

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7411326号

(P7411326)

(45)発行日 令和6年1月11日(2024.1.11)

(24)登録日 令和5年12月27日(2023.12.27)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/501 (2006.01)

A 6 1 K 31/501

Z N A

A 6 1 K 31/4545 (2006.01)

A 6 1 K 31/4545

A 6 1 P 37/06 (2006.01)

A 6 1 P 37/06

C 0 7 D 401/12 (2006.01)

C 0 7 D 401/12

G 0 1 N 33/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/68

請求項の数 13 (全111頁)

(21)出願番号 特願2018-516828(P2018-516828)

(86)(22)出願日 平成28年9月30日(2016.9.30)

(65)公表番号 特表2019-501863(P2019-501863  
A)

(43)公表日 平成31年1月24日(2019.1.24)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/054691

(87)国際公開番号 WO2017/059207

(87)国際公開日 平成29年4月6日(2017.4.6)

審査請求日 令和1年9月30日(2019.9.30)

(31)優先権主張番号 62/235,896

(32)優先日 平成27年10月1日(2015.10.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 517241101

ワープ ドライブ バイオ インコーポレ  
イテッド

WARP DRIVE BIO, INC.

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー

セッツ州 ケンブリッジ テクノロジー

スクエア 4 0 0

(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

(74)代理人 100152489

弁理士 中村 美樹

最終頁に続く

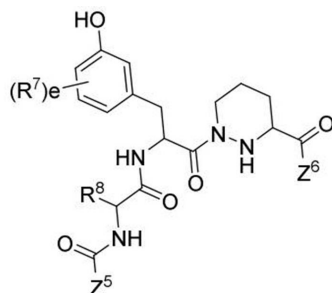
(54)【発明の名称】 タンパク質 - タンパク質インターフェースを分析するための方法および試薬

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

プレゼンタータンパク質結合部分および架橋基を含む化合物または医薬的に許容可能な塩において、前記架橋基が、アミノ酸と化学選択的反応をすることができる部分であり、前記プレゼンタータンパク質結合部分は、化学式 I V の構造

## 【化1】

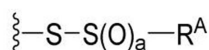


化学式 I V

を有し、式中、Z<sup>3</sup>、Z<sup>4</sup>、Z<sup>5</sup>、およびZ<sup>6</sup>は、それぞれ独立に、ヒドロキシル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>ヘテロアルキルであるか、あるいはZ<sup>3</sup>およびZ<sup>4</sup>またはZ<sup>5</sup>およびZ<sup>6</sup>は合わさって、これらが付着

している原子と共に、任意選択で置換されている 10 ~ 40 メンバーの大環状分子を形成し、 $Z^3$ 、 $Z^4$ 、 $Z^5$ 、 $Z^6$ 、または  $R^5$  の少なくとも 1 つは、前記架橋基への付着点を含み、 $e$  は、0、1、2、3、または 4 であり、 $R^5$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルキニル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルキニル、任意選択で置換されている  $C_3 \sim C_{10}$  カルボシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル、または任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^6$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、各  $R^7$  は、独立に、ヒドロキシル、シアノ、任意選択で置換されているアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルキニル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルキニル、任意選択で置換されている  $C_3 \sim C_{10}$  カルボシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル、または任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、 $R^8$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルキニル、任意選択で置換されているアリール、 $C_3 \sim C_7$  カルボシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール  $C_1 \sim C_6$  アルキル、および任意選択で置換されている  $C_3 \sim C_7$  カルボシクリル  $C_1 \sim C_6$  アルキルであり、前記架橋基は、化学式 I の構造を有し、

【化 2】



化学式 I

式中、波線は、前記化合物の残部への前記架橋基の付着点を示し、

$a$  は、0、1、または 2 であり、

$R^A$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール、または任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロアリールである、化合物または医薬的に許容可能な塩。

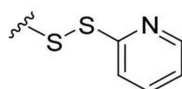
【請求項 2】

$R^A$  がピリジルである、請求項 1 に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

【請求項 3】

前記架橋基が、構造

【化 3】



を含み、式中、波線は前記化合物の残部への前記架橋基の付着点を示す、請求項 2 に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

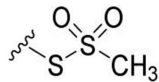
【請求項 4】

$R^A$  がメチルである、請求項 1 に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

【請求項 5】

前記架橋基が、構造

## 【化 4】

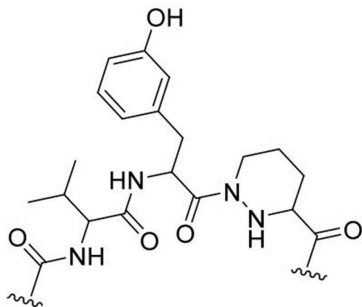


を含み、式中、波線は前記化合物の残部への前記架橋基の付着点を示す、請求項 4 に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 6】

前記プレゼンタータンパク質結合部分が、構造

## 【化 5】

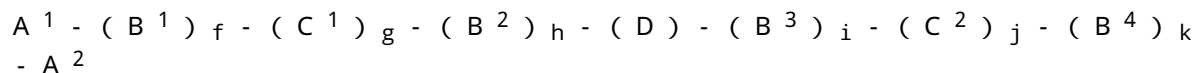


を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 7】

前記タンパク質結合部分および前記架橋基が、リンカーを介して接合し、

前記リンカーが、化学式 V の構造



## 化学式 V

を有し、式中、 $A^1$  は、前記リンカーおよびタンパク質結合部分の間の結合であり、 $A^2$  は、前記架橋基および前記リンカーの間の結合であり、 $B^1$ 、 $B^2$ 、 $B^3$ 、および  $B^4$  は、それぞれ独立に、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_2$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_3$  ヘテロアルキル、O、S、および  $NR^N$  から選択され、 $R^N$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 4$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 4$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 4$  アルキニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 6$  ヘテロシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim 12$  アリール、または任意選択で置換されている  $C_1 \sim 7$  ヘテロアルキルであり、 $C^1$  および  $C^2$  は、それぞれ独立に、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、 $f$ 、 $g$ 、 $h$ 、 $i$ 、 $j$ 、および  $k$  は、それぞれ独立に、0 または 1 であり、 $D$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 10$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 10$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 10$  アルキニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 6$  ヘテロシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim 12$  アリール、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_{10}$  ポリエチレングリコール、または任意選択で置換されている  $C_1 \sim 10$  ヘテロアルキル、または  $A^1 - (B^1)_f - (C^1)_g - (B^2)_h - (B^3)_i - (C^2)_j - (B^4)_k - A^2$  を連結している化学結合である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 8】

前記リンカーが、化学式 VI の構造

10

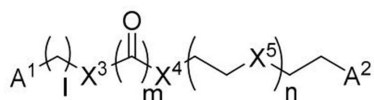
20

30

40

50

## 【化 6】



化学式 V I

を有し、式中、 $A^1$ は、前記リンカーおよびタンパク質結合部分の間の結合であり、

$A^2$ は、前記架橋基および前記リンカーの間の結合であり、

$l$ は、0、1、2、または3であり、

$m$ は、0または1であり、

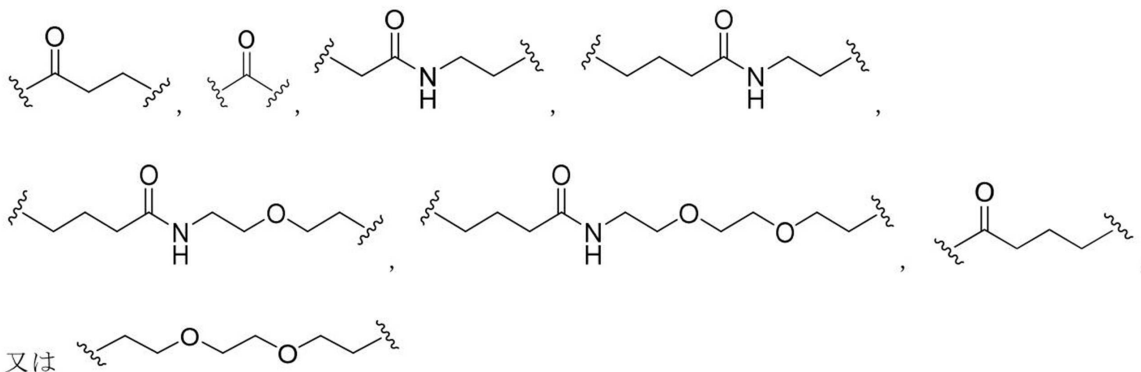
$n$ は、0、1、または2であり、

$X^3$ 、 $X^4$ 、および $X^5$ は、それぞれ独立に、非存在、O、S、 $-C-C-$ 、 $CR^9R^{10}$ または $NR^{11}$ であり、各 $R^9$ 、 $R^{10}$ 、および $R^{11}$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルキニル、任意選択で置換されているアリール、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール $C_1 \sim C_6$ アルキル、および任意選択で置換されている $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル $C_1 \sim C_6$ アルキルである、請求項1～7のいずれか一項に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 9】

前記リンカーが、構造

## 【化 7】



を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩。

## 【請求項 10】

構造

10

20

30

40

50

又は

又は

10

## 20

【請求項 12】  
標的タンパク質をモジュレートする方法に用いるための請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩、または請求項 11 に記載の組成物であって、前記方法が、前記標的タンパク質と、モジュレーション量の前記化合物または前記医薬的に許容可能な塩または前記組成物とを接触させることを含むものである、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の化合物または医薬的に許容可能な塩、または請求項 11 に記載の組成物。

## 30

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

40

## 【 0 0 0 2 】

標的との小分子の相互作用は接着力によって推進され、その強さは接触表面積と概ね比例するため、小分子はそれらの標的化能力において制限されている。それらの小さなサイズのために、小分子が十分な分子間の接触表面積を増大し、標的タンパク質と効果的に相互作用する唯一の方法は、そのタンパク質によって文字どおりに取り込まれることである。実際に、多数の実験および計算用データの両方は、それらの表面上に疎水性「ポケット」を有するそれらのタンパク質のみが、小分子を結合することができるという考え方を支持する。そのような場合、結合は、取込みによって可能となる。

## 【 0 0 0 3 】

小分子が、疎水性ポケット以外の部位におい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自然は進展させてきた。この戦略は、天然由来の免疫抑制薬であるシクロスポリン A、ラパマイシン、および F K 5 0 6 によって例示される。これらの薬物の生物活性は、小さな提示タンパク質との小分子の高親和性複合体の形成を伴う。小分子および提示タンパク質の複合表面は、標的と会合する。このように、例えば、シクロスポリン A およびシクロフィリン A の間に形成される二元複合体は、高親和性およ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 またはシクロフィリン A 単独のどちらも測定可能な親和性を伴ってカルシニューリンを結合しない。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 4 】

本発明者らは、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質ペアを同定し、かつこれらの相互作用をモジュレートすることができる小分子の開発において使用するための、これらの間のインターフェースを探索するのに有用な化合物およびコンジュゲートを開発した。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 5 】

したがって、本開示は、タンパク質 - タンパク質インターフェース、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）および標的タンパク質の間のインターフェースを分析するのに有用な方法および試薬を提供する。このような分析は、プレゼンタータンパク質およ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小分子の設計を助けることにおいて有用であり、このように得られた小分子 - 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、標的タンパク質の活性をモジュレートすることができる。一部の実施形態では、標的および / 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。一部の実施形態では、標的および / またはプレゼンタータンパク質は、哺乳動物のタンパク質である。

## 【 0 0 0 6 】

一部の態様では、本開示は、架橋基質として使用し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）に共有結合または非共有結合することができるタンパク質結合部分と、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反応をすることができる少なくとも 1 個の架橋基とを含み得る。一部の実施形態では、化合物は、1 個のみの架橋基を含む。

## 【 0 0 0 7 】

したがって、一態様では、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）および架橋基（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反応と化学選択的反応を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、こ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）に結合（共有結合的または非共有結合的）することができ、一方、架橋基は、タンパク質（例えば、プレゼンタータ

10

20

30

40

50

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を結合することができる別の化合物)と共に共有結合を形成することができる。一部の実施形態では、化合物がプレゼンタータンパク質結合部分を含むとき、化合物は、標的タンパク質結合部分を含まない。一部の実施形態では、化合物が標的タンパク質結合部分を含むとき、化合物は、プレゼンタータンパク質結合部分を含まない。

【0008】

一部の実施形態では、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。

【0009】

一部の実施形態では、架橋基は、混合ジスルフィドを含み、例えば、架橋基は、化学式 I の構造

【0010】

【化1】



化学式 I

【0011】

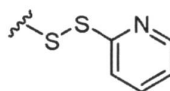
を含み、化学式中、波線は、化合物の残部への架橋基の付着点を例示し、

a は、0、1、または2であり、

R<sup>A</sup> は、任意選択で置換されている C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、任意選択で置換されている C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> ヘテロアルキル、任意選択で置換されている C<sub>6</sub> ~ C<sub>10</sub> アリール、または任意選択で置換されている C<sub>2</sub> ~ C<sub>9</sub> ヘテロアリールである。一部の実施形態では、R<sup>A</sup> は、任意選択で置換されている C<sub>2</sub> ~ C<sub>9</sub> ヘテロアリール(例えば、ピリジル)である。一部の実施形態では、架橋基は、構造

【0012】

【化2】



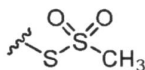
【0013】

を含み、化学式中、波線は、化合物の残部への架橋基の付着点を例示する。

一部の実施形態では、R<sup>A</sup> は、任意選択で置換されている C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル(例えば、メチル)である。一部の実施形態では、架橋基は、構造

【0014】

【化3】

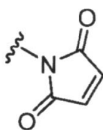


【0015】

を含み、化学式中、波線は、化合物の残部への架橋基の付着点を例示する。 一部の実施形態では、架橋基は、マレイミドを含み、例えば、架橋基は、構造

【 0 0 1 6 】

【 化 4 】



10

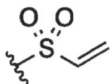
【 0 0 1 7 】

を含み、化学式中、波線は、化合物の残部への架橋基の付着点を例示する。

一部の実施形態では、架橋基は、ビニルスルホンを含み、例えば、架橋基は、構造

【 0 0 1 8 】

【 化 5 】



20

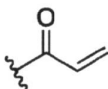
【 0 0 1 9 】

を含み、化学式中、波線は、化合物の残部への架橋基の付着点を例示する。

一部の実施形態では、架橋基は、ビニルケトンを含み、例えば、架橋基は、構造

【 0 0 2 0 】

【 化 6 】



30

【 0 0 2 1 】

を含み、化学式中、波線は、化合物の残部への架橋基の付着点を例示する。

一部の実施形態では、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

【 0 0 2 2 】

【 化 7 】



40

【 0 0 2 3 】

を含み、化学式中、波線は、化合物の残部への架橋基の付着点を例示する。

上記の化合物のいずれかの一部の実施形態では、タンパク質結合部分ポーションは、タンパク質と非共有結合性相互作用をすることができる。上記の化合物のいずれかの一部の実施形態では、タンパク質結合部分ポーションは、タンパク質と共有結合性相互作用をすることができる。

50



【 0 0 2 4 】

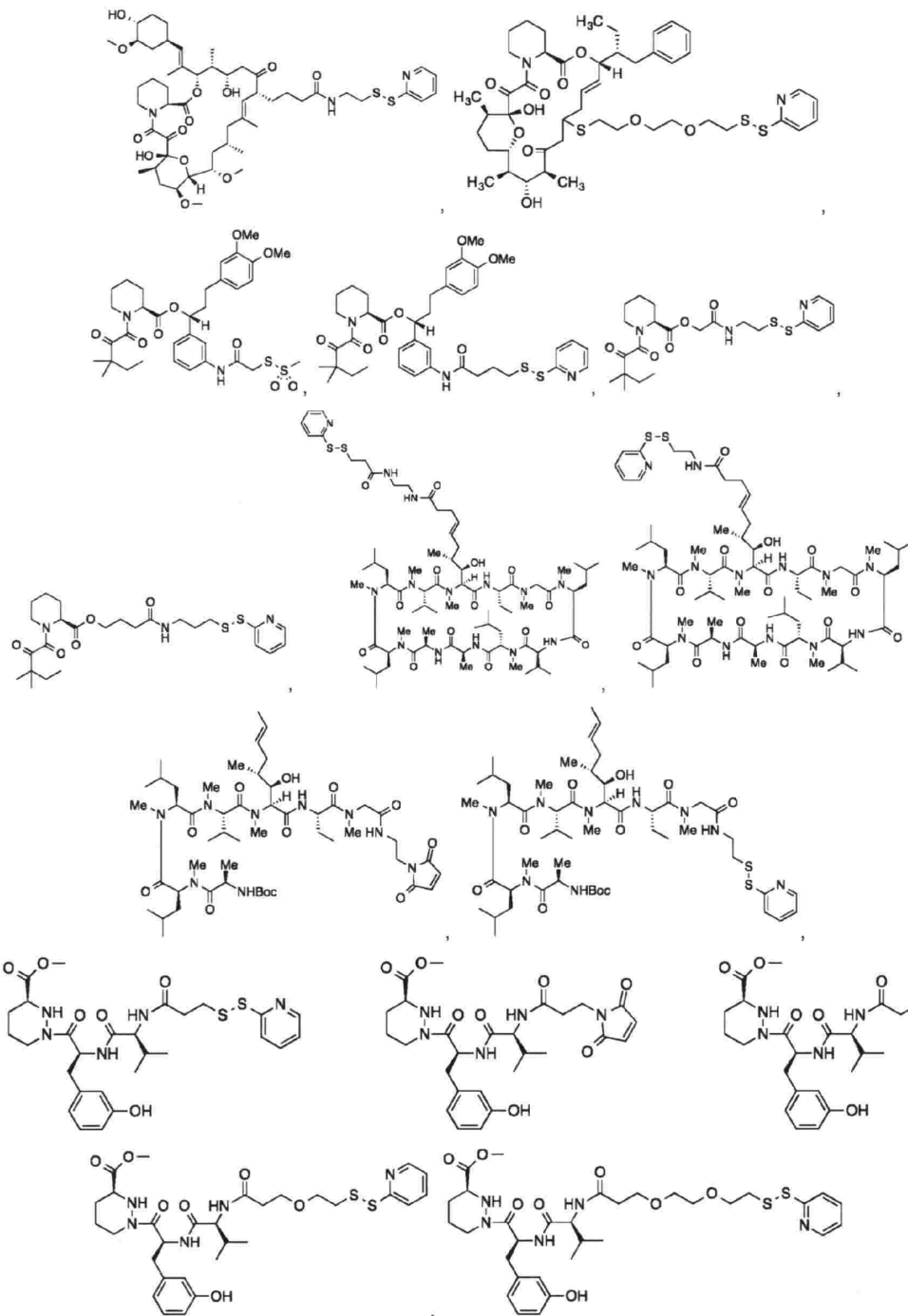
一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基とを含む化合物を提供する。一部の実施形態では、タンパク質結合部分および架橋基は、リンカーを介して付着している。

【 0 0 2 5 】

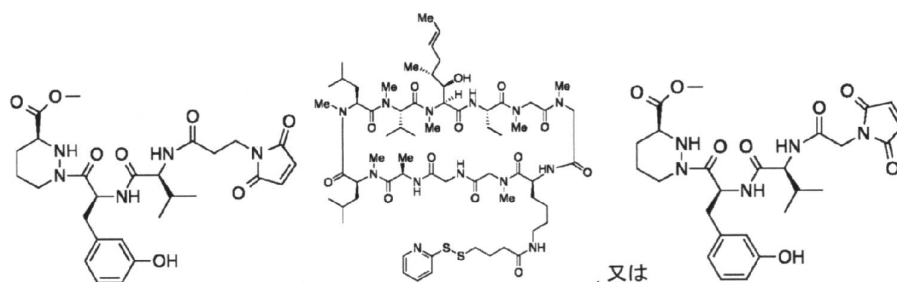
一部の態様では、本開示は、構造

【 0 0 2 6 】

【 化 8 】



【 0 0 2 7 】



10

## 【0028】

を有する化合物を提供する。

一部の態様では、本開示は、リンカーを介して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に共有結合または非共有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コンジュゲート、これらの合成のための方法、およびその使用を提供する。

## 【0029】

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ている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提供する。一部の実施形態では、コンジュゲートのプレゼンタータンパク質結合部分ポーションは、プレゼンタータンパク質と非共有結合性相互作用をすることができる。一部の実施形態では、コンジュゲートのプレゼンタータンパク質結合部分ポーションは、プレゼンタータンパク質と共有結合性相互作用をすることができる。

20

## 【0030】

一部の態様では、本開示は、標的タンパク質にコンジュゲートしている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、コンジュゲートの生成を可能とする条件下で、(a) プレゼンタータンパク質結合部分と架橋基とを含む化合物を、(b) 標的タンパク質と反応させることを含む。

30

## 【0031】

一部の態様では、本開示は、標的タンパク質にコンジュゲートしている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とを含む化合物；(b) 標的タンパク質；および(c) プレゼンタータンパク質を提供することと；コンジュゲートの生成を可能とする条件下で、化合物を標的タンパク質と反応させることを含む。

## 【0032】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と、プレゼンタータンパク質結合部分および標的タンパク質を含むコンジュゲートとを含む複合体、これらの生成のための方法、およびその使用を提供する。

40

## 【0033】

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ている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と、(ii) プレゼンタータンパク質とを含む複合体を提供する。

## 【0034】

一部の態様では、本開示は、(i) 標的タンパク質にコンジュゲートしている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と、(ii) プレゼンタータンパク質とを含む複合体を生成する方法を提供する。この方法は、複合体の生成を可能とする条件下で、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を含むコンジュゲートと、プレゼンタータンパク質とを合わせることを含む。

50

## 【 0 0 3 5 】

一部の態様では、本開示は、( i ) 標的タンパク質にコンジュゲートしている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と、( i i ) プレゼンタータンパク質と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とを含む化合物；( b ) 標的タンパク質；および( c ) プレゼンタータンパク質を提供することと；複合体の生成を可能とする条件下で、化合物を標的タンパク質と反応させることとを含む。

## 【 0 0 3 6 】

上記の方法の一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の非存在下で、化合物に結合する。上記の方法の一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の非存在下で、化合物に実質的に結合しない。上記の方法の一部の実施形態では、化合物および標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の非存在下で、実質的に反応しない。上記の方法の一部の実施形態では、化合物および標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の非存在下で反応する。上記の方法の一部の実施形態では、条件は、還元試薬を含まない。上記の方法の一部の実施形態では、条件は、過剰なプレゼンタータンパク質を含む。

## 【 0 0 3 7 】

一部の実施形態では、化合物およびプレゼンタータンパク質の間の検出可能な結合は、標的タンパク質の非存在下で観察される。しかし、一部の実施形態では、化合物およびプレゼンタータンパク質の間の検出可能な結合は、標的タンパク質の非存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）。一部の実施形態では、架橋基および標的タンパク質の間のかなりの反応（例えば、かなりのコンジュゲート形成）は、プレゼンタータンパク質の非存在下で観察されない。しかし、一部の実施形態では、架橋基および標的タンパク質の間のかなりの反応は、プレゼンタータンパク質の非存在下でさえ観察し得る。一部の実施形態では、このような反応の速度および／または程度（例えば、コンジュゲート形成の速度および／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および／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、1 0 倍、または1 0 0 倍大きい））。

## 【 0 0 3 8 】

一部の実施形態では、本明細書に記載のような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。

一部の実施形態では、本発明は、( i ) プレゼンタータンパク質と；( i i ) 本明細書に記載のような化合物（例えば、その構造がプレゼンタータンパク質結合部分と架橋基とを含む化合物）と；( i i i ) 標的タンパク質とを含む複合体を提供する。一部の実施形態では、このような複合体は、架橋部分と標的タンパク質との反応を可能とする条件に曝露されるか、かつ／または、それらの間の架橋が形成されるように、この条件下に維持される。一部の実施形態では、架橋は、標的タンパク質のアミノ酸（例えば、アミノ酸側鎖）中のヘテロ原子とのものである。一部の実施形態では、架橋は、標的タンパク質中のシステインにおける - S - 原子とのものである。一部の実施形態では、標的タンパク質は、天然標的タンパク質の変異体である。一部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、8 0 %、8 1 %、8 2 %；8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % もしくはそれ超）を示すが、架橋基との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添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）。

## 【 0 0 3 9 】

一部の態様では、本開示は、リンカーを介してプレゼンタータンパク質にコンジュゲートしている標的タンパク質に共有結合または非共有結合することができる標的タンパク質

10

20

30

40

50

結合部分を含むコンジュゲート、これらの合成のための方法、およびその使用を提供する。

【0040】

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ている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。一部の実施形態では、コンジュゲートの標的タンパク質結合部分ポジションは、標的タンパク質と非共有結合性相互作用をすることができる。一部の実施形態では、コンジュゲートの標的タンパク質結合部分ポジションは、標的タンパク質と非共有結合性相互作用をすることができる。一部の実施形態では、標的タンパク質結合部分およびプレゼンタータンパク質は、リンカーを介してコンジュゲートしている。

【0041】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートしている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、コンジュゲートの生成を可能とする条件下で、(a) 標的タンパク質結合部分および架橋基を含む化合物を、(b) プレゼンタータンパク質と反応させることを含む。

【0042】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートしている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および架橋基を含む化合物；(b) プレゼンタータンパク質；ならびに(c) 標的タンパク質を提供することと；コンジュゲートの生成を可能とする条件下で、化合物をプレゼンタータンパク質と反応させることを含む。

【0043】

一部の実施形態では、化合物および標的タンパク質の間の検出可能な結合は、プレゼンタータンパク質の非存在下で観察される。しかし、一部の実施形態では、化合物および標的タンパク質の間の検出可能な結合は、プレゼンタータンパク質の非存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)。一部の実施形態では、架橋基およびプレゼンタータンパク質の間のかかなりの反応(例えば、かなりのコンジュゲート形成)は、標的タンパク質の非存在下で観察されない。しかし、一部の実施形態では、架橋基およびプレゼンタータンパク質の間のかかなりの反応は、標的タンパク質の非存在下でさえ観察し得る。一部の実施形態では、このような反応の速度および/または程度(例えば、コンジュゲート形成の速度および/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および/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、100倍大きい)。

【0044】

一部の実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の非存在下で、化合物に結合する。一部の実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の非存在下で、化合物に実質的に結合しない。一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の非存在下で、化合物に実質的に結合しない。一部の実施形態では、架橋基および標的タンパク質の間の反応(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非存在下で観察されない。しかし、一部の実施形態では、架橋基および標的タンパク質の間の反応は、プレゼンタータンパク質の非存在下でさえ観察される。一部の実施形態では、本明細書に記載のようなコンジュゲート生成は、還元剤を含まない(例えば、実質的に非含有である)条件下で行われる。

【0045】

一部の実施形態では、本発明は、(i) プレゼンタータンパク質と；(ii) 本明細書に記載のような化合物(例えば、その構造が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)と；(iii) 標的タンパク質とを含む複合体を提供する。一部の実施形態では、このような複合体は、架橋部分と標的タンパク質との反応を可能とする条件に曝露されるか、かつ/または、それらの間の架橋が形成されるように、この条件下に維持される。一部の実施形態では、架橋は、標的タンパク質のアミノ酸(例えば、アミノ酸側鎖

10

20

30

40

50

）中のヘテロ原子とのものである。一部の実施形態では、架橋は、標的タンパク質中のシステインにおける - S - 原子とのものである。一部の実施形態では、標的タンパク質は、天然標的タンパク質の変異体である。一部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%もしくはそれ超）を示すが、架橋基との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添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）。

#### 【0046】

一部の態様では、本開示は、標的タンパク質と、リンカーを介してプレゼンタータンパク質にコンジュゲートしている標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートとを含む複合体、これらの生成のための方法、およびその使用を提供する。

#### 【0047】

一部の態様では、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ている標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートと；（ii）標的タンパク質と；（iii）プレゼンタータンパク質とを含む複合体を提供する。一部の実施形態では、このような複合体は、プレゼンタータンパク質との架橋部分の反応を可能とする条件に曝露されるか、かつ/または、それらの間の架橋が形成されるように、この条件下に維持される。一部の実施形態では、架橋は、プレゼンタータンパク質のアミノ酸（例えば、アミノ酸側鎖）

#### 【0048】

一部の実施形態では、架橋は、プレゼンタータンパク質中のシステインにおける - S - 原子とのものである。一部の実施形態では、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。一部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%もしくはそれ超）を示すが、架橋基との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添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）。

#### 【0049】

一部の態様では、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ている標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートと、（ii）標的タンパク質とを含む、複合体を生成する方法を提供する。この方法は、複合体の生成を可能とする条件下で、プレゼンタータンパク質にコンジュゲートしている標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートと、標的タンパク質とを合わせることを含む。一部の態様では、本発明は、（i）本明細書に記載のようなコンジュゲート（例えば、標的タンパク質結合部分およびプレゼンタータンパク質を含むコンジュゲート）と、（ii）標的タンパク質とを含む複合体を生成する方法を特徴とする。一部のこのような実施形態では、提供する方法は、複合体の生成を可能とする条件下で、コンジュゲートおよび標的タンパク質を合わせることを含む。代わりにまたはさらに、一部の実施形態では、このような方法は、例えば、（i）（a）化合物（例えば、その構造が標的タンパク質結合部分および架橋基を含む化合物）；（b）標的タンパク質；ならびに（c）プレゼンタータンパク質を互いに合わせることと；（ii）組合せを複合体の生成を可能とする条件に曝露し、かつ/または組合せを複合体の生成を可能とする条件下に維持することを含む。一部のこのような実施形態では、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。

#### 【0050】

一部の態様では、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ている

10

20

30

40

50

標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートと、( i i ) 標的タンパク質と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および架橋基を含む化合物；( b ) プレゼンタータンパク質；ならびに( c ) 標的タンパク質を提供することと；複合体の生成を可能とする条件下で、化合物をプレゼンタータンパク質と反応させることとを含む。

#### 【 0 0 5 1 】

一部のこのような実施形態では、条件は、化合物および標的タンパク質の間の検出可能な結合が、プレゼンタータンパク質の非存在下で観察されるという点において、化合物、プレゼンタータンパク質、および/または標的タンパク質が、特性決定されるというものである。しかし、一部の実施形態では、化合物および標的タンパク質の間の検出可能な結合は、この条件下で、プレゼンタータンパク質の非存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）。一部の実施形態では、架橋基およびプレゼンタータンパク質の間のかなりの反応は、この条件下で、標的タンパク質の非存在下で観察されない。しかし、一部の実施形態では、架橋基およびプレゼンタータンパク質の間のかなりの反応は、この条件下で、標的タンパク質の非存在下でさえ観察し得る。一部の実施形態では、条件は、還元試薬を含まない。一部の実施形態では、条件は、過剰なプレゼンタータンパク質を含む。

#### 【 0 0 5 2 】

一部の実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の非存在下で、化合物に結合する。一部の実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質の非存在下で、化合物に実質的に結合しない。一部の実施形態では、化合物およびプレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の非存在下で実質的に反応しない。一部の実施形態では、化合物およびプレゼンタータンパク質は、標的タンパク質の非存在下で反応する。一部の実施形態では、条件は、還元試薬を含まない。一部の実施形態では、条件は、過剰な標的タンパク質を含む。

#### 【 0 0 5 3 】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と非共有結合性相互作用をすることができるプレゼンタータンパク質結合部分と、標的タンパク質と共有結合性または非共有結合性相互作用をすることができる標的タンパク質結合部分とを含む化合物を提供する。一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分および標的タンパク質結合部分は、リンカーを介して付着している。

#### 【 0 0 5 4 】

したがって、一部の態様では、本開示は、化学式 V I I の構造

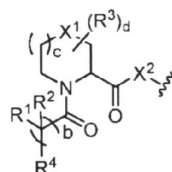
A - L - B

化学式 V I I

を有する化合物を提供し、化学式中、A は、化学式 V I I I の構造

#### 【 0 0 5 5 】

#### 【 化 9 】



化学式 VIII

#### 【 0 0 5 6 】

を含み、化学式中、b および c は、独立に、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、

$X^1$  および  $X^2$  は、それぞれ独立に、非存在、 $CH_2$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $SO$ 、 $SO_2$ 、または  $NR^{13}$  であり、

各  $R^1$  および  $R^2$  は、独立に、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されているアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルキニル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルキニル、任意選択で置換されている  $C_3 \sim C_{10}$  カルボシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロアリール）、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル  $C_1 \sim C_6$  アルキル（例えば、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロアリール  $C_1 \sim C_6$  アルキル）であるか、あるいは  $R^1$  および  $R^2$  は、これらが結合している炭素原子と合わさって、 $C=O$  を形成するか、あるいは  $R^1$  および  $R^2$  は合わさって、任意選択で置換されている  $C_3 \sim C_{10}$  カルボシクリルまたは任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリルを形成し、

各  $R^3$  は、独立に、ヒドロキシル、任意選択で置換されているアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  アルキニル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  ヘテロアルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_6$  ヘテロアルキニル、任意選択で置換されている  $C_3 \sim C_{10}$  カルボシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール  $C_1 \sim C_6$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロアリール）、または任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル  $C_1 \sim C_6$  アルキル（例えば、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロアリール  $C_1 \sim C_6$  アルキル）であるか、あるいは 2 個の  $R^8$  は合わさって、任意選択で置換されている  $C_3 \sim C_{10}$  カルボシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim C_{10}$  アリール、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロシクリル、例えば、任意選択で置換されている  $C_2 \sim C_9$  ヘテロアリールを形成し、

$R^4$  は、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_6$  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。

【0057】

化学式  $VII$  の化合物の一部の実施形態では、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性相互作用をすることができる。化学式  $VII$  の化合物の一部の実施形態では、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性相互作用をすることができる。化学式  $VII$  の化合物の一部の実施形態では、リンカー、 $L$  は存在する。化学式  $VII$  の化合物の一部の実施形態では、リンカー、 $L$  は存在しない。

【0058】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と、標的タンパク質と、プレゼンタータンパク質結合部分および標的タンパク質結合部分を含む化合物とを含む三元複合体、これらの生成のための方法、およびその使用を提供する。

【0059】

したがって、別の態様では、本開示は、(i) 化学式  $VII$  の化合物；(ii) 標的タンパク質；および (iii) プレゼンタータンパク質を含む複合体を提供する。

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、および複合体は、プレゼンタータンパク質と共に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および標的タンパク質を含むコンジュゲートの同定のために有用であり得る。

【0060】

一部の態様では、本発明は、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる本明細書に記載のようなコンジュゲート（例えば、ここで、その構造がプレゼンター

10

20

30

40

50

タンパク質結合部分と架橋基とを含む化合物は、標的タンパク質にコンジュゲートしている)を同定および/または特性決定する方法を特徴とする。一部の実施形態では、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、ここで、その構造がプレゼンタータンパク質結合部分と架橋基とを含む化合物は、標的タンパク質にコンジュゲートしている)、および(ii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと;(b)コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと;(c)コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を含む複合体が形成されているかを決定するステップとを含み、複合体の形成は、コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができるものであることを示す。

10

**【0061】**

したがって、一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができるコンジュゲートを同定および/または特性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ている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、および(ii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと;(b)コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと;(c)コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を含む複合体が形成されているかを決定するステップとを含み、複合体の形成は、コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができるものであることを示す。

20

**【0062】**

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、および複合体は、化合物と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のために有用であり得る。

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および/または特性決定する方法を提供し、化合物は、プレゼンタータンパク質結合部分および架橋部分を含む。この方法は、(a)(i)プレゼンタータンパク質結合部分および架橋部分を含む化合物;(ii)標的タンパク質;ならびに(iii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと;(b)コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと;(c)標的タンパク質および化合物が複合体の形成の間に反応して、コンジュゲートを形成しているかを決定するステップとを含み、標的タンパク質および化合物が、コンジュゲートを形成する場合、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。

30

**【0063】**

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、および複合体は、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる標的タンパク質の同定のために有用であり得る。

**【0064】**

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および/または特性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ている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、および(ii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと;(b)コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと;(c)標的タンパク質が、複合体中のプレゼンタータンパク質に結合しているかを決定するステップとを含み、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、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。

40

**【0065】**

50



一部の態様では、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および/または特性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および架橋部分を含む化合物；(ii)標的タンパク質；ならびに(iii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b)コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；(c)標的タンパク質が、複合体中のプレゼンタータンパク質に結合しているかを決定するステップとを含み、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、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であると同定される。

10

**【0066】**

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる標的タンパク質を同定および/または特性決定する方法を提供する。この方法は、(a)(i)化学式V I Iの化合物；(ii)標的タンパク質；および(iii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b)コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；(c)化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質が、複合体を形成しているかを決定するステップとを含み、化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる標的タンパク質であると同定される。

20

**【0067】**

一部の態様では、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および/または特性決定する方法を提供する。この方法は、(a)(i)化学式V I Iの化合物；(ii)標的タンパク質；および(iii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b)化合物がプレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；(c)標的タンパク質が複合体中のプレゼンタータンパク質に結合するかを決定するステップとを含み、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、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であると同定される。

30

**【0068】**

一部の態様では、本開示は、(a)(i)1つもしくは複数の標的タンパク質、(ii)上記の化合物のいずれか；および(iii)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と；(b)標的タンパク質の1つもしくは複数の、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、1つもしくは複数の標的タンパク質、化合物、およびプレゼンタータンパク質を合わせることと；(c)1つもしくは複数の標的タンパク質が、化合物およびプレゼンタータンパク質と共に複合体を形成しているかを決定することとによって、プレゼンタータンパク質と共に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、プレゼンタータンパク質と共に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共に複合体を形成することができる標的タンパク質であると同定される。

40

**【0069】**

一部の実施形態では、決定ステップは、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（例えば、プルダウン実験における使用による）。一部の実施形態では、複合体は、標的タンパク質、プレゼンタータンパク質、および本発明の化合物を含む。一部の実施形態では、複合体は、標的タンパク質およ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と、標的タンパク質の反応性アミノ酸との

50

間の反応によって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。一部の実施形態では、方法は、(d) 1つもしくは複数の標的タンパク質、化合物、およびプレゼンタータンパク質の間に形成される複合体において、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。一部の実施形態では、標的タンパク質の構造を同定することは、複合体上の質量分析を行うことを含む。一部の実施形態では、標的タンパク質およびプレゼンタータンパク質が複合体を形成し、かつ/または標的タンパク質が複合体中のプレゼンタータンパク質に結合するかどうかの決定は、標的タンパク質またはプレゼンタータンパク質が標識されているプルダウン実験を使用して行い得る(例えば、ここで複合体は、複合体中にはない標的タンパク質および/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し得る)。

10

#### 【0070】

一部の態様では、本開示は、(a)(i) 2つもしくはそれよりも多い標的タンパク質;(ii) 上記の化合物のいずれか;および(iii) 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と;(b) 前記標的タンパク質が、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、2つもしくはそれよりも多い標的タンパク質、化合物、およびプレゼンタータンパク質を合わせることと;(c) (b)において形成される標的タンパク質、化合物、およびプレゼンタータンパク質の1つもしくは複数の複合体を選択的に単離することと;(d) 質量分析法によってステップ(c)において単離した1つもしくは複数の複合体中の標的タンパク質を同定し(例えば、標的タンパク質の構造を決定し)、それによって、プレゼンタータンパク質と共に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ことによって、プレゼンタータンパク質と共に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する。

20

#### 【0071】

一部の実施形態では、決定ステップは、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(例えば、プルダウン実験における使用による)。一部の実施形態では、複合体は、標的タンパク質、プレゼンタータンパク質、および本発明の化合物を含む。一部の実施形態では、複合体は、標的タンパク質およ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と、標的タンパク質の反応性アミノ酸との間の反応によって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。一部の実施形態では、標的タンパク質およびプレゼンタータンパク質が複合体を形成し、かつ/または標的タンパク質が複合体中のプレゼンタータンパク質に結合するかどうかの決定は、標的タンパク質またはプレゼンタータンパク質が標識されているプルダウン実験を使用して行い得る(例えば、ここで複合体は、複合体中にはない標的タンパク質および/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し得る)。

30

#### 【0072】

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、および複合体は、プレゼンタータンパク質と共に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す、プレゼンタータンパク質結合部分を付着させ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。

40

#### 【0073】

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標的タンパク質上の場所を同定および/または特性決定する方法を提供し、ここでコンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる。この方法は、(a)(i) ある場所において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を含むコンジュゲート、および(ii) プレゼンタータンパク質を提供するステップと;(b) コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと;(c) コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質が複合体を形成しているかを決定するステップと;(d) コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク

50

質が複合体を形成するまで、標的タンパク質上の異なる場所において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でステップ (a) ~ (c) を任意選択で繰り返すステップとを含み、コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質が、複合体を形成する場合、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標的タンパク質上の場所 (コンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる) は同定される。一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、天然由来の標的タンパク質の変異体である。

【0074】

一部の態様では、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標的タンパク質上の場所を同定および/または特性決定する方法を提供し、ここでコンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と共に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とを含む化合物；(ii) 標的タンパク質；および(iii) プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b) プレゼンタータンパク質の存在下である場所において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を含むコンジュゲートの形成を可能とする条件下で、化合物と標的タンパク質とを併せるステップと；(c) コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質が複合体を形成しているかを決定するステップと；(d) コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質が複合体を形成するまで、ステップ(a) ~ (c) を任意選択で繰り返す (プレゼンタータンパク質結合部分は、標的タンパク質上の異なる場所においてコンジュゲートしている) (コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質が、複合体を形成する場合、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標的タンパク質上の場所 (コンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる) は同定される)、それによって、プレゼンタータンパク質と共に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標的タンパク質上の場所を同定するステップとを含む。一部の実施形態では、標的タンパク質は、天然由来の標的タンパク質の変異体である。

【0075】

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、および複合体は、プレゼンタータンパク質の存在下で標的タンパク質と共有結合を形成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。一部の実施形態では、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共有結合を選択的に形成すると同定される。

【0076】

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することができる化合物を同定および/または特性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とを含む化合物；(ii) 標的タンパク質；および(iii) プレゼンタータンパク質を含む試料を提供するステップと；(b) 化合物および標的タンパク質が、試料中の前記化合物中の架橋基を介して共有結合を形成しているかを決定するステップとを含み、化合物および標的タンパク質が試料中で反応する場合、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すると同定される。

【0077】

一部の態様では、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および共有結合することができる化合物を同定および/または特性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とを含む化合物；(ii) 標的タンパク質；および(iii) プレゼンタータンパク質を含む第1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とを含む、第1の試料と同じ化合物と、(ii) 第1の試料中と同じ標的タンパク質とを含む第2の試料を提供するステップと；(b) 化合物および標的タンパク質が、第2の試料と比較して、第1の試料中で反応する程度を決定するステップとを含み、化合物および標的タンパク質が、第2の試料中よりも第1の試料中で反応する場合、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すると同定される。

【0078】

一部の実施形態では、化合物および標的タンパク質が、第2の試料中よりも少なくとも5倍多く第1の試料中で反応する場合、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すると同定される。一部の実施形態では、化合物および標的タンパク質が第1の試料中で反応するが、第2の試料中で実質的に反応しない場合、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すると同定される。

【0079】

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、および複合体は、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質と共に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を含むコンジュゲートの同定において有用であり得る。

10

【0080】

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共に複合体を形成することができるコンジュゲートを同定および/または特性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ている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、および(ii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b)複合体を形成するのに適した条件下で、コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；(c)コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質が複合体を形成しているかを決定し(コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質が複合体を形成する場合、コンジュゲートは、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができると同定される)、それによって、プレゼンタータンパク質と共に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ステップとを含む。

20

【0081】

一部の実施形態では、コンジュゲートおよ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し得る。

【0082】

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、および複合体は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質の間のタンパク質-タンパク質インターフェースの構造を決定するのに有用であり得る。

30

【0083】

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および標的タンパク質を含む複合体におけるインターフェースの構造を決定し、かつ/またはその1つもしくは複数の構造的フィーチャをアセスメント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ている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、および(ii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b)コンジュゲートとプレゼンタータンパク質とを接触させて、複合体を形成させる(例えば、バイアル中)ステップと；(c)複合体の結晶構造を決定し(インターフェースの構造は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質の間の結晶構造の少なくともポーションを含む)、それによって、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるインターフェースの構造を決定するステップとを含む。

40

【0084】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるインターフェースの構造を決定し、かつ/またはその1つもしくは複数の構造的フィーチャをアセスメント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および架橋部分を含む化合物；(ii)標的タンパク質；ならびに(iii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b)化合物および標的タンパク質の間のコンジュゲートの形成、ならびに前記コンジュゲートおよび前記プレゼンタータンパク質の間の複合体の形成(例えば、バイアル中)に適した条件下で、化合物、標

50

的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；（c）複合体の結晶構造を決定し（インターフェースの構造は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質の間の結晶構造の少なくともポーションを含む）、それによって、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるインターフェースの構造を決定するステップとを含む。

【0085】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるインターフェースの構造を決定し、かつ/またはその1つもしくは複数の構造的フィーチャをアセスメントする方法を提供する。この方法は、（a）（i）化学式V I Iの化合物；（i i）標的タンパク質；および（i i i）プレゼンタータンパク質を提供するステップと；（b）化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を含む複合体を形成するステップ（例えば、バイアル中）と；（c）複合体の結晶構造を決定し（インターフェースの構造は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質の間の結晶構造の少なくともポーションを含む）、それによって、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるインターフェースの構造を決定するステップとを含む。

【0086】

一部の態様では、本開示は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるタンパク質-タンパク質インターフェースの構造を決定し、かつ/またはその1つもしくは複数の構造的フィーチャをアセスメントする方法を提供する。この方法は、（a）上記の複体のいずれかの結晶を提供するステップと；（b）結晶の構造を決定し（インターフェースの構造は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質の間の結晶構造の少なくともポーションを含む）、それによって、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるタンパク質-タンパク質インターフェースの構造を決定するステップとを含む。一部の態様では、本開示は、標的タンパク質の生物活性をモジュレートすることができる化合物を同定および/または特性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および標的タンパク質を含む複合体におけるタンパク質-タンパク質インターフェースの構造（例えば、上記の方法のいずれかによって決定される構造）を提供するステップと；（b）インターフェースにおいて結合することができる化合物の構造を決定し、それによって、標的タンパク質の生物活性をモジュレートすることができる化合物を同定するステップとを含む。一部の実施形態では、インターフェースにおいて結合することができる化合物の構造は、計算的方法を使用して決定される。一部の実施形態では、インターフェースにおいて結合することができる化合物の構造は、標的タンパク質およびプレゼンタータンパク質の存在下で、複合体形成のための本明細書に記載されている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って決定される。

【0087】

一部の態様では、本開示は、複合体についての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ている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、および（i i）プレゼンタータンパク質を提供するステップと；（b）コンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、コンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；（c）複合体の結晶構造を決定し、それによって、複合体についてのX線結晶座標を得るステップとを含む。

【0088】

一部の態様では、本開示は、複合体についての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および架橋部分を含む化合物；（i i）標的タンパク質；ならびに（i i i）プレゼンタータンパク質を提供するステップと；（b）化合物がプレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；（c）複合体の結晶構造を決定し、それによ

10

20

30

40

50

て、複合体についてのX線結晶座標を得るステップとを含む。

【0089】

一部の態様では、本開示は、複合体についての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；および(iii)プレゼンタータンパク質を提供するステップと；(b)化合物がプレゼンタータンパク質と共に複合体を形成することができる場合、複合体形成を可能とするのに適した条件下で、化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質を合わせるステップと；(c)複合体の結晶構造を決定し、それによって、複合体についてのX線結晶座標を得るステップとを含む。

【0090】

一部の態様では、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)本発明の方法によって得られる複合体のX線結晶座標を提供するステップと；(b)プレゼンタータンパク質上の原子の4内の原子を含む標的タンパク質の残基を同定し、それによって、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ステップとを含む。

【0091】

一部の態様では、本開示は、本明細書に記載されている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化学的および/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)本明細書に記載されている方法によって得られる本明細書に記載されている複合体のX線結晶座標を提供するステップと；(b)複合体の生化学的および/または生物物理学の特性を計算し、それによって、プレゼンタータンパク質/標的タンパク質複合体の生化学的および/または生物物理学の特性を決定するステップとを含む。

【0092】

一部の実施形態では、生化学的および/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 $K_{inact}$ 、および/または複合体の $K_i/K_{inact}$ を含む。一部の実施形態では、生化学的および/または生物物理学の特性は、等温滴定熱量測定、表面プラズモン共鳴、および/または質量分析法によって決定される。

【0093】

一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質を含む複合体におけるインターフェースは、結合ポケットであるか、あるいは結合ポケットを含む。

一部の態様では、本開示は、溶液中の上記の化合物、標的タンパク質、およびプレゼンタータンパク質のいずれかを含む組成物を提供する。

【0094】

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合体のいずれかと薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物を特徴とする。いくつかの実施形態では、医薬組成物はユニット製剤である。

【0095】

いくつかの態様では、本発明は、標的タンパク質（たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質）をモジュレートする方法を特徴とする。いくつかの実施形態では、かかる方法は、標的タンパク質と、モジュレーション（たとえば、正または負のモジュレーション）量の本発明の化合物（たとえば、プレゼンタータンパク質の存在下）、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、を接触させる工程を含む。

【0096】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質（たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質）をモジュレート（たとえば、正または負にモジュレート）する方

10

20

30

40

50

法を提供する。いくつかの実施形態では、かかる方法は、化合物がプレゼンタータンパク質との複合体を形成可能でありかつ得られる複合体が標的タンパク質に結合可能である条件下で、標的タンパク質とプレゼンタータンパク質とを発現する細胞と、有効量の本発明の化合物または組成物と、を接触させることにより、標的タンパク質をモジュレート（たとえば、正または負にモジュレート）する工程を含む。

【0097】

いくつかの態様では、本開示は、標的タンパク質（たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質）をモジュレート（たとえば、正または負にモジュレート）する方法を提供する。いくつかの実施形態では、かかる方法は、標的タンパク質と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を接触させることにより、標的タンパク質をモジュレートする工程を含む。

10

【0098】

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、かかる方法は、化合物とプロリルイソメラーゼとの間の複合体の形成を可能にする条件下で本発明の化合物または組成物とプロリルイソメラーゼを発現する細胞とを接触させることにより、プロリルイソメラーゼ活性を阻害する工程を含む。

【0099】

いくつかの態様では、本開示は、細胞内でプレゼンタータンパク質／化合物複合体を形成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、かかる方法は、化合物とプレゼンタータンパク質との間の複合体の形成を可能にする条件下で、プレゼンタータンパク質を発現する細胞と本発明の化合物または組成物とを接触させる工程を含む。

20

【0100】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、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を結合することができる。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、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。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、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、もしくはFKBP52を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、PPI L4、PPI L6、RANBP2、もしくはPPWD1を結合することができる）、またはPIN1結合部分である。上記の方法のいずれかの一部の実施形態では、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ことが既知である。

30

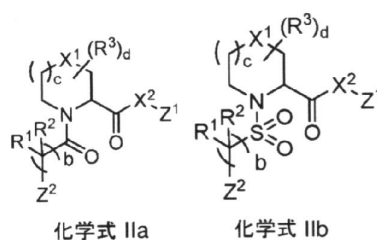
【0101】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、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。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、FKBP結合部分は、化学式IIaまたはIIbの構造

40

【0102】

## 【化 1 0】



10

## 【0 1 0 3】

を含み、化学式中、 $Z^1$ および $Z^2$ は、それぞれ独立に、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキルであるか、あるいは $Z^1$ および $Z^2$ は合わさって、これらが付着している原子と共に、任意選択で置換されている10～40メンバーの大環状分子を形成し、 $Z^1$ または $Z^2$ の少なくとも1つは、架橋基への付着点を含み、

$b$ および $c$ は、独立に、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、

$X^1$ および $X^2$ は、それぞれ独立に、非存在、 $CH_2$ 、O、S、SO、 $SO_2$ 、または $NR^4$ であり、

20

各 $R^1$ および $R^2$ は、独立に、水素、ヒドロキシル、任意選択で置換されているアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルキニル、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されている $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロアリール）、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリル $C_1 \sim C_6$ アルキル（例

30

例えば、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロアリール $C_1 \sim C_6$ アルキル）であるか、あるいは $R^1$ および $R^2$ は、これらが結合している炭素原子と合わさって、 $C=O$ を形成するか、あるいは $R^1$ および $R^2$ は合わさって、任意選択で置換されている $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリルまたは任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリルを形成し、各 $R^3$ は、独立に、ヒドロキシル、任意選択で置換されているアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルキニル、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されている $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロアリール）、または任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリル $C_1 \sim C_6$ アルキル（例えば、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロアリール $C_1 \sim C_6$ アルキル）であるか、あるいは2個の $R^8$ は合わさって、任意選択で置換されている $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール、例えば、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロアリールを形成し、

40

各 $R^4$ は、独立に、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルキニル、任意選択で置換されているアリール、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、任意選択で置換されている $C$

50



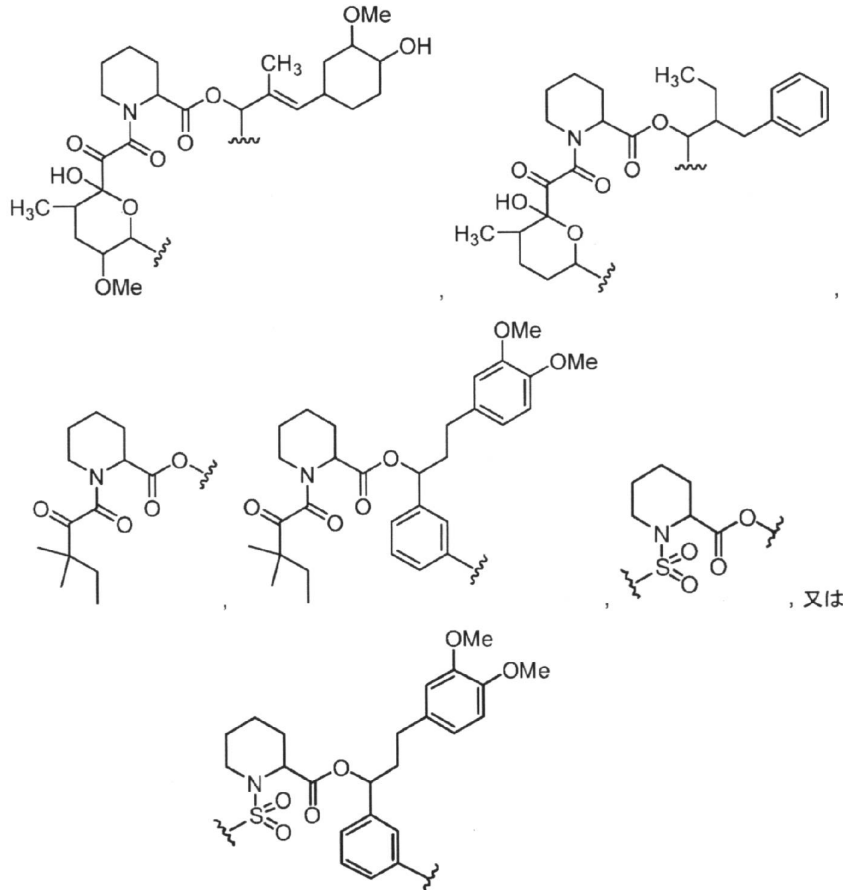
6 ~ C<sub>10</sub> アリール C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキル、および任意選択で置換されている C<sub>3</sub> ~ C<sub>7</sub> カルボシクリル C<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub> アルキルである。

【0104】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、構造

【0105】

【化11】



10

20

30

【0106】

を含む。

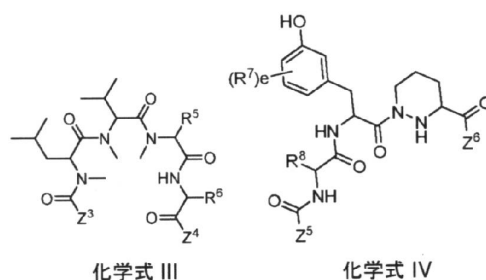
上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、シクロフィリン結合部分（例えば、選択的シクロフィリン結合部分または非選択的シクロフィリン結合部分）である。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、シクロフィリン結合部分は、化学式 I I I または I V の構造

【0107】

40

50

## 【化 1 2】



10

## 【0108】

を含み、化学式中、 $Z^3$ 、 $Z^4$ 、 $Z^5$ 、および $Z^6$ は、それぞれ独立に、ヒドロキシル、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキルであるか、あるいは $Z^3$ および $Z^4$ または $Z^5$ および $Z^6$ は合わさって、これらが付着している原子と共に、任意選択で置換されている10～40メンバーの大環状分子を形成し、

$Z^3$ 、 $Z^4$ 、 $Z^5$ 、 $Z^6$ 、または $R^5$ 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、

20

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

$R^6$ は、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキルであり、

30

各 $R^7$ は、独立に、ヒドロキシル、シアノ、任意選択で置換されているアミノ、ハロゲン、チオール、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルキニル、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ ヘテロアルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ ヘテロアルキニル、任意選択で置換されている $C_3 \sim C_{10}$ カルボシクリル、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリル（例えば、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロアリール）、または任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロシクリル $C_1 \sim C_6$ アルキル（例えば、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_9$ ヘテロアリール $C_1 \sim C_6$ アルキル）であり、

40

$R^8$ は、水素、任意選択で置換されている $C_1 \sim C_6$ アルキル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルケニル、任意選択で置換されている $C_2 \sim C_6$ アルキニル、任意選択で置換されているアリール、 $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル、任意選択で置換されている $C_6 \sim C_{10}$ アリール $C_1 \sim C_6$ アルキル、および任意選択で置換されている $C_3 \sim C_7$ カルボシクリル $C_1 \sim C_6$ アルキルである。

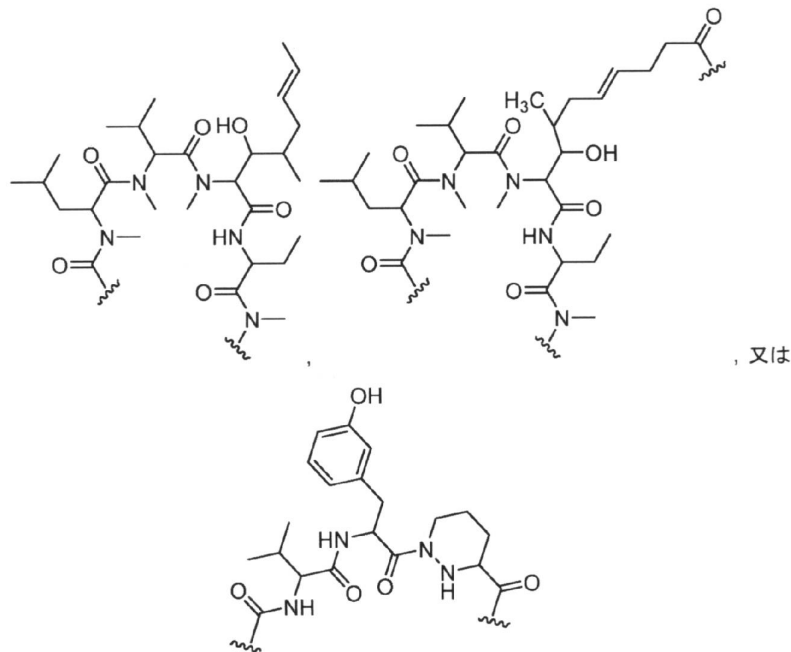
## 【0109】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、構造

## 【0110】

50

## 【化 1 3】



## 【0111】

を含む。

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、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、クロマチンモディファイヤー/リモデラー、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およびモチーフを有するタンパク質である。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、標的タンパク質は、アンドラッグابل表面を含む。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、標的タンパク質は、伝統的な結合ポケットを有さない。

## 【0112】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、標的タンパク質のアミノ酸配列は修飾されており、少なくとも1個の天然アミノ酸が反応性アミノ酸（例えば、天然アミノ酸、例えば、システイン、リシン、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）で置換されている。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、標的タンパク質のアミノ酸配列は修飾されており、少なくとも1個の天然反応性アミノ酸（例えば、システイン、リシン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリン）が非反応性アミノ酸（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）で置換されている。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、少なくとも1個の天然反応性アミノ酸は、溶媒に曝露されたアミノ酸である。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、標的タンパク質のアミノ酸配列は修飾されて、全ての反応性アミノ酸が非反応性アミノ酸で置換されている。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、置換は、保存的置換である。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、標的タンパク質は、1つのみの、溶媒に曝露された反応性アミノ酸を含む。

## 【 0 1 1 3 】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、表 1 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である。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、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。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、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、FKBP 12、FKBP 12.6、FKBP 13、FKBP 25、FKBP 51、もしくはFKBP 52）、シクロフィリンファミリーのメンバー（例えば、PP1A、CYPB、CYP C、CYP 40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC 27、CYP L1、CYP 60、CYP J、PPI L4、PPI L6、RANBP 2、もしくはPPWD 1）、またはPIN 1である。

10

## 【 0 1 1 4 】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列は修飾されており、少なくとも 1 個の天然アミノ酸は反応性アミノ酸（例えば、天然アミノ酸、例えば、システイン、リシン、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）で置換されている。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列は修飾されており、少なくとも 1 個の天然反応性アミノ酸（例えば、システイン、リシン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはセリン）が非反応性アミノ酸（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）で置換されている。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、少なくとも 1 個の天然反応性アミノ酸は、溶媒に曝露されたアミノ酸である。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質のアミノ酸配列は修飾されて、全ての反応性アミノ酸が非反応性アミノ酸で置換されている。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、置換は、保存的置換である。

20

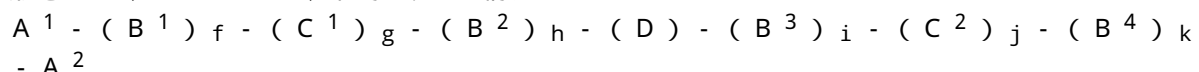
## 【 0 1 1 5 】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、リンカーは、長さで 1 ~ 20 個の原子である。上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、リンカーは、長さで 1 . 5 ~ 30 オングストロームである。

30

## 【 0 1 1 6 】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、リンカーは、化学式 V の構造



化学式 V

を有し、

化学式中、 $A^1$  は、リンカーおよびタンパク質結合部分の間の結合であり、 $A^2$  は、架橋基およびリンカーの間の結合であり、 $B^1$ 、 $B^2$ 、 $B^3$ 、および  $B^4$  は、それぞれ独立に、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_2$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_1 \sim C_3$  ヘテロアルキル、O、S、および  $NR^N$  から選択され、 $R^N$  は、水素、任意選択で置換されている  $C_1 \sim 4$  アルキル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 4$  アルケニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 4$  アルキニル、任意選択で置換されている  $C_2 \sim 6$  ヘテロシクリル、任意選択で置換されている  $C_6 \sim 12$  アリール、または任意選択で置換されている  $C_1 \sim 7$  ヘテロアルキルであり、 $C^1$  および  $C^2$  は、それぞれ独立に、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、および k は、それぞれ

40

50

独立に、0または1であり、Dは、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~10アルキル、任意選択で置換されているC<sub>2</sub>~10アルケニル、任意選択で置換されているC<sub>2</sub>~10アルキニル、任意選択で置換されているC<sub>2</sub>~6ヘテロシクリル、任意選択で置換されているC<sub>6</sub>~12アリール、任意選択で置換されているC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>ポリエチレングリコール、または任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~10ヘテロアルキル、またはA<sup>1</sup>-(B<sup>1</sup>)<sub>f</sub>-(C<sup>1</sup>)<sub>g</sub>-(B<sup>2</sup>)<sub>h</sub>-を-(B<sup>3</sup>)<sub>i</sub>-(C<sup>2</sup>)<sub>j</sub>-(B<sup>4</sup>)<sub>k</sub>-A<sup>2</sup>を連結している化学結合である。

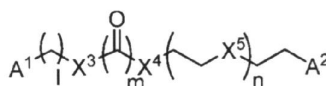
【0117】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、リンカーは、化学式VIの構造

10

【0118】

【化14】



化学式 VI

【0119】

20

を含み、化学式中、A<sup>1</sup>は、リンカーおよびタンパク質結合部分の間の結合であり、A<sup>2</sup>は、架橋基およびリンカーの間の結合であり、

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<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、およびX<sup>5</sup>は、それぞれ独立に、非存在、O、S、-C-C-、CR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>またはNR<sup>11</sup>であり、

各R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、およびR<sup>11</sup>は、独立に、水素、任意選択で置換されているC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、任意選択で置換されているC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルケニル、任意選択で置換されているC<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキニル、任意選択で置換されているアリール、C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>カルボシクリル、任意選択で置換されているC<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリールC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、および任意選択で置換されているC<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>カルボシクリルC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである。一部の実施形態では、各R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、およびR<sup>11</sup>は、独立に、水素、非置換C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、非置換C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルケニル、非置換C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub>アルキニル、非置換アリール、C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>カルボシクリル、非置換C<sub>6</sub>~C<sub>10</sub>アリールC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキル、および非置換C<sub>3</sub>~C<sub>7</sub>カルボシクリルC<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>アルキルである。

30

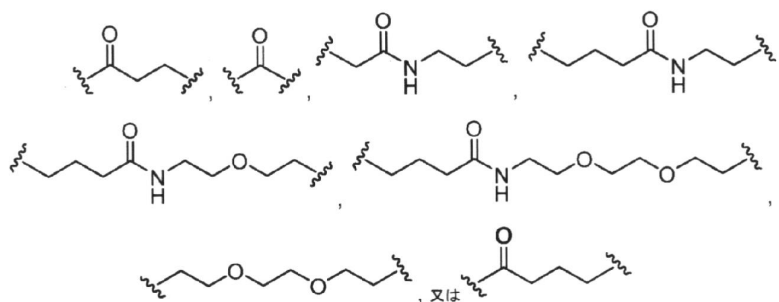
【0120】

上記の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、または方法のいずれかの一部の実施形態では、リンカーは、構造

【0121】

40

## 【化 1 5】



10

## 【0 1 2 2】

を含む。

化学用語

本明細書に記載されるある特定の化合物が1種以上の異なる異性体（たとえば、立体異性体、幾何異性体、互変異性体）および/または同位体（1個以上の原子をその原子の異なる同位体で置き換えたもの、たとえば、水素をジウムで置き換えたもの）の形態で存在可能であることは、当業者であれば分かるであろう。とくに指定がない限りまたは文脈から明らかでない限り、表される構造は、任意のかかる異性体または同位体の形態を単独または組合せて表すものと理解可能である。

20

## 【0 1 2 3】

本明細書に記載の化合物は非対称でありうる（たとえば、1つ以上のステロ中心を有する）。とくに指定がない限り、エナンチオマーやジアステロマーなどの立体異性体はすべて意図される。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技術分野で公知であり、たとえば、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すべて本開示で企図される。本開示の化合物のシスおよ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形として単離しうる。

30

## 【0 1 2 4】

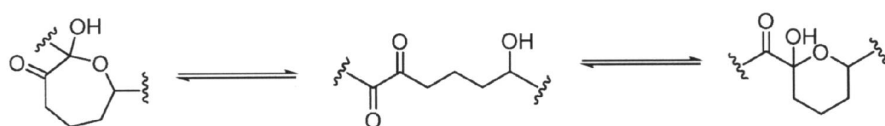
いくつかの実施形態では、本明細書に表される1種以上の化合物はさまざまな互変異性形で存在しうる。文脈から明らかであろうが、明示的に除外されない限り、かかる化合物への参照はかかる互変異性形をすべて包含する。いくつかの実施形態では、互変異性形は、単結合と隣接二重結合との交換およびそれに付随するプロトンの移動から生じる。ある特定の実施形態では、互変異性形は、参照形と同一の実験式および全電荷を有する異性プロトン化状態のプロトトロピー互変異性体でありうる。プロトトロピー互変異性形部分の例は、ケトン-エノールペア、アミド-イミド酸ペア、ラクタム-ラクチムペア、アミド-イミド酸ペア、エナミン-イミンペア、およ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、たとえば、1H-および3H-イミダゾール、1H-、2H-、および4H-1,2,4-トリアゾール、1H-および2H-イソインドール、ならびに1H-および2H-ピラゾールである。いくつかの実施形態では、互変異性形は、平衡状態でありうるかまたは適切な置換により1つの形に立体的にロックしうる。ある特定の実施形態では、互変異性形は、アセタール相互変換、たとえば、以下のスキーム：

40

## 【0 1 2 5】

50

## 【化 16】



## 【0126】

10

に例示される相互変換から生じる。

いくつかの実施形態では、本発明に従って本明細書に記載の化合物の同位体を調製および/または利用しうるとは、当業者であれば分かるであろう。「同位体」とは、同一の原子番号を有するが原子核中の異なる中性子数から生じる異なる質量数を有する原子を意味する。たとえば、水素の同位体としては、トリチウムおよびジウテリウムが挙げられる。いくつかの実施形態では、同位体置換（たとえば、ジウテリウムによる水素の置換）は、代謝および/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性質を変化させる。

## 【0127】

20

当技術分野で公知のように、多くの化学エンティティー（とくに、多くの有機分子および/または多くの低分子）は、たとえばアモルファス形および/または結晶形などの多種多様な固体形（たとえば、多形体、水和物、溶媒和物など）をとりうる。いくつかの実施形態では、かかるエンティティーは、任意の固体形を含めて任意の形で利用しうる。いくつかの実施形態では、かかるエンティティーは、特定の形たとえば特定の固体形で利用される。

## 【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載および/または表される化合物は、塩形で提供および/または利用しうる。

ある特定の実施形態では、本明細書に記載および/または表される化合物は、水和物形または溶媒和物形で提供および/または利用しうる。

30

## 【0129】

本明細書の種々の箇所に、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、かかるグループおよび範囲のメンバーのあらゆる個別の部分的組合せを含むことがとくに意図される。たとえば、「 $C_{1-6}$ 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、および $C_6$ アルキルを個別に開示することがとくに意図される。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、とくに指定がない限り、本開示は、各位置にメンバーのあらゆる個別の部分的組合せを含有する個別の化合物および化合物のグループ（たとえば、族および亜族）を対象とすることが意図される。

## 【0130】

40

本明細書では、「任意選択的に置換されたX」（たとえば、任意選択的に置換されたアルキル）という形の語句は、「Xが任意選択的に置換されたときのX」（たとえば、「アルキルが任意選択的に置換されたときのアルキル」）と等価であることが意図される。それは、特徴「X」（たとえばアルキル）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。

## 【0131】

本明細書で用いられる「アルキル」という用語は、1~20（たとえば1~10または1~6）個の炭素を含有する飽和炭化水素基を意味する。いくつかの実施形態では、アルキル基は非分岐状（すなわち線状）である。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-およびiso-プロピル、n-、sec

50

-、*iso* -、および *tert* - ブチル、ネオペンチルなどにより例示され、かつ (1) アルコキシ、(2) アルキルスルフィニル、(3) 本明細書に定義されるアミノ (たとえば、非置換アミノ (すなわち -NH<sub>2</sub>) または置換アミノ (すなわち -N(R<sup>N1</sup>)<sub>2</sub> (化学式中、R<sup>N1</sup> はアミノに対して定義した通りである))、(4) C<sub>6</sub>~10 アリール C<sub>1</sub>~6 アルコキシ、(5) アジド、(6) ハロ、(7) (C<sub>2</sub>~9 ヘテロシクリル) オキシ、(8) O - 保護基により任意選択的に置換されたヒドロキシル、(9) ニトロ、(10) オキソ (たとえば、カルボキシアリドまたはアシル)、(11) C<sub>1</sub>~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的に置換された -CO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>' (化学式中、R<sup>A</sup> は、(a) C<sub>1</sub>~20 アルキル (たとえば C<sub>1</sub>~6 アルキル)、(b) C<sub>2</sub>~20 アルケニル (たとえば C<sub>2</sub>~6 アルケニル)、(c) C<sub>6</sub>~10 アリール、(d) 水素、(e) C<sub>1</sub>~6 アルク - C<sub>6</sub>~10 アリール、(f) アミノ - C<sub>1</sub>~20 アルキル、(g) - (CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub> (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub> OR' (化学式中、s<sub>1</sub> は 1~10 (たとえば 1~6 または 1~4) の整数であり、s<sub>2</sub> および s<sub>3</sub> のそれぞれは、独立して、0~10 (たとえば、0~4、0~6、1~4、1~6、または 1~10) の整数であり、かつ R' は H または C<sub>1</sub>~20 アルキルである) で示されるポリエチレングリコール、および (h) -NR<sup>N1</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>NR<sup>N1</sup> (化学式中、s<sub>1</sub> は 1~10 (たとえば、1~6 または 1~4) の整数であり、s<sub>2</sub> および s<sub>3</sub> のそれぞれは、独立して、0~10 (たとえば、0~4、0~6、1~4、1~6、または 1~10) の整数であり、かつ各 R<sup>N1</sup> は、独立して、水素または任意選択的に置換された C<sub>1</sub>~6 アルキルである) で示されるアミノ - 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<sup>B</sup>'R<sup>C</sup>' (化学式中、R<sup>B</sup> および R<sup>C</sup> のそれぞれは、独立して、(a) 水素、(b) C<sub>1</sub>~6 アルキル、(c) C<sub>6</sub>~10 アリール、および (d) C<sub>1</sub>~6 アルク - C<sub>6</sub>~10 アリールからなる群から選択される)、(16) -SO<sub>2</sub>R<sup>D</sup>' (化学式中、R<sup>D</sup> は、(a) C<sub>1</sub>~6 アルキル、(b) C<sub>6</sub>~10 アリール、(c) C<sub>1</sub>~6 アルク - C<sub>6</sub>~10 アリール、および (d) ヒドロキシルからなる群から選択される)、(17) -SO<sub>2</sub>NR<sup>E</sup>'R<sup>F</sup>' (化学式中、R<sup>E</sup> および R<sup>F</sup> のそれぞれは、独立して、(a) 水素、(b) C<sub>1</sub>~6 アルキル、(c) C<sub>6</sub>~10 アリール、および (d) C<sub>1</sub>~6 アルク - C<sub>6</sub>~10 アリールからなる群から選択される)、(18) -C(O)R<sup>G</sup>' (化学式中、R<sup>G</sup> は、(a) C<sub>1</sub>~20 アルキル (たとえば C<sub>1</sub>~6 アルキル)、(b) C<sub>2</sub>~20 アルケニル (たとえば C<sub>2</sub>~6 アルケニル)、(c) C<sub>6</sub>~10 アリール、(d) 水素、(e) C<sub>1</sub>~6 アルク - C<sub>6</sub>~10 アリール、(f) アミノ - C<sub>1</sub>~20 アルキル、(g) - (CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub> (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub> OR' (化学式中、s<sub>1</sub> は 1~10 (たとえば 1~6 または 1~4) の整数であり、s<sub>2</sub> および s<sub>3</sub> のそれぞれは、独立して、0~10 (たとえば、0~4、0~6、1~4、1~6、または 1~10) の整数であり、かつ R' は H または C<sub>1</sub>~20 アルキルである) で示されるポリエチレングリコール、および (h) -NR<sup>N1</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>NR<sup>N1</sup> (式中、s<sub>1</sub> は 1~10 (たとえば、1~6 または 1~4) の整数であり、s<sub>2</sub> および s<sub>3</sub> のそれぞれは、独立して、0~10 (たとえば、0~4、0~6、1~4、1~6、または 1~10) の整数であり、かつ各 R<sup>N1</sup> は、独立して、水素または任意選択的に置換された C<sub>1</sub>~6 アルキルである) で示されるアミノ - 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<sup>H</sup>'C(O)R<sup>I</sup>' (式中、R<sup>H</sup> は、(a1) 水素および (b1) C<sub>1</sub>~6 アルキルからなる群から選択され、かつ R<sup>I</sup> は、(a2) C<sub>1</sub>~20 アルキル (たとえば C<sub>1</sub>~6 アルキル)、(b2) C<sub>2</sub>~20 アルケニル (たとえば C<sub>2</sub>~6 アルケニル)、(c2) C<sub>6</sub>~10 アリール、(d2) 水素、(e2) C<sub>1</sub>~6 アルク - C<sub>6</sub>~10 アリール、(f2) アミノ - C<sub>1</sub>~20 アルキル、(g2) - (CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub> (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub> OR' (式中、s<sub>1</sub> は 1~10 (たとえば 1~6 または 1~4) の整数であり、s<sub>2</sub> および s<sub>3</sub> のそれぞれは、独立して、0~10 (たとえば、0~4、0~6、1~4、1~6、または 1~10) の整数であり、かつ R' は H または C<sub>1</sub>~20 アルキルである) で示されるポリエチレングリコール、および (h2) -NR<sup>N1</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>NR<sup>N1</sup> (式中、s<sub>1</sub> は 1~10

10

20

30

40

50



(たとえば、1～6または1～4)の整数であり、 $s_2$ および $s_3$ のそれぞれは、独立して、0～10(たとえば、0～4、0～6、1～4、1～6、または1～10)の整数であり、かつ各 $R^{N1}$ は、独立して、水素または任意選択的に置換された $C_{1-6}$ アルキルである)で示されるアミノ-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)水素および(b1) $C_{1-6}$ アルキルからなる群より選択され、かつ $R^K$ は、(a2) $C_{1-20}$ アルキル(たとえば $C_{1-6}$ アルキル)、(b2) $C_{2-20}$ アルケニル(たとえば $C_{2-6}$ 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、 $s_1$ は1～10(たとえば1～6または1～4)の整数であり、 $s_2$ および $s_3$ のそれぞれは、独立して、0～10(たとえば、0～4、0～6、1～4、1～6、または1～10)の整数であり、かつ $R'$ はHまたは $C_{1-20}$ アルキルである)で示されるポリエチレングリコール、および(h2)- $NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ (式中、 $s_1$ は1～10(たとえば、1～6または1～4)の整数であり、 $s_2$ および $s_3$ のそれぞれは、独立して、0～10(たとえば、0～4、0～6、1～4、1～6、または1～10)の整数であり、かつ各 $R^{N1}$ は、独立して、水素または任意選択的に置換された $C_{1-6}$ アルキルである)で示されるアミノ-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個の置換基により任意選択的に置換しうる。いくつかの実施形態では、これらのグループのそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。たとえば、 $C_1$ -アルカールのアルキレン基は、オキソ基によりさらに置換してそれぞれのアリーロイル置換基を与えうる。

#### 【0132】

本明細書で用いられる「アルキレン」という用語および「アルク-」という接頭辞は、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鎖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」という用語および「 $C_x-y$ 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、および6であり、かつ $y$ 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(たとえば、 $C_{1-6}$ 、 $C_{1-10}$ 、 $C_{2-20}$ 、 $C_{2-6}$ 、 $C_{2-10}$ 、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個の置換基によりさらに置換可能である。

#### 【0133】

本明細書で用いられる「アルケニル」という用語は、とくに明記されていない限り、1個以上の炭素-炭素二重結合を含有する2～20個の炭素(たとえば、2～6または2～10個の炭素)の1価の直鎖状または分岐鎖状の基を表し、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、シスおよ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(たと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個の置換基により任意選択的に置換しうる。

#### 【0134】

本明細書で用いられる「アルキニル」という用語は、炭素-炭素三重結合を含有する2～20個の炭素原子(たとえば、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鎖状の基を表し、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

10

20

30

40

50

(たと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個の置換基により任意選択的に置換しうる。

#### 【0135】

本明細書で用いられる「アミノ」という用語は、 $-N(R^{N1})_2$  (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、カルボキシアリール(たとえば、任意選択的に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-保護基により任意選択的に置換されたもの)、スルホアルキル、アシル(たとえば、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(たとえば、任意選択的に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-保護基により任意選択的に置換されたもの)、ヘテロシクリル(たとえばヘテロアリール)、またはアルクヘテロシクリル(たと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的に置換可能であり、または2つの $R^{N1}$ は、組み合わせて、ヘテロシクリルもしくはN-保護基を形成し、かつ各 $R^{N2}$ 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 $-N(R^{N1})_2$ )でありうる。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、カルボキシアリール、スルホアルキル、アシル(たとえば、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(たとえばt-ブトキシカルボニルアルキル)、またはアリールであり、かつ各 $R^{N2}$ は、H、 $C_1-20$ アルキル(たとえば $C_1-6$ アルキル)、または $C_6-10$ アリールでありうる)である。

#### 【0136】

本明細書に記載される「アミノ酸」という用語は、側鎖とアミノ基と酸基(たとえば、 $-CO_2H$ のカルボキシ基または $-SO_3H$ のスルホ基)とを有する分子を意味し、アミノ酸は、側鎖、アミノ基、または酸基(たとえば側鎖)により親分子基に結合される。本明細書で用いられる場合、最広義の「アミノ酸」という用語は、たとえば、1つ以上のペプチド結合の形成によりポリペプチド鎖中に組み込み可能な任意の化合物および/または物質を意味する。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、アミノ酸は天然に存在するアミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は合成アミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸はD-アミノ酸である。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、天然に存在す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意味する。「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意味する。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、ポリペプチド中のカルボキシ末端および/またはアミノ末端のアミノ酸を含めて、以上の一般構造に対して構造修飾を含有しうる。たとえば、いくつかの実施形態では、アミノ酸は、一般構造に対してメチル化、アミド化、アセチル化、および/または置換により修飾しうる。いくつかの実施形態では、かかる修飾は、たとえば、それ以外は同じ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うる。いくつかの実施形態では、かかる修飾は、それ以外は同じ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。文脈から明らかであろうが、いくつかの実施形態では、「アミノ酸」という用語は、遊離アミノ酸を意味するように用いられる。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意味するように用いられる。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、側鎖またはアミノ基が

10

20

30

40

50

カルボニル基に結合された状態でカルボニル基により親分子基に結合される。いくつかの実施形態では、アミノ酸は - アミノ酸である。ある特定の実施形態では、アミノ酸は - アミノ酸である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は - アミノ酸である。例示的な側鎖としては、任意選択的に置換されたアルキル、アリール、ヘテロシクリル、アルカリアル、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、およ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、リシン、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、セレノシスチン、セリン、タウリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよ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（たとえば、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 ) オキソ（たとえば、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（たとえば  $C_{1-6}$  アルキル）、( b )  $C_{2-20}$  アルケニル（たとえば  $C_{2-6}$  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（たとえば 1 ~ 6 または 1 ~ 4）の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、0 ~ 10（たとえば、0 ~ 4、0 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 6、または 1 ~ 10）の整数であり、かつ  $R'$  は H または  $C_{1-20}$  アルキルである）で示されるポリエチレングリコール、および ( h )  $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ （式中、 $s1$  は 1 ~ 10（たとえば、1 ~ 6 または 1 ~ 4）の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、0 ~ 10（たとえば、0 ~ 4、0 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 6、または 1 ~ 10）の整数であり、かつ各  $R^{N1}$  は、独立して、水素または任意選択的に置換された  $C_{1-6}$  アルキルである）で示されるアミノ - 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、 $R^B$  および  $R^C$  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、および ( 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、および ( 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、 $R^E$  および  $R^F$  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、および ( 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（たとえば  $C_{1-6}$  アルキル）、( b )  $C_{2-20}$  アルケニル（たとえば  $C_{2-6}$  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（たとえば 1 ~ 6 または 1 ~ 4）の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、0 ~ 10（たとえば、0 ~ 4、0 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 6、または 1 ~ 10）の整数であり、かつ  $R'$  は H または  $C_{1-20}$  アルキルである）で示されるポリエチレングリコール、および ( h )  $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$ （式中、 $s1$  は 1 ~ 10（たとえば、1 ~ 6 または 1 ~ 4）の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、0 ~ 10（たとえば、0 ~ 4、0 ~ 6、1 ~ 4、1 ~ 6、または 1 ~ 10）の整数であり、かつ各  $R^{N1}$  は、独立して、水素または任意選択的に置換された  $C_{1-6}$  アルキルである）で示されるアミノ - 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、( a 1 ) 水素および ( b 1 )  $C_{1-6}$  アルキルからなる群から選択され、かつ  $R^I$  は、( a 2 )  $C_1$

10

20

30

40

50

$\sim 20$  アルキル (たとえば  $C_1 \sim 6$  アルキル)、(b2)  $C_2 \sim 20$  アルケニル (たとえば  $C_2 \sim 6$  アルケニル)、(c2)  $C_6 \sim 10$  アリール、(d2) 水素、(e2)  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリール、(f2) アミノ -  $C_1 \sim 20$  アルキル、(g2) -  $(CH_2)_{s2} (OCH_2CH_2)_{s1} (CH_2)_{s3} OR'$  (式中、 $s1$  は  $1 \sim 10$  (たとえば  $1 \sim 6$  または  $1 \sim 4$ ) の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、 $0 \sim 10$  (たとえば、 $0 \sim 4$ 、 $0 \sim 6$ 、 $1 \sim 4$ 、 $1 \sim 6$ 、または  $1 \sim 10$ ) の整数であり、かつ  $R'$  は H または  $C_1 \sim 20$  アルキルである) で示されるポリエチレングリコール、および (h2) -  $NR^{N1} (CH_2)_{s2} (CH_2CH_2O)_{s1} (CH_2)_{s3} NR^{N1}$  (式中、 $s1$  は  $1 \sim 10$  (たとえば、 $1 \sim 6$  または  $1 \sim 4$ ) の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、 $0 \sim 10$  (たとえば、 $0 \sim 4$ 、 $0 \sim 6$ 、 $1 \sim 4$ 、 $1 \sim 6$ 、または  $1 \sim 10$ ) の整数であり、かつ各  $R^{N1}$  は、独立して、水素または任意選択的に置換された  $C_1 \sim 6$  アルキルである) で示されるアミノ - 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) 水素および (b1)  $C_1 \sim 6$  アルキルからなる群より選択され、かつ  $R^K'$  は、(a2)  $C_1 \sim 20$  アルキル (たとえば  $C_1 \sim 6$  アルキル)、(b2)  $C_2 \sim 20$  アルケニル (たとえば  $C_2 \sim 6$  アルケニル)、(c2)  $C_6 \sim 10$  アリール、(d2) 水素、(e2)  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリール、(f2) アミノ -  $C_1 \sim 20$  アルキル、(g2) -  $(CH_2)_{s2} (OCH_2CH_2)_{s1} (CH_2)_{s3} OR'$  (式中、 $s1$  は  $1 \sim 10$  (たとえば  $1 \sim 6$  または  $1 \sim 4$ ) の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、 $0 \sim 10$  (たとえば、 $0 \sim 4$ 、 $0 \sim 6$ 、 $1 \sim 4$ 、 $1 \sim 6$ 、または  $1 \sim 10$ ) の整数であり、かつ  $R'$  は H または  $C_1 \sim 20$  アルキルである) で示されるポリエチレングリコール、および (h2) -  $NR^{N1} (CH_2)_{s2} (CH_2CH_2O)_{s1} (CH_2)_{s3} NR^{N1}$  (式中、 $s1$  は  $1 \sim 10$  (たとえば、 $1 \sim 6$  または  $1 \sim 4$ ) の整数であり、 $s2$  および  $s3$  のそれぞれは、独立して、 $0 \sim 10$  (たとえば、 $0 \sim 4$ 、 $0 \sim 6$ 、 $1 \sim 4$ 、 $1 \sim 6$ 、または  $1 \sim 10$ ) の整数であり、かつ各  $R^{N1}$  は、独立して、水素または任意選択的に置換された  $C_1 \sim 6$  アルキルである) で示されるアミノ - 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 個の置換基により任意選択的に置換しうる。いくつかの実施形態では、これらのグループのそ

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。

#### 【0137】

本明細書で用いられる「N - アルキル化アミノ酸」という用語は、ペプチド結合を形成するアミノ酸の窒素上に任意選択的に置換された  $C_1 \sim C_6$  アルキルを含有するアミノ酸を意味する。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 ( ) - メチル - リシン、N ( ) - メチル - アスパラギン、N ( ) - メチル - グルタミンなどの N - メチルアミノ酸が挙げられる。

#### 【0138】

本明細書で用いられる場合「アリール」という用語は、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、かつ (1)  $C_1 \sim 7$  アシル (たとえばカルボキシアルデヒド)、(2)  $C_1 \sim 20$  アルキル (たとえば、 $C_1 \sim 6$  アルキル、アルコキシ -  $C_1 \sim 6$  アルキル、 $C_1 \sim 6$  アルキルスルフィニル -  $C_1 \sim 6$  アルキル、アミノ -  $C_1 \sim 6$  アルキル、アジド -  $C_1 \sim 6$  アルキル、(カルボキシアルデヒド) -  $C_1 \sim 6$  アルキル、ハロ -  $C_1 \sim 6$  アルキル (たとえばペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ -  $C_1 \sim 6$  アルキル、ニトロ -  $C_1 \sim 6$  アルキル、または  $C_1 \sim 6$  チオアルコキシ -  $C_1 \sim 6$  アルキル)、(3)  $C_1 \sim 20$  アルコキシ (たとえば  $C_1 \sim 6$  アルコキシ、たとえばペルフルオロアルコキシ)、(4)  $C_1 \sim 6$  アルキルスルフィニル、(5)  $C_6 \sim 10$  アリール、

( 6 ) アミノ、( 7 )  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリール、( 8 ) アジド、( 9 )  $C_3 \sim 8$  シクロアルキル、( 10 )  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_3 \sim 8$  シクロアルキル、( 11 ) ハロ、( 12 )  $C_1 \sim 12$  ヘテロシクリル (たとえば  $C_1 \sim 12$  ヘテロアリール)、( 13 ) (  $C_1 \sim 12$  ヘテロシクリル ) オキシ、( 14 ) ヒドロキシル、( 15 ) ニトロ、( 16 )  $C_1 \sim 20$  チオアルコキシ (たとえば、チオアルコキシ)、( 17 ) - (  $CH_2$  )<sub>q</sub>  $CO_2 R^A$  ' (式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ  $R^A$  は、( a ) アルキル、( b )  $C_6 \sim 10$  アリール、( c ) 水素、および ( d )  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリールからなる群から選択される)、( 18 ) - (  $CH_2$  )<sub>q</sub>  $CONR^B R^C$  ' (式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ  $R^B$  および  $R^C$  は、( a ) 水素、( b )  $C_1 \sim 6$  アルキル、( c )  $C_6 \sim 10$  アリール、および ( d )  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリールからなる群から独立して選択される)、( 19 ) - (  $CH_2$  )<sub>q</sub>  $SO_2 R^D$  ' (式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ  $R^D$  は、( a ) アルキル、( b )  $C_6 \sim 10$  アリール、および ( c ) アルク -  $C_6 \sim 10$  アリールからなる群から選択される)、( 20 ) - (  $CH_2$  )<sub>q</sub>  $SO_2 NR^E R^F$  ' (式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ  $R^E$  および  $R^F$  のそれぞれは、( a ) 水素、( b )  $C_1 \sim 6$  アルキル、( c )  $C_6 \sim 10$  アリール、および ( d )  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  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 )  $C_6 \sim 10$  アリールオキシ、( 23 )  $C_3 \sim 8$  シクロアルコキシ、( 24 )  $C_6 \sim 10$  アリール  $C_1 \sim 6$  アルコキシ、( 25 )  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_1 \sim 12$  ヘテロシクリル (たとえば  $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_1 \sim 12$  ヘテロアリール)、( 26 )  $C_2 \sim 20$  アルケニル、ならびに ( 27 )  $C_2 \sim 20$  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 個の置換基により任意選択的に置換しうる。いくつかの実施形態では、これらのグループのそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。たとえば、 $C_1$  - 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、オキシ基によりさらに置換してそれぞれのアリーロイル置換基および (ヘテロシクリル) オイル置換基を与える。

#### 【 0 1 3 9 】

本明細書で用いられる「アリールアルキル」基は、本明細書に定義されるアルキレン基により親分子基に結合され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 (たとえば、7 ~ 16 または 7 ~ 20 個の炭素、たとえば、 $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリール、 $C_1 \sim 10$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリール、または  $C_1 \sim 20$  アルク -  $C_6 \sim 10$  アリール) である。いくつかの実施形態では、アルキレンおよ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 個の置換基により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、とくに断りのない限り、 $C_1 \sim 6$  アルキレンを意味し、結合される化学構造は、本明細書に定義される通りである。

#### 【 0 1 4 0 】

「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。

本明細書で用いられる「炭素環式」および「カルボシクリル」という用語は、環が炭素原子により形成される任意選択的に置換された  $C_3 \sim 12$  単環式、二環式、または三環式非芳香環構造を意味する。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、およびシクロアルキニル基が挙げられる。

#### 【 0 1 4 1 】

本明細書で用いられる「カルボシクリルアルキル」基は、本明細書に定義されるアルキレン基により親分子基に結合され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 (たとえば、7 ~ 16 または 7 ~ 20 個の炭素、たとえば、 $C_1 \sim 6$  アルク -  $C_6 \sim 10$  カルボシクリル、 $C_1 \sim 10$  アルク -  $C_6 \sim 10$  カルボシクリル、または  $C_1 \sim 20$  アルク -  $C_6 \sim 10$  カルボシクリル) である。いくつかの実施形態では、アルキレンおよ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 個の置換基により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、とくに断りのない限り、 $C_1 \sim 6$  アルキレンを意味し、結合される化学構造は、本

明細書に定義される通りである。

#### 【0142】

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

本明細書で用いられる「カルボキシ」という用語は、 $-CO_2H$ を意味する。

#### 【0143】

本明細書で用いられる「シアノ」という用語は、 $-CN$ 基を表す。

本明細書で用いられる「シクロアルキル」という用語は、とくに明記されていない限り、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」基として参照可能である。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(たとえばカルボキシアルデヒド)、(2)  $C_{1-20}$ アルキル(たとえば、アルキル、アルコキシ- $C_{1-6}$ アルキル、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(たと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(たとえば $C_{1-6}$ アルコキシ、たと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(たとえば $C_{1-12}$ 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(たとえば $C_{1-6}$ チオアルコキシ)、(17)  $-(CH_2)_qCO_2R^A$ (式中、 $q$ は0～4の整数であり、かつ $R^A$ は、(a)  $C_{1-6}$ アルキル、(b)  $C_{6-10}$ アリール、(c) 水素、および(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)  $-(CH_2)_qCONR^BR^C$ (式中、 $q$ は0～4の整数であり、かつ $R^B$ および $R^C$ は、(a) 水素、(b)  $C_{6-10}$ アルキル、(c)  $C_{6-10}$ アリール、および(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)  $-(CH_2)_qSO_2R^D$ (式中、 $q$ は0～4の整数であり、かつ $R^D$ は、(a)  $C_{6-10}$ アルキル、(b)  $C_{6-10}$ アリール、および(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)  $-(CH_2)_qSO_2NR^ER^F$ (式中、 $q$ は0～4の整数であり、かつ $R^E$ および $R^F$ 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、および(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(たとえば $C_{1-6}$ 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)  $C_{2-20}$ アルキニルにより任意選択的に置換可能である。いくつかの実施形態では、これらのグループのそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。たとえば、 $C_1$ -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、オキソ基によりさらに置換してそれぞれのアリーロイル置換基および(ヘテロシクリル)オイル置換基を与えうる。

#### 【0144】

本明細書で用いられる「シクロアルキルアルキル」基は、本明細書に定義されるアルキレン基(たとえば、1～4、1～6、1～10、または1～20個の炭素のアルキレン基)により親分子基に結合され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、アルキレンおよびシクロアルキルはそれぞれ、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個の置換基によりさらに置換可能である。

## 【0145】

本明細書で用いられる「ジアステレオマー」という用語は、互いに鏡像でなくかつ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。

本明細書で用いられる「エナンチオマー」という用語は、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%かつ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を意味する。

## 【0146】

本明細書で用いられる「ハロ」という用語は、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。

10

本明細書で用いられる「ヘテロアルキル」という用語は、成分炭素原子の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た本明細書に定義されるアルキル基を意味する。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個の置換基によりさらに置換可能である。本明細書で用いられる「ヘテロアルケニル」および「ヘテロアルキニル」という用語は、それぞれ、成分炭素原子の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た本明細書に定義されるアルケニル基およ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およ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個の置換基によりさらに置換可能である。

20

## 【0147】

本明細書で用いられる「ヘテロアリール」という用語は、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（たとえば、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個の置換基により置換される。

## 【0148】

「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により親分子基に結合された本明細書に定義されるヘテロアリール基を意味する。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（たとえば、2~22、2~18、2~17、2~16、3~15、2~14、2~13、または2~12個の炭素、たとえば、 $C_1\sim 6$ アルク- $C_1\sim 12$ ヘテロアリール、 $C_1\sim 10$ アルク- $C_1\sim 12$ ヘテロアリール、または $C_1\sim 20$ アルク- $C_1\sim 12$ ヘテロアリール）である。いくつかの実施形態では、アルキレンおよ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個の置換基により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。

30

## 【0149】

本明細書で用いられる「ヘテロシクリル」という用語は、とくに明記されていない限り、窒素、酸素、およ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、2個の二重結合へのゼロを有する。また、6-および7員環は、3個の二重結合へのゼロを有する。例示的な無置換ヘテロシクリル基は、1~12（たとえば、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」という用語はまた、1個以上の炭素および/またはヘテロ原子が単環の2つの非隣接メンバーを架橋する架橋多環構造を有するヘテロ環式化合物たとえばキヌクリジニル基を表す。「ヘテロシクリル」という用語は、以上のヘテロ環のいずれかが1、2、または3個の炭素環、たとえば、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、たとえば、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、ベンゾフリル、ベンゾチエニルなどに縮合した二環式、

40

50

三環式、および四環式の基を含む。縮合ヘテロシクリルの例としては、1個以上の二重結合が還元されて水素により置き換えられたジヒドロ形およびテトラヒドロ形を含めて、トロパンおよび1, 2, 3, 5, 8, 8a-ヘキサヒドロインドリジンが挙げられる。ヘテロ環式化合物としては、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、ペリジニル、ホモペリジニル、ピラジニル、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(たとえば、1, 2, 3-オキサジアゾリル)、プリニル、チアジアゾリル(たとえば、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る。さらに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(たとえば、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(たとえば、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-チオキソ-1, 3, 4-オキサジアゾリル(たとえば、2, 3-ジヒドロ-2-チオキソ-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(たとえば、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(たとえば、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-ペリジニル(たとえば、2, 6-ジオキソ-3-エチル-3-フェニルペリジニル)、1, 6-ジヒドロ-6-オキソピリミジニル、1, 6-ジヒドロ-4-オキソピリミジニル(たとえば、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(たとえば、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(たとえば、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(たとえば、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(たとえば、3, 3-ジメチル-2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-1H-インドリルおよび2, 3-ジヒドロ-2-オキソ-3, 3'-スピロプロパン-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(たとえば、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(たとえば、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(たとえば、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(たとえば、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-2, 4-ジオキソ-3H-キナゾリル(た

10

20

30

40

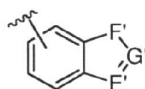
50



例えば、1 - エチル - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロ - 2, 4 - ジオキソ - 3 H - キナゾリル)、1, 2, 3, 6 - テトラヒドロ - 2, 6 - ジオキソ - 7 H - プリニル (たとえば、1, 2, 3, 6 - テトラヒドロ - 1, 3 - ジメチル - 2, 6 - ジオキソ - 7 H - プリニル)、1, 2, 3, 6 - テトラヒドロ - 2, 6 - ジオキソ - 1 H - プリニル (たとえば、1, 2, 3, 6 - テトラヒドロ - 3, 7 - ジメチル - 2, 6 - ジオキソ - 1 H - プリニル)、2 - オキソベンズ [ c, d ] インドリル、1, 1 - ジオキソ - 2 H - ナフト [ 1, 8 - c, d ] イソチアゾリル、および 1, 8 - ナフチレンジカルボキサミドが挙げられる。追加のヘテロ環式化合物としては、3, 3 a, 4, 5, 6, 6 a - ヘキサヒドロ - ピロロ [ 3, 4 - b ] ピロール - ( 2 H ) - イル、および 2, 5 - ジアザピシクロ [ 2.2.1 ] ヘプタン - 2 - イル、ホモピペラジニル (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、およびチオカニルが挙げられる。ヘテロ環式基としてはまた、化学式

【 0 1 5 0 】

【 化 1 7 】



【 0 1 5 1 】

( 式中、

E' は、- N - および - CH - からなる群から選択され、F' は、- N = CH - 、- NH - CH<sub>2</sub> - 、- NH - C ( O ) - 、- NH - 、- CH = N - 、- CH<sub>2</sub> - NH - 、- C ( O ) - NH - 、- CH = CH - 、- CH<sub>2</sub> - 、- CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> - 、- CH<sub>2</sub>O - 、- OCH<sub>2</sub> - 、- O - 、および - S - からなる群から選択され、かつ G' は、- CH - および - N - からなる群から選択される) で示される基も挙げられる。本明細書に挙げられたヘテロシクリル基はいずれも、( 1 ) C<sub>1</sub> ~ 7 アシル (たとえばカルボキシアルデヒド)、( 2 ) C<sub>1</sub> ~ 20 アルキル (たとえば、アルキル、アルコキシ - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、アルキルスルフィニル - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、アミノ - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、アジド - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、(カルボキシアルデヒド) - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、ハロ - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル (たとえばペルフルオロアルキル)、ヒドロキシ - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、ニトロ - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、または C<sub>1</sub> ~ 6 チオアルコキシ - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル)、( 3 ) C<sub>1</sub> ~ 20 アルコキシ (たとえば C<sub>1</sub> ~ 6 アルコキシ、たとえばペルフルオロアルコキシ)、( 4 ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルキルスルフィニル、( 5 ) C<sub>6</sub> ~ 10 アリール、( 6 ) アミノ、( 7 ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>6</sub> ~ 10 アリール、( 8 ) アジド、( 9 ) C<sub>3</sub> ~ 8 シクロアルキル、( 10 ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>3</sub> ~ 8 シクロアルキル、( 11 ) ハロ、( 12 ) C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロシクリル (たとえば C<sub>2</sub> ~ 12 ヘテロアリール)、( 13 ) ( C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロシクリル ) オキシ、( 14 ) ヒドロキシル、( 15 ) ニトロ、( 16 ) C<sub>1</sub> ~ 20 チオアルコキシ (たとえば C<sub>1</sub> ~ 6 チオアルコキシ)、( 17 ) - ( CH<sub>2</sub> )<sub>q</sub> CO<sub>2</sub> R<sup>A</sup>' ( 式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ R<sup>A</sup>' は、( a ) アルキル、( b ) C<sub>6</sub> ~ 10 アリール、( c ) 水素、および ( d ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>6</sub> ~ 10 アリールからなる群から選択される)、( 18 ) - ( CH<sub>2</sub> )<sub>q</sub> CONR<sup>B</sup>' R<sup>C</sup>' ( 式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ R<sup>B</sup>' および R<sup>C</sup>' は、( a ) 水素、( b ) アルキル、( c ) C<sub>6</sub> ~ 10 アリール、および ( d ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>6</sub> ~ 10 アリールからなる群から独立して選択される)、( 19 ) - ( CH<sub>2</sub> )<sub>q</sub> SO<sub>2</sub> R<sup>D</sup>' ( 式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ R<sup>D</sup>' は、( a ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、( b ) C<sub>6</sub> ~ 10 アリール、および ( c ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>6</sub> ~ 10 アリールからなる群から選択される)、( 20 ) - ( CH<sub>2</sub> )<sub>q</sub> SO<sub>2</sub> NR<sup>E</sup>' R<sup>F</sup>' ( 式中、q は 0 ~ 4 の整数であり、かつ R<sup>E</sup>' および R<sup>F</sup>' のそれぞれは、( a ) 水素、( b ) C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル、( c ) C<sub>6</sub> ~ 10 アリール、および ( d ) C<sub>1</sub> ~ 6 アル

ク - C<sub>6</sub> ~ 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<sub>6</sub> ~ 10 アリールオキシ、(23)C<sub>3</sub> ~ 8 シクロアルコキシ、(24)アリールアルコキシ、(25)C<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロシクリル(たとえばC<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロアリール)、(26)オキソ、(27)(C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロシクリル)イミノ、(28)C<sub>2</sub> ~ 20 アルケニル、ならびに(29)C<sub>2</sub> ~ 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個の置換基により任意選択的に置換しうる。いくつかの実施形態では、これらのグループのそれぞれは、本明細書に記載されるようにさらに置換可能である。たとえば、C<sub>1</sub> - アルカリールまたはC<sub>1</sub> - アルクヘテロシクリルのアルキレン基は、オキソ基によりさらに置換してそれぞれのアリーロイル置換基および(ヘテロシクリル)オイル置換基を与える。

10

#### 【0152】

本明細書で用いられる「ヘテロシクリルアルキル」基は、本明細書に定義されるアルキレン基により親分子基に結合され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 ~ 32個の炭素(たとえば、2 ~ 22、2 ~ 18、2 ~ 17、2 ~ 16、3 ~ 15、2 ~ 14、2 ~ 13、または2 ~ 12個の炭素、たとえば、C<sub>1</sub> ~ 6 アルク - C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロシクリル、C<sub>1</sub> ~ 10 アルク - C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロシクリル、またはC<sub>1</sub> ~ 20 アルク - C<sub>1</sub> ~ 12 ヘテロシクリル)である。いくつかの実施形態では、アルキレンおよ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個の置換基によりさらに置換可能である。

#### 【0153】

20

本明細書で用いられる「炭化水素」という用語は、炭素原子と水素原子とのみからなる基を表す。

「本明細書で用いられるヒドロキシル」という用語は、-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(たとえばO - 保護基)により置換可能である。

#### 【0154】

本明細書で用いられる「異性体」という用語は、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つ以上のキラル中心および/または二重結合を有しうるとともに、それにより、二重結合異性体(すなわちE/Z幾何異性体)やジアステレオマー(たとえばエナンチオマー(すなわち(+))もしくは(-))またはシス/トランス異性体)などの立体異性体として存在しうると認識される。本発明によれば、本明細書に表される化学構造つまり本発明の化合物は、すべての対応する立体異性体、すなわち、ステレオマー的純粋形(たとえば、幾何学的純粋形、エナンチオマー的純粋形、またはジアステレオマー的純粋形)もエナンチオマー混合物や立体異性体混合物(たとえばラセミ体)も包含する。本発明の化合物のエナンチオマー混合物およ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、キラル塩複合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可能である。エナンチオマーおよび立体異性体はまた、周知の不斉合成法によりステレオマー的またはエナンチオマー的に純粋な中間体、試薬、および触媒から取得可能である。

30

40

#### 【0155】

本明細書で用いられる「N - 保護アミノ」という用語は、本明細書に定義される1または2個のN - 保護基に結合された本明細書に定義されるアミノ基を意味する。

本明細書で用いられる「N - 保護基」という用語は、合成手順時に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、グリーン(Greene)著、「有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)」、第3版(ジョン・ワイリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1999年)(参照により本明細書に組み込まれる)に開示されている。N - 保護基としては、アシル基、ア

50

リーロイル基、またはカルバミル基、たとえば、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、*o*-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、およびキラル補助剤、たとえば、保護または脱保護D、L、またはD、L-アミノ酸、たとえば、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、たとえば、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、たとえば、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、*o*-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、たとえば、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、たとえば、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)、およびベンジルオキシカルボニル(Cbz)である。

#### 【0156】

本明細書で用いられる「ニトロ」という用語は、-NO<sub>2</sub>基を表す。

本明細書で用いられる「O-保護基」という用語は、合成手順時に望ましくない反応から酸素含有(たとえば、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、グリーン(Greene)著、「有機合成における保護基(Protective Groups in Organic Synthesis)」、第3版(ジョン・ワイリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1999年)(参照により本明細書に組み込まれる)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、たとえば、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、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-*iso*-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、および4-ニトロベンゾイル、アルキルカルボニル基、たとえば、アシル、アセチル、プロピオニル、ピバロイルなど、任意選択的に置換されたアリールカルボニル基、たとえば、ベンゾイル、シリル基、たとえば、トリメチルシリル(TMS)、*tert*-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、トリ-*iso*-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、たとえば、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、たとえば、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

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、たとえば、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、たとえば、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、任意選択的に置換されたアリールアルコキシカルボニル基、たとえば、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、および任意選択的に置換されたアリールオキシカルボニル基、たとえば、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、およびアルカリールエーテル(たとえば、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、およびニトロベンジル)、シリルエーテル(たとえば、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、およびジフェニルメチルシリル)、カーボネート(たとえば、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、およびニトロベンジル)、カルボニル保護基(たとえば、アセタール基およびケタール基、たとえば、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、およびジチアン基、たとえば、1, 3 - ジチアン、1, 3 - ジチオランなど)、カルボン酸保護基(たとえば、エステル基、たとえば、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。

#### 【0157】

本明細書で用いられる「オキソ」という用語は = O を表す。

本明細書で用いられる「ペルフルオロ」という接頭辞は、アルキル基に結合された各水素基がフッ化物基により置き換えられた本明細書に定義される任意の基を表す。たとえば、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。

#### 【0158】

本明細書で用いられる「保護ヒドロキシル」という用語は、O - 保護基に結合された酸素原子を意味する。

本明細書で用いられる「スピロシクリル」という用語は、両方の末端が親基の同一の炭素原子に結合されてスピロ環式基を形成する C<sub>2</sub> ~ 7 アルキレン 2 価基を表すとともに、両方の末端が同一の原子に結合されたヘテロアルキレン 2 価基も表す。スピロシクリル基を形成するヘテロアルキレン基は、窒素、酸素、およ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可能である。いくつかの実施形態では、スピロシクリル基は、2 価基が結合され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、シクロアルキル基および/またはヘテロシクリル基に対して任

意選択的な置換基として本明細書に提供される 1、2、3、または 4 個の置換基により任意選択的に置換しうる。

【0159】

本明細書で用いられる「立体異性体」という用語は、化合物（たとえば、本明細書に記載される任意の化学式の化合物）がとりうるすべての可能な異なる異性形さらにはコンフォメーション形、とくに、基本分子構造のすべての可能な立体化学異性形およびコンフォメーション異性形、すべてのジアステレオマー、エナンチオマー、および/またはコンフォーマを意味する。本発明のいくつかの化合物は、異なる互変異性形で存在しうるとともに、これらの互変異性形はすべて本発明の範囲内に含まれる。

【0160】

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

本明細書で用いられる「チオール」という用語は  $-SH$  基を表す。

定義

本出願では、とくに文脈から明らかでない限り、(i)「a」という用語は、「少なくとも1つ」を意味するものと理解しうるし、(ii)「or（または）」という用語は、「and/or（および/または）」を意味するものと理解しうるし、(iii)「comprising（～を含む）」および「including（～を含む）」という用語は、アイテム化された成分または工程を包含しうるとともに、それ自体で提示されるかまたは1つ以上の追加の成分もしくは工程と一緒に提示されるかを問わないものと理解しうるし、かつ(iv)「about（約）」および「approximately（約）」という用語は、当業者により理解される標準偏差を許容にするものと理解しうるし、かつ(v)範囲が提供される場合、端点が含まれている。

【0161】

当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リガンド濃度よりも過剰に固定しうる。代替的または追加的に、いくつかの実施形態では、結合パートナー濃度および/またはリガンド濃度は変化させうる。いくつかのかかる実施形態では、親和性は、同等な条件（たとえば濃度）下で参照と比較しうる。

【0162】

本明細書で用いられる場合、「approximately（約）」および「about（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る通常の統計的変動を包含することが意図される。ある特定の実施形態では、「approximately（約）」または「about（約）」という用語は、それぞれ、とくに明記されていない限りまたはとくに文脈から自明でない限り（たとえば、かかる数が可能な値の100%を超える場合）、明記された値のいずれの方向にも（それよりも大きい方向にも小さい方向にも）、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ以下の範囲内に入る値の範囲を意味する。

【0163】

本明細書で用いられる「結合」という用語が、典型的には、2つ以上のエンティティー間の関連（たとえば、非共有結合または共有結合）を意味することは、理解されよう。「直接」結合は、エンティティー間または部分間の物理的接触を含み、間接結合は、1つ以上の中間エンティティーとの物理的接触による物理的相互作用を含む。2つ以上のエンティティー間の結合は、典型的には、相互作用するエンティティーまたは部分を単離状態またはより複雑な系で研究する場合を含めてさまざまな状況のいずれかで評価可能である（たとえば、担体エンティティーおよび/または生体系または細胞に共有結合または他の形で関連した状態で）。

【0164】

10

20

30

40

50

分子XとそのパートナーYとの親和性は、一般的には、解離定数 ( $K_D$ ) により表現可能である。親和性は、本明細書に記載のものを含めて当技術分野で公知の通常の方法により測定可能である。結合親和性を測定するための特定の例示的かつ典型的な実施形態を以下に記載する。本明細書で用いられる「 $K_D$ 」という用語は、特定の化合物-タンパク質または複合-タンパク質の相互作用の解離平衡定数を意味することが意図される。典型的には、本発明の化合物は、たとえば、プレゼンタータンパク質をアナライトとしてかつ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、たとえば、約  $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、もしくは  $10^{-10}$  M、またはさらには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、たとえば、標的タンパク質をアナライトとしてかつ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、たとえば、約  $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、もしくは  $10^{-10}$  M、またはさらにはそれ以下の解離平衡定数 ( $K_D$ ) で標的タンパク質 (たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質) に結合する。

10

#### 【0165】

本明細書において使用する場合、用語「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。「アミノ酸と化学選択的反応をすることができる部分」は、本明細書において使用する場合、天然または非天然アミノ酸の官能基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 (例えば、第一級および第二級アミン、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)。架橋基の例は、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、例えば、NHSEステル、イミドエステル、およ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)、およ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) を含む。

20

30

#### 【0166】

本明細書において使用する場合、用語「複合体」は、結合相互作用 (例えば、非共有結合性相互作用、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 効果相互作用) によって一緒に結合している、2つもしくはそれよりも多い化合物および/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」および「標的タンパク質/コンジュゲート複合体」である。本明細書において使用する場合、用語「コンジュゲート」は、2つもしくはそれよりも多い化合物 (例えば、架橋基およびタンパク質、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) の接合 (例えば、共有結合形成反応による) によって形成される化合物を指す。

40

#### 【0167】

本明細書において使用する場合、「結合に関与する」原子は、それが結合している実体の4以内にあるか、またはそれが結合している実体の4以内にある原子に接続している。

#### 【0168】

「プレゼンタータンパク質」という用語は、標的タンパク質 (たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質) に結合してその活性をモジュレートする複合体を形成するように低分子に結合するタンパク質を意味する。いくつかの実施形態では、プレゼン

50

タータンパク質は、比較的豊富なタンパク質である（たとえば、プレゼンタータンパク質は、トリパート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役割および/または細胞の生存能もしくは他の属性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。ある特定の形態では、プレゼンタータンパク質は、標的タンパク質に結合してその生物学的活性モジュレート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ように低分子に結合することが知られているものである。

【0169】

「プレゼンタータンパク質結合部分」という用語は、化合物が、たとえば、10  $\mu$ M未満（たとえば、5  $\mu$ M未満、1  $\mu$ 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KDで、前記プレゼンタータンパク質に特異的に結合するように、またはたとえば、1  $\mu$ M未満（たとえば、0.5  $\mu$ M未満、0.1  $\mu$ M未満、0.05  $\mu$ M未満、0.01  $\mu$ M未満）のIC<sub>50</sub>で、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ように、プレゼンタータンパク質への結合に関与する原子およびそれらに結合された部分のグループ（たとえば、20個の原子に含まれる原子、たとえば、15個の原子に含まれる原子、10個の原子に含まれる原子、5個の原子に含まれる原子）を意味する。プレゼンタータンパク質結合部分が、プレゼンタータンパク質と相互作用する化合物中の原子の全体を包含するとは限らないことは、理解されよう。プレゼンタータンパク質結合部分の1個以上の原子が、標的タンパク質結合部分（たとえば、哺乳動物標的タンパク質結合部分や菌類標的タンパク質結合部分などの真核生物標的タンパク質結合部分または細菌標的タンパク質結合部分など原核生物標的タンパク質結合部分）内にありうることもまた、理解されよう。

【0170】

本明細書において使用する場合、「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つい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、本明細書において使用する場合、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個もしくは複数（例えば、2個、3個、4個、5個）のメンバーに対して特異的である結合部分を指す。「非選択的FKBP結合部分」は、本明細書において使用する場合、FKBPファミリーの全てのメンバーについて匹敵する親和性（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。

【0171】

用語「タンパク質結合部分」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、およびそれに付着した部分（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  $\mu$ M未満（例えば、5  $\mu$ M未満、1  $\mu$ 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KD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  $\mu$ M未満（例えば、0.5  $\mu$ M未満、0.1  $\mu$ M未満、0.05  $\mu$ M未満、0.01  $\mu$ M未満）のIC<sub>50</sub>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。タンパク質結合部分は、タンパク質と相互作用する、化合物中の全原子を必ずしも包含しないことが理解される。

【0172】

本明細書において使用する場合、用語「反応する」は、同じまたは異なる元素の原子がそれら自体再構成して、新規な物質を形成するプロセスを指す。例えば、2個の原子の間の共有結合の形成、例えば、共有結合を形成させるタンパク質上の反応性アミノ酸と架橋

10

20

30

40

50

基との間の反応。反応は当技術分野において公知の任意の方法によって測定し得、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。

【0173】

本明細書において使用する場合、用語「反応性アミノ酸」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は、システイン、リシン、セリン、および側鎖上にアジドを有するアミノ酸を含む。「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は、バリン、アラニン、イソロイシン、テロニン（*theronine*）、およびロイシンを含む。

10

【0174】

「参照」という用語は、多くの場合、対象の化合物、個体、集団、サンプル、配列、または値と比較される標準または対照の化合物、個体、集団、サンプル、配列、または値を記述するために本明細書で用いられる。いくつかの実施形態では、参照の化合物、個体、集団、サンプル、配列、または値は、対象の化合物、個体、集団、サンプル、配列、または値の検査または決定と実質的に同時に検査および/または決定される。いくつかの実施形態では、参照の化合物、個体、集団、サンプル、配列、または値は、タンジブルメディアで任意選択的に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るように、参照の化合物、個体、集団、サンプル、配列、または値は、対象の化合物、個体、集団、サンプル、配列、または値の決定または特徴付けに利用されるものと同等の条件下で決定または特徴付けされる。

20

【0175】

本明細書において使用する場合、用語「溶媒に曝露されたアミノ酸」は、タンパク質を取り囲んでいる溶媒に到達可能であるアミノ酸を指す。一部の実施形態では、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。

【0176】

本明細書で用いられる場合、「特異的結合」または「特異的」という用語は、結合剤と標的エンティティーとの間の相互作用を意味する。当業者により理解されるように、代替相互作用の存在下で、たとえば、10  $\mu$ M未満（たとえば、5  $\mu$ M未満、1  $\mu$ 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KDによる結合が有利であれば、相互作用は「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、標的エンティティーの特定の構造の特徴（たとえば、エピトープ、クレフト、結合部位）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を理解すべきである。いくつかの実施形態では、特異性は、1つ以上の他の可能な標的エンティティー（たとえばコンペティター）に対する結合剤の特異性と対比して評価しうる。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、参照非特異的結合作用剤の特異性と対比して評価される。

30

【0177】

「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、化合物が可能性のある標的エンティティー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。たとえば、いくつかの実施形態では、化合物は、1つ以上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のであれば、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、標的エンティティーの特定の構造の特徴（たとえば、エピトープ、クレフト、結合部位）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を理解すべきである。いくつかの実施形態では、特異性は、1つ以上の他の可能な標的エンティティー（たとえばコンペティター）に対する結合剤の特異性と対比して評価しうる。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、参照非特異的結合作用

40

50



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、作用剤またはエンティティーは、その標的エンティティー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、減少した解離、および/または増加した安定性で、その標的エンティティーに結合する。

#### 【0178】

「実質的」という用語は、対象の特性または性質の全体またはほぼ全体の範囲または度合いを呈する定性的条件を意味する。生物学技術分野の当業者であれば、生物学および化学的な現象が、最終状態に達することおよび/または完全に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、あってもまれであるものと理解されよう。したがって、「実質的」という用語は、多くの生物学およ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られる。

10

#### 【0179】

本明細書で用いられる特定のタンパク質に「実質的に結合しない」という用語は、たとえば、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 ~  $10^{-12}$  M もしくは  $10^{-6}$  M ~  $10^{-10}$  M もしくは  $10^{-7}$  M ~  $10^{-9}$  M の範囲内の  $K_D$  を有する分子または分子の部分により表すことが可能である。

#### 【0180】

20

用語「標的タンパク質」は、疾患、障害または状態と関連する生物学的経路に関与している任意のタンパク質を指す。一部の実施形態では、標的タンパク質は、mTOR またはカルシニューリンではない。一部の実施形態では、標的タンパク質は、プレゼンタータンパク質および小分子と共にトリパート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存在するタンパク質である。いくつかのかかる実施形態では、標的タンパク質は、ある特定の哺乳動物細胞（たとえば、哺乳動物標的タンパク質）、菌類細胞（たとえば、菌類標的タンパク質）、細菌細胞（たとえば、細菌標的タンパク質）、または植物細胞（たとえば、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つ以上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により特徴付けられる。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により特徴付けられ、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（および異なる低分子）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 と、プレゼンタータンパク質（たとえば、FKBP）と、の複合体に実質的に結合しない。標的タンパク質は、天然に存在可能であり、たとえば、野生型でありうる。代替的に、標的タンパク質は、野生型タンパク質と異なりうるが、生物学的機能、たとえば、対立遺伝子変異体、スプライス突然変異体、または生物学的活性断片を依然として維持する。例示的な哺乳動物標的タンパク質は、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、クロマチンモディファイヤー/リモデラー、古典的タンパク質-タンパク質相互作用ドメインおよびモチーフを有するタンパク質、または疾患、障害、もしくは病態に関連する生物学的経路に関与する任意の他のタンパク質である。

30

40

#### 【0181】

一部の実施形態では、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アミノ酸の保存的または非保存的な挿入、欠失、また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、ここではこのような変化は、ポリペプチドの生物活性を実質的に変化させない）。特に、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個もしくは複数

50

のシステイン残基の添加は、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。一部の実施形態では、1個もしく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、タンパク質上の可能なコンジュゲーション部位の数を減少させる。アミノ酸置換は、保存的（すなわち、ここで、残基は、同じ一般タイプもしくは群の別のものによって置き換えられている）または非保存的（すなわち、ここで、残基は、別のタイプのアミノ酸によって置き換えられている）でよい。さらに、非天然アミノ酸（すなわち、天然由来でない保存的アミノ酸置換または天然由来でない非保存的アミノ酸置換）を、天然アミノ酸で代用することができる。「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のときに標的タンパク質（たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質）への結合に関与する環原子およびそれらに結合された部分のグループ（たとえば、20個の原子に含まれる原子、たとえば、15個の原子に含まれる原子、10個の原子に含まれる原子、5個の原子に含まれる原子）を意味する。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の全体を包含するとは限らないことは、理解されよう。プレゼンタータンパク質結合部分の1個以上の原子が、標的タンパク質結合部分にも存在しうることもまた、理解されよう。

#### 【0182】

「従来型の結合ポケット」という用語は、活性が1つ以上の低分子によりモジュレートされたタンパク質に匹敵する生理化学的および/または幾何学的な性質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意味する。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」との関係に気づいている。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。

#### 【0183】

「アンドラッグブル標的」という用語は、薬剤の標的とな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および/または低分子への高親和性結合に好適な結合部位を有していないタンパク質を意味する。標的タンパク質がアンドラッグブルかを決定する方法は、当技術分野で公知である。たとえば、標的タンパク質がアンドラッグブルであるかは、体積、表面積、親油性表面積、深さ、および/または疎水性比をはじめとする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ドッグサイトスコアラー（DOGSITESCORER）（登録商標）（ハンブルク大学（Universität Hamburg）、独国ハンブルグ）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うる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0184】

【図1】KRASGTP/S39clite/C2-FK506コンジュゲートのSDS-PAGE分析を例示する画像である。レーン1：KRASGTP/S39clite；レーン2：KRASGTP/S39clite/C2-FK506反応混合物；レーン3：KRASGTP/S39clite/C2-FK506反応混合物+100mMのDTT。

【図2】KRASGTP/G12clite/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】KRASGTP/S39clite/C2-Holt/FKBP12複合体形成のSECおよび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、KRASGTP/S39clite/C2-Holt/FKBP12三元複合体の溶出に対応するピークを示す。

【図3B】KRASGTP/S39clite/C2-Holt/FKBP12複合体形成のSECおよびSDS-PAGE分析を例示する画像である。SEC溶出ピークのSDS

10

20

30

40

50

- PAGE 分析。青い点線は、KRAS<sub>GTP</sub>/S39C lite / C2 - Holt / FKBP12 溶出ピークについて集めた画分に対応する。

【図4】KRAS<sub>GDP</sub>/S39C lite / SFAC4DS / CypA<sub>52S</sub> 複合体の形成を確認する、SECプロファイル、および溶出ピークのSDS - PAGE 分析を例示する画像である。

【図5A】遊離PTP1B<sub>S187C</sub> lite およびFKBP12 タンパク質およびPTP1B<sub>S187C</sub> lite / C3 - SLF / FKBP12 複合体のSECプロファイルおよびSDS - PAGE 分析を例示する画像である。

【図5B】遊離PTP1B<sub>S187C</sub> lite およびFKBP12 タンパク質およびPTP1B<sub>S187C</sub> lite / C3 - SLF / FKBP12 複合体のSECプロファイルおよびSDS - PAGE 分析を例示する画像である。

10

【図6】SDS - PAGE によるC3 - およびC4 - SLF の架橋効率を例示する画像である。

【図7A】FKBP12 - 化合物1 - KRAS<sub>GTP</sub>/S39C 複合体の結晶構造を例示する画像である。FKBP12、KRAS<sub>GTP</sub>/S39C およびリガンドを示すリボン状の表現。示された3 におけるFo - Fc 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】FKBP12 - 化合物1 - KRAS<sub>GTP</sub>/S39C 複合体の結晶構造を例示する画像である。複合体の表面の表現であり、リガンドまたはパートナータンパク質に4 以内で近接する原子は赤で着色する。

20

【図8】CypA<sub>52S</sub> - SFAC4DS - KRAS<sub>GDP</sub>/S39C の結晶構造を例示する画像である。

【図9A】FKBP12 - C3SLF - PTP1B<sub>S187C</sub> の結晶構造を例示する画像である。結晶が、非対称単位のFKBP12 - C3SLF - PTP1B<sub>S187C</sub> の2 個の複合体分子を含有することを例示する。

【図9B】FKBP12 - C3SLF - PTP1B<sub>S187C</sub> の結晶構造を例示する画像である。PTP1B<sub>S187C</sub> の埋込面積が427 Å<sup>2</sup> であり、C3 - SLF の埋込面積が615 Å<sup>2</sup> であることを例示する。

【図10】MCL1<sub>S245C</sub> / C3SLF / FKBP52 の結晶構造を例示する画像である。

30

【図11】CYP A - W21487 - KRAS<sub>G12C</sub> - 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<sub>G12C</sub> - 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 および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<sub>11.4</sub> およびCEP250<sub>29.2</sub> 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<sub>11.4</sub> およびCEP250<sub>29.2</sub> 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。

40

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

【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<sub>G12C</sub> - GTP の2D1H - 15N TROSY - HSQC スペクトル (図17A) 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 および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】

【0185】

50

低分子は標的との相互作用が接着力により駆動され、その強さは接触表面積にほぼ比例するので、その標的化能力は限られている。その小サイズが小さいので、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、そのタンパク質にそのまま包み込むことである。実際には、多くの一連の実験および計算の両方のデータから、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に結合できるという見解が支持される。その場合、結合は包込みにより可能になる。

#### 【 0 1 8 6 】

自然は、低分子と標的タンパク質とを疎水性ポケット以外の部位で相互作用させるストラテジーを進化させてきた。このストラテジーは、天然に存在する免疫抑制剤のシクロスポリン A、ラパマイシン、および F K 5 0 6 により例示される。これらの薬剤の生物学的活性は、低分子と小さい提示タンパク質との高親和性複合体の形成を必要とする。低分子と提示タンパク質との複合表面は、標的にエンゲージする。したがって、たとえば、シクロスポリン A とシクロフィリン A との間で形成される二元複合体は、高い親和性および特異性で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 も単独ではカルシニューリンに測定可能な親和性で結合しない。

#### 【 0 1 8 7 】

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。タンパク質 / タンパク質相互作用表面は、これらの系の多くで、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すべてに寄与するので、このクラスターは、タンパク質 - タンパク質相互作用のエンゲージメント用の「ホットスポット」として表されてきた。重要なこととして、天然に存在する低分子と小さい提示タンパク質との以上に挙げた複合体では、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アーキテクチャーを模倣する。

#### 【 0 1 8 8 】

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。最も良好に特徴付けられた例では、F K 5 0 6 結合タンパク質 ( F K B P ) と F K 5 0 6 との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、F K B P はまた、関連分子のラパマイシンとの複合体を形成可能であり、しかも複合体は、まったく異なる標的 T o r C 1 と相互作用する。これまでアンドラッグブルであるとみなされた他の標的タンパク質と相互作用してそれをモジュレートできるように、プレゼンタータンパク質 / リガンドインターフェースの結合およびモジュレート能力を再プログラムする方法は、これまでのところ、開発されていない。

#### 【 0 1 8 9 】

そのほかに、いくつかの薬剤候補物質は、意図された標的および他の意図されていないタンパク質の両方の活性を同じようにモジュレートすることから、うまく機能しないことが広く認められている。この問題は、標的タンパク質の薬剤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とくに困難なものとなる。A T P 結合ポケットが非標的インスリンレセプター ( I R ) 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レセプター ( I G F - 1 R ) は、そのような一例である。I G F - 1 R を標的とするように設計された低分子開発候補物質もまた、典型的には、同様にインスリンレセプターもモジュレートする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的非類似性が存在する。かかる知見にもかかわらず、そうした差の利点を生かして I R よりも I G F - 1 R に特異的な薬剤を開発する方法は、これまでのところ存在しない。

#### 【 0 1 9 0 】

本開示は、タンパク質 - タンパク質インターフェース、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 ) および標的タンパク質の間のインターフェースを分析するのに有用な方法

10

20

30

40

50

および試薬を提供する。一部の実施形態では、標的および/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。一部の実施形態では、標的および/またはプレゼンタータンパク質は、哺乳動物のタンパク質である。一部の実施形態では、これらの方法および試薬は、プレゼンタータンパク質および小分子と共に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。一部の実施形態では、これらの方法および試薬は、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質と共に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ことにおいて有用であり得る。化合物およびコンジュゲート

この開示は、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）および架橋基を含む化合物を提供する。本発明はまた、タンパク質にコンジュゲートしている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ている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ている標的タンパク質結合部分を含むコンジュゲートを特徴とする。

【 0 1 9 1 】

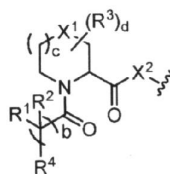
本発明はまた、化学式 V I I の化合物 A - L - B

( 化学式 V I I )

を特徴とし、化学式中、A は、化学式 V I I I の構造

【 0 1 9 2 】

【 化 1 8 】



化学式 VIII

【 0 1 9 3 】

を含む。

一部の実施形態では、本発明の化合物は、

【 0 1 9 4 】

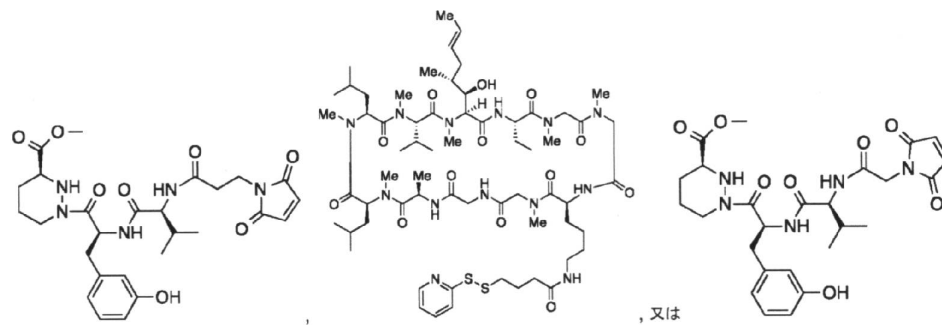
10



30

40

【 0 1 9 5 】



10

## 【 0 1 9 6 】

である。

## 架橋基

一部の実施形態では、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、例えば、NH Sエステル、イミドエステル、およ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）、およ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）を含む。

20

## 【 0 1 9 7 】

例示的な架橋基は、2'-ピリジリジスルフィド、4'-ピリジリ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、NH Sエステル、アルデヒド、塩化アルキル、アルキン、およびアジドを含む。

30

## 【 0 1 9 8 】

## プレゼンタータンパク質結合部分

一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、提供される化合物が、たとえば、10  $\mu$ M未満（たとえば、5  $\mu$ M未満、1  $\mu$ 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KDで、前記プレゼンタータンパク質に特異的に結合するように、またはたとえば、1  $\mu$ M未満（たとえば、0.5  $\mu$ M未満、0.1  $\mu$ M未満、0.05  $\mu$ M未満、0.01  $\mu$ M未満）のIC<sub>50</sub>で、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ように、プレゼンタータンパク質への結合に関与する原子（たとえば、5~20個の原子、5~10個の原子、10~20個の原子）およびそれらに結合された部分（たとえば、20個の原子に含まれる原子、たとえば、15個の原子に含まれる原子、10個の原子に含まれる原子、5個の原子に含まれる原子）のグループを含み得る。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原子の全体を包含しない。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個以上の原子は、プレゼンタータンパク質と相互作用しない。

40

## 【 0 1 9 9 】

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-モルホリノカルボン酸部分、および/またはN-アシルピペラジン酸部分を含む（たとえば、いずれかの窒素原子がアシル化

50

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 - モルホリノカルボン酸部分を含む。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 - アシルピペラジン酸部分を含む。

【0200】

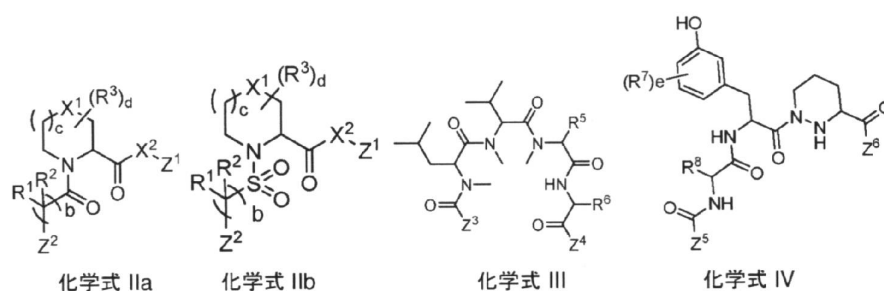
いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分の少なくとも1個の原子は、FKBP12のTyr27、Phe37、Asp38、Arg41、Phe47、Gln54、Glu55、Val56、Ile57、Trp60、Ala82、Try83、His88、Ile92、および/またはPhe100の1つ以上（たとえば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15）との結合に関与する。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分の少なくとも1つは、FKBP12のArg41、Gln54、Glu55、および/またはAla82の少なくとも1つ（たとえば、2、3、または4）と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

【0201】

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、化学式II ~ IV：

【0202】

【化20】



【0203】

で示される構造を有する。

一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質結合部分は、構造

【0204】

10

20

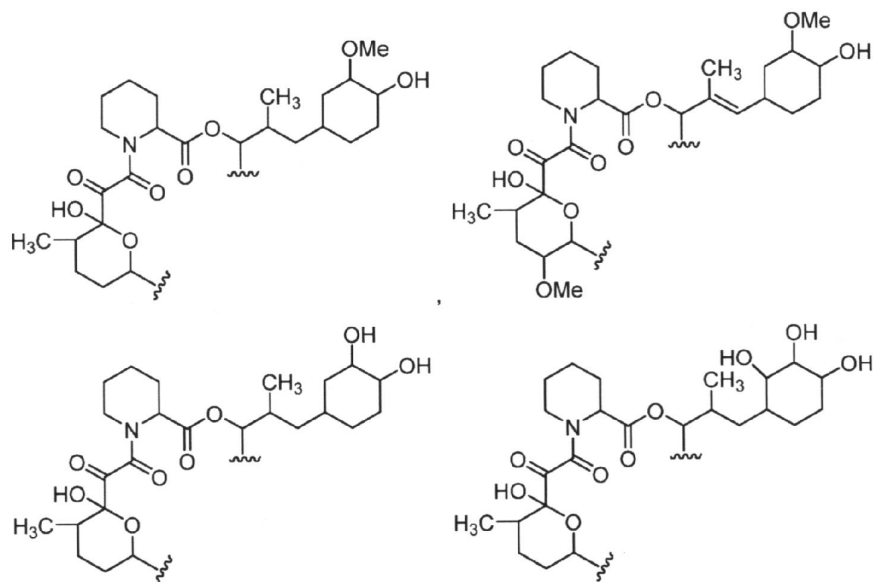
30

40

50



【化 2 1】



10

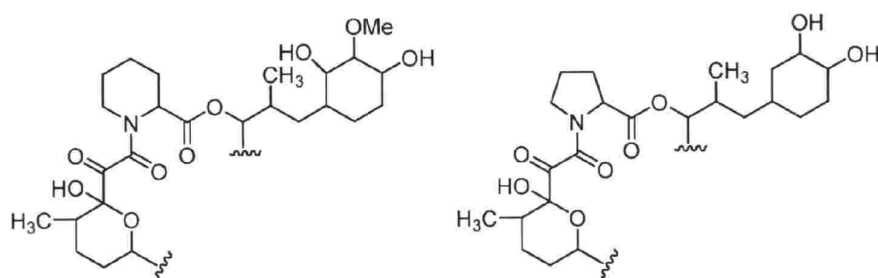
【 0 2 0 5】

20

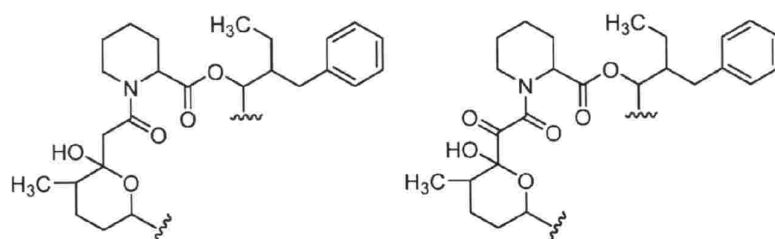
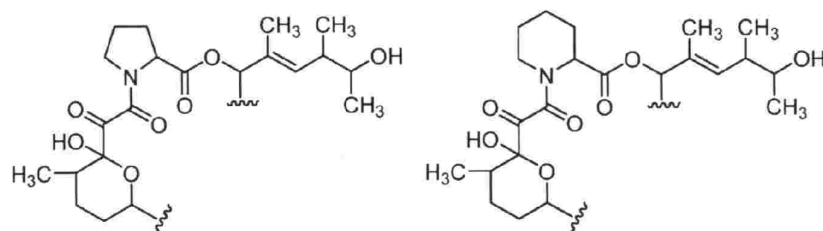
30

40

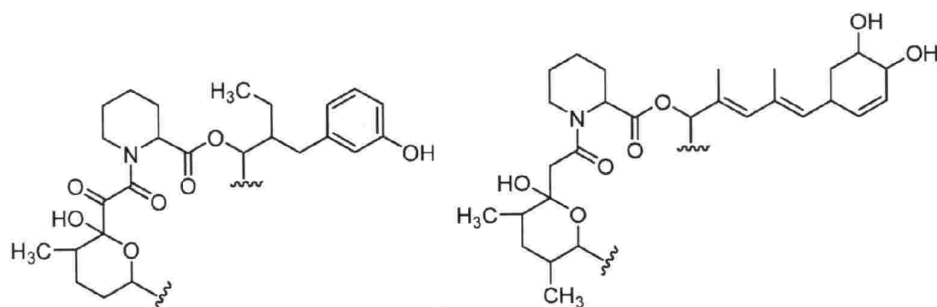
50



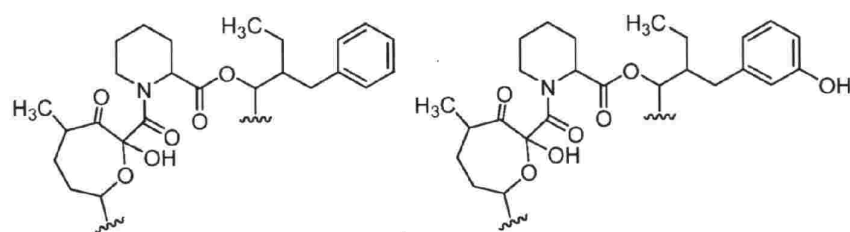
10



20



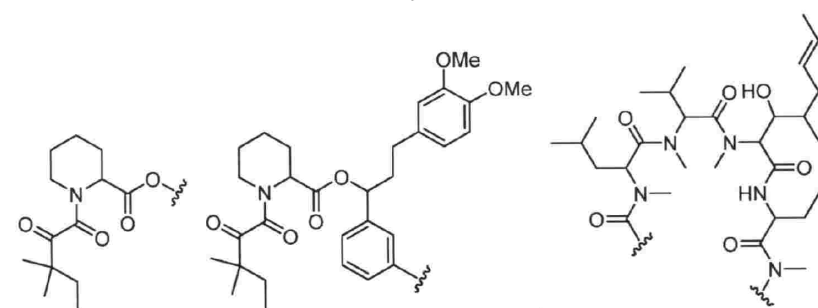
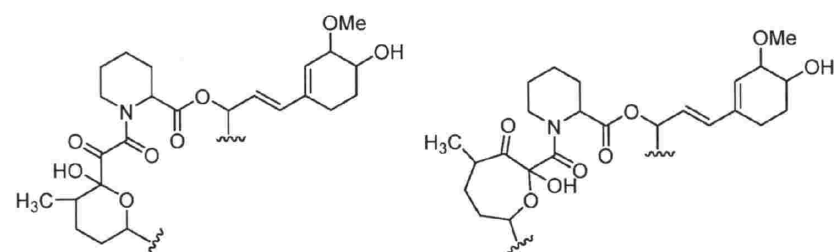
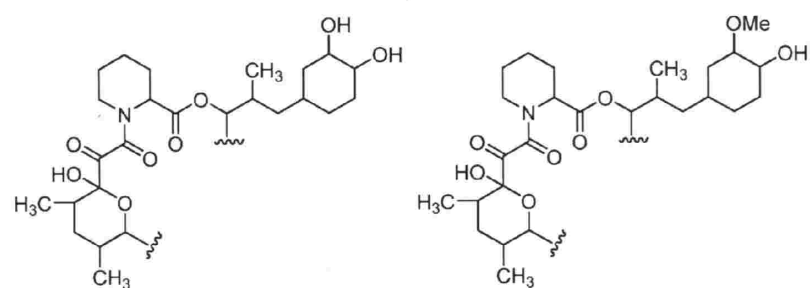
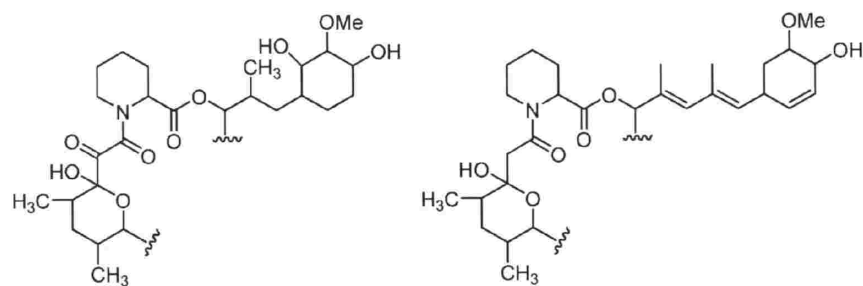
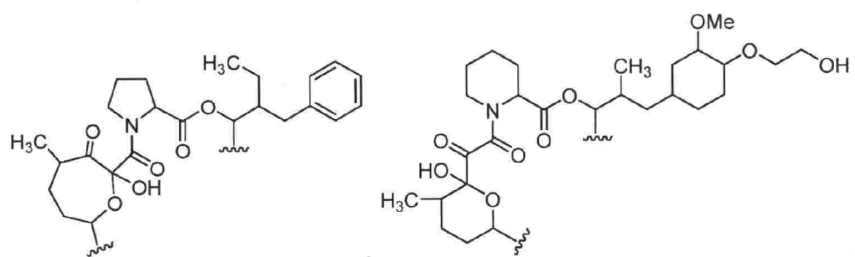
30



40

【 0 2 0 6 】

50



【 0 2 0 7 】

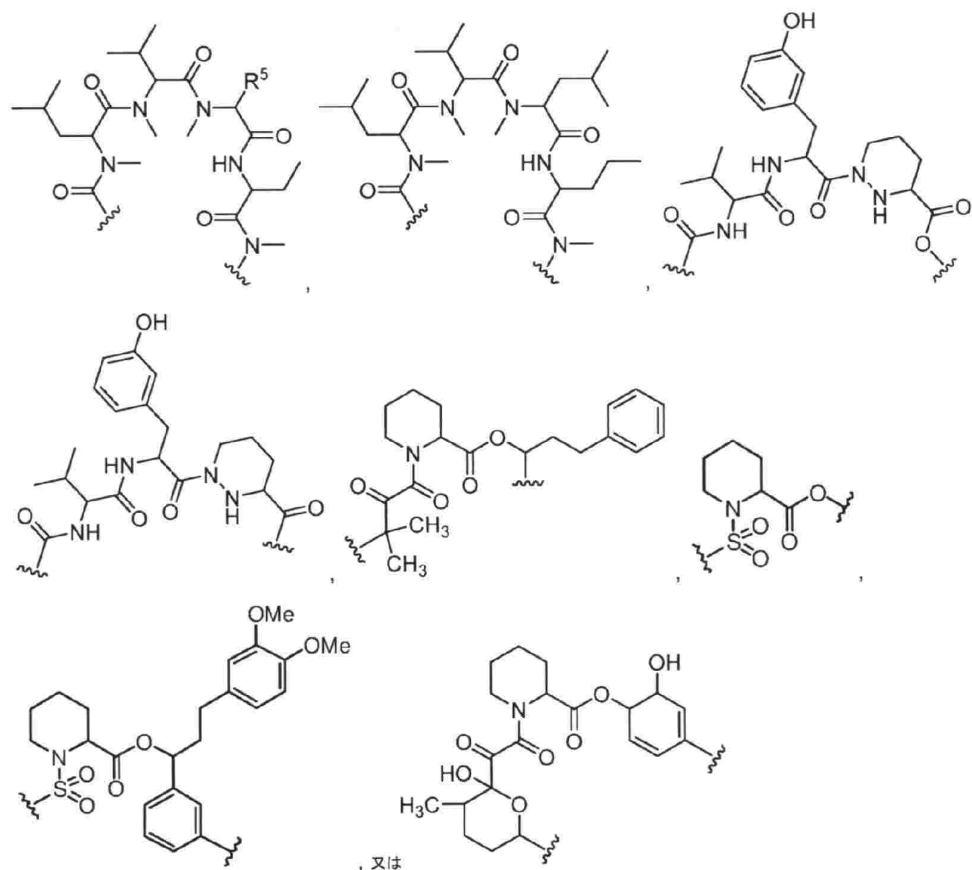
10

20

30

40

50



10

20

## 【0208】

またはその立体異性体を含むか、またはこれらからなる。

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おける原子に結合することができる。代わりにまたはさらに、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おける2個もしくはそれよりも多い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における1個もしく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、一部の実施形態では、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おける原子に、およびプレゼンタータンパク質結合部分における1個もしくは複数の原子に付着している置換基に結合することができる。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、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、二元複合体中のプレゼンタータンパク質についてのプレゼンタータンパク質の親和性は、複合体の非存在下でのプレゼンタータンパク質についてのプレゼンタータンパク質の親和性に対して増加する。このような例における結合は典型的には、これらに限定されないが、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性相互作用による。

30

40

## 【0209】

## 標的タンパク質結合部分

一部の実施形態では、本発明の化合物は、標的タンパク質結合部分（例えば、真核生物の標的タンパク質結合部分、例えば、哺乳動物の標的タンパク質結合部分または真菌の標的タンパク質結合部分または原核生物の標的タンパク質結合部分、例えば、細菌の標的タンパク質結合部分）を含む。一部の実施形態では、標的タンパク質結合部分は、原子の群

50

(例えば、5～20個の原子、5～10個の原子、10～20個の原子)を含み、標的タンパク質に特異的に結合する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。一部の実施形態では、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、化合物中の複数の原子を含む。ある特定の実施形態では、標的タンパク質結合部分の1個もしくは複数の原子は、標的タンパク質と相互作用しない。

#### 【0210】

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可能である。代替的にあるいはさらに、標的タンパク質は、標的タンパク質結合部分中の2つ以上の原子に結合可能である。他の選択肢として、標的タンパク質は、標的タンパク質結合部分中の1個以上の原子に結合された置換基に結合可能である。他の選択肢として、標的タンパク質は、標的タンパク質結合部分中の原子と、標的タンパク質結合部分中の1個以上の原子に結合された置換基と、に結合可能である。他の選択肢として、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、かつ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結合する。さらに他の選択肢として、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、限定されるものではないが、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相互作用を介する。

#### 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もしくは標的タンパク質)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、また、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を提供し得る。

#### 【0211】

一部の実施形態では、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および/または標的タンパク質への結合に関与している。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および/または標的タンパク質への結合に関与していない。

#### 【0212】

このように、リンカーは、本明細書に記載のような化合物および/またはコンジュゲート中に含まれるとき、いずれかの部分上に位置している1個もしくは複数の官能基との結合形成を伴う共有結合的手段によって2つ(もしくはそれ超)の部分の連結を達成する。この目的のために用い得る化学反応性官能基の例には、これらに限定されないが、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、およびフェノール基が含まれる。

#### 【0213】

一部の実施形態では、2つ以上の部分の共有結合は、両方の部分に存在するかかる官能基による反応が可能な反応性部分を含有するリンカーを用いて行い得る。たとえば、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うるので、2つを結合するアミドを形成する。

#### 【0214】

スルフヒドリル基と反応可能な部分の例としては、 $XCH_2CO-$ (式中、 $X = Br, Cl$ 、または $I$ )タイプの  $\alpha$ -ハロアセチル化合物が挙げられる。このタイプのものは、ガード(Gurd)著、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods Enzymol.)、第11巻、p. 532、1967年に記載されるように、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、およびアミノ基を修飾するためにも使用可能である。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性があるとみなされるが、そのほかに、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うる。アミノ基の変換によりチオール基を導入する2 - イミノチオランなどの試薬(トラウト( Traut )ら著、バイオケミストリー( Biochemistry )、第12巻、p . 3266、1973年)は、ジスルフィド架橋の形成により結合が行われる場合、スルフヒドリル試薬と見なしうる。

#### 【0215】

アミノ基と反応可能な反応性部分の例としては、たとえば、アルキル化剤およ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 ) - ハロアセチル化合物、これは、たとえば、ウォング( Wong )著、バイオケミストリー( Biochemistry )、第24巻、p . 5337、1979年に記載されるように、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、かつXCH<sub>2</sub>CO - ( 式中、X = Br、Cl、またはI ) タイプである)、

( ii ) N - マレイミド誘導体、これは、たとえば、スミス( Smyth )ら著、米国化学会誌( J . Am . Chem . Soc . )、第82巻、p . 4600、1960年、およびバイオケミカル・ジャーナル( Biochem . J . )、第91巻、p . 589、1964年に記載されるように、マイケル型反応を介してまたは環カルボニル基への付加によるアシル化を介してアミノ基と反応しうる、

( iii ) ハロゲン化アリール、たとえば、反応性ニトロハロ芳香族化合物、

( iv ) ハロゲン化アルキル、たとえば、マッケンジー( McKenzie )ら著、ジャーナル・オブ・プロテイン・ケミストリー( J . Protein Chem . )、第7巻、p . 581、1988年、

( v ) アミノ基とシッフ塩基を形成可能なアルデヒドおよびケトン、形成される付加物は、通常、還元により安定なアミンを与える、

( vi ) エピクロロヒドリンやビスオキシランなどのエポキシド誘導体、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うる、

( vii ) s - トリアジンの塩素含有誘導体類、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 ) 以上に詳述したs - トリアジン化合物に基づくアジリジン、たとえば、ロス( Ross )著、ジャーナル・オブ・アドバンスド・キャンサー・リサーチ( J . Adv . Cancer Res . )第2巻、p . 1、1954年に記載されており、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、ティーツェ( Tietze )著、ヘミッシュ・ベリヒテ( Chem . Ber . )、第124巻、p . 1215、1991年に記載されている、および

( x ) - ハロアルキルエーテル、これはベネッシェ( Benneche )ら著、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー( Eur . J . Med . Chem . )、第28巻、p . 463、1993年に記載されるように、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、  
が挙げられる。

#### 【0216】

代表的なアミノ反応性アシル化剤としては、

( i ) イソシアネートおよびイソチオシアネート、とくに芳香族誘導体、これはそれぞれ安定な尿素誘導体およびチオ尿素誘導体を形成する、

( ii ) スルホニルクロリド、これはハーzig( Herzig )ら著、バイオポリマーズ( Biopolymers )、第2巻、p . 349、1964年に記載されている、

( iii ) 酸ハロゲン化物、

( iv ) 活性エステル、たとえば、エステルニトロフェニルエステルまたはN - ヒドロ

10

20

30

40

50

キシスクシンイミジルエステル、

(v) 酸無水物、たとえば、混合型、対称型、または  $\alpha$ -カルボキシ無水物、

(vi) アミド結合形成用の他の有用な試薬、たとえば、M. ボダンスキー (M. Bodansky) 著、ペプチド合成の原理 (Principles of Peptide Synthesis)、シュプリンガー・フェアラーク (Springer-Verlag)、1984年に記載されている、

(vii) アシルアジド、このアジド基は、ウェッツ (Wetzel) ら著、アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、第58巻、p. 347、1974年に記載されるように、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、

(viii) イミドエステル、これは、たとえば、ハンター (Hunter) およびルドウィッヒ (Ludwig) 著、米国化学会誌 (J. Am. Chem. Soc.)、第84巻、p. 3491、1962年に記載されるように、アミノ基との反応により安定なアミジンを形成する、および

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

#### 【0217】

アルデヒドおよびケトン、アミンと反応してシッフ塩基を形成しうるとともに、これは還元的アミノ化により有利に安定化しうる。アルコキシシルアミノ部分は、たとえば、ウェブ (Webb) ら著、バイオコンジュゲート・ケミストリー (Bioconjugate Chem.)、第1巻、p. 96、1990年に記載されるように、ケトンおよ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。

#### 【0218】

カルボキシル基と反応可能な反応性部分の例としては、ジアゾアセテートエステルやジアゾアセトアミドなどのジアゾ化合物が挙げられる。これは、たとえば、ヘリオット (Herriot) 著、アドバンス・イン・プロテイン・ケミストリー (Adv. Protein Chem.)、第3巻、p. 169、1947年に記載されるように、高い特異性で反応してエステル基を生成する。O-アシルウレア形成およびそれに続くアミド結合形成により反応するカルボジイミドなどのカルボキシル修飾試薬も利用可能である。

#### 【0219】

たとえば、追加の反応性または選択性を付与するために、所望により、いずれかの部分の官能基を反応前に他の官能基に変換しうることは、分かるであろう。この目的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たアミンからカルボキシルへの変換、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、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たアミンからチオールへの変換、 $\alpha$ -ハロアセテートなどの試薬を用いたチオールからカルボキシルへの変換、エチレンイミンや2-ブロモエチルアミンなどの試薬を用いたチオールからアミンへの変換、カルボジイミドおよび続いてジアミンなどの試薬を用いたカルボキシルからアミンへの変換、ならびに塩化トシルなどの試薬を用いたアルコールからチオールへの変換、および続いてチオアセテートを用いたエステル交換、および酢酸ナトリウムを用いたチオールへの加水分解が挙げられる。

#### 【0220】

所望により、本発明に従って、追加の結合材料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部分の反応性化学基とを直接共有結合することを含むいわゆるゼロリングスリンカーを使用しうる。

#### 【0221】

しかしながら、より一般的には、リンカーは、以上に記載のようにスペーサエレメントにより接続された2つ以上の反応性部分を含む。かかるスペーサの存在は、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て2つの間に共有結合を生成する。リンカー中の反応性部分は、同一であっても（ホモ二官能性リンカー）異なってもよく

10

20

30

40

50

(ヘテロ二官能性リンカーまたはいくつかの類似していない反応性部分が存在する場合は多官能性リンカー)、2つの部分間に共有結合を生成しうるさまざまな可能性のある試薬を提供する。

#### 【0222】

リンカー中のスペーサエレメントは、典型的には、直鎖または分岐鎖からなり、 $C_1 \sim 10$  アルキル、 $C_2 \sim 10$  アルケニル、 $C_2 \sim 10$  アルキニル、 $C_2 \sim 6$  ヘテロシクリル、 $C_6 \sim 12$  アリール、 $C_7 \sim 14$  アルカリール、 $C_3 \sim 10$  アルクヘテロシクリル、 $C_2 \sim C_{10}$  ポリエチレングリコール、または $C_1 \sim 10$  ヘテロアルキルを含みうる。

#### 【0223】

いくつかの場合には、リンカーは化学式Vにより記述される。

10

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、限定されるものではないが、エチレンジアミン、プロピレンジアミンおよびヘキサメチレンジアミン、エチレングリコール、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、およ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およびジオールが挙げられる。

#### 【0224】

いくつかの実施形態では、リンカーは、結合であるか、または炭素原子、窒素原子、酸素原子、硫黄原子、もしくはリン原子から独立して選択される10個までの原子の直鎖であり、鎖中の各原子は、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、アリールオキシ、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、およびスルホニルから独立して選択される1個以上の置換基で任意選択的に置換され、かつ鎖中の任意の2個の原子は、それらに結合された置換基と一緒に環を形成しうるとともに、環は、さらなる置換および/または1つ以上の任意選択的に置換された炭素環、ヘテロ環、アリール環、またはヘテロアリール環への融合を行いうる。

20

#### 【0225】

いくつかの実施形態では、リンカーは、化学式XI X:

$$A^1 - (B^1)_a - (C^1)_b - (B^2)_c - (D) - (B^3)_d - (C^2)_e - (B^4)_f - A^2$$

30

化学式XI X

(式中、 $A^1$ は、リンカーとプレゼンタータンパク質結合部分との間の結合であり、 $A^2$ は、哺乳動物標的相互作用部分とリンカーとの間の結合であり、 $B^1$ 、 $B^2$ 、 $B^3$ 、および $B^4$ は、それぞれ独立して、任意選択的に置換された $C_1 \sim C_2$ アルキル、任意選択的に置換された $C_1 \sim C_3$ ヘテロアルキル、O、S、および $NR^N$ から選択され、 $R^N$ は、水素、任意選択的に置換された $C_1 \sim 4$ アルキル、任意選択的に置換された $C_2 \sim 4$ アルケニル、任意選択的に置換された $C_2 \sim 4$ アルキニル、任意選択的に置換された $C_2 \sim 6$ ヘテロシクリル、任意選択的に置換された $C_6 \sim 12$ アリール、または任意選択的に置換された $C_1 \sim 7$ ヘテロアルキルであり、 $C^1$ および $C^2$ 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、およびfは、それぞれ独立して、0または1であり、ならびにDは、任意選択的に置換された $C_1 \sim 10$ アルキル、任意選択的に置換された $C_2 \sim 10$ アルケニル、任意選択的に置換された $C_2 \sim 10$ アルキニル、任意選択的に置換された $C_2 \sim 6$ ヘテロシクリル、任意選択的に置換された $C_6 \sim 12$ アリール、任意選択的に置換された $C_2 \sim C_{10}$ ポリエチレングリコール、もしくは任意選択的に置換された $C_1 \sim 10$ ヘテロアルキル、または $A^1 - (B^1)_a - (C^1)_b - (B^2)_c - (B^3)_d - (C^2)_e - (B^4)_f - A^2$ とを結合する化学結合である)の構造を有する。

40

#### 【0226】

タンパク質

50



## 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しうるとともに、この複合体は、標的タンパク質（たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質）に結合してその活性をモジュレートしうる。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動物プレゼンタータンパク質（たとえば、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（たとえば、プレゼンタータンパク質は、トリパータイト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役割および/または細胞の生存能もしくは他の属性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）。いくつかの実施形態では、プレゼンタータンパク質はより豊富な標的タンパク質である。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、細胞内の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、標的タンパク質に結合してその生物学的活性モジュレート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ように低分子に結合することが知られているものである。イムノフィリンは、こうした機能を有することが知られるプレゼンタータンパク質のクラスであり、FKBPおよ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対して同等の活性を呈する。ある特定の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、FKBPファミリーのメンバー（たとえば、FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP19、FKBP22、FKBP23、FKBP25、FKBP36、FKBP38、FKBP51、FKBP52、FKBP60、FKBP65、およびFKBP133）、シクロフィリンファミリーのメンバー（たとえば、PP1A、CYPB、CYP C、CYP40、CYPE、CYPD、NKTR、SRCyp、CYPH、CWC27、CYPL1、CYP60、CYPJ、PPI L4、PPI L6、RANBP2、PPWD1、PPIAL4A、PPIAL4B、PPIAL4C、PPIAL4D、もしくは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フォールディング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、およびLOC541473が挙げられる。

### 【0227】

「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、PP1A、PP1B、PP1C、PP1D、PP1E、PP1F、PP1G、PP1H、SDCCAG-10、PPI L1、PPI L2、PPI L3、PPI L4、P270、PPWD1、および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、およびPPIAL4Gが挙げられる。

### 【0228】

一部の実施形態では、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、G

R P 7 8 / B i P、G R P 9 4、G R P 1 7 0、カルネキシン、カルレティキュリン、H S P 4 7、E R p 2 9、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ ( P D I )、および E R p 5 7 である。

【 0 2 2 9 】

一部の実施形態では、プレゼンタータンパク質は、本明細書において開示されている F K B P 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ものと有意な同一性を示し、ii) 参照プレゼンタータンパク質の対応する部分との有意な同一性を示す部分を含み、および/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、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上であれば、プレゼンタータンパク質を定義する目的では「有意」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分は、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、またはそれ以上のアミノ酸の長さを有する。

【 0 2 3 0 】

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、プレゼンタータンパク質全般および/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可能である。

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1. 選択し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	ユニプロット (Uniprot) 受託番号
AIP	O00170
AIP1	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
PPIG	Q13427
PPIH	O43447
PPIL1	Q9Y3C6
PPIL2	Q13356
PPIL3	Q9H2H8
PPIL4	Q8WUA2
PPIL5	Q32Q17
PPIL6	Q8IXY8
PPWD1	Q96BP3

【0232】

標的タンパク質

標的タンパク質（たとえば、哺乳動物標的タンパク質や菌類標的タンパク質などの真核生物標的タンパク質または細菌標的タンパク質などの原核生物標的タンパク質）は、疾患病態または疾患病態の症状を媒介するタンパク質である。このため、その活性をモジュレート（阻害または増加）することにより、望ましい治療効果は達成することが可能である。本発明の複合体および方法に有用な標的タンパク質としては、天然ではプレゼンタータンパク質に関連しないもの、たとえば、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ンパク質に対して1 μM超、好ましくは5 μM超、より好ましくは10 μM超の親和性を有するものが挙げられる。代替的に、天然ではプレゼンタータンパク質に関連し

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  $1\ \mu\text{M}$  超、好ましくは  $5\ \mu\text{M}$  超、より好ましくは  $10\ \mu\text{M}$  超の親和性を有するものである。他の選択肢として、天然ではプレゼンタータンパク質に関連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 F K 5 0 6 と、プレゼンタータンパク質と、の二元複合体に対して  $1\ \mu\text{M}$  超、好ましくは  $5\ \mu\text{M}$  超、より好ましくは  $10\ \mu\text{M}$  超の親和性を有するもの（たとえば、F K B P）である。さらに他の選択肢として、天然ではプレゼンタータンパク質に関連しない標的タンパク質は、カルシニューリンや m T O R 以外のものである。本発明の複合体およ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する。たとえば、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、F K B P に対して高親和性を有することもあり、その場合は後者と一緒には使用されないであろう。

10

**【 0 2 3 3 】**

標的タンパク質は、天然に存在可能であり、たとえば、野生型でありうる。代替的に、標的タンパク質は、野生型タンパク質と異なりうるが、生物学的機能、たとえば、対立遺伝子変異体、スプライス突然変異体、または生物学的活性断片を依然として維持する。

**【 0 2 3 4 】**

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、標的タンパク質はダイマー複合体の一方のタンパク質である。

**【 0 2 3 5 】**

いくつかの実施形態では、本発明の標的タンパク質は、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はその部位に対して低いまたは検出不能な結合を示すことを特徴とする 1 つ以上の表面部位（たとえばフラット表面部位）を含む。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 / 化合物複合体の形成の不在下で特定の低分子（たとえば化合物）が低いまたは検出不能な結合（たとえば、同一の化合物を含むプレゼンタータンパク質 / 化合物複合体で観測される結合の多くとも  $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 、 $1/20$ 、 $1/30$ 、 $1/40$ 、 $1/50$ 、 $1/100$ 、またはそれ以下の結合）を示す 1 つ以上の表面部位（たとえばフラット表面部位）を含む。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、いずれの従来型の結合ポケットも欠如した、たとえば、1 つ以上の低分子により活性がモジュレートされたタンパク質に匹敵する生理化学的および / または幾何学的な性質を有するタンパク質構造上のキャビティやポケットが欠如した 1 つ以上の部位により特徴付けられる表面（いくつかの実施形態では全表面）を有する。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に適した従来型の結合ポケットおよび部位を有する。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、アンドラッグブル標的であり、たとえば、標的タンパク質は、薬剤の標的とな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はなく、かつ / または低分子への結合に好適であると期待される（たとえば、本明細書で考察されるように当技術分野で認められた理解に従って）結合部位を有していない。一部の実施形態では、タンパク質は、少なくとも 1 個の反応性スチンを含む。

20

30

**【 0 2 3 6 】**

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、G T P アーゼ、たとえば、D I R A S 1、D I R A S 2、D I R A S 3、E R A S、G E M、H R A S、K R A S、M R A S、N K I R A S 1、N K I R A S 2、N R A S、R A L A、R A L B、R A P 1 A、R A P 1 B、R A P 2 A、R A P 2 B、R A P 2 C、R A S D 1、R A S D 2、R A S L 1 0 A、R A S L 1 0 B、R A S L 1 1 A、R A S L 1 1 B、R A S L 1 2、R E M 1、R E M 2、R E R G、R E R G L、R R A D、R R A S、R R A S 2、R H O A、R H O B、R H O B T B 1、R H O B T B 2、R H O B T B 3、R H O C、R H O D、R H O F、R H O G、R H O H、R H O J、R H O Q、R H O U、R H O V、R N D 1、R N D 2、R N D 3、R A C 1、R A C 2、R A C 3、C D C 4 2、R A B 1 A、R A B 1 B、R A B 2、R A B 3 A、R A B 3 B、R A B 3 C、R A B 3 D、R A B 4 A、R A B 4 B、R A B 5

40

50

A、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、GTPase活性化タンパク質、たとえば、NF1、IQGAP1、PLEXIN-B1、RASAL1、RASAL2、ARHGAP5、ARHGAP8、ARHGAP12、ARHGAP22、ARHGAP25、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、たとえば、CNRASGEF、RASGEF1A、RASGRF2、RASGRP1、RASGRP4、SOS1、RALGDS、RGL1、RGL2、RGR、ARHGEF10、ASEF/ARHGEF4、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、たとえば、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、たとえば、Hsp20、Hsp27、Hsp70、Hsp84、Bクリスタリン、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、たとえば、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、たとえば、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、キナーゼで、たとえば、CyclinD1、ABL、ALK、AXL、BTK、EGFR、FMS、FAK、FGFR1、2、3、4、FLT3、HER2/Erbb2、HER3/Erbb3、HER4/Erbb4、IGF1R、INSR

10

20

30

40

50

、JAK1、JAK2、JAK3、KIT、MET、PDGFRA、PDGFRB、RET  
 TRON、ROR1、ROR2、ROS、SRC、SYK、TIE1、TIE2、TRK  
 A、TRKB、KDR、AKT1、AKT2、AKT3、PDK1、PKC、RHO、R  
 OCK1、RSK1、RKS2、RKS3、ATM、ATR、CDK1、CDK2、CD  
 K3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8、CDK9、CDK10、E  
 RK1、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、たとえば、WIP1、S  
 HP2、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、NED  
 D8、ATG8タンパク質、SUMOタンパク質、ISG15）、活性化酵素（E1、例  
 えば、UBA1、UBA2、UBA3、UBA5、UBA6、UBA7、ATG7、NA  
 E1、SAE1）、コンジュゲーション酵素（E2、例えば、UBEタンパク質、ATG  
 3、BIRC6）、ライゲーション酵素（E3、例えば、BMI-1、MDM2、NED  
 D4-1、ベータ-TRCP、SKP2、E6AP、CBL-B、もしくはAPC/C）  
 、およ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、クロマチンモディファイヤー/リモデラー、たとえば、遺  
 伝子BRG1、BRM、ATRX、PRDM3、ASH1L、CBP、KAT6A、KA  
 T6B、MLL、NSD1、SETD2、EP300、KAT2AまたはCREBBPに  
 よってコードされるクロマチンモディファイヤー/リモデラーである。いくつかの実施形  
 態では、標的タンパク質は、転写因子、たとえば、遺伝子EHF、ELF1、ELF3、  
 ELF4、ELF5、ELK1、ELK3、ELK4、ERF、ERG、ETS1、ET  
 V1、ETV2、ETV3、ETV4、ETV5、ETV6、FEV、FLI1、GAV  
 PA、SPDEF、SPI1、SPIC、SPIB、E2F1、E2F2、E2F3、E  
 2F4、E2F7、E2F8、ARNTL、BHLHA15、BHLHB2、BHLBH  
 B3、BHLHE22、BHLHE23、BHLHE41、CLOCK、FIGLA、H  
 AS5、HES7、HEY1、HEY2、ID4、MAX、MESP1、MLX、MLX  
 IPL、MNT、MSC、MYF6、NEUROD2、NEUROG2、NHLH1、O  
 LIG1、OLIG2、OLIG3、SREBF2、TCF3、TCF4、TFAP4、  
 TFE3、TFEB、TFEC、USF1、ARF4、ATF7、BATF3、CEBP  
 B、CEBPD、CEBPG、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、DLX  
 2、DLX3、DLX4、DLX5、DLX6、DMBX1、DPRX、DRGX、DU  
 XA、EMX1、EMX2、EN1、EN2、ESX1、EVX1、EVX2、GBX1  
 、GBX2、GSC、GSC2、GSX1、GSX2、HESX1、HMX1、HMX2  
 、HMX3、HNF1A、HNF1B、HOMEZ、HOXA1、HOXA1、HOXA  
 13、HOXA2、HOXAB13、HOXB2、HOXB3、HOXB5、HOXC1  
 0、HOXC11、HOXC12、HOXC13、HOXD11、HOXD12、HOX  
 D13、HOXD8、IRX2、IRX5、ISL2、ISX、LBX2、LHX2、L  
 HX6、LHX9、LMX1A、LMX1B、MEIS1、MEIS2、MEIS3、M  
 EOX1、MEOX2、MIXL1、MNX1、MSX1、MSX2、NKX2-3、N  
 KX2-8、NKX3-1、NKX3-2、NKX6-1、NKX6-2、NOTO、O  
 NECUT1、ONECUT2、OTX1、OTX2、PDX1、PHOX2A、PHO  
 X2B、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、PO

10

20

30

40

50

U3F1、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、FOX D2、FOX D3、FOX G1、FOX I1、FOX J2、FOX J3、FOX K1、FOX L1、FOX O1、FOX O4、FOX O6、FOXP3、EOMES、MGA、NFAT5、NFATC1、NFKB1、NFKB2、T63、RUNX2、RUNX3、T、TBR1、T1、T15、T19、T2、T20、T21、T4、T5、AR、ESR1、ESRRA、ESRRB、HNF4A、NR2C2、NR2E1、NR2F1、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A2、RARA、RAR B、RARG、RORA、RXRA、RXRB、RXRG、THRA、THRB、VDR、GATA3、GATA4またはGATA5、またはC-myc、Max、Stat3、Stat4、Stat6、アンドロゲンレセプター、C-Jun、C-Fox、N-Myc、L-Myc、MITF、Hif-1、Hif-2、Bcl6、E2F1、NF- $\kappa$ B、Stat5、またはER(coact)によりコードされる転写因子である。ある特定の実施形態では、標的タンパク質は、TrkA、P2Y14およびmPEGS、ASK1、ALK、Bcl-2、BCL-XL、mSIN1、ROR $\gamma$ t、IL17RA、eIF4E、TLR7R、PCSK9、IgE $\alpha$ 、CD40、CD40L、Shn-3、TNFR1、TNFR2、IL31RA、OSMR、IL12beta1、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、カテニン、AAC、PLD1、PLD2、Frizzled7、RALP11、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。

#### 【0237】

##### タンパク質変異体

本明細書に記載のようなタンパク質またはポリペプチド変異体は一般に、参照ポリペプチド(例えば、本明細書に記載のようなプレゼンタータンパク質または標的タンパク質、例えば、哺乳動物の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%もしくはそれ超、すなわち、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ超の)アイデンティティを示すが、限定さ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)を含むアミノ酸配列を有し、かつ/または参照ポリペプチドに対し1個もしくは複数のアミノ酸変異体または類似体(例えば、D-アミノ酸、デスアミノ

10

20

30

40

50

酸)を含む。ある特定の実施形態では、変異体は、関連性のある生物活性(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。一部のこのような実施形態では、変異体は、参照ポリペプチドの活性の約50%以上であり、かつ/または参照ポリペプチドの活性の約0.5分の1以下であるレベルでこのような活性を示す。

#### 【0238】

一部の実施形態では、変異体ポリペプチドは、少なくとも(または単に)変異体が、参照ポリペプチドにおける非システイン残基に対応する位置において、多数のシステイン残基を有し、かつ/または1個もしくは複数のシステイン残基を有するという点に関して、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、一部の実施形態では、本明細書に記載のようなポリペプチド(例えば、プレゼンタータンパク質および/または標的タンパク質)のいずれかのアミノまたはカルボキシ末端への1個もしくは複数のシステイン残基の添加は、例えば、ジスルフィド結合によるこのようなポリペプチドのコンジュゲーションを促進することができる。

#### 【0239】

一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的(すなわち、ここで、残基は、同じ一般タイプもしくは群の別のもの置き換えられている)または非保存的(すなわち、ここで、残基は、別のタイプのアミノ酸で置き換えられている)であり得る。一部の実施形態では、天然アミノ酸は、非天然アミノ酸(すなわち、天然由来でない保存的アミノ酸置換もしくは天然由来でない非保存的アミノ酸置換)の代わりに置換されていてもよく、または逆もまた同様である。

#### 【0240】

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、天然由来で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。非天然アミノ酸の例は、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ている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、化学式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (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、t-ブチルアラニン、t-ブチルグリシン、N-メチルイソロイシン、およびノルロイシンを含む。フェニルグリシンは、Trp、Tyr、またはPheの代わりをし得る。シトルリンおよ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で置換され、コンホメーション付与特性を保持し得る。

#### 【0241】

類似体は、置換型突然変異誘発によって生じ、オリジナルのタンパク質の構造(例えば、局所的構造または全般的構造)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において示す。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ているような、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。

#### 【0242】

機能または免疫学的アイデンティティー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コンホメーションとしての、置換の領域におけるタンパク質骨格の構造、(b)標的部位における分子の変化もしくは疎水性、または(c)側鎖のバルクを維持することに対するこ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。天然由来の残基は、一般の側鎖特性に基づいて群に分けられる：

- (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/負に帯電している：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)、リシン(Lys)、アルギニン(Arg)、

10

20

30

40

50



( 5 ) 鎖の配向に影響を与える残基：グリシン ( G l y )、プロリン ( P r o ) ；  
 ( 6 ) 芳香族：トリプトファン ( T r p )、チロシン ( T y r )、フェニルアラニン ( P h e )、ヒスチジン ( H i s )、( 7 ) 極性：S e r、T h r、A s n、G l n、  
 ( 8 ) 塩基性で正に帯電している：A r g、L y s、H i s、および；  
 ( 9 ) 電荷を帯びている：A s p、G l u、A r g、L y s、H i s  
 他のアミノ酸置換は、表 2 において列挙する。

【 0 2 4 3 】

【表 2】

表2. アミノ酸置換

オリジナルの残基	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

【 0 2 4 4 】

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

一部の実施形態では、タンパク質またはポリペプチド変異体は、タンパク質（例えば、本明細書に記載されているタンパク質のいずれかのアミノまたはカルボキシ末端における）への 1 個もしくは複数の反応性アミノ酸残基（例えば、システイン）の添加を含み得、これは例えば、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。一部の実施形態では、1 個もしくは複数の反応性アミノ酸（例えば、システイン）は除去して、タンパク質上の可能なコンジュゲーション部位の数を減少させ得る。アミノ酸置換は、保存的（すなわち、ここで、残基は、同じ一般タイプもしくは群の別のもので置き換えられている）または非保存的（すなわち、ここで、残基は、別のタイプのアミノ酸で置き換えられている）であり得る。さらに、天然アミノ酸は、非天然アミノ酸（すなわち、天然由来でない保存的アミノ酸置換または天然由来でない非保存的アミノ酸置換）の代わりに置換することができる。

【 0 2 4 5 】

当技術分野において公知のように、例えば、チン J . W . ( C h i n , J . W . ) 著、

細胞および動物の遺伝コードの伸長および再プログラム化 (Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals)、生化学の年次レビュー (Annual Review of Biochemistry)、第 83 巻, p. 379 ~ 408 に記載されているように、非天然アミノ酸は、*in vitro* で作製されたタンパク質中に組み込み得る。例えば、1 つの系において、UAG アンバー (停止) コドンが使用されて、古細菌 tRNA シンテターゼおよび tRNA を介してピロリジンが組み込まれてきており、UAG アンバー (停止) コドンをまた使用して、摂食を介してアジドおよびアルキンを組み込むことができる。当技術分野で示されてきた非天然アミノ酸上の他の側鎖は、シクロプロペン、trans-シクロオクテン、ピシクロ [6.1.0] ノニン-リシン、クマリン、p-アジドフェニルアラニン、N6-[ (2-プロピニロキシ (propynloxy)) カルボニル ] -L-リシン、ピシクロ [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-リシン、N-tert-ブチルオキシカルボニル-L-リシン、N-2-アジドエチルオキシカルボニル-L-リシン、N-L-チアプロリル-L-リシン、N-D-システニル-L-リシン、N-L-システニル-L-リシン、N6-[ (2-プロピニルオキシ) カルボニル ] -L-リシン、N6-[ (2-アジドエトキシ) カルボニル ] -L-リシン、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、およびシクロオクチンを含む。【0246】

#### 複合体

タンパク質上のキャビティまたはポケット中の小分子の間の相互作用によって推進される多くの小分子-タンパク質相互作用と対照的に、天然由来のタンパク質-タンパク質相互作用において、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って大いに推進される。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。一部の状況において、小分子は、例えば、タンパク質 (例えば、プレゼンタータンパク質) 上の疎水的相互作用部位に関与するか、生じさせ、これは、小分子の非存在下では存在しないという点で、小分子は、「移動できるホットスポット」 (またはそのポーション) 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、一部の実施形態では、本明細書に記載のような化合物 (および/またはそのタグ付き形態) は、タンパク質と共に複合体 (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トリパートタイム複合体の形成) に関与する。【0247】

多くの哺乳動物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、菌類および細菌の種の選択グループにより生成される天然物のクラスにより媒介可能である。こうした分子は、共通の構造組織を呈するとともに、タンパク質-タンパク質相互作用をモジュレートする能力を提供する機能も結果として呈する。こうした分子は、高度に保存されたプレゼンタータンパク質結合部分と、異なる天然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と、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。哺乳動物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モジュレートする (たとえば、正または負にモジュレートする)。本発明において、二元複合体 (例えば、化合物およびプレゼンタータンパク質の間、または化合物および標的タンパク質の間) 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。次いで、このように得られた本発明のコンジュゲートは、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、トリパートイト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および標的タンパク質の間のインターフェースの構造を決定するために使用し得る。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し得る。

#### 【0248】

##### 使用

##### 標的タンパク質の同定

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、および/または方法は、（例えば、小分子の存在下で）プレゼンタータンパク質と共に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ている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、およびコンジュゲートが、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成しているかを決定することによって同定し得る。

#### 【0249】

プレゼンタータンパク質および小分子と共に三元複合体を形成する当技術分野において公知の大部分の標的タンパク質は、小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、標的分子へとプレゼンタータンパク質結合部分を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および標的タンパク質の両方を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って、小分子の存在下で、プレゼンタータンパク質と共に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。

#### 【0250】

プレゼンタータンパク質および同定された標的タンパク質の間の複合体形成を促進するこれらの能力についての小分子のスクリーニングは、次いで、標的タンパク質の生物活性をモジュレートすることができる有望な療法を同定するために行うことができる。

#### 【0251】

一部の実施形態では、本発明の化合物を使用して、プレゼンタータンパク質と共に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つもしく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）とを合わせることによって同定し得る。次いで、プレゼンタータンパク質と共に複合体を形成しない標的タンパク質は、除去（例えば、洗い流し）してもよく、次いで、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上の標識を使用してプルダウンし、分析し得る。一部の実施形態では、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、これらのアイデンティティを決定し得る。

#### 【0252】

##### 化合物の設計

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、および/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活性をモジュレートすることができる化合物の設計のために有用であり得る。

#### 【0253】

例えば、本発明のプレゼンタータンパク質およびコンジュゲートの複合体の形成は、複合体の結晶化および結晶構造決定による、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質の間のタンパク質-タンパク質インターフェースの構造の決定を促進することができる。本発明の複合体の結晶構造が決定されると、合理的なドラッグデザインのための当技術分野において公知の方法、例えば、構造を新規に構築する計算機化学方法および/または方法、例えば、本発明の複合体の結晶のフラグメント浸漬、ならびにこのように得られた構

10

20

30

40

50

造の決定を使用したフラグメントベースのドラッグデザインを使用して、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質の間の複合体形成を促進することができる小分子を開発し得る。

【0254】

次いで、上記のように設計された化合物はスクリーニングして、標的タンパク質の生物活性をモジュレートするこれらの能力を決定してもよく、かつ医薬品化学技術を必要に応じて使用して修飾し、治療的に有用な化合物を生成してもよい。

【0255】

共有結合性小分子療法の同定

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、および/または方法は、共有結合性相互作用によって標的タンパク質の生物活性をモジュレート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

【0256】

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および非存在下での標的タンパク質に共有結合するこれらの能力についてスクリーニングして、プレゼンタータンパク質の存在下でのみで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し得る。次いで、これらの化合物は、標的タンパク質の生物活性をモジュレートするこれらの能力について試験してもよく、かつ医薬品化学技術を必要に応じて使用して修飾し、治療的に有用な化合物を生成してもよい。

20

【0257】

生化学的および/または生物物理学の特性の決定

一部の実施形態では、本発明の化合物、コンジュゲート、複合体、組成物、および/または方法は、タンパク質または複合体の生化学的および/または生物物理学の特性を決定するのに有用であり得る。

【0258】

例えば、プレゼンタータンパク質結合部分および標的タンパク質を含むコンジュゲートと、プレゼンタータンパク質との間の結合の自由エネルギーは、例えば、等温滴定熱量測定によって決定し得る。プレゼンタータンパク質についてのプレゼンタータンパク質結合部分および標的タンパク質を含むコンジュゲートの $K_d$ は、例えば、表面プラズモン共鳴によって決定し得る。標的タンパク質についての化合物およびプレゼンタータンパク質の $K_i$ 、 $K_{inact}$ 、および/または $K_i/K_{inact}$ は、例えば、質量分析法によって決定し得る。

30

【0259】

疾患または障害の処置

本明細書に記載されている化合物、コンジュゲート、および複合体は、本明細書に記載されている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、理論に束縛されるものではないが、標的タンパク質（例えば、真核生物の標的タンパク質、例えば、哺乳動物の標的タンパク質または真菌の標的タンパク質または原核生物の標的タンパク質、例えば、細菌の標的タンパク質）の活性をモジュレート（例えば、正または負にモジュレート）するこれらの能力によって、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質との相互作用によってこれらの望ましい効果を発揮すると考えられる。

40

【0260】

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便利かつ効果的に実施するためのキットに関する。一般的には、医薬パックまたはキットは、本発明の医薬組成物の1つ以上の成分が充填された1つ以上の容器を含む。かかるキットは、錠剤やカプセル剤などの固体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、いくつかのユニット投与量を含み、意図されるその使用順序に合った投与量を記したカードを含みうる。所望により、たとえば、被験体がアルツハイマー病に罹患している場合、たとえば、数字、文字、もしくは他の表示の形式で、または投与を行いうる期日を治療スケジュール

50

ルに指定してカレンダーへの書込みを行って、記憶補助を提供可能である。代替的に、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プラセボ投与量またはカルシウム食事サプリメント)を含めて、投与量が毎日摂取されるキットを提供可能である。かかる容器に任意選択的に関連付けられるのは、医薬品の製造、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りうる。この注意書きは、ヒトに投与するための製造、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したものである。

#### 医薬組成物

ヒトおよび動物被験体の治療に使用するために、本発明の化合物およびコンジュゲートは、医薬組成物または獣医薬組成物として製剤化可能である。治療される被験体、投与モード、および所望の治療タイプ(たとえば、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、レミングトン：薬学の科学と実践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)、第21版、リッピンコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス(Lippincott Williams & Wilkins)、2005年; およびエンサイクロペディア・オブ・ファーマシューティカル・テクノロジー(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology)、J. スワーブリクス(J. Swarbrick)およびJ. C. ボイラン(J. C. Boylan)編、1988 - 1999年、マーセル・デッカー(Marcel Dekker)、ニューヨーク(それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)に見いだされる。

#### 【0261】

本明細書に記載される化合物は、組成物の全重量の1~95重量%の合計量で存在しうる。組成物は、関節内、経口、非経口(たとえば、静脈内、筋肉内)、経直腸、皮膚、皮下、局所、経真皮、舌下、経鼻、経膈、小胞内、尿道内、髄腔内、硬膜外、経耳、もしくは経眼の投与、または注射、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好適な剤形で提供しうる。それゆえ、医薬組成物は、たとえば、錠剤、カプセル剤、丸剤、粉末剤、顆粒剤、サスペンション剤、エマルジョン剤、溶液剤、ヒドロゲル剤を含めてゲル剤、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うる。組成物は従来の薬務に従って製剤化しうる。

#### 【0262】

一般的には、治療に使用するために、本明細書に記載される化合物は、単独でまたは1つ以上の他の活性剤と組み合わせて使用しうる。本明細書に記載される化合物と組み合される他の医薬の例は、同一の適応症の治療のための医薬を含むであろう。本明細書に記載される化合物と組み合される可能性のある医薬の他の例は、異なるとはいえ関連のある症状または適応症の治療のための医薬を含むであろう。投与モードに依存して、化合物は、容易な送達を可能にするのに好適な組成物として製剤化される。組合せ療法の各化合物は、当技術分野で公知のさまざまな方法に製剤化しうる。たとえば、組合せ療法の第1および第2の作用剤は一緒にまたは個別に製剤化しうる。望ましくは、第1および第2の作用剤は、作用剤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。

#### 【0263】

本発明の化合物は、当技術分野で周知のように、本明細書に記載される有効量の化合物と薬学的に許容可能な担体または賦形剤とを含む医薬組成物として調製および使用しうる。いくつかの実施形態では、組成物は、少なくとも2つの異なる薬学的に許容可能な賦形剤または担体を含む。

#### 【0264】

製剤は、全身投与または局所投与に好適な方式で調製しうる。全身製剤は、注射(たとえば、筋肉内、静脈内、皮下の注射)に供すべく設計されたものを含むか、または経真皮、経粘膜、もしくは経口の投与に供すべく調製しうる。製剤は、一般に、希釈剤さらには

10

20

30

40

50

いくつかの場合にはアジュバント、緩衝剤、保存剤などを含む。化合物はまた、リポソーム組成物またはマイクロエマルジョン剤として投与可能である。

【0265】

注射に供する場合、製剤は、液体溶液剤としてまたはサスペンション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形で調製可能である。好適な賦形剤としては、たとえば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールなどが挙げられる。かかる組成物はまた、種々の量の非毒性補助物質、たとえば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤など、たとえば、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うる。

【0266】

薬剤のさまざまな持続放出系も考案されてきた。たとえば、米国特許第5,624,677号明細書（参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

全身投与としては、比較的非侵襲性的の方法、たとえば、坐剤、経真皮パッチの使用、経粘膜送達、および鼻腔内投与も挙げられうる。経口投与もまた本発明の化合物に好適である。好適な製剤としては、当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、および錠剤が挙げられる。

【0267】

本明細書に記載される組合せ療法の各化合物は、当技術分野で公知のさまざまな方法で製剤化しうる。たとえば、組合せ療法の第1および第2の作用剤は一緒にまたは分割して製剤化しうる。

【0268】

個別にまたは分割して製剤化された作用剤は、キットとして一緒にパッケージング可能である。その例としては、限定されるものではないが、たとえば、2丸剤、丸剤+粉末剤、バイアル中の坐剤+液体剤、2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、ユニット用量を被験体に投与するのを支援する任意選択的なコンポーネント、たとえば、粉末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送達システム、インヘラーなどを含みうる。そのほかに、ユニット用量キットは、組成物の調製および投与のための説明書を含有しうる。キットは、一被験体用の単回使用ユニット用量として、特定被験体用の複数回使用として（一定用量でまたは治療の進行にに合わせて個別の化合物の効力が変化するように）製造しうるか、またはキットは、複数被験体への投与に好適なマルチプル用量を含有しうる（「バルクパッケージング」）。キットのコンポーネントは、カートン、ブリスターパック、ボトル、チューブなどとしてアSEMBルしうる。

【0269】

経口使用に供される製剤としては、非毒性の薬学的に許容可能な賦形剤との混合物として活性成分を含有する錠剤が挙げられる。こうした賦形剤は、たとえば、不活性希釈剤または充填剤（たとえば、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などのデンプン、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）、顆粒化剤および崩壊剤（たとえば、微結晶セルロースなどのセルロース誘導体、ジャガイモデンプンなどのデンプン、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（たとえば、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、ナトリウムアルギネート、ゼラチン、デンプン、化デンプン、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、滑剤、および接着防止剤（たとえば、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、水素化植物油、またはタルク）でありうる。他の薬学的に許容可能な賦形剤は、着色剤、風味剤、可塑剤、保湿剤、緩衝剤などでありうる。

【0270】

10

20

30

40

50

2つ以上の化合物は、錠剤、カプセル剤、もしくは他の媒体と一緒に混合しうるか、または分割しうる。一例として、第2の化合物の実質的部分が第1の化合物の放出前に放出されるように、第1の化合物は錠剤の内側にかつ第2の化合物は外側に含有される。

#### 【0271】

経口使用に供される製剤はまた、咀嚼錠剤として、または活性成分が不活性固体希釈剤（たとえば、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、リン酸カルシウム、もしくはカオリン）と混合されるハードゼラチンカプセル剤として、または活性成分が水もしくは油性媒体、たとえば、ラッカセイ油、流動パラフィン、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しうる。粉末剤、顆粒剤、およびペレット剤は、従来方式で、たとえば、ミキサー、流動床装置、またはスプレードライ装置により錠剤およびカプセル剤の状態の以上に挙げた成分を用いて調製しうる。

10

#### 【0272】

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、また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中に化合物を組み込むことにより達成可能である。制御放出コーティング剤としては、以上に挙げたコーティング物質の1つ以上、および/または、たとえば、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、グリセリルモノステアレート、グリセリルジステアレート、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 1ポリ乳酸、セルロースアセートブチレート、ポリビニルクロライド、ポリビニルアセート、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つのヒドロキシメタクリレート、メタクリレートヒドロゲル剤、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、および/またはポリエチレングリコールが挙げられる。また、制御放出マトリックス製剤では、マトリックス材料として、たとえば、水和メチルセルロース、カルナウバワックスおよびステアリルアルコール、カーボポール934、シリコーン、トリストアリン酸グリセリン、メチルアクリレート-メチルメタクリレート、ポリ塩化ビニル、ポリエチレン、および/またはハロゲン化フルオロカーボンが挙げられうる。

20

#### 【0273】

経口投与に供すべく本発明の化合物および組成物を組み込める液状製剤としては、メンジツ油、ゴマ油、ココヤシ油、ラッカセイ油などの食用油さらにはエリキシル剤および類似の医薬媒体を有する、水性溶液剤、好適に風味付けされたシロップ剤、水性または油性サスペンション剤、および、風味付けされたエマルジョン剤が挙げられる。

30

#### 【0274】

一般に、ヒトに投与する場合、本発明の組合せの化合物のいずれについてもその経口投与量は、化合物の性質に依存するが、当業者であれば容易に決定可能である。典型的には、かかる投与量は、通常は約0.001mg~2000mg/日、望ましくは約1mg~1000mg/日、より望ましくは約5mg~500mg/日である。200mg/日までの投与量が必要でありうる。

#### 【0275】

本明細書に記載される組合せ療法の各薬剤の投与は、独立して、1日~1年間にわたり毎日4回でありうるが、さらには被験体の寿命にわたりうる。慢性長期投与が必要となりうる。

40

#### 【実施例】

#### 【0276】

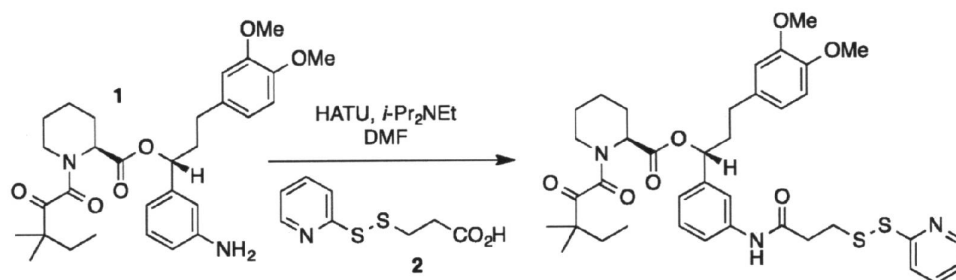
実施例1：特定の架橋試薬の合成

(R)-3-(3,4-ジメトキシフェニル)-1-(3-(3-(ピリジン-2-イルジスルファニル)プロパンアミド)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(C3-SLF)の合成：

#### 【0277】

50

## 【化 2 2】



10

## 【0 2 7 8】

アニリン 1 (90 mg、172  $\mu\text{mol}$ 、1 当量)、ジスルフィド 2 (74 mg、343  $\mu\text{mol}$ 、2 当量) およびジイソプロピルエチルアミン (149  $\mu\text{L}$ 、111 mg、858  $\mu\text{mol}$ 、5 当量) の DMF (3 mL) 溶液に、HATU (130 mg、343  $\mu\text{mol}$ 、2 当量) を加え、反応物を室温にて 24 時間撹拌した。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチル (3 $\times$ ) で抽出した。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。残渣はシリカゲル勾配溶離 (20% 酢酸エチル : 80% ヘプタン 100% 酢酸エチル) 上で精製し、表題化合物 C3-SLF (50 mg、40%) を得た。MS (ESI) 計算値 = 722.3 (M+H)、観測値 = 722.3。

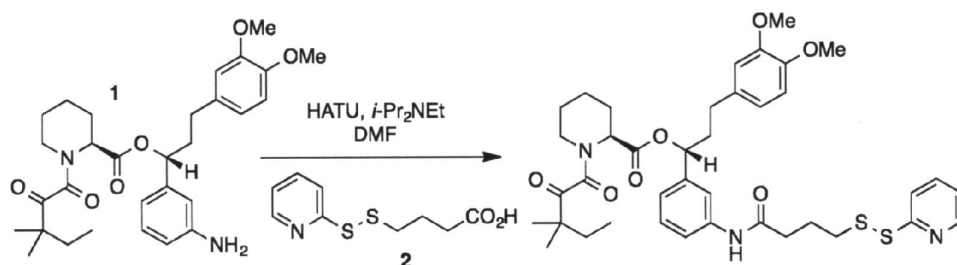
20

## 【0 2 7 9】

(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:

## 【0 2 8 0】

## 【化 2 3】



30

## 【0 2 8 1】

アニリン 1 (90 mg、172  $\mu\text{mol}$ 、1 当量)、ジスルフィド 2 (79 mg、343  $\mu\text{mol}$ 、2 当量) およびジイソプロピルエチルアミン (149  $\mu\text{L}$ 、111 mg、858  $\mu\text{mol}$ 、5 当量) の DMF (3 mL) 溶液に、HATU (130 mg、343  $\mu\text{mol}$ 、2 当量) を加え、反応混合物を室温にて 24 時間撹拌した。反応混合物は水で希釈し、酢酸エチル (3 $\times$ ) で抽出した。水、飽和塩化ナトリウムで有機抽出物を洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、蒸発させた。残渣はシリカゲル勾配溶離 (20% 酢酸エチル : 80% ヘプタン 100% 酢酸エチル) 上で精製し、表題化合物 C4-SLF (98 mg、77%) を得た。MS (ESI) 計算値 = 736.3 (M+H)、観測値 = 736

40

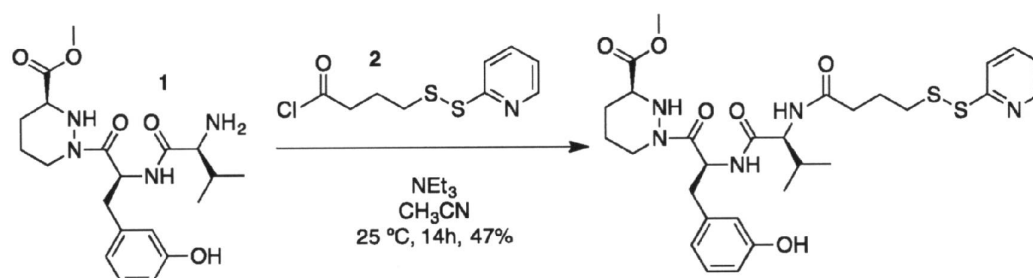
50



【 0 2 8 2 】

【 0 2 8 3 】

【化 2 4】



【 0 2 8 4 】

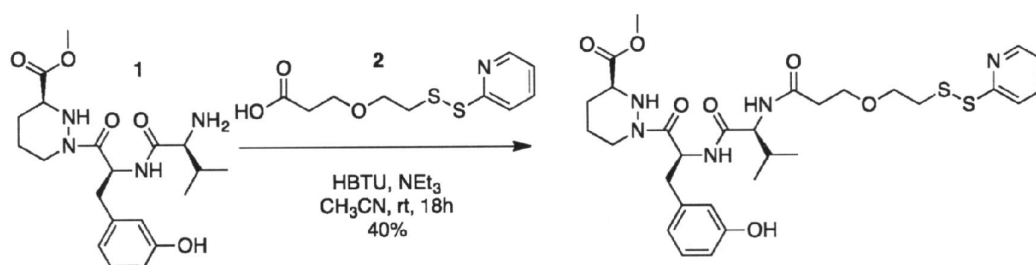
アミン 1 は、パケット ( Paquette ) ら著、JACS、2002 年 ( 124 巻 )、p. 4257 ~ 4270 によって調製した。アミン 1 ( 20 mg、49.2  $\mu$ mol ) のアセトニトリル ( 1 mL ) 溶液に、トリエチルアミン ( 16.5  $\mu$ L、118  $\mu$ mol、2.4 当量 )、それに続いて酸塩化物 2 ( 13.8 mg、59.2  $\mu$ mol、1.2 当量 ) を加えた。室温にて 14 時間反応混合物を攪拌し、次いで、濃縮し、分取 TLC ( ジクロロメタン : MeOH : NH<sub>4</sub>OH、20 : 1 : 0.1 ) によって残渣を精製し、14.0 mg ( 47% ) の生成物を無色の泡として得た。R<sub>f</sub> = 0.59 ( ジクロロメタン : MeOH : NH<sub>4</sub>OH、10 : 1 : 0.1 )。MS ( ESI ) 計算値 = 618.2 ( M + H )、観測値 = 618.2。

【 0 2 8 5 】

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 :

【 0 2 8 6 】

【化 2 5】



【 0 2 8 7 】

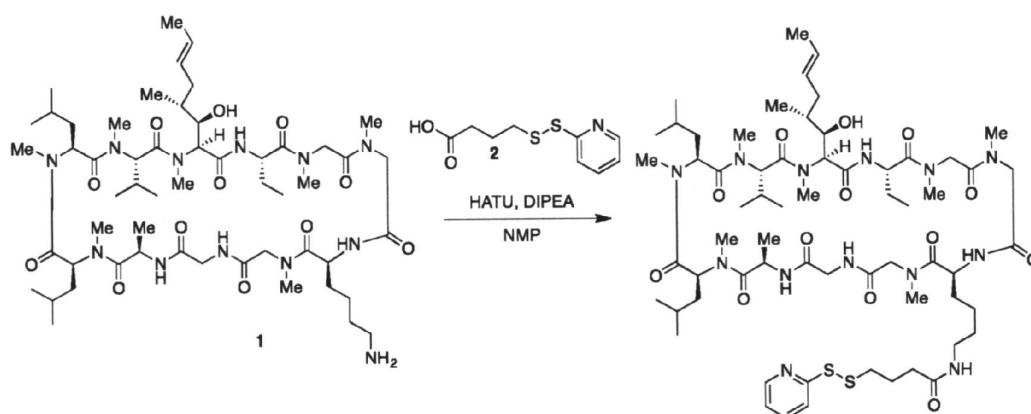
カルボン酸 2 (70 mg、0.270 mmol) および HBTU (204 mg、0.540 mmol、2.00 当量) を 3 mL のアセトニトリル中で混合し、このように得られた懸濁液は室温にて 15 分間撹拌した。この期間に続いて、アミン 1 (110 mg、0.270 mmol、1.00 当量)、それに続いてトリエチルアミン (113  $\mu$ L、0.810 mmol、3.00 当量) を加え、混合物は室温にて 18 時間撹拌した。次いで、混合物は 20 mL の飽和炭酸水素ナトリウムで処理し、2  $\times$  30 mL ポーションの酢酸エチルで抽出した。プールした有機抽出物は 2  $\times$  20 mL ポーション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。残基はジクロロメタン: MeOH、100:1~50:1 で溶出するシリカゲルクロマトグラフィーを使用して精製し、70 mg (40%) の生成物を無色の油として得た。R<sub>f</sub> = 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。

# 【0288】

N - (4 - ((2S, 11R, 14S, 17S, 20S, 23S, 26S) - 26 - エチル - 23 - ((1R, 2R, E) - 1 - ヒドロキシ - 2 - メチルヘキサ - 4 - エン - 1 - イル) - 14, 17 - ジイソブチル - 20 - イソプロピル - 4, 11, 13, 16, 19, 22, 28, 31 - オクタメチル - 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 - ウンデカオキソ - 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 - ウンデカアザシクロトリトリアコンタン - 2 - イル) プチル) - 4 - (ピリジン - 2 - イルジスルファニル) ブタンアミド (CSA3) の合成

# 【0289】

# 【化26】



# 【0290】

アミン 1 (100 mg、90.5  $\mu$ mol) およびカルボン酸 2 (31 mg、135.2  $\mu$ mol、1.5 当量) の NMP (6 mL) 溶液に、HATU (51 mg、134.1  $\mu$ mol、1.48 当量) および DIPEA (70  $\mu$ L、401.9  $\mu$ mol、4.4 当量) を加えた。反応物は室温にて 1 時間撹拌し、次いで、水で希釈し、3  $\times$  30 mL ポーションの酢酸エチルで抽出した。有機抽出物を飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、真空下で濃縮した。粗材料は、15% アセトニトリル: 85% 水 (両方とも 0.1% ギ酸を含有) から 100% アセトニトリル (0.1% ギ酸を含有) の勾配で溶出する C18 媒体上の逆相クロマトグラフィーによって精製した。MS (ESI) 計算値 = 658.9 (M+2H)、観測値 = 659.0。

# 【0291】

実施例 2: 特定のコンジュゲートの合成

一般プロトコル: 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

めの方法について記載する。

試薬：100% DMSO中の化合物（自社製）および哺乳動物の標的タンパク質（自社製）

装置：ミニプロティアン（Mini-PROTEAN）TGXゲル（バイオ-ラッド（Bio-Rad））

実験プロトコル：1：2モル比の標的タンパク質および化合物を、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、2% DMSOを含有する75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。架橋効率は、SDS-PAGEゲルによってアセスメントする。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、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に戻す反応混合物への100 mMの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。

10

#### 【0292】

A. KRASGTP/S39clite/C2-FK506コンジュゲートの形成

試薬：100% DMSO中のC2-FK506（自社製）、KRASGTP/S39clite（自社製；G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169）。装置：ミニプロティアン（Mini-PROTEAN）TGXゲル（バイオ-ラッド（Bio-Rad））

実験プロトコル：1：2モル比のKRASGTP/S39cliteおよびC2-FK506を、2% DMSOを含有する12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。架橋効率は、SDS-PAGEゲルによってアセスメントする。KRASGTP/S39clite上のシステイン39へのC2-FK506の付着はまた、100 mMのDTTとの反応混合物のインキュベーションによってアセスメントされる。

20

結果：C2-FK506は、KRASGTP/S39cliteと効率的に架橋し、かつシステイン39に対して特異的である（図1）。

#### 【0293】

B. KRASGTP/G12clite/SFAX9DSコンジュゲートの形成

試薬：100% DMSO中のSFAX9DS（自社製）、KRASGTP/G12clite（自社製；G12C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169）。装置：ミニプロティアン（Mini-PROTEAN）TGXゲル（バイオ-ラッド（Bio-Rad））

30

実験プロトコル：1：2モル比のKRASGTP/G12cliteおよびSFAX9DSを、2% DMSOを含有する12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。架橋効率は、SDS-PAGEゲルによってアセスメントする。野生型CypAはまた、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はセリンに変異させ、プレゼンター架橋を抑止した。

結果：SFAX9DSは、KRASGTP/G12cliteタンパク質と効率的に架橋し、CypAc52Sは、SFAX9DSに架橋しない（図2）。

40

#### 【0294】

実施例3：特定の複合体の形成

一般プロトコル：このプロトコルは、プレゼンタータンパク質、化合物、および哺乳動物の標的タンパク質からなる複合体の形成および単離のための2つの方法を記載する。

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）および哺乳動物の標的タンパク質（自社製）

装置：ミニプロティアン（Mini-PROTEAN）TGXゲル（バイオ-ラッド（Bio-Rad））、スーパーデックス（Superdex）75（GEヘルスケア（GE Healthcare））、CV120mL）。

50

## 【0295】

実験プロトコルA：事前コンジュゲートされた化合物およびタンパク質

1：2モル比のコンジュゲートおよびプレゼンタータンパク質を、2% DMSOを含有する12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。純粋な複合体は、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。反応混合物は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたスーパーデックス（Superdex）75カラム（CV120 mL）に直接注入する。複合体は、未反応の標的タンパク質およ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によって試料をアセスメントする。

10

## 【0296】

実験プロトコルB：架橋試薬、プレゼンタータンパク質および標的タンパク質

1：2：2モル比の化合物、プレゼンタータンパク質、および標的タンパク質を、2% DMSOを含有する12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。純粋な複合体は、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。反応混合物は、12.5 mMのHEPES pH 7.4、75 mMのNaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたスーパーデックス（Superdex）75カラム（CV120 mL）に直接注入する。複合体は、未反応の標的タンパク質およ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によって試料をアセスメントする。

20

## 【0297】

A. KRASGTP/S39clite/C2-Holt/FKBP12三元複合体の形成  
試薬：100% DMSO中のC2-Holt（自社製）、KRASGTP/S39clite（自社製；G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169）、およびFKBP12（自社製）。

装置：ミニプロティアン（Mini-PROTEAN）TGXゲル（バイオ-ラッド（Bio-Rad））、スーパーデックス（Superdex）75（GEヘルスケア（GE Healthcare））、CV120 mL

30

実験プロトコル：1：2：2モル比のC2-Holt、FKBP12、およびKRASGTP/S39cliteを、2% DMSOを含有する12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。純粋な複合体は、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。反応混合物は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたスーパーデックス（Superdex）75カラム（CV120 mL）に直接注入する。複合体は、注入後概ね69 mLで溶出し、未反応のKRASGTP/S39cliteおよびFKBP12は、注入後、それぞれ、概ね75 mLおよび87 mLで溶出する。溶出ピークにおけるKRASGTP/S39cliteおよびFKBP12の存在を確認するために、SDS-PAGEによって試料をまたアセスメントする。

40

結果：溶出ピークのSECプロファイルおよびSDS-PAGE分析は、KRASGTP/S39clite/C2-Holt/FKBP12複合体の形成を確認する（図3Aおよび3B）。

## 【0298】

B. KRASGDP/S39clite/SFAC4DS/CypAc52s三元複合体の形成

試薬：100% DMSO中のSFAC4DS（自社製）、KRASGDP/S39clite（自社製；G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1～169）、およびCypAc52s（自社製）。

50

装置：ミニプロティアン（Mini-PROTEAN）TGXゲル（バイオ-ラッド（Bio-Rad））、スーパーデックス（Superdex）75（GEヘルスケア（GE Healthcare））、CV120mL）

実験プロトコル：1：2：2モル比のSFAC4DS、CypAc52S、およびKRAS GDP/S39cliteを、2% DMSOを含有する12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。純粋な複合体は、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。反応混合物は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたスーパーデックス（Superdex）75カラム（CV120mL）に直接注入する。複合体は、注入後概ね69 mLで溶出し、未反応のKRAS GDP/S39cliteおよびCypAc52Sは、注入後、それぞれ、概ね75 mLおよび80 mLで溶出する。溶出ピークにおけるKRAS GDP/S39cliteおよびCypAc52Sの存在を確認するために、SDS-PAGEによって試料をまたアセスメントする。

結果：溶出ピークのSECプロファイルおよびSDS-PAGE分析によって、KRAS GDP/S39clite/SFAC4DS/CypAc52S複合体の形成を確認する（図4）。

#### 【0299】

C.PTP1B S187clite/C3-SLF/FKBP12三元複合体の形成

試薬：100% DMSO中のC3-SLF（自社製）、PTP1B E186clite（自社製；C32S/C92V/C121S/S187Cを含有する残基1~293）、およびFKBP12（自社製）。

装置：ミニプロティアン（Mini-PROTEAN）TGXゲル（バイオ-ラッド（Bio-Rad））、スーパーデックス（Superdex）75（GEヘルスケア（GE Healthcare））、CV120mL）

実験プロトコル：1：3：3モル比のC3-SLF、FKBP12、およびPTP1B S187cliteを、4% DMSOを含有する12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液中で一緒に混合する。反応物は、37℃にて30分間インキュベートし、それに続いて室温で一晩インキュベートする。純粋な複合体は、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。反応混合物は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaClを含有する緩衝液で事前に平衡させたスーパーデックス（Superdex）75カラム（CV120mL）に直接注入する。複合体は注入後概ね62 mLで溶出し、未反応のFKBP12は、注入後、それぞれ概ね75 mL（二量体）および90 mL（モノマー）で溶出する。溶出ピークにおけるPTP1B S187cliteおよびFKBP12の存在を確認するために、SDS-PAGEによって試料をまたアセスメントする。遊離PTP1B S187cliteおよびFKBP12混合物は、同じ条件下でスーパーデックス（Superdex）75カラムに供し、これらの溶出時間を決定する。

結果：概ね64~65 mLにおいて溶出する遊離PTP1B S187cliteを確認する、遊離PTP1B S187cliteおよびFKBP12タンパク質（図5A）のSECプロファイル、ならびにSDS-PAGE分析。溶出ピークのSECプロファイルおよびSDS-PAGE分析によって、PTP1B S187clite/C3-SLF/FKBP12複合体の形成を確認し、これは概ね61 mLにおいて溶出する（図5B）。

#### 【0300】

実施例4：プレゼンタータンパク質が存在するとき、コンジュゲート形成であるが、これが非存在のとき、コンジュゲート形成ではない

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アセスメントする試みにおける、質量分析法およ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について記載する。

試薬：100% DMSO中の化合物（自社製）、FKBP12（自社製）、KRAS GTP

/ G 1 2 c ( 自 社 製 、 残 基 1 ~ 1 6 9 ) 。

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、A d v a n c e B i o ( ア ド バ ン ス バ イ オ ) R P - m A b C 4 カ ラ ム ( 2 . 1 × 1 0 0 m m 、 3 . 5 μ m ) を 用 い 、 か つ オ ー ト サ ンプ ラ ー を 備 え た ア ジ レ ン ト ( A g i l e n t ) 6 2 3 0 T O F - L C / M S お よ び ア ジ レ ン ト ( A g i l e n t ) 1 2 6 0 H P L C 機 器 を 使 用 し た 。 H P L C グ レ ー ド の ア セ ト ニ ト リ ル お よ び 水 ( そ れ ぞ れ 、 1 . 0 m M の ギ 酸 ア ン モ ニ ウ ム お よ び 1 容 量 % の ギ 酸 を 含 有 ) は 、 下 記 の ラ ン プ を 伴 っ て 移 動 相 と し て 使 用 し た 。 0 . 6 m l / 分 の 流 量 、 水 : ア セ ト ニ ト リ ル = 9 5 : 5 、 0 . 0 ~ 1 3 . 0 分 の ラ ン ピ ン グ か ら 、 水 : ア セ ト ニ ト リ ル = 5 : 9 5 、 1 3 . 0 ~ 1 7 . 0 分 。 総 時 間 = 1 7 . 0 分 。

【 0 3 0 1 】

全ての架橋反応は、0 . 5 m L の ガ ラ ス 製 イ ン サ ー ト を 備 え た 1 . 5 m L 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 : Y Q N L L V G R N R G E E I L D ) は 、 内 部 標 準 と し て 用 い 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 ( F K B P 1 2 を 妨 げ る ) お よ び シ ス テ イ ン ( ジ ス ル フ ィ ド 結 合 形 成 を 妨 げ る ) 残 基 は 除 外 し た 。 全 て の 反 応 物 お よ び 標 準 液 は 、 H E P E S ( p H 7 . 4 、 1 . 0 m M の M g C l 2 ) 緩 衝 液 中 で 調 製 し た 。

【 0 3 0 2 】

全ての反応の前に、一連の標準液 ( F K B P 1 2 に つ い て の 標 準 曲 線 分 析 の 一 例 は 、 下 記 の 表 3 に お い て 示 す ) を 使 用 し て 個 々 の 構 成 要 素 に つ い て 標 準 曲 線 を 得 た 。 標 準 曲 線 か ら の デ ー タ を 使 用 し て 、 μ m o l の タ ン パ ク 質 試 料 は 面 積 比 ( 試 料 : s t d ) に 対 し て プ ロ ッ ト し 、 線 形 フ ィ ッ ト (  $y = m x + c$  ) を 用 い て 、 ス ロ ー プ お よ び イ ン タ ー セ プ ト を 得 た 。 こ れ ら の 標 準 曲 線 に 関 わ る ス ロ ー プ お よ び イ ン タ ー セ プ ト の 値 は 、 反 応 の 前 お よ び 反 応 の 過 程 の 間 に 、 基 質 お よ び 生 成 物 濃 度 の 評 価 の 間 に 説 明 さ れ 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 い 、 残 留 タ ン パ ク 質 / 試 薬 の 存 在 を 検 証 し た 。 こ の 分 析 に 基 づ い て 、 オ ー ト サ ンプ ラ ー の シ ー ク エ ン ス は 、 も し あ れ ば 、 残 留 す る 構 成 要 素 の 除 去 の た め の 適 当 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 。 M S ス ペ ク ト ル は 、 ア ジ レ ン ト ( A g i l e n t ) マ ス ハ ン タ ー ( M a s s H u n t e r ) v B . 0 7 . 0 ソ フ ト ウ ェ ア を 使 用 し て 分 析 し た 。

【 0 3 0 3 】

【 表 3 】

表3. FKBP12についての標準曲線。スロープ=6.53、インターセプト=-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)	試料の比:Std
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

【 0 3 0 4 】

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アセスメントする代表的な実験において、K R A S G T P / G 1 2 c お よ び C 3 - ま た は C 4 - S L F リ ガ ン ド は 、

F K B P 1 2 の存在下または非存在下で、1 2 . 5 m M の H E P E S、p H 7 . 4、7 5 m M の N a C l、1 m M の M g C l<sub>2</sub>、3 % D M S O 中、2 μ M の K R A S、1 0 μ M の F K B P 1 2、1 0 μ M の C 3 - または C 4 - S L F の濃度で室温にて4時間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 K R A S の量の分析。表 4 において示すように、5 倍から 1 0 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。

【 0 3 0 5 】

【 表 4 】

表4. C3-およびC4-SLFの架橋効率を分析するMS

	C3-SLF		C4-SLF	
FKBP12	-	+	-	+
KRASへの連結%	9.6	47.5	7.0	69.8

【 0 3 0 6 】

質量分析と平行して、C 3 - または C 4 - S L F との架橋反応は、架橋反応をより高い濃度で設定した ( 6 0 μ M の K R A S、1 8 0 μ M の F K B P 1 2、および 1 8 0 μ M の C 3 - または C 4 - S L F ) を除いて、上記の同じ実験条件において、F K B P 1 2 の存在下または非存在下で、1 2 % S D S - P A G E を使用したゲルシフトアッセイに供し、これらは M M T S によってクエンチし、反応を終了させた。M S データと同様に、リガンド架橋効率は、F K B P 1 2 の存在下で有意にブーストされたが、これは C 4 - S L F についてより明白である ( 図 6 )。

【 0 3 0 7 】

実施例 5 : X 線分析によるプレゼンタータンパク質 / 標的タンパク質インターフェース構造の決定

このプロトコルは、F K B P 1 2 - C 2 H o l t - K R A S G T P / S 3 9 C の三元複合体の結晶化、およびこの三元複合体の結晶構造についての構造決定方法を記載する。

【 0 3 0 8 】

A . F K B P 1 2 - C 2 H o l t - K R A S G T P / S 3 9 C 三元複合体の結晶構造決定  
試薬 : 1 0 0 % D M S O 中のリガンド ( C 2 H o l t ) ( 自社製 )、F K B P 1 2 ( 自社製 )、K R A S G T P / S 3 9 C l i t e ( 自社製、G 1 2 V / S 3 9 C / C 5 1 S / C 8 0 L / C 1 1 8 S を含有する残基 1 ~ 1 6 9 )。

装置 : スーパーデックス ( S u p e r d e x ) 7 5 ( G E ヘルスケア ( G E H e a l t h c a r e ) )

実験プロトコル : C H o l t および F K B P 1 2 は、1 2 . 5 m M の H E P E S、p H 7 . 4、7 5 m M の N a C l 緩衝液、1 m M の M g C l<sub>2</sub>、2 % D M S O 中で 3 : 1 および 1 . 5 : 1 の過剰モルで K R A S G T P / S 3 9 C l i t e に加え、2 0 にて一晩、または 4 にて 3 6 ~ 7 2 時間インキュベートした。純粋な複合体は、1 2 . 5 m M の H E P E S、p H 7 . 4、7 5 m M の N a C l、および 1 m M の M g C l<sub>2</sub> 中で、スーパーデックス ( S u p e r d e x ) 7 5 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 ( 1 5 ~ 2 0 m g / m l での ) は、シットティングドロップ蒸気拡散法を使用して 2 0 にて結晶化スクリーニングに供した。結晶は、0 . 1 M の M E S、p H 6 . 5、2 0 ~ 2 2 % P E G 2 0 , 0 0 0 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、結晶は、1 5 % 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。回折データセットは先端放射光施設 ( A d v a n c e d P h o t o n S o u r c e ) ( A P S ) において集め、H K L プログラムで処理した。分子置換ソリューションは、F K B P 1 2 ( P D B - I D 1 F K D ) および K R A S ( P

DB-ID3GFT)の公表された構造を検索モデルとして使用して、CCP4スイートにおけるプログラムPHASERを使用して得た。それに続くモデル構成および精密化は、ソフトウェアパッケージCCP4およびCootを伴う標準的なプロトコルによって行った。

#### 【0309】

結果：FKBP12-C2Holt-KRASGTP/S39Cの全体的構造：結晶は、非対称単位でFKBP12およびKRASGTP/S39Cの1個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、およびKRASGTP/S39CのMet1からLys169を含んだ。このように得られた電子密度は、リガンドの配向およびコンホメーションを含む明確な結合モードを示す。タンパク質のシステイン、およ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連続的な電子密度が観察された。

10

#### 【0310】

C2Holtの結合に関わるKRASGTP/S39C残基(4 距離カットオフ)は、Glu37、Cys39、Leu56、およびMet67である。FKBP12への結合に関わるKRASGTP/S39C残基は、Glu3、Lys5、Ile36、Cys39、Tyr40、Arg41、Asp54、Glu63、Tyr64、Met67、およびArg73である。KRASGTP/S39Cの結合に関わるFKBP12残基は、Arg43、Lys53、Gln54、Glu55、Thr86、Pro89、Gly90、および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、およびPhe100である。

20

#### 【0311】

複合体の総埋込面積は、 $1,947 \text{ }^2$ である。KRASGTP/S39Cの埋込面積は、 $600 \text{ }^2$ であり、このうち、 $501 \text{ }^2$ は、FKBP12(83%)が寄与し、 $99 \text{ }^2$ は、C2Holt(17%)が寄与する。FKBP12の埋込面積は、 $762 \text{ }^2$ であり、このうち、 $500 \text{ }^2$ は、KRASGTP/S39C(66%)が寄与し、 $262 \text{ }^2$ は、C2Holtが寄与する(34%)。C2Holtの埋込面積は、 $584 \text{ }^2$ であり、このうち、 $132 \text{ }^2$ は、KRASGTP/S39Cが寄与し(23%)、 $452 \text{ }^2$ は、FKBP12が寄与する(77%)。KRASGTP/S39CおよびFKBP12の間のタンパク質-タンパク質インターフェースは、3個の分子間H結合を含む疎水性および極性相互作用の両方によって形成される。C2HoltおよびFKBP12の間の結合インターフェースは、疎水的相互作用が大きく寄与するが、またリガンドの3個のカルボニル基、ならびにFKBP12のTyr27、Ile57、およびTyr83の間の3個のH結合が寄与する。C2Holtは、設計( $99 \text{ }^2$ )によってKRASGTP/S39Cとの最小の接触を形成するが、KRASGTP/S39CのGlu37と1個のH結合を形成する。データ収集および最終構造の精密化統計は、下記の表5において列挙する。

30

#### 【0312】

B. KRASGDP/S39C/SFAC4DS/CypAc52S三元複合体の結晶構造決定

40

試薬：100% DMSO中のリガンド(SFAC4DS)(自社製)、CypAc52S(自社製)、KRASGDP/S39C lite(自社製、G12V/S39C/C51S/C80L/C118Sを含有する残基1~169)。

装置：スーパーデックス(Superdex)75(GEヘルスケア(GE Healthcare))

実験プロトコル：SFAC4DSおよびCypAc52Sは、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液、1 mMのMgCl<sub>2</sub>、2% DMSO中で2:1および2:1の過剰モルでKRASGDP/S39C liteに加え、20 にて一晩インキュベートした。純粋な複合体は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl、および1 mMのMgCl<sub>2</sub>中で、スーパーデックス(Superdex)75

50



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 (15 mg / ml での) は、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。結晶は、0.1 M のピス - Tris、pH 6.5、25% PEG 3350 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、結晶は、これを 40% の PEG とするためにさらなる PEG 3350 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。回折データセットはアドバンストライトソース (Advanced Light Source) (ALS) で集め、HKL プログラムで処理した。分子置換ソリューションは、CypA (PDB - ID 1CWA) および KRAS (PDB - ID 3GFT) の公表された構造を検索モデルとして使用して、CCP4 スイートにおけるプログラム PHASER を使用して得た。それに続くモデル構成および精密化は、ソフトウェアパッケージ CCP4 および COOT を伴う標準的なプロトコルによって行った。

10

#### 【0313】

結果: CypA<sub>525</sub> - SFAC4DS - KRAS<sub>GDP/539c</sub> の全体的構造: 結晶は、非対称単位での CypA<sub>525</sub> および KRAS<sub>GDP/539c</sub> の 1 個のヘテロ二量体を含有する (図 8)。モデルは、CypA の残基 Met 1 から Glu 165、および KRAS<sub>GDP/539c</sub> の Met 1 から Lys 169 を含んだ。このように得られた電子密度は、リガンドの配向およびコンホメーションを含めた明確な結合モードを示す。タンパク質のシステイン、およ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連続的な電子密度が観察された。

#### 【0314】

SFAC4DS の結合に関わる KRAS<sub>GDP/539c</sub> 残基 (4 距離カットオフ) は、Glu 3、Lys 5、Cys 39、Arg 41、Leu 52、Asp 54、Ile 55 および Leu 56 である。CypA<sub>525</sub> への結合に関わる KRAS<sub>GDP/539c</sub> 残基は、Glu 37、Asp 38、Cys 39、Arg 41、Gln 43、Leu 56、Ala 66、Met 67、Gln 70、および Thr 74 である。KRAS<sub>GDP/539c</sub> の結合に関わる CypA<sub>525</sub> 残基は、Arg 55、Ile 57、Arg 69、Asn 71、Thr 73、Ala 81、Ala 103、Arg 148、および Asn 149 である。SFAC4DS の結合に関わる CypA<sub>525</sub> 残基は、Arg 55、Phe 60、Met 61、Gln 63、Gly 72、Ala 101、Asn 102、Gln 111、Phe 113、および His 126 である。

20

#### 【0315】

この複合体の総埋込面積は、タンパク質 - タンパク質インターフェース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。計算のための無秩序領域を除いて、タンパク質 - タンパク質インターフェースにおける埋込面積は  $1,350 \text{ \AA}^2$  超であり、このうち、30% 超は、SFAC4DS ( $443 \text{ \AA}^2$ ) が寄与する。KRAS<sub>GDP/539c</sub> および CypA<sub>525</sub> の間のタンパク質 - タンパク質インターフェースは、2 個の分子間 H 結合を含む疎水性および極性相互作用の両方によって形成される。SFAC4DS および CypA の間の結合インターフェースは、疎水性およ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および N - H 基と、CypA<sub>525</sub> の残基 Arg 55、Gln 63、Asn 102、および His 126 との間に 6 個の H 結合が存在する。SFAC4D 40

30

#### 【0316】

C . PTP1B<sub>S187c</sub> / C3SLF / FKBP12 三元複合体の結晶構造決定  
試薬: 100% DMSO 中のリガンド (C3 - SLF) (自社製)、FKBP12 (自社製)、PTP1B<sub>S187c</sub> lite (自社製、C32S / C92V / C121S / S187C を含有する残基 1 ~ 169)。

装置: スーパーデックス (Superdex) 75 (GE ヘルスケア (GE Healthcare))、グリフォン (Gryphon) (アートロピンズインストルメンツ (A

50

rt Robbins Instruments))

実験プロトコル: C3SLFおよびFKBP12は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液、4% DMSO中で3:1の過剰モルでPTP1B<sub>S187C</sub>に比べ、4にて36~72時間インキュベートした。純粋な複合体は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4および75 mMのNaCl中、スーパーデックス(Superdex) 75カラム上の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(15 mg/mlでの)は、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。結晶は、0.2 Mの酢酸マグネシウム、20% w/v PEG 3350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、結晶は、25% PEG 400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。回折データセットは先端放射光施設(Advanced Photon Source)(APS)において集め、XDSプログラムで処理した。分子置換ソリューションは、FKBP12(PDB-ID 2PPN)およびPTP1B(PDB-ID 2NT7)の公表された構造を検索モデルとして使用して、CCP4スイートにおけるプログラムPHASERを使用して得た。それに続くモデル構成および精密化は、ソフトウェアパッケージCCP4およびCootを伴う標準的なプロトコルによって行った。

10

#### 【0317】

結果: FKBP12-C3SLF-PTP1B<sub>S187C</sub>の全体的構造: 結晶は、非対称単位でFKBP12-C3SLF-PTP1B<sub>S187C</sub>の2個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、およびPTP1B<sub>S187C</sub>のGlu6からPhe280を含んだ。このように得られた電子密度は、リガンドの配向およびコンホメーションを含めた明確な結合モードを示す。タンパク質のシステイン、およ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連続的な電子密度が観察された。

20

#### 【0318】

複合体の総埋込面積は、1,042<sup>2</sup>である。PTP1B<sub>S187C</sub>の埋込面積は、427<sup>2</sup>である。C3-SLFの埋込面積は、615<sup>2</sup>である(図9B)。PTP1B<sub>S187C</sub>およびFKBP12の間のタンパク質-タンパク質インターフェースは、疎水性および極性相互作用の両方によって形成される。

#### 【0319】

30

D.MCL1<sub>S245C</sub>/C3SLF/FKBP52三元複合体の結晶構造決定  
試薬: 100% DMSO中のリガンド(C3-SLF)(自社製)、FKBP52(自社製、残基1~140)、MCL1<sub>S245C</sub> lite(自社製、S245C/C286Sを含有する残基172~327)。

装置: スーパーデックス(Superdex) 75(GEヘルスケア(GE Healthcare))、グリフォン(Gryphon)(アートロピンズインストルメンツ(Art Robbins Instruments))

実験プロトコル: C3SLFおよびFKBP52は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4、75 mMのNaCl緩衝液、2% DMSO中、3:1の過剰モルでMCL1<sub>S245C</sub> liteと混合し、4にて24~48時間インキュベートした。純粋な複合体は、12.5 mMのHEPES、pH 7.4および75 mMのNaCl中、スーパーデックス(Superdex) 75カラム上の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(15 mg/mlでの)は、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。結晶は、2.1 Mの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、結晶は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 分解能回折データセットは先端放射光施設(Advanced Photon Source)(APS)において測定し、XDSプログラムで処理した。分子置換ソリューションは、FKBP52(PDB-ID 1N1A)およびPTP1B(PDB-ID 3MK8)の公表された構造を検索モデルとして使用して、CCP4スイートにおけるプログラムPHASERを使用し

40

50

て得た。それに続くモデル構成および精密化は、ソフトウェアパッケージ C C P 4 および C O O T を伴う標準的なプロトコルによって行った。

【 0 3 2 0 】

結果：結晶は、非対称単位で M C L 1 S 2 4 5 C / C 3 S L F / F K B P 5 2 の 1 個の複合体分子を含有する（図 1 0）。このように得られた電子密度は、リガンドの配向およびコンホメーションを含めた 2 つのタンパク質の間の明確な結合を明らかにした。タンパク質のシステイン、およ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連続的な電子密度が観察された。複合体の埋込面積は 1 , 4 1 0<sup>2</sup> であり、このうち、概ね 6 0 % は、F K B P 5 2 ( 8 0 4<sup>2</sup> ) が寄与し、概ね 4 0 % は、C 3 - S L F ( 6 0 6<sup>2</sup> ) が寄与する。制限された分解能によって、タンパク質 - タンパク質およびタンパク質 - 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。

【 0 3 2 1 】

【表 5】

表5. データ収集および精密化統計

	構造A	構造B	構造C	構造D
分解能[A]	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 <sub>結晶</sub> [%]	18.9	17.9	23.0	33.2
R <sub>遊離</sub> [%] <sup>1</sup>	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
理想的な幾何学的形状からの偏差: <sup>2</sup>				
結合距離[Å] <sup>3</sup>	0.007	0.011	0.004	0.010
結合角[°]	1.33	1.49	0.87	1.30
ラマチャンドラプロット: <sup>3</sup>				
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	0.3	1.8	0.4

<sup>1</sup>試験セットは、測定した反射の5%を含有する

<sup>2</sup>幾何学的目標値からの最小2乗偏差

<sup>3</sup>ランページ(RAMPAGE)で計算

【 0 3 2 2 】

実施例 6：T R - F R E T による複合体形成の決定

T R - F R E T 技術 ( L A N C E、パーキンエルマー ( P e r k i n E l m e r ) ) 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 およびタンパク質 2 / タグ B (ここで、A および B は、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ ( G S T )、ヘキサヒスチジン ( H i s 6 )、F L A G、ピオチン - a v i、M y c、およびヘマグルチニン ( H A ) のいずれかであり得る) の二元会合を検出する標準的方法である。この実施例において、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 および標的タンパク質 / タグ B の混合物は、本発明の化合物を含有する 3 8 4 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、および抗融合タグAまたはBアロフィコシアニンアクセプターまたはユーライト (U l i g h t) 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を使用してエンビジョン (EnV i s i o n) マイクロプレートリーダー (パーキンエルマー (P e r k i n E l m e r)) 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。

#### 【0323】

TR - FRETによるCYP A - 化合物3 - K R A S G 1 2 C - G T P複合体形成の決定  
A v iタグ付きシクロフィリンAおよびH i sタグ付きK R A S G 1 2 C - G T Pは増加する濃度のリガンド (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H i s E u - W 1 0 2 4およびストレプトアビジンA P C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、エンビジョン (EnV i s i o n) マイクロプレートリーダー (パーキンエルマー (P e r k i n E l m e r))、Ex 320 nm、Em 665 / 615 nm) 上で読み取る。プレゼンターおよび標的タンパク質を伴わないカウンタースクリーンをまた実行して、化合物単独の寄与を除外する。

#### 【0324】

##### 試薬および機器

・ H i s 6 - K R A S G 1 2 C - G T P (自社製; 残基1 ~ 169); P B S緩衝液、p H 7 . 4 中1 . 2 m M

・ A v i - C Y P A (自社製; 残基1 ~ 165); P B S緩衝液、p H 7 . 4 中556 μ M

・ 抗H i s E u - W 1 0 2 4 (パーキンエルマー (P e r k i n E l m e r))

・ ストレプトアビジンA P C (パーキンエルマー (P e r k i n E l m e r))

・ リガンド (W 2 1 4 8 7)、100% DMSO中10 m M

・ エンビジョン (EnV i s i o n) (パーキンエルマー (P e r k i n E l m e r))

・ 8チャンネル少容量カセットを伴うコンビ (C o m b i) マルチドロップ (M u t i d r o p) 液体ディスペンサー

・ 384ウェルプロキシプレート (P r o x i P l a t e) (ブラック)

##### 実験プロトコル

1 . モスキート (M o s q u i t o) を使用して、100 n L / ウェルの化合物 (DMSO中変化する濃度) を384ウェルブラックプロキシプレート (P r o x i P l a t e) 中に分注し、アッセイレディプレート (A R P) を作製する。

#### 【0325】

2 . 40 m MのH e p e s、p H 8 . 0、200 m MのN a C l、2 m MのM g C l<sub>2</sub>、0 . 1 % B S Aおよび0 . 004 % T w e e n - 20を含有する2 × アッセイ緩衝液を作製する。

#### 【0326】

3 . 1 × アッセイ緩衝液中で2 × P R E - M I X A : 100 n MのH i s 6 - K R a s G 1 2 C - G T P (1 ~ 169) および1000 n MのA v i - C y p A (1 ~ 165) を作製する。

#### 【0327】

4 . マルチドロップ (M u t i D r o p) コンビ (C o m b i) を使用して、2 × P R E - M I X AをA R P、5 μ l / ウェル中に分注する。室温にて15分インキュベートする。

#### 【0328】

5 . 2 × P R E - M I X B : 10 n Mの抗H i s E u - W 1 0 2 4および40 n MのS A A P Cを作製する。

10

20

30

40

50

6. マルチドロップ (Multi Drop) コンビ (Combi) を使用して、2 × P R E - M I X B を A R P、5 μ l / ウェル中に分注する。コンビ (Combi) 上で短時間振盪し、室温で 60 分インキュベートする。

【0329】

7. エンビジョン (EnVision) 上で読み取る (Ex: 320 nm; Em1: 615 nm; Em2: 665 nm)。

8. ドットマティクス (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ついての EC50 値を決定する。

【0330】

結果：結合曲線 (図 11) は、2.1 μ M の計算した EC50 値を伴う、C Y P A - 化合物 3 - K R A S G 1 2 C - G T P 三元複合体の化合物 3 に依存する複合体形成を示す。

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

アルファスクリーン (AlphaScreen) 技術 (パーキンエルマー (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 およびタンパク質 2 / タグ B (ここで、A および 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 (His<sub>6</sub>)、FLAG、ピオチン - avi、Myc、およびヘマグルチニン (HA) のいずれかであり得る) の二元会合を検出する標準的方法である。この実施例において、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 および標的タンパク質 / タグ B の混合物は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られ、15 分間インキュベートする。抗融合タグ A または B アルファスクリーン (AlphaScreen) ドナービーズおよび抗融合タグ A または B アルファスクリーン (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。アルファスクリーン (AlphaScreen) シグナルは、励起 = 680 nm、発光 = 585 nm を使用してエンビジョン (EnVision) マイクロプレートリーダー (パーキンエルマー (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アルファスクリーン (AlphaScreen) シグナルの増加を引き出すものと同定される。

【0331】

アルファ L I S A による C Y P A - 化合物 3 - K R A S G 1 2 C - G T P 複合体形成の決定

A v i タグ付きシクロフィリン A および H i s タグ付き K R A S G 1 2 C - G T P は増加する濃度のリガンド (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およ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 L I S A (AlphaLISA) シグナルは、エンビジョン (EnVision) マイクロプレートリーダー (パーキンエルマー (Perkin Elmer))、Ex 680 nm、Em 615 nm) 上で読み取る。プレゼンターおよび標的タンパク質を伴わないカウンタースクリーンをまた実行して、化合物単独の寄与を除外する。

【0332】

試薬および機器：

・ His<sub>6</sub> - K R A S G 1 2 C - G T P (自社製；残基 1 ~ 169)；P B S 緩衝液、p H 7.4 中 1.2 mM

・ A v i - C Y P A (自社製；残基 1 ~ 165)；P B S 緩衝液、p H 7.4 中 556 μ M

・ ニッケルキレートドナービーズ (パーキンエルマー (Perkin Elmer))  
・ ストレプトアビジンアクセプタービーズ (パーキンエルマー (Perkin Elmer))

・ リガンド (W21487)、100% DMSO 中 10 mM

・ エンビジョン (EnVision) (パーキンエルマー (Perkin Elmer))

10

20

30

40

50

))

- ・ 8チャンネル少容量カセットを伴うコンビ (C o m b i) マルチドロップ (M u t i d r o p) 液体ディスペンサー
- ・ アルファプレート (a l p h a P l a t e) - 384プレート (ホワイト)

実験プロトコル:

1. モスキート (M o s q u i t o) を使用して、100 nL / ウェルの化合物 (D M S O 中変化する濃度) を 384 ウェルブラックプロキシプレート (P r o x i P l a t e) 中に分注し、アッセイレディプレート (A R P) を作製する。

【0333】

2. 40 mM の H e p e s、pH 8.0、200 mM の N a C l、2 mM の M g C l<sub>2</sub> および 0.004 % T w e e n - 20 を含有する 2 x アッセイ緩衝液を作製する。 10

3. 1 x アッセイ緩衝液中で 2 x P R E - M I X A : 300 nM の H i s 6 - K R a s G 1 2 C - G T P (1 ~ 169) および 300 nM の A v i - C y p A (1 ~ 165) を作製する。

【0334】

4. マルチドロップ (M u t i D r o p) コンビ (C o m b i) を使用して、2 x P R E - M I X A を A R P、5 μl / ウェル中に分注する。室温にて 60 分インキュベートする。

【0335】

5. 2 x P R E - M I X B : 30 μg / ml のストレプトアビジンアクセプタービーズおよび 30 μg / ml のニッケルキレートドナービーズを作製する。 20

6. マルチドロップ (M u t i D r o p) コンビ (C o m b i) を使用して、2 x P R E - M I X B を A R P、5 μl / ウェル中に分注する。コンビ (C o m b i) 上で短時間振盪し、室温で 60 分インキュベートする。

【0336】

7. エンビジョン (E n V i s i o n) 上で読み取る (E x : 680 nm ; E m 1 : 615 nm)。

8. ドットマティクス (D o t m a t i c s) 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ついての E C 50 値を決定する。 30

【0337】

結果: 結合曲線 (図 12) は、0.99 μM の計算した E C 50 値を伴う、C Y P A - 化合物 3 - K R A S G 1 2 C - G T P 三元複合体の化合物 3 に依存する複合体形成を示す。

【0338】

実施例 8 : 等温滴定熱量測定による複合体形成の決定

等温滴定熱量測定 (I T C) は、2 つのタンパク質、またはリガンドへのタンパク質の二元相互作用と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<sub>a</sub>)、反応化学量論 (N)、および結合エンタルピーの変化 (H) の正確な決定を可能とする。ギブスエネルギー変化 (G) およびエントロピー変化 (S) はまた、関係:  $G = -RT \ln K_a = H - TS$  (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ができる。この実施例において、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。 40

【0339】

I T C による F K B P 1 2 - 化合物 1 および C E P 2 5 0 の間の結合の速度論および熱力学の決定

試薬: 100 % D M S O 中の化合物 1 および化合物 2 (自社製)、タンパク質緩衝液 (10 mM の H E P E S、pH 7.5、75 mM の N a C l、0.5 mM の T C E P)、アッセイ緩衝液 (タンパク質緩衝液 + 1 % D M S O)、F K B P 1 2 (自社製)、C E P 2 5 0<sub>29.4</sub> (自社製、残基 1982 ~ 2231) および C E P 2 5 0<sub>11.4</sub> (自社製、 50

残基 2 1 3 4 ~ 2 2 3 1 )。

【 0 3 4 0 】

装置：MicroCal（商標）ITC<sub>200</sub>（GEヘルスケア（GE Healthcare））。機器パラメータは、表 6 において示す。

【 0 3 4 1 】

【表 6】

表6. 等温滴定熱量測定機器パラメータ

実験デバイス	MicroCal™ ITC <sub>200</sub> (GE Healthcare)
試料セル容量(μl)	270
インジェクター容量(μl)	40
実験パラメータ	
注入の総数	19
セル温度(°C)	25
参照電力(μ Cal/s)	5
初期遅延(s)	200
攪拌スピード(rpm)	750
注入パラメータ	
容量(μl)	2
持続期間(s)	4
スペーシング(s)	170-200
フィルター時間(s)	5
フィードバックモード/ゲイン	高

【 0 3 4 2 】

実験プロトコル：FKBP12 ストック溶液をアッセイ緩衝剤で 10 μM に希釈する（最終 1 % DMSO）。化合物を 20 μM になるように FKBP12 に添加し（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 装置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剤中 50 μM になるように希釈し、20 μM 化合物を追加し（最終 1 % DMSO）、その後、注入シリンジに充填する。シリンジから反応セルに注入する際、操作アーチファクトおよび滴定剤の希釈に伴う熱を決定するために、化合物の不在下で対照実験も行う。より詳細な実験パラメータは、以下の表 7 に示される。

【 0 3 4 3 】

【表 7】

表7. 最終タンパク質およびリガンド濃度

実験	セル含量	シリンジ含量	リガンド	DMSO濃度(%)
3	FKBP12, 10 μM	CEP250 <sub>29.2</sub> , 50 μM	なし	1.0
4	FKBP12, 10 μM	CEP250 <sub>11.4</sub> , 50 μM	なし	1.0
5	FKBP12, 10 μM	CEP250 <sub>29.2</sub> , 118 μM	化合物1b, 20 μM	1.0
6	FKBP12, 10 μM	CEP250 <sub>29.2</sub> , 118 μM	化合物2, 20 μM	1.0
7	FKBP12, 10 μM	CEP250 <sub>11.4</sub> , 68 μM	化合物1b, 20 μM	1.0
8	FKBP12, 10 μM	CEP250 <sub>11.4</sub> , 68 μM	化合物2, 20 μM	1.0

10

20

30

40

50

## 【 0 3 4 4 】

データフィッティング：以下の手順に従ってオリジン ( O r i g i n ) I T C 2 0 0 ソフトウェアによりデータのフィッティングを行った。

1 ) 生データの読み込み。

## 【 0 3 4 5 】

2 ) 「 m R a w I T C 」：積分ピークおよびベースラインを調整してすべてのピークを積分する。

3 ) 「 H 」 - データ管理：不良データを除去し ( 注入 # 1 および他のアーチファクト )、直線を差し引く ( バックグラウンド除去 )。

## 【 0 3 4 6 】

4 ) 「 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、 2 がさらに減少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、「 d o n e 」で終了する ( パラメータ N、K a、および はフィッティングに基づいて計算する )。

## 【 0 3 4 7 】

結果：F K B P 1 2 - 化合物 1 および F K B P 1 2 - 化合物 2 二元複合体と C E P 2 5 0 との結合の I T C 測定は、以下の表 8 および図 1 3 にまとめる。全体として、C E P 2 5 0 1 1 . 4 および C E P 2 5 0 2 9 . 4 に結合する F K B P 1 2 - 化合物 1 および F K B P 1 2 - 化合物 2 二元複合体のデータは、類似の相互作用パラメータを示す。K d 値はすべての組合せで類似していた。すべての相互作用は、ほとんど同一の熱力学的プロファイルを示し、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 \* A S 項は正であり、ギブズ自由エネルギーに寄与しない )。すべての相互作用に対する結合化学量論比は、N = 0 . 5 ~ 0 . 6 であり、C E P 2 5 0 1 1 . 4 / 化合物 1 / F K B P 1 2 の結晶構造で実証されるように 2 種の F K B P 1 2 分子に結合する 1 種の C E P 2 5 0 ホモ二量体に対して 1 : 2 の結合比を支持する。

## 【 0 3 4 8 】

## 【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	Kd ( $\mu$ M)*	$\Delta H$ (kJ* $\text{mol}^{-1}$ )**	- T* $\Delta S$ (kJ* $\text{mol}^{-1}$ )***	$\Delta H$ (kJ* $\text{mol}^{-1}$ )****
3	298	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	298	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
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<sub>d</sub>(K<sub>a</sub>=1/K<sub>d</sub>から計算)

\*\*  $\Delta H$

\*\*\* T\* $\Delta S$ (-T $\Delta S$ = $\Delta G$ - $\Delta H$ から計算)

\*\*\*\*  $\Delta G = -RT \ln K_a = RT \ln K_d$

## 【 0 3 4 9 】

実施例 9：表面プラズモン共鳴によるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の速度論の決定

表面プラズモン共鳴 ( S P R ) は、2つのタンパク質、またはリガンドへのタンパク質の二元相互作用と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、二元相互作用ペアの 1 つの構成要素は、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されている。次いで、増加する濃度の第 2 の構成要素 ( 分析



物)を活性表面上に一定の時間の間注入する。会合相の間のSPRシグナル(共鳴単位、RUで表す)の増加、および解離相の間の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、関連する $K_D$ 、 $K_a$ 、 $K_d$ 値を決定することができる。この実施例において、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ついての速度論を測定するために使用され、ここで、(i)コンジュゲートは、融合タグを介してチップ上に固定化されており、表面上にプレゼンタータンパク質を注入するか、または(ii)プレゼンタータンパク質は、融合タグを介してチップ上に固定化されており、表面上にコンジュゲートを注入する。

#### 【0350】

SPRによるFKBP12-化合物1およびCEP250の間の結合の速度論の決定

10

このプロトコルは、固定化されたFKBP12-化合物1の二元複合体(リガンド)へのCEP250(分析物)の結合についての速度論( $K_D$ 、 $K_a$ 、 $K_d$ )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。

#### 【0351】

試薬: 100% DMSO中の化合物1(自社製)、10×HBS-P+緩衝液(GEヘルスケア(GE Healthcare)BR-1006-71)、アッセイ緩衝液(1×HBS-P+緩衝液、1%DMSO、1μMの化合物1)、12×HISタグ付きFKBP12(自社製)、CEP250<sub>29.2</sub>(残基1982~2231)およびCEP250<sub>11.4</sub>(残基2134~2231)(自社製)。

#### 【0352】

20

装置: BIACORE(商標)X100(GEヘルスケア(GE Healthcare))

装置: NTAセンサーチップ(GEヘルスケア(GE Healthcare)BR-1000-34)

実験プロトコル: 実験は25℃にて行う。12×HISタグ付きFKBP12のストック溶液は、1μMの化合物1を含有するアッセイ緩衝液中で100nMに希釈する(最終1%DMSO)。概ね200~400RUのFKBP12は、活性化NTAチップの2つのフローセルの1つ上に固定化されている。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されない。1μMの化合物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た様々な濃度のCEP250(1nM~1μM範囲)は、10μl/分の流量でFKBP12表面および参照表面上に注入する。表面は、350mMのEDTAを伴う分析物の注入の間に再生成される。

30

#### 【0353】

データフィッティング: データフィッティングのためにピアエバルエーション(BiaEvaluation)ソフトウェアプログラムを使用する。全てのデータは、参照フローセルおよび緩衝液注入の両方に対して参照分を差し引く。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。

#### 【0354】

結果: SPRセンサーグラムは、図14において示す。5.4nMおよび0.29nMの解離定数( $K_D$ )は、それぞれ、CEP250<sub>11.4</sub>およびCEP250<sub>29.2</sub>へのFKBP12/化合物1の結合について決定した。

40

#### 【0355】

実施例10: バイオ層インターフェロメトリーによるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の速度論の決定

バイオ層インターフェロメトリー(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の二元相互作用と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、二元相互作用ペアの1つの構成要素は、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ている。次いで、増加する濃度の第2の構成要素(分析物)は、バイオセンサーチップ上で一定の時間の間注入する。会合相の間のBLIシグナル(光学的厚さ、nmで表す)の増加、および解離相の間のBLIシグ

50

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、関連する $K_D$ 、 $K_a$ 、 $K_d$ 値を決定することができる。この実施例において、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ついての速度論を測定するために使用され、ここで、(i) 融合タグを介してチップ上にコンジュゲートが固定化されており、表面上にプレゼンタータンパク質を注入するか、または(ii) 融合タグを介してチップ上にプレゼンタータンパク質が固定化されており、表面上にコンジュゲートを注入する。

#### 【0356】

B L I による C Y P A - 化合物 3 および K R A S G 1 2 C - G T P の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 C Y P A - 化合物 3 二元複合体 (リガンド) への K R A S G 1 2 C - G T P (分析物) の結合についての解離定数 ( $K_D$ ) を決定する方法として バイオ層インターフェロメトリー (B L I) を利用する。

#### 【0357】

試薬: 100% DMSO 中の化合物 3 (自社製)、フォルテバイオ (F o r t e B i o) 速度論緩衝液 (フォルテバイオ (F o r t e B i o) 株式会社、メンローパーク、CA)、アッセイ緩衝液 (速度論緩衝液、1% DMSO、2  $\mu$ M の化合物 3)、A v i タグ付き C Y P A (自社製)、K R A S G 1 2 C - G T P (残基 1 ~ 169) (自社製)。装置: オクテットレッド (O c t e t R e d) 96 機器 (フォルテバイオ (F o r t e B i o) 株式会社、メンローパーク、CA)

装置: ストレプトアビジン (S A) バイオセンサー (フォルテバイオ (F o r t e B i o) )

実験プロトコル: ストレプトアビジン (S A) バイオセンサーは、0.6 nm の充填シグナルまで 10  $\mu$ M の A v i - C Y P A 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、長期に亘る安定性、およびベースラインドリフトが存在しないことを示した。三元複合体の形成は、1:2 希釈系列で 200  $\mu$ M から開始する K R A S G 1 2 C - G T P タンパク質濃度を伴う用量応答実験において評価した。陰性対照について、A v i - C Y P A タンパク質でコーティングしたセンサーは、スクリーニング緩衝液 (2  $\mu$ M の化合物 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 (s e n s o g r a m s) は記録および分析した。

#### 【0358】

データフィッティング: フォルテバイオ (F o r t e B i o) オクテットレッド (O c t e t R E D) 機器上の分析は、フォルテバイオ (F o r t e B i o) ソフトウェアを使用して行った。分析は、非特異的結合、バックグラウンド、およびシグナルドリフトを説明し、ウェルベースおよびセンサー可変性を最小化させる。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 ( $K_D$ ) が決定された。

#### 【0359】

結果: センソグラム (S e n s o g r a m) および定常状態フィッティング曲線は、図 15 において示す。44  $\mu$ M の解離定数 ( $K_D$ ) は、K R A S G 1 2 C - G T P への C Y P A / 化合物 3 の結合について決定した。

#### 【0360】

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)。

#### 【0361】

実験プロトコル: H E K 2 9 3 T 細胞ライセートは、氷上の超音波処理 (20% パワーで 4、10 秒パルス) を使用して、40 mM の H E P E S、pH 7.3、120 mM の N a C l、2 mM の M g C l<sub>2</sub>、2 mM の C a C l<sub>2</sub>、0.5% オクチル - b - グルコシド、および E D T A 非含有プロテアーゼ阻害剤カクテル (ロシュ (R o c h e)) からなる溶解緩衝液を使用して調製した。ライセートは遠心分離によって最初に清浄にしたが、このように得られた上清は氷上の 0.2 mm のシリンジフィルターを通過させる。N 末端ビ

10

20

30

40

50

オチン標識 F K B P 1 2 は、4 m M の最終濃度まで 5 0 0 m l のライセートに加え、ピペット処理によって混合し、次いで、化合物を 1 0 m M の最終濃度までに加え、反応物はピペット処理によって混合した。6 0 m l の 5 0 % 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）を加えたが、反応は 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の後、樹脂を穏やかにペレット化し、添加、遠心分離、および吸引によって氷上の 1 m l の溶解緩衝液で 4 回洗浄し、次いで、同じ物理的様式で、洗剤を伴わない 1 m l 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は、H E P E S 緩衝液中の 8 M の尿素、p H 8 . 0 を使用して樹脂から溶出させ、1 0 0 m M の H E P E S 、p H 8 . 0 で 7 M の尿素に希釈し、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 3 7 にて 2 時間添加した。次に、試料を 1 0 0 m M の H E P E S 、p H 8 . 0 を使用して 0 . 8 M の尿素に希釈し、トリプシンを加え、試料をさらに 1 6 時間 3 7 にて消化させた。消化が完了した後、C 1 8 S P E フィルターを使用して L C - M S / M S 分析のために試料を調製し、このフィルターの上に、試料を充填し、洗浄し、溶出させ、スピードヴァク（s p e e d - v a c）において乾燥させ、L C - M S / M S 分析のために 1 0 m l の 5 % アセトニトリル、5 % ギ酸緩衝液に最終的に懸濁させた。L C - M S / M S 分析は、トップ 2 0 データ依存型取得方法、および H P L C のための 8 ~ 3 5 % アセトニトリル勾配を使用して、サーモ - フィッシャー（T h e r m o - F i s h e r）L T Q - ベロス - プロオービトラップ（V e l o s - P r o O r b i T r a p）質量分析計上で行った。シークエスト（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たが、同定したタンパク質は、候補標的タンパク質を同定するために対照試料（D M S O のみ）と比較する。

10

20

#### 【 0 3 6 2 】

結果：上記のプロトコルを使用して、> 1 0 0 個の標的タンパク質が、架橋化合物の存在下でプレゼンタータンパク質に結合することができると同定されてきた。同定された標的タンパク質は、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、および種々のタンパク質結合タンパク質を含む。

#### 【 0 3 6 3 】

実施例 1 2：蛍光偏光によるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の決定

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き、これは分子旋光度と反比例する偏光の程度を伴って光を発光するという観察に基づいている。小分子は励起状態の間に急速に回転し、発光によって、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、したがって、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の標識リガンドの相互作用を測定するために使用することができ、かつ直接および競合結合アッセイの基礎を提供する。この実施例において、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、かつ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る。

30

#### 【 0 3 6 4 】

F P による C y p A：C 3 D S：K R A S 複合体形成の決定

40

試薬：1 0 0 % D M S O 中の C 3 D S（自社製）、タンパク質緩衝液（1 2 . 5 m M の H E P E S、p H = 7 . 4、1 m M の M g C l<sub>2</sub>）、アッセイ緩衝液（2 5 m M の H E P E S、p H 7 . 3、0 . 0 0 2 % T w e e n 2 0、0 . 1 % B S A、1 0 m M の N a C l、1 m M の M g C l<sub>2</sub>）、C Y P A（自社製）、M a n t - G M P - P N P 充填 K R A S（1 ~ 1 6 9 残基）。

#### 【 0 3 6 5 】

装置：スペクトラマックス（S p e c t r a M a x）

実験プロトコル：K R A S ストック溶液は、アッセイ緩衝液（最終 1 % D M S O）中で 0 . 8 μ M の最終濃度まで充填する。化合物（C 3 D S）は 1 0 μ M の最終濃度までに加え、反応混合物は 3 8 4 ウェルコスター（C o s t a r）ブラックプレートに分注する。

50

C Y P Aはプレートのウェル中に段階希釈し、室温にて15分間インキュベートする。化合物の非存在下での対照実験はまた、化合物の非存在下でのK R A SへのC Y P Aの会合を決定するために実行する。反応混合物は355nmにおいて励起し、発光シグナルは455nmにおいて記録する。シグナルは垂直平面および平行平面において測定し、偏光は下記の等式を使用して記録する。

【0366】

$$F P \text{ (偏光単位} \times 10^{-3}) = \text{シグナル (平行)} - \text{シグナル (垂直)} / [\text{シグナル (平行)} + \text{シグナル (垂直)}]$$

結果：代表的な曲線は図16において示し、EC50 (K R A SのF Pシグナルを50%増進するのに必要とされる濃度)を列挙する表は下記で列挙する。曲線は4パラメータ式にフィットさせたが、得られたEC50は、C Y P AおよびK R A Sの間の結合を増進させることについてのリガンドC3DSの効果を示す。

【0367】

【表9】

	CypA:Kras	CypA:C3DS:Kras
EC50	30 $\mu$ M	2.3 $\mu$ M

【0368】

実施例13：核磁気共鳴によるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の決定

核磁気共鳴 (NMR) 分光法は、三次元構造を解明し、かつタンパク質およびタンパク質 - リガンド複合体のダイナミクスを研究するために使用される技術である。さらに、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<sup>1</sup>H - <sup>15</sup>N TROSY - HSQCスペクトル)、およびリガンド (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、および2D<sup>1</sup>H - <sup>15</sup>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ついての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リガンド結合の弱い、中間の、および強い親和性を研究することができる。この情報は既存の構造的、動的、および速度論情報に直接連結させることができる。この実施例において、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結合 (例えば、非共有結合性もしくは共有結合性) を示すために使用される。

【0369】

溶液MR分光法による三元複合体におけるK R A S (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のT R I S - d<sub>11</sub>、50mMのN a C l、pH7.0、1mMのT C E P - d<sub>16</sub>、1mMのM g C l<sub>2</sub>)、K R A SのNMR試料中の添加物 (93% H<sub>2</sub>Oおよび7% D<sub>2</sub>O中の100  $\mu$ MのD S S)、アッセイ緩衝液 (DMSO (5%) 中のタンパク質緩衝液 + 増加する当量の薬物)、GMP - <sup>15</sup>N - K R A S (G12C) - 16 (N - H i s、残基1 ~ 169、自社製)、非標識 (U L) シクロフィリン (C Y P A；残基1 ~ 165) (自社製)。

【0370】

装置：5mmのC P T C I<sup>1</sup>H - <sup>13</sup>C / <sup>15</sup>N / D Z - G R D Z 4 4 9 0 9 / 0 0 2 6 凍結探針 (ブルカー (B r u k e r)) を備えたブルカー (B r u k e r) アヴァン

ス ( A v a n c e ) 8 0 0 M H z 分光計。高精度の 5 m m N M R チューブは、これらの実験において使用する。

#### 【 0 3 7 1 】

N M R データプロセッシングおよび分析：プロセッシングのためにトップスピン ( T o p s p i n ) v 3 . 1 および N M R P i p e / N M R D r a w、ならびにデータ分析のために C C P N M R 「分析」プログラムを実行するリナックス ( L i n u x ) コンピュータ。

#### 【 0 3 7 2 】

実験プロトコル：タンパク質緩衝液中の 0 . 7 2 m M の G M P -  $^{15}N$  - K R A S ( G 1 2 C ) - 1 6 ストック溶液は、6 0 0  $\mu$  l ( N M R 添加物を含めた ) 中の 0 . 1 8 m M の N M R 試料を調製するために使用した。D S S は、化学シフト参照のための内部標準として使用した ( 0 . 0 p p m での  $^1H$  ピーク ) 。  $^{15}N$  K R A S の 2 D  $^1H$  -  $^{15}N$  T R O S Y - H S Q C スペクトルを集めた ( データサイズ、2 0 4 8  $\times$  1 2 8 ) 。タンパク質緩衝液中の 1 当量 ( 0 . 1 8 m M ) の C Y P A は、( 0 . 4 m M のストック溶液から ) N M R 試料中に加え、1 0 分間攪拌した。最終 N M R 試料容量は、6 0 0  $\mu$  l に維持した。二元複合体 (  $^{15}N$  - K R A S + U L - C Y P A ) の 2 D  $^1H$  -  $^{15}N$  T R O S Y - H S Q C スペクトルは、他の取得パラメータを同じに維持しながら集めた ( データサイズ 2 0 4 8  $\times$  1 2 8 ) ( K R A S  $^1H$  -  $^{15}N$  相関クロスピークのみは、スペクトルにおいて可視である ) 。1 0 0 % D M S O 中の 2 0 m M の化合物 3 のストック溶液は、N M R 滴定のために使用した。N M R 試料中に化合物 3 を逐次的に加え、二元複合体 (  $^{15}N$  - K R A S + U L - C Y P A ) の N M R 試料中で (  $^{15}N$  - K R A S 濃度のそれに対して ) その 0 . 5 当量、1 . 0 当量、2 . 5 当量、および 5 . 0 当量を得た。各段階において、取得パラメータを同じに維持しながら、6 0 0  $\mu$  l の試料容量を維持した。化合物 3 添加の各段階において、2 D  $^1H$  -  $^{15}N$  T R O S Y - H S Q C スペクトルは、K R A S 残基の化学シフト摂動 ( C S P ) を調査するために取得した。全てのスペクトルは、互いに重ねた。それぞれの化合物 3 滴定ポイントにおける有効な C S P は、二元複合体 ( K R A S + C Y P A ) に対する三元複合体 ( K R A S + C Y P A + 化合物 3 ) における K R A S の各残基の化学シフトの差異を使用して決定する。それに続いて、各 K R A S 残基の加重平均化学シフト ( 加重 ) は、下記の式を使用して決定する：

$$\text{加重} = [ ( \text{ } ^1H ) ^2 + ( \text{ } ^{15}N / 5 ) ^2 ] ^{1 / 2}$$

総平均から 1 標準偏差超の 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。別々の滴定実験において、本発明者らは、D M S O 当量を逐次的に加え ( 上記の実験におけるのと同等の溶媒濃度を満たすため ) 、D M S O 添加からの寄与を減算することによって、二元複合体 ( K R A S + C Y P A ) に対する 2 D  $^1H$  -  $^{15}N$  T R O S Y - H S Q C スペクトルを集めた。第 2 の対照実験において、本発明者らは、( C Y P A の非存在下で ) 異なる当量において化合物 3 で滴定した  $^{15}N$  - K R A S の一連の 2 D  $^1H$  -  $^{15}N$  T R O S Y - H S Q C スペクトルを集めた。

#### 【 0 3 7 3 】

有効な C S P は、作表および分析する。K R A S の薬物結合残基 ( C Y P A の存在下 ) は、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。

実験およびプロセッシングパラメータ：

スペクトルデータサイズ：2 0 4 8 (  $^1H$  次元 )  $\times$  1 2 8 (  $^{15}N$  次元 )

スキャンの数：4

温度：2 9 8 K

クワドラチャ検出モード：D Q D (  $^1H$  ) およびエコー - アンチエコー ( E c h o - A n t i E c h o ) (  $^{15}N$  )

データサイズは、間接次元内で前向後向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 回ゼロ補充することによって外挿した。

#### 【 0 3 7 4 】

結果：K R A S G 1 2 C - G T P の 2 D  $^1H$  -  $^{15}N$  T R O S Y - H S Q C スペクトルは、図 1 7 A において示す。化学量論量の C Y P A を加えることは、K R A S アミド骨格

クロスピークに対して効果を有せず（図 17B）、KRAS および 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、KRAS との直接の相互作用を示す明確な化学シフトを引き出す（図 17C）。

#### 【0375】

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およびタンパク質の間の結合の決定

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コンホメーションにおける変化を相関させることによる、生体分子相互作用の特性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変化蛍光を使用して分子を標識することによって特性決定されることが多い。この実施例において、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、かつ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、（i）コンジュゲートは、フルオロフォアで標識されており、プレゼンタータンパク質は滴定されるか、または（ii）プレゼンタータンパク質は、フルオロフォアで標識されており、コンジュゲートは滴定される。

#### 【0376】

実施例 15 . 第 2 次高調波発生技術によるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の決定

第 2 次高調波発生（SHG）は、水溶液中のコンホメーション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、表面に連結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。異なるコンホメーションは、結合によるシグナル変化の大きさ、ベースラインに対するシグナル（表面生成正シグナル変化に対してより垂直配向、逆の場合も同じ）および速度論によって分類することができる。この実施例において、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、かつ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、（i）色素標識されたコンジュゲートは、融合タグを介して表面上に固定化されており、プレゼンタータンパク質は、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は、融合タグを介して表面上に固定化されており、コンジュゲートは、表面上に注入される。

#### 【0377】

実施例 16 . 示差走査蛍光分析によるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の決定

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技術である。典型的な実験において、目的のタンパク質は、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 ~ 95）に供される。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派生最小から計算する。標的タンパク質について、小分子の存在下での熱シフト（ $T_m$ ）は、小分子がタンパク質に結合し、安定化させるかをアセスメントするために測定することができる。この実施例において、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、（i）コンジュゲートは蛍光色素で標識されており、プレゼンタータンパク質は滴定されるか、または（ii）プレゼンタータンパク質は蛍光色素で標識されており、コンジュゲートは滴定される。

#### 【0378】

実施例 17 . ナノ DSF によるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の決定

ナノ DSF は、変化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。典型的な実験において、目的のタンパク質は上昇する熱（典型的には、4 ~ 95）に供され、内因性トリプトファンまたはチロシン残基の蛍光強度は温度の関数としてモニターされる。 $T_m$  は、トリプトファン蛍光強度の

10

20

30

40

50

変化から、または330 nmおよび350 nmでのトリプトファン発光の速度から計算することができ、これはアンフォールディングによる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、小分子の存在下での  $T_m$  は、小分子がタンパク質に結合し、かつ安定化させるかをアセスメントするために測定することができる。この実施例において、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、（i）コンジュゲートの蛍光は測定され、プレゼンタータンパク質は滴定されるか、または（ii）プレゼンタータンパク質の蛍光はモニターされ、コンジュゲートは滴定される。

【0379】

実施例18：示差光散乱による複合体形成の決定

10

動的光散乱（DLS）は、ランダムなブラウン運動を起こしている散乱強度における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方法である。拡散係数および粒径情報は、これらの変動の分析から得ることができる。さらに具体的には、この方法は、水溶液中のタンパク質の半径および分子量を含めたサイズの特徴を測定する能力を提供する。この実施例において、この方法は、（i）本発明のコンジュゲートの結合による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による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。

【0380】

実施例19：音波音響技術によるコンジュゲートおよびタンパク質の間の結合の決定

20

表面音波（SAW）技術は、バイオセンサーに沿って進む表面音波の相におけるシフトのモニタリングによる、結合に誘発されるコンホメーション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二元相互作用と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、二元相互作用ペアの1つの構成要素は、融合タグを介してバイオセンサー上に固定化されている。次いで、第2の構成要素（分析物）の増加する濃度は、バイオセンサー上に一定の時間の間注入する。会合相の間のシグナルの増加（波相または振幅における変化によって測定）、および解離相の間のシグナルの減少は、相互作用を示し、かつ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。この実施例において、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ついての速度論を測定するために使用され、ここで、（i）コンジュゲートは、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ており、プレゼンタータンパク質は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。

30

【0381】

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、平均粒径およ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、1～25 nmの分解能範囲、およびサイズが150 nmまでの部分的規則系における反復距離の構造上の情報を送達することができる。超小角散乱（USAXS）は、さらにより大きな次元を分解することができる。典型的な散乱実験において、タンパク質またはタンパク質複合体の溶液は、X線（典型的には、概ね0.15 nmの波長を伴う）に曝露される。散乱強度  $I(s)$  は、運動量輸送の関数として記録する（ $s = 4 \sin \theta / \lambda$ 、式中、 $2\theta$  は、入射放射および散乱放射の間の角度である）。溶液の強度から、溶媒のみからの散乱を減算する。次いで、X線散乱曲線（散乱角に対する強度）は、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生じさせるために使用する。この実施例において、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。

40

【0382】

他の実施形態

その詳細な説明と併せて本開示を記載してきた一方で、上記の説明は、本開示の範囲を

50

例示するが、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制限しないことを意図することを理解すべきである。他の態様、利点、および変更は、下記の特許請求の範囲内である。当業者は、単に通例の実験法を使用して、本明細書に記載されている本発明による特定の実施形態の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。本発明の範囲は、上記の説明に制限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。特許請求の範囲において、冠詞、例えば、「a」、「an」および「the」は、逆のことが示されない限り、または文脈からその他の点で明らかでない限り、1つもしくは複数を意味し得る。群の1つもしくは複数のメンバーの間に「または」を含む特許請求の範囲または記載内容は、群メンバーの1つ、複数、または全部が所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、またはその他の点で関連する場合、逆のことが示されない限り、または文脈からその他の点で明らかでない限り、満たされていると考えられる。本発明は、群の正確に1つのメンバーが所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、またはその他の点で関連する実施形態を含む。本発明は、群メンバーの複数、または全てが所与の生成物またはプロセスにおいて存在するか、用いられているか、またはその他の点で関連する実施形態を含む。

10

**【0383】**

用語「含むこと」はオープンであることを意図し、さらなる要素またはステップを含むことを許容するが、含むことを必要としないことがまた留意される。用語「含むこと」が本明細書において使用されるとき、用語「からなること」がこのようにまた包含および開示される。

20

**【0384】**

範囲が与えられる場合、エンドポイントが含まれる。さらに、他に示さない限り、または文脈および当業者の理解からその他の点で明らかでない限り、範囲として表される値は、文脈によって明らかにそれ以外のことの指示がない限り、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任意の特定の値、または記述した範囲内の部分範囲を想定することができることを理解すべきである。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つもしくは複数から明確に除外し得ることを理解すべきである。このような実施形態は当業者には公知であると見なされるため、たとえ、除外が本明細書において明確に記載されなくてもこのような実施形態は除外し得る。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ってコードされるタンパク質；生成の任意の方法；使用の任意の方法）は、従来技術の存在に関連するかどうかを問わず、何らかの理由によって、任意の1つもしくは複数の特許請求の範囲から除外することができる。

30

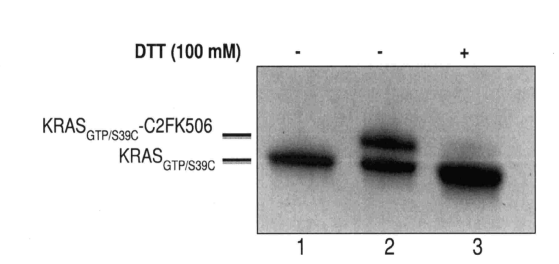
40

50

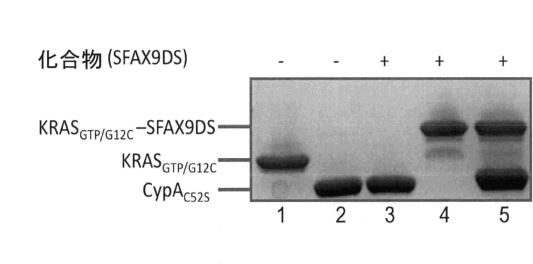


【図面】

【図 1】

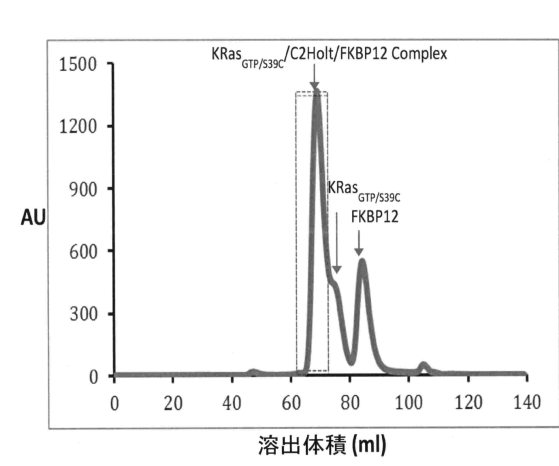


【図 2】

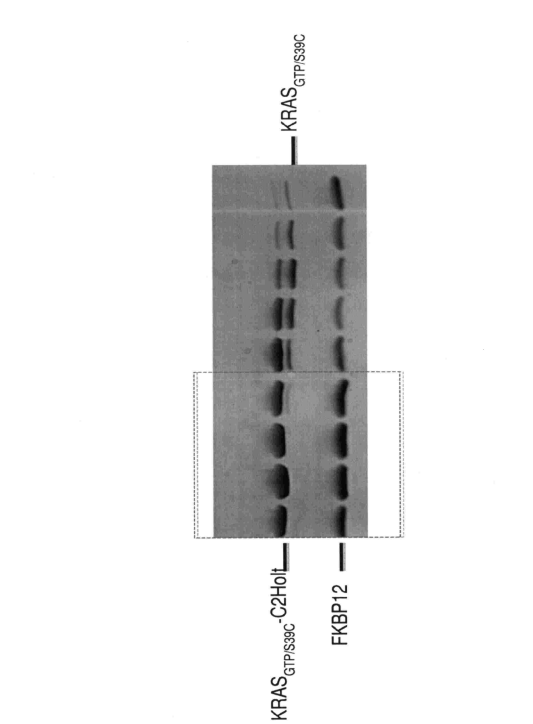


10

【図 3 A】



【図 3 B】



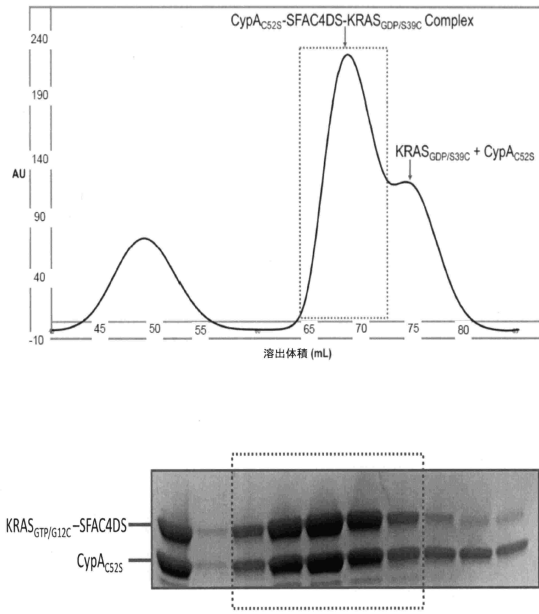
20

30

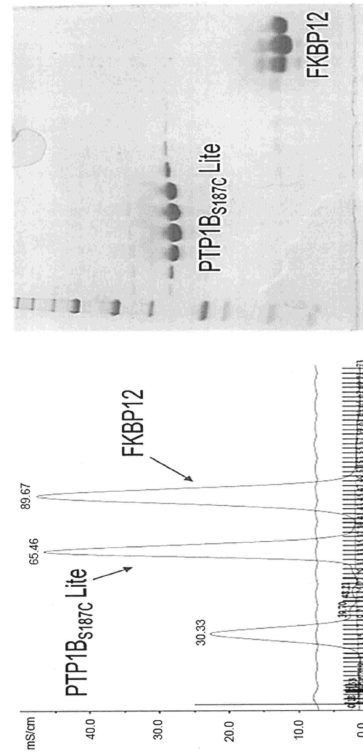
40

50

【 図 4 】



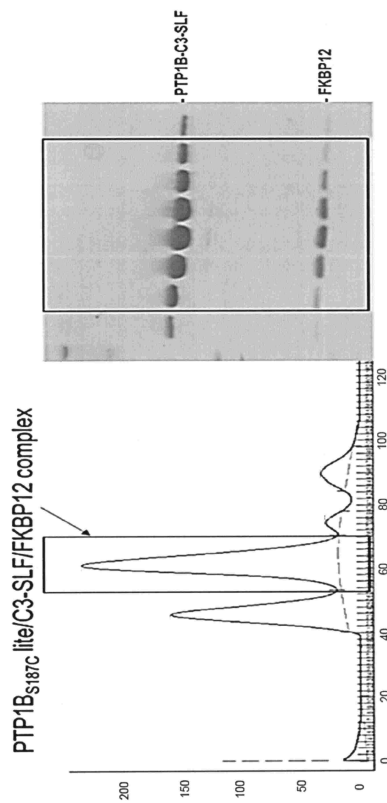
【 図 5 A 】



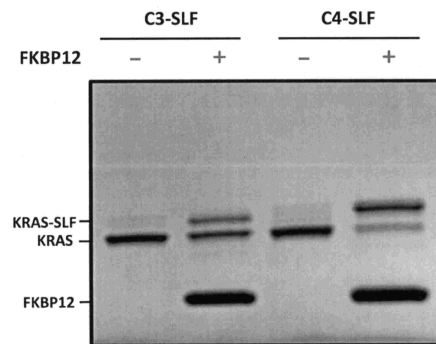
10

20

【 図 5 B 】



【 図 6 】

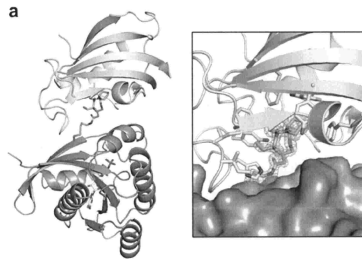


30

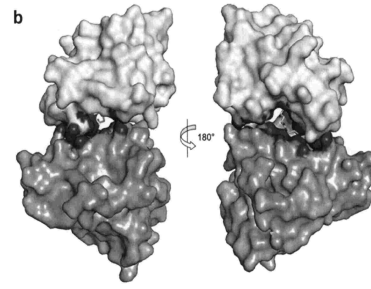
40

50

【 図 7 A 】

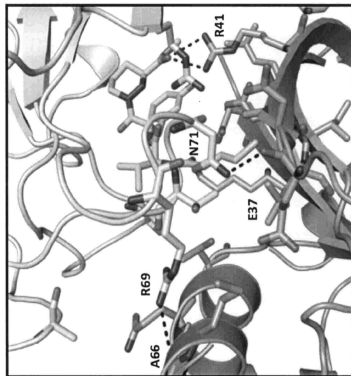


【 図 7 B 】

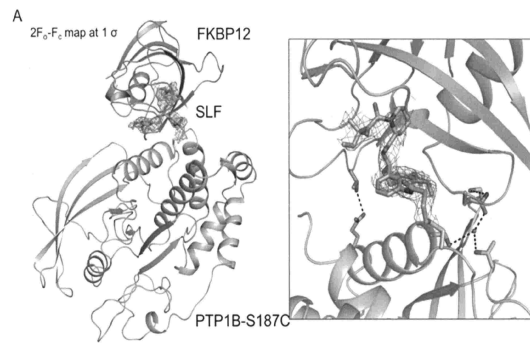


10

【 図 8 】



【 図 9 A 】



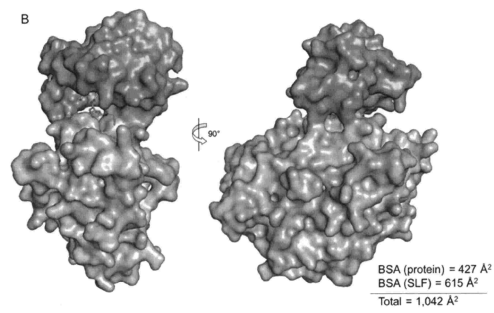
20



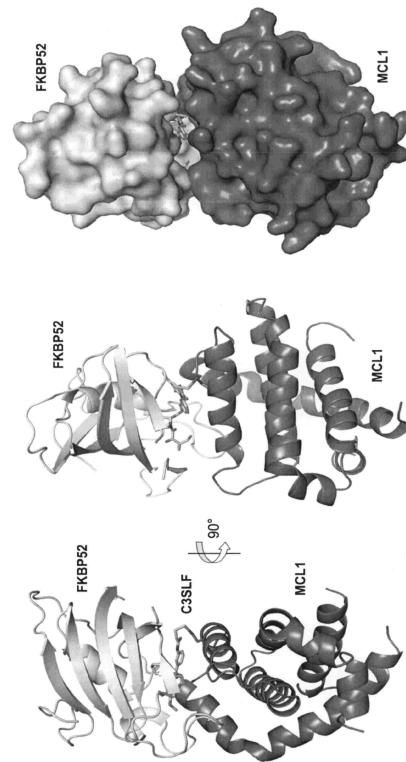
40

50

【図 9 B】



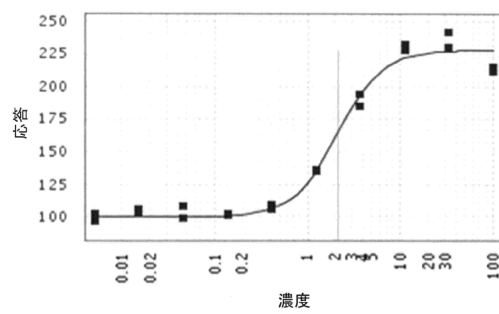
【図 10】



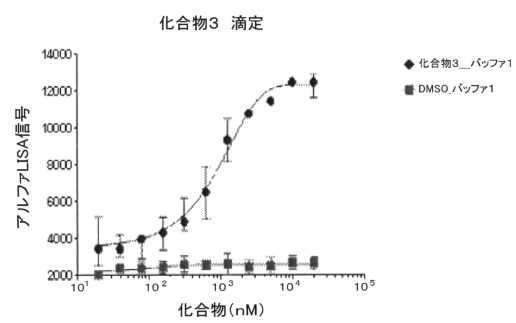
10

20

【図 11】



【図 12】

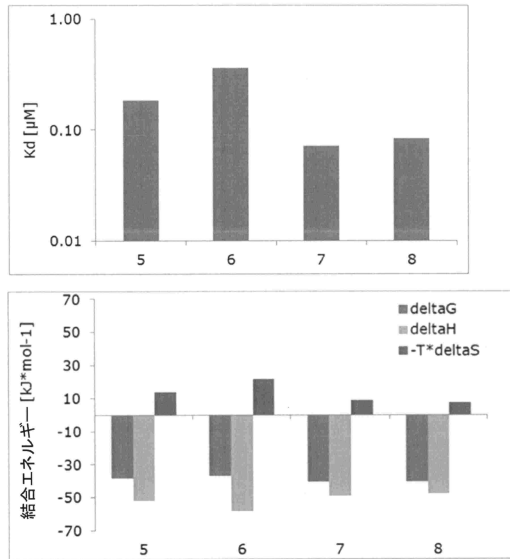


30

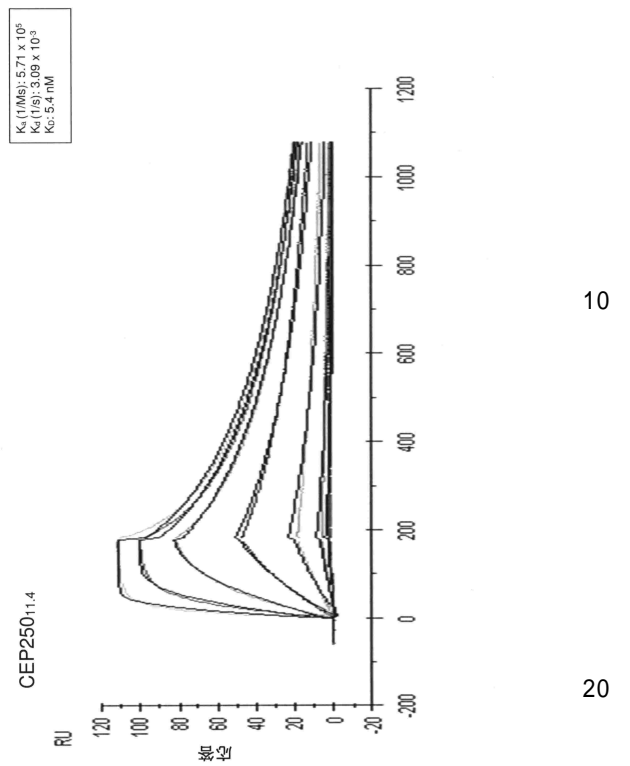
40

50

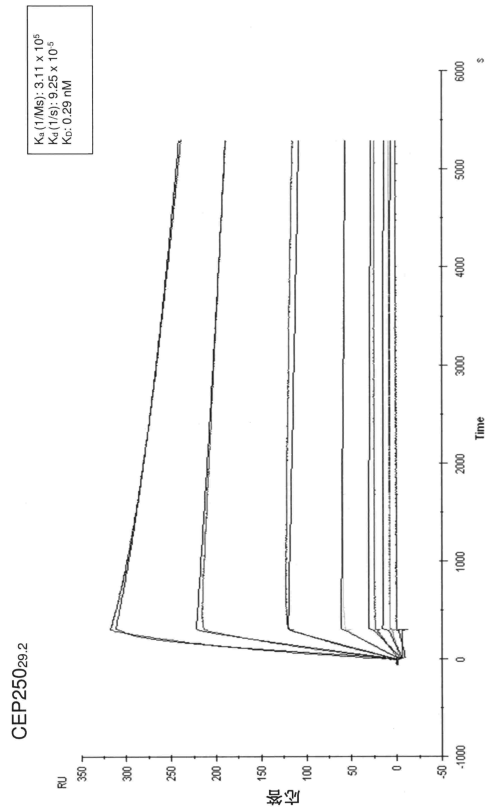
【図 1 3】



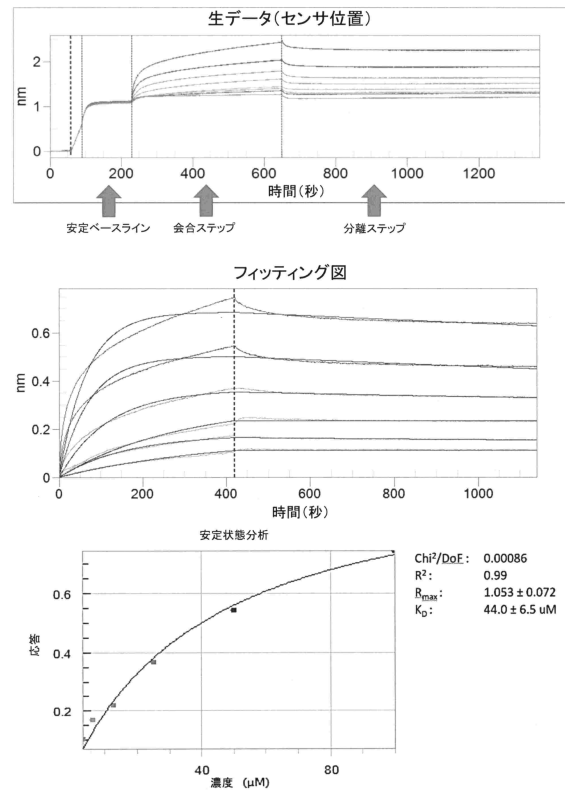
【図 1 4 - 1】



【図 1 4 - 2】



【図 1 5】



10

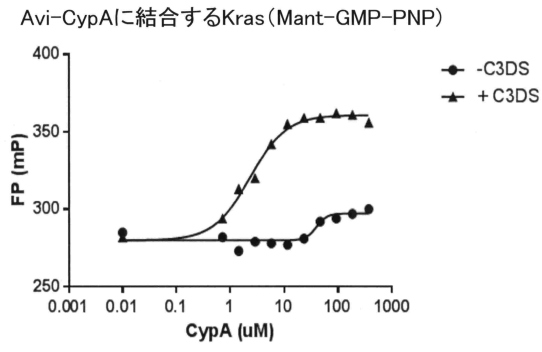
20

30

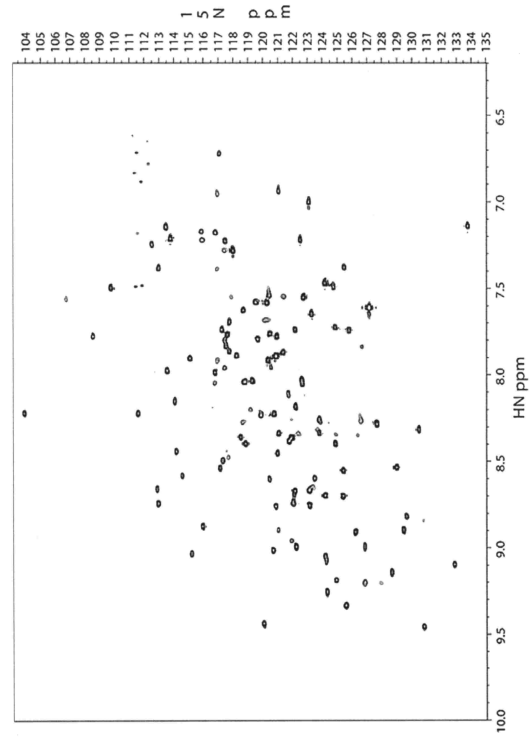
40

50

【図 16】



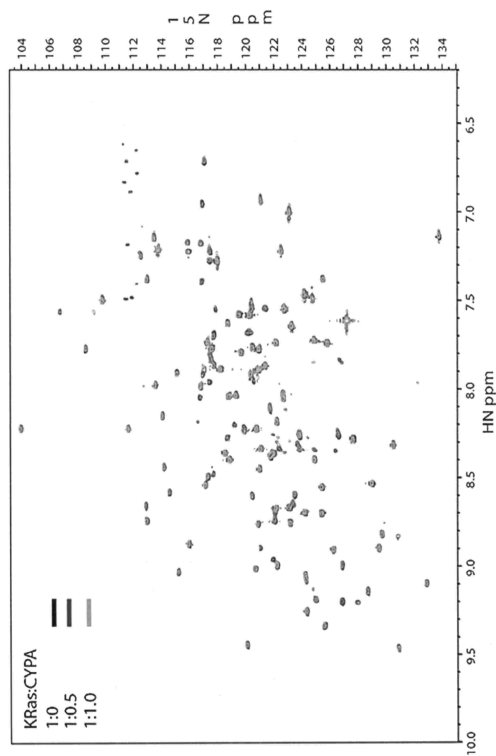
【図 17 A】



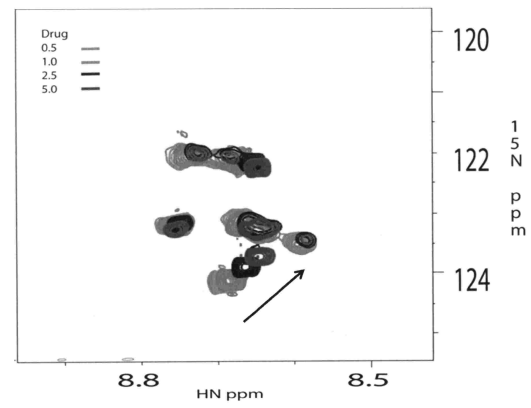
10

20

【図 17 B】



【図 17 C】



30

40

50

## フロントページの続き

(72)発明者   バーダイン、グレゴリー エル .  
              アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 400  
(72)発明者   ニコルス、エム . ジェームズ  
              アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 400  
(72)発明者   タウンソン、シャロン エイ .  
              アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 400  
(72)発明者   シグデル、ウダブ クマール  
              アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 400  
(72)発明者   イ、スン - ジュ  
              アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 400  
(72)発明者   スタイルズ、ディラン ティ .  
              アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 400  
(72)発明者   アンソニー、ネビル ジェイ .  
              アメリカ合衆国 02139 マサチューセッツ州 ケンブリッジ テクノロジー スクエア 400

審査官   金子 亜希

(56)参考文献   米国特許第07220552 (US, B1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 31/501

A61K 31/4545

A61P 37/06

C07D 401/12

G01N 33/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)