(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103153335 A
(43)申请公布日 2013.06.12

(21)申请号 201180041433.6
(22)申请日 2011.06.30
(30)优先权数据
61/360,257 2010.06.30 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.02.26
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2011/042535 2011.06.30
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/003281 EN 2012.01.05
(71)申请人 布兰代斯大学
地址 美国麻萨诸塞州
(72)发明人 L.K. 赫兹特伦 M. 龙
D.R. 加拉帕利
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 孔青 万雪松
(51)Int.Cl.
A61K 38/43(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
A61K 31/505(2006.01)
A61K 31/4184(2006.01)

权利要求书6页 说明书41页 附图17页

(54)发明名称

小分子靶定的蛋白质降解

(57)摘要

本发明的某些方面涉及通过增强蛋白质的降解而对治疗或预防受试者中的疾病有用的化合物、组合物和方法。在其它方面,所述化合物可以是用于研究蛋白质降解的有用研究工具。在其它方面,所述化合物为用于研究蛋白质功能的有用研究工具。在某些实施方案中,降解的蛋白质牵涉于以下疾病或病症,所述疾病或病症的病理学至少在某种程度上与蛋白质的过度表达或突变形式蛋白质的表达有关。

CN 103153335 A

1. 一种化合物，所述化合物包含：与蛋白质结合的蛋白质结合部分、促进所述蛋白质降解的标签以及将蛋白质结合部分与标签连接的共价接头。

2. 权利要求 1 的化合物，其中所述蛋白质在哺乳动物中的过度表达至少在某种程度上为疾病或病症的起因。

3. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物选自谷胱甘肽 -S- 转移酶 α 1 (GST)、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、肉毒杆菌毒素 (BoNT)、Bcr-Abl、硫氧还蛋白相互作用蛋白 (TXNIP)、引起癌症的突变形式的 Ras 以及引发色素性视网膜炎的突变形式的 1 型 IMP 脱氢酶 (IMPDH1)。

4. 权利要求 1 的化合物，其中所述蛋白质为包含第一蛋白和第二蛋白的融合蛋白；所述蛋白质结合部分与第一蛋白结合；而所述标签促进第二蛋白的降解。

5. 权利要求 4 的化合物，其中所述第一蛋白为 GST、DHFR、SNAP、CLIP 或 HALO。

6. 权利要求 1 的化合物，其中结合蛋白质的蛋白质结合部分为蛋白质活性的抑制剂。

7. 权利要求 1 的化合物，其中将共价接头与蛋白质结合部分的氧、硫或氮结合。

8. 权利要求 1 的化合物，其中共价接头包括亚烷基。

9. 权利要求 1 的化合物，其中共价接头为氨基亚烷基氨基。

10. 权利要求 1 的化合物，其中共价接头为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

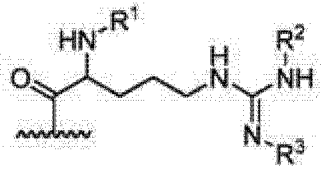
11. 权利要求 1 的化合物，其中共价接头为 $-(OCH_2CH_2)_nO-$；n 为 1-10。

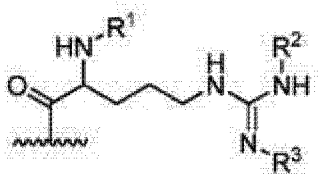
12. 权利要求 1 的化合物，其中共价接头为 $-(OCH_2CH_2)_nNH-$；n 为 1-10。

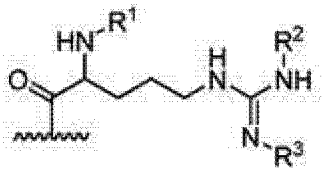
13. 权利要求 1 的化合物，其中共价接头包括三唑基部分。

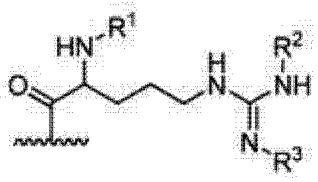
14. 权利要求 1 的化合物，其中标签包括经氧化的氨基酸、脂质氧化降解产物、N 端法则残基或取代的精氨酸。

15. 权利要求 1 的化合物，其中标签包括胍鎓。

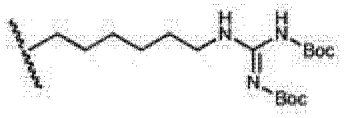
16. 权利要求 1 的化合物，其中标签为 ；R^1 为烷氧羰基，R^2 为烷氧羰基，R^3 为烷氧羰基。

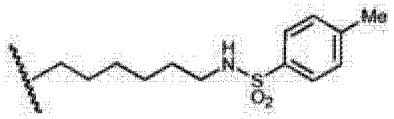
17. 权利要求 1 的化合物，其中标签为 ；R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基，R^2 为芳基磺酰基或杂芳基磺酰基；R^3 为氢。

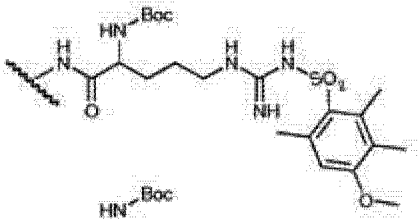
18. 权利要求 1 的化合物，其中标签为 ；R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基，R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

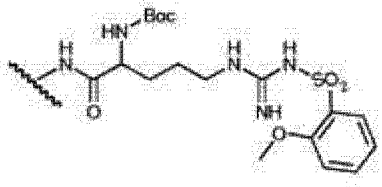
19. 权利要求 1 的化合物，其中标签为  ；R^1 为苄氧羰基；R^2 为苄氧羰基；R^3 为苄氧羰基。

20. 权利要求 1 的化合物，其中标签选自：

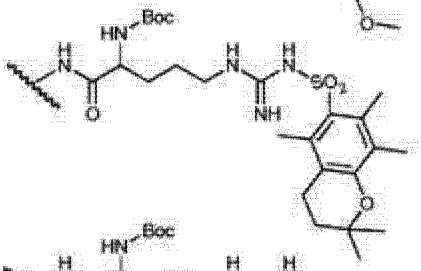


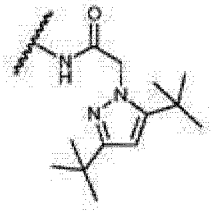


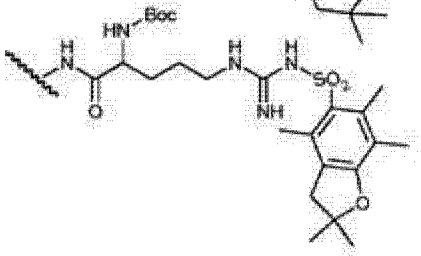


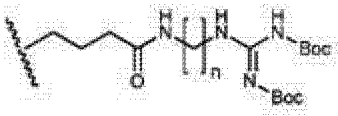
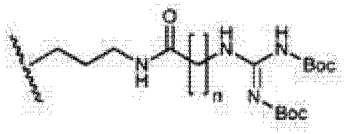


、

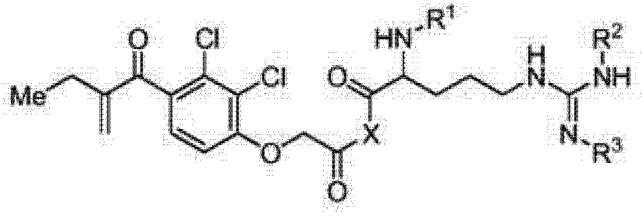






 和 ，其中 n 为 1-20 的整数。

21. 由式 I 表示的化合物或其药学上可接受的盐：



I

其中

X 为氨基亚烷基氨基；

R^1 为烷氧羰基；

R^2 为烷氧羰基；和

R^3 为烷氧基羰基。

22. 权利要求 21 的化合物，其中 X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

23. 权利要求 21 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基。

24. 权利要求 21 的化合物，其中 R^2 为叔丁氧羰基。

25. 权利要求 21 的化合物，其中 R^3 为叔丁氧羰基。

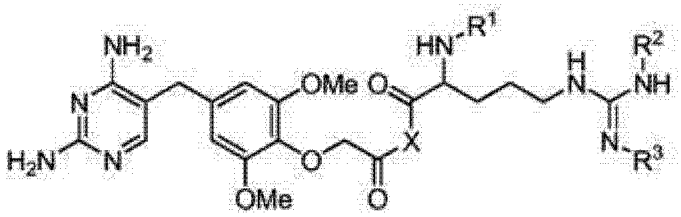
26. 权利要求 21 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基。

27. 权利要求 21 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

28. 权利要求 21 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 4-8。

29. 权利要求 21 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 6。

30. 由式 II 表示的化合物或其药学上可接受的盐：



II

其中

X 为氨基亚烷基氨基；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳基磺酰基或杂芳基磺酰基；和

R^3 为氢。

31. 权利要求 30 的化合物，其中 X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

32. 权利要求 30 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

33. 权利要求 30 的化合物，其中 R^1 为苄氧羰基。

34. 权利要求 30 的化合物，其中 R^2 为芳基磺酰基。

35. 权利要求 30 的化合物，其中 R^2 为 4- 甲苯基磺酰基。

36. 权利要求 30 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为芳基磺酰基。

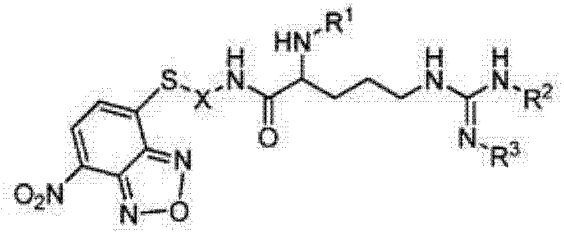
37. 权利要求 30 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基。

38. 权利要求 30 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

39. 权利要求 30 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 4-8。

40. 权利要求 30 的化合物，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 6。

41. 由式 III 表示的化合物或其药学上可接受的盐：



III

其中

X 为亚烷基；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

42. 权利要求 41 的化合物，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

43. 权利要求 41 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

44. 权利要求 41 的化合物，其中 R^1 为苄氧羰基。

45. 权利要求 41 的化合物，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

46. 权利要求 41 的化合物，其中 R^2 为苄氧羰基。

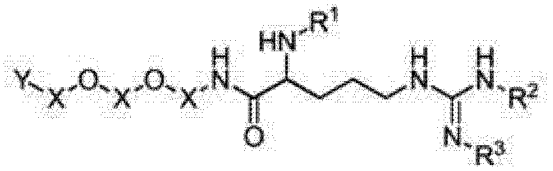
47. 权利要求 41 的化合物，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

48. 权利要求 41 的化合物，其中 R^3 为苄氧羰基。

49. 权利要求 41 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

50. 权利要求 41 的化合物，其中 R^1 为苄氧羰基；R^2 为苄氧羰基；R^3 为苄氧羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 6。

51. 由式 IV 表示的化合物或其药学上可接受的盐：



IV

其中

X 为亚烷基；

Y 为氯、溴或碘；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

52. 权利要求 51 的化合物，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

53. 权利要求 51 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

54. 权利要求 51 的化合物，其中 R^1 为苄氧羰基。

55. 权利要求 51 的化合物，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

56. 权利要求 51 的化合物，其中 R^2 为苄氧羰基。

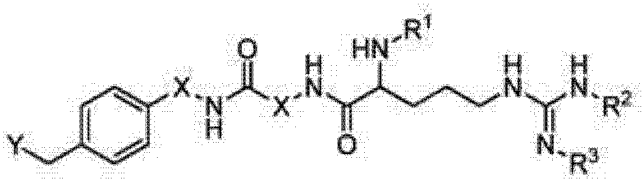
57. 权利要求 51 的化合物，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

58. 权利要求 51 的化合物，其中 R^3 为苄氧羰基。

59. 权利要求 51 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

60. 权利要求 51 的化合物，其中 Y 为氯。

61. 由式 V 表示的化合物或其药学上可接受的盐：



V

其中

X 为亚烷基；

Y 为氯、溴或碘；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

62. 权利要求 61 的化合物，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

63. 权利要求 61 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

64. 权利要求 61 的化合物，其中 R^1 为苄氧羰基。

65. 权利要求 61 的化合物，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

66. 权利要求 61 的化合物，其中 R^2 为苄氧羰基。

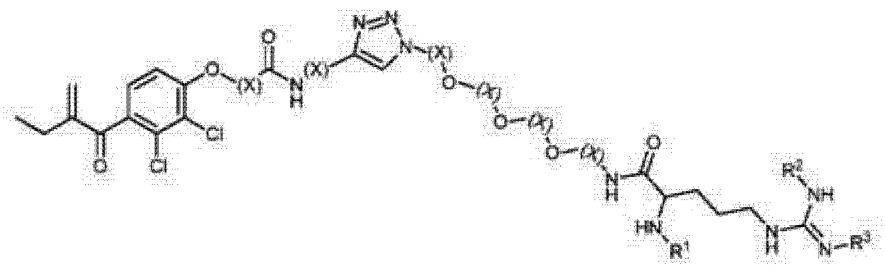
67. 权利要求 61 的化合物，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

68. 权利要求 61 的化合物，其中 R^3 为苄氧羰基。

69. 权利要求 61 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

70. 权利要求 61 的化合物，其中 Y 为氯。

71. 由式 VI 表示的化合物或其药学上可接受的盐：



VI

其中

X 为亚烷基；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

72. 权利要求 71 的化合物，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

73. 权利要求 71 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

74. 权利要求 71 的化合物，其中 R^1 为苄氧羰基。

75. 权利要求 71 的化合物，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

76. 权利要求 71 的化合物，其中 R^2 为苄氧羰基。

77. 权利要求 71 的化合物，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

78. 权利要求 71 的化合物，其中 R^3 为苄氧羰基。

79. 权利要求 71 的化合物，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

80. 一种组合物，所述组合物包含权利要求 1-79 中任一项的化合物和药学上可接受的赋形剂。

81. 一种通过选择性增强蛋白质的降解来治疗疾病或病症或其症状的方法，所述方法包括以下步骤：给予有需要的受试者治疗上有效量的权利要求 1-79 中任一项的化合物。

82. 权利要求 81 的方法，其中所述疾病或病症选自常染色体显性色素性视网膜炎、癌症、IMPDH1 介导的色素性视网膜炎、阿尔茨海默氏病、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、囊性纤维化、肾性尿崩症、朊病毒介导的感染、年龄相关的黄斑变性、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、肉毒杆菌毒素中毒、睡眠障碍和时差综合征。

小分子靶定的蛋白质降解

[0001] 相关申请

本申请要求保护 2010 年 6 月 30 日提交的美国临时专利申请序号 61/360,257 的优先权的权益，所述申请的内容通过引用结合到本文中。

[0002] 政府支持

本发明使用国立卫生研究院授予的奖助金号 R01 GM054403 和 U01 AI075466 下的美国政府支持进行。政府在本发明中具有一定权利。

[0003] 发明背景

虽然存在用于在转录水平上操纵蛋白质表达的强大的工具盒，但是用于翻译后调节的方法很少且大部分依赖于融合蛋白的表达。虽然这类系统可提供对细胞过程的重要的深入理解，但是对融合蛋白表达的需要可为约束性的以及用于治疗用途的可能性为零。诱导内源性蛋白质降解的小分子策略显然会是用于探测蛋白质功能的非常有用的工具以及用于化疗的令人兴奋的新方法。挑战为开发可广泛适用的技术。

[0004] 靶定基因敲除和 RNAi 为目前选择用于去除内源性蛋白质的方法。 两种方法均非常有用，但二者均具有严重的局限性。最受关注的蛋白质常常为必需的并因此不顺从基因敲除。虽然这个问题常常可用调节的基因表达或条件基因靶向（例如四环素或 Cre-loxP 系统）来避免，但是这类实验可能因基因表达缺失和蛋白质耗竭之间的长时间而难以解释。RNAi 亦受诱导时间限制，所述诱导时间可以是很多天。RNAi 敲减可能常常不完全或受脱靶效应困扰。重要的是，并非所有生物具有 RNAi 途径：其在疟原虫中尤其缺乏。更严重的是，在此方法可在哺乳动物中和在临床上具有广泛应用之前，需要克服在渗透性和递送方面的主要障碍。如果可经由小分子来利用胞内蛋白质降解机构，则可能避免这些问题。

[0005] 数个实验室已开发出其中小分子调节蛋白质降解的系统。最常见的策略涉及融合蛋白的表达，所述融合蛋白使靶标与不稳定的“降解决定子”结构域偶联。所述降解决定子结构域通过配体的存在来稳定；去除配体则诱导降解。例如，已将不稳定的 DHFR 突变体用于产生温度敏感性降解决定子，所述降解决定子通过甲氨蝶呤或甲氧苄啶 (TMP) 来稳定。其它系统使用基于雷帕霉素相互作用蛋白 FKBP12 和 FKBP- 雷帕霉素结合蛋白 (FRB) 的降解决定子。这些结构域在缺少基于雷帕霉素的配体时不稳定；再次在去除配体时诱导降解。在 SURF 系统中发现了基于雷帕霉素的二聚化的特别巧妙的运用。在这种情况下，雷帕霉素通过使降解决定子从靶蛋白上移除来终止降解。已证明这些系统非常有用，但是受到以下限制：其需要配体的恒定存在以维持蛋白质水平——通过添加小分子来诱导降解的系统会更容易维持。另一种方法利用一对融合蛋白将靶蛋白直接局限至蛋白酶体，一个配偶体在靶蛋白上而另一个配偶体在蛋白酶体亚基上。重要的是，此策略的成功证实蛋白酶体局限化足以诱导降解。已将相似策略用于细菌中的靶蛋白降解。虽然上述系统在不同程度上成功调节转基因融合蛋白的水平，但不能用于降低内源性蛋白质的水平。

[0006] 已描述了蛋白质水解靶向嵌合分子 (PROTAC)。PROTAC 含有识别靶蛋白的配体，所述靶蛋白与结合特异性 E3 遍在蛋白连接酶的配体连接。已报道甲硫氨酸氨肽酶、雄激素受体、雌激素受体和芳烃受体的降解。在大多数情况下，E3 连接酶靶向配体为肽，这限制了治

疗用途。此外，此方法仅在表达靶定的 E3 连接酶的细胞和生物中起作用。更普遍的是，遍在蛋白途径极其复杂且甚少理解，这表明这些途径的受控操作很难。将蛋白质直接靶定至蛋白酶体的小分子策略相对于 PROTAC 将具有许多优势。

[0007] 此外，蛋白质必须折叠成其正确的三维构象来实现其生物功能。多肽的天然构象在其一级氨基酸序列内编码，乃至氨基酸序列中的单突变可损害蛋白质实现其适当构象和 / 或功能的能力。如果蛋白质未能正确折叠，或无活性，那么生物效应和临床效应可能是破坏性的。例如，蛋白质聚集和错折叠为许多人类疾病的主要促成者，所述疾病例如常染色体显性色素性视网膜炎、阿尔茨海默氏病、α 1- 抗胰蛋白酶缺乏、囊性纤维化、肾性尿崩症和朊病毒介导的感染。在其它蛋白质折叠病症例如年龄相关的黄斑变性、帕金森病和亨廷顿舞蹈病中，因错折叠蛋白质的细胞毒性效应而导致病理学。

[0008] 突变（例如错折叠）蛋白常常通过内质网 (ER) 质量控制系统来识别并通过蛋白酶体来靶定以降解。除蛋白酶体途径之外，自噬为用于蛋白质降解的另一个主要的细胞机制。虽然自噬可受多种胞内和胞外应力刺激，所述应力包括氨基酸饥饿、蛋白质聚集和损伤细胞器的蓄积，但自噬似乎在很大程度上为非选择性过程。与亨廷顿舞蹈病相关的有聚集倾向的聚谷氨酰胺和聚丙氨酸延展蛋白，通过自噬来降解，并且自噬的抑制降低亨廷顿病的蝇模型和小鼠模型中突变型亨廷顿蛋白的毒性。亦已显示自噬促进在 ER 中蓄积的蛋白质的清除。用于增加突变蛋白降解的方法可能增强这类蛋白质的清除，从而降低或消除其细胞毒性效应。参见例如标题为“Materials and Methods for Enhanced Degradation of Mutant Proteins Associate with Human Disease（用于增强与人类疾病相关的突变蛋白降解的材料和方法）”的美国专利申请号 2010/0087474 A1，其通过引用以其整体结合到本文中。诱导突变蛋白降解的小分子策略亦会是有用的工具。

[0009] 发明概述

本发明的某些方面涉及这样的化合物，其包含与蛋白质结合的蛋白质结合部分、促进所述蛋白质降解的标签（识别元件）以及将蛋白质结合部分与标签连接的共价接头。在某些实施方案中，本发明亦涉及所述化合物用于调节靶蛋白的水平和 / 或活性的用途。在某些实施方案中，本发明涉及这样的化合物、组合物和方法，其可用于通过在体内增强蛋白质的降解而治疗或预防受试者中的疾病。在某些实施方案中，所述化合物可以是用于研究蛋白质降解的有用研究工具。在某些实施方案中，降解的蛋白质与疾病或病症有关，所述疾病或病症的病理学至少在某种程度上与蛋白质的过度表达或突变形式的蛋白质的表达有关。在某些实施方案中，所述化合物、组合物和方法对诸如感染、炎性病况、糖尿病、心血管疾病、癌症和遗传疾病等疾病的治疗有用。在其它实施方案中，所述化合物、组合物和方法亦用作杀虫剂和除草剂。本发明的其它方面、实施方案和优点在下文中详细论述。

[0010] 附图简述

图 1 描述本发明化合物的实例。

[0011] 图 2 描述本发明化合物及其与融合蛋白一起使用的实例。在这种情况下，HALO、SNAP 或 CLIP 蛋白为融合蛋白的部分，所述融合蛋白还包含待降解的蛋白质。

[0012] 图 3 描述 eDHFR-KRas D12 融合蛋白的降解。使用 MSCV 逆转录病毒将 eDHFR-KRas D12 融合基因插入 NIH3T3 细胞。将这些细胞接种在 48 孔板中并用 16 μM 甲氧苄啶或甲氧苄啶 -Boc_3Arg 处理，然后在指定的时间收获。eDHFR-Ras 在氨基端含有 FLAG 标签并通过使

用抗 FLAG 抗体的蛋白质印迹来测定。将微管蛋白用作上样对照。

[0013] 图 4 描述通过 EA-Boc3Arg 在 Cos-1 和 HeLa 细胞中降解内源性 GST-π。(A) Cos-1 细胞中内源性 GST-π 的降解；(B) (A) 中数据的定量；(C) 环己酰亚胺处理的 Cos-1 细胞中内源性 GST-π 的降解；(D) 环己酰亚胺处理的 HeLa 细胞中内源性 GST-π 的降解。

[0014] 图 5 描述 HeLa 细胞裂解物中 GST-α1-HA 和 HeLa 细胞中 eDHFR-HA-GST 的降解。蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (Velcade®) 和 MG132 阻止降解。(A) 经添加到 HeLa 裂解物中的 EA-Boc_3Arg 预处理的 GST-α1-HA 的降解；(B) 经细胞裂解物中 EA-Boc_3Arg 预处理的 GST-α1-HA 的降解，对 3 个结果取平均值并定量；(C) 经细胞裂解物中 Fur-Boc3Arg 预处理的 GST-HA 的降解；(D) MG132 对经 EA-Boc3Arg 预处理的 GST-HA 降解的作用；(E) 在经环己酰亚胺处理的 HeLa 细胞中异位表达的 eDHFR-HA-GST-α1 的降解；(F) 经 HeLa 细胞裂解物中不同抑制剂预处理的 GST-HA 的降解 (TS = 2; Boc_3Arg = 1)；(G) 在多数结果中，用 EA-Boc_3Arg 处理细胞可在经环己酰亚胺处理的 HeLa 细胞中引起 eDHFR-HA-GST-α1 的降解，而用 EA 或 DMSO 处理不会引起 eDHFR-HA-GST-α1 的降解；(H) 在环己酰亚胺 (Cy) 和无环己酰亚胺 (无 Cy) 处理的 HeLa 细胞二者中，硼替佐米均延缓通过 EA-Boc_3Arg 的 eDHFR-HA-GST-α1 降解。

[0015] 图 6 描述细胞裂解物中 eDHFR-HA 的降解和 HeLa 细胞中 eDHFR 融合蛋白的降解。(A) HeLa 细胞裂解物中 eDHFR 的降解；(B) 图 (A) 的定量；(C) 整体蛋白稳定性 (GPS) 测定。细胞由双顺反子构建体共表达红色荧光蛋白 (RFP) 和 DHFR-HA-GFP。通过流式细胞术测定红色和绿色荧光。在 TMP-Boc_3Arg 存在下观察到 GFP:RFP 的比率随时间减小；(D) 在转染 HeLa 细胞中使用 TMP 的 GPS 测定未显示作为时间函数的 GFP:RFP 比率的变化；(E) 在无环己酰亚胺处理的转染 HeLa 细胞中作为时间函数的 GFP:RFP 比率的平均变化；(F) 在经环己酰亚胺处理的转染 HeLa 细胞中作为时间函数的 GFP:RFP 比率的平均变化；(G) 转染 MCF-7 细胞中的 GPS 测定。(H) 显示转染 HeLa 细胞中 eDHFR-HA-GFP 降解的蛋白质印迹；(I) 蛋白质印迹显示蛋白质浓度的变化与用 GPS 质粒转染的 HeLa 细胞中的 GPS 信号变化类似；(J) 在蛋白酶体抑制剂硼替佐米和去遍在蛋白化抑制剂 PU1 存在下，转染 HeLa 细胞中 eDHFR-HA-GFP 的降解更慢。未观察到遍在蛋白化；(K) (I) 中各组的定量。

[0016] 图 7 描述本发明的示例性化合物。

[0017] 图 8 描述本发明的多个示例性标签。

[0018] 图 9 描述本发明的配体介导的蛋白质降解的图示。

[0019] 图 10 描述 A) 通过依他尼酸 (EA) 衍生物灭活 GST；B) EA 衍生物的结构；和 C) EA 和 EA-Boc_3Arg (叔丁基氨基甲酸酯保护的精氨酸) 以相似的效力抑制 GST-α-1。

[0020] 图 11 描述的曲线图显示，Fur-Boc_3Arg 诱导 GSTα-1 的降解。用 Fur-Boc_3Arg 修饰纯化的 C 端经 HA 标记的 GST-α-1 并添加到 NIH 3T3 细胞裂解物中。

[0021] 图 12 描述内源性 GST-π 的降解。将细胞与 EA-Boc_3Arg 一起孵育 2 小时。使用抗 GST 抗体通过免疫印迹监测降解。EA = 右侧条；EA-Boc_3-Arg = 左侧条。

[0022] 图 13 描述蛋白酶体的 Boc_3Arg 诱导降解。A. 细胞裂解物中 GST-α-1 的降解。B. 整个 HeLa 细胞中 eDHFR-HA-GFP 的降解。

[0023] 图 14 描述多种可能的 Boc_3Arg- 接头衍生物。除非另有说明，否则使用 L- 氨基酸。

[0024] 图 15 描述 TMP 的 SAR 概况。这些化合物可用于确定识别配体的亲和力要求。R_2

可为 Boc_3Arg- 接头。基于已公布的 TMP 的 SAR 来设计 pK_i、$-logK_i$。

[0025] 图 16 描述建议的 DS-Boc_3Arg 合成。

[0026] 图 17 描述通过纯化的 20S 蛋白酶体的 eDHFR-HA 降解。

[0027] 图 18 描述通过多种 EA 衍生物来降解 HeLa 细胞裂解物中的 GST-α-HA。如图 1 所示，EA = 5，Ts = 2，Boc3Arg = 1。显示了邻苯二甲酰亚胺 (pthalimide) 衍生物的结构。

[0028] 发明详述

综述

本发明的某些方面涉及对于在体内选择性增强蛋白质降解有用的组合物和方法。在某些实施方案中，本发明基于以下发现：本发明的化合物可用于靶定特定蛋白质并增强其降解。有利的是，在某些实施方案中，可选择性降解突变的蛋白质，而各自的野生型的水平大部分保持不变。

[0029] 这类物质的治疗潜能在癌症化疗中显而易见，但亦可广泛适用于其它疾病。癌蛋白降解为癌症化疗中的新兴策略。氟维司群相对于他莫昔芬在乳腺癌治疗中的改良作用归因于其诱导雌激素受体降解的能力。重要的是，抗他莫昔芬乳腺癌细胞对选择性雌激素受体减量调节物 (SERDS) 保持敏感，说明了此策略的治疗潜能。其它 SERD 目前正在开发。用康士得治疗观察到雄激素受体的相似降解。同样，视黄酸 / 三氧化二砷组合在急性早幼粒细胞白血病 (APL) 治疗中的成功归因于其诱导致癌融合蛋白 PML-RARA 降解的能力。清楚的是，仅阻断 Bcr-Abl 激酶的激酶活性不足以阻断其下游信号转导途径的激活；如果降解 Bcr-Abl，显然将消除这类激酶独立性信号转导。异常蛋白质的降解亦会为治疗遗传疾病提供新型和急需的策略。例如，在 *IMPDH1* 中的突变引起色素性视网膜炎——因视杆光感受器 (rod photoreceptor) 的降解造成的遗传性失明。*IMPDH1* 敲除小鼠仅表现出轻微的视网膜病，表明突变蛋白的去除将预防疾病。肉毒杆菌毒素 (BoNT) 中毒的治疗突出此策略的另一个优势。BoNT 具有 90 天的半寿期，所以患者必须持续使用呼吸机达多个月；亦必须给予 BoNT 的小分子抑制剂达多个月，但是可诱导 BoNT 降解的药剂会需要大大减少的治疗日程。更一般而言，最近已公认的是，在其靶标上具有长停留时间的抑制剂在体内更有效。此观察结果导出以下想法：完美的药物不可逆地灭活其靶标，使得仅靶蛋白的新合成恢复活性。显然，根据这个定义，诱导降解的药物为完美的。这些实例显示，用于设计可诱导蛋白质降解的小分子的普遍适用策略，会是具有广泛影响的较大进步。

[0030] 在某些实施方案中，本发明的化合物包含与蛋白质结合的蛋白质结合部分、促进所述蛋白质降解的标签以及将蛋白质结合部分与标签连接的共价接头。在某些实施方案中，蛋白质结合部分为人谷胱甘肽 -S- 转移酶 α 1 (GST) 的抑制剂或大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的抑制剂。在某些实施方案中，蛋白质结合部分为 O^6- 烷基鸟嘌呤 -DNA 烷基转移酶 (SNAP) 的修饰物、SNAP 的 CLIP 变体的修饰物或者工程改造的卤代烷脱卤素酶 (HALO) 的修饰物。具体而言，在某些实施方案中，蛋白质结合部分来源于依他尼酸 (GST 的抑制剂)、硫代苯并呋喃 (GST 的抑制剂) 或甲氧苄啶 (细菌 DHFR 的抑制剂)，如图 1 所示。具体而言，在某些实施方案中，蛋白质结合部分来源于 O^6- 烷基鸟嘌呤 (SNAP 的修饰物)、O^2- 苄基胞嘧啶 (CLIP 的修饰物) 或烷基氯化物 (HALO 的修饰物)。在某些实施方案中，标签包括氧化的氨基酸、脂质氧化降解产物或 N 端法则残基。在某些实施方案中，标签包括修饰的精氨酸。

[0031] 在某些实施方案中，在体外使用来源于Cos、HeLa和NIH 3T3细胞的哺乳动物细胞裂解物以及在体内使用瞬时转染的Cos和HeLa细胞，测定经修饰的抑制剂引起其靶蛋白降解的能力。值得注意的是，发现经修饰的精氨酸标签在细胞裂解物测定中(1和22)、在全细胞测定中(22)以及使用纯化的20S和免疫蛋白酶体(22)时促进两个靶蛋白的降解。此外，发现甲苯磺酰基精氨酸衍生物2在细胞裂解物测定中为功能性降解标签。

[0032] 在某些实施方案中，本发明的化合物应可用于治疗多种疾病，所述疾病至少在某种程度上因过度的蛋白质表达或突变蛋白的表达所致。例如，本发明的化合物应可用于治疗肉毒杆菌毒素(BoNT)中毒。BoNT在运动神经元中的半寿期约为90天。降低BoNT滴度的策略会是常规小分子抑制剂疗法的有效备选方案，所述疗法通常需要长期的疗程。另一个潜在应用在于治疗其中突变蛋白的存在促进或引起病理学的遗传疾病。例如，1型IMP脱氢酶(IMPDH1)介导的色素性视网膜炎为因在IMPDH1中不影响酶活性的突变造成的遗传性视网膜病。IMPDH1(-/-)小鼠未表现出类似的视力缺陷，表明突变蛋白的存在比IMPDH1的缺失更有害。因此，经由降解去除突变蛋白应为有效的治疗策略。例如，慢性髓细胞性白血病由Bcr-Abl蛋白激酶的表达造成。该激酶活性的抑制不足以阻断所有的Bcr-Abl信号转导。如果降解Bcr-Abl，则将消除这类抑制剂独立性信号转导。

[0033] 定义

为方便起见，将用于说明书、实施例和随附权利要求的某些术语收集于此。本文所限定和使用的所有定义，取代所定义术语的字典定义、通过引用结合的文件中的定义和/或通常含义。

[0034] 本文所用冠词“一”和“一个”是指一个或多于一个（即至少一个）该冠词的语法上的宾语。例如，“一个要素”意指一个要素或多于一个要素。

[0035] 本文说明书中和权利要求中所用短语“和/或”，应理解为意指如此联合的要素“之一或二者”，即在一些情况下联合出现以及在其它情况下分开出现的要素。用“和/或”列出的多个要素应当以相同的形式解释，即“一个或多个”如此联合的要素。除通过“和/或”从句具体标识的要素之外，可任选存在其它要素，而不论与具体标识的那些要素相关或无关。因此，作为非限制性实例，提及“A和/或B”，当与诸如“包括”等开放式语言联用时，在一个实施方案中可仅指A（任选包括除B之外的要素）；在另一个实施方案中可仅指B（任选包括除A之外的要素）；在又另一个实施方案中可指A和B二者（任选包括其它要素）；等等。

[0036] 本文说明书中和权利要求中所用“或”应理解为具有与如上所定义的“和/或”相同的含义。例如，当在列表中分隔项目时，“或”或者“和/或”应解释为包含在内的，即包含许多要素或一列要素中的至少一个（而且还包含许多要素或一列要素中的多于一个），以及任选另外的未列举的项目。除非术语明确指出相反，例如“仅之一”或“恰好之一”或者在用于权利要求中时，“由……组成”指包含许多要素或一列要素中的恰好一个要素。一般而言，当之前加上诸如“二者之一”、“之一”、“仅之一”或“恰好之一”等排他性术语时，本文所用术语“或”应当仅解释为表明唯一备选物（即“一个或另一个但非二者”）。“基本上由……组成”，当用于权利要求中时，应具有其用于专利法领域的普通含义。

[0037] 本文说明书中和权利要求中所用短语“至少一个”，在提及一个或多个要素的列表时，应理解为意指选自所述要素列表中的任一个或多个要素的至少一个要素，但不一定包

含在要素列表内具体列举的各个和每个要素的至少一个，以及不排除要素列表中要素的任何组合。此定义亦允许可任选存在短语“至少一个”所指的要素列表内具体标识的要素之外的要素，而不论与具体标识的那些要素相关或无关。因此，作为非限制性实例，“A 和 B 中的至少一个”（或等同地，“A 或 B 中的至少一个”，或等同地，“A 和 / 或 B 中的至少一个”），在一个实施方案中可指至少一个（任选包含多于一个）A，不存在 B（以及任选包含除 B 之外的要素）；在另一个实施方案中可指至少一个（任选包含多于一个）B，不存在 A（以及任选包含除 A 之外的要素）；在又另一个实施方案中，可指至少一个（任选包含多于一个）A，和至少一个（任选包含多于一个）B（以及任选包含其他要素）；等等。

[0038] 亦应理解的是，除非明确指出相反，否则在包括多于一个步骤或动作的本文要求保护的任何方法中，所述方法的步骤或动作的顺序无需限于所述方法的步骤或动作所叙述的顺序。

[0039] 在权利要求中以及上文说明书中，将诸如“包括”、“包含”、“带有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”、“组成 (composed of)”等所有过渡短语应理解成开放式的，即意指包括但不限于。仅过渡短语“由……组成”和“基本上由……组成”应分别为封闭式或半封闭式过渡短语，如在United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures(美国专利局专利审查程序手册），2111.03 段中所述。

[0040] 术语“共同给药”和“共同给予”是指同时进行的给药（在相同时间给予两种或更多种治疗药）和不同时间的给药（在一个时间给予一种或多种治疗药，在与之不同的时间给予一种或多种另外的治疗药），只要所述治疗药在某种程度上同时存在于患者中即可。

[0041] 术语“溶剂化物”是指含有一种或多种溶剂分子的规定化合物的药学上可接受的形式，其保留这类化合物的生物有效性。溶剂化物的实例包括与溶剂组合的本发明的化合物，所述溶剂例如水（以形成水合物）、异丙醇、乙醇、甲醇、二甲亚砜、乙酸乙酯、乙酸、乙醇胺或丙酮。诸如与两种或更多种溶剂组合的本发明化合物等溶剂化物混合物的制剂亦包括在内。

[0042] 例如烷基、m、n 等各个表述的定义，当在任何结构中出现多于一次时，意图其独立于其在相同结构中别处的定义。

[0043] 应理解的是，“取代”或“用……取代”包含以下隐含条件：这类取代符合取代原子和取代基的允许化合价，以及所述取代得到稳定的化合物，例如并不会自发经历转化（如通过重排、环化、消去或其它反应）的化合物。

[0044] 亦考虑术语“取代的”包含有机化合物的所有允许的取代基。在广泛的方面，允许的取代基包括有机化合物的无环和环状的、支链和无支链的、碳环和杂环的、芳族和非芳族的取代基。说明性取代基包括例如下文所述的那些取代基。对于适当有机化合物，允许的取代基可以是一个或多个以及相同或不同。对于本发明的目的，诸如氮等杂原子可具有氢取代基和 / 或本文所述有机化合物的任何允许的取代基，所述取代基满足杂原子的化合价。不意图有机化合物的允许取代基以任何方式限制本发明。

[0045] 将术语“低级的”附加至下文所列任何基团时，表明所述基团包含少于 7 个碳（即 6 个碳或更少）。例如“低级烷基”是指含有 1-6 个碳的烷基，“低级烯基”是指含有 2-6 个碳的烯基。

[0046] 本文所用术语“不饱和的”，适于具有至少一个碳 - 碳双键或碳 - 碳三键的化合物

和 / 或基团。

[0047] 本文所用术语“脂肪族的”，适于其为线性或支链但非环状的化合物和 / 或基团（亦称为“无环的”或“开链”基团）。

[0048] 本文所用术语“环状的”，适于具有一个环或者两个或更多个环的（例如螺、稠合的、桥接的）化合物和 / 或基团。“单环的”是指含有一个环的化合物和 / 或基团；“二环的”是指含有两个环的化合物和 / 或基团。

[0049] 术语“芳族的”是指以含有 4n+2 个电子的环状共轭分子部分为特征的平面或多环结构，其中 n 为整数的绝对值。含有稠合环或连接环的芳族分子亦称为二环芳环。例如，烃环结构中含有杂原子的二环芳环称为二环杂芳环。

[0050] 本文所用术语“烃”是指完全由氢和碳组成的有机化合物。

[0051] 对于本发明的目的，依照 Handbook of Chemistry and Physics（化学和物理学手册），第 67 版，1986-87 内封面的 Periodic Table of the Elements（元素周期表），CAS 版识别化学元素。

[0052] 本文所用术语“杂原子”为领域公认的，是指除碳或氢之外任何元素的原子。说明性杂原子包括硼、氮、氧、磷、硫和硒。

[0053] 术语“烷基”意指含有 1-20、1-15 或 1-10 个碳原子的脂肪族烃基或环烃基。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、2- 甲基环戊基、1-(1- 乙基环丙基）乙基和 1- 环己基乙基。

[0054] 术语“环烷基”为烷基的子集，其指含有 3-15、3-10 或 3-7 个碳原子的环烃基。环烷基的代表性实例包括但不限于环丙基和环丁基。

[0055] 本文所用术语“烯基”意指含有 2-10 个碳且含有至少一个通过脱除两个氢形成的碳 - 碳双键的直链或支链烃基。烯基的代表性实例包括但不限于乙烯基、2- 丙烯基、2- 甲基 -2- 丙烯基、3- 丁烯基、4- 戊烯基、5- 己烯基、2- 庚烯基、2- 甲基 -1- 庚烯基和 3- 癸烯基。

[0056] 本文所用术语“炔基”意指含有 2-10 个碳原子且含有至少一个碳 - 碳三键的直链或支链烃基。炔基的代表性实例包括但不限于乙炔基、1- 丙炔基、2- 丙炔基、3- 丁炔基、2- 戊炔基和 1- 丁炔基。

[0057] 术语“亚烷基”为领域公认的，用于本文时适于通过脱除如上定义的烷基的两个氢原子获得的二基。

[0058] 本文所用术语“碳环基”意指含有 3-12 个碳原子的单环或多环（例如二环、三环等）烃基，其为完全饱和的或具有一个或多个不饱和键，并且为避免疑义，不饱和度并不导致形成芳环系统（例如苯基）。碳环基的实例包括 1- 环丙基、1- 环丁基、2- 环戊基、1- 环戊烯基、3- 环己基、1- 环己烯基和 2- 环戊烯基甲基。

[0059] 本文所用术语“杂环基 (heterocyclyl)”是指非芳环系统的基团，包括但不限于单环、二环和三环，其可以是完全饱和的或者可含有一个或多个不饱和单元，为避免疑义，不饱和度并不导致形成芳环系统，且具有包含至少一个杂原子的 3-12 个原子，所述杂原子例如氮、氧或硫。为了举例说明的目的（不应将其解释为限制本发明的范围），以下为杂环的实例：氮杂环丙烷基、氮杂环丙烯基 (azirinyl)、环氧乙烷基、硫杂环丙烷基、硫杂环丙烯

基、二氧杂环丙烷基、二氮杂环丙烯基、氮杂环丁烯基 (azetyl)、氧杂环丁烷基、氧杂环丁烯基、硫杂环丁烷基、硫杂环丁烯基、二氮杂环丁烷基、二氧杂环丁烷基、二氧杂环丁烯基、二硫杂环丁烷基、二硫杂环丁烯基、呋喃基、二氧杂环戊烷基 (dioxalanyl)、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、三嗪基、异噻唑基、异噁唑基、苯硫基、吡唑基、四唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、四嗪基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、吡啶并吡嗪基 (pyridopyrazinyl)、苯并噁唑基、苯并苯硫基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁二唑基、苯并噻二唑基、吲哚基、苯并三唑基、萘啶基、吖庚因基、氮杂环丁烷基、吗啉基、哌啶酮基、吡咯烷酮基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、奎宁环基 (quinicludinyl)、硫代吗啉基、四氢吡喃基和四氢呋喃基。本发明的杂环基被独立选自以下的 0、1、2、3、4 或 5 个取代基取代 :烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷基硫代、卤代烷基硫代、氟烷基硫代、硫烯基、炔基硫代、磺酸、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧羰基、卤代烷氧基羰基、氟烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、烷基羰氧基、卤代烷基羰氧基、氟烷基羰氧基、烯基羰氧基、炔基羰氧基、烷基磺酰基氧基、卤代烷基磺酰基氧基、氟烷基磺酰基氧基、烯基磺酰基氧基、炔基磺酰基氧基、卤代烷氧基磺酰基氧基、氟烷氧基磺酰基氧基、烯氧基磺酰基氧基、炔氧基磺酰基氧基、烷基亚磺酰基氧基、卤代烷基亚磺酰基氧基、氟烷基亚磺酰基氧基、烯基亚磺酰基氧基、炔基亚磺酰基氧基、烷氧基亚磺酰基氧基、卤代烷氧基亚磺酰基氧基、氟烷氧基亚磺酰基氧基、烯氧基亚磺酰基氧基、炔氧基亚磺酰基氧基、氨基亚磺酰基氧基、氨基、酰胺基 (amido)、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦基 (phosphinyl)、磷酰基、甲硅烷基、甲硅烷基氧基，以及通过亚烷基部分（例如亚甲基）与杂环基结合的任何所述取代基。

[0060] 本文所用术语“芳基”意指苯基、萘基、菲基或蒽基。本发明的芳基可任选被独立选自以下的 1、2、3、4 或 5 个取代基取代 :烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷基硫代、卤代烷基硫代、氟烷基硫代、烯基硫代、炔基硫代、磺酸、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧羰基、卤代烷氧基羰基、氟烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、烷基羰氧基、卤代烷基羰氧基、氟烷基羰氧基、烯基羰氧基、炔基羰氧基、烷基磺酰基氧基、卤代烷基磺酰基氧基、氟烷基磺酰基氧基、烯基磺酰基氧基、炔基磺酰基氧基、卤代烷氧基磺酰基氧基、氟烷氧基磺酰基氧基、烯氧基磺酰基氧基、炔氧基磺酰基氧基、烷基亚磺酰基氧基、卤代烷基亚磺酰基氧基、氟烷基亚磺酰基氧基、烯基亚磺酰基氧基、炔基亚磺酰基氧基、烷氧基亚磺酰基氧基、卤代烷氧基亚磺酰基氧基、氟烷氧基

亚磺酰基氧基、烯氧基亚磺酰基氧基、炔氧基亚磺酰基氧基、氨基亚磺酰基氧基、氨基、酰胺基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦基、磷酰基、甲硅烷基、甲硅烷基氧基，以及通过亚烷基部分（例如亚甲基）与杂环基结合的任何所述取代基。

[0061] 术语“亚芳基”为领域公认的，用于本文时适于通过脱去如上所定义的芳环的两个氢原子获得的二基。

[0062] 本文所用术语“芳基烷基”或“芳烷基”意指通过如本文所定义的烷基添加到母体分子部分的如本文所定义的芳基。芳烷基的代表性实例包括但不限于苄基、2- 苯乙基、3- 苯丙基和 2- 萘 -2- 基乙基。

[0063] 本文所用术语“联芳基”意指芳基取代的芳基、芳基取代的杂芳基、杂芳基取代的芳基或杂芳基取代的杂芳基，其中芳基和杂芳基如本文所定义。代表性实例包括 4-（苯基）苯基和 4-(4- 甲氧苯基）吡啶基。

[0064] 本文所用术语“杂芳基”包括芳环系统的基团，包括但不限于单环、二环和三环，其具有包含至少一个杂原子的 3-12 个原子，所述杂原子例如氮、氧或硫。为了举例说明的目的，不应将其解释为限制本发明的范围：氨基苯并咪唑、苯并咪唑、氮杂吲哚基、苯并 (b) 噻吩基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并三唑基、苯并噁二唑基、呋喃基、咪唑基、咪唑并吡啶基、吲哚基、吲哚啉基、吲唑基、异吲哚啉基、异噁唑基、异噻唑基、异喹啉基、噁二唑基、噁唑基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、吡咯并 [2,3-d] 嘧啶基、吡唑并 [3,4-d] 嘧啶基、喹啉基、喹唑啉基、三唑基、噻唑基、苯硫基、四氢吲哚基、四唑基、噻二唑基、噻吩基、硫代吗啉基、三唑基或莨菪烷基。本发明的杂芳基被独立选自以下的 0、1、2、3、4 或 5 个取代基取代：烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷基硫代、卤代烷基硫代、氟烷基硫代、烯基硫代、炔基硫代、磺酸、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酸基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧羰基、卤代烷氧基羰基、氟烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、烷基羰氧基、卤代烷基羰氧基、氟烷基羰氧基、烯基羰氧基、炔基羰氧基、烷基磺酰基氧基、卤代烷基磺酰基氧基、氟烷基磺酰基氧基、烯基磺酰基氧基、炔基磺酰基氧基、卤代烷氧基磺酰基氧基、氟烷氧基磺酰基氧基、烯氧基磺酰基氧基、炔氧基磺酰基氧基、烷基亚磺酰基氧基、卤代烷基亚磺酰基氧基、氟烷基亚磺酰基氧基、烯基亚磺酰基氧基、炔基亚磺酰基氧基、烷氧基亚磺酰基氧基、卤代烷氧基亚磺酰基氧基、氟烷氧基亚磺酰基氧基、烯氧基亚磺酰基氧基、炔氧基亚磺酰基氧基、氨基亚磺酰基氧基、氨基、酰胺基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦基、磷酰基、甲硅烷基、甲硅烷基氧基，以及通过亚烷基部分（例如亚甲基）与杂芳基结合的任何所述取代基。

[0065] 术语“杂亚芳基”为领域公认的，用于本文时适于通过脱去如上所定义的杂芳环的两个氢原子获得的二基。

[0066] 本文所用术语“杂芳基烷基”或“杂芳烷基”意指通过如本文所定义的烷基添加

到母体分子部分中的如本文所定义的杂芳基。杂芳基烷基的代表性实例包括但不限于吡啶 -3- 基甲基和 2-(噻吩 -2- 基) 乙基。

[0067] 本文所用术语“稠合二环基”意指二环系统的基团，其中两个环邻位稠合，且每个环包含含有两个稠合原子的总计 4、5、6 或 7 个原子 (即碳和杂原子)，以及每个环可以是完全饱和的、可包含一个或多个不饱和单元或者可以是完全不饱和的 (例如在某些情况下为芳族的)。为避免疑义，稠合二环基中的不饱和度不导致产生芳基或杂芳基部分。

[0068] 术语“卤代”或“卤素”意指 -Cl、-Br、-I 或 -F。

[0069] 术语“卤代烷基”意指其中至少一个氢被如本文所定义的卤素取代的如本文所定义的烷基。卤代烷基的代表性实例包括但不限于氯甲基、2- 氟乙基、三氟甲基、五氟乙基和 2- 氯 -3- 氟戊基。

[0070] 术语“氟烷基”意指其中某些或全部氢被氟取代的如本文所定义的烷基。

[0071] 本文所用术语“卤代亚烷基”适于通过脱去如上所定义的卤代烷基的两个氢原子获得的二基。

[0072] 本文所用术语“羟基”意指 -OH 基团。

[0073] 本文所用术语“烷氧基”意指通过氧原子添加到母体分子部分的本文所定义的烷基。烷氧基的代表性实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2- 丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和己氧基。同样地定义术语“烯氧基”、“炔氧基”、“碳环基氧基”和“杂环基氧基”。

[0074] 本文所用术语“卤代烷氧基”意指其中至少一个氢被如本文所定义的卤素取代的本文所定义的烷氧基。卤代烷氧基的代表性实例包括但不限于氯甲氧基、2- 氟乙氧基、三氟甲氧基和五氟乙氧基。同样地定义术语“氟烷氧基”。

[0075] 本文所用术语“芳氧基”意指通过氧添加到母体分子部分的如本文所定义的芳基。本文所用术语“杂芳氧基”意指通过氧添加到母体分子部分的如本文所定义的杂芳基。同样地定义术语“杂芳氧基”。

[0076] 本文所用术语“芳基烷氧基”或“芳烷氧基”意指通过氧添加到母体分子部分的如本文所定义的芳基烷基。同样地定义术语“杂芳基烷氧基”。芳氧基和杂芳基烷氧基的代表性实例包括但不限于 2- 氯苯基甲氧基、3- 三氟甲基 - 苯基乙氧基和 2,3- 二甲基吡啶基甲氧基。

[0077] 本文所用术语“巯基”或“硫基 (thio)”意指 -SH 基团。

[0078] 本文所用术语“烷基硫代”意指通过硫添加到母体分子部分的如本文所定义的烷基。烷基硫代的代表性实例包括但不限于甲基硫代、乙基硫代、叔丁基硫代和己基硫代。同样地定义术语“卤代烷基硫代”、“氟烷基硫代”、“烯基硫代”、“炔基硫代”、“碳环基硫代”和“杂环基硫代”。

[0079] 本文所用术语“芳基硫代”意指通过硫添加到母体分子部分的如本文所定义的芳基。同样地定义术语“杂芳基硫代”。

[0080] 本文所用术语“芳基烷基硫代”或“芳烷基硫代”意指通过硫添加到母体分子部分的如本文所定义的芳基烷基。同样地定义术语“杂芳基烷基硫代”。

[0081] 本文所用术语“磺酰基”是指 $-S(=O)_2-$ 基团。

[0082] 本文所用术语“磺酸”是指 $-S(=O)_2OH$。

[0083] 本文所用术语“烷基磺酰基”意指通过如本文所定义的磺酰基添加到母体分子部

分的如本文所定义的烷基。烷基磺酰基的代表性实例包括但不限于甲磺酰基和乙磺酰基。同样地定义术语“卤代烷基磺酰基”、“氟烷基磺酰基”、“烯基磺酰基”、“炔基磺酰基”、“碳环基磺酰基”、“杂环基磺酰基”、“芳基磺酰基”、“芳烷基磺酰基”、“杂芳基磺酰基”和“杂芳烷基磺酰基”。

[0084] 本文所用术语“烷氧基磺酰基”意指通过如本文所定义的磺酰基添加到母体分子部分的如本文所定义的烷氧基。烷氧基磺酰基的代表性实例包括但不限于甲氧基磺酰基、乙氧基磺酰基和丙氧基磺酰基。同样地定义术语“卤代烷氧基磺酰基”、“氟烷氧基磺酰基”、“烯氧基磺酰基”、“炔氧基磺酰基”、“碳环氧基磺酰基”、“杂环氧基磺酰基”、“芳氧基磺酰基”、“芳烷氧基磺酰基”、“杂芳氧基磺酰基”和“杂芳烷氧基磺酰基”。

[0085] 术语三氟甲磺酰基 (triflyl)、甲苯磺酰基、甲磺酰基和九氟丁磺酰基为领域公认的，分别是指三氟甲烷磺酰基、对甲苯磺酰基、甲烷磺酰基和九氟丁烷磺酰基。术语三氟甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯和九氟丁磺酸酯为领域公认的，分别是指三氟甲烷磺酸酯、对甲苯磺酸酯、甲烷磺酸酯和九氟丁烷磺酸酯官能团以及包含所述基团的分子。

[0086] 本文所用术语“氨基磺酰基”意指通过磺酰基添加到母体分子部分的本文所定义的氨基。

[0087] 本文所用术语“亚磺酰基”是指 -S(=O)- 基团。亚磺酰基如上文对磺酰基所定义。本文所用术语“亚磺酸”是指 -S(=O)OH。

[0088] 术语“氧基”是指 -O- 基团。

[0089] 本文所用术语“羰基”意指 -C(=O)- 基团。

[0090] 本文所用术语“硫代羰基”意指 -C(=S)- 基团。

[0091] 本文所用术语“甲酰基”意指 -C(=O) 氢基团。

[0092] 本文所用术语“酰基”是指 -C(=O)R 形式的任何基团，其中 R 为有机基团。酰基的实例为乙酰基 (-C(=O)CH_3)。

[0093] 本文所用术语“烷基羰基”意指通过如本文所定义的羰基添加到母体分子部分的如本文所定义的烷基。烷基羰基的代表性实例包括但不限于乙酰基、1- 氧代丙基、2,2- 二甲基 -1- 氧代丙基、1- 氧代丁基和 1- 氧代苯基。同样地定义术语“卤代烷基羰基”、“氟烷基羰基”、“烯基羰基”、“炔基羰基”、“碳环基羰基”、“杂环基羰基”、“芳基羰基”、“芳烷基羰基”、“杂芳基羰基”和“杂芳烷基羰基”。

[0094] 本文所用术语“羧基”意指 -CO_2H 基团。

[0095] 本文所用术语“烷氧羰基”意指通过如本文所定义的羰基添加到母体分子部分的如本文所定义的烷氧基。烷氧羰基的代表性实例包括但不限于甲氧羰基、乙氧羰基和叔丁氧羰基。同样地定义术语“卤代烷氧基羰基”、“氟烷氧基羰基”、“烯氧基羰基”、“炔氧基羰基”、“碳环基氧基羰基”、“杂环基氧基羰基”、“芳氧基羰基”、“芳烷氧基羰基”、“杂芳氧基羰基”和“杂芳烷氧基羰基”。

[0096] 本文所用术语“烷基羰氧基”意指通过氧原子添加到母体分子部分的如本文所定义的烷基羰基。烷基羰氧基的代表性实例包括但不限于乙酰氧基、乙基羰氧基和叔丁基羰氧基。同样地定义“卤代烷基羰氧基”、“氟烷基羰氧基”、“烯基羰氧基”、“炔基羰氧基”、“碳环基羰氧基”、“杂环基羰氧基”、“芳基羰氧基”、“芳烷基羰氧基”、“杂芳基羰氧基”和“杂芳烷基羰氧基”。

[0097] 本文所用术语“烷基磺酰基氧基”意指通过氧原子添加到母体分子部分的如本文所定义的烷基磺酰基。同样地定义术语“卤代烷基磺酰基氧基”、“氟烷基磺酰基氧基”、“烯基磺酰基氧基”、“炔基磺酰基氧基”、“碳环基磺酰基氧基”、“杂环基磺酰基氧基”、“芳基磺酰基氧基”、“芳烷基磺酰基氧基”、“杂芳基磺酰基氧基”、“杂芳烷基磺酰基氧基”、“卤代烷氧基磺酰基氧基”、“氟烷氧基磺酰基氧基”、“烯氧基磺酰基氧基”、“炔氧基磺酰基氧基”、“碳环基氧基磺酰基氧基”、“杂环基氧基磺酰基氧基”、“芳氧基磺酰基氧基”、“芳烷氧基磺酰基氧基”、“杂芳氧基磺酰基氧基”和“杂芳烷氧基磺酰基氧基”。

[0098] 本文所用术语“氨基”或“胺”是指 $-NH_2$ 及其经取代的衍生物，其中一个或两个氢独立地被选自以下的取代基取代：上文所定义的烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、碳环基羰基、杂环基羰基、芳基羰基、芳烷基羰基、杂芳基羰基、杂芳烷基羰基以及磺酰基和亚磺酰基；或者两个氢一起被亚烷基取代（以形成含氮的环）。代表性实例包括但不限于甲氨基、乙酰氨基和二甲氨基。

[0099] 本文所用术语“酰胺基 (amido)”意指通过羰基添加到母体分子部分的如本文所定义的氨基。

[0100] 本文所用术语“氰基”意指 $-C\equiv N$ 基团。

[0101] 本文所用术语“硝基”意指 $-NO_2$ 基团。

[0102] 本文所用术语“叠氮基”意指 $-N_3$ 基团。

[0103] 本文所用术语“膦基 (phosphinyl)”或“膦基 (phosphino)”包括 $-PH_3$ 及其经取代的衍生物，其中一个、两个或三个氢被选自以下的取代基独立地取代：烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、芳氧基、芳烷氧基、杂芳氧基、杂芳烷氧基和氨基。

[0104] 本文所用术语“磷酰基”是指 $-P(=O)OH_2$ 及其经取代的衍生物，其中一个或两个羟基被选自以下的取代基独立地取代：烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、芳氧基、芳烷氧基、杂芳氧基、杂芳烷氧基和氨基。

[0105] 本文所用术语“甲硅烷基”包括 H_3Si- 及其经取代的衍生物，其中一个、两个或三个氢被选自以下的取代基独立地取代：烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳烷基。代表性实例包括三甲基甲硅烷基 (TMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基 (TBDPS)、叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBS/TBDMS)、三异丙基甲硅烷基 (TIPS) 和 [2-(三甲基甲硅烷基) 乙氧基] 甲基 (SEM)。

[0106] 本文所用术语“甲硅烷基氧基”意指通过氧原子添加到母体分子的如本文所定义的甲硅烷基。

[0107] 缩写 Me、Et、Ph、Tf、Nf、Ts、Ms、Cbz 和 Boc 分别代表甲基、乙基、苯基、三氟甲烷磺酰基、九氟丁烷磺酰基、对甲苯磺酰基、甲烷磺酰基、苄氧羰基和叔丁氧羰基。具有本领域普通技术的有机化学家所用缩写的更全面的列表见 *Journal of Organic Chemistry* 每卷的首期；通常此列表存在于标题为 *Standard List of Abbreviations* 的表格中。

[0108] “蛋白质表达相关的疾病”意指这样的疾病或病症，其病理学至少在某种程度上与

不适当的蛋白质表达（例如，在错误时间和/或在错误细胞中的表达）、过度的蛋白质表达或突变蛋白的表达相关。在一个实施方案中，当突变蛋白干扰细胞、组织或器官的正常生物活性时，引起突变蛋白疾病。

[0109] “突变蛋白”意指相对于参照（野生型）蛋白质具有以下变化的蛋白质，所述变化影响其一级、二级或三级结构。

[0110] “增强”意指至少约 10%、15%、25%、50%、75% 或 100% 的正变化。

[0111] “减轻”意指至少约 10%、25%、50%、75% 或 100% 的负变化。

[0112] “选择性降解”意指优先作用于靶定蛋白，使得其它蛋白质基本上不受影响的降解。在多个实施方案中，降解少于约 45%、35%、25%、15%、10% 或 5% 的非靶定蛋白。

[0113] 本文所用术语“处理”、“治疗”、“疗法”等是指减轻或改善与之相关的病症和/或症状。要理解的是，虽然不排除，但是治疗病症或病况不要求完全消除与之相关的病症、病况或症状。

[0114] 本文所用术语“阻止”、“防止”、“预防”、“预防性治疗”等是指降低在受试者中形成病症或病况的可能性，所述受试者未患有病症或病况，但是处于形成病症或病况的风险中或易形成病症或病况。

[0115] BOC_3-ARG 介导的降解

小分子可通过引导靶蛋白进入遍在蛋白化途径来促进降解。具有 N 端 Arg 残基的蛋白质被遍在蛋白连接酶的特定组识别，引起快速降解。可通过经由接头将 Arg 与抑制剂连接以使蛋白质此时似乎具有 N 端 Arg，来诱导降解。选择谷胱甘肽 S- 转移酶 α-1(GST α-1) 作为模型蛋白质，并选择依他尼酸 (EA) 作为抑制剂（图 10）。如图 10A 所示，EA 与 GST 的活性部位 Cys 形成共价加合物。EA 羧基的修饰对失活具有很少影响（图 10C）。在试图合成 EA-Arg (1，图 10) 时，合成了其经 Boc 保护的前体 EA-Boc_3Arg (2，图 10)。使用 EA-Boc_3Arg 观察到降解（图 5）。在用 EA 或 EA- 接头 (3，图 10) 处理蛋白质时或者在不存在抑制剂时，未观察到降解。在来自网织红细胞、HeLa、Cos 和 NIH 3T3 细胞的裂解物中观察到降解。

[0116] 合成了第二种 Boc_3Arg 连接的 GST 抑制剂以测试降解现象的普遍性。硫代苯并呋咱 (Fur) 亦与 GST 形成共价加合物（图 11）。Fur-Boc_3Arg 修饰的 GST-α-1 在来自 NIH 3T3 的裂解物中容易降解（图 11）。这些结果证实，Boc_3Arg 诱导的降解不依赖于与 GST-α-1 相互作用的配体的性质。

[0117] 此外，将大肠杆菌 (*E. coli*) 二氢叶酸还原酶 (eDHFR) 和甲氧苄啶 (TMP) 系统用于测试 Boc_3Arg 诱导的降解的普遍性。TMP 为 DHFR 的特异性抑制剂，其对哺乳动物酶具有弱亲和力。可在 B 环的 4 位上容易地修饰 TMP，同时保留效力和选择性（图 1，化合物 22）。已将 TMP 连接的荧光染料用于选择性标记细胞和细胞裂解物中的 eDHFR 融合蛋白。重要的是，尽管解离非常缓慢 ($T_{1/2}$ 约 20 分钟)，但是 eDHFR 和 TMP 之间的相互作用为非共价的。参见图 6。

[0118] 作为另外的实例，将 eDHFR 与绿色荧光蛋白 (GFP) 融合以更容易地观察降解。如同 EA-Boc_3Arg，TMP-Boc_3Arg 诱导其靶蛋白的降解（图 6）。TMP 和 TMP-Arg 诱导的降解，均不是在缺乏抑制剂的情况下观察到的降解。重要的是，不需要与靶蛋白的共价相互作用。

[0119] 亦评价了全细胞中的蛋白质降解。在 CMV 启动子的控制下，eDHFR-HA-GFP 在双顺反子构建体中与珊瑚虫 (*Discosoma* sp.) 红色荧光蛋白 (RFP) 共表达，DHFR-HA-GFP 翻译

发生在内部核糖体结合位点。因此单个 mRNA 负责产生 RFP 和 DHFR-HA-GFP 两者，使得在所有转染细胞中应产生相似比率的两种蛋白质。通过流式细胞术测定在红色荧光与绿色荧光的相对强度上的改变，提供在活细胞中 DHFR-HA-GFP 降解的实时轻快且定量的测定。如通过此测定法、抗 HA 印迹和抗 GFP 印迹所确定，在 80 μM TMP-Boc_3Arg 存在下，在 5 小时内观察到 eDHFR-HA-GFP 减少 40%（图 6）。单独使用 TMP 未观察到降解。重要的是，如通过台盼蓝染色和 PARP 裂解所测定，TMP-Boc_3Arg 在直至 135 μM 的浓度仍未表现出细胞毒性或诱导凋亡。此实验证实，TMP-Boc_3Arg 为细胞渗透性的并且可在全细胞环境下诱导大量靶蛋白的选择性降解。重要的是，降解远快于对 RNAi 通常观察到的降解。

[0120] 亦研究了 EA-Boc_3Arg 在全细胞环境下降解内源性 GST-π 的能力。在 EA-Boc_3Arg 存在下，在 2 小时内观察到 GST-π 信号消减 30%（图 12）。Boc_3Arg 部分可在体内调节内源性蛋白质水平。

[0121] 诸如 MG132、乳胞素和硼替佐米等蛋白酶体抑制剂阻断 Boc_3Arg 诱导的降解（图 13）。然而，较高分子量形式的 GST 或 eDHFR 在蛋白酶体抑制剂存在下不会蓄积，表明降解不需要遍在蛋白化。在将去遍在蛋白化酶抑制剂遍在蛋白醛或 IU1 与蛋白酶体抑制剂一起包括时（IU1 为 USP14 的抑制剂），仍未出现高分子量形式。虽然可能常常难以探测遍在蛋白化，但这些观察结果表明，Boc_3Arg 基团通过新的作用机制来诱导靶蛋白的降解，所述作用机制不依赖遍在蛋白途径并因此区别于 PROTAC。

[0122] TMP-Boc_3Arg 对 eDHFR 稳定性的作用。正如预期的，TMP 与 eDHFR 的缔合使熔点增加约 10℃（未显示数据）。在用另一种 TMP 连接部分 TMP-DOPA 处理 eDHFR 时，观察到相似增加（数据未显示），这正如预期，鉴于 B 环 4 位的修饰延伸到溶剂中并因此对 TMP 的亲和力具有可忽略的作用。相比之下，在 TMP-Boc_3Arg 存在下观察到稳定性的较小增加。这些观察结果指出，Boc_3Arg 基团与 eDHFR 相互作用。

[0123] 蛋白质结合部分

本发明的蛋白质结合部分为结合靶蛋白的分子结构。将这些蛋白质结合部分与标签共价连接以形成本发明的化合物，并提供本发明化合物的这两个元件之间的连接。当本发明化合物的蛋白质结合部分与给定靶蛋白结合时，其提呈标签以触发蛋白质降解。

[0124] 在某些实施方案中，蛋白质结合部分衍生自由与预定的靶分子结合所限定的小有机分子，具有约 50- 约 30,000 的分子量以及对关注的靶蛋白具有大于约 10^5 M^{-1} 的结合亲和力。在有利实施方案中的结合亲和力大于约 10^6 M^{-1}。在有利实施方案中的分子量介于约 50- 约 3,000 之间。在更有利实施方案中的结合亲和力大于约 10^8 M^{-1}。在某些实施方案中的分子量介于约 100- 约 2,000 之间。

[0125] 亦可基于具有至少一个下列特征来选择靶蛋白结合元件：少于 50 个 H 键供体，MW 小于 5,000，ClogP 或 MLogP（计算的 log P，基于 Pomona College Medicinal Chemistry 程序 ClopP 或使用基于 Molecular Design Limited MACCS 和 ISIS 的程序 MlogP，logP（辛醇 / 水分配系数的对数）小于 6，N 和 O 的总数（H 键受体的粗略衡量）少于 100。

[0126] 亦可基于具有至少一个以下特征来选择靶蛋白结合元件：少于 5 个 H 键供体，MW 小于 500，ClogP 或 MLogP 小于 5，N 和 O 的总数（H 键受体的粗略衡量）少于 10。

[0127] 亦可基于具有以下特征的两个或更多个组合来选择靶蛋白结合元件：少于 5 个 H 键供体，MW 小于 500，ClogP 或 MLogP 小于 5，N 和 O 的总数（H 键受体的粗略衡量）少于 10

(Lipinski C A, 1997, Adv. Drug Delivery Rev. 23, 3-25)。

[0128] 在某些实施方案中，蛋白质结合部分与肽、蛋白质以及 DNA 和 RNA 不同，因为它们不是高度带电或高极性的，由于大小和疏水性所致而容易地吸收进体内。此外，靶蛋白结合元件的其它关键特性之一为相对于蛋白质的稳定性，因需要维持折叠多肽链的给定结构构象所致，所述蛋白质在狭窄范围的温度、pH 和离子强度内稳定。虽然对环境的物理性质不如药物敏感，但因其在细胞内的弱生物稳定性、短半寿期和弱生物利用度所致，肽与药物相比相对不适合并且不被认为是本发明的化合物。

[0129] 具有靶蛋白结合元件中所需部分的分子的一些实例包括选择用于结合和 / 或抑制多种蛋白质功能的药物分子和分子，例如 :依他尼酸、甲氧苄啶、荧光素、生物素、抗原、L- 得普尼林、奥美拉唑、克拉维酸盐、诸如 4',5'- 双 (1,3,2- 二硫代砷杂环戊烷 -2- 基) 荧光素、对氨基苯基胂氧化物、对氨基苯基胂氧化物等有机砷化物、菊苣酸、卡托普利、依那普利、洛伐他汀、保列治、indinivar、齐留通、L-372,460 (J. Med Chem 41, 401, 1998)、阿扑吗啡、N- 正丙基降阿扑吗啡、二羟西啶、喹吡罗、氯氮平、氟哌啶醇、硝基卡拉美芬、碘代卡拉美芬、硫代苯并呋咱衍生物、O^6- 烷基鸟嘌呤衍生物和 O^2- 苄基胞嘧啶衍生物。

[0130] 从上述小样品明显看出在化学上存在大量实例，其可形成蛋白质结合部分的化学基础。这些潜在的蛋白质结合部分的许多性质亦说明潜在的简便性，利用所述简便性可使用常规实验发现这类部分。

[0131] 本发明的化合物包括用于其中产生生物效应的兽医、农业、食品和环境应用的小分子。本发明化合物的实例为杀真菌剂、除草剂、杀虫剂、除藻剂、杀昆虫剂、抗病毒药、抗寄生虫药等。此外，本发明的化合物亦为能够与关注的靶蛋白形成共价键的分子，例如自杀抑制剂。能够形成共价键的众所周知的药物的实例如下 :L- 得普尼林 (Gerlach, M 等 1992, Eur. J. Pharmacol. 226, 97-108)、奥美拉唑 (Howden, C W. 1991, Clin. Pharmacokinet, 20, 38-49) 和克拉维酸盐 (Neu, H C. 1990, J. Am. Acad. Dermatol, 22, 896-904)。除这些众所周知的分子之外，还已知与多种蛋白质特异地形成共价键的相当多数量的其它小分子。用于共价修饰蛋白质 (例如法尼基化、磷酸化、糖基化和香叶基化 (gerenylation)) 的酶底物亦考虑为本发明化合物，其中天然酶底物以其包含标签的方式进行修饰。

[0132] 蛋白质结合部分的靶标

靶蛋白结合部分的靶标很多且选自蛋白质以及在细胞中表达使得至少一部分序列在细胞内可用的蛋白质。术语蛋白质包括多于两个氨基酸的所有序列且包括肽。下文为靶蛋白的部分列表。真核细胞中的任何蛋白质均为通过本发明化合物介导的降解的靶标。特别关注的那些为涉及所包括的疾病或疾病过程的那些 ;其为病毒、微生物和寄生性质的传染病、代谢病、老化、环境性疾病、遗传疾病、生活方式疾病。此外，涉及性能增强的蛋白质靶标亦为靶标，例如涉及生长和发育、记忆以及感知觉的那些。

[0133] 考虑作为主题发明靶标的病毒的实例为 HIV1、HIV2、HLTV、CMV、HPV、HSV、肝炎、HBV、HCV、HAV、HDV、HGV、A 型流行性感冒、B 型流行性感冒、C 型流行性感冒、鼻病毒、轮状病毒、肠道病毒 (entroviruses)、Ebola、脊髓灰质炎、水痘、RSV、冠状病毒、腺病毒、3 型副流行性感冒、A 型柯萨奇病毒和 EB 病毒。

[0134] 以下为主题发明的蛋白质结合部分的靶标的实例，其包括 :

受体：CD124、B7.1 和 B7、TNFR1m(p55)、TNFR2 (p75)、Bcl/Bax、硫氧还蛋白相互作用蛋白及凋亡途径中的其它配偶体、C5a 受体、CXCR1、CXCR2、5HT 受体、多巴胺受体、G 蛋白（即 Gq)、组胺受体、趋化因子受体、JAK/STAT cf 配体、RXR 及类似物、CD4、CD5、IL-2 受体、IL-1 受体、TNF-α R、ICAM1、VCAM、VLA-4 整联蛋白、选择蛋白、CD40/CD40L、神经激肽及受体、Ras/Raf/MEK/ERK 途径、血管内皮生长因子、催产素受体、微粒体转移蛋白抑制剂、血管紧张素 II、甘氨酸受体、去甲肾上腺素重摄取受体、内皮素受体、神经肽 Y 和受体、腺苷受体、嘌呤能受体 (P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2X1-7)、NGF 的受体 TrkA、β-淀粉状蛋白、酪氨酸激酶 Flk-1/KDR、玻连蛋白受体、整联蛋白受体、Her-2/neu、MCH 受体、IL-4 受体 α 链和 Toll 样受体及人同源物、FKHR 和 AFX 或者 daf2、daf 16 和 age 1 的人同源物。

[0135] 酶：NADPH 氧化酶、HMG-CoA 还原酶、PDE V 型磷酸二酯酶、PDE IV 4 型磷酸二酯酶、PDEI、PDEII、PDEIII、角鲨烯环化酶抑制剂、一氧化氮 (NO) 合酶、环加氧酶 1、环加氧酶 2,5-脂肪加氧酶、类胰蛋白酶丝氨酸蛋白酶、胸苷酸合酶、嘌呤核苷磷酸化酶、锥虫 GAPDH、糖原磷酸化酶、碳酸酐酶、HIV 1 蛋白酶、HIV 1 整合酶、流行性感冒、神经氨酸酶、乙型肝炎逆转录酶、酪氨酸激酶、CD23、酪氨酸激酶 p56 lck、次黄苷酸脱氢酶、p38 MAP 激酶、白介素 -1 转化酶、胱天蛋白酶、HCV、NS3 蛋白酶、HCV NS3 RNA 解旋酶、甘氨酰胺核糖核苷酸甲酰基转移酶、鼻病毒 3C 蛋白酶、单纯疱疹病毒 -1 (HSV-1) 蛋白酶、巨细胞病毒 (CMV) 蛋白酶、聚 (ADP- 核糖）聚合酶、细胞周期蛋白依赖性激酶、5α 还原酶抑制剂、腺苷激酶和 AMP 脱氨酶、法尼基转移酶、香叶基香叶基转移酶、端粒酶、胞质磷脂酶 A2、EGF 受体酪氨酸激酶。

[0136] 膜转运蛋白：钠通道、Ca++ 通道、多抗药性 (MDR)、蛋白 P- 糖蛋白（和 MRP)、胆汁酸转运蛋白。

[0137] 杀虫剂靶标实例包括蜕皮激素 20- 单加氧酶、GABA 门控的氯通道的离子通道、乙酰胆碱酯酶、电压敏感的钠通道蛋白、钙释放通道和氯通道。

[0138] 除草剂靶标实例包括乙酰辅酶 A 羧化酶、腺苷酸琥珀酸合成酶、初卟啉原氧化酶和烯醇丙酮酰莽草酸 (enolpyruvylshikimate)- 磷酸合酶。

[0139] 用于抗寄生虫药开发的靶标包括：利什曼原虫属 (Leishmania)，甾醇合成途径的蛋白质；疟原虫属 (Plasmodium)，二氢叶酸还原酶，已知因在此酶基因中的突变产生二氢叶酸还原酶 - 胸苷酸合酶（双功能的）抗性，血红素聚合酶、二氢乳清酸脱氢酶；锥虫属 (Trypanosoma)，鸟氨酸脱羧酶、锥虫胱甘肽还原酶。因其长半寿期以及在锥虫属中缓慢的代谢回转所致，锥虫属的鸟氨酸脱羧酶亦代表用于灭除的理想候选物。亦已提出，为除草剂开发靶标的莽草酸途径，因其在哺乳动物中缺失而亦会在开发用于顶复门 (Apicomplexa) 寄生虫（即恶性疟原虫 (Plasmodium falciparum)、小球隐孢子虫 (Cryptosporidium parvum) 和鼠弓形体 (Toxoplasma gondii)）的抗寄生虫药中具有价值。

[0140] 融合蛋白中的靶标包括但不限于：GST、DHRF、SNAP、CLIP 和 HALO。

[0141] 主题发明的靶标亦包括涉及细胞和 / 或生物的性能的蛋白质。细胞和 / 或生物的性能特征为这样的特征，认为其是细胞和 / 或生物在某种程度上所具有的合乎需要的性状。这些性能特征可存在于其它细胞或生物中，且在不具有它们的细胞和 / 或生物中为需要的。考虑的性能特征的实例为花色、香味、在诸如猫和狗等生物中的特定形状和颜色、抗病性、生长速率、大小、味道、来自酵母的醇产率。因此，性能特征通常为用于产生所需产物或用于产生美学价值（视觉、味觉、感觉、嗅觉和听觉）的细胞和生物所需的事物。

[0142] 就花色而言（考虑美学价值），将涉及类黄酮、类胡萝卜素和花色苷的生物合成的蛋白质考虑为涉及性能特征的主题发明的靶标；包括黄烷酮 3- 羟化酶、花色苷合酶、二氢黄酮醇 4- 还原酶、类黄酮 3',5'- 羟化酶、花色苷 5- 芳族酰基转移酶、UDP- 葡萄糖：类黄酮 3-O- 葡萄糖基转移酶、花色苷鼠李糖基转移酶、花色苷 3'- 甲基转移酶、花色苷 3'5'- 甲基转移酶、无色花色素加双氧酶、花色素合酶、花色苷酰基转移酶、查耳酮合酶、查尔酮黄烷酮异构酶、谷胱甘肽 S- 转移酶。除涉及花色合成的蛋白质之外，涉及合酶表达的调节的蛋白质和涉及花色产生的其它蛋白质亦被考虑为主题发明的靶标。调节基因的实例包括 R 和 C1 基因家族、an2 以及 jaf13、delila 基因。Quattrocchio F. 1998, Plant J. 13(4), 475-488。

[0143] 主题发明的其它潜在靶分子包括如上所述的靶标以及所有真核生物中的靶标。潜在的靶标存在于农业、兽医和环境领域。例如在农业领域中，作用具选择性且无毒的分子对于用作除草剂、抗病毒药、抗寄生虫药、生长调节剂和药物而言是高度需要的；因此可自农业关注的特定动物、植物、病毒和寄生虫中选择靶分子。兽医领域关注抗病毒药、抗寄生虫药、抗生素、生长调节剂、抗炎药和药物，可自兽医学中关注的特定动物、病毒和寄生虫中选择靶分子。环境领域中的潜在靶标与农业的潜在靶标相同，但其目的为选择性控制特定种群，在濒危物种的情况下进行正向控制，以及在种群扩张超出其环境或给定生态系统不需要外来生物时进行负向控制。因此，本领域技术人员理解的是，调节所选靶分子水平的能力可在科学、技术和人类努力的非常多领域中具有广泛范围的影响。

[0144] 化合物

本发明的一个方面涉及这样的化合物，其包含：与蛋白质结合的蛋白质结合部分、促进所述蛋白质降解的标签以及将蛋白质结合部分与标签连接的共价接头。

[0145] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中哺乳动物中该蛋白质的过度表达至少在某种程度上为疾病或病症的起因。

[0146] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中所述蛋白质选自谷胱甘肽 -S- 转移酶 α 1 (GST)、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、肉毒杆菌毒素 (BoNT)、1 型 IMP 脱氢酶 (IMPDH1) 的突变形式、Bcr-Abl 以及硫氧还蛋白相互作用蛋白。1 型 IMP 脱氢酶 (IMPDH1) 的突变形式引发色素性视网膜炎。

[0147] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中所述蛋白质为包含第一蛋白和第二蛋白的融合蛋白。在某些实施方案中，第一蛋白为 GST、DHFR、SNAP、CLIP 或 HALO。在某些实施方案中，标签促进第二蛋白的降解。在某些实施方案中，第一蛋白为 GST。在某些实施方案中，第一蛋白为 GST；而蛋白质结合部分为依他尼酸。在某些实施方案中，第一蛋白为 GST；而蛋白质结合部分为硫代苯并呋咱衍生物。在某些实施方案中，第一蛋白为 DHFR；而蛋白质结合部分为甲氧苄啶衍生物。在某些实施方案中，第一蛋白为 SNAP；而蛋白质结合部分为 O^6- 烷基鸟嘌呤衍生物或苄基鸟嘌呤衍生物。在某些实施方案中，第一蛋白为 CLIP；而蛋白质结合部分为 O^2- 苄基胞嘧啶衍生物。在某些实施方案中，第一蛋白为 HALO；而蛋白质结合部分为卤代烷衍生物。参见图 2。重要的是，术语“第一蛋白”和“第二蛋白”不是指融合构建体中蛋白质的顺序。

[0148] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中结合蛋白质的蛋白质结合部分为蛋白质活性的抑制剂。

[0149] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中将共价接头与蛋白质结合部分的氧、硫或氮结合。

[0150] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中共价接头包括亚烷基。

[0151] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中共价接头为氨基亚烷基氨基。

[0152] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中共价接头为 -N(H)$[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

[0153] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中共价接头为 $-(OCH_2CH_2)_nO-$；n 为 1-10。

[0154] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中共价接头为 $-(OCH_2CH_2)_nNH-$；n 为 1-10。

[0155] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中共价接头包括三唑基部分。

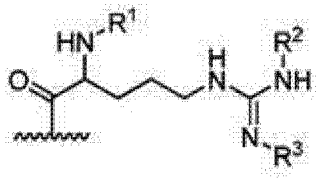
[0156] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 4-8。

[0157] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 6。

[0158] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中标签包括经氧化的氨基酸、脂质氧化降解产物、N 端法则残基或取代的精氨酸。

[0159] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中标签包括胍鎓。

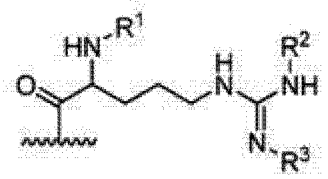
[0160] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中标签为



；R^1 为烷氧羰基，R^2 为烷氧羰基，R^3 为烷氧羰基。

[0161] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1、R^2 和 R^3 为叔丁氧羰基。

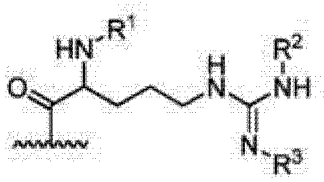
[0162] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中标签为



；R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基，R^2 为芳基磺酰基或杂芳基磺酰基；R^3 为氢。

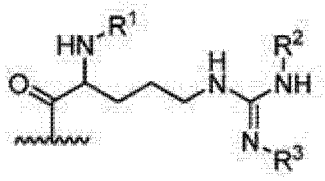
[0163] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基；R^3 为氢。

[0164] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中标签为



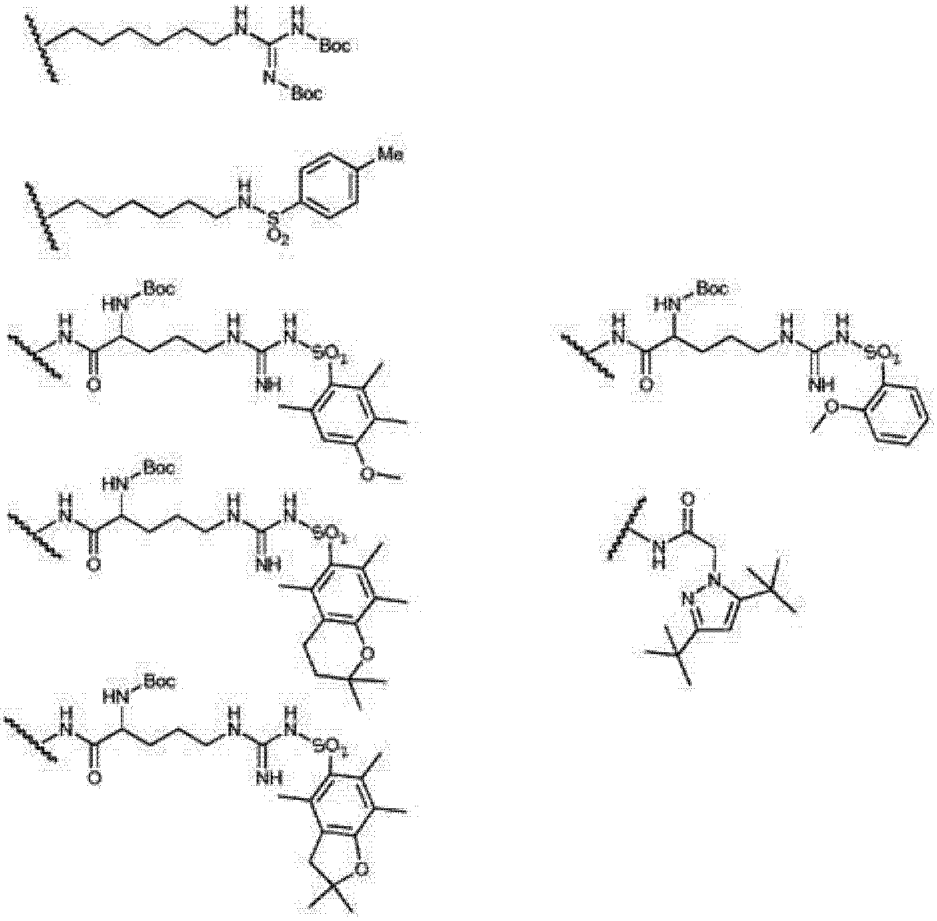
；R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基，R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

[0165] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中标签为

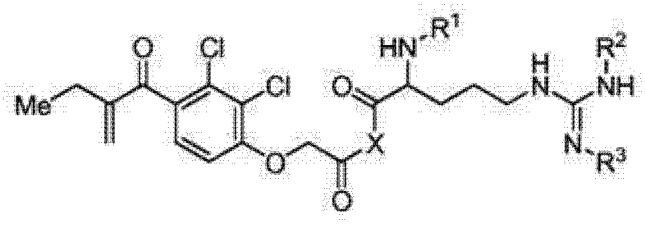


；R^1 为苄氧羰基，R^2 为苄氧羰基；R^3 为苄氧羰基。

[0166] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中标签选自：



本发明的另一个方面涉及由式 I 表示的化合物或其药学上可接受的盐，



I

其中

X 为氨基亚烷基氨基；

R^1 为烷氧羰基；

R^2 为烷氧羰基；和

R^3 为烷氧基羰基。

[0167] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

[0168] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 4-8。

[0169] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 6。

[0170] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基。

[0171] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为叔丁氧羰基。

[0172] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为叔丁氧羰基。

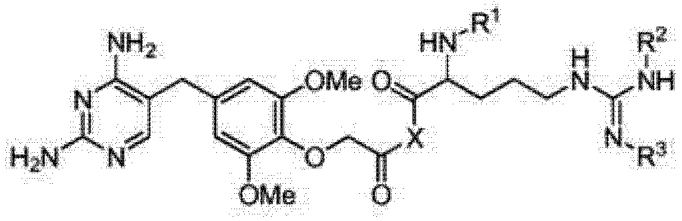
[0173] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基。

[0174] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

[0175] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 4-8。

[0176] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为叔丁氧羰基；R^3 为叔丁氧羰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 6。

[0177] 本发明的另一个方面涉及由式 II 表示的化合物或其药学上可接受的盐，



II

其中

X 为氨基亚烷基氨基；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳基磺酰基或杂芳基磺酰基；和

R^3 为氢。

[0178] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

[0179] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 4-8。

[0180] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 6。

[0181] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

[0182] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为苄氧羰基。

[0183] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为芳基磺酰基。

[0184] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为 4- 甲苯基磺酰

基。

[0185] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为芳基磺酰基。

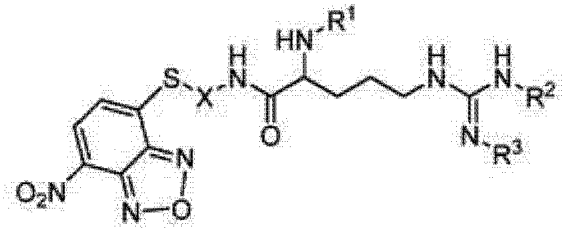
[0186] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基。

[0187] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 1-10。

[0188] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 4-8。

[0189] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为叔丁氧羰基；R^2 为 4- 甲苯基磺酰基；X 为 $-N(H)[CH_2]_nN(H)-$；n 为 6。

[0190] 本发明的另一个方面涉及由式 III 表示的化合物或其药学上可接受的盐，



III

其中

X 为亚烷基；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

[0191] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0192] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 4-8。

[0193] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 n 为 6。

[0194] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

[0195] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为苄氧羰基。

[0196] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

[0197] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为苄氧羰基。

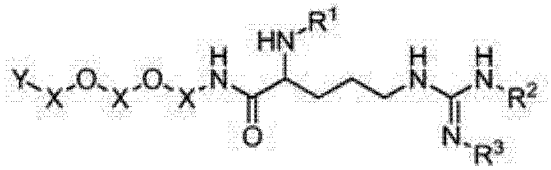
[0198] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

[0199] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为苄氧羰基。

[0200] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0201] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为苄氧羰基；R^2 为苄氧羰基；R^3 为苄氧羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 6。

[0202] 本发明的另一个方面涉及由式 IV 表示的化合物或其药学上可接受的盐，



IV

其中

X 为亚烷基；

Y 为氯、溴或碘；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

[0203] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0204] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

[0205] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为苄氧羰基。

[0206] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

[0207] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为苄氧羰基。

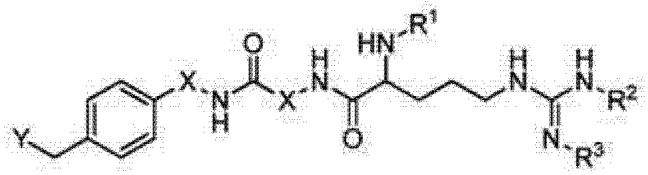
[0208] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

[0209] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为苄氧羰基。

[0210] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0211] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 Y 为氯。

[0212] 本发明的另一个方面涉及由式 V 表示的化合物或其药学上可接受的盐，



V

其中

X 为亚烷基；

Y 为氯、溴或碘；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

[0213] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0214] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

[0215] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为苄氧羰基。

[0216] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

[0217] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为苄氧羰基。

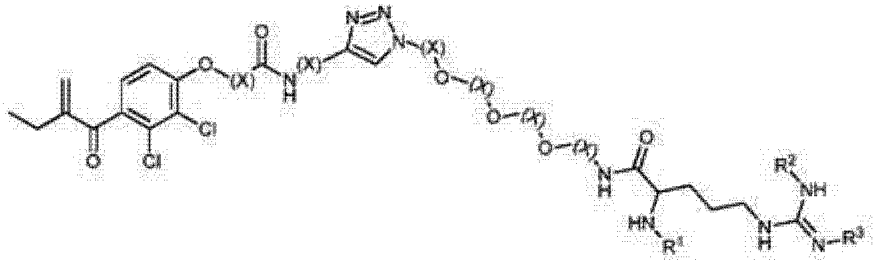
[0218] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

[0219] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为苄氧羰基。

[0220] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0221] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 Y 为氯。

[0222] 本发明的另一个方面涉及由式 VI 表示的化合物或其药学上可接受的盐，



VI

其中

X 为亚烷基；

R^1 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；

R^2 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基；和

R^3 为芳烷氧基羰基或杂芳烷氧基羰基。

[0223] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0224] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基。

[0225] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为苄氧羰基。

[0226] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为芳烷氧基羰基。

[0227] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^2 为苄氧羰基。

[0228] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为芳烷氧基羰基。

[0229] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^3 为苄氧羰基。

[0230] 在某些实施方案中，本发明涉及前述化合物中的任一种，其中 R^1 为芳烷氧基羰基；R^2 为芳烷氧基羰基；R^3 为芳烷氧基羰基；X 为 $-(CH_2)_n-$；n 为 1-10。

[0231] 可用药学上相容的反荷离子作为盐（即药学上可接受的盐）提供本发明的许多化合物。“药学上可接受的盐”意指在给予受者时，能够直接或间接提供本发明的化合物或本发明化合物的前体药物的任何无毒的盐。“药学上可接受的反荷离子”为在给予受者时自盐中释放时无毒的盐的离子部分。药学上相容的盐可用许多酸形成，所述酸包括但不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。与对应的游离碱形式相比，盐在水性溶剂或其它质子型溶剂中趋于更可溶。

[0232] 常用于形成药学上可接受的盐的酸包括无机酸，例如二硫化氢、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸和磷酸，以及有机酸，例如对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、重酒石酸、抗坏血酸、马来酸、苯磺酸、反丁烯二酸、葡萄糖酸、葡糖醛酸、甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、

乳酸、草酸、对溴苯磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸和乙酸，以及相关的无机酸和有机酸。因此这类药学上可接受的盐包括硫酸盐、焦硫酸盐、重硫酸盐、亚硫酸盐、重亚硫酸盐、磷酸盐、一氢磷酸盐、二氢磷酸盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、醋酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐、丁炔 -1,4- 二酸盐、己炔 -1,6- 二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟苯酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、β - 羟基丁酸盐、乙醇酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘 -1- 磺酸盐、萘 -2- 磺酸盐、扁桃酸盐等。优选的药学上可接受的酸加成盐包括由诸如盐酸和氢溴酸等矿物酸形成的那些盐，以及特别是由诸如马来酸等有机酸形成的那些盐。

[0233] 用于与酸性官能团形成药学上可接受的盐的合适碱包括但不限于诸如钠、钾和锂等碱金属的氢氧化物；诸如钙和镁等碱土金属的氢氧化物；诸如铝和锌等其它金属的氢氧化物；氨和有机胺，例如未取代的或羟基取代的一、二或三烷基胺；二环己基胺；三丁基胺；吡啶；N- 甲基，N- 乙基胺；二乙胺；三乙胺；一、二或三 -(2- 羟基 - 低级烷基胺)，例如一、二或三 -(2- 羟乙基）胺、2- 羟基 - 叔丁胺或三 -（羟甲基）甲胺、N,N- 二 - 低级烷基 -N-（羟基低级烷基）- 胺，例如 N,N- 二甲基 -N-(2- 羟乙基）胺或三 -(2- 羟乙基）胺；N- 甲基 -D- 葡糖胺；以及氨基酸，例如精氨酸、赖氨酸等。

[0234] 本发明的某些化合物及其盐可以多于一种晶形存在且本发明包括各种晶形及其混合物。

[0235] 本发明的某些化合物及其盐亦可以溶剂化物（例如水合物）的形式存在，且本发明包括各种溶剂化物及其混合物。

[0236] 本发明的某些化合物可含有一个或多个手性中心，并且以不同的旋光形式存在。当本发明的化合物含有一个手性中心时，所述化合物以两种对映体形式存在且本发明包括两种对映体及对映体的混合物，例如外消旋混合物。对映体可通过本领域技术人员已知的方法来拆分，例如通过形成可分离（例如通过结晶）的非对映异构盐；形成可分离（例如通过结晶、气液或液相色谱）的非对映异构衍生物或复合物；使一种对映体与对映体特异性试剂选择性反应，例如酶促酯化；或者在手性环境中的气液或液相色谱，手性环境例如在手性支持体上（例如带有结合的手性配体的二氧化硅）或在手性溶剂存在下。要理解的是，在通过上述分离程序之一将所需对映体转变成另一种化学实体时，可使用另外的步骤来释放所需的对映体形式。或者，特异性对映体可利用旋光试剂、底物、催化剂或溶剂通过不对称合成来合成，或通过不对称转化将一种对映体转化成另一种对映体来合成。

[0237] 当本发明的化合物含有多于一个手性中心时，其可以非对映异构形式存在。所述非对映异构化合物可通过本领域技术人员已知的方法来分离，例如色谱法或结晶，并且可如上述分离各对映体。本发明包括本发明化合物的各种非对映异构体及其混合物。

[0238] 本发明的某些化合物可以不同的互变异构形式存在或作为不同的几何异构体存在，且本发明包括本发明化合物的各种互变异构体和 / 或几何异构体及其混合物。

[0239] 本发明的某些化合物可以可分离的不同的稳定构象形式存在。因对于不对称单键的受限旋转所致的扭转不对称（例如因位阻或环张力所致），可允许分离不同的构象异构体。本发明包括本发明化合物的各种构象异构体及其混合物。

[0240] 本发明的某些化合物可以两性离子形式存在，且本发明包括本发明化合物的各种两性离子形式及其混合物。

[0241] 本发明亦包括前体药物。本文所用术语“前体药物”是指通过一些生理化学过程在体内转化成母体药物的物质（例如，在带入生理pH时将前体药物转化成所需的药物形式）。前体药物常常有用，因为在一些情况下，它们可比母体药物更容易给予。它们可例如通过口服给药而为生物可利用的，而母体药物则不能。前体药物亦可在药理组合物中具有与母体药物相比改进的溶解性。不受限制的前体药物的实例为这样的本发明化合物，其中将其作为酯（“前体药物”）给予以利于传输跨越细胞膜（在此处水溶性是不利的），但是之后其一旦处于细胞内（在此处水溶性是有利的）便代谢水解成羧酸。前体药物具有许多有用的特性。例如，前体药物与最终药物相比可更具水溶性，从而利于药物的静脉内给予。前体药物与最终药物相比亦可具有更高水平的口服生物利用度。给药之后，前体药物酶促或化学地裂解以在血液或组织中递送最终药物。

[0242] 示例性前体药物在裂解时释放相应的游离酸，本发明化合物的这类可水解的酯形成残基包括但不限于羧酸取代基（例如 $-C(O)_2H$ 或含有羧酸的部分），其中游离氢被以下取代基取代：(C_1-C_4) 烷基、(C_2-C_{12}) 烷酰氧甲基、(C_4-C_9) 1-（烷酰氧）乙基、具有5-10个碳原子的1-甲基-1-（烷酰氧）-乙基、具有3-6个碳原子的烷氧基羰基氧基甲基、具有4-7个碳原子的1-（烷氧基羰氧基）乙基、具有5-8个碳原子的1-甲基-1-（烷氧基羰氧基）乙基、具有3-9个碳原子的N-（烷氧羰基）氨甲基、具有4-10个碳原子的1-(N-（烷氧羰基）氨基）乙基、3-酞基、4-巴豆酰内酯基（crotonolactonyl）、γ-丁内酯-4-基、二-N,N-(C_1-C_2) 烷基氨基 (C_2-C_3) 烷基（例如 β-二甲氨基乙基）、氨基甲酰基-(C_1-C_2) 烷基、N,N-二 (C_1-C_2)-烷基氨基甲酰基-(C_1-C_2) 烷基和哌啶子基-、吡咯烷子基-或吗啉代 (C_2-C_3) 烷基。

[0243] 其它示例性前体药物释放本发明化合物的醇或胺，其中羟基或胺取代基的游离氢被以下取代基取代：(C_1-C_6) 烷酰氧甲基、1-（(C_1-C_6) 烷酰氧）乙基、1-甲基-1-（(C_1-C_6) 烷酰氧）乙基、(C_1-C_6) 烷氧羰基-氧甲基、N-(C_1-C_6) 烷氧羰基氨基-甲基、丁二酰基、(C_1-C_6) 烷酰基、α-氨基 (C_1-C_4) 烷酰基、芳酰基（arylacyl）和 α-氨酰基或 α-氨酰基-α-氨酰基（其中所述 α-氨酰基部分独立地为在蛋白质中发现的任何天然存在的L-氨基酸）、$-P(O)(OH)_2$、$-P(O)(O(C_1-C_6)$ 烷基 $)_2$ 或糖基（因碳水化合物半缩醛的羟基脱离而产生的基团）。

[0244] 本文所用短语“保护基”意指保护潜在活性官能团免受不需要的化学转化的临时取代基。这类保护基的实例分别包括羧酸的酯、醇的甲硅烷基醚以及醛和酮的缩醛和缩酮。已对保护基化学的领域进行综述（Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*（有机合成中的保护基），第二版；Wiley: New York, 1991）。本发明化合物的保护形式包括在本发明的范围内。

[0245] 本文所用术语“化学保护形式”适于其中一个或多个活性官能团经保护免受不必要的化学反应的化合物，即其呈经保护的基团或保护基（亦称为经掩蔽的基团或掩蔽基）形式。可方便或合乎需要地制备、纯化和/或处理呈化学保护形式的活性化合物。

[0246] 通过保护活性官能团，可进行涉及其它未保护活性官能团的反应，而不会影响已保护的基团；通常可在后续步骤中脱去保护基，而基本上不会影响分子的剩余部分。参见，例如Protective Groups in Organic Synthesis（有机合成中的保护基）（T. Green和P.

Wuts, Wiley, 1991) 和 Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基) (T. Green 和 P. Wuts ;第 3 版 ;John Wiley 和 Sons, 1999)。

[0247] 例如,可将羟基保护为醚 (-OR) 或酯 (-OC(=O)R),例如,作为 :叔丁醚 ;苄基醚、二苯甲基醚或三苯甲基醚 ;三甲基甲硅烷基醚或叔丁基二甲基甲硅烷基醚 ;或乙酰酯 (-OC(=O)CH_3, -OAc)。

[0248] 例如,可将醛基或酮基分别保护为缩醛或缩酮,其中通过与例如伯醇反应来将羰基 (C(=O)) 转化为二醚 ($C(OR)_2$)。在酸存在下,使用远过量的水通过水解来容易地再生醛基或酮基。

[0249] 例如,可将胺基保护为例如酰胺 (-NRC(=O)R) 或氨基甲酸酯 (-NRC(=O)OR),例如,作为 :甲酰胺 (-NHC(=O)CH_3) ;苄氧酰胺 (-NHC(=O)$OCH_2C_6H_5NHCbz$) ;作为叔丁氧酰胺 (-NHC=(=O)OC$(CH_3)_3$, -NHBoc) ;2- 二苯基 -2- 丙氧酰胺 (-NHC(=O)OC$(CH_3)_2C_6H_4C_6H_5NHBoc$)、作为 9- 芴基甲氧酰胺 (-NHFmoc)、作为 6- 硝基藜芦氧酰胺 (-NHNvoc)、作为 2- 三甲基甲硅烷基乙氧酰胺 (-NHTeoc)、作为 2,2,2- 三氯乙氧酰胺 (-NHTroc)、作为烯丙氧酰胺 (-NHAlloc)、作为 2-(苯磺酰基) 乙氧酰胺 (-NHPsec) ;或者在合适的情况下 (例如环胺),作为硝基氧基团。

[0250] 例如,可将羧酸基团保护为酯或酰胺,例如,作为 :苄基酯 ;叔丁酯 ;甲酯 ;或甲酰胺。

[0251] 例如,可将巯基保护为硫醚 (-SR),例如,作为 :苄基硫醚 ;或乙酰胺基甲醚 (-$SCH_2NHC(=O)CH_3$)。

[0252] 方法

在某些实施方案中,本发明提供利用靶定的蛋白质降解和 / 或靶定的多肽降解的蛋白质疗法的方法。筛选小分子文库的当前范例为寻找引起疾病的酶促过程的抑制剂。然而,既与多肽特异性结合,又抑制多肽功能 (即通过抑制一个或多个活性部位) 的小分子数量极少。近来已公认的是,在其靶标上具有长停留时间的抑制剂在体内更有效。此观察结果导出以下想法 :完美的抑制剂不可逆地灭活其靶标,使得仅靶蛋白的新合成恢复活性。显然,根据这个定义,诱导降解的抑制剂为完美的。此外,因活性部位趋于高度保守的或会聚性的,所以抑制靶定蛋白和 / 或多肽的活性部位的化合物,亦可表现出与一种或多种未靶定蛋白质和 / 或多肽的活性部位的不合乎需要的交叉反应。靶定蛋白质和 / 或多肽以降解的化合物可帮助限制此类交叉反应的程度。

[0253] 靶定的蛋白质和 / 或多肽降解亦对开发催化治疗剂有用。例如,本发明的治疗剂将特异性多肽靶定到蛋白酶体以降解。降解之后,所述药剂被释放且可用来将另一种多肽靶定到蛋白酶体以降解。这可允许在治疗上使用更低剂量的药剂,导致更低的费用和更少的副作用。

[0254] 本文所用的与多肽的表达和 / 或活性相关的病症 (即“蛋白质表达相关的疾病”) 意指这样的疾病或病症,其病理学至少在某种程度上与不适当的蛋白质表达 (例如在错误时间和 / 或在错误细胞中的表达)、过度的蛋白质表达或突变蛋白的表达相关 ;其包括由多肽的错误调节 (例如增量调节) 导致或表征的病症、疾病或病况。蛋白质表达相关的疾病可不利地影响细胞功能,包括但不限于细胞增殖、生长、分化或迁移、胞间或胞内交流、组织功能、生物中的全身反应、对病原性感染的易感性、免疫应答以及保护细胞免受有毒化合物

（例如致癌物、毒素或诱变剂）侵扰。

[0255] 在至少某些实例中，本文所公开的化合物可用于治疗蛋白质表达相关的疾病，例如细胞增殖性病症（例如癌症）。意图细胞增殖性病症的治疗包括增殖（包括快速增殖）的抑制。本文所用术语“细胞增殖性病症”包括以在多细胞生物中一种或多种细胞亚类的不合乎需要或不适当的增殖为特征的病症。术语“癌症”是指多种恶性新生物，其大部分可侵袭周围组织，并且可转移至不同部位（参见，例如 PDR Medical Dictionary (PDR 医学词典）第一版 (1995)）。术语“新生物”和“肿瘤”是指这样的异常组织，其通过比正常组织更快的细胞增殖生长，并且在去除开始增殖的刺激物后继续生长（参见，例如 PDR Medical Dictionary (PDR 医学词典）第一版 (1995)）。这类异常组织显示部分或完全缺乏结构组构以及与正常组织的功能协调，其可以是良性的（即良性瘤）或恶性的（即恶性瘤）。

[0256] 意图术语“细胞增殖性病症的治疗”包括预防受试者中新生物的生长或减少受试者中预先存在的新生物的生长。所述抑制亦可以是抑制新生物从一个部位转移到另一个部位。本发明意图包含的新生物种类的实例包括但不限于与乳腺、皮肤、骨、前列腺、卵巢、子宫、宫颈、肝、肺、脑、喉、胆囊、胰腺、直肠、甲状旁腺、甲状腺、肾上腺、免疫系统、神经组织、头和颈、结肠、胃、支气管和 / 或肾的癌症相关的那些新生物。

[0257] 细胞增殖性病症还可包括与血管平滑肌细胞的过量增殖相关的病症，例如增殖性心血管病症，如动脉粥样硬化和再狭窄 (restinosis)。细胞增殖性病症亦可包括诸如增殖性皮肤病症等病症，例如 X 连锁鱼鳞癣、银屑病、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、表皮松解性角化过度症和脂溢性皮炎。细胞增殖性病症还可包括诸如常染色体显性多囊性肾病 (ADPKD)、肥大细胞增多症 (mastocystosis) 以及由诸如病毒等传染剂引起的细胞增殖性病症等病症。

[0258] 在某些实施方案中，本发明涉及癌症化疗的方法。例如，在全部肿瘤的 20-30% 中发现了在 Ras 中的突变。Ras 为支架蛋白，并因此不像酶或受体那样顺从小分子抑制剂的开发。在某些实施方案中，本发明涉及降解致癌 Ras 的方法。作为概念的验证，通过甲氧苄啶标签降解 Ras-DHFR 融合蛋白。参见图 3。

[0259] 类似地，认为诸如 Myc 等转录因子为用于抗癌疗法的靶标，但是难以开发阻断转录因子作用的小分子。在某些实施方案中，本发明涉及降解 Myc 的方法。

[0260] 在某些实施方案中，本发明涉及改进现存抗癌疗法的方法。Bcr-Abl 为在引起慢性髓细胞性白血病 (CML) 的基因融合事件中形成的异常的蛋白激酶。诸如甲磺酸伊马替尼（即 Gleevec®）等选择性 Bcr-Abl 抑制剂已在治疗 CML 上非常成功。但是，需要新疗法来对抗抗药性。重要的是，仅阻断 Bcr-Abl 激酶的激酶活性不足以阻断其全部下游信号转导途径的激活；如果降解 Bcr-Abl，显然将消除这类激酶活性独立性信号转导。另外，伊马替尼和第二代抑制剂达沙替尼 (DS) 均不诱导 CML 干细胞的凋亡。认为此清除 CML 干细胞的失败在撤去药物时导致复发。在某些实施方案中，本发明涉及降解 Bcr-Abl 的方法。

[0261] 在某些实施方案中，本发明涉及改进现存糖尿病疗法的方法。硫氧还蛋白相互作用蛋白 (TXNIP) 的敲减针对葡萄糖诱导的凋亡提供保护。在某些实施方案中，本发明涉及降解 TXNIP 的方法。

[0262] 在至少某些实例中，本文所公开的化合物可用于治疗与病原体感染相关的病症。与病原体感染相关的病症包括但不限于经病毒 (DNA 病毒、RNA 病毒、动物病毒等）、细菌

（例如革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、抗酸菌等）、真菌、寄生微生物、线虫等的感染。

[0263] 本文所公开的化合物亦对治疗与异常的肽折叠和/或异常的肽降解有关的病症有用。这类病症包括但不限于细胞增殖性病症、朊病毒病（例如瘙痒病、克雅病、格施谢三氏症(Gerstmann-Strassler Scheinker disease)、牛海绵样脑病等）、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病、II型糖尿病、囊性纤维化、肺气肿、脊髓小脑性共济失调、α-1-抗胰蛋白酶缺乏等。

[0264] 如上所述，本发明的某些方面涉及通过选择性增强蛋白质的降解，来治疗疾病和/或病症或其症状（例如细胞毒性）的方法。在某些实施方案中，所述方法包括给予有需要的受试者（例如，诸如人等哺乳动物）治疗上有效量的包含本文所述化合物的药物组合物。因此，一个实施方案为治疗受蛋白质表达相关的疾病所累或易患蛋白质表达相关的疾病的受试者的方法。在某些实施方案中，所述方法包括以下步骤：在使得治疗疾病或病症的条件下，给予哺乳动物足以治疗所述疾病或病症或其症状的治疗量的本文化合物。在某些实施方案中，所述疾病选自常染色体显性色素性视网膜炎、IMPDH1介导的色素性视网膜炎、慢性髓细胞性白血病、糖尿病、癌症、阿尔茨海默氏病、α-1-抗胰蛋白酶缺乏、囊性纤维化、肾性尿崩症、朊病毒介导的感染、年龄相关的黄斑变性、帕金森病、亨廷顿舞蹈病以及肉毒杆菌毒素中毒。

[0265] 在某些实施方案中，给予治疗上有效量的包含本文所述化合物的药物组合物可在治疗例如睡眠障碍和时差综合征中有用，所述化合物靶定生物钟的组分。

[0266] 本文的方法包括给予受试者（包括鉴定为需要这类治疗的受试者）有效量的本文所述化合物或本文所述组合物以产生所需效应。鉴定需要这类治疗的受试者可在受试者或卫生保健专业人员的判断中进行以及可以是主观的（例如意见）或客观的（例如可通过测试或诊断方法测定）。

[0267] 包括预防性治疗的本发明的治疗方法，一般包括给予包括哺乳动物特别是人在内的有需要的受试者（例如动物、人）治疗上有效量的至少一种本文的化合物，例如本文化学式的化合物。这类治疗可适当地给予受疾病、病症或其症状所累、患有、易患疾病、病症或其症状、或处于患疾病、病症或其症状的风险中的受试者，特别是人。“处于风险中”的那些受试者的确定可通过诊断测试或者受试者或卫生保健提供者的意见的任何客观或主观确定来进行（例如遗传测试、酶或蛋白质标志物、标志物（如本文所定义）、家族史等）。

[0268] 在一个实施方案中，本发明提供监测治疗进展的方法。所述方法包括以下步骤：确定在受病症或其症状所累或者易患该病症或其症状的受试者中诊断标志物（标志物）（例如，通过本文的化合物、蛋白质或其指示物等调节的本文描述的任何靶标）的水平或在所述受试者中的诊断测量（例如筛选、测定），所述病症或其症状与蛋白质表达相关的疾病（包括错折叠）有关，其中已给予所述受试者足以治疗所述疾病或其症状的治疗量的本文化合物。可将在所述方法中确定的标志物水平与健康正常对照或其它受累患者中已知的标志物水平对比，以确立受试者的疾病状态。在某些实施方案中，在确定第一水平之后的时间点确定受试者中标志物的第二水平，并将两个水平进行比较以监测病程或治疗功效。在某些实施方案中，在依照本发明开始治疗之前确定受试者中标志物的治疗前水平；然后可将标志物的此治疗前水平与治疗开始后受试者中标志物的水平进行比较，以确定治疗功效。

[0269] 在另一个实施方案中，本发明提供利用本发明的化合物研究蛋白质降解的方法。

[0270] 在至少某些实例中，本文所公开的化合物可用于研究蛋白质功能。在某些实施方案中，该方法涉及通过使带有已知的结合部分的蛋白质与关注蛋白质连接来创建融合蛋白。在某些实施方案中，带有已知的结合部分的蛋白质为 GST、DHFR、SNAP、CLIP 或 HALO。在某些实施方案中，使所述融合蛋白与前述化合物中的任一种接触。

[0271] 药物组合物

本发明特征在于包含化合物连同药学上可接受的载体的药物制剂，其中所述化合物提供靶定蛋白质的选择性降解。这类制剂既具有治疗应用又具有预防应用。本发明的化合物可作为药物组合物的部分来给予。本发明的组合物和组合可以是药包的部分，其中各化合物以单独剂量存在。

[0272] 待用于预防性给予或治疗性给予的本发明的药物组合物应为无菌的。通过用无菌滤膜（例如 0.2 μm 膜）过滤、通过 γ 辐照或本领域技术人员已知的任何其它合适的方法，容易地实现无菌。一般将治疗用多肽组合物放入具有无菌进入孔的容器中，例如带有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或溶液瓶。通常将这些组合物作为水溶液或作为用于重构的冻干制剂，储存在单位剂量容器或多剂量容器（例如密封安瓿或密封瓶）中。

[0273] 可任选将所述化合物与药学上可接受的赋形剂组合。本文所用术语“药学上可接受的赋形剂”意指适于给予人的一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂或封装物质。术语“载体”表示天然或合成的有机或无机成分，将活性成分与之组合以利于给药。药物组合物的组分亦能够以使得不存在相互作用的方式与本发明的分子共混合以及彼此共混合，所述相互作用可大幅降低所需的药物效力。

[0274] 赋形剂常常含有少量添加剂，例如增强等渗性和化学稳定性的物质。这类材料在所用剂量和浓度下对受者无毒，以及包括缓冲剂，例如磷酸、柠檬酸、琥珀酸、醋酸、乳酸、酒石酸和其它有机酸或其盐；三羟甲基氨基甲烷 (TRIS)、碳酸氢盐、碳酸盐和其它有机碱及其盐；抗氧化剂，例如抗坏血酸；低分子量（例如少于约 10 个残基）多肽，例如聚精氨酸、聚赖氨酸、聚谷氨酸和聚天冬氨酸；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、聚丙二醇 (PPG) 和聚乙二醇 (PEG)；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸或精氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、糊精或硫酸化碳水化合物衍生物，例如肝素、硫酸软骨素或硫酸葡聚糖；多价金属离子，例如二价金属离子，包括钙离子、镁离子和锰离子；螯合剂，例如乙二胺四乙酸 (EDTA)；糖醇，例如甘露醇或山梨糖醇；反荷离子，例如钠或铵；和 / 或非离子型表面活性剂，例如聚山梨醇酯或泊洛沙姆。可包含其它添加剂，例如稳定剂、抗微生物剂、惰性气体、流体和营养补充剂（即林格氏葡萄糖）、电解质补充剂等，其可以常规量存在。

[0275] 如上所述的组合物可以有效量给予。所述有效量取决于给药模式、治疗的特定病况以及所需结果。其亦可取决于病况的阶段、受试者的年龄和身体状况、共存疗法（若有的话）的性质以及医学从业人员所熟知的类似因素。对于治疗应用，其为足以达到医学上所需结果的量。

[0276] 对于患有至少在某种程度上因过度的蛋白质表达或突变蛋白的表达所致的疾病或病症的受试者，有效量足以减少细胞中过表达的蛋白质或突变蛋白，或者为足以稳定、减缓或减轻病理学相关症状的量。一般而言，本发明化合物的剂量可为约 0.01 mg/kg/ 天 - 约

1,000 mg/kg/ 天。在某些实施方案中，范围为约 50- 约 2000 mg/kg 的剂量可为合适的。某些形式的给药（例如静脉内给药）将导致更低的剂量。在施用的起始剂量下受试者中的反应不足的情况下，在患者耐受允许的范围内可使用更高的剂量（或者通过不同的更局限化的递送途径得到的实际上更高的剂量）。考虑每天多次剂量以达到本发明组合物的适当的全身水平。

[0277] 可采用多种给药途径。一般而言，可利用医学上可接受的任何给药模式来实施本发明的方法，所述模式意指产生有效水平的活性化合物而不会引起临床上不可接受的不利效应的任何模式。在一个优选的实施方案中，眼内给予本发明的组合物。其它的给药模式包括经口、直肠、局部、眼内、经颊、阴道内、脑池内 (intracistemal)、脑室内、气管内、经鼻、透皮、植入物内 / 上或者胃肠外途径。术语“胃肠外的”包括皮下、鞘内、静脉内、肌内、腹膜内或输注。可将包含本发明组合物的组合物添加到生理溶液中，例如添加到玻璃体液中。对于 CNS 给药，可利用多种技术来促进将治疗药跨越血脑屏障传送，包括通过外科手术破坏，或注射短暂打开 CNS 血管内皮细胞之间的粘附接触的药物，以及利于易位通过这类细胞的化合物。因对患者以及给药方案的便利所致，对于预防性治疗可优选口服给药。

[0278] 本发明的药物组合物可包含一种或多种 pH 缓冲化合物以将制剂的 pH 维持在反映生理 pH 的预定水平，例如在约 5.0- 约 8.0 的范围。用于水性液体制剂的 pH 缓冲化合物可以是氨基酸或氨基酸的混合物，例如组氨酸或者诸如组氨酸和甘氨酸等氨基酸的混合物。或者，优选 pH 缓冲化合物为将制剂的 pH 维持在预定水平（例如在约 5.0- 约 8.0 的范围）并且不会螯合钙离子的物质。这类 pH 缓冲化合物的说明性实例包括但不限于咪唑和醋酸根离子。pH 缓冲化合物可以适于将制剂的 pH 维持在预定水平的任何量存在。

[0279] 本发明的药物组合物亦可含有一种或多种渗透调节剂，即将制剂的渗透性（例如张力、同渗重摩和 / 或渗透压）调节至受者个体的血流和血细胞可接受的水平。渗透调节剂可以是不螯合钙离子的物质。渗透调节剂可以是调节制剂渗透性的本领域技术人员已知或可得的任何化合物。本领域技术人员可经验地确定给定的渗透调节剂对于用于本发明制剂的适宜性。合适类型的渗透调节剂的说明性实例包括但不限于 ：盐，例如氯化钠和醋酸钠 ；糖，例如蔗糖、葡萄糖和甘露醇 ；氨基酸，例如甘氨酸 ；以及一种或多种这些物质和 / 或物质类型的混合物。渗透调节剂可以足以调节制剂的渗透性的任何浓度存在。

[0280] 包含本发明化合物的组合物可含有多价金属离子，例如钙离子、镁离子和 / 或锰离子。可使用帮助稳定组合物且不会不利地影响受者个体的任何多价金属离子。基于这两个标准，技术人员可经验地确定合适的金属离子，并且这类金属离子的合适来源为已知的以及包括无机盐和有机盐。

[0281] 本发明的药物组合物亦可以是非水性液体制剂。可利用任何合适的非水性液体，只要其为其中所含活性物质提供稳定性即可。优选所述非水性液体为亲水液体。合适的非水性液体的说明性实例包括 ：甘油 ；二甲亚砜 (DMSO) ；聚二甲基硅氧烷 (PMS) ；乙二醇类，例如乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、聚乙二醇 （“PEG”） 200、PEG 300 和 PEG 400 ；以及丙二醇类，例如二丙二醇、三丙二醇、聚丙二醇 （“PPG”） 425、PPG 725、PPG 1000、PPG 2000、PPG 3000 和 PPG 4000。

[0282] 本发明的药物组合物亦可以是混合的水性 / 非水性液体制剂。可将任何合适的非水性液体制剂例如上述那些，与任何水性液体制剂例如上述那些一起使用，只要混合的水

性 / 非水性液体制剂为其中所含化合物提供稳定性即可。优选这类制剂中的非水性液体为亲水液体。合适的非水性液体的说明性实例包括 :甘油 ;DMSO ;PMS ;乙二醇类,例如 PEG 200、PEG 300 和 PEG 400 ;以及丙二醇类,例如 PPG 425、PPG 725、PPG 1000、PPG 2000、PPG 3000 和 PPG 4000。

[0283] 其它递送系统可包括随时间释放、缓释或持续释放递送系统。这类系统可避免本发明组合物的重复给予,增加受试者和医师的便利。许多类型的释放递送系统为本领域普通技术人员可得且已知的。它们包括聚合物基料系统,例如聚丙交酯 (美国专利号 3,773,919 (通过引用结合) ;欧洲专利号 58,481)、聚 (丙交酯 - 乙交酯)、共聚草酸酯、聚己内酯、聚酰胺酯、聚原酸酯、聚羟基丁酸,例如聚 -D-(-)-3- 羟基丁酸 (欧洲专利号 133,988)、L- 谷氨酸和 γ - 乙基 -L- 谷氨酸酯的共聚物 (Sidman, K. R. 等, Biopolymers 22: 547-556)、聚 (2- 羟乙基甲基丙烯酸酯) 或乙烯乙酸乙烯酯 (Langer, R. 等, J. Biomed. Mater. Res. 15:267-277 ;Langer, R. Chem. Tech. 12:98-105) 以及聚酐。

[0284] 持续释放组合物的其它实例包括呈成形制品形式 (例如薄膜或微囊) 的半渗透性聚合物基质。递送系统亦包括非聚合物系统,其为 :脂质,包括甾醇例如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或者中性脂肪例如甘油一酯、甘油二脂和甘油三酯 ;水凝胶释放系统,例如生物来源的生物可吸收的水凝胶 (即壳多糖水凝胶或壳聚糖水凝胶) ;硅橡胶 (sylastic) 系统 ;基于肽的系统 ;蜡包被物 ;使用常规粘合剂和赋形剂的压制片剂 ;局部融合的植入物等。具体实例包括但不限于 :(a) 侵蚀系统,其中药剂以位于基质例如美国专利号 4,452,775、4,667,014、4,748,034 和 5,239,660 (所有四者通过引用结合) 中描述的那些之内的形式包含于内,以及 (b) 扩散系统,其中活性成分以受控速率自聚合物例如在美国专利号 3,832,253 和 3,854,480 (二者通过引用结合) 中描述的聚合物中渗透。

[0285] 可与本发明的方法和组合物一起使用的另一种递送系统为胶态分散系统。胶态分散系统包括基于脂质的系统,包括水包油型乳剂、微胶粒、混合微胶粒和脂质体。脂质体为人工膜容器 (membrane vessel),将其用作体内或体外递送载体。大小范围在 0.2-4.0 μm 的大单层容器 (large unilamellar vessel, LUV) 可将大型大分子封装进水性内部并以生物活性形式递送给细胞 (Fraley, R. 和 Papahadjopoulos, D., Trends Biochem. Sci. 6: 77-80)。

[0286] 可通过使脂质体与诸如单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白质等特异性配体偶联,将脂质体靶定到特定组织。脂质体可例如作为 LIPOFECTIN™ 和 LIPOFECTACE™ 市购于 Gibco BRL, LIPOFECTIN™ 和 LIPOFECTACE™ 由阳离子脂质例如氯化 N-[1-(2,3 二油基氧基)- 丙基]-N,N,N- 三甲基铵 (DOTMA) 和溴化二甲基二 - 十八烷基铵 (DDAB) 形成。用于制备脂质体的方法为本领域所熟知并且已在许多出版物中描述,所述出版物例如 DE 3,218,121 ; Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692 (1985) ;Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034 (1980) ;EP 52,322 ;EP 36,676 ;EP 88, 046 ; EP 143,949 ;EP 142,641 ;日本专利申请 83-118008 ;美国专利申请号 4,485,045 (通过引用结合) 和 4,544,545 (通过引用结合) ;和 EP 102,324。Gregoriadis, G., Trends Biotechnol., 3: 235-241 亦综述了脂质体。

[0287] 另一种载体为适于植入哺乳动物受者中的生物相容性微粒或植入物。可依照此方法使用的示例性生物蚀解性植入物在 PCT 国际申请号 PCT/US/03307 (公布号 WO

95/24929，标题为“Polymeric Gene Delivery System（聚合物基因递送系统）”）中描述。PCT/US/0307 描述了用于包含在适当启动子控制下的外源基因的生物相容性、优选生物可降解的聚合基质。所述聚合基质可用于实现受试者中外源基因或基因产物的持续释放。

[0288] 优选所述聚合基质呈诸如微球（其中药剂分散于整个固体聚合基质）或微囊（其中药剂储存在聚合物外壳的核心）等微粒形式。含有药物的前述聚合物的微囊在例如美国专利号 5,075,109 （通过引用结合）中描述。用于包含药剂的聚合基质的其它形式包括薄膜、包被物、凝胶、植入物和支架。选择聚合基质装置的大小和组成以在将基质引入其中的组织中产生良好的释放动力学。聚合基质的大小依照待使用的递送方法来进一步选择。当使用气溶胶途径时，优选将聚合基质和组合物包含在表面活性剂溶媒中。可选择既具有良好的降解速率又由生物粘附性材料形成的聚合基质组合物，以进一步增加传送效果。亦可选择不会降解而是在延长的时期内通过扩散释放的基质组合物。递送系统亦可以是适于局部、定位递送的生物相容性微球。这类微球在 Chickering, D. E. 等, Biotechnol. Bioeng., 52: 96-101 ;Mathiowitz, E. 等, Nature 386: 410-414 中公开。

[0289] 非生物可降解和生物可降解的聚合基质均可用于将本发明的组合物递送给受试者。这类聚合物可以是天然的或合成的聚合物。基于所需的释放时期来选择聚合物，所述时期一般约为几个小时到一年或更长时期。通常在范围介于几个小时和 3-12 个月之间的时期内的释放为最合乎需要的。任选所述聚合物呈水凝胶形式，所述水凝胶在水中可吸收高达其重量的约 90%，以及任选进一步与多价离子或其它聚合物交联。

[0290] 可用于形成生物可降解的递送系统的示例性合成聚合物包括 :聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基、聚亚烷基二醇、聚亚烷基氧化物、聚亚烷基对苯二甲酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚卤乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨酯及其共聚物、烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝酸纤维素、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、醋酸纤维素、丙酸纤维素、醋酸丁酸纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三醋酸纤维素、硫酸纤维素钠盐、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸乙酯、聚甲基丙烯酸丁酯、聚甲基丙烯酸异丁酯、聚甲基丙烯酸己酯、聚甲基丙烯酸异癸酯、聚甲基丙烯酸月桂酯、聚甲基丙烯酸苯酯、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯酸异丙酯、聚丙烯酸异丁酯、聚丙烯酸十八烷基酯、聚乙烯、聚丙烯、聚乙二醇、聚氧化乙烯、聚对苯二甲酸亚乙酯、聚乙烯醇、聚醋酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮以及乳酸和乙醇酸的聚合物、聚酐、聚原酸酯、聚丁酸(poly(butic acid))、聚戊酸和丙交酯 - 己内酯共聚物以及天然聚合物，例如藻酸盐和其它多糖，包括葡聚糖和纤维素、胶原、其化学衍生物（取代、添加例如烷基、亚烷基等化学基团、羟化、氧化以及本领域技术人员常规进行的其它修饰）、白蛋白和其它亲水蛋白、玉米醇溶蛋白和其它谷醇溶蛋白以及疏水蛋白、其共聚物和混合物。一般而言，这些材料通过酶促水解或体内暴露给水（通过表面溶蚀或整体溶蚀）来降解。

[0291] 试剂盒

本发明还提供用于治疗或预防疾病或其症状的试剂盒，所述疾病至少在某种程度上因过度的蛋白质表达或突变蛋白表达所致。在一个实施方案中，试剂盒包含含有有效量组合物的药包，所述组合物包含本发明的化合物。通常所述组合物以单位剂型存在。在一些实施方案中，试剂盒包含含有治疗用或预防用组合物的无菌容器 ;这类容器可以是盒、安瓿、瓶、

小瓶、管、包、袋、泡罩包装或本领域已知的其它合适的容器形式。这类容器可由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适于保存药剂的其它材料制成。

[0292] 若需要的话，连同说明书一起提供本发明的组合物或其组合以将其给予患有疾病或处于形成疾病的风险中的受试者，所述疾病至少在某种程度上因过度的蛋白质表达或突变蛋白的表达所致。说明书一般包含关于所述化合物用于治疗或预防所述疾病的用途的信息。在其它实施方案中，说明书包含以下内容中的至少一种：化合物或化合物组合的描述；用于治疗疾病或其症状的剂量方案和给药，所述疾病至少在某种程度上因过度的蛋白质表达或突变蛋白的表达所致；注意事项；警告；适应症；禁忌症；超剂量信息；不良反应；动物药理学；临床研究；和 / 或参考文献。说明书可直接印刷在容器（如果存在）上，或作为覆在容器上的标签，或者作为在容器内或与容器一起提供的独立的印刷品、小册子、卡片或折叠式印刷品。

实施例

[0293] 目前已大致描述了本发明，其将通过参考以下实施例而更容易地理解，包含所述实施例仅以说明本发明的某些方面和实施方案为目的，并且不意图其限制本发明。

[0294] 除非另有规定，否则所有试剂均来自 Sigma Aldrich 化学公司且无需进一步纯化便使用。所有溶剂均为 HPLC 级。薄层色谱在市购的玻璃支持板 SiliaPlate G (Silicycle®) 上进行。利用 UV 光照或碘、高锰酸盐或硝酸高铈铵染色使这些可见。在 Siliflash F60 (silicycle) 或碱性氧化铝 (Sigma Aldrich) 上进行色谱。所有玻璃器皿在使用前均经火焰干燥并在真空中冷却。所有反应均使用磁力搅拌在干燥氮气的气氛下进行。1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基）碳化二亚胺来自 ChemImpex®。在 Eppendorf ® 离心机 5417C 上进行离心。与辣根过氧化物酶缀合的抗血凝素 (YPYDVPDYA) 抗体（抗 -HA-HRP) 来自 Roche diagnostics （来自大鼠的单克隆抗体，克隆 3F10)。多克隆抗 -GST- α 1 和抗 -GST- π 来自 Oxford Biomedical。与辣根过氧化物酶缀合的抗 - 甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（抗 -GAPDH-HRP) 来自 Aldrich。胰蛋白酶、Dulbecco 改良的最小必需培养基、100X 青霉素 (10000 单位 /mL)/ 链霉素 10 mg/mL、100X L- 谷氨酰胺 (200 mM)、0.25% 胰蛋白酶和磷酸缓冲盐水来自 Gibco®。20S 蛋白酶体和免疫蛋白酶体来自 Boston Biochem。上样缓冲液具有以下组成：250 mM Tris，pH 6.8，10% 十二烷基硫酸钠、30% 甘油、0.02% 溴酚蓝、150 mM 二硫苏糖醇。^{1}H NMR 光谱在 Brucker 400 光谱仪上记录并且参照内标 (7.26 ppm 处的 $CDCl_3$) 以 ppm （百万分率）报告。将数据记为 [积分，s= 单峰、d= 双峰、t= 三重峰、q= 四重峰、m= 多重峰，耦合常数 (Hz)]。

[0295] 实施例 1- 用于肽偶联反应的一般程序

将酸、胺、1- 乙基 -3-3- 二甲基氨丙基碳化二亚胺和三乙胺溶于二甲基甲酰胺并搅拌过夜。在真空中去除挥发物，将残留物再溶于氯仿并相继使用 10% 柠檬酸、碳酸氢钠和水洗涤。将氯仿相用硫酸镁干燥、过滤并在真空中浓缩以得到粗产物。

[0296] 实施例 2- 用于蛋白质印迹的一般程序

将凝胶转移至 Towbin (3 g Tris /14.4g 甘氨酸）缓冲液中的聚二氟乙烯膜上，对于 18% 凝胶，100V 1.2 小时然后 40V 3 小时，对于 12% 凝胶，100V 1.2 小时。用 3% 脱脂乳的 Tris 缓冲盐溶液 (100 mM Tris 碱、500 mM NaCl，pH 7.6) 将膜封闭 1 小时，然后将其直

接加入至抗 HA-HRP 缀合抗体在 0.5% 脱脂乳的含 0.05% 吐温 -20 的 Tris 缓冲盐溶液中的溶液达 2 小时。用含 0.05% 吐温 -20 的 Tris 缓冲盐溶液达 10 分钟将膜洗涤两次，然后用 Tris 缓冲盐溶液洗涤一次达 15 分钟。将残留的缓冲液去除，然后暴露给 ECL plus ™ (GE healthcare) 达 5 分钟。通过暴露给胶卷 (HyBlot CL, Denville Scientific) 使膜显影。对于细胞内降解测定，将膜切成两半 (在约 40 千道尔顿处) 并用抗 GAPDH-HRP 对较低分子量部分进行探测和显影，除 Tris 缓冲盐溶液含 150 mM 而非 500 mM NaCl 之外，方案与用于抗 -HA 的相同。用抗 -HA-HRP 对膜的较高分子量部分进行探测和显影。

[0297] 实施例 3- 所选化合物的制备

所选化合物在图 1 中显示；这些化合物中某些的制备在下文中详细说明。详细说明的一些反应是基于Calloway, N. T. ;Choob, M. ;Sanz, A. ;Sheetz, M. P. ;Miller, L. W. ; Cornish, V. W. *ChemBioChem* 2007, *8*, 767-774。

[0298] *N*-(6- 氨己基)-5-(2,3- 二 - 叔丁氧羰基胍基)-2-(叔丁氧羰基氨基) 戊酰胺 (8)。经由套管向 1,6- 己二胺 3 (857 mg,7.35 mmol) 和 1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基) 碳化二亚胺 (326 mg,2.10 mmol) 的混合物的 DMF (200mL) 溶液中加入 *ω*, *ω*', *α* -*N*- 三叔丁氧羰基精氨酸 6 (500 mg,1.05 mmol) (ChemImpex®) 的二甲基甲酰胺 (200 mL) 溶液。将所得混合物搅拌过夜。在真空中去除二甲基甲酰胺并将所得固体再溶于氯仿 (50 mL)，相继用饱和碳酸钠和水洗涤，然后用硫酸镁干燥并在真空中浓缩。通过碱性氧化铝色谱纯化混合物以产生作为白色固体的标题化合物 (210 mg,35%)。

[0299] *N*-(6-(2-(2,3- 二氯 -4-(2- 亚甲基丁酰基) 苯氧基) 乙酰胺基) 己基)-5-(2,3- 二 - 叔丁氧羰基胍基)-2-(叔丁氧羰基氨基) 戊酰胺 (1)。依照实施例 1 ：将游离胺 8 (200 mg,0.35 mmol)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基) 碳化二亚胺 (105 mg,0.70 mmol)、依他尼酸 5 (121 mg,0.40 mmol) 和三乙胺 (48 μL,0.35 mmol) 溶于二甲基甲酰胺 (10 mL)。通过硅胶色谱 (10% 增量的己烷 : 乙酸乙酯不连续梯度) 纯化粗产物，以提供作为灰白色固体的标题化合物 (214mg,50%)。δ_H (400MHz, $CDCl_3$) 1.10 (3H, t, *J*=6.8), 1.19-1.71 (12H, m), 1.40 (9H, s), 1.45 (9H, s), 1.47 (9H, s), 2.42 (2H, q, *J*=6.8), 3.12 (1H, m), 3.25 (1H, m), 3.31 (2H, t, *J*= 8.1), 3.64 (1H, m), 3.93 (1H, m), 4.22 (1H, s), 4.53 (2H, s), 5.55 (1H, s), 5.92 (1H, s), 6.82 (1H, d, *J*= 7.2), 7.15 (1H, d, *J*=7.2)。

[0300] *N*-(6- 三氟乙酰氨己基)-2-(苄基羰氧氨基)-5-(3- 甲苯磺酰胍基) 戊酰胺 (11)。依照实施例 1 ：将游离胺 4 (200 mg,0.35 mmol)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基) 碳化二亚胺 (105 mg,0.94 mmol)、依他尼酸 5 (285 mg,0.94 mmol) 和三乙胺 (96 μL,0.70 mmol) 溶于 DMF (5 mL)。通过硅胶色谱 (20% 增量的己烷 : 乙酸乙酯不连续梯度) 纯化粗产物，以提供作为灰白色固体的标题化合物 (137 mg,60%)。

[0301] *N*-(6- 氨己基)-2-(苄基羰氧氨基)-5-(3- 甲苯磺酰胍基) 戊酰胺 (9)。用 LiOH (25 mg,1.05 mmol) 的含 3% 水的甲醇溶液 (5 mL) 将三氟乙酰胺 11 (137 mg,0.21 mmol) 处理过夜。在真空中去除挥发物并且所述粗产物无需纯化便使用。

[0302] *N*-(6-(2-(2,3- 二氯 -4-(2- 亚甲基丁酰基) 苯氧基) 乙酰胺基) 己基)-2-(苄基羰氧氨基)-5-(3- 甲苯磺酰胍基) 戊酰胺 (2)。依照实施例 1 ：将游离胺 9 (100 mg,0.18 mmol)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基) 碳化二亚胺 (41 mg,0.36 mmol)、依他尼酸 5 (54 mg,0.18 mmol) 和三乙胺 (48 μL,0.35 mmol) 溶于 DMF (5 mL)。通过硅胶色谱 (含 50% 乙

酸乙酯的己烷：含 10% 甲醇的乙酸乙酯）的纯化得到作为白色固体的标题化合物 (58 mg，36%)。δ_H (400MHz，$CDCl_3$) 1.11 (3H，t，*J*=6.8)，1.20-1.85 (12H，m)，2.38 (3H，s)，2.45 (2H，q，*J*=6.8)，3.16-3.40 (6H，m)，4.28 (1H，q，*J*=3.2)，4.57 (2H，s)，5.19 (2H，s)． 5.60 (1H，s)，5.85 (1H，d，*J*=8.0)，5.95 (1H，s)，6.30 (2H，br s)，6.83 (2H，重叠)，7.18 (1H，d，*J*=7.3)，7.21 (2H，d，*J*=5.4)，7.28-7.35 (5H，m) 7.76 (2H，d，*J*=5.4)。

[0303] 4-((2,4- 二氨基嘧啶 -5- 基）甲基)-2,6- 二甲氧基酚 (13)。将甲氧苄啶 12 (10 g，34.48 mmol) (Chem Impex®) 溶于 48% HBr 水溶液 (125 mL) 并回流 20 分钟。然后加入 50% NaOH 水溶液 (30 mL) 并将所得溶液冷却至 4℃过夜，得到作为浅褐色晶体的粗产物。将这些晶体溶于最小量的 90℃水并使其在室温下沉淀，去除液相并在冻干器中干燥固体以产生作为白色固体的标题化合物 (5.23g，55%)。

[0304] 2-(4-((2,4- 二氨基嘧啶 -5- 基）甲基)-2,6- 二甲氧基苯氧基）乙酸甲酯 (14)。用 NaH (60%，分散于矿物油中）(76 mg，1.90 mmol) 处理化合物 13 (500 mg，1.81 mmol) 的二甲基甲酰胺溶液以形成红色混合物。向其中加入溴乙酸甲酯 (275 mg，1.81 mmol) 并将反应混合物搅拌 30 分钟。在真空中去除挥发物（警告！溴乙酸甲酯有毒，应始终在通风橱中使用）。所述粗制反应产物无需进一步纯化便使用。

[0305] 2-(4-((2,4- 二氨基嘧啶 -5- 基）甲基)-2,6- 二甲氧基苯氧基）乙酸 (15)。将酯 14 (400 mg，1.15 mmol) 溶于甲醇和 3% 水 (5 mL) 并向其中加入 LiOH (83 mg，3.45 mmol)。将混合物搅拌 4 小时并随后在真空中浓缩。将残留物再溶于最小量的水并通过添加 HCl 将 pH 降至 3。将沉淀物过滤并冻干，得到作为白色固体的标题化合物 (300 mg，80%)。

[0306] *N*-(6- 氨己基)-2-(4-((2,4- 二氨基嘧啶 -5- 基）甲基)-2,6- 二甲氧基苯氧基）乙酰胺 (16)。依照实施例 1：使酸 15 (500 mg，1.50 mmol)、1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨丙基）碳化二亚胺 (460 mg，3.00 mmol)、三乙胺 (209 mL，1.65 mmol) 和单 t-Boc 1,6- 己二胺 (356 mg，1.54 mmol) 的二甲基甲酰胺溶液 (5 mL) 反应。然而，搅拌过夜之后，加入 t-Boc_2O (2.25 g，10.5 mmol) 并将混合物再搅拌 24 小时。然后在真空中将此浓缩并通过硅胶色谱纯化以得到粗产物，所述粗产物通过硅胶色谱 (3% 甲醇 / 乙酸乙酯）纯化。用 1:1 三氟醋酸：二氯甲烷 (10 mL) 处理此粗产物并搅拌 1 小时。在真空中去除挥发物以得到无需进一步纯化便使用的粗产物 (250 mg，40%)。δ_H (400MHz，CD_3SOCD_3) 1.00-1.33 (4H，m)，1.38-1.41 (4H，m)，2.73 (2H，t，*J*= 5.1Hz)，3.00 (2H，m)，3.54 (2H，s)，3.72 (6H，s)，4.21 (2H，s)，6.62 (2H，s)，7.18 (2H，br s)，7.42 (1H，s)。

[0307] *N*-(6-(2-(4-((2,4- 二氨基嘧啶 -5- 基）甲基)-2,6- 二甲氧基苯氧基）乙酰胺基）己基)-5-(2,3- 二 - 叔丁氧羰基胍基)-2-(叔丁氧羰基氨基）戊酰胺 (22)。依照实施例 1：使游离胺 16 (100 mg，0.23 mmol)、1- 苯并三唑 -1- 基 - 氧基三吡咯烷子基磷鎓六氟磷酸盐 (240 mg，0.46 mmol)、三 - 叔丁氧羰基精氨酸 (118 mg，0.25 mmol) 和三乙胺 (33 μL，0.25 mmol) 的二甲基甲酰胺溶液 (4 mL) 一起反应。将粗产物通过硅胶色谱纯化并随后自热的氯仿中再结晶，以产生作为固体的标题化合物。δ_H (400MHz，CD_3SOCD_3) 1.13-1.20 (6H，m)，1.25 (9H，s)，1.30 (9H，s)，1.40 (9H，s)，1.20-1.45 (6H，m)，2.90-3.10 (2H，m)，3.10 (2H，q，*J* =3.2Hz)，3.50 (2H，s)，3.72 (6H，s)，3.70-3.82 (3H，m)，4.18 (2H，s)，6.02 (2H，br s) 6.45 (2H，br s)，6.60 (2H，s)，6.78 (1H，s)，7.44 (1H，s)，7.75 (1H，s)，7.87 (1H，s)，9.05 (2H，br s)。

[0308] 5-(2,3-二-叔丁氧羰基胍基)-2-(叔丁氧羰基氨基)-*N*-(6-(三苯甲硫代)己基)戊酰胺(18)。依照实施例1:使胺17 (1.00 g,2.67 mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳化二亚胺(820 mg,5.34 mmol)、6 (1.26 g,2.67 mmol)和三乙胺(375 μL,2.67 mmol)反应以得到标题化合物。从粗产物开始使用此化合物。

[0309] 6-(5-(2,3-二-叔丁氧羰基胍基)-2-(二-叔丁氧氨基)戊酰胺基)己基硫代乙酯(19)。用I_2 (0.88 g,3.42 mmol)的MeCN (10 mL)/水(1 mL)溶液处理化合物18 (1 g,1.71 mmol)。用PPh_3(1.79 g,6.84 mmol)/水(1 mL)的四氢呋喃(10 mL)溶液将粗产物处理5小时并随后用过量的乙酰氯直接处理。经硅胶色谱(含10%乙酸乙酯的己烷:100%乙酸乙酯)得到标题化合物(127 mg,20%)。δ_H (400 MHz, $CDCl_3$) 1.23-1.78 (12H,m),1.42 (9H,s),1.44 (9H,s),1.49 (9H,s),2.21 (3H,s),2.80 (2H,t,*J* =7.1),3.12 (1H,m),3.28 (1H,m),3.64 (1H,m),3.96 (1H,m),4.25 (1H,m) 5.93 (1H,d,*J*=5.5),6.92 (1H,m),9.25 (1H,br s),9.38 (1H,br s)。

[0310] 5-(2,3-二-叔丁氧羰基胍基)-2-(叔丁氧羰基氨基)-*N*-(6-(7-硝基苯并[c][1,2,5]噁二唑-4-基巯代)己基)戊酰胺(20)。将化合物19 (127 mg,0.34 mmol)溶于已除气的pH 7.8磷酸盐缓冲液(20 mL)中并向其中加入21 (60 mg,0.30 mmol)。将所得固体自热的乙酸乙酯中再结晶三次,得到纯化合物。δ_H (400MHz,$CDCl_3$) 1.20-1.90 (12H,m),1.40 (9H,s),1.44 (9H,s),1.50 (9H,s),3.15 (1H,m),3.20 (2H,t,*J*=6.5),3.32 (1H,m),3.65 (1H,m), 3.94 (1H,m),4.23 (1H,m),5.95 (1H,m),6.95 (1H,m),7.10 (1H,d,*J*=6.0),8.38 (1H,d,*J*=6.0),9.21 (1H,s),9.33 (1H,s)。

[0311] 实施例4-带有标签的人谷胱甘肽-*S*-转移酶α-1的制备

使用pOXO4-α1载体在大肠杆菌中重组表达带有*N*-端HA标签的人谷胱甘肽-*S*-转移酶α-1。使用谷胱甘肽亲和色谱法(GST·Bind™,Novagen)将此酶纯化。使用pET28a载体在大肠杆菌中重组表达带有*N*-端$(His)_6$标签和*C*-端HA标签的大肠杆菌二氢叶酸还原酶。使用Ni-NTA树脂(Qiagen)将此酶纯化。

[0312] 实施例5-细胞裂解物中预先抑制的蛋白质的降解

使全部细胞在用10%胎牛血清、1X L-谷氨酰胺和1X青霉素/链霉素补充的Dulbecco改良的最小必需培养基(完全培养基)中生长至90%汇合。在Cos和HeLa细胞的情况下,随后使细胞血清饥饿2天,在NIH3T3细胞的情况下使细胞血清饥饿1天。将细胞用磷酸缓冲盐水洗涤并随后经胰蛋白酶作用。收集细胞,并加入等体积的完全培养基。通过离心法沉淀细胞并吸去上清液。用磷酸缓冲盐水将细胞沉淀物洗涤3次。将细胞沉淀物储存在-80℃直至需要时。将细胞在冰上融化并保持在4℃直至需要用于测定时。然后用冰冷的裂解缓冲液(150 mM蔗糖、200 mM磷酸钠、43 mM $MgCl_2$,pH 7.8)重悬浮细胞。在Dounce匀浆器(10冲程)中裂解细胞,然后以14000 rpm离心30分钟。用裂解缓冲液将澄清的裂解液标准化为1 mg/mL的最优浓度(Bradford assay,Biorad®,如按照制造商说明书,使用免疫球蛋白作为标准品)。10X ATP再生缓冲液由以下组成:1 mg/mL肌酸激酶(Roche diagnostics®)、600 mM磷酸肌酸、100 mM ATP、200 mM Tris pH 8.0、600 mM $MgCl_2$。使用前将此缓冲液在37℃孵育30分钟。在250 μL PCR管中以55 μL总体积[包含1X ATP再生缓冲液,以及用100 μM依他尼酸衍生的抑制剂或1 μM甲氧苄啶衍生的抑制剂预先抑制的120 ng HA标记的蛋白质(1 μL)]进行测定。测定之前,将50 μL Chill Out™蜡(Biorad®)覆盖在

小瓶顶部。取出 15 μL 等分试样并稀释到 6 μL 5X 还原性 SDS PAGE 上样缓冲液中并通过放入干冰中立即冷冻。将这些储存在 -80℃直至需要时。将样品在 100℃融化并继续煮沸 5 分钟。然后在微量离心机上以 14,000 rpm 将样品离心 30 分钟并上样至 18% 聚丙烯酰胺 SDS PAGE 凝胶，按照实施例 2 进行蛋白质印迹。

[0313] 实施例 6- 细胞内降解测定

在 6 孔板中，使细胞在用 10% 胎牛血清、1X L- 谷氨酰胺补充且不含抗生素的 Dulbecco 改良的最小必需培养基中生长至 90% 汇合。此时使细胞血清饥饿，并随后使用 1 μg 质粒（由巨细胞病毒启动子驱动的表达；编码与大肠杆菌二氢叶酸还原酶的 *C*- 端融合的增强的绿色荧光蛋白的基因）：2 μL transfectin™ (Biorad) / 孔进行转染。转染之后 48 小时，再次吸去培养基，并加入新鲜的无血清培养基。然后向细胞中加入环己酰亚胺（终浓度 100 μg/mL）并在 5 分钟之后，加入 30 μM 抑制剂。在每个时间点 (45 分钟)，吸出培养基，将细胞用胰蛋白酶处理、离心并用磷酸缓冲盐水洗涤三次。将细胞沉淀物在干冰中速冻，并随后在 -80℃无限期储存。将细胞在冰上融化，并随后用裂解缓冲液 (150 mM 蔗糖、200 mM 磷酸钠、43 mM $MgCl_2$，pH 7.8，0.1% triton X-100) 重悬浮。通过两个冷冻 / 融化循环 (-80℃ 5 分钟，然后 4℃ 10 分钟）裂解细胞。通过用裂解缓冲液稀释使得在它们在稀释到 Bradford 测定染料 (Biorad) 中时得到相同的 A_{595}，而使裂解液浓度标准化。在 12% SDS PAGE 凝胶上分辨等体积的标准化裂解液并如实施例 2 指示进行印迹。

[0314] 实施例 7- 通过纯化的 20S 蛋白酶体的降解

用 1 mM 抑制剂通过在 30℃孵育 20 分钟将蛋白质预先抑制。向测定混合物（在 50 mM Hepes，pH 8.0、250 mM NaCl、1 mM DTT 中）中加入此混合物，以使蛋白质的终浓度为 90nM。蛋白酶体的浓度为 6 nM。测定温度为 37℃。总测定体积为 55 μL。在不同的时间点取出 15 μL 等分试样并立即放入 6 μL 5X 上样缓冲液中并煮沸 5 分钟。在干冰上速冻之后将这些储存在 -80℃并通过煮沸 2 分钟来融化。如实施例 2 所述通过蛋白质印迹分析数据。

[0315] 实施例 8- Boc_3Arg 诱导的蛋白质降解的构效关系 (SAR)

Boc_3Arg 部分的 SAR。 我们将系统地改变 Boc_3Arg 的结构以确定用于降解的最小需要。我们亦将研究配体的长度、柔性和化学组成以确定接头在降解过程中的作用。

[0316] 对于这些实验我们将使用 GST-α-1/EA 系统，因为这些化合物的合成比 Fur 或 TMP 的衍生物更容易。起始 SAR 将利用通常可获得的经保护的氨基酸。图 14 显示待测试的第一化合物的选择。所述合成自容易得到的前体开始是简明的——完全在我们实验室的合成专长之内。如果三唑接头是活性的，我们将能够使用铜辅助的炔叠氮化物环加成（作为点击化学的 a/k/a) 来快速合成广泛多样的衍生物。

[0317] 我们最初将通过向 Hela 细胞裂解物中加入重组 GST-α-1 来测定降解。利用整体蛋白稳定性测定法测试在此测定中有活性的化合物在全细胞中降解 GST-α-1-GFP 的能力。我们将使用较小组的化合物来测定相同的 SAR 是否存在于 TMP/eDHFR 系统，以及根据需要在此组上扩展。

[0318] 这些实验将确定可诱导降解的最小化学部分。此信息对于未来应用而言极其重要——失稳部分越小，最终化合物越可能是生物相容的和生物可利用的。单独的 Boc_3Arg 具有 473 Da 的分子量，所以任何配体 - 接头 - Boc_3Arg 化合物将比一般建议用于药物样分子的化合物大得多。因此，减小失稳部分的大小对于最终治疗应用而言为重要的。然而，即使

证明当前的 Boc_3Arg- 接头为可诱导降解的唯一官能度，但初步结果表明，Boc_3Arg 诱导的降解可以是有用的工具。我们注意到，在成像应用中使用了相似的大分子。

[0319] 此信息亦将提供对降解机制的重要的深入理解。例如，如果降解仅由暴露的疏水表面造成，那么许多不同的官能度可为有活性的。相比之下，如果降解由 Boc_3Arg 与诸如 20S 蛋白酶体等细胞因子之间的特异性相互作用造成，那么应显示非常确定的 SAR。或者，如果 Boc_3Arg 标签必需嵌入靶蛋白的结构中，那么接头区的长度和柔性可为极其重要的。

[0320] 我们预期，在 EA/GST 和 TMP/eDHFR 系统二者中均观察到相似的 SAR。我们将在 SAR 研究早期试验此假设——如果证明事实并非如此，那么我们将聚焦于 TMP/eDHFR 系统的 SAR，因为此系统更可能发展成用于蛋白质敲减的一般系统。

[0321] *靶标 - 抑制剂相互作用的亲和力 / 解离速率与降解之间的关系。*必需确定靶标 - 抑制剂相互作用的要求，使得这个方法可容易地应用于其他的蛋白质靶标。虽然 TMP 证实非共价识别元件可用于靶定蛋白质以降解，但是 TMP 对 eDHFR 的亲和力非常高 (<1 nM) 并且解离速率非常慢 (k_{off} 为 <0.0005 s^{-1})。较低的亲和力识别配体可能更不有效。这些实验利用充分描述的 TMP 的 SAR。预期图 15 中所示化合物在亲和力上的不同达 10^3 倍。这些化合物的合成可依照已公布的程序。可在如上所述的细胞裂解物和全细胞中监测降解。

[0322] 我们将如前所述确定抑制剂结合的亲和力和动力学。这些实验比配体结合中常遇到的挑战更具挑战性，因为 TMP 为慢结合抑制剂。TMP 亲和力为缓冲液依赖性的，并且亦取决于辅因子 NADPH/$NADP^+$ 的存在情况。适当时，我们将使用发展曲线分析、停流荧光和 ^{14}C-TMP (Moravek) 置换的组合来监测抑制剂结合的亲和力和动力学。

[0323] 这些实验将确立识别元件的结合亲和力的下限。此信息为选择用于新蛋白质靶标的识别元件所需要。如果亲和力未如预期表现，那么我们可能需要表征更多的化合物。另一个可能的新增困难为，与简单的亲和力相比，解离速率可能是更关键的参数。另外，可能需要表征更多化合物来描述识别配体的关键特性。

[0324] *关于蛋白质靶标的降解 / 去稳定活性的概论。*我们已证实 Boc_3Arg 在三种不同配体和三种不同蛋白质的情况下诱导降解。我们将此集合扩展至三个另外的配体 / 蛋白质对，并且亦确定细胞定位如何影响 eDFR 融合蛋白的降解。

[0325] *BG/SNAP。*SNAP 标签开发自 DNA 修复蛋白 O^6- 烷基鸟嘌呤 -DNA 烷基转移酶。SNAP 为 20 kDa 蛋白质；其与苄基鸟嘌呤 (BG) 衍生物反应形成共价加合物。可使用容易获得到的合成方法，如指示地用染料和其它探针修饰 BG。此系统已用于在体内特异性标记融合蛋白。我们将纯化重组 SNAP-GFP 融合蛋白以测试 Hela 细胞裂解物中的降解以及在 Hela 细胞中表达 SNAP-GFP 以用于整体蛋白稳定性测定。

[0326] *BC/CLIP。*CLIP 标签为与 O2- 苄基胞嘧啶 (BC) 衍生物反应的 SNAP 衍生物。重要的是，SNAP 和 CLIP 可同时使用。

[0327] *DS/Bcr-Abl。*Bcr-Abl 为在引起慢性髓细胞性白血病 (CML) 的基因融合事件中形成的异常的蛋白激酶。诸如甲磺酸伊马替尼 (即 Gleevec®) 等选择性 Bcr-Abl 抑制剂已在治疗 CML 上非常成功。但是，需要新疗法来对抗抗药性。重要的是，仅阻断 Bcr-Abl 激酶的激酶活性不足以阻断其全部下游信号转导途径的激活；如果降解 Bcr-Abl，显然将消除这类激酶活性独立性信号转导。另外，伊马替尼和第二代抑制剂达沙替尼 (DS) 均不诱导 CML 干细胞的凋亡。认为此清除 CML 干细胞的失败在去除药物时导致复发。或许 Bcr-Abl 的降

解将清除 CML 干细胞。

[0328] 可在侧臂羟基修饰 DS，而对其抑制特性几乎无影响（图 16）。我们将如图 16 所示合成 DS-Boc_3Arg。我们将利用 MSCV 载体系统在 NIH3T3 细胞中表达 Bcr-Abl。简单说来，将此载体转录到 Bosc23 细胞中，所述细胞产生包含 5'LTR-Bcr-Abl-IRES-GFP-3'LTR 的 mRNA，其表达 p210 形式的 Bcr-Abl 和 GFP。Bosc23 细胞将此 mRNA 包装进逆转录病毒的衣壳。将此病毒用于转染 NIH3T3 细胞。转染的细胞通过基于 GFP 表达的细胞分选来分离。使用可市购的抗体通过免疫印迹来确证 Bcr-Abl 表达。DS 亦抑制 Src 家族激酶，所以我们亦将使用可市购的抗体通过免疫印迹来监测这些内源性蛋白质的降解。如果观察到降解，我们将比较 Bcr-Abl 和 Src 信号转导途径的 DS 和 DS-Boc_3Arg 抑制的剂量依赖性。我们将使用抗磷酸 Tyr 抗体来评价全部的 Tyr 激酶活性，使用抗 Src- 磷酸 Tyr416 来评价 Src 激活（Src 激活在伊马替尼存在下进行，但被 DS 阻断）以及使用抗磷酸 CrkL（CrkL 磷酸化被伊马替尼和 DS 二者阻断）。这些抗体可市购于 Santa Cruz Biotechnology 和 Cell Signaling Technology。

[0329] *对 Boc_3Arg 诱导降解的定位约束的确定。*初步实验和上述实验已测试了胞质蛋白的降解。我们将通过确定 TMP/eDHFR 系统能否降解膜相关的蛋白、核蛋白和定位于细胞器的蛋白，来进一步测试 Boc_3Arg 诱导的降解谱（repertoire）。例如，图 17 显示 TMP-Boc_3Arg 可诱导 K-Ras-eDHFR 融合蛋白的降解，表明此方法可有效地敲减膜相关的蛋白。Ras 突变为癌症的常见原因，所以这些实验亦将证实降解作为用于癌症化疗的策略的可能性。

[0330] *对 Boc_3Arg 诱导的降解敏感的生物的鉴定。*我们的初步结果证实 Boc_3Arg 在广泛多样的哺乳动物组织培养细胞中诱导降解。我们将进一步测试在常用模型生物大肠杆菌、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）（S2 细胞）和鼠弓形体中的起作用范围。我们将 EA/GST 用于裂解物中的起始实验。如果观察到 Boc_3Arg 诱导的降解，我们将表达 eDHFR-GFP 融合蛋白并确定 TMP-Boc_3Arg 能否在全细胞中诱导降解。

[0331] 这些实验将确定顺从 Boc_3Arg 诱导的蛋白质敲减的生物谱。一个潜在的缺陷为，TMP-Boc_3Arg 在这些系统的某些中可能不可渗透。我们将通过比较裂解物和 / 或透化细胞中的 eDHFR-GFP 降解来对此进行测试。所述生物谱亦将为 Boc_3Arg 诱导降解的机制提供重要线索。

[0332] 实施例 9- Boc_3Arg 诱导降解的机制的阐明

这些实验将帮助鉴定 Boc_3Arg 诱导的降解所需的细胞组分。提出了三种模型。

[0333] *模型 1 :Boc_3Arg 部分直接与蛋白酶体相互作用。*Boc_3Arg 诱导的蛋白质降解为蛋白酶体依赖性的，如由以下观察结果清楚地证实 :三种不同的蛋白酶体抑制剂阻断降解。即使在去遍在蛋白化酶抑制剂存在下，仍未观察到遍在蛋白化的迹象。因此，我们暂时推断遍在蛋白化为不需要的——暂时因为哺乳动物细胞含有许多去遍在蛋白化酶，所以不能确保完全抑制。

[0334] 蛋白酶体依赖性的遍在蛋白独立性蛋白质降解比一般认识到的更普遍。虽然松散的蛋白质亦似乎通过此途径降解，但是氧化的蛋白质降解可能为此现象的最具特色的实例。重要的是，这些途径仍未完全确定。虽然遍在蛋白介导的降解利用 26S 蛋白酶体并且为 ATP 依赖性的，但是氧化的蛋白质降解仅需要核心 20S 蛋白酶体并且为非 ATP 依赖性的。

20S 蛋白酶体为由 4 个七聚体环形成的圆柱体：β 亚基的两个环在中心形成蛋白水解腔，而 α 亚基的两个环存在于各末端。蛋白水解腔含有三种活性部位，一种在疏水残基处切割（胰凝乳蛋白酶样位点），一种在带正电荷的残基处切割（胰蛋白酶样位点），一种在带负电的残基处切割（胱天蛋白酶样位点）。蛋白水解腔的入口由 α 亚基的 N 端延伸门控。在 26S 蛋白酶体中，19S 调节亚基盖住 20S 圆柱体的末端，与 α 亚基相互作用以控制蛋白水解腔的通路。19S 调节亚基亦与遍在蛋白链相互作用，并使用 ATP 来展开遍在蛋白化蛋白，以便其可进入蛋白酶体。入口亦受 11S 激活物调节，但是在此情况下，入口开启似乎为非 ATP 依赖性的。11S 激活物的生物作用还未理解。有趣的是，疏水肽可能通过打开入口来变构激活全部三种蛋白酶体活性部位，表明展开的蛋白质可以类似方式进入。或许 Boc_3Arg 亦与这些变构部位相互作用，打开入口并允许靶蛋白通过进入蛋白水解腔。

[0335] *模型 2：Boc_3Arg 部分与靶蛋白相互作用，使其对蛋白酶体降解敏感。*在氟维司群与雌激素受体的相互作用中可发现此机制的优先权。初步结果表明，Boc_3Arg 与 eDHFR 相互作用，如由较低的解链温度所证实。我们假定，Boc_3Arg 嵌入蛋白质中，扰乱结构并利于降解。

[0336] *模型 3：Boc_3Arg 部分直接与介导降解的另一种细胞因子相互作用。*可能的因子包括分子伴侣、11S 激活物和遍在蛋白连接酶。

[0337] *Boc_3Arg 可起直接引导蛋白质进入蛋白酶体的作用。*模型 1 提出，Boc_3Arg 部分与 20S 蛋白酶体相互作用，打开入口并引起靶蛋白的降解。由此模型产生数个可测试的预测：

*20S 蛋白酶体降解的充分性。*我们将通过用获自商业来源 (BostonBiochem) 的纯化蛋白酶体表征 EA-Boc_3Arg/GST 降解，来测试此想法。初步实验指出，20S 蛋白酶体降解 Boc_3-Arg 修饰的蛋白质（图 18）。此降解不需要加入 ATP。用 20S 免疫蛋白酶体获得相似结果，所述免疫蛋白酶体包含三个交替的 β 亚基（未显示）。我们将进一步表征此反应，以确定此活性是否足够稳健地解释裂解物中的降解。

[0338] *Boc_3Arg 可起促进入口开启的作用。*对于全部三种活性部位，疏水肽刺激 20S 蛋白酶体催化的肽底物水解达 6-90 倍。此变构激活显示了强大的正协同性，Hill 系数为 4-17。如果 Boc_3Arg 亦与这些变构部位相互作用，那么应观察到肽底物水解的相似刺激，其具有相似的正协同性。我们将监测 Boc_3Arg 对 20S 蛋白酶体催化的 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC（胰凝乳蛋白酶样活性的底物）、Suc-Leu-Leu-Glu-AMC（胱天蛋白酶样活性的底物）和 Boc-Leu-Arg-Arg-AMC（胰蛋白酶样活性的底物）水解的作用。这些底物可市购 (BostonBiochem)。如果 Boc_3Arg 打开入口，那么全部三种底物的全部水解将受到刺激。根据我们对胰蛋白酶的工作（例如 (56)），我们非常熟知这些测定法。如果 Boc_3Arg 以类似于疏水肽的方式激活 20S 蛋白酶体，那么应观察到强协同性。

[0339] 我们预期，这些实验将显示 Boc_3Arg 诱导的降解仅需要 20S 蛋白酶体。如果 20S 蛋白酶体不够充分，我们将测试 26S 蛋白酶体，因为 19S 调节亚基亦已涉及一些非遍在蛋白依赖性降解。我们亦将确定是否需要特定的候选因子。例如，氧化的钙调蛋白的降解需要 Hsp90 的存在，因此我们将向我们的实验中加入 Hsp90。11S 调节亚基 (aka PA28) 亦已与非遍在蛋白依赖性降解相关，因此这是另一个可能的候选者。最后，我们将进行一些另外的实验以确证 Boc_3Arg 诱导降解的非遍在蛋白依赖性。例如，热敏性 Ube1 细胞可用来破坏遍在蛋白依赖性蛋白质降解；我们将测试 Boc_3Arg 诱导的降解在这些细胞中的有效性。

[0340] 我们还预期，上述实验会显示 Boc_3Arg 促进入口的开启，以及此活性的 SAR 将匹配

用于降解的 SAR。此结果会为我们提供用于发现另外的失稳部分的快捷测定法。如果这证明事实并非如此，那么我们将探索以下可能性：Boc_3Arg 仅与蛋白酶体结合。将蛋白质定位至蛋白酶体足以诱导降解，因此这是可行的备选方案。在此情况下，我们预期 Boc_3Arg 会与 Boc_3Arg 修饰的蛋白质竞争，而不是与诸如 Suc-Leu-Leu-Glu-AMC 等肽竞争。

[0341] *Boc_3Arg-DHFR 相互作用。* 用于模型 2 的工作假说为，Boc_3Arg 基团嵌入蛋白质结构中，暴露促进降解的疏水表面。我们将使用 NMR 光谱法来确定 eDHFR 的哪些区与 Boc_3Arg-TMP 相互作用。这些实验将利用从数十年对 eDHFR 结构的 NMR 研究中收集的知识。已掌握脱辅基酶蛋白和许多抑制剂复合体的次序分配 (Sequential assignment)。主链扰动可用 ^{15}N- 标记蛋白的 ^{1}H, ^{15}N-HSQC 实验容易地鉴定；可比较脱辅基酶蛋白、DFHR•TMP 和 DHFR•TMP-Boc_3Arg 复合体的光谱，以了解 Boc_3Arg 部分如何与蛋白质相互作用。NADPH 增加 TMP 的亲和力，因此我们亦将检测 DFHR•TMP•NADPH 和 DHFR•TMP-Boc_3Arg•NADPH 复合体。如果 Boc3Arg 与 eDHFR 相互作用，那么这些复合体的光谱将与 TMP 复合体显著不同。

[0342] 如果 Boc_3Arg 如提出地嵌入蛋白质中，那么结构扰动最可能完全延伸超出实际接触 Boc_3Arg 部分的残基。因此我们亦将制备用于 ^{12}C, ^{13}C-NOE 实验的 ^{13}C- 标记蛋白。双半滤器的使用使得能够鉴定直接与 Boc_3Arg 相互作用的残基。

[0343] 如果未观察到相互作用，那么可剔除模型 2。如果观察到相互作用，并且 SAR 匹配在目标 1 中确立的整体降解的 SAR，那么模型 2 可能为有效的。

[0344] *其它因子涉及 Boc_3Arg 诱导的降解。* 如果以上实验表明其它因子涉及 Boc_3Arg 诱导的降解，那么可继续这些实验。

[0345] *与 Boc_3Arg 相互作用的蛋白质。* 我们将通过将 Boc_3Arg- 接头 - 胺连接到诸如 Toyopearl AF-Tresyl-650M 等活化树脂来构建 Boc_3Arg 亲和树脂。我们将使用诸如丁酰基 - 接头胺等惰性化合物来构建用于阴性对照的树脂。我们将利用商业质谱设备，鉴定 Hela 细胞裂解物中与 Boc3Arg 树脂结合但是不与对照树脂结合的蛋白质。

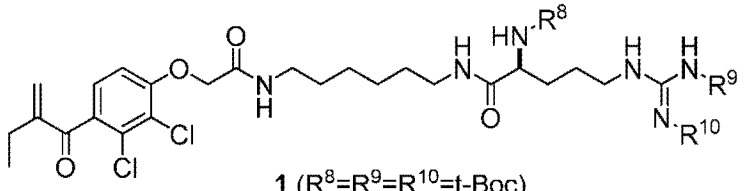
[0346] *在体外促进 Boc_3Arg 诱导降解的因子。* 我们将向纯化的蛋白酶体中加入 Hela 裂解物的级分，以利用传统的蛋白质纯化方法鉴定促进降解的因子。

[0347] 通过引用结合

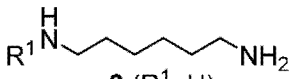
本文提及的所有出版物和专利均通过引用以其整体结合到本文中，就像每个独立出版物或专利具体而单独指明通过引用结合一样。以下专利 / 出版物亦通过引用以其整体结合：US 5122463、US 5766927、US 5851791、US 5866121、US 6222095、US 6670348、US 6217864、US 6306663、US 6559280、US 20040102458A1、EP 01426055A1 和 US 20050152888A1。如有冲突，以本申请（包括本文的任何定义）为准。

[0348] 等同内容

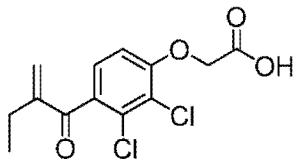
虽然已论述了主题发明的具体实施方案，但是以上说明书为说明性的而非限制性的。在回顾本说明书后，本发明的许多变动对本领域技术人员而言将变得显而易见。不意图附随权利要求要求保护所有这类实施方案和变动，本发明的全部范围应参考权利要求连同其等同内容的全部范围以及说明书连同这类变动来确定。



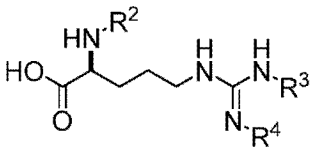
1 (R^8=R^9=R^{10}=t-Boc)
2 (R^8=Cbz, R^9=Ts, R^{10}=H)



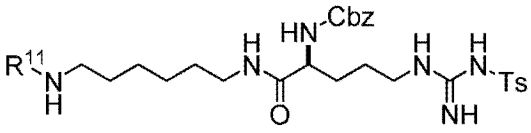
3 (R^1=H)
4 (R^1= $OCCF_3$)



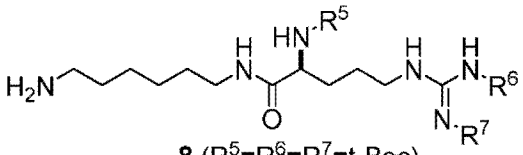
5



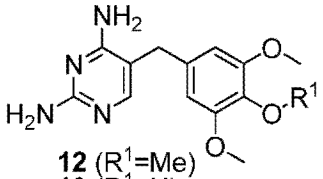
6 (R^2=R^3=R^4=t-Boc)
7 (R^2=Cbz,R^3=Ts,R^4=H)



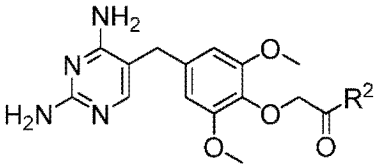
10 (R^{11}=H)
11 (R^{11}= $OCCF_3$)



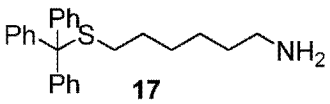
8 (R^5=R^6=R^7=t-Boc)
9 (R^5=Cbz, R^6=Ts, R^7=H)



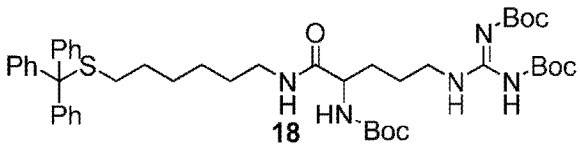
12 (R^1=Me)
13 (R^1=H)



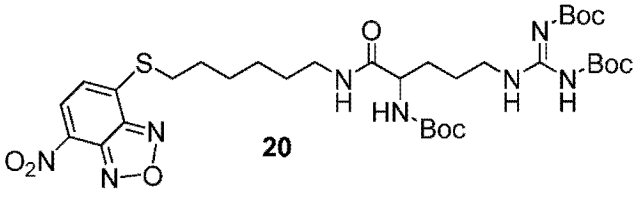
14 (R^2=OCH_3)
15 (R^2=OH)
16 [R^2=$NH(CH_2)_6NH_2$]



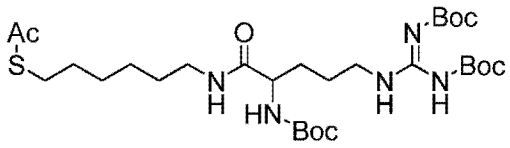
17



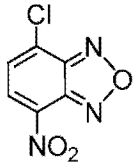
18



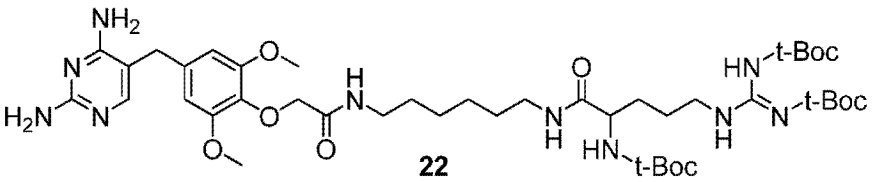
20



19



21



22

图 1

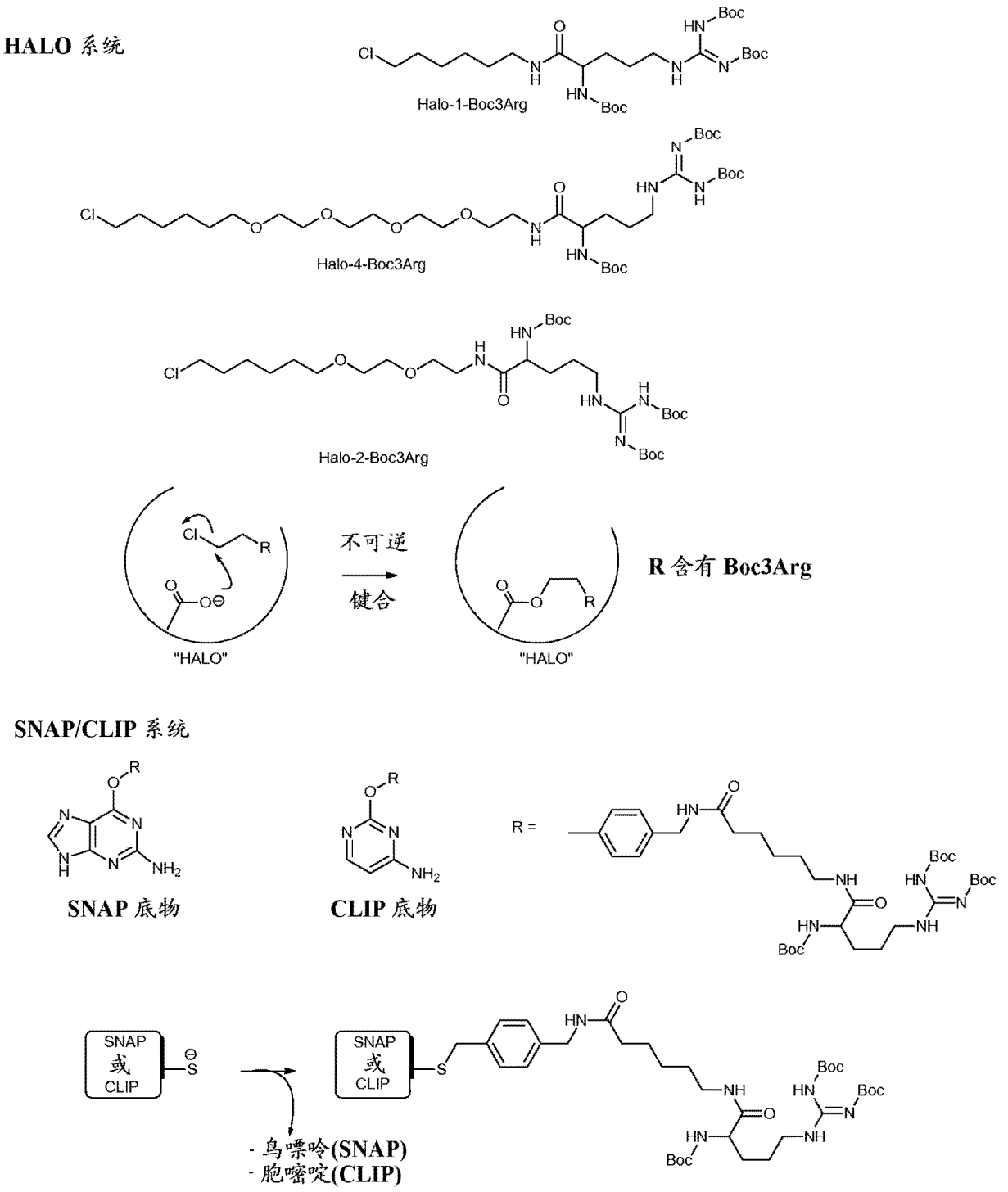

HALO 系统
Halo-1-Boc3Arg
Halo-4-Boc3Arg
Halo-2-Boc3Arg
不可逆
键合
"HALO"
"HALO"
R 含有 Boc3Arg
SNAP/CLIP 系统
SNAP 底物
CLIP 底物
R =
SNAP
或
CLIP
- 鸟嘌呤(SNAP)
- 胞嘧啶(CLIP)

图 2

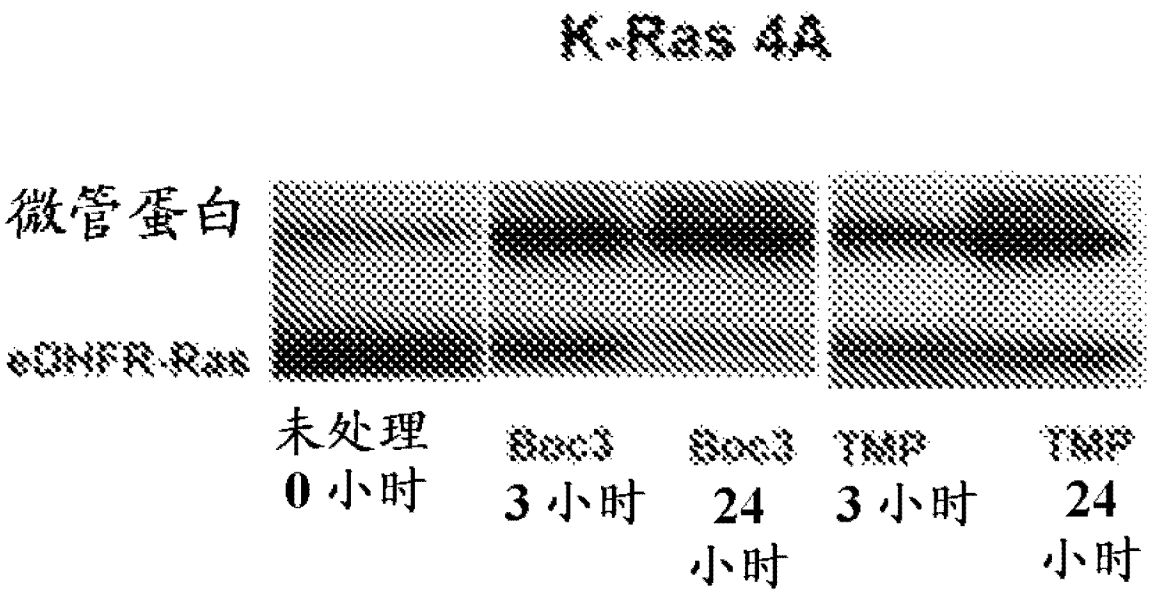

K-Ras 4A
微管蛋白
eGNFR-Ras
未处理
0 小时
Sec3
3 小时
Sec3
24
小时
YAP
3 小时
YAP
24
小时

图 3

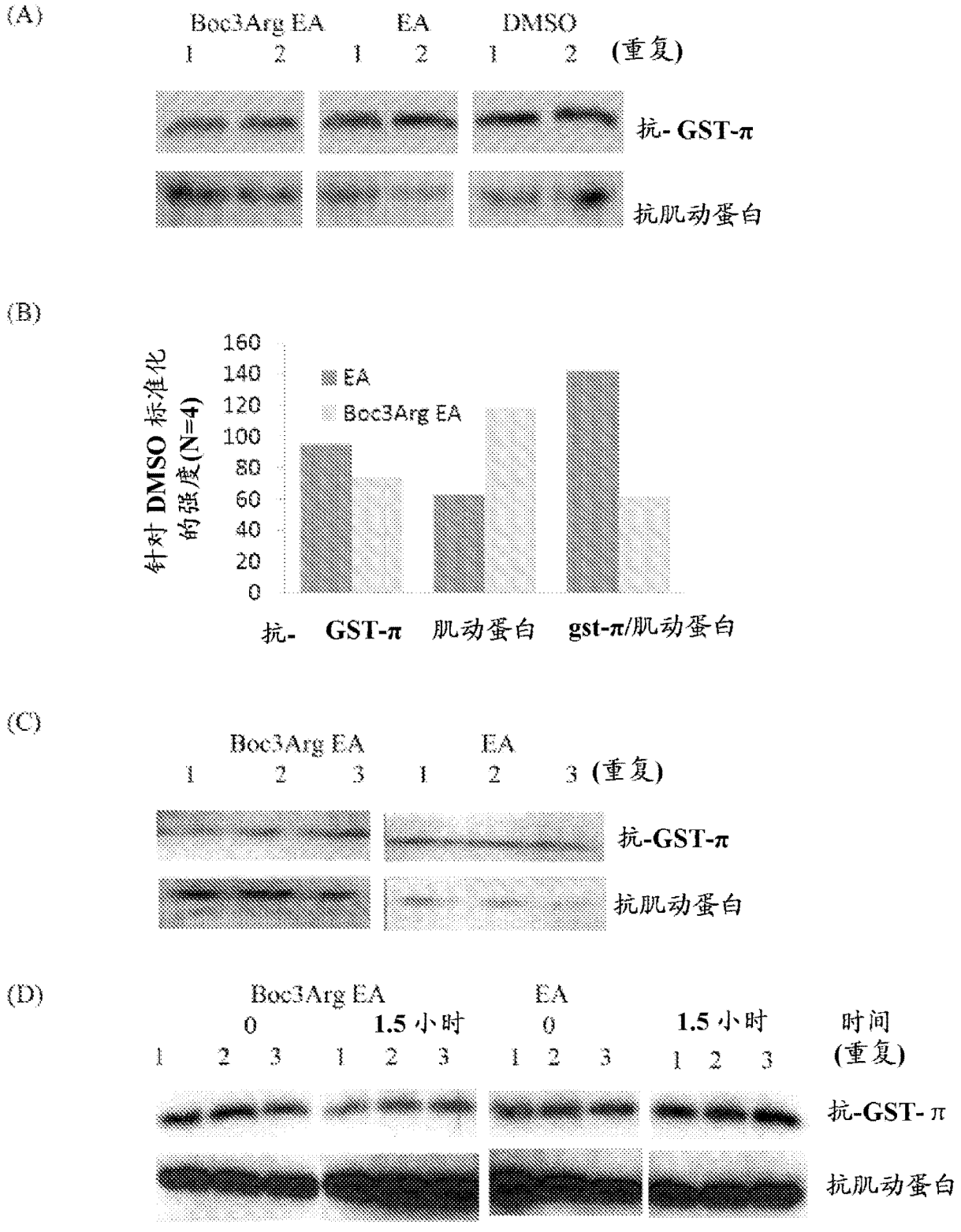

(A)
Boc3Arg EA
EA
DMSO
1 2 1 2 1 2 (重复)
抗- GST-π
抗肌动蛋白
(B)
针对 DMSO 标准化的强度(N=4)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
EA
Boc3Arg EA
抗- GST-π
肌动蛋白
gst-π/肌动蛋白
(C)
Boc3Arg EA
EA
1 2 3 1 2 3 (重复)
抗-GST-π
抗肌动蛋白
(D)
Boc3Arg EA
EA
0
1.5 小时
0
1.5 小时
时间
1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 (重复)
抗-GST-π
抗肌动蛋白

图 4

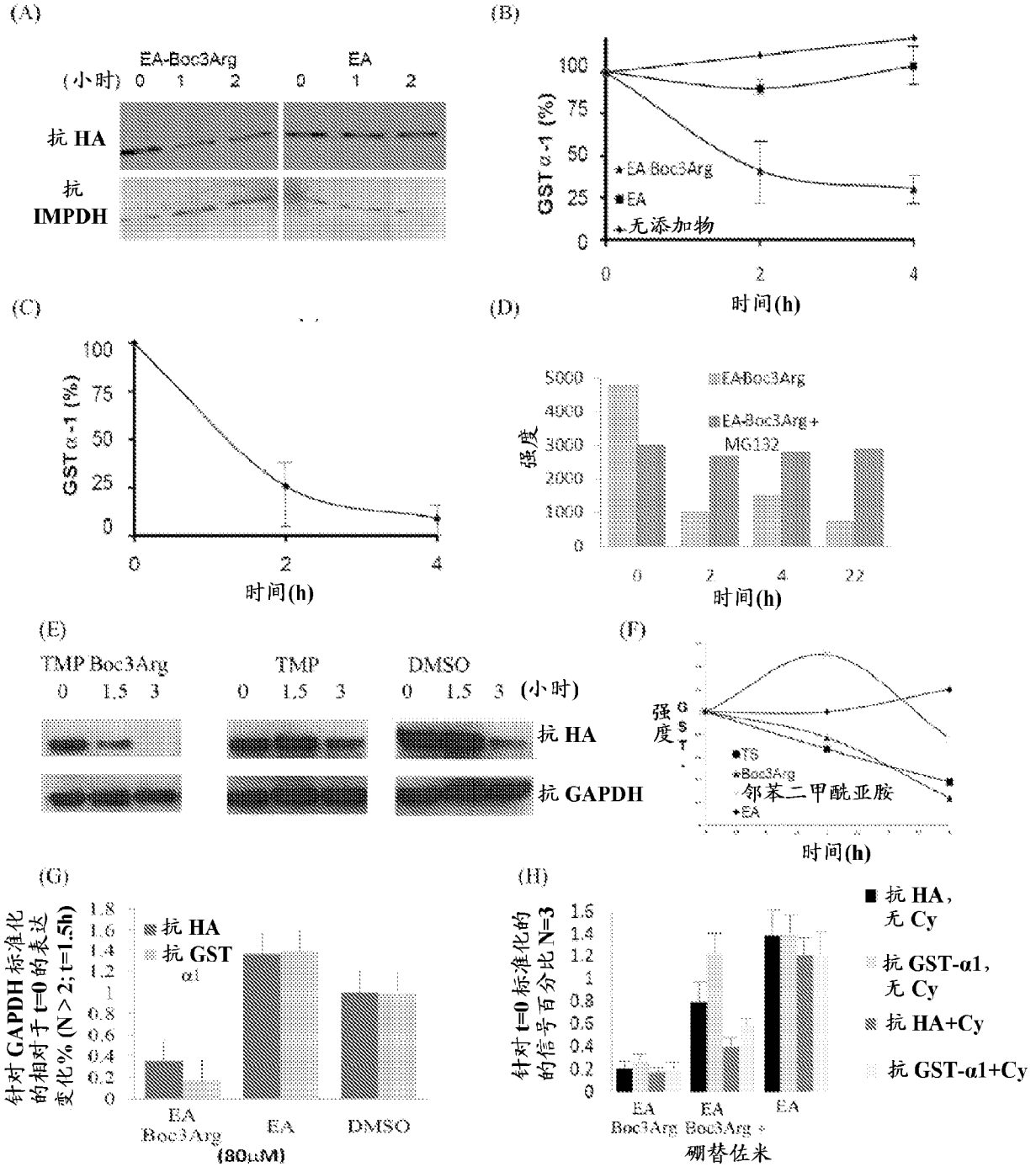

(A)
EA-Boc3Arg
EA
(小时) 0 1 2 0 1 2
抗 HA
抗 IMPDH
(B)
GST α-1 (%)
EA Boc3Arg
EA
无添加物
时间(h)
(C)
GST α-1 (%)
时间(h)
(D)
强度
EABoc3Arg
EA-Boc3Arg + MG132
时间(h)
(E)
TMP Boc3Arg
TMP
DMSO
0 1.5 3 0 1.5 3 0 1.5 3 (小时)
抗 HA
抗 GAPDH
(F)
强度
GST
TS
Boc3Arg
邻苯二甲酰亚胺
EA
时间(h)
(G)
针对 GAPDH 标准化的相对于 t=0 的表达变化% (N > 2; t=1.5h)
抗 HA
抗 GST α1
EA Boc3Arg
EA
DMSO
(80μM)
(H)
针对 t=0 标准化的的信号百分比 N=3
抗 HA, 无 Cy
抗 GST-α1, 无 Cy
抗 HA+Cy
抗 GST-α1+Cy
EA Boc3Arg
EA Boc3Arg +
EA
硼替佐米

图 5

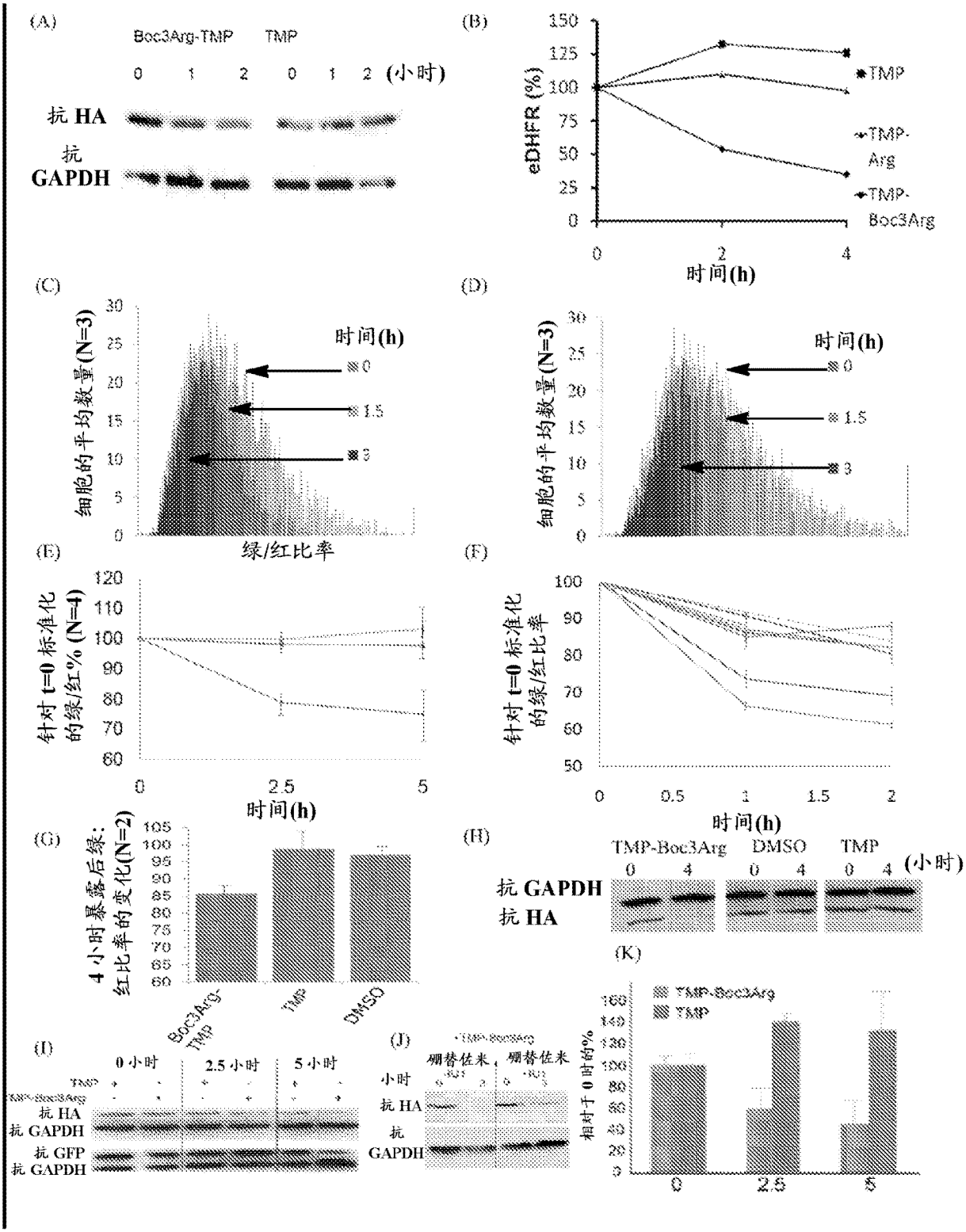

(A)
Boc3Arg-TMP
TMP
0 1 2 0 1 2 (小时)
抗 HA
抗 GAPDH
(B)
eDHFR (%)
TMP
TMP-Arg
TMP-Boc3Arg
时间(h)
(C)
细胞的平均数量(N=3)
时间(h)
0
1.5
3
绿/红比率
(D)
细胞的-平均数量(N=3)
时间(h)
(E)
针对 t=0 标准化的绿/红% (N=4)
时间(h)
(F)
针对 t=0 标准化的绿/红比率
时间(h)
(G)
4 小时暴露后绿:红比率的变化(N=2)
Boc3Arg-TMP
TMP
DMSO
(H)
TMP-Boc3Arg
DMSO
TMP
(小时)
抗 GAPDH
抗 HA
(I)
0 小时
2.5 小时
5 小时
抗 HA
抗 GAPDH
抗 GFP
抗 GAPDH
(J)
棚替佐米
棚替佐米
小时
抗 HA
抗 GAPDH
(K)
TMP-Boc3Arg
TMP
相对于 0 时的%

图 6

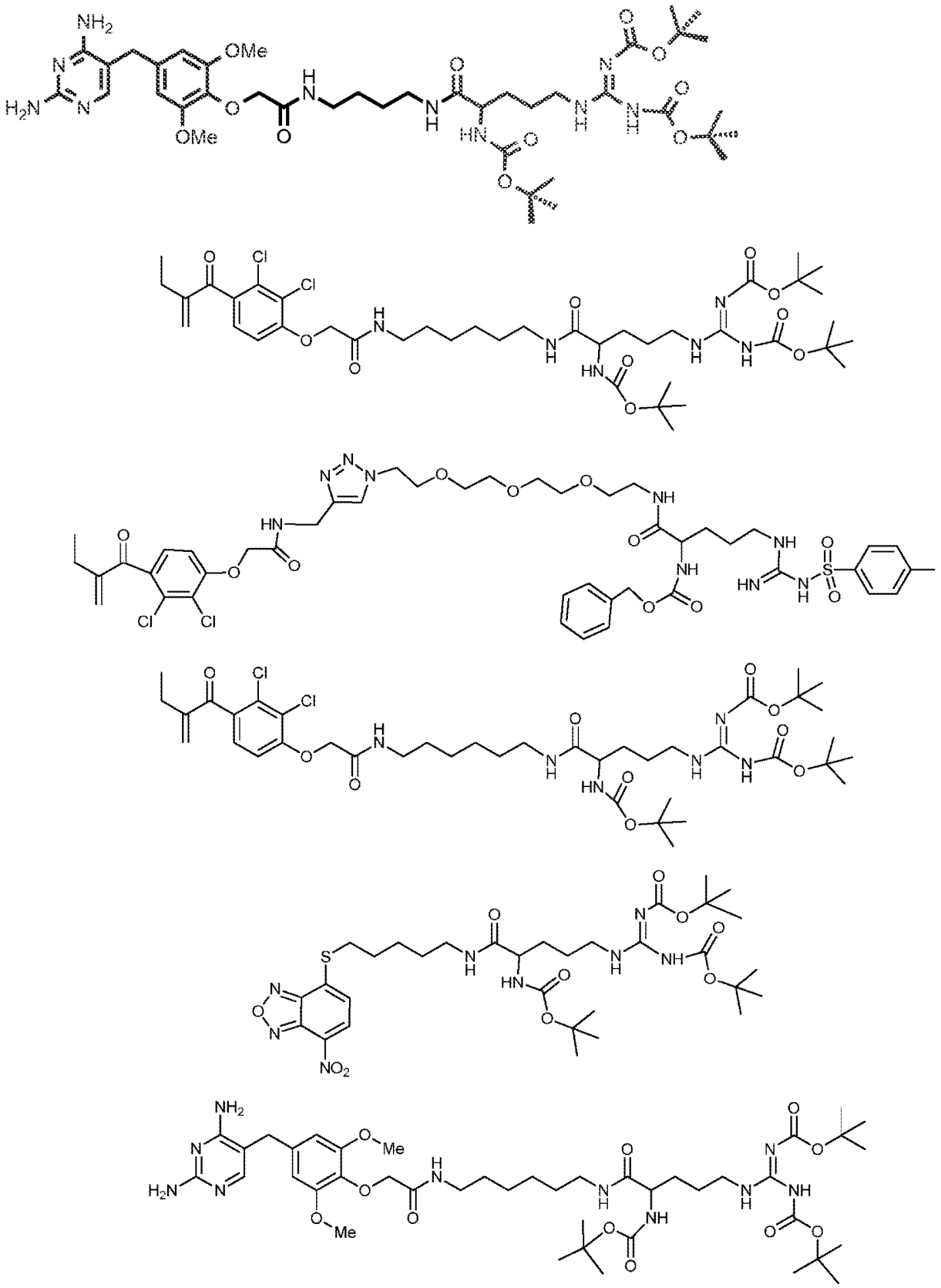


图 7

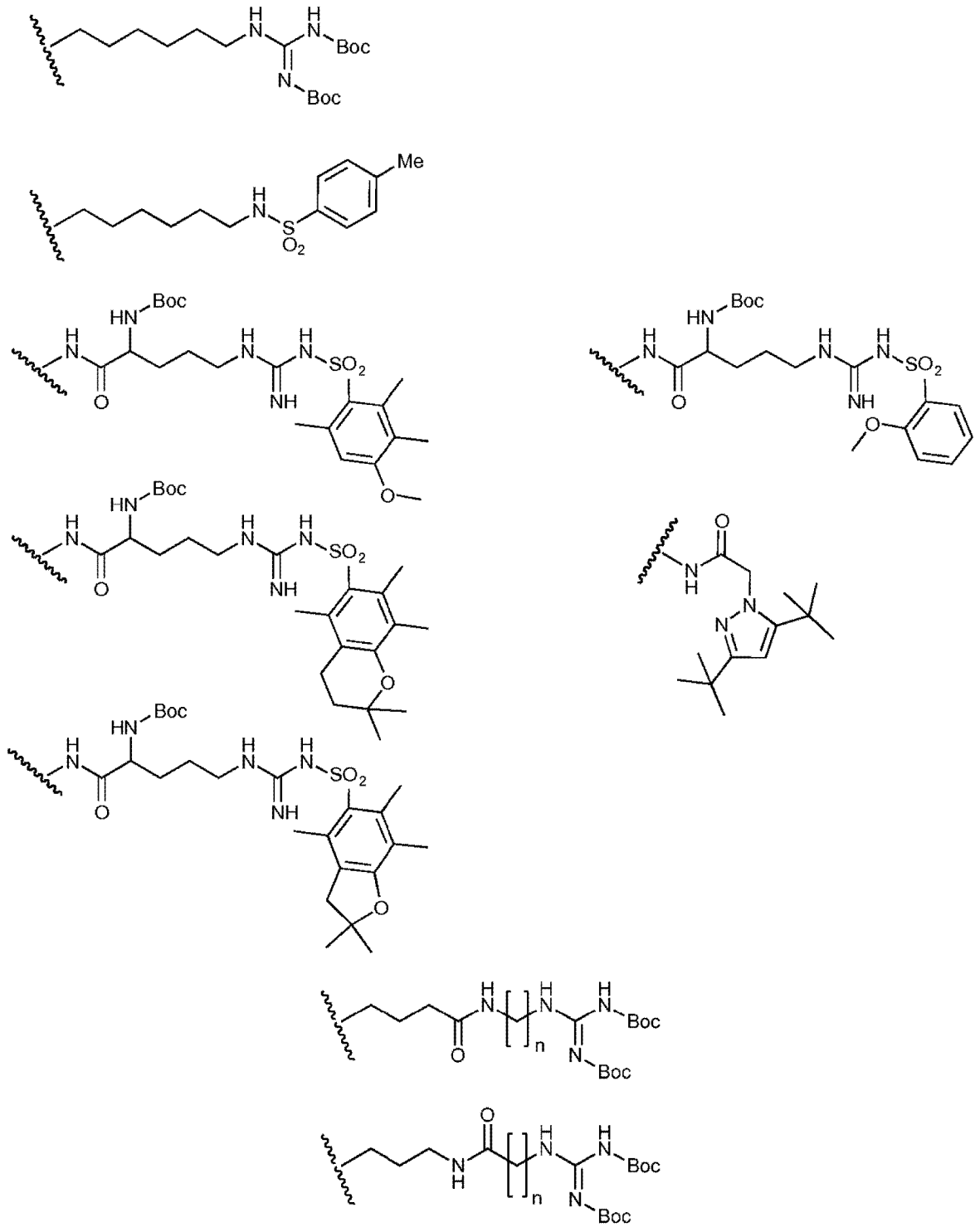


图 8

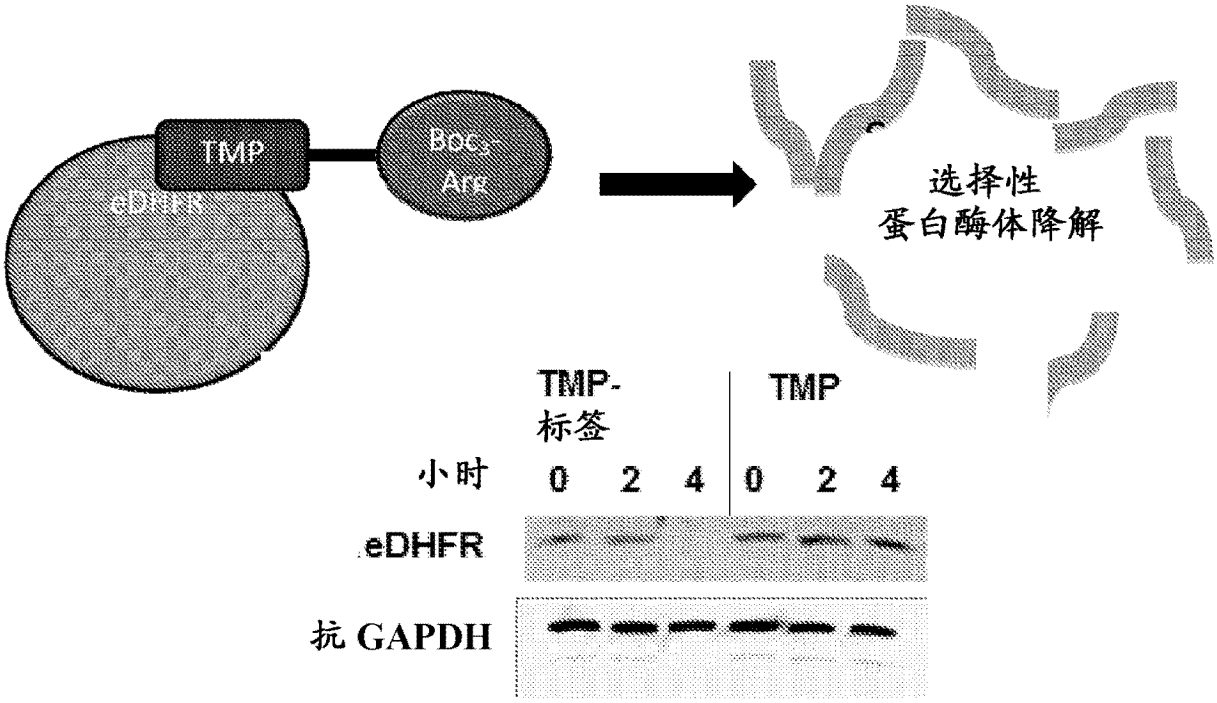

TMP
eDHFR
Boc3-
Arg
选择性
蛋白酶体降解
TMP-
标签
TMP
小时
0 2 4 0 2 4
eDHFR
抗 GAPDH

图 9

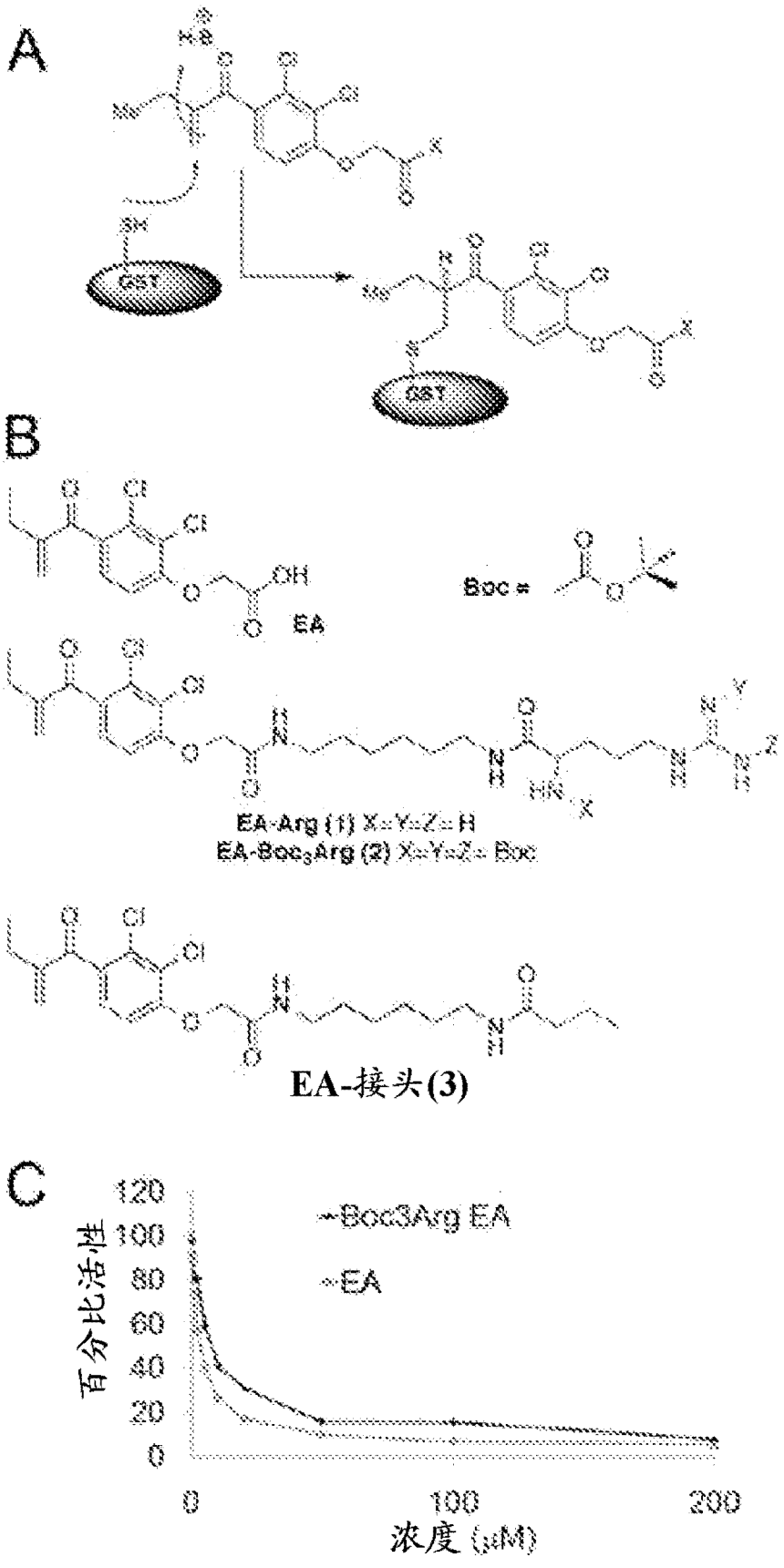

A
GST
GST
B
EA
Boc =
EA-Arg (1) X=Y=Z= H
EA-Boc3Arg (2) X=Y=Z= Boc
EA-接头(3)
C
百分比活性
120
100
80
60
40
20
0
Boc3Arg EA
EA
0
100
200
浓度 (μM)

图 10

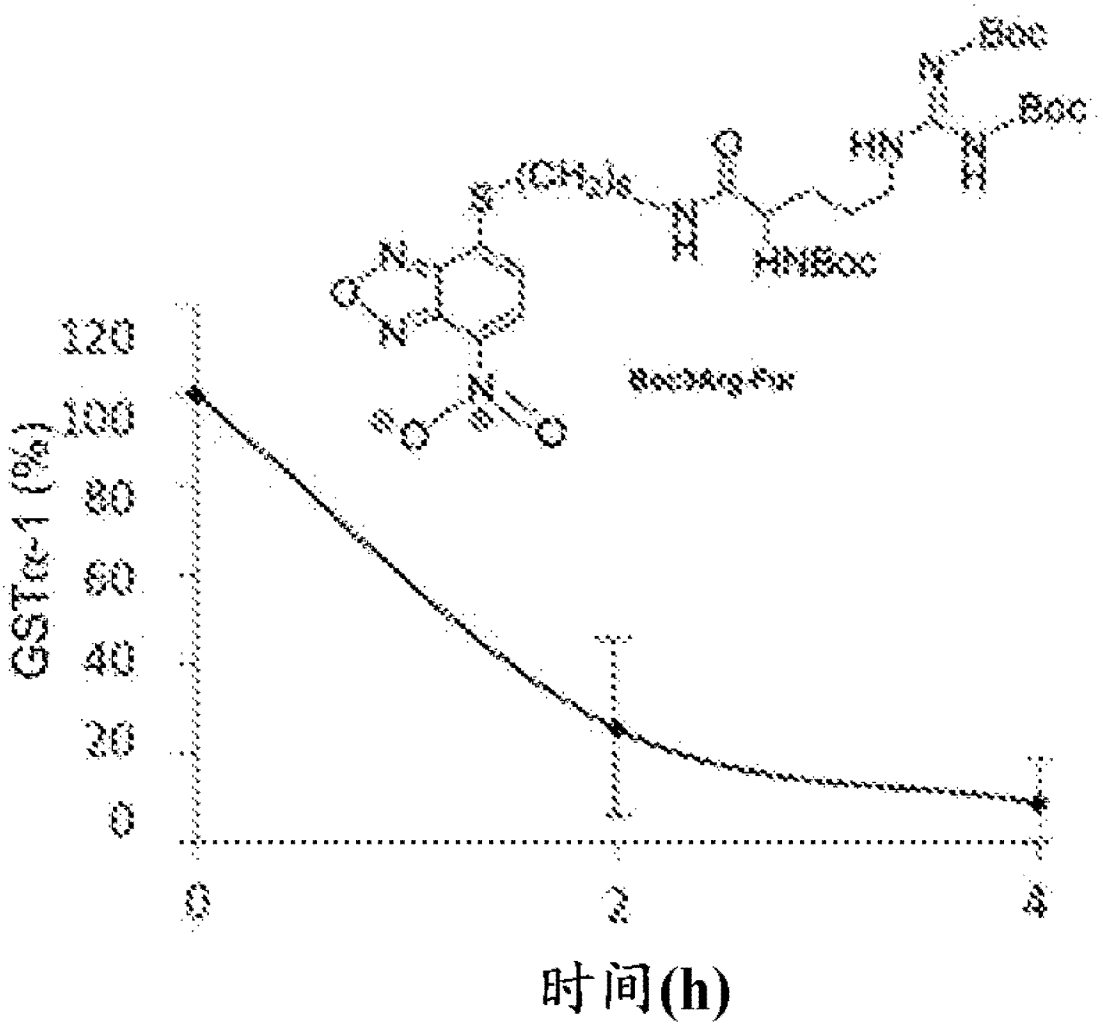


图 11

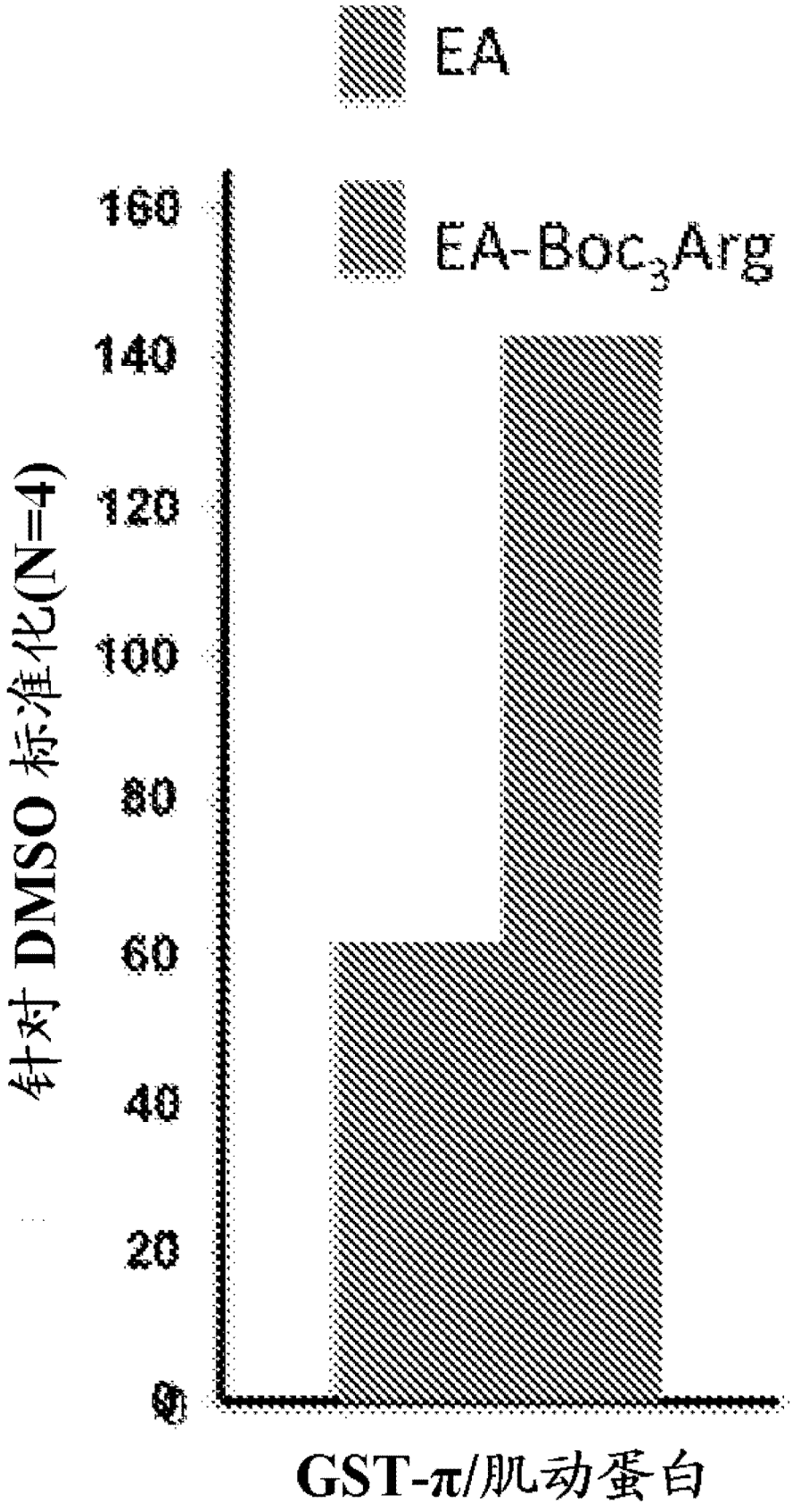

EA
EA-Boc3Arg
160
140
120
100
80
60
40
20
0
针对 DMSO 标准化(N=4)
GST-π/肌动蛋白

图 12

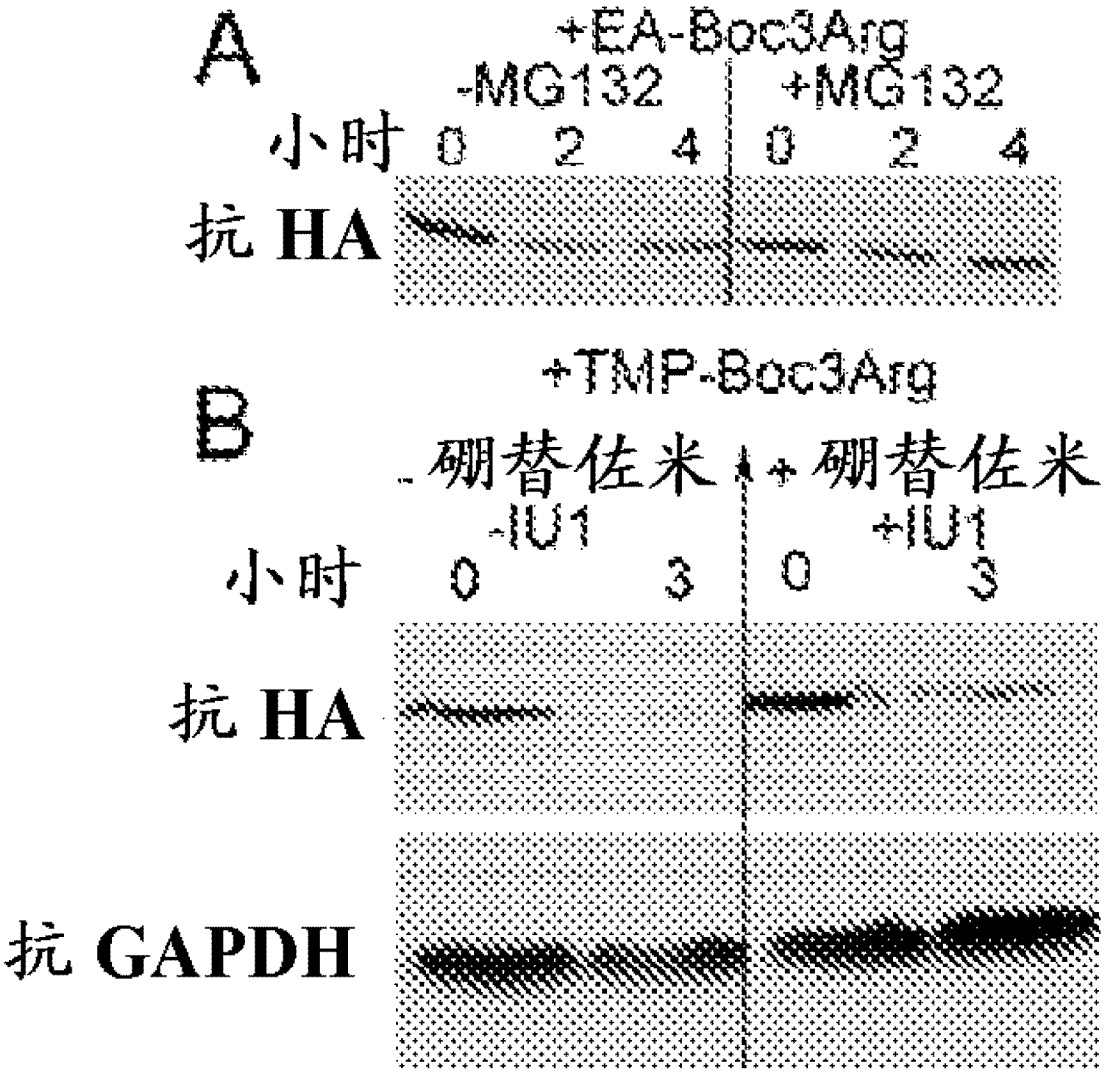

A
+EA-Boc3Arg
-MG132
+MG132
小时
0
2
4
0
2
4
抗 HA
B
+TMP-Boc3Arg
-硼替佐米
+硼替佐米
-IU1
+IU1
小时
0
3
0
3
抗 HA
抗 GAPDH

图 13

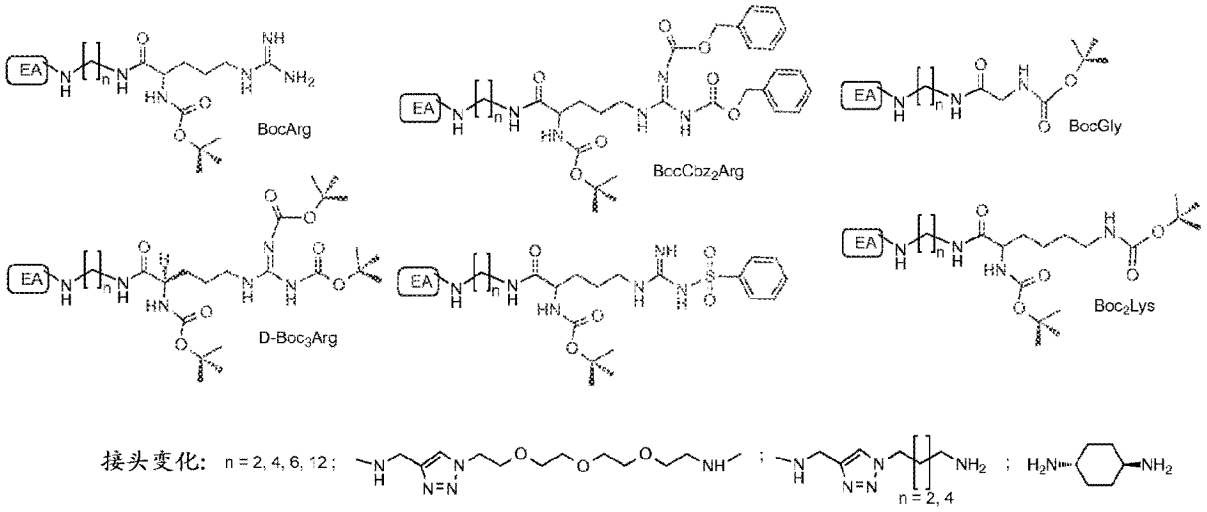

EA
BocArg
BccCbz2Arg
BocGly
D-Boc3Arg
Boc2Lys
接头变化: n = 2, 4, 6, 12 ;
n = 2, 4

图 14

化合物	R1	R3	pK_i
TMP	OCH_3	OCH_3	8.87
T1	OCH_3	OCH_3	8.35
T2	CF_3	H	7.69
T3	H	H	6.89
T4	CH_2CH_3	CH_2CH_3	5.75

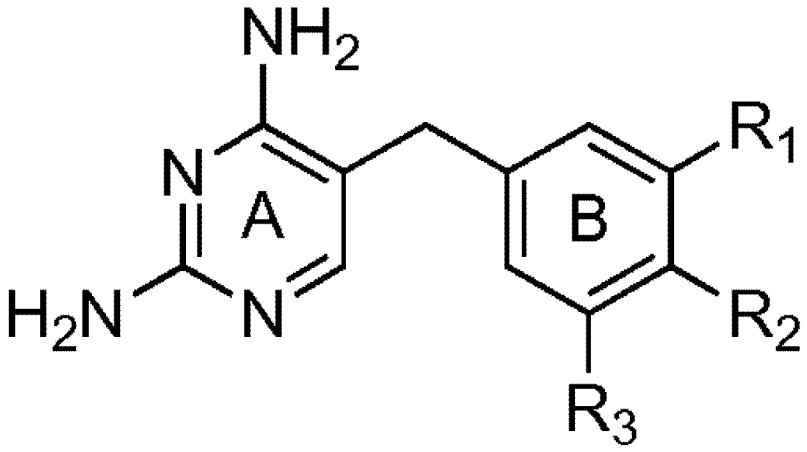


图 15

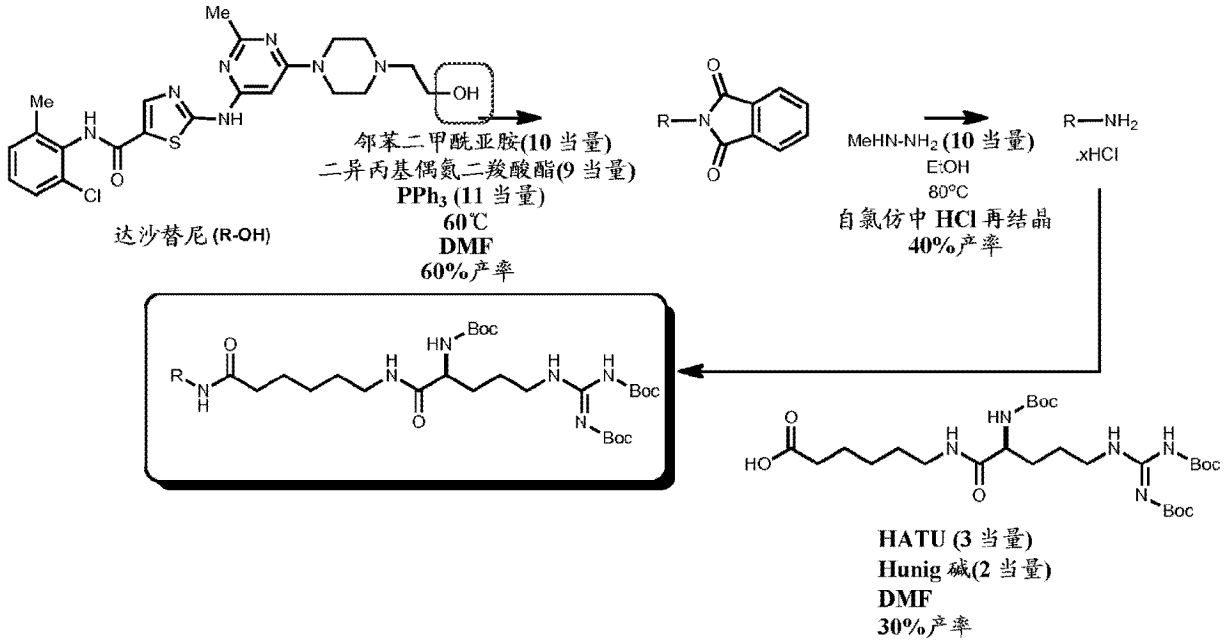

达沙替尼 (R-OH)
邻苯二甲酰亚胺(10 当量)
二异丙基偶氮二羧酸酯(9 当量)
PPh3 (11 当量)
60℃
DMF
60%产率
MeHN-NH2 (10 当量)
EtOH
80°C
自氯仿中 HCl 再结晶
40%产率
R—NH2
.xHCl
HATU (3 当量)
Hunig 碱(2 当量)
DMF
30%产率

图 16

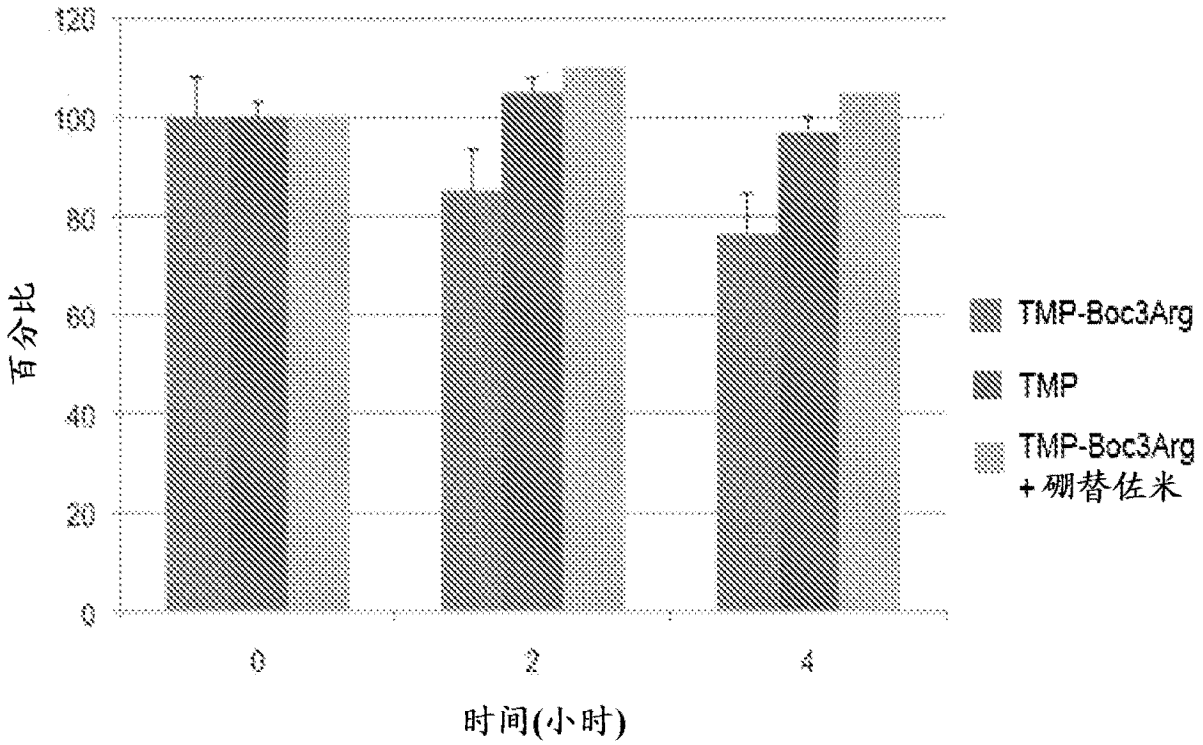
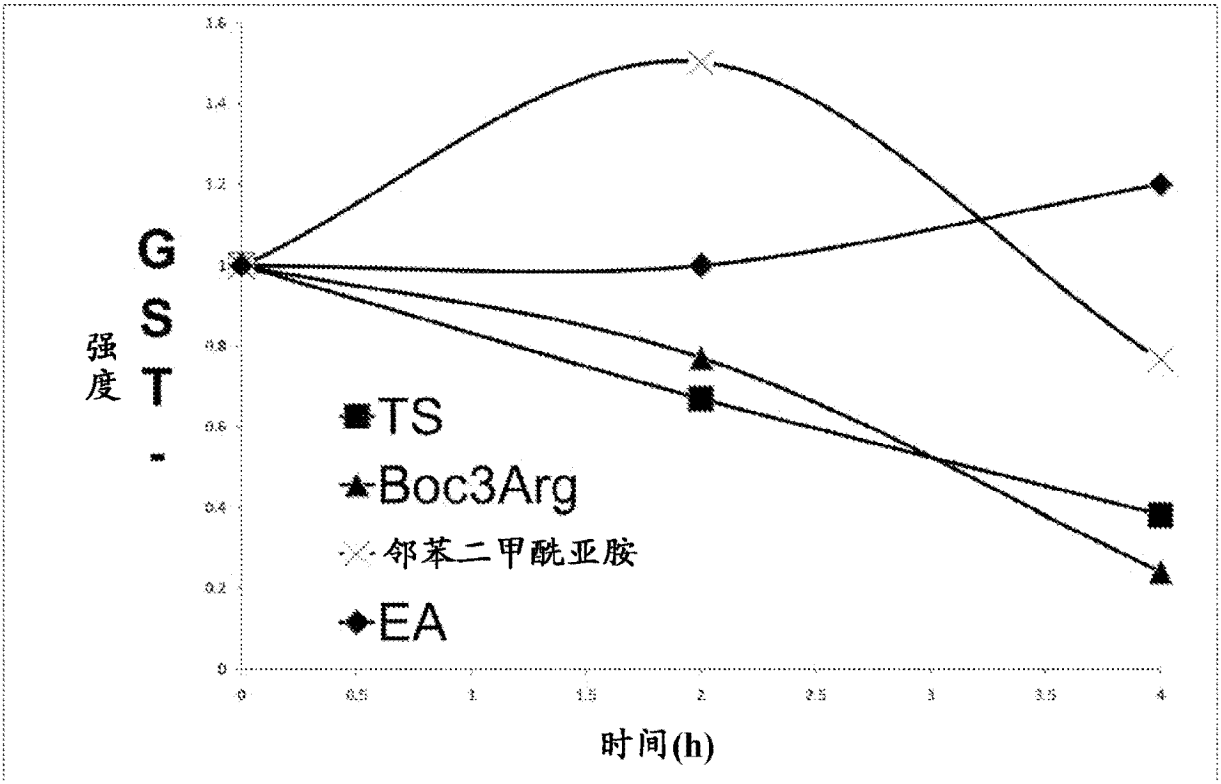
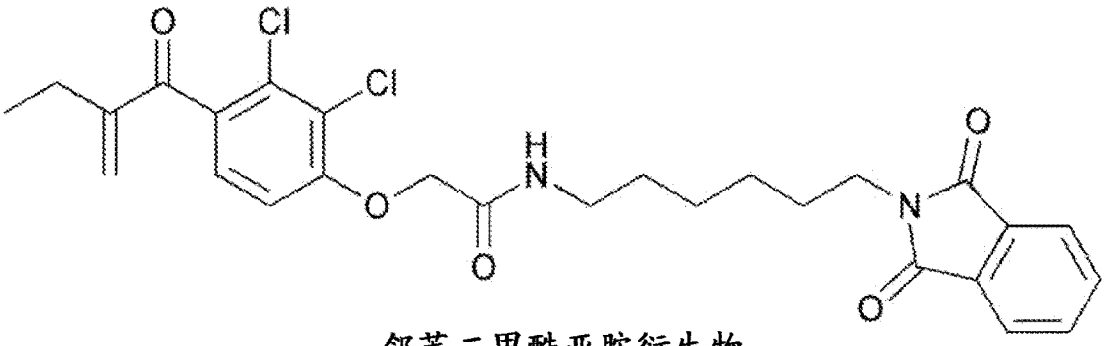

百分比
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
时间(小时)
TMP-Boc3Arg
TMP
TMP-Boc3Arg
+ 硼替佐米

图 17





邻苯二甲酰亚胺衍生物

图 18