(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112533918 A
(43)申请公布日 2021.03.19

(21)申请号 201980039241.8

(22)申请日 2019.06.13

(30)优先权数据
62/684,265 2018.06.13 US
62/835,953 2019.04.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/065481 2019.06.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/238817 EN 2019.12.19

(71)申请人 安菲斯塔治疗有限责任公司
地址 英国伦敦

(72)发明人 阿莱西奥·丘利
安德烈亚·泰斯塔 斯科特·休斯
史蒂文·彼得·布彻

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 吴小明

(51)Int.Cl.
C07D 417/14(2006.01)
C07D 495/14(2006.01)
C07D 417/12(2006.01)
A61K 31/4439(2006.01)
A61K 31/444(2006.01)
A61K 31/506(2006.01)
A61K 31/5517(2006.01)
A61P 7/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书35页 说明书200页
序列表3页 附图8页

(54)发明名称

用于靶向Rpn11的双功能分子

(57)摘要

本发明提供了包含Rpn11结合配偶体和靶蛋白结合配偶体的双功能分子。根据本发明的双功能分子结合Rpn11并且结合靶蛋白，由此促进与靶蛋白结合配偶体结合的靶蛋白的降解。本发明还提供了双功能分子用于预防或治疗疾病的用途。

CN 112533918 A

1.一种双功能分子,所述双功能分子包含与靶蛋白结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体。

2.根据权利要求1所述的双功能分子,其中所述Rpn11结合配偶体以至少10nM的亲和力与Rpn11结合。

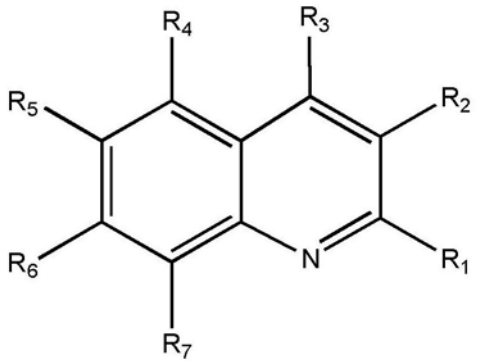
3.根据权利要求1所述的双功能分子,其中所述Rpn11结合配偶体以小于1μM的Kd与Rpn11结合。

4.根据权利要求1所述的双功能分子,其中所述Rpn11结合配偶体选自表1中提供的Rpn11结合分子的组。

5.根据权利要求1所述的双功能分子,其中所述靶蛋白结合配偶体选自由以下各项组成的组:激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、靶向含有BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂和抗体。

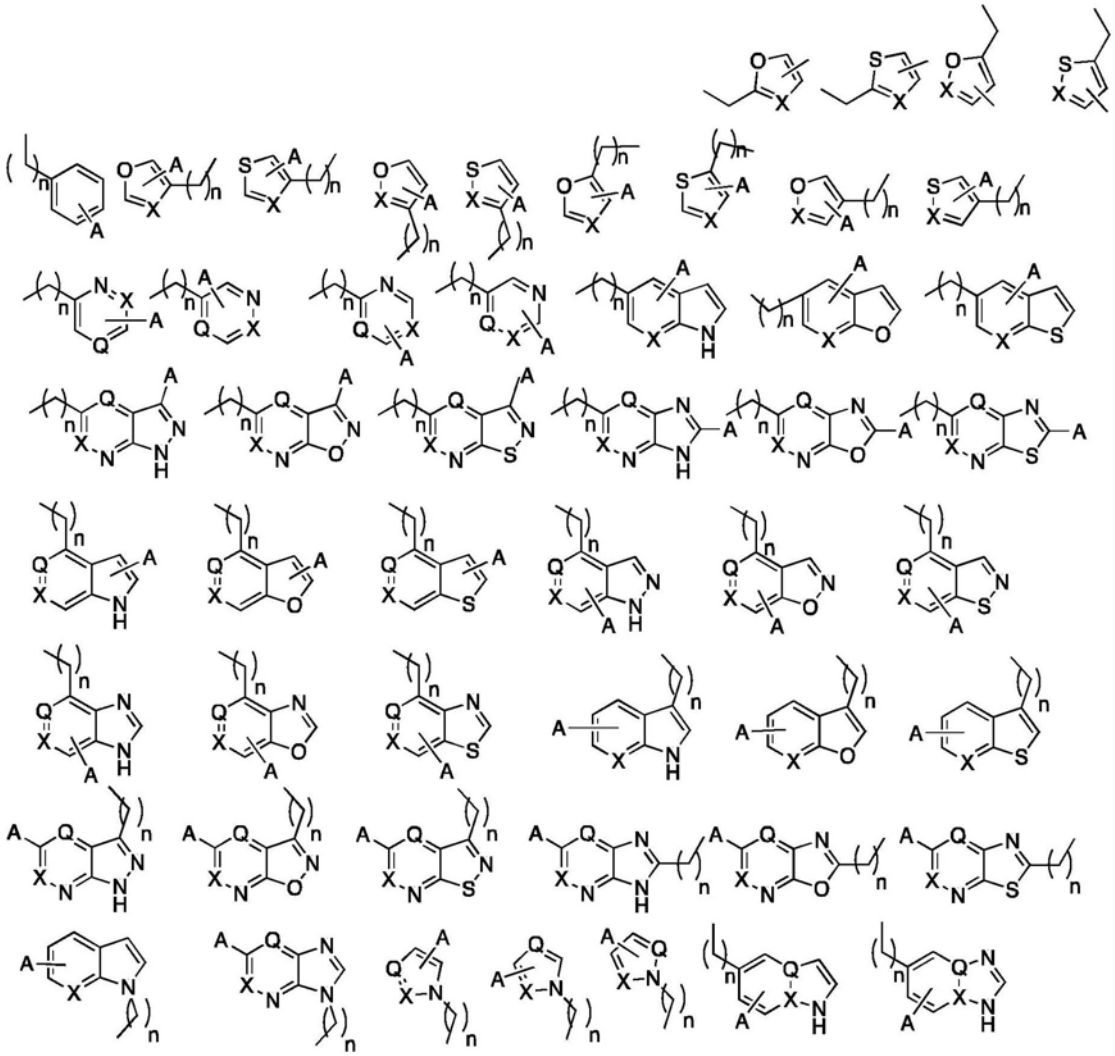
6.根据权利要求1所述的双功能分子,其中连接基团是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团、烷基-醚连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。

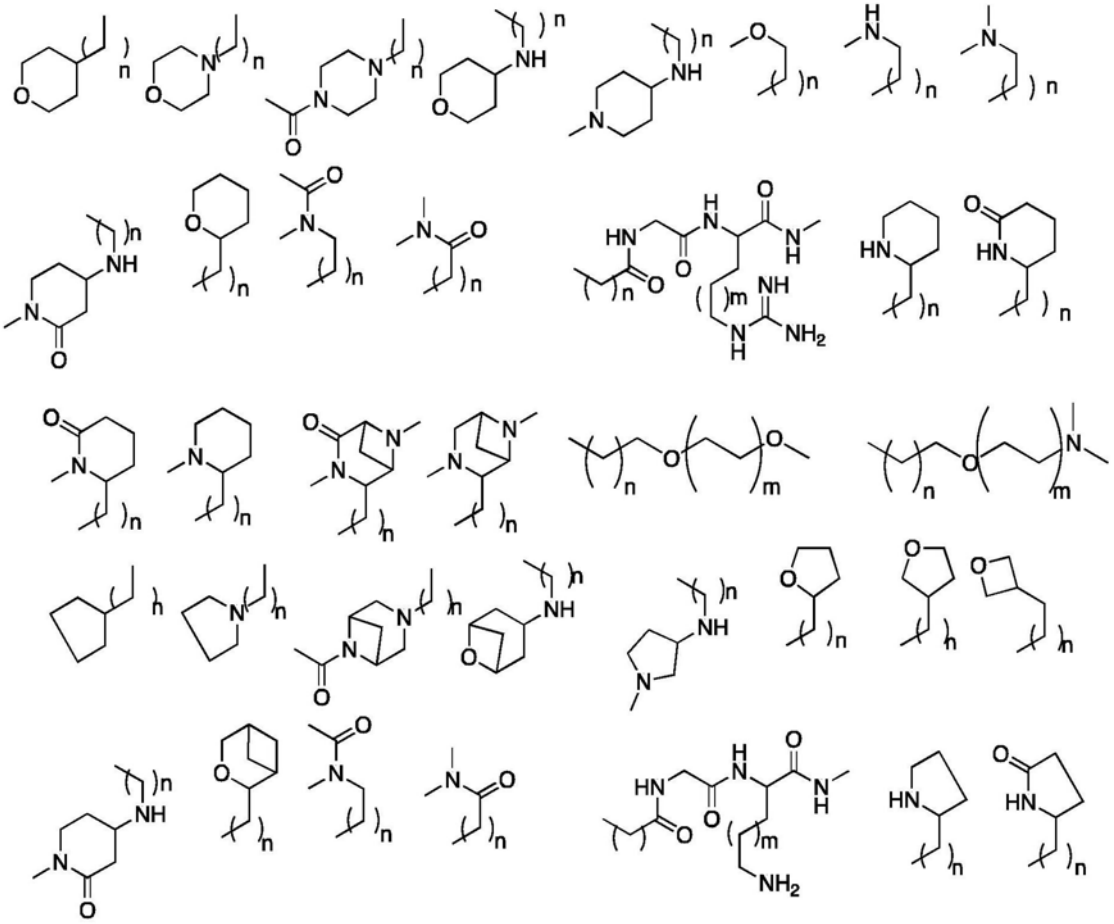
7.根据权利要求1所述的双功能分子,其中Rpn11结合配偶体由式I表示:



R1和R6优先地是-H,但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe2、NO_2、CHO…

R2、R3、R4和R5选自由以下各项组成的组:-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe2、NO_2、CHO…;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe2、-NO_2、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

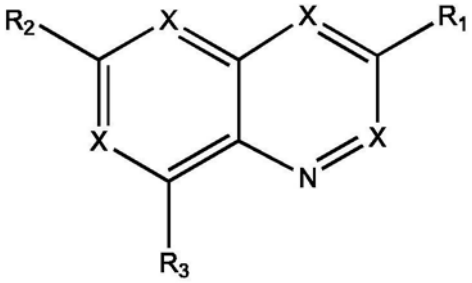
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4，

• R_2、R_3、R_4和R5是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R7选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

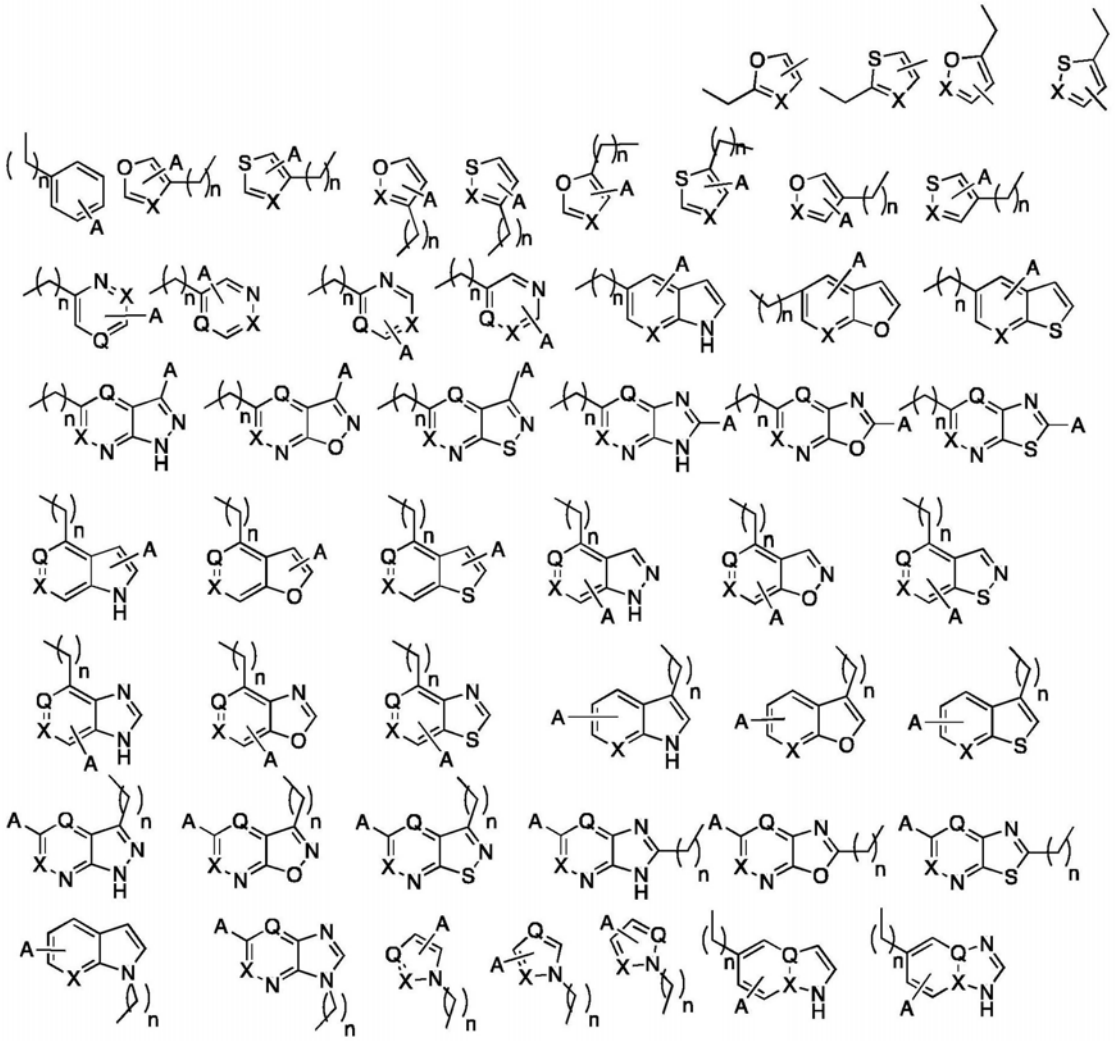
8.根据权利要求1所述的双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式II表示：

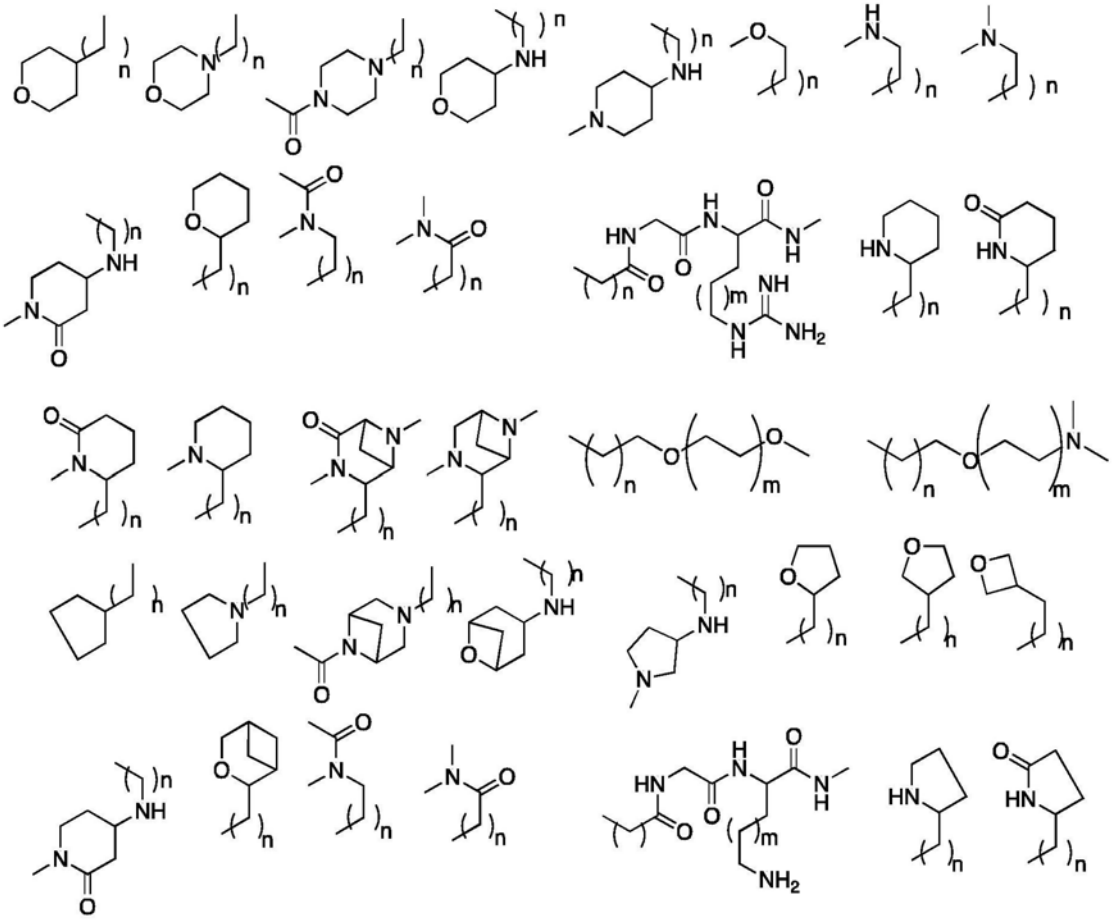


• X＝CH或N

• R_1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-

CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

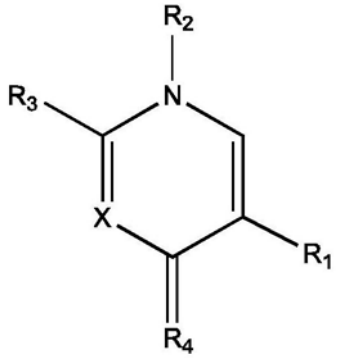
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4，

• R_1和R2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R3选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述。

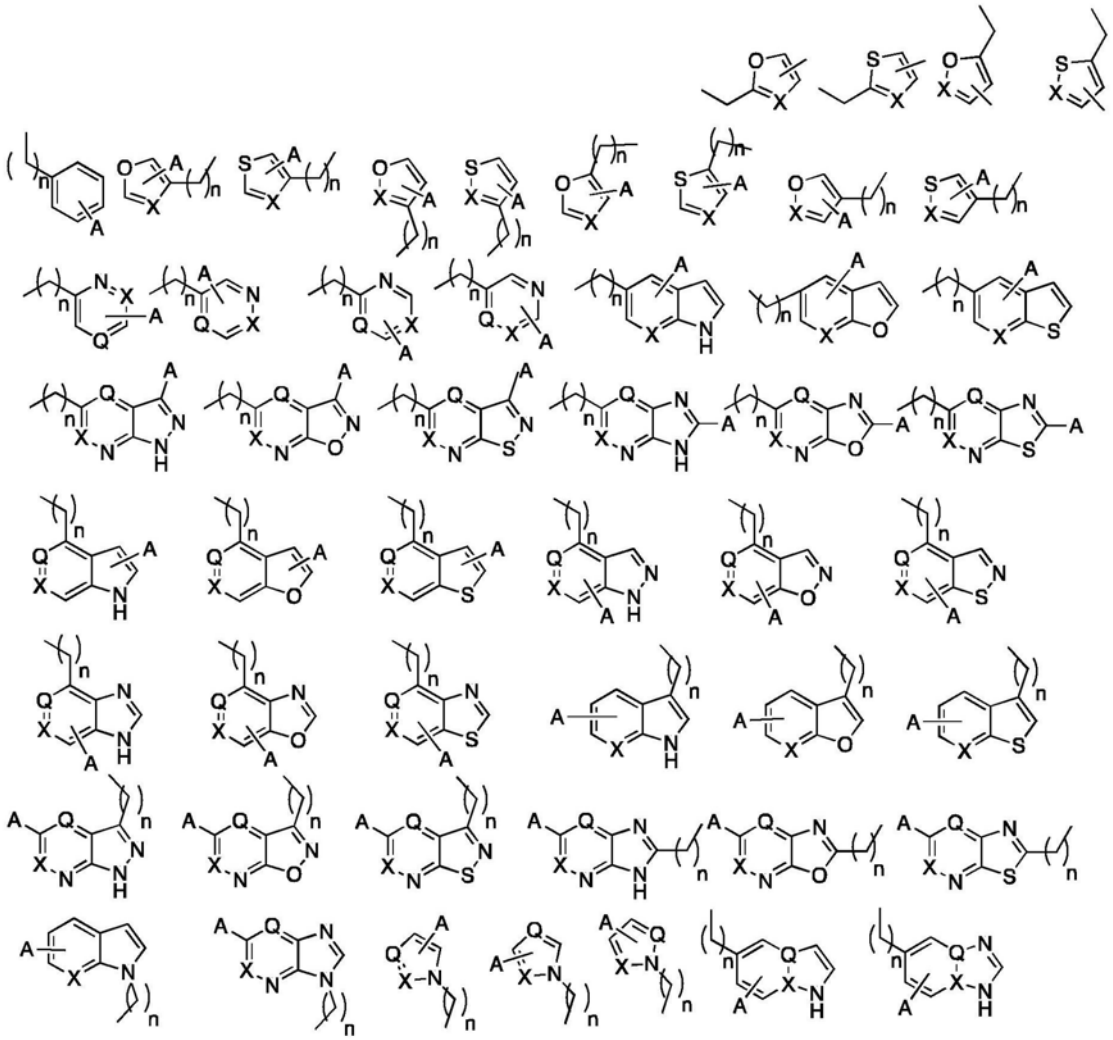
9.根据权利要求1所述的双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式III表示：

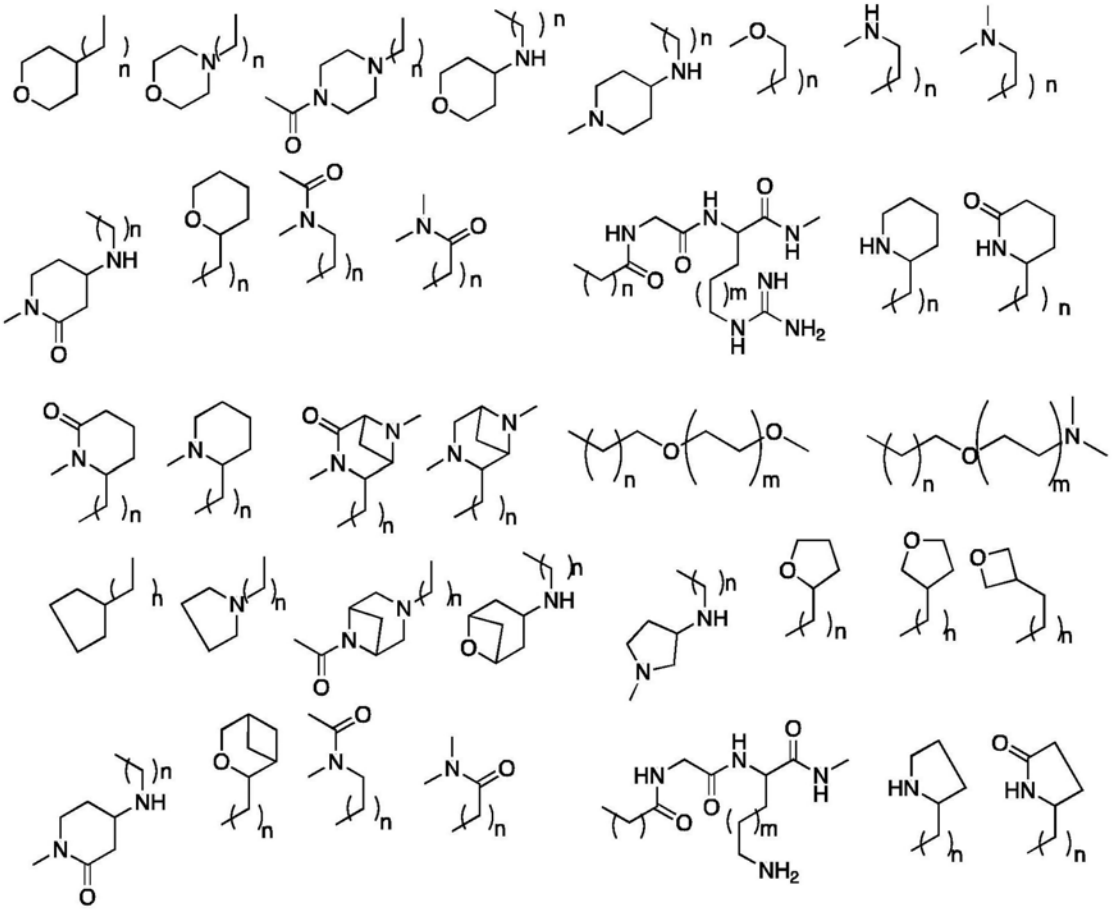


• R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述，

• R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-

Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

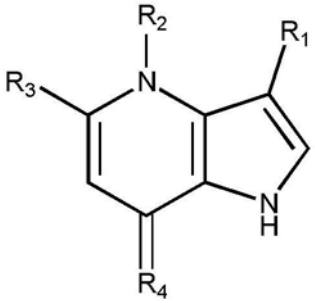
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

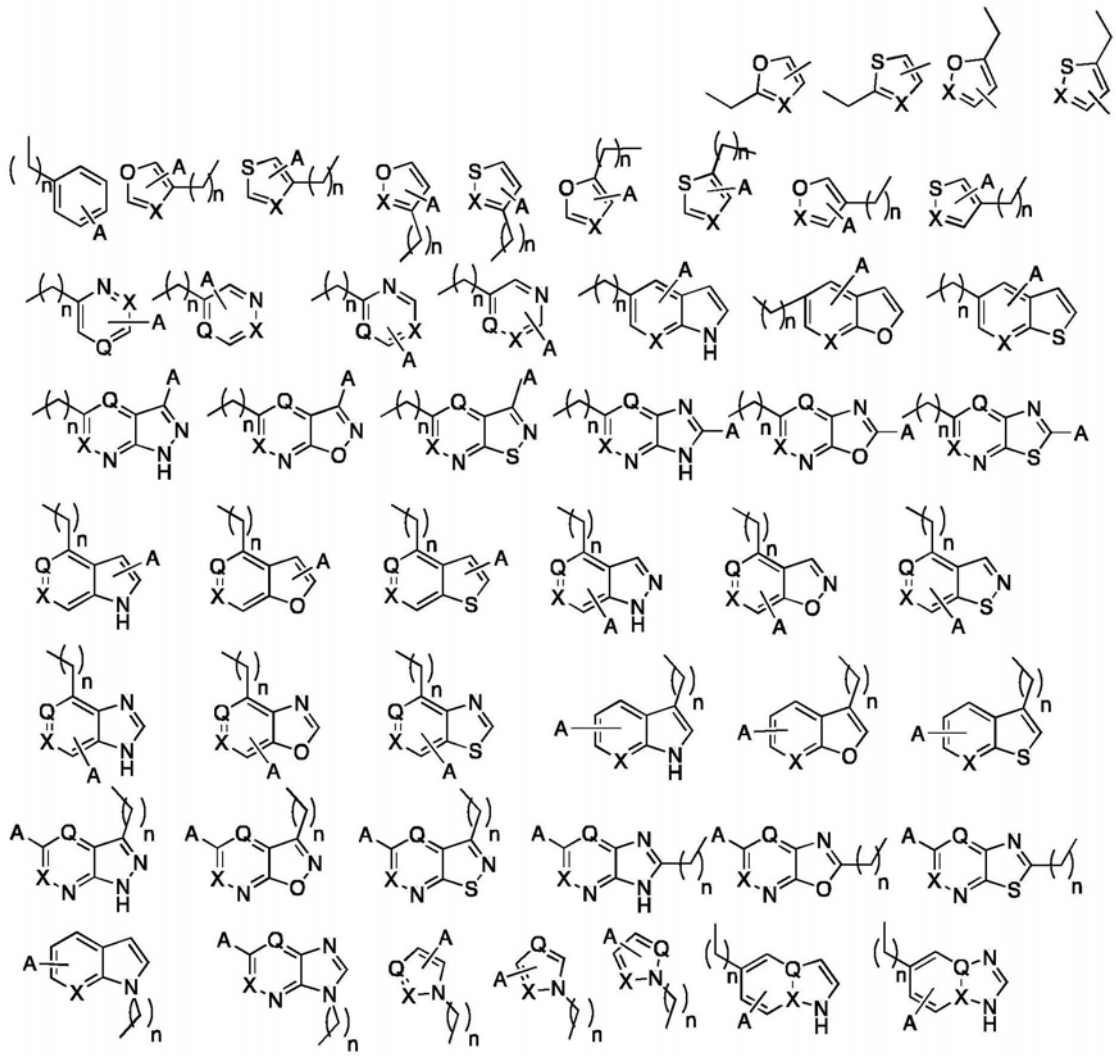
• R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

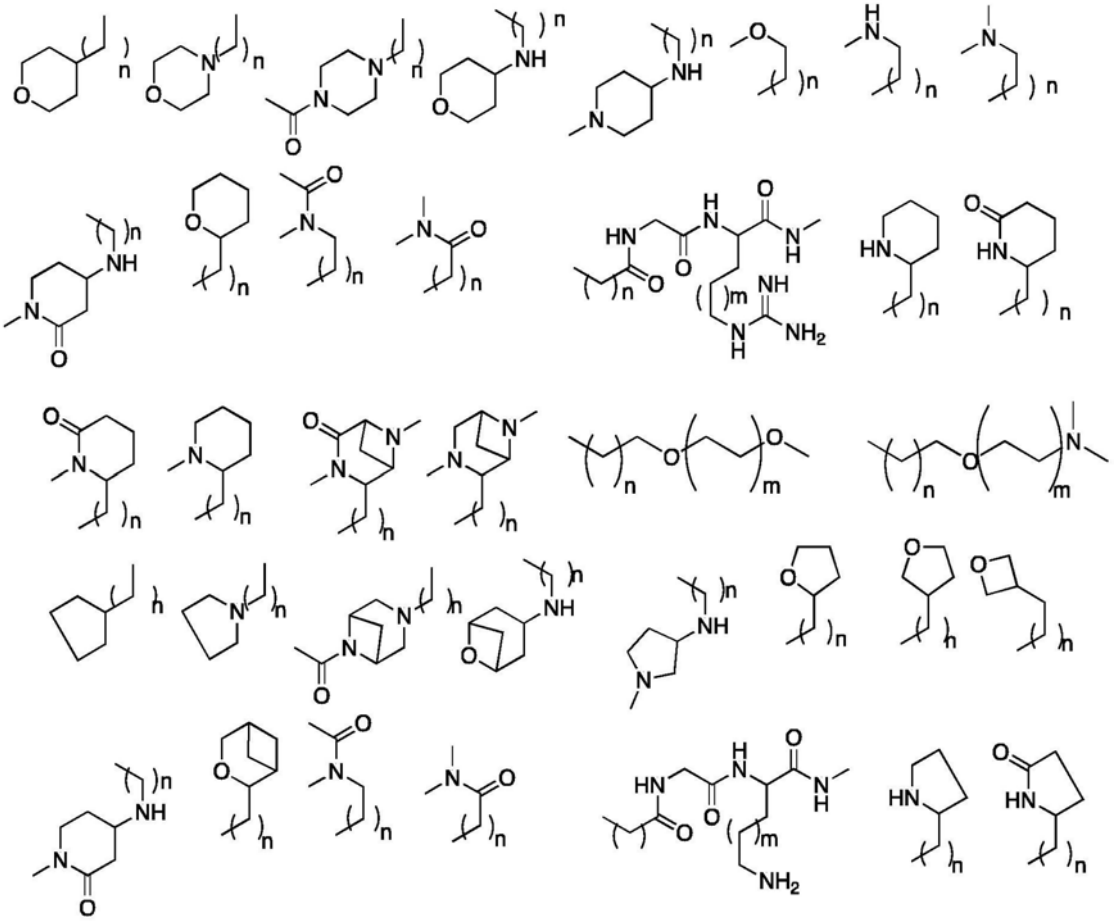
• R4是O、S、NH。

10.根据权利要求1所述的双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式IV表示：



• R1、R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

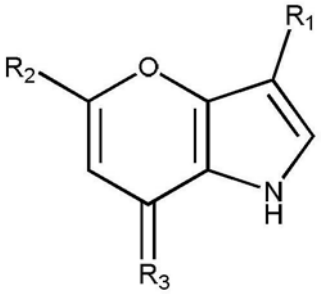
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

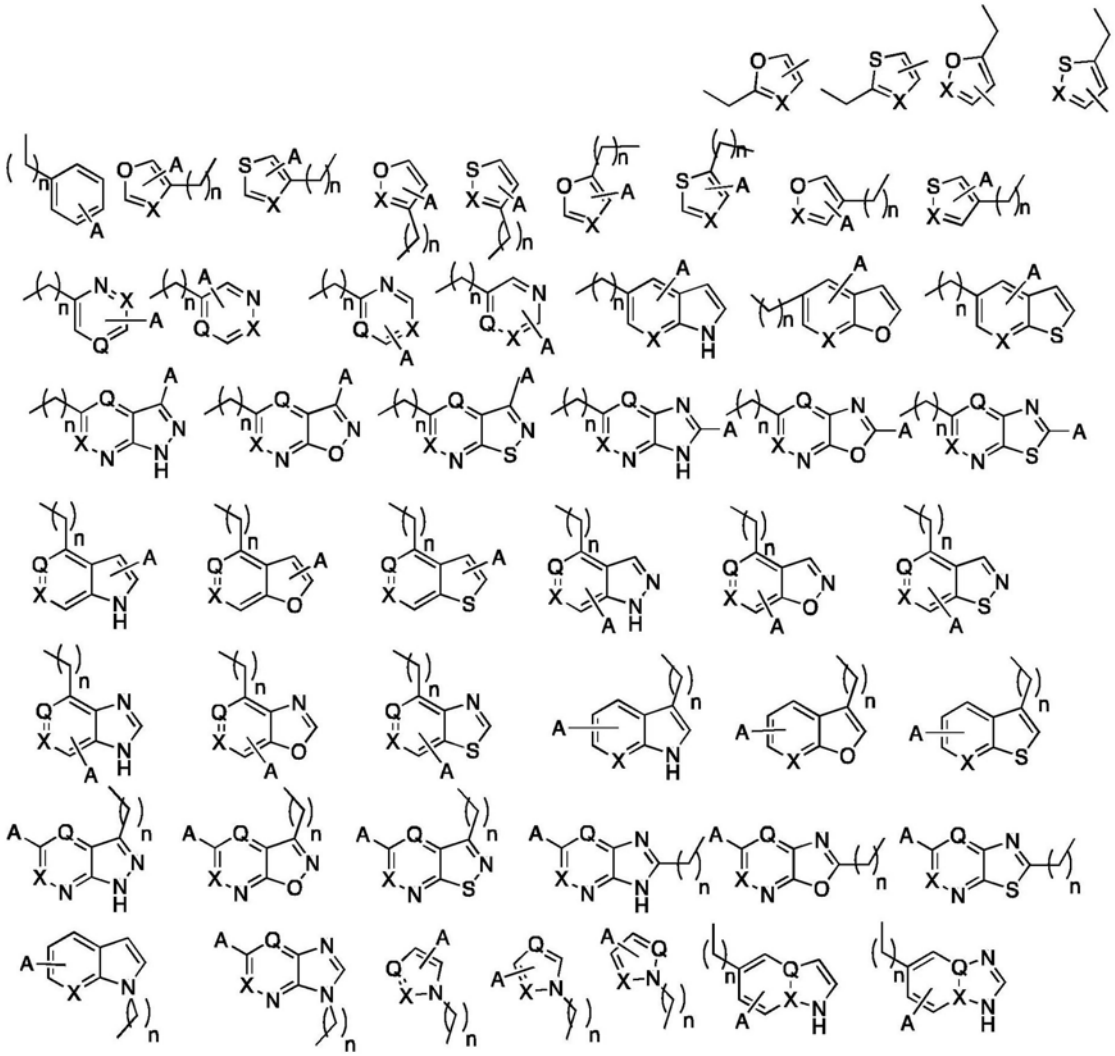
• R1、R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

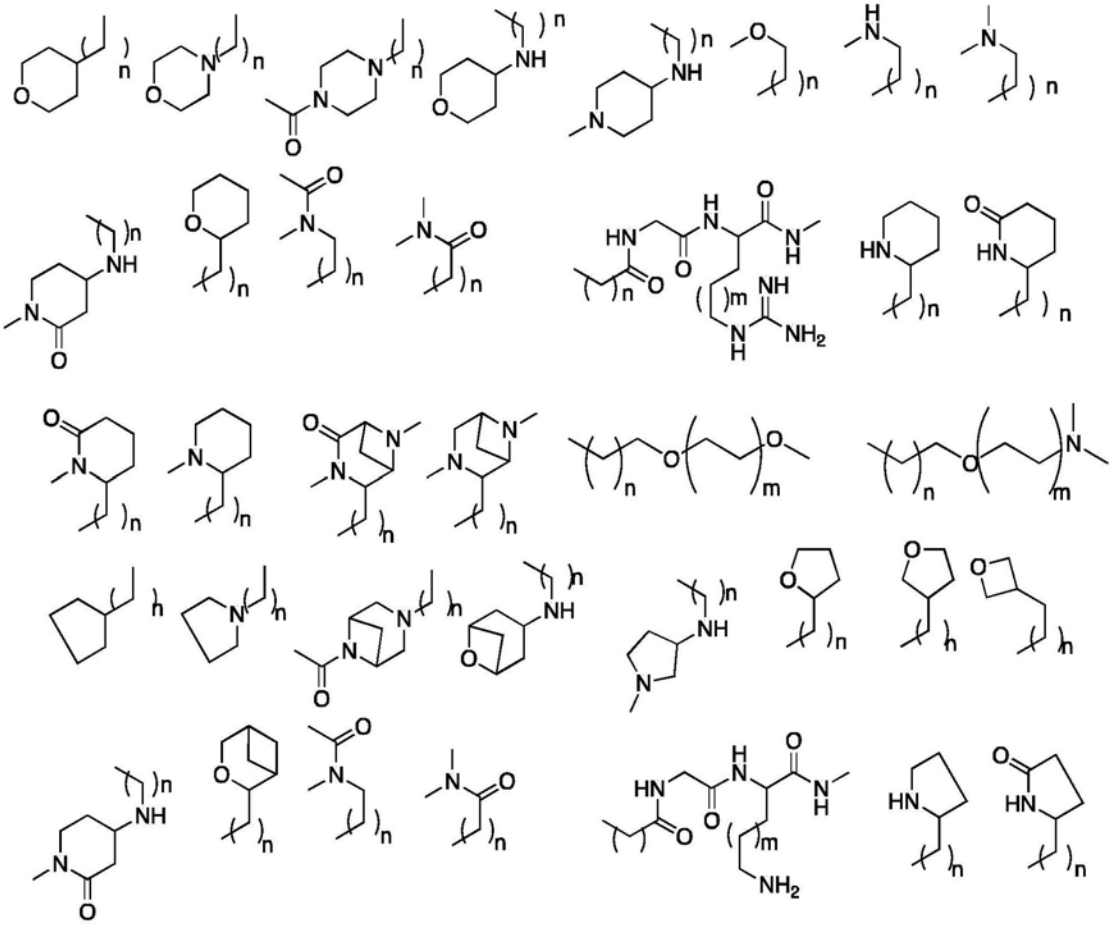
• R4是O、S、NH、NCOY。

11.根据权利要求1所述的双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式V表示：



• R1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

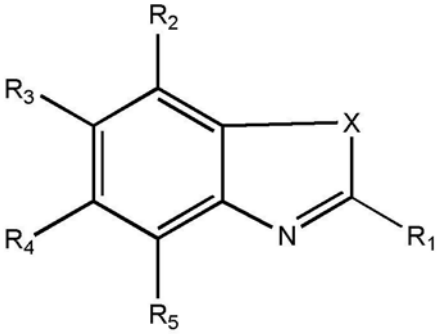
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R1和R_2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R3是O、S、NH、NCOY。

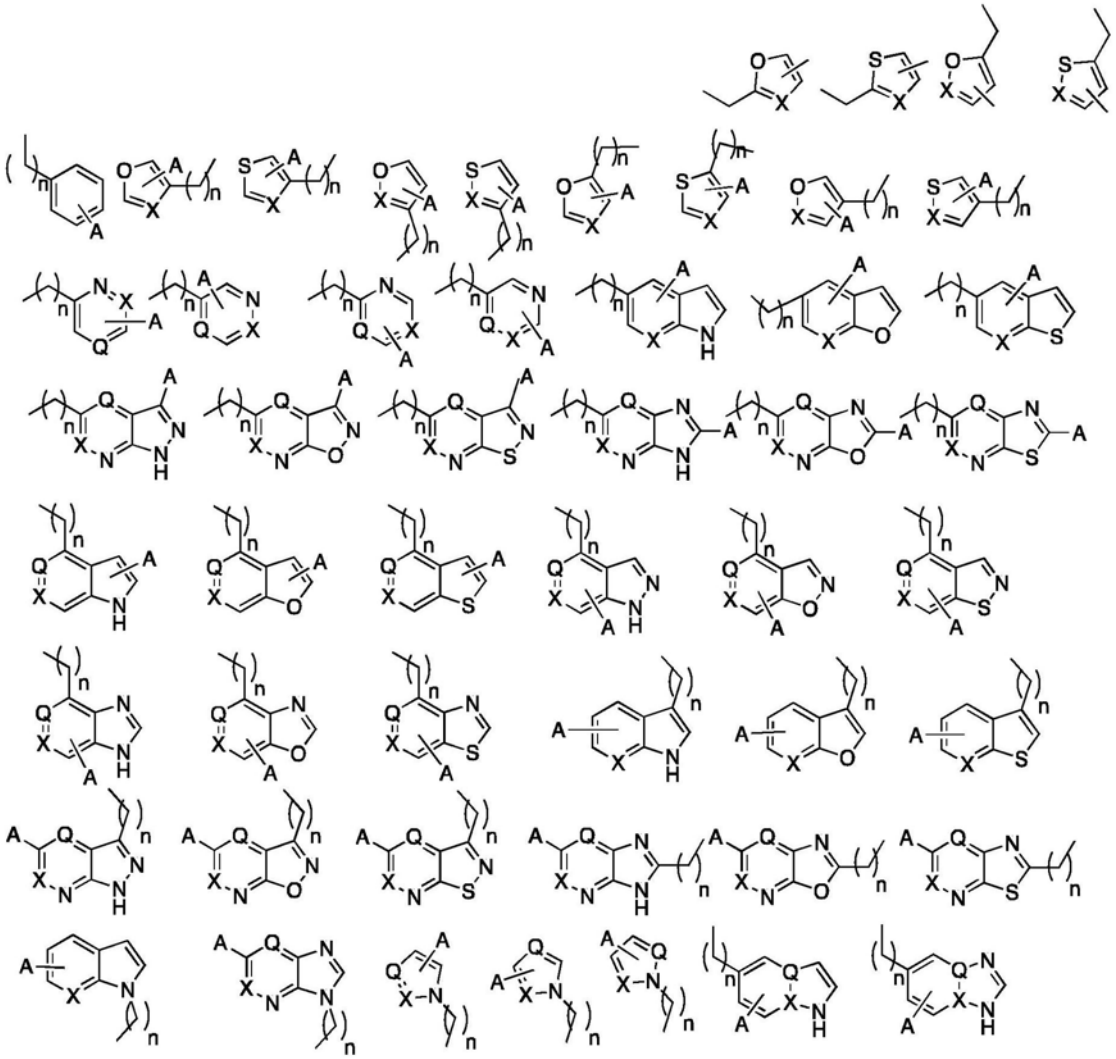
12.根据权利要求1所述的双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式VI表示：

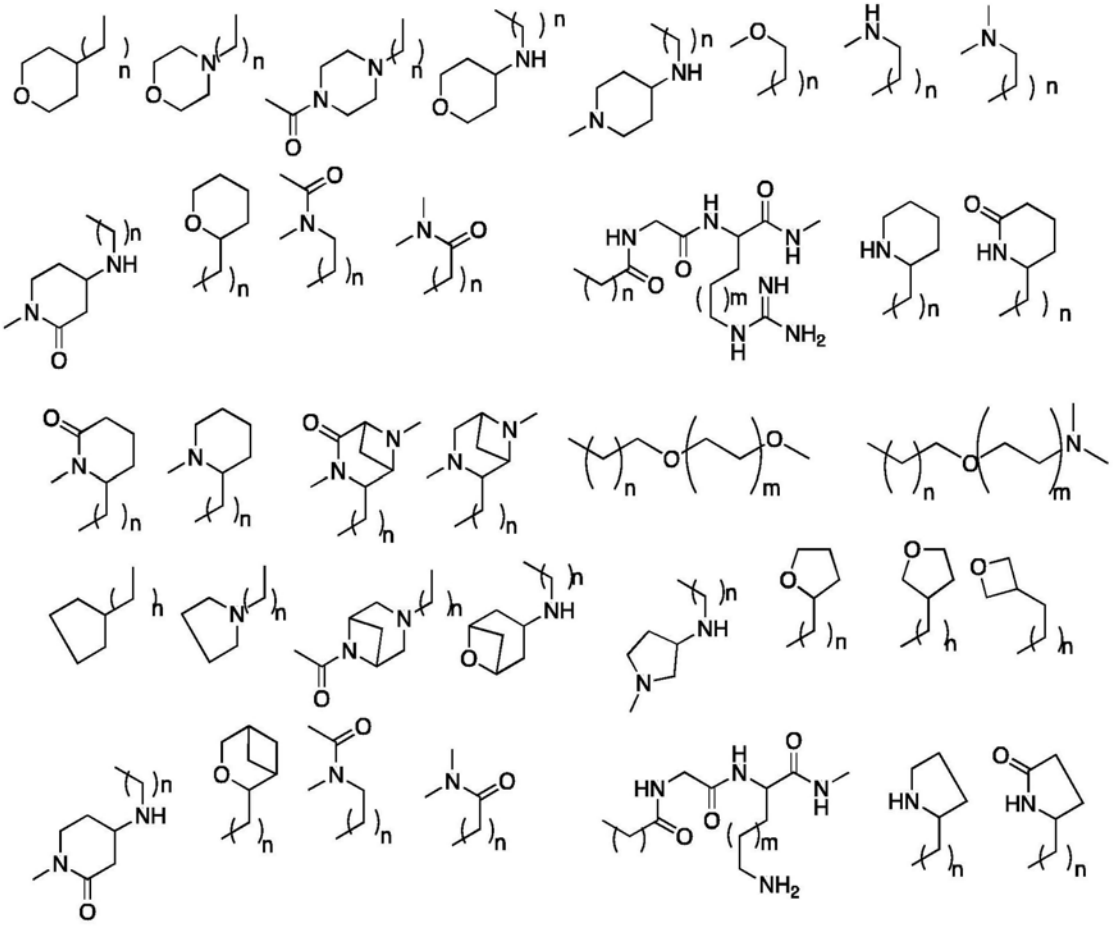


• X＝NH、O、S、CH2

• R1和R4优先地是-H，但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-CHO…

• R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、$-CF_3$、-COOH、$-CH_2NH_2$、$-CH_3$、-H、-F、-Cl、-Br、$-CF_3$、$-CHF_2$、$-CH_2F$、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、$-SO_2Me$、$-NH_2$、-NHMe、$-NMe_2$、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：$-NH_2$、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：$-CH_3$、$-CH_2$-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$

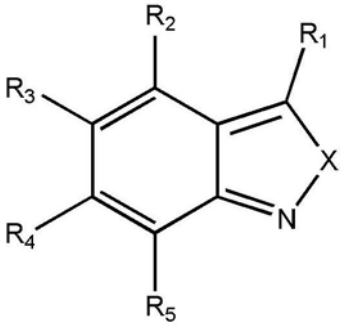
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

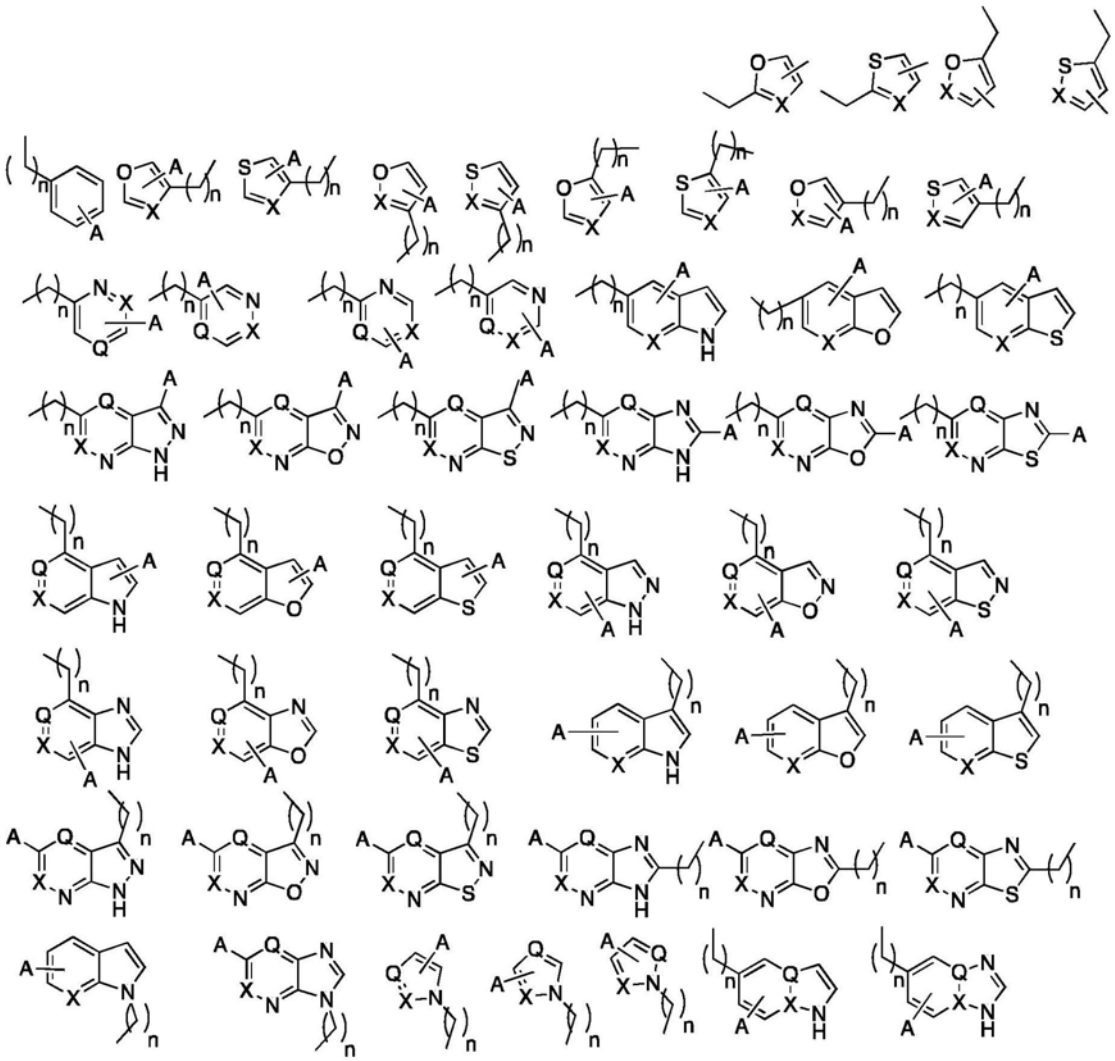
13.根据权利要求1所述的双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式VII表示：

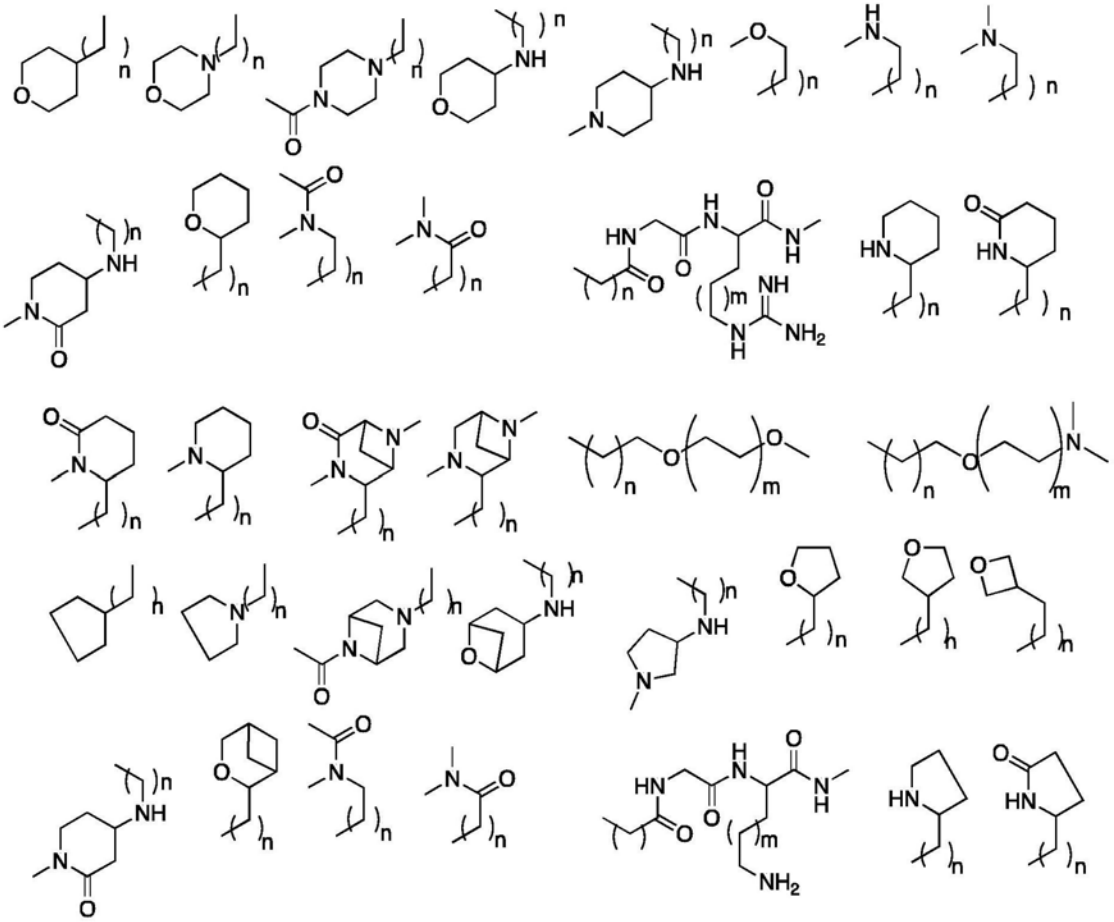


• X＝NH、O、S、CH2

• R1、R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、

CHO;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

--A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

-X和Q是N或CH，

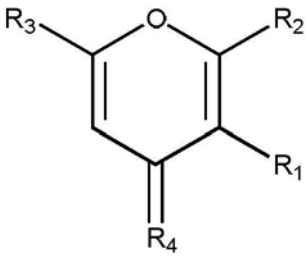
n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R1、R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R4优先地是-H，但也为Me、F、Cl、Br、CF_3、CHF_2、CH_2F、CN、OMe、SMe、SOMe、SO_2Me NH_2、NHMe、NO_2、CHO，

• R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

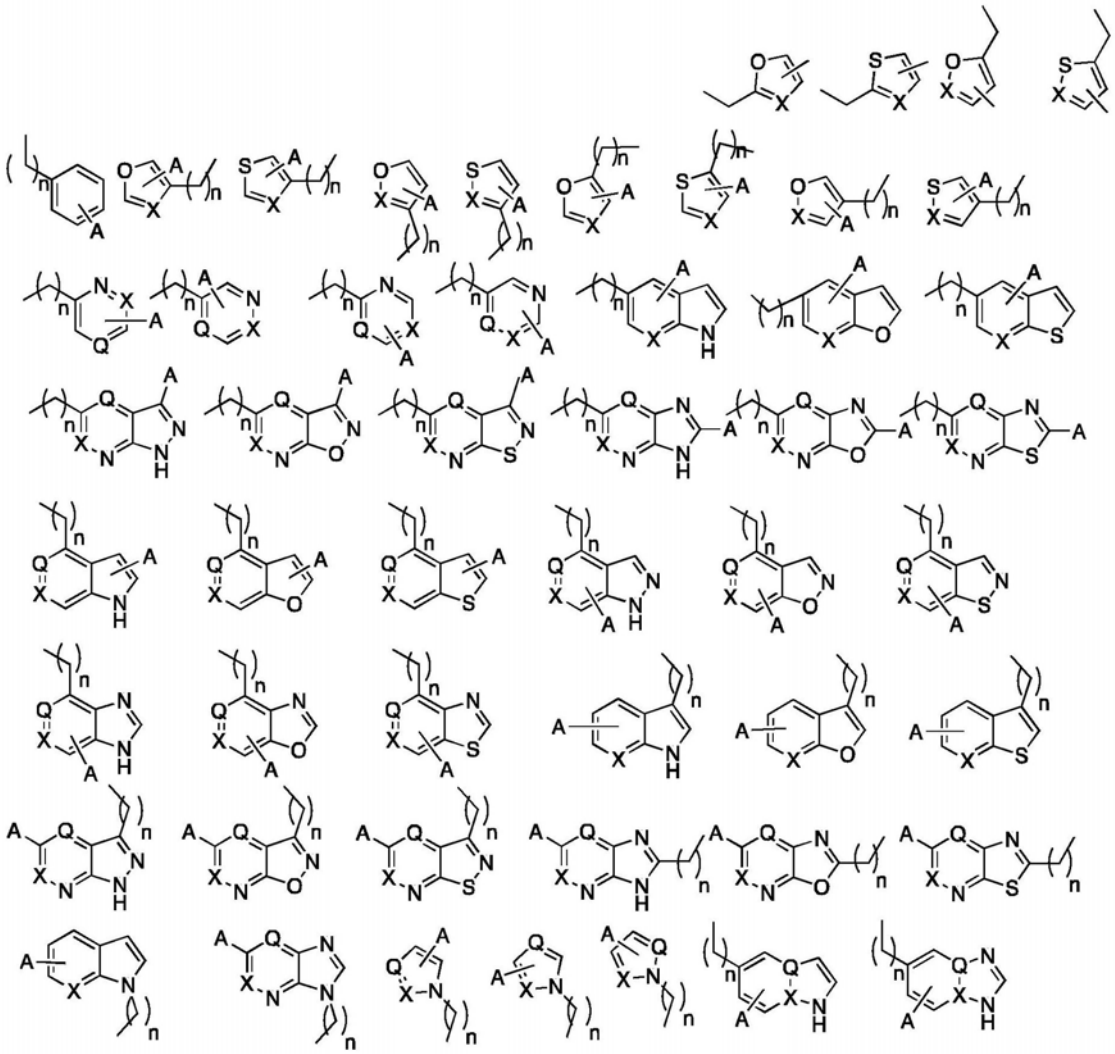
14.根据权利要求1所述的双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式VIII表示：

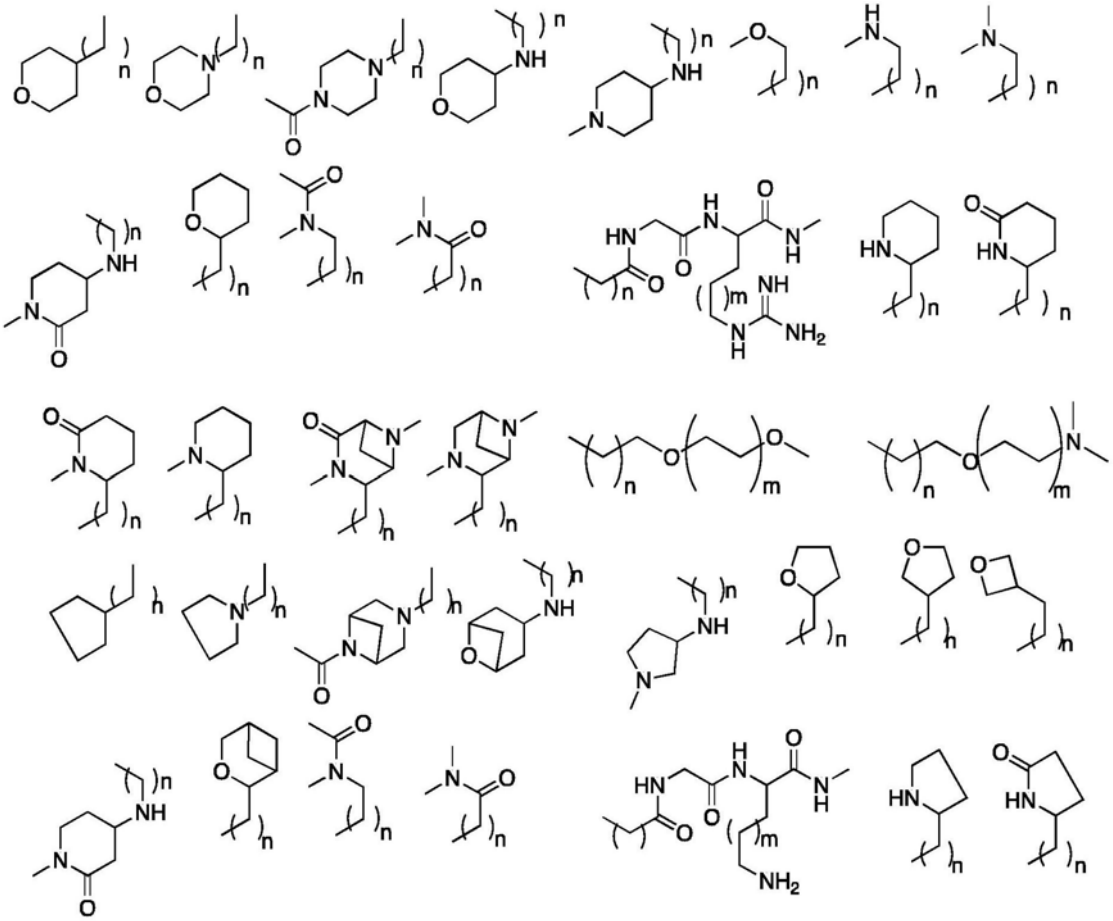


• R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY、NHCOY，其中Y如上所述，

• R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O，

• R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

•R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

并且R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O。

15.式(IX)的化合物：

R11L-(CL)-TPL　　(IX)，

其中-是指共价键；

其中R11L是结合Rpn11的配体，

其中CL是共价连接基团，

其中TPL是与靶蛋白结合的配体。

16.根据权利要求15所述的化合物，其中所述R11L选自表1中提供的Rpn11配体的组。

17.根据权利要求15所述的化合物，其中所述R11L以至少10nm的亲和力与Rpn11结合。

18.根据权利要求15所述的化合物，其中所述R11L以小于1μM的Kd与1μM结合。

19.根据权利要求15所述的化合物，其中TPL是激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、与含有BET布罗莫结构域的蛋白质结合的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、HDAC抑制

剂或人赖氨酸甲基转移酶抑制剂中的一种。

20.根据权利要求15所述的化合物，其中CL是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团、烷基-醚连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。

21.式(X)的化合物：

R11L-A-(CL)-B-TPL (X)，

其中-是指共价键；

其中R11L是结合Rpn11的配体，

其中CL是具有第一末端A和第二末端B的共价连接基团，所述第一末端A和第二末端B是不同的，其中A和B独立地是酰胺、肟、酮、碳、醚、酯或氨基甲酸酯；

其中TPL是与靶蛋白结合的配体，并且

其中R11L与A共价连接并且TPL与B共价连接。

22.根据权利要求21所述的化合物，其中TPL是激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、与含有BET布罗莫结构域的蛋白质结合的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、HDAC抑制剂或人赖氨酸甲基转移酶抑制剂中的一种。

23.式(XI)的化合物：

R11L-(CL)-Rx (XI)，

其中-是指共价键；

其中R11L是结合Rpn11的配体，

其中CL是以Rx结尾的共价连接基团，

其中Rx能够与配体形成共价化学键，并且

其中Rx不是PEG。

24.根据权利要求21或23所述的化合物，其中所述R11L以至少10nM的亲和力与Rpn11结合。

25.根据权利要求21或23所述的化合物，其中所述R11L以小于1μM的Kd与Rpn11结合。

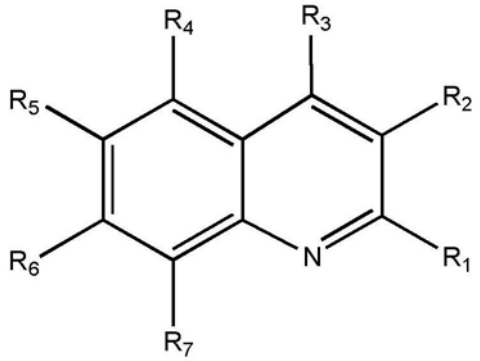
26.根据权利要求21或23所述的化合物，其中所述R11L选自表1中提供的Rpn11配体的组。

27.根据权利要求21或23所述的化合物，其中所述连接基团是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。

28.根据权利要求21或23所述的化合物，其中所述连接基团具有第一末端，所述第一末端是肟。

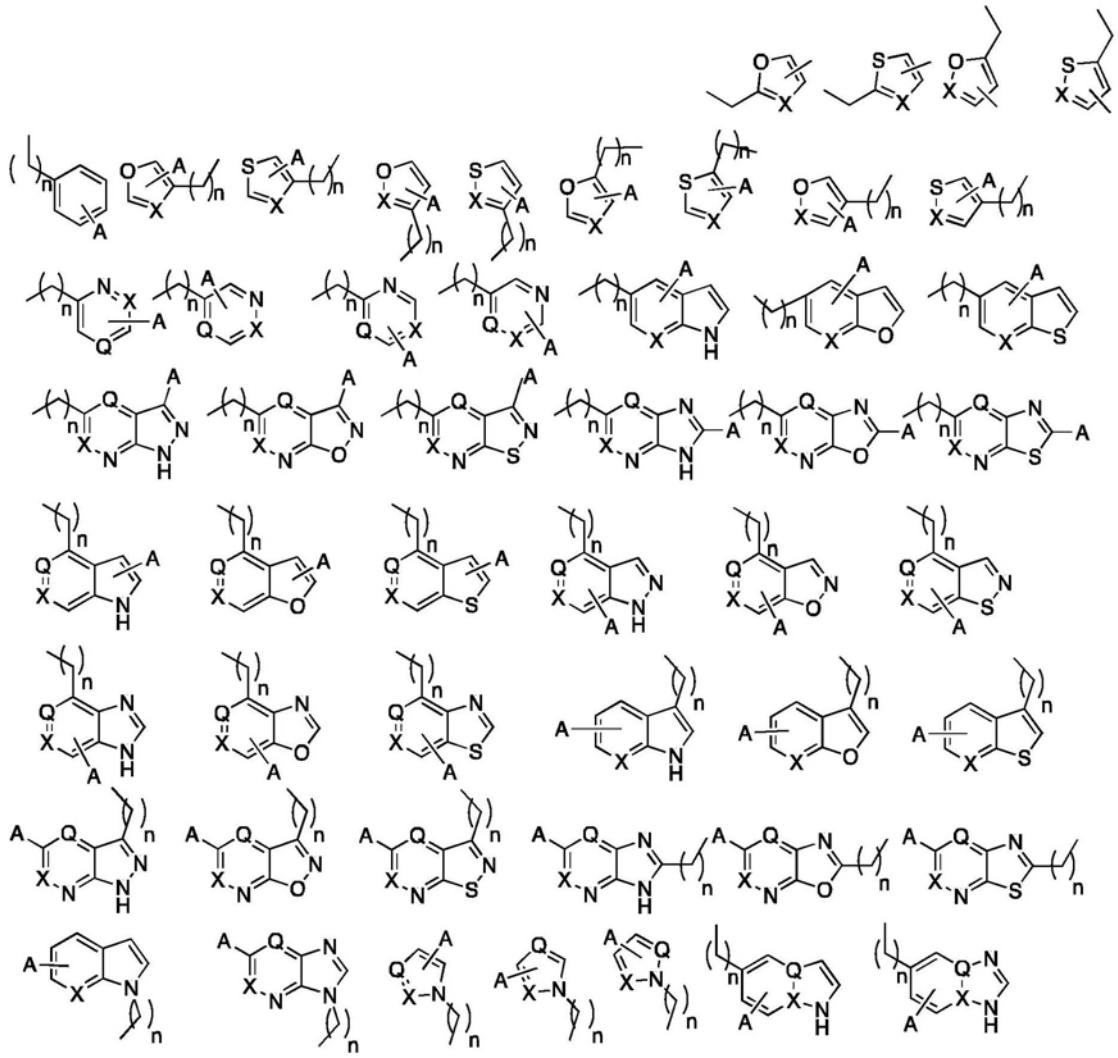
29.根据权利要求21或23所述的化合物，其中所述连接基团具有第二末端，所述第二末端是胺。

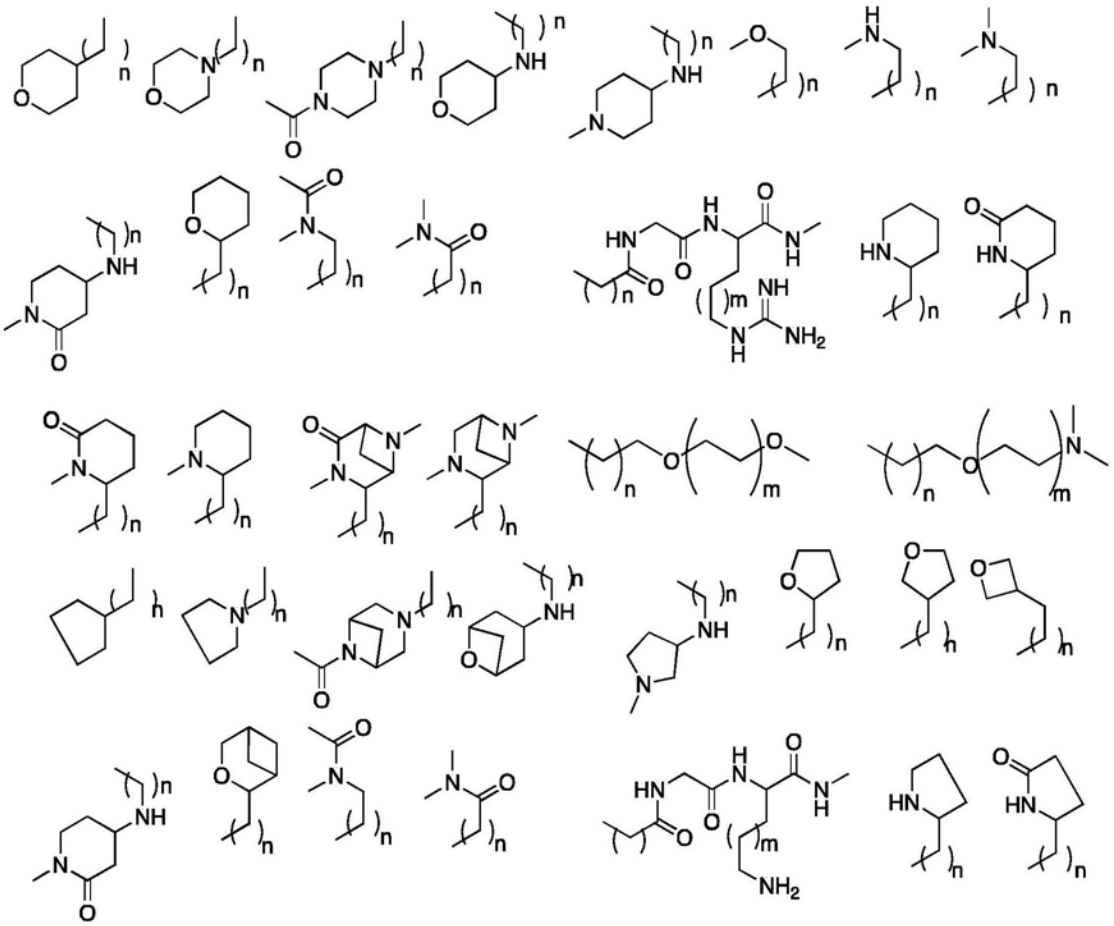
30.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式I表示：



R1和R6优先地是-H,但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…

R_2、R_3、R_4和R_5选自由以下各项组成的组:-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、-NO_2、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

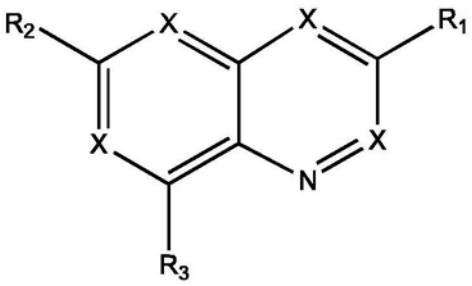
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R_2、R_3、R_4和R_5是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R7选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

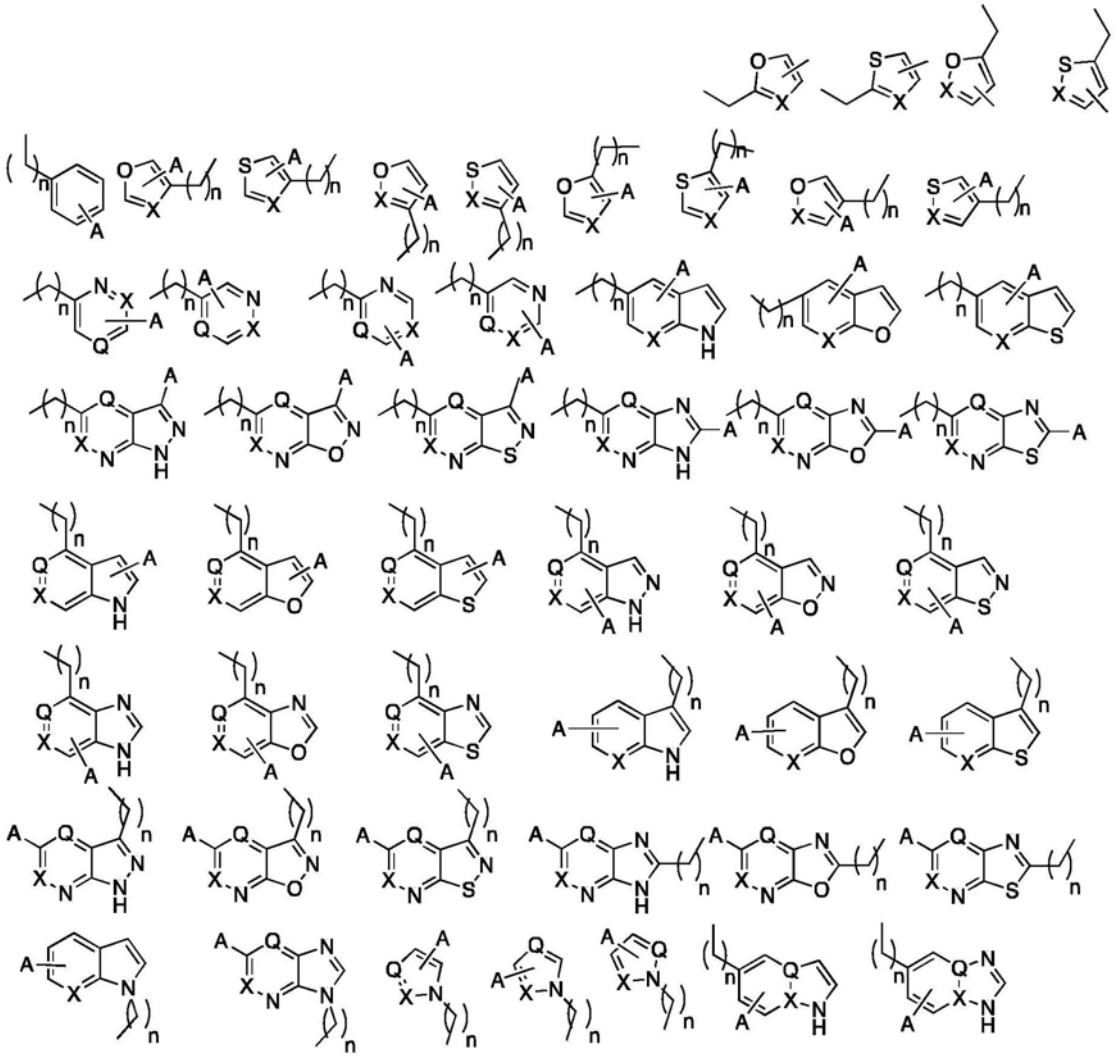
31.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式II表示：

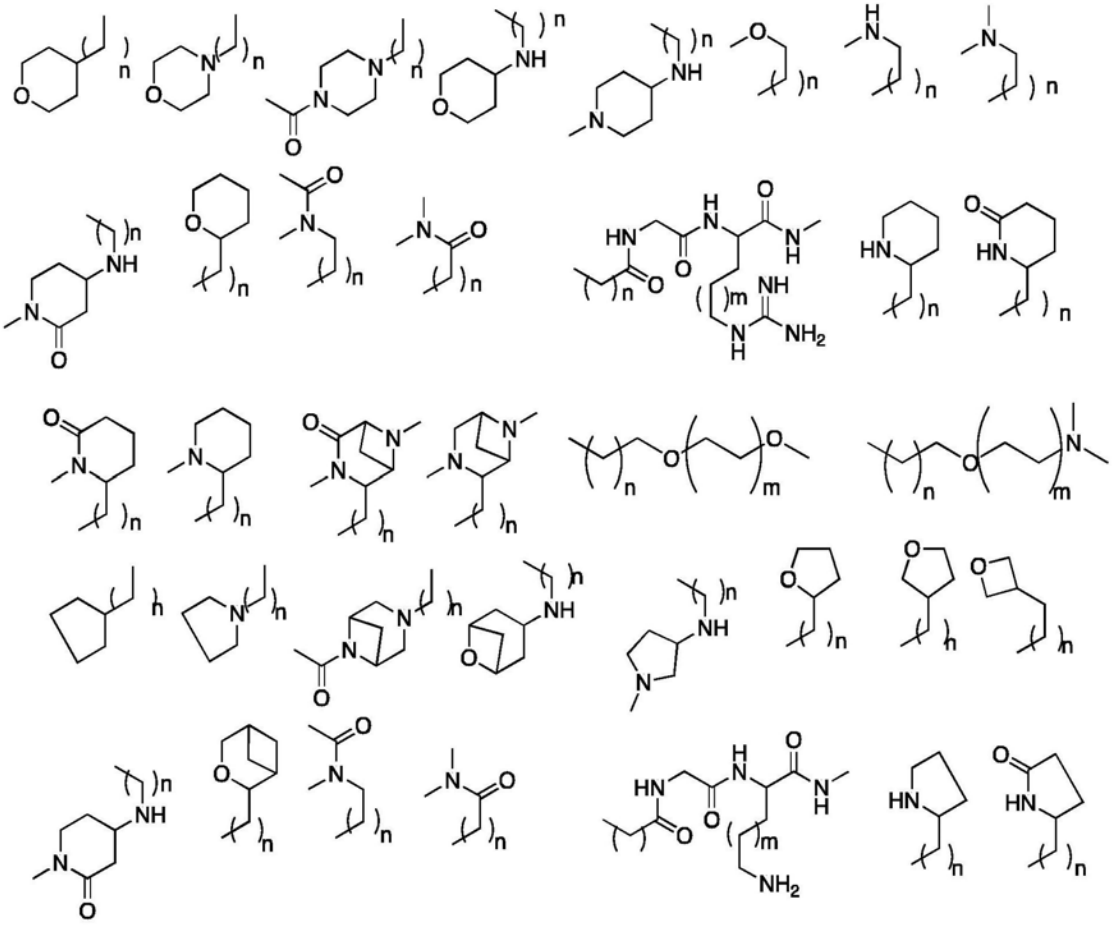


• X＝CH或N

• R_1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、

CHO;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

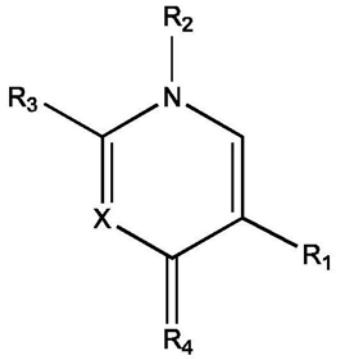
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4，

• R_1和R2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

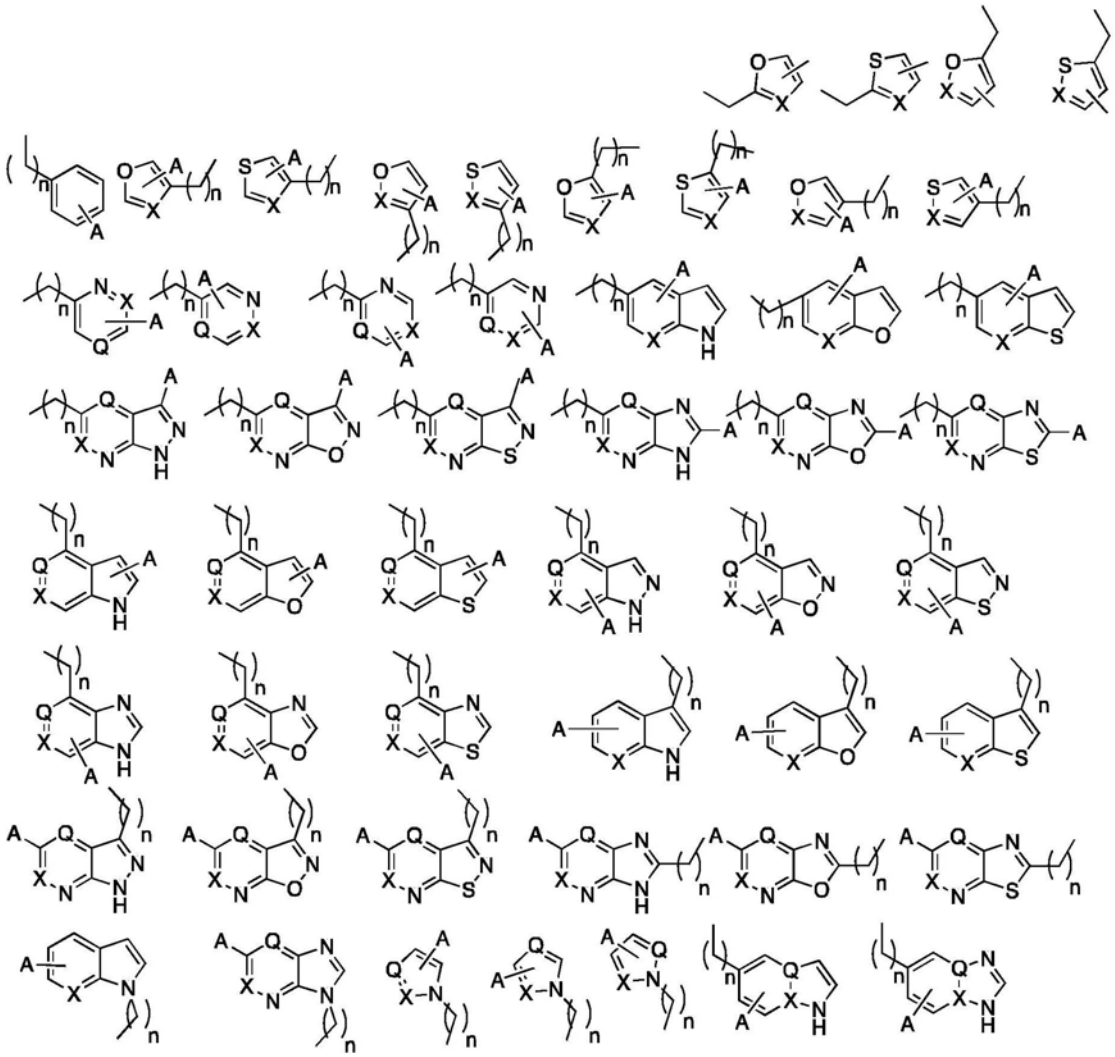
• R3选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述。

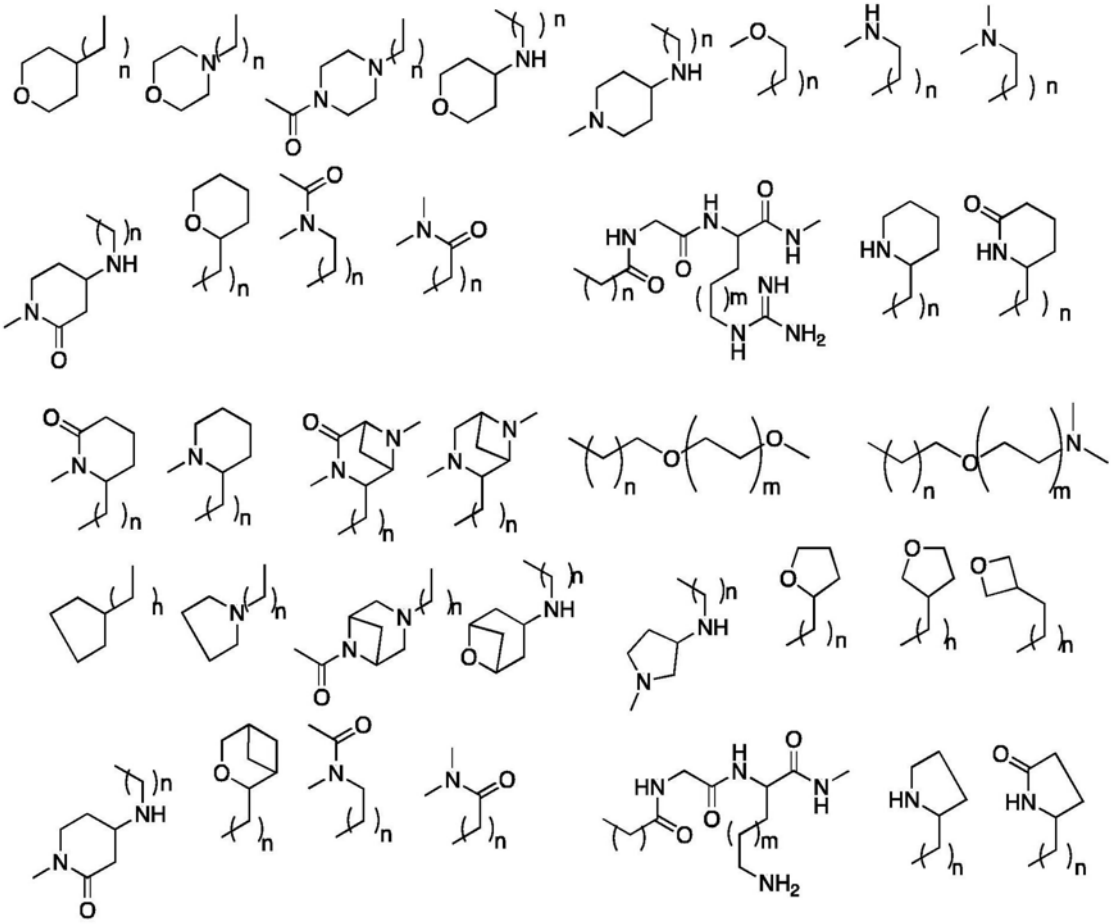
32.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式III表示：



• R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述，

• R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

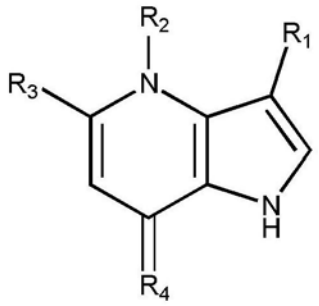
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

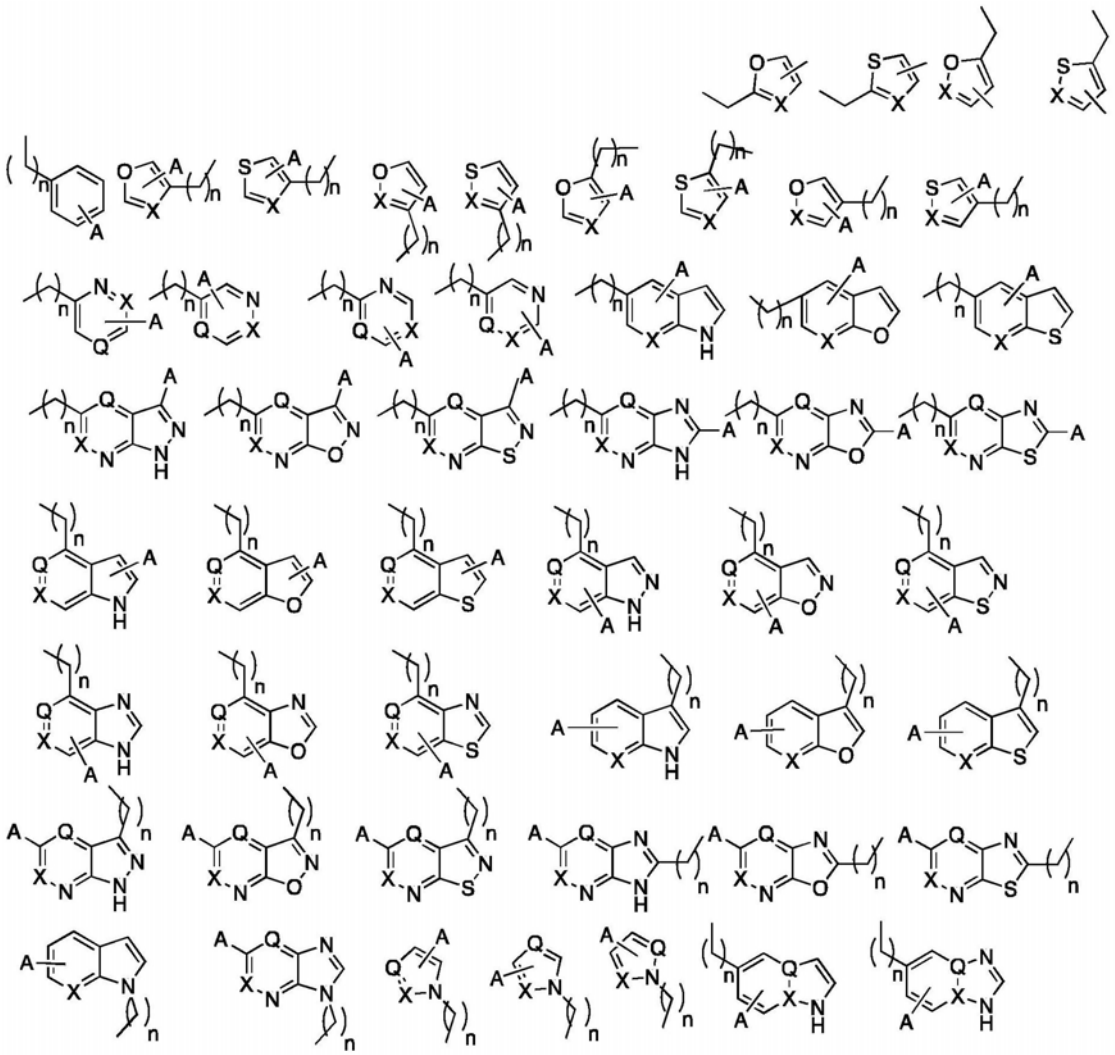
R4是O、S、NH。

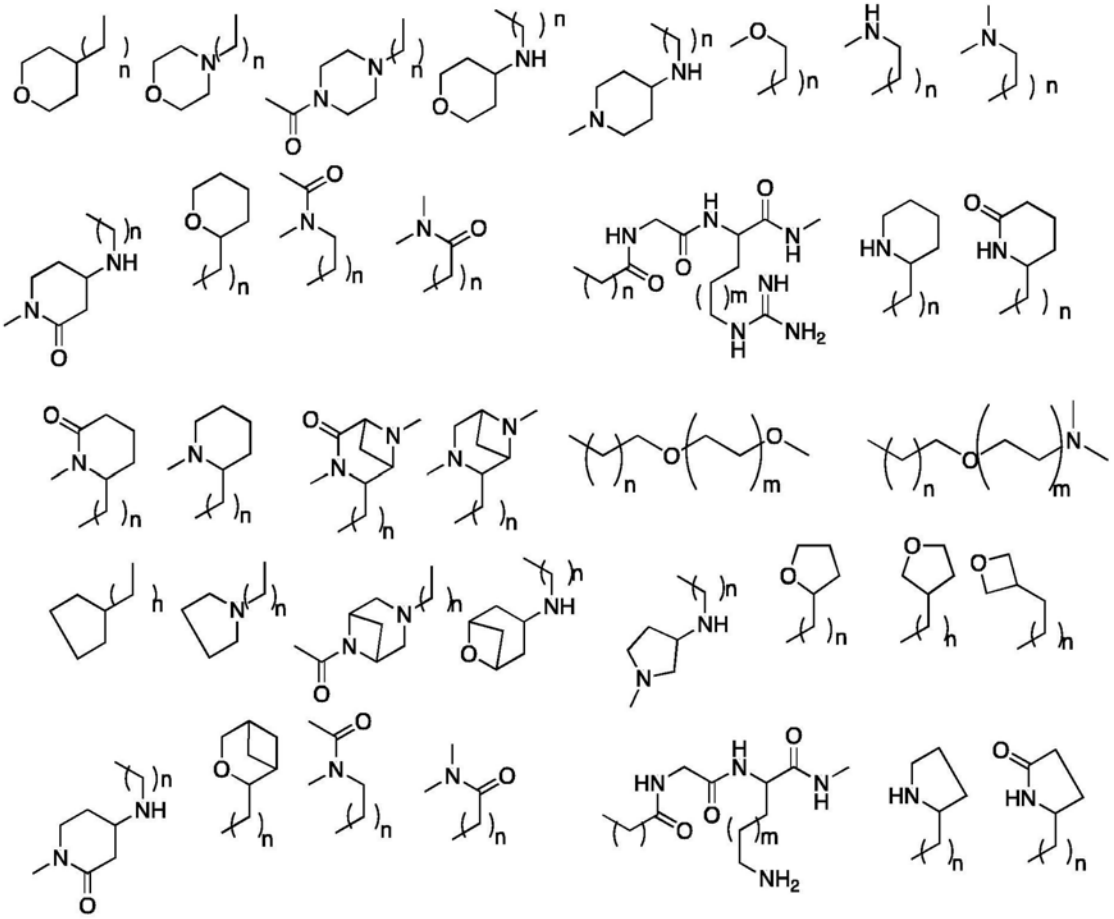
33.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式IV表示：



• R1、R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、

CHO;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

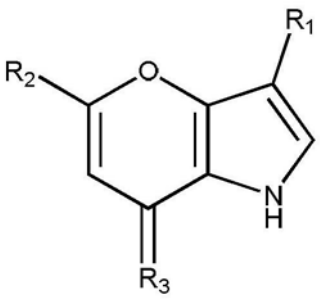
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R1、R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

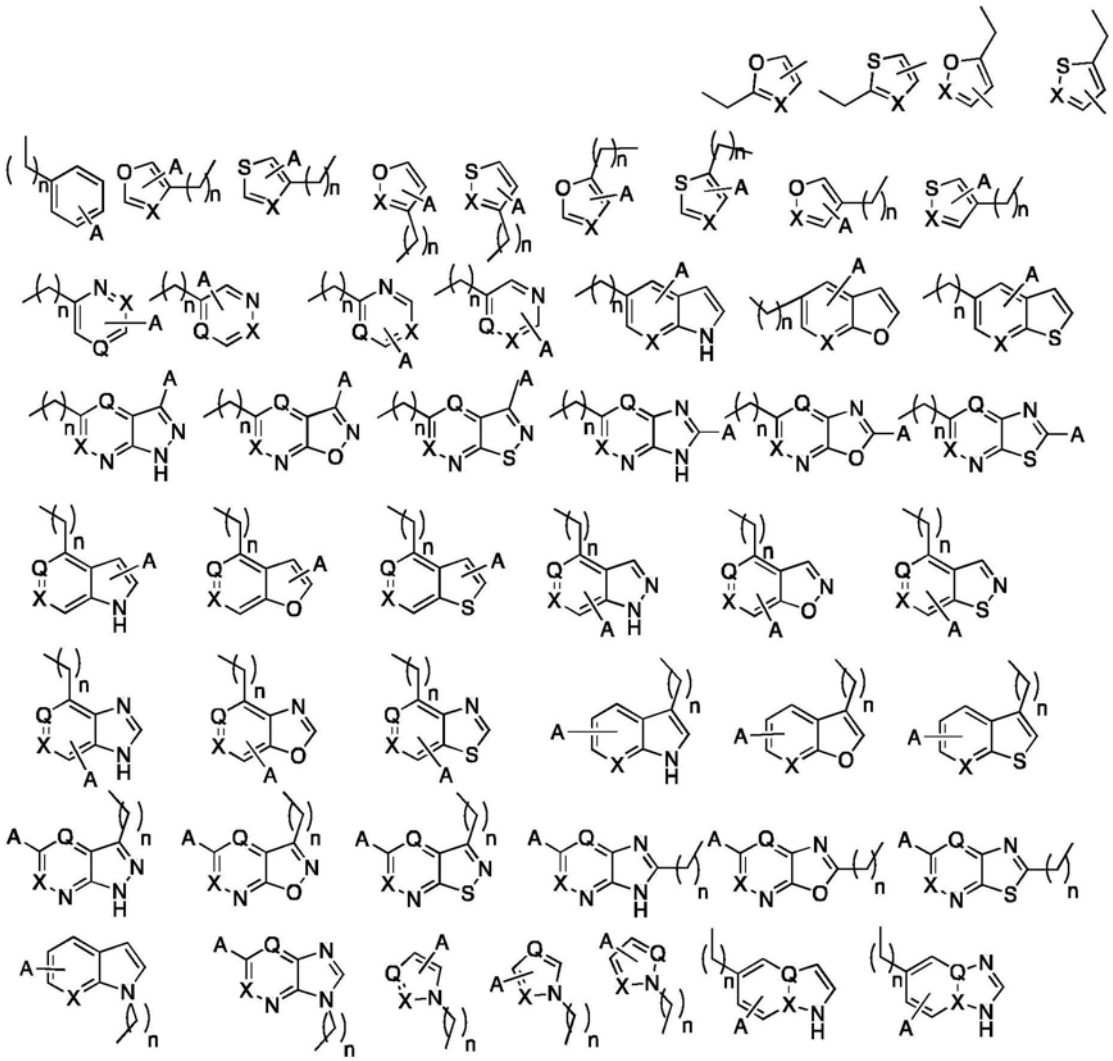
• R4是O、S、NH、NCOY。

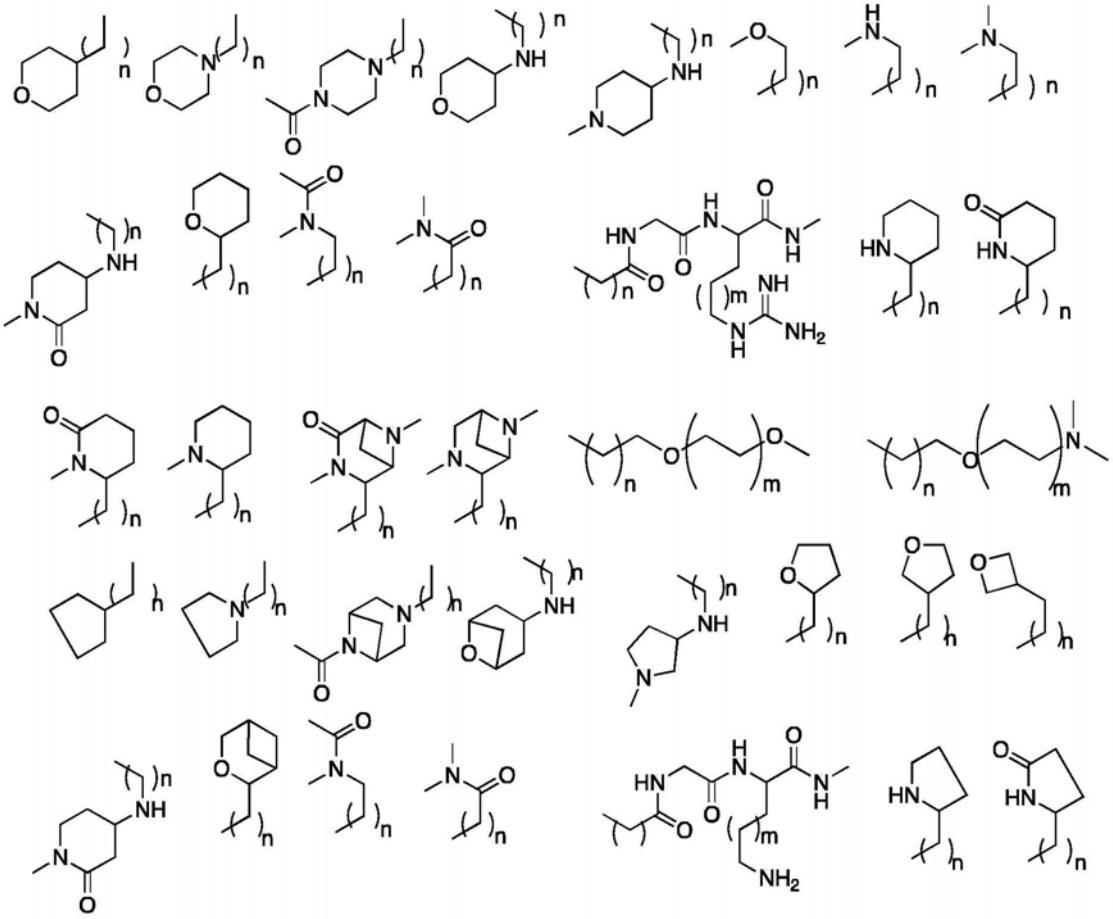
34.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式V表示：



• R1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-

CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

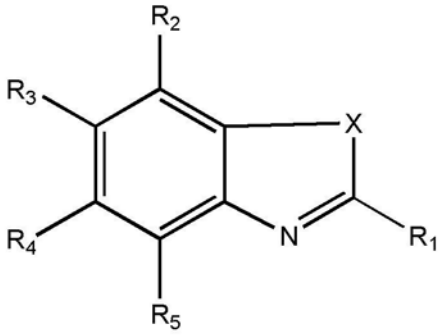
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R1和R_2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R3是O、S、NH、NCOY。

35.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式VI表示：

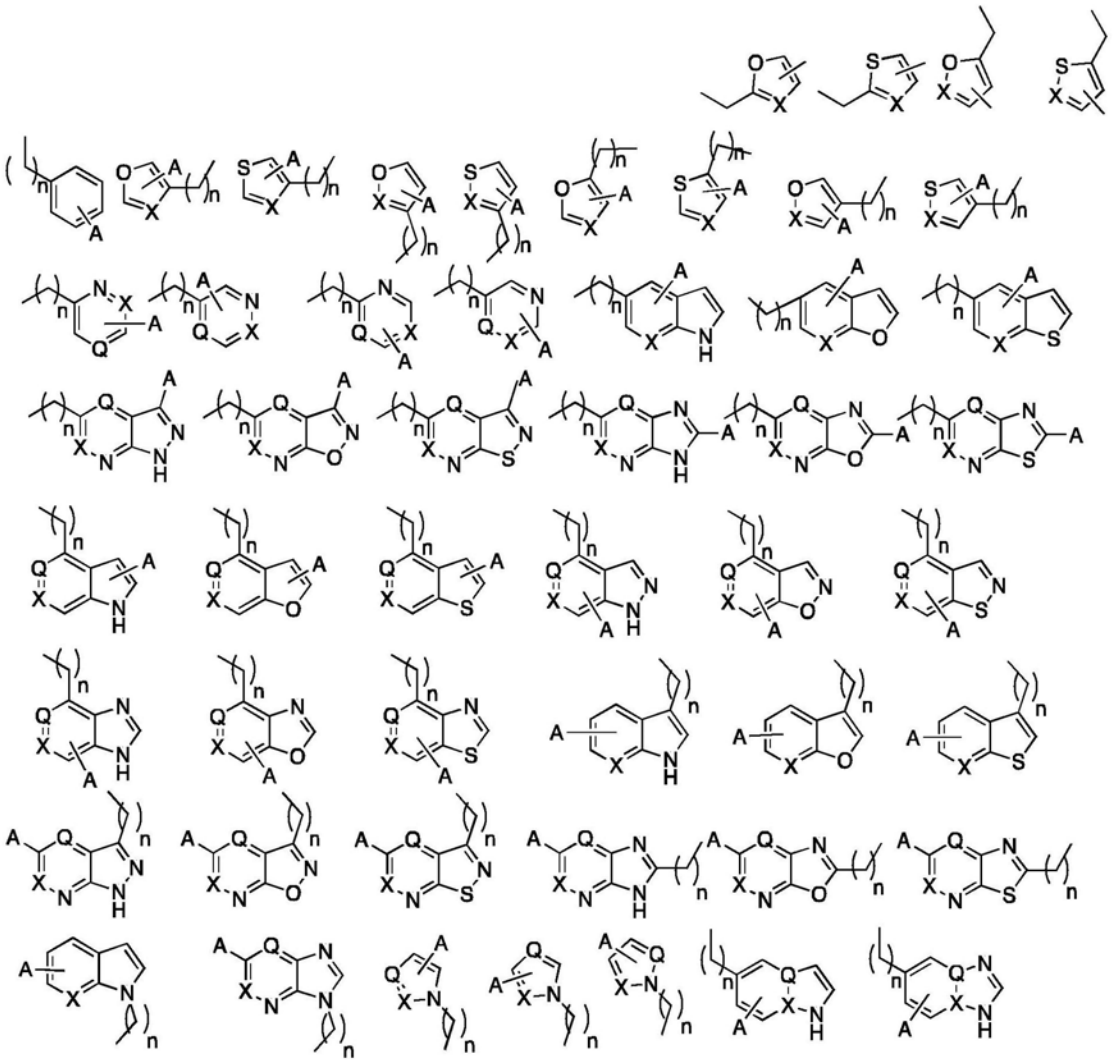


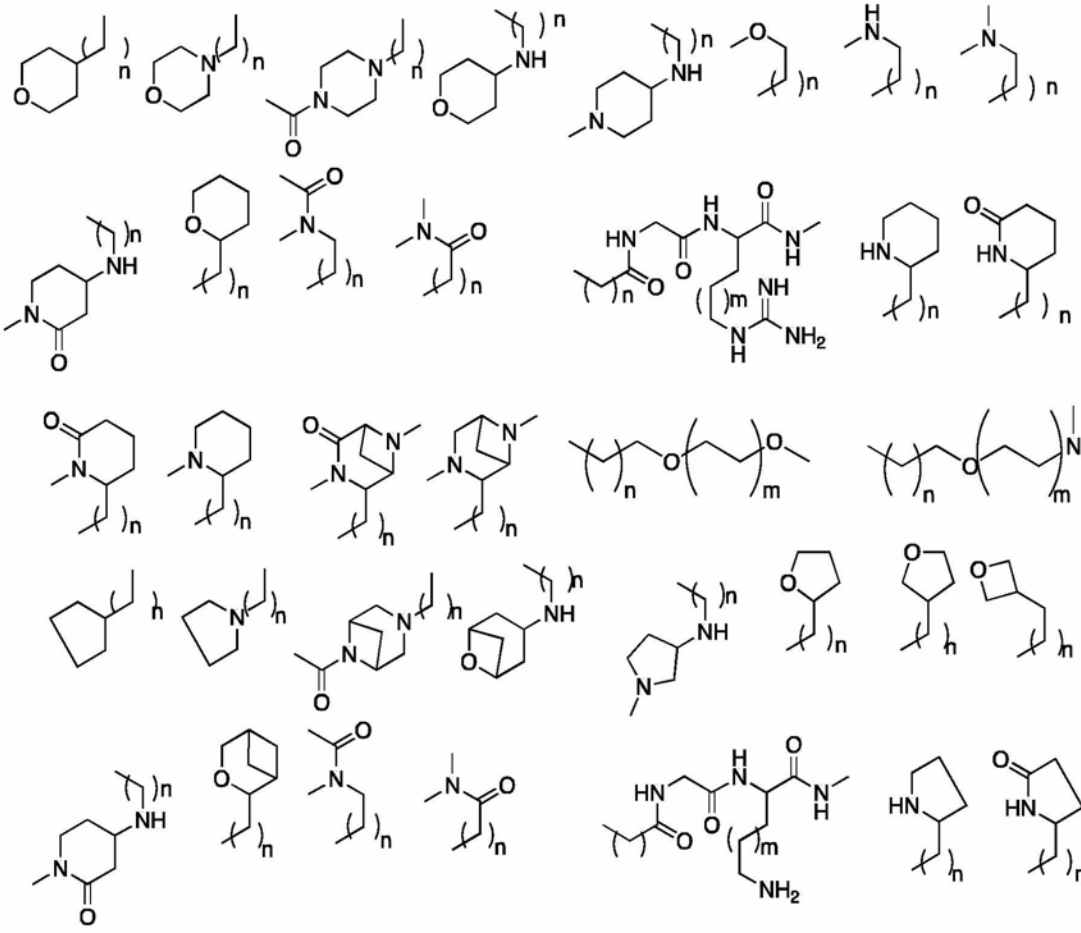
• X＝NH、O、S、CH2

• R1和R4优先地是-H，但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-

SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-CHO…

• R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$

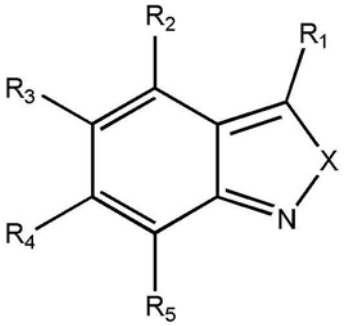
-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

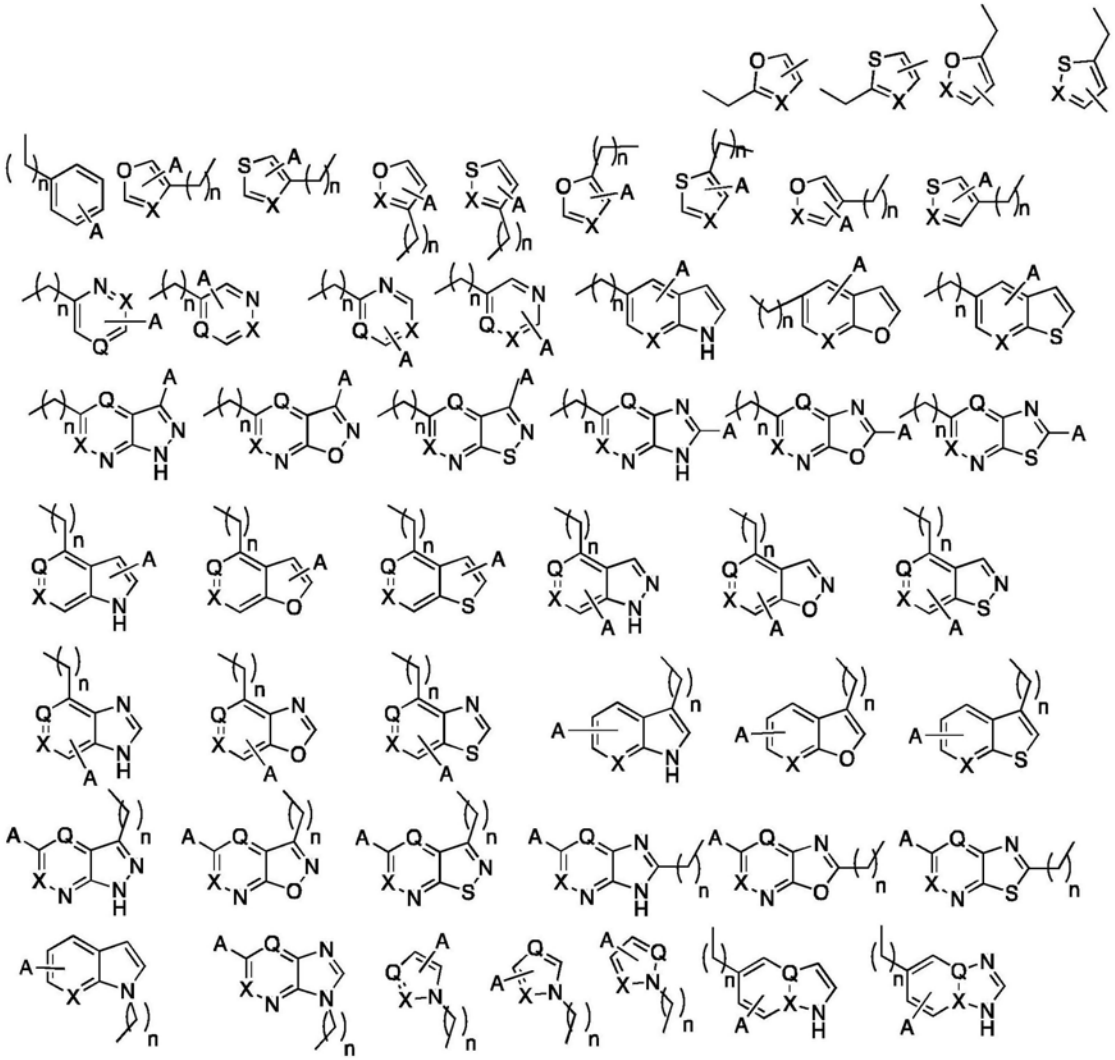
36.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式VII表示：

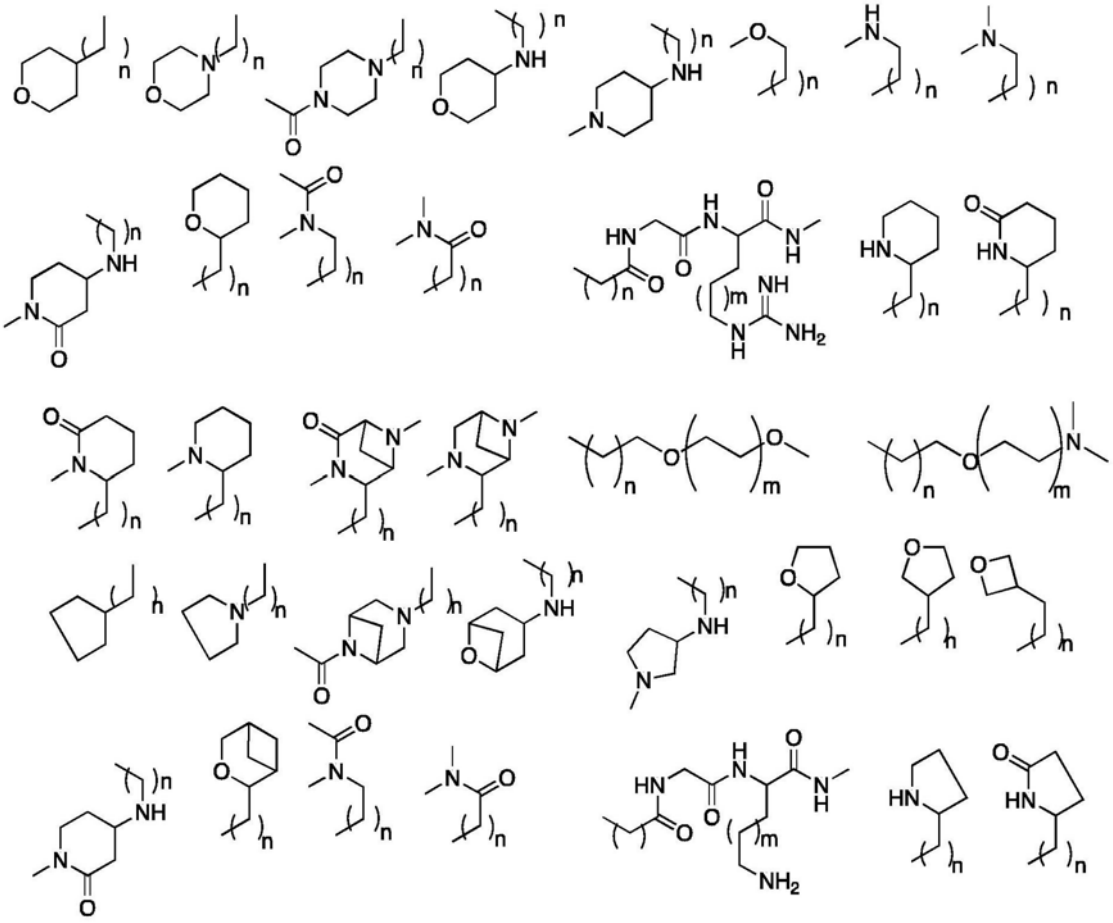


• X＝NH、O、S、CH2

• R1、R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-

Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

--A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

-X和Q是N或CH，

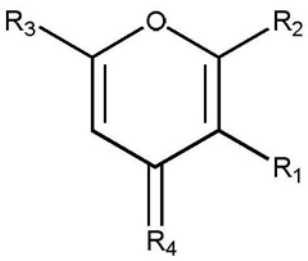
n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R1、R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

• R4优先地是-H，但也为Me、F、Cl、Br、CF_3、CHF_2、CH_2F、CN、OMe、SMe、SOMe、SO_2Me NH_2、NHMe、NO_2、CHO…

• R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

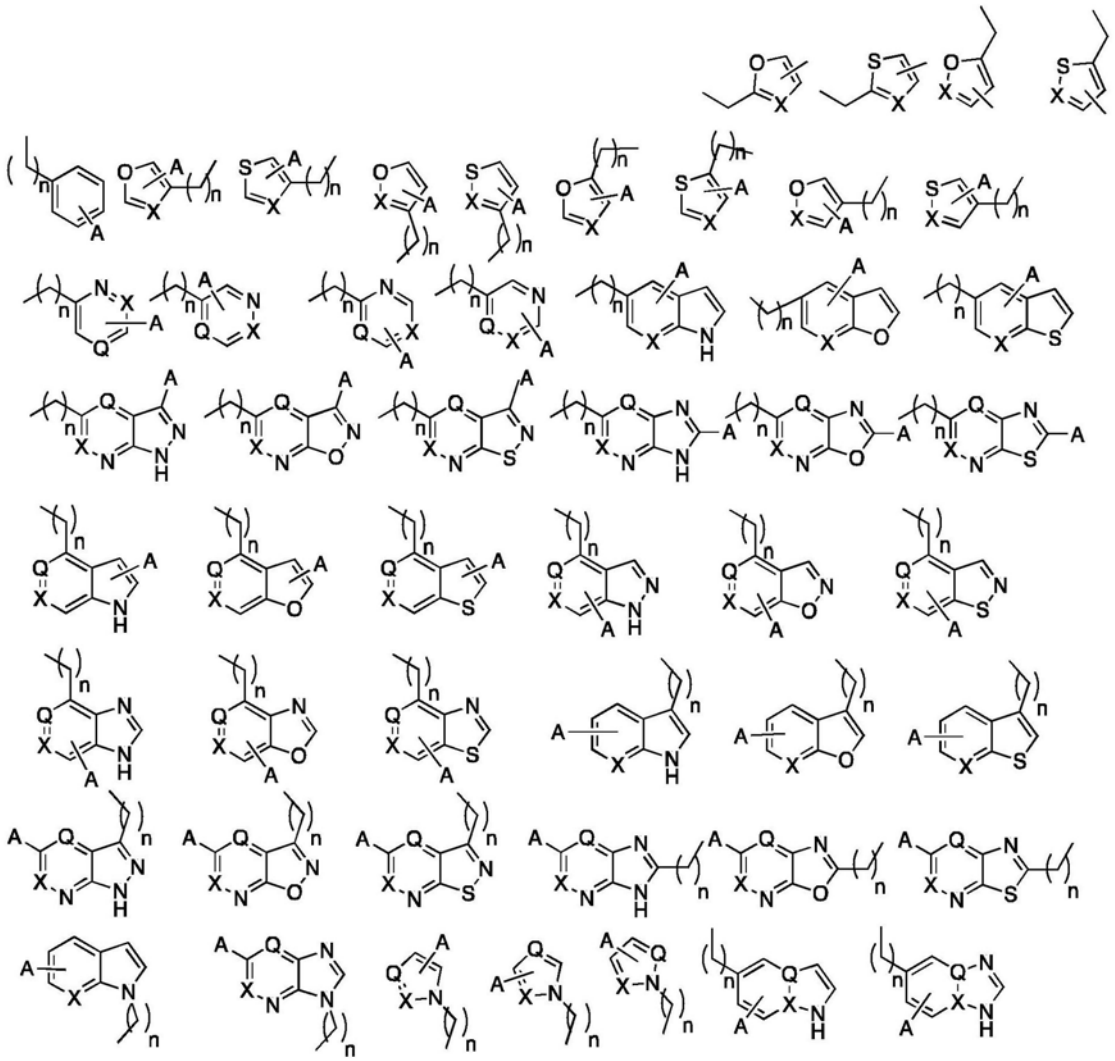
37.根据权利要求15或权利要求21或权利要求23所述的化合物，其中所述R11L由式VIII表示：

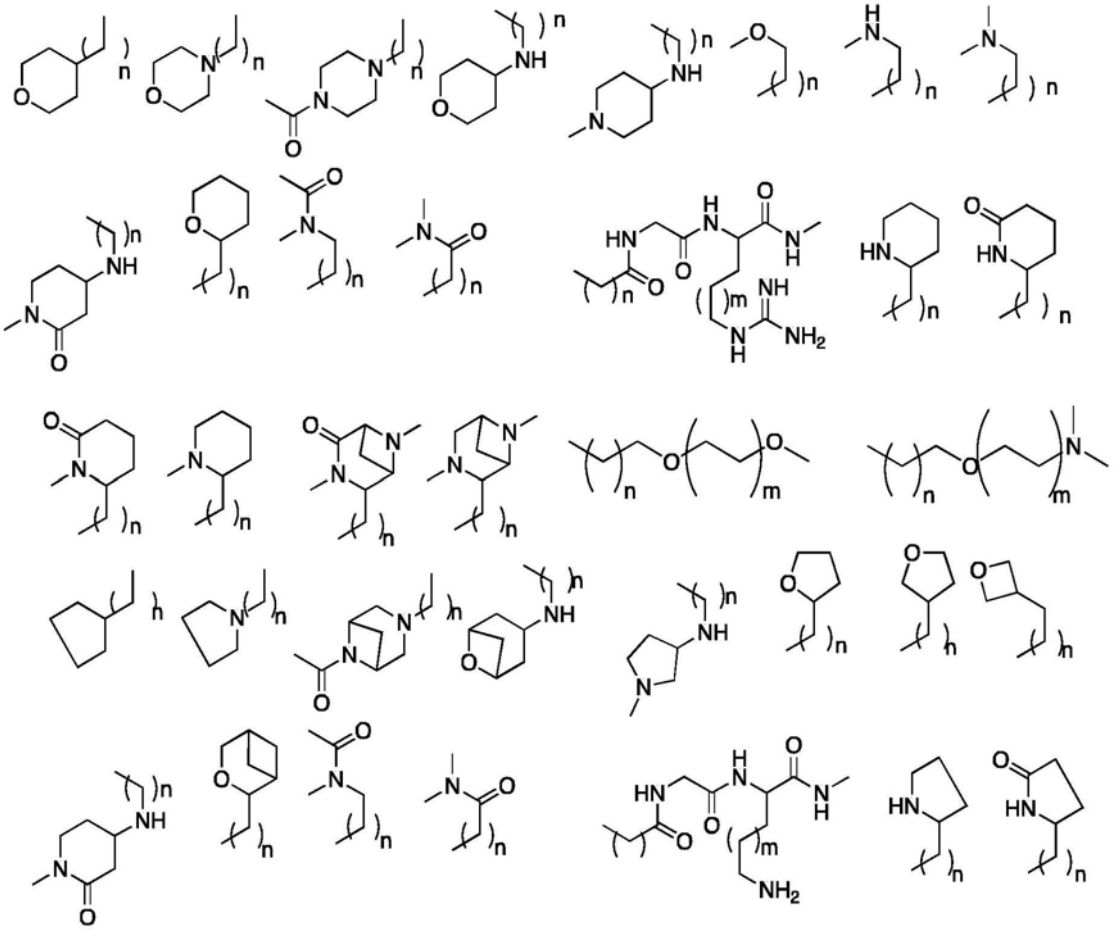


• R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY、NHCOY，其中Y如上所述，

• R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O，

• R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、





其中：

-A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

-X和Q是N或CH，

n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

• R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

并且R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O。

38.一种获得细胞中的靶蛋白的增加的蛋白水解的方法，所述方法包括使所述细胞与根据权利要求1-37中任一项所述的双功能分子接触。

39.一种获得受试者中的靶蛋白的增加的蛋白水解的方法，所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1-37中任一项所述的双功能分子。

40.一种提供包含两个共价连接的结合配偶体的双功能分子的方法，其中第一结合配偶体与Rpn11结合并且第二结合配偶体与选择的靶蛋白结合，所述方法包括提供所述第一结合配偶体和所述第二结合配偶体，并且共价连接所述第一结合配偶体和所述第二结合配偶体。

41.一种选择促进靶蛋白的蛋白水解的双功能分子的方法：

a.通过提供候选第一结合配偶体并且确定所述候选第一结合配偶体与Rpn11结合，选择第一结合配偶体；

b.通过提供候选第二结合配偶体并且确定所述候选第二结合配偶体与目标靶蛋白结合,选择第二结合配偶体;

c.共价连接所述第一结合配偶体和第二结合配偶体以形成双功能分子;

d.使细胞与所述双功能分子接触;

e.确定所述靶蛋白是否经历蛋白水解。

42.一种选择能够促进靶蛋白的蛋白水解的双功能分子的方法,所述方法包括:

(a)提供包含与靶蛋白结合配偶体共价连接的Rpn11结合配偶体的双功能分子,

(b)在体外或在哺乳动物中使所述双功能分子与细胞接触,所述细胞包含Rpn11和所述靶蛋白,其中所述接触允许所述双功能分子与所述Rpn11和所述靶蛋白结合,以及

(c)检测所述细胞中的所述靶蛋白的蛋白水解,其中检测到的蛋白水解相对于在不存在所述接触的情况下的所述靶蛋白的蛋白水解是增加的。

43.根据权利要求41或42所述的方法,所述方法包括以下步骤:在不存在所述双功能分子的情况下测量所述靶蛋白的蛋白水解。

44.一种在具有RPN11分子或其同系物的真核生物或原核生物中在体内诱导蛋白质降解的方法,所述方法包括向所述真核生物或原核生物施用根据权利要求1-37中任一项所述的化合物,而不抑制经由所述RPN11的去泛素化。

45.一种细胞、组织或器官培养基,其包含根据权利要求1-37中任一项所述的化合物,而不抑制经由所述RPN11的去泛素化。

46.一种使靶蛋白降解的方法,所述方法包括以下步骤:使用根据权利要求1-37中任一项所述的化合物诱导所述靶蛋白的降解,而不抑制经由所述RPN11的去泛素化。

47.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-37中任一项所述的化合物和药用载体。

用于靶向Rpn11的双功能分子

技术领域

[0001] 本发明涉及用于细胞中的蛋白质的选择性降解的双功能分子。

背景技术

[0002] 蛋白质降解是维持细胞稳态的高度受控且必不可少的过程。选择性地鉴定和移除受损的、错误折叠的或过量的蛋白质部分地经由泛素-蛋白酶体途径(UPP)实现。UPP在几乎所有细胞过程的调节中都至关重要,所述细胞过程包括抗原加工,细胞凋亡,细胞器的生物发生,细胞周期,DNA转录和修复,分化和发育,免疫应答和炎症,神经和肌肉变性,神经网络的形态发生,细胞表面受体、离子通道和分泌途径的调节,对应激和细胞外调节剂的反应,核糖体的生物发生以及病毒感染。E3泛素连接酶通常将多个泛素分子共价连接至末端赖氨酸残基,从而标记了用于蛋白酶体降解的蛋白质,其中该蛋白质被消化成小肽,最终被消化成作为用于新蛋白质的结构单元的其组成氨基酸。有缺陷的蛋白酶体降解与多种临床病症有关,所述病症包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)、亨廷顿病(Huntington's disease)、肌营养不良(muscular dystrophies)、心血管疾病和癌症等。

[0003] 存在超过600种E3泛素连接酶,其在体内促进不同蛋白质的泛素化。E3连接酶可以分为四个家族:HECT-结构域E3、U-盒E3、单体RING E3和多亚基Cullin-RING E3。参见Bulatov等人(Biochem J.,2015,467:365-386),Li等人(PLOS One,2008,3,1487),Berndsen等人(Nat.Struct.Mol.Biol.,2014,21,301-307),Deshaies等人(Ann.Rev.Biochem.,2009,78,399-434),Spratt等人(Biochem.2014,458,421-437),和Wang等人(Nat.Rev.Cancer.,2014,14,233-347)。

[0004] 蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)化合物由通过连接基团连接的两个配体构成-一个配体与靶蛋白接合并且另一个配体募集E3泛素连接酶。因此,靶蛋白被带至E3连接酶,被泛素化,然后降解。(参见Ottis,P.&Crews,C.M.Proteolysis-Targeting Chimeras:Induced Protein Degradation as a Therapeutic Strategy(靶向蛋白水解的嵌合体:诱导的蛋白质降解作为治疗策略).ACS Chem Biol 12、892-898(2017)。)

[0005] PCT/US2015/025813(Arvinas)、WO 2016/146985(邓迪大学(University of Dundee))和WO 2013/106643(耶鲁大学(Yale University)等)涉及基于酰亚胺和基于羟脯氨酸的PROTAC双功能化合物,其旨在将内源性蛋白质募集到E3泛素连接酶以进行降解。US 2016/0176916、WO 2017/024318、WO 2017/024317和WO 2017/024319(全部Dana-Farber Cancer Institute)也涉及使用已知的E3连接酶配体以使靶蛋白泛素化并且指导其降解的靶蛋白降解。

[0006] 26S蛋白酶体是参与降解细胞质蛋白和核蛋白二者的大型多亚基复合物。其由至少32个不同的亚基构成。含有蛋白水解活性位点的中央20S核心圆柱颗粒在一端或两端被19S调节颗粒封端。降解室可以通过沿着核心颗粒的中心延伸的通道到达。蛋白酶体抑制剂Velcade^{R}是FDA批准的用于治疗多发性骨髓瘤(multiple myeloma)的药物,其靶向20S内的

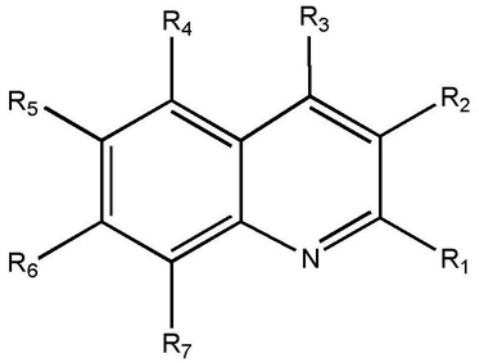
中央催化腔。通道的入口很窄，因此折叠的蛋白质必须至少部分展开，然后它们可以穿入20S核心颗粒中，被切割，并且最终降解。19S调节颗粒由至少19个亚基构成，所述亚基排列成两个亚复合物-一个被称为“盖子”并且另一个被称为“基部”。调节颗粒含有ATP酶亚基，其催化ATP水解以在能量方面支持其功能。这些包括开启降解通道的入口，介导底物识别，泛素链的蛋白水解裂解(以便在识别泛素化的蛋白质后使泛素再循环)，展开，最后移位到20S核心颗粒中。

发明内容

[0007] 本发明提供了双功能分子，所述双功能分子促进细胞中的选择的靶蛋白的降解。

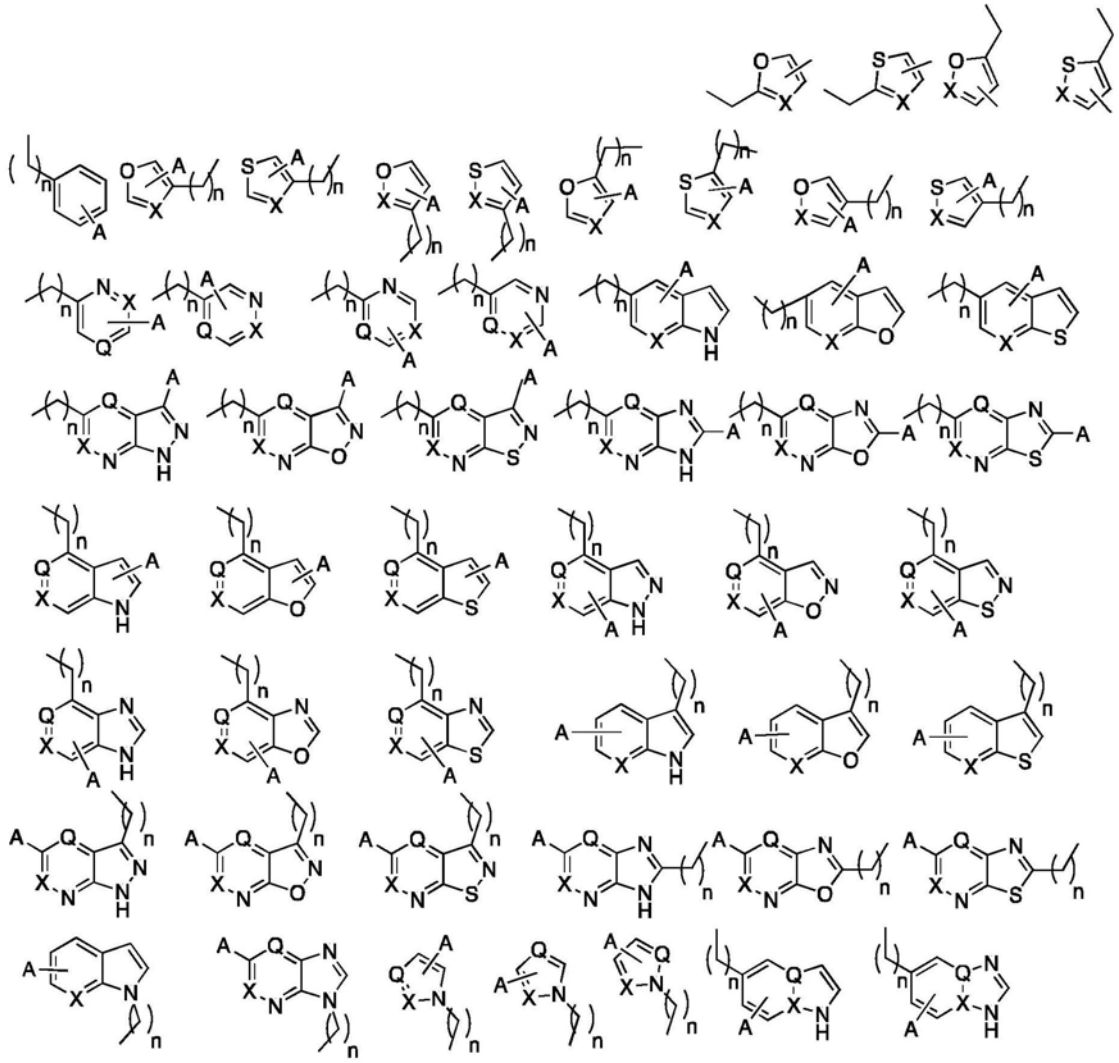
[0008] 在一个实施方案中，本发明包括一种双功能分子，所述双功能分子包含与靶蛋白结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体。

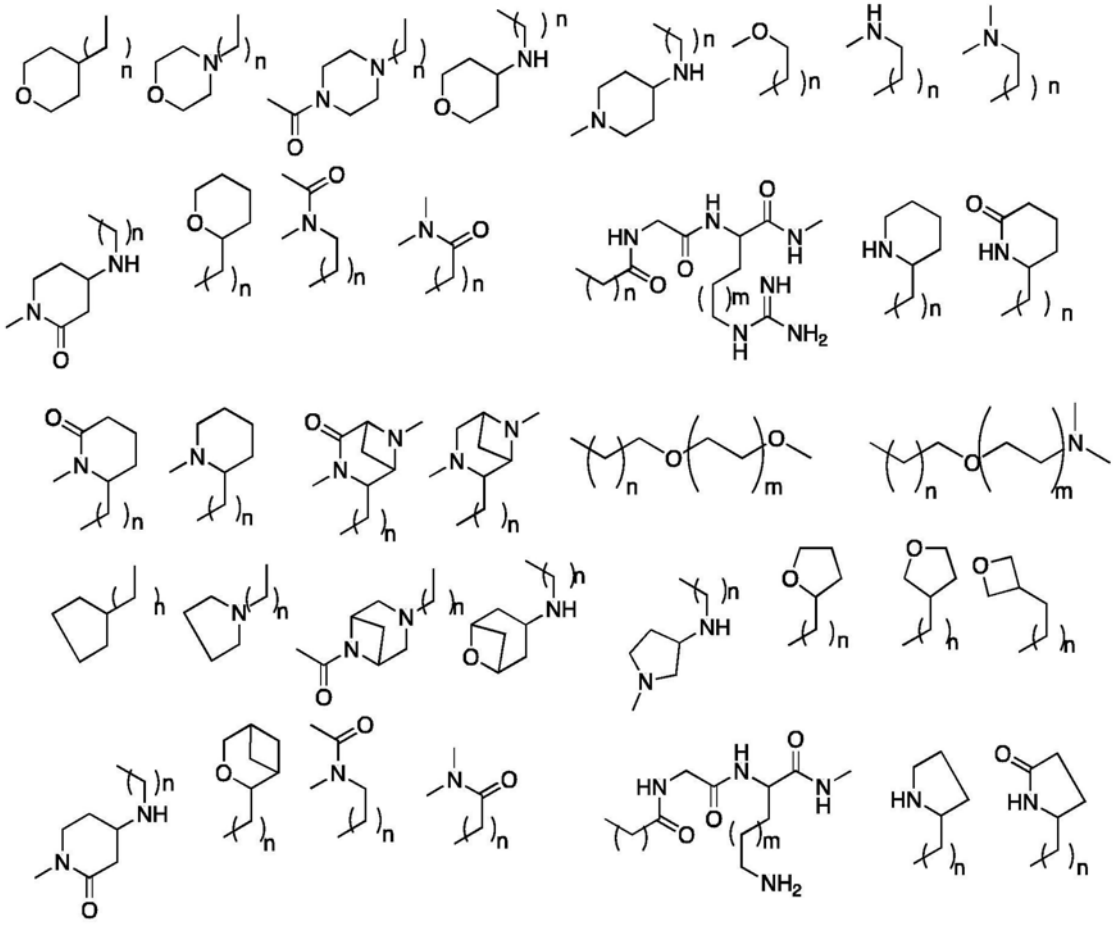
[0009] 优选地，Rpn11结合配偶体以至少10nM的亲和力与Rpn11结合。优选地，Rpn11结合配偶体以小于1μM的Kd与Rpn11结合。Rpn11结合配偶体可以选自表1中提供的Rpn11结合分子的组。优选地，靶蛋白结合配偶体可以选自由以下各项组成的组：激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、靶向含有BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂和抗体。在其他优选实施方案中，连接基团可以是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团、烷基(akyl)-醚连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。优选地所述双功能分子，其中Rpn11结合配偶体由式I表示：

[0010] 

[0011] R1和R6优先地是-H，但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…

[0012] R2、R3、R4和R5选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、

[0013] 

[0014] 

[0015] 其中：

[0016] -A是-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、-NO_2、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

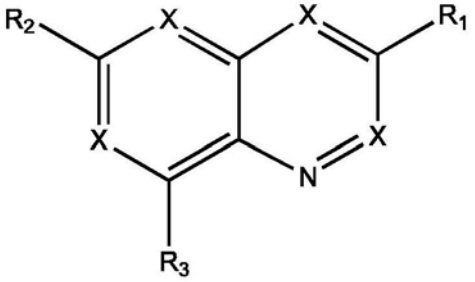
[0017] -X和Q是N或CH，

[0018] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0019] • R_2、R3、R4和R5是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0020] • R7选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

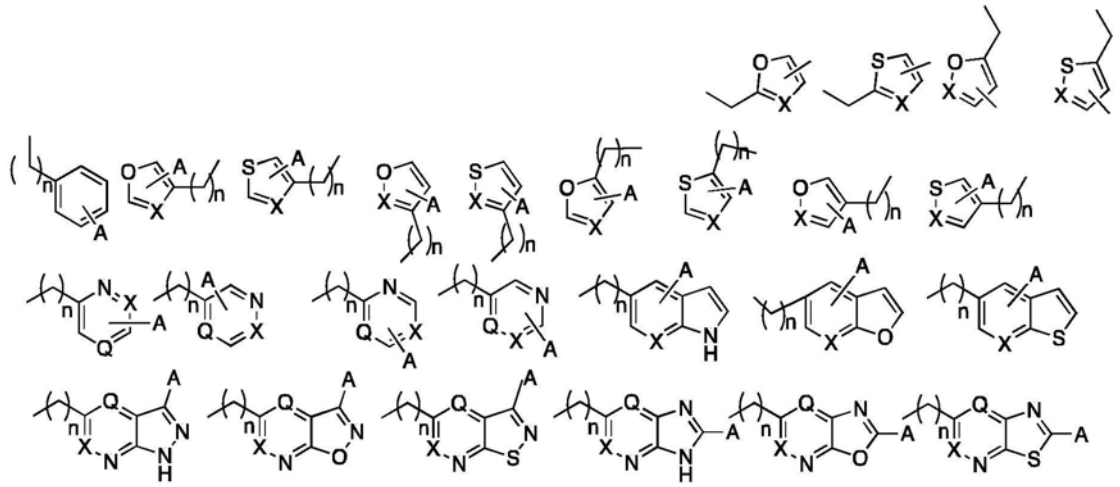
[0021] 在其他优选实施方案中，Rpn11结合配偶体是由式II表示的配偶体：

[0022] 

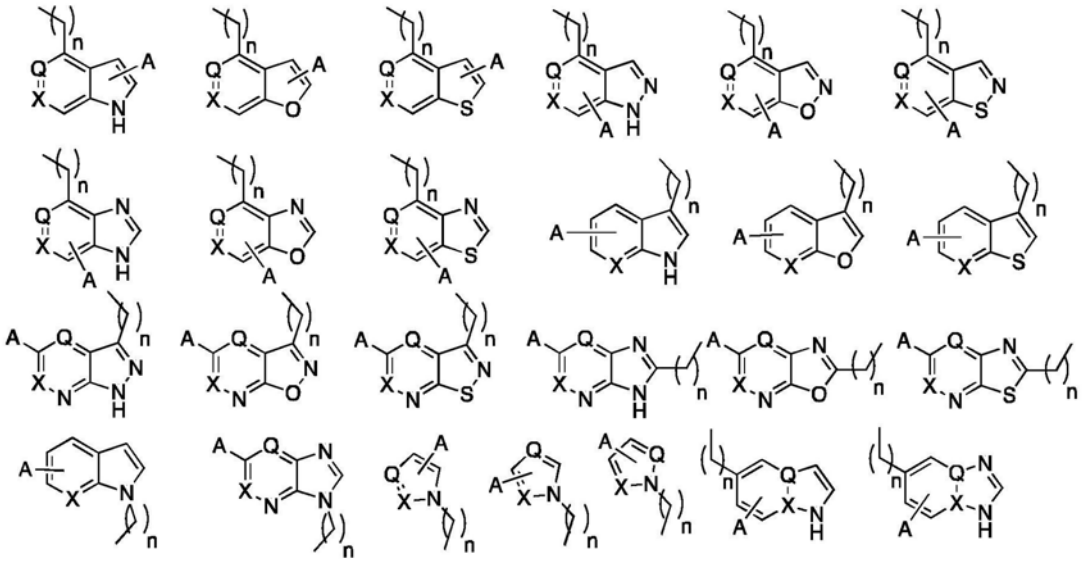
[0023] • X＝CH或N

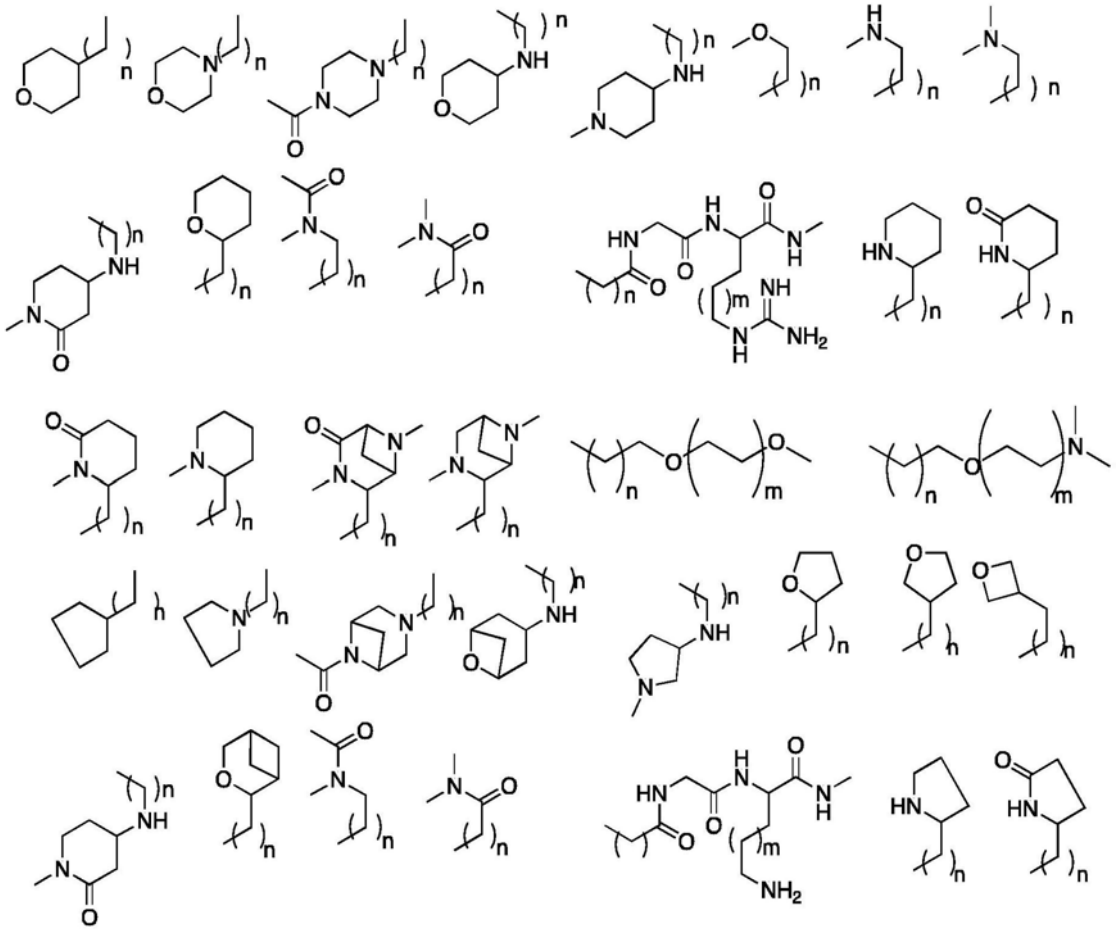
[0024] • R1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-

CH_2-COO-、



[0025]



[0026] 

[0027] 其中：

[0028] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

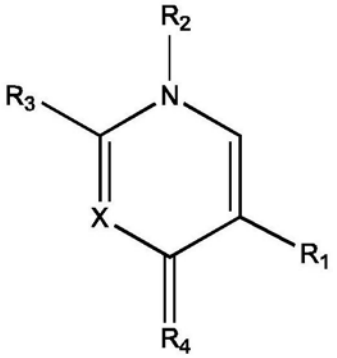
[0029] -X和Q是N或CH，

[0030] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4，

[0031] • R_1和R2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0032] • R3选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述。

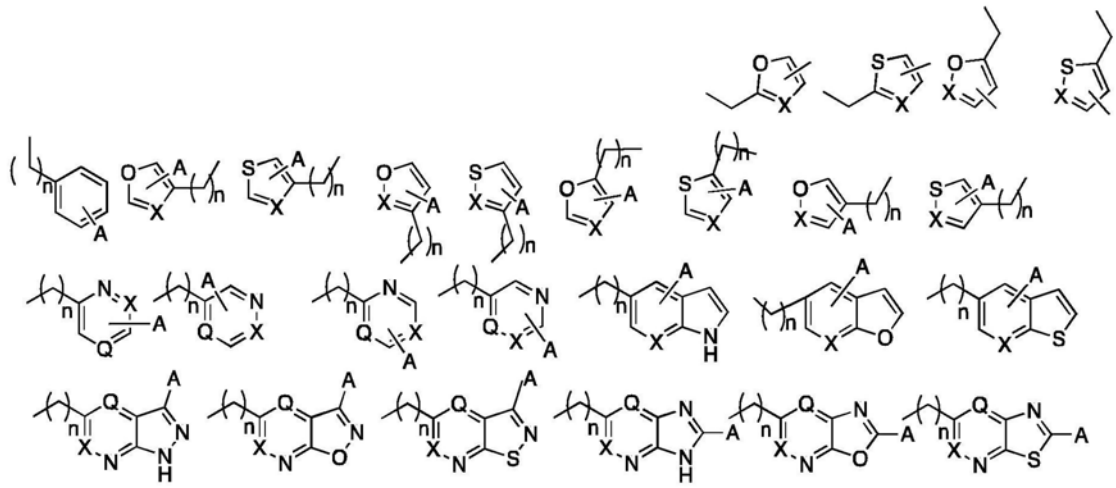
[0033] 在其他优选实施方案中，Rpn11结合配偶体是由式III表示的配偶体：

[0034] 

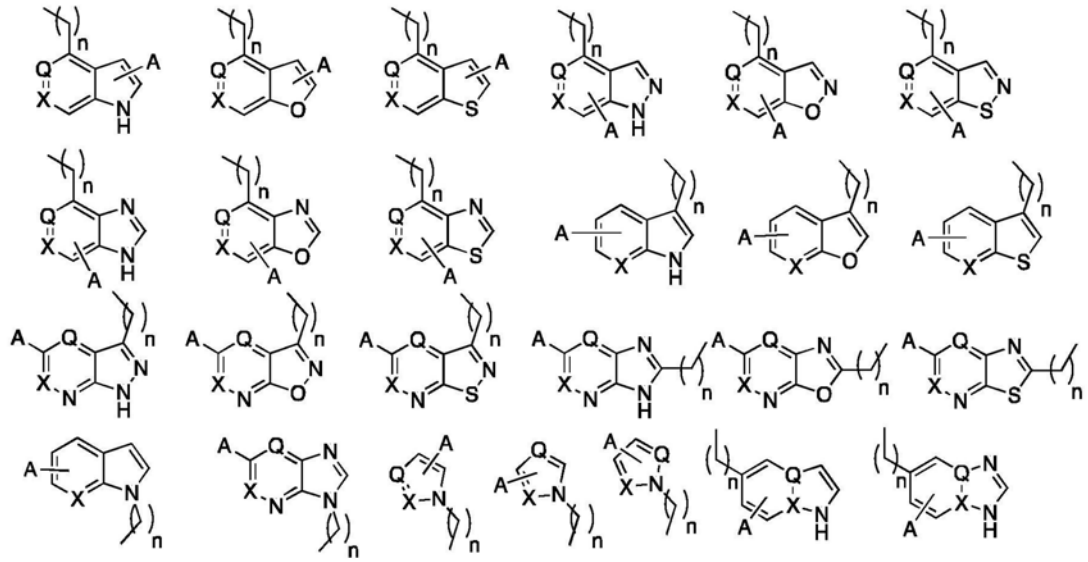
[0035] • R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所

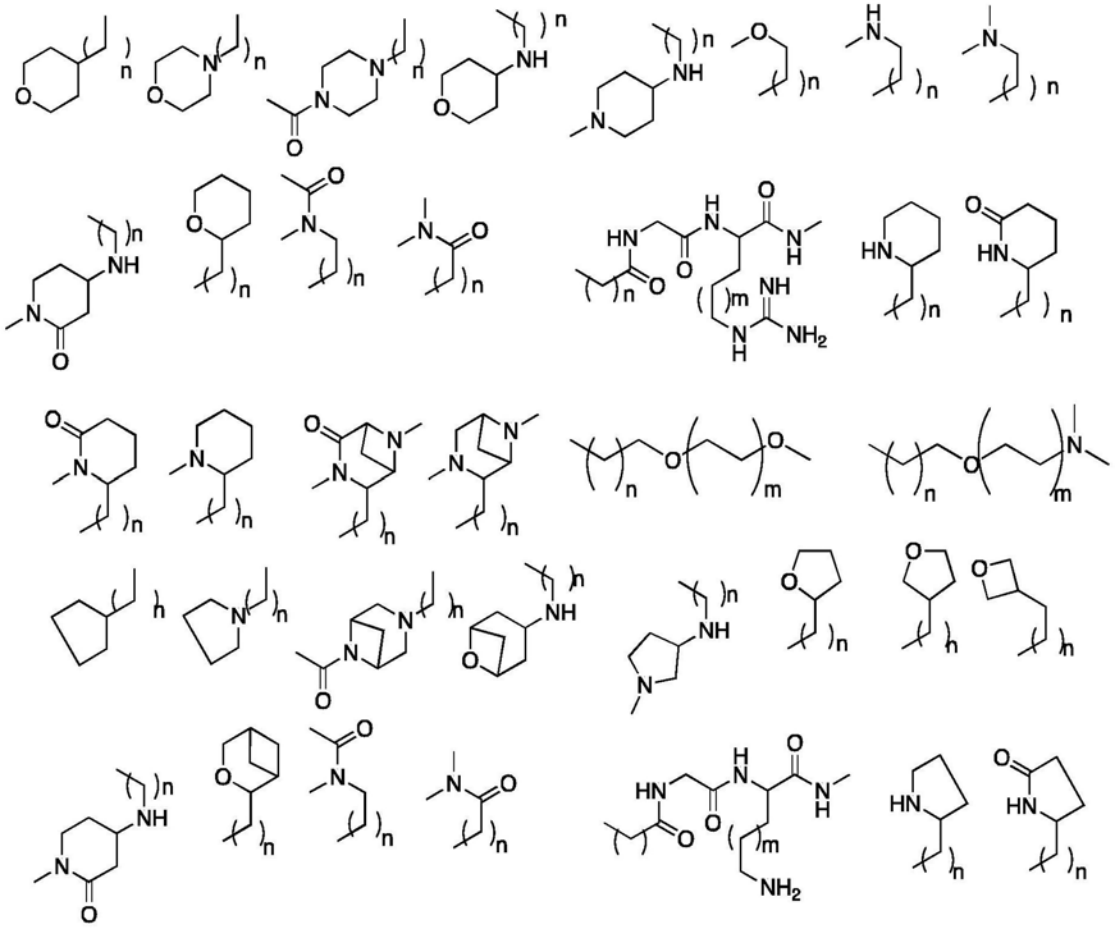
述，

[0036] • R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、



[0037]



[0038] 

[0039] 其中：

[0040] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

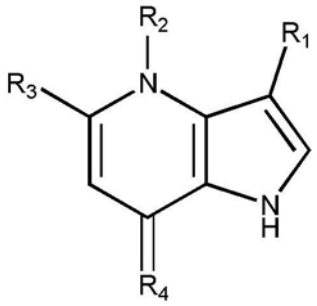
[0041] -X和Q是N或CH，

[0042] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0043] • R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

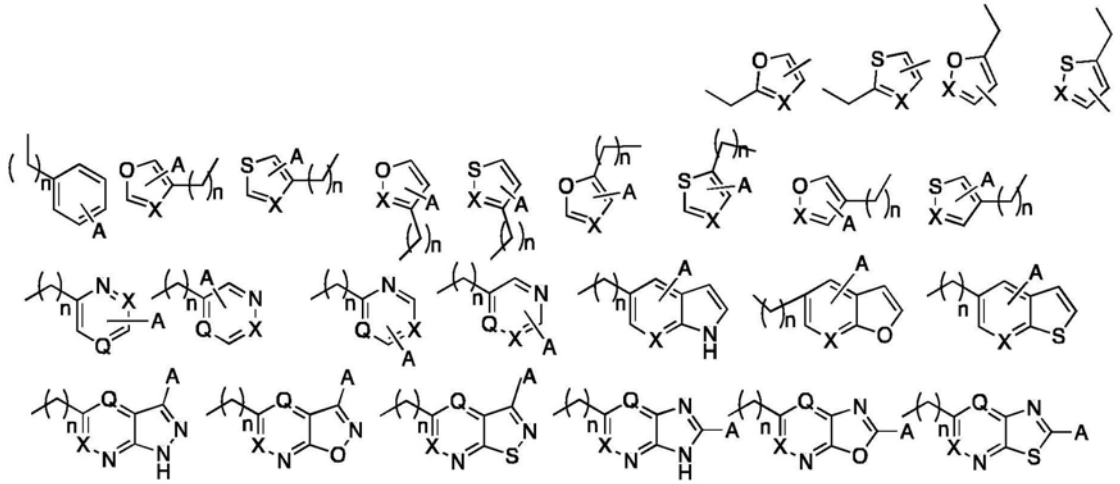
[0044] • R4是O、S、NH。

[0045] 在其他优选实施方案中，Rpn11结合配偶体是由式IV表示的配偶体：

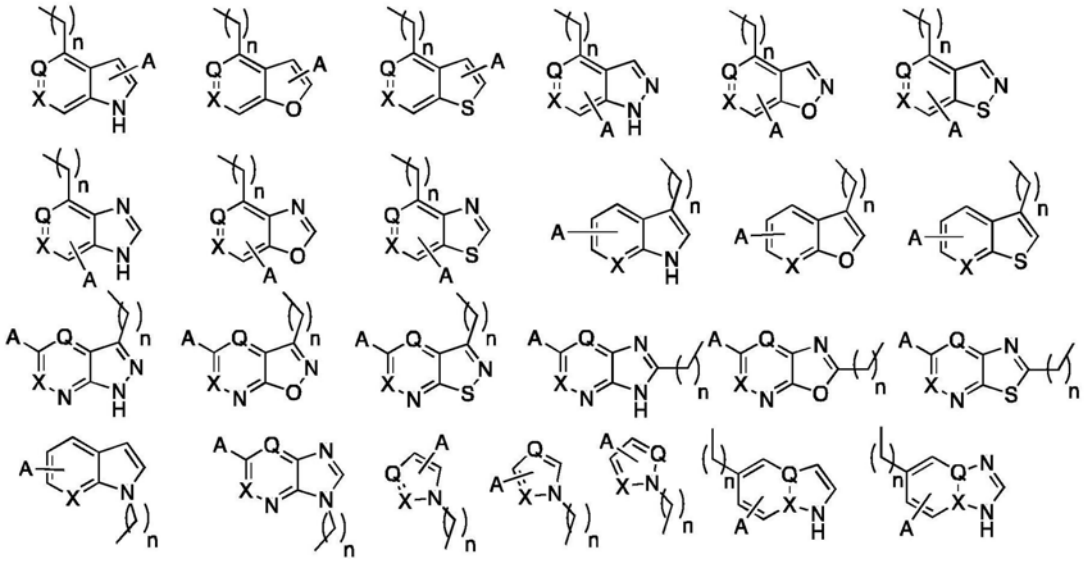
[0046] 

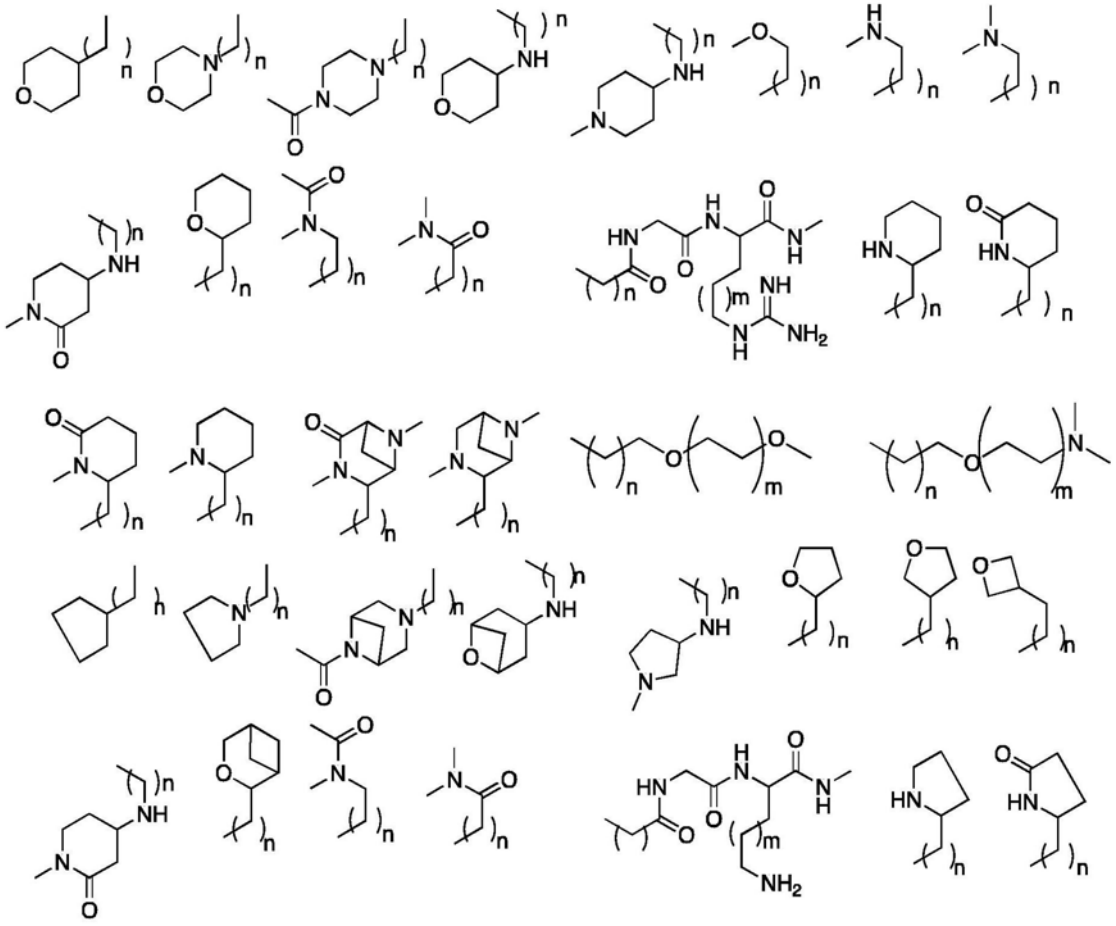
[0047] • R1、R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-

CH_3、-CH_2-COO-、



[0048]



[0049] 

[0050] 其中：

[0051] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

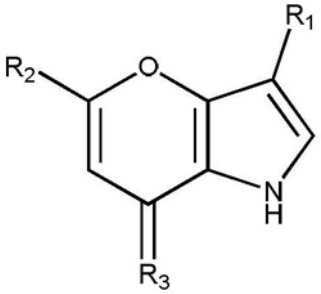
[0052] -X和Q是N或CH，

[0053] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

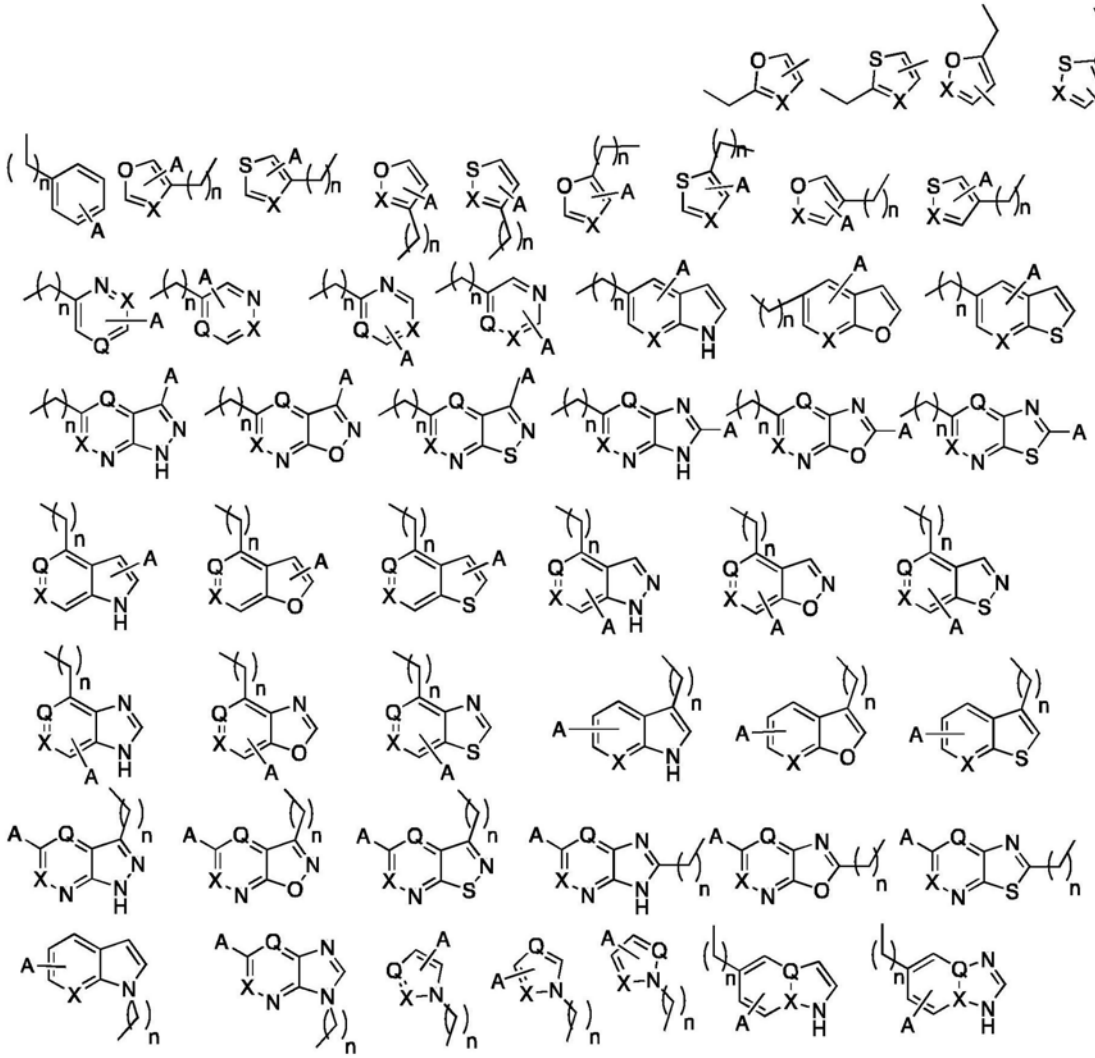
[0054] • R1、R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

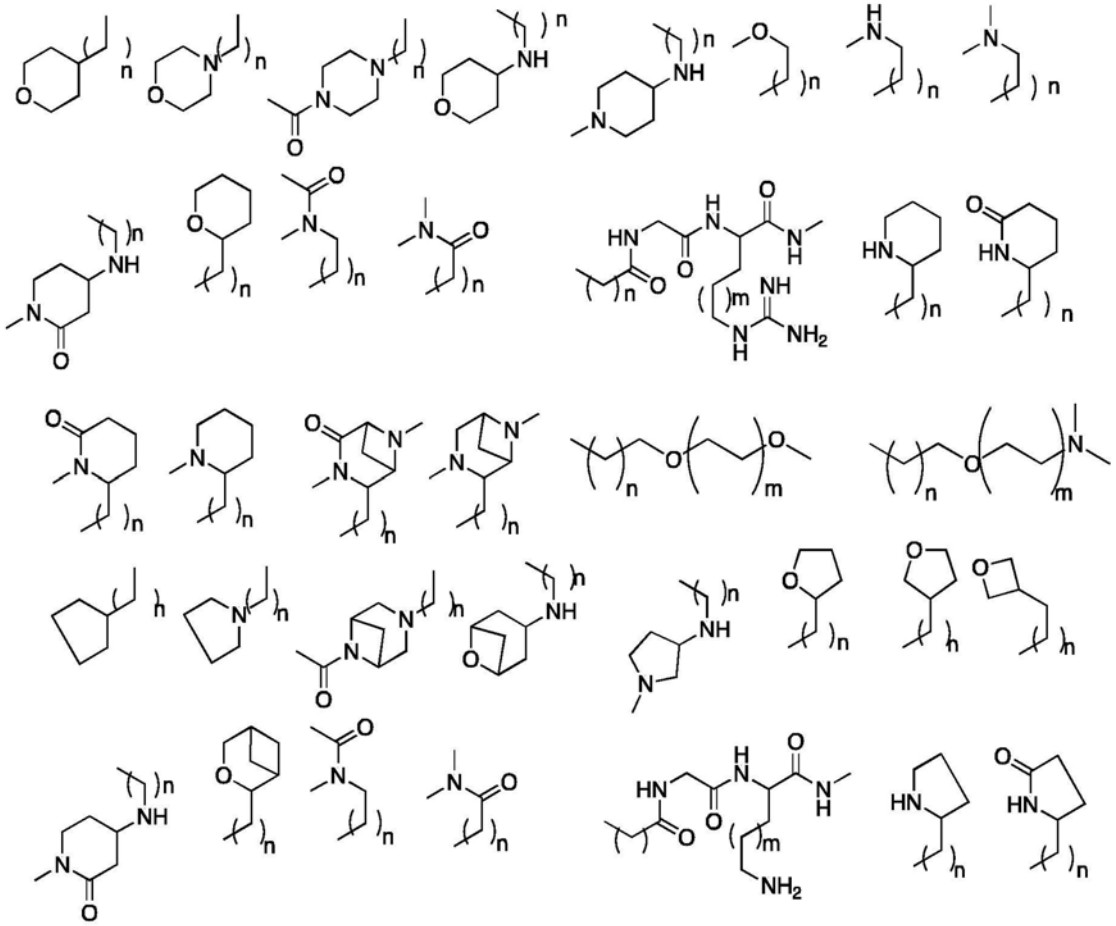
[0055] • R4是O、S、NH、NCOY。

[0056] 在其他优选实施方案中，Rpn11结合配偶体是由式V表示的配偶体：

[0057] 

[0058] • R1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、

[0059] 

[0060] 

[0061] 其中：

[0062] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

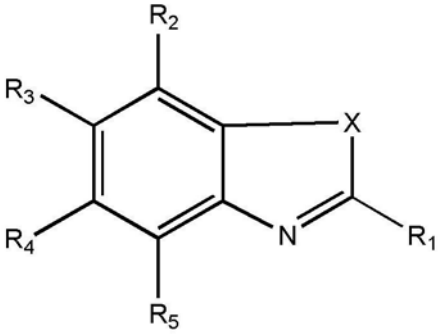
[0063] -X和Q是N或CH，

[0064] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0065] • R1和R_2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0066] R3是O、S、NH、NCOY。

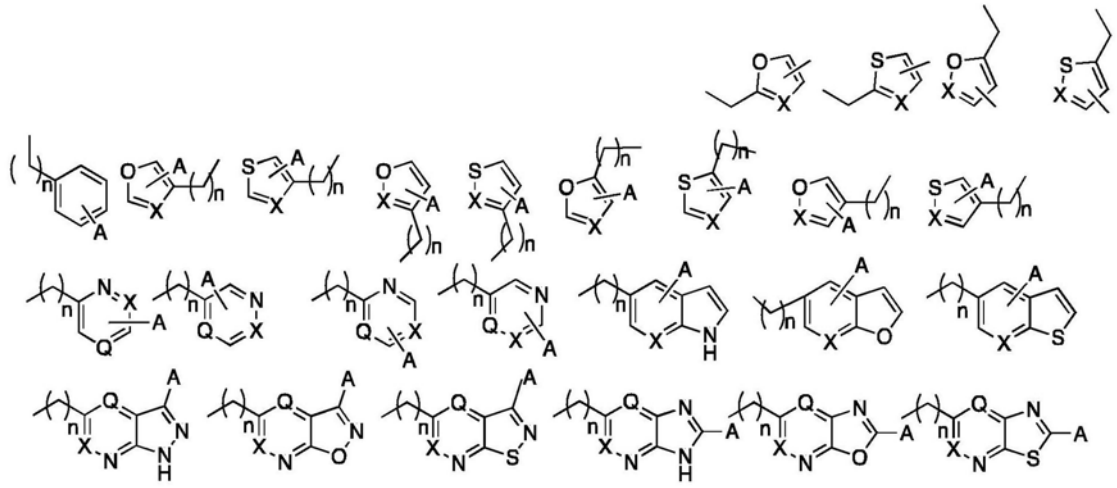
[0067] 在其他优选实施方案中，Rpn11结合配偶体是由式VI表示的配偶体：

[0068] 

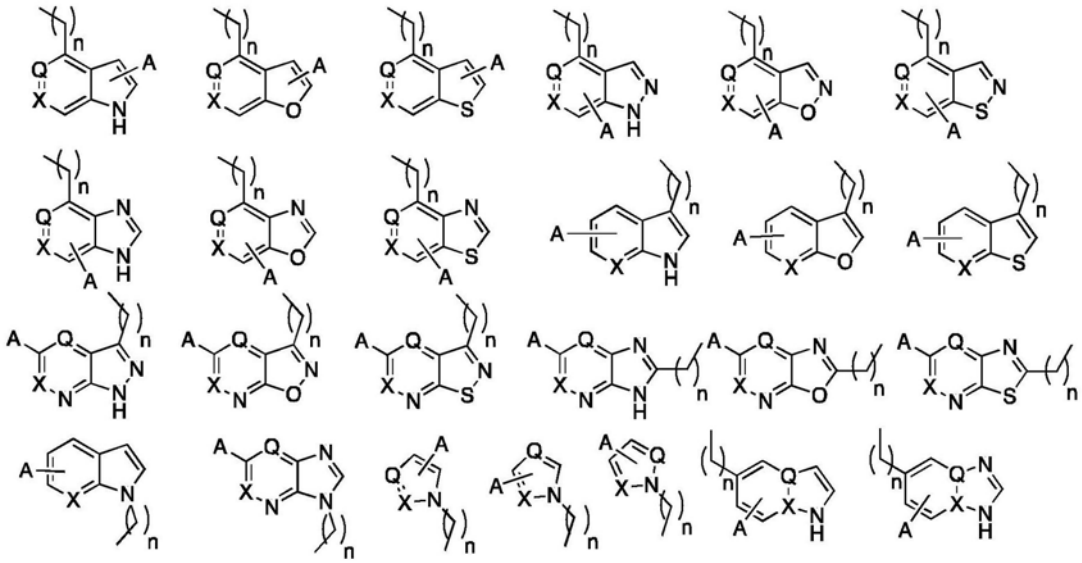
[0069] • X＝NH、O、S、CH2

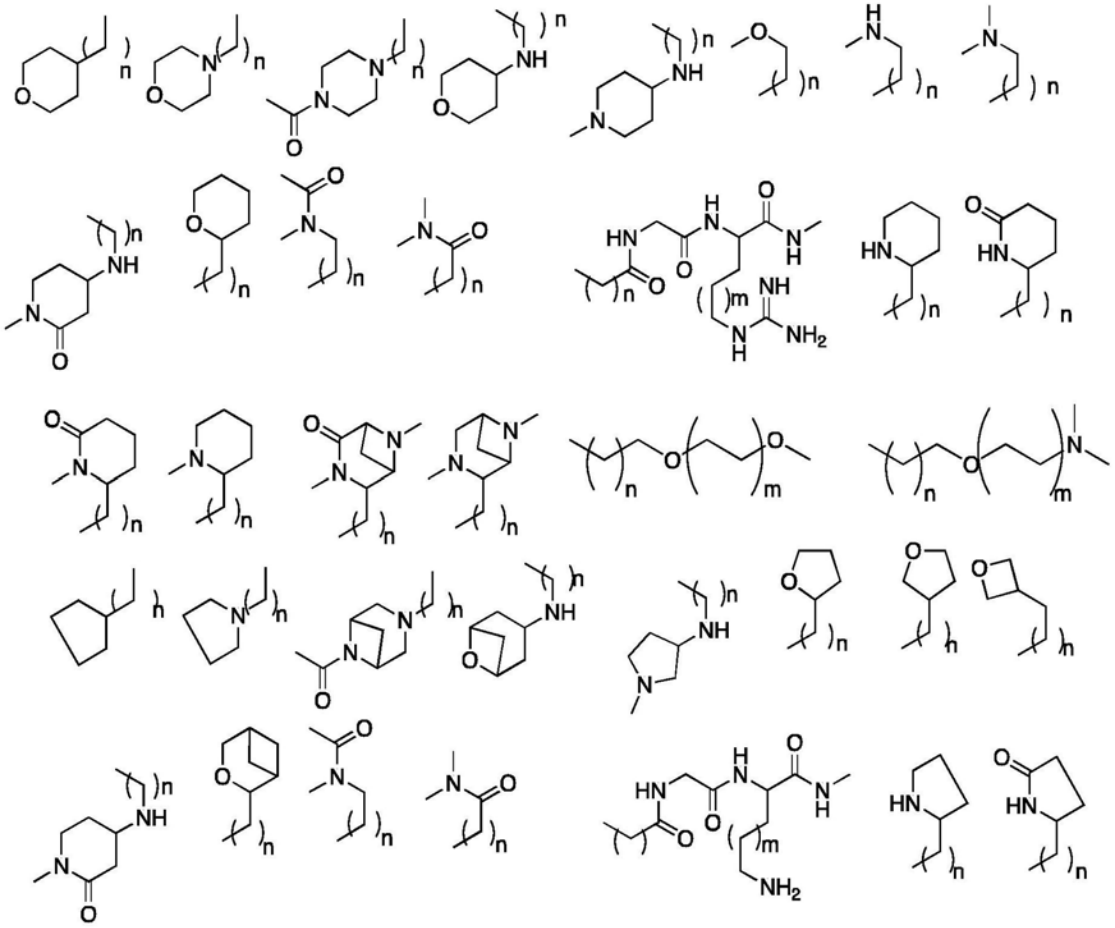
[0070] • R1和R4优先地是-H，但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-CHO…

[0071] • R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、$-CF_3$、-COOH、$-CH_2NH_2$、$-CH_3$、-H、-F、-Cl、-Br、$-CF_3$、$-CHF_2$、$-CH_2F$、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、$-SO_2Me$、$-NH_2$、-NHMe、$-NMe_2$、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：$-NH_2$、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：$-CH_3$、$-CH_2$-COO-、



[0072]



[0073] 

[0074] 其中：

[0075] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-SONHNH$_2$

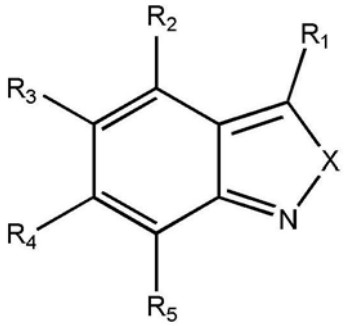
[0076] -X和Q是N或CH，

[0077] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0078] • R2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0079] • R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

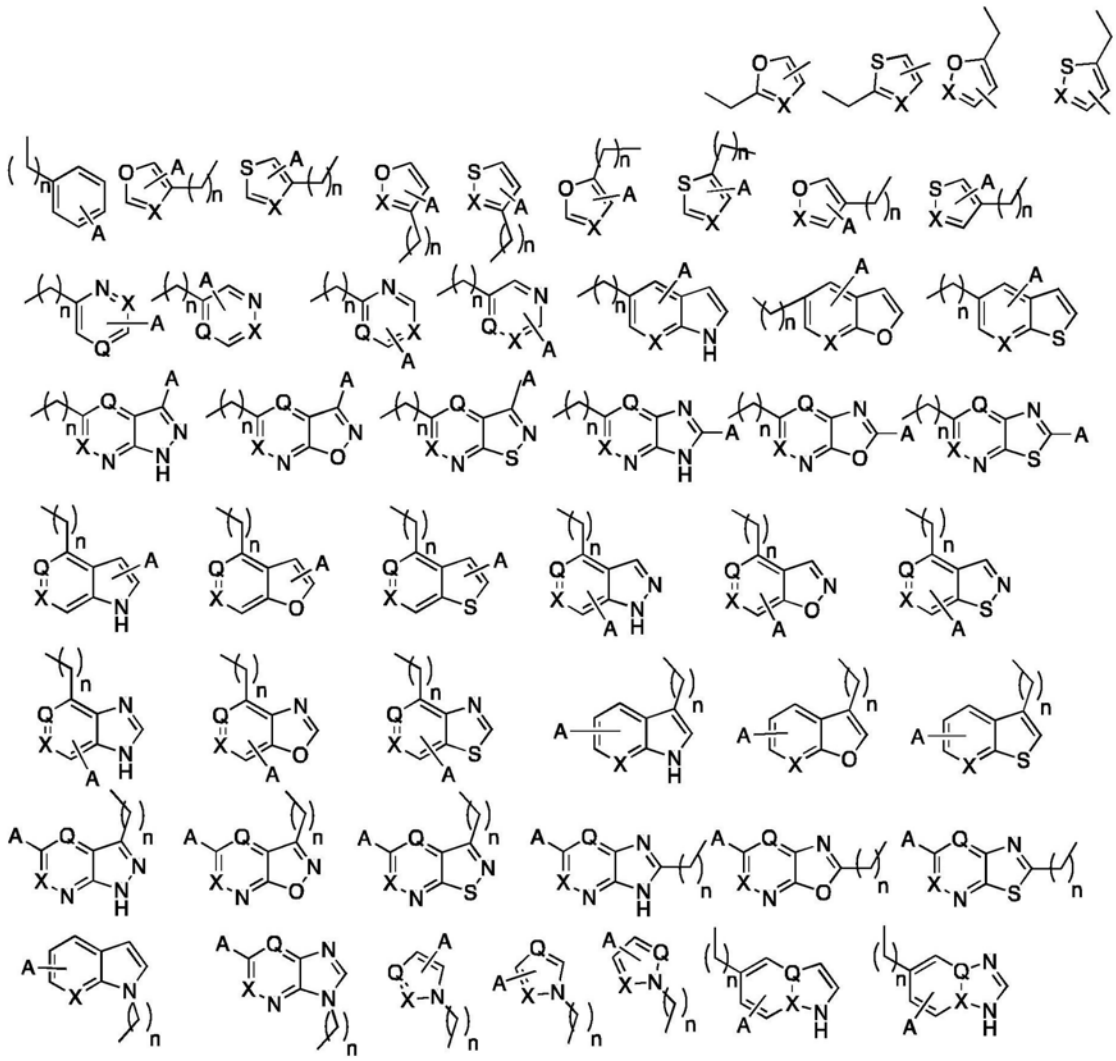
[0080] 在其他优选实施方案中，Rpn11结合配偶体是由式VII表示的配偶体：

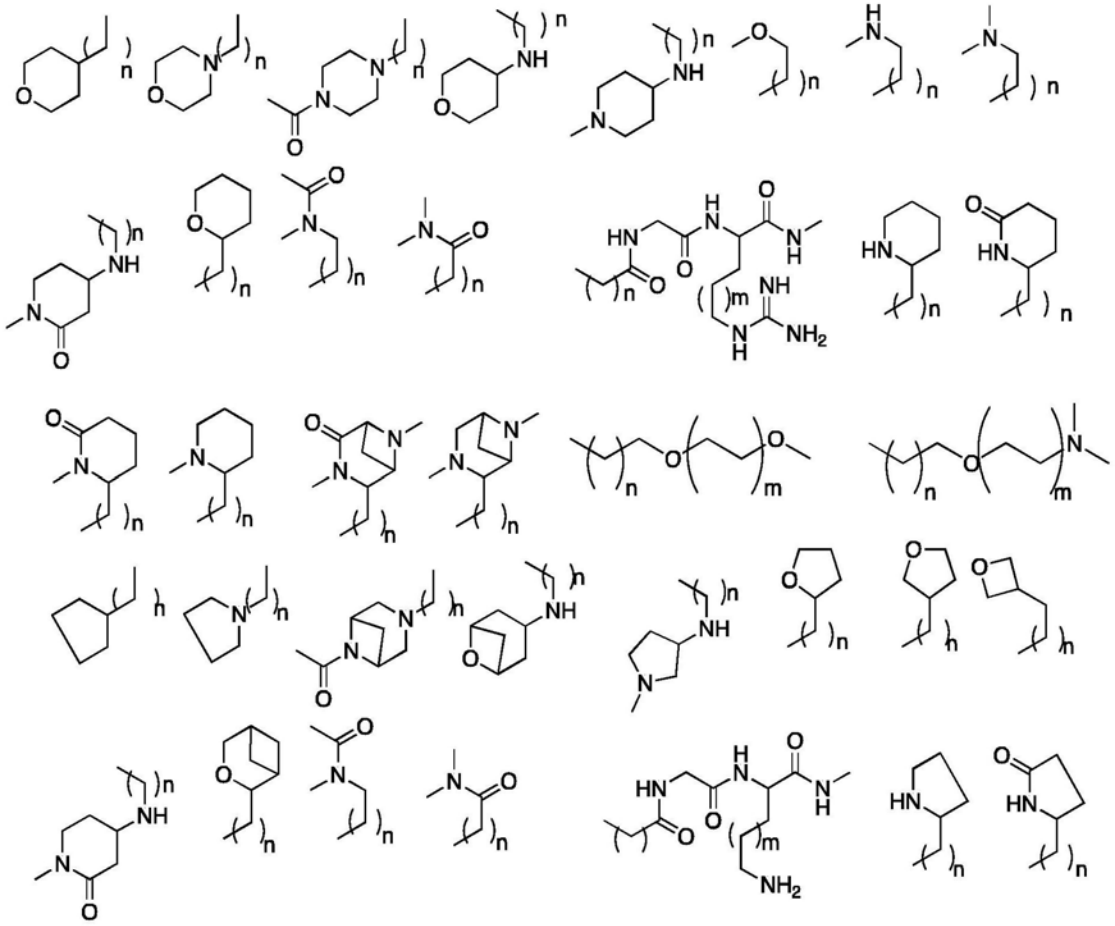
[0081] 

[0082] • X＝NH、O、S、CH2

[0083] • R1、R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、

NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：$-NH_2$、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：$-CH_3$、$-CH_2-COO-$、

[0084] 

[0085] 

[0086] 其中：

[0087] --A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

[0088] -X和Q是N或CH，

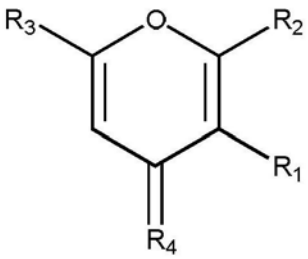
[0089] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0090] • R1、R2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0091] • R4优先地是-H，但也为Me、F、Cl、Br、CF_3、CHF_2、CH_2F、CN、OMe、SMe、SOMe、SO_2Me NH_2、NHMe、NO_2、CHO，

[0092] • R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

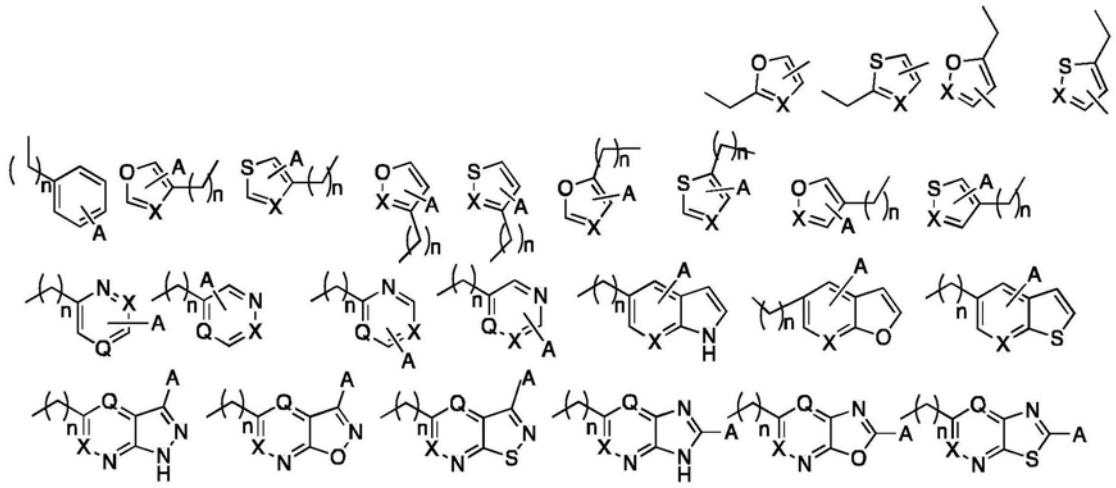
[0093] 在其他优选实施方案中，Rpn11结合配偶体是由式VIII表示的配偶体：

[0094] 

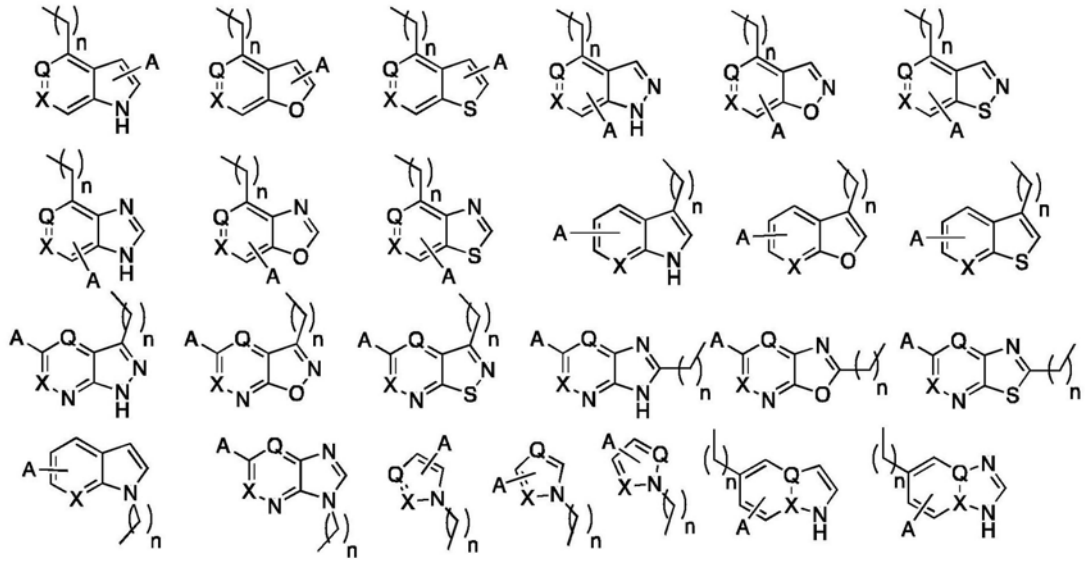
[0095] • R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY、NHCOY，其中Y如上所述，

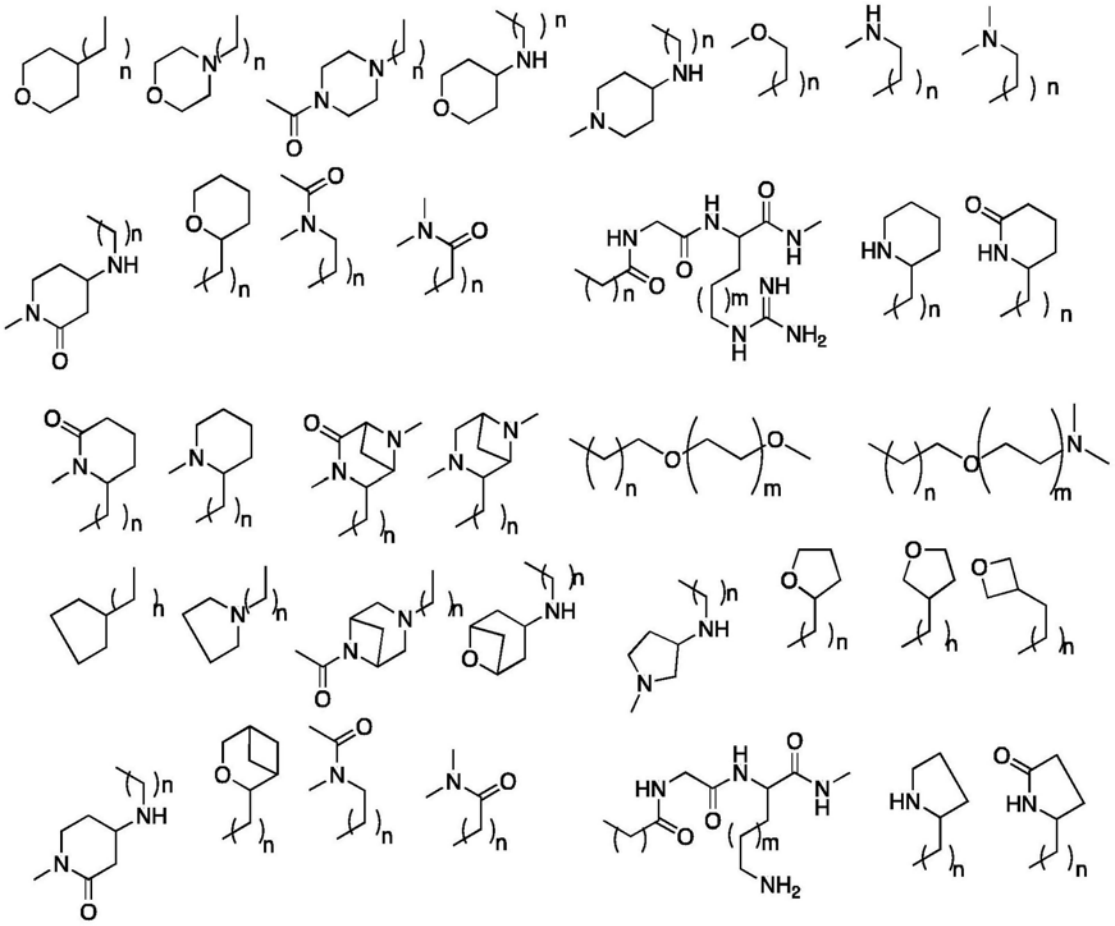
[0096] • R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O，

[0097] • R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、



[0098]



[0099] 

[0100] 其中：

[0101] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

[0102] -X和Q是N或CH，

[0103] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0104] • R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0105] 并且R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O。

[0106] 本发明还涵盖式(IX)的化合物：

[0107] R11L-(CL)-TPL (IX)，

[0108] 其中-是指共价键；

[0109] 其中R11L是结合Rpn11的配体，

[0110] 其中CL是共价连接基团，

[0111] 其中TPL是与靶蛋白结合的配体。

[0112] R11L可以选自表1中提供的Rpn11配体的组。优选地，Rpn11配体以至少10nM的亲和力与Rpn11结合。优选地，Rpn11配体以小于1μM的Kd与Rpn11结合。Rpn11配体可以选自表1中提供的Rpn11结合分子的组。

[0113] 优选地，靶蛋白配体可以选自由以下各项组成的组：激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、靶向含有BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、

HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂和抗体。在其他优选实施方案中，连接基团可以是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团、烷基(akyl)-醚连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。

[0114] 本发明还涵盖式(X)的化合物：

[0115] R11L-A-(CL)-B-TPL (X)，

[0116] 其中-是指共价键；

[0117] 其中R11L是结合Rpn11的配体，

[0118] 其中CL是具有第一末端A和第二末端B的共价连接基团，所述第一末端A和第二末端B是不同的，其中A和B独立地是酰胺、肟、酮、碳、醚、酯或氨基甲酸酯；

[0119] 其中TPL是与靶蛋白结合的配体，并且

[0120] 其中R11L与A共价连接并且TPL与B共价连接。

[0121] 优选地，靶蛋白配体可以选自由以下各项组成的组：激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、靶向含有BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂和抗体。在其他优选实施方案中，连接基团可以是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团、烷基(akyl)-醚连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。

[0122] 本发明还涵盖式XI的化合物：

[0123] R11L-(CL)-Rx (XI)，

[0124] 其中-是指共价键；

[0125] 其中R11L是结合Rpn11的配体，

[0126] 其中CL是以Rx结尾的共价连接基团，

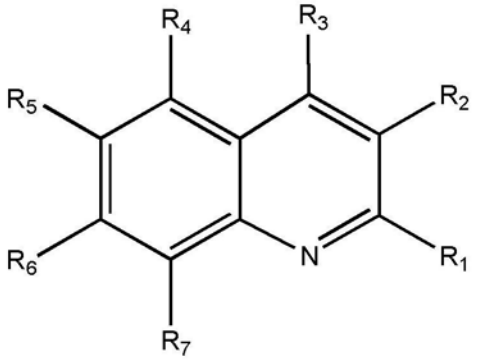
[0127] 其中Rx能够与配体形成共价化学键，并且

[0128] 其中Rx不是PEG。

[0129] 优选地，R11L可以选自表1中提供的Rpn11配体的组。优选地，Rpn11配体以至少10nM的亲和力与Rpn11结合。优选地，Rpn11配体以小于1μM的Kd与Rpn11结合。Rpn11配体可以选自表1中提供的Rpn11结合分子的组。

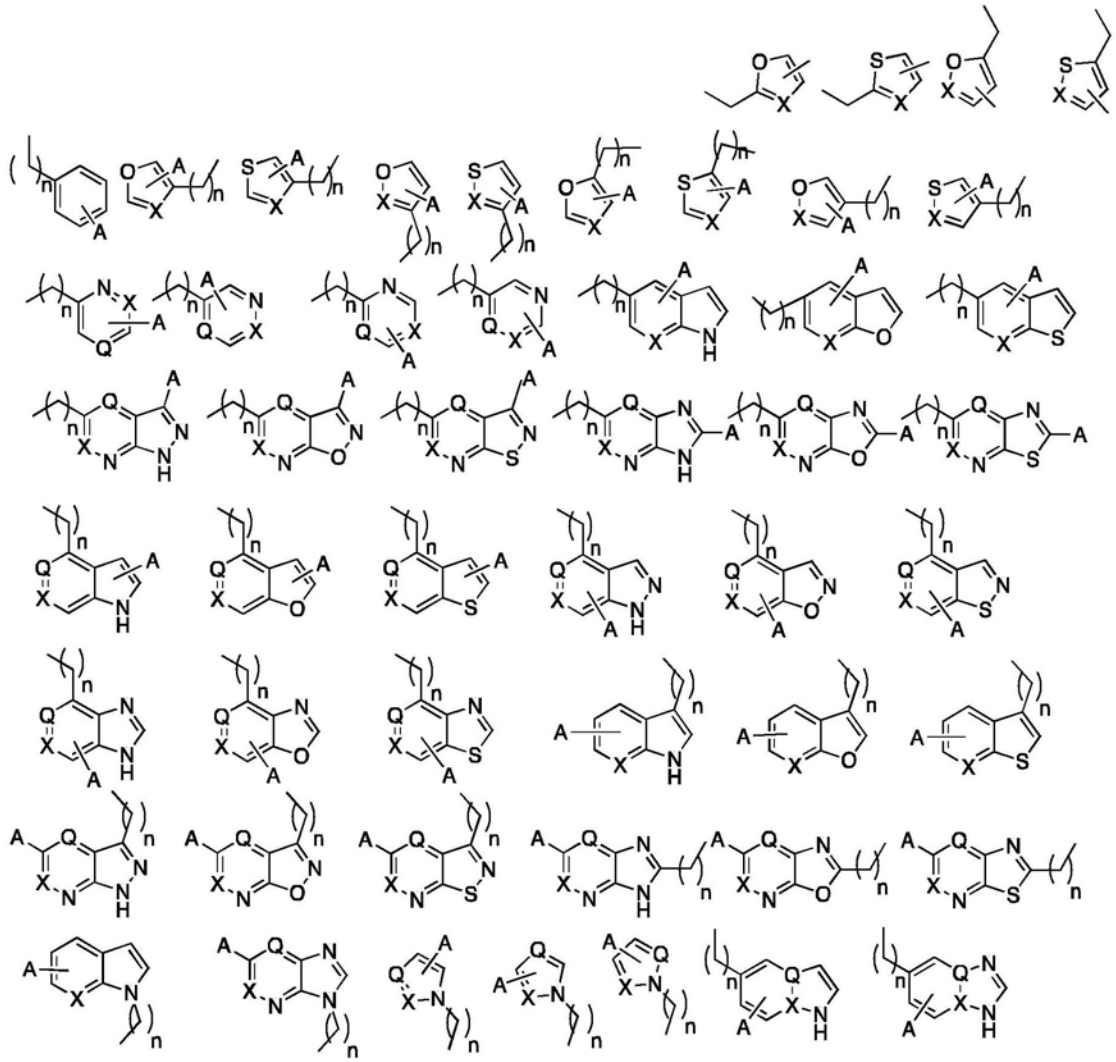
[0130] 优选地，靶蛋白配体可以选自由以下各项组成的组：激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、靶向含有BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂和抗体。在其他优选实施方案中，连接基团可以是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团、烷基-醚连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。优选地，连接基团具有第一末端，所述第一末端是肟。优选地，连接基团具有第二末端，所述第二末端是胺。

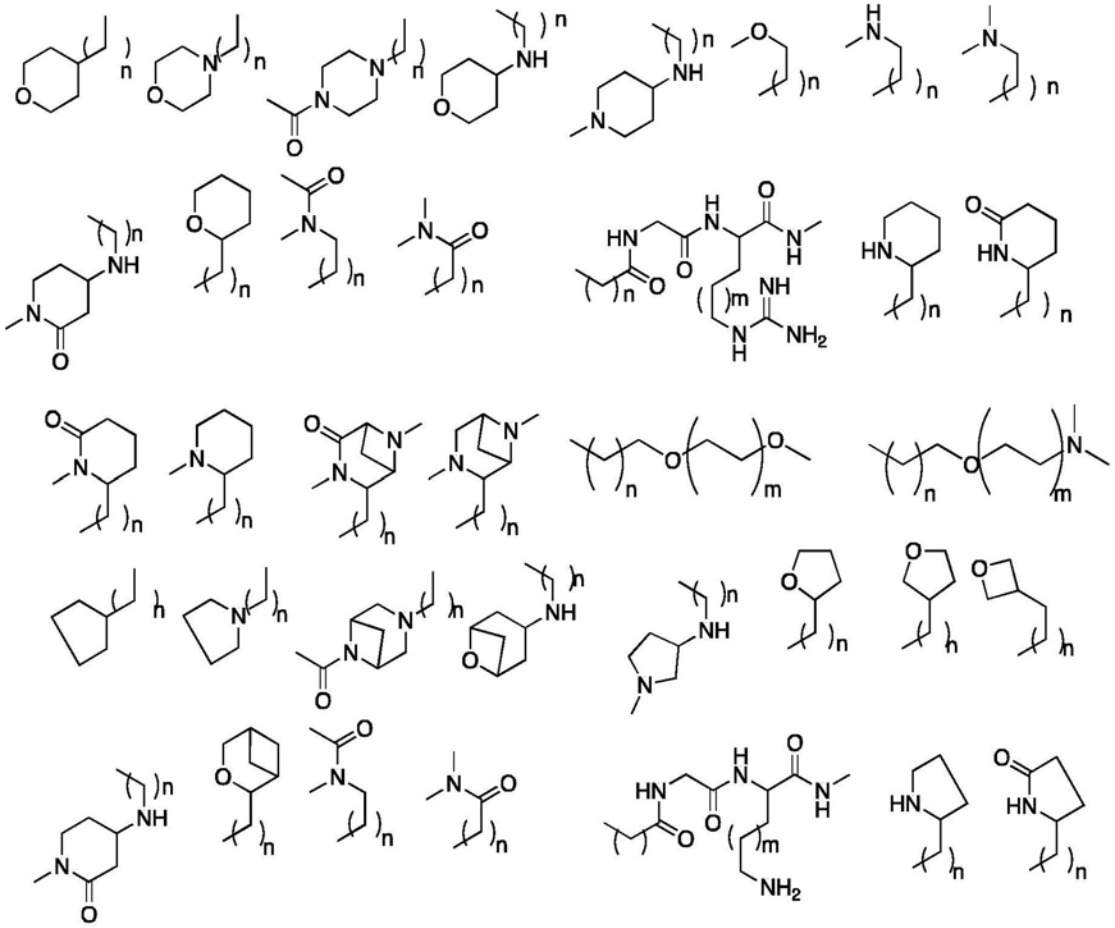
[0131] 优选地，R11L由式I表示

[0132] 

[0133] R1和R6优先地是-H,但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…

[0134] R2、R3、R4和R5选自由以下各项组成的组:-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、

[0135] 

[0136] 

[0137] 其中：

[0138] -A是-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、-NO_2、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

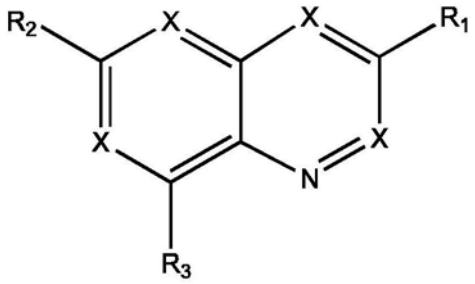
[0139] -X和Q是N或CH，

[0140] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0141] • R_2、R3、R4和R5是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0142] • R7选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

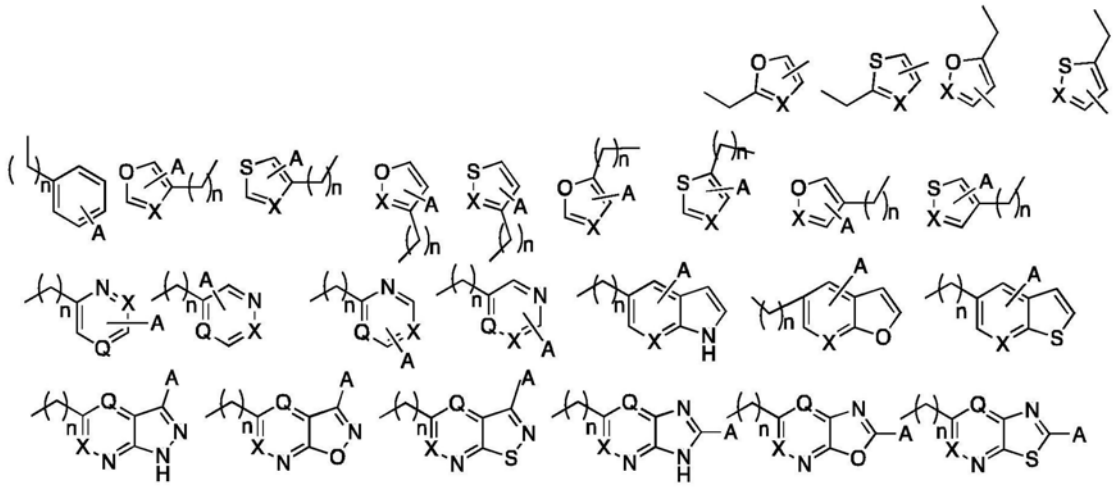
[0143] 优选地，R11L由式II表示

[0144] 

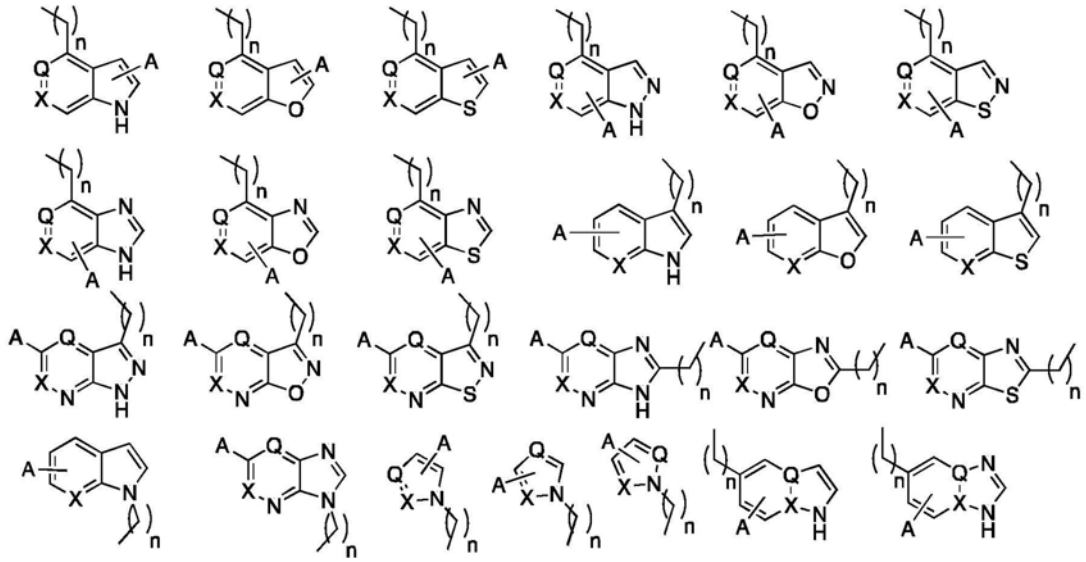
[0145] • X＝CH或N

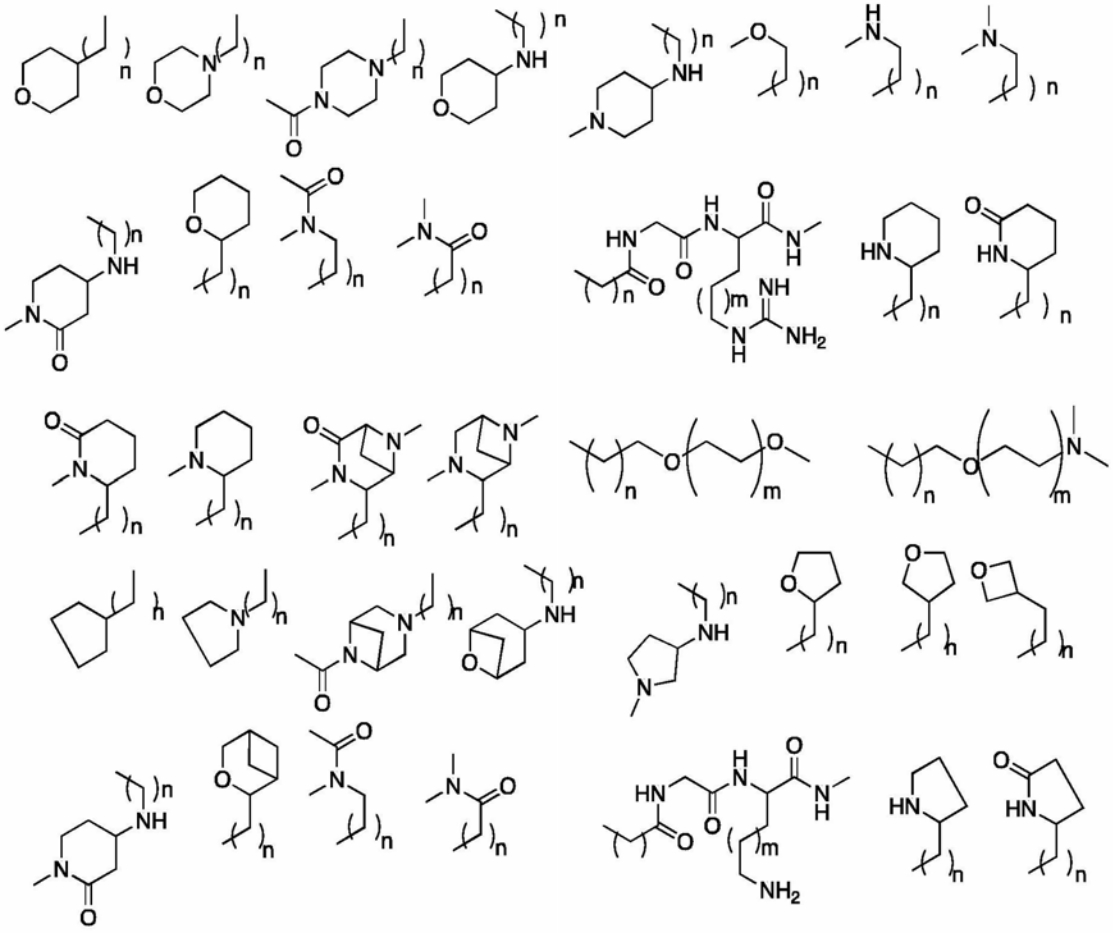
[0146] • R1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-

CH_2-COO-、



[0147]



[0148] 

[0149] 其中：

[0150] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

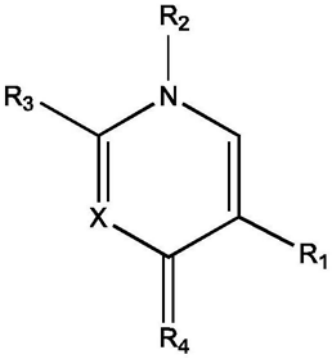
[0151] -X和Q是N或CH，

[0152] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4，

[0153] • R_1和R2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

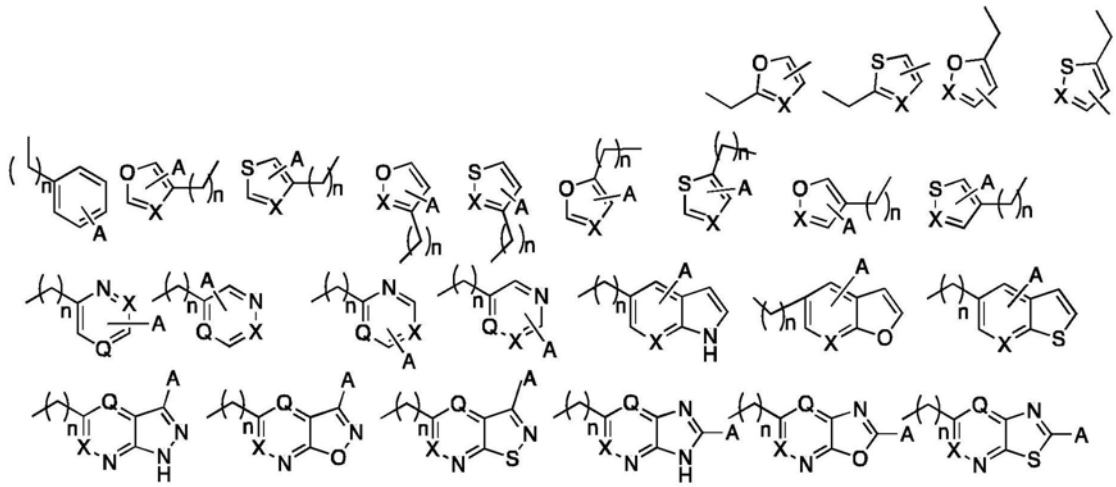
[0154] R3选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述。

[0155] 优选地，R11L由式III表示

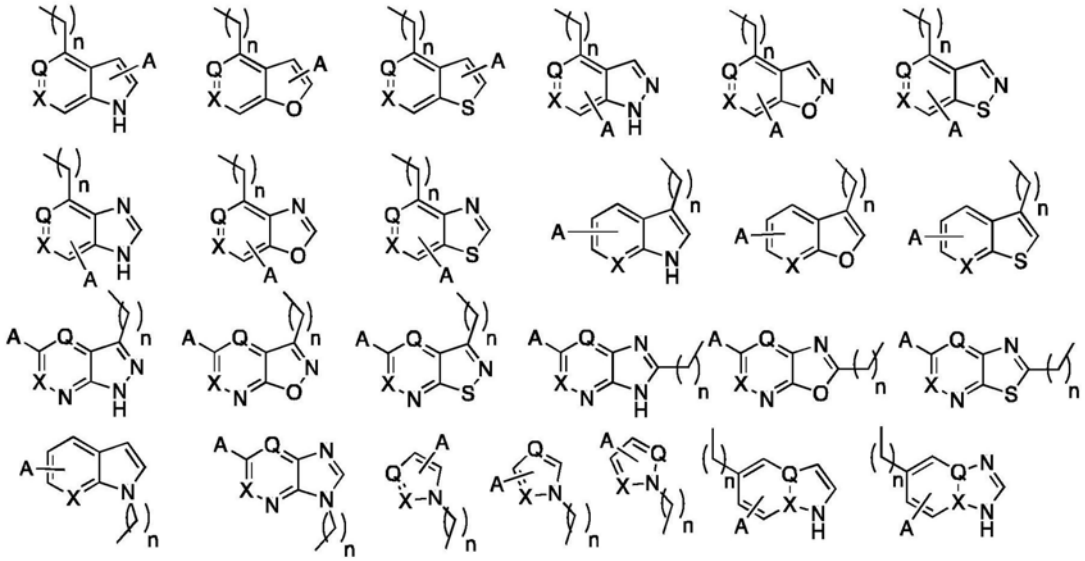
[0156] 

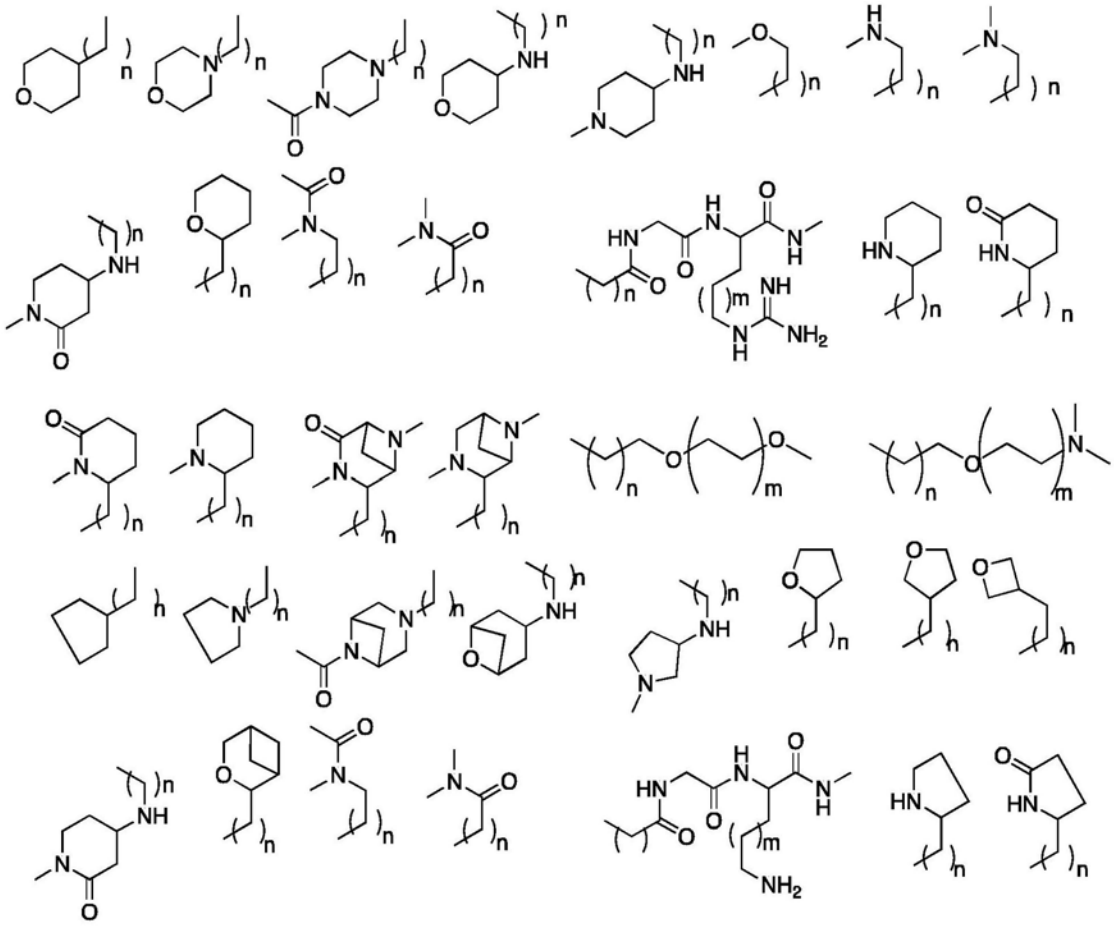
[0157] • R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述，

[0158] • R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、



[0159]



[0160] 

[0161] 其中：

[0162] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

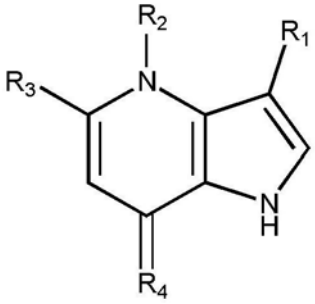
[0163] -X和Q是N或CH，

[0164] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0165] •R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

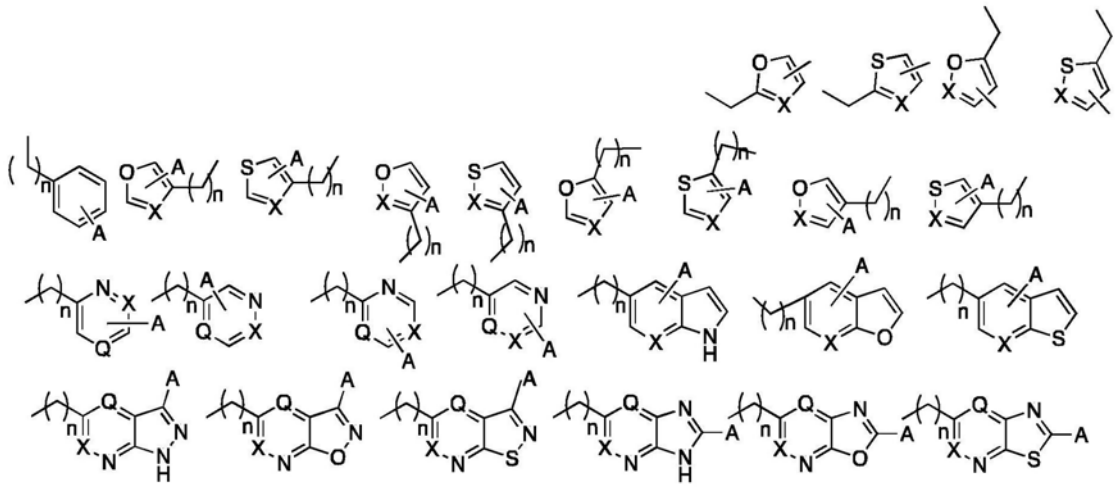
[0166] R4是O、S、NH。

[0167] 优选地，R11L由式IV表示

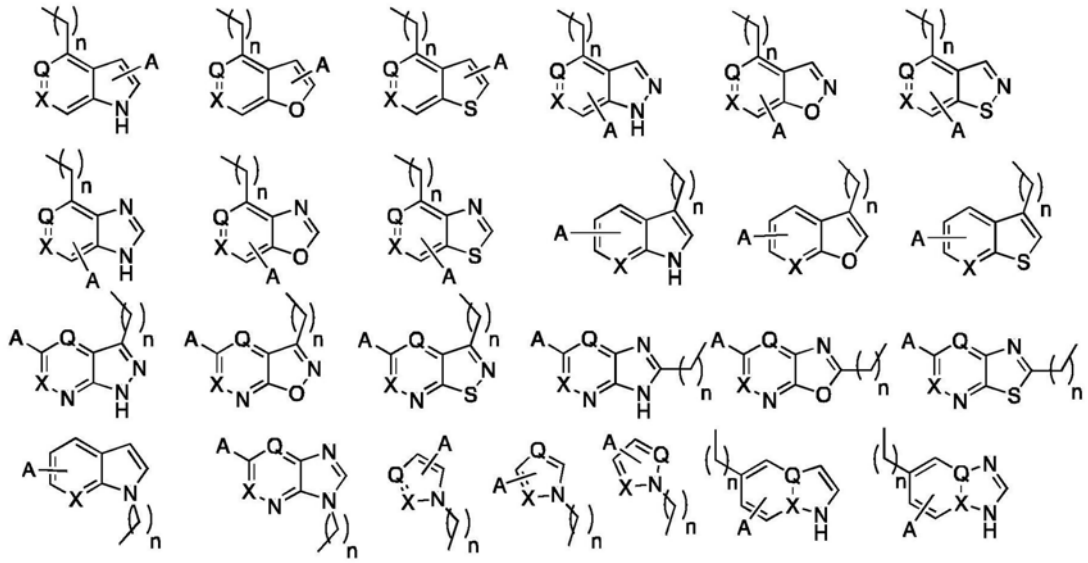
[0168] 

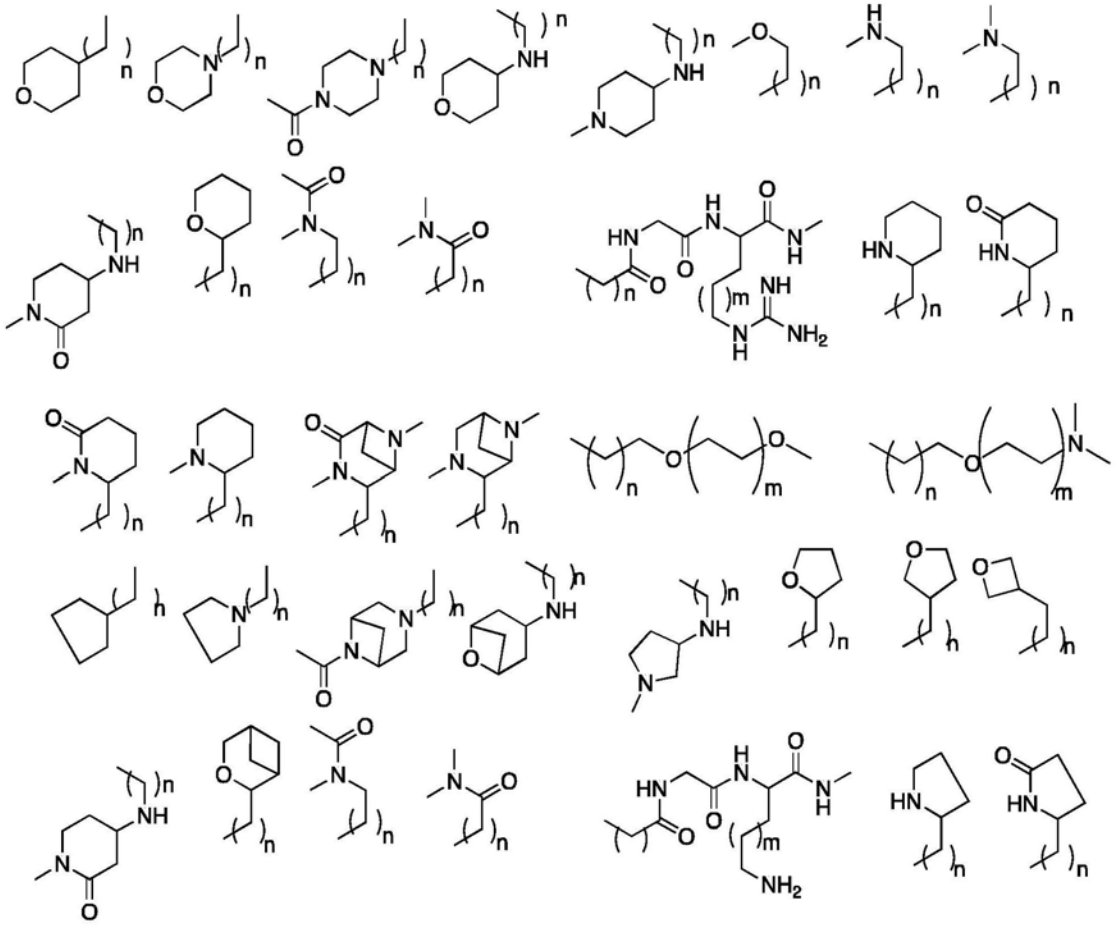
[0169] •R1、R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-

CH_3、-CH_2-COO-、



[0170]



[0171] 

[0172] 其中：

[0173] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

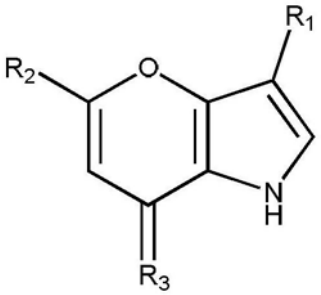
[0174] -X和Q是N或CH，

[0175] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

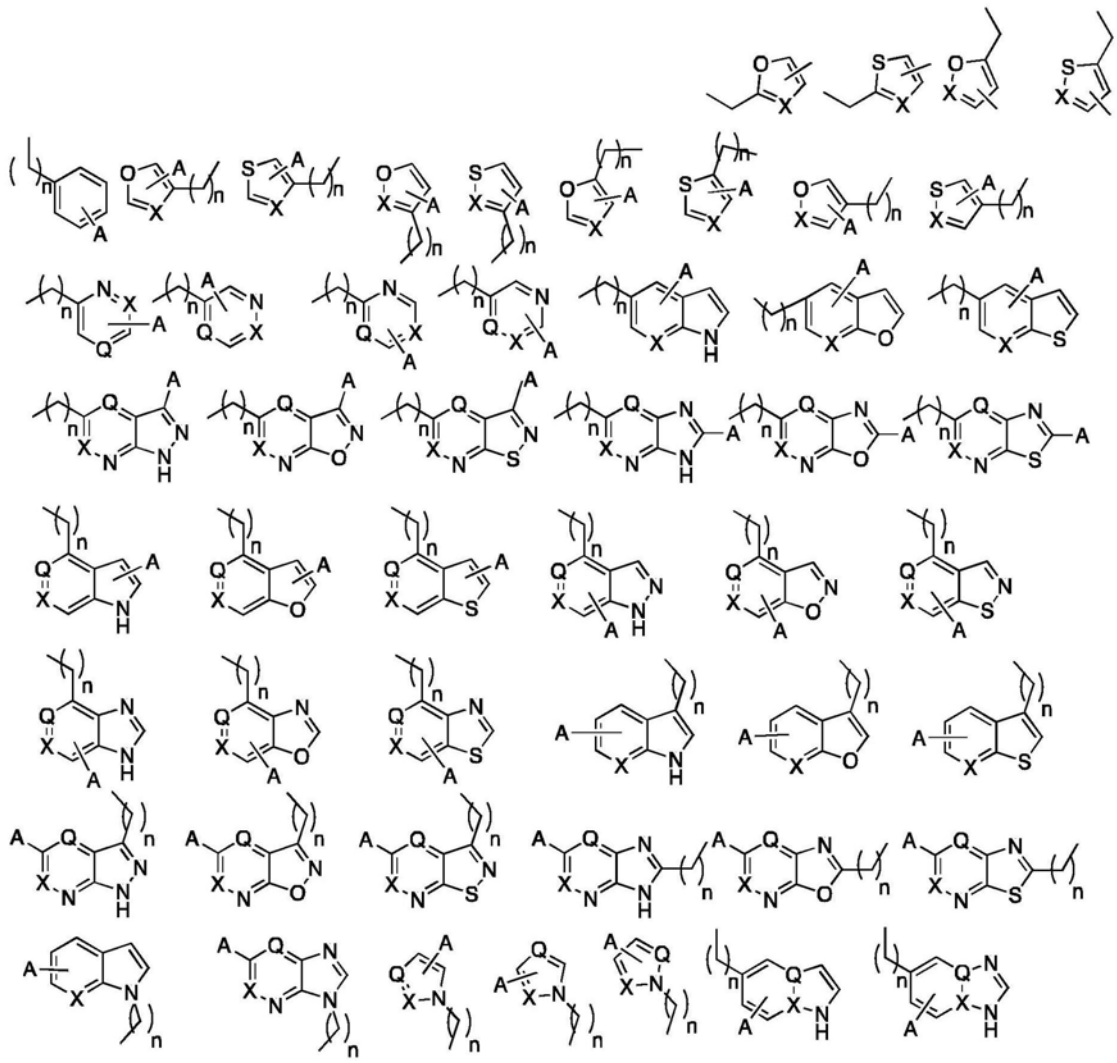
[0176] • R1、R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

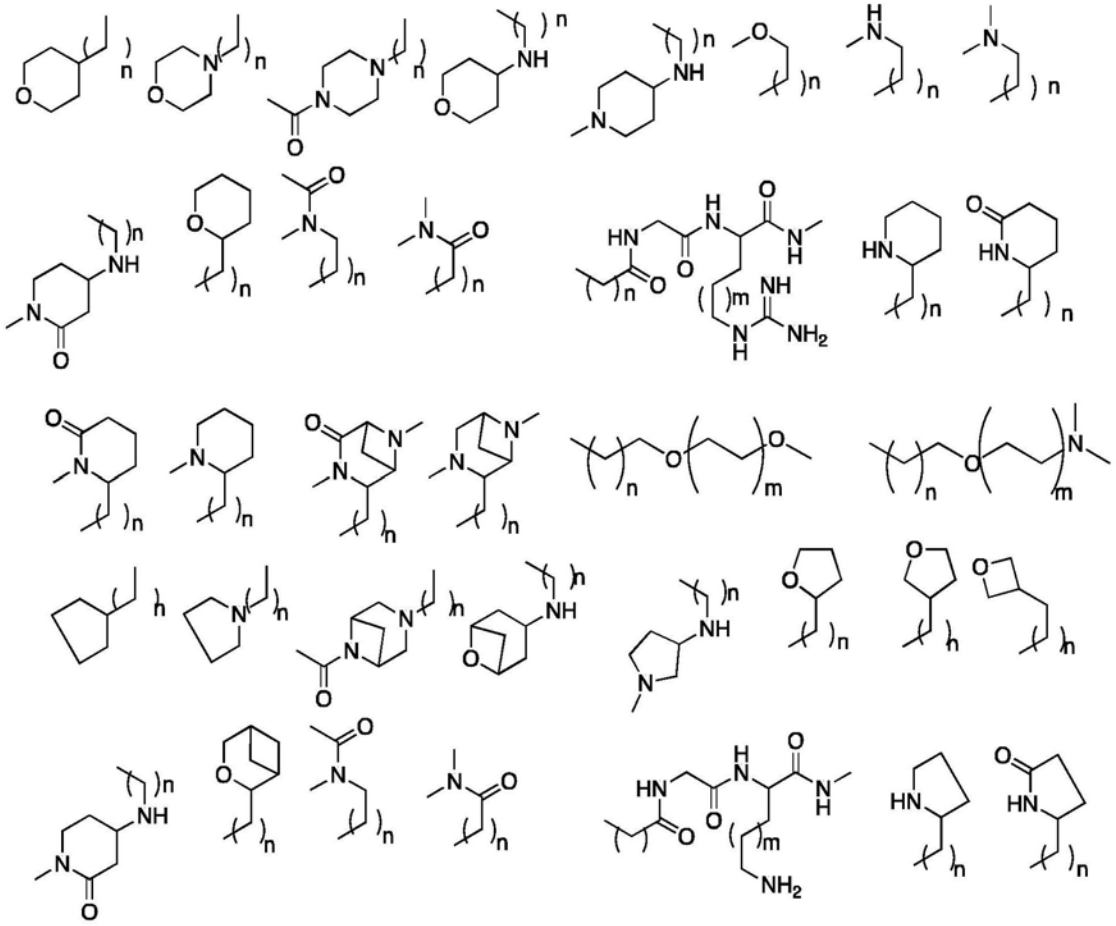
[0177] • R4是O、S、NH、NCOY。

[0178] 优选地，R11L由式V表示

[0179] 

[0180] • R1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、

[0181] 

[0182] 

[0183] 其中：

[0184] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

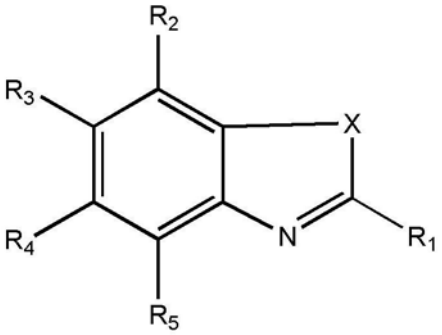
[0185] -X和Q是N或CH，

[0186] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0187] • R1和R_2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0188] R3是O、S、NH、NCOY。

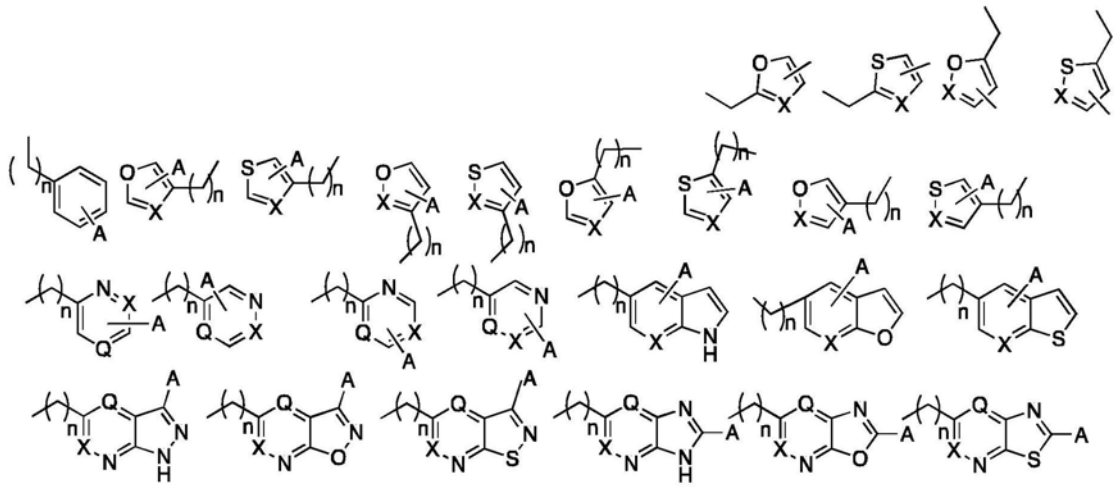
[0189] 优选地，R11L由式VI表示

[0190] 

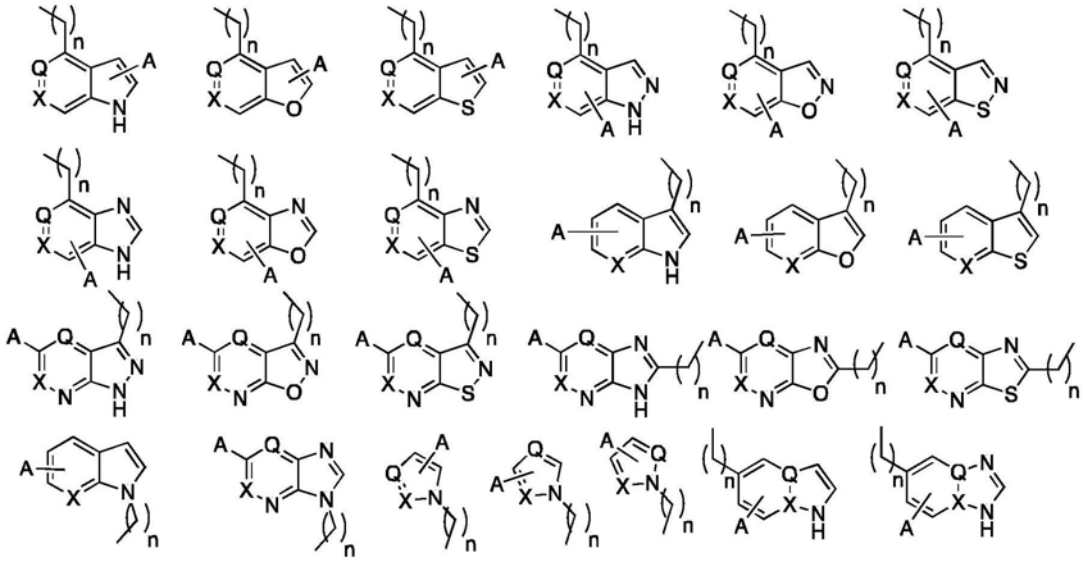
[0191] • X＝NH、O、S、CH2

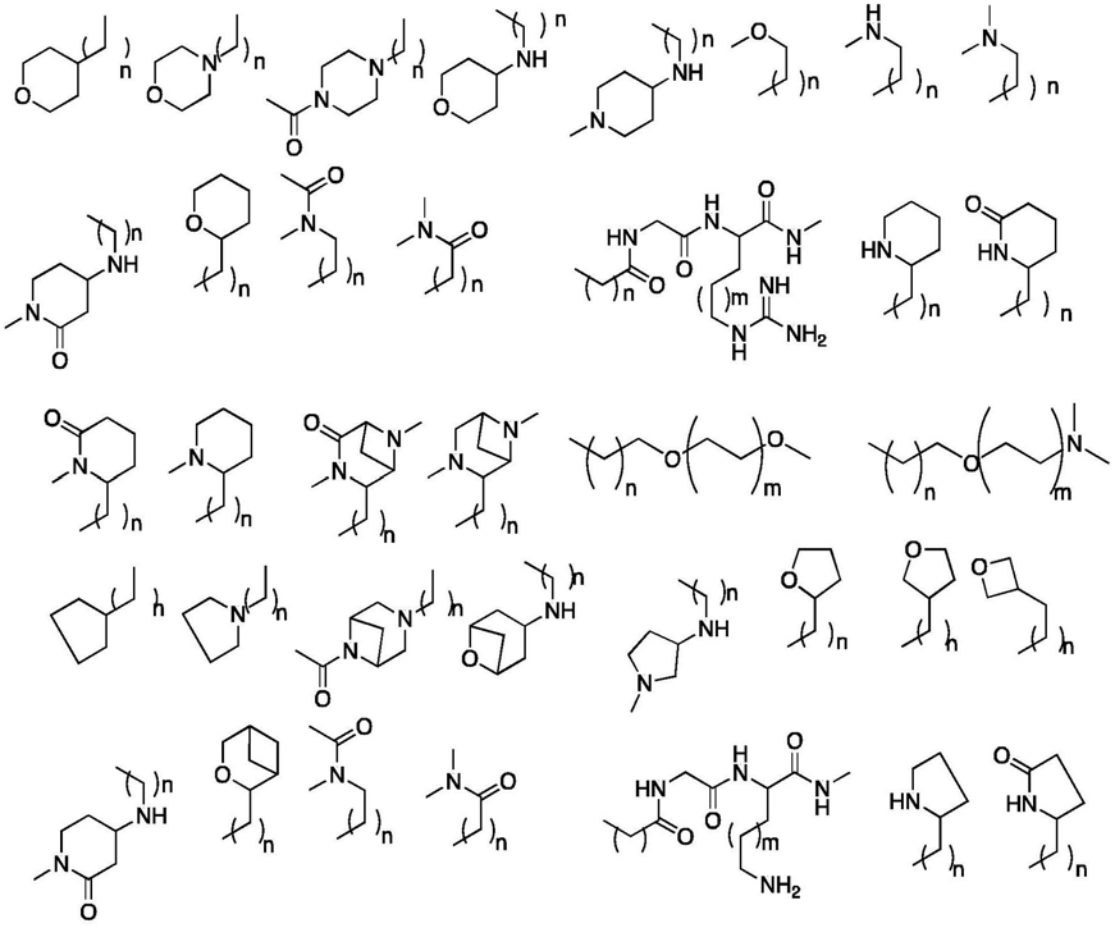
[0192] • R1和R4优先地是-H，但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-CHO…

[0193] • R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、$-CF_3$、-COOH、$-CH_2NH_2$、$-CH_3$、-H、-F、-Cl、-Br、$-CF_3$、$-CHF_2$、$-CH_2F$、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、$-SO_2Me$、$-NH_2$、-NHMe、$-NMe_2$、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：$-NH_2$、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：$-CH_3$、$-CH_2-COO-$、



[0194]



[0195] 

[0196] 其中：

[0197] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-SONHNH$_2$

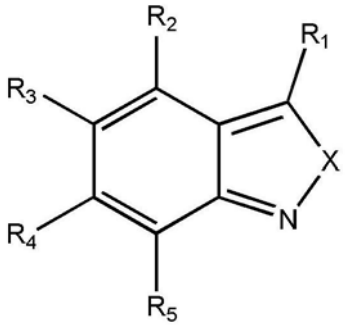
[0198] -X和Q是N或CH，

[0199] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0200] • R2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0201] • R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

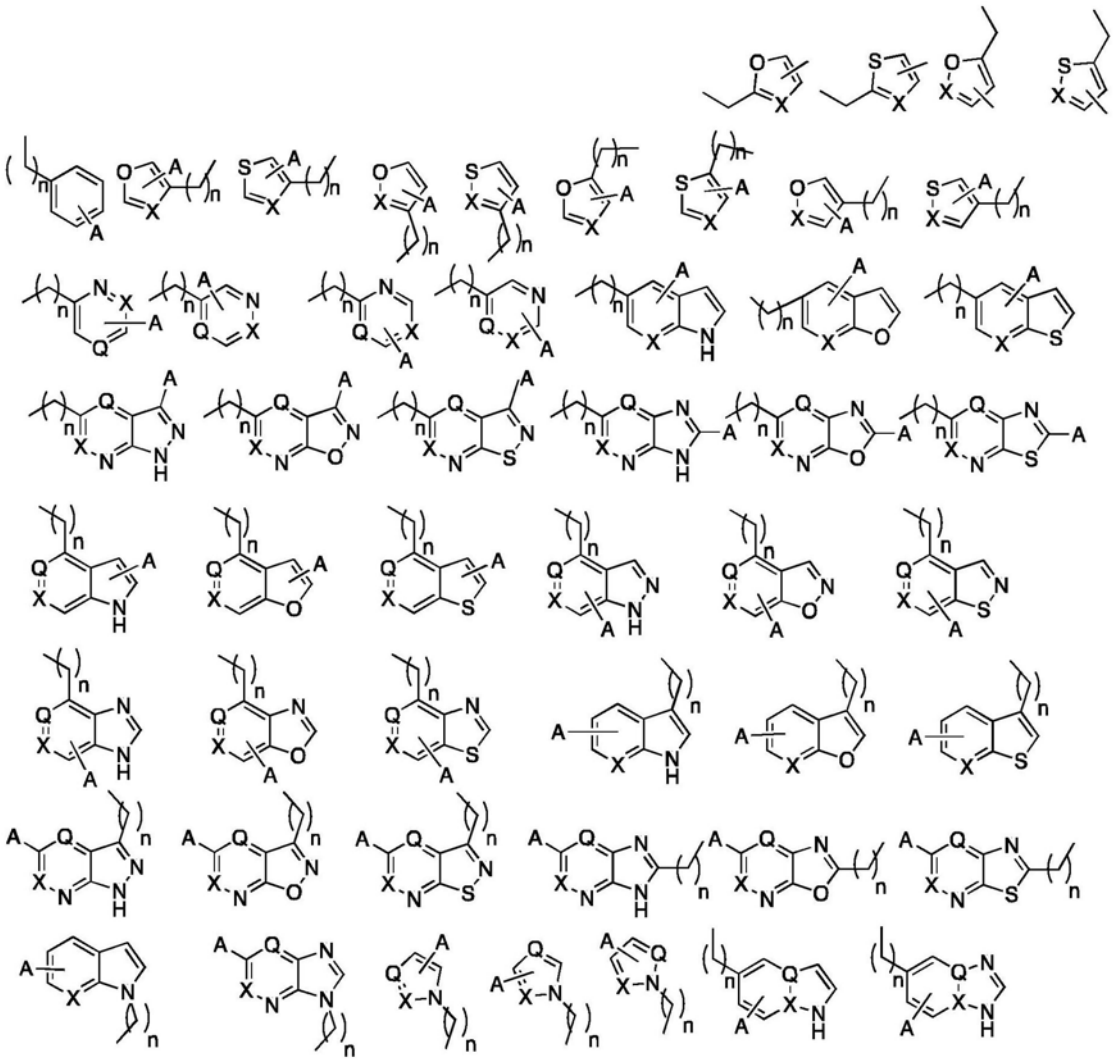
[0202] 优选地，R11L由式VII表示

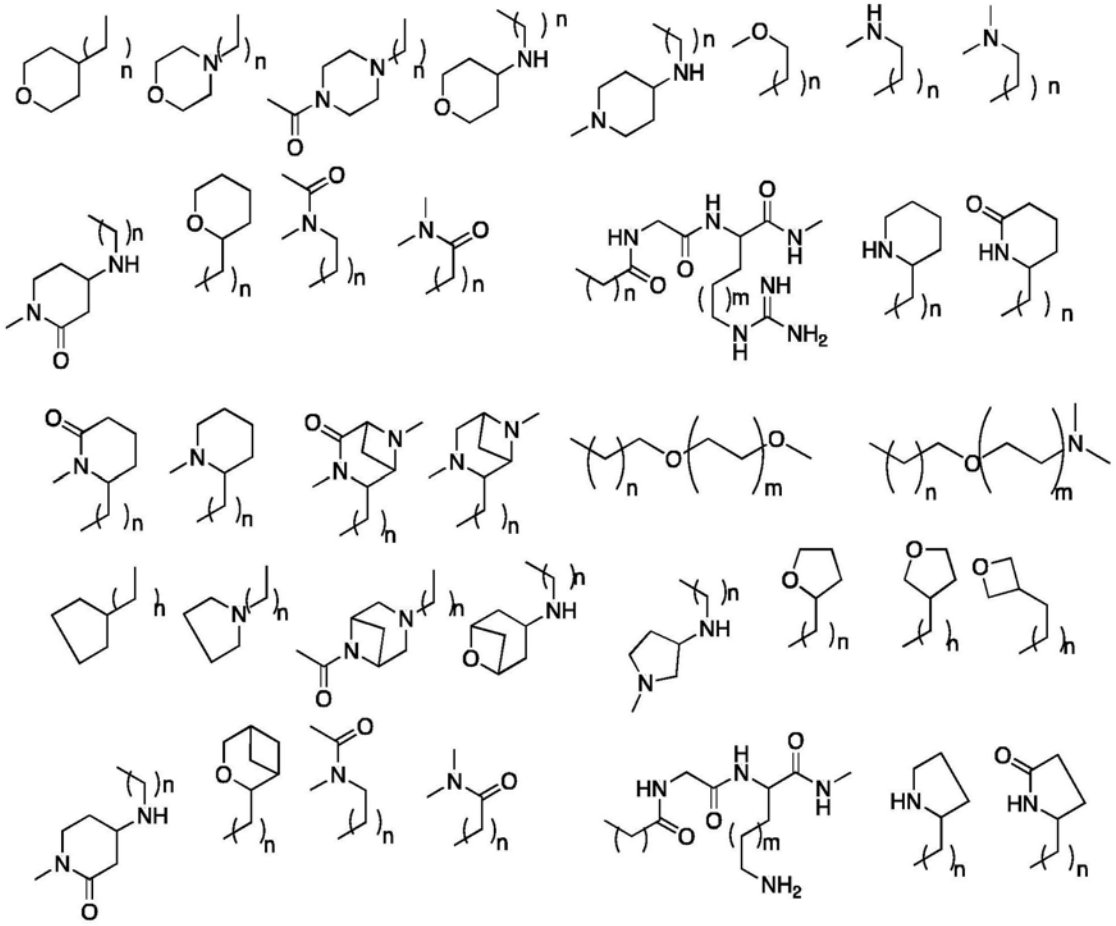
[0203] 

[0204] • X＝NH、O、S、CH2

[0205] • R1、R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、

NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：$-NH_2$、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：$-CH_3$、$-CH_2-COO-$、

[0206] 

[0207] 

[0208] 其中：

[0209] --A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

[0210] -X和Q是N或CH，

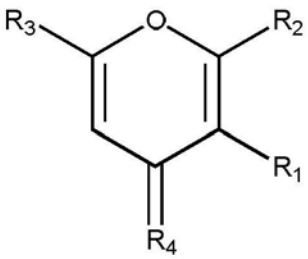
[0211] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0212] • R1、R2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0213] • R4优先地是-H，但也为Me、F、Cl、Br、CF_3、CHF_2、CH_2F、CN、OMe、SMe、SOMe、SO_2Me NH_2、NHMe、NO_2、CHO…

[0214] • R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

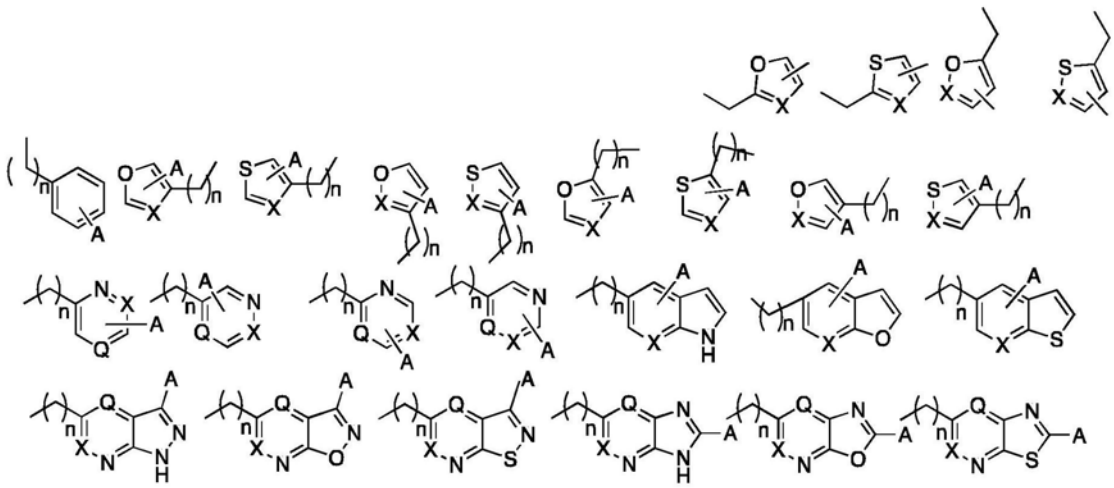
[0215] 优选地，R11L由式VIII表示

[0216] 

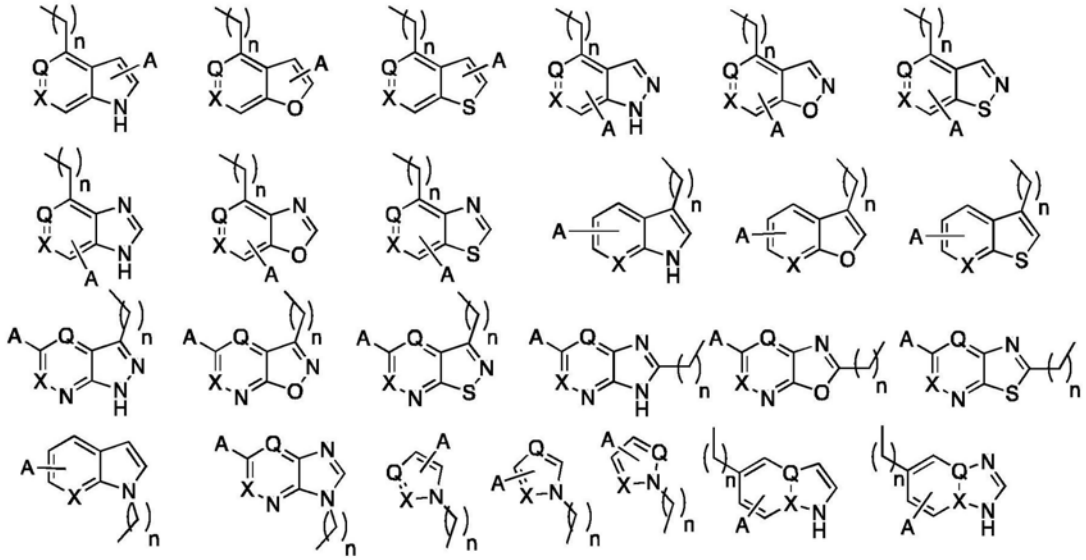
[0217] • R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY、NHCOY，其中Y如上所述，

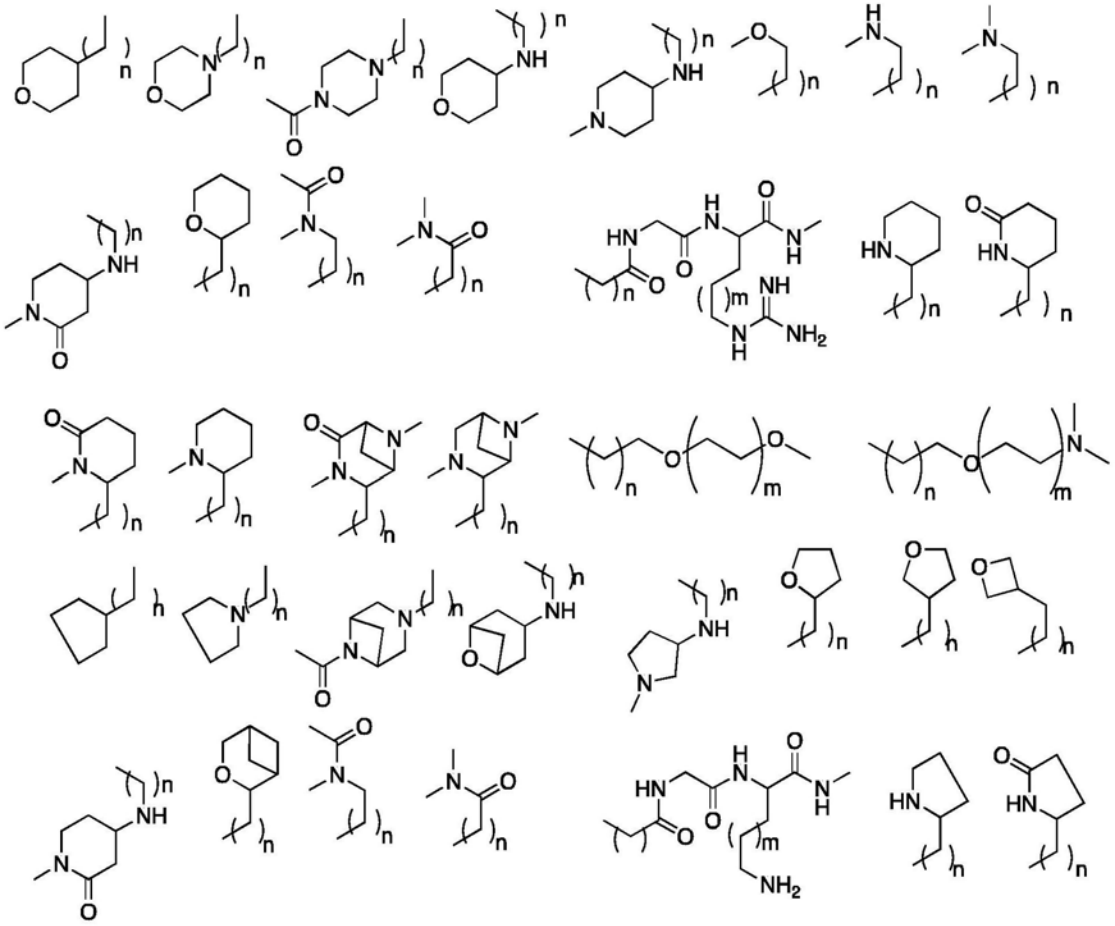
[0218] • R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O，

[0219] • R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、



[0220]



[0221] 

[0222] 其中：

[0223] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

[0224] -X和Q是N或CH，

[0225] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0226] • R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0227] 并且R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O。

[0228] 本发明还涵盖一种获得细胞中的靶蛋白的增加的蛋白水解的方法，所述方法包括使细胞与根据前述化合物中任一种的双功能分子接触。

[0229] 本发明还涵盖一种获得受试者中的靶蛋白的增加的蛋白水解的方法，所述方法包括向受试者施用根据前述化合物中任一种的双功能分子。

[0230] 本发明还涵盖一种提供包含两个共价连接的结合配偶体的双功能分子的方法，其中第一结合配偶体与Rpn11结合并且第二结合配偶体与选择的靶蛋白结合，所述方法包括提供第一结合配偶体和第二结合配偶体，并且共价连接第一结合配偶体和第二结合配偶体。

[0231] 本发明还涵盖一种选择促进靶蛋白的蛋白水解的双功能分子的方法：

[0232] a.通过提供候选第一结合配偶体并且确定所述候选第一结合配偶体与Rpn11结合，选择第一结合配偶体；

[0233] b.通过提供候选第二结合配偶体并且确定所述候选第二结合配偶体与目标靶蛋白结合,选择第二结合配偶体;

[0234] c.共价连接所述第一结合配偶体和第二结合配偶体以形成双功能分子;

[0235] d.使细胞与所述双功能分子接触;

[0236] e.确定所述靶蛋白是否经历蛋白水解。

[0237] 本发明还涵盖一种选择能够促进靶蛋白的蛋白水解的双功能分子的方法,所述方法包括:

[0238] (a)提供包含与靶蛋白结合配偶体共价连接的Rpn11结合配偶体的双功能分子,

[0239] (b)在体外或在哺乳动物中使双功能分子与细胞接触,所述细胞包含Rpn11和靶蛋白,其中所述接触允许双功能分子与Rpn11和靶蛋白结合,以及

[0240] (c)检测细胞中的靶蛋白的蛋白水解,其中检测到的蛋白水解相对于在不存在所述接触的情况下的靶蛋白的蛋白水解是增加的。

[0241] 本发明还涵盖前述方法中的任一种,其包括以下步骤:在不存在双功能分子的情况下测量靶蛋白的蛋白水解。

[0242] 本发明还涵盖一种在具有RPN11分子或其同系物的真核生物或原核生物中在体内诱导蛋白质降解的方法,所述方法包括向所述真核生物或原核生物施用如本文中所述的化合物,而不抑制经由所述RPN11的去泛素化。

[0243] 本发明还涵盖一种细胞、组织或器官培养基,其包含根据前述化合物中任一种的化合物,而不抑制经由所述RPN11的去泛素化。

[0244] 本发明还涵盖一种使靶蛋白降解的方法,所述方法包括以下步骤:使用根据前述化合物中任一种的化合物诱导靶蛋白的降解,而不抑制经由所述RPN11的去泛素化。

[0245] 本发明还涵盖一种药物组合物,所述药物组合物包含根据前述化合物中任一种的化合物和药用载体。

[0246] 优选地,双功能分子表示为Rpn11结合配偶体-连接基团-R,其中连接基团是-[(CH2)n-(V)m-(Z)p-(CH2)q]y

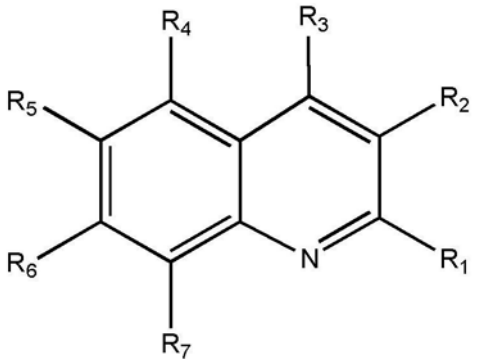
[0247] 其中:

[0248] n、m、p、q和y=0、1、2、3、4、5、6、7、8

[0249] V=O、S、NR1、CO、CONR1、CC、CH=CH,其中R1=H、烷基、芳基或杂芳基

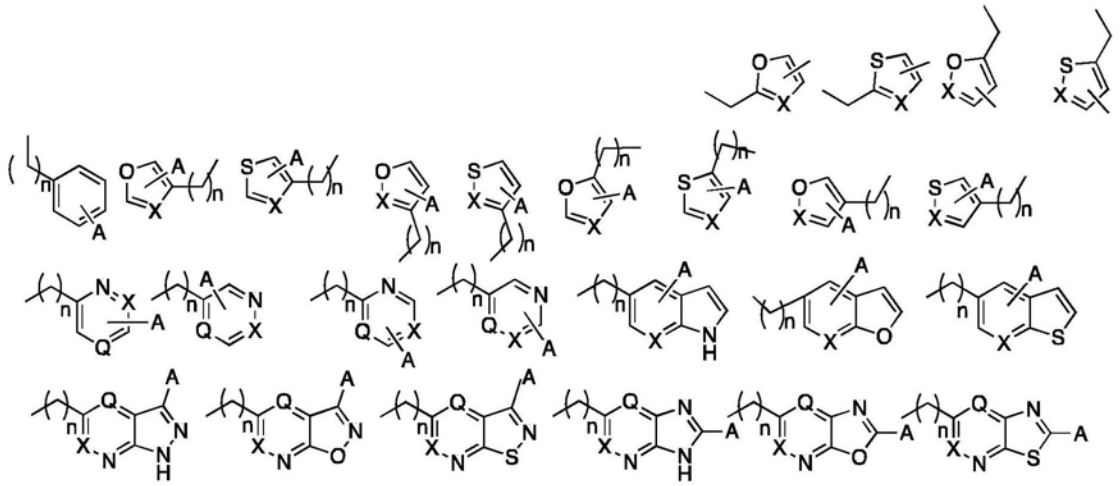
[0250] Z=环烷基、芳基、杂芳基

[0251] 优选地,Rpn 11(R11L)结合配偶体由式I表示,在一些实施方案中,连接基团通过选自由R2、R3、R4和R5组成的组的位置与Rpn11结合配偶体连接。

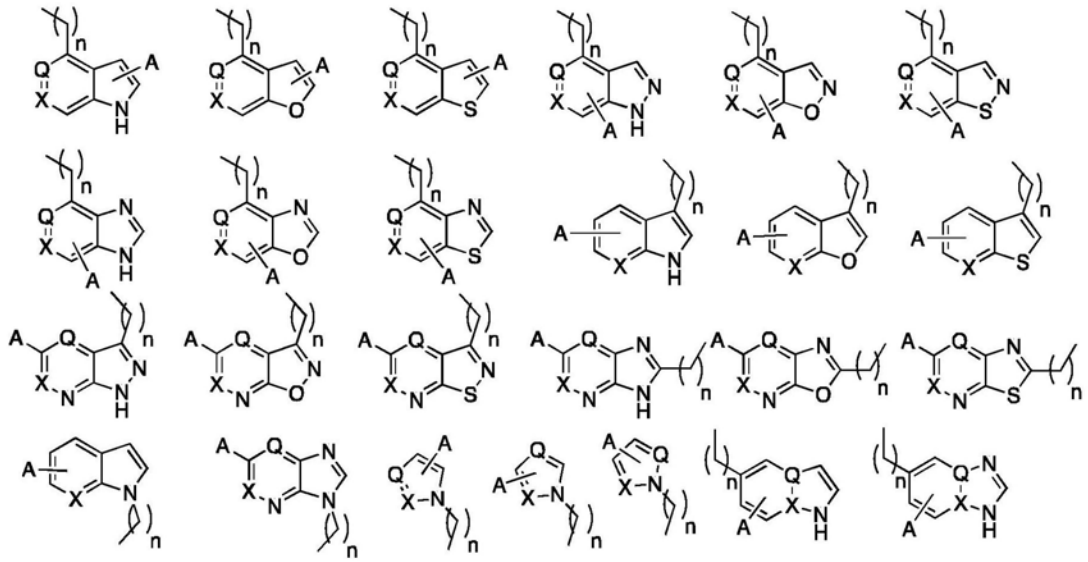
[0252] 

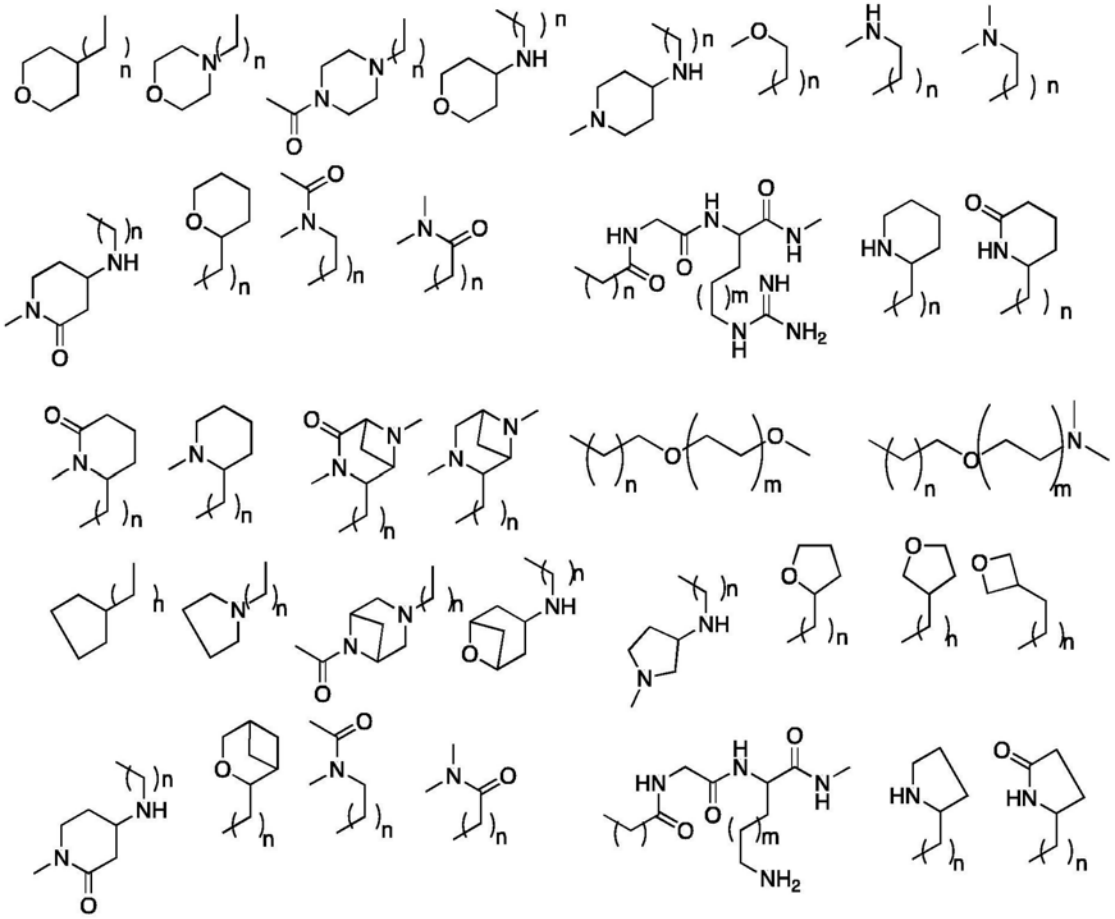
[0253] • R1和R6优先地是-H,但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…

[0254] • R_2、R_3、R_4和R_5选自由以下各项组成的组:-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO…;Z选自由以下各项组成的组:-NH_2、-NHY、-OH和-OY;Y选自由以下各项组成的组:-CH_3、-CH_2-COO-、



[0255]



[0256] 

[0257] 其中：

[0258] -A是-H、-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、-NO_2、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

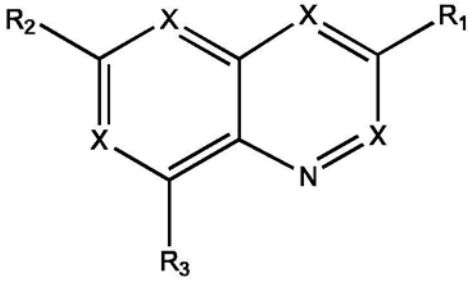
[0259] -X和Q是N或CH，

[0260] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0261] • R_2、R_3、R_4和R5是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0262] • R7选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

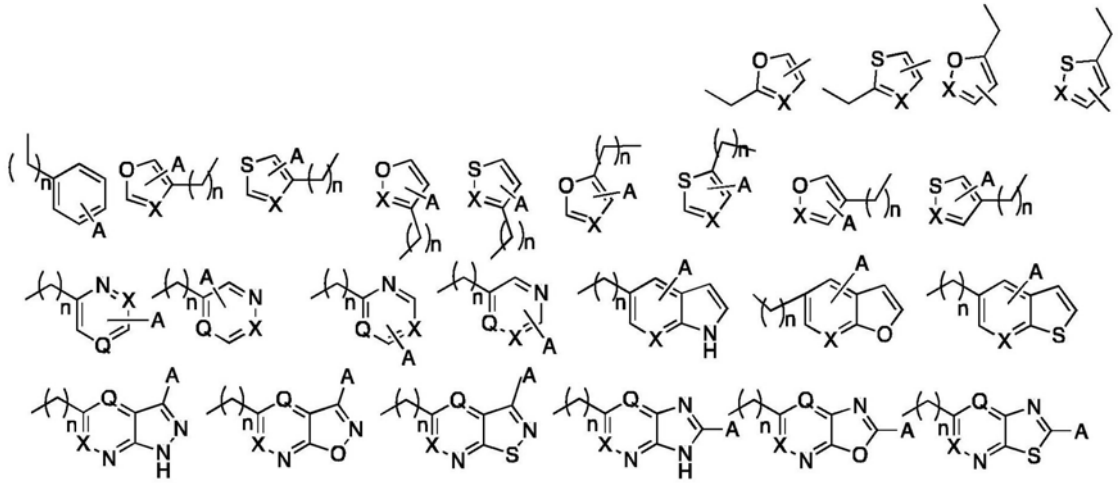
[0263] 优选地，Rpn 11结合配偶体由式II表示

[0264] 

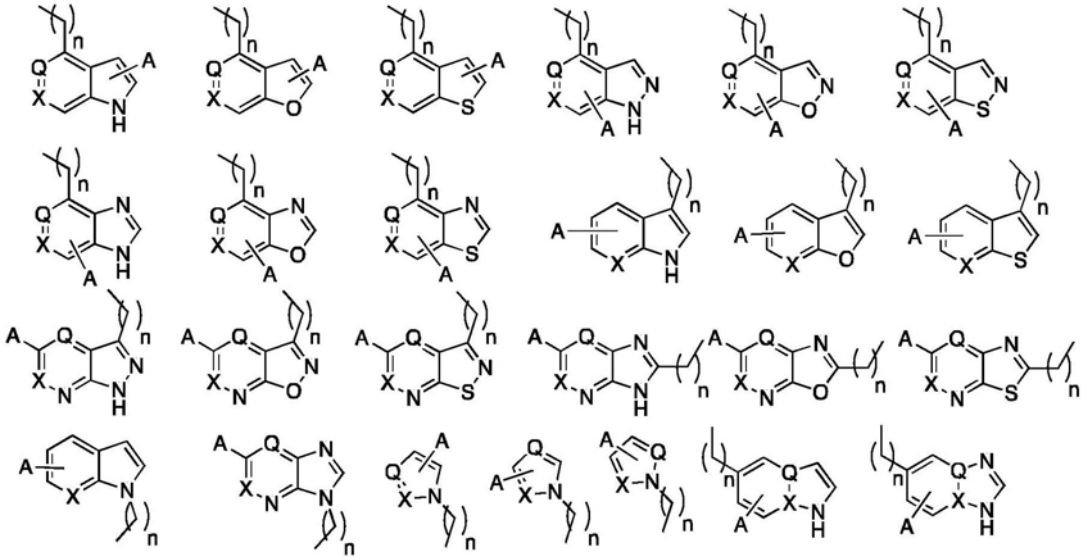
[0265] • X＝CH或N

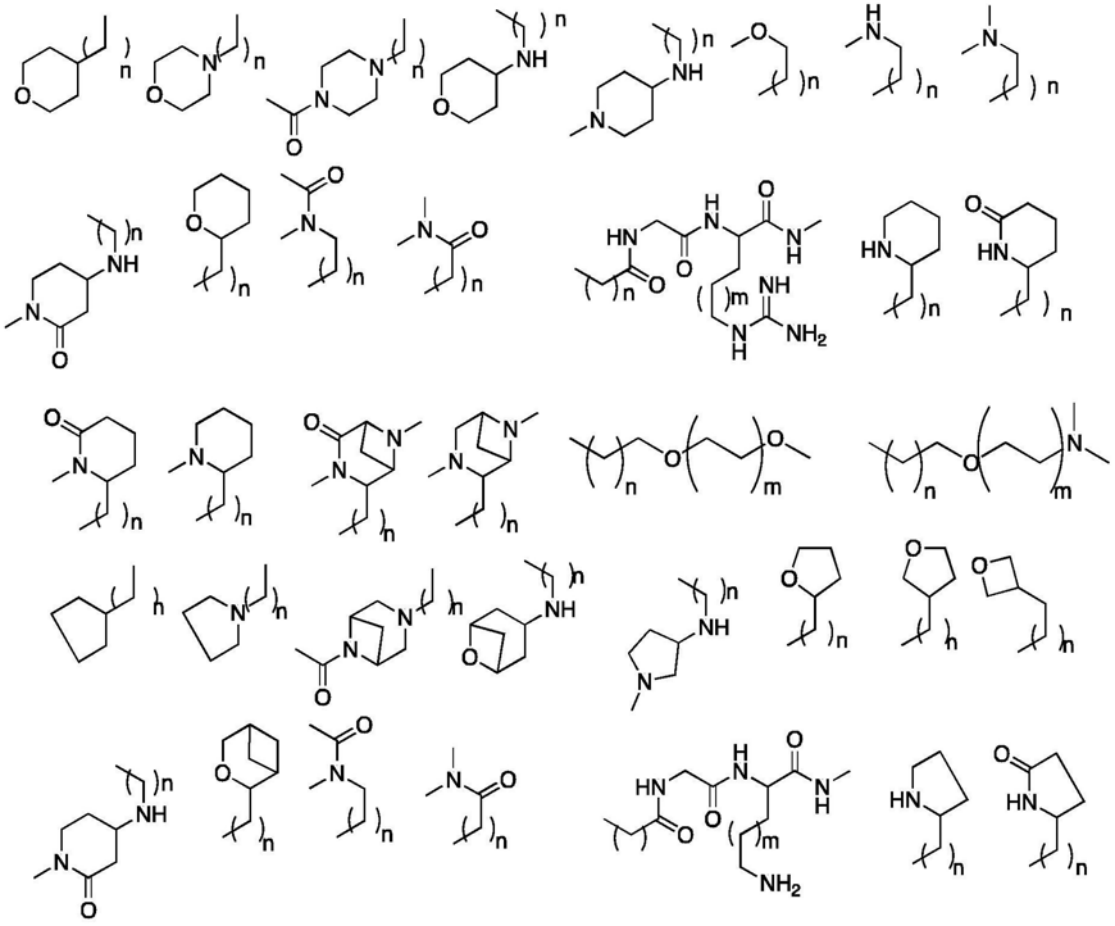
[0266] • R_1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-

CH_2-COO-、



[0267]



[0268] 

[0269] 其中：

[0270] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

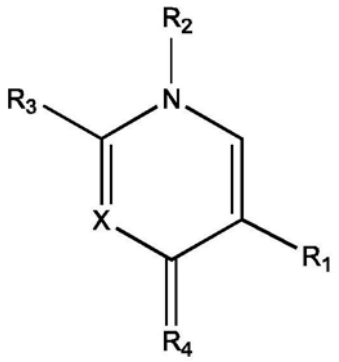
[0271] -X和Q是N或CH，

[0272] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4，

[0273] • R_1和R2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

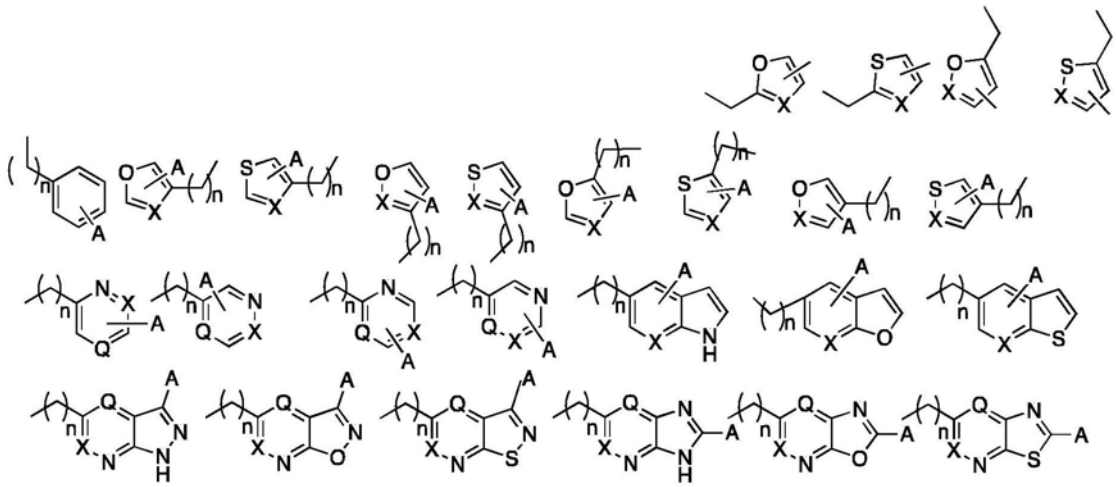
[0274] • R3选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY，其中Y如上所述。

[0275] 优选地，Rpn 11结合配偶体由式III表示

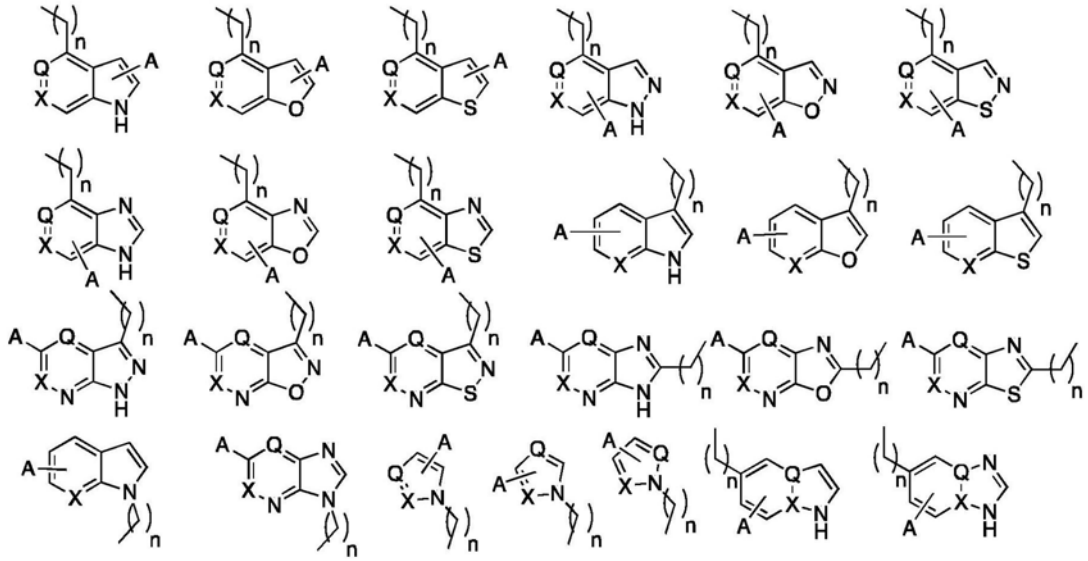
[0276] 

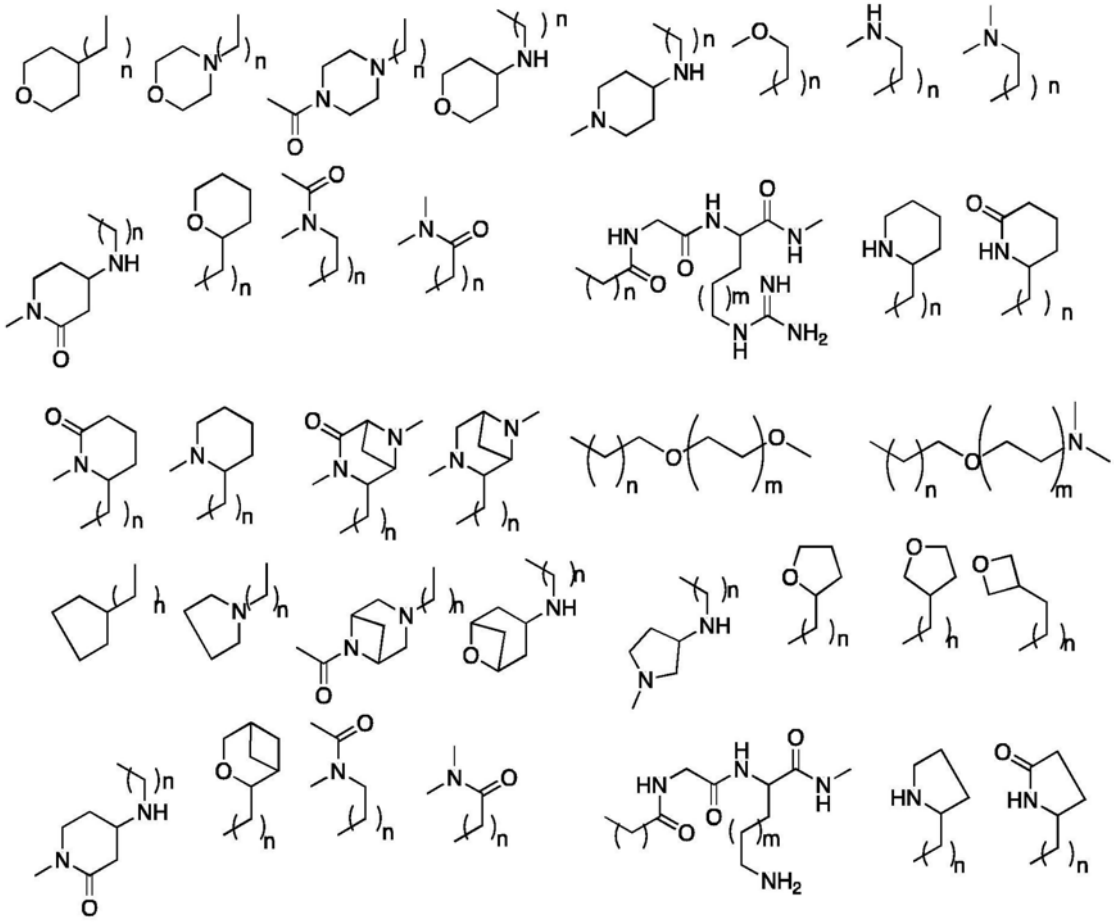
[0277] • R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述，

[0278] • R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、



[0279]



[0280] 

[0281] 其中：

[0282] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

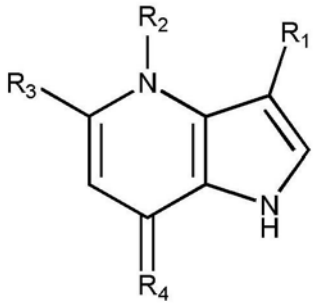
[0283] -X和Q是N或CH，

[0284] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0285] • R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

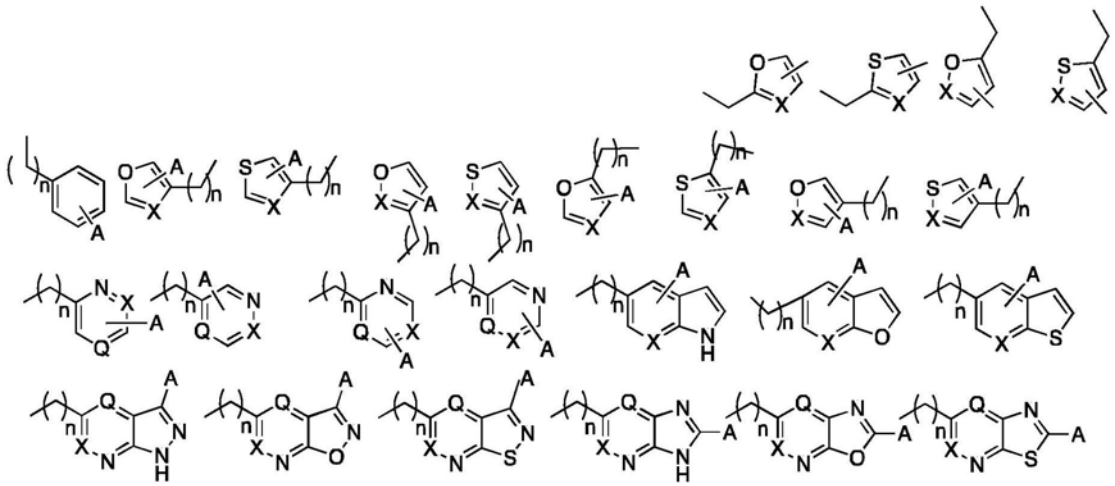
[0286] • R4是O、S、NH

[0287] 优选地，Rpn 11结合配偶体由式IV表示

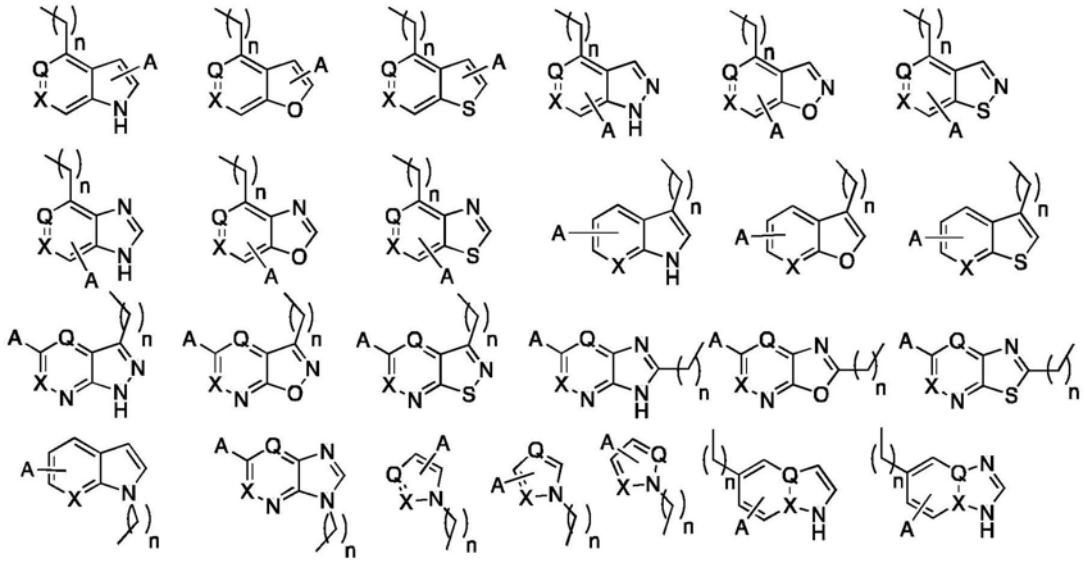
[0288] 

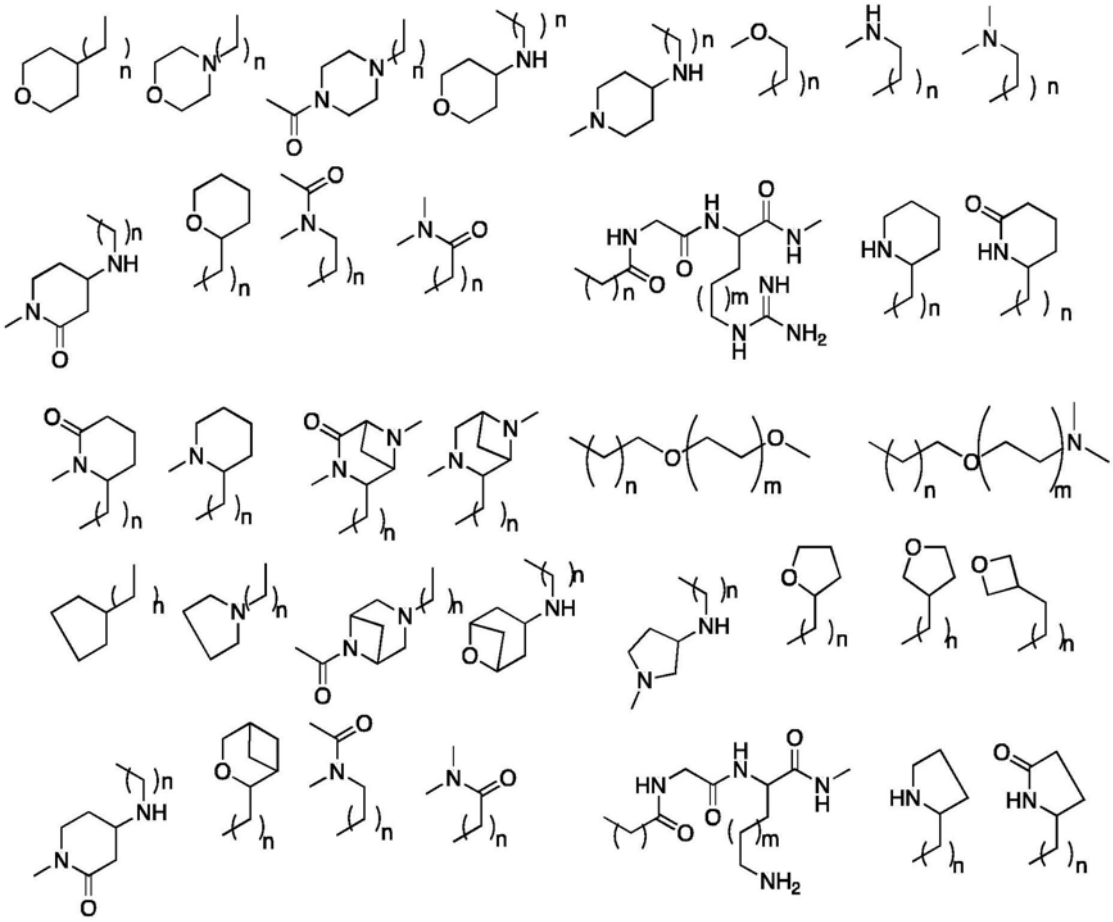
[0289] • R1、R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-

CH_3、-CH_2-COO-、



[0290]



[0291] 

[0292] 其中：

[0293] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

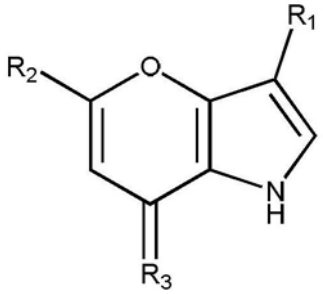
[0294] -X和Q是N或CH，

[0295] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

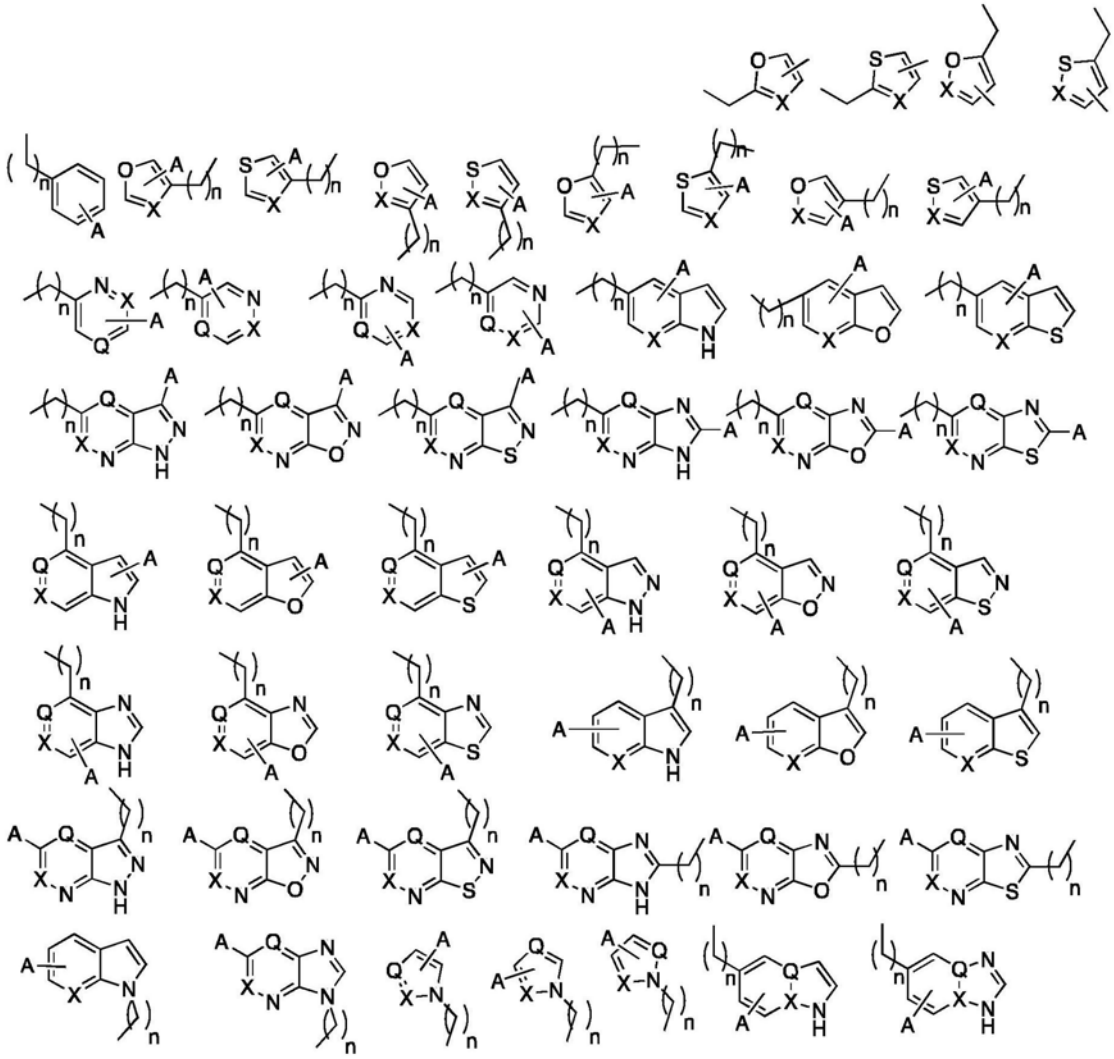
[0296] • R1、R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

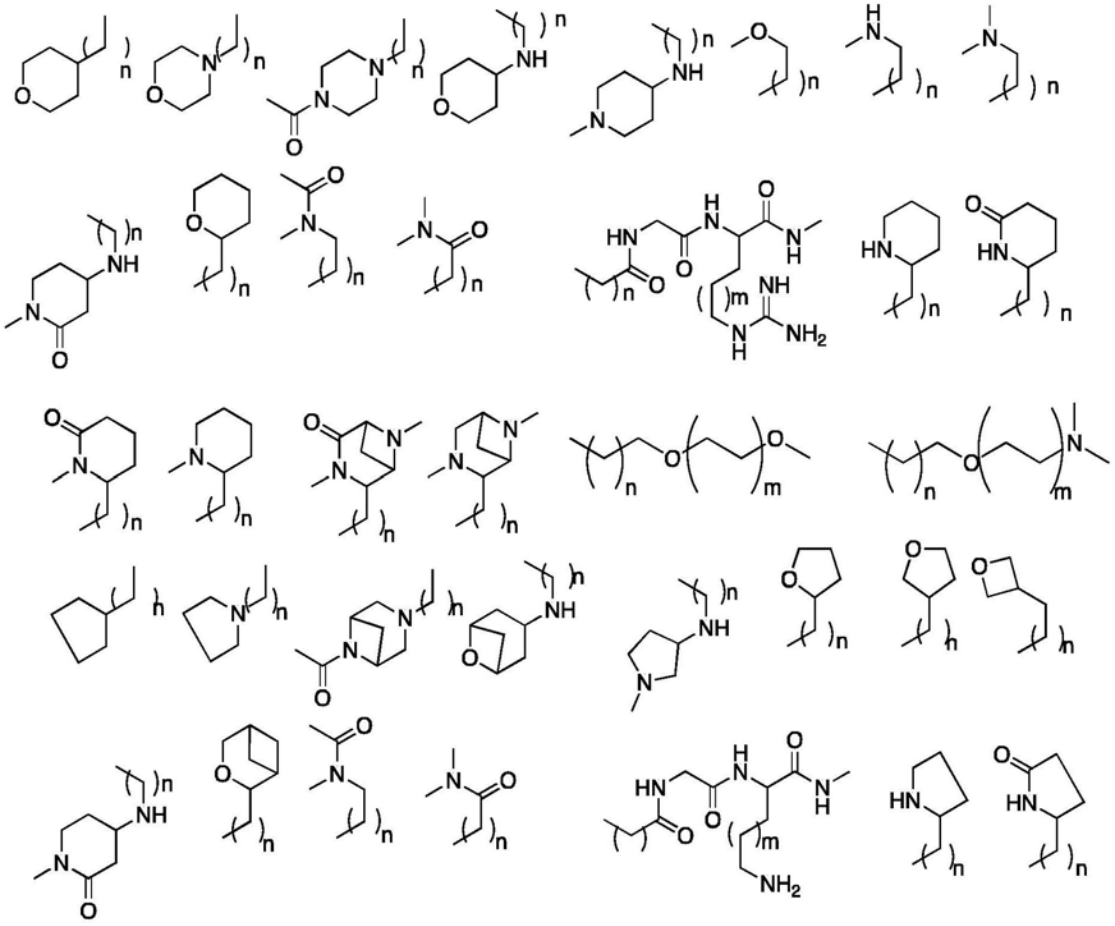
[0297] • R4是O、S、NH、NCOY

[0298] 优选地，Rpn 11结合配偶体由式V表示

[0299] 

[0300] • R1和R2选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、

[0301] 

[0302] 

[0303] 其中：

[0304] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

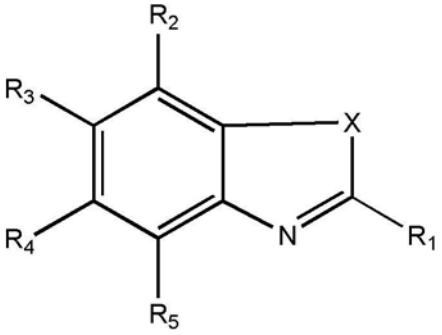
[0305] -X和Q是N或CH，

[0306] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0307] • R1和R_2是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0308] • R3是O、S、NH、NCOY

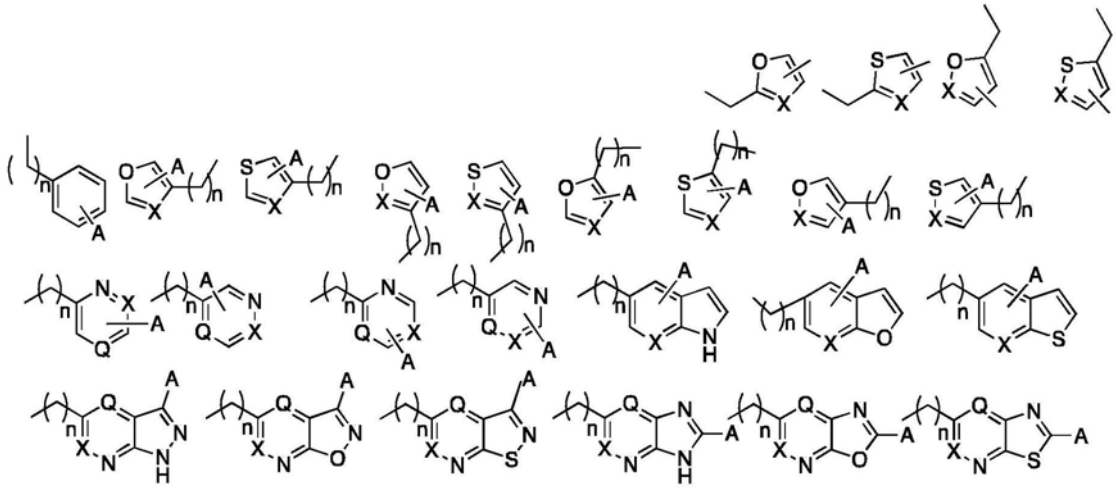
[0309] 优选地，Rpn 11结合配偶体由式VI表示

[0310] 

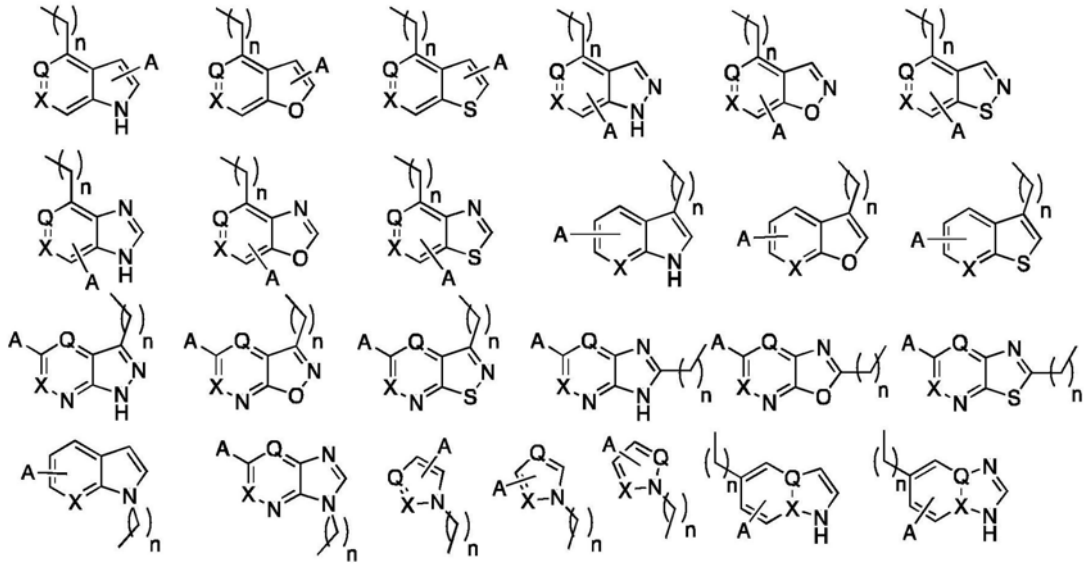
[0311] • X＝NH、O、S、CH2

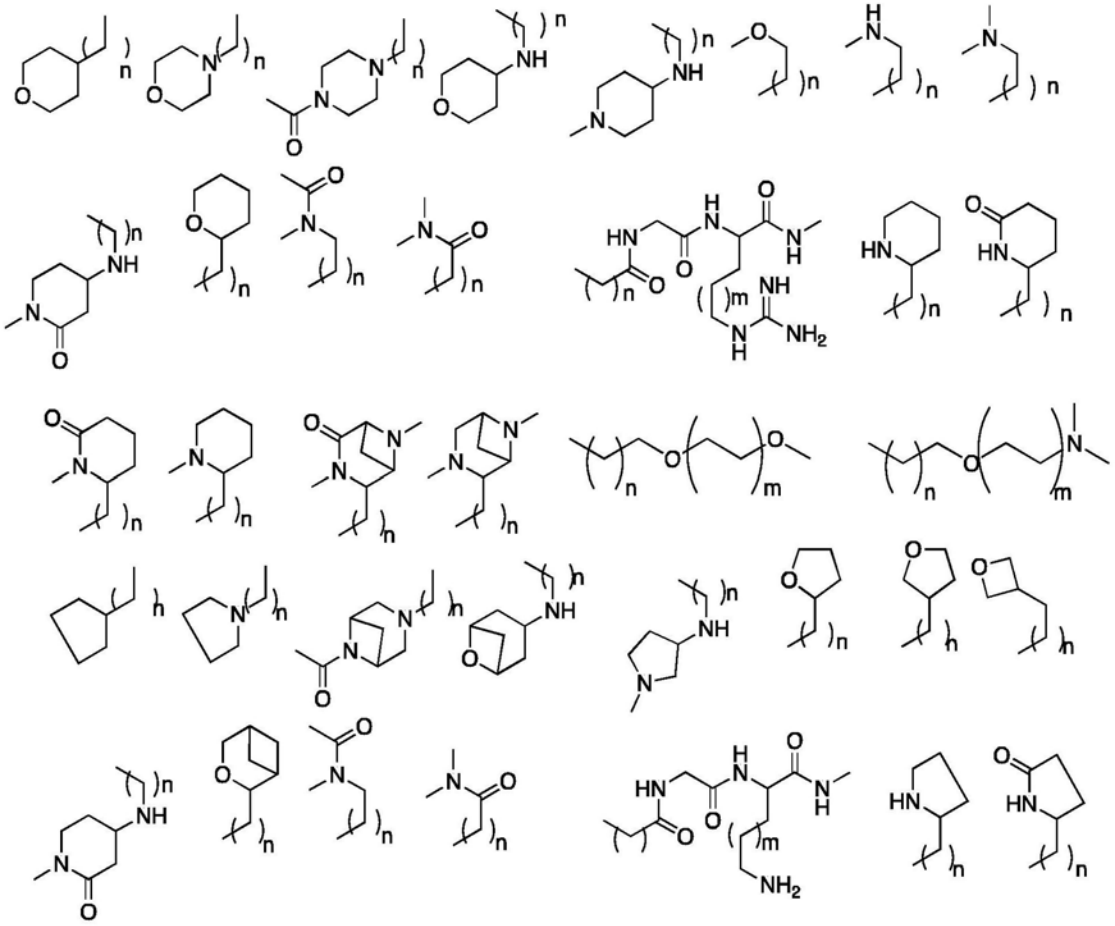
[0312] • R1和R4优先地是-H，但也为-Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-CHO…

[0313] • R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、$-CF_3$、-COOH、$-CH_2NH_2$、$-CH_3$、-H、-F、-Cl、-Br、$-CF_3$、$-CHF_2$、$-CH_2F$、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、$-SO_2Me$、$-NH_2$、-NHMe、$-NMe_2$、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：$-NH_2$、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：$-CH_3$、$-CH_2-COO-$、



[0314]



[0315] 

[0316] 其中：

[0317] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-SONHNH$_2$

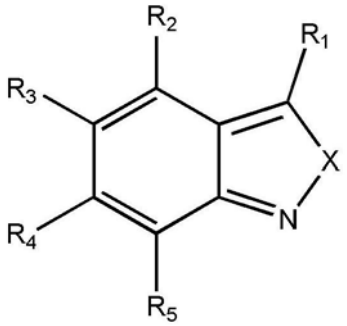
[0318] -X和Q是N或CH，

[0319] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0320] • R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0321] • R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

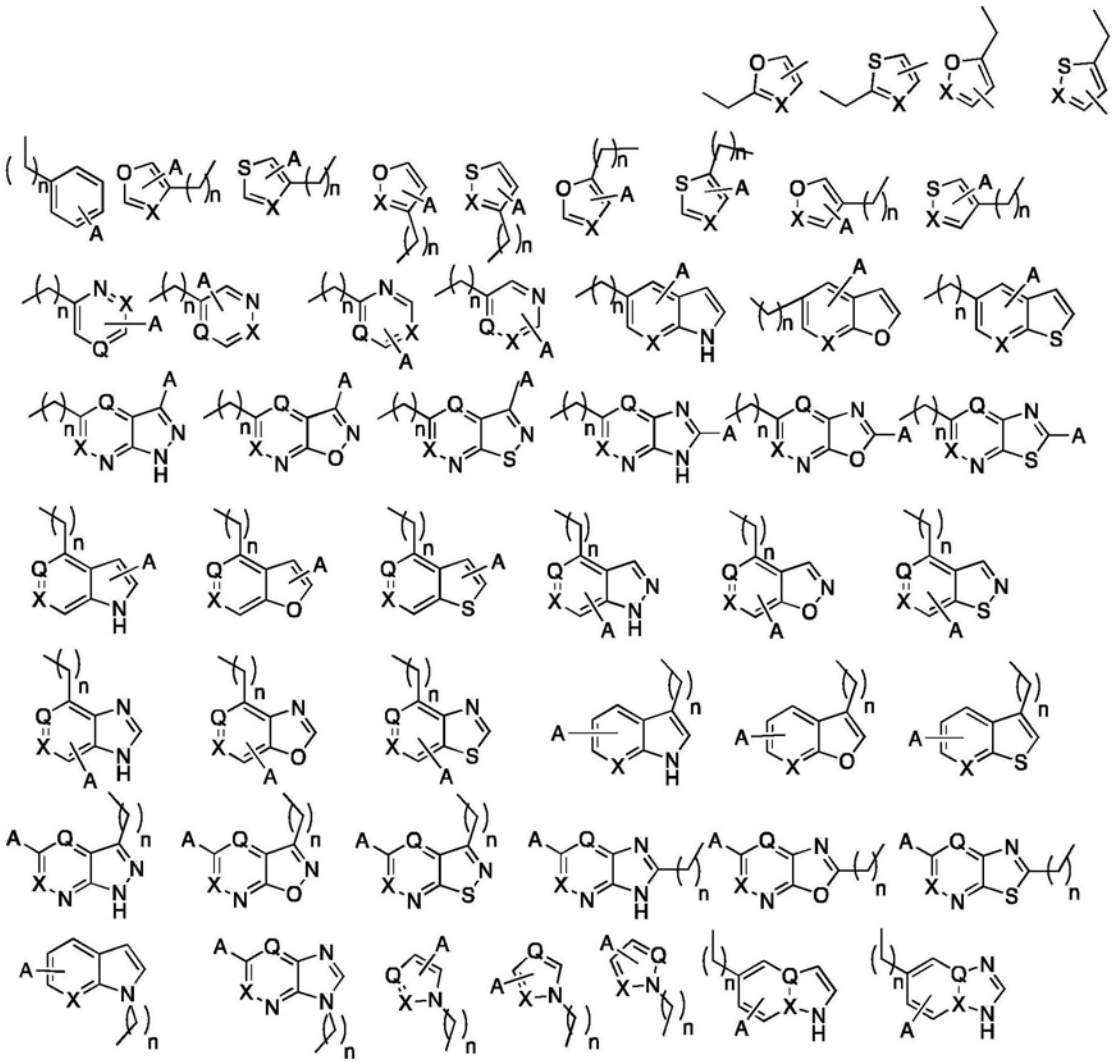
[0322] 优选地，Rpn 11结合配偶体由式VII表示

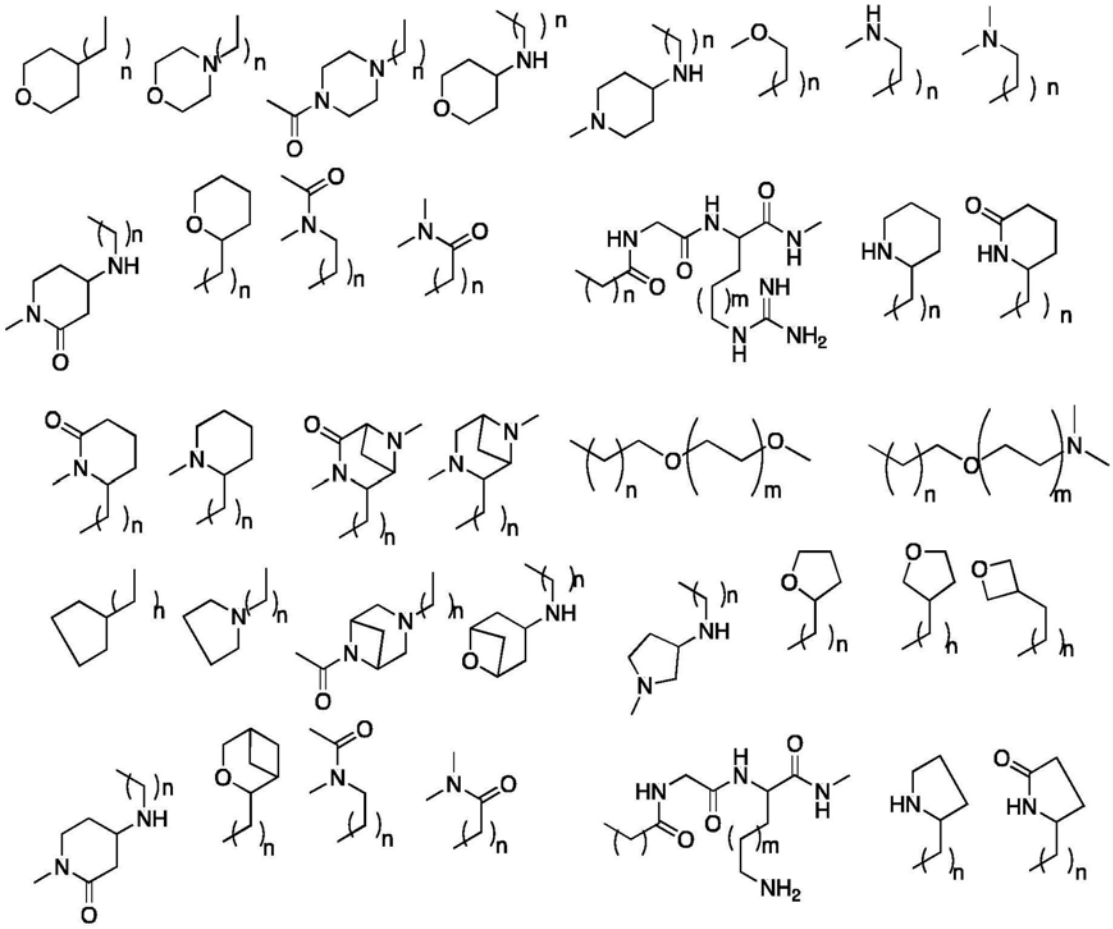
[0323] 

[0324] • X＝NH、O、S、CH2

[0325] • R1、R_2和R_3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、

NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：$-NH_2$、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：$-CH_3$、$-CH_2-COO-$、

[0326] 

[0327] 

[0328] 其中：

[0329] --A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

[0330] -X和Q是N或CH，

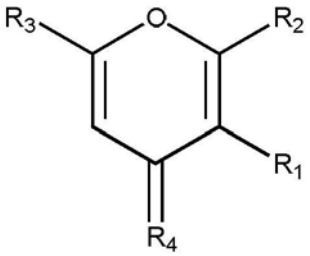
[0331] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

[0332] • R1、R2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0333] • R4优先地是-H，但也为Me、F、Cl、Br、CF_3、CHF_2、CH_2F、CN、OMe、SMe、SOMe、SO_2Me NH_2、NHMe、NO_2、CHO…

[0334] • R5选自由以下各项组成的组：-SH、-NH2、-OH、SSY、SCOY、OCOY，其中Y如上所述。

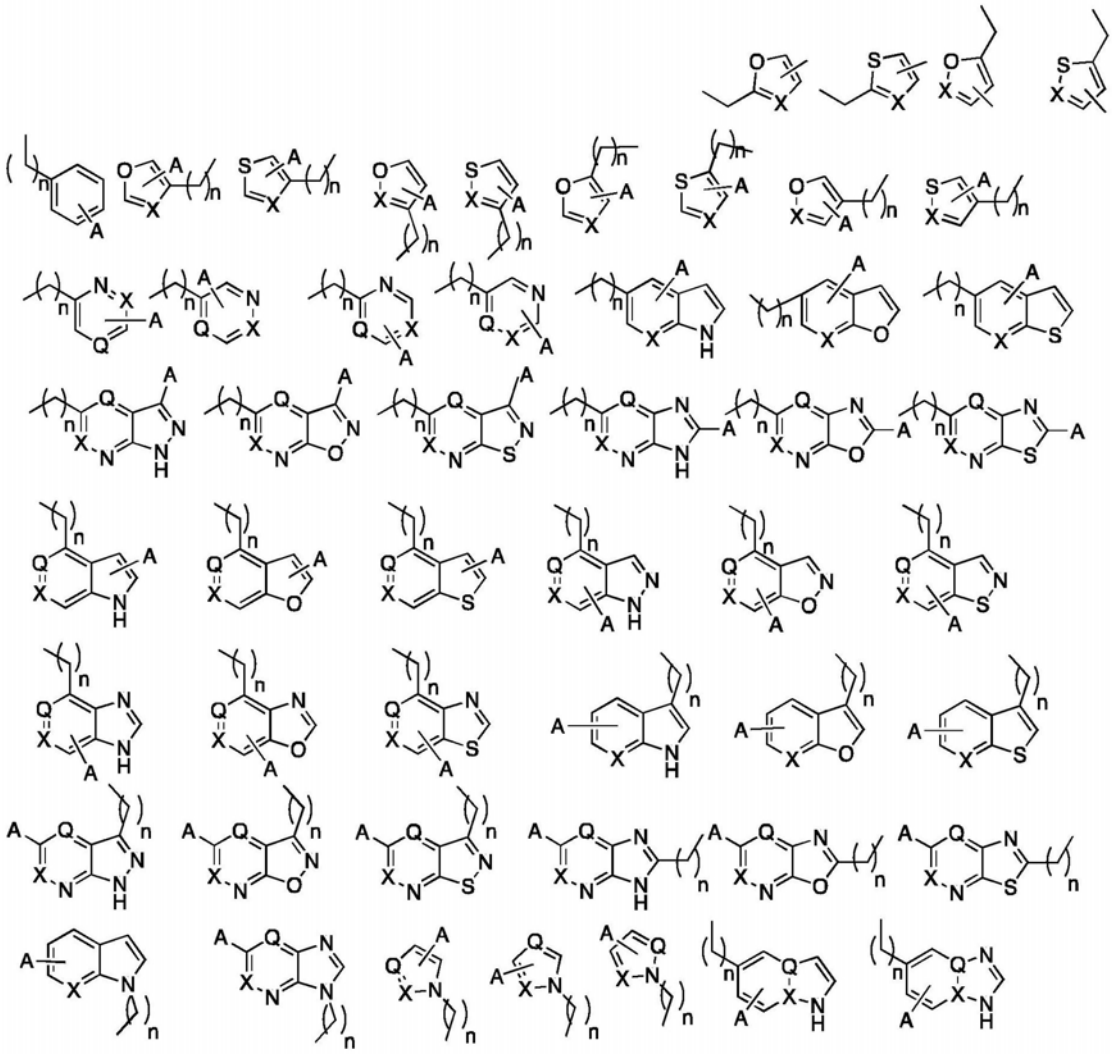
[0335] 优选地，Rpn 11结合配偶体由式VIII表示

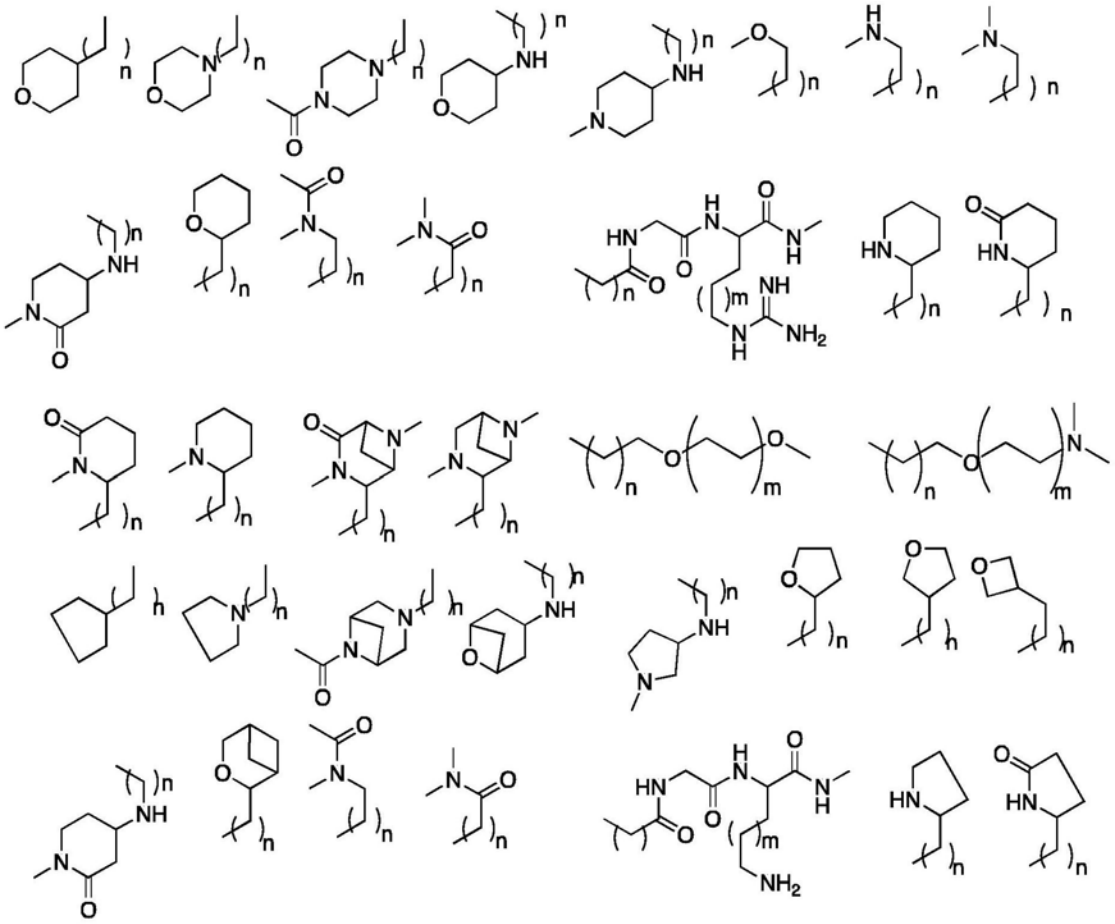
[0336] 

[0337] • R1选自由以下各项组成的组：-SH、-NH_2、-OH、-SSY、-SCOY、-OCOY、NHCOY，其中Y如上所述，

[0338] • R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O，

[0339] • R2和R3选自由以下各项组成的组：-CO-Z、-OCH_3、-CF_3、-COOH、-CH_2NH_2、-CH_3、-H、-F、-Cl、-Br、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me、-NH_2、-NHMe、-NMe_2、NO_2、CHO；Z选自由以下各项组成的组：-NH_2、-NHY、-OH和-OY；Y选自由以下各项组成的组：-CH_3、-CH_2-COO-、

[0340] 

[0341] 

[0342] 其中：

[0343] -A是-H、-Me、-Cl、-F、-Br、-I、-CF_3、-CHF_2、-CH_2F、-CN、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO_2Me-NH_2、-NHMe、-NO_2、-COOH、-CHO、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-OCF_3、-$OCHF_2$、-OCH_2F、-SCF_3、-$SCHF_2$、-SCH_2F、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$CSNH_2$、-$SONH_2$、-SO_2NH_2、-$SONHNH_2$…

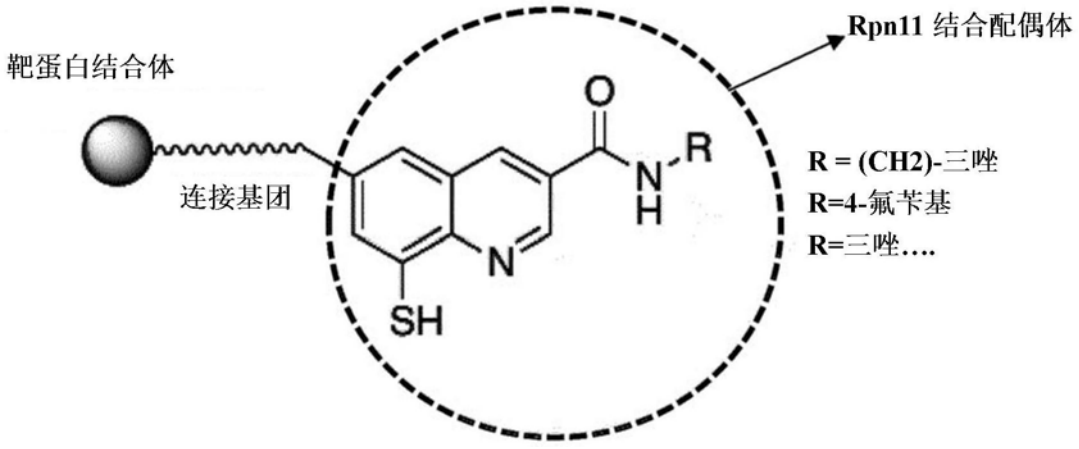
[0344] -X和Q是N或CH，

[0345] n＝0、1、2、3或4；m＝0、1、2、3或4

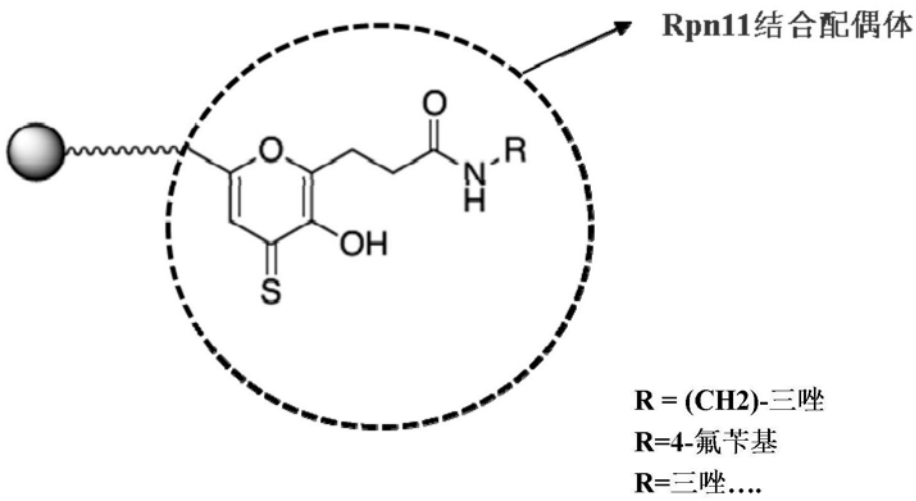
[0346] • R_2和R3是与蛋白质结合体连接的CONH-、O-、CH2-、HN-、CC-S-连接基团；

[0347] • R4选自由以下各项组成的组：-S、-NH、-O，

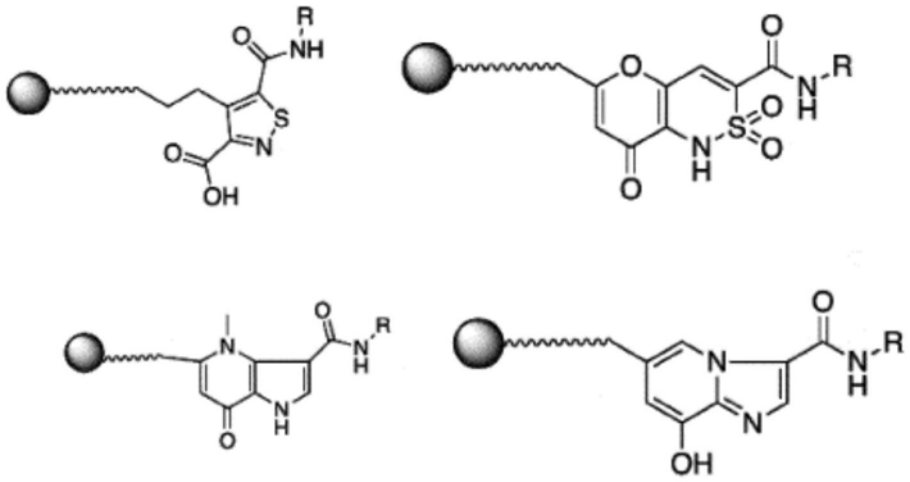
[0348] 在一个实施方案中，双功能分子是

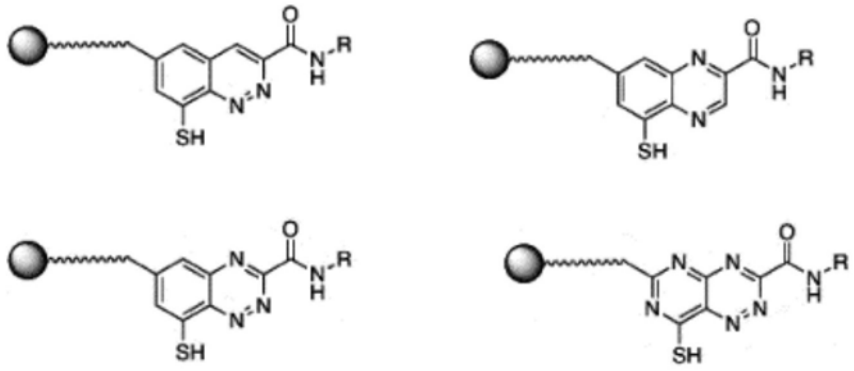
[0349] 

[0350] 在一个实施方案中,双功能分子是

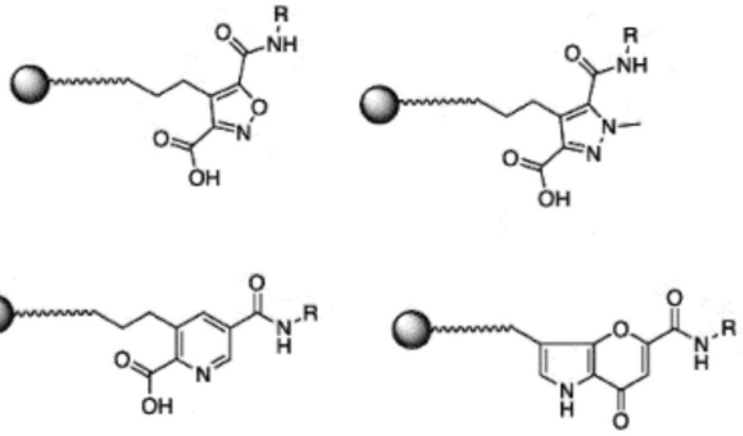
[0351] 

[0352] 在一个实施方案中,双功能分子选自由以下各项组成的组:

[0353] 



[0354]



[0355] 其中

[0356] R＝(CH2)-三唑

[0357] R＝4-氟苄基

[0358] R＝三唑….

[0359] 优选地，当不与靶蛋白结合配偶体共价结合时，Rpn11结合配偶体以在10nM-10μM范围内的亲和力与Rpn11结合。更优选地，当不与靶蛋白结合配偶体共价结合时，Rpn11结合配偶体以至少10nM的亲和力与Rpn11结合。

[0360] 优选地，当不与靶蛋白结合配偶体共价结合时，Rpn11结合配偶体以1nM-1μM的解离常数(Kd)范围与Rpn11结合。更优选地，当不与靶蛋白结合配偶体共价结合时，Rpn11结合配偶体以小于1μM的Kd与Rpn11结合。

[0361] Rpn11结合配偶体可以选自表1中提供的Rpn11结合分子的组。

[0362] 靶蛋白结合配偶体可以选自由以下各项组成的组：激酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、靶向含有BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物、HDM2/MDM2抑制剂、热休克蛋白90抑制剂、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂和抗体。

[0363] 双功能分子促进靶蛋白的蛋白水解。

[0364] 优选地，连接基团是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。优选地，连接基团具有第一末端，所述第一末端是肟，和/或连接基团具有第二末端，所述第二末端是胺。连接基团可以包含2至12个PEG重复单元，和/或可以包含2至12个$(CH_2)_n$重复单元。

[0365] 本发明还包括一种结合分子,所述结合分子包含与连接基团连接的Rpn11结合配偶体,其中连接基团能够与第二结合配偶体连接。

[0366] 在该结合分子中,Rpn11结合配偶体可以以10nM-10μM范围内的亲和力与Rpn11结合。Rpn11结合配偶体可以以至少10nM的亲和力与Rpn11结合。

[0367] 在该结合分子中,Rpn11结合配偶体可以以1nM-1μM的解离常数(Kd)范围与Rpn11结合。Rpn11结合配偶体可以以小于1μM的Kd与Rpn11结合。

[0368] Rpn11结合配偶体可以选自表1中提供的Rpn11结合分子的组。

[0369] 优选地,连接基团是聚乙二醇(PEG)连接基团、烃连接基团或组合的PEG、烷基连接基团。优选地,连接基团具有第一末端,所述第一末端是肟,和/或连接基团具有第二末端,所述第二末端是胺。连接基团可以包含2至12个PEG重复单元,和/或可以包含2至12个(CH_2)n重复单元。

[0370] 本发明还包括一种获得细胞中的靶蛋白的增加的蛋白水解的方法,所述方法包括使细胞与双功能分子接触,所述双功能分子包含与靶蛋白结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体。

[0371] 本发明的方法还包括一种通过向受试者施用包含与靶蛋白结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体的双功能分子而获得受试者中的靶蛋白的增加的蛋白水解的方法。

[0372] 本发明还包括一种提供包含两个共价连接的结合配偶体的双功能分子的方法,其中第一结合配偶体与Rpn11结合并且第二结合配偶体与选择的靶蛋白结合,所述方法包括提供第一结合配偶体和第二结合配偶体并且共价连接第一结合配偶体和第二结合配偶体。

[0373] 本发明还包括一种选择促进靶蛋白的蛋白水解的双功能分子的方法:

[0374] a.通过提供候选第一结合配偶体并且确定候选第一结合配偶体与Rpn11结合,选择第一结合配偶体;

[0375] b.通过提供候选第二结合配偶体并且确定候选第二结合配偶体与目标靶蛋白结合,选择第二结合配偶体;

[0376] c.共价连接第一结合配偶体和第二结合配偶体以形成双功能分子;

[0377] d.使细胞与双功能分子接触;

[0378] e.确定靶蛋白是否经历蛋白水解。

[0379] 本发明的方法还包括一种选择能够促进靶蛋白的蛋白水解的双功能分子的方法,所述方法包括:

[0380] (a)提供包含与靶蛋白结合配偶体共价连接的Rpn11结合配偶体的双功能分子,

[0381] (b)在体外或在哺乳动物中使双功能分子与细胞接触,所述细胞包含Rpn11和靶蛋白,其中所述接触允许双功能分子与Rpn11和靶蛋白结合,以及

[0382] (c)检测细胞中的靶蛋白的蛋白水解,其中检测到的蛋白水解相对于在不存在如步骤(b)中的所述接触的情况下的靶蛋白的蛋白水解是增加的。

[0383] 所述方法还可以包括以下步骤:在不存在双功能分子的情况下测量靶蛋白的蛋白水解。

[0384] 本发明还包括双功能分子的文库,所述文库包含多个双功能分子,所述多个双功能分子包含多个与选择的靶蛋白结合配偶体共价连接的Rpn11结合配偶体。因此,靶蛋白结合配偶体是预先选择的并且Rpn11结合配偶体并未预先确定。文库可以用于确定双功能分

子的候选Rpn11结合配偶体在促进靶蛋白降解中的活性。

[0385] 本发明还包括双功能分子的文库,所述文库包含多个双功能分子,所述多个双功能分子包含多个靶蛋白结合元件和选择的Rpn11结合配偶体。因此,Rpn11结合配偶体是预先选择的并且靶蛋白并未预先确定。文库可以用于确定假定的靶蛋白结合配偶体的活性及其作为靶蛋白的结合体以促进靶蛋白降解的价值。

[0386] 本发明还提供一种筛选候选双功能分子的文库以鉴定促进靶蛋白的蛋白水解的双功能分子的方法。所述方法包括将细胞与来自文库的双功能分子池一起温育;监测细胞中的靶蛋白的量;鉴定提供细胞中的靶蛋白量的降低的双功能分子的子池;将细胞与来自鉴定的子池的双功能分子一起温育;监测细胞中的靶蛋白的量;并且鉴定提供细胞中的靶蛋白量的降低的双功能分子。

[0387] 这些和另外的本发明的组合物和方法在以下详细描述和权利要求中找到。

附图说明

[0388] 图1示出了使用1μM化合物对HEK293细胞进行4小时处理后Brd2、Brd3和Brd4的免疫印迹分析。MZ1用作阳性对照。每个泳道下记录的值表示相对于平均0.1％DMSO对照的BET丰度。

[0389] 图2示出了使用指定浓度的11JQ7(母体化合物)或11JQ16(前药)对HEK293细胞进行4小时处理后Brd4的免疫印迹分析。每个泳道下记录的值表示相对于0.1％DMSO对照的BET丰度。

[0390] 图3示出了使用1μM 11JQ15(活性化合物)或11JQ17(非活性叔丁基)对HEK293细胞进行4小时处理后Brd4的代表性免疫印迹分析。条带强度被归一化至微管蛋白荷载对照并且报告为0.1％DMSO媒介物强度的％。将降解数据绘图,并且使用Prism(Graphpad,第8版)进行分析,其中条形图是三个独立实验的平均值±SEM。

[0391] 图4示出了使用增加浓度的11JQ16或11JQ15对HEK293细胞进行4小时处理后Brd2、Brd3和Brd4蛋白质水平的免疫印迹分析。MZ1和11JQ17以1μM使用,分别作为阳性对照和阴性对照。

[0392] 图5示出了使用11JQ16或11JQ15对HEK293细胞进行1μM处理达各个时间点后Brd2、Brd3和Brd4蛋白质水平的免疫印迹分析。MZ1和11JQ17以1μM(4小时)使用,分别作为阳性对照和阴性对照。

[0393] 图6A示出了在存在和不存在10μM硼替佐米、10μM capzimin和10μM JQ1的情况下使用1μM 11JQ15或MZ1对HEK293细胞进行4小时处理后Brd4蛋白质水平的代表性免疫印迹。在图6B中,Brd4条带强度被归一化至微管蛋白荷载对照并且报告为平均0.1％DMSO媒介物强度的％。每条是一式两份地进行的三个独立实验(n＝3)的平均值±SEM。图6C示出了在存在和不存在10μM硼替佐米、20μM capzimin和10μM JQ1的情况下使用1μM 11JQ16或MZ1对HeLa细胞进行4小时处理后Brd4蛋白质水平的免疫印迹。

[0394] 图7示出了通过无偏的(unbiased)TMT-标记蛋白质组学的选择性BET布罗莫结构域降解。将HEK293细胞用DMSO、1μM 11JQ15或1μM11JQ17处理4小时。图7(左)描绘了比较11JQ15与DMSO处理的7882蛋白质的丰度的倍数变化以及其各自的p值(t检验;n＝3);图7(右)描绘了比较1μM 11JQ17与DMSO处理的7882蛋白质的丰度的倍数变化(n＝3)。

[0395] 图8示出了使用1μM基于capzimin的代表性化合物进行处理后MV4-11细胞中的抗增殖效果，如使用CellTiter-Glo测定(Promega)测量的。JQ1和capzimin(CPZ)平行进行，并且MZ1和11JQ18分别用作阳性和阴性对照。

[0396] 图9示出了与BET抑制剂JQ1相比，使用增加浓度的11JQ16处理后MV4-11细胞中的Brd4、c-MYC、裂解的PARP(C-PARP)水平的代表性免疫印迹。11JQ18用作阴性对照。

[0397] 图10示出了基于capzimin的化合物向纯化的人Rpn11-Rpn8异二聚体中的ITC滴定。

[0398] 发明详述

[0399] 本发明提供了双功能分子，其可以同时与Rpn11和选择的靶蛋白结合，由此促进经由蛋白水解的靶蛋白的降解。

[0400] 描述了涉及将选择的靶蛋白募集到蛋白酶体以经历蛋白水解的组合物和方法。这根据本发明使用结合Rpn11和选择的靶蛋白二者的双功能分子来完成。因此，本发明提供了包含与靶蛋白的结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体的具有双重结合功能性的分子。本发明促进蛋白酶体对选择的靶蛋白的降解。

[0401] 定义：

[0402] 如本文中使用的，“双功能分子”在每端都具有功能基团，其中第一功能基团是Rpn11结合配偶体，并且第二功能基团是靶蛋白结合配偶体。双功能分子可以同时与Rpn11和选择的靶蛋白结合。

[0403] 术语“泛素化”是指给定蛋白质的泛素连接过程，由此蛋白质经历一个或多个泛素分子与蛋白质的共价连接(这经由典型地泛素与蛋白质的表面赖氨酸残基或与其N端的连接而发生)。泛素分子的共价连接标记了用于蛋白酶体降解的蛋白质，因而蛋白质被消化成小肽。

[0404] 术语“非泛素依赖性降解”意指选择的靶蛋白的蛋白水解，其中在其蛋白水解之前不需要靶蛋白的泛素化。

[0405] 还应该理解的是，除非存在明显的相反指示，否则在本文要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中，方法的步骤或动作的顺序不必限于所记载的方法的步骤或动作的顺序。

[0406] 在权利要求中以及在以上说明书中，所有过渡短语诸如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、“含有”、“涉及”、“持有”、“构成”等应被理解为是开放式的，即意指包括但不限于。如美国专利局专利审查程序手册(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03节所述，仅过渡短语“由…组成”和“基本上由…组成”应分别是封闭式或半封闭式的过渡短语。

[0407] 术语“共同施用”和“共同给药”是指同时施用(在相同时间施用两种或更多种治疗剂)和时变施用(在不同于施用一种或多种治疗剂的时间施用另外的一种或多种治疗剂)，只要治疗剂在某种程度上同时存在于患者中即可。

[0408] 术语“溶剂化物”是指具有一种或多种溶剂分子的指定化合物的药用形式，其保留了这样的化合物的生物有效性。溶剂化物的实例包括与溶剂诸如例如水(以形成水合物)、异丙醇、乙醇、甲醇、二甲亚砜、乙酸乙酯、乙酸、乙醇胺或丙酮组合的本发明化合物。还包括溶剂化物混合物(诸如与两种以上溶剂组合的本发明化合物)的制剂。

[0409] 当在任何结构中不止一次出现每个表述(例如烷基、m、n等)时,每个表述的定义旨在独立于其在相同结构中其他地方的定义。

[0410] 应当理解,“取代”或“被…取代”包括隐含的条件,即这样的取代符合取代的原子和取代基的允许的化合价,并且取代导致稳定的化合物,例如不会自发地发生转化(诸如通过重排、环化、消除或其他反应)的化合物。

[0411] 术语“取代的”还考虑包括有机化合物的所有允许的取代基。在广泛的方面,允许的取代基包括有机化合物的无环和环状的、支链和直链的、碳环和杂环的、芳族和非芳族的取代基。说明性的取代基包括例如下文中描述的那些。对于适当的有机化合物,允许的取代基可以是一个或多个并且是相同或不同的。为了本发明的目的,杂原子(诸如氮)可以具有氢取代基和/或满足杂原子的化合价的本文所述的有机化合物的任何允许的取代基。本发明不旨在以任何方式受限于有机化合物的允许的取代基。

[0412] 当附加到下面列出的任何基团时,术语“低级”表示基团含有少于七个碳(即六个碳或更少的碳)。例如,“低级烷基”是指含有1-6个碳的烷基基团,并且“低级烯基”是指含有2-6个碳的烯基基团。

[0413] 如本文中使用的术语“不饱和的”涉及具有至少一个碳-碳双键或碳-碳三键的化合物和/或基团。

[0414] 如本文中使用的术语“脂族”涉及直链或支链的但不是环状(也称为“非环状”或“开链”基团)的化合物和/或基团。

[0415] 如本文中使用的术语“环状”涉及具有一个环或者两个或更多个环(例如,螺环、稠环、桥环)的化合物和/或基团。“单环”是指具有一个环的化合物和/或基团;并且“二环”是指具有两个环的化合物和/或基团。

[0416] 术语“芳族”是指特征在于含有4n+2个电子的环状共轭分子部分的平面或多环结构,其中n是整数的绝对值。含有稠合或连接的环的芳族分子也被称为二环芳环。例如,在烃环结构中含有杂原子的二环芳环被称为二环杂芳环。

[0417] 如本文中使用的术语“烃”是指完全由氢和碳组成的有机化合物。

[0418] 为了本发明的目的,根据化学和物理手册(Handbook of Chemistry and Physics),第67版,1986-87,内封面的元素周期表,CAS版本来确认化学元素。

[0419] 如本文中使用的术语“杂原子”是本领域公认的并且是指除碳或氢以外的任何元素的原子。示例性的杂原子包括硼、氮、氧、磷、硫和硒。

[0420] 术语“烷基”意指含有1至20个、1至15个或1至10个碳原子的脂族或环状烃基团。烷基的代表性实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、2-甲基环戊基、1-(1-乙基环丙基)乙基和1-环己基乙基。

[0421] 术语“环烷基”是烷基的子集,其是指含有3至15个、3至10个或3至7个碳原子的环状烃基团。环烷基的代表性实例包括但不限于环丙基和环丁基。

[0422] 如本文中使用的术语“烯基”意指含有2至10个碳并且含有通过移除两个氢形成的至少一个碳-碳双键的直链或支链烃基团。烯基的代表性实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、2-甲基-2-丙烯基、3-丁烯基、4-戊烯基、5-己烯基、2-庚烯基、2-甲基-1-庚烯基和3-癸烯基。

[0423] 如本文中使用的术语“炔基”意指含有2至10个碳原子并且含有至少一个碳-碳三键的直链或支链烃15基团。炔基的代表性实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、3-丁炔基、2-戊炔基和1-丁炔基。

[0424] 术语“亚烷基”是本领域公认的，并且如本文中使用的，涉及通过移除如上所限定的烷基基团的两个氢原子而获得的双游离基(diradical)。

[0425] 如本文中使用的术语”碳环基”意指含有3至12个碳原子的单环或多环(例如，二环、三环等)的烃基团，其是完全饱和的或者具有一个或多个不饱和键，并且为了避免疑义，不饱和度不会产生芳环体系(例如，苯基)。碳环基基团的实例包括1-环丙基、1-环丁基、2-环戊基、1-环戊烯基、3-环己基、1-环己烯基和2-环戊烯基甲基。

[0426] 如本文中使用的术语“杂环基”是指非芳族环体系的基团，包括但不限于单环、二环和三环，其可以是完全饱和的或者其可以含有一个或多个不饱和单元，为了避免疑义，不饱和度不会产生芳环体系，并且具有包括至少一个杂原子(诸如氮、氧或硫)的3至12个原子。为了示例目的，其不应被理解为限制本发明的范围，下面是杂环的实例：氮杂环丙基(aziridinyl)、氮杂环丙烯基(azirinyl)、氧杂环丙基(oxiranyl)、硫杂丙环基(thiiranyl)、硫杂环丙烯基(thiirenyl)、二氧杂环丙基(dioxiranyl)、二氮杂环丙烯基(diazirinyl)、氮杂环丁烯基(azetyl)、氧杂环丁基(oxetanyl)、氧杂环丁烯基(oxetyl)、硫杂环丁基(thietanyl)、硫杂环丁烯基(thietyl)、二氮杂环丁基(diazetidinyl)、二氧杂环丁基(dioxetanyl)、二氧杂环丁烯基(dioxetenyl)、二硫杂环丁基(dithietanyl)、二硫杂环丁烯基(dithietyl)、呋喃基、二氧杂环戊基(dioxalanyl)、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、三嗪基、异噻唑基、异噁唑基、噻吩基、吡唑基、四唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、四嗪基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、吡啶并吡嗪基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁二唑基、苯并噻二唑基、吲哚基、苯并三唑基、萘啶基、氮杂䓬、氮杂环丁基(azetidinyl)、吗啉基、氧代哌啶基、氧代吡咯烷基、哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、奎宁环基(quinicludinyl)、硫代吗啉基、四氢吡喃基和四氢呋喃基。

[0427] 本发明的杂环基基团被0、1、2、3、4或5个取代基取代，所述取代基独立地选自由以下各项组成的组：烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷硫基、卤代烷硫基、氟烷硫基、烯基硫基、炔基硫基、磺酸、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧基羰基、卤代烷氧基羰基、氟烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、烷基羰基氧基、卤代烷基羰基氧基、氟烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、烷基磺酰基氧基、卤代烷基磺酰基氧基、氟烷基磺酰基氧基、烯基磺酰基氧基、炔基磺酰基氧基、卤代烷氧基磺酰基氧基、氟烷氧基磺酰基氧基、烯氧基磺酰基氧基、炔氧基磺酰基氧基、烷基亚磺酰基氧基、卤代烷基亚磺酰基氧基、氟烷基亚磺酰基氧基、烯基亚磺酰基氧基、炔基亚磺酰基氧基、烷氧基亚磺酰基氧基、卤代烷氧基亚磺酰基氧基、氟烷氧基亚磺酰基氧

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

[0428] 如本文中使用的术语“芳基”意指苯基、萘基、菲基或蒽基基团。本发明的芳基基团可以任选地被1、2、3、4或5个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下各项组成的组:烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷硫基、卤代烷硫基、氟烷硫基、烯基硫基、炔基硫基、磺酸、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧基羰基、卤代烷氧基羰基、氟烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、烷基羰基氧基、卤代烷基羰基氧基、氟烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、烷基磺酰基氧基、卤代烷基磺酰基氧基、氟烷基磺酰基氧基、烯基磺酰基氧基、炔基磺酰基氧基、卤代烷氧基磺酰基氧基、氟烷氧基磺酰基氧基、烯氧基磺酰基氧基、炔氧基磺酰基氧基、烷基亚磺酰基氧基、卤代烷基亚磺酰基氧基、氟烷基亚磺酰基氧基、烯基亚磺酰基氧基、炔基亚磺酰基氧基、烷氧基亚磺酰基氧基、卤代烷氧基亚磺酰基氧基、氟烷氧基亚磺酰基氧基、烯氧基亚磺酰基氧基、炔氧基亚磺酰基氧基、氨基亚磺酰基氧基、氨基、酰胺基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、氧膦基、磷酰基、甲硅烷基、甲硅烷基氧基以及通过亚烷基部分(例如,亚甲基)与杂环基基团结合的任何所述取代基。

[0429] 术语“亚芳基”是本领域公认的,并且如本文中使用的,涉及通过移除如上所限定的芳环的两个氢原子而获得的双游离基。

[0430] 如本文中使用的术语“芳基烷基”或“芳烷基”意指通过如上所限定的烷基基团附接至母体分子部分的如上所限定的芳基基团。

[0431] 芳烷基的代表性实例包括但不限于苄基、2-苯基乙基、3-苯基丙基和2-萘-2-基乙基。

[0432] 如本文中使用的术语“联芳基”意指芳基取代的芳基、芳基取代的杂芳基、杂芳基取代的芳基或杂芳基取代的杂芳基,其中芳基和杂芳基是如上所限定的。代表性实例包括4-(苯基)苯基和4-(4-甲氧基苯基)吡啶基。

[0433] 如本文中使用的术语“杂芳基”包括芳环体系的基团,包括但不限于单环、二环和三环,其具有包括至少一个杂原子(诸如氮、氧或硫)的3至12个原子。为了示例目的,其不应被理解为限制本发明的范围:氨基苯并咪唑、苯并咪唑、氮杂吲哚基、苯并(b)噻吩基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并三唑基、苯并噁二唑基、呋喃基、咪唑基、咪唑并吡啶基、吲哚基、二氢吲哚基、吲唑基、异二氢吲哚基、异噁唑基、异噻唑基、异喹啉基、噁二唑基、噁唑基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、吡咯并[2,3-d]嘧啶基、吡唑并[3,4-d]嘧啶基、喹啉基、喹唑啉基、三唑基、噻唑基、噻吩基、四氢吲哚基、四唑基、噻二唑基、噻吩基、硫代吗啉基、三唑基或托烷基(tropanyl)。本发明的杂芳基基团被0、1、2、3、4或5个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下各项组成

的组:烷基、烯基、炔基、卤素、卤代烷基、氟烷基、羟基、烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、巯基、烷硫基、卤代烷硫基、氟烷硫基、烯基硫基、炔基硫基、磺酸、烷基磺酰基、卤代烷基磺酰基、氟烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、烷氧基磺酰基、卤代烷氧基磺酰基、氟烷氧基磺酰基、烯氧基磺酰基、炔氧基磺酰基、氨基磺酰基、亚磺酸、烷基亚磺酰基、卤代烷基亚磺酰基、氟烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、烷氧基亚磺酰基、卤代烷氧基亚磺酰基、氟烷氧基亚磺酰基、烯氧基亚磺酰基、炔氧基亚磺酰基、氨基亚磺酰基、甲酰基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、羧基、烷氧基羰基、卤代烷氧基羰基、氟烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、烷基羰基氧基、卤代烷基羰基氧基、氟烷基羰基氧基、烯基羰基氧基、炔基羰基氧基、烷基磺酰基氧基、卤代烷基磺酰基氧基、氟烷基磺酰基氧基、烯基磺酰基氧基、炔基磺酰基氧基、卤代烷氧基磺酰基氧基、氟烷氧基磺酰基氧基、烯氧基磺酰基氧基、炔氧基磺酰基氧基、烷基亚磺酰基氧基、卤代烷基亚磺酰基氧基、氟烷基亚磺酰基氧基、烯基亚磺酰基氧基、炔基亚磺酰基氧基、烷氧基亚磺酰基氧基、卤代烷氧基亚磺酰基氧基、氟烷氧基亚磺酰基氧基、烯氧基亚磺酰基氧基、炔氧基亚磺酰基氧基、氨基亚磺酰基氧基、氨基、酰胺基、氨基磺酰基、氨基亚磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、氧膦基、磷酰基、甲硅烷基、甲硅烷基氧基以及通过亚烷基部分(例如,亚甲基)与杂芳基基团结合的任何所述取代基。

[0434] 术语“亚杂芳基”是本领域公认的,并且如本文中使用的,涉及通过移除如上所限定的杂芳环的两个氢原子而获得的双游离基。

[0435] 如本文中使用的术语“杂芳基烷基”或“杂芳烷基”意指通过如上所限定的烷基基团附接至母体分子部分的如上所限定的杂芳基。杂芳基烷基的代表性实例包括但不限于吡啶-3-基甲基和2-(噻吩-2-基)乙基。

[0436] 如本文中使用的术语“稠合二环基”意指二环体系的基团,其中两个环是单边稠合的,并且每个环含有包括两个稠合原子的总计四个、五个、六个或七个原子(即,碳和杂原子),并且每个环可以是完全饱和的、可以含有一个或多个不饱和单元或者可以是完全不饱和的(例如,在一些情况下是芳族的)。为了避免疑义,稠合二环基中的不饱和度不会产生芳基或杂芳基部分。术语“卤代”或“卤素”意指-Cl、-Br、-I或-F。

[0437] 术语“卤代烷基”意指这样的如上所限定的烷基基团,其中至少一个氢被如上所限定的卤素取代。卤代烷基的代表性实例包括但不限于氯甲基、2-氟乙基、三氟甲基、五氟乙基和2-氯-3-氟戊基。

[0438] 术语“氟烷基”意指这样的如上所限定的烷基基团,其中一些或全部的氢被氟取代。

[0439] 如本文中使用的术语“卤代亚烷基”涉及通过移除如上所限定的卤代烷基基团的两个氢原子而获得的双游离基。

[0440] 如本文中使用的术语“羟基”意指-OH基团。

[0441] 如本文中使用的术语“烷氧基”意指通过氧原子附接至母体分子部分的如上所限定的烷基基团。烷氧基的代表性实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和己氧基。同样地定义术语“烯氧基”、“炔氧基”、“碳环基氧基”和“杂环基氧基”。

[0442] 如本文中使用的术语“卤代烷氧基”意指这样的如上所限定的烷氧基基团,其中至

少一个氢被如上所限定的卤素取代。卤代烷氧基的代表性实例包括但不限于氯甲氧基、2-氟乙氧基、三氟甲氧基和五氟乙氧基。同样地定义术语“氟烷氧基”。

[0443] 如本文中使用的术语“芳氧基”意指通过氧附接至母体分子部分的如上所限定的芳基基团。如本文中使用的术语“杂芳氧基”意指通过氧附接至母体分子部分的如上所限定的杂芳基基团。同样地定义术语“杂芳氧基”。

[0444] 如本文中使用的术语“芳基烷氧基(arylalkoxy)”或“芳基烷氧基(arylalkyloxy)”意指通过氧附接至母体分子部分的如上所限定的芳基烷基基团。同样地定义术语“杂芳基烷氧基”。芳氧基和杂芳基烷氧基的代表性实例包括但不限于2-氯苯基甲氧基、3-三氟甲基-苯基乙氧基和2,3-二甲基吡啶基甲氧基。

[0445] 如本文中使用的术语“巯基”或“硫基”意指-SH基团。

[0446] 如本文中使用的术语“烷硫基”意指通过硫附接至母体分子部分的如上所限定的烷基基团。烷硫基的代表性实例包括但不限于甲硫基、乙硫基、叔丁硫基和己硫基。同样地定义术语“卤代烷硫基”、“氟烷硫基”、“烯基硫基”、“炔基硫基”、“碳环基硫基”和“杂环基硫基”。

[0447] 如本文中使用的术语“芳基硫基”意指通过硫附接至母体分子部分的如上所限定的芳基基团。同样地定义术语“杂芳基硫基”。

[0448] 如本文中使用的术语“芳基烷硫基”或“芳烷硫基”意指通过硫附接至母体分子部分的如上所限定的芳基烷基基团。同样地定义术语“杂芳基烷硫基”。

[0449] 如本文中使用的术语“磺酰基”是指-S(=O)2-基团。

[0450] 如本文中使用的术语“磺酸”是指-S(=O)2OH。

[0451] 如本文中使用的术语“烷基磺酰基”意指通过如上所限定的磺酰基基团附接至母体分子部分的如上所限定的烷基基团。烷基磺酰基的代表性实例包括但不限于甲基磺酰基和乙基磺酰基。同样地定义术语“卤代烷基磺酰基”、“氟烷基磺酰基”、“烯基磺酰基”、“炔基磺酰基”、“碳环基磺酰基”、“杂环基磺酰基”、“芳基磺酰基”、“芳烷基磺酰基”、“杂芳基磺酰基”和“杂芳烷基磺酰基”。

[0452] 如本文中使用的术语“烷氧基磺酰基”意指通过如上所限定的磺酰基基团附接至母体分子部分的如上所限定的烷氧基基团。

[0453] 烷氧基磺酰基的代表性实例包括但不限于甲氧基磺酰基、乙氧基磺酰基和丙氧基磺酰基。同样地定义术语“卤代烷氧基磺酰基”、“氟烷氧基磺酰基”、“烯氧基磺酰基”、“炔氧基磺酰基”、“碳环基氧基磺酰基”、“杂环基氧基磺酰基”、“芳氧基磺酰基”、“芳烷氧基磺酰基”、“杂芳氧基磺酰基”和“杂芳烷氧基磺酰基”。

[0454] 术语三氟甲磺酰基(triflyl)、甲苯磺酰基(tosyl)、甲磺酰基(mesyl)和九氟丁烷磺酰基(nonaflyl)是本领域公认的,并且分别是指三氟甲磺酰基(trifluoromethanesulfonyl)、对甲苯磺酰基(p-toluenesulfonyl)、甲磺酰基(methanesulfonyl)和九氟丁烷磺酰基(nonafluorobutanesulfonyl)基团。术语三氟甲磺酸酯(triflate)、甲苯磺酸酯(tosylate)、甲磺酸酯(mesylate)和九氟丁烷磺酸酯(nonaflate)是本领域公认的,并且分别是指三氟甲磺酸酯、对甲苯磺酸酯、甲磺酸酯和九氟丁烷磺酸酯官能团和含有所述基团的分子。

[0455] 如本文中使用的术语“氨基磺酰基”意指通过磺酰基基团附接至母体分子部分的

如上所限定的氨基基团。

[0456] 如本文中使用的术语“亚磺酰基”是指-S(=O)-基团。亚磺酰基基团是如上对于磺酰基基团所限定的。如本文中使用的术语“亚磺酸”是指-S(=O)OH。

[0457] 术语“氧基”是指-O-基团。

[0458] 如本文中使用的术语“羰基”意指-C(=O)-基团。

[0459] 如本文中使用的术语“硫羰基”意指-C(=S)-基团。

[0460] 如本文中使用的术语“甲酰基”意指-C(=O)氢基团。

[0461] 如本文中使用的术语“酰基”是指-C(=O)R形式的任何基团或原子团,其中R是有机基团。酰基基团的实例是乙酰基基团(-C(=O)CH3)。

[0462] 如本文中使用的术语“烷基羰基”意指通过如上所限定的羰基基团附接至母体分子部分的如上所限定的烷基基团。烷基羰基的代表性实例包括但不限于乙酰基、1-氧代丙基、2,2-二甲基-1-氧代丙基、1-氧代丁基和1-氧代戊基。同样地定义术语“卤代烷基羰基”、“氟烷基羰基”、“烯基羰基”、“炔基羰基”、“碳环基羰基”、“杂环基羰基”、“芳基羰基”、“芳烷基羰基”、“杂芳基羰基”和“杂芳烷基羰基”。

[0463] 如本文中使用的术语“羧基”意指-CO_2H基团。

[0464] 如本文中使用的术语“烷氧基羰基”意指通过如上所限定的羰基基团附接至母体分子部分的如上所限定的烷氧基基团。烷氧基羰基的代表性实例包括但不限于甲氧基羰基、乙氧基羰基和叔丁氧基羰基。

[0465] 同样地定义术语“卤代烷氧基羰基”、“氟烷氧基羰基”、“烯氧基羰基”、“炔氧基羰基”、“碳环基氧基羰基”、“杂环基氧基羰基”、“芳氧基羰基”、“芳烷氧基羰基”、“杂芳氧基羰基”和“杂芳烷氧基羰基”。

[0466] 如本文中使用的术语“烷基羰基氧基”意指通过氧原子附接至母体分子部分的如上所限定的烷基羰基基团。烷基羰基氧基的代表性实例包括但不限于乙酰氧基、乙基羰基氧基和叔丁基羰基氧基。同样地定义术语“卤代烷基羰基氧基”、“氟烷基羰基氧基”、“烯基羰基氧基”、“炔基羰基氧基”、“碳环基羰基氧基”、“杂环基羰基氧基”、“芳基羰基氧基”、“芳烷基羰基氧基”、“杂芳基羰基氧基”和“杂芳烷基羰基氧基”。

[0467] 如本文中使用的术语“烷基磺酰基氧基”意指通过氧原子附接至母体分子部分的如本文所限定的烷基磺酰基基团。同样地定义术语“卤代烷基磺酰基氧基”、“氟烷基磺酰基氧基”、“烯基磺酰基氧基”、“炔基磺酰基氧基”、“芳基磺酰基氧基”、“杂芳烷基磺酰基氧基”、“烯氧基磺酰基氧基”、“杂环基氧基磺酰基氧基”、“碳环基磺酰基氧基”、“芳烷基磺酰基氧基”、“卤代烷氧基磺酰基氧基”、“炔氧基磺酰基氧基”、“芳氧基磺酰基氧基”、“杂环基磺酰基氧基”、“杂芳基磺酰基氧基”、“氟烷氧基磺酰基氧基”、“碳环基氧基磺酰基氧基”、“芳烷氧基磺酰基氧基”、“杂芳氧基磺酰基氧基”和“杂芳烷氧基磺酰基氧基”。

[0468] 如本文中使用的术语“氨基”或“胺”是指-NH2及其取代的衍生物,所述衍生物中一个或两个氢独立地被选自由以下各项组成的组的取代基取代:烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷基羰基、卤代烷基羰基、氟烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、碳环基羰基、杂环基羰基、芳基羰基、芳烷基羰基、杂芳基羰基、杂芳烷基羰基以及磺酰基和亚磺酰基基团,如上所限定;或者当两个氢一起被亚烷基基团取代(以形成含有氮的环)。代表性实例包括但不限于甲氨基、乙酰氨基和二甲基氨基。

[0469] 如本文中使用的术语“酰胺基”意指通过羰基附接至母体分子部分的如上所限定的氨基基团。

[0470] 如本文中使用的术语“氰基”意指-CN基团。

[0471] 如本文中使用的术语“硝基”意指-NO2基团。

[0472] 如本文中使用的术语“叠氮基”意指-N3基团。

[0473] 如本文中使用的术语“氧膦基”或“膦基”包括-PH3及其取代的衍生物,所述衍生物中一个、两个或三个氢独立地被选自由以下各项组成的组的取代基取代:烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、芳氧基、芳烷氧基、杂芳氧基、杂芳烷氧基和氨基。

[0474] 如本文中使用的术语“磷酰基”是指-P(=O)OH2及其取代的衍生物,所述衍生物中一个或两个羟基独立地被选自由以下各项组成的组的取代基取代:烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、烷氧基、卤代烷氧基、氟烷氧基、烯氧基、炔氧基、碳环基氧基、杂环基氧基、芳氧基、芳烷氧基、杂芳氧基、杂芳烷氧基和氨基。

[0475] 如本文中使用的术语“甲硅烷基”包括H3Si-及其取代的衍生物,所述衍生物中一个、两个或三个氢独立地被选自烷基、卤代烷基、氟烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳烷基的取代基取代。代表性实例包括三甲基甲硅烷基(TMS)、叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)、叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS/TBDMS)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)和[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]甲基(SEM)。

[0476] 如本文中使用的术语“甲硅烷基氧基”意指如上所限定的甲硅烷基基团通过氧原子附接至母体分子。

[0477] 缩写Me、Et、Ph、Tf、Nf、Ts、Ms、Cbz和Boc分别表示甲基、乙基、苯基、三氟甲磺酰基、九氟丁烷磺酰基、对甲苯磺酰基、甲磺酰基、苄氧基羰基(carbobenzyloxy)和叔丁氧基羰基。具有本领域普通技术的有机化学家所使用的缩写的更全面的列表参见Journal of Organic Chemistry每卷的第一期;该列表通常存在于标题为Standard List of Abbreviations(缩写的标准列表)的表格中。

[0478] “蛋白表达相关的疾病”意指这样的疾病或病症,其病理学至少部分地与不适当的蛋白表达(例如,在错误时间和/或在错误细胞中的表达)、过度的蛋白表达或突变蛋白的表达相关。在一个实施方案中,当突变蛋白干扰细胞、组织或器官的正常生物活性时,引起突变蛋白疾病。

[0479] “突变蛋白”意指相对于参照(野生型)蛋白质具有影响其一级、二级或三级结构的变化的蛋白质。

[0480] “增强”意指至少约10%、15%、25%、50%、75%或100%的正变化。

[0481] “降低”意指至少约10%、25%、50%、75%或100%的负变化。

[0482] “选择性降解”意指优先影响靶蛋白使得其他蛋白质基本上不受影响的降解。在各个实施方案中,小于约45%、35%、25%、15%、10%或5%的非靶蛋白被降解。

[0483] Rpn11是一种去泛素化酶,其通过在泛素链和底物之间的接合处切割来帮助从泛素化的底物中移除聚泛素链,以释放泛素用以循环利用。Rpn11催化的泛素循环利用步骤对

于蛋白质降解是必需的。Rpn11是金属蛋白酶。(Perez等人2017J.Med.Chem.60:1343-1361和US2017050931)。Rpn11呈现金属蛋白酶活性,以在蛋白质底物被折叠和降解之前水解聚泛素链中的泛素分子。人Rpn11也被称为PSMD14和POH1。

[0484] Rpn11UchL5核苷酸和氨基酸序列(人)

[0485] PSMD14-000487

[0486] Rpn11核苷酸序列

[0487]
```
atggacagacttcttagacttggaggaggtatgcctggactgggccaggggccacctacagatgctcctg
cagtggacacagcagaacaagtctatatctcttccctggcactgttaaaaatgttaaaacatggccgtgc
tggagttccaatggaagttatgggtttgatgcttggagaatttgttgatgattataccgtcagagtgatt
gatgtgtttgctatgccacagtcaggaacaggtgtcagtgtggaggcagttgatccagtgttccaagcta
aaatgttggatatgttgaagcagacaggaaggccggagatggttgttggttggtatcacagtcaccctgg
ctttggttgttggctttctggtgtggatatcaacactcagcagagctttgaagccttgtcggagagagct
gtggcagtggttgtggatcccattcagagtgtaaaaggaaaggttgttattgatgccttcagattgatca
atgctaatatgatggtcttaggacatgaaccaagacaaacaacttcgaatctgggtcacttaaacaagcc
atctatccaggcattaattcatggactaaacagacattattactccattactattaactatcggaaaaat
gaactggaacagaagatgttgctaaatttgcataagaagagttggatggaaggtttgacacttcaggact
acagtgaacattgtaaacacaatgaatcagtggtaaaagagatgttggaattagccaagaattacaataa
ggctgtagaagaagaagataagatgacacctgaacagctggcaataaagaatgttggcaagcaggacccc
aaacgtcatttggaggaacatgtggatgtacttatgacctcaaatattgtccagtgtttagcagctatgt
tggatactgtcgtatttaaataa
```

[0488] Rpn11氨基酸序列

[0489]
```
MDRLLRLGGGMPGLGQGPPTDAPAVDTAEQVYISSLALLKMLKHGRAGVPMEVMGLMLGE

FVDDYTVRVIDVFAMPQSGTGVSVEAVDPVFQAKMLDMLKQTGRPEMVVGWYHSHPGFGC
WLSGVDINTQQSFEALSERAVAVVVDPIQSVKGKVVIDAFRLINANMMVLGHEPRQTTSN
LGHLNKPSIQALIHGLNRHYYSITINYRKNELEQKMLLNLHKKSWMEGLTLQDYSEHCKH
NESVVKEMLELAKNYNKAVEEEDKMTPEQLAIKNVGKQDPKRHLEEHVDVLMTSNIVQCL
AAMLDTVVFK

--------------------------------------------------------------------
```

[0490] “选择的靶蛋白”是技术人员希望在细胞或哺乳动物(例如,人受试者)中选择性地降解和/或抑制的蛋白质。根据本发明,当靶蛋白经受如本文所述的双功能分子时,将发生靶蛋白的降解。靶蛋白的降解将降低蛋白质水平,并且降低靶蛋白在细胞中的作用。本发明提供的蛋白质水平的控制提供了疾病状态或病况的治疗,其通过降低患者细胞中的该蛋白质的水平而通过靶蛋白进行调节。

[0491] “靶蛋白结合配偶体”是指与选择的靶蛋白结合的配偶体。靶蛋白结合配偶体是选择性地与靶蛋白结合的分子。根据本发明的双功能分子含有靶蛋白结合配偶体,所述靶蛋白结合配偶体以足够的结合亲和力与靶蛋白结合,使得该靶蛋白相比于未与双功能分子结合的靶蛋白更易于进行蛋白水解。

[0492] 术语“选择的靶蛋白”是指由本领域技术人员选择作为蛋白质降解的靶标的蛋白

质。

[0493] 术语“连接基团”以其最简单的形式是指包含-CH_2-重复亚单元的烷基连接基团；其中重复次数为1至50，例如1-50、1-40、1-30、1-20、1-19、1-18、1-17、1-16、1-15、1-14、1-13、1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3和1-2。术语“连接基团”还是指包含乙二醇(C_2H_4O)重复亚单元的聚乙二醇(PEG)连接基团，例如具有约1-50个乙二醇亚单元，例如其中重复次数为1至100，例如1-50、1-40、1-30、1-20、1-19、1-18、1-17、1-16、1-15、1-14、1-13、1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3和1-2。期望“连接基团”具有一定具有长度和柔性，使得靶蛋白结合配偶体和Rpn11结合配偶体在特定距离内。例如，经由连接基团连接的本发明的双功能分子的Rpn11结合配偶体和靶蛋白结合配偶体可以分开18-95Å的距离，例如对于包含2-4个乙二醇亚单元的连接基团为18-25Å，对于包含4-6个乙二醇亚单元的连接基团为25-33Å，对于包含6-8个乙二醇亚单元的连接基团为33-39Å，对于包含8-12个乙二醇亚单元的连接基团为39-53Å，并且对于包含12-24个乙二醇亚单元的连接基团为53至95Å。在一个实施方案中，经由连接基团连接的本发明的双功能分子的Rpn11结合配偶体和靶蛋白结合配偶体可以分开7至80个原子的距离，例如对于包含2-4个乙二醇亚单元的连接基团为7-13个原子，对于包含4-6个乙二醇亚单元的连接基团为13-19个原子，对于包含6-8个乙二醇亚单元的连接基团为19-25个原子，对于包含8-12个乙二醇亚单元的连接基团为25-41个原子，并且对于包含12-24个乙二醇亚单元的连接基团为41-80个原子。在一些实施方案中，连接基团是单个原子，例如-CH_2-或-O-。在一些实施方案中，连接基团是肽连接基团。

[0494] 本发明的连接基团可以具有与连接基团中的可旋转键的数目相对应的柔性程度。可旋转键被定义为与非末端重原子键合的单个非环键。酰胺(C-N)键由于具有很高的旋转能垒而不被认为是可旋转的。本发明提供了具有特定柔性程度或范围的连接基团。可以通过包括环、双键和酰胺来设计这样的连接基团，以降低连接基团的柔性。具有高柔性程度的连接基团将是未取代的PEG或烷基连接基团。

[0495] 本发明还包括前药。如本文中使用的，术语“前药”是指通过某些生理化学过程在体内转化为母体药物的药剂(例如，前药在达到生理pH时被转化为所需药物形式)。前药通常是有用的，因为在某些情况下，它们可能比母体药物更易于施用。例如，它们通过口服施用可能具有生物利用度，而母体药物则不能。与母体药物相比，前药在药理学组合物中还可以具有改善的溶解度。前药的非限制性的一个实例将是本发明的化合物，其中它以酯的形式(“前药”)施用，以促进在水溶性是不利的情况下跨越细胞膜的传送，但是一旦在其中水溶性是有利的细胞中，其被代谢性地水解为羧酸。前药具有许多有用的性质。例如，前药可能比最终药物更可溶于水，从而有利于药物的静脉内施用。前药还可以具有比最终药物更高的口服生物利用度水平。施用后，将前药酶促裂解或化学裂解，以在血液或组织中递送最终药物。

[0496] 示例性的前药在裂解后释放相应的游离酸，并且本发明化合物的这种可水解的酯形成残基包括但不限于羧酸取代基(例如，-C(0)2H或含有羧酸的部分)，其中游离氢被(Ci-C4)烷基、(C2-Ci2)烷酰氧基甲基、(C4-C9)1-(烷酰氧基)乙基、具有5至10个碳原子的1-甲

基-1-(烷酰氧基)-乙基、具有3至6个碳原子的烷氧基羰基氧基甲基、具有4至7个碳原子的1-(烷氧基羰基氧基)乙基、具有5至8个碳原子的1-甲基-1-(烷氧基羰基氧基)乙基、具有3至9个碳原子的N-(烷氧基羰基)氨基甲基、具有4至10个碳原子的1-(N-(烷氧基羰基)氨基)乙基、3-酞基、4-巴豆内酯基、γ-丁内酯-4-基、二-N,N-(Ci-C2)烷基氨基(C2-C3)烷基(诸如二甲基氨基乙基)、氨基甲酰基-(Ci-C2)烷基、N,N-二(Ci-C2)-烷基氨基甲酰基-(Ci-C2)烷基以及哌啶基-、吡咯烷基-或吗啉基(C2-C3)烷基取代。

[0497] 其他示例性的前药释放本发明的化合物的醇或胺,其中羟基或胺取代基的游离氢被(C1-C6)烷酰氧基甲基、1((C1-C6)烷酰氧基)乙基、1-甲基-14(Ci-C6)烷酰氧基)乙基、(C1-C6)烷氧基羰基-氧基甲基、N-(Ci-C6)烷氧基羰基氨基-甲基、琥珀酰基、(C1-C6)烷酰基、a-氨基(C1-C4)烷酰基、芳基酰基和a-氨基酰基或者a-氨基酰基-a-氨基酰基取代,其中所述a-氨基酰基部分独立地是蛋白质中出现的天然存在的L-氨基酸、-P(O)(OH)2、-P(O)(O(C1-C6)烷基)2或糖基(由碳水化合物的半缩醛的羟基的脱离产生的基团)中的任一种。

[0498] 如本文中使用的短语“保护基团”意指保护潜在的反应性官能团免受不希望的化学转化的临时取代基。这样的保护基团的实例分别包括羧酸的酯、醇的甲硅烷基醚以及醛和酮的缩醛和缩酮。已经综述了保护基团化学领域(Greene、T.W.;Wuts、P.G.M.Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基团)、第2版;Wiley:New York、1991)。本发明化合物的保护形式包括在本发明的范围内。

[0499] 如本文中使用的术语“化学保护形式”涉及这样的化合物,其中一个或多个反应性官能团被保护免受不希望的化学反应,即处于受保护基团或保护基团(也称为受掩蔽基团或掩蔽基团)的形式。以化学保护形式制备、纯化和/或处理活性化合物可能是方便的或期望的。

[0500] 通过保护反应性官能团,可以进行涉及其他未保护的反应性官能团的反应,而不影响受保护的基团;通常可以在随后的步骤中移除保护基团,而基本上不影响分子的其余部分。参见例如Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基团)(T.Green和P.Wuts、Wiley、1991)以及Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的保护基团)(T.Green和P.Wuts;第3版;John Wiley&Sons,1999)。

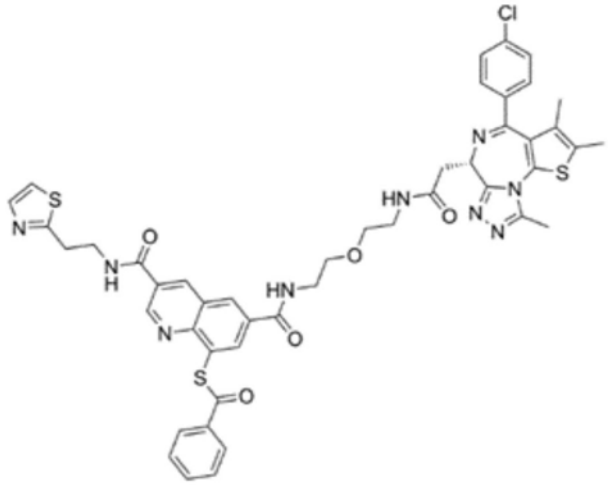
[0501] 例如,羟基可以以醚(-OR)或酯(-OC(=O)R)形式进行保护,例如以以下形式进行保护:叔丁基醚;苄基、二苯甲基(二苯基甲基)或三苯甲基(三苯基甲基)醚;三甲基甲硅烷基或叔丁基二甲基甲硅烷基醚;或乙酰基酯(-OC(=O)CH3,-OAc)。

[0502] 例如,醛基或酮基可以分别以缩醛或缩酮形式进行保护,其中通过与例如伯醇反应将羰基基团(C(=O))转化为二醚(C(OR)2)。醛基或酮基容易通过在酸的存在下使用大量过量的水进行水解来再生。

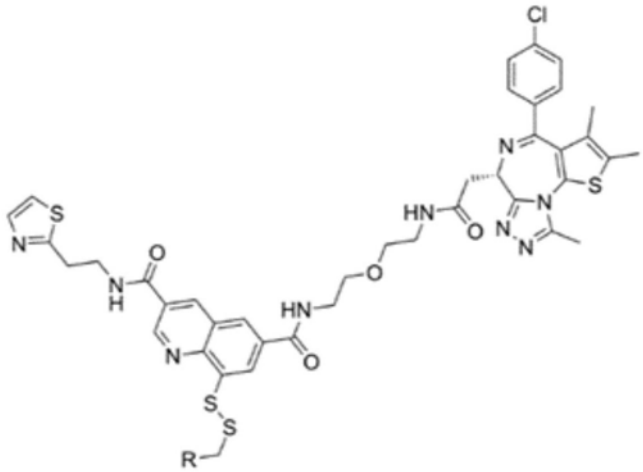
[0503] 例如,胺基可以以例如酰胺(-NRC(=O)R)或尿烷(-NRC(=O)OR)形式进行保护,例如以以下形式进行保护:甲基酰胺(-NHC(=O)CH3);苄氧基酰胺(-NHC(=O)OCH2C6H5NHCbz);叔丁氧基酰胺(-NHC=(=O)OC(CH3)3,-NHBoc);2-联苯基-2-丙氧基酰胺(-NHC(=O)OC(CH3)2C6H4C6H5NHBoc)、9-芴基甲氧基酰胺(-NHFmoc)、6-硝基藜芦基氧基酰胺(-NHNvoc)、2-三甲基甲硅烷基乙氧基酰胺(-NHTeoc)、2,2,2-三氯乙基氧基酰胺(-NHTroc)、烯丙氧基酰胺(-NHAlloc)、2-(苯基磺酰基)乙氧基酰胺(-NHPsec);或在合适的情况下(例如,环状胺)的硝基氧基团。

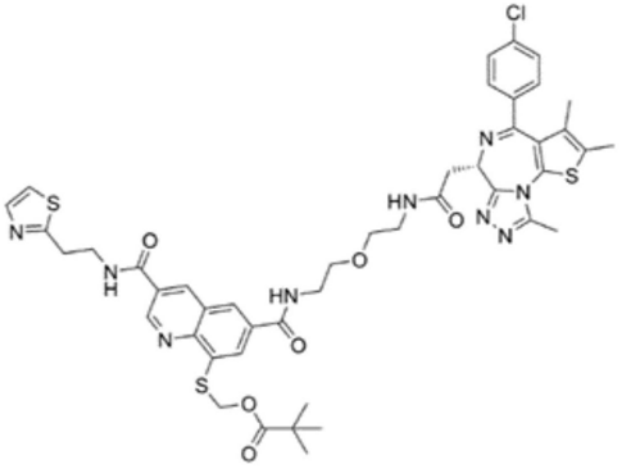
[0504] 例如,羧酸基团可以以酯或酰胺形式进行保护,例如以以下形式进行保护:苄酯;叔丁酯;甲酯;或甲基酰胺。例如,巯基可以以硫醚(-SR)的形式进行保护,例如以以下形式进行保护:苄基硫醚;或乙酰胺基甲基醚(-SCH2NHC(=O)CH3)。

[0505] 下面示出了通过化学保护基团的裂解或水解激活的前药的一些代表性实例。



[0506]





[0507] 缺氧激活前药

[0508] 本发明的前药还可以包括缺氧激活前药。低氧(缺氧)区域存在于各种生物环境

中，包括疾病状态、细菌感染和肿瘤环境。在肿瘤发展期间，由于代谢活跃的肿瘤细胞数量众多，所以供氧迅速成为生长限制因素。响应于供氧不足的问题，血管生成过程被启动以产生肿瘤脉管系统。然而，该脉管系统具有许多异常特征，并且尽管它设法维持肿瘤，但是它还导致了缺氧区域，在缺氧区域中仅最具侵袭性的肿瘤细胞部分可以存活。这些缺氧区域出现在距功能血管>100μm的距离处，并且它们可以是慢性的和急性的。缺氧细胞对放疗具有抗性，因为细胞杀伤所需的辐射诱导的DNA损伤以氧依赖性方式发生。缺氧细胞包括最具侵袭性的肿瘤部分，并且它们对于进行治疗以改善患者预后是最为重要的。本发明的前药利用了缺氧和常氧之间的化学环境的实质差异以将本发明的药物化合物靶向这些治疗上具有挑战性的肿瘤区域。

[0509] 如本文中使用的，术语“缺氧激活前药”或“HAP”是指这样的前药，其中该前药相对于相应的药物而言活性较低或无活性，并且包含药物和一个或多个生物可还原基团。HAP包括被多种还原剂和还原酶激活的前药，所述还原酶包括但不限于单电子转移酶(诸如细胞色素P450还原酶)和双电子转移(或氢化物转移)酶。在一些实施方案中，HAP是2-硝基咪唑触发的缺氧激活前药。HAP的实例包括但不限于TH-302和TH-281。US 2010/0137254和US 2010/0183742(通过引用结合于此)中描述了合成TH-302的方法。

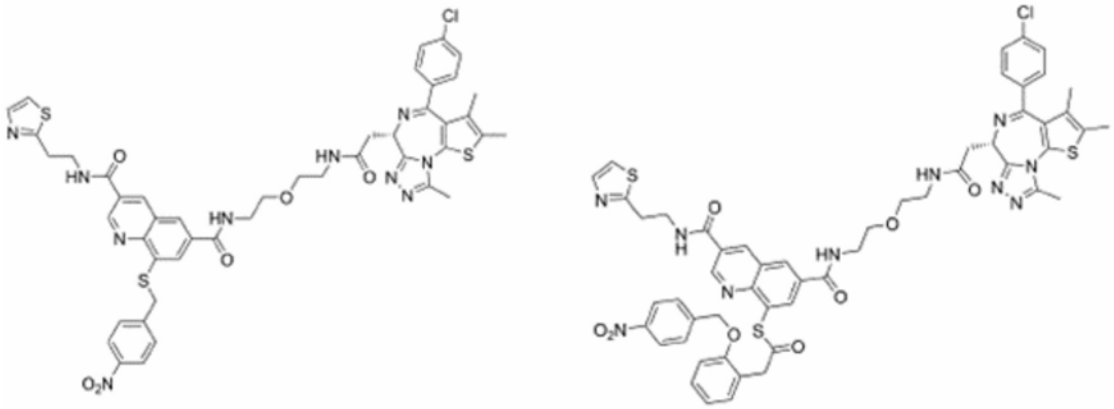
[0510] 通过使用本领域技术人员公知的技术，可以容易地将本发明的目标药物转化为缺氧激活前药。例如，O’Connor等人已经表明，可以通过向已知的Chk1和Aurora A激酶抑制剂中添加生物还原性的4-硝基苄基基团来产生Chk1和Aurora A激酶抑制剂的缺氧敏感性前药，由此实现将相关治疗化合物靶向缺氧区域的目标。许多缺氧激活前药使用1-甲基-2-硝基咪唑基团作为生物还原性官能团。已经确定了对生物还原敏感的五个不同化学部分，即硝基基团、醌、芳族N-氧化物、脂族N-氧化物和过渡金属。考虑到它们的广泛使用，基于硝基芳基的化合物是最适合用于生物还原性前药开发的化合物。除了4-硝基苄基和1-甲基-2-硝基咪唑基团以外，基于硝基呋喃和硝基噻吩的基团也已用作生物还原性化合物的基础。原则上，当选择使用哪个生物还原性基团时，最重要的考虑因素是其进行生物还原的倾向以及该过程发生时的氧浓度。另外，药物组分成为良好离去基团的倾向影响其从前药中释放的速率。将基于4-硝基苄基、硝基呋喃和硝基噻吩的基团连接至生物活性化合物所需的试剂可容易地从商业来源获得。O’Connor等人还描述了一种用于合成一系列衍生物的优化方案，所述衍生物具有可用的合成柄，用以连接至生物活性化合物(O’Connor等人，Nat Protoc.2016Apr;11(4):781-94，其内容通过引用整体结合于此)。

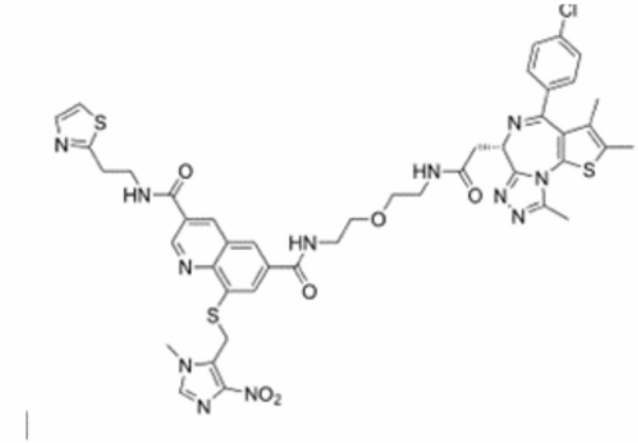
[0511] Sun等人(Clin Cancer Res.2012年2月1日;18(3):758-70，其内容通过引用整体结合于此)描述了优化的缺氧激活前药的设计标准，并且其可以包括药代动力学特性以确保足够的肿瘤递送和渗透;对非氧浓度依赖性的活化或失活还原酶具有稳定性;仅在严重缺氧的肿瘤组织而不是中等缺氧的正常组织中具有激活的高缺氧选择性;以及旁观者效应，其中邻近的肿瘤细胞(其缺氧不足以激活前药)仍然被可扩散的效应物部分靶向。一些早期的实例是前药，包括醌生物还原药(诸如泊非霉素(porfiromycin))、N-氧化物(诸如替拉扎明(tirapazamine))和硝基芳族药剂(诸如CI-1010)。已进入临床试验的前药的一些实例包括替拉扎明、PR104、AQ4N和TH-302(28-31)。TH-302(1-甲基-2-硝基-1H-咪唑5-基)N、NO-双(2-溴乙基)二酰胺基磷酸酯是异磷酰胺氮芥的溴化版本的2-硝基咪唑-连接的前药。TH-302的2-硝基咪唑部分是细胞内的1-电子还原酶的底物，并且当在深度缺氧条件下还原

时,其释放Br-IPM。采用人癌细胞系的体外细胞毒性和克隆形成测定表明,TH-302在常氧条件下几乎不具有细胞毒性活性并且在缺氧条件下大大提高了细胞毒性效力。可以将TH-302的硝基咪唑部分并入目标药物化合物中以产生本发明的前药化合物。

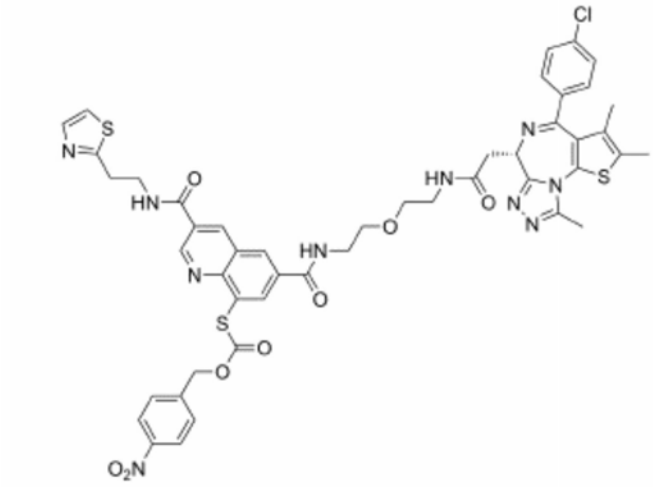
[0512] Rui Zhu等人(J.Med.Chem.2011,54,7720-7728;其内容通过引用整体结合于此)描述了使用4-硝基苄氧基羰基衍生物作为用于开发缺氧激活前药化合物的部分。Rui Zhu等人公开了可以连接至目标药物以产生缺氧敏感性前药或缺氧激活前药的三个不同部分。它们包括(6-(苄基氧基)-9H-嘌呤-2-基)氨基甲酸4-硝基苄酯(1)及其单甲基(2)和偕-二甲基类似物。Rui Zhu等人还教导了用于选择用于产生前药的部分的所需特质。它们包括(a)还原硝基基团的容易性和程度,(b)硝基基团相对于侧链的相对位置,以及(c)当硝基基团被转化为羟基氨基或氨基官能团时C O键断裂的容易性,其中C为苄基碳。

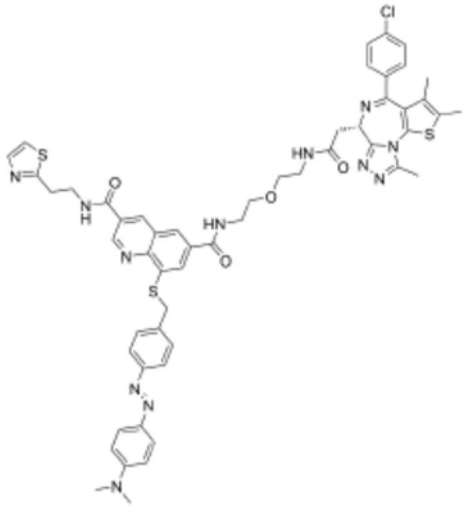
[0513] 下面示出了在肿瘤微环境中发现的通过缺氧激活的前药的一些代表性实例。

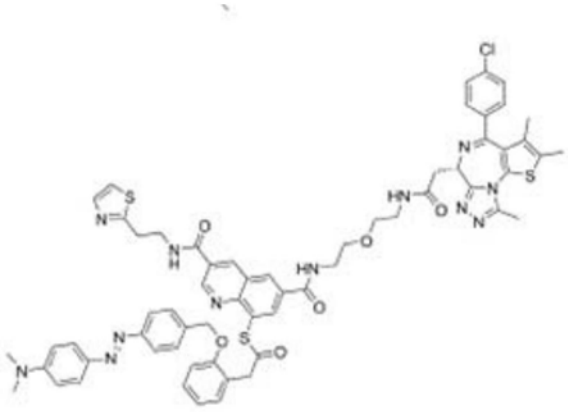


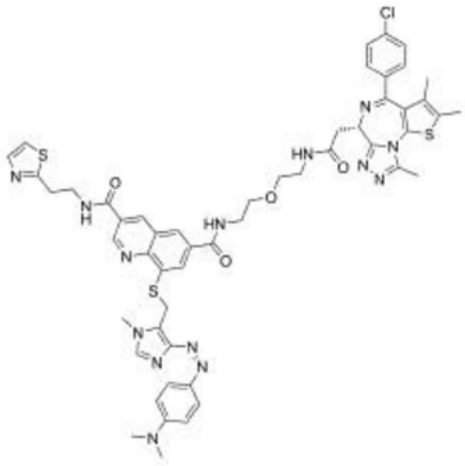


[0514]

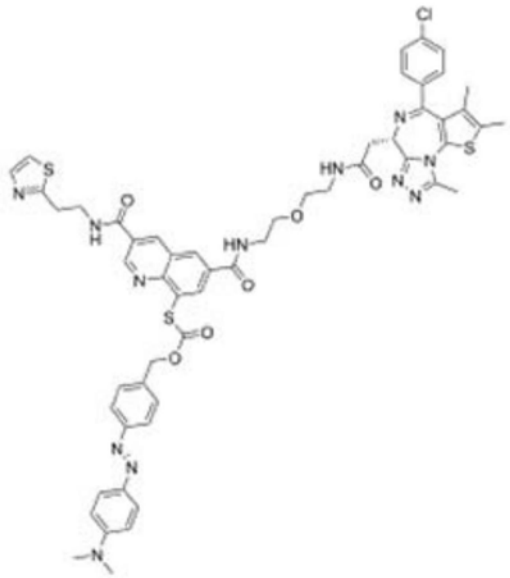


[0515] 





[0516]



[0517] pH敏感性前药

[0518] 本发明的前药还可以包括pH敏感性前药。如本文中使用的，术语“pH敏感性前药”是指这样的前药，其中该前药相对于相应的药物而言活性较低或无活性，并且包含药物和一个或多个pH不稳定性基团。当暴露于酸性微环境中时，pH敏感性前药发生pH不稳定性基团的裂解，从而激活目标药物并且促进定点释放。pH敏感性前药可以包括适于口服施用的胃滞留性质，其包含一个或多个pH敏感性部分和治疗剂，其中pH敏感性部分允许在小肠的

升高的pH中或酸性肿瘤微环境或内体或溶酶体环境(～pH5)中释放治疗性目标药物。

[0519] pH触发的药物释放是针对癌症的重要治疗类型并且已得到广泛利用。众所周知，癌细胞的内体(pH 5.0-6.5)和溶酶体(pH 4.5-5.0)的pH值比7.4的生理pH的更为酸性。在引入pH敏感性连接时，可以将目标药物缀合至聚合物主链，当它们被内化到癌细胞内时可以充当储存器。一旦降解，治疗性有效载荷可以以其原始活性形式直接释放，起到治疗作用。

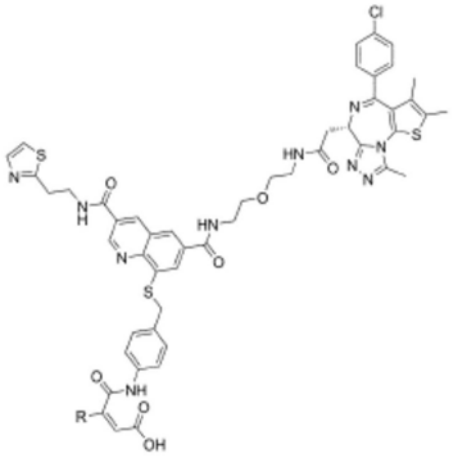
[0520] 使用近红外(NIR)光的光热疗法(PTT)已被认为是化学疗法的有力补充，以在破坏癌组织方面提供组合效果。另外，PTT产生的热量可以增强细胞代谢和细胞膜通透性，这促进癌细胞的药物摄入，从而增强治疗效果。

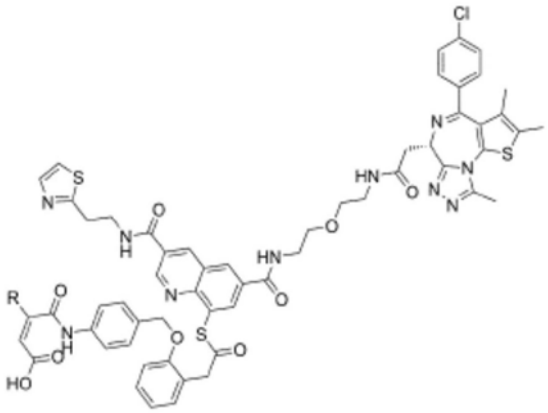
[0521] 通过使用本领域技术人员公知的技术，可以容易地将本发明的目标药物转化为pH敏感性前药。例如，Sun等人(Mol.Pharmaceutics 2018,15,3343-3355;其内容通过引用整体结合于此)描述了制造无货且pH响应性的纳米药物以将DOX(阿霉素(Doxorubicin))和SN38(7-乙基-10-羟基喜树碱)共同递送至癌细胞的简单方法。该无货纳米药物由前药(PEG-CH＝N-DOX)和SN38构成。PEG和DOX之间的pH敏感性部分或亚胺连接基团促进了酸性条件下快速药物释放。这样的pH敏感性前药展现出有效的细胞摄入能力、高肿瘤穿透能力以及通过增强的通透性和滞留性(EPR)效应而增强的被动靶向能力。可以使用本领域技术人员已知的标准合成化学方法将这样的pH敏感性亚胺连接基团连接至本发明的目标药物以产生pH敏感性前药。

[0522] 类似地，Zhang等人(European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 128(2018)260-271，其内容通过引用整体结合于此)描述了pH敏感性前药缀合的聚多巴胺，用于NIR触发的协同化学光热疗法。化学疗法与光热疗法(PTT)的组合表现出对有效的肿瘤药物治疗高度理想。Zhang等人教导了含有喜树碱(CPT)的聚合物前药(PCPT)可以通过使用可逆加成-断裂转移(RAFT)策略将pH敏感性喜树碱(CPT)前药单体和MPC聚合来制造。通过酰胺化化学将pH敏感性聚合物前药束缚在聚多巴胺(PDA)纳米颗粒的表面上，用以组合化学疗法与光热疗法。在酸性微环境中从多功能纳米颗粒中迅速释放的活性CPT归因于双功能甲硅烷基醚键的裂解。同时，PDA可以将近红外(NIR)光能以高效率转化为热量，这使得所得纳米颗粒成为光热疗法的有效平台。体外分析证实，PDA@PCPT纳米颗粒可以被HeLa细胞有效吸收，并且将CPT地送到癌细胞的细胞核中。细胞活力测定表明在808nm光照射下对HeLa癌细胞具有明显的体外细胞毒性。使用PDA@PCPT纳米颗粒提供的组合疗法，在荷瘤小鼠模型中也观察到显著的肿瘤消退。

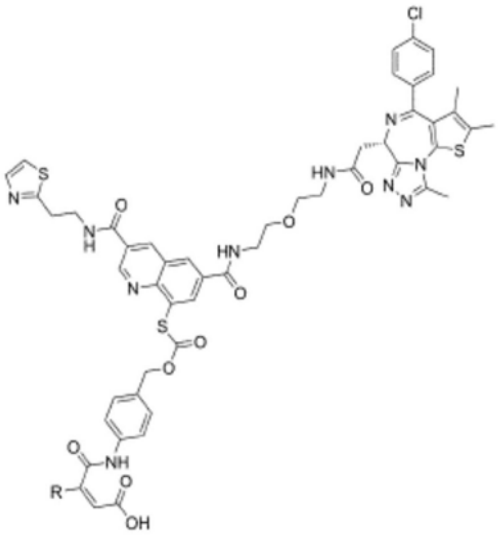
[0523] 由本发明的目标药物产生的本发明的pH敏感性前药将展现以下独特特征。(1)基于前药的聚合物囊泡避免了过早释放的问题;(2)除了起到药物载体作用以外，PDA核心还具有固有的光稳定性和优异的光热转化效率;(3)本发明的目标药物将经由pH敏感性甲硅烷基醚键与聚合物连接，该键可以在低pH下(尤其是在癌细胞的微环境下)裂解;以及(4)产生的局部高热和释放的药物可以协同地杀死癌细胞并且抑制肿瘤生长。因此，本领域技术人员可以使用本领域技术人员已知的标准合成化学方法通过将pH不稳定性连接基团或pH不稳定性部分如甲硅烷基醚键或亚胺连接基团连接至目标药物来产生pH敏感性前药。

[0524] 下面示出了在肿瘤微环境或溶酶体或内体中发现的通过pH改变激活的前药的一些代表性实例。





[0525]



[0526] 前药的其他实例可以显示出活化的双键(作为迈克尔受体)参与代谢活化。实例包括曼尼希碱、β砜、亚砜或磺酰胺衍生物、β氨基甲酸酯和碳酸酯衍生物以及处于吸电子基团β位的其他离去基团。

[0527] 术语“患者”和“受试者”在整个说明书中可互换使用,以描述哺乳动物,在某些实施方案中是人或驯养动物,向其提供了使用根据本发明的组合物的治疗,包括预防性治疗。在某些实施方案中,在本发明中,术语患者是指人类患者,除非从使用该术语的上下文中另外指明或暗示。

[0528] 术语“有效”用于描述化合物、组合物或组分的量,当在其预期用途的上下文中使用时该量实现了预期结果。术语“有效”包括所有其他有效量或有效浓度术语,其在本申请中其他地方描述或使用。

[0529] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。以下参考文献向技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,微生物学和分子生物学词典(Dictionary of Microbiology and

Molecular Biology)(第2版,1994);剑桥科学技术词典(The Cambridge Dictionary of Science and Technology)(Walker编著,1988);遗传学词汇(The Glossary of Genetics),第5版,R.Rieger等人(编著),Springer Verlag(1991);以及Hale&Marham,哈珀柯林斯生物学词典(The Harper Collins Dictionary of Biology)(1991)。如本文中使用的,除非另外指明,否则以下术语具有下面赋予它们的含义。

[0530] 在提供数值范围的情况中,应当理解,该范围的上限与下限之间相差下限十分之一(除非上下文另有清楚指明)(诸如在含有多个碳原子的基团的情况中,在该情况中提供了落入范围内的每个碳原子数)的每一个居间值及所叙述范围中任何其它叙述的或居间的值涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在本发明还涵盖的更小的范围中,服从所叙述的范围中任何具体排除的极限。在所记载的范围包括一个或两个极限的情况下,不包括那些被包括的极限中的任一个或两个的范围也包括在本发明内。

[0531] 参考本发明的以下详细描述和其中包括的实施例可以更容易地理解本发明。

[0532] 本文中提及的所有出版物通过引用结合于此以公开和描述关于所引用出版物的方法和/或材料。本文中讨论的出版物仅在本申请的申请日之前为了其公开内容而提供。本文中的任何内容都不应被解释为承认本发明无权通过优先权发明先于所述出版物。此外,本文中提供的出版物的日期可以不同于实际出版日期,其可能需要独立确认。

[0533] Rpn11结合配偶体

[0534] 本发明的Rpn11结合配偶体以在1pM-1mM的范围内或在100nM-100μM、100nM-1μM、100nM-10μM、10nM-100μM、10nM-50μM、10nM-10μM、10nM-5μM、10nM-1μM、10nM-100nM、1nM-100μM、1nM-10μM、1nM-1μM、1nM-100nM、1nM-10nM、1μM-100μM和1μM-10μM的子范围内的IC50与Rpn11结合。根据本领域中公知的方法测定IC50,例如泛素-罗丹明110水解测定。

[0535] 本发明的Rpn11结合配偶体和Rpn11的Kd在1pM-1mM的范围内或在100nM-100μM、100nM-1μM、100nM-10μM、10nM-100μM、10nM-50μM、10nM-10μM、10nM-5μM、10nM-1μM、10nM-100nM、1nM-100μM、1nM-10μM、1nM-1μM、1nM-100nM、1nM-10nM、1μM-100μM和1μM-10μM的子范围内。根据本领域中公知的方法(例如等温量热法(ITC)和表面等离子共振(SPR))测定Kd,以直接评价结合。

[0536] Rpn11结合配偶体与Rpn11的结合可以是可逆的。

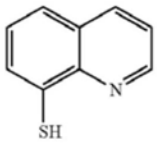
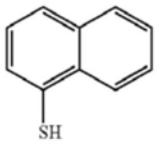
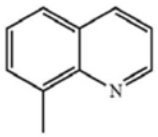
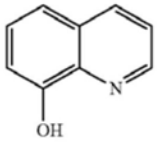
[0537] Rpn11结合配偶体与Rpn11的结合可以是不可逆的。

[0538] 根据本发明可用的Rpn11结合配偶体包括如下表1所示的分子。

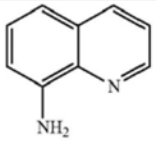
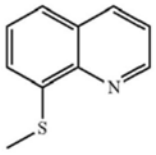
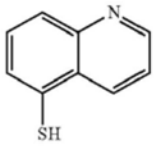
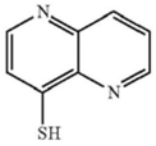
[0539] 表1

[0540] 表1-Rpn11结合配偶体包括但不限于以下各项:

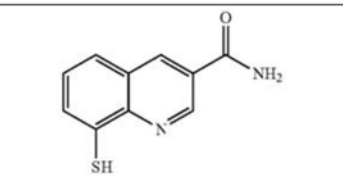
[0541]

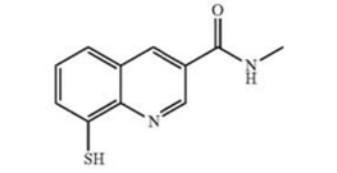
出版物	公开的化合物
US 2017/0050931	 8TQ   

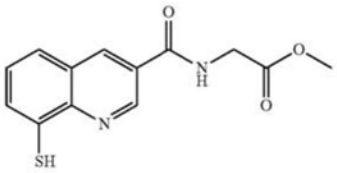
[0542]

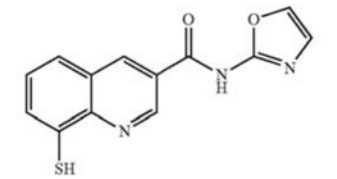
	   

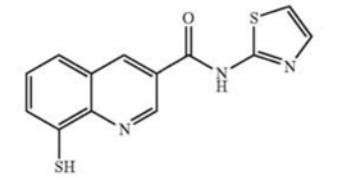
[0543]

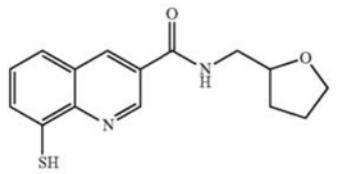


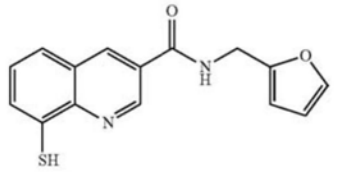




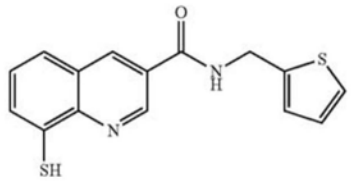
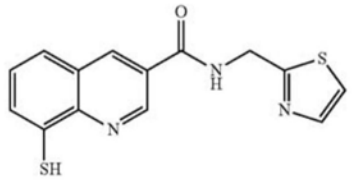
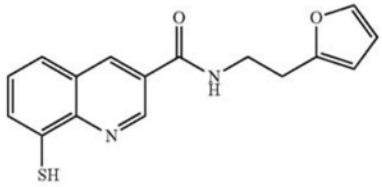
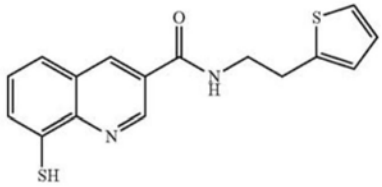
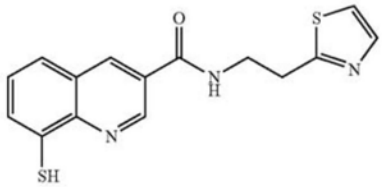
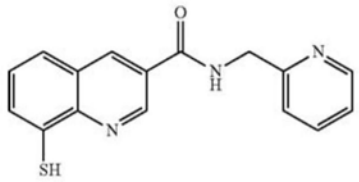
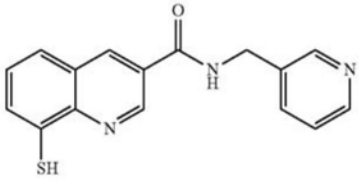




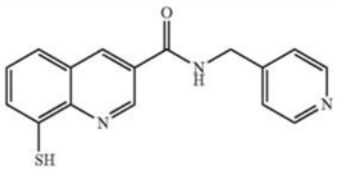
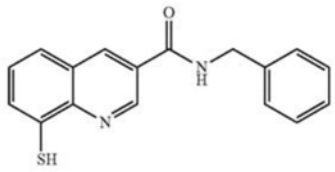
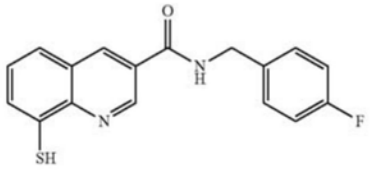
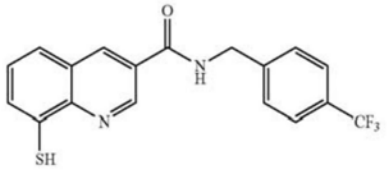
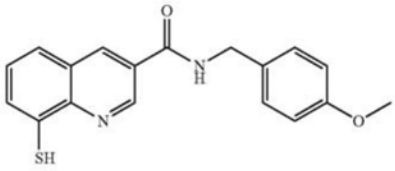
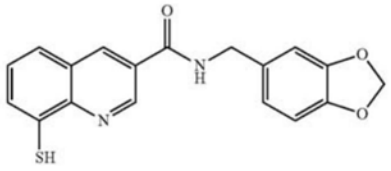
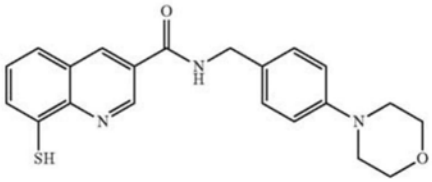




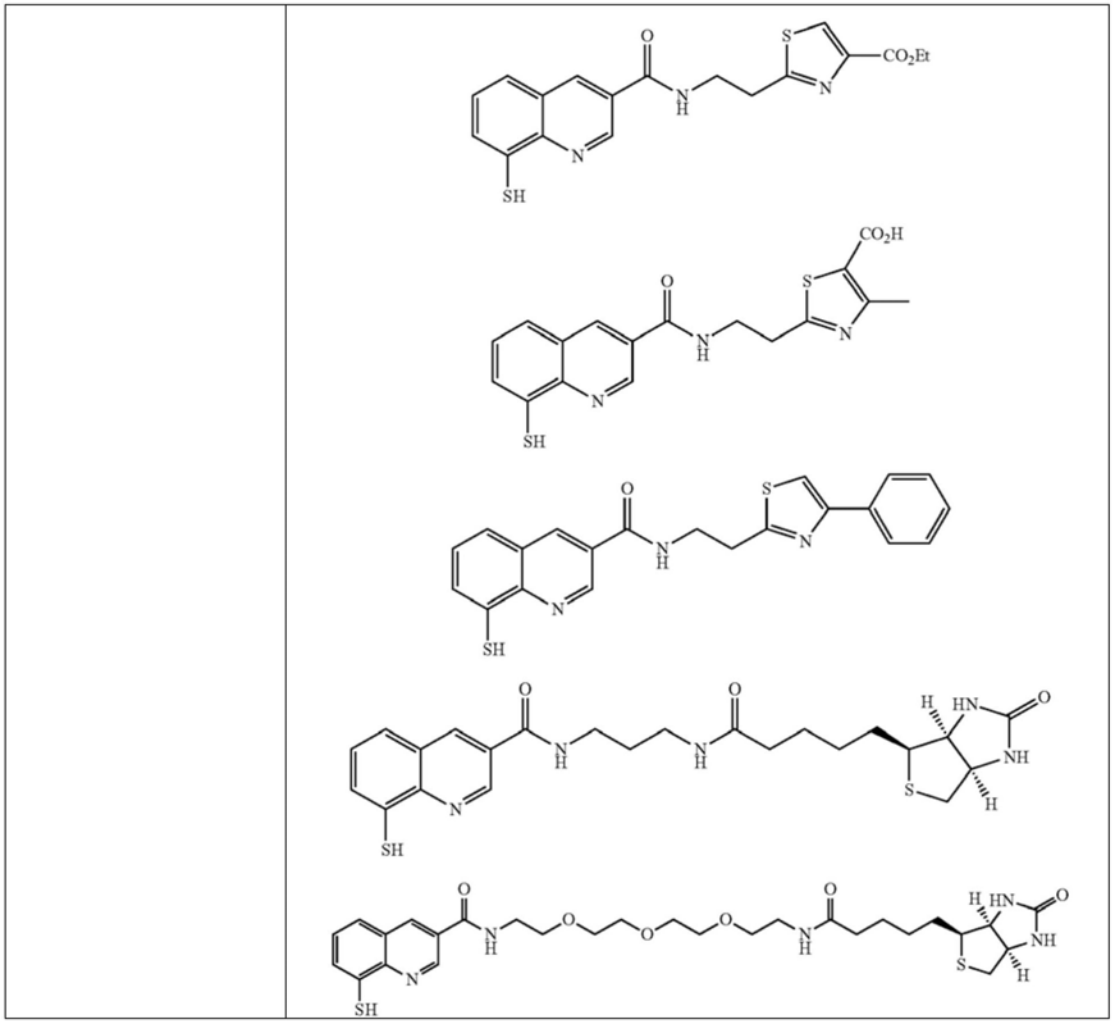
[0544]

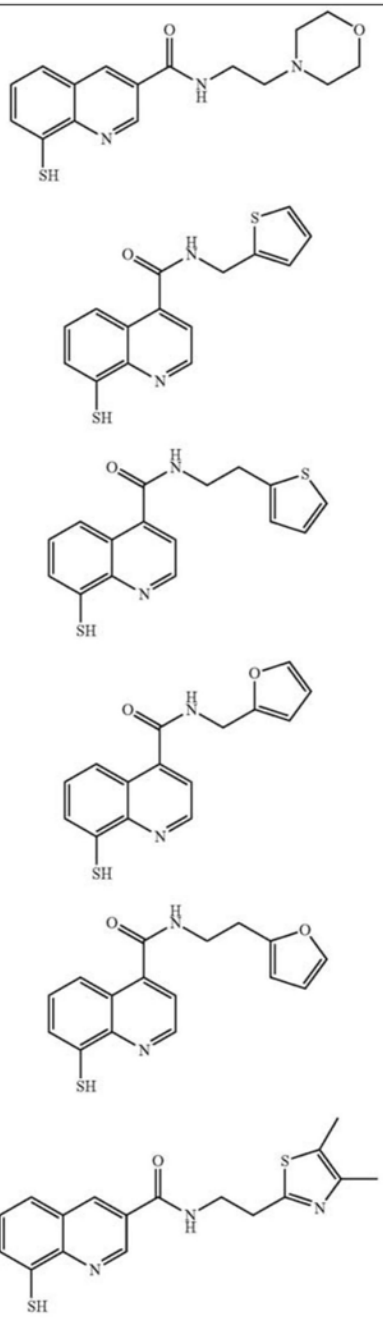
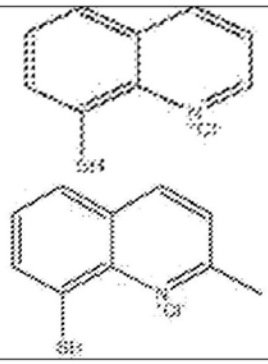
[0545]

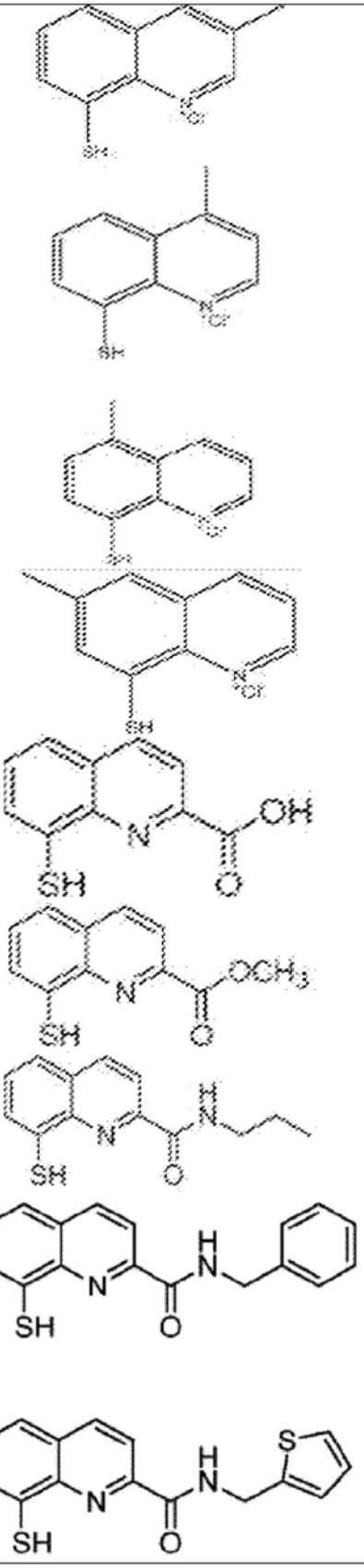
[0546]



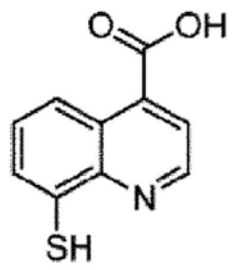
[0547]

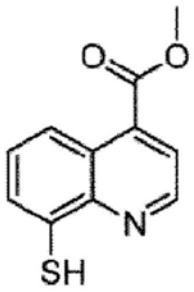
	
US 2014/0235548	

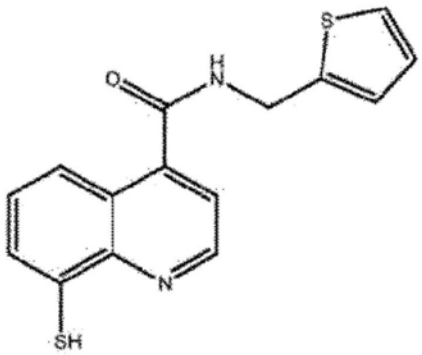
[0548]

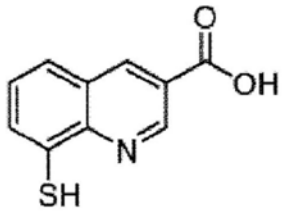


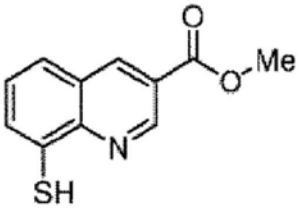
[0549]

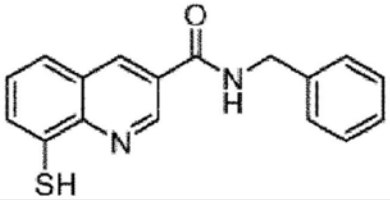




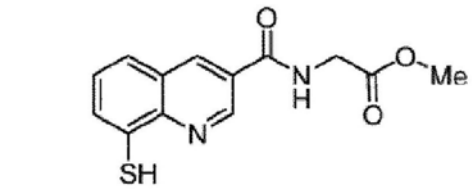
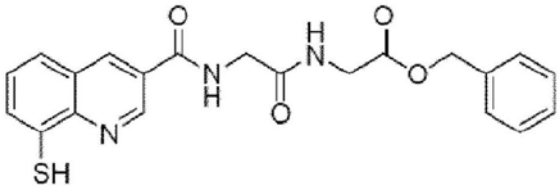
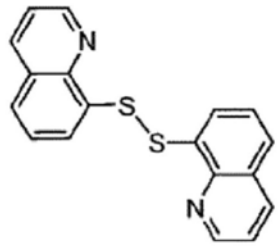
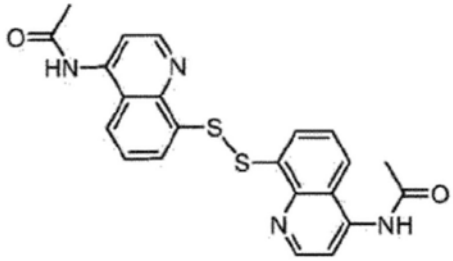
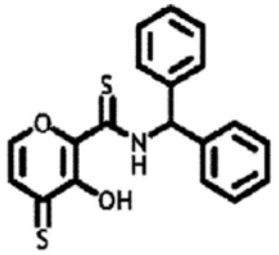
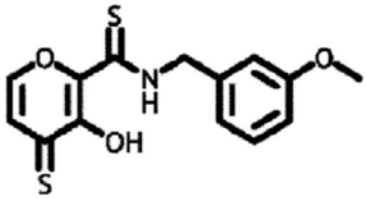




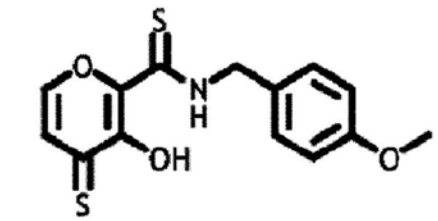
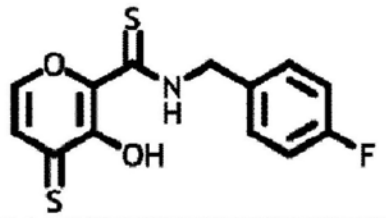
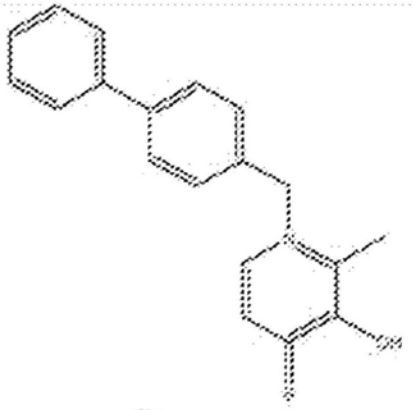
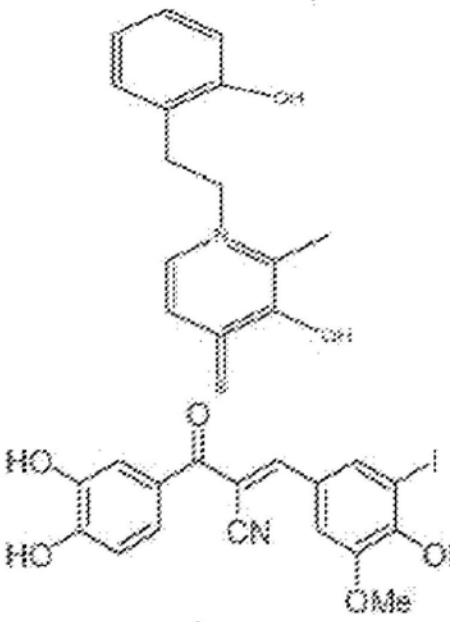
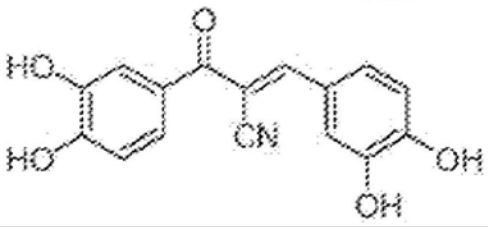




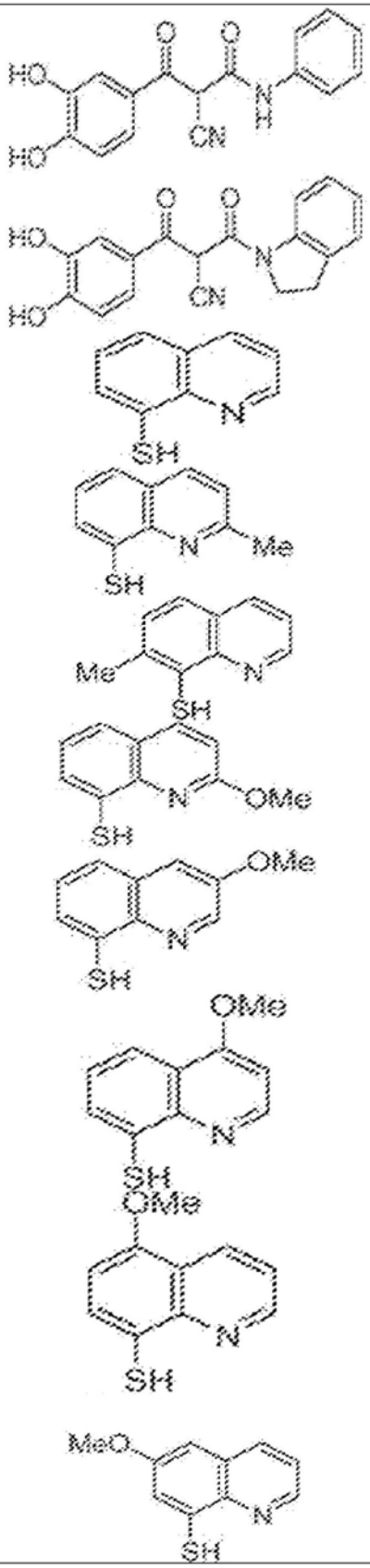
[0550]

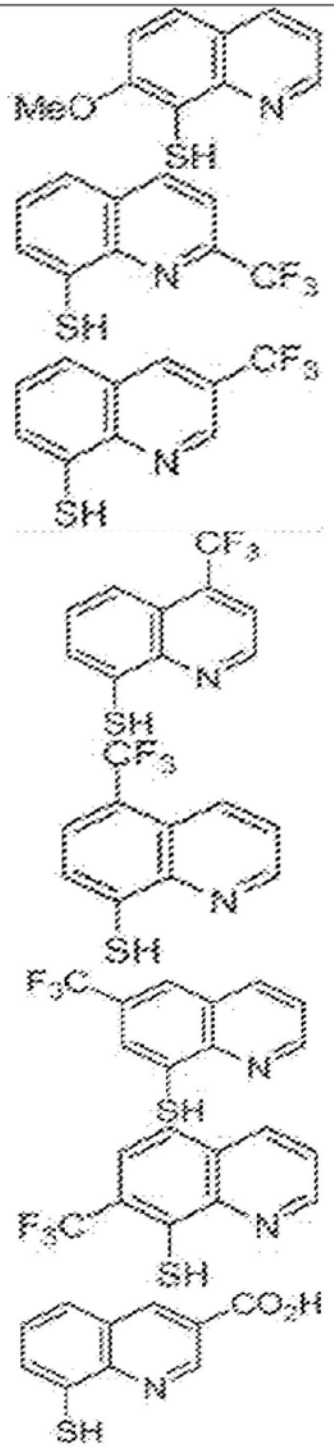
[0551]

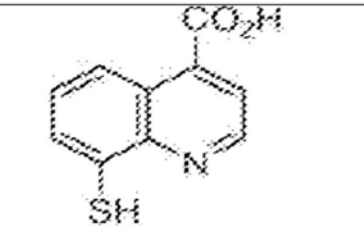
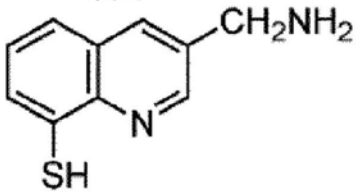
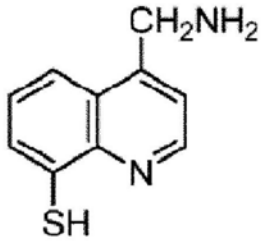
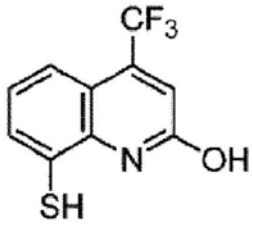
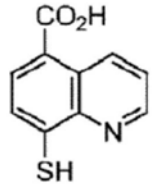
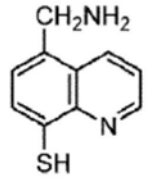
[0552]


HO
HO
O
O
N
H
CN
HO
HO
O
O
N
CN
N
SH
N
Me
SH
Me
N
SH
N
OMe
SH
OMe
N
SH
OMe
N
SH
OMe
N
SH
MeO
N
SH

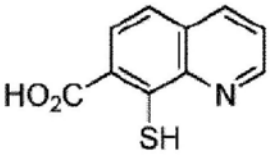
[0553]

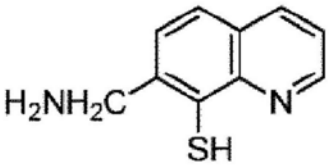


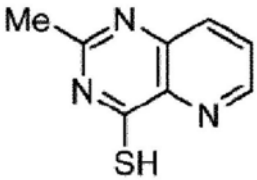
[0554]

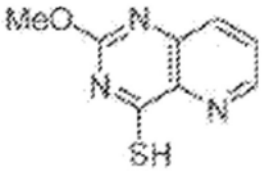
	     

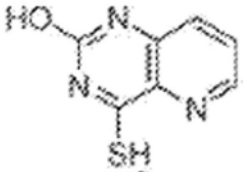
[0555]

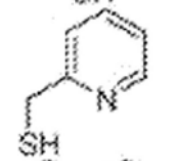


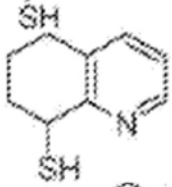


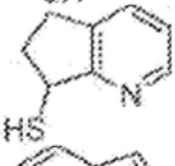


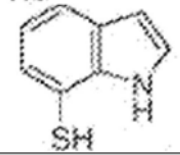




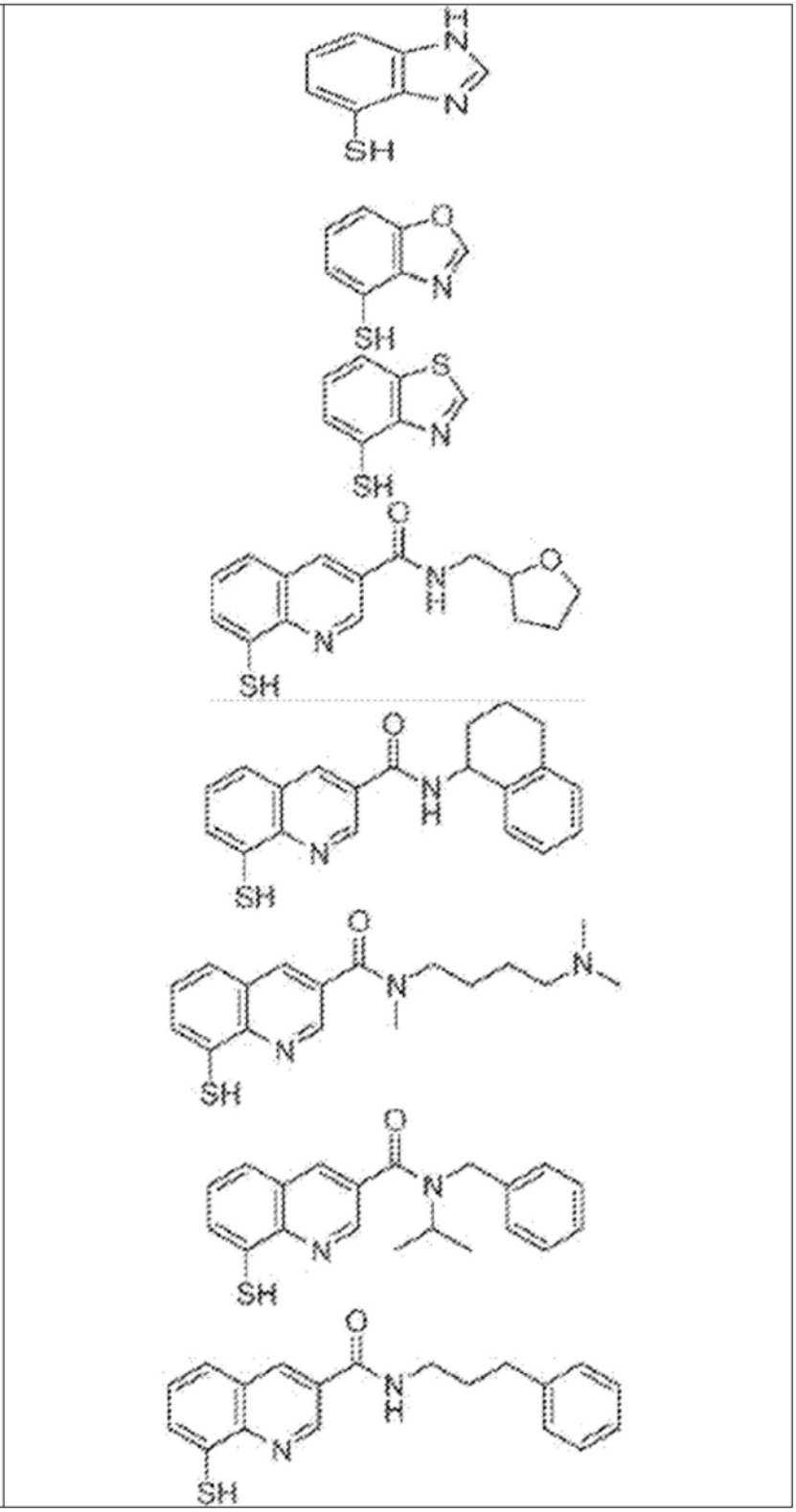




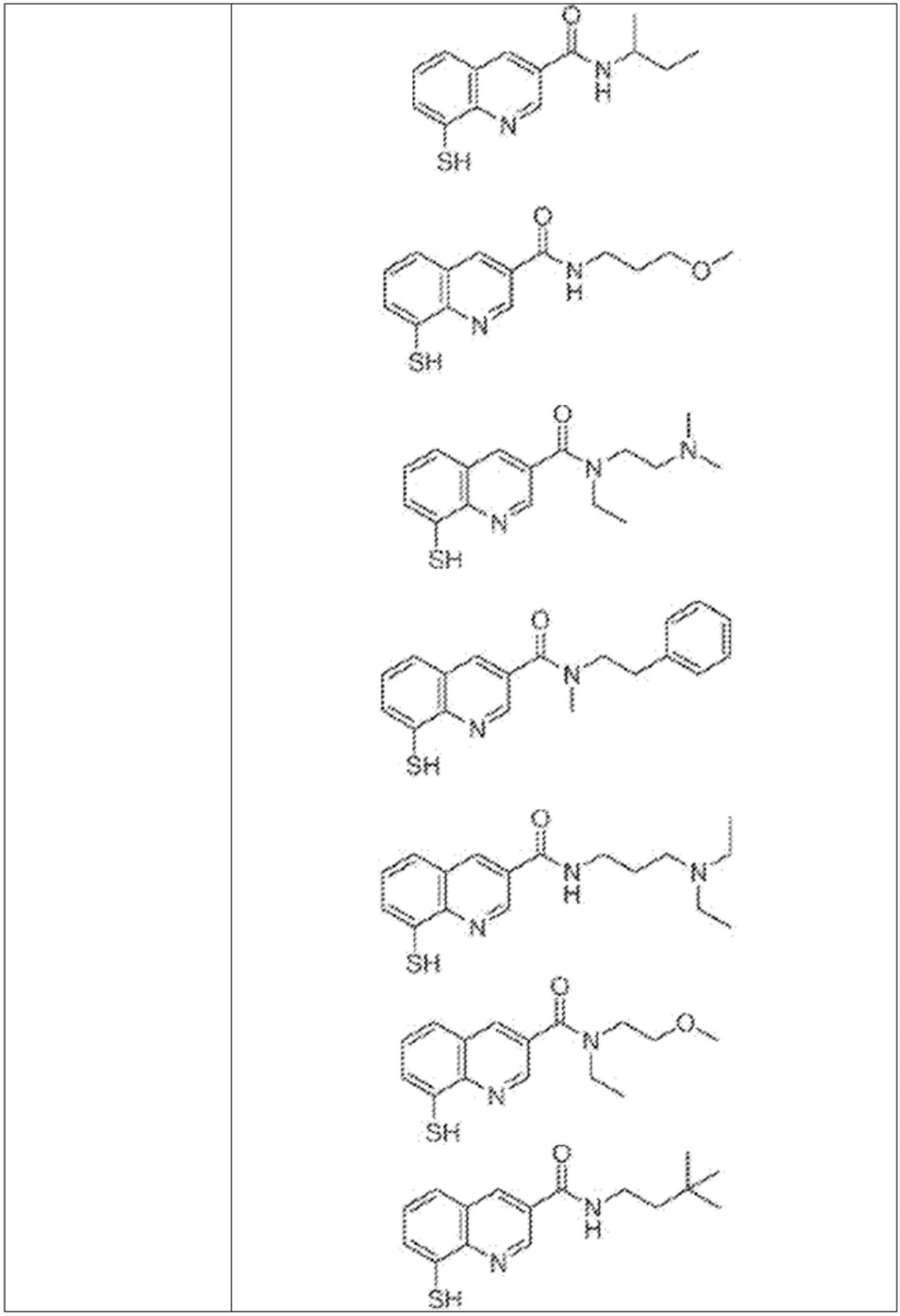




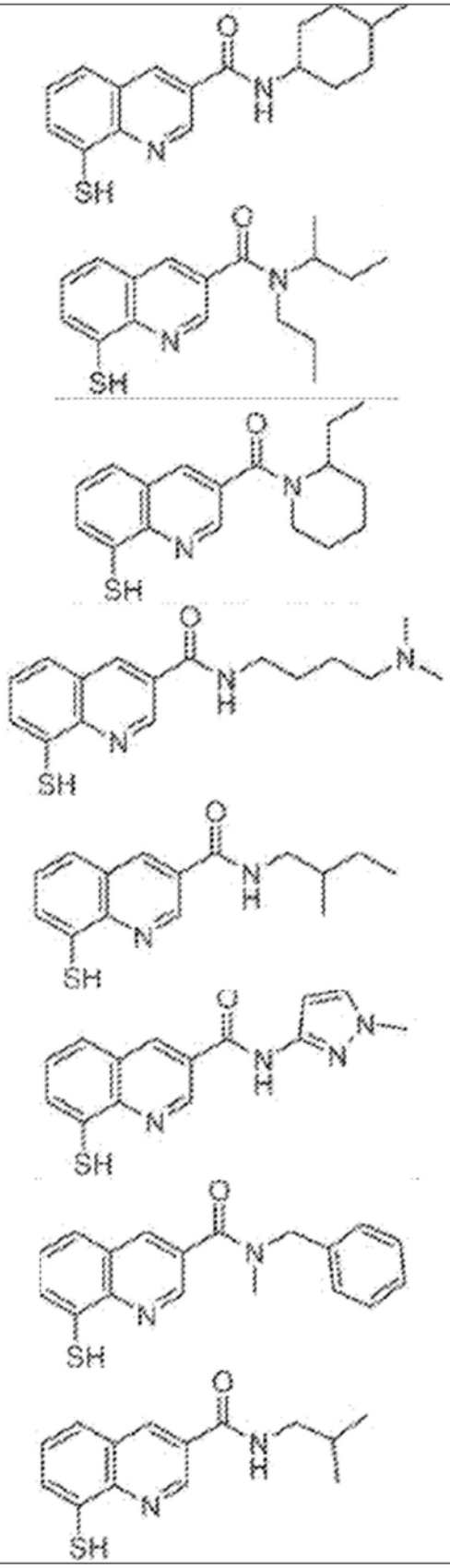
[0556]



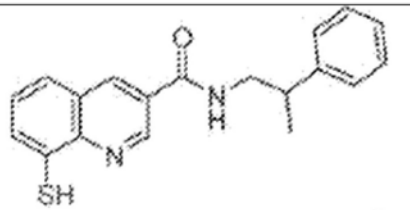
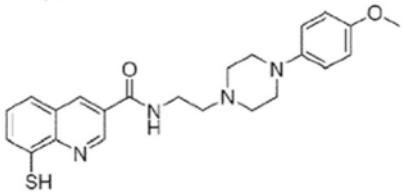
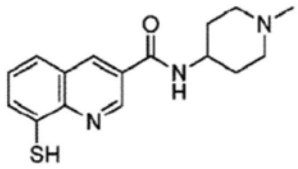
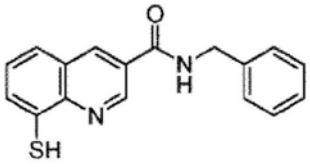
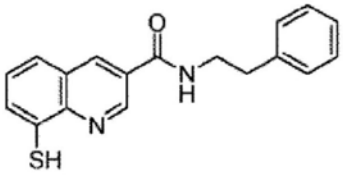
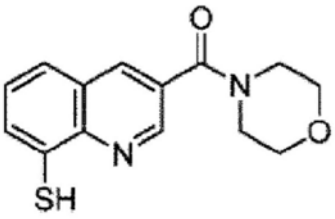
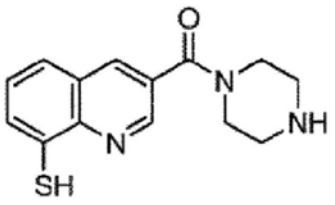
[0557]



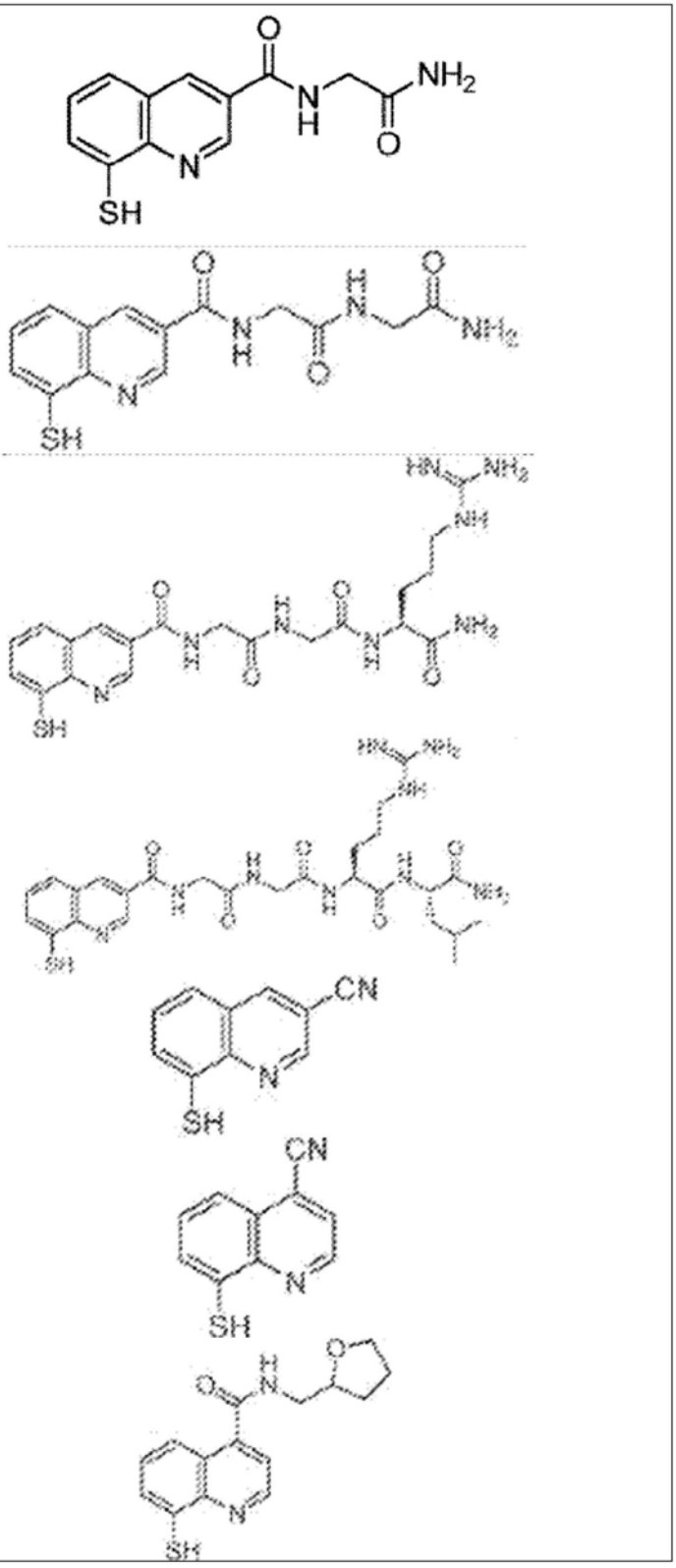
[0558]



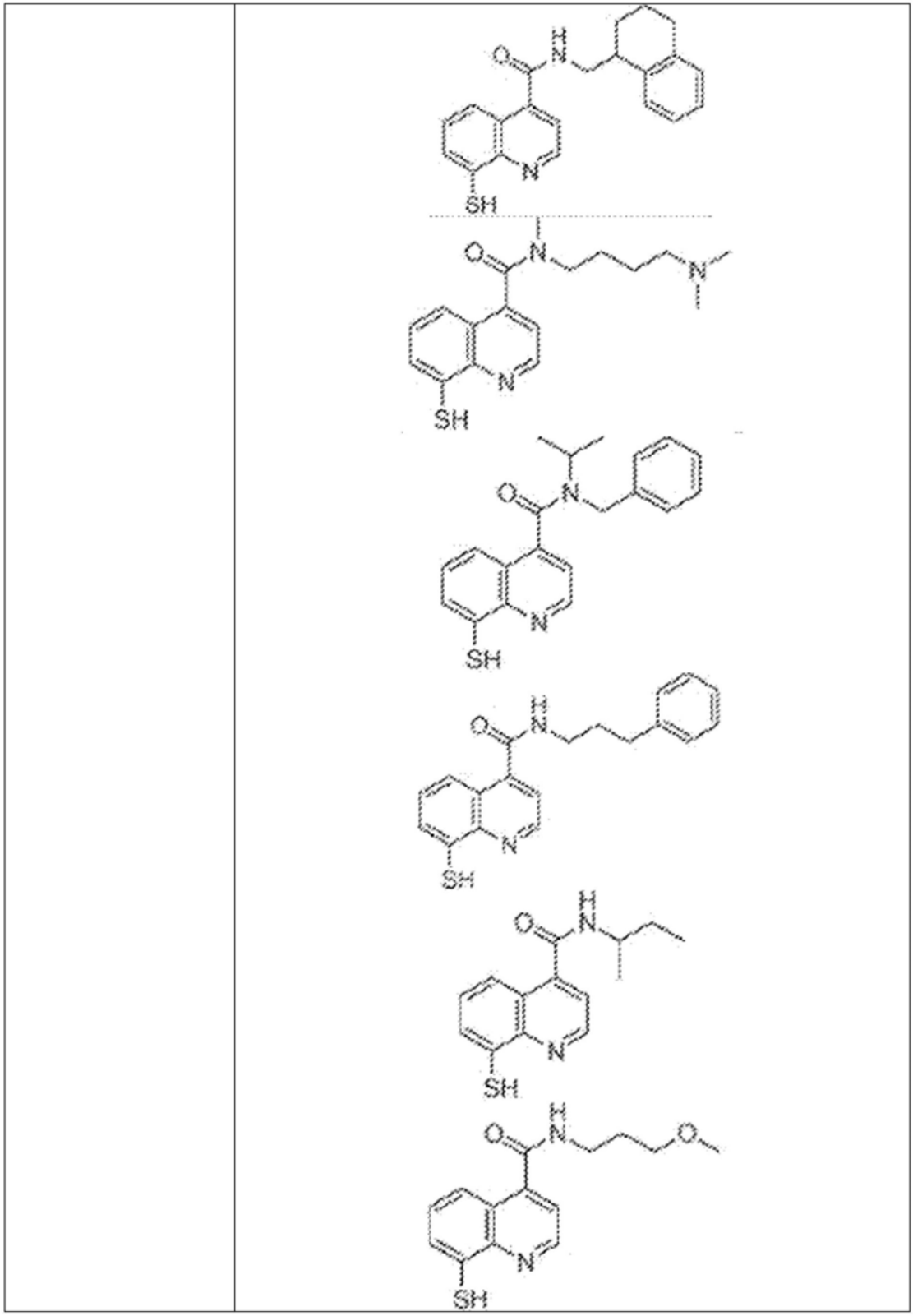
[0559]

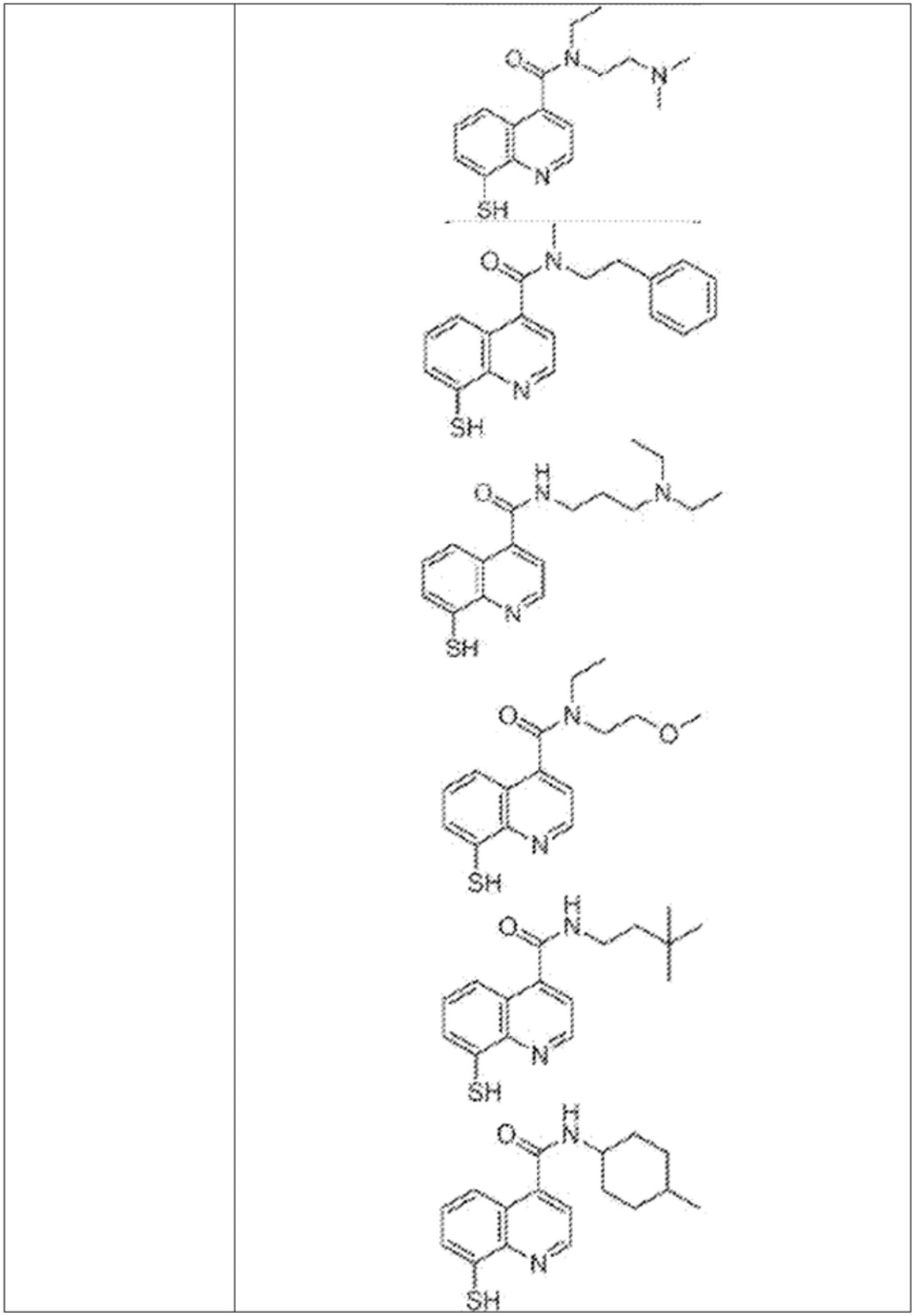
[0560]



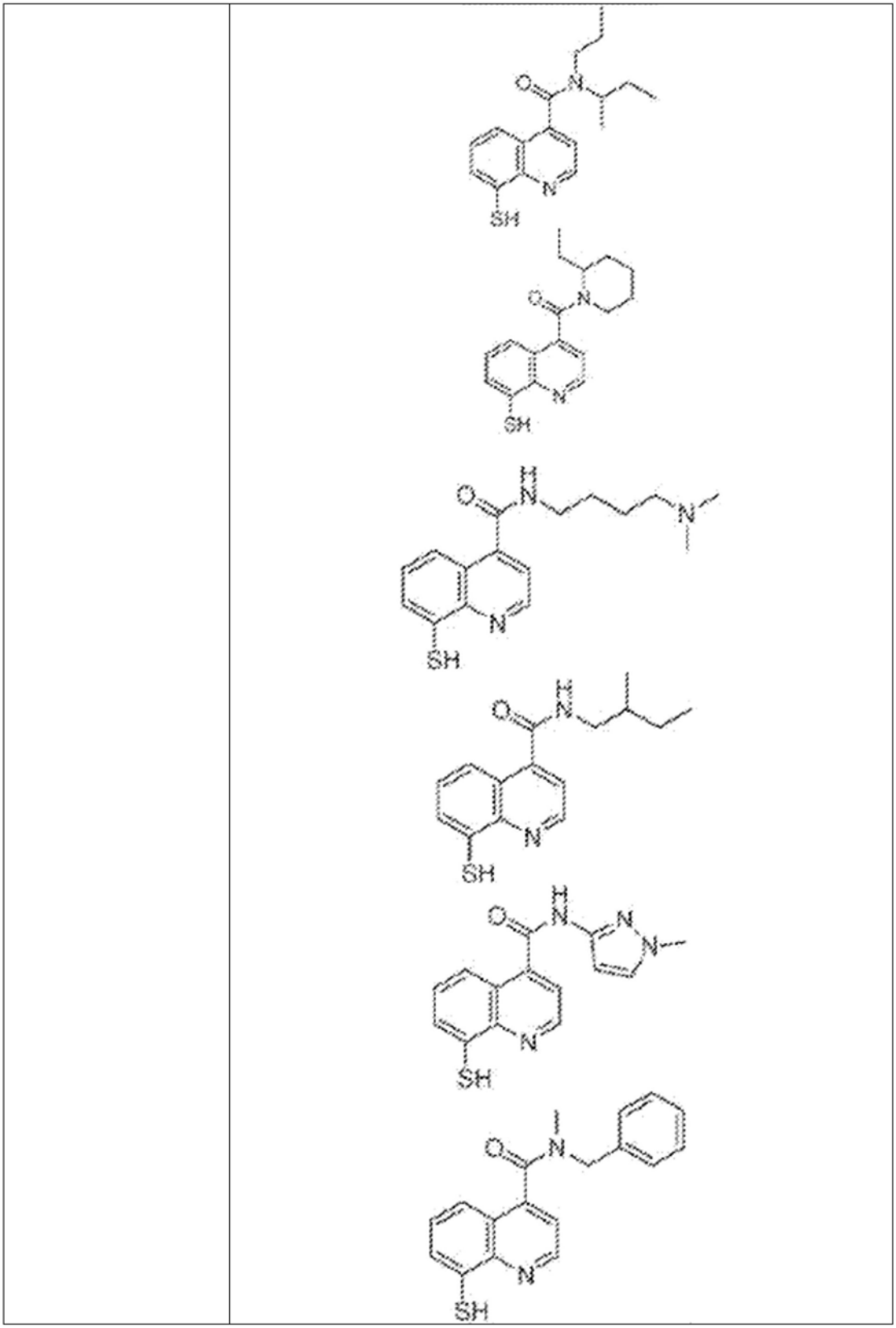
[0561]



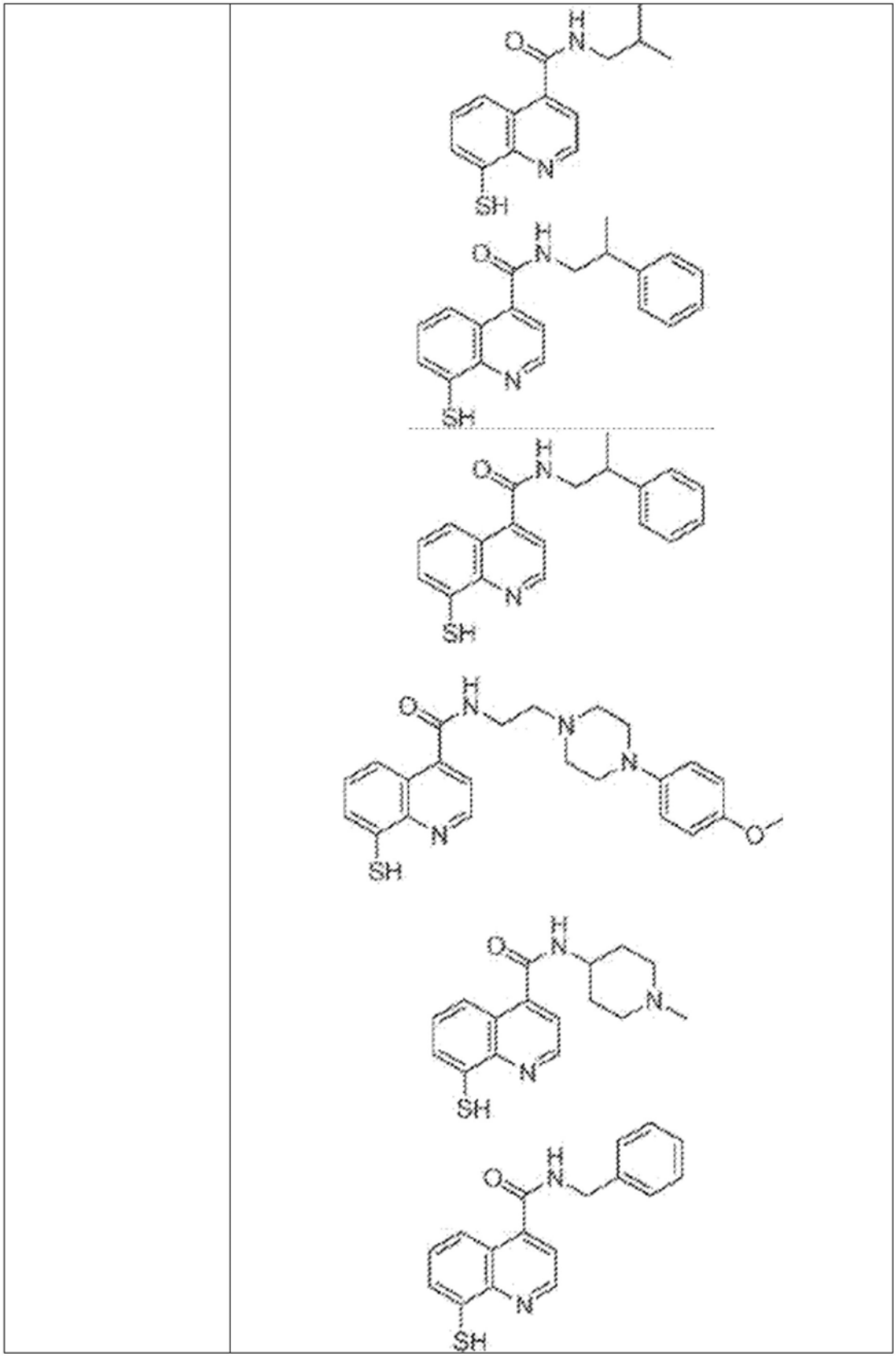
[0562]



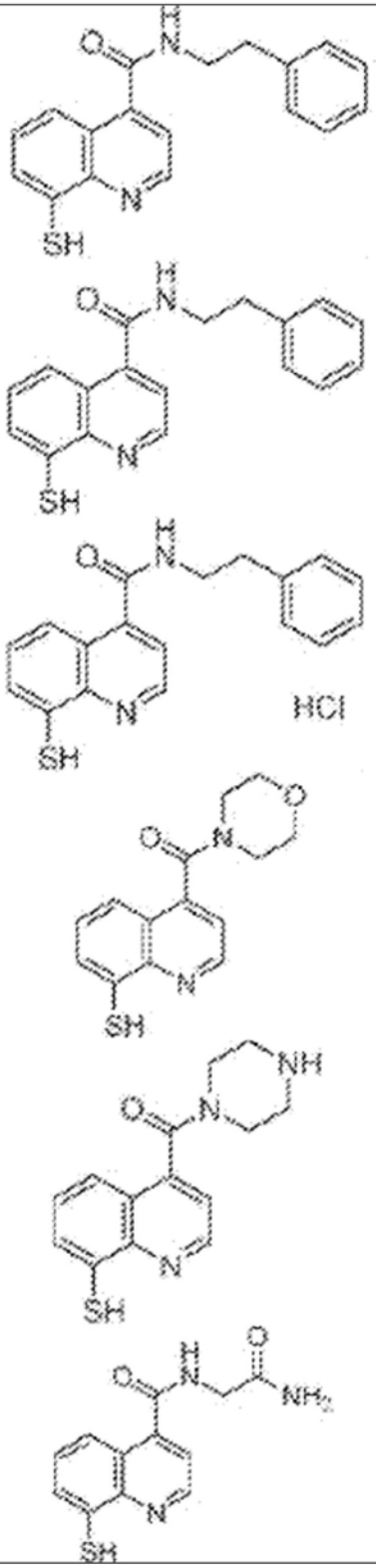
[0563]



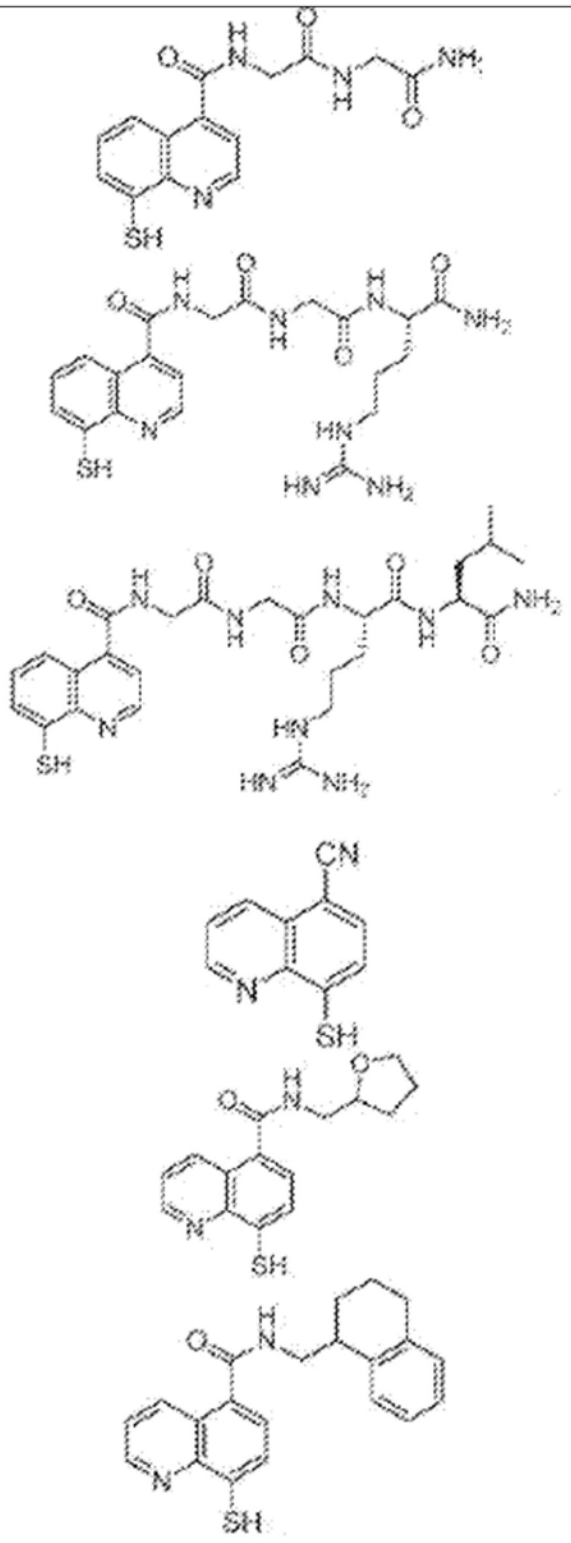
[0564]



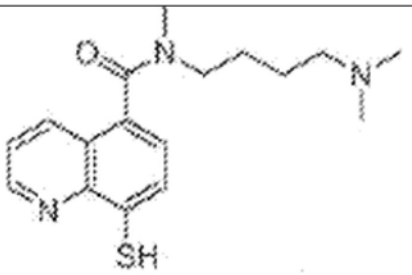
[0565]

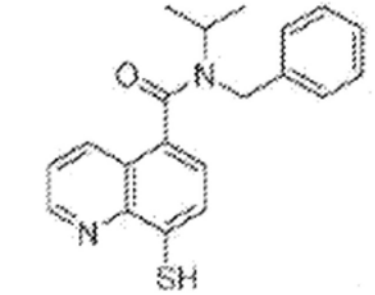


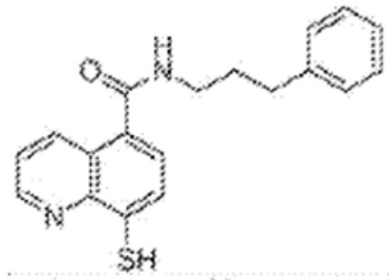
[0566]

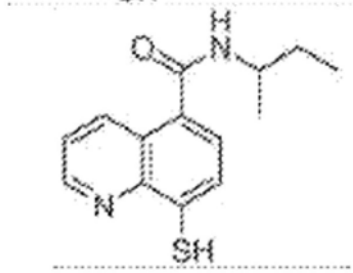


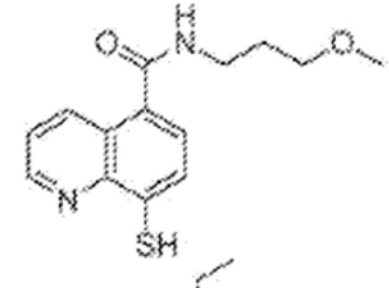
[0567]

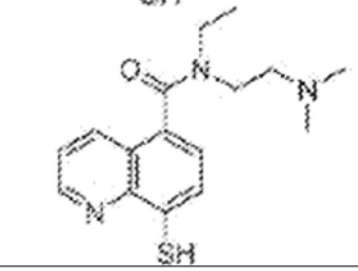




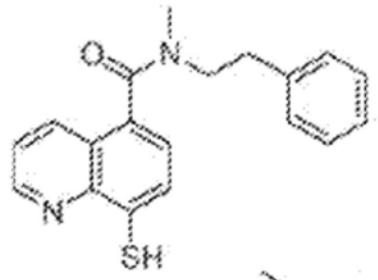
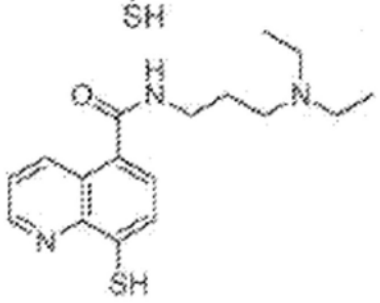
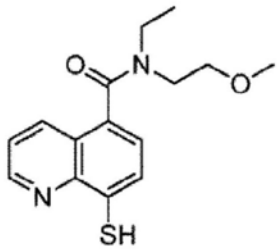
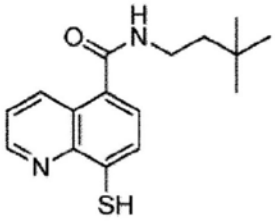
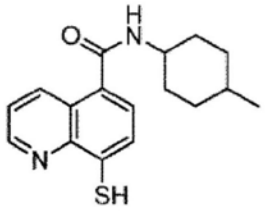




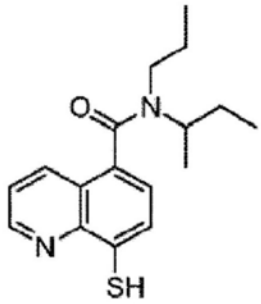
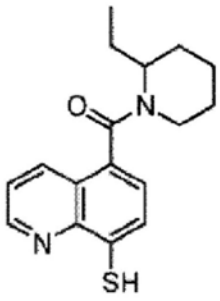
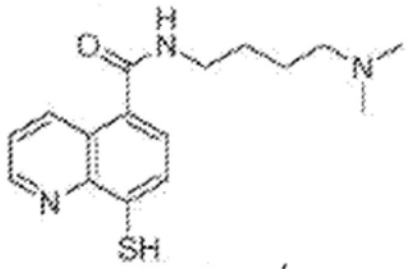
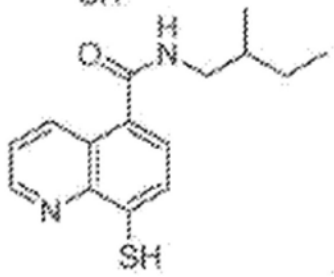
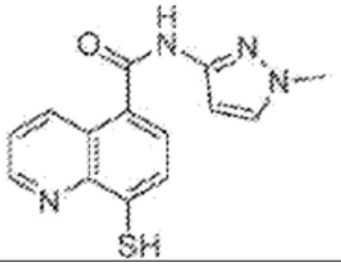




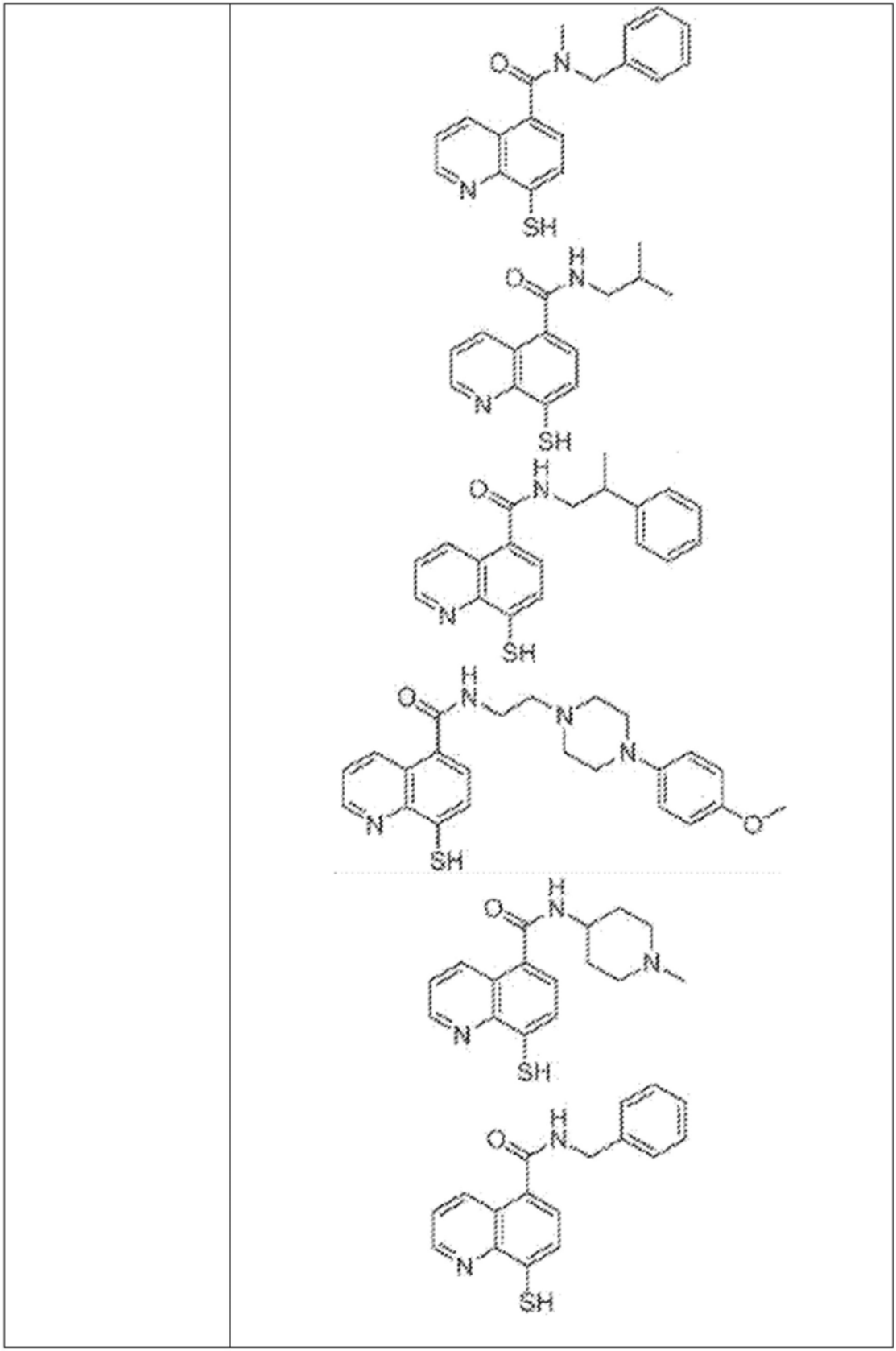
[0568]

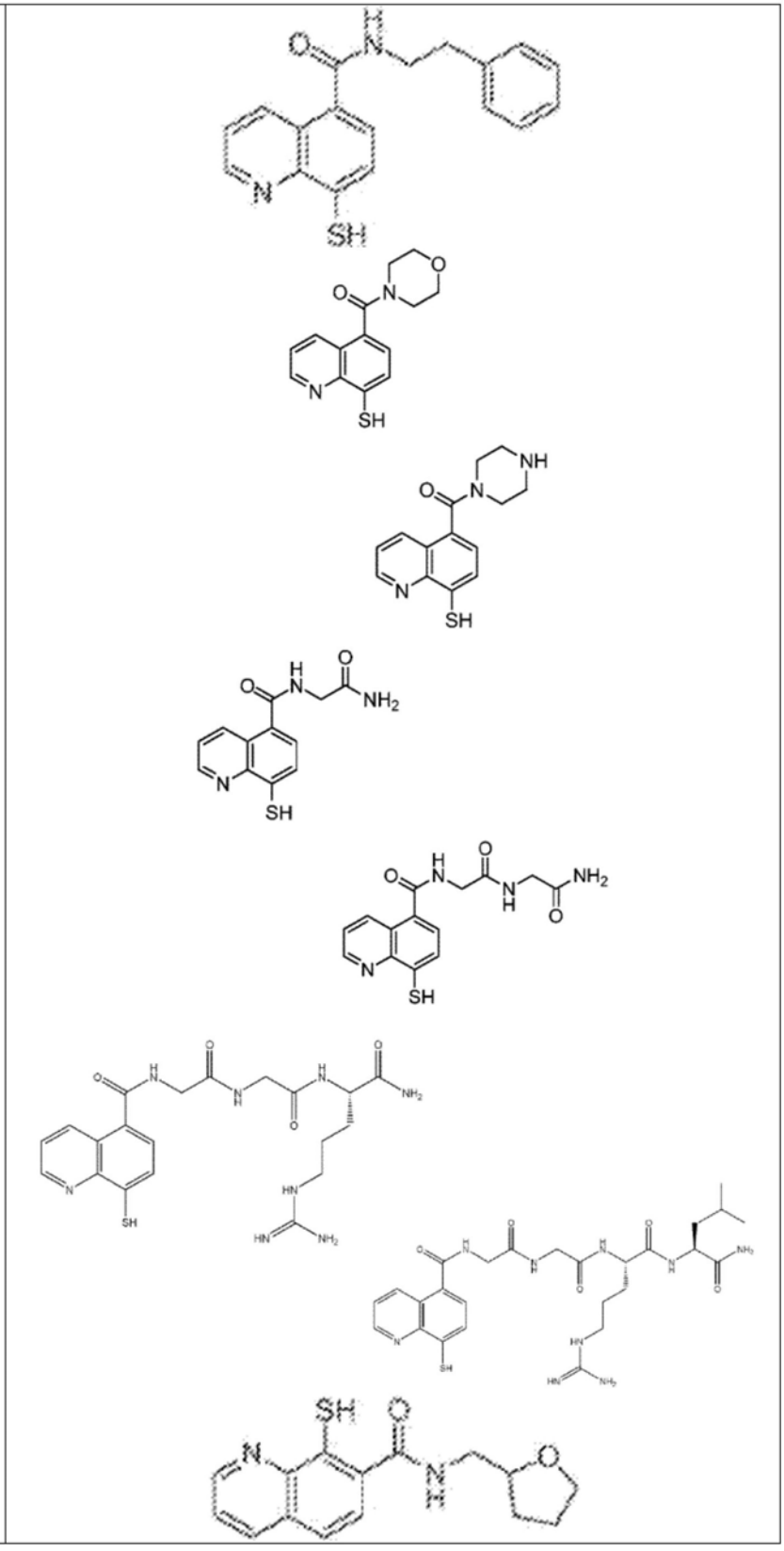
[0569]

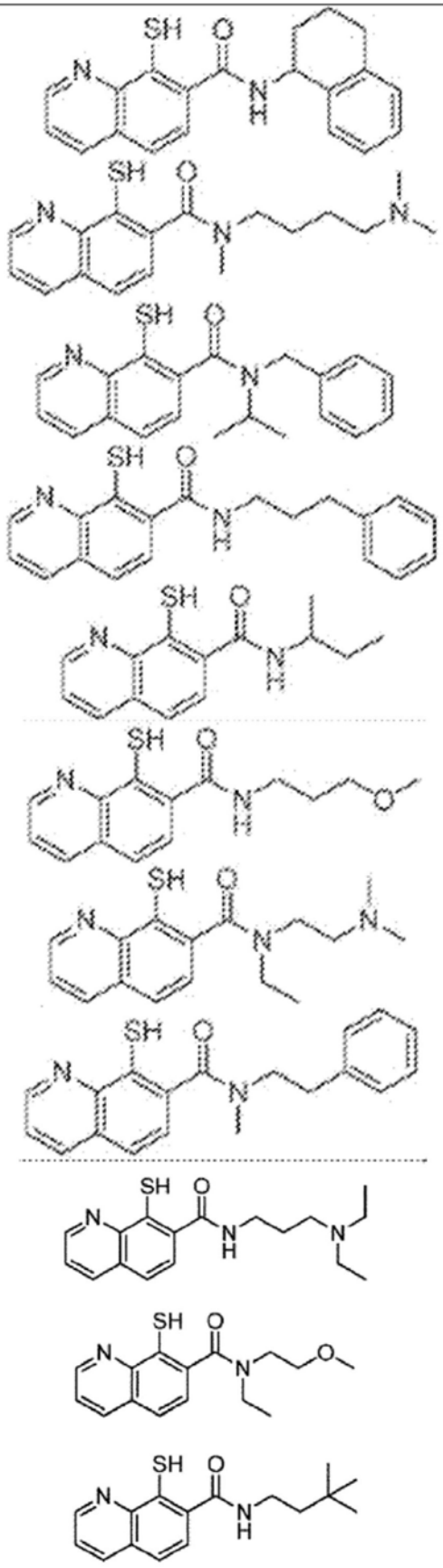
[0570]



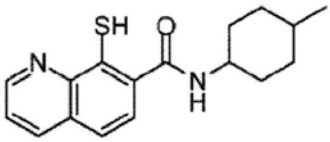
[0571]

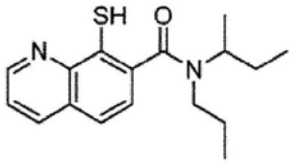


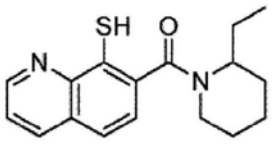
[0572]

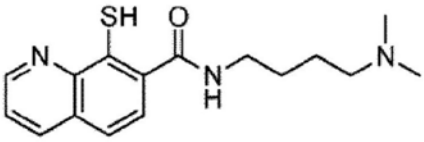


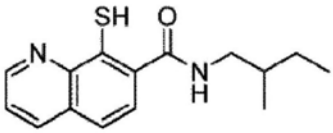
[0573]

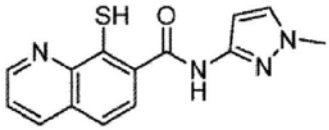


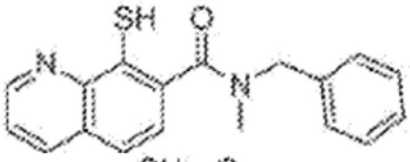


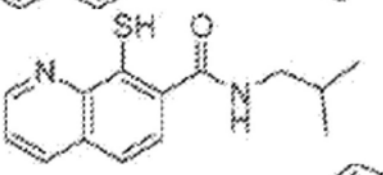


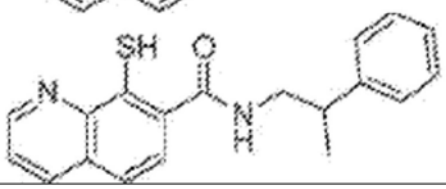




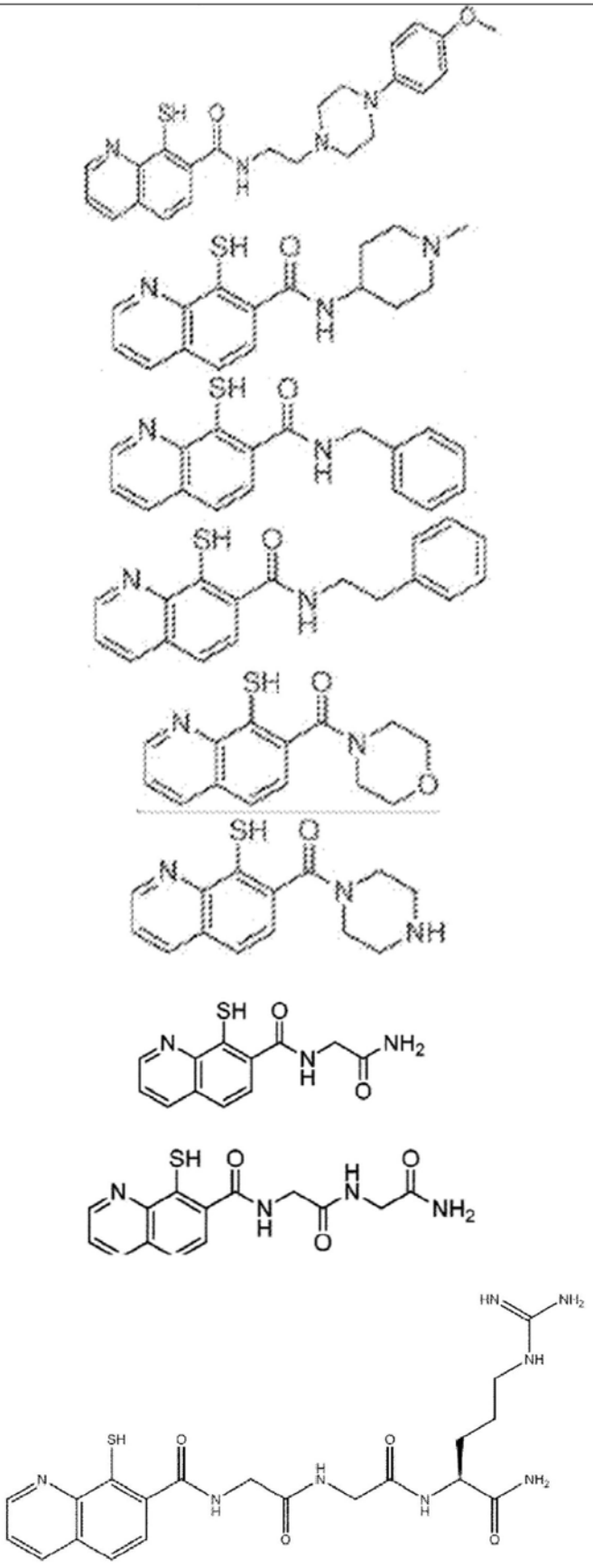




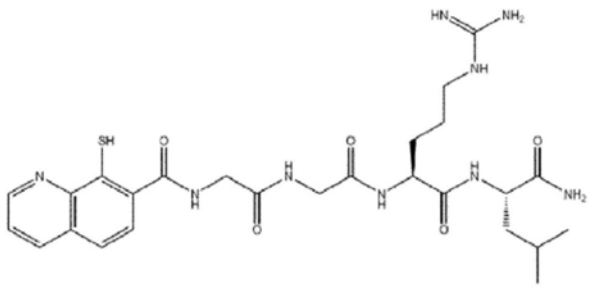


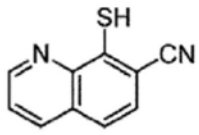


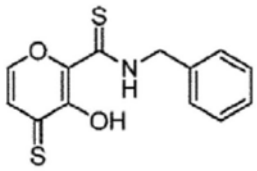
[0574]

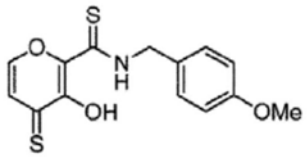


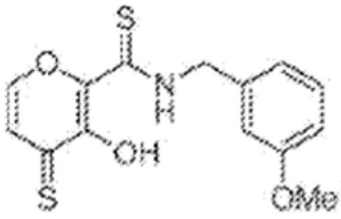
[0575]

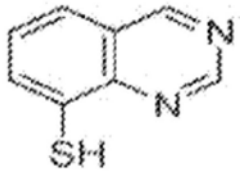


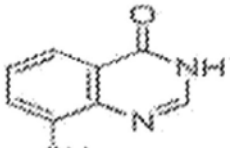


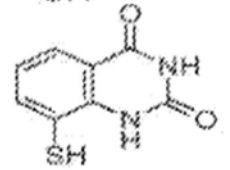




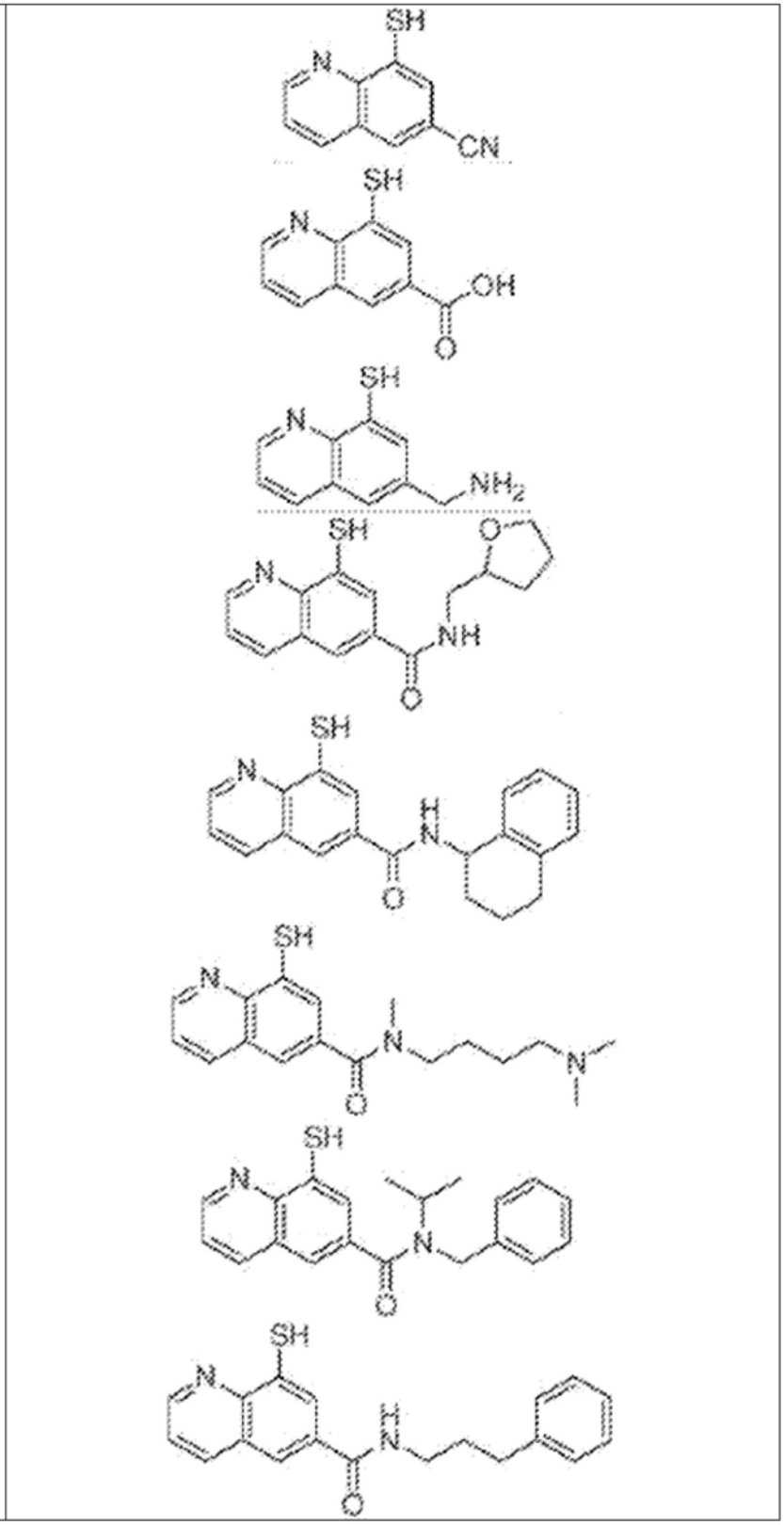




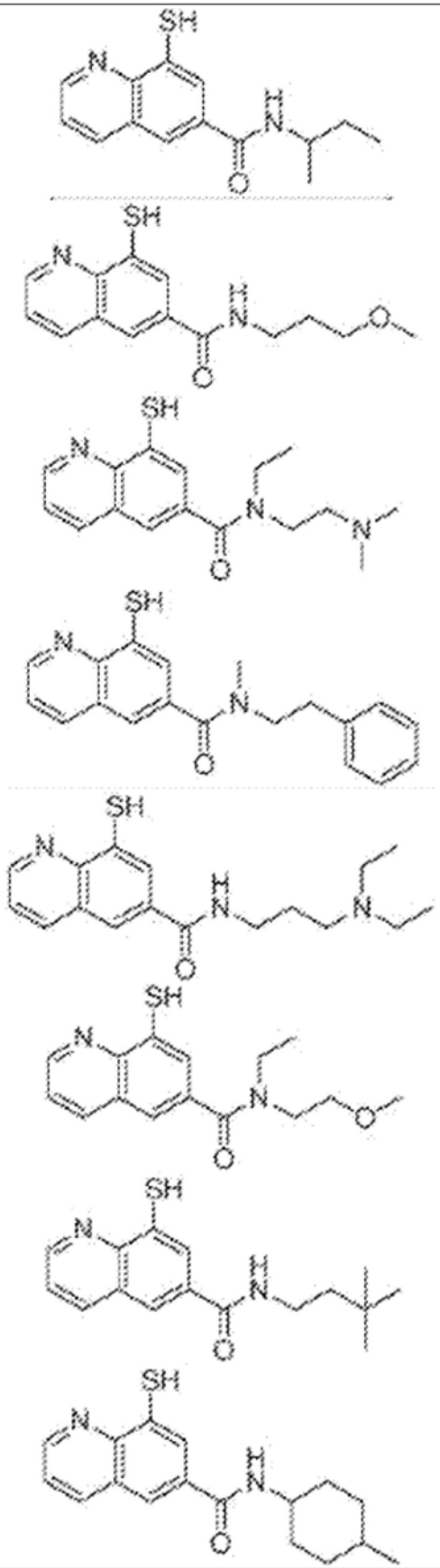




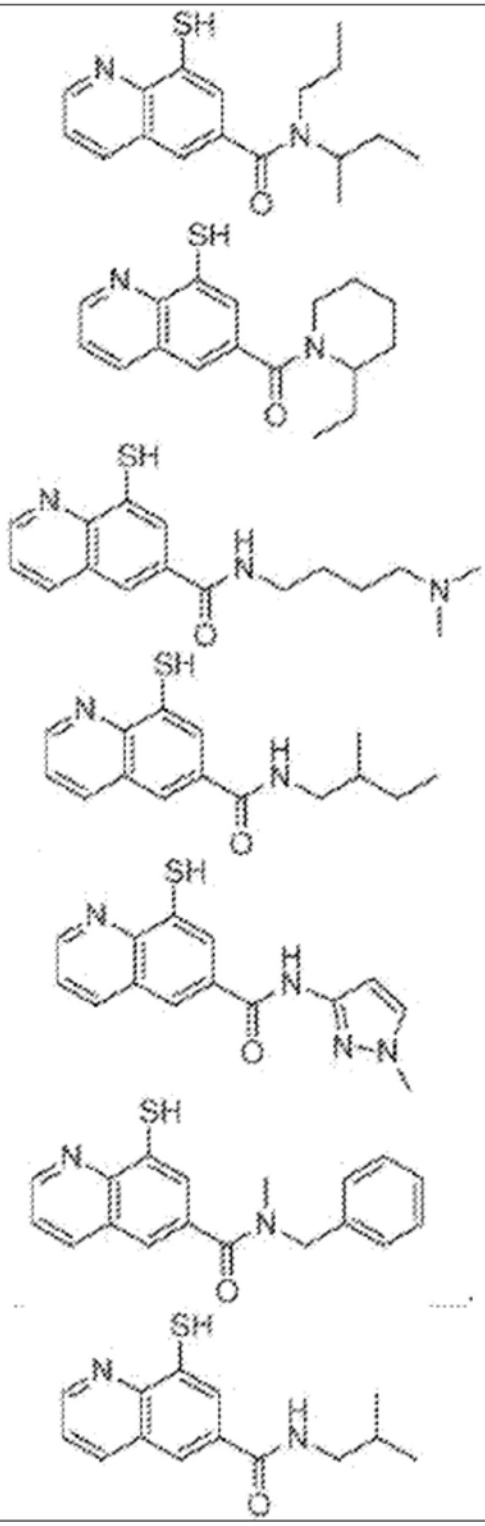
[0576]



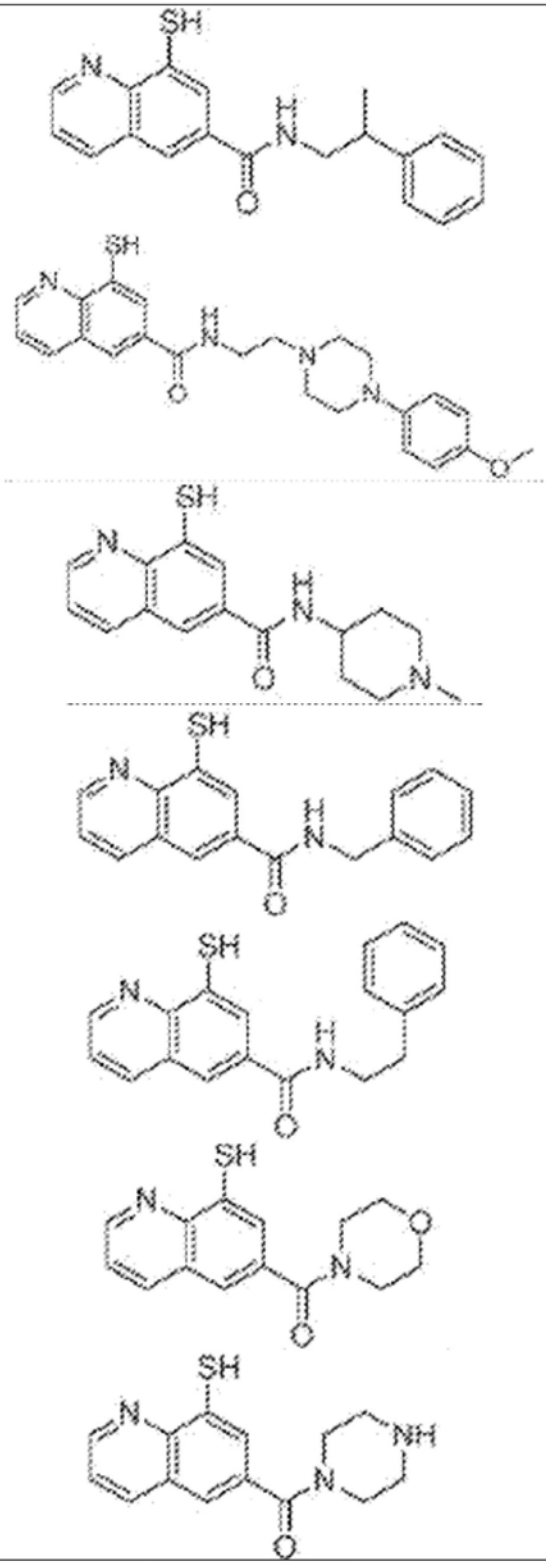
[0577]



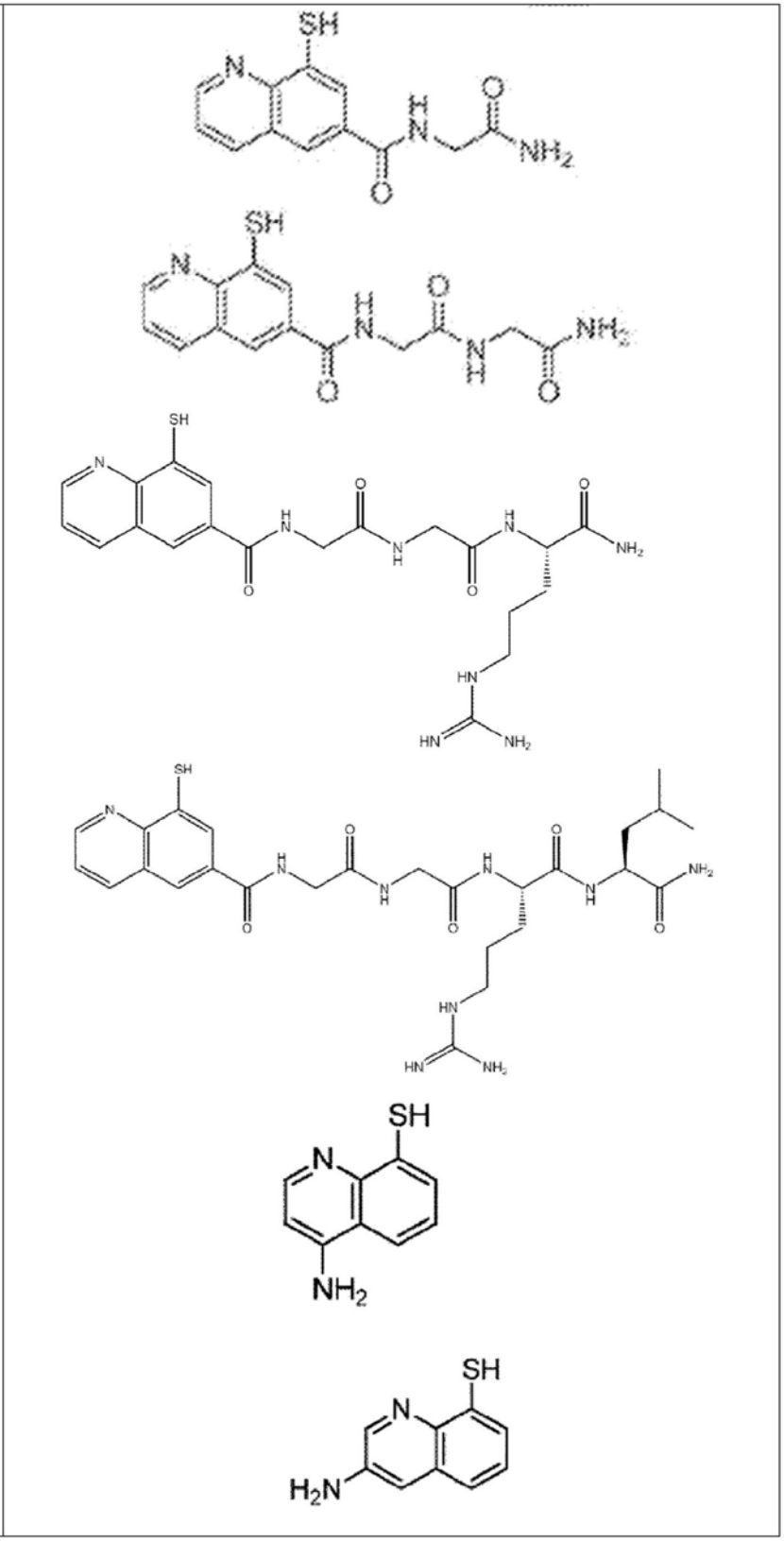
[0578]



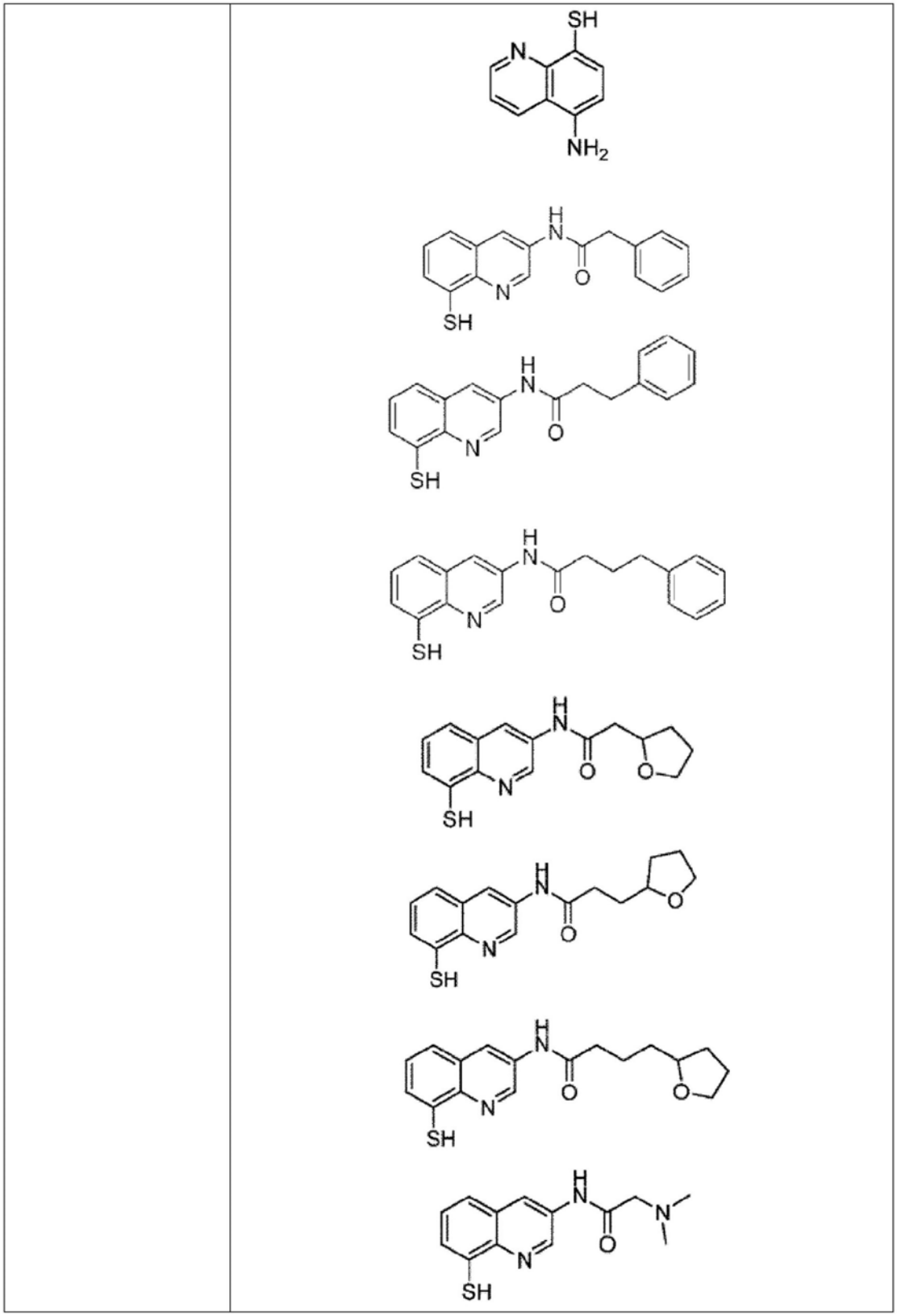
[0579]

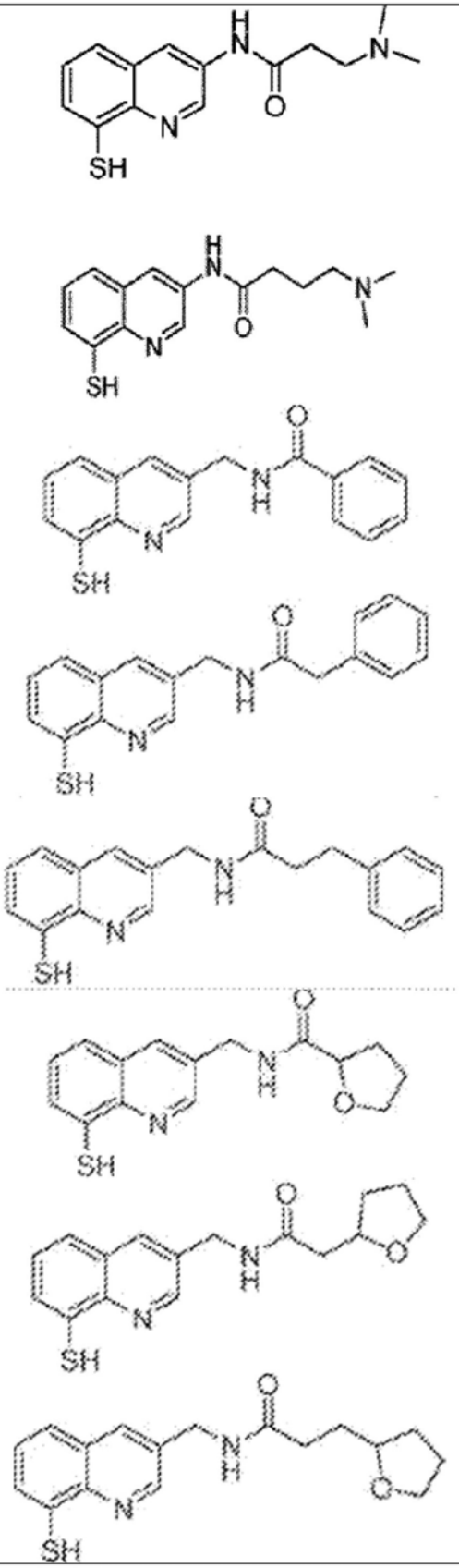
[0580]



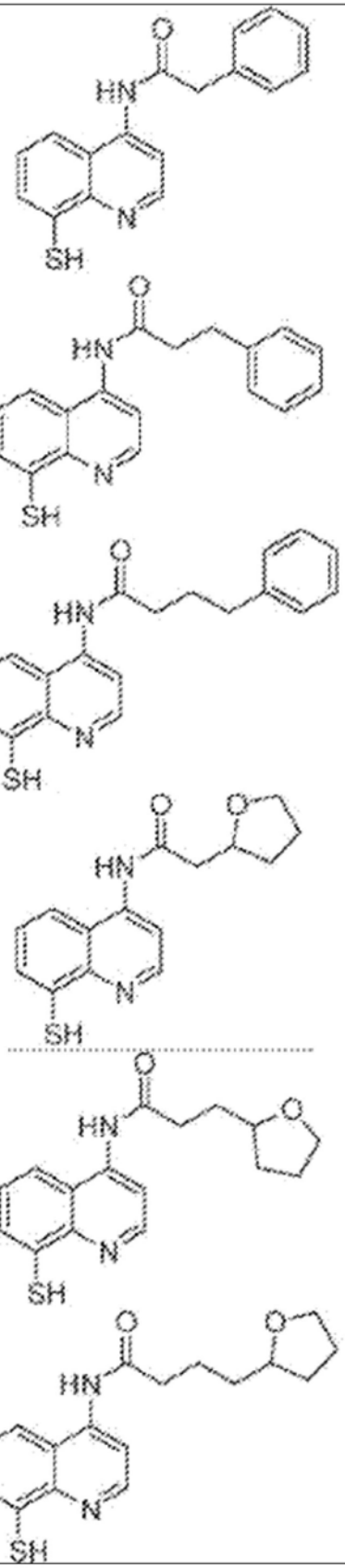
[0581]



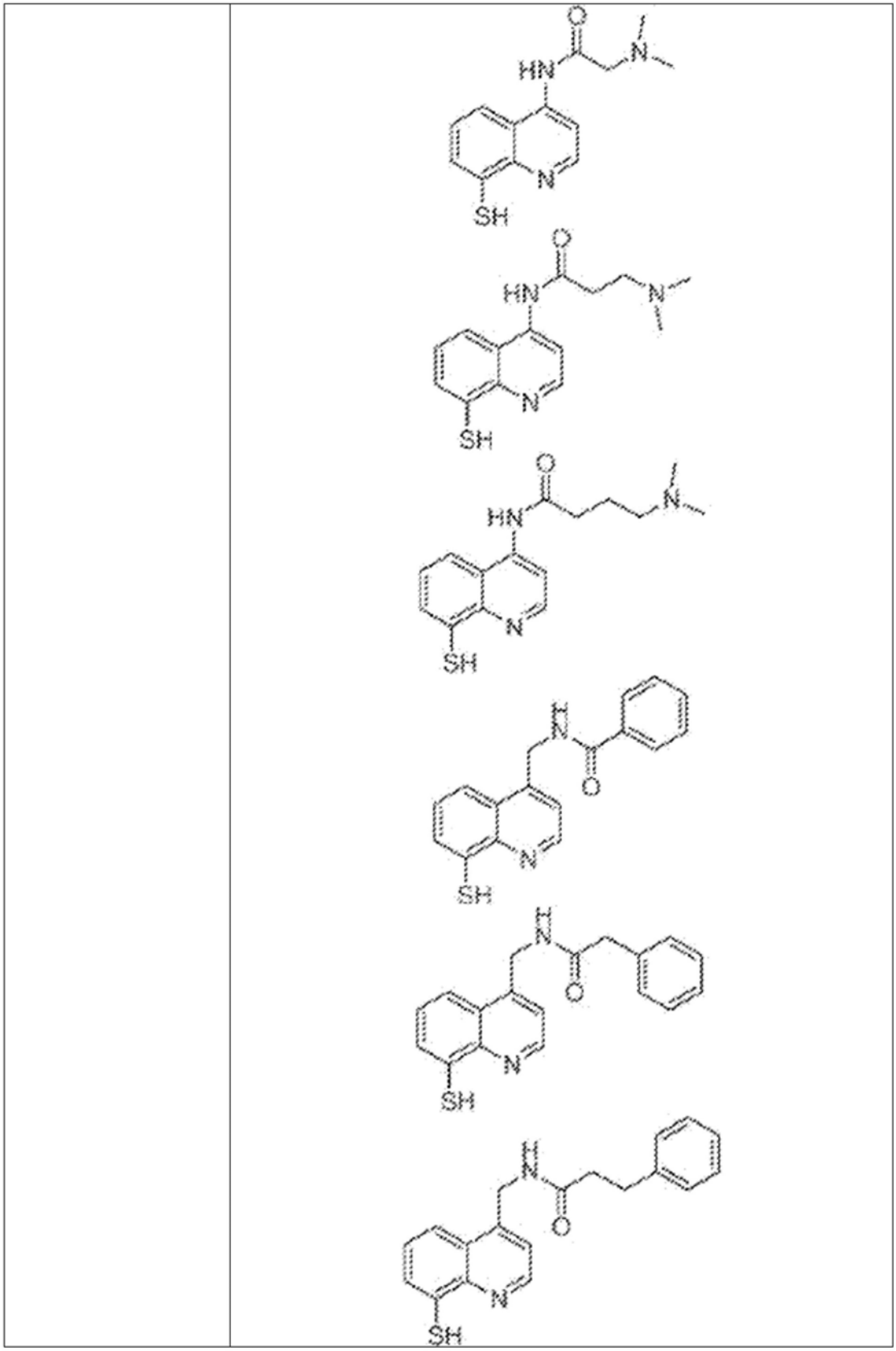
[0582]



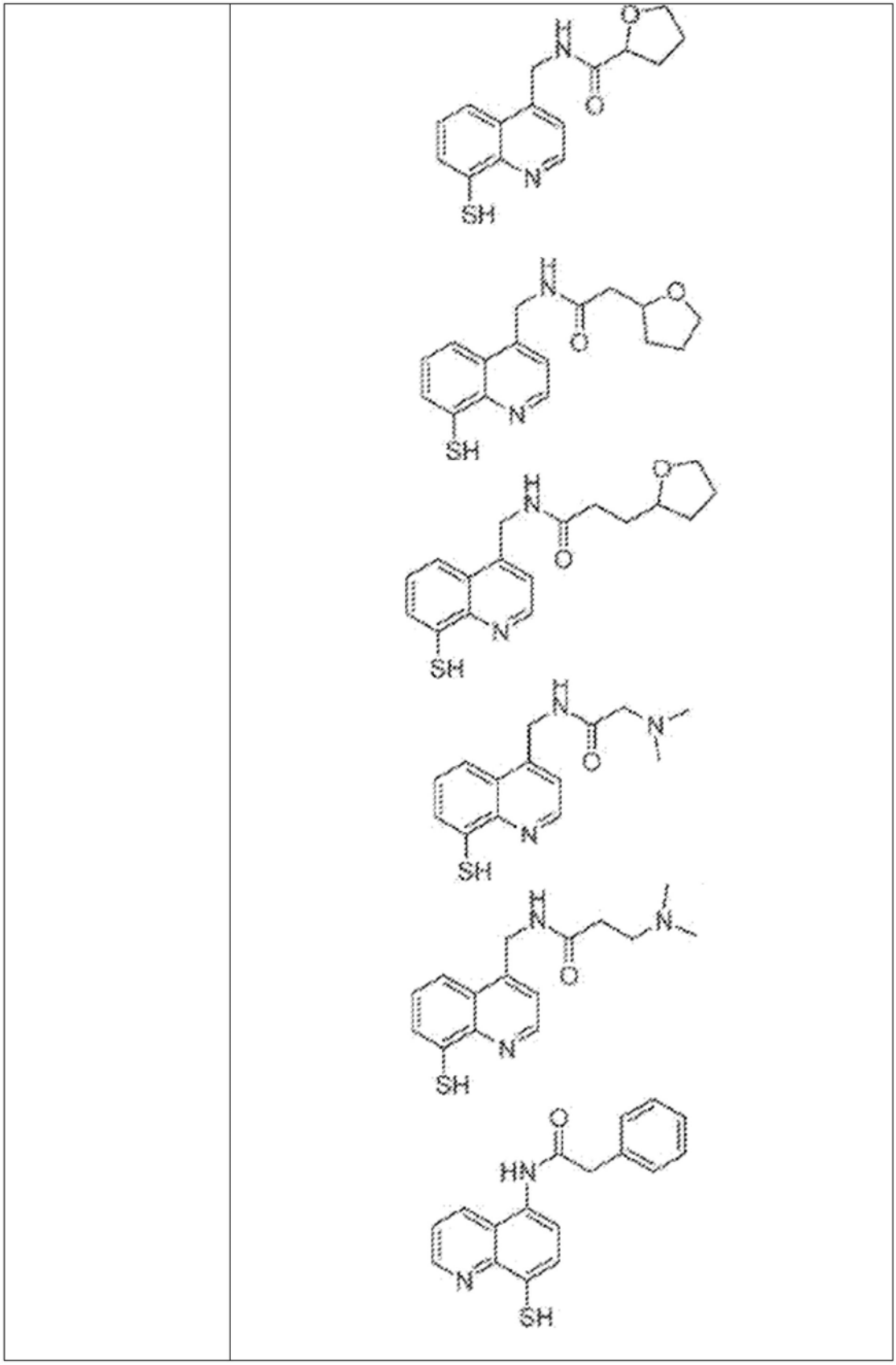
[0583]



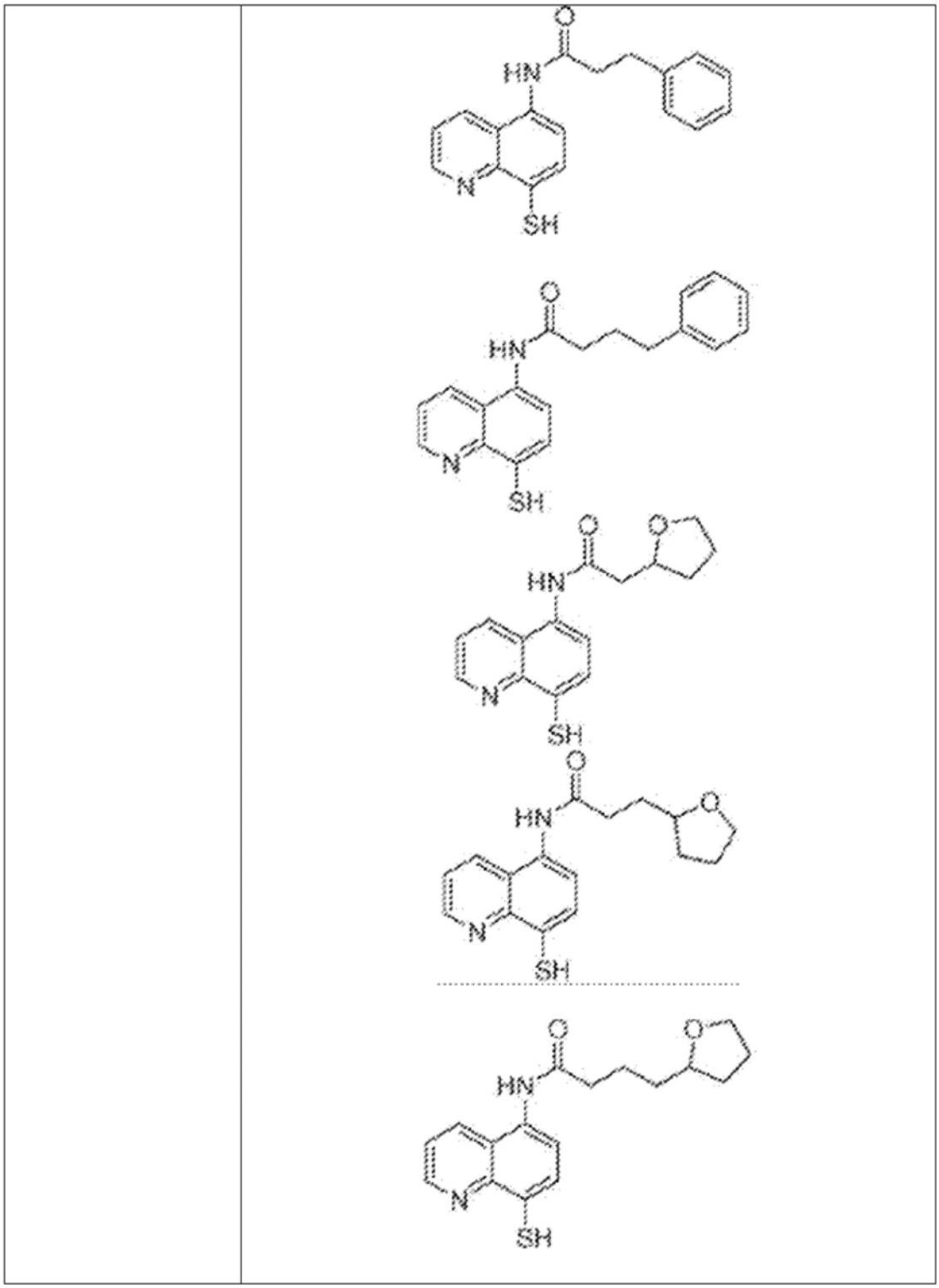
[0584]



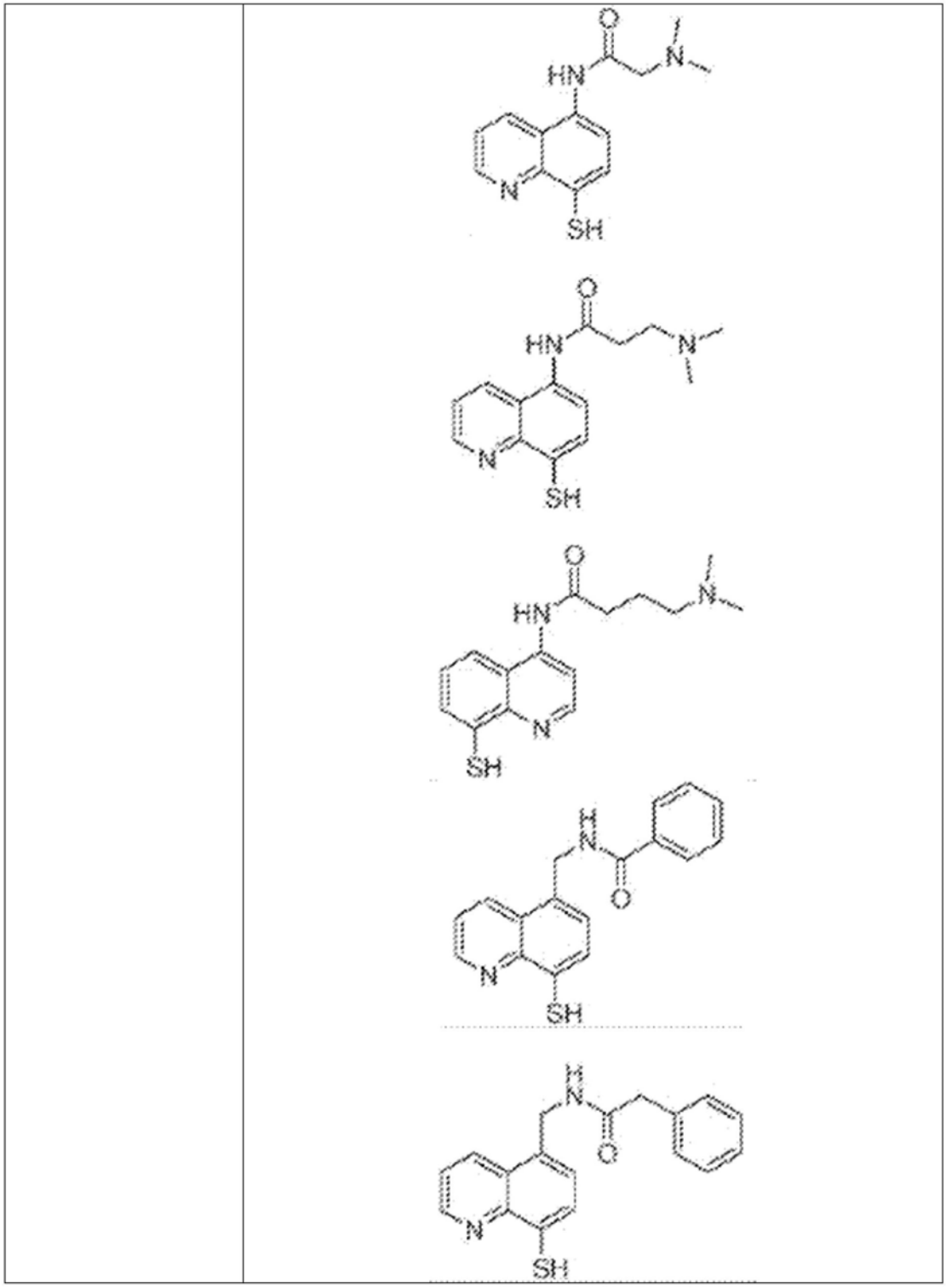
[0585]



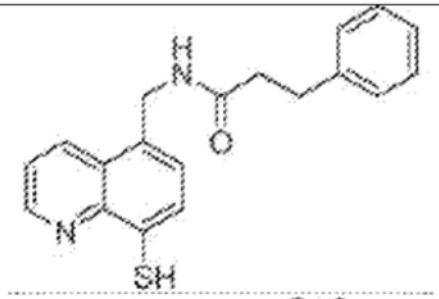
[0586]

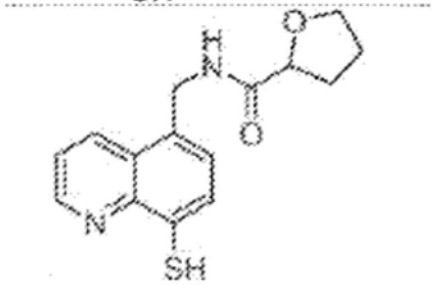


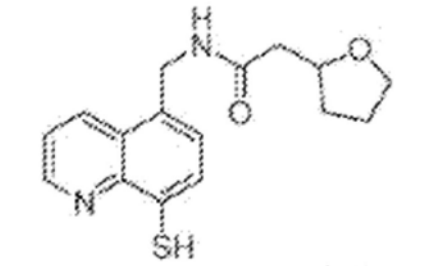
[0587]

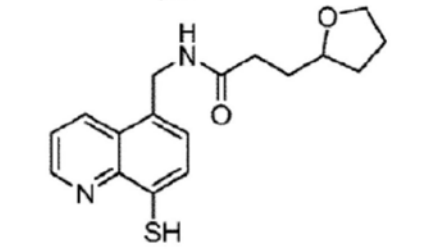


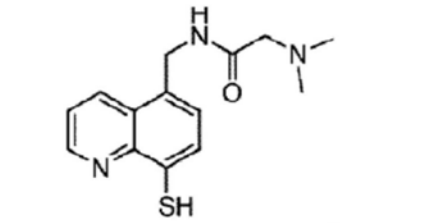
[0588]

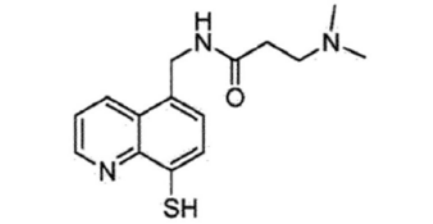




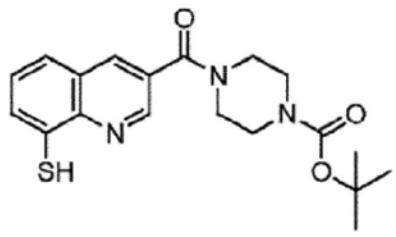


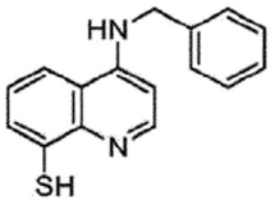


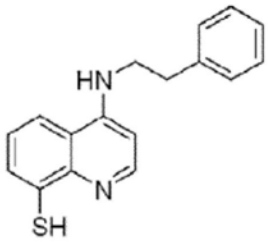


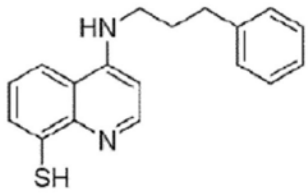


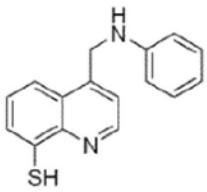
[0589]

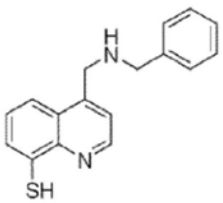


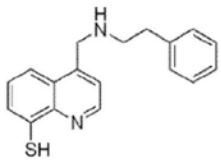


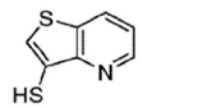




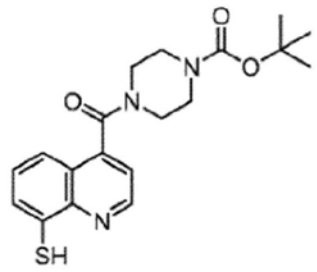
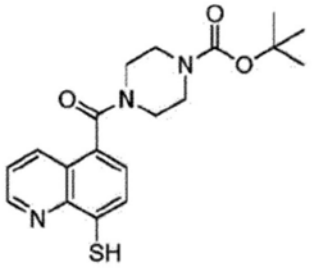
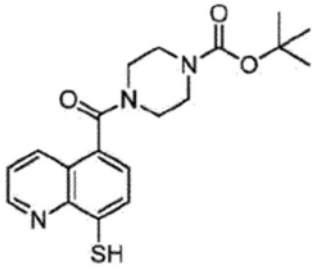
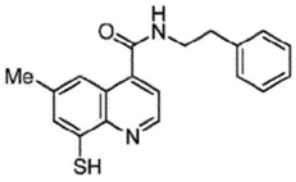
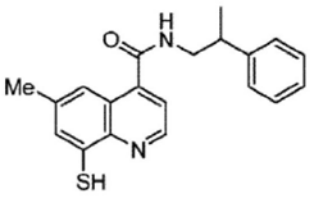
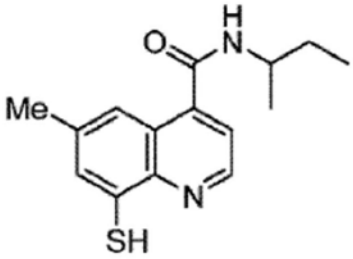




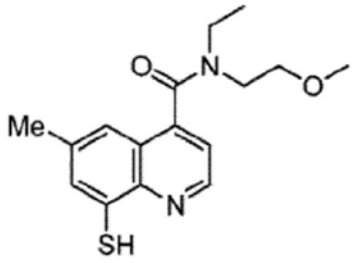
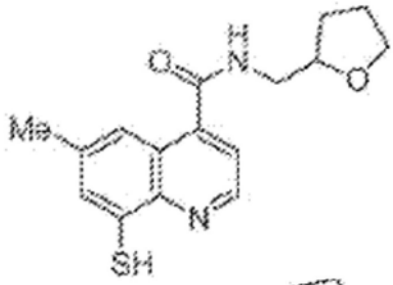
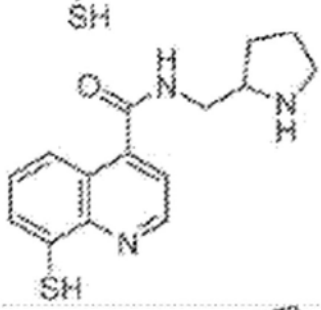
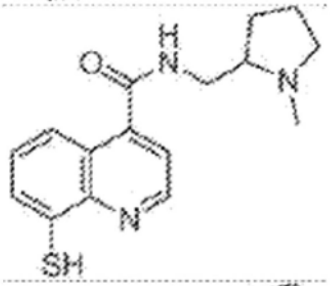
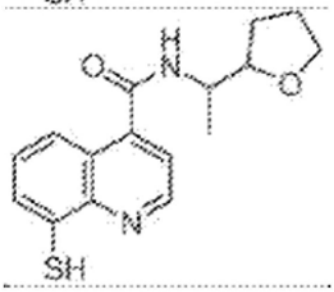
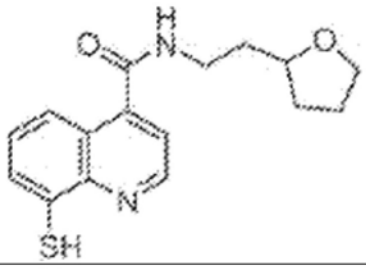




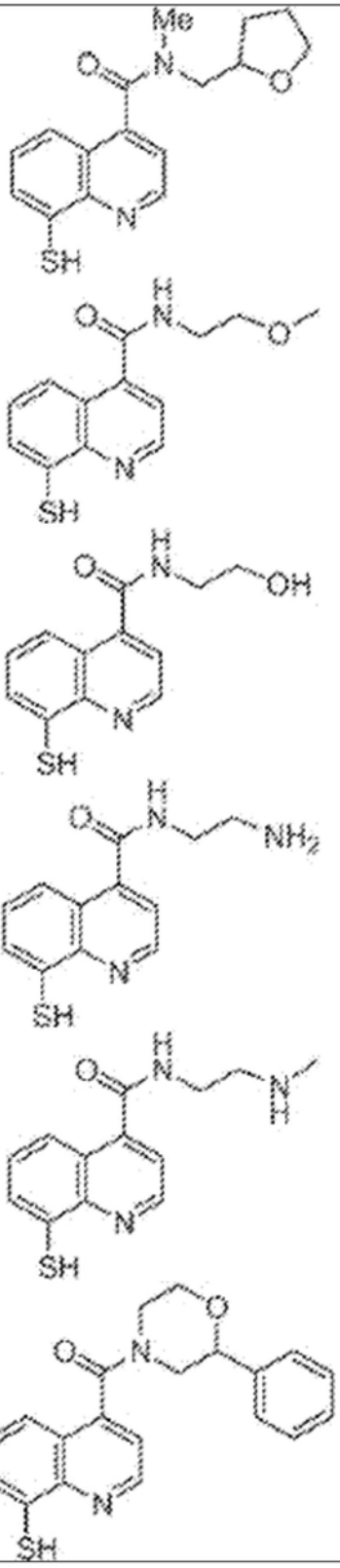
[0590]

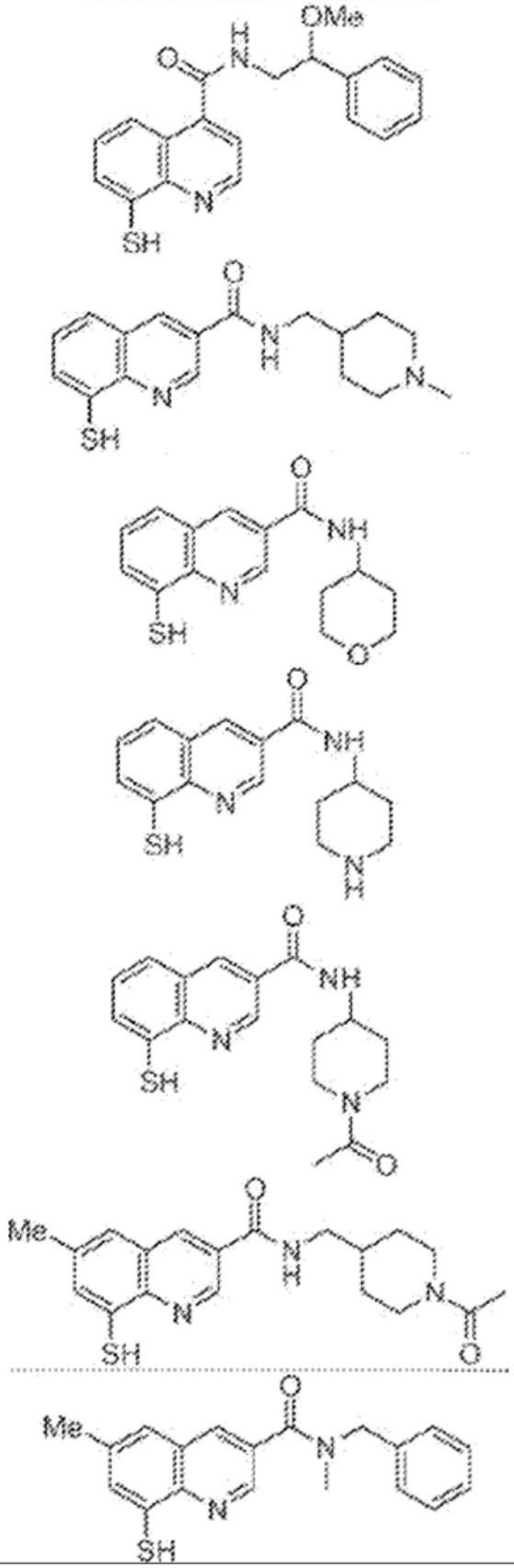
[0591]

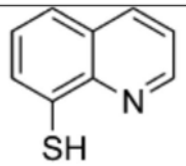
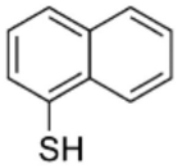
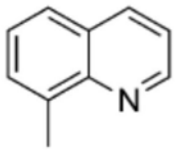
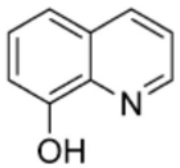
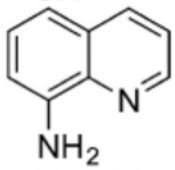
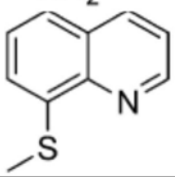
[0592]



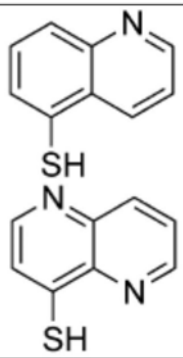
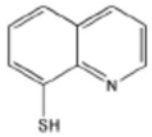
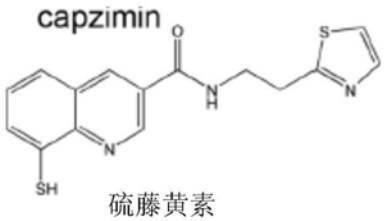
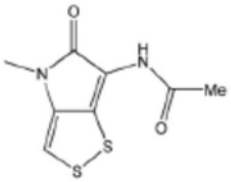
[0593]



[0594]

	卡非佐米(Carfilzomib) MLN-4924
Li 等人 *Nat Chem Biol*. 2017 年 5 月; 13(5):486-493	喹诺酮-8-硫醇 (8TQ) Capzimin
Lauinger 等人 *Nat Chem Biol*. 2017 年 7 月;13(7):709-714	硫藤黄素(Thiolutin)
Perez等人 *J Med Chem*. 2017 年 2 月 23 日;60(4):1343-1361	

[0595]

	
Chen 等人 Cancer Metastasis Rev. 2017 年 12 月;36(4):655-668.	8TQ  capzimin  硫藤黄素 

[0596] 本发明还提供了这样的Rpn11结合配偶体,其是抗-Rpn11抗体及其片段,诸如Fv抗体、双抗体、单结构域抗体诸如VH和/或VL多肽,以及抗体片段,只要它们展现出所需生物活性即可,即与Rpn11结合。抗体例如作为完整免疫球蛋白存在或作为通过用各种肽酶消化产生的许多充分表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键下方消化抗体以产生F(ab)'2(Fab的二聚体,其本身是通过二硫键连接到V_H-C_{H1}的轻链)。F(ab)'2可以在温和条件下被还原以打断铰链区中的二硫键,由此将F(ab)'2二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体实质上是具有铰链区部分的Fab(参见Fundamental Immunology(Paul编著,第3版.1993)。尽管根据完整抗体的消化来定义各种抗体片段,但是技术人员将会理解,这样的片段可以通过化学方法或通过使用重组DNA方法从头合成。因此,如本文中使用的,术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或使用重组DNA方法从头合成的那些(例如,单链Fv)或使用噬菌体展示文库鉴定的那些(参见例如McCafferty等人,(Nature,1990 348:552-554)。

[0597] 包含连接至靶蛋白结合配偶体的与Rpn11结合的抗体的双功能分子可以根据本领域中已知的方法来制备,例如如在Tsuchikama等人(Protein Cell,2018,9(1):33-46)中提供的。

[0598] 根据本发明可用的抗-Rpn11抗体包括但不限于:

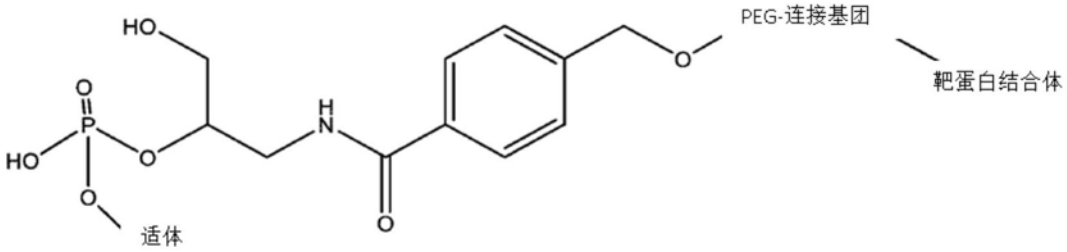
[0599]

产品	公司	目录号
蛋白酶体 19S Rpn11/S13 亚基(人)多克隆抗体	Enzo Life Sciences, Inc.	BML-PW9625-0100
抗-26S 蛋白酶体调节亚基 Rpn11 抗体	MilliporeSigma	ABE390
抗-26S 蛋白酶体调节亚基 Rpn11，克隆 7C7.1	MilliporeSigma	MABE881
针对 P43588 (酵母泛素羧基-末端水解酶 Rpn11)的 N 端的抗体组合	Abmart	X1-P43588

[0600] 本发明还提供了其为适体的Rpn11结合配偶体。包含连接至靶蛋白结合配偶体的与Rpn11结合的适体的双功能分子可以根据本领域中已知的方法来制备，例如如在Wang等人，dx.doi.org/10.1021/ja4117395|J.Am.Chem.Soc.2014,136,2731-2734中提供的方法。

[0601] 在一个实施方案中，包含经由连接基团与靶蛋白结合配偶体连接的其为适体的Rpn11结合配偶体的双功能分子具有下面示出的一般结构：

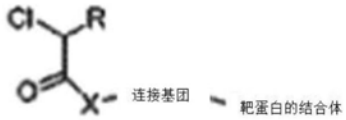
[0602]



[0603] 本发明还提供了其为二环或多特异性肽分子的Rpn11结合配偶体，例如如在U.S.9,670,482中描述的。这样的二环肽分子具有低分子量(1.5-2kDa)，是柔性的，并且是化学合成的。

[0604] 下面示出的结构允许第一结合配偶体和第二结合配偶体的共价结合以产生根据本发明的双功能分子：在下面示出的结构中，X表示Rpn11结合配偶体。


连接基团
靶蛋白的结合体

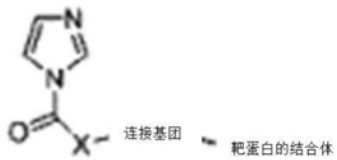

连接基团
靶蛋白的结合体

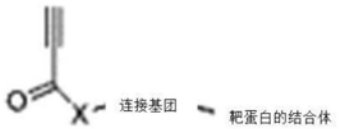

连接基团
靶蛋白的结合体


连接基团
靶蛋白的结合体

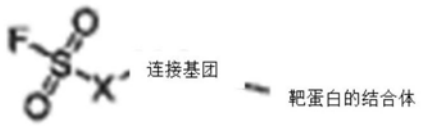
[0605]

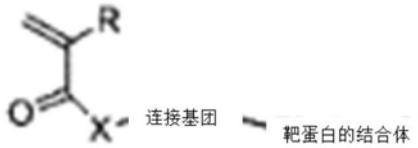

连接基团
靶蛋白的结合体

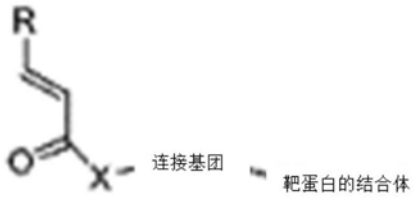

连接基团
靶蛋白的结合体


连接基团
靶蛋白的结合体

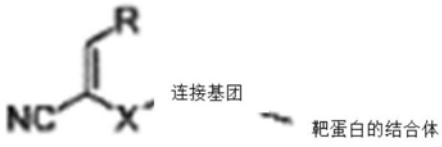

连接基团
靶蛋白的结合体



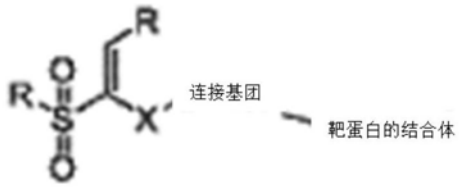




[0606]







[0607] 靶蛋白结合配偶体

[0608] 靶蛋白结合配偶体是以如上所述的亲和力或Kd与选择的靶蛋白结合的分子(蛋白质、肽、蛋白质的配体、核酸诸如DNA或RNA或者组合的DNA/RNA分子)。

[0609] 术语“靶蛋白结合配偶体”包括与靶蛋白结合的分子(例如小分子)、抗体、适体、肽、蛋白质的配体。靶标结合配偶体经由连接基团直接与Rpn11结合配偶体共价连接或结合以形成促进靶蛋白降解的双功能分子。

[0610] 根据本发明的靶蛋白结合配偶体与蛋白质结合并且可以是小分子。已知抑制给定靶蛋白的活性的小分子是根据本发明可用的,包括但不限于激酶抑制剂、靶向含有人BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物、HSP90抑制剂、HDM2和MDM2抑制剂、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂、血管生成抑制剂、细胞核激素受体化合物、免疫抑制化合物和靶向芳烃受体(AHR)的化合物。下面提供了可用于本发明的示例性的小分子抑制剂靶蛋白部分。

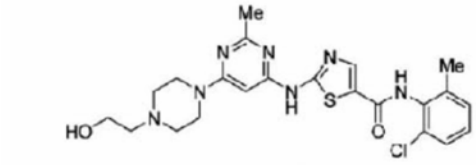
[0611] 靶蛋白配偶体还包括与目标靶蛋白特异性结合的抗体。如本文中使用的术语“抗体”(Ab)包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、人源化或人抗体、Fv抗体、双抗体、单结构域(VH、VL结构域)抗体和抗体片段,只要它们展现出所需结合活性即可。“抗体”是指特异性结合蛋白质表位的多肽。轻链被分为κ或λ。重链被分为γ、μ、α、δ或ε,其进而分别定义免疫球蛋白类型IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0612] 抗体例如作为完整免疫球蛋白存在或作为通过用各种肽酶消化产生的许多充分表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键下方消化抗体以产生F(ab)’2(Fab的二聚体,其本身是通过二硫键连接到V_H-C_{H1}的轻链)。F(ab)’2可以在温和条件下被还原以打断铰链区中的二硫键,由此将F(ab)’2二聚体转化为Fab’单体。Fab’单体实质上是具有铰链区部分的Fab(参见Fundamental Immunology(Paul编著,第3版.1993)。尽管根据完整抗体的消化来定义各种抗体片段,但是技术人员将会理解,这样的片段可以通过化学方法或通过使用重组DNA方法从头合成。因此,如本文中使用的,术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或使用重组DNA方法从头合成的那些(例如,单链Fv)或使用噬菌体展示文库鉴定的那些(参见例如McCafferty等人,1990,Nature,348:552-554)。

[0613] 本发明还提供了这样的靶蛋白结合配偶体,其是卤代烷基基团,其中烷基基团通常在长度为约1或2个碳至约12个碳、例如长度为2至10个碳、长度为3个碳至约8个碳并且长度为4个碳至约6个碳的大小范围内。卤代烷基基团通常是直链烷基基团(尽管也可以使用支链烷基基团),并且用至少一个卤素基团封端,优选用单个卤素基团,通常是单个氯基团封端。用于本发明的卤代烷基PT基团优选地由化学结构-(CH_2)v-卤代表示,其中v是2至约12、通常约3至约8、更通常约4至约6的整数。卤代可以是卤素,但是优选Cl或Br,更通常是Cl。

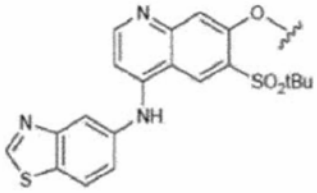
[0614] 本发明还包括包括靶蛋白结合配偶体的药用盐、对映异构物、溶剂化物和多晶型物。

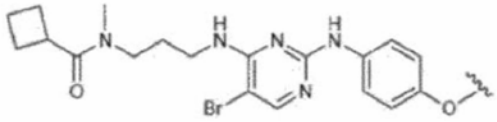
[0615] 其为激酶抑制剂的靶蛋白结合配偶体包括但不限于下面示出的分子及其衍生物中的任一种:



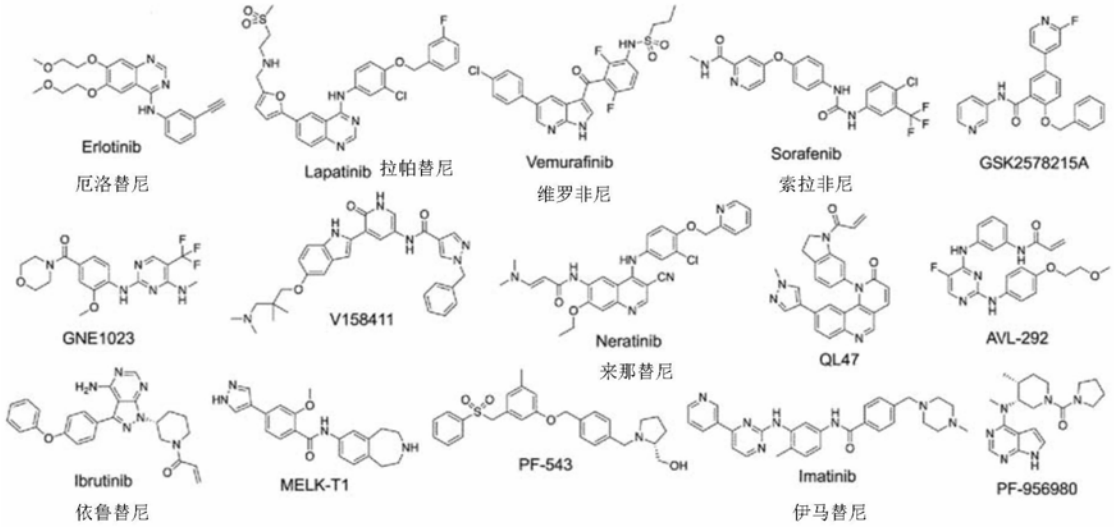
Dasatinib

达沙替尼





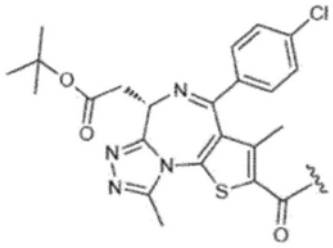
[0616]



[0617] 参见Jones等人Small-Molecule Kinase Downregulators(小分子激酶下调物)，2017,Cell Chem.Biol.,25:30-35。

[0618] 靶向BET蛋白的靶蛋白结合配偶体包括但不限于下面示出的分子及其衍生物：

[0619]



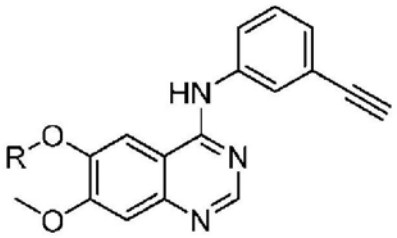
[0620] JQ1

[0621] 在Romero、F.A.、Taylor、A.M.、Crawford、T.D.、Tsui、V.、Cote、A.、Magnuson、S.Disrupting Acetyl-Lysine Recognition:Progress in the Development of Bromodomain Inhibitors(中断乙酰基-赖氨酸识别:布罗莫结构域抑制剂的开发进展)(2016J.Med.Chem.,59(4),1271-1298)中描述了另外的BET抑制剂。

[0622] I.激酶和磷酸酶抑制剂：

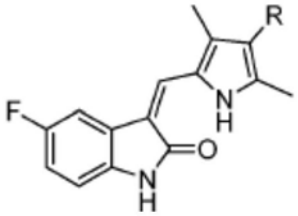
[0623] 如本文中使用的激酶抑制剂包括但不限于：

[0624] 1.厄洛替尼(Erlotinib)衍生物酪氨酸激酶抑制剂：

[0625] 

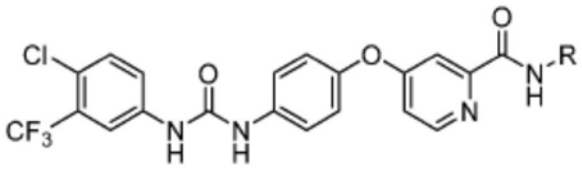
[0626] 其中R是例如经由醚基团连接的连接基团；

[0627] 2.激酶抑制剂舒尼替尼(sunitinib)(衍生化)：

[0628] 

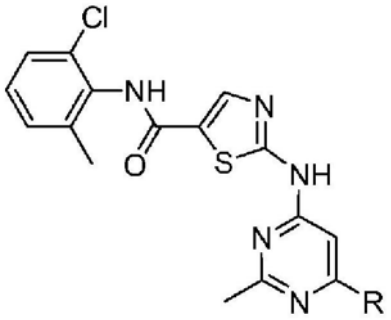
[0629] (衍生化,其中R是例如与吡咯部分连接的连接基团)；

[0630] 3.激酶抑制剂索拉非尼(sorafenib)(衍生化)：

[0631] 

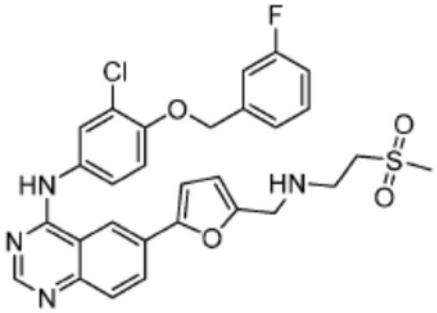
[0632] (衍生化,其中R是例如与酰胺部分连接的连接基团)；

[0633] 4.激酶抑制剂达沙替尼(desatinib)(衍生化)：

[0634] 

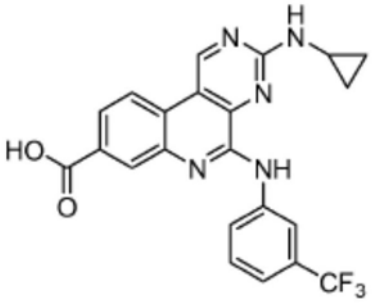
[0635] (衍生化,其中R是例如与嘧啶连接的连接基团)；

[0636] 5.激酶抑制剂拉帕替尼(lapatinib)(衍生化)：

[0637] 

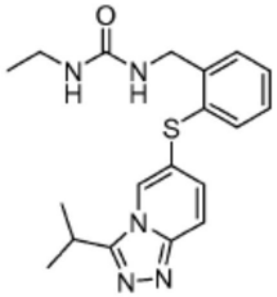
[0638] (衍生化,其中连接基团例如经由磺酰基甲基基团的末端甲基连接)；

[0639] 6.激酶抑制剂UO9-CX-5279(衍生化)：

[0640] 

[0641] 衍生化,其中连接基团例如经由处于环丙基基团α位的胺(苯胺)、羧酸或胺或者环丙基基团连接;

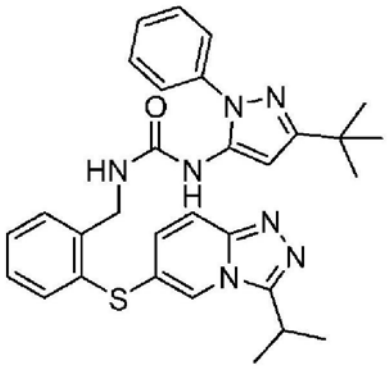
[0642] 7.在Millan等人,Design and Synthesis of Inhaled P38 Inhibitors for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease(用于治疗慢性阻塞性肺病的吸入的P38抑制剂的设计和合成)、(2011,].Med.Chem.54:7797)中确定的激酶抑制剂,包括具有以下结构的激酶抑制剂Y1W和Y1X(衍生化):

[0643] 

[0644] YIX

[0645] (L-乙基-3-(2-{[3-(1-甲基乙基)[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡啶-6-基]磺酰基}苄基)脲

[0646] 衍生化,其中连接基团例如经由异丙基基团连接;

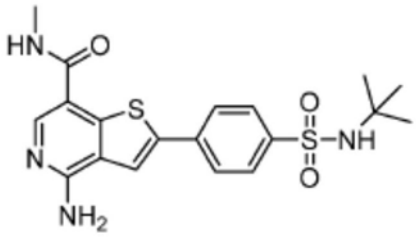
[0647] 

[0648] Y1W

[0649] 1-(3-叔丁基-1-苯基-1H-吡唑-5-基)-3-(2-{[3-(1-甲基乙基)[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡啶-6-基]硫烷基}苄基)脲

[0650] 衍生化,其中连接基团例如优选地经由异丙基基团或叔丁基基团连接;

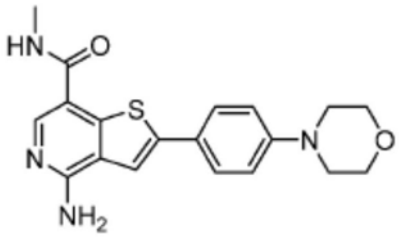
[0651] 8.在Schenkel等人,Discovery of Potent and Highly Selective Thienopyridine Janus Kinase 2Inhibitors(有效和高选择性的噻吩并吡啶Janus激酶2抑制剂的发现)(2011,J.Med.Chem.,54(24):8440-8450)中确定的激酶抑制剂,包括具有以下结构的化合物6TP和OTP(衍生化):

[0652] 

[0653] 6TP

[0654] 4-氨基-2-[4-(叔丁基氨磺酰基)苯基]-N-甲基噻吩并[3,2-c]吡啶-7-甲酰胺噻吩并吡啶19

[0655] 衍生化,其中连接基团例如经由与酰胺部分结合的末端甲基基团连接;

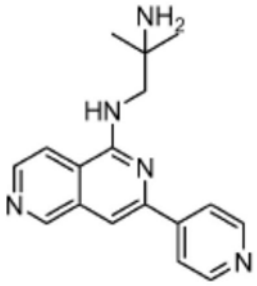
[0656] 

[0657] OTP

[0658] 4-氨基-N-甲基-2-[4-(吗啉-4-基)苯基]噻吩并[3,2-c]吡啶-7-甲酰胺噻吩并吡啶8

[0659] 衍生化,其中连接基团例如经由与酰胺部分结合的末端甲基基团连接;

[0660] 9.在Van Eis等人,“2,6-Naphthyridines as potent and selective inhibitors of the novel protein kinase C isozymes(作为新型蛋白激酶C同工酶的有效且选择性的抑制剂的2,6-萘啶)”,(2011年12月,Biorg.Med.Chem.Lett.,15,21(24):7367-72)中确定的激酶抑制剂,包括具有以下结构的激酶抑制剂07U:

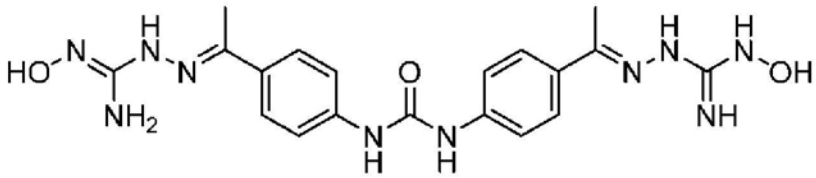
[0661] 

[0662] 07U

[0663] 2-甲基-N-1--[3-(吡啶-4-基)-2,6-萘啶-1-基]丙烷-1,2-二胺

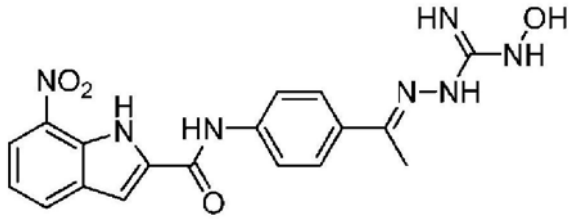
[0664] 衍生化,其中连接基团例如经由仲胺或末端氨基基团连接;

[0665] 10.在Lountos等人,“Structural Characterization of Inhibitor Complexes with Checkpoint Kinase 2(Chk2),a Drug Target for Cancer Therapy(与作为癌症疗法药物靶标的检查点激酶2(Chk2)的抑制剂复合物的结构表征)”、(2011,J.Struct..Biol.,176:292)中确定的激酶抑制剂,包括具有以下结构的激酶抑制剂YCF:

[0666] 

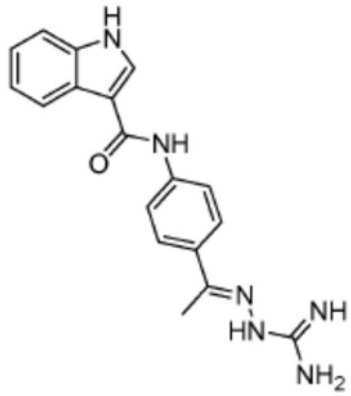
[0667] 衍生化,其中连接基团例如经由任一末端羟基基团连接;

[0668] 11.在Lountos等人,“Structural Characterization of Inhibitor Complexes with Checkpoint Kinase 2(Chk2),a Drug Target for Cancer Therapy(与作为癌症疗法药物靶标的检查点激酶2(Chk2)的抑制剂复合物的结构表征)”、(2011,J.Struct..Biol.,176292)中确定的激酶抑制剂,包括具有以下结构的激酶抑制剂XK9和NXP(衍生化):

[0669] 

[0670] XK9

[0671] N-{4-[(1E)-N-(N-羟基氨基甲酰氨基)乙烷肼酰基]苯基}-7-硝基-1H-吲哚-2-甲酰胺;

[0672] 

[0673] NXP

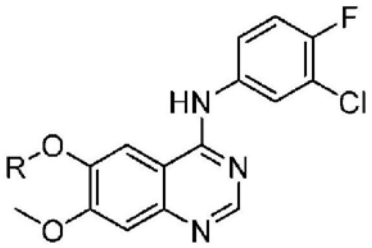
[0674] N-{4-[(1E)-N-氨基甲酰氨基乙烷肼酰基]苯基}-1H-吲哚-3-甲酰胺

[0675] 衍生化,其中连接基团例如经由末端羟基基团(XK9)或脲基团(NXP)连接;

[0676] 12.激酶抑制剂阿法替尼(afotinib)(衍生化)(N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[(3S)-四氢-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁酰胺)(衍生化,其中连接基团例如经由脂族胺基团连接);

[0677] 13.激酶抑制剂福坦替尼(fostamatinib)(衍生化)([6-({5-氟-2-[(3,4,5-三甲氧基苯基)氨基]嘧啶-4-基}氨基)-2,2-二甲基-3-氧代-2,3-二氢-4H-吡啶并[3,2-b]-1,4-噁嗪-4-基]甲基磷酸二钠六水合物)(衍生化,其中连接基团例如经由甲氧基基团连接);

[0678] 14.激酶抑制剂吉非替尼(gefitinib)(衍生化)(N-(3-氯-4-氟-苯基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉-4-基丙氧基)喹唑啉-4-胺):

[0679] 

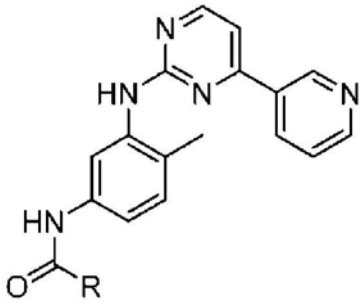
[0680] (衍生化,其中连接基团例如经由甲氧基或醚基团连接);

[0681] 15.激酶抑制剂乐伐替尼(lenvatinib)(衍生化)(4-[3-氯-4-(环丙基氨甲酰基氨基)苯氧基]-7-甲氧基-喹啉-6-甲酰胺)(衍生化,其中连接基团例如经由环丙基基团连接);

[0682] 16.激酶抑制剂凡德他尼(vandetanib)(衍生化)(N-(4-溴-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[(1-甲基哌啶-4-基)甲氧基]喹唑啉-4-胺)(衍生化,其中连接基团例如经甲氧基或羟基基团连接);

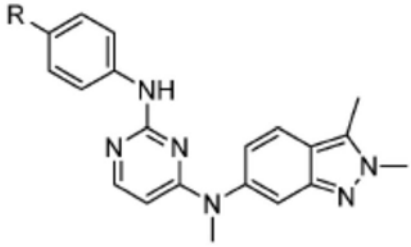
[0683] 17.激酶抑制剂维罗非尼(vemurafenib)(衍生化)(丙烷-1-磺酸{3-[5-(4-氯苯基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-羰基]-2,4-二氟-苯基}-酰胺)(衍生化,其中连接基团例如经由磺酰基丙基基团连接);

[0684] 18.激酶抑制剂格列卫(Gleevec)(也称为伊马替尼)(衍生化):

[0685] 

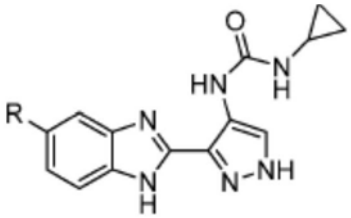
[0686] (衍生化,其中R是例如经由酰胺基团或经由苯胺胺基团连接的连接基团);

[0687] 19.激酶抑制剂帕唑帕尼(pazopanib)(衍生化)(VEGFR3抑制剂):

[0688] 

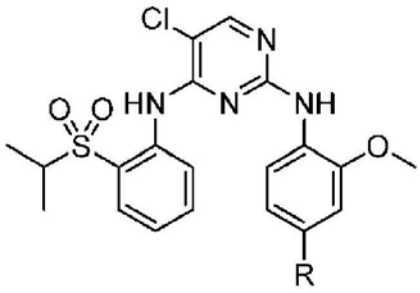
[0689] (衍生化,其中R是例如与苯基部分连接或经由苯胺胺基团连接的连接基团);

[0690] 20.激酶抑制剂AT-9283(衍生化)极光(Aurora)激酶抑制剂

[0691] 

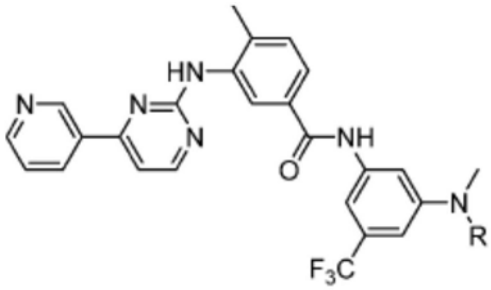
[0692] (其中R是例如与苯基部分连接的连接基团);

[0693] 21.激酶抑制剂TAE684(衍生化)ALK抑制剂

[0694] 

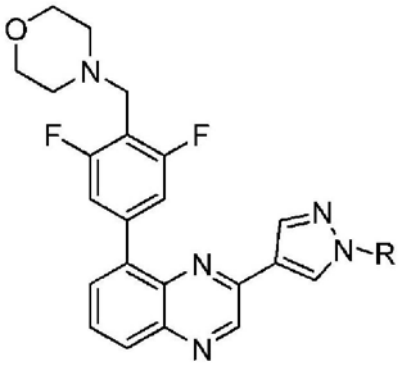
[0695] (其中R是例如与苯基部分连接的连接基团)；

[0696] 22.激酶抑制剂尼洛替尼(nilotanib)(衍生化)Abl抑制剂：

[0697] 

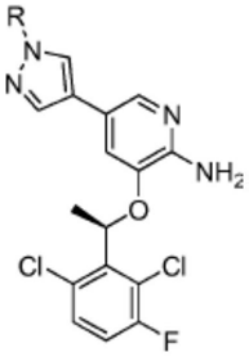
[0698] (衍生化,其中R是例如与苯基部分或苯胺胺基团连接的连接基团)；

[0699] 23.激酶抑制剂NVP-BSK805(衍生化)JAK2抑制剂

[0700] 

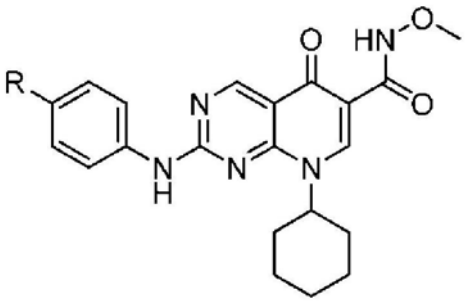
[0701] (衍生化,其中R是例如与苯基部分或二唑基团连接的连接基团)；

[0702] 24.激酶抑制剂克唑替尼(crizotinib)衍生化Alk抑制剂

[0703] 

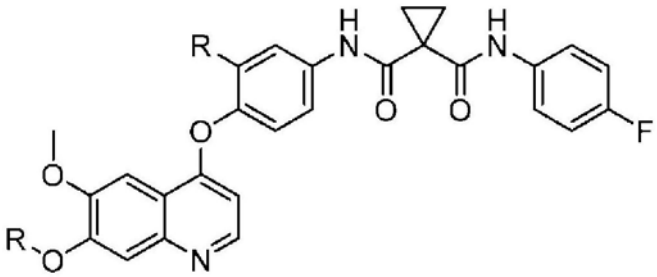
[0704] (衍生化,其中R是例如与苯基部分或二唑基团连接的连接基团)；

[0705] 25.激酶抑制剂JNJ FMS(衍生化)抑制剂

[0706] 

[0707] (衍生化,其中R是例如与苯基部分连接的连接基团);

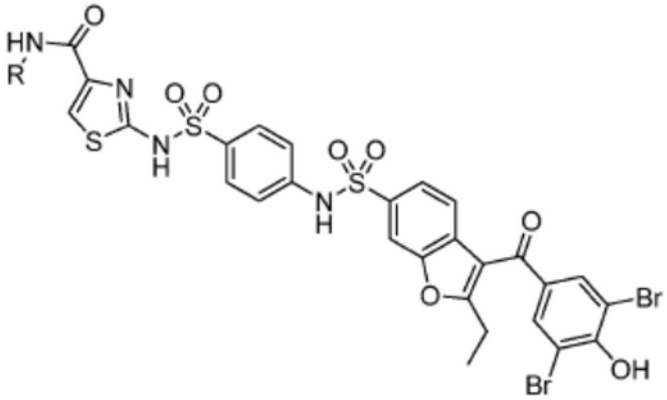
[0708] 26.激酶抑制剂佛瑞替尼(foretinib)(衍生化)Met抑制剂

[0709] 

[0710] (衍生化,其中R是例如与苯基部分或喹啉部分上的羟基或醚基团连接的连接基团);

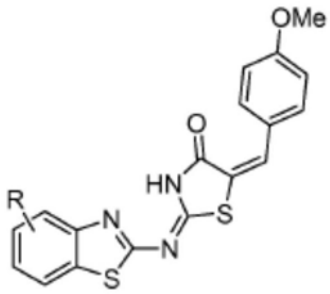
[0711] 27.变构蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂PTP1B

[0712] (衍生化:

[0713] 

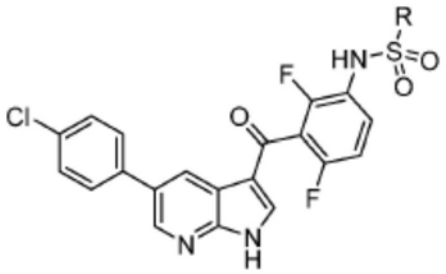
[0714] 衍生化,其中连接基团例如在所示的R处连接;

[0715] 28.酪氨酸磷酸酶的SHP-2结构域的抑制剂(衍生化):

[0716] 

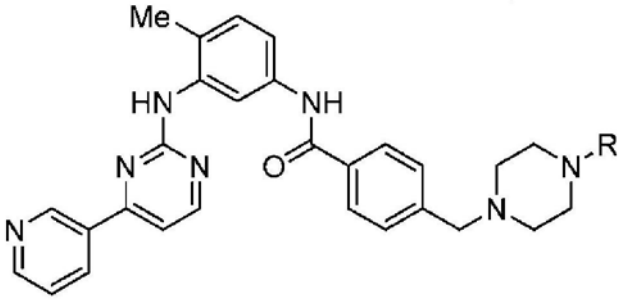
[0717] 衍生化,其中连接基团例如在R处连接;

[0718] 29.BRAF(BRAFV600E)/MEK的抑制剂(衍生化):

[0719] 

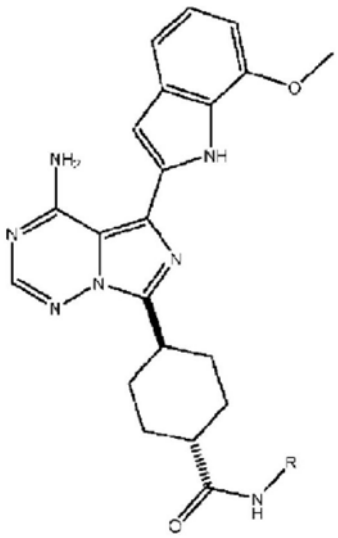
[0720] 衍生化,其中连接基团例如在R处连接;

[0721] 30.酪氨酸激酶ABL的抑制剂(衍生化)

[0722] 

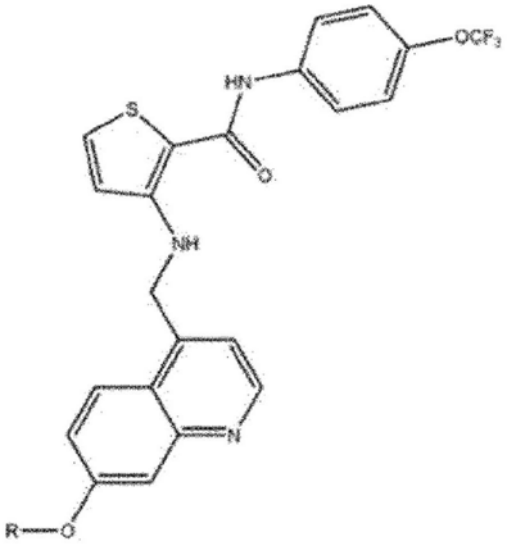
[0723] 衍生化,其中连接基团例如在R处连接;

[0724] 31.激酶抑制剂OSI-027(衍生化)mTORC1/2抑制剂

[0725] 

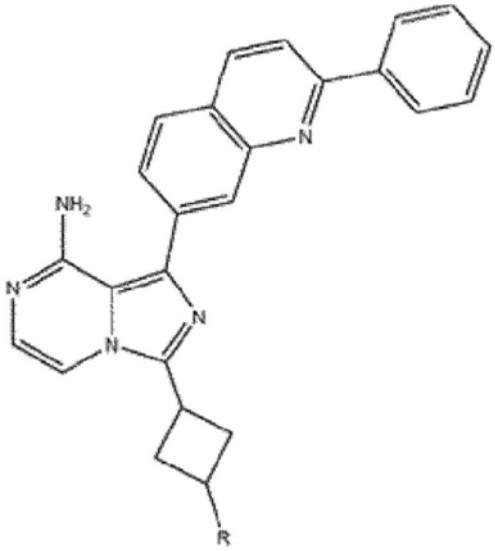
[0726] 衍生化,其中连接基团例如在R处连接;

[0727] 32.激酶抑制剂OSI-930(衍生化)c-Kit/KDR抑制剂

[0728] 

[0729] 衍生化,其中连接基团例如在R处连接;以及

[0730] 33.激酶抑制剂OSI-906(衍生化)IGF1R/IR抑制剂

[0731] 

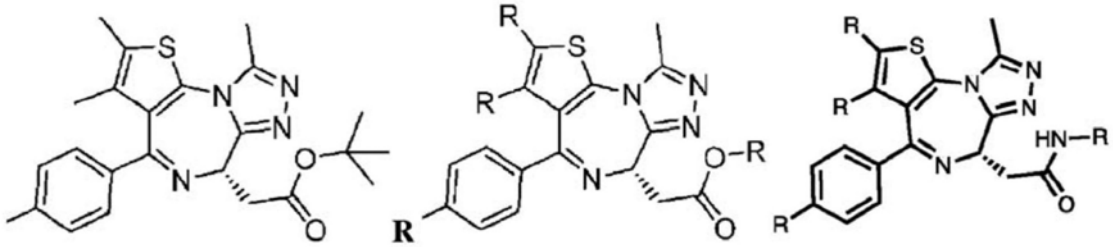
[0732] 衍生化,其中连接基团例如在R处连接;

[0733] (衍生化,其中"R"表示用于在哌嗪部分上与连接基团连接的位点)。

[0734] II.靶向含有人BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物:

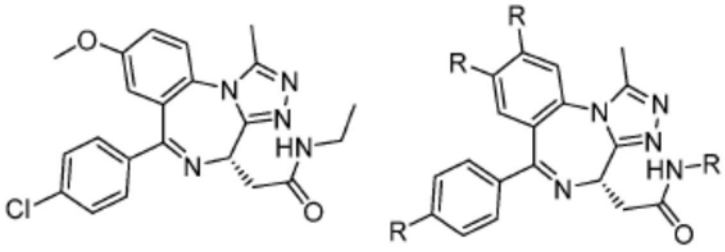
[0735] 靶向含有人BET布罗莫结构域的蛋白质的化合物包括但不限于与下述靶标有关的化合物,其中"R"表示用于连接基团连接的位点,例如:

[0736] JQ1,Filippakopoulos等人Selective inhibition of BET bromodomains(BET布罗莫结构域的选择性抑制).Nature(2010):

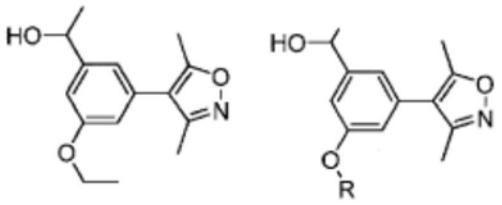
[0737] 

[0738] 2.I-BET,Nicodeme等人Supression of Inflammation by a Synthetic Histone

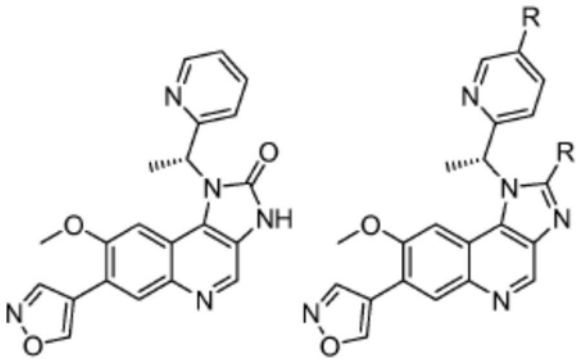
(通过合成组蛋白的炎症抑制)Mimic.Nature(2010).Chung等人Discovery and Characterization of Small Molecule Inhibitors of the BET Family Bromodomains (BET家族布罗莫结构域的小分子抑制剂的发现和表征).J.Med Chem.(2011)：

[0739] 

[0740] 3.在Hewings等人3,5-Dimethylisoxazoles Act as Acetyl-lysine Bromodomain Ligands(3,5-二甲基异噁唑用作乙酰基-赖氨酸布罗莫结构域配体).(2011,J.Med.Chem.54:6761-6770)中描述的化合物。

[0741] 

[0742] 4.I-BET151,Dawson等人Inhibition of BET Recruitment to Chromatin as an Effective Treatment for MLL-fusion Leukemia(抑制向染色质的BET募集作为MLL-融合白血病的有效治疗).Nature(2011)：

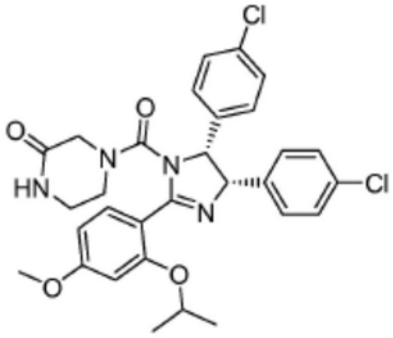
[0743] 

[0744] (其中在每个情况下R表示用于与连接基团连接的位点。)

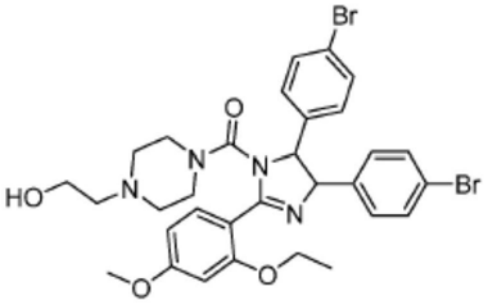
[0745] III.HDM2/MDM2抑制剂：

[0746] 本发明的HDM2/MDM2抑制剂包括但不限于：

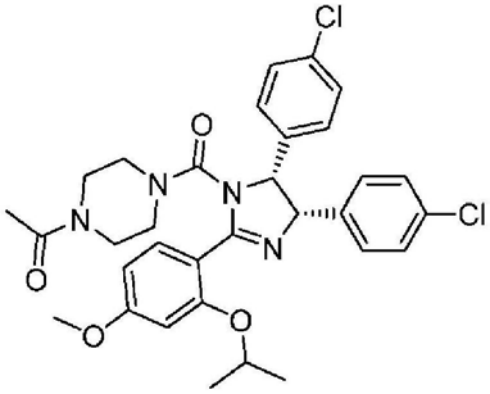
[0747] 1.在Vassilev等人,In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2(通过MDM2的小分子拮抗剂的p53通路体内激活),(2004,Science,303844-848)和Schneekloth等人,Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule:En route to chemical proteomics(由小分子诱导的靶向细胞内蛋白质降解:通向化学蛋白组学),(2008,Biorg.Med.Chem.Lett.,18:5904-5908)中确定的HDM2/MDM2抑制剂,包括(或另外地)如下所述的化合物nutlin-3、nutlin-2和nutlin-1(衍生化),以及它们的所有衍生物和类似物：

[0748] 

[0749] (衍生化,其中连接基团例如在甲氧基基团或羟基基团处连接);

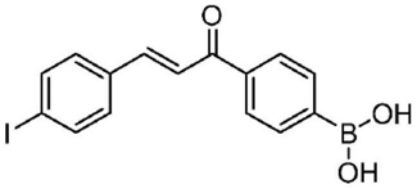
[0750] 

[0751] (衍生化,其中连接基团例如在甲氧基基团或羟基基团处连接);

[0752] 

[0753] (衍生化,其中连接基团例如经由甲氧基基团或羟基基团连接);

[0754] 2.反式-4-碘-4'-硼烷基-查耳酮

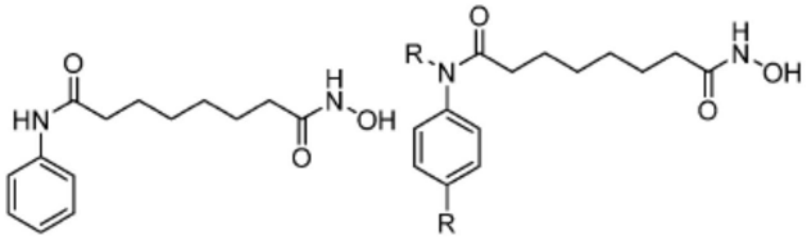
[0755] 

[0756] (衍生化,其中连接基团例如经由羟基基团连接);

[0757] IV.HDAC抑制剂:

[0758] HDAC抑制剂(衍生化)包括但不限于:

[0759] 1.Finnin、M.S.等人Structures of Histone Deacetylase Homologue Bound to the TSA and SAHA Inhibitors(与TSA和SAHA抑制剂结合的组蛋白脱乙酰基酶同系物的结构).(1999,Nature,40:188-193)。

[0760] 

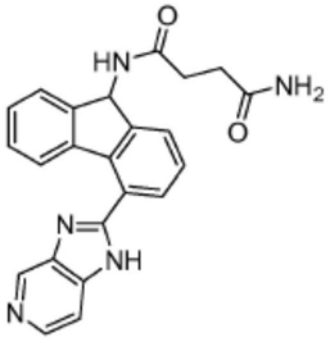
[0761] (衍生化,其中“R”表示用于连接例如连接基团的位点;以及

[0762] 2.如由PCT WO0222577(“DEACETYLASE INHIBITORS(脱乙酰基酶抑制剂)”)的式(I)所限定的化合物(衍生化,其中连接基团例如经由羟基基团连接);

[0763] V.热休克蛋白90(HSP90)抑制剂:

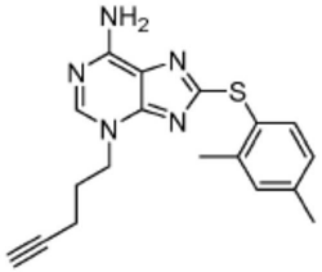
[0764] 根据本发明可用的HSP90抑制剂包括但不限于:

[0765] 1.在Vallee等人,“Tricyclic Series of Heat Shock Protein 90(HSP90) Inhibitors Part I:Discovery of Tricyclic Imidazo[4,5-C]Pyridines as Potent Inhibitors of the HSP90 Molecular Chaperone(三环系热休克蛋白90(HSP90)抑制剂部分I:发现三环咪唑并[4,5-C]吡啶作为HSP90分子分子伴侣的有效抑制剂)(2011,].Med.Chem.,54:7206)中确定的HSP90抑制剂,包括YKB(N-[4-(3H-咪唑并[4,5-C]吡啶-2-基)-9H-芴-9-基]-琥珀酰胺):

[0766] 

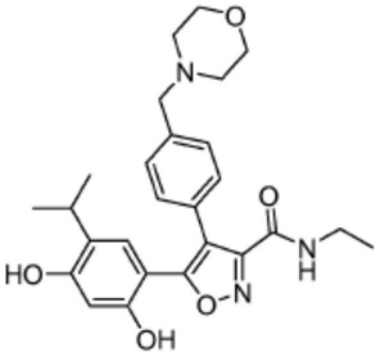
[0767] 衍生化,其中连接基团例如经由末端酰胺基团连接;

[0768] 2.HSP90抑制剂p54(改性的)(8-[(2,4-二甲基苯基)硫烷基]-3]戊-4-炔-1-基-3H-嘌呤-6-胺):

[0769] 

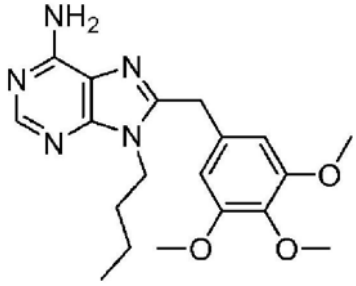
[0770] 其中连接基团例如经由末端乙炔基团连接;

[0771] 3.在Brough等人,“4,5-Diarylisoxazole HSP90 Chaperone Inhibitors: Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer(4,5-二芳基异噁唑HSP90分子伴侣抑制剂:用于治疗癌症的潜在治疗剂)”,(2008,].Med.Chem.,51:196)中确定的HSP90抑制剂(改性的),包括具有以下结构的化合物2GJ(5-[2,4-二羟基-5-(1-甲基乙基)苯基]-n-乙基-4-[4-(吗啉-4-基甲基)苯基]异噁唑-3-甲酰胺):

[0772] 

[0773] 衍生化,其中连接基团例如经由酰胺基团(在胺处或在胺上的烷基基团处)连接;

[0774] 4.在Wright等人,Structure-Activity Relationships in Purine-Based Inhibitor Binding to HSP90 Isoforms(与HSP90同工型结合的基于嘌呤的抑制剂的构效关系),(2004年1月,Chem Biol.11(6):775-85)中确定的HSP90抑制剂(改性的),包括具有以下结构的HSP90抑制剂PU3:

[0775] 

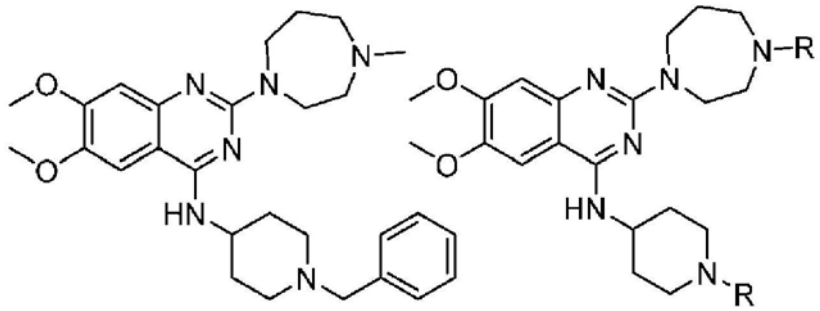
[0776] 其中连接基团例如经由丁基基团连接;以及

[0777] 5.HSP90抑制剂格尔德霉素(geldanamycin)((4E,6Z,8S,9S,10E,12S,13R,14S,16R)-13-羟基-8,14,19-三甲氧基-4,10,12,16-四甲基-3,20,22-三氧代-2-氮杂二环[16.3.1](衍生化)或其任何衍生物(例如17-烷基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素("17-AAG")或17-(2-二甲基氨基乙基)氨基-17-去甲氧基格尔德霉素("17-DMAG"))(衍生化,其中例如经由酰胺基团连接)。

[0778] VI.人赖氨酸甲基转移酶抑制剂:

[0779] 人赖氨酸甲基转移酶抑制剂包括但不限于:

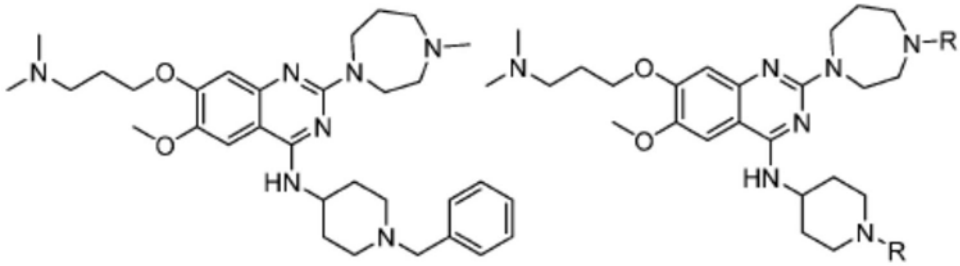
[0780] 1.Chang等人Structural Basis for G9a-Like protein Lysine Methyltransferase Inhibition by BIX-1294(BIX-1294的G9a-样蛋白赖氨酸甲基转移酶抑制的结构基础)(2009,Nat.Struct.Biol.,16(3):312)。

[0781] 

[0782] (衍生化,其中"R"表示用于连接例如连接基团的位点;

[0783] 2.Liu、F.等人2,4-Diamino-7-aminoalkoxyquinazoline as a Potent and

Selective Inhibitor of Histone Methyltransferase G9a(发现2,4-二氨基-7-氨基烷氧基喹唑啉作为组蛋白甲基转移酶G9a的有效且选择性的抑制剂).(2009,J.Med.Chem.,52(24):7950)。

[0784] 

[0785] (衍生化,其中"R"表示用于连接基团连接的可能位点);

[0786] 3.阿扎胞苷(Azacitidine)(衍生化)(4-氨基-1--D-呋喃核糖基-1,3,5-三嗪-2(1H)-酮)(衍生化,其中连接基团例如经由羟基或氨基基团连接);以及

[0787] 4.地西他滨(Decitabine)(衍生化)(4-氨基-1-(2-去氧-b-D-赤式-呋喃戊糖基)-1,3,5-三嗪-2(1H)-酮)(衍生化,其中连接基团例如经由任一羟基基团或在氨基基团处连接)。

[0788] VII.血管生成抑制剂

[0789] 血管生成抑制剂包括但不限于:

[0790] 1.GA-1(衍生化)及其衍生物和类似物,具有如Sakamoto等人,Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation(靶向癌症促进蛋白以进行泛素化和降解的Protacs的开发)、(2003Dec.,Mol.Cell Proteomics,2(12):1350-1358)所述的结构并且与其中所述的连接基团结合;

[0791] 2.雌二醇(衍生化),其可以与通常如Rodriguez-Gonzalez等人,Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer(靶向类固醇激素受体以在乳腺癌和前列腺癌中进行泛素化和降解),(2008,Oncogene 27:7201-7211)所述的连接基团结合;

[0792] 3.雌二醇、睾酮(衍生化)以及相关衍生物,包括但不限于DHT及其衍生物和类似物,具有通常如Sakamoto等人,Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation(靶向癌症促进蛋白以进行泛素化和降解的Protacs的开发),(2003Dec.,Mol.Cell Proteomics,2(12):1350-1358)所述的结构并且与其中所述的连接基团结合;以及

[0793] 4.卵假散囊菌素(Ovalicin)、烟曲霉素(fumagillin)(衍生化)及其衍生物和类似物,具有通常如Sakamoto等人,Protacs:chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation(Protacs:靶向Skp1-Cullin-F盒复合物以进行泛素化和降解的嵌合分子)(2001Jul.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,98(15):8554-8559)和美国专利号7,208,157所述的结构并且与其中所述的连接基团结合。

[0794] VIII.免疫抑制化合物:

[0795] 免疫抑制化合物包括但不限于:

[0796] 1.AP21998(衍生化),具有通常如Schneekloth等人,Chemical Genetic Control

of Protein Levels:Selective in Vivo Targeted Degradation(蛋白质水平的化学基因控制:体内选择性靶向降解)(2004,J.Am.Chem.Soc.、126:3748-3754)所述的结构并且与其中所述的连接基团结合。

[0797] 2.糖皮质激素(例如,氢化可的松(hydrocortisone)、泼尼松(prednisone)、泼尼松龙(prednisolone)和甲泼尼龙(methylprednisolone))(衍生化,其中连接基团例如与任一羟基结合)以及二丙酸倍氯米松(beclometasone dipropionate)(衍生化,其中连接基团例如与丙酸酯结合);

[0798] 3.甲氨喋呤(Methotrexate)(衍生化,其中连接基团可以例如与任一末端羟基结合);

[0799] 4.环孢素(Ciclosporin)(衍生化,其中连接基团可以例如在丁基基团处结合);

[0800] 5.他克莫司(Tacrolimus)(FK-506)和雷帕霉素(rapamycin)(衍生化,其中连接基团可以例如在甲氧基基团中的一个处结合);以及

[0801] 6.放线菌素(Actinomycin)(衍生化,其中连接基团可以例如在异丙基基团中的一个处结合)。

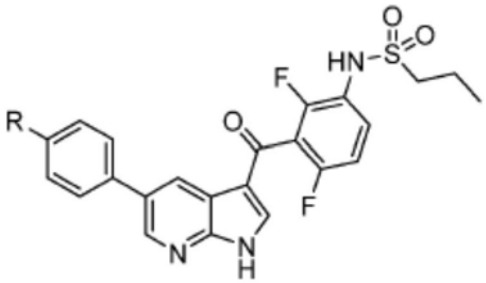
[0802] IX.靶向芳烃受体(AHR)的化合物

[0803] 靶向芳烃受体(AHR)的化合物包括但不限于:

[0804] 1.芹菜素(Apigenin)(以结合至连接基团的方式衍生化,通常如Lee等人,Targeted Degradation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by the PROTAC Approach: A Useful Chemical Genetic Tool(通过PROTAC途径的芳烃受体靶向降解:有用的化学基因工具),ChemBioChem第8卷,第17期,第2058-2062页,2007年11月23日);以及

[0805] 2.Srl和LGC006(衍生化,以便结合连接基团),如Boitano等人,Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells(芳烃受体拮抗剂促进人造血干细胞的扩增)(2010年9月,Science,329(5997):1345-1348)所述。

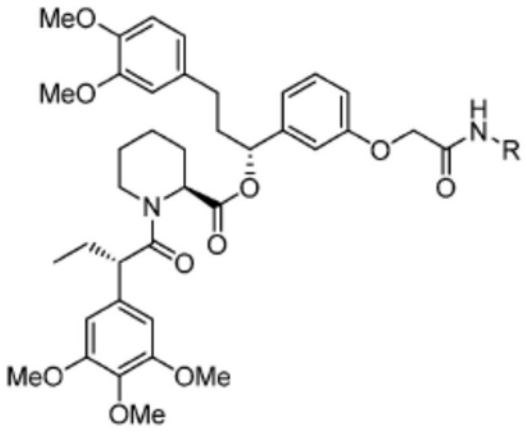
[0806] X.靶向RAF受体的化合物(激酶):

[0807] 

[0808] PLX4032

[0809] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。

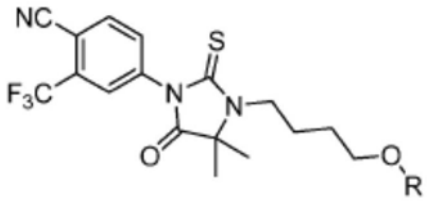
[0810] XI.靶向FKBP的化合物:

[0811] 

[0812] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。

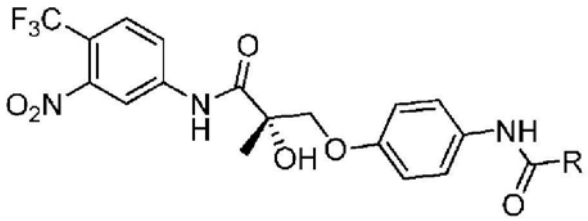
[0813] XII.靶向雄激素受体(AR)的化合物:

[0814] 1.雄激素受体的RU59063配体(衍生化)

[0815] 

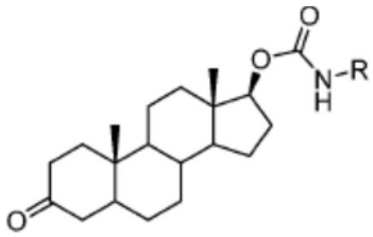
[0816] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。

[0817] 2.雄激素受体的SARM配体(衍生化)

[0818] 

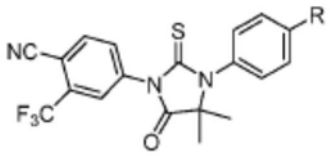
[0819] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。

[0820] 3.雄激素受体配体DHT(衍生化)

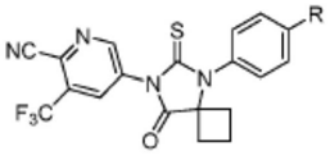
[0821] 

[0822] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。

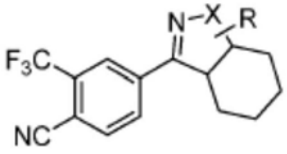
[0823] 4.MDV3100配体(衍生化)

[0824] 

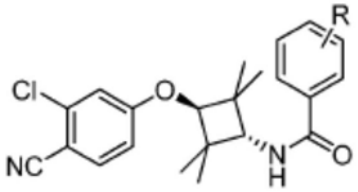
[0825] 5.ARN-509配体(衍生化)

[0826] 

[0827] 6.六氢苯并异噁唑

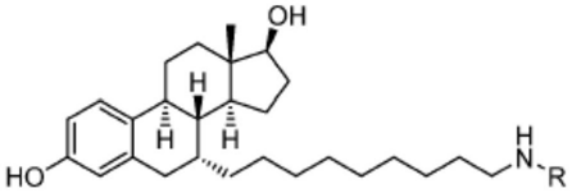
[0828] 

[0829] 7.四甲基环丁烷

[0830] 

[0831] XIII.靶向雌激素受体(ER)的化合物ICI-182780：

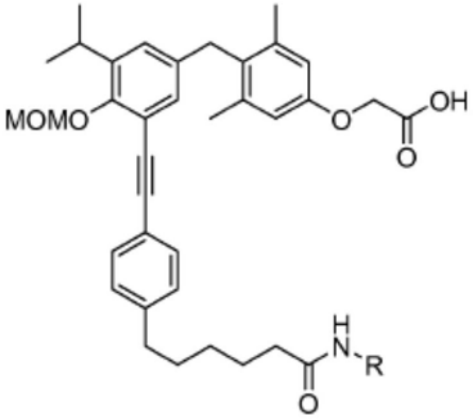
[0832] 1.雌激素受体配体

[0833] 

[0834] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。

[0835] XIV.靶向甲状腺激素受体(TR)的化合物：

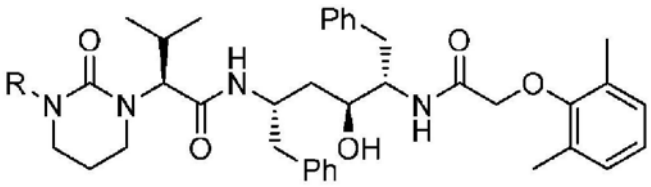
[0836] 1.甲状腺激素受体配体(衍生化)

[0837] 

[0838] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点,并且MOMO表示甲氧基甲氧基基团)。

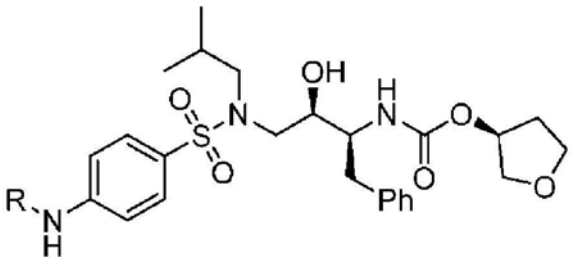
[0839] XV.靶向HIV蛋白酶的化合物

[0840] 1.HIV蛋白酶的抑制剂(衍生化)

[0841] 

[0842] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。参见2010,J.Med.Chem.,53:521-538。

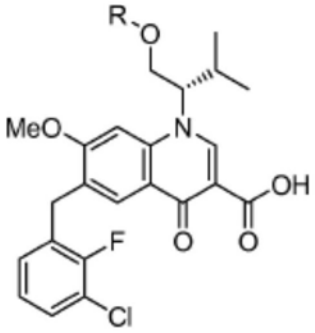
[0843] 2.HIV蛋白酶的抑制剂

[0844] 

[0845] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的可能位点)。参见2010,J.Med.Chem.,53:521-538。

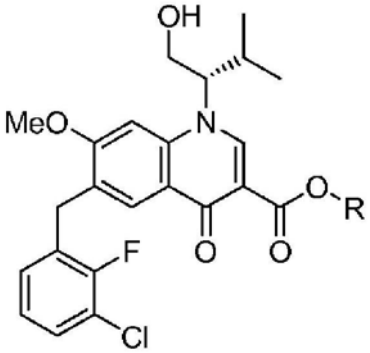
[0846] XVI.靶向HIV整合酶的化合物

[0847] 1.HIV整合酶的抑制剂(衍生化)

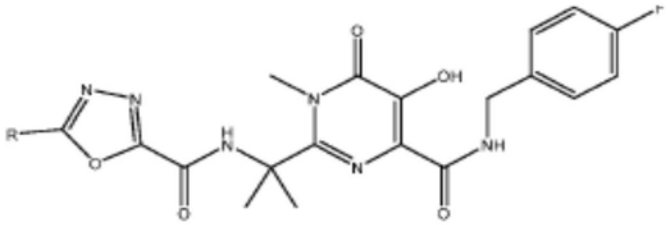
[0848] 

[0849] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。参见2010,J.Med.Chem.,53:6466。

[0850] 2.HIV整合酶的抑制剂(衍生化)

[0851] 

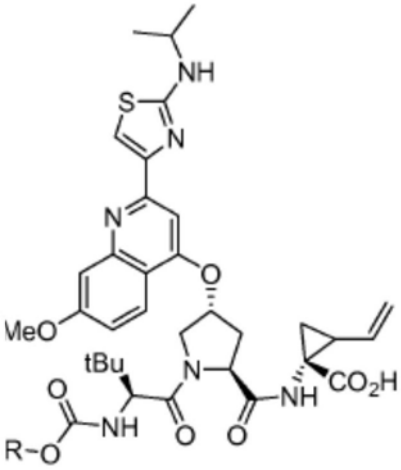
[0852] 3.HIV整合酶的抑制剂Isetntress(衍生化)

[0853] 

[0854] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。参见2010,J.Med.Chem.,53:6466。

[0855] XVII.靶向HCV蛋白酶的化合物

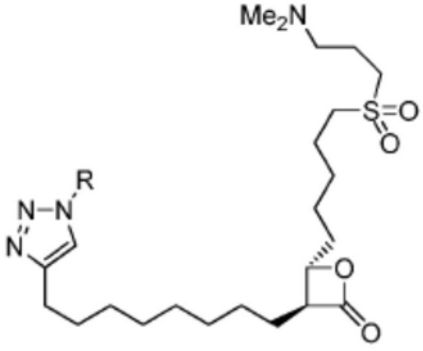
[0856] 1.HCV蛋白酶的抑制剂(衍生化)

[0857] 

[0858] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。

[0859] XVIII.靶向酰基-蛋白硫酯酶-1和-2(APT1和APT2)的化合物

[0860] 1.APT1和APT2的抑制剂(衍生化)

[0861] 

[0862] (衍生化,其中“R”表示用于连接基团连接的位点)。参见2011,Angew.Chem.Int.Ed.,50:9838-9842。

[0863] 靶蛋白

[0864] 根据本发明可用的“靶蛋白”包括本领域技术人员选择用以增加细胞内蛋白水解的蛋白质或多肽。

[0865] 根据本发明可用的靶蛋白包括蛋白质或多肽,包括其片段、其类似物/或其同系物。靶蛋白包括具有生物功能或活性(包括结构、调节、激素、酶、遗传、免疫、收缩、储存、运输和信号转导)的蛋白质和肽。在某些实施方案中,靶蛋白包括结构蛋白,受体,酶,细胞表面蛋白,与细胞整合功能相关的蛋白质(包括参与催化活性、芳香酶活性、运动活性、解旋酶

活性、代谢过程(合成代谢和分解代谢)、抗氧化活性、蛋白水解、生物合成的蛋白质),具有激酶活性、氧化还原酶活性、转移酶活性、水解酶活性、裂解酶活性、异构酶活性、连接酶活性、酶调节剂活性、信号转导活性、结构分子活性、结合活性(蛋白质、脂质碳水化合物)、受体活性、细胞运动性、膜融合、细胞通讯、生物过程调节、发育、细胞分化、对刺激的反应的蛋白质,行为蛋白,细胞粘附蛋白,参与细胞死亡的蛋白质,参与以下的蛋白质:运输(包括蛋白质转运活性、核转运、离子转运蛋白活性、通道转运蛋白活性、载体活性、通透酶活性、分泌活性、电子转运蛋白活性、发病、分子伴侣调节蛋白活性、核酸结合活性、转录调节蛋白活性、细胞外组织和生物发生活性、翻译调节蛋白活性。目标蛋白质可以包括来自真核生物和原核生物的蛋白质,包括微生物、病毒、真菌和寄生虫,尤其包括作为药物疗法靶标的人、其他动物(包括驯养动物)、微生物、病毒、真菌和寄生虫。

[0866] 靶蛋白还包括人治疗药的靶标。这些包括可以用于在多种多基因疾病中恢复功能的蛋白质,包括例如B7.1和B7、TNFR1、TNFR2、NADPH氧化酶、BclI/Bax和凋亡途径中的其他配偶体、C5a受体、HMG-CoA还原酶、PDE V磷酸二酯酶类型、PDE IV磷酸二酯酶4型、PDE I、PDEII、PDEIII、角鲨烯环化酶抑制剂、CXCR1、CXCR2、一氧化氮(NO)合酶、环加氧酶1、环加氧酶2、5HT受体、多巴胺受体、G蛋白(即Gq)、组胺受体、5-脂氧合酶、类胰蛋白酶丝氨酸蛋白酶、胸苷酸合成酶、嘌呤核苷磷酸化酶、锥虫GAPDH、糖原磷酸化酶、碳酸酐酶、趋化因子受体、JAK STAT、RXR及类似物、HIV 1蛋白酶、HIV 1整合酶、流感神经氨酸酶、乙型肝炎逆转录酶、钠通道、多重耐药性(MDR)、蛋白质P-糖蛋白(和MRP)、酪氨酸激酶、CD23、CD124、酪氨酸激酶p56 lck、CD4、CD5、IL-2受体、IL-1受体、TNF-αR、ICAM1、Cat+通道、VCAM、VLA-4整合素、选择素、CD40/CD40L、神经激肽(newokinin)和受体、肌苷一磷酸脱氢酶、p38 MAP激酶、Ras/Raf/MEK/ERK通路、白介素-1转换酶、胱天蛋白酶、HCV、NS3蛋白酶、HCV NS3 RNA解旋酶、甘氨酰胺核糖核苷酸甲酰转移酶、鼻病毒3C蛋白酶、单纯疱疹病毒-1(HSV-I)、蛋白酶、巨细胞病毒(CMV)蛋白酶、聚(ADP-核糖)聚合酶、周期蛋白依赖性激酶、血管内皮生长因子、催产素受体、微粒体转运蛋白抑制剂、胆汁酸转运抑制剂、5α还原酶抑制剂、血管紧张素11、甘氨酸受体、去甲肾上腺素再摄取受体、内皮素受体、神经肽Y和受体、雌激素受体、雄激素受体、腺苷受体、腺苷激酶和AMP脱氨酶、嘌呤能受体(P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2X1-7)、法尼基转移酶、香叶酰转移酶、NGF的TrkA受体、β-淀粉样蛋白、酪氨酸激酶Flk-IIKDR、玻连蛋白受体、整合素受体、Her-21neu、端粒酶抑制、细胞溶质磷脂酶A2和EGF受体酪氨酸激酶。另外的蛋白质靶标包括例如蜕皮激素20-单加氧酶、GABA门控氯离子通道的离子通道、乙酰胆碱酯酶、电压敏感性钠通道蛋白、钙释放通道和氯离子通道。再另外的靶蛋白包括乙酰-CoA羧化酶、腺苷酸琥珀酸合成酶、原卟啉原氧化酶和烯醇丙酮莽草酸磷酸合酶。

[0867] 本发明的靶标结合配偶体还可以是卤代烷脱卤素酶。含有氯烷烃肽结合部分(C1-C12,通常约C2-C10烷基卤代基团)的根据本发明的化合物可以用于抑制和/或降解用于融合蛋白或相关诊断蛋白的卤代烷烃脱卤素酶,如于2011年12月6日递交并且于2012年6月14日作为WO 2012/078559公布的PCT/US2012/063401(其内容通过引用结合于此)中所述。

[0868] 根据本发明的双功能分子包括靶蛋白结合配偶体和Rpn11的结合配偶体。

[0869] 提供Rpn11:

[0870] Rpn11可以如下提供:Rpn11以与酵母直系同源物相同的方式表达为与PSMD7(Rpn8)的二聚体(参见Worden等人,NSMB 2014;DOI:10.1038/nsmb.2771)。含有带有GST标

签和六组氨酸标签的全长PSMD14的质粒(分别为DU22812和DU22813)购自邓迪大学的信号转导和治疗学系(Division of Signal Transduction and Therapeutics,DSTT)。PSMD7(Rpn8,AKA)的基因购自Addgene(Plasmid#22558)。PCR扩增并克隆的PSMD7和PSMD14的结构域包括MPN(Mpr1,Pad1 N-端)或JAMM(JAB1/MPN/Mov34金属酶)结构域以及C-端结构域。也可以扩增和克隆这些结构域的一部分。例如,通过PCR扩增PSDM14的残基2-243和PSMD7的残基1-180并且将其克隆到含有TEV可切割的六组氨酸标签的pCDFDuet™-1(或等效物)载体中。

[0871] Rpn11可以根据本领域公知的方法进行表达和纯化。用于表达和纯化Rpn11的方法包括以下方案:

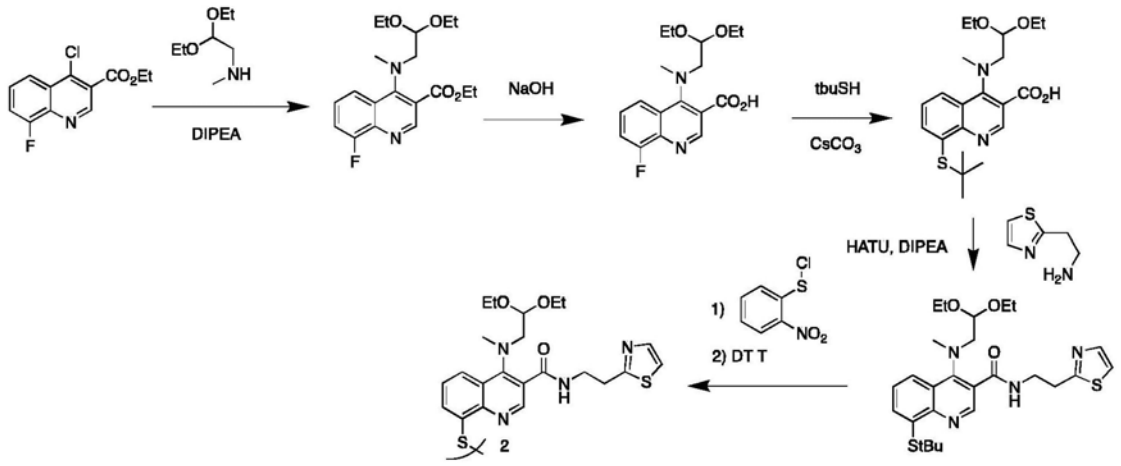
[0872] 将表达Rpn11的构建体转化到大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)细胞中,并且在37℃生长,直到达到OD600为大约0.8。然后降低温度,并且通过加入IPTG来诱导蛋白表达。诱导后16小时收获细胞,并且将其重悬于含有蛋白酶抑制剂的结合缓冲液中。用弗氏压碎器(French press)裂解细胞,然后通过离心澄清。

[0873] 根据Lee等人,Sci Rep 2015;DOI:10.1038/srep10757的改进方法来纯化带有GST标签的蛋白质。使用谷胱甘肽琼脂糖4B树脂进行亲和层析。使用前剪切(PreScission)蛋白酶进行GST-标签的柱上切割。使用脱盐柱将所得蛋白质转移至低盐缓冲液中。阴离子交换色谱使用Resource Q(或等效物)柱进行,随后使用Superdex75 16-600(或等效物)柱进行尺寸排阻色谱。

[0874] 通过Worden等人,NSMB 2014;DOI:10.1038/nsmb.2771改进的方法来纯化带有His标签的蛋白质。使用Ni-NTA树脂进行亲和层析。将所得物质用TEV蛋白酶切割过夜。第二个亲和柱用于移除切割的His标签。使用脱盐柱将所得物质转移至低盐缓冲液中。阴离子交换色谱使用Resource Q(或等效物)柱进行,随后使用Superdex75 16-600(或等效物)柱进行尺寸排阻色谱。

[0875] 待用于缀合的Rpn11结合配偶体也可以如下合成。

[0876]



[0877] 根据本发明可用的连接基团

[0878] 根据本发明可用的连接基团将Rpn11结合配偶体和靶蛋白结合配偶体连接,使得所得分子可以诱导靶蛋白结合配偶体所结合的靶标的降解。在一个实施方案中,连接基团具有第一末端和第二末端,并且在一端与Rpn11结合配偶体共价结合,并且在另一端与靶标结合配偶体共价结合。

[0879] 连接基团的第一末端和第二末端可以是相同的或不同的以提供对称或不对称的连接基团。连接基团的末端可以具有选自以下各项的官能团:酰胺、肟、酮基、碳、醚、酯、氨基甲酸酯等。连接基团可以包括具有一个或多个乙二醇亚单元的PEG连接基团、包含一个或多个CH_2基团的烷基连接基团、亚砜、环(例如苯环或嘧啶环)、三唑、醚、PEG变体以及它们的组合。在某些实施方案中,连接基团包括交替的(-CH_2-乙二醇-单元)。

[0880] 在一个实施方案中,"连接基团"具有胺和/或肟官能团,并且特别地,本发明提供了具有位于连接基团的相反末端处的胺和肟二者的连接基团,从而提供不对称的连接。在本发明的一个实施方案中,连接基团是不可裂解的直链聚合物。在另一个实施方案中,连接基团是化学可裂解的直链聚合物。在另一个实施方案中,连接基团是不可裂解的任选取代的烃聚合物。在另一个实施方案中,连接基团是对光不稳的任选取代的烃聚合物。

[0881] 在某些实施方案中,连接基团是取代或未取代的聚乙二醇连接基团,其具有1-12个乙二醇亚单元,例如1-10个乙二醇亚单元、1-8个乙二醇亚单元、2-12个乙二醇亚单元、2-8个乙二醇亚单元、3-8个乙二醇亚单元、3-6个乙二醇亚单元以及1个乙二醇亚单元、2个乙二醇亚单元、3个乙二醇亚单元、4个乙二醇亚单元、5个乙二醇亚单元、6个乙二醇亚单元、7个乙二醇亚单元、8个乙二醇亚单元、9个乙二醇亚单元、10个乙二醇亚单元、11个乙二醇亚单元或12个乙二醇亚单元。

[0882] 在某些实施方案中,连接基团是取代或未取代的烷基连接基团,其具有1-12个-CH_2-亚单元,例如1-10个-CH_2-亚单元、1-8个-CH_2-亚单元、2-12个-CH_2-亚单元、2-8个-CH_2-亚单元、3-8个-CH_2-亚单元、3-6个-CH_2-亚单元以及1个-CH_2-亚单元、2个-CH_2-亚单元、3个-CH_2-亚单元、4个-CH_2-亚单元、5个-CH_2-亚单元、6个-CH_2-、7个-CH_2-亚单元、8个-CH_2-亚单元、9个-CH_2-亚单元、10个-CH_2-亚单元、11个-CH_2-亚单元或12-CH_2-亚单元。

[0883] 连接基团可以包括取代的PEG连接基团或取代的烷基连接基团,其在沿着连接基团的任一点处包括O、P、S、N或Si原子。连接基团还可以在沿着连接基团的任一点处被芳基、亚烷基、烷基、苄基、杂环、三唑、亚砜或苯基基团的组合取代。

[0884] 在一些实施方案中,连接基团包含PEG亚单元和烷基-醚链的组合,例如(-$(CH_2CH_2)_{1-11}$-O-$(CH_2CH_2)_{1-11}$-O-)或(-$(CH_2CH_2)_{1-11}$-O-)等。在一些实施方案中,连接基团包含CH_2亚单元和氧的组合,例如烷基-醚、(-$(CH_2)_{1-11}$-O-$(CH_2)_{1-11}$-O-)或(-$(CH_2)_{1-11}$-O-)等。在一些实施方案中,连接基团包括PEG亚单元和环结构的组合。在其他实施方案中,连接基团包括CH_2亚单元和环结构的组合。

[0885] 连接基团具有这样的长度,使得Rpn11结合配偶体和靶蛋白结合配偶体分开18-95Å的距离,例如对于包含2-4个乙二醇亚单元的连接基团为18-25Å,对于包含4-6个乙二醇亚单元的连接基团为25-33Å,对于包含6-8个乙二醇亚单元的连接基团为33-39Å,对于包含8-12个乙二醇亚单元的连接基团为39-53Å,并且对于包含12-24个乙二醇亚单元的连接基团为53至95Å。在一个实施方案中,经由连接基团连接的本发明双功能分子的Rpn11结合配偶体和靶蛋白结合配偶体可以分开2个原子、3个原子、4个原子、5个原子、6个原子、7个原子、8个原子、9个原子、10个原子、11个原子、12个原子、13个原子、14个原子、15个原子、16个原子、17个原子、18个原子、19个原子、20个原子、21个原子、22个原子、23个原子、24个原子、25个原子、26个原子、27个原子、28个原子、29个原子、30个原子、40个

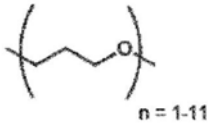
原子、50个原子、60个原子、70个原子、80个原子和90个原子或更多个原子。

[0886] 根据本发明可用的连接基团长度、稳定性和柔性，允许在根据本发明的双功能分子的两个结合配偶体之间具有给定间隔或距离；进而，给定分子的两个结合配偶体之间的间隔允许双功能分子所结合的靶蛋白呈现促进靶蛋白降解的构型。

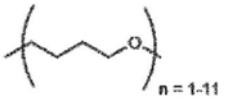
[0887] 如果当根据本发明的连接基团作为纯材料或以溶液形式储存时不发生降解或裂解，则认为其是稳定的。如果根据本发明的连接基团不被代谢，则认为其是生物学稳定的。

[0888] 在某些实施方案中，结合配偶体经由一个或多个连接基团连接。在一些实施方案中，结合配偶体通过共价键直接连接；这样的直接连接在术语“连接基团”内。

[0889] 根据本发明可用的连接基团包括但不限于



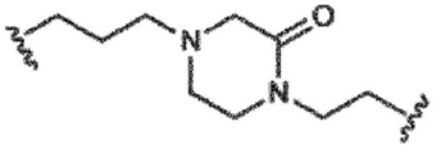
[0890] 或



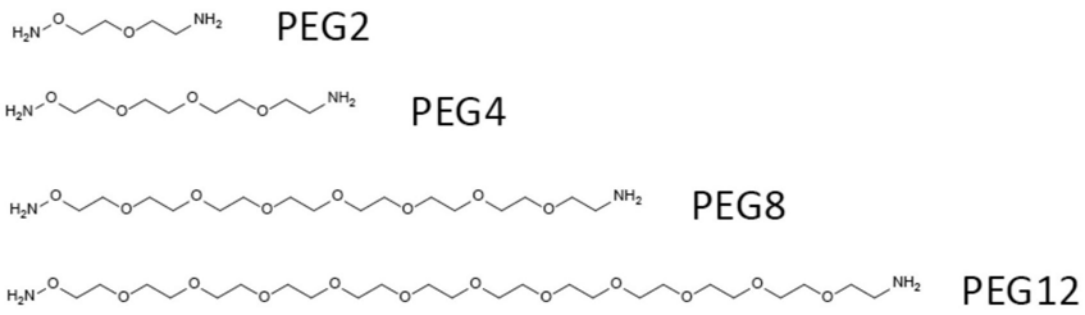
[0891] 以及它们的组合，例如，

[0892] 

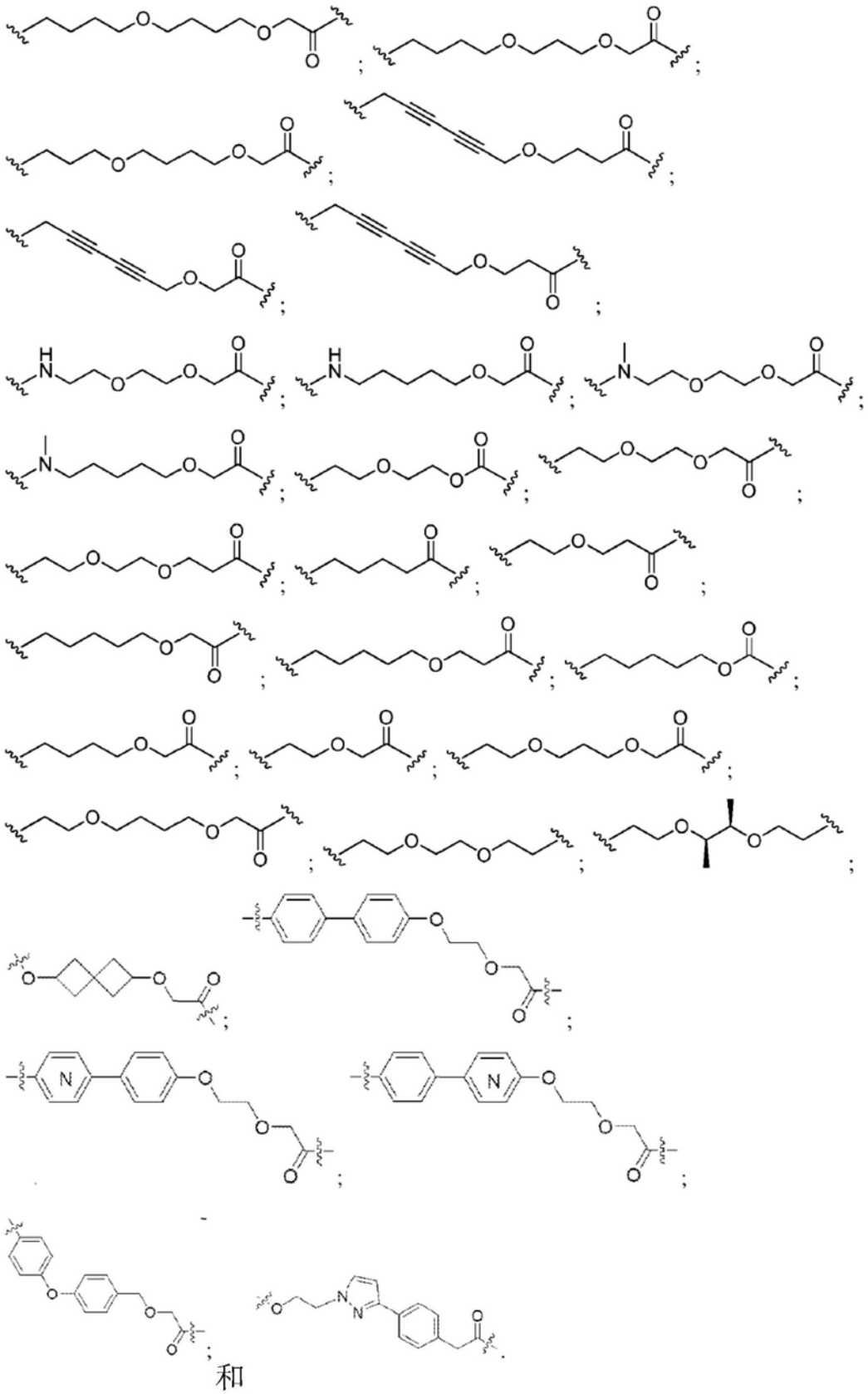
[0893] 根据本发明的连接基团可以包括环结构，例如，

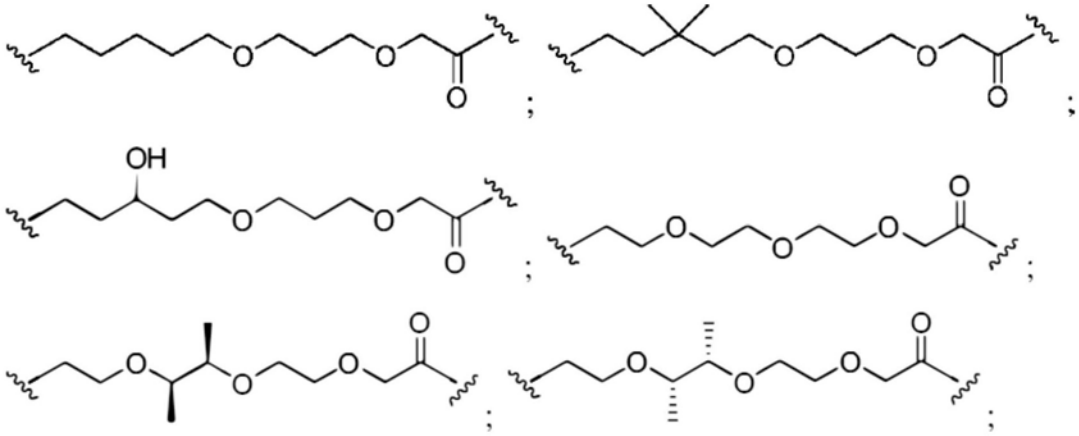
[0894] 

[0895] 根据本发明可用的连接基团可以包括在一端具有肟并且在另一端具有胺的PEG连接基团，例如，

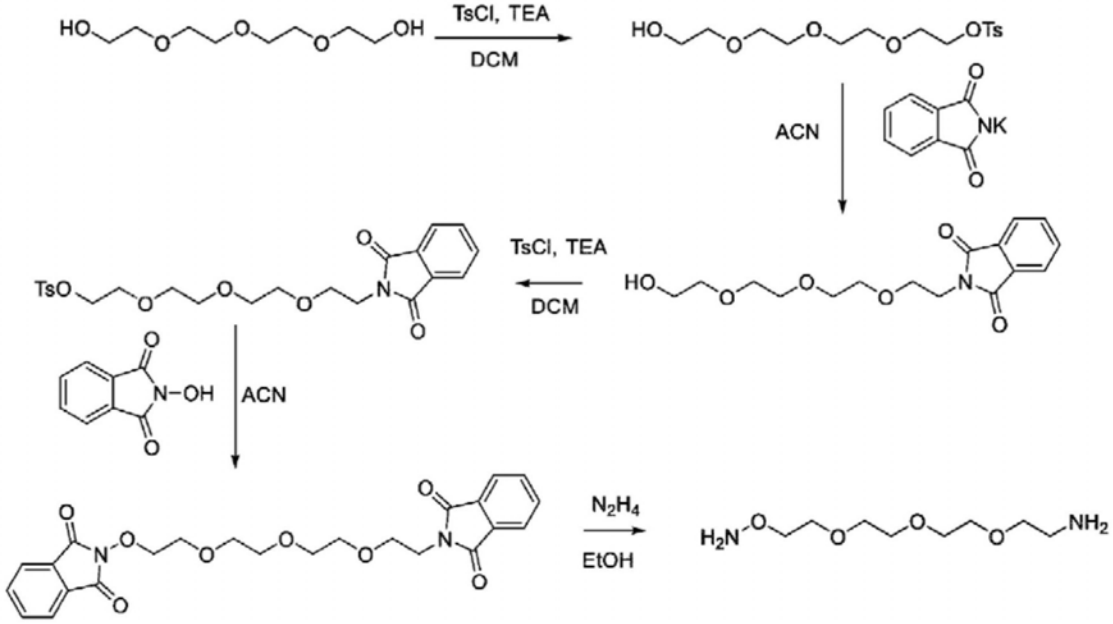
[0896] 

[0897] 根据本发明的连接基团可以包括选自以下各项的连接基团：

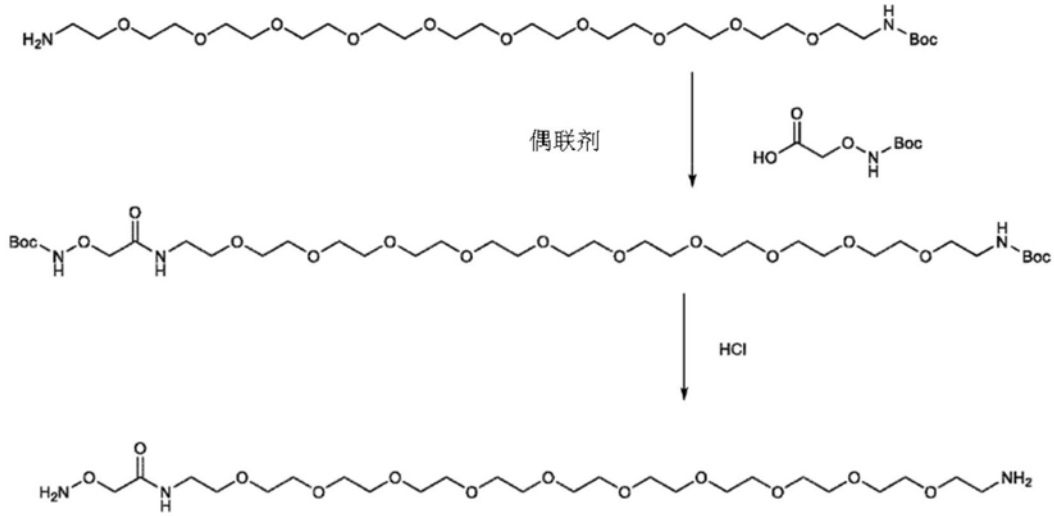
[0898] 

[0899] 

[0900] 可以通过以下方式制备根据本发明的连接基团:将PEG单甲苯磺酰化,然后在90℃在DMF或ACN中使单甲苯磺酰化的PEG与酞酰亚胺钾反应。该反应的产物被甲苯磺酰化或甲磺酰化,并且在作为碱的TEA的存在下与N-羟基酞酰亚胺反应。最终的脱保护可以通过在回流的乙醇中用过量的水合肼处理来实现。

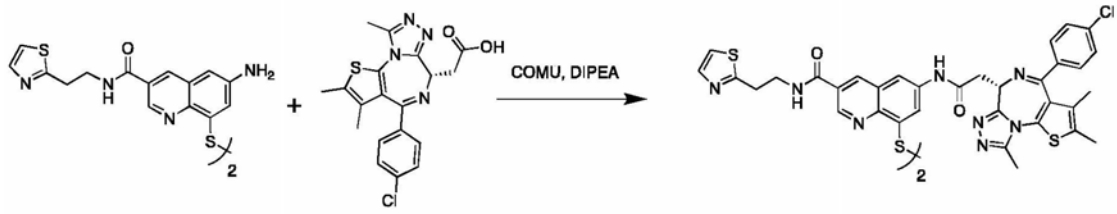
[0901] 

[0902] 还可以通过以下方式制备根据本发明的连接基团:使单BOC保护的PEG胺与Boc-氨氧基乙酸和酰胺偶联剂反应。产物是脱保护的酸,例如在HCl的存在下。

[0903] 

[0904] 本发明提供了双功能分子,其中结合配偶体直接连接并且例如如下合成:

[0905] Rpn11-BET靶向缀合物的合成

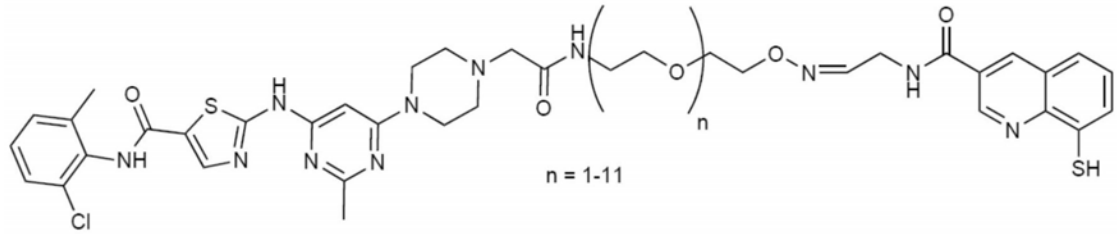
[0906] 

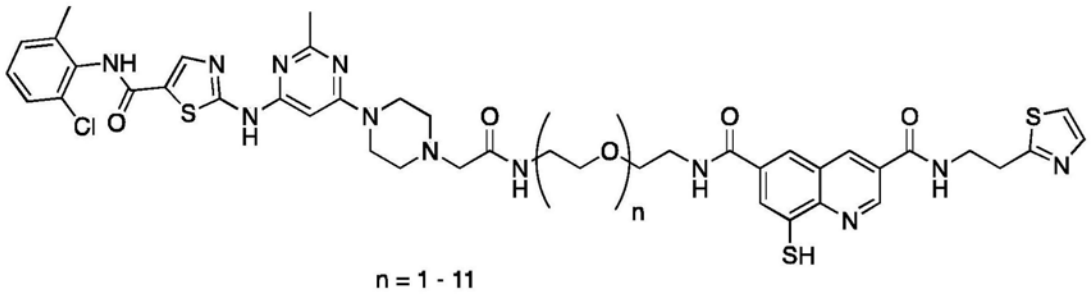
[0907] 示例性分子

[0908] 本发明提供了具有Rpn11结合配偶体和靶蛋白结合配偶体的分子,例如如本文中公开的。

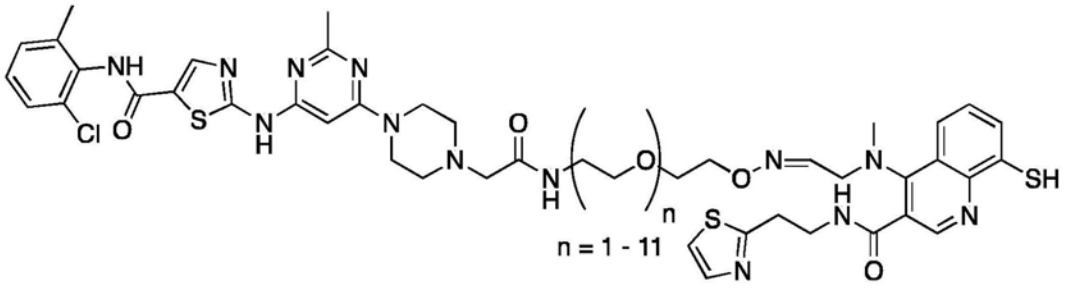
[0909] 包含Rpn11结合配偶体的激酶靶向分子

[0910] 本发明提供了包含Rpn11结合配偶体和激酶靶向配偶体的分子。下面示出了示例性结构。

[0911] 

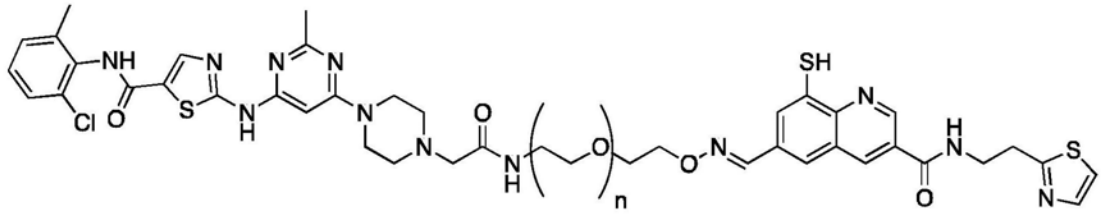


n = 1 - 11

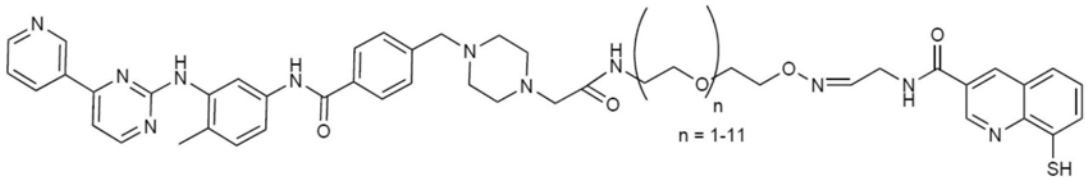


n = 1 - 11

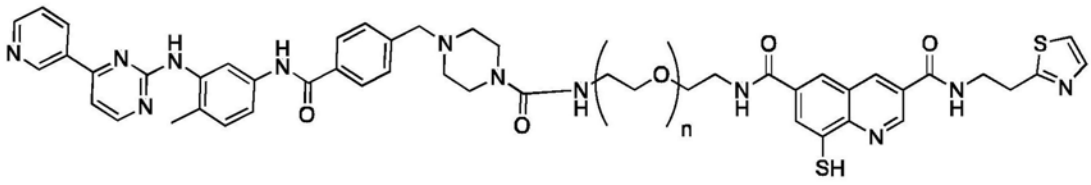
[0912]



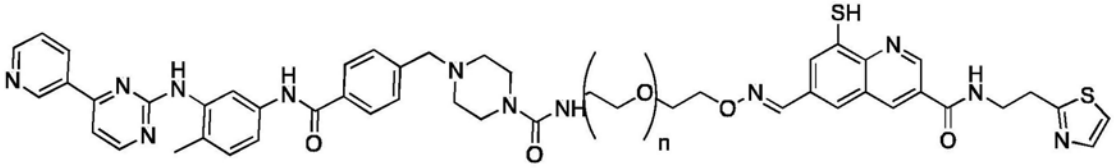
n = 1 - 11



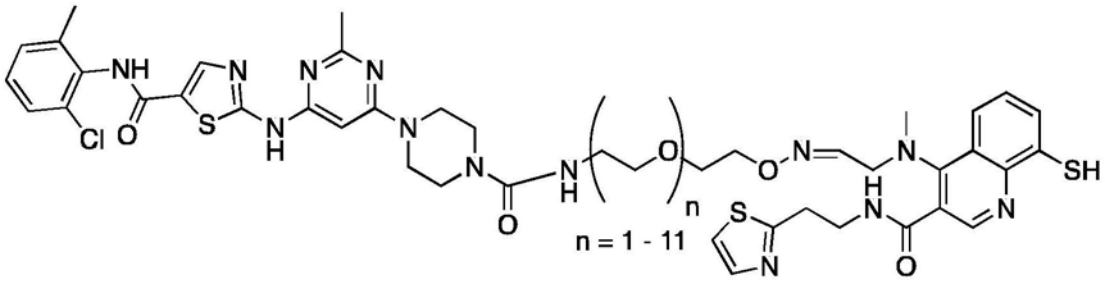
n = 1-11



n = 1 - 11

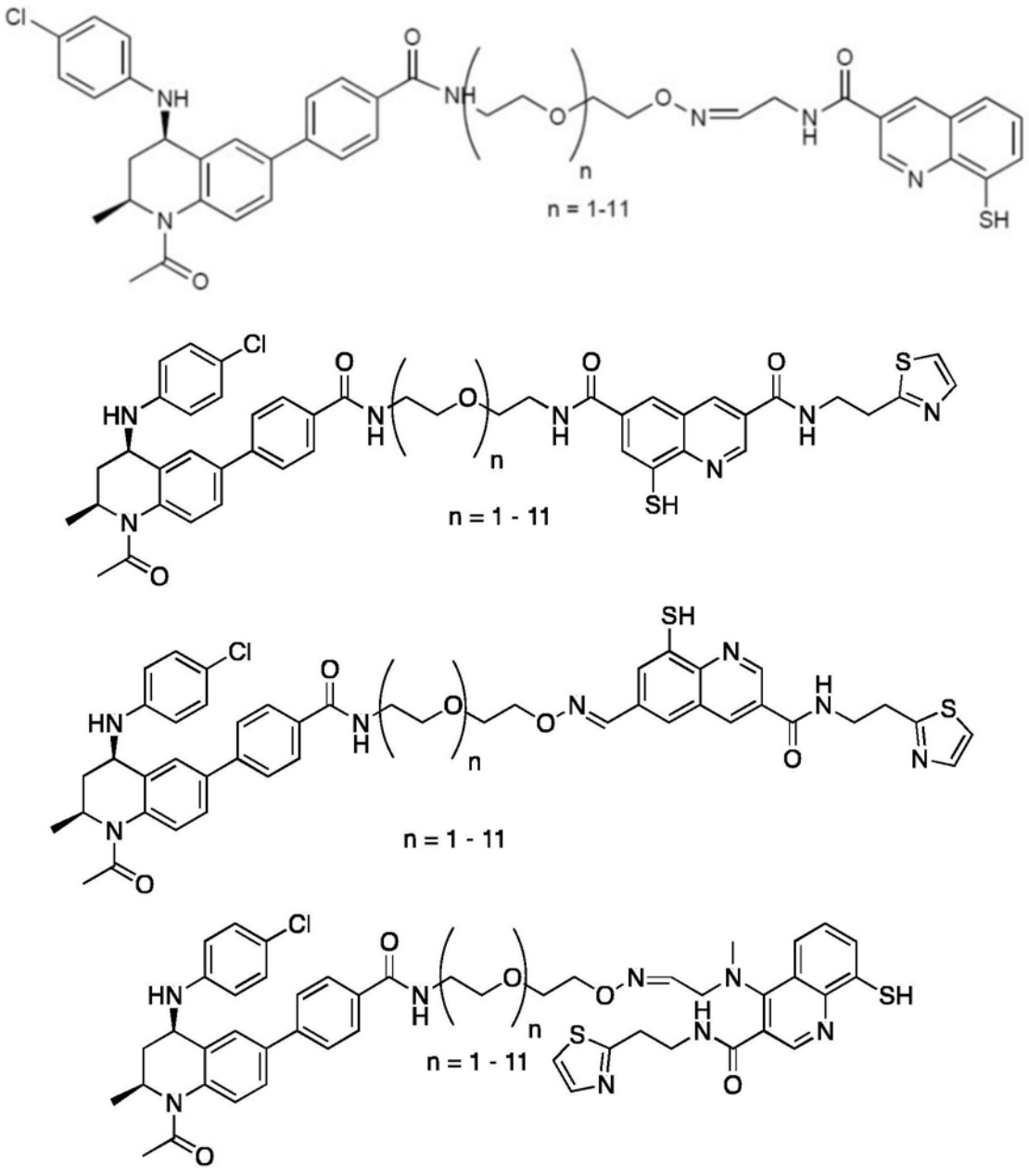


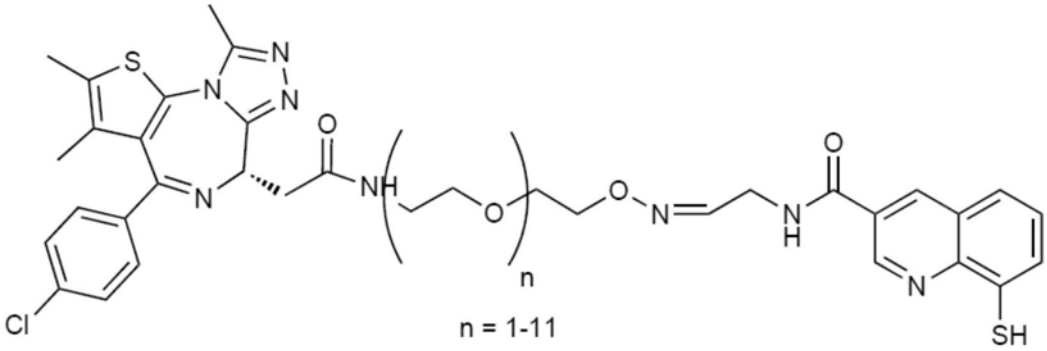
n = 1 - 11

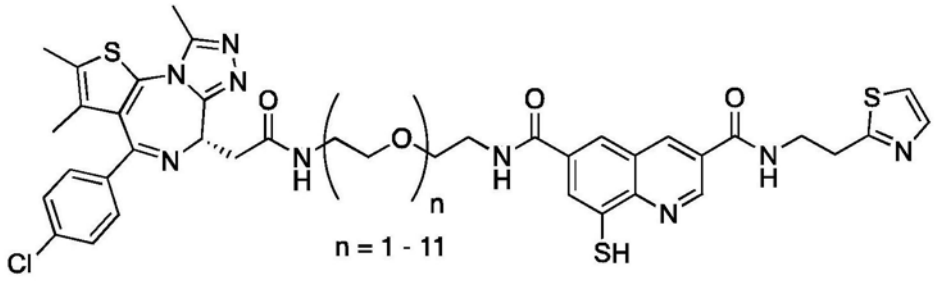
[0913] 

[0914] 包含Rpn11结合配偶体的BET靶向分子

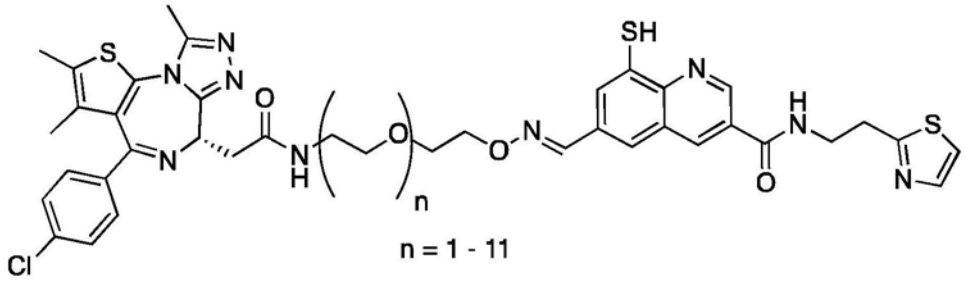
[0915] 本发明提供了包含Rpn11结合配偶体和BET靶向配偶体的分子。下面示出了示例性结构。

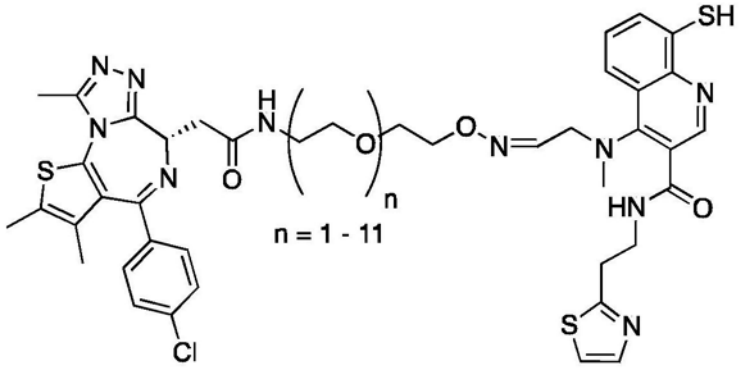
[0916] 





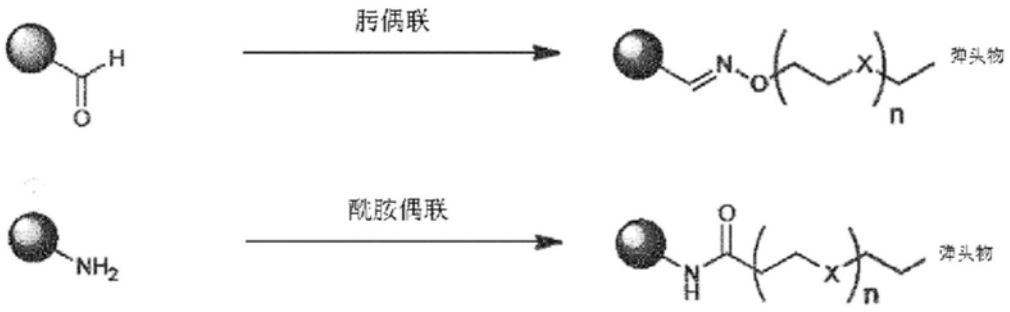
[0917]



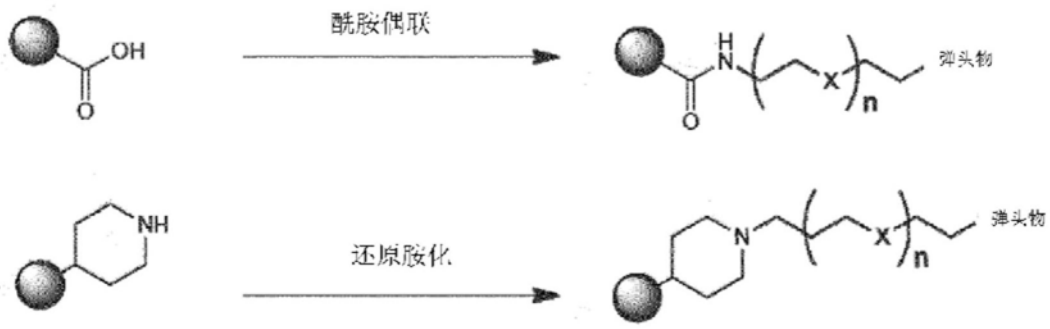


[0918] 合成方法

[0919] 使用本领域众所周知的合成方法来合成本发明的分子。本发明的分子可以例如通过肟、酰胺偶联或通过还原胺化来合成。



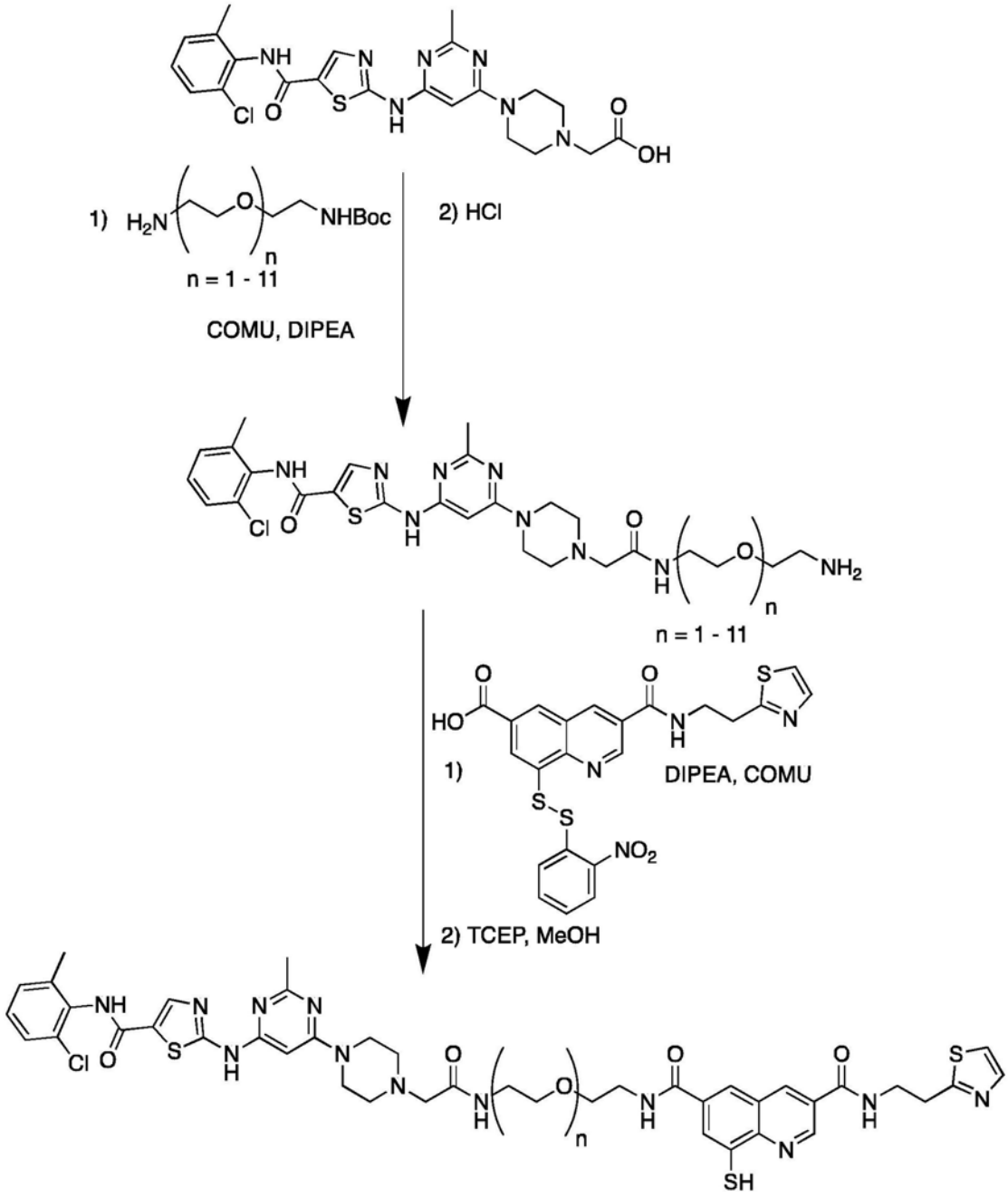
[0920]



[0921] 可以根据下面示出的任一种方法合成包含与靶蛋白结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体的本发明的双功能分子。然而,也可以采用替代的合成方法。

[0922] 合成包含Rpn11结合配偶体的BCR/Abl激酶靶向双功能分子,其是经由在两端具有胺的PEG连接基团与达沙替尼连接的另一capzimin衍生物。

[0923]



[0924] 这些双功能分子可以例如通过使用酰胺偶联剂(例如,HATU、COMU、HBTU、HCTU、PyBOP、EDC、DCC、DIC)、碱(即,TEA、DIPEA、NMM)和合适的溶剂(即,DCM、DMF、NMP、THF)来制备。随后,首先通过使用酸(例如HCl或TFA)在合适的溶剂(即DCM、MeOH、二噁烷、乙醇、二乙醚)中进行Boc脱保护。在第二个偶联反应后,通过使用还原剂例如TCEP或DTT或者另一种二硫化物还原剂实现最终的脱保护。

[0925] 包含与靶蛋白结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体的双功能分子用于降解的用途

[0926] 本发明提供了使用包含与靶蛋白结合配偶体连接的Rpn11结合配偶体的双功能分子来降解目标靶蛋白的方法。所述方法可以在体外和体内使用。所述方法包括使目标靶蛋白例如分离的目标靶蛋白或包含目标靶蛋白的细胞与本发明的双功能分子在使得靶蛋白降解的一定条件和时间长度下接触。

[0927] 测定靶蛋白的降解

[0928] 通过在存在和不存在本发明的双功能分子的情况下测量并且比较靶蛋白的量来测定降解。可以例如通过对已经用双功能分子处理或未处理的细胞进行免疫印迹测定、蛋白质印迹分析和ELISA来测定降解。蛋白质降解成功提供为在特定时间点降解的蛋白质的量。如果在存在本发明的双功能分子的情况下在特定时间点观察到靶蛋白的量减少，则已发生降解。

[0929] 更特别地，如果在存在1nM至10μM本发明的双功能分子(例如1nM、10nM、100nM、1μM和10μM)的情况下在24小时以上(例如24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、54小时、60小时、66小时和72小时)内观察到蛋白质的量减少至少10％(例如20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或100％)，则已发生降解。

[0930] 药物组合物

[0931] 在某些实施方案中，本发明提供了包含本发明的分子的药物组合物。可以通过允许足够部分的分子进入细胞以诱导与分子的靶蛋白结合配偶体结合的靶蛋白降解并且增加或降低细胞功能的方式适当地配制所述分子，并且将其引入细胞环境中。本发明的分子可以配制成缓冲溶液，诸如磷酸盐缓冲盐水溶液。这样的组合物通常包括所述分子和药用载体。如本文中使用的，用语“药用载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。辅助的活性化合物也可以并入组合物中。

[0932] 将药物组合物配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外施用，例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如，吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或混悬液可以包括以下组分：无菌稀释剂，诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂；抗细菌剂，诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，诸如乙二胺四乙酸；缓冲剂，诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及用于调节张力的试剂，诸如氯化钠或葡萄糖。pH可以用酸或碱诸如盐酸或氢氧化钠进行调节。肠胃外制剂可以包封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0933] 适于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液(其中是水溶性的)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、克列莫佛(Cremophor)EL.TM.(BASF，Parsippany，N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，组合物必须是无菌的并且应是流动的，达到存在容易的注射性的程度。其在制备和储存条件下应是稳定的并且必须被保存以免受微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)以及它们的合适混合物的溶剂或分散介质。例如，通过使用包衣(诸如卵磷脂)、通过在分散体的情况下保持所需的粒度和通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。通过各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如尼泊金酯(paraben)、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，可以实现阻止微生物的作用。在许多情况下，在组合物将优选包含等张剂，例如，糖、多元醇(诸如甘露醇)、山梨醇、氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长的吸收。

[0934] 可以通过以下方式制备无菌可注射溶液：将所需量的活性化合物与以上列举的成分中的一种或组合(根据需要)并入合适的溶剂中，随后过滤灭菌。通常，通过以下方式制备

分散体:将活性化合物并入无菌媒介物中,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何额外的所需成分的粉末。

[0935] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。为了口服治疗施用的目的,可以将活性化合物与赋形剂合并,并且以片剂、锭剂或胶囊的形式(例如,明胶胶囊)使用。口服组合物还可以使用流体载体制备以用作漱口剂。可以包含药学上相容的粘合剂和/或辅剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有以下成分或具有类似性质的化合物中的任一种:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味调味料。

[0936] 对于通过吸入的施用,化合物以气雾喷雾剂的形式从含有合适的推进剂(例如气体,诸如二氧化碳)的加压容器或分配器或者喷雾器中递送。这样的方法包括在美国专利号6,468,798中描述的那些。

[0937] 全身施用还可以通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮施用,在制剂中使用适合于待渗透的屏障的渗透剂。这样的渗透剂是本领域公知的,并且包括例如用于经粘膜施用的去垢剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来完成。对于经皮施用,将活性化合物配制成本领域中通常已知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。

[0938] 化合物还可以制备成栓剂(例如,使用常规栓剂基质,诸如可可脂和其他甘油酯)或保留灌肠剂的形式,以用于直肠递送。

[0939] 化合物还可以使用本领域已知的方法通过转染或感染来施用,包括但不限于在McCaffrey等人(2002),Nature,418(6893),38-9(流体动力转染);Xia等人(2002),Nature Biotechnol.,20(10),1006-10(病毒介导的递送);或Putnam(1996),Am.J.Health Syst.Pharm.53(2),151-160,勘误表,于Am.J.Health Syst.Pharm.53(3),325(1996)中描述的方法。

[0940] 在一个实施方案中,活性化合物和载体一起制备,所述载体将保护化合物免于从体内快速消除,诸如控释制剂,包括植入物和微囊封递送系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。这样的制剂可以使用标准技术制备。所述材料还可以从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals、Inc.商购获得。脂质体悬浮液(包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作药用载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如如美国专利号4,522,811中所描述的。

[0941] 这样的化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药物程序来确定,例如用于确定LD_{50}(对50%群体致死的剂量)和ED_{50}(对50%群体治疗有效的剂量)的程序。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且它可以表示为比率LD_{50}/ED_{50}。展现高治疗指数的化合物是优选的。尽管可以使用展现毒副作用的化合物,但是应注意设计使这样的化合物靶向受影响组织部位的递送系统,从而最小化对未感染细胞的潜在损害,并且由此减少副作用。

[0942] 从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可以用于配制用于人体的剂量范围。这

样的化合物的剂量优选地在循环浓度的范围内，所述循环浓度包括几乎没有或没有毒性的ED_{50}。剂量可以在该范围内变化，这取决于所采用的剂型和所利用的施用途径。对于用于本发明的方法的化合物，治疗有效剂量可以首先从细胞培养测定中进行评估。可以在动物模型中配制剂量以达到循环血浆浓度范围，所述范围包括如在细胞培养物中测定的IC_{50}(即，达到症状的半最大抑制的测试化合物的浓度)。这样的信息可以用于更准确地确定在人体内可用的剂量。血浆中的水平可以例如通过高效液相色谱测量。

[0943] 如本文中所定义的，本发明的分子的治疗有效量(即，有效剂量)取决于所选择的分子。例如，可以施用大约1pg至1000mg范围内的单一剂量；在一些实施方案中，可以施用10、30、100或1000pg，或者10、30、100或1000ng，或者10、30、100或1000μg，或者10、30、100或1000mg。在一些实施方案中，可以施用1-5g的组合物。组合物可以每天施用一次或多次至每周施用一次或多次；包括隔天一次。技术人员将理解，某些因素可以影响有效治疗受试者所需的剂量和时间安排，包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄以及存在的其他疾病。此外，用治疗有效量的本发明的分子治疗受试者可以包括单一治疗，或者优选地可以包括一系列治疗。

[0944] 在某些实施方案中，根据本发明的双功能分子的剂量在5mg/kg/周至500mg/kg/周的范围内，例如5mg/kg/周、10mg/kg/周、15mg/kg/周、20mg/kg/周、25mg/kg/周、30mg/kg/周、35mg/kg/周、40mg/kg/周、45mg/kg/周、50mg/kg/周、55mg/kg/周、60mg/kg/周、65mg/kg/周、70mg/kg/周、75mg/kg/周、80mg/kg/周、85mg/kg/周、90mg/kg/周、95mg/kg/周、100mg/kg/周、150mg/kg/周、200mg/kg/周、250mg/kg/周、300mg/kg/周、350mg/kg/周、400mg/kg/周、450mg/kg/周和500mg/kg/周。在某些实施方案中，根据本发明的双功能分子的剂量在10mg/kg/周至200mg/kg/周、20mg/kg/周至150mg/kg/周或25mg/kg/周至100mg/kg/周的范围内。在某些实施方案中，双功能分子每周施用1次，持续时间为2周至6个月，例如2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、26周、6个月、8个月、10个月或1年以上。在某些实施方案中，所述分子每周施用2次。在其他实施方案中，双功能分子隔周施用一次。在某些实施方案中，静脉内施用双功能分子。

[0945] 本发明的分子可以配制成药物组合物，所述药物组合物包含药理有效量的分子和药用载体。药理或治疗有效量是指有效地产生预期的药理、治疗或预防结果的双功能分子的量。短语“药理有效量”和“治疗有效量”或简单地“有效量”是指有效地产生预期的药理、治疗或预防结果的双功能分子的量。例如，如果在与疾病或病症相关的可测量参数降低至少20％时给定的临床治疗被认为是有效的，则用于治疗该疾病或病症的药物的治疗有效量是实现该参数的至少20％降低所需的量。

[0946] 本发明的适当配制的药物组合物可以通过本领域已知的任何方式施用，诸如通过肠胃外途径，包括静脉内、肌内、腹膜内、皮下、经皮、气道(气雾剂)、直肠、阴道和局部(包括经颊和舌下)施用。在一些实施方案中，药物组合物通过静脉内或肠胃外(intraparenteral)输注或注射施用。

[0947] 通常，分子的合适的剂量单位将在0.001至0.25毫克/千克接受者体重/天的范围内，或者在0.01至20微克/千克体重/天的范围内，或者在0.01至10微克/千克体重/天的范围内，或者在0.10至5微克/千克体重/天的范围内，或者在0.1至2.5微克/千克体重/天的范围内。包含所述分子的药物组合物可以每天施用一次。然而，治疗剂也可以以剂量单位给

药,所述剂量单位含有在一整天内以适当的间隔施用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量。在那种情况下,每个亚剂量中含有的分子必须是相应地较少的,以获得总的日剂量单位。剂量单位还可以配置成几天内的单一剂量,例如使用常规的持续释放制剂,其在几天的时间段内提供分子的持续和一致的释放。持续释放制剂是本领域公知的。在该实施方案中,剂量单位含有每日剂量的相应倍数。不论制剂如何,药物组合物必须含有足以具有活性的量的分子,例如以诱导与分子的靶蛋白结合配偶体结合的靶蛋白的降解,并且在某些实施方案中引起细胞功能的改变。组合物可以以分子的多个单位的总和一起含有足够剂量的方式配制。

[0948] 可以从细胞培养测定和动物研究中获得数据以配制用于人体的合适剂量范围。本发明的组合物的剂量在循环浓度的范围内,所述循环浓度包括几乎没有或没有毒性的ED_{50}(如通过已知方法测定的)。剂量可以在该范围内变化,这取决于所采用的剂型和所利用的施用途径。对于用于本发明的方法的化合物,治疗有效剂量可以首先从细胞培养测定中进行评估。可以在动物模型中配制剂量以达到化合物的循环血浆浓度范围,所述范围包括如在细胞培养物中测定的IC_{50}(即,达到症状的半最大抑制的测试化合物的浓度)。这样的信息可以用于更准确地确定在人体内可用的剂量。血浆中的分子水平可以例如经由高效液相色谱通过标准方法测量。

[0949] 药物组合物可以与施用说明书一起包括在试剂盒、容器、包装或分配器中。

[0950] 治疗方法

[0951] 本发明提供了治疗处于整体上或部分地由靶蛋白过表达引起的疾病或病症的风险中(或易感于所述疾病或病症)的受试者的预防和治疗方法二者。

[0952] 如本文中使用的,“治疗(Treatment/treating)”定义为向患者施加或施用治疗剂(例如,本发明的分子),或者向来自患者的分离组织或细胞系施加或施用治疗剂,所述患者具有疾病或病症、疾病或病症的症状或者疾病或病症的易感性,其目的是治愈、愈合、减缓、缓解、改变、补救、减轻、改善或影响疾病或疾病、疾病或病症的症状或者疾病易感性。

[0953] 在一个方面,本发明提供了通过向受试者施用治疗剂(例如,本发明的分子)以在受试者中预防如上所述的疾病或病症的方法。可以通过例如本文所述的诊断或预后测定中的任一种或组合来鉴别处于疾病风险中的受试者。预防剂的施用可以在检测到例如受试者中的病毒颗粒或者疾病或病症的症状特征的表现之前进行,从而预防或备选地延缓疾病或病症的进展。

[0954] 本发明的另一个方面涉及治疗性地治疗受试者的方法(即,改变疾病或病症的症状的发作)。这些方法可以在体外或备选地在体内进行(例如,通过向受试者施用本发明的分子)。

[0955] 关于治疗的预防性和治疗性方法二者,可以基于从药物基因组学领域获得的知识来具体地定制或修改这样的治疗。如本文中使用的,“药物基因组学”是指基因组学技术诸如基因测序、统计遗传学和基因表达分析对临床开发和在售的药物的应用。更具体说,该术语是指研究患者的基因如何确定他或她对药物的反应(例如,患者的“药物反应表型”或“药物反应基因型”)。药物基因组学使得临床医生或医师能够将预防性或治疗性治疗靶向将从所述治疗中收益最多的患者并且避免治疗将发生毒性药物相关副作用的患者。

[0956] 可以在适当的动物模型中测试治疗剂。例如,如本文所述的分子可以用于动物模

型中以确定用所述药剂治疗的功效、毒性或副作用。备选地，可以在动物模型中使用治疗剂，以确定这样的药剂的作用机理。例如，可以在动物模型中使用药剂以确定用这样的药剂治疗的功效、毒性或副作用。备选地，可以在动物模型中使用药剂以确定这样的药剂的作用机理。

[0957] 本发明的双功能分子可用于增加所选靶蛋白的蛋白水解。选择蛋白质进行靶向蛋白水解，以减少细胞中的该蛋白质的量。为了治疗、预防或减少给定疾病的有害作用，减少细胞中给定靶蛋白的量可以是有利的。在一些情形中，给定疾病涉及在细胞中存在增加量的给定靶蛋白。如果在将双功能分子施用至本发明的细胞或受试者后减轻或消除了疾病的一种或多种症状，则认为治疗了该受试者的疾病。

[0958] 动物模型

[0959] 为了测试双功能分子在促进所选靶蛋白的蛋白水解中的活性，可以将所述分子施用至动物，并且评价动物中的效果。根据本发明可用的动物模型包括但不限于以下各项：

[0960]

动物模型	治疗领域
B6C3F1 小鼠	心血管
CB6F1 小鼠	心血管

[0961]

CD2F1(CDF1)小鼠	心血管
Dahl/盐敏感性大鼠	心血管
DBA/2 小鼠	心血管
FHH 大鼠	心血管
Hartley 豚鼠	心血管
IAF 无毛豚鼠	心血管
LVG 叙利亚金黄地鼠(olden Syrian Hamster)	心血管
蒙古沙鼠(Mongolian Gerbil)	心血管
新西兰白兔(New Zealand White Rabbit)	心血管
易肥胖型 CD 大鼠	心血管
抗肥胖型 CD 大鼠	心血管
自发性高血压(SHR)大鼠	心血管
自发性高血压心力衰竭(SHHF)大鼠	心血管
自发性高血压肥胖(SHROB)大鼠	心血管
自发性高血压易卒中型(SHRSP)大鼠	心血管
SS-13BN 大鼠	心血管
Wistar Furth 大鼠	心血管
Wistar IGS 大鼠	心血管
Wistar Kyoto(WKY)大鼠	心血管
Zucker 大鼠	心血管
B10.A/Cr 小鼠	炎症
Lewis 大鼠	炎症
Ly5.1 小鼠	炎症
NCG 小鼠	炎症
OT I 小鼠	炎症
OT II 小鼠	炎症
SJL-Elite 小鼠	炎症
Wistar IGS 大鼠	炎症
C57BL/6-无菌小鼠	代谢病

[0962]

ZDF 大鼠	代谢病
C57BL/6-无菌小鼠	神经科学
AKR 小鼠	肿瘤学
无胸腺裸小鼠	肿瘤学
BALB/c 裸小鼠	肿瘤学
BDIX 大鼠	肿瘤学
Buffalo 大鼠	肿瘤学
C57BL/6-无菌小鼠	肿瘤学
CD-1 裸小鼠	肿瘤学
哥本哈根大鼠(Copenhagen Rat)	肿瘤学
Fox Chase CB17 小鼠	肿瘤学
Fox Chase SCID 米色小鼠	肿瘤学
Fox Chase SCID 小鼠	肿瘤学
永生化小鼠(Immortomouse)	肿瘤学
NCG 小鼠	肿瘤学
NCI SCID/NCr 小鼠	肿瘤学
NIH-III 裸小鼠	肿瘤学
NMRI 裸小鼠	肿瘤学
Noble 大鼠	肿瘤学
NOD SCID 小鼠	肿瘤学
NU/NU 裸小鼠	肿瘤学
OFA 大鼠	肿瘤学
RNU 大鼠	肿瘤学
SCID 无毛同类系(SHC)小鼠	肿瘤学
SCID 无毛远交系(SHO)小鼠	肿瘤学
Swiss 裸小鼠	肿瘤学
Wistar Furth 大鼠	肿瘤学

[0963] 除非另有指明,否则本发明的实施采用化学,分子生物学,微生物学,重组DNA,遗传学,免疫学,细胞生物学,细胞培养和转基因生物学的常规技术,它们在本领域的技术范围内。参见例如Maniatis等人,1982,Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.);Sambrook等人,1989,Molecular Cloning,第2版.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.);

Sambrook和Russell,2001,Molecular Cloning,第3版.(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.);Ausubel等人,1992),Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,包括定期更新);Glover,1985,DNA Cloning(IRL Press,Oxford);Anand,1992;Guthrie和Fink,1991;Harlow和Lane,1988,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.);Jakoby和Pastan,1979;Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames&S.J.Higgins编著.1984);Transcription And Translation(B.D.Hames&S.J.Higgins编著.1984);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller和M.P.Calos编著,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Methods In Enzymology,第154和155卷(Wu等人编著),Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer和Walker编著,Academic Press,London,1987);Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷(D.M.Weir和C.C.Blackwell编著,1986);Riott,Essential Immunology,第6版,Blackwell Scientific Publications,Oxford,1988;Hogan等人,Manipulating the Mouse Embryo,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1986);Westerfield,M.,The zebrafish book.A guide for the laboratory use of zebrafish(Danio rerio),(第4版,Univ.of Oregon Press,Eugene,2000)。

[0964] 除非另外限定,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文所述那些类似或等效的方法和材料可以用于实施或测试本发明,但是下面描述合适的方法和材料。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用整体并入。如果发生冲突,则以本说明书(包括定义)为准。

[0965] 材料、方法和实施例仅是说明性的,而非旨在限制本文所述的本发明的各种实施方案。

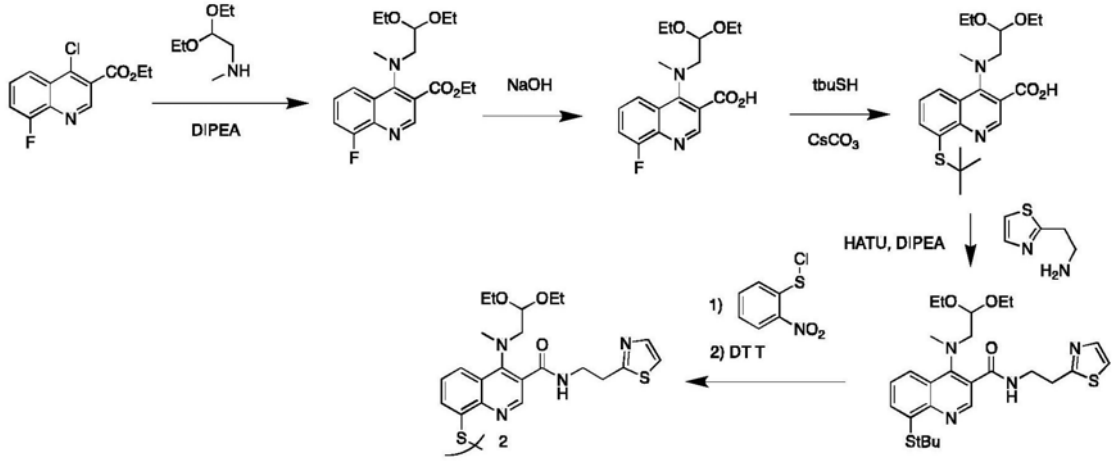
实施例

[0966] 实施例1-包含Rpn11结合配偶体的激酶靶向分子的合成

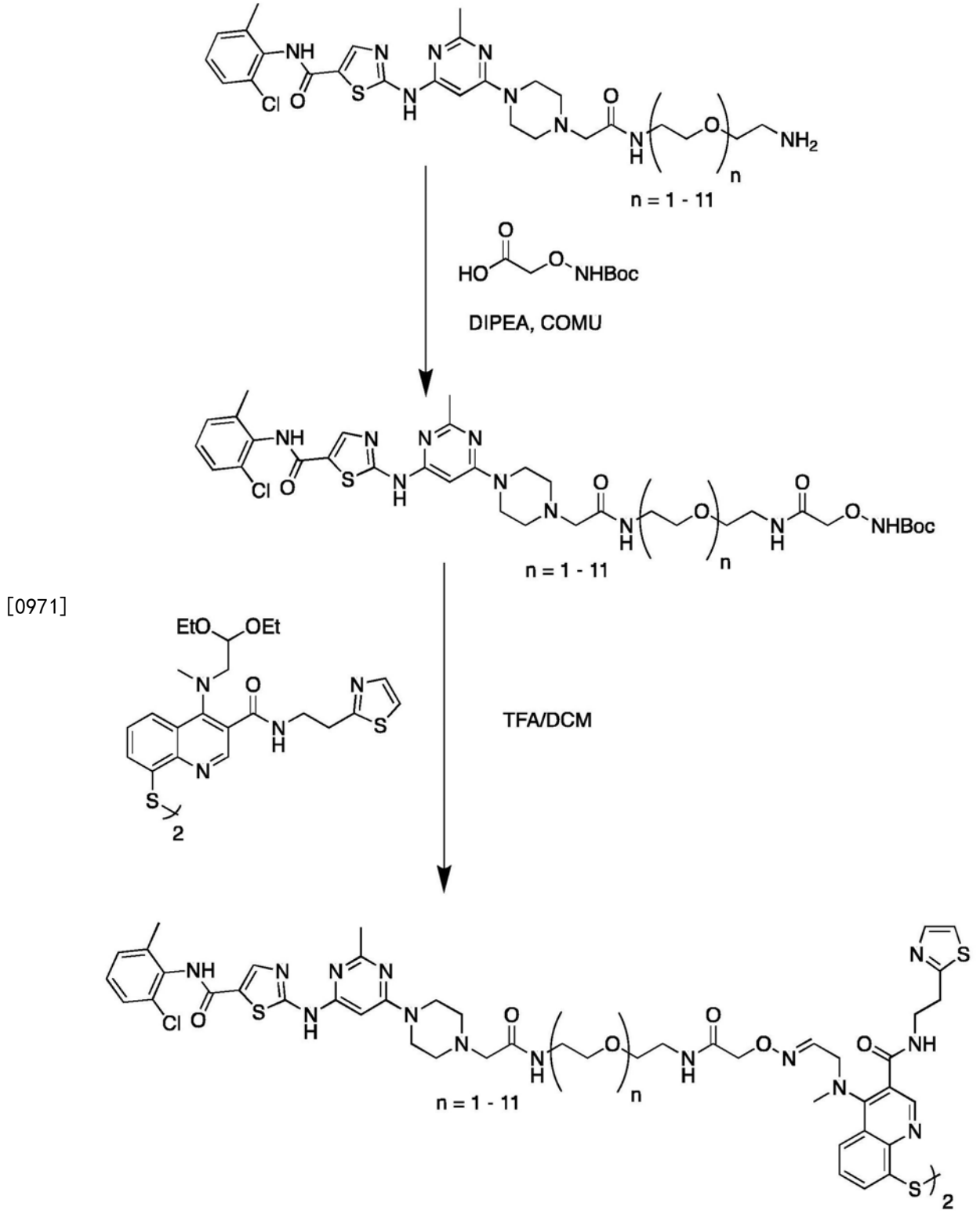
[0967] 在一个实施方案中,通过以下方法产生本发明的分子,所述分子包含经由连接基团与Rpn11结合配偶体连接的靶向激酶的靶蛋白结合配偶体。为了合成本发明的双功能分子,所述双功能分子包含经由连接基团与Rpn11结合配偶体连接的靶向激酶配偶体的靶蛋白结合配偶体,所述Rpn11结合配偶体用可以在酰胺偶联条件下与含有氨氧基的连接基团反应的醛基团官能化并且随后用激酶抑制剂-羧酸衍生物官能化,以得到所需的双功能分子。

[0968] 用于合成包含Rpn11结合配偶体的激酶靶向分子的起始组分例如根据以下合成方案制备:

[0969]



[0970] 以下合成方案用于合成包含Rpn11结合配偶体的激酶靶向分子。



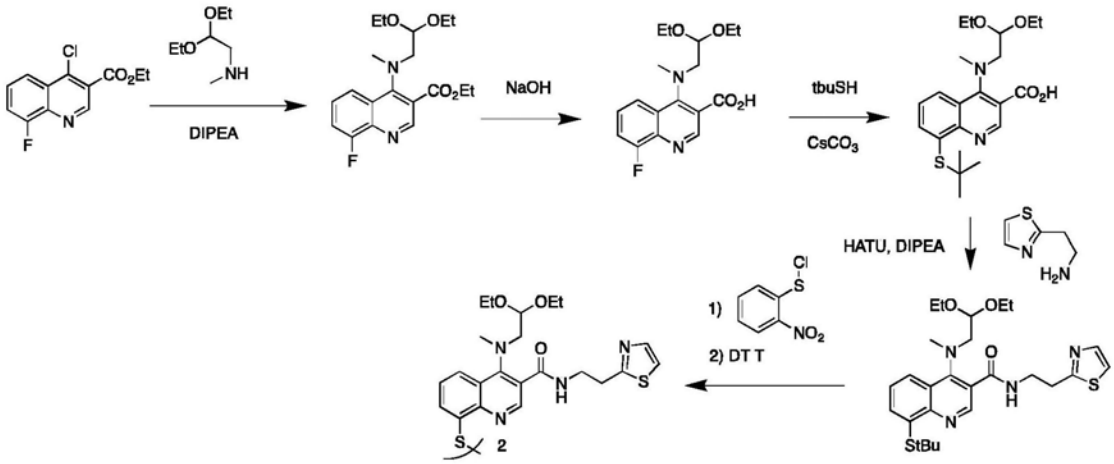
[0971]

[0972] 实施例2-包含Rpn11结合配偶体的BET靶向分子的合成

[0973] 通过以下方法产生本发明的分子,所述分子包含经由连接基团与Rpn11结合配偶体连接的靶向BET的靶蛋白结合配偶体。为了合成包含Rpn11结合配偶体的BET靶向分子,所述Rpn11结合配偶体在酰胺偶联条件下用与含有氨氧基的连接基团反应的醛基团官能化并且随后用激酶抑制剂-羧酸衍生物官能化,以得到所需的双功能分子。

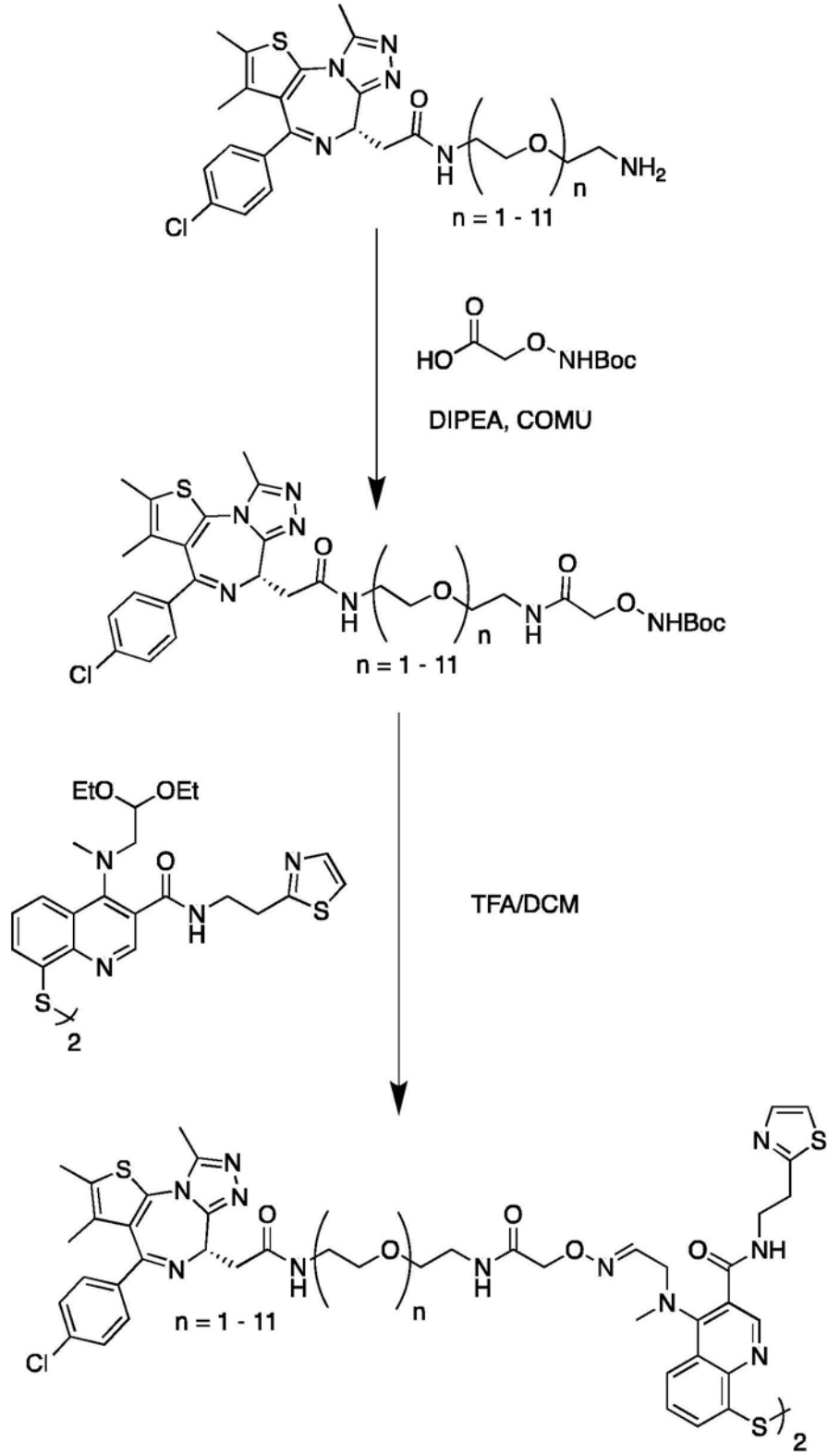
[0974] 用于合成包含Rpn11结合配偶体的激酶靶向分子的起始组分例如根据以下合成方

案制备：



[0975]

[0976] 如下合成包含Rpn11结合配偶体的BET靶向分子：



[0977]

[0978] 实施例3-双功能分子与Rpn11和靶蛋白的结合

[0979] 本发明的双功能分子与Rpn11和目标靶蛋白的结合通过以下方式进行测定,例如,通过使用NanoBRET™蛋白质-蛋白质相互作用系统根据制造商方案(Promega)进行测定,或者通过细胞热移测定(CETSA)随后是蛋白质印迹或质谱分析进行测定。

[0980] 为了分析Rpn11结合配偶体与Rpn11的结合,等温量热法(ITC)和表面等离子共振

(SPR)可以用于直接评价结合配偶体与PSMD14和PSMD7(分别为Rpn11和Rpn8)的二聚体的结合。还可以采用荧光偏振(FP)测定来促进分子的高通量测试,类似于已建立的涉及置换俄勒冈绿(Oregon Green)标记的四泛素底物(Li等人(Nat.Chem.Biol.2017;DOI:

[0981] 10.1038/nchembio.2326)或Ub-LysGly^{TAMRA}(DOI:10.1016/j.molcel.2014.12.039)的方法。

[0982] 等温量热法(ITC)和/或表面等离子共振(SPR)也可以用于直接评价分子与靶蛋白的结合。

[0983] 实施例4-靶蛋白降解

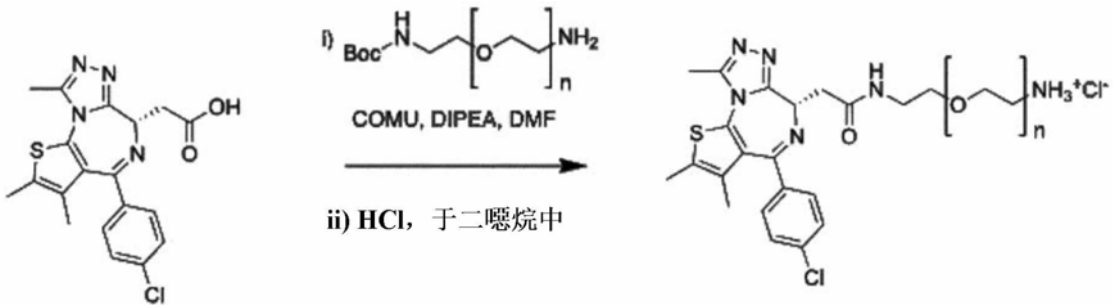
[0984] 通过在存在和不存在本发明的双功能分子的情况下测量靶蛋白的量来测定靶蛋白降解。例如通过对已经用双功能分子处理或未处理的细胞进行免疫印迹测定、蛋白质印迹分析和ELISA来测定降解。蛋白质降解成功提供为在特定时间点降解的蛋白质的量。如果在存在本发明的双功能分子的情况下在特定时间点观察到蛋白质的量减少,则已发生降解。

[0985] 实施例5-抑制剂-连接基团缀合物的制备

[0986] 可商购获得的化学品购自Apollo Scientific、Sigma-Aldrich、Fluorochem或Manchester Organics,并且在不进行任何进一步纯化的情况下使用。

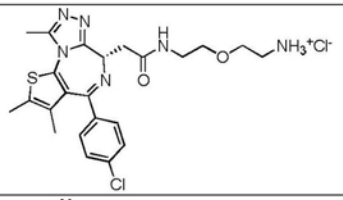
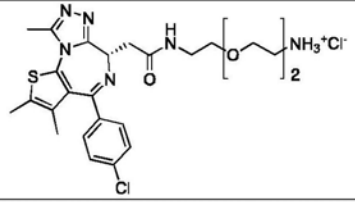
[0987] 所有反应均使用无水溶剂进行。使用Waters X-Bridge C18柱(100mm×19mm;5μm粒度,流速25mL/min)在Gilson制备型HPLC上进行制备型HPLC,在15分钟内使用具有0.01%v/v甲酸的在水中的5%至95%v/v乙腈的梯度(方法1)或在15分钟内使用具有0.01%v/v氢氧化铵水溶液的在水中的5%至95%v/v乙腈的梯度(方法2)。

[0988] 液相色谱-质谱(LC-MS)分析使用连接至Bruker Daltonics MicroTOF的Agilent HPLC 1100系列或连接至Agilent Technologies 6130四极质谱的Agilent Technologies 1200系列HPLC进行。对于LC-MS,使用的分析柱是Waters X-bridge C18柱(50mm×2.1mm×3.5mm粒度);流速为0.5mL/min,流动相为水/MeCN+0.01%HCOOH(方法1A);首先将95/5水/MeCN保持0.5分钟,然后是在3.5分钟内从95/5到5/95水/MeCN的线性梯度,然后保持2分钟。使用前面所述的分析型LC-MS系统评估了所有化合物的纯度,并且纯度>95%。

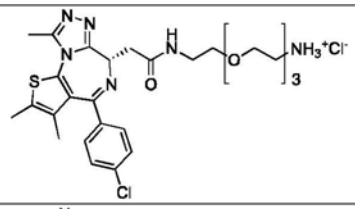
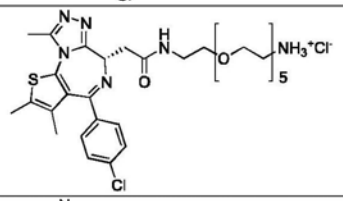
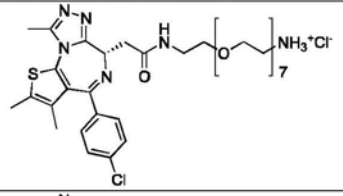
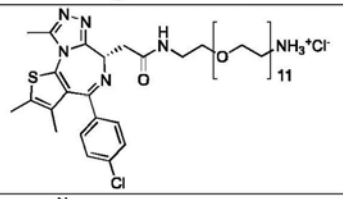
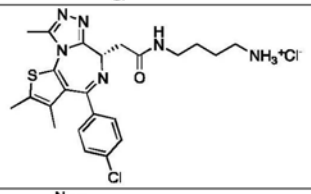
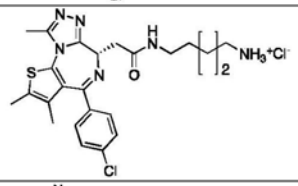
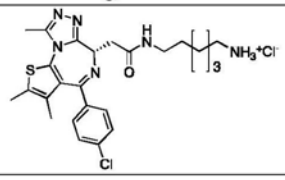
[0989] 

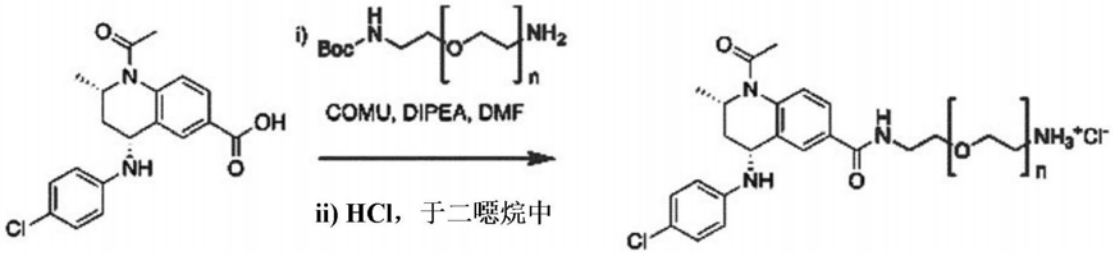
[0990] 向单Boc保护的二胺连接基团(0.1mmol,1当量)和JQ1-COOH(40mg,0.1mmol,1当量)在DMF(1mL)中的溶液中加入COMU(43mg,1mmol,1当量)和DIPEA(48微升)。将反应混合物在室温搅拌1小时,然后用冰冷的水猝灭。在真空中移除挥发物,并且将粗制混合物通过制备型HPLC(方法2)纯化。在减压下蒸发含有所需产物的级分,并且将残余物溶解于DCM(1mL)中,并且用无水HCl在二噁烷中的溶液(4M,1mL)处理。1小时后,在减压下移除挥发物,并且将残余物冷冻干燥以移除任何过量的酸。分析数据(HRMS)在下面示出的表II中提供。

[0991]

实施例	结构	m/z [M+H]+
S1		487.1605
S2		531.1867

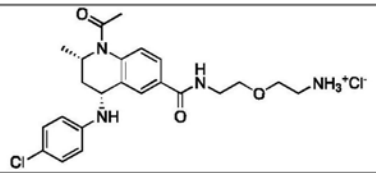
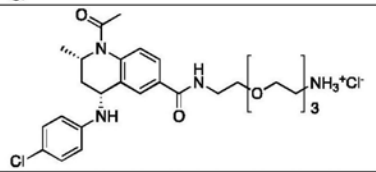
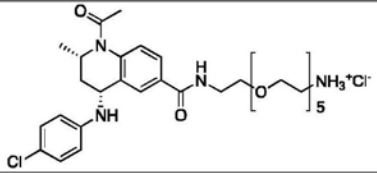
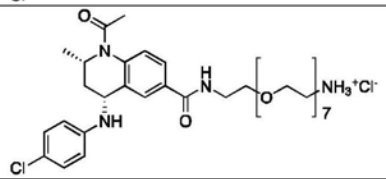
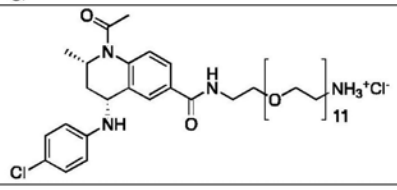
[0992]

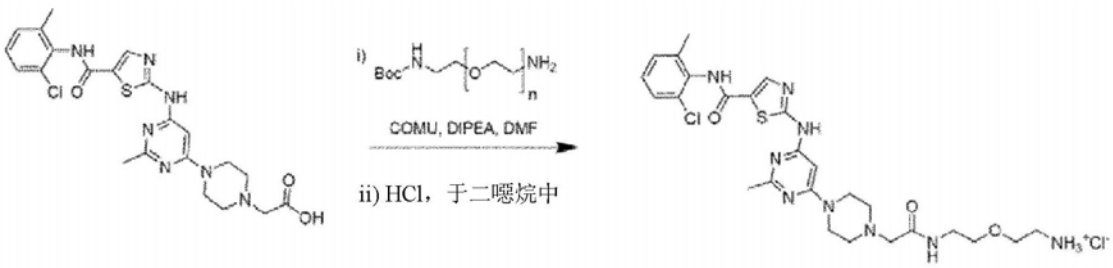
S3		:575.2129
S4		663.2653
S5		751.3178
S6		927.4226
S7		471.1656
S8		485.1812
S9		499.1969

[0993] 

[0994] 向单Boc保护的二胺连接基团(0.1mmol,1当量)和iBET726(36mg,0.1mmol,1当量)在DMF(1mL)中的溶液中加入COMU(43mg,1mmol,1当量)和DIPEA(48微升)。将反应混合物在室温搅拌1小时,然后用冰冷的水猝灭。在真空中移除挥发物,并且将粗制混合物通过制备型HPLC(方法2)纯化。在减压下蒸发含有所需产物的级分,并且将残余物溶解于DCM(1mL)中,并且用无水HCl在二噁烷中的溶液(4M,1mL)处理。1小时后,在减压下移除挥发物,并且将残余物冷冻干燥以移除任何过量的酸。分析数据(HRMS)在下面示出的表III中提供。

[0995]

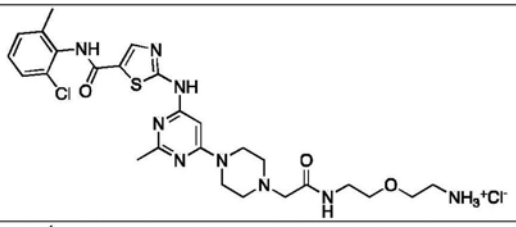
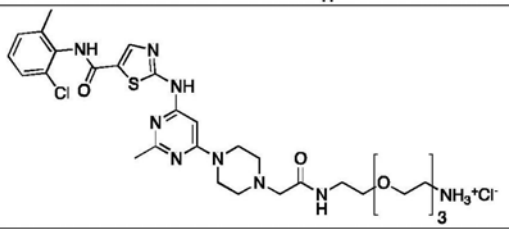
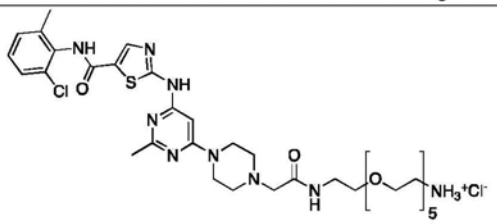
实施例	结构	m/z $[M+H]^+$
S10		445.1928
S11		533.2452
S12		621.2977
S13		709.3501
S14		885.4550

[0996] 

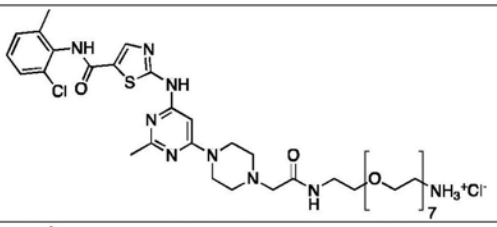
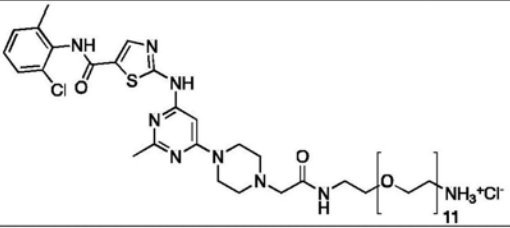
[0997] 向单Boc保护的二胺连接基团(0.1mmol,1当量)和达沙替尼-COOH(50mg,0.1mmol,

1当量)在DMF(1mL)中的溶液中加入COMU(43mg,1mmol,1当量)和DIPEA(48μL)。将反应混合物在室温搅拌1小时,然后用冰冷的水猝灭。在真空中移除挥发物,并且将粗制混合物通过制备型HPLC(方法2)纯化。在减压下蒸发含有所需产物的级分,并且将残余物溶解于DCM(1mL)中,并且用无水HCl在二噁烷中的溶液(4M,1mL)处理。1小时后,在减压下移除挥发物,并且将残余物冷冻干燥以移除任何过量的酸。分析数据(HRMS)在下面示出的表IV中提供。

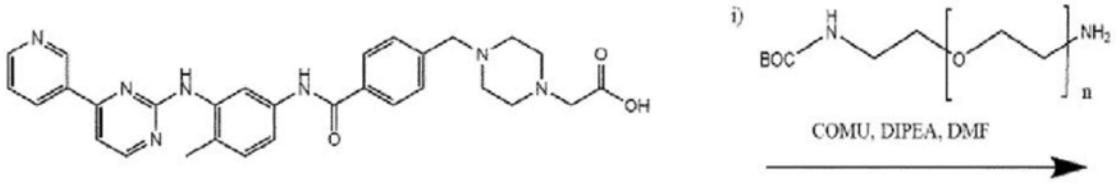
[0998]

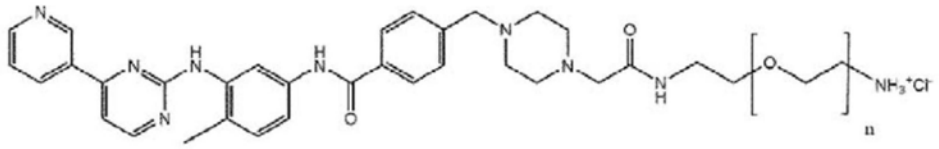
实施例	结构	m/z $[M+H]^+$
S15		588.2194
S16		676.2718
S17		764.3242

[0999]

S18		852.3767
S19		1028.4815

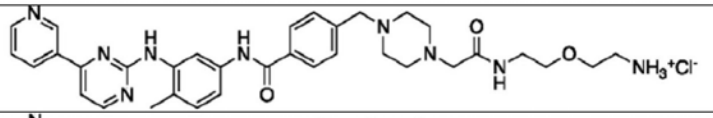
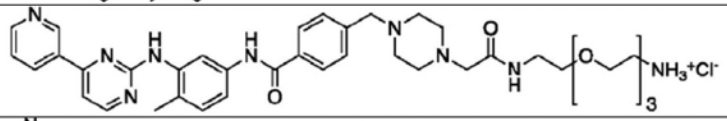
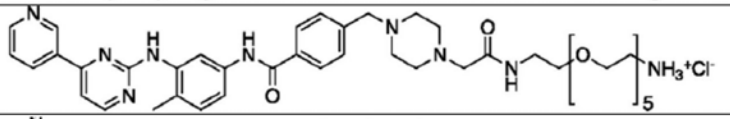
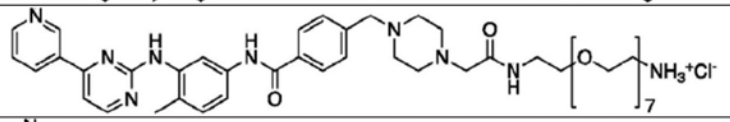
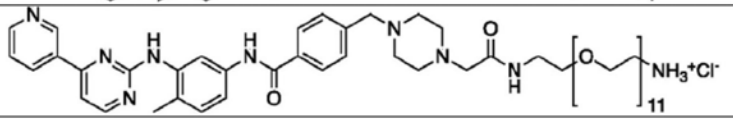
[1000]





[1001] 向单Boc保护的二胺连接基团(0.1mmol,1当量)和达沙替尼-COOH(54mg,0.1mmol,1当量)在DMF(1mL)中的溶液中加入COMU(43mg,1mmol,1当量)和DIPEA(48μL)。将反应混合物在室温搅拌1小时,然后用冰冷的水猝灭。在真空中移除挥发物,并且将粗制混合物通过制备型HPLC(方法2)纯化。在减压下蒸发含有所需产物的级分,并且将残余物溶解于DCM(1mL)中,并且用无水HCl在二噁烷中的溶液(4M,1mL)处理。1小时后,在减压下移除挥发物,并且将残余物冷冻干燥以移除任何过量的酸。分析数据(HRMS)在下面示出的表V中提供。

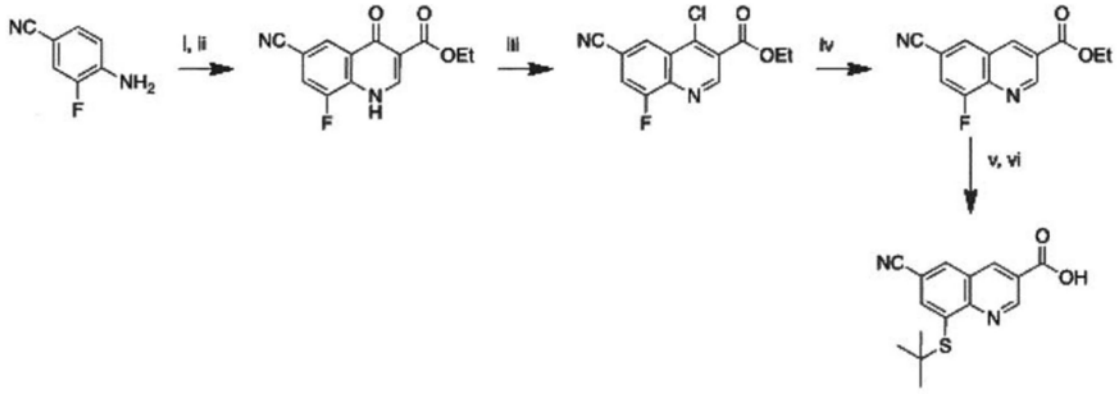
[1002]

实施例	结构	m/z $[M+H]^+$
S20		624.3332
S21		712.3857
S22		800.4381
S23		888.4905
S24		1064.5954

[1003]

[1004] 实施例6-8-(叔丁基硫代)-6-氰基喹啉-3-甲酸的制备

[1005]



[1006] 将2-乙氧基亚甲基丙二酸二乙酯(10mmol)、2乙氧基亚甲基丙二酸二乙酯(11mmol)和甲苯(30mL)的混合物回流5小时。然后,将反应混合物冷却并且用3N H2SO4(100mL)洗涤。之后,将甲苯蒸馏掉。剧烈刮擦混合物以得到固体产物。将该产物(5g)与二苯醚(50mL)在280℃一起回流2小时。然后将其冷却,并且在加入少量的石油醚(100mL)后搅拌1小时。通过过滤分离产物6-氰基-8-氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯。

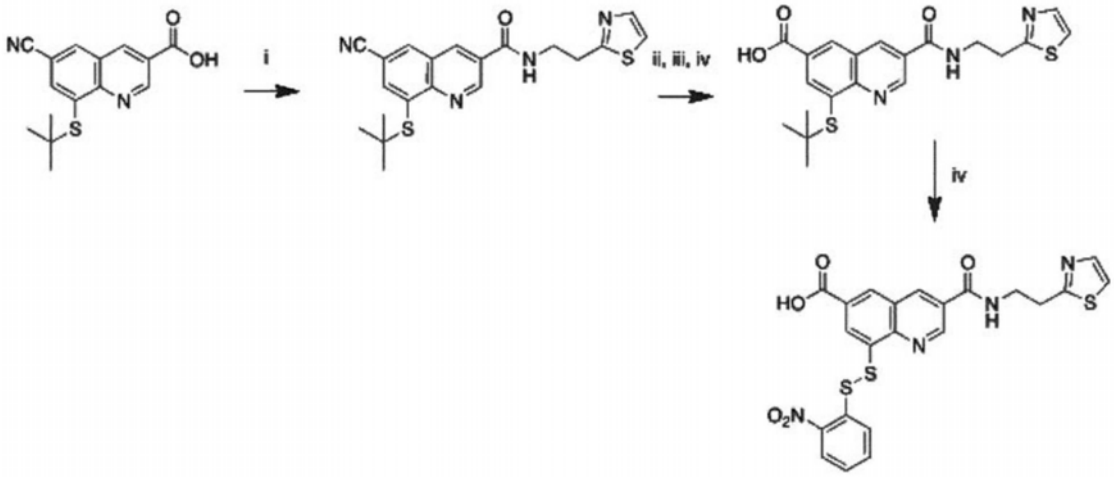
[1007] 将粗制物6-氰基-8-氟-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯悬浮于POCl3中,并且将混合物在100℃加热过夜。将冷却的溶液在真空中浓缩,并且将所得褐色油状物在CH2Cl2(500ml)和水(250ml)之间分配。将有机萃取物用Na2SO4干燥并且在真空中浓缩,得到褐色油状物,将其在硅胶上进行层析,用在庚烷中的EtOAc的梯度洗脱。

[1008] 4-氯-6-氰基-8-氟喹啉-3-甲酸乙酯(1当量)、Et3SiH(2当量)、Pd(PPh3)2Cl2(0.05当量)在乙腈中的混合物在80℃加热3小时。将反应混合物过滤(硅藻土(Celite)),浓缩至油状物,用10%NH4OH稀释,并且用二氯甲烷萃取。将有机萃取物用10%NH4OH洗涤,干燥(MgSO4),并且浓缩,得到6-氰基-8-氟喹啉-3-甲酸乙酯,为黄色固体(40g,0.18mol,95%)。

[1009] 向6-氰基-8-氟喹啉-3-甲酸乙酯(1当量)在DMF中的溶液中加入tBuSH和Cs2CO3(3当量)。将混合物在130℃搅拌18小时。将溶液蒸发至干燥,并且将粗物质置入水中,并且用6M HCl酸化,直到形成沉淀(pH 2)。将沉淀过滤并且在真空下干燥。将粗制物(1当量)在室温下溶解于乙醇中并且用LiOH(1M,2当量)处理,直到起始材料耗尽。将反应混合物小心地酸化至pH=4,移除挥发物,并且通过结晶分离产物8-(叔丁基硫代)-6-氰基喹啉-3-甲酸。

[1010] 实施例7-8-((2-硝基苯基)二硫烷基)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸的制备

[1011]



[1012] 方案X1:i)2-(噻唑-2-基)乙-1-胺,COMU,DIPEA,DMF;ii)MeOH中的NaOMe,然后HCl水溶液,然后LiOH;iv)乙酸中的硫代次氯酸2-硝基苯酯。

[1013] 向8-(叔丁基硫代)-6-氰基喹啉-3-甲酸(1当量)和2-(噻唑-2-基)乙-1-胺(1当量)在DMF(50mL/mmol)中的溶液中加入COMU(1当量)和DIPEA(3当量)。将反应混合物在室温搅拌直到起始材料耗尽。然后,将粗制混合物倒入冰水中,并且通过过滤分离产物8-(叔丁基硫代)-6-氰基-N-(2-(噻唑-2-基)乙基)喹啉-3-甲酰胺。

[1014] 在0℃,向8-(叔丁基硫代)-6-氰基-N-(2-(噻唑-2-基)乙基)喹啉-3-甲酰胺在无水甲醇中的混合物中逐滴加入甲醇钠溶液(1,1当量,1M,于甲醇中)。将反应缓慢温热至室温,过夜。反应混合物的HPLC分析(方法1A)显示出完全转化为亚氨基醚。加入2M HCl直到pH=2,并且将反应在室温搅拌2小时。HPLC分析(方法1A)显示出亚氨基醚转化为相应的甲酯。此时,逐滴加入1M NaOH的溶液直到pH=11。将混合物搅拌直到HPLC分析(方法1A)显示出形成所需的酸。加入水,并且用1M HCl小心地酸化(pH=4)反应混合物,形成沉淀,将其用异丙醇(10%)在氯仿中的混合物萃取。将有机萃取物用MgSO4干燥,并且通过FCC(在DCM中的MeOH的梯度)纯化,得到分析纯的8-(叔丁基硫代)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸。

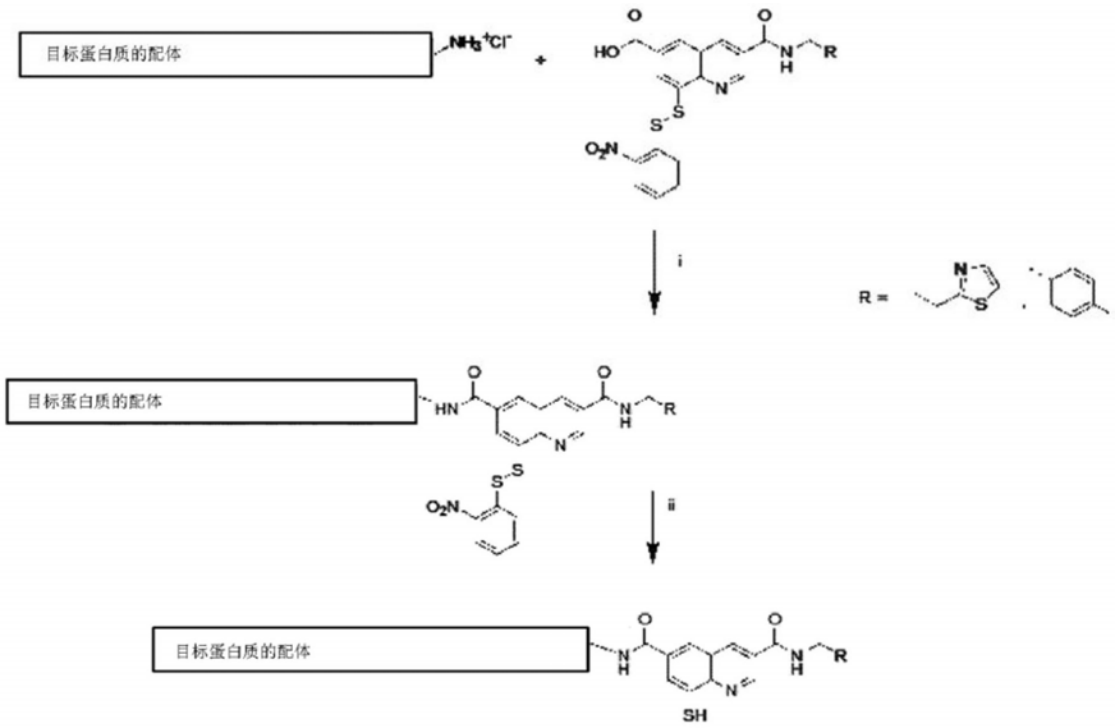
[1015] 将8-(叔丁基硫代)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸(1当量)在乙酸(100mL/mmol)中的混合物用硫代次氯酸2-硝基苯酯处理2小时。HPLC分析(方法1A)显示出完全转化为所需产物,通过将反应混合物用过量的冰水处理来分离产物。将产物通过过滤分离并且在真空下干燥。

[1016] 实施例8-3-((4-氟苄基)氨基甲酰基)-8-((2-硝基苯基)二硫烷基)喹啉-6-甲酸

[1017] 使用对于制备8-((2-硝基苯基)二硫烷基)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸所述相同的程序,由8-(叔丁基硫代)-6-氰基喹啉-3-甲酸和4-氟苄胺制备该衍生物。

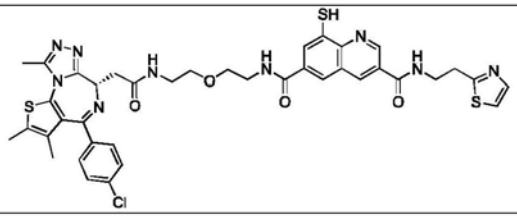
[1018] 实施例9-Capzimin缀合物的制备

[1019]

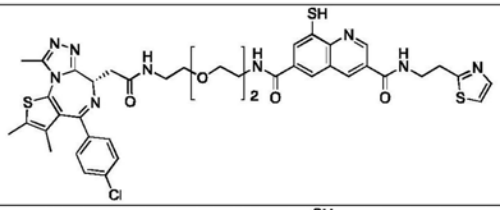
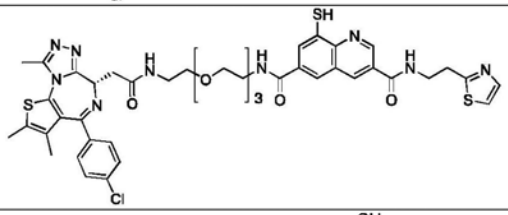
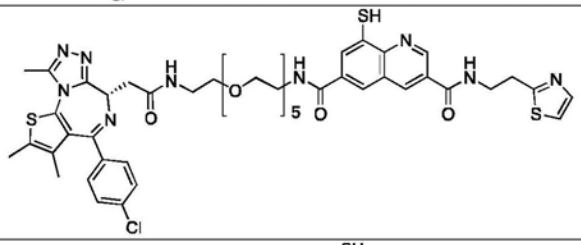
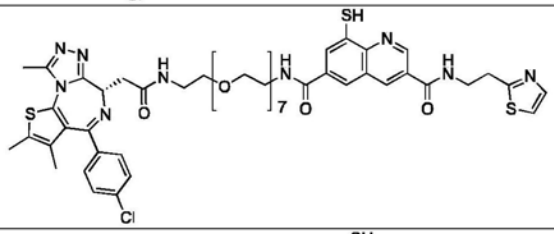
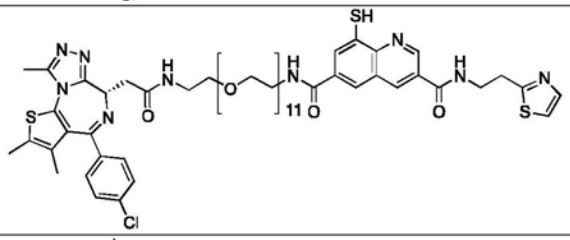
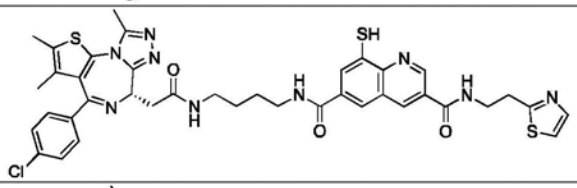
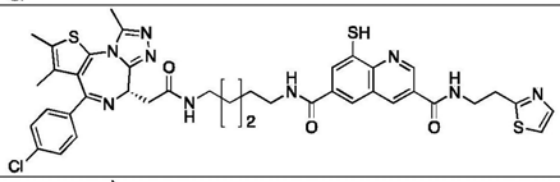
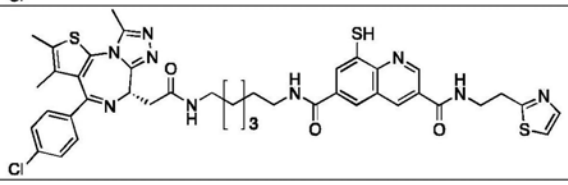


[1020] 方案X2:i)COMU,DIPEA,DMF;ii)TCEP,MeOH。向弹头物-连接基团胺(0.01mmol)在DMF(0.05M)中的溶液中加入8-((2-硝基苯基)二硫烷基)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸(或3-((4-氟苄基)氨基甲酰基)-8-((2-硝基苯基)二硫烷基)喹啉-6-甲酸)(0.01mmol)、COMU(0.01mmol)和DIPEA(0.05mmol)。使反应混合物在室温反应1小时,然后加入水,并且在真空下移除溶剂。将粗物质通过反相HPLC(方法1)纯化。在减压下移除溶剂,并且将纯化的缀合物溶解在甲醇(1mL)中。加入TCEP(0.05mmol),并且使混合物在室温反应2小时,之后直接注入制备型HPLC(方法1)中,得到最终化合物。分析数据(HRMS)在下面示出的表VI-IX中提供。

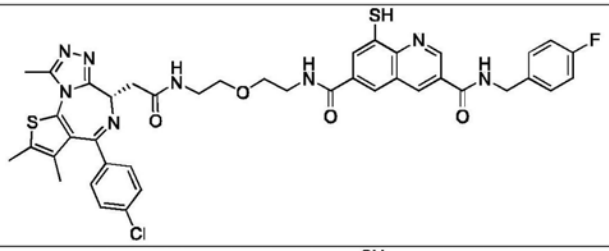
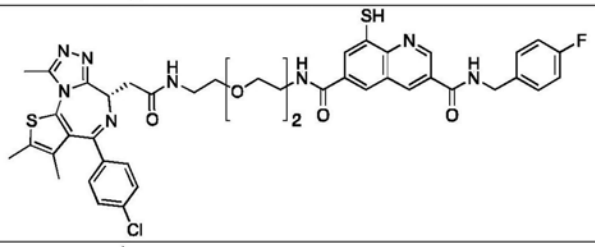
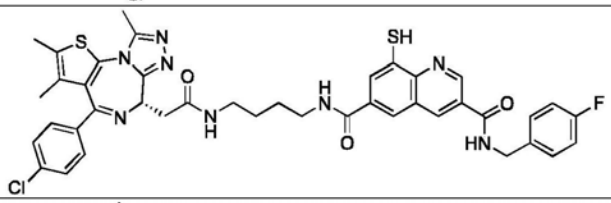
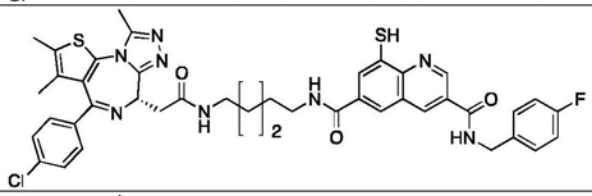
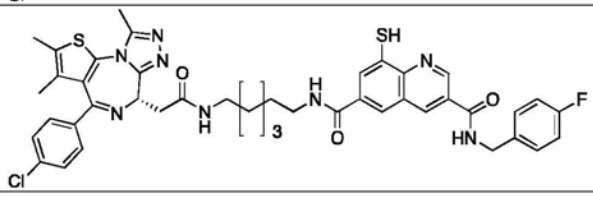
[1021]

实施例	结构	m/z $[M+H]^+$
11JQ1		828.1897

[1022]

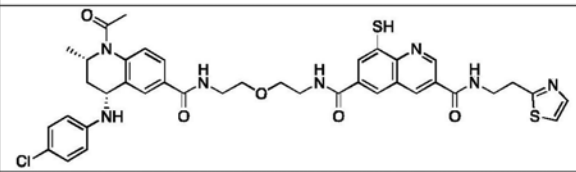
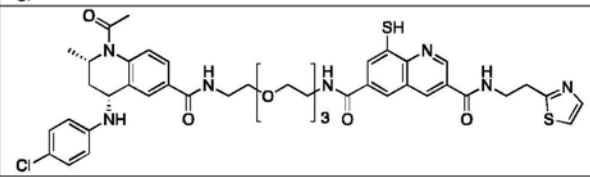
11JQ2		872.2160
11JQ3		916.2422
11JQ4		1004.2946
11JQ5		1092.3470
11JQ6		1268.4519
11JQ7		812.1948
11JQ8		826.2105
11JQ9		840.2261

[1023]

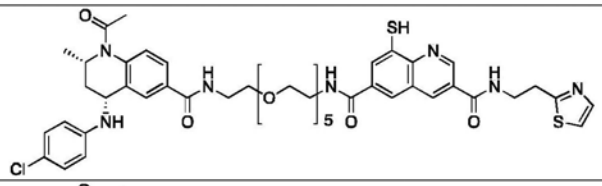
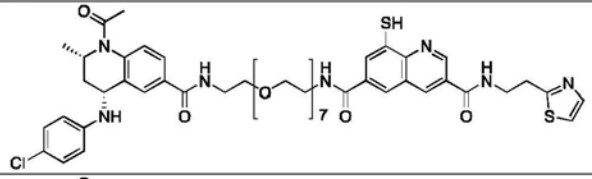
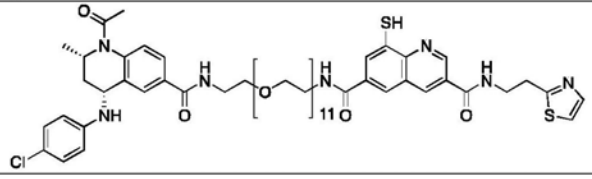
11JQ10		825.2130
11JQ11		869.2392
11JQ12		809.2181
11JQ13		823.2337
11JQ14		837.2494

[1024] 表VII

[1025]

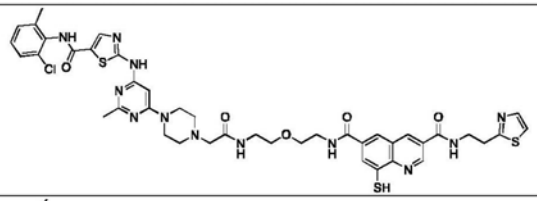
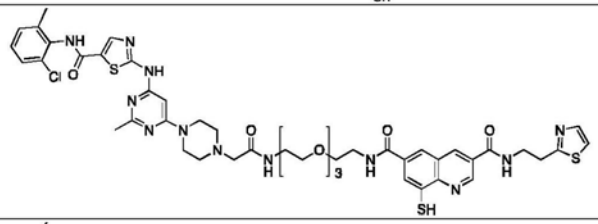
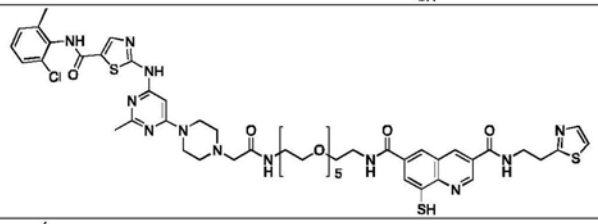
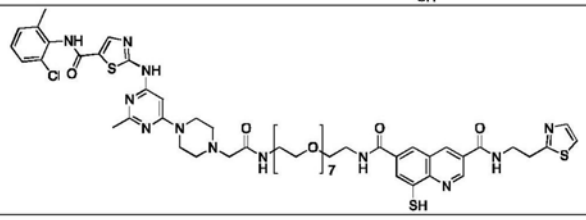
实施例	结构	m/z $[M+H]^+$
11IB1		786.2221
11IB2		874.2745

[1026]

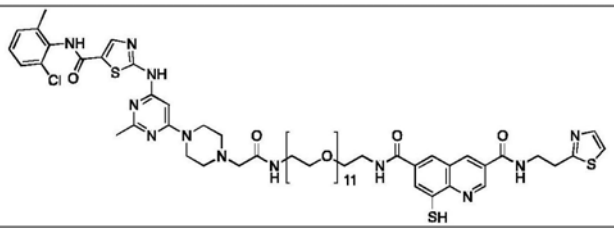
11IB3		962.3269
11IB4		1050.3794
11IB5		1226.4842

[1027] 表VIII

[1028]

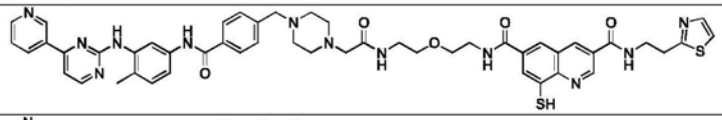
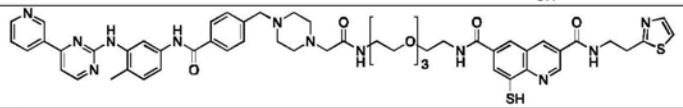
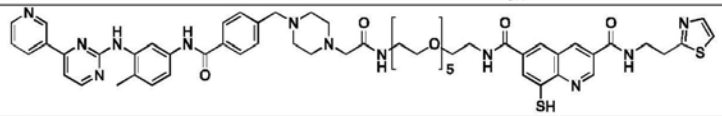
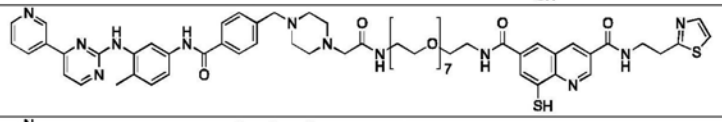
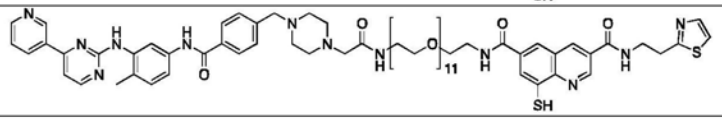
实施例	结构	m/z $[M+H]^+$
11DA1		929.2487
11DA2		1017.3011
11DA3		1105.3535
11DA4		1193.4059

[1029]

11DA5		1369.5108

[1030] 表IX

[1031]

实施例	结构	m/z [M+H]+
11IM1		965.3625
11IM2		1053.4149
11IM2		1141.4674
11IM3		1229.5198
11IM4		1405.6247

[1032] 实施例10-capzimin缀合物-苯甲酰酯前药的制备

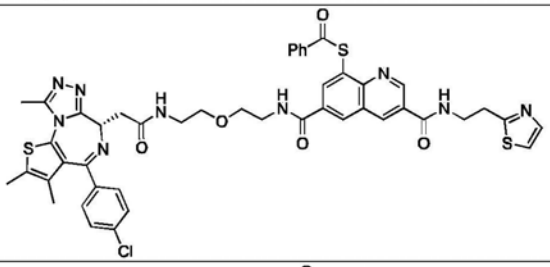
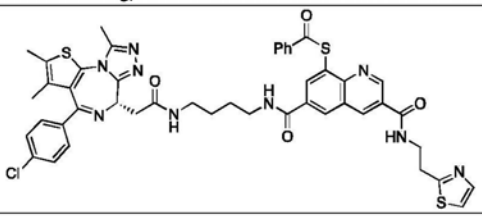
[1033] 方法1.

[1034] 向弹头物-连接基团胺(0.01mmol)在DMF(0.05M)中的溶液中加入8-((2-硝基苯基)二硫烷基)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸(0.01mmol)、COMU(0.01mmol)和DIPEA(0.05mmol)。使反应混合物在室温反应1小时,然后加入水,并且在真空下移除溶剂。将粗物质通过反相HPLC(方法1)纯化。在减压下移除溶剂,并且将纯化的缀合物溶解在甲醇(1mL)中。加入TCEP(0.05mmol),并且使混合物在室温反应2小时。在真空下移除甲醇,并且将粗制混合物悬浮于无水DCM(3mL)中。加入TEA直到pH=10,之后逐滴加入苯甲酰氯(beznoyl chloride)(0.07mmol)。在室温1小时后,HPLC分析显示出形成硫酯。在减压下移除溶剂,将粗制物溶解在甲醇中,然后注入制备型HPLC(方法1)中,得到最终化合物。

[1035] 方法2.

[1036] 向8-((2-硝基苯基)二硫烷基)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸(1当量)在乙腈/水8:2(100mL/mmol)中的混合物中加入TCEP(盐酸盐,3当量)。30分钟后,HPLC分析(方法1A)显示出形成游离硫醇。加入苯甲酰氯(1.5当量),并且使混合物在室温反应1小时。将粗制物在减压下浓缩,溶解在甲醇中,然后注入制备型HPLC(方法1)中,得到纯的8-(苯甲酰基硫代)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸。向弹头物-连接基团胺(0.01mmol)在DMF(0.05M)中的溶液中加入8-(苯甲酰基硫代)-3-((2-(噻唑-2-基)乙基)氨基甲酰基)喹啉-6-甲酸(0.01mmol)、COMU(0.01mmol)和DIPEA(0.05mmol)。使反应混合物在室温反应1小时,在真空下移除溶剂。将粗物质通过反相HPLC(方法1)纯化。分析数据(HRMS)在下面示出的表X中提供。

[1037]

实施例	结构	m/z [M+H]+
11JQ15		932.2160
11JQ16		916.2210

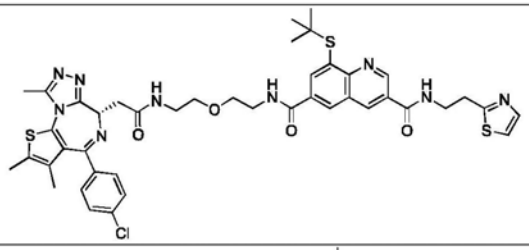
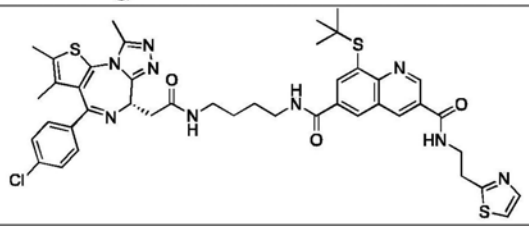
[1038] 实施例11-阴性对照和8-硫代喹啉缀合物的制备

[1039] 向弹头物-连接基团胺(0.01mmol)在DMF(0.05M)中的溶液中加入8-(叔丁基硫代)-6-氰基喹啉-3-甲酸(0.01mmol)、COMU(0.01mmol)和DIPEA(0.05mmol)。使反应混合物在室温反应1小时,然后加入水,并且在真空下移除溶剂。将粗物质通过反相HPLC(方法1)纯化,得到最终化合物。

[1040]

实施例	结构	m/z [M+H]+

[1041]

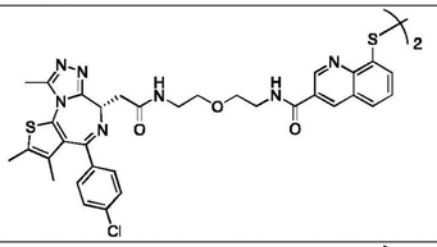
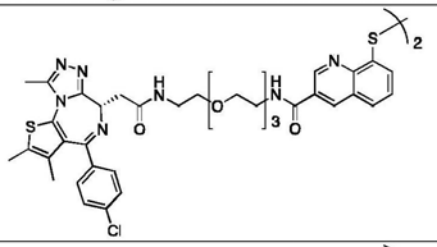
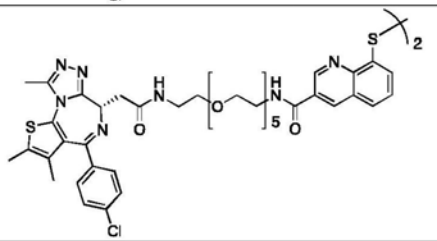
11JQ17		884.2523
11JQ18		868.2574

[1042] 8-硫代喹啉缀合物的制备:

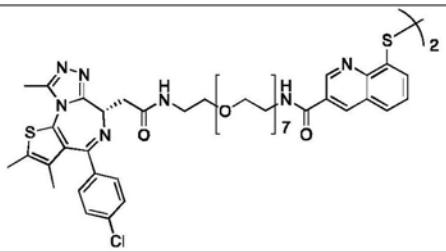
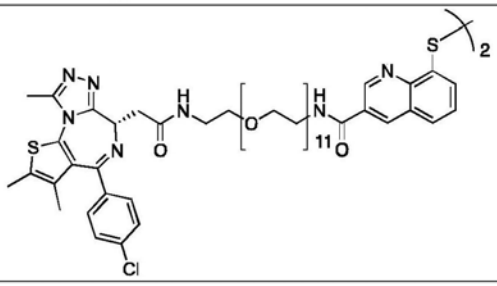
[1043] 向弹头物-连接基团胺(0.01mmol)在DMF(0.05M)中的溶液中加入8,8'-二硫烷二基双(喹啉-3-甲酸)(0.005mmol)、COMU(0.01mmol)和DIPEA(0.05mmol)。使反应混合物在室温反应1小时,然后加入水,并且在真空下移除溶剂。将粗物质通过反相HPLC(方法1)纯化。在减压下移除溶剂以得到所需产物。分析数据(HRMS)在下面示出的表XIa至XId中提供。

[1044] 表XIa

[1045]

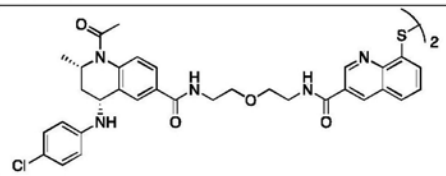
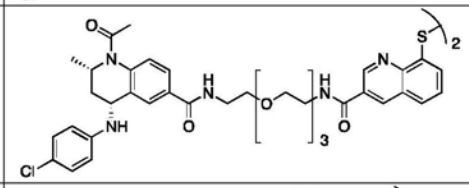
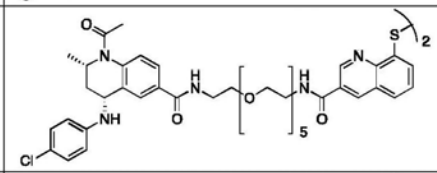
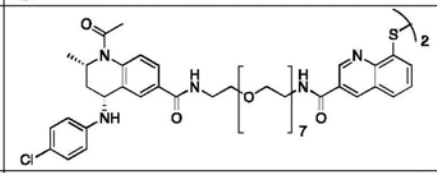
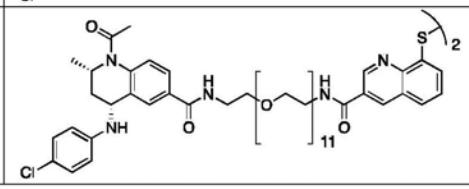
实施例	结构	m/z [M+2H]$^{++}$
11JQ19		673.1697
11JQ20		761.2221
11JQ21		849.2745

[1046]

11JQ22		937.3269
11JQ23		1113.4318

[1047] 表XIb

[1048]

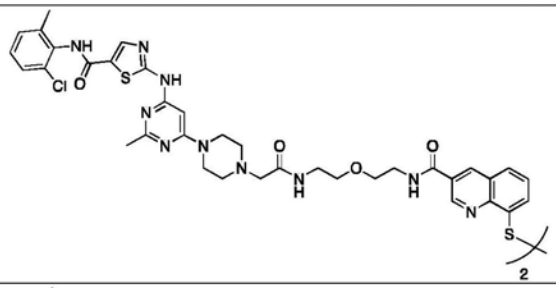
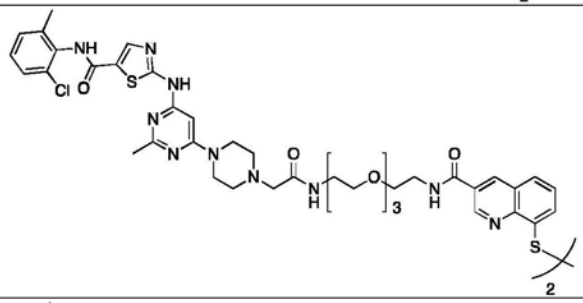
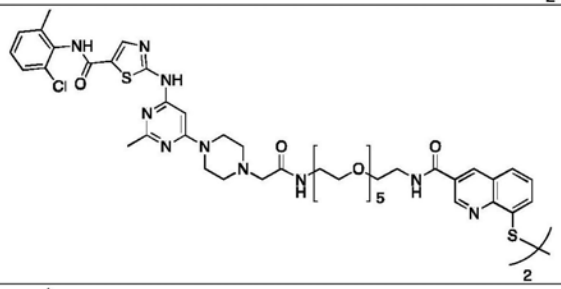
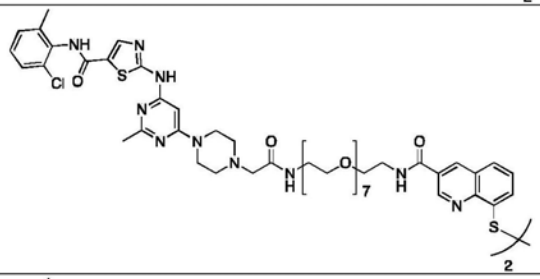
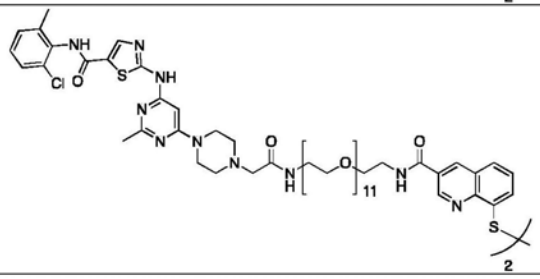
实施例	结构	$[M+2H]^{++}$
11IB6		631.2020
11IB7		719.2544
11IB8		807.3069
11IB9		895.3593
11IB10		1071.4642

[1049] 表XIc

[1050]

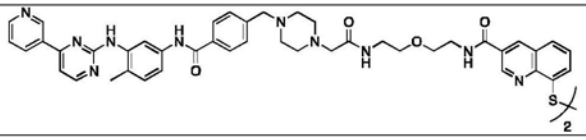
实施例	结构	m/z $[M+2H]^{++}$

[1051]

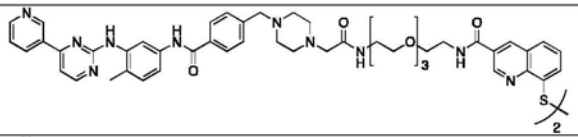
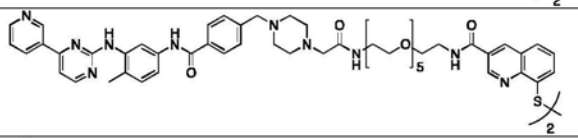
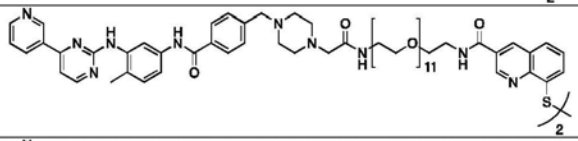
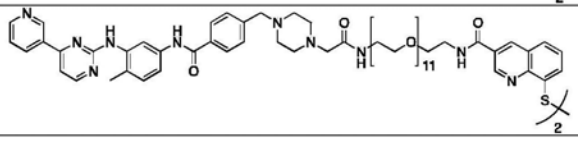
11DA6		774.2286
11DA7		862.2810
11DA8		950.3334
11DA9		1038.3859
11DA10		1214.4907

[1052] 表XId

[1053]

实施例	结构	m/z $[M+2H]^{++}$
11IM6		810.3424

[1054]

11IM7		898.3949
11IM8		986.4473
11IM9		1074.4997
11IM10		1250.6046

[1055] 实施例12-通过基于capzimin的代表性化合物的布罗莫-和超末端-结构域蛋白(BET)蛋白质的降解

[1056] 细胞培养。HeLa(CCL-2)和HEK293(CRL-1573)细胞购自ATCC,并且在补充有10%FBS、100μg/mL青霉素/链霉素和L-谷氨酰胺的DMEM培养基(Gibco)中培养。将细胞在37℃和5%CO_2下生长,并且保持不超过30代。使用来自Lonza的MycoAlert试剂盒来常规地测试所有细胞系的支原体污染。

[1057] 将HeLa(5x 10^5)和HEK293(1x 10^6)细胞在标准6孔板(2mL培养基)中接种过夜,之后用1μM化合物处理,最终DMSO浓度为0.1%v/v。4小时的温育时间后,将细胞用DPBS(Gibco)洗涤,并且使用补充有cOmplete Mini无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和benzonase的85μL RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich)裂解。通过离心(20000g,10min,4℃)使裂解物澄清,并且使用Bradford比色测定定量上清液的总蛋白含量。使用等量的总蛋白和LDS样品缓冲液(Invitrogen)来制备样品。

[1058] 免疫印迹。免疫印迹。通过在NuPage 4-12%Bis-Tris凝胶上的SDS-PAGE分离蛋白质,随后使用湿转移将其转移至Amersham Protran0.45NC硝酸纤维素膜(GE Healthcare)。使用具有0.1%Tween-20的在Tris-缓冲盐水(TBS)中的5%w/v牛奶封闭膜。视情况而定,使用抗-Brd2(Abcam ab139690,1:2,000稀释)、抗-Brd3(Abcam ab50818,1:500稀释)和抗-Brd4(Abcam ab128874,1:1,000稀释)一抗探测印迹(过夜,于4℃)。第二天,将印迹用TBST洗涤,并且与抗-微管蛋白hFAB-罗丹明(BioRad,12004166)一抗以及抗-兔IRDye 800CW(Licor 1:1,000稀释)或抗-小鼠IRDye 800CW(Licor 1:1,000稀释)二抗一起温育(在室温1小时)。使用Bio-Rad ChemiDoc MP成像系统将印迹显影,并且使用Image Studio软件(LiCor)进行条带定量。条带强度被归一化至微管蛋白荷载对照并且报告为平均0.1%DMSO媒介物强度的%。将降解数据绘图,并且使用Prism(Graphpad,第8版)进行分析。

[1059] 图1中来自HEK293裂解物的代表性蛋白质印迹显示出在用1μM化合物处理4小时后Brd2、Brd3和Brd4蛋白质水平的消耗。MZ1用作阳性对照。每个泳道下记录的值表示相对于平均0.1%DMSO对照的BET丰度。所有代表性化合物都显示出BRD2、BRD3和BRD4的消耗,其中几个化合物(例如11JQ7)接近PROTAC MZ1的效力。

[1060] 实施例13-苯甲酰酯前药的活性

[1061] 将HEK293(1x 10^6)细胞与所需浓度(1nM-10μM)的DMSO、11JQ7或11JQ16化合物一起温育,最终DMSO浓度为0.1%v/v。4小时的处理时间后,将细胞用RIPA缓冲液裂解,并且针对Brd4和β-微管蛋进行免疫印迹。每个泳道下记录的值表示相对于0.1%DMSO对照的BET丰度。苯甲酰酯前药和母体分子二者都观察到类似水平的BRD4消耗。结果在图2中示出。

[1062] 实施例14-11JQ15的阴性SAR

[1063] 将HEK293(1x 10^6)细胞与DMSO、1μM 11JQ15或1μM 11JQ17一起温育4小时,最终DMSO浓度为0.1%v/v。来自三个独立处理的细胞(n=3)用RIPA缓冲液裂解,并且针对Brd4和β-微管蛋进行免疫印迹。条带强度被归一化至微管蛋白荷载对照并且报告为0.1%DMSO媒介物强度的%。将降解数据绘图,并且使用Prism(Graphpad,第8版)进行分析,其中条形图是三个独立实验的平均值±SEM。尽管在11JQ15的情况下观察到Brd4水平的显著消耗,但是用叔丁基封端的等效物11JQ17处理后的消耗最小。结果在图3中示出。

[1064] 实施例15-通过基于capzimin的代表性化合物的浓度依赖性BET降解

[1065] 将HeLa(5x 10^5)和HEK293(1x 10^6)细胞在标准6孔板(2mL培养基)中接种过夜,之后用所需浓度(1nM-10μM)的化合物处理,最终DMSO浓度为0.1%v/v。4小时的处理时间后,将细胞用DPBS(Gibco)洗涤,并且使用补充有cOmplete Mini无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和benzonase的85μL RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich)裂解。通过离心(20000g,10min,4℃)使裂解物澄清,并且使用Bradford比色测定定量上清液的总蛋白含量。使用等量的总蛋白和LDS样品缓冲液(Invitrogen)来制备样品。条带强度被归一化至微管蛋白荷载对照并且报告为平均0.1%DMSO媒介物强度的%。将降解数据绘图,并且使用Prism(Graphpad,第8版)进行分析。

[1066] 图4中的代表性印迹显示出在用增加浓度的11JQ16或11JQ15处理后Brd2、Brd3和Brd4蛋白质水平的消耗。MZ1和11JQ17以1μM使用,分别作为阳性对照和阴性对照。表XII示出了代表性化合物(11JQ17、11JQ1、11JQ15、11JQ12、11JQ7和11JQ16)的DC50参数,其中:Dmax是观察到的最大降解,并且DC50是达到Dmax的50%所需的浓度。对于表格,D_{max}:+(D_{max}≤25%);++(26%≤D_{max}≤50%);+++(51%≤D_{max}≤70%);++++(71%≤D_{max});DC_{50}:A(DC_{50}≤50nM);B(51nM≤DC_{50}≤500nM);C(501nM≤DC_{50})。

[1067] 表XII.通过基于capzimin的代表性化合物的浓度依赖性降解

[1068]

	靶标	HEK293		HeLa	
		D_{max} (%)	DC_{50}	D_{max} (%)	DC_{50}
11JQ17	Brd2	+	-	+	-
	Brd3	+	-	+	-
	Brd4 (L)	+	-	+	-
	Brd4 (S)	+	-	+	-
11JQ1	Brd2	++++	B	++	B
	Brd3	+++	C	+++	C

[1069]

	Brd4 (L)	++++	B	++++	B
	Brd4 (S)	++++	B	++++	B
11JQ15	Brd2	++	B	++	B
	Brd3	++	B	++	B
	Brd4 (L)	+++	B	+++	B
	Brd4 (S)	+++	B	+++	B
11JQ12	Brd2	++	C	++	C
	Brd3	++	C	+	C
	Brd4 (L)	++++	B	++++	C
	Brd4 (S)	++++	B	++++	C
11JQ7	Brd2	++++	B	++++	C
	Brd3	++++	C	++++	B
	Brd4 (L)	++++	B	++++	A
	Brd4 (S)	++++	B	++++	A
11JQ16	Brd2	++++	B	+++	B
	Brd3	++++	A	+++	C
	Brd4 (L)	++++	A	++++	B
	Brd4 (S)	++++	A	++++	B

[1070] 实施例16-通过基于capzimin的代表性化合物的时间依赖性BET降解

[1071] 将HEK293(0.5x 10^6)细胞在标准6孔板(2mL培养基)中接种过夜,之后用1μM浓度的化合物处理,最终DMSO浓度为0.1%v/v。在所需时间(0-24小时)的温育后,将细胞用DPBS(Gibco)洗涤,并且使用补充有完全Mini无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和benzonase的85μL RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich)裂解。通过离心(20000g,10min,4℃)使裂解物澄清,并且使用Bradford比色测定定量上清液的总蛋白含量。使用等量的总蛋白和LDS样品缓冲液(Invitrogen)来制备样品。条带强度被归一化至微管蛋白荷载对照并且报告为平均0.1%DMSO媒介物强度的%。将降解数据绘图,并且使用Prism(Graphpad,第8版)进行分析。

[1072] 图5中的代表性印迹显示出在用11JQ16或11JQ15在多个时间点的1μM处理后Brd2、Brd3和Brd4蛋白质水平的消耗。MZ1和11JQ17以1μM使用(4小时),分别作为阳性对照和阴性对照。表XIII示出了在HEK293细胞中代表性化合物的时间进程参数,其中:D_{max}是观察到的最大降解,T1/2(h)是达到D_{max}的50%所需的时间,并且Abs.T1/2(h)是相对于DMSO的消耗50%蛋白质所需的时间。

[1073] 表XIII.通过基于capzimin的代表性化合物的时间依赖性降解

[1074]

	靶标	HEK293			HeLa		
		D_{max} (%)	$T_{1/2}$ (h)	Abs.$T_{1/2}$ (h)	D_{max} (%)	$T_{1/2}$ (h)	Abs.$T_{1/2}$ (h)
11JQ1	Brd2	60	1.0	3.5	ND		
	Brd3	90	2.7	3.5	ND		
	Brd4 (L)	95	1.6	1.7	ND		
	Brd4 (S)	95	2	1.9	ND		
11JQ15	Brd2	50	1.1	5.7	ND		
	Brd3	70	1.5	2.6	ND		
	Brd4 (L)	90	0.8	1.1	90	3.5	4.3
	Brd4 (S)	90	0.9	1.2	90	2.8	3.3
11JQ7	Brd2	80	1.8	3.2	50	4	4
	Brd3	95	2.9	3.4	ND		
	Brd4 (L)	98	1.2	1.2	100	2.3	2.4
	Brd4 (S)	99	1.9	1.9	100	3	3.1
11JQ16	Brd2	75	1.7	2.7	ND		
	Brd3	95	1.6	1.9	ND		
	Brd4 (L)	98	1.0	1.0	ND		
	Brd4 (S)	95	0.6	0.6	ND		

[1075] ND＝未测

[1076] 实施例17:基于capzimin的代表性化合物的机理评价

[1077] 将HeLa(5x 10^5)和HEK293(1x 10^6)细胞在标准6孔板(2mL培养基)中接种过夜,之后用抑制剂(10μM硼替佐米、10μM capzimin、10μM JQ1)预处理。0.5小时的预温育时间后,随后将细胞用媒介物、1μM MZ1或1μM 11JQ15处理,得到0.2%v/v的最终总DMSO浓度。4小时的温育后,将细胞用DPBS(Gibco)洗涤,并且使用补充有cOmplete Mini无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和benzonase的85μL RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich)裂解。通过离心(20000g,10min,4C)使裂解物澄清,并且使用Bradford比色测定定量上清液的总蛋白含量。使用等量的总蛋白和LDS样品缓冲液(Invitrogen)来制备样品。

[1078] 图6A中HEK293裂解物的代表性印迹显示出在存在和不存在10μM硼替佐米、10μM capzimin和10μM JQ1的情况下用1μM 11JQ15或MZ1处理4小时后Brd4蛋白质水平的消耗。Brd4条带强度被归一化至微管蛋白荷载对照并且在图6B中报告为平均0.1%DMSO媒介物强度的%。每条是一式两份地进行的三个独立实验(n＝3)的平均值±SEM。

[1079] 通过11JQ15的降解在硼替佐米和JQ1的存在下被完全阻断,并且在capzimin的存在下被显著阻断($p<0.01$;配对t检验)。备选地,MZ1仅被硼替佐米和JQ1阻断。这些数据表明

降解是蛋白酶体依赖性的。

[1080] 实施例18:通过TMT标记的MS的无偏的(unbiased)全蛋白质组分析

[1081] 将HEK293(2.2x 10^6)细胞接种在10cm平板(10mL培养基)中过夜,之后用1μM化合物处理,最终DMSO浓度为0.1%v/v。4小时的温育时间后,将细胞用DPBS(Gibco)洗涤2次,并且使用补充有cOmplete Mini无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和benzonase的500μL裂解缓冲液(100mM Tris,4%(w/v)SDS,pH 8.0)裂解。将裂解物简单地进行超声处理(2x 10s),通过离心(20000g,10min,4℃)澄清,并且使用BCA测定(Thermo Fisher Scientific)定量上清液的总蛋白含量。

[1082] 在Fingerprint Proteomics(邓迪大学)中进行样品加工、消化、脱盐、标记和分级,如先前所描述的[Gadd等人10.1038/nchembio.2329]。图7描绘了比较11JQ15与DMSO处理(左)和比较1μM 11JQ17与DMSO处理(右)的7882蛋白质的丰度的倍数变化,以及它们各自的p值(t检验;n=3)。明显的是在活性化合物11JQ15的存在下存在Brd2、Brd3和Brd4的选择性降解。叔丁基等效物(11JQ17)未显示出任何BET消耗,表明官能化的基于Capzimin的代表性化合物对于降解是必需的。

[1083] 实施例19:基于capzimin的代表性化合物对细胞活力的影响

[1084] 使用CellTiter-Glo测定(Promega)测量的代表性化合物和其他化合物的抗增殖作用。将MV4-11细胞在无菌的白色透明底部384孔细胞培养微孔板(Greiner Bio-one)中以在RPMI培养基中的2X浓度和25μl的体积温育。第二天,将测试化合物在RPMI培养基中连续稀释至2X浓度,然后加入到细胞中,使最终体积为50μl。72小时的温育后,将25μl的CellTiter-Glo试剂加入各孔中。15分钟的温育后,在Pherastar FS上读取发光信号。测定组分的最终浓度如下:3x10^5细胞/ml,0.05%DMSO,5μM以下的化合物。使用Prism 8(Graphpad)处理数据(图8)并且生成剂量响应曲线。

[1085] 数据显示,11JQ7和11JQ16的细胞毒性特征不同于JQ1和非活性11JQ18,这与靶标降解(而非靶标抑制)相一致。单独的Capzimin显示出显著更低的细胞毒性。

[1086] 实施例20:基于capzimin的代表性化合物在MV4-11细胞中对c-MYC水平和PARP裂解的作用

[1087] 将MV4-11(0.7x 10^6细胞/mL)在10cm板(补充有10%FBS和L-谷氨酰胺的10mL DMEM)中接种过夜,之后用所需浓度并且最终DMSO浓度为0.1%v/v的化合物处理。6小时的温育时间后,将细胞用DPBS(Gibco)洗涤2次,并且使用补充有cOmplete Mini无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche)和benzonase的85μL RIPA缓冲液(Sigma-Aldrich)裂解。通过离心(20000g,10min,4C)使裂解物澄清,并且使用Bradford比色测定定量上清液的总蛋白含量。使用等量的总蛋白和LDS样品缓冲液(Invitrogen)来制备样品。对于免疫印迹分析,使用以下抗体:抗-Brd4(ab128874,1:1,000稀释),抗-cmyc(ab32072,1:1000稀释),抗-CPARP(CST-9541T,1:1,000稀释),和抗-微管蛋白hFAB-罗丹明(BioRad,12004166,1:10000稀释)。

[1088] 图9中的代表性免疫印迹显示出在用增加浓度的11JQ16处理后Brd4和c-MYC水平的消耗以及裂解的PARP的相应增加。C-PARP的增加显著大于单独的抑制剂(JQ1)和阴性对照(11JQ18),这与靶向降解(而非抑制)相一致。

[1089] 实施例21.基于capzimin的代表性化合物与人Rpn11结合。

[1090] 等温滴定量热法(ITC)用于测量结合纯化的人Rpn11(残基2-239)的capzimin,所述人Rpn11(残基2-239)与Rpn8(残基1-179)共表达。滴定在ITC200微量热计(25℃,750rpm)中进行,其中蛋白质在池中(40μM)并且配体在注射器中(400μM)。用ITC缓冲液(20mM Bis-Tris丙烷,100mM NaCl,1mM三(2-羧乙基)膦(TCEP),pH 7.5)制备溶液,最终DMSO浓度为2%。运行包括2μL蛋白质溶液的19次注射,速率为0.5μL/s,时间间隔为120s。进行0.4μL的初始进样,并且在数据分析期间弃去。使用MicroCal PEAQ-ITC分析软件将数据拟合到单结合位点模型,以获得解离常数K_d(675nM)、化学计量N(1.04)和结合焓ΔH(-2.3kcal/mol)。

序列表

<110> 邓迪大学
CIULLI, Alessio
TESTA, Andrea
HUGHES, Scott
BUTCHER, Steven P

<120> 用于蛋白质降解的双功能分子

<130> 44900-10202

<150> US 62/684,265
<151> 2018-06-13

<150> US 62/835,953
<151> 2018-04-18

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 933
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

[0001] <400> 1
atggacagac ttcttagact tggaggaggt atgcctggac tgggccaggg gccacctaca 60

gatgctcctg cagtggacac agcagaacaa gtctatatct cttccctggc actgttaaaa 120

atgttaaaac atggccgtgc tggagttcca atggaagtta tgggtttgat gcttggagaa 180

tttgttgatg attataccgt cagagtgatt gatgtgtttg ctatgccaca gtcaggaaca 240

ggtgtcagtg tggaggcagt tgatccagtg ttccaagcta aaatgttgga tatgttgaag 300

cagacaggaa ggccggagat ggttgttggt tggtatcaca gtcaccctgg ctttggttgt 360

tggctttctg gtgtggatat caacactcag cagagctttg aagccttgtc ggagagagct 420

gtggcagtgg ttgtggatcc cattcagagt gtaaaaggaa aggttgttat tgatgccttc 480

agattgatca atgctaatat gatggtctta ggacatgaac caagacaaac aacttcgaat 540

ctgggtcact taaacaagcc atctatccag gcattaattc atggactaaa cagacattat 600

tactccatta ctattaacta tcggaaaaat gaactggaac agaagatgtt gctaaatttg 660

cataagaaga gttggatgga aggtttgaca cttcaggact acagtgaaca ttgtaaacac 720

aatgaatcag tggtaaaaga gatgttggaa ttagccaaga attacaataa ggctgtagaa 780

gaagaagata agatgacacc tgaacagctg gcaataaaga atgttggcaa gcaggacccc 840

aaacgtcatt tggaggaaca tgtggatgta cttatgacct caaatattgt ccagtgttta 900

gcagctatgt tggatactgt cgtatttaaa taa 933

<210> 2
<211> 310
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Asp Arg Leu Leu Arg Leu Gly Gly Gly Met Pro Gly Leu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Pro Pro Thr Asp Ala Pro Ala Val Asp Thr Ala Glu Gln Val Tyr
20 25 30

Ile Ser Ser Leu Ala Leu Leu Lys Met Leu Lys His Gly Arg Ala Gly
35 40 45

Val Pro Met Glu Val Met Gly Leu Met Leu Gly Glu Phe Val Asp Asp
50 55 60

[0002]

Tyr Thr Val Arg Val Ile Asp Val Phe Ala Met Pro Gln Ser Gly Thr
65 70 75 80

Gly Val Ser Val Glu Ala Val Asp Pro Val Phe Gln Ala Lys Met Leu
85 90 95

Asp Met Leu Lys Gln Thr Gly Arg Pro Glu Met Val Val Gly Trp Tyr
100 105 110

His Ser His Pro Gly Phe Gly Cys Trp Leu Ser Gly Val Asp Ile Asn
115 120 125

Thr Gln Gln Ser Phe Glu Ala Leu Ser Glu Arg Ala Val Ala Val Val
130 135 140

Val Asp Pro Ile Gln Ser Val Lys Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Phe
145 150 155 160

Arg Leu Ile Asn Ala Asn Met Met Val Leu Gly His Glu Pro Arg Gln
165 170 175

Thr Thr Ser Asn Leu Gly His Leu Asn Lys Pro Ser Ile Gln Ala Leu
180 185 190

Ile His Gly Leu Asn Arg His Tyr Tyr Ser Ile Thr Ile Asn Tyr Arg
195 200 205

Lys Asn Glu Leu Glu Gln Lys Met Leu Leu Asn Leu His Lys Lys Ser
210 215 220

Trp Met Glu Gly Leu Thr Leu Gln Asp Tyr Ser Glu His Cys Lys His
225 230 235 240

[0003] Asn Glu Ser Val Val Lys Glu Met Leu Glu Leu Ala Lys Asn Tyr Asn
245 250 255

Lys Ala Val Glu Glu Glu Asp Lys Met Thr Pro Glu Gln Leu Ala Ile
260 265 270

Lys Asn Val Gly Lys Gln Asp Pro Lys Arg His Leu Glu Glu His Val
275 280 285

Asp Val Leu Met Thr Ser Asn Ile Val Gln Cys Leu Ala Ala Met Leu
290 295 300

Asp Thr Val Val Phe Lys
305 310

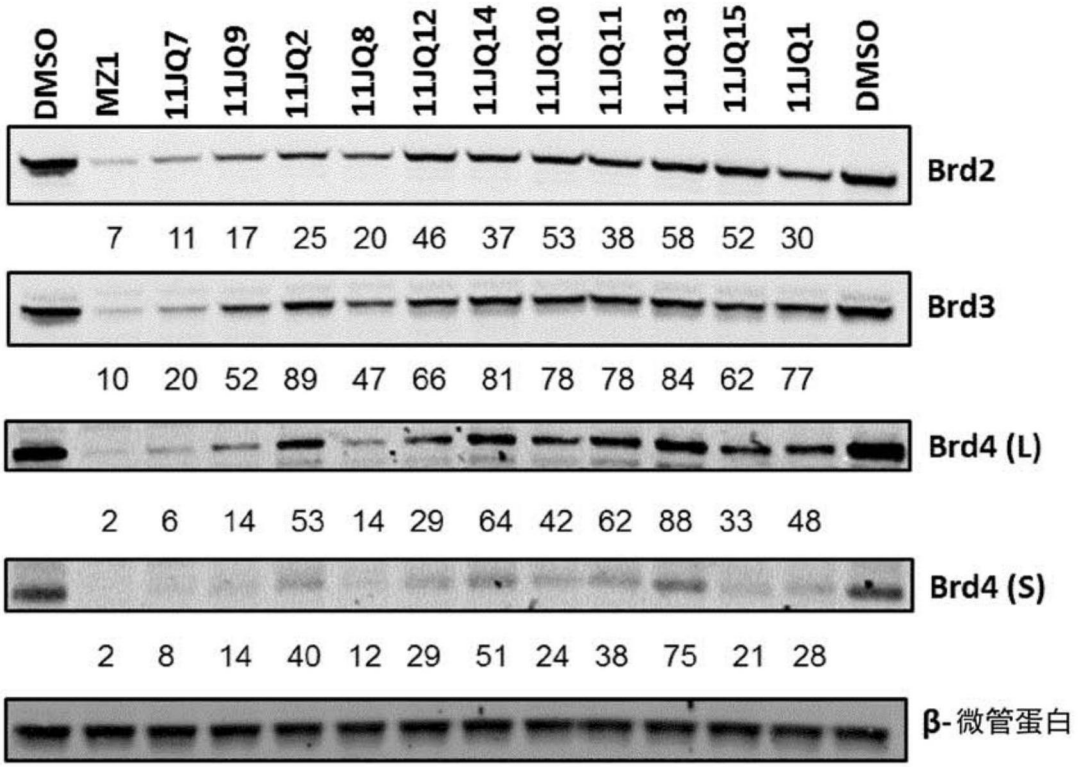

DMSO
MZ1
11JQ7
11JQ9
11JQ2
11JQ8
11JQ12
11JQ14
11JQ10
11JQ11
11JQ13
11JQ15
11JQ1
DMSO
Brd2
7 11 17 25 20 46 37 53 38 58 52 30
Brd3
10 20 52 89 47 66 81 78 78 84 62 77
Brd4 (L)
2 6 14 53 14 29 64 42 62 88 33 48
Brd4 (S)
2 8 14 40 12 29 51 24 38 75 21 28
β-微管蛋白

图1

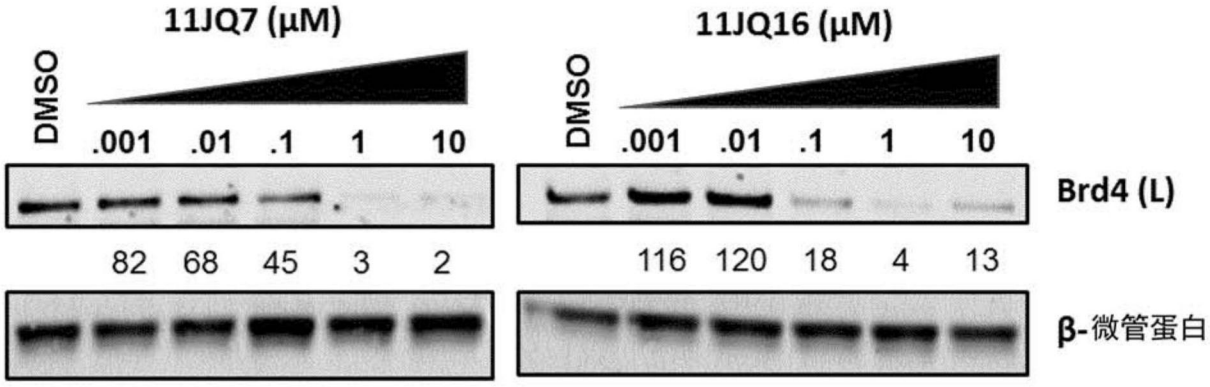

11JQ7 (μM)
DMSO
.001 .01 .1 1 10
11JQ16 (μM)
DMSO
.001 .01 .1 1 10
Brd4 (L)
82 68 45 3 2
116 120 18 4 13
β-微管蛋白

图2

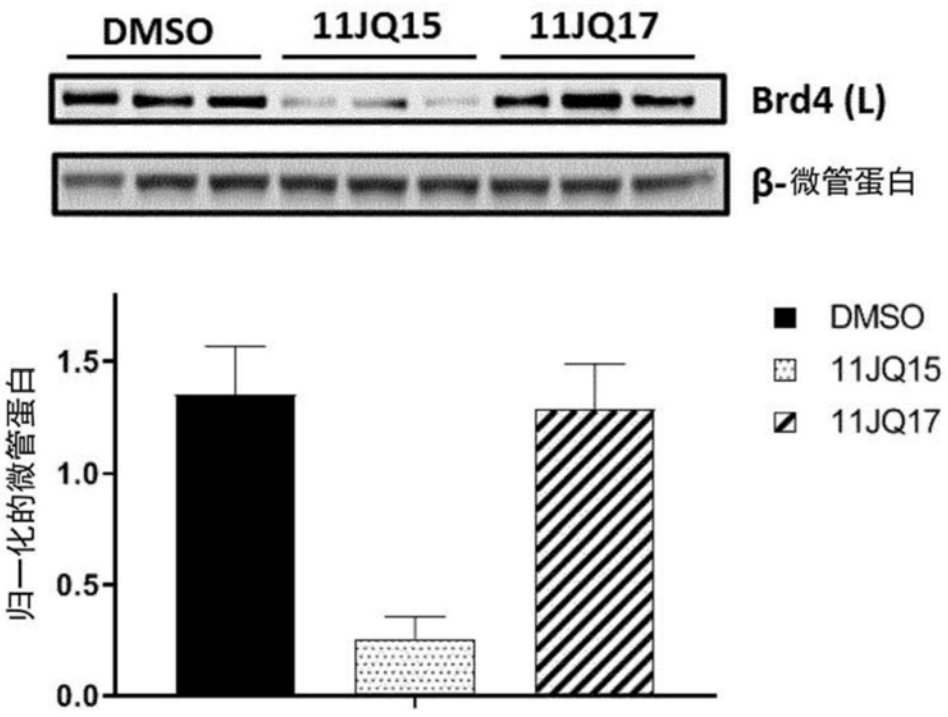

DMSO
11JQ15
11JQ17
Brd4 (L)
β-微管蛋白
归一化的微管蛋白
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
11JQ15
11JQ17

图3

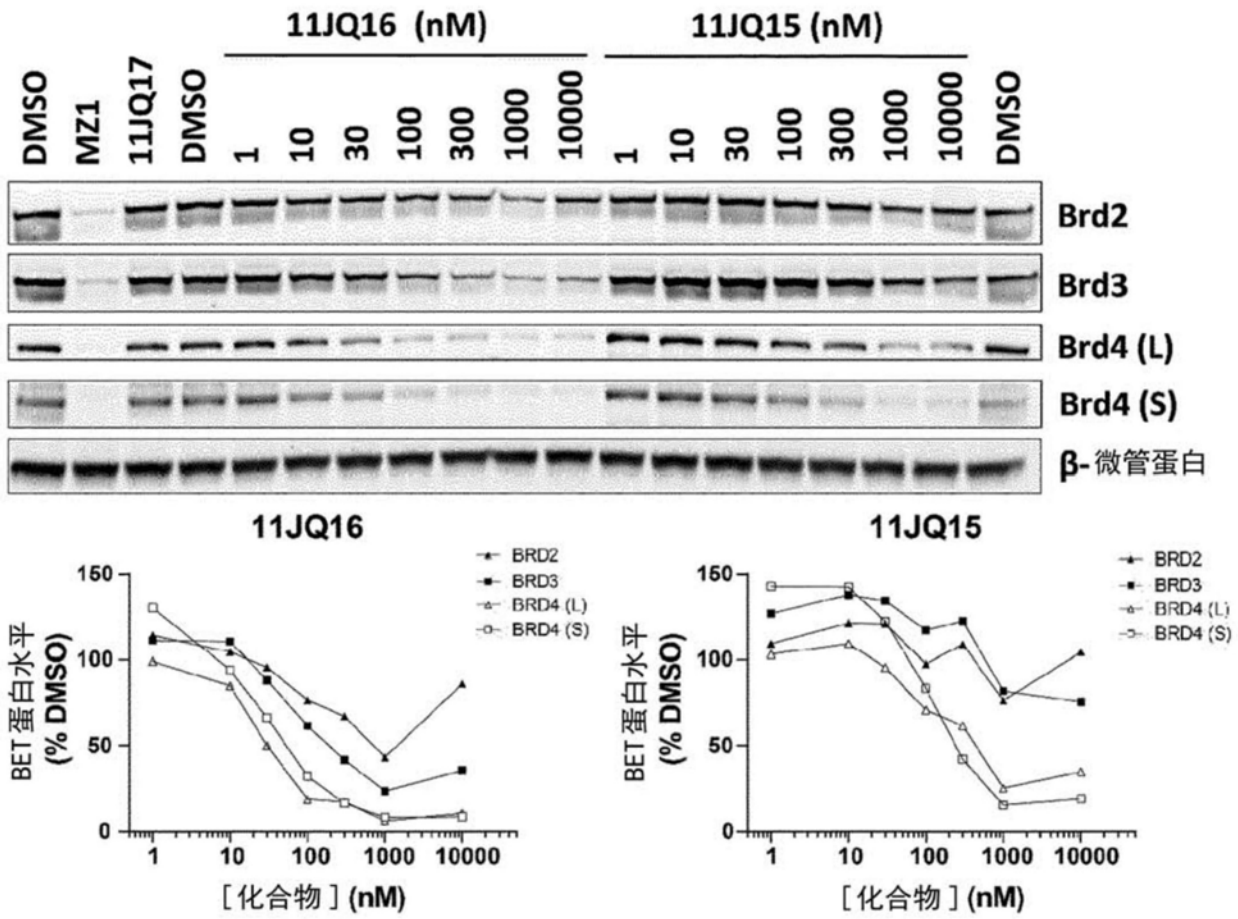

11JQ16 (nM)
11JQ15 (nM)
DMSO
MZ1
11JQ17
DMSO
1
10
30
100
300
1000
10000
1
10
30
100
300
1000
10000
DMSO
Brd2
Brd3
Brd4 (L)
Brd4 (S)
β-微管蛋白
11JQ16
11JQ15
BRD2
BRD3
BRD4 (L)
BRD4 (S)
BET蛋白水平
(% DMSO)
150
100
50
0
1
10
100
1000
10000
[化合物](nM)

图4

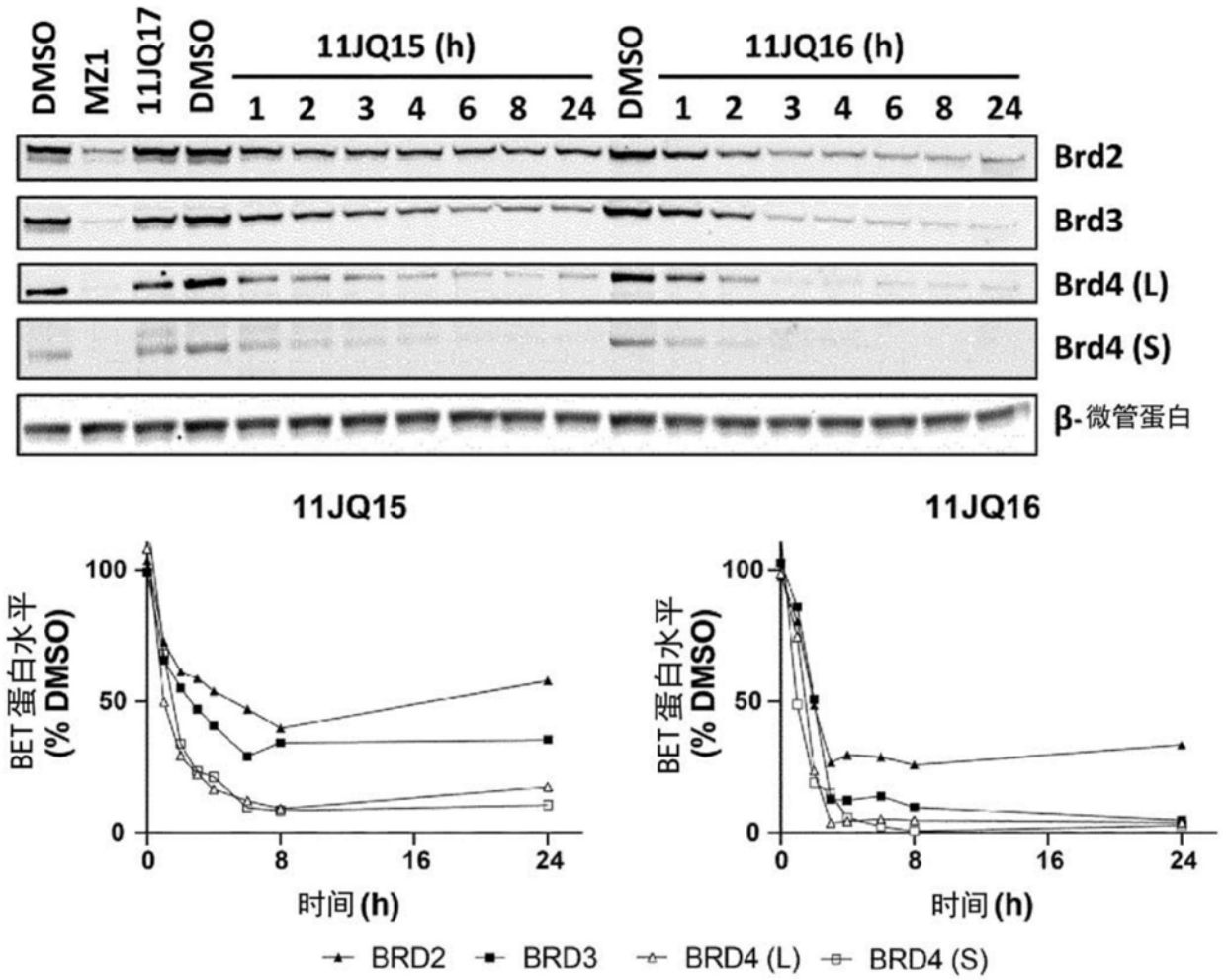

DMSO
MZ1
11JQ17
DMSO
11JQ15 (h)
1 2 3 4 6 8 24
DMSO
11JQ16 (h)
1 2 3 4 6 8 24
Brd2
Brd3
Brd4 (L)
Brd4 (S)
β-微管蛋白
11JQ15
11JQ16
BET 蛋白水平 (% DMSO)
100
50
0
0 8 16 24
时间 (h)
BRD2
BRD3
BRD4 (L)
BRD4 (S)

图5

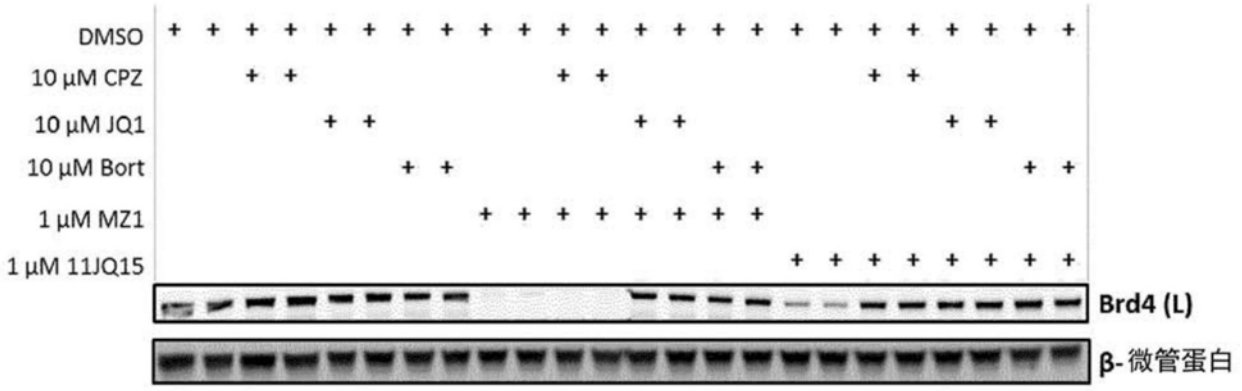

DMSO
10 μM CPZ
10 μM JQ1
10 μM Bort
1 μM MZ1
1 μM 11JQ15
Brd4 (L)
β-微管蛋白

图6A

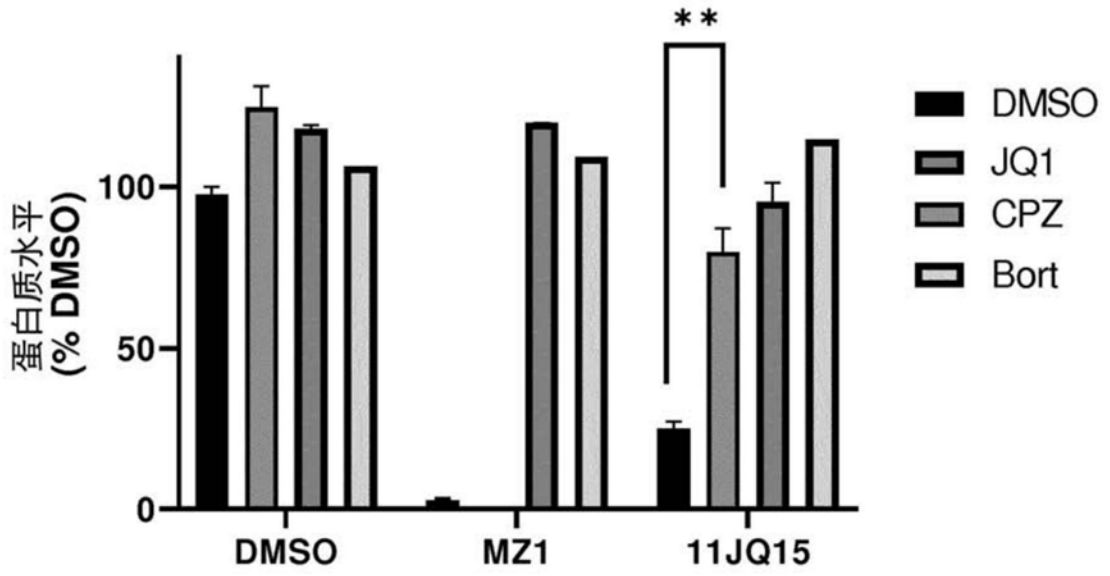

**
DMSO
JQ1
CPZ
Bort
蛋白质水平
(% DMSO)
100
50
0
DMSO
MZ1
11JQ15

图6B

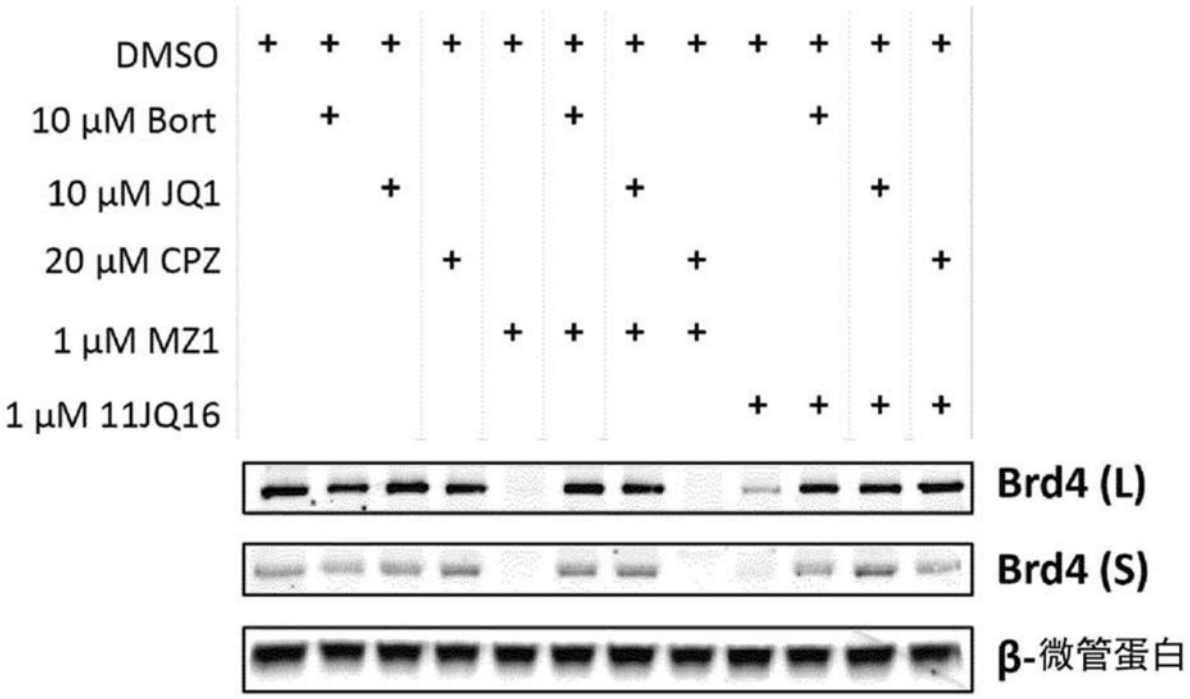

DMSO
10 μM Bort
10 μM JQ1
20 μM CPZ
1 μM MZ1
1 μM 11JQ16
Brd4 (L)
Brd4 (S)
β-微管蛋白

图6C

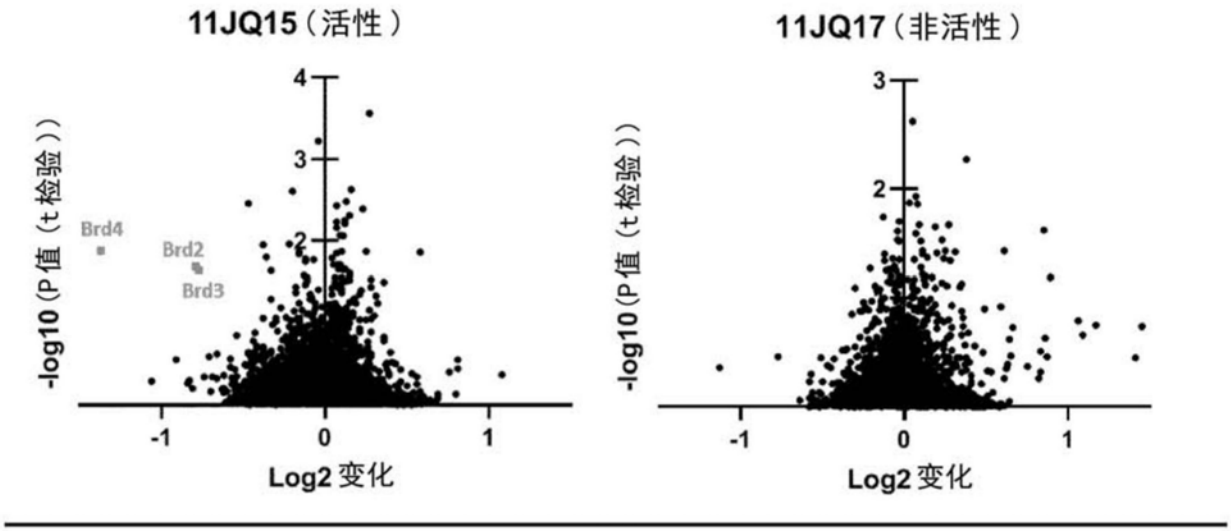

11JQ15（活性）
11JQ17（非活性）
-log10(P值（t检验））
Brd4
Brd2
Brd3
Log2变化

图7

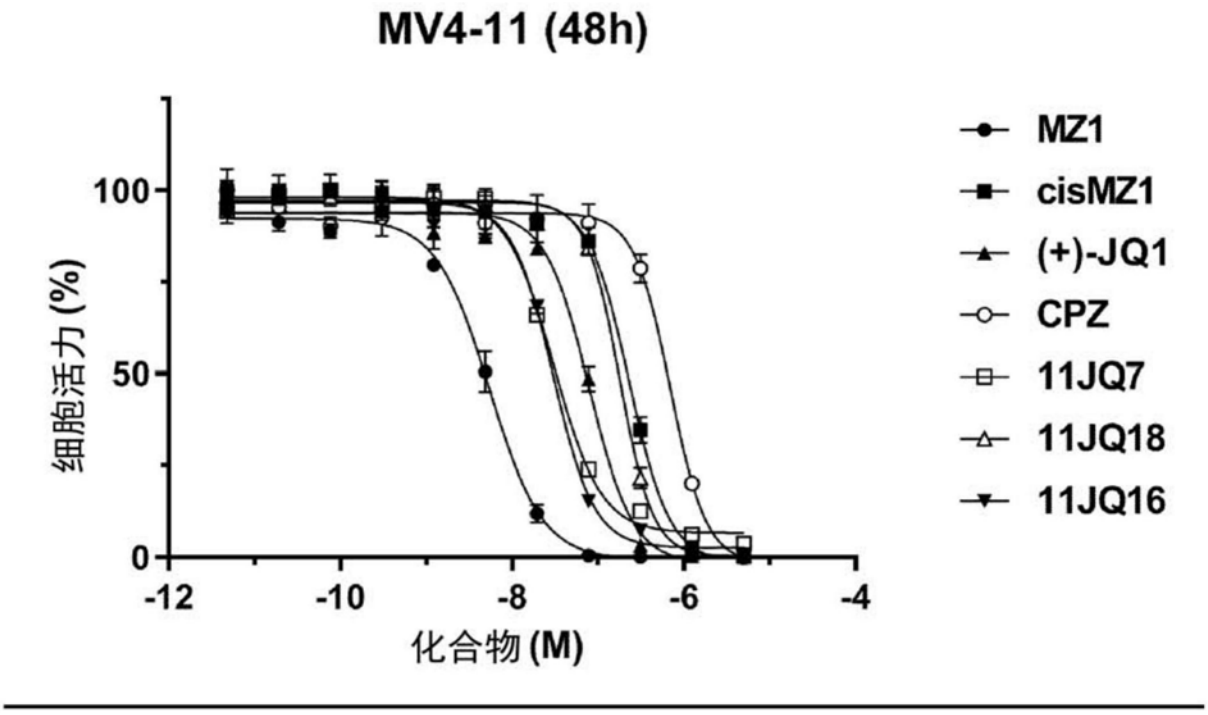

MV4-11 (48h)
细胞活力 (%)
化合物 (M)
MZ1
cisMZ1
(+)-JQ1
CPZ
11JQ7
11JQ18
11JQ16

图8

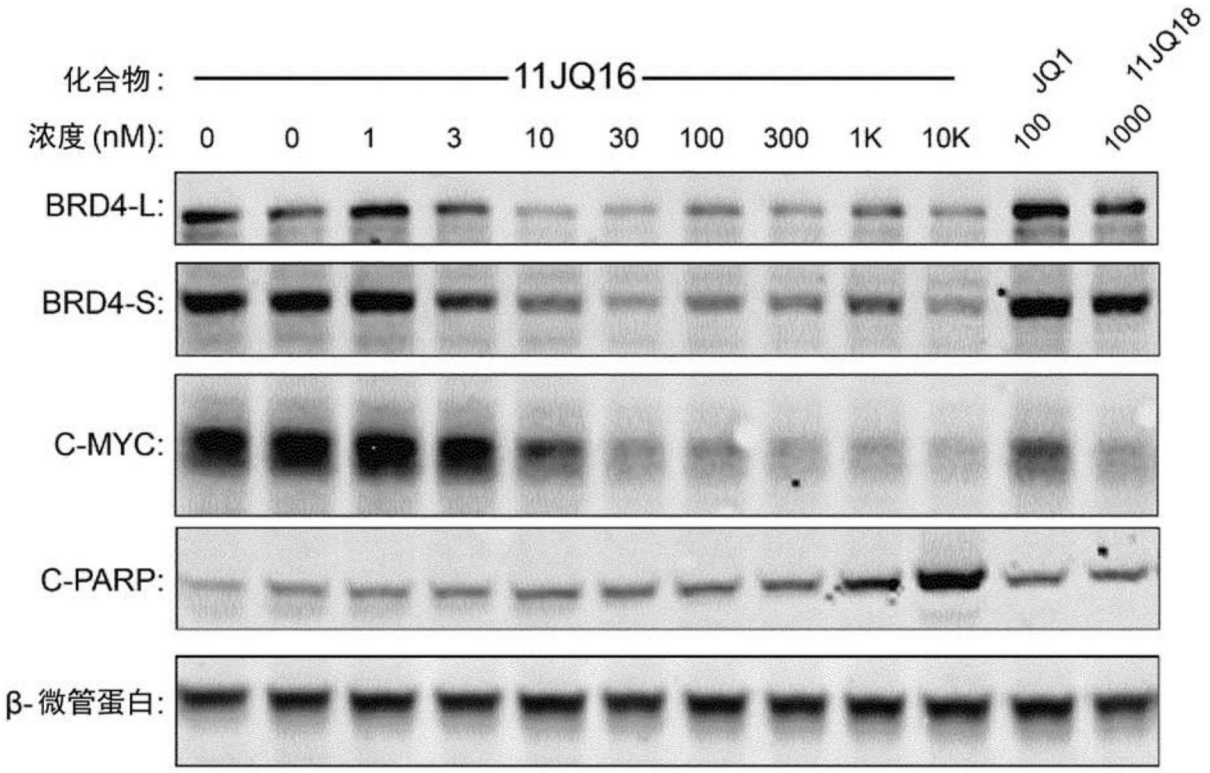

化合物:
11JQ16
JQ1
11JQ18
浓度(nM):
0
0
1
3
10
30
100
300
1K
10K
100
1000
BRD4-L:
BRD4-S:
C-MYC:
C-PARP:
β-微管蛋白:

图9

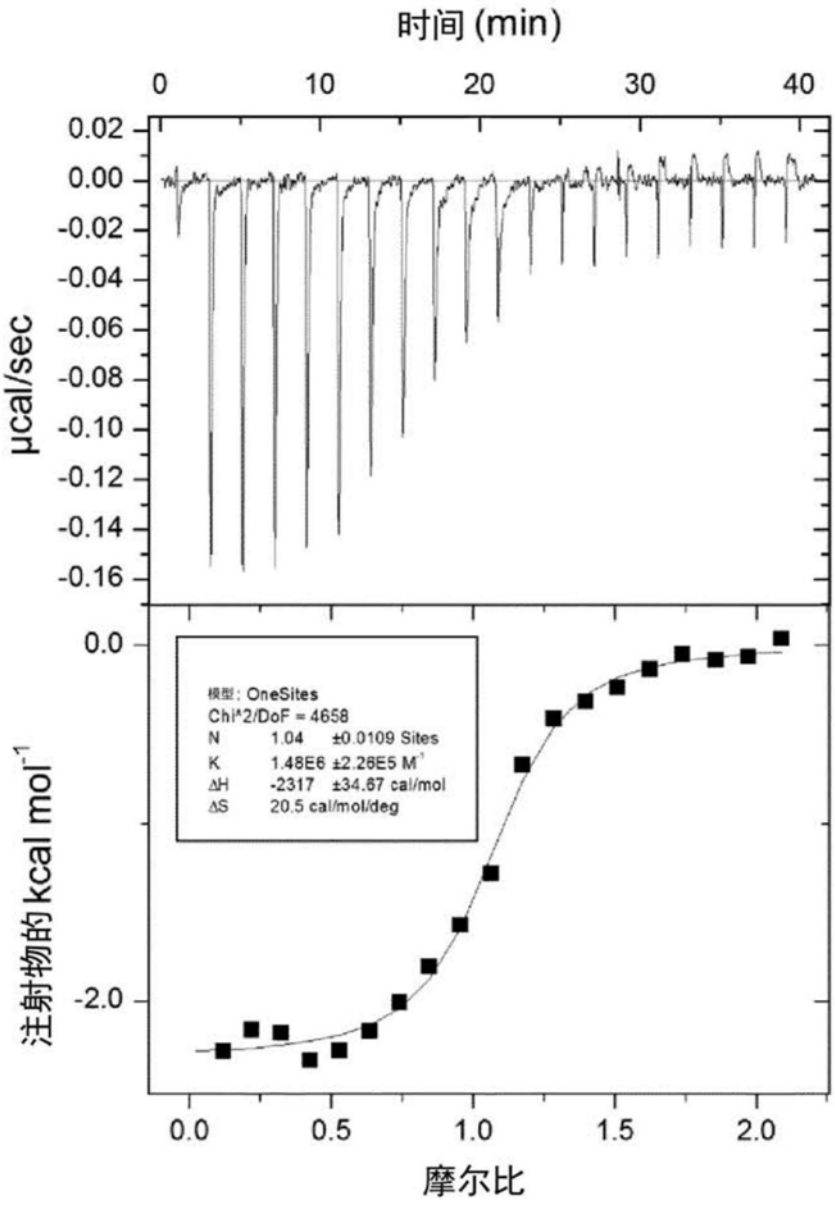

时间 (min)
0
10
20
30
40
0.02
0.00
-0.02
-0.04
-0.06
-0.08
-0.10
-0.12
-0.14
-0.16
μcal/sec
0.0
-2.0
注射物的 kcal mol-1
模型: OneSites
Chi^2/DoF = 4658
N 1.04 ±0.0109 Sites
K 1.48E6 ±2.26E5 M-1
ΔH -2317 ±34.67 cal/mol
ΔS 20.5 cal/mol/deg
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
摩尔比

图10