(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0020107
(43) 공개일자 2021년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 417/14 (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)
A61K 47/55 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01) *C07D 401/14* (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01) *C07D 417/12* (2006.01)
C07D 495/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 417/14 (2013.01)
A61K 47/55 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2021-7000976
(22) 출원일자(국제) 2019년06월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년01월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/065479
(87) 국제공개번호 WO 2019/238816
국제공개일자 2019년12월19일
(30) 우선권주장
62/684,268 2018년06월13일 미국(US)
62/835,955 2019년04월18일 미국(US)

(71) 출원인
암피스타 테라퓨틱스 엘티디
영국 엔더블유1 2엔디 런던 노쓰 가워 스트리트 158-160
(72) 발명자
출리 알레시오
영국 던디 디디2 1에이에프 스텝 로우 11
테스타 안드레아
영국 노스 래넉셔 엠엘1 5유에이치 뉴하우스 보니스 로드 암피스타 테라퓨틱스 엘티디
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

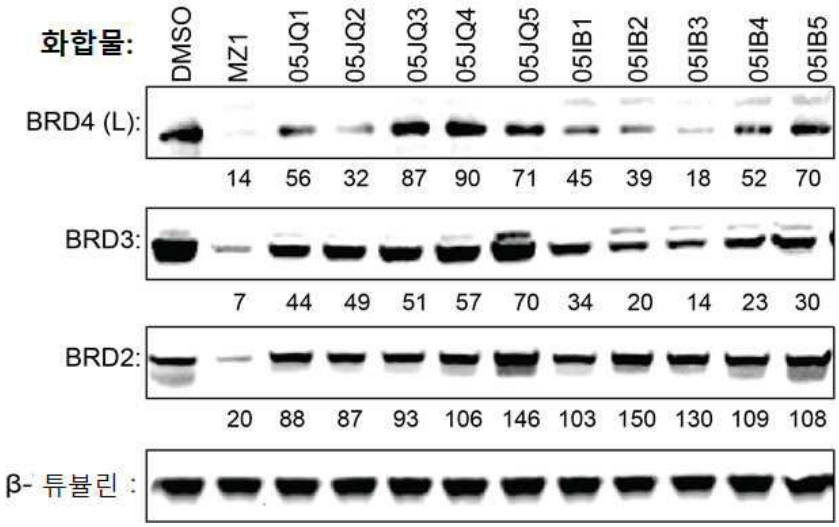
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 **UchL5 표적화를 위한 이중작용성 분자**

(57) 요 약

본 발명은 가요성 링커를 통해 링크된 UchL5 결합 파트너 및 표적 단백질 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 제공한다. 본 발명에 따른 이중작용성 분자는 UchL5 및 표적 단백질에 결합하여 표적 단백질 결합 파트너에 결합된 표적 단백질의 분해를 촉진한다. 본 발명은 또한 질병을 예방 또는 치료하기 위한 이중작용성 분자의 용도를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/555 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07D 401/12 (2013.01)
C07D 401/14 (2013.01)
C07D 413/12 (2013.01)
C07D 417/12 (2013.01)
C07D 495/14 (2013.01)
(72) 발명자
휴스 스캇
영국 노스 래넉셔 엠엘1 5유에이치 뉴하우스 보니스 로드 암피스타 테라퓨틱스 엘티디
부처 스티븐 피터
영국 피이28 0티엘 케임브리지셔 헌팅던 스토 롱가스팔드윅 로드 23

명 세 서

청구범위

청구항 1

표적 단백질 결합 파트너에 연결(link)된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 UchL5 결합 파트너가 적어도 10nM의 친화도로 UchL5에 결합하는 것인 이중작용성 분자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 UchL5 결합 파트너가 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합하는 것인 이중작용성 분자.

청구항 4

청구항 1에 있어서, UchL5 결합 파트너가 표 1에 제공된 UchL5 결합 분자의 군으로부터 선택되는 것인 이중작용성 분자.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 표적 단백질 결합 파트너가 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적으로 하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 및 항체로 구성된 군에서 선택되는 것인 이중작용성 분자.

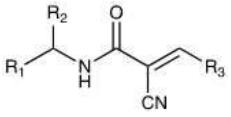
청구항 6

청구항 1에 있어서, 링커가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커, 알킬-에테르 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커인 것인 이중작용성 분자.

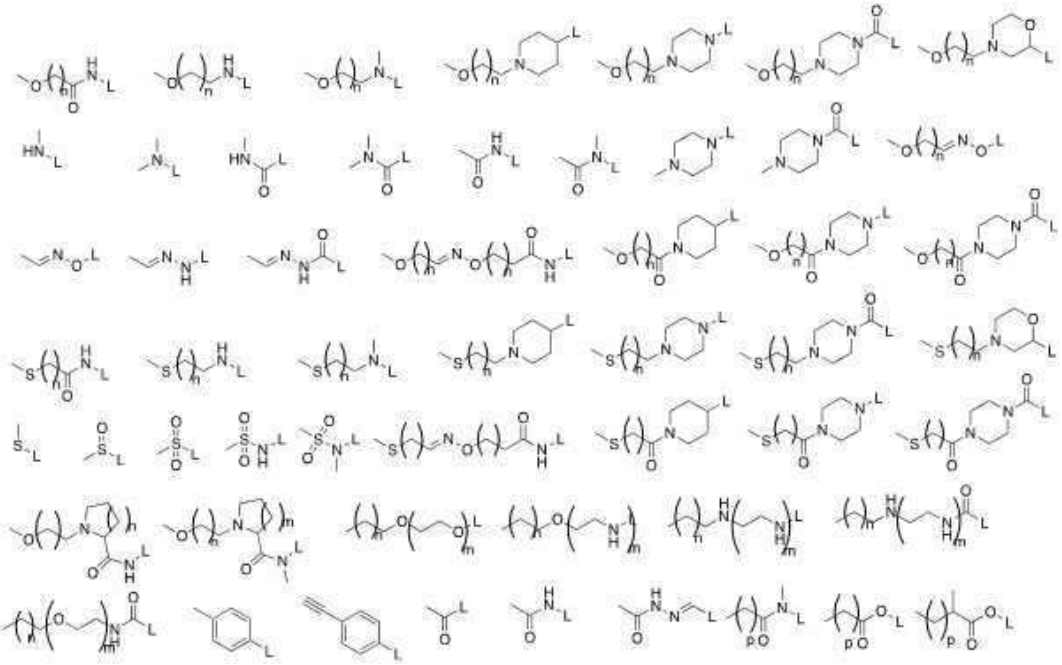
청구항 7

청구항 1에 있어서, UchL5 결합 파트너가 화학식 I로 표시되는 것인 이중작용성 분자:

[화학식 I]



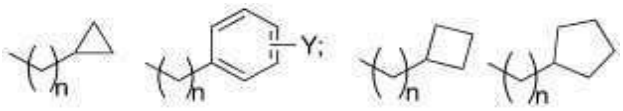
R1은  또는 헤테로-치환 방향족 고리이고, 여기서 Y =



n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; p = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

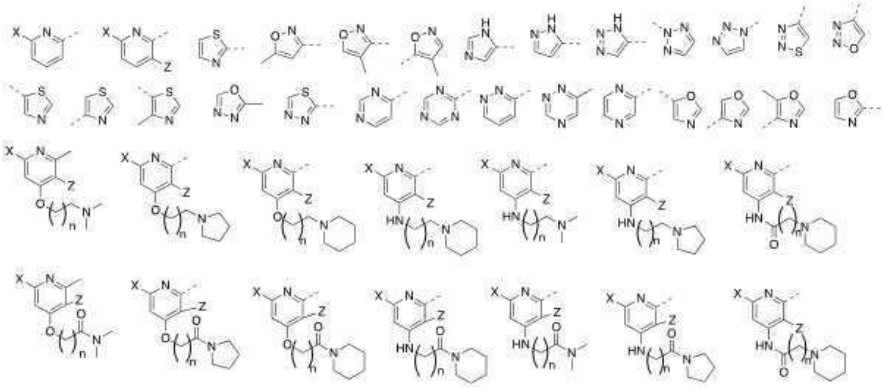
L은 단백질 바인더에 연결된 링커이다.

R2는 -H, CH3, (CH2)nCH3; (CH2)nOCH3 (여기에서 n = 1, 2, 3 및 4) 및 하기에서 선택되고:



여기서 Y = -Me, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CHF2, -CH2F, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe, -NMe2, NO2, CHO 및 위의 예이다.

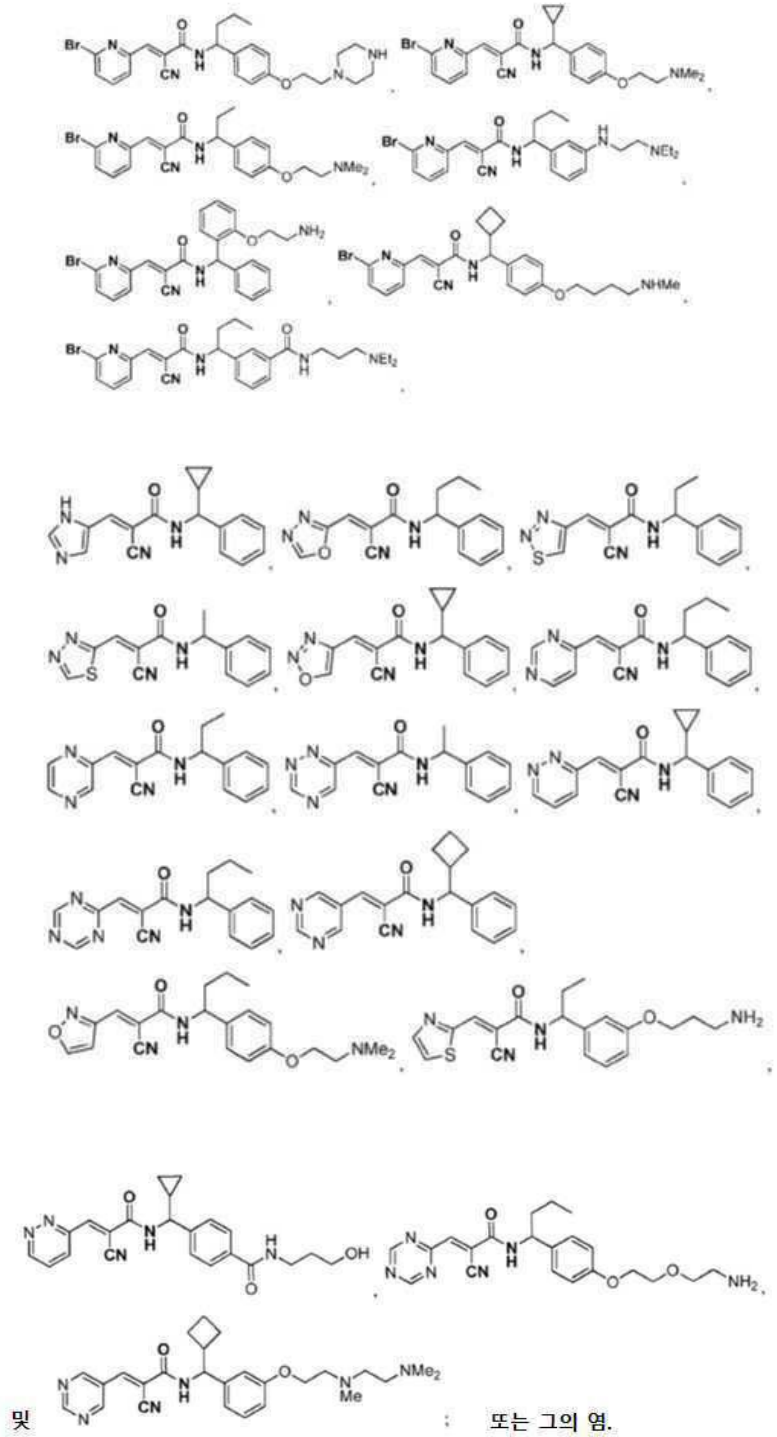
R3 은 하기부터 선택된다:



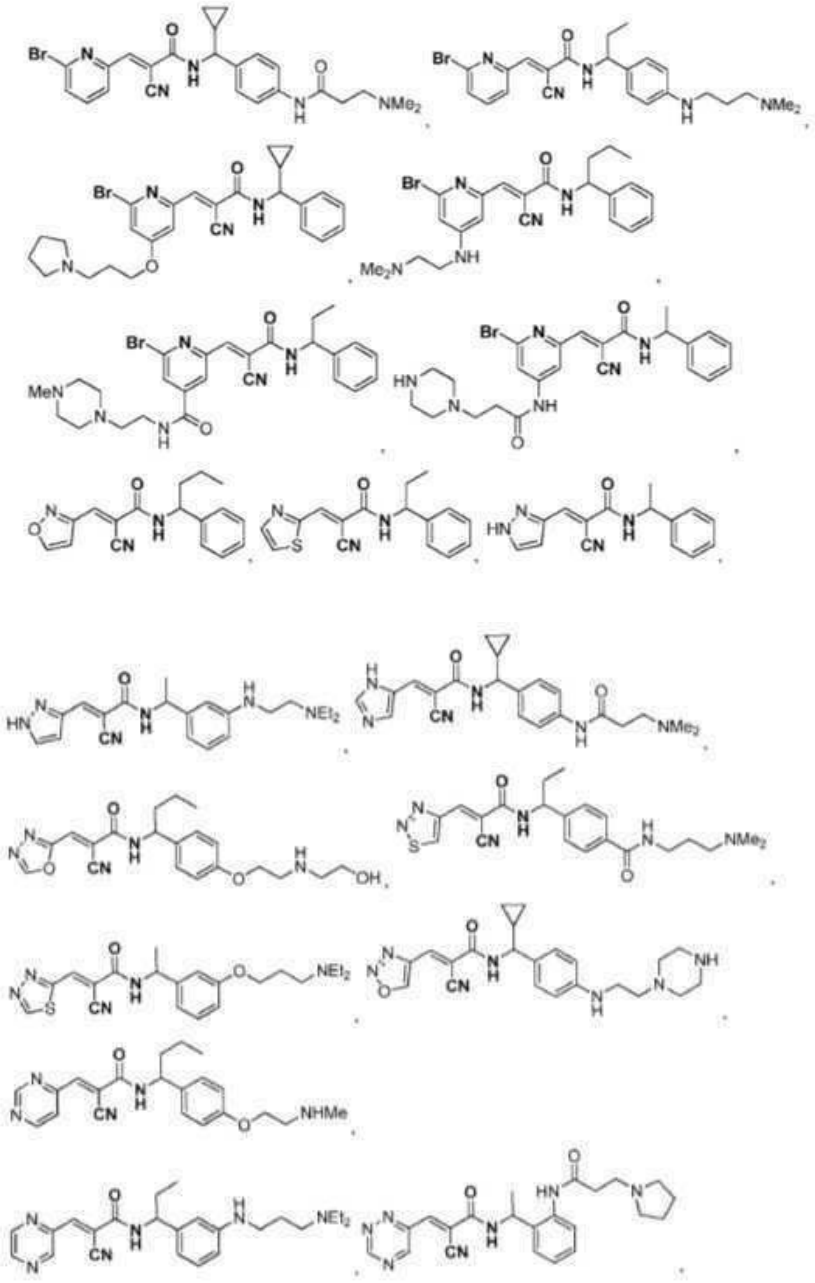
여기서 X 및 Z = -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CH2F, -CHF2, -CH3, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, $-SO_2Me$, $-NH_2$, -NHMe, $-NMe_2$, $-NO_2$, -CHO이고 n = 1, 2, 3, 4이다.

청구항 8

청구항 1에 있어서, UchL5 결합 파트너가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 이중작용성 분자:



및 : 또는 그의 염.



청구항 9

화학식 (I)의 화합물:

U5L-(CL)-TPL (I),

여기서 -는 공유결합을 의미하고;

여기서 U5L은 UchL5에 결합하는 리간드이고,

CL은 공유결합적 링커고,

여기서 TPL은 표적 단백질에 결합하는 리간드이다.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 U5L이 표 1에 제공된 UchL5 리간드의 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 U5L은 적어도 10nm의 친화도로 UchL5에 결합하는 것인 화합물.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 U5L이 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합하는 것인 화합물.

청구항 13

청구항 9에 있어서, TPL은 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질에 결합하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 또는 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 중 하나인 것인 화합물.

청구항 14

청구항 9에 있어서, CL은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커, 알킬-에테르 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커인 것인 화합물.

청구항 15

화학식 (II)의 화합물:

U5L-A-(CL)-B-TPL (II),

여기서 -는 공유결합을 의미하고;

U5L은 UchL5에 결합하는 리간드이고,

CL은 상이한 제 1 말단 A 및 제 2 말단 B를 갖는 공유결합적 링커이고, 여기서 A 및 B는 독립적으로 아미드, 옥심, 케토, 탄소, 에테르, 에스테르, 또는 카바 메이트이고;

TPL은 표적 단백질에 결합하는 리간드이고,

U5L은 A에 공유결합으로 연결되고 TPL은 B에 공유결합으로 연결된다.

청구항 16

청구항 15에 있어서, TPL은 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질에 결합하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 또는 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 중 하나인 것인 화합물.

청구항 17

다음 화학식의 화합물:

U5L-(CL)-Rx (III),

여기서 -는 공유결합을 의미하고;

U5L은 UchL5에 결합하는 리간드이고,

CL은 Rx로 끝나는 공유결합 링커이고,

Rx는 리간드와 공유 화학 결합을 형성할 수 있고,

Rx는 PEG가 아니다.

청구항 18

청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, 상기 U5L은 적어도 10nM의 친화도로 UchL5에 결합하는 것인 화합물.

청구항 19

청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, 상기 U5L이 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합하는 것인 화합물.

청구항 20

청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, 상기 U5L이 표 1에 제공된 UchL5 리간드의 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 21

청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, 상기 링커가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커 또는 조합된 PEG, 알킬 링커인 것인 화합물.

청구항 22

청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, 상기 링커가, 옥심인 제 1 말단을 갖는 것인 화합물.

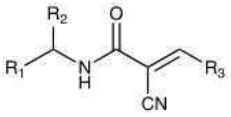
청구항 23

청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, 상기 링커가, 아민인 제 2 말단을 갖는 것인 화합물.

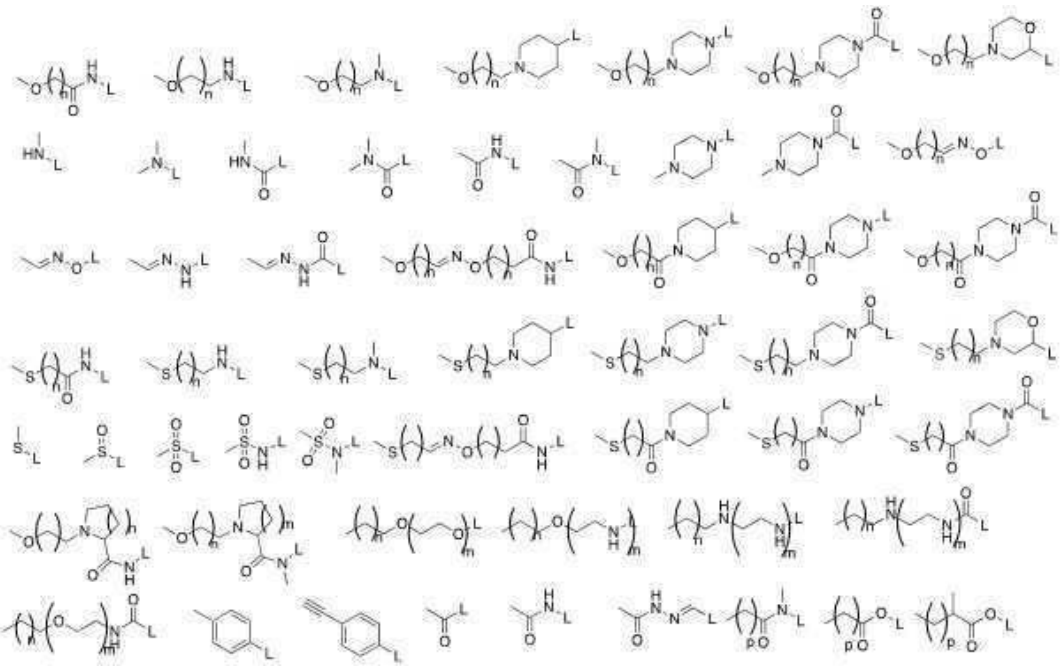
청구항 24

청구항 9, 또는 청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, 상기 U5L이 화학식 I로 표시되는 것인 화합물:

[화학식I]



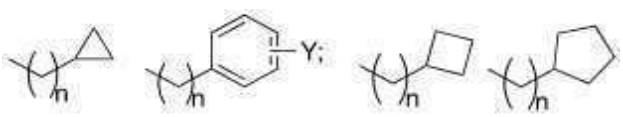
R1은  또는 헤테로-치환 방향족 고리이고, 여기서 Y =



n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; p = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

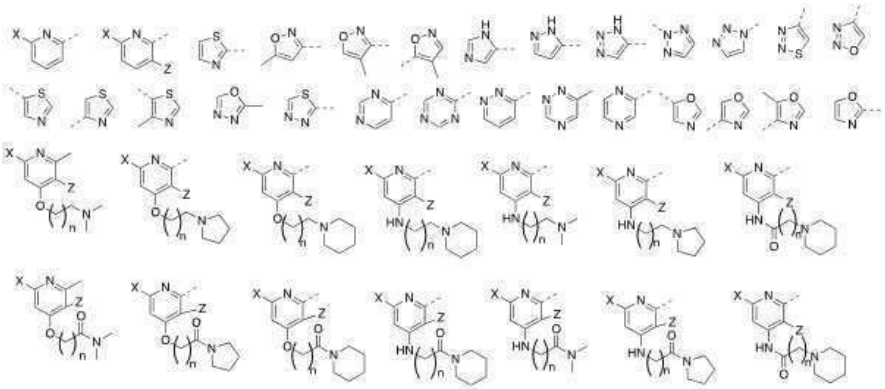
L은 단백질 바인더에 연결된 링커이다.

R2는 -H, CH3, (CH2)nCH3; (CH2)nOCH3 (여기서 n = 1, 2, 3 및 4) 및 하기로 부터 선택된다:



여기서, Y = -Me, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CHF2, -CH2F, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, $-SO_2Me$, $-NH_2$, -NHMe, $-NMe_2$, NO_2, CHO 및 상기 예이다.

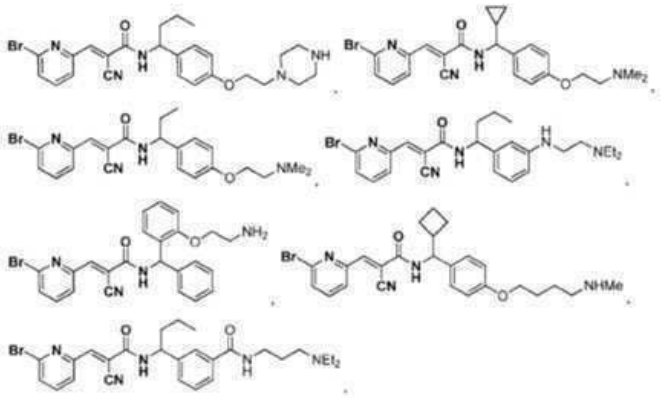
R3 은 하기로부터 선택된다:

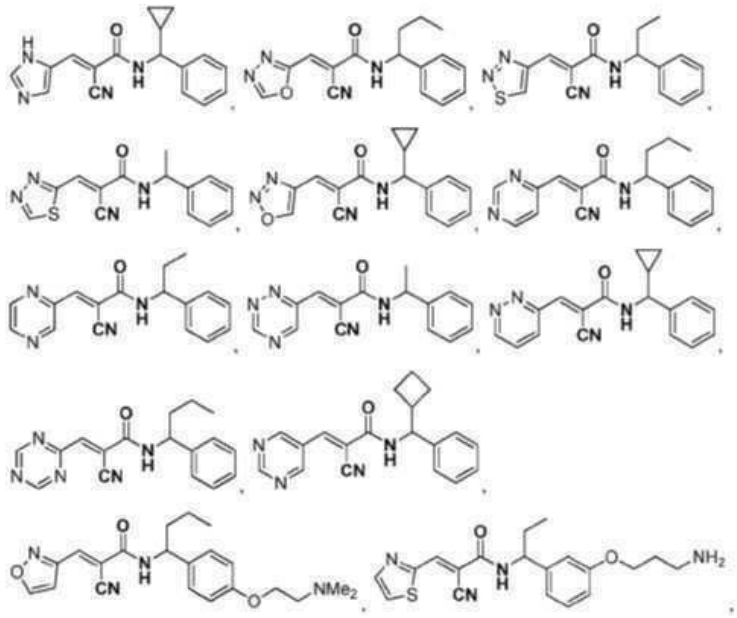


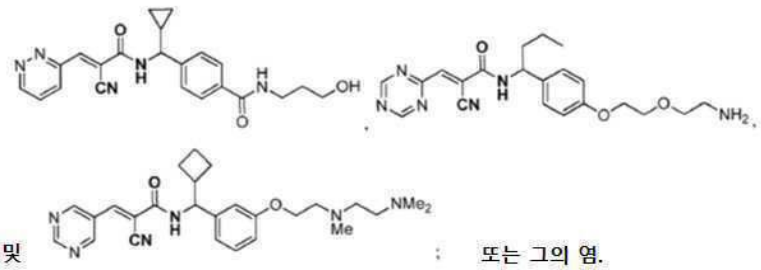
여기서 X 및 Z = -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CH2F, -CHF2, -CH3, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, $-SO_2Me$, $-NH_2$, -NHMe, $-NMe_2$, $-NO_2$, -CHO이고 n = 1, 2, 3, 4이다.

청구항 25

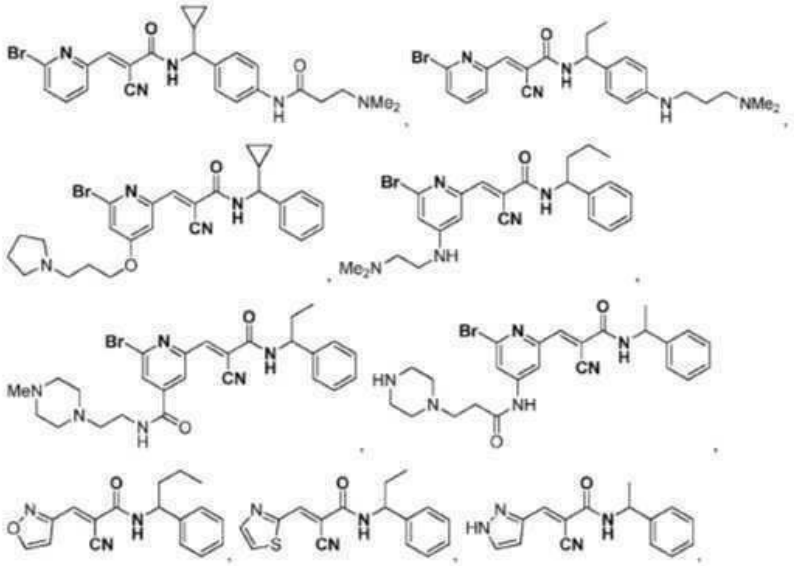
청구항 9, 청구항 15 또는 청구항 17에 있어서, U5L이 다음으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 화합물:

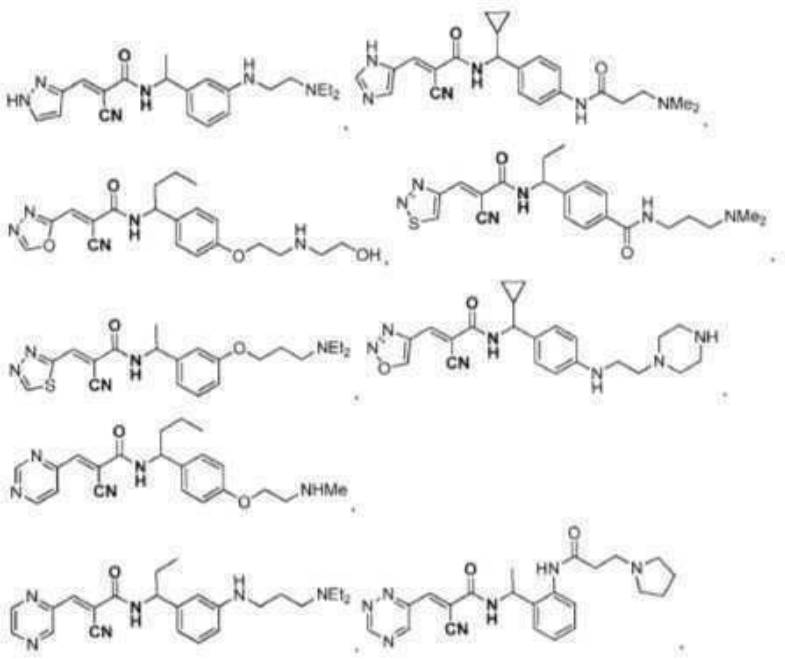






및 : 또는 그의 염.





청구항 26

세포에서 표적 단백질의 증가된 단백질분해(proteolysis)를 얻는 방법으로서, 상기 방법은 세포를 청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 따른 이중작용성 분자와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 27

개체에서 표적 단백질의 증가된 단백질분해를 얻는 방법으로서, 상기 방법은 개체에게 청구항 1 내지 25 중 어느 한 항에 따른 이중작용성 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 28

두 개의 공유결합으로 연결(link)된 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 제공하는 방법으로서, 상기 제 1 결합 파트너는 UchL5에 결합하고 제 2 결합 파트너는 선택된 표적 단백질에 결합하며, 상기 방법은 상기 제 1 및 상기 제 2 결합 파트너를 제공하는 단계, 및 상기 제 1 및 상기 제 2 결합 파트너를 공유결합으로 연결(link)하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

하기를 포함하는, 표적 단백질의 단백질분해를 촉진하는 이중작용성 분자를 선택하는 방법:

a. 후보 제 1 결합 파트너를 제공하고 상기 후보 제 1 결합 파트너가 UchL5에 결합하는 것을 결정함으로써 제 1 결합 파트너를 선택하는 단계;

b. 후보 제 2 결합 파트너를 제공하고 상기 후보 제 2 결합 파트너가 관심 표적 단백질에 결합하는 것을 결정함으로써 제 2 결합 파트너를 선택하는 단계;

c. 상기 제 1 및 제 2 결합 파트너를 공유결합적으로 부착하여 이중작용성 분자를 형성하는 단계;

d. 세포를 상기 이중작용성 분자와 접촉시키는 단계;

e. 상기 표적 단백질이 단백질분해를 겪는 지 결정하는 단계.

청구항 30

하기를 포함하는, 표적 단백질의 단백질분해를 촉진할 수 있는 이중작용성 분자를 선택하는 방법:

(a) 표적 단백질 결합 파트너에 공유결합적으로 링크된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 제공하는 단계,

(b) 이중작용성 분자를 생체 내(in vitro) 또는 포유류 내에서의 세포와 접촉시키는 단계로서, 상기 세포는 UchL5 및 표적 단백질을 포함하고, 상기 접촉은 이중작용성 분자가 UchL5 및 표적 단백질에 결합하도록 허용하는 것인 단계, 및

(c) 세포에서 표적 단백질의 단백질분해를 검출하는 단계로서, 상기 검출된 단백질분해는 접촉 부재하에서의 상기 표적 단백질의 단백질분해에 비해 증가된 것인 단계.

청구항 31

청구항 29 또는 청구항 30에 있어서, 상기 이중작용성 분자의 부재하에 상기 표적 단백질의 단백질분해를 측정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

UCHL5 분자 또는 그의 동족체를 갖는 진핵 생물 또는 원핵 생물에서 생체 내 단백질의 분해를 유도하는 방법으로서, 상기 UCHL5에 의한 탈유비퀴틴화(de-ubiquitination)를 억제하지 않고, 청구항 1 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 따른 화합물을 상기 진핵 생물 또는 원핵 생물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 33

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하되, 상기 UCHL5에 의한 탈유비퀴틴화를 억제하지 않는 세포, 조직, 또는 기관 배양 배지.

청구항 34

표적 단백질을 분해하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 따른 화합물로 표적 단백질의 분해를 유도하되 상기 UCHL5에 의한 탈유비퀴틴화를 억제하지 않는 단계를 포함하는 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 따른 화합물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포에서 단백질의 선택된 분해를 위한 이중작용성 분자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 단백질의 분해는 세포 항상성을 유지하는 고도로 조절되고 필수적인 과정이다. 손상되거나 잘못 접히거나 과잉인 단백질의 선택적 식별 및 제거는 유비퀴틴-프로테아좀 경로 (UPP)를 통해 부분적으로 이루어진다. UPP는 항원 처리, 아폽토시스, 세포 소기관의 생생성(biogenesis), 세포 주기(cell cycling), DNA 전사 및 복구, 분화 및 발달, 면역 반응 및 염증, 신경 및 근육 퇴행(degeneration), 신경망의 형태 형성, 세포 표면 수용체, 이온 채널 및 분비 경로의 조절, 스트레스 및 세포 외 조절제에 대한 반응, 리보솜 생생성 및 바이러스 감염을 포함하는 거의 모든 세포 과정의 조절의 중심에 있다. E3 유비퀴틴 리가제에 의해 다수의 유비퀴틴 분자가 일반적으로 말단 라이신 잔기에 공유결합적으로 부착하는 것은 프로테아좀 분해를 위해 단백질을 표시하는 것이며, 여기서 단백질은 작은 펩티드로 소화되고 결국에는 새로운 단백질의 빌딩 블록으로서 역할하는 구성 아미노산으로 분해된다. 결함이 있는 프로테아좀 분해는 무엇보다 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 헌팅턴병, 근이영양증, 심혈관 질환, 및 암을 비롯한 다양한 임상 장애와 관련성이 있어 왔다.

[0003] 생체 내(*in vivo*)에서 상이한 단백질의 유비퀴틴화를 촉진하는 600 개 이상의 E3 유비퀴틴 리가제가 있다. E3 리가제는 HECT-도메인 E3s, U-box E3s, 모노머 RING E3s 및 다중-서브유닛 Cullin-RING E3s의 네 가지 패밀리로 나눌 수 있다. Bulanov et al. (*Biochem J.*, 2015, 467 : 365-386), Li et al. (*PLOS One*, 2008, 3, 1487), Berndsen et al. (*Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2014, 21, 301-307), Deshaies et al. (*Ann. Rev. Biochem.*, 2009, 78, 399-434), Spratt et al. (*Biochem.* 2014, 458, 421-437) 및 Wang et al. (*Nat. Rev. Cancer.*, 2014, 14, 233-347) 참조.

[0004] 단백질분해(Proteolysis) 표적 키메라 (PROTAC) 화합물은 링커에 의해 결합된 두 개의 리간드로 구성되는데, 하나의 리간드는 표적 단백질과 결합하는 것이고 다른 하나의 리간드는 E3 유비퀴틴 리가제를 동원하는 것이다. 그리하여, 표적 단백질을 E3 리가제로 가져 와서 유비퀴틴화되고 분해된다. (Ottis, P. & Crews, C. M. *Proteolysis-Targeting Chimeras: Induced Protein Degradation as a Therapeutic Strategy. ACS Chem Biol* ***12,*** 892-898 (2017).참조)

[0005] PCT/US2015/025813 (Arvinas), WO 2016/146985 (University of Dundee) 및 WO 2013/106643 (Yale University et al.)은 분해를 위해 E3 유비퀴틴 리가제로 내인성 단백질을 동원하도록 의도된 이미드계 및 히드록시프롤린계 PROTAC 이중작용성 화합물에 관한 것이다. US 2016/0176916, WO 2017/024318, WO 2017/024317 및 WO 2017/024319 (전부 Dana-Farber Cancer Institute)는 또한 공지된 E3 리가제 리간드를 사용하여 표적 단백질을 유비퀴틴화하고 분해되도록 하는 표적 단백질의 분해에 관한 것이다.

[0006] 26S 프로테아좀은 세포질 및 핵의 단백질 모두를 분해하는 데 관여하는 대형 다중 서브유닛 복합체이다. 그것은 적어도 32 개의 상이한 서브유닛으로 구성된다. 단백질분해(proteolytic) 활성 부위를 포함하는 중앙 20S 코어 원통형 입자는 한쪽 또는 양쪽 말단에서 19S 조절 입자로 캡이 씌워져 있다. 분해 챔버는 코어 입자의 중심을 따라 이어지는 채널을 통해 도달할 수 있다. 프로테아좀 억제제 인 VelcadeR은 20S 내 중앙 촉매 강을 표적으로 하는 다발골수종(multiple myeloma) 치료를위한 FDA 승인 약물이다. 채널의 입구는 좁기 때문에 접힌 단백질은 20S 코어 입자에 들어가 절단되어 최종적으로 분해되기 전에 적어도 부분적으로 펼쳐 져야한다. 19S 조절 입자는 하나는 "뚜껑(lid)"이고 다른 하나는 "베이스"로 불리는 두개의 서브 복합체로 배열된, 적어도 19 개의 서브유닛으로 구성되어 있다. 그 조절 입자는 그의 기능을 정력적으로 지원하기 위해 ATP 가수 분해를 촉매하는 ATP아제(ATPase) 서브유닛을 포함한다. 이러한 기능에는 분해 채널 입구 게이팅, 기질 인식 매개, 유비퀴틴 사슬의 단백질분해적 절단 (따라서 유비퀴틴화된 단백질 인식 후 유비퀴틴이 재활용됨), 접힘풀기(unfolding) 및 궁극적으로 20S 코어 입자로의 전위(translocation)가 포함된다.

발명의 내용

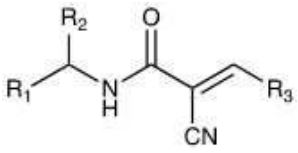
해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 세포에서 선택된 표적 단백질의 분해를 촉진하는 이중작용성 분자를 제공한다.

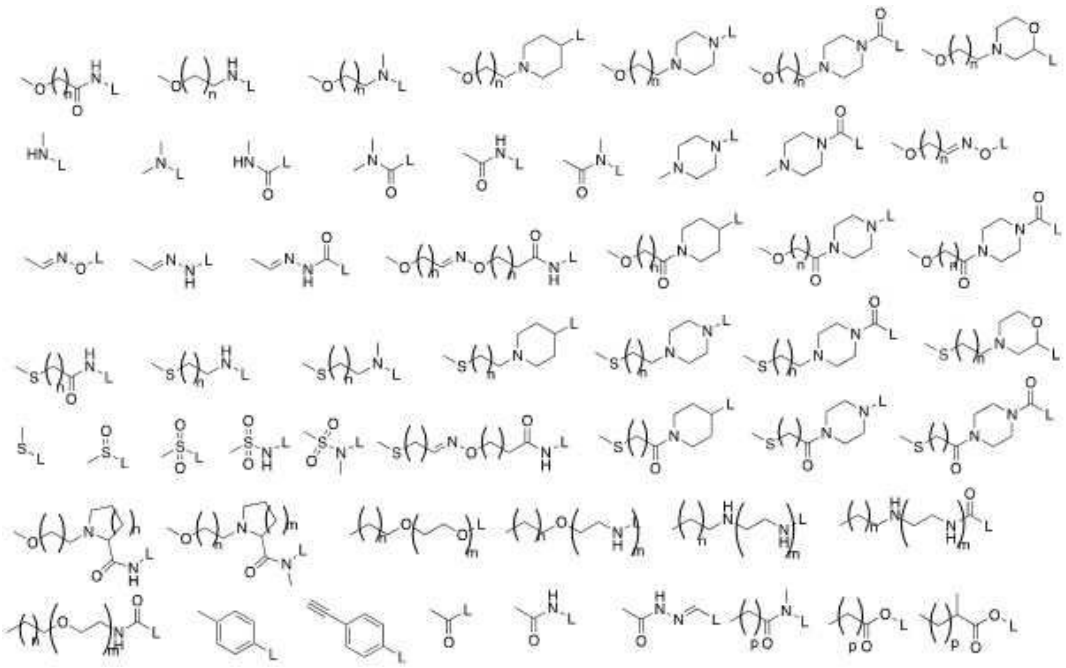
과제의 해결 수단

[0008] 일 구체예에서, 본 발명은 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 포함한다.

[0009] 바람직하게는, UchL5 결합 파트너는 적어도 10nM의 친화도로 UchL5에 결합한다. 바람직하게는, UchL5 결합 파트너는 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합한다. UchL5 결합 파트너는 표 1에 제공된 UchL5 결합 분자 그룹에서 선택될 수 있다. 바람직하게는, 표적 단백질 결합 파트너는 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적으로 하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 및 항체로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 링커가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커, 알킬-에테르 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커일 수 있다. 청구항 1에 있어서, UchL5 결합 파트너가 화학식 I로 표시되는 이중작용성 분자이다.

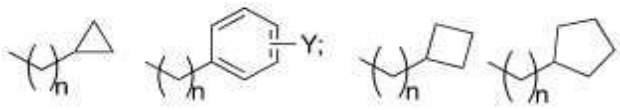
[0010] 

[0011] · R1은  또는 헤테로-치환 방향족 고리이고, 여기서 Y =

[0012] 

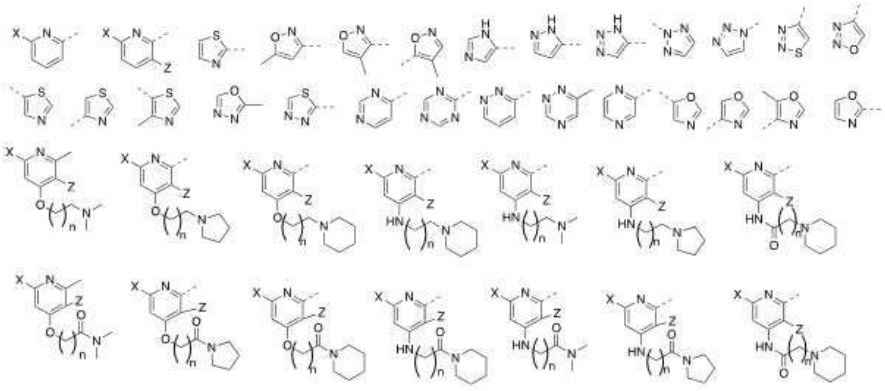
[0013] n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; p = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8이고, L은 단백질 바인더에 연결된 링커이고,

[0014] R2는 -H, CH3, (CH2)nCH3; (CH2)nOCH3(여기서 n = 1, 2, 3 및 4) 및 하기에서 선택되고:

[0015] 

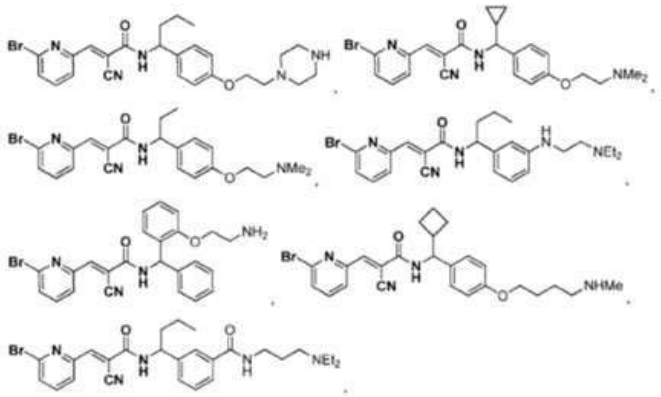
[0016] 여기서 Y = -Me, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CHF2, -CH2F, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe, -NMe2, NO2, CHO 및 상기 예시이다.

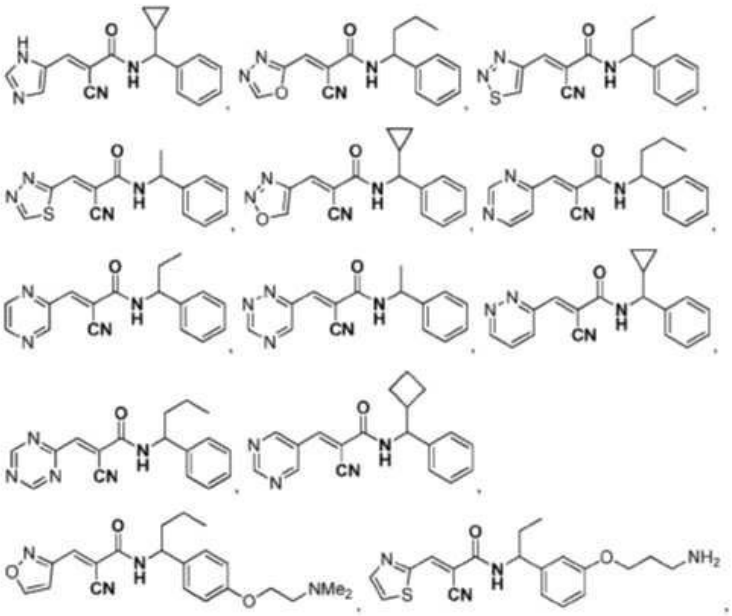
[0017] · R3 은 하기로부터 선택된다:

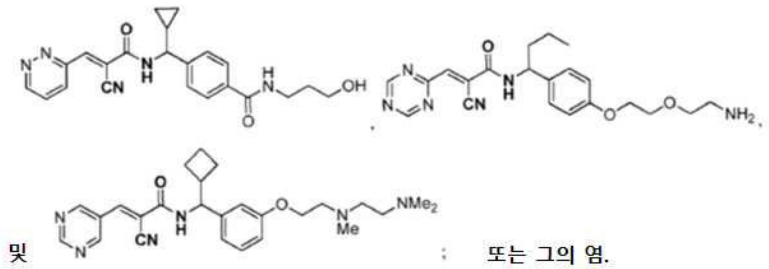
[0018] 

[0019] 여기서, X 및 Z = -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CH2F, -CHF2, -CH3, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NO2, -CHO 및 n = 1, 2, 3, 4.

[0020] 다른 바람직한 구체예에서, UchL5 결합 파트너는 하기로부터 선택될 수 있다:

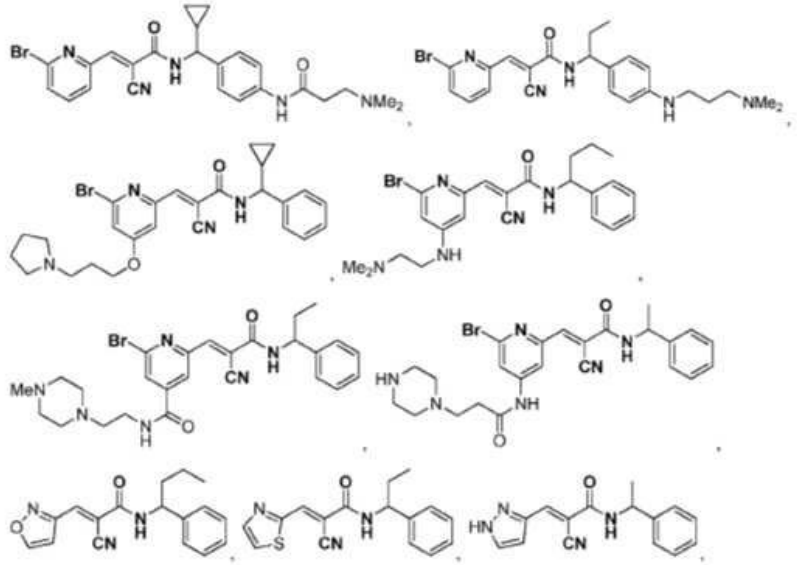
[0021] 

[0022] 

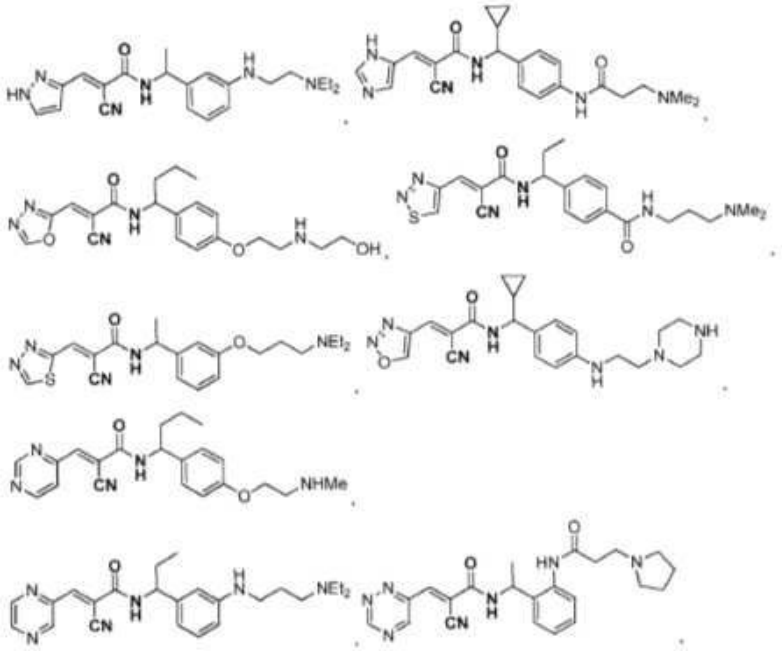


및 : 또는 그의 염.

[0023]



[0024]



[0025]

[0026] 본 발명은 또한 다음 화학식 (I)의 화합물을 포함한다 :

[0027] U5L-(CL)-TPL (I),

[0028] 여기서 -는 공유결합을 의미하고;

[0029] 여기서 U5L은 UchL5에 결합하는 리간드이고,

[0030] 여기서 CL은 공유결합적 링커이고,

[0031] 여기서 TPL은 표적 단백질에 결합하는 리간드이다.

[0032] U5L은 표 1에 제공된 UchL5 리간드의 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는, UchL5 리간드는 적어도 10nM의 친화도로 UchL5에 결합한다. 바람직하게는, UchL5 리간드는 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합한다. UchL5 리간드는 표 1에 제공된 UchL5 결합 분자의 군에서 선택될 수 있다.

[0033] 바람직하게는, 표적 단백질 리간드는 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적으로 하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 및 항체로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜

(PEG) 링커, 탄화수소 링커, 알킬-에테르 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커일 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한 화학식 (II)의 화합물을 포함한다 :

[0035] U5L-A-(CL)-B-TPL (II),

[0036] 여기서 -는 공유결합을 의미하고;

[0037] 여기서 U5L은 UchL5에 결합하는 리간드이고,

[0038] 여기서 CL은 상이한 제 1 말단 A 및 제 2 말단 B를 갖는 공유결합적 링커이고, 여기서 A 및 B는 독립적으로 아미드, 옥심, 케토, 탄소, 에테르, 에스테르, 또는 카바메이트이고;

[0039] 여기서 TPL은 표적 단백질에 결합하는 리간드이고,

[0040] 여기서 U5L은 A에 공유결합으로 연결되고 TPL은 B에 공유결합적으로 연결된다.

[0041] 바람직하게는, 표적 단백질 리간드는 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적으로 하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 또는 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 및 항체로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커, 알킬-에테르 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커일 수 있다.

[0042] 본 발명은 또한 다음 화학식의 화합물을 포함한다:

[0043] U5L-(CL)-Rx (III),

[0044] 여기서 -는 공유결합을 의미하고;

[0045] 여기서 U5L은 UchL5에 결합하는 리간드이고,

[0046] 여기서 CL은 Rx로 끝나는 공유결합적 링커이고,

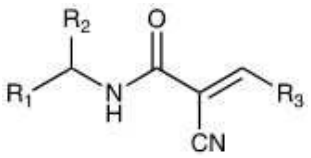
[0047] 여기서 Rx는 리간드와 공유결합적 화학 결합을 형성할 수 있고,

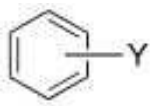
[0048] 여기서 Rx는 PEG가 아니다.

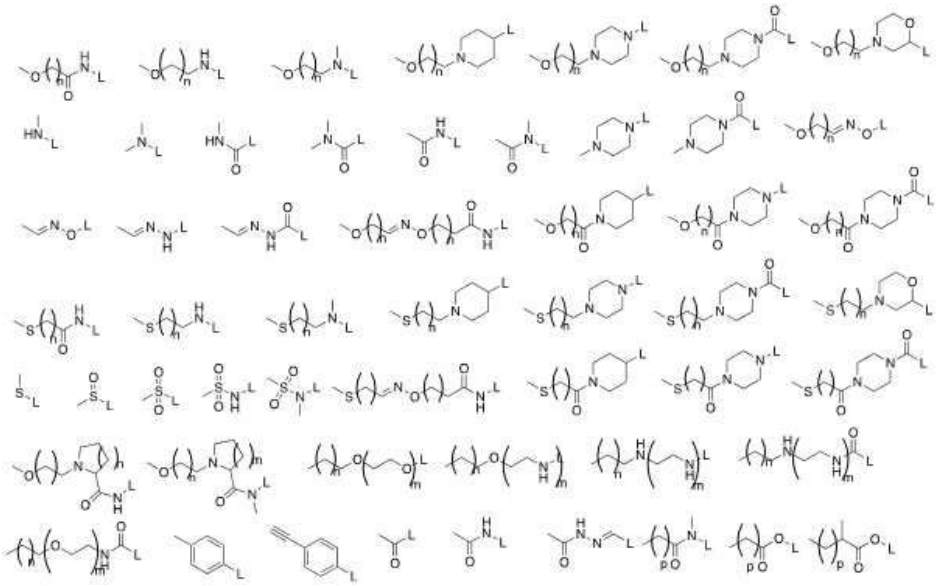
[0049] 바람직하게는, U5L은 표 1에 제공된 UchL5 리간드의 군으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, UchL5 리간드는 적어도 10nM의 친화도로 UchL5에 결합한다. 바람직하게는, UchL5 리간드는 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합한다. UchL5 리간드는 표 1에 제공된 UchL5 결합 분자의 군에서 선택될 수 있다.

[0050] 바람직하게는, 표적 단백질 리간드는 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적으로 하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 또는 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 및 항체로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커, 알킬-에테르 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커일 수 있다. 바람직하게는 링커는, 옥심인 제 1 말단을 갖는다. 바람직하게는 링커는 아민인 제 2 말단을 갖는다.

[0051] 바람직하게는, U5L은 화학식 I로 표시된다.

[0052] 

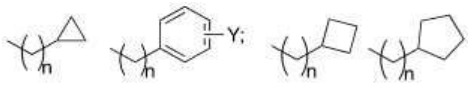
[0053] · R1은  또는 헤테로-치환 방향족 고리이고, 여기서 Y =

[0054] 

[0055] n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; p = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

[0056] L은 단백질 바인더에 연결된 링커이다.

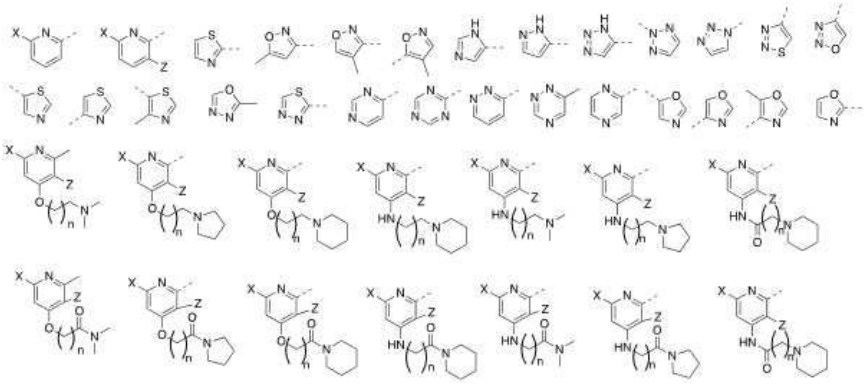
[0057] R2는 -H, CH3, n = 1, 2, 3 및 4 인 (CH2) nCH3; (CH2) nOCH3 및

[0058] 

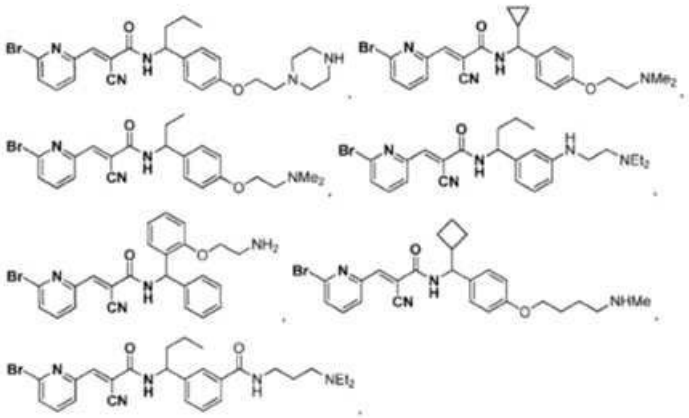
[0059] 에서 선택되는데,

[0060] Y = -Me, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CHF2, -CH2F, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe , -NMe2, NO2, CHO 및 위의 예이다.

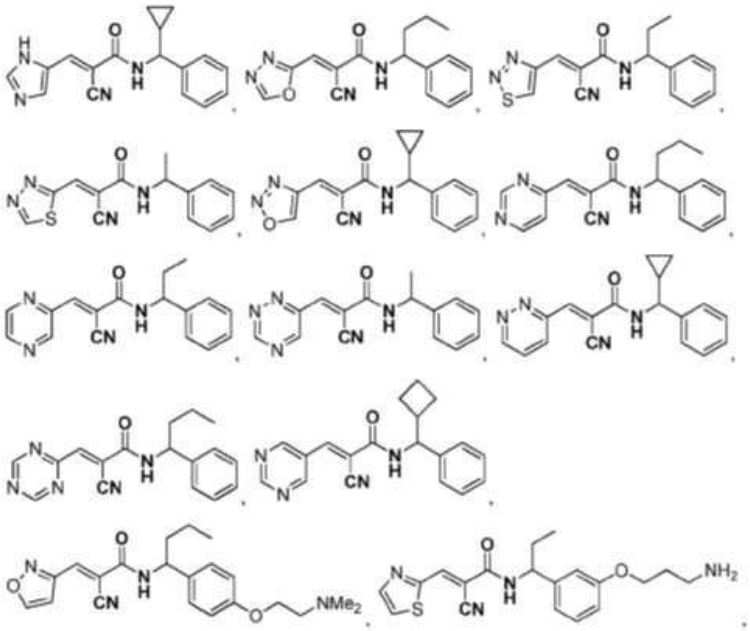
[0061] R3은 하기로부터 선택되고:

[0062] 

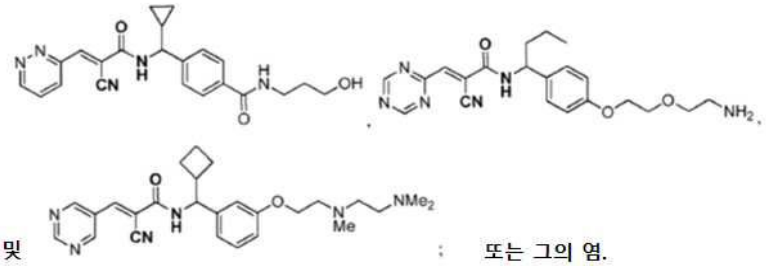
[0063] X 및 Z = -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CH2F, -CHF2, -CH3, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NO2, -CHO 및 n = 1, 2, 3, 4이다. 상기 화합물은 U5L이 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0064]

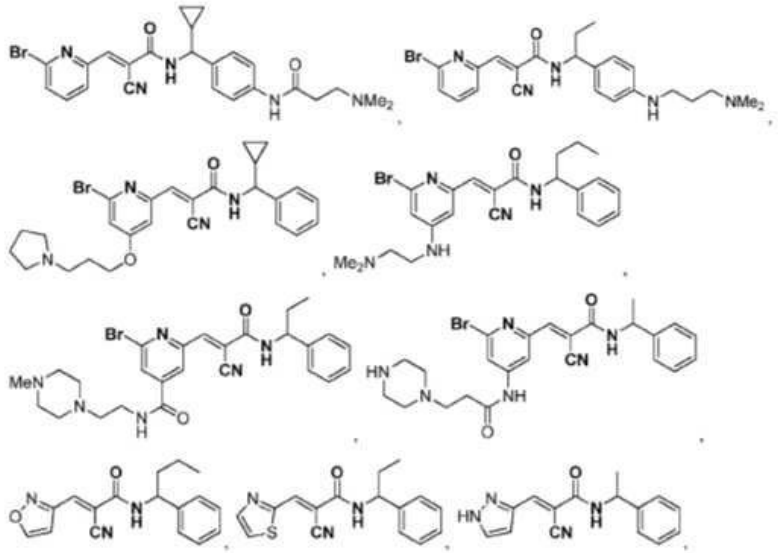


[0065]

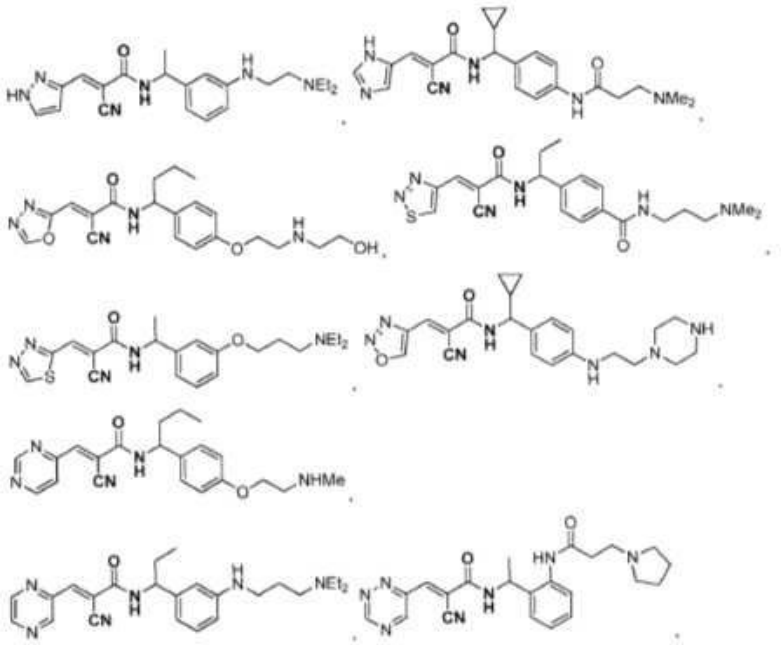


및 : 또는 그의 염.

[0066]



[0067]



[0068]

[0069] 본 발명은 또한 세포에서 표적 단백질의 증가된 단백질분해(proteolysis)를 얻는 방법으로서, 상기 방법은 세포를 상기 언급한 화합물 중 임의의 것에 따른 이중작용성 분자와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0070] 본 발명은 또한 개체에서 표적 단백질의 증가된 단백질분해를 얻는 방법으로서, 상기 방법은 상기 언급한 화합물 중 임의의 것에 따른 이중작용성 분자를 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0071] 본 발명은 또한 두 개의 공유결합적으로 연결된 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 제공하는 방법으로서, 여기서 제 1 결합 파트너는 UchL5에 결합하고 제 2 결합 파트너는 선택된 표적 단백질에 결합하며, 상기 방법은 상기 제 1 및 상기 제 2 결합 파트너를 제공하는 단계, 및 상기 제 1 및 상기 제 2 결합 파트너를 공유결합적으로 연결하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.

[0072] 본 발명은 또한 표적 단백질의 단백질분해를 촉진하는 이중작용성 분자를 선택하는 방법을 포함한다:

[0073] a.후보 제 1 결합 파트너를 제공하고 상기 후보 제 1 결합 파트너가 UchL5에 결합하는 것을 결정함으로써 제 1 결합 파트너를 선택하는 단계;

[0074] b.후보 제 2 결합 파트너를 제공하고 상기 후보 제 2 결합 파트너가 관심 표적 단백질에 결합하는 것을 결정함으로써 제 2 결합 파트너를 선택하는 단계;

[0075] c.상기 제 1 및 제 2 결합 파트너를 공유결합적으로 부착하여 이중작용성 분자를 형성하는 단계;

[0076] d.세포를 상기 이중작용성 분자와 접촉시키는 단계;

[0077] e.상기 표적 단백질이 단백질분해를 겪는 지 결정하는 단계.

[0078] 본 발명은 또한 표적 단백질의 단백질분해를 촉진할 수 있는 이중작용성 분자를 선택하는 방법으로서, 다음을 포함하는 방법을 포함한다:

[0079] (a) 표적 단백질 결합 파트너에 공유결합적으로 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 제공하는 단계,

[0080] (b) 이중작용성 분자를 생체 내(in vitro) 또는 포유류 내에서의 세포와 접촉시키는 단계로서, 상기 세포는 UchL5 및 표적 단백질을 포함하고, 여기서 상기 접촉은 이중작용성 분자가 UchL5 및 표적 단백질에 결합하도록 허용하는 것인 단계, 및

[0081] (c) 세포에서 표적 단백질의 단백질분해를 검출하는 단계로서, 여기서 검출된 단백질분해는 접촉 부재하에 표적 단백질의 단백질분해에 비해 증가된 것인 단계.

[0082] 본 발명은 또한 이중작용성 분자의 부재하에 표적 단백질의 단백질분해를 측정하는 단계를 포함하는 상기 언급된 방법 중 임의의 것을 포함한다.

[0083] 본 발명은 또한 UCHL5 분자 또는 그의 동족체를 갖는 진핵 생물 또는 원핵 생물에서 생체 내 단백질분해를 유도하는 방법으로서, UCHL5에 의한 탈유비퀴틴화(de-ubiquitination)를 저해하지 않고 본 명세서에서 개시된 화합물을 상기 진핵 생물 또는 원핵 생물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.

[0084] 본 발명은 또한 상기 언급된 화합물 중 임의의 것에 따른 화합물을 포함하되, UCHL5에 의한 탈유비퀴틴화를 저해하지 않는 세포, 조직, 또는 기관 배양 배지를 포함한다.

[0085] 본 발명은 또한 표적 단백질을 분해하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 언급된 화합물 중 임의의 것에 따른 화합물로 표적 단백질의 분해를 유도하는 단계를 포함하되 UCHL5에 의한 탈유비퀴틴화를 저해하지 않는 방법을 포함한다.

[0086] 본 발명은 또한 상기 언급된 화합물 중 임의의 것에 따른 화합물 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.

[0087] 바람직하게는 이중작용성 분자는 UchL5 결합 파트너-링커 -R로 표시되며, 여기서 링커는 -[(CH2)n-(V)m-(Z)p-(CH2)q]y이고

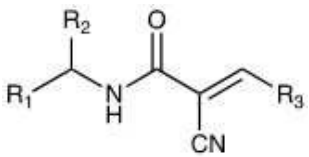
[0088] 여기서 :

[0089] n, m, p, q 및 y = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

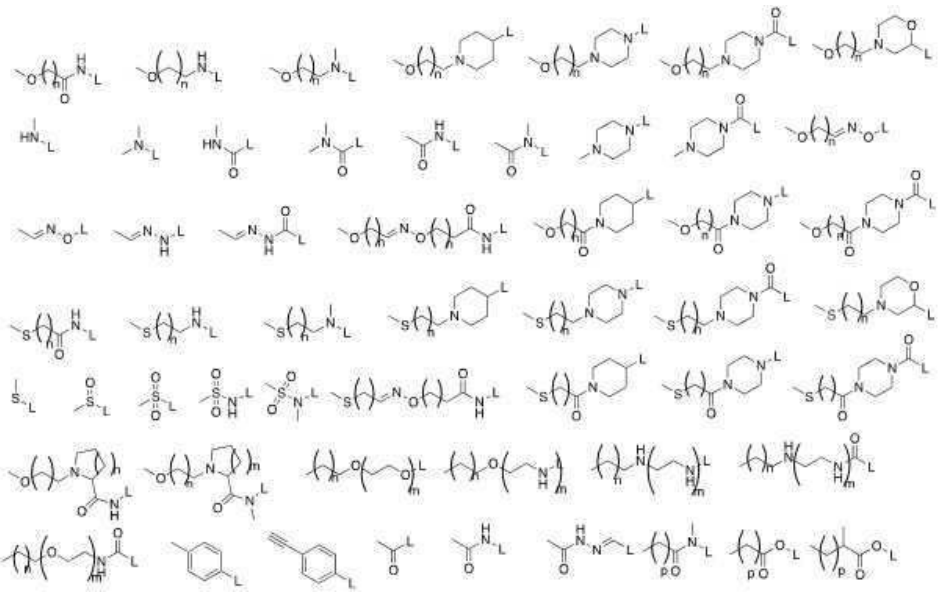
[0090] V = O, S, NR1, CO, CONR1, CC, CH = CH이되, 여기서 R1 = H, 알킬, 아릴, 또는 헤테로아릴이고,

[0091] Z = 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴이다.

[0092] 바람직하게는, UchL5 결합 파트너 (U5L)는 화학식 I로 표시되고, 일부 구체예에서 링커는 위치 R1을 통해 UchL5 결합 파트너에 연결된다.

[0093] 

[0094] · R1은  또는 헤테로-치환 방향족 고리이고, 여기서 Y =

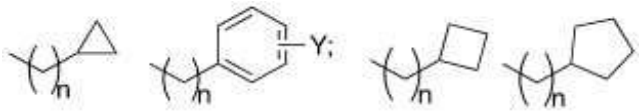


[0095]

[0096] n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; p = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8이다.

[0097] L은 단백질 바인더에 연결된 링커이다.

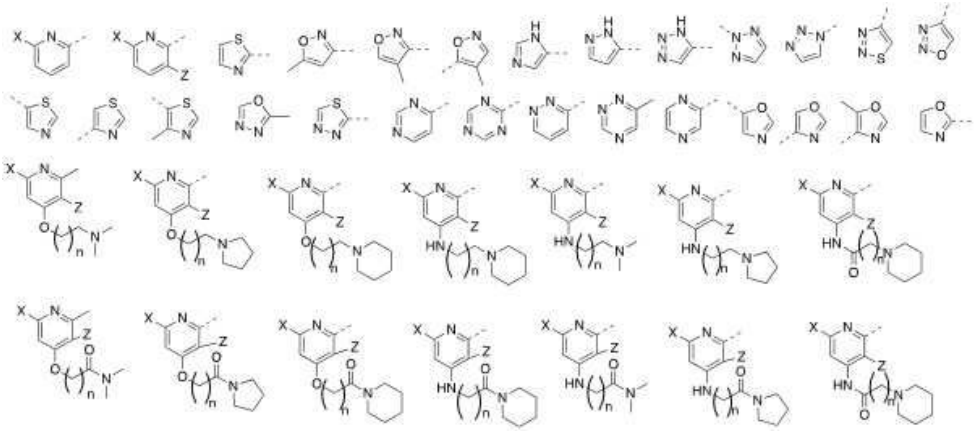
[0098] · R2는 -H, CH3, (CH2)nCH3; (CH2)nOCH3 (여기서 n = 1, 2, 3 및 4)및 하기로부터 선택된다:



[0099]

[0100] 여기서, Y = -Me, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CHF2, -CH2F, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe , -NMe2, NO2, CHO 및 위의 예이다.

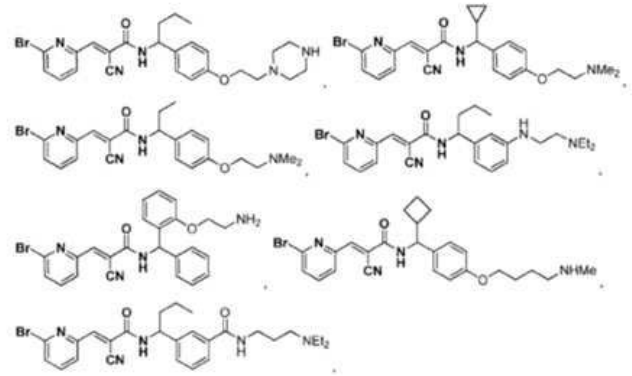
[0101] · R3은 하기로부터 선택되고:

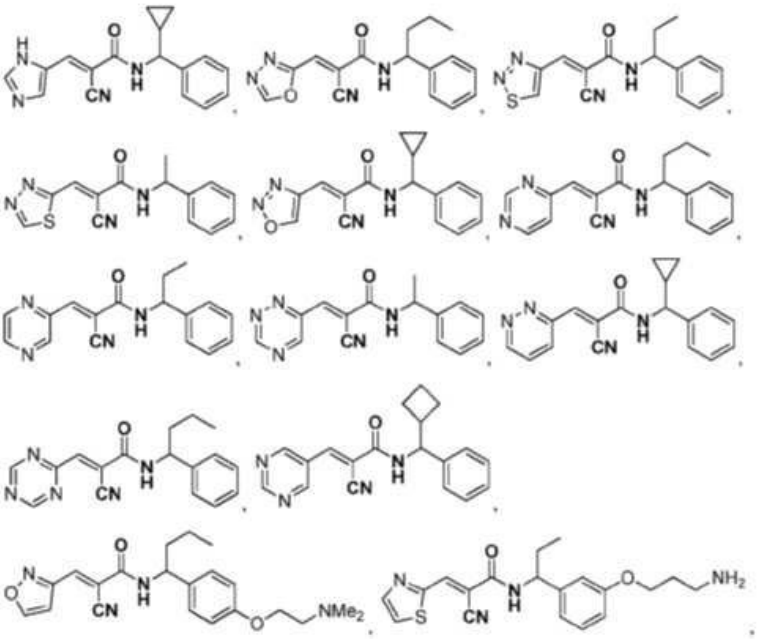


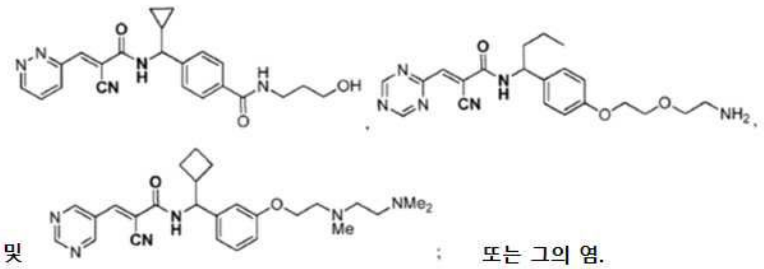
[0102]

[0103] X 및 Z = -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CF3, -CH2F, -CHF2, -CH3, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe, -NMe2, -NO2, -CHO이고 n = 1, 2, 3, 4이다.

[0104] 바람직하게는, UchL5 결합 파트너는 다음으로 구성된 군에서 선택된다.

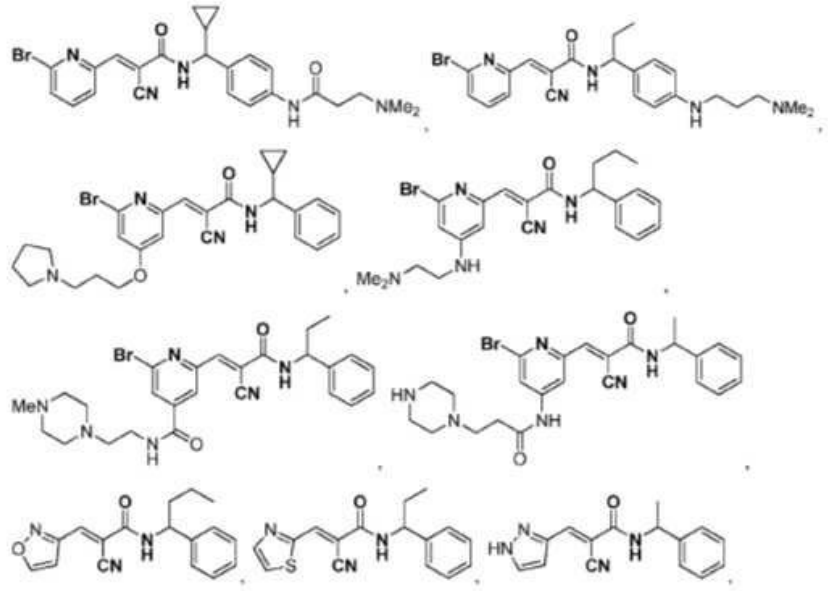
[0105] 

[0106] 

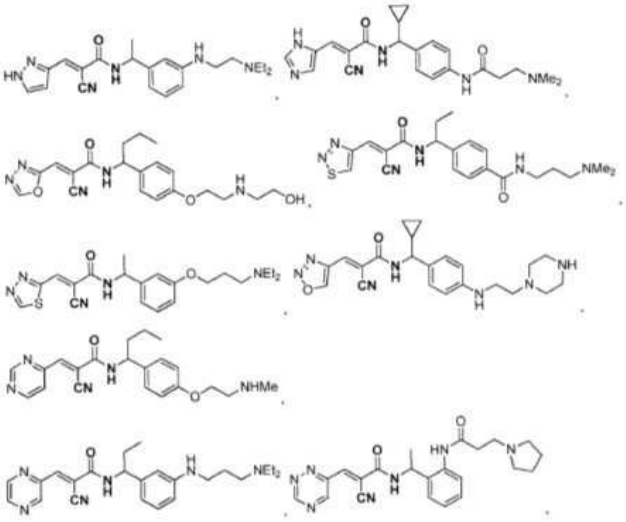


및 : 또는 그의 염.

[0107]

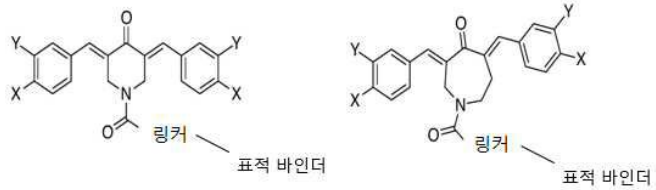


[0108]



[0109]

[0110] 일부 구체예에서 이중작용성 분자는



[0111]

[0112] 여기서 X 및 Y는 바람직하게 -F, -Cl, -NO2, -CF3, CN 및 H이지만 -Br, -I, -CHF2, -CH2F, -CN, -OH, -OMe, -SMe, -SOMe, -SO2Me, -NH2, -NHMe, -NMe2, CHO, OMe 로 구성된 군에서 선택될 수도 있다.

[0113] 바람직하게는, UchL5 결합 파트너는 표적 단백질 결합 파트너에 공유결합되지 않은 경우 10 nM - 10 μM 범위의 친화도로 UchL5에 결합한다. 보다 바람직하게는, UchL5 결합 파트너는 표적 단백질 결합 파트너에 공유결합되지 않을 때 적어도 10 nM의 친화도로 UchL5에 결합한다.

[0114] 바람직하게는, UchL5 결합 파트너는 표적 단백질 결합 파트너에 공유결합되지 않은 경우 1 nM - 1 μM의 해리 상수 (Kd) 범위로 UchL5에 결합한다. 보다 바람직하게는, UchL5 결합 파트너는 표적 단백질 결합 파트너에 공

유결합되지 않은 경우 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합한다.

[0115] UchL5 결합 파트너는 표 1에 제공된 UchL5 결합 분자의 군에서 선택될 수 있다.

[0116] 표적 단백질 결합 파트너는 키나제 억제제, 포스파타제 억제제, BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적으로 하는 화합물, HDM2/MDM2 억제제, 열 충격 단백질 90 억제제, HDAC 억제제, 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제 및 항체로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0117] 이중작용성 분자는 표적 단백질의 단백질분해를 촉진한다.

[0118] 바람직하게는, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커, 알킬-에테르 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커이다. 바람직하게는, 링커가, 옥심인 제 1 말단을 갖고 및/또는 링커가, 아민인 제 2 말단을 갖는다. 링커는 2 내지 12 개의 PEG 반복을 포함할 수 있고/있거나 2 내지 12개의 (CH2)n 반복을 포함할 수 있다.

[0119] 본 발명은 또한 링커에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 결합 분자를 포함하며, 여기서 링커는 제 2 결합 파트너에 연결할 수 있다.

[0120] 이 결합 분자에서, UchL5 결합 파트너는 10 nM - 10 μM 범위의 친화도로 UchL5에 결합할 수 있다. UchL5 결합 파트너는 적어도 10 nM 의 친화도로 UchL5에 결합할 수 있다.

[0121] 이 결합 분자에서, UchL5 결합 파트너는 1 nM - 1 μM의 해리 상수 (Kd) 범위로 UchL5에 결합할 수 있다. UchL5 결합 파트너는 1μM 미만의 Kd로 UchL5에 결합할 수 있다.

[0122] UchL5 결합 파트너는 표 1에 제공된 UchL5 결합 분자의 군에서 선택될 수 있다.

[0123] 바람직하게는, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커, 탄화수소 링커, 또는 조합된 PEG, 알킬 링커이다. 바람직하게는, 링커는, 옥심인 제 1 말단을 갖고/갖거나 링커는, 아민인 제 2 말단을 갖는다. 링커는 2 내지 12 개의 PEG 반복을 포함할 수 있고/있거나 2 내지 12 (CH2)n 반복을 포함할 수 있다.

[0124] 본 발명은 또한 세포에서 표적 단백질의 증가된 단백질분해를 얻는 방법을 포함하는데, 상기 방법은 세포를 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0125] 본 발명의 방법은 또한 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 개체에게 투여함으로써 개체에서 표적 단백질의 증가된 단백질분해를 얻는 방법을 포함한다.

[0126] 본 발명은 또한 두 개의 공유결합된 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 제공하는 방법을 포함하는데, 여기서 제 1 결합 파트너는 UchL5에 결합하고 제 2 결합 파트너는 선택된 표적 단백질에 결합하며, 상기 방법은 상기 제 1 및 상기 제 2 결합 파트너를 제공하는 단계, 및 상기 제 1 및 상기 제 2 결합 파트너를 공유결합적으로 연결하는 단계를 포함한다.

[0127] 본 발명은 또한 표적 단백질의 단백질분해를 촉진하는 이중작용성 분자를 선택하는 방법을 포함한다:

[0128] a.후보 제 1 결합 파트너를 제공하고 상기 후보 제 1 결합 파트너가 UchL5에 결합하는 것을 결정함으로써 제 1 결합 파트너를 선택하는 단계;

[0129] b.후보 제 2 결합 파트너를 제공하고 상기 후보 제 2 결합 파트너가 관심 표적 단백질에 결합하는 것을 결정함으로써 제 2 결합 파트너를 선택하는 단계;

[0130] c.상기 제 1 및 제 2 결합 파트너를 공유결합적으로 부착하여 이중작용성 분자를 형성하는 단계;

[0131] d.세포를 상기 이중작용성 분자와 접촉시키는 단계;

[0132] e.상기 표적 단백질이 단백질분해를 겪는 지 결정하는 단계.

[0133] 본 발명의 방법은 또한 표적 단백질의 단백질분해를 촉진할 수 있는 이중작용성 분자를 선택하는 방법을 포함하는데, 이는 다음을 포함한다:

[0134] (a) 표적 단백질 결합 파트너에 공유결합적으로 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 제공하는 단계,

[0135] (b) 이중작용성 분자를 생체 내(in vitro) 또는 포유류 내에서의 세포와 접촉시키는 단계로서, 상기 세포는 UchL5 및 표적 단백질을 포함하고, 여기서 상기 접촉은 이중작용성 분자가 UchL5 및 표적 단백질에 결합하도록 허용하는 것인 단계, 및

[0136] (c) 세포에서 표적 단백질의 단백질분해를 검출하는 단계로서, 여기서 검출된 단백질분해는 (b) 단계에서의 접촉 부재하에 표적 단백질의 단백질분해에 비해 증가된 것인 단계.

[0137] 상기 방법은 또한 이중작용성 분자의 부재하에 표적 단백질의 단백질분해를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0138] 본 발명은 또한 이중작용성 분자의 라이브러리를 포함하는데, 상기 라이브러리는 복수의 이중작용성 분자를 포함하고, 복수의이중작용성 분자는 선택된 표적 단백질 결합 파트너에 공유결합적으로 연결된 복수의 ***UchL5*** 결합 파트너를 포함한다. 따라서 표적 단백질 결합 파트너는 미리 선택되어 있으며 UchL5 결합 파트너는 미리 결정되지 않는다. 라이브러리는 표적 단백질 분해를 촉진하는데 있어서 이중작용성 분자의 후보 UchL5 결합 파트너의 활성을 결정하는데에 사용될 수 있다.

[0139] 본 발명은 또한 이중작용성 분자의 라이브러리를 포함하는데, 상기 라이브러리는 복수의 이중작용성 분자를 포함하고, 복수의 이중작용성 분자는 복수의 표적 단백질 결합 요소 및 선택된 UchL5 결합 파트너를 포함한다. 따라서 UchL5 결합 파트너는 미리 선택되어 있으며 표적 단백질은 미리 결정되지 않는다. 라이브러리는 추정상의 표적 단백질 결합 파트너의 활성 및 표적 단백질분해를 촉진하기위한 표적 단백질의 바인더로서의 그 값을 결정하는데에 사용될 수 있다.

[0140] 본 발명은 또한 표적 단백질의 단백질분해를 촉진하는 이중작용성 분자를 확인하기 위해 후보 이중작용성 분자의 라이브러리를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 이 방법은 라이브러리로부터의 이중작용성 분자의 풀(pool)로 세포를 인큐베이션하는 단계; 세포에서 표적 단백질의 양을 모니터링하는 단계; 세포에서 표적 단백질의 양의 감소를 제공하는 이중작용성 분자의 서브풀을 확인하는 단계; 확인된 서브풀로부터의 이중작용성 분자로 세포를 인큐베이션하는 단계; 세포에서 표적 단백질의 양을 모니터링하는 단계; 및 세포에서 표적 단백질의 양의 감소를 제공하는 이중작용성 분자를 확인하는 단계를 포함한다.

[0141] 이들 및 추가의 본 발명의 조성물 및 방법은 다음의 상세한 설명 및 청구 범위에서 찾을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0142] 도 1은 1μM 화합물로 HEK293 세포를 6 시간 처리한 후 Brd2, Brd3 및 Brd4의 면역블롯 분석을 보여준다. MZ1은 양성 대조군으로 사용되었다. 각 레인 아래에 보고된 값은 평균 0.1 % DMSO 대조군에 비해 BET 풍부함을 나타낸다.

도 2는 1μM 05IB6 (활성) 또는 05IB11 (음성 대조군)으로 HEK293 세포를 6 시간 처리한 후 Brd4 및 튜불린의 대표적인 면역블롯 분석 (3 개의 생물학적 복제물)을 보여준다.

도 3은 05IB1, 05IB2 또는 05IB3의 농도 증가로 HEK293 세포를 6 시간 처리한 후 Brd2, Brd3 및 Brd4 단백질 수준의 면역블롯 분석을 보여준다. 밴드 강도는 β-튜불린 로딩 대조군으로 정규화되었고 평균 0.1% DMSO 비히클 강도의 %로서 보고되었는데, 각 지점은 두 개의 독립적인 실험의 평균 ± SEM을 나타낸다 (n = 2).

도 4는 05IB1, 05IB2 또는 05IB3으로 다양한 시점에 HEK293 세포를 1μM 처리한 후 Brd2, Brd3 및 Brd4 단백질 수준의 면역블롯 분석을 보여준다. 밴드 강도는 β-튜불린 로딩 대조군으로 정규화되었고 평균 0.1% DMSO 비히클 강도의 %로서 보고되었는데, 각 지점은 두 개의 독립적인 실험의 평균 ± SEM을 나타낸다 (n = 2).

도 5는 10μM 보르테조밉의 존재 및 부재하에 HEK293 세포를 1μM 05IB6 또는 MZ1로 6 시간 처리한 후 Brd4 단백질 수준의 대표적인 면역블롯 분석을 보여준다.

도 6은 1μM 화합물로 K562 세포를 24 시간 처리한 후 ABL2의 면역블롯 분석을 보여준다. DAS-6-2-2-6-CRBN (PROTAC; doi : 10.1002/anie.201507634)를 양성 대조군으로 사용했다. 데그라신, 이마티닙 및 다사티닙 워헤드도 병렬로 테스트되었다.

도 7은 증가하는 농도의 05DA1 또는 05DA6으로 K562 세포를 24 시간 처리한 후 ABL2 단백질 수준의 대표적인 면역블롯 분석을 보여준다. 밴드 강도는 β-튜불린 로딩 대조군으로 정규화되었고 평균 0.1% DMSO 비히클 강도의 %로서 보고되었는데, 각 지점은 두 개의 독립적인 실험의 평균 ± SEM을 나타낸다 (n = 2).

도 8은 5μM 데그라신 또는 1μM I-BET726의 존재 및 부재하에 0.1μM 05IB9 또는 MZ1로 HEK293 세포를 6 시간 처리한 후 Brd4 단백질 수준의 면역블롯 분석을 보여준다.

도 9a는 10μM 보르테조밉, 5μM 데그라신 또는 1μM I-BET726의 존재 및 부재하에 0.1μM 05IB9 또는 MZ1로 HAP1 세포를 6 시간 처리한 후 Brd4 단백질 수준의 대표적인 면역블롯 분석을 보여준다. 밴드 강도는 β-튜불

린 로딩 대조군으로 정규화되었고 도 9b에서 평균 0.1% DMSO 비히클 강도의 %로서 보고되었는데, 각 막대는 네 개의 독립적인 실험의 평균 ± SEM을 나타낸다 (n = 4).

도 10은 BET 억제제 I-BET726에 비해 증가하는 농도의 05IB9로 처리한 후 MV4-11 세포에서 Brd2, Brd3, Brd4, c-MYC, 총 PARP (PARP) 및 절단된 PARP (C-PARP) 수준의 대표적인 면역블롯을 보여준다. 05IB11은 음성 대조군으로 사용되었다.

도 11은 CellTiter-Glo 분석 (Promega)을 사용하여 측정한, 1μM 데그라신계의 대표 화합물로 48 시간 처리한 후 MV4-11 세포에서 항 증식 효과를 보여준다. I-BET726 및 데그라신 (DEG)은 병렬적으로 주행되었으며 MZ1 및 05IB11은 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용되었다.

도 12는 데그라신계의 대표적인 화합물과 함께 인큐베이션한 후 UchL5 촉매 도메인의 LC-MS 분석을 보여준다. 디콘볼루션은 개질되지 않은 (26859 Da) 및 개질된 (27915 Da; 예상되는 27911 Da) 단백질 둘다에 해당하는 단백질 질량을 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0143] 본 발명은 UchL5 및 선택된 표적 단백질에 동시에 결합하여 단백질분해(proteolysis)에 의한 표적 단백질의 분해를 촉진할 수 있는 이중작용성 분자를 제공한다.

[0144] 선택된 표적 단백질을 프로테아좀에 동원하여 단백질분해를 겪는 것과 관련된 조성물 및 방법이 설명된다. 이는 UchL5 및 선택된 표적 단백질 둘 다에 결합하는 이중작용성 분자를 사용하여 본 발명에 따라 달성된다. 따라서, 본 발명은 표적 단백질의 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중 결합 작용성을 갖는 분자를 제공한다. 본 발명은 프로테아좀에 의한 선택된 표적 단백질의 분해를 촉진한다.

[0145] **정의(Definitions):**

[0146] 본 명세서에 사용된 "이중작용성 분자"는 각 말단에 작용기를 가지며, 여기서 제 1 작용기는 UchL5 결합 파트너이고, 제 2 작용기는 표적 단백질 결합 파트너이다. 이중작용성 분자는 UchL5 및 선택된 표적 단백질에 동시에 결합할 수 있다.

[0147] 용어 "유비퀴틴화"는 주어진 단백질의 유비퀴틴 결찰(ligation) 과정을 지칭하며, 이에 의해 단백질은 하나 이상의 유비퀴틴 분자들이 단백질에 공유결합적으로 부착되는 것을 겪는다 (이는 일반적으로 단백질의 표면 라이신 잔기, 또는 그것의 N- 말단에 유비퀴틴의 부착을 통해 발생함). 유비퀴틴 분자의 공유결합적 부착은 프로테아좀 분해를 위해 단백질을 표시하는 것이며, 그 결과 단백질이 작은 펩티드로 소화된다.

[0148] 용어 "유비퀴틴-독립적 분해"는 단백질분해(proteolysis) 전에 표적 단백질의 유비퀴틴화를 필요로하지 않는, 선택된 표적 단백질의 단백질분해를 의미한다.

[0149] 반대로 명확하게 표시되지 않는 한, 하나 이상의 단계 또는 행위를 포함하는 본 명세서에서 청구된 임의의 방법에서, 방법의 단계 또는 행위의 순서는 그 방법의 단계 또는 행위가 나열된 순서로 반드시 제한되는 것은 아님을 이해해야한다.

[0150] 청구 범위 뿐만 아니라 상기 명세서에서 "포함하는", "포함하는", "담지하는", "갖는", "함유하는", "가지고 있는", "유지하는", "구성된", 등과 같은 모든 전환 문구는 개방형, 즉 그것만으로 제한되지 않는 포함을 의미하는 것으로 이해되어야한다. "으로 구성되는" 및 "으로 필수적으로 구성되는"의 전이 문구 만이 미국 특허청 MPEP(Manual of Patent Examining Procedures), 섹션 2111.03에 명시된 대로 각각 폐쇄형 또는 반 폐쇄형 전환 문구이다.

[0151] 용어 "병용-투여(co-administration)"및 "병용-투여하는"은 동시적 투여 (동시에 2 개 이상의 치료제의 투여) 및 시간의 가변적 투여 (추가적인 치료제나 치료제들의 투여 시간과 상이한 시간에 하나 이상의 치료제의 투여)를 모두 지칭하는데 이는 치료제가 환자에게 동시에 어느 정도 존재하는 경우에 한한다.

[0152] 용어 "용매화물"은 하나 이상의 용매 분자를 갖는 특정 화합물의 제약상 허용되는 형태를 지칭하는데, 그러한 화합물의 생물학적 효과를 유지하는 것이다. 용매화물의 예는 예를 들어 물 (수화물을 형성하기 위함), 이소프로판올, 에탄올, 메탄올, 디메틸 술폭시드, 에틸 아세테이트, 아세트산, 에탄올아민, 또는 아세톤과 같은 용매와 조합된 본 발명의 화합물을 포함한다. 또한 2 개 이상의 용매와 조합된 본 발명의 화합물과 같은 용매화물 혼합물의 제제가 포함된다.

[0153] 예를 들어, 알킬, m, n 등의 각 표현의 정의는 어떤 구조에서 한 번보다 많이 발생하는 경우 동일한 구조의 다른 곳에서 정의와는 독립적인 것으로 의도된 것이다.

[0154] "치환" 또는 "으로 치환된"은 그러한 치환이 치환된 원자 및 치환기의 허용된 원자가에 따른다는 암시적 조건을 포함하고, 그 치환은 안정한 화합물, 예를 들어 재배열, 고리화, 종말(elimination), 또는 기타 반응과 같이 자발적으로 변형되지 않는 화합물을 생성한다는 것으로 이해할 것이다.

[0155] 용어 "치환된"은 또한 유기 화합물의 모든 허용 가능한 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 넓은 측면에서, 허용되는 치환기는 유기 화합물의 비고리형 및 고리 형, 분지형 및 비분지형, 카르보시클릭 및 헤테로시클릭, 방향족 및 비방향족 치환기를 포함한다. 예시적인 치환체는 예를 들어 아래에 설명된 것들을 포함한다. 허용되는 치환기는 적절한 유기 화합물에 대해 하나 이상이고 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 질소와 같은 헤테로원자는 수소 치환기, 및/또는 헤테로원자의 원자가를 만족시키는 본 명세서에 기재된 유기 화합물의 임의의 허용 가능한 치환기를 가질 수 있다. 본 발명은 유기 화합물의 허용 가능한 치환기에 의해 어떤 방식으로든 제한되지 않는다는 것을 의도한다.

[0156] 아래에 나열된 임의의 군에 "저급"이라는 용어가 추가된 경우 그 군에 7 개 미만의 탄소 (즉, 6 개 이하의 탄소)가 포함되어 있음을 나타낸다. 예를 들어, "저급 알킬"은 1-6 개의 탄소를 함유하는 알킬기를 의미하고, "저급 알케닐"은 2-6 개의 탄소를 함유하는 알케닐기를 의미한다.

[0157] 본 명세서에 사용된 용어 "불포화"는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합 또는 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 화합물 및/또는 기에 관한 것이다.

[0158] 본 명세서에 사용된 용어 "지방족"은 선형 또는 분지형이지만 고리형이 아닌 화합물 및/또는 기 ("비고리형" 또는 "개방형-사슬"기로도 알려짐)에 관한 것이다.

[0159] 본 명세서에 사용된 용어 "시클릭"은 하나의 고리, 또는 둘 이상의 고리 (예를 들어, 스피로, 융합, 가교)를 갖는 화합물 및/또는 기에 관한 것이다. "단환"은 하나의 고리를 갖는 화합물 및/또는 기를 지칭하고; "바이시클릭"은 2 개의 고리를 갖는 화합물/및 또는 기를 지칭한다.

[0160] 용어 "방향족"은 4n + 2 개의 전자를 함유하는 고리적으로 컨쥬게이트된 분자 모이어티를 특징으로하는 평면 또는 폴리시클릭 구조를 의미하며, 여기서 n은 정수의 절대값이다. 융합되거나 결합된 고리를 함유하는 방향족 분자는 또한 바이시클릭 방향족 고리라고도 한다. 예를 들어, 탄화수소 고리 구조에 헤테로원자를 포함하는 바이시클릭 방향족 고리를 바이시클릭 헤테로아릴 고리라고 지칭한다.

[0161] 본 명세서에 사용된 용어 "탄화수소"는 전적으로 수소와 탄소로 구성된 유기 화합물을 의미한다.

[0162] 본 발명의 목적을 위해, 화학 원소는 CAS 버전, Handbook of Chemistry and Physics, 67th Ed., 1986-87, 표지 안쪽의 원소 주기율표에 따라 식별된다.

[0163] 본 명세서에서 사용된 용어 "헤테로원자"는 당해 기술분야에서 인정되는 것이며 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 의미한다. 예시적인 헤테로원자는 붕소, 질소, 산소, 인, 황 및 셀레늄을 포함한다.

[0164] 용어 "알킬"은 1 내지 20 개, 1 내지 15 개, 또는 1 내지 10 개의 탄소 원자를 함유하는 지방족 또는 시클릭 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알킬의 대표적인 예에는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, sec-부틸, 이소-부틸, tert-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, n-헥실, 2-메틸시클로펜틸, 1-(1-에틸시클로프로필)에틸 및 1-시클로헥실에틸이 포함되는데 이에 제한되지는 않는다.

[0165] 용어 "시클로알킬"은 3 내지 15, 3 내지 10, 또는 3 내지 7 개의 탄소 원자를 함유하는 시클릭 탄화수소 라디칼을 지칭하는 알킬의 서브세트이다. 시클로알킬의 대표적인 예는 시클로프로필 및 시클로부틸을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0166] 본 명세서에 사용된 용어 "알케닐"은 2 내지 10 개의 탄소를 함유하고 2 개의 수소 제거에 의해 형성된 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지 쇄 탄화수소 라디칼을 의미한다. 알케닐의 대표적인 예는 에테닐, 2-프로페닐, 2-메틸-2-프로페닐, 3-부테닐, 4-펜테닐, 5-헥세닐, 2-헵테닐, 2-메틸-1-헵테닐, 및 3-데세닐을 포함하는데 이에 제한되지는 않는다.

[0167] 본 명세서에 사용된 용어 "알키닐"은 2 내지 10 개의 탄소 원자를 함유하고 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 15 라디칼을 의미한다. 알키닐의 대표적인 예는 아세틸레닐, 1-프로피닐,

2-프로피닐, 3-부티닐, 2-펜티닐, 및 1-부티닐을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0168] 용어 "알킬렌"은 당해 기술분야에서 인정되고, 본 명세서에서 사용된 것으로서 상기 정의된 바와 같이 알킬기의 2 개의 수소 원자를 제거함으로써 수득된 디라디칼에 관한 것이다.

[0169] 본 명세서에 사용된 용어 "카르보시클릴"은 완전히 포화되거나 하나 이상의 불포화 결합을 갖고 의심의 여지가 없도록 불포화 정도는 방향족 고리 시스템 (예 : 페닐)을 생성하지 않는, 3 내지 12 개의 탄소 원자를 함유하는 모노시클릭 또는 멀티시클릭 (예 : 바이시클릭, 트리시클릭 등) 탄화수소 라디칼을 의미한다. 카르보시클릴기의 예는 1-시클로프로필, 1-시클로부틸, 2-시클로펜틸, 1-시클로펜테닐, 3-시클로헥실, 1-시클로헥세닐 및 2-시클로펜테닐메틸을 포함한다.

[0170] 본 명세서에 사용된 용어 "헤테로시클릴"은 완전히 포화될 수 있거나 하나 이상의 불포화 단위를 갖고, 의심의 여지를 피하기 위해 불포화 정도는 방향족 고리 계를 생성하지 않으며 질소, 산소, 또는 황과 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 3 ~ 12 개의 원자를 갖는, 모노시클릭, 바이시클릭 및 트리시클릭 고리를 포함하나 이에 제한되지 않는 비-방향족 고리계의 라디칼을 지칭한다. 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안되는 예시를 들면, 헤테로시클릭 고리의 예는 다음과 같다: 아지리디닐, 아지리닐, 옥시라닐, 티이라닐, 티이레닐, 디옥시라닐, 디아지리닐, 아제틸, 옥세타닐, 옥세틸, 티에타닐, 티에틸, 디아제티디닐, 디옥세타닐, 디옥세테닐, 디티에타닐, 디티에틸, 푸릴, 디옥살라닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 이미다졸릴, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴, 트리아졸릴, 트리아지닐, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 티오페닐, 피라졸릴, 테트라졸릴, 피리딜, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 트리아지닐, 테트라지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 피리도피라지닐, 벤족사졸릴, 벤조티오페닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤족사디아졸릴, 벤즈티아디아졸릴, 인돌릴, 벤즈트리아졸릴, 나프티리디닐, 아제핀, 아제티디닐, 모르폴리닐, 옥소피페리디닐, 옥소피롤리디닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 피롤리디닐, 퀴니클루디닐, 티오모르폴리닐, 테트라히드로피라닐 및 테트라히드로푸라닐.

[0171] 본 발명의 헤테로시클릴기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 할로, 할로알킬, 플루오로알킬, 히드록시, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 카르보시클릴옥시, 헤테로시클릴옥시, 할로알콕시, 플루오로알킬옥시, 술피드릴, 알킬티오, 할로알킬티오, 플루오로알킬티오, 알키에닐티오, 알키닐티오, 술폰산, 알킬술포닐, 할로알킬술포닐, 플루오로알킬술포닐, 알케닐술포닐, 알키닐술포닐, 알콕시술포닐, 할로알콕시술포닐, 플루오로알콕시술포닐, 알케닐옥시술포닐, 알키닐옥시술포닐, 아미노술포닐, 술핀산, 알킬술피닐, 할로알킬술피닐, 플루오로알킬술피닐, 알케닐술피닐, 알키닐술피닐, 알콕시술피닐, 할로알콕시술피닐, 플루오로알콕시술피닐, 알케닐옥시술피닐, 알키닐옥시술피닐, 아미노술피닐, 포르밀, 알킬카르보닐, 할로알킬카르보닐, 플루오로알킬카르보닐, 알케닐카르보닐, 알키닐카르보닐, 카르복시, 알콕시카르보닐, 할로알콕시카르보닐, 플루오로알콕시카르보닐, 알케닐옥시카르보닐, 알키닐옥시카르보닐, 알킬카르보닐옥시, 플루오로알킬카르보닐옥시, 알케닐카르보닐옥시, 알키닐카르보닐옥시, 알킬술포닐옥시, 할로알킬술포닐옥시, 플루오로알킬술포닐옥시, 알케닐술포닐옥시, 알키닐술포닐옥시, 할로알콕시술포닐옥시, 플루오로알콕시술포닐옥시, 알케닐옥시술포닐옥시, 알키닐옥시술포닐옥시, 알킬술피닐옥시, 할로알킬술피닐옥시, 플루오로알킬술피닐옥시, 알케닐술피닐옥시, 알키닐술피닐옥시, 알콕시술피닐옥시, 할로 알콕시술피닐옥시, 플루오로알콕시술피닐옥시, 알케닐옥시술피닐옥시, 알키닐옥시술피닐옥시, 아미노술피닐옥시, 아미노, 아미도, 아미노술포닐, 아미노술 피닐, 시아노, 니트로, 아지도, 포스피닐, 포스포릴, 실릴, 실릴옥시, 및 알킬렌 모이어티 (예를 들어, 메틸렌)를 통해 헤테로시클릴기에 결합된 임의의 치환기로 구성된 군에서 독립적으로 선택된 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 치환된다.

[0172] 본 명세서에 사용된 용어 "아릴"은 페닐, 나프틸, 페난트레닐, 또는 안트라세닐 기를 의미한다. 본 발명의 아릴기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 할로, 할로알킬, 플루오로알킬, 히드록시, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 카르보시클릴옥시, 헤테로시클릴옥시, 할로알콕시, 플루오로알킬옥시, 술피드릴, 알킬티오, 할로알킬티오, 플루오로알킬티오, 알키에닐티오, 알키닐티오, 술폰산, 알킬술포닐, 할로알킬술포닐, 플루오로알킬술포닐, 알케닐술포닐, 알키닐술포닐, 알콕시술포닐, 할로알콕시술포닐, 플루오로알콕시술포닐, 알케닐옥시술포닐, 알키닐옥시술포닐, 아미노술포닐, 술핀산, 알킬술피닐, 할로알킬술피닐, 플루오로알킬술피닐, 알케닐술피닐, 알키닐술피닐, 알콕시술피닐, 할로알콕시술피닐, 플루오로알콕시술피닐, 알케닐옥시술피닐, 알키닐옥시술피닐, 아미노술피닐, 포르밀, 알킬카르보닐, 할로알킬카르보닐, 플루오로알킬카르보닐, 알케닐카르보닐, 알키닐카르보닐, 카르복시, 알콕시카르보닐, 할로알콕시카르보닐, 플루오로알콕시카르보닐, 알케닐옥시카르보닐, 알키닐옥시카르보닐, 알킬카르보닐옥시, 플루오로알킬카르보닐옥시, 알케닐카르보닐옥시, 알키닐카르보닐옥시, 알킬술포닐옥시, 할로알킬술포닐옥시, 플루오로알킬술포닐옥시, 알케닐술포닐옥시, 알키닐술포닐옥시, 할로알콕시술포닐옥시, 플루오로알콕시술포닐옥시, 알케닐옥시술포닐옥시, 알키닐옥시술포닐옥시, 알킬술피닐옥시, 할로알킬술피닐옥시, 플루오로알

킬술피닐옥시, 알케닐술피닐옥시, 알키닐술피닐옥시, 알콕시술피닐옥시, 할로 알콕시술피닐옥시, 플루오로알콕시술피닐옥시, 알케닐옥시술피닐옥시, 알키닐옥시술피닐옥시, 아미노술피닐옥시, 아미노, 아미도, 아미노술포닐, 아미노술 피닐, 시아노, 니트로, 아지도, 포스피닐, 포스포릴, 실릴, 실릴옥시, 및 알킬렌 모이어티 (예를 들어, 메틸렌)를 통해 헤테로시클릴기에 결합된 임의의 치환기로 구성된 군에서 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0173] 용어 "아릴렌"은 당해 기술분야에서 인정되고, 본 명세서에서 사용된 것으로서 상기 정의된 바와 같이 아릴 고리의 2 개의 수소 원자를 제거함으로써 수득된 디라디칼에 관한 것이다.

[0174] 본 명세서에 사용된 용어 "아릴 알킬" 또는 "아랄킬"은 본 명세서에 정의된 바와 같이 알킬기를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 대로의 아릴기를 의미한다.

[0175] 아랄킬의 대표적인 예는 벤질, 2-페닐에틸, 3-페닐프로필, 및 2-나프트-2-일에틸을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0176] 본 명세서에 사용된 용어 "바이아릴(biaryl)"은 아릴-치환된 아릴, 아릴-치환된 헤테로아릴, 헤테로아릴-치환된 아릴 또는 헤테로아릴-치환된 헤테로아릴을 의미하며, 여기서 아릴 및 헤테로아릴은 본 명세서에 정의된 바와 같다. 대표적인 예는 4-(페닐)페닐 및 4-(4-메톡시페닐)피리디닐을 포함한다.

[0177] 본 명세서에 사용된 용어 "헤테로아릴"은 질소, 산소, 또는 황과 같은 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 3 내지 12 개의 원자를 갖는 모노시클릭, 바이시클릭 및 트리시클릭 고리를 포함하지만 이에 제한되지 않는 방향족 고리계의 라디칼을 포함한다. 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안되는 예시를 위해서는 다음과 같다: 아미노벤즈이미다졸, 벤즈이미다졸, 아자인돌릴, 벤조(b)티에닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조푸라닐, 벤족사졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티아디아졸릴, 벤조트리아졸릴, 벤조옥사디아졸릴, 푸라닐, 이미다졸릴, 이미다조피리디닐, 인돌릴, 인돌리닐, 인다졸릴, 이소인돌리닐, 이속사졸릴, 이소티아졸릴, 이소퀴놀리닐, 옥사디아졸릴, 옥사졸릴, 퓨리닐, 피라닐, 피라지닐, 피라졸릴, 피리디닐, 피리미디닐, 피롤릴, 피롤로[2,3-d]피리미디닐, 피라졸로[3,4-d]피리미디닐, 퀴놀리닐, 퀴나졸리닐, 트리아졸릴, 티아졸릴, 티오페닐, 테트라히드로인돌릴, 테트라졸릴, 티아디아졸릴, 티에닐, 티오모르폴리닐, 트리아졸릴 또는 트로파닐.

[0178] 본 발명의 헤테로아릴기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 할로, 할로알킬, 플루오로알킬, 히드록시, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 카르보시클릴옥시, 헤테로시클릴옥시, 할로알콕시, 플루오로알킬옥시, 술피드릴, 알킬티오, 할로알킬티오, 플루오로알킬티오, 알키에닐티오, 알키닐티오, 술폰산, 알킬술포닐, 할로알킬술포닐, 플루오로알킬술포닐, 알케닐술포닐, 알키닐술포닐, 알콕시술포닐, 할로알콕시술포닐, 플루오로알콕시술포닐, 알케닐옥시술포닐, 알키닐옥시술포닐, 아미노술포닐, 술핀산, 알킬술피닐, 할로알킬술피닐, 플루오로알킬술피닐, 알케닐술피닐, 알키닐술피닐, 알콕시술피닐, 할로알콕시술피닐, 플루오로알콕시술피닐, 알케닐옥시술피닐, 알키닐옥시술피닐, 아미노술피닐, 포르밀, 알킬카르보닐, 할로알킬카르보닐, 플루오로알킬카르보닐, 알케닐카르보닐, 알키닐카르보닐, 카르복시, 알콕시카르보닐, 할로알콕시카르보닐, 플루오로알콕시카르보닐, 알케닐옥시카르보닐, 알키닐옥시카르보닐, 알킬카르보닐옥시, 플루오로알킬카르보닐옥시, 알케닐카르보닐옥시, 알키닐카르보닐옥시, 알킬술포닐옥시, 할로알킬술포닐옥시, 플루오로알킬술포닐옥시, 알케닐술포닐옥시, 알키닐술포닐옥시, 할로알콕시술포닐옥시, 플루오로알콕시술포닐옥시, 알케닐옥시술포닐옥시, 알키닐옥시술포닐옥시, 알킬술피닐옥시, 할로알킬술피닐옥시, 플루오로알킬술피닐옥시, 알케닐술피닐옥시, 알키닐술피닐옥시, 알콕시술피닐옥시, 할로 알콕시술피닐옥시, 플루오로알콕시술피닐옥시, 알케닐옥시술피닐옥시, 알키닐옥시술피닐옥시, 아미노술피닐옥시, 아미노, 아미도, 아미노술포닐, 아미노술 피닐, 시아노, 니트로, 아지도, 포스피닐, 포스포릴, 실릴, 실릴옥시, 및 알킬렌 모이어티 (예를 들어, 메틸렌)를 통해 헤테로아릴기에 결합된 임의의 치환기로 구성된 군에서 독립적으로 선택된 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 치환된다.

[0179] 용어 "헤테로아릴렌"은 당해 기술분야에서 인정되고, 본 명세서에서 사용된 것으로서 상기 정의된 바와 같이 헤테로아릴 고리의 2 개의 수소 원자를 제거함으로써 수득된 디라디칼에 관한 것이다.

[0180] 본 명세서에 사용된 용어 "헤테로아릴알킬" 또는 "헤테로아랄킬"은 본 명세서에 정의된 대로의 알킬기를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 대로의 헤테로아릴을 의미한다. 헤테로아릴 알킬의 대표적인 예는 피리딘-3-일메틸 및 2-(티엔-2-일)에틸을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0181] 본 명세서에 사용된 용어 "융합된 바이시클릴"은 2 개의 고리가 오르토-융합되고 각 고리가 2 개의 융합 원자를 포함하는 총 4, 5, 6 또는 7 개의 원자 (즉, 탄소 및 헤테로원자)를 함유하는 바이시클릭 고리계의 라디칼을 의미하는데, 각 고리는 완전히 포화될 수 있고, 하나 이상의 불포화 단위를 포함할 수 있거나, 완전히 불포화될

수 있다 (예를 들어, 어떤 경우에는 방향족). 의심의 여지가 없도록 융합된 바이시클릴의 불포화 정도는 아릴 또는 헤테로아릴 모이어티를 생성하지 않는다. 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 -Cl, -Br, -I 또는 -F를 의미한다.

[0182] 용어 "할로알킬"은 본 명세서에 정의된 대로의 알킬기를 의미하며, 여기서 적어도 하나의 수소는 본 명세서에 정의된 할로겐으로 대체된다. 할로알킬의 대표적인 예는 클로로메틸, 2-플루오로에틸, 트리플루오로메틸, 펜타플루오로에틸 및 2-클로로-3-플루오로펜틸을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0183] 용어 "플루오로알킬"은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬기를 의미하며, 여기서 수소의 일부 또는 전부가 불소로 대체된다.

[0184] 본 명세서에 사용된 용어 "할로알킬렌"은 상기 정의된 바와 같이 할로알킬기의 2 개의 수소 원자를 제거함으로써 수득된 디라디칼에 관한 것이다.

[0185] 본 명세서에 사용된 용어 "히드록시"는 -OH기를 의미한다.

[0186] 본 명세서에 사용된 용어 "알콕시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 알킬기를 의미한다. 알콕시의 대표적인 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 2- 프로폭시, 부톡시, tert-부톡시, 펜틸옥시 및 헥실옥시를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 "알키에닐옥시", "알키닐옥시", "카르보시클릴옥시" 및 "헤테로시클릴옥시"는 마찬가지로 정의된다.

[0187] 본 명세서에 사용된 용어 "할로알콕시"는 본 명세서에 정의된 대로의 알콕시기를 의미하며, 여기서 하나 이상의 수소는 본 명세서에 정의된 할로겐으로 대체된다. 할로알콕시의 대표적인 예는 클로로메톡시, 2-플루오로에톡시, 트리플루오 로메톡시, 및 펜타플루오로에톡시를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 용어 "플루오로알킬옥시"도 마찬가지로 정의된다.

[0188] 본 명세서에 사용된 용어 "아릴옥시"는 산소를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 아릴기를 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "헤테로아릴옥시"는 산소를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 헤테로아릴기를 의미한다. 용어 "헤테로아릴옥시"도 마찬가지로 정의된다.

[0189] 본 명세서에 사용된 용어 "아릴알콕시" 또는 "아릴알킬옥시"는 산소를 통해 모 분자 모이어티에 부가된, 본 명세서에 정의된 대로의 아릴알킬기를 의미한다. 용어 "헤테로아릴알콕시"도 마찬가지로 정의된다. 아릴옥시 및 헤테로아릴알콕시의 대표적인 예는 2-클로로페닐메톡시, 3-트리플루오로메틸-페닐에톡시, 및 2,3-디메틸피리디닐메톡시를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0190] 본 명세서에 사용된 용어 "술피드릴" 또는 "티오"는 -SH기를 의미한다.

[0191] 본 명세서에 사용된 용어 "알킬티오"는 황을 통해 모 분자 모이어티에 부가된, 본 명세서에 정의된 대로의 알킬기를 의미한다. 알킬 티오의 대표적인 예는 메틸티오, 에틸티오, tert-부틸티오 및 헥실티오를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 "할로알킬티오", "플루오로알킬티오", "알키에닐티오", "알키닐티오", "카르보시클릴티오" 및 "헤테로시클릴티오"는 마찬가지로 정의된다.

[0192] 본 명세서에 사용된 용어 "아릴티오"는 황을 통해 모 분자 모이어티에 부가된, 본 명세서에 정의된 대로의 아릴기를 의미한다. 용어 "헤테로아릴티오"도 마찬가지로 정의된다.

[0193] 본 명세서에 사용된 용어 "아릴알킬티오" 또는 "아랄킬티오"는 황을 통해 모 분자 모이어티에 부가된, 본 명세서에 정의된 대로의 아릴알킬기를 의미한다. 용어 "헤테로아릴알킬티오"도 마찬가지로 정의된다.

[0194] 본 명세서에서 사용된 용어 "술포닐"은 -S(=O)2- 기를 의미한다.

[0195] 본 명세서에 사용된 용어 "술폰산"은 -S(=O)2OH를 의미한다.

[0196] 본 명세서에 사용된 용어 "알킬술포닐"은 본 명세서에 정의된 대로의 술포닐기를 통해 모 분자 모이어티에 부가된, 본 명세서에 정의된 대로의 알킬기를 의미한다. 알킬술포닐의 대표적인 예는 메틸술포닐 및 에틸술포닐을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 "할로알킬술포닐", "플루오로알킬술포닐", "알케닐술포닐", "알키닐술포닐", "카르보시클릴술포닐", "헤테로시클릴술포닐", "아릴술포닐", "아랄킬 술포닐", "헤테로아릴술포닐" 및 "헤테로아랄킬술포닐"은 마찬가지로 정의된다.

[0197] 본 명세서에 사용된 용어 "알콕시술포닐"은 본 명세서에 정의된 대로의 술포닐기를 통해 모 분자 모이어티에 부가된, 본 명세서에 정의된 대로의 알콕시기를 의미한다.

[0198] 알콕시술포닐의 대표적인 예는 메톡시술포닐, 에톡시술포닐 및 프로폭시술포닐을 포함하지만 이에 제한되지 않

는다. 용어 "할로알콕시술포닐", "플루오로알콕시술포닐", "알케닐옥시술포닐", "알키닐옥시술포닐", "카르보시클릴옥시술포닐", "헤테로시클릴옥시술포닐", "아릴옥시술포닐", "아랄킬옥시술포닐", "헤테로아릴옥시술포닐" 및 "헤테로아랄킬옥시술포닐"은 마찬가지로 정의된다.

[0199] 용어 트리플릴, 토실, 메실, 및 노나플릴은 당해 기술분야에서 인식되고 있으며 각각 트리플루오로메탄술포닐, p-톨루엔술포닐, 메탄술포닐, 및 노나플루오로부탄술포닐 기를 지칭한다. 용어 트리플레이트, 토실레이트, 메실레이트, 및 노나플레이트는 당해 기술분야에서 인정되고 각각 트리플루오로메탄술포네이트 에스테르, p-톨루엔술포네이트 에스테르, 메탄술포네이트 에스테르, 및 노나플루오로부탄술포네이트 에스테르 작용기 및 이들 기를 함유하는 분자를 지칭한다.

[0200] 본 명세서에 사용된 용어 "아미노술포닐"은 술포닐기를 통해 모 분자 모이어티에 첨부된 본 명세서에 정의된 대로의 아미노기를 의미한다.

[0201] 본 명세서에서 사용된 용어 "술피닐"은 -S(=O)- 기를 의미한다. 술피닐기는 술포닐기에 대해 위에서 정의한 바와 같다. 본 명세서에서 사용된 용어 "술핀산"은 -S(=O)OH를 의미한다.

[0202] 용어 "옥시"는 -O- 기를 의미한다.

[0203] 본 명세서에서 사용된 용어 "카르보닐"은 -C(=O)- 기를 의미한다.

[0204] 본 명세서에서 사용된 용어 "티오카르보닐"은 -C(=5)- 기를 의미한다.

[0205] 본 명세서에서 사용된 용어 "포르밀"은 -C(=O)수소 기를 의미한다.

[0206] 본 명세서에 사용된 용어 "아실"은 -C(=O)R 형태의 임의의 기 또는 라디칼을 지칭하며, 여기서 R은 유기기이다. 아실기의 예는 아세틸 기 (-C(=O)CH3)이다.

[0207] 본 명세서에 사용된 용어 "알킬카르보닐"은 본 명세서에 정의된 대로의 카르보닐기를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 대로의 알킬기를 의미한다. 알킬카르보닐의 대표적인 예는 아세틸, 1-옥소프로필, 2,2-디메틸-1-옥소프로필, 1-옥소부틸, 및 1-옥소펜틸을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 "할로알킬카르보닐", "플루오로알킬카르보닐", "알케닐 카르보닐", "알키닐카르보닐", "카르보시클릴카르보닐", "헤테로시클릴카르보닐", "아릴카르보닐", "아랄킬카르보닐", "헤테로아릴카르보닐" 및 "헤테로아랄킬카르보닐"도 마찬가지로 정의된다.

[0208] 본 명세서에서 사용된 용어 "카르복실"은 $-CO_2H$ 기를 의미한다.

[0209] 본 명세서에 사용된 용어 "알콕시카르보닐"은 본 명세서에 정의된 대로의 카르보닐기를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 대로의 알콕시기를 의미한다. 알콕시카르보닐의 대표적인 예는 메톡시카르보닐, 에톡시카르보닐 및 tert-부톡시카르보닐을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0210] 용어 "할로알콕시카르보닐", "플루오로알콕시카르보닐", "알케닐옥시카르보닐", "알키닐옥시카르보닐", "카르보시클릴옥시카르보닐", "헤테로시클릴옥시카르보닐", "아릴옥시카르보닐", "아랄킬옥시카르보닐", "헤테로아릴옥시카르보닐" 및 "헤테로 아랄킬옥시카르보닐"은 마찬가지로 정의된다.

[0211] 본 명세서에 사용된 용어 "알킬카르보닐옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 대로의 알킬카르보닐기를 의미한다. 알킬 카르보닐옥시의 대표적인 예는 아세틸옥시, 에틸카르보닐옥시, 및 tert-부틸카르보닐옥시를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용어 "할로알킬카르보닐옥시", "플루오로알킬카르보닐옥시", "알케닐카르보닐옥시", "알키닐카르보닐옥시", "카르보시클릴카르보닐옥시", "헤테로시클릴카르보닐옥시", "아릴카르보닐옥시", "아랄킬카르보닐옥시", "헤테로아릴카르보닐옥시" 및 "헤테로아랄킬카르보닐옥시"는 마찬가지로 정의된다.

[0212] 본 명세서에 사용된 용어 "알킬술포닐옥시"는 산소 원자를 통해 모 분자 모이어티에 첨부된, 본 명세서에 정의된 대로의 알킬술포닐 기를 의미한다. 용어 "할로알킬술포닐옥시", "플루오로알킬술포닐옥시", "알케닐술포닐옥시", "알키닐술포닐옥시", "아릴술포닐옥시", "헤테로아랄킬술포닐옥시", "알케닐옥시술포닐옥시", "헤테로시클릴옥시술포닐옥시" "카르보시클릴술포닐옥시", "아랄킬술포닐옥시", "할로알콕시술포닐옥시", "알키닐옥시술포닐옥시", "아릴옥시술포닐옥시", "헤테로시클릴술포닐옥시", "헤테로아릴술포닐옥시", "플루오로알콕시술포닐옥시", "카르보시클릴옥시술포닐옥시", "아랄킬옥시술포닐옥시", "헤테로아릴옥시술포닐옥시" 및 "헤테로아랄킬옥시술포닐옥시"가 마찬가지로 정의된다.

[0213] 본 명세서에 사용된 용어 "아미노" 또는 "아민"은 -NH2 및 이의 치환된 유도체를 지칭하며, 여기서 수소 중 하나 또는 둘 모두가 독립적으로 알킬, 할로알킬, 플루오로알킬, 알케닐, 알키닐, 카르보시클릴, 헤테로시클릴, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 헤테로아랄킬, 알킬카르보닐, 할로알킬카르보닐, 플루오로알킬카르보닐, 알케닐카르보닐, 알키닐카르보닐, 카르보시클릴카르보닐, 헤테로시클릴카르보닐, 아릴카르보닐, 아랄킬카르보닐, 헤테로아릴카르보닐, 헤테로아랄킬카르보닐 및 상기 정의된 대로의 술포닐 및 술피닐 기로 이루어진 군에서 선택된 치환기로 대체되거나; 또는 두 수소가 함께 알킬렌기로 대체된 경우(질소를 포함하는 고리를 형성하기 위함)이다. 대표적인 예는 메틸아미노, 아세틸아미노, 및 디메틸아미노를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0214] 본 명세서에 사용된 용어 "아미도"는 카르보닐을 통해 모 분자 모이어티에 부가된 본 명세서에 정의된 대로의 아미노기를 의미한다.

[0215] 본 명세서에서 사용된 용어 "시안"은 -CN 기를 의미한다.

[0216] 본 명세서에서 사용된 용어 "니트로"는 -NO2 기를 의미한다.

[0217] 본 명세서에서 사용된 용어 "아지도"는 -N3기를 의미한다.

[0218] 본 명세서에 사용된 용어 "포스피닐" 또는 "포스피노"는 -PH3 및 그의 치환된 유도체를 포함하며, 여기서 수소 중 1 개, 2 개 또는 3 개는 독립적으로 알킬, 할로알킬, 플루오로알킬, 알케닐, 알키닐, 카르보시클릴, 헤테로시클릴, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 헤테로아랄킬, 알콕시, 할로알콕시, 플루오로알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 카르보시클릴옥시, 헤테로시클릴옥시, 아릴옥시, 아랄킬옥시, 헤테로아릴옥시, 헤테로아랄킬옥시, 및 아미노로 구성된 군에서 선택된 치환기로 대체된다.

[0219] 본 명세서에 사용된 용어 "포스포릴"은 -P(=O)OH2 및 이의 치환된 유도체를 지칭하며, 여기서 히드록실 중 하나 또는 둘 모두는 독립적으로 알킬, 할로알킬, 플루오로알킬, 알케닐, 알키닐, 카르보시클릴, 헤테로시클릴, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 헤테로아랄킬, 알콕시, 할로알콕시, 플루오로알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 카르보시클릴옥시, 헤테로시클릴옥시, 아릴옥시, 아랄킬옥시, 헤테로아릴옥시, 헤테로아랄킬옥시 및 아미노로 구성된 군으로부터 선택된 치환기로 대체된다.

[0220] 본 명세서에 사용된 용어 "실릴"은 H3Si- 및 그의 치환된 유도체를 포함하며, 여기서 수소 중 1 개, 2 개 또는 3 개는 독립적으로 알킬, 할로알킬, 플루오로알킬, 알케닐, 알키닐, 카르보시클릴, 헤테로시클릴, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 및 헤테로아랄킬로부터 선택된 치환기로 대체된다. 대표적인 예는 트리메틸실릴(TMS), tert-부틸디페닐실릴(TBDPS), tert-부틸디메틸실릴(TBS/TBDMS), 트리이소프로필실릴(TIPS), 및 [2-(트리메틸실릴)에톡시]메틸(SEM)을 포함한다.

[0221] 본 명세서에 사용된 용어 "실릴옥시"는 본 명세서에 정의된 대로의 실릴기가 산소 원자를 통해 모 분자에 부가됨을 의미한다.

[0222] 약어 Me, Et, Ph, Tf, Nf, Ts, Ms, Cbz 및 Boc는 각각 메틸, 에틸, 페닐, 트리 플루오로메탄술포닐, 노나플루오로부탄술포닐, p-톨루엔술포닐 메탄술포닐, 카르보벤질옥시 및 tert-부틸옥시카르보닐을 나타낸다. 관련분야 통상의 기술자에 의해 사용되는 보다 포괄적인 약어 목록은 Journal of Organic Chemistry의 각 권의 첫 번째 호에 나와 있는데 이 목록은 일반적으로 표준 약어 목록이라는 표에 나와 있다.

[0223] "단백질-발현 관련 질환"은 병리학이 적어도 부분적으로 부적절한 단백질 발현 (예를 들어, 잘못된 시간 및/또는 잘못된 세포에서의 발현), 과도한 단백질 발현 또는 돌연변이 단백질의 발현과 관련된 질환 또는 장애를 의미한다. 일 구체예에서, 돌연변이 단백질 질환은 돌연변이 단백질이 세포, 조직, 또는 기관의 정상적인 생물학적 활성을 방해할 때 발생한다.

[0224] "돌연변이 단백질"은 참조(야생형) 단백질에 비해 1 차, 2 차 또는 3 차 구조에 영향을 미치는 변형을 갖는 단백질을 의미한다.

[0225] "향상된다"는 적어도 약 10 %, 15 %, 25 %, 50 %, 75 %, 또는 100 %의 양성인 변형을 의미한다.

[0226] "감소된다"는 적어도 약 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 또는 100 %의 음성적인 변형을 의미한다.

[0227] "선택적 분해"는 다른 단백질이 실질적으로 영향을 받지 않도록 표적 단백질에 우선적으로 영향을 미치는 분해를 의미한다. 다양하나의 구체예에서, 약 45 %, 35 %, 25 %, 15 %, 10 %, 또는 5 % 미만의 비-표적 단백질이 분해된다.

[0228] UchL5 (Uch37)는 기질이 프로테아좀 분해에 관여하기 전에 기능하는 탈유비퀴틴화(deubiquitinating) 효소이다. UchL5는 기질-원위 끝에서 유비퀴틴 사슬을 해체하는데(Lam et al., (1997), *Nature*, 385,737-740), 그 효소 활성은 사슬을 완전히 제거하는 것이 아니라 짧게 만드는 것이다. UchL5에 의한 사슬 다듬기는 길고 짧은 멀티 유비퀴틴 사슬을 구별하는 프로테아좀의 능력을 증가시킨다고 제안되었다.

[0229] **UchL5 뉴클레오티드 및 아미노산 서열 (인간)**

[0230] 뉴클레오티드 서열 (Q9Y5K5)

[0231] ATGACGGGCAATGCCGGGGAGTGGTGCCTCATGGAAAGCGACCCCGGGGTCTTCACCGAGCTCAT

[0232] TAAAGGATTCGGTTGCCGAGGAGCCCAAGTAGAAGAAATATGGAGTTTAGAGCCTGAGAATTTTG

[0233] AAAAATTAAAGCCAGTTCATGGGTTAATTTTTCTTTTCAAGTGGCAGCCAGGAGAAGAACCAGCA

[0234] GGCTCTGTGGTTCAGGACTCCCGACTTGACACGATATTTTTTGCTAAGCAGGTAATTAATAATGC

[0235] TTGTGCTACTCAAGCCATAGTGAGTGTGTTACTGAACTGTACCCACCAGGATGTCCATTTAGGCG

[0236] AGACATTATCAGAGTTTAAAGAATTTTCACAAAGTTTTGATGCAGCTATGAAAGGCTTGGCACTG

[0237] AGCAATTCAGATGTGATTCGACAAGTACACAACAGTTTCGCCAGACAGCAAATGTTTGAATTTGA

[0238] TACGAAGACATCAGCAAAAGAAGAAGATGCTTTTCACTTTGTCAGTTATGTTCCTGTTAATGGGA

[0239] GACTGTATGAATTAGATGGATTAAGAGAAGGACCGATTGATTTAGGTGCATGCAATCAAGATGAT

[0240] TGGATCAGTGCAGTAAGGCCTGTCATAGAAAAAAGGATACAAAAGTACAGTGAAGGTGAAATTCG

[0241] ATTTAATTTAATGGCCATTGTGTCTGACAGAAAAATGATATATGAGCAGAAGATAGCAGAGTTAC

[0242] AAAGACAACTTGCAGAGGAACCCATGGATACAGATCAAGGTAATAGTATGTTAAGTGCTATTCAG

[0243] TCAGAAGTTGCCAAAAATCAGATGCTTATTGAAGAAGAAGTACAGAAATTAAAAAGATACAAGAT

[0244] TGAGAATATCAGAAGGAAGCATAATTATCTGCCTTTCATTATGGAATTGTTAAAGACTTTAGCAG

[0245] AACACCAGCAGTTAATACCACTAGTAGAAAAGGCAAAAGAAAAACAGAACGCAAAGAAAGCTCAG

[0246] GAAACCAAATGA

[0247] 아미노산 서열

[0248] MTGNAGEWCLMESDPGVFTELIKGFGCRGAQVEEIWSLEPENFEKLKPVHGLIFLFKWQP

[0249] GEEPAGSVVQDSRLDTIFFAKQVINNACATQAIVSVLLNCTHQDVHLGETLSEFKEFSQS

[0250] FDAAMKGLALSNSDVIRQVHNSFARQQMFEFDTKTSAKEEDAFHFVSYVPVNGRLYELDG

[0251] LREGPIDLGACNQDDWISAVRPVIEKRIQKYSEGEIRFNLMAIVSDRKMIYEQKIAELQR

[0252] QLAEEEPMDTDQGNSMLSAIQSEVAKNQMLIEEEVQKLKRYKIENIRRKHNYLPFIMELL

[0253] KTLAEHQQLIPLVEKAKEKQNAKKAQETK

[0254] "**선택된 표적 단백질**"은 숙련된 의사가 세포 또는 포유 동물, 예를 들어 인간 개체에서 선택적으로 분해 및/또는 억제하기를 원하는 단백질이다. 본 발명에 따르면, 표적 단백질의 분해는 본 명세서에 기재된 바와 같이 표적 단백질이 이중작용성 분자에 노출될 때 발생할 것이다. 표적 단백질의 분해는 단백질 수준을 감소시키고 세포에서 표적 단백질의 효과를 감소시킨다. 본 발명에 의해 제공되는 단백질 수준의 제어는 환자의 세포에서 그 단백질 수준을 낮춤으로써 표적 단백질을 통해 조절되는 질환의 정도 또는 상태에 대한 치료를 제공하게 한다.

[0255] "**표적 단백질 결합 파트너**"는 선택된 표적 단백질에 결합하는 파트너를 의미한다. 표적 단백질 결합 파트너는 표적 단백질에 선택적으로 결합하는 분자이다. 본 발명에 따른 이중작용성 분자는 충분한 결합 친화도로 표적 단백질에 결합하는 표적 단백질 결합 파트너를 함유하여 표적 단백질이 이중작용성 분자에 의해 결합되지 않는 경우보다 단백질분해에 더 민감하도록 한다.

[0256] 용어 "**선택된 표적 단백질**"은 단백질의 분해를 위해 표적화되도록 관련분야의 통상의 기술자에 의해 선택되는

단백질을 지칭한다.

[0257] 용어 "**링커**"는 그것의 가장 간단한 형태에서는, -CH2-의 반복 서브유닛을 포함하는 알킬 링커를 지칭하며, 여기서의 반복 횟수는 1내지 50, 예를 들어 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9. 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 및 1-2이다. 용어 "링커"는 또한 에틸렌 글리콜(C2H4O)의 반복 서브유닛을 포함하는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커를 지칭하며, 예를 들어, 약 1-50 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 가지며, 예를 들어 여기서의 반복 횟수는 1 내지 100이고, 예를 들어, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-19 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 및 1-2이다. "**링커**"는 표적 단백질 결합 파트너 및 **UchL5** 결합 파트너가 특정 거리 내에 있도록 길이 및 유연성을 갖는 것이 바람직하다. 예를 들어, 링커를 통해 연결된 본 발명의 이중작용성 분자의 UchL5 결합 파트너 및 표적 단백질 결합 파트너는 18-95Å, 예를 들어 2-4개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 18-25Å, 4-6 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 25-33Å, 6-8 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 33-39Å, 8-12 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 39-53Å, 및 12 ~ 24 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 53-95Å 의 거리만큼 분리되어 있을 수 있다. 하나의 구체예에서, 링커를 통해 연결된 본 발명의 이중작용성 분자의 UchL5 결합 파트너 및 표적 단백질 결합 파트너는 7 내지 80개의 원자, 예를 들어 2-4개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 7-13개의 원자, 4-6 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 13-19개의 원자, 6-8 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 19-25개의 원자, 8-12 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 25-41개의 원자, 및 12 - 24 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 41-80개의 원자의 거리만큼 분리되어 있을 수 있다. 일부 구체예에서, 링커는 단일 원자, 예를 들어 -CH2- 또는 -O-이다. 일부 구체예에서, 링커는 펩티드 링커이다.

[0258] 본 발명의 링커는 링커에서 회전 가능한 결합의 수에 상응하는 정도의 유연성을 가질 수 있다. 회전 가능한 결합은 비말단(nonterminal) 중원자에 결합된, 단일 비-고리(non-ring) 결합으로서 정의된다. 아미드 (C-N) 결합은 높은 회전 에너지 장벽으로 인해 회전 가능한 것으로 간주되지 않는다. 본 발명은 특정 정도 또는 범위의 유연성을 갖는 링커를 제공한다. 이러한 링커는 링커의 유연성을 줄이기 위해 고리, 이중 결합 및 아미드를 포함함으로써 설계할 수 있다. 높은 유연성을 갖는 링커는 비치환된 PEG 또는 알킬 링커일 것이다.

[0259] 본 발명은 또한 전구약물(pro-drugs)을 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "전구약물"은 어떠한 생리학적 화학적 과정에 의해 생체 내에서 모 약물(parent drug)로 전환되는 작용제를 지칭한다 (예를 들어, 생리학적 pH로 되어 있는 전구약물은 원하는 약물 형태로 전환됨). 전구약물은 경우에 따라 모 약물보다 투여하기가 더 쉬울 수 있기 때문에 종종 유용하다. 예를 들어, 그들은 경구 투여에 의해 생체 이용가능할 수 있지만 모 약물은 그렇지 않는다. 전구약물은 또한 모 약물에 비해 약리학적 조성물에서 개선 된 용해도를 가질 수 있다. 제한없이 전구약물의 예는 본 발명의 화합물 일 수 있는데 여기서는 그것이 수용성이 유익하지 않은 세포막을 통한 전달을 촉진하기 위해 에스테르("전구약물")로서 투여되며 다만 일단 수용성이 유익한 세포 내부에서는 카르복실산으로 대사적으로 가수 분해된다. 전구약물은 많은 유용한 특성을 가지고 있다. 예를 들어, 전구약물은 최종 약물보다 더 수용성이어서 약물의 정맥 내 투여를 용이하게 할 수 있다. 전구약물은 또한 최종 약물보다 높은 수준의 경구 생체 이용률을 가질 수 있다. 투여 후, 전구약물은 효소적으로 또는 화학적으로 절단되어 혈액 또는 조직에 최종적인 약물을 전달한다.

[0260] 절단시 예시적인 전구약물은 상응하는 유리 산을 방출하고, 본 발명의 화합물의 이러한 가수 분해 가능한 에스테르-형성 잔기는 카르복실산 치환체 (예 : -C(O)2H 또는 카르복실산을 함유하는 모이어티) 산)를 포함하되 이에 제한되지 않는데, 여기서는 유리 수소가 (C1-C4) 알킬, (C2-C12) 알카노일옥시메틸, (C4-C9)1-(알카노일옥시)에틸, 5 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 1-메틸-1-(알카노일옥시)-에틸, 3 내지 6 개의 탄소 원자를 갖는 알콕시카르보닐옥시메틸, 4 내지 7 개의 탄소 원자를 갖는 1-(알콕시카르보닐옥시)에틸, 5 내지 8 개의 탄소 원자를 갖는 1-메틸-1-(알콕시카르보닐옥시)에틸, 3 내지 9 개의 탄소 원자를 갖는 N-(알콕시카르보닐) 아미노메틸, 4 내지 10 개의 탄소 원자를 갖는 1-(N-(알콕시카르보닐) 아미노)에틸, 3-프탈리딜, 4-크로토놀락토닐, 감마-부티로락톤-4-일, 디-N,N-(C1-C2) 알킬아미노(C2-C3)알킬 (예 : 디메틸아미노 에틸), 카르바모일-(C1-C2) 알킬, N,N-디 (C1-C2)-알킬카르바모일-(C1-C2)알킬 및 피페리디노-, 피롤리디노- 또는 모르폴리노 (C2 -C3) 알킬로 대체된다.

[0261] 다른 예시적인 전구약물은 본 발명의 화합물의 알코올 또는 아민을 방출하는데 여기서는 히드록실 또는 아민 치환기의 유리 수소가 (C1-C6)알카노일옥시메틸, 1 ((C1-C6) 알카노일옥시)에틸, 1-메틸-14 (C1-C6)알카노일옥시)에틸, (C1-C6) 알콕시카르보닐-옥시메틸, N-(C1-C6)알콕시카르보닐아미노-메틸, 숙시노일, (C1-C6)알카노일,

a-아미노(C1-C4) 알카노일, 아릴락틸 및 α-아미노아실 또는 α-아미노아실-α-아미노아실로 대체되며 여기서 α-아미노아실 모이어티는 독립적으로 단백질에서 발견되는 임의의 자연 발생적 L-아미노산, -P(O)(OH)2, -P(O)(O(C1-C6)알킬)2 또는 글리코실 (탄수화물의 헤미아세탈의 히드록실이 분리되어 생성되는 라디칼)이다.

[0262] 본 명세서에서 사용된 "보호기"라는 구절은 바람직하지 않은 화학적 변형으로부터 잠재적으로 반응성인 작용기를 보호하는 임시적 치환기를 의미한다. 이러한 보호기의 예는 각각 카르복실산의 에스테르, 알코올의 실릴 에테르, 및 알데히드 및 케톤 각각의 아세탈 및 케탈을 포함한다. 보호기 화학의 분야가 검토되었다(Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd ed.; Wiley: New York, 1991). 본 발명의 화합물의 보호된 형태는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0263] 본 명세서에서 사용된 용어 "화학적으로 보호된 형태"는 하나 이상의 반응성 작용기가 바람직하지 않은 화학 반응으로부터 보호되는, 즉 보호되는 또는 보호하는 기 (마스킹된 또는 마스킹하는 기로도 알려짐)의 형태인 화합물에 관한 것이다. 화학적으로 보호된 형태로 활성 화합물을 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 바람직할 수 있다.

[0264] 반응성 작용기를 보호함으로써, 다른 비보호된 반응성 작용기와 관련된 반응은 보호기에 영향을 주지 않고 수행될 수 있다: 보호기는 분자의 나머지 부분에 실질적으로 영향을 주지 않고 일반적으로 후속 단계에서 제거될 수 있다. 예를 들어, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green and P. Wuts, Wiley, 1991), and Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green and P. Wuts; 3rd Edition; John Wiley and Sons, 1999) 참조.

[0265] 예를 들어, 히드록시기는 에테르(-OR) 또는 에스테르(-OC(=O)R), 예를 들어, t- 부틸 에테르; 벤질, 벤즈히드릴(디페닐메틸), 또는 트리틸(트리페닐메틸) 에테르; 트리메틸실릴 또는 t-부틸디메틸실릴 에테르; 또는 아세틸 에스테르 (-OC(=O)CH3, -OAc)로 보호될 수 있다.

[0266] 예를 들어, 알데히드 또는 케톤 기는 각각 아세탈 또는 케탈로 보호될 수 있으며, 여기서 카르보닐 기(C(=O))는 예를 들어 1차 알코올과의 반응에 의해 디에테르 (C(OR)2)로 전환된다. 알데히드 또는 케톤 기는 산의 존재하에 과량의 물을 사용하여 가수 분해에 의해 쉽게 재생된다.

[0267] 예를 들어, 아민 기는 예를 들어 아미드 (-NRC(=O)R) 또는 우레탄 (-NRC(=O)OR), 예를 들어 메틸 아미드 (-NHC(=O)CH3); 벤질옥시 아미드 (-NHC(=O)OCH2C6H5NHCbz); t-부톡시 아미드 (-NHC=(=O)OC(CH3)3, -NHBoc); 2-비페닐-2-프로폭시 아미드 (-NHC(=O)OC(CH3)2C6H4C6H5NHBoc), 9 -플루오레닐메톡시 아미드 (-NHFmoc), 6-니트로베라트릴옥시 아미드 (-NHNvoc), 2-트리메틸실릴에틸옥시 아미드 (-NHTeoc), 2,2,2-트리클로로에틸옥시 아미드 (-NHTroc), 알릴옥시 아미드 (-NHAlloc), 2-(페닐술포닐)에틸옥시 아미드 (-NHPsec)로서; 또는 적합한 경우 (예를 들어, 시클릭 아민), 니트록시드 라디칼로서 보호될 수 있다.

[0268] 예를 들어, 카르복실산 기는 에스테르 또는 아미드, 예를 들어 벤질 에스테르; t- 부틸 에스테르; 메틸 에스테르; 또는 메틸 아미드로 보호될 수 있다. 예를 들어, 티올 기는 티오에테르 (-SR), 예를 들어 벤질 티오에테르; 또는 아세트아미도메틸 에테르 (SCH2NHC(=O)CH3)로 보호될 수 있다.

[0269] 화학적 보호기의 절단 또는 가수 분해에 의해 활성화되는 전구약물의 대표적인 예가 아래에 나타나 있다.

[0270] 저산소증-활성화되는 전구약물 (hypoxia-activated prodrugs)

[0271] 본 발명의 전구약물은 또한 저산소증-활성화되는 전구약물을 포함할 수 있다. 낮은 산소증 (저산소증) 영역은 질병 상태, 세균 감염 및 종양 환경을 포함하여 다양한 생물학적 상황의 영역에서 발생한다. 종양이 발생하는 동안 산소 공급은 급속하게 성장 제한 요소가 되는데 이는 대사적으로 활성인 종양 세포의 수가 많기 때문이다. 불충분한 산소 공급 문제에 대응하여 혈관 신생 과정이 시작되어 종양 혈관구조를 생성한다. 그러나, 이 혈관구조는 많은 비정상적인 특징을 가지고 있으며, 종양을 지속시킬 수 있지만 종양 세포의 가장 공격적인 부분만이 생존 할 수 있는 저산소증 영역을 초래한다. 이러한 저산소 영역은 기능성 혈관으로부터 100 μm 이상의 거리에서 발생하며 만성 및 급성일 수 있다. 저산소 세포는 세포 사멸에 필요한, 방사선에 의해 유발되는 DNA 손상이 산소 의존적 방식으로 발생하기 때문에 방사선 요법에 내성이 있다. 저산소 세포는 가장 공격적인 종양 분획을 포함하며 환자의 예후를 개선하기 위해 치료하는 것이 가장 중요하다. 본 발명의 약물 화합물을 이러한 치료적으로 어려운 종양 영역에 표적화하기 위하여 본 발명의 전구약물은 저산소증과 정상 산소증 사이의 화학적 환경의 실질적인 차이를 이용한다.

[0272] 본 명세서에 사용된 용어 "저산소증 활성화되는 전구약물" 또는 "HAP"는 전구약물이 상응하는 약물에 비해 덜

활성이거나 비활성이고 약물 및 하나 이상의 생환원성기를 포함하는 전구약물을 지칭한다. HAP는 단일 전자 전달 효소 (예 : 시토크롬 P450 환원 효소) 및 2 개의 전자 전달 (또는 수소화물 전달) 효소를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 환원제 및 환원 효소에 의해 활성화되는 전구약물을 포함한다. 일부 구체예에서, HAP는 2-니트로이미다졸 유발 저산소증-활성화되는 전구약물이다. HAP의 예에는 TH-302 및 TH-281이 포함되나 이에 제한되지 않는다. TH-302를 합성하는 방법은 US 2010/0137254 및 US 2010/0183742에 설명되어 있으며, 본원에 참조로 포함된다.

[0273] 본 발명의 표적 약물은 관련 분야 통상의 기술자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 저산소증 활성화되는 전구약물로 쉽게 전환될 수 있다. 예를 들어, O'Connor 등은 공지된 Chk1 및 Aurora A 키나제 억제제에 생환원성 4-니트로벤질기를 첨가하여 표적화 목표를 달성함으로써 Chk1 및 Aurora A 키나제 억제제의, 저산소증에 민감한 전구약물을 생성할 수 있음을 보여주었는데 이에 의해 저산소증 영역에 관련된 치료 화합물을 표적화한다는 목적을 달성하였다. 많은 저산소증 활성화되는 전구약물은 1-메틸-2-니트로이미다졸기를 생환원 작용기로 사용한다. 다섯 가지 다른 화학적 모이어티, 니트로기, 퀴논, 방향족 N-산화물, 지방족 N-산화물 및 전이 금속이 생환원에 민감한 것으로 확인되었다. 광범위한 사용을 감안할 때 니트로아릴계 화합물은 생환원성 전구약물의 개발에 사용하기에 가장 적합하다. 4-니트로벤질 및 1-메틸-2-니트로이미다졸기 외에도 니트로푸란- 및 니트로티오펜-계의 기들도 생환원성 화합물의 기초로 사용되었다. 원칙적으로, 어떠한 생환원기를 사용할 지 선택할 때에 가장 중요한 고려 사항은 생환원을 겪는 성향과 이 과정이 발생하는 산소 농도이다. 또한, 약물 성분이 우수한 이탈기(leaving group)가 되는 경향은 전구약물로부터의 방출 속도에서 중요한 역할을 한다. 4-니트로벤질, 니트로푸란- 및 니트로티오펜-계의 기를 생물학적으로 활성인 화합물에 부착하는 데에 필요한 시약은 시중에서 쉽게 구할 수 있다. O' Connor 등은 또한 생물학적으로 활성인 화합물에 대한 부착을 위한 유용한 합성 손잡이를 가진, 광범위한 유도체의 합성을 위한 최적화된 프로토콜을 설명한다 (O' Connor et al., *Nat Protoc. 2016 Apr; 11 (4):781-94*, 그 내용은 전체가 참조로 본 명세서에 포함됨).

[0274] Sun 등 (*Clin Cancer Res. 2012 Feb 1; 18 (3):758-70*, 그 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)은 최적화된 저산소증 활성화되는 전구약물에 대한 설계 기준을 설명하며, 적절한 종양 전달 및 침투; 산소 농도에 독립적인 활성화 또는 비활성화 환원 효소에 대한 안정성; 중등도 저산소성 정상 조직이 아닌 중증 저산소 종양 조직에서만 활성화되는 높은 저산소증 선택성 및 인접 종양 세포가 전구약물을 활성화하기에 충분히 저산소 상태가 아닌 경우에도 불구하고 확산성 효과자 모이어티에 의해 표적화되는 방관자 효과를 보장하기위한 약동학적 특성을 포함한다. 일부 초기 예들로는 포르피로마이신과 같은 퀴논 생환원성 약물, 티라파자민과 같은 N-산화물, 및 CI-1010과 같은 니트로방향족 제제를 포함한다. 임상 시험으로 진행된 전구약물의 예들로는 티라파자민, PR104, AQ4N, 및 TH-302 (28-31)을 포함한다. TH-302 (1-메틸-2-니트로-1H-이미다졸5-일)N, NO-비스(2-브로모에틸)디아미도포스페이트는 이소포스포라미드 머스타드의 브롬화 버전의 2-니트로이미다졸 결합 전구약물이다. TH-302의 2-니트로이미다졸 모이어티는 세포 내 1-전자 환원 효소의 기질이며, 깊은 저산소 상태에서 환원되면 Br-IPM을 방출한다. 인간 암 세포주를 사용하는 시험관 내(in vitro) 세포독성 및 클론생성 분석은 TH-302가 정상 산소 상태에서 세포 독성 활성이 거의없고 저산소 상태에서 세포 독성 효능이 크게 향상되었음을 보여준다. TH-302의 니트로이미다졸 모이어티는 표적 약물 화합물에 통합되어 본 발명의 전구약물 화합물을 생성할 수 있다.

[0275] Rui Zhu 등 (*J. Med. Chem. 2011, 54, 7720-7728*; 그 내용은 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨)은 저산소증 활성화되는 전구약물 화합물의 개발을 위한 모이어티로서 4-니트로벤질옥시카르보닐 유도체의 사용을 기재하고 있다. Rui Zhu 등은 저산소증 민감성 또는 저산소증 활성화 전구약물을 생성하기 위해 표적 약물에 부착될 수 있는 3 개의 상이한 모이어티를 개시한다. 여기에는 4-니트로벤질(6-(벤질옥시)-9H-푸린-2-일)카르바메이트 (1) 및 그것의 모노메틸 (2) 및 젬-디메틸 유사체가 포함된다. Rui Zhu는 또한 전구약물 생성에 사용되는 모이어티를 선택하기 위한 바람직한 특성에 대해 교시한다. 여기에는 (a) 니트로기의 환원의 용이성과 정도, (b) 측쇄에 대한 니트로기의 상대적 위치, 및 (c) CO 결합의 단편화 용이성이 포함되며, 여기서 일단 니트로기가 히드록실아미노 또는 아미노 작용기로 전환된다면 C는 벤질 탄소이다.

[0276] 종양 미세 환경에서 발견되는 저산소증에 의해 활성화되는 전구약물의 몇가지 대표적인 예는 아래와 같다.

[0277] <u>pH-민감성 전구약물(pH Sensitive Pro-Drugs)</u>

[0278] 본 발명의 전구약물은 또한 pH-민감성 전구약물을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "pH-민감성 전구약물"은 전구약물이 상응하는 약물에 비해 덜 활성 또는 비활성이고 약물 및 하나 이상의 pH 불안정기를 포함하는 전구약물을 지칭한다. 산성 미세 환경에 노출되었을 때 pH-민감성 전구약물은 pH 불안정기의 절단을 거쳐 표적

약물을 활성화하고 부위 지정 방출을 촉진한다. pH-민감성 전구약물은 하나 이상의 pH-민감성 모이어티 및 치료제를 포함하는 경구 투여에 적합한 위장 유지 특성을 포함할 수 있으며, 여기서 pH-민감성 모이어티는 소장 또는 산성 종양 미세 환경 또는 엔도좀 또는 리소좀 환경 (~pH 5)의 증가된 pH에서 치료 표적 약물의 방출을 허용한다.

[0279] pH-촉발되는 약물(pH-triggered drug) 방출은 암에 대한 저명한 유형의 치료법이며 광범위하게 이용되었다. 암세포의 엔도좀 (pH 5.0-6.5) 및 리소좀 (pH 4.5-5.0)의 pH 값은 생리학적 pH인 7.4보다 더 산성인 것으로 잘 알려져 있다. pH-민감성 결합을 도입하면 표적 약물이, 암세포에 내재화 될 때 저장소 역할을 할 수 있는 폴리머 주골격에 결합될 수 있다. 분해시에 치료제 탑재물은 원래의 활성 형태로 직접 방출되어 치료 효과를 제공한다.

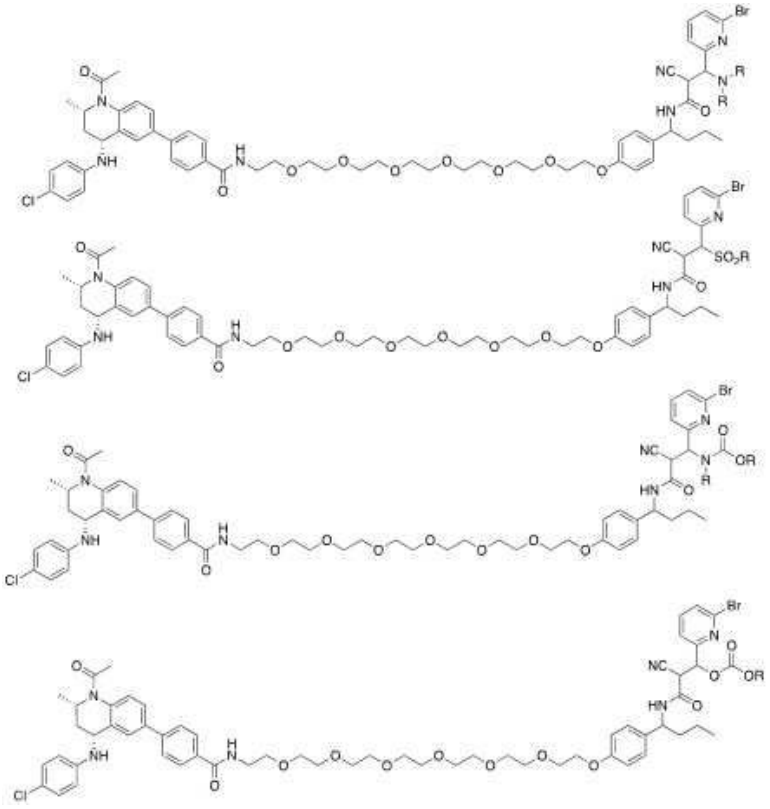
[0280] 근적외선 (NIR) 광을 이용한 광열 요법 (Photothermal therapy, PTT)은 암 조직 파괴에 결합 효과를 제공하는 화학 요법의 강력한 보충법으로 간주되어 왔다. 또한 PTT에서 발생하는 열은 세포 대사와 세포막의 투과성을 강화시켜 암세포의 약물 흡수를 촉진하여 치료 효과를 높일 수 있다.

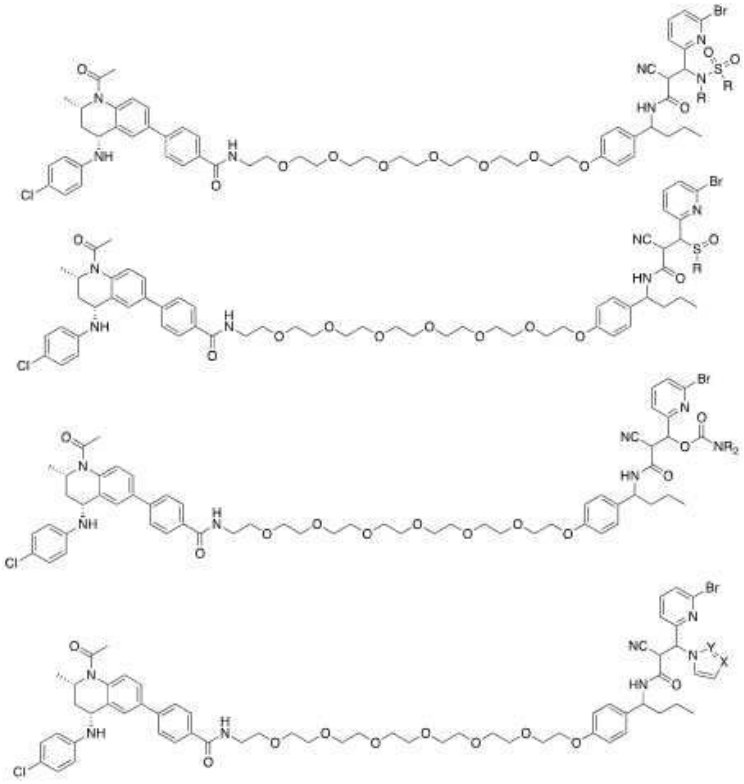
[0281] 본 발명의 표적 약물은 관련분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 기술을 사용하여 pH-민감성 전구약물로 쉽게 전환될 수 있다. 예를 들어, Sun et al.,(*Mol. Pharmaceutics 2018, 15, 3343-3355*; 그 전체 내용은 본 명세서에 참조로 포함됨)는 암세포에 DOX (독소루비신) 및 SN38 (7-에틸-10-히드록실 캄프토테신)의 동시전달을 위해 목적단백질이 없고(cargo-free) pH에 반응하는 나노 의약을 제조하는 간단한 방법을 설명한다. 이 목적단백질 부재(cargo-free) 나노 의약은 전구약물 (PEG-CH = N-DOX) 및 SN38로 구성되었다. PEG와 DOX 사이의 pH-민감성 모이어티 또는 이민 링커는 산성 조건에서 신속한 약물 방출을 촉진했다. 이러한 pH-민감성 전구약물은 향상된 투과성 및 체류 (EPR) 효과를 통해 효과적인 세포 흡수 능력, 높은 종양 침투 능력, 및 향상된 수동적 표적화 능력을 나타낸다. 이러한 pH-민감성 이민 링커는 관련분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 합성 화학 공정을 사용하여 pH-민감성 전구약물을 생성하기 위해 본 발명의 표적 약물에 부착될 수 있다.

[0282] 유사하게, Zhang 등(*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 128 (2018) 260-271*, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함됨)은 NIR-유발 시너지 화학-광열 요법을 위해 pH-민감성 전구약물 접합된 폴리도파민을 설명한다. 화학 요법과 광열 요법 (PTT)의 조합은 종양의 효율적인 치료에 매우 바람직하다는 것을 보여준다. Zhang 등은 캄프토테신 (CPT) 함유 폴리머 전구약물 (PCPT)이 가역적 첨가-단편화 전이 (RAFT) 전략을 사용하여 pH-민감성 캄프토테신 (CPT) 전구약물 모노머 및 MPC의 중합에 의해 제조될 수 있음을 교시한다. pH-민감성 폴리머 전구약물은 화학 요법과 광열 요법의 조합을 위해 아미드화 화학에 의해 폴리 도파민 (PDA) 나노입자의 표면에 묶여 있다. 산성 미세 환경에서 다기능성 나노 입자로부터 빠르게 방출된 활성 CPT는 이중작용성 실릴 에테르 결합의 절단에 기인한다. 한편, PDA는 근적외선 (NIR) 광 에너지를 높은 효율의 열로 변환할 수 있는데, 이는 결과적으로 생성된 나노 입자를 광열 요법을 위한 효과적인 플랫폼이 되도록 한다. 시험 관내(in vitro) 분석은 PDA @ PCPT 나노 입자가 HeLa 세포에 의해 효율적으로 흡수되고 CPT를 암 세포의 핵으로 전달할 수 있음을 확인했다. 세포 생존력 분석은 808 nm 광 조사 하에서 HeLa 암 세포에 대해 명백한 시험관 내 세포 독성을 나타낸다. PDA@PCPT 나노 입자로부터 제공되는 조합 요법으로 종양 보유 마우스 모델에서도 유의적인 종양 퇴행이 관찰되었다.

[0283] 본 발명의 표적 약물로부터 생성된 본 발명의 pH-민감성 전구약물은 다음과 같은 특징을 나타낼 것이다. (1) 전구약물 기반의 폴리머좀은 조기 방출 문제를 회피한다; (2) 약물 담체 역할 외에도 PDA 코어는 고유한 광 안정성과 우수한 광열 변환 효율을 가지고 있다; (3) 본 발명의 표적 약물은 pH-민감성 실릴 에테르 결합을 통해 폴리머에 연결될 것이며, 이는 낮은 pH 하, 특히 암세포의 미세환경 하에서 절단될 수 있다; 및 (4) 생산된 국소 고열과 방출된 약물은 상승적으로 암세포를 죽이고 종양 성장을 억제할 수 있다. 따라서, 관련 분야의 통상의 기술자는 pH 불안정 링커 또는 실릴 에테르 결합 또는 이민 링커와 같은 pH 불안정 모이어티를 표적 약물에 부착함으로써 관련 분야의 통상의 기술자에게 알려진 표준 합성 화학 공정을 사용하여 pH-민감성 전구약물을 생산할 수 있다.

[0284] 종양 미세환경 또는 리좀 또는 엔도좀에서 발견되는 pH 변화에 의해 활성화되는 전구약물의 몇 가지 대표적인 예가 아래에 나타나 있다. 전구약물의 다른 예는 활성화된 이중 결합 (Michael 수용체로서)이 대사 활성화에 참여하는 것을 나타낼 수 있다. 예로는 만니히 염기, 베타 술폰, 술폭시드 또는 술폰아미드 유도체, 베타 카르바메이트 및 카르보네이트 유도체 및 전자 수용기(electron withdrawing group)에 대한 기타 베타 이탈기를 포함한다.

[0285] 

[0286] 

[0287] 용어 "환자"및 "대상"은 본 발명에 따른 조성물로 예방적 치료를 포함하여 치료가 제공되는 포유 동물, 특정 구체예에서는 인간 또는 가축을 설명하기 위해 명세서 전체를 통틀어 상호 교환적으로 사용된다. 특정 구체예에서, 본 발명에서, 환자란 용어는 용어 사용의 맥락에서 달리 언급되거나 암시되지 않는 한 인간 환자를 지칭한다.

[0288] 용어 "유효한"은 의도된 용도의 맥락 내에서 사용될 때 의도된 결과에 영향을 미치는 화합물, 조성물 또는 성분의 양을 설명하기 위해 사용된다. 유효라는 용어는 본 출원에서 달리 기술되거나 사용되는 다른 모든 유효량

또는 유효 농도 용어를 포함한다.

[0289] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 다음 참고 문헌은 통상의 기술자에게 본 발명에서 사용되는 많은 용어의 일반적인 정의를 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Clossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본 명세서에서 사용된 다음 용어는 달리 명시되지 않는 한 하기로서 부여된 의미를 갖는다.

[0290] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한 (예를 들어, 그 범위 내에 들어오는 개개의 탄수 원자수가 제공되는 많은 탄소 원자를 포함하는 기의 경우와 같이) 각각의 중간의 값(intervening value)은 그 범위의 상한 및 하한 사이에서 하한 단위의 10 분의 1까지이며 그 서술된 범위 내에서 다르게 서술되거나 중간의 값은 본 발명 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있으며, 언급된 범위에서 특별히 제외된 제한에 따라 역시 본 발명에 포함된다. 명시된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 포함된 한계 둘 중 하나를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다.

[0291] 본 발명은 본 발명에 대한 다음의 상세한 설명 및 여기에 포함된 실시예를 참조하여 보다 쉽게 이해될 수 있다.

[0292] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물은 간행물이 인용되는 방법 및/또는 자료를 개시하고 설명하기 위해 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 그것의 공개한 것에 대해서만 제공된다. 본 명세서의 어떠한 것도 선행 발명으로 인해 본 발명이 그러한 간행물보다 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 또한, 여기에 제공된 게시 날짜는 실제의 게시 날짜와 다를 수 있는 바 독립적인 확인이 필요할 수 있다.

[0293] **UchL5 결합 파트너**

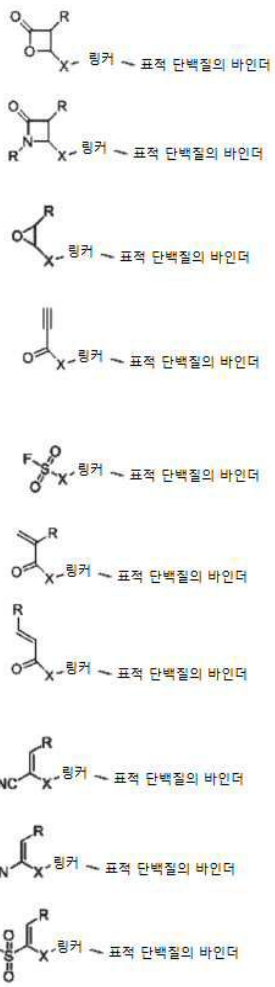
[0294] 본 발명의 UchL5 결합 파트너는 1pM-1mM 범위, 또는 그 하위 범위 100nM-100μM, 100nM-1μM, 100nM-10μM, 10nM-100μM, 10nM-50μM 10nM-10μM, 10nM-5μM, 10nM-1μM, 10nM-100nM, 1nM-100μM, 1nM-10μM, 1nM-1μM, 1nM-100nM, 1nM-10nM, 1μM-100 μM 및 1μM-10 μM의 IC50으로 UchL5에 결합한다. IC50은 당해 기술분야에 잘 알려진 방법, 예를 들어 유비퀴틴-로다민 110 가수 분해 분석에 따라 결정된다.

[0295] 본 발명의 UchL5 결합 파트너 및 UchL5의 Kd는 1pM-1mM 범위, 또는 그 하위 범위 M-100μM, 100nM-1μM, 100nM-10 μM, 10nM-100μM, 10nM-50μM, 10nM-10μM, 10nM-5μM, 10nM-1μM, 10nM-100nM, 1nM-100μM, 1nM-10μM, 1nM-1μM, 1nM-100nM, 1nM-10nM, 1μM-100 μM 및 1μM-10 μM에 있다. Kd는 예를 들어, 결합을 직접 평가하기 위한 등온 열량계 (ITC) 및 표면 플라스몬 공명 (SPR)과 같이 당해 기술분야에 잘 알려진 방법에 따라 결정된다.

[0296] UchL5에 대한 UchL5 결합 파트너의 결합은 가역적일 수 있다.

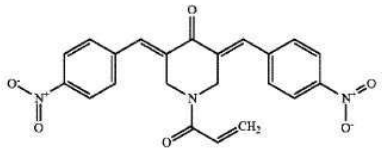
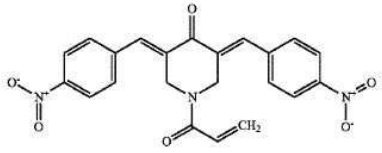
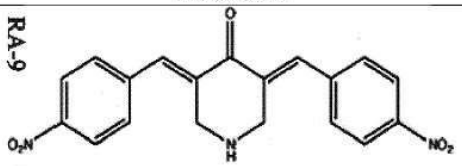
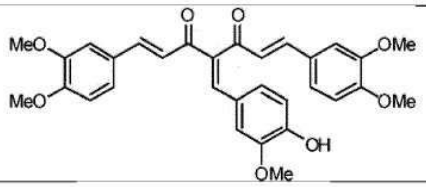
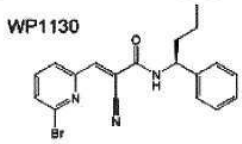
[0297] UchL5에 대한 UchL5결합 파트너의 결합은 비가역적일 수 있다.

[0298] 아래에 제시된 구조는 제 1 및 제 2 결합 파트너의 공유결합을 허용하여 본 발명에 따른 이중작용성 분자를 생성한다: 아래 제시된 구조에서, X는 UchL5 결합 파트너를 나타낸다.

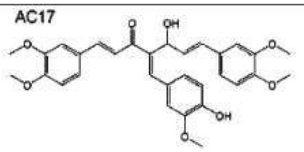
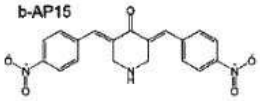
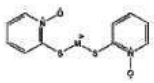
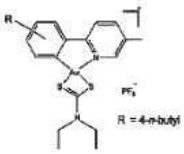
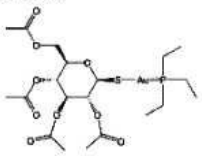
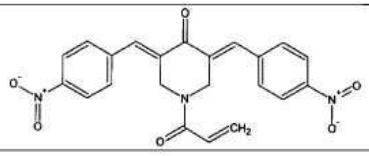

링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더
링커 — 표적 단백질의 바인더

[0299]

[0300] [표 1] - UchL5 결합 파트너에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.

간행물	개시된 화합물
US 2014/0370528	 b-AP15 (NSC687852)
US 9856511	 b-AP15 (NSC687852)
Coughlin et al. Clin Cancer Res. 2014 Jun 15;20(12):3174-86.	 RA-9
Zhou et al. Mol Cancer Ther. 2013 Aug;12(8):1381-92.	
Chen et al. Cancer Metastasis Rev. 2017 Dec;36(4):655-668.	 WP1130

[0301]

	AC17  b-AP15  "Metal" PT (M=Cu, Zn, Pt, Ni)  AUIII  auranofin 
WO 2013058691	

[0302]

[0303] 본 발명은 또한 항-UchL5 항체 및 이의 단편인 UchL5 결합 파트너, Fv 항체, 디아 바디, VH 및/또는 VL 도메인 항체와 같은 단일 도메인 항체, 및 항체 단편을 이들이 원하는 생물학적 활성(UchL5에 결합)을 나타내는 한 제공한다. 항체는 예를 들어 온전한 면역 글로불린 또는 다양한 펩티다제의 소화에 의해 생성된 다수의 잘 특성화된 단편으로 존재한다. 따라서, 예를 들어, 펩신은 힌지 영역에서 이황화 결합 아래에서 항체를 분해하여, 그 자체가 이황화 결합에 의해 VH-CH1에 연결된 경쇄인 Fab의 다이머인 F (ab)' 2를 생성한다. F (ab)'2는 온화한 조건 하에서 환원되어 힌지 영역에서 이황화 결합을 끊어 F (ab)' 2 다이머를 Fab' 모노머로 전환할 수 있다. Fab'모노머는 필수적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다 (Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993). 다양한 항체 단편이 온전한 항체의 소화의 측면에서 정의되지만, 통상의 기술자는 이러한 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새로 합성될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 명세서에 사용된 항체라는 용어는 또한 전체 항체의 개질에 의해 생성된 항체 단편, 또는 재조합 DNA 방법론 (예를 들어, 단일 사슬 Fv)을 사용하여 새로 합성 된 것 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 확인된 것 (예를 들어, McCafferty et al, *Nature 348 : 552-554 (1990)* 참조)을 또한 포함한다.

[0304] 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 항체를 포함하는 이중작용성 분자는 예를 들어 Tsuchikama et al.,(*2018, Protein Cell, 9 (1):33-46*)에서 제공된 바와 같이 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0305] 본 발명에 따라 유용한 항-UchL5 항체, 또는 이러한 항체의 단편은 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:

[0306] **항-UCHL5 항체인 UCHL5 결합 파트너**

생성물	회사	카탈로그 번호
항 -UCHL5/Uch37 항체	BosterBio	A04276
UCHL5 항체-중간 영역	Aviva 시스템 생물학	ARP56797_P050
항 -UCHL5 항체	항체 온라인	ABIN1882286
UCHL5 항체	Fitzgerald Industries International	70R-9729
항 -UCHL5 항체	세인트 존스 연구소	STJ110285
UCHL5 항체	Biorbyt	오브 166588
Mouse monoclonal UCH37 (UCHL5) 항체 (N-term)	OriGene 기술	TA325168
UCHL5 항체	BioVision	6129-50
UCHL5 항체	ProSci, Inc.	60-847
항 -UCHL5 항체	GeneTex	GTX131407
항 -UCHL5/UCH37 항체	LifeSpan BioSciences	LS-C401325-120
안티 -UCHL5	Atlas 항체	HPA075383
UCHL5 항체	Signalway 항체	36168
UCH37 (UCHL5) 항체 (N-term)	MyBioSource.com	MBS9200578
UCH37 항체 (UCHL5)	NSJ Bioreagents	F47955
UCH37 항체/UCHL5 (Mouse Monoclonal)	NSJ Bioreagents	F52271
UCHL5 항체	Abclonal	A7978
UCHL5 폴리 클로 날 항체	Abnova Corporation	PAB3907
UCHL5 정제 된 MaxPab 마우스 폴리 클로 날 항체 (B02P)	Abnova Corporation	H00051377-B02P
마우스 반 인간 UCH37 (UCHL5) (N-term)	Raybiotech, Inc.	102-10419
UCHL5 항체	Proteintech 그룹	11527-1-AP
Ubiquitin Carboxyl Terminal Hydrolase L5 (UCHL5) 폴리 클로 날 항체	Biomatik	CAU22122
UCH37 항체 N- 말단 영역	Aviva 시스템 생물학	OAAB15729

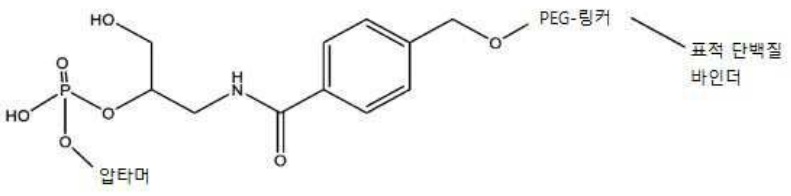
[0307]

UCHL5 폴리 클로 날 항체	Amsbio	ESAP14951
UCH37 (854CT5.5.6) 항체	Bioss Inc.	bsm-51223M
Human Ubiquitin Thioesterase L5 (UCH-L5) 항체	AssayPro	31358-05111

[0308]

[0309] 본 발명은 또한 압타머인 UchL5 결합 파트너를 제공한다 (Lee et al. "Isolation and Characterization of RNA Aptamers against a Proteasome-Associated Deubiquitylating Enzyme UCH37."(*Chembiochem. 2017 Jan 17; 18 (2) : 171-175*)참조) . 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5에 결합하는 압타머를 포함하는 이중작용성 분자는 예를 들어 Wang et al., dx.doi.org/10.1021/ja4117395/ *(2014, J. Am. Chem. Soc. 136, 2731-2734).*에서 제공된 바와 같이 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다

[0310] 하나의 구체예에서, 링커를 통해 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너, 즉 압타머를 포함하는 이중작용성 분자는 하기에 나타낸 일반적인 구조를 갖는다:



[0311]

[0312] 본 발명은 또한 예를 들어 U.S. 9,670,482에 기재된 바와 같이, 바이사이클 또는 다중특이적 펩티드 분자인

UchL5 결합 파트너를 제공한다. 이러한 바이사이클릭 펩타이드 분자는 저 분자량 (1.5-2kDa)이고 유연하며 화학적으로 합성된다.

[0313] **표적 단백질 결합 파트너**

[0314] 표적 단백질 결합 파트너는 위에서 설명한 바와 같이 친화성 또는 Kd로, 선택된 표적 단백질에 결합하는 분자(단백질, 펩티드, 단백질의 리간드, DNA 또는 RNA 또는 결합된 DNA/RNA 분자와 같은 핵산)이다.

[0315] 용어 "**표적 단백질 결합 파트너**"는 표적 단백질에 결합하는 분자, 예를 들어 소분자, 항체, 압타머, 펩티드, 표적 단백질의 리간드를 포함한다. 표적 결합 파트너는 링커를 통해 UchL5 결합 파트너에 직접 공유적으로 링크되거나 연결되어 표적 단백질의 분해를 촉진하는 이중작용성 분자를 형성한다.

[0316] 본 발명에 따른 표적 단백질 결합 파트너는 단백질에 결합하고 소분자일 수 있다. 주어진 표적 단백질의 활성을 억제하는 것으로 알려진 소분자는 본 발명에 따라 유용하며 키나제 억제제, 인간 BET 브로모 도메인-함유 단백질을 표적화하는 화합물, Hsp90 억제제, HDM2 및 MDM2 억제제, HDAC 억제제, 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제, 혈관 신생 억제제, 핵 호르몬 수용체 화합물, 면역 억제 화합물, 및 아릴 탄화수소 수용체 (AHR)를 표적으로하는 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 유용한 예시적인 소분자 억제제 표적 단백질 모이어티가 아래에 제공된다.

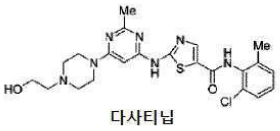
[0317] 표적 단백질 파트너는 또한 관심 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"(Ab)는 그것이 원하는 결합 활성을 나타내는 한에서 단일 클론 항체, 다중 클론 항체, 다중 특이적 항체 (예 : 이중 특이적 항체), 인간화 또는 인간 항체, Fv 항체, 디아바디, 단일 도메인 (VH, VL 도메인) 항체, 및 항체 단편을 포함한다. "항체"는 단백질의 에피토프에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 의미한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되며, 이들은 차례로 면역 글로불린의 종류인 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 각각 정의한다.

[0318] 항체는 예를 들어 온전한 면역 글로불린 또는 다양한 펩티다제로의 소화에 의해 생성된 다수의 잘 특성화된 단편으로 존재한다. 따라서, 예를 들어, 펩신은 힌지 영역에서 이황화 결합 아래에서 항체를 소화하여 그 자체가 이황화 결합에 의해 VH-CH1에 연결된 경쇄인 Fab의 다이머인 F(ab)'2를 생성한다. F(ab)'2는 온화한 조건 하에서 환원되어 힌지 영역에서 이황화 결합을 끊어 F(ab)' 2 이량체를 Fab'모노머로 전환할 수 있다. Fab'모노머는 필수적으로 힌지 영역의 일부를 갖는 Fab이다 (Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993). 다양한 항체 단편이 온전한 항체의 소화 측면에서 정의되지만, 통상의 기술자는 이러한 단편이 화학적으로 또는 재조합 DNA 방법론을 사용하여 새로 합성될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 명세서에 사용된 용어 항체는 또한 전체 항체의 변형에 의해 생성된 항체 단편, 또는 재조합 DNA 방법론 (예를 들어, 단일 사슬 Fv)을 사용하여 새로 합성된 것 또는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 확인된 것 (예를 들어 , McCafferty et al, 1990, *Nature, 348 : 552-554*)을 포함한다.

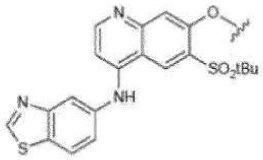
[0319] 본 발명은 또한 할로알킬기인 표적 단백질 결합 파트너를 제공하는데, 여기서 알킬기는 일반적으로 크기가 약 1 또는 2 개의 탄소 내지 약 12 개의 탄소 길이, 예를 들어 2 내지 10 개의 탄소 길이, 3 개의 탄소 내지 약 8 개의 탄소 길이, 4 개의 탄소 내지 약 6 개의 탄소 길이이다. 할로알킬기는 일반적으로 선형 알킬기(분지쇄 알킬기도 사용될 수 있음)이며, 하나 이상의 할로겐기, 바람직하게는 단일 할로겐기, 종종 단일 염화물기로 말단 캡핑되어 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 기인 할로알킬 PT는 바람직하게는 화학 구조-(CH2)v-Halo로 표시되며, 여기서 v는 2 내지 약 12, 종종 약 3 내지 약 8, 더 자주로는 약 4 내지 약 6의 정수이다. Halo는 할로겐일 수 있지만 바람직하게는 Cl 또는 Br이고, 더 자주로는 Cl이다.

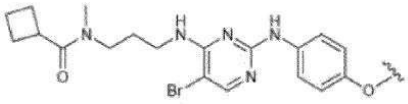
[0320] 본 발명은 또한 표적 단백질 결합 파트너의 약학적으로 허용되는 염, 거울상 이성질체, 용매화물 및 다형체(polymorphs)를 포함한다.

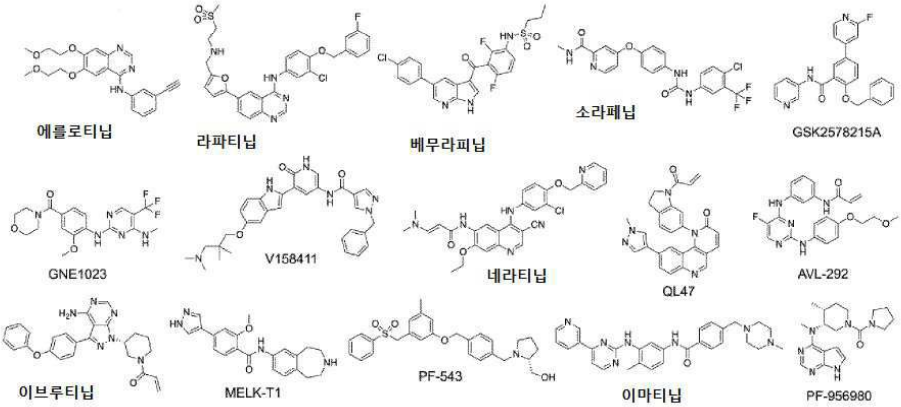
[0321] 키나제 억제제인 표적 단백질 결합 파트너는 아래 제시된 분자 및 이의 유도체 중 어느 하나를 포함하나 이에 제한되지는 않는다:



다사티닙



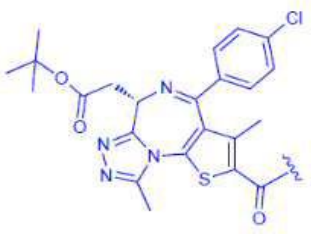




[0322]

[0323] Jones et al. Small-Molecule Kinase downregulators *(2017, Cell Chem. Biol., 25 : 30-35)* 참조.

[0324] BET 단백질을 표적으로하는 표적 단백질 결합 파트너는 아래 표시된 분자 및 이의 유도체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:



[0325]

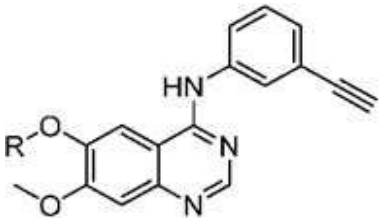
[0326] JQ1

[0327] 추가적인 BET 억제제는 Romero, F.A.,Taylor,A.M., Crawford, T.D., Tsui, V., Cote, A., Magnuson, S. *Disrupting Acetyl-Lysine Recognition: Progress in the Development of Bromodomain Inhibitors (2016 J. Med. Chem., 59 (4), 1271-1298).* 에 기술되어 있다.

[0328] **L. 키나제 및 포스페이타제 억제제 :**

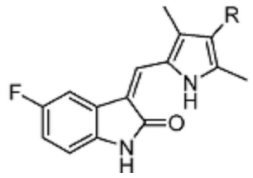
[0329] 본 명세서에 사용된 키나제 억제제는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:

[0330] 1. 에를로티닙 유도체 티로신 키나제 억제제:

[0331] 

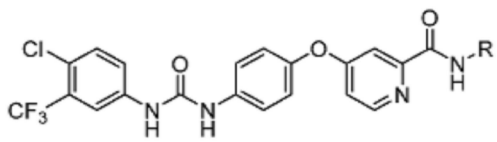
[0332] 여기서 R은 예를 들어 에테르기를 통해 부착된 링커이다;

[0333] 2. 키나제 억제제 수니티닙 (유도체화됨):

[0334] 

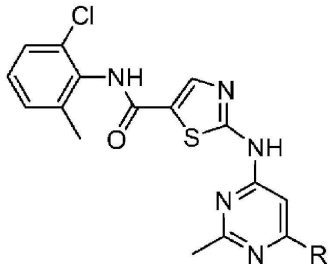
[0335] (R이 예를 들어 피롤 모이어티에 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0336] 3. 키나제 억제제 소라페닙 (유도체화됨):

[0337] 

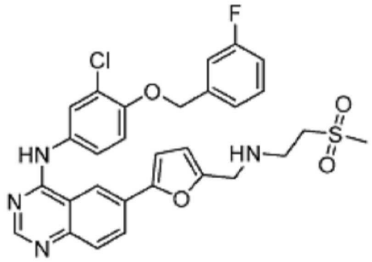
[0338] (R이 예를 들어 아미드 부분에 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0339] 4. 키나제 억제제 데사티닙 (유도체화됨):

[0340] 

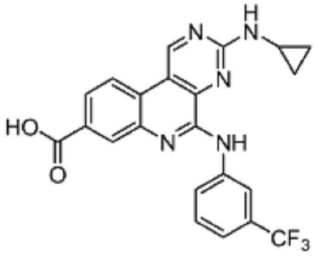
[0341] (R이 예를 들어 피리미딘에 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0342] 5. 키나제 억제제 라파티닙 (유도체화됨):

[0343] 

[0344] (예를 들어, 술포닐 메틸기의 말단 메틸을 통해 링커가 부착되어 유도체화됨);

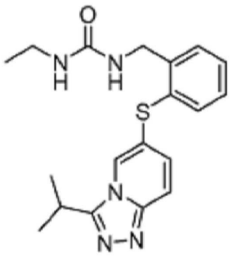
[0345] 6. 키나제 억제제 U09-CX-5279 (유도체화됨):



[0346]

[0347] 예를 들어 아민 (아닐린), 카르복실산 또는 아민 알파를 통해 시클로프로필기, 또는 시클로프로필기에 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0348] 7. Millan, et al., Design and Synthesis of Inhaled P38 Inhibitors for Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *(2011,] MED.CHEM. 54:7797),*에서 확인 된 키나제 억제제로서 다음 구조를 갖는 키나제 억제제 Y1W 및 Y1X (유도체화됨) 포함:

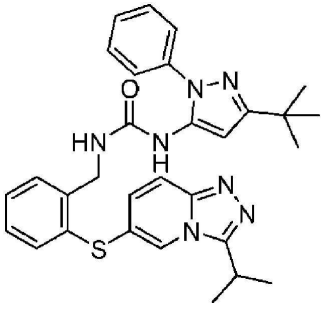


[0349]

[0350] YIX

[0351] (1-에틸-3-(2-{[3-(1-메틸에틸)[1,2,4]트리아졸로[4,3-a]피리딘-6-일]설파닐}벤질)우레아

[0352] 예를 들어, i프로필기를 통해 링커가 부착되어유도체화됨;



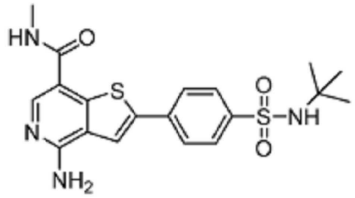
[0353]

[0354] Y1W

[0355] 1-(3-tert-부틸-1-페닐-1H-피라졸-5-일)-3-(2-{[3-(1-메틸에틸)[1,2,4]트라이아졸로[4,3-a]피리딘-6-일]설파닐}벤질)우레아

[0356] 예를 들어 바람직하게는 i-프로필기 또는 t-부틸기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0357] 8. Schenkel, et al., Discovery of Potent and Highly Selective Thienopyridine Janus Kinase 2 Inhibitors *(2011, J. Med. Chem., 54 (24):8440-8450)*에서 확인된 키나제 억제제로서 다음 구조를 갖는 화합물 6TP 및 OTP (유도체화됨) 포함:

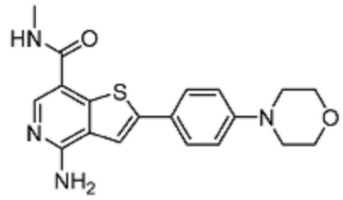


[0358]

[0359] 6TP

[0360] 4-아미노-2-[4-(tert-부틸술파모일)페닐]-N-메틸티에노[3,2-c]피리딘-7-카르복사미드 티에노피리딘 19

[0361] 예를 들어 아미드 모이어티에 결합된 말단 메틸기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨;



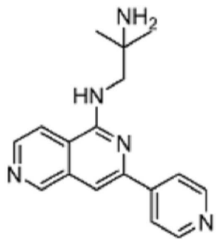
[0362]

[0363] 0TP

[0364] 4-아미노-N-메틸-2-[4-(모르폴린-4-일)페닐]티에노[3,2-c]피리딘-7-카르복사미드 티에노피리딘 8

[0365] 예를 들어 아미드 모이어티에 결합된 말단 메틸기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0366] 9. Van Eis, et al., "2,6-Naphthyridines as potent and selective inhibitors of the novel protein kinase C isozymes", *(2011 Dec., Biorg. Med. Chem. Lett.,15,21(24):7367-72)*에서 확인되는 키나제 억제제로서, 다음 구조를 갖는 키나제 억제제 07U 포함:



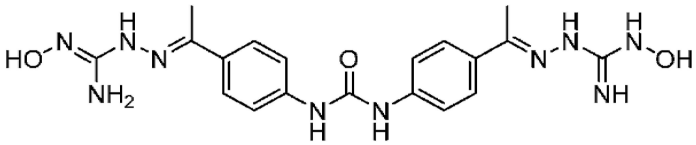
[0367]

[0368] 07U

[0369] 2-메틸-N-1-[3-(피리딘-4-일)-2,6-나프티리딘-1-일]프로판-1,2-디아민

[0370] 예를 들어, 2 차 아민 또는 말단 아미노기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨;

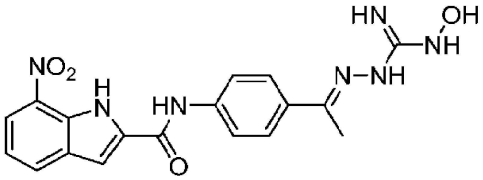
[0371] 10. Lountos, et al., "Structural Characterization of Inhibitor Complexes with Checkpoint Kinase 2 (Chk2), a Drug Target for Cancer Therapy", *(2011, J. Struct.. Biol.,*176:292*)*에서 확인되는 키나제 억제제로서, 다음 구조를 갖는 키나제 억제제 YCF 포함:



[0372]

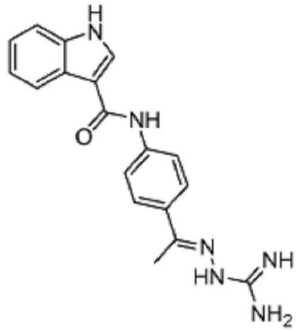
[0373] 예를 들어, 말단 히드록실기 중 하나를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0374] 11. Lountos, et al., "Structural Characterization of Inhibitor Complexes with Checkpoint Kinase 2 (Chk2), a Drug Target for Cancer Therapy", *(2011, J. Struct. Biol.176292)*에서 확인되는 키나제 억제제로서, 다음 구조를 갖는 키나제 억제제 XK9 및 NXP (유도체화됨) 포함:

[0375] 

[0376] XK9

[0377] N-{4-[(1E)-N-(N-히드록시카르바미미도일)에탄히드라조노일]페닐}-7-니트로-1H-인돌-2-카르복사미드;

[0378] 

[0379] NXP

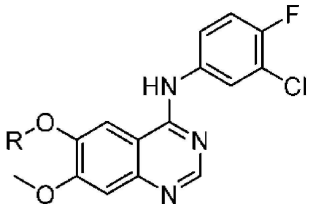
[0380] N-{4-[(1E)-N-카르바미미도일에탄히드라조노일]페닐}-1H-인돌-3-카르복사미드

[0381] 예를 들어, 말단 히드록실기(XK9) 또는 히드라존기(NXP)을 통해 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0382] 12. 키나제 억제제 아파티닙 (유도체화됨) (N-[4-[(3-클로로-4-플루오로페닐)아미노]-7-[[(3S)-테트라히드로-3-푸라닐]옥시]-6-퀴나졸리닐]-4(디메틸아미노)-2-부텐아미드)(예를 들어, 지방족 아민기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨);

[0383] 13. 키나제 억제제 포스타마티닙 (유도체화됨) ([6-({5-플루오로-2-[(3,4,5-트리메톡시페닐)아미노]피리미딘-4-일}아미노)-2,2-디메틸-3-옥소-2,3-디히드로-4H-피리도[3,2-b]-1,4-옥사진-4-일]메틸인산이나트륨6수화물) (예를 들어, 메톡시기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨);

[0384] 14. 키나제 억제제 게피티닙 (유도체화됨) (N-(3-클로로-4-플루오로-페닐)-7-메톡시-6-(3-모르폴린-4-일프로폭시)퀴나졸린-4-아민):

[0385] 

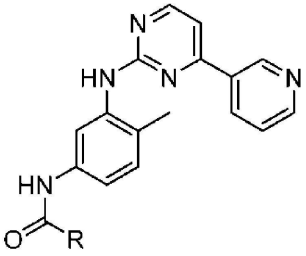
[0386] (예를 들어 메톡시 또는 에테르기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨);

[0387] 15. 키나제 억제제 렌바티닙 (유도체화됨) (4-[3-클로로-4-(시클로프로필 카르바모일아미노)페녹시]-7-메톡시-퀴놀린-6-카르복사미드) (예를 들어, 시클로프로필기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨);

[0388] 16. 키나제 억제제 반데타닙 (유도체화됨) (N-(4-브로모-2-플루오로페닐)-6-메톡시-7-[(1-메틸피페리딘-4-일)메톡시]퀴나졸린-4-아민) (예를 들어, 메톡시 또는 히드록실기를 통해 링커가 부착됨);

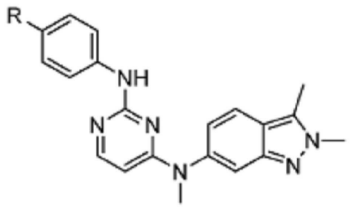
[0389] 17. 키나제 억제제 베무라페닙 (유도체화됨) (프로판-1-술폰산{3-[5-(4-클로로페닐)-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-카르보닐]-2,4-디플루오로-페닐}-아미드) (예를 들어, 술포닐 프로필기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨,);

[0390] 18. 키나제 억제제 글리벡(Gleevec) (이마티닙이라고도 알려짐) (유도체화됨):

[0391] 

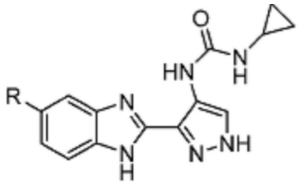
[0392] (R은 예를 들어 아미드기 또는 아닐린 아민기를 통해 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0393] 19. 키나제 억제제 파조파닙 (유도체화됨) (VEGFR3 억제제) :

[0394] 

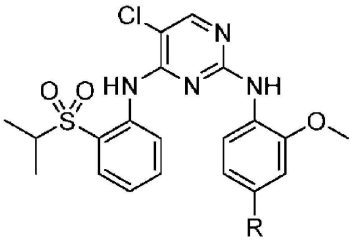
[0395] (R은 예를 들어 페닐 모이어티에 또는 아닐린 아민기를 통해 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0396] 20. 키나제 억제제 AT-9283 (유도체화됨) Aurora 키나제 억제제

[0397] 

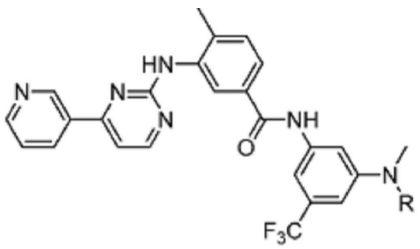
[0398] (R은 예를 들어 페닐 모이어티에 부착된 링커임);

[0399] 21. 키나제 억제제 TAE684 (유도체화됨) ALK 억제제

[0400] 

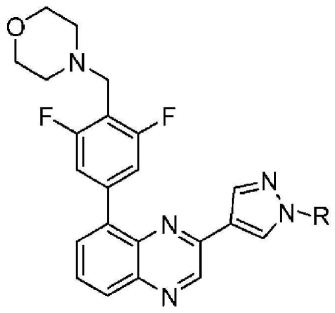
[0401] (R은 예를 들어 페닐 모이어티에 부착된 링커임);

[0402] 22. 키나제 억제제 닐로타닙 (유도체화됨) Abl 억제제:

[0403] 

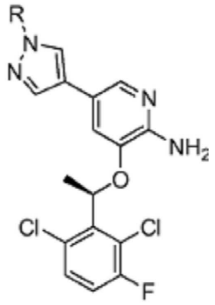
[0404] (R은 예를 들어 페닐 모이어티 또는 아닐린 아민기에 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0405] 23. 키나제 억제제 NVP-BSK805 (유도체화됨) JAK2 억제제

[0406] 

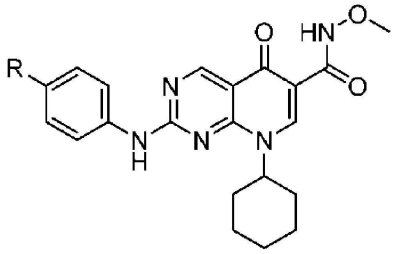
[0407] (R은 예를 들어 페닐 모이어티 또는 디아졸기에 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0408] 24. 키나제 억제제 크리조티닙(crizotinib) 유도체화된 Alk 억제제

[0409] 

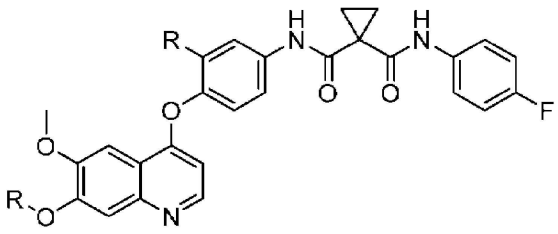
[0410] (R은 예를 들어 페닐 모이어티 또는 디아졸기에 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0411] 25. 키나제 억제제 JNJ FMS (유도체화됨) 억제제

[0412] 

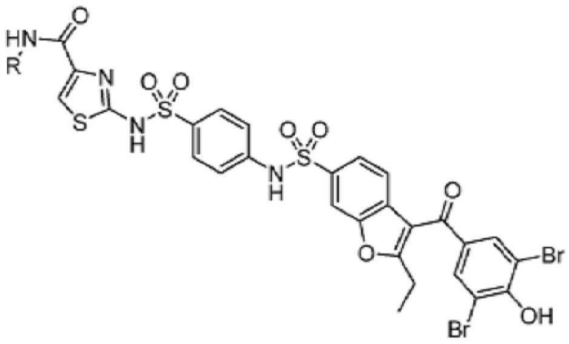
[0413] (R은 예를 들어 페닐 모이어티에 부착된 링커로서 유도체화됨);

[0414] 26. 키나제 억제제 포레티닙(foretinib) (유도체화됨) Met 억제제

[0415] 

[0416] (R은 예를 들어 페닐 모이어티 또는 퀴놀린 모이어티상의 히드록실 또는 에테르기에 부착된 링커로서 유도체화됨);

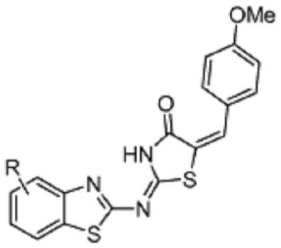
[0417] 27. 알로스테릭 단백질 티로신 포스파타제 억제제 PTP1B (유도체화됨):



[0418]

[0419] 예를 들어, 표시된 바와 같이 R에 링커가 부착되어 유도체화됨;

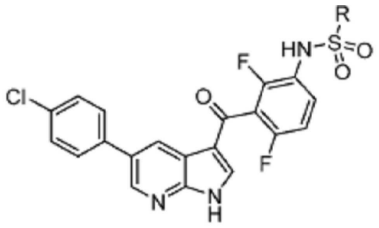
[0420] 28. 티로신 포스파타제의 SHP-2 도메인 억제제 (유도체화됨):



[0421]

[0422] 예를 들어 R에서 링커가 부착되어 유도체화됨;

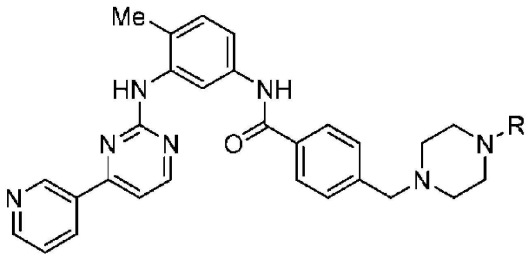
[0423] 29. BRAF (BRAFV600E)/MEK의 억제제 (유도체화됨):



[0424]

[0425] 예를 들어 R에서 링커가 부착되어 유도체화됨;

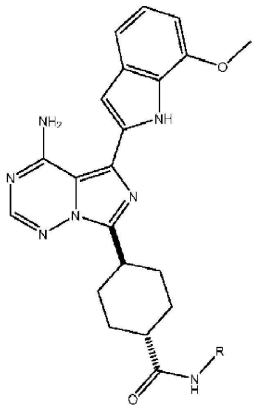
[0426] 30. 티로신 키나제 ABL의 억제제 (유도체화됨)



[0427]

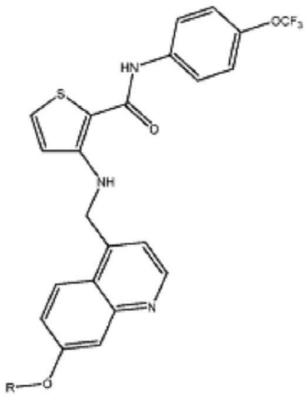
[0428] 예를 들어 R에서 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0429] 31. 키나제 억제제 OSI-027 (유도체화됨) mTORC1/2 억제제

[0430] 

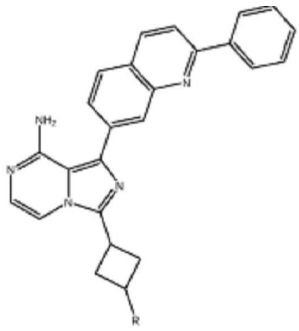
[0431] 예를 들어 R에서 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0432] 32. 키나제 억제제 OSI-930 (유도체화됨) c-Kit/KDR 억제제

[0433] 

[0434] 예를 들어 R에 링커가 부착되어 유도체화됨; 및

[0435] 33. 키나제 억제제 OSI-906 (유도체화됨) IGF1R/IR 억제제

[0436] 

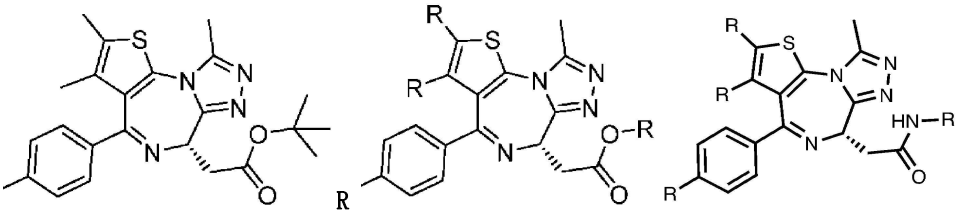
[0437] 예를 들어 R에서 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0438] ("R"이 피페라진 모이어티상에서 링커의 부착을 위한 부위를 나타내는 것으로서 유도체화됨).

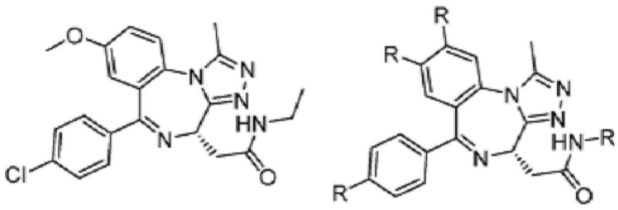
[0439] **II. 인간 BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적으로 하는 화합물:**

[0440] 인간 BET 브로모도메인-함유 단백질을 표적화하는 화합물은 아래에 기술된 바와 같은 표적과 관련된 화합물을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 여기서 "R"은 링커 부착을 위한 부위를 나타내고 예컨대 다음과 같다:

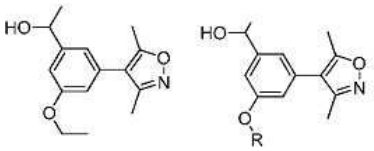
[0441] JQl, Filippakopoulos et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* (2010):

[0442] 

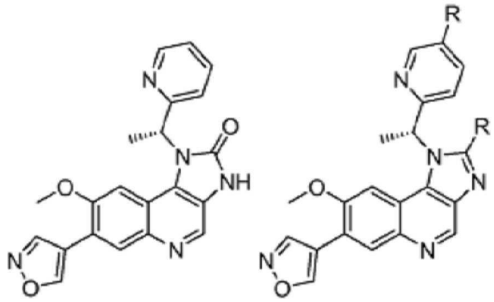
[0443] 2. I-BET, Nicodeme et al. Supression of Inflammation by a Synthetic Histone Mimic. *Nature* (2010). Chung et al. Discovery and Characterization of Small Molecule Inhibitors of the BET Family Bromodomains. **J.** Med Chem. (2011):

[0444] 

[0445] 3. Compounds described in Hewings et al. 3,5-Dimethylisoxazoles Act as Acetyl-lysine Bromodomain Ligands. *(2011, **J.** Med. Chem.54:6761-6770)*.

[0446] 

[0447] 4. I-BET151, Dawson et al. Inhibition of BET Recruitment to Chromatin as an Effective Treatment for MLL-fusion Leukemia. *Nature (2011)*:

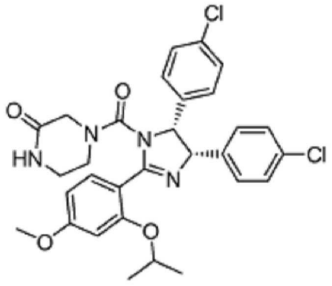
[0448] 

[0449] (여기서 R은 각 경우에 링커의 부착 부위를 지정한다.)

[0450] III. HDM2/MDM2 억제제 :

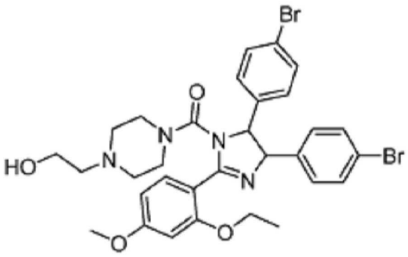
[0451] 본 발명의 HDM2/MDM2 억제제는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:

[0452] 1. *Vassilev et al., In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*, (*2004, Science, 303844-848*), and Schneekloth, *et al., Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics*, (2008, *Biorg. Med. Chem. Lett.,18:5904-5908)*에서 확인되는 HDM2/MDM2 억제제, 여기서는 하기 기재된 바와 같은 화합물 nutlin-3, nutlin-2 및 nutlin-1 (유도체화됨), 뿐만 아니라 그의 모든 유도체 및 유사체을 포함한다:



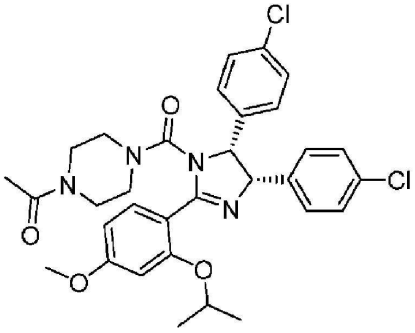
[0453]

[0454] (예를 들어 메톡시기 또는 히드록실기에서 링커가 부착되어 유도체화됨);



[0455]

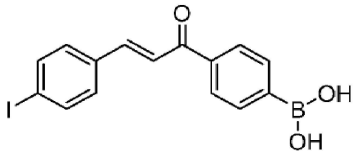
[0456] (예를 들어 메톡시기 또는 히드록실기에서 링커가 부착되어 유도체화됨);



[0457]

[0458] (예를 들어, 메톡시기를 통해 또는 히드록실기로서 링커가 부착되어 유도체화됨); 및

[0459] 2. 트랜스-4-요오도-4'-보라닐-칼콘



[0460]

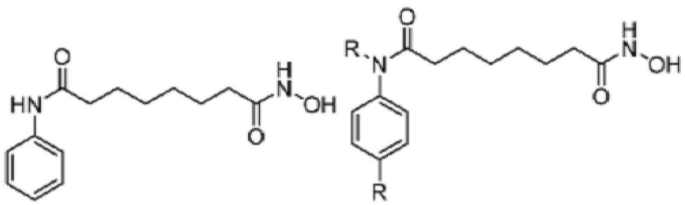
[0461] (예를 들어, 히드록시기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨).

[0462] **IV. HDAC 억제제 :**

[0463] HDAC 억제제 (유도체화됨)는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0464] 1. Finnin,M.S. et al. *Structures of Histone Deacetylase Homologue Bound*

[0465] *to the TSA and SAHA Inhibitors.* (1999, *Nature,* 40:188-193).



[0466]

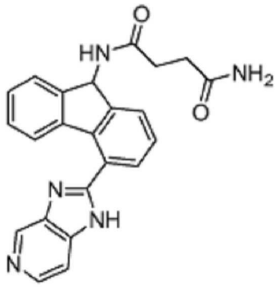
[0467] ("R"이 링커의 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화) 및

[0468] 2. PCT WO0222577 ("데아세틸라제 억제제")의 화학식 I로 정의된 화합물 (예를 들어, 히드록실기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨);

[0469] **V. 열충격 단백질 90 (HSP90) 억제제:**

[0470] 본 발명에 따라 유용한 HSP90 억제제는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:

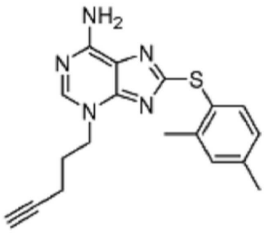
[0471] 1. Vallee, *et al.*, "Tricyclic Series of Heat Shock Protein 90 (HSP90) Inhibitors Part I: Discovery of Tricyclic Imidazo[4,5-C]Pyridines as Potent Inhibitors of the HSP90 Molecular Chaperone (*2011, J.Med.Chem., 54:7206)*에서 확인된 HSP90 억제제로서 YKB (N-[4-(3H-이미다조[4,5-C]피리딘-2-일)-9H-플루오렌-9-일]-숙신 아미드)를 포함:



[0472]

[0473] 예를 들어 말단 아미드기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨;

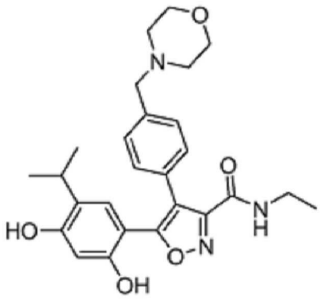
[0474] 2. HSP90 억제제 p54 (개질됨) (8-[(2,4-디메틸페닐)설파닐]-3]펜트-4-인-1-일-3H-푸린-6-아민):



[0475]

[0476] 예를 들어 말단 아세틸렌기를 통해 링커가 부착되어 있음;

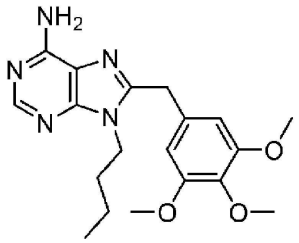
[0477] 3. HSP90 억제제 (개질됨), Brough, *et al.*, "4,5- Diarylisoxazole HSP90 Chaperone Inhibitors: Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer", (*2008, J. Med.Chem., 51:196*)에서 확인되는 것으로서, 다음 구조를 갖는 화합물 2GJ (5-[2,4- dihydroxy-5-(1-methylethyl)phenyl]-n-ethyl-4-[4-(morpholin-4-ylmethyl)phenyl]isoxazole- 3-carboxamide) 포함:



[0478]

[0479] 예를 들어, 아미드기를 통해 (아민에서 또는 아민의 알킬기에서) 링커가 부착되어 유도체화됨;

[0480] 4. HSP90 억제제 (개질됨) Wright, *et al.*, Structure- Activity Relationships in Purine-Based Inhibitor Binding to HSP90 Isoforms, *(2004 Jun., Chem Biol. 11(6):775-85)*, 에서 확인되는 것으로서 다음 구조를 갖는 HSP90 억제제 PU3 포함:



[0481]

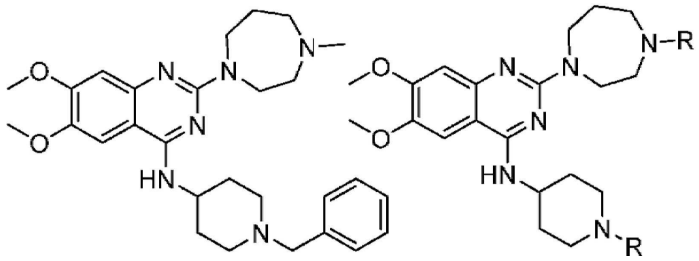
[0482] 여기서는 예를 들어 부틸기를 통해 링커가 부착되어 있음; 및

[0483] 5. HSP90 억제제 겔다나마이신(geldanamycin) ((4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-히드록시-8,14,19-트리메톡시-4,10,12,16- 테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자비시클로[16.3. 1] (유도체화됨) 또는 그의 임의의 유도체 (예를 들어 17-알킬아미노-17-데스메톡시겔다나마이신("17- AAG") 또는 17-(2-디메틸아미노에틸)아미노-17-데스메톡시겔다나마이신 ("17-DMAG")) (예를 들어 아미드기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨).

[0484] **VI. 인간 라이신 메틸트랜스페라제:**

[0485] 인간 라이신 메틸트랜스페라제 억제제는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:

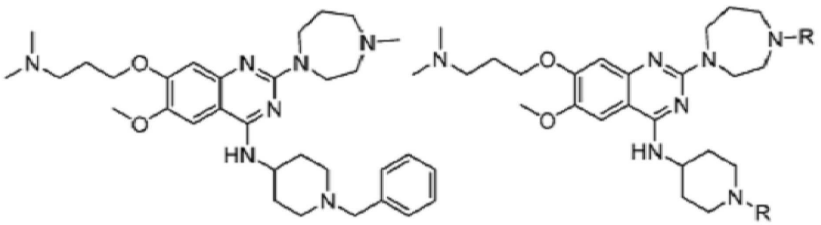
[0486] 1. Chang et al. Structural Basis for G9a-Like protein Lysine Methyltransferase Inhibition by BIX-1294 *(2009, Nat. Struct. Biol.,16(3):312)*.



[0487]

[0488] ("R"은 예를 들어 링커의 부착을 위한 부위를 저정하고 유도체화됨);

[0489] 2. Liu, F. et al Discovery of a 2,4-Diamino-7-aminoalkoxyquinazoline as a Potent and Selective Inhibitor of Histone Methyltransferase G9a. *(2009, **J.** Med. Chem.,52(24):7950)*.



[0490]

[0491] ("R"은 예를 들어 링커의 부착을 위한 잠재적 부위를 저정하고 유도체화됨);

[0492] 3. 아자시티딘 (유도체화됨) (4-아미노-1-D-리보푸라노실-1,3,5-트리아진-2(1H)-온) (예를 들어, 히드록시 또는 아미노기를 통해 링커가 부착되어 유도체화됨); 및

[0493] 4. 데시타빈 (유도체화됨) (4-아미노-1-(2-데옥시-b-D-에리트로-펜토푸라노실) -1,3,5-트리아진-2(1H)-온) (예를 들어, 히드록시기 또는 아미노기를 통하여 링커가 부착되어 유도체화됨).

[0494] **VII. 혈관 신생 억제제 (Angiogenesis Inhibitors) :**

[0495] 혈관 신생 억제제에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다:

[0496] 1. GA-1 (유도체화됨) 및 이의 유도체 및 유사체, Sakamoto, *et al.,* Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation, *(2003 Dec.,Mol. Cell Proteomics,2(12):1350-1358)*에 기재된 바와 같은 구조 및 링커에 대한 결합을 갖고 있음;

[0497] 2. 에스트라디올 (유도체화됨), 이는 Rodriguez-Gonzalez, et al., Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degrading in breast and prostate cancer, (2008, *Oncogene* 27 : 7201-7211)에 일반적으로 설명된 링커에 결합될 수 있는 것임;

[0498] 3. 에스트라디올, 테스토스테론 (유도체화됨) 및 관련 유도체로서 DHT 및 그것의 유도체 및 유사체를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, Sakamoto, *et al.,* Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation, *(2003 Dec., Mol. Cell Proteomics, 2(12):1350-1358)* 에 일반적으로 기재된 바와 같은 구조 및 링커에 대한 결합을 갖고 있음; 및

[0499] 4. 오발리신, 푸마길린 (유도체화됨), 및 그것들의 유도체 및 유사체로서 Sakamoto, et al., Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1- Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation *(2001 Jul., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(15):8554-8559)* 및 미국특허 제 7,208,157호에 일반적으로 기재된 바와 같은 구조 및 링커에 대한 결합을 갖고 있음.

[0500] **VIII. 면역 억제 화합물 (Immunosuppressive Compounds) :**

[0501] 면역 억제 화합물에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다:

[0502] 1. AP21998 (유도체화됨), 이는 Schneekloth, *et al.,* Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation *(2004, J. Am. Chem. Soc., 126:3748-3754)*에 일반적으로 기재된 바와 같은 구조 및 링커에 대한 결합을 갖고 있음;

[0503] 2. 글루코코르티코이드 (예를 들어, 히드로코르티손, 프레드니손, 프레드니솔론 및 메틸프레드니솔론) (예를 들어 임의의 히드록실에 링커가 결합되어 유도체화됨) 및 베클로메타손 디프로피오네이트 (예를 들어 프로피오네이트에 링커가 결합되어 유도체화됨);

[0504] 3. 메토트렉세이트 (예를 들어 말단 히드록실 중 하나에 링커가 결합될 수 있고 유도체화됨);

[0505] 4. 시클로스포린 (예를 들어 부틸기 중 하나에서 링커가 결합될 수 있고 유도체화됨);

[0506] 5. 타크로리무스 (FK-506) 및 라파마이신 (예를 들어 메톡시기 중 하나에서 링커기가 결합될 수 있고 유도체화됨); 및

[0507] 6. 악티노마이신 (예를 들어 이소프로필기 중 하나에서 링커가 결합될 수 있고 유도체화됨).

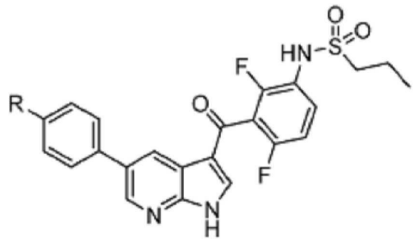
[0508] **IX. 아릴 탄화수소 수용체 (AHR)를 표적으로하는 화합물:**

[0509] 아릴 탄화수소 수용체 (AHR)를 표적으로하는 화합물은 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:

[0510] 1. 아피게닌 (Apigenin) (Lee, et al., Targeted Degradation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by the PROTAC Approach: A Useful Chemical Genetic Tool, ChemBioChem Volume 8, Issue 17, pages 2058-2062, November 23, 2007에 일반적으로 설명된대로 링커에 결합하는 방식으로 유도체화됨); 및

[0511] 2. SR1 및 LGC006 (Boitano, *et al.,* Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells *(2010 Sep., Science, 329(5997):1345-1348* 에 일반적으로 설명된대로 링커가 결합하도록 유도체화됨).

[0512] X. RAF 수용체 (키나제)를 표적으로하는 화합물 :

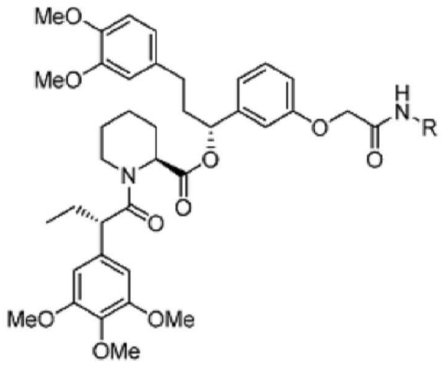


[0513]

[0514] PLX4032

[0515] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨).

[0516] XI. FKBP를 표적으로하는 화합물 :



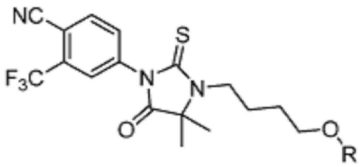
[0517]

[0518] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨).

[0519] XII. 안드로겐 수용체 (AR)를 표적으로하는 화합물

[0520] 1. 안드로겐 수용체에서 RU59063 리간드 (유도체화됨)

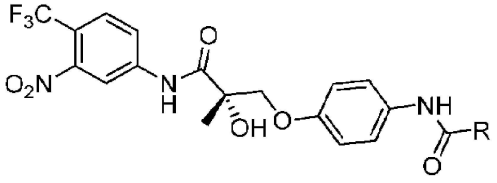
[0521]



[0522]

[0523] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨).

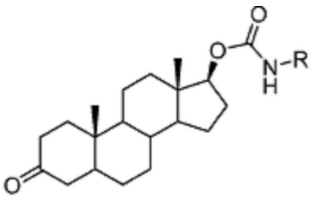
[0524] 2. 안드로겐 수용체의 SARM 리간드 (유도체화됨)



[0525]

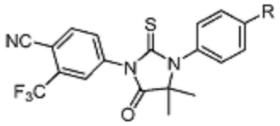
[0526] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨).

[0527] 3. 안드로겐 수용체 리간드 DHT (유도체화됨)

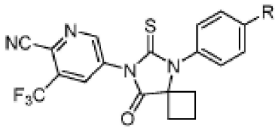
[0528] 

[0529] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨).

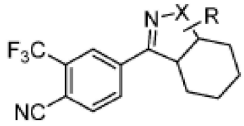
[0530] 4. MDV3100 리간드 (유도체화됨)

[0531] 

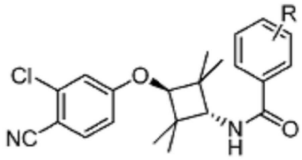
[0532] 5. ARN-509 리간드 (유도체화됨)

[0533] 

[0534] 6. 헥사히드로벤즈이속사졸

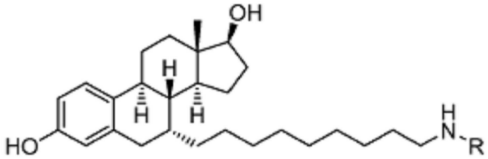
[0535] 

[0536] 7. 테트라메틸시클로부탄

[0537] 

[0538] <u>XIII. 에스트로겐 수용체 (ER) ICI-182780을 표적으로 하는 화합물</u>

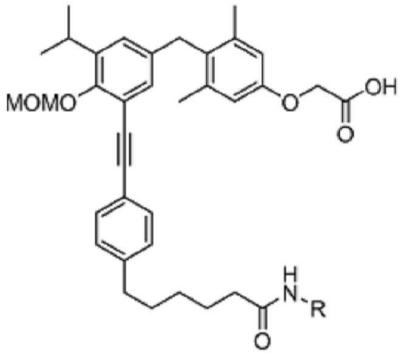
[0539] 1. 에스트로겐 수용체 리간드

[0540] 

[0541] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨).

[0542] <u>XIV. 갑상선 호르몬 수용체 (TR)를 표적으로 하는 화합물</u>

[0543] 1. 갑상선 호르몬 수용체 리간드 (유도체화됨)

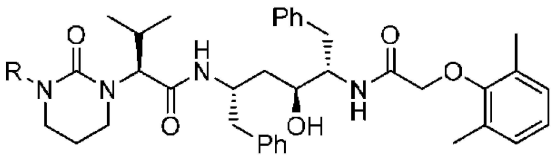


[0544]

[0545] ("R"이 링커 부착 부위를 지정하고 MOMO가 메톡시메톡시기를 나타내어 유도체화됨).

[0546] **XV. HIV 프로테아제를 표적으로하는 화합물**

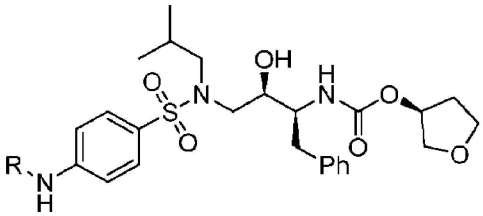
[0547] 1. HIV 프로테아제의 억제제 (유도체화됨)



[0548]

[0549] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨). 2010, *J. Med. Chem.*, 53:521-538 참조.

[0550] 2. HIV 프로테아제의 억제제

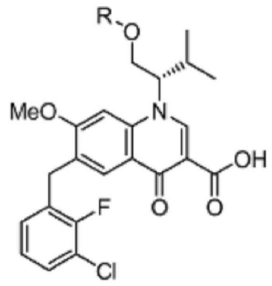


[0551]

[0552] ("R"이 링커 부착을 위한 잠재적 부위를 지정하여 유도체화됨). *2010, J. Med. Chem.*, 53 : 521-538참조.

[0553] **XVI. HIV 인테그라제를 표적으로하는 화합물**

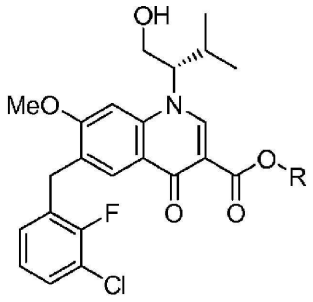
[0554] 1. HIV 인테그라제의 억제제 (유도체화됨)



[0555]

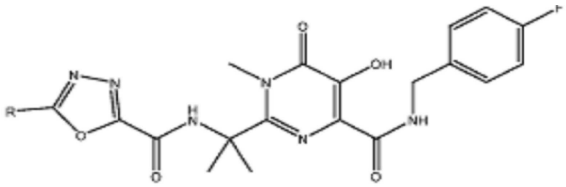
[0556] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨). 2010, *J. Med. Chem.*,53:6466참조.

[0557] 2. HIV 인테그라제의 억제제 (유도체화됨)



[0558]

[0559] 3. HIV 인테그라제 Isetntress의 억제제 (유도체화됨)

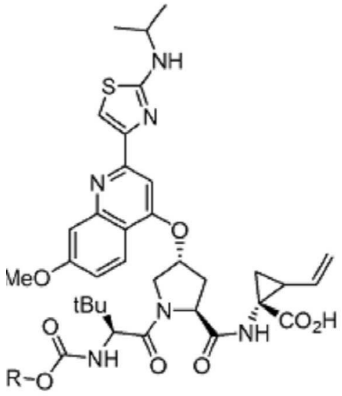


[0560]

[0561] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨). 2010, *J. Med. Chem.*, 53:6466참조.

[0562] **XVII. HCV 프로테아제를 표적으로하는 화합물**

[0563] 1. HCV 프로테아제의 억제제 (유도체화됨)

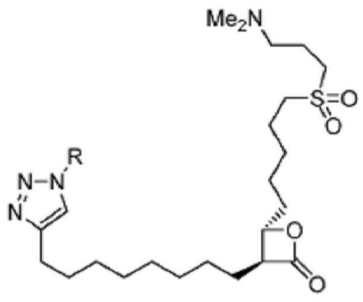


[0564]

[0565] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨).

[0566] **XVIII. 아실-단백질 티오에스테라제-1 및 -2 (APT1 및 APT2)를 표적으로하는 화합물**

[0567] 1. APT1 및 APT2의 억제제 (유도체화됨)



[0568]

[0569] ("R"이 링커 부착을 위한 부위를 지정하여 유도체화됨). 2011, *Angew. Chem. Int. Ed.*,50:9838-9842 참조.

[0570] **표적 단백질**

[0571] 본 발명에 따라 유용한 "표적 단백질"은 세포에서 증가된 단백질분해를 위해 관련분야의 통상의 기술자에 의해 선택된 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0572] 본 발명에 따라 유용한 표적 단백질은 단백질 또는 펩티드를 포함하되, 이의 단편, 이의 유사체 및/또는 이의 상동체를 포함한다. 표적 단백질은 구조적, 조절적, 호르몬적, 효소적, 유전적, 면역학적, 수축성, 저장, 수송, 및 신호 전달을 포함하는 생물학적 기능 또는 활성을 갖는 단백질 및 펩티드를 포함한다. 특정 구체예에서, 표적 단백질은 구조적 단백질, 수용체, 효소, 세포 표면 단백질, 촉매 활성, 아로마타제 활성, 운동 활성, 헬리카제 활성, 대사 과정 (동화 작용 및 이화 작용), 항산화 활성, 단백질분해, 생합성, 키나제 활성 단백질, 산화환원 효소 활성, 전이 효소 활성, 가수 분해 효소 활성, 리아제 활성, 이성체화 효소 활성, 리가제 활성, 효소 조절 활성, 신호 전달 활성, 구조 분자 활성, 결합 활성 (단백질, 지질 탄수화물), 수용체 활성, 세포 운동성, 막 융합, 세포 소통, 생물학적 과정 조절, 발달, 세포 분화, 자극에 대한 반응, 행동 단백질, 세포 부착 단백질, 세포 사멸에 관여하는 단백질, 수송에 관련된 단백질 (단백질 수송자 활성, 핵 수송, 이온 수송자 활성, 채널 수송자 활성 포함), 담체 활성, 투과 효소 활성, 분비 활성, 전자 수송자 활성, 발병기전 (pathogenesis), 샤페론 조절자 활성, 핵산 결합 활성, 전사 조절자 활성, 세포 외 조직 및 생물 발생 활성, 번역 조절자 활성을 포함한다. 관심 단백질은 미생물, 바이러스, 진균 및 기생충을 포함하는, 인간, 기타 동물을 포함하는, 가축, 미생물, 바이러스, 진균 및 기생충을 포함하는 진핵 생물 및 원핵 생물, 특히 약물 요법의 표적으로부터의 단백질을 포함한다.

[0573] 표적 단백질은 또한 인간 치료 약물에 대한 표적을 포함한다. 여기에는 예를 들어 B7.1 및 B7, TNFR1, TNFR2, NADPH 산화 효소, Bcll/Bax 및 세포 사멸(apoptosis) 경로의 다른 파트너들, C5a 수용체, HMG-CoA 환원 효소, PDE V 포스포디에스테라제 유형, PDE IV 포스포디에스테라 제 4 형, PDE I, PDEII, PDEIII, 스쿠알렌 시클라제 억제제, CXCR1, CXCR2, 산화 질소 (NO) 합성효소, 사이클로-옥시게나제 1, 사이클로-옥시게나제 2, 5HT 수용체, 도파민 수용체, G 단백질, 즉, Gq, 히스타민 수용체, 5-리폭시게나제, 트립타제 세린 프로테아제, 티미딜레이트 합성효소, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제, 트리파노좀의 GAPDH, 글리코겐 포스포릴라제, 탄산 탈수효소, 케모카인 수용체, JAK STAT, RXR 및 유사체, HIV 1 프로테아제, HIV 1 인테그라제 , 인플루엔자, 뉴라미미다제, B 형 간염 역전사 효소, 나트륨 채널, 다중 약물 내성 (MDR), 단백질 P-당단백질 (및 MRP), 티로신 키나제, CD23, CD124, 티로신 키나제 p56 lck, CD4, CD5, IL-2 수용체, IL-1 수용체, TNF-alphaR , ICAM1, Cat+ 채널, VCAM, VLA-4 인테그린, 셀렉틴, CD40/CD40L, 뉴오키닌 및 수용체, 이노신 모노포스페이트 탈수소 효소, p38 MAP 키나제, Ras/Raf/MEK/ERK 경로, 인터루킨-1 전환 효소, 카스파 제, HCV, NS3 프로테아제, HCV NS3 RNA 헬리카제, 글리시나미드 리보뉴클레오티드 포르밀 트랜스페라제, 리노바이러스 3C 프로테아제, 단순 헤르페스 바이러스-1 (HSV-I), 프로테아제, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로테아제, 폴리 (ADP-리보스)폴리메라제, 사이클린 의존성 키나제, 혈관 내피 성장 인자, 옥시토신 수용체, 마이크로솜 전달 단백질 억제제, 담즙산 수송 억제제, 5 알파 환원 효소 억제제, 안지오텐신 11, 글리신 수용체, 노르아드레날린 재흡수 수용체, 엔도텔린 수용체, 뉴로펩티드 Y 및 수용체, 에스트로겐 수용체, 안드로겐 수용체, 아데노신 수용체, 아데노신 키나아제 및 AMP 데아미나제, 퓨린성 수용체 (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2X1-7), 파네실트랜스페라제, 제라닐제라닐 트랜스페라제, TrkA, NGF에 대한 수용체, 베타-아밀로이드, 티로신 키나제 Flk-IIKDR, 비트로넥틴 수용체, 인테그린 수용체, Her-21 neu, 텔로머라제 저해, 세포질 포스포리파제 A2 및 EGF 수용체 티로신 키나아제를 포함하여 다양한 다유전자성 질환에서 기능 복원에 사용될 수 있는 단백질을 포함한다. 추가적인 단백질 표적은 예를 들어, 엑디손 20-모노옥시게나제, GABA 게이트된 클로라이드 채널의 이온 채널, 아세틸콜린 에스테라제, 전압-민감성 나트륨 채널 단백질, 칼슘 방출 채널 및 클로라이드 채널을 포함한다. 또 다른 표적 단백질은 아세틸 -CoA 카르복실라제, 아데닐로숙시네이트 합성 효소, 프로토포르피리노겐 산화 효소, 및 에놀피루빌시키메이트-포스페이트 합성 효소를 포함한다.

[0574] 본 발명의 표적 결합 파트너는 또한 할로알칸 데할로게나제 효소일 수 있다. 클로로알칸 펩티드 결합 모이어티 (종종 C2-C10 알킬 할로기인 C1-C12)를 함유하는 본 발명에 따른 화합물은 2011년 12월 6일에 출원된 PCT/US2012/063401 및 2012년 6월 14일에 WO 2012/078559로 공개되었으며, 그 내용이 본 명세서에 참고로 포함되는 융합 단백질 또는 관련 진단 단백질에 사용되는 할로알칸 데할로게나제 효소를 저해 및/또는 분해하는데에 사용될 수 있다.

[0575] **본 발명에 따른 이중작용성 분자는 표적 단백질 결합 파트너 및 UchL5의 결합 파트너를 포함한다.**

[0576] **UchL5의 제공:**

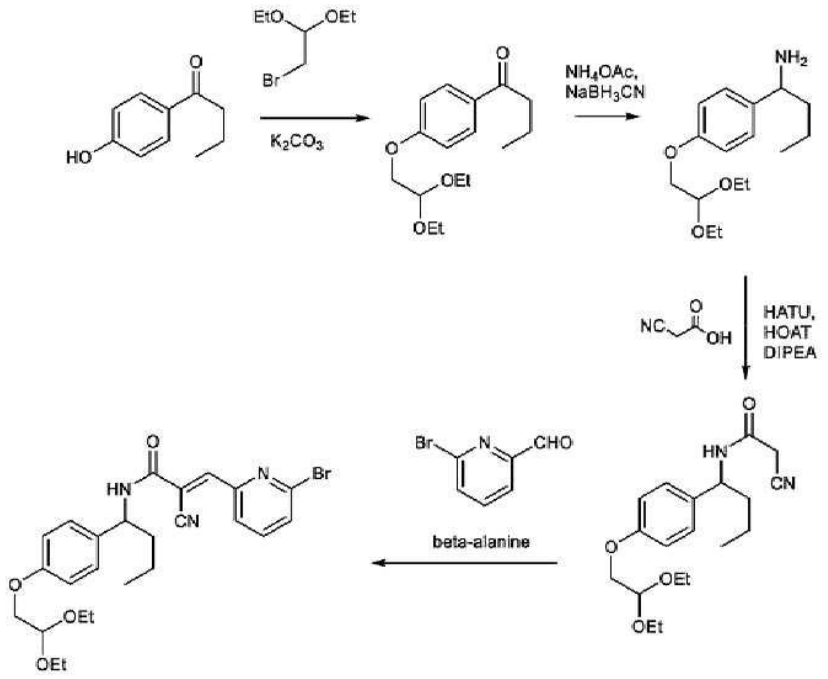
[0577] UchL5는 다음과 같이 제공한다. UchL5 (DU12771) 유전자는 Dundee 대학교의 신호 전달 및 치료 학부 (DSTT)에

서 구입한다. 전장 및 촉매 도메인의 구축물은 PCR에 의해 증폭되고 각각 N-말단 GST 태그 및 N-말단 헥사히스티딘 태그를 포함하는 pGEX-6P-1 및 pNIC28a-Bsa4 벡터에 클로닝된다.

[0578] GST-태그된 단백질은 Lee et al, Sci Rep 2015; DOI: 10.1038/srep10757의 수정 된 방법에 따라 정제한다. 글루타티온 세파로스 4B 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피를 수행한다. GST-태그의 온-컬럼 절단(on-column cleavage)은 PreScission 프로테아제를 사용하여 수행한다. 생성된 단백질은 탈염 컬럼을 사용하여 저염 완충액으로 전달한다. 음이온 교환 크로마토그래피는 Resource Q (또는 동급) 컬럼을 사용하여 수행한 다음 Superdex75 16-600 (또는 동급) 컬럼을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행한다.

[0579] His-태그된 단백질은 Worden et al, NSMB 2014; DOI: 10.1038/nsmb.2771로부터 수정된 방법을 통해 정제된다. Ni-NTA 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피를 수행한다. 생성된 물질은 TEV 프로테아제로 밤새 절단한다. 두 번째 친화성 컬럼은 절단된 His 태그를 제거하는데에 사용한다. 결과 물질은 탈염 컬럼을 사용하여 저염 완충액으로 옮긴다. Resource Q (또는 동급) 컬럼을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피를 수행한 다음 Superdex75 16-600 (또는 동급) 컬럼을 사용하는 크기 배제 크로마토그래피를 수행한다.

[0580] UchL5 결합 파트너는 다음과 같이 합성할 수 있다:



[0581]

[0582] **본 발명에 따른 유용한 링커**

[0583] 본 발명에 따른 유용한 링커는 표적 단백질 결합 파트너가 결합하는 표적의 분해를 생성된 분자가 유도할 수 있도록 UchL5 결합 파트너 및 표적 단백질 결합 파트너를 연결한다. 하나의 구체예에서, 링커는 제 1 및 제 2 말단을 갖고, 한쪽 말단에서 UchL5 결합 파트너에 공유결합되고 다른 말단에서는 표적 결합 파트너에 공유결합된다.

[0584] 링커의 제 1 및 제 2 말단은 대칭 또는 비대칭인 링커를 제공하기 위해 동일하거나 상이할 수 있다. 링커의 말단은 무엇보다 아미드, 옥심, 케토기, 탄소, 에테르, 에스테르, 카바메이트 중에서 선택된 작용기를 가질 수 있다. 링커는 하나 이상의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 PEG 링커, 하나 이상의 CH_2기를 포함하는 알킬 링커, 술폭시드, 고리, 예를 들어 페닐 고리 또는 피리미딘 고리, 트리아졸, 에테르, PEG 변이체를 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 링커는 교대 (-CH_2-에틸렌 글리콜- 단위)를 포함한다.

[0585] 하나의 구체예에서 "링커"는 아민 및/또는 옥심 작용기를 가지며, 특히, 본 발명은 비대칭 연결을 제공하기 위해 링커의 반대쪽 말단에 위치하는 아민 및 옥심 둘 다를 갖는 링커를 제공한다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 링커는 절단 불가능한 직쇄 폴리머이다. 다른 구체예에서, 링커는 화학적으로 절단 가능한 직쇄 폴리머이다. 추가 구체예에서, 링커는 절단 불가능하고 선택적으로 치환된 탄화수소 폴리머이다. 또 다른 구체

예에서, 링커는 광 불안정성의 선택적으로 치환된 탄화수소 폴리머이다.

[0586] 특정 구체예에서 링커는 1-12 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 예를 들어 1-10 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 1-8 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 2-12 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 2-8 개의 에틸렌글리콜 서브유닛, 3-8 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 3-6 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛 및 1 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 2 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 3 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 4 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 5 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 6 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 7 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 8 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 9 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 10 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛, 11 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛 또는 12 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 갖는 치환 또는 비치환된 폴리에틸렌 글리콜 링커이다..

[0587] 특정 구체예에서 링커는 1-12 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 예를 들어 1-10개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 1-8 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 2-12 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 2-8개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 3-8개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 3-6 개의 $-CH_2-$ 서브유닛 및 1 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 2 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 3 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 4 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 5 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 6 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 7 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 8 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 9 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 10 개의 $-CH_2-$ 서브유닛, 11 개의 $-CH_2-$ 서브유닛 또는 12 개의 $-CH_2-$ 서브유닛을 갖는 치환 또는 비치환된 알킬 링커이다.

[0588] 링커는 링커를 따라 임의의 지점에서 O, P, S, N 또는 Si 원자를 포함하는 치환된 PEG 링커 또는 치환된 알킬 링커를 포함할 수 있다. 링커는 또한 링커를 따라 임의의 지점에서 아릴, 알킬렌, 알킬, 벤질, 헤테로사이클, 트리아졸, 술폭시드 또는 페닐기의 조합으로 치환될 수 있다.

[0589] 일부 구체예에서, 링커는 PEG 서브유닛 및 알킬-에테르 사슬의 조합, 예를 들어, $(-(CH_2CH_2)_{1-11}-O-(CH_2CH_2)_{1-11}-O-)$ 또는 $(-(CH_2CH_2)_{1-11}-O-)$ 등...을 포함한다. 일부 구체예에서, 링커는 CH2 서브유닛 및 산소의 조합, 예를 들어 알킬-에테르, $(-(CH_2)_{1-11}-O-(CH_2)_{1-11}-O-)$ 또는 $(-(CH_2)_{1-11}-O-)$ 등...을 포함한다. 일부 구체예에서 링커는 PEG 서브유닛 및 고리 구조의 조합을 포함한다. 다른 구체예에서, 링커는 CH2 서브유닛과 고리 구조의 조합을 포함한다.

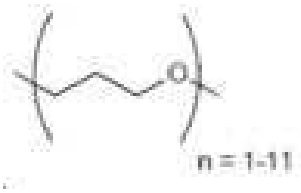
[0590] 링커는 UchL5 결합 파트너 및 표적 단백질 결합 파트너가 18-95Å, 예를 들어 2-4 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 18-25Å, 4-6 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 25-33Å, 6-8 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 33-39Å, 8-12 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 39-53Å, 및 12-24 개의 에틸렌 글리콜 서브유닛을 포함하는 링커의 경우 53 내지 95Å 의 거리만큼 분리되도록 하는 길이이다. 하나의 구체예에서, 링커를 통해 연결된 본 발명의 이중작용성 분자의 UchL5 결합 파트너 및 표적 단백질 결합 파트너는 2 개의 원자, 3 개의 원자, 4 개의 원자, 5 개의 원자, 6 개의 원자, 7 개의 원자, 8 개의 원자, 9 개의 원자, 10 개의 원자, 11 개의 원자, 12 개의 원자, 13 개의 원자, 14 개의 원자, 15 개의 원자, 16 개의 원자, 17 개의 원자, 18 개의 원자, 19 개의 원자, 20 개의 원자, 21 개의 원자, 22 개의 원자, 23 개의 원자, 24 개의 원자, 25 개 원자, 26 개 원자, 27 개 원자, 28 개 원자, 29 개 원자, 30 개 원자. 원자 40 개의 원자, 원자 50 개의 원자, 원자 60 개의 원자, 70 개의 원자, 80 개의 원자, 90 개 이상의 원자 거리만큼 분리되어 있을 수 있다.

[0591] 본 발명에 따른 유용한 링커의 길이, 안정성 및 유연성은 본 발명에 따른 이중작용성 분자의 두 결합 파트너 사이에 주어진 간격 또는 거리를 허용하고; 차례로, 주어진 분자의 두 결합 파트너 사이의 간격은 이중작용성 분자에 의해 결합된 표적 단백질이 표적 단백질의 분해를 용이하게하는 구조를 가정하도록 허용한다.

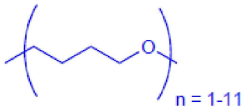
[0592] 본 발명에 따른 링커는 순수한 물질 또는 용액으로 저장될 때 분해 또는 절단을 겪지 않는다면 안정한 것으로 간주된다. 본 발명에 따른 링커는 대사되지 않으면 생물학적으로 안정한 것으로 간주된다..

[0593] 특정 구체예에서, 결합 파트너는 하나 이상의 링커를 통해 연결된다. 일부 구체예에서, 결합 파트너는 공유결합에 의해 직접 연결되고; 이러한 직접 연결은 "링커"라는 용어 내에 있다.

[0594] 본 발명에 따라 유용한 링커는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0595] 

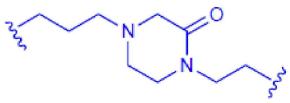
[0596] 또는

[0597] 

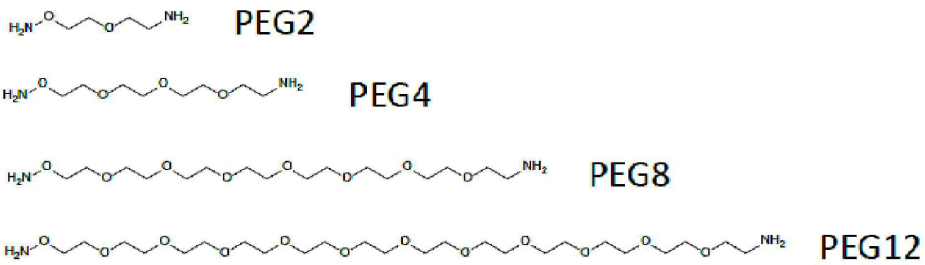
[0598] 및 이들의 조합, 예를 들어,

[0599] 

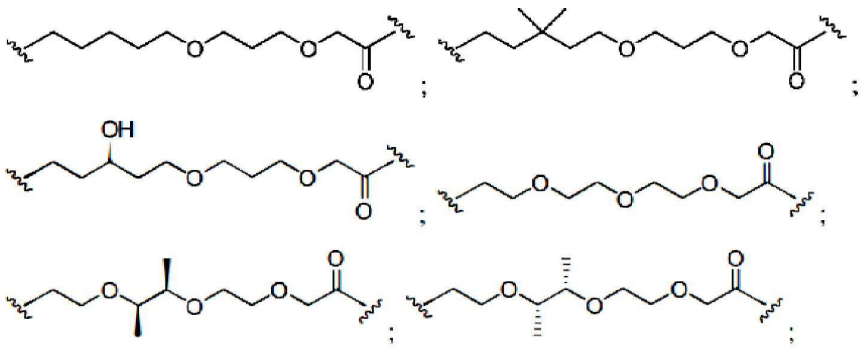
[0600] 본 발명에 따른 링커는 예를 들어 다음과 같은 고리 구조를 포함할 수 있다.

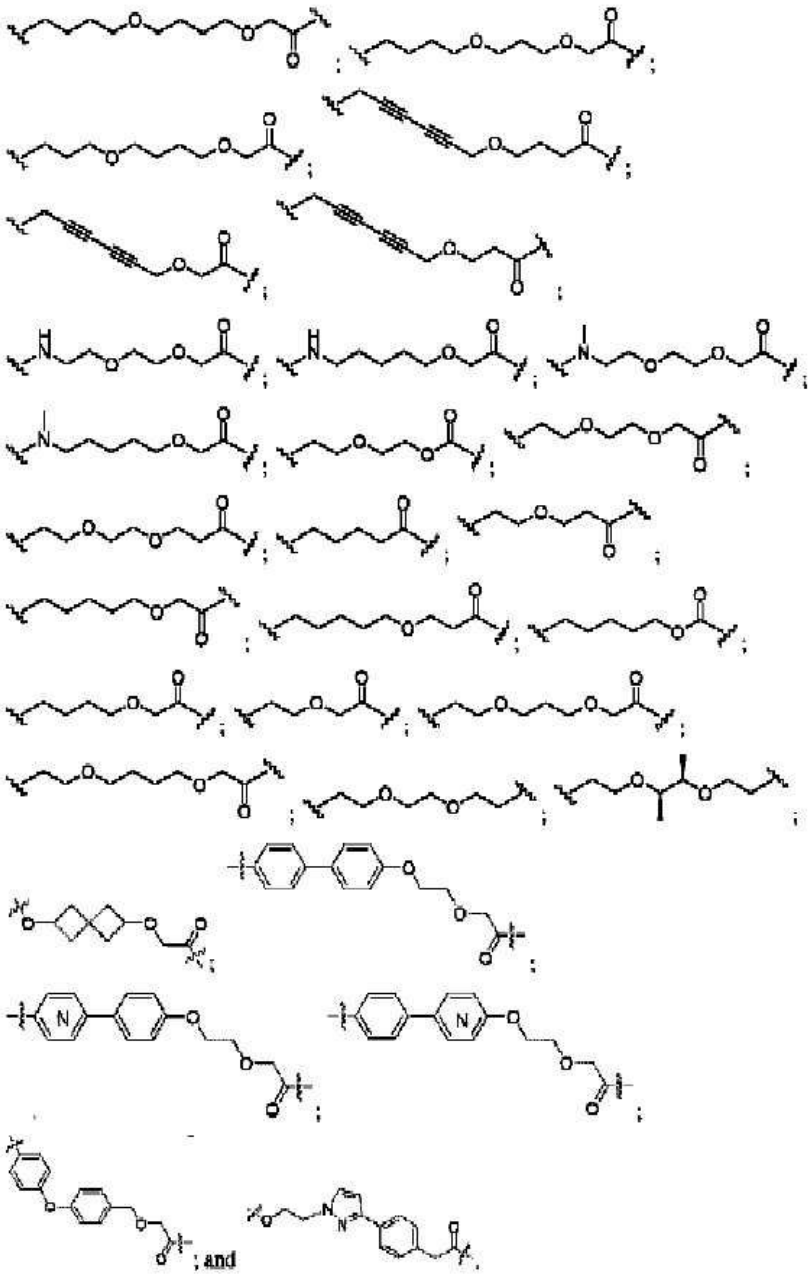
[0601] 

[0602] 본 발명에 따라 유용한 링커는 한 말단에 옥심을 갖고 다른 말단에 아민을 갖는 PEG 링커, 예를 들어 다음과 같은 것을 포함할 수 있다.

[0603] 

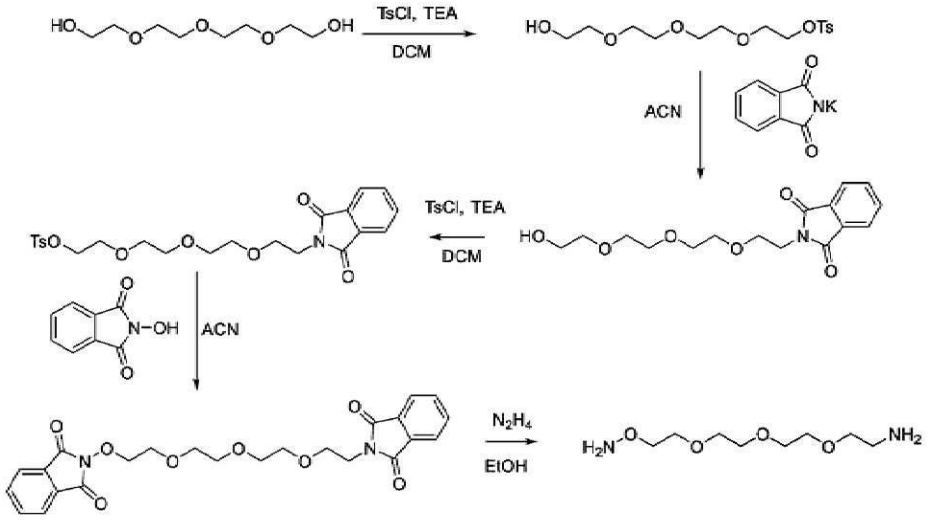
[0604] 본 발명에 따른 링커는 하기로부터 선택된 링커를 포함할 수 있다:

[0605] 



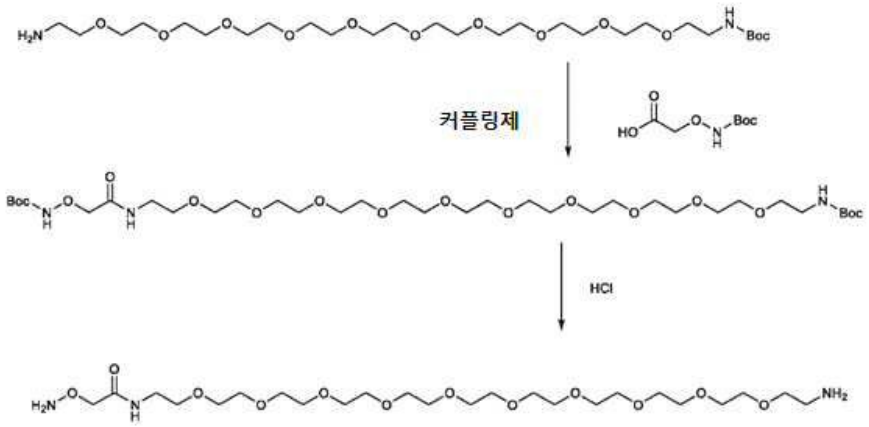
[0606]

[0607] 본 발명에 따른 링커는 PEG를 모노-토실화한 다음 90℃에서 DMF 또는 ACN에서 칼륨 팔리이미드와 모노-토실화 PEG를 반응시켜 제조할 수 있다. 그 반응의 생성물은 토실화 또는 메실화되고 염기로서 TEA의 존재하에 N-히드록시 프탈리이미드와 반응한다. 최종 탈보호는 환류 에탄올에서 과량의 히드라진 수화물로 처리하여 달성할 수 있다.



[0608]

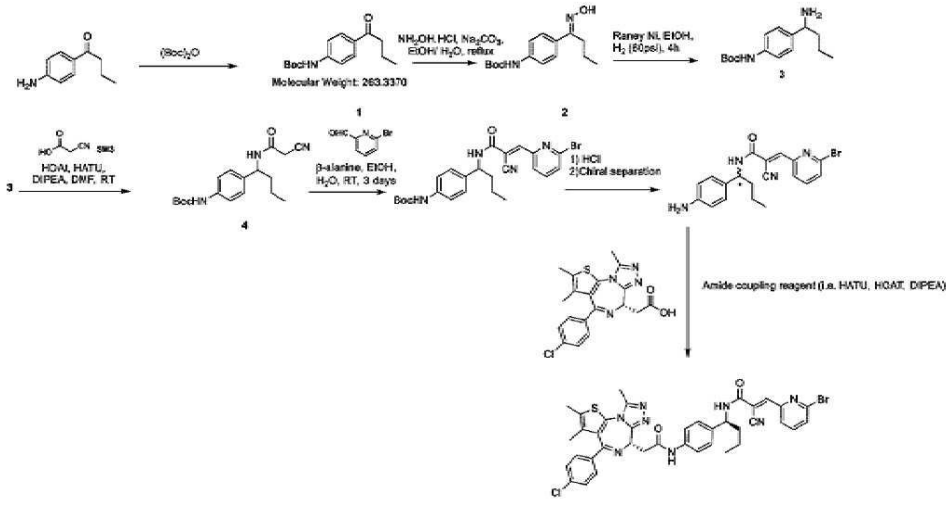
[0609] 본 발명에 따른 링커는 또한 모노-BOC 보호 PEG 아민을 Boc-아미노옥시아세트산 및 아미드 커플링 시약과 반응시켜 제조할 수 있다. 생성물은 예를 들어 HCl의 존재하에 탈보호된 산이다.



[0610]

[0611] 본 발명은 이중작용성 분자를 제공하는데, 여기서는 결합 파트너가 직접 연결되고 예를 들어 다음과 같이 합성되는 것이다:

[0612] UCHL5-BET 표적화 컨쥬게이트의 합성 :

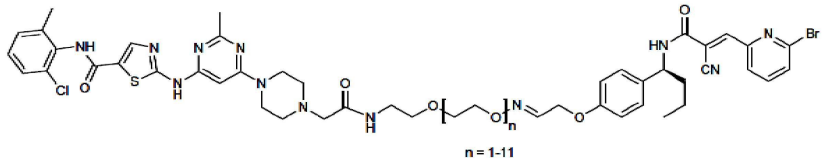


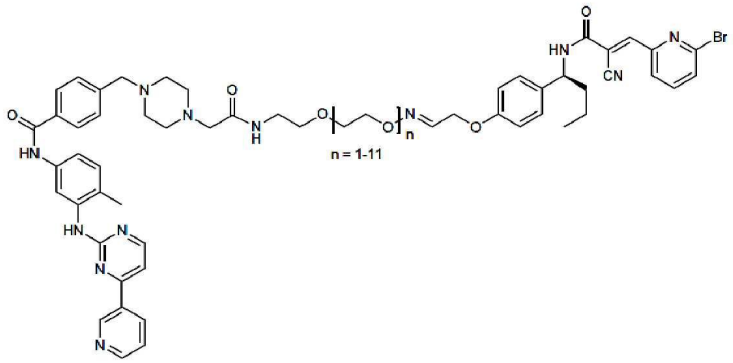
[0613]

[0614] 본 발명은 예를 들어 본 명세서에 개시된 바와 같이 UchL5 결합 파트너 및 표적 단백질 결합 파트너를 갖는 분자를 제공한다.

[0615] *UCHL5 결합 모이어티를 포함하는 키나제-표적화 분자*

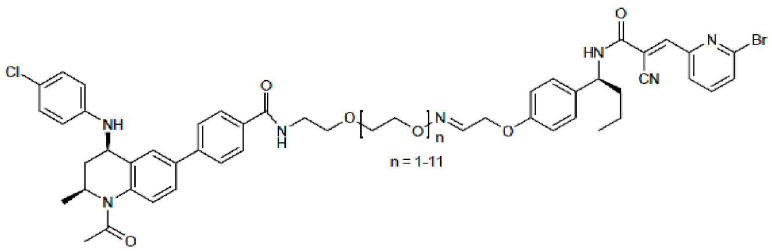
[0616] 본 발명은 UchL5 결합 모이어티 및 키나제-표적화 모이어티를 포함하는 분자를 제공한다. 예시적인 구조는 다음과 같다.

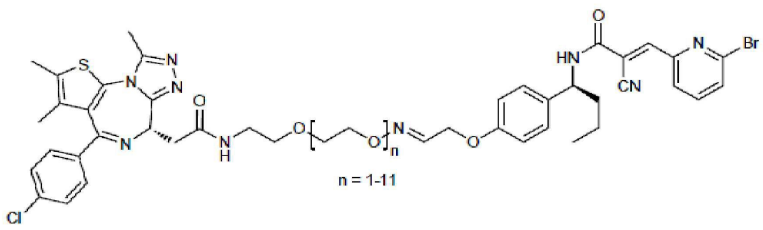
[0617] 



[0618] *UchL5 결합 파트너를 포함하는 BET- 표적화 분자*

[0619] 본 발명은 UchL5 결합 파트너 및 BET-표적화 파트너를 포함하는 분자를 제공한다. 예시적인 구조는 다음과 같다.

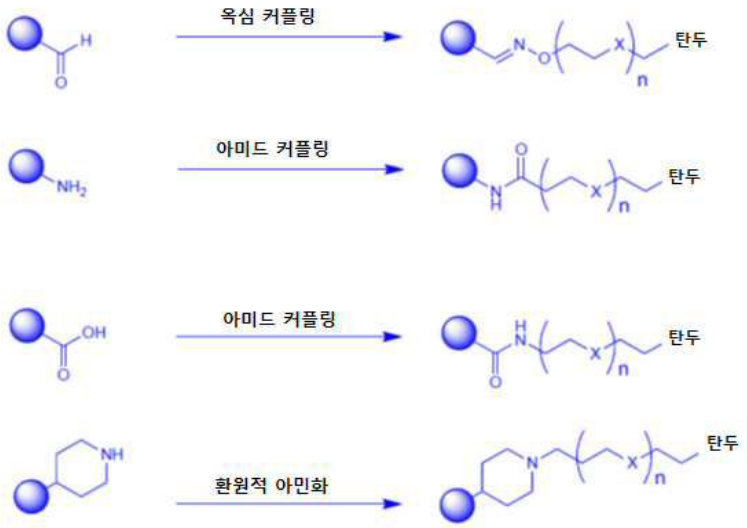
[0620] 



[0621]

[0622] **합성 방법**

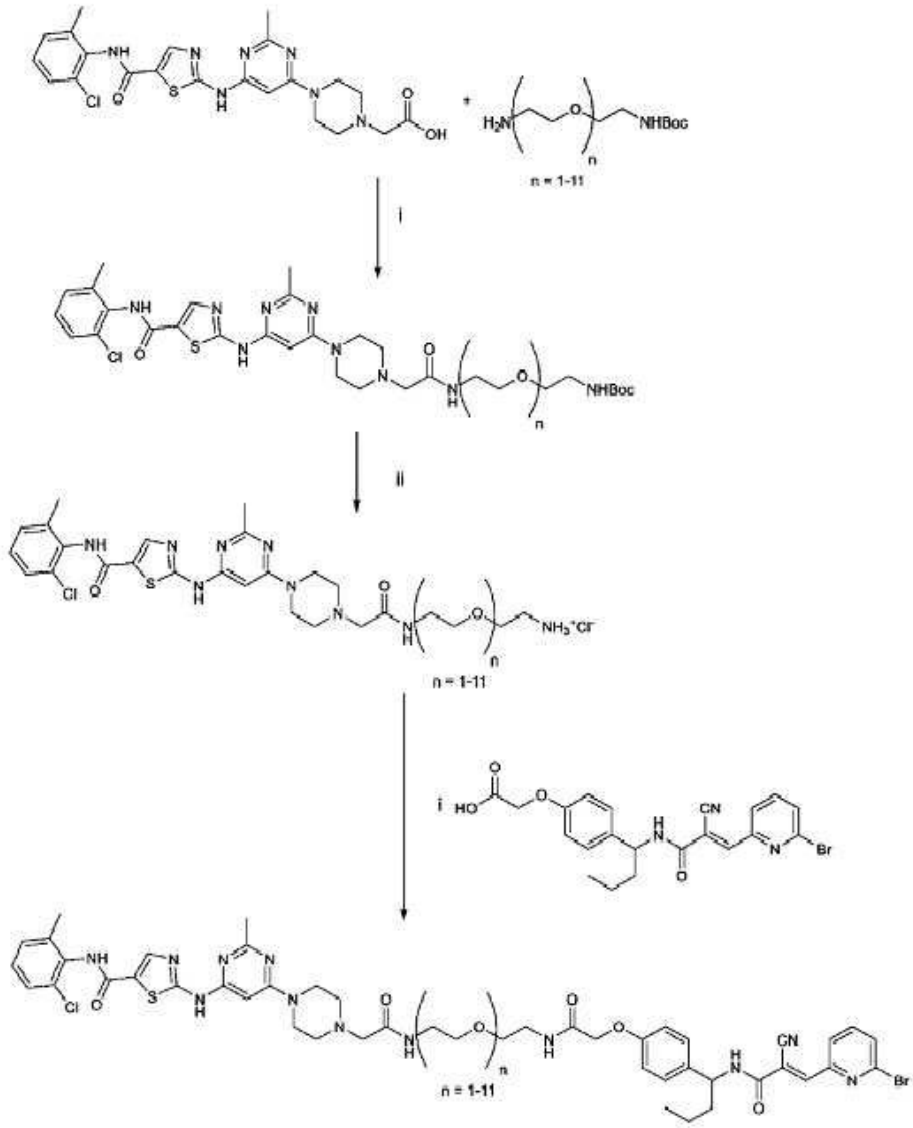
[0623] 당해 기술분야에 잘 알려진 합성 방법을 사용하여 본 발명의 분자를 합성한다. 본 발명의 분자는 예를 들어 옥심, 아미드 커플링 또는 환원성 아민화에 의해 합성할 수 있다.



[0624]

[0625] 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 본 발명의 이중작용성 분자는 아래 제시된 방법 중 어느 하나에 따라 합성할 수 있다. 그러나, 대안적인 합성 방법도 또한 사용할 수 있다.

[0626] **양쪽 말단에 아민을 갖는 PEG 링커를 통해 다사티닙에 연결된 데그라신 유도체 인 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 표적화하는 BCR/Abl 키나제의 합성.**



[0627]

[0628] 이러한 이중작용성 분자는 예를 들어 아미드 커플링 시약, 예를 들어 HATU, COMU, HBTU, HCTU, PyBOP, EDC, DCC, DIC; 염기, 즉 TEA, DIPEA, NMM 및 적합한 용매, 즉 DCM, DMF, NMP, THF를 사용하여 제조할 수 있다. 그 후, 첫 번째 Boc 탈보호는 적절한 용매, 즉 DCM, MeOH, 디옥산, 에탄올, 디에틸에테르에서 산, 예를 들어 HCl 또는 TFA를 사용하여 달성되고, 이어서 두 번째 및 최종 커플링 반응이 이어진다.

[0629] **분해를 위해 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자의 사용**

[0630] 본 발명은 표적 단백질 결합 파트너에 연결된 UchL5 결합 파트너를 포함하는 이중작용성 분자를 사용하여 관심의 표적 단백질을 분해하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 사용할 수 있다. 상기 방법은 관심의 표적 단백질, 예를 들어 표적 단백질의 분해를 허용하는 조건 하에서 그리고 일정 기간 동안, 관심의 단리된 표적 단백질 또는 관심의 표적 단백질을 포함하는 세포를 본 발명의 이중작용성 분자와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0631] **표적 단백질 분해를 결정하기**

[0632] 분해는 본 발명의 이중작용성 분자의 존재 및 부재하에 표적 단백질의 양을 측정하고 비교함으로써 결정된다. 분해는 예를 들어, 이중작용성 분자로 처리되거나 처리되지 않은 세포에 대한 면역 블롯팅 분석, 웨스턴 블롯 분석 및 ELISA를 수행하여 결정될 수 있다. 단백질분해의 성공은 특정 시점에서 분해 된 단백질의 양으로 제공된다. 본 발명의 이중작용성 분자가 존재하는 특정 시점에서 단백질 양의 감소가 관찰되면 분해가 발생한다.

[0633] 보다 구체적으로, 24 시간 이상, 예를 들어 24 시간, 30 시간, 36 시간, 42 시간, 48 시간, 54 시간, 60 시간, 66 시간 및 72 시간 이내에서 본 발명의 이중작용성 분자 1nM 내지 10 μM, 예를 들어 1nM, 10nM, 100nM, 1 μ

M, 및 10 μM의 존재 하에 단백질 양의 적어도 10 %, 예를 들어 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 또는 100 % 감소가 관찰된다면 분해가 발생한 것이다.

[0634] **약학적 조성물**

[0635] 특정 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 분자를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 분자는 분자의 표적 단백질 결합 파트너에 결합하는 표적 단백질의 분해를 유도하기 위해 분자의 충분한 부분이 세포에 들어가도록 허용하는 수단에 의해 적절하게 제형화되고 세포의 환경에 도입될 수 있으며, 세포 기능을 증가 또는 감소시킨다. 본 발명의 분자는 포스페이트 완충 식염수 용액과 같은 완충 용액 내에서 제형화될 수 있다. 이러한 조성물은 일반적으로 분자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 약학적 투여와 양립 가능한 식염수, 용매, 분산 매질, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 보충 활성 화합물도 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0636] 약학적 조성물은 의도된 투여 경로와 양립할 수 있도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어 정맥내, 피내, 피하, 경구 (예를 들어, 흡입), 경피 (국소), 경점막 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액에는 다음 성분이 포함될 수 있다: 주사용수, 식염수, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 중아황산나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충액 및 염화나트륨 또는 덱스트로스와 같은 긴장성 조절 제제. pH는 염산 또는 수산화 나트륨과 같은 산 또는 염기로 조정할 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만든 다회 용량 바이알에 넣을 수 있다.

[0637] 주사용으로 적합한 약학적 조성물은 멸균된 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조(extemporaneous preparation)를 위한 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥 내 투여에 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL. TM. (BASF, Parsippany, N.J.) 또는 인산염 완충 식염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우에 조성물은 무균이어야하고 주사가 용이할 정도로 유동적이어야한다. 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하며 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면 활성제의 사용에 의해 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균 및 항진균제에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에 등장제, 예를 들어 당, 만니톨과 같은 폴리알콜, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 도모할 수 있다.

[0638] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분의 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 활성 화합물을 혼입시킨 다음 여과 멸균함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질과 위에서 열거한 다른 필요 성분을 포함하는 멸균 비히클에 통합하여 제조한다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조로서, 활성 성분의 분말과 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 원하는 임의의 추가 성분을 생성한다.

[0639] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 혼입될 수 있고 정제, 트로키 또는 캡슐, 예를 들어 젤라틴 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 구강용 조성물은 또한 구강 세정제로 사용하기 위한 유체 담체를 사용하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 적합한 결합제 및/또는 보조제 물질이 조성물의 일부로 포함될 수 있다. 정제, 알약, 캡슐, 트로키 등은 다음 성분 또는 유사한 성질의 화합물 중 임의의 것을 함유할 수 있다: 바인더, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 트라가칸트 검 또는 젤라틴; 전분 또는 락토스와 같은 부형제, 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스와 같은 윤활제; 콜로이드성 이산화 규소와 같은 활택제; 수크로스 또는 사카린과 같은 감미제; 또는 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지 향료와 같은 향료.

[0640] 흡입에 의한 투여를 위해 화합물은 적절한 추진제, 예를 들어 이산화탄소와 같은 가스, 또는 네불라이저를 함유하는 압력 용기 또는 디스펜서로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다. 이러한 방법에는 미국특허 제6,468,798호에 기재된 것을 포함한다.

[0641] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 침투할 장

벽에 적합한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 경점막 투여용, 세제, 담즙 염, 및 푸시드산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌약을 사용하여 수행 할 수 있다. 경피 투여를 위해 활성 화합물은 당해 기술분야에 일반적으로 알려진 바와 같이 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 제형화된다.

[0642] 화합물은 또한 좌약 (예를 들어, 코코아 버터 및 기타 글리세리드와 같은 통상적 인 좌약베이스와 함께) 또는 직장 전달을 위한 체류 관장의 형태로 제조될 수 있다.

[0643] 화합물은 또한 McCaffrey et al. (2002), Nature, 418(6893), 38-9 (hydrodynamic transfection); Xia et al. (2002), Nature Biotechnol., 20(10), 1006-10 (viral-mediated delivery); or Putnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53(2), 151-160, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53(3), 325 (1996)에 기재된 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 형질 감염 또는 감염에 의해 투여할 수 있다.

[0644] 하나의 구체예에서, 활성 화합물은 신체로부터의 신속한 제거로부터 화합물을 보호할 담체와 함께 제조되는데 이는 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하여 제어된 방출 제제와 같은 것이다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 폴리머를 사용할 수 있다. 이러한 제형은 표준 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 물질은 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.로부터 상업적으로 구할 수 있다. 리포좀 현탁액 (바이러스 항원에 대한 단일 클론 항체로 감염된 세포를 표적으로하는 리포좀 포함)도 제약상 허용되는 담체로 사용할 수 있다. 이들은 예를 들어, 미국특허 제 4,522,811호에 기재되어 있는 바와 같이 관련업계의 통상의 기술장게 알려진 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0645] 이러한 화합물의 독성 및 치료 효능은 예를 들어 LD_{50} (집단의 50 %까지의 치사량) 및 ED_{50} (집단의 50 %에서 치료적으로 유효한 용량)의 결정과 같이 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 선량 비율이 치료 지수이며 LD_{50}/ED_{50} 비율로 표현할 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물을 사용할 수 있지만 감염되지 않은 세포에 대한 잠재적인 손상을 최소화하고 그에 따른 부작용을 줄이기 위해 이러한 화합물을 감염된 조직 부위로 표적화하는 전달 시스템을 설계하는 데에 주의를 기울여야한다.

[0646] 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 얻은 데이터는 인간에게 사용하기 위한 다양한 용량을 제형화하는 데 사용할 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀없는 ED_{50}을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 화합물의 경우, 치료적 유효 용량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정할 수 있다. 용량은 세포 배양에서 결정된 바와 같이 IC_{50} (즉, 증상의 최대 절반 저해를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보는 인간의 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는데에 사용될 수 있다. 혈장 내 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피로 측정할 수 있다.

[0647] 본 명세서에 정의된 바와 같이, 본 발명의 분자의 치료적 유효량 (즉, 유효 투여량)은 선택된 분자에 따라 달라진다. 예를 들어, 약 1pg 내지 1000mg 범위의 단일 용량이 투여될 수 있다; 일부 구체예에서, 10, 30, 100, 또는 1000 pg, 또는 10, 30, 100, 또는 1000 ng, 또는 10, 30, 100, 또는 1000 μg, 또는 10, 30, 100 또는 1000 mg이 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 1-5g의 조성물이 투여할 수 있다. 조성물은 1 일 1 회 이상부터 1 주일에 1 회 이상 투여할 수 있으며 격일로 한 번씩을 포함한다. 숙련된 기술자는 개체를 효과적으로 치료하기 위해 필요한 용량 및 시기에 특정 요인이 영향을 미칠 수 있음을 인식할 것인데 이에는 질병 또는 장애의 중증도, 이전의 치료, 개체의 일반적인 건강 및/또는 연령 및 기타 기존 질환을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 더욱이, 본 발명의 분자의 치료적 유효량으로 개체를 치료하는 것은 단일 치료를 포함할 수 있거나, 바람직하게는 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0648] 특정 구체예에서, 본 발명에 따른 이중작용성 분자의 투여량은 5 mg/kg/주 내지 500 mg/kg/주, 예를 들어 5 mg/kg/주, 10 mg/kg/주, 15 mg/kg/주, 20 mg/kg/주, 25 mg/kg/주, 30 mg/kg/주, 35 mg/kg/주, 40 mg/kg/주, 45 mg/kg/주, 50 mg/kg/주, 55mg/kg/주, 60mg/kg/주, 65mg/kg/주, 70mg/kg/주, 75mg/kg/주, 80mg/kg/주, 85mg/kg/주, 90mg/kg/주, 95mg/kg/주, 100mg/kg/주, 150mg/kg/주, 200mg/kg/주, 250mg/kg/주, 300mg/kg/주, 350mg/kg/주, 400mg/kg/주, 450mg/kg/주 및 500mg/kg/주의 범위 내에 있다. 특정 구체예에서, 본 발명에 따른

이중작용성 분자의 투여량은 10 mg/kg/주 내지 200 mg/kg/주, 20 mg/kg/주 내지 150 mg/kg/주 또는 25 mg/kg/주 내지 100 mg/kg/주의 범위 내에 있다. 특정 구체예에서, 이중작용성 분자는 2 주 내지 6 개월, 예를 들어 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 8 주, 9 주, 10주, 11 주, 12 주, 13 주, 26 주, 6 개월, 8 개월, 10 개월 또는 1 년 이상 동안 주당 1x 회 투여된다. 특정 구체예에서, 분자는 주당 2x 회 투여된다. 다른 구체예에서, 이중작용성 분자는 격주로 투여된다. 특정 구체예에서, 이중작용성 분자는 정맥 내로 투여된다.

[0649] 본 발명의 분자는 약리학적 유효량의 분자 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물로 제형화할 수 있다. 약리학적 또는 치료학적 유효량은 의도된 약리학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생성하는 데 효과적인 이중작용성 분자 작용제의 양을 의미한다. "약리학적 유효량" 및 "치료학적 유효량" 또는 간단히 "유효량"이라는 어구는 의도된 약리학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생성하는 데 효과적인 이중작용성 분자의 양을 지칭한다. 예를 들어, 주어진 임상 치료가 질병 또는 장애와 관련된 측정 가능한 매개 변수가 20 % 이상 감소 할 때 효과적인 것으로 간주된다면, 그 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약물의 치료적 유효량은 해당 매개 변수를 최소 20 % 감소시키기에 필요한 양이다.

[0650] 본 발명의 적절하게 제형화된 약학적 조성물은 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하, 경피, 기도 (에어로졸), 직장, 질 및 국소 (협측 및 설하 포함) 투여를 포함하는 비경구 경로와 같은 당해 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 투여할 수 있다. 관리. 일부 구체예에서, 약학적 조성물은 정맥 내 또는 비경구 주입 또는 주사에 의해 투여된다.

[0651] 일반적으로 분자의 적절한 투여량 단위는 하루당 수용자의 체중 kg 당 0.001 내지 0.25mg의 범위, 또는 1 일당 체중 1kg 당 0.01 내지 20마이크로그램의 범위, 또는 1 일당 체중 kg 당 0.01 내지 10 마이크로그램의 범위, 또는 1 일 체중 1kg 당 0.10 내지 5 마이크로그램의 범위, 또는 1 일당 체중 kg 당 0.1 내지 2.5 마이크로그램의 범위이다. 분자를 포함하는 약학적 조성물은 1 일 1 회 투여할 수 있다. 그러나, 치료제는 또한 하루 종일 적절한 간격으로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 하위 용량을 포함하는 투여 단위로 투여할 수 있다. 이 경우 총 일일 투여량 단위를 달성하려면 각 하위 투여량에 포함된 분자가 그에 따라 더 작아야한다. 투여 단위는 또한, 예를 들어, 수일 기간에 걸쳐 분자의 지속적이고 일관된 방출을 제공하는 통상적인 지속 방출 제형을 사용하여 수일에 걸쳐 단일 용량으로 배합될 수 있다. 지속 방출 제형은 당해 기술분야에 잘 알려져있다. 이 구체예에서, 투여량 단위는 일일 투여량의 상응하는 배수를 포함한다. 제형에 관계없이, 약학적 조성물은 예를 들어 분자의 표적 단백질 결합 파트너에 결합된 표적 단백질의 분해를 유도하고, 특정 구체예에서 세포 기능의 변화를 유발하는 표적 단백질의 분해를 유도하도록 활성이기에 충분한 양의 분자를 함유해야 한다. 조성물은 분자의 복수 단위의 합이 함께 충분한 용량을 포함하는 방식으로 배합할 수 있다.

[0652] 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 데이터를 얻어 인간에게 적합한 용량 범위를 제형화할 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여량은 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED50 (공지된 방법으로 결정됨)을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 화합물의 경우, 치료적 유효 용량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 결정된 바와 같이 IC50을 포함하는 화합물의 순환 혈장 농도 범위 (즉, 증상의 최대 절반 저해를 달성하는 시험 화합물의 농도)를 달성하기 위해 동물 모델에서 제형화할 수 있다. 이러한 정보는 인간의 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는 데 사용될 수 있다. 혈장 내 분자 수준은 표준 방법, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피로 측정할 수 있다.

[0653] 약학적 조성물은 투여 지침과 함께 키트, 용기, 팩, 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

[0654] **치료 방법**

[0655] 본 발명은 표적 단백질의 과발현에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 야기되는 질환 또는 장애의 위험이 있는 (또는 이에 민감한) 개체를 치료하는 예방방법 및 치료 방법을 둘다 제공한다.

[0656] 본 명세서에 사용된 "치료" 또는 "치료하는"은 질병 또는 장애, 질병 또는 장애의 증상, 또는 질병에 대한 소인을 치료, 치유, 완화, 경감, 변경, 구제, 개선, 개량 또는 영향을 주기 위한 목적으로 환자에게 치료제 (예를 들어, 본 발명의 분자)의 적용 또는 투여, 또는 단리된 조직 또는 세포주에 대한 치료제의 적용 또는 투여로 정의되는데, 상기 환자는 질병 또는 장애, 질병 또는 장애의 증상, 또는 질병 또는 장애에 대한 소인을 갖고 있는 것이다.

[0657] 한 측면에서, 본 발명은 개체에게 치료제 (예를 들어, 본 발명의 분자)를 투여함으로써 상기 기재된 바와 같은 질환 또는 장애를 개체에서 예방하는 방법을 제공한다. 질병에 걸릴 위험이있는 개체는 예를 들어 본 명세서에

기술된 진단 또는 예후 분석 중 임의의 하나 또는 조합에 의해 식별될 수 있다. 예방제의 투여는 예를 들어, 개체에서 바이러스 입자의 검출 또는 질병 또는 장애의 특징적인 증상의 발현 이전에 일어날 수 있으며, 따라서 질병 또는 장애가 예방되거나, 대안적으로 진행이 지연된다.

[0658] 본 발명의 또 다른 측면은 개체를 치료적으로 치료하는 방법, 즉 질환 또는 장애의 증상의 발병을 변경하는 방법에 관한 것이다. 이들 방법은 시험관내(in vitro) 또는 대안적으로 생체 내(in vivo)에서 (예를 들어, 본 발명의 분자를 개체에게 투여함으로써) 수행될 수 있다.

[0659] 치료(treatment)의 예방 및 치료(therapeutic) 방법과 관련하여, 이러한 치료는 약리유전학(Pharmacogenomics) 분야에서 얻은 지식을 기반으로 특별히 맞춤화되거나 수정할 수 있다. 본 명세서에 사용된 "약리유전학"은 유전자 시퀀싱, 통계적 유전학 및 유전자 발현 분석과 같은 게놈 기술을 임상 개발 및 시장에서 약물에 적용하는 것을 의미한다. 보다 구체적으로, 이 용어는 환자의 유전자가 약물에 대한 자신의 반응을 결정하는 방법 (예: 환자의 "약물 반응 표현형" 또는 "약물 반응 유전자형")에 대한 연구를 의미한다. 약리유전학을 사용하면 임상의 또는 의사가 치료의 혜택을 가장 많이 받는 환자에게 예방적 또는 치료적 치료를 목표로 삼고 독성 약물 관련 부작용을 경험하는 환자의 치료를 피할 수 있다.

[0660] 적절한 동물 모델에서 치료제를 테스트할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술 된 분자는 약제를 사용한 치료의 효능, 독성, 또는 부작용을 결정하기 위해 동물 모델에서 사용될 수 있다. 대안적으로, 치료제는 이러한 작용제의 작용 메커니즘을 결정하기 위해 동물 모델에서 사용할 수 있다. 예를 들어, 동물 모델에서 제제를 사용하여 이러한 제제를 사용한 치료의 효능, 독성, 또는 부작용을 결정할 수 있다. 대안적으로, 동물 모델에서 그러한 작용제의 작용 메커니즘을 결정하기 위해 작용제를 사용할 수 있다.

[0661] 본 발명의 이중작용성 분자는 선택된 표적 단백질의 단백질분해(proteolysis)를 증가시키는 데 유용하다. 단백질이 표적된 단백질분해를 위해 선택되는데 이는 세포에서 그 단백질의 양을 줄이기 위해서이다. 세포에서 주어진 표적 단백질의 양의 감소는 주어진 질병의 해로운 영향을 치료, 예방, 또는 감소시키기 위해 유리할 수 있다. 어떤 경우에는 주어진 질병은 세포에서 주어진 표적 단백질의 증가된 양의 존재를 포함한다. 이중작용성 분자를 세포 또는 본 발명의 개체에 투여한 후, 질병의 하나 이상의 증상이 감소되거나 제거되면 개체는 질병에 대해 치료된다고 한다.

[0662] **동물 모델**

[0663] 선택된 표적 단백질의 단백질분해를 촉진하는 활성에 대해 이중작용성 분자를 테스트하기 위해 분자를 동물에게 투여하고 동물에 대한 영향을 평가할 수 있다. 본 발명에 따른 유용한 동물 모델은 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다:

동물 모델	치료 영역
B6C3F1 마우스	심혈관
CB6F1 마우스	심혈관
CD2F1 (CDF1) 마우스	심혈관
Dahl/염 민감성 쥐(래트)	심혈관
DBA/2 마우스	심혈관
FHH 쥐	심혈관
하틀리 기니피그	심혈관
IAF 털이없는 기니피그	심혈관
LVG 골든 시리아 햄스터	심혈관
몽골 게르빌	심혈관
뉴질랜드 흰 토끼	심혈관
비만 경향 CD 쥐	심혈관
비만 내성 CD 쥐	심혈관
자발적 고혈압 (SHR) 쥐	심혈관
자발적 고혈압성 심부전 (SHHF) 쥐	심혈관
자발적 고혈압 비만 (SHROB) 쥐	심혈관
SHRSP (자발성 고혈압성 뇌졸중 경향) 쥐	심혈관
SS-13BN 쥐	심혈관
Wistar Furth 쥐	심혈관
Wistar IGS 쥐	심혈관
위스타 교토 (WKY) 쥐	심혈관
주커 쥐	심혈관
B10.A/Cr 마우스	염증
루이스 쥐	염증
Ly5.1 마우스	염증
NCG 마우스	염증
OT I 마우스	염증
OT II 마우스	염증

[0664]

SJL-Elite 마우스	염증
Wistar IGS 쥐	염증
C57BL/6-무균(Germ-Free) 마우스	대사 질환
ZDF 쥐	대사 질환
C57BL/6-무균 마우스	신경 과학
AKR 마우스	종양학
무흉선 누드 마우스	종양학
BALB/c 누드 마우스	종양학
BDIX 쥐	종양학
버팔로 쥐	종양학
C57BL/6- 무균 마우스	종양학
CD-1 누드 마우스	종양학
코펜하겐 쥐	종양학
Fox Chase CB17 마우스	종양학
Fox Chase SCID 베이지 마우스	종양학
Fox Chase SCID 마우스	종양학
Immortomouse	종양학
NCG 마우스	종양학
NCI SCID/NCr 마우스	종양학
NIH-III 누드 마우스	종양학
NMRI 누드 마우스	종양학
노블 쥐	종양학
NOD SCID 마우스	종양학
NU/NU 누드 마우스	종양학
OFA 쥐	종양학
RNU 쥐	종양학
SCID 무모(Hairless) 유사유전자형(Congenic) (SHC) 마우스	종양학
SCID 무모 아웃브레드 (SHO) 마우스	종양학
스위스 누드 마우스	종양학
Wistar Furth 쥐	종양학

[0665]

[0666] 본 발명의 실시는 달리 지시되지 않는 한, 관련 업계의 기술 내에 있는 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 유전학, 면역학, 세포 생물학, 세포 배양 및 트랜스제닉 생물학의 통상적인 기술을 사용한다. 예를 들어, Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Ausubel et al., 1992), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, DNA Cloning (IRL Press, Oxford); Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Harlow and Lane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby and Pastan, 1979; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for

the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), (4th Ed., Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000) 참조.

[0667] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 아래에 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참고로서 통합된다. 상충되는 경우 정의를 포함하여 본 명세서가 우선한다.

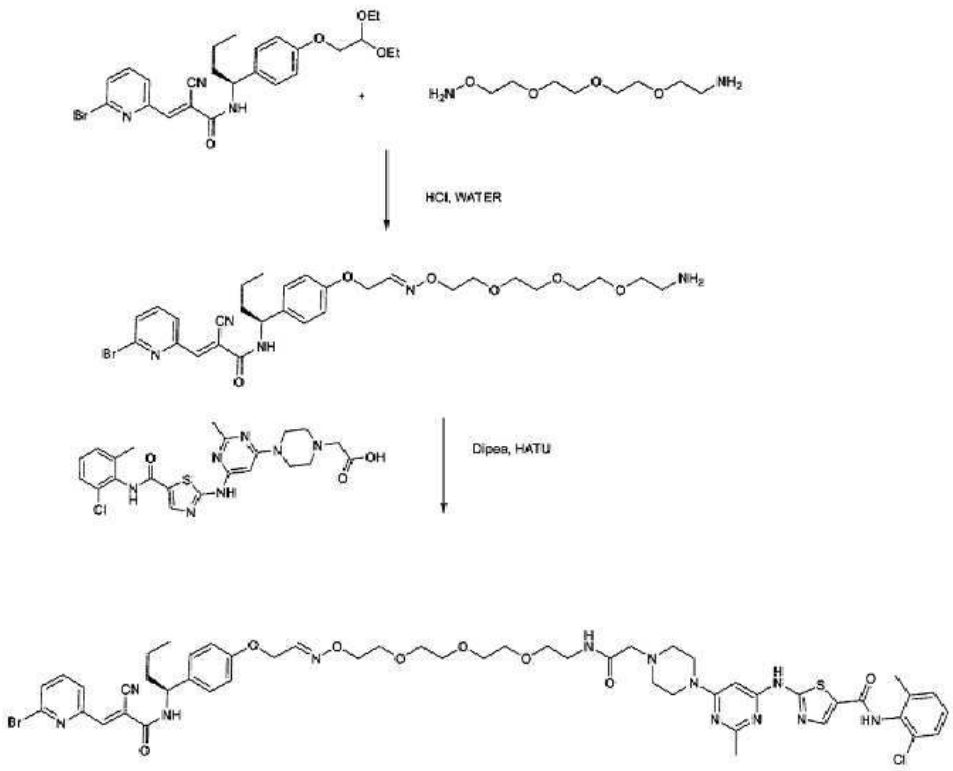
[0668] 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시일 뿐이며 여기에 설명된 본 발명의 다양한 구체예를 제한하려는 의도는 아니다.

[0669] **실시예**

[0670] *실시예 1 UchL5 결합 파트너를 포함하는 키나제 표적화 분자의 합성*

[0671] 링커를 통해 UchL5 결합 파트너에 연결된 키나제를 표적으로하는 표적 단백질 결합 파트너를 포함하는 본 발명의 분자는 하나의 구체예에서 다음 방법에 의해 생성된다. 링커를 통해 UchL5 결합 파트너에 연결된 키나제 파트너를 표적으로하는 표적 단백질 결합 파트너를 포함하는 본 발명의 이중작용성 분자를 합성하기 위해, UchL5 결합 파트너는 아미노옥시-함유 링커와 반응할 수 있는 알데히드기로 기능화되고 이어서 아미드 커플링 조건 하에서 키나제 억제제-카르복실산 유도체로 원하는 이중작용성 분자를 수득한다.

[0672] 다음 합성 반응식은 결합 파트너인 UchL5를 포함하는 키나제 표적 분자를 합성하기 위해 사용된다.

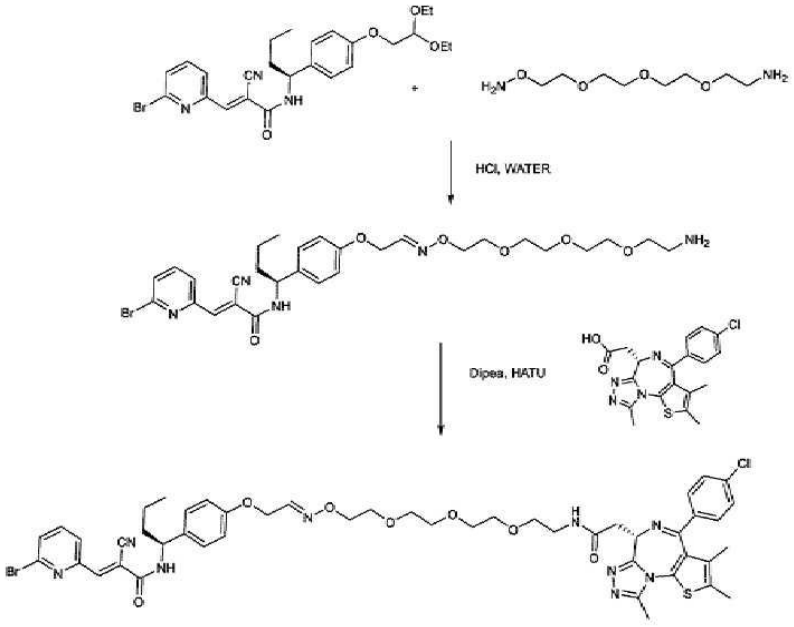


[0673]

[0674] *실시예 2 UchL5 결합 파트너를 포함하는 BET- 표적화 분자의 합성*

[0675] 링커를 통해 UchL5 결합 파트너에 연결된 BET를 표적으로하는 표적 단백질 결합 파트너를 포함하는 본 발명의 분자는 다음 방법에 의해 생성된다. UchL5 결합 파트너를 포함하는 BET- 표적화 분자를 합성하기 위해, UchL5 결합 파트너는 알데히드 기로 기능화되고, 아미노옥시-함유 링커와 반응한 다음 아미드 커플링 조건 하에서 키나제 억제제-카르복실산 유도체와 반응하여 원하는 이중작용성 분자를 생성한다.

[0676] UchL5 결합 파트너를 포함하는 BET- 표적화 분자는 다음과 같이 합성된다:



[0677] *실시예 3 UchL5 및 표적 단백질에 이중작용성 분자의 결합*

[0678] 본 발명의 이중작용성 분자의 UchL5 및 관심 표적 단백질에 대한 결합은 예를 들어 제조업체의 프로토콜(Promega)에 따른 NanoBRETTM 단백질-단백질 상호 작용 시스템, 또는 세포 열 이동 분석 (CETSA)을 사용하여 결정되며 웨스턴 블롯 또는 질량 분석(mass spectrometry)의 분석이 이어진다.

[0679] UchL5 결합 파트너의 UchL5에 대한 결합을 결정하기 위한 분석은 전체 프로테아좀 대신 단백질을 활성화하는 역할을 하는 hRpn13의 존재하에 수행된다 (Sahtoe DD et al. Mol Cell 2015. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.039). UchL5에 대한 결합 (hRpn13의 존재하)은 Lee 등 (ChemBioChem 2017; DOI: 10.1002/cbic.201600515)에 의해 기술된 바와 같이 유비퀴틴-로다민 110 (Rh110)의 가수 분해를 결정함으로써 평가된다. Oregon Green 표지된 테트라-유비퀴틴 기질의 변위를 포함하는 확립된 방법과 유사한, 분자의 더 높은 처리 테스트량을 촉진하기 위해 형광 편광 (FP) 분석도 또한 사용할 수 있다 (Li et al. (Nat. Chem. Biol. 2017; DOI: 10.1038/nchembio.2326) 또는 Ub-LysGly^{TAMRA} (DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.039).

[0680] 등온 열량계 (ITC) 및/또는 표면 플라즈몬 공명 (SPR)은 또한 표적 단백질에 대한 분자의 결합을 직접 평가하기 위해 사용할 수 있다.

[0681] *실시예 4 표적 단백질 분해*

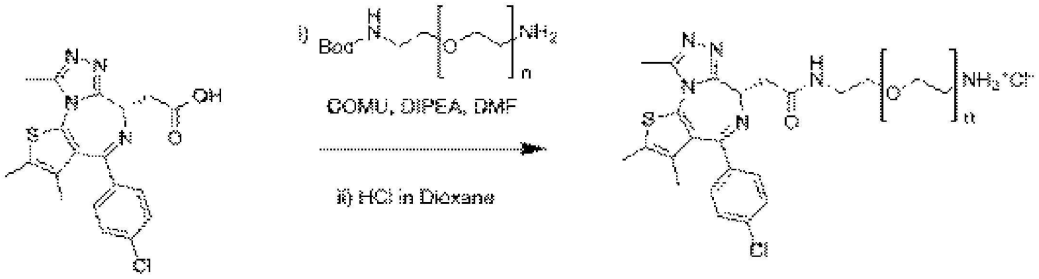
[0682] 표적 단백질 분해는 본 발명의 이중작용성 분자의 존재 및 부재하에 표적 단백질의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 분해는 예를 들어, 이중작용성 분자로 처리되거나 처리되지 않은 세포에 대한 면역 블롯팅 분석, 웨스턴 블롯 분석 및 ELISA를 수행하여 결정될 수 있다. 단백질 분해의 성공은 특정 시점에서 분해된 단백질의 양으로 제공된다. 본 발명의 이중작용성 분자가 존재하는 특정 시점에서 단백질 양의 감소가 관찰된다면 분해가 발생한 것이다.

[0683] *실시예 5 억제제-링커 컨쥬게이트의 제조*

[0684] 시판되는 화학 물질은 Apollo Scientific, Sigma-Aldrich, Fluorochem 또는 Manchester Organics에서 구입했으며 추가 정제없이 사용되었다. 모든 반응은 무수 용매를 사용하여 수행되었다. 분취용 HPLC는 Waters X-Bridge C18 컬럼 (100mm × 19mm; 5μm 입자 크기, 유속 25mL/분)이 있는 Gilson 분취용 HPLC에서 15분에 걸쳐 0.01 % v/v의 포름산을 함유한 수중의 5 %에서 95 % v/v까지의 아세토니트릴의 구배를 사용하여 (방법 1) 또는 15분에 걸쳐 0.01 % v/v의 수성 수산화 암모늄과 함께 수중에서 5 %에서 95 % v/v까지의 아세토니트릴의 구배를 사용하여 (방법 2) 수행되었다.

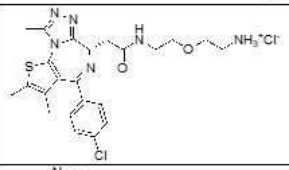
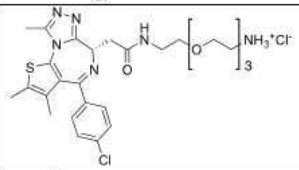
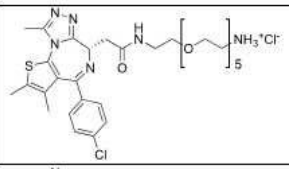
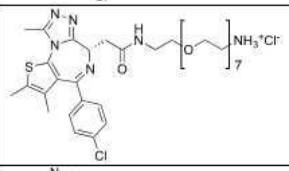
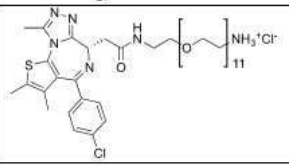
[0685] 액체 크로마토그래피-질량 분석 (LC-MS) 분석은 Bruker Daltonics MicroTOF에 연결된 Agilent HPLC 1100 시리

즈 또는 Agilent Technologies 6130 사중극자 분광계에 연결된 Agilent Technologies 1200 시리즈 HPLC로 수행되었다. LC-MS의 경우 사용된 분석 컬럼은 Waters X-bridge C18 컬럼 (50mm × 2.1mm × 3.5mm 입자 크기); 유속, 물/MeCN + 0.01 % HCOOH의 이동상으로 0.5 mL/분 (방법 1A); 95/5 물/MeCN을 처음에 0.5 분 동안 유지한 다음 3.5 분에 걸쳐 물/MeCN 95/5에서 5/95으로 선형 구배를 유지하고 이후 2 분 동안 유지했다. 모든 화합물의 순도는 앞에서 설명한 분석 LC-MS 시스템을 사용하여 평가되었으며 순도는 >95 %였다.



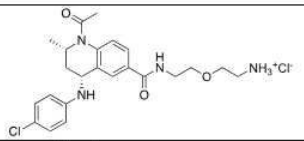
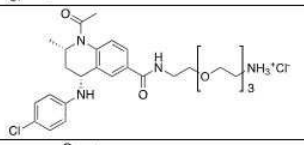
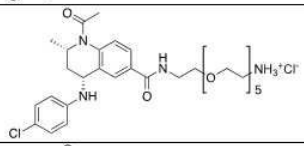
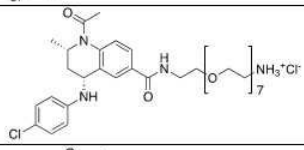
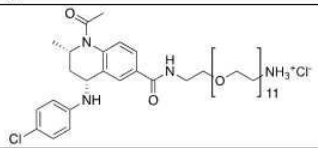
[0686]

[0687] DMF (1mL) 중 모노-Boc 보호된 디아민 링커 (0.1mmol, 1eq) 및 JQ1-COOH (40mg, 0.1mmol, 1eq) 용액에 COMU (43mg, 1mmol, 1eq) 및 DIPEA (48 mircoL)를 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반한 다음 빙냉수로 급냉시켰다. 휘발성 물질을 진공에서 제거하고 조 혼합물을 분취 HPLC (방법 2)로 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 감압하에 증발시키고 잔류물을 DCM (1 mL)에 용해시키고 디옥산 (4M, 1 mL) 중 무수 HCl 용액으로 처리하였다. 1 시간 후, 휘발성 물질을 감압 하에서 제거하고 잔류물을 동결 건조하여 과량의 산을 제거했다. 분석 데이터 (HRMS)는 아래 표 II에 제공된다.

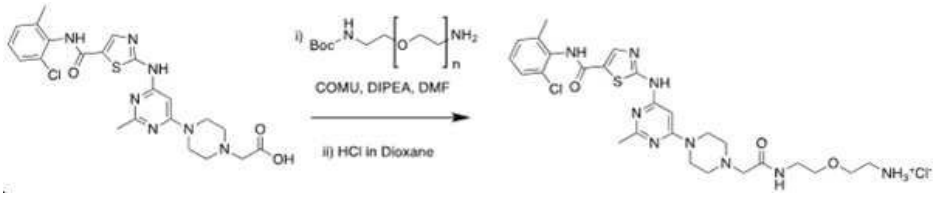
예	구조	m/z [M + H] +
S1		487.1605
S2		575.2129
S3		663.2653
S4		751.3178
S5		927.4226

[0688]

[0689] DMF (1mL) 중에서 모노-Boc 보호된 디아민 링커 (0.1mmol, 1eq) 및 iBET726 (36mg, 0.1mmol, 1eq) 용액에 COMU (43mg, 0.1mmol, 1eq) 및 DIPEA (48 mircoL)이 추가되었다. 반응 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반한 다음 빙 냉수로 급냉시켰다. 휘발성 물질을 진공에서 제거하고 조 혼합물을 분취 HPLC(방법 2)로 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 감압하에 증발시키고 잔류물을 DCM (1 mL)에 용해시키고 디옥산 (4M, 1 mL) 중 무수 HCl 용액으로 처리하였다. 1 시간 후, 휘발성 물질을 감압 하에서 제거하고 잔류물을 동결 건조하여 과량의 산을 제거했다. 분석 데이터 (HRMS)는 아래 표 III에 제공된다.

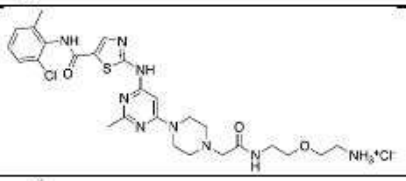
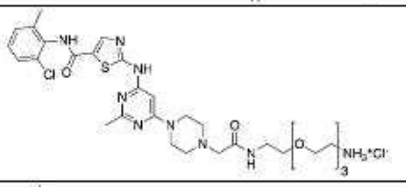
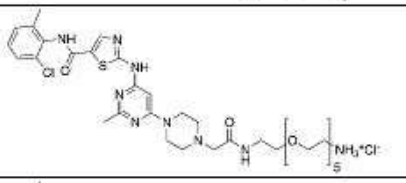
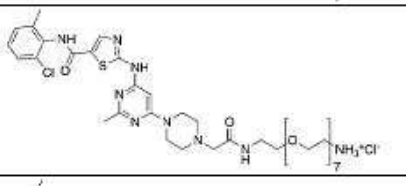
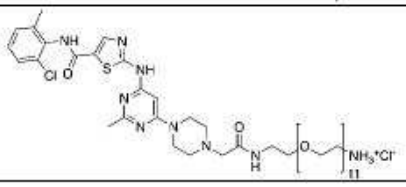
예	구조	m/z [M + H] +
S10		445.1928
S11		533.2452
S12		621.2977
S13		709.3501
S14		885.4550

[0690]

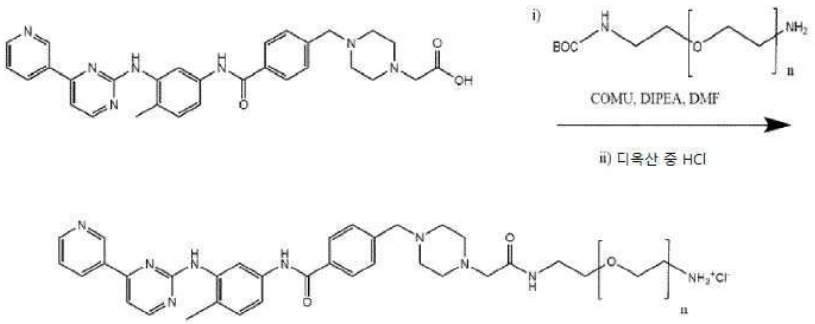


[0691]

[0692] DMF (1 mL) 중 모노-Boc 보호된 디아민 링커 (0.1 mmol, 1 eq) 및 다사티닙-COOH (50 mg, 0.1 mmol, 1 eq) 용액에 COMU (43 mg, 0.1 mmol, 1 eq) 및 DIPEA (48 μL)를 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반한 다음 빙 냉수로 급냉시켰다. 휘발성 물질을 진공에서 제거하고 조 혼합물을 분취 HPLC (방법 2)로 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 감압하에 증발시키고 잔류물을 DCM (1 mL)에 용해시키고 디옥산 (4M, 1 mL) 중 무수 HCl 용액으로 처리하였다. 1 시간 후, 휘발성 물질을 감압 하에서 제거하고 잔류물을 동결 건조하여 과량의 산을 제거했다. 분석 데이터 (HRMS)는 표 IV에 제공된다.

예	구조	m/z [M+H]+
S15		588.2194
S16		676.2718
S17		764.3242
S18		852.3767
S19		1028.4815

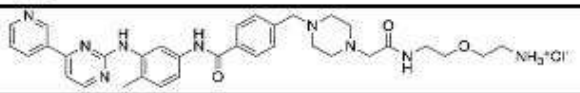
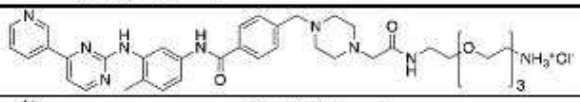
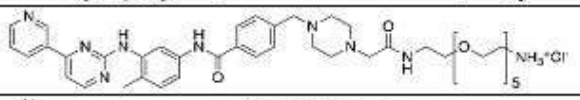
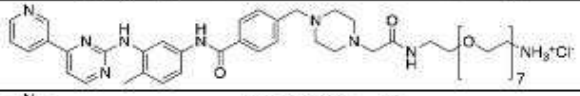
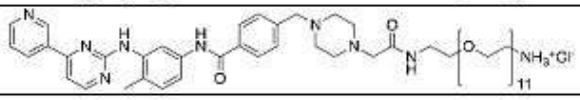
[0693]



[0694]

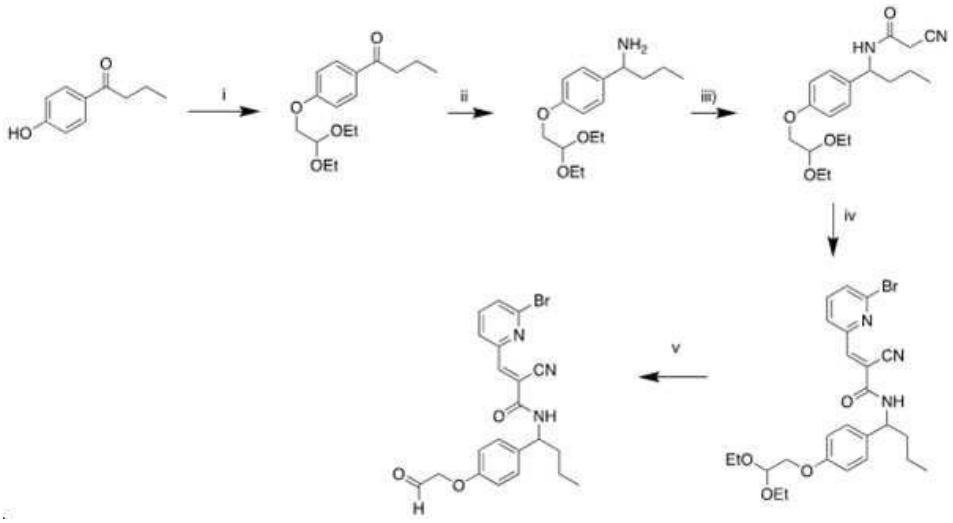
[0695] DMF (1 mL) 중 모노-Boc 보호된 디아민 링커 (0.1 mmol, 1 eq) 및 이마티닙-COOH (54 mg, 0.1 mmol, 1 eq)의 용액에 COMU (43 mg, 0.1 mmol, 1 eq) 및 DIPEA (48 μL)를 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반한 다음 빙 냉수로 급냉시켰다. 휘발성 물질을 진공에서 제거하고 조 혼합물을 분취 HPLC (방법 2)로 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 감압하에 증발시키고 잔류물을 DCM (1 mL)에 용해시키고 디옥산 (4M, 1 mL) 중 무수 HCl 용액으로 처리하였다. 1 시간 후, 휘발성 물질을 감압 하에서 제거하고 잔류물을 동결 건조하여 과량의 산을 제거했다. 분석 데이터 (HRMS)는 표 V에 제공된다.

[0696] [표 V]

예	구조	m/z [M+H]+
S20		624.3332
S21		712.3857
S22		800.4381
S23		888.4905
S24		1064.5954

[0697]

[0698] *실시예 6 2-(((2-(4-(1-((E)-3-(6-브로모피리딘-2-일)-2-시아노아크릴아미도)부틸)페녹시)에틸리덴)아미노)옥시)아세트산의 제조*

[0699] 

[0700] **반응식 XX:** i) 브로모아세트알데히드 디에틸 아세탈, K_2CO_3 (2 eq), DMF (5 Vol), 85 ℃, ii) NH_2OH HCl (2eq), Na_2CO_3 (3 eq), Ethanol/H_2O, 80℃, 이어서 Raney-Ni (w/w), H_2 (60 psi), EtOH, RT; iii) HOAt (1 eq), HATU (1 eq), DIPEA (2.2 eq), iv) DMF, RT,o.n.; 6-브로모피콜린알데히드, 피페리딘 THF; v) I2, 아세톤, 4 h, 이어서 아미녹시아세트산, 물/아세토니트릴 pH = 4.5.

[0701] *실시예 7 (E)-3-(6-브로모피리딘-2-일)-2-시아노-N-(1-(4-(2,2-디에톡시에톡시)페닐) 부틸)아크릴아미드의 제조*

[0702] DMF (5 Vol) 중의 1-(4-히드록시페닐)부탄-1-온 (1 eq) 용액에 브로모아세트알데히드 디에틸 아세탈 (1.2 eq) 및 K2CO3 (2 eq)를 첨가하였다. 혼합물을 밤새 85 ℃에서 교반한 다음 디에틸 에테르 (20 Vol)로 희석하고 물로 3 회 세척하였다. 유기상을 무수 MgSO4로 건조시키고, 여과하고 용매를 감압하에 제거하였다. 조 물질을 에탄올 (mmol 당 1.5mL)에 용해시키고, NH2OH · HCl (2 eq), Na2CO3 (3 eq) 및 물 (mmol 당 2.5mL)을 첨가하였다. 반응 플라스크를 밤새 80 ℃로 가열하였다. 냉각 후, 침전물을 흡입 여과하고, 조 생성물을 냉수로 세척하고 진공하에 건조시켜 원하는 옥심 생성물을 88 % 수율로 수득하였다. 그 다음 옥심을 에탄올 (0.05 M)에 용해시키고 Raney-Ni를 첨가하고 H2 (60 psi)에 16 시간 동안 노출시켰다. 혼합물을 셀라이트 패드로 여과한 다음 용매를 제거하여 아민 생성물을 회수하였다. 생성된 아민 (1 eq)을 DMF (0.5M) 중에서 시아노아세트산 (1eq), HOAt (1 eq), HATU (1 eq) 및 DIPEA (2.2 eq)와 반응시켰다. 혼합물을 밤새 반응하도록 방치하고, 얼음물을 첨가하고 반응 혼합물을 DCM으로 3 회 추출하였다. 유기상을 무수 MgSO4로 건조시키고, 여과하고 용매를 감압하에 제거하였다. 조 물질을 DCM 중 0-20 % MeOH의 구배를 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 원하는 생성물

2- 시아노-N-(1-(4-(2,2-디에톡시에톡시)페닐)부틸)아세트아미드를 65 % 수율로 얻었다.

[0703] THF (0.1M) 중 2-시아노-N-(1-(4-(2,2-디에톡시에톡시)페닐)부틸)아세트아미드(1 eq)의 용액에 6-브로모피콜린알데하이드 (4 eq) 및 피페리딘 (0.01 eq)를 가하였다. 혼합물을 70 ℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 증발시키고 생성물을 DCM 중 0 에서 20 %까지의 MeOH의 구배를 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피 후에 단리하였다.

[0704] *실시예 8 2-(((2-(4-(1-((E)-3-(6-브로모피리딘-2-일)-2-시아노아크릴아미도)부틸)페녹시)에틸리덴)아미노)옥시)아세트산의 제조*

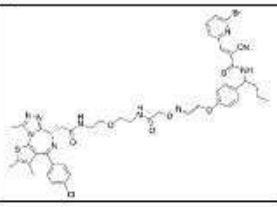
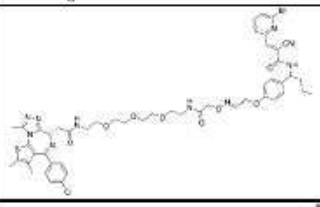
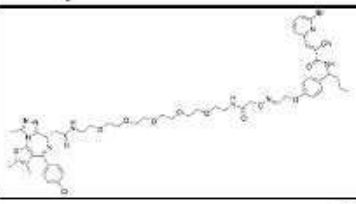
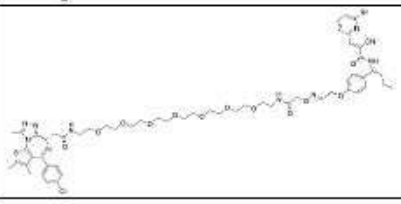
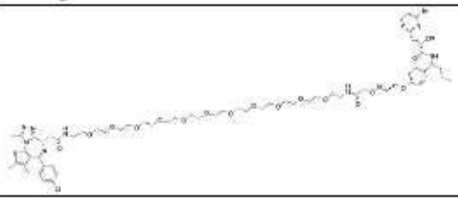
[0705] 아세톤 (20 mL, 시약 ACS, ≤0.5 % H2O) 중 아세탈 (1, 5 mmol)과 요오드 (125 mg, 0.5 mmol)의 혼합물을 실온에서 4 시간 동안 교반했다. 그 다음 아세톤을 진공하에 제거하고 잔류물을 디클로로메탄 (50 mL)으로 희석하였다. 혼합물을 5 % 수성 Na2S2O3 (10 mL), H2O (20 mL) 및 염수 (20 mL)로 연속적으로 세척하였다. 유기층을 분리하고 Na2SO4로 건조하고 여과 하였다. 용매를 제거하여 pH = 4.5 (아세트산으로 조정)에서 물/아세토니트릴의 혼합물에서 아미노옥시아세트산 (1.2 eq)과 2 시간 동안 반응시킨 생성물을 얻었다. 용매를 감압 하에서 제거하고 조 물질을 분취용 HPLC (방법 1)로 정제하여 순수한 물질을 얻었다.

[0706] *실시예 9 데그라신-컨쥬게이트의 제조*

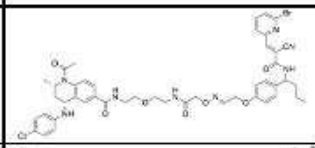
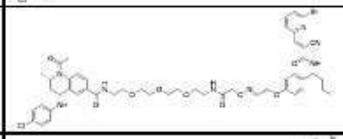
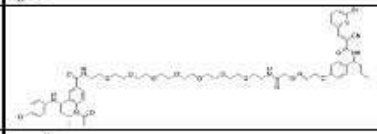
[0707] DMF (0.05 M) 중 탄두-링커 아민 (0.01 mmol) 용액에 2-(((2-(4-(1-((E)-3-(6-브로모피리딘-2-일)-2시아노아크릴아미도)부틸)페녹시)에틸리덴)아미노)옥시)아세트산 (0.01mmol), COMU (0.01mmol) 및 DIPEA (0.05mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 다음 물을 첨가하고 용매를 진공 하에서 제거하였다. 조 물질을 역상 HPLC (방법 1)로 정제하여 최종 화합물을 얻었다. 분석 데이터 (HRMS)는 표 VIa-VId에 제공된다.

[0708] 표 VIa

[0709]

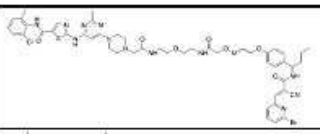
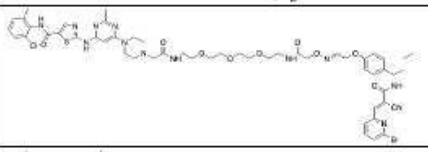
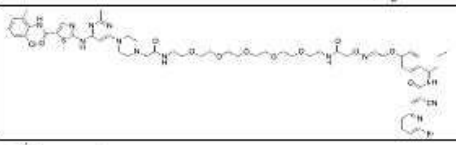
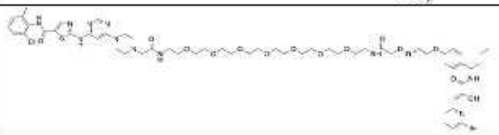
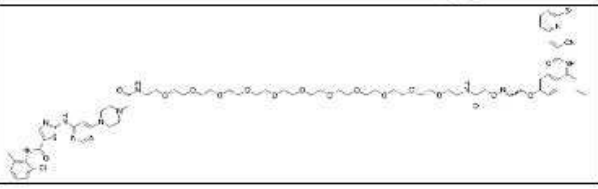
예	구조	m/z [M+H]+
05JQ1		983.2351
05JQ2		1071.2875
05JQ3		1159.3399
05JQ4		1247.3924
05JQ5		1423.4972

[0710] [표 VIb]

예	구조	m/z [M + H] +
05IB1		941.2674
05IB2		1029.3199
05IB3		1117.3723
05IB4		1203.4247
05IB5		1381.5296

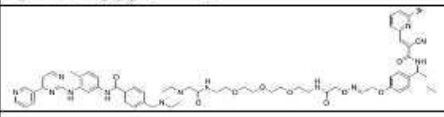
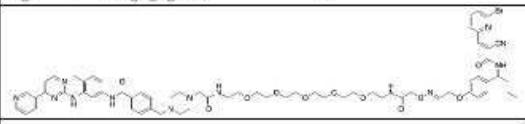
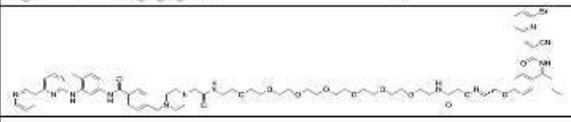
[0711]

[0712] [표 VIc]

예	구조	m/z [M+H]+
05DA1		1084.2940
05DA2		1172.3464
05DA3		1260.3989
05DA4		1348.4513
05DA5		1524.5561

[0713]

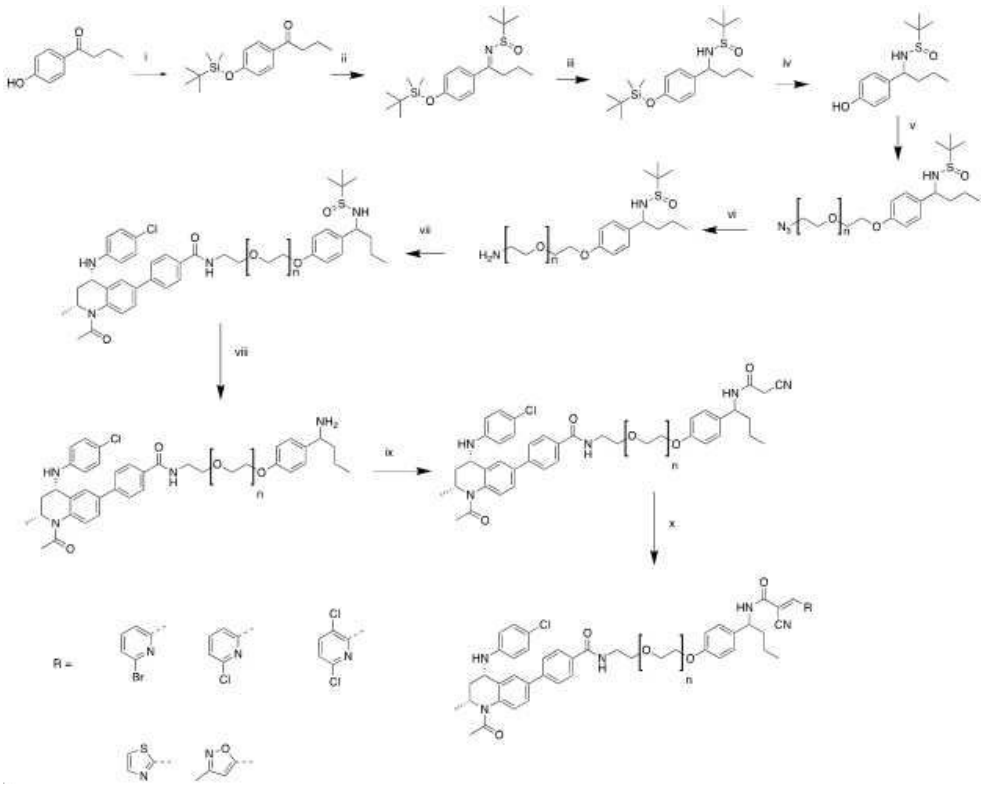
[0714] 표 VId

예	구조	m/z [M+H]+
05IM1		정확히 1120.4079
05IM2		정확히 1208.4603
05IM3		정확히 1296.5127
05IM4		정확히 1384.5651
05IM5		정확히 1560.6700

[0715]

[0716] *실시예 10 N-결합 화합물 및 O-결합 화합물의 제조*

[0717] O-링크된 화합물



[0718]

[0719] **1-(4-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)페닐)부탄-1-온**

[0720] DMF (mmol 당 1mL) 중 1-(4-히드록시페닐)부탄-1-온 (1 eq) 용액에 이미다졸 (2 eq)을 첨가한 다음 tert-부틸디메틸실릴 클로라이드 (1.3 eq)를 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 디에틸에테르와 헵탄의 혼합물 (1 : 1, 10mL/mmol)을 첨가하고 용액을 물 (3X) 및 염수로 세척하였다. 유기층을 MgSO4상에서 건조시키고, 용매를 제거하여 -20 ℃에서 저장시 고형화된 옅은 노란색 오일을 얻었다. 수율 : 정량적.

[0721] **(N-(1-(4-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)페닐)부틸리덴)-2-메틸프로판-2-술핀아미드**

[0722] 톨루엔 (mmol 당 2mL) 중 1- (4-((tert- 부틸디메틸실릴)옥시)페닐)부탄-1-온 (1 eq) 용액에 2-메틸-2-프로판술핀아미드 (2 eq)를 첨가한 후 티타늄 에톡사이드 (4 eq)를 첨가했다. 반응 혼합물을 90 ℃에서 16 시간 동안

가열하였다. 에틸 아세테이트를 첨가하고, 반응을 과량의 물로 켄칭하고 15 분 동안 교반한 후 셀라이트 패드상에서 여과하였다. 유기층을 분리하고 수상을 에틸 아세테이트로 2 회 추출하였다. 조합된 유기상을 MgSO4상에서 건조시키고, 용매를 제거하고, 조 생성물을 헵탄 중 에틸 아세테이트의 0 % 내지 30 %의 구배를 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 수율 : 60 %.

[0723] **N-(1-(4-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드**

[0724] 0 ℃에서 THF (mmol 당 2.5mL) 중 설피니민 (1 eq) 용액에 L-셀렉트라이드 (THF 중 1.0M, 3 eq)를 첨가했다. 생성된 용액을 3 시간에 걸쳐 실온으로 가온되도록 하였다. TLC에 의한 반응 혼합물의 분석은 출발 이민의 소비를 보여 주었다. 반응 혼합물을 포화 중탄산 나트륨 용액으로 급냉(quench)시켰다. 유기층을 분리하고 수상(aqueous phase)을 에틸 아세테이트로 2 회 추출하였다. 조조합한 유기상을 MgSO4상에서 건조시키고, 용매를 제거하고, 조 생성물을 헵탄 중 10 % 내지 50 %의 에틸 아세테이트의 구배를 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 분석적으로 순수한 생성물을 80 % 수율로 제공하였다.

[0725] **N-(1-(4-히드록시페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드**

[0726] DMF (mmol 당 4mL) 중의 N-(1-(4-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드 (1 eq) 용액을 실온에서 1 시간 동안 TBAF (THF 중에서 1M, 1.2 eq)로 처리하였다. 반응 혼합물을 pH = 5.5에서 인산염 완충액으로 급냉시키고 용매를 감압하에 제거하였다. 조 물질을 DCM에 용해시키고 물로 2 회 세척하고 마지막으로 염수로 세척하였다. 유기상을 MgSO4상에서 건조시키고, 용매를 제거하고 조 생성물을 추가 정제없이 사용하였다. 수율 : 정량적

[0727] **N-(1-(4-((20-아지도-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코실)옥시)페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드**

[0728] DMF (mmol 당 5mL) 중 N-(1-(4-히드록시페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드 (1 eq) 용액에 1-아지도-20-브로모-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코산 (1.2 eq) 및 K2CO3 (3 eq)를 첨가했다. 반응 혼합물을 70 ℃에서 2 시간 동안 격렬하게 교반하였다. DCM을 첨가하고 유기상을 소량의 물로 세척하였다. 수상을 DCM으로 2 회 추출하였다. 조합한 유기상을 MgSO4로 건조하고, 용매를 제거하고 조 생성물을 분취용 HPLC (방법 1)로 정제하였다. 수율 : 66 %.

[0729] **N-(1-(4-((20-아미노-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코실)옥시)페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드**

[0730] THF/물 (4:1, 5 mL/mmol) 중의 N-(1-(4-((20-아지도-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코실)옥시)페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드 용액에 트리페닐포스핀 (2 eq)을 첨가했다. 반응 혼합물을 70 ℃에서 6 시간 동안 가열하였다. 용매를 감압하에 증발시키고 원하는 생성물을 분취용 HPLC (방법 1)로 분리하였다. 수율 : 72 %.

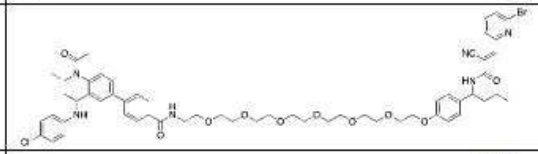
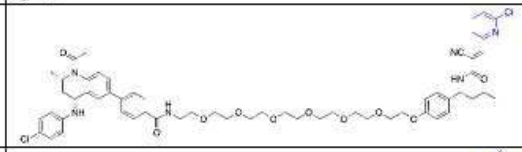
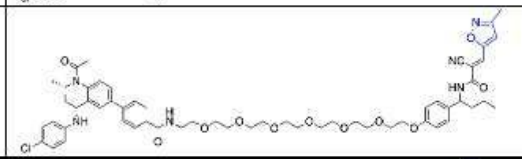
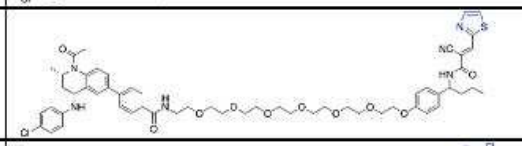
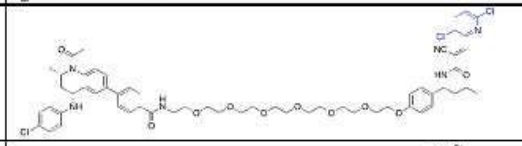
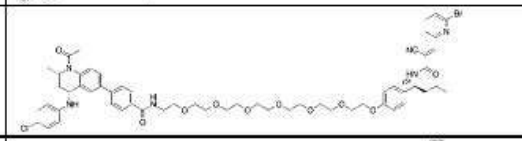
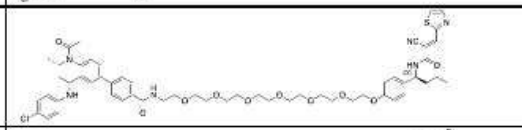
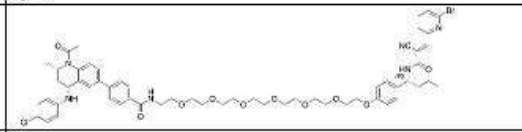
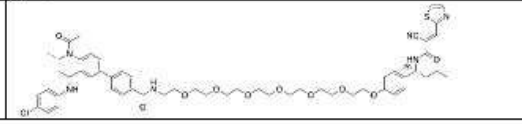
[0731] **iBET-726 컨쥬게이션**

[0732] DMF (mmol 당 100ml) 중 링커-아민 화합물 (1 eq) 및 iBET726 (1 eq) 용액에 COMU (1 eq) 및 DIPEA (2.5 mircoL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반한 다음 빙 냉수로 급냉시켰다. 휘발성 물질을 진공에서 제거하고 조 혼합물을 분취 HPLC (방법 2)로 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 감압하에 증발시키고 잔류물을 DCM (1 mL)에 용해시키고 디옥산 (4M, 1 mL) 중 무수 HCl 용액으로 처리하였다. 1 시간 후, 휘발성 물질을 감압 하에서 제거했다. 포화 NaHCO3 용액을 염기성 pH에 첨가하고 혼합물을 DCM으로 3 회 추출하였다. 잔류물은 과량의 산을 제거하기 위해 동결 건조되었다. 조합한 유기상을 MgSO4로 건조시키고 용매를 제거하여 원하는 생성물을 얻었다.

[0733] *실시예 11 시아노아세트산 및 Knoevenagel 응축의 커플링 과정*

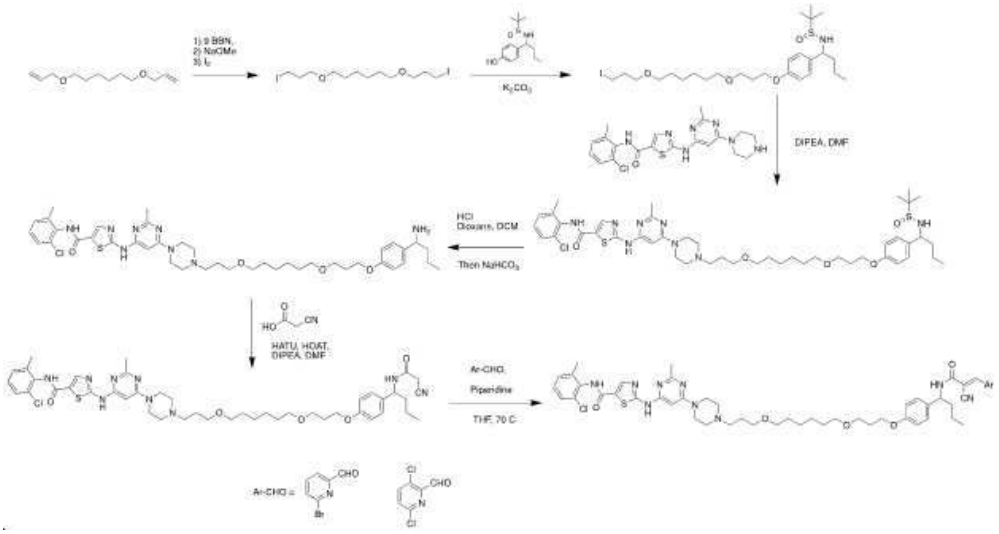
[0734] 이전 합성 단계 (1 eq)의 아민 생성물을 DMF (mmol 당 100ml) 중에서 시아노 아세트산 (1eq), HOAt (1 eq), HATU (1 eq) 및 DIPEA (2.2 eq)와 반응시켰다. 혼합물을 밤새 반응하도록 방치하고, 얼음물을 첨가하고 휘발성 성분을 진공하에 제거하였다. 조 생성물을 분취용 HPLC (방법 1)로 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 건조시키고, THF (mmol 당 100ml)를 첨가한 다음 원하는 알데히드 (3 eq) 및 촉매량의 피페리딘을 첨가하였다. 혼합물을 70 ℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압에서 증발시키고 생성물을 분취용 HPLC (방법 1)로 분리하였다.

[0735] [표 VII]

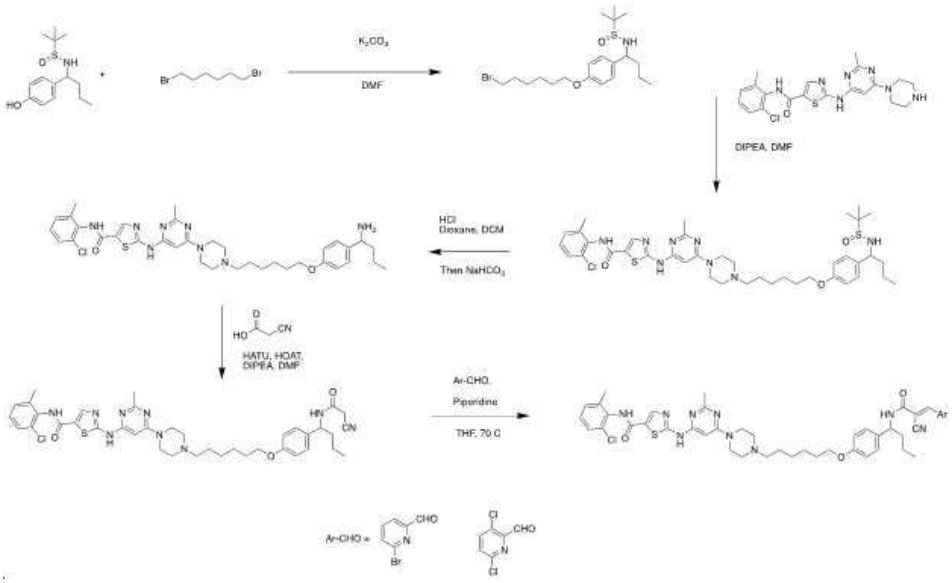
예	구조	m/z [M+H]+
05IB6		1123.3849
05IB7		1079.4374
05IB8		1048.7196
05IB9		1051.4340
05IB10		1113.3994
05IB13		1123.3841
05IB14		1051.4331
05IB15		1123.3844
05IB16		1051.4336

[0736]

[0737] *실시예 18: N, O-링크된 다사티닙계 화합물의 합성*



[0738]



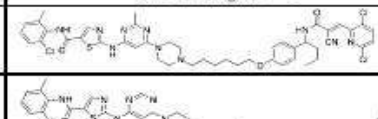
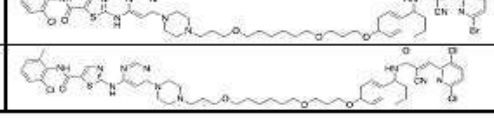
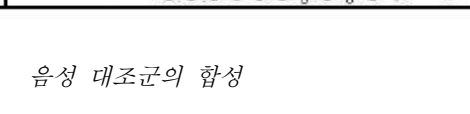
[0739]

[0740] 0℃에서 질소하에 5mL의 건조 THF 중 디알릴 에테르 (400mg, 2.02mmol)의 용액에 9BBN (THF 중 0.5mL, 10mL, 5mmol) 용액을 첨가하였다. 반응을 실온(r.t.)에서 교반하에 밤새 두었다. TLC 분석 (Hept에서 10 % AcOEt, KMnO4 염색)은 더 이상 알켄이 존재하지 않는 것을 보여주었다. 반응 혼합물을 다시 0 ℃에서 냉각시키고 NaOMe (MeOH 중 25 %, 12mmol)을 첨가한 다음 고체 요오드 (3.0g, 12mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 추가로 40 분 동안 반응하도록 두었다. Na2S2O3의 포화 용액을 첨가하여 Et2O로 추출하기 전에 반응을 급냉(quench)했다. 유기상을 MgSO4상에서 건조시키고, 휘발성 용매를 증발시키고 조 물질을 헵탄 중 AcOEt의 0 % 내지 20 %의 구배를 사용하여 FCC에 의해 정제하였다 (TLC 분석을 위한 KMnO4 염색). 651 mg, 71 % 수율을 얻었다.

[0741] DMF (1mL) 중 N-(1-(4-히드록시페닐)부틸)-2-메틸프로판-2-술핀아미드 (100 mg, 0.37 mmol) 용액에 디요도-유도체 (또는 디브로모 유도체) (0.74 mmol)를 첨가한 다음 K2CO3 (153 mg, 1.1 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2-3 시간 동안 교반하였다. LC-MS 및 TLC 분석은 더 이상 출발 물질을 나타내지 않았다. 반응을 DCM으로 희석하고 물로 세척하였다. 유기상을 MgSO4상에서 건조시키고 증발 건조시켰다. 조 물질을 헵탄 중 AcOEt의 10 %에서 80 %까지의 구배를 사용하여 FCC에 의해 정제하였다. 160 mg, 73 % 수율을 얻었다.

[0742] DMF (0.5mL) 중 요오도 또는 봄로 유도체 (0.099mmol)와 데스메틸다사티닙 (유리 염기, 40mg, 0.090mmol)의 혼합물에 DIPEA (46uL, 0.27mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 24 시간 동안 교반되도록 두었다. LC-MS 및 TLC 분석은 더 이상 출발 물질을 나타내지 않았다. 혼합물을 감압하에 증발 건조시켰다. 조 물질을 DCM 중 0 %에서 15 %까지의 MeOH의 구배를 사용하여 FCC에 의해 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 감압하에 증발시키고 잔류물을 DCM (1 mL)에 용해시키고 디옥산 (4M, 1 mL) 중 무수 HCl 용액으로 처리하였다. 1 시간

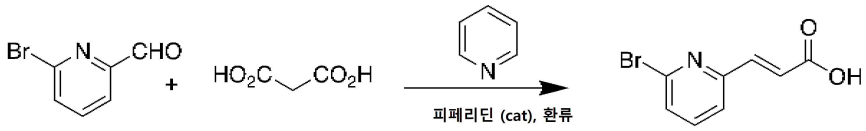
후, 휘발성 물질을 감압 하에서 제거했다. 포화 NaHCO3 용액을 염기성 pH에 첨가하고 혼합물을 DCM으로 3 회 추출하였다. 잔류물은 과량의 산을 제거하기 위해 동결 건조되었다. 조합한 유기상을 MgSO4로 건조시키고 용매를 제거하여 원하는 생성물을 80 % 수율로 얻었다. 이전 합성 단계 (1 eq)로부터의 아민 생성물을 DMF (mmol 당 100ml) 중 시아노아세트산 (1eq), HOAt (1 eq), HATU (1 eq) 및 DIPEA (2.2 eq)와 반응시켰다. 혼합물을 밤새 반응하도록 방치하고, 얼음물을 첨가하고 휘발성 성분을 진공하에 제거하였다. 조 생성물을 분취용 HPLC (방법 1)로 정제하였다. 원하는 생성물을 함유하는 분획을 건조시키고, THF (mmol 당 100ml)를 첨가한 다음 원하는 알데히드 (3 eq) 및 촉매량의 피페리딘을 첨가하였다. 혼합물을 70 ℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 용매를 감압하에 증발시키고 생성물을 분취용 HPLC (방법 1)로 분리하였다.

05DA6		925.2688
05DA7		915.2776
05DA8		1041.3495
05DA9		1033.5233

[0743]

[0744] *실시예 12 음성 대조군의 합성*

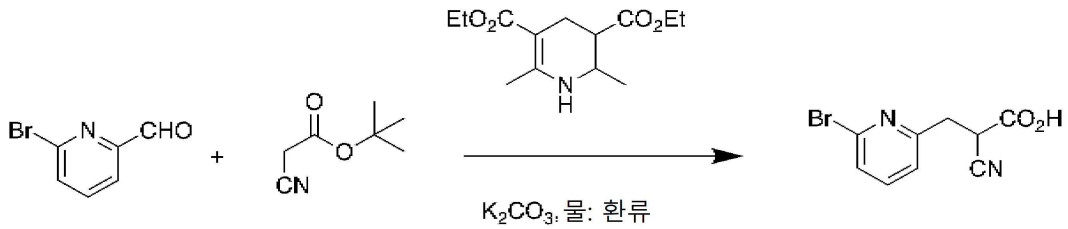
[0745] **(E)-3-(6-브로모피리딘-2-일)아크릴산.**



[0746]

[0747] 6- 브로모피콜린알데히드 (2.16mmol), 말론산 (0.45g, 4.32mmol), 피페리딘 (2.0mL), 피리딘 (20mL)의 혼합물을 3-40 시간 동안 환류에서 가열하였다. 휘발성 물질을 진공 하에서 제거하고 순수한 생성물을 에틸 아세테이트/헵탄 (76 % 수율)으로부터 결정화하여 정제하였다.

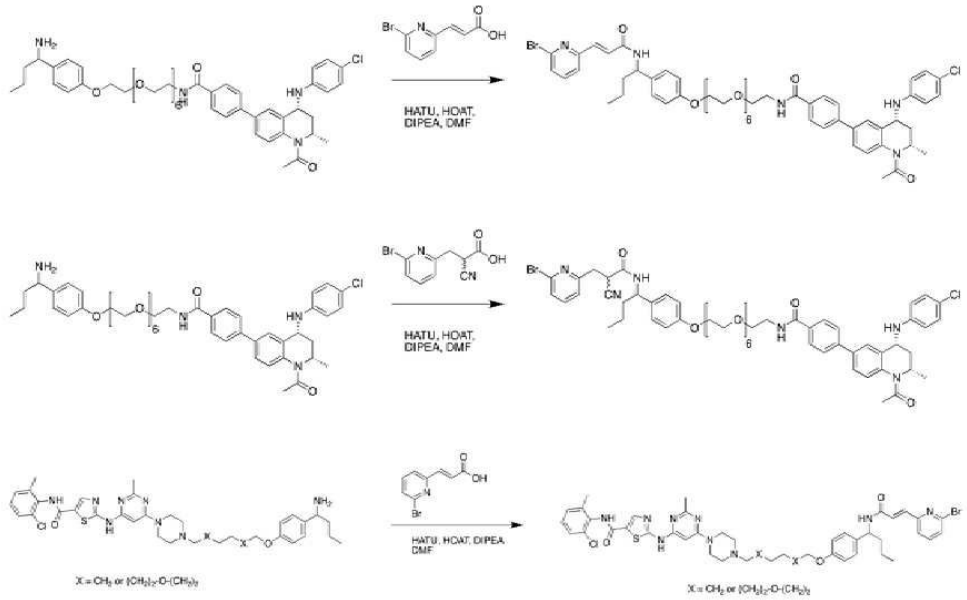
[0748] **3-(6-브로모피리딘-2-일)-2-시아노프로판산**



[0749]

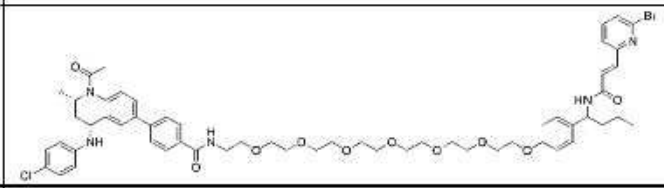
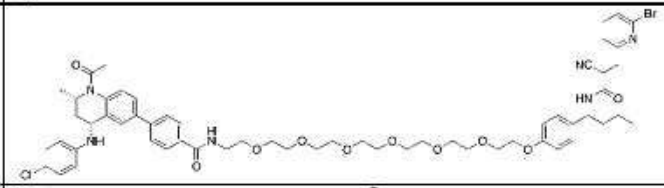
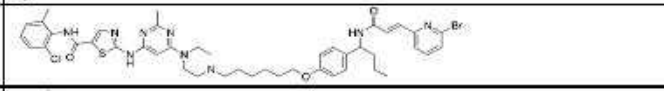
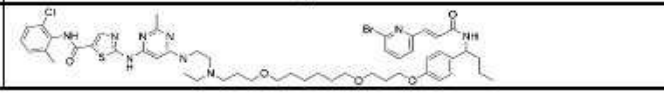
[0750] 수 (2.0 mL) 중 6-브로모피콜린 알데히드 tert-부틸 2-시아노아세테이트 (0.24 mmol), K2CO3 (0.02 mmol) 및 Hantzsch 에스테르 (0.24 mmol)의 혼합물을 100 ℃에서 12 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 조 용액을 에틸 아세테이트 (3 x 5 mL)로 추출하였다. 조합한 유기층을 염수로 세척하고 무수 Na2SO4로 건조시켰다. 감압 하에서 용매를 제거한 후, 잔류물을 DCM 중 0 %에서 20 %까지의 MeOH 구배를 사용하여 실리카상의 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하였다. 생성물을 유리 산으로 단리하였다 (52 % 수율).

[0751] **비활성 컨쥬게이트의 합성**



[0752]

[0753] 컨쥬게이트된 아민-함유 iBET726 (1 eq)을 DMF (mmol 당 100ml) 중에서 (E)-3-(6-브로모피리딘-2-일)아크릴산 또는 3-(6-브로모피리딘-2-일)-2-시아노프로판산(1 eq), HOAt (1 eq), HATU (1 eq) 및 DIPEA (2.2 eq)와 반응시켰다. 혼합물을 밤새 반응하도록 방치하고, 얼음물을 첨가하고 휘발성 성분을 진공하에 제거하였다. 조 생성물을 분취용 HPLC (방법 1)로 정제하였다.

예	구조	m/z [M+H]+
05IB11		1098.3435
05IB12		1125.4022
05DA10		890.2705
05DA11		1016.3542

[0754]

[0755] *실시예 13 데그라신계 대표 화합물에 의한 브로모- 및 말단-외(extra-terminal) 도메인 단백질 (BET) 단백질의 분해*

[0756] 세포 배양. HeLa (CCL-2) 및 HEK293 (CRL-1573) 세포를 ATCC에서 구입하여 10 % FBS, 100 μg/mL 페니실린/스트렙토마이신 및 L-글루타민이 보충된 DMEM 배지 (Gibco)에서 배양하였다. 세포는 37 ℃ 및 5 % CO2에서 성장시켰으며 30 계대 이하로 유지하였다. 모든 세포주는 Lonza의 MycoAlert 키트를 사용하여 마이코플라스마 오염에 대해 일상적으로 테스트되었다.

[0757] HeLa (5×10^5) 및 HEK293 (1×10^6) 세포는 최종 DMSO 농도가 0.1 % v/v 인 1μM 화합물로 처리하기 전에 표준 6-웰 플레이트 (2mL 배지)에 밤새 파종하였다. 6 시간 인큐베이션 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85 μL RIPA 완충액

(Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물을 원심 분리 (20000g, 10 분, 4 ℃)로 명확히하고(clarify), 상층액의 총 단백질 함량을 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량했다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)를 사용하여 준비하였다.

[0758] 면역블롯팅(Immunoblotting). 단백질을 NuPage 4-12 % Bis-Tris 겔에서 SDS-PAGE로 분리한 후 습식 전이를 사용하여 Amersham Protran 0.45 NC 니트로셀룰로오스 막 (GE Healthcare)으로 전달했다. 0.1 % Tween-20과 함께 Tris 완충 식염수 (TBS)에서 5 % w/v 밀크를 사용하여 막을 차단했다. 블롯은 항-Brd2 (Abcam ab139690, 1 : 2,000 희석), 항-Brd3 (Abcam ab50818, 1 : 500 희석), 및 항-Brd4 (Abcam ab128874, 1 : 1,000 희석) 1차 항체를 사용하여 적절하게 프로브되었다 (4 ℃에서 밤새). 다음날, 블롯을 TBST로 세척하고 항-튜불린 hFAB-로다민 (BioRad, 12004166) 1 차 항체, 및 항-토끼 IRDye 800CW (Licor 1 : 10,000 희석) 또는 항-마우스 IRDye 800CW (Licor 1 : 10,000 희석) 2 차 항체와 함께 인큐베이션(RT에서 1 시간)했다. 블롯은 Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System을 사용하여 현상하였고 밴드 정량화는 Image Studio 소프트웨어 (LiCor)를 사용하여 수행하였다. 밴드 강도는 튜불린 로딩 컨트롤로 정규화하였고 평균 0.1 % DMSO 비히클 강도의 %로 보고되었다. 분해 데이터는 Prism (Graphpad, 버전 8)을 사용하여 플롯하고 분석하였다.

[0759] 도 1의 HEK293 용해물로부터의 대표적인 웨스턴 블롯은 1 μM 화합물로 6 시간 처리한 후 Brd2, Brd3 및 Brd4 단백질 수준의 고갈을 보여준다. MZ1은 양성 대조군으로 사용되었다. 각 레인 아래에 보고된 값은 평균 0.1 % DMSO 대조군에 비해 BET의 풍부함을 나타낸다.

[0760] *실시예 14 05IB11의 음성 SAR*

[0761] HEK293 (1 x 10^6) 세포를 DMSO, 1 μM 05IB11 또는 1 μM 05IB6과 함께 0.1 % v/v의 최종 DMSO 농도로 6 시간 동안 인큐베이트하였다. 3회의 독립적인 처리 (n = 3)로부터의 세포를 RIPA 완충액으로 용해하고 Brd4 및 β-튜불린에 대해 면역 블롯팅했다. 05IB6에서 Brd4 수준의 상당한 고갈이 관찰되었지만 음성 대조군 05IB11로 처리한 후는 최소 고갈이 있었다. 결과는 도 2에 나타나 있다.

[0762] *실시예 15 데그라신계 대표 화합물에 의한 농도-의존적 BET 분해*

[0763] HeLa (5 x 10^5) 및 HEK293 (1 x 10^6) 세포를 원하는 농도 (1 nM - 10 μM)의 화합물로 처리하기 전에 표준 6-웰 플레이트 (2 mL 배지)에 밤새 파종하였는데, 최종 DMSO 농도는 0.1 % v/v이었다. 6 시간 처리 시간 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85 μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물을 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량화하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액(Invitrogen)을 사용하여 제조하였다.

[0764] 도 3의 대표적인 블롯은 증가하는 농도의 대표적인 화합물로 처리한 후 Brd2, Brd3 및 Brd4 단백질 수준의 고갈을 보여준다. 밴드 강도는 β-튜불린 로딩 컨트롤로 정규화되었고 평균 0.1 % DMSO 비히클 강도의 %로 보고되었으며, 각 지점은 두 개의 독립적인 실험 (n = 2)의 평균 ± SEM을 나타낸다. Prism (Graphpad, 버전 8)을 사용하여 분해 데이터를 플롯하고 분석하였다.

[0765] 표 VIII은 대표적인 화합물에 대한 DC50 매개 변수를 보여주는데, 여기서 Dmax는 관찰된 최대 분해이고, DC50은 Dmax의 50 %에 도달하기 위해 필요한 농도 및 Abs이다. pDC50은 DMSO에 비해 단백질의 50 %를 고갈시키기 위해 필요한 -log (농도)이다.

[0766]

[0767] 표 VIII. 데그라신계 대표 화합물에 의한 농도-의존적 분해

[0768] D_{max}: + (D_{max} ≤ 25%); ++ (26%≤ D_{max} ≤ 50%); +++ (51%≤ D_{max} ≤ 70%); ++++ (71%≤ D_{max});

[0769] DC_{50}: A (DC_{50} ≤ 50 nM); B (51nM ≤ DC_{50} ≤ 500 nM); C (501nM ≤ DC_{50}).

[0770] [표 VIII]

	표적	HEK293		HeLa	
		D_{max} (%)	DC_{50} (nM)	D_{max} (%)	DC_{50} (nM)
05IB1	Brd4 (L)	++++	A	++	B
	Brd4 (S)	++++	A	++++	A
	Brd3	++++	A	++	A
	Brd2	+++	A	+	B
05IB2	Brd4 (L)	++++	A	++++	B
	Brd4 (S)	++++	A	++++	B
	Brd3	++++	B	++	B
	Brd2	+++	B	++	B
05IB3	Brd4 (L)	++++	A	++++	B
	Brd4 (S)	++++	A	++++	A
	Brd3	++++	A	++++	B
	Brd2	++++	B	++++	B
05IB6	Brd4 (L)	++++	A	++++	B
	Brd4 (S)	++++	A	++++	A
	Brd3	+++	B	++++	A
	Brd2	++	B	++++	A
05IB11	Brd4 (L)	+	-	+	-
	Brd4 (S)	++	-	+	-
	Brd3	+	A	++	B
	Brd2	+	-	+	-
05IB12	Brd4 (L)	+	-	+	-
	Brd4 (S)	++	-	+	-
	Brd3	+	-	++	-
	Brd2	+	-	+	-
05IB9	Brd4 (L)	++++	A	++++	A
	Brd4 (S)	++++	A	++++	A
	Brd3	+++	A	+++	A
	Brd2	+++	A	++++	B
05IB10	Brd4 (L)	++++	A	+++	A
	Brd4 (S)	++++	A	++++	B
	Brd3	++++	B	++++	B
	Brd2	+++	B	++++	A

[0771]

[0772] *실시예 16 데그라신계 대표 화합물에 의한 시간-의존적 BET 분해*

[0773] HeLa (3×10^5) 및 HEK293 (0.5×10^6) 세포를 1 μM 농도의 화합물로 처리하기 전에 표준 6-웰 플레이트 (2mL 배지)에 밤새 파종하였는데, 최종 DMSO 농도가 0.1 % v/v 이었다. 원하는 시간 (0 - 8 시간) 동안 인큐베이션 한 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85 μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물을 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액(Invitrogen)을 사용하여 제조하였다.

[0774] 도 4의 대표적인 블롯은 다양한 시점에서 대표적인 화합물로 1 μM 처리 후 Brd2, Brd3 및 Brd4 단백질 수준의 고갈을 보여준다. 밴드 강도는 β-튜불린 로딩 컨트롤로 정규화되었고 평균 0.1 % DMSO 비히클 강도의 %로 보고되었으며, 각 지점은 두 개의 독립적인 실험 (n = 2)의 평균 ± SEM을 나타낸다. 분해 데이터는 Prism (Graphpad, 버전 8)을 사용하여 플롯되고 분석되었다.

[0775] 표 IX는 HEK293 및 HeLa 세포의 대표적인 화합물에 대한 시간 경과 매개 변수를 보여준다. 여기서 Dmax는 관찰된 최대 분해이고, T1/2 (h)는 Dmax및 Abs의 50 % 에 도달하기 위해 필요한 시간이다. T1/2 (h)는 DMSO에 비해 단백질의 50 %를 고갈시키기 위해 필요한 시간이다.

[0776] [표 IX] 데그라신계 대표 화합물에 의한 시간 의존적 분해

	표적	HEK293			HeLa		
		D_{max} (%)	$T_{1/2}$ (h)	Abs. $T_{1/2}$ (h)	D_{max} (%)	$T_{1/2}$ (h)	Abs. $T_{1/2}$ (h)
05IB1	Brd4 (L)	100	2.9	2.9	100	7.7	7.7
	Brd4 (S)	100	1.8	1.8	100	8.7	8.7
	Brd3	100	3.2	3.2	100	6.5	6.5
	Brd2	100	9.0	9.0	100	10.1	10.1
05IB2	Brd4 (L)	100	2.0	2.0	67	2.1	4.1
	Brd4 (S)	100	0.8	0.8	67	2.1	3.1
	Brd3	100	2.9	2.9	93	9.7	9.7
	Brd2	76	1.1	1.7	50	1.4	N/A
05IB3	Brd4 (L)	96	1.1	1.2	79	1.6	2.3
	Brd4 (S)	100	1.0	1.0	100	2.9	2.9
	Brd3	100	3.1	3.1	100	4.2	4.2
	Brd2	83	2.3	3.1	54	0.5	1.9
05IB6	Brd4 (L)	100	1.0	1.0	100	2.7	4.0
	Brd4 (S)	97	0.7	0.7	100	2.7	2.7
	Brd3	74	0.9	1.9	90	5.5	6.4
	Brd2	76	0.3	0.5	79	3.1	4.0
05IB9	Brd4 (L)	96	0.6	0.6	100	2.0	3.3
	Brd4 (S)	96	0.7	0.8	100	3.1	3.1
	Brd3	60	1.1	3.0	80	9.6	13.6
	Brd2	73	0.2	0.3	76	6.1	9.6
05IB10	Brd4 (L)	100	0.5	0.5	100	3.1	4.4
	Brd4 (S)	99	0.6	0.6	100	2.2	2.2
	Brd3	90	0.7	1.4	100	4.9	4.9
	Brd2	82	0.3	0.3	97	3.1	3.9

[0777]

[0778] *실시예 17 데그라신계 대표 화합물의 기계론적 평가*

[0779] HEK293 (1 x 10^6) 세포를 표준 6-웰 플레이트 (2 mL 배지)에 밤새 파종한 후 10 μM 보르테조밉으로 전처리했다. 0.5 시간의 사전 인큐베이션 시간 후, 세포를 비히클, 1 μM MZ1 또는 1 μM 05IB6으로 처리하여 0.2 % v/v의 최종 총 DMSO 농도를 산출했다. 6 시간 배양 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85 μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물을 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고, 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)을 사용하여 제조하였다.

[0780] 도 5의 대표적인 블롯은 10 μM 보르테조밉의 존재 및 부재하에 1 μM 05IB6 또는 MZ1로 6 시간 처리한 후 Brd4 단백질 수준의 고갈을 보여준다. 05IB6에 의한 분해는 보르테조밉의 존재 하에서 완전히 차단되는데, 이는 분해가 프로테아좀 의존적임을 시사한다.

[0781] *실시예 19 데그라신계 대표 화합물에 의한 ABL2 분해*

[0782] K562 (CCL-243) 세포를 ATCC에서 구입하여 10 % FBS 및 100 μg/mL 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 IMDM 배지 (Gibco)에서 배양하였다. 세포를 37 ℃ 및 5 % CO2에서 성장시키고 30 계대 이하로 유지했다. 모든 세포주는 Lonza의 MycoAlert 키트를 사용하여 마이코플라스마 오염에 대해 일상적으로 테스트되었다.

[0783] K562 (1-1.5 x 10^6) 세포는 0.1 % v/v의 최종 DMSO 농도에서 1 μM 화합물로 처리하기 전에 표준 6-웰 플레이트 (2 mL 배지)에 밤새 파종하였다. 24 시간 인큐베이션 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 80 μL RIPA 완충액(Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물은 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)을 사용하여 제조하였다. 면역블롯 분석을 위해 다음 항체가 사용되었다: 항-ABL2 (ab134134, 1:1,000 희석) 및 항-튜불린 hFAB- 로다민 (BioRad, 12004166, 1 : 10,000 희석).

[0784] 도 6의 K562 용해물의 대표적인 웨스턴 블롯은 1 μM 다사티닙계 화합물로 24 시간 처리한 후 ABL2 단백질 수준의 고갈을 보여준다. DAS-6-2-2-6-CRBN (PROTAC; doi: 10.1002/anie.201507634)를 양성 대조군으로 사용했다.

[0785] *실시예 20 데그라신계 대표 화합물에 의한 농도-의존적 ABL2 분해*

[0786] K562 (1.2 x 10^6) 세포는 원하는 농도 (1 nM - 10 μM)의 화합물로 처리하기 전에 밤새 표준 6-웰 플레이트 (2 mL 배지)에 파종되었는데 최종 농도는 최종 DMSO 농도는 0.1 % v/v 이었다. 24 시간 처리 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 80 μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물을 원심 분리 (20000g, 10 분, 4 ℃)로 명확히 하였고 상층액의 총 단백질 함량을 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량했다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)을 사용하여 제조하였다.

[0787] 도 7의 대표적인 블롯은 대표적인 화합물의 농도를 증가시켜 처리한 후 ABL2 단백질 수준의 고갈을 보여준다. 밴드 강도는 β-튜불린 로딩 컨트롤로 정규화되었고 평균 0.1 % DMSO 비히클 강도의 %로 보고되었으며, 각 지점은 두 개의 독립적인 실험 (n = 2)의 평균 ± SEM을 나타낸다. 분해 데이터는 Prism (Graphpad, 버전 8)을 사용하여 플롯되고 분석되었다.

[0788] *실시예 21 데그라신계 대표 화합물의 프로테아좀 의존성*

[0789] HEK293 (1 x 10^6) 세포를 표준 6-웰 플레이트 (2 mL 배지)에 밤새 파종한 후 10 μM 보르테조밉으로 전처리했다. 0.5 시간의 사전 인큐베이션 시간 후, 세포를 비히클, 1 μM MZ1 또는 1 μM 05IB6으로 처리하여 0.2 % v/v의 최종 전체 DMSO 농도를 산출했다. 6 시간 배양 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85 μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물은 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)를 사용하여 제조하였다.

[0790] 도 5의 대표적인 블롯은 10 μM 보르테조밉의 존재 및 부재하에 1 μM 05IB6 또는 MZ1로 6 시간 처리한 후 Brd4 단백질 수준의 고갈을 보여준다. 05IB6에 의한 분해는 보르테조밉의 존재 하에서 완전히 차단되어 그 분해가 프로테아좀 의존적임을 시사한다.

[0791] *실시예 22 HEK293 세포에서 데그라신계 대표 화합물의 기계적 평가*

[0792] HEK293 (1 x 10^6) 세포를 억제제 (5 μM 데그라신 또는 1 μM I-BET726)로 전처리하기 전에 표준 6-웰 플레이트 (2 mL 배지)에 밤새 파종했다. 0.5 시간의 사전 인큐베이션 시간 후, 세포를 비히클, 0.1 μM MZ1 또는 0.1 μM 05IB9로 처리하여 0.2 % v/v의 최종 전체 DMSO 농도를 산출했다. 6 시간 배양 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85 μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물은 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)를 사용하여 제조하였다.

[0793] 도 8의 HEK293 용해물의 대표적인 블롯은 5μM 데그라신 및 1μM I-BET726의 존재 및 부재하에 0.1μM 05IB9 또는 MZ1로 6 시간 처리한 후 Brd4 단백질 수준의 고갈을 보여준다. 05IB9에 의한 분해는 데그라신 또는 I-BET726의 존재하에 완전히 차단되는 반면 MZ1 분해는 I-BET726에 의해서만 차단된다.

[0794] *실시예 23 HAP1 세포에서 데그라신계 대표 화합물의 기계적 평가*

[0795] 억제제 (10 μM 보르테조밉, 5 μM 데그라신 또는 1 μM I-BET726)로 전처리하기 전에 HAP1 (1 x 10^6) 세포를 표준 6-웰 플레이트 (2 mL 배지)에 밤새 파종했다. 0.5 시간의 사전 인큐베이션 시간 후, 세포를 비히클, 0.1 μM MZ1 또는 0.1 μM 05IB9로 처리하여 0.2 % v/v의 최종 전체 DMSO 농도를 산출했다. 6 시간 배양 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85 μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물은 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)를 사용하여 제조하였다.

[0796] 도 9의 HAP1 용해물의 대표적인 블롯은 5μM 데그라신 및 10μM 보르테조밉의 존재 및 부재하에 0.1μM 05IB9 또는 MZ1로 6 시간 처리한 후 Brd4 단백질 수준의 고갈을 보여준다. Brd4 밴드 강도는 β-튜불린 로딩 제어로 정규화되었고 평균 0.1 % DMSO 비히클 강도의 %로 도 9B에보고되었다. 각 막대는 중복으로 수행된 세 가지 독립적인 실험의 평균 ± SEM이다(n=3). 05IB9에 의한 분해는 보르테조밉과 데그라신의 존재 하에서 완전히 차단

된 반면 MZ1 분해는 보르테조밉에 의해서만 차단되었다. 이들 데이터는 05IB9에 의한 HAP1 세포에서의 Brd4 분해가 프로테아좀 의존적임을 시사한다. 또한 과도한 데그라신은 05IB9와 경쟁하여 Brd4의 분해를 감소시킨다.

[0797] *실시예 24 MV4-11 세포에서 c-MYC 수준 및 PARP 절단에 대한 데그라신계, BET- 표적화 화합물의 효과.*

[0798] MV4-11 (0.7 x 10^6 세포/mL)을 원하는 농도의 화합물과 0.1 % v/v의 최종 DMSO 농도로 처리하기 전에 밤새 10cm 플레이트 (10 % FBS 및 L-글루타민으로 보충된 10mL DMEM)에 파종했다. 6 시간 배양 후, 세포를 DPBS (Gibco)로 2 회(2x) 세척하고 cOmplete Mini EDTA-free 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche) 및 벤조나아제가 보충된 85μL RIPA 완충액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 용해하였다. 용해물은 원심 분리 (20,000g, 10 분, 4 ℃)에 의해 명확히 하였고 상청액의 총 단백질 함량은 Bradford 비색 분석을 사용하여 정량하였다. 샘플은 동일한 양의 총 단백질과 LDS 샘플 완충액 (Invitrogen)를 사용하여 제조하였다. 면역블롯 분석을 위해 다음 항체가 사용되었다: 항-Brd2 (ab139690, 1 : 2,000 희석), 항-Brd3 (ab50818, 1 : 500 희석), 항-Brd4 (ab128874, 1 : 1,000 희석), 항-c-myc (ab32072, 1 : 1,000 희석), 항-총 PARP (BD Bioscience # 556494; 1 : 1,000 희석), 항-절단 PARP (CST-9541T, 1 : 1,000 희석), 및 항-튜불린 hFAB-로다민 (BioRad , 12004166, 1 : 10,000 희석).

[0799] 도 10의 대표적인 면역블롯은 증가하는 농도의 05IB9로 처리한 후 Brd2, Brd3, Brd4, 총 PARP 및 c-MYC 수준의 고갈 및 절단된 PARP의 상응하는 증가를 보여준다. c-MYC의 감소와 C-PARP의 증가는 둘다 억제제 (I-BET726) 단독 및 음성 대조군 (05IB11)보다 큰데, 이는 억제보다는 표적 분해와 일치하는 것이다.

[0800] *실시예 25 데그라신계 대표 화합물에 의한 세포 생존도상의 영향*

[0801] 대표적인 화합물의 항 증식 효과는 CellTiter-Glo 분석 (Promega)을 사용하여 측정하였다. MV4-11 세포를 멸균된 흰색의 투명한 바닥이 있는 384-웰 세포 배양 마이크로플레이트 (Greiner Bio-one)에서 RPMI 배지에서 2 배(2X) 농도 및 25μl의 부피로 배양했다. 다음날, 테스트 화합물을 RPMI 배지에서 2 배(2X) 농도로 연속 희석한 다음 세포에 첨가하여 최종 부피를 50μl로 만들었다. 72 시간 인큐베이션 후 25 μl의 CellTiter-Glo 시약을 각 웰에 첨가했다. 15 분 인큐베이션 후 Pherastar FS에서 발광 신호를 판독했다. 분석 성분의 최종 농도는 다음과 같다: 3 x 10^5 cells/mL, 0.05 % DMSO, 5 μM 이하 화합물. 데이터 (도 11)를 처리하고 Prism 8 (그래프패드)을 사용하여 선량-반응 곡선을 생성했다.

[0802] 데이터는 I-BET726 및 비활성 05IB11과 구별되는 05IB3, 05IB6 및 05IB9에 대한 세포 독성 프로파일을 보여주는데, 이는 표적 저해 보다는 표적 분해와 일치한다. 데그라신만이 세포 독성이 현저히 낮음을 보여준다.

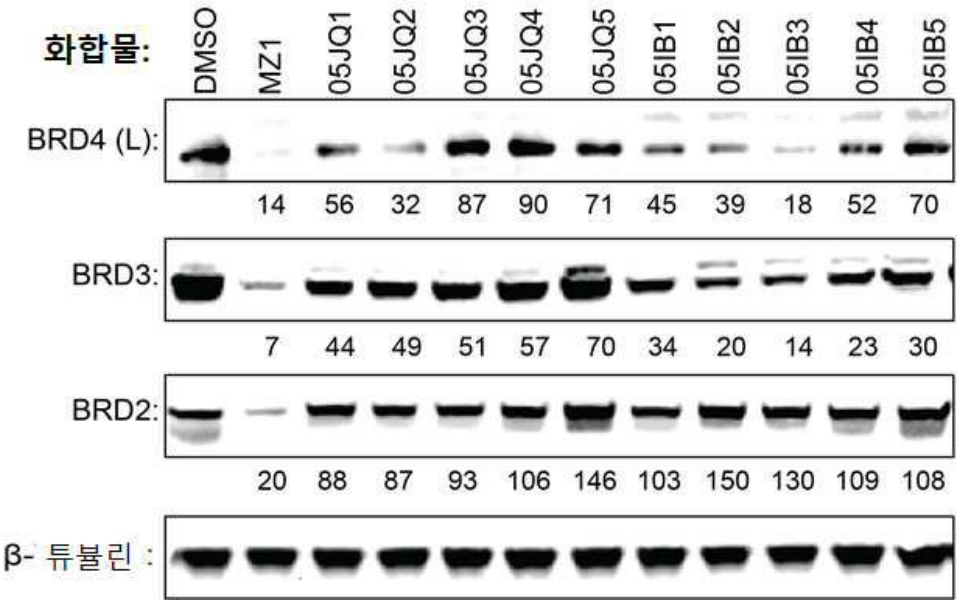
[0803] *실시예 26 데그라신계 대표 화합물에 의한 UCHL5의 공유결합적 개질.*

[0804] 재조합 UCHL5 (촉매 도메인; 1-237 잔기)를 LC-MS 분석 전에 실온에서 1 시간 동안 과잉의 05IB9 (3 : 1 몰비)와 함께 인큐베이션했다. 6130 Quadrupole 분광기 및 Agilent ZORBAX 300SB-C3 5um, 2.1 x 150mm 컬럼에 커플링된 Max-Light Cartridge 플로우 셀이 장착된 Agilent Technologies 1200 single quadrupole LC-MS 시스템에서 ESI (electrospray ionization)를 사용하여 온전한 단백질 질량을 측정했다. 단백질 MS 획득은 양이온 모드에서 수행되었으며 총 단백질 질량은 MS Chemstation 소프트웨어 (Agilent Technologies) 내에서 디콘볼루션(deconvolution)으로 계산되었다.

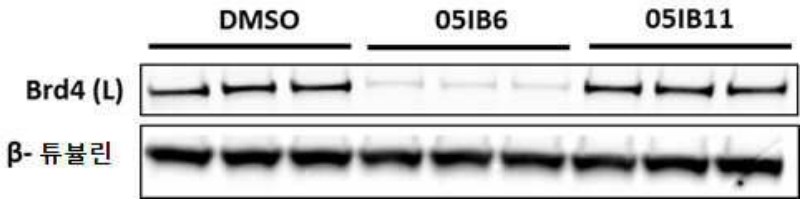
[0805] 스펙트럼의 디콘볼루션은 개질되지 않은 (26859 Da) 및 개질된 (관찰된 27915 Da, 예상되는 27911 Da) 단백질에 해당하는 질량을 나타내며, 이는 데그라신계 화합물이 UCHL5를 공유결합적으로 개질(covalently modify)시킬 수 있음을 나타낸다.

도면

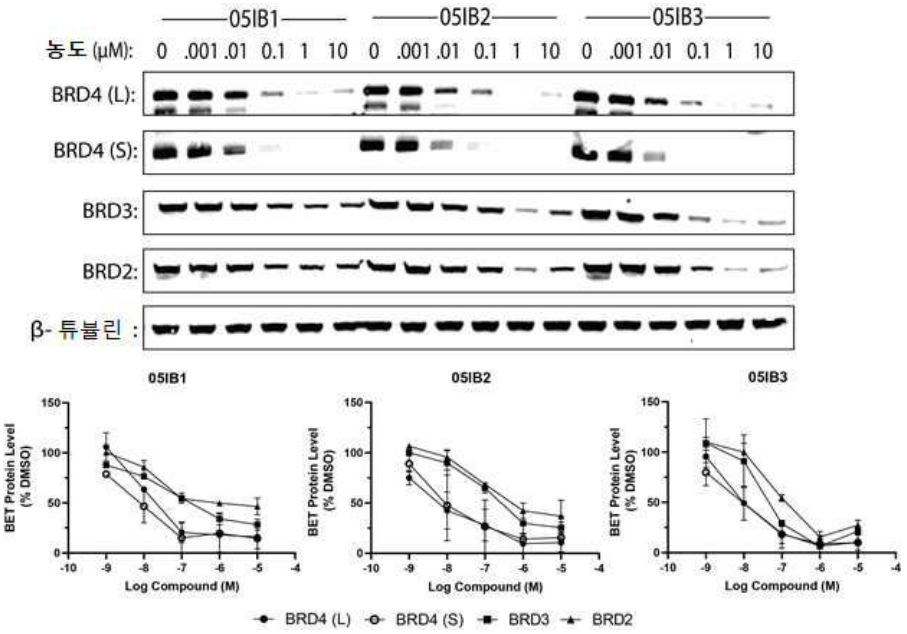
도면1



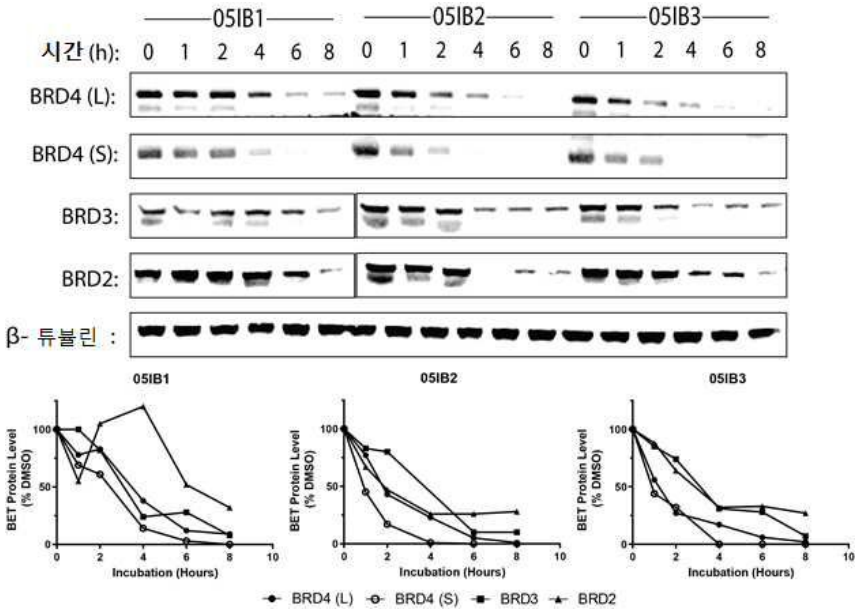
도면2



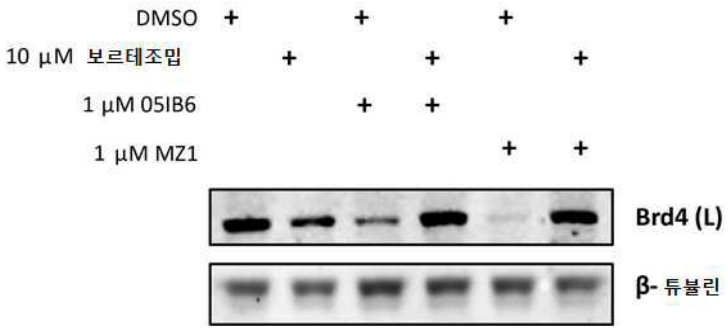
도면3



도면4


05IB1
05IB2
05IB3
시간 (h): 0 1 2 4 6 8 0 1 2 4 6 8 0 1 2 4 6 8
BRD4 (L):
BRD4 (S):
BRD3:
BRD2:
β- 튜불린 :
05IB1
05IB2
05IB3
BET Protein Level (% DMSO)
Incubation (Hours)
BRD4 (L) BRD4 (S) BRD3 BRD2

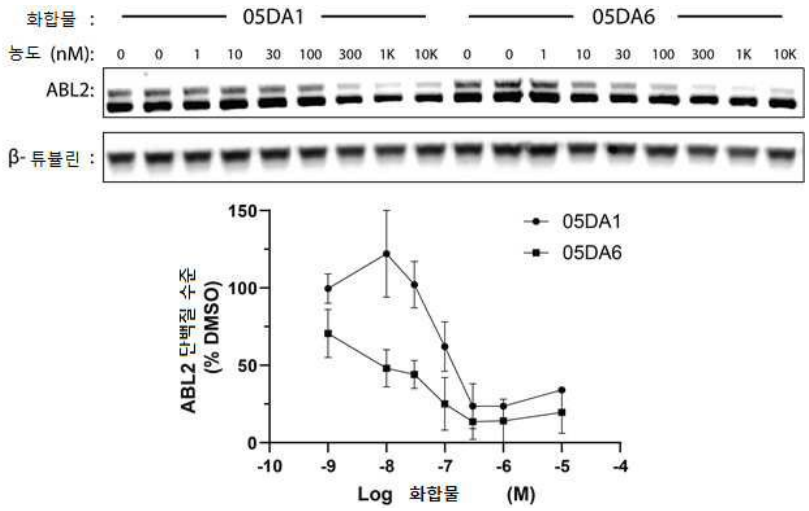
도면5


DMSO
10 μM 보르테조밉
1 μM 05IB6
1 μM MZ1
Brd4 (L)
β- 튜불린

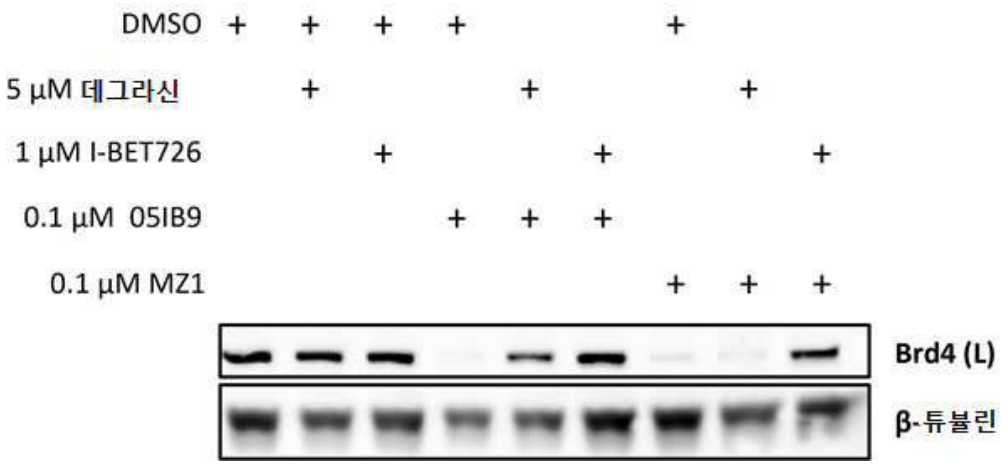
도면6


DMSO
Degrasyn
PROTAC
05DA1
05DA2
05DA3
05DA4
05DA5
DMSO
05IM1
05IM2
05IM3
05IM4
05IM5
Dasatinib
Imatinib
ABL2
β- 튜불린

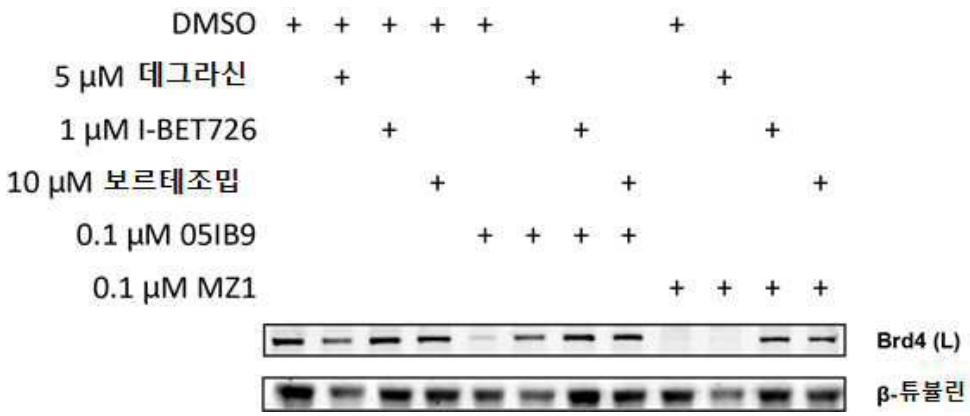
도면7


화합물 :
05DA1
05DA6
농도 (nM): 0 0 1 10 30 100 300 1K 10K 0 0 1 10 30 100 300 1K 10K
ABL2:
β-튜불린 :
ABL2 단백질 수준 (% DMSO)
150
100
50
0
-10 -9 -8 -7 -6 -5 -4
Log 화합물 (M)
05DA1
05DA6

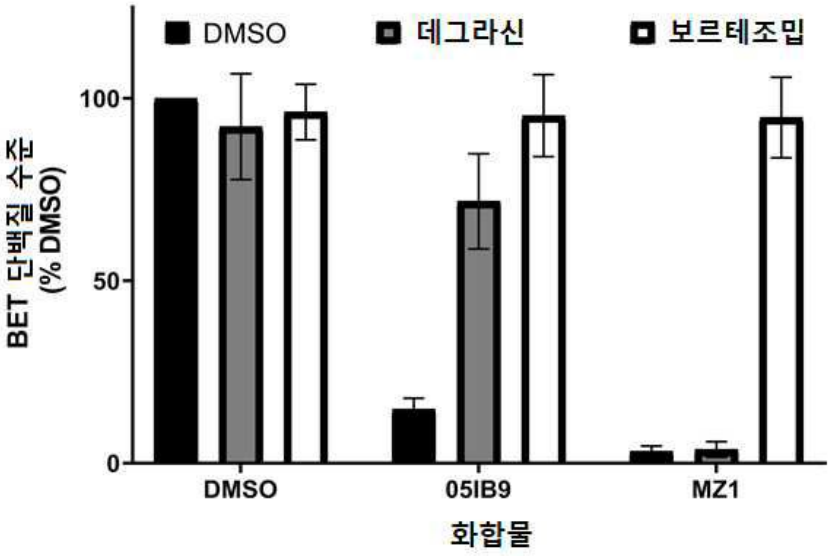
도면8


DMSO
5 μM 데그라신
1 μM I-BET726
0.1 μM 05IB9
0.1 μM MZ1
Brd4 (L)
β-튜불린

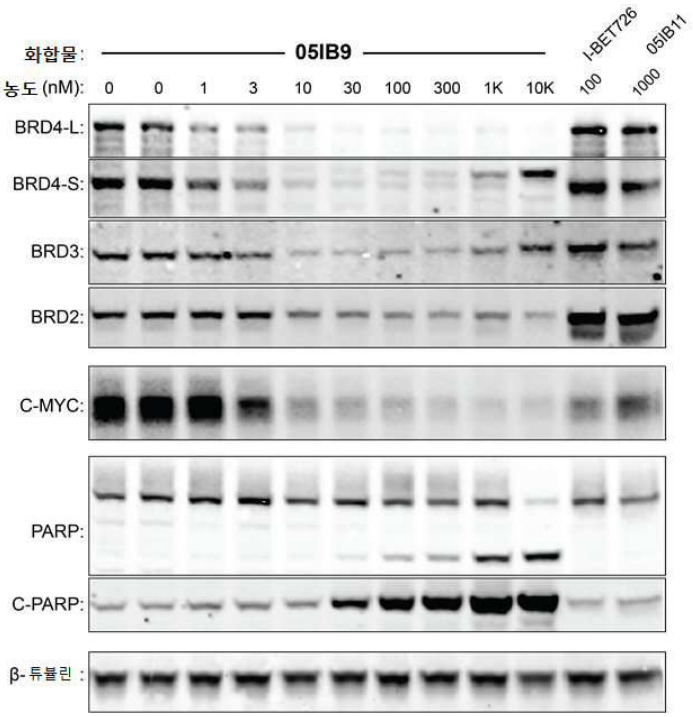
도면9a


DMSO
5 μM 데그라신
1 μM I-BET726
10 μM 보르테조밉
0.1 μM 05IB9
0.1 μM MZ1
Brd4 (L)
β-튜불린

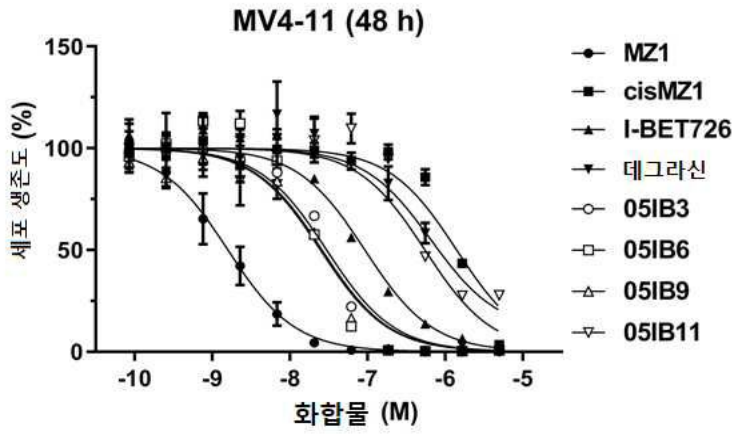
도면9b


DMSO
데그라신
보르테조밉
BET 단백질 수준
(% DMSO)
100
50
0
DMSO
05IB9
MZ1
화합물

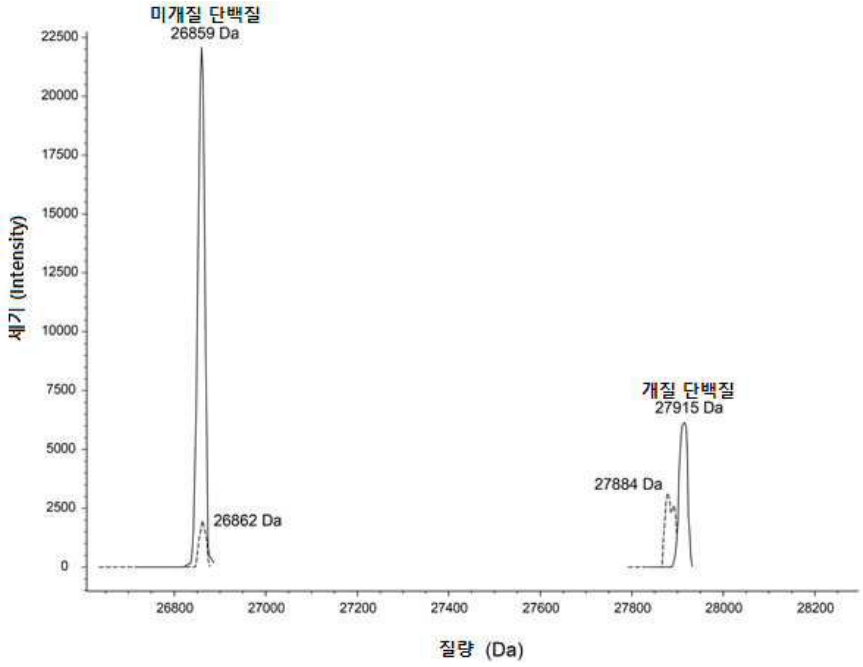
도면10


화합물:
05IB9
I-BET726
05IB11
농도 (nM):
0
0
1
3
10
30
100
300
1K
10K
100
1000
BRD4-L:
BRD4-S:
BRD3:
BRD2:
C-MYC:
PARP:
C-PARP:
β-튜불린 :

도면11



도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Dundee

<120> Bifunctional Molecules for Targeting UchL5

<130> 4490-10302

<150> 62/684,268

<151> 2018-06-13

<150> 62/835,955

<151> 2019-04-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgacgggca atgccgggga gtggtgcctc atggaaagcg accccggggt cttcaccgag 60

ctcattaaag gattcggttg ccgaggagcc caagtagaag aaatatggag tttagagcct 120

gagaattttg aaaaattaaa gccagttcat gggttaattt ttcttttcaa gtggcagcca 180

ggagaagaac cagcaggctc tgtggttcag gactcccgac ttgacacgat atttttgct 240

aagcaggtaa ttaataatgc ttgtgctact caagccatag tgagtgtgtt actgaactgt 300

acccaccagg atgtccattt aggcgagaca ttatcagagt ttaaagaatt ttcacaaagt 360

tttgatgcag ctatgaaagg cttggcactg agcaattcag atgtgattcg acaagtacac 420

aacagtttcg ccagacagca aatgtttgaa tttgatacga agacatcagc aaaagaagaa 480

gatgcttttc actttgtcag ttatgttcct gttaatggga gactgtatga attagatgga 540

ttaagagaag gaccgattga tttaggtgca tgcaatcaag atgattggat cagtgcagta 600

aggcctgtca tagaaaaaag gatacaaaag tacagtgaag gtgaaattcg atttaattta 660

atggccattg tgtctgacag aaaaatgata tatgagcaga agatagcaga gttacaaaga 720

caacttgcag aggaacccat ggatacagat caaggtaata gtatgttaag tgctattcag 780

tcagaagttg ccaaaaatca gatgcttatt gaagaagaag tacagaaatt aaaaagatac 840

aagattgaga atatcagaag gaagcataat tatctgcctt tcattatgga attgttaaag 900

actttagcag aacaccagca gttaatacca ctagtagaaa aggcaaaaga aaaacagaac 960

gcaaagaaag ctcaggaaac caaatga 987

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Gly Asn Ala Gly Glu Trp Cys Leu Met Glu Ser Asp Pro Gly

1 5 10 15

Val Phe Thr Glu Leu Ile Lys Gly Phe Gly Cys Arg Gly Ala Gln Val

20 25 30

Glu Glu Ile Trp Ser Leu Glu Pro Glu Asn Phe Glu Lys Leu Lys Pro

35 40 45

Val His Gly Leu Ile Phe Leu Phe Lys Trp Gln Pro Gly Glu Glu Pro

50 55 60

Ala Gly Ser Val Val Gln Asp Ser Arg Leu Asp Thr Ile Phe Phe Ala

65 70 75 80

Lys Gln Val Ile Asn Asn Ala Cys Ala Thr Gln Ala Ile Val Ser Val

85 90 95

Leu Leu Asn Cys Thr His Gln Asp Val His Leu Gly Glu Thr Leu Ser

100 105 110

Glu Phe Lys Glu Phe Ser Gln Ser Phe Asp Ala Ala Met Lys Gly Leu

115 120 125

Ala Leu Ser Asn Ser Asp Val Ile Arg Gln Val His Asn Ser Phe Ala

130 135 140

Arg Gln Gln Met Phe Glu Phe Asp Thr Lys Thr Ser Ala Lys Glu Glu

145 150 155 160

Asp Ala Phe His Phe Val Ser Tyr Val Pro Val Asn Gly Arg Leu Tyr

165 170 175

Glu Leu Asp Gly Leu Arg Glu Gly Pro Ile Asp Leu Gly Ala Cys Asn

180 185 190

Gln Asp Asp Trp Ile Ser Ala Val Arg Pro Val Ile Glu Lys Arg Ile

195 200 205

Gln Lys Tyr Ser Glu Gly Glu Ile Arg Phe Asn Leu Met Ala Ile Val

210 215 220

Ser Asp Arg Lys Met Ile Tyr Glu Gln Lys Ile Ala Glu Leu Gln Arg

225 230 235 240

Gln Leu Ala Glu Glu Glu Pro Met Asp Thr Asp Gln Gly Asn Ser Met

245 250 255

Leu Ser Ala Ile Gln Ser Glu Val Ala Lys Asn Gln Met Leu Ile Glu

260 265 270

Glu Glu Val Gln Lys Leu Lys Arg Tyr Lys Ile Glu Asn Ile Arg Arg

275 280 285

Lys His Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu Leu Lys Thr Leu Ala

290 295 300

Glu His Gln Gln Leu Ile Pro Leu Val Glu Lys Ala Lys Glu Lys Gln

305 310 315 320

Asn Ala Lys Lys Ala Gln Glu Thr Lys

325