(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0093922
(43) 공개일자 2024년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 498/16 (2006.01) *A61K 31/444* (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01) *A61K 31/501* (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01) *C07D 211/60* (2006.01)
C07D 237/04 (2006.01) *C07D 401/12* (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01) *C07K 7/64* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 498/16 (2013.01)
A61K 31/444 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7017424(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년04월04일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7032295
원출원일자(국제) 2018년04월04일
심사청구일자 2021년04월01일
(85) 번역문제출일자 2024년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/026014
(87) 국제공개번호 WO 2018/187423
국제공개일자 2018년10월11일
(30) 우선권주장
62/482,018 2017년04월05일 미국(US)

(71) 출원인
레볼루션 메디슨즈, 인크.
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 새기노 드라이브 700
(72) 발명자
멀비힐, 마크 조셉
미국 01776 매사추세츠주 서드베리 웹스터 서클 4
진, 메이중
미국 02481 매사추세츠주 웰즐리 프리실라 서클 34
펄, 니컬러스
미국 02143 매사추세츠주 서머빌 기벤즈 스트리트 7
(74) 대리인
양영준, 이상남

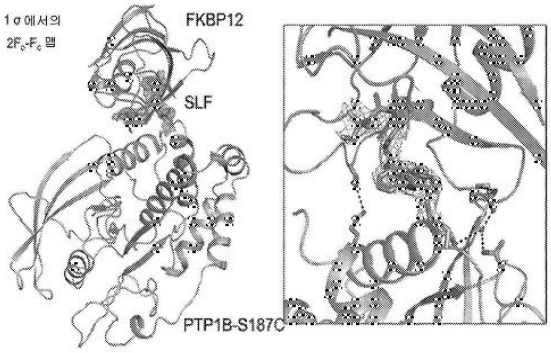
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **단백질-단백질 계면을 분석하기 위한 방법 및 시약**

(57) 요 약

본 개시내용은 프리젠터 단백질 (예를 들어, FKBP 계열의 구성원, 사이클로필린 계열의 구성원, 또는 PIN1)과 표적 단백질 사이의 계면과 같은 단백질-단백질 계면을 분석하는데 유용한 방법 및 시약을 제공한다. 일부 구현예에서, 표적 및/또는 프리젠터 단백질은 세포내 단백질이다. 일부 구현예에서, 표적 및/또는 프리젠터 단백질은 포유동물 단백질이다.

대 표 도 - 도9a



(52) CPC특허분류
A61K 31/4545 (2013.01)
A61K 31/501 (2013.01)
A61K 38/13 (2013.01)
C07D 211/60 (2013.01)
C07D 237/04 (2013.01)
C07D 401/12 (2013.01)
C07D 403/12 (2013.01)
C07K 7/645 (2013.01)

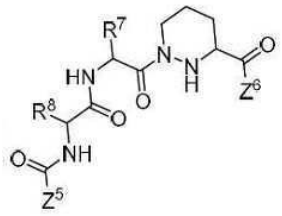
명 세 서

청구범위

청구항 1

단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하며, 여기서 상기 가교결합기는 아미노산과의 화학선택적 반응을 가능하게 하는 모이어티인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

여기서 단백질 결합 모이어티는 하기 화학식 IV의 구조를 포함하고,



화학식 IV

여기서 Z^5 및 Z^6은 각각, 독립적으로, 하이드록실, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬이거나, 또는 Z^5 및 Z^6은 조합되어 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환된 10 내지 40원 매크로사이클을 형성하고;

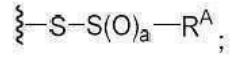
Z^5 또는 Z^6 중 하나 이상은 가교결합기에 대한 부착점을 포함하고;

각각의 R^7은 독립적으로, 하이드록실, 시아노, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고;

R^8은 수소, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, C_3-C_7 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 및 선택적으로 치환된 C_3-C_7 카보사이클릴 C_1-C_6 알킬이고;

여기서

a) 상기 가교결합기는 하기 화학식 I의 구조를 포함하며,



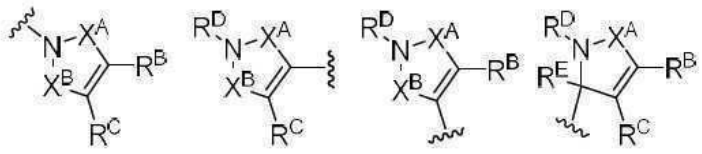
화학식 I

여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

a는 0, 1, 또는 2이고;

R^A는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴이거나;

b) 상기 가교결합기는 하기 화학식 Ib, Ic, Id, 또는 Ie의 구조를 포함하며,



화학식 Ib 화학식 Ic 화학식 Id 화학식 Ie

여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

X^A는 -C(O)- 또는 $-SO_2-$이고;

X^B는 -C(O)- 또는 CR^ER^F이고;

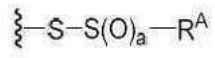
R^B 및 R^C는 독립적으로, 수소, 할로겐, 선택적으로 치환된 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고;

R^D는 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고; 및

R^E 및 R^F는 독립적으로, 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 가교결합기는 하기 화학식 I의 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:



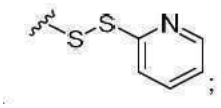
화학식 I

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 R^A는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 가교결합기는 하기 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:



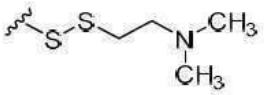
여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 R^A는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

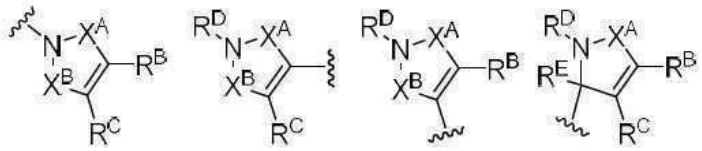
제5항에 있어서, 상기 가교결합기는 하기 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:



여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 가교결합기는 하기 화학식 Ib, Ic, Id, 또는 Ie의 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:



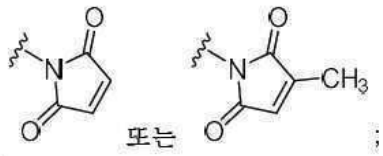
화학식 Ib 화학식 Ic 화학식 Id 화학식 Ie

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 가교결합기는 화학식 Ib의 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 가교결합기는 하기 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

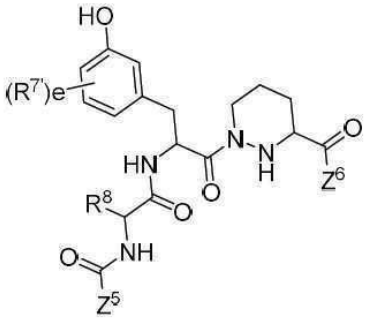


또는

여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

청구항 10

제1항에 있어서, 단백질 결합 모이어티는 사이클로필린 결합 모이어티이고 하기 화학식 IVa의 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

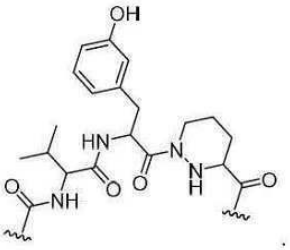


화학식 IVa

여기서 각각의 $R^{7'}$는 독립적으로, 하이드록실, 시아노, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴), 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬)이고, e는 0, 1, 2, 3, 또는 4이다.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티는 하기 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:



청구항 12

제1항에 있어서, 상기 단백질 결합 모이어티 및 상기 가교결합기는 링커를 통해 연결되는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 링커는 하기 화학식 V의 구조를 갖는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

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

화학식 V

식 중, A^1은 링커와 단백질 결합 모이어티 사이의 결합이고; A^2는 가교결합기와 링커 사이의 결합이고; B^1, B^2, B^3, 및 B^4는 각각, 독립적으로 선택적으로 치환된 C_1-C_2 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_3 헤테로알킬, O, S, 및 NR^N로부터 선택되고; R^N은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알키닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-7} 헤테로알킬이고; C^1 및 C^2는 각각, 독립적으로 카보닐, 티오카보닐, 설포닐, 또는 포스포릴로부터 선택되며;

f, g, h, I, j, 및 k는 각각, 독립적으로, 0 또는 1이고; D는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알키닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_{10} 폴리에틸렌 글리콜, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 헤테로알킬, 또는 $-(B^3)_i-(C^2)_j-(B^4)_k-A^2$에 대해 $A^1-(B^1)_f-(C^1)_g-(B^2)_h-$를 연결하는 화학 결합이다.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 링커는 하기 화학식 VI의 구조를 포함하는 것인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:

화학식 VI

식 중, A^1은 링커와 단백질 결합 모이어티 사이의 결합이고;

A^2는 가교결합기와 링커 사이의 결합이고;

l은 0, 1, 2, 또는 3이고;

m은 0 또는 1이고;

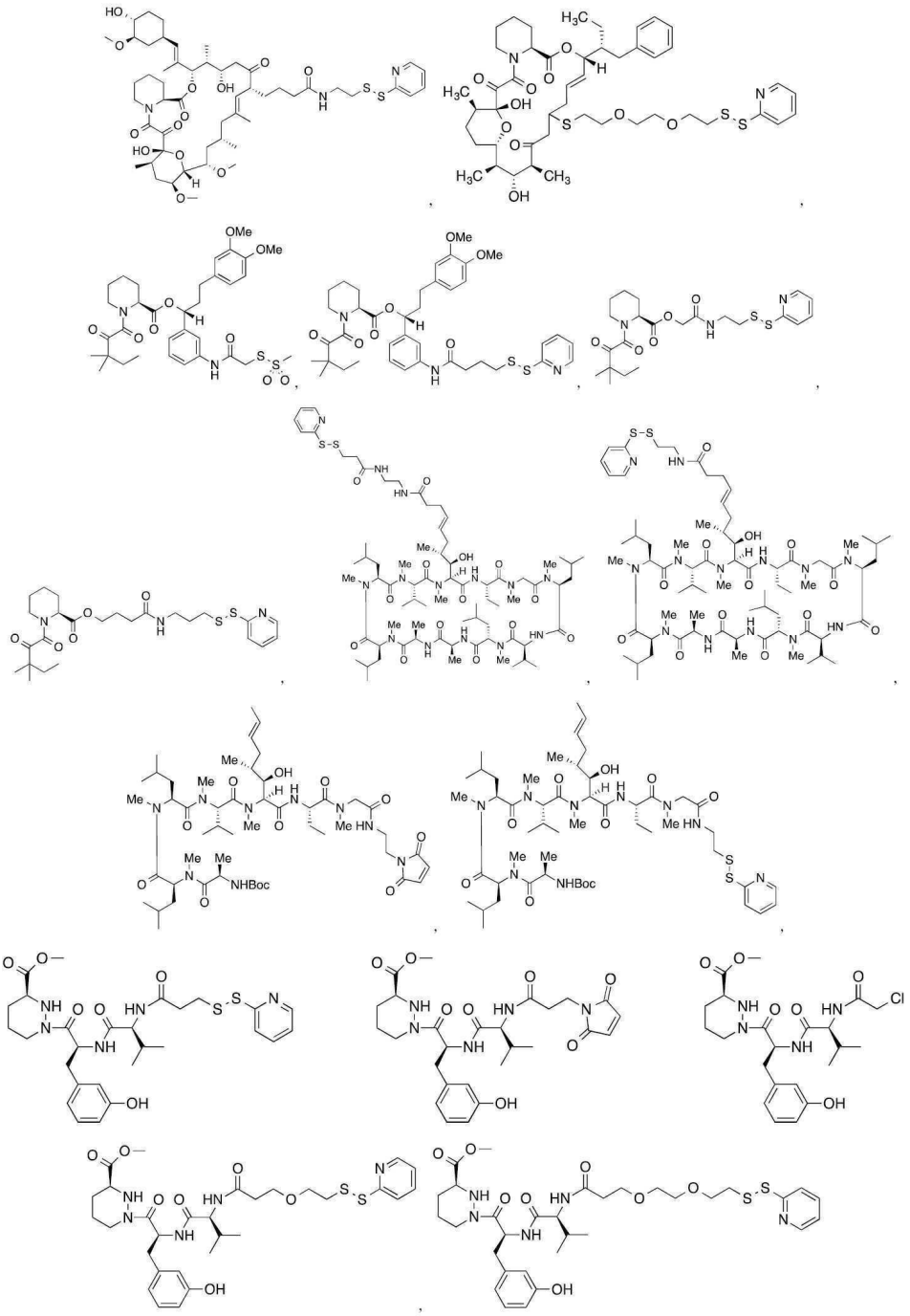
n은 0, 1, 또는 2이고;

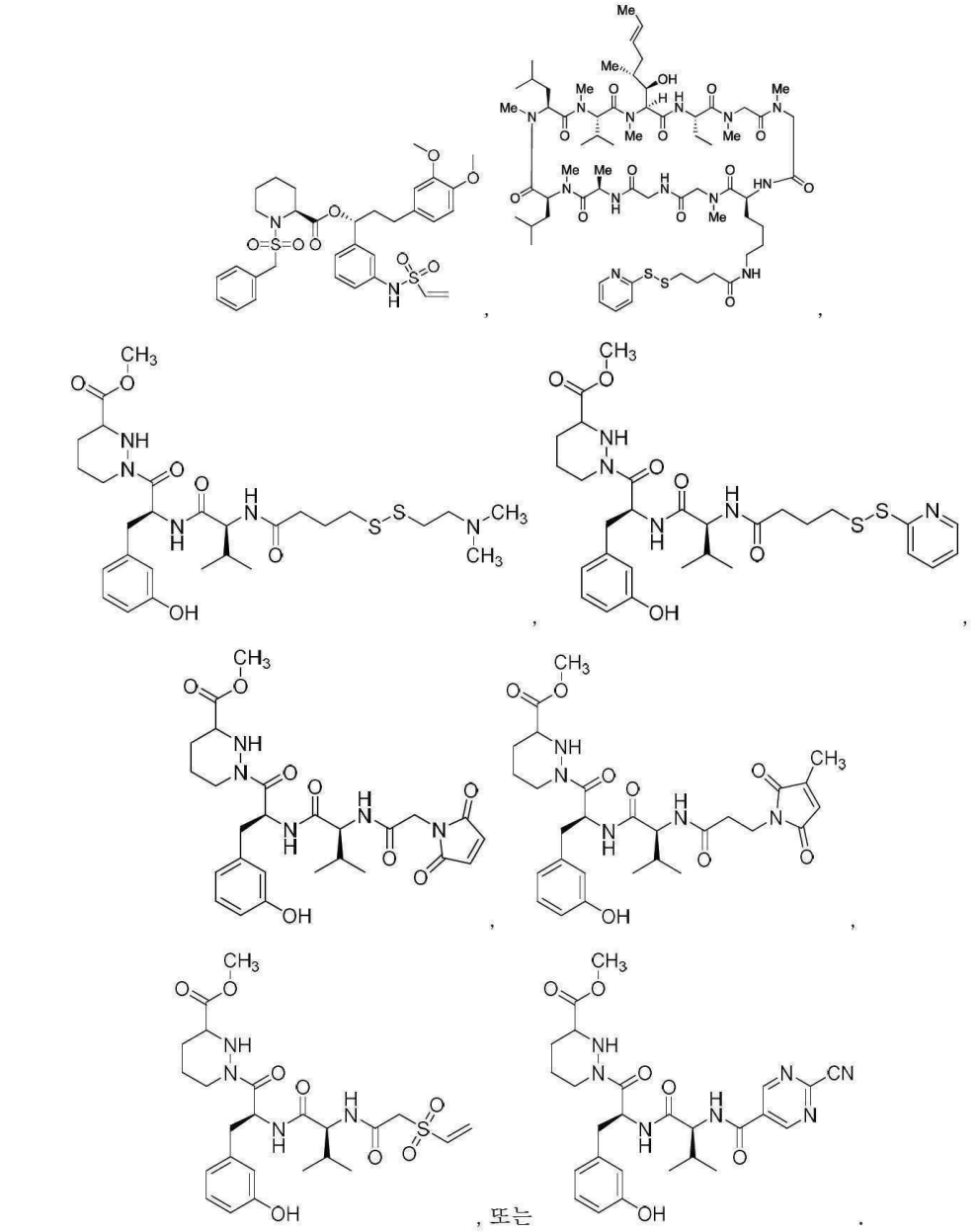
X^3, X^4, 및 X^5는 각각, 독립적으로, 부재하거나, O, S, $-C\equiv C-$, CR^9R^{10} 또는 NR^{11}이고;

각각의 R^9, R^{10}, 및 R^{11}는 독립적으로, 수소, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, C_3-C_7 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 및 선택적으로 치환된 C_3-C_7 카보사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

청구항 15

하기 구조를 갖는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염:





청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 약학적으로 허용가능한 캐리어를 포함하는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 소분자 약물의 대부분은 표적 단백질 상에 기능적으로 중요한 포켓을 결합하고, 이에 의해 이 단백질의 활성을 조절함으로써 작용된다. 예를 들어, 콜레스테롤-강하 약물 스타틴은 HMG-CoA 환원효소의 효소 활성 부위를 결합하고, 이에 따라 효소가 그것의 기질과 결합하는 것을 방지한다. 수많은 이러한 약물/표적 상호작용 쌍이 공지되어 있다는 사실은 소분자 조절제가 전부는 아니지만 대부분의 합리적인 양의 시간, 노력, 및 자원이 제공된 단백질에 대해 발견될 수 있다고 몇몇에게 믿게 만들 수 있다. 이것은 상기 경우와 다르다. 현재 추정값은 모든

인간 단백질의 단지 약 10%만이 소분자에 의해 표적화가 가능하다. 나머지 90%는 현재 소분자 약물 발견에 대해 곤란하거나 또는 어려운 것이다. 이러한 표적은 통상적으로 "난공불락"로 지칭된다. 이러한 난공불락 표적은 의료적으로 중요한 인간 단백질의 방대한 그리고 대개 미개발된 보고(reservoir)를 포함한다. 따라서, 이러한 난공불락 표적의 기능을 조절할 수 있는 신규한 분자 양상을 발견하는데 상당한 관심이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0002] 소분자는 표적과의 그것의 상호작용이 접착력에 의해 유도되기 때문에 그것의 표적화 능력이 제한되고, 접착력의 강도는 거의 접촉 표면적에 비례한다. 그것의 작은 크기로 인하여, 소분자가 충분한 분자간 접촉 표면적을 증가시켜 표적 단백질과 효과적으로 상호작용하는 유일한 방식은 문자 그대로 이 단백질에 의해 탐식되는 것이다. 사실상, 실험 및 전산 데이터 둘 모두의 대부분은 그것의 표면 상의 소수성 "포켓"을 갖는 단백질만이 소분자를 결합할 수 있다는 관점을 지지한다. 이 경우에, 결합은 탐식에 의해 가능하다.

[0003] 자연은 소분자가 소수성 포켓 이외의 부위에서 표적 단백질과 상호작용할 수 있는 전략을 진화시켰다. 이러한 전략은 자연 발생 면역억제성 약물 사이클로스포린 A, 라파마이신, 및 FK506에 의해 예시된다. 이러한 약물의 생물학적 활성은 작은 프리젠팅 단백질을 갖는 소분자의 고-친화도 복합체의 형성과 관련된다. 소분자 및 프리젠팅 단백질의 복합체 표면은 표적과 결합한다. 따라서, 예를 들어, 사이클로스포린 A와 사이클로필린 A 사이에 형성된 2원 복합체는 고친화도 및 특이성으로 칼시뉴린을 표적화하지만, 사이클로스포린 A 또는 사이클로필린 A 단독은 측정가능한 친화도로 칼시뉴린을 결합하지 못한다.

[0004] 본 발명자들은 프리젠터 단백질 및 표적 단백질 쌍을 확인하고, 이들 상호작용을 조절할 수 있는 소분자의 개발에 사용하기 위해 이들 사이의 계면을 탐침검사하기 위해 유용한 화합물 및 접합체를 개발하였다.

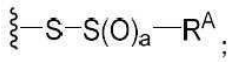
[0005] 따라서, 본 개시내용은 단백질-단백질 계면 예컨대 프리젠터 단백질(예를 들어, FKBP 계열의 구성원, 사이클로필린 계열, 또는 PIN1의 구성원)과 표적 단백질 사이의 계면을 분석하는데 유용한 방법 및 시약을 제공한다. 이러한 분석은 두 프리젠터 단백질 및 표적 단백질에 동시에 결합할 수 있는 소분자의 디자인을 지원하는데 유용하며, 이로서 생성된 소분자-프리젠터 단백질 복합체는 표적 단백질에 결합하고, 이의 활성을 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 및/또는 프리젠터 단백질은 세포내 단백질이다. 일부 구현예에서, 표적 및/또는 프리젠터 단백질은 포유동물 단백질이다.

[0006] 일부 양태에서, 본 개시내용은 가교결합 기질로서 사용될 수 있는 화합물을 제공한다. 이러한 화합물은 단백질(예를 들어, 표적 단백질 또는 프리젠터 단백질)을 고유 또는 비-공유 결합할 수 있는 단백질 결합 모이어티 및 단백질 결합 모이어티에 결합하는 것보다 상이한 단백질의 아미노산과 화학선택적 반응이 가능한 하나 이상의 가교결합기를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 화합물은 단 하나의 가교결합기를 포함한다.

[0007] 따라서, 일 양태에서, 본 개시내용은 단백질 결합 모이어티 (예를 들어, 프리젠터 단백질 결합 모이어티 또는 표적 단백질 결합 모이어티) 및 가교결합기 (예를 들어, 단백질 결합 모이어티와 결합하는 것과 상이한 단백질의 아미노산과 화학선택적 반응이 가능한 모이어티)를 포함하는 화합물을 제공한다. 단백질 결합 모이어티는 단백질 (예를 들어, 프리젠터 단백질 또는 표적 단백질, 이것이 프리젠터 단백질 결합 모이어티 또는 표적 단백질 결합 모이어티인지 여부에 따름)에의 (공유적 또는 비-공유적) 결합이 가능할 수 있고, 한편 가교결합기는 단백질 (예를 들어, 프리젠터 단백질, 표적 단백질, 또는 이러한 다른 단백질과 결합할 수 있는 다른 화합물)과 공유결합을 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 화합물이 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 경우, 화합물은 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 화합물이 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 경우, 화합물은 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하지 않는다.

[0008] 일부 구현예에서, 가교결합기는 설프하이드릴-반응 가교결합기 (예를 들어, 가교결합기는 혼합된 이황화물, 말레이미드, 비닐 설폰, 비닐 케톤, 또는 알킬 할라이드를 포함함), 아미노-반응 가교결합기, 카복실-반응 가교결합기, 카보닐-반응 가교결합기, 또는 트리아졸-형성 가교결합기이다.

[0009] 일부 구현예에서, 가교결합기는 혼합된 이황화물을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 화학식 Ia의 구조를 포함한다:



화학식 Ia

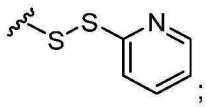
[0010]

[0011] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고; 및

[0012] a는 0, 1, 또는 2이고;

[0013] R^A는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴이다.

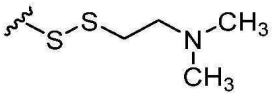
[0014] 일부 구현예에서, R^A는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 (예를 들어, 피리딜)이다. 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:



[0015]

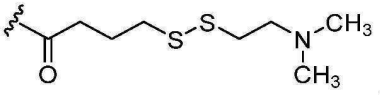
[0016] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0017] 일부 구현예에서, R^A는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬 (예를 들어, N, N-디메틸에틸)이다. 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:



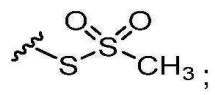
[0018]

[0019] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다. 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:



[0020]

[0021] 일부 구현예에서, R^A는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬 (예를 들어, 메틸)이다. 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

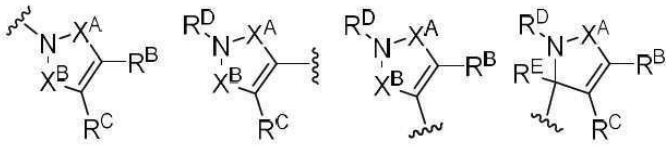


[0022]

[0023] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0024] 일부 구현예에서, 가교결합기는 탄소계 가교결합기 (예를 들어, 티올과의 반응시 탄소-설파이드 결합을 형성하는 가교결합기)를 포함한다.

[0025] 일부 구현예에서, 가교결합기는 말레이미드를 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 화학식 Ib, Ic, Id, 또는 Ie의 구조를 포함한다:

[0026] 

화학식 Ib 화학식 Ic 화학식 Id 화학식 Ie

[0027] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

[0028] X^A는 -C(O)- 또는 $-SO_2-$이고;

[0029] X^B는 -C(O)- 또는 CR^ER^F이고;

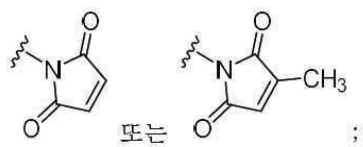
[0030] R^B 및 R^C는 독립적으로, 수소, 할로겐, 선택적으로 치환된 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고;

[0031] R^D는 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고; 및

[0032] R^E 및 R^F는 독립적으로, 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

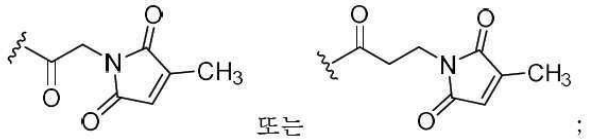
[0033] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 화학식 Ib의 구조를 포함한다. 일부 구현예에서, X^A는 -C(O)-이다. 일부 구현예에서, X^B는 -C(O)-이다. 일부 구현예에서, R^B 및 R^C는 수소 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬 (예를 들어, 메틸)이다.

[0034] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0035] 
또는 ;

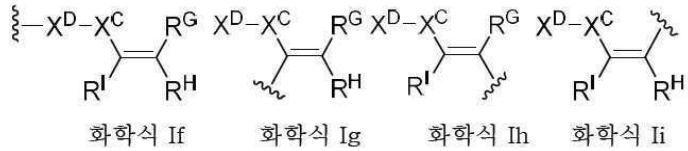
[0036] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0037] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0038]  또는 ;

[0039] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0040] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 화학식 If, Ig, Ih, 또는 Ii의 구조를 포함한다:

[0041] 
화학식 If 화학식 Ig 화학식 Ih 화학식 Ii

[0042] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

[0043] X^C는 -C(O)- 또는 $-SO_2-$이고;

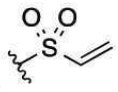
[0044] X^D는 부재하거나, NR^JR^K, 또는 OR^L이고;

[0045] R^G, R^H, 및 R^I는 독립적으로, 수소, 니트릴, 할로겐, 선택적으로 치환된 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고; 및

[0046] R^J, R^K, 및 R^L는 독립적으로, 부재하거나, 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

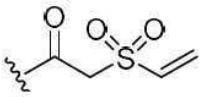
[0047] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 화학식 If의 구조를 포함한다. 일부 구현예에서, X^D는 부재한다. 일부 구현예에서, R^G, R^H, 및 R^I는 수소이다. 일부 구현예에서, X^C는 -C(O)-이다. 일부 구현예에서, X^C는 $-SO_2-$이다.

[0048] 일부 구현예에서, 가교결합기는 비닐 설폰을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0049] 

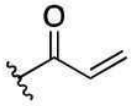
[0050] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0051] 일부 구현예에서, 가교결합기는 비닐 설폰을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0052] 

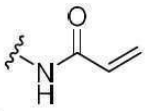
[0053] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0054] 일부 구현예에서, 가교결합기는 비닐 케톤을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0055] 

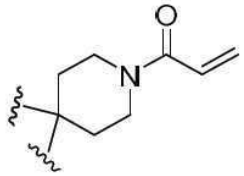
[0056] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0057] 일부 구현예에서, 가교결합기는 비닐 케톤을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0058] 

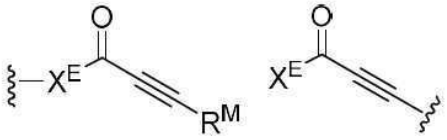
[0059] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0060] 일부 구현예에서, 가교결합기는 비닐 케톤을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0061] 

[0062] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0063] 일부 구현예에서, 가교결합기는 이논(ynone) 예컨대 하기 화학식 Ij 또는 Ik의 구조를 포함한다:

[0064] 

화학식 Ij 화학식 Ik

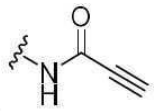
[0065] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

[0066] X^E는 부재하거나, NR^NR^O, 또는 OR^P이거나;

[0067] R^M은 수소, 할로겐, 선택적으로 치환된 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고; 및

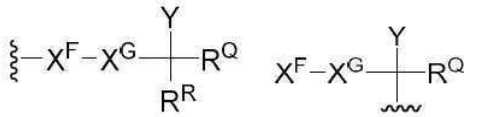
[0068] R^N, R^O, 및 R^P는 독립적으로 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

[0069] 일부 구현예에서, 가교결합기는 비닐 케톤을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0070] 

[0071] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0072] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 화학식 Im 또는 In의 구조를 포함한다:

[0073] 

화학식 Im 화학식 In

[0074] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

[0075] X^F는 부재하거나, NR^SR^T, 또는 OR^U이고;

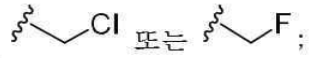
[0076] X^G는 부재하거나 또는 -C(O)-이고;

[0077] Y는 이탈기이고;

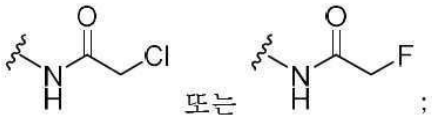
[0078] R^Q 및 R^R은 독립적으로, 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고; 및

[0079] R^S, R^T, 및 R^U는 독립적으로, 부재하거나, 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

[0080] 일부 구현예에서, Y는 할로겐 (예를 들어, 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 아이오도), 메실레이트, 토실레이트, 또는 트리플레이트이다. 일부 구현예에서, Y는 니트릴이다. 일부 구현예에서, X^F 및 X^G는 부재한다. 일부 구현예에서, R^Q 및 R^R은 수소이다. 일부 구현예에서, 가교결합기는 알킬 할라이드 예컨대 염화알킬을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0081] 

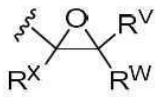
[0082] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다. 일부 구현예에서, 가교결합기는 알킬 할라이드 예컨대 염화알킬 또는 불화알킬을 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:



[0083]

[0084] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0085] 일부 구현예에서, 가교결합기는 에폭사이드를 포함하고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 화학식 Io의 구조를 포함한다:



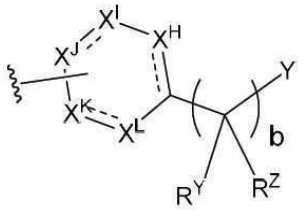
화학식 Io

[0086]

[0087] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

[0088] R^V, R^W, 및 R^X는 독립적으로, 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

[0089] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 화학식 Ip의 구조를 포함한다:



화학식 Ip

[0090]

[0091] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

[0092] 점선은 방향족인 구조에 대해 필요에 따라 포함된 선택적인 이중 결합을 나타내며;

[0093] b는 0, 1, 또는 2이고;

[0094] Y는 이탈기이고;

[0095] R^Y 및 R^Z는 독립적으로, 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고;

[0096] 각각의 X^H, X^I, X^J, X^K, 및 X^L는 독립적으로, 부재하거나, NR^{AA}, 또는 CR^{AB}이고, 여기서 X^H, X^I, X^J, X^K, 및 X^L 중 적어도 5개는 NR^{AA}, 또는 CR^{AB}이고;

[0097] R^{AA}는 부재하거나 또는 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알

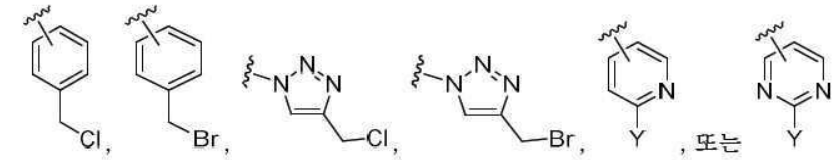
킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고; 및

[0098] R^{AB}는 수소, 니트릴, 할로겐, 선택적으로 치환된 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

[0099] 일부 구현예에서, 하나 이상의 R^{AB}는 전자 끄는 기이다. 일부 구현예에서, 1 내지 3개의 R^{AB}는 전자 끄는 기이다.

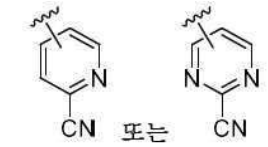
[0100] 일부 구현예에서, Y는 니트릴이다. 일부 구현예에서, Y는 할로겐 (예를 들어, 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 아이오도), 메실레이트, 토실레이트, 또는 트리플레이트이다.

[0101] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0102] 

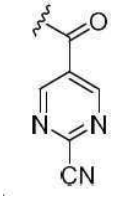
[0103] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0104] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0105] 

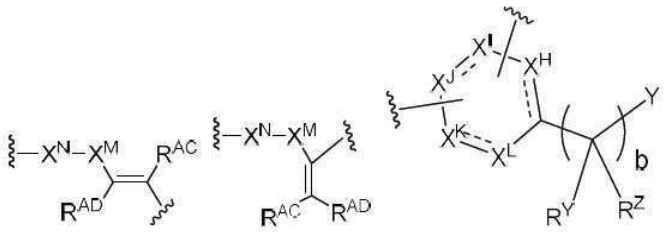
[0106] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0107] 일부 구현예에서, 가교결합기는 하기 구조를 포함한다:

[0108] 

[0109] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시한다.

[0110] 일부 구현예에서, 가교결합기는 내부 가교결합기이고, 예를 들어, 가교결합기는 하기 화학식 Iq, Ir, 또는 Is의 구조를 포함한다:

[0111] 

화학식 Iq 화학식 Ir 화학식 Is

[0112] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 가교결합기의 부착점을 예시하고;

[0113] X^M은 -C(O)- 또는 $-SO_2-$이고;

[0114] X^N는 부재하거나, NR^{AE}, 또는 O이고;

[0115] R^{AC} 및 R^{AD}는 독립적으로, 수소, 니트릴, 할로겐, 선택적으로 치환된 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고; 및

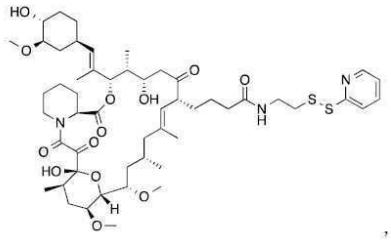
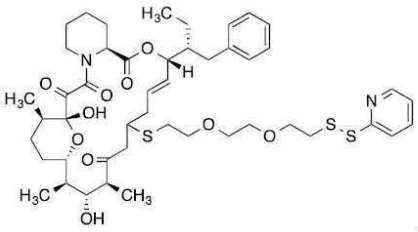
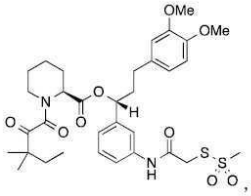
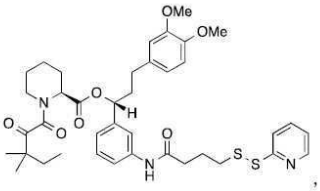
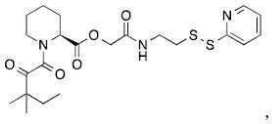
[0116] R^{AE}는 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

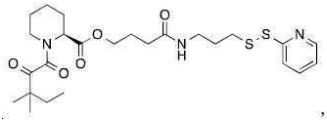
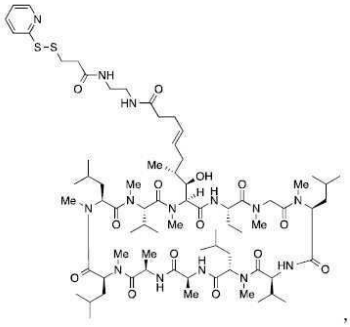
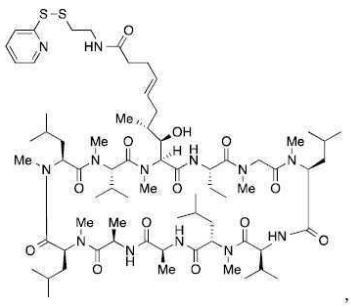
[0117] 일부 구현예에서, X^N은 NR^{AE}이고, 여기서 R^{AE}는 수소이다. 일부 구현예에서, R^{AC} 및 R^{AD}는 수소이다. 일부 구현예에서, X^M은 -C(O)-이다. 일부 구현예에서, X^M은 $-SO_2-$이다.

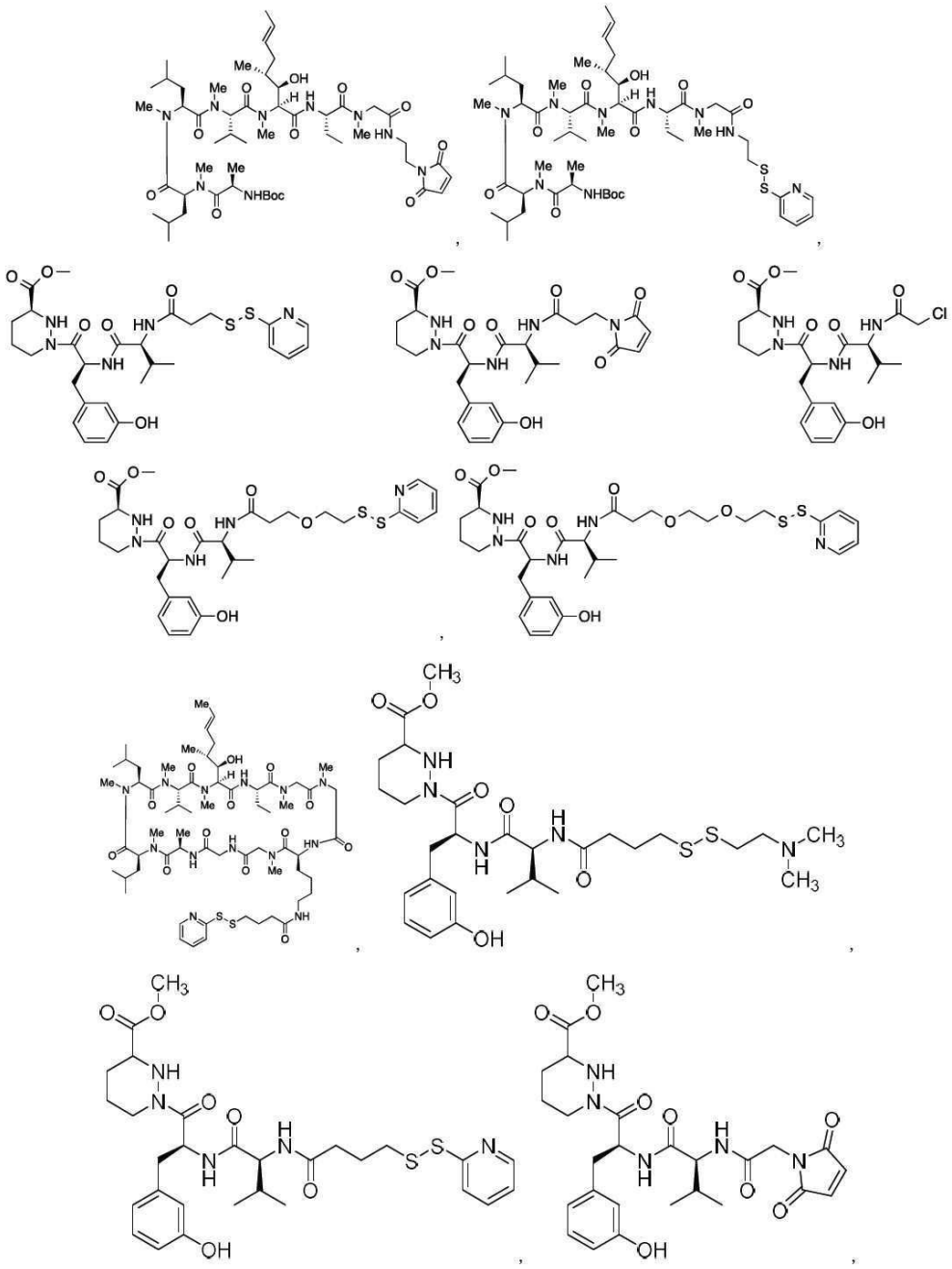
[0118] 상술한 화합물 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 단백질 결합 모이어티 부분은 단백질과 비-공유 상호작용할 수 있다. 상술한 화합물 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 단백질 결합 모이어티 부분은 단백질과 공유 상호작용할 수 있다.

[0119] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물을 제공한다. 일부 구현예에서, 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기는 링커를 통해 부착된다.

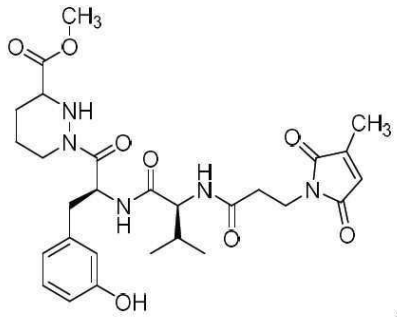
[0120] 일부 양태에서, 본 개시내용은 하기 구조를 갖는 화합물을 제공한다:


,

,

,

,

,

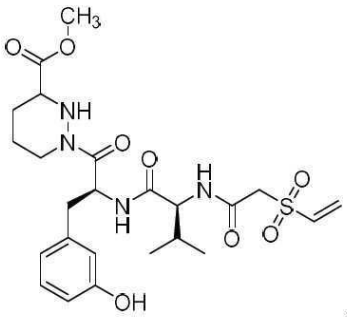
[0121]

,

,

,



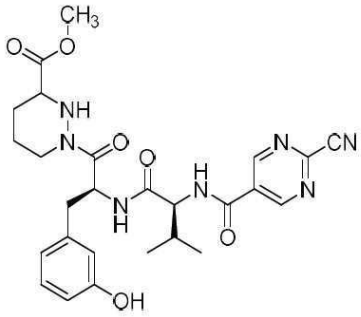
[0122]



,



, 또는



.

[0123]

[0124] 일부 양태에서, 본 개시내용은 링커를 통해 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질에 공유 또는 비-공유 결합할 수 있는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체, 그것의 합성 방법, 및 이의 용도를 제공한다.

[0125] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 접합체의 프리젠터 단백질 결합 모이어티 부분은 프리젠터 단백질과 비-공유 상호작용할 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체의 프리젠터 단백질 결합 모이어티 부분은 프리젠터 단백질과 공유 상호작용할 수 있다.

[0126] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 접합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 (a) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물과 (b) 표적 단백질과 반응시키는 것을 포함한다.

[0127] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (a) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물; (b) 표적 단백질; 및 (c) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; 및 접합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 화합물과 표적 단백질을 반응시키는 단계를 포함한다.

[0128] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 표적 단백질을 포함하는 프리젠터 단백질 및 접합체를 포함하는 복합체, 그것의 제조 방법, 및 이의 용도를 제공한다.

[0129] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 (i) 표적 단백질에 접합된 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체를 제공한다.

[0130] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (i) 표적 단백질에 접합된 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 복합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 표적 단백질과 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 것을 포함한다.

[0131] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (i) 표적 단백질에 접합된 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 복합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 (a) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물; (b) 표적 단백질; 및 (c) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; 및 화합물을 표적 단백질과 반응시키는 단계를 포함한다.

[0132] 상술한 방법의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 표적 단백질의 부재 하에 화합물에 결합한다. 상술한 방법의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 표적 단백질의 부재 하에 화합물에 실질적으로 결합하지 않는다. 상술한 방법의 일부 구현예에서, 화합물 및 표적 단백질은 프리젠터 단백질의 부재 하에 실질적으로 반응하지 않는다. 상술한 방법의 일부 구현예에서, 화합물 및 표적 단백질은 프리젠터 단백질의 부재 하에 반응된다. 상술한

방법의 일부 구현예에서, 조건은 환원제를 포함하지 않는다. 상술한 방법의 일부 구현예에서, 조건은 과량의 프리젠터 단백질을 포함한다.

[0133] 일부 구현예에서, 화합물과 프리젠터 단백질 사이의 검출가능한 결합은 표적 단백질의 부재 하에 관측된다. 일부 구현예에서, 그러나 화합물과 프리젠터 단백질 사이의 검출가능한 결합은 표적 단백질의 부재 하에 관측되지 않는다 (예를 들어, 프리젠터 단백질은 화합물과 실질적으로 결합하지 않는다). 일부 구현예에서, 가교결합기와 표적 단백질 사이의 상당한 반응 (예를 들어, 상당한 접합체 형성)은 프리젠터 단백질의 부재 하에 관측되지 않는다. 일부 구현예에서, 그러나, 가교결합기와 표적 단백질 사이의 상당한 반응은 심지어 프리젠터 단백질의 부재 하에 관측될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 반응의 속도 및/또는 범위 (예를 들어, 접합체 형성의 속도 및/또는 양)는 프리젠터 단백질은 이것이 부재시와 비교되는 바와 같이 프리젠터 단백질이 제공되는 경우에 주어진 검정에서 차이가 있을 수 있다 (예를 들어, 접합체 형성의 속도 및/또는 양은 프리젠터 단백질의 존재 하에 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 또는 100-배 초과이다).

[0134] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 접합체 생성은 환원제를 포함하지 않는 (예를 들어, 이것을 실질적으로 함유하지 않는) 조건 하에 수행된다.

[0135] 일부 구현예에서, 본 발명은 (i) 프리젠터 단백질; (ii) 본 명세서에서 기재된 화합물 (예를 들어, 그 구조가 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물); 및 (iii) 표적 단백질을 포함하는 복합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 복합체는 표적 단백질과 가교결합 모이어티의 반응을 가능하게 하는 조건 하에 노출되고 및/또는 유지되고, 이로써 그 사이의 가교-결합이 형성된다. 일부 구현예에서, 가교-결합은 표적 단백질의 아미노산에서 (예를 들어, 아미노산 측쇄에서) 헤테로원자와 이루어진다. 일부 구현예에서, 가교-결합은 표적 단백질에서 시스테인에서의 -S- 원자와 이루어진다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 천연 표적 단백질의 변이체이고; 일부 이러한 구현예에서, 변이체는 천연 표적 단백질을 높은 정도로 (예를 들어, 80%, 81%, 82%; 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 나타내고, 그러나 가교결합기 (예를 들어, 이의 아미노산 측쇄는 이러한 가교-결합에서 참여할 수 있는 헤테로원자를 포함함)와의 가교-결합에서의 참여에 민감한 하나 이상의 아미노산의 치환 또는 첨가가 상이한 아미노산 서열을 가진다.

[0136] 일부 양태에서, 본 개시내용은 링커를 통한 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질에 공유 또는 비-공유 결합할 수 있는 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체, 그것의 합성 방법, 및 이의 용도를 제공한다.

[0137] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 접합체의 표적 단백질 결합 모이어티 부분은 표적 단백질과 비-공유 상호작용할 수 있다. 일부 구현예에서, 접합체의 표적 단백질 결합 모이어티 부분은 표적 단백질과 비-공유 상호작용할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 단백질 결합 모이어티 및 프리젠터 단백질은 링커를 통해 접합된다.

[0138] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 접합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 (a) 표적 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물과 (b) 프리젠터 단백질과 반응하는 것을 포함한다.

[0139] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (a) 표적 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물; (b) 프리젠터 단백질; 및 (c) 표적 단백질을 제공하는 단계; 및 접합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 화합물과 프리젠터 단백질을 반응하는 단계를 포함한다.

[0140] 일부 구현예에서, 화합물과 표적 단백질 사이의 검출가능한 결합은 프리젠터 단백질의 부재 하에 관측된다. 일부 구현예에서, 그러나 화합물과 표적 단백질 사이의 검출가능한 결합은 프리젠터 단백질의 부재 하에 관측되지 않는다 (예를 들어, 프리젠터 단백질은 화합물과 실질적으로 결합하지 않는다). 일부 구현예에서, 가교결합기와 프리젠터 단백질 사이의 상당한 반응 (예를 들어, 상당한 접합체 형성)은 표적 단백질의 부재 하에 관측되지 않는다. 일부 구현예에서, 그러나, 가교결합기와 프리젠터 단백질 사이의 상당한 반응은 심지어 표적 단백질의 부재 하에 관측될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 반응의 속도 및/또는 범위 (예를 들어, 접합체 형성의 속도 및/또는 양)는 프리젠터 단백질은 이것이 부재시와 비교되는 바와 같이 프리젠터 단백질이 제공되는 경우에 주어진 검정에서 차이가 있을 수 있다 (예를 들어, 접합체 형성의 속도 및/또는 양은 프리젠터 단백질의 존재 하에 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 또는 100-배 초과이다).

[0141] 일부 구현예에서, 표적 단백질은 프리젠터 단백질의 부재 하에 화합물과 결합한다. 일부 구현예에서, 표적 단백

질은 프리젠터 단백질의 부재 하에 화합물과 실질적으로 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 표적 단백질 의 부재 하에 화합물에 실질적으로 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 가교결합기와 표적 단백질 사이의 반응 (예를 들어, 접합체 형성)은 프리젠터 단백질의 부재 하에 관측되지 않는다. 일부 구현예에서, 그러나, 가교결합기와 표적 단백질 사이의 반응은 심지어 프리젠터 단백질의 부재 하에 관측된다. 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 접합체 생성은 환원제를 포함하지 않는 (예를 들어, 이를 실질적으로 함유하지 않는) 조건 하에 수행된다.

[0142] 일부 구현예에서, 본 발명은 (i) 프리젠터 단백질; (ii) 본 명세서에서 기재된 화합물 (예를 들어, 그 구조가 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물); 및 (iii) 표적 단백질을 포함하는 복합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 복합체는 표적 단백질과 가교결합 모이어티의 반응을 가능하게 하는 조건 하에 노출되고 및/또는 유지되고, 이로써 그 사이의 가교-결합이 형성된다. 일부 구현예에서, 가교-결합은 표적 단백질의 아미노산에서 (예를 들어, 아미노산 측쇄에서) 헤테로원자와 이루어진다. 일부 구현예에서, 가교-결합은 표적 단백질에서 시스테인에서의 -S- 원자와 이루어진다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 천연 표적 단백질의 변이체이고; 일부 이러한 구현예에서, 변이체는 천연 표적 단백질을 높은 정도로 (예를 들어, 80%, 81%, 82%; 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 나타내고, 그러나 가교결합기 (예를 들어, 이의 아미노산 측쇄는 이러한 가교-결합에서 참여할 수 있는 헤테로원자를 포함함)와의 가교-결합에서의 참여에 민감한 하나 이상의 아미노산의 치환 또는 첨가가 상이한 아미노산 서열을 가진다.

[0143] 일부 양태에서, 본 개시내용은 링커를 통한 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질에 공유 또는 비-공유 결합할 수 있는 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체, 그것의 합성 방법, 및 이의 용도를 제공한다.

[0144] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (i) 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질 결합 모이어티; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체를 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 복합체는 프리젠터 단백질과 가교결합 모이어티의 반응을 가능하게 하는 조건 하에 노출되고 및/또는 유지되고, 이로써 그 사이의 가교-결합이 형성된다. 일부 구현예에서, 가교-결합은 프리젠터 단백질의 아미노산에서 (예를 들어, 아미노산 측쇄에서) 헤테로원자와 이루어진다. 일부 구현예에서, 가교-결합은 프리젠터 단백질에서 시스테인에서의 -S- 원자와 이루어진다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 천연 프리젠터 단백질의 변이체이고; 일부 이러한 구현예에서, 변이체는 천연 프리젠터 단백질을 높은 정도로 (예를 들어, 80%, 81%, 82%; 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 나타내고, 그러나 가교결합기 (예를 들어, 이의 아미노산 측쇄는 이러한 가교-결합에서 참여할 수 있는 헤테로원자를 포함함)와의 가교-결합에서의 참여에 민감한 하나 이상의 아미노산의 치환 또는 첨가가 상이한 아미노산 서열을 가진다.

[0145] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (i) 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 표적 단백질을 포함하는 복합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 복합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 프리젠터 단백질에 접합되는 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 표적 단백질을 조합시키는 것을 포함한다.

[0146] 일부 양태에서, 본 발명은 (i) 본 명세서에서 기재된 접합체 (예를 들어, 표적 단백질 결합 모이어티 및 프리젠터 단백질을 포함하는 접합체) 및 (ii) 표적 단백질을 포함하는 복합체의 제조 방법을 특징으로 한다. 일부 이러한 구현예에서, 제공된 방법은 복합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 접합체 및 표적 단백질을 조합시키는 것을 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 이러한 방법은 예를 들어, (i) (a) 화합물 (예를 들어, 이 구조가 표적 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물); (b) 표적 단백질; 및 (c) 프리젠터 단백질을 서로 배합시키는 단계; 및 (ii) 복합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 상기 조합물을 노출시키고 및/또는 상기 조합물을 유지시키는 단계를 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, 상기 조건은 프리젠터 단백질을 가교결합기와 반응시켜 이로서 접합체를 생성한다.

[0147] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (i) 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 표적 단백질을 포함하는 복합체의 제조 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (a) 표적 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물; (b) 프리젠터 단백질; 및 (c) 표적 단백질을 제공하는 단계; 및 복합체의 생성을 가능하게 하는 조건 하에 화합물과 프리젠터 단백질과 반응시키는 단계를 포함한다.

[0148] 일부 이러한 구현예에서, 상기 조건은 화합물, 프리젠터 단백질, 및/또는 표적 단백질이 화합물과 표적 단백질 사이의 검출가능한 결합이 프리젠터 단백질의 부재 하에 관측되는 것을 특징으로 하는 것이다. 일부 구현예에서, 그러나, 화합물과 표적 단백질 사이의 검출가능한 결합은 프리젠터 단백질의 부재 하에 상기 조건

하에서 관측되지 않는다 (예를 들어, 표적 단백질은 화합물과 실질적으로 결합하지 않는다). 일부 구현예에서, 가교결합기와 프리젠터 단백질 사이의 상당한 반응은 상기 조건 하에 표적 단백질의 부재 하에 관측되지 않는다. 일부 구현예에서, 그러나, 가교결합기와 프리젠터 단백질 사이의 상당한 반응은 심지어 상기 조건 하에 표적 단백질의 부재 하에 관측될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 조건은 환원제를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 조건은 과량의 프리젠터 단백질을 포함한다.

[0149] 일부 구현예에서, 표적 단백질은 프리젠터 단백질의 부재 하에 화합물과 결합한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 프리젠터 단백질의 부재 하에 화합물과 실질적으로 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 화합물 및 프리젠터 단백질은 표적 단백질의 부재 하에 실질적으로 반응하지 않는다. 일부 구현예에서, 화합물 및 프리젠터 단백질은 표적 단백질의 부재 하에 반응한다. 일부 구현예에서, 상기 조건은 환원제를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 조건은 과량의 표적 단백질을 포함한다.

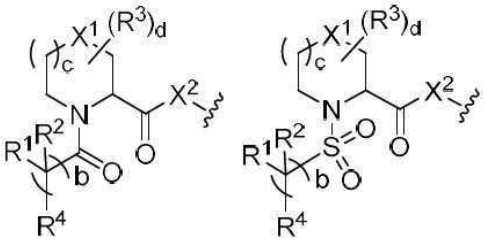
[0150] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질과 비-공유 상호작용할 수 있는 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 표적 단백질과 공유 또는 비-공유 상호작용할 수 있는 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 화합물을 제공한다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 표적 단백질 결합 모이어티는 링커를 통해 부착된다.

[0151] 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 VII의 구조를 갖는 화합물을 제공한다:

A-L-B

[0152] 화학식 VII

[0153] 여기서 A는 하기 화학식 VIIIa 또는 VIIIb의 구조를 포함한다:



화학식 VIIIa

화학식 VIIIb

[0154]

[0155] 여기서 b 및 c는 독립적으로 0, 1, 또는 2이고;

[0156] d는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7이고;

[0157] X^1 및 X^2는 각각, 독립적으로, 부재하거나, CH_2, O, S, SO, SO_2, 또는 NR^{13}이고;

[0158] 각각의 R^1 및 R^2는 독립적으로 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴), 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬)이거나, 또는 R^1 및 R^2는 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 조합되어 C=O를 형성하거나 또는 R^1 및 R^2는 조합되어 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴을 형성하고;

[0159] 각각의 R^3는 독립적으로, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10}

카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴), 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬)이거나 또는 2개의 R^8는 조합되어 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴을 형성하고;

[0160] R^4는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고;

[0161] L은 선택적인 링커이고; 및

[0162] B는 표적 단백질 결합 모이어티이다.

[0163] 화학식 VII의 화합물의 일부 구현예에서, 표적 단백질 결합 모이어티, B는 표적 단백질과 비-공유 상호작용할 수 있다. 화학식 VII의 화합물의 일부 구현예에서, 표적 단백질 결합 모이어티, B는 표적 단백질과 공유 상호작용할 수 있다. 화학식 VII의 화합물의 일부 구현예에서, 링커, L이 존재한다. 화학식 VII의 화합물의 일부 구현예에서, 링커, L이 부재한다.

[0164] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 화합물을 포함하는 3원 복합체, 그것의 제조 방법, 및 이의 용도를 제공한다.

[0165] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 (i) 화학식 VII의 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체를 제공한다.

[0166] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 및 복합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 표적 단백질을 포함하는 접합체의 확인에 대해 유용할 수 있다.

[0167] 일부 양태에서, 본 발명은 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 본 명세서에서 기재된 접합체 (예를 들어, 그 구조가 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물이 표적 단백질에 접합됨)를 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 이러한 접합체 (예를 들어, 그 구조가 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물) 및 (ii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 접합체 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 접합체 및 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체가 형성되는지 여부를 결정하는 단계로서, 여기서 복합체의 형성은 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 것임을 나타내는 단계.

[0168] 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 접합체를 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 접합체 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 접합체 및 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체가 형성되는지 여부를 결정하는 단계로서, 여기서 복합체의 형성은 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 것임을 나타내는 단계.

[0169] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 및 복합체는 프리젠터 단백질의 존재 하에 화합물과 공유결합을 형성할 수 있는 표적 단백질의 확인에 유용할 수 있다.

[0170] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질의 존재 하에 화합물과 반응할 수 있는 표적 단백질을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공하며, 여기서 화합물은 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합 모이어티를 포함한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합 모이어티를 포함하는 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 표적 단백질 및 화합물이 복합체의 형성 과정에서 반응하여 접합체를 형성하는지 여부를 결정하는 단계로서, 표적 단백질이 프리젠터 단백질의 존재 하에 화합물과 반응할 수 있는 것으로 확인되는 단계.

[0171] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 및 복합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질의 확인에 유용할 수 있다.

[0172] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질에 결합하는 표적 단백질을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 접합체 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 표적 단백질이 복합체 내의 프리젠터 단백질과 결합하는지 여부를 결정하는 단계로서, 여기서 표적 단백질이 프리젠터 단백질에 결합하는 경우, 표적 단백질은 프리젠터 단백질에 결합하는 것으로 확인되는 단계.

[0173] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질에 결합하는 표적 단백질을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합 모이어티를 포함하는 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 표적 단백질이 복합체 내의 프리젠터 단백질과 결합하는지 여부를 결정하는 단계로서, 표적 단백질이 프리젠터 단백질에 결합하는 표적 단백질로서 확인되는 단계.

[0174] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 화학식 VII의 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부를 결정하는 단계로서, 여기서 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는 경우, 표적 단백질이 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질로서 확인되는 단계.

[0175] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질에 결합하는 표적 단백질을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 화학식 VII의 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 화합물이 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 표적 단백질이 복합체 내의 프리젠터 단백질에 결합하는지 여부를 결정하는 단계로서, 여기서 표적 단백질이 프리젠터 단백질에 결합하는 경우, 표적 단백질이 프리젠터 단백질에 결합하는 표적 단백질로서 확인되는 단계.

[0176] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (a) (i) 하나 이상의 표적 단백질, (ii) 임의의 상술한 화합물; 및 (iii) 태그(예를 들어, 친화도 태그)를 포함하는 프리젠터 단백질를 제공하는 단계; (b) 하나 이상의 표적 단백질이 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 하나 이상의 표적 단백질, 화합물, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 하나 이상의 표적 단백질이 화합물 및 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는지 여부를 결정하는 단계로서; 여기서 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는 표적 단백질은 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질로서 확인되는 단계에 의해 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질을 확인하는 방법을 제공한다.

[0177] 일부 구현예에서, 결정 단계는 (예를 들어 풀 다운 실험(pull down experiment)에서 사용하는 것에 의해) 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성한 표적 단백질을 선택적으로 단리하기 위해 상기 프리젠터 단백질의 태그를 이용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 복합체는 표적 단백질, 프리젠터 단백질, 및 본 발명의 화합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 복합체는 표적 단백질 및 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 (예를 들어, 본 발명의 화합물의 가교결합기와 표적 단백질의 반응성 아미노산 사이에서의 반응에 의해 형성된 접합체) 및 프리젠터 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가로 (d) 하나 이상의 표적 단백질, 화합물, 및 프리젠터 단백질 사이에 형성된 복합체에서 표적 단백질을 확인하는 것 (예를 들어, 표적 단백질의 구조를 결정하는 것)을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질의 구조의 확인은 복합체에 대해 질량 분광분석법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부 및/또는 표적 단백질이 복합체 내의 프리젠터 단백질에 결합되는지 여부의 결정은 풀 다운 실험을 사용하여 수행될 수 있고, 여기서 표적 단백질 또는 프리젠터 단백질은 라벨링된다 (예를 들어, 복합체는 복합체에 존재하지 않는 표적 단백질 및/또는 프리젠터 단백질의 존재 하에 선택적으로 풀 다운될 수 있다).

[0178] 일부 양태에서, 본 개시내용은 (a) (i) 2개 이상의 표적 단백질; (ii) 임의의 상술한 화합물; 및 (iii) 친화도

태그를 포함하는 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 상기 표적 단백질이 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 2개 이상의 표적 단백질, 화합물, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; (c) 단계 (b)에서 형성된 표적 단백질, 화합물, 및 프리젠터 단백질의 하나 이상의 복합체를 선택적으로 단리하는 단계; 및 (d) 질량 분광분석법에 의해 단계 (c)에서 단리된 하나 이상의 복합체에서 표적 단백질을 확인하고 (예를 들어, 표적 단백질의 구조를 결정하고); 그것에 의해 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질을 확인하는 단계에 의해 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질을 확인하는 방법을 제공한다.

[0179] 일부 구현예에서, 결정 단계는 (예를 들어 풀 다운 실험에서 사용하는 것에 의해) 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성한 표적 단백질을 선택적으로 단리하기 위해 상기 프리젠터 단백질의 태그를 이용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 복합체는 표적 단백질, 프리젠터 단백질, 및 본 발명의 화합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 복합체는 표적 단백질 및 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 (예를 들어, 본 발명의 화합물의 가교결합기와 표적 단백질의 반응성 아미노산 사이에서의 반응에 의해 형성된 접합체) 및 프리젠터 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부 및/또는 표적 단백질이 복합체 내의 프리젠터 단백질에 결합되는지 여부의 결정은 풀 다운 실험을 사용하여 수행될 수 있고, 여기서 표적 단백질 또는 프리젠터 단백질은 라벨링된다 (예를 들어, 복합체는 복합체에 존재하지 않는 표적 단백질 및/또는 프리젠터 단백질의 존재 하에 선택적으로 풀 다운될 수 있다).

[0180] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 및 복합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 접합체를 생성하는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 부착시키는 표적 단백질 상의 위치를 확인하는데 유용할 수 있다.

[0181] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 결합 모이어티와 함께 접합체를 형성하는 표적 단백질 상의 위치를 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 접합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 일정 위치에서 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; (c) 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부를 결정하는 단계; 및 (d) 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성할 때까지 표적 단백질 상의 상이한 위치에서 접합된 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 사용하여 단계 (a) 내지 (c)를 선택적으로 반복하는 단계로서, 여기서 프리젠터 단백질 결합 모이어티와 함께 접합체를 형성하기 위한 표적 단백질 상의 위치로서, 여기서 상기 접합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 위치는 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부를 확인한다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 자연 발생 표적 단백질의 변이체이다.

[0182] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 결합 모이어티와 함께 접합체를 형성하는 표적 단백질 상의 위치로서, 여기서 접합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 위치를 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 한 위치에서 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질과 함께 화합물을 배합시키는 단계; (c) 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부를 결정하는 단계; 및 (d) 단계 (a) 내지 (c)를 선택적으로 반복하는 단계로서, 여기서 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성할 때까지 표적 단백질 상의 상이한 위치에서 접합되며; 프리젠터 단백질 결합 모이어티과 함께 접합체를 형성하는 표적 단백질 상의 위치로서, 여기서 접합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 위치가 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부를 확인하며, 그것에 의해 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 접합체를 형성하는 표적 단백질 상의 위치를 확인하는 단계. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 자연 발생 표적 단백질의 변이체이다.

[0183] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 및 복합체는 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질에 공유결합을 형성할 수 있는 화합물을 확인하는데 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 선택적으로 확인된 화합물은 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질과 공유결합을 형성한다.

[0184] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질에 공유적으로 결합할 수 있는 화합물을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백

질을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 화합물 및 표적 단백질이 샘플 중의 상기 화합물에서의 가교결합기를 통해 공유결합을 형성하는지 여부를 결정하는 단계로서, 여기서 화합물은 화합물 및 표적 단백질이 샘플에서 반응되는 경우, 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질에 공유 결합하는 것으로 확인되는 단계.

[0185] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질에 선택적으로 그리고 공유적으로 결합할 수 있는 화합물을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 포함하는 제1 샘플 및 (i) 제1 샘플에서와 같은 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합기를 포함하는 동일한 화합물 및 (ii) 제1 샘플에서와 같은 동일한 표적 단백질을 포함하는 제2 샘플을 제공하는 단계; 및 (b) 화합물 및 표적 단백질이 제2 샘플과 비교하여 제1 샘플에서 반응되는 정도를 결정하는 단계로서, 여기서 화합물이 화합물 및 표적 단백질이 제2 샘플에서보다 더 제1 샘플에서 반응되는 경우에 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질에 선택적으로 공유적으로 결합하는 것으로 확인되는 단계.

[0186] 일부 구현예에서, 화합물은 화합물 및 표적 단백질이 제2 샘플에서보다 적어도 5-배 더 많이 제1 샘플에서 반응되는 경우에, 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질에 선택적으로 공유적으로 결합하는 것으로 확인된다. 일부 구현예에서, 화합물은 화합물 및 표적 단백질이 제1 샘플에서 반응되지만, 제2 샘플에서 실질적으로 반응되지 않는 경우에, 프리젠터 단백질의 존재 하에 표적 단백질에 선택적으로 공유적으로 결합하는 것으로 확인된다.

[0187] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 및 복합체는 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질 및 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체를 확인하는데 유용할 수 있다.

[0188] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 접합체를 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; 및 (b) 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에 접합체 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; (c) 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하는지 여부를 결정하는 단계로서, 여기서 접합체 및 프리젠터 단백질이 복합체를 형성하고, 그것에 의해 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 접합체를 확인하는 경우에, 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 것으로 확인되는 단계.

[0189] 일부 구현예에서, 접합체와 단백질 사이의 결합은 3원 시간-분해 형광 에너지 전달 검정, 3원 증폭 발광 근접 균질 검정, 등온 적정 열량측정, 표면 플라즈몬 공명, 또는 핵자기 공명을 포함하는 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0190] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 및 복합체는 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 단백질-단백질 계면의 구조를 결정하는데 유용할 수 있다.

[0191] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체의 구조를 결정하고 및/또는 이의 하나 이상의 구조 특징을 평가하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 표적 단백질에 접합되는 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체와 프리젠터 단백질과 접촉하여 (예를 들어, 바이알에서) 복합체를 형성하는 단계; 및 (c) 복합체의 결정 구조를 결정하는 단계로서, 여기서 계면의 구조는 적어도 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 결정 구조의 부분을 포함하며, 그것에 의해 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서 계면의 구조를 결정하는 단계.

[0192] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 계면의 구조를 결정하고 및/또는 이의 하나 이상의 구조 특징을 평가하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합 모이어티를 포함하는 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) (예를 들어, 바이알에서) 화합물과 표적 단백질 사이에서 접합체를 형성하기 위해 그리고 상기 접합체와 상기 프리젠터 단백질 사이에서의 복합체의 형성을 위해 적합한 조건 하에 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 복합체의 결정 구조를 결정하는 단계로서, 여기서 계면의 구조는 적어도 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 결정 구조의 부분을 포함하며, 그것에 의해 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 계면의 구조를 결정하는 단계.

[0193] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 계면의 구조를 결정하고 및/또는 이의 하나 이상의 구조 특징을 평가하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

(a) (i) 화학식 VII의 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) (예를 들어, 바이알에서) 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 포함하는 복합체를 형성하는 단계; 및 (c) 복합체의 결정 구조를 결정하는 단계로서, 여기서 계면의 구조는 적어도 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 결정 구조의 부분을 포함하며, 그것에 의해 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 계면의 구조를 결정하는 단계.

[0194] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 단백질-단백질 계면의 구조를 결정하고 및/또는 이의 하나 이상의 구조 특징을 평가하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 상술한 복합체의 임의의 결정을 제공하는 단계; 및 (b) 결정의 구조를 결정하는 단계로서, 여기서 계면의 구조는 적어도 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 결정 구조의 부분을 포함하며, 그것에 의해 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 단백질-단백질 계면의 구조를 결정하는 단계.

[0195] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표적 단백질의 생물학적 활성을 조절할 수 있는 화합물을 확인하고 및/또는 특성화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 단백질-단백질 계면의 구조 (예를 들어, 상술한 방법의 임의의 것에 의해 결정된 구조)를 제공하는 단계; 및 (b) 계면에서 결합할 수 있는 화합물의 구조를 결정하며, 그것에 의해 표적 단백질의 생물학적 활성을 조절할 수 있는 화합물을 확인하는 단계. 일부 구현예에서, 계면에서 결합할 수 있는 화합물의 구조는 컴퓨터 전산 방법을 사용하여 결정된다. 일부 구현예에서, 계면에서 결합될 수 있는 화합물의 구조는 표적 단백질 및 프리젠터 단백질의 존재 하에 복합체 형성에 대해 본원에 기재된 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 화합물의 스크리닝에 의해 결정된다.

[0196] 일부 양태에서, 본 개시내용은 복합체에 대한 X-선 결정 좌표를 수득하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 표적 단백질에 접합된 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체 및 (ii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 접합체 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 복합체의 결정 구조를 결정하여, 그것에 의해 복합체에 대한 X-선 결정 좌표를 수득하는 단계.

[0197] 일부 양태에서, 본 개시내용은 복합체에 대한 X-선 결정 좌표를 수득하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 가교결합 모이어티를 포함하는 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 화합물이 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 경우에 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 복합체의 결정 구조를 결정하며, 그것에 의해 복합체에 대한 X-선 결정 좌표를 수득하는 단계.

[0198] 일부 양태에서, 본 개시내용은 복합체에 대한 X-선 결정 좌표를 수득하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) (i) 본 발명의 화합물; (ii) 표적 단백질; 및 (iii) 프리젠터 단백질을 제공하는 단계; (b) 화합물이 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 경우에, 복합체 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건 하에 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질을 배합시키는 단계; 및 (c) 복합체의 결정 구조를 결정하며, 그것에 의해 복합체에 대한 X-선 결정 좌표를 수득하는 단계.

[0199] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프리젠터 단백질과의 결합에 참여하는 표적 단백질 상의 잔기를 결정하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 본 발명의의 방법에 의해 수득된 복합체의 X-선 결정 좌표를 제공하는 단계; (b) 프리젠터 단백질 상의 4 Å의 원자 내의 원자를 포함하는 표적 단백질의 잔기를 확인하고; 그것에 의해 프리젠터 단백질과의 결합에 참여하는 표적 단백질 상의 잔기를 결정하는 단계. 일부 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 프리젠터 단백질/표적 단백질 복합체의 임의의 생화학적 및/또는 생체물리학적 특성을 결정하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 본원에 기재된 방법에 의해 수득된 본원에 기재된 복합체의 X-선 결정 좌표를 제공하는 단계; (b) 복합체의 생화학적 및/또는 생체물리학적 특성을 계산하고; 그것에 의해 프리젠터 단백질/표적 단백질 복합체의 생화학적 및/또는 생체물리학적 특성을 결정하는 단계.

[0200] 일부 구현예에서, 생화학적 및/또는 생체물리학적 특성은 복합체의 결합의 자유 에너지, 복합체의 K_d, 복합체의 K_i, 복합체의 K_{inact}, 및/또는 복합체의 K_i/K_{inact}을 포함한다. 일부 구현예에서, 생화학적 및/또는 생체물리학적 특성은 등온 적정 열량측정, 표면 플라즈몬 공명, 및/또는 질량 분광분석법에 의해 결정된다.

[0201] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 및 표적 단백질을 포함하는 복합체에서의 계면은 결합 포켓이거나 또는 이를

포함한다.

[0202] 일부 양태에서, 본 개시내용은 용액에서의 상술한 화합물, 표적 단백질, 및 프리젠터 단백질 중 임의의 것을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0203] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본 발명의 화합물, 접합체, 또는 복합체 중 임의의 것 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 단위 투약 형태이다.

[0204] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)을 조절하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 (예를 들어, 프리젠터 단백질의 존재 하에) 화합물, 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체, 또는 본 발명의 조성물 중 조절된 양(예를 들어, 양성 또는 음성 조절)의 임의의 것을 표적 단백질과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0205] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)을 조절하는 (예를 들어, 양성으로 또는 음성으로 조절하는) 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 화합물이 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있고, 생성된 복합체가 표적 단백질에 결합하여 그것에 의해 표적 단백질을 조절하는 (예를 들어, 양성으로 또는 음성으로 조절하는) 조건 하에 본 발명의 화합물 또는 조성물의 유효량을 세포 발현 표적 단백질 및 프리젠터 단백질과 접촉시키는 단계를 포함한다.

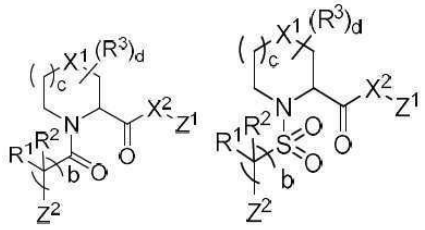
[0206] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)을 조절하는 (예를 들어, 양성으로 또는 음성으로 조절하는) 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 본 발명의 접합체를 표적 단백질과 접촉시켜, 그것에 의해 표적 단백질을 조절하는 단계를 포함한다.

[0207] 일부 양태에서, 본 개시내용은 프롤릴 이소머라제 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 화합물과 프롤릴 이소머라제 사이에서의 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건 하에 본 발명의 화합물 또는 조성물과 세포 발현 프롤릴 이소머라제를 접촉시켜, 그것에 의해 프롤릴 이소머라제 활성을 억제하는 단계를 포함한다.

[0208] 일부 양태에서, 본 개시내용은 세포에서 프리젠터 단백질/화합물 복합체를 형성하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 화합물과 프리젠터 단백질 사이에서의 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에 본 발명의 화합물 또는 조성물과 세포 발현 프리젠터 단백질을 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0209] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 표 1의 유전자 중 임의의 하나에 의해 인코딩된 단백질을 결합할 수 있다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 프롤릴 이소머라제 결합 모이어티이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 FKBP 결합 모이어티 (예를 들어, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51, 또는 FKBP52를 결합할 수 있음), 사이클로필린 결합 모이어티 (예를 들어, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, 또는 PPWD1을 결합할 수 있음), 또는 PIN1 결합 모이어티이다. 상술한 방법 중 임의의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 프리젠터 단백질 결합 모이어티에 결합하는 것으로 알려져 있다.

[0210] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 FKBP 결합 모이어티 (예를 들어, 선택적 FKBP 결합 모이어티 또는 비-선택적 FKBP 결합 모이어티)이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, FKBP 결합 모이어티는 하기 화학식 IIa 또는 IIb의 구조를 포함한다:



화학식 IIa 화학식 IIb

[0211]

[0212] 여기서 Z^1 및 Z^2는 각각, 독립적으로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬이거나, 또는 Z^1 및 Z^2는 조합되어 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환된 10 내지 40원 매크로사이클을 형성하고; 여기서 Z^1 또는 Z^2 중 하나 이상은 가교결합기에 대한 부착점을 포함하고;

[0213] b 및 c는 독립적으로 0, 1, 또는 2이고;

[0214] d는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7이고;

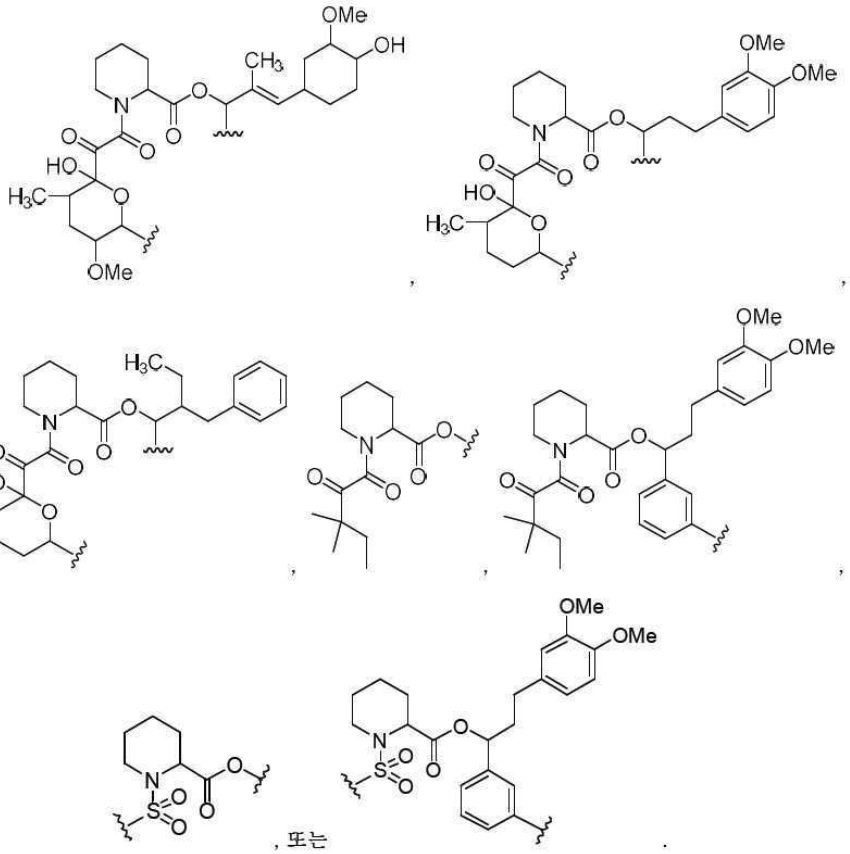
[0215] X^1 및 X^2는 각각, 독립적으로, 부재하거나, CH_2, O, S, SO, SO_2, 또는 NR^4이고;

[0216] 각각의 R^1 및 R^2는 독립적으로 수소, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴), 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬 (e,g, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬)이거나, 또는 R^1 및 R^2는 이들이 결합되는 탄소 원자와 함께 조합되어 C=O를 형성하거나 또는 R^1 및 R^2는 조합되어 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴을 형성하고;

[0217] 각각의 R^3는 독립적으로, 하이드록실, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, , 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴), 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬)이거나, 또는 2개의 R^8은 조합되어 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴을 형성하고;

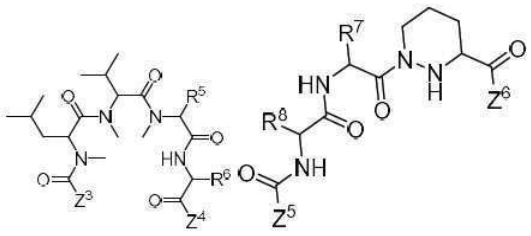
[0218] 각각의 R^4는 독립적으로, 수소, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, C_3-C_7 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 및 선택적으로 치환된 C_3-C_7 카보사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

[0219] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 하기 구조를 포함한다:



[0220] , 또는 .

[0221] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 사이클로필린 결합 모이어티 (예를 들어, 선택적 사이클로필린 결합 모이어티 또는 비-선택적 사이클로필린 결합 모이어티)이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 사이클로필린 결합 모이어티는 하기 화학식 III 또는 IV의 구조를 포함한다:



화학식 III 화학식 IV

[0222] .

[0223] 여기서 Z^3, Z^4, Z^5, 및 Z^6은 각각, 독립적으로, 하이드록실, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬이거나, 또는 Z^3 및 Z^4 또는 Z^5 및 Z^6은 조합되어 이들이 부착되는 원자와 함께 선택적으로 치환된 10 내지 40원 매크로사이클을 형성하고;

[0224] Z^3, Z^4, Z^5, Z^6, 또는 R^5 중 하나 이상은 가교결합기에 대한 부착점을 포함하고;

[0225] e는 0, 1, 2, 3, 또는 4이고;

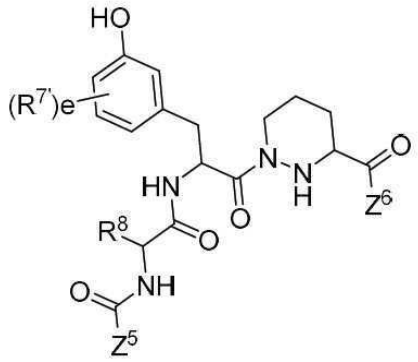
[0226] R^5 및 R^7은 독립적으로, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬,

선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴, 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬이고;

[0227] R^6는 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬이고; 및

[0228] R^8은 수소, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, C_3-C_7 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 및 선택적으로 치환된 C_3-C_7 카보사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

[0229] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 사이클로필린 결합 모이어티는 하기 화학식 IVa의 구조를 포함한다:

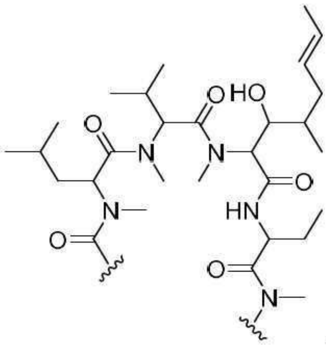
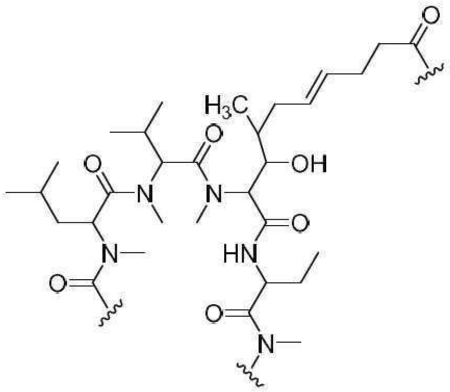
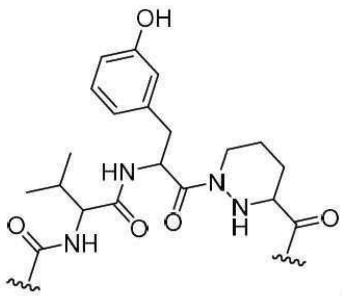


화학식 IVa

[0230]

[0231] 여기서 각각의 $R^{7'}$는 독립적으로, 하이드록실, 시아노, 선택적으로 치환된 아미노, 할로겐, 티올, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C_3-C_{10} 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴), 또는 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로사이클릴 C_1-C_6 알킬 (예를 들어, 선택적으로 치환된 C_2-C_9 헤테로아릴 C_1-C_6 알킬)이다.

[0232] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 하기 구조를 포함한다:

[0233]  ,  , 또는  .

[0234] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 표적 단백질은 GTPase, GTPase 활성화 단백질, 구아닌 뉴클레오타이드-교환 인자, 열충격 단백질, 이온 통로, 이중나선 단백질, 키나제, 포스파타제, 유비퀴틴 리가제, 전사 인자, 염색질 개질제/리모델러(remodeler), 또는 고전적 단백질-단백질 상호작용 도메인 및 모티프를 갖는 단백질이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 표적 단백질은 난공불락 표면(undruggable surface)을 포함한다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 표적 단백질은 통상적 결합 포켓을 가지지 않는다.

[0235] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 표적 단백질의 아미노산 서열은 하나 이상의 순수 아미노산을 반응성 아미노산 (예를 들어, 천연 아미노산 예컨대 시스테인, 라이신, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 세린, 또는 비-천연 아미노산)으로 치환되도록 개질되었다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 표적 단백질의 아미노산 서열은 하나 이상의 네이티브 반응성 아미노산 (예를 들어, 시스테인, 라이신, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 세린)을 비-반응성 아미노산 (예를 들어, 천연 아미노산 예컨대 세린, 발린, 알라닌, 이소류신, 트레오닌, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 류신, 또는 비-천연 아미노산)으로 치환되도록 개질되었다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 하나 이상의 네이티브 반응성 아미노산은 용매 노출된 아미노산이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 표적 단백질의 아미노산 서열은 모든 반응성 아미노산을 비-반응성 아미노산으로 치환되도록 개질된다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 치환은 보존적 치환이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 표적 단백질은 단 하나의 용매 노출된 반응성 아미노산을 포함한다.

[0236] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 표 1의 유전자 중 임의의 하나에 의해 인코딩된 단백질이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 프롤릴 이소머라제이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프롤릴 이소머라제는 FKBP 계열 (예를 들어, FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, FKBP51, 또는 FKBP52)의 구성원, 사이클로필린 계열 (예를 들어, PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, 또는 PPWD1)의 구성원, 또는 PIN1이다.

[0237] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질의 아미노산 서열은 하나 이상의 순수 아미노산을 반응성 아미노산 (예를 들어, 천연 아미노산 예컨대 시스테인, 라이

신, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 세린, 또는 비-천연 아미노산)으로 치환되도록 개질되었다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질의 아미노산 서열은 하나 이상의 네이티브 반응성 아미노산 (예를 들어, 시스테인, 라이신, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 세린)을 비-반응성 아미노산 (예를 들어, 천연 아미노산 예컨대 세린, 발린, 알라닌, 이소류신, 트레오닌, 티로신, 아스파르트산, 글루탐산, 또는 류신, 또는 비-천연 아미노산)으로 치환되도록 개질되었다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 하나 이상의 네이티브 반응성 아미노산은 용매 노출된 아미노산이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질의 아미노산 서열은 모든 반응성 아미노산을 비-반응성 아미노산으로 치환하도록 개질된다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 치환은 보존적 치환이다.

[0238] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 링커의 길이는 1 내지 20개의 원자이다. 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 링커의 길이는 1.5 내지 30 옹스트롬이다.

[0239] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 링커는 하기 화학식 V의 구조를 가진다:

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

[0240] 화학식 V

[0241] 식 중, A^1은 링커와 단백질 결합 모이어티 사이의 결합이고; A^2는 가교결합기와 링커 사이의 결합이고; B^1, B^2, B^3, 및 B^4는 각각, 독립적으로 선택적으로 치환된 C_1-C_2 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_3 헤테로알킬, O, S, 및 NR^N으로부터 선택되고; R^N은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알키닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-7} 헤테로알킬이고; C^1 및 C^2는 각각, 독립적으로 카보닐, 티오카보닐, 설포닐, 또는 포스포릴로부터 선택되고; f, g, h, I, j, 및 k는 각각, 독립적으로 0 또는 1이고; D는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알키닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_{10} 폴리에틸렌 글리콜, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 헤테로알킬, 또는 $-(B^3)_i-(C^2)_j-(B^4)_k-A^2$에 $A^1-(B^1)_f-(C^1)_g-(B^2)_h-$를 연결하는 화학 결합이다.

[0242] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 링커는 하기 화학식 VI의 구조를 포함한다:

[0243] 화학식 VI

[0244] 식 중, A^1은 링커와 단백질 결합 모이어티 사이의 결합이고;

[0245] A^2는 가교결합기와 링커 사이의 결합이고;

[0246] l은 0, 1, 2, 또는 3이고;

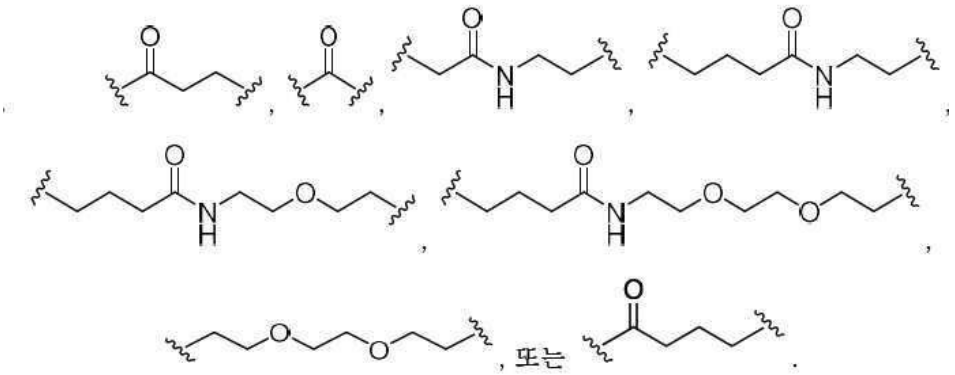
[0247] m은 0 또는 1이고;

[0248] n은 0, 1, 또는 2이고; 및

[0249] X^3, X^4, 및 X^5는 각각, 독립적으로, 부재하거나, O, S, -C≡C-, CR^9R^{10} 또는 NR^{11}이고; 및

[0250] 각각의 R^9, R^{10}, 및 R^{11}는 독립적으로, 수소, 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, C_3-C_7 카보사이클릴, 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 및 선택적으로 치환된 C_3-C_7 카보사이클릴 C_1-C_6 알킬이다. 일부 구현예에서, 각각의 R^9, R^{10}, 및 R^{11}은 독립적으로, 수소, 비치환된 C_1-C_6 알킬, 비치환된 C_2-C_6 알케닐, 비치환된 C_2-C_6 알키닐, 비치환된 아릴, C_3-C_7 카보사이클릴, 비치환된 C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_6 알킬, 및 비치환된 C_3-C_7 카보사이클릴 C_1-C_6 알킬이다.

[0251] 상술한 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 또는 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 링커는 하기 구조를 포함한다:



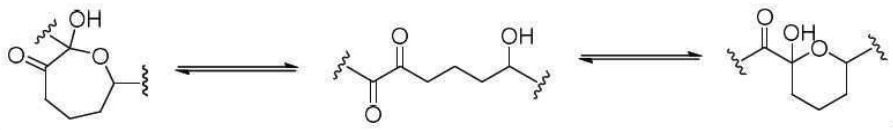
[0252]

[0253] *화학적 용어*

[0254] 당해 분야의 숙련가는 본원에 기재된 특정 화합물은 하나 이상의 상이한 이성질체 (예를 들어, 입체이성질체, 기하 이성질체, 호변이성질체) 및/또는 동위원소 (예를 들어, 이에서 하나 이상의 원자는 원자의 상이한 동위원소, 예컨대 중수소에 대해 치환된 수소로 치환된 것임) 형태로 존재할 수 있음을 이해할 것이다. 달리 나타내거나 또는 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 도시된 구조는 임의의 이러한 이성질체 또는 동위원소 형태를 개별적으로 또는 조합되어 나타나는 것으로 이해될 수 있다.

[0255] 본원에 기재된 화합물은 비대칭일 수 있다 (예를 들어, 하나 이상의 입체중심을 가짐). 달리 나타내지 않는 한, 모든 입체이성질체, 예컨대 거울상이성질체 및 부분입체이성질체가 의도된다. 비대칭으로 치환된 탄소 원자를 함유하는 본 개시내용의 화합물은 광학 활성 또는 라세미 형태로 단리될 수 있다. 광학 활성 개시 물질로부터 광학 활성 형태를 제조하기 위한 방법은 예컨대 라세미 혼합물의 분해에 의해 또는 입체선택적 합성에 의한 것과 같이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 올레핀, C=N 이중 결합 등의 다수의 기하 이성질체는 또한 본원에 기재된 화합물로 존재할 수 있고, 모든 이러한 안정한 이성질체는 본 개시내용에서 고려된다. 본 개시내용의 화합물의 시스 및 트랜스 기하 이성질체가 기재되어 있으며, 이성질체의 혼합물로서 또는 분리된 이성질체 형태로서 단리될 수 있다.

[0256] 일부 구현예에서, 본원에 도시된 하나 이상의 화합물은 상이한 호변이성질체 형태로 존재할 수 있다. 문맥으로부터 분명한 바와 같이, 명백하게 배제되지 않는 한, 이러한 화합물에 대한 참조는 모든 이러한 호변이성질체 형태를 포괄한다. 일부 구현예에서, 호변이성질체 형태는 단일 결합의 인접한 이중 결합으로 교환 및 양성자의 수반되는 이동으로 생성된다. 특정 구현예에서, 호변이성질체 형태는 양성자성 호변이성질체일 수 있고, 이는 참조 형태로서 총 전하 및 동일한 경험적 화학식을 갖는 이성질체 양성자화 상태이다. 양성자성 호변이성질체 형태를 갖는 모이어티의 예는 케톤 - 엔올 쌍, 아미드 - 이미드산 쌍, 락탐 - 락팀 쌍, 아미드 - 이미드산 쌍, 엔아민 - 이민 쌍, 및 환상 형태 (여기서 양성자는 헤테로사이클릭 시스템의 2개 이상의 위치를 점유할 수 있음), 예컨대 1H- 및 3H-이미다졸, 1H-, 2H- 및 4H- 1,2,4-트리아졸, 1H- 및 2H- 이소인돌, 및 1H- 및 2H-피라졸이다. 일부 구현예에서, 호변이성질체 형태는 평형 상태일 수 있거나 또는 적절한 치환에 의해 하나의 형태로 고정될 수 있다. 특정 구현예에서, 호변이성질체 형태는 예를 들어 하기 반응식에서 예시된 상호전환과 같은 아세탈 상호전환으로부터 생성된다:

[0257] 

[0258] 당해 분야의 숙련가는 일부 구현예에서, 본원에 기재된 화합물의 동위원소는 본 발명에 따라 제조되고 및/또는 이용될 수 있다. "동위원소"는 동일한 원자 번호를 가지지만 핵에서의 상이한 수의 중성자로부터 야기된 상이한 질량수를 갖는 원자를 지칭한다. 예를 들어, 수소의 동위원소는 삼중수소 및 중수소를 포함한다. 일부 구현예에서, 동위원소 치환 (예를 들어, 중수소로의 수소의 치환)은 분자의 물리화학 특성, 예컨대 키랄 중심의 라세미화의 대사 및/또는 속도를 변경할 수 있다.

[0259] 당업계에서 알려진 바와 같이, 다수의 화학적 독립체 (특히 다수의 유기 분자 및/또는 다수의 소분자)는 다양한 상이한 고체 형태 예컨대, 예를 들어, 비결정형 형태 및/또는 결정형 (예를 들어, 다형체, 수화물, 용매화물 등)이 적용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 독립체는 임의의 고체 형태를 포함하여 임의의 형태로 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 독립체는 특정 형태 예를 들어 특정 고체 형태로 이용된다.

[0260] 일부 구현예에서, 본원에 기재되고 및/또는 도시된 화합물은 염 형태 제공되고 및/또는 이용될 수 있다.

[0261] 특정 구현예에서, 본원에 기재되고 및/또는 도시된 화합물은 수화물 또는 용매화물 형태로 제공되고 및/또는 이용될 수 있다.

[0262] 본 명세서의 다양한 위치에서, 본 개시내용의 화합물의 치환기는 그룹 또는 범위로 개시되어 있다. 본 개시내용은 이러한 그룹 및 범위의 구성원의 각각 그리고 모든 개개의 하위조합을 포함하는 것으로 구체적으로 의도된다. 예를 들어, 용어 "C_{1-6} 알킬"은 메틸, 에틸, C_3 알킬, C_4 알킬, C_5 알킬, 및 C_6 알킬을 개별적으로 개시되는 것으로 구체적으로 의도된다. 게다가, 화합물은 달리 나타내지 않는 한, 대체물이 그룹 또는 범위로 개시된 복수의 위치를 포함하고, 본 개시내용은 각 위치에서 구성원의 각각 그리고 모든 개개의 하위조합을 함유하는 화합물의 그룹 (예를 들어 속 및 아속) 및 개개의 화합물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0263] 본원에서 형태 "선택적으로 치환된 X" (예를 들어, 선택적으로 치환된 알킬)의 어구는 "여기서 X는 선택적으로 치환된 X"과 동등한 것으로 의도된다 (예를 들어, "알킬은 선택적으로 치환된 알킬임"). 특징 "X" (예를 들어 알킬) 자체는 선택적인 것을 의미하는 것으로 의도되지 않는다.

[0264] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "알킬"은 1 내지 20개의 (예를 들어, 1 내지 10 또는 1 내지 6개의) 탄소를 함유하는 포화된 탄화수소기를 지칭한다. 일부 구현예에서, 알킬기는 비분지형 (즉, 선형임)이고; 일부 구현예에서, 알킬기는 분지형이다. 알킬기는 메틸, 에틸, n- 및 이소-프로필, n-, sec-, 이소- 및 tert-부틸, 네오펜틸 등으로 예시되며, 하기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 또는 2개 이상의 탄소의 알킬기의 경우에서, 4개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다: (1) C_{1-6} 알콕시; (2) C_{1-6} 알킬설피닐; (3) 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아미노, (예를 들어, 비치환된 아미노 (즉, $-NH_2$) 또는 치환된 아미노 (즉, $-N(R^{N1})_2$, 여기서 R^{N1}은 아미노에 대해 정의된 것과 같음); (4) C_{6-10} 아릴-C_{1-6} 알콕시; (5) 아지도; (6) 할로; (7) (C_{2-9} 헤테로사이클릴)옥시; (8) O-보호기로 선택적으로 치환된 하이드록실; (9) 니트로; (10) 옥소 (예를 들어, 카복시 알데하이드 또는 아실); (11) C_{1-7} 스피로사이클릴; (12) 티오알콕시; (13) 티올; (14) O-보호기로 선택적으로 치환된 $-CO_2R^{A'}$ (여기서 $R^{A'}$는 (a) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c) C_{6-10} 아릴, (d) 수소, (e) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임) 글리콜로 이루어진 군으로부터 선택됨; (15) $-C(O)NR^{B'}R^{C'}$ 여기서 각각의 $R^{B'}$ 및 $R^{C'}$는, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으

로부터 선택됨; (16) $-SO_2R^{D'}$, 여기서 $R^{D'}$는 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, 및 (d) 하이드록실로 이루어진 군으로부터 선택됨; (17) $-SO_2NR^{E'}R^{F'}$, 여기서 각각의 $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$는, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18) $-C(O)R^{G'}$, 여기서 $R^{G'}$는 (a) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c) C_{6-10} 아릴, (d) 수소, (e) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜, (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임)로 이루어진 군으로부터 선택됨; (19) $-NR^{H'}C(O)R^{I'}$, 여기서 $R^{H'}$는 (a1) 수소 및 (b1) C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, $R^{I'}$는 (a2) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b2) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c2) C_{6-10} 아릴, (d2) 수소, (e2) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f2) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g2) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임)으로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-NR^{J'}C(O)OR^{K'}$, 여기서 $R^{J'}$는 (a1) 수소 및 (b1) C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, $R^{K'}$는 (a2) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b2) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c2) C_{6-10} 아릴, (d2) 수소, (e2) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f2) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g2) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임)로 이루어진 군으로부터 선택됨; (21) 아미딘; 및 (22) 실릴기 예컨대 트리메틸실릴, t-부틸디메틸실릴, 및 트리-이소프로필실릴. 일부 구현예에서, 이러한 기의 각각은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C_1-알크아릴의 알킬렌기는 각각의 아릴로일 치환기를 제공하도록 옥소기로 추가로 치환될 수 있다.

[0265] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "알킬렌" 및 접두어 "알크-"는 2개의 수소 원자의 제거에 의해 직쇄 또는 분지쇄 포화된 탄화수소로부터 유래된 포화된 2가 탄화수소기를 나타내고, 이는 메틸렌, 에틸렌, 이소프로필렌 등으로 예시된다. 용어 "C_{x-y} 알킬렌" 및 접두어 "C_{x-y} 알크-"는 x 내지 y개의 탄소를 갖는 알킬렌기를 나타낸다. X에 대한 예시적인 값은 1, 2, 3, 4, 5, 및 6이고, y에 대한 예시적인 값은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 또는 20이다 (예를 들어, C_{1-6}, C_{1-10}, C_{2-20}, C_{2-6}, C_{2-10}, 또는 C_{2-20} 알킬렌). 일부 구현예에서, 알킬렌은 알킬기에 대한 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 추가로 치환될 수 있다.

[0266] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "알케닐"은 달리 구체화되지 않는 한, 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는 2 내지 20개의 탄소 (예를 들어, 2 내지 6 또는 2 내지 10개의 탄소)의 1가 직쇄 또는 분지쇄 기를 나타내고, 이는 에테닐, 1-프로페닐, 2-프로페닐, 2-메틸-1-프로페닐, 1-부테닐, 2-부테닐 등으로 예시된다. 알

케닐은 시스 및 트랜스 이성질체 모두를 포함한다. 알케닐기는 독립적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아미노, 아릴, 사이클로알킬, 또는 헤테로사이클릴 (예를 들어, 헤테로아릴), 또는 본원에 기재된 예시적인 알킬 치환 중 임의의 것으로부터 선택된 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0267] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "알키닐"은 탄소-탄소 삼중 결합을 함유하는 2 내지 20개의 탄소 원자 (예를 들어, 2 내지 4, 2 내지 6, 또는 2 내지 10개의 탄소)의 1가 직쇄 또는 분지쇄 기를 나타내고, 이는 에티닐, 1-프로피닐 등으로 예시된다. 알키닐기는 독립적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아릴, 사이클로알킬, 또는 헤테로사이클릴 (예를 들어, 헤테로아릴), 또는 본원에 기재된 예시적인 알킬 치환기 중 임의의 것으로부터 선택된 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0268] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "아미노"는 $-N(R^{N1})_2$를나타내고, 여기서 각각의 R^{N1}은 독립적으로, H, OH, NO_2, $N(R^{N2})_2$, SO_2OR^{N2}, SO_2R^{N2}, SOR^{N2}, N-보호기, 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 아릴, 알크아릴, 사이클로알킬, 알크사이클로알킬, 카복시알킬 (예를 들어, O-보호기, 예컨대 선택적으로 치환된 아릴알콕시카보닐기 또는 본 명세서에 기재된 임의의 것으로 선택적으로 치환됨), 설포알킬, 아실 (예를 들어, 아세틸, 트리플루오로아세틸, 또는 본원에 기재된 기타의 것), 알콕시카보닐알킬 (예를 들어, O-보호기, 예컨대 선택적으로 치환된 아릴알콕시카보닐기 또는 본 명세서에 기재된 임의의 것으로 선택적으로 치환됨), 헤테로사이클릴 (예를 들어, 헤테로아릴), 또는 알크헤테로사이클릴 (예를 들어, 알크헤테로아릴)이고, 여기서 각각의 이들 인용된 R^{N1} 기는 각각의 기에 대해 본 명세서에서 정의된 바와 같이 선택적으로 치환될 수 있거나; 또는 2개의 R^{N1}은 조합되어 헤테로사이클릴 또는 N-보호기를 형성하고, 각각의 R^{N2}는 독립적으로, H, 알킬, 또는 아릴이다. 본 발명의 아미노기는 비치환된 아미노 (즉, $-NH_2$) 또는 치환된 아미노 (즉, $-N(R^{N1})_2$)일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 아미노는 $-NH_2$ 또는$-NHR^{N1}$이고, 여기서 R^{N1}은 독립적으로, OH, NO_2, NH_2, NR^{N2}_2, SO_2OR^{N2}, SO_2R^{N2}, SOR^{N2}, 알킬, 카복시알킬, 설포알킬, 아실 (예를 들어, 아세틸, 트리플루오로아세틸, 또는 본원에 기재된 기타의 것), 알콕시카보닐알킬 (예를 들어, t-부톡시카보닐알킬) 또는 아릴이고, 각각의 R^{N2}는 H, C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), 또는 C_{6-10} 아릴일 수 있다.

[0269] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 용어 "아미노산"은 측쇄, 아미노기, 및 산성 기 (예를 들어, $-CO_2H$의 카복시기 또는$-SO_3H$)의 설포기, 여기서 아미노산은 측쇄, 아미노기, 또는 산성 기 (예를 들어, 측쇄)에 의해 모 분자기에 부착됨)를 갖는 분자를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 그것의 가장 넓은 의미로의 용어 "아미노산"은 예를 들어, 하나 이상의 펩타이드 결합의 형성을 통해 폴리펩타이드 사슬로 혼입될 수 있는 임의의 화합물 및/또는 물질을 지칭한다. 일부 구현예에서, 아미노산은 일반 구조 $H_2N-C(H)(R)-COOH$를 가진다. 일부 구현예에서, 아미노산은 자연 발생 아미노산이다. 일부 구현예에서, 아미노산은 합성 아미노산이고; 일부 구현예에서, 아미노산은 D-아미노산이고; 일부 구현예에서, 아미노산은 L-아미노산이다. "표준 아미노산"은 통상적으로 자연 발생 펩타이드에 발견되는 20개의 표준 L-아미노산 중 임의의 것을 지칭한다. "비표준 아미노산"은 그것이 합성적으로 제조되거나 또는 천연 공급원으로부터 수득되는지 여부와 무관하게 표준 아미노산 이외의 임의의 아미노산을 지칭한다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드에서의 카복시- 및/또는 아미노-말단 아미노산을 포함하는 아미노산은 상기 일반 구조와 비교하여 구조 개질이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 아미노산은 일반 구조와 비교하여 메틸화, 아미드화, 아세틸화, 및/또는 치환에 의해 개질될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 개질은 예를 들어, 그 외에 동일한 비개질된 아미노산을 함유하는 것과 비교하여 개질된 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드의 순환 반감기를 변경할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 개질은 그 외에 동일한 비개질된 아미노산을 함유하는 것과 비교하여 개질된 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드의 관련 활성을 상당하게 변경하지 않는다. 문맥으로부터 명백한 바와 같이, 일부 구현예에서, 용어 "아미노산"은 유리 아미노산을 지칭하기 위해 사용되며; 일부 구현예에서, 이는 폴리펩타이드의 아미노산 잔기를 지칭하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 아미노산은 카보닐기에 의해 모 분자기에 부착되며, 여기서 측쇄 또는 아미노기는 카보닐기에 부착된다. 일부 구현예에서, 아미노산은 α-아미노산이다. 특정 구현예에서, 아미노산은 β-아미노산이다. 일부 구현예에서, 아미노산은 γ-아미노산이다. 예시적인 측쇄는 선택적으로 치환된 알킬, 아릴, 헤테로사이클릴, 알크아릴, 알크헤테로사이클릴, 아미노알킬, 카바모일알킬, 및 카복시알킬을 포함한다. 예시적인 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 하이드록시노

르발린, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 노르발린, 오르니틴, 페닐알라닌, 프롤린, 피롤리신, 셀레시노시스테인, 세린, 타우린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린을 포함한다. 아미노산기는 하기로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 1, 2, 3, 또는 2개 이상의 탄소의 아미노산기의 경우, 4개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다: (1) C_{1-6} 알콕시; (2) C_{1-6} 알킬설피닐; (3) 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아미노, (예를 들어, 비치환된 아미노 (즉, $-NH_2$) 또는 치환된 아미노 (즉, $-N(R^{N1})_2$, 여기서 R^{N1}은 아미노에 대해 정의된 바와 같음); (4) C_{6-10} 아릴-C_{1-6} 알콕시; (5) 아지도; (6) 할로; (7) (C_{2-9} 헤테로사이클릴)옥시; (8) 하이드록실; (9) 니트로; (10) 옥소 (예를 들어, 카복시알데하이드 또는 아실); (11) C_{1-7} 스피로사이클릴; (12) 티오알콕시; (13) 티올; (14) $-CO_2R^{A'}$, 여기서 $R^{A'}$는 (a) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c) C_{6-10} 아릴, (d) 수소, (e) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임)으로 이루어진 군으로부터 선택됨; (15) $-C(O)NR^{B'}R^{C'}$, 여기서 각각의 $R^{B'}$ 및 $R^{C'}$는, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (16) $-SO_2R^{D'}$, 여기서 $R^{D'}$는 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, 및 (d) 하이드록실로 이루어진 군으로부터 선택됨; (17) $-SO_2NR^{E'}R^{F'}$, 여기서 각각의 $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$는, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18) $-C(O)R^{G'}$, 여기서 $R^{G'}$는 (a) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c) C_{6-10} 아릴, (d) 수소, (e) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임)으로 이루어진 군으로부터 선택됨; (19) $-NR^{H'}C(O)R^{I'}$, 여기서 $R^{H'}$는 (a1) 수소 및 (b1) C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, $R^{I'}$는 (a2) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b2) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c2) C_{6-10} 아릴, (d2) 수소, (e2) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f2) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g2) $-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임)으로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-NR^{J'}C(O)OR^{K'}$, 여기서 $R^{J'}$는 (a1) 수소 및 (b1) C_{1-6} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, $R^{K'}$는 (a2) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬), (b2) C_{2-20} 알케닐 (예를 들어, C_{2-6} 알케닐), (c2) C_{6-10} 아릴, (d2) 수소, (e2) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, (f2) 아미노-C_{1-20} 알킬, (g2)

$-(CH_2)_{s2}(OCH_2CH_2)_{s1}(CH_2)_{s3}OR'$의 폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, R'는 H 또는 C_{1-20} 알킬임), 및 (h2) $-NR^{N1}(CH_2)_{s2}(CH_2CH_2O)_{s1}(CH_2)_{s3}NR^{N1}$의 아미노-폴리에틸렌 글리콜 (여기서 s1은 1 내지 10 (예를 들어, 1 내지 6 또는 1 내지 4)의 정수이고, 각각의 s2 및 s3는, 독립적으로, 0 내지 10 (예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 6, 또는 1 내지 10)의 정수이고, 각각의 R^{N1}은, 독립적으로, 수소 또는 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬임)으로 이루어진 군으로부터 선택됨; 및 (21) 아미딘. 일부 구현예에서, 이러한 기의 각각은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다.

[0270] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "N-알킬화된 아미노산"은 펩타이드 결합을 형성하는 아미노산의 질소 상에 선택적으로 치환된 C_1 내지 C_6 알킬을 함유하는 아미노산을 지칭한다. N-알킬화된 아미노산은, 비제한적으로, N-메틸 아미노산, 예컨대 N-메틸-알라닌, N-메틸-트레오닌, N-메틸-페닐알라닌, N-메틸-아스파르트산, N-메틸-발린, N-메틸-류신, N-메틸-글리신, N-메틸-이소류신, N(α)-메틸-라이신, N(α)-메틸-아스파라긴, 및 N(α)-메틸-글루타민을 포함한다.

[0271] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "아릴"은 1 또는 2개의 방향족 고리를 갖는 단환형, 이환형, 또는 다중환형 카보사이클릭 고리계를 나타내고, 이는 페닐, 나프틸, 1,2-디하이드로나프틸, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸, 안트라세닐, 펜안트레닐, 플루오레닐, 인다닐, 인데닐 등으로 예시되며, 이는 하기로 이루어진 군으로부 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다: (1) C_{1-7} 아실 (예를 들어, 카복시알데하이드); (2) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시-C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬설피닐-C_{1-6} 알킬, 아미노-C_{1-6} 알킬, 아지도-C_{1-6} 알킬, (카복시알데하이드)-C_{1-6} 알킬, 할로-C_{1-6} 알킬 (예를 들어, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C_{1-6} 알킬, 니트로-C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 티오알콕시-C_{1-6} 알킬); (3) C_{1-20} 알콕시 (예를 들어, C_{1-6} 알콕시, 예컨대 퍼플루오로알콕시); (4) C_{1-6} 알킬설피닐; (5) C_{6-10} 아릴; (6) 아미노; (7) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴; (8) 아지도; (9) C_{3-8} 사이클로알킬; (10) C_{1-6} 알크-C_{3-8} 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C_{1-12} 헤테로사이클릴 (예를 들어, C_{1-12} 헤테로아릴); (13) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록실; (15) 니트로; (16) C_{1-20} 티오알콕시 (예를 들어, C_{1-6} 티오알콕시); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^{A'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, 및 $R^{A'}$는 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) 수소, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18) $-(CH_2)_qCONR^{B'}R^{C'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, 여기서 $R^{B'}$ 및 $R^{C'}$는 독립적으로 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^{D'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, 여기서 $R^{D'}$는 (a) 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, 및 (c) 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, 여기서 각각의 $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$는, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (21) 티올; (22) C_{6-10} 아릴옥시; (23) C_{3-8} 사이클로알콕시; (24) C_{6-10} 아릴-C_{1-6} 알콕시; (25) C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴 (예를 들어, C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴); (26) C_{2-20} 알케닐; 및 (27) C_{2-20} 알키닐. 일부 구현예에서, 이러한 기의 각각은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C_1-알크아릴 또는 C_1-알크헤테로사이클릴의 알킬렌기는 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)오일 치환기를 제공하도록 옥소기로 추가로 치환될 수 있다.

[0272] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "아릴알킬"기는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬렌기를 통해 모 분자기에 부착되는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아릴기를 나타낸다. 예시적인 비치환된 아릴알킬기는 7 내지 30개의 탄소이다 (예를 들어, 7 내지 16 또는 7 내지 20개의 탄소, 예컨대 C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴, C_{1-10} 알크-C_{6-10} 아릴, 또는 C_{1-20} 알크-C_{6-10} 아릴). 일부 구현예에서, 알킬렌 및 아릴 각각은 각각의 기에 대해 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 추가로 치환될 수 있다. 접두어 "알크-"가 선행되는 다른 기는 동일한

방식으로 정의되며, 여기서 "알크"는 달리 지적되지 않는 한, C_{1-6} 알킬렌으로 지칭되며, 부착된 화학적 구조는 본 명세서에서 정의된 바와 같다.

[0273] 용어 "아지도"는 $-N_3$ 기를 나타내고, 이는 또한 -N=N=N와 같이 나타날 수 있다.

[0274] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "카보사이클릭" 및 "카보사이클릴"은 고리가 탄소 원자에 의해 형성되는 선택적으로 치환된 C_{3-12} 단환형, 이환형, 또는 삼환형 비-방향족 고리 구조를 지칭한다. 카보사이클릭 구조는 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 및 사이클로알키닐 기를 포함한다.

[0275] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "카보사이클릴알킬"기는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬렌기를 통해 모분자기에 부착되는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 카보사이클릭기를 나타낸다. 예시적인 비치환된 카보사이클릴알킬기는 7 내지 30개의 탄소이다 (예를 들어, 7 내지 16 또는 7 내지 20개의 탄소, 예컨대 C_{1-6} 알크-C_{6-10} 카보사이클릴, C_{1-10} 알크-C_{6-10} 카보사이클릴, 또는 C_{1-20} 알크-C_{6-10} 카보사이클릴). 일부 구현예에서, 알킬렌 및 카보사이클릴 각각은 각각의 기에 대해 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 추가로 치환될 수 있다. 접두어 "알크-"가 선행되는 다른 기는 동일한 방식으로 정의되며, 여기서 "알크"는 달리 지적되지 않는 한, C_{1-6} 알킬렌으로 지칭되며, 부착된 화학적 구조는 본 명세서에서 정의된 바와 같다.

[0276] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "카보닐"은 C(O)기를 나타내고, 이는 또한 C=O로 나타날 수 있다.

[0277] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "카복시"는 $-CO_2H$를 의미한다.

[0278] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "시아노"는 -CN기를 나타낸다.

[0279] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "사이클로알킬"은 달리 구체화되지 않는 한, 3 내지 8개의 탄소의 1가 포화된 또는 불포화된 비-방향족 환형 탄화수소기를 나타내고, 이는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 바이사이클 헵틸 등으로 예시된다. 사이클로알킬기가 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 경우, 사이클로알킬기는 "사이클로알케닐"기로 지칭될 수 있다. 예시적인 사이클로알케닐기는 사이클로펜테닐, 사이클로헥세닐 등을 포함한다. 본 발명의 사이클로알킬기는 하기로 선택적으로 치환될 수 있다: (1) C_{1-7} 아실 (예를 들어, 카복시알데하이드); (2) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시-C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬설피닐-C_{1-6} 알킬, 아미노-C_{1-6} 알킬, 아지도-C_{1-6} 알킬, (카복시알데하이드)-C_{1-6} 알킬, 할로-C_{1-6} 알킬 (예를 들어, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C_{1-6} 알킬, 니트로-C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 티오알콕시-C_{1-6} 알킬); (3) C_{1-20} 알콕시 (예를 들어, C_{1-6} 알콕시, 예컨대 퍼플루오로알콕시); (4) C_{1-6} 알킬설피닐; (5) C_{6-10} 아릴; (6) 아미노; (7) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴; (8) 아지도; (9) C_{3-8} 사이클로알킬; (10) C_{1-6} 알크-C_{3-8} 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C_{1-12} 헤테로사이클릴 (예를 들어, C_{1-12} 헤테로아릴); (13) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록실; (15) 니트로; (16) C_{1-20} 티오알콕시 (예를 들어, C_{1-6} 티오알콕시); (17) $-(CH_2)_qCO_2R^{A'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, $R^{A'}$는 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) 수소, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18) $-(CH_2)_qCONR^{B'}R^{C'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, $R^{B'}$ 및 $R^{C'}$는 독립적으로 (a) 수소, (b) C_{6-10} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^{D'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, $R^{D'}$는 (a) C_{6-10} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, 및 (c) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, 각각의 $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$는, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{6-10} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (21) 티올; (22) C_{6-10} 아릴옥시; (23) C_{3-8} 사이클로알콕시; (24) C_{6-10} 아릴-C_{1-6} 알콕시; (25) C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴 (예를 들어, C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴); (26) 옥소; (27) C_{2-20} 알케닐; 및 (28) C_{2-20} 알키닐. 일부 구현예에서, 이러한 기의 각각은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C_1-알크아릴 또는 C_1-알크헤테로사이클릴의 알킬렌기는 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)오일 치환기를 제공하도록 옥소기로 추가로 치환될 수 있다.

[0280] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "사이클로알킬알킬"기는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬렌기 (예를 들어, 1 내지 4, 1 내지 6, 1 내지 10, 또는 1 내지 20개의 탄소의 알킬렌기)를 통해 모 분자기에 부착되는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 사이클로알킬기를 나타낸다. 일부 구현예에서, 알킬렌 및 사이클로알킬 각각은 각각의 기에 대해 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 추가로 치환될 수 있다.

[0281] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "부분입체이성질체"는 서로의 서울상이 아니며, 서로 포개질 수 없는 입체이성질체를 의미한다.

[0282] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "거울상이성질체"는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90% 및 더 바람직하게는 적어도 98%의 광학 순도 또는 거울상이성질체 과잉 (당업계에서 표준 방법에 의해 결정됨) (즉, 하나의 거울상이성질체의 적어도 90% 및 다른 거울상이성질체의 최대 10%)을 갖는 본 발명의 화합물의 각각의 개별 광학 활성 형태를 의미한다.

[0283] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "할로"는 브롬, 염소, 요오드, 또는 불소로부터 선택된 할로겐을 나타낸다.

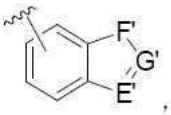
[0284] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "헤테로알킬"은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬기를 지칭하고, 이는 구성성분 탄소 원자 중 1 또는 2개는 각각 질소, 산소, 또는 황으로 대체된 것이다. 일부 구현예에서, 헤테로알킬기는 알킬기에 대해 본 명세서에서 기재된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 추가로 치환될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "헤테로알케닐" 및 헤테로알키닐"은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알케닐 및 알키닐 기를 지칭하고, 이에서 구성성분 탄소 원자 중 1 또는 2개는 각각 질소, 산소, 또는 황으로 대체된 것이다. 일부 구현예에서, 헤테로알케닐 및 헤테로알키닐기는 알킬기에 대해 본 명세서에서 기재된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기를 추가로 치환될 수 있다.

[0285] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "헤테로아릴"은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 방향족인 헤테로사이클릴의 하위세트를 나타내고: 즉, 이는 모노- 또는 다중환형 고리계 내에 4n+2 pi 전자를 함유한다. 예시적인 비치환된 헤테로아릴기는 1 내지 12개의 (예를 들어, 1 내지 11, 1 내지 10, 1 내지 9, 2 내지 12, 2 내지 11, 2 내지 10, 또는 2 내지 9개의) 탄소의 것이다. 일부 구현예에서, 헤테로아릴은 헤테로사이클릴기에 대해 정의된 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 치환된다.

[0286] 용어 "헤테로아릴알킬"은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬렌기를 통해 모 분자기에 부착된 본 명세서에서 정의된 바와 같은 헤테로아릴기를 지칭한다. 예시적인 비치환된 헤테로아릴알킬기는 2 내지 32개의 탄소이다 (예를 들어, 2 내지 22, 2 내지 18, 2 내지 17, 2 내지 16, 3 내지 15, 2 내지 14, 2 내지 13, 또는 2 내지 12개의 탄소, 예컨대 C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴, C_{1-10} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴, 또는 C_{1-20} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴). 일부 구현예에서, 알킬렌 및 헤테로아릴 각각은 각각의 기에 대해 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 추가로 치환될 수 있다. 헤테로아릴알킬기는 헤테로사이클릴알킬기의 하위세트이다.

[0287] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "헤테로사이클릴"은 달리 구체화되지 않는 한, 독립적으로 질소, 산소, 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2, 3, 또는 4개의 헤테로원자를 함유하는 5-, 6- 또는 7-원 고리를 나타낸다. 5-원 고리는 제로 내지 2개의 이중 결합을 가지고, 6- 및 7-원 고리는 제로 내지 3개의 이중 결합을 가진다. 예시적인 비치환된 헤테로사이클릴기는 1 내지 12개의 (예를 들어, 1 내지 11, 1 내지 10, 1 내지 9, 2 내지 12, 2 내지 11, 2 내지 10, 또는 2 내지 9개의) 탄소의 것이다. 또한, 용어 "헤테로사이클릴"기는 가교된 다중환형 구조를 갖는 복소환형 화합물을 나타내고, 이에서 하나 이상의 탄소 및/또는 헤테로원자는 단환형 고리, 예를 들어, 퀴누클리디닐기의 2개의 인접하지 않은 구성원을 가교시킨다. 용어 "헤테로사이클릴"은 이환형, 삼환형, 및 사환형 기를 포함하고, 이에서 상기 복소환형 고리 중 임의의 것은 1, 2, 또는 3개의 탄소환형 고리, 예를 들어, 아릴 고리, 사이클로헥산 고리, 사이클로헥센 고리, 사이클로펜탄 고리, 사이클로펜텐 고리, 또는 또 다른 단환형 복소환형 고리, 예컨대 인돌릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 테트라하이드로퀴놀릴, 벤조퓨릴, 벤조티에닐 등에 융합된다. 융합된 헤테로사이클릴의 예는 트로판 및 1,2,3,5,8,8a-헥사하이드로인돌리진을 포함한다. 복소환은 피롤릴, 피롤리닐, 피롤리디닐, 피라졸릴, 피라졸리닐, 피라졸리디닐, 이미다졸릴, 이미다졸리닐, 이미다졸리디닐, 피리딜, 피페리디닐, 호모피페리디닐, 피라지닐, 피페라지닐, 피리미디닐, 피리다지닐, 옥사졸릴, 옥사졸리디닐, 이속사졸릴, 이속사졸리디니일, 모폴리닐, 티오모폴리닐, 티아졸릴, 티아졸리디닐, 이소티아졸릴, 이소티아졸리디닐, 인돌릴, 인다졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 퀴녹살리닐, 디하이드로퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 신놀리닐, 프탈라지닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤즈옥사졸릴, 벤조티아디아졸릴, 퓨릴, 티에닐, 티아졸리디닐, 이소티아졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴 (예를 들어, 1,2,3-옥사디아졸

릴), 퓨리닐, 티아디아졸릴 (예를 들어, 1,2,3-티아디아졸릴), 테트라하이드로푸라닐, 디하이드로푸라닐, 테트라하이드로티에닐, 디하이드로티에닐, 디하이드로인돌릴, 디하이드로퀴놀릴, 테트라하이드로퀴놀릴, 테트라하이드로이소퀴놀릴, 디하이드로이소퀴놀릴, 피라닐, 디하이드로피라닐, 디티아졸릴, 벤조푸라닐, 이소벤조푸라닐, 벤조티에닐 등 (이는 이의 디하이드로 및 테트라하이드로 형태를 포함함)을 포함하고, 여기서 하나 이상의 이중 결합은 환원되어 수소로 대체된다. 또 다른 예시적인 헤테로사이클릴은 하기를 포함한다: 2,3,4,5-테트라하이드로-2-옥소-옥사졸릴; 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-이미다졸릴; 2,3,4,5-테트라하이드로-5-옥소-1H-피라졸릴 (예를 들어, 2,3,4,5-테트라하이드로-2-페닐-5-옥소-1H-피라졸릴); 2,3,4,5-테트라하이드로-2,4-디옥소-1H-이미다졸릴 (예를 들어, 2,3,4,5-테트라하이드로-2,4-디옥소-5-메틸-5-페닐-1H-이미다졸릴); 2,3-디하이드로-2-티옥소-1,3,4-옥사디아졸릴 (예를 들어, 2,3-디하이드로-2-티옥소-5-페닐-1,3,4-옥사디아졸릴); 4,5-디하이드로-5-옥소-1H-트리아졸릴 (예를 들어, 4,5-디하이드로-3-메틸-4-아미노 5-옥소-1H-트리아졸릴); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소피리디닐 (예를 들어, 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3,3-디에틸피리디닐); 2,6-디옥소-피페리디닐 (예를 들어, 2,6-디옥소-3-에틸-3-페닐피페리디닐); 1,6-디하이드로-6-옥소피리디미닐; 1,6-디하이드로-4-옥소피리미디닐 (예를 들어, 2-(메틸티오)-1,6-디하이드로-4-옥소-5-메틸피리미딘-1-일); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소피리미디닐 (예를 들어, 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3-에틸피리미디닐); 1,6-디하이드로-6-옥소-피리다지닐 (예를 들어, 1,6-디하이드로-6-옥소-3-에틸피리다지닐); 1,6-디하이드로-6-옥소-1,2,4-트리아지닐 (예를 들어, 1,6-디하이드로-5-이소프로필-6-옥소-1,2,4-트리아지닐); 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-인돌릴 (예를 들어, 3,3-디메틸-2,3-디하이드로-2-옥소-1H-인돌릴 및 2,3-디하이드로-2-옥소-3,3'-스피로프로판-1H-인돌-1-일); 1,3-디하이드로-1-옥소-2H-이소-인돌릴; 1,3-디하이드로-1,3-디옥소-2H-이소-인돌릴; 1H-벤조피라졸릴 (예를 들어, 1-(에톡시카보닐)- 1H-벤조피라졸릴); 2,3-디하이드로-2-옥소-1H-벤즈이미다졸릴 (예를 들어, 3-에틸-2,3-디하이드로-2-옥소-1H-벤즈이미다졸릴); 2,3-디하이드로-2-옥소-벤즈옥사졸릴 (예를 들어, 5-클로로-2,3-디하이드로-2-옥소-벤즈옥사졸일); 2,3-디하이드로-2-옥소-벤즈옥사졸릴; 2-옥소-2H-벤조피라닐; 1,4-벤조디옥사닐; 1,3-벤조디옥사닐; 2,3-디하이드로-3-옥소,4H-1,3-벤조티아지닐; 3,4-디하이드로-4-옥소-3H-퀴나졸리닐 (예를 들어, 2-메틸-3,4-디하이드로-4-옥소-3H-퀴나졸리닐); 1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3H-퀴나졸릴 (예를 들어, 1-에틸-1,2,3,4-테트라하이드로-2,4-디옥소-3H-퀴나졸릴); 1,2,3,6-테트라하이드로-2,6-디옥소-7H-퓨리닐 (예를 들어, 1,2,3,6-테트라하이드로-1,3-디메틸-2,6-디옥소-7 H -퓨리닐); 1,2,3,6-테트라하이드로-2,6-디옥소-1 H -퓨리닐 (예를 들어, 1,2,3,6-테트라하이드로-3,7-디메틸-2,6-디옥소-1 H -퓨리닐); 2-옥소벤즈[c,d]인돌릴; 1,1-디옥소-2H-나프트[1,8-c,d]이소티아졸릴; 및 1,8-나프틸렌디카복사미도. 추가의 복소환은 3,3a,4,5,6,6a-헥사하이드로-피롤로[3,4-b]파이롤-(2H)-일, 및 2,5-디아자바이사이클로[2.2.1]헵탄-2-일, 호모피페라지닐 (또는 디아제파닐), 테트라하이드로피라닐, 디티아졸릴, 벤조푸라닐, 벤조티에닐, 옥세파닐, 티에파닐, 아조카닐, 오세카닐, 및 티오카닐을 포함한다. 복소환기는 또한 하기 화학식의 기를 포함한다:

[0288] 

. 여기서

[0289] E'는 -N- 및 -CH-로 이루어진 군으로부터 선택되고; F'는 -N=CH-, -NH-CH_2-, -NH-C(O)-, -NH-, -CH=N-, -CH_2-NH-, -C(O)-NH-, -CH=CH-, -CH_2-, -CH_2CH_2-, -CH_2O-, -OCH_2-, -O-, 및 -S-로 이루어진 군으로부터 선택되고; G'는 -CH- 및 -N- 로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 언급된 임의의 헤테로사이클릴기는 하기로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다: (1) C_{1-7} 아실 (예를 들어, 카복시알데하이드); (2) C_{1-20} 알킬 (예를 들어, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시-C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알킬설피닐-C_{1-6} 알킬, 아미노-C_{1-6} 알킬, 아지도-C_{1-6} 알킬, (카복시알데하이드)-C_{1-6} 알킬, 할로-C_{1-6} 알킬 (예를 들어, 퍼플루오로알킬), 하이드록시-C_{1-6} 알킬, 니트로-C_{1-6} 알킬, 또는 C_{1-6} 티오알콕시-C_{1-6} 알킬); (3) C_{1-20} 알콕시 (예를 들어, C_{1-6} 알콕시, 예컨대 퍼플루오로알콕시); (4) C_{1-6} 알킬설피닐; (5) C_{6-10} 아릴; (6) 아미노; (7) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴; (8) 아지도; (9) C_{3-8} 사이클로알킬; (10) C_{1-6} 알크-C_{3-8} 사이클로알킬; (11) 할로; (12) C_{1-12} 헤테로사이클릴 (예를 들어, C_{2-12} 헤테로아릴); (13) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)옥시; (14) 하이드록실; (15) 니트로; (16) C_{1-20} 티오알콕시 (예를 들어, C_{1-6} 티오알콕시); (17) -$(CH_2)_qCO_2R^{A'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고,, 및 $R^{A'}$는 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, (c) 수소, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (18)

$-(CH_2)_qCONR^{B'}R^{C'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, $R^{B'}$ 및 $R^{C'}$는 독립적으로 (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (19) $-(CH_2)_qSO_2R^{D'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, $R^{D'}$는 (a) C_{1-6} 알킬, (b) C_{6-10} 아릴, 및 (c) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (20) $-(CH_2)_qSO_2NR^{E'}R^{F'}$, 여기서 q는 제로 내지 4의 정수이고, 각각의 $R^{E'}$ 및 $R^{F'}$는, 독립적으로, (a) 수소, (b) C_{1-6} 알킬, (c) C_{6-10} 아릴, 및 (d) C_{1-6} 알크-C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨; (21) 티올; (22) C_{6-10} 아릴옥시; (23) C_{3-8} 사이클로알콕시; (24) 아릴알콕시; (25) C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴 (예를 들어, C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로아릴); (26) 옥소; (27) (C_{1-12} 헤테로사이클릴)이미노; (28) C_{2-20} 알케닐; 및 (29) C_{2-20} 알키닐. 일부 구현예에서, 이러한 기의 각각은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, C_1-알크아릴 또는 C_1-알크헤테로사이클릴의 알킬렌기는 각각의 아릴로일 및 (헤테로사이클릴)오일 치환기를 제공하도록 옥소기로 추가로 치환될 수 있다.

[0290] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "헤테로사이클릴알킬"기는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 알킬렌기를 통해 모 분자 기에 부착되는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 헤테로사이클릴기를 나타낸다. 예시적인 비치환된 헤테로사이클릴알킬기는 2 내지 32개의 탄소이다 (예를 들어, 2 내지 22, 2 내지 18, 2 내지 17, 2 내지 16, 3 내지 15, 2 내지 14, 2 내지 13, 또는 2 내지 12개의 탄소, 예컨대 C_{1-6} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴, C_{1-10} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴, 또는 C_{1-20} 알크-C_{1-12} 헤테로사이클릴). 일부 구현예에서, 알킬렌 및 헤테로사이클릴 각각은 각각의 기에 대해 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 추가고 치환될 수 있다.

[0291] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "탄화수소"는 유일하게 탄소 및 수소 원자로 이루어진 군을 나타낸다.

[0292] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "하이드록실"은 -OH 기를 나타낸다. 일부 구현예에서, 하이드록실기는 알킬에 대해 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기 (예를 들어, O-보호기)로 치환될 수 있다.

[0293] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "이성질체"는 본 발명의 임의의 화합물의 임의의 호변이성질체, 입체이성질체, 거울상이성질체, 또는 부분입체이성질체를 의미한다. 본 발명의 화합물은 하나 이상의 키랄 중심 및/또는 이중 결합을 가질 수 있고, 이에 따라 입체이성질체, 예컨대 이중-결합 이성질체 (즉, 기하학적 E/Z 이성질체) 또는 부분입체이성질체 (예를 들어, 거울상이성질체 (즉, (+) 또는 (-)) 또는 시스/트랜스 이성질체)로서 존재할 수 있음을 이해한다. 본 발명에 따르면, 본원에 도시된 화학적 구조 및 이에 따른 본 발명의 화합물은 모든 상응하는 입체이성질체, 즉, 입체이성질체적으로 순수한 형태 (예를 들어, 기하학적으로 순수, 거울상이성질체로서 순수, 또는 부분입체이성질체로서 순수) 및 거울상이성질체 및 입체이성질체 혼합물 모두, 예를 들어, 라세미체를 포괄한다. 본 발명의 화합물의 거울상이성질체 및 입체이성질체 혼합물은 전형적으로 잘 알려진 방법, 예컨대 키랄상 기체 크로마토그래피, 키랄상 고성능 액체 크로마토그래피, 키랄 염 착물으로서 화합물을 결정화하는 것, 또는 키랄 용매에서 화합물을 결정화하는 것에 의해 그것의 성분 거울상이성질체 또는 입체이성질체로 분해될 수 있다. 또한, 거울상이성질체 및 입체이성질체는 잘-알려진 비대칭 합성 방법에 의해 입체이성질체적으로 또는 거울상이성질체으로 순수한 중간체, 시약, 및 촉매로부터 수득될 수 있다.

[0294] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "N-보호된 아미노"는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 1 또는 2개의 N-보호기가 부착된 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아미노기를 지칭한다.

[0295] 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "N-보호기"는 합성 절차 과정에서 바람직하지 않은 반응에 대해 아미노기를 보호하도록 의도된 기를 나타낸다. 통상적으로 사용된 N-보호기는 하기에 개시되어 있다: 문헌[Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999)], 이는 본원에 참조로 편입되어 있다. N-보호기는 아실, 아릴로일, 또는 카바밀 기 예컨대 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 피발로일, t-부틸아세틸, 2-클로로아세틸, 2-브로모아세틸, 트리플루오로아세틸, 트리클로로아세틸, 프탈릴, o-니트로페녹시아세틸, α-클로로부티릴, 벤조일, 4-클로로벤조일, 4-브로모벤조일, 4-니트로벤조일, 및 키랄 보조물 예컨대 보호된 또는 비보호된 D, L 또는 D, L-아미노산 예컨대 알라닌, 류신, 페닐알라닌 등; 설포닐-함유 기 예컨대 벤젠설포닐, p-톨루엔설포닐 등; 카바메이트 형성 기 예컨대 벤질옥시카보닐, p-클로로벤질옥시카보닐, p-메톡시벤질옥시카보닐, p-니트로벤질옥시카보닐, 2-니트로벤질옥시카보닐, p-브로모벤질옥시카보닐, 3,4-디메

톡시벤질옥시카보닐, 3,5-디메톡시벤질옥시카보닐, 2,4-디메톡시벤질옥시카보닐, 4-메톡시벤질옥시카보닐, 2-니트로-4,5-디메톡시벤질옥시카보닐, 3,4,5-트리메톡시벤질옥시카보닐, 1-(p-바이페닐일)-1-메틸에톡시카보닐, α,α-디메틸-3,5-디메톡시벤질옥시카보닐, 벤즈하이드릴옥시 카보닐, t-부틸옥시카보닐, 디이소프로필메톡시카보닐, 이소프로필옥시카보닐, 에톡시카보닐, 메톡시카보닐, 알릴옥시카보닐, 2,2,2,-트리클로로에톡시카보닐, 페녹시카보닐, 4-니트로페녹시 카보닐, 플루오레닐-9-메톡시카보닐, 사이클로펜틸옥시카보닐, 아다만틸옥시카보닐, 사이클로헥실옥시카보닐, 페닐티오카보닐, 등, 알크아릴 기 예컨대 벤질, 트리페닐메틸, 벤질옥시메틸 등 및 실릴기, 예컨대 트리메틸실릴 등을 포함한다. 바람직한 N-보호기는 포르밀, 아세틸, 벤조일, 피발로일, t-부틸아세틸, 알라닐, 페닐설포닐, 벤질, t-부틸옥시카보닐 (Boc), 및 벤질옥시카보닐 (Cbz)이다.

[0296] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "니트로"는 $-NO_2$ 기를 나타낸다.

[0297] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "O-보호기"는 합성 절차 동안 바람직하지 않은 반응에 대해 산소 함유 (예를 들어, 페놀, 하이드록실, 또는 카보닐) 기를 보호하는 것으로 의도된 것을 나타낸다. 통상적으로 사용된 O-보호기는 하기에 개시되어 있다: 문헌[Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999)], 이는 본원에 참조로 편입되어 있다. 예시적인 O-보호기는 아실, 아릴로일, 또는 카바밀 기, 예컨대 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 피발로일, t-부틸아세틸, 2-클로로아세틸, 2-브로모아세틸, 트리플루오로아세틸, 트리클로로아세틸, 프탈릴, o-니트로페녹시아세틸, α-클로로부티릴, 벤조일, 4-클로로벤조일, 4-브로모벤조일, t-부틸디메틸실릴, 트리-이소-프로필실릴옥시메틸, 4,4'-디메톡시트리틸, 이소부티릴, 페녹시아세틸, 4-이소프로필페헨옥시아세틸, 디메틸포름아미디노, 및 4-니트로벤조일; 알킬카보닐기, 예컨대 아실, 아세틸, 프로피오닐, 피발로일 등; 선택적으로 치환된 아릴카보닐기, 예컨대 벤조일; 실릴기, 예컨대 트리메틸실릴 (TMS), tert-부틸디메틸실릴 (TBDMS), 트리-이소-프로필실릴옥시메틸 (TOM), 트리이소프로필실릴 (TIPS) 등; 하이드록실을 갖는 에테르-형성 기, 예컨대 메틸, 메톡시메틸, 테트라하이드로피라닐, 벤질, p-메톡시벤질, 트리틸 등; 알콕시카보닐, 예컨대 메톡시카보닐, 에톡시카보닐, 이소프로폭시카보닐, n-이소프로폭시카보닐, n-부틸옥시카보닐, 이소부틸옥시카보닐, sec-부틸옥시카보닐, t-부틸옥시카보닐, 2-에틸헥실옥시카보닐, 사이클로헥실옥시카보닐, 메틸옥시카보닐 등; 알콕시알콕시카보닐기, 예컨대 메톡시메톡시카보닐, 에톡시메톡시카보닐, 2-메톡시에톡시카보닐, 2-에톡시에톡시카보닐, 2-부톡시에톡시카보닐, 2-메톡시에톡시메톡시카보닐, 알릴옥시카보닐, 프로파르길옥시카보닐, 2-부텐옥시카보닐, 3-메틸-2-부텐옥시카보닐 등; 할로알콕시카보닐, 예컨대 2-클로로에톡시카보닐, 2-클로로에톡시카보닐, 2,2,2-트리클로로에톡시카보닐 등; 선택적으로 치환된 아릴알콕시카보닐기, 예컨대 벤질옥시카보닐, p-메틸벤질옥시카보닐, p-메톡시벤질옥시카보닐, p-니트로벤질옥시카보닐, 2,4-디니트로벤질옥시카보닐, 3,5-디메틸벤질옥시카보닐, p-클로로벤질옥시카보닐, p-브로모벤질옥시-카보닐, 플루오레닐메틸옥시카보닐 등; 및 선택적으로 치환된 아릴옥시카보닐기, 예컨대 페녹시카보닐, p-니트로페녹시카보닐, o-니트로페녹시카보닐, 2,4-디니트로페녹시카보닐, p-메틸-페녹시카보닐, m-메틸페녹시카보닐, o-브로모페녹시카보닐, 3,5-디메틸페녹시카보닐, p-클로로페녹시카보닐, 2-클로로-4-니트로페녹시-카보닐 등); 치환된 알킬, 아릴, 및 알크아릴 에테르 (예를 들어, 트리틸; 메틸티오메틸; 메톡시메틸; 벤질옥시메틸; 실록시메틸; 2,2,2,-트리클로로에톡시메틸; 테트라하이드로피라닐; 테트라하이드로푸라닐; 에톡시에틸; 1-[2-(트리메틸실릴)에톡시]에틸; 2-트리메틸실릴에틸; t-부틸 에테르; p-클로로페닐, p-메톡시페닐, p-니트로페닐, 벤질, p-메톡시벤질, 및 니트로벤질); 실릴 에테르 (예를 들어, 트리메틸실릴; 트리에틸실릴; 트리이소프로필실릴; 디메틸이소프로필실릴; t-부틸디메틸실릴; t-부틸디페닐실릴; 트리벤질실릴; 트리페닐실릴; 및 디페닐메틸실릴); 카보네이트 (예를 들어, 메틸, 메톡시메틸, 9-플루오레닐메틸; 에틸; 2,2,2-트리클로로에틸; 2-(트리메틸실릴)에틸; 비닐, 알릴, 니트로페닐; 벤질; 메톡시벤질; 3,4-디메톡시벤질; 및 니트로벤질); 카보닐-보호기 (예를 들어, 아세탈 및 케탈기, 예컨대 디메틸 아세탈, 1,3-디옥솔란 등; 아실알기; 및 디티안기, 예컨대 1,3-디티안, 1,3-디티올란 등); 카복실산-보호기 (예를 들어, 에스테르기, 예컨대 메틸 에스테르, 벤질 에스테르, t-부틸 에스테르, 오르토에스테르 등; 및 옥사졸린 기를 포함한다.

[0298] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "옥소"는 =O를 나타낸다.

[0299] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 접두어 "퍼플루오로"는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 아닐기를 나타내고, 여기서 알킬기에 결합된 각각의 수소 라디칼은 플루오라이드 라디칼에 의해 대체된 것이다. 예를 들어, 퍼플루오로알킬기는 트리플루오로메틸, 펜타플루오로에틸 등에 의해 예시된다.

[0300] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "보호된 하이드록실"은 O-보호기에 결합된 산소 원자를 지칭한다.

[0301] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "스피로사이클릴"은 C_{2-7} 알킬렌 디라디칼을 나타내고, 이의 두 단부는 모

그룹의 동일한 탄소 원자에 결합되어 스피로환형 기, 및 또한 C_{1-6} 헤테로알킬렌 디라디칼을 형성하고, 이의 두 단부는 동일한 원자에 결합된다. 스피로사이클릴기를 형성하는 헤테로알킬렌 라디칼은 질소, 산소, 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3, 또는 4개의 헤테로원자를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스피로사이클릴기는 디라디칼이 부착된 탄소 원자를 제외하고 1 내지 7개의 탄소를 포함한다. 본 발명의 스피로사이클릴기는 사이클로알킬 및/또는 헤테로사이클릴기에 대한 선택적인 치환기로서 본원에 제공된 1, 2, 3, 또는 4개의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0302] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "입체이성질체"는 이 화합물이 가질 수 있는 모든 가능한 상이한 이성질체뿐만 아니라 형태적 형태 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 화학식의 화합물), 기본 분자 구조의 특히 모든 가능한 입체화학적으로 및 형태적으로 이성질체 형태, 모든 부분입체이성질체, 거울상이성질체 및/또는 이형태체를 지칭한다. 본 발명의 일부 화합물은 상이한 호변이성질체 형태로 존재할 수 있고, 후자의 모두는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0303] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "설포닐"은 $-S(O)_2-$기를 나타낸다.

[0304] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "티올"은 -SH 기를 나타낸다.

[0305] *정의*

[0306] 본원에서, 문맥으로부터 달리 명확하지 않으면, (i) 용어 관사("a")는 "하나 이상"을 의미하는 것으로 이해될 수 있고; (ii) 용어 "또는"은 "및/또는"을 의미하는 것으로 이해될 수 있고; (iii) 용어 "포함하는(comprising)" 및 "포함하는(including)"은 그 자체로서 또는 하나 이상의 추가의 성분 또는 단계와 함께 항목화된 성분 또는 단계를 포괄하는 것으로 이해될 수 있고; 및 (iv) 용어 "약" 및 "대략"은 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이 표준 변동을 허용하는 것으로 이해될 것이며; 및 (v) 여기서 범위가 제공되며, 종점이 포함된다.

[0307] 당업계에서 알려진 바와 같이, "친화도"는 특정 리간드가 그것의 파트너에 결합되는 기밀성의 측정값이다. 친화도는 상이한 방식으로 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 친화도는 정량적 검정에 의해 측정된다. 일부 이러한 구현예에서, 결합 파트너 농도는 생리적 병태를 모사하도록 리간드 농도의 초과하여 고정될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 결합 파트너 농도 및/또는 리간드 농도는 변화될 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 친화도는 비슷한 조건 (예를 들어, 농도) 하에 표준과 비교될 수 있다.

[0308] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대략" 및 "약"은 각각 관련된 문맥에 대해 적절한 바와 같이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되는 일반 통계적인 변동을 포함하는 것으로 의도된다. 특정 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 각각 달리 언급되거나 또는 문맥으로부터 분명하지 않으며, 언급된 값의 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 이하를 포함하는 값의 범위를 지칭한다 (예를 들어, 이러한 수는 가능한 값의 100%를 초과할 것이다).

[0309] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "결합하는"은 전형적으로 2개 이상의 독립체 사이의 또는 그 중에서의 회합 (예를 들어, 비-공유 또는 공유)을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. "직접적인" 결합은 독립체와 모이어티 사이의 물리적 접촉과 관련되고; 간접적인 결합은 하나 이상의 중간 독립체와의 물리적 접촉에 의해 물리적 상호작용과 관련된다. 2개 이상의 독립체 사이의 결합은 전형적으로 독립체 또는 모이어티가 상호작용하는 것이 단리시 연구되는 경우를 포함하는 - 다양한 맥락 중 임의의 것에서 또는 더 많은 복합 시스템의 맥락에서 (예를 들어, 캐리어 독립체와 및/또는 생물학적 시스템 또는 세포에서 공유적으로 또는 그렇지 않으면 회합되는 경우) 평가될 수 있다.

[0310] 그것의 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (K_D)에 의해 나타날 수 있다. 친화도는 본 명세서에서 기재된 것을 포함하여 당업계에서 알려진 일반 방법에 의해 측정될 수 있다. 결합 친화도를 측정하기 위해 특이적 예시적 및 예시적인 구현예는 하기에 기재되어 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "K_D"는 특정 화합물-단백질 또는 복합체-단백질 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 전형적으로, 본 발명의 화합물은 예를 들어 피분석물로서 프리젠터 단백질 및 리간드로서 화합물을 사용하여 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정되는 경우에, 약 10^{-6} M 미만, 예컨대 대략 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 또는 10^{-10} M 미만, 또는 심지어 그 미만의 해리 평형 상수 (K_D)를 갖는 프리젠터 단백질에 결합된다. 본 발명의 프리젠터 단백질/화합물 복합체는 예를 들어, 피분석물로서 표적 단백질 및 리간드로서 복합체를 사용하여 표면 플라즈몬 공

명 (SPR) 기술에 의해 결정되는 경우에, 약 10^{-6} M 미만, 예컨대 대략 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 또는 10^{-10} M 미만 또는 심지어 그 미만의 해리 평형 상수 (K_D)를 갖는 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)에 결합한다.

[0311] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "가교결합기"는 단백질 또는 다른 분자 상의 특이적 작용기 (예를 들어, 일차 아민, 설프하이드릴)에 화학적으로 부착될 수 있는 반응성 작용기를 포함하는 기를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "아미노산과 화학선택적 반응이 가능한 모이어티"는 천연 또는 비-천연 아미노산의 작용기 (예를 들어, 일차 및 이차 아민, 설프하이드릴, 알코올, 카복실기, 카보닐, 또는 트리아졸 형성 작용기 예컨대 아자이드 또는 알킨)에 화학적으로 부착될 수 있는 반응성 작용기를 포함하는 모이어티를 지칭한다. 가교결합기의 예는 설프하이드릴-반응 가교결합기 (예를 들어, 말레이미드, 할로아세틸, 피리딜이황화물, 티오설포네이트, 또는 비닐설폰을 포함하는 기), 아민-반응 가교결합기 (예를 들어, 에스테르 예컨대 NHS 에스테르, 이미도에스테르, 및 펜타플루오로페닐 에스테르, 또는 하이드록시메틸포스핀을 포함하는 기), 카복실-반응 가교결합기 (예를 들어, 일차 또는 이차 아민, 알코올, 또는 티올을 포함하는 기), 카보닐-반응 가교결합기 (예를 들어, 하이드라자이드 또는 알콕시아민을 포함하는 기), 및 트리아졸-형성 가교결합기 (예를 들어, 아자이드 또는 알킨을 포함하는 기)를 포함한다.

[0312] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "복합체"는 결합 상호작용 (예를 들어, 비-공유 상호작용, 예컨대 소수성 효과 상호작용, 정전 상호작용, 반데르발스 상호작용, 또는 π-효과 상호작용)을 통해 함께 결합된 2개 이상의 화합물 및/또는 단백질의 그룹을 지칭한다. 복합체의 예는 프리젠터 단백질 또는 표적 단백질에 결합된 본 발명의 접합체를 포함하는 "프리젠터 단백질/접합체 복합체" 및 "표적 단백질/접합체 복합체"이다.

[0313] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "접합체"는 (예를 들어, 공유결합 형성 반응을 통해) 2개 이상의 화학적 화합물 (예를 들어, 가교결합기 및 단백질 예컨대 표적 단백질 또는 프리젠터 단백질을 포함하는 화합물)의 연결에 의해 형성된 화합물을 지칭한다.

[0314] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "전자 끄는 기"는 π 시스템로부터 전자 밀도를 제거한 작용기를 지칭한다. 전자 끄는 기의 예는 비제한적으로, 할라이드 (예를 들어, 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드), 알데하이드, 케톤, 카복실산, 아실 클로라이드, 에스테르, 아미드, 트리할라이드 (예를 들어, 트리플루오로메틸, 트리클로로메틸), 니트릴, 설포네이트, 및 니트로 기를 포함한다.

[0315] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "이탈기"는 불균질 결합 절단에서 한 쌍의 전자와 함께 벗어난 분자 단편을 지칭한다. 이탈기의 예는 비제한적으로 할라이드 (예를 들어, 플루오라이드, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드), 카복실레이트, 토실레이트, 메실레이트, 퍼플루오로알킬설포네이트 (예를 들어, 트리플레이트), 니트레이트, 및 포스페이트를 포함한다.

[0316] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "결합에 참여하는" 원자는 이들이 결합되는 4 Å의 독립체를 가진 원자에 이들이 결합되거나 또는 연결되는 독립체의 4 Å에 있다.

[0317] 용어 "프리젠터 단백질"은 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)에 결합하는 그리고 이의 활성을 조절하는 복합체를 형성하기 위해 소분자에 결합되는 단백질을 지칭한다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 상대적으로 풍부한 단백질이다 (예를 들어, 프리젠터 단백질은 충분히 풍부하여 3분체 복합체에의 참여는 세포에서의 프리젠터 단백질의 생물학적 역할 및/또는 세포의 생존력 또는 다른 속성에 실질적으로 영향을 미치지 않는다). 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질은 세포 내에서의 차폐론 활성을 갖는 단백질이다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 세포 내에 다중 천연 상호작용 파트너를 갖는 단백질이다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질은 표적 단백질에 결합하고 이의 생물학적 활성을 조절하는 것으로 알려진 또는 이러한 것으로 예상되는 2원 복합체를 형성하는 것이다.

[0318] 용어 "프리젠터 단백질 결합 모이어티"는 화합물이 예를 들어, 10 μM 미만 (예를 들어, 5 μM 미만, 1 μM 미만, 500 nM 미만, 200 nM 미만, 100 nM 미만, 75 nM 미만, 50 nM 미만, 25 nM 미만, 10 nM 미만)의 K_D를 갖는 프리젠터 단백질에 결합하거나 또는 예를 들어 1 μM 미만(예를 들어 0.5 μM 미만, 0.1 μM 미만, 0.05 μM 미만, 0.01 μM 미만)의 IC_{50}의 프리젠터 단백질의 펩티딜-프롤릴 이소머라제 활성을 억제하도록 프리젠터 단백질에의 결합에 참여하는 이에 부착된 원자 및 모이어티의 그룹 (예를 들어, 20개 내의 원자 내의 원자, 15 개의 원자 내의 원자, 10개 내의 원자, 5개 원자 내의 원자)을 지칭한다. 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 프리젠터

단백질과 상호작용하는 화합물에서의 전체 원자를 반드시 포함하지 않는 것으로 이해될 것이다. 또한, 프리젠터 단백질 결합 모이어티 중 하나 이상의 원자는 표적 단백질 결합 모이어티 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 결합 모이어티 예컨대 포유동물 표적 단백질 결합 모이어티 또는 진균 표적 단백질 결합 모이어티 또는 원핵 표적 단백질 결합 모이어티 예컨대 박테리아 표적 단백질 결합 모이어티) 내에 있을 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0319] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "FKBP 결합 모이어티"는 단백질의 FKBP 계열 (예를 들어, FKBP12, FKBP12.6, FKBPP13, FKBP25, FKBP51, 또는 FKBP52)에서 프리젠터 단백질에 대해 선택적인 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "선택적 FKBP 결합 모이어티"는 FKBP 계열의 모든 다른 구성원에 대한 FKBP 계열의 하나 이상의 (예를 들어, 2, 3, 4, 5) 구성원에 대해 특이적인 결합 모이어티를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "비-선택적 FKBP 결합 모이어티"는 FKBP 계열의 모든 구성원에 대한 비슷한 친화도 (2-배 이내, 3-배 이내, 4-배 이내, 5-배 이내, 10-배 이내)를 갖는 결합 모이어티를 지칭한다.

[0320] 용어 "단백질 결합 모이어티"는 화합물이 예를 들어, 10 μM 미만 (예를 들어, 5 μM 미만, 1 μM 미만, 500 nM 미만, 200 nM 미만, 100 nM 미만, 75 nM 미만, 50 nM 미만, 25 nM 미만, 10 nM 미만)의 K_D를 갖는 상기 단백질에 결합하거나 또는 예를 들어 1 μM 미만(예를 들어 0.5 μM 미만, 0.1 μM 미만, 0.05 μM 미만, 0.01 μM 미만)의 IC_{50}의 프리젠터 단백질의 펩티딜-프롤릴 이소머라제 활성을 억제하도록 단백질에의 결합에 참여하는 이에 부착된 원자 및 모이어티의 그룹 (예를 들어, 20개 내의 원자 내의 원자, 15 개의 원자 내의 원자, 10개 내의 원자, 5개 원자 내의 원자)을 지칭한다. 단백질 결합 모이어티는 단백질과 상호작용하는 화합물에서의 전체 원자를 반드시 포함하지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0321] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어는 동일한 또는 상이한 요소의 원자는 자체로서 재배열되어 신규한 물질을 형성하는 공정을 지칭한다. 예를 들어, 2개의 원자 사이의 공유결합의 형성 예컨대 공유결합을 형성하기 위한 단백질 상의 반응성 아미노산과 가교결합기 사이의 반응. 반응은 당업계에서 알려진 임의의 방법에 의해 측정될 수 있고, 예를 들어, 반응 생성물의 형성은 LC-MS 또는 NMR에 의해 결정될 수 있다.

[0322] 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "반응 아미노산"은 특이적 작용기 (예를 들어, 가교결합기)에 화학적으로 부착될 수 있는 작용기 (예를 들어, 친핵성 작용기)를 포함하는 천연 또는 비-천연 아미노산을 지칭한다. 반응성 아미노산의 예는 측쇄 상의 아자이드를 갖는 아미노산, 시스테인, 라이신, 및 세린을 포함한다. "비-반응성 아미노산"은 특이적 작용기에 화학적으로 부착될 수 있는 작용기를 함유하지 않는 천연 또는 비-천연 아미노산을 지칭한다. 비-반응성 아미노산의 예는 발린, 알라닌, 이소류신, 트레오닌, 및 류신을 포함한다.

[0323] 용어 "참조"는 대개 관심대상의 화합물, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값이 비교되는 표준 또는 대조군 화합물, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값을 기술하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 표준 화합물, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심대상의 화합물, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값의 시험 또는 결정과 실질적으로 동시에 시험되고 및/또는 결정된다. 일부 구현예에서, 표준 화합물, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은 실재하는 매체에서 선택적으로 형체화된 이력적 표준이다. 전형적으로, 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 표준 화합물, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값은 관심대상의 화합물, 개체, 모집단, 샘플, 서열 또는 값을 결정하거나 또는 특성화하도록 이용되는 것과 비슷한 조건 하에 결정되거나 또는 특성화된다.

[0324] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "용매 노출된 아미노산"은 단백질을 둘러싸는 용매에 접근가능한 아미노산을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용매 노출된 아미노산은 치환되는 경우에 단백질의 3차원 구조를 실질적으로 변화시키지 않는 아미노산이다.

[0325] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "특이적 결합" 또는 "~대해 특이적인" 또는 "~에 대해 특이적인"은 결합제와 표적 독립체 사이의 상호작용을 지칭한다. 통상적인 기술에 의해 이해될 것인 바와 같이, 대안적인 상호작용, 예를 들어 상호작용은 10 μM 미만(예를 들어, 5 μM 미만, 1 μM 미만, 500 nM 미만, 200 nM 미만, 100 nM 미만, 75 nM 미만, 50 nM 미만, 25 nM 미만, 10 nM 미만)의 K_D을 갖는 결합의 존재시 이것이 선호되는 경우에 상호작용이 "특이적"인 것으로 간주된다. 다수의 구현예에서, 특이적 상호작용은 표적 독립체 (예를 들어, 에피토프, 열, 결합 부위)의 특정 구조 특징의 존재에 좌우된다. 특이성은 절대적일 필요가 없음을 이해하여야 한다. 일부 구현예에서, 특이성은 하나 이상의 다른 잠재 표적 독립체 (예를 들어, 경쟁자)에 대한 결합제의 것에 대해 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 특이성은 표준 특이적 결합제의 것에 대해 평가된다. 일부 구현예에서, 특이성은 표준 비-특이적 결합제의 것에 대해 평가된다.

[0326] 활성을 갖는 화합물과 관련하여 사용되는 경우의 용어 특이적"은 화합물이 잠재 표적 독립체 또는 상태 사이에서 식별될 수 있는 것을 의미하는 것으로 당해 분야의 숙련가에 의해 이해된다. 예를 들어, 일부 구현예에서,

화합물은 이것이 하나 이상의 경쟁적인 대안적 표적의 존재 하에 이 표적과 우선적으로 결합되는 경우에 그것의 표적에 "특이적으로" 결합하는 것으로 언급된다. 다수의 구현예에서, 특이적 상호작용은 표적 독립체 (예를 들어, 에피토프, 열, 결합 부위)의 특정 구조 특징의 존재에 좌우된다. 특이성은 절대적일 필요가 없음을 이해하여야 한다. 일부 구현예에서, 특이성은 하나 이상의 다른 잠재 표적 독립체 (예를 들어, 경쟁자)에 대한 결합제의 것에 대해 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 특이성은 표준 특이적 결합제의 것에 대해 평가된다. 일부 구현예에서, 특이성은 표준 비-특이적 결합제의 것에 대해 평가된다. 일부 구현예에서, 제제 또는 독립체는 그것의 표적 독립체에 결합하는 조건 하에 경쟁적인 대안 표적에 대해 검출가능하게 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 결합제는 경쟁적인 대안 표적(들)과 비교하여 그것의 표적 독립체에 대해 더 높은 온-레이트로, 더 낮은 오프-레이트, 증가된 친화도, 줄어든 해리도, 및/또는 증가된 안정성으로 결합한다.

[0327] 용어 "실질적으로"은 관심대상의 특징 또는 특성의 전체 또는 거의 전체의 범위 또는 정도를 나타내는 정성적 조건을 지칭한다. 생물학적 기술분야의 숙련가는 생물학적 및 화학적 현상이 거의, 설사 있더라도 완료되고 및/또는 완료를 위해 진행되거나 또는 절대적인 결과를 달성하거나 또는 회피하지 못하는 것으로 이해될 것이다. 용어 "실질적으로"는 이에 따라 다수의 생물학적 및 화학적 현상에서 고유한 완성도의 잠재적 결여를 포착하기 위해 사용된다.

[0328] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 특정 단백질에 "실질적으로 결합하지 않는다"는 예를 들어 10^{-4} M 이상, 대안적으로 10^{-5} M 이상, 대안적으로 10^{-6} M 이상, 대안적으로 10^{-7} M 이상, 대안적으로 10^{-8} M 이상, 대안적으로 10^{-9} M 이상, 대안적으로 10^{-10} M 이상, 대안적으로 10^{-11} M 이상, 대안적으로 10^{-12} M 이상의 표적에 대한 K_D, 또는 10^{-4} M 내지 10^{-12} M 또는 10^{-6} M 내지 10^{-10} M 또는 10^{-7} M 내지 10^{-9} M의 범위의 K_D를 갖는 분자 또는 분자의 부분에 의해 나타날 수 있다.

[0329] 용어 "표적 단백질"은 질환, 장애 또는 병태와 연관된 생물학적 경로에 참여하는 임의의 단백질을 지칭한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 mTOR 또는 칼시뉴린이 아니다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 프리젠터 단백질 및 소분자와 함께 3분체 복합체를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 자연 발생 단백질이고; 일부 이러한 구현예에서, 표적 단백질은 특정 포유동물 세포 (예를 들어, 포유동물 표적 단백질), 진균 세포 (예를 들어, 진균 표적 단백질), 박테리아 세포 (예를 들어, 박테리아 표적 단백질) 또는 식물 세포 (예를 들어, 식물 표적 단백질)에서 자연적으로 발견된다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 하나 이상의 천연 프리젠터 단백질/천연 소분자 복합체와의 천연 상호작용을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 복수의 상이한 천연 프리젠터 단백질/천연 소분자 복합체와의 천연 상호작용을 특징으로 하고; 일부 이러한 구현예에서, 복합체의 일부 또는 모두는 동일한 프리젠터 단백질 (및 상이한 소분자)을 이용한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 사이클로스포린, 라파마이신, 또는 FK506 및 프리젠터 단백질 (예를 들어, FKBP)의 복합체에 실질적으로 결합하지 않는다. 표적 단백질은 자연 발생될 수 있고, 예를 들어, 야생형일 수 있다. 대안적으로, 표적 단백질은 야생형 단백질로부터 변형될 수 있으나, 여전히 예를 들어 대립유전자 변이체, 스플라이스 돌연변이체 또는 생물학적 활성 단편으로서 생물학적 기능을 보유할 수 있다. 예시적인 포유동물 표적 단백질은 GTPases, GTPase 활성화 단백질, 구아닌 뉴클레오타이드-교환 인자, 열충격 단백질, 이온 통로, 이중나선 단백질, 키나제, 포스파타제, 유비퀴틴 리가제, 전사 인자, 염색질 개질제/리모델러, 고전적 단백질-단백질 상호작용 도메인 및 모티프를 갖는 단백질, 또는 질환, 장애 또는 병태와 연관된 생물학적 경로에 참여하는 임의의 다른 단백질이다.

[0330] 일부 구현예에서, 표적 단백질은 변형된 표적 단백질이다. 변형된 표적 단백질은 단백질 서열에서 보존적 또는 비-보존적인 아미노산 삽입, 결실, 또는 치환 (예를 들어, D-아미노산, 데스아미노산)을 포함할 수 있다 (예를 들어, 이러한 변화는 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는다). 특히, 본 발명의 임의의 폴리펩타이드의 아미노 또는 카복시 말단에 대한 하나 이상의 시스테인 잔기의 첨가는 예를 들어, 이황화 결합에 의해 이러한 단백질의 접합을 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 반응성 아미노산 잔기 (예를 들어, 시스테인)는 단백질 상의 가능한 접합 부위의 수를 감소시키기 위해 제거된다. 아미노산 치환은 보존적일 수 있고 (즉, 여기서 잔기는 다른 동일한 일반 유형 또는 그룹으로 대체됨) 또는 비-보존적일 수 있다 (즉, 여기서 잔기는 다른 유형의 아미노산으로 대체됨). 또한, 자연 발생 아미노산은 비-자연 발생 아미노산에 대해 치환될 수 있다 (즉, 비-자연 발생 보존적 아미노산 치환 또는 비-자연 발생 비-보존적 아미노산 치환).

[0331] 용어 "표적 단백질 결합 모이어티"는 화합물이 프리젠터 단백질을 갖는 복합체에 존재하는 경우 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)에 대한 결합에 참여하는 이에 부착된 고리 원자 및 모이어티의 그룹 (예를 들어,

20개 원재 내의 원자, 15개 원자 내의 원자, 10개 원자 내, 5개 원자 내의 원자)을 지칭한다. 표적 단백질 결합 모이어티가 표적 단백질과 상호작용하는 화합물에서의 전체 원자를 반드시 포함하지 않음을 이해할 것이다. 또한, 프리젠터 단백질 결합 모이어티의 하나 이상의 원자는 또한 표적 단백질 결합 모이어티에 존재할 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0332] 용어 "통상적 결합 포켓"은 이의 활성이 하나 이상의 소분자에 의해 조절되는 단백질과 비슷한 이화학적 및/또는 기하학적 특성을 갖는 단백질 구조 상의 공동 또는 포켓을 지칭한다. 일부 구현예에서, 통상적 결합 포켓은 1000 $Å^3$ 초과의 용적을 갖는 잘 정의된 포켓이다. 당해 분야의 숙련가는 통상적 결합 포켓의 개념에 익숙하며, 또한 "약물성"에 대한 그것의 관계를 인식한다. 특정 구현예에서, 단백질은 본 명세서에서 정의된 바와 같이 그것이 난공불락인 경우에 통상적 결합 포켓을 가지지 않는 것으로 간주된다.

[0333] 용어 "난공불락 표적"은 약물에 의해 표적화되는 것으로 알려져 있고 및/또는 소분자에 대한 고-친화도 결합에 적합한 결합 부위를 가지지 않는 단백질 계열의 구성원이 아닌 단백질을 지칭한다. 표적 단백질이 난공불락인지 여부를 결정하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 표적 단백질이 난공불락인지 여부는 구조-기반 알고리즘, 예컨대 용적, 표면적, 친유성 표면적, 깊이, 및/또는 소수성 비를 포함하는 단백질 상의 결합 포켓에 대해 계산된 파라미터에 기초한 약물성을 평가하는 프로그램 DOGSITESCORER® (Universitat Hamburg, 독일 함부르크 소재)에 의해 사용되는 것을 사용하여 결정될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0334] **도 1**은 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2-FK506 접합체의 SDS-PAGE 분석을 예시하는 이미지이다. 레인 1: $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트; 레인 2: $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2-FK506 반응 혼합물; 레인 3: $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2-FK506 반응 혼합물 + 100 mM DTT.

도 2는 $KRAS_{GTP/G12C}$ 라이트/SFAX9DS 접합체의 SDS-PAGE 분석을 예시하는 이미지이다.

도 3a 및 3b는 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2Holt/FKBP12 복합체 형성의 SEC 및 SDS-PAGE 분석을 예시하는 이미지이다. 도 3a) SEC 정제 프로파일. 대시기호로 된 청색선은 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2Holt/FKBP12 3원 복합체의 용출에 상응하는 피크를 나타낸다; 도 3b) SEC 용출 피크의 SDS-PAGE 분석. 대시기호로 된 청색선은 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2Holt/FKBP12 용출 피크에 대해 수집된 분획에 상응한다.

도 4는 SEC 프로파일을 예시하는 이미지이고, 용출 피크의 SDS-PAGE 분석은 $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트/SFAC4DS/$CypA_{C52S}$ 복합체의 형성을 확인한다.

도 5a 및 5b는 $PTP1B_{S187C}$ 라이트 및 FKBP12 단백질 및 $PTP1B_{S187C}$ 라이트/C3SLF/FKBP12 복합체가 없는 SEC 프로파일 및 SDS-PAGE 분석을 예시하는 이미지이다.

도 6은 SDS-PAGE에 의해 C3 및 C4SLF의 가교결합 효율을 예시하는 이미지이다.

도 7a 및 7b는 FKBP12-화합물 1-$KRAS_{GTP/S39C}$ 복합체의 결정 구조를 예시하는 이미지이다. 도 7a) FKBP12, $KRAS_{GTP/S39C}$ 및 리간드를 나타내는 리본 도식이다. 나타낸 3 σ에서의 Fo-Fc 전자 밀도는 확대도에서 리간드에 대해 나타나 있다. 도 7b) 적색으로 착색된 리간드 또는 파트너 단백질에 대한 4 Å 근접성 내의 원자를 갖는 복합체의 표면 도식이다.

도 8은 $CypA_{C52S}$-SFAC4DS-$KRAS_{GDP/S39C}$의 결정 구조를 예시하는 이미지이다.

도 9a 및 9b는 FKBP12-C3SLF-$PTP1B_{S187C}$ 의 결정 구조를 예시하는 이미지이다. 도 9a는 결정이 비대칭 단위로의 FKBP12-C3SLF-$PTP1B_{S187C}$ 의 2개의 복합체 분자를 함유하는 것을 예시한다. 도 9b는 $PTP1B_{S187C}$의 매립된 표면적은 427 $Å^2$이고, C3SLF의 매립된 표면적은 615 $Å^2$인 것을 예시한다.

도 10은 $MCL1_{S245C}$/C3SLF/FKBP52의 결정 구조를 예시하는 이미지이다.

도 11은 CYPA-W21487- $KRAS_{G12C-GTP}$ 3원 복합체의 W21487 의존적 복합체 형성의 결합 곡선을 예시하는

이미지이다.

도 12는 CYPA-W21487- $KRAS_{G12C-GTP}$ 3원 복합체의 W21487 의존적 복합체 형성 의 결합 곡선을 예시하는 이미지이다.

도 13은 CEP250에 대한 FKBP12-화합물 1 및 FKBP12-화합물 2 2원 복합체의 결합을 위해 ITC 측정을 예시하는 이미지이다.

도 14는 $CEP250_{11.4}$ 및 CEP25029.2에 대한 FKBP12/화합물 1의 결합을 위한 SPR 센서그램 을 예시하는 이미지이다.

도 15는 $KRASG_{12C-GTP}$에 대한 CYPA/ 화합물 3의 결합을 위한 센소그램 및 정상 상태 핏팅 곡선을 예시하는 이미지이다.

도 16은 CypA: C3DS: KRAS 복합체 형성에 대한 형광 분극화 곡선을 예시하는 이미지이다.

도 17a-17c는 $KRAS_{G12C-GTP}$ 의 2D 1H-15N TROSY-HSQC 스펙트럼(도 17a), 화학양론적 양의 CYPA의 첨가 (도 17b), 및 KRAS 및 CYPA 단독 (도 17c)을 예시하는 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0335] 소분자는 표적과의 그것의 상호작용이 접착력에 의해 유도되기 때문에 그것의 표적화 능력이 제한되고, 접착력의 강도는 거의 접촉 표면적에 비례한다. 그것의 작은 크기로 인하여, 소분자가 충분한 분자간 접촉 표면적을 증가시켜 표적 단백질과 효과적으로 상호작용하는 유일한 방식은 문자 그대로 이 단백질에 의해 탐식되는 것이다. 사실상, 실험 및 전산 데이터 둘 모두의 대부분은 그것의 표면 상의 소수성 "포켓"을 갖는 단백질만이 소분자를 결합할 수 있다는 관점을 지지한다. 이 경우에, 결합은 탐식에 의해 가능하다.

[0336] 자연은 소분자가 소수성 포켓 이외의 부위에서 표적 단백질과 상호작용할 수 있는 전략을 진화시켰다. 이러한 전략은 자연 발생 면역억제성 약물 사이클로스포린 A, 라파마이신, 및 FK506에 의해 예시된다. 이러한 약물의 생물학적 활성은 작은 프리젠팅 단백질을 갖는 소분자의 고-친화도 복합체의 형성과 관련된다. 소분자 및 프리젠팅 단백질의 복합체 표면은 표적과 결합한다. 따라서, 예를 들어, 사이클로스포린 A와 사이클로필린 A 사이에 형성된 2원 복합체는 고친화도 및 특이성으로 칼시뉴린을 표적화하지만, 사이클로스포린 또는 사이클로필린 단독은 측정가능한 친화도로 칼시뉴린을 결합하지 못한다.

[0337] 다수의 중요한 치료 표적은 다른 단백질과의 복합체화에 의해 그것의 기능을 발휘한다. 다수의 이러한 시스템에서의 단백질/단백질 상호작용 표면은 극성 잔기의 넓은 고리에 의해 둘러싸인 소수성 부위 사슬의 내부 코어를 함유한다. 소수성 잔기가 에너지적으로 바람직한 접촉의 거의 모두에 기여하고, 이에 따라 이러한 클러스터는 단백질-단백질 상호작용에서의 참여에 대한 "핫스팟"으로서 표시되었다. 중요하게는, 작은 프리젠팅 단백질과의 자연 발생 소분자의 상술한 복합체에서, 소분자는 핫스팟에 유사한 소수성 기능의 클러스터를 제공하고, 단백질은 대부분 극성 잔기의 고리를 제공한다. 환언하면, 표면 구조를 모사한 프리젠팅 단백질된 소분자 시스템은 천연 단백질/단백질 상호작용 시스템에서 널리 이용되었다.

[0338] 자연은 진화론적 다양성을 통한 -제시된 소분자--이동가능한 핫스팟의 표적 특이성을 재프로그래밍하는 능력을 실증하였다. 최상의 특성화된 예에서, FK506 결합 단백질 (FKBP)과 FK506 사이에 형성된 복합체는 칼시뉴린을 표적화한다. 그러나, FKBP는 또한 관련된 분자 라파마이신을 갖는 복합체를 형성할 수 있고, 이 복합체는 완전히 상이한 표적, TorC1과 상호작용한다. 현재까지, 이들이 이전에 난공불락로 고려되는 다른 표적 단백질과 상호작용하고 조절할 수 있도록 프리젠터 단백질/리간드 계면의 결합 및 조절 능력을 재프로그래밍하도록 개발된 방법론은 없다.

[0339] 또한, 일부 약물 후보는 의도된 표적과 마찬가지로 의도되지 않은 단백질 모두의 활성을 조절하기 때문에 실패된 것이라는 것은 잘 확립되어 있다. 상기 문제는 특히 표적 단백질의 약물 결합 부위는 비-표적 단백질에서의 결합 부위에 유사한 경우에 어렵게 된다. 이의 ATP 결합 포켓이 비-표적 인슐린 수용체 (IR)의 결합 포켓에 대해 구조적으로 유사한 인슐린 유사 성장 인자 수용체 (IGF-1R)는 하나의 이러한 예이다. IGF-1R을 표적화하도록 설계된 소분자 개발 후보는 또한 인슐린 수용체를 조절하는 허용가능하지 않은 부작용을 가진다. 그러나, 구조 비유사성은 ATP 결합 포켓을 둘러싸는 영역에서의 이러한 2개의 단백질들 사이에서 존재한다. 이러한 정보에도 불구하고, 현재까지 이러한 차이를 이용하고, IR에 대해 IGF-1R에 대해 특이적인 약물을 개발하는 방법이 존재

하지 않는다.

[0340] 본 개시내용은 단백질-단백질 계면 예컨대 프리젠터 단백질 (예를 들어, FKBP 계열의 구성원, 사이클로필린 계열, 또는 PIN1의 구성원)과 표적 단백질의 계면을 분석하기 위해 유용한 방법 및 시약을 제공한다. 일부 구현예에서, 표적 및/또는 프리젠터 단백질은 세포내 단백질이다. 일부 구현예에서, 표적 및/또는 프리젠터 단백질은 포유동물 단백질이다. 일부 구현예에서, 이들 방법 및 시약은 프리젠터 단백질 및 소분자와 함께 복합체를 형성함으로써 억제 또는 활성화가 가능한 표적 단백질을 확인하기 위해 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 이들 방법 및 시약은 프리젠터 단백질 및 표적 단백질과 함께 복합체를 형성함으로써 표적 단백질을 억제하거나 또는 활성화할 수 있는 화합물을 확인하기 위해 유용할 수 있다.

[0341] **화합물 및 접합체**

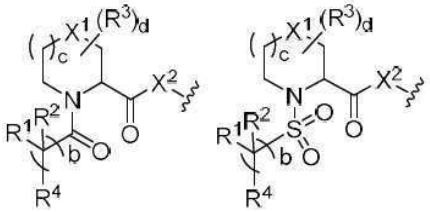
[0342] 본 개시내용은 단백질 결합 모이어티 (예를 들어, 프리젠터 단백질 결합 모이어티 또는 표적 단백질 결합 모이어티) 및 가교결합기를 포함하는 화합물을 제공한다. 본 발명은 또한 단백질에 접합된 단백질 결합 모이어티, 예를 들어, 표적 단백질에 적합된 프리젠터 단백질 결합 모이어티 또는 프리젠터 단백질에 접합된 표적 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체를 특징으로 한다.

[0343] 본 발명은 또한 하기 화학식 VII의 화합물을 특징으로 한다:

A-L-B

[0344] 화학식 VII

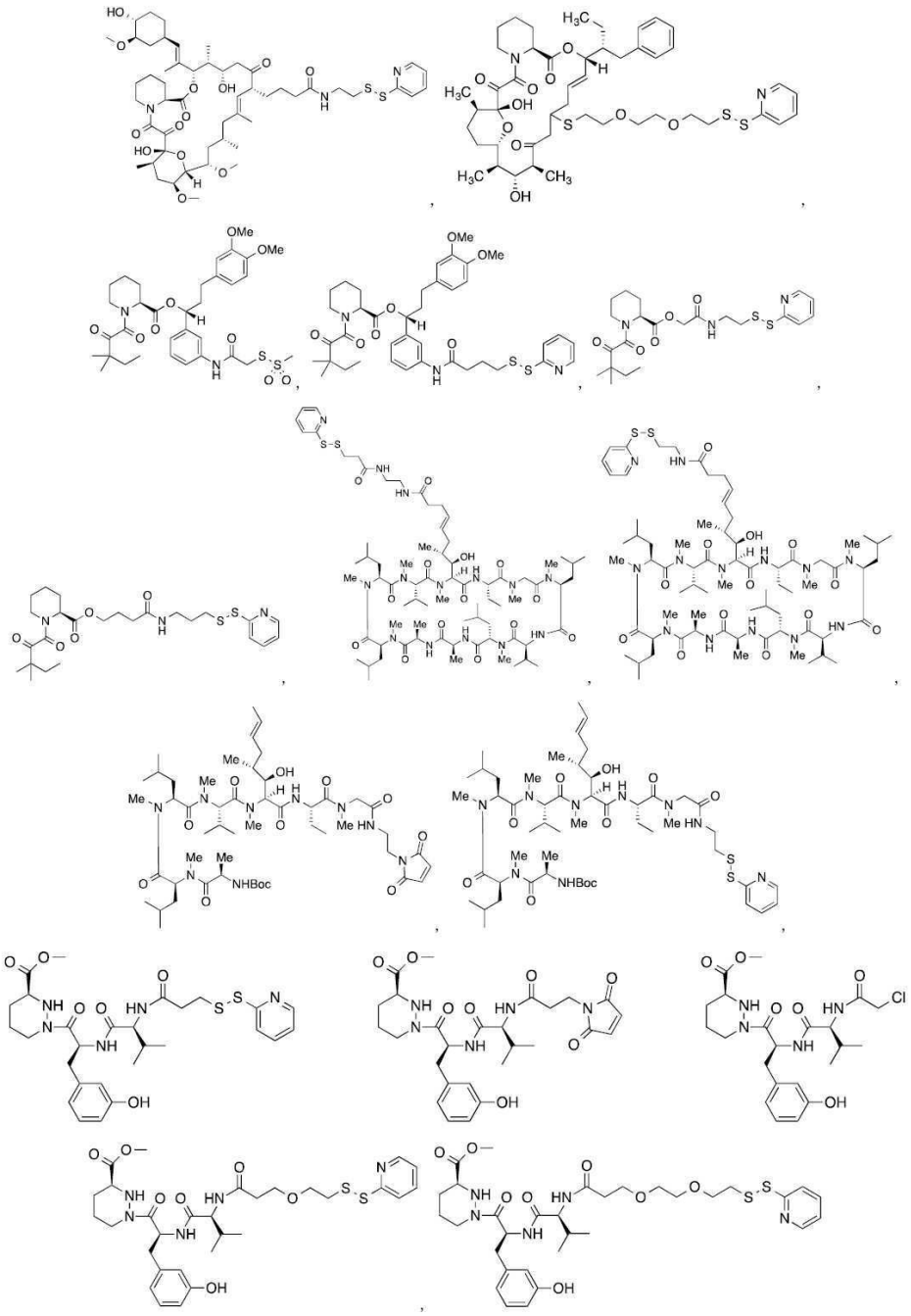
[0345] 여기서 A는 하기 화학식 VIII의 구조를 포함한다:



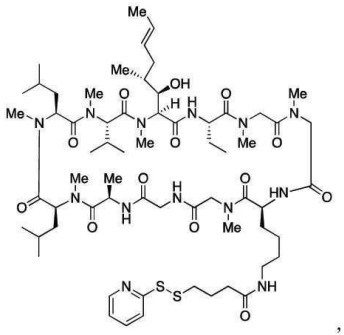
화학식 VIIIa 화학식 VIIIb

[0346]

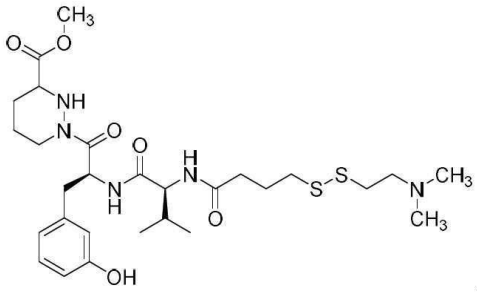
[0347] 일부 구현예에서, 발명의 화합물은 하기와 같다:



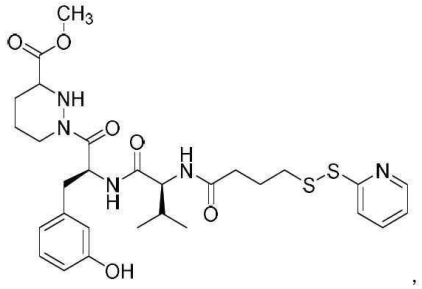
[0348]



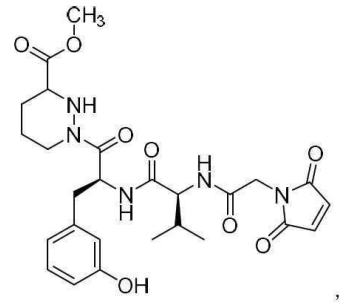
,



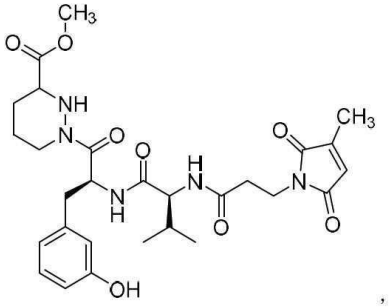
,



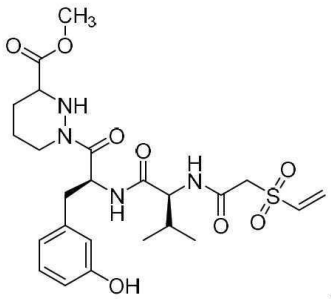
,



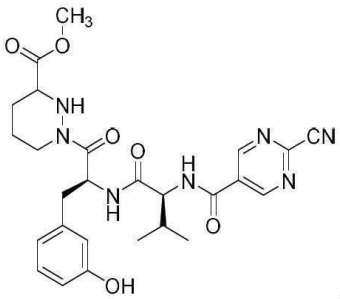
,



,



, 또는



.

[0349]

[0350] *가교결합기*

[0351] 일부 구현예에서, 발명의 화합물은 가교결합기를 포함한다. 가교결합기는 단백질 또는 다른 분자 상의 특이적 작용기 (예를 들어, 일차 아민, 설프하이드릴)에 대해 화학적으로 부착될 수 있는 반응성 작용기를 포함하는 기를 지칭한다. 가교결합기의 예는 설프하이드릴-반응 가교결합기 (예를 들어, 말레이미드, 할로아세틸, 피리딜이황화물, 티오설포네이트, 또는 비닐설폰을 포함하는 기), 아민-반응 가교결합기 (예를 들어, 에스테르 예컨대 NHS 에스테르, 이미도에스테르, 및 펜타플루오로페닐 에스테르, 또는 하이드록시메틸포스핀을 포함하는 기), 카복실-반응 가교결합기 (예를 들어, 일차 또는 이차 아민, 알코올, 또는 티올을 포함하는 기), 카보닐-반응 가교결합기 (예를 들어, 하이드라자이드 또는 알콕시아민을 포함하는 기), 및 트리아졸-형성 가교결합기 (예를 들어, 아자이드 또는 알킨을 포함하는 기)를 포함한다.

[0352] 예시적인 가교결합기는 2'-피리딜이황화물, 4'-피리딜이황화물 아이오도아세틸, 말레이미드, 티오에스테르, 알킬이황화물, 알킬아민 이황화물, 니트로벤조산 이황화물, 무수물, NHS 에스테르, 알데하이드, 염화알킬, 알킨, 마이클 수용체기 (예를 들어, α,β-비치환된 케톤 또는 설폰), 에폭사이드, 헤테로아릴 니트릴, 및 아자이드를 포함한다.

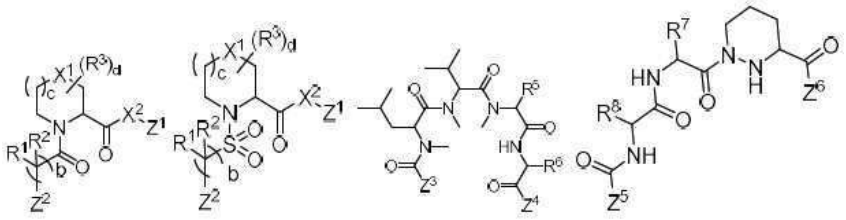
[0353] *프리젠터 단백질 결합 모이어티*

[0354] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물은 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 원자 (예를 들어, 5 내지 20 원자, 5 내지 10 원자, 10 내지 20개의 원자)의 기를 포함하고, 제공된 화합물이 예를 들어, 10 μM 미만 (예를 들어 5 μM 미만, 1 μM 미만, 500 nM 미만, 200 nM 미만, 100 nM 미만, 75 nM 미만, 50 nM 미만, 25 nM 미만, 10 nM 미만)의 K_D를 갖는 프리젠터 단백질에 특이적으로 결합하거나 또는 예를 들어, 1 μM 미만 (예를 들어 0.5 μM 미만, 0.1 μM 미만, 0.05 μM 미만, 0.01 μM 미만)의 IC_{50}를 갖는 프리젠터 단백질의 펩티딜-프롤릴 이소머라제 활성을 억제하도록 프리젠터 단백질에 결합하는데 참여하는 이에 부착되는 임의의 모이어티(예를 들어, 20개의 원자를 갖는 원자들, 15개의 원자를 갖는 원자들, 10개의 원자를 갖는 원자들, 5개의 원자를 갖는 원자들)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 프리젠터 단백질과 상호작용하는 제공된 화합물에 전체 원자를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티의 하나 이상의 원자는 프리젠터 단백질과 상호작용하지 않는다.

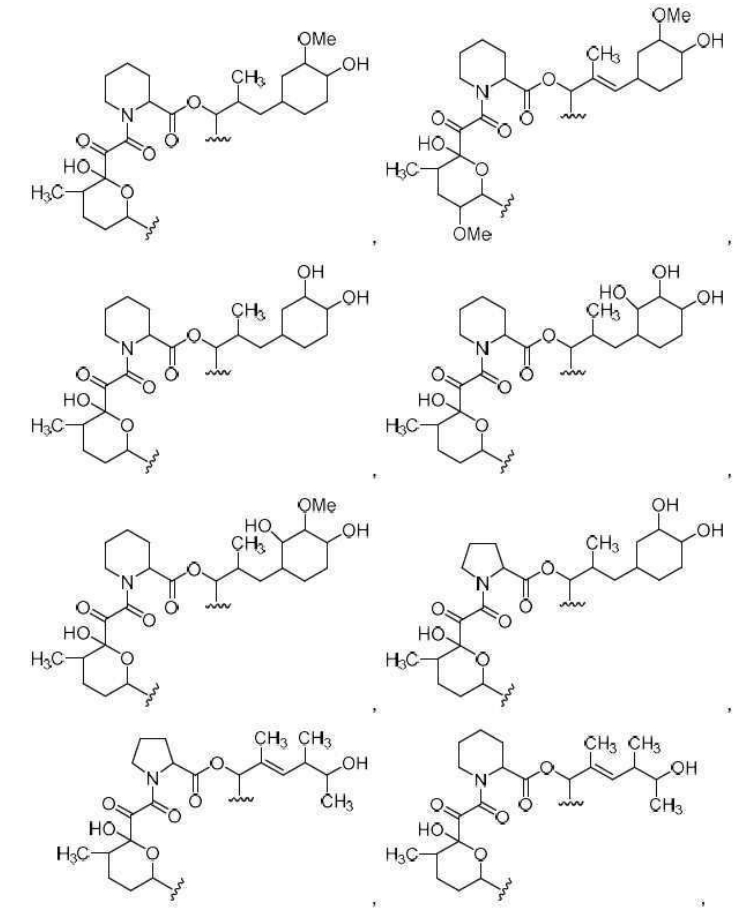
[0355] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 N-아실 프롤린 모이어티, N-아실-피페콜산 모이어티, N-아실 3-모폴리노-카복실산 모이어티, 및/또는 N-아실 피페르직산 모이어티 (예를 들어, 질소 원자에 대한 아실화가 이루어짐)을 포함한다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 N-아실-피페콜산 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 N-아실 프롤린 모이어티를 포함한다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 N-아실 3-모폴리노-카복실산 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 N-아실 피페르직산 모이어티(piperzic acid moiety)를 포함한다.

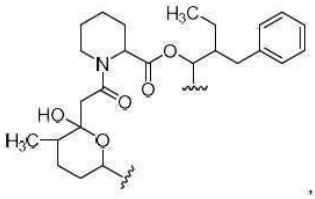
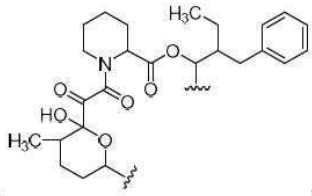
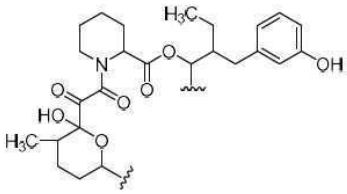
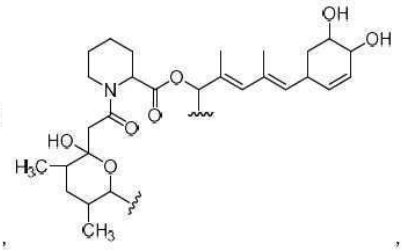
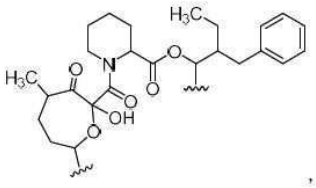
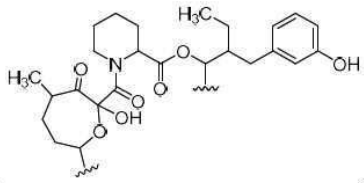
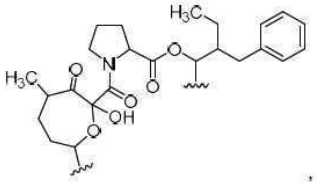
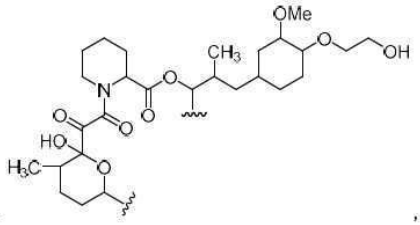
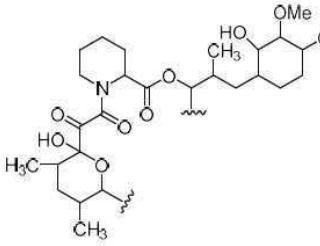
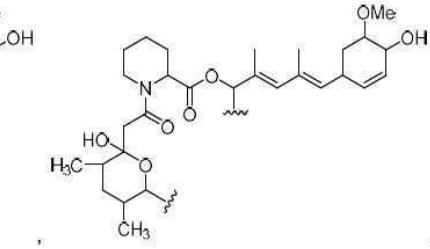
[0356] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티의 하나 이상의 원자는 Tyr 27, Phe 37, Asp 38, Arg 41, Phe 47, Gln 54, Glu 55, Val 56, Ile 57, Trp 60, Ala 82, Try 83, His 88, Ile 92, 및/또는 FKBP12의 Phe 100 중 하나 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15)과 결합하는데 참여한다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티 중 하나 이상은 Arg 41, Gln 54, Glu 55, 및/또는 FKBP12의 Ala 82 중 하나 이상과 결합하는데 참여한다.

[0357] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 하기 화학식 II-IV에 따른 구조를 가진다:

[0358] 
화학식 IIa 화학식 IIb 화학식 III 화학식 IV

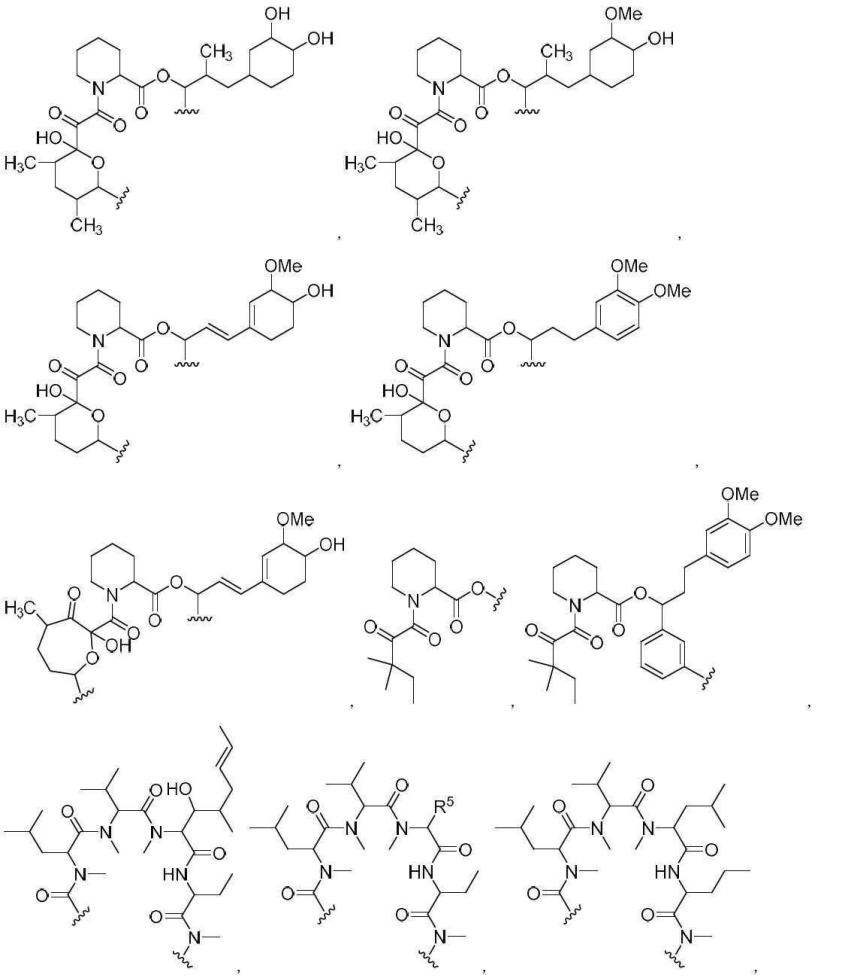
[0359] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 하기 구조를 포함하거나 또는 이로 이루어진다:

[0360] 


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

[0361] 

[0362] 또는 이의 입체이성질체.

[0363] 프리젠터 단백질은 프리젠터 단백질 결합 모이어티에서의 원자에 결합될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 프리젠터 단백질은 프리젠터 단백질 결합 모이어티에서의 2개 이상의 원자에 결합될 수 있다. 다른 대안예에서, 프리젠터 단백질은 프리젠터 단백질 결합 모이어티에서의 하나 이상의 원자에 부착된 치환기에 결합될 수 있다. 게다가, 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 프리젠터 단백질 결합 모이어티에서의 원자 및 프리젠터 단백질 결합 모이어티에서의 하나 이상의 원자에 대해 부착된 치환기에 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 프리젠터 단백질의 천연 리간드를 모사하는 기에 결합되고, 여기서 프리젠터 단백질의 천연 리간드를 모사하는 기는 프리젠터 단백질 결합 모이어티에 대해 부착된다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 프리젠터 단백질에 결합되고, 2원 복합체에서의 프리젠터 단백질에 대한 프리젠터 단백질의 친화도는 복합체의 부재 하에 프리젠터 단백질에 대한 프리젠터 단백질의 친화도와 관련하여 증가된다. 이러한 예에서의 결합은 전형적으로

비제한적으로 프리젠터 단백질 결합 모이어티에 대한 프리젠터 단백질의 비-공유 상호작용을 통한 것이다.

[0364] *표적 단백질 결합 모이어티*

[0365] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물은 표적 단백질 결합 모이어티 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 결합 모이어티 예컨대 포유동물 표적 단백질 결합 모이어티 또는 진균 표적 단백질 결합 모이어티 또는 원핵 표적 단백질 결합 모이어티 예컨대 박테리아 표적 단백질 결합 모이어티)를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질 결합 모이어티는 원자 (예를 들어, 5 내지 20 원자, 5 내지 10 원자, 10 내지 20개의 원자)의 그룹을 포함하고, 표적 단백질에 특이적으로 결합되는 이에 부착된 임의의 모이어티(예를 들어, 20개의 원자 내의 원자, 15개의 원자 내의 원자, 10개의 원자 내의 원자, 5개의 원자 내의 원자)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 단백질 결합 모이어티는 표적 단백질과 상호작용하는 화합물에서의 복수개의 원자를 포함한다. 특정 구현예에서, 표적 단백질 결합 모이어티의 하나 이상의 원자는 표적 단백질과 상호작용한다.

[0366] 표적 단백질은 표적 단백질 결합 모이어티에서의 원자에 결합될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 표적 단백질은 표적 단백질 결합 모이어티에서의 2개 이상의 원자에 결합될 수 있다. 다른 대안예에서, 표적 단백질은 표적 단백질 결합 모이어티에서의 하나 이상의 원자에 부착된 치환기에 부착될 수 있다. 다른 대안예에서, 표적 단백질은 표적 단백질 결합 모이어티에서의 원자 및 표적 단백질 결합 모이어티에서의 하나 이상의 원자에 부착된 치환기에 결합될 수 있다. 다른 대안예에서, 표적 단백질은 표적 단백질의 천연 리간드를 모사하한 기에 결합되고, 여기서 표적 단백질의 천연 리간드를 모사하는 기는 표적 단백질 결합 모이어티에 부착된다. 또 다른 대안예에서, 표적 단백질은 프리젠터 단백질에 결합되고, 2원 복합체에서의 프리젠터 단백질에 대한 프리젠터 단백질의 친화도는 복합체의 분재 하의 프리젠터 단백질에 대한 표적 단백질의 친화도에 대해 증가된다. 이들 예에서의 결합은 전형적으로, 비제한적으로 표적 단백질 결합 모이어티에 대한 표적 단백질의 비-공유 상호작용을 통한 것이다.

[0367] 일부 구현예에서, 표적 단백질 결합 모이어티는 가교결합기 (예를 들어, 내부 가교결합기)를 포함한다.

[0368] *링커*

[0369] 본 발명의 화합물은 링커 (예를 들어, 가교결합기에 단백질 결합 모이어티 (예를 들어, 프리젠터 단백질 결합 모이어티 또는 표적 단백질 결합 모이어티))를 연결하는 모이어티 링커 또는 단백질 (예를 들어, 프리젠터 단백질 또는 표적 단백질)에 단백질 결합 모이어티에 연결하는 링커를 포함한다. 본 발명의 링커 성분은 그것의 가장 간단한 결합이지만, 또한 2개의 모이어티를 공유적으로 연결하는 펜던트기를 갖는 선형, 환형, 또는 분지형 분자 골격을 제공할 수 있다.

[0370] 일부 구현예에서, 링커의 하나 이상의 원자는 프리젠터 단백질 및/또는 표적 단백질에 결합하는데 참여한다. 특정 구현예에서, 링커의 하나 이상의 원자는 프리젠터 단백질 및/또는 표적 단백질에 결합하는데 참여하지 않는다.

[0371] 따라서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 화합물 및/또는 접합체에 포함되는 경우에, 링커는 모이어티 상에 위치한 하나 이상의 작용기와의 결합 형성을 수반하는 공유 수단에 의해 2개 (이상)의 모이어티의 연결을 달성한다. 이러한 목적을 위해 이용될 수 있는 화학적으로 반응성 작용기의 예는 비제한적으로, 아미노, 하이드록실, 설프하이드릴, 카복실, 카보닐, 카보하이드레이트기, 비시날 디올, 티오에테르, 2-아미노알코올, 2-아미노티올, 구아니디닐, 이미다졸릴, 및 페놀계기를 포함한다.

[0372] 일부 구현예에서, 2개 (이상)의 모이어티의 이러한 공유 연결은 모이어티에 존재하는 이러한 작용기와 반응할 수 있는 반응성 모이어티를 함유하는 링커를 사용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 모이어티의 아민기는 링커의 카복실기, 또는 이의 활성화된 유도체와 반응할 수 있고, 이는 2개를 연결하는 아미드의 형성을 야기한다.

[0373] 설프하이드릴기와 반응할 수 있는 모이어티의 예는 유형 XCH_2CO- (여기서 X=Br, Cl, 또는 I)의 α-할로아세틸 화합물을 포함하고, 이는 설프하이드릴기에 대한 특정 반응성을 나타내며, 그러나 이는 또한 문헌[Gurd, Methods Enzymol]에 기재된 바와 같이 이미다졸릴, 티오에테르, 페놀, 및 아미노기를 개질하기 위해 사용될 수 있다. 11: 532 (1967). N-말레이미드 유도체는 설프하이드릴기를 선택적으로 향하는 것으로 고려되며, 그러나 추가로 특정 조건 하에서 아미노기에 대한 커플링에서 추가로 유용할 수 있다. 아미노기의 전환을 통해 티올기를 주입하는 시약 예컨대 2-이미노티올란 (Traut et al. , Biochemistry 12: 3266 (1973))은 이황화 가교의 형성을 통해 연결이 일어나는 경우에 설프하이드릴 시약으로서 고려될 수 있다.

[0374] 아미노기와 반응할 수 있는 반응성 모이어티의 예는 예를 들어, 알킬화 및 아실화제를 포함한다. 대표적인 알킬

화제는 하기를 포함한다:

[0375] (i) α-할로아세틸 화합물로서, 이는 반응성 티올기의 부재 하에 아미노기를 향한 특이성을 나타내고, 예를 들어, 문헌[Wong Biochemistry 24: 5337 (1979)]에 의해 기재된 바와 같이 유형 XCH_2CO-의 것(여기서 X=Br, Cl, 또는 I)인 α-할로아세틸 화합물,

[0376] (ii) N-말레이미드 유도체로서, 이는 하기 문헌에 기재된 마이클 유형 반응을 통해 또는 예를 들어, 고리 카보닐기에 대한 첨가에 의한 아실화를 통해 아미노기와 반응할 수 있는 N-말레이미드 유도체: 문헌[Smyth et al. , J. Am. Chem. Soc. 82: 4600 (1960) 및 Biochem]. J. 91: 589 (1964);

[0377] (iii) 아릴 할라이드 예컨대 반응성 니트로 할로방향족 화합물;

[0378] (iv) 하기 문헌에 기재된 바와 같은 알킬 할라이드: 문헌 McKenzie et al. , J. Protein Chem. 7: 581 (1988)];

[0379] (v) 아미노기와 함께 쉬프 염기 형성을 가능하게 하는 알데하이드 및 케톤으로서, 형성된 부가물은 일반적으로 안정한 아민을 생성하기 위한 환원을 통해 안정화되는 알데하이드 및 케톤;

[0380] (vi) 에폭사이드 유도체 예컨대 에피클로로히드린 및 비스옥시란으로서, 이는 아미노, 설프하이드릴, 또는 페놀계 하이드록실기와 같은 친핵체를 향해 매우 반응성인 에폭사이드 유도체;

[0381] (vii) s-트리아진의 염소-함유 유도체로서, 이는 예컨대 아미노, 설피드릴, 및 하이드록실기와 같은 향해 매우 반응성인 s-트리아진의 염소-함유 유도체;

[0382] (viii) 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 바와 같이 상술한 s-트리아진 화합물에 기초한 아지리딘, 문헌[Ross, J. Adv. Cancer Res]. 2: 1 (1954)], 이는 개환에 친핵체들 예컨대 아미노기와 반응하는 친핵체들 예컨대 아미노기;

[0383] (ix) 하기 문헌에 기재된 스쿠아릭 산 디에틸 에스테르: 문헌[Tietze, Chem. Ber. 124: 1215 (1991)]; 및

[0384] (x) α-할로알킬 에테르로서, 이는 하기 문헌에 기재된 에테르 산소 원자에 의해 야기된 활성화로 인하여 일반 알킬 할라이드보다 더 반응성인 알킬화제인 α-할로알킬 에테르: 문헌[Benneche et al. , Eur. J. Med. Chem. 28: 463 (1993)].

[0385] 대표적인 아미노-반응 아실화제는 하기를 포함한다:

[0386] (i) 이소시아네이트 및 이소티오시아네이트, 특히 각각 안정한 우레아 및 티오우레아 유도체를 형성하는 방향족 유도체;

[0387] (ii) 하기 문헌[Herzig et al. , Biopolymers 2: 349 (1964)]에 기재된 설포닐 클로라이드;

[0388] (iii) 산 할라이드;

[0389] (iv) 활성 에스테르 예컨대 니트로페닐에스테르 또는 N-하이드록시석신이미딜 에스테르;

[0390] (v) 산 무수물 예컨대 혼합된, 대칭, 또는 N-카복시무수물;

[0391] (vi) 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 아미드 결합 형성을 위한 다른 유용한 시약: 문헌[M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1984];

[0392] (vii) 아실아자이드, 예를 들어, 여기서 아자이드기가 하기 문헌에 기재된 바와 같이 아질산나트륨을 사용하여 사전형성된 하이드라자이드 유도로부터 생성된 아실아자이드: 문헌[Wetz et al. , Anal. Biochem. 58: 347 (1974)];

[0393] (viii) 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 바와 같이 아미노기와의 반응시 안정한 아미딘을 형성하는 이미도에스테르: 문헌[Hunter and Ludwig, J. Am. Chem. Soc. 84: 3491 (1962)]; 및

[0394] (ix) 할로헤테로아릴기 예컨대 할로피리딘 또는 할로피리미딘.

[0395] 알데하이드 및 케톤은 아민과 반응하여 쉬프 염기를 형성할 수 있고, 이는 유리하게는 환원성 아미노화를 통해 안정화될 수 있다. 알콕실아미노 모이어티는 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 바와 같이 케톤 및 알데하이드와 용이하게 반응하여 안정한 알크옥사민을 생성한다: 문헌[Webb et al. , in Bioconjugate Chem. 1: 96 (1990)].

[0396] 카복실기와 반응할 수 있는 반응성 모이어티의 예는 디아조 화합물 예컨대 디아조아세테이트 에스테르 및 디아조아세트아미드를 포함하고, 이는 예를 들어, 하기 문헌에 기재된 바와 같이 높은 특이성으로 반응하여 에스테르기를 생성한다: 문헌[Herriot, Adv. Protein Chem. 3: 169 (1947)]. O-아실우레아 형성 이어서 아미드 결합 형성을 통해 카복실 개질 시약 예컨대 카보디이미드는 또한 이용될 수 있다.

[0397] 모이어티에서의 작용기가 필요한 경우 반응 전에 다른 작용기로 전환되어, 예를 들어 추가의 반응성 또는 선택성을 제공할 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 목적을 위해 유용한 방법의 예는 시약 예컨대 디카복실산 무수물을 사용한 카복실로의 아민의 전환; 시약 예컨대 N-아세틸호모시스테인 티오락톤, S-아세틸머캅토석신산 무수물, 2-이미노티올란, 또는 티올-함유 석신이미딜 유도체를 사용한 티올로의 아민의 전환; 시약 예컨대 α-할로아세테이트를 사용한 카복실로의 티올의 전환; 시약 예컨대 에틸렌이민 또는 2-브로모에틸아민을 사용한 아민으로의 티올의 전환; 시약 예컨대 카보디이미드 이어서 디아민을 사용한 아민으로의 카복실의 전환; 및 시약 예컨대 토실 클로라이드을 사용한 티올로의 알코올의 전환 이후 티오아세테이트로의 에스테르교환 그리고 아세트산나트륨으로의 티올로의 가수분해를 포함한다.

[0398] 추가의 연결 물질을 주입하지 않고 하나의 모이어티의 반응성 화학기를 다른 반응성 화학기를 직접 공유 결합하는 것과 관련된 소위 제로-길이 링커 (zero-length linker)는 필요한 경우에 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0399] 보다 일반적으로, 그러나, 링커는 스페이서 성분에 의해 연결되는 상기에 기재된 바와 같은 2개 이상의 반응성 모이어티를 포함한다. 이러한 스페이서의 존재는 이중작용성 링커가 모이어티 내의 특이적 작용기와 반응할 수 있게 하며, 이는 둘 사이에서 공유결합을 생성한다. 링커에서의 반응성 모이어티는 동일한 (동종이중작용성 링커) 또는 상이할 수 있고 (이종이중작용성 링커, 또는 몇몇 비유사 반응성 모이어티가 존재하는 경우, 이종다작용성 링커), 이는 2개의 모이어티 사이의 공유결합을 생성할 수 있는 잠재적 시약의 다양성을 제공한다.

[0400] 링커에서의 스페이서 성분은 직쇄 또는 분지쇄로 이루어지고, C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐, C_{2-10} 알키닐, C_{2-6} 헤테로사이클릴, C_{6-12} 아릴, C_{7-14} 알크아릴, C_{3-10} 알크헤테로사이클릴, C_2-C_{100} 폴리에틸렌 글리콜, 또는 C_{1-10} 헤테로알킬을 포함할 수 있다.

[0401] 일부 경우에서, 링커는 화학식 V로 기재되어 있다.

[0402] 본 발명의 접합체의 제조하는데 유용한 동종이중작용성 링커의 예는 비제한적으로, 에틸렌디아민, 프로필렌디아민 및 헥사메틸렌디아민으로부터 선택된 디아민 및 디올, 에틸렌 글리콜, 디에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 1,4-부탄디올, 1,6-헥산디올, 사이클로헥산디올, 및 폴리카프로락톤 디올을 포함한다.

[0403] 일부 구현예에서, 링커는 독립적으로 탄소, 질소, 산소, 황 또는 인 원자로부터 선택된 최대 10개의 원자의 선형 사슬 또는 결합이고, 여기서 사슬에서의 각각의 원자는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 클로로, 아이오도, 브로모, 플루오로, 하이드록실, 알콕시, 아릴옥시, 카복시, 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 아실아미노, 카복사미도, 시아노, 옥소, 티오, 알킬티오, 아릴티오, 아실티오, 알킬설포네이트, 아릴 설포네이트, 포스포릴, 및 설포닐로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환되고, 사슬에서의 임의의 2개의 원자는 이에 결합되는 치환기와 함께 취해져 고리를 형성하고, 여기서 고리는 하나 이상의 선택적으로 치환된 탄소환, 복소환, 아릴, 또는 헤테로아릴 고리로 추가로 치환되거나 및/또는 융합될 수 있다.

[0404] 일부 구현예에서, 링커는 하기 화학식 XIX의 구조를 가진다:

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

[0405] 화학식 XIX

[0406] 식 중, A^1은 링커와 프리젠터 단백질 결합 모이어티 사이의 결합이고; A^2는 포유동물 표적 상호작용 모이어티와 링커 사이의 결합이고; B^1, B^2, B^3, 및 B^4 각각은 독립적으로 선택적으로 치환된 C_1-C_2 알킬, 선택적으로 치환된 C_1-C_3 헤테로알킬, O, S, 및 NR^N으로부터 선택되고; R^N은 수소, 선택적으로 치환된 C_{1-4} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-4} 알키닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-7} 헤테로알킬이고; C^1 및 C^2는 각각, 독립적으로, 카보닐, 티오카보닐, 설포닐, 또는 포스포릴로부터 선택되고; a, b, c, d, e, 및 f는 각각, 독립적으로, 0 또는 1이고; D는 선택적으로 치환

된 C_{1-10} 알킬, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알케닐, 선택적으로 치환된 C_{2-10} 알키닐, 선택적으로 치환된 C_{2-6} 헤테로사이클릴, 선택적으로 치환된 C_{6-12} 아릴, 선택적으로 치환된 C_2-C_{10} 폴리에틸렌 글리콜, 또는 선택적으로 치환된 C_{1-10} 헤테로알킬, 또는 $-(B^3)_d-(C^2)_e-(B^4)_f-A^2$에 $A^1-(B^1)_a-(C^1)_b-(B^2)_c-$를 연결하는 화학 결합이다.

[0407] **단백질**

[0408] *프리젠터 단백질*

[0409] 프리젠터 단백질은 소분자에 결합하여 복합체를 형성할 수 있고, 이는 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)을 결합하고, 이의 활성을 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 포유동물 프리젠터 단백질 (예를 들어, 인간 프리젠터 단백질)이다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 진균 프리젠터 단백질이다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질은 박테리아 프리젠터 단백질이다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 식물 프리젠터 단백질이다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 상대적으로 풍부한 단백질이다 (예를 들어, 프리젠터 단백질은 충분히 풍부하여 3분체 복합체에서의 참여가 세포에서의 프리젠터 단백질의 생물학적 역할 및/또는 세포의 생존력 또는 다른 속성에 실질적인 부정적인 영향을 미치지 않는다). 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 표적 단백질보다 더 풍부하다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질은 세포 내에서의 차페론 활성을 갖는 단백질이다. 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 세포 내의 다중 천연 상호작용 파트너를 가진다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질은 표적 단백질에 결합하고 이의 생물학적 활성을 조절하는 것으로 알려진 또는 이러한 것으로 예상되는 2원 복합체를 형성하는 것이다. 이뮤노필린은 이러한 기능을 갖는 것으로 알려져 있고, FKBP 및 사이클로필린을 포함하는 프리젠터 단백질의 부류이다. 일부 구현예에서, 참조 프리젠터 단백질은 펩티딜 프롤릴 이소머라제 활성을 나타내고; 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 참조 프리젠터 단백질과 비슷한 활성을 나타낸다. 특정 구현예에서, 프리젠터 단백질은 FKBP 계열의 구성원 (예를 들어, FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP19, FKBP22, FKBP23, FKBP25, FKBP36, FKBP38, FKBP51, FKBP52, FKBP60, FKBP65, 및 FKBP133), 사이클로필린 계열의 구성원 (예를 들어, PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, PPWD1, PPIAL4A, PPIAL4B, PPIAL4C, PPIAL4D, 또는 PPIAL4G), 또는 PIN1이다. "FKBP 계열"은 프롤릴 이소머라제 활성 및 프롤린 잔기를 함유하는 단백질에 대해 단백질 폴딩 차페론으로서 역할을 하는 단백질의 계열이다. 이러한 계열에서 단백질을 인코딩하는 유전자는 AIP, AIPL1, FKBP1A, FKBP1B, FKBP2, FKBP3, FKBP4, FKBP5, FKBP6, FKBP7, FKBP8, FKBP9, FKBP9L, FKBP10, FKBP11, FKBP14, FKBP15, 및 LOC541473을 포함한다.

[0410] "사이클로필린 계열"은 사이클로스포린에 결합하는 단백질의 계열이다. 이러한 계열에서 단백질을 인코딩하는 유전자는 PPIA, PPIB, PPIC, PPID, PPIE, PPIF, PPIG, PPIH, SDCCAG-10, PPIL1, PPIL2, PPIL3, PPIL4, P270, PPWD1, 및 COAS-2를 포함한다. 예시적인 사이클로필린은 PP1A, CYPB, CYPC, CYP40, CYPE, CYPD, NKTR, SRCyp, CYPH, CWC27, CYPL1, CYP60, CYPJ, PPIL4, PPIL6, RANBP2, PPWD1, PPIAL4A, PPIAL4B, PPIAL4C, PPIAL4D, 및 PPIAL4G를 포함한다.

[0411] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 차페론 단백질 예컨대 GRP78/BiP, GRP94, GRP170, 칼넥신, 칼레티큘린, HSP47, ERp29, 단백질 이황화물 이소머라제 (PDI), 및 ERp57이다.

[0412] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 본원에 개시된 FKBP 또는 사이클로필린의 대립유전자 변이체 또는 스플라이스 변이체이다.

[0413] 일부 구현예에서, 프리젠터 단백질은 이의 아미노산 서열이 i) 참조 프리젠터 단백질의 것과 유의미한 동일성을 나타내고; ii) 참조 프리젠터 단백질의 상응하는 부분과의 유의미한 동일성을 나타내는 부분을 포함하고; 및/또는 iii) 프리젠터 단백질에서 발견된 하나 이상의 특징적인 서열을 포함하는 폴리펩타이드이다. 다수의 구현예에서, 동일성은 이것이 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 더 높은 경우에 프리젠터 단백질을 정의하기 위한 목적을 위해 "유의미한 것으로" 간주된다. 일부 구현예에서, 유의미한 동일성을 나타내는 부분은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 450, 500, 550, 600 아미노산 이상의 길이를 가진다.

[0414] 대표적인 프리젠터 단백질은 표 1에 열거된 이의 유전자 또는 동족체에 의해 인코딩되고; 일부 구현예에서, 참조 프리젠터 단백질이 표 1에 제시된 유전자에 의해 인코딩된다. 또한, 당해 분야의 숙련가는, 표 1을 참조하면, 일반적으로, 프리젠터 단백질, 및/또는 프리젠터 단백질의 특정 하위세트를 특징으로 하는 서열을 용이하게 식별할 수 있다.

[0415] [표 1] 선택된 프리젠터 단백질을 인코딩하는 유전자

유전자 명칭	유니프롯(Uniprot) 수탁 번호
AIP	O00170
AIPL1	Q9NZN9
FKBP1A	P62942
FKBP1B	P68106
FKBP2	P26885
FKBP3	Q00688
FKBP4	Q02790
FKBP5	Q13451
FKBP6	O75344
FKBP7	Q9Y680
FKBP8	Q14318
FKBP9	O95302
FKBP9L	Q75LS8
FKBP10	Q96AY3
FKBP11	Q9NYL4
FKBP14	Q9NWM8
FKBP15	Q5T1M5
LOC541473	-
PPIA	Q567Q0
PPIB	P23284
PPIC	P45877
PPID	Q08752
PPIE	Q9UNP9
PPIG	Q13427
PPIH	O43447
PPIL1	Q9Y3C6
PPIL2	Q13356
PPIL3	Q9H2H8
PPIL4	Q8WUA2
PPIL5	Q32Q17
PPIL6	Q8IXY8
PPWD1	Q96BP3

[0416]

[0417] *표적 단백질*

[0418] 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)은 질환 상태 또는 질환 상태의 증상을 매개하는 단백질이다. 이와 같이, 바람직한 치료 효과는 그것의 활성을 조절함으로써 (억제하거나 또는 증가시킴으로써) 달성될 수 있다. 본 발명의 복합체 및 방법에 유용한 표적 단백질은 프리젠터 단백질과 자연적으로 연관되지 않은 것, 예를 들어, 1 μM 초과, 바람직하게는 5 μM 초과, 및 더 바람직하게는 10 μM 초과의 본 발명의 화합물을 가진 2원 복합체의 부재 하에 프리젠터 단백질에 대한 친화도를 가지는 것을 포함한다. 대안적으로, 프리젠터 단백질과 자연적으로 연관되지 않은 표적 단백질은 1 μM 초과, 바람직하게는 5 μM 초과, 더 바람직하게는 10 μM 초과의 2원 복합체의 부재 하에 본 발명의 화합물에 대한 친화도를 갖는 것이다. 다른 대안에에서, 프리젠터 단백질과 자연적으

로 연관되지 않은 표적 단백질은 1 μM 초과, 바람직하게는 5 μM 초과, 및 더 바람직하게는 10 μM 초과의 사이클로스포린, 라파마이신, 또는 FK506 및 프리젠터 단백질 (예를 들어, FKBP)의 2원 복합체에 대한 친화도를 갖는 것이다. 다른 대안예에서, 프리젠터 단백질과 자연적으로 연관되지 않은 표적 단백질은 칼시뉴린 또는 mTOR 이외의 것이다. 본 발명의 복합체 및 방법에 대한 적합한 표적 단백질의 선택은 프리젠터 단백질에 좌우될 수 있다. 예를 들어, 사이클로필린에 대해 저친화도를 갖는 표적 단백질은 FKBP에 대해 고친화도를 가질 수 있고, 후자와 함께 사용되지 않을 것이다.

[0419] 표적 단백질은 자연 발생될 수 있고, 예를 들어, 야생형일 수 있다. 대안적으로, 표적 단백질은 야생형 단백질로부터 변형될 수 있으나, 여전히 예를 들어 대립유전자 변이체, 스플라이스 돌연변이체 또는 생물학적 활성 단편으로서 생물학적 기능을 보유할 수 있다.

[0420] 일부 구현예에서, 표적 단백질은 막관통 단백질이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 이중나선 구조를 가진다. 특정 구현예에서, 표적 단백질은 이량체성 복합체의 하나의 단백질이다.

[0421] 일부 구현예에서, 본 발명의 표적 단백질은 형성 프리젠터 단백질/화합물 복합체의 부재 하에, 소분자는 전형적으로 부위(들)에 대해 낮은 또는 검출가능한 결합을 입증하는 것을 특징으로 하는 하나 이상의 표면 부위 (예를 들어, 평평한 표면 부위)를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 형성하는 프리젠터 단백질/화합물 복합체의 부재 하에 특정 소분자 (예를 들어, 화합물)가 낮은 또는 검출불가능한 결합 (예를 들어, 동일한 화합물과 관련된 프리젠터 단백질/화합물 복합체로 관련된 것보다 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100 배 이상 더 낮은 결합)을 나타내는 하나 이상의 표면 부위 (예를 들어, 평평한 표면 부위)를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 임의의 통상적 결합 포켓, 예를 들어, 활성이 하나 이상의 소분자에 의해 조절된 단백질과 비슷한 이화학적 및/또는 기하학적 특성 단백질 구조 상의 공동 또는 포켓이 결여된 하나 이상의 부위 (및, 일부 구현예에서, 전체 표면)를 특징으로 하는 표면을 가진다. 특정 구현예에서, 표적 단백질은 단백질-단백질 상호작용에 대한 통상적 결합 포켓 및 부위를 가진다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 난공불락 표적이고, 예를 들어, 표적 단백질은 약물에 의해 표적화되지 않은 것으로 알려진 단백질 계열의 구성원이 아니고 및/또는 소분자에 대해 결합하기에 적합한 것으로 기대되는 (예를 들어, 기술분야에서 허용되는 이해에 따라, 본원에 논의된 바에 따라) 결합 부위를 가지지 않는다. 일부 구현예에서, 단백질은 하나 이상의 반응성 시스테인을 포함한다.

[0422] 일부 구현예에서, 표적 단백질은 GTPase 예컨대 DIRAS1, DIRAS2, DIRAS3, ERAS, GEM, HRAS, KRAS, MRAS, NKIRAS1, NKIRAS2, NRAS, RALA, RALB, RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B, RAP2C, RASD1, RASD2, RASL10A, RASL10B, RASL11A, RASL11B, RASL12, REM1, REM2, RERG, RERGL, RRAD, RRAS, RRAS2, RHOA, RHOB, RHOBTB1, RHOBTB2, RHOBTB3, RHOC, RHOD, RHOF, RHOG, RHOH, RHOJ, RHOQ, RHOU, RHOV, RND1, RND2, RND3, RAC1, RAC2, RAC3, CDC42, RAB1A, RAB1B, RAB2, RAB3A, RAB3B, RAB3C, RAB3D, RAB4A, RAB4B, RAB5A, RAB5B, RAB5C, RAB6A, RAB6B, RAB6C, RAB7A, RAB7B, RAB7L1, RAB8A, RAB8B, RAB9, RAB9B, RABL2A, RABL2B, RABL4, RAB10, RAB11A, RAB11B, RAB12, RAB13, RAB14, RAB15, RAB17, RAB18, RAB19, RAB20, RAB21, RAB22A, RAB23, RAB24, RAB25, RAB26, RAB27A, RAB27B, RAB28, RAB2B, RAB30, RAB31, RAB32, RAB33A, RAB33B, RAB34, RAB35, RAB36, RAB37, RAB38, RAB39, RAB39B, RAB40A, RAB40AL, RAB40B, RAB40C, RAB41, RAB42, RAB43, RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B, RAP2C, ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARF6, ARL1, ARL2, ARL3, ARL4, ARL5, ARL5C, ARL6, ARL7, ARL8, ARL9, ARL10A, ARL10B, ARL10C, ARL11, ARL13A, ARL13B, ARL14, ARL15, ARL16, ARL17, TRIM23, ARL4D, ARFRP1, ARL13B, RAN, RHEB, RHEBL1, RRAD, GEM, REM, REM2, RIT1, RIT2, RHOT1, 또는 RHOT2이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 GTPase 활성화 단백질 예컨대 NF1, IQGAP1, 플렉신-B1, RASAL1, RASAL2, ARHGAP5, ARHGAP8, ARHGAP12, ARHGAP22, ARHGAP25, BCR, DLC1, DLC2, DLC3, GRAF, RALBP1, RAP1GAP, SIPA1, TSC2, AGAP2, ASAP1, 또는 ASAP3이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 구아닌 뉴클레오타이드-교환 인자 예컨대 CNRASGEF, RASGEF1A, RASGRF2, RASGRP1, RASGRP4, SOS1, RALGDS, RGL1, RGL2, RGR, ARHGEF10, ASEF/ARHGEF4, ASEF2, DBS, ECT2, GEF-H1, LARG, NET1, OBSCURIN, P-REX1, P-REX2, PDZ-RHOGEF, TEM4, TIAM1, TRIO, VAV1, VAV2, VAV3, DOCK1, DOCK2, DOCK3, DOCK4, DOCK8, DOCK10, C3G, BIG2/ARFGEF2, EFA6, FBX8, 또는 GEP100이다. 특정 구현예에서, 표적 단백질은 ARM; BAR; BEACH; BH; BIR; BRCT; BROMO; BTB; C1; C2; CARD; CC; CALM; CH; CHROMO; CUE; DEATH; DED; DEP; DH; EF-hand; EH; ENTH; EVH1; F-box; FERM; FF; FH2; FHA; FYVE; GAT; GEL; GLUE; GRAM; GRIP; GYF; HEAT; HECT; IQ; LRR; MBT; MH1; MH2; MIU; NZF; PAS; PB1; PDZ; PH; POLO-Box; PTB; PUF; PWWP; PX; RGS; RING; SAM; SC; SH2; SH3; SOCS; SPRY; START; SWIRM; TIR; TPR; TRAF; SNARE; TUBBY; TUDOR; UBA; UEV; UIM; VHL; VHS; WD40; WW; SH2; SH3; TRAF; 브로모도메인; 또는 TPR과 같은 단백질-단백질 상호작용 도메인을 갖는 단백질이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 열충격 단백질 예컨대 Hsp20, Hsp27,

Hsp70, Hsp84, 알파 B 결정, TRAP-1, hsf1, 또는 Hsp90이다. 특정 구현예에서, 표적 단백질은 이온 통로 예컨대 Cav2.2, Cav3.2, IKACh, Kv1.5, TRPA1, NAv1.7, Nav1.8, Nav1.9, P2X3, 또는 P2X4이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 이중나선 단백질 예컨대 게미닌, SPAG4, VAV1, MAD1, ROCK1, RNF31, NEDP1, HCCM, EEA1, 비멘틴, ATF4, Nemo, SNAP25, 신탁신 1a, FYCO1, 또는 CEP250이다. 특정 구현예에서, 표적 단백질은 키나제 예컨대 사이클린 D1, ABL, ALK, AXL, BTK, EGFR, FMS, FAK, FGFR1, 2, 3, 4, FLT3, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4, IGF1R, INSR, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, MET, PDGFRA, PDGFRB, RET RON, ROR1, ROR2, ROS, SRC, SYK, TIE1, TIE2, TRKA, TRKB, KDR, AKT1, AKT2, AKT3, PDK1, PKC, RHO, ROCK1, RSK1, RKS2, RKS3, ATM, ATR, CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, CDK10, ERK1, ERK2, ERK3, ERK4, GSK3A, GSK3B, JNK1, JNK2, JNK3, AurA, AurB, PLK1, PLK2, PLK3, PLK4, IKK, KIN1, cRaf, PKN3, c-Src, Fak, PyK2, 또는 AMPK이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 포스파타제 예컨대 WIP1, SHP2, SHP1, PRL-3, PTP1B, 또는 STEP이다. 특정 구현예에서, 표적 단백질은 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질 (예컨대 NEDD8, ATG8 단백질, SUMO 단백질, ISG15), 활성화 효소 (E1' 예컨대 UBA1, UBA2, UBA3, UBA5, UBA6, UBA7, ATG7, NAE1, SAE1), 콘주게이션 효소 (E2' 예컨대 UBE 단백질, ATG3, BIRC6), 결찰 효소 (E3' 예컨대 BMI-1, MDM2, NEDD4-1, 베타-TRCP, SKP2, E6AP, CBL-B, 또는 APC/C), 및 유비퀴틴 또는 유비퀴틴-유사 단백질 프로테아제이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 염색질 개질제/리모델러 예컨대 유전자 BRG1, BRM, ATRX, PRDM3, ASH1L, CBP, KAT6A, KAT6B, MLL, NSD1, SETD2, EP300, KAT2A, 또는 CREBBP에 의해 인코딩된 염색질 개질제/리모델러이다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 전사 인자 예컨대 유전자 EHF, ELF1, ELF3, ELF4, ELF5, ELK1, ELK3, ELK4, ERF, ERG, ETS1, ETV1, ETV2, ETV3, ETV4, ETV5, ETV6, FEV, FLI1, GAVPA, SPDEF, SPI1, SPIC, SPIB, E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F7, E2F8, ARNTL, BHLHA15, BHLHB2, BHLBHB3, BHLHE22, BHLHE23, BHLHE41, CLOCK, FIGLA, HAS5, HES7, HEY1, HEY2, ID4, MAX, MESP1, MLX, MLXIPL, MNT, MSC, MYF6, NEUROD2, NEUROG2, NHLH1, OLIG1, OLIG2, OLIG3, SREBF2, TCF3, TCF4, TFAP4, TFE3, TFEB, TFEC, USF1, ARF4, ATF7, BATF3, CEBPB, CEBPD, CEBPG, CREB3, CREB3L1, DBP, HLF, JDP2, MAFF, MAFG, MAFK, NRL, NFE2, NFIL3, TEF, XBP1, PROX1, TEAD1, TEAD3, TEAD4, ONECUT3, ALX3, ALX4, ARX, BARHL2, BARX, BSX, CART1, CDX1, CDX2, DLX1, DLX2, DLX3, DLX4, DLX5, DLX6, DMBX1, DPRX, DRGX, DUXA, EMX1, EMX2, EN1, EN2, ESX1, EVX1, EVX2, GBX1, GBX2, GSC, GSC2, GSX1, GSX2, HESX1, HMX1, HMX2, HMX3, HNF1A, HNF1B, HOMEZ, HOXA1, HOXA10, HOXA13, HOXA2, HOXAB13, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXC10, HOXC11, HOXC12, HOXC13, HOXD11, HOXD12, HOXD13, HOXD8, IRX2, IRX5, ISL2, ISX, LBX2,LHX2, LHX6, LHX9, LMX1A, LMX1B, MEIS1, MEIS2, MEIS3, MEOX1, MEOX2, MIXL1, MNX1, MSX1, MSX2, NKX2-3, NKX2-8, NKX3-1, NKX3-2, NKX6-1, NKX6-2, NOTO, ONECUT1, ONECUT2, OTX1, OTX2, PDX1, PHOX2A, PHOX2B, PITX1, PITX3, PKNOX1, PROP1, PRRX1, PRRX2, RAX, RAXL1, RHOXF1, SHOX, SHOX2, TGIF1, TGIF2, TGIF2LX, UNCX, VAX1, VAX2, VENTX, VSX1, VSX2, CUX1, CUX2, POU1F1, POU2F1, POU2F2, POU2F3, POU3F1, POU3F2, POU3F3, POU3F4, POU4F1, POU4F2, POU4F3, POU5F1P1, POU6F2, RFX2, RFX3, RFX4, RFX5, TFAP2A, TFAP2B, TFAP2C, GRHL1, TFCP2, NFIA, NFIB, NFIX, GCM1, GCM2, HSF1, HSF2, HSF4, HSFY2, EBF1, IRF3, IRF4, IRF5, IRF7, IRF8, IRF9, MEF2A, MEF2B, MEF2D, SRF, NRF1, CPEB1, GMEB2, MYBL1, MYBL2, SMAD3, CENPB, PAX1, PAX2, PAX9, PAX3, PAX4, PAX5, PAX6, PAX7, BCL6B, EGR1, EGR2, EGR3, EGR4, GLIS1, GLIS2, GLI2, GLIS3, HIC2, HINFP1, KLF13, KLF14, KLF16, MTF1, PRDM1, PRDM4, SCRT1, SCRT2, SNAI2, SP1, SP3, SP4, SP8, YY1, YY2, ZBED1, ZBTB7A, ZBTB7B, ZBTB7C, ZIC1, ZIC3, ZIC4, ZNF143, ZNF232, ZNF238, ZNF282, ZNF306, ZNF410, ZNF435, ZBTB49, ZNF524, ZNF713, ZNF740, ZNF75A, ZNF784, ZSCAN4, CTCF, LEF1, SOX10, SOX14, SOX15, SOX18, SOX2, SOX21, SOX4, SOX7, SOX8, SOX9, SRY, TCF7L1, FOXO3, FOXB1, FOXC1, FOXC2, FOXD2, FOXD3, FOXG1, FOXI1, FOXJ2, FOXJ3, FOXK1, FOXL1, FOXO1, FOXO4, FOXO6, FOXP3, EOMES, MGA, NFAT5, NFATC1, NFKB1, NFKB2, TP63, RUNX2, RUNX3, T, TBR1, TBX1, TBX15, TBX19, TBX2, TBX20, TBX21, TBX4, TBX5, AR, ESR1, ESRRA, ESRRB, ESRRG, HNF4A, NR2C2, NR2E1, NR2F1, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A2, RARA, RARB, RARG, RORA, RXRA, RXRB, RXRG, THRA, THRB, VDR, GATA3, GATA4, 또는 GATA5; 또는 C-myc, Max, Stat3, Stat4, Stat6, 안드로겐 수용체, C-Jun, C-Fox, N-Myc, L-Myc, MITF, Hif-1알파, Hif-2알파, Bcl6, E2F1, NF-카파B, Stat5, 또는 ER(coact)에 의해 인코딩된 전사 인자이다. 특정 구현예에서, 표적 단백질은 TrkA, P2Y14, mPEGS, ASK1, ALK, Bcl-2, BCL-XL, mSIN1, RORɣt, IL17RA, eIF4E, TLR7 R, PCSK9, IgE R, CD40, CD40L, Shn-3, TNFR1, TNFR2, IL31RA, OSMR, IL12beta1,2, 타우, FASN, KCTD 6, KCTD 9, Raptor, Rictor, RALGAPA, RALGAPB, 아넥신 패밀리 일원, BCOR, NCOR, 베타 카테닌, AAC 11, PLD1, PLD2, 프리즐레드7, RaLP, ,MLL-1, Myb, Ezh2, RhoGD12, EGFR, CTLA4R, GCGC (coact), 아디포넥틴 R2, GPR 81, IMPDH2, IL-4R, IL-13R, IL-1R, IL2-R, IL-6R, IL-22R, TNF-R, TLR4, MyD88, Keap1, 또는 Nrlp3이다.

[0423] *단백질 변이체*

[0424] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 단백질 또는 폴리펩타이드 변이체는, 일반적으로 표준 폴리펩타이드 (예를 들어, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 프리젠터 단백질 또는 표적 단백질 예컨대 예를 들어 포유동물 프리젠터 단백질 또는 표적 단백질)의 것과의 유의미한 (예를 들어, 80% 이상, 즉, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 동일성을 나타내지만, 표준 폴리펩타이드에 비해 제한된 수의 특정 아미노산 변화 (예를 들어, 삽입, 결실, 또는 치환, 보존적 또는 비-보존적 및/또는 하나 이상의 아미노산 변이체 또는 유사체 (예를 들어, D-아미노산, 데스아미노산) 포함)를 포함하는 아미노산 서열을 가진다. 특정 구현예에서, 변이체는 참조 폴리펩타이드와의 관련된 생물학적 활성 (예를 들어, 이의 특정 화합물 또는 모이어티에 대한 결합)을 공유하고; 일부 이러한 구현예에서, 변이체는 참조 폴리펩타이드의 것의 약 50% 이상이고 및/또는 참조 폴리펩타이드의 것보다 약 0.5 배 이상으로 낮은 수준으로 이러한 활성을 나타낸다.

[0425] 일부 구현예에서, 변이체 폴리펩타이드는 적어도 (또는 단독으로) 참조 폴리펩타이드의 것과 상이한 아미노산 서열을 가지고, 이에서 변이체는 다수의 시스테인 잔기를 가지고 및/또는 참조 폴리펩타이드에서의 비-시스테인 잔기에 상응하는 위치에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 가진다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 (예를 들어, 프리젠터 단백질 및/또는 표적 단백질의) 임의의 폴리펩타이드의 아미노 또는 카복시 말단으로의 하나 이상의 시스테인 잔기의 첨가는 예를 들어, 이황화 결합에 의해 이러한 폴리펩타이드의 접합을 촉진할 수 있다.

[0426] 일부 구현예에서, 아미노산 치환은 보존적일 수 있고 (즉, 여기서 잔기는 다른 동일한 일반 유형 또는 그룹에 의해 대체됨) 또는 비-보존적일 수 있다 (즉, 여기서 잔기는 또 다른 유형의 아미노산으로 대체됨). 일부 구현예에서, 자연 발생 아미노산은 비-자연 발생 아미노산에 대해 치환될 수 있다 (즉, 비-자연 발생 보존적 아미노산 치환 또는 비-자연 발생 비-보존적 아미노산 치환), 또는 그 반대.

[0427] 합성으로 제조된 폴리펩타이드는 DNA (예를 들어, 비-자연 발생 또는 비천연 아미노산)에 의해 자연적으로 인코딩되지 않은 아미노산(예를 들어, 비-자연 발생 또는 비천연 아미노산)의 치환을 포함할 수 있다. 비-자연 발생 아미노산의 예는 D-아미노산, 아자이드-함유 측쇄를 갖는 아미노산, 시스테인의 황 원자에 부착된 아세틸아미노메틸기를 갖는 아미노산, 페길화된 아미노산, 화학식 $NH_2(CH_2)_nCOOH$(여기서 n은 2-6임)의 오메가 아미노산, 중성 무극성 아미노산, 예컨대 사르코신, t-부틸 알라닌, t-부틸 글리신, N-메틸 이소류신, 및 노르류신을 포함한다. 페닐글리신은 Trp, Tyr, 또는 Phe에 대해 치환될 수 있고; 시트룰린 및 메티오닌 설폭사이드는 중성 무극성이고, 시스테인산은 산성이고, 오르니틴은 염기성이다. 프롤린은 하이드록시프롤린으로 치환될 수 있고, 형태 제공 특성을 보유한다.

[0428] 유사체는 치환형 돌연변이유발에 의해 생성될 수 있고, 최초 단백질의 구조 (예를 들어, 국소 구조 또는 전반적인 구조)를 보유할 수 있다. "보존적 치환"으로 확인된 치환의 예는 표 2에 나타나 있다. 이러한 치환이 원하지 않는 변화를 초래하는 경우, 이후 표 2에서의 "예시적인 치환"으로 표시되거나 또는 아미노산 분류와 관련하여 본원에 추가로 기재된 바와 같은 다른 유형의 치환이 도입되고, 생성물이 선별된다.

[0429] 기능 또는 면역학적 동일성에서의 실질적인 변형은 예를 들어, (a) 시트 또는 나선 형태와 같은 치환의 부분에서의 단백질 백본의 구조를 유지하는 데 있어서 그것의 효과가 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 이루어진다. (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크. 자연 발생 잔기는 일반 측쇄 특성에 기초하여 그룹으로 나누어진다.

[0430] (1) 소수성: 노르류신, 메티오닌 (Met), 알라닌 (Ala), 발린 (Val), 류신 (Leu), 이소류신 (Ile), 히스티딘 (His), 트립토판 (Trp), 티로신 (Tyr), 페닐알라닌 (Phe),

[0431] (2) 중성 친수성: 시스테인 (Cys), 세린 (Ser), 트레오닌 (Thr)

[0432] (3) 산성/음으로 하전됨: 아스파르트산 (Asp), 글루탐산 (Glu)

[0433] (4) 염기성: 아스파라긴 (Asn), 글루타민 (Gln), 히스티딘 (His), 라이신 (Lys), 아르기닌 (Arg)

[0434] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: 글리신 (Gly), 프롤린 (Pro);

[0435] (6) 방향족: 트립토판 (Trp), 티로신 (Tyr), 페닐알라닌 (Phe), 히스티딘 (His),

[0436] (7) 극성: Ser, Thr, Asn, Gln

[0437] (8) 염기성 양으로 하전됨: Arg, Lys, His, 및;

[0438] (9) 하전됨: Asp, Glu, Arg, Lys, His

[0439] 다른 아미노산 치환는 표 2에 열거되어 있다.

[0440] [표 2] 아미노산 치환

최초 잔기	예시적인 치환	보존적 치환
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, 노르류신	Leu

[0441]

[0442] *변경된 반응성 아미노산 프로파일을 갖는 단백질 변이체*

[0443] 일부 구현예에서, 단백질 또는 폴리펩타이드 변이체는 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 단백질의 아미노 또는 카복시 말단에서) 단백질에 하나 이상의 반응성 아미노산 잔기 (예를 들어, 시스테인)의 첨가를 포함할 수 있고, 이는 예를 들어, 이황화 결합에 의해 이러한 단백질의 접합을 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 반응성 아미노산 (예를 들어, 시스테인)은 제거되어 단백질 상의 가능한 접합 부위의 수를 감소시킬 수 있다. 아미노산 치환은 보존적일 수 있고 (즉, 여기서 잔기는 다른 동일한 일반 유형 또는 그룹으로 대체됨) 또는 비-보존적일 수 있다 (즉, 여기서 잔기는 다른 유형의 아미노산으로 대체됨). 또한, 자연 발생 아미노산은 비-자연 발생 아미노산에 대해 치환될 수 있다 (즉, 비-자연 발생 보존적 아미노산 치환 또는 비-자연 발생 비-보존적 아미노산 치환).

[0444] 당업계에서 알려진 바와 같이, 예를 들어, 하기에 기재된 바와 같이: 문헌[Chin, J. W. , Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals, Annual Review of Biochemistry, Vol. 83: 379-408], 비천연 아미노산은 시험관내에서 제조된 단백질로 편입될 수 있다. 예를 들어, 하나의 시스템에서, UAG 엠버 (정지) 코돈은 아칠(archeal) tRNA 합성효소 및 tRNA를 통해 피로리신을 혼입하기 위해 사용되었으며, 이들은 또한 공급을 통해 아자이드 및 알킨을 혼입하기 위해 사용될 수 있다. 당업계에서 실증된 비천연 아미노산 상의 다른 측쇄는 사이클로프로펜, 트랜스-사이클로옥텐, 바이사이클로[6.1.0]노닌 -라이신, 쿠마린, p-아지도페닐알라닌, N6-[(2- 프로핀록시)카보닐]-L-라이신, 바이사이클로[6.1.0]논-4-인-9-일메탄올 (BCN), N-5-노르보르넨-2-일옥시카보닐-l-라이신, N-tert-부틸옥시카보닐-l-라이신, N-2-아지도에틸옥시카보닐-l-라이신, N-L-티아 프롤릴-L-라이신, N-D-시스테이닐-L-라이신, N-L-시스테이닐-L-라이신, N6-[(2-프로피닐옥시)카보닐]-L-라이신, N6-[(2-아지도에톡시)카보닐]-L-라이신, 벤조페논, 4-(6-메틸-s-테트라진-3-일)아미노페닐알라닌, 및 사이클로옥틴을 포함한다.

[0445] **복합체**

[0446] 자연 발생 단백질-단백질 상호작용에서, 결합 사건은 전형적으로 대개 단백질 상의 공동 또는 포켓에서 소분자들 사이의 상호작용에 의해 유도된 다수의 소분자-단백질 상호작용에 대조적으로 상호작용 단백질의 평평한 표면 부위 상의 소수성 잔기에 의해 유도된다. 통상적으로, 단백질의 평평한 표면 부위 상의 소수성 잔기는 소수성 핫스팟을 형성하고, 여기서 상호작용 단백질 사이 또는 그 중에서의 대부분의 결합 상호작용은 반데르발스 상호작용이다. 일부 상황에서, 소분자는, 이것이 예컨대 단백질 (예를 들어, 프리젠터 단백질) 상의 소수성 상호작용 부위에 참여하거나 또는 이를 생성하는 "이동가능 핫스팟" (또는 이의 부분)을 제공할 수 있고, 여기서 이들은 소분자 부재 하에 존재하지 않고; 본 개시내용의 양태는 특히 이러한 상황에 적용가능하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 화합물 (및/또는 이의 태그된 형태)은 단백질과 함께 복합체를 형성하고 (예를 들어, 프리젠터 단백질/화합물 복합체), 유사 단백질-단백질 상호작용 (예를 들어, 표적 단백질과 함께의 3분체 복합체의 형성)에 참여한다.

[0447] 다수의 포유동물 단백질은 임의의 복수의 상이한 파트너에 결합할 수 있고; 일부 경우에, 이러한 대안적인 결합 상호작용은 단백질의 생물학적 활성에 기여한다. 다수의 이들 단백질은 상이한 구조 문맥에서 동일한 잔기를 제공하는 핫스팟 단백질 영역의 고유한 가변성을 적용한다. 보다 구체적으로, 단백질-단백질 상호작용은 진균 및 박테리아 종의 그룹을 선택함으로써 생성된 천연 생성물의 부류에 의해 매개될 수 있다. 이러한 분자는 단백질-단백질 상호작용을 조절하는 능력을 제공하는 일반 구조 조직화 및 생성된 기능성 모두를 나타낸다. 이러한 분자는 고도로 보존된 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 상이한 천연 생성물 중에서 고도의 가변성을 나타내는 표적 단백질 상호작용 모이어티를 함유한다. 프리젠터 단백질 결합 모이어티는 프리젠터 단백질에 대해 특이성을 제공하고, 분자가 프리젠터 단백질에 결합하게 하여 복합체를 형성하며; 포유동물 표적 단백질 결합 모이어티는 표적 단백질에 대해 특이성을 제공하고, 2원 복합체가 표적 단백질에 결합하게 하여 전형적으로 (예를 들어, 양성으로 또는 음성으로 조절하는) 그것의 활성을 조절한다. 본 발명에서, (예를 들어, 화합물과 프리젠터 단백질 또는 화합물 및 표적 단백질 사이의) 2원 복합체는 표적 단백질에 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 접합하거나 또는 프리젠터 단백질에 표적 단백질 결합 모이어티에 접합하여 모사된다. 본 발명의 생성된 접합체는 이후 3원 복합체를 모사하는 프리젠터 단백질 또는 표적 단백질 형성 복합체에 결합할 수 있다. 이들 복합체는 예를 들어 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 계면의 구조를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 게다가, 복합체의 형성을 간소화함으로써, 예를 들어, 표적 단백질에 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 접합시킴으로써, 본 발명의 화합물은 예를 들어 프리젠터 단백질에 결합시킬 수 있는 표적 단백질을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0448] **용도**

[0449] *표적 단백질의 확인*

[0450] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 및/또는 방법은 (예를 들어, 소분자의 존재 하에) 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질을 확인하는데 유용할 수 있다. 표적 단백질은 표적 모이어티에 접합된 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체의 형성에 의해 그리고 접합체가 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성하는지 여부를 결정함으로써 확인될 수 있다.

[0451] 프리젠터 단백질 및 소분자와 함께 3원 복합체를 형성하는 것으로 당업계에 알려진 대부분의 표적 단백질은 소분자의 작용 기전의 결정 과정에서 우연히 확인되었다. 본 방법은 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 표적 분자에 공유적으로 접합시키고, 프리젠터 단백질 및 표적 단백질 둘 모두를 동시에 결합할 수 있는 화합물의 확인 이전에 복합체의 형성을 가능하게 함으로써 소분자의 존재 하에 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질의 합리적인 확인을 가능하게 한다.

[0452] 프리젠터 단백질과 확인된 표적 단백질 사이의 복합체 형성을 촉진하는 그것의 능력에 대한 소분자의 스크리닝은 이후 수행되어 표적 단백질의 생물학적 활성을 조절할 수 있는 잠재적 치료제를 확인하기 위해 수행될 수 있다.

[0453] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물은 프리젠터 단백질과 함께 복합체를 형성할 수 있는 표적 단백질을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 단백질은 프리젠터 단백질/표적 단백질 복합체의 형성을 가능하게 하는데 적합한 조건으로 본 발명의 화합물의 존재 하에 하나 이상의 표적 단백질을 (예를 들어, 바이오틴으로 라벨링된) 라벨링된 프리젠터 단백질을 배합하여 확인될 수 있다. 프리젠터 단백질과 함께의 복합체를 형성하지 않는 표적 단백질은 이후 제거될 수 있거나 (예를 들어 세정될 수 있고), 복합체를 형성하는 표적 단백질은 이후 프리젠터 단백질 상의 라벨을 사용하여 풀 다운되어, 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, 풀 다운된 표적 단

백질은 질량 분광분석법에 의해 분석되어 그것의 동일성을 결정할 수 있다.

[0454] *화합물 설계*

[0455] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 및/또는 방법은 질환의 치료에 사용하기 위한 표적 단백질의 생물학적 활성을 조절할 수 있는 화합물의 설계에 유용할 수 있다.

[0456] 예를 들어, 본 발명의 프리젠터 단백질 및 접합체의 복합체의 형성은 복합체의 결정화 및 결정 구조 결정에 의해 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 단백질-단백질 계면의 구조의 결정을 촉진할 수 있다. 본 발명의 복합체의 결정 구조가 결정되는 경우에, 본 발명의 복합체의 결정을 절편 함침시키는 방법을 사용하고 생성된 구조를 결정하는 약물 설계에 기초하여 신규한 구조 및/또는 절편을 구축하는 전산 화학 방법과 같은 합리적인 약물 설계에 대해 당업계에서 알려진 방법은 프리젠터 단백질과 표적 단백질 사이의 복합체 형성을 촉진할 수 있는 소분자를 개발하기 위해 사용될 수 있다.

[0457] 상기에 기재된 바와 같이 설계된 화합물은 이후 선별되어 표적 단백질의 생물학적 활성을 조절하는 그것의 능력을 결정하기 위해 선별될 수 있고, 필요에 따라, 치료적으로 유용한 화합물을 제조하기 위해 약효 화학 기술을 사용하여 개질될 수 있다.

[0458] *공유 소분자 치료제의 확인*

[0459] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 및/또는 방법은 공유 상호작용을 통해 표적 단백질의 생물학적 활성을 조절할 수 있는 화합물을 확인하기 위해 유용할 수 있다.

[0460] 예를 들어, 본 발명의 화합물은 프리젠터 단백질의 존재 하에서만 표적 단백질에 선택적으로 결합할 수 있는 화합물을 확인하기 위해 프리젠터 단백질의 존재 및 부재 하에 표적 단백질에 공유적으로 결합하는 그것의 능력에 대해 선별될 수 있다. 이들 화합물은 이후 표적 단백질의 생물학적 활성을 조절하는 그것의 능력에 대해 시험될 수 있고, 치료적으로 유용한 화합물을 제조하기 위해 필요에 따라, 약효 화학 기술을 사용하여 변형될 수 있다.

[0461] *생화학적 및/또는 생체물리학적 특성의 결정*

[0462] 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물, 접합체, 복합체, 조성물, 및/또는 방법은 단백질 또는 복합체의 생화학적 및/또는 생체물리학적 특성을 결정하는데 유용할 수 있다.

[0463] 예를 들어, 프리젠터 단백질 결합 모이어티를 포함하는 접합체와 표적 단백질 및 프리젠터 단백질 사이의 결합의 자유 에너지는 예를 들어 등온 적정 열량측정에 의해 결정될 수 있다. 프리젠터 단백질 결합 모이어티 및 프리젠터 단백질에 대한 표적 단백질을 포함하는 접합체의 K_d는 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정될 수 있다. 표적 단백질에 대한 프리젠터 단백질 및 화합물에 대한 K_i, K_{inact}, 및/또는 K_i/K_{inact}은 예를 들어, 질량 분광분석법에 의해 결정될 수 있다.

[0464] *질환 또는 장애의 치료*

[0465] 본원에 기재된 화합물, 접합체, 및 복합체는 본원에 기재된 표적 단백질과 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법에서 유용할 수 있고, 이론에 결합되지 않고, 프리젠터 단백질 및 표적 단백질과의 상호작용을 통해 표적 단백질 (예를 들어, 진핵 표적 단백질 예컨대 포유동물 표적 단백질 또는 진균 표적 단백질 또는 원핵 표적 단백질 예컨대 박테리아 표적 단백질)의 활성을 조절하는 (예를 들어, 양성으로 또는 음성으로 조절하는) 그것의 능력을 통해 그것의 바람직한 효과를 발휘하는 것으로 여겨진다.

[0466] *키트*

[0467] 일부 구현예에서, 본 발명은 편리하게 및 효과적으로 본 발명에 따른 방법을 실시하기 위한 키트에 관한 것이다. 일반적으로, 약제학적 팩 또는 키트는 본 발명의 약제학적 조성물의 성분 중 하나 이상으로 채워진 하나 이상의 컨테이너를 포함한다. 이러한 키트는 특히 고체 경구 형태 예컨대 정제 또는 캡슐의 전달에 적합하다. 이러한 키트는 바람직하게는 다수의 단위 투약량을 포함하고, 또한 그것의 의도한 용도의 순서로 배치된 투약량을 갖는 카드를 포함할 수 있다. 바람직한 경우, 예를 들어, 상기 대상체가 알츠하이머병을 앓고 있는 경우, 기억 지원은 예를 들어 투약량은 투여될 수 있는 치료 스케줄에서 일수를 표시하는 수, 문자, 또는 다른 표시 또는 캘린더 삽입물의 형태로 제공될 수 있다. 대안적으로, 약제학적 조성물의 투약량과 유사하거나 또는 이와 구분되는 형태로 위약 투약량, 또는 칼슘 식이 보충물은 투약량이 매일 취해지는 키트를 제공하도록 포함될 수 있다. 이러한 컨테이너(들)과 관련하여 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 조절하는 정규 기관에 의해

규정된 형태로 통지될 수 있고, 이러한 통지는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 기관의 승인을 반영한다.

[0468] *약제학적 조성물*

[0469] 인간 및 동물 대상체의 치료로서 사용하기 위해, 본 발명의 화합물 및 접합체는 약제학적 또는 수의과 조성물로서 배합될 수 있다. 치료되는 대상체, 투여 방식, 및 원하는 치료의 유형－예를 들어, 예방, 예방, 또는 요법－에 따라, 화합물은 이러한 파라미터와 일치하는 방식으로 배합된다. 이러한 기술의 요약은 하기 문헌에서 발견된다: 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (2005); 및 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York], 이들 각각은 본원에 참조로 편입되어 있다.

[0470] 본원에 기재된 화합물은 조성물의 총 중량의 1-95 중량%의 총량으로 존재할 수 있다. 조성물은 관절내, 경구, 비경구 (예를 들어, 정맥내, 근육내), 직장, 피부, 피하, 국소, 경피, 설하, 비강, 질, 방광내, 요도내, 척추강내, 경막외, 귀, 또는 안구 투여, 또는 주사로, 흡입, 또는 비강, 비뇨생식, 생식 또는 경구 점막과의 직접 접촉에 대해 적합한 투약 형태로 제공될 수 있다. 따라서, 약제학적 조성물은 예를 들어, 정제, 캡슐, 알약, 분말, 과립, 현탁액, 에멀션, 용액, 하이드로겔을 포함하는 겔, 페이스트, 연고, 크림, 플라스터, 드렌치, 삼투 전달 장치, 좌약, 관장제, 주사제, 이식물, 스프레이, 이온침투 전달, 또는 에어로졸에 적합한 제제의 형태일 수 있다. 조성물은 종래의 약제학적 실시에 따라 배합될 수 있다.

[0471] 일반적으로, 치료에서의 사용을 위해, 본원에 기재된 화합물은 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 활성제와 조합하여 사용될 수 있다. 본원에 기재된 화합물과 조합되는 다른 의약품의 예는 동일한 적응증의 치료를 위한 의약품을 포함할 것이다. 본원에 기재된 화합물과 조합되는 잠재적 제약의 다른 예는 상이한 연관된 또는 관련된 증상 또는 징후의 치료에 대한 의약품을 포함할 것이다. 투여 방식에 따라, 화합물은 손쉬운 전달을 가능하게 하는 적합한 조성물로 배합된다. 병용 요법의 각각의 화합물은 당해 기술에 공지된 다양한 방식으로 배합될 수 있다. 예를 들어, 병용 요법의 제1 및 제2 제제는 함께 또는 별도로 배합될 수 있다. 바람직하게는, 제1 및 제2 제제는 제제의 투여와 동시에 또는 거의 동시에 배합된다.

[0472] 본 발명의 화합물은 본원에 기재된 화합물 및 당해 분야에 공지된 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제의 유효량을 포함하는 약제학적 조성물로서 제조되거나 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 2개의 상이한 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 캐리어를 포함한다.

[0473] 제제는 전신 투여 또는 국소 또는 국소 투여에 대해 적합한 방식으로 제조될 수 있다. 전신 제제는 주사 (예를 들어, 근육내, 정맥내 또는 피하 주사)를 위해 설계된 것을 포함하거나 또는 경피, 경점막, 또는 경구 투여를 위해 제조될 수 있다. 제제는 일반적으로 희석제뿐만 아니라, 일부 경우에, 아쥬반트, 완충액, 보존제 등을 포함한다. 화합물은 또한 리포좀 조성물에서 또는 마이크로에멀션으로서 투여될 수 있다.

[0474] 주사를 위해, 제제는 액체 용액 또는 현탁액로서 또는 주사 이전에 액체 중의 용액 또는 현탁액에 대해 적합한 고체 형태로서 또는 에멀션으로서의 종래의 형태로 제조될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 덱스트로스, 글리세롤 등을 포함한다. 이러한 조성물은 또한 비독성 보조 물질 예컨대 습윤 또는 유화제, pH 완충제 등, 예컨대, 예를 들어, 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트 등의 양을 함유할 수 있다.

[0475] 약물에 대한 다양한 지속 방출 시스템이 또한 고안되었다. 참고, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,624,677, 이는 본원에 참조로 편입되어 있다.

[0476] 전신 투여는, 또한, 상대적으로 비침습성 방법 예컨대 좌약, 경피 패치, 경점막 전달 및 비강내 투여의 사용을 포함할 수 있다. 경구 투여는 또한 본 발명의 화합물에 대해 적합하다. 적합한 형태는 당업계에서 이해되는 바와 같은 시럽, 캡슐, 및 정제를 포함한다.

[0477] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 병용 요법의 각각의 화합물은 당해 기술에 공지되어 있는 다양한 방식으로 배합될 수 있다. 예를 들어, 병용 요법의 제1 및 제2 제제는 함께 또는 별도로 배합될 수 있다.

[0478] 개별적으로 또는 별도로 배합된 제제는 키트로서 함께 포장될 수 있다. 비-제한적인 예는 비제한적으로, 예를 들어, 2개의 알약, 알약 및 분말, 좌약 및 바이알 중의 액체, 2개의 국소 크림 등을 함유하는 키트를 포함한다. 키트는 대상체에 단위 용량의 투여를 지원하는 선택적인 구성요소, 예컨대 분말 형태를 재구성하기 위한 바이알, 주사를 위한 주사기, 맞춤형 IV 전달 시스템, 흡입기 등을 포함할 수 있다. 추가로, 단위 용량 키트는 조성물의 제조 및 투여에 대한 지침을 포함할 수 있다. 본 키트는 (개별 화합물은 요법이 진행됨에 따라 효력에

있어서 변화될 수 있는 일정한 용량으로) 하나의 대상체에 대한 단일 사용 단위 용량으로서, 특정 대상체에 대한 다중 사용으로서 제조될 수 있고; 또는 본 키트는 다중 대상체 ("벌크 패키징")에 대한 투여에 적합한 다중 용량을 함유할 수 있다. 키트 구성요소는 카턴, 블리스터 팩, 병, 튜브 등으로 어셈블링될 수 있다.

[0479] 경구용 제제는 무독성 약학적으로 허용가능한 부형제를 갖는 혼합물에서의 활성 성분(들)을 함유하는 정제를 포함한다. 이러한 부형제는 예를 들어, 불활성 희석제 또는 충전제 (예를 들어, 수크로스, 소르비톨, 당, 만니톨, 미세결정성 셀룰로스, 감자 전분을 포함하는 전분, 탈산칼슘, 염화나트륨, 락토스, 인산칼슘, 황산칼슘, 또는 인산나트륨); 과립화 및 붕해제 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스를 포함하는 셀룰로스 유도체, 감자 전분을 포함하는 전분, 크로스카르멜로스 나트륨, 알기네이트, 또는 알긴산); 결합제 (예를 들어, 수크로스, 글루코스, 소르비톨, 아카시아, 알긴산, 나트륨 알기네이트, 젤라틴, 전분, 사전절라틴화된 전분, 미세결정성 셀룰로스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 또는 폴리에틸렌 글리콜); 및 윤활제, 활택제, 및 접착방지제 (예를 들어, 스테아르산마그네슘, 스테아르산아연, 스테아르산, 실리카, 수소화된 식물성 오일, 또는 탈크)일 수 있다. 다른 약학적으로 허용가능한 부형제는 착색제, 풍미제, 가소제, 휴멕턴트, 완충제 등일 수 있다.

[0480] 2개 이상의 화합물은 정제, 캡슐, 또는 다른 비히클에서 함께 혼합될 수 있고, 또는 분할될 수 있다. 일예에서, 제1 화합물은 정제의 내부에 함유되고, 제2 화합물은 외부에 있고, 이로써 제2 화합물의 상당한 부분은 제1 화합물의 방출 이전에 방출될 수 있다.

[0481] 경구용 제제는 또한 씹을 수 있는 정제로서, 또는 경질 젤라틴 캡슐(여기서 활성 성분은 불활성 고체 희석제(예를 들어, 감자 전분, 락토스, 미세결정성 셀룰로스, 탈산칼슘, 인산칼슘 또는 카올린)와 함께 혼합됨)로서, 또는 연질 젤라틴 캡슐(여기서 활성 성분은 물 또는 오일 미디엄, 예를 들어, 땅콩 오일, 유동 파라핀, 또는 올리브 오일과 혼합됨)로서 제공될 수 있다. 분말, 과립, 및 펠릿은 예를 들어, 혼합기, 유동층 장치 또는 분무 건조 장비를 사용하여 종래의 방식으로 정제 및 캡슐 하에 상술한 성분을 사용하여 제조될 수 있다.

[0482] 용해 또는 확산 조절 방출은 화합물의 정제, 캡슐, 펠릿, 또는 과립 제제의 적절한 코팅에 의해, 또는 화합물을 적절한 매트릭스로의 혼입에 의해 달성될 수 있다. 조절 방출 코팅은 상술한 코팅 물질 및/또는, 예를 들어, 셀락, 밀랍, 글리코왁스, 캐스터 왁스, 카르나우바 왁스, 스테아릴 알코올, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 글리세롤 팔미토스테아레이트, 에틸셀룰로스, 아크릴 수지, 디-폴리락트산, 셀룰로스 아세테이트 부티레이트, 다염화비닐, 폴리비닐 아세테이트, 비닐 피롤리돈, 폴리에틸렌, 폴리메타크릴레이트, 메틸메타크릴레이트, 2-하이드록시메타크릴레이트, 메타크릴레이트 하이드로겔, 1,3 부틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜 메타크릴레이트, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 조절 방출 매트릭스 제제에서, 매트릭스 물질은 또한 예를 들어, 수화된 메틸셀룰로스, 카르나우바 왁스 및 스테아릴 알코올, 카보폴 934, 실리콘, 글리세릴 트리스테아레이트, 메틸 아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트, 다염화비닐, 폴리에틸렌, 및/또는 할로겐화된 플루오로카본을 포함할 수 있다.

[0483] 본 발명의 화합물 및 조성물이 경구로 투여하기 위해 혼입될 수 있는 액체 형태는 수용액, 적합하게는 풍미 시럽, 수성 또는 오일 서스펜션, 및 식용 오일 예컨대 목화씨 오일, 참깨 오일, 코코넛 오일, 또는 땅콩 오일을 갖는 풍미 에멀션 뿐만 아니라 엘릭시르 및 유사한 약제학적 비히클을 포함한다.

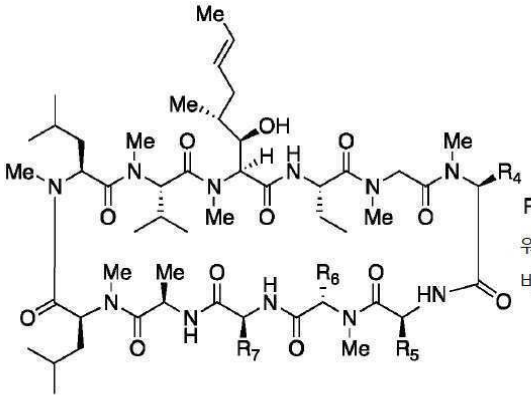
[0484] 일반적으로, 인간에게 투여되는 경우, 본 발명의 조합의 임의의 화합물의 경구 투약량은 화합물의 특징에 좌우되고, 이는 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 이러한 투약량은 일반적으로 약 0.001 mg 내지 2000 mg/일, 바람직하게는 약 1 mg 내지 1000 mg/일, 더 바람직하게는 약 5 mg 내지 500 mg/일이다. 최대 200 mg/일의 투약량은 필요할 수 있다. .

[0485] 본 명세서에서 기재된 바와 같은 병용 요법에서의 각각의 약물의 투여는 독립적으로, 1 일 내지 1년 동안 1 내지 4회일 수 있고, 심지어 대상체의 일생 동안일 수 있다. 만성의 장기간 투여가 나타날 수 있다.

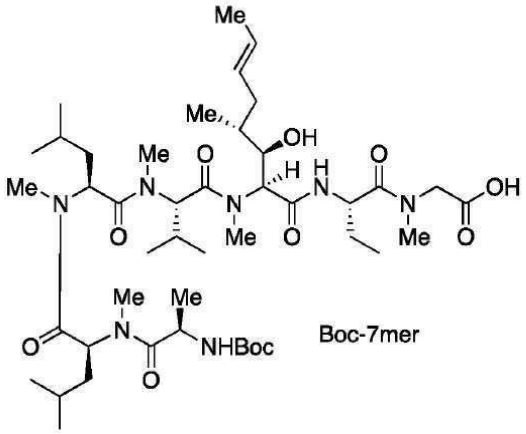
[0486] **실시예**

[0487] **실시예 1: 특정 가교결합 시약의 합성**

[0488] 아크릴아미드-함유 사이클로스포린 유사체의 합성



R4, R6, R7, R7 은 아미노산 측쇄 또는 반응성 워헤드 친전자체 (예를 들어 아크릴아미드 또는 비닐 설폰아미드)이다.



Boc-7mer

[0489]

[0490] 모든 시약 및 용매를 하기로부터 구매하였다: Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltd. Fmoc-아미노산, HATU, HOAT, H-Ala-2-Cl-(Trt) 수지 (0.36 mmol/g), H-Leu-2-Cl-(Trt) 수지 (0.30 mmol/g), H-Phe-2-Cl-(Trt) 수지 (0.35 mmol/g) 및 H-Thr(tBu)-2-Cl-(Trt) 수지 (0.36 mmol/g)을 GL Biochem (Shanghai) Ltd로부터 구매하였다.

[0491] 선형 펩타이드의 커플링은 자동화 합성기에 대한 표준 Fmoc SPSS 절차를 사용하여 수행되었다.

[0492] **일반 방법 A:** 선형 펩타이드를 0.025 mmol의 수지의 크기로 TETRAS™ 합성기를 사용하여 합성하였다. 일반 프로토콜은 하기와 같다: 2 x NMP, 30 s; NMP 중 1 x 20% (vol/vol) 피페리딘, 15 min; 5 x NMP, 30 s; NMP 중아미노산 (3 eq) 용액을 수지를 함유하는 용기에 첨가하였고, 이후 각각 DMF 중의 HATU 및 DIEA의 용액의 첨가를 후속하였고, 45분 동안 커플링시켰다; 3 x NMP, 30 s. 이중 커플링 전략를 모든 아미노산에 대해 적용하였다.

[0493] **일반 방법 B:** Boc-7mer의 부착

[0494] 커플링은 아미노산 커플링에 대한 것과 동일한 일반 프로토콜을 사용하여 TETRAS™ 합성기 상에서 달성되었고, 단, Boc-7mer의 양은 1.5 당량이다. 단 하나의 커플링이 필요로 된다.

[0495] **일반 방법 C:** ivDde 보호기의 제거.

[0496] Dap 측쇄 상의 ivDde 보호기의 제거를 TETRAS™ 합성기 상에서 달성하였다. 일반 프로토콜: NMP 중의 20% (vol/vol) 하이드라진 일수화물의 용액을 수지를 함유하는 용기에 첨가하였다. 용기를 30분 동안 진탕하였다. 수지를 배출하고, 린스하고 5 x 5 mL (30 s)의 NMP로 린스하였다.

[0497] **일반 방법 D:** Dap의 측쇄 아미노기 상의 아크릴산의 부착.

[0498] 커플링은 아미노산 커플링에 대한 것과 동일한 일반 프로토콜을 사용하여 TETRAS™ 합성기 상에서 달성되었다. 이중 커플링 전략을 적용하였다.

[0499] **일반 방법 E:** 측쇄 보호기의 탈보호 및 수지로부터의 최종 절단.

[0500] 전반적인 탈보호 및 수지로부터의 절단은 실온에서 1-2시간 동안 TFA 칵테일에 의해 달성되었다. 절단 칵테일 (TFA/TIPS/H_2O, 95/2.5/2.5) 또는 (TFA/DCM/TIPS, 40: 60: 1)은 최종 절단에 대해 사용될 수 있다. 대부분 용

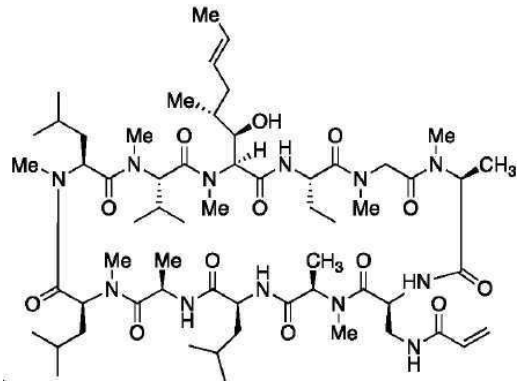
매를 감압 하에서 제거하였고, 잔류물을 진공 하에서 농축하여 미량의 용매를 제거하였다. 수득한 잔류물을 추가 정제없이 직접적으로 다음 고리화에서 사용하였다.

[0501] **일반 방법 F:** 선형 펩타이드의 고리화

[0502] 조 선형 펩타이드를 건조 DCM에 용해시켜 0.1 M의 최종 농도를 얻었다. 이후 HATU (3eq), HOAt (3eq) 및 DIEA (6eq)을 첨가했다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였고, 이후 ESI-LCMS로 모니터링하였다. 용매를 감압 하에서 농축하였고, 잔류물을 NMP에 용해시키고, 분취 HPLC에 의해 정제하였다. 사이클로-펩타이드를 ESI-LCMS에 의해 확인하였다.

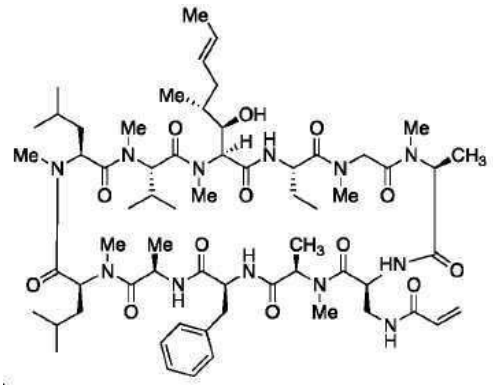
[0503] **역상 HPLC.** 1 mL/min 유량을 사용한 Accucore C18 컬럼 (2.6 μm, 2.1 mm x 50 mm)을 분석적 RP-HPLC를 위해 사용하였다. Xselect Peptide CSH 컬럼 (5um, 19 mm x 150mm)을 분취 RP-HPLC에 대해 사용하였다. 이동상 A: 물 (0.1% 포름산), 이동상 B: ACN; 유량: 20 mL/min; 구배: 16분 내의 25% B 내지 95% B.

[0504] 사이클로[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-LEU]의 합성:

[0505] 

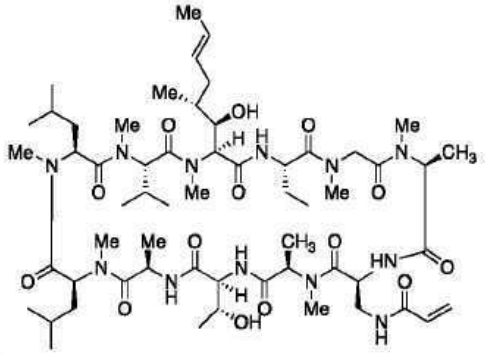
[0506] 선형 펩타이드-사슬 어셈블리를 850 mg의 H-Leu-2-Cl-(Trt) 수지 (0.3 mmol/g, 0.025 mmol 척도)를 사용하여 상기 기재된 일반 방법을 사용하여 수행하였다. D-N-메틸 Ala, Dap 및 L-N-메틸 Ala 잔기를 일반 방법 A를 사용하여 부착하였다. 이후, Boc-7mer를 일반 방법 B와 조합하였다. 측쇄 ivDde 보호기의 제거는 일반 방법 C를 사용하여 달성되었다. 이후 아크릴산을 일반 방법 D를 사용하여 Dap의 측쇄 상의 유리 아미노기 상에 부착하였다. 1 단계 (일반 방법 E)에서의 전반적인 탈보호 및 수지로부터의 절단 이후, 조 선형 펩타이드를 고리화하였다 (일반 방법 F). 최종 분취 HPLC 이후, 17 mg의 최종 화합물은 백색 고형물 (수지 장입에 의해 계산된 56.6%)로서 수득하였다. ESI-MS: $[M+1]^+$=1202, $[M+Na]^+$=1224, $[M/2 + 1]^+$=602.

[0507] 사이클로[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-PHE]의 합성:

[0508] 

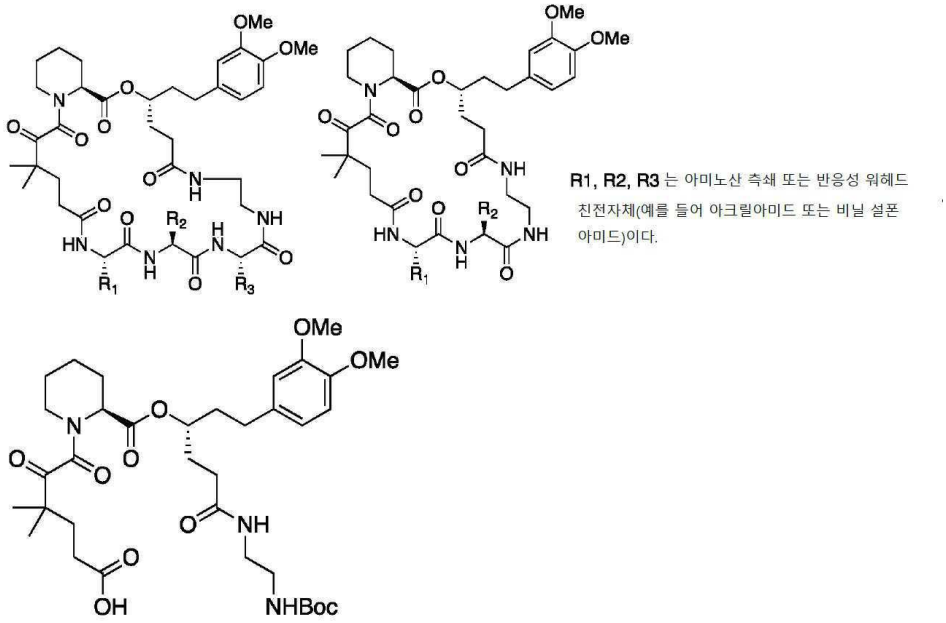
[0509] 2.8 mg의 최종 화합물을 사이클로[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-LEU]의 합성과 유사한 방법을 사용하여 백색 고형물 (수지 장입에 의해 계산된 9.1%)로서 수득하였다. ESI-MS: $[M+1]^+$=1236, $[M+Na]^+$=1258, $[M/2 + 1]^+$=619.

[0510] 사이클로[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-THR]의 합성:

[0511] 

[0512] 3.4 mg의 최종 화합물을 사이클로[7mer-NMALA-Dap-d-nmala-LEU]의 합성과 유사한 방법을 사용하여 백색 고형물(수지 장입에 의해 계산된 11.4%)로서 수득하였다. ESI-MS: $[M+1]^+$=1190, $[M+Na]^+$=1212, $[M/2 + 1]^+$=596.

[0513] 아크릴아미드-함유 FKBP12 리간드의 합성



[0514] Boc-3mer

[0515] 모든 시약 및 용매를 하기로부터 구매하였다: Sinopharm Chemical Reagent Co. Ltd. Fmoc-아미노산, HATU, HOAT, 2-Cl-(Trt)-Cl 수지 (활성 부위에 기초한 0.9 mmol/g) 및 Ala 장입된 2-Cl-(Trt)-Cl 수지 (0.36 mmol/g)을 GL Biochem (Shanghai) Ltd로부터 구매하였다.

[0516] 2-Cl-(Trt)-Cl 수지 상에 제1 아미노산을 부착하기 위해.

[0517] SPSS에 대한 용기에, 5 g의 수지를 40분 동안 50 mL의 건조 NMP에 팽윤시켰다. 수지를 배출하고, 이를 DCM (5 x 30 mL) 그 다음 NMM 2%/DCM (3 x 30 mL)로 린스하였다. 50 mL의 DCM 중의 NMM (4 mmol, 400 mg)과의 Fmoc-Dap(ivDde)-OH (3.0 mmol, 1.6g)의 용액을 첨가하였다. 용기를 밤새 진탕시켰다. 이후, 25% NMM/MeOH의 2 mL의 용액을 첨가하였고, 용기를 1시간 이상 동안 진탕시켰다. 수지를 배출시키고, DCM, NMP, MeOH 및 EtOH (3 x 50 mL 각각)로 린스하였다. 수지를 실온에서 진공 하에 건조시켰다.

[0518] Fmoc 절단 측광 측정 (0.32 mmol/g)에 의해 장입을 측정하였다.

[0519] 선형 펩타이드의 커플링을 자동화 합성기에 대한 표준 Fmoc SPSS 절차를 사용하여 수행하였다.

[0520] **일반 방법 A:** 선형 펩타이드를 0.025 mmol의 수지의 크기로 TETRAS™ 합성기를 사용하여 합성하였다. 하기와 같은 일반 프로토콜: 2 x NMP, 30 s; NMP 중 1 x 20% (vol/vol) 피페리딘, 15 min; 5 x NMP, 30 s; NMP 중 아미노산 (3 eq) 용액을 수지를 함유하는 용기에 첨가하였고, 이후 각각 DMF 중의 HATU 및 DIEA의 용액의 첨가를 후

속하였고, 45분 동안 커플링시켰다; 3 x NMP, 30 s. 이중 커플링 전략을 모든 아미노산에 대해 적용하였다.

[0521] **일반 방법 B:** Boc-3mer의 부착

[0522] 커플링을 아미노산 커플링에 것과 동일한 일반 프로토콜을 사용하여 TETRAS™ 합성기 상에서 달성하였고, 단 Boc-3mer의 양은 1.5 당량이다. 단지 1회의 커플링이 필요하였다.

[0523] **일반 방법 C:** ivDde 보호기의 제거.

[0524] Dap 측쇄 상의 ivDde 보호기의 제거를 TETRAS™ 합성기 상에서 달성하였다. 일반 프로토콜: NMP 중의 20% (vol/vol) 하이드라진 일수화물의 용액을 수지를 함유하는 용기에 첨가하였다. 용기를 30분 동안 진탕하였다. 수지를 배출하고, 린스하고 5 x 5 mL (30 s)의 NMP로 린스하였다.

[0525] **일반 방법 D:** Dap의 측쇄 아미노기 상의 아크릴산의 부착.

[0526] 커플링을 아미노산 커플링에 대한 것과 동일한 일반 프로토콜을 사용하여 TETRAS™ 합성기 상에서 달성하였다. 이중 커플링 전략을 적용하였다.

[0527] **일반 방법 E:** 측쇄 보호기의 탈보호 및 수지로부터의 최종 절단.

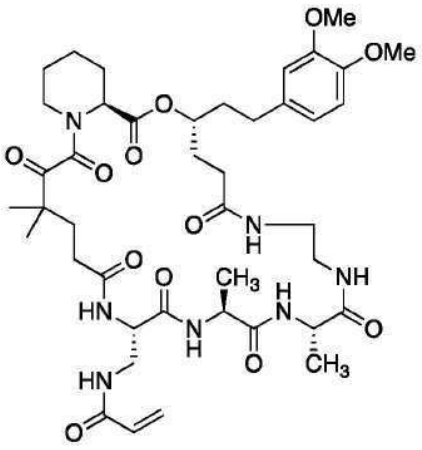
[0528] 전반적인 탈보호 및 수지로부터의 절단은 실온에서 1-2시간 동안 TFA 칵테일에 의해 달성되었다. 절단 칵테일 (TFA/TIPS/H_2O, 95/2.5/2.5) 또는 (TFA/DCM/TIPS, 40:60:1)은 최종 절단에 대해 사용될 수 있다. 대부분 용매를 감압 하에서 제거하였고, 잔류물을 진공 하에서 농축하여 미량의 용매를 제거하였다. 수득한 잔류물을 추가 정제없이 직접적으로 다음 고리화에서 사용하였다.

[0529] **일반 방법 F:** 선형 펩타이드의 고리화

[0530] 조 선형 펩타이드를 건조 DCM에 용해시켜 0.1 M의 최종 농도를 얻었다. 이후 HATU (3eq), HOAt (3eq) 및 DIEA (6eq)을 첨가했다. 반응 혼합물을 밤새 교반하였고, 이후 ESI-LCMS로 모니터링하였다. 용매를 감압 하에서 농축하였고, 잔류물을 NMP에 용해시키고, 분취 HPLC에 의해 정제하였다. 사이클로-펩타이드를 ESI-LCMS에 의해 확인하였다.

[0531] **역상 HPLC.** 1 mL/min 유량을 사용한 Accucore C18 컬럼 (2.6 μm, 2.1 mm x 50 mm)을 분석적 RP-HPLC를 위해 사용하였다. Xselect Peptide CSH 컬럼 (5um, 19 mm x 150mm)을 분취 RP-HPLC에 대해 사용하였다. 이동상 A: 물 (0.1% 포름산), 이동상 B: ACN; 유량: 20 mL/min; 구배: 16분 내의 25% B 내지 95% B.

[0532] 사이클로[디아민-Dap-ALA-ALA]의 합성:

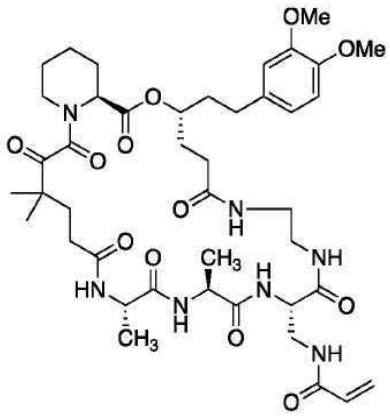


[0533]

[0534] 선형 펩타이드-사슬 어셈블리를 700 mg의 H-Ala-2-Cl-(Trt) 수지 (0.025 mmol 척도)를 사용하여 상술한 일반 방법을 사용하여 수행하였다. Ala 및 Dap 잔류물을 일반 방법 A를 사용하여 축하였다. 이후 Boc-3mer을 일반 방법 B와 조합하였다. 측쇄 ivDde 보호기의 제거는 일반 방법 C를 사용하여 달성되었다. 이후 아크릴산을 일반 방법 D를 사용하여 Dap의 측쇄 상의 유리 아미노기 상에 부착하였다. 1 단계 (일반 방법 E)에서의 전반적인 탈보호 및 수지로부터의 절단 이후, 조 선형 펩타이드를 고리화하였다 (일반 방법 F). 최종 분취 HPLC 이후, 3.1 mg의 최종 화합물을 백색 고형물 (수지 장입에 의해 계산된 14.5%)로서 얻었다. ESI-MS: $[M+1]^+$=857,

$[M+Na]^+$=879.

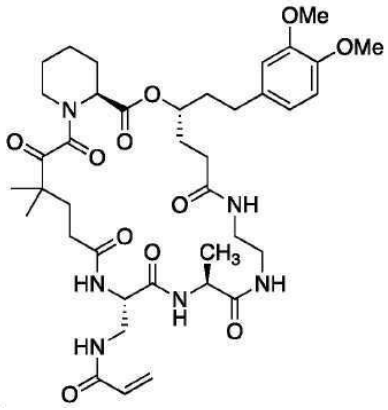
[0535] 사이클로[디아민-ALA-ALA-Dap]의 합성



[0536]

[0537] 2.2 mg의 최종 화합물을 사이클로[디아민-Dap-ALA-ALA]의 합성에 대한 것과 유사한 방법을 사용하여 백색 고형물 (수지 장입에 의해 계산된 10.3%)로서 수득하였다. ESI-MS: $[M+1]^+$=857, $[M+Na]^+$=879.

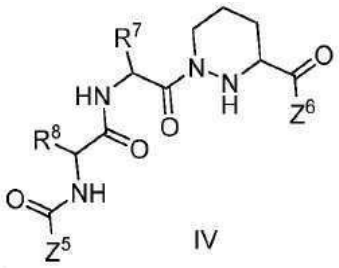
[0538] 사이클로[디아민-Dap-ALA]의 합성:



[0539]

[0540] 2.7 mg의 최종 화합물을 사이클로[디아민-Dap-ALA-ALA]의 합성에 대한 것과 유사한 방법으로 백색 고형물 (수지 장입에 의해 계산된 12.6%)로서 수득하였다. ESI-MS: $[M+1]^+$=786.

[0541] 산글페린 유사체의 합성:

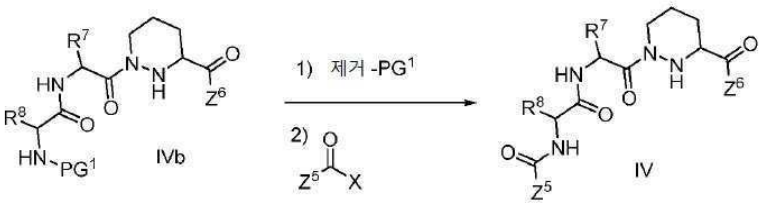


IV

[0542]

[0543] 방법 A를 반응식 1에서 하기에 나타난 바와 같은 화학식 IV의 화합물을 제조하기 위해 사용하였다.

[0544] 반응식 1

[0545] 

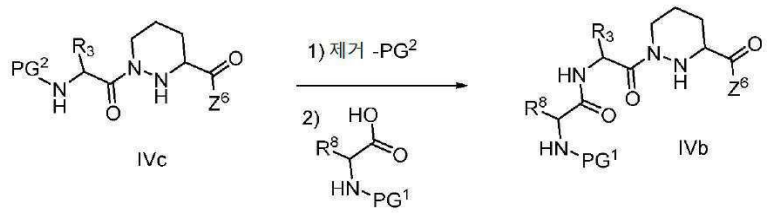
[0546] 식 중, R^7, R^8, Z^5, 및 Z^6는 하기에 정의되어 있고, PG^1은 비제한적으로 Boc, Cbz, Alloc, 및 Fmoc를 포함하는 적합한 아민 보호기이고, X는 OH, Cl, F, 또는 치환 또는 치환 이후의 활성화에 대해 적합한 일부 다른 기이다.

[0547] 통상적인 절차에서, 보호된 아민 IV는 당해 분야의 숙련가에게 익숙한 적절한 시약과 반응하여 보호기 PG^1가 제거된다. 단리된 조 생성물은 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 아실화제 $Z^5C(O)X$와 반응될 수 있다. 산 및 아민 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기의 존재 하에 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함) 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함)에서 커플링제와 배합된다.

[0548] 대안적으로, 탈보호된 아민은 X가 -78℃ 내지 약 120 ℃, 바람직하게는 -20 ℃ 내지 50 ℃의 온도에서 염기(비제한적으로 피리딘, DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함)의 존재 하에 적합한 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, DME, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함) 중의 할로겐인 경우 아실화제 시약 $Z^5C(O)X$과 직접적으로 반응될 수 있다.

[0549] 반응식 1의 화학식 IVb의 화합물은 반응식 2에서 하기에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다.

[0550] 반응식 2

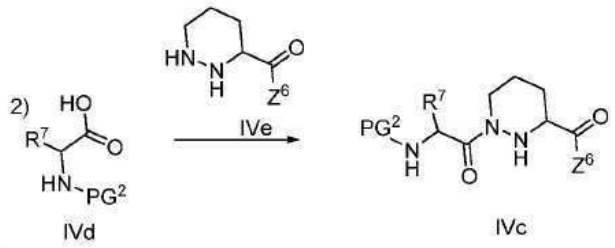
[0551] 

[0552] 식 중, R^7, R^8, 및 Z^6는 앞서 정의된 바와 같고, PG^1 및 PG^2는 비제한적으로 Boc, Cbz, Alloc, 및 Fmoc를 포함하는 각각의 독립적으로 적합한 아민 보호기이다.

[0553] 통상적인 절차에서, 보호된 아민 IVc는 당해 분야의 숙련가에게 익숙한 적절한 시약과 함께 반응되어 보호기 PG^2를 제거하여 상응하는 아민을 생성하고, 이는 이후 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 적절한 아미노산과 반응된다. 산 및 아민 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기의 존재에서 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함) 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함)에서의 커플링제와 조합되어 화학식 IVb의 화합물을 전달한다.

[0554] 반응식 2의 화학식 IVc의 화합물은 반응식 3에서 하기에 나타나나 바와 같이 제조될 수 있다.

[0555] 반응식 3



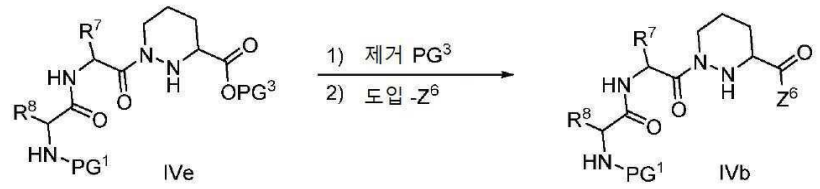
[0556]

[0557] 식 중, R^7 및 Z^6은 앞서 정의된 바와 같고, PG^2 는 비제한적으로 Boc, Cbz, Alloc, 및 Fmoc를 포함하는 적합한 아민 보호기이다.

[0558] 통상적인 절차에서, 보호된 아민 IVd는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 피페라직산 유도체 IVe와 반응된다. 산 및 아민 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함)의 존재 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함) 중에서 커플링제와 조합된다.

[0559] 대안적으로, 화학식 IVb의 화합물은 반응식 4에 기재된 바와 같이 화학식 II-B의 화합물로부터 합성될 수 있다.

[0560] 반응식 4



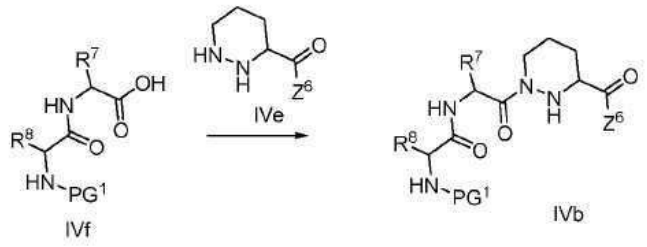
[0561]

[0562] 식 중, R^7, R^8, 및 Z^6는 앞서 정의된 바와 같고, PG^1 은 비제한적으로 Boc, Cbz, Alloc, 및 Fmoc를 포함하는 적합한 아민 보호기이고, PG^3는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 방법에 의해 제거될 수 있는 메틸, 에틸, 벤질, 알릴, 페닐 등을 비제한적으로 포함하는 알킬 또는 아릴기이다.

[0563] 통상적인 절차에서, 화합물 IVe는 물이 있거나 없는 유기 (예를 들어, 메탄올, THF, 디옥산)이 포함된 용매계에서 염기 (예를 들어, 수산화리튬, 수산화나트륨, 탄산나트륨)를 사용하여 가수분해 조건 하에 실온에서 반응된다. PG^3의 동일성에 따라, PG^3의 제거는 또한 적절한 촉매를 사용하는 수소화분해 조건 하에서, 또는 팔라듐 촉매, 예를 들어 $Pd(PPh_3)_4$ 및 염기성 포착제 (예를 들어, 피페리딘, 모폴린, 피페리딘)를 사용하는 탈-알릴화 조건 하에 일어날 수 있는 것으로 당해 분야의 숙련가에게 이해될 것이다. 생성된 카복실산을 얻기 위한 탈보호 이후에, Z^6은 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 도입될 수 있다. 카복실산 및 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함)의 존재 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함)에서 커플링제와 조합되어 생성물 IVb를 생성한다.

[0564] 대안적으로, 화학식 IVb의 화합물은 반응식 5에서 하기에 나타난 바와 같이 합성될 수 있다.

[0565] 반응식 5

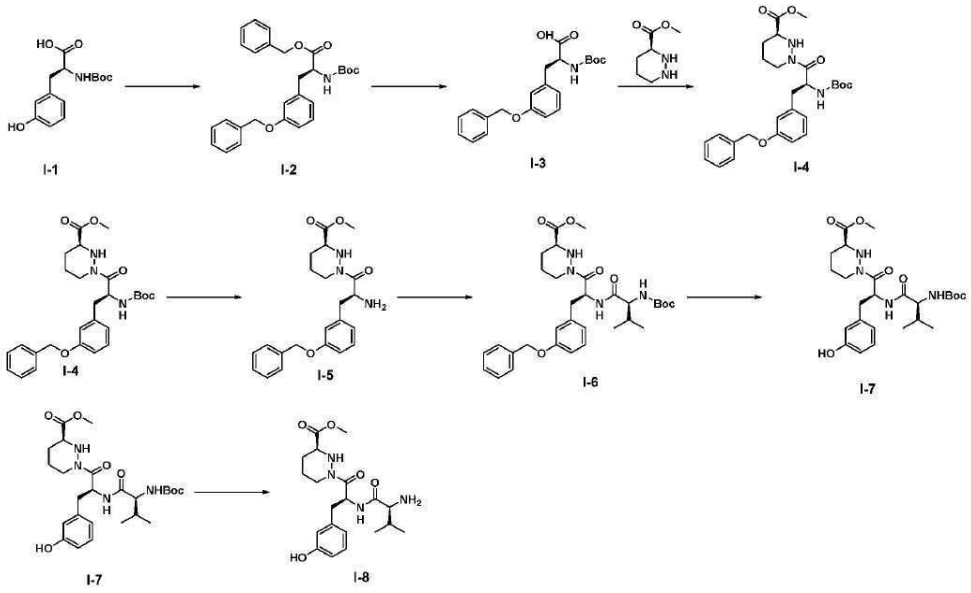


[0566]

[0567] 식 중, R^7, R^8, 및 Z^6은 앞서 정의된 바와 같고, PG^1은 비제한적으로 Boc, Cbz, Alloc, 및 Fmoc를 포함하는 적합한 아민 보호기이다.

[0568] 통상적인 절차에서, 보호된 아민 VI는 당해 분야의 숙련가에 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 시약 V와 반응된다. 산 및 아민 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, NMM 포함)의 존재 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함)에서의 커플링제와 조합된다.

[0569] 중간체 I-8의 합성



[0570]

[0571] DMF (13 mL) 중의 **중간체 I-1** (2.00 g, 7.11 mmol)의 실온 용액에 25 ℃에서 탄산세슘 (4.75 g, 14.58 mmol) 및 벤질 브로마이드 (2.49 g, 14.58 mmol, 1.73 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하고, 이후 에틸 아세테이트 (100 mL)로 희석하고, 염수 (50 mL x 3)로 세정하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농추하여 조 잔류물을 얻었다. 조 생성물을 실리카겔 (용출액: 석유 에테르/에틸 아세테이트 → 20: 1 내지 10: 1)을 사용하는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 무색 오일로서 **중간체 I-2** (3.20 g, 96% 수율)를 얻었다. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 - 7.30 (m, 10 H), 7.20 - 7.10 (m, 1 H), 6.95 - 6.85 (m, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 6.70 - 6.60 (m, 1 H), 5.20 - 5.10 (m, 2 H), 4.99 (s, 2 H), 4.70 - 4.60 (m, 1 H), 3.15 - 3.05 (m, 2 H), 1.43 (s, 9 H). ESI-MS m/z = 484.1 $[M+Na]^+$; 계산치 MW: 461.55.

[0572] 테트라하이드로푸란 (15 mL) 중의 **중간체 I-2** (3.20 g, 6.93 mmol)의 용액에 0 ℃에서 수산화리튬 (수중 1 M, 10 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 0 ℃에서 HCl (수중 1 M)로 pH~6로 조정하였고, 에틸 아세테이트 (100 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (20 mL)로 세정하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에 농축하여 조 잔류물을 얻었다. 조 생성물을 수성 중탄산나트륨 (7 mL)에 용해시켰고, MTBE (100 mL x 3)로 추출하였다. 수성층을 염산 (H_2O 중 1 M)으로 pH~6로 조정하였고, 에틸 아세테이트 (50 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (50 mL)로 세정하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축하여 무색 오일로서 **중간체 I-3** (2.27 g, 88% 수율)를

수득하였다. ^{1}HNMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.45 - 7.30 (m, 5 H), 7.25 - 7.18 (m, 1 H), 6.90 - 6.85 (m, 1 H), 6.83 - 6.75 (m, 2 H), 5.05 (s, 2 H), 4.94 (d, J=8.00 Hz, 1H), 4.60 - 4.50 (m, 1 H), 3.20 - 3.12 (m, 1 H), 3.10 - 3.00 (m, 1 H), 1.43 (s, 9 H). ESI-MS m/z = 394.3 $[M+Na]^{+}$; 계산치 MW: 371.43

[0573] 디클로로메탄 (15 mL) 중의 **중간체 I-3** (888 mg, 2.39 mmol)의 용액에 0℃에서 N-메틸 모폴린 (967 mg, 9.56 mmol), HOBt (65 mg, 478 umol), TFA 염 (890 mg, 2.39 mmol)으로서 (S)-메틸 헥사하이드로피리다진-3-카복실레이트, 및 EDCI (917 mg, 4.78 mmol)에 첨가하였다. 반응 혼합물을 0 ℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄 (50 mL)으로 희석하였고, 5% 수성 시트르산으로 pH~6로 조정하였다. 수성층을 디클로로메탄 (20 mL x 2)으로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (50 mL)로 세정하였고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시켰고, 감압 하에서 농축하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 실리카겔 (용출액: 석유 에테르/에틸 아세테이트 → 10: 1, 5: 1 내지 3: 1)을 사용하여 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 무색 오일로서 **중간체 I-4** (910 mg, 77% 수율)를 수득하였다. ^{1}HNMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.50 - 7.35 (m, 5 H), 7.20 - 7.13 (m, 1 H), 6.90 - 6.80 (m, 3 H), 5.60 - 5.50 (m, 1 H), 5.30 - 5.20 (m, 1 H), 5.05 - 5.00 (m, 2 H), 4.40 - 4.30 (m, 1 H), 3.65 (s, 3 H), 3.55 (d, J=11.20 Hz, 1H), 3.00 - 2.93 (m, 1 H), 2.90 - 2.80 (m, 1 H), 2.75 - 2.65 (m, 1 H), 2.35 - 2.25 (m, 1 H), 1.80 - 1.72 (m, 2 H), 1.42 (s, 9 H). ESI-MS m/z = 520.1 $[M+Na]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 497.58.

[0574] 에틸 아세테이트 (4 mL) 중의 **중간체 I-4** (450 mg, 904 umol)의 용액에 0 ℃에서 에틸 아세테이트 (4 M, 8.00 mL) 중의 염산을 첨가하였다. 반응 혼합물을 25 ℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에서 농축하여 밝은 황색 고체로서 **중간체 I-5** (390 mg, 100% 수율)의 HCl 염을 수득하였다. ESI-MS m/z = 398.0 $[M+H]^{+}$, 420.0 $[M+Na]^{+}$, 계산치 MW: 397.47.

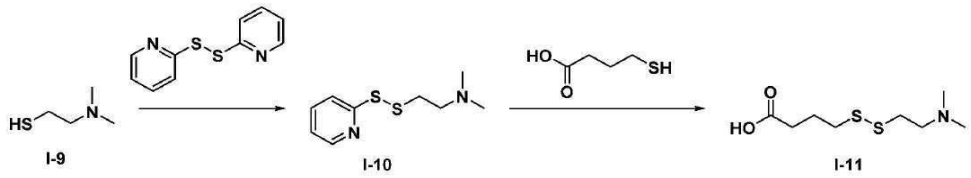
[0575] 디클로로메탄 (5.00 mL) 중의 **중간체 I-5** (195 mg, 899 umol)의 용액에 0 ℃에서 N-메틸모폴린 (273 mg, 2.70 mmol), HOBt (24.29 mg, 179.75 umol), (S)-메틸 1-((S)-2-아미노-3-(3-(벤질옥시)페닐)프로파노일)헥사하이드로피리다진-3-카복실레이트의 HCl 염 (390 mg, 899 umol) 및 EDCI (345 mg, 1.80 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 0 ℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄 (20 mL)로 희석하고, 5% 수성 시트르산으로 pH~6으로 조정하였다. 수성층을 디클로로메탄 (20 mL x 2)으로 추출하였다. 조합된 유기층을 염수 (20 mL)로 세정하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 감압 하에서 농축하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 실리카겔 (용출액: 석유 에테르/에틸 아세테이트 → 5: 1, 2: 1, 1: 1)을 사용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 백색 고체로서 **중간체 I-6** (750 mg, 70% 수율)를 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.50 - 7.35 (m, 5 H), 7.23 - 7.15 (m, 1 H), 6.90 - 6.80 (m, 3 H), 6.13 - 6.08 (m, 1 H), 5.83 - 5.73 (m, 1 H), 5.10 - 5.00 (m, 3 H), 4.30 - 4.20 (m, 1 H), 4.00 - 3.90 (m, 1 H), 3.65 (s, 3 H), 3.50 (d, J=11.20 Hz, 1H), 3.05 - 2.97 (m, 1 H), 2.93 - 2.83 (m, 1 H), 2.80 - 2.70 (m, 1 H), 2.35 - 2.25 (m, 1 H), 2.15 - 2.10 (m, 1 H), 1.75 - 1.65 (m, 4 H), 1.45 (s, 9 H), 0.94 (d, J=6.80 Hz, 3H), 0.88 (d, J=6.80 Hz, 3H). ESI-MS m/z = 597.1 $[M+H]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 596.71.

[0576] 메탄올 (300 mL) 중의 **중간체 I-6** (3.00g, 6.03 mmol)의 용액에 질소 분위기 하에서 탄소 상의 팔라듐 (2 그램, 10% 장입)을 첨가하였다. 현탁액을 탈기시키고, 수소 가스로 퍼징하고, 혼합물을 3 시간 동안 20 ℃에서 수소 (1 atm) 하에 교반하였다. 혼합물을 여과시키고, 감압 하에서 농축하여 백색 고체로서 **중간체 I-7** (2.3 g, 5.64 mmol, 94% 수율)을 얻었다. ESI-MS m/z = 430.1 $[M+Na]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 407.46

[0577] 디옥산 (10 mL) 중의 **중간체 I-7** (2.3 g, 5.64 mmol)의 혼합물에 20℃에서 한번에 디옥산 (4 M, 30 mL) 중의 염산을 첨가하였다. 혼합물을 3시간 동안 20 ℃에서 교반하였다. 혼합물을 포화된 수성 $NaHCO_3$로 pH ~7-8로 조정하였고, 에틸 아세테이트 (100 mL x 3)로 추출하였다. 조합된 유기상을 염수 (100 mL x 2)로 세정하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 및 진공 중에서 농축시켜 밝은 황색 고체으로 **중간체 I-8** (1.3 g, 3.63 mmol, 64% 수율, 86% 순도)을 얻었다. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.15-7.02 (m, 1 H), 6.75-6.5 (m, 3 H), 4.90-4.77 (m, 1 H), 4.50-4.37 (m, 1 H), 4.00-3.90 (m, 1 H), 3.80-3.70 (m, 1 H), 3.68-3.65 (m, 3 H), 2.95-2.80 (m, 1 H), 2.77-2.62 (m, 2 H), 2.50-2.35 (m, 1 H), 1.97-1.85 (m, 1 H), 1.82-1.70 (m, 1

H), 1.60 - 1.45 (m, 1 H), 1.42-1.28 (m, 1 H). ESI-MS m/z = 308.2 $[M+Na]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 307.34.

[0578] 중간체 I-11의 합성

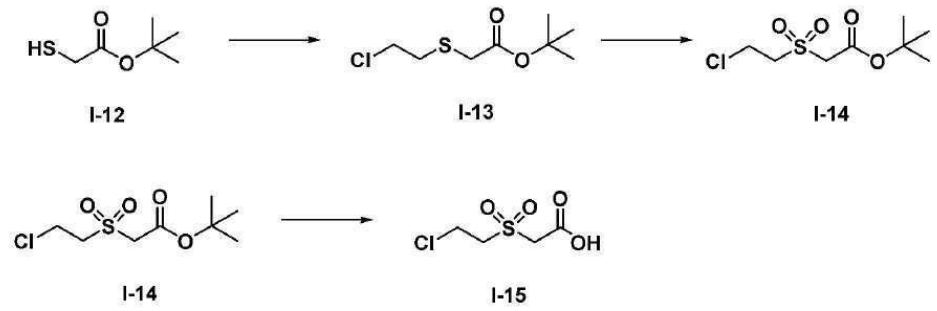


[0579]

[0580] 메탄올 (10 mL) 중의 2-(디메틸아미노)에탄티올 **I-9** (500 mg, 3.53 mmol)의 용액에 0 ℃에서 메탄올 (10 mL) 중의 1,2-디(피리딘-2-일)이황화물 (1.17 g, 5.3 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 25 ℃에서 15 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 (용출액: 석유 에테르/에틸 아세테이트 → 3: 1, 1: 1, 그 다음 디클로로메탄/에틸 아세테이트 → 2: 1, 그 다음 디클로로메탄/메탄올 → 10: 1)으로 정제하였고, 이를 이전의 배치와 조합하여 밝은 황색 고체로서 **중간체 I-10** (1.05 g, 58% 수율)를 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.56 (d, J=4.0 Hz, 1 H), 7.85-7.75 (m, 1 H), 7.69 (d, J=8.0 Hz, 1 H), 7.36-7.26 (m, 1 H), 3.48-3.40 (m, 2 H), 3.28-3.20 (m, 2 H), 2.93 (s, 6 H). ESI-MS m/z = 214.9 $[M+H]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 214.35.

[0581] 메탄올 (1 mL) 중의 4-머캅토부탄산 (50 mg, 416 umol)의 용액에 25 ℃에서 메탄올 (1.5 mL) 중의 **중간체 I-10** (125 mg, 499 umol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 25 ℃에서 15 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 저압에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 (용출액: 석유 에테르/에틸 아세테이트 → 2: 1, 1: 1, 이후 디클로로메탄/메탄올 → 10: 1)을 사용하여 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 백색 검으로서 **중간체 I-11** (80 mg, 86% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 3.55-3.45 (m, 2 H), 3.08-3.00 (m, 2 H), 2.93 (s, 6H), 2.83 (t, J=7.2 Hz, 2 H), 2.43 (t, J=7.2 Hz, 2 H), 2.05-1.94 (m, 2 H).

[0582] 중간체 I-15의 합성



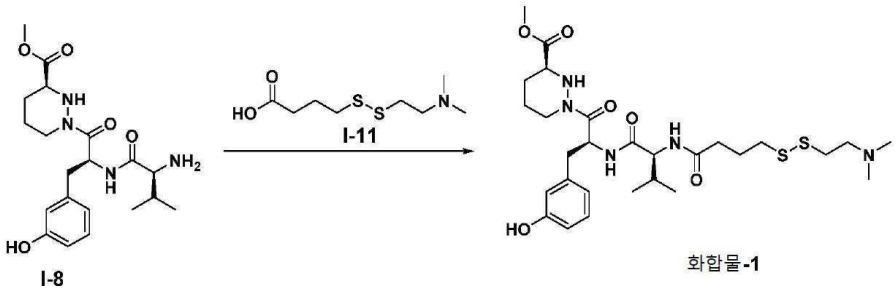
[0583]

[0584] N,N-디메틸포름아미드 (15 mL) 중의 tert-부틸 2-머캅토아세테이트 **I-12** (800 mg, 5.4 mmol)의 용액에 탄산칼륨 (1.49 g, 10.8 mmol) 및 1-브로모-2-클로로에탄 (2.32 g, 16.2 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 25 ℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트 (100 mL)로 희석하여 물 (50 mL x 3)로 세정하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜 무색 오일로서 **중간체 I-13** (1.00 g, 79% 수율)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.64 - 3.71 (m, 2 H), 3.14 - 3.17 (m, 2 H), 2.95 - 3.01 (m, 2 H), 1.47 (s, 9 H).

[0585] 디클로로메탄 (10 mL) 중의 **중간체 I-13** (1.00 g, 4.75 mmol)의 용액에 0 ℃에서 디클로로메탄 (10 mL) 중의 m-CPBA (4.61 g, 21.4 mmol, 80% 순도)의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온시키고, 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 디클로로메탄 (80 mL)으로 희석시키고, 포화된 수성 아황산나트륨 (50 mL) 및 포화된 수성 중탄산나트륨 (50 mL)으로 세정하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜 조 잔류물을 얻었고, 이를 실리카겔 크로마토그래피 (용출액: 석유 에테르/에틸 아세테이트 → 5/1)로 정제하여 무색 오일로서 **중간체 I-14** (700 mg, 60% 수율)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.99 (s, 2 H), 3.90 - 3.95 (m, 2 H), 3.69 - 3.75 (m, 2 H), 1.50 - 1.53 (m, 9 H).

[0586] 디클로로메탄 (12 mL) 중의 **중간체 I-14** (650 mg, 2.68 mmol)의 용액에 트리플루오로아세트산 (6.00 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 45 ℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 이후, 혼합물을 농축시켜 백색 고체로서 **중간체 I-15** (360.00 mg, 72% 수율)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 4.34 (s, 2 H), 3.89 - 4.01 (m, 2 H), 3.71 - 3.81 (m, 2 H).

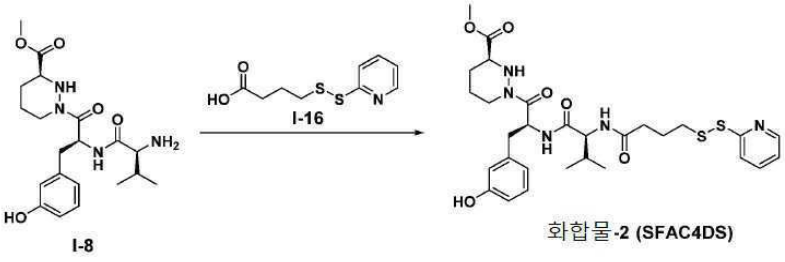
[0587] 화합물-1의 합성



[0588]

[0589] 디클로로메탄 (1.5 mL) 중의 **중간체 I-8** (31 mg, 119 umol) 및 **중간체 I-11** (44 mg, 99 umol)의 HCl 염의 용액에 HOBt (1.34 mg, 9.9 umol), N-메틸모폴린 (38.2 μL) 및 EDCI (27 mg, 139 umol)을 첨가하였다. 혼합물을 25 ℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄 (10 mL)로 희석하고, 물 (5 mL)로 세정하였다. 수성층을 디클로로메탄 (5 mL x 2)으로 추출하였다. 조합된 유기층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 및 농축했다. 잔류물을 역상 HPLC (HCl 첨가제)에 의해 정제하여, 역상 HPLC (HCOOH 첨가제)를 사용하여 재정제하고, 동결건조시켜 밝은 황색 오일로서 **화합물-1** (5.8 mg, 9% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR (400MHz, MeOD) δ 8.53 (br. s. , 1 H), 7.12-7.04 (m, 1 H), 6.72-6.62 (m, 3H), 5.75 -5.65 (m, 1 H), 4.20-4.10 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.08- 3.00 (m, 2H), 2.95-2.76 (m, 5 H), 2.76-2.70 (m, 2 H), 2.60 (s, 6 H), 2.42-2.32 (m, 3 H), 2.10-1.98 (m, 3 H),1.85-1.70 (m, 2 H), 1.55-1.40 (m, 2 H), 1.02-0.85 (m, 6 H). ESI-MS m/z = 612.1 $[M+H]^+$, 634.5 $[M+Na]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 611.82.

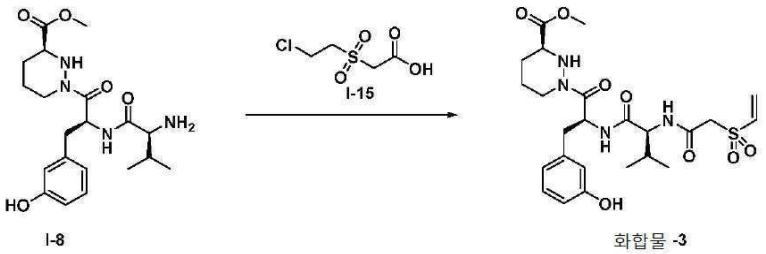
[0590] 화합물-2 (SFAC4DS)의 합성



[0591]

[0592] 디클로로메탄 중의 **중간체 I-8** (27 mg, 60 umol)의 용액을 N,N-디이소프로필에틸아민 (24 mg, 180 umol), **중간체 I-16** (14 mg, 60 umol), HOBt (1.6 mg, 2 umol) 및 이후 마지막으로 EDCI (18mg, 90 umol)로 처리하였다. 15 시간 동안 교반한 이후, 용액을 물 및 에틸 아세테이트에 부었다. 층을 분리하였고, 수성층을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 및 용매를 진공 중에서 제거하였다. 역상 HPLC (0.1% 포름산과 함께 물 중의 아세토니트릴)에 의해 정제하고, 동결 건조하여 백색 고체로서 **화합물-2 (SFAC4DS)** (16mg, 42% 수율)를 얻었다. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) 8.47 (d, 1H), 8.16 (br s, 1H), 7.69-7.66 (m, 1H), 7.63-7.60 (m, 1H), 7.13 (app t, 1H), 7.09-7.05 (m, 1H), 5.85-5.79 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.31 (br s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.42 (d, 1H), 3.00 (dd, 1H), 2.87-2.78 (m, 3H), 2.52-2.43 (m, 2H), 2.28 (br s, 1H), 2.14 -2.04 (m, 3H), 1.83-1.73 (m, 2H), 1.62-143 (m, 5H), 0.95 (d, 3H), 0.90 (d, 3H). ESI-MS m/z = 617.9 $[M+H]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 617.78.

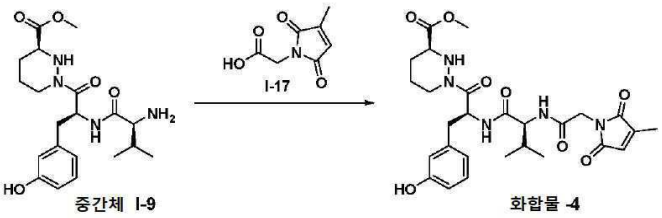
[0593] 화합물-3의 합성



[0594]

[0595] DCM (0.75 mL) 중의 **중간체 I-15** (31.8 mg, 0.17 mmol)의 HCl 염, HOBt (2.3 mg, 0.017 mmol) 및 NMM (54 μL, 0.54 mmol)의 용액에 실온에서 **I-8**의 HCl 염 (86mg, 0.17 mmol,) 및 EDCI (76 mg, 0.34 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온 2 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 디클로로메탄 (2 mL)으로 희석하였고, 시트르산 (pH~3, 2 mL), 포화된 수성 중탄산나트륨 (2 mL), 및 포화된 수성 염화나트륨 (2 mL)으로 세정하였고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 및 15℃에서 감압 하에서 농축하여 황색 오일로서 생성물을 얻었다. 잔류물을 하기에 의해 정제하였고: 실리카겔을 사용한 분취-TLC (용출액: DCM/MeOH → 10: 1) 이어서 분취 HPLC (칼럼: Phenomenex Gemini C18 250 x 50 10u; 이동상: [물 (0.225%FA)-ACN]; B%: 26%-56%, 11.2 min), 백색 고체로서 **화합물-3** (8.5 mg, 8% 수율)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.02 (s, 1 H), 8.80 (s, 1 H), 8.42 (s, 1 H), 7.01 - 7.08 (m, 1 H), 6.82 (dd, J=16.3, 9.9 Hz, 1 H), 6.74 (d, J=7.5 Hz, 1 H), 6.64 - 6.70 (m, 2 H), 6.36 (d, J=16.5 Hz, 1 H), 6.12 - 6.16 (m, 2 H), 4.81 - 4.85 (m, 1 H), 4.40 - 4.46 (m, 2 H), 4.21 - 4.25 (m, 1 H), 4.09 - 4.13 (m, 1 H), 3.57 (s, 3 H), 2.81 - 3.08 (m, 2 H), 2.63 - 2.65 (m, 1 H), 2.15 - 2.19 (m, 1 H), 1.21 - 1.60 (m, 4 H), 0.88 - 0.92 (m, 6 H). ESI-MS m/z = 539.1 $[M+H]^{+\cdot}$ 계산치 MW: 538.61.

[0596] 화합물-4의 합성

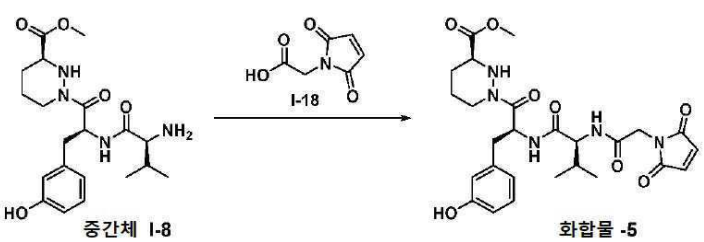


[0597]

[0598] **화합물-4**를 개시 물질로서 중간체 I-8 (34 mg, 77 umol)의 HCl 염 및 **2-(3-메틸-2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-파이롤-1-일)아세트산 I-17** (13 mg, 77 umol)을 사용하여 **화합물-3** 의 제조시 기재된 바와 같이 제조하였다.

수득한 조 생성물을 이전에 합성된 조 물질과 조합시키고, 정제하여 동결건조 이후에 백색 고형물로서 **화합물-4** (29.0 mg, 51.28 umol, 45% 수율)를 얻었다. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.55-8.40 (s, 1 H), 8.20-8.07 (m, 1 H), 7.10-6.97 (m, 2 H), 6.80-6.73 (m, 1 H), 6.73-6.63 (m, 1H), 6.63-6.50 (m, 1 H), 6.47-6.37 (m, 1 H), 5.90-5.75 (m, 1 H), 4.80-4.67 (m, 1 H), 4.35-4.15 (m, 3 H), 3.70-3.57 (m, 3 H), 3.45-3.30 (d, 1 H), 3.10-3.00 (m, 1 H), 3.00-2.70 (m, 2 H), 2.20-2.00 (m, 5 H), 1.85-1.60 (m, 2 H), 1.60-1.45 (m, 1 H), 1.45-1.30 (m, 1 H), 1.05-0.80 (m, 6 H). ESI-MS m/z = 558.3 $[M+H]^+$; 계산치 MW: 557.60.

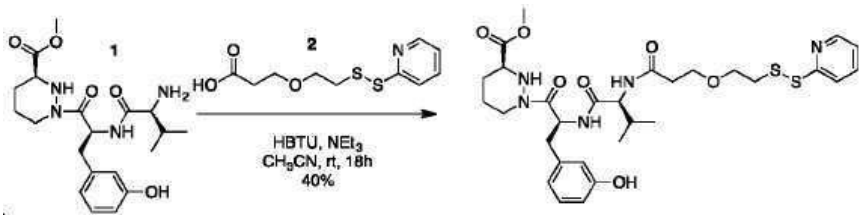
[0599] 화합물-5의 합성



[0600]

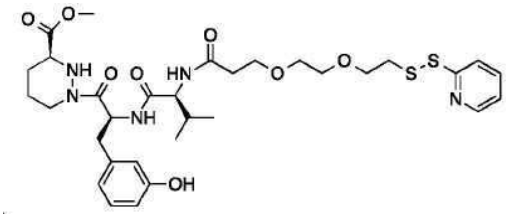
[0601] **화합물-5**를 개시 물질로서 **중간체 I-8**의 HCl 염(34 mg, 77 umol) 및 **2-(2,5-디옥소-2,5-디하이드로-1H-파이롤-1-일)아세트산 I-18** (13 mg, 77 umol)을 사용하여 **화합물-3**의 제조시 기재된 바와 같이 제조하여 **화합물-5**를 얻었다. ESI-MS m/z = 544.0 $[M+H]^+$; 계산치 MW: 543.58.

[0602] 메틸 (S)-1-((S)-3-(3-하이드록시페닐)-2-((S)-3-메틸-2-(3-(2-(피리딘-2-일디설파닐)에톡시)프로판아미도)부탄아미도)프로파노일)헥사하이드로피리다진-3-카복실레이트 (SFAX6)의 합성:

[0603] 

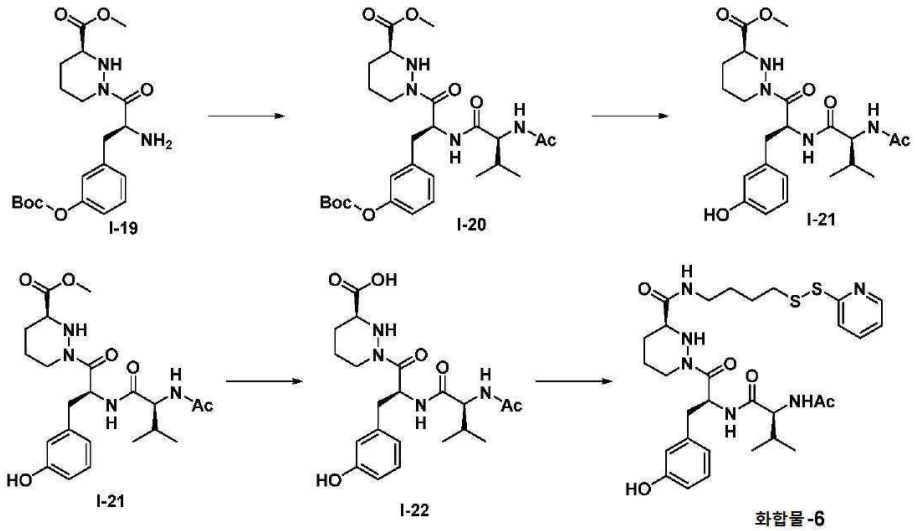
[0604] 카복실산 **2** (70mg, 0.270mmol) 및 HBTU (204mg, 0.540mmol, 2.00eq)을 3mL의 아세토니트릴에서 혼합하였고, 생성된 현탁액을 15분 동안 실온에서 교반하였다. 이러한 기간 이후, 아민 **1** (중간체 I-8) (110mg, 0.270mmol, 1.00eq), 이후 트리에틸아민 (113 μL, 0.810mmol, 3.00eq)을 첨가하였고, 혼합물을 18시간 동안 실온에서 교반하였다. 혼합물을 이후 20Ml의 포화된 중탄산나트륨로 처리하였고, 2x30mL 회분의 에틸 아세테이트로 추출하였다. 수집된 유기 추출물을 2x20mL 회분의 염수로 세정하고, 포화된 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과시키고, 진공 하에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피를 사용하여 정제하였고, 디클로로메탄: MeOH, 100 : 1 내지 50 : 1로 용출시켜 무색 오일로서 70mg (40%)의 생성물을 수득하였다. R_f =0.31 (디클로로메탄: MeOH, 20 : 1). MS (ESI) calc=648.2 (M+H), obs = 648.2.

[0605] **SFAX9DS의 합성:**

[0606] 

[0607] SFAX9DS를 SFAX6의 합성에 대해 상기 기재된 유사한 절차에 따라 합성하였다.

[0608] 화합물-6의 합성

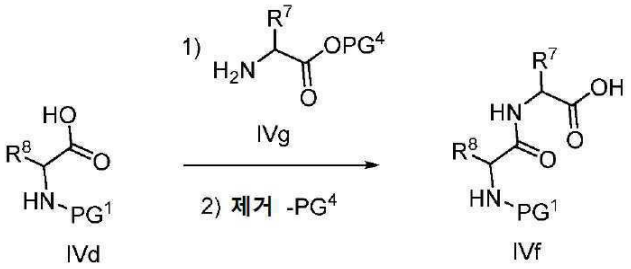
[0609] 

[0610] **화합물-6**을 **중간체 I-19**를 사용하여 출발하여 제조하여 **화합물-6**를 얻었다. ESI-MS m/z = 631.0 $[M+H]^+$; 계산치 MW: 630.82.

[0611] 화학식 IVf의 화합물의 합성

[0612] 화학식 IVf의 화합물의 합성을 반응식 6에서 하기에 나타낸 바와 같이 합성될 수 있다.

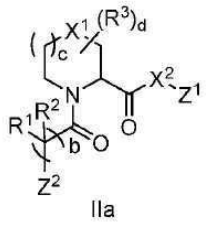
[0613] 반응식 6



[0614]

[0615] 식 중, R^7, R^8, 및 Z^6는 앞서 정의된 바와 같고, PG^1 은 비제한적으로 Boc, Cbz, Alloc, 및 Fmoc를 포함하는 적합한 아민 보호기이고, PG^4는 당해 분야의 숙련가에 대해 알려진 방법에 의해 제거될 수 있는 메틸, 에틸, 벤질, 알릴, 및 페닐을 비제한적으로 포함하는 알킬 또는 아릴기이다.

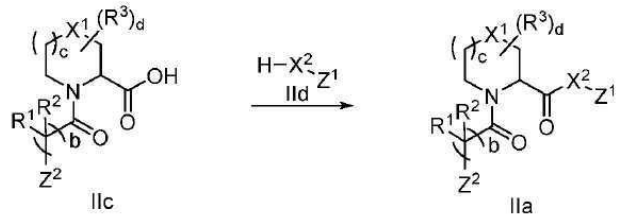
[0616] 통상적인 절차에서, 화합물 IVd는 당해 분야의 숙련가에게 익숙한 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 시약 IVg과 반응된다. 산 및 아민 커플링 파트너를 실온 또는 약간 고온에서 염기 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함)의 존재 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함) 중에서 커플링제와 조합하였다. 아미드 형성 이후, 보호기 PG^4를 이후 화학식 IVe의 화합물의 PG^3의 제거를 위해 기재된 조건을 사용하여 제거한다 (반응식 4).



[0617]

[0618] 방법 B는 반응식 7에서 하기에 나타난 바와 같이 화학식 IIa의 화합물을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0619] 반응식 7



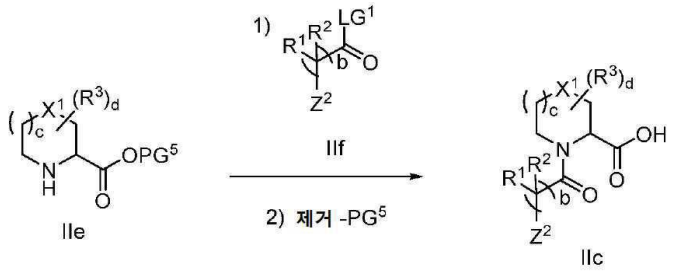
[0620]

[0621] 식 중, R^1, R^2, R^3, X^1, X^2, Z^1 및 Z^2 은 앞서 정의된 바와 같다.

[0622] 통상적인 절차에서, 카복실산 IIc는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 중간체 XI와 반응된다. 산 IIc 및 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함)의 존재 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, DCE, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함) 중에서 커플링제와 조합된다.

[0623] 화학식 IIc의 화합물은 반응식 8에서 하기에 나타난 바와 같이 합성될 수 있다.

[0624] 반응식 8



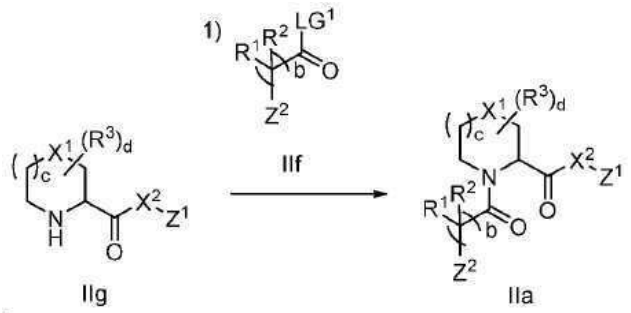
[0625]

[0626] 식 중, R^1, R^2, R^3, X^1, 및 Z^2는 앞서 정의된 바와 같고, PG^5는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 방법에 의해 제거될 수 있는 메틸, 에틸, 벤질, 알릴, 및 페닐을 비제한적으로 포함하는 알킬 또는 아릴기이고, LG^1은 화합물 IIe의 아민에 의해 활성화되고 대체될 수 있는 OH와 같은 기이다. 대안적으로, LG^1은 친핵체에 의해 대체될 수 있는 적절한 할라이드 (예컨대 F, Cl, 및 Br)일 수 있다.

[0627] 통상적인 절차에서, IIe는 -78℃ 내지 120 ℃, 그러나 최적으로는 -20 ℃ 내지 50 ℃의 범위의 온도에서 적절한 용매 (비제한적으로 THF, DCM, 및 DMF 포함) 중에서 적합한 염기 (비제한적으로 피리딘, 트리에틸아민, DIPEA, 및 NMM 포함)의 존재 하에 IIf (LG^1= 할라이드)와 반응된다. 대안적으로, LG^1이 OH인 경우, XII는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 시약 IIf와 반응된다. 산 및 아민 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함)의 존재 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함) 중에서 커플링제와 조합된다. 화합물 IIf (LG^1= 할라이드)는 적합한 할로겐화 시약으로의 처리에 의해 상응하는 카복실산으로 용이하게 제조될 수 있는 것으로 당해 분야의 숙련가에게 이해될 것이다. IIe와 IIf 사이의 아미드 형성 이후, 보호기 PG^5는 그 다음 화학식 IVe의 화합물의 PG^3의 제거에 대해 기재된 조건(반응식 4)을 사용하여 제거되어 화합물 IIc를 얻었다.

[0628] 방법 B-2는 반응식 9에서 하기에 나타난 바와 같이 화학식 IIa의 화합물을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0629] 반응식 9

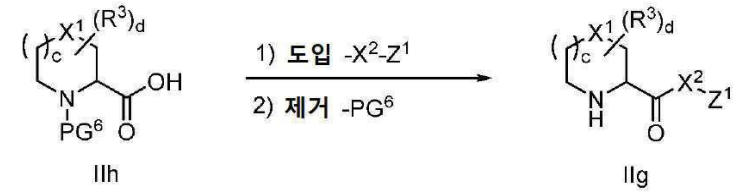


[0630]

[0631] 식 중, R^1, R^2, R^3, X^1, X^2, Z^1 및 Z^2는 앞서 정의된 바와 같다. 반응을 화합물 IIg와 화합물 IIf 사이의 커플링 반응에 대해 기재된 조건 하에 수행될 수 있다(반응식 8).

[0632] 화학식 IIg의 화합물은 반응식 11에서 하기에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다.

[0633] 반응식 11

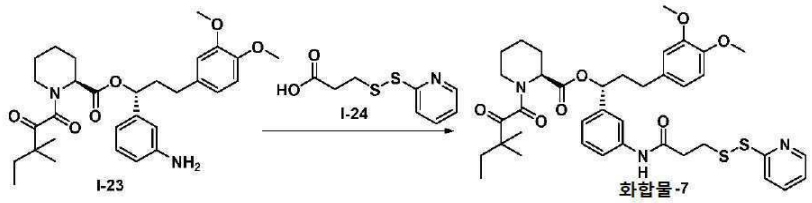


[0634]

[0635] 식 중, R^3, X^1, X^2, Z^1은 앞서 정의된 바와 같고, PG^6 은 Boc, Cbz, Alloc, 및 Fmoc를 비제한적으로 포함하는 적합한 아민 보호기이다.

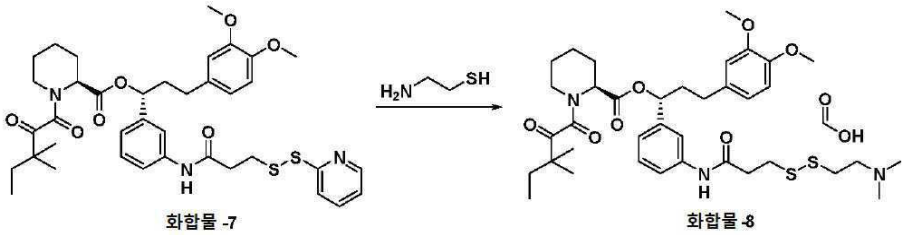
[0636] 통상적인 절차에서, 카복실산 IIg는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 표준 커플링제 (예를 들어, EDC/HOBT, DCC, PyBOP, PyBROP, HATU, HBTU, COMU)의 존재 하에 $-X^2-Z^1$ 모이어티를 함유하는 적절한 커플링 파트너와 반응된다. 산 및 커플링 파트너는 실온 또는 약간 고온에서 염기 (비제한적으로 DIPEA, 트리에틸아민, 및 NMM 포함)의 존재 하에 유기 용매 (비제한적으로 DMF, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 테트라하이드로푸란 포함) 중에서 커플링제와 조합된다. PG^6은 그 다음 생성된 중간체와 당해 분야의 숙련가에게 익숙한 적절한 시약과 반응함으로써 제거된다.

[0637] 화합물-7 (C3SLF)의 합성

[0638] 

[0639] 테트라하이드로푸란 (1.2 mL) 중의 **중간체 I-24** (18 mg, 0.085 mmol)의 용액에 N-메틸모폴린 (10 μL, 0.085 mmol)을 첨가하였다. 용액을 -20 ℃로 냉각시키고, 그 다음 이소부틸클로로포르메이트 (11 μL, 0.085 mmol)을 적가했다. 용액을 즉시 0 ℃로 가온시켰다. 0 ℃에서 45분 동안 교반한 이후, **중간체 I-23**의 TFA 염 (37 mg, 0.057 mmol)을 무수 테트라하이드로푸란 (0.5 mL) 중의 N-메틸모폴린 (7 μL, 0.057 mmol)와 혼합하였고, 5분의 과정에 걸쳐 혼합된 무수물의 0 ℃ 용액에 적가하였다. 생성된 용액을 0 ℃에서 1.5 시간 동안 교반하였고, 이 시점에서 메탄올 (1 mL)을 첨가하였고, 용액을 즉시 실온으로 가온시켰고, 5분 동안 교반하였다. 용액을 디클로로메탄 (75 mL) 및 포화된 수성 중탄산나트륨 (50 mL)으로 희석하였다. 층을 분리하였고, 수성층을 디클로로메탄 (2 x 30 mL)로 추출하였다. 유기물을 조합하였고, 염수 (20 mL)로 세정하였고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 용매를 진공에서 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피 (헥산 중 0-80% 에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 백색 포움으로서 **화합물 7** (C3SLF)을 제공하였다 (20 mg, 50% 수율). ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 9.49 (s, 1H), 8.55 (d, 1H), 7.77 (app t, 1H), 7.71-7.65 (m, 2H), 7.60-7.58 (m, 1H), 7.20-7.17 (m, 1H), 7.01 (d, 1H), 6.78-6.76 (m, 1H) 6.70-6.67 (m, 2H), 5.77 (dd, 1H), 5.33 (d, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.35 (d, 1H), 3.25 (t, 2H), 3.15 (dt, 1H), 2.92 (t, 2H), 2.64-2.50 (m, 2H), 2.38 (d, 1H), 2.29-2.15 (m, 1H), 2.10-2.00 (m, 1H), 1.78-1.63 (m, 3H), 1.53-1.37 (m, 3H), 1.22 (s, 6H), 0.89 (t, 3H, 회전이성질체 1), 0.80 (t, 3H, 회전이성질체 2). ESI-MS m/z = 722.0 $[M+H]^+$, 744.0 $[M+Na]^+$; 계산치 MW: 721.93.

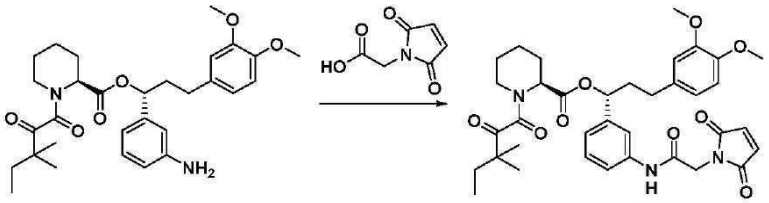
[0640] 화합물-8의 합성

[0641] 

[0642] 디클로로메탄 (0.5 mL) 중의 용액 **화합물 7** (22 mg, 0.031 mmol)에 트리에틸아민 (62 μL, 0.55 mmol) 이어서 2-(디메틸아미노)에탄티올 (0.mL, 0.0500mmol) (4.8 mg, 0.046mmol)을 첨가하였다. 30 분 동안 실온에서 교반한 이후, 용액을 디클로로메탄 (30 mL) 및 포화된 수성 중탄산나트륨 (30 mL)에 부었다. 층을 분리하였고, 수성층을 디클로로메탄 (2 x 20 mL)으로 추출하였다. 유기물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 용매를 진공에서 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피 (디클로로메탄 중 0-10% 메탄올)에 의해 정제하여 불순한 물질을 제공하였고, 이를 역상 HPLC (0.1% 포름산과 함께 물 중의 아세토니트릴)에 의해 재정제되어 백색 고체로

서 **화합물-8**의 포름산염 (7.1 mg, 21% 수율)을 얻었다. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 12.53 (br s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.75 (d, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.29 (t, 1H), 7.02 (d, 1H), 6.79-6.77 (m, 1H), 6.70-6.67 (m, 2H), 5.76 (dd, 1H), 5.29 (d, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.36-3.27 (m, 2H), 3.23-3.11 (m, 4H), 2.90 (t, 2H), 2.79-2.71 (m, 8H), 2.62-2.50 (m, 2H), 2.55 (d, 1H), 2.28-2.17 (m, 1H), 2.12-2.03 (m, 1H), 1.72-1.61 (m, 3H), 1.49-1.36 (m, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 0.88 (t, 3H, 회전이성질체 1), 0.79 (t, 3H, 회전이성질체 2). ESI-MS m/z = 716.1 $[M+H]^+$; 계산치 MW: 715.97.

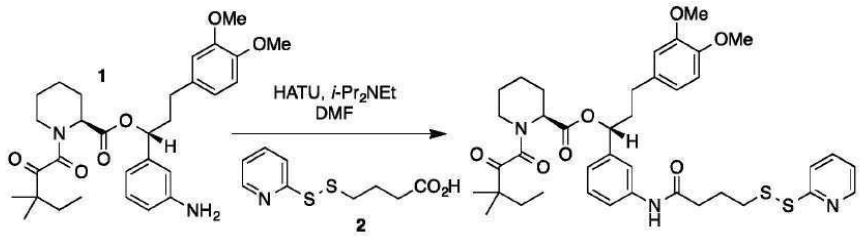
[0643] 화합물-9의 합성



[0644]

[0645] 디클로로메탄 중의 **중간체 I-23** (15 mg, 0.029 mmol), 3-(2,5-디옥소파이롤-1-일)프로판산 (5.8mg, 0.034 mmol), 및 DMAP (0.4 mg, 0.003 mmol)의 실온 용액에 N,N'-디사이클로헥실카보디이미드 (9.4 mg, 0.046 mmol)를 첨가하였다. 15 시간 동안 실온에서 교반한 이후, 수득한 고체를 주사기 필터를 통해 여과하고, 디클로로메탄으로 세정하였다. 용매를 진공 중에서 제거하여, 생성된 잔류물을 에틸 아세테이트에서 채취하였다. -20 ℃로의 냉각 이후, 현탁액을 주사기 필터를 통해 여과하고, 차가운 에틸 아세테이트로 세정하였다. 여과물을 에틸 아세테이트 (30 mL) 및 물 (30 mL)로 희석시켰다. 층을 분리하였고, 수성층을 에틸 아세테이트 (2 x 20 mL)로 추출하였다. 유기물을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과시키고, 용매를 진공에서 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피 (헥산 중 0-90% 에틸 아세테이트)에 의해 정제하여 오일로서 **화합물-9** (11 mg, 60% 수율)를 제공하였다. ^{1}H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8.25 (br s, 1H), 7.79 (d, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.29 (t, 1H), 6.98 (d, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.78-6.76 (m, 1H), 6.70-6.66 (m, 2H), 5.83 (dd, 1H), 5.37 (d, 1H), 4.43 (d, 1H), 4.37 (d, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.32 (d, 1H), 2.96 (t, 1H), 2.55 (t, 2H), 2.35 (d, 1H), 2.29-2.15 (m, 1H), 2.11-2.01 (m, 1H), 1.81-1.60 (m, 4H), 1.49-1.42 (m, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 0.93 (t, 3H, 회전이성질체 1), 0.82 (t, 3H, 회전이성질체 2). ESI-MS m/z = 662.0 $[M+H]^+$; 계산치 MW: 661.75.

[0646] (R)-3-(3,4-디메톡시페닐)-1-(3-(4-(피리딘-2-일디설파닐)부탄아미도)페닐)프로필 (S)-1-(3,3-디메틸-2-옥소펜타노일)피페리딘-2-카복실레이트 (C4-SLF)의 합성:



[0647]

[0648] DMF (3mL) 중의 아닐린 **1** (90mg, 172 μmol, 1eq), 이황화물 **2** (79mg, 343 μmol, 2eq) 및 디이소프로필에틸아민 (149 μL, 111mg, 858 μmol, 5eq)의 용액에 HATU (130mg, 343 μmol, 2eq)를 첨가하였고, 반응 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고, 에틸 아세테이트 (3x)로 추출하였다. 유기 추출물을 물, 포화된 염화나트륨 로 세정하였고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 증발시켰다. 잔류물을 실리카겔 구배 용출 (20% 에틸 아세테이트 : 80% 헵탄 → 100% 에틸 아세테이트) 상에서 정제하여 표제 화합물 C4-SLF (98mg, 77%)을 제공하였다. MS (ESI) calc=736.3 (M+H), obs=736.3.

[0649] **실시예 2: 특정 접합체의 합성**

[0650] *일반 프로토콜:* 이러한 프로토콜은 표적 단백질-화합물 접합체의 형성을 위한 방법을 기술한다.

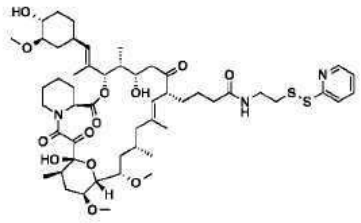
[0651] *시약:* 100% DMSO 중의 화합물 (인하우스) 및 포유동물 표적 단백질 (인하우스)

[0652] *장비:* Mini-PROTEAN TGX 겔 (Bio-Rad)

[0653] *실험 프로토콜:* 1:2 몰비의 표적 단백질 및 화합물은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (2% DMSO를 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 가교결합 효율은 SDS-PAGE 겔에 의해 평가된다. 접합체는 비-가교결합된 표적 단백질보다 더 느리게 이동한다. 티올 반응성 화합물의 경우, 표적 단백질에 대한 화합물의 Cys 특이적 부착은 반응 혼합물로의 100 mM DTT의 첨가 이후에 SDS-PAGE에 의해 추가로 확인될 수 있고, 이는 그것의 성분으로 다시 접합체를 환원시킨다.

[0654] **A. $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2-FK506 접합체의 형성**

[0655] 시약: 100% DMSO 중의 C2-FK506 (인하우스), $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트 (인하우스; G12V/S39C/C51S/C80L/C118S를 함유하는 잔기 1-169).



C2-FK506

[0656]

[0657] *장비:* Mini-PROTEAN TGX 겔 (Bio-Rad)

[0658] *실험 프로토콜:* 1:2 몰비의 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트 및 C2-FK506를 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (2% DMSO 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 가교결합 효율은 SDS-PAGE 겔에 의해 평가된다. $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트 상의 시스테인 39에 대한 C2-FK506의 부착은 또한 100 mM DTT와 함께의 반응 혼합물의 인큐베이션에 의해 평가된다.

[0659] *결과:* C2-FK506은 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트와 함께 효율적으로 가교 결합되고, 시스테인 39에 대해 특이적이다 (도 1).

[0660] **B. $KRAS_{GTP/G12C}$ 라이트/SFAX9DS 접합체의 형성**

[0661] *시약:* 100% DMSO 중의 SFAX9DS (인하우스), $KRAS_{GTP/G12C}$ 라이트 (인하우스; G12C/C51S/C80L/C118S를 함유하는 잔기 1-169).

[0662] *장비:* Mini-PROTEAN TGX 겔 (Bio-Rad)

[0663] *실험 프로토콜:* 1:2 몰비의 $KRAS_{GTP/G12C}$ 라이트 및 SFAX9DS는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (2% DMSO 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 가교결합 효율은 SDS-PAGE 겔에 의해 평가된다. 야생형 CypA 또한 화합물과 가교결합된다. CypA 상의 반응성 시스테인으로서의 시스테인 52는 세린으로 돌연변이되어 프리젠터 가교결합이 근절되었다.

[0664] 결과: SFAX9DS는 $KRAS_{GTP/G12C}$ 라이트 단백질과 효율적으로 가교-결합되고, $CypA_{C52S}$ 은 SFAX9DS에 가교결합된다 (도 2).

[0665] **실시예 3: 특정 복합체의 형성**

[0666] **일반 프로토콜:** 이러한 프로토콜은 프리젠터 단백질, 화합물, 및 포유동물 표적 단백질을 포함하는 복합체의 형성 및 단리에 대한 2개의 방법을 기술한다.

[0667] *시약:* 100% DMSO 중의 화합물(인하우스), 프리젠터 단백질 (인하우스) 및 포유동물 표적 단백질 (인하우스)

[0668] *장비:* Mini-PROTEAN TGX 겔 (Bio-Rad), Superdex 75 (GE HEALTHCARE, CV 120 mL)

[0669] *실험 프로토콜 A:* 사전-접합된 화합물 및 단백질

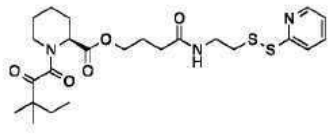
[0670] 1: 2 몰비의 접합체 및 프리젠터 단백질은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (2% DMSO 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 순수한 복합체는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 정제에 의해 단리된다. 반응 혼합물은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl을 함유하는 완충액으로 사전-평형화된 Superdex 75 컬럼 (CV 120mL) 상에 직접적으로 주입된다. 복합체는 미반응된 표적 단백질 및 프리젠터 단백질보다 더 높은 분자량으로 용출된다. 용출 피크에서 복합체의 존재를 확인하기 위해, 샘플은 SDS-PAGE에 의해 평가된다.

[0671] 실험 프로토콜 B: 가교결합 시약, 프리젠터 단백질 및 표적 단백질

[0672] 1: 2: 2 몰비의 화합물, 프리젠터 단백질, 및 표적 단백질은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (2% DMSO 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 순수한 복합체는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 정제에 의해 단리된다. 반응 혼합물은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl을 함유하는 완충액으로 사전-평형화된 Superdex 75 컬럼 (CV 120mL) 상에 직접적으로 주입된다. 복합체는 미반응된 표적 단백질 및 프리젠터 단백질보다 더 높은 분자량으로 용출된다. 용출 피크에서 복합체의 존재를 확인하기 위해, 샘플은 SDS-PAGE에 의해 평가된다.

[0673] **A. $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2Holt/FKBP12 3원 복합체의 형성**

[0674] *시약:* 100% DMSO 중의 C2Holt (인하우스), $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트 (인하우스; G12V/S39C/C51S/C80L/C118S를 함유하는 잔기 1-169), 및 FKBP12 (인하우스).



C2Holt

[0675]

[0676] *장비:* Mini-PROTEAN TGX 겔 (Bio-Rad), Superdex 75 (GE HEALTHCARE, CV 120 mL)

[0677] *실험 프로토콜:* 1:2:2 몰비의 C2-Holt, FKBP12, 및 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트를 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (2% DMSO 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 순수한 복합체는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 정제에 의해 단리된다. 반응 혼합물은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl을 함유하는 완충액으로 사전-평형화된 Superdex 75 컬럼 (CV 120mL) 상에 직접적으로 주입된다. 복합체는 대략 69 mL 주사후에서 용출되고, 미반응된 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트 및 FKBP12는 각각 대략 75 mL 및 87 mL 주사후 용출된다. 용출 피크에서 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트 및 FKBP12의 존재를 확인하기 위해, 샘플은 또한 SDS-PAGE에 의해 평가된다.

[0678] *결과:* 용출 피크의 SEC 프로파일 및 SDS-PAGE 분석은 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트/C2Holt/FKBP12 복합체의 형성을 확인한다 (도 3a 및 3b).

[0679] **B. $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트/SFAC4DS/$CypA_{C52S}$ 3원 복합체의 형성**

[0680] *시약:* 100% DMSO 중의 SFAC4DS (인하우스), $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트 (인하우스; G12V/S39C/C51S/C80L/C118S를 함유하는 잔기 1-169), 및 $CypA_{C52S}$ (인하우스).

[0681] *장비:* Mini-PROTEAN TGX 겔 (Bio-Rad), Superdex 75 (GE HEALTHCARE, CV 120 mL)

[0682] *실험 프로토콜:* 1:2:2 몰비의 SFAC4DS, $CypA_{C52S}$, 및 $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (2% DMSO 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 순수한 복합체는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 정제에 의해 단리된다. 반응 혼합물은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl을 함유하는 완충액으로 사전-평형화된 Superdex 75 컬럼 (CV 120mL) 상에 직접적으로 주입된다. 복합체는 대략 69 mL 주사후 용출되고, 미반응된 $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트 및 $CypA_{C52S}$는 각

각 대략 75 mL 및 80 mL 주사후 용출된다. 용출 피크에서 $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트 및 $CypA_{C52S}$의 존재를 확인하기 위해, 샘플은 또한 SDS-PAGE에 의해 평가된다.

[0683] *결과:* 용출 피크의 SEC 프로파일 및 SDS-PAGE 분석은 $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트/SFAC4DS/$CypA_{C52S}$ 복합체의 형성을 확인한다 (도 4).

[0684] **C. $PTP1B_{S187C}$ 라이트/C3SLF/FKBP12 3원 복합체의 형성**

[0685] *시약:* 100% DMSO 중의 C3SLF (인하우스), $PTP1B_{E186C}$ 라이트 (인하우스; C32S/C92V/C121S/S187C를 함유하는 잔기 1-293), 및 FKBP12 (인하우스).

[0686] *장비:* Mini-PROTEAN TGX 겔 (Bio-Rad), Superdex 75 (GE HEALTHCARE, CV 120 mL)

[0687] *실험 프로토콜:* 1:3:3 몰비의 C3SLF, FKBP12, 및 $PTP1B_{S187C}$ 라이트는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액 (4% DMSO 함유)에서 함께 혼합된다. 상기 반응은 37℃에서 30분 동안 인큐베이션되고, 이어서 실온에서 밤새 인큐베이션을 후속하였다. 순수한 복합체는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 정제에 의해 단리된다. 반응 혼합물은 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl을 함유하는 완충액으로 사전-평형화된 Superdex 75 컬럼 (CV 120mL) 상에 직접적으로 주입된다. 복합체는 대략 62 mL 주사후 용출되고, 미반응된 FKBP12는 각각 대략 75 mL (이량체) 및 90 mL (단량체) 주사후 용출된다. 용출 피크에서 $PTP1B_{S187C}$ 라이트 및 FKBP12의 존재를 확인하기 위해, 샘플은 또한 SDS-PAGE에 의해 평가된다. 유리 $PTP1B_{S187C}$ 라이트 및 FKBP12 혼합물을 그것의 용출 시간을 결정하기 위한 동일한 조건 하에 Superdex 75 컬럼에 가해진다.

[0688] *결과:* 유리 $PTP1B_{S187C}$ 라이트 및 FKBP12 단백질 (도 5a)의 SEC 프로파일 및 SDS-PAGE 분석은 유리 $PTP1B_{S187C}$ 라이트가 대략 64-65 ml에서 용출되는 것을 확인한다. 용출 피크의 SEC 프로파일 및 SDS-PAGE 분석은 $PTP1B_{S187C}$ 라이트/C3SLF/FKBP12 복합체의 형성을 확인하고, 이는 대략 61 ml (도 5b)에서 용출된다.

[0689] **실시예 4: 프리젠터 단백질이 부재하는 경우가 아닌, 이것이 존재하는 경우의 접합체 형성**

[0690] 이러한 프로토콜은 접합체 형성의 프리젠터 의존성을 평가하기 위한 노력으로 질량 분광분석법 및 겔 이동 검정을 사용하여 가교결합 효율을 분석하기 위한 방법을 기술한다.

[0691] *시약:* 100% DMSO 중의 화합물 (인하우스), FKBP12 (인하우스), $KRAS_{GTP/G12C}$ (인하우스, 잔기 1-169).

[0692] 실험 프로토콜: 이황화 가교결합 반응의 동력학을 따르기 위해, Agilent 6230 TOF-LC/MS 및 Agilent 1260 HPLC 기기 (AdvanceBio RP-mAb C4 컬럼 (2.1 x 100 mm, 3.5 μm)을 이용하고, 오토-샘플러가 장착됨)를 사용하였다. HPLC 등급 아세토니트릴 및 물 (각각 1.0 mM 암모늄 포르메이트 및 1부피% 포름산 함유)을 하기 램프(ramp)로의 이동상으로서 사용하였다: 0.6 ml/min 유량, 0.0 내지 13.0분의 물:아세토니트릴 = 95:5로부터 13.0 내지 17.0분의 물:아세토니트릴 = 5:95로 램핑됨. 총 시간 = 17.0분.

[0693] 모든 가교결합 반응을 0.5 mL 유리 삽입물이 구비된 1.5 mL 호박색 착색된 유리 바이알에서 수행하였다. 수용성 펩타이드 (서열번호: 1: YQNLLVGRNRGEEILD)을 내부 표준으로서 이용된다. 내부 표준의 실제 서열은 중요하지 않지만, 아미노산 잔류물의 선택은 가교결합 검정에서의 방해를 회피하기 위해 중요하였다. 그러므로, 프롤린 (FKBP12로 방해됨) 및 시스테인 (이황화 결합 형성으로 방해됨) 잔류물을 배제하였다. 모든 반응 및 표준 용액을 HEPES (pH 7.4, 1.0 mM $MgCl_2$) 완충액에서 준비하였다.

[0694] 모든 반응 이전에, 표준 곡선을 일련의 표준 용액 (FKBP12에 대한 표준 곡선 분석의 예는 하기 표 3에 나타나 있음)을 사용하여 개별 성분에 대해 얻었다. 표준 곡선으로부터의 데이터를 사용하여, μmol의 단백질 샘플을 면적의 비 (샘플: std)에 대해 플롯팅하였고, 선형 핏트(linear fit) (y = mx+c)을 이용하여 기울기 및 절편을 얻었다. 이들 표준 곡선에 관연된 기울기 및 절편의 값은 반응의 기간 이전 및 그 과정에서 기질 평가 및 생성물 농도의 평가 과정에서 설명되었다. 모든 기질/생성물의 경우, 초기 주사는 임의의 잔존 단백질/시약의 존재를 확인하기 위해 블랭크 주사에 의해 후속처리되었다. 이러한 분석에 기초하여 오토-샘플러의 순서는 존재하는 경우에 잔존 성분의 제거를 위해 적절한 수의 블랭크 주사가 포함되도록 조정될 수 있다. MS 스펙트럼은 Agilent MassHunter v B. 07.0 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.

[0695] [표 3] FKBP12에 대한 표준 곡선. 기울기 = 6.53, 절편= -0.64, R^2 = 0.999

용액	농도 (mM)	내부 표준하 면적 (R_t = 7.1 min)	FKBP-12하 면적 (R_t = 8.9 min)	샘플:Std의 비
1	100	2615940.1	40314760.1	15.41
2	10	5244417.4	8718886.5	1.66
3	1	5868006.9	1745344.5	0.30
4	0.5	5407354.8	910748.2	0.17
5	0.1	5626447.0	237074.5	0.04

[0696]

[0697] 표적 단백질 상의 리간드 가교결합의 프리젠터 의존성을 평가하는 대표적인 실험에서, $KRAS_{GTP/G12C}$ 및 C3 또는 C4SLF 리간드는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 3% DMSO 중의 실온에서 4시간 동안 2 μM KRAS, 10 μM FKBP12, 10 μM C3 또는 C4SLF의 농도로 FKBP12의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션되었다. 상기 방법을 사용한 리간드와의 이황화 가교결합이 진행되는 KRAS의 양의 분석. 표 4 에서 나타낸 바와 같이, 5- 내지 10-배 증가된 가교 결합 효율은 프리젠터의 존재 하에 관측되었다.

[0698] [표 4] C3- 및 C4SLF 분석된 MS의 가교결합 효율

	C3SLF		C4SLF	
FKBP12	-	+	-	+
KRAS에 대한 %x연결	9.6	47.5	7.0	69.8

[0699]

[0700] 질량 분광분석법 분석과 병행하여, C3 또는 C4SLF과의 가교결합 반응은 가교결합 반응을 더 높은 농도 (60 μM KRAS, 180 μM FKBP12, 및 180 μM C3 또는 C4SLF)로 설정하고, 이들을 MMTS로 켄칭하여 반응을 종결하는 것을 제외하고, 상기 기재된 것과 동일한 실험 조건에서 FKBP12의 존재 또는 부재 하에 12% SDS-PAGE를 사용하는 겔 이동 검정에 가하였다. MS 데이터에 유사하게는, 리간드 가교결합 효율은 FKBP12의 존재 하에 상당하게 증가되었고, 이는 C4SLF에 대해 보다 확연하였다 (도 6).

[0701] **실시예 5: X-선 분석에 의한 프리젠터 단백질/표적 단백질 계면 구조의 결정**

[0702] 이러한 프로토콜은 FKBP12-C2Holt-$KRAS_{GTP/S39C의}$ 3원 복합체의 결정 구조에 대한 결정화 및 구조 결정 방법을 기술한다.

[0703] **A. FKBP12-C2Holt-$KRAS_{GTP/S39C}$ 3원 복합체의 결정 구조 결정**

[0704] *시약:* 100% DMSO 중의 리간드 (C2Holt) (인하우스), FKBP12 (인하우스), $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트 (인하우스, G12V/S39C/C51S/C80L/C118S를 함유하는 잔기 1-169).

[0705] *장비:* Superdex 75 (GE HEALTHCARE)

[0706] *실험 프로토콜:* C Holt 및 FKBP12는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액, 1 mM $MgCl_2$, 2% DMSO 중의 3:1 및 1.5:1 몰 과량으로 $KRAS_{GTP/S39C}$ 라이트에 첨가되었고, 20℃에서 밤새 또는 4℃에서 36-72 시간 동안 인큐베이션시켰다. 순수한 복합체는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl, 및 1 mM $MgCl_2$에서 Superdex 75 컬럼 상의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단리되었다. 정제된 복합체 (15-20 mg/ml의 경우)을 시팅 드롭 증기 확산 방법 (sitting drop vapor diffusion method)을 사용하여 20℃에서의 결정화 스크리닝에 가하였다. 결정을 0.1 M MES pH 6.5, 20-22% PEG 20,000를 함유하는 웰 용액에서 성장시켰다. 데이터 수집을 위해 결정을 15% 글리세롤이 보충된 모액을 함유하는 용액으로 이송하였고, 그 다음 액체 질소에서 냉동시켰다. 회절 데이터세트를 방사광 가속기(Advanced Photon Source, APS)에서 수집하였고, HKL 프로그램으로 처리하였다. 연구 모델로서

FKBP12 (PDB-ID 1FKD) 및 KRAS (PDB-ID 3GFT)의 공개된 구조를 사용하여 CCP4 세트에서 프로그램 PHASER을 사용하여 분자 대체 용액(molecular replacement solution)을 얻었다. 후속적인 모델 구축 및 전처리를 소프트웨어 패키지 CCP4 및 COOT를 사용하여 표준 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0707] *결과:* FKBP12-C2Holt-$KRAS_{GTP/S39C}$의 전체 구조: 결정은 비대칭 유닛에서 FKBP12 및 $KRAS_{GTP/S39C}$의 하나의 이종이량체를 함유한다 (도 7). 상기 모델은 FKBP12의 잔기 Met1 내지 Glu108 및 $KRAS_{GTP/S39C}$의 Met1 내지 Lys169를 포함하였다. 생성된 전자 밀도는 리간드의 배향 및 형태를 포함하는 분명한 결합 방식을 나타낸다. 연속적 전자 밀도는 단백질의 시스테인 및 리간드로부터의 황으로부터 생성된 이황화물에 대해 관측되었다.

[0708] C2Holt (4 Å 거리 컷-오프)를 결합하는데 관여된 $KRAS_{GTP/S39C}$ 잔기는 Glu37, Cys39, Leu56, 및 Met67이다. FKBP12에 대한 결합에 관여된 $KRAS_{GTP/S39C}$ 잔기는 Glu3, Lys5, Ile36, Cys39, Tyr40, Arg41, Asp54, Glu63, Tyr64, Met67, 및 Arg73이다. $KRAS_{GTP/S39C}$를 결합하는데 관여한 FKBP12 잔기는 Arg43, Lys53, Gln54, Glu55, Thr86, Pro89, Gly90, 및 Ile92이다. C2Holt를 결합하는데 관여한 FKBP12 잔기는 Tyr27, Phe37, Asp38, Phe47, Glu55, Val56, Ile57, Trp60, Tyr83, His88, Ile91, Ile92, 및 Phe100이다.

[0709] 복합체의 총 매립된 표면적은 1,947 $Å^2$이다. $KRAS_{GTP/S39C}$의 매립된 표면적은 600 $Å^2$이고, 이의 501 $Å^2$은 FKBP12 (83%)에 의해 기인하고, 99 $Å^2$는 C2Holt (17%)에 기인한다. FKBP12의 매립된 표면적은 762 $Å^2$이고, 이의 500 $Å^2$는 $KRAS_{GTP/S39C}$ (66%)에 기인하고, 262 $Å^2$는 C2Holt (34%)에 기인한다. C2 Holt의 매립된 표면적은 584 $Å^2$이고, 이의 132 $Å^2$은 $KRAS_{GTP/S39C}$ (23%)에 기인하고, 452 $Å^2$는 FKBP12 (77%)에 기인한다. $KRAS_{GTP/S39C}$ 과 FKBP12 사이의 단백질-단백질 계면은 분자간 H-결합을 포함하는 소수성 및 극성 상호작용 모두에 의해 형성된다. C2 Holt와 FKBP12 사이의 결합 계면은 대개 소수성 상호작용에 기인하고, 뿐만 아니라 리간드의 3개의 카보닐기와 FKBP12의 Tyr27, Ile57, 및 Tyr83 사이의 3개의 H-결합에 기인한다. C2 Holt는 디자인 (99 $Å^2$)에 의해 $KRAS_{GTP/S39C}$과의 최소 접촉을 형성하지만, $KRAS_{GTP/S39C}$의 Glu37과의 하나의 H-결합을 형성한다. 최종 구조의 데이터 수집 및 전처리 통계는 하기 표 5에 열거되어 있다.

[0710] **B. $KRAS_{GDP/S39C}$/SFAC4DS/$CypA_{C52S}$ 3원 복합체의 결정 구조 결정**

[0711] *시약:* 100% DMSO 중의 리간드 (SFAC4DS) (인하우스), $CypA_{C52S}$ (인하우스), $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트 (인하우스, G12V/S39C/C51S/C80L/C118S를 함유하는 잔기 1-169).

[0712] *장비:* Superdex 75 (GE HEALTHCARE)

[0713] *실험 프로토콜:* SFAC4DS 및 $CypA_{C52S}$는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액, 1 mM $MgCl_2$, 2% DMSO에서 2:1 및 2:1 몰 과량으로 $KRAS_{GDP/S39C}$ 라이트에 첨가되었고, 20℃에서 밤새 인큐베이션되었다. 순수한 복합체는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl, 및 1 mM $MgCl_2$에서 Superdex 75 컬럼 상의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단리되었다. 정제된 복합체 (15 mg/ml의 경우)를 시팅 드롭 증기 확산 방법을 사용하여 20℃에서의 결정화 스크리닝에 가하였다. 결정을 0.1 M 비스-Tris pH 6.5, 25 % PEG 3350을 함유하는 웰 용액에서 성장시켰다. 데이터 수집을 위해, 결정을 40 %의 PEG로 이루어진 추가의 PEG 3350로 보충된 모액을 함유하는 용액으로 이송시켰고, 그 다음 액체 질소에서 냉동시켰다. 회절 데이터세트를 방사광 가속기(ALS)에서 수집하였고, HKL 프로그램으로 처리하였다. 연구 모델로서 CypA (PDB-ID 1CWA) 및 KRAS (PDB-ID 3GFT)의 공개된 구조를 사용하여 CCP4 세트에서 프로그램 PHASER을 사용하여 분자 대체 용액을 얻었다. 후속적인 모델 구축 및 전처리를 소프트웨어 패키지 CCP4 및 COOT를 사용하여 표준 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0714] 결과: $CypA_{C52S}$-SFAC4DS-$KRAS_{GDP/S39C}$의 전체 구조: 결정은 비대칭 단위로의 $CypA_{C52S}$ 및 $KRAS_{GDP/S39C}$ 의 하나의 이종이량체를 함유한다 (도 8). 모델은 CypA의 Met1 내지 Glu165 및 $KRAS_{GDP/S39C}$의 Met1 내지 Lys169를 포함하였다. 생성된 전자 밀도는 리간드의 배향 및 형태를 포함하는 분명한 결합 방식을 나타낸다. 연속적 전자 밀도는 단백질의 시스테인 및 리간드로부터의 황으로부터 생성된 이황화물에 대해 관측되었다.

[0715] SFAC4DS (4 Å 거리 컷-오프)를 결합하는데 관여한 $KRAS_{GDP/S39C}$ 잔기는 Glu3, Lys5, Cys39, Arg41, Leu52,

Asp54, Ile55 및 Leu56이다. $CypA_{C52S}$에 결합하는데 관여된 $KRAS_{GDP/S39C}$ 잔기는 Glu37, Asp38, Cys39, Arg41, Gln43, Leu56, Ala66, Met67, Gln70, 및 Thr74이다. $KRAS_{GDP/S39C}$를 결합하는데 관여된 $CypA_{C52S}$ 잔기는 Arg55, Ile57, Arg69, Asn71, Thr73, Ala81, Ala103, Arg148, 및 Asn149이다. SFAC4DS를 결합하는데 관여된 $CypA_{C52S}$ 잔기는 Arg55, Phe60, Met61, Gln63, Gly72, Ala101, Asn102, Gln111, Phe113, 및 His126이다.

[0716] 이러한 복합체의 총 매립된 표면적은 단백질-단백질 계면에서의 부분적인 구조 장애에 기인하여 계산될 수 없다. 계산을 위해 무질서한 영역을 배제하여, 단백질-단백질 계면에서의 매립된 표면적은 1,350 $Å^2$보다 크고, 이는 30% 초과는 SFAC4DS (443 $Å^2$)에 기인한다. $KRAS_{GDP/S39C}$ 과 $CypA_{C52S}$ 사이의 단백질-단백질 계면은 2개의 분자간 H-결합을 포함하는 소수성 및 극성 상호작용 둘 모두에 의해 형성된다. SFAC4DS와 CypA 사이의 결합 계면은 소수성 및 극성 상호작용 둘 모두에 의해 기인한다. 리간드의 카보닐 및 N-H 기 및 $CypA_{C52S}$의 잔기 Arg55, Gln63, Asn102, 및 His126 사이에 6개의 H-결합이 존재한다. SFAC4DS는 $KRAS_{GDP/S39C}$와 최소 직접 접촉을 형성하지만, $KRAS_{GDP/S39C}$의 Arg41 하나의 H-결합을 형성한다. 최종 구조의 데이터 수집 및 전처리 통계는 하기 표 5에 열거되어 있다.

[0717] **C. $PTP1B_{S187C}$/C3SLF/FKBP12 3원 복합체의 결정 구조 결정**

[0718] *시약:* 100% DMSO 중의 리간드 (C3SLF) (인하우스), FKBP12 (인하우스), $PTP1B_{S187C}$ 라이트 (인하우스, C32S/C92V/C121S/S187C를 함유하는 잔기 1-169).

[0719] *장비:* Superdex 75 (GE HEALTHCARE), Gryphon (Art Robbins Instruments)

[0720] *실험 프로토콜:* C3SLF 및 FKBP12는 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액, 4% DMSO에서 3:1 몰 과량으로 $PTP1B_{S187C}$ 라이트에 첨가되었고, 4℃에서 36-72 시간 동안 인큐베이션되었다. 순수한 복합체를 12.5 mM HEPES pH 7.4 및 75 mM NaCl에서 Superdex 75 컬럼 상의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단리하였다. 정제된 복합체 (15 mg/ml의 경우)를 시팅 드롭 증기 확산 방법을 사용하여 20℃에서의 결정화 스크리닝에 가하였다. 결정은 0.2 M 마그네슘 아세테이트, 20 % w/v PEG 3350을 함유하는 웰 용액에서 성장되었다. 데이터 수집을 위해, 결정을 25% PEG400이 보충된 모액을 함유하는 용액에 이송시켰고, 그 다음 액체 질소에서 냉동시켰다. 회절 데이터 세트를 방사광 가속기(APS)에서 수집하였고, XDS 프로그램으로 처리하였다. 연구 모델로서 FKBP12 (PDB-ID 2PPN) 및 PTP1B (PDB-ID 2NT7)의 공개된 구조를 사용하여 CCP4 세트에서 프로그램 PHASER을 사용하여 분자 대체 용액을 얻었다. 후속적인 모델 구축 및 전처리를 소프트웨어 패키지 CCP4 및 COOT를 사용하여 표준 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0721] *결과:* FKBP12-C3SLF-$PTP1B_{S187C}$의 전체 구조: 결정은 비대칭 단위로의 FKBP12-C3SLF-$PTP1B_{S187C}$ 의 2개의 복합체 분자를 함유한다(도 9a). 상기 모델은 FKBP12의 잔기 Gly2 내지 Glu108 및 $PTP1B_{S187C}$의 Glu6 내지 Phe280을 포함하였다. 생성된 전자 밀도는 리간드의 배향 및 형태를 포함하는 분명한 결합 방식을 나타낸다. 연속적 전자 밀도는 단백질의 시스테인 및 리간드로부터의 황으로부터 생성된 이황화물에 대해 관측되었다.

[0722] 복합체의 총 매립된 표면적은 1,042 $Å^2$이다. $PTP1B_{S187C}$의 매립된 표면적은 427 $Å^2$이다. C3SLF의 매립된 표면적은 615 $Å^2$이다 (도 9b). $PTP1B_{S187C}$와 FKBP12 사이의 단백질-단백질 계면은 소수성 및 극성 상호작용 모두에 의해 형성된다.

[0723] **D. $MCL1_{S245C}$/C3SLF/FKBP52 3원 복합체의 결정 구조 결정**

[0724] *시약:* 100% DMSO 중 리간드 (C3SLF) (인하우스), FKBP52 (인하우스, 잔기 1-140), $MCL1_{S245C}$ 라이트 (인하우스, S245C/C286S를 함유하는 잔기 172-327).

[0725] *장비:* Superdex 75 (GE HEALTHCARE), Gryphon (Art Robbins Instruments)

[0726] *실험 프로토콜:* C3SLF 및 FKBP52를 12.5 mM HEPES pH 7.4, 75 mM NaCl 완충액, 2% DMSO에서 3:1 몰 과량으로 $MCL1_{S245C}$ 라이트와 혼합하였고, 4℃에서 24-48 시간 동안 인큐베이션시켰다. 순수한 복합체를 12.5 mM HEPES pH 7.4 및 75 mM NaCl에서 Superdex 75 컬럼 상의 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단리하였다. 정제된 복합체

(15 mg/ml의 경우)를 시팅 드롭 증기 확산 방법을 사용하여 20℃에서의 결정화 스크리닝에 가하였다. 결정을 2.1 M 말산을 함유하는 웰 용액에서 성장시켰다. 데이터 수집을 위해, 결정을 20% 글리세롤로 보충된 모액을 함유하는 용액으로 이송시켰고, 그 다음 액체 질소에서 플래시-냉동시켰다. 3.0 Å 분할 회절 데이터세트를 방사광 가속기(APS)에서 수집하였고, XDS 프로그램으로 처리하였다. 연구 모델로서 FKBP52 (PDB-ID 1N1A) 및 PTP1B (PDB-ID 3MK8)의 공개된 구조를 사용하여 CCP4 세트에서 프로그램 PHASER을 사용하여 분자 대체 용액을 얻었다. 후속적인 모델 구축 및 전처리를 소프트웨어 패키지 CCP4 및 COOT를 사용하여 표준 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0727] *결과:* 결정은 비대칭 단위로의 $MCL1_{S245C}$/C3SLF/FKBP52의 하나의 복합체 분자를 함유한다 (도 10). 생성된 전자 밀도는 리간드의 배향 및 형태를 포함하는 2개의 단백질 사이의 분명한 결합 방식을 나타낸다. 연속적 전자 밀도는 단백질의 시스테인 및 리간드로부터의 황으로부터 생성된 이황화물에 대해 관측되었다. 복합체의 총 매립된 표면적은 1,410 $Å^2$이고, 이의 대략 60%는 FKBP52 (804 $Å^2$)에 기인하고, 대략 40%는 C3SLF (606 $Å^2$)에 기인한다. 제한된 해상도로 인하여, 단백질-단백질 및 단백질-리간드 상호작용에서의 상세한 분석은 실행가능하지 않았다.

[0728] [표 5] 데이터 수집 및 전처리 통계

.	표면 A	표면 B	표면 C	표면 D
해상도 [Å]	47.8-1.4	70.1-1.6	49.0-2.4	65.9-3.0
반사의 수 (연구/시험)	50,557/2,708	34,377/1,790	30,175/1,543	5,343/245
R_{cryst} [%]	18.9	17.9	23.0	33.2
R_{free}[%][1]	21.7	21.2	28.1	37.8
원자의 총수:				
단백질	2,202	2,528	6,192	2,035
물	268	171	38	0
리간드	69	63	43	43
이온	1	1	0	0
이상적 형상으로부터의 편차 : [2]				
결합 길이 [Å]	0.007	0.011	0.004	0.010
결합 각도 [°]	1.33	1.49	0.87	1.30
라마찬드라 플롯: [3]				
가장 바람직한 영역 [%]	93.8	96.5	93.3	95.2
허용된 영역 [%]	6.2	3.1	4.9	4.4
불허용 영역 [%]	0.0	0.3	1.8	0.4

[1]테스트-세트는 측정된 반사의 %5를 함유한다
[2]기하학적 표적 값으로부터의 평균 제곱근 편차
[3] RAMPAGE로 계산됨

[0729]

[0730] **실시예 6: TR-FRET에 의한 복합체 형성의 결정**

[0731] TR-FRET 기술 (LANCE, Perkin Elmer)은 2개의 융합-태깅된 단백질, 예를 들어, 단백질 1/태그 A 및 단백질 2/태그 B의 2원 회합을 검출하기 위한 표준 방법이며, 여기서 A 및 B는 글루타티온-S-전달효소 (GST), 헥사히스티딘 (His_6), FLAG, 바이오틴-avi, Myc, 및 혈구응집소 (HA) 중 임의의 것일 수 있다. 이 실시예에서, 기술을 사용하여 프리젠터 단백질과 표적 단백질의 화합물-촉진된 회합을 측정한다. 프리젠터 단백질/태그 A 및 표적 단백질/태그 B의 혼합물을 본 발명의 화합물을 함유하는 384-웰 검정 플레이트에 첨가하였고, 15분 동안 인큐베이션시켰다. 항-융합 태그 A 또는 B 유로퓸-킬레이트 공여체 및 항-융합 태그 A 또는 B 알로피코시아닌 수용체 또는 울라이트(Ulight) 수용체 시약의 혼합물을 첨가하고, 240 분 동안 인큐베이션시켰다. TR-FRET 신호는 여기 = 320 nm, 방출 = 665/615 nm을 사용하는 EnVision 마이크로플레이트 판독기 (Perkin Elmer) 상에서 판독된다. 3원 복합체 형성을 촉지하는 화합물은 DMSO 대조군 웰에 비해 TR-FRET 비의 증가를 유도하는 것으로 확인된다.

[0732] **TR-FRET에 의한 CYPA-화합물 3-$KRAS_{G12C-GTP}$ 복합체 형성의 결정**

[0733] Avi-태깅된 사이클로필린 A 및 His-태깅된 $KRAS_{G12C-GTP}$은 증가된 농도의 리간드 (화합물 3)와 혼합되었고, 3원 복합체 형성을 가능하도록 15분 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 항-His Eu-W1024 및 스트렙타비딘 APC의 예비-혼합물은 이후 첨가되었고, 60분 동안 인큐베이션되었다. TR-FRET 신호는 EnVision 마이크로플레이트 판독기 (Perkin Elmer, Ex 320 nm, Em 665/615 nm) 상에서 판독된다. 프리젠터 및 표적 단백질이 없는 카운터 스크린은 또한 화합물 단독만의 기여가 배제되도록 실시된다.

[0734] *시약 및 기기*

[0735] • His6-$KRAS_{G12C-GTP}$ (인하우스; 잔기 1-169); PBS 완충액 중 1.2 mM, pH 7.4

[0736] • Avi-CYPA (인하우스; 잔기 1-165); PBS 완충액 중 556 μM, pH 7.4

[0737] • 항-His Eu-W1024 (Perkin Elmer)

[0738] • 스트렙타비딘 APC (Perkin Elmer)

[0739] • 리간드 (W21487), 100% DMSO 중 10 mM

[0740] • EnVision (Perkin Elmer)

[0741] • 8-채널 작은 용적 카셋트가 구비된 Combi Mutidrop 액체 분배기

[0742] • 384-w ProxiPlate (흑색)

[0743] *실험 프로토콜*

[0744] 1.모스키토(Mosquito)를 사용하여 100 nL/웰의 화합물 (DMSO 중에서 농도가 변화됨)을 384-w 흑색 ProxiPlate 분배하여 검정용 플레이트 (ARP)를 제조한다.

[0745] 2. 40 mM Hepes pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.1% BSA 및 0.004% Tween-20을 함유하는 2 x 검정 완충액을 제조한다.

[0746] 3. 1X 검정 완충액 중의 2x 프리-믹스 A: 100 nM의 His6-KRas G12C-GTP (1-169) 및 1000 nM의 Avi-CypA (1-165)를 제조한다.

[0747] 4. MutiDrop Combi를 사용하여 2x 프리-믹스 A를 ARP, 5 μl/웰에 분배한다. 실온에서 15분 배양한다.

[0748] 5. 2X 프리-믹스 B: 10 nM의 항-His Eu-W1024 및 40 nM의 SA APC를 제조한다.

[0749] 6. MutiDrop Combi를 사용하여 2x 프리-믹스 B를 ARP, 5 μl/웰에 분배한다. Combi 상에서 간단하게 진탕하고, 실온에서 60분 동안 인큐베이션시킨다.

[0750] 7. 하기 상에서 판독한다: EnVision (Ex: 320 nm; Em1: 615 nm; Em2: 665 nm).

[0751] 8. 데이터는 Dotmatics를 사용하여 처리된다. 곡선은 4 파라미터 비-선형 핏트를 사용하여 핏팅되어 3원 복합체의 형성에 대한 EC50 값을 결정하다.

[0752] *결과:* 결합 곡선 (도 11)은 2.1 μM의 계산된 EC50 값을 갖는 CYPA-화합물 3- $KRAS_{G12C-GTP}$ 3원 복합체의 화합물 3 의존적 복합체 형성을 입증한다.

[0753] **실시예 7: 증폭된 발광성 근접 균질 검정에 의한 복합체 형성의 결정**

[0754] AlphaScreen 기술 (Perkin Elmer)은 2개의 융합-태깅된 단백질, 예를 들어, 단백질 1/태그 A 및 단백질 2/태그 B의 2원 회합을 검출하기 위한 표준 방법이고, 여기서 A 및 B는 글루타티온-S-전달효소 (GST), 헥사히스티딘 (His_6), FLAG, 바이오틴-avi, Myc, 및 혈구응집소 (HA) 중 임의의 것일 수 있다. 이 실시예에서, 기술을 사용하여 프리젠터 단백질과 표적 단백질의 화합물-촉진된 회합을 측정한다. 프리젠터 단백질/태그 A 및 표적 단백질/태그 B의 혼합물을 본 발명의 혼합물을 함유하는 384-웰 검정 플레이트에 첨가되고, 15분 동안 인큐베이션된다.

항-융합 태그 A 또는 B 알파스크린(AlphaScreen) 공여체 비드 및 항-융합 태그 A 또는 B 알파스크린 수용체 비드의 혼합물이 첨가되어, 반응은 240분 동안 인큐베이션된다. 알파스크린 신호는 여기 = 680 nm, 방출 = 585 nm을 사용하여 EnVision 마이크로플레이트 판독기 (Perkin Elmer) 상에서 판독된다. 3원 복합체 형성을 촉진하는 화합물은 DMSO 대조군 웰에 의해 알파스크린 신호의 증가를 유도하는 것으로 확인된다.

[0755] **알파 LISA에 의한 CYPA-화합물 3- $KRAS_{G12C-GTP}$ 복합체 형성의 결정**

[0756] Avi-태깅된 사이클로필린 A 및 His-태깅된 $KRAS_{G12C-GTP}$는 증가된 농도의 리간드 (화합물 3)와 혼합되었고, 3원 복합체가 형성되도록 60분 동안 실온에서 인큐베이션되었다. 니켈 킬레이트 공여체 비드 및 스트렙타비딘 수용체 비드의 예비-혼합물이 이후 첨가되고, 60분 동안 인큐베이션되었다. AlphaLISA 신호는 EnVision 마이크로플레이트 판독기 (Perkin Elmer, Ex 680 nm, Em 615 nm) 상에서 판독된다. 프리젠터 및 표적 단백질이 없는 카운터 스크린은 또한 화합물 단독만의 기여가 배제되도록 실시된다.

[0757] *시약 및 기기:*

[0758] • $His6-KRAS_{G12C-GTP}$ (인하우스; 잔기 1-169); PBS 완충액 중 1.2 mM, pH 7.4

[0759] • Avi-CYPA (인하우스; 잔기 1-165); PBS 완충액 중 556 uM, pH 7.4

[0760] • 니켈 킬레이트 공여체 비드 (Perkin Elmer)

[0761] • 스트렙타비딘 수용체 비드 (Perkin Elmer)

[0762] • 리간드 (W21487), 100% DMSO 중 10 mM

[0763] • EnVision (Perkin Elmer)

[0764] • 8-채널 작은 용적 카셋트가 구비된 Combi Mutidrop 액체 분배기

[0765] • 알파플레이트(alphaPlate)-384 플레이트 (백색)

[0766] *실험 프로토콜:*

[0767] 1. 모스키토(Mosquito)를 사용하여 100 nL/웰의 화합물 (DMSO 중에서 농도가 변화됨)을 384-w 흑색 ProxiPlate 분배하여 검정용 플레이트 (ARP)를 제조한다.

[0768] 2. 40 mM Hepes pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$ 및 0.004% Tween-20을 함유하는 2X 검정 완충액을 제조한다.

[0769] 3. 2x 프리-믹스 A: 1X 검정 완충액 중의 300 nM의 His6-KRas G12C-GTP (1-169) 및 300 nM의 Avi-CypA (1-165)를 제조한다.

[0770] 4. MutiDrop Combi를 사용하여 2x 프리-믹스 A를 ARP, 5 μl/웰에 분배한다. 실온에서 60분 동안 인큐베이션시킨다.

[0771] 5. 2X 프리-믹스 B: 30 μg/ml의 스트렙타비딘 수용체 비드 및 30 μg/ml의 니켈 킬레이트 공여체 비드를 제조한다.

[0772] 6. MutiDrop Combi를 사용하여 2x 프리-믹스 B를 ARP, 5 μl/웰에 분배한다. Combi 상에서 간단하게 진탕하고, 실온에서 60분 동안 인큐베이션시킨다.

[0773] 7. 하기 상에서 판독한다: EnVision (Ex: 680 nm; Em1: 615nm).

[0774] 8. 데이터는 Dotmatics를 사용하여 처리된다. 곡선은 4 파라미터 비-선형 핏트를 사용하여 핏팅되어 3원 복합체의 형성에 대한 EC50 값을 결정하다.

[0775] *결과:* 결합 곡선 (도 12)은 0.99 μM의 계산된 EC50 값을 갖는 CYPA-화합물 3- $KRAS_{G12C-GTP}$ 3원 복합체의 화합물 3 의존적 복합체 형성을 입증한다.

[0776] **실시예 8: 등온 적정 열량측정에 의한 복합체 형성의 결정**

[0777] 등온 적정 열량측정 (ITC)은 리간드에 대한 2개의 단백질 또는 단백질의 2원 상호작용과 연관된 열 변화를 직접적으로 측정하기 위해 사용된 확립된 생체물리학적 기술이다. 열 변화의 측정은 결합 상수 (K_a)의 정확한 결정, 반응 화학양론 (N), 및 결합 엔탈피 (△H)의 변화를 가능하게 한다. 깁스 에너지 변화 (△G) 및 엔트로피 변화 (△S)는 또한 하기 관계를 사용하여 결정될 수 있다: $\triangle G = -RT\ln K_a = \triangle H - T\triangle S$ (식 중, R은 가스 상수이고, T는 절대 온도임). 이 실시예에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 또는 접합체의 결합 (예를 들어, 비-공유 또는 공유 결합)을 측정하여 사용된다.

[0778] **ITC에 의한 FKBP12-화합물 1과 CEP250 사이의 결합의 동력학 및 열역학의 결정**

[0779] *시약:* 100% DMSO 중 화합물 1 및 화합물 2 (인하우스), 단백질 완충액 (10 mM HEPES, pH 7.5, 75 mM NaCl, 0.5 mM TCEP), 검정 완충액 (단백질 완충액 + 1% DMSO), FKBP12 (인하우스), $CEP250_{29.4}$ (인하우스, 잔기 1982-2231) 및 $CEP250_{11.4}$ (인하우스, 잔기 2134-2231).

[0780] *장비:* MicroCal™ ITC_{200} (GE HEALTHCARE). 기기 파라미터는 표 6에 나타나 있다.

[0781] [표 6] 등온 적정 열량측정 기기 파라미터

실험 장치	MicroCal™ ITC_{200} (GE HEALTHCARE)
샘플 세포 용적 (μl)	270
주사기 용적 (μl)	40
실험 파라미터	
주사의 총수	19
세포 온도 (ºC)	25
표준 전력 (μCal/s)	5
초기 지연 (s)	200
교반 속도 (rpm)	750
주사 파라미터	
용적 (μl)	2
기간 (s)	4
간격 (s)	170-200
필터 기간 (s)	5
피드백 방식/게인(Gain)	높음

[0782]

[0783] 실험 프로토콜: FKBP12 모액은 검정 완충액 (1% DMSO 최종)에서 10 μM로 희석된다. 화합물은 20 μM (1% DMSO 최종)로 FKBP12에 첨가되고, 2원 복합체는 5-10 min 사전- 인큐베이션 시간 이후에 ITC 디바이스의 반응 세포에 채워진다. CEP250 단백질 저장액은 검정 완충액 중 50 μM로 희석되고, 주입 주사기에 채워지기 전에 20 μM 화합물 (1% DMSO 최종)이 보충된다. 화합물의 부재 하에 대조군 실험을 또한 실시하여 작업 인공물 및 주사기로부터 반응 세포로 주입되는 적정제의 희석과 연관된 열을 결정한다. 보다 상세한 실험 파라미터는 표 7에 나타나 있다.

[0784] [표 7] 최종 단백질 및 리간드 농도

실험	세포 함량	주사기 함량	리간드	DMSO 농도 (%)
3	FKBP12, 10 μM	$CEP250_{29.2}$, 50 μM	없음	1.0
4	FKBP12, 10 μM	$CEP250_{11.4}$, 50 μM	없음	1.0
5	FKBP12, 10 μM	$CEP250_{29.2}$, 118μM	화합물 1b, 20 μM	1.0
6	FKBP12, 10 μM	$CEP250_{29.2}$, 118 μM	화합물 2, 20 μM	1.0
7	FKBP12, 10 μM	$CEP250_{11.4}$, 68 μM	화합물 1b, 20 μM	1.0
8	FKBP12, 10 μM	$CEP250_{11.4}$, 68 μM	화합물 2, 20 μM	1.0

[0785]

[0786] *데이터 핏팅:* 데이터는 하기 절차에 따라 Origin ITC200 소프트웨어로 핏팅되었다.

[0787] 1) 미가공 데이터를 판독한다.

[0788] 2) "mRawITC"에서: 적분 피크 및 기준선을 조정하고, 모든 피크를 적분한다.

[0789] 3) "델타 H" - 데이터 조절에서: 좋지 않은 데이터 (주사 #1 및 다른 인공물)를 제공하고, 직선을 제거한다 (배경 제거).

[0790] 4) "델타 H" - 모델 적합화에서: 한 세트의 부위 모델을 선택하고, 카이 제곱이 더 감소되지 않을 때까지 Levenberg-Marquardt 알고리즘으로의 핏팅을 수행하고, "실행"된 것을 완료한다 (파라미터 N, K_a 및 △H는 핏팅에 기초하여 계산됨).

[0791] *결과*: CEP250에의 FKBP12-화합물 1 및 FKBP12-화합물 2 2원 복합체의 결합에 대한 ITC 측정은 표 8 및 도 13에 요약되어 있다. 전반적으로, $CEP250_{11.4}$ 및 $CEP250_{29.4}$에의 FKBP12-화합물 1 및 FKBP12-화합물 2 2원 복합체 결합에 대한 데이터는 유사한 상호작용 파라미터를 나타낸다. K_d 값은 모든 조합에 대해 유사하였다. 모든 상호작용은 거의 동일한 열역학적 프로파일을 나타내고, 이에서 결합은 순수 엔탈피 결합 방식 (-T*△S 용어는 양이며, 깁스 자유 에너지에 기여되지 않는다). 모든 상호작용에 대한 결합 화학양론은 N=0.5-0.6이었고, $CEP250_{11.4}$/화합물 1/FKBP12의 결정 구조에서 입증된 바와 같이 2 FKBP12 분자에 대한 1 CEP250 동종이량체 결합에 대한 1:2 결합 비를 지지한다.

[0792] [표 8] ITC에 의한 FKBP12-화합물 1-CEP250 3원 복합체 형성의 결정

실험	T (K)	N	Kd (μM)*	ΔH ($kJ*mol^{-1}$)**	- T*ΔS ($kJ*mol^{-1}$)***	ΔH (kJ*mol-1)*** *
3	298	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	298	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	298	0.50	0.19	-52.21	13.80	-38.41
6	298	0.57	0.36	-58.48	21.73	-36.74
7	298	0.56	0.07	-49.37	8.62	-40.75
8	298	0.54	0.08	-47.78	7.41	-40.36

* K_d (K_a = 1/K_d으로부터 계산됨
** ΔH
*** T*ΔS (- TΔS = ΔG- ΔH로부터 계산됨)
**** ΔG = -RT ln K_a = RT ln K_d

[0793]

[0794] **실시예 9: 표면 플라즈몬 공명에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 동력학의 결정**

[0795] 표면 플라즈몬 공명 (SPR)은 리간드에 대한 2개의 단백질 또는 단백질의 2원 상호작용과 관련된 동력학을 측정하기 위해 사용되는 생체물리학적 기술이다. 전형적으로, 2원 상호작용 쌍 중 하나의 성분은 융합 태그를 통해 활성화된 센서 칩의 흐름 셀 상에 고정된다. 증가된 농도의 제2 성분 (피분석물)은 이후 고정된 시간 동안 활성 표면 상에 주입된다. 회합 단계 과정에서의 SPR 신호 (공명 단위로 표현됨, RU)의 증가 및 해리 단계 과정에서의 SPR 신호의 감소는 상호작용을 나타내고, 결합 모델을 핏팅하여 연관된 K_D, K_a, K_d 값을 결정할 수 있다. 이

실시예에서, 상기 방법을 사용하여 프리젠터 단백질에의 본 발명의 접합체의 결합에 대한 동력학을 측정하고, 이에서 (i) 접합체는 융합 태그를 통해 칩 상에 고정되고, 프리젠터 단백질이 표면 상에 주입되거나, 또는 (ii) 프리젠터 단백질은 융합 태그를 통해 칩 상에 고정되고, 접합체는 표면 상에 주입된다.

[0796] **SPR에 의한 FKBP12-화합물 1과 CEP250 사이의 결합의 동력학의 결정**

[0797] 이러한 프로토콜은 FKBP12-화합물 1 2원 복합체 (리간드)를 고정하는 CEP250 (피분석물)의 결합에 대한 동력학 (K_D, K_a, K_d)을 결정하는 방법으로서 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 이용한다.

[0798] *시약*: 100% DMSO (인하우스) 중 화합물 1, 10 X HBS-P+ 완충액 (GE HEALTHCARE BR-1006-71), 검정 완충액 (1 X HBS-P+ 완충액, 1% DMSO, 1 μM 화합물 1), 12 x HIS 태깅된 FKBP12 (인하우스), $CEP250_{29.2}$ (잔기 1982-2231) 및 $CEP250_{11.4}$ (잔기 2134-2231) (인하우스).

[0799] *장비*: BIACORE™ X100 (GE HEALTHCARE)

[0800] *공급*: NTA 센서 칩 (GE HEALTHCARE BR-1000-34)

[0801] *실험 프로토콜*: 실험은 25℃에서 수행된다. 12XHIS 태깅된 FKBP12의 모액은 1 μM 화합물 1 (1% DMSO 최종)을 함유하는 검정 완충액에서 100 nM로 희석된다. FKBP12의 대략 200-400 RU는 활성화된 NTA 칩의 2개의 유동 셀 중 하나 상에 고정된다. 제2 유동 셀은 센서 칩에 대한 피분석물의 비-특이적 상호작용에 대한 참조로서 활성화되지 않는다. 1 μM 화합물 1 (1% DMSO 최종)을 함유하는 동일한 검정 완충액에서 연속적으로 희석된 다양한 농도의 CEP250 (1 nM-1 μM 범위)는 10 μl/min의 유량으로 FKBP12 표면 및 참조 표면 상에 주입된다. 표면은 350 mM EDTA로의 피분석물 주사들 사이에 재생성된다.

[0802] *데이터 핏팅*: BiaEvaluation 소프트웨어 프로그램은 데이터 핏팅을 위해 사용된다. 모든 데이터는 표준 흐름 셀 및 완충액 주사 모두에 대해 제거된 표준이다. 동력학 분석을 위해, 데이터는 1:1 상호작용 모델에 대해 국소적으로 핏팅된다.

[0803] *결과*: SPR 센서그램은 도 14에 나타나 있다. 5.4 nM 및 0.29 nM 의 해리 상수 (K_D)는 각각 $CEP250_{11.4}$ 및 $CEP250_{29.2,}$에 대한 FKBP12/화합물 1의 결합에 대해 결정되었다.

[0804] **실시예 10: 생물층 간섭법에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 동력학의 결정**

[0805] 생물층 간섭법 (BLI)는 리간드에 대한 2개의 단백질 또는 단백질의 2원 상호작용과 연관된 동력학을 측정하기 위해 사용된 생체물리학적 기술이다. 전형적으로, 2원 상호작용 쌍 중 하나의 성분은 융합 태그를 통한 바이오센서 팁 상에 고정된다. 증가된 농도의 제2 성분 (피분석물)은 이후 고정된 시간 동안 바이오센서 상에 주입된다. 회합 단계 과정에서의 BLI 신호 (광학 두께로 표현됨, nm)의 증가 및 해리 단계 과정에서의 BLI 신호의 감소는 상호작용을 나타내고, 결합 모델에 대해 핏팅되어 연관된 K_D, K_a, K_d 값을 결정할 수 있다. 이 실시예에서, 상기 방법이 사용되어 프리젠터 단백질에의 본 발명의 접합체의 결합에 대한 동력학을 측정하며, 이에서 (i) 접합체는 융합 태그를 통해 팁 상에 고정되며, 프리젠터 단백질은 표면 상에 주입되거나, 또는 (ii) 프리젠터 단백질은 융합 태그를 통해 팁 상에 고정되고, 접합체는 표면 상에 주입된다.

[0806] **BLI에 의한 CYPA-화합물 3과 $KRAS_{G12C-GTP}$ 사이의 결합의 동력학의 결정**

[0807] 이러한 프로토콜은 CYPA-화합물 3 2원 복합체 (리간드)를 고정하는 $KRAS_{G12C-GTP}$ (피분석물)의 결합에 대한 해리 상수 (K_D)를 결정하기 위한 방법으로서 생물층 간섭법 (BLI)을 이용한다.

[0808] *시약*: 100% DMSO 중 화합물 3 (인하우스), ForteBio 동력학 완충액 (*ForteBio Inc.* , Menlo Park, CA), 검정 완충액 (동력학 완충액, 1% DMSO, 2 μM 화합물 3), Avi-태깅된 CYPA (인하우스), $KRAS_{G12C-GTP}$ (잔기 1-169) (인하우스).

[0809] *장비*: Octet Red 96 기기 (*FortéBio Inc.* , Menlo Park, CA)

[0810] *공급*: 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서 (FortéBio)

[0811] *실험 프로토콜*: 스트렙타비딘 (SA) 바이오센서는 0.6 nm의 장입 신호로 25℃에서 10 μM Avi-CYPA 단백질을 함

유하는 용액에서 코팅되었다. 단백질의 장입은 시간에 따른 안정성 및 기준선 이동의 부재를 나타내었다. 3원 복합체의 형성은 1:2 희석 시리즈로 200 μM로부터 출발되는 $KRAS_{G12C-GTP}$ 단백질 농도로의 용량- 반응 실험에서 평가되었다. 음성 대조군의 경우, Avi-CYPA 단백질로 코팅된 센서를 유일한 스크리닝 완충액 (2 μM 화합물 3으로 보충됨)을 함유하는 웰에 침지시켰다. 보정된 결합 반응 센소그램을 기록하고 분석하였다.

[0812] *데이터 핏팅*: ForteBio *Octet RED* 기기 상의 분석을 ForteBio 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 분석은 비-특이적 결합, 배경, 및 신호 이동을 설명하며, 잘 표준화된 센서 가변성을 최소화한다. 3원 복합체의 용량- 의존적 형성이 관측되었고, 상응하는 평형 해리 상수 (K_D)가 결정되었다.

[0813] *결과*: 센소그램 및 정상 상태 핏팅 곡선은 도 15에 나타나 있다. 44 μM의 해리 상수 (K_D)는 $KRAS_{G12C-GTP}$에 대한 CYPA/화합물 3의 결합에 대해 결정되었다.

[0814] **실시예 11: 가교결합 시약에 대한 FKBP12 결합된 표적 단백질의 단백체 확인**

[0815] *시약*: 100% DMSO 중 화합물 (인하우스), N-말단 바이오틴-FKBP12 (인하우스), HEK293T 세포 용해물 (인하우스).

[0816] *실험 프로토콜*: HEK293T 세포 용해물은 얼름 상의 초음파처리 (20% 전력으로의 4, 10초 펄스)를 사용하여 40 mM HEPES, pH 7.3, 120 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 0.5% 옥틸-b-글루코사이드, 및 EDTA 유리 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche)로 이루어진 세포용해 버퍼를 사용하여 제조되었다. 용해물은 원심분리를 통해 우선 투명하게 되었고, 생성된 상청액은 얼음 상의 0.2 mm 주사기 필터에 통과된다. N-말단 바이오틴 라벨링된 FKBP12는 4mM의 최종 농도로 500ml의 용해물에 첨가되었고, 피펫팅을 통해 혼합되었고, 이후 혼합물을 10 mM의 최종 농도로 첨가되었고, 반응은 피펫팅을 통해 혼합된다. 60mL의 50% 슬러리 아가로스-스트렙타비딘 수지 (세포용해 버퍼에서의 사전-평형화됨)가 첨가되었고, 반응은 1시간 동안 약하게 흔들면서 4 ℃에서 진행되었다. 인큐베이션 이후, 수지를 온건하게 펠릿화하였고, 첨가, 원심분리, 및 흡인을 통해 얼음 상에서의 1 mL의 세포용해 버퍼로 4회 세정하였고, 이후 동일한 물리적 방식으로 세제 없이 1mL의 세포용해 버퍼로 추가 4회 세정되었다. 유지된 단백질은 HEPES 완충액 중의 8M 우레아, pH 8.0를 사용하여 수지로부터 용출되었고, 100 mM HEPES, pH 8.0와 함께 7M 우레아로 희석시켰고, 2시간 동안 37℃에서 단백질 소화를 위해 퓁티드내부가수분해효소 Lys-C를 첨가하였다. 다음으로, 샘플을 100 mM HEPES, pH8.0을 사용하여 0.8M 우레아로 희석시켰고, 트립신을 첨가하였고, 샘플을 37 ℃에서 추가의 16 시간 동안 소화시켰다. 소화가 완료된 이후, 샘플은 그 위에 샘플이 장입된 C18 SPE 필터를 사용한 LC-MS/MS 분석을 위해 제조되고, 세정되고, 용출되고, 스피드-vac에서 건조시키고, 최종적으로 LC-MS/MS 분석을 위해 10ml의 5% 아세토니트릴, 5% 포름산 완충액 중에 현탁시켰다. LC-MS/MS 분석은 최상부 20 데이터 종속 획득 방법 및 HPLC에 대한 8-35% 아세토니트릴 구배을 사용하여 Thermo-Fisher LTQ-Velos-Pro OrbiTrap 질량 분광분석기 상에서 수행되었다. 펩타이드 서열을 Sequest 알고리즘을 사용하여 배정되었고, 확인된 단백질은 후보 표적 단백질을 확인하기 위해 대조군 샘플 (DMSO 단독)에 대해 비교된다.

[0817] *결과*: 상기 프로토콜을 사용하여, >100 표적 단백질은 가교결합 화합물의 존재 하에 프리젠터 단백질에 대해 결합할 수 있는 것으로 확인되었다. 확인된 표적 단백질은 키나제, 포스파타제, 유비퀴틴 리가제, DNA 결합 단백질, 열충격 단백질, DNA 헬리카제, GTPase 활성화 단백질, 뉴클레오타이드 결합 단백질, 및 여러 종류 단백질 결합 단백질을 포함한다.

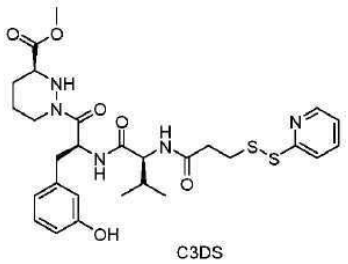
[0818] **실시예 12: 형광 분극화에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 결정**

[0819] 형광 분극화 (FP)의 기술은 형광 라벨링된 분자가 편광에 의해 야기되는 경우, 이는 분자 회전의 속도에 반비례하는 분극화의 정도를 가진 광을 방출하는 관찰에 기초한다. 소분자는 여기 상태 과정에서 빠르게 회전하고, 방출시, 낮은 분극화 값을 가진다. 제2 분자에 대한 라벨링된 분자의 결합에 의해 형성된 큰 복합체는 여기 상태 과정에서 약간 회전하고, 이에 따라 높은 분극화 값을 가진다. 형광의 이러한 특성을 사용하여 더 큰 단백질과의 라벨링된 리간드의 상호작용을 측정할 수 있고, 직접적인 경쟁 결합 검정에 대한 기준을 제공할 수 있다. 이 실시예에서, 상기 방법을 사용하여 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 또는 접합체의 결합을 측정하며, 표적 단백질과의 3원 복합체 형성을 확립한다.

[0820] **FP에 의한 CypA: C3DS: KRAS 복합체 형성의 결정**

[0821] *시약*: 100% DMSO 중 C3DS (인하우스), 단백질 완충액 (12.5 mM HEPES pH = 7.4, 1 mM $MgCl_2$), 검정 완충액 (25 mM HEPES, pH 7.3, 0.002% Tween 20, 0.1% BSA, 10 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$), CYPA (인하우스), Mant-GMP-PNP 장

입된 KRAS (1-169 잔기).



C3DS

[0822]

[0823] *장비*: SpectraMax

[0824] *실험 프로토콜*: KRAS 모액은 검정 완충액 (1% DMSO 최종) 중의 0.8 μM의 최종 농도로 장입된다. 화합물 (C3DS)은 10 μM의 최종 농도로 첨가되고, 반응 혼합물은 384 웰 Costar 흑색 플레이트에 분배된다. CYPA는 플레이트의 웰로 연속적으로 희석되고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션되었다. 또한, 화합물의 부재 하의 대조군 실험은 실시되어 화합물의 부재 하에 KRAS에 대한 CYPA의 회합을 결정한다. 반응 혼합물은 355nm에서 여기되고, 방출 신호는 455 nm에서 기록된다. 신호는 수직으로 측정되며, 평면 및 분극화는 하기 식을 사용하여 기록된다.

[0825] FP (분극화 단위 x 10^-3) = 신호 (평행)-신호(수직)/ [신호 (평행)+신호(수직)]

[0826] *결과*: 대표적인 곡선은 도 16에 나타나 있고, EC50 (농도는 50%까지 KRAS의 FP 신호를 향상시킬 것을 요구함)을 열거하는 표는 하기에 열거되어 있다. 곡선은 4-파라미터 방정식에 대해 핏팅되고, 수득된 EC50은 CYPA와 KRAS 사이의 결합을 향상시키는 방향으로의 리간드 C3DS의 효과를 나타낸다.

[0827]

	CypA:Kras	CypA:C3DS:Kras
EC50	30 μM	2.3 μM

[0828] **실시예 13: 핵자기 공명에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 결정**

[0829] 핵자기 공명 (NMR) 분광법은 3차원 구조를 알아내고, 단백질 및 단백질-리간드 복합체의 동력학을 연구하기 위해 사용된 기술이다. 또한, 단백질-리간드 상호작용에서의 리간드 결합 부위를 확인하는 것이 사용될 수 있다. 다수의 이용가능한 NMR 접근법 중에서, 단백질 구조 기반 리간드 스크리닝 (고도의 감수성 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC 스펙트럼) 및 리간드 (약물) 결합에서 관련된 중요 잔기의 확인은 이러한 연구에 대한 가장 민감한 방법이다. 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC의 수집 및 단백질의 NMR 샘플로의 순차적으로 증가되는 리간드 농도의 추가는 화학적 이동 섭동(chemical shift perturbation, CSP)으로 지칭되는 원자 수준으로 고도로 분해된 잔기 섭동 정보를 제공하며, 이는 이용가능한 임의의 다른 생체물리학적 기술에 의해 가능하지 않은 리간드 결합 부위의 확인에 대한 보다 정확한 정보를 직접적으로 제공한다. 이러한 접근법을 사용하여, 단백질 또는 2원 단백질 복합체에 대해 결합하는 리간드의 약한, 중간, 및 강한 친화도가 연구될 수 있고, 이러한 정보는 기존 구조, 동적, 및 동력학 정보와 직접적으로 연관될 수 있다. 이 실시예에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 (약물) 또는 접합체의 결합 (예를 들어 비-공유 또는 공유)을 입증하기 위해 사용된다.

[0830] **용액 NMR 분광법에 의한 3원 복합체에서 결합되는 KRAS(G12C)-사이클로필린-화합물 3의 결정**

[0831] *시약*: 100% DMSO 중 화합물 3 (인하우스), 단백질 완충액 (50 mM 트리스-d_{11}, 50 mM NaCl, pH 7.0, 1 mM TCEP-d_{16}, 1 mM $MgCl_2$), KRAS (93% H_2O 및 7% D_2O 중 100 μM DSS)의 NMR 샘플에서의 첨가제, 검정 완충액 (DMSO 중 단백질 완충액 + 증가된 당량의 약물 (≤ 5%)), GMP-^{15}N-KRAS(G12C) -16 (N-His, 잔기 1-169, 인하우스), 비표지된 (UL) 사이클로필린 (CYPA; 잔기 1-165) (인하우스).

[0832] *장비*: 5mm CPTCI ^{1}H-^{13}C/^{15}N/D Z-GRD Z44909/0026 냉동프로브가 장착된 Bruker Avance 800 MHz 분광기 (Bruker). 고정확성 5 mm NMR 튜브가 이러한 실험에서 사용된다.

[0833] *NMR 데이터 처리 및 분석*: Linux 컴퓨터는 처리를 위해 Topspin v3.1 및 NMRPipe/NMRDraw, 및 데이터 분석을 위한 CCPNMR "분석" 프로그램을 실행한다.

[0834] *실험 프로토콜*: 단백질 완충액 중의 0.72 mM의 GMP-^{15}N-KRAS(G12C) -16 모액을 사용하여 600 μl에서의 0.18 mM

NMR 샘플(NMR 첨가제 포함)을 제조하였다. DSS를 화학적 이동 참조를 위한 내부 표준 (0.0 ppm에서의 ^{1}H 피크)으로서 사용하였다. ^{15}N KRAS의 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC 스펙트럼을 수집하였다 (데이터 크기 2048x128). 단백질 완충액 중의 1 당량 (0.18 mM)의 CYPA를 (0.4 mM의 모액으로부터) NMR 샘플로 첨가하였고, 10분 동안 진탕시켰다. 최종 NMR 샘플 용적을 600 μl로 유지하였다. 2원 복합체 (^{15}N-KRAS + UL-CYPA)의 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC 스펙트럼 (데이터 크기 2048x128)을 다른 획득 파라미터를 동일하게 유지하여 수집하였다 (유일하게 KRAS ^{1}H-^{15}N 상관관계 교차피크만이 스펙트럼에서 볼 수 있다). 100% DMSO에서의 20 mM 화합물 3의 모액을 NMR 적정을 위해 사용하였다. 화합물 3을 NMR 샘플에 순차적으로 첨가하여 2원 복합체 (^{15}N-KRAS + UL-CYPA)의 NMR 샘플에서 (15N-KRAS 농도의 것에 대해) 그것의 0.5, 1.0, 2.5, 및 5.0 당량을 얻었다. 각각의 단계에서 600 μl의 샘플 용적은 획득 파라미터를 동일하게 하여 유지되었다. 화합물 3 첨가의 각각의 단계에서, 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC 스펙트럼은 KRAS 잔기의 화학적 이동 섭동 (CSP)을 조사하기 위해 획득되었다. 모든 스펙트럼은 사로에 대해 중첩되었다. 각각의 화합물 3 적정점에서의 효과적인 CSP는 3원 복합체 (KRAS+CYPA+ 화합물 3) 대 2원 복합체 (KRAS+CYPA)에서의 KRAS의 잔기의 화학적 이동의 차이를 사용하여 결정된다. 그 다음, 계량된 평균 화학적 이동 (각각의 KRAS 잔기의 ($\triangle\delta_{\text{칭량됨}}$)는 하기 화학식을 사용하여 결정된다:

[0835] $$\triangle\delta_{\text{칭량됨}} = [(\triangle^{1}H)^{2} + (\triangle^{15}N/5)^{2}]^{1/2}$$

[0836] 전체 평균으로부터의 하나의 표준 편차보다 더 큰 잔기 유도 $\triangle\delta_{\text{칭량됨}}$은 유의미하게 섭동된 것으로 간주되며, 결합 부위 맵핑에서 사용된다. 별개의 적정 실험에서, 본 발명자는 (상기 실험에서와 같이 동등 용매 농도를 충족시키는) DMSO 당량을 순차적으로 부가하고 DMSO 부가로부터의 기여도를 차감함으로써 2원 복합체 (KRAS+CYPA)에 대한 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC 스펙트럼을 수집하였다. 제2 대조군 실험에서, 본 발명자는 (CYPA의 부재 하에) 상이한 당량에서 화합물 3으로 적정된 15N-KRAS의 2D ^{1}H-^{15}N TROSY-HSQC 스펙트럼의 시리즈를 수집하였다.

[0837] 효과적인 CSP를 표로 작성하고 분석하였다. (CYPA의 존재 하에) KRAS의 약물 결합 잔기는 단백질 표면 상에서 맵핑된다. 해리 상수, K_D가 결정된다.

[0838] *실험 및 가공 파라미터*:

[0839] 스펙트럼 데이터 크기: 2048 (1H 치수) x128 (15N- 치수)

[0840] 스캔의 횟수: 4

[0841] 온도: 298 K

[0842] 직교 검출 방식: DQD (1H) 및 Echo-AntiEcho (15N)

[0843] 데이터 크기는 간접 크기 내의 전향-부향 선형 예측을 적용함으로써 확장되었다. 데이터 세트는 푸리에 변환 이전에 각각의 치수에서 1회 제로 핏팅됨으로써 외삽되었다.

[0844] *결과*: $KRAS_{G12C\text{-}GTP}$ 의 2D 1H-15N TROSY-HSQC 스펙트럼은 도 17a에서 도시되어 있다. 화학양론적 양의 CYPA는 KRAS 아미드 백본 교차피크의 효과가 없었고 (도 17b), 이는 KRAS 및 CYPA가 직접적으로 상호작용하지 않음을 나타낸다. CYPA: KRAS의 1:1 샘플로의 W21487의 적정은 KRAS와의 직접적인 상호작용을 나타내는 뚜렷한 화학적 이동 (도 17c)을 나타낸다.

[0845] **실시예 14: 마이크로 단위 열 영동에 의한 접합체 및 단백질 사이의 결합의 결정**

[0846] 마이크로 단위 열 영동 (Microscale Thermophoresis, MST)은 분자의 분자 특성, 예컨대 유도된 온도 구배로의 그것의 이동도에 대한 크기, 형태에서의 임의의 변화와 상관시킴으로써 생체분자 상호작용의 특성 규면에 대한 기술이다. 구배의 생성은 적외선 레이저에 의해 유도된다. 생체분자의 운동은 대개 공유결합된 형광단 또는 심지어 고유 형상을 사용한 라벨링 분자를 특징으로 한다. 이 실시예에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 또는 접합체의 결합을 측정하고, 표적 단백질과의 3원 복합체 형성을 확립하기 위해 사용되며, 이에서 (i) 접합체는 형광단으로 라벨링되며, 프리젠터 단백질은 적정되거나, 또는 (ii) 프리젠터 단백질은 형광단으로 라벨링되며, 접합체는 적정된다.

[0847] **실시예 15: 제2 하모닉 생성 기술에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 결정**

[0848] 제2 하모닉 생성 (SHG)은 실시간으로 수용액에서의 구조적 변화를 측정하기 위해 사용될 수 있는 광학 현상이다. SHG 신호 강도는 표면에 고정된 단백질에 대해 라벨링된 염료의 평균 각도 배형에 민감하고, 신호 변화의 크기는 각도 변화의 양과 직접적으로 상호관련된다. 상이한 형태(conformation)는 결합시의 신호 변화의 규모, 기준선에 대한 신호 (양의 신호 변화 및 그 반대를 생성하는 표면에 대해 보다 더 수직한 배향) 및 동력학으로 분류될 수 있다. 이 실시예에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 또는 접합체의 결합을 측정하고, 표적 단백질과의 3원 복합체 형성을 달성하기 위해 사용되며, 이에서 (i) 염료 라벨링된 접합체는 융합 태그를 통해 표면 상에 고정되며, 프리젠터 단백질은 표면 상에 주입되거나, 또는 (ii) 염료 라벨링된 프리젠터 단백질은 융합 태그를 통해 표면 상에 고정되며, 접합체는 표면 상에 주입된다.

[0849] **실시예 16: 시차 주사 형광측정법에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 결정**

[0850] 시차 주사 형광측정법 (DSF)은 단백질의 용융 온도 (T_m)를 측정하기 위해 사용되는 용액 기반 생체물리학적 기술이다. 통상적인 실험에서, 관심대상의 단백질은 형광 염료 (예를 들어 SYPRO 오렌지)의 존재 하에 증가된 열 (전형적으로 4℃-95℃)에 가해진다. 형광 강도는 온도의 함수로서 플롯팅되고, T_m은 형광 신호의 음의 미분 최소값으로부터 계산된다. 표적 단백질의 경우, 소분자의 존재 하의 열 이동 (ΔT_m)은 소분자가 단백질에 결합되어 안정화되는지 여부를 평가하기 위해 측정될 수 있다. 이 실시예에서에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 또는 접합체의 열 이동 (예를 들어, 비-공유 또는 공유 결합)을 측정하기 위해 사용되고, 이에서 (i) 접합체는 형광 염료로 라벨링되고, 프리젠터 단백질은 적정되거나, 또는 (ii) 프리젠터 단백질은 형광 염료로 라벨링되고, 접합체는 적정된다.

[0851] **실시예 17: NanoDSF에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 결정**

[0852] NanoDSF는 고유 트립토판 또는 티로신 형광을 사용하여 단백질의 T_m를 측정하기 위한 개선된 DSF 방법이다. 통상적인 실험에서, 관심대상의 단백질은 증가된 열 (통상적으로 4℃-95℃)에 가해지고, 고유 트립토판 또는 티로신 잔기의 형광 강도는 온도의 함수로서 모니터링된다. T_m은 트립토판 형광 강도의 변화, 또는 미접힘(unfolding)시 트립토판 방출의 이동을 기술하는 330 및 350 nm에서의 트립토판 방출의 비로부터 계산될 수 있다. 표적 단백질의 경우, 소분자의 존재 하의 ΔT_m은 소분자가 단백질에 결합되고 안정화되는지 여부를 평가하기 위해 측정될 수 있다. 이 실시예에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 또는 접합체의 열 이동 (예를 들어, 비-공유 또는 공유 결합)을 측정하기 위해 사용되고, 이에서 (i) 접합체의 형광이 측정되고, 프리젠터 단백질은 적정되거나, 또는 (ii) 프리젠터 단백질의 형광이 모니터링되고, 접합체가 적정된다.

[0853] **실시예 18: 시차 광 산란에 의한 복합체 형성의 결정**

[0854] 동적 광 산란 (DLS)은 무작위 브라운 운동을 하고 있는 입자로부터 발생되는 산란 강도에서의 시간-의존적 변동을 측정하기 위해 사용되는 확립된 생물리학 방법이다. 확산 계수 및 입자 크기 정보는 이러한 변동의 분석으로부터 구할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 방법은 수용액에서의 단백질의 반경 및 분자량을 포함하는 크기 특성을 측정하는 능력을 제공한다. 이 실시예에서, 상기 방법은 (i) 본 발명의 접합체의 결합시의 프리젠터 단백질 또는 (ii) 프리젠터 단백질에의 결합시의 본 발명의 접합체에서의 반경 또는 분자의 변화를 측정하기 위해 사용된다.

[0855] **실시예 19: 음파 음향 기술에 의한 접합체와 단백질 사이의 결합의 결정**

[0856] 표면 음파 (SAW) 기술은 바이오센서 따라 이동되는 표면 음파의 위상에서의 이동을 모니터링하여 결합-유도된 구조적 변화의 실시간 검출을 위해 사용되는 생물리학적 방법이다. 리간드에 대한 2개의 단백질 또는 단백질의 2원 상호작용과 연관된 동력학을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 통상적으로, 2원 상호작용 쌍 중 하나의 성분은 융합 태그를 통해 바이오센서에 고정된다. 증가된 농도의 제2 성분 (피분석물)은 이후 고정 시간 동안 바이오센서 위에 주입된다. 회합 단계 과정에서의 (파위상 또는 진폭의 변화를 통해 측정되는) 신호의 증가 및 해리 단계에서의 신호의 감소는 상호작용을 나타내고, 결합 모델에 핏팅되어 연관된 K_D, K_a, K_d 값을 결정할 수 있다. 이 실시예에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 접합체의 결합에 대한 동력학을 측정하기 위해 사용되며, 이에서 (i) 접합체는 융합 태그를 통해 바이오센서 칩에 고정되고, 프리젠터 단백질은 표면, 또는 (ii) 프리젠터 단백질 상에 주입된다.

[0857] **실시예 20: 소각 X-선 산란에 의한 복합체 형성의 결정**

[0858] 소각 X-선 산란 (SAXS)은 평균 입자 크기 및 형상과 관련하여 단백질의 구조를 결정하기 위해 사용되는 용액 기반 방법이다. 이는 1 내지 25 nm의 해상도 범위, 및 최대 150 nm 크기의 부분적으로 정렬된 시스템에서의 반복 거리의 구조적 정보를 전달할 수 있다. 초소각 산란 (USAS)은 더욱더 큰 치수를 해상할 수 있다. 전형적인 산란 실험에서, 단백질 또는 단백질 복합체의 용액은 X-선 (전형적으로 대략 0.15 nm의 파장 λ를 가짐)에 노출된다. 산란된 강도 I(s)는 운동량 전달의 함수 ($s=4\pi\sin\theta/\lambda$, 여기서 2θ는 입사각 및 산란된 방사선 사이의 각이다)로서 기록된다. 용액의 강도로부터 단지 용매로부터의 용액 산란이 차감된다. X-선 산란 곡선 (강도 대 산란 각)은 이후 단백질 또는 단백질 복합체의 저-해상도 모델을 생성하기 위해 사용된다. 이 실시예에서, 상기 방법은 프리젠터 단백질에 대한 본 발명의 화합물 또는 접합체의 3원 복합체 (예를 들어, 비-공유 또는 공유 결합)의 존재를 확인하기 위해 사용된다.

[0859] **다른 구현예**

[0860] 본 개시내용은 이의 상세한 설명과 결합하여 기재되어 있는 한편, 이의 상술한 설명은 설명하기 위한 것으로 의도되며, 첨부된 청구항의 범위에 의해 정의되는 본 개시내용의 범위를 제한하지 않는다. 다른 양태, 이점, 및 변경은 하기 청구항의 범위 내에 있다.

[0861] 당해 분야의 숙련가는 일상적인 실험과정만을 사용하여 본 명세서에 기재된 본 발명에 따른 특정 구현예에 대한 다수의 균등물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 설명에 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 이는 첨부된 청구항의 범위에 제시되어 있다.

[0862] 청구항에서, 관사(예컨대 "a," "an," 및 "the")는 반대로 나타내거나 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 하나 이상의 것을 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 청구항 또는 설명은 그룹 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 반대로 나타내거나 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않은 한, 주어진 생성물 또는 방법에서 존재하거나, 이용되거나, 또는 이와 관련되는 경우를 충족시키는 것으로 고려된다. 본 발명은 그룹의 정확하게 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 방법에서 존재하거나, 이용되거나, 또는 이와 관련되는 구현예를 포함한다. 본 발명은 그룹 구성원 중 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 방법에서 존재하거나, 이용되거나, 또는 이와 관련되는 구현예를 포함한다.

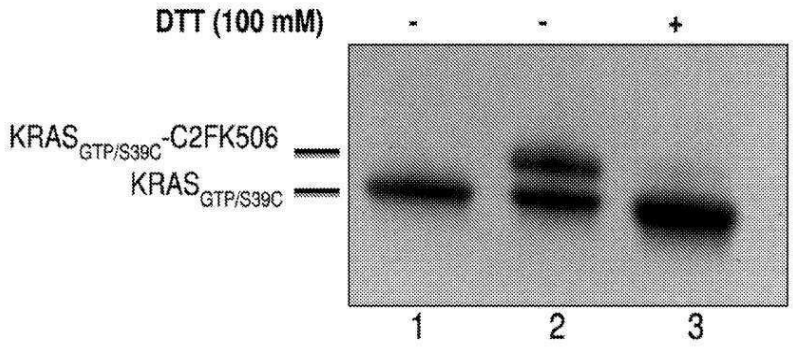
[0863] 또한, 용어 "포함하는"은 개방형인 것으로 의도되며, 추가의 성분 또는 단계의 개입을 허용하지만 이를 필요로 하지 않는다. 용어 "포함하는"이 본 명세서에서 사용되는 경우, 용어 "~로 이루어지는"은 이에 따라 포괄적이며, 개시된 것이다.

[0864] 범위가 주어지는 경우, 종점이 포함된다. 게다가, 달리 나타내거나 또는 문맥 및 당업자의 이해로부터 달리 명백하지 않는 한, 범위로 표현되는 값은 본 발명의 상이한 구현예에서의 언급된 범위 내의 임의의 특정 값 또는 하위 범위를 문맥에서 달리 언급되지 않는 한, 상기 범위의 하한값의 10분의 1까지로 가정할 수 있음을 이해하여야 한다.

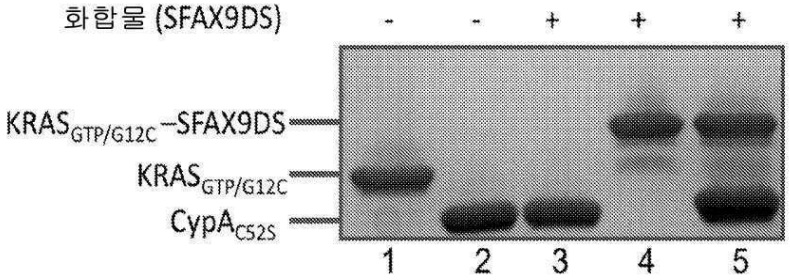
[0865] 또한, 선행기술에 포함되는 본 발명의 임의의 특정 구현예는 청구항의 임의의 하나 이상으로부터 명백하게 배제될 수 있음을 이해하여야 한다. 이러한 구현예는 당해 분야의 숙련가에게 알려진 것으로 간주된 이후에, 이들은 배제가 본 명세서에 명백하게 제시되어 있지 않을지라도 배제될 수 있다. 본 발명의 조성물의 임의의 특정 구현예 (예를 들어, 그것에 의해 인코딩된 임의의 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질; 임의의 제조 방법; 임의의 사용 방법)는 선행기술의 존재와 관련되거나 되지 않고 임의의 이유로 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 배제될 수 있다.

도면

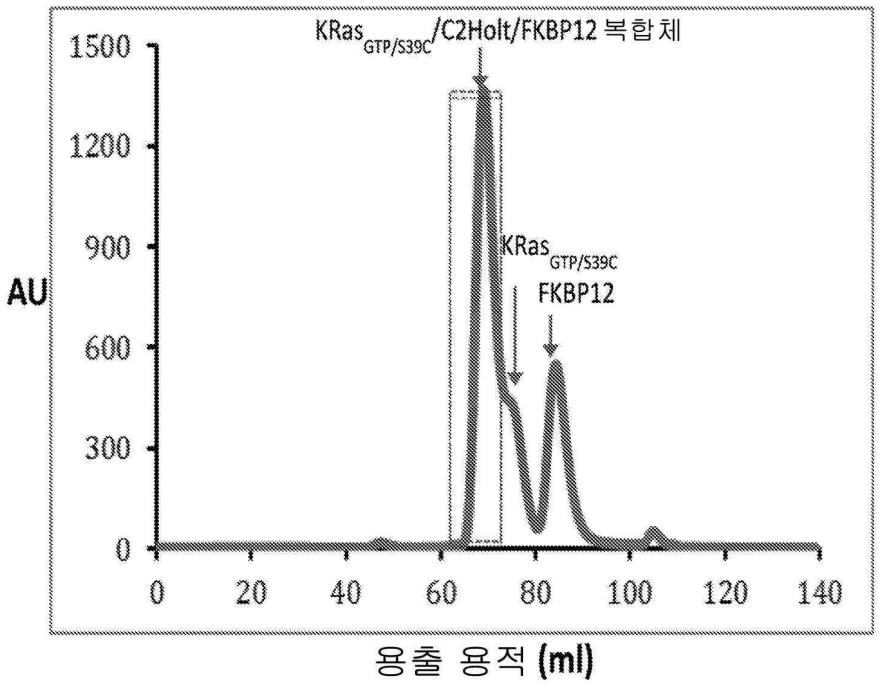
도면1



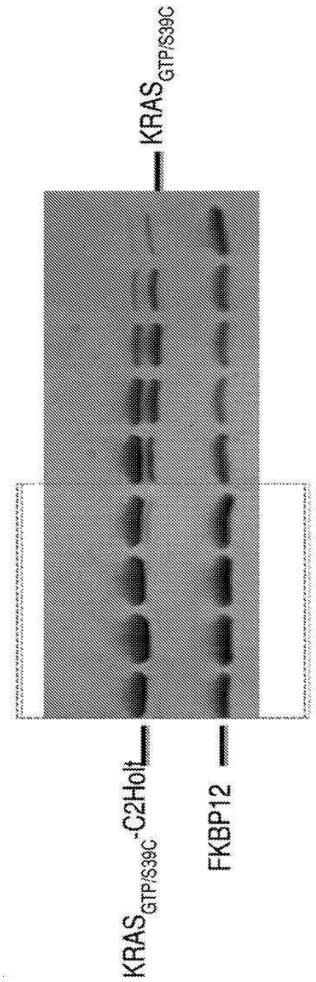
도면2



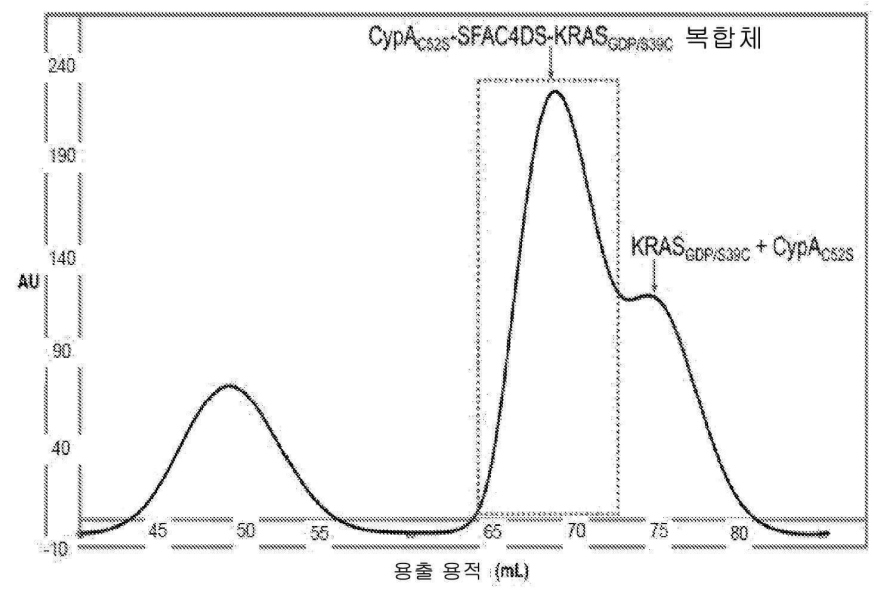
도면3a

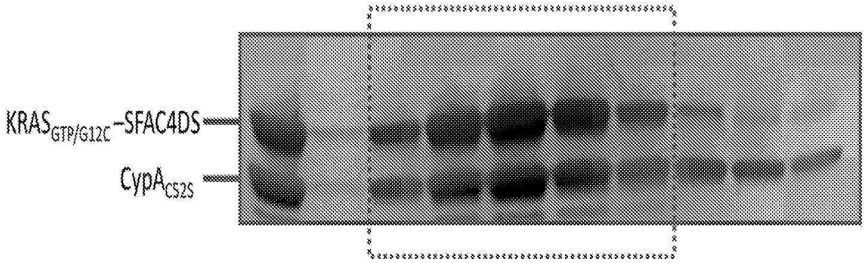


도면3b

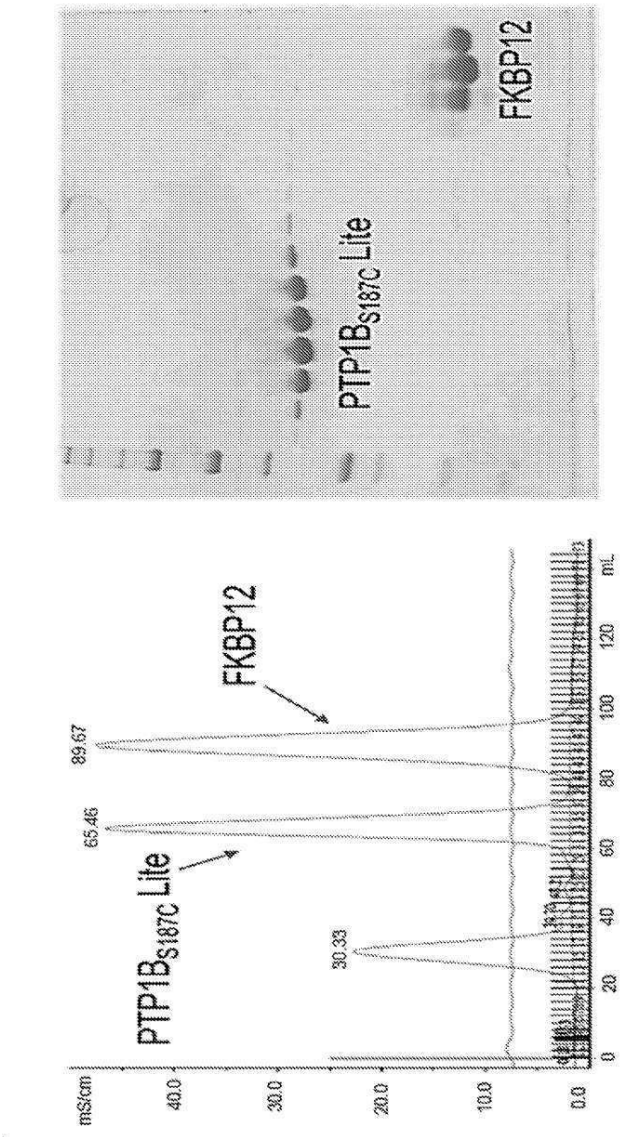


도면4

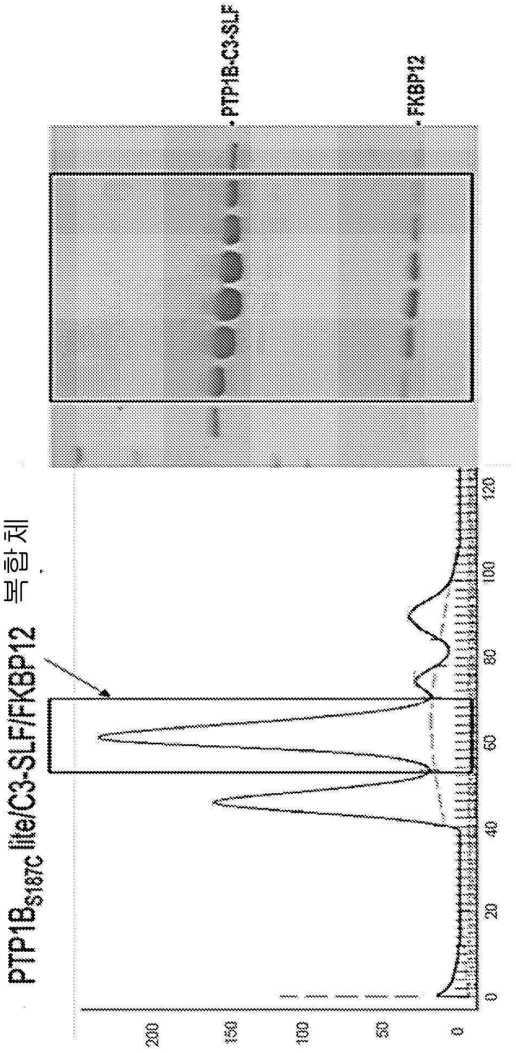

CypA$_{C52S}$-SFAC4DS-KRAS$_{GDP/S39C}$ 복합체
KRAS$_{GDP/S39C}$ + CypA$_{C52S}$
AU
240
190
140
90
40
-10
45
50
55
65
70
75
80
용출 용적 (mL)


KRAS$_{GTP/G12C}$-SFAC4DS
CypA$_{C52S}$

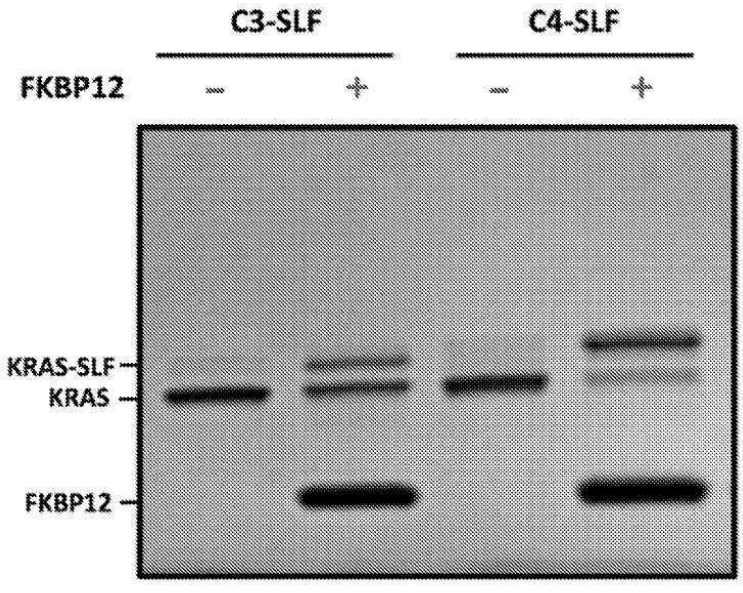
도면5a


FKBP12
PTP1B$_{S187C}$ Lite
FKBP12
PTP1B$_{S187C}$ Lite
89.67
65.46
30.33
mS/cm
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
0
20
40
60
80
100
120
mL

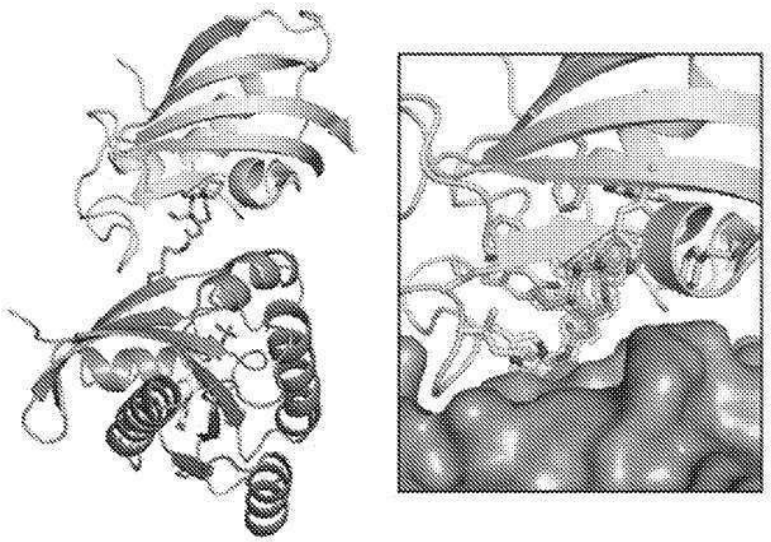
도면5b


PTP1B-C3-SLF
FKBP12
복합체
PTP1B$_{S187C}$ lite/C3-SLF/FKBP12
200
150
100
50
0
120
100
80
60
40
20
0

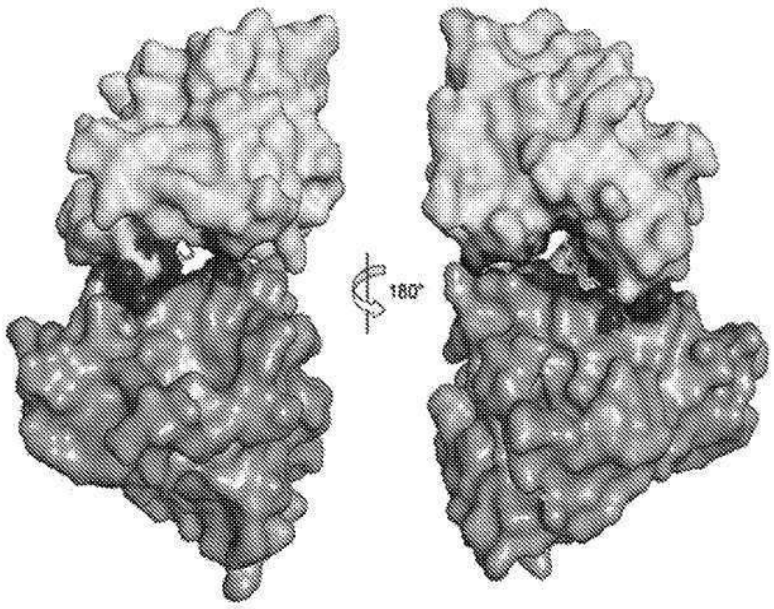
도면6


C3-SLF
C4-SLF
FKBP12
-
+
-
+
KRAS-SLF
KRAS
FKBP12

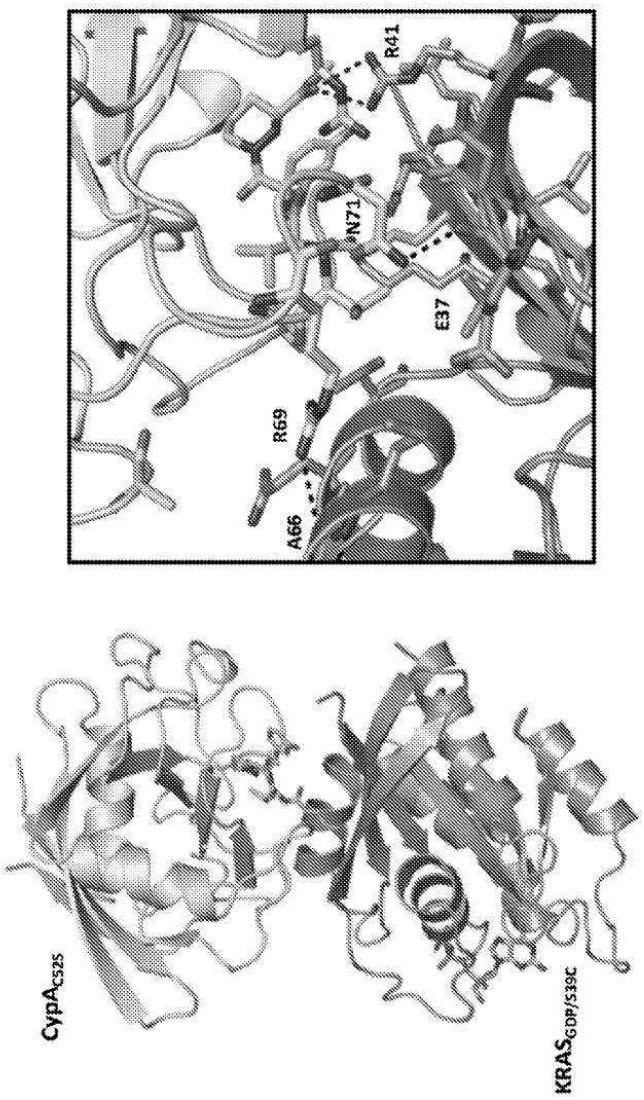
도면7a



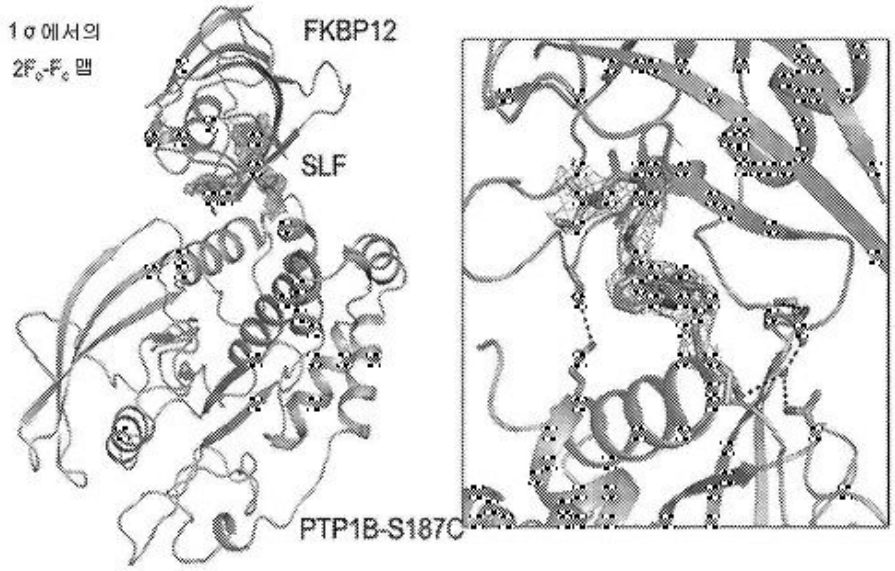
도면7b



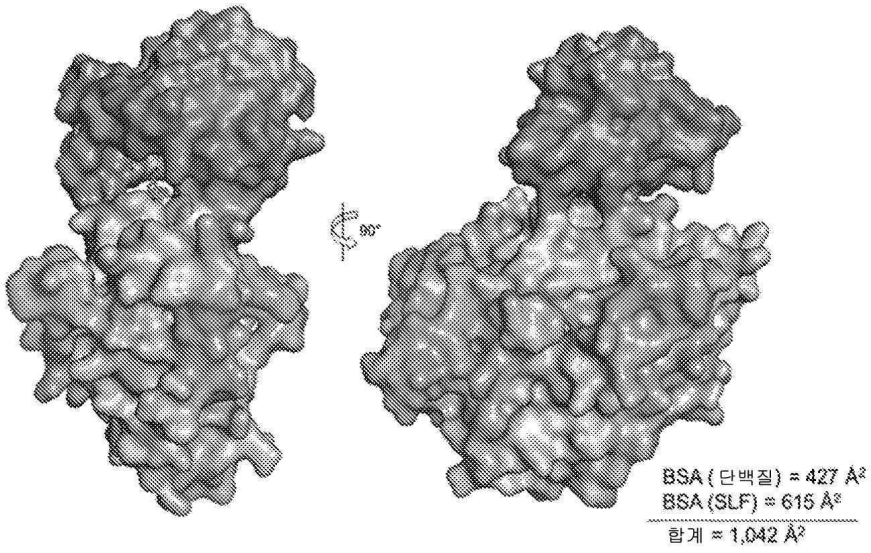
도면8



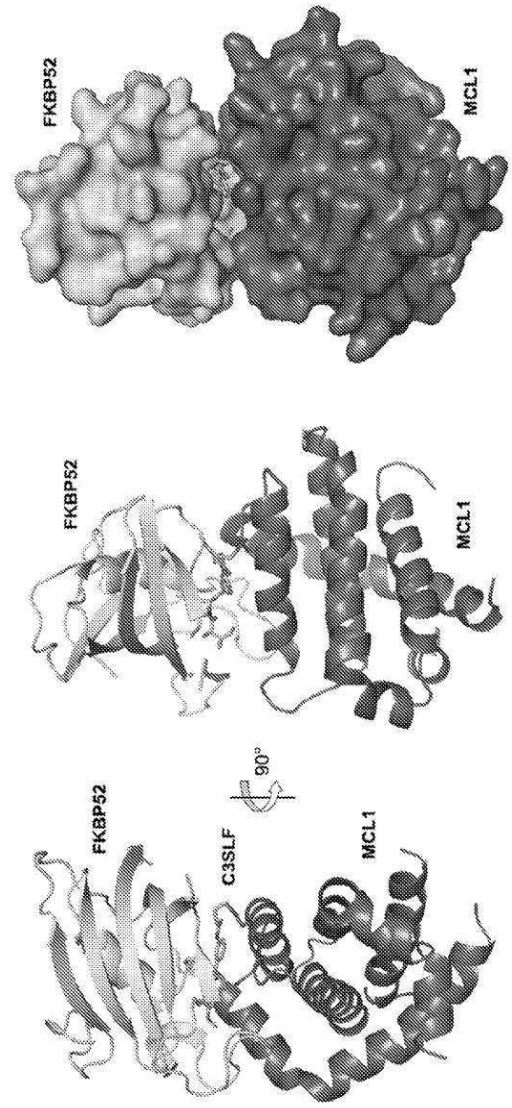
도면9a


1σ에서의
$2F_o$-F_c 맵
FKBP12
SLF
PTP1B-S187C

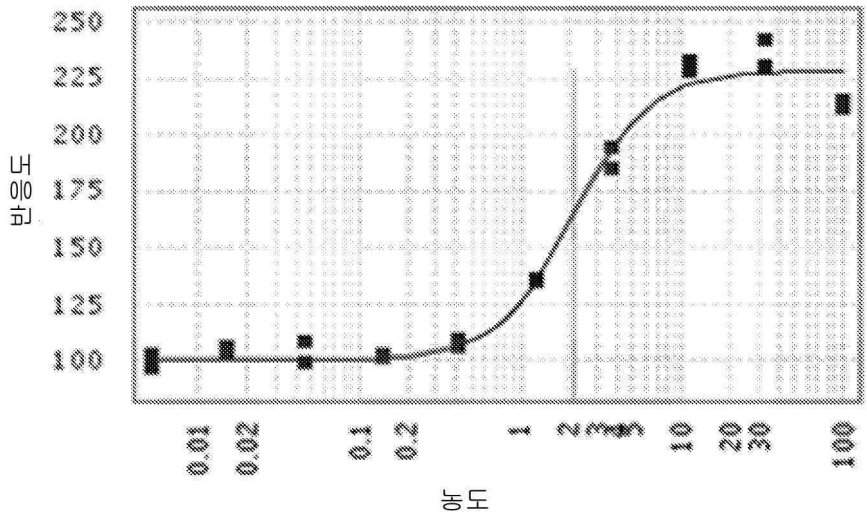
도면9b


BSA (단백질) = 427 Å²
BSA (SLF) = 615 Å²
합계 = 1,042 Å²

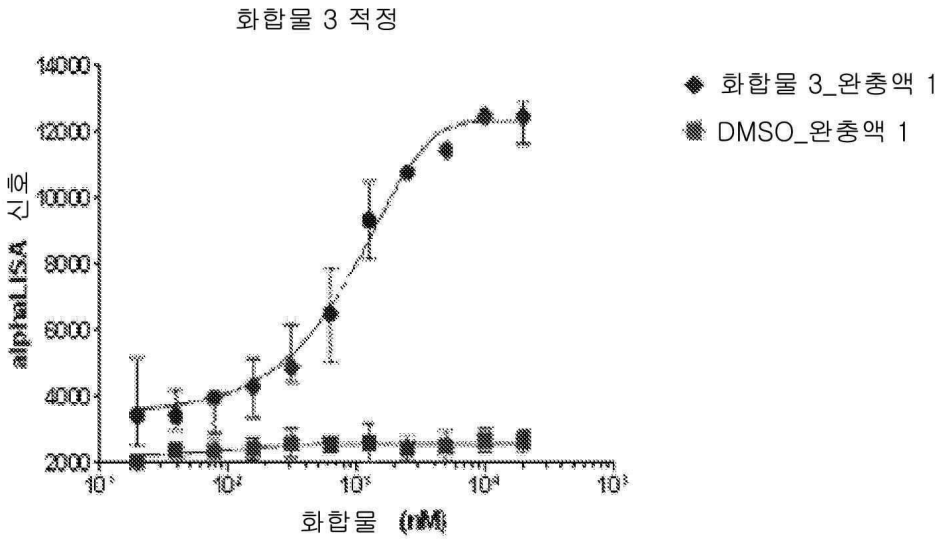
도면10


FKBP52
MCL1
FKBP52
MCL1
90°
FKBP52
C3SLF
MCL1

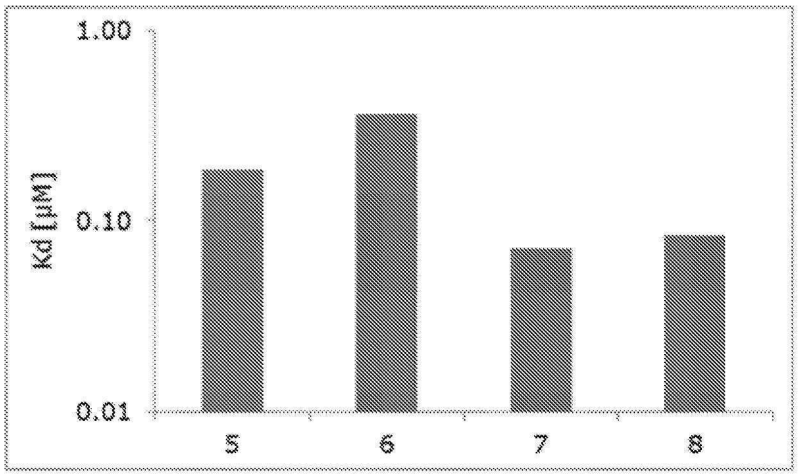
도면11

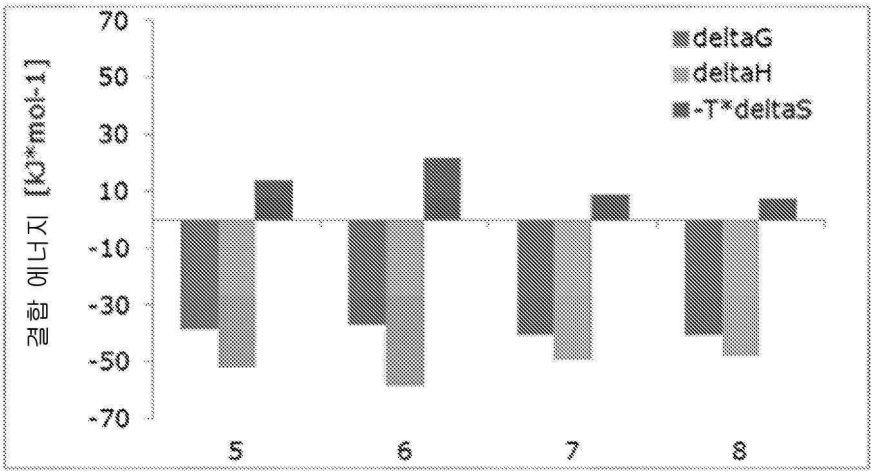

250
225
200
175
150
125
100
반응도
0.01
0.02
0.1
0.2
1
10
20
100
농도

도면12

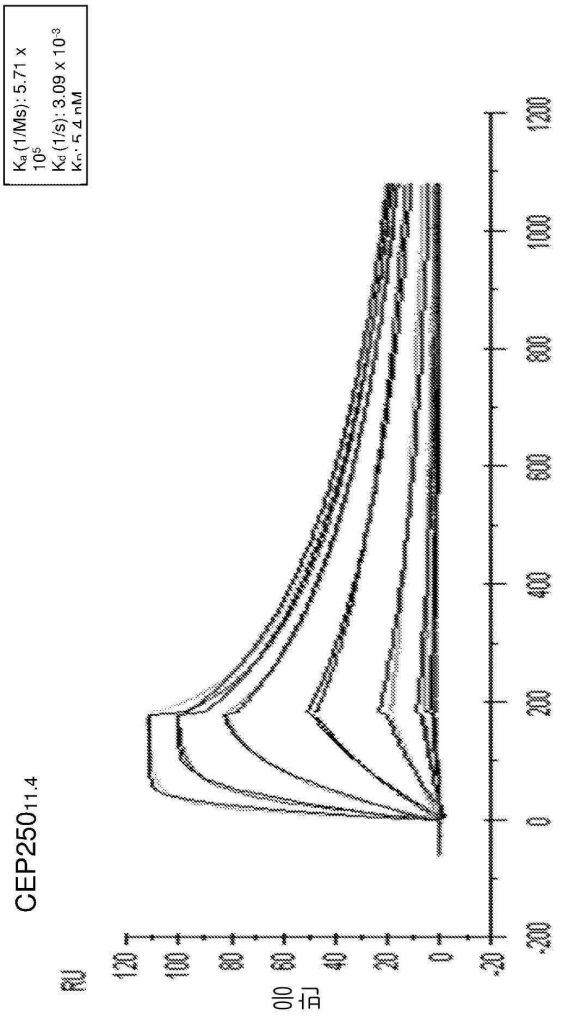

화합물 3 적정
alphaLISA 신호
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
화합물 (nM)
화합물 3_완충액 1
DMSO_완충액 1

도면13

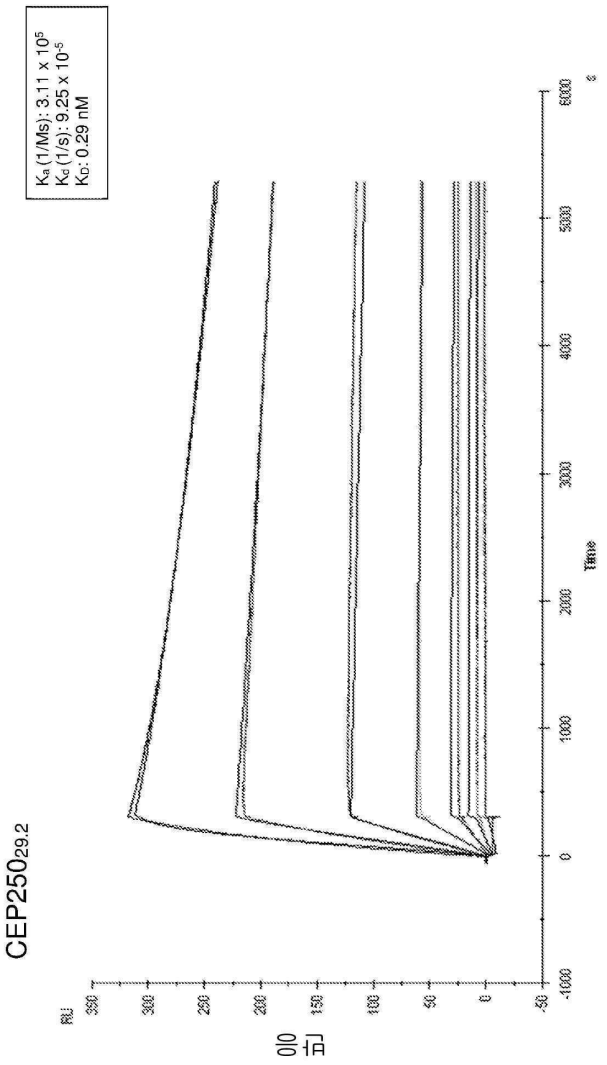

Kd [μM]
1.00
0.10
0.01
5
6
7
8


결합 에너지 [kJ*mol-1]
70
50
30
10
-10
-30
-50
-70
deltaG
deltaH
-T*deltaS
5
6
7
8

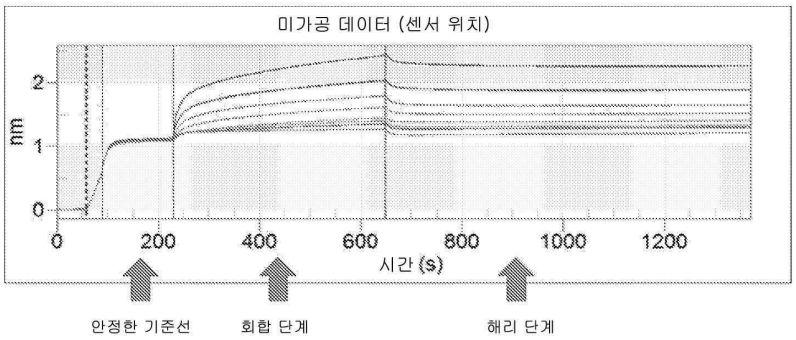
도면14a

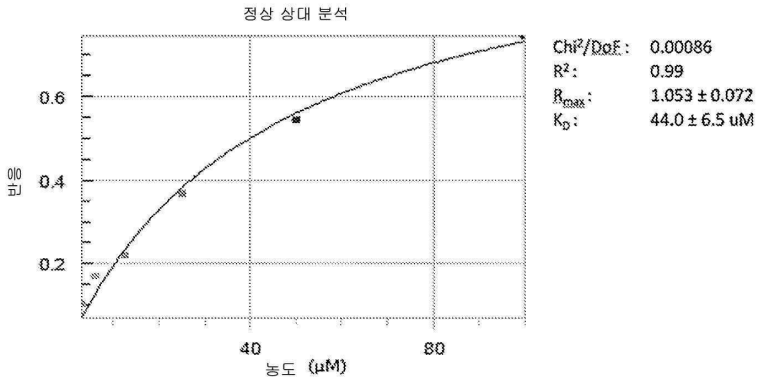

Ka (1/Ms): 5.71 x 10^6
Kd (1/s): 3.09 x 10^-3
KD: 5.4 nM
CEP250 11.4
RU
120
100
80
60
40
20
0
-20
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
반응

도면14b

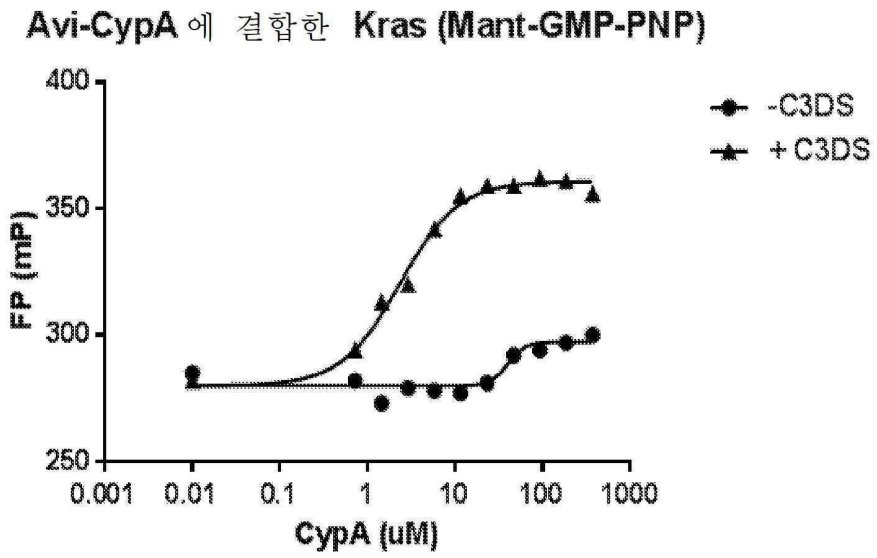

CEP250$_{29.2}$
K_a (1/Ms): 3.11 x 10^5
K_d (1/s): 9.25 x 10^{-5}
K_D: 0.29 nM
RU
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-1000
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
s
Time

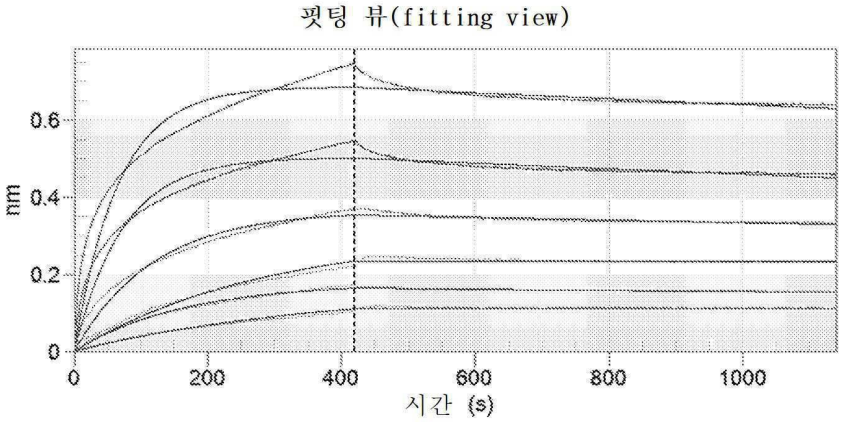
도면15


미가공 데이터 (센서 위치)
nm
2
1
0
0
200
400
600
800
1000
1200
시간 (s)
안정한 기준선
회합 단계
해리 단계

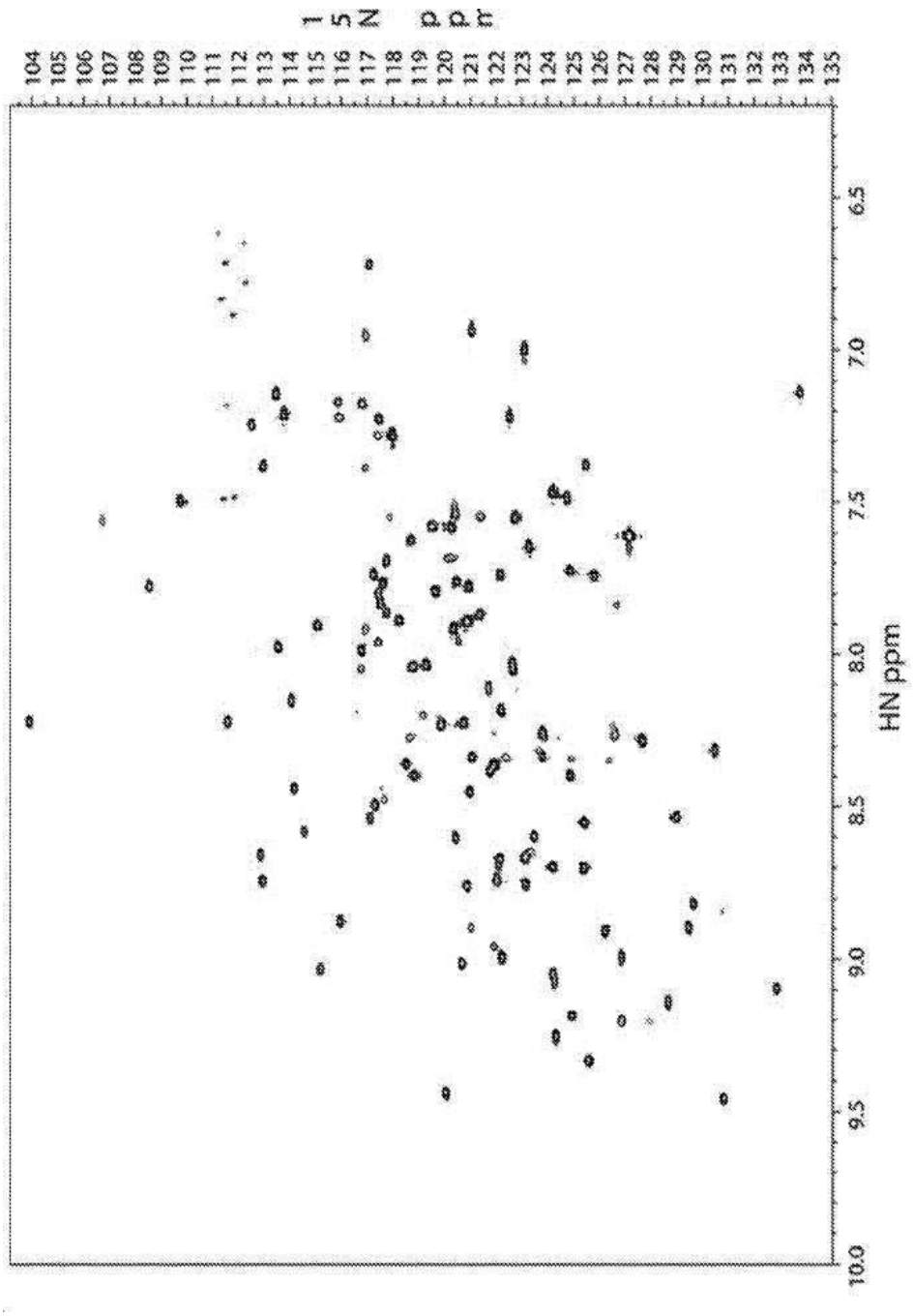

정상 상대 분석
응답
0.6
0.4
0.2
40
80
농도 (μM)
Chi²/DoF: 0.00086
R²: 0.99
Rmax: 1.053 ± 0.072
KD: 44.0 ± 6.5 uM

도면16

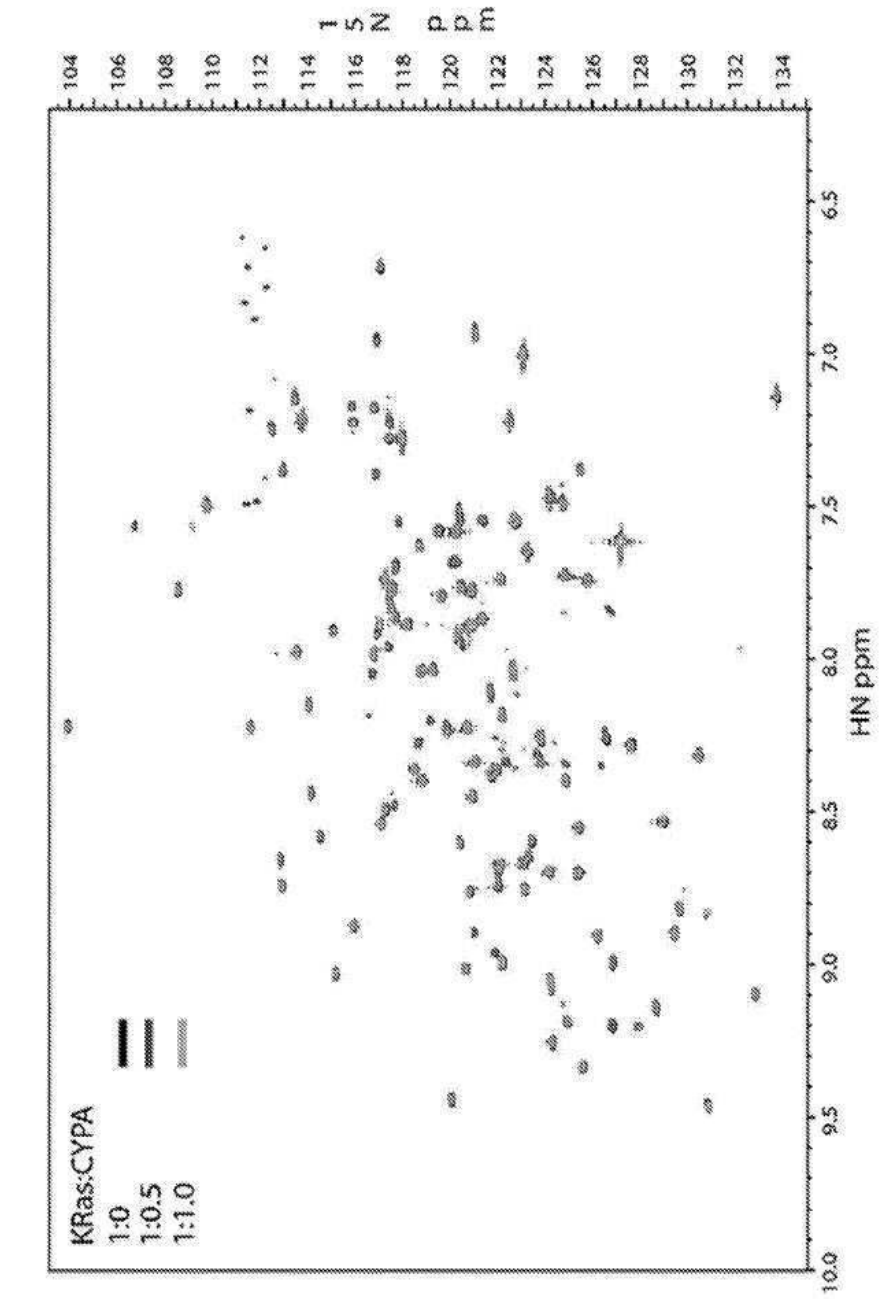

Avi-CypA 에 결합한 Kras (Mant-GMP-PNP)
400
350
300
250
FP (mP)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
CypA (uM)
-C3DS
+C3DS


핏팅 뷰(fitting view)
0.6
0.4
0.2
0
nm
0
200
400
600
800
1000
시간 (s)

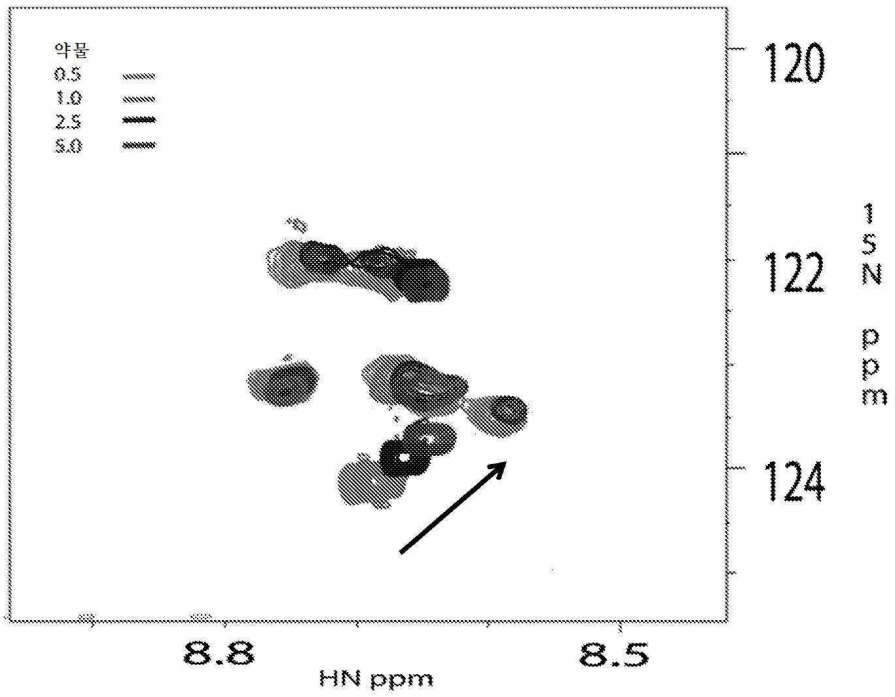
도면17a


15N ppm
104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135
HN ppm
6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5 10.0

도면17b


KRas:CYPA
1:0
1:0.5
1:1.0
15N ppm
HN ppm
104
106
108
110
112
114
116
118
120
122
124
126
128
130
132
134
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0

도면17c



서 열 목 록

<110> WARP DRIVE BIO, INC.

<120> METHODS AND REAGENTS FOR ANALYZING PROTEIN-PROTEIN INTERFACES

<130> 50869-020KR2

<150> PCT/US18/26014

<151> 2018-04-04

<150> US 62/482,018

<151> 2017-04-05

<160> 1

<170> KoPatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Tyr Gln Asn Leu Leu Val Gly Arg Asn Arg Gly Glu Glu Ile Leu Asp

1 5 10 15