し、

30

X^M は、 $-C(O)-$ または $-SO_2-$ であり、

X^N は、存在しない、 NR^{AE} 、または O であり、

R^{AC} 及び R^{AD} は、独立して、水素、ニトリル、ハロゲン、任意選択で置換されたヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

40

R^{AE} は、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルである。

50

【0061】

いくつかの実施形態では、 X^N は、 NR^{AE} であり、 R^{AE} は、水素である。いくつかの実施形態では、 R^{AC} 及び R^{AD} は、水素である。いくつかの実施形態では、 X^M は、 $-C(O)-$ である。いくつかの実施形態では、 X^M は、 $-SO_2-$ である。

【0062】

前述の化合物のいずれかのいくつかの実施形態では、タンパク質結合部分の部位は、タンパク質と非共有結合的に相互作用することができる。前述の化合物のいずれかのいくつかの実施形態では、タンパク質結合部分の部位は、タンパク質と共有結合的に相互作用することができる。

【0063】

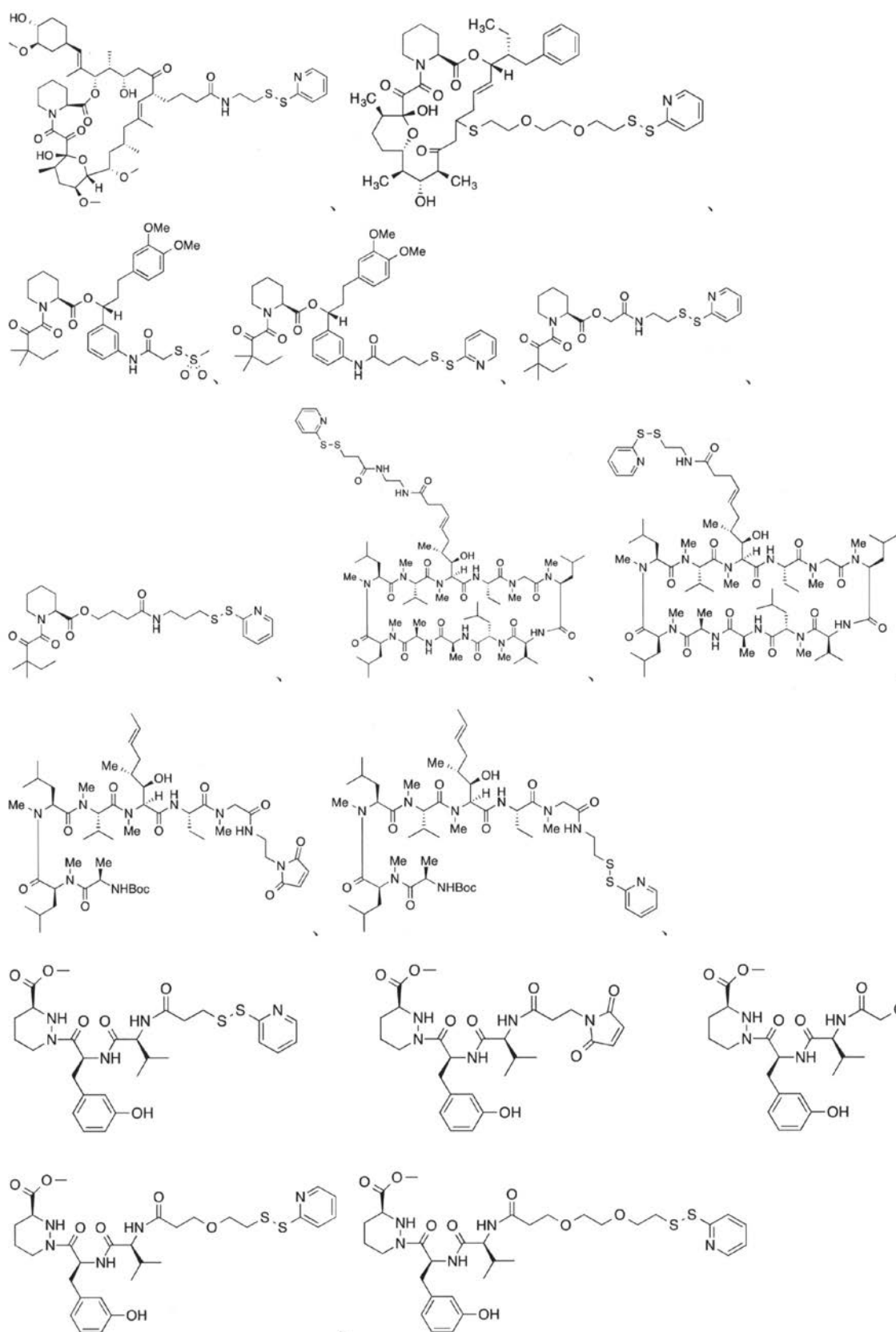
いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物を提供する。いくつかの実施形態では、タンパク質結合部分及び架橋基は、リンカーを通して付着する。

【0064】

いくつかの態様では、本開示は、構造：

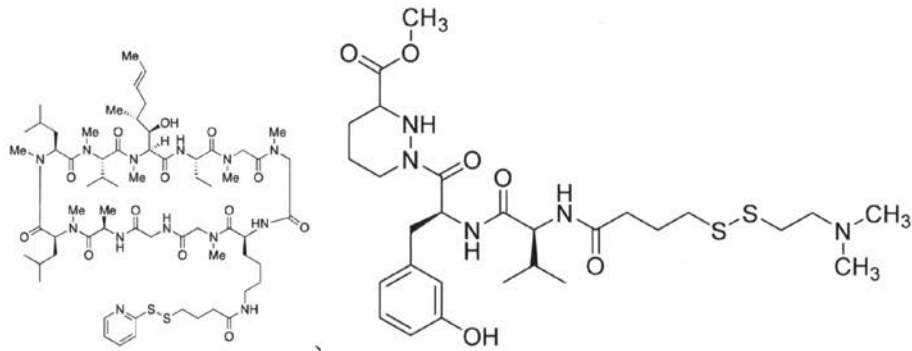
【0065】

【化 26-1】

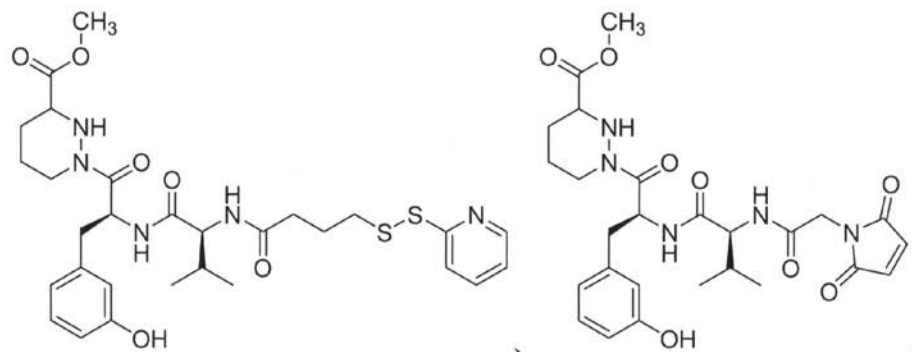


【0066】

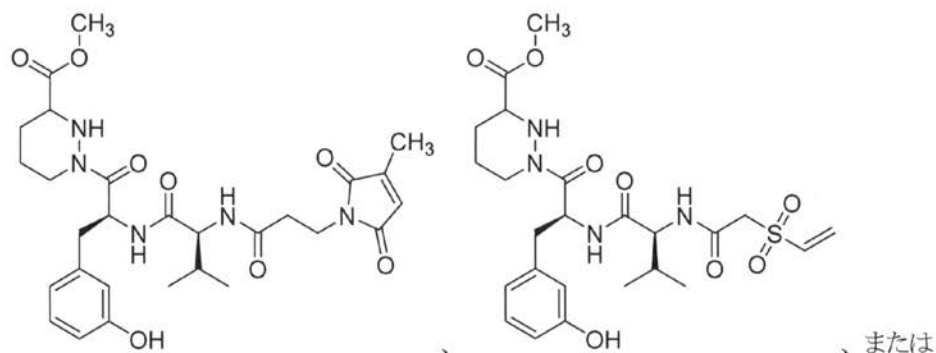
【化 26-2】



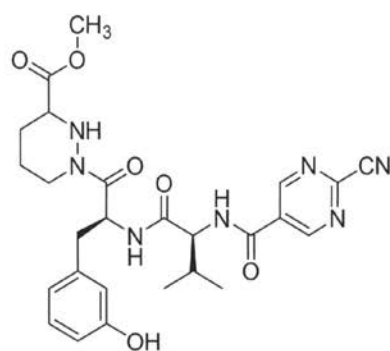
10



20



30



40

を有する化合物を提供する。

【0067】

いくつかの態様では、本開示は、コンジュゲート、それらの合成のための方法、及びその使用を提供し、それには、リンカーを通して標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質に共有結合的または非共有結合的に結合することができるプレゼンタータンパク質結合部分を含む。

【0068】

したがって、別の態様では、本開示は、標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼン

50

タータンパク質結合部分を含むコンジュゲートを提供する。いくつかの実施形態では、コンジュゲートのプレゼンタータンパク質結合部分の部位は、プレゼンタータンパク質と非共有結合的に相互作用することができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートのプレゼンタータンパク質結合部分の部位は、プレゼンタータンパク質と共有結合的に相互作用することができる。

【0069】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートを生成する方法を提供する。この方法は、(a) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物を、(b) 標的タンパク質と、コンジュゲートの生成を可能にする条件下で、反応させることを含む。

10

【0070】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートを生成する方法を提供する。この方法は、(a) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) 標的タンパク質、及び(c) プレゼンタータンパク質を提供すること、ならびに、化合物を標的タンパク質と、コンジュゲートの生成を可能にする条件下で、反応させることを含む。

【0071】

いくつかの態様では、本開示は、複合体、それらの生成のための方法、及びその使用を提供し、それには、プレゼンタータンパク質ならびにプレゼンタータンパク質結合部分及び標的タンパク質を含むコンジュゲートが含まれる。

20

【0072】

したがって、別の態様では、本開示は、(i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) プレゼンタータンパク質を含む複合体を提供する。

【0073】

いくつかの態様では、本開示は、(i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) プレゼンタータンパク質を含む複合体を生成する方法を提供する。この方法は、標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、複合体の生成を可能にする条件下で、組み合わせることを含む。

30

【0074】

いくつかの態様では、本開示は、(i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) プレゼンタータンパク質を含む複合体を生成する方法を提供する。この方法は、(a) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) 標的タンパク質、及び(c) プレゼンタータンパク質を提供すること、ならびに化合物を標的タンパク質と、複合体の生成を可能にする条件下で、反応させることを含む。

【0075】

前述の方法のいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の不在下で化合物に結合する。前述の方法のいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の不在下で化合物に実質的に結合しない。前述の方法のいくつかの実施形態では、化合物及び標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の不在下で実質的に反応しない。前述の方法のいくつかの実施形態では、化合物及び標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の不在下で反応する。前述の方法のいくつかの実施形態では、条件は、還元試薬を含まない。前述の方法のいくつかの実施形態では、条件は、過剰なプレゼンタータンパク質を含む。

40

【0076】

いくつかの実施形態では、化合物及びプレゼンタータンパク質間の検出可能な結合は、標的タンパク質の不在下で観察される。いくつかの実施形態では、しかしながら、化合物及びプレゼンタータンパク質間の検出可能な結合は、標的タンパク質の不在下で観察され

50

ない（例えば、プレゼンタータンパク質は、化合物に実質的に結合しない）。いくつかの実施形態では、架橋基及び標的タンパク質間での有意な反応（例えば、有意なコンジュゲート形成）は、プレゼンタータンパク質の不在下で観察されない。いくつかの実施形態では、しかしながら、架橋基及び標的タンパク質間での有意な反応は、プレゼンタータンパク質の不在下であっても観察され得る。いくつかの実施形態では、このような反応の速度及び／または程度（例えば、コンジュゲート形成の速度及び／または量）は、プレゼンタータンパク質が存在するとき、これが存在しないときと比較して、所与のアッセイにおいて異なり得る（例えば、コンジュゲート形成の速度及び／または量は、プレゼンタータンパク質の存在下で、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、または100倍大きい）。

【0077】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲート生成は、還元試薬を含まない（例えば、実質的に非含有である）条件下で行われる。

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) プレゼンタータンパク質、(i i) 本明細書に記載の化合物（例えば、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む構造の化合物）、及び(i i i) 標的タンパク質を含む複合体を提供する。いくつかの実施形態では、このような複合体は、架橋部分と標的タンパク質との間の架橋が形成されるように、架橋部分と標的タンパク質との反応を可能とする条件に曝露される及び／またはこの条件下に維持される。いくつかの実施形態では、架橋は、標的タンパク質のアミノ酸内（例えば、アミノ酸側鎖内）のヘテロ原子とのものである。いくつかの実施形態では、架橋は、標的タンパク質内のシステイン内の-S-原子とのものである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、天然標的タンパク質の変異体である、いくつかのこのような実施形態では、変異体は、天然標的タンパク質と高度（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはより高い）を示すが、架橋基における架橋への関与の影響を受けやすい少なくとも1個のアミノ酸の置換または付加によって異なるアミノ酸配列を有する（例えば、そのアミノ酸側鎖は、このような架橋に関与することができるヘテロ原子を含む）。

【0078】

いくつかの態様では、本開示は、コンジュゲート、それらの合成のための方法、及びその使用を提供し、それには、リンカーを通してプレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質に共有結合または非共有結合的に結合することができる標的タンパク質結合部分が含まれる。

【0079】

したがって、別の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートを提供する。いくつかの実施形態では、コンジュゲートの標的タンパク質結合部分の部位は、標的タンパク質と非共有結合的に相互作用することができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートの標的タンパク質結合部分の部位は、標的タンパク質と非共有結合的に相互作用することができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質結合部分及びプレゼンタータンパク質は、リンカーを通してコンジュゲートする。

【0080】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートを生成する方法を提供する。この方法は、(a) 標的タンパク質結合部分と架橋基を含む化合物を(b) プレゼンタータンパク質と、コンジュゲートの生成を可能にする条件下で、反応させることを含む。

【0081】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートを生成する方法を提供する。この方法は、(a) 標的タンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) プレゼンタータンパク質、及び(c) 標的タンパク質を提供すること、ならびに化合物をプレゼンタータンパク質と、コン

10

20

30

40

50

ジュゲートの生成を可能にする条件下で、反応させることを含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、化合物及び標的タンパク質間の検出可能な結合は、プレゼンタータンパク質の不在で観察される。いくつかの実施形態では、しかしながら、化合物及び標的タンパク質間の検出可能な結合は、プレゼンタータンパク質の不在下で観察されない（例えば、プレゼンタータンパク質は、化合物に実質的に結合しない）。いくつかの実施形態では、架橋基及びプレゼンタータンパク質間の有意な反応（例えば、有意なコンジュゲート形成）は、標的タンパク質の不在下で観察されない。いくつかの実施形態では、しかしながら、架橋基及びプレゼンタータンパク質間の有意な反応は、標的タンパク質の不在下であっても観察され得る。いくつかの実施形態では、このような反応の速度及び／または程度（例えば、コンジュゲート形成の速度及び／または量）は、プレゼンタータンパク質が存在するとき、これが存在しないときと比較して、所与のアッセイにおいて異なり得る（例えば、コンジュゲート形成の速度及び／または量は、プレゼンタータンパク質の存在下で、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、または100倍大きい）。

10

【0083】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の不在下で化合物に結合する。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の不在下で化合物に実質的に結合しない。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の不在下で化合物に実質的に結合しない。いくつかの実施形態では、架橋基及び標的タンパク質間の反応（例えば、コンジュゲート形成）は、プレゼンタータンパク質の不在下で観察されない。いくつかの実施形態では、しかしながら、架橋基及び標的タンパク質間の反応は、プレゼンタータンパク質の不在下であっても観察される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲート生成は、還元試薬を含まない（例えば、実質的に非含有である）条件下で行われる。

20

【0084】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) プレゼンタータンパク質、(ii) 本明細書に記載の化合物（例えば、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む構造の化合物）、及び(iii) 標的タンパク質を含む複合体を提供する。いくつかの実施形態では、このような複合体は、架橋部分と標的タンパク質との間の架橋が形成されるように、架橋部分と標的タンパク質との反応を可能とする条件に曝露される及び／またはこの条件下に維持される。いくつかの実施形態では、架橋は、標的タンパク質のアミノ酸内（例えば、アミノ酸側鎖内）のヘテロ原子とのものである。いくつかの実施形態では、架橋は、標的タンパク質内のシステイン内の-S-原子とのものである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、天然標的タンパク質の変異体である、いくつかのこのような実施形態では、変異体は、天然標的タンパク質と高度（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはより高い）を示すが、架橋基との架橋における関与の影響を受けやすい少なくとも1個のアミノ酸の置換または付加によって異なるアミノ酸配列を有する（例えば、そのアミノ酸側鎖は、このような架橋に関与することができるヘテロ原子を含む）。

30

40

【0085】

いくつかの態様では、本開示は、複合体、それらの生成のための方法、及びその使用を提供し、これには、標的タンパク質及びリンカーを通してプレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートが含まれる。

【0086】

いくつかの態様では、本開示は、(i) プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート、(ii) 標的タンパク質、及び(iii) プレゼンタータンパク質を含む複合体を提供する。いくつかの実施形態では、このような複合体は、架橋部分とプレゼンタータンパク質との間の架橋が形成されるように、架橋部分とプレゼンタータンパク質との反応を可能とする条件に曝露される及び／またはこの

50

条件下に維持される。いくつかの実施形態では、架橋は、プレゼンタータンパク質のアミノ酸内（例えば、アミノ酸側鎖内）のヘテロ原子とのものである。いくつかの実施形態では、架橋は、プレゼンタータンパク質内のシステイン内の-S-原子とのものである。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、天然プレゼンタータンパク質の変異体である、いくつかのこのような実施形態では、変異体は、天然プレゼンタータンパク質と高度（例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはより高い）を示すが、架橋基との架橋における関与の影響を受けやすい少なくとも1個のアミノ酸の置換または付加によって異なるアミノ酸配列を有する（例えば、そのアミノ酸側鎖は、このような架橋に関与することができるヘテロ原子を含む）。 10

【0087】

いくつかの態様では、本開示は、(i) プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) 標的タンパク質を含む複合体を生成する方法を提供する。この方法は、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び標的タンパク質を、複合体の生成を可能にする条件下で、組み合わせることを含む。

【0088】

いくつかの態様では、本発明は、(i) 本明細書に記載のコンジュゲート（例えば、標的タンパク質結合部分及びプレゼンタータンパク質を含むコンジュゲート）及び(ii) 標的タンパク質を含む複合体を生成する方法に関する。いくつかのかかる実施形態では、コンジュゲート及び標的タンパク質を、複合体の生成を可能にする条件下で、組み合わせることを含む方法を提供する。あるいはまたは加えて、いくつかの実施形態では、このような方法は、例えば、(i) (a) 化合物（例えば、標的タンパク質結合部分と架橋基を含む構造の化合物）、(b) 標的タンパク質、及び(c) プレゼンタータンパク質を互いに組み合わせること、ならびに(ii) 組み合わせを複合体の生成を可能にする条件に曝露する及び／または組み合わせを複合体の生成を可能にする条件下に維持することを含む。いくつかのかかる実施形態では、条件は、コンジュゲートが生成されるように、プレゼンタータンパク質との架橋基の反応を可能とする。 20

【0089】

いくつかの態様では、本開示は、(i) プレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) 標的タンパク質を含む複合体を生成する方法を提供する。この方法は、(a) 標的タンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(b) プレゼンタータンパク質、及び(c) 標的タンパク質を提供すること、ならびに化合物をプレゼンタータンパク質と、複合体の生成を可能にする条件下で、反応させることを含む。 30

【0090】

いくつかのかかる実施形態では、条件は、化合物、プレゼンタータンパク質、及び／または標的タンパク質が、プレゼンタータンパク質の不在下で、化合物及び標的タンパク質間の検出可能な結合が観察されるということの特徴とするものである。いくつかの実施形態では、しかしながら、化合物及び標的タンパク質間の検出可能な結合は、該条件下、プレゼンタータンパク質の不在下で観察されない（例えば、標的タンパク質は、化合物に実質的に結合しない）。いくつかの実施形態では、架橋基及びプレゼンタータンパク質間の有意な反応は、標的タンパク質の不在下、該条件下で観察されない。いくつかの実施形態では、しかしながら、架橋基及びプレゼンタータンパク質間の有意な反応は、標的タンパク質の不在下、該条件下であっても観察され得る。いくつかの実施形態では、条件は、還元試薬を含まない。いくつかの実施形態では、条件は、過剰なプレゼンタータンパク質を含む。 40

【0091】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の不在下で化合物に結合する。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の 50

不在下で化合物に実質的に結合しない。いくつかの実施形態では、化合物及びプレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の不在下で実質的に反応しない。いくつかの実施形態では、化合物及びプレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の不在下で反応する。いくつかの実施形態では、条件は、還元試薬を含まない。いくつかの実施形態では、条件は、過剰な標的タンパク質を含む。

【0092】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と非共有結合的に相互作用することができるプレゼンタータンパク質結合部分及び標的タンパク質と共有結合的または非共有結合的に相互作用することができる標的タンパク質結合部分を含む化合物を提供する。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分及び標的タンパク質結合部分は、リンカーを介して付着する。

10

【0093】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、式VII:

A-L-B

式VII

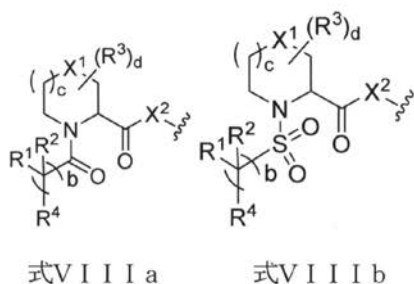
の構造を有し、

式中、Aは、式VIIaまたはVIIb:

【0094】

【化27】

20



30

の構造を含み、

式中、b及びcは、独立して、0、1、または2であり、

dは、0、1、2、3、4、5、6、または7であり、

X¹及びX²は、それぞれ、独立して、存在しない、CH₂、O、S、SO、SO₂、またはNR¹⁻³であり、

各R¹及びR²は、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁-C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂-C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂-C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁-C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂-C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂-C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃-C₁₀カルボシクリル、任意選択で置換されたC₆-C₁₀アリール、任意選択で置換されたC₆-C₁₀アリールC₁-C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂-C₉ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換されたC₂-C₉ヘテロアリール）、任意選択で置換されたC₂-C₉ヘテロシクリルC₁-C₆アルキル（例えば、任意選択で置換されたC₂-C₉ヘテロアリールC₁-C₆アルキル）であるか、あるいはR¹及びR²は、それらが結合している炭素原子と組み合わせあって、C=Oを形成するまたはR¹及びR²は、組み合わせあって、任意選択で置換されたC₃-C₁₀カルボシクリルもしくは任意選択で置換されたC₂-C₉ヘテロシクリルを形成し、

40

各R³は、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁-C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂-C₆アルケニ

50

ル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール）もしくは任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル）であるか、または2つの R^8 は組み合わせあって、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリールを形成し、

R^4 は、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキルであり、

L は、任意選択のリンカーであり、

B は、標的タンパク質結合部分である、化合物を提供する。

【0095】

式V I Iの化合物のいくつかの実施形態では、標的タンパク質結合部分であるBは、標的タンパク質と非共有結合的に相互作用することができる。式V I Iの化合物のいくつかの実施形態では、標的タンパク質結合部分であるBは、標的タンパク質と共有結合的に相互作用することができる。式V I Iの化合物のいくつかの実施形態では、リンカーであるLは、存在する。式V I Iの化合物のいくつかの実施形態では、リンカーであるLは、存在しない。

【0096】

いくつかの態様では、本開示は、三元複合体、それらの生成のための方法、及びその使用を提供し、これには、プレゼンタータンパク質、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質結合部分と標的タンパク質結合部分を含む化合物が含まれる。

【0097】

したがって、別の態様では、本開示は、(i) 式V I Iの化合物、(i i) 標的タンパク質、及び(i i i) プレゼンタータンパク質を含む複合体を提供する。

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる、プレゼンタータンパク質結合部分及び標的タンパク質を含むコンジュゲートの同定に有用であり得る。

【0098】

いくつかの態様では、本発明は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる本明細書に記載のコンジュゲート（例えば、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む構造の化合物が、標的タンパク質にコンジュゲートしている）を同定する及び／または特徴決定する方法に関する。いくつかの実施形態では、このような方法は、(a) (i) このようなコンジュゲート（例えば、標的タンパク質にコンジュゲートしている、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む構造の化合物）及び(i i) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、コンジュゲートがプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を含む複合体が形成されるか否かを決定するステップを含み、ここで複合体の形成は、該コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるものであることを示す。

【0099】

したがって、いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートを同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(i i) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、コンジュゲートがプレゼンタータンパク

質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c)コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を含む複合体が形成されるか否かを決定するステップを含み、ここで複合体の形成は、該コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるものであることを示す。

【0100】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、プレゼンタータンパク質の存在下で、化合物に対する共有結合を形成することができる標的タンパク質の同定に有用であり得る。

【0101】

したがって、別の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質の存在下で、化合物と反応することができる標的タンパク質を同定する及び／または特徴決定する方法を提供し、ここで化合物は、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む。この方法は、(a)(i)プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(ii)標的タンパク質、及び(iii)プレゼンタータンパク質を提供する、(b)化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を、コンジュゲートがプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c)標的タンパク質及び化合物が、コンジュゲートを形成するように複合体の形成中に反応するか否かを決定するステップを含み、ここで、標的タンパク質及び化合物がコンジュゲートを形成する場合に、該標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の存在下で、化合物と反応することができると同定される。

【0102】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質の同定に有用であり得る。

【0103】

したがって、別の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a)(i)標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii)プレゼンタータンパク質を提供する、(b)コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、コンジュゲートがプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c)標的タンパク質が、複体内のプレゼンタータンパク質に結合するか否かを決定するステップを含み、ここで標的タンパク質がプレゼンタータンパク質に結合する場合に、該標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質に結合すると同定される。

【0104】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a)(i)プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(ii)標的タンパク質、及び(iii)プレゼンタータンパク質を提供する、(b)化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を、コンジュゲートがプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c)標的タンパク質が、複体内のプレゼンタータンパク質に結合するか否かを決定するステップを含み、ここで標的タンパク質がプレゼンタータンパク質に結合する場合に、該標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質として同定される。

【0105】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a)(i)式VIIの化合物、(ii)標的タンパク質、及び(iii)プレゼンター

タンパク質を提供する、(b) 化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を、コンジュゲートがプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c) 化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成するか否かを決定するステップを含み、ここで化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に、該標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質として同定される。

【0106】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質を同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a) (i) 式V I Iの化合物、(i i) 標的タンパク質、及び(i i i) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) 化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を、化合物がプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c) 標的タンパク質が、複合体内のプレゼンタータンパク質に結合するか否かを決定するステップを含み、ここで標的タンパク質がプレゼンタータンパク質に結合する場合に、該標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質に結合する標的タンパク質として同定される。

【0107】

いくつかの態様では、本開示は、(a) (i) 1つまたは複数の標的タンパク質、(i i) 前述のいずれかの化合物、及び(i i i) タグ(例えば、親和性タグ)を含むプレゼンタータンパク質を提供すること、(b) 1つまたは複数の標的タンパク質、化合物、及びプレゼンタータンパク質を、標的タンパク質のうちの1つまたは複数のプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせること、ならびに(c) 1つまたは複数の標的タンパク質が、化合物及びプレゼンタータンパク質と複合体を形成するか否かを決定することによりプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定する方法を提供し、ここでプレゼンタータンパク質と複合体を形成する標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質として同定される。

【0108】

いくつかの実施形態では、決定ステップは、(例えば、プルダウン実験における使用により) プレゼンタータンパク質と複合体を形成している標的タンパク質を選択的に単離するために前記プレゼンタータンパク質のタグを利用することを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、本発明の標的タンパク質、プレゼンタータンパク質、及び化合物を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート(例えば、本発明の化合物の架橋基及び標的タンパク質の反応性アミノ酸間での反応により形成されたコンジュゲート)ならびにプレゼンタータンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、(d) 1つまたは複数の標的タンパク質、化合物、及びプレゼンタータンパク質間で形成された複合体内の標的タンパク質を同定すること(例えば、標的タンパク質の構造を決定すること)をさらに含む。いくつかの実施形態では、標的タンパク質の構造を同定することは、複合体に質量分析を行うことを含む。いくつかの実施形態では、標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成するか否か及び／または標的タンパク質が複合体内のプレゼンタータンパク質に結合するか否かの決定は、プルダウン実験を使用して実行され得、ここで標的タンパク質またはプレゼンタータンパク質のいずれかは、標識される(例えば、複合体は、複合体内に無い標的タンパク質及び／またはプレゼンタータンパク質の存在下で選択的にプルダウンされ得る)。

【0109】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を、(a) (i) 2つ以上の標的タンパク質、(i i) 前述の化合物のいずれか、及び(i i i) 親和性タグを含むプレゼンタータンパク質を提供すること、

(b) 2つ以上の標的タンパク質、化合物、及びプレゼンタータンパク質を、前記標的タンパク質がプレゼンタータンパク質と複合体を形成する場合に、複合体形成を可能とする条件下で、組み合わせること、(c) ステップ(b)において形成された標的タンパク質、化合物、及びプレゼンタータンパク質の1つまたは複数の複合体を選択的に単離すること、ならびに(d) 質量分析によりステップ(c)において単離された1つまたは複数の複合体内の標的タンパク質を同定すること(例えば、標的タンパク質の構造を決定すること)により、同定する方法を提供し、それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質が同定される。

【0110】

いくつかの実施形態では、決定ステップは、(例えば、プルダウン実験における使用により)プレゼンタータンパク質と複合体を形成している標的タンパク質を選択的に単離するために前記プレゼンタータンパク質のタグを利用することを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、本発明の標的タンパク質、プレゼンタータンパク質、及び化合物を含む。いくつかの実施形態では、複合体は、標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート(例えば、本発明の化合物の架橋基及び標的タンパク質の反応性アミノ酸間での反応により形成されたコンジュゲート)ならびにプレゼンタータンパク質を含む。いくつかの実施形態では、標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成するか否か及び/または標的タンパク質が複合体内のプレゼンタータンパク質に結合するか否かの決定は、プルダウン実験を使用して実行され得、ここで標的タンパク質またはプレゼンタータンパク質のいずれかは、標識される(例えば、複合体は、複体内に無い標的タンパク質及び/またはプレゼンタータンパク質の存在下で選択的にプルダウンされ得る)。

【0111】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートをもたらし、プレゼンタータンパク質結合部分に付着する標的タンパク質上の場所を同定するのに有用であり得る。

【0112】

したがって、別の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質結合部分とコンジュゲートを形成するための標的タンパク質上の場所を同定する及び/または特徴決定する方法を提供し、このコンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる。この方法は、(a)(i)ある場所にて標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii)プレゼンタータンパク質を提供する、(b)コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を組み合わせる、(c)コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否かを決定する、ならびに(d)コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成するまで、プレゼンタータンパク質結合部分を標的タンパク質上の異なる場所にてコンジュゲートさせてステップ(a)～(c)を任意選択で反復するステップを含み、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる、プレゼンタータンパク質結合部分とのコンジュゲートを、形成するための標的タンパク質上の場所は、コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に同定される。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、天然に生じる標的タンパク質の変異体である。

【0113】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質結合部分とコンジュゲートを形成するための標的タンパク質上の場所を同定する及び/または特徴決定する方法を提供し、このコンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる。この方法は、(a)(i)プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(ii)標的タンパク質、及び(iii)プレゼンタータンパク質を提供する、(b)化合物を標的タンパク質と、プレゼンタータンパク質の存在下で、ある場所にて標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートの形成を可

能とする条件下で、組み合わせる、(c) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否かを決定する、ならびに (d) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成するまで、プレゼンタータンパク質結合部分を標的タンパク質上の異なる場所にてコンジュゲートさせてステップ (a) ~ (c) を任意選択で反復するステップを含み、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる、プレゼンタータンパク質結合部分とのコンジュゲートを、形成するための標的タンパク質上の場所は、コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に同定され、それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートを形成するための標的タンパク質上の場所が同定される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、天然に生じる標的タンパク質の変異体である。

10

【0114】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に共有結合を形成することができる化合物の同定に有用であり得る。いくつかの実施形態では、同定された化合物は、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質と選択的に共有結合を形成する。

【0115】

したがって、別の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に共有結合的に結合することができる化合物を同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び (iii) プレゼンタータンパク質を含む試料を提供する、ならびに (b) 化合物及び標的タンパク質が、試料中の前記化合物の架橋基を介して共有結合を形成するか否かを決定するステップを含み、化合物及び標的タンパク質が試料中で反応する場合に、化合物は、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に共有結合的に結合すると同定される。

20

【0116】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に、選択的及び共有結合的に結合することができる化合物を同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び (iii) プレゼンタータンパク質を含む第一の試料、ならびに (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基を含む第一の試料におけるものと同じ化合物及び (ii) 第一の試料におけるものと同じ標的タンパク質を含む第二の試料を提供する、(b) 第二の試料と比較して、第一の試料において、化合物及び標的タンパク質が反応する程度を決定するステップを含み、化合物及び標的タンパク質が、第二の試料中よりも第一の試料中で多く反応する場合に、化合物は、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に選択的に共有結合的に結合すると同定される。

30

【0117】

いくつかの実施形態では、化合物は、化合物及び標的タンパク質が第二の試料中より少なくとも5倍多く第一の試料中で反応する場合に、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に選択的に共有結合的に結合すると同定される。いくつかの実施形態では、化合物は、化合物及び標的タンパク質が第一の試料中で反応するが、第二の試料中で実質的に反応しない場合に、プレゼンタータンパク質の存在下で、標的タンパク質に選択的に共有結合的に結合すると同定される。

40

【0118】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートの同定に有用であり得る。

【0119】

したがって、別の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートを同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方

50

法は、(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (i i) プレゼンタータンパク質を提供する、ならびに (b) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、(c) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が、複合体を形成するか否かを決定するステップを含み、コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合に、コンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができると同定され、それにより、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができるコンジュゲートが同定される。

【0120】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート及びタンパク質の間の結合は、三元時間分解蛍光エネルギー移動アッセイ、三元増幅発光近接ホモジニアスアッセイ、等温滴定型熱量測定、表面プラズモン共鳴、または核磁気共鳴を含む方法によって決定され得る。

【0121】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間のタンパク質-タンパク質界面の構造の決定に有用であり得る。

【0122】

したがって、別の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造を決定する及び／またはその1つもしくは複数の構造的特徴を評価する方法を提供する。この方法は、(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び (i i) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) 複合体を (例えば、バイアル内で) 形成するように、コンジュゲートをプレゼンタータンパク質と接触させる、ならびに (c) 複合体の結晶構造を決定するステップを含み、界面の構造は、少なくとも、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間の結晶構造の部位を含み、それにより、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造が決定される。

【0123】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造を決定する及び／またはその1つもしくは複数の構造的特徴を評価する方法を提供する。この方法は、(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(i i) 標的タンパク質、及び (i i i) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) 化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を、化合物及び標的タンパク質間でコンジュゲートを形成する及び前記コンジュゲート及び前記プレゼンタータンパク質間で複合体を (例えば、バイアル中で) 形成するのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに (c) 複合体の結晶構造を決定するステップを含み、界面の構造は、少なくとも、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間の結晶構造の部位を含み、それにより、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造が決定される。

【0124】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造を決定する及び／またはその1つもしくは複数の構造的特徴を評価する方法を提供する。この方法は、(a) (i) 式 V I I の化合物、(i i) 標的タンパク質、及び (i i i) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) 化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を含む複合体を (例えば、バイアル内で) 形成する、ならびに (c) 複合体の結晶構造を決定するステップを含み、界面の構造は、少なくとも、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間の結晶構造の部位を含み、それにより、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面の構造が決定される。

【0125】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内のタンパク質-タンパク質界面の構造を決定する及び／またはその1つもしくは複

10

20

30

40

50

数の構造的特徴を評価する方法を提供する。この方法は、(a) 前述の複合体のいずれかの結晶を提供する、及び(b) 結晶の構造を決定するステップを含み、界面の構造は、少なくとも、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間の結晶構造の部位を含み、それにより、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内のタンパク質-タンパク質界面の構造が決定される。

【0126】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質の生物学的活性を調節することができる化合物を同定する及び／または特徴決定する方法を提供する。この方法は、(a) プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内のタンパク質-タンパク質界面の構造(例えば、前述の方法のいずれかにより決定される構造)を提供する、ならびに(b) 界面にて結合することができる化合物の構造を決定するステップを含み、それにより、標的タンパク質の生物学的活性を調節することができる化合物が同定される。いくつかの実施形態では、界面にて結合することができる化合物の構造は、計算法を使用して決定される。いくつかの実施形態では、界面にて結合することができる化合物の構造は、標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質の存在下での複合体形成のための本明細書に記載のプレゼンタータンパク質結合部分を含む化合物のスクリーニングにより決定される。

10

【0127】

いくつかの態様では、本開示は、複合体に関するX線結晶座標を得る方法を提供する。この方法は、(a) (i) 標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲート及び(ii) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) コンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、コンジュゲートがプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c) 複合体の結晶構造を決定するステップを含み、それにより、複合体に関するX線結晶座標が得られる。

20

【0128】

いくつかの態様では、本開示は、複合体に関するX線結晶座標を得る方法を提供する。この方法は、(a) (i) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋部分を含む化合物、(ii) 標的タンパク質、及び(iii) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) 化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を、化合物がプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c) 複合体の結晶構造を決定するステップを含み、それにより、複合体に関するX線結晶座標が得られる。

30

【0129】

いくつかの態様では、本開示は、複合体に関するX線結晶座標を得る方法を提供する。この方法は、(a) (i) 本発明の化合物、(ii) 標的タンパク質、及び(iii) プレゼンタータンパク質を提供する、(b) 化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質を、化合物がプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる場合に、複合体形成を可能とするのに好適な条件下で、組み合わせる、ならびに(c) 複合体の結晶構造を決定するステップを含み、それにより、複合体に関するX線結晶座標が得られる。

40

【0130】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質との結合に関与する標的タンパク質上の残基を決定する方法を提供する。この方法は、(a) 本発明の方法により得られる複合体のX線結晶座標を提供する、(b) プレゼンタータンパク質上の原子の4 Å以内の原子を含む標的タンパク質の残基を同定するステップを含み、それにより、プレゼンタータンパク質との結合に関与する標的タンパク質上の残基を決定する。いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載のプレゼンタータンパク質／標的タンパク質複合体のいずれかの生物化学及び／または生物物理学の特性を決定する方法を提供する。この方法は、(a) 本明細書に記載の方法により得られた本明細書に記載の複合体のX線結晶座標を提供する、(b) 複合体の生物化学及び／または生物物理学の特性を算出するステップを

50

含み、それにより、プレゼンタータンパク質／標的タンパク質複合体の生物化学及び／または生物物理学の特性を決定する。

【0131】

いくつかの実施形態では、生物化学及び／または生物物理学の特性は、複合体の結合の自由エネルギー、複合体の K_d 、複合体の K_i 、複合体の $K_{i n a c t}$ 、及び／または複合体の $K_i / K_{i n a c t}$ を含む。いくつかの実施形態では、生物化学及び／または生物物理学の特性は、等温滴定型熱量測定、表面プラズモン共鳴、及び／または質量分析により決定される。

【0132】

いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質を含む複体内の界面は、結合ポケットであるまたはこれを含む。

いくつかの態様では、本開示は、前述の化合物、標的タンパク質、及びプレゼンタータンパク質のいずれかを含む組成物を溶液で提供する。

【0133】

いくつかの態様では、本開示は、本発明の化合物、コンジュゲート、または複体のいずれか及び薬学的に許容され得る賦形剤を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、単位剤形である。

【0134】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）を調節する方法を提供する。いくつかの実施形態では、このような方法は、標的タンパク質を、調節（例えば、正または負の調節）量の本発明の化合物（例えば、プレゼンタータンパク質の存在下で）、標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲート、または組成物のいずれかと接触させるステップを含む。

【0135】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）を調節する（例えば、正または負に調節する）方法を提供する。いくつかの実施形態では、このような方法は、標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質を発現する細胞を、有効量の本発明の化合物または組成物と、化合物がプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができ、得られた複合体が標的タンパク質に結合することができる条件下で、接触させるステップを含み、それにより、標的タンパク質を調節する（例えば、正または負に調節する）。

【0136】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）を調節する（例えば、正または負に調節する）方法を提供する。いくつかの実施形態では、このような方法は、標的タンパク質を、標的タンパク質結合部分を含む本発明のコンジュゲートと接触させるステップを含み、それにより、標的タンパク質を調節する。

【0137】

いくつかの態様では、本開示は、プロリルイソメラーゼ活性を阻害する方法を提供する。いくつかの実施形態では、このような方法は、プロリルイソメラーゼを発現する細胞を、本明細書の化合物または組成物と、化合物及びプロリルイソメラーゼ間で複体の形成を可能とする条件下で接触させることを含み、それにより、プロリルイソメラーゼ活性を阻害する。

【0138】

いくつかの態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質／化合物複合体を細胞内で形成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、このような方法は、プレゼンタータンパク質を発現する細胞を本発明の化合物または組成物と、化合物及びプレゼンタータンパ

10

20

30

40

50

ク質間で複合体の形成を可能とする条件下で、接触させるステップを含む。

【0139】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、表1に記載の遺伝子のいずれか1つによりコードされるタンパク質と結合することができる。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、プロリルイソメラーゼ結合部分である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、FKBP結合部分（例えば、プレゼンタータンパク質結合部分は、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP25、FKBP51、またはFKBP52と結合することができる）、シクロフィリン結合部分（例えば、プレゼンタータンパク質結合部分は、PP1A、CYPB、CYP C、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYPL1、CYP60、CYPJ、PPIL4、PPIL6、RANBP2、またはPPWD1と結合することができる）、またはPIN1結合部分である。前述の方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、プレゼンタータンパク質結合部分に結合すると知られている。

10

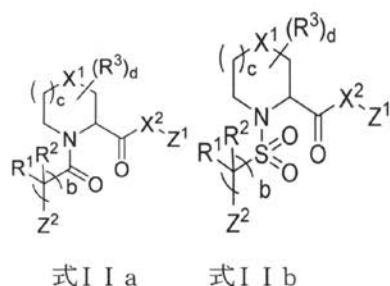
【0140】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、FKBP結合部分（例えば、選択的FKBP結合部分または非選択的FKBP結合部分）である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、FKBP結合部分は、式IIaまたはIIb：

20

【0141】

【化28】



30

の構造を含み、

式中、Z¹及びZ²は、それぞれ、独立して、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキルであるか、またはZ¹及びZ²は、それらが付着している原子と、組み合わせさせて、任意選択で置換された10～40員の大環状分子を形成し、Z¹またはZ²のうちの少なくとも1つは、架橋基への付着点を含み、b及びcは、独立して、0、1、または2であり、dは、0、1、2、3、4、5、6、または7であり、X¹及びX²は、それぞれ、独立して、存在しない、CH₂、O、S、SO、SO₂、またはNR⁴であり、

40

各R¹及びR²は、独立して、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されたC₁－C₆アルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆アルキニル、任意選択で置換されたC₁－C₆ヘテロアルキル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルケニル、任意選択で置換されたC₂－C₆ヘテロアルキニル、任意選択で置換されたC₃－C₁₀カルボ

50

シクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール）、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル）であるか、あるいは R^1 及び R^2 は、それらが結合している炭素原子と組み合わせあって、 $C=O$ を形成するまたは R^1 及び R^2 は、組み合わせあって、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリルまたは任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリルを形成し、

各 R^3 は、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール）、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル）であるか、または2つの R^8 は組み合わせあって、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリールを形成し、

各 R^4 は、独立して、水素、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 C_3-C_7 カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、及び任意選択で置換された C_3-C_7 カルボシクリル C_1-C_6 アルキルである。

【0142】

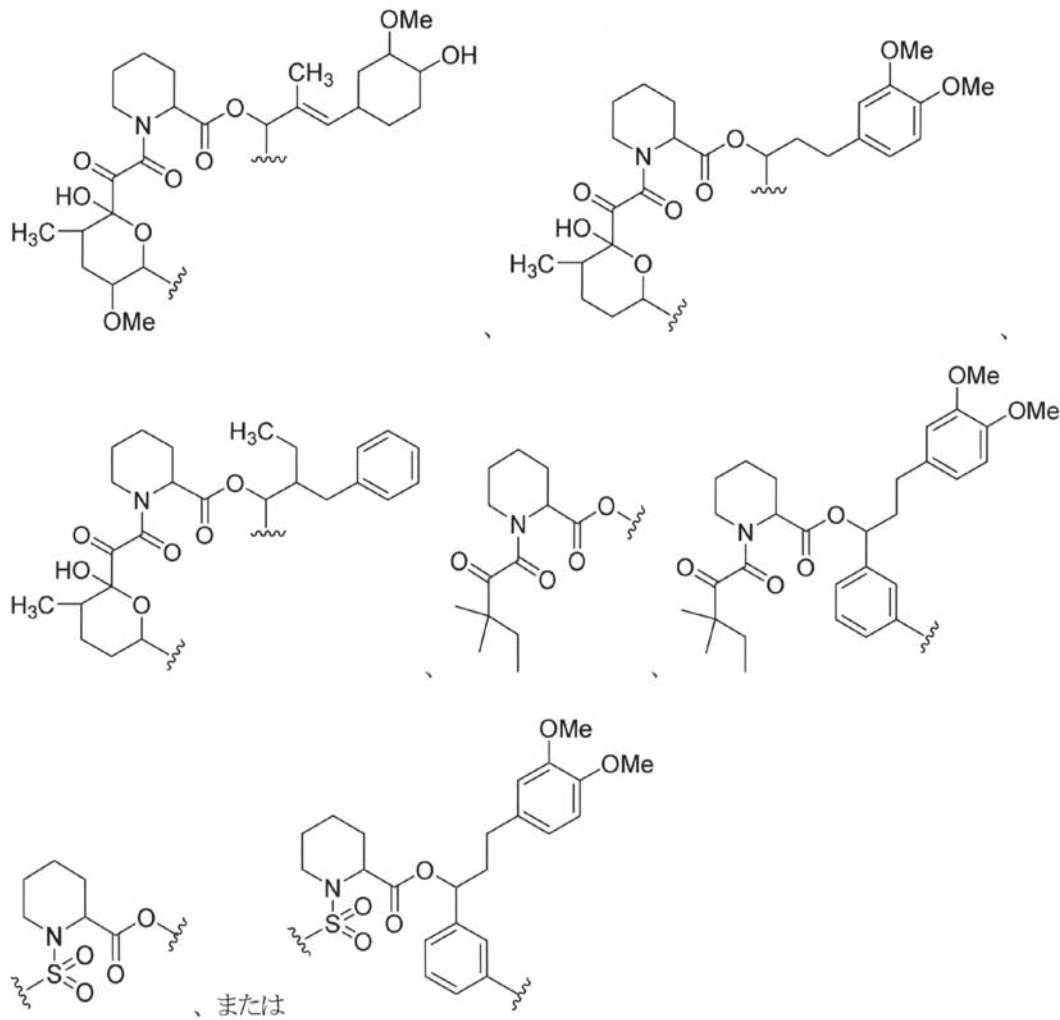
前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、構造：

【0143】

10

20

【化 2 9】



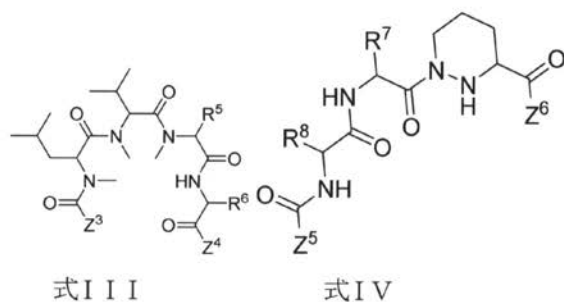
を含む。

【0144】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、シクロフィリン結合部分（例えば、選択的シクロフィリン結合部分または非選択的シクロフィリン結合部分）である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、シクロフィリン結合部分は、式 I I I または I V：

【0145】

【化 3 0】



の構造を含み、

式中、 Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、及び Z^6 は、それぞれ、独立して、ヒドロキシル、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキルであるか、または Z^3 及び Z^4 もしくは Z^5 及び Z^6 は、それらが付着している原子と、組み合わせて、任意選択で置換された10～40員の大環状分子を形成し、

Z^3 、 Z^4 、 Z^5 、 Z^6 、または R^5 のうちの少なくとも1つは、架橋基への付着点を含み、

e は、0、1、2、3、または4であり、

R^5 及び R^7 は、独立して、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキルであり、

R^6 は、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキルであり、

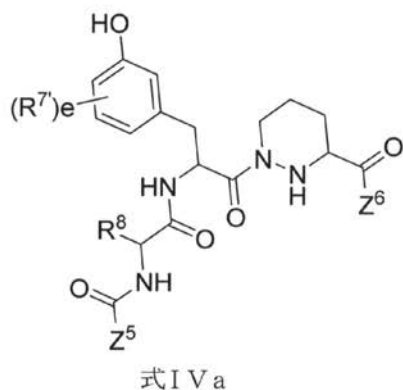
R^8 は、水素、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 C_3-C_7 カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、及び任意選択で置換された C_3-C_7 カルボシクリル C_1-C_6 アルキルである。

【0146】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、シクロフィリン結合部分は、式IVa：

【0147】

【化31】



の構造を含み、

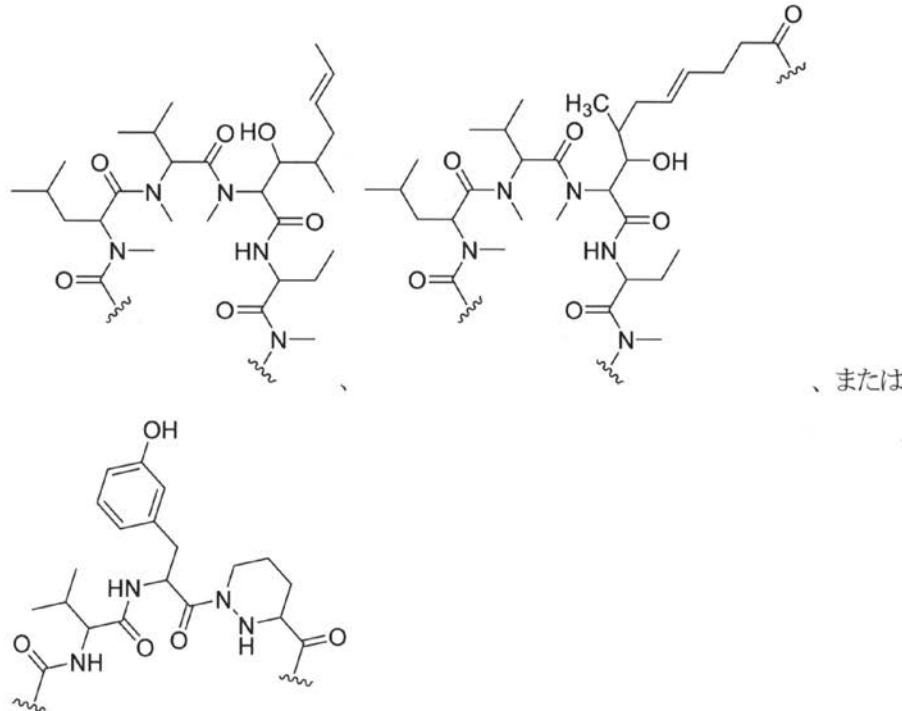
式中、各 R^7 は、独立して、ヒドロキシル、シアノ、任意選択で置換されたアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換された C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 アルキニル、任意選択で置換された C_1-C_6 ヘテロアルキル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルケニル、任意選択で置換された C_2-C_6 ヘテロアルキニル、任意選択で置換された C_3-C_{10} カルボシクリル、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール、任意選択で置換された C_6-C_{10} アリール C_1-C_6 アルキル、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール）、または任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロシクリル C_1-C_6 アルキル（例えば、任意選択で置換された C_2-C_9 ヘテロアリール C_1-C_6 アルキル）である。

【0148】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、構造：

【0149】

【化32】



を含む。

【0150】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、標的タンパク質は、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子、または古典的なタンパク質-タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを伴うタンパク質である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、標的タンパク質は、アンドラッグアブル表面を含む。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、標的タンパク質は、従来型の結合ポケットを有さない。

【0151】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、標的タンパク質のアミノ酸配列は、少なくとも1個のネイティブアミノ酸を反応性アミノ酸（例えば、天然アミノ酸、例えばシステイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、もしくはセリン、または非天然アミノ酸）で置換するように修飾されている。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、標的タンパク質のアミノ酸配列は、少なくとも1個のネイティブ反応性アミノ酸（例えば、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリン）を非反応性アミノ酸（例えば、天然アミノ酸、例えばセリン、バリン、アラニン、イソロイシン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、もしくはロイシン、または非天然アミノ酸）で置換するように修飾されている。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形

態では、少なくとも1個のネイティブ反応性アミノ酸は、溶媒に曝露されたアミノ酸である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、標的タンパク質のアミノ酸配列は、全ての反応性アミノ酸を非反応性アミノ酸で置換するように修飾されている。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、置換は、保存的置換である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1個のみの溶媒に曝露された反応性アミノ酸を含む。

【0152】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、表1に記載の遺伝子のいずれか1つによりコードされるタンパク質である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、プロリルイソメラーゼである。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プロリルイソメラーゼは、FKBPファミリーのメンバー（例えば、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP25、FKBP51、またはFKBP52）、シクロフィリンファミリーのメンバー（例えば、PP1A、CYPB、CYPC、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYP11、CYP60、CYPJ、PPI14、PPI16、RANBP2、またはPPWD1）、またはPIN1である。

【0153】

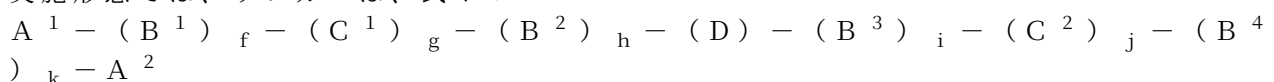
前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列は、少なくとも1個のネイティブアミノ酸を反応性アミノ酸（例えば、天然アミノ酸、例えばシステイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、もしくはセリン、または非天然アミノ酸）で置換するように修飾されている。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列は、少なくとも1個のネイティブ反応性アミノ酸（例えば、システイン、リジン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリン）を非反応性アミノ酸（例えば、天然アミノ酸、例えばセリン、バリン、アラニン、イソロイシン、トレオニン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、もしくはロイシン、または非天然アミノ酸）で置換するように修飾されている。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、少なくとも1個のネイティブ反応性アミノ酸は、溶媒に曝露されたアミノ酸である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列は、全ての反応性アミノ酸を非反応性アミノ酸で置換するように修飾されている。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、置換は、保存的置換である。

【0154】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、リンカーは、1～20原子長である。前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、リンカーは、1.5～30オングストローム長である。

【0155】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、リンカーは、式V：



式V

の構造を有し、

式中、 A^1 は、リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、 A^2 は、架橋基及びリ

ンカー間の結合であり、 B^1 、 B^2 、 B^3 、及び B^4 は、それぞれ、独立して、任意選択で置換された $C_1 - C_2$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 - C_3$ ヘテロアルキル、O、S、及び NR^N から選択され、 R^N は、水素、任意選択で置換された $C_1 - 4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - 4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - 4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - 6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - 1_2$ アリール、または任意選択で置換された $C_1 - 7$ ヘテロアルキルであり、 C^1 及び C^2 は、それぞれ、独立して、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、またはホスホリルから選択され、 f 、 g 、 h 、 i 、 j 、及び k は、それぞれ、独立して、0または1であり、 D は、任意選択で置換された $C_1 - 1_0$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - 1_0$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - 1_0$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - 6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - 1_2$ アリール、任意選択で置換された $C_2 - C_1_0$ ポリエチレングリコール、もしくは任意選択で置換された $C_1 - 1_0$ ヘテロアルキルであるか、または $A^1 - (B^1)_f - (C^1)_g - (B^2)_h - (B^3)_i - (C^2)_j - (B^4)_k - A^2$ に連結する化学結合である。

10

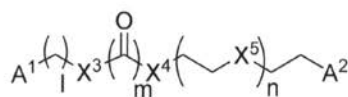
【0156】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、リンカーは、式VI：

【0157】

【化33】

20



式VI

の構造を含み、

式中、 A^1 は、リンカー及びタンパク質結合部分間の結合であり、

A^2 は、架橋基及びリンカー間の結合であり、

30

l は、0、1、2、または3であり、

m は、0または1であり、

n は、0、1、または2であり、

X^3 、 X^4 、及び X^5 は、それぞれ、独立して、存在しない、O、S、 $-C \equiv C-$ 、 CR^9 、 R^{10} または NR^{11} であり、

各 R^9 、 R^{10} 、及び R^{11} は、独立して、水素、任意選択で置換された $C_1 - C_6$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - C_6$ アルキニル、任意選択で置換されたアリール、 $C_3 - C_7$ カルボシクリル、任意選択で置換された $C_6 - C_{10}$ アリール、 $C_1 - C_6$ アルキル、及び任意選択で置換された $C_3 - C_7$ カルボシクリル、 $C_1 - C_6$ アルキルである。いくつかの実施形態では、各 R^9 、 R^{10} 、及び R^{11} は、独立して、水素、非置換 $C_1 - C_6$ アルキル、非置換 $C_2 - C_6$ アルケニル、非置換 $C_2 - C_6$ アルキニル、非置換アリール、 $C_3 - C_7$ カルボシクリル、非置換 $C_6 - C_{10}$ アリール、 $C_1 - C_6$ アルキル、及び非置換 $C_3 - C_7$ カルボシクリル、 $C_1 - C_6$ アルキルである。

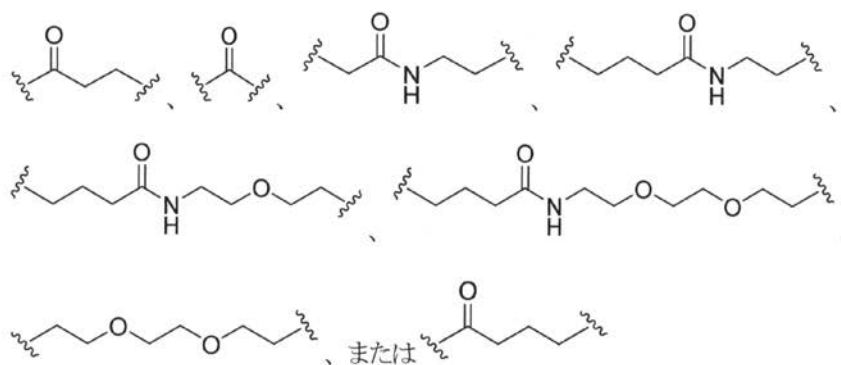
40

【0158】

前述の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかのいくつかの実施形態では、リンカーは、構造：

【0159】

【化 3 4】



10

を含む。

化学用語

当業者であれば、本明細書に記載されるある特定の化合物が、1つもしくは複数の異なる異性体（例えば、立体異性体、幾何異性体、互変異性体）及び／または同位体（1個または複数の原子をその原子の異なる同位体で置換したもの、例えば、水素をジュウテリウムで置換したもの）の形態で存在できることを、理解するだろう。別段の指定がない限りまたは文脈から明らかでない限り、示される構造は、任意のかかる異性体または同位体の形態を個別または組み合わせで表すものと理解されることができる。

20

【0160】

本明細書に記載の化合物は、非対称であることができる（例えば、1つまたは複数のステレオ中心を有する）。別段の指定がない限り、全ての立体異性体、例えばエナンチオマー及びジアステレオマーが意図される。非対称置換炭素原子を含有する本開示の化合物は、光学活性形またはラセミ形で単離可能である。光学活性出発材料から光学活性形をいかに調製するかに関する方法は、当該技術分野で公知であり、例えば、ラセミ混合物の分割によるものまたは立体選択的合成によるものがある。オレフィン、C=N二重結合などの多くの幾何異性体もまた、本明細書に記載の化合物中に存在可能であり、かかる安定な異性体は全て本開示で企図される。本開示の化合物のシス及びトランス幾何異性体は記載されており、異性体の混合物としてまたは分離された異性体形態として単離され得る。

30

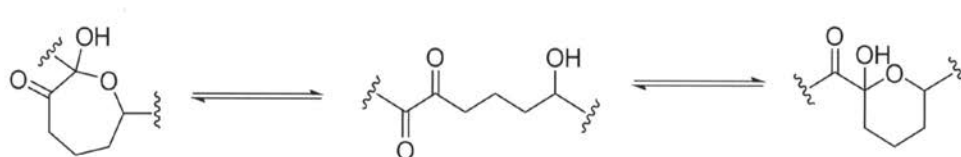
【0161】

いくつかの実施形態では、本明細書に示される1つまたは複数の化合物は、さまざまな互変異性体形態で存在し得る。文脈から明らかとなり得るように、明示的に除外されない限り、かかる化合物への言及は、かかる互変異性体形態を全て包含する。いくつかの実施形態では、互変異性体形態は、単結合と隣接二重結合の交換及びそれに付随するプロトンの移動から生じる。ある特定の実施形態では、互変異性体形態は、参照形態と同一の実験式及び全電荷を有する異性プロトン化状態のプロトトロピー互変異性体であり得る。プロトトロピー互変異性体形態を伴う部分の例は、ケトン-エノール対、アミド-イミド酸対、ラクタム-ラクチム対、アミド-イミド酸対、エナミン-イミン対、及びプロトンがヘテロ環系の2つ以上の位置を占有可能である環状形、例えば、1H-及び3H-イミダゾール、1H-、2H-、及び4H-1, 2, 4-トリアゾール、1H-及び2H-イソインドール、ならびに1H-及び2H-ピラゾールである。いくつかの実施形態では、互変異性体形態は、平衡状態であり得るかまたは適切な置換により1つの形態に立体的にロックされ得る。ある特定の実施形態では、互変異性体形態は、アセタール相互変換、例えば、下記スキーム：

40

【0162】

【化 3 5】



に例示される相互変換から生じる。

10

【0163】

当業者であれば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物の同位体を、本発明に従って調製及び／または利用してよいことを理解するだろう。「同位体」とは、同一の原子番号を有するが、原子核中の中性子数が異なるために異なる質量数を有する原子を指す。例えば、水素の同位体には、トリチウム及びジュウテリウムが含まれる。いくつかの実施形態では、同位体置換（例えば、ジュウテリウムを用いる水素の置換）は、代謝及び／またはキラル中心のラセミ化速度などの分子の物理化学的特性を変化させ得る。

【0164】

当該技術分野で公知のように、多くの化学実体（特に、多くの有機分子及び／または多くの低分子）は、例えばアモルファス形態及び／または結晶形態などの多種多様な固体形（例えば、多形体、水和物、溶媒和化合物など）をとり得る。いくつかの実施形態では、かかる実体は、任意の固体形を含む任意の形態で利用され得る。いくつかの実施形態では、かかる実体は、特定の形態、例えば特定の固体形で利用される。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載及び／または示す化合物は、塩形態で提供及び／または利用され得る。

ある特定の実施形態では、本明細書に記載及び／または示す化合物は、水和物形または溶媒和化合物の形態で提供及び／または利用され得る。

【0166】

本明細書の種々の箇所にて、本開示の化合物の置換基がグループまたは範囲で開示される。本開示は、かかるグループ及び範囲のメンバーのあらゆる個別の部分的組み合わせを含むことを具体的に意図する。例えば、「 $C_1 - 6$ アルキル」という用語は、メチル、エチル、 C_3 アルキル、 C_4 アルキル、 C_5 アルキル、及び C_6 アルキルを個別に開示することを具体的に意図する。さらに、化合物がグループまたは範囲で置換が開示される複数の位置を含む場合、別段の指定がない限り、本開示は、各位置にメンバーのあらゆる個別の部分的組み合わせを含有する個別の化合物及び化合物のグループ（例えば、族及び亜族）を対象とすることを意図する。

30

【0167】

本明細書では、「任意選択で置換された X」（例えば、任意選択で置換されたアルキル）という形の語句は、「Xであり、Xが任意選択で置換されている」（例えば、「アルキルであり、前記アルキルが任意選択で置換されている」）と等しいことが意図される。それは、特徴「X」（例えばアルキル）自体が任意選択的であることを意味することを意図するものではない。

40

【0168】

「アルキル」という用語は、本明細書で用いる場合、1～20（例えば、1～10または1～6）個の炭素を含有する飽和炭化水素基を指す。いくつかの実施形態では、アルキル基は、非分岐状（すなわち、直鎖状）であり、いくつかの実施形態では、アルキル基は、分岐状である。アルキル基は、メチル、エチル、 n -及び i so-プロピル、 n -、 sec -、 i so-、及び $tert$ -ブチル、ネオペンチルなどにより例示され、（1） $C_1 - 6$ アルコキシ、（2） $C_1 - 6$ アルキルスルフィニル、（3）本明細書に定義される

50

アミノ（例えば、非置換アミノ（すなわち、 $-\text{NH}_2$ ）または置換アミノ（すなわち、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{N}1})_2$ （式中、 $\text{R}^{\text{N}1}$ は、アミノに対して定義した通りである））、（４） C_{6-10} アリール C_{1-6} アルコキシ、（５）アジド、（６）ハロ、（７）（ C_{2-9} ヘテロシクリル）オキシ、（８） O -保護基により任意選択で置換されたヒドロキシル、（９）ニトロ、（１０）オキソ（例えば、カルボキシアルデヒドまたはアシル）、（１１） C_{1-7} スピロシクリル、（１２）チオアルコキシ、（１３）チオール、（１４） O -保護基により任意選択で置換された $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}'}$ （式中、 $\text{R}^{\text{A}'}$ は、（ａ） C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、（ｂ） C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、（ｃ） C_{6-10} アリール、（ｄ）水素、（ｅ） C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、（ｆ）アミノ- C_{1-20} アルキル、（ｇ） $-(\text{CH}_2)_{s2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{OR}'$ （式中、 $s1$ は、 $1\sim 10$ （例えば、 $1\sim 6$ または $1\sim 4$ ）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、 $0\sim 10$ （例えば、 $0\sim 4$ 、 $0\sim 6$ 、 $1\sim 4$ 、 $1\sim 6$ 、または、 $1\sim 10$ ）の整数であり、 R' は、 H または C_{1-20} アルキルである）のポリエチレングリコール、及び（ｈ） $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{s2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{NR}^{\text{N}1}$ （式中、 $s1$ は、 $1\sim 10$ （例えば、 $1\sim 6$ または $1\sim 4$ ）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、 $0\sim 10$ （例えば、 $0\sim 4$ 、 $0\sim 6$ 、 $1\sim 4$ 、 $1\sim 6$ 、または、 $1\sim 10$ ）の整数であり、各 $\text{R}^{\text{N}1}$ は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである）のアミノ-ポリエチレングリコールからなる群から選択される）、（１５） $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{B}'}\text{R}^{\text{C}'}$ （式中、 $\text{R}^{\text{B}'}$ 及び $\text{R}^{\text{C}'}$ のそれぞれは、独立して、（ａ）水素、（ｂ） C_{1-6} アルキル、（ｃ） C_{6-10} アリール、及び（ｄ） C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される）、（１６） $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{D}'}$ （式中、 $\text{R}^{\text{D}'}$ は、（ａ） C_{1-6} アルキル、（ｂ） C_{6-10} アリール、（ｃ） C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、及び（ｄ）ヒドロキシルからなる群から選択される）、（１７） $-\text{SO}_2\text{NR}^{\text{E}'}\text{R}^{\text{F}'}$ （式中、 $\text{R}^{\text{E}'}$ 及び $\text{R}^{\text{F}'}$ のそれぞれは、独立して、（ａ）水素、（ｂ） C_{1-6} アルキル、（ｃ） C_{6-10} アリール、及び（ｄ） C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される）、（１８） $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{G}'}$ （式中、 $\text{R}^{\text{G}'}$ は、（ａ） C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、（ｂ） C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、（ｃ） C_{6-10} アリール、（ｄ）水素、（ｅ） C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、（ｆ）アミノ- C_{1-20} アルキル、（ｇ） $-(\text{CH}_2)_{s2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{OR}'$ （式中、 $s1$ は、 $1\sim 10$ （例えば、 $1\sim 6$ または $1\sim 4$ ）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、 $0\sim 10$ （例えば、 $0\sim 4$ 、 $0\sim 6$ 、 $1\sim 4$ 、 $1\sim 6$ 、または、 $1\sim 10$ ）の整数であり、 R' は、 H または C_{1-20} アルキルである）のポリエチレングリコール、及び（ｈ） $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{s2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{NR}^{\text{N}1}$ （式中、 $s1$ は、 $1\sim 10$ （例えば、 $1\sim 6$ または $1\sim 4$ ）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、 $0\sim 10$ （例えば、 $0\sim 4$ 、 $0\sim 6$ 、 $1\sim 4$ 、 $1\sim 6$ 、または、 $1\sim 10$ ）の整数であり、各 $\text{R}^{\text{N}1}$ は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである）のアミノ-ポリエチレングリコールからなる群から選択される）、（１９） $-\text{NR}^{\text{H}'}\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{I}'}$ （式中、 $\text{R}^{\text{H}'}$ は、（ａ１）水素及び（ｂ１） C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、 $\text{R}^{\text{I}'}$ は、（ａ２） C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、（ｂ２） C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、（ｃ２） C_{6-10} アリール、（ｄ２）水素、（ｅ２） C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、（ｆ２）アミノ- C_{1-20} アルキル、（ｇ２） $-(\text{CH}_2)_{s2}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{OR}'$ （式中、 $s1$ は、 $1\sim 10$ （例えば、 $1\sim 6$ または $1\sim 4$ ）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、 $0\sim 10$ （例えば、 $0\sim 4$ 、 $0\sim 6$ 、 $1\sim 4$ 、 $1\sim 6$ 、または、 $1\sim 10$ ）の整数であり、 R' は、 H または C_{1-20} アルキルである）のポリエチレングリコール、及び（ｈ２） $-\text{NR}^{\text{N}1}(\text{CH}_2)_{s2}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{s1}(\text{CH}_2)_{s3}\text{NR}^{\text{N}1}$ （式中、 $s1$ は、 $1\sim 10$ （例えば、 $1\sim 6$ または $1\sim 4$ ）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、 $0\sim 10$ （例えば、 $0\sim 4$ 、 $0\sim 6$ 、 $1\sim 4$ 、 $1\sim 6$ 、または、

10

20

30

40

50

、1～10)の整数であり、各 R^{N-1} は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである)のアミノポリエチレングリコールからなる群から選択される)、 $(20)-NR^J-C(O)OR^K$ (式中、 R^J は、(a1)水素及び(b1) C_{1-6} アルキルからなる群より選択され、 R^K は、(a2) C_{1-20} アルキル(例えば、 C_{1-6} アルキル)、(b2) C_{2-20} アルケニル(例えば、 C_{2-6} アルケニル)、(c2) C_{6-10} アリール、(d2)水素、(e2) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f2)アミノ- C_{1-20} アルキル、(g2)- $(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ (式中、s1は、1～10(例えば、1～6または1～4)の整数であり、s2及びs3のそれぞれは、独立して、0～10(例えば、0～4、0～6、1～4、1～6、または、1～10)の整数であり、 R' は、Hまたは C_{1-20} アルキルである)のポリエチレングリコール、及び(h2)- $NR^{N-1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N-1}$ (式中、s1は、1～10(例えば、1～6または1～4)の整数であり、s2及びs3のそれぞれは、独立して、0～10(例えば、0～4、0～6、1～4、1～6、または、1～10)の整数であり、各 R^{N-1} は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである)のアミノポリエチレングリコールからなる群より選択される)、(21)アミジン、ならびに(22)トリメチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、トリイソプロピルシリルなどのシリル基からなる群から独立して選択される、1、2、3個の置換基、または2個以上の炭素のアルキル基の場合は、4個の置換基を用いて任意選択で置換され得る。いくつかの実施形態では、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。例えば、 C_1 -アルカリルのアルキレン基は、オキソ基を用いてさらに置換して、それぞれのアリーロイル置換基を得ることができる。

10

20

【0169】

「アルキレン」という用語及び「アルク-」という接頭辞は、本明細書で用いる場合、2個の水素原子を除去することにより直鎖状または分岐状飽和炭化水素から誘導される飽和2価炭化水素基を表し、メチレン、エチレン、イソプロピレンなどにより例示される。

「 C_x-y アルキレン」という用語及び「 C_x-y アルク-」という接頭辞は、 $x-y$ 個の炭素を有するアルキレン基を表す。 x の例示的な値は、1、2、3、4、5、及び6であり、 y の例示的な値は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、または20である(例えば、 C_{1-6} 、 C_{1-10} 、 C_{2-20} 、 C_{2-6} 、 C_{2-10} 、または C_{2-20} アルキレン)。いくつかの実施形態では、アルキレンは、アルキル基に対して本明細書に定義される1、2、3、または4個の置換基を用いてさらに置換可能である。

30

【0170】

「アルケニル」という用語は、本明細書で用いる場合、別段の指定がない限り、1個または複数の炭素-炭素二重結合を含有する2～20個の炭素(例えば、2～6または2～10個の炭素)の1価の直鎖状または分岐状の基を表し、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニルなどにより例示される。アルケニルは、シス及びトランスの両方の異性体を含む。アルケニル基は、本明細書に定義されるアミノ、アリール、シクロアルキル、もしくはヘテロシクリル(例えばヘテロアリール)または本明細書に記載される例示的なアルキル置換基のいずれかから、独立して、選択される1、2、3、または4個の置換基を用いて任意選択で置換され得る。

40

【0171】

「アルキニル」という用語は、本明細書で用いる場合、炭素-炭素三重結合を含有する2～20個の炭素原子(例えば、2～4、2～6、または2～10個の炭素)の1価の直鎖状または分岐状の基を表し、エチニル、1-プロピニルなどにより例示される。アルキニル基は、本明細書に定義される、アリール、シクロアルキル、もしくはヘテロシクリル(例えばヘテロアリール)または本明細書に記載される例示的なアルキル置換基のいずれかから、独立して、選択される1、2、3、または4個の置換基を用いて任意選択で置換

50

され得る。

【0172】

「アミノ」という用語は、本明細書で用いる場合、 $-N(R^{N1})_2$ （式中、各 R^{N1} は、独立して、H、OH、 NO_2 、 $N(R^{N2})_2$ 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、N-保護基、アルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリール、アルカリール、シクロアルキル、アルクシクロアルキル、カルボキシアルキル（例えば、任意選択で置換されたアリールアルコキシカルボニル基や本明細書に記載されるいずれかなどのO-保護基を用いて任意選択で置換されたもの）、スルホアルキル、アシル（例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、または本明細書に記載される他のもの）、アルコキシカルボニルアルキル（例えば、任意選択で置換されたアリールアルコキシカルボニル基や本明細書に記載されるいずれかなどのO-保護基を用いて任意選択で置換されたもの）、ヘテロシクリル（例えばヘテロアリール）、もしくはアルクヘテロシクリル（例えばアルクヘテロアリール）であり、これらの列挙された R^{N1} 基のそれぞれは、各基に対して本明細書に定義されるように任意選択で置換可能であるか、または2つの R^{N1} は、組み合わせさせて、ヘテロシクリルもしくはN-保護基を形成し、各 R^{N2} は、独立して、H、アルキル、またはアリールである）を表す。本発明のアミノ基は、非置換アミノ（すなわち、 $-NH_2$ ）または置換アミノ（すなわち、 $-N(R^{N1})_2$ ）であり得る。好ましい実施形態では、アミノは、 $-NH_2$ または $-NHR^{N1}$ （式中、 R^{N1} は、独立して、OH、 NO_2 、 NH_2 、 NR^{N2}_2 、 SO_2OR^{N2} 、 SO_2R^{N2} 、 SOR^{N2} 、アルキル、カルボキシアルキル、スルホアルキル、アシル（例えば、アセチル、トリフルオロアセチル、または本明細書に記載される他のもの）、アルコキシカルボニルアルキル（例えば、 t -ブトキシカルボニルアルキル）、またはアリールであり、各 R^{N2} は、H、 C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、または C_{6-10} アリールであり得る）である。

10

20

【0173】

「アミノ酸」という用語は、本明細書に記載される場合、側鎖、アミノ基、及び酸基（例えば、 $-CO_2H$ のカルボキシ基または $-SO_3H$ のスルホ基）を有する分子を指し、アミノ酸は、側鎖、アミノ基、または酸基（例えば側鎖）により親分子基に付着する。本明細書で用いる場合、最広義の「アミノ酸」という用語は、例えば、1つまたは複数のペプチド結合の形成を通してポリペプチド鎖中に組み込み可能な任意の化合物及び／または物質を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造 $H_2N-C(H)(R)-COOH$ を有する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、天然に生じるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、合成アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、D-アミノ酸であり、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、L-アミノ酸である。「標準アミノ酸」とは、天然に生じるペプチドに共通して見いだされる20種の標準L-アミノ酸のいずれかを指す。「非標準アミノ酸」とは、合成により調製されるかまたは天然源から取得されるかにかかわらず、標準アミノ酸以外の任意のアミノ酸を指す。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、ポリペプチド中にカルボキシ末端及び／またはアミノ末端のアミノ酸を含み、上記の一般構造と比較して、構造修飾を含有することができる。例えば、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造と比較して、メチル化、アミド化、アセチル化、及び／または置換により修飾され得る。いくつかの実施形態では、かかる修飾は、例えば、それ以外は同一である未修飾アミノ酸を含有するものと比較して、修飾アミノ酸を含有するポリペプチドの循環半減期を変化させ得る。いくつかの実施形態では、かかる修飾は、それ以外は同一である未修飾アミノ酸を含有するものと比較して、修飾アミノ酸を含有するポリペプチドの関連活性を有意に変化させない。文脈から明らかとなり得るように、いくつかの実施形態では、「アミノ酸」という用語は、遊離アミノ酸を指すように用いられる、いくつかの実施形態では、それはポリペプチドのアミノ酸残基を指すように用いられる。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、カルボニル基により親分子基に付着し、この場合側鎖またはアミノ基がカルボニル基に付着する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は α -アミノ酸である。ある特定の実施形態では、アミノ酸は

30

40

50

β-アミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸はγ-アミノ酸である。例示的な側鎖としては、任意選択で置換されたアルキル、アリール、ヘテロシクリル、アルカリール、アルクヘテロシクリル、アミノアルキル、カルバモイルアルキル、及びカルボキシアルキルが挙げられる。例示的なアミノ酸としては、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、ヒドロキシノルバリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、ノルバリン、オルニチン、フェニルアラニン、プロリン、ピロリシン、セレノシステイン、セリン、タウリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリンが挙げられる。アミノ酸基は、

(1) C_{1-6} アルコキシ、(2) C_{1-6} アルキルスルフィニル、(3) 本明細書に定義されるアミノ（例えば、非置換アミノ（すなわち、 $-NH_2$ ）または置換アミノ（すなわち、 $-N(R^{N1})_2$ （式中、 R^{N1} は、アミノに対して定義した通りである））、(4) C_{6-10} アリール C_{1-6} アルコキシ、(5) アジド、(6) ハロ、(7) (C_{2-9} ヘテロシクリル) オキシ、(8) ヒドロキシル、(9) ニトロ、(10) オキシ（例えば、カルボキシアルデヒドまたはアシル）、(11) C_{1-7} スピロシクリル、(12) チオアルコキシ、(13) チオール、(14) $-CO_2R^A$ （式中、 R^A は、(a) C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、(b) C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、(c) C_{6-10} アリール、(d) 水素、(e) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ （式中、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6または1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10）の整数であり、 R' は、Hまたは C_{1-20} アルキルである）のポリエチレングリコール、及び(h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ （式中、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6または1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10）の整数であり、各 R^{N1} は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである）のアミノ-ポリエチレングリコールからなる群から選択される）、(15) $-C(O)NR^B R^C$ （式中、 R^B 及び R^C のそれぞれは、独立して、(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される）、(16) $-SO_2R^D$ （式中、 R^D は、(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、及び(d) ヒドロキシルからなる群から選択される）、(17) $-SO_2NR^E R^F$ （式中、 R^E 及び R^F のそれぞれは、独立して、(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される）、(18) $-C(O)R^G$ （式中、 R^G は、(a) C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、(b) C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、(c) C_{6-10} アリール、(d) 水素、(e) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$ （式中、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6または1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10）の整数であり、 R' はHまたは C_{1-20} アルキルである）のポリエチレングリコール、及び(h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ （式中、 $s1$ は、1~10（例えば、1~6または1~4）の整数であり、 $s2$ 及び $s3$ のそれぞれは、独立して、0~10（例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10）の整数であり、各 R^{N1} は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである）のアミノ-ポリエチレングリコールからなる群から選択される）、(19) $-NR^H C(O)R^I$ （式中、 R^H は、(a1) 水素及び(b1) C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、 R^I は、(a2) C_{1-20} アルキル（例えば、 C_{1-6} アルキル）、(b2) C_{2-20} アルケニル（例えば、 C_{2-6} アルケニル）、(c2) C_{6-10} アリール、

10

20

30

40

50

(d 2) 水素、(e 2) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f 2) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g 2) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ (式中、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 または 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 のそれぞれは、独立して、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10) の整数であり、 R' は、H または C_{1-20} アルキルである) のポリエチレングリコール、及び (h 2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$ (式中、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 または 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 のそれぞれは、独立して、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10) の整数であり、各 R^{N1} は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである) のアミノ-ポリエチレングリコールからなる群から選択される)、(20) $-NR^J'C(O)OR^K'$ (式中、 R^J' は、(a 1) 水素及び (b 1) C_{1-6} アルキルからなる群より選択され、 R^K' は、(a 2) C_{1-20} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル)、(b 2) C_{2-20} アルケニル (例えば、 C_{2-6} アルケニル)、(c 2) C_{6-10} アリール、(d 2) 水素、(e 2) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(f 2) アミノ- C_{1-20} アルキル、(g 2) $-(CH_2)_{s_2}(OCH_2CH_2)_{s_1}(CH_2)_{s_3}OR'$ (式中、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 または 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 のそれぞれは、独立して、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10) の整数であり、 R' は、H または C_{1-20} アルキルである) のポリエチレングリコール、及び (h 2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s_2}(CH_2CH_2O)_{s_1}(CH_2)_{s_3}NR^{N1}$ (式中、 s_1 は、1~10 (例えば、1~6 または 1~4) の整数であり、 s_2 及び s_3 のそれぞれは、独立して、0~10 (例えば、0~4、0~6、1~4、1~6、または、1~10) の整数であり、各 R^{N1} は、独立して、水素または任意選択で置換された C_{1-6} アルキルである) のアミノ-ポリエチレングリコールからなる群より選択される)、ならびに (21) アミジンからなる群から独立して選択される、1、2、3 個の置換基、または 2 個以上の炭素のアミノ酸基の場合は、4 個の置換基を用いて任意選択で置換され得る。いくつかの実施形態では、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。

10

20

【0174】

「N-アルキル化アミノ酸」という用語は、本明細書で用いる場合、ペプチド結合を形成するアミノ酸の窒素上に任意選択で置換された C_1-C_6 アルキルを含有するアミノ酸を指す。N-アルキル化アミノ酸としては、限定されるものではないが、N-メチルアミノ酸、例えば N-メチル-アラニン、N-メチル-トレオニン、N-メチル-フェニルアラニン、N-メチル-アスパラギン酸、N-メチル-バリン、N-メチル-ロイシン、N-メチル-グリシン、N-メチル-イソロイシン、N(α)-メチル-リジン、N(α)-メチル-アスパラギン、N(α)-メチル-グルタミンが挙げられる。

30

【0175】

「アリール」という用語は、本明細書で用いる場合、1 または 2 個の芳香環を有する単環式、二環式、または多環式炭素環系を表し、フェニル、ナフチル、1, 2-ジヒドロナフチル、1, 2, 3, 4-テトラヒドロナフチル、アントラセニル、フェナントレニル、フルオレニル、インダニル、インデニルなどにより例示され、(1) C_{1-7} アシル (例えば、カルボキシアルデヒド)、(2) C_{1-20} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル- C_{1-6} アルキル、アミノ- C_{1-6} アルキル、アジド- C_{1-6} アルキル、(カルボキシアルデヒド)- C_{1-6} アルキル、ハロ- C_{1-6} アルキル (例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル、ニトロ- C_{1-6} アルキル、または C_{1-6} チオアルコキシ- C_{1-6} アルキル)、(3) C_{1-20} アルコキシ (例えば、 C_{1-6} アルコキシ、例えばペルフルオロアルコキシ)、(4) C_{1-6} アルキルスルフィニル、(5) C_{6-10} アリール、(6) アミノ、(7) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(8) アジド、(9) C_{3-8} シクロアルキル、(10) C_{1-6} アルク- C_{3-8} シクロアルキ

40

50

ル、(11) ハロ、(12) C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{1-12} ヘテロアリール)、(13) (C_{1-12} ヘテロシクリル) オキシ、(14) ヒドロキシル、(15) ニトロ、(16) C_{1-20} チオアルコキシ (例えば、 C_{1-6} チオアルコキシ)、(17) $-(CH_2)_q CO_2 R^A$ (式中、 q は、0~4 の整数であり、 R^A は、(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び (d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される)、(18) $-(CH_2)_q CONR^B R^C$ (式中、 q は、0~4 の整数であり、 R^B 及び R^C は、(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から独立して選択される)、(19) $-(CH_2)_q SO_2 R^D$ (式中、 q は、0~4 の整数であり、 R^D は、(a) アルキル、(b) C_{6-10} アリール、及び (c) アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される)、(20) $-(CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ (式中、 q は、0~4 の整数であり、 R^E 及び R^F のそれぞれは、(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から独立して選択される)、(21) チオール、(22) C_{6-10} アリールオキシ、(23) C_{3-8} シクロアルコキシ、(24) C_{6-10} アリール- C_{1-6} アルコキシ、(25) C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロアリール)、(26) C_{2-20} アルケニル、ならびに (27) C_{2-20} アルキニルからなる群から独立して選択される 1、2、3、4、または 5 個の置換基を用いて任意選択で置換され得る。いくつかの実施形態では、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。例えば、 C_1 -アルカリールまたは C_1 -アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキシ基を用いてさらに置換して、それぞれのアリーロイル置換基及び (ヘテロシクリル) オイル置換基を得ることができる。

10

20

30

40

50

【0176】

「アリールアルキル」基は、本明細書で用いる場合、本明細書に定義されるアルキレン基を通して親分子基に付着した本明細書に定義されるアリール基を表す。例示的な非置換アリールアルキル基は、7~30 個の炭素 (例えば、7~16 または 7~20 個の炭素、例えば C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、 C_{1-10} アルク- C_{6-10} アリール、または C_{1-20} アルク- C_{6-10} アリール) である。いくつかの実施形態では、アルキレン及びアリールはそれぞれ、それぞれの基に対して本明細書に定義される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いてさらに置換可能である。「アルク-」という接頭辞が前に付いた他の基も同様に定義され、この場合、「アルク」は、別段の注記がない限り、 C_{1-6} アルキレンを指し、付着する化学構造は、本明細書に定義される通りである。

【0177】

「アジド」という用語は、 $-N_3$ 基を表し、 $-N=N=N$ として表すことも可能である。

「炭素環式」及び「カルボシクリル」という用語は、本明細書で用いる場合、環が炭素原子により形成される任意選択で置換された C_{3-12} 単環式、二環式、または三環式非芳香環構造を指す。炭素環式構造としては、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、及びシクロアルキニル基が挙げられる。

【0178】

「カルボシクリルアルキル」基は、本明細書で用いる場合、本明細書に定義されるアルキレン基を通して親分子基に付着した本明細書に定義される炭素環式基を表す。例示的な非置換カルボシクリルアルキル基は、7~30 個の炭素 (例えば、7~16 または 7~20 個の炭素、例えば C_{1-6} アルク- C_{6-10} カルボシクリル、 C_{1-10} アルク- C_{6-10} カルボシクリル、または C_{1-20} アルク- C_{6-10} カルボシクリル) である。いくつかの実施形態では、アルキレン及びカルボシクリルはそれぞれ、それぞれの基に対して本明細書に定義される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いてさらに置換可能である。「アルク-」という接頭辞が前に付いた他の基も同様に定義され、この場合、「アルク」は、別段の注記がない限り、 C_{1-6} アルキレンを意味し、付着する化学構造は、

本明細書に定義される通りである。

【0179】

「カルボニル」という用語は、本明細書で用いる場合、C (O) 基を表し、C=Oとして表すことも可能である。

「カルボキシ」という用語は、本明細書で用いる場合、 $\text{-CO}_2\text{H}$ を意味する。

【0180】

「シアノ」という用語は、本明細書で用いる場合、 -CN 基を表す。

「シクロアルキル」という用語は、本明細書で用いる場合、別段の指定がない限り、3～8個の炭素の1価の飽和または不飽和の非芳香環式炭化水素基を表し、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、二環ヘプチルなどにより例示される。シクロアルキル基が1つの炭素-炭素二重結合を含む場合、シクロアルキル基は「シクロアルケニル」基と称することができる。例示的なシクロアルケニル基としては、シクロペンテニル、シクロヘキセニルなどが挙げられる。本発明のシクロアルキル基は、(1) C_{1-7} アシル (例えば、カルボキシアルデヒド)、(2) C_{1-20} アルキル (例えば、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ- C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルキルスルフィニル- C_{1-6} アルキル、アミノ- C_{1-6} アルキル、アジド- C_{1-6} アルキル、(カルボキシアルデヒド)- C_{1-6} アルキル、ハロー- C_{1-6} アルキル (例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル、ニトロ- C_{1-6} アルキル、または C_{1-6} チオアルコキシ- C_{1-6} アルキル)、(3) C_{1-20} アルコキシ (例えば、 C_{1-6} アルコキシ、例えばペルフルオロアルコキシ)、(4) C_{1-6} アルキルスルフィニル、(5) C_{6-10} アリール、(6) アミノ、(7) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリール、(8) アジド、(9) C_{3-8} シクロアルキル、(10) C_{1-6} アルク- C_{3-8} シクロアルキル、(11) ハロ、(12) C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{1-12} ヘテロアリール)、(13) (C_{1-12} ヘテロシクリル) オキシ、(14) ヒドロキシル、(15) ニトロ、(16) C_{1-20} チオアルコキシ (例えば、 C_{1-6} チオアルコキシ)、(17) $\text{-(CH}_2\text{)}_q\text{CO}_2\text{R}^{\text{A}}$ (式中、 q は、0～4の整数であり、 R^{A} は、(a) C_{1-6} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、(c) 水素、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される)、(18) $\text{-(CH}_2\text{)}_q\text{CONR}^{\text{B}}\text{R}^{\text{C}}$ (式中、 q は、0～4の整数であり、 R^{B} 及び R^{C} は、(a) 水素、(b) C_{6-10} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から、独立して、選択される)、(19) $\text{-(CH}_2\text{)}_q\text{SO}_2\text{R}^{\text{D}}$ (式中、 q は、0～4の整数であり、 R^{D} は、(a) C_{6-10} アルキル、(b) C_{6-10} アリール、及び(c) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から選択される)、(20) $\text{-(CH}_2\text{)}_q\text{SO}_2\text{NR}^{\text{E}}\text{R}^{\text{F}}$ (式中、 q は、0～4の整数であり、 R^{E} 及び R^{F} のそれぞれは、(a) 水素、(b) C_{6-10} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び(d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から、独立して、選択される)、(21) チオール、(22) C_{6-10} アリールオキシ、(23) C_{3-8} シクロアルコキシ、(24) C_{6-10} アリール C_{1-6} アルコキシ、(25) C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロアリール)、(26) オキソ、(27) C_{2-20} アルケニル、ならびに(28) C_{2-20} アルキニルを用いて任意選択で置換可能である。いくつかの実施形態では、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。例えば、 C_1 -アルカリールまたは C_1 -アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基を用いてさらに置換して、それぞれのアリーロイル置換基及び(ヘテロシクリル) オイル置換基を得ることができる。

【0181】

「シクロアルキルアルキル」基は、本明細書で用いる場合、本明細書に定義されるアルキレン基 (例えば、1～4、1～6、1～10、または1～20個の炭素のアルキレン基) を通して親分子基に付着した本明細書に定義されるシクロアルキル基を表す。いくつかの実施形態では、アルキレン及びシクロアルキルはそれぞれ、それぞれの基に対して本

細書に定義される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いてさらに置換可能である。

【0182】

「ジアステレオマー」という用語は、本明細書で用いる場合、互いに鏡像でなく互いに重ね合わせることができない立体異性体を意味する。

「エナンチオマー」という用語は、本明細書で用いる場合、少なくとも 80%（すなわち、一方のエナンチオマーが少なくとも 90%、他方のエナンチオマーが多くとも 10%）、好ましくは少なくとも 90%、より好ましくは少なくとも 98% の光学純度またはエナンチオマー過剰率（当該技術分野の標準的方法により決定される）を有する、本発明の化合物の各個別の光学活性形態を意味する。

【0183】

「ハロ」という用語は、本明細書で用いる場合、臭素、塩素、ヨウ素、またはフッ素から選択されるハロゲンを表す。

「ヘテロアルキル」という用語は、本明細書で用いる場合、構成炭素原子の 1 または 2 個がそれぞれ窒素、酸素、または硫黄により置き換えられている、本明細書に定義されるアルキル基を指す。いくつかの実施形態では、ヘテロアルキル基は、アルキル基に対して本明細書に記載される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いてさらに置換可能である。

「ヘテロアルケニル」及び「ヘテロアルキニル」という用語は、本明細書で用いる場合、それぞれ、構成炭素原子の 1 または 2 個がそれぞれ窒素、酸素、または硫黄により置き換えられている、本明細書に定義されるアルケニル基及びアルキニル基を意味する。いくつかの実施形態では、ヘテロアルケニル基及びヘテロアルキニル基は、アルキル基に対して本明細書に記載される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いてさらに置換可能である。

【0184】

「ヘテロアリール」という用語は、本明細書で用いる場合、芳香族である本明細書に定義されるヘテロシクリルのサブセットを表す。すなわち、それらは単環内または多環系内に $4n+2$ 個のパイ電子を含有する。例示的な非置換ヘテロアリール基は、1～12（例えば、1～11、1～10、1～9、2～12、2～11、2～10、または 2～9）個の炭素である。ある実施形態では、ヘテロアリールは、ヘテロシクリル基に対して定義される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いて置換される。

【0185】

「ヘテロアリールアルキル」という用語は、本明細書に定義されるアルキレン基を通して親分子基に付着した本明細書に定義されるヘテロアリール基を指す。例示的な非置換ヘテロアリールアルキル基は、2～32 個の炭素（例えば、2～22、2～18、2～17、2～16、3～15、2～14、2～13、または 2～12 個の炭素、例えば C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロアリール、 C_{1-10} アルク- C_{1-12} ヘテロアリール、または C_{1-20} アルク- C_{1-12} ヘテロアリール）である。いくつかの実施形態では、アルキレン及びヘテロアリールはそれぞれ、それぞれの基に対して本明細書に定義される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いてさらに置換可能である。ヘテロアリールアルキル基は、ヘテロシクリルアルキル基のサブセットである。

【0186】

「ヘテロシクリル」という用語は、本明細書で用いる場合、別段の指定がない限り、窒素、酸素、及び硫黄からなる群から独立して選択される 1、2、3、または 4 個のヘテロ原子を含有する、5 員、6 員、または 7 員の環を表す。5 員環は、0～2 個の二重結合を有し、6 及び 7 員環は、0～3 個の二重結合を有する。例示的な非置換ヘテロシクリル基は、1～12（例えば、1～11、1～10、1～9、2～12、2～11、2～10、または 2～9）個の炭素である。「ヘテロシクリル」という用語は、1 個または複数の炭素及び／またはヘテロ原子が単環の 2 つの非隣接員を架橋する、架橋多環構造を有するヘテロ環化合物、例えば、キヌクリジニル基も表す。「ヘテロシクリル」という用語は、上記のヘテロ環のいずれかが、1、2、または 3 個の炭素環、例えば、アリール環、シクロヘキサン環、シクロヘキセン環、シクロペンタン環、シクロペンテン環、または他の単環式ヘテロ環、例えばインドリル、キノリル、イソキノリル、テトラヒドロキノリル、ベン

10

20

30

40

50

ゾフリル、ベンゾチエニルなどに縮合した、二環式、三環式、及び四環式の基を含む。縮合ヘテロシクリルの例としては、トロパン及び1, 2, 3, 5, 8, 8a-ヘキサヒドロインドリジンが挙げられる。ヘテロ環化合物としては、ピロリル、ピロリニル、ピロリジニル、ピラゾリル、ピラゾリニル、ピラゾリジニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、ピリジル、ピペリジニル、ホモピペリジニル、ピラジニル、ピペラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、イソオキサゾリル、イソオキサゾリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、チアゾリル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソチアゾリジニル、インドリル、インダゾリル、キノリル、イソキノリル、キノキサリニル、ジヒドロキノキサリニル、キナゾリニル、シンノリニル、フタラジニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、ベンゾチア

ジアゾリル、フリル、チエニル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、オキサジアゾリル（例えば、1, 2, 3-オキサジアゾリル）、プリニル、チア

ジアゾリル（例えば、1, 2, 3-チアジアゾリル）、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロインドリル、ジヒドロキノリル、テトラヒドロキノリル、テトラヒドロイソキノリル、ジヒドロイソキノリル、ピラニル、ジヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、イソベンゾフラニル、ベンゾチエニルなどが挙げられ、これには、1つまたは複数の二重結合が還元され、水素を用いて置き換えられているそれらのジヒドロ及びテトラヒドロ形態が含まれる。なおも他の例示的なヘテロシクリルとしては、2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-2-オキソ-オキサゾリル、2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-イミダゾリル、2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-5-オキソ-1H-ピラゾリル（例えば、2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-2-フェニル-5-オキソ-1H-ピラゾリル）、2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-2, 4-ジオキソ-1H-イミダゾリル（例えば、2, 3, 4, 5-テトラヒドロ-2, 4-ジオキソ-5-メチル-5-フェニル-1H-イミダゾリル）、2, 3-ジヒドロ-2-チオオキソ-1, 3, 4-オキサジアゾリル（例えば、2, 3-ジヒドロ-2-チオオキソ-5-フェニル-1, 3, 4-オキサジアゾリル）、4, 5-ジヒドロ-5-オキソ-1H-トリアゾリル（例えば、4, 5-ジヒドロ-3-メチル-4-アミノ-5-オキソ-1H-トリアゾリル）、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-2, 4-ジオキソピリジニル（例えば、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-2, 4-ジオキソ-3, 3-ジエチルピリジニル）、2, 6-ジオキソ-ピペリジニル（例えば、2, 6-ジオキソ-3-エチル-3-フェニルピペリジニル）、1, 6-ジヒドロ-6-オキソピリジミニル、1, 6-ジヒドロ-4-オキソピリミジニル（例えば、2-(メチルチオ)-1, 6-ジヒドロ-4-オキソ-5-メチルピリミジン-1-イル）、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-2, 4-ジオキソピリミジニル（例えば、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-2, 4-ジオキソ-3-エチルピリミジニル）、1, 6-ジヒドロ-6-オキソ-ピリダジニル（例えば、1, 6-ジヒドロ-6-オキソ-3-エチルピリダジニル）、1, 6-ジヒドロ-6-オキソ-1, 2, 4-トリアジニル（例えば、1, 6-ジヒドロ-5-イソプロピル-6-オキソ-1, 2, 4-トリアジニル）、2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-インドリル（例えば、3, 3-ジメチル-2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-インドリル及び2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-3, 3'-スビロプロパン-1H-インドール-1-イル）、1, 3-ジヒドロ-1-オキソ-2H-イソ-インドリル、1, 3-ジヒドロ-1, 3-ジオキソ-2H-イソ-インドリル、1H-ベンゾピラゾリル（例えば、1-(エトキシカルボニル)-1H-ベンゾピラゾリル）、2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-ベンゾイミダゾリル（例えば、3-エチル-2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-ベンゾイミダゾリル）、2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル（例えば、5-クロロ-2, 3-ジヒドロ-2-オキソベンゾオキサゾリル）、2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-ベンゾオキサゾリル、2-オキソ-2H-ベンゾピラニル、1, 4-ベンゾジオキサニル、1, 3-ベンゾジオキサニル、2, 3-ジヒドロ-3-オキソ, 4H-1, 3-ベンゾチアジニル、3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-3H-キナゾリニル（例えば、2-メチル-3, 4-ジヒドロ-4-オキソ-3H-キナゾリニル）、1, 2, 3, 4-テトラヒドロ

10

20

30

40

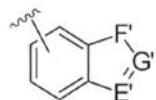
50

ー2, 4-ジオキソ-3H-キナゾリル (例えば、1-エチル-1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-2, 4-ジオキソ-3H-キナゾリル)、1, 2, 3, 6-テトラヒドロ-2, 6-ジオキソ-7H-プリニル (例えば、1, 2, 3, 6-テトラヒドロ-1, 3-ジメチル-2, 6-ジオキソ-7H-プリニル)、1, 2, 3, 6-テトラヒドロ-2, 6-ジオキソ-1H-プリニル (例えば、1, 2, 3, 6-テトラヒドロ-3, 7-ジメチル-2, 6-ジオキソ-1H-プリニル)、2-オキソベンズ [c, d] インドリル、1, 1-ジオキソ-2H-ナフト [1, 8-c, d] イソチアゾリル、及び1, 8-ナフチレンジカルボキサミドが挙げられる。追加のヘテロ環化合物としては、3, 3a, 4, 5, 6, 6a-ヘキサヒドロピロロ [3, 4-b] ピロール- (2H) -イル、及び2, 5-ジアザピシクロ [2. 2. 1] ヘプタン-2-イル、ホモペラジニル (またはジアゼパニル)、テトラヒドロピラニル、ジチアゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾチエニル、オキセパニル、チエパニル、アゾカニル、オキセカニル、及びチオカニルが挙げられる。ヘテロ環式基としてはまた、式

10

【0187】

【化36】



20

の基も挙げられ、

式中、

E' は、-N-及び-CH-からなる群から選択され、F' は、-N=CH-、-NH-CH₂-、-NH-C(O)-、-NH-、-CH=N-、-CH₂-NH-、-C(O)-NH-、-CH=CH-、-CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH₂O-、-OCH₂-、-O-、及び-S-からなる群から選択され、G' は、-CH-及び-N-からなる群から選択される。本明細書に述べたヘテロシクリル基はいずれも、(1) C₁₋₇ アシル (例えば、カルボキシアルデヒド)、(2) C₁₋₂₀ アルキル (例えば、C₁₋₆ アルキル、C₁₋₆ アルコキシ-C₁₋₆ アルキル、C₁₋₆ アルキルスルフィニル-C₁₋₆ アルキル、アミノ-C₁₋₆ アルキル、アジド-C₁₋₆ アルキル、(カルボキシアルデヒド)-C₁₋₆ アルキル、ハロ-C₁₋₆ アルキル (例えば、ペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ-C₁₋₆ アルキル、ニトロ-C₁₋₆ アルキル、またはC₁₋₆ チオアルコキシ-C₁₋₆ アルキル)、(3) C₁₋₂₀ アルコキシ (例えば、C₁₋₆ アルコキシ、例えばペルフルオロアルコキシ)、(4) C₁₋₆ アルキルスルフィニル、(5) C₆₋₁₀ アリール、(6) アミノ、(7) C₁₋₆ アルク-C₆₋₁₀ アリール、(8) アジド、(9) C₃₋₈ シクロアルキル、(10) C₁₋₆ アルク-C₃₋₈ シクロアルキル、(11) ハロ、(12) C₁₋₁₂ ヘテロシクリル (例えば、C₂₋₁₂ ヘテロアリール)、(13) (C₁₋₁₂ ヘテロシクリル) オキシ、(14) ヒドロキシル、(15) ニトロ、(16) C₁₋₂₀ チオアルコキシ (例えば、C₁₋₆ チオアルコキシ)、(17) -(CH₂)_q CO₂ R^{A'} (式中、q は、0~4の整数であり、R^{A'} は、(a) C₁₋₆ アルキル、(b) C₆₋₁₀ アリール、(c) 水素、及び(d) C₁₋₆ アルク-C₆₋₁₀ アリールからなる群から選択される)、(18) -(CH₂)_q CONR^{B'} R^{C'} (式中、q は、0~4の整数であり、R^{B'} 及びR^{C'} は、(a) 水素、(b) C₁₋₆ アルキル、(c) C₆₋₁₀ アリール、及び(d) C₁₋₆ アルク-C₆₋₁₀ アリールからなる群から独立して選択される)、(19) -(CH₂)_q SO₂ R^{D'} (式中、q は、0~4の整数であり、R^{D'} は、(a) C₁₋₆ アルキル、(b) C₆₋₁₀ アリール、及び(c) C₁₋₆ アルク-C₆₋₁₀ アリールからなる群から

30

40

50

選択される)、 $(20) - (CH_2)_q SO_2 NR^E R^F$ (式中、 q は、 $0 \sim 4$ の整数であり、 R^E 及び R^F のそれぞれは、(a) 水素、(b) C_{1-6} アルキル、(c) C_{6-10} アリール、及び (d) C_{1-6} アルク- C_{6-10} アリールからなる群から、独立して、選択される)、 (21) チオール、 (22) C_{6-10} アリールオキシ、 (23) C_{3-8} シクロアルコキシ、 (24) アリールアルコキシ、 (25) C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロシクリル (例えば、 C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロアリール)、 (26) オキソ、 (27) (C_{1-12} ヘテロシクリル) イミノ、 (28) C_{2-20} アルケニル、ならびに (29) C_{2-20} アルキニルからなる群から独立して選択される 1、2、3、4、または 5 個の置換基を用いて任意選択で置換され得る。いくつかの実施形態では、これらの基のそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。例えば、 C_1 -アルカリールまたは C_1 -アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基を用いてさらに置換して、それぞれのアリーロイル置換基及び (ヘテロシクリル) オイル置換基を得ることができる。

10

【0188】

「ヘテロシクリルアルキル」基は、本明細書で用いる場合、本明細書に定義されるアルキレン基を通して親分子基に付着した本明細書に定義されるヘテロシクリル基を表す。例示的な非置換ヘテロシクリルアルキル基は、 $2 \sim 32$ 個の炭素 (例えば、 $2 \sim 22$ 、 $2 \sim 18$ 、 $2 \sim 17$ 、 $2 \sim 16$ 、 $3 \sim 15$ 、 $2 \sim 14$ 、 $2 \sim 13$ 、または $2 \sim 12$ 個の炭素、例えば C_{1-6} アルク- C_{1-12} ヘテロシクリル、 C_{1-10} アルク- C_{1-12} ヘテロシクリル、または C_{1-20} アルク- C_{1-12} ヘテロシクリル) である。いくつかの実施形態では、アルキレン及びヘテロシクリルはそれぞれ、それぞれの基に対して本明細書に定義される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いてさらに置換可能である。

20

【0189】

「炭化水素」という用語は、本明細書で用いる場合、炭素原子及び水素原子のみからなる基を表す。

「ヒドロキシル」という用語は、本明細書で用いる場合、 $-OH$ 基を表す。いくつかの実施形態では、ヒドロキシル基は、アルキルに対して本明細書に定義される 1、2、3、または 4 個の置換基 (例えば O -保護基) を用いて置換可能である。

【0190】

「異性体」という用語は、本明細書で用いる場合、本発明の任意の化合物の任意の互変異性体、立体異性体、エナンチオマー、またはジアステレオマーを意味する。本発明の化合物は、1 つまたは複数のキラル中心及び／または二重結合を有することができ、それゆえ、立体異性体、例えば二重結合異性体 (すなわち、幾何 E/Z 異性体) またはジアステレオマー (例えば、エナンチオマー (すなわち、 $(+)$ または $(-)$) またはシス／トランス異性体) として存在することができると認識される。本発明によると、本明細書で描かれる化学構造、及びそれゆえ本発明の化合物は、全ての対応する立体異性体、つまり、立体異性体的に純粋な (例えば、幾何学的に純粋な、エナンチオマー的に純粋な、またはジアステレオマー的に純粋な) 形態ならびにエナンチオマー混合物及び立体異性体混合物、例えばラセミ体の両方を包含する。本発明の化合物のエナンチオマー混合物及び立体異性体混合物は、典型的には、キラル相ガスクロマトグラフィー、キラル相高性能液体クロマトグラフィー、キラル塩錯体としての化合物の結晶化、キラル溶媒中での化合物の結晶化などの周知の方法により、それらの成分のエナンチオマーまたは立体異性体に分割することができる。エナンチオマー及び立体異性体はまた、周知の不斉合成法により立体異性体的またはエナンチオマー的に純粋な中間体、試薬、及び触媒から取得可能である。

30

40

【0191】

「 N -保護アミノ」という用語は、本明細書で用いる場合、本明細書に定義される 1 または 2 つの N -保護基に付着した本明細書に定義されるアミノ基を指す。

「 N -保護基」という用語は、本明細書で用いる場合、合成手順中の望ましくない反応からアミノ基を保護するように意図された基を表す。一般に使用される N -保護基は、参照により本明細書に組み込まれる、Greene, "Protective Group

50

s in Organic Synthesis, " 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999) に開示されている。N-保護基としては、アシル基、アリーロイル基、またはカルバミル基、例えばホルミル、アセチル、プロピオニル、ピバロイル、*t*-ブチルアセチル、2-クロロアセチル、2-ブロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、*o*-ニトロフェノキシアセチル、 α -クロロブチリル、ベンゾイル、4-クロロベンゾイル、4-ブロモベンゾイル、4-ニトロベンゾイル、及びキラル補助剤、例えば保護または脱保護D、L、またはD、L-アミノ酸、例えばアラニン、ロイシン、フェニルアラニンなど、スルホニル含有基、例えばベンゼンスルホニル、*p*-トルエンスルホニルなど、カルバメート形成基、例えばベンジルオキシカルボニル、*p*-クロロベンジルオキシカルボニル、*p*-メトキシベンジルオキシカルボニル、*p*-ニトロベンジルオキシカルボニル、2-ニトロベンジルオキシカルボニル、*p*-ブロモベンジルオキシカルボニル、3, 4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、3, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、2, 4-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、2-ニトロ-4, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、3, 4, 5-トリメトキシベンジルオキシカルボニル、1-(*p*-ピフェニリル)-1-メチルエトキシカルボニル、 α , α -ジメチル-3, 5-ジメトキシベンジルオキシカルボニル、ベンズヒドリルオキシカルボニル、*t*-ブチルオキシカルボニル、ジイソプロピルメトキシカルボニル、イソプロピルオキシカルボニル、エトキシカルボニル、メトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニル、フェノキシカルボニル、4-ニトロフェノキシカルボニル、フルオレニル-9-メトキシカルボニル、シクロペンチルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、フェニルチオカルボニルなど、アルカリール基、例えばベンジル、トリフェニルメチル、ベンジルオキシメチルなど、ならびにシリル基、例えば、トリメチルシリルなどが挙げられる。好ましいN-保護基は、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、ピバロイル、*t*-ブチルアセチル、アラニル、フェニルスルホニル、ベンジル、*t*-ブチルオキシカルボニル(Boc)、及びベンジルオキシカルボニル(Cbz)である。

10

20

30

40

50

【0192】

「ニトロ」という用語は、本明細書で用いる場合、-NO₂基を表す。

「O-保護基」という用語は、本明細書で用いる場合、合成手順中の望ましくない反応から酸素含有（例えば、フェノール、ヒドロキシル、またはカルボニル）基を保護するように意図された基を表す。一般に使用されるO-保護基は、参照により本明細書に組み込まれるGreene, "Protective Groups in Organic Synthesis, " 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999)、に開示されている。例示的なO-保護基としては、アシル基、アリーロイル基、またはカルバミル基、例えばホルミル、アセチル、プロピオニル、ピバロイル、*t*-ブチルアセチル、2-クロロアセチル、2-ブロモアセチル、トリフルオロアセチル、トリクロロアセチル、フタリル、*o*-ニトロフェノキシアセチル、 α -クロロブチリル、ベンゾイル、4-クロロベンゾイル、4-ブロモベンゾイル、*t*-ブチルジメチルシリル、トリ-*i*so-プロピルシリルオキシメチル、4, 4'-ジメトキシトリチル、イソブチリル、フェノキシアセチル、4-イソプロピルフェノキシアセチル、ジメチルホルムアミジノ、及び4-ニトロベンゾイル、アルキルカルボニル基、例えばアシル、アセチル、プロピオニル、ピバロイルなど、任意選択で置換されたアリールカルボニル基、例えばベンゾイル、シリル基、例えばトリメチルシリル(TMS)、*tert*-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、トリ-*i*so-プロピルシリルオキシメチル(TOM)、トリイソプロピルシリル(TIPS)など、ヒドロキシルとのエーテル形成基、例えばメチル、メトキシメチル、テトラヒドロピラニル、ベンジル、*p*-メトキシベンジル、トリチルなど、アルコキシカルボニル、例えばメトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、*n*-イソプロポキシカルボニル、*n*-ブチルオキシカルボニル、イソブチルオキシカルボニル、*sec*-ブチルオキシカルボニル、*t*-ブチ

ルオキシカルボニル、2-エチルヘキシルオキシカルボニル、シクロヘキシルオキシカルボニル、メチルオキシカルボニルなど、アルコキシアルコキシカルボニル基、例えばメトキシメトキシカルボニル、エトキシメトキシカルボニル、2-メトキシエトキシカルボニル、2-エトキシエトキシカルボニル、2-ブトキシエトキシカルボニル、2-メトキシエトキシメトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、プロパルギルオキシカルボニル、2-ブテノキシカルボニル、3-メチル-2-ブテノキシカルボニルなど、ハロアルコキシカルボニル、例えば2-クロロエトキシカルボニル、2-クロロエトキシカルボニル、2, 2, 2-トリクロロエトキシカルボニルなど、任意選択で置換されたアリールアルコキシカルボニル基、例えばベンジルオキシカルボニル、p-メチルベンジルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、2, 4-ジニトロベンジルオキシカルボニル、3, 5-ジメチルベンジルオキシカルボニル、p-クロロベンジルオキシカルボニル、p-ブロモベンジルオキシカルボニル、フルオレニルメチルオキシカルボニルなど、及び任意選択で置換されたアリールオキシカルボニル基、例えば、フェノキシカルボニル、p-ニトロフェノキシカルボニル、o-ニトロフェノキシカルボニル、2, 4-ジニトロフェノキシカルボニル、p-メチルフェノキシカルボニル、m-メチルフェノキシカルボニル、o-ブロモフェノキシカルボニル、3, 5-ジメチルフェノキシカルボニル、p-クロロフェノキシカルボニル、2-クロロ-4-ニトロフェノキシカルボニルなど）、置換アルキル、アリール、及びアルカリエーテル（例えば、トリチル、メチルチオメチル、メトキシメチル、ベンジルオキシメチル、シロキシメチル、2, 2, 2-トリクロロエトキシメチル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロフラニル、エトキシエチル、1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチル、2-トリメチルシリルエチル、t-ブチルエーテル、p-クロロフェニル、p-メトキシフェニル、p-ニトロフェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、及びニトロベンジル）、シリルエーテル（例えば、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、ジメチルイソプロピルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリベンジルシリル、トリフェニルシリル、及びジフェニルメチルシリル）、カーボネート（例えば、メチル、メトキシメチル、9-フルオレニルメチル、エチル、2, 2, 2-トリクロロエチル、2-(トリメチルシリル)エチル、ビニル、アリル、ニトロフェニル、ベンジル、メトキシベンジル、3, 4-ジメトキシベンジル、及びニトロベンジル）、カルボニル保護基（例えば、アセタール基及びケタール基、例えばジメチルアセタール、1, 3-ジオキソランなど、アシラール基、及びジチアン基、例えば1, 3-ジチアン、1, 3-ジチオランなど）、カルボン酸保護基（例えば、エステル基、例えばメチルエステル、ベンジルエステル、t-ブチルエステル、オルトエステルなど）、ならびにオキサゾリン基が挙げられる。

【0193】

「オキソ」という用語は、本明細書で用いる場合、=Oを表す。

「ペルフルオロ」という接頭辞は、本明細書で用いる場合、アルキル基に結合した各水素ラジカルがフッ化物ラジカルにより置換されている、本明細書に定義されるアニル基を表す。例えば、ペルフルオロアルキル基は、トリフルオロメチル、ペンタフルオロエチルなどによって例示される。

【0194】

「保護ヒドロキシル」という用語は、本明細書で用いる場合、O-保護基に結合した酸素原子を表す。

「スピロシクリル」という用語は、本明細書で用いる場合、両方の末端が親基の同一の炭素原子に結合してスピロ環基を形成するC₂-₇アルキレンジラジカル、及びさらに両方の末端が同一の原子に結合された、C₁-₆ヘテロアルキレンジラジカルを表す。スピロシクリル基を形成するヘテロアルキレンジラジカルは、窒素、酸素、及び硫黄からなる群から独立して選択される1、2、3、または4個のヘテロ原子を含有することができる。いくつかの実施形態では、スピロシクリル基は、ジラジカルが付着した炭素原子を除いて、1~7個の炭素を含む。本発明のスピロシクリル基は、シクロアルキル基及び／または

ヘテロシクリル基に関して任意選択の置換基として本明細書に提供される 1、2、3、または 4 個の置換基を用いて任意選択で置換され得る。

【0195】

「立体異性体」という用語は、本明細書で用いる場合、化合物（例えば、本明細書に記載される任意の式の化合物）が有し得る、考え得る全ての異なる異性体ならびに立体配座形態、特に、考え得る全ての立体化学異性体形態及び配座異性体形態、基本的分子構造のあらゆるジアステレオマー、エナンチオマー、及び／または配座異性体を指す。本発明のいくつかの化合物は、異なる互変異性体形態で存在し得、これらの互変異性体形態は全て本発明の範囲内に含まれる。

【0196】

「スルホニル」という用語は、本明細書で用いる場合、 $-S(O)_2-$ 基を表す。

「チオール」という用語は、本明細書で用いる場合、 $-SH$ 基を表す。

定義

本出願では、文脈からそうでないと明らかでない限り、(i)「a」という用語は、「少なくとも 1 つ」を意味すると理解されてよく、(ii)「または」という用語は、「及び／または」を意味すると理解されてよく、(iii)「含む (comprising)」及び「含む (including)」という用語は、それ自体で、または 1 つもしくは複数の追加の構成要素もしくはステップとともに提示されるかどうかにかかわらず、明細に示した構成要素またはステップを包含すると理解されてよく、(iv)「約」及び「おおよそ」という用語は、当業者により理解され得るように、標準偏差を許容にすると理解されてよく、(v) 範囲が提供される場合、端点は含まれる。

【0197】

当該技術分野で公知のように、「親和性」とは、特定のリガンドがそのパートナーに結合する緊密性の尺度である。親和性はさまざまな方法で測定可能である。いくつかの実施形態では、親和性は、定量的アッセイにより測定される。いくつかのかかる実施形態では、結合パートナー濃度は、生理学的条件を模倣するように、過剰なリガンド濃度にて固定され得る。あるいはまたは加えて、いくつかの実施形態では、結合パートナー濃度及び／またはリガンド濃度は変化し得る。いくつかのかかる実施形態では、親和性は、同等な条件（例えば、濃度）下で参照と比較され得る。

【0198】

本明細書で用いる場合、「おおよそ」及び「約」という用語は、関連する文脈上適切であれば、当業者により理解され得る通常の統計的変動を包含することをそれぞれ意図する。ある特定の実施形態では、「おおよそ」または「約」という用語は、別段の記載がない限り、または文脈からそうでないと明確（例えば、かかる数字が可能な値の 100 % を超え得る場合）でない限り、記載値（を超えるまたは未満）のいずれかの方向で 25 %、20 %、19 %、18 %、17 %、16 %、15 %、14 %、13 %、12 %、11 %、10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、またはそれ未満に入る値の範囲をそれぞれ指す。

【0199】

「結合」という用語は、本明細書で用いる場合、典型的には、2 つ以上の実体間または中の会合（例えば、非共有結合または共有結合）を指すことが理解されるだろう。「直接」結合は、実体間または部分間の物理的接触を必然的に含み、間接結合は、1 つまたは複数の中間実体との物理的接触による物理的相互作用を必然的に含む。2 つ以上の実体間の結合は、典型的には、相互作用する実体または部分を、単離にてまたはより複雑な系の状況にて（例えば、担体実体と共有結合または別様に会合している状態で及び／または生物学系もしくは細胞中で）研究する場合を含む、さまざまな状況のいずれかで評価することができる。

【0200】

分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般的には、解離定数 (K_D) により表すことができる。親和性は、本明細書に記載のものを含めて当該技術分野で公知の通常の

10

20

30

40

50

方法により測定できる。結合親和性を測定するための特定の例示的及び例としての実施形態を以下に記載する。「 K_D 」という用語は、本明細書で用いる場合、特定の化合物－タンパク質または複合体－タンパク質相互作用の解離平衡定数を指すと意図される。典型的には、本発明の化合物は、例えば、プレゼンタータンパク質をアナライトとして及び化合物をリガンドとして用いて表面プラズモン共鳴（SPR）技術により決定したとき、約 10^{-6} M 未満、例えばおおよそ 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、もしくは 10^{-10} M、またはさらにそれ以下の解離平衡定数（ K_D ）で、プレゼンタータンパク質に結合する。本発明のプレゼンタータンパク質／化合物複合体は、例えば、標的タンパク質をアナライトとして及び複合体をリガンドとして用いて表面プラズモン共鳴（SPR）技術により決定したとき、約 10^{-6} M 未満、例えばおおよそ 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、もしくは 10^{-10} M、またはさらにそれ以下の解離平衡定数（ K_D ）で、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）に結合する。

10

【0201】

本明細書で用いる場合、「架橋基」という用語は、タンパク質または他の分子上の特定の官能基（例えば、第一級アミン、スルフヒドリル）に化学的に付着することができる反応性官能基を含む基を指す。「アミノ酸と化学選択的に反応することができる部分」は、本明細書で用いる場合、天然または非天然アミノ酸の官能基（例えば、第一級及び第二級アミン、スルフヒドリル、アルコール、カルボキシル基、カルボニル、またはトリアゾール形成官能基、例えばアジドまたはアルキン）に化学的に付着することができる反応性官能基を含む部分を指す。架橋基の例としては、スルフヒドリル反応性架橋基（例えば、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、チオスルホネート、またはビニルスルホンを含む基）、アミン反応性架橋基（例えば、エステル、例えばNHSEステル、イミドエステル、及びペンタフルオロフェニルエステル、またはヒドロキシメチルホスフィンを含む基）、カルボキシル反応性架橋基（例えば、第一級もしくは第二級アミン、アルコール、またはチオールを含む基）、カルボニル反応性架橋基（例えば、ヒドラジドまたはアルコキシアミンを含む基）、及びトリアゾール形成架橋基（例えば、アジドまたはアルキンを含む基）が挙げられる。

20

【0202】

本明細書で用いる場合、「複合体」という用語は、結合相互作用（例えば、非共有結合的相互作用、例えば疎水性効果相互作用、静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、または π 効果相互作用）を通して一つに結合している、2つ以上の化合物及び／またはタンパク質の群を指す。複合体の例は、プレゼンタータンパク質または標的タンパク質に結合した本発明のコンジュゲートを含む「プレゼンタータンパク質／コンジュゲート複合体」及び「標的タンパク質／コンジュゲート複合体」である。

30

【0203】

本明細書で用いる場合、「コンジュゲート」という用語は、2つ以上の化学化合物（例えば、架橋基及びタンパク質、例えば標的タンパク質またはプレゼンタータンパク質を含む化合物）の（例えば、共有結合形成反応を介した）接合により形成される化合物を指す。

40

【0204】

本明細書で用いる場合、「電子吸引基」という用語は、 π 系から電子密度を除去する官能基を指す。電子吸引基の例としては、これらに限定されないが、ハロゲン化物（例えば、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、塩化アシル、エステル、アミド、三ハロゲン化物（例えば、トリフルオロメチル、トリクロロメチル）、ニトリル、スルホネート、及びニトロ基が挙げられる。

【0205】

本明細書で用いる場合、「脱離基」という用語は、ヘテロリティック結合開裂で電子の対と共に離れる分子フラグメントを指す。脱離基の例としては、これらに限定されないが

50

、ハロゲン化物（例えば、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、カルボキシレート、トシレート、メシレート、ペルフルオロアルキルスルホネート（例えば、トリフレート）、硝酸塩、及びリン酸塩が挙げられる。

【0206】

本明細書で用いる場合、「結合に関与する」原子は、それが結合する実体の4 Å以内にあるか、またはそれが結合する実体の4 Å以内にある原子に接続する。

「プレゼンタータンパク質」という用語は、低分子に結合して、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）に結合する及びその活性を調節する複合体を形成するタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、比較的豊富なタンパク質である（例えば、プレゼンタータンパク質は、三分子複合体への関与が、細胞内でのプレゼンタータンパク質の生物学的機能及び／または細胞の生存力もしくは他の特質に実質的に影響を及ぼさない程度に十分に豊富である）。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、細胞内でシャペロン活性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、細胞内で複数の天然の相互作用パートナーを有するタンパク質である。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、低分子と結合して、標的タンパク質に結合する及びその生物学的活性を調節することが知られているかまたはそのように推定される二元複合体を形成すると知られているものである。

【0207】

「プレゼンタータンパク質結合部分」という用語は、プレゼンタータンパク質への結合に関与する原子の群及びそこに付着した部分（例えば、20個の原子以内の原子、例えば15個の原子以内の原子、10以内の原子、5個の原子以内の原子）を指し、化合物は、例えば、10 μM未満（例えば、5 μM未満、1 μM未満、500 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、25 nM未満、10 nM未満）の K_D を伴って、前記プレゼンタータンパク質に特異的に結合するか、または例えば、1 μM未満（例えば、0.5 μM未満、0.1 μM未満、0.05 μM未満、0.01 μM未満）の IC_{50} を伴って、プレゼンタータンパク質のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を阻害する。プレゼンタータンパク質結合部分は、プレゼンタータンパク質と相互作用する化合物中の全原子を必ずしも包含しないことが理解されるだろう。プレゼンタータンパク質結合部分の1個または複数の原子が標的タンパク質結合部分（例えば、真核生物標的タンパク質結合部分、例えば哺乳類標的タンパク質結合部分もしくは真菌類標的タンパク質結合部分または原核生物標的タンパク質結合部分、例えば細菌標的タンパク質結合部分）内にあり得ることも理解されるだろう。

【0208】

本明細書で用いる場合、「FKBP結合部分」は、タンパク質のFKBPファミリー（例えば、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP25、FKBP51、またはFKBP52）におけるプレゼンタータンパク質に関して選択的なプレゼンタータンパク質結合部分を指す。「選択的FKBP結合部分」は、本明細書で用いる場合、FKBPファミリーの全ての他のメンバーを超えて、FKBPファミリーの1つもしくは複数（例えば、2、3、4、5）のメンバーに特異的である結合部分を指す。「非選択的FKBP結合部分」は、本明細書で用いる場合、FKBPファミリーの全てのメンバーに関して、同等の親和性（2倍以内、3倍以内、4倍以内、5倍以内、10倍以内）を有する結合部分を指す。

【0209】

「タンパク質結合部分」という用語は、タンパク質（例えば、プレゼンタータンパク質または標的タンパク質）への結合に関与する原子の群及びそこに付着した部分（例えば、20個の原子以内の原子、例えば15個の原子以内の原子、10以内の原子、5個の原子以内の原子）を指し、化合物は、例えば、10 μM未満（例えば、5 μM未満、1 μM未満、500 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、

25 nM未満、10 nM未満)の K_D を伴って、前記タンパク質に特異的に結合するか、または例えば、1 μ M未満(例えば、0.5 μ M未満、0.1 μ M未満、0.05 μ M未満、0.01 μ M未満)の IC_{50} を伴って、プレゼンタータンパク質のペプチジループロリルイソメラーゼ活性を阻害する。タンパク質結合部分は、タンパク質と相互作用する化合物中の原子全体を包含するとは限らないことが、理解されるだろう。

【0210】

本明細書で用いる場合、「反応する」という用語は、同じまたは異なる元素の原子が、それら自身を再構成して新規の物質を形成するプロセスを指す。例えば、2個の原子間の共有結合の形成、例えば共有結合を形成する、タンパク質上の反応性アミノ酸及び架橋基間の反応。反応は、当該技術分野において公知の任意の方法によって測定されてよく、例えば、反応生成物の形成は、LC-MSまたはNMRによって決定することができる。

10

【0211】

本明細書で用いる場合、「反応性アミノ酸」という用語は、特定の官能基(例えば、架橋基)に化学的に付着することができる官能基(例えば、求核性官能基)を含む天然または非天然アミノ酸を指す。反応性アミノ酸の例としては、システイン、リジン、セリン、及び側鎖上にアジドを有するアミノ酸が挙げられる。「非反応性アミノ酸」は、特定の官能基に化学的に付着することができる官能基を含有しない天然または非天然アミノ酸を指す。非反応性アミノ酸の例としては、バリン、アラニン、イソロイシン、トレオニン(theronine)、及びロイシンが挙げられる。

【0212】

「参照」という用語は、多くの場合、関心対象の化合物、個体、集団、試料、配列、もしくは値と比較される標準または対照の化合物、個体、集団、試料、配列、もしくは値を記述するために本明細書で用いる。いくつかの実施形態では、参照化合物、個体、集団、試料、配列、または値は、関心対象の化合物、個体、集団、試料、配列、もしくは値の検査または決定と実質的に同時に検査及び/または決定される。いくつかの実施形態では、参照化合物、個体、集団、試料、配列、または値は、有形媒体において任意選択で具現化された履歴参照である。典型的には、当業者により理解され得るように、参照化合物、個体、集団、試料、配列、または値は、関心対象の化合物、個体、集団、試料、配列、もしくは値の決定または特徴決定に利用されるものと同等の条件下で決定または特徴決定される。

20

30

【0213】

本明細書で用いる場合、「溶媒に曝露されたアミノ酸」という用語は、タンパク質を取り囲む溶媒と接触可能であるアミノ酸を指す。いくつかの実施形態では、溶媒に曝露されたアミノ酸は、置換されているとき、タンパク質の三次元構造を実質的に変化させないアミノ酸である。

【0214】

本明細書で用いる場合、「特異的結合」または「に特異的」または「に対して特異的」という用語は、結合剤及び標的実体間の相互作用を指す。当業者により理解され得るように、相互作用は、代替相互作用の存在下で有利である場合、例えば、10 μ M未満(例えば、5 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、25 nM未満、10 nM未満)の K_D で結合する場合、「特異的」とであるとみなされる。多くの実施形態では、特異的相互作用は、標的実体(例えば、エピトープ、クレフト、結合部位)の特定の構造的特徴の存在に依存する。特異性が絶対的である必要はないことが理解されたい。いくつかの実施形態では、特異性は、1つまたは複数の他の潜在的な標的実体(例えば、競合因子)に対する結合剤の特異性と対比して評価され得る。いくつかの実施形態では、特異性は、参照特異的結合剤の特異性と対比して評価される。いくつかの実施形態では、特異性は、参照非特異的結合剤の特異性と対比して評価される。

40

【0215】

「特異的」という用語は、活性を有する化合物に関連して用いられる場合、化合物が潜

50

在的標的実体または状態を識別することを意味するものと当業者により理解される。例えば、いくつかの実施形態では、化合物は、1つまたは複数の競合する代替標的の存在下でその標的に優先的に結合する場合に、その標的に「特異的」に結合すると言われる。多くの実施形態では、特異的相互作用は、標的実体（例えば、エピトープ、クレフト、結合部位）の特定の構造的特徴の存在に依存する。特異性が絶対的である必要はないことが理解されたい。いくつかの実施形態では、特異性は、1つまたは複数の他の潜在的な標的実体（例えば、競合因子）に対する結合剤の特異性と対比して評価され得る。いくつかの実施形態では、特異性（*s p e i c i f c i t y*）は、参照特異的結合剤の特異性と対比して評価される。いくつかの実施形態では、特異性は、参照非特異的結合剤の特異性と対比して評価される。いくつかの実施形態では、作用剤または実体は、その標的実体への結合の条件下で競合する代替標的に検出可能に結合しない。いくつかの実施形態では、結合剤は、競合する代替標的（複数可）と比較して、より高いオン速度、より低いオフ速度、増加した親和性、低減した解離、及び／または増加した安定性を伴って、その標的実体に結合する。

10

【0216】

「実質的」という用語は、関心対象の特徴または特性の全体またはほぼ全体の程度または度合いを呈する定性的条件を指す。生物学技術分野の当業者であれば、生物学的及び化学的な現象が、最終状態に達すること及び／または完全まで進行することまたは絶対的結果を達成もしくは回避することは、あっても稀であるものと理解するだろう。したがって、「実質的」という用語は、多くの生物学的及び化学的な現象に固有の完全性の欠如の可能性を取り込むように本明細書で用いる。

20

【0217】

特定のタンパク質に「実質的に結合しない」という用語は、本明細書で用いる場合、例えば、標的に対して、 10^{-4} M以上、代替的に 10^{-5} M以上、代替的に 10^{-6} M以上、代替的に 10^{-7} M以上、代替的に 10^{-8} M以上、代替的に 10^{-9} M以上、代替的に 10^{-10} M以上、代替的に 10^{-11} M以上、代替的に 10^{-12} M以上の K_D 、または 10^{-4} M $\sim$ 10^{-12} Mもしくは 10^{-6} M $\sim$ 10^{-10} Mもしくは 10^{-7} M $\sim$ 10^{-9} Mの範囲内の K_D を有する分子または分子の部位により表すことができる。

【0218】

「標的タンパク質」という用語は、疾患、障害または状態に関連する生物学的経路に参与する任意のタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、mTORまたはカルシニューリンではない。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質及び低分子と三分子複合体を形成することができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、天然に生じるタンパク質であり、いくつかのかかる実施形態では、標的タンパク質は、ある特定の哺乳類細胞（例えば、哺乳類標的タンパク質）、菌類細胞（例えば、菌類標的タンパク質）、細菌細胞（例えば、細菌標的タンパク質）、または植物細胞（例えば、植物標的タンパク質）に天然に見いだされる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1つまたは複数の天然プレゼンタータンパク質／天然低分子複合体との天然相互作用を特徴とする。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、複数の異なる天然プレゼンタータンパク質／天然低分子複合体との天然相互作用を特徴とし、いくつかのかかる実施形態では、複合体の一部または全部は、同一のプレゼンタータンパク質（及び異なる低分子）を利用する。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、シクロスポリン、ラパマイシン、またはFK506及びプレゼンタータンパク質（例えば、FKBP）の複合体に実質的に結合しない。標的タンパク質は、天然に生じる、例えば、野生型であることができる。あるいは、標的タンパク質は、野生型タンパク質から変異することができるが、例えば、対立遺伝子変異体、スプライス突然変異体、または生物学的に活性なフラグメントとして、生物学的機能を依然として維持する。例示的な哺乳類標的タンパク質は、GTPアーゼ、GTPアーゼ活性化タンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子、熱ショックタンパク質、イオンチャネル、コイルドコイルタンパク質、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、転写因子、クロマチン修飾因子／再構成因子

30

40

50

、古典的なタンパク質－タンパク質相互作用ドメイン及びモチーフを有するタンパク質、または疾患、障害もしくは状態に関連する生物学的経路に關与する任意の他のタンパク質である。

【0219】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、修飾された標的タンパク質である。修飾された標的タンパク質は、タンパク質配列における、保存的または非保存的な、アミノ酸の挿入、欠失、もしくは置換を含むことができる（例えば、D-アミノ酸、デスアミノ酸）（例えば、この場合、このような変化は、ポリペプチドの生物学的活性を実質的に変えない）。具体的には、本発明のポリペプチドのいずれかのアミノまたはカルボキシ末端への1個または複数のシステイン残基の付加は、例えば、ジスルフィド結合によるこれらのタンパク質のコンジュゲーションを促進することができる。いくつかの実施形態では、1個または複数の反応性アミノ酸残基（例えば、システイン）は除去されて、タンパク質上の潜在的なコンジュゲーション部位の数を低減させる。アミノ酸置換は、保存的（すなわち、残基を、同じ属タイプまたは群の別の残基により置き換える）または非保存的（すなわち、残基を、別のタイプのアミノ酸により置き換える）であることができる。加えて、天然に生じるアミノ酸は、天然には生じないアミノ酸に置換することができる（すなわち、天然には生じない保存的アミノ酸置換または天然には生じない非保存的アミノ酸置換）。

10

【0220】

「標的タンパク質結合部分」という用語は、化合物がプレゼンタータンパク質との複合体であるとき、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）への結合に關与する環原子の群、及びそこに付着した部分（例えば、20個の原子以内の原子、例えば、15個の原子以内の原子、10以内の原子、5個の原子以内の原子）を指す。標的タンパク質結合部分が、標的タンパク質と相互作用する化合物中の原子全体を包含するとは限らないことが、理解されるだろう。プレゼンタータンパク質結合部分の1個または複数の原子が、標的タンパク質結合部分にも存在し得ることもまた、理解されるだろう。

20

【0221】

「従来型の結合ポケット」という用語は、活性が1個または複数の低分子により調節されたタンパク質に匹敵する生理化学的及び／または幾何学的な特性を有するタンパク質構造上のキャビティまたはポケットを指す。いくつかの実施形態では、従来型の結合ポケットは、 $1000 \text{ \AA}^3$ 超の体積を有する明確に規定されたポケットである。当業者であれば、従来型の結合ポケットの概念を熟知しており、さらにそれと「ドラッグビリティ」との関係を認識している。ある特定の実施形態では、タンパク質は、本明細書に定義されるように、アンドラッグブルであれば、従来型の結合ポケットを有していないとみなされる。

30

【0222】

「アンドラッグブル標的」という用語は、薬物により標的されることが知られているタンパク質ファミリーのメンバーでない及び／または低分子への高親和性結合に好適な結合部位を有さないタンパク質を指す。標的タンパク質がアンドラッグブルであるか否かを決定する方法は、当該技術分野で公知である。例えば、標的タンパク質がアンドラッグブルであるか否かは、体積、表面積、親油性表面積、深度、及び／または疎水性比を含むタンパク質上の結合ポケットに対して計算されたパラメータに基づいてドラッグビリティを評価する DOGSITESCORER（登録商標）（University at Hamburg, Hamburg, Germany）というプログラムにより用いられるような構造ベースのアルゴリズムを用いて決定し得る。

40

【図面の簡単な説明】

【0223】

【図1】KRAS_{GTP}/S39C l i t e / C 2 - F K 5 0 6 コンジュゲートのSD

50

S-PAGE分析を例示する画像である。レーン1: KRAS_{GTP}/S39C lite、レーン2: KRAS_{GTP}/S39C lite/C2-FK506 反応混合物、レーン3: KRAS_{GTP}/S39C lite/C2-FK506 反応混合物+100mM DTT。

【図2】KRAS_{GTP}/G12C lite/SFAX9DS コンジュゲートのSDS-PAGE分析を例示する画像である。

【図3A】KRAS_{GTP}/S39C lite/C2Holt/FKBP12 複合体形成のSEC及びSDS-PAGE分析を例示する画像である。SEC精製プロファイル。青い点線は、KRAS_{GTP}/S39C lite/C2Holt/FKBP12 三元複合体の溶出に対応するピークを示す。

【図3B】KRAS_{GTP}/S39C lite/C2Holt/FKBP12 複合体形成のSEC及びSDS-PAGE分析を例示する画像である。SEC溶出ピークのSDS-PAGE分析。青い点線は、KRAS_{GTP}/S39C lite/C2Holt/FKBP12 溶出ピークについて集めた画分に対応する。

【図4】KRAS_{GDP}/S39C lite/SFAC4DS/CypA_{C52S} 複合体の形成を確認する、SECプロファイル、及び溶出ピークのSDS-PAGE分析を例示する画像である。

【図5A】遊離PTP1B_{S187C} lite及びFKBP12 タンパク質ならびにPTP1B_{S187C} lite/C3SLF/FKBP12 複合体のSECプロファイル及びSDS-PAGE分析を例示する画像である。

【図5B】遊離PTP1B_{S187C} lite及びFKBP12 タンパク質ならびにPTP1B_{S187C} lite/C3-SLF/FKBP12 複合体のSECプロファイル及びSDS-PAGE分析を例示する画像である。

【図6】SDS-PAGEによるC3及びC3SLFの架橋効率を例示する画像である。

【図7】A及びBは、FKBP12-化合物1-KRAS_{GTP}/S39C 複合体の結晶構造を例示する画像である。図7A) FKBP12、KRAS_{GTP}/S39C 及びリガンドを示すリボン状の表示。示された3σにおけるF_o-F_c電子密度は、クローズアップ図においてリガンドについて示す。図7B)、リガンドまたはパートナータンパク質に4Å以内で近接する原子を赤で着色した、複合体の表面の表示である。

【図8】CypA_{C52S}-SFAC4DS-KRAS_{GDP}/S39C の結晶構造を例示する画像である。

【図9】A及びBは、FKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C} の結晶構造を例示する画像である。図9Aは、結晶が、非対称単位のFKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C} の2個の複合体分子を含有することを例示する。図9Bは、PTP1B_{S187C} の埋込面積が427Å²であり、C3SLFの埋込面積が615Å²であることを例示する。

【図10】MCL1_{S245C}/C3SLF/FKBP52 の結晶構造を例示する画像である。

【図11】CYP A-W21487-KRAS_{G12C}-GTP 三元複合体のW21487に依存する複合体形成の結合曲線を例示する画像である。

【図12】CYP A-W21487-KRAS_{G12C}-GTP 三元複合体のW21487に依存する複合体形成の結合曲線を例示する画像である。

【図13】CEP250へのFKBP12-化合物1及びFKBP12-化合物2二元複合体の結合についてのITC測定を例示する画像である。

【図14-1】CEP250_{11.4}及びCEP250_{29.2}へのFKBP12/化合物1の結合についてのSPRセンサーグラムを例示する画像である。

【図14-2】CEP250_{11.4}及びCEP250_{29.2}へのFKBP12/化合物1の結合についてのSPRセンサーグラムを例示する画像である。

【図15】KRAS_{G12C}-GTPへのCYP A/化合物3の結合についてのセンソグラム(sensogram)及び定常状態フィッティング曲線を例示する画像である。

10

20

30

40

50

【図16】CypA：C3DS：KRAS複合体形成についての蛍光偏光曲線を例示する画像である。

【図17A】KRAS_{G12C}-GTPの2D 1H-15N TROSY-HSQCスペクトルを例示する画像である。

【図17B】化学量論量のCYP Aの添加を例示する画像である。

【図17C】KRAS及びCYP A単独を例示する画像である。

【発明を実施するための形態】

【0224】

低分子は、標的とのその相互作用が接着力により推進され、その強さは接触表面積に概ね比例するため、その標的化能力において制限されている。それらのサイズが小さいために、低分子が標的タンパク質と効果的に相互作用するのに十分な分子間接触表面積を構築する唯一の方法は、文字通りそのタンパク質により取り込まれることである。実際に、多数の実験及び計算上のデータの両方が、それらの表面上に疎水性「ポケット」を有するタンパク質のみが、低分子と結合できるという見解を支持する。その場合、結合は取り込みにより可能となる。

【0225】

自然は、低分子が、疎水性ポケット以外の部位にて標的タンパク質と相互作用することを可能とする戦略を進化させてきた。この戦略は、天然に生じる免疫抑制薬であるシクロスポリンA、ラパマイシン、及びFK506により例示される。これらの薬物の生物学的活性は、低分子と小さな提示タンパク質との高親和性複合体の形成に關与する。低分子及び提示タンパク質の複合表面は、標的に会合する。ゆえに、例えば、シクロスポリンA及びシクロフィリンA間で形成される二元複合体は、高親和性及び特異性を伴ってカルシニューリンを標的とするが、シクロスポリンAもシクロフィリンAも単独では測定可能な親和性を伴ってカルシニューリンに結合しない。

【0226】

多くの重要な治療標的は、他のタンパク質との複合体化によりそれらの機能を発揮する。これらの系の多くにおけるタンパク質／タンパク質相互作用表面は、極性残基の広い環に取り囲まれた疎水性側鎖の内側コアを含有する。疎水性残基は、エネルギー的に有利な接触のほぼ全てに寄与し、そのためこのクラスターは、タンパク質－タンパク質相互作用における会合のための「ホットスポット」として指定されてきた。重要なことに、天然に生じる低分子と小さい提示タンパク質との前述の複合体では、低分子は、ホットスポットと類似の疎水性機能のクラスターを提供し、タンパク質は、主に極性の残基の環を提供する。言い換えれば、提示された低分子系は、天然のタンパク質／タンパク質相互作用系で広く利用される表面構築を模倣する。

【0227】

自然は、提示された低分子－ポータブルホットスポット－の標的特異性を進化の多様化により再プログラムする能力を実証してきた。最も良好に特徴決定された例では、FK506結合タンパク質（FKBP）及びFK506間で形成された複合体は、カルシニューリンを標的とする。しかしながら、FKBPは、関連分子のラパマイシンとも複合体を形成することができ、その複合体は、まったく異なる標的TorC1と相互作用する。これまでのところ、アンドラッグプルであると以前にみなされた他の標的タンパク質と相互作用し、それを調節できるように、プレゼンタータンパク質／リガンド界面の結合及び調節能力を再プログラムする方法は、開発されていない。

【0228】

加えて、いくつかの薬物候補物質は、意図された標的及び他の意図されていないタンパク質の両方の活性を同様に調節するために、うまく機能しないことが十分に確立されている。この問題は、標的タンパク質の薬物結合部位が非標的タンパク質の結合部位に類似している場合に、特に困難なものとなる。ATP結合ポケットが非標的インスリン受容体（IR）の結合ポケットに構造的に類似しているインスリン様成長因子受容体（IGF-1R）は、そのような一例である。IGF-1Rを標的とするように設計された低分子開発

10

20

30

40

50

候補物質は、典型的には、インスリン受容体も調節するという許容できない副作用を有する。しかしながら、A T P結合ポケットの周囲の領域には、これらの2つのタンパク質間の構造の非類似性が存在する。かかる知見にもかかわらず、こうした差異の利点を生かしてI RよりもI G F-1 Rに特異的である薬物を開発する方法は、これまでのところ存在しない。

【0229】

本開示は、タンパク質-タンパク質界面、例えばプレゼンタータンパク質（例えば、F K B Pファミリーのメンバー、シクロフィリンファミリーのメンバー、またはP I N 1）及び標的タンパク質間の界面を分析するのに有用な方法及び試薬を提供する。いくつかの実施形態では、標的及び／またはプレゼンタータンパク質は、細胞内タンパク質である。いくつかの実施形態では、標的及び／またはプレゼンタータンパク質は、哺乳類タンパク質である。いくつかの実施形態では、これらの方法及び試薬は、プレゼンタータンパク質及び低分子と複合体を形成することによって、阻害または活性化の影響を受けやすい標的タンパク質を同定するのに有用であり得る。いくつかの実施形態では、これらの方法及び試薬は、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質と複合体を形成することによって、標的タンパク質を阻害または活性化することができる化合物を同定するのに有用であり得る。

化合物及びコンジュゲート

本開示は、タンパク質結合部分（例えば、プレゼンタータンパク質結合部分または標的タンパク質結合部分）と架橋基を含む化合物を提供する。本発明は、タンパク質にコンジュゲートしたタンパク質結合部分、例えば、標的タンパク質にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分またはプレゼンタータンパク質にコンジュゲートした標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートにも関する。

【0230】

本発明は、式V I I I :

A-L-B

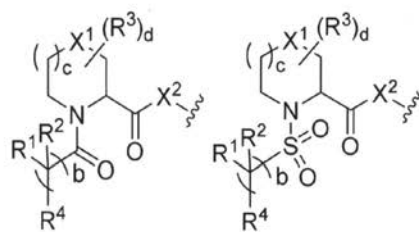
式V I I I

の化合物にも関し、

式中、Aは、式V I I I I :

【0231】

【化37】



式VII Ia 式VII Ib

の構造を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、

【0233】

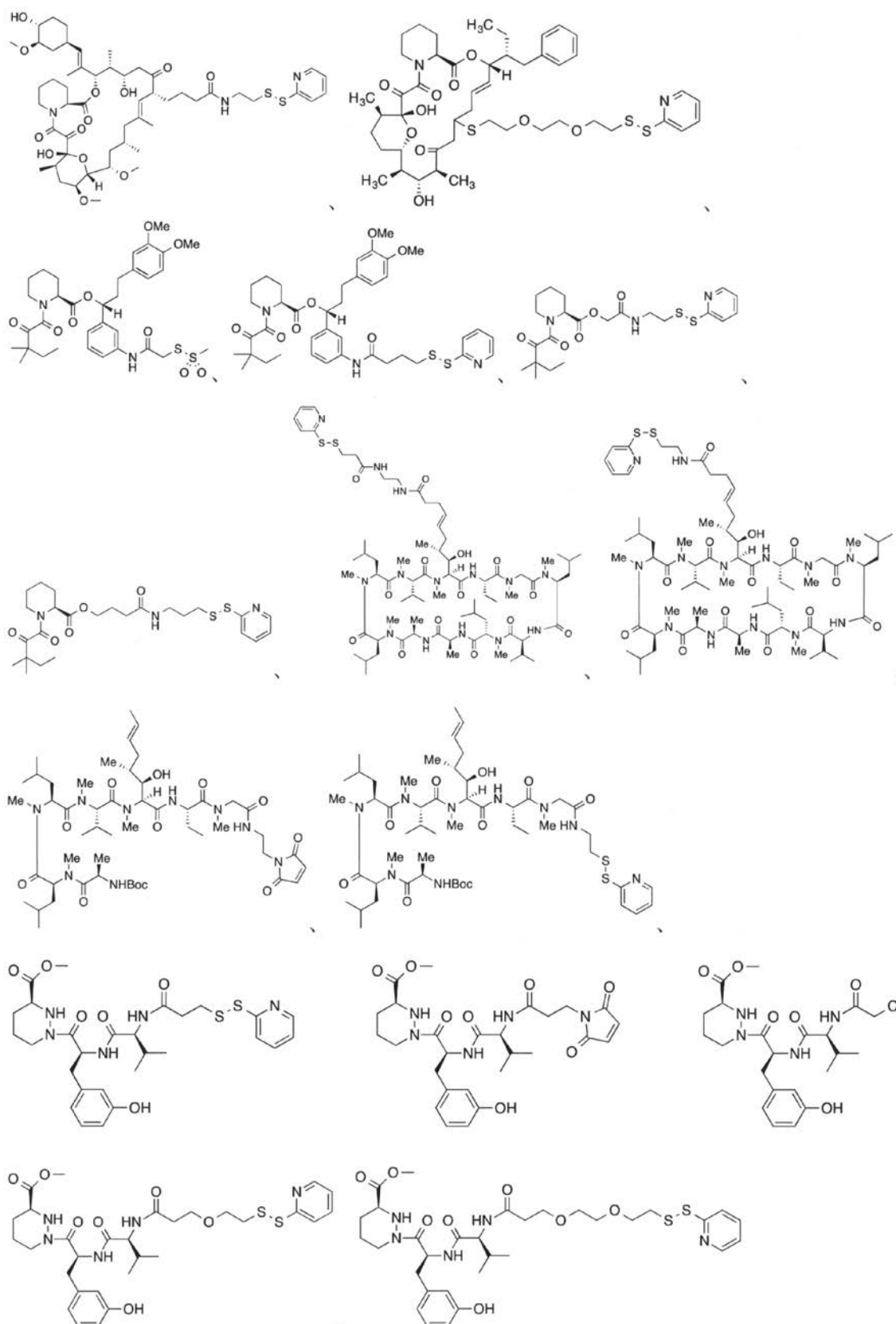
10

20

30

40

【化 3 8 - 1】



10

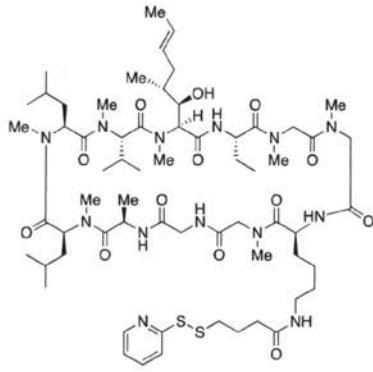
20

30

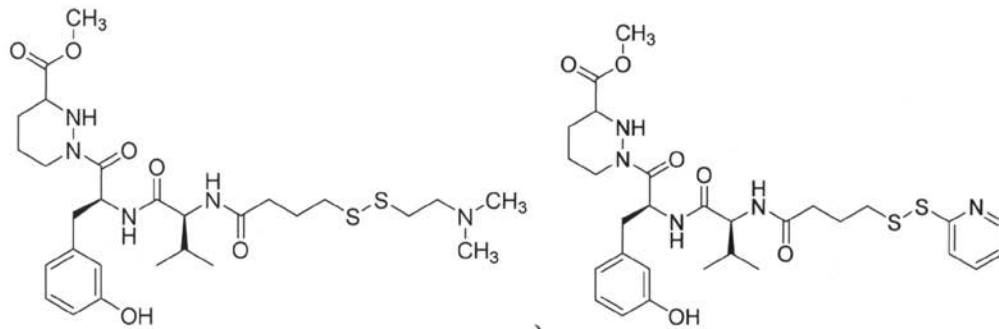
40

【 0 2 3 4】

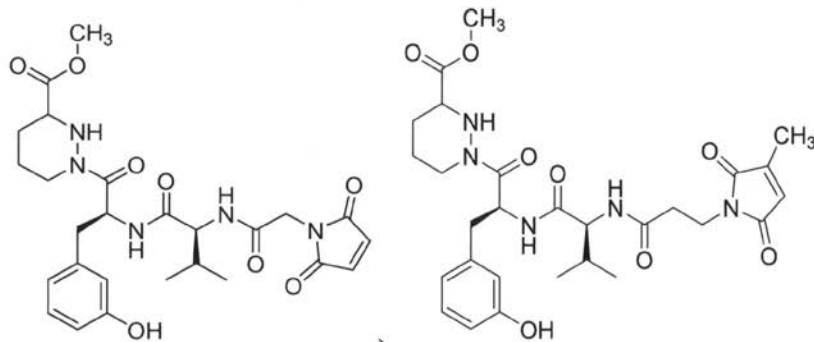
【化 3 8 - 2】



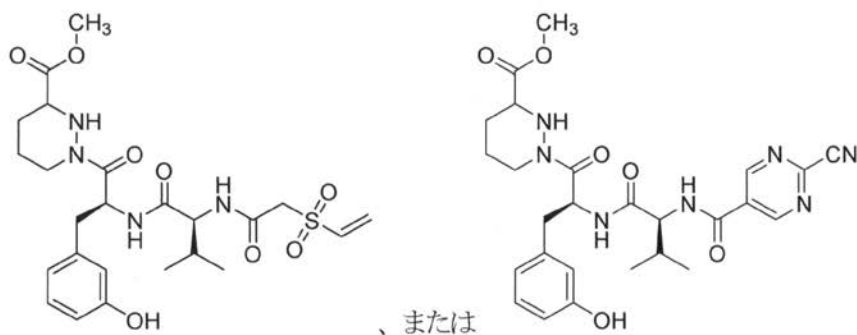
10



20



30



40

である。

架橋基

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、架橋基を含む。架橋基は、タンパク質または他の分子上の特定の官能基（例えば、第一級アミン、スルフヒドリル）に化学的に付着することができる反応性官能基を含む基を指す。架橋基の例としては、スルフヒドリル反応性架橋基（例えば、マレイミド、ハロアセチル、ピリジリジスルフィド、チオスルホネート、またはビニルスルホンを含む基）、アミン反応性架橋基（例えば、エステル、例

50

例えばNHSEステル、イミドエステル、及びペンタフルオロフェニルエステル、またはヒドロキシメチルホスフィンを含む基)、カルボキシル反応性架橋基(例えば、第一級もしくは第二級アミン、アルコール、またはチオールを含む基)、カルボニル反応性架橋基(例えば、ヒドラジドまたはアルコキシアミンを含む基)、及びトリアゾール形成架橋基(例えば、アジドまたはアルキンを含む基)が挙げられる。

【0235】

例示的な架橋基としては、2'-ピリジルジスルフィド、4'-ピリジルジスルフィド、ヨードアセチル、マレイミド、チオエステル、アルキルジスルフィド、アルキルアミンジスルフィド、ニトロ安息香酸ジスルフィド、無水物、NHSEステル、アルデヒド、塩化アルキル、アルキン、マイケルアクセプター基(例えば、 α , β -非置換ケトンまたはスルホン)、エポキシド、ヘテロアリールニトリル及びアジドが挙げられる。

10

プレゼンタータンパク質結合部分

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、プレゼンタータンパク質結合部分を含む。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、プレゼンタータンパク質への結合に関与する原子の群(例えば、5~20個の原子、5~10個の原子、10~20個の原子)を含み、そこに付着した任意の部分(例えば、20個の原子以内の原子、例えば15個の原子以内の原子、10個の原子以内の原子、5個の原子以内の原子)を含み得、提供される化合物は、例えば、10 μ M未満(例えば、5 μ M未満、1 μ M未満、500 nM未満、200 nM未満、100 nM未満、75 nM未満、50 nM未満、25 nM未満、10 nM未満)の K_D を伴って、前記プレゼンタータンパク質に特異的に結合するか、または例えば、1 μ M未満(例えば、0.5 μ M未満、0.1 μ M未満、0.05 μ M未満、0.01 μ M未満)の IC_{50} を伴って、プレゼンタータンパク質のペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を阻害する。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、プレゼンタータンパク質と相互作用する、提供される化合物中の全原子を包含しない。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分の1個または複数の原子は、プレゼンタータンパク質と相互作用しない。

20

【0236】

いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、N-アシルプロリン部分、N-アシルピペコリン酸部分、N-アシル3-モルフォリノーカルボン酸部分、及び/またはN-アシルピペルジン酸部分を含む(例えば、いずれかの窒素原子がアシル化されている。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、N-アシルピペコリン酸部分を含む。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、N-アシルプロリン部分を含む。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、N-アシル3-モルフォリノーカルボン酸部分を含む。いくつかの実施形態(emobodiments)では、プレゼンタータンパク質結合部分は、N-アシルピペルジン酸部分を含む。

30

【0237】

いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分の少なくとも1個の原子は、FKBP12のTyr27、Phe37、Asp38、Arg41、Phe47、Gln54、Glu55、Val56、Ile57、Trp60、Ala82、Try83、His88、Ile92、及び/またはPhe100のうちの1つまたは複数(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15)との結合に関与する。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分の少なくとも1個の原子(at least one of)は、FKBP12のArg41、Gln54、Glu55、及び/またはAla82の少なくとも1つ(例えば、2、3、または4)との結合に関与する。

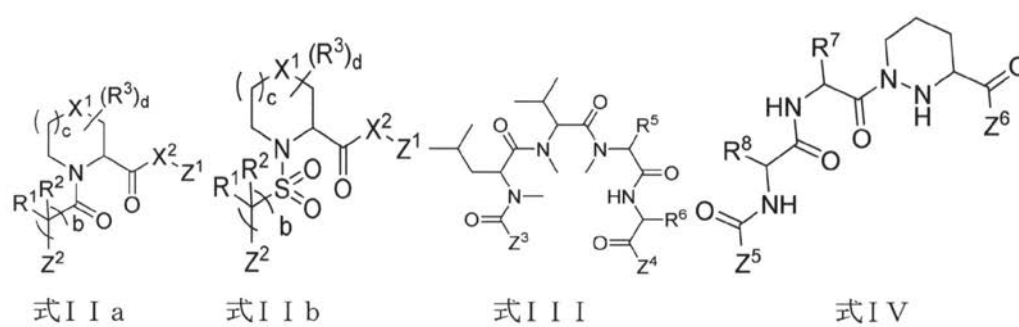
40

【0238】

いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、式II~IV:

【0239】

【化 3 9】



10

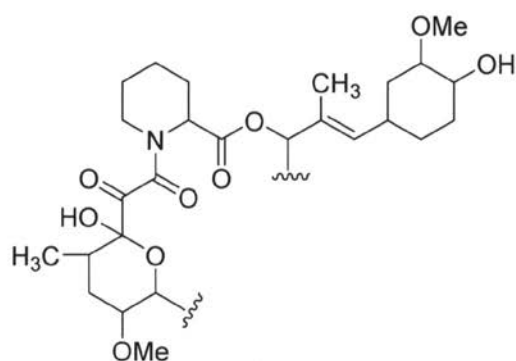
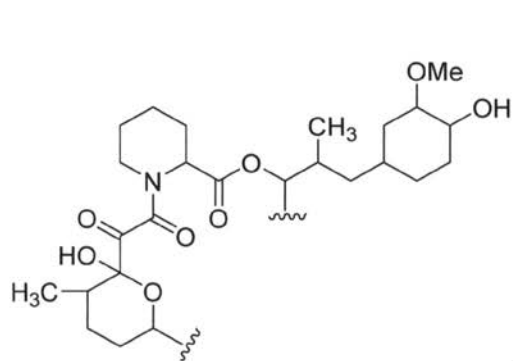
に従う構造を有する。

【0240】

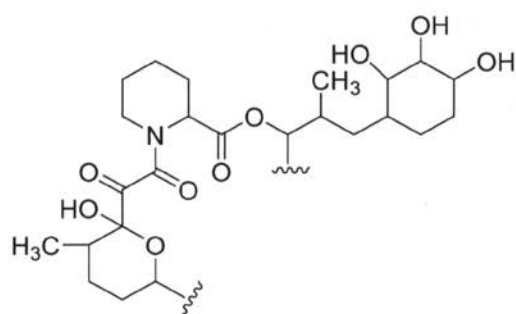
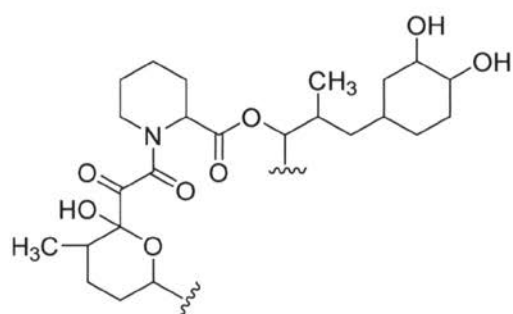
いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、構造：

【0241】

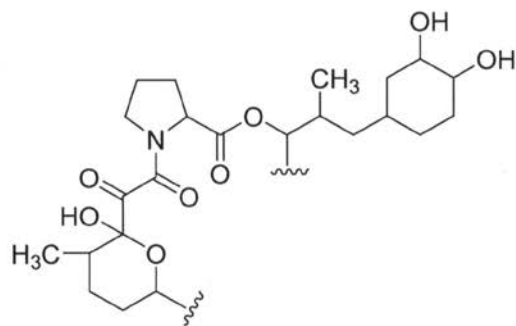
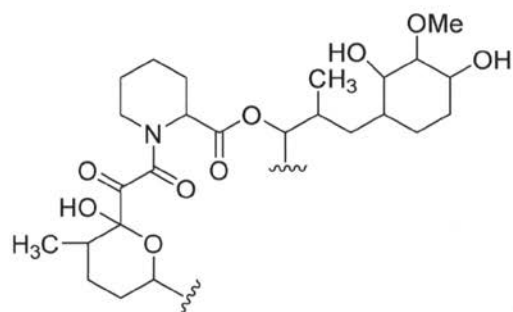
【化 4 0 - 1】



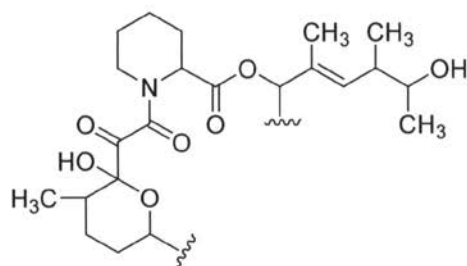
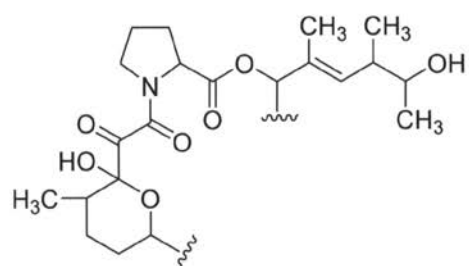
10



20

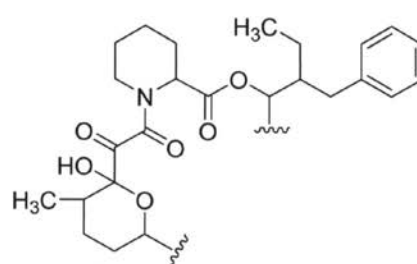
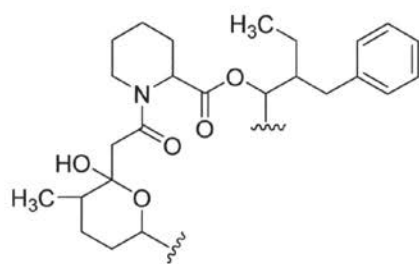


30

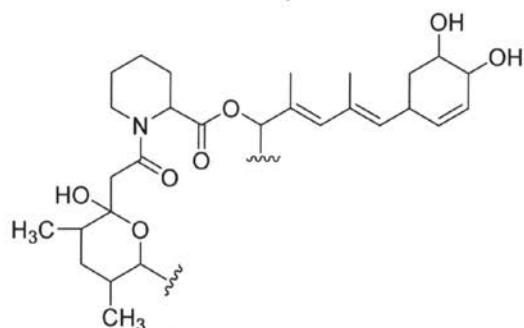
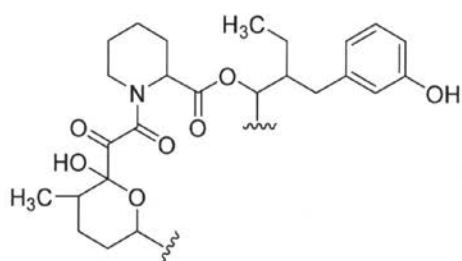


【 0 2 4 2】

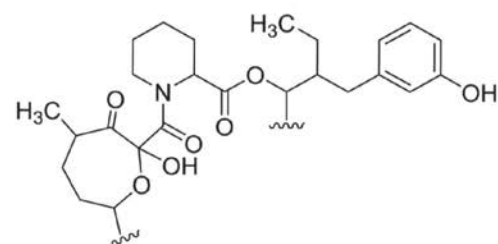
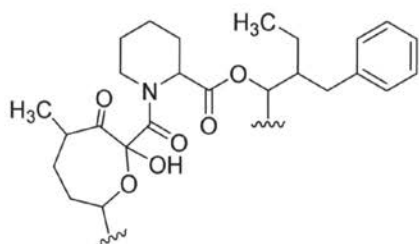
【化 4 0 - 2】



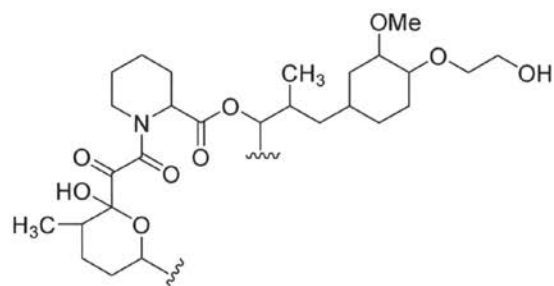
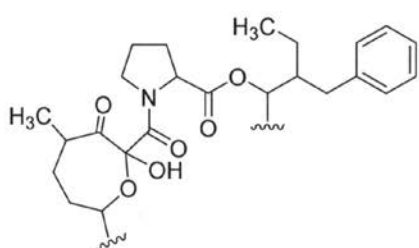
10



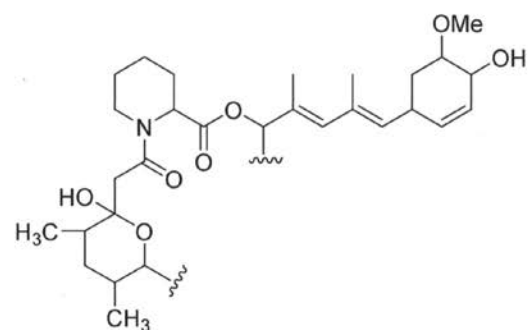
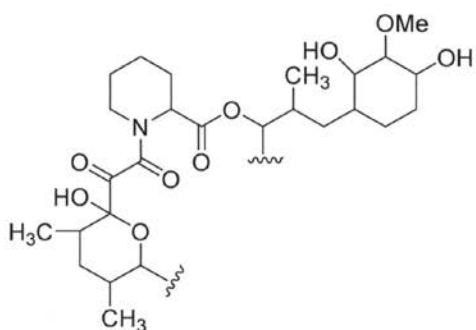
20



30

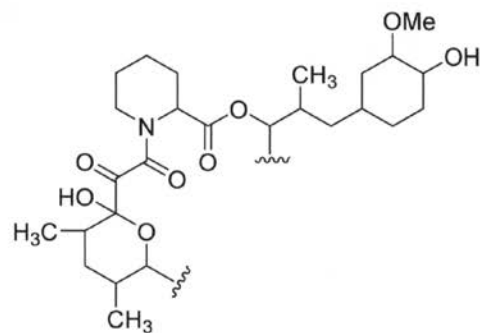
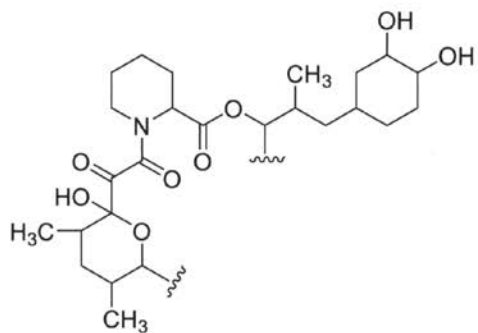


40

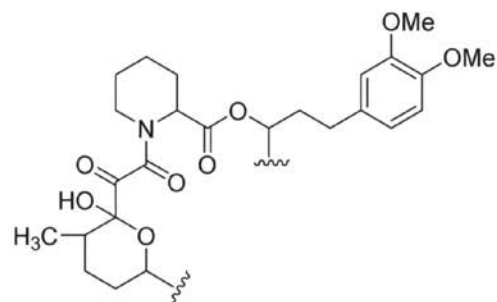
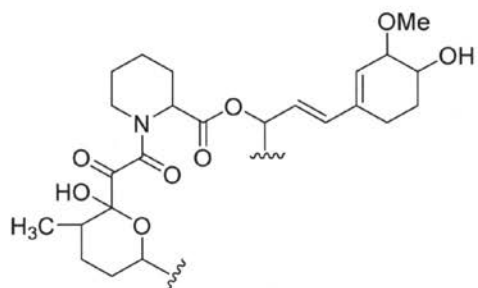


【 0 2 4 3】

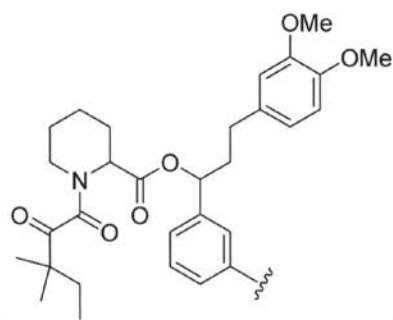
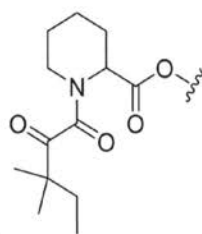
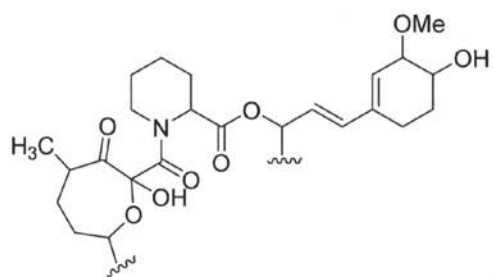
【化 4 0 - 3】



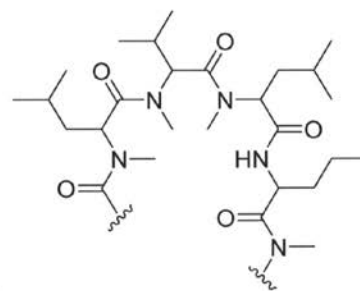
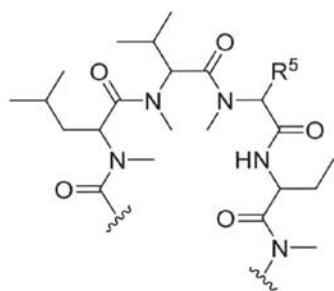
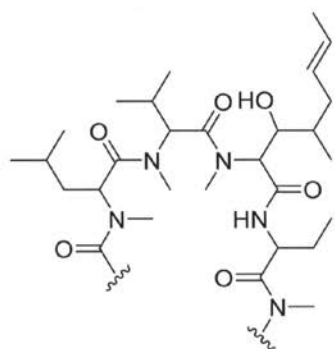
10



20



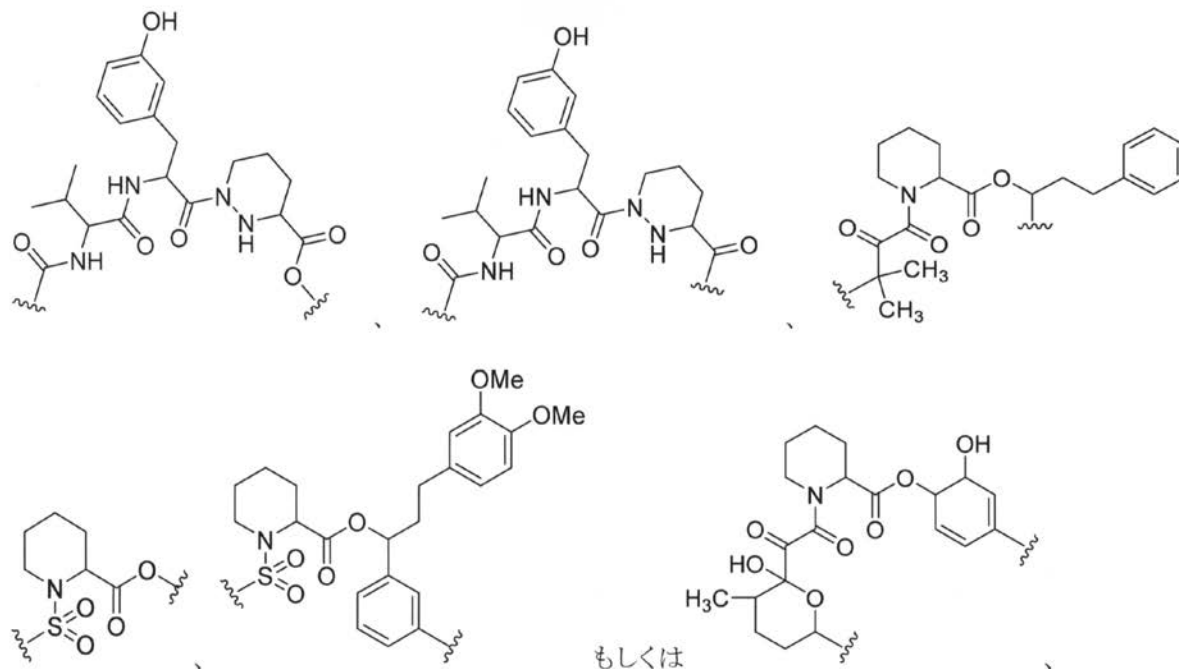
30



40

【 0 2 4 4】

【化 40 - 4】



10

20

またはその立体異性体を含む、またはこれからなる。

【0245】

プレゼンタータンパク質は、プレゼンタータンパク質結合部分内の原子に結合することができる。あるいはまたは加えて、プレゼンタータンパク質は、プレゼンタータンパク質結合部分内の2個以上の原子に結合することができる。別の代替では、プレゼンタータンパク質は、プレゼンタータンパク質結合部分内の1個または複数の原子に付着した置換基に結合することができる。さらに、いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、プレゼンタータンパク質結合部分内の原子に、及びプレゼンタータンパク質結合部分内の1個または複数の原子に付着した置換基に結合することができる。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、プレゼンタータンパク質の天然リガンドを模倣する基に結合し、ここで、プレゼンタータンパク質の天然リガンドを模倣する基は、プレゼンタータンパク質結合部分に付着している。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質はプレゼンタータンパク質に結合し、二元複合体におけるプレゼンタータンパク質に対するプレゼンタータンパク質の親和性は、複合体の不在下でのプレゼンタータンパク質に対するプレゼンタータンパク質の親和性に対比して増加する。このような例における結合は、典型的には、限定されないが、プレゼンタータンパク質結合部分へのプレゼンタータンパク質の非共有結合的相互作用による。

30

標的タンパク質結合部分

いくつかの実施形態では、本発明の化合物は、標的タンパク質結合部分（例えば、真核生物標的タンパク質結合部分、例えば哺乳類標的タンパク質結合部分もしくは真菌類標的タンパク質結合部分または原核生物標的タンパク質結合部分、例えば細菌標的タンパク質結合部分）を含む。いくつかの実施形態では、標的タンパク質結合部分は、標的タンパク質に特異的に結合する原子の群（例えば、5～20個の原子、5～10個の原子、10～20個の原子）を含み、そこに付着した任意の部分（例えば、20個の原子以内の原子、15個の原子以内の原子、10個の原子以内の原子、5個の原子以内の原子）を含み得る。いくつかの実施形態では、標的タンパク質結合部分は、標的タンパク質と相互作用する化合物内の複数個の原子を含む。ある特定の実施形態では、標的タンパク質結合部分の1個または複数の原子は、標的タンパク質と相互作用しない。

40

【0246】

50

標的タンパク質は、標的タンパク質結合部分中の原子に結合することができる。あるいはまたは加えて、標的タンパク質は、標的タンパク質結合部分内の2個以上の原子に結合することができる。別の代替では、標的タンパク質は、標的タンパク質結合部分内の1個または複数の原子に付着した置換基に結合することができる (bind can)。別の代替では、標的タンパク質は、標的タンパク質結合部分内の原子に、及び標的タンパク質結合部分内の1個または複数の原子に付着した置換基に結合することができる。別の代替では、標的タンパク質は、標的タンパク質の天然リガンドを模倣する基に結合し、ここで、標的タンパク質の天然リガンドを模倣する基は、標的タンパク質結合部分に付着している。なおも別の代替では、標的タンパク質はプレゼンタータンパク質に結合し、二元複合体内のプレゼンタータンパク質に対する標的タンパク質の親和性は、複合体の不在下でのプレゼンタータンパク質に対する標的タンパク質の親和性に対比して増加する。これらの例における結合は、典型的には、限定されないが、標的タンパク質結合部分への標的タンパク質の非共有結合的相互作用による。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質結合部分は、架橋基（例えば、内的架橋基）を含む。

リンカー

本発明の化合物は、タンパク質結合部分（例えば、プレゼンタータンパク質結合部分または標的タンパク質結合部分）を架橋基に接合するリンカー（例えば、部分リンカーまたはタンパク質結合部分をタンパク質（例えば、プレゼンタータンパク質または標的タンパク質）に接合するリンカーを含む。本発明のリンカー構成要素は、その最も単純なものでは、結合であるが、2つの部分を共有結合的に連結しているペンダント基を有する直鎖状、環状、または分岐状分子の骨格も提供し得る。

20

【0248】

いくつかの実施形態では、リンカーの少なくとも1個の原子は、プレゼンタータンパク質及び／または標的タンパク質への結合に関与する。ある特定の実施形態では、リンカーの少なくとも1個の原子は、プレゼンタータンパク質及び／または標的タンパク質への結合に関与しない。

【0249】

ゆえに、リンカーは、本明細書に記載のような化合物及び／またはコンジュゲート内に含まれるとき、いずれかの部分上に位置する1つまたは複数の官能基との結合形成を伴って、共有結合的手段によって2つの（またはそれより多い）部分の連結を達成する。この目的のために採用され得る化学反応性官能基の例としては、限定されないが、アミノ、ヒドロキシル、スルフヒドリル、カルボキシル、カルボニル、炭水化物基、隣接ジオール、チオエーテル、2-アミノアルコール、2-アミノチオール、グアニジニル、イミダゾリル、及びフェノール基が挙げられる。

30

【0250】

いくつかの実施形態では、2つの（またはそれより多い）部分のかかる共有結合的連結は、いずれかの部分に存在するかかる官能基と反応することができる反応性部分を含有するリンカーを使用して、もたらされ得る。例えば、部分のアミン基は、リンカーのカルボキシル基、またはその活性化誘導体と反応し得、2つを連結するアミドの形成をもたらし得る。

40

【0251】

スルフヒドリル基と反応することができる部分の例としては、 XCH_2CO- （式中、 $X = Br, Cl$ 、または I ）タイプの α -ハロアセチル化合物が挙げられ、これは、スルフヒドリル基に対して特定の反応性を示すだけでなく、イミダゾリル基、チオエーテル基、フェノール基、及びアミノ基を修飾するためにも使用することができ、これはGurd, Methods Enzymol. 11: 532 (1967)に記載されている。N-マレイミド誘導体もまた、スルフヒドリル基に対して選択的であるとみなされるが、加えて、ある特定の条件下でアミノ基とのカップリングに有用であり得る。アミノ基の変換を

50

通してチオール基を導入する、2-イミノチオランなどの試薬 (Traut et al., Biochemistry 12: 3266 (1973)) は、連結がジスルフィド架橋の形成を通して生じる場合に、スルフヒドリル試薬とみなされ得る。

【0252】

アミノ基と反応することができる反応性部分の例としては、例えば、アルキル化剤及びアシル化剤が挙げられる。代表的なアルキル化剤としては：

(i) α -ハロアセチル化合物、これは、反応性チオール基の不在下でアミノ基に対して特異性を示し、 XCH_2CO- (式中、 $X=Br, Cl$ 、または I) タイプである、これは例えば、Wong Biochemistry 24: 5337 (1979) に記載される、

(ii) N-マレイミド誘導体、これは、マイケル型反応を通してまたは環カルボニル基への付加によるアシル化を通してアミノ基と反応し得る、これは例えば、Smyth et al., J. Am. Chem. Soc. 82: 4600 (1960) 及び Biochem. J. 91: 589 (1964) に記載される、

(iii) ハロゲン化アリール、例えば、反応性ニトロハロ芳香族化合物、

(iv) ハロゲン化アルキル、これは例えば、McKenzie et al., J. Protein Chem. 7: 581 (1988) に記載される、

(v) アミノ基とシッフ塩基を形成することができるアルデヒド及びケトン、形成される付加物は、通常、還元を通して安定化して、安定したアミンを得る、

(vi) エポキシド誘導体、例えばエピクロロヒドリンやビスオキシラン、これはアミノ基、スルフヒドリル基、またはフェノール性ヒドロキシル基と反応し得る、

(vii) s-トリアジンの塩素含有誘導体、これはアミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基などの求核剤に対して非常に反応性である、

(viii) 上に詳述した s-トリアジン化合物に基づくアジリジン、例えば、Ross, J. Adv. Cancer Res. 2: 1 (1954) に記載されており、これは開環によりアミノ基などの求核剤と反応する、

(ix) スクアリン酸ジエチルエステル、これは Tietze, Chem. Ber. 124: 1215 (1991) に記載される、ならびに

(x) α -ハロアルキルエーテル、これは、エーテル酸素原子により引き起こされる活性化に起因して、通常のハロゲン化アルキルよりも高反応性のアルキル化剤である、これは Benneche et al., Eur. J. Med. Chem. 28: 463 (1993) に記載される、

が挙げられる。

【0253】

代表的なアミノ反応性アシル化剤としては、

(i) イソシアネート及びイソチオシアネート、特に芳香族誘導体、これはそれぞれ安定な尿素誘導体及びチオ尿素誘導体を形成する、

(ii) スルホニルクロリド、これは Herzog et al., Biopolymers 2: 349 (1964) に記載されている、

(iii) 酸ハロゲン化物、

(iv) 活性エステル、例えばニトロフェニルエステルまたは N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、

(v) 酸無水物、例えば混合型、対称型、または N-カルボキシ無水物、

(vi) アミド結合形成に関する他の有用な試薬、例えば、M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1984 に記載される、

(vii) アシルアジド、例えば、このアジド基は、亜硝酸ナトリウムを用いて事前に形成されたヒドラジド誘導体から生成される、これは Wetzel et al., Anal. Biochem. 58: 347 (1974) に記載される、

(viii) イミドエステル、これは、アミノ基との反応の際に安定なアミジンを形成す

10

20

30

40

50

る、これは例えば、Hunter and Ludwig, J. Am. Chem. Soc. 84: 3491 (1962)に記載される、ならびに

(ix) ハロヘテロアリール基、例えばハロピリジンまたはハロピリミジンが挙げられる。

【0254】

アルデヒド及びケトン、アミンと反応して Schiff 塩基を形成し得、これは還元的アミノ化を通して有利に安定化され得る。アルコキシルアミノ部分は、ケトン及びアルデヒドと容易に反応して安定なアルコキサミンを生成する、これは例えば、Webb et al., Bioconjugate Chem. 1: 96 (1990)において記載される。

10

【0255】

カルボキシル基と反応することができる反応性部分の例としては、ジアゾ化合物、例えばジアゾアセテートエステル及びジアゾアセトアミドが挙げられ、これらは、高い特異性で反応してエステル基を生成する、これは例えば、Herriot, Adv. Protein Chem. 3: 169 (1947)に記載される。O-アシルウレア形成及びそれに続くアミド結合形成を通して反応するカルボキシル修飾試薬、例えばカルボジイミドも、利用可能である。

【0256】

例えば、追加の反応性または選択性を付与するために、いずれかの部分の官能基を、所望の場合、反応の前に他の官能基に変換してよいことを理解されたい。この目的のために有用な方法の例としては、ジカルボン酸無水物などの試薬を用いるカルボキシルへのアミンの変換、N-アセチルホモシステインチオラクトン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、2-イミノチオラン、またはチオール含有スクシンイミジル誘導体などの試薬を用いるチオールへのアミンの変換、 α -ハロアセテートなどの試薬を用いるカルボキシルへのチオールの変換、エチレンジアミンまたは2-ブロモエチルアミンなどの試薬を用いるアミンへのチオールの変換、カルボジイミド続いてジアミンなどの試薬を用いるアミンへのカルボキシルの変換、ならびに塩化トシルなどの試薬の使用、続いてチオアセテートを用いたエステル交換反応、及び酢酸ナトリウムを用いたチオールへの加水分解による、チオールへのアルコールの変換が挙げられる。

20

【0257】

いわゆる、長さゼロのリンカーは、追加の連結物を導入することなく、一方の部分の反応性化学基と他方の反応性化学基との直接的な共有結合的接合を伴い、所望の場合、本発明に従って使用され得る。

30

【0258】

より一般的には、しかしながら、リンカーは、上記のように、スペーサーエレメントにより接続した2つ以上の反応性部分を含む。かかるスペーサーの存在により、二官能性リンカーをいずれかの部分内の特定の官能基と反応させることが可能となり、2つの間に共有結合的連結がもたらされる。リンカー内の反応性部分は、同一（ホモ二官能性リンカー）または異なってもよく（ヘテロ二官能性リンカー、または、いくつかの非類似反応性部分が存在する場合は、ヘテロ多官能性リンカー）、2つの部分間に共有結合的付着をもたらし得る多様な潜在的試薬を提供する。

40

【0259】

リンカー内のスペーサーエレメントは、典型的には、直鎖または分岐鎖からなり、 C_{1-10} アルキル、 C_{2-10} アルケニル、 C_{2-10} アルキニル、 C_{2-6} ヘテロシクリル、 C_{6-12} アリール、 C_{7-14} アルカリール、 C_{3-10} アルクヘテロシクリル、 C_2-C_{100} ポリエチレングリコール、または C_{1-10} ヘテロアルキルを含み得る。

【0260】

いくつかの例では、リンカーは、式Vにより記される。

本発明のコンジュゲートの調製に有用なホモ二官能性リンカーの例としては、限定されないが、エチレンジアミン、プロピレンジアミン及びヘキサメチレンジアミン、エチレン

50

グリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、1, 4-ブタンジオール、1, 6-ヘキサジオール、シクロヘキサジオール、及びポリカプロラクトンジオールから選択されるジアミン及びジオールが挙げられる。

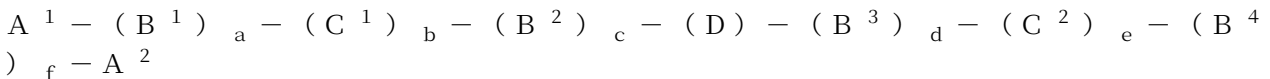
【0261】

いくつかの実施形態では、リンカーは、結合であるか、または炭素、窒素、酸素、硫黄、もしくはリン原子から独立して選択される最大で10個までの原子の直鎖であり、鎖内の各原子は、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、クロロ、ヨード、ブロモ、フルオロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アリーロキシ、カルボキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アシルアミノ、カルボキサミド、シアノ、オキソ、チオ、アルキルチオ、アリールチオ、アシルチオ、アルキルスルホネート、アリールスルホネート、ホスホリル、及びスルホニルから独立して選択される1つまたは複数の置換基を用いて任意選択で置換され、鎖内の任意の2個の原子は、それらに結合した置換基と一緒に環を形成し得、環は、さらに置換され得る及び／または1つもしくは複数の任意選択で置換された炭素環、ヘテロ環、アリール環、またはヘテロアリール環に縮合し得る。

10

【0262】

いくつかの実施形態では、リンカーは、式X I X:



式X I X

20

の構造を有し、

式中、 A^1 は、リンカー及びプレゼンタータンパク質結合部分間の結合であり、 A^2 は、哺乳類標的相互作用部分及びリンカー間の結合であり、 B^1 、 B^2 、 B^3 、及び B^4 は、それぞれ、独立して、任意選択で置換された $C_1 - C_2$ アルキル、任意選択で置換された $C_1 - C_3$ ヘテロアルキル、O、S、及び NR^N から選択され、 R^N は、水素、任意選択で置換された $C_1 - 4$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - 4$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - 4$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - 6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - 12$ アリール、または任意選択で置換された $C_1 - 7$ ヘテロアルキルであり、 C^1 及び C^2 は、それぞれ、独立して、カルボニル、チオカルボニル、スルホニル、またはホスホリルから選択され、a、b、c、d、e、及びfは、それぞれ、独立して、0または1であり、Dは、任意選択で置換された $C_1 - 10$ アルキル、任意選択で置換された $C_2 - 10$ アルケニル、任意選択で置換された $C_2 - 10$ アルキニル、任意選択で置換された $C_2 - 6$ ヘテロシクリル、任意選択で置換された $C_6 - 12$ アリール、任意選択で置換された $C_2 - C_{10}$ ポリエチレングリコール、もしくは任意選択で置換された $C_1 - 10$ ヘテロアルキルであるか、または $A^1 - (B^1)_a - (C^1)_b - (B^2)_c - (B^3)_d - (C^2)_e - (B^4)_f - A^2$ に連結する化学結合である。

30

タンパク質

プレゼンタータンパク質

プレゼンタータンパク質は、低分子に結合して複合体を形成することができ、この複合体は、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）に結合してその活性を調節することができる。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、哺乳類プレゼンタータンパク質（例えば、ヒトプレゼンタータンパク質）である。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、真菌類プレゼンタータンパク質である。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、細菌プレゼンタータンパク質である。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、植物プレゼンタータンパク質である。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、比較的豊富なタンパク質である（例えば、プレゼンタータンパク質は、三分子複合体における関与が、細胞内でのプレゼンタータンパク質の生物学的機能及び／または細胞の生存もしくは他の特質に実質的に悪影響を及ぼさない程度に十分に豊富である）。いくつかの実施形

40

50

態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質よりも豊富である。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、細胞内でシャペロン活性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、細胞内で複数の天然相互作用パートナーを有する。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、低分子に結合して、標的タンパク質に結合してその生物学的活性を調節すると知られているまたはそのように推定される二元複合体を形成することが知られているタンパク質である。イムノフィリンは、これらの機能を有すると知られているプレゼンタータンパク質のクラスであり、FKBP及びシクロフィリンを含む。いくつかの実施形態では、参照プレゼンタータンパク質は、ペプチジルプロリルイソメラーゼ活性を呈する、いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、参照プレゼンタータンパク質に匹敵する活性を示す。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、FKBPファミリーのメンバー（例えば、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP19、FKBP22、FKBP23、FKBP25、FKBP36、FKBP38、FKBP51、FKBP52、FKBP60、FKBP65、及びFKBP133）、シクロフィリンファミリーのメンバー（例えば、PP1A、CYPB、CYP C、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYPL1、CYP60、CYPJ、PPI L4、PPI L6、RANBP2、PPWD1、PPIAL4A、PPIAL4B、PPIAL4C、PPIAL4D、またはPPIAL4G）、またはPIN1である。「FKBPファミリー」は、プロリルイソメラーゼ活性を有するタンパク質のファミリーであり、プロリン残基を含有するタンパク質に対してタンパク質の折りたたみシャペロンとして機能する。このファミリーのタンパク質をコードする遺伝子としては、AIP、AIP L1、FKBP1A、FKBP1B、FKBP2、FKBP3、FKBP4、FKBP5、FKBP6、FKBP7、FKBP8、FKBP9、FKBP9L、FKBP10、FKBP11、FKBP14、FKBP15、及びLOC541473が挙げられる。

【0263】

「シクロフィリンファミリー」は、シクロスポリンに結合するタンパク質のファミリーである。このファミリーのタンパク質をコードする遺伝子としては、PPIA、PPIB、PPI C、PPI D、PPI E、PPI F、PPI G、PPI H、SDCCAG-10、PPI L1、PPI L2、PPI L3、PPI L4、P270、PPWD1、及びCOAS-2が挙げられる。例示的なシクロフィリンとしては、PP1A、CYPB、CYP C、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYPL1、CYP60、CYPJ、PPI L4、PPI L6、RANBP2、PPWD1、PPIAL4A、PPIAL4B、PPIAL4C、PPIAL4D、及びPPIAL4Gが挙げられる。

【0264】

いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、シャペロンタンパク質、例えばGRP78/BiP、GRP94、GRP170、カルネキシン、カルレティキュリン、HSP47、ERp29、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)、及びERp57である。

【0265】

いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、本明細書に開示のFKBPまたはシクロフィリンの対立遺伝子変異体またはスプライス変異体である。

いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質は、アミノ酸配列が、i) 参照プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列との有意な同一性を示す、ii) 参照プレゼンタータンパク質の対応する部位との有意な同一性を示す部位を含む、及び/またはiii) プレゼンタータンパク質に見いだされる少なくとも1つの特徴的配列を含む、ポリペプチドである。多くの実施形態では、同一性は、それが、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を超える、またはそれより高い場合に、プレゼンタータンパク質の定義上「有意」とであるとみなされる。いくつかの実施形態では、有意な同

一性を示す部位は、少なくとも 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、300、350、450、500、550、600 個のアミノ酸またはそれ以上の長さを有する。

【0266】

代表的なプレゼンタータンパク質は、表 1 に列挙された遺伝子またはそのホモログによりコードされる、いくつかの実施形態では、参照プレゼンタータンパク質は、表 1 に示される遺伝子セットによりコードされる。また、当業者であれば、表 1 を参照して、一般にプレゼンタータンパク質、及び／またはプレゼンタータンパク質の特定のサブセットに特徴的な配列を容易に同定することができる。

【0267】

【表 1】

表1. 選択されたプレゼンタータンパク質をコードする遺伝子

遺伝子名称	Uniprot受託番号
AIP	O00170
AIP L1	Q9NZN9
FKBP1A	P62942
FKBP1B	P68106
FKBP2	P26885
FKBP3	Q00688
FKBP4	Q02790
FKBP5	Q13451
FKBP6	O75344
FKBP7	Q9Y680
FKBP8	Q14318
FKBP9	O95302
FKBP9L	Q75LS8
FKBP10	Q96AY3
FKBP11	Q9NYL4
FKBP14	Q9NWM8
FKBP15	Q5T1M5
LOC541473	—
PPIA	Q567Q0
PPIB	P23284
PPIC	P45877
PPID	Q08752
PPIE	Q9UNP9
PIIG	Q13427
PPIH	O43447
PPIL1	Q9Y3C6
PPIL2	Q13356
PPIL3	Q9H2H8
PPIL4	Q8WUA2
PPIL5	Q32Q17
PPIL6	Q8IXY8
PPWD1	Q96BP3

10

20

30

40

標的タンパク質

標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）は、疾患状態または疾患状態の症状を媒介するタンパク質である。このため、その活性を調節（阻害または増加）することにより、望ましい治療効果を達成することができる。本発明の複合体及び方法に有用な標的タンパク質としては、プレゼンタータンパク質と天然では会合しないもの、例えば、本発明の化合物との二元複合体の不在下でプレゼンタータ

50

ンパク質に対して、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 超、好ましくは $5\text{ }\mu\text{M}$ 超、より好ましくは $10\text{ }\mu\text{M}$ 超の親和性を有するものが挙げられる。あるいは、プレゼンタータンパク質と天然では会合しない標的タンパク質は、二元複合体の不在下で本発明の化合物に対して、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 超、好ましくは $5\text{ }\mu\text{M}$ 超、より好ましくは $10\text{ }\mu\text{M}$ 超の親和性を有するものである。他の代替では、プレゼンタータンパク質と天然では会合しない標的タンパク質は、シクロスポリン、ラパマイシン、またはFK506とプレゼンタータンパク質（例えば、FKBP）との二元複合体に対して、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 超、好ましくは $5\text{ }\mu\text{M}$ 超、より好ましくは $10\text{ }\mu\text{M}$ 超の親和性を有するものである。さらに別の代替では、プレゼンタータンパク質と天然では会合しない標的タンパク質は、カルシニューリンやmTOR以外のものである。本発明の複合体及び方法に好適な標的タンパク質の選択は、プレゼンタータンパク質に依存し得る。例えば、シクロフィリンに対して低親和性を有する標的タンパク質は、FKBPに対して高親和性を有し得、後者と一緒には使用されないであろう。

【0268】

標的タンパク質は、天然に生じる、例えば、野生型であることができる。あるいは、標的タンパク質は、野生型タンパク質とは異なり得るが、例えば、対立遺伝子変異体、スプライス突然変異体、または生物学的に活性なフラグメントとして、生物学的機能を依然として維持する。

【0269】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、膜貫通タンパク質である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、コイルドコイル構造を有する。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、二量体複合体の一方のタンパク質である。

【0270】

いくつかの実施形態では、本発明の標的タンパク質は、1つまたは複数の表面部位（例えば、平坦表面部位）を含み、プレゼンタータンパク質／化合物複合体の形成の不在下で、低分子が、典型的に、その部位（複数可）に対して低いまたは検出不可能な結合を示すことを特徴とする。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1つまたは複数の表面部位（例えば、平坦表面部位）を含み、プレゼンタータンパク質／化合物複合体の形成の不在下で、それに対して特定の低分子（例えば、化合物）が、低いまたは検出不可能な結合（例えば、同一の化合物を含むプレゼンタータンパク質／化合物複合体で観察される結合の少なくとも $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、 $1/20$ 、 $1/30$ 、 $1/40$ 、 $1/50$ 、 $1/100$ 、またはそれ以下の結合）を示す。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、任意の従来型の結合ポケット、例えば、1個または複数の低分子により活性が調節されているタンパク質に匹敵する生理化学的及び／または幾何学的な特性を有するタンパク質構造上のキャビティまたはポケットが欠如した1つまたは複数の部位を特徴とする表面（いくつかの実施形態では、表面全体）を有する。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、従来型の結合ポケット及びタンパク質－タンパク質相互作用のための部位を有する。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、アンドラッグアブル標的であり、例えば、標的タンパク質は、薬物により標的されると知られているタンパク質のメンバーではない及び／または低分子への結合に好適であると予想される（例えば、本明細書に記載のように、当該技術分野で受け入れられている理解に従う）結合部位を有さない。いくつかの実施形態では、タンパク質は、少なくとも1つの反応性システインを含む。

【0271】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、GTPアーゼ、例えばDIRAS1、DIRAS2、DIRAS3、ERAS、GEM、HRAS、KRAS、MRAS、NKIRAS1、NKIRAS2、NRAS、RALA、RALB、RAP1A、RAP1B、RAP2A、RAP2B、RAP2C、RASD1、RASD2、RASL10A、RASL10B、RASL11A、RASL11B、RASL12、REM1、REM2、REGG、RERGL、RRAD、RRAS、RRAS2、RHOA、RHOB、RHOBTB1、RHOBTB2、RHOBTB3、RHOC、RHOD、RHOF、RHOG、

RHOH、RHOJ、RHOQ、RHOV、RND1、RND2、RND3、RAC1、RAC2、RAC3、CDC42、RAB1A、RAB1B、RAB2、RAB3A、RAB3B、RAB3C、RAB3D、RAB4A、RAB4B、RAB5A、RAB5B、RAB5C、RAB6A、RAB6B、RAB6C、RAB7A、RAB7B、RAB7L1、RAB8A、RAB8B、RAB9、RAB9B、RABL2A、RABL2B、RABL4、RAB10、RAB11A、RAB11B、RAB12、RAB13、RAB14、RAB15、RAB17、RAB18、RAB19、RAB20、RAB21、RAB22A、RAB23、RAB24、RAB25、RAB26、RAB27A、RAB27B、RAB28、RAB2B、RAB30、RAB31、RAB32、RAB33A、RAB33B、RAB34、RAB35、RAB36、RAB37、RAB38、RAB39、RAB39B、RAB40A、RAB40AL、RAB40B、RAB40C、RAB41、RAB42、RAB43、RAP1A、RAP1B、RAP2A、RAP2B、RAP2C、ARF1、ARF3、ARF4、ARF5、ARF6、ARL1、ARL2、ARL3、ARL4、ARL5、ARL5C、ARL6、ARL7、ARL8、ARL9、ARL10A、ARL10B、ARL10C、ARL11、ARL13A、ARL13B、ARL14、ARL15、ARL16、ARL17、TRIM23、ARL4D、ARFRP1、ARL13B、RAN、RHEB、RHEBL1、RRAD、GEM、REM、REM2、RIT1、RIT2、RHOT1、またはRHOT2である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、GTPアーゼ活性化タンパク質、例えばNF1、IQGAP1、PLEXIN-B1、RASAL1、RASAL2、ARRHGAP5、ARRHGAP8、ARRHGAP12、ARRHGAP22、ARRHGAP25、BCR、DLC1、DLC2、DLC3、GRAF、RALBP1、RAP1GAP、SIPA1、TSC2、AGAP2、ASAP1、またはASAP3である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、グアニンヌクレオチド交換因子、例えばCNRASGEF、RASGEF1A、RASGRF2、RASGRP1、RASGRP4、SOS1、RALGDS、RGL1、RGL2、RGR、ARRHGEF10、ASEF/ARRHGEF4、ASEF2、DBS、ECT2、GEF-H1、LARG、NET1、OBSCURIN、P-REX1、P-REX2、PDZ-RHOGEF、TEM4、TIAM1、TRIO、VAV1、VAV2、VAV3、DOCK1、DOCK2、DOCK3、DOCK4、DOCK8、DOCK10、C3G、BIG2/ARFGEF2、EFA6、FBX8、またはGEP100である。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、タンパク質-タンパク質相互作用ドメインを有するタンパク質、例えばARM、BAR、BEACH、BH、BIR、BRCT、BROMO、BTB、C1、C2、CARD、CC、CALM、CH、CHROMO、CUE、DEATH、DED、DEP、DH、EF-hand、EH、ENTH、EVH1、F-box、FERM、FF、FH2、FHA、FYVE、GAT、GEL、GLUE、GRAM、GRIP、GYF、HEAT、HECT、IQ、LRR、MBT、MH1、MH2、MIU、NZF、PAS、PB1、PDZ、PH、POLO-Box、PTB、PUF、PWWP、PX、RGS、RING、SAM、SC、SH2、SH3、SOCS、SPRY、START、SWIRM、TIR、TPR、TRAF、SNARE、TUBBY、TUDOR、UBA、UEV、UIM、VHL、VHS、WD40、WW、SH2、SH3、TRAF、プロモドメイン、またはTPRである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、熱ショックタンパク質、例えばHsp20、Hsp27、Hsp70、Hsp84、アルファBクリスチリン、TRAP-1、hsf1、またはHsp90である。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、イオンチャネル、例えばCav2.2、Cav3.2、IKACH、Kv1.5、TRPA1、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、P2X3、またはP2X4である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、コイルドコイルタンパク質、例えばジェミニン、SPAG4、VAV1、MAD1、ROCK1、RNF31、NEDP1、HCCM、EEA1、ピメンチン、ATF4、Nemo、SNAP25、シンタキシン1a、FYCO1、またはCEP250である。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は

10

20

30

40

50

、キナーゼ、例えばサイクリンD1、ABL、ALK、AXL、BTK、EGFR、FMS、FAK、FGFR1、2、3、4、FLT3、HER2／Erbb2、HER3／Erbb3、HER4／Erbb4、IGF1R、INSR、JAK1、JAK2、JAK3、KIT、MET、PDGFRA、PDGFRB、RETRO、ROR1、ROR2、ROS、SRC、SYK、TIE1、TIE2、TRKA、TRKB、KDR、AKT1、AKT2、AKT3、PDK1、PKC、RHO、ROCK1、RSK1、RKS2、RKS3、ATM、ATR、CDK1、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8、CDK9、CDK10、ERK1、ERK2、ERK3、ERK4、GSK3A、GSK3B、JNK1、JNK2、JNK3、AurA、AurB、PLK1、PLK2、PLK3、PLK4、IKK、KIN1、cRaf、PKN3、c-Src、Fak、PyK2、またはAMPKである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ホスファターゼ、例えばWIP1、SHP2、SHP1、PRL-3、PTP1B、またはSTEPである。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、ユビキチンまたはユビキチン様タンパク質（例えばNEDD8、ATG8タンパク質、SUMOタンパク質、ISG15）、活性化酵素（E1のもの、例えばUBA1、UBA2、UBA3、UBA5、UBA6、UBA7、ATG7、NAE1、SAE1）、コンジュゲーション酵素（E2のもの、例えばUBEタンパク質、ATG3、BIRC6）、ライゲーション酵素（E3のもの、例えばBMI-1、MDM2、NEDD4-1、ベーターTRCP、SKP2、E6AP、CBL-B、またはAPC／C）、及びユビキチンまたはユビキチン様タンパク質プロテアーゼである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、クロマチン修飾因子／再構成因子、例えば遺伝子BRG1、BRM、ATRX、PRDM3、ASH1L、CBP、KAT6A、KAT6B、MLL、NSD1、SETD2、EP300、KAT2A、またはCREBBPによりコードされるクロマチン修飾因子／再構成因子である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、転写因子、例えば遺伝子EHF、ELF1、ELF3、ELF4、ELF5、ELK1、ELK3、ELK4、ERF、ERG、ETS1、ETV1、ETV2、ETV3、ETV4、ETV5、ETV6、FEV、FLI1、GAVPA、SPDEF、SPI1、SPIC、SPIB、E2F1、E2F2、E2F3、E2F4、E2F7、E2F8、ARNTL、BHLHA15、BHLHB2、BHLHB3、BHLHE22、BHLHE23、BHLHE41、CLOCK、FIGLA、HAS5、HES7、HEY1、HEY2、ID4、MAX、MESP1、MLX、MLXIP、MNT、MSC、MYF6、NEUROD2、NEUROG2、NHLH1、OLIG1、OLIG2、OLIG3、SREBF2、TCF3、TCF4、TFAP4、TFE3、TFEB、TFEC、USF1、ARF4、ATF7、BATF3、CEBPB、CEBPD、CEBPG、CREB3、CREB3L1、DBP、HLF、JDP2、MAFF、MAFG、MAFK、NRL、NFE2、NFIL3、TEF、XBP1、PROX1、TEAD1、TEAD3、TEAD4、ONECUT3、ALX3、ALX4、ARX、BARHL2、BARX、BSX、CART1、CDX1、CDX2、DLX1、DLX2、DLX3、DLX4、DLX5、DLX6、DMBX1、DPRX、DRGX、DUXA、EMX1、EMX2、EN1、EN2、ESX1、EVX1、EVX2、GBX1、GBX2、GSC、GSC2、GSX1、GSX2、HESX1、HMX1、HMX2、HMX3、HNF1A、HNF1B、HOMEZ、HOXA1、HOXA10、HOXA13、HOXA2、HOXAB13、HOXB2、HOXB3、HOXB5、HOXC10、HOXC11、HOXC12、HOXC13、HOXD11、HOXD12、HOXD13、HOXD8、IRX2、IRX5、ISL2、ISX、LBX2、LHX2、LHX6、LHX9、LMX1A、LMX1B、MEIS1、MEIS2、MEIS3、MEOX1、MEOX2、MIXL1、MNX1、MSX1、MSX2、NKX2-3、NKX2-8、NKX3-1、NKX3-2、NKX6-1、NKX6-2、NOTO、ONECUT1、ONECUT2、OTX1、OTX2、PDX1、PHOX2A、PHOX2B、PITX1、PITX3、PKNOX1、PROP1、PRRX1、PRRX2、RAX、RAXL1、RHOXF1

、SHOX、SHOX2、TGIF1、TGIF2、TGIF2LX、UNCX、VAX1、VAX2、VENTX、VSX1、VSX2、CUX1、CUX2、POU1F1、POU2F1、POU2F2、POU2F3、POU3F1、POU3F2、POU3F3、POU3F4、POU4F1、POU4F2、POU4F3、POU5F1P1、POU6F2、RFX2、RFX3、RFX4、RFX5、TFAP2A、TFAP2B、TFAP2C、GRHL1、TFCP2、NFIA、NFIB、NFIX、GCM1、GCM2、HSF1、HSF2、HSF4、HSFY2、EBF1、IRF3、IRF4、IRF5、IRF7、IRF8、IRF9、MEF2A、MEF2B、MEF2D、SRF、NRF1、CPEB1、GMEB2、MYBL1、MYBL2、SMAD3、CENPB、PAX1、PAX2、PAX9、PAX3、PAX4、PAX5、PAX6、PAX7、BCL6B、EGR1、EGR2、EGR3、EGR4、GLIS1、GLIS2、GLI2、GLIS3、HIC2、HINFP1、KLF13、KLF14、KLF16、MTF1、PRDM1、PRDM4、SCRT1、SCRT2、SNAI2、SP1、SP3、SP4、SP8、YY1、YY2、ZBED1、ZBTB7A、ZBTB7B、ZBTB7C、ZIC1、ZIC3、ZIC4、ZNF143、ZNF232、ZNF238、ZNF282、ZNF306、ZNF410、ZNF435、ZBTB49、ZNF524、ZNF713、ZNF740、ZNF75A、ZNF784、ZSCAN4、CTCF、LEF1、SOX10、SOX14、SOX15、SOX18、SOX2、SOX21、SOX4、SOX7、SOX8、SOX9、SRY、TCF7L1、FOXO3、FOXB1、FOXC1、FOXC2、FOXD2、FOXD3、FOXG1、FOXI1、FOXJ2、FOXJ3、FOXK1、FOXL1、FOXO1、FOXO4、FOXO6、FOXP3、EOMES、MGA、NFAT5、NFATC1、NFKB1、NFKB2、TP63、RUNX2、RUNX3、T、TBR1、TBX1、TBX15、TBX19、TBX2、TBX20、TBX21、TBX4、TBX5、AR、ESR1、ESRRA、ESRRB、ESRRG、HNF4A、NR2C2、NR2E1、NR2F1、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A2、RARA、RARB、RARG、RORA、RXRA、RXRB、RXRG、THRA、THRB、VDR、GATA3、GATA4、もしくはGATA5によりコードされる転写因子、またはC-myc、Max、Stat3、Stat4、Stat6、アンドロゲン受容体、C-Jun、C-Fox、N-Myc、L-Myc、MITF、Hif-1アルファ、Hif-2アルファ、Bcl6、E2F1、NF-カッパB、Stat5、またはER(coact)である。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、TrkA、P2Y14、mPEGS、ASK1、ALK、Bcl-2、BCL-XL、mSIN1、RORγt、IL17RA、eIF4E、TLR7R、PCSK9、IgER、CD40、CD40L、Shn-3、TNFR1、TNFR2、IL31RA、OSMR、IL12ベータ1、2、Tau、FASN、KCTD6、KCTD9、Raptor、Rictor、RALGAPA、RALGAPB、アネキシンファミリーメンバー、BCOR、NCOR、ベータカテニン、AAC11、PLD1、PLD2、Frizzled7、RaLP、MLL-1、Myb、Ezh2、RhoGD12、EGFR、CTLA4R、GCGC(coact)、アディポネクチンR2、GPR81、IMPDH2、IL-4R、IL-13R、IL-1R、IL2-R、IL-6R、IL-22R、TNF-R、TLR4、MyD88、Keap1、またはNr1p3である。

10

20

30

40

タンパク質変異体

タンパク質またはポリペプチド変異体は、本明細書に記載する場合、概して、参照ポリペプチド（例えば、本明細書に記載のプレゼンタータンパク質または標的タンパク質、例えば例として哺乳類プレゼンタータンパク質または標的タンパク質）のアミノ酸配列と有意な（例えば、80%以上、すなわち、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上）同一性を示すが、参照ポリペプ

50

チドに対して限られた数の特定のアミノ酸変化（例えば、保存的または非保存的な、挿入、欠失または置換、及び／または1つもしくは複数のアミノ酸変異体もしくは類似体（例えば、D-アミノ酸、デスアミノ酸）を含む、アミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、変異体は、関連する生物学的活性（例えば、特定の化合物またはその部分への結合）を参照ポリペプチドと共有する、いくつかのかかる実施形態では、変異体は、かかる活性を、参照ポリペプチドのその約50%以上のレベルで及び／または参照ポリペプチドのその約0.5倍低いのを下回らないレベルで呈する。

【0272】

いくつかの実施形態では、変異体ポリペプチドは、少なくとも（または唯一）、変異体がより多数のシステイン残基を有する及び／または1個または複数のシステイン残基を参照ポリペプチド内の非システイン残基に対応する位置にて有するという点において参照ポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、プレゼンタータンパク質の及び／または標的タンパク質の）ポリペプチドのいずれかのアミノまたはカルボキシ末端への1個または複数のシステイン残基の付加は、かかるポリペプチドのコンジュゲーションを、例えば、ジスルフィド結合により促進することができる。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、保存的（すなわち、残基を、同じ属タイプまたは群の別の残基により置き換える）または非保存的（すなわち、残基を、別のタイプのアミノ酸により置き換える）であることができる。いくつかの実施形態では、天然に生じるアミノ酸は、天然には生じないアミノ酸に置換することができ（すなわち、天然には生じない保存的アミノ酸置換または天然には生じない非保存的アミノ酸置換）、逆も同様である。

【0273】

合成的に作製されたポリペプチドは、DNAによって天然にコードされないアミノ酸（例えば、天然には生じないアミノ酸または非天然アミノ酸）の置換を含むことができる。天然には生じないアミノ酸の例としては、D-アミノ酸、アジド含有側鎖を有するアミノ酸、システインの硫黄原子に付着したアセチルアミノメチル基を有するアミノ酸、ペグ化アミノ酸、式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ （式中、 n は、2～6である）のオメガアミノ酸、中性非極性アミノ酸、例えばサルコシン、 α -ブチルアラニン、 α -ブチルグリシン、 N -メチルイソロイシン、及びノルロイシンが挙げられる。フェニルグリシンは、Trp、Tyr、またはPheを置き換えてよく、シトルリン及びメチオニンスルホキシドは、中性非極性であり、システイン酸は、酸性であり、オルニチンは、塩基性である。プロリンは、ヒドロキシプロリンを用いて置換され得、特性を与える立体配座を保持し得る。

【0274】

類似体は、置換型突然変異誘発によって生成され得、元来のタンパク質の構造（例えば、局所的構造または全体構造）を保持し得る。「保存的置換」として同定される置換の例は、表2に示す。このような置換が望ましくない変化をもたらす場合、表2において「例示的な置換」と称される、またはアミノ酸クラスに関連して本明細書にさらに記載されるような、他のタイプの置換が導入され、生成物がスクリーニングされる。

【0275】

機能または免疫学的同一性における実質的な修飾は、（a）例えば、シートもしくはらせん状の立体配座としての、置換の領域におけるタンパク質骨格の構造、（b）標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または（c）側鎖のバルクを維持することに対するそれらの効果において有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に生じる残基は、共通の側鎖特性に基づいて群に分類される：

- （1）疎水性：ノルロイシン、メチオニン（Met）、アラニン（Ala）、バリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、ヒスチジン（His）、トリプトファン（Trp）、チロシン（Tyr）、フェニルアラニン（Phe）、
- （2）中性親水性：システイン（Cys）、セリン（Ser）、トレオニン（Thr）
- （3）酸性／負電荷：アスパラギン酸（Asp）、グルタミン酸（Glu）
- （4）塩基性：アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、ヒスチジン（His）

、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)
 (5) 鎖の配向に影響する残基：グリシン (Gly)、プロリン (Pro)、
 (6) 芳香族：トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe)、ヒスチジン (His)、
 (7) 極性：Ser、Thr、Asn、Gln
 (8) 塩基性正電荷：Arg、Lys、His、及び、
 (9) 電荷：Asp、Glu、Arg、Lys、His
 他のアミノ酸置換は、表 2 に列挙する。

【0276】

【表 2】

表 2. アミノ酸置換

元来の残基	例示的な置換	保存的置換
Ala (A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	Gln、His、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、 ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン、Ile、Val、Met、 Ala、Phe	Ile
Lys (K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、 ノルロイシン	Leu

変化した反応性アミノ酸プロファイルを有するタンパク質変異体

いくつかの実施形態では、タンパク質またはポリペプチド変異体は、1 個または複数の反応性アミノ酸残基（例えば、システイン）のタンパク質への（例えば、本明細書に記載のタンパク質のいずれかのアミノまたはカルボキシ末端での）付加を含んでよく、例えば、ジスルフィド結合によるこれらのタンパク質のコンジュゲーションを促進することができる。いくつかの実施形態では、1 個または複数の反応性アミノ酸（例えば、システイン）を除去して、タンパク質上の潜在的なコンジュゲーション部位の数を低減させ得る。アミノ酸置換は、保存的（すなわち、残基を、同じ属タイプまたは群の別の残基により置き

換える)または非保存的(すなわち、残基を、別のタイプのアミノ酸により置き換える)であることができる。加えて、天然に生じるアミノ酸は、天然には生じないアミノ酸に置換することができる(すなわち、天然には生じない保存的アミノ酸置換または天然には生じない非保存的アミノ酸置換)。

【0277】

当該技術分野で公知であるように、例えば、Chin, J. W., *Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals*, *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 83: 379-408に記載のように、非天然アミノ酸は、*in vitro*で作製されたタンパク質へと組み込まれ得る。例えば、1つの系において、UAGアンバー(停止)コドンを使用して、古細菌tRNA合成酵素及びtRNAを介してピロリジンを組み込んでおり、これらを使用して、摂食を介してアジド及びアルキンを組み込むこともできる。当該技術分野で示されてきた非天然アミノ酸上の他の側鎖には、シクロプロペン、trans-シクロオクテン、ビシクロ[6.1.0]ノニールリジン、クマリン、p-アジドフェニルアラニン、N6-[(2-プロピロキシ)カルボニル]-L-リジン、ビシクロ[6.1.0]ノナ-4-イン-9-イルメタノール(BCN)、N-5-ノルボルネン-2-イルオキシカルボニル-L-リジン、N-tert-ブチルオキシカルボニル-L-リジン、N-2-アジドエチルオキシカルボニル-L-リジン、N-L-チアプロリル-L-リジン、N-D-システニル-L-リジン、N-L-システニル-L-リジン、N6-[(2-プロピニルオキシ)カルボニル]-L-リジン、N6-[(2-アジドエトキシ)カルボニル]-L-リジン、ベンゾフェノン、4-(6-メチル-s-テトラジン-3-イル)アミノフェニルアラニン、及びシクロオクテンが含まれる。

複合体

天然に生じるタンパク質-タンパク質相互作用では、結合事象は、典型的には、相互作用タンパク質の平坦表面部位上の疎水性残基により主に推進され、これは、タンパク質上のキャビティまたはポケット内の低分子間の相互作用により推進される多くの低分子-タンパク質相互作用とは対照的である。一般に、タンパク質の平坦表面部位上の疎水性残基は、疎水性ホットスポットを形成し、ここで、相互作用タンパク質の間のまたは中の結合相互作用の大部分は、ファンデルワールス相互作用である。一部の状況では、低分子は、例えば、タンパク質(例えば、プレゼンタータンパク質)上の疎水性相互作用部位に関与するか、またはこれを生成し、低分子が不在ではこのようなものは存在しないという点で、「ポータブルホットスポット」(またはその部位)を提供し得る、本開示の態様は、このような状況に特に適用可能である。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載のような化合物(及び/またはそのタグ付き形態)は、タンパク質と複合体(例えば、プレゼンタータンパク質/化合物複合体)を形成し、疑似タンパク質-タンパク質相互作用(例えば、標的タンパク質との三分子複合体の形成)に関与する。

【0278】

多くの哺乳類タンパク質は、複数の異なるパートナーのいずれかに結合可能であり、いくつかの場合には、かかる代替結合相互作用は、タンパク質の生物学的活性に寄与する。こうしたタンパク質の多くは、ホットスポットタンパク質領域の固有可変性に適合してさまざまな構造状況で同一の残基を提示する。より具体的には、タンパク質-タンパク質相互作用は、真菌類及び細菌種の選択群により生成される天然生成物のクラスにより媒介することができる。これらの分子は、共通の構造組織及び、タンパク質-タンパク質相互作用を調節する能力を提供する、結果得られる機能の両方を呈する。これらの分子は、高度に保存されたプレゼンタータンパク質結合部分及び異なる天然生成物間で高度の可変性を呈する標的タンパク質相互作用部分を含有する。プレゼンタータンパク質結合部分は、プレゼンタータンパク質に対する特異性を付与し、分子をプレゼンタータンパク質に結合させて複合体を形成させる、哺乳類標的タンパク質結合部分は、標的タンパク質に対する特異性を付与し、二元複合体を標的タンパク質に結合させて、典型的にはその活性を調節す

る（例えば、正または負に調節する）。本発明において、二元複合体（例えば、化合物及びプレゼンタータンパク質間、または化合物及び標的タンパク質間）は、標的タンパク質へとプレゼンタータンパク質結合部分をコンジュゲートするか、またはプレゼンタータンパク質へと標的タンパク質結合部分をコンジュゲートすることによって模倣される。結果得られた本発明のコンジュゲートは、次いで、プレゼンタータンパク質または標的タンパク質に結合し、三分子複合体を模倣する複合体を形成し得る。これらの複合体は、例えば、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間の界面の構造を決定するために使用され得る。さらに、複合体の形成を単純化することによって、例えば、プレゼンタータンパク質結合部分を標的タンパク質にコンジュゲートすることによって、本発明の化合物は、例えば、プレゼンタータンパク質に結合することができる標的タンパク質を同定するために使用され得る。

10

用途

標的タンパク質の同定

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、及び／または方法は、プレゼンタータンパク質と（例えば、低分子の存在下で）複合体を形成することができる標的タンパク質を同定するのに有用であり得る。標的タンパク質は、標的部分にコンジュゲートしたプレゼンタータンパク質結合部分を含むコンジュゲートの形成、及び該コンジュゲートがプレゼンタータンパク質と複合体を形成するか否かを決定することによって同定され得る。

20

【0279】

プレゼンタータンパク質及び低分子と三元複合体を形成する当該技術分野で公知の標的タンパク質の大半は、低分子の作用機序の決定の間に幸運にも同定された。本方法は、プレゼンタータンパク質結合部分を標的分子に共有結合的にコンジュゲートし、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質の両方に同時に結合することができる化合物の同定の前に複合体の形成を可能とすることにより、低分子の存在下でプレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質の合理的な同定を可能とする。

【0280】

次いで、プレゼンタータンパク質及び同定された標的タンパク質間での複合体形成を促進するその能力に関する低分子のスクリーニングを実行して、標的タンパク質の生物学的活性を調節することができる潜在的な治療薬を同定することができる。

30

【0281】

いくつかの実施形態では、本発明の化合物を使用して、プレゼンタータンパク質と複合体を形成することができる標的タンパク質を同定し得る。例えば、標的タンパク質は、本発明の化合物の存在下で、プレゼンタータンパク質／標的タンパク質複合体の形成を可能とする条件下で、1つまたは複数の標的タンパク質と、標識されたプレゼンタータンパク質（例えば、ビオチンで標識）とを組み合わせることによって同定され得る。プレゼンタータンパク質と複合体を形成しない標的タンパク質は、次いで、除去（例えば、洗い流し）され得、複合体を形成する標的タンパク質は、次いで、プレゼンタータンパク質上の標識を使用してプルダウンし、分析され得る。いくつかの実施形態では、プルダウンした標的タンパク質は、質量分析法によって分析して、これらの同一性を決定され得る。

40

化合物設計

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、及び／または方法は、疾患の処置において使用するための標的タンパク質の生物学的活性を調節することができる化合物の設計に有用であり得る。

【0282】

例えば、本発明のプレゼンタータンパク質及びコンジュゲートの複合体の形成は、複合体の結晶化及び結晶構造決定により、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間のタンパク質－タンパク質界面の構造の決定を容易にすることができる。本発明の複合体の結晶構造が決定されると、合理的な薬物設計のための当該技術分野において公知の方法、例えば、構造を *de novo* で構築する計算機化学方法及び／または本発明の複合体の結

50

晶のフラグメント浸漬、結果得られた構造の決定などの方法を使用したフラグメントベースの薬物設計を使用して、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質間の複合体形成を促進することができる低分子を開発し得る。

【0283】

上記のように設計された化合物は、次いでスクリーニングされて、標的タンパク質の生物学的活性を調節するその能力を決定され得る、及び、必要に応じて、医薬品化学技術を使用して改変されて、治療的に有用な化合物を生成し得る。

共有結合的低分子治療薬の同定

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、及び／または方法は、共有結合的相互作用を通して標的タンパク質の生物学的活性を調節することができる化合物を同定するのに有用であり得る。

10

【0284】

例えば、本発明の化合物は、プレゼンタータンパク質の存在下でのみ標的タンパク質に選択的に結合することができる化合物を同定するために、プレゼンタータンパク質の存在下及び非存在下で標的タンパク質に共有結合的に結合するその能力に関してスクリーニングされ得る。これらの化合物は、次いで、標的タンパク質の生物学的活性を調節するその能力について検査され、必要に応じて、医薬品化学技術を使用して改変されて、治療的に有用な化合物を生成し得る。

生物化学及び／または生物物理学の特性の決定

いくつかの実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、及び／または方法は、タンパク質または複合体の生物化学及び／または生物物理学の特性の決定に有用であり得る。

20

【0285】

例えば、プレゼンタータンパク質結合部分及び標的タンパク質を含むコンジュゲートならびにプレゼンタータンパク質間の結合の自由エネルギーは、例えば、等温滴定型熱量測定により決定され得る。プレゼンタータンパク質結合部分及び標的タンパク質を含むコンジュゲートのプレゼンタータンパク質に関する K_d は、例えば、表面プラズモン共鳴により決定され得る。化合物及びプレゼンタータンパク質の標的タンパク質に関する K_i 、 $K_{i\text{ n a c t}}$ 、及び／または $K_i / K_{i\text{ n a c t}}$ は、例えば、質量分析により決定され得る。

30

疾患または障害の処置

本明細書に記載の化合物、コンジュゲート、及び複合体は、本明細書に記載の標的タンパク質に関連する疾患または障害を処置する方法において有用であり得、理論により束縛されないが、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質との相互作用を通して、標的タンパク質（例えば、真核生物標的タンパク質、例えば哺乳類標的タンパク質もしくは真菌類標的タンパク質または原核生物標的タンパク質、例えば細菌標的タンパク質）の活性を調節する（例えば、正にまたは負に調節する）能力を通してその望ましい効果を発揮すると考えられている。

キット

いくつかの実施形態では、本発明は、本発明に係る方法を好都合に及び効果的に実施するためのキットに関する。一般に、医薬パックまたはキットは、本発明の医薬組成物の成分のうちの1つまたは複数が入った1つまたは複数の容器を含む。かかるキットは、錠剤やカプセル剤などの固形経口製剤の送達にとりわけ適している。かかるキットは、好ましくは、いくつかの単位投与量を含み、その意図される使用順序に沿った投与量を記したカードも含み得る。所望により、例えば、対象がアルツハイマー病に罹患している場合、例えば、数字、文字、もしくは他の表示の形式で、または投与量を投与することができる日程を処置スケジュール内で指定するカレンダーの挿入を伴って、記憶の補助を提供することができる。あるいは、プラセボ投与量、またはカルシウム食事サプリメントを、医薬組成物の投与量に類似したまたはそれとは異なる形で含めて、投与量が毎日摂取されるキットを提供することができる。かかる容器（複数可）に任意選択で付随するものは、医

40

50

薬品の製造、使用、または販売を規制する政府機関により指定された形態の注意書きであることができ、この注意書きは、ヒト投与に関する製造、使用、または販売が監督官庁により認可されたことを反映するものである。

医薬組成物

ヒト及び動物対象の処置としての使用に関して、本発明の化合物及びコンジュゲートは、医薬組成物または獣医学組成物として製剤化することができる。処置される対象、投薬の様式、望ましい処置のタイプ、例えば、防止、予防、または治療、に依存して、化合物は、これらのパラメータに合致した方法で製剤化される。かかる技術の概要は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (2005)、及びEncyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New Yorkに見いだされ、このそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0286】

本明細書に記載の化合物は、組成物の全重量の1～95重量%の合計量で存在し得る。組成物は、関節内、経口、非経口（例えば、静脈内、筋肉内）、経直腸、皮膚、皮下、局所、経皮、舌下、経鼻、経腔、小胞内、尿道内、髄腔内、硬膜外、経耳、または経眼の投与に、あるいは注射、吸入、または鼻、泌尿生殖器、生殖器、もしくは口腔粘膜との直接接触による投与に好適な剤形にて提供され得る。ゆえに、医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、懸濁剤、エマルジョン剤、溶液剤、ヒドロゲル剤を含むゲル剤、ペースト剤、軟膏剤、クリーム剤、硬膏剤、ドレンチ剤、浸透圧送達デバイス、坐剤、浣腸剤、注射剤、インプラント、スプレー剤、イオン泳動送達に好適な調製物、またはエアロゾル剤の形をとり得る。組成物は、従来の薬務に従って製剤化され得る。

20

【0287】

一般に、処置での使用に関しては、本明細書に記載の化合物は、単独で、または1つもしくは複数の他の活性剤と組み合わせて使用され得る。本明細書に記載の化合物と組み合わせる他の医薬品の例としては、同じ適応症の処置のための医薬品が挙げられるだろう。本明細書に記載の化合物と組み合わせる考え得る医薬品の別の例としては、異なるとはいえ付随するまたは関連する症状または適応症の処置のための医薬品が挙げられるだろう。投与の様式に依存して、化合物は、容易な送達を可能とするのに好適な組成物へと製剤化される。併用療法の各化合物は、当該技術分野で公知のさまざまな方法にて製剤化され得る。例えば、併用療法の第一及び第二の作用物質は、一緒にまたは別々に製剤化され得る。望ましくは、第一及び第二の作用物質は、作用物質の同時投与またはほぼ同時投与のために一緒に製剤化される。

30

【0288】

本発明の化合物は、当該技術分野で周知のように、有効量の本明細書に記載の化合物及び薬学的に許容され得る担体または賦形剤を含む医薬組成物として調製及び使用され得る。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも2種の異なる薬学的に許容され得る賦形剤または担体を含む。

40

【0289】

製剤は、全身投与または局所性もしくは局所投与に好適な方式にて調製され得る。全身用製剤は、注射（例えば、筋肉内、静脈内、皮下注射）用に設計されたものを含むか、または経皮、経粘膜、もしくは経口用に調製され得る。製剤は、一般に、希釈剤、ならびに、いくつかの場合には、補助剤、緩衝剤、保存剤などを含む。化合物は、リボソーム組成物にてまたはマイクロエマルジョン剤として投与することもできる。

【0290】

注射に関しては、製剤は、溶液剤もしくは懸濁剤としてまたは注射前に液体中に溶解もしくは懸濁させるのに好適な固体製剤としてまたはエマルジョン剤として従来の形態で調製することができる。好適な賦形剤には、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グ

50

リセロールなどが含まれる。かかる組成物は、種々の量の非毒性補助物質、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤など、例えば例として、酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレートなども含有し得る。

【0291】

薬物に関するさまざまな持続放出系も考案されてきた。例えば、米国特許第5,624,677号を参照されたく、これは参照により本明細書に組み込まれる。

全身投与には、比較的非侵襲性的の方法、例えば坐剤、経皮パッチの使用、経粘膜送達、及び鼻腔内投与も含まれ得る。経口投与もまた本発明の化合物に好適である。好適な形には、当該技術分野で理解されているように、シロップ剤、カプセル剤、及び錠剤が含まれる。

10

【0292】

併用療法の各化合物は、本明細書に記載される場合、当該技術分野で公知のさまざまな方法で製剤化され得る。例えば、併用療法の第一及び第二の作用物質は、一緒にまたは別々に製剤化され得る。

【0293】

個別にまたは別々に製剤化された作用物質は、キットとして一緒に包装することができる。非限定例としては、限定されないが、例えば、2種類の丸剤、丸剤及び散剤、坐剤及び液体剤を含むバイアル、2種類の局所クリーム剤などを含有するキットが挙げられる。キットは、対象への単位用量の投与を補助する任意選択的の構成要素、例えば、散剤形を再構成するためのバイアル、注入用のシリンジ、カスタマイズされたIV送達系、吸入器などを含むことができる。加えて、単位用量キットは、組成物の調整及び投与のための使用説明書を含有することができる。キットは、一対象用の単回使用単位用量として、特定対象用の複数回使用として（一定用量でまたは治療の進行に合わせて個別の化合物の効力が変動する）製造され得る、またはキットは、複数対象への投与に好適な複数用量を含有し得る（「バルクパッケージング」）。キットの構成要素は、カートン、ブリスターパック、ボトル、チューブなどにて組み立てられ得る。

20

【0294】

経口用途のための製剤には、非毒性の薬学的に許容され得る賦形剤との混合物内に有効成分（複数可）を含有する錠剤が含まれる。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤または充填剤（例えば、スクロース、ソルビトール、糖、マンニトール、微結晶セルロース、ジャガイモデンプンを含むデンプン、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、またはリン酸ナトリウム）、顆粒化剤及び崩壊剤（例えば、微結晶セルロースを含むセルロース誘導体、ジャガイモデンプンを含むデンプン、クロスカルメロースナトリウム、アルギン酸塩、またはアルギン酸）、結合剤（例えば、スクロース、グルコース、ソルビトール、アカシア、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、デンプン、予めゼラチン化したデンプン、微結晶セルロース、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、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、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、またはポリエチレングリコール）、ならびに滑沢剤、流動促進剤、及び接着防止剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、硬化植物油、またはタルク）であり得る。他の薬学的に許容され得る賦形剤は、着色剤、風味剤、可塑剤、保水剤、緩衝剤などであり得る。

30

40

【0295】

2つ以上の化合物は、錠剤、カプセル、もしくは他のビヒクル内に一緒に混合され得るか、または分割され得る。一例として、第一の化合物を錠剤の内側に、そして第二の化合物を外側に含有することで、第二の化合物の実質的部分を、第一の化合物の放出前に放出させる。

【0296】

経口用途のための製剤はまた、咀嚼錠剤として、または有効成分が不活性固体希釈剤（例えば、ジャガイモデンプン、ラクトース、微結晶セルロース、炭酸カルシウム、リン酸

50

カルシウム、またはカオリン)と混合されるハードゼラチンカプセル剤として、または有効成分が水もしくは油性媒体、例えば、ピーナッツ油、流動パラフィン、もしくはオリーブ油と混合されるソフトゼラチンカプセル剤としても提供され得る。散剤、顆粒剤、及びペレット剤は、例えば、ミキサー、流動床装置、またはスプレードライ装置を使用する従来の様式にて、錠剤及びカプセルについての上述の成分を使用して調製され得る。

【0297】

溶解または拡散制御放出は、化合物の錠剤、カプセル剤、ペレット剤、もしくは顆粒剤に適切なコーティングを施すことにより、または適切なマトリックス内に化合物を組み込むことにより達成することができる。制御放出コーティング剤は、上述のコーティング物質の1つもしくは複数、ならびに／または、例えば、シェラック、ビーワックス、グリコワックス、カスターワックス、カルナウバワックス、ステアリルアルコール、モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、グリセロールパルミトステアレート、エチルセルロース、アクリル樹脂、d l ポリ乳酸、酢酸セルロースブチレート、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ビニルピロリドン、ポリエチレン、ポリメタクリレート、メチルメタクリレート、2-ヒドロキシメタクリレート、メタクリレートヒドロゲル、1, 3-ブチレングリコール、エチレングリコールメタクリレート、及び／もしくはポリエチレングリコールを含む。制御放出マトリックス製剤では、マトリックス材料はまた、例えば、水和メチルセルロース、カルナウバワックス及びステアリルアルコール、カーボポール 934、シリコーン、トリステアリン酸グリセリル、アクリル酸メチル-メタクリル酸メチル、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、及び／またはハロゲン化フルオロカーボンを含み得る。

10

20

【0298】

本発明の化合物及び組成物を、経口投与のために中に組み込むことができる液体形態には、溶液剤、好適に風味付けされたシロップ剤、水性または油性懸濁剤、及び風味付けされたエマルジョン剤が含まれ、これらは食用油、例えば綿実油、ゴマ油、ヤシ油、またはピーナッツオイル油、ならびにエリキシル剤及び類似する薬剤ビヒクルを伴う。

【0299】

一般に、ヒトに投与する場合、本発明の組み合わせの化合物のいずれかの経口投与量は、化合物の性質に依存し、当業者により容易に決定可能である。典型的には、かかる投与量は、通常1日あたり約0.001mg~2000mg、望ましくは、1日あたり約1mg~1000mg、より望ましくは一日あたり約5mg~500mgである。1日あたり最大で200mgまでの投与量が必要であり得る。

30

【0300】

併用療法における各薬物の投与は、本明細書で記載する場合、独立して、一日1~4回を、1日~1年間であることができ、さらには対象の一生涯にわたる可能性がある。慢性的、長期投与が必要となり得る。

【実施例】

【0301】

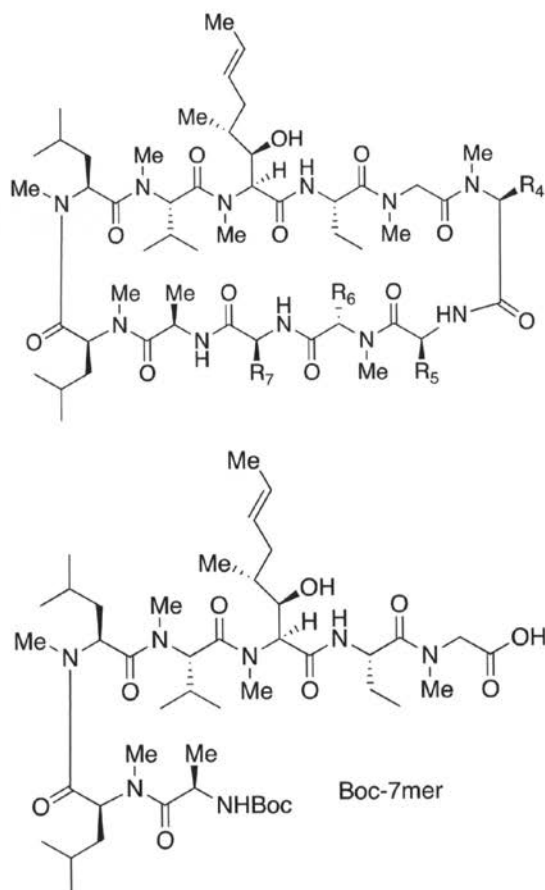
実施例1：ある特定の架橋試薬の合成

アクリルアミド含有シクロスポリン類似体の合成

40

【0302】

【化 4 1】



R4、R6、R7、R7は、アミノ酸側鎖
または反応性ウォーヘッド求電子剤（例え
ば、アクリルアミドまたはビニルスルホン
アミド）である

10

20

全ての試薬及び溶媒は、Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltdから購入した。Fmoc-アミノ酸、HATU、HOAT、H-Ala-2-Cl-(Trt)樹脂(0.36mmol/g)、H-Leu-2-Cl-(Trt)樹脂(0.30mmol/g)、H-Phe-2-Cl-(Trt)樹脂(0.35mmol/g)及びH-Thr(tBu)-2-Cl-(Trt)樹脂(0.36mmol/g)は、GL Biochem(Shanghai) Ltdから購入した。

30

【0303】

直鎖ペプチドのカップリングを、自動合成機上で標準のFmoc-SPSS手順を使用して実行した。

一般方法A：直鎖ペプチドを、TETRAS（商標）合成機を0.025mmolの樹脂のスケールで使用するにより合成した。一般的プロトコルは以下の通りである：2×NMP、30秒；NMP中1×20%（vol/vol）ピペリジン、15分；5×NMP、30秒；NMP中アミノ酸（3当量）溶液を、樹脂を含有する容器へと加え、その後、DMF中のHATU及びDIEAの溶液をそれぞれ加え、45分間カップリングした；3×NMP、30秒。二重カップリング戦略を全てのアミノ酸に適用した。

40

一般方法B：Boc-7merの付加

カップリングを、Boc-7merの量が1.5当量であることを除いてアミノ酸カップリングに関するものと同じ一般プロトコルを使用することによって、TETRAS（商標）合成機上で達成した。1回のカップリングのみが必要であった。

一般方法C：ivDde保護基の除去。

【0304】

Dap側鎖上のivDde保護基の除去を、TETRAS（商標）合成機上で達成した。一般的プロトコル：NMP中の20%（vol/vol）ヒドラジン-水和物の溶液を、樹脂を含有する容器に加えた。容器を、30分間振とうした。樹脂を排出し、5×5m

50

L (30 秒) の NMP を用いてすすいだ。

一般方法 D : Dap の側鎖アミノ基上のアクリル酸の付加。

【0305】

カップリングを、アミノ酸カップリングに関するものと同じ一般的プロトコルを使用することによって、TETRA S (商標) 合成機上で達成した。二重カップリング戦略を適用した。

一般方法 E : 側鎖保護基の脱保護及び樹脂からの最終切断。

【0306】

全体的な脱保護及び樹脂からの切断を、TFA カクテルにより 1 ~ 2 時間室温にて達成した。切断カクテル (TFA / TIPS / H₂O、95 / 2.5 / 2.5) または (TFA / DCM / TIPS、40 : 60 : 1) を最終切断のために使用することができる。大半の溶媒を減圧下で除去し、残渣を真空下で濃縮して微量溶媒を除去した。得られた残渣をさらに精製せずに次の環化で直接使用した。

一般方法 F : 直鎖ペプチドの環化

粗直鎖ペプチドを、乾燥 DCM に溶解して、最終濃度を 0.1 M とした。次いで、HATU (3 当量)、HOAt (3 当量) 及び DIEA (6 当量) を加えた。反応混合物を一晩攪拌し、次いで、ESI-LCMS によりモニターした。溶媒を減圧下で濃縮し、残渣を NMP に溶解し、分取 HPLC により精製した。シクロペプチドを、ESI-LCMS により同定した。

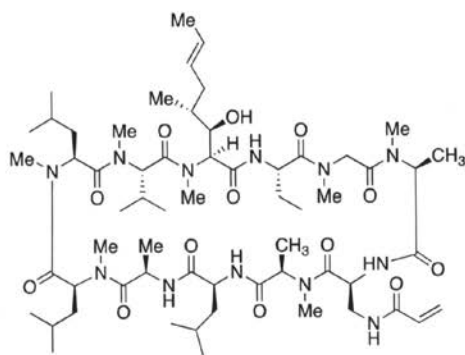
【0307】

逆相 HPLC。Accucore C18 カラム (2.6 μm、2.1 mm × 50 mm) を流量 1 mL / 分で、分析 RP-HPLC に使用した。Xselect ペプチド CSH カラム (5 μm、19 mm × 150 mm) を、分取 RP-HPLC に使用した。移動相 A : 水 (0.1 % ギ酸)、移動相 B : ACN ; 流量 : 20 mL / 分 ; 勾配 : 16 分で 25 % B から 95 % B。

シクロ [7mer-NMALA-Dap-d-nmala-LEU] の合成 :

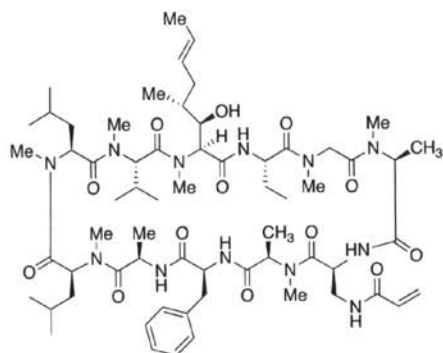
【0308】

【化 42】



線状ペプチド鎖のアセンブリを、上記の一般方法を使用して、850 mg の H-Leu-2-C1-(Trt) 樹脂 (0.3 mmol / g、0.025 mmol スケール) を用いて行った。D-N-メチルAla、Dap 及び L-N-メチルAla 残基を、一般方法 A を使用して付加した。次いで、Boc-7mer を、一般方法 B を用いて組み立てた。側鎖 ivDde 保護基の除去を、一般方法 C を使用することにより達成した。次いで、アクリル酸を、Dap の側鎖の遊離アミノ基上に、一般方法 D を用いて付加した。全体的な脱保護及び樹脂からの切断を 1 ステップで行った (一般方法 E) 後、粗直鎖ペプチドを、環化に供した (一般方法 F)。最終的分取 HPLC の後、17 mg の最終化合物を、白色固体として得た (樹脂充填量により算出して 56.6 %)。ESI-MS : [M+1]⁺ = 1202, [M+Na]⁺ = 1224, [M/2 + 1]⁺ = 602。

シクロ [7mer-NMA L A-D a p-d-n m a l a-P H E] の合成：
 【0309】
 【化43】

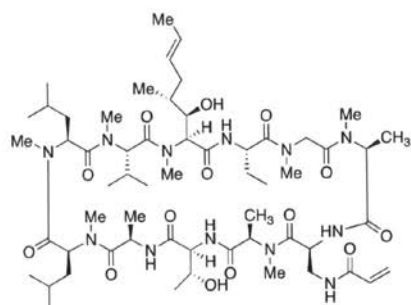


10

2. 8 mg の最終化合物を白色固体として得た（樹脂充填量により算出して9.1%）が、これには、シクロ [7mer-NMA L A-D a p-d-n m a l a-L E U] の合成と同様の方法を用いた。ESI-MS： $[M+1]^+ = 1236$ ， $[M+Na]^+ = 1258$ ， $[M/2 + 1]^+ = 619$ 。

シクロ [7mer-NMA L A-D a p-d-n m a l a-T H R] の合成：
 【0310】
 【化44】

20



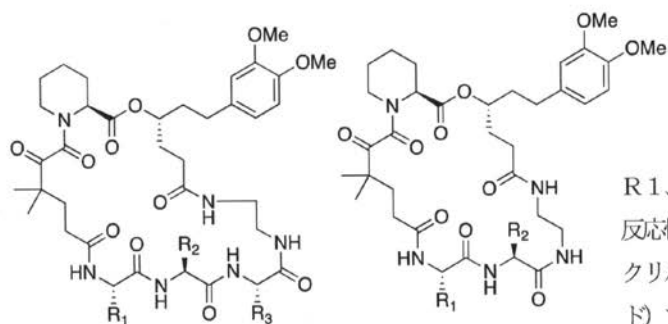
30

3. 4 mg の最終化合物を白色固体として得た（樹脂充填量により算出して11.4%）が、これには、シクロ [7mer-NMA L A-D a p-d-n m a l a-L E U] の合成と同様の方法を用いた。ESI-MS： $[M+1]^+ = 1190$ ， $[M+Na]^+ = 1212$ ， $[M/2 + 1]^+ = 596$ 。

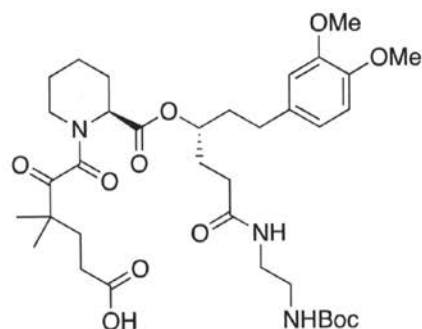
アクリルアミド含有FKBP12リガンドの合成
 【0311】

40

【化 4 5】



10



20

B o c - 3 m e r

全ての試薬及び溶媒は、Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltdから購入した。Fmoc-アミノ酸、HATU、HOAT、2-Cl-(Trt)-Cl樹脂（活性部位に基づいて0.9 mmol/g）及びAla負荷2-Cl-(Trt)-Cl樹脂（0.36 mmol/g）は、GL Biochem (Shanghai) Ltdから購入した。

2-Cl-(Trt)-Cl樹脂上に第一のアミノ酸を付加する。

【0312】

SPSSの容器にて、5 gの樹脂を50 mLの乾燥NMP中で40分間膨潤させた。樹脂を排出し、DCM（5×30 mL）を用いて、次いでNMM 2% / DCM（3×30 mL）を用いてすすぐ。50 mLのDCM中のNMM（4 mmol、400 mg）を伴うFmoc-Dap(ivd de)-OH（3.0 mmol、1.6 g）の溶液を加えた。容器を一晩振とうした。次いで、2 mLの25% NMM / MeOHの溶液を加え、容器をさらに1時間振とうした。樹脂を排出し、DCM、NMP、MeOH及びEtOH（それぞれ3×50 mL）を用いてすすいだ。樹脂を、真空下、室温にて乾燥させた。

30

【0313】

充填量を、Fmoc切断光度測定により測定した（0.32 mmol/g）。直鎖ペプチドのカップリングは、標準のFmoc SPSS手順を自動合成機上で使用して実行した。

40

【0314】

一般方法A：直鎖ペプチドを、TETRAS（商標）合成機を0.025 mmolの樹脂のスケールで使用するにより合成した。一般的プロトコルは以下の通りである：2×NMP、30秒；NMP中1×20%（vol/vol）ピペリジン、15分；5×NMP、30秒；NMP中アミノ酸（3当量）溶液を、樹脂を含有する容器へと加え、その後、DMF中のHATU及びDIEAの溶液をそれぞれ加え、45分間カップリングした；3×NMP、30秒。二重カップリング戦略を全てのアミノ酸に適用した。

一般方法B：Boc-3merの付加

カップリングを、Boc-3merの量が1.5当量であることを除いてアミノ酸カップリングに関するものと同じ一般プロトコルを使用することによって、TETRAS（

50

商標) 合成機上で達成した。1 回のカップリングのみが必要であった。

一般方法 C : i v D d e 保護基の除去。

【0315】

D a p 側鎖上の i v D d e 保護基の除去を、T E T R A S (商標) 合成機上で達成した。一般的プロトコル : N M P 中の 20% (v o l / v o l) ヒドラジン-水和物の溶液を、樹脂を含有する容器に加えた。容器を、30 分間振とうした。樹脂を排出し、5 × 5 m L (30 秒) の N M P を用いてすすいだ。

一般方法 D : D a p の側鎖アミノ基上のアクリル酸の付加。

【0316】

カップリングを、アミノ酸カップリングに関するものと同じ一般プロトコルを使用することによって、T E T R A S (商標) 合成機上で達成した。二重カップリング戦略を適用した。

一般方法 E : 側鎖保護基の脱保護及び樹脂からの最終切断。

【0317】

全体的な脱保護及び樹脂からの切断を、T F A カクテルにより 1 ~ 2 時間室温にて達成した。切断カクテル (T F A / T I P S / H₂O、95 / 2.5 / 2.5) または (T F A / D C M / T I P S、40 : 60 : 1) を最終切断のために使用することができる。大半の溶媒を減圧下で除去し、残渣を真空下で濃縮して微量溶媒を除去した。得られた残渣をさらに精製せずに次の環化で直接使用した。

一般方法 F : 直鎖ペプチドの環化

粗直鎖ペプチドを、乾燥 D C M に溶解して、最終濃度を 0.1 M とした。次いで、H A T U (3 当量)、H O A t (3 当量) 及び D I E A (6 当量) を加えた。反応混合物を一晚攪拌し、次いで、E S I - L C M S によりモニターした。溶媒を減圧下で濃縮し、残渣を N M P に溶解し、分取 H P L C により精製した。シクロペプチドを、E S I - L C M S により同定した。

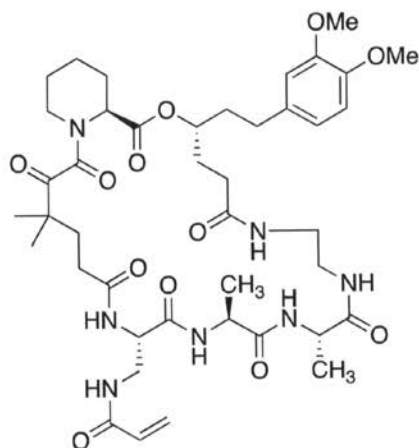
【0318】

逆相 H P L C。A c c u c o r e C18 カラム (2.6 μm、2.1 mm × 50 mm) を流量 1 mL / 分で、分析 R P - H P L C に使用した。X s e l e c t ペプチド C S H カラム (5 μm、19 mm × 150 mm) を、分取 R P - H P L C に使用した。移動相 A : 水 (0.1% ギ酸)、移動相 B : A C N ; 流量 : 20 mL / 分 ; 勾配 : 16 分で 25% B から 95% B 。

シクロ [ジアミン-D a p - A L A - A L A] の合成 :

【0319】

【化 46】



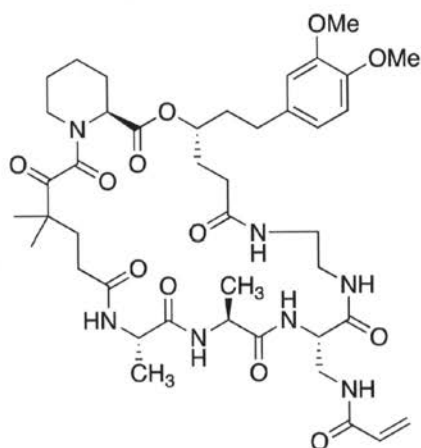
線状ペプチド鎖のアセンブリを、上記の一般方法を使用して、700 mg の H - A l a

−2−Cl−(Trt)樹脂(0.025mmolスケール)を用いて行った。Ala及びDap残基を、一般方法Aを使用して付加した。次いで、Boc−3merを、一般方法Bを用いて組み立てた。側鎖ivDde保護基の除去を、一般方法Cを使用することにより達成した。次いで、アクリル酸を、Dapの側鎖の遊離アミノ基上に、一般方法Dを用いて付加した。全体的な脱保護及び樹脂からの切断を1ステップで行った(一般方法E)後、粗直鎖ペプチドを、環化に供した(一般方法F)。最終の分取HPLCの後、3.1mgの最終化合物を、白色固体として得た(樹脂充填量により算出して14.5%)。ESI−MS： $[M+1]^+=857$ ， $[M+Na]^+=879$ 。
シクロ[ジアミン−ALA−ALA−Dap]の合成

【0320】

【化47】

10



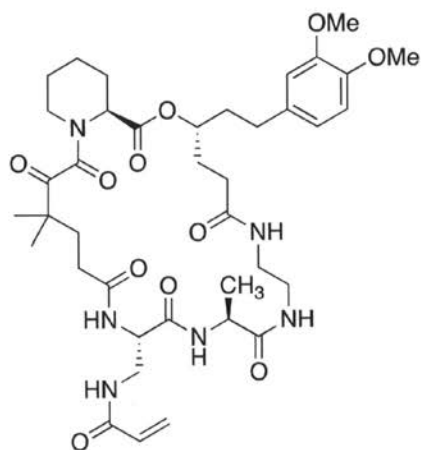
20

2.2mgの最終化合物を白色固体として得た(樹脂充填量により算出して10.3%)が、これには、シクロ[ジアミン−Dap−ALA−ALA]の合成と同様の方法を用いた。ESI−MS： $[M+1]^+=857$ ， $[M+Na]^+=879$ 。
シクロ[ジアミン−Dap−ALA]の合成：

【0321】

【化48】

30



40

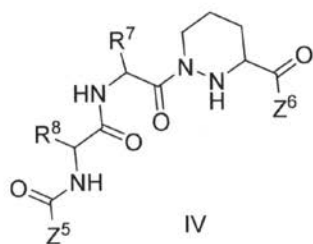
2.7mgの最終化合物を白色固体として得た(樹脂充填量により算出して12.6%)が、これには、シクロ[ジアミン−Dap−ALA−ALA]の合成と同様の方法を用いた。ESI−MS： $[M+1]^+=786$ 。

50

サングレフェーリン (sanglifehrin) 類似体の合成：

【0322】

【化49】



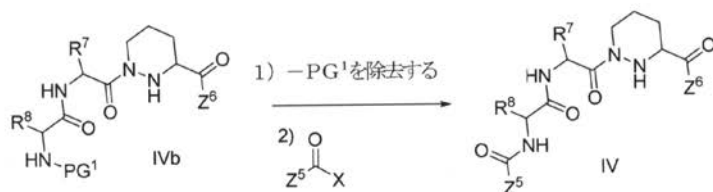
10

方法Aを使用して、下記のスキーム1に示すように式IVの化合物を調製し得る。

【0323】

【化50】

スキーム1



20

式中、 R^7 、 R^8 、 Z^5 、及び Z^6 は、以前に定義した通りであり、 PG^1 は、Boc、Cbz、Alloc、及びFmocを含むがこれらに限定されない好適なアミン保護基であり、Xは、OH、Cl、F、または置き換えまたは活性化とそれに続く置き換えに好適な何らかの他の基のいずれかである。

【0324】

典型的な手順では、保護アミンIVを、当業者が熟知している適切な試薬と反応させて、保護基 PG^1 を除去する。単離された粗生成物を、アシル化剤 $Z^5C(O)X$ と、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で、反応させ得る。酸及びアミンカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて、組み合わせる。

30

【0325】

あるいは、脱保護アミンを、アシル化試薬 $Z^5C(O)X$ 、式中Xはハロゲンである、と、好適な溶媒（DMF、ジクロロメタン、DME、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（ピリジン、DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、 -78°C ～約 120°C 、好ましくは -20°C ～ 50°C の温度範囲内で、直接反応させ得る。

40

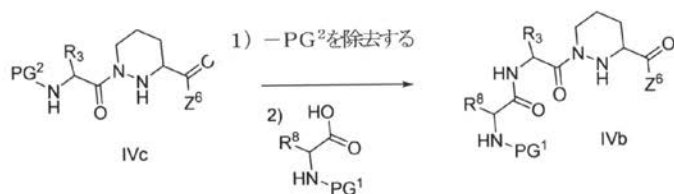
【0326】

スキーム1の式IVbの化合物は、下記のスキーム2に示すように調製され得る。

【0327】

【化 5 1】

スキーム 2



10

式中、 R^7 、 R^8 、及び Z^6 は、以前に定義した通りであり、 PG^1 及び PG^2 は、それぞれ独立して、Boc、Cbz、Alloc、及びFmocを含むがこれらに限定されない好適なアミン保護基である。

【0328】

典型的な手順では、保護アミンIVcを、当業者が熟知している適切な試薬と反応させて、保護基 PG^2 を除去して、対応するアミンを生成し、次いで、これを適切なアミノ酸と、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で反応させる。酸及びアミンカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて組み合わせて、式IVbの化合物を得る。

20

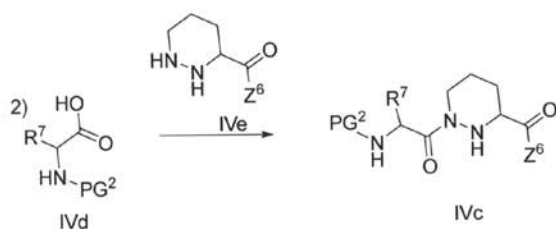
【0329】

スキーム2の式IVcの化合物を、下記のスキーム3に示すように調製し得る。

【0330】

【化 5 2】

スキーム 3



30

式中、 R^7 及び Z^6 は、以前に定義した通りであり、 PG^2 は、Boc、Cbz、Alloc、及びFmocを含むがこれらに限定されない好適なアミン保護基である。

【0331】

典型的な手順では、保護アミンIVdを、ピペラジン酸誘導体IVeと、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で、反応させる。酸及びアミンカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて、組み合わせる。

40

【0332】

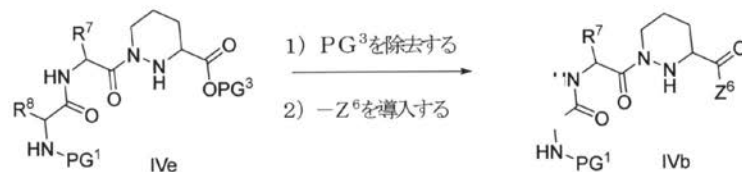
あるいは、式IVbの化合物を、スキーム4に記載のように式II-Bの化合物から合成し得る。

【0333】

50

【化 5 3】

スキーム4



10

式中、R⁷、R⁸、及びZ⁶は、以前に定義した通りであり、PG¹は、Boc、Cbz、Alloc、及びFmocを含むがこれらに限定されない好適なアミン保護基であり、PG³は、当業者に公知の方法により除去することができる、メチル、エチル、ベンジル、アリル、フェニルなどを含んだがこれらに限定されないアルキルまたはアリール基である。

【0334】

典型的な手順では、化合物IVeを、室温にて、加水分解条件下で、塩基（例えば、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム）を、水を伴うまたは伴わない有機（例えば、メタノール、THF、ジオキサン）から構成される溶媒系中で使用して、反応させる。当業者であれば、PG³の同一性に依存して、PG³の除去が、水素化分解条件下で適切な触媒を使用して、または脱アリル化条件下でパラジウム触媒、例えばPd(PPh₃)₄及び塩基捕捉剤（例えば、ピペリジン、モルホリン、ピペリジン）を使用しても生じ得ることを理解するだろう。結果得られるカルボン酸を得るための脱保護に続いて、Z⁶を、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で、導入し得る。カルボン酸及びカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて組み合わせて、生成物IVbを得る。

20

30

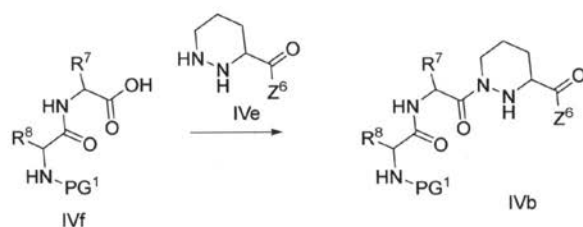
【0335】

あるいは、式IVbの化合物を、下記のスキーム5に示すように合成し得る。

【0336】

【化 5 4】

スキーム5



40

式中、R⁷、R⁸、及びZ⁶は、以前に定義した通りであり、PG¹は、Boc、Cbz、Alloc、及びFmocを含むがこれらに限定されない好適なアミン保護基である。

【0337】

典型的な手順では、保護アミンVIを、試薬Vと、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HB

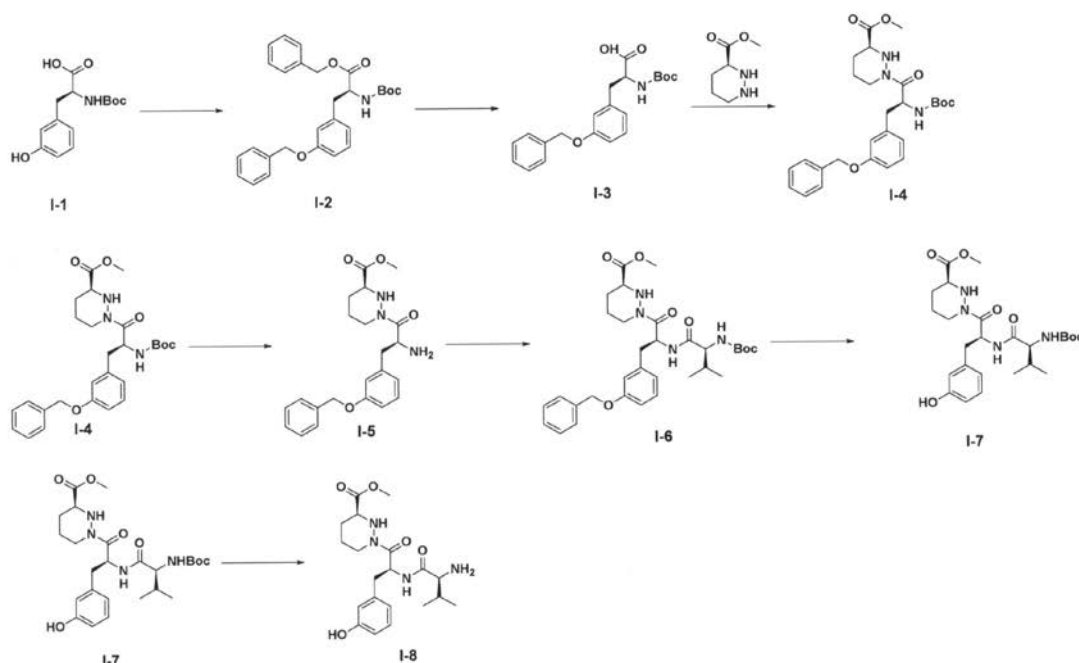
50

TU、COMU)の存在下で、反応させる。酸及びアミンカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒(DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない)中、塩基(DIPEA、トリエチルアミン、NMMを含むがこれらに限定されない)の存在下で、室温または少し上昇した温度にて、組み合わせる。

中間体 I-8 の合成

【0338】

【化55】



DMF (13 mL) 中の中間体 I-1 (2.00 g、7.11 mmol) の室温の溶液に、炭酸セシウム (4.75 g、14.58 mmol) 及びベンジルブロミド (2.49 g、14.58 mmol、1.73 mL) を 25℃ で加えた。反応混合物を、2 時間攪拌し、次いで、酢酸エチル (100 mL) で希釈し、ブライン (50 mL × 3) で洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、粗残渣を得た。粗生成物を、シリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィーにより精製して (溶離液: 石油エーテル/酢酸エチル → 20:1 ~ 10:1)、中間体 I-2 (3.20 g、96% 収率) を、無色油状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.30 (m, 10 H), 7.20 – 7.10 (m, 1 H), 6.95 – 6.85 (m, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 6.70 – 6.60 (m, 1 H), 5.20 – 5.10 (m, 2 H), 4.99 (s, 2 H), 4.70 – 4.60 (m, 1 H), 3.15 – 3.05 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H)。ESI-MS m/z = 484.1 [M+Na]⁺; 算出分子量: 461.55。

【0339】

テトラヒドロフラン (15 mL) 中の中間体 I-2 (3.20 g、6.93 mmol) の溶液に、水酸化リチウム (水中 1 M、10 mL) を 0℃ で加えた。反応混合物を、室温にて 1 時間攪拌した。反応混合物を、HCl (水中 1 M) を用いて 0℃ にて pH 約 6 に調整し、酢酸エチル (100 mL × 3) で抽出した。合一した有機層を、ブライン (20 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、粗残渣を得た。粗生成物を、炭酸水素ナトリウム水溶液 (7 mL) に溶解し、MTBE (100 mL × 3) で抽出した。水層を、塩酸 (H₂O 中 1 M) を用いて pH 約 6 に調整し、酢酸エチル

(50 mL×3)で抽出した。合一した有機層を、ブライン(50 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、中間体I-3(2.27 g、88%収率)を無色油状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.30 (m, 5 H), 7.25 – 7.18 (m, 1 H), 6.90 – 6.85 (m, 1 H), 6.83 – 6.75 (m, 2 H), 5.05 (s, 2 H), 4.94 (d, J=8.00 Hz, 1 H), 4.60 – 4.50 (m, 1 H), 3.20 – 3.12 (m, 1 H), 3.10 – 3.00 (m, 1 H), 1.43 (s, 9 H)。ESI-MS m/z = 394.3 [M+Na]⁺; 算出分子量: 371.43

ジクロロメタン(15 mL)中の中間体I-3(888 mg、2.39 mmol)の溶液に、N-メチルモルホリン(967 mg、9.56 mmol)、HOBt(65 mg、478 μmol)、(S)-メチルヘキサヒドロピリダジン-3-カルボキシレートTFAC塩(890 mg、2.39 mmol)として、及びEDCI(917 mg、4.78 mmol)を0℃で加えた。反応混合物を、0℃にて1時間攪拌した。反応混合物を、ジクロロメタン(50 mL)で希釈し、5%クエン酸水溶液を用いてpH約6に調整した。水層を、ジクロロメタン(20 mL×2)で抽出した。合一した有機層を、ブライン(50 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、粗生成物を得た。粗生成物を、シリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィーにより精製して(溶離液:石油エーテル/酢酸エチル→10:1、5:1~3:1)、中間体I-4(910 mg、77%収率)を無色油状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.50 – 7.35 (m, 5 H), 7.20 – 7.13 (m, 1 H), 6.90 – 6.80 (m, 3 H), 5.60 – 5.50 (m, 1 H), 5.30 – 5.20 (m, 1 H), 5.05 – 5.00 (m, 2 H), 4.40 – 4.30 (m, 1 H), 3.65 (s, 3 H), 3.55 (d, J=11.20 Hz, 1 H), 3.00 – 2.93 (m, 1 H), 2.90 – 2.80 (m, 1 H), 2.75 – 2.65 (m, 1 H), 2.35 – 2.25 (m, 1 H), 1.80 – 1.72 (m, 2 H), 1.42 (s, 9 H)。ESI-MS m/z = 520.1 [M+Na]⁺。算出分子量: 497.58

酢酸エチル(4 mL)中の中間体I-4(450 mg、904 μmol)溶液に、酢酸エチル中の塩酸(4 M、8.00 mL)を0℃にて加えた。反応混合物を、25℃にて1時間攪拌した。反応混合物を、減圧下で濃縮して、中間体I-5のHCl塩(390 mg、100%収率)を、淡黄色固体として得て、これを精製せずに次のステップに使用した。ESI-MS m/z = 398.0 [M+H]⁺, 420.0 [M+Na]⁺、算出分子量: 397.47。

【0340】

ジクロロメタン(5.00 mL)中の中間体I-5(195 mg、899 μmol)の溶液に、N-メチルモルホリン(273 mg、2.70 mmol)、HOBt(24.29 mg、179.75 μmol)、(S)-メチル1-((S)-2-アミノ-3-(3-(ベンジルオキシ)フェニル)プロパノイル)ヘキサヒドロピリダジン-3-カルボキシレートのHCl塩(390 mg、899 μmol)及びEDCI(345 mg、1.80 mmol)を、0℃にて加えた。反応混合物を、0℃にて1時間攪拌した。反応混合物を、ジクロロメタン(20 mL)で希釈し、5%クエン酸(critic acid)水溶液でpH約6に調整した。水層を、ジクロロメタン(20 mL×2)で抽出した。合一した有機層を、ブライン(20 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、粗生成物を得た。粗生成物を、シリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィーにより精製して(溶離液:石油エーテル/酢酸エチル→5:1、2:1、1:1)、中間体I-6(750 mg、70%収率)を白色固体として得た。¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ 7.50 – 7.35 (m, 5 H), 7.23 – 7.15 (m, 1 H), 6.90 – 6.80 (m, 3 H), 6.13 – 6.08 (m, 1 H), 5.83 – 5.73 (m, 1 H), 5.10 – 5.00 (m, 3 H), 4.30 – 4.20 (m, 1 H), 4.00 – 3.90 (m, 1 H), 3.65 (s, 3 H), 3.50 (d, J = 11.20 Hz, 1 H), 3.05 – 2.97 (m, 1 H), 2.93 – 2.83 (m, 1 H), 2.80 – 2.70 (m, 1 H), 2.35 – 2.25 (m, 1 H), 2.15 – 2.10 (m, 1 H), 1.75 – 1.65 (m, 4 H), 1.45 (s, 9 H), 0.94 (d, J = 6.80 Hz, 3 H), 0.88 (d, J = 6.80 Hz, 3 H)。ESI-MS m/z = 597.1 [M+H]⁺。算出分子量：596.71。

【0341】

メタノール (300 mL) 中の中間体 I-6 (3.00 g、6.03 mmol) の溶液に、パラジウム炭素 (2 グラム、10% 負荷) を窒素雰囲気下に加えた。懸濁液を、脱気し、水素ガスでパージし、混合物を、水素下 (1 気圧)、20 °C にて 3 時間攪拌した。混合物を濾過し、減圧下で濃縮して、中間体 I-7 (2.3 g、5.64 mmol、94% 収率) を、白色固体として得た。ESI-MS m/z = 430.1 [M+Na]⁺。算出分子量：407.46。

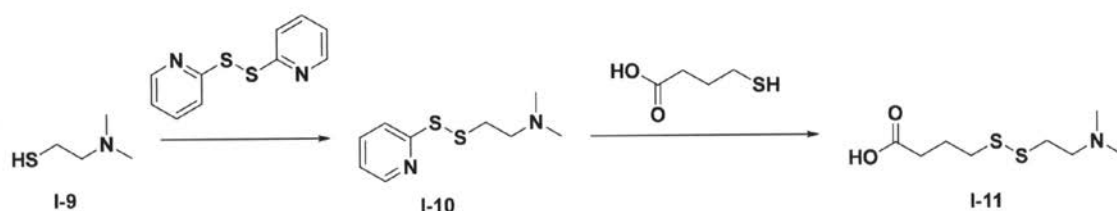
【0342】

ジオキサン (10 mL) 中の中間体 I-7 (2.3 g、5.64 mmol) の混合物に、ジオキサン中の塩酸 (4 M、30 mL) を一度で 20 °C にて加えた。混合物を、20 °C にて 3 時間攪拌した。混合物を、飽和 NaHCO₃ 水溶液で pH 約 7~8 に調整し、酢酸エチル (100 mL × 3) で抽出した。合一した有機相を、ブライン (100 mL × 2) で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮して、中間体 I-8 (1.3 g、3.63 mmol、64% 収率、86% 純度) を、淡黄色固体として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.15–7.02 (m, 1 H), 6.75–6.5 (m, 3 H), 4.90–4.77 (m, 1 H), 4.50–4.37 (m, 1 H), 4.00–3.90 (m, 1 H), 3.80–3.70 (m, 1 H), 3.68–3.65 (m, 3 H), 2.95–2.80 (m, 1 H), 2.77–2.62 (m, 2 H), 2.50–2.35 (m, 1 H), 1.97–1.85 (m, 1 H), 1.82–1.70 (m, 1 H), 1.60 – 1.45 (m, 1 H), 1.42–1.28 (m, 1 H)。ESI-MS m/z = 308.2 [M+Na]⁺。算出分子量：307.34。

中間体 I-11 の合成

【0343】

【化56】



メタノール (10 mL) 中の 2-(ジメチルアミノ)エタンチオール I-9 (500 mg、3.53 mmol) の溶液に、メタノール (10 mL) 中の 1,2-ジ(ピリジン-2-イル)ジスルフィド (1.17 g、5.3 mmol) の溶液を 0 °C にて加えた。混合

物を、25℃にて15時間攪拌した。反応混合物を、真空下で濃縮した。残渣を、シリカゲルカラム（溶離液：石油エーテル／酢酸エチル→3：1、1：1、次いで、ジクロロメタン／酢酸エチル→2：1、次いで、ジクロロメタン／メタノール→10：1）により精製し、これを、前のバッチと組み合わせて、中間体 I-10（1.05 g、58%収率）を、淡黄色固体として得た。¹H NMR（400 MHz, CD₃OD）δ 8.56（d, J=4.0 Hz, 1 H）, 7.85–7.75（m, 1 H）, 7.69（d, J=8.0 Hz, 1 H）, 7.36–7.26（m, 1 H）, 3.48–3.40（m, 2 H）, 3.28–3.20（m, 2 H）, 2.93（s, 6 H）。ESI-MS m/z = 214.9 [M+H]⁺。算出分子量：214.35。

10

【0344】

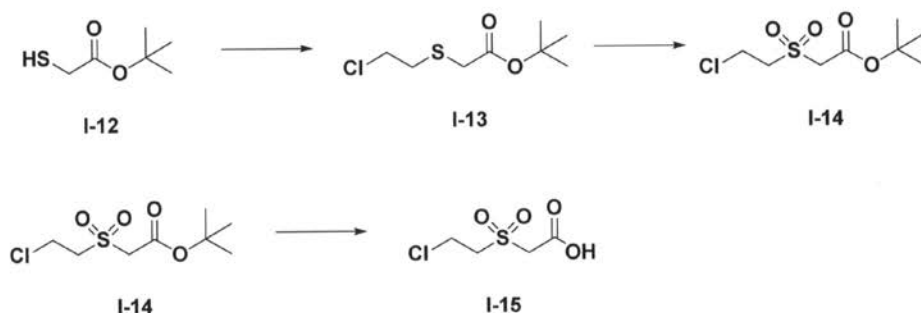
メタノール（1 mL）中の4-メルカプトブタン酸（50 mg、416 μmol）の溶液に、メタノール（1.5 mL）中の中間体 I-10（125 mg、499 μmol）の溶液を、25℃にて加えた。混合物を、25℃にて15時間攪拌した。反応混合物を、低圧で濃縮した。残渣を、シリカゲルを用いてカラムクロマトグラフィーにより精製して（溶離液：石油エーテル／酢酸エチル→2：1、1：1、次いで、ジクロロメタン／メタノール→10：1）、中間体 I-11（80 mg、86%収率）を、白色ゴムとして得た。¹H NMR（400 MHz, CD₃OD）δ 3.55–3.45（m, 2 H）, 3.08–3.00（m, 2 H）, 2.93（s, 6 H）, 2.83（t, J=7.2 Hz, 2 H）, 2.43（t, J=7.2 Hz, 2 H）, 2.05–1.94（m, 2 H）。

20

中間体 I-15 の合成

【0345】

【化57】



30

N, N-ジメチルホルムアミド（15 mL）中のtert-ブチル 2-メルカプト酢酸 I-12（800 mg、5.4 mmol）の溶液に、炭酸カリウム（1.49 g、10.8 mmol）及び1-ブロモ-2-クロロエタン（2.32 g、16.2 mmol）を加えた。混合物を、25℃にて2時間攪拌した。混合物を、酢酸エチル（100 mL）で希釈し、水（50 mL×3）で洗浄した。有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して、中間体 I-13（1.00 g、79%収率）を、無色油状物として得た。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）δ 3.64–3.71（m, 2 H）, 3.14–3.17（m, 2 H）, 2.95–3.01（m, 2 H）, 1.47（s, 9 H）。

40

【0346】

ジクロロメタン（10 mL）中の中間体 I-13（1.00 g、4.75 mmol）の溶液に、ジクロロメタン（10 mL）中のm-CPBA（4.61 g、21.4 mmol、80%純度）の溶液を、0℃にて加えた。混合物を室温まで温め、2時間攪拌した。混合物を、ジクロロメタン（80 mL）で希釈し、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液（50 mL）及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50 mL）で洗浄した。有機層を、無水硫酸ナト

50

リウム上で乾燥させ、濃縮して、粗残渣を得て、これをシリカゲルクロマトグラフィーにより精製して（溶離液：石油エーテル／酢酸エチル→5／1）中間体 I-14（700 mg、60%収率）を、無色油状物として得た。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃） δ 3.99（s, 2 H）, 3.90 – 3.95（m, 2 H）, 3.69 – 3.75（m, 2 H）, 1.50 – 1.53（m, 9 H）。

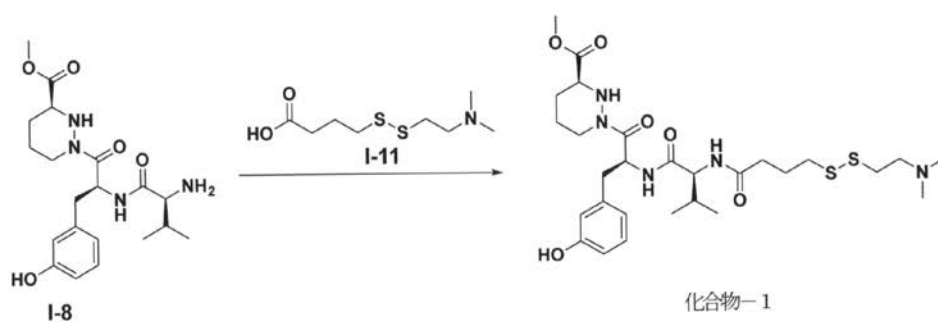
【0347】

ジクロロメタン（12 mL）中の中間体 I-14（650 mg、2.68 mmol）の溶液に、トリフルオロ酢酸（6.00 mL）を加えた。混合物を、45℃で2時間攪拌した。次いで、混合物を濃縮して、中間体 I-15（360.00 mg、72%収率）を、白色固体として得た。¹H NMR（400 MHz, DMSO-d₆） δ 4.34（s, 2 H）, 3.89 – 4.01（m, 2 H）, 3.71 – 3.81（m, 2 H）。

化合物-1の合成

【0348】

【化58】

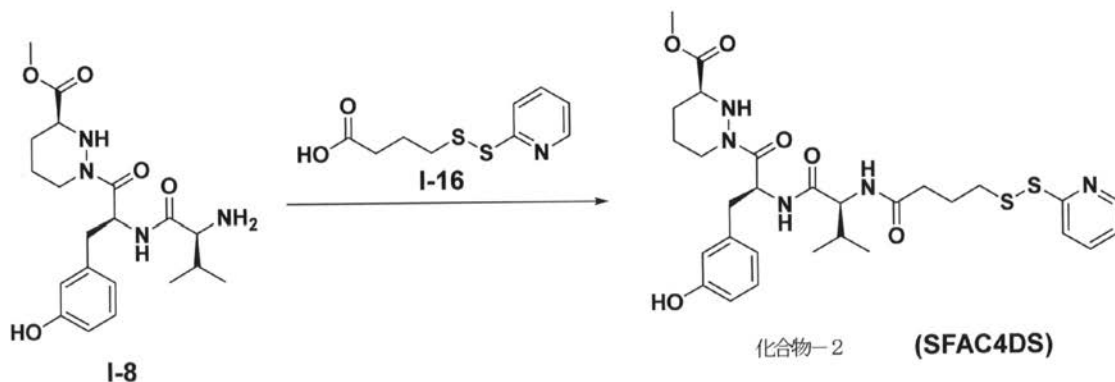


ジクロロメタン（1.5 mL）中の中間体 I-8 の HCl 塩（31 mg、119 μ mol）及び中間体 I-11（44 mg、99 μ mol）の溶液に、HOBT（1.34 mg、9.9 μ mol）、N-メチルモルホリン（38.2 μ L）及び EDCI（27 mg、139 μ mol）を加えた。混合物を、25℃にて1時間攪拌した。反応混合物を、ジクロロメタン（10 mL）で希釈し、水（5 mL）で洗浄した。水層を、ジクロロメタン（5 mL $\times$ 2）で抽出した。合一した有機層を、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮した。残渣を、逆相 HPLC（HCl 添加）により精製し、逆相 HPLC（HCOOH 添加）を使用して再精製し、凍結乾燥して、化合物-1（5.8 mg、9%収率）を淡黄色油状物として得た。¹H NMR（400 MHz, MeOD） δ 8.53（ブロード一重項, 1 H）, 7.12 – 7.04（m, 1 H）, 6.72 – 6.62（m, 3 H）, 5.75 – 5.65（m, 1 H）, 4.20 – 4.10（m, 2 H）, 3.70（s, 3 H）, 3.08 – 3.00（m, 2 H）, 2.95 – 2.76（m, 5 H）, 2.76 – 2.70（m, 2 H）, 2.60（s, 6 H）, 2.42 – 2.32（m, 3 H）, 2.10 – 1.98（m, 3 H）, 1.85 – 1.70（m, 2 H）, 1.55 – 1.40（m, 2 H）, 1.02 – 0.85（m, 6 H）。ESI-MS m/z = 612.1 [M+H]⁺, 634.5 [M+Na]⁺。算出分子量：611.82。

化合物-2（SFAC4DS）の合成

【0349】

【化 5 9】



10

ジクロロメタン中の中間体 I-8 (27 mg、60 μmol) の溶液を、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (24 mg、180 μmol)、中間体 I-16 (14 mg、60 μmol)、HOBt (1.6 mg、2 μmol) で、次いで最後に EDCI (18 mg、90 μmol) で処理した。15 時間攪拌した後、溶液を、水及び酢酸エチルに注いだ。層を分離し、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、溶媒を真空下で除去した。逆相 HPLC による精製 (0.1% ギ酸を含む水中のアセトニトリル) 及び凍結乾燥により、化合物-2 (SFAC4DS) (16 mg、42% 収率) を白色固体として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 8.47 (d, 1H), 8.16 (ブロードー重項, 1H), 7.69–7.66 (m, 1H), 7.63–7.60 (m, 1H), 7.13 (見かけの三重項, 1H), 7.09–7.05 (m, 1H), 5.85–5.79 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.31 (ブロードー重項, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.42 (d, 1H), 3.00 (dd, 1H), 2.87–2.78 (m, 3H), 2.52–2.43 (m, 2H), 2.28 (ブロードー重項, 1H), 2.14–2.04 (m, 3H), 1.83–1.73 (m, 2H), 1.62–1.43 (m, 5H), 0.95 (d, 3H), 0.90 (d, 3H)。ESI-MS m/z = 617.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。算出分子量: 617.78。

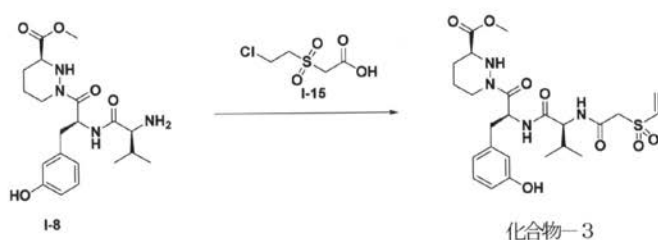
20

30

化合物-3 の合成

【0350】

【化 6 0】



40

DCM (0.75 mL) 中の中間体 I-15 の HCl 塩 (31.8 mg、0.17 mmol)、HOBt (2.3 mg、0.017 mmol) 及び NMM (54 μL 、0.54 mmol) の溶液に、I-8 (86 mg、0.17 mmol) の HCl 塩及び EDCI (76 mg、0.34 mmol) を室温にて加えた。反応混合物を、室温にて 2 時間攪拌した。混合物を、ジクロロメタン (2 mL) で希釈し、クエン酸 (pH 約 3、2 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (2 mL)、及び飽和塩化ナトリウム水溶液 (2 mL) で

50

洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で15℃にて濃縮して、生成物を黄色油状物として得た。残渣を、シリカゲルを用いて分取TLCにより（溶離液：DCM/MeOH→10：1）、続いて分取HPLCにより精製して（カラム：Phenomenex Gemini C18 250×50 10μ；移動相：[水（0.225%FA）-ACN]；B%：26%～56%、11.2分）、化合物-3（8.5mg、8%収率）を白色固体として得た。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）δ 9.02（s, 1 H）, 8.80（s, 1 H）, 8.42（s, 1 H）, 7.01 – 7.08（m, 1 H）, 6.82（dd, J = 16.3, 9.9 Hz, 1 H）, 6.74（d, J = 7.5 Hz, 1 H）, 6.64 – 6.70（m, 2 H）, 6.36（d, J = 16.5 Hz, 1 H）, 6.12 – 6.16（m, 2 H）, 4.81 – 4.85（m, 1 H）, 4.40 – 4.46（m, 2 H）, 4.21 – 4.25（m, 1 H）, 4.09 – 4.13（m, 1 H）, 3.57（s, 3 H）, 2.81 – 3.08（m, 2 H）, 2.63 – 2.65（m, 1 H）, 2.15 – 2.19（m, 1 H）, 1.21 – 1.60（m, 4 H）, 0.88 – 0.92（m, 6 H）。ESI-MS m/z = 539.1 [M+H]⁺。算出分子量：538.61。

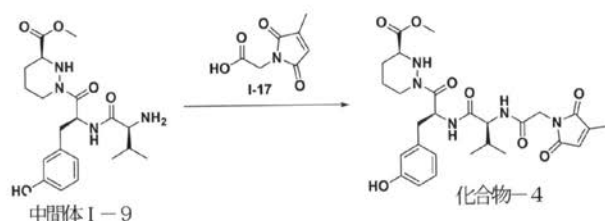
10

化合物-4の合成

【0351】

20

【化61】



30

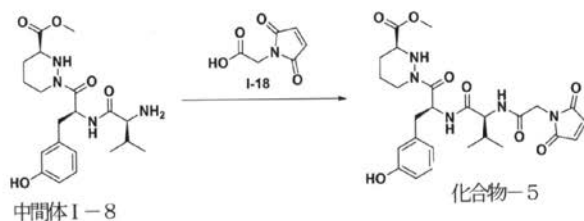
化合物-4を、化合物-3の調製において記載した通りに、中間体I-8のHCl塩（34mg、77μmol）及び2-（3-メチル-2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル）酢酸I-17（13mg、77μmol）を出発物質として使用することにより調製した。得られた粗生成物を、前に合成した粗物質と合一し、精製して、凍結乾燥後に、化合物-4（29.0mg、51.28μmol、45%収率）を白色固体として得た。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）δ 8.55 – 8.40（s, 1 H）, 8.20 – 8.07（m, 1 H）, 7.10 – 6.97（m, 2 H）, 6.80 – 6.73（m, 1 H）, 6.73 – 6.63（m, 1 H）, 6.63 – 6.50（m, 1 H）, 6.47 – 6.37（m, 1 H）, 5.90 – 5.75（m, 1 H）, 4.80 – 4.67（m, 1 H）, 4.35 – 4.15（m, 3 H）, 3.70 – 3.57（m, 3 H）, 3.45 – 3.30（d, 1 H）, 3.10 – 3.00（m, 1 H）, 3.00 – 2.70（m, 2 H）, 2.20 – 2.00（m, 5 H）, 1.85 – 1.60（m, 2 H）, 1.60 – 1.45（m, 1 H）, 1.45 – 1.30（m, 1 H）, 1.05 – 0.80（m, 6 H）。ESI-MS m/z = 558.3 [M+H]⁺；算出分子量：557.60。

40

化合物-5の合成

【0352】

【化 6 2】



10

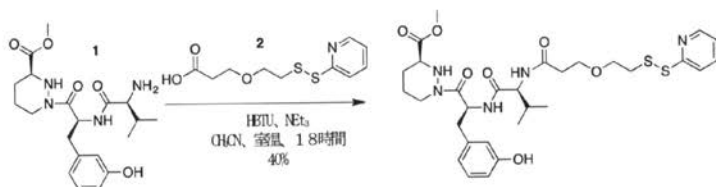
化合物-5を、化合物-3の調製において記載した通りに、中間体 I-8 (34 mg、77 μmol) の HCl 塩及び 2-(2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル) 酢酸 I-18 (13 mg、77 μmol) を出発物質として使用することにより調製して、化合物-5を得た。ESI-MS $m/z = 544.0$ $[\text{M} + \text{H}]^+$; 算出分子量 : 543.58。

メチル (S)-1-((S)-3-(3-ヒドロキシフェニル)-2-((S)-3-メチル-2-(3-(2-(ピリジン-2-イルジスルファニル) エトキシ) プロパンアミド) ブタンアミド) プロパノイル) ヘキサヒドロピリダジン-3-カルボキシレート (S F A X 6) の合成 :

【0353】

20

【化 6 3】



30

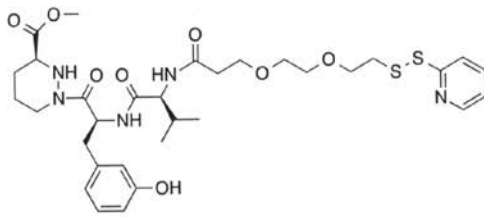
カルボン酸 2 (70 mg、0.270 mmol) 及び HBTU (204 mg、0.540 mmol、2.00 当量) を、3 mL のアセトニトリル中に混合し、得られた懸濁液を、室温にて 15 分間攪拌した。この期間の後、アミン 1 (中間体 I-8) (110 mg、0.270 mmol、1.00 当量) を、その後トリエチルアミン (113 μL 、0.810 mmol、3.00 当量) を加え、混合物を室温にて 18 時間攪拌した。次いで、混合物を、20 mL の飽和炭酸水素ナトリウムで処理し、2 $\times$ 30 mL の酢酸エチルで抽出した。プールした有機抽出物を、2 $\times$ 20 mL のブラインで洗浄し、飽和硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮した。残渣を、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し、ジクロロメタン : MeOH、100 : 1 ~ 50 : 1 で溶出し、70 mg (40%) の生成物を無色油状物として得た。R_f = 0.31 (ジクロロメタン : MeOH、20 : 1)。MS (ESI) 計算値 = 648.2 (M+H)、観測値 = 648.2。

40

S F A X 9 D S の合成 :

【0354】

【化 6 4】



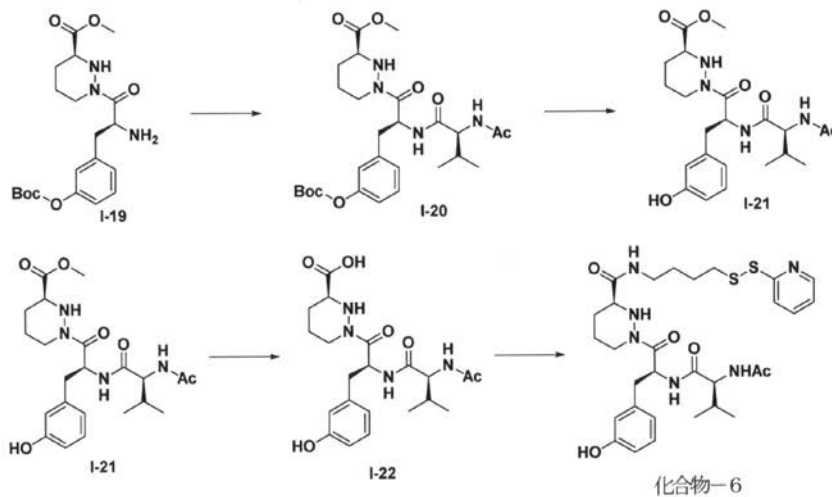
10

S F A X 9 D S を、S F A X 6 の合成に関して上に記載した同様の手順に従って合成した。

化合物－6 の合成

【 0 3 5 5】

【化 6 5】



20

30

化合物－6 を、中間体 I－19 で出発して調製し、化合物－6 を得た。E S I－M S $m/z = 631.0$ $[M+H]^+$ ；算出分子量：630.82。

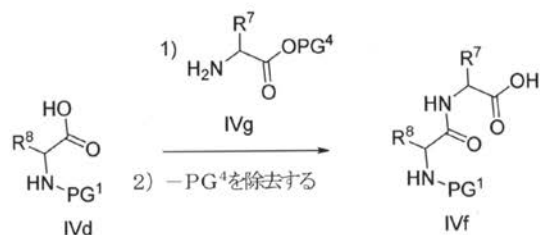
式 I V f の化合物の合成

式 I V f の化合物の合成は、下記のスキーム 6 に示すように合成され得る。

【 0 3 5 6】

【化 6 6】

スキーム 6



40

式中、 R^7 、 R^8 、及び Z^6 は、以前に定義した通りであり、 PG^1 は、Boc、Cbz、Alloc、及び Fmoc を含むがこれらに限定されない好適なアミン保護基であり、 PG^4 は、メチル、エチル、ベンジル、アリル、及びフェニルを含んだがこれらに限定

50

されないアルキルまたはアリール基であり、これは当業者に公知の方法により除去することができる。

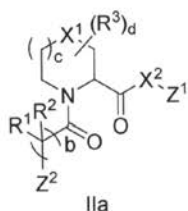
【0357】

典型的な手順では、化合物 I V d を、試薬 I V g と、当業者が熟知している標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で反応させる。酸及びアミンカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて、組み合わせる。アミド形成の後、保護基 PG⁴ を次いで、式 I V e の化合物の PG³ の除去に関して記載した条件（スキーム 4）を使用して除去する。

10

【0358】

【化67】



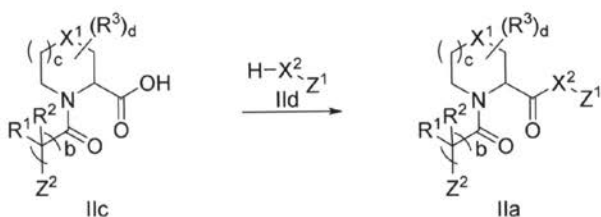
20

方法 B を使用して、下記のスキーム 7 に示すように式 I I a の化合物を調製し得る。

【0359】

【化68】

スキーム 7



30

式中、R¹、R²、R³、X¹、X²、Z¹ 及び Z² は、以前に定義した通りである。

【0360】

典型的な手順では、カルボン酸 I I c を、中間体 X I と、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で、反応させる。酸 I I c 及びカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、DCE、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて、組み合わせる。

40

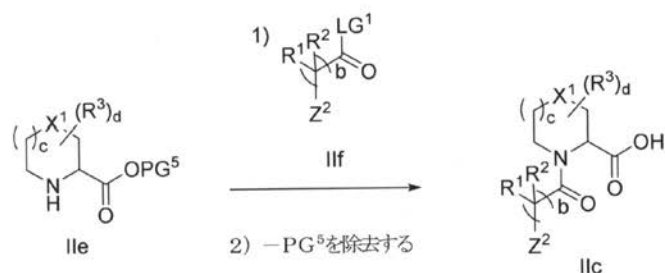
【0361】

下記のスキーム 8 に示すように式 I I c の化合物を合成し得る。

【0362】

【化 6 9】

スキーム 8



10

式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X^1 、及び Z^2 は、以前に定義した通りであり、 PG^5 は、メチル、エチル、ベンジル、アリル、及びフェニルを含んだがこれらに限定されないアルキルまたはアリール基であり、当業者に公知の方法により除去することができ、 LG^1 は、化合物IIeのアミンにより活性化及び置き換えることができる基、例えばOHである。あるいは、 LG^1 は、求核剤により置き換えることができる、適切なハロゲン化合物（例えば、F、Cl、及びBr）であり得る。

【0363】

典型的な手順では、IIeを、IIIf（ $\text{LG}^1 = \text{ハロゲン化合物}$ ）と、好適な塩基（ピリジン、トリエチルアミン、DIPEA、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下、適切な溶媒（THF、DCM、及びDMFを含むがこれらに限定されない）中、 $-78^\circ\text{C} \sim 120^\circ\text{C}$ の範囲、しかし最適には $-20^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ の温度範囲にて、反応させる。あるいは、 LG^1 がOHである場合、XIIを、試薬IIIfと、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で、反応させる。酸及びアミンカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及びNMMを含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて、組み合わせる。化合物IIIf（ $\text{LG}^1 = \text{ハロゲン化合物}$ ）が、好適なハロゲン化試薬を用いた処理により対応するカルボン酸から容易に作製され得ることは、当業者であれば理解するだろう。IIe及びIIIf間でのアミド形成の後、保護基 PG^5 を、次いで、式IVeの化合物の PG^3 の除去に関して記載した条件（スキーム4）を使用して除去して、化合物IIcを得た。

20

30

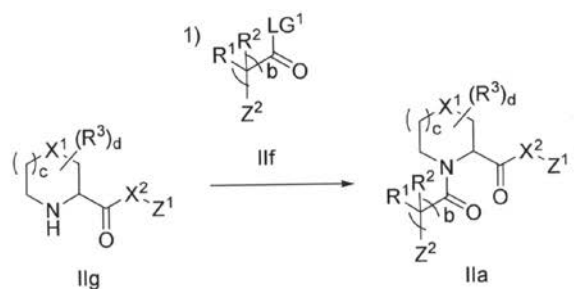
【0364】

方法B-2を使用して、下記のスキーム9に示すように式IIaの化合物を調製し得る。

【0365】

【化 7 0】

スキーム 9



40

式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 X^1 、 X^2 、 Z^1 及び Z^2 は、以前に定義した通りである。

50

反応は、化合物 I I g 及び化合物 I I f 間のカップリング反応に関して記載した条件（スキーム 8）下で実行され得る。

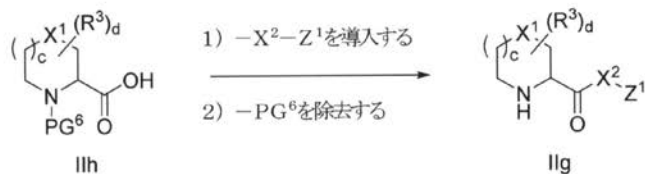
【0366】

式 I I g の化合物は、下記のスキーム 11 に示すように調製され得る。

【0367】

【化71】

スキーム 11



10

式中、 R^3 、 X^1 、 X^2 、 Z^1 は、以前に定義した通りであり、 PG^6 は、Boc、Cbz、Alloc、及び Fmoc を含むがこれらに限定されない好適なアミン保護基である。

【0368】

典型的な手順では、カルボン酸 I I g を、 $-X^2-Z^1$ 部分を含有する適切なカップリングパートナーと、当業者に公知の標準的なカップリング剤（例えば、EDC/HOBT、DCC、PyBOP、PyBROP、HATU、HBTU、COMU）の存在下で、反応させる。酸及びカップリングパートナーを、カップリング剤と、有機溶媒（DMF、ジクロロメタン、アセトニトリル、及びテトラヒドロフランを含むがこれらに限定されない）中、塩基（DIPEA、トリエチルアミン、及び NMM を含むがこれらに限定されない）の存在下で、室温または少し上昇した温度にて、組み合わせる。 PG^6 を、次いで、得られた中間体を当業者が熟知している適切な試薬と反応させることにより除去する。

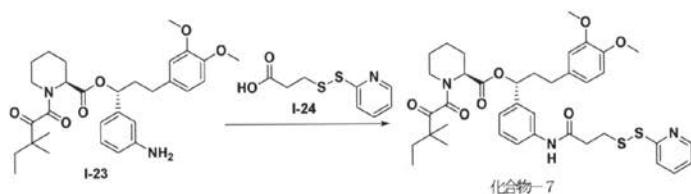
20

化合物-7 (C3SLF) の合成

【0369】

【化72】

30



テトラヒドロフラン（1.2 mL）中の中間体 I-24（18 mg、0.085 mmol）の溶液に、N-メチルモルホリン（10 μ L、0.085 mmol）を加えた。溶液を、 -20°C まで冷却し、次いで、クロロギ酸イソブチル（11 μ L、0.085 mmol）を滴下添加した。溶液を、すぐに 0°C まで温めた。45 分間 0°C にて攪拌した後、中間体 I-23 の TFA 塩（37 mg、0.057 mmol）を、無水テトラヒドロフラン（0.5 mL）中の N-メチルモルホリン（7 μ L、0.057 mmol）と混合し、5 分間にわたって混合無水物の 0°C 溶液に滴下添加した。得られた溶液を、1.5 時間 0°C にて攪拌し、その時点でメタノール（1 mL）を加え、溶液をすぐに室温まで温め、5 分間攪拌した。この溶液を、ジクロロメタン（75 mL）及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（50 mL）で希釈した。層を分離し、水層を、ジクロロメタン（ 2×30 mL）で抽出した。有機層を合一し、ブライン（20 mL）で洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥さ

40

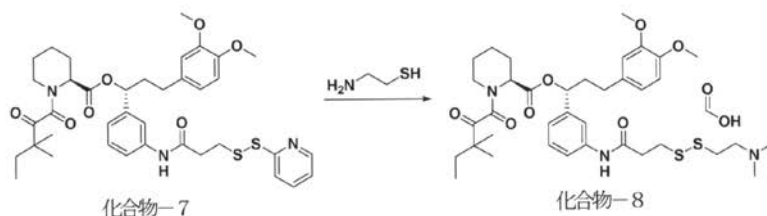
50

せ、濾過し、溶媒を、真空下で除去した。シリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン中 0～80% 酢酸エチル）によって精製し、化合物 7（C₃S₁L₁F）を白色泡状物として得た（20 mg、50% 収率）。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）δ 9.49（s, 1H）, 8.55（d, 1H）, 7.77（見かけの三重項, 1H）, 7.71–7.65（m, 2H）, 7.60–7.58（m, 1H）, 7.20–7.17（m, 1H）, 7.01（d, 1H）, 6.78–6.76（m, 1H）, 6.70–6.67（m, 2H）, 5.77（dd, 1H）, 5.33（d, 1H）, 3.86（s, 3H）, 3.85（s, 3H）, 3.35（d, 1H）, 3.25（t, 2H）, 3.15（dt, 1H）, 2.92（t, 2H）, 2.64–2.50（m, 2H）, 2.38（d, 1H）, 2.29–2.15（m, 1H）, 2.10–2.00（m, 1H）, 1.78–1.63（m, 3H）, 1.53–1.37（m, 3H）, 1.22（s, 6H）, 0.89（t, 3H, 回転異性体 1）, 0.80（t, 3H, 回転異性体 2）。ESI-MS m/z = 722.0 [M+H]⁺, 744.0 [M+Na]⁺; 算出分子量: 721.93。

化合物-8 の合成

【0370】

【化73】



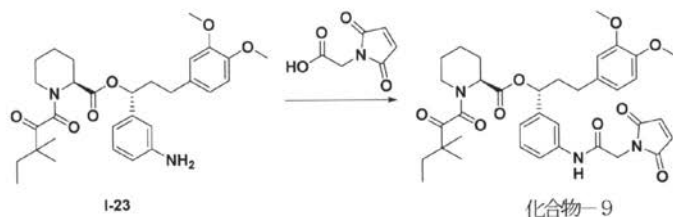
ジクロロメタン（0.5 mL）中の化合物 7（22 mg、0.031 mmol）の溶液に、トリエチルアミン（62 μL、0.55 mmol）、続いて 2-（ジメチルアミノ）エタントール（0. mL、0.0500 mmol）（4.8 mg、0.046 mmol）を加えた。室温にて 30 分間攪拌した後、溶液を、ジクロロメタン（30 mL）及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（30 mL）へと注いだ。層を分離し、水層を、ジクロロメタン（2×20 mL）で抽出した。有機層を、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、溶媒を、真空下で除去した。シリカゲルクロマトグラフィー（ジクロロメタン中 0～10% メタノール）によって精製し、不純物質を得て、これを逆相 HPLC（0.1% ギ酸を含む水中のアセトニトリル）によって再精製して、化合物-8（7.1 mg、21% 収率）のギ酸塩を白色固体として得た。¹H NMR（400 MHz, CDCl₃）δ 12.53（ブロード一重項, 1H）, 9.50（s, 1H）, 8.00（s, 1H）, 7.75（d, 1H）, 7.68（s, 1H）, 7.29（t, 1H）, 7.02（d, 1H）, 6.79–6.77（m, 1H）, 6.70–6.67（m, 2H）, 5.76（dd, 1H）, 5.29（d, 1H）, 3.86（s, 3H）, 3.85（s, 3H）, 3.36–3.27（m, 2H）, 3.23–3.11（m, 4H）, 2.90（t, 2H）, 2.79–2.71（m, 8H）, 2.62–2.50（m, 2H）, 2.55（d, 1H）, 2.28–2.17（m, 1H）, 2.12–2.03（m, 1H）, 1.72–1.61（m, 3H）, 1.49–1.36（m, 3H）, 1.22（s, 3H）, 1.21（s, 3H）, 0.88（t, 3H, 回転異性体 1）, 0.79（t, 3H, 回転異性体 2）。ESI-MS m/z = 716.1 [M+H]⁺; 算出分子

量：715.97。

化合物-9の合成

【0371】

【化74】



10

ジクロロメタン中の中間体 I-23 (15 mg、0.029 mmol)、3-(2,5-ジオキソピロール-1-イル)プロパン酸 (5.8 mg、0.034 mmol)、及び DMAP (0.4 mg、0.003 mmol) の室温の溶液に、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (9.4 mg、0.046 mmol) を加えた。室温にて15時間攪拌した後、得られた固体を、シリンジフィルターを通して濾過し、ジクロロメタンで洗浄した。溶媒を、真空下で除去し、得られた残渣を、酢酸エチルに入れた。-20℃まで冷却した後、懸濁液を、シリンジフィルターを通して濾過し、冷酢酸エチルで洗浄した。濾液を、酢酸エチル (30 mL) 及び水 (30 mL) で希釈した。層を分離し、水層を、酢酸エチル (2×20 mL) で抽出した。有機層を、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、溶媒を、真空下で除去した。シリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン中0~90% 酢酸エチル) によって精製して、化合物-9 (11 mg、60%収率) を油状物として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (ブロード一重項, 1H), 7.79 (d, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.29 (t, 1H), 6.98 (d, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.78-6.76 (m, 1H), 6.70-6.66 (m, 2H), 5.83 (dd, 1H), 5.37 (d, 1H), 4.43 (d, 1H), 4.37 (d, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.32 (d, 1H), 2.96 (t, 1H), 2.55 (t, 2H), 2.35 (d, 1H), 2.29-2.15 (m, 1H), 2.11-2.01 (m, 1H), 1.81-1.60 (m, 4H), 1.49-1.42 (m, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 0.93 (t, 3H, 回転異性体1), 0.82 (t, 3H, 回転異性体2)。ESI-MS m/z = 662.0 [M+H]⁺; 算出分子量: 661.75。

(R)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)-1-(3-(4-(ピリジン-2-イルジスルファニル)ブタンアミド)フェニル)プロピル (S)-1-(3,3-ジメチル-2-オキソペンタノイル)ピペリジン-2-カルボキシレート (C4-SLF) の合成:

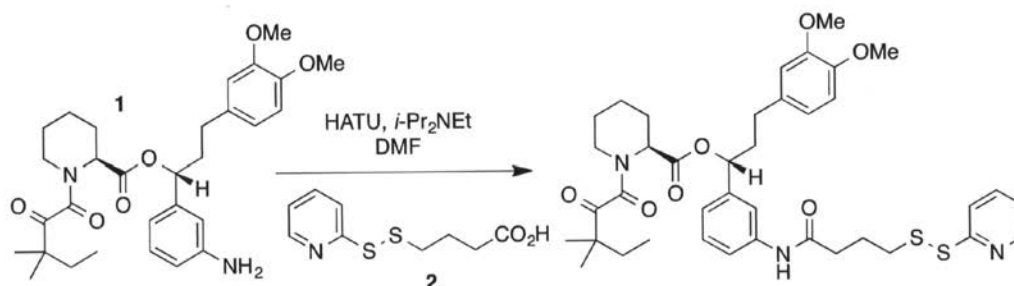
【0372】

20

30

40

【化 7 5】



10

DMF (3 mL) 中のアニリン 1 (90 mg、172 μmol 、1 当量)、ジスルフィド 2 (79 mg、343 μmol 、2 当量) 及びジイソプロピルエチルアミン (149 μL 、111 mg、858 μmol 、5 当量) の溶液に、HATU (130 mg、343 μmol 、2 当量) を加え、反応混合物を、室温にて 24 時間攪拌した。反応混合物を、水で希釈し、酢酸エチルで抽出した (3 回)。有機抽出物を、水、飽和塩化ナトリウムで洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、蒸発させた。残渣を、シリカゲル勾配溶出 (20 % 酢酸エチル : 80 % ヘプタン $\rightarrow$ 100 % 酢酸エチル) で精製して、主題の化合物 C4-SLF (98 mg、77 %) を得た。MS (ESI) 計算値 = 736.3 (M+H)、観測値 = 736.3。

20

実施例 2 : ある特定のコンジュゲートの合成

一般的プロトコル : このプロトコルは、標的タンパク質-化合物コンジュゲートの形成のための方法を記載する。

【0373】

試薬 : 100 % DMSO 中の化合物 (自社製) 及び哺乳類標的タンパク質 (自社製)

装置 : Mini-PROTEAN TGX ゲル (Bio-Rad)

実験プロトコル : 1 : 2 モル比の標的タンパク質及び化合物を、2 % DMSO を含有する、12.5 mM HEPES、pH 7.4、75 mM NaCl 緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37 $^{\circ}\text{C}$ にて 30 分間インキュベートし、続いて室温にて一晩インキュベートする。架橋効率を、SDS-PAGE ゲルによって評価する。コンジュゲートは、非架橋標的タンパク質よりゆっくりと移動する。チオール反応性化合物については、標的タンパク質への化合物の Cys 特異的付着は、コンジュゲートをその構成要素へと戻す、反応混合物への 100 mM DTT の添加の後に、SDS-PAGE によってさらに確認することができる。

30

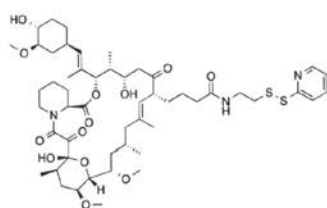
A. KRAS_{GTP}/S39C lite/C2-FK506 コンジュゲートの形成

試薬 : 100 % DMSO 中の C2-FK506 (自社製)、KRAS_{GTP}/S39C lite (自社製 ; G12V/S39C/C51S/C80L/C118S を含有する残基 1 ~ 169)。

【0374】

【化 7 6】

40



C2-FK506

50

装置：Mini-PROTEAN TGXゲル (Bio-Rad)

実験プロトコル：1：2モル比のKRAS_{GTP/S39C} lite及びC2-FK506を、2%DMSOを含有する、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37℃にて30分間インキュベートし、続いて室温にて一晩インキュベートする。架橋効率を、SDS-PAGEゲルによって評価する。KRAS_{GTP/S39C} lite上のシステイン39へのC2-FK506の付着もまた、100mM DTTとの反応混合物のインキュベーションによって評価される。

【0375】

結果：C2-FK506は、KRAS_{GTP/S39C} liteと効率的に架橋し、システイン39に対して特異的である (図1)。

B. KRAS_{GTP/G12C} lite/SFAX9DSコンジュゲートの形成

試薬：100%DMSO中のSFAX9DS (自社製)、KRAS_{GTP/G12C} lite (自社製；G12C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169)。

【0376】

装置：Mini-PROTEAN TGXゲル (Bio-Rad)

実験プロトコル：1：2モル比のKRAS_{GTP/G12C} lite及びSFAX9DSを、2%DMSOを含有する、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37℃にて30分間インキュベートし、続いて室温にて一晩インキュベートする。架橋効率を、SDS-PAGEゲルによって評価する。野生型CypAも、化合物と架橋した。CypA上の反応性システインとしてのシステイン52を、セリンに変異させ、プレゼンター架橋を抑止した。

【0377】

結果：SFAX9DSは、KRAS_{GTP/G12C} liteタンパク質と効率的に架橋し、CypA_{C52S}は、SFAX9DSに架橋しない (図2)。

実施例3：ある特定の複合体の形成

一般的プロトコル：このプロトコルは、プレゼンタータンパク質、化合物、及び哺乳類標的タンパク質から構成される複合体の形成及び単離のための2つの方法を記載する。

【0378】

試薬：100%DMSO中の化合物 (自社製)、プレゼンタータンパク質 (自社製) 及び哺乳類標的タンパク質 (自社製)

装置：Mini-PROTEAN TGXゲル (Bio-Rad)、Superdex 75 (GE Healthcare、CV120mL)。

【0379】

実験プロトコルA：事前にコンジュゲートした化合物及びタンパク質

1：2モル比のコンジュゲート及びプレゼンタータンパク質を、2%DMSOを含有する、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37℃にて30分間インキュベートし、続いて室温にて一晩インキュベートする。純粋な複合体を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 精製によって単離する。反応混合物を、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたSuperdex 75カラム (CV120mL) に直接注入する。複合体は、未反応の標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質より高い分子量で溶出する。溶出ピークにおける複合体の存在を確認するために、SDS-PAGEによって試料を評価する。

【0380】

実験プロトコルB：架橋試薬、プレゼンタータンパク質及び標的タンパク質

1：2：2モル比の化合物、プレゼンタータンパク質、及び標的タンパク質を、2%DMSOを含有する、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37℃にて30分間インキュベートし、続いて室温にて一

10

20

30

40

50

晩インキュベートする。純粋な複合体を、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）精製によって単離する。反応混合物を、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたSuperdex75カラム（CV120mL）に直接注入する。複合体は、未反応の標的タンパク質及びプレゼンタータンパク質より高い分子量で溶出する。溶出ピークにおける複合体の存在を確認するために、SDS-PAGEによって試料を評価する。

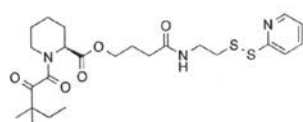
A. KRAS_{GTP/S39C} lite/C2Holt/FKBP12三元複合体の形成

試薬：100%DMSO中のC2Holt（自社製）、KRAS_{GTP/S39C} lite（自社製；G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169）、及びFKBP12（自社製）。

10

【0381】

【化77】



C2Holt

20

装置：Mini-PROTEAN TGXゲル（Bio-Rad）、Superdex75（GE Healthcare、CV120mL）

実験プロトコル：1：2：2モル比のC2-Holt、FKBP12、及びKRAS_{GTP/S39C} liteを、2%DMSOを含有する、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37℃にて30分間インキュベートし、続いて室温にて一晚インキュベートする。純粋な複合体を、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）精製によって単離する。反応混合物を、12.5mM

HEPES、pH7.4、75mM NaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたSuperdex75カラム（CV120mL）に直接注入する。複合体は、注入後およそ69mLで溶出し、未反応のKRAS_{GTP/S39C} lite及びFKBP12は、注入後、それぞれ、およそ75mL及び87mLで溶出する。溶出ピークにおけるKRAS_{GTP/S39C} lite及びFKBP12の存在を確認するために、SDS-PAGEによってさらに試料を評価する。

30

【0382】

結果：溶出ピークのSECプロファイル及びSDS-PAGE分析により、KRAS_{GTP/S39C} lite/C2Holt/FKBP12複合体の形成が確認される（図3A及び3B）。

B. KRAS_{GDP/S39C} lite/SFAC4DS/CypA_{C52S}三元複合体の形成

試薬：100%DMSO中のSFAC4DS（自社製）、KRAS_{GDP/S39C} lite（自社製；G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169）、及びCypA_{C52S}（自社製）。

40

【0383】

装置：Mini-PROTEAN TGXゲル（Bio-Rad）、Superdex75（GE Healthcare、CV120mL）

実験プロトコル：1：2：2モル比のSFAC4DS、CypA_{C52S}、及びKRAS_{GDP/S39C} liteを、2%DMSOを含有する、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37℃にて30分間インキュベートし、続いて室温にて一晚インキュベートする。純粋な複合体を、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）精製によって単離する。反応混合物を、12.5

50

mM HEPES、pH 7.4、75 mM NaCl を含有する緩衝液で事前に平衡させた Superdex 75 カラム (CV120 mL) に直接注入する。複合体は、注入後およそ 69 mL で溶出し、未反応の KRAS_{GDP}/S39C lite 及び CypA_{C52S} は、注入後、それぞれ、およそ 75 mL 及び 80 mL で溶出する。溶出ピークにおける KRAS_{GDP}/S39C lite 及び CypA_{C52S} の存在を確認するために、SDS-PAGE によって試料をさらに評価する。

【0384】

結果：溶出ピークの SEC プロファイル及び SDS-PAGE 分析により、KRAS_{GDP}/S39C lite/SFAC4DS/CypA_{C52S} 複合体の形成が確認される (図 4)。

C. PTP1B_{S187C} lite/C3SLF/FKBP12 三元複合体の形成

試薬：100% DMSO 中の C3SLF (自社製)、PTP1B_{E186C} lite (自社製；C32S/C92V/C121S/S187C を含有する残基 1~293)、及び FKBP12 (自社製)。

【0385】

装置：Mini-PROTEAN TGX ゲル (Bio-Rad)、Superdex 75 (GE Healthcare、CV120 mL)

実験プロトコル：1:3:3 モル比の C3SLF、FKBP12、及び PTP1B_{S187C} lite を、4% DMSO を含有する、12.5 mM HEPES、pH 7.4、75 mM NaCl 緩衝液中で一緒に混合する。反応物を、37℃ にて 30 分間インキュベートし、続いて室温にて一晩インキュベートする。純粋な複合体を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 精製によって単離する。反応混合物を、12.5 mM HEPES、pH 7.4、75 mM NaCl を含有する緩衝液で事前に平衡させた Superdex 75 カラム (CV120 mL) に直接注入する。複合体は、注入後およそ 62 mL で溶出し、未反応の FKBP12 は、注入後、それぞれ、およそ 75 mL (二量体) 及び 90 mL (単量体) で溶出する。溶出ピークにおける PTP1B_{S187C} lite 及び FKBP12 の存在を確認するために、SDS-PAGE によって試料をさらに評価する。遊離 PTP1B_{S187C} lite 及び FKBP12 混合物を、同じ条件下で Superdex 75 カラムに供して、それらの溶出時間を決定する。

【0386】

結果：遊離 PTP1B_{S187C} lite 及び FKBP12 タンパク質の SEC プロファイル及び SDS-PAGE 分析 (図 5A) により、遊離 PTP1B_{S187C} lite がおよそ 64~65 mL で溶出することが確認される。溶出ピークの SEC プロファイル及び SDS-PAGE 分析により、PTP1B_{S187C} lite/C3SLF/FKBP12 複合体の形成を確認し、これはおよそ 61 mL で溶出する (図 5B)。
実施例 4：プレゼンタータンパク質が存在するときコンジュゲートは形成されるが、存在しないときは形成されない

このプロトコルは、コンジュゲート形成のプレゼンター依存性を評価する試みにおける、質量分析及びゲルシフトアッセイを使用した架橋効率を分析する方法を記載する。

【0387】

試薬：100% DMSO 中の化合物 (自社製)、FKBP12 (自社製)、KRAS_{GTP}/G12C (自社製、残基 1~169)。

実験プロトコル：ジスルフィド架橋反応の速度論を追跡するために、Advance Bio RP-mAb C4 カラム (2.1×100 mm、3.5 μm) を採用し、オートサンプラーを備えた Agilent 6230 TOF-LC/MS 及び Agilent 1260 HPLC 機器を使用した。HPLC グレードのアセトニトリル及び水 (それぞれ、1.0 mM のギ酸アンモニウム及び 1 容量% のギ酸を含有) を、移動相として使用し、以下のランプを用いた：0.6 mL/分の流量、水：アセトニトリル = 95:5、0.0~13.0 分を水：アセトニトリル = 5:95、13.0~17.0 分にランピング。総時間 = 17.0 分。

【0388】

全ての架橋反応は、0.5 mLのガラス製インサートを備えた1.5 mLのあめ色のガラス製バイアル中で行った。水溶性ペプチド（配列番号1：YQNLLVGRNRGEELID）を、内部標準として採用した。内部標準の実際の配列は重要でないが、アミノ酸残基の選択は、架橋アッセイにおける干渉を回避するために重大であった。したがって、プロリン（FKBP12に干渉する）及びシステイン（ジスルフィド結合形成に干渉する）残基は除外した。全ての反応物及び標準液は、HEPES（pH7.4、1.0 mM MgCl₂）緩衝液中で調製した。

【0389】

全ての反応の前に、一連の標準液（FKBP12に関する標準曲線分析の一例を、下記の表3に示す）を使用して個々の構成要素に関する標準曲線を得た。標準曲線からのデータを使用して、 μmol のタンパク質試料を、面積比（試料：std）に対してプロットし、線形フィット（ $y = mx + c$ ）を用いて、傾き及び切片を得た。これらの標準曲線に関わる傾き及び切片の値は、反応の前及び経過中の基質と生成物濃度の評価中に明らかとなった。全ての基質／生成物について、最初の注入に続いてブランク注入を行って、残留タンパク質／試薬の存在を確認した。この分析に基づき、オートサンプラーのシーケンスを、もしあれば、残留構成要素の除去のために、適切な数のブランク注入を含むように調節することができる。MSスペクトルは、Agilent MassHunter v B. 07. 0ソフトウェアを使用して分析した。

【0390】

【表3】

表3. FKBP12に関する標準曲線。傾き=6.53、切片=-0.64、
 $R^2 = 0.999$

溶液	濃度 (mM)	内部標準下面積 ($R_t = 7.1$ 分)	FKBP-12 下面積 ($R_t = 8.9$ 分)	試料：Stdの比率
1	100	2615940.1	40314760.1	15.41
2	10	5244417.4	8718886.5	1.66
3	1	5868006.9	1745344.5	0.30
4	0.5	5407354.8	910748.2	0.17
5	0.1	5626447.0	237074.5	0.04

標的タンパク質に対するリガンド架橋のプレゼンター依存性を評価する代表的な実験では、KRAS_{GTP/G12C}及びC3またはC4SLFリガンドのいずれかを、FKBP12の存在下または不在下、 $2\mu\text{M}$ KRAS、 $10\mu\text{M}$ FKBP12、 $10\mu\text{M}$ C3またはC4SLFの濃度で、4時間室温にて、 12.5mM HEPES、pH7.4、 75mM NaCl、 1mM MgCl₂、3% DMSO中でインキュベートした。上記の方法を使用したりガンドとのジスルフィド架橋を受けているKRASの量の分析。表4に示すように、5倍から10倍増加した架橋効率が、プレゼンターの存在下で観察された。

【0391】

【表 4】

表 4. C3SLF及びC4SLF架橋効率を分析したMS

	C3SLF		C4SLF	
FKBP12	—	+	—	+
KRASへの架橋率 (%)	9.6	47.5	7.0	69.8

10

質量分析と平行して、C3またはC4SLFとの架橋反応を、架橋反応をより高い濃度で設定した（60 μ M KRAS、180 μ M FKBP12、及び180 μ M C3またはC4SLF）ことを除いて、上記と同じ実験条件で、FKBP12の存在下または不在下で、12% SDS-PAGEを使用して、ゲルシフトアッセイに供し、これらをMMTSによりクエンチして、反応を終了させた。MSデータと同様に、リガンド架橋効率は、FKBP12の存在下で有意にブーストされたが、これはC4-SLFに関してより明白である（図6）。

実施例5：X線分析によるプレゼンタータンパク質／標的タンパク質界面構造の決定

このプロトコルは、FKBP12-C2Holt-KRAS_{GTP/S39C}の三元複合体の結晶化、及びこの三元複合体の結晶構造に関する構造決定方法を記載する。

A. FKBP12-C2Holt-KRAS_{GTP/S39C}三元複合体の結晶構造決定

試薬：100%DMSO中のリガンド（C2Holt）（自社製）、FKBP12（自社製）、KRAS_{GTP/S39C} lite（自社製、G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169）。

装置：Superdex75（GE Healthcare）

実験プロトコル：CHolt及びFKBP12を、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl緩衝液、1mM MgCl₂、2%DMSO中で3：1及び1.5：1の過剰モルでKRAS_{GTP/S39C} liteに加え、20℃にて一晩、または4℃にて36～72時間インキュベートした。純粋な複合体を、12.5mM HEPES、pH7.4、75mM NaCl、及び1mM MgCl₂中、Superdex75カラム上でサイズ排除クロマトグラフィーによって単離した。精製した複合体を（15～20mg/mlで）、シッティングドロップ蒸気拡散法を使用して20℃にて結晶化スクリーニングに供した。結晶を、0.1M MES、pH6.5、20～22% PEG20,000を含有するウェル溶液中で成長させた。データ収集のために、結晶を、15%グリセロールを補充した母液を含有する溶液に移し、次いで、液体窒素中で凍結した。回折データセットを、Advanced Photon Source（APS）にて収集し、HKLプログラムで処理した。分子置換溶液を、CCP4スイートのプログラムPHASERを使用して、FKBP12（PDB-ID 1FKD）及びKRAS（PDB-ID 3GFT）の公開構造を検索モデルとして使用して得た。それに続くモデル構築及び精密化は、ソフトウェアパッケージCCP4及びCootを用いて標準的なプロトコルに従って行った。

【0392】

結果：FKBP12-C2Holt-KRAS_{GTP/S39C}の全体構造：結晶は、非対称単位でFKBP12及びKRAS_{GTP/S39C}の1つのヘテロ二量体を含有する（図7）。モデルは、FKBP12の残基Met1からGlu108、及びKRAS_{GTP/S39C}のMet1からLys169を含んだ。得られた電子密度は、リガンドの配向及び立体配座を含む、明確な結合様式を示す。連続的な電子密度が、タンパク質のシステイン及びリガンドからの硫黄から生じたジスルフィドについて観察された。

【0393】

20

30

40

50

C2Holtの結合に関わるKRAS_{GTP/S39C}残基(4 Åのカットオフ距離)は、Glu37、Cys39、Leu56、及びMet67である。FKBP12への結合に関わるKRAS_{GTP/S39C}残基は、Glu3、Lys5、Ile36、Cys39、Tyr40、Arg41、Asp54、Glu63、Tyr64、Met67、及びArg73である。KRAS_{GTP/S39C}の結合に関わるFKBP12残基は、Arg43、Lys53、Gln54、Glu55、Thr86、Pro89、Gly90、及びIle92である。C2Holtの結合に関わるFKBP12残基は、Tyr27、Phe37、Asp38、Phe47、Glu55、Val56、Ile57、Trp60、Tyr83、His88、Ile91、Ile92、及びPhe100である。

【0394】

複合体の総埋込表面積は、1,947 Å²である。KRAS_{GTP/S39C}の埋込表面積は、600 Å²であり、このうち、501 Å²は、FKBP12(83%)が寄与し、99 Å²は、C2Holt(17%)が寄与する。FKBP12の埋込表面積は、762 Å²であり、このうち、500 Å²は、KRAS_{GTP/S39C}(66%)が寄与し、262 Å²は、C2Holt(34%)が寄与する。C2Holtの埋込表面積は、584 Å²であり、このうち、132 Å²は、KRAS_{GTP/S39C}(23%)が寄与し、452 Å²は、FKBP12(77%)が寄与する。KRAS_{GTP/S39C}及びFKBP12間のタンパク質-タンパク質界面は、3つの分子間H結合を含む、疎水性及び極性相互作用の両方によって形成される。C2Holt及びFKBP12間の結合界面は、疎水性相互作用が大きく寄与するが、リガンドの3個のカルボニル基、ならびにFKBP12のTyr27、Ile57、及びTyr83の間の3つのH結合も寄与する。C2Holtは、設計によってKRAS_{GTP/S39C}との最小の接触を形成する(99 Å²)、KRAS_{GTP/S39C}のGlu37と1のH結合を形成する。最終構造のデータ収集及び精密化統計は、下記の表5に列挙する。

B. KRAS_{GDP/S39C}/SFAC4DS/CypA_{C52S} 三元複合体の結晶構造決定

試薬：100% DMSO中のリガンド(SFAC4DS)(自社製)、CypA_{C52S}(自社製)、KRAS_{GDP/S39C} lite(自社製、G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1~169)。

【0395】

装置：Superdex75(GE Healthcare)

実験プロトコル：SFAC4DS及びCypA_{C52S}を、12.5 mM HEPES、pH 7.4、75 mM NaCl緩衝液、1 mM MgCl₂、2% DMSO中で2:1及び2:1の過剰モルでKRAS_{GDP/S39C} liteに加え、20℃にて一晩インキュベートした。純粋な複合体を、12.5 mM HEPES、pH 7.4、75 mM NaCl、及び1 mM MgCl₂中、Superdex75カラム上でサイズ排除クロマトグラフィーによって単離した。精製した複合体を(15 mg/mlで)、シッティングドロップ蒸気拡散法を使用して20℃にて結晶化スクリーニングに供した。結晶を、0.1 M Bis-Tris、pH 6.5、25% PEG3350を含有するウェル溶液中で成長させた。データ収集のために、結晶を、これを40%のPEGとするためにさらなるPEG3350を補充した母液を含有する溶液に移し、次いで、液体窒素中で凍結した。回折データセットを、Advanced Light Source(ALS)にて収集し、HKLプログラムで処理した。分子置換溶液を、CCP4スイートのプログラムPHASERを使用して、CypA(PDB-ID 1CWA)及びKRAS(PDB-ID 3GFT)の公開構造を検索モデルとして使用して得た。それに続くモデル構築及び精密化は、ソフトウェアパッケージCCP4及びCootを用いて標準的なプロトコルに従って行った。

【0396】

結果：CypA_{C52S}-SFAC4DS-KRAS_{GDP/S39C}の全体的構造：結晶は、非対称単位でCypA_{C52S}及びKRAS_{GDP/S39C}の1つのヘテロ二

10

20

30

40

50

量体を含む (図 8)。モデルは、CypA の残基 Met 1 から Glu 165、及び K R A S_{GDP / S39C} の Met 1 から Lys 169 を含んだ。得られた電子密度は、リガンドの配向及び立体配座を含む、明確な結合様式を示す。連続的な電子密度が、タンパク質のシステイン及びリガンドからの硫黄から生じたジスルフィドについて観察された。

【0397】

S F A C 4 D S の結合に関わる K R A S_{GDP / S39C} 残基 (4 Å のカットオフ距離) は、Glu 3、Lys 5、Cys 39、Arg 41、Leu 52、Asp 54、Ile 55 及び Leu 56 である。CypA_{C52S} への結合に関わる K R A S_{GDP / S39C} 残基は、Glu 37、Asp 38、Cys 39、Arg 41、Gln 43、Leu 56、Ala 66、Met 67、Gln 70、及び Thr 74 である。K R A S_{GDP / S39C} の結合に関わる CypA_{C52S} 残基は、Arg 55、Ile 57、Arg 69、Asn 71、Thr 73、Ala 81、Ala 103、Arg 148、及び Asn 149 である。S F A C 4 D S の結合に関わる CypA_{C52S} 残基は、Arg 55、Phe 60、Met 61、Gln 63、Gly 72、Ala 101、Asn 102、Gln 111、Phe 113、及び His 126 である。

【0398】

この複合体の総埋込表面積は、タンパク質-タンパク質界面における部分的な構造的障害によって計算することができない。計算に対して障害となる領域を除いて、タンパク質-タンパク質界面での埋込表面積は、1, 350 Å² 超であり、このうち、30% 超は、S F A C 4 D S (443 Å²) が寄与する。K R A S_{GDP / S39C} 及び CypA_{C52S} 間のタンパク質-タンパク質界面は、2つの分子間H結合を含む、疎水性及び極性相互作用の両方によって形成される。S F A C 4 D S 及び CypA 間の結合界面は、疎水性及び極性相互作用の両方が寄与する。リガンドのカルボニル及びN-H基、ならびにCypA_{C52S} の残基 Arg 55、Gln 63、Asn 102、及び His 126 の間に6つのH結合が存在する。S F A C 4 D S は、K R A S_{GDP / S39C} と最小の直接的接触を形成するが、K R A S_{GDP / S39C} の Arg 41 と1つのH結合を形成する。最終構造のデータ収集及び精密化統計は、下記の表5に列挙する。

C. P T P 1 B_{S187C} / C 3 S L F / F K B P 1 2 三元複合体の結晶構造決定

試薬：100% DMSO 中のリガンド (C 3 S L F) (自社製)、F K B P 1 2 (自社製)、P T P 1 B_{S187C} l i t e (自社製、C 3 2 S / C 9 2 V / C 1 2 1 S / S 1 8 7 C を含む残基 1 ~ 169)。

【0399】

装置：Superdex 75 (GE Healthcare)、Gryphon (Art Robbins Instruments)

実験プロトコル：C 3 S L F 及び F K B P 1 2 を、12.5 mM HEPES、pH 7.4、75 mM NaCl 緩衝液、4% DMSO 中で3:1の過剰モルで P T P 1 B_{S187C} l i t e に加え、36~72時間4℃にてインキュベートした。純粋な複合体を、12.5 mM HEPES、pH 7.4 及び 75 mM NaCl 中、Superdex 75 カラム上でサイズ排除クロマトグラフィーによって単離した。精製した複合体を (15 mg/ml で)、シッティングドロップ蒸気拡散法を使用して20℃にて結晶化スクリーニングに供した。結晶を、0.2 M 酢酸マグネシウム、20% w/v PEG 3350 を含むウェル溶液中で成長させた。データ収集のために、結晶を、25% PEG 400 を補充した母液を含む溶液に移し、次いで、液体窒素中で凍結した。回折データセットを、Advanced Photon Source (APS) にて収集し、XDS プログラムで処理した。分子置換溶液を、CCP4 スイートのプログラム PHASER を使用して、F K B P 1 2 (PDB-ID 2PPN) 及び P T P 1 B (PDB-ID 2NT7) の公開構造を検索モデルとして使用して得た。それに続くモデル構築及び精密化は、ソフトウェアパッケージ CCP4 及び COOT を用いて標準的なプロトコルに従って行った。

【0400】

結果：FKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C}の全体的構造：結晶は、非対称単位でFKBP12-C3SLF-PTP1B_{S187C}の2つの複合体分子を含有する（図9A）。モデルは、FKBP12の残基Gly2からGlu108、及びPTP1B_{S187C}のGlu6からPhe280を含んだ。得られた電子密度は、リガンドの配向及び立体配座を含む、明確な結合様式を示す。連続的な電子密度が、タンパク質のシステイン及びリガンドからの硫黄から生じたジスルフィドについて観察された。

【0401】

複合体の総埋込表面積は、 $1,042 \text{ \AA}^2$ である。PTP1B_{S187C}の埋込表面積は、 $427 \text{ \AA}^2$ である。C3SLFの埋込表面積は、 $615 \text{ \AA}^2$ である（図9B）。PTP1B_{S187C}及びFKBP12間のタンパク質-タンパク質界面は、疎水性及び極性相互作用の両方によって形成される。

10

D. MCL1_{S245C}/C3SLF/FKBP52三元複合体の結晶構造決定

試薬：100% DMSO中のリガンド（C3SLF）（自社製）、FKBP52（自社製、残基1～140）、MCL1_{S245C} lite（自社製、S245C/C286Sを含有する残基172～327）。

【0402】

装置：Superdex75（GE Healthcare）、Gryphon（Art Robbins Instruments）

実験プロトコル：C3SLF及びFKBP52を、 12.5 mM HEPES、 $\text{pH} 7.4$ 、 75 mM NaCl緩衝液、2% DMSO中で3:1の過剰モルでMCL1_{S245C} liteと混合し、24～48時間4℃にてインキュベートした。純粋な複合体を、 12.5 mM HEPES、 $\text{pH} 7.4$ 及び 75 mM NaCl中、Superdex75カラム上でサイズ排除クロマトグラフィーによって単離した。精製した複合体を（ 15 mg/ml で）、シッティングドロップ蒸気拡散法を使用して20℃にて結晶化スクリーニングに供した。結晶を、 2.1 M リンゴ酸を含有するウェル溶液中で成長させた。データ収集のために、結晶を、20%グリセロールを補充した母液を含有する溶液に移し、次いで、液体窒素中で急速冷凍した。 $3.0 \text{ \AA}$ 分解能回折データセットを、Advanced Photon Source（APS）にて測定し、XDSプログラムで処理した。分子置換溶液を、CCP4スイートのプログラムPHASERを使用して、FKBP52（PDB-ID 1N1A）及びPTP1B（PDB-ID 3MK8）の公開構造を検索モデルとして使用して得た。それに続くモデル構築及び精密化は、ソフトウェアパッケージCCP4及びCOOTを用いて標準的なプロトコルに従って行った。

20

30

【0403】

結果：結晶は、非対称単位でMCL1_{S245C}/C3SLF/FKBP52の1つの複合体分子を含有する（図10）。得られた電子密度は、リガンドの配向及び立体配座を含む、2つのタンパク質の間の明確な結合を明らかにした。連続的な電子密度が、タンパク質のシステイン及びリガンドからの硫黄から生じたジスルフィドについて観察された。複合体の埋込表面積は、 $1,410 \text{ \AA}^2$ であり、このうち、およそ60%は、FKBP52（ $804 \text{ \AA}^2$ ）が寄与し、およそ40%は、C3-SLF（ $606 \text{ \AA}^2$ ）が寄与する。分解能が制限されているため、タンパク質-タンパク質及びタンパク質-リガンド相互作用における詳細な分析は、実行可能でなかった。

40

【0404】

【表 5】

表 5. データ収集及び精密化統計

	構造 A	構造 B	構造 C	構造 D
分解能 [Å]	47.8-1.4	70.1-1.6	49.0-2.4	65.9-3.0
反射の数 (ワーキング/試験)	50,557/2,708	34,377/1,790	30,175/1,543	5,343/245
R _{結晶} [%]	18.9	17.9	23	33.2
R _{自由} [%] ¹	21.7	21.2	28.1	37.8
原子の総数:				
タンパク質	2,202	2,528	6,192	2,035
水	268	171	38	0
リガンド	69	63	43	43
イオン	1	1	0	0
理想的な幾何学からの偏差: ²				
結合距離 [Å]	0.007	0.011	0.004	0.01
結合角 [°]	1.33	1.49	0.87	1.3
ラマチャンドラプロット: ³				
最適領域 [%]	93.8	96.5	93.3	95.2
許容される領域 [%]	6.2	3.1	4.9	4.4
許容されない領域 [%]	0	0.3	1.8	0.4

¹試験セットは、測定された反射の 5 %を含有する²幾何学的目標値からの平均二乗偏差³RAMPAGEで算出

実施例 6: TR-FRET による複合体形成の決定

TR-FRET 技術 (LANCIE、Perkin Elmer) は、2 つの融合タグ付きタンパク質、例えば、タンパク質 1 / タグ A 及びタンパク質 2 / タグ B、ここで、A 及び B は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、ヘキサヒスチジン (His₆)、FLAG、ビオチン-avi、Myc、及びヘマグルチニン (HA) のいずれかであることができる、の二元会合を検出する標準的方法である。この実施例では、この技術は、プレゼンタータンパク質と標的タンパク質との化合物が促進する会合を測定するために使用される。プレゼンタータンパク質 / タグ A 及び標的タンパク質 / タグ B の混合物を、本発明の化合物を含有する 384 ウェルアッセイプレートに加え、15 分間インキュベートする。抗融合タグ A または B ユウロピウム-キレートドナー、及び抗融合タグ A または B アロフィコシアニンアクセプターもしくは U light アクセプター試薬の混合物を加え、反応物を 240 分間インキュベートする。TR-FRET シグナルは、励起 = 320 nm、発光 = 665 / 615 nm を使用して EnVision マイクロプレートリーダー (Perkin Elmer) 上で読み取る。三元複合体形成を促進する化合物は、DMSO 対照ウェルに対して TR-FRET 比の増加を引き出すものと同定される。

TR-FRET による CYP A-化合物 3-KRAS_{G12C}-GTP 複合体形成の決定

Avi タグ付きシクロフィリン A 及び His タグ付き KRAS_{G12C}-GTP を、漸増濃度のリガンド (化合物 3) と混合し、室温にて 15 分間インキュベートし、三元複合体の形成を可能とした。次いで、抗 His Eu-W1024 及びストレプトアビジン APC の事前混合物を加え、60 分間インキュベートした。TR-FRET シグナルは、E

10

20

30

40

50

nVisionマイクロプレートリーダー（Perkin Elmer、励起320nm、発光665/615nm）上で読み取る。プレゼンター及び標的タンパク質を伴わないカウンタースクリーニングも実行して、化合物単独の寄与を除外する。

【0405】

試薬及び機器

- ・His6-KRAS_{G12C}-GTP（自社製；残基1～169）；PBS緩衝液、pH7.4中1.2mM
- ・Avi-CYPA（自社製；残基1～165）；PBS緩衝液、pH7.4中556μM
- ・抗His-Eu-W1024（Perkin Elmer）
- ・ストレプトアビジンAPC（Perkin Elmer）
- ・リガンド（W21487）、100%DMSO中10mM
- ・nVision（Perkin Elmer）
- ・8チャンネル少容量カセットを備えるCombi Multidrop液体ディスペンサー
- ・384ウェルProxiPlate（ブラック）

実験プロトコル

1. Mosquitoを使用して、100nL/ウェルの化合物（DMSO中で濃度は変動する）を384ウェルブラックProxiPlateへと分注して、アッセイレディプレート（ARP）を作製する。
2. 40mM Hepes、pH8.0、200mM NaCl、2mM MgCl₂、0.1%BSA及び0.004%Tween-20を含有する2×アッセイ緩衝液を作製する。
3. 1×アッセイ緩衝液中で、2×PRE-MIX A：100nMのHis6-KRAS_{G12C}-GTP（1～169）及び1000nMのAvi-CypA（1～165）を作製する。
4. Multidrop Combiを使用して、2×PRE-MIX AをARPへと分注する（5μl/ウェル）。室温にて15分インキュベートする。
5. 2×PRE-MIX B：10nMの抗His-Eu-W1024及び40nMのSA-APCを作製する。
6. Multidrop Combiを使用して、2×PRE-MIX BをARPへと分注する（5μl/ウェル）。Combi上で短時間振とうし、室温にて60分インキュベートする。
7. nVision上で読み取る（励起：320nm；発光1：615nm；発光2：665nm）。
8. Dotmaticsを使用してデータを処理する。4パラメータ非線形フィットを使用して曲線をフィットさせて、三元複合体の形成に関するEC50値を決定する。

【0406】

結果：結合曲線（図11）は、2.1μMの算出EC50値を伴う、CYPA-化合物3-KRAS_{G12C}-GTP三元複合体の化合物3に依存する複合体形成を実証する。

実施例7：増幅発光近接ホモジニアスアッセイによる複合体形成の決定

AlphaScreen技術（Perkin Elmer）は、2つの融合タグ付きタンパク質、例えば、タンパク質1/タグA及びタンパク質2/タグB、ここで、A及びBは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、ヘキサヒスチジン（His₆）、FLAG、ビオチン-avi、Myc、及びヘマグルチニン（HA）のいずれかであることができる、の二元会合を検出する標準的方法である。この実施例では、この技術は、プレゼンタータンパク質と標的タンパク質との化合物が促進する会合を測定するために使用される。プレゼンタータンパク質/タグA及び標的タンパク質/タグBの混合物を、本発明の化合物を含有する384ウェルアッセイプレートに加え、15分間インキュベートする。抗融合タグAまたはB-AlphaScreenドナービーズ、及び抗融合タグAまたはB-AlphaScreenアクセプタービーズの混合物を加え、反応物を240

分間インキュベートする。AlphaScreenシグナルは、励起=680nm、発光=585nmを使用してEnvisionマイクロプレートリーダー(Perkin Elmer)上で読み取る。三元複合体形成を促進する化合物は、DMSO対照ウェルに対してAlphaScreenシグナルの増加を引き出すものと同定される。

アルファLISAによるCYPA-化合物3-KRAS_{G12C}-GTP複合体形成の決定

Aviタグ付きシクロフィリンA及びHisタグ付きKRAS_{G12C}-GTPを、漸増濃度のリガンド(化合物3)と混合し、室温にて60分間インキュベートし、三元複合体の形成を可能とした。次いで、ニッケルキレートドナービーズ及びストレプトアビジンアクセプタービーズの事前混合物を加え、60分間インキュベートした。アルファLISAシグナルは、Envisionマイクロプレートリーダー(Perkin Elmer、励起680nm、発光615nm)上で読み取る。プレゼンター及び標的タンパク質を伴わないカウンタースクリーニングも実行して、化合物単独の寄与を除外する。

10

【0407】

試薬及び機器：

- ・His6-KRAS_{G12C}-GTP(自社製；残基1~169)；PBS緩衝液、pH7.4中1.2mM

- ・Avi-CYPA(自社製；残基1~165)；PBS緩衝液、pH7.4中556uM

20

- ・ニッケルキレートドナービーズ(Perkin Elmer)

- ・ストレプトアビジンアクセプタービーズ(Perkin Elmer)

- ・リガンド(W21487)、100%DMSO中10mM

- ・Envision(Perkin Elmer)

- ・8チャンネル少容量カセットを備えるCombi Multidrop液体ディスペンサー

- ・alphaPlate-384プレート(ホワイト)

実験プロトコル：

1. Mosquitoを使用して、100nL/ウェルの化合物(DMSO中で濃度は変動する)を384ウェルブラックProxiPlateへと分注して、アッセイレディプレート(ARP)を作製する。

2. 40mM Hepes、pH8.0、200mM NaCl、2mM MgCl₂及び0.004%Tween-20を含有する2×アッセイ緩衝液を作製する。

30

3. 1×アッセイ緩衝液中で2×PRE-MIX A：300nMのHis6-KRAS_{G12C}-GTP(1~169)及び300nMのAvi-CypA(1~165)を作製する。

4. Multidrop Combiを使用して、2×PRE-MIX AをARPへと分注する(5μl/ウェル)。室温にて60分インキュベートする。

5. 2×PRE-MIX B：30μg/mlのストレプトアビジンアクセプタービーズ及び30μg/mlのニッケルキレートドナービーズを作製する。

6. Multidrop Combiを使用して、2×PRE-MIX BをARPへと分注する(5μl/ウェル)。Combi上で短時間振とうし、室温にて60分インキュベートする。

40

7. Envision上で読み取る(励起：680nm；発光1：615nm)。

8. Dotmaticsを使用してデータを処理する。4パラメータ非線形フィットを使用して曲線をフィットさせ、三元複合体の形成に関するEC50値を決定する。

【0408】

結果：結合曲線(図12)は、0.99μMの算出EC50値を伴う、CYPA-化合物3-KRAS_{G12C}-GTP三元複合体の化合物3に依存する複合体形成を実証する。

実施例8：等温滴定型熱量測定による複合体形成の決定

等温滴定型熱量測定(ITC)は、2つのタンパク質、またはリガンドへのタンパク質

50

の、二元相互作用に関連する熱変化を直接測定するために使用される確立された生物物理学的技術である。熱変化の測定は、会合定数 (K_a)、反応化学量論 (N)、及び結合エンタルピーの変化 (ΔH) の正確な決定を可能とする。ギブスエネルギー変化 (ΔG) 及びエントロピー変化 (ΔS) は、関係: $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S$ (式中、 R は、気体定数であり、 T は、絶対温度である) を使用して決定することもできる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物またはコンジュゲートの結合 (例えば、非共有結合または共有結合) を測定するために使用される。

ITC による FKBP12-化合物1及びCEP250間の結合の速度論及び熱力学の決定

試薬: 100% DMSO中の化合物1及び化合物2 (自社製)、タンパク質緩衝液 (10 mM HEPES、pH 7.5、75 mM NaCl、0.5 mM TCEP)、アッセイ緩衝液 (タンパク質緩衝液 + 1% DMSO)、FKBP12 (自社製)、CEP250₂₉₋₄ (自社製、残基1982~2231) 及びCEP250₁₁₋₄ (自社製、残基2134~2231)。

【0409】

装置: MicroCal (商標) ITC₂₀₀ (GE Healthcare)。機器パラメータを表6に示す。

【0410】

【表6】

表6. 等温滴定型熱量測定機器パラメータ

実験デバイス	MicroCal (商標) ITC ₂₀₀ (GE Healthcare)
サンプルセル容量 (μ l)	270
インジェクター容量 (μ l)	40
実験パラメータ	
注入の総回数	19
セル温度 (°C)	25
リファレンスパワー (μ Cal/秒)	5
初期遅延 (秒)	200
攪拌速度 (rpm)	750
注入パラメータ	
容量 (μ l)	2
持続期間 (秒)	4
間隔時間 (秒)	170-200
フィルター時間 (秒)	5
フィードバックモード/ゲイン	高

実験プロトコル: FKBP12ストック溶液を、アッセイ緩衝液中10 μ Mに希釈する (最終1% DMSO)。化合物をFKBP12に加えて、20 μ Mとし (最終1% DMSO)、5~10分のプレインキュベーション時間の後、二元複合体をITCデバイスの反応セルに充填する。CEP250タンパク質ストックを、アッセイ緩衝液中50 μ Mに希釈し、20 μ M化合物を補充し (最終1% DMSO)、その後、注入シリンジに充填する。化合物の不在下での対照実験も行っており、シリンジから反応セルへと注入する際、操作のアーチファクト及び滴定剤の希釈に伴う熱を決定する。より詳細な実験パラメータを、表

7に示す。

【0411】

【表7】

表7. 最終タンパク質及びリガンド濃度

実験	セル含量	シリンジ含量	リガンド	DMSO 濃度 (%)
3	FKBP12、10 μ M	CEP250 _{29.2} 、50 μ M	なし	1.0
4	FKBP12、10 μ M	CEP250 _{11.4} 、50 μ M	なし	1.0
5	FKBP12、10 μ M	CEP250 _{29.2} 、118 μ M	化合物 1b、20 μ M	1.0
6	FKBP12、10 μ M	CEP250 _{29.2} 、118 μ M	化合物 2、20 μ M	1.0
7	FKBP12、10 μ M	CEP250 _{11.4} 、68 μ M	化合物 1b、20 μ M	1.0
8	FKBP12、10 μ M	CEP250 _{11.4} 、68 μ M	化合物 2、20 μ M	1.0

10

データフィッティング：以下の手順に従って、Origin ITC 200ソフトウェアを用いてデータのフィッティングを行った。

20

1) 生データの読み込み

2) 「mRaw ITC」：積分ピーク及びベースラインを調整して、全てのピークを積分する

3) 「デルタH」－データコントロール：不良データを除去し（注入番号1及び他のアーチファクト）、直線を差し引く（バックグラウンド差し引き）。

4) 「デルタH」－モデルフィッティング：部位モデルの1セットを選択し、カイ二乗がさらに低下しなくなるまで、レーベンバーグ－マーカートアルゴリズムを用いてフィッティングを行い、「done」で終了する（パラメータN、 K_a 、及び ΔH は、フィッティングに基づいて算出される）。

【0412】

30

結果：FKBP12－化合物1及びFKBP12－化合物2二元複合体のCEP250に対する結合に関するITC測定値を、表8及び図13にまとめる。全体として、CEP250_{11.4}及びCEP250_{29.2}に結合するFKBP12－化合物1及びFKBP12－化合物2二元複合体に関するデータは、類似の相互作用パラメータを示す。 K_d 値は全ての組み合わせで類似していた。全ての相互作用は、ほとんど同一の熱力学的プロファイルを示し、ここで結合は、純粋エンタルピー結合モードにより特徴付けられる（ $-T \cdot \Delta S$ 項は正であり、ギブズ自由エネルギーに寄与しない）。全ての相互作用に関する結合化学量論は、 $N = 0.5 \sim 0.6$ であり、CEP250_{11.4}／化合物1／FKBP12の結晶構造において証明されるように、1つのCEP250ホモ二量体が2つのFKBP12分子に結合する1：2の結合比を支持する。

40

【0413】

【表 8】

表 8. ITCによるFKBP12-化合物1-CEP250三元複合体形成の決定

実験	T(K)	N	K_d (μM) [*]	ΔH ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ^{**}	$-T^*\Delta S$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ^{***}	ΔH ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ^{****}
3	298	検出されず	検出されず	検出されず	検出されず	検出されず
4	298	検出されず	検出されず	検出されず	検出されず	検出されず
5	298	0.50	0.19	-52.21	13.80	-38.41
6	298	0.57	0.36	-58.48	21.73	-36.74
7	298	0.56	0.07	-49.37	8.62	-40.75
8	298	0.54	0.08	-47.78	7.41	-40.36

^{*} K_d ($K_a=1/K_d$ から算出)

^{**} ΔH

^{***} $T^*\Delta S(-T\Delta S=\Delta G-\Delta H$ から算出)

^{****} $\Delta G=-RT \ln K_a=RT \ln K_d$

10

20

実施例 9：表面プラズモン共鳴によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の速度論の決定

表面プラズモン共鳴 (SPR) は、2つのタンパク質、またはリガンドへのタンパク質いずれかの、二元相互作用に関連する速度論を測定するために使用される生物物理学的技術である。典型的には、二元相互作用対の1つの構成要素を、融合タグを介して活性化センサーチップのフローセル上に固定化する。次いで、漸増濃度の第2の構成要素 (分析物) を、活性表面上に一定時間注入する。会合期中の SPR シグナル (共鳴単位、RUで表す) の増加、及び解離期中の SPR シグナルの減少は、相互作用を示し、結合モデルにフィットさせて、関連する K_D 、 K_a 、 K_d 値を決定することができる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明のコンジュゲートの結合に関する速度論を測定するために使用され、ここでは、(i) コンジュゲートが、融合タグを介してチップ上に固定化され、プレゼンタータンパク質が表面上に注入されるか、または (ii) プレゼンタータンパク質が、融合タグを介してチップ上に固定化され、コンジュゲートが表面上に注入される。

30

SPRによるFKBP12-化合物1及びCEP250間の結合の速度論の決定

このプロトコルは、固定化されたFKBP12-化合物1二元複合体 (リガンド) への CEP250 (分析物) の結合に関する速度論 (K_D 、 K_a 、 K_d) を決定する方法として表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用する。

【0414】

試薬：100% DMSO中の化合物1 (自社製)、10×HBS-P+緩衝液 (GE Healthcare BR-1006-71)、アッセイ緩衝液 (1×HBS-P+緩衝液、1% DMSO、1 μM 化合物1)、12×HISタグ付きFKBP12 (自社製)、CEP250₂₉₋₂ (残基1982~2231) 及びCEP250₁₁₋₄ (残基2134~2231) (自社製)。

40

【0415】

装置：BIACORE (商標) X100 (GE Healthcare)

備品：NTAセンサーチップ (GE Healthcare BR-1000-34)

実験プロトコル：実験を、25℃にて行う。12×HISタグ付きFKBP12のストック溶液を、1 μM 化合物1を含有するアッセイ緩衝液中で100 nMに希釈する (最終1% DMSO)。おおよそ200~400 RUのFKBP12を、活性化NTAチップの

50

2つのフローセルのうちの1つ上に固定化する。第2のフローセルは、センサーチップへの分析物の非特異的相互作用についての参照として活性化しない。変動濃度のCEP250 (1 nM~1 μM範囲)を、1 μM化合物1 (最終1% DMSO)を含有する同じアッセイ緩衝液に段階希釈し、10 μl/分の流量でFKBP12表面及び参照表面上に注入する。表面を、350 mM EDTAを用いて分析物の注入の間に再生する。

【0416】

データフィッティング：データフィッティングのためにBiaEvaluationソフトウェアプログラムを使用する。全てのデータは、参照フローセル及び緩衝液注入の両方に対して参照を差し引く。速度論的分析のために、データは1:1相互作用モデルにローカルフィッティングする。

10

【0417】

結果：SPRセンサーグラムを、図14に示す。5.4 nM及び0.29 nMの解離定数(K_D)を、それぞれ、CEP250_{11.4}及びCEP250_{29.2}へのFKBP12/化合物1の結合に関して決定した。

実施例10：バイオレイヤー干渉法によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の速度論の決定

バイオレイヤー干渉法 (interferometry) (BLI)は、2つのタンパク質、またはリガンドへのタンパク質いずれかの、二元相互作用に関連する速度論を測定するために使用される生物物理学的技術である。典型的には、二元相互作用対の1つの構成要素を、融合タグを介してバイオセンサーチップ上に固定化する。次いで、漸増濃度の第2の構成要素 (分析物)をバイオセンサーチップ上に一定時間注入する。会合期中のBLIシグナル (光学的厚さ、nmで表す)の増加、及び解離期中のBLIシグナルの減少は、相互作用を示し、結合モデルにフィットさせて、関連する K_D 、 K_a 、 K_d 値を決定することができる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明のコンジュゲートの結合に関する速度論を測定するために使用され、ここでは、(i)コンジュゲートが、融合タグを介してチップ上に固定化され、プレゼンタータンパク質が表面上に注入されるか、または(ii)プレゼンタータンパク質が、融合タグを介してチップ上に固定化されており、コンジュゲートが表面上に注入される。

20

BLIによるCYPA-化合物3及びKRAS_{G12C}-GTP間の結合の速度論の決定

このプロトコルは、固定化されたCYPA-化合物3二元複合体 (リガンド)へのKRAS_{G12C}-GTP (分析物)の結合に関する解離定数(K_D)を決定する方法としてバイオレイヤー干渉法 (BLI)を利用する。

30

【0418】

試薬：100% DMSO中の化合物3 (自社製)、ForteBio速度論緩衝液 (ForteBio Inc., Menlo Park, CA)、アッセイ緩衝液 (速度論緩衝液、1% DMSO、2 μM化合物3)、Aviタグ付きCYPA (自社製)、KRAS_{G12C}-GTP (残基1~169) (自社製)。

【0419】

装置：Octet Red96機器 (ForteBio Inc., Menlo Park, CA)

40

備品：ストレプトアビジン (SA) バイオセンサー (ForteBio)

実験プロトコル：ストレプトアビジン (SA) バイオセンサーを、0.6 nmの充填シグナルまで10 μM Avi-CYPAタンパク質を含有する溶液中で25℃にてコーティングした。タンパク質の充填は、経時的な安定性、及びベースラインドリフトの不在を示した。三元複合体の形成を、1:2希釈系列で200 μMから開始するKRAS_{G12C}-GTPタンパク質濃度を用いて用量応答実験において評価した。陰性対照については、Avi-CYPAタンパク質でコーティングしたセンサーを、スクリーニング緩衝液 (2 μM化合物3を補充)のみを含有するウェル中に浸漬した。補正した結合応答センソグラム (sensogram)を記録し、分析した。

【0420】

50

データフィッティング：F o r t e B i o O c t e t R E D機器上の分析を、F o r t e B i oソフトウェアを使用して行った。分析により、非特異的結合、バックグラウンド、及びシグナルドリフトが説明され、ウェルベースの及びセンサー変動性が最小限に抑えられる。三元複合体の用量依存的形成が観察され、対応する平衡解離定数 (K_D) を決定した。

【0421】

結果：センソグラム (S e n s o g r a m) 及び定常状態フィッティング曲線を、図15に示す。44 μ Mの解離定数 (K_D) が、K R A S G 1 2 C - G T P へのC Y P A / 化合物3の結合に関して決定された。

実施例11：架橋試薬のためのF K B P 1 2 結合標的タンパク質のプロテオミクス同定

試薬：100% DMSO中の化合物 (自社製)、N末端ビオチン-F K B P 1 2 (自社製)、H E K 2 9 3 T細胞ライセート (自社製)。

【0422】

実験プロトコル：H E K 2 9 3 T細胞ライセートを、氷上での超音波処理 (20%パワーで4、10秒パルス) を使用して、40mM H E P E S、pH7.3、120mM N a C l、2mM M g C l₂、2mM C a C l₂、0.5%オクチル- β -グルコシド、及びE D T A非含有プロテアーゼ阻害剤カクテル (R o c h e) からなる溶解緩衝液を使用して調製した。ライセートを、最初に遠心分離を介して清澄し、得られた上清を、氷上で0.2mmのシリンジフィルターに通過させた。N末端ビオチン標識F K B P 1 2を、500mlのライセートに加えて最終濃度を4mMとし、ピペット操作を介して混合し、次いで、化合物を加えて10mMの最終濃度とし、反応物を、ピペット操作を介して混合した。60mLの50%スラリーアガロースストレプトアビジン樹脂 (溶解緩衝液中で事前に平衡) を加え、反応を1時間穏やかに揺り動かしながら4℃にて進行させる。インキュベーション後、樹脂を穏やかにペレット化し、添加、遠心分離、及び吸引を介して氷上で1mLの溶解緩衝液で4回洗浄し、次いで、同じ物理的様式で、洗剤を用いずに1mLの溶解緩衝液でさらに4回洗浄した。保持されたタンパク質を、H E P E S緩衝液中の8M尿素、pH8.0を使用して樹脂から溶出させ、100mM H E P E S、pH8.0で7M尿素に希釈し、エンドプロテアーゼL y s - Cをタンパク質消化のために37℃にて2時間加えた。次に、試料を100mM H E P E S、pH8.0を使用して0.8M尿素に希釈し、トリプシンを加え、試料をさらに16時間37℃にて消化させた。消化が完了した後、試料を、C 1 8 S P Eフィルターを使用してL C - M S / M S分析のために調製し、このフィルターの上に、試料を充填し、洗浄し、溶出させ、スピードバック中で乾燥させ、最後に、L C - M S / M S分析のために、10mlの5%アセトニトリル、5%ギ酸緩衝液に懸濁させた。L C - M S / M S分析を、T h e r m o - F i s h e r L T Q - V e l o s - P r o O r b i T r a p質量分析計上で、上位20データ依存型取得方法、及びH P L Cのために8~35%アセトニトリル勾配を使用して、行った。S e q u e s t アルゴリズムを使用してペプチド配列を割り当て、同定したタンパク質を、候補標的タンパク質を同定するために、対照試料 (DMSOのみ) と比較する。

【0423】

結果：上記のプロトコルを使用して、100を超える標的タンパク質が、架橋化合物の存在下でプレゼンタータンパク質に結合できると同定されてきた。同定された標的タンパク質には、キナーゼ、ホスファターゼ、ユビキチンリガーゼ、DNA結合タンパク質、熱ショックタンパク質、DNAヘリカーゼ、G T Pアーゼ活性化タンパク質、ヌクレオチド結合タンパク質、及び種々のタンパク質結合タンパク質が含まれる。

実施例12：蛍光偏光によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の決定

蛍光偏光 (F P) の技術は、蛍光標識分子が偏光によって励起されると、分子旋光度に反比例する偏光度を伴う光を放射するという所見に基づく。低分子は励起状態の間に急速に回転し、発光の際に、低い偏光値を有する。第2の分子への標識分子の結合によって形成される、大きな複合体は、励起状態の間に僅かに回転し、それゆえ、高い偏光値を有する。蛍光のこの特性は、より大きなタンパク質と標識リガンドの相互作用を測定するため

10

20

30

40

50

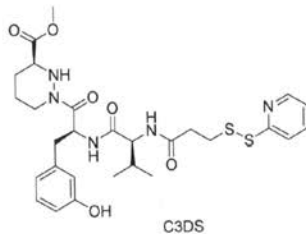
に使用することができ、直接及び競合結合アッセイの基盤を提供する。この実施例では、この方法を使用して、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物またはコンジュゲートの結合を測定し、標的タンパク質との三元複合体形成を確立する。

F PによるCypA：C3DS：KRAS複合体形成の決定

試薬：100% DMSO中のC3DS（自社製）、タンパク質緩衝液（12.5 mM HEPES、pH=7.4、1 mM MgCl₂）、アッセイ緩衝液（25 mM HEPES、pH 7.3、0.002% Tween 20、0.1% BSA、10 mM NaCl、1 mM MgCl₂）、CYP A（自社製）、Mant-GMP-PNP充填KRAS（1～169残基）。

【0424】

【化78】



装置：SpectraMax

実験プロトコル：KRASストック溶液を充填して、アッセイ緩衝液（最終1% DMSO）中で0.8 μMの最終濃度とする。化合物（C3DS）を加えて、10 μMの最終濃度とし、反応混合物を384ウェルCostarブラックプレートに分注する。CYP Aを、プレートのウェルへと段階希釈し、室温にて15分間インキュベートする。化合物の不在下での対照実験も実行して、化合物の不在下でのKRASへのCYP Aの会合を決定する。反応混合物を、355 nmにて励起し、発光シグナルを455 nmにて記録する。シグナルを、垂直平面及び平行平面にて測定し、偏光を、下記の等式を使用して記録する。

F P（偏光単位×10⁻³）＝シグナル（平行）－シグナル（垂直）／〔シグナル（平行）＋シグナル（垂直）〕

結果：代表的な曲線を図16に示し、EC50（KRASのFPシグナルを50%増強するのに必要とされる濃度）を列挙する表を、下に記す。曲線を、4パラメータ式に当てはめ、得られたEC50は、CYP A及びKRAS間の結合を増強させることに対するリガンドC3DSの効果を示す。

【0425】

【表9】

	CypA:Kras	CypA:C3DS:Kras
EC50	30μM	2.3μM

実施例13：核磁気共鳴によるコンジュゲート及びタンパク質間の（off-off）結合の決定

核磁気共鳴（NMR）分光法は、三次元構造を解明し、タンパク質及びタンパク質－リガンド複合体の動態を研究するために使用される技術である。加えて、これは、タンパク質－リガンド相互作用におけるリガンド結合部位を同定するために使用することができる。いくつかの利用可能なNMRアプローチのうち、タンパク質構造をベースとするリガンドスクリーニング（高度に感受性である2D ¹H－¹⁵N TROSY－HSQCスペクトル）及びリガンド（薬物）結合に関わる重大な残基の同定は、このような研究のため

の最も感受性の高い方法である。タンパク質のNMR試料中への逐次的に増加する濃度のリガンドの添加、及び2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY-HSQCの収集は、化学シフト摂動(CSP)と称される原子レベルの高度に分解された残基の摂動情報を提供し、これは利用可能な任意の他の生物物理学的技術では可能でないリガンド結合部位の同定に関するより正確な情報を直接的に提供する。このアプローチでは、タンパク質または二元タンパク質複合体への弱い、中程度、及び強い親和性のリガンド結合を研究することができ、この情報は既存の構造的、動的、及び速度論情報に直接連結させることができる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物(薬物)またはコンジュゲートの(例えば、非共有結合的もしくは共有結合的)結合を実証するために使用される。

10

溶液NMR分光法による三元複合体におけるKRAS (G12C) - シクロフィリン化合物3結合の決定

試薬: 100% DMSO中の化合物3 (自社製)、タンパク質緩衝液(50mM TRIS- d_11 、50mM NaCl、pH7.0、1mM TCEP- d_16 、1mM MgCl_2)、KRASのNMR試料中の添加物(93% H_2O 及び7% D_2O 中の100 μM DSS)、アッセイ緩衝液(DMSO中のタンパク質緩衝液+増加する当量の薬物($\leq 5\%$))、GMP- ^{15}N -KRAS (G12C) - 16 (N-His、残基1~169、自社製)、非標識(UL)シクロフィリン(CYPA; 残基1~165) (自社製)。

20

【0426】

装置: 5mmのCPTCI $^1\text{H}-^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}_2\text{O}$ -GRD Z44909/0026凍結探針(Bruker)を備えたBruker Avance 800MHz分光計。高精度の5mm NMRチューブを、これらの実験において使用する。

【0427】

NMRデータプロセッシング及び分析: プロセッシングのためにTopspin v3.1及びNMRPipe/NMRDraw、ならびにデータ分析のためにCCPNMR「分析」プログラムを実行するLinuxコンピュータ。

【0428】

実験プロトコル: タンパク質緩衝液中の0.72mMのGMP- ^{15}N -KRAS (G12C) - 16ストック溶液を、(NMR添加物を含む)600 μl 中の0.18mM NMR試料を調製するために使用した。DSSを、化学シフト参照のための内部標準として使用した(0.0ppmにて ^1H ピーク)。 ^{15}N KRASの2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY-HSQCスペクトルを収集した(データサイズ2048 $\times$ 128)。タンパク質緩衝液中の1当量(0.18mM)のCYPAを、(0.4mMのストック溶液から)NMR試料中に加え、10分間攪拌した。最終NMR試料容量は、600 μl に維持した。二元複合体(^{15}N -KRAS+UL-CYPA)の2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY-HSQCスペクトルを、他の取得パラメータを同じに維持しながら収集した(データサイズ2048 $\times$ 128)(KRAS $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 相関クロスピークのみが、スペクトルにおいて可視である)。100% DMSO中の20mMの化合物3のストック溶液を、NMR滴定のために使用した。化合物3を、NMR試料中に逐次的に加えて、二元複合体(^{15}N -KRAS+UL-CYPA)のNMR試料中で(15N-KRAS濃度のそれに対して)その0.5、1.0、2.5、及び5.0当量を得た。各段階では、取得パラメータを同じに維持しながら、600 μl の試料容量を維持した。化合物3添加の各段階では、2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY-HSQCスペクトルを、KRAS残基の化学シフト摂動(CSP)を調査するために取得した。全てのスペクトルを、互いに重ねた。それぞれの化合物3滴定点での有効なCSPを、二元複合体(KRAS+CYPA)に対する三元複合体(KRAS+CYPA+化合物3)におけるKRASの各残基の化学シフトの差異を使用して決定する。続いて、各KRAS残基の加重平均化学シフト($\Delta\delta_{\text{加重}}$)は、下記の式を使用して決定する:

30

40

$$\Delta\delta_{\text{加重}} = [(\Delta^1\text{H})^2 + (\Delta^{15}\text{N}/5)^2]^{1/2}$$

50

全体平均から1超の標準偏差の $\Delta\delta_{加重}$ を引き出す残基は、有意に摂動されていると考えられ、結合部位マッピングにおいて使用される。別々の滴定実験では、本発明者らは、DMSO当量を逐次的に加えて（上記の実験におけるものと同等の溶媒濃度を満たすため）、DMSO添加からの寄与を差し引くことによって、二元複合体（KRAS + CYP A）に対する $2D\ ^1H-^{15}N\ TROSY-HSQC$ スペクトルを収集した。第2の対照実験では、本発明者らは、（CYP Aの不在下で）異なる当量にて化合物3で滴定した $15N-KRAS$ の一連の $2D\ ^1H-^{15}N\ TROSY-HSQC$ スペクトルを収集した。

【0429】

有効なCSPを、表に示し、分析する。（CYP Aの存在下での）KRASの薬物結合残基を、タンパク質表面上にマッピングする。解離定数、 K_D を決定する。

実験及びプロセッシングパラメータ：

スペクトルデータサイズ： $2048\ (1H\text{次元}) \times 128\ (15N\text{次元})$

スキンの数：4

温度： $298\ K$

クワドラチャ検出モード： $DQD\ (1H)$ 及び $Echo-AntiEcho\ (15N)$

データサイズは、間接次元内で前向き後向き線形予測を適用することによって拡張した。データセットは、フーリエ変換の前に各次元において1回ゼロフィリングを行うことによって外挿した。

【0430】

結果： $KRAS_{G12C-GTP}$ の $2D\ ^1H-^{15}N\ TROSY-HSQC$ スペクトルを、図17Aに示す。化学量論量のCYP Aを加えることは、KRASアミド骨格クロスピークに対して効果を有さず（図17B）、KRAS及びCYP Aが直接相互作用しないことを示す。CYP A：KRASの1：1試料へのW21487の滴定は、明確な化学シフトを引き出し（図17C）、これはKRASとの直接相互作用を示す。

実施例14．マイクロスケール熱泳動によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の決定

マイクロスケール熱泳動（MST）は、分子の分子特性、例えば、サイズ、定方向温度勾配におけるその移動性に対する立体配座における任意の変化を相関させることによる、生体分子相互作用の特徴決定のための技術である。勾配の生成は、赤外レーザーによって誘発される。生体分子の動きは、共有結合的に付着したフルオロフォアまたはそれどころか自家蛍光を使用して分子を標識することによって特徴決定されることが多い。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物またはコンジュゲートの結合を測定し、標的タンパク質との三元複合体形成を確立するために使用され、ここでは、（i）コンジュゲートが、フルオロフォアで標識され、プレゼンタータンパク質が滴定されるか、または（ii）プレゼンタータンパク質が、フルオロフォアで標識され、コンジュゲートが滴定される。

実施例15．第2次高調波発生技術によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の決定

第2次高調波発生（SHG）は、水溶液中の立体配座変化をリアルタイムで測定するために使用することができる光学現象である。SHGシグナル強度は、表面に係留されたタンパク質を標識した色素の平均角度配向に対して感受性であり、シグナル変化の大きさは角度変化の量と直接相関する。異なる立体配座は、結合の際のシグナル変化の大きさ、ベースラインに対するシグナル（表面に対してより垂直な配向は、正のシグナル変化を生成し、逆の場合も同様である）及び速度論によって分類することができる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物またはコンジュゲートの結合を測定し、標的タンパク質との三元複合体形成を確立するために使用され、ここでは、（i）色素標識されたコンジュゲートが、融合タグを介して表面上に固定化され、プレゼンタータンパク質が、表面上に注入されるか、または（ii）色素標識されたプレゼンタータンパク質が、融合タグを介して表面上に固定化され、コンジュゲートが、表面上に注入される。

10

20

30

40

50

実施例 16．示差走査蛍光分析によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の決定

示差走査蛍光分析 (DSF) は、タンパク質の融解温度 (T_m) を測定するために使用される溶液をベースとする生物物理学的方法である。典型的な実験では、目的のタンパク質を、蛍光色素 (例えば、SYPRO オレンジ) の存在下で上昇する熱 (典型的には、 $4^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$) に供する。蛍光強度は、温度の関数としてプロットされ、 T_m は、蛍光シグナルの負の導関数最小値から計算する。標的タンパク質については、低分子の存在下での熱シフト (ΔT_m) を測定して、低分子がタンパク質に結合し、安定化させるか否かを評価することができる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物またはコンジュゲートの熱シフト (例えば、非共有結合または共有結合) を測定するために使用され、ここでは、(i) コンジュゲートが蛍光色素で標識され、プレゼンタータンパク質が滴定されるか、または (ii) プレゼンタータンパク質が蛍光色素で標識され、コンジュゲートが滴定される。

10

実施例 17．Nano DSF によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の決定

Nano DSF は、内因性トリプトファンまたはチロシン蛍光を使用してタンパク質の T_m を測定するための高度な DSF 方法である。典型的な実験では、目的のタンパク質を、上昇する熱 (典型的には、 $4^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$) に供し、内因性トリプトファンまたはチロシン残基の蛍光強度を、温度の関数としてモニターする。 T_m は、トリプトファン蛍光強度の変化から、または 330 及び 350 nm でのトリプトファン発光の割合から計算することができる。これはアンフォールディングの際のトリプトファン発光のシフトを説明する。標的タンパク質については、低分子の存在下での ΔT_m を測定して、低分子がタンパク質に結合し、安定化させるか否かを評価することができる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物またはコンジュゲートの熱シフト (例えば、非共有結合または共有結合) を測定するために使用され、ここでは、(i) コンジュゲートの蛍光が測定され、プレゼンタータンパク質が滴定されるか、または (ii) プレゼンタータンパク質の蛍光がモニターされ、コンジュゲートが滴定される。

20

実施例 18．示差光散乱による複合体形成の決定

動的な光散乱 (DLS) は、ランダムなブラウン運動を受ける粒子から生じる散乱強度の時間依存的変動を測定するために使用される確立された生物物理学的方法である。拡散係数及び粒径情報は、これらの変動の分析から得ることができる。より具体的には、この方法は、水溶液中のタンパク質の半径及び分子量を含むサイズの特徴を測定する能力を提供する。この実施例では、この方法は、(i) 本発明のコンジュゲートの結合の際のプレゼンタータンパク質、または (ii) プレゼンタータンパク質への結合の際の本発明のコンジュゲートにおける、半径または分子量における変化を測定するために使用される。

30

実施例 19．超音波弾性波技術によるコンジュゲート及びタンパク質間の結合の決定

超音波表面弾性波 (SAW) 技術は、バイオセンサーに沿って伝わる表面弾性波の位相の変化のモニタリングを通じた、結合が誘導する立体配座変化のリアルタイム検出のために使用される生物物理学的方法である。これは、2つのタンパク質またはリガンドへのタンパク質のいずれかの二元相互作用に関連する速度論を測定するために使用することができる。典型的には、二元相互作用対の1つの構成要素を、融合タグを介してバイオセンサー上に固定する。次いで、漸増濃度の第2の構成要素 (分析物) を、バイオセンサー上に一定時間注入する。会合期中のシグナルの増加 (波の位相または振幅の変化によって測定) 及び解離期中のシグナルの減少は、相互作用を示し、結合モデルにフィットさせて、関連する K_D 、 K_a 、 K_d 値を決定することができる。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明のコンジュゲートの結合に関する速度論を測定するために使用され、ここでは、(i) コンジュゲートが、融合タグを介してバイオセンサーチップ上に固定化され、プレゼンタータンパク質が表面上に注入されるか、または (ii) プレゼンタータンパク質。

40

実施例 20：小角 X 線散乱による複合体形成の決定

小角 X 線散乱 (SAXS) は、平均粒径及び形状に関してタンパク質の構造を決定するために使用する溶液をベースとする方法である。これは、 $1 \sim 25\text{ nm}$ の分解能範囲、及

50

び最大で150nmまでのサイズの部分的に秩序化された系における反復距離の構造情報を送達することができる。超小角散乱（USAS）は、さらに大きな次元を分解することができる。典型的な散乱実験では、タンパク質またはタンパク質複合体の溶液を、X線（典型的には、おおよそ0.15nmの波長 λ を伴う）に曝露する。散乱強度 $I(s)$ を、運動量輸送 s （ $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$ 、式中、 2θ は、入射及び散乱放射間の角度である）の関数として記録する。溶液の強度から、溶媒のみからの散乱を差し引く。次いで、X線散乱曲線（散乱角に対する強度）を使用して、タンパク質またはタンパク質複合体の低分解能モデルを作製する。この実施例では、この方法は、プレゼンタータンパク質への本発明の化合物またはコンジュゲートの三元複合体（例えば、非共有結合または共有結合）の存在を同定するために使用する。

10

他の実施形態

本開示を、その発明を実施するための形態と併せて記載してきたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を例示するものであり、限定することを意図するものではないことを理解されたい。他の態様、利点、及び変更は、下記の特許請求の範囲内にある。

【0431】

当業者は、通例の実験法のみを使用して、本明細書に記載の本発明による特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または確認することができるだろう。本発明の範囲は、上記の発明を実施するための形態に限定されることを意図せず、むしろ添付の特許請求の範囲において記載されている通りである。

20

【0432】

特許請求の範囲では、冠詞、例えば、「a」、「an」及び「the」は、反対の指示がない限り、または文脈からそうでないと明らかでない限り、1つまたは複数を意味し得る。グループの1つまたは複数のメンバー間に「または」を含む特許請求の範囲または記載は、グループメンバーの1つ、複数、または全部が、所与の生成物もしくはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、または別様に関連する場合に、反対の指示がない限り、または文脈からそうでないと明らかでない限り、満たされていると考えられる。本発明は、グループの正確に1つのメンバーが、所与の生成物もしくはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、または別様に関連する実施形態を含む。本発明は、グループメンバーの複数、または全てが、所与の生成物もしくはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、または別様に関連する実施形態を含む。

30

【0433】

「含む」という用語が、非限定的であることを意図し、追加の要素またはステップを含むことを許容するが、必要としないこともまた留意されたい。ゆえに、「含む」という用語が本明細書で使用されるとき、「からなる」という用語も包含及び開示される。

【0434】

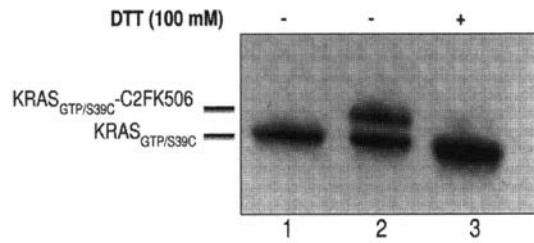
範囲が与えられる場合、端点が含まれる。さらに、別段の指定がない限り、または文脈及び当業者の理解からそうでないと明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈が明らかにそうでないと示さない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本発明の異なる実施形態において指定した範囲内の任意の特定の値または部分範囲を想定することができることを理解されたい。

40

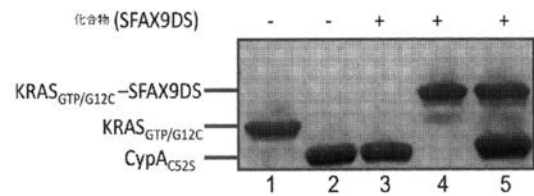
【0435】

さらに、従来技術の範囲内にある本発明の任意の特定の実施形態は、特許請求の範囲の任意の1つまたは複数から明確に除外され得ることを理解されたい。このような実施形態は当業者には公知であるとみなされるため、除外が本明細書に明確に記載されていなくてもこのような実施形態は除外され得る。本発明の組成物の任意の特定の実施形態（例えば、任意のポリヌクレオチドまたはそれによりコードされるタンパク質；任意の生成方法；任意の使用法）を、従来技術の存在に関連するか否かを問わず、何れの理由によっても、任意の1つまたは複数の特許請求の範囲から除外することができる。

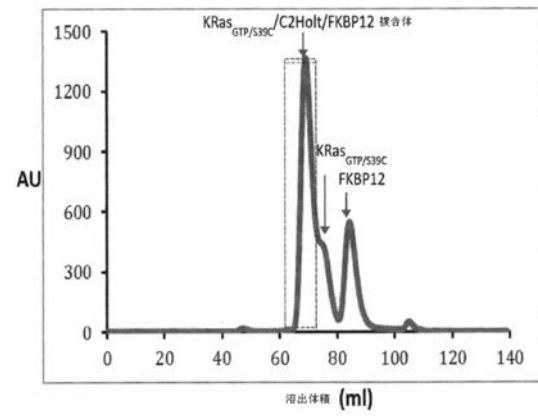
【図 1】



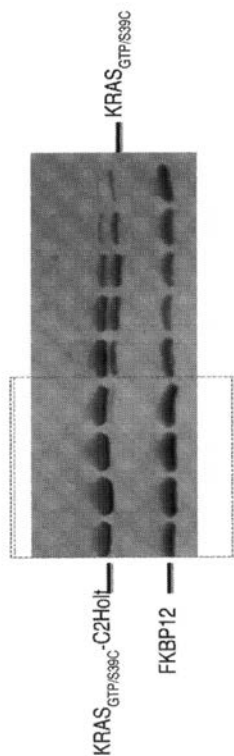
【図 2】



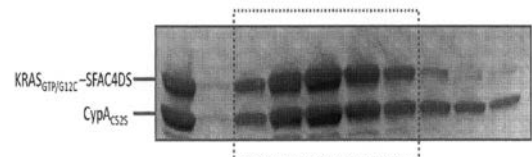
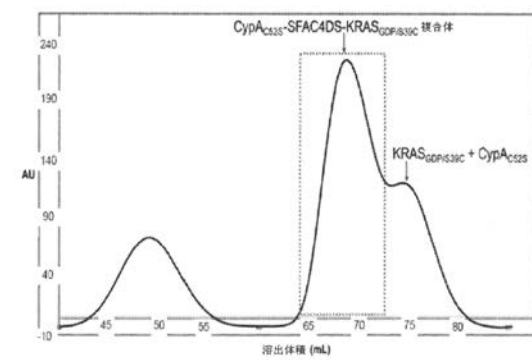
【図 3 A】



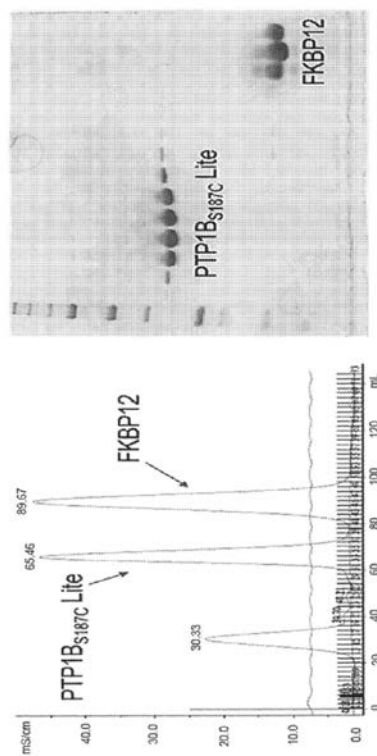
【図 3 B】



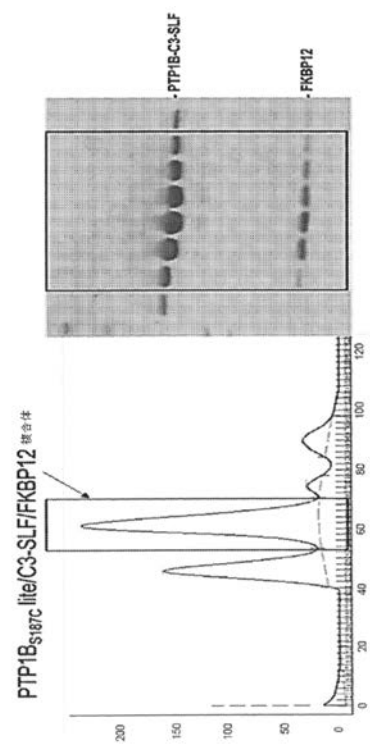
【図 4】



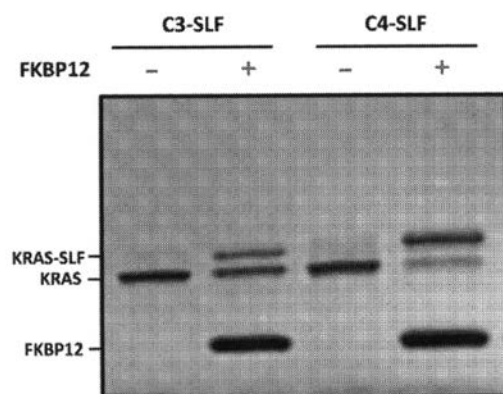
【図 5 A】



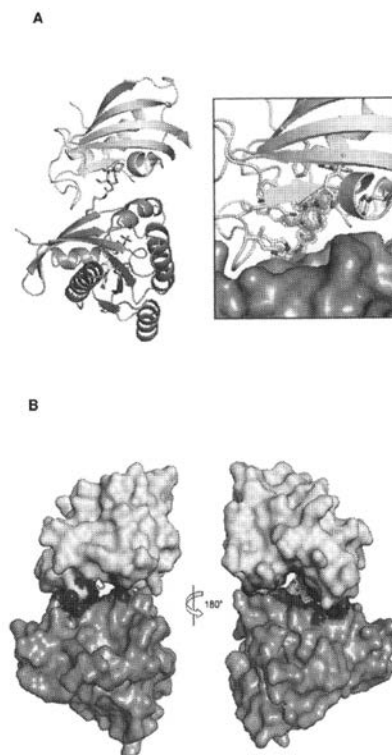
【図 5 B】



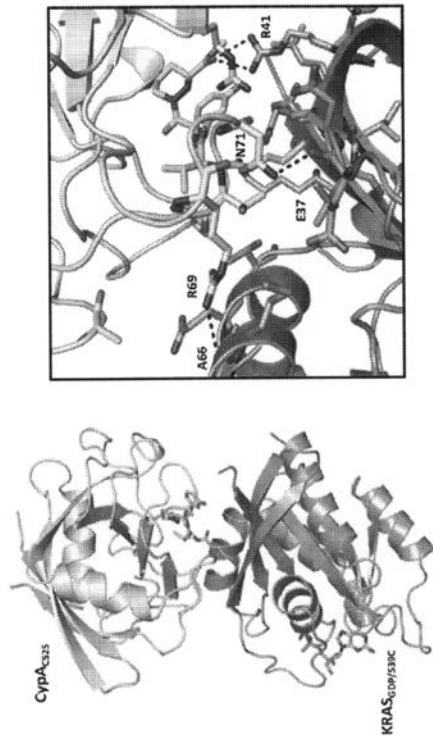
【図 6】



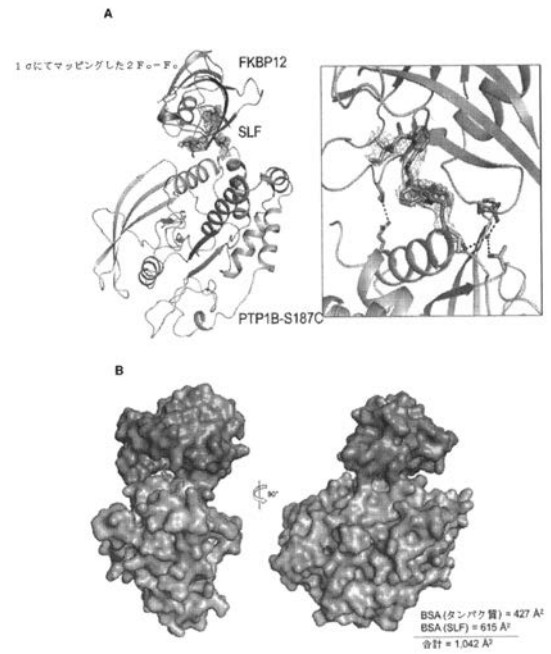
【図 7】



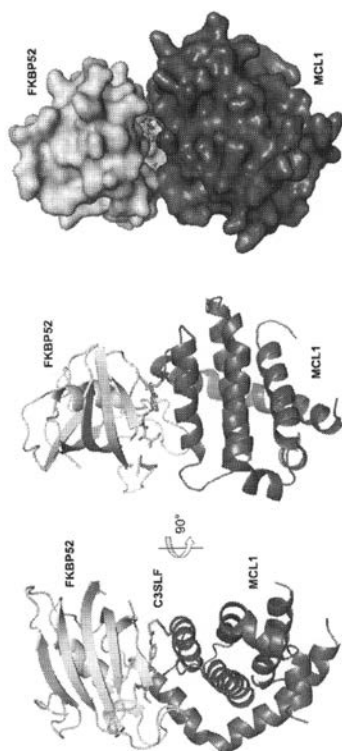
【図 8】



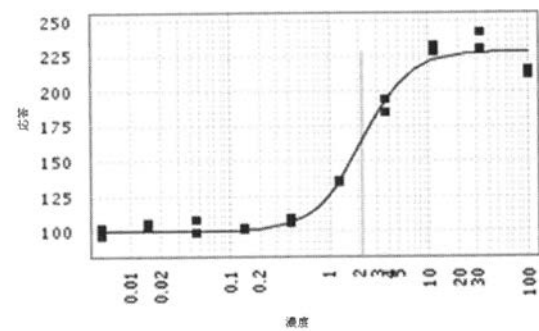
【図 9】



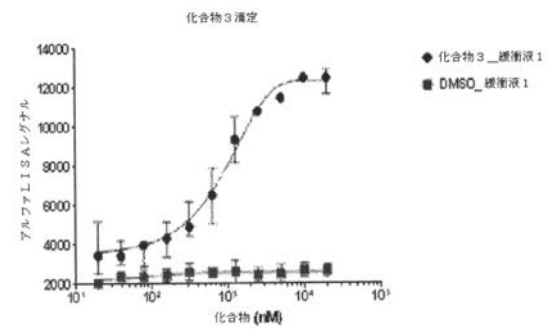
【図 10】



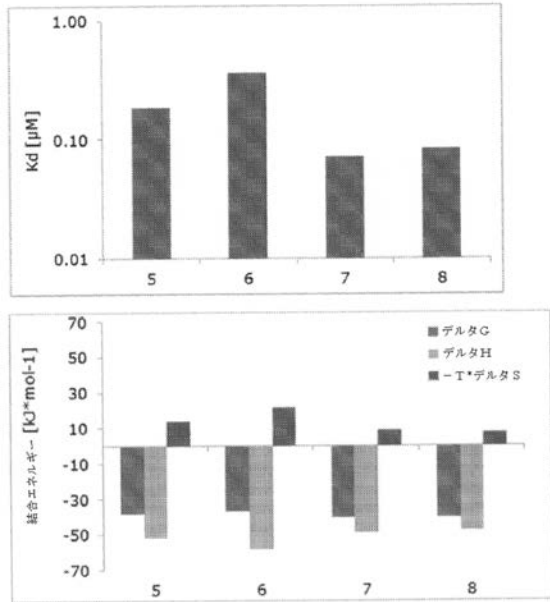
【図 11】



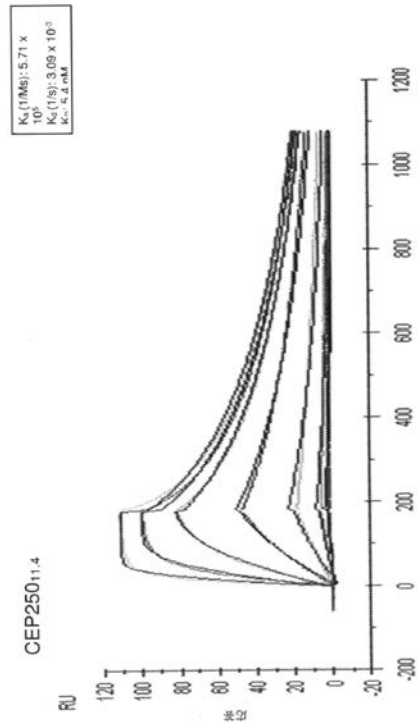
【図 12】



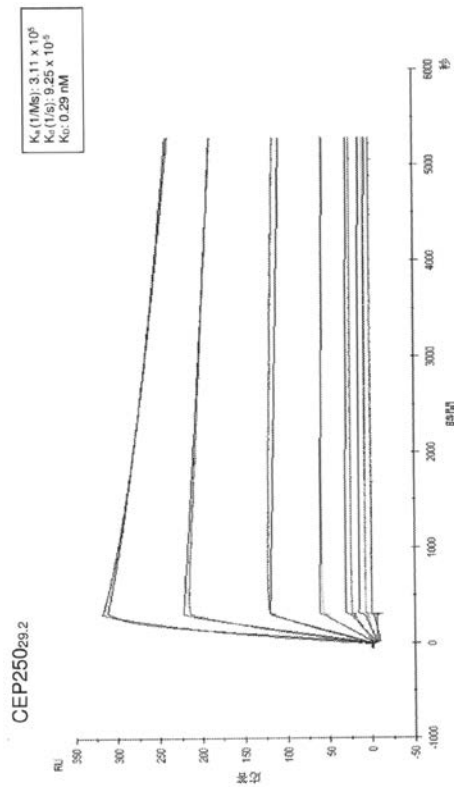
【図 1 3】



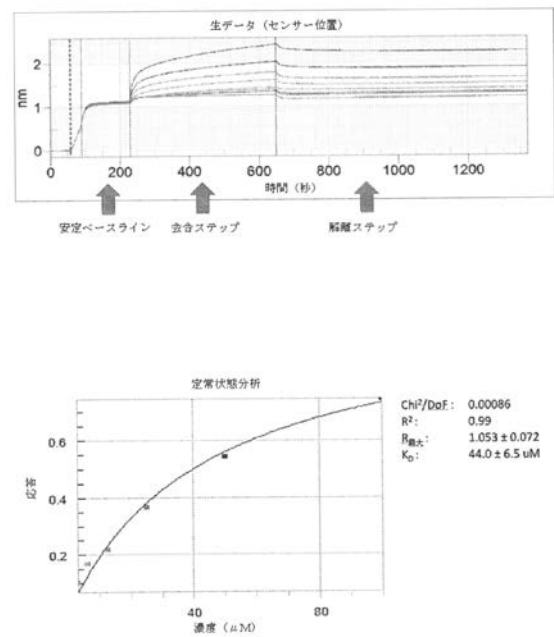
【図 1 4 - 1】



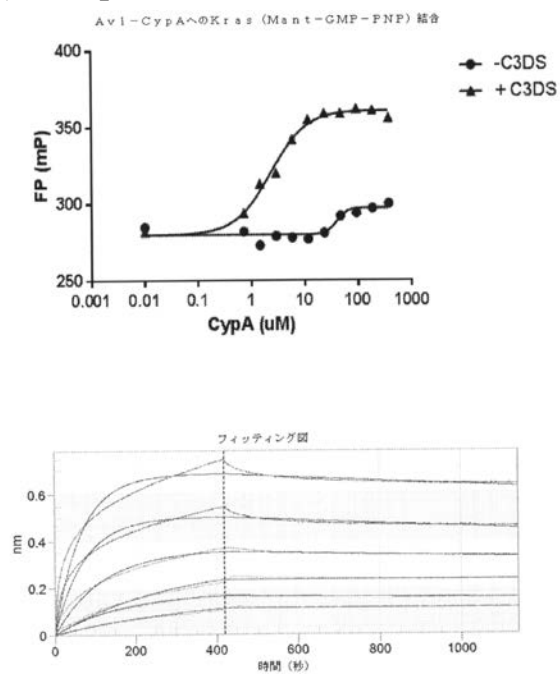
【図 1 4 - 2】



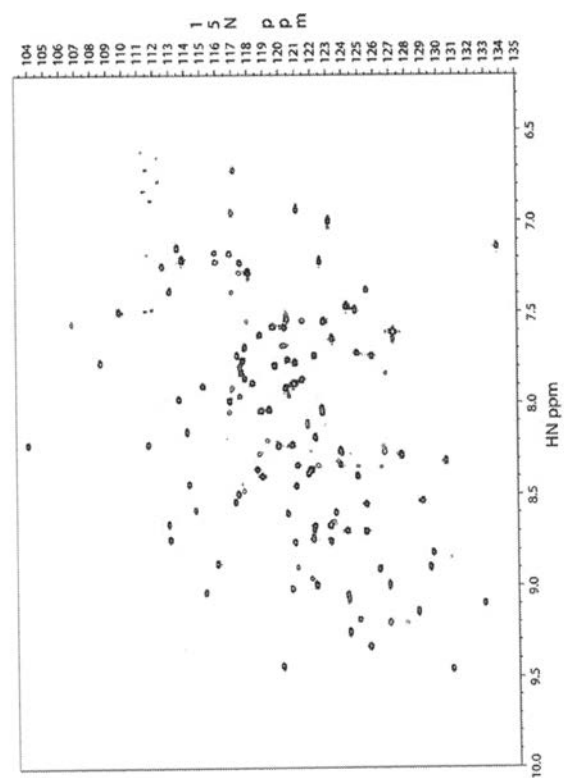
【図 1 5】



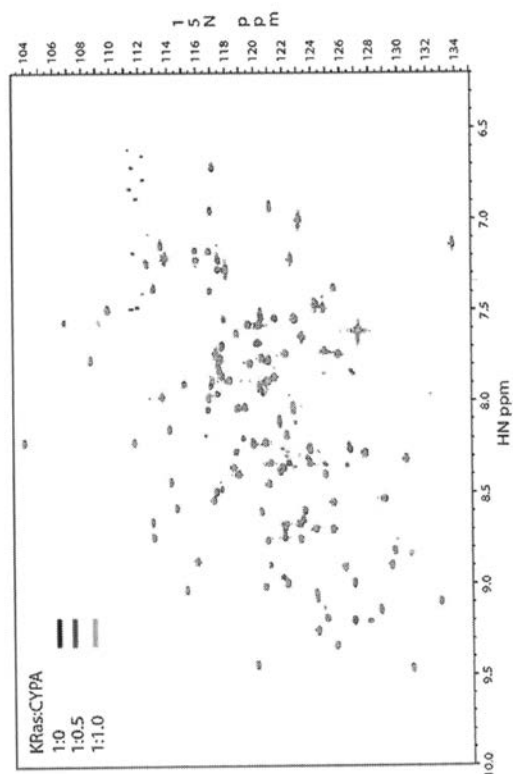
【図 16】



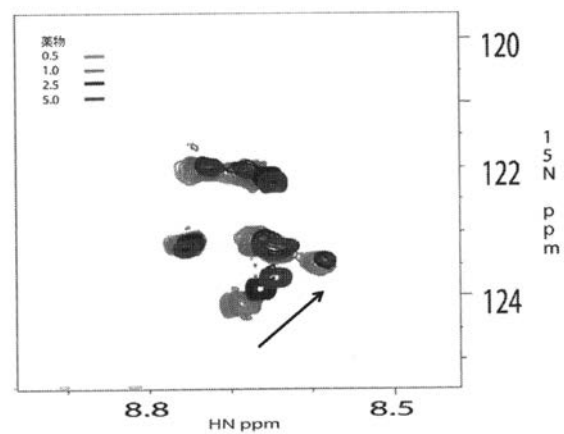
【図 17 A】



【図 17 B】



【図 17 C】



【配列表】

2020520988000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/26014

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - G01N 33/68, 33/566; C12Q 1/533; A61K 47/42 (2018.01) CPC - G01N 33/6845, 33/566; C12Q 1/533; A61K 47/42		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/112279 A1 (WARP DRIVE BIO, INC.) 14 July, 2016; page 1, lines 25-39; page 18, lines 10-17; page 34, lines 14-15; page 61, lines 3-19; page 64, lines 22-36; page 72, lines 5-18	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 70, 97-99, 135-138, 139/136-138, 140/136-138, 142, 148-151, 152/149-151, 153/149-151, 224-227, 248-250, 252/249-250, 253-254

Y		71, 100/97-99, 143, 230-231, 232/230-231, 233/232/230-231, 234/233/232/230-231, 235/232/230-231, 256/253-254
Y	(MAJUMDER, A et al.) Interaction of Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein-like 1 with the Farnesyl Moiety. The Journal of Biological Chemistry. 04 June 2013; Vol. 288, No. 29; pages 21320-21328; figure 4; page 21324, column 2, paragraph 1; page 21326, column 2, paragraph 2; DOI: 10.1074/jbc.M113.476242	71, 100/97-99, 143
Y	(SUN, F et al.) Design and Structure-Based Study of New Potential FKBP12 Inhibitors. Biophysical Journal. November, 2003; Vol. 85, No. 5; pages 3194-3201; page 3195, column 2, paragraph 3; DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74737-7	256/253-254
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 "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 25 July 2018 (25.07.2018)		Date of mailing of the international search report 07 AUG 2018
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/26014

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2007/0218502 A1 (HAHN, KM et al.) 20 September, 2007; abstract; paragraphs [0008], [0010], [0035]	230-231, 232/230-231, 233/232/230-231, 234/233/232/230-231, 235/232/230-231
P, X	WO 2017/059207 A1 (WARP DRIVE BIO, INC.) 06 April, 2017; whole document	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 70-71, 97-99, 100/97-99, 135-138, 139/138-138, 140/136-138, 142-143, 148-151, 152/149-151, 153/149-151, 224-227, 230-231, 232/230-231, 233/232/230-231, 234/233/232/230-231, 235/232/230-231, 248-250, 252/249-250, 253-254, 256/253-254

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/26014

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
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:

3. ☒ Claims Nos.: -***- Please See Supplemental Page-***-
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***- Please See Supplemental Page-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group 1+ Claims 1-4, 70, 71 (in-part), 97-99, 100 (in-part), 135-140, 142, 143 (in-part), 148-153, 224-227, 230-235, 248-250, 252 (in-part), 253, 254, and 256 (in-part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US18/26014

-Continued from Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable-

Claims Nos: 5-69, 76-79, 82-86, 90-95, 102-134, 141, 154-155, 160-183, 190, 194, 201-202, 207-214, 218-223, 226-229, 236-243, 257-277 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

- Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking -

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+. Claims 1-4, 70-75, 80, 81, 87-89, 96-101, 135-140, 142-153, 156-159, 184-189, 191-193, 195-200, 203-206, 215-217, 224-227, 230-235, 244-256, a presenter protein binding moiety (protein binding moiety), and AIP (presenter protein) are directed toward a compound comprising a protein binding moiety and a cross-linking group; conjugates comprising the compound; complexes comprising the compound, methods of producing the conjugates and complexes; methods associated with the proteins, complexes, conjugates, and the interfaces thereof, or crystal structures thereof.

The compounds, conjugates, complexes and methods will be searched to the extent they encompass a compound encompassing a presenter protein binding moiety (first exemplary protein binding moiety), that binds to a presenter protein encompassing AIP (first exemplary presenter protein). Applicant is invited to elect additional compound(s), with, where applicable, fully specified structure(s) for each compound (i.e. no optional or variable atoms, groups, or substituents), and/or protein binding moiety(ies) and/or specific protein(s) bound by the protein binding moiety(ies) to be searched. Additional compound(s) and/or protein binding moiety(ies) and/or protein(s) bound by the protein binding moiety(ies) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-4, 70, 71 (in-part), 97-99, 100 (in-part), 135-140, 142, 143 (in-part), 148-153, 224-227, 230-235, 248-250, 252 (in-part), 253, 254, and 256 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a presenter protein binding moiety (protein binding moiety), and AIP (presenter protein). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected compound(s), and/or protein binding moiety(ies), and/or specific protein(s) bound by protein binding moiety(ies). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be AIP.1 (presenter protein). (It should be noted that applicants must identify the protein(s) bound by any elected compound(s) with specified structure(s), wherein the protein bound is associated with the elected compound, and search of said bound protein would not require payment of a further fee (as said protein does not constitute a separately elected species). It should further be noted that, should applicants elect, in general, for the search of an additional protein binding moiety, such as a target protein binding moiety, applicant would be allowed to elect one target protein bound by said moiety as the first embodiment of said election).

No technical features are shared between the compounds and/or crosslinkers and/or proteins of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a compound comprising a protein binding moiety and a cross-linking group; a conjugate comprising protein binding moiety conjugated to a protein; a method of producing a conjugate comprising a protein binding moiety conjugated to a protein, said method comprising reacting (a) a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group with (b) a second protein under conditions that permit production of said conjugate; a complex comprising (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and (ii) a first protein; a method of producing a complex comprising (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and (ii) a first protein, said method comprising combining a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and a first protein under conditions that permit production of said complex; a method of identifying a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein capable of forming a complex with a first protein, said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and (ii) a first protein; (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; and (c) determining if said conjugate and said first protein form a complex, wherein if said conjugate and said first protein form a complex, said conjugate is identified as a conjugate capable of forming a complex with a first protein, thereby identifying a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein capable of forming a complex with a first protein; a method of identifying a second protein which binds to a first protein, said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and (ii) a first protein; (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; and (c) determining whether said second protein binds to said first protein in said complex, wherein if said second protein binds to said first protein, said second protein is identified as binding to the first protein, thereby identifying a second protein which binds to a first protein; a method of identifying a second protein capable of reacting with a compound in the presence of a first protein, wherein the compound comprises a first protein binding moiety and a cross-linking moiety, said method comprising: (a) providing (i) a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking moiety; (ii) a second protein; and (iii) a first protein; (b) combining said compound, said second protein, and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said compound is capable of forming a complex with the first protein; and (c) determining if said second protein and said compound react during formation of said complex to form a conjugate, wherein if said second protein and said compound react during formation of said complex to form a conjugate, said second protein is identified as a second protein capable of reacting with the compound in the presence of a first protein, thereby identifying a second protein capable of reacting with a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking moiety in the presence of a first protein; a method of identifying a location on a second protein to form a conjugate with a first protein binding moiety, which conjugate is capable of forming a complex with a first protein, said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein at a location and (ii) a first protein; (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; (c) determining if said conjugate and said first protein form a complex;

-Continued Within the Next Supplemental Box-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/26014

-***Continued from Previous Supplemental Page:

and (d) repeating steps (a) to (c) with said first protein binding moiety conjugated at different locations on said second protein until a conjugate and said first protein form a complex, wherein a location on a second protein to form a conjugate with a first protein binding moiety, which conjugate is capable of forming a complex with a first protein is identified if said conjugate and said first protein form a complex, thereby identifying a location on a second protein to form a conjugate capable of forming a complex with a first protein; a method of identifying a compound capable of selective and covalent binding to a second protein in the presence of a first protein, said method comprising: (a) providing a first sample comprising (i) a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group; (ii) a second protein; and (iii) a first protein; and a second sample comprising (i) the same compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group as in the first sample and (ii) the same second protein as in the first sample; and (b) determining the extent to which said compound and said second protein react in said first sample as compared to said second sample, wherein a compound is identified as selectively covalently binding to a second protein in the presence of a first protein if said compound and said second protein reacts in said first sample more than in said second sample; a method of determining the structure of an interface in a complex comprising a first protein and a second protein, said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and (ii) a first protein; (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; and (c) determining the crystal structure of said complex, wherein the structure of the interface comprises at least the portion of the crystal structure between said first protein and said second protein, thereby determining the structure of an interface in a complex comprising a first protein and a second protein; a method of obtaining X-ray crystal coordinates for a complex, said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and (ii) a first protein; (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; and (c) determining the crystal structure of said complex, thereby obtaining X-ray crystal coordinates for said complex; and a method of determining the residues on a second protein that participate in binding with a first protein, said method comprising: (a) providing X-ray crystal coordinates of a complex; (b) identifying the residues of said second protein which comprise an atom within 4Å of an atom on said first protein; thereby determining the residues on a second protein that participate in binding with a first protein; these shared technical features are previously disclosed by WO 2016/112279 A1 to Warp Drive Bio, Inc., (hereinafter 'Warp') as evidenced by 'Distinction between the weak hydrogen bond and the van der Waals interaction' by Steiner et al. (hereinafter 'Steiner'), and in view of US 2007/0218502 A1 to Hahn et al. (hereinafter 'Hahn').

Warp discloses a compound comprising a protein binding moiety and a cross-linking group (a compound comprising a protein binding moiety and a cross-linking group; page 1, lines 25-39); a conjugate comprising protein binding moiety conjugated to a protein (a compound comprising a linker that participates in binding to a protein covalently (a conjugate comprising protein binding moiety conjugated to a protein) page 60, line 34 - page 61, line 10); a method of producing a conjugate (use of linkers in (a method of) preparation of conjugates; page 63, lines 9-10) comprising a protein binding moiety conjugated to a protein (comprising a protein binding moiety conjugated to a protein; page 60, line 34 - page 61, line 10), said method comprising reacting (a) a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group with (b) a second protein under conditions that permit production of said conjugate (the method comprising bond formation with one or more functional groups located on a linker and a second protein (said method comprising reacting (a) a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group with (b) a second protein under conditions that permit production of said conjugate); page 60, line 34 - page 61, line 7); a complex (a complex; page 64, lines 11-13) comprising (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein (comprising (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein; page 60, line 34 - page 61, line 10, page 63, lines 9-10; page 64, lines 11-13) and (ii) a first protein (and a first protein; page 64, lines 11-13); a method of producing a complex (a method of modulating a protein by producing a complex; page 18, lines 18-22, page 60, line 34 - page 61, line 7) comprising (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein (comprising (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein; page 18, lines 18-22, page 60, line 34 - page 61, line 7) and (ii) a first protein (and a first protein; page 18, lines 18-22), said method comprising combining a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and a first protein (said method comprising combining a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and a first protein; page 18, lines 18-22, page 60, line 34 - page 61, line 7) under conditions that permit production of said complex (under conditions effective to modulate the protein (that permit production of said complex); page 18, lines 18-22); a method of identifying a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein (a method of determining binding of conjugate compounds (identifying a conjugate) comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 66, lines 21-22) capable of forming a complex with a first protein (capable of forming a complex with cyclosporine A or FKBP12 (a first protein); page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63; page 66, lines 21-22; Table 5; page 88, lines 3-4, Table 6), said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein (said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 66, lines 21-22) and (ii) a first protein (cyclosporine A or FKBP12 (a first protein); page 66, lines 21-22; Table 5; page 88, lines 3-4, Table 6); (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein (combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 66, lines 21-22; Table 5; page 88, line 14 - page 89, line 2); and (c) determining if said conjugate and said first protein form a complex (determining if said conjugate and said first protein form a complex; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 66, lines 21-22; Table 5; page 88, lines 3-4, Table 6), wherein if said conjugate and said first protein form a complex, said conjugate is identified as a conjugate capable of forming a complex with a first protein, thereby identifying a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein capable of forming a complex with a first protein (wherein if said conjugate and said first protein form a complex, said conjugate is identified as a conjugate capable of forming a complex with a first protein, thereby identifying a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein capable of forming a complex with a first protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 66, lines 21-22; Table 5; page 88, lines 3-4, Table 6);

-***Continued Within the Next Supplemental Box:-***

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/26014

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

wherein if said conjugate and said first protein form a complex, said conjugate is identified as a conjugate capable of forming a complex with a first protein, thereby identifying a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein capable of forming a complex with a first protein (wherein if said conjugate and said first protein form a complex, said conjugate is identified as a conjugate capable of forming a complex with a first protein, thereby identifying a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein capable of forming a complex with a first protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 86, lines 21-22; Table 5; page 88, lines 3-4, Table 6); a method of determining the structure of an interface (determining the residues which interact in a ternary complex comprising a compound and two proteins (a method of determining the structure of an interface in a complex comprising a first protein and a second protein); page 97, lines 29-30; page 98, lines 7-15), said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein (said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 97, line 34 - page 98, line 15) and (ii) a first protein (and a first protein; page 97, line 34 - page 98, line 15); (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein (combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 97, line 34 - page 98, line 15); and (c) determining the crystal structure of said complex (determining the crystal structure of said complex; page 97, line 29 - page 98, line 15), wherein the structure of the interface comprises at least the portion of the crystal structure between said first protein and said second protein (wherein the structure of the interface comprises residues that interact between the first and second proteins, based on the crystal structure (at least the portion of the crystal structure between said first protein and said second protein); page 97, line 29 - page 98, line 15), thereby determining the structure of an interface in a complex comprising a first protein and a second protein (thereby determining the residues that interact between the two proteins in the crystal structure (structure of an interface in a complex comprising a first protein and a second protein); page 97, line 29 - page 98, line 15); a method of obtaining X-ray crystal coordinates for a complex (a method of obtaining X-ray crystal coordinates for a complex; page 97, line 29 - page 98, line 34), said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein (said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 97, line 34 - page 98, line 15) and (ii) a first protein (and a first protein; page 97, line 34 - page 98, line 15); (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; (combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; page 60, line 34 - page 61, line 7; page 63, lines 9-10; page 97, line 34 - page 98, line 15); and (c) determining the crystal structure of said complex (determining the crystal structure of said complex; page 97, line 29 - page 98, line 34), thereby obtaining X-ray crystal coordinates for said complex (thereby obtaining X-ray crystal coordinates for said complex; page 97, line 34 - page 98, line 15); and a method of determining the residues on a second protein that participate in binding with a first protein (a method of determining the residues on a second protein that participate in binding with a first protein; page 97, line 34 - page 98, line 15), said method comprising: (a) providing X-ray crystal coordinates of a complex (said method comprising: (a) providing X-ray crystal coordinates of a complex; page 97, line 34 - page 98, line 34); (b) identifying the residues of said second protein which comprise an atom within 4Å of an atom on said first protein (identifying the residues of said second protein which comprise an atom within 4Å of an atom on said first protein (within 4Å of an atom on said first protein); page 97, line 34 - page 98, line 34; wherein van der Waals contacts are at less than 4Å, as evidenced by Steiner [Table 1]); thereby determining the residues on a second protein that participate in binding with a first protein (thereby determining the residues on a second protein that participate in binding with a first protein; page 97, line 34 - page 98, line 34); Warp further discloses wherein a ternary complex is formed by protein-protein interactions (wherein a ternary complex is formed by protein-protein interactions; page 19, lines 6-19; page 72, lines 19-28); and wherein the ternary complex includes polypeptides which do not bind in the absence of the compound, or wherein the first and second proteins bind with at least 5-fold greater affinity in the presence of the compound than the absence of the compound (wherein the ternary complex includes polypeptides which do not bind in the absence of the compound, or wherein the first and second proteins bind with at least 5-fold greater affinity in the presence of the compound than the absence of the compound; page 1, lines 25-34).

Warp does not disclose: a method of identifying a second protein which binds to a first protein, said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein and (ii) a first protein; (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; and (c) determining whether said second protein binds to said first protein in said complex, wherein if said second protein binds to said first protein, said second protein is identified as binding to the first protein, thereby identifying a second protein which binds to a first protein; a method of identifying a second protein capable of reacting with a compound in the presence of a first protein, wherein the compound comprises a first protein binding moiety and a cross-linking moiety, said method comprising: (a) providing (i) a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking moiety; (ii) a second protein; and (iii) a first protein; (b) combining said compound, said second protein, and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said compound is capable of forming a complex with the first protein; and (c) determining if said second protein and said compound react during formation of said complex to form a conjugate, wherein if said second protein and said compound react during formation of said complex to form a conjugate, said second protein is identified as a second protein capable of reacting with the compound in the presence of a first protein, thereby identifying a second protein capable of reacting with a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking moiety in the presence of a first protein; a method of identifying a location on a second protein to form a conjugate with a first protein binding moiety, which conjugate is capable of forming a complex with a first protein, said method comprising: (a) providing (i) a conjugate comprising a first protein binding moiety conjugated to a second protein at a location and (ii) a first protein; (b) combining said conjugate and said first protein under conditions suitable for to permit complex formation if said conjugate is capable of forming a complex with the first protein; (c) determining if said conjugate and said first protein form a complex; and (d) repeating steps (a) to (c) with said first protein binding moiety conjugated at different locations on said second protein until a conjugate and said first protein form a complex, wherein a location on a second protein to form a conjugate with a first protein binding moiety, which conjugate is capable of forming a complex with a first protein is identified if said conjugate and said first protein form a complex, thereby identifying a location on a second protein to form a conjugate capable of forming a complex with a first protein; and a method of identifying a compound capable of selective and covalent binding to a second protein in the presence of a first protein, said method comprising: (a) providing a first sample comprising (i) a compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group; (ii) a second protein; and (iii) a first protein; and a second sample comprising (i) the same compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/26014

-***-Continued from Box -***-

(ii) a second protein; and (iii) a first protein; and a second sample comprising (i) the same compound comprising a first protein binding moiety and a cross-linking group as in the first sample and (ii) the same second protein as in the first sample; and (b) determining the extent to which said compound and said second protein react in said first sample as compared to said second sample, wherein a compound is identified as selectively covalently binding to a second protein in the presence of a first protein if said compound and said second protein reacts in said first sample more than in said second sample.

Hahn discloses methods for identifying optimum conjugate attachment sites to peptides (methods for identifying optimum conjugate attachment sites to peptides; abstract); including introduction of a conjugation site into the peptide or protein at different locations (including introduction of a conjugation site into the peptide or protein at different locations; paragraphs [0008], [0010]) and assessing the degree to which the different conjugates are active (assessing the degree to which the different conjugates are active; paragraph [0035]).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Warp to have provided a method of identifying a second protein which binds to a first protein by providing a conjugate, as disclosed by Warp, comprising a protein, and a second protein, and determining the crystal structure of the complex to identify the interface between the proteins to a second protein which binds to a first protein. Since Warp further discloses the crosslinking of a compound with a first protein, it further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have provided the first protein and the compound to which it crosslinks with a second protein, wherein the second protein binds to both the compound and the first protein, as disclosed by Warp, in order to better stabilize the first protein in complex with the compound to more effectively crosslink the compound to the first protein at a desired location. It also would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Warp to have provided a method of identifying a compound capable of selective and covalent binding (i.e. forming a conjugate) to a second protein in the presence of a first protein by comparing the conjugation of the compound to the first protein in the presence of absence of the second protein, wherein, due to the increased affinity in the tripartite complex, the compound reacts and forms a conjugate to a greater degree in the presence of the second protein than in its absence, as a means of specifically identifying compounds that stabilize the tripartite complex with the second protein. Finally, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Warp to have used a locatable conjugation site in a protein, as disclosed by Hahn, and moving the site to a plurality of locations on the protein surface, as disclosed by Hahn, in order to determine the best site for the formation of a conjugate capable of producing a tripartite or ternary complex, as disclosed by Warp, with high efficiency.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Warp and Hahn references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K	5/062	(2006.01)	C 0 7 K 5/062
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K 7/06
C 0 7 K	7/64	(2006.01)	C 0 7 K 7/64
C 1 2 N	9/90	(2006.01)	C 1 2 N 9/90
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N 15/12

(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, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, NE, 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, IR, IS, JO, 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, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. L i n u x

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

(72)発明者 マルビヒル、マーク ジョセフ

アメリカ合衆国 0 1 7 7 6 マサチューセッツ州 サドベリー ウェブスター サークル 4

(72)発明者 ジン、メイゾン

アメリカ合衆国 0 2 4 8 1 マサチューセッツ州 ウェルスレイ プリシラ サークル 3 4

(72)発明者 パール、ニコラス

アメリカ合衆国 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州 サマービル ギベンス ストリート 7

Fターム(参考) 4B050 LL01 LL03

4H045 AA10 AA30 DA89 EA20 EA50 FA34 FA44 GA25