

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-533181

(P2021-533181A)

(43) 公表日 令和3年12月2日 (2021. 12. 2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/64 (2017. 01)	A 6 1 K 47/64	4 B 0 6 5
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/00 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 141 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2021-518993 (P2021-518993)	(71) 出願人	520489606
(86) (22) 出願日	令和1年6月13日 (2019. 6. 13)		アンフィスタ セラピューティクス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	令和3年2月9日 (2021. 2. 9)		イギリス エヌダブリュー1 2 エヌディー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2019/065479		ー ロンドン ノース ガワー ストリート 1 5 8 - 1 6 0
(87) 国際公開番号	W02019/238816	(74) 代理人	100094569
(87) 国際公開日	令和1年12月19日 (2019. 12. 19)		弁理士 田中 伸一郎
(31) 優先権主張番号	62/684, 268	(74) 代理人	100103610
(32) 優先日	平成30年6月13日 (2018. 6. 13)		弁理士 ▲吉▼田 和彦
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100109070
(31) 優先権主張番号	62/835, 955		弁理士 須田 洋之
(32) 優先日	平成31年4月18日 (2019. 4. 18)	(74) 代理人	100119013
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 山崎 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 U c h L 5 を標的化するための二機能性分子

(57) 【要約】

本発明は、フレキシブルリンカーを介して連結された U c h L 5 結合パートナーと標的タンパク質結合パートナーを含む二機能性分子を提供する。本発明による二機能性分子は U c h L 5 と標的タンパク質に結合し、それにより、標的タンパク質結合パートナーに結合した標的タンパク質の分解を促進する。本発明は又、疾患を予防又は治療するための二機能性分子の使用も提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的タンパク質結合パートナーに連結された U c h L 5 結合パートナーを含む二機能性分子。

【請求項 2】

前記 U c h L 5 結合パートナーが少なくとも 1 0 n M の親和性で U c h L 5 に結合する、請求項 1 に記載の二機能性分子。

【請求項 3】

前記 U c h L 5 結合パートナーが 1 μ M 未満の K d で U c h L 5 に結合する、請求項 1 に記載の二機能性分子。

10

【請求項 4】

前記 U c h L 5 結合パートナーが表 1 に示される U c h L 5 結合分子の群から選択される、請求項 1 に記載の二機能性分子。

【請求項 5】

前記標的タンパク質結合パートナーがキナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、B E T プロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物、H D M 2 / M D M 2 阻害剤、熱ショックタンパク質 9 0 阻害剤、H D A C 阻害剤、ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の二機能性分子。

【請求項 6】

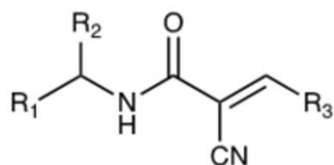
前記リンカーがポリエチレングリコール (P E G) リンカー、炭化水素リンカー、アルキルエーテルリンカー、又は複合 P E G 、アルキルリンカーである、請求項 1 に記載の二機能性分子。

20

【請求項 7】

前記 U c h L 5 結合パートナーが式 I により表され、

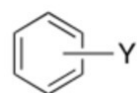
【化 1】



30

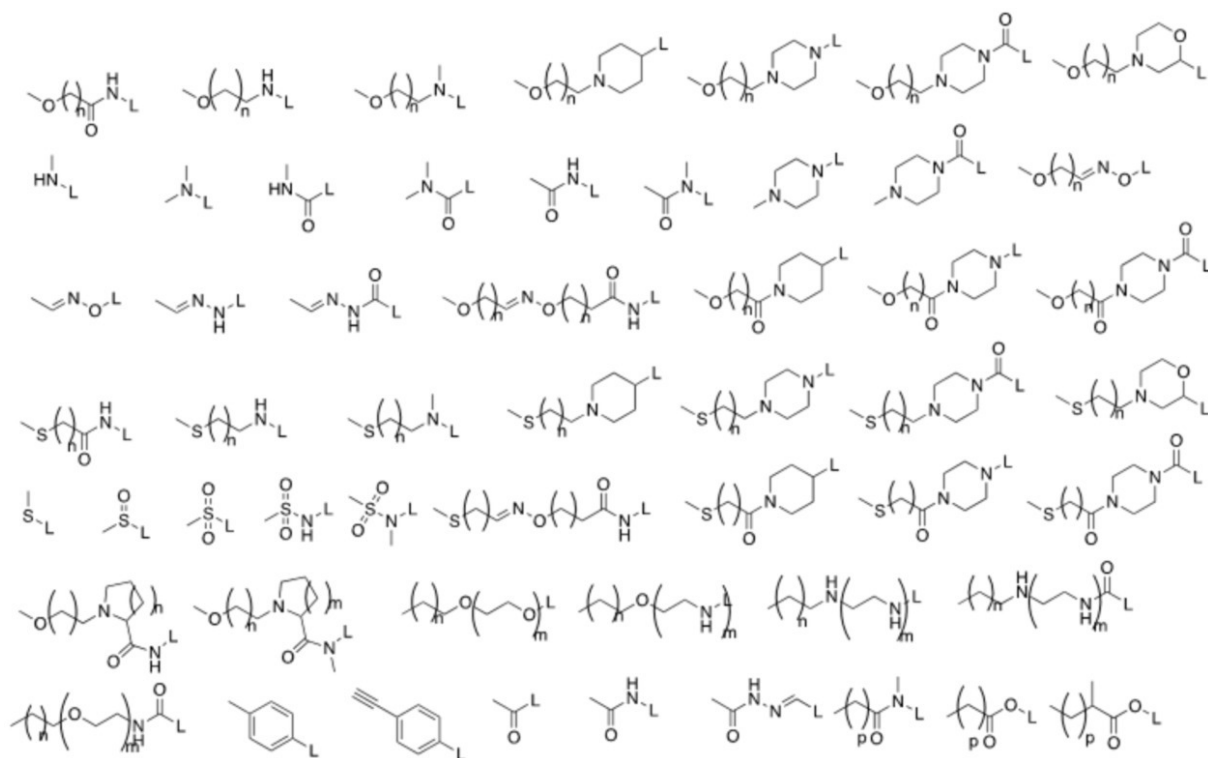
・ R₁ は、

【化 2】



又はヘテロ置換芳香環であり、ここで、Y =

【化 3】



10

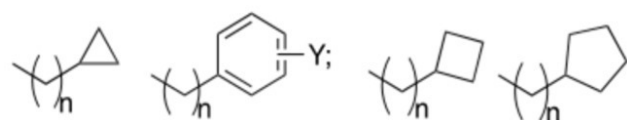
20

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

L は、タンパク質結合剤に連結したリンカーである、

・ R_2 は、 $-H$ 、 CH_3 、 $(CH_2)_n CH_3$ ； $(CH_2)_n OCH_3$ 、ここで、 $n = 1, 2, 3$ 、及び 4 、並びに

【化 4】

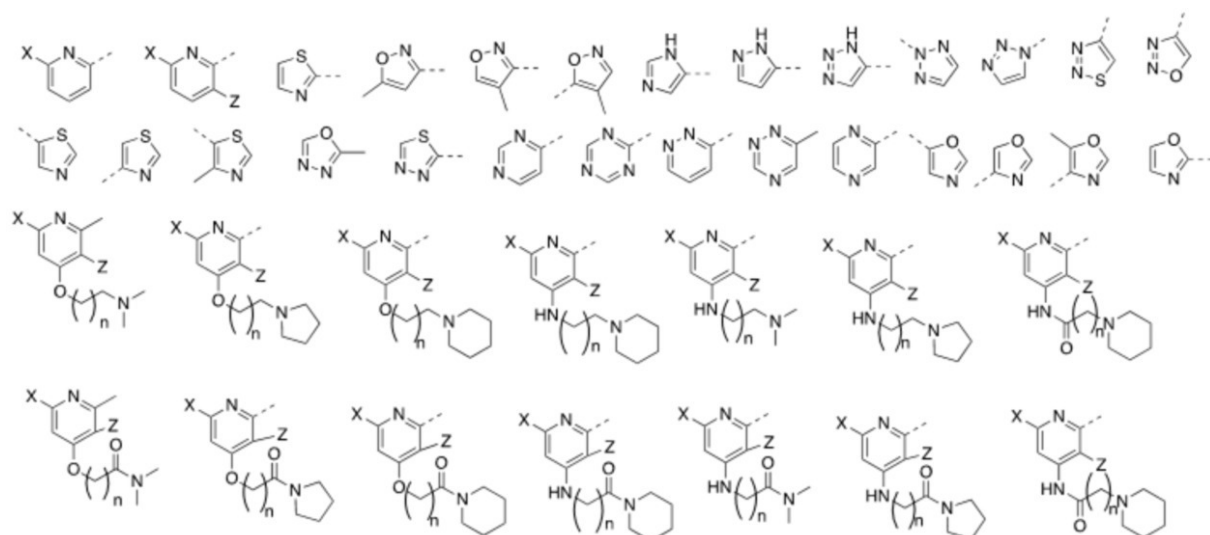


30

ここで、 $Y = -Me$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CF_3$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-SMe$ 、 $-SOMe$ 、 $-SO_2Me$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NMe_2$ 、 NO_2 、 CHO 及び上記の例から選択され、

・ R_3 は、

【化 5】



10

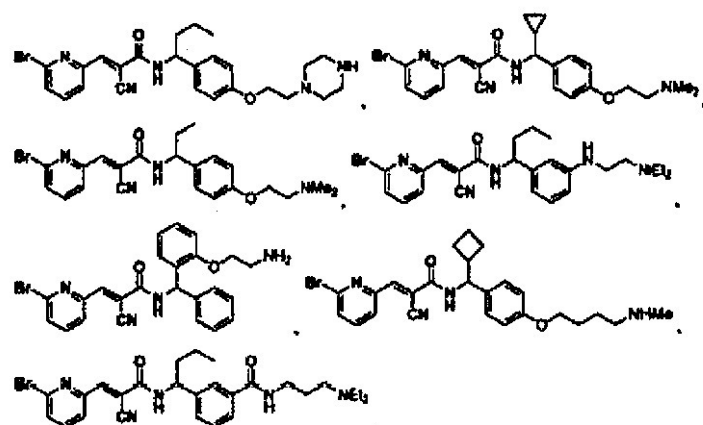
ここで、X 及び Z = -H、-F、-Cl、-Br、-I、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CH₃、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO₂Me、-NH₂、-NHMe、-NMe₂、-NO₂、-CHO 及び n = 1、2、3、4 から選択される、請求項 1 に記載の二機能性分子。

20

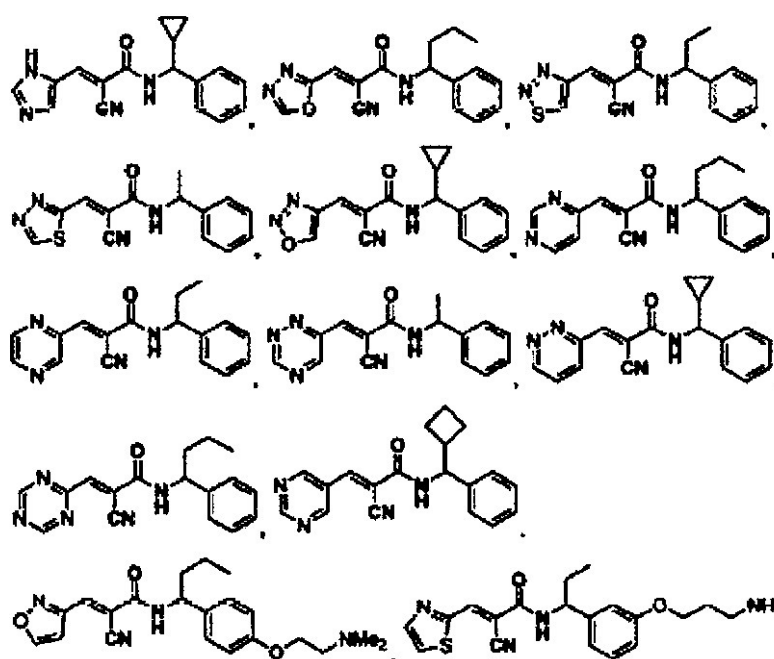
【請求項 8】

前記 U c h L 5 結合パートナーが

【化 6】

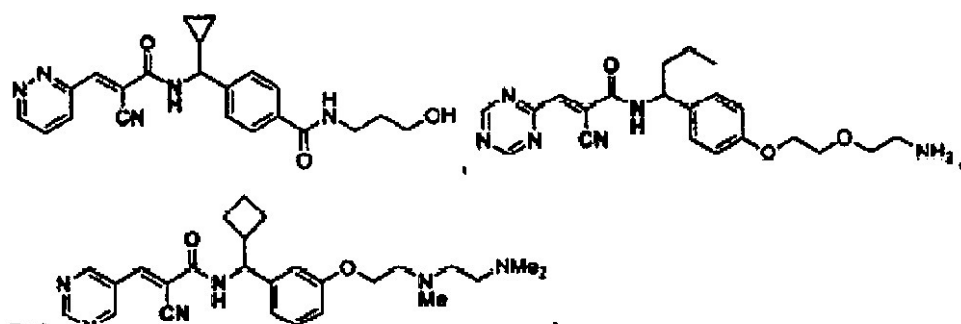


10



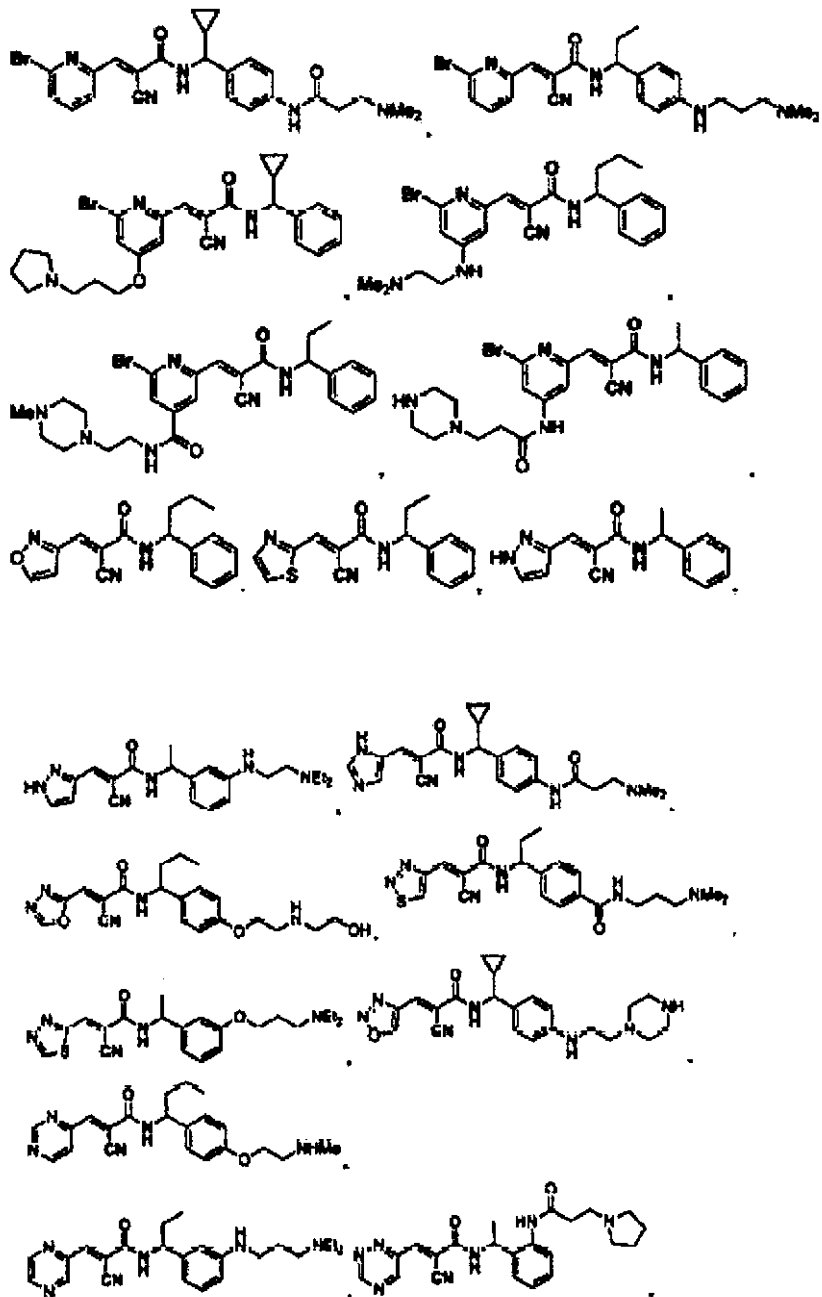
20

30



40

及び
又はこれらの塩



からなる群から選択される、請求項 1 に記載の二機能性分子。

【請求項 9】

式 (I) :

U 5 L - (C L) - T P L (I)

で示され、

式中、- は、共有結合を指し；

U 5 L は、U c h L 5 と結合するリガンドであり、

C L は、共有結合リンカーであり、

T P L は、標的タンパク質に結合するリガンドである、化合物。

【請求項 10】

U 5 L が表 1 に示される U c h L 5 リガンドの群から選択される、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 11】

前記 U 5 L が少なくとも 1 0 n M の親和性で U c h L 5 に結合する、請求項 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 2】

前記 U 5 L が 1 μ M 未満の K d で U c h L 5 に結合する、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 1 3】

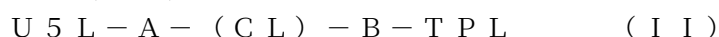
T P L がキナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、B E T プロモドメイン含有タンパク質に結合する化合物、H D M 2 / M D M 2 阻害剤、熱ショックタンパク質 9 0 阻害剤、H D A C 阻害剤、又はヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤のうち 1 つである、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 1 4】

C L がポリエチレングリコール (P E G) リンカー、炭化水素リンカー、アルキルエーテルリンカー、又は複合 P E G 、アルキルリンカーである、請求項 9 に記載の化合物。

【請求項 1 5】

式 (I I) :



で示され、

式中、— は、共有結合を指し、

U 5 L は、U c h L 5 と結合するリガンドであり、

C L は、異なる第 1 の末端 A と第 2 の末端 B を有する共有結合リンカーであり、ここで、A 及び B は独立に、アミド、オキシム、ケト、炭素、エーテル、エステル、又はカルバマートであり、

T P L は、標的タンパク質に結合するリガンドであり、且つ

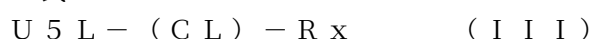
U 5 L は A に共有結合的に連結され、且つ T P L は B に共有結合的に連結されている、化合物。

【請求項 1 6】

T P L がキナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、B E T プロモドメイン含有タンパク質に結合する化合物、H D M 2 / M D M 2 阻害剤、熱ショックタンパク質 9 0 阻害剤、H D A C 阻害剤、又はヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤のうち 1 つである、請求項 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

式：



で示され、

式中、— は、共有結合を指し、

U 5 L は、U c h L 5 と結合するリガンドであり、

C L は、R x で終わる共有結合リンカーであり、

R x は、リガンドと共有結合的の化学結合を形成することができ、且つ

R x は、P E G でない、

化合物。

【請求項 1 8】

前記 U 5 L が少なくとも 1 0 n M の親和性で U c h L 5 に結合する、請求項 1 5 又は 1 7 に記載の化合物。

【請求項 1 9】

前記 U 5 L が 1 μ M 未満の K d で U c h L 5 に結合する、請求項 1 5 又は 1 7 に記載の化合物。

【請求項 2 0】

前記 U 5 L が表 1 に示される U c h L 5 リガンドの群から選択される、請求項 1 5 又は 1 7 に記載の化合物。

【請求項 2 1】

前記リンカーがポリエチレングリコール (P E G) リンカー、炭化水素リンカー又は複

10

20

30

40

50

合 P E G、アルキルリンカーである、請求項 1 5 又は 1 7 に記載の化合物。

【請求項 2 2】

前記リンカーがオキシムである第 1 の末端を有する、請求項 1 5 又は 1 7 に記載の化合物。

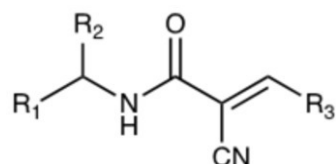
【請求項 2 3】

前記リンカーがアミンである第 2 の末端を有する、請求項 1 5 又は 1 7 に記載の化合物。

【請求項 2 4】

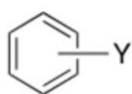
前記 U 5 L が式 I により表され、

【化 7】



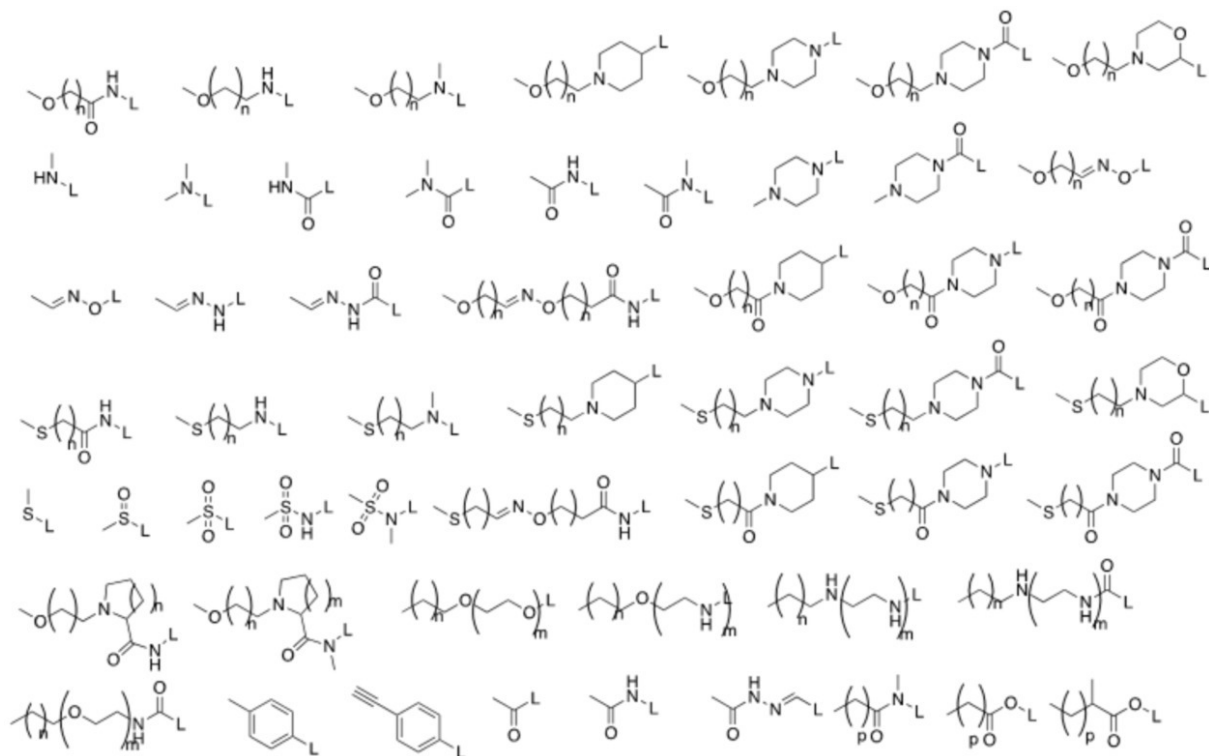
・ R₁ は、

【化 8】



又はヘテロ置換芳香環であり、ここで、Y =

【化 9】



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

L は、タンパク質結合剤に連結したリンカーである、

・ R₂ は、-H、CH₃、(CH₂)_nCH₃ ; (CH₂)_nOCH₃、ここで、n = 1、2、3、及び 4、並びに

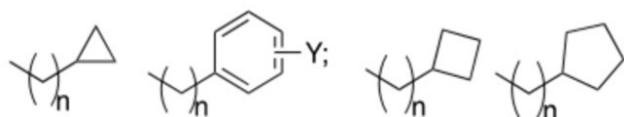
10

20

30

40

【化 1 0】

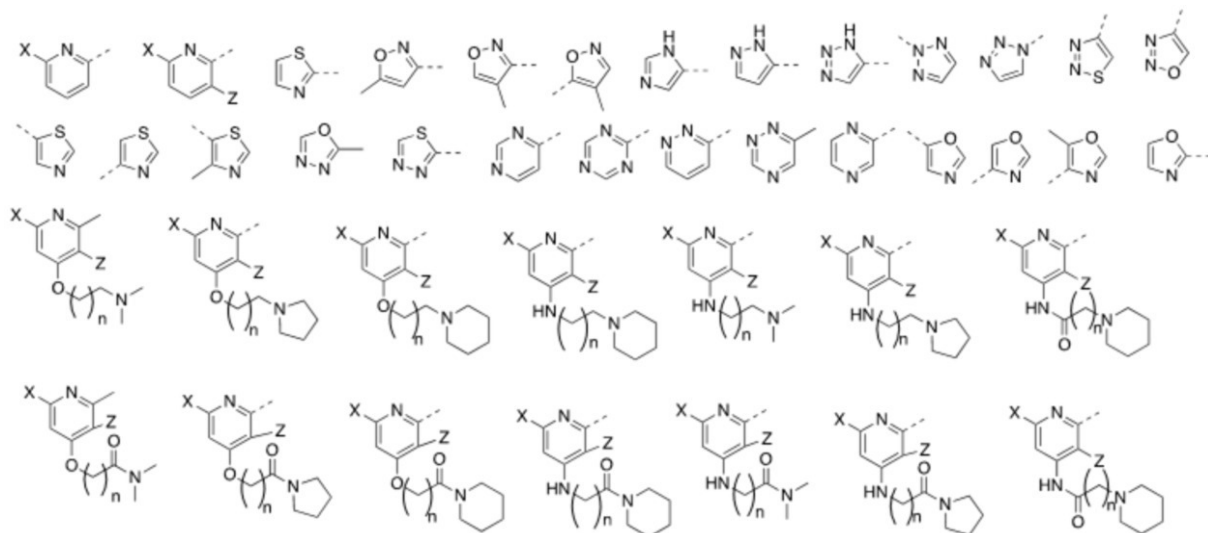


Y = -Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF₃、-CHF₂、-CH₂F、-CN、
-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO₂Me、-NH₂、-NHMe、-NMe₂、NO₂、CHO 及び上記の例
から選択され、

・ R₃ は、

10

【化 1 1】



20

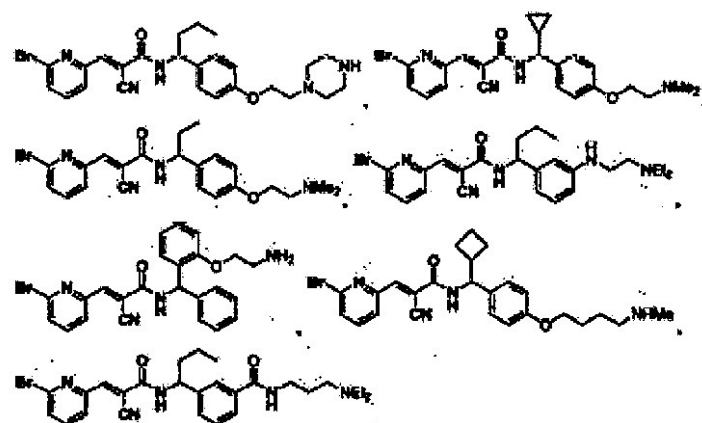
ここで、X 及び Z = -H、-F、-Cl、-Br、-I、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、
-CH₃、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO₂Me、-NH₂、
-NHMe、-NMe₂、-NO₂、-CHO 及び n = 1、2、3、4、
から選択される、請求項 9 又は請求項 15 又は請求項 17 に記載の化合物。

30

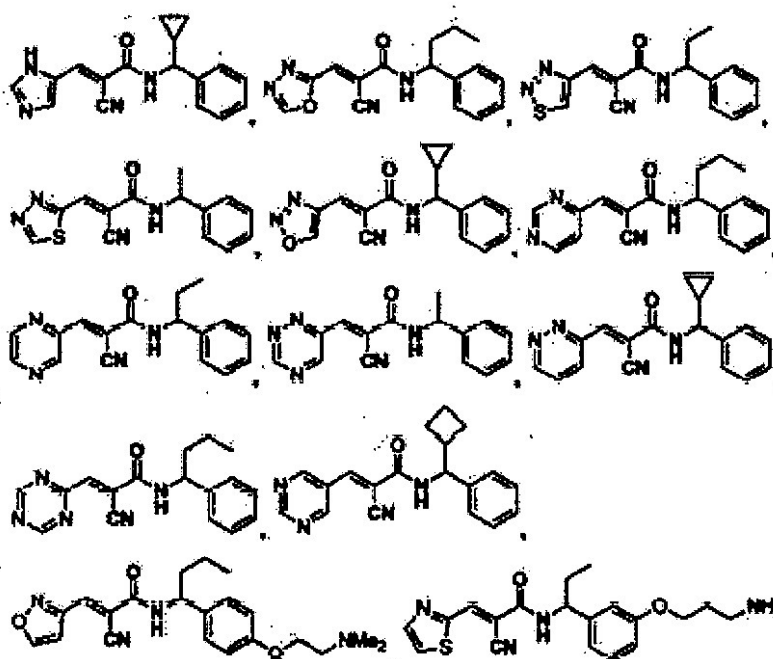
【請求項 25】

前記 U5L が

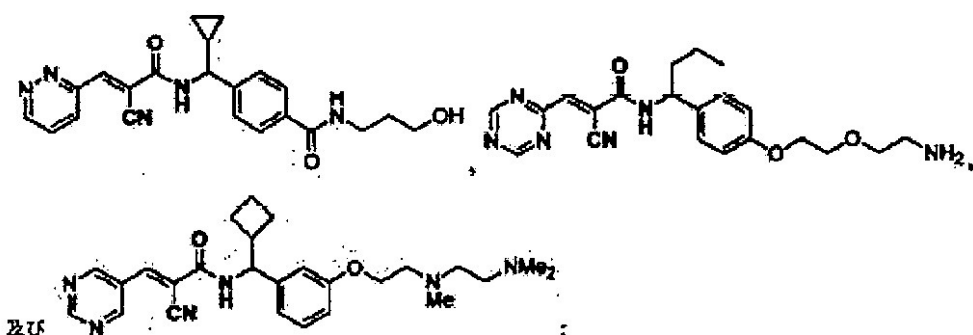
【化 1 2】



10



20

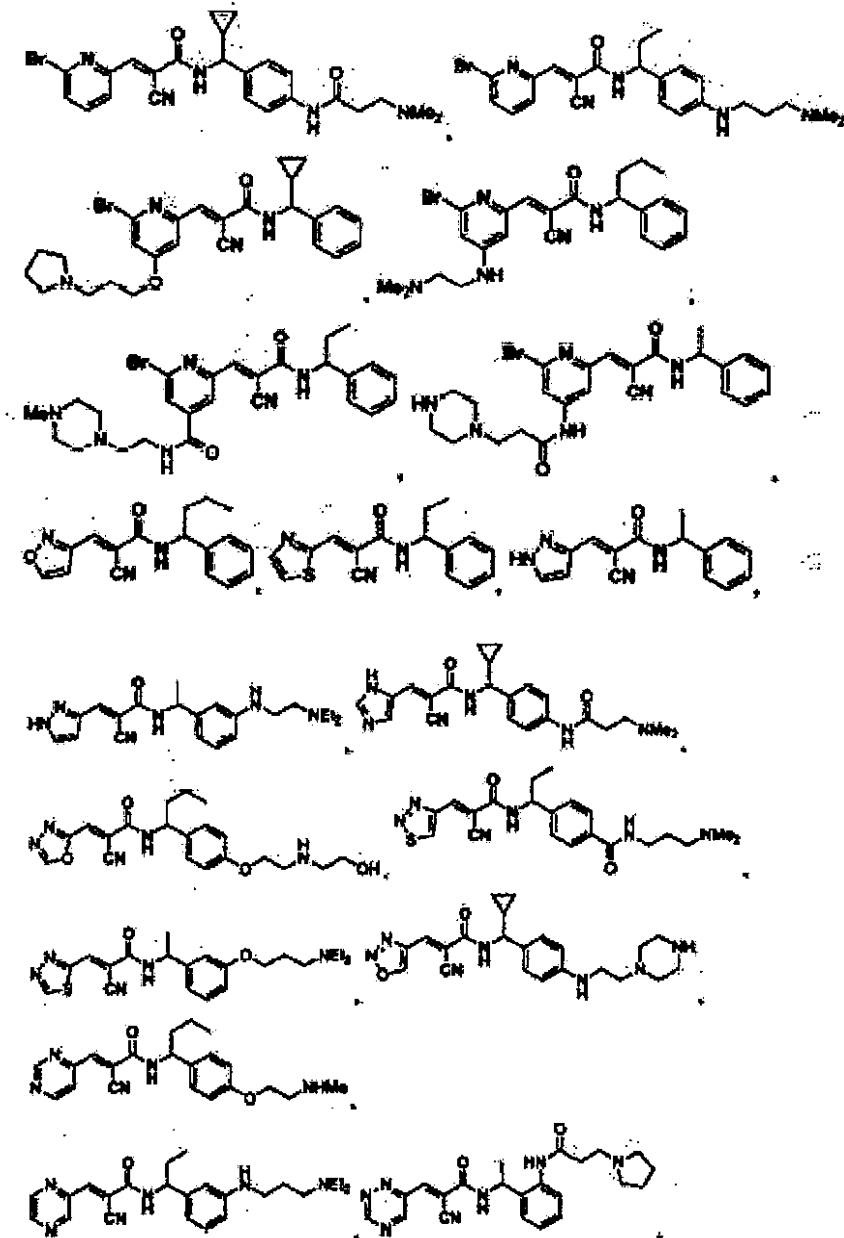


30

及び

又はこれらの塩

40



10

20

30

からなる群から選択される、請求項 9 又は請求項 15 又は請求項 17 に記載の化合物。

【請求項 26】

細胞において標的タンパク質のタンパク質分解の増大を得る方法であって、前記細胞を請求項 1～25 のいずれか一項に記載の二機能性分子と接触させることを含む、方法。

【請求項 27】

対象において標的タンパク質のタンパク質分解の増大を得る方法であって、前記対象に請求項 1～25 のいずれか一項に記載の二機能性分子を投与することを含む、方法。

40

【請求項 28】

2つの共有結合的に連結された結合パートナーを含み、第1の結合パートナーがUchL5に結合し、第2の結合パートナーが選択された標的タンパク質に結合する二機能性分子を提供する方法であって、前記第1の結合パートナーと前記第2の結合パートナーを準備すること、及び前記第1の結合パートナーと前記第2の結合パートナーを共有結合的に連結することを含む、方法。

【請求項 29】

標的タンパク質のタンパク質分解を促進する二機能性分子を選択する方法であって、

a. 第1の結合パートナー候補を準備すること、及び前記第1の結合パートナー候補が

50

U c h L 5 に結合するかどうか判定することにより第 1 の結合パートナーを選択すること；

b. 第 2 の結合パートナー候補を準備すること、及び前記第 2 の結合パートナー候補が対象とする標的タンパク質に結合するかどうか判定することにより第 2 の結合パートナーを選択すること；

c. 前記第 1 の結合パートナーと第 2 の結合パートナーを共有結合的に付着させて二機能性分子を形成すること；

d. 細胞を前記二機能性分子と接触させること；

e. 前記標的タンパク質がタンパク質分解を受けるかどうか判定することを含む、方法。

10

【請求項 30】

標的タンパク質のタンパク質分解を促進し得る二機能性分子を選択する方法であって、

(a) 標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に連結された U c h L 5 結合パートナーを含む二機能性分子を準備すること、

(b) i n v i t r o 又は哺乳動物において前記二機能性分子を細胞と接触させること、ここで、前記細胞は U c h L 5 及び前記標的タンパク質を含み、接触は二機能性分子と U c h L 5 及び前記標的タンパク質との結合を可能とする、及び

(c) 前記細胞において前記標的タンパク質のタンパク質分解を検出すること、ここで、検出されるタンパク質分解は、接触させない場合の標的タンパク質のタンパク質分解よりも増大している、

20

を含む、方法。

【請求項 31】

前記二機能性分子の不在下で標的タンパク質のタンパク質分解を測定する工程を含む、請求項 29 又は 30 に記載の方法。

【請求項 32】

U C H L 5 分子又はそのホモログを有する真核生物又は原核生物において i n v i v o タンパク質分解を誘導する方法であって、前記 U C H L 5 による脱ユビキチン化を阻害することなく、前記真核生物又は原核生物に請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の化合物を投与することを含む、方法。

【請求項 33】

30

前記 U C H L 5 による脱ユビキチン化を阻害しない、請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に記載の化合物を含む細胞、組織、又は器官培養培地。

【請求項 34】

標的タンパク質を分解する方法であって、前記 U C H L 5 による脱ユビキチン化を阻害することなく、請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に記載の化合物で前記標的タンパク質の分解を誘導する工程を含む、方法。

【請求項 35】

請求項 1 ～ 25 のいずれか一項に記載の化合物と薬学上許容される担体とを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞におけるタンパク質の選択的分解のための二機能性分子を対象とする。

【背景技術】

【0002】

タンパク質分解は、細胞の恒常性を維持する、高度に調節された不可欠なプロセスである。損傷した、誤って折り畳まれた、又は過剰なタンパク質の選択的識別及び除去は、ユビキチン-プロテアソーム経路 (U P P) によってその一部が達成される。U P P は、抗原のプロセッシング、アポトーシス、オルガネラの生合成、細胞周期、D N A 転写及び修復、分化及び発生、免疫応答及び炎症、神経系及び筋肉の変性、神経網の形態形成、細胞表

50

面受容体、イオンチャネル及び分泌経路の調整、ストレス及び細胞外モジュレーターに対する応答、リボソーム生合成、及びウイルス感染を含む、ほとんど全ての細胞プロセスの調節の中枢である。E3ユビキチンリガーゼによる、一般に末端のリシン残基への複数のユビキチン分子の共有結合が、プロテアソーム分解に向けたタンパク質のマークであり、プロテアソーム分解でタンパク質は消化されて小ペプチドとなり、やがてはその構成アミノ酸となり、新たなタンパク質の構成ブロックとして役立つ。プロテアソーム分解の欠陥が、とりわけアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋ジストロフィー、心血管疾患、及び癌を含む様々な臨床的障害に関連付けられてきた。

【0003】

*in vivo*において種々のタンパク質のユビキチン化を促進する600を超えるE3ユビキチンリガーゼが存在する。E3リガーゼは、HECTドメイン型E3、Uボックス型E3、モノマーRING E3及びマルチサブユニットCullin-RING型E3の4つのファミリーに分けることができる。Bulanov et al. (Biochem J., 2015, 467: 365-386)、Li et al. (PLOS One, 2008, 3, 1487)、Berndsen et al. (Nat. Struct. Mol. Biol., 2014, 21, 301-307)、Deshaies et al. (Ann. Rev. Biochem., 2009, 78, 399-434)、Spratt et al. (Biochem. 2014, 458, 421-437)、及びWang et al. (Nat. Rev. Cancer., 2014, 14, 233-347) 参照。

【0004】

タンパク質分解誘導キメラ (Proteolysis targeting chimeric) (PROTAC) 化合物は、リンカーにより連結された2つのリガンドから構成され、一方のリガンドは標的タンパク質に結合するためのものであり、もう一方のリガンドはE3ユビキチンリガーゼを動員するためのものである。従って、標的タンパク質はE3リガーゼへと導かれ、ユビキチン化され、その後分解される (Ottis, P. & Crews, C. M. Proteolysis-Targeting Chimeras: Induced Protein Degradation as a Therapeutic Strategy. ACS Chem Biol 12, 892-898 (2017) 参照)。

国際出願PCT/US2015/025813号明細書 (Arvinas)、国際公開第2016/146985号明細書 (ダンディー大学) 及び国際公開第2013/106643号明細書 (イェール大学他) は、内因性タンパク質を分解のためにE3ユビキチンリガーゼへと動員することが意図されるイミドベースの及びヒドロキシプロリンベースのPROTAC二機能性化合物に関するものである。米国特許出願公開第2016/0176916号明細書、国際公開第2017/024318号明細書、国際公開第2017/024317号明細書、及び国際公開第2017/024319号明細書 (全てダナ・ファーマー癌研究所) も、標的タンパク質をユビキチン化し、それを分解に向かわせることが知られるE3リガーゼリガンドを用いた標的タンパク質の分解に関するものである。

【0005】

26Sプロテアソームは、細胞質タンパク質及び核タンパク質の両方の分解に関与する大きなマルチサブユニット複合体である。このプロテアソームは、少なくとも32の異なるサブユニットから構成される。タンパク質分解活性部位を含有する中央の20Sコアシリンダー粒子の一端又は両端に19S調節粒子のキャップが付いている。分解チャンバーには、コア粒子の中心に走るチャネルによって到達し得る。プロテアソーム阻害剤ベルケード (登録商標) は、多発性骨髄腫の治療に関してFDA承認を受けた薬物であり、20S内の中心触媒腔を標的とする。このチャネルへの入り口は狭く、従って、折り畳まれたタンパク質は少なくとも部分的に折り畳みが解除されなければならず、その後、20Sコア粒子を通り抜け、切断され、最終的に分解され得る。19S調節粒子は、一方は「蓋」

と呼ばれ、もう一方は「底」と呼ばれる2つのサブ複合体に構成される少なくとも19のサブユニットから構成される。調節粒子は、その機能をエネルギー的に補助するためにATPの加水分解を触媒するアデノシン三リン酸分解酵素サブユニットを含有する。これらには、分解チャンネルへの入り口の開閉、基質認識の媒介、ユビキチン鎖のタンパク質分解切断（ユビキチン化タンパク質の認識後にユビキチンが再利用されるように）、折り畳み解除、及び最終的には、20Sコア粒子への移行が含まれる。

【発明の概要】

【0006】

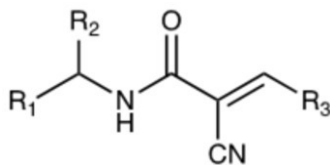
本発明は、細胞において選択された標的タンパク質の分解を促進する二機能性分子を提供する。

一実施形態では、本発明は、標的タンパク質結合パートナーに連結されたUchL5結合パートナーを含む二機能性分子を含む。

【0007】

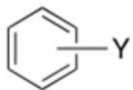
好ましくは、UchL5結合パートナーは、少なくとも10nMの親和性でUchL5に結合する。好ましくは、UchL5結合パートナーは、1μM未満のK_dでUchL5に結合する。UchL5結合パートナーは、表1に示されるUchL5結合分子の群から選択され得る。好ましくは、標的タンパク質結合パートナーは、キナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、BETプロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物、HDM2/MDM2阻害剤、熱ショックタンパク質90阻害剤、HDAC阻害剤、ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び抗体からなる群から選択され得る。他の好ましい実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー、炭化水素リンカー、アルキルエーテル（alkylether）リンカー、又は複合PEG、アルキルリンカーであり得る。UchL5結合パートナーが式Iにより表される請求項1に記載の二機能性分子

【化1】



・ R₁は

【化2】



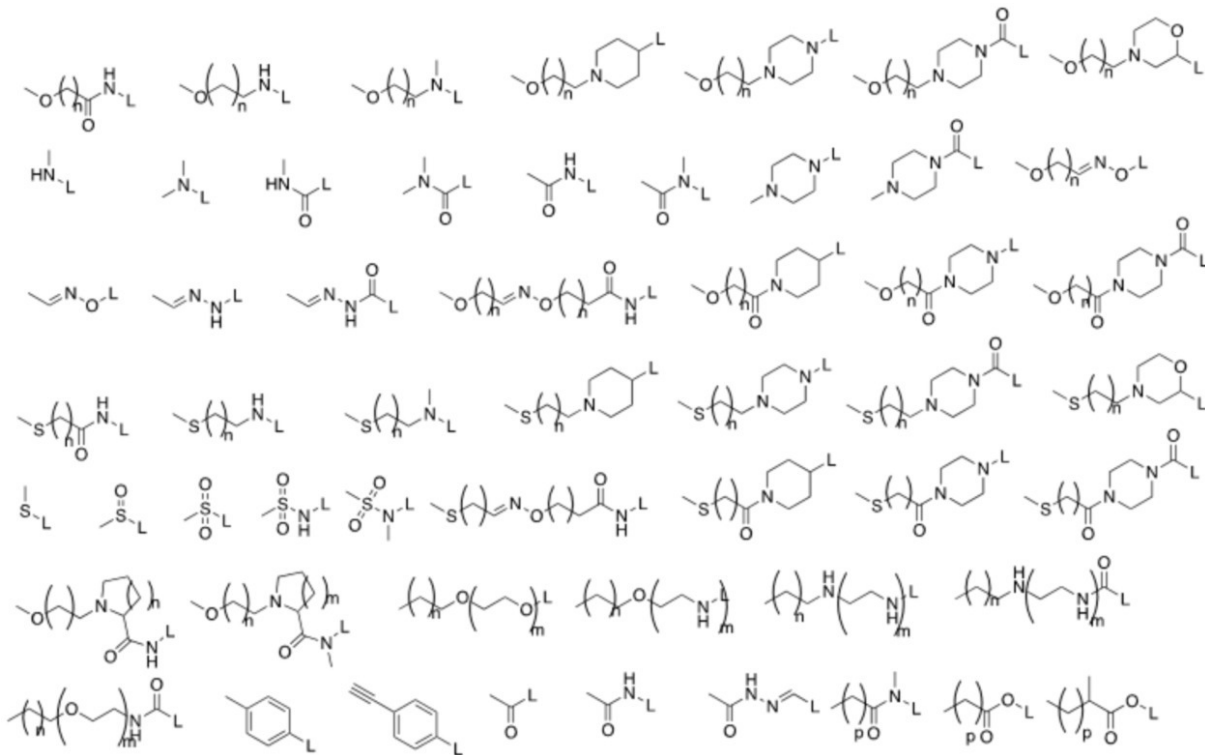
又はヘテロ置換芳香環であり、ここで、Y＝

10

20

30

【化 3】

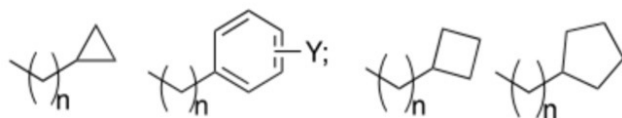


10

20

$n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$; $m = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$; $p = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$; Lは、タンパク質結合剤に連結したリンカーである、 R_2 は、 $-H$ 、 CH_3 、 $(CH_2)_nCH_3$; $(CH_2)_nOCH_3$ から選択され、 $n = 1, 2, 3$ 、及び4、並びに

【化 4】

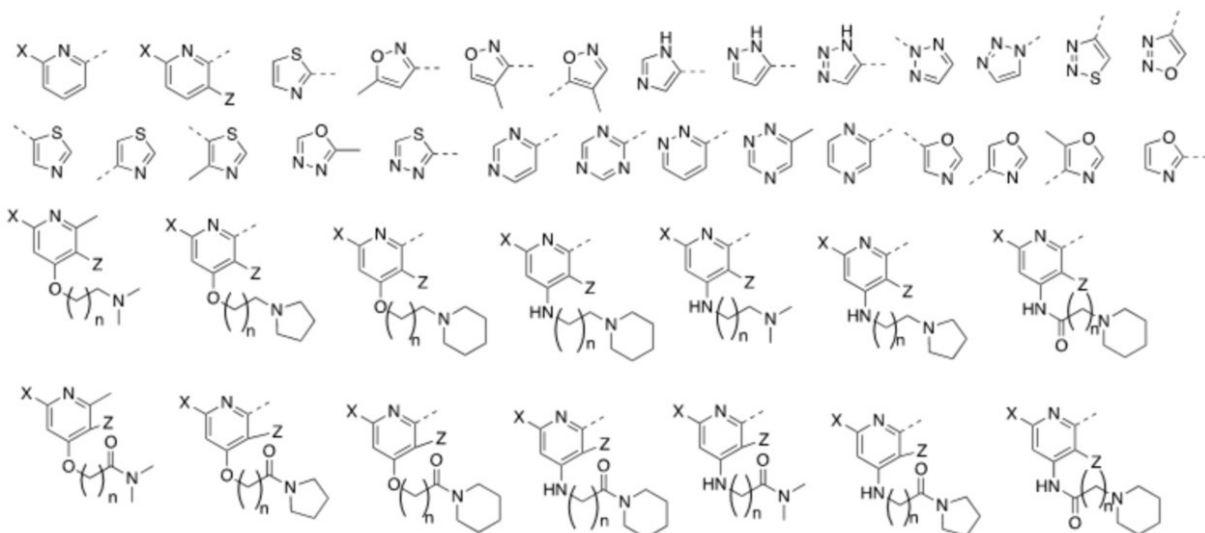


30

ここで、Y = $-Me$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CF_3$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-SMe$ 、 $-SOMe$ 、 $-SO_2Me$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NMe_2$ 、 NO_2 、 CHO 及び上記の例から選択され、

・ R_3 は、

【化 5】



40

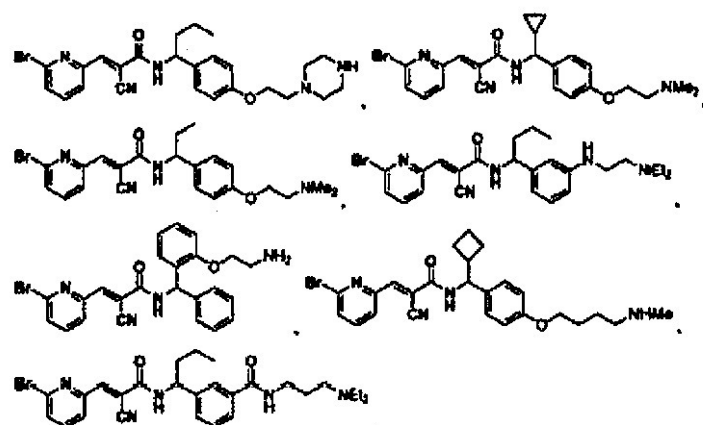
50

ここで、X 及び Z = -H、-F、-Cl、-Br、-I、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CH₃、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO₂Me、-NH₂、-NHMe、-NMe₂、-NO₂、-CHO 及び n = 1、2、3、4 から選択される。

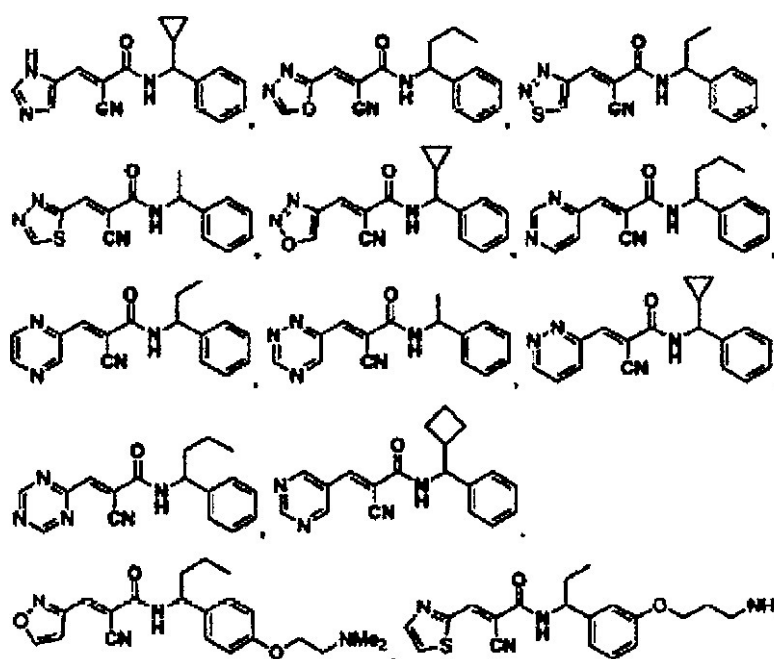
【0008】

他の好ましい実施形態では、Uc h L 5 結合パートナーは、

【化 6】

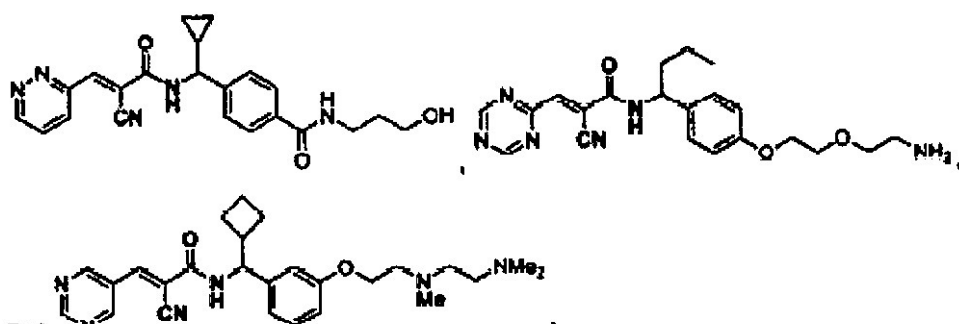


10



20

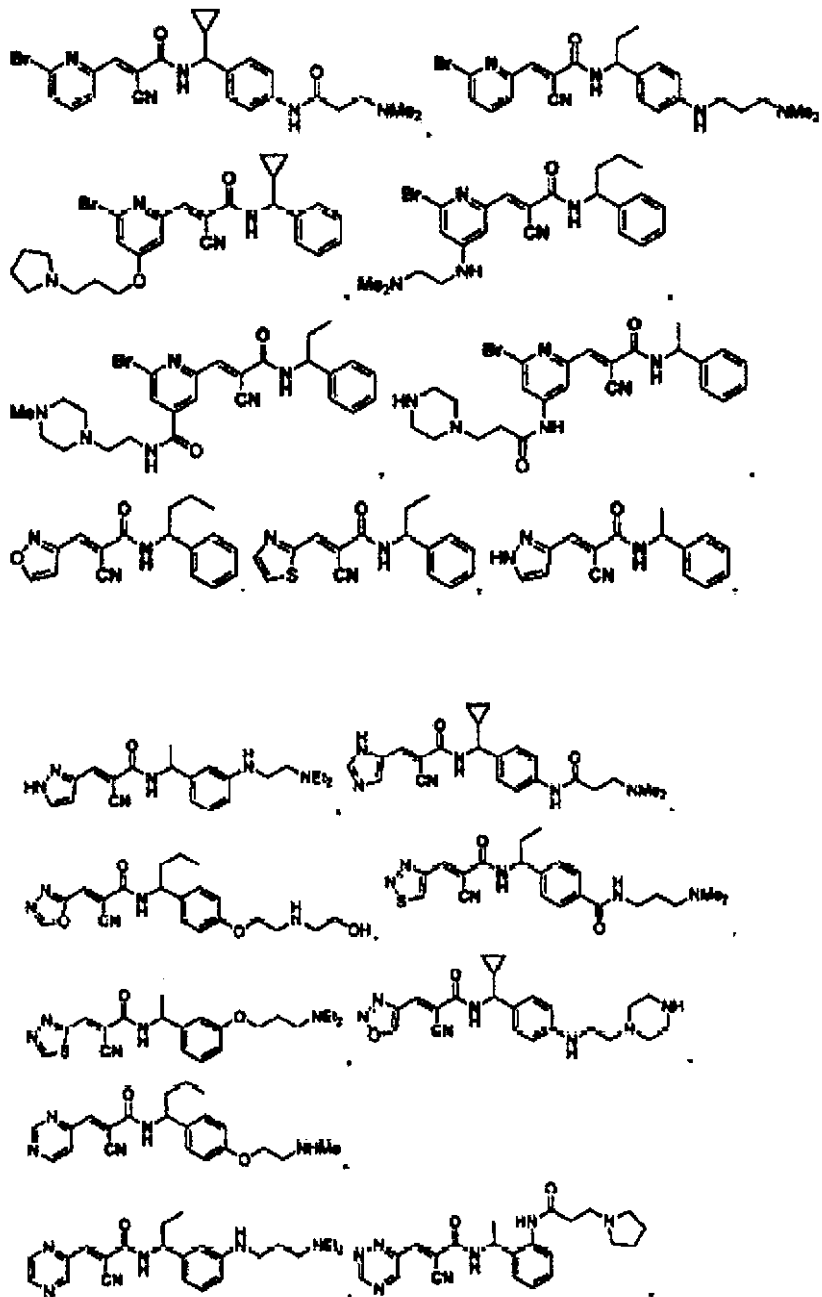
30



40

及び

又はこれらの塩



から選択され得る。

【0009】

本発明は又、式（I）：

U5L-(CL)-TPL (I)

で示され、

式中、-は、共有結合を指し；

U5Lは、UchL5と結合するリガンドであり、

CLは、共有結合リンカーであり、

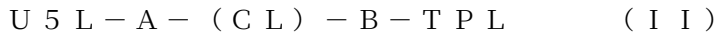
TPLは、標的タンパク質に結合するリガンドである、
化合物も包含する。

U5Lは、表1に示されるUchL5リガンドの群から選択され得る。好ましくは、UchL5リガンドは、少なくとも10nMの親和性でUchL5に結合する。好ましくは、UchL5リガンドは、1μM未満のKdでUchL5に結合する。UchL5リガンドは、表1に示されるUchL5結合分子の群から選択される。

好ましくは、標的タンパク質リガンドは、キナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、BETプロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物、HDM2／MDM2阻害剤、熱ショックタンパク質90阻害剤、HDAC阻害剤、ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び抗体からなる群から選択され得る。他の好ましい実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー、炭化水素リンカー、アルキルーエーテル（alkyl-ether）リンカー、又は複合PEG、アルキルリンカーであり得る。

【0010】

本発明は又、式（II）：



で示され、

式中、－は、共有結合を指し、

U5Lは、UchL5と結合するリガンドであり、

CLは、異なる第1の末端Aと第2の末端Bを有する共有結合リンカーであり、ここで、A及びBは独立に、アミド、オキシム、ケト、炭素、エーテル、エステル、又はカルバマートであり、

TPLは、標的タンパク質に結合するリガンドであり、且つ

U5LはAに共有結合的に連結され、且つTPLはBに共有結合的に連結されている、化合物も包含する。

好ましくは、標的タンパク質リガンドは、キナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、BETプロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物、HDM2／MDM2阻害剤、熱ショックタンパク質90阻害剤、HDAC阻害剤、ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び抗体からなる群から選択され得る。他の好ましい実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー、炭化水素リンカー、アルキルーエーテル（alkyl-ether）リンカー、又は複合PEG、アルキルリンカーであ得る、

【0011】

本発明は又、式：



で示され、

式中、－は、共有結合を指し、

U5Lは、UchL5と結合するリガンドであり、

CLは、Rxで終わる共有結合リンカーであり、

Rxは、リガンドと共有結合的の化学結合を形成することができ、且つ

Rxは、PEGでない、

化合物も包含する。

好ましくは、U5Lは、表1に示されるUchL5リガンドの群から選択され得る。好ましくは、UchL5リガンドは、少なくとも10nMの親和性でUchL5に結合する。好ましくは、UchL5リガンドは、1μM未満のKdでUchL5に結合する。UchL5リガンドは、表1に示されるUchL5結合分子の群から選択され得る。

【0012】

好ましくは、標的タンパク質リガンドは、キナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、BETプロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物、HDM2／MDM2阻害剤、熱ショックタンパク質90阻害剤、HDAC阻害剤、ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び抗体からなる群から選択され得る。他の好ましい実施形態では、リンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）リンカー、炭化水素リンカー、アルキルーエーテル（alkyl-ether）リンカー、又は複合PEG、アルキルリンカーであり得る。好ましくは、リンカーオキシムである第1の末端を有する。好ましくは（Preferably）、リンカーは、アミンである第2の末端を有する。

【0013】

好ましくは、U5Lは、式Iにより表され、

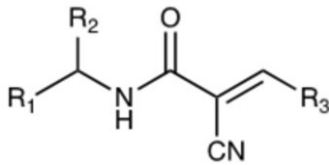
10

20

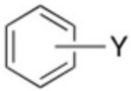
30

40

【化 7】

・ R₁ は、

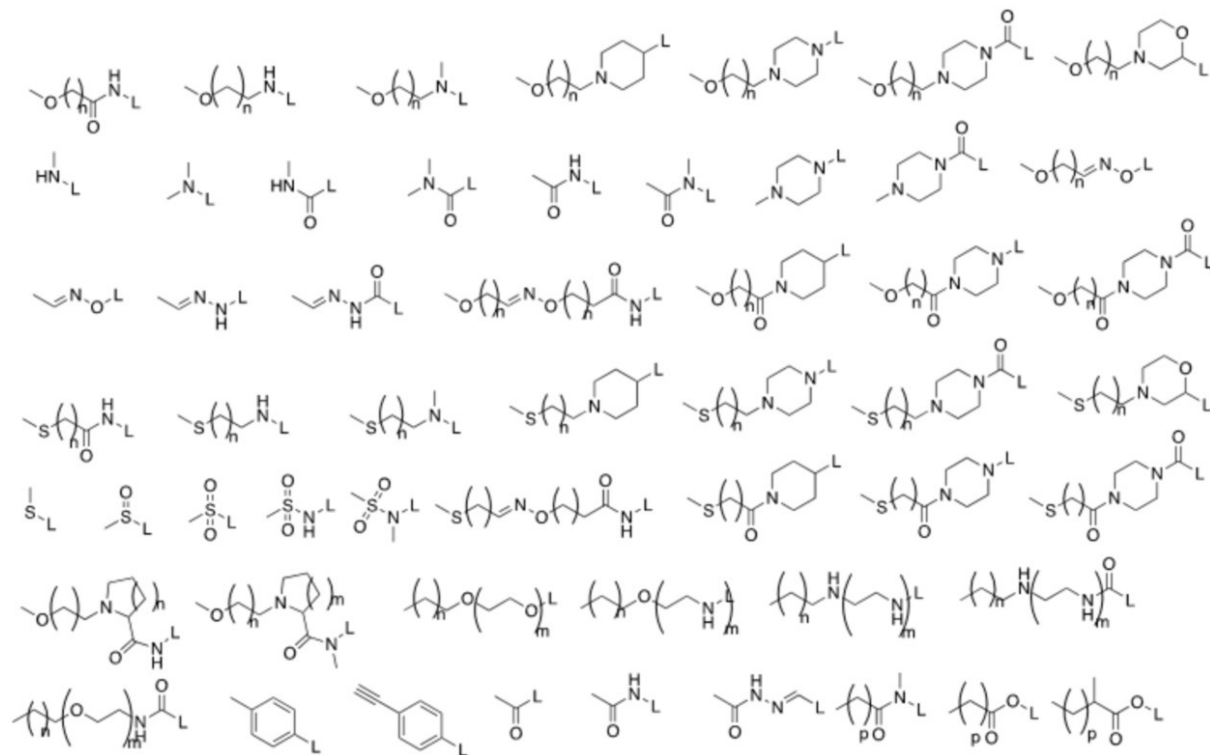
【化 8】



10

又はヘテロ置換芳香環であり、ここで、Y =

【化 9】



20

30

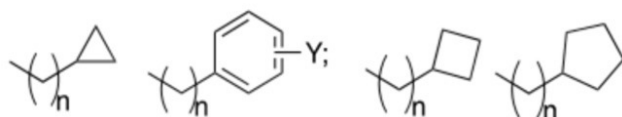
n = 1、2、3、4、5、6、7、8 ; m = 1、2、3、4、5、6、7、8 ; p = 0、1、2、3、4、5、6、7、8

L は、タンパク質結合剤に連結したリンカーである、

R₂ は、-H、CH₃、(CH₂)_nCH₃ ; (CH₂)_nOCH₃、ここで、n = 1、2、3、及び 4、並びに

【化 10】

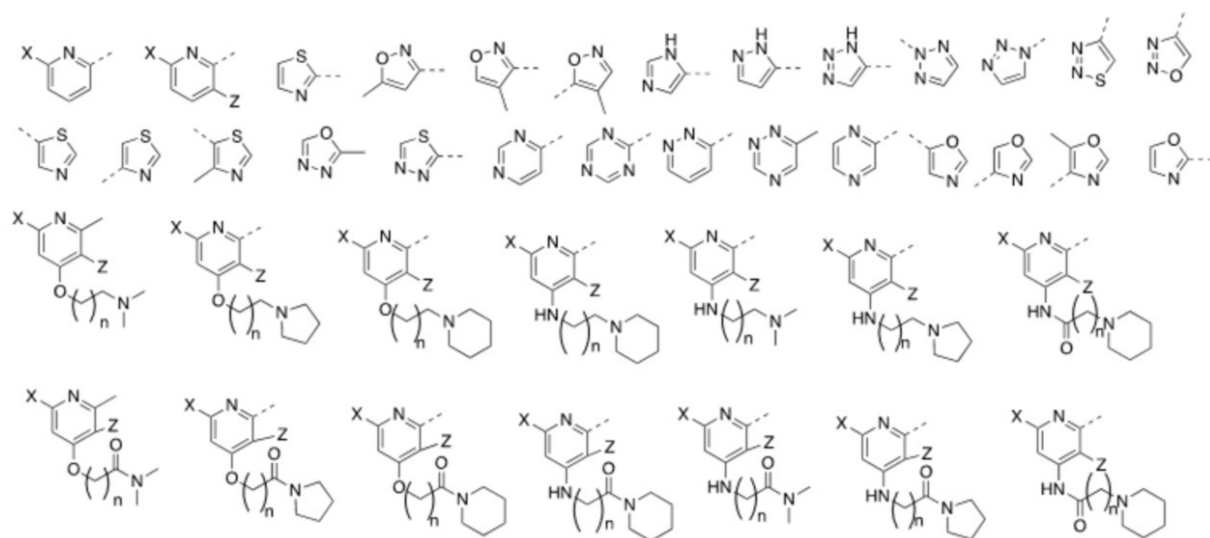
40



ここで、Y = -Me、-F、-Cl、-Br、-I、-CF₃、-CHF₂、-CH₂F、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO₂Me、-NH₂、-NHMe、-NMe₂、NO₂、CHO 及び上記の例から選択される。

R₃ は、

【化 1 1】



10

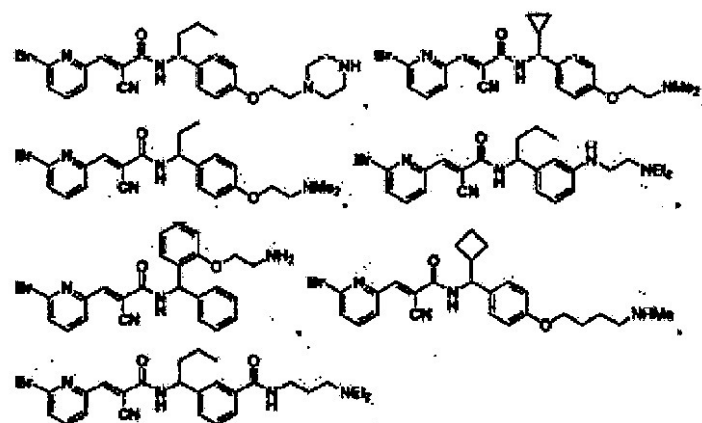
から選択され、

X 及び Z = -H、-F、-Cl、-Br、-I、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CH₃、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO₂Me、-NH₂、-NHMe、-NMe₂、-NO₂、-CHO 及び n = 1、2、3、4 である。U 5 L が以下

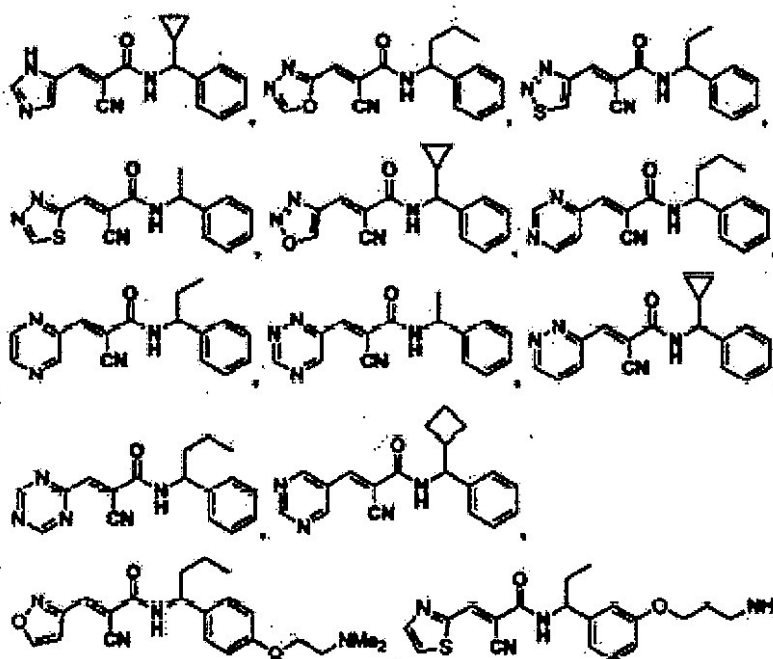
20

からなる群から選択される上記化合物

【化 1 2】

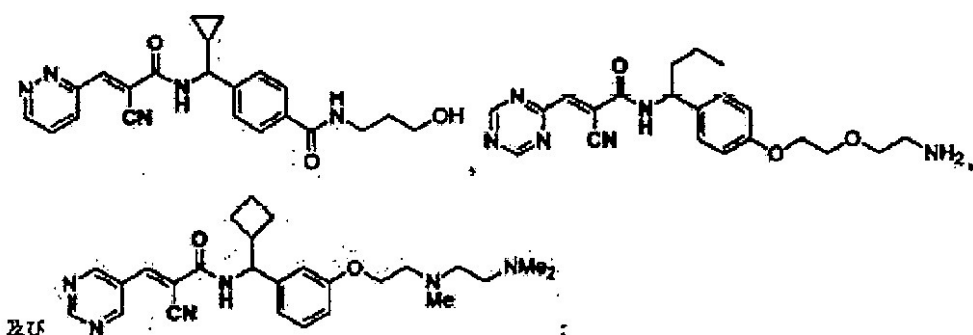


10



20

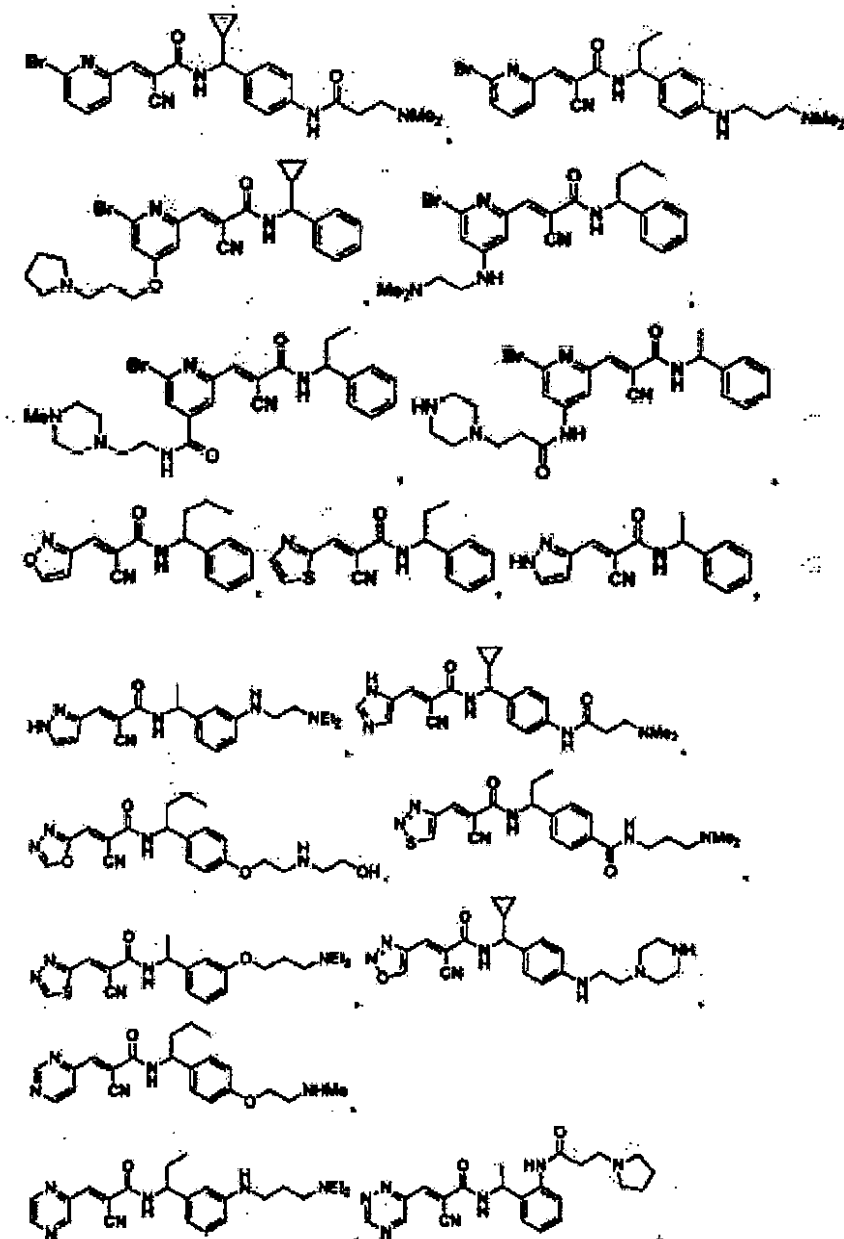
30



40

及び

又はこれらの塩



10

20

30

【0014】

本発明は又、細胞において標的タンパク質のタンパク質分解の増大を得る方法であって、前記細胞を前述の化合物のいずれかによる二機能性分子と接触させることを含む方法も包含する。

本発明は又、対象において標的タンパク質のタンパク質分解の増大を得る方法であって、前記対象を前述の化合物のいずれかによる二機能性分子を投与することを含む方法も包含する。

40

本発明は又、2つの共有結合的に連結された結合パートナーを含み、第1の結合パートナーがUchL5に結合し、第2の結合パートナーが選択された標的タンパク質に結合する二機能性分子を提供する方法であって、第1の結合パートナー及び第2の結合パートナーを準備すること、及び前記第1の結合パートナーと前記第2の結合パートナーを共有結合的に連結することを含む方法も包含する。

【0015】

本発明は又、標的タンパク質のタンパク質分解を促進する二機能性分子を選択する方法であって、

a. 第1の結合パートナー候補を準備すること、及び前記第1の結合パートナー候補が

50

U c h L 5 に結合するかどうか判定することにより第 1 の結合パートナーを選択すること；

b. 第 2 の結合パートナー候補を準備すること、及び前記第 2 の結合パートナー候補が対象とする標的タンパク質に結合するかどうか判定することにより第 2 の結合パートナーを選択すること；

c. 前記第 1 の結合パートナーと第 2 の結合パートナーを共有結合的に付着させて二機能性分子を形成すること；

d. 細胞を前記二機能性分子と接触させること；

e. 前記標的タンパク質がタンパク質分解を受けるかどうか判定することを含む方法も包含する。

10

【0016】

本発明は又、標的タンパク質のタンパク質分解を促進できる二機能性分子を選択する方法であって、

(a) 標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に連結された U c h L 5 結合パートナーを含む二機能性分子を準備すること、

(b) *in vitro* 又は哺乳動物において前記二機能性分子を細胞と接触させること、ここで、前記細胞は U c h L 5 及び前記標的タンパク質を含み、接触は二機能性分子と U c h L 5 及び前記標的タンパク質との結合を可能とする、及び

(c) 前記細胞において前記標的タンパク質のタンパク質分解を検出すること、ここで、検出されるタンパク質分解は、接触させない場合の標的タンパク質のタンパク質分解よりも増大している、を含む方法も包含する。

20

【0017】

本発明は又、前記二機能性分子の不在下で標的タンパク質のタンパク質分解を測定する工程を含む、前述の方法のいずれかを包含する。

本発明は又、U C H L 5 分子又はそのホモログを有する真核生物又は原核生物において *in vivo* タンパク質分解を誘導する方法であって、前記 U C H L 5 による脱ユビキチン化を阻害することなく、前記真核生物又は原核生物に本明細書で示されるような化合物を投与することを含む方法も包含する。

本発明は又、前記 U C H L 5 による脱ユビキチン化を阻害しない、前述の化合物のいずれかによる化合物を含む細胞、組織、又は器官培養培地も包含する。

30

本発明は又、標的タンパク質を分解する方法であって、前記 U C H L 5 による脱ユビキチン化を阻害することなく、前述の化合物のいずれかによる化合物で前記標的タンパク質の分解を誘導する工程を含む方法も包含する。

本発明は又、前述の化合物のいずれかによる化合物と薬学上許容される担体とを含む医薬組成物も包含する。

【0018】

好ましくは、二機能性分子は、U c h L 5 結合パートナー—リンカー—R として表され、ここで、リンカーは、 $-(CH_2)_n-(V)_m-(Z)_p-(CH_2)_q)_y$ である。

40

式中、n、m、p、q 及び y = 0、1、2、3、4、5、6、7、8

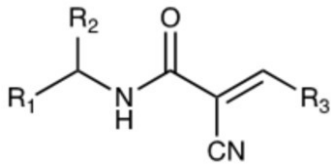
V = O、S、NR₁、CO、CONR₁、CC、CH=CH、ここで、R₁ = H、アルキル、アリール又はヘテロアリール

Z = シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール

【0019】

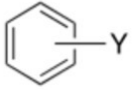
好ましくは、U c h L 5 結合パートナー (U 5 L) は、式 I により表される。いくつかの実施形態では、リンカーは、R₁ の位置で U c h L 5 結合パートナーに連結されている。

【化 1 3】



・ R_1 は、

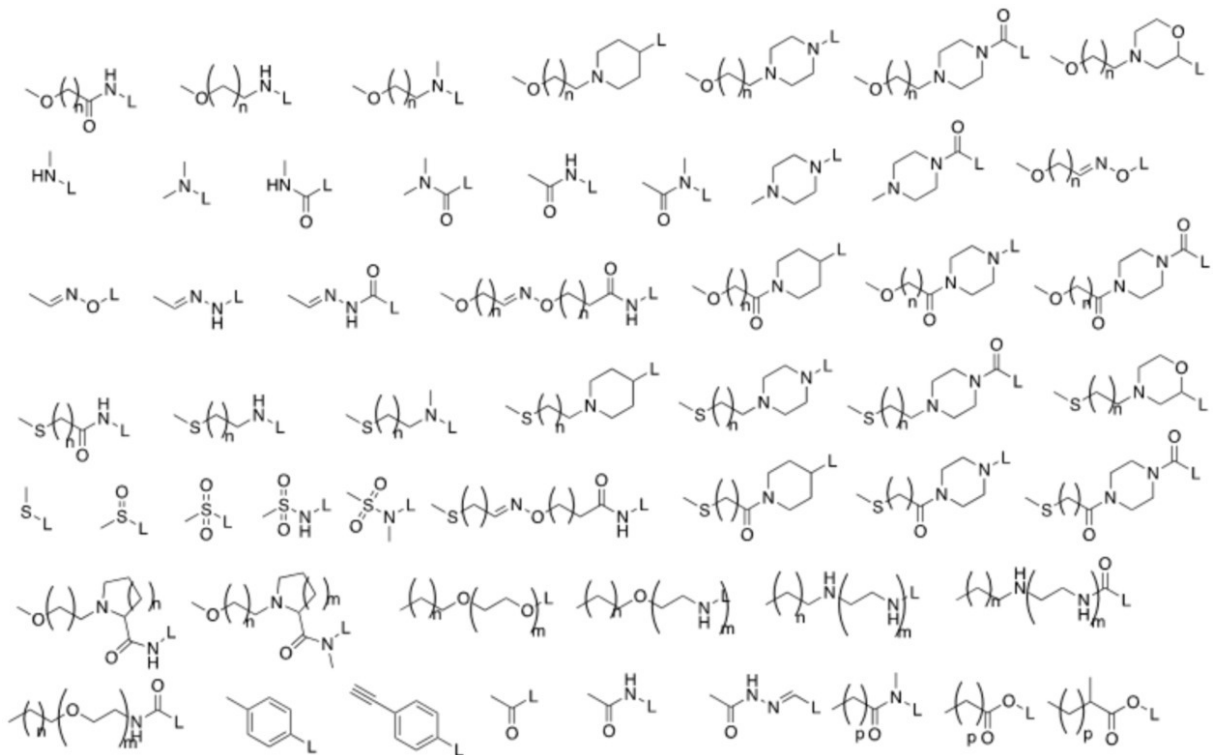
【化 1 4】



10

又はヘテロ置換芳香環であり、ここで、 $Y =$

【化 1 5】



20

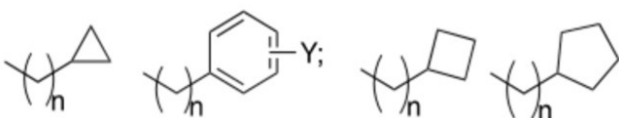
30

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

L は、タンパク質結合剤に連結したリンカーである、

・ R_2 は、 $-H$ 、 $-CH_3$ 、 $-(CH_2)_n-CH_3$ ； $-(CH_2)_n-O-CH_3$ から選択され、ここで、 $n = 1, 2, 3$ 、及び 4 、並びに

【化 1 6】

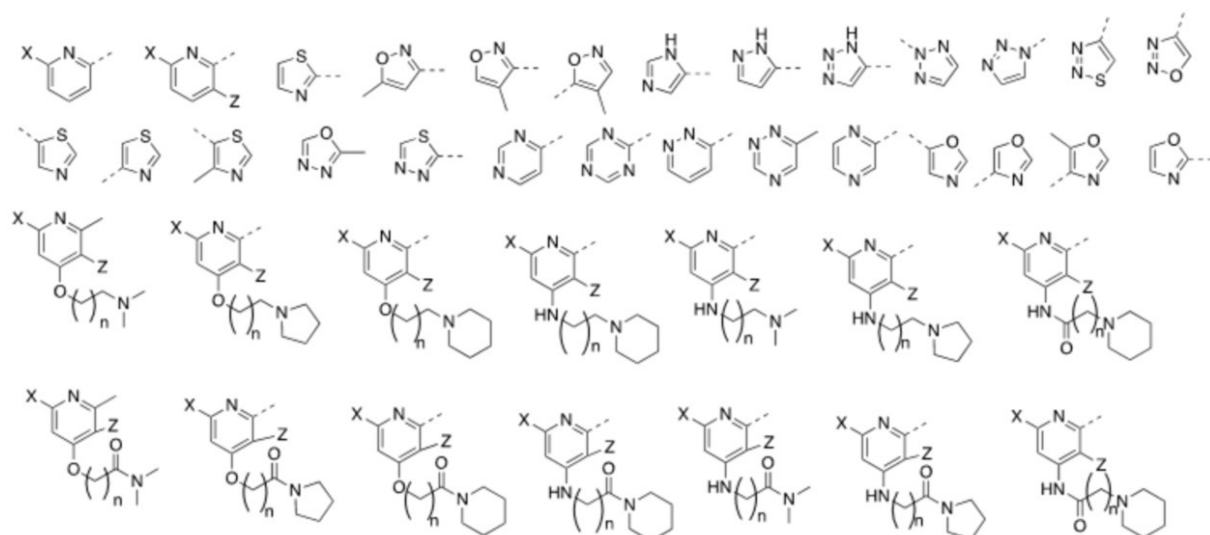


40

ここで、 $Y = -Me$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CF_3$ 、 $-CHF_2$ 、 $-CH_2F$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-OMe$ 、 $-SMe$ 、 $-SOMe$ 、 $-SO_2Me$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHMe$ 、 $-NMe_2$ 、 NO_2 、 CHO 及び上記の例から選択され、

・ R_3 は、

【化 17】



10

ここで、X及びZ = -H、-F、-Cl、-Br、-I、-CF₃、-CH₂F、-CHF₂、-CH₃、-CN、-OH、-OMe、-SMe、-SOMe、-SO₂Me、-NH₂、-NHMe、-NMe₂、-NO₂、-CHO

且つ、n = 1、2、3、4

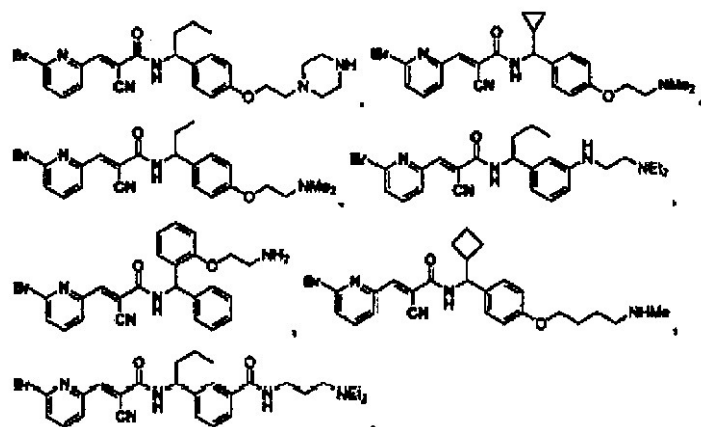
から選択される。

20

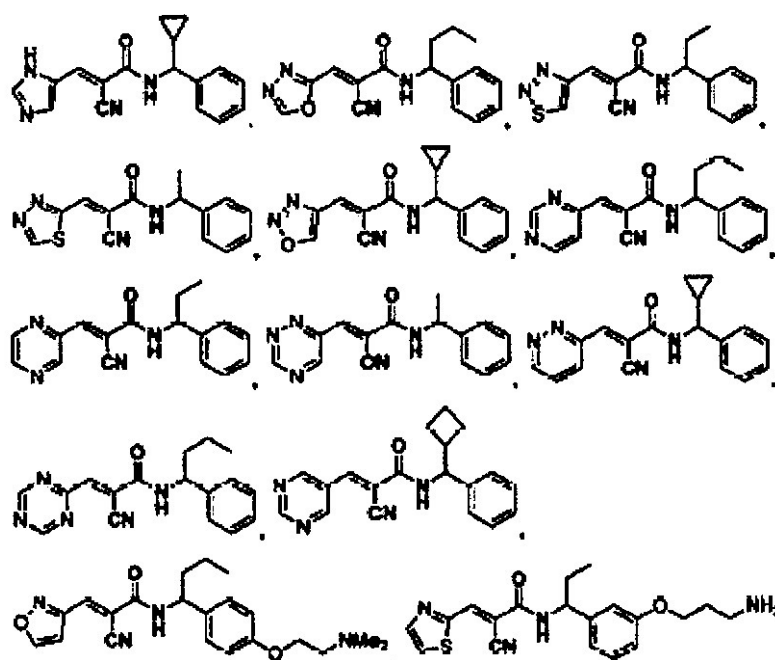
【0020】

好ましくは、U c h L 5 結合パートナーは、以下からなる群から選択される。

【化 18】

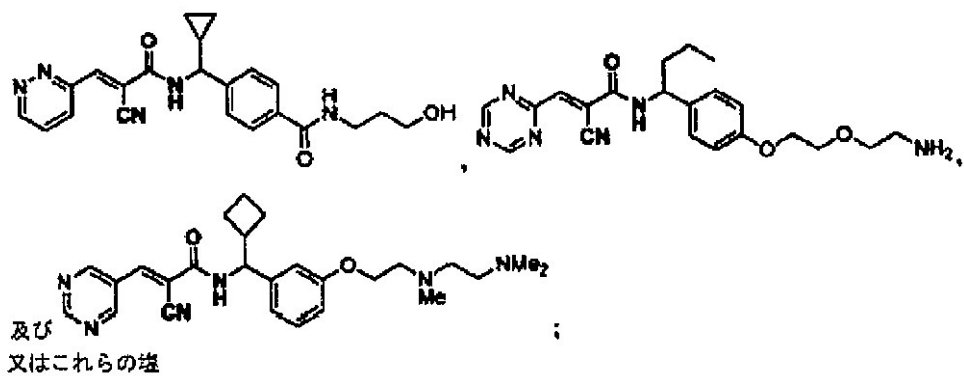


10

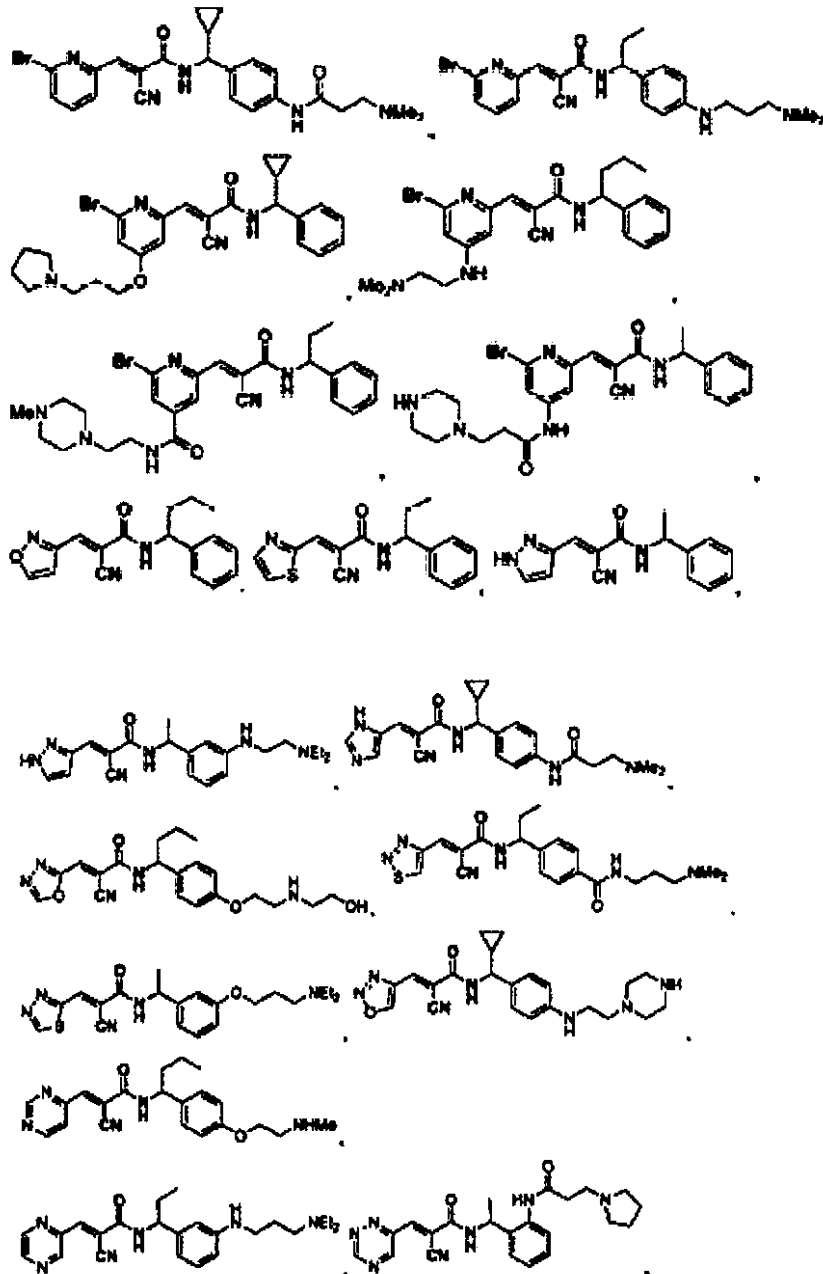


20

30



40



10

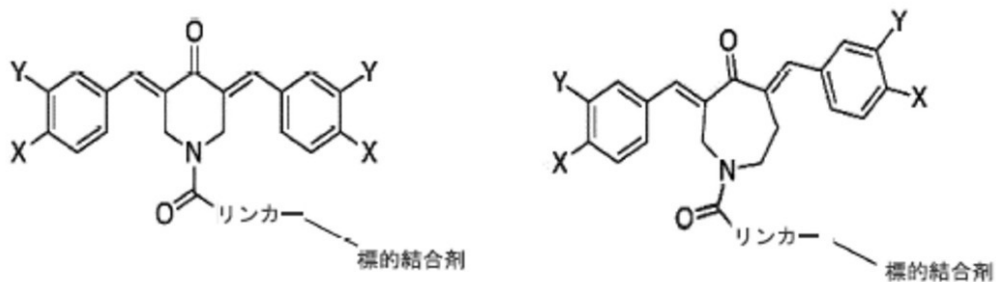
20

30

【0021】

いくつかの実施形態では、二機能性分子は、

【化19】



40

であり、

ここで、X及びYは、優先的には、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-NO_2$ 、 $-CF_3$ 、 CN 及びHであ

50

るが、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、 $-\text{CHF}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OMe}$ 、 $-\text{SMe}$ 、 $-\text{SOMe}$ 、 $-\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHMe}$ 、 $-\text{NMe}_2$ 、 CHO 、 OMe からなる群から選択することもできる。

【0022】

好ましくは、U c h L 5 結合パートナーは、標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に結合されない場合には、 $10\text{ nM} \sim 10\text{ }\mu\text{M}$ の範囲の親和性でU c h L 5に結合する。より好ましくは、U c h L 5 結合パートナーは、標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に結合されない場合には、少なくとも 10 nM の親和性でU c h L 5に結合する。

好ましくはU c h L 5 結合パートナーは、標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に結合されない場合には、 $1\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の範囲の解離定数 (K_d) でU c h L 5に結合する。より好ましくは、U c h L 5 結合パートナーは、標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に結合されない場合には、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満の K_d でU c h L 5に結合する。

U c h L 5 結合パートナーは、表1に示されるU c h L 5 結合分子の群から選択され得る。

【0023】

標的タンパク質結合パートナーは、キナーゼ阻害剤、ホスファターゼ阻害剤、BETプロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物、HDM2/MDM2阻害剤、熱ショックタンパク質90阻害剤、HDAC阻害剤、ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤及び抗体からなる群から選択され得る。

二機能性分子は、標的タンパク質のタンパク質分解を促進する。

好ましくは、リンカーは、ポリエチレングリコール (PEG) リンカー、炭化水素リンカー、又は複合PEG、アルキルリンカーである。好ましくは、リンカーは、オキシムである第1の末端を有し、且つ/又はリンカーは、アミンである第2の末端を有する。リンカーは、2～12回のPEGリピートを含んでよく、且つ/又は2～12回の(CH_2) n リピートを含んでよい。

【0024】

本発明は又、リンカーに連結されたU c h L 5 結合パートナーを含む結合分子を含み、このリンカーは、第2の結合パートナーに連結することができる。

この結合分子において、U c h L 5 結合パートナーは、 $10\text{ nM} \sim 10\text{ }\mu\text{M}$ の範囲の親和性でU c h L 5に結合し得る。U c h L 5 結合パートナーは、少なくとも 10 nM の親和性でU c h L 5に結合し得る。

この結合分子において、U c h L 5 結合パートナーは、 $1\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の範囲の解離定数 (K_d) でU c h L 5に結合し得る。U c h L 5 結合パートナーは、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満の K_d でU c h L 5に結合し得る。

U c h L 5 結合パートナーは、表1に示されるU c h L 5 結合分子の群から選択され得る。

好ましくは、リンカーは、ポリエチレングリコール (PEG) リンカー、炭化水素リンカー、又は複合PEG、アルキルリンカーである。好ましくは、リンカーは、オキシムである第1の末端を有し、且つ/又はリンカーは、アミンである第2の末端を有する。リンカーは、2～12回のPEGリピートを含んでよく、且つ/又は2～12回の(CH_2) n リピートを含んでよい。

【0025】

本発明は又、細胞において標的タンパク質のタンパク質分解の増大を得る方法であって、前記細胞を、標的タンパク質結合パートナーに連結されたU c h L 5 結合パートナーを含む二機能性分子と接触させることを含む方法も含む。

本発明の方法は又、対象において標的タンパク質のタンパク質分解の増大を得る方法であって、前記対象に標的タンパク質結合パートナーに連結されたU c h L 5 結合パートナーを含む二機能性分子を投与することによる方法を含む。

本発明は又、2つの共有結合的に連結された結合パートナーを含み、第1の結合パートナーがU c h L 5に結合し、第2の結合パートナーが選択された標的タンパク質に結合す

10

20

30

40

50

る二機能性分子を提供する方法であって、前記第 1 の結合パートナーと前記第 2 の結合パートナーを準備すること、及び前記第 1 の結合パートナーと前記第 2 の結合パートナーを共有結合的に連結することを含む方法も含む。

【0026】

本発明は又、標的タンパク質のタンパク質分解を促進する二機能性分子を選択する方法であって、

a. 第 1 の結合パートナー候補を準備すること、及び前記第 1 の結合パートナー候補が U c h L 5 に結合するかどうか判定することにより第 1 の結合パートナーを選択すること；

b. 第 2 の結合パートナー候補を準備すること、及び前記第 2 の結合パートナー候補が対象とする標的タンパク質に結合するかどうか判定することにより第 2 の結合パートナーを選択すること；

c. 前記第 1 の結合パートナーと第 2 の結合パートナーを共有結合的に付着させて二機能性分子を形成すること；

d. 細胞を前記二機能性分子と接触させること；

e. 前記標的タンパク質がタンパク質分解を受けるかどうか判定することを含む方法も含む。

【0027】

本発明の方法は又、標的タンパク質のタンパク質分解を促進し得る二機能性分子を選択する方法であって、

(a) 標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に連結された U c h L 5 結合パートナーを含む二機能性分子を準備すること、

(b) i n v i t r o 又は哺乳動物において前記二機能性分子を細胞と接触させること、ここで、前記細胞は U c h L 5 及び前記標的タンパク質を含み、接触は二機能性分子と U c h L 5 及び前記標的タンパク質との結合を可能とする、及び

(c) 前記細胞において前記標的タンパク質のタンパク質分解を検出すること、ここで、検出されるタンパク質分解は、工程 (b) のような接触を行わない場合の標的タンパク質のタンパク質分解よりも増大している、を含む方法も含む。

【0028】

この方法は又、二機能性分子の不在下で標的タンパク質のタンパク質分解を測定する工程も含み得る。

本発明は又、二機能性分子のライブラリーを含み、このライブラリーは複数の二機能性分子を含み、この複数の二機能性分子は、選択された標的タンパク質結合パートナーに共有結合的に連結された複数の U c h L 5 結合パートナーを含む。従って、標的タンパク質結合パートナーは予め選択され、U c h L 5 結合パートナーは、事前に決定されない。このライブラリーは、二機能性分子の U c h L 5 結合パートナー候補の標的タンパク質分解促進活性を決定するために使用することができる。

本発明は又、二機能性分子のライブラリーを含み、このライブラリーは複数の二機能性分子を含み、この複数の二機能性分子は、複数の標的タンパク質結合要素及び選択された U c h L 5 結合パートナーを含む。従って、U c h L 5 結合パートナーは予め選択され、標的タンパク質は、事前に決定されない。このライブラリーは、標的タンパク質分解を促進するための推定標的タンパク質結合パートナーの活性及び標的タンパク質の結合剤としてのその価値を決定するために使用することができる。

【0029】

本発明は又、標的タンパク質のタンパク質分解を促進する二機能性分子を特定するために、二機能性分子候補のライブラリーをスクリーニングする方法も提供する。この方法は、細胞をライブラリー由来の二機能性分子のプールとともにインキュベートすること；前記細胞において標的タンパク質の量をモニタリングすること；前記細胞において標的タンパク質の量に低下をもたらす二機能性分子のサブプールを特定すること；前記細胞を特定

されたサブプール由来の二機能性分子とともにインキュベートすること；前記細胞において標的タンパク質の量をモニタリングすること；及び前記細胞において標的タンパク質の量に低下をもたらす二機能性分子を特定することを含む。

これらの及び付加的な本発明の組成物及び方法は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲に示される。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、HEK293細胞を1 μ Mの化合物で6時間処理した後の、Brd2、Brd3及びBrd4の免疫プロット分析を示す。MZ1を陽性対照として使用した。各レーンの下に報告される値は、平均0.1% DMSO対照と比較したBETの存在量を示す。

10

【図2】図2は、HEK293細胞を1 μ Mの05IB6（活性型）又は05IB11（陰性対照）で6時間処理した後のBrd4及びチューブリンの免疫プロット分析を示す（3回の生物学的反復）。

【図3】図3は、HEK293細胞を漸増濃度の05IB1、05IB2又は05IB3で6時間処理した後のBrd2、Brd3及びBrd4タンパク質レベルの免疫プロット分析を示す。バンド強度をチューブリン負荷対照に対して正規化し、平均0.1% DMSOビヒクル強度に対する%として報告し、各点は2回の独立した実験（n=2）の平均±SEMを表す。

【図4】図4は、HEK293細胞を種々の時間、05IB1、05IB2又は05IB3で1 μ M処理した後のBrd2、Brd3及びBrd4タンパク質レベルの免疫プロット分析を示す。バンド強度をチューブリン負荷対照に対して正規化し、平均0.1% DMSOビヒクル強度に対する%として報告し、各点は2回の独立した実験（n=2）の平均±SEMを表す。

20

【図5】図5は、10 μ Mボルテゾミブの存在下及び不在下で、HEK293細胞を1 μ Mの05IB6又はMZ11で6時間処理した後のBrd4タンパク質レベルの代表的免疫プロットを示す。

【図6】図6は、K562細胞を1 μ Mの化合物で24時間処理した後のABL2の免疫プロット分析を示す。DAS-6-2-2-6-CRBN（PROTAC；doi：10.1002/anlie.201507634）を陽性対照として使用した。デグラシン、イマチニブ及びダサチニブ弾頭も並行して試験した。

30

【図7】図7は、K562細胞を漸増濃度の05DA1又は05DA6で24時間処理した後のABL2タンパク質レベルの代表的免疫プロット分析を示す。バンド強度を β -チューブリン負荷対照に対して正規化し、平均0.1% DMSOビヒクル強度に対する%として報告し、各点は2回の独立した実験（n=2）の平均±SEMを表す。

【図8】図8は、5 μ Mのデグラシン又は1 μ MのI-BET726の存在下及び不在下で、HEK293細胞を0.1 μ Mの05IB9又はMZ1で6時間処理した後のBrd4タンパク質レベルの免疫プロット分析を示す。

【図9A-9B】図9Aは、10 μ Mのボルテゾミブ、5 μ Mのデグラシン又は1 μ MのI-BET726の存在下及び不在下で、HAP1細胞を0.1 μ Mの05IB9又はMZ1で6時間処理した後のBrd4タンパク質レベルの代表的免疫プロット分析を示す。バンド強度を β -チューブリン負荷対照に対して正規化し、図9Bに平均0.1% DMSOビヒクル強度に対する%として報告し、各バーは4回の独立した実験（n=4）の平均±SEMを表す。

40

【図10】図10は、BET阻害剤I-BET726と比較した場合の、漸増濃度の05IB9で処理した後のMV4-11細胞におけるBrd2、Brd3、Brd4、c-MYC、総PARP（PARP）及び切断PARP（C-PARP）レベルの代表的免疫プロットを示す。05IB11を陰性対照として使用した。

【図11】図11は、Cell Titer-Gloアッセイ（Promega）を用いて測定した場合の、1 μ Mのデグラシン系代表的化合物で48時間処理した後のMV4-1

50

1 細胞における抗増殖効果を示す。I-BET726 及びデグラシン (DEG) を並行して測定し、MZ1 及び 05IB11 をそれぞれ陽性対照及び陰性対照として使用した。

【図 12】図 12 は、デグラシン系代表的化合物とのインキュベーション後の UchL5 触媒ドメインの LC-MS 分析を示す。デコンボリューションにより、非修飾タンパク質 (26859 Da) 及び修飾タンパク質 (27915 Da; 予測値 27911 Da) の両方に相当するタンパク質量が明らかになった。

【発明を実施するための形態】

【0031】

詳細な説明

本発明は、UchL5 及び選択された標的タンパク質に同時に結合することができ、それにより、タンパク質分解による標的タンパク質の分解を促進する二機能性分子を提供する。

選択された標的タンパク質を、タンパク質分解を受けるようにプロテアソームへ動員することに関する組成物及び方法を記載する。これは本発明によれば、UchL5 と選択された標的タンパク質の両方に結合する二機能性分子を用いて達成される。よって、本発明は、標的タンパク質の結合パートナーに連結された UchL5 結合パートナーを含む、二重の結合機能を有する分子を提供する。本発明は、プロテアソームによる選択された標的タンパク質の分解を促進する。

【0032】

定義：

本明細書で使用する場合、「二機能性分子」は、各末端に官能基を有し、第 1 の官能基は UchL5 結合パートナーであり、第 2 の官能基は標的タンパク質結合パートナーである。二機能性分子は、UchL5 と選択された標的タンパク質に同時に結合することができる。

用語「ユビキチン化」は、所与のタンパク質のユビキチン連結のプロセスを指し、それにより、そのタンパク質はそのタンパク質への 1 以上のユビキチン分子の共有結合を受ける（これは一般にそのタンパク質の表面リシン残基への、又はその N 末端へのユビキチンの付着を介して起こる）。ユビキチン分子の共有結合は、プロテアソーム分解に向けるタンパク質のマークであり、その結果、タンパク質は消化されて小ペプチドとなる。

用語「ユビキチン非依存性分解」は、タンパク質分解の前に標的タンパク質のユビキチン化を必要としない、選択された標的タンパク質のタンパク質分解を意味する。

又、そうではないことが明示されない限り、2 つ以上の工程又は行為を含む本明細書で特許請求されるいずれの方法においても、その方法の工程又は行為の順序は、その方法の工程又は行為が列挙されている順序に必ずしも限定されないことも理解されるべきである。

【0033】

特許請求の範囲並びに上記の明細書において、「を含む (comprising)」、「を含む (including)」、「を備える (carrying)」、「を有する (having)」、「を含有する (containing)」、「包含する (involving)」、「保持する (holding)」、「から構成される (composed of)」などのような全ての移行句は、オープンエンドである、すなわち、限定されるものではないが含むことを意味すると理解されるべきである。米国特許審査便覧第 2111.03 節に示されているように移行句「からなる (consisting of)」及び「から本質的になる (consisting essentially of)」のみがそれぞれクローズド又はセミクローズドの移行句であるものとする。

用語「併用投与」及び「併用投与する」とは、複数の治療薬が同時にある程度まで患者内に存在する限り、同時投与 (2 種類以上の治療薬の同時の投与) 及び時間差投与 (1 又は複数の付加的治療薬の投与とは異なる時点での 1 以上の治療薬の投与) の両方を指す。

【0034】

用語「溶媒和物」は、特定の化合物の、そのような化合物の生物学的有効性を保持する

10

20

30

40

50

、1以上の溶媒分子を伴った薬学上許容される形態を指す。溶媒和物の例としては、例えば、水（水和物を形成するため）、イソプロパノール、エタノール、メタノール、ジメチルスルホキシド、酢酸エチル、酢酸、エタノールアミン、又はアセトンなどの溶媒と組み合わせた本発明の化合物が挙げられる。又、2種類以上の溶媒と組み合わせた本発明の化合物などの溶媒和物混合物の製剤も含まれる。

例えば、アルキル、m、nなどの各表現の定義は、それが任意の構造において2つ以上存在する場合、同じ構造の他の場所でのその定義とは独立であることが意図される。

【0035】

「置換」又は「で置換された」は、そのような置換が置換された原子及び置換基の許容される価数に従い、及びその置換が安定な化合物、例えば、転位、環化、脱離、又は他の反応によるなどの変換を自発的に受けない化合物をもたらすという暗に示される条件を含むことが理解されるであろう。

用語「置換された」は、又、有機化合物の全ての許容される置換基を含むことも企図する。広い態様において、許容される置換基には、有機化合物の非環式及び環式、分岐型及び非分岐型、炭素環式及び複素環式、芳香族及び非芳香族置換基が含まれる。例示的置換基として、例えば、本明細書の以下に記載されるものが挙げられる。許容される置換基は、1以上であってよく、適当な有機化合物に関して同じであっても異なってもよい。本発明の目的では、窒素などのヘテロ原子は、水素置換基、及び／又はヘテロ原子の価数を満たす本明細書に記載の有機化合物のいずれかの許容される置換基を有し得る。本発明は、有機化合物の許容される置換基によって何ら限定されるものではないことを意図する。

【0036】

用語「低級」は、以下に列挙する基のいずれかに付く場合、その基が7個未満の炭素（すなわち、6個以下の炭素）を含有することを示す。例えば、「低級アルキル」は、1～6個の炭素を含有するアルキル基を指し、「低級アルケニル」は、2～6個の炭素を含有するアルケニル（alkenylyl）基を指す。

用語「不飽和」は、本明細書で使用する場合、少なくとも1つの炭素－炭素二重結合又は炭素－炭素三重結合を有する化合物及び／又は基に関する。

用語「脂肪族」は、本明細書で使用する場合、直鎖又は分岐鎖であるが環式ではない（「非環式」又は「開鎖」基としても知られる）化合物及び／又は基に関する。

用語「環式」は、本明細書で使用する場合、一環、又は2以上の環（例えば、スピロ、縮合、架橋）を有する化合物及び／又は基に関する。「単環式」は、一環を有する化合物及び／又は基を指し；「二環式」は、二環を有する化合物及び／又は基を指す。

【0037】

用語「芳香族」は、 $4n+2$ 個の電子（ n は整数の絶対値である）を含有する環状共役分子部分の特徴とする平面構造又は多環式構造を指す。縮合又は連結した環を含有する芳香族分子は又、二環式芳香環とも呼ばれる。例えば、炭化水素環構造中にヘテロ原子を含有する二環式芳香環は、二環式ヘテロアリール環と呼ばれる。

用語「炭化水素」は、本明細書で使用する場合、完全に水素と炭素からなる有機化合物を指す。

本発明の目的では、化学元素は、Handbook of Chemistry and Physics、第67版、1986－87の見返しの元素の周期表CASバージョンに従って特定される。

【0038】

用語「ヘテロ原子」は、本明細書で使用する場合、当技術分野で認識され、炭素又は水素以外のいずれの元素の原子も指す。例示的ヘテロ原子としては、ホウ素、窒素、酸素、リン、硫黄及びセレンが挙げられる。

用語「アルキル」は、1～20個、1～15個、又は1～10個の炭素原子を含有する脂肪族又は環式炭化水素基を意味する。アルキルの代表例としては、限定されるものではないが、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、sec-ブチル

、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、2-メチルシクロペンチル、1-(1-エチルシクロプロピル)エチル及び1-シクロヘキシルエチルが挙げられる。

用語「シクロアルキル」は、3～15個、3～10個、又は3～7個の炭素原子を含有する環式炭化水素基を指すアルキルのサブセットである。シクロアルキルの代表例としては、限定されるものではないが、シクロプロピル及びシクロブチルが挙げられる。

【0039】

用語「アルケニル」は、本明細書で使用する場合、2～10個の炭素を含有し、且つ、2個の水素の除去により形成された少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含有する直鎖又は分岐鎖炭化水素基を意味する。アルケニルの代表例としては、限定されるものではないが、エテニル、2-プロペニル、2-メチル-2-プロペニル、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニル、2-ヘプテニル、2-メチル-1-ヘプテニル、及び3-デセニルが挙げられる。

用語「アルキニル」は、本明細書で使用する場合、2～10個の炭素原子を含有し、且つ、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含有する直鎖又は分岐鎖炭化水素15ラジカルを意味する。アルキニルの代表例としては、限定されるものではないが、アセチレニル、1-プロピニル、2-プロピニル、3-ブチニル、2-ペンチニル、及び1-ブチニルが挙げられる。

【0040】

用語「アルキレン」は、当技術分野で認識され、本明細書で使用する場合、上記で定義されたようなアルキル基の2個の水素原子を除去することにより得られるジラジカルに関する。

用語「カルボシクリル」は、本明細書で使用する場合、完全に飽和しているか又は1以上の不飽和結合を有する、3～12個の炭素原子を含有する単環式又は多環式（例えば、二環式、三環式など）炭化水素基を意味し、疑念を避けるため、この不飽和度は芳香環系（例えば、フェニル）によるものではない。カルボシクリル基の例としては、1-シクロプロピル、1-シクロブチル、2-シクロペンチル、1-シクロペンテニル、3-シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル及び2-シクロペンテニルメチルが挙げられる。

【0041】

用語「ヘテロシクリル」は、本明細書で使用する場合、完全に飽和していてもよいし、又は1以上の不飽和単位を含有することができ（疑念を避けるため、この不飽和度は芳香環系によるものではない）、窒素、酸素、又は硫黄などの少なくとも1個のヘテロ原子を含む3～12個の原子を有する、限定されるものではないが、単環式、二環式及び三環式環を含む非芳香族環系のラジカルを指す。本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきでない例示の目的では、以下が複素環式環の例となる：アジリジニル、アジリニル、オキシラニル、チイラニル、チイレニル、ジオキシラニル、ジアジリニル、アゼチル、オキセタニル、オキセチル、チエタニル、チエチル、ジアゼチジニル、ジオキセタニル、ジオキセテニル、ジチエタニル、ジチエチル、フリル、ジオキシアラニル、ピロリル、オキサゾリル、チアゾリル、イミダゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、トリアゾリル、トリアジニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、チオフエニル、ピラゾリル、テトラゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、トリアジニル、テトラジニル、キノリニル、イソキノリニル、キノキサリニル、キナゾリニル、ピリドピラジニル、ベンゾキサゾリル、ベンゾチオフエニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンズオキサジアゾリル、ベンズチアジアゾリル、インドリル、ベンズトリアゾリル、ナフチリジニル、アゼピン、アゼチジニル、モルホリニル、オキソピペリジニル、オキソピロリジニル、ピペラジニル、ピペリジニル、ピロリジニル、キニクルジニル、チオモルホリニル、テトラヒドロピラニル及びテトラヒドロフラニル。

【0042】

本発明のヘテロシクリル基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、ハロアルキル、フルオロアルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルケニルオキシ (alkenyloxy)

oxy)、アルキニルオキシ、カルボシクリルオキシ、ヘテロシクリルオキシ、ハロアルコキシ、フルオロアルキルオキシ、スルフヒドリル、アルキルチオ、ハロアルキルチオ、フルオロアルキルチオ、アルケニルチオ (alkyeny l t h i o)、アルキニルチオ、スルホン酸 (s u l f o n i a c i d)、アルキルスルホニル、ハロアルキルスルホニル、フルオルアルキルスルホニル、アルケニルスルホニル、アルキニルスルホニル、アルコキシスルホニル、ハロアルコキシスルホニル、フルオロアルコキシスルホニル、アルケニルオキシスルホニル、アルキニルオキシスルホニル (a l k y n y l o x y s u l f o n y)、アミノスルホニル、スルフィン酸、アルキルスルフィニル、ハロアルキルスルフィニル、フルオルアルキルスルフィニル、アルケニルスルフィニル、アルキニルスルフィニル、アルコキシスルフィニル、ハロアルコキシスルフィニル、フルオロアルコキシスルフィニル、アルケニルオキシスルフィニル、アルキニルオキシスルフィニル (a l k y n y l o x y s u l f i n y)、アミノスルフィニル、ホルミル、アルキルカルボニル、ハロアルキルカルボニル、フルオロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ハロアルコキシカルボニル、フルオロアルコキシカルボニル、アルケニルオキシカルボニル、アルキニルオキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、ハロアルキルカルボニルオキシ、フルオロアルキルカルボニルオキシ、アルケニルカルボニルオキシ、アルキニルカルボニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、ハロアルキルスルホニルオキシ、フルオロアルキルスルホニルオキシ、アルケニルスルホニルオキシ、アルキニルスルホニルオキシ、ハロアルコキシスルホニルオキシ、フルオロアルコキシスルホニルオキシ、アルケニルオキシスルホニルオキシ、アルキニルオキシスルホニルオキシ、アルキルスルフィニルオキシ、ハロアルキルスルフィニルオキシ、フルオロアルキルスルフィニルオキシ、アルケニルスルフィニルオキシ、アルキニルスルフィニルオキシ、アルコキシスルフィニルオキシ、ハロアルコキシスルフィニルオキシ、フルオロアルコキシスルフィニルオキシ、アルケニルオキシスルフィニルオキシ、アルキニルオキシスルフィニルオキシ、アミノスルフィニルオキシ、アミノ、アミド、アミノスルホニル、アミノスルフィニル、シアノ、ニトロ、アジド、ホスフィニル、ホスホリル、シリル、シリルオキシ、及びアルキレン部分 (例えば、メチレン) を介してヘテロシクリル基に結合された前記置換基のいずれかからなる群から独立に選択される 0、1、2、3、4 又は 5 個の置換基で置換されている。

10

20

30

【0043】

用語「アリール」は、本明細書で使用する場合、フェニル、ナフチル、フェナントレニル、又はアントラセニル基を意味する。本発明のアリール基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、ハロアルキル、フルオロアルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルケニルオキシ (a l k y e n y l o x y)、アルキニルオキシ、カルボシクリルオキシ、ヘテロシクリルオキシ、ハロアルコキシ、フルオロアルキルオキシ、スルフヒドリル、アルキルチオ、ハロアルキルチオ、フルオロアルキルチオ、アルケニルチオ (a l k y e n y l t h i o)、アルキニルチオ、スルホン酸、アルキルスルホニル、ハロアルキルスルホニル、フルオルアルキルスルホニル、アルケニルスルホニル、アルキニルスルホニル、アルコキシスルホニル、ハロアルコキシスルホニル、フルオロアルコキシスルホニル、アルケニルオキシスルホニル、アルキニルオキシスルホニル (a l k y n y l o x y s u l f o n y)、アミノスルホニル、スルフィン酸、アルキルスルフィニル、ハロアルキルスルフィニル、フルオルアルキルスルフィニル、アルケニルスルフィニル、アルキニルスルフィニル、アルコキシスルフィニル、ハロアルコキシスルフィニル、フルオロアルコキシスルフィニル、アルケニルオキシスルフィニル、アルキニルオキシスルフィニル (a l k y n y l o x y s u l f i n y)、アミノスルフィニル、ホルミル、アルキルカルボニル、ハロアルキルカルボニル、フルオロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ハロアルコキシカルボニル、フルオロアルコキシカルボニル、アルケニルオキシカルボニル、アルキニルオキシカルボニル (a l k y n y l o x y c a r b o n y l)、アルキルカルボニルオキシ、ハロアルキルカルボニルオキシ、フルオロアルキルカルボニルオキシ、アルケニルカルボニルオキシ

40

50

シ、アルキニルカルボニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、ハロアルキルスルホニルオキシ、フルオロアルキルスルホニルオキシ、アルケニルスルホニルオキシ、アルキニルスルホニルオキシ、ハロアルコキシスルホニルオキシ、フルオロアルコキシスルホニルオキシ、アルケニルオキシスルホニルオキシ、アルキニルオキシスルホニルオキシ、アルキルスルフィニルオキシ、ハロアルキルスルフィニルオキシ、フルオルアルキルスルフィニルオキシ、アルケニルスルフィニルオキシ、アルキニルスルフィニルオキシ、アルコキシスルフィニルオキシ、ハロアルコキシスルフィニルオキシ、フルオロアルコキシスルフィニルオキシ、アルケニルオキシスルフィニルオキシ、アルキニルオキシスルフィニルオキシ、アミノスルフィニルオキシ、アミノ、アミド、アミノスルホニル、アミノスルフィニル、シアン、ニトロ、アジド、ホスフィニル、ホスホリル、シリル、シリルオキシ、及びアルキレン部分（例えば、メチレン）を介してヘテロシクリル基に結合された前記置換基のいずれかからなる群から独立に選択される1、2、3、4又は5個の置換基で任意選択により置換されていてもよい。

10

【0044】

用語「アリーレン」は、当技術分野で認識され、本明細書で使用する場合、上記で定義されたようなアリーレン環の2個の水素原子を除去することによって得られるジラジカルに関する。

用語「アリーラルアルキル」又は「アララルキル」は、本明細書で使用する場合、上記で定義されたようなアルキル基を介して親分子部分に付加された、本明細書で定義されるようなアリーレン基を意味する。

20

アララルキルの代表例としては、限定されるものではないが、ベンジル、2-フェニルエチル、3-フェニルプロピル、及び2-ナフト-2-イルエチルが挙げられる。

用語「ピアリアル」は、本明細書で使用する場合、アリーレン置換アリーレン、アリーレン置換ヘテロアリーレン、ヘテロアリーレン置換アリーレン又はヘテロアリーレン置換ヘテロアリーレンを意味し、アリーレン及びヘテロアリーレンは本明細書で定義される通りである。代表例としては、4-(フェニル)フェニル及び4-(4-メトキシフェニル)ピリジニルが挙げられる。

【0045】

用語「ヘテロアリーレン」は、本明細書で使用する場合、窒素、酸素、又は硫黄などの少なくとも1個のヘテロ原子を含む3～12個の原子を有する、限定されるものではないが、単環式、二環式及び三環式環を含む芳香環系のラジカルを含む。本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきでない例示の目的では：アミノベンズイミダゾール、ベンズイミダゾール、アザインドリル、ベンゾ(b)チエニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾキサゾリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾチアジアゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾオキサジアゾリル、フラニル、イミダゾリル、イミダゾピリジニル、インドリル、インドリニル、インダゾリル、イソインドリニル、イソキサゾリル、イソチアゾリル、イソキノリニル、オキサジアゾリル、オキサゾリル、プリニル、ピラニル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリジニル、ピリミジニル、ピロリル、ピロロ[2, 3-d]ピリミジニル、ピラゾロ[3, 4-d]ピリミジニル、キノリニル、キナゾリニル、トリアゾリル、チアゾリル、チオフェニル、テトラヒドロインドリル、テトラゾリル、チアジアゾリル、チエニル、チオモルホリニル、トリアゾリル又はトロパニル。本発明のヘテロアリーレン基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、ハロ、ハロアルキル、フルオロアルキル、ヒドロキシ、アルコキシ、アルケニルオキシ(alkyenyloxy)、アルキニルオキシ、カルボシクリルオキシ、ヘテロシクリルオキシ、ハロアルコキシ、フルオロアルキルオキシ、スルフヒドリル、アルキルチオ、ハロアルキルチオ、フルオロアルキルチオ、アルケニルチオ(alkyenylylthio)、アルキニルチオ、スルホン酸、アルキルスルホニル、ハロアルキルスルホニル、フルオルアルキルスルホニル、アルケニルスルホニル、アルキニルスルホニル、アルコキシスルホニル、ハロアルコキシスルホニル、フルオロアルコキシスルホニル、アルケニルオキシスルホニル、アルキニルオキシスルホニル(alkynyloxysulfonyl)、アミノスルホニル、スルフィン酸、アルキルスルフ

30

40

50

イニル、ハロアルキルスルフィニル、フルオルアルキルスルフィニル、アルケニルスルフィニル、アルキニルスルフィニル、アルコキシスルフィニル、ハロアルコキシスルフィニル、フルオロアルコキシスルフィニル、アルケニルオキシスルフィニル、アルキニルオキシスルフィニル (alkynyloxysulfinyl)、アミノスルフィニル、ホルミル、アルキルカルボニル、ハロアルキルカルボニル、フルオロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、カルボキシル、アルコキシカルボニル、ハロアルコキシカルボニル、フルオロアルコキシカルボニル、アルケニルオキシカルボニル、アルキニルオキシカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、ハロアルキルカルボニルオキシ、フルオロアルキルカルボニルオキシ、アルケニルカルボニルオキシ、アルキニルカルボニルオキシ、アルキルスルホニルオキシ、ハロアルキルスルホニルオキシ、フルオロアルキルスルホニルオキシ、アルケニルスルホニルオキシ、アルキニルスルホニルオキシ、ハロアルコキシスルホニルオキシ、フルオロアルコキシスルホニルオキシ、アルケニルオキシスルホニルオキシ、アルキニルオキシスルホニルオキシ、アルキルスルフィニルオキシ、ハロアルキルスルフィニルオキシ、フルオルアルキルスルフィニルオキシ、アルケニルスルフィニルオキシ、アルキニルスルフィニルオキシ、アルコキシスルフィニルオキシ、ハロアルコキシスルフィニルオキシ、フルオロアルコキシスルフィニルオキシ、アルケニルオキシスルフィニルオキシ、アルキニルオキシスルフィニルオキシ、アミノスルフィニルオキシ、アミノ、アミド、アミノスルホニル、アミノスルフィニル、シアノ、ニトロ、アジド、ホスフィニル、ホスホリル、シリル、シリルオキシ、及びアルキレン部分（例えば、メチレン）を介してヘテロアリール基に結合された前記置換基のいずれかからなる群から独立に選択される 0、1、2、3、4 又は 5 個の置換基で置換されている。

10

20

【0046】

用語「ヘテロアリーレン」は、当技術分野で認識され、本明細書で使用する場合、上記で定義されたようなヘテロアリール環の 2 個の水素原子を除去することによって得られるジラジカルに関する。

用語「ヘテロアリールアルキル」又は「ヘテロアラルキル」は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されるようなアルキル基を介して親分子部分に付加された、本明細書で定義されるようなヘテロアリールを意味する。ヘテロアリールアルキルの代表例としては、限定されるものではないが、ピリジン-3-イルメチル及び 2-（チエン-2-イル）エチルが挙げられる。

30

用語「縮合ビシクリル」は、本明細書で使用する場合、2 環がオルト縮合し、各環が 2 個の融合原子を含む合計 4、5、6 又は 7 個の原子（すなわち、炭素及びヘテロ原子）を含有し、且つ、各環は完全に飽和していてもよいし、1 以上の不飽和単位を含んでいてもよく、又は完全に不飽和であってもよい（例えば、場合によっては芳香族）、二環式環系のラジカルを意味する。疑念を避けるため、この縮合ビシクリルの不飽和度は、アリール又はヘテロアリール部分によるものではない。用語「ハロ」又は「ハロゲン」は、-Cl、-Br、-I 又は -F を意味する。

【0047】

用語「ハロアルキル」は、少なくとも 1 個の水素が本明細書に定義されるようなハロゲンで置換された、本明細書に定義されるようなアルキル基を意味する。ハロアルキルの代表例としては、限定されるものではないが、クロロメチル、2-フルオロエチル、トリフルオロメチル、ペンタフルオロエチル、及び 2-クロロ-3-フルオロペンチルが挙げられる。

40

用語「フルオロアルキル」は、水素の一部又は全てがフッ素で置換された、本明細書に定義されるようなアルキル基を意味する。

用語「ハロアルキレン」は、本明細書で使用する場合、上記で定義されたようなハロアルキル基の 2 個の水素原子を除去することによって得られるジラジカルに関する。

用語「ヒドロキシ」は、本明細書で使用する場合、-OH 基を意味する。

【0048】

用語「アルコキシ」は、本明細書で使用する場合、酸素原子を介して親分子部分に付加

50

された、本明細書に定義されるようなアルキル基を意味する。アルコキシの代表例としては、限定されるものではないが、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、及びヘキシルオキシが挙げられる。用語「アルケニルオキシ (alkenyloxy)」、「アルキニルオキシ」、「カルボシクリルオキシ」、及び「ヘテロシクリルオキシ」も同様に定義される。

用語「ハロアルコキシ」は、本明細書で使用する場合、少なくとも1個の水素が本明細書に定義されるようなハロゲンで置換された、本明細書に定義されるようなアルコキシ基を意味する。ハロアルコキシの代表例としては、限定されるものではないが、クロロメトキシ、2-フルオロエトキシ、トリフルオロメトキシ、及びペンタフルオロエトキシが挙げられる。用語「フルオロアルキルオキシ」も同様に定義される。

10

用語「アリアルオキシ」は、本明細書で使用する場合、酸素を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアリアル基を意味する。用語「ヘテロアリアルオキシ」は、本明細書で使用する場合、酸素を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなヘテロアリアル基を意味する。用語「ヘテロアリアルオキシ」も同様に定義される。

用語「アリアルアルコキシ」又は「アリアルアルキルオキシ」は、本明細書で使用する場合、酸素を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアリアルアルキル基を意味する。用語「ヘテロアリアルアルコキシ」も同様に定義される。アリアルオキシ及びヘテロアリアルアルコキシの代表例としては、限定されるものではないが、2-クロロフェニルメトキシ、3-トリフルオロメチルフェニルエトキシ、及び2, 3-ジメチルピリジニルメトキシが挙げられる。

20

【0049】

用語「スルフヒドリル」又は「チオ」は、本明細書で使用する場合、-SH基を意味する。

用語「アルキルチオ」は、本明細書で使用する場合、硫黄を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアルキル基を意味する。アルキルチオの代表例としては、限定されるものではないが、メチルチオ、エチルチオ、tert-ブチルチオ、及びヘキシルチオが挙げられる。用語「ハロアルキルチオ」、「フルオロアルキルチオ」、「アルケニルチオ (alkenylthio)」、「アルキニルチオ」、「カルボシクリルチオ」、及び「ヘテロシクリルチオ」も同様に定義される。

30

用語「アリアルチオ」は、本明細書で使用する場合、硫黄を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアリアル基を意味する。用語「ヘテロアリアルチオ」も同様に定義される。

用語「アリアルアルキルチオ」又は「アラルキルチオ」は、本明細書で使用する場合、硫黄を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアリアルアルキル基を意味する。用語「ヘテロアリアルアルキルチオ」も同様に定義される。

用語「スルホニル」は、本明細書で使用する場合、-S(=O)₂-基を指す。

用語「スルホン酸」は、本明細書で使用する場合、-S(=O)₂OHを指す。

【0050】

用語「アルキルスルホニル」は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されるようなスルホニル基を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアルキル基を意味する。アルキルスルホニルの代表例としては、限定されるものではないが、メチルスルホニル及びエチルスルホニルが挙げられる。用語「ハロアルキルスルホニル」、「フルオロアルキルスルホニル (fluoroalkylsulfonyl)」、「アルケニルスルホニル」、「アルキニルスルホニル」、「カルボシクリルスルホニル」、「ヘテロシクリルスルホニル」、「アリアルスルホニル」、「アラルキルスルホニル」、「ヘテロアリアルスルホニル」及び「ヘテロアラルキルスルホニル」も同様に定義される。

40

用語「アルコキシスルホニル」は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されるようなスルホニル基を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアルコキシ基を意味する。

50

アルコキシスルホニルの代表例としては、限定されるものではないが、メトキシスルホニル、エトキシスルホニル及びプロポキシスルホニルが挙げられる。用語「ハロアルコキシスルホニル」、「フルオロアルコキシスルホニル」、「アルケニルオキシスルホニル」、「アルキニルオキシスルホニル」、「カルボシクリルオキシスルホニル」、「ヘテロシクリルオキシスルホニル」、「アリールオキシスルホニル」、「アラルキルオキシスルホニル」、「ヘテロアリールオキシスルホニル」及び「ヘテロアラルキルオキシスルホニル」も同様に定義される。

【0051】

用語トリフリル、トシル、メシル、及びノナフリルは、当技術分野で認識され、それぞれトリフルオロメタンスルホニル、p-トルエンスルホニル、メタンスルホニル、及びノナフルオロブタンスルホニル基を指す。用語トリフラート、トシラート、メシラート、及びノナフラートは、当技術分野で認識され、それぞれ前記の基を含有するトリフルオロメタンスルホン酸エステル、p-トルエンスルホン酸エステル、メタンスルホン酸エステル、及びノナフルオロブタンスルホン酸エステル官能基及び分子を指す。

用語「アミノスルホニル」は、本明細書で使用する場合、スルホニル基を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアミノ基を意味する。

用語「スルフィニル」は、本明細書で使用する場合、 $-S(=O)-$ 基を指す。スルフィニル基は、スルホニル基に関して上記で定義された通りである。用語「スルフィン酸」は、本明細書で使用する場合、 $-S(=O)OH$ を指す。

用語「オキシ」は、 $-O-$ 基を指す。

用語「カルボニル」は、本明細書で使用する場合、 $-C(=O)-$ 基を意味する。

用語「チオカルボニル」は、本明細書で使用する場合、 $-C(=S)-$ 基を意味する。

用語「ホルミル」は、本明細書で使用する場合、 $-C(=O)H$ 基を意味する。

用語「アシル」は、本明細書で使用する場合、形態 $-C(=O)R$ のいずれの基又はラジカルも指し、ここで、Rは有機基である。アシル基の一例は、アセチル基($-C(=O)CH_3$)である。

【0052】

用語「アルキルカルボニル」は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されるようなカルボニル基を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアルキル基を意味する。アルキルカルボニルの代表例としては、限定されるものではないが、アセチル、1-オキソプロピル、2,2-ジメチル-1-オキソプロピル、1-オキソブチル、及び1-オキソペンチルが挙げられる。用語「ハロアルキルカルボニル」、「フルオロアルキルカルボニル」、「アルケニルカルボニル」、「アルキニルカルボニル」、「カルボシクリルカルボニル」、「ヘテロシクリルカルボニル」、「アリールカルボニル」、「アラルキルカルボニル」、「ヘテロアリールカルボニル」、及び「ヘテロアラルキルカルボニル」も同様に定義される。

用語「カルボキシ」は、本明細書で使用する場合、 $-CO_2H$ 基を意味する。

用語「アルコキシカルボニル」は、本明細書で使用する場合、本明細書に定義されるようなカルボニル基を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアルコキシ基を意味する。アルコキシカルボニルの代表例としては、限定されるものではないが、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、及びtert-ブトキシカルボニルが挙げられる。

【0053】

用語「ハロアルコキシカルボニル」、「フルオロアルコキシカルボニル」、「アルケニルオキシカルボニル」、「アルキニルオキシカルボニル」、「カルボシクリルオキシカルボニル」、「ヘテロシクリルオキシカルボニル」、「アリールオキシカルボニル」、「アラルキルオキシカルボニル」、「ヘテロアリールオキシカルボニル」、及び「ヘテロアラルキルオキシカルボニル」も同様に定義される。

用語「アルキルカルボニルオキシ」は、本明細書で使用する場合、酸素原子を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアルキルカルボニル基を意味する。

アルキルカルボニルオキシの代表例としては、限定されるものではないが、アセチルオキシ、エチルカルボニルオキシ、及びtert-ブチルカルボニルオキシが挙げられる。用語「ハロアルキルカルボニルオキシ」、「フルオロアルキルカルボニルオキシ」、「アルケニルカルボニルオキシ」、「アルキニルカルボニルオキシ」、「カルボシクリルカルボニルオキシ」、「ヘテロシクリルカルボニルオキシ」、「アリールカルボニルオキシ」、「アラルキルカルボニルオキシ」、「ヘテロアリールカルボニルオキシ」、及び「ヘテロアラルキルカルボニルオキシ」も同様に定義される。

【0054】

用語「アルキルスルホニルオキシ」は、本明細書で使用する場合、酸素原子を介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアルキルスルホニル基を意味する。用語「ハロアルキルスルホニルオキシ」、「フルオロアルキルスルホニルオキシ」、「アルケニルスルホニルオキシ」、「アルキニルスルホニルオキシ」、「アリールスルホニルオキシ」、「ヘテロアラルキルスルホニルオキシ」、「アルケニルオキシスルホニルオキシ」、「ヘテロシクリルオキシスルホニルオキシ」、「カルボシクリルスルホニルオキシ」、「アラルキルスルホニルオキシ」、「ハロアルコキシスルホニルオキシ」、「アルキニルオキシスルホニルオキシ」、「アリールオキシスルホニルオキシ」、「ヘテロシクリルスルホニルオキシ」、「ヘテロアリールスルホニルオキシ」、「フルオロアルコキシスルホニルオキシ」、「カルボシクリルオキシスルホニルオキシ」、「アラルキルオキシスルホニルオキシ」、「ヘテロアリールオキシスルホニルオキシ」及び「ヘテロアラルキルオキシスルホニルオキシ」も同様に定義される。

用語「アミノ」又は「アミン」は、本明細書で使用する場合、 -NH_2 並びにそれらの水素の一方又は両方がアルキル、ハロアルキル、フルオロアルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、アルキルカルボニル、ハロアルキルカルボニル、フルオロアルキルカルボニル、アルケニルカルボニル、アルキニルカルボニル、カルボシクリルカルボニル、ヘテロシクリルカルボニル、アリールカルボニル、アラルキルカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、ヘテロアラルキルカルボニル並びに上記で定義されるスルホニル及びスルフィニル基からなる群から選択される置換基で独立に置換された；又は両方の水素が一緒にアルキレン基で置換された場合の（窒素を含有する環を形成する）、その置換誘導体を指す。代表例としては、限定されるものではないが、メチルアミノ、アセチルアミノ、及びジメチルアミノが挙げられる。

【0055】

用語「アミド」は、本明細書で使用する場合、カルボニルを介して親分子部分に付加された、本明細書に定義されるようなアミノ基を意味する。

用語「シアノ」は、本明細書で使用する場合、 -CN 基を意味する。

用語「ニトロ」は、本明細書で使用する場合、 -NO_2 基を意味する。

用語「アジド」は、本明細書で使用する場合、 -N_3 基を意味する。

用語「ホスフィニル」又は「ホスフィノ」としては、本明細書で使用する場合、 -PH_3 並びにそれらの水素の1個、2個又は3個がアルキル、ハロアルキル、フルオロアルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、アルコキシ、ハロアルコキシ、フルオロアルキルオキシ、アルケニルオキシ、アルキニルオキシ、カルボシクリルオキシ、ヘテロシクリルオキシ、アリールオキシ、アラルキルオキシ、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアラルキルオキシ、及びアミノからなる群から選択される置換基で独立に置換されたその置換誘導体が含まれる。

【0056】

用語「ホスホリル」は、本明細書で使用する場合、 -P(=O)OH_2 並びにそれらのヒドロキシルの一方又は両方がアルキル、ハロアルキル、フルオロアルキル、アルケニル、アルキニル、カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアラルキル、アルコキシ、ハロアルコキシ、フルオロアルキルオキシ、アルケ

ニルオキシ、アルキニルオキシ、カルボシクリルオキシ、ヘテロシクリルオキシ、アリー
ルオキシ、アラルキルオキシ、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアラルキルオキシ、及びア
ミノからなる群から選択される置換基で独立に置換されたその置換誘導体を指す。

用語「シリル」は、本明細書で使用する場合、H 3 S iー並びにそれらの水素の1個、
2個又は3個がアルキル、ハロアルキル、フルオロアルキル、アルケニル、アルキニル、
カルボシクリル、ヘテロシクリル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、及びヘテロ
アラルキルから選択される置換基で独立に置換されたその置換誘導体を含む。代表例とし
ては、トリメチルシリル(TMS)、tert-ブチルジフェニルシリル(TBDPS)、
tert-ブチルジメチルシリル(TBS/TBDMS)、トリイソプロピルシリル(TIPS)、及び[2-(トリメチルシリル)エトキシ]メチル(SEM)が挙げられる
。

10

【0057】

用語「シリルオキシ」は、本明細書で使用する場合、酸素原子を介して親分子に付加さ
れた、本明細書に定義されるようなシリル基を意味する。

略号Me、Et、Ph、Tf、Nf、Ts、Ms、Cbz、及びBocはそれぞれ
メチル、エチル、フェニル、トリフルオロメタンスルホニル、ノナフルオロブタンスルホ
ニル、p-トルエンスルホニルメタンスルホニル、カルボベンジルオキシ、及びtert
-ブチルオキシカルボニルを表す。有機化学の熟練者が利用する略号の更なる総覧は、t
he Journal of Organic Chemistryの各巻の初号に見ら
れ、この一覧は一般に、Standard List of Abbreviation
sという名称の表に示されている。

20

「疾患に関連するタンパク質発現」とは、その病理が少なくとも部分的に不適当なタン
パク質発現(例えば、誤った時点及び/又は誤った細胞での発現)、過剰なタンパク質発
現又は変異型タンパク質の発現に関連している疾患又は障害を意味する。一実施形態では
、変異型タンパク質疾患は、変異型タンパク質が細胞、組織、又は器官の正常な生物活性
に干渉する場合に引き起こされる。

【0058】

「変異型タンパク質」とは、参照(野生型)タンパク質に比べてその一次構造、二次構
造又は三次構造に影響を及ぼす変化を有するタンパク質を意味する。

「増強する」とは、少なくとも約10%、15%、25%、50%、75%、又は10
0%の正の変化を意味する。

30

「低下する」とは、少なくとも約10%、25%、50%、75%、又は100%の負
の変化を意味する。

「選択的分解」とは、他のタンパク質には実質的に影響を及ぼさないように標的タンパ
ク質に優先的に影響を及ぼす分解を意味する。種々の実施形態において、分解されるのは
非標的タンパク質の約45%、35%、25%、15%、10%、又は5%未満である。

【0059】

UchL5(Uch37)は、基質をプロテアソーム分解に向かわせる前に働く脱ユビ
キチン化酵素である。UchL5は、基質遠位端においてユビキチン鎖を解離し(Lam
et al., (1997), Nature, 385, 737-740)、その
酵素活性は、それらを完全に除去するのではなく鎖を短縮する。マルチュビキチン鎖の長
鎖と短鎖を識別するプロテアソームの能力を増大させることが報告されている。

40

【0060】

UchL5ヌクレオチド及びアミノ酸配列(ヒト)
ヌクレオチド配列(Q9Y5K5)

ATGACGGGCAATGCCGGGAGTGGTGCCCTCATGGAAAAGCGACCCCGGGGTCTTCACCGAGCTCAT
TAAAGGATTTCGGTTGCCGAGGAGCCCAAGTAGAAGAAATATGGAGTTTAGAGCCTGAGAATTTTG
AAAAATTAAAGCCAGTTCATGGGTAAATTTTCTTTTCAAGTGGCAGCCAGGAGAAGAACCAGCA
GGCTCTGTGGTTTCAGGACTCCCGACTTGACACGATATTTTTTGCTAAGCAGGTAATTAATAATGC
TTGTGCTACTCAAGCCATAGTGAGTGTGTTACTGAACTGTACCCACCAGGATGTCCATTTAGGCG

50

AGACATTATCAGAGTTTAAAGAATTTTCACAAAAGTTTGTATGCAGCTATGAAAGGCTTGGCACTG
 AGCAATTCAGATGTGATTCGACAAGTACACAACAGTTTCGCCAGACAGCAAATGTTTGAATTTGA
 TACGAAGACATCAGCAAAAAGAAGATGCTTTTCACTTTGTCTAGTTATGTTCTGTAAATGGGA
 GACTGTATGAATTAGATGGATTAAAGAGAAGGACCGATTGATTTAGGTGCATGCAATCAAGATGAT
 TGGATCAGTGCAGTAAGGCCTGTCATAGAAAAAAGGATACAAAAGTACAGTGAAGGTGAAATTCG
 ATTTAATTTAATGGCCATTGTGTCTGACAGAAAAATGATATATGAGCAGAAAGATAGCAGAGTTAC
 AAAGACAACTTGCAGAGGAACCCATGGATACAGATCAAGGTAATAGTATGTTAAGTGCTATTTCAG
 TCAGAAGTTGCCAAAAATCAGATGCTTATTGAAGAAGAAGTACAGAAATTAAAAAGATACAAGAT
 TGAGAATATCAGAAGGAAGCATAATTATCTGCCTTTCATTATGGAATTGTTAAAGACTTTAGCAG
 AACACCAGCAGTTAATACCACTAGTAGAAAAAGGCAAAAAGAAAAACAGAACGCAAGAAAGCTCAG
 GAAACCAAATGA

10

アミノ酸配列

MTGNAGEWCLMESDPGVFTELIKGFGRGAQVEE IWSLEPENFEKLKPVHGLIFLFWQWP
 GEEPAGSVVQDSRLDTIFFAKQVINNACATQAIVSVLLNCTHQDVHLGETLSEFKEFSQS
 FDAAMKGLALSNSDVIRQVHNSFARQQMFEDTKTSAKEEDAFHFVSYPVNGRLYELDG
 LREGPIDLGACNQDDWISAVRPVIEKRIQKYSEGEIRFNLMAIVSDRKMIYEQKIAELQR
 QLAEELPMDTDQNSMLSAIQSEVAKNQMLIEEEVQKLKRYKIENIRRKHNYLPFIMELL
 KTLAEHQQLIPLVEKAKEKQNAKKAQETK

【0061】

「選択された標的タンパク質」は、当業者が細胞又は哺乳動物、例えば、ヒト対象において選択的に分解及び／又は阻害しようとするタンパク質である。本発明によれば、標的タンパク質の分解は、標的タンパク質が本明細書に示されるように二機能性分子に曝された際に起こる。標的タンパク質の分解は、その細胞においてタンパク質レベルを低下させ、標的タンパク質の作用を低減する。本発明が影響を与えるタンパク質レベルの制御は、病状又は病態の治療を提供し、それは標的タンパク質を介し、患者の細胞においてそのタンパク質のレベルを低下させることによって調整される。

20

「標的タンパク質結合パートナー」は、選択された標的タンパク質に結合するパートナーを指す。標的タンパク質結合パートナーは、標的タンパク質と選択的に結合する分子である。本発明による二機能性分子は、標的タンパク質が、二機能性分子が結合していない場合よりもタンパク質分解を受けやすいように十分な結合親和性で標的タンパク質に結合する標的タンパク質結合パートナーを含有する。

30

用語「選択された標的タンパク質」は、タンパク質分解の標的とされるように当業者により選択されるタンパク質を指す。

【0062】

用語「リンカー」は、その最も簡単な形態において、 $-CH_2-$ のリピートサブユニットを含むアルキルリンカーを指し、リピート数は1～50、例えば、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及び1～2である。用語「リンカー」は又、例えば、約1～50のエチレングリコールサブユニットを有する、エチレングリコール(C_2H_4O)のリピートサブユニットを含むポリエチレングリコール(PEG)リンカーも指し、例えば、リピート数は1～100、例えば、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及び1～2である。「リンカー」は、標的タンパク質結合パートナーとUchL5結合パートナーが特定の距離内にあるような長さ及びフレキシビリティのものであることが望まれる。例えば、本発明の二機能性分子の、リンカーによって連結されたUchL5結合パートナーと標的タンパク質結合パートナーは、18～95 Å、例えば、2～4のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には18～25 Å、4～6のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には25～33 Å、6～8のエチレングリコールサブユニットを含むリ

40

50

ンカーの場合には33～39 Å、8～12のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には39～53 Å、及び12～24のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には53～95 Åの距離だけ離れてよい。一実施形態では、本発明の二機能性分子の、リンカーによって連結されたU c h L 5結合パートナーと標的タンパク質結合パートナーは、7～80原子、例えば、2～4のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には7～13原子、4～6のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には13～19原子、6～8のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には19～25原子、8～12のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には25～41原子、及び12～24のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には41～80原子の距離だけ離れてよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、単一原子、例えば、 $-CH_2-$ 又は $-O-$ である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ペプチドリinkerである。

10

【0063】

本発明のリンカーは、リンカー中の回転可能な結合の数に相当するフレキシビリティを有し得る。回転可能な結合は、非末端重原子に結合した一重の非環結合と定義される。アミド(C-N)結合は、高い回転エネルギー障壁のために回転可能とは考えられない。本発明は、特定のフレキシビリティ度又はフレキシビリティ範囲を有するリンカーを提供する。このようなリンカーは、リンカーのフレキシビリティを低減するために環、二重結合及びアミドを含めることによって設計することができる。高いフレキシビリティ度を有するリンカーは、非置換PEG又はアルキルリンカーであろう。

20

本発明は又、プロドラッグも含む。本明細書で使用する場合、用語「プロドラッグ」は、*in vivo*で何らかの生理学的化学プロセスによって親薬物に変換される薬剤を指す(例えば、プロドラッグは、生理学的pHになった際に所望の薬物形態に変換される)。プロドラッグは、場合によっては親薬物よりも投与が容易であり得るので有用である場合が多い。プロドラッグは、例えば、経口投与によってバイオアベイラビリティがあり得るが、親薬物には無い。プロドラッグは又、医薬組成物の溶解度が親薬物よりも改善されている場合がある。プロドラッグの例は、限定されるものではないが、水溶性が有益でない細胞膜の伝達を促進するためにエステル(「プロドラッグ」)として投与されるが、次に、水溶性が有益である細胞内に入ると代謝的に加水分解されてカルボン酸となるという本発明の化合物である。プロドラッグは、多くの有用な特性を有する。例えば、プロドラッグは、最終的な薬物よりも水溶性が高く、それにより薬物の静脈内投与を容易にし得る。プロドラッグは又、最終的な薬物よりも高いレベルの経口バイオアベイラビリティを有し得る。投与後、プロドラッグは、血液又は組織中に最終的な薬物を送達するために酵素的又は化学的に開裂される。

30

【0064】

例示的プロドラッグは、開裂時に対応する遊離酸を遊離し、本発明の化合物のこのような加水分解可能なエステル形成残基としては、限定されるものではないが、フリー水素が(C i-C 4)アルキル、(C 2-C i 2)アルカノイルオキシメチル、(C 4-C 9)1-(アルカノイルオキシ)エチル、5～10個の炭素原子を有する1-メチル-1-(アルカノイルオキシ)-エチル、3～6個の炭素原子を有するアルコキシカルボニルオキシメチル、4～7個の炭素原子を有する1-(アルコキシカルボニルオキシ)エチル、5～8個の炭素原子を有する1-メチル-1-(アルコキシカルボニルオキシ)エチル、3～9個の炭素原子を有するN-(アルコキシカルボニル)アミノメチル、4～10個の炭素原子を有する1-(N-(アルコキシカルボニル)アミノ)エチル、3-フタリジル、4-クロトノラクトニル、 γ -ブチロラクトン-4-イル、ジ-N, N-(C i-C 2)アルキルアミノ(C 2-C 3)アルキル(例えば、ジメチルアミノエチル)、カルバモイル(carbamoyl)-(C i-C 2)アルキル、N, N-ジ(C i-C 2)-アルキルカルバモイル(alkyl carbamoyl)-(C i-C 2)アルキル及びピペリジノー、ピロリジノー又はモルホリノ(C 2-C 3)アルキルにより置換されているカルボン酸置換基(例えば、 $-C(O)_2H$ 又はカルボン酸含有部分)が含まれる。

40

50

他の例示的プロドラッグは、ヒドロキシル又はアミン置換基のフリー水素が（C1-C6）アルカノイルオキシメチル、1（（C1-C6）アルカノイルオキシ）エチル、1-メチル（methyl）-1,4（C1-C6）アルカノイルオキシ）エチル、（C1-C6）アルコキシカルボニル-オキシメチル、N-（C1-C6）アルコキシカルボニルアミノ-メチル、スクシノイル、（C1-C6）アルカノイル、 α -アミノ（C1-C4）アルカノイル、アリールアシル（aryls）及び α -アミノアシル、又は α -アミノアシル- α -アミノアシル（ここで、前記 α -アミノアシル部分は独立に、タンパク質に見られる天然L-アミノ酸のいずれかである）、 $-P(O)(OH)_2$ 、 $-P(O)(O(C1-C6)アルキル)_2$ 又はグリコシル（炭水化物のヘミアセタールのヒドロキシルの脱離から生じるラジカル）により置換されている、本発明の化合物のアルコール又はアミンを遊離する。

10

【0065】

「保護基」という句は、本明細書で使用する場合、潜在的に反応性のある官能基を望まない化学変換から保護する一時的置換基を意味する。このような保護基の例としては、カルボン酸のエステル、アルコールのシリルエーテル、並びにアルデヒド及びケトンそれぞれのアセタール及びケタールが挙げられる。保護基化学の分野は総説されている（Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1991）。本発明の化合物の保護形態も本発明の範囲に含まれる。

20

用語「化学的に保護された形態」は、本明細書で使用する場合、1以上の反応性官能基が望ましくない化学反応から保護される、すなわち、保護された基又は保護基（マスクされた基又はマスキング基としても知られる）の形態にある化合物に関する。このような基は化学的に保護された形態で有効化合物を調製、精製する及び／又は取り扱うために便利な又は望ましいものであり得る。

【0066】

反応性官能基を保護することにより、他の保護されていない反応性官能基を含む反応は、保護された基に影響を及ぼすことなく遂行でき、保護基は通常、その分子の残りの部分に実質的に影響を及ぼすことなく、後の工程で除去され得る。例えば、*Protective Groups in Organic Synthesis*（T. Greene and P. Wuts, Wiley, 1991）、及び*Protective Groups in Organic Synthesis*（T. Greene and P. Wuts; 第3版; John Wiley and Sons, 1999）を参照。

30

例えば、ヒドロキシ基は、エーテル（-OR）又はエステル（-OC(=O)R）として、例えば、*t*-ブチルエーテル；ベンジル、ベンズヒドリル（ジフェニルメチル）、又はトリチル（トリフェニルメチル）エーテル；トリメチルシリル又は*t*-ブチルジメチルシリルエーテル；又はアセチルエステル（-OC(=O)CH₃、-OAc）として保護され得る。

例えば、アルデヒド又はケトン基はそれぞれアセタール又はケタールとして保護することができ、この場合、カルボニル基（C(=O)）が、例えば第1級アルコールとの反応によってジエーテル（C(OR)₂）に変換される。このアルデヒド又はケトン基は、酸の存在下で大過剰の水を用いる加水分解によって容易に再生される。

40

【0067】

例えば、アミン基は、例えば、アミド（-NRC(=O)R）又はウレタン（-NRC(=O)OR）として、例えば、メチルアミド（-NHC(=O)CH₃）；ベンジルオキシアミド（-NHC(=O)OCH₂C₆H₅NHCbz）；*t*-ブトキシアミド（-NHC(=O)OC(CH₃)₃、-NHBoc）；2-ビフェニル-2-プロポキシアミド（-NHC(=O)OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅NHBoc）、9-フルオレニルメトキシアミド（-NHFmoc）、6-ニトロベラトリルオキシアミド（-NH

50

N v o c)、2-トリメチルシリルエチルオキシアミド(−NH T e o c)、2, 2, 2-トリクロロエチルオキシアミド(−NH T r o c)、アリルオキシアミド(−NH A l l o c)、2-(フェニルスルホニル)エチルオキシアミド(−NH P s e c)として; 又は好適な場合には(例えば、環式アミン)、ニトロキシドラジカルとして保護され得る。

例えば、カルボン酸基は、エステル又はアミドとして、例えば、ベンジルエステル; t-ブチルエステル; メチルエステル; 又はメチルアミドとして保護され得る。例えば、チオール基は、チオエーテル(−S R)として、例えば、ベンジルチオエーテル; 又はアセトアミドメチルエーテル(−S C H 2 N H C (=O) C H 3)として保護され得る。

化学保護基の開裂又は加水分解によって活性化されるプロドラッグのいくつかの代表例を以下に示す。

【0068】

低酸素症活性化プロドラッグ

本発明のプロドラッグは又、低酸素活性化プロドラッグも含み得る。低い酸素(低酸素)の領域は、病的状態、細菌感染及び腫瘍環境を含む多様な範囲の生物学的状況において生じる。腫瘍発達の際、代謝が活発な腫瘍細胞の数が多いために、酸素供給はすぐに成長制限因子となる。不十分な酸素供給の問題に応答して、腫瘍の脈管構造を作り出すために血管新生のプロセスが開始される。しかしながら、この脈管構造は多くの異常な特徴を有し、それは腫瘍をなんとか維持するものの、その結果として低酸素領域も生じ、その領域では、腫瘍細胞のうち最も攻撃的な画分だけが生き残ることができる。これらの低酸素領域は機能的血管から $>100\mu\text{m}$ の距離で生じ、それらは慢性及び急性の両方であり得る。低酸素細胞は、細胞の死滅に必要とされる放射線により誘導されるDNA損傷は酸素依存的に起こるので、放射線療法に耐性がある。低酸素細胞は最も攻撃的な腫瘍画分を含み、それらの細胞は、患者の予後の改善を図って治療するために最も重要である。本発明のプロドラッグは、本発明の薬物化合物をこれらの治療が困難な腫瘍領域に標的化するために低酸素と及び酸素正常状態の間の化学的環境の実質的な違いを利用する。

【0069】

本明細書で使用する場合、用語「低酸素活性化プロドラッグ(Hypoxia activated prodrug)」又は「HAP」は、プロドラッグが対応する薬物に比べて活性が低いか又は不活性であり、且つ、薬物と1以上の生体還元性基を含むプロドラッグを指す。HAPには、限定されるものではないが、単電子移動酵素(例えば、シトクロムP450レダクターゼ)及び二電子移動(又は水素移動)酵素を含む多様な還元剤及び還元酵素によって活性化されるプロドラッグが含まれる。いくつかの実施形態では、HAPは、2-ニトロイミダゾール誘発性低酸素活性化プロドラッグである。HAPの例としては、限定されるものではないが、TH-302及びTH-281が挙げられる。TH-302を合成する方法は、本明細書の一部として援用される米国特許出願第2010/0137254号及び同第2010/0183742号明細書に記載されている。

【0070】

本発明の標的薬は、当業者に周知の技術を使用することによって容易に低酸素活性化プロドラッグに変換され得る。例えば、O'Connorらは、Chk1及びオーロラAキナーゼ阻害剤の低酸素感受性プロドラッグが、既知のChk1及びオーロラAキナーゼ阻害剤に生体還元性4-ニトロベンジル基を付加することによって作出され、それにより、適切な化合物を低酸素領域に標的化するという目標を達成し得ることを示した。多くの低酸素活性化プロドラッグが、生体還元性官能基として1-メチル-2-ニトロイミダゾール基を使用している。5つの異なる化学部分、すなわち、ニトロ基、キノン、芳香族N-オキシド、脂肪族N-オキシド及び遷移金属が、生体還元感受性があると特定されている。それらの広い使用を考えれば、ニトロアリール系化合物が生体還元性プロドラッグの開発に最も使用しやすいものである。4-ニトロベンジル及び1-メチル-2-ニトロイミダゾール基に加え、ニトロフランベースの基及びニトロチオフエンベースの基も生体還元性化合物の基礎として使用されてきた。基本的に、どの生体還元性基を使用するか選

択する場合に最も重要な考慮事項は、生体還元を受けるその性質とこのプロセスが起こる酸素濃度である。加えて、良好な脱離基となる薬物成分の性質は、プロドラッグからのその遊離速度に役割を持つ。4-ニトロベンジル、ニトロフランベースの基及びニトロチオフェンベースの基を生物学的に有効な化合物に付着させるために必要な試薬は、商業的供給者から容易に入手可能である。O'Connorらは又、生物学的に有効な化合物に付着させるための有用な合成ハンドルを用いてある範囲の誘導体を合成するために最適化プロトコールも記載している(O'Connor et al., Nat Protoc. 2016 Apr; 11(4): 781-94, その内容は全て本明細書の一部として援用される)。

【0071】

Sunら(Clin Cancer Res. 2012 Feb 1; 18(3): 758-70, その内容は全て本明細書の一部として援用される)は、最適な低酸素活性化プロドラッグのための設計基準を記載し、それには十分な腫瘍送達及び浸透を確保するための薬物動態特性；酸素濃度非依存性活性化又は不活化レダクターゼに対する安定性；重度低酸素の腫瘍組織でのみ活性化し、中等度低酸素の正常組織では活性化しない高い低酸素選択性；及びプロドラッグを活性化させるには十分低酸素状態でない隣接腫瘍細胞も、拡散性のエフェクター部分によってやはり標的化されるバイスタンダー効果が含まれる。プロドラッグのいくつかの初期の例(Some early examples are pro-drugs)としては、ポルフィロマイシンなどのキノン生体還元薬、チラパザミンなどのN-オキシド、及びCI-1010などのニトロ芳香族薬剤が含まれる。臨床試験が進んだプロドラッグのいくつかの例としては、チラパザミン、PR104、AQ4N、及びTH-302(28-31)が含まれる。TH-302(1-メチル-2-ニトロ-1H-イミダゾール5-イル)N, N0-ビス(2-プロモエチル)ジアミドホスフェートは、臭素化型イソホスホルアミドマスタードの2-ニトロイミダゾール連結プロドラッグである。TH-302の2-ニトロイミダゾール部分は、細胞内1電子還元酵素の基質であり、重度の低酸素条件下で還元された場合にBr-IPMを遊離する。ヒト癌細胞株を用いるin vitro細胞傷害性アッセイ及びクローン原性アッセイは、TH-302が酸素正常条件下ではほとんど細胞傷害活性がなく、低酸素条件下では細胞傷害効力を大幅に増強したことを示す。TH-302のニトロイミダゾール部分は、発明のプロドラッグ化合物を作出するために標的薬化合物に組み込むことができる。

【0072】

Rui Zhuら(J. Med. Chem. 2011, 54, 7720-7728; その内容は全て本明細書の一部として援用される)は、低酸素活性化プロドラッグ化合物の開発のための部分としての4-ニトロベンジルオキシカルボニル誘導体の使用を記載している。Rui Zhuらは、低酸素感受性又は低酸素活性化プロドラッグを作出するために標的薬と結合させることができる3つの異なる部分を開示している。それには、4-ニトロベンジル(6-(ベンジルオキシ)-9H-プリン-2-イル)カルバマート(1)及びそのモノメチル(2)及びgem-ジメチル類似体が含まれる。Rui Zhuらは又、プロドラッグの作出に使用される部分を選択するための望ましい特性について教示している。それらは(a)ニトロ基の還元の容易さ及び程度、(b)側鎖に対するニトロ基の適切な位置、及び(c)CO結合のフラグメンテーションの容易さ(ここで、ニトロ基がヒドロキシルアミノ又はアミノ官能基に変換されると、Cはベンジル炭素となる)を含む。

腫瘍微小環境に見られる低酸素状態によって活性化されるプロドラッグのいくつかの代表例を以下に示す。

【0073】

pH感受性プロドラッグ

本発明のプロドラッグは又、pH感受性プロドラッグも含み得る。本明細書で使用する場合、用語「pH感受性プロドラッグ」は、プロドラッグが対応する薬物に比べて活性が低いか又は不活性であり、且つ、薬物及び1以上のpH不安定性基を含むプロドラッグを

指す。pH感受性プロドラッグは、酸性微小環境に曝されるとpH不安定性基の開裂を受け、それにより、標的薬を活性化し、部位指定遊離を促進する。pH感受性プロドラッグは、1以上のpH感受性部分と治療薬を含む経口投与に適合した胃保持特性を含んでよく、このpH感受性部分は、小腸又は酸性腫瘍微小環境又はエンドソーム若しくはリソソーム環境の高いpH（約pH5）で治療標的薬の放出を可能とする。

pH誘導性の薬物放出は、癌に対する卓越したタイプの療法であり、集中的に開発されてきた。癌細胞のエンドソーム内のpH値（pH5.0～6.5）及びリソソーム内のpH値（pH4.5～5.0）は、7.4の生理学的pHよりも酸性であることがよく知られている。pH感受性結合の導入によって、標的薬はポリマー主鎖にコンジュゲートさせることができ、これが癌細胞に内部移行された際にリザーバーとして働き得る。分解時、治療用弾頭がそのままその元の活性形態で放出され、治療効果を及ぼし得る。

10

【0074】

近赤外線（NIR）を用いた光温熱療法（Photothermal therapy）（PTT）は、癌組織の破壊に複合的效果を提供するための化学療法の有力な補助と考えられてきた。加えて、PTTから発生する熱は、細胞代謝及び細胞膜の透過性を高めることができ、これが癌細胞の薬物取り込みを促進して治療効果を高める。

本発明の標的薬は、当業者に周知の技術を使用することにより、pH感受性プロドラッグに容易に変換させることができる。例えば、Sunら（Mol. Pharmaceutics 2018, 15, 3343-3355; その内容は全て本明細書の一部として援用される）は、DOX（ドキソルビシン）及びSN38（7-エチル-10-ヒドロキシルカンプトテシン）を癌細胞に同時送達するための無積載のpH応答性ナノメディシンを作製するための簡単な方法を記載している。この無積載ナノメディシンは、プロドラッグ（PEG-CH=N-DOX）及びSN38から構成された。PEGとDOXの間のpH感受性部分又はイミンリンカーは、酸性条件で急速な薬物放出を促進した。このようなpH感受性プロドラッグは、有効な細胞取り込み能、高い腫瘍浸透力、並びに血管透過性・滞留性亢進（enhanced permeability and retention）（EPR）効果を介して増強された受動的標的化力を発揮する。このようなpH感受性イミンリンカーは、当業者に知られた標準的な合成化学法を用いてpH感受性プロドラッグを作出するために本発明の標的薬と結合させることができる。

20

【0075】

同様に、Zhangら（European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 128 (2018) 260-271, その内容は全て本明細書の一部として援用される）は、NIR誘発性化学-光温熱共同療法のためのpH感受性プロドラッグコンジュゲートポリドーパミンを記載している。化学療法と光温熱療法（PTT）の組合せは、腫瘍の有効な医学的処置に極めて望ましいことを示す。Zhangらは、カンプトテシン（CPT）含有ポリマープロドラッグ（PCPT）が、可逆的付加-開裂移動（reversible addition-fragmentation transfer）（RAFT）法を用いたpH感受性カンプトテシン（CPT）プロドラッグモノマーとMPCの重合によって作製され得ることを教示している。pH感受性ポリマープロドラッグは、化学療法と光温熱療法の組合せのためのアミド化化学によってポリドーパミン（PDA）ナノ粒子の表面に係留された。酸性微小環境において多官能性ナノ粒子から急速に放出される活性型のCPTは、二官能性シリルエーテル結合の開裂によるものである。一方、PDAは近赤外線（NIR）エネルギーを高い効率で熱に変換することができ、これにより、得られたナノ粒子は光温熱療法の有効なプラットフォームとなる。in vitro分析により、PDA@PCPTナノ粒子がHeLa細胞によって有効に取り込まれ、CPTを癌細胞の核に送達できたことが確認された。細胞生存アッセイでは、808nmの光照射下でHeLa癌細胞への明白なin vitro細胞傷害性が示された。又、PDA@PCPTナノ粒子から提供された併用療法で、担癌マウスモデルにおいて有意な腫瘍退縮も見られた。

30

40

【0076】

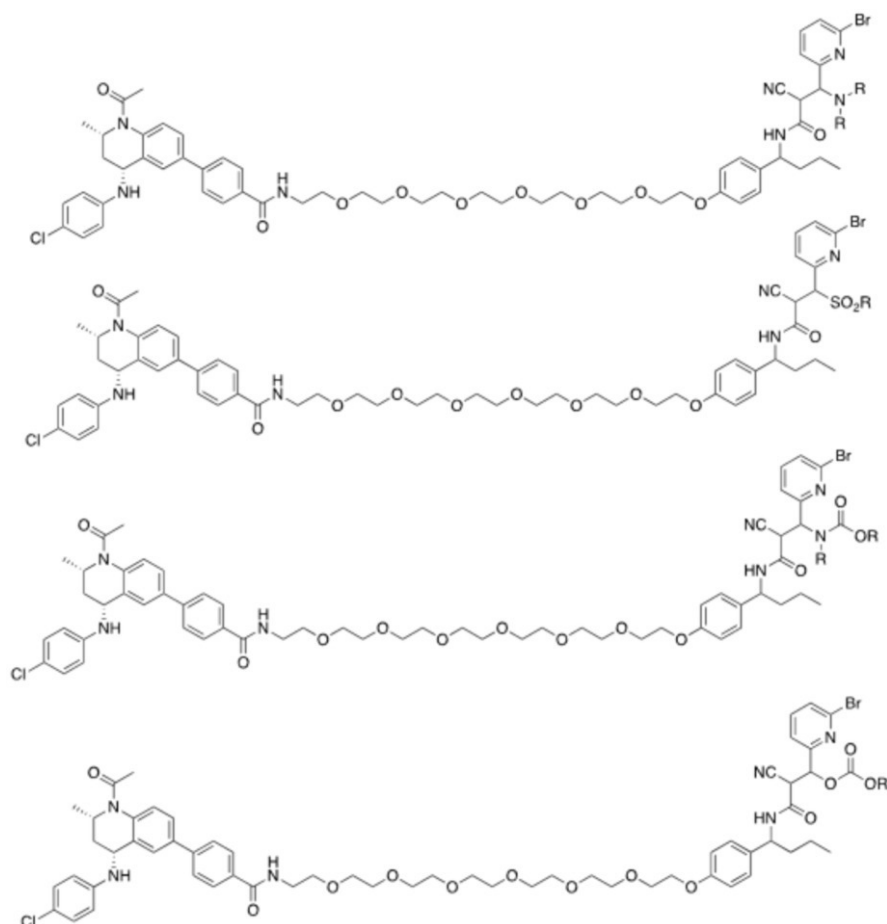
50

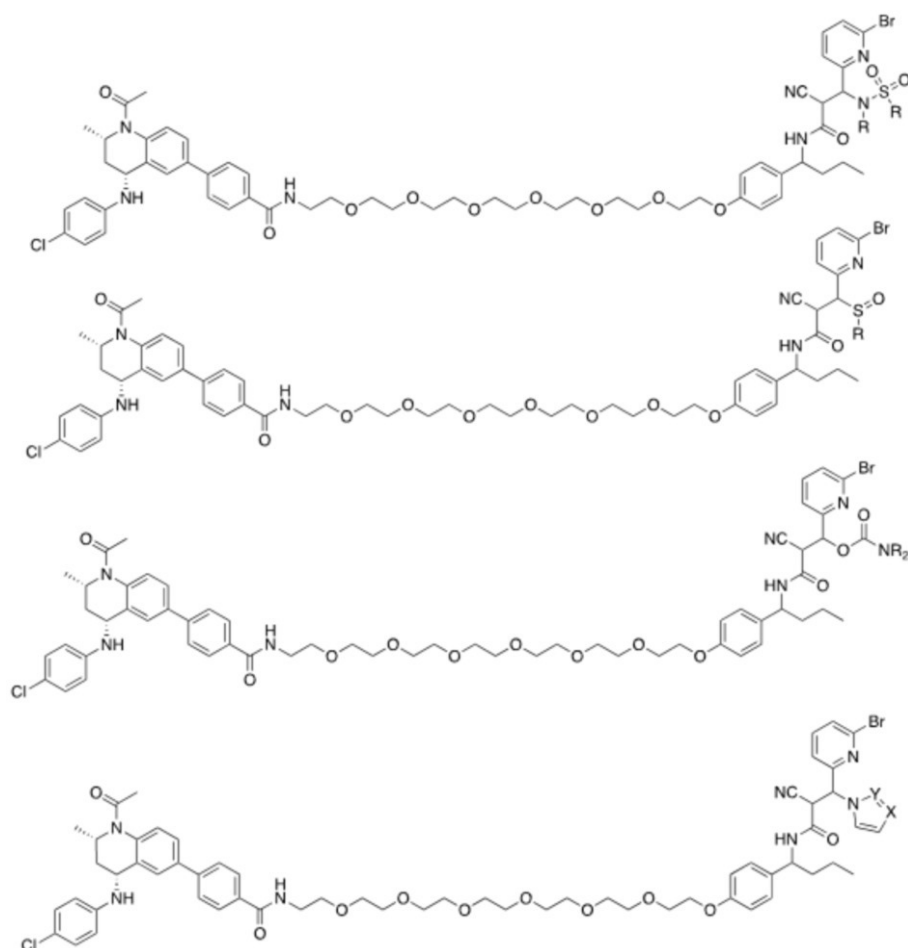
本発明の標的薬から作出された本発明のpH感受性プロドラッグは、以下の明瞭な特徴を示す。(1)プロドラッグに基づくポリマーソームは早期放出の問題を回避すること；(2)薬物担体の役割を果たす他、PDAコアは固有の光安定性及び優れた光熱変換効率を有すること；(3)本発明の標的薬は低pH下、特に癌細胞の微小環境下で開裂され得るpH感受性シリルエーテル結合を介してポリマーに連結されること；及び(4)形成された局部的高体温と放出された薬物が共同して癌細胞を死滅させ、腫瘍成長を抑制すること。よって、当業者は、当業者に公知の標準的な合成化学法を用い、シリルエーテル結合又はイミンリンカーのようなpH不安定性リンカー又はpH不安定性部分を標的薬に付着させることによってpH感受性プロドラッグを作製することができる。

【0077】

腫瘍微小環境又はリソソーム又はエンドソームに見られるpH変化によって活性化されるプロドラッグのいくつかの代表例を以下に示す。プロドラッグの他の例は、性化された二重結合(マイケルアクセプターとして)が代謝の活性化と結びついていることを示し得る。例としては、マンニツヒ塩基、βスルホン、スルホキシド又はスルホンアミド誘導体、βカルバマート及びカーボネート誘導体並びに電子吸引基に対してβの他の脱離基が挙げられる。

【化20】





10

20

【0078】

用語「患者」及び「対象」は、本明細書を通して、本発明による組成物を用いた予防的処置を含む処置が提供される哺乳動物、特定の実施形態では、ヒト又は飼育動物を表すために互換的に使用される。本発明の特定の実施形態では、患者という用語は、そうではないことが述べられない限り、又はこの用語の使用の文脈から暗に示されない限り、ヒト患者を指す。

30

用語「有効な」は、その意図される使用の文脈内で使用される場合に意図される結果を果たす化合物、組成物又は成分の量を表すために使用される。有効という用語は、本願に記載又は使用されているもの以外の全ての有効量又は有効濃度を包含する。

そうではないことが定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者により一般に理解されている意味を有する。以下の参考文献は、本発明で使用する用語の多くの一般定義を熟練者に示す：Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第2版 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker編, 1988); The Glossary of Genetics, 第5版, R. Rieger et al. (編), Springer Verlag (1991); 及びHale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書で使用する場合、以下の用語は、そうではないことが明示されない限り、下記でそれらに与えられた意味を有する。

40

【0079】

ある範囲の値が示される場合、文脈がそうではないことを明らかに示さない限り、その範囲の上限と下限の間の、下限の単位の10分の1までの各中間値（例えば、ある数の炭素原子を含有する基の場合、この場合、その範囲内に入る各炭素原子数が示される）、及

50

びこの記載の範囲内のその他の記載される任意の値又は中間値が本発明に包含されると理解される。これらの小さい範囲の上限及び下限は、記載される範囲に具体的に排除される限界がない限り、この小さい範囲に独立に含めることができ、それも又本開示の範囲に含まれる。記載される範囲が、一方又は両方の限界を含む場合は、これらの含まれる限界の一方又は両方を排除する範囲も本開示に含まれる。

本発明は以下の発明の詳細な説明及びそこに含まれる実施例を参照すればより容易に理解することができる。

本明細書に記載される全ての刊行物は、それらの刊行物が引用されている方法及び／又は材料を開示及び説明するために本明細書の一部として援用される。本明細書に述べられている刊行物は、本願の出願日前にそれらの開示が提供されているに過ぎない。本明細書において、先行発明であると理由でそのような刊行物に先行する権利が本発明にないことを認めたものと解釈されるべきでない。更に、本明細書に示される刊行物の日付は実際の出版日とは異なる場合があり、独自に確認する必要がある場合がある。

【0080】

U c h L 5 結合パートナー

本発明のU c h L 5 結合パートナーは、1 p M～1 m Mの範囲、又は1 0 0 n M～1 0 0 μ M、1 0 0 n M～1 μ M、1 0 0 n M～1 0 μ M、1 0 n M～1 0 0 μ M、1 0 n M～5 0 μ M、1 0 n M～1 0 μ M、1 0 n M～5 μ M、1 0 n M～1 μ M、1 0 n M～1 0 0 n M、1 n M～1 0 0 μ M、1 n M～1 0 μ M、1 n M～1 μ M、1 n M～1 0 0 n M、1 n M～1 0 n M、1 μ M～1 0 0 μ M、及び1 μ M～1 0 μ Mの部分範囲のI C 5 0でU c h L 5に結合する。I C 5 0は、当技術分野で周知の方法、例えば、ユビキチン-ローダミン1 1 0加水分解アッセイに従って決定される。

本発明のU c h L 5 結合パートナーとU c h L 5のK dは、1 p M～1 m Mの範囲、又は1 0 0 n M～1 0 0 μ M、1 0 0 n M～1 μ M、1 0 0 n M～1 0 μ M、1 0 n M～1 0 0 μ M、1 0 n M～5 0 μ M、1 0 n M～1 0 μ M、1 0 n M～5 μ M、1 0 n M～1 μ M、1 0 n M～1 0 0 n M、1 n M～1 0 0 μ M、1 n M～1 0 μ M、1 n M～1 μ M、1 n M～1 0 0 n M、1 n M～1 0 n M、1 μ M～1 0 0 μ M、及び1 μ M～1 0 μ Mの部分範囲である。K dは、結合を直接評価するための当技術分野で周知の方法、例えば、等温熱量測定（I T C）及び表面プラズモン共鳴（S P R）に従って決定される。

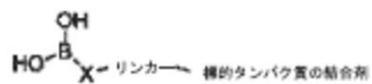
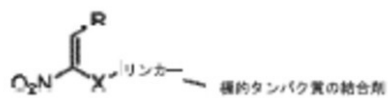
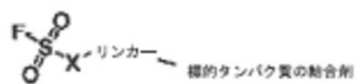
U c h L 5 結合パートナーとU c h L 5の結合は可逆的であり得る。

U c h L 5 結合パートナーとU c h L 5の結合は、不可逆的であり得る。

【0081】

以下に示す構造が、本発明による二機能性分子を作製するための第1の結合パートナーと第2の結合パートナーの共有結合を可能とする：以下に示される構造において、XはU c h L 5 結合パートナーを表す。

【化 2 1】



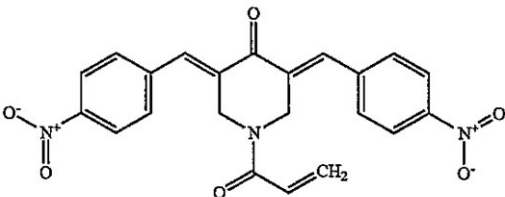
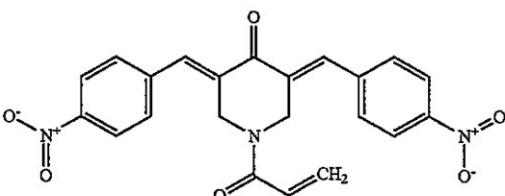
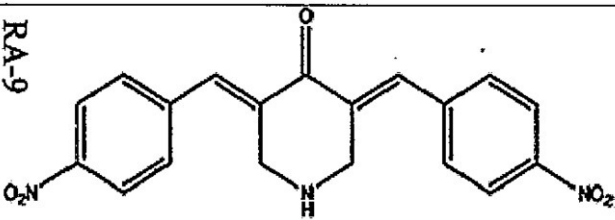
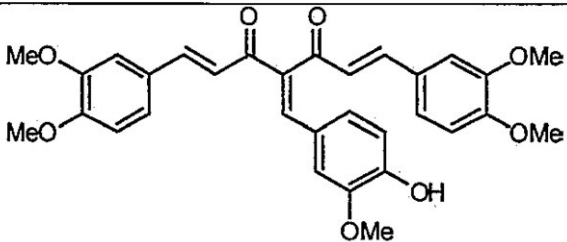
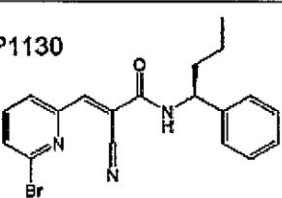
10

20

30

40

【表 1】

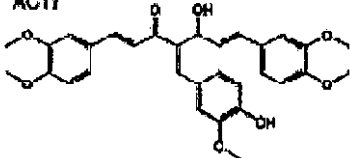
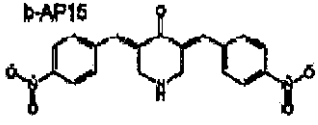
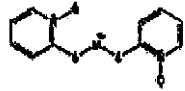
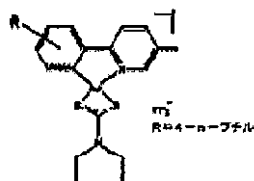
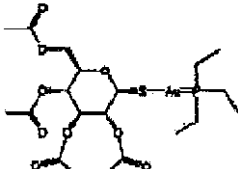
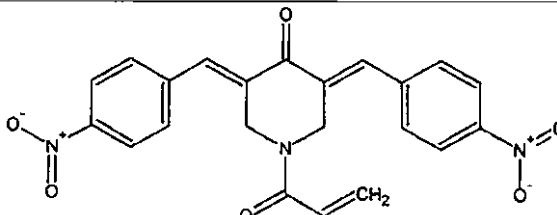
刊行物	開示化合物
米国特許出願公開第2014/0370528号明細書	 b-AP15 (NSC687852)
米国特許第9856511号	 b-AP15 (NSC687852)
Coughlin et al. Clin Cancer Res. 2014 Jun 15; 20(12): 3174-86.	 RA-9
Zhou et al. Mol Cancer Ther. 2013 Aug; 12(8): 1381-92.	 WP1130
Chen et al. Cancer Metastasis Rev. 2017 Dec; 36(4): 655-668.	 WP1130

10

20

30

40

	AC17  D-AP15  「金属」PT (M=Cu, Zn, Pt, Ni)  AJIII  オーラノフィン 
国際公開第20 1305869 1号明細書	

10

20

30

【0082】

本発明は又、UchL5と結合する所望の生物活性を示す限り、抗UchL5抗体抗体及びこれらのフラグメント、Fv抗体、ダイアボディ、シングルドメイン抗体、例えば、VH及び／又はVLドメイン抗体、及び抗体フラグメントであるUchL5結合パートナーを提供する。抗体は、例えば、無傷免疫グロブリンとして又は種々のペプチダーゼでの消化によって作製された十分に特性決定されたいくつかのフラグメントとして存在する。よって、例えば、ペプシンは、抗体をヒンジ領域のジスルフィド結合で消化してFabの二量体であるF(ab)′₂を生成し、Fabはそれ自体、軽鎖とV_H-C_{H1}がジスルフィド結合により連結したものである。F(ab)′₂は、ヒンジ領域のジスルフィド結合を破断するために温和な条件下で還元することができ、それにより、F(ab)′₂二量体がFab′単量体に変換する。Fab′単量体は、ヒンジ領域の一部を伴う、本質的にはFabである(Fundamental Immunology (Paul ed., 第3版 1993参照)。種々の抗体フラグメントが無傷抗体の消化の点から定義されるが、当業者は、そのようなフラグメントは化学的に又は組換えDNA法を用いてdenovo合成可能であることを認識するであろう。よって、抗体という用語は又、本明

40

50

細書で使用する場合、完全な抗体の修飾により生成された抗体フラグメント、又は組換えDNA法を用いて *de novo* 合成されたもの（例えば、一本鎖Fv）又はファージディスプレイライブラリーを用いて特定されたもの（例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990) 参照）を含む。

【0083】

標的タンパク質結合パートナーに連結された、UchL5に結合する抗体を含む二機能性分子は、当技術分野で公知の、例えば、Tsuchikama et al., (2018, Protein Cell, 9(1): 33-46) に示されているような方法に従って作製することができる。

本発明において有用な抗UchL5抗体、又はそのような抗体のフラグメントとしては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

【表 2】

抗UCHL 5抗体であるUCHL 5結合パートナー		
製品	会社	カタログ番号
抗UCHL 5／Uch 37 抗体	Boster Bio	A04276
UCHL 5抗体—中央領域	Aviva Systems Biology	ARP56797_P050
抗UCHL 5抗体	Antibodies-online	ABIN1882286
UCHL 5抗体	Fitzgerald Industries International	70R-9729
抗UCHL 5抗体	St John's Laboratory	STJ110285
UCHL 5抗体	Biorbyt	orb166588
マウスモノクローナルUCH H37 (UCHL 5) 抗体 (N末端)	Origene Technologies	TA325168
UCHL 5抗体	BioVision	6129-50
UCHL 5抗体	ProSci, Inc.	60-847
抗UCHL 5抗体	GeneTex	GTX131407
抗UCHL 5 / UCH 37抗体	LifeSpan Biosciences	LS-C401325-120
抗UCHL 5	Atlas Antibodies	HPA075383
UCHL 5抗体	Signalway Antibody	36168
UCH37 (UCHL 5)) 抗体 (N末端)	MyBioSource . com	MBS9200578
UCH37抗体 (UCH L 5)	NSJ Bioreagents	F47955
UCH37抗体 / UC HL 5 (マウスモノクロー ナル)	NSJ Bioreagents	F52271
UCHL 5抗体	Abclonal	A7978
UCHL 5ポリクローナル 抗体	Abnova Corporation	PAB3907

10

20

30

40

UCHL5精製MaxPabマウスポリクローナル抗体 (B02P)	Abnova Corporation	H00051377-B02P
マウス抗ヒトUCH37 (UCHL5) (N末端)	Raybiotech, Inc.	102-10419
UCHL5抗体	Proteintech Group	11527-1-AP
ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼL5 (UCHL5) ポリクローナル抗体	Biomatik	CAU22122
UCH37抗体N末端領域	Aviva Systems Biology	OAA15729
UCHL5ポリクローナル抗体	Ambio	ESAP14951
UCH37 (854CT5.5.6) 抗体	Bioss Inc.	Bsm-51223M
ヒトユビキチンチオエステラーゼL5 (UCHL5) 抗体	AssayPro	31358-05111

10

20

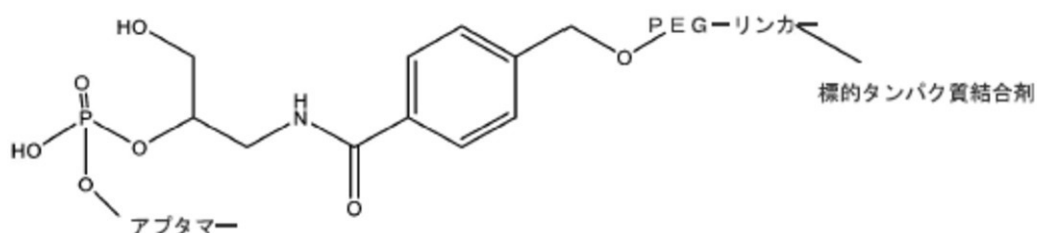
【0084】

本発明は又、アプタマーであるUchL5結合パートナーも提供する (Lee et al., "Isolation and Characterization of RNA Aptamers against a Proteasome-Associated Deubiquitylating Enzyme UCH37." (ChemBiochem. 2017 Jan 17;18(2):171-175参照)。標的タンパク質結合パートナーに連結された、UchL5に結合するアプタマーを含む二機能性分子は、当技術分野で公知の、例えば、Wang et al., dx.doi.org/10.1021/ja4117395 | (2014, J. Am. Chem. Soc. 136, 2731-2734) に示されているような方法に従って作製することができる。

30

一実施形態では、リンカーを介して標的タンパク質結合パートナーに連結された、アプタマーであるUchL5結合パートナーを含む二機能性分子は、以下に示される一般構造を有する。

【化22】



40

本発明は又、例えば、米国特許第9,670,482号に記載されているような二環式又は多重特異性ペプチド分子であるUchL5結合パートナーも提供する。このような二環式ペプチド分子は、低分子量(1.5~2kDa)であり、フレキシブルであり、化学的に合成される。

50

【0085】

標的タンパク質結合パートナー

標的タンパク質結合パートナーは、上記に示されるような親和性又はK_dで選択された標的タンパク質に結合する分子（タンパク質、ペプチド、タンパク質のリガンド、DNA若しくはRNAなどの核酸又はDNA/RNA分子の組合せ）である。

用語「標的タンパク質結合パートナー」には、標的タンパク質に結合する分子、例えば、小分子、抗体、アプタマー、ペプチド、標的タンパク質のリガンドが含まれる。標的結合パートナーは、UchL5結合パートナーに直接、共有結合的に連結されるか、又はリンカーを介して連結されて、標的タンパク質の分解を促進する二機能性分子を形成する。

【0086】

本発明による標的タンパク質結合パートナーは、タンパク質に結合し、且つ、小分子であり得る。所与の標的タンパク質の活性を阻害することが知られている小分子は、本発明によれば有用であり、限定されるものではないが、キナーゼ阻害剤、ヒトBETプロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物、Hsp90阻害剤、HDM2及びMDM2阻害剤、HDAC阻害剤、ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤、血管新生阻害剤、核内ホルモン受容体化合物、免疫抑制化合物、及びアリアル炭化水素受容体（AHR）を標的とする化合物が含まれる。本発明に有用な例示的小分子阻害剤標的タンパク質部分を以下に示す。

標的タンパク質パートナーとしては又、対象とする標的タンパク質に特異的に結合する抗体が含まれる。用語「抗体」（Ab）には、本明細書で使用する場合、所望の結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト化又はヒト抗体、Fv抗体、ダイアボディ、シングルドメイン（VH、VLドメイン）抗体、及び抗体フラグメントが含まれる。「抗体」は、タンパク質のエピトープと特異的に結合するポリペプチドを指す。軽鎖はκ又はλのいずれかとして分類される。重鎖はγ、μ、α、δ、又はεとして分類され、これが次にそれぞれ免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEを定義する。

【0087】

抗体は、例えば、無傷免疫グロブリンとして又は種々のペプチダーゼでの消化によって作製された十分に特性決定されたいくつかのフラグメントとして存在する。よって、例えば、ペプシンは、抗体をヒンジ領域のジスルフィド結合で消化してFabの二量体であるF(ab)[']₂を生成し、Fabはそれ自体、軽鎖とV_H-C_{H1}がジスルフィド結合により連結したものである。F(ab)[']₂は、ヒンジ領域のジスルフィド結合を破断するために温和な条件下で還元することができ、それにより、F(ab)[']₂二量体がFab[']単量体に変換する。Fab[']単量体は、ヒンジ領域の一部を伴う、本質的にはFabである（Fundamental Immunology（Paul ed.，第3版1993参照）。種々の抗体フラグメントが無傷抗体の消化の点から定義されるが、当業者は、そのようなフラグメントは化学的に又は組換えDNA法を用いてde novo合成可能であることを認識するであろう。よって、抗体という用語は又、本明細書で使用する場合、完全な抗体の修飾により生成された抗体フラグメント、又は組換えDNA法を用いてde novo合成されたもの（例えば、一本鎖Fv）又はファージディスプレイライブラリーを用いて特定されたもの（例えば、McCafferty et al.，ature，1990 348：552-554参照）。

本発明は又、ハロアルキル基である標的タンパク質結合パートナーも提供し、このアルキル基は一般に、炭素約1又は2個～炭素約12個の長さ、例えば、炭素2個～炭素10個の長さ、炭素3個～炭素約8個の長さ、及び炭素4個～炭素約6個の長さの範囲のサイズである。ハロアルキル基は、一般に、直鎖アルキル基であり（分岐鎖アルキル基も使用可能である）、少なくとも1個のハロゲン基、好ましくは、単一のハロゲン基、多くの場合、単一の塩化物基でエンドキャップされる。本発明において使用するためのハロアルキルPT基は、好ましくは、化学構造—(CH₂)_v—ハロにより表され、ここで、vは2～約12、多くの場合、約3～約8、より多くの場合には、約4～約6の整数である。ハ

10

20

30

40

50

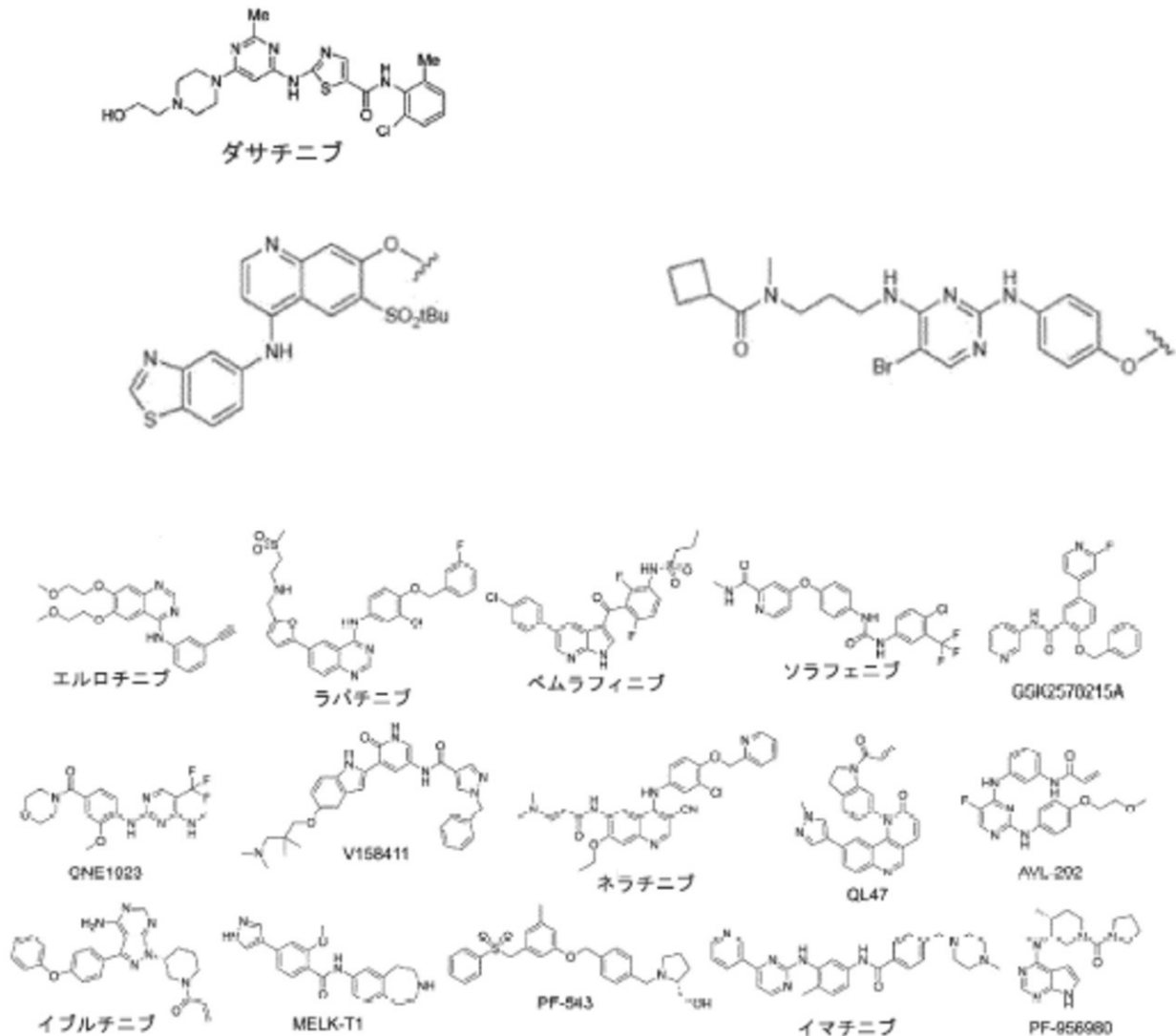
ロはハロゲンであり得るが、好ましくは、C l 又は B r、より多くの場合にはC lである。

【0088】

本発明は又、標的タンパク質結合パートナーの薬学上許容される塩、鏡像異性体、溶媒和物及び多形体も含む。

キナーゼ阻害剤である標的タンパク質結合パートナーとしては、限定されるものではないが、以下に示される分子及びこれらの誘導体のうちいずれか1つが含まれる。

【化23】



Jones et al. Small-Molecule Kinase Downr egulators, (2017, Cell Chem. Biol., 25: 30-35) 参照。

【0089】

B E Tタンパク質を標的とする標的タンパク質結合パートナーとしては、限定されるものではないが、以下に示される分子及びその誘導体が含まれる。

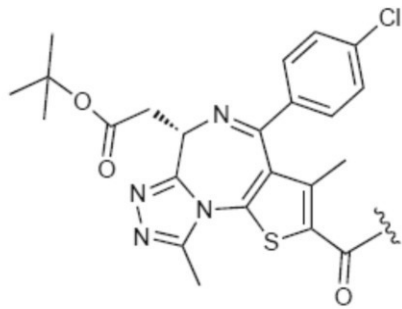
10

20

30

40

【化 2 4】



10

JQ1

更なるBET阻害剤は、Romero, F. A., Taylor, A. M., Crawford, T. D., Tsui, V., Cote, A., Magnuson, S. Disrupting Acetyl-Lysine Recognition: Progress in the Development of Bromodomain Inhibitors (2016 J. Med. Chem., 59 (4), 1271-1298)に記載されている。

20

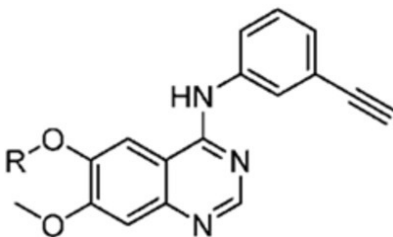
【0090】

I. キナーゼ及びホスファターゼ阻害剤：

キナーゼ阻害剤としては、本明細書で使用する場合、限定されるものではないが以下のものが含まれる。

1. エルロチニブ誘導体チロシンキナーゼ阻害剤：

【化 2 5】

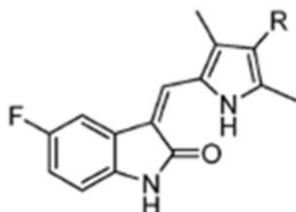


30

式中、Rは、例えばエーテル基を介して付着したリンカーである；

2. キナーゼ阻害剤スニチニブ（誘導体化）：

【化 2 6】



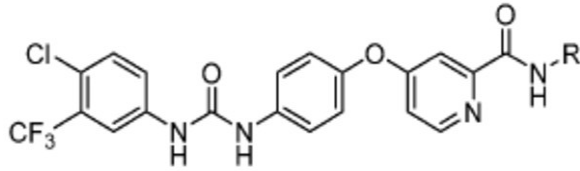
40

（誘導体化 Rは、例えばピロール部分に付着したリンカーである）；

【0091】

3. キナーゼ阻害剤ソラフェニブ（誘導体化）：

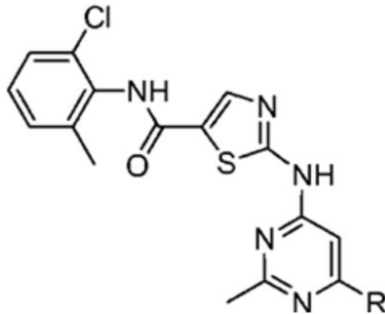
【化 2 7】



（誘導体化 R は、例えばアミド部分に付着したリンカーである）；

4. キナーゼ阻害剤デサチニブ（誘導体化）；

【化 2 8】

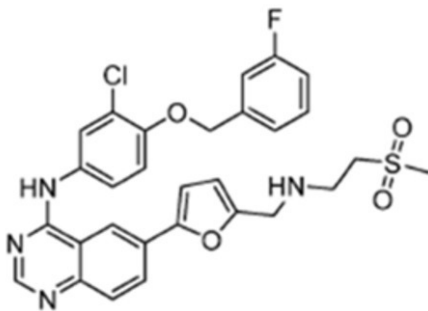


（誘導体化 R は、例えばピリミジンに付着したリンカーである）；

【0092】

5. キナーゼ阻害剤ラパチニブ（誘導体化）；

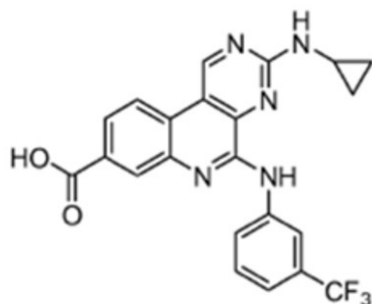
【化 2 9】



（誘導体化 リンカーは、例えばスルホニルメチル基の末端メチルを介して付着されている）；

6. キナーゼ阻害剤 U09-CX-5279（誘導体化）；

【化 30】



誘導体化 リンカーは、例えばアミン（アニリン）、カルボン酸又はアミン α を介してシクロプロピル基、又はシクロプロピル基に付着されている；

【0093】

7. 以下の構造を有するキナーゼ阻害剤 Y1W 及び Y1X（誘導体化）；

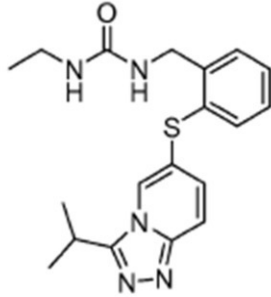
10

20

30

40

【化 3 1】



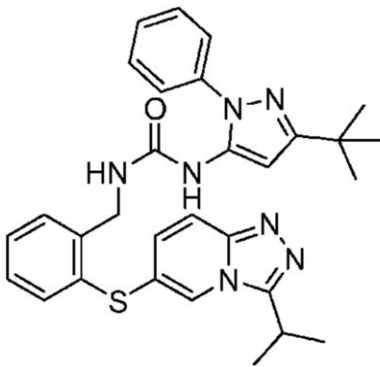
YIX

10

(1-エチル-3-(2-{[3-(1-メチルエチル)[1,2,4]トリアゾロ[4,3-a]ピリジン-6-イル]スルファニル}ベンジル)尿素

誘導体化 リンカーは、例えば i-プロピル基を介して付着されている

【化 3 2】



YIW

20

1-(3-tert-ブチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-5-イル)-3-(2-{[3-(1-メチルエチル)[1,2,4]トリアゾロ[4,3-a]ピリジン-6-イル]スルファニル}ベンジル)尿素

誘導体化 リンカーは、例えば、好ましくは i-プロピル基又は t-ブチル基のいずれかを介して付着されている

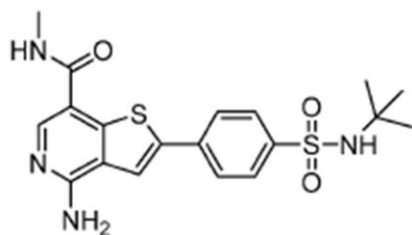
30

を含む、Millan, et al., Design and Synthesis of Inhaled P38 Inhibitors for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, (2011,]. MED. CHEM. 54:7797) で特定されているキナーゼ阻害剤；

【0094】

8. 以下の構造を有する化合物 6TP 及び OTP (誘導体化)：

【化 3 3】



6TP

40

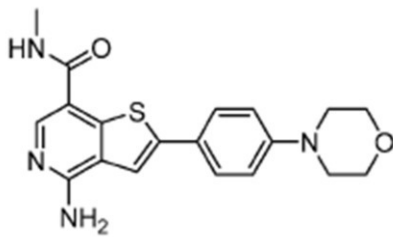
4-アミノ-2-[4-(tert-ブチルスルファモイル)フェニル]-N-メチルチエノ[3,2-c]ピリジン-7-カルボキサミドチエノピリジン 19

誘導体化 リンカーは、例えば、アミド部分に結合した末端メチル基を介して付着されて

50

いる

【化 3 4】



0TP

10

4-アミノ-N-メチル-2-[4-(モルホリン-4-イル)フェニル]チエノ[3,2-c]ピリジン-7-カルボキサミドチエノピリジン8

誘導体化 リンカーは、例えば、アミド部分に結合した末端メチル基を介して付着されている

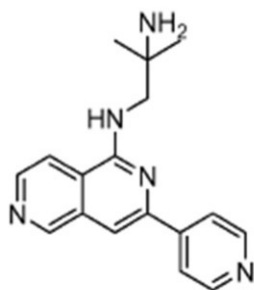
を含む、Schenkel, et al., Discovery of Potent and Highly Selective Thienopyridine Janus Kinase 2 Inhibitors (2011, J. Med. Chem., 54(24):8440-8450)で特定されているキナーゼ阻害剤;

【0095】

9. 以下の構造を有するキナーゼ阻害剤07U:

20

【化 3 5】



07U

30

2-メチル-N-1-[3-(ピリジン-4-イル)-2,6-ナフチリジン-1-イル]プロパン-1,2-ジアミン

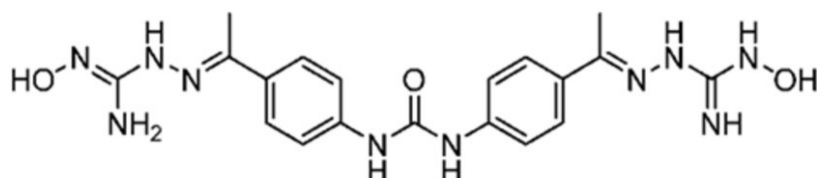
誘導体化 リンカーは例えば第二級アミン又は末端アミノ基を介して付着されている

を含む、Van Eis, et al., "2,6-Naphthyridines as potent and selective inhibitors of the novel protein kinase C isozymes", (2011 Dec., Biorg. Med. Chem. Lett., 15, 21(24):7367-72)で特定されているキナーゼ阻害剤:

10. 以下の構造を有するキナーゼ阻害剤YCFを含む、Lountos, et al., "Structural Characterization of Inhibitor Complexes with Checkpoint Kinase 2 (Chk2), a Drug Target for Cancer Therapy", (2011, J. Struct. Biol., 176:292)で特定されているキナーゼ阻害剤:

40

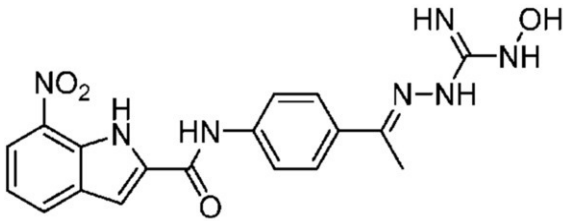
【化 3 6】



50

誘導体化 リンカーは、例えば末端ヒドロキシル基のいずれかを介して付着されている；
【0096】

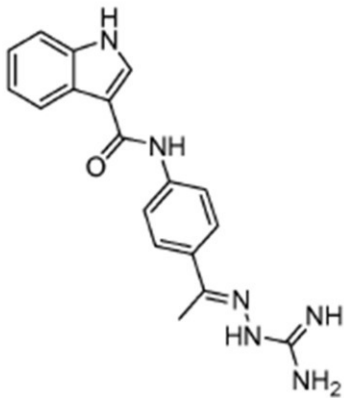
11. 以下の構造を有するキナーゼ阻害剤XK9及びNXP（誘導体化）：
【化37】



10

XK9

N- { 4 - [(1 E) - N - (N - ヒドロキシカルバミミドイル) エタンヒドラゾノイル
] フェニル } - 7 - ニトロ - 1 H - インドール - 2 - カルボキサミド
【化38】



20

NXP

N- { 4 - [(1 E) - N - カルバミミドイルエタンヒドラゾノイル] フェニル } - 1 H
- インドール - 3 - カルボキサミド

誘導体化 リンカーは、例えば末端ヒドロキシル基（XK9）又はヒドラゾン基（NXP）
を介して付着されている

30

を含む、Lountos, et al., “Structural Characterization of Inhibitor Complexes with Checkpoint Kinase 2 (Chk2), a Drug Target for Cancer Therapy”, (2011, J. Struct. Biol., 176:292) で特定されているキナーゼ阻害剤：

12. キナーゼ阻害剤アフチニブ（誘導体化）（N- [4 - [(3 - クロロ - 4 - フル
オロフェニル (fluorophenyl) アミノ] - 7 - [[(3 S) - テトラヒドロ
- 3 - フラニル] オキシ] - 6 - キナゾリニル] - 4 (ジメチルアミノ) - 2 - プテンア
ミド] （誘導体化 リンカーは、例えば脂肪族アミン基を介して付着されている）；

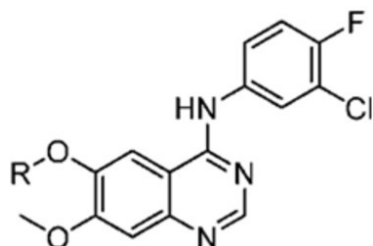
40

【0097】

13. キナーゼ阻害剤フォスタマチニブ（誘導体化）（ [6 - ({ 5 - フルオロ (fluoro)
- 2 - [(3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル) アミノ] ピリミジン - 4 - イル } アミノ) - 2 ,
2 - ジメチル - 3 - オキソ - 2 , 3 - ジヒドロ - 4 H - ピリド [3 , 2 - b] - 1 , 4 - オキサジン - 4 - イル]
メチルリン酸二ナトリウム六水和物) （誘導体化 リンカーは、例えばメトキシ基を介して付着されている）；

14. キナーゼ阻害剤ゲフィチニブ（誘導体化）（N- (3 - クロロ - 4 - フルオロ (fluoro)
- フェニル) - 7 - メトキシ - 6 - (3 - モルホリン - 4 - イルプロポキシ) キナゾリン - 4 - アミン) ；

【化 3 9】



（誘導体化 リンカーは、例えばメトキシ又はエーテル基を介して付着されている）；

【0098】

10

15. キナーゼ阻害剤レンバチニブ（誘導体化）（4-〔3-クロロ-4-（シクロプロピルカルバモイルアミノ）フェノキシ〕-7-メトキシキノリン-6-カルボキサミド）（誘導体化 リンカーは、例えばシクロプロピル基を介して付着されている）；

16. キナーゼ阻害剤バンデタニブ（誘導体化）（N-（4-ブromo-2-フルオロフェニル（f i u o r o p h e n y l））-6-メトキシ-7-〔（1-メチルピペリジン-4-イル）メトキシ〕キナゾリン-4-アミン）（誘導体化 リンカーは、例えばメトキシ又はヒドロキシル基を介して付着されている）；

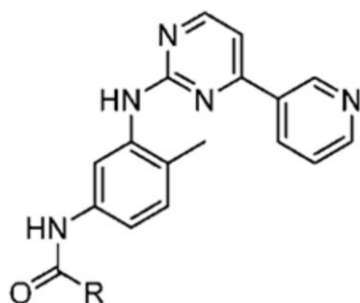
【0099】

20

17. キナーゼ阻害剤ベムラフェニブ（誘導体化）（プロパン-1-スルホン酸〔3-〔5-（4-クロロフェニル）-1H-ピロロ〔2, 3-b〕ピリジン-3-カルボニル〕-2, 4-ジフルオロ（d i f i u o r o）-フェニル〕-アミド）（誘導体化 リンカーは、例えばスルホニルプロピル基を介して付着されている）；

18. キナーゼ阻害剤グリベック（イマチニブとしても知られる）（誘導体化）；

【化 4 0】



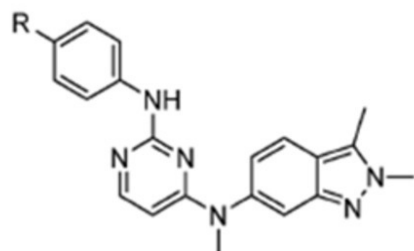
30

（誘導体化 Rは、例えばアミド基又はアニリンアミン基を介して付着したリンカーである）；

【0100】

19. キナーゼ阻害剤バゾパニブ（誘導体化）（V E G F R₃阻害剤）；

【化 4 1】

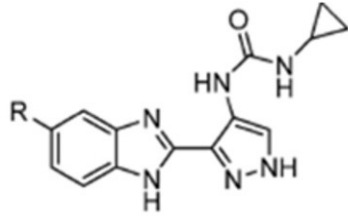


40

（誘導体化 Rは、例えば、フェニル部分に、又はアニリンアミン基を介して付着したリンカーである）；

20. キナーゼ阻害剤A T-9 2 8 3（誘導体化）オーロラキナーゼ阻害剤

【化 4 2】



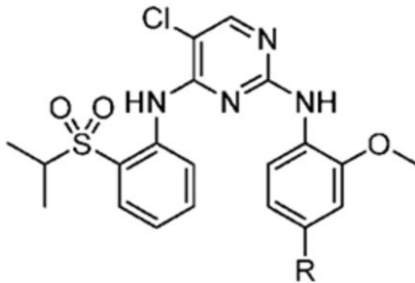
(Rは、例えばフェニル部分に付着したリンカーである)；

【0101】

21. キナーゼ阻害剤 T A E 6 8 4 (誘導体化) A L K 阻害剤

10

【化 4 3】

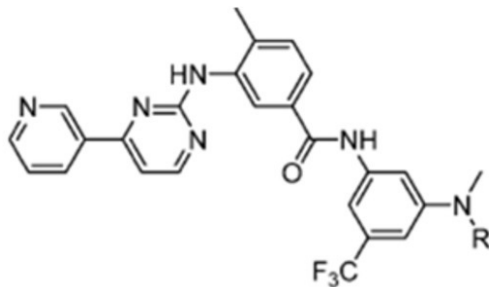


20

(Rは、例えばフェニル部分に付着したリンカーである)；

22. キナーゼ阻害剤 ニロタニブ (誘導体化) A b 1 阻害剤：

【化 4 4】



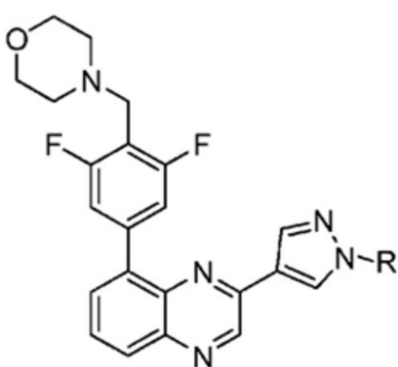
30

(誘導体化 Rは、例えばフェニル部分又はアニリンアミン基に付着したリンカーである)；

【0102】

23. キナーゼ阻害剤 N V P - B S K 8 0 5 (誘導体化) J A K 2 阻害剤

【化 4 5】

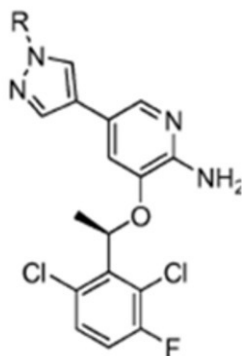


40

(誘導体化 Rは、例えばフェニル部分又はジアゾール基に付着したリンカーである)；

24. キナーゼ阻害剤 クリゾチニブ誘導体化 A l k 阻害剤

【化 4 6】

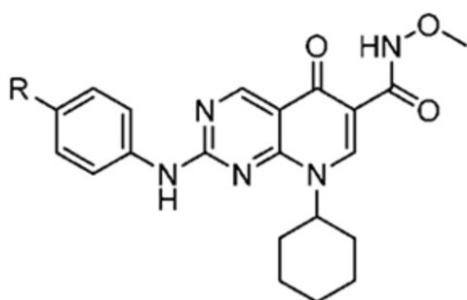


10

【0103】

25. キナーゼ阻害剤 J N J F M S (誘導体化) 阻害剤

【化 4 7】

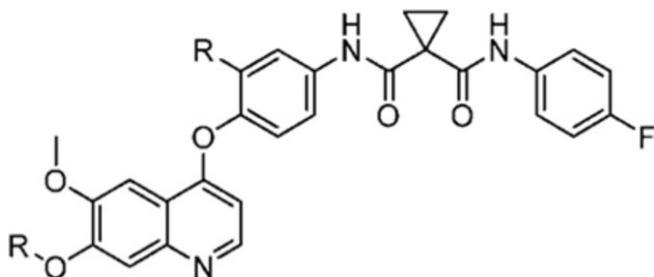


20

(誘導体化 Rは、例えばフェニル部分に付着したリンカーである) ;

26. キナーゼ阻害剤 フォレチニブ (誘導体化) M e t 阻害剤

【化 4 8】



30

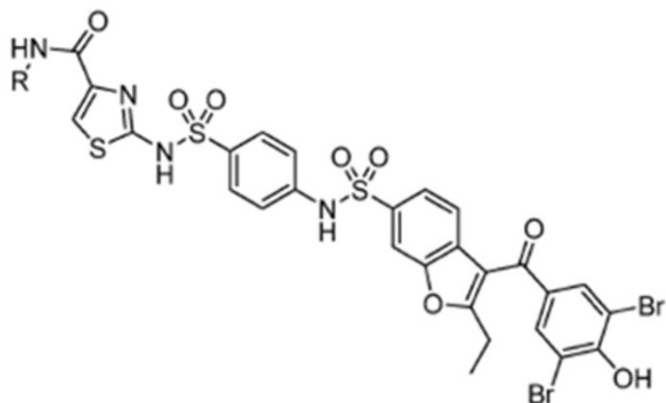
(誘導体化 Rは、例えばフェニル部分、又はキノリン部分のヒドロキシル又はエーテル基に付着したリンカーである) ;

【0104】

27. アロステリックタンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤 P T P 1 B (誘導体化)

:

【化 4 9】

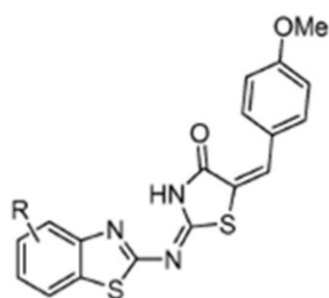


10

誘導体化 リンカーは、例えば示されているようにRにおいて付着されている；

28. チロシンホスファターゼの SHP-2 ドメインの阻害剤（誘導体化）：

【化 5 0】



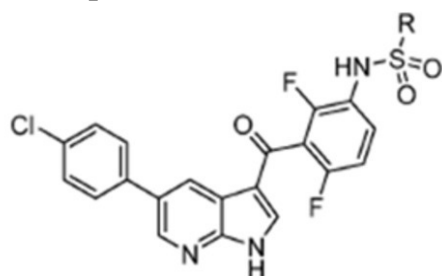
20

誘導体化 リンカーは、例えばRにおいて付着されている；

【0105】

29. BRAF (BRA F V 6 0 0 E) / MEK の阻害剤（誘導体化）：

【化 5 1】

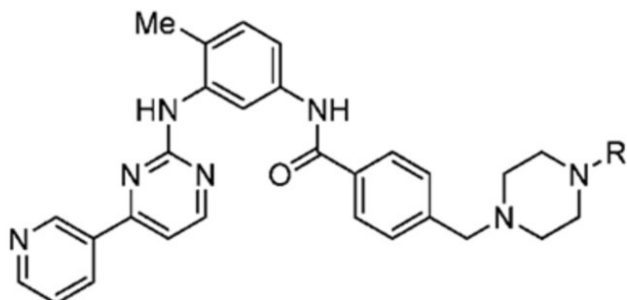


30

誘導体化 リンカー基は、例えばRにおいて付着されている；

30. チロシンキナーゼABLの阻害剤（誘導体化）

【化 5 2】



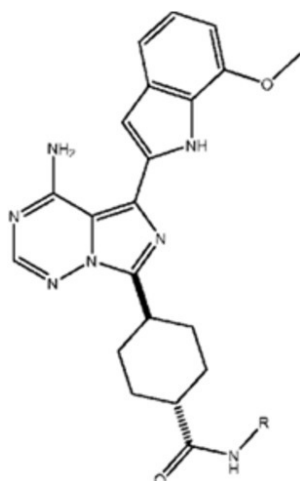
40

誘導体化 リンカーは、例えばRにおいて付着されている；

【0106】

50

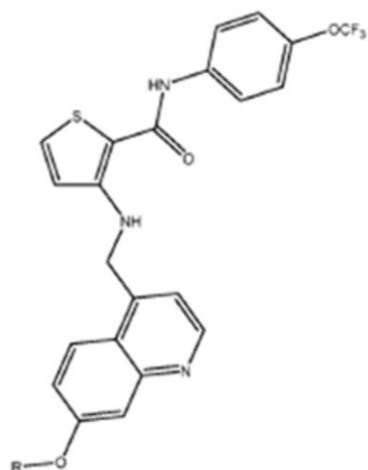
31. キナーゼ阻害剤 O S I - 0 2 7 (誘導体化) m T O R C 1 / 2 阻害剤
【化 5 3】



10

誘導体化 リンカーは、例えば R において付着されている；

32. キナーゼ阻害剤 O S I - 9 3 0 (誘導体化) c - K i t / K D R 阻害剤
【化 5 4】

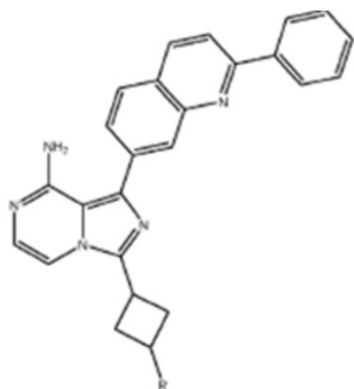


20

誘導体化 リンカーは、例えば R において付着されている；及び

【0107】

33. キナーゼ阻害剤 O S I - 9 0 6 (誘導体化) I G F 1 R / I R 阻害剤
【化 5 5】



40

誘導体化 リンカーは、例えば R において付着されている；

(誘導体化 「R」は、ピペラジン部分にあるリンカーの付着のための部位を表す)。

【0108】

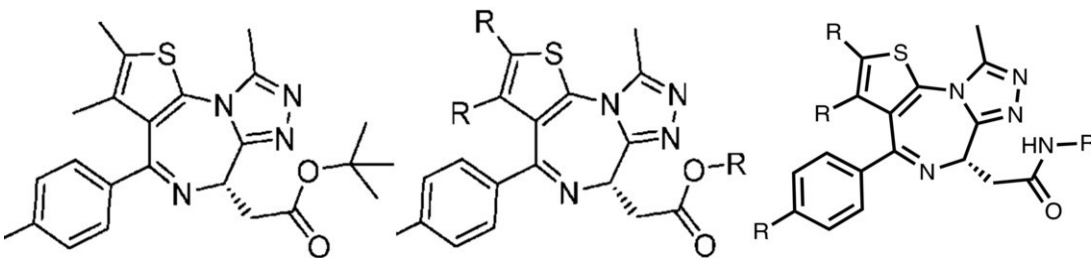
I I. ヒト B E T ブロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物：

50

ヒト BET ブロモドメイン含有タンパク質を標的とする化合物としては、限定されるものではないが、下記のように標的と会合された化合物が含まれ、「R」は、例えばリンカー付着のための部位を表す：

J Q 1、Filippakopoulos et al. Selective inhibition of BET bromodomains. Nature (2010)：

【化 5 6】

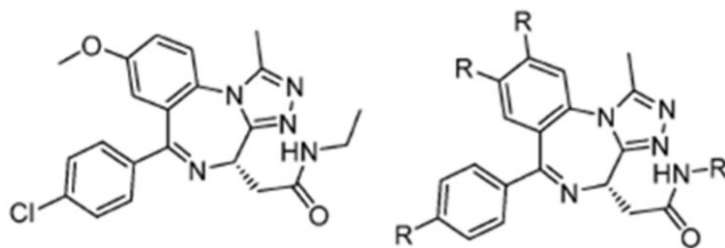


10

2. I-BET、Nicodeme et al. Suppression of Inflammation by a Synthetic Histone Mimic. Nature (2010).

Chung et al. Discovery and Characterization of Small Molecule Inhibitors of the BET Family Bromodomains. J. Med Chem. (2011)：

【化 5 7】

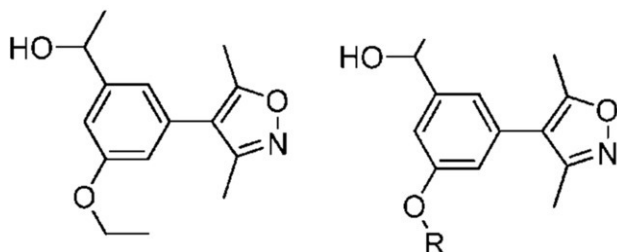


20

【0109】

3. Hewings et al. 3, 5-Dimethylisoxazoles Act as Acetyl-lysine Bromodomain Ligands. (2011, J. Med. Chem. 54:6761-6770) に記載の化合物：

【化 5 8】

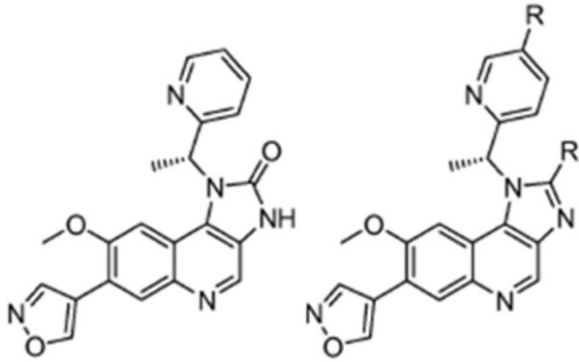


30

40

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

【化 5 9】



10

(Rは、いずれの場合においても、リンカーの付着のための部位を表す)

【0110】

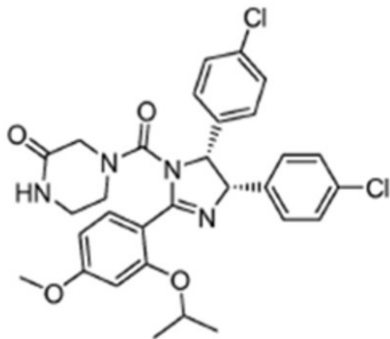
III. HDM2 / MDM2 阻害剤：

本発明のHDM2 / MDM2 阻害剤としては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

1. 下記のような化合物ニュートリンー3、ニュートリンー2、及びニュートリンー1（誘導体化）並びにこれらの全ての誘導体及び類似体：

【化 6 0】

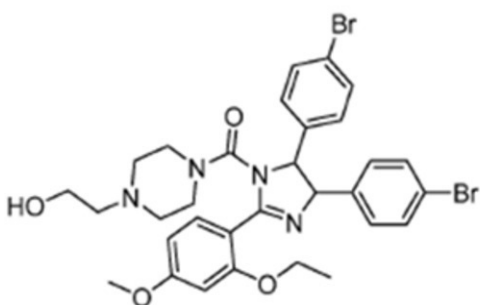
20



30

(誘導体化 リンカーは、例えばメトキシ基において又はヒドロキシル基として付着されている)；

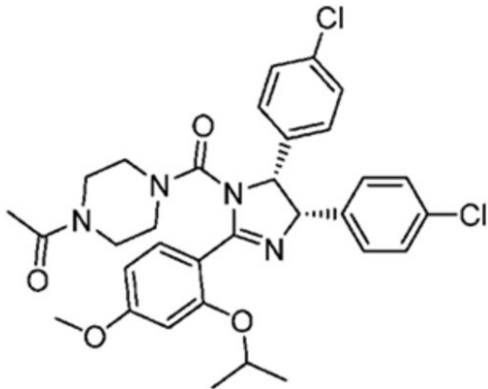
【化 6 1】



40

(誘導体化 リンカーは、例えばメトキシ基又はヒドロキシル基において付着されている)；

【化 6 2】



10

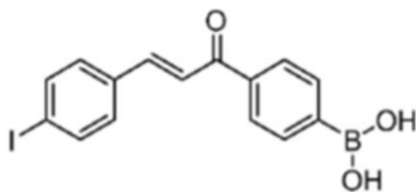
(誘導体化 リンカーは、例えばメトキシ基を介して又はヒドロキシ基として付着されている)

を含む (又は追加的)、Vassilev, et al., In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, (2004, Science, 303:844-848) 及び Schneekloth, et al., Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: En route to chemical proteomics, (2008, Biorg. Med. Chem. Lett., 18:5904-5908) で特定されている HDM2/M

20

DM2 阻害剤; 及び

【化 6 3】



30

(誘導体化 リンカーは、例えばヒドロキシ基を介して付着されている)。

【0111】

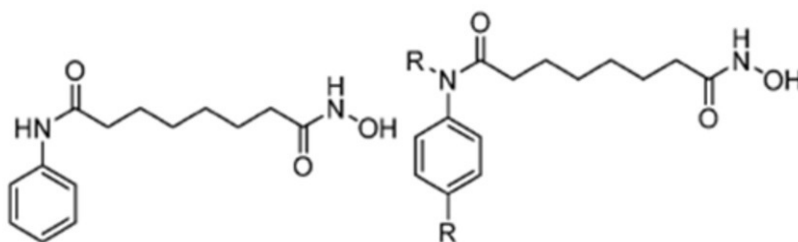
IV. HDAC 阻害剤:

HDAC 阻害剤 (誘導体化) は、限定されるものではないが、以下のものが含まれる:

1. Finnin, M. S. et al. Structures of Histone Deacetylase Homologue Bound to the TSA and SAHA Inhibitors. (1999, Nature, 40:188-193)

【化 6 4】

40



(誘導体化 「R」は、例えばリンカーの付着のための部位を表す; 及び

2. 国際出願 PCT WO/2002/25777 号明細書 (「脱アセチル化酵素阻害剤」) の式 (I) によって定義される化合物 (誘導体化 リンカーは、例えばヒドロキシ基を介

50

して付着されている) ;

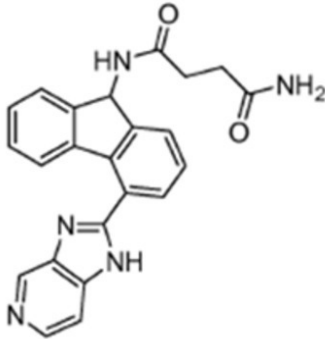
【0112】

V. 熱ショックタンパク質90 (HSP90) 阻害剤:

本発明において有用なHSP90阻害剤としては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる:

1. YKB (N-[4-(3H-イミダゾ[4,5-C]ピリジン-2-イル)-9H-フルオレン-9-イル]-スクシニアミド):

【化65】



10

誘導体化 リンカーは、例えば末端アミド基を介して付着されている

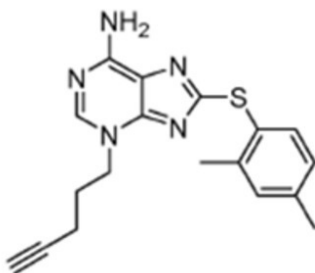
を含む、Vallee, et al., "Tricyclic Series of Heat Shock Protein 90 (HSP90) Inhibitors Part I: Discovery of Tricyclic Imidazo [4,5-C] Pyridines as Potent Inhibitors of the HSP90 Molecular Chaperone (2011,]. Med. Chem., 54:7206) で特定されているHSP90阻害剤;

20

【0113】

2. HSP90阻害剤p54 (修飾型) (8-[(2,4-ジメチルフェニル)スルファニル]-3]ペンタ-4-イン-1-イル-3H-プリン-6-アミン):

【化66】



30

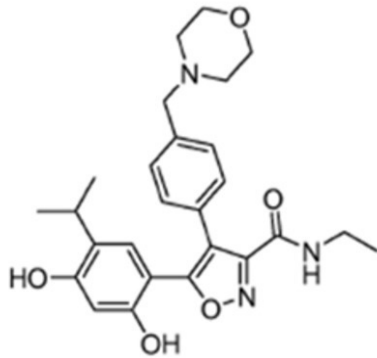
リンカーは、例えば末端アセチレン基を介して付着されている;

【0114】

3. 以下の構造を有する化合物2GJ (5-[2,4-ジヒドロキシ-5-(1-メチルエチル)フェニル]-n-エチル-4-[4-(モルホリン-4-イルメチル)フェニル]イソキサゾール-3-カルボキサミド):

40

【化 6 7】



10

誘導体化、リンカーは、例えばアミド基を介して（アミンにおいて又はアミン上のアルキル基において）付着されている

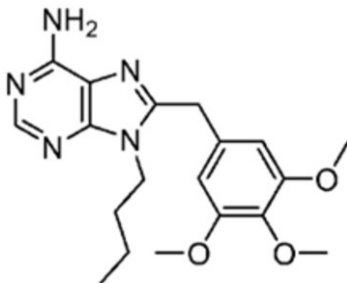
を含む、Brough, et al., “4, 5- Diaryl isoxazole HSP90 Chaperone Inhibitors: Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer”, (2008, J. Med. Chem., 51:196) で特定されているHSP90阻害剤（修飾型）；

【0115】

4. 以下の構造を有するHSP90阻害剤PU3：

20

【化 6 8】



リンカー基は、例えばブチル基を介して付着されている

30

を含む、Wright, et al., Structure-Activity Relationships in Purine-Based Inhibitor Binding to HSP90 Isoforms, (2004 Jun., Chem Biol. 11(6):775-85) で特定されているHSP90阻害剤（修飾型）；及び

【0116】

5. HSP90阻害剤ゲルダナマイシン（（4E, 6Z, 8S, 9S, 10E, 12S, 13R, 14S, 16R）-13-ヒドロキシ-8, 14, 19-トリメトキシ-4, 10, 12, 16-テトラメチル-3, 20, 22-トリオキソ-2-アザビシクロ[16.3.1]（誘導体化）又はその任意の誘導体（例えば、17-アルキルアミノ-17-デスメトキシゲルダナマイシン（「17-AAG」）又は17-（2-ジメチルアミノエチル）アミノ-17-デスメトキシゲルダナマイシン（「17-DMAG」））（誘導体化、リンカーは、例えばアミド基を介して付着されている）。

40

【0117】

VI. ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤：

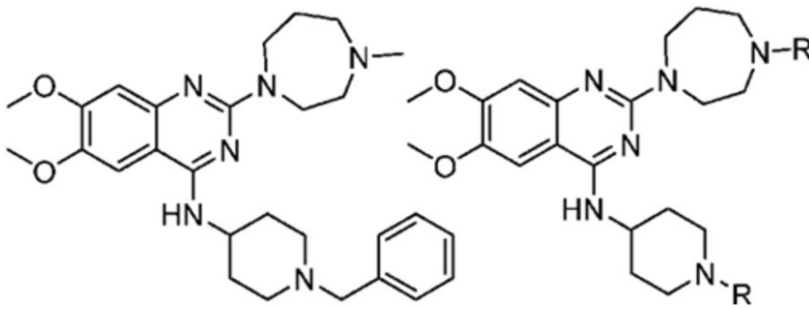
ヒトリシンメチルトランスフェラーゼ阻害剤としては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

1. Chang et al. Structural Basis for G9a-Like protein Lysine Methyltransferase Inhibition by BIX-1294 (2009, Nat. Struct

50

. Biol., 16 (3) : 312)

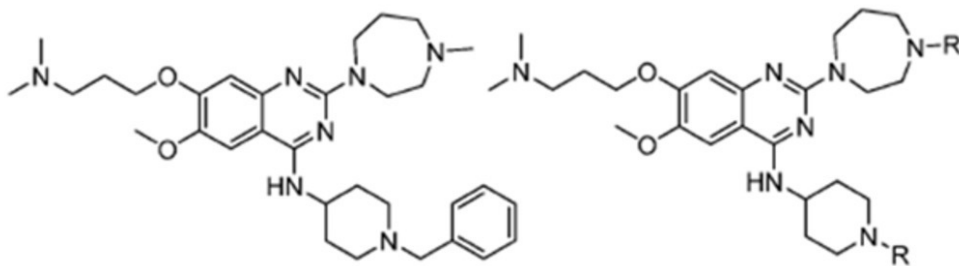
【化69】



(誘導体化 「R」は、例えばリンカーの付着のための部位を表す；

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

【化70】



(誘導体化 「R」は、リンカーの付着のための潜在的部位を表す)；

【0118】

3. アザシチジン (誘導体化) (4-アミノ-1-β-D-リボフラノシル-1, 3, 5-トリアジン-2 (1H)-オン) (誘導体化 リンカーは、例えばヒドロキシ又はアミノ基を介して付着されている)；及び

4. デシタビン (誘導体化) (4-アミノ-1-β-(2-デオキシ-β-D-エリスローペントフラノシル)-1, 3, 5-トリアジン-2 (1H)-オン) (誘導体化 リンカーは、例えばヒドロキシ基のいずれかを介して又はアミノ基において付着されている)。

【0119】

VII. 血管新生阻害剤：

血管新生阻害剤としては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

1. Sakamoto, et al., Development of Prota cs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation, (2003 Dec., Mol. Cell Proteomics, 2 (12) : 1350-1358) に記載されているような構造を有し、記載されているようにリンカーに結合するGA-1 (誘導体化) 並びにその誘導体及び類似体；

2. Rodriguez-Gonzalez, et al., Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer, (2008, Oncogene 27 : 7201-7211) に一般に記載されているようにリンカーに結合させることができるエストラジオール (誘導体化)；

【0120】

3. 限定されるものではないが、DHT及びその誘導体及び類似体を含む、Sakamo

10

20

30

40

50

to, et al., Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation, (2003 Dec., Mol. Cell Proteomics, 2(12):1350-1358)に一般に記載されているような構造を有し、記載されているようにリンカーに結合するエストラジオール、テストステロン（誘導体化）及び関連の誘導体；及び

4. Sakamoto, et al., Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation (2001 Jul., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 98(15):8554-8559)及び米国特許第7,208,157号に一般に記載されているような構造を有し、記載されているようにリンカーに結合するオバリシン、フマギリン（誘導体化）、並びにその誘導体及び類似体。

【0121】

VIII. 免疫抑制化合物：

免疫抑制化合物としては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

1. Schneekloth, et al., Chemical Genetic Control of Protein Levels: Selective in Vivo Targeted Degradation (2004, J. Am. Chem. Soc., 126:3748-3754)に一般に記載されているような構造を有し、記載されているようにリンカーに結合するAP21998（誘導体化）；
2. グココルチコイド（例えば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、及びメチルプレドニゾロン）（誘導体化 リンカーは、例えばヒドロキシルのいずれかに結合されている）及びニプロピオン酸ベクロメタゾン（誘導体化 リンカーは、例えばプロプリオナートに結合されている）；
3. メトトレキサート（誘導体化 リンカーは、例えば末端ヒドロキシルのいずれかに結合させることができる）；
4. シクロスポリン（誘導体化 リンカーは、例えばブチル基において結合させることができる）；
5. タクロリムス（FK-506）及びラパマイシン（誘導体化 リンカー基は、例えばメトキシ基のいずれか1つにおいて結合させることができる）；及び
6. アクチノマイシン（誘導体化 リンカーは、例えばイソプロピル基の1つにおいて結合させることができる）。

【0122】

IX. アリール炭化水素受容体（AHR）を標的とする化合物：

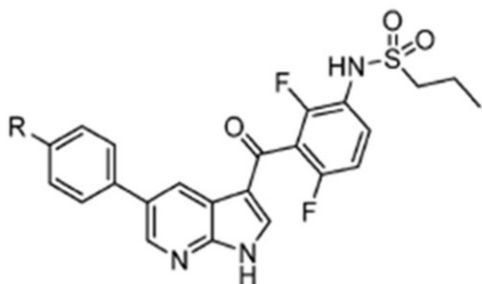
アリール炭化水素受容体（AHR）を標的とする化合物としては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

1. アピゲニン（Lee, et al., Targeted Degradation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by the PROTAC Approach: A Useful Chemical Genetic Tool, ChemBioChem Volume 8, Issue 17, pages 2058-2062, November 23, 2007）に一般に示されているようにリンカーに結合するように誘導体化）；及び
2. Boitano, et al., Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells (2010 Sep., Science, 329(5997):1345-1348)に記載されているようなSR1及びLGC006（リンカーが結合されるように誘導体化）。

【0123】

X. R A F 受容体を標的とする化合物（キナーゼ）：

【化 7 1】



10

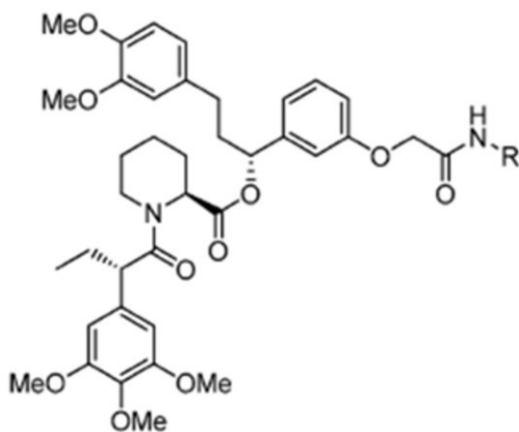
PLX4032

（誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す）。

【0 1 2 4】

X I. F K B P を標的とする化合物：

【化 7 2】



20

（誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す）。

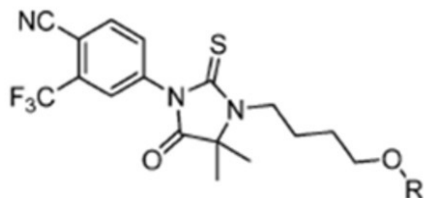
【0 1 2 5】

30

X I I. アンドロゲン受容体（A R）を標的とする化合物

1. アンドロゲン受容体における R U 5 9 0 6 3 リガンド（誘導体化）

【化 7 3】

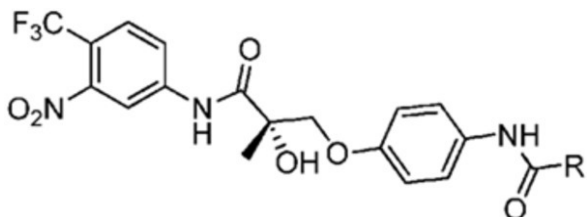


（誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す）。

40

2. アンドロゲン受容体の S A R M リガンド（誘導体化）

【化 7 4】

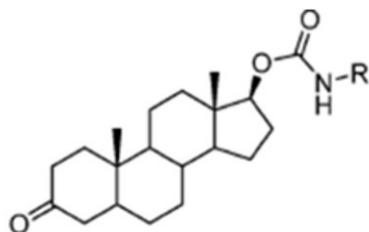


（誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す）。

3. アンドロゲン受容体リガンド D H T （誘導体化）

50

【化 7 5】

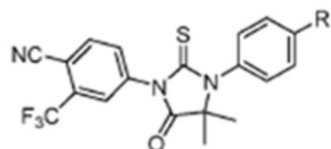


(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す)。

4. MDV3100リガンド (誘導体化)

10

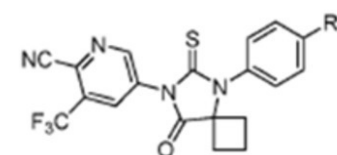
【化 7 6】



5. ARN-509リガンド (誘導体化)

【化 7 7】

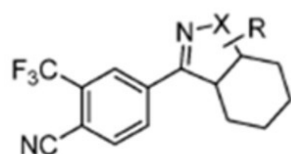
20



6. ヘキサヒドロベンズイソキサゾール

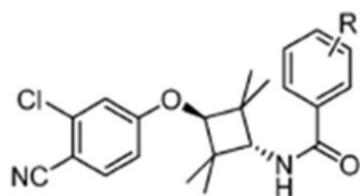
【化 7 8】

30



7. テトラメチルシクロブタン

【化 7 9】



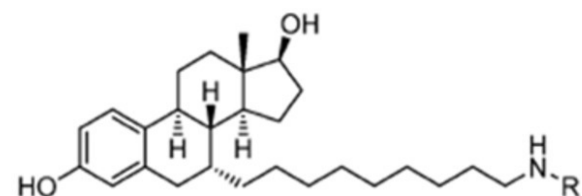
【0126】

40

XIII. エストロゲン受容体 (ER) を標的とする化合物ICI-182780

1. エストロゲン受容体リガンド

【化 8 0】



(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す)。

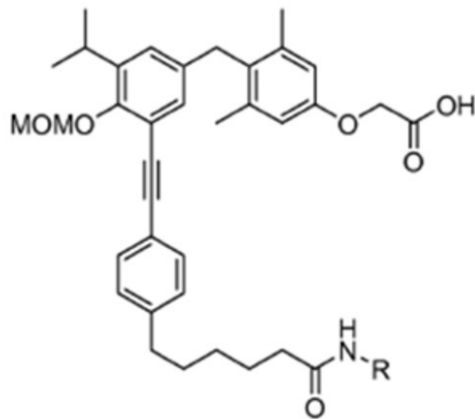
50

【0127】

XIV. 甲状腺ホルモン受容体 (TR) を標的とする化合物

1. 甲状腺ホルモン受容体リガンド (誘導体化)

【化81】



10

(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表し、MOMOは、メトキシメトキシ基を示す)。

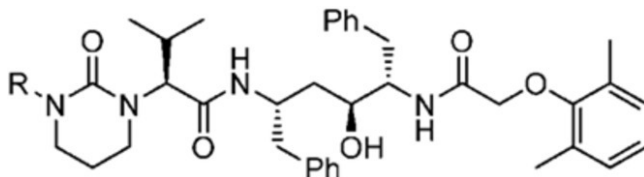
【0128】

XV. HIVプロテアーゼを標的とする化合物

20

1. HIVプロテアーゼの阻害剤 (誘導体化)

【化82】

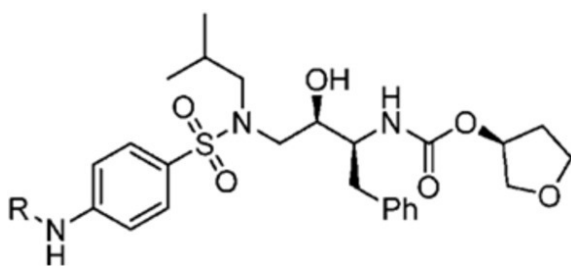


(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す)。2010, J. Med. Chem., 53:521-538 参照。

2. HIVプロテアーゼの阻害剤

30

【化83】



(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための潜在的部位を表す)。2010, J. Med. Chem., 53:521-538 参照。

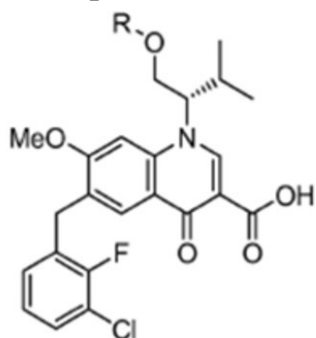
40

【0129】

XVI. HIVインテグラーゼを標的とする化合物

1. HIVインテグラーゼの阻害剤 (誘導体化)

【化 8 4】

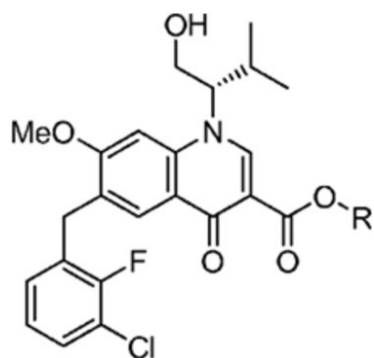


10

(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す)。2010, J. Med. Chem., 53: 6466参照。

2. H I V インテグラーゼの阻害剤 (誘導体化)

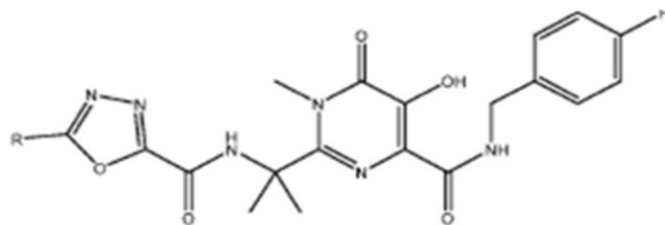
【化 8 5】



20

3. H I V インテグラーゼ阻害剤アイセントレス (Isetntress) (誘導体化)

【化 8 6】



30

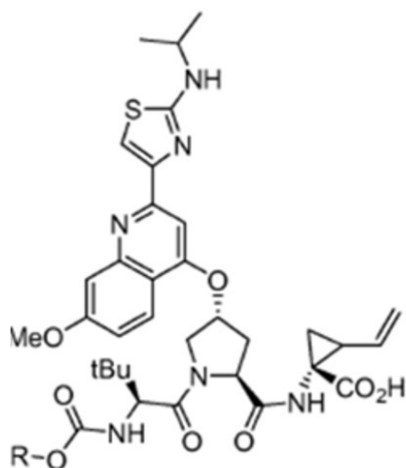
(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す)。2010, J. Med. Chem., 53: 6466参照。

【0 1 3 0】

X V I I. H C V プロテアーゼを標的とする化合物

1. H C V プロテアーゼの阻害剤 (誘導体化)

【化 8 7】



10

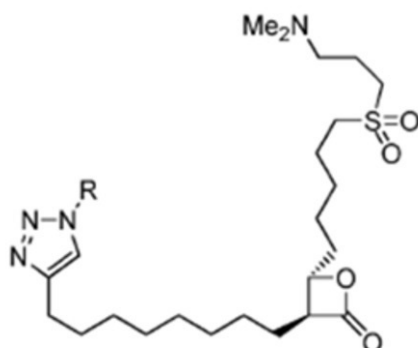
(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す)。

【 0 1 3 1 】

X V I I I . アシルタンパク質チオエステラーゼ-1 及び-2 (A P T 1 及び A P T 2)
を標的とする化合物

1. APT 1 及び APT 2 の阻害剤（誘導体化）

【化 8 8】



30

(誘導体化 「R」は、リンカー付着のための部位を表す)。2011, Angew. Chem., Int. 編, 50:9838-9842 参照。

【 0 1 3 2 】

標的タンパク質

本発明において有用な「標的タンパク質」としては、細胞内でタンパク質分解を増強するように当業者によって選択されるタンパク質又はポリペプチドが含まれる。

本発明において有用な標的タンパク質としては、フラグメント、類似体、及び／又はホモログを含めたタンパク質又はペプチドが含まれる。標的タンパク質としては、構造、調節、ホルモン、酵素、遺伝、免疫、収縮、貯蔵、輸送、及びシグナル伝達を含む生体機能又は活性を有するタンパク質及びペプチドが含まれる。特定の実施形態では、標的タンパク質としては、構造タンパク質、受容体、酵素、細胞表面タンパク質；触媒活性、アロマトラーゼ活性、モーター活性、ヘリカーゼ活性、代謝プロセス（同化作用及び異化作用）、抗酸化活性、タンパク質分解、生合成に關与するタンパク質、キナーゼ活性、オキシドレダクターゼ活性、トランスフェラーゼ活性、ヒドロラーゼ活性、リアーゼ活性、イソメラーゼ活性、リガーゼ活性、酵素レギュレーター活性、シグナル伝達活性、構造分子活性、結合活性（タンパク質、脂質糖鎖）、受容体活性を有するタンパク質、細胞運動、膜融合、細胞コミュニケーション、生体プロセスの調節、発生、細胞分化、刺激に対する応答に關与するタンパク質、行動タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞死に關与するタンパク質、輸送に關与するタンパク質（タンパク質輸送体活性、核輸送、イオン輸送体活性、チ

40

50

ャネル輸送体活性を含む)、担体活性、透過酵素活性、分泌活性、電子伝達体活性、病因、シャペロンレギュレーター活性、核酸結合活性、転写レギュレーター活性、細胞外組織化及び生合成活性、翻訳レギュレーター活性に関与するタンパク質を含む細胞の統合機能に直接関係するタンパク質が含まれる。対象とするタンパク質としては、薬物療法の多くの他の標的の中でも、ヒト、飼育動物を含む他の動物の細菌、ウイルス、真菌s及び寄生虫を含む、細菌、ウイルス、真菌及び寄生虫を含む真核生物及び原核生物由来のタンパク質を含み得る。

【0133】

標的タンパク質としては又、ヒト治療薬の標的も含む。これらには、例えば、B7.1及びB7、TNFR1、TNFR2、NADPHオキシダーゼ、BclI/Bax及びアポトーシス経路における他のパートナー、C5a受容体、HMG-CoAレダクターゼ、PDE Vホスホジエステラーゼタイプ、PDE IVホスホジエステラーゼタイプ4、PDE I、PDE II、PDE III、スクアレンシクラーゼ阻害剤、CXCR1、CXCR2、酸化窒素(NO)シンターゼ、シクロオキシゲナーゼ1、シクロオキシゲナーゼ2、5HT受容体、ドーパミン受容体、Gタンパク質、すなわち、Gq、ヒスタミン受容体、5-リポキシゲナーゼ、トリプターゼセリンプロテアーゼ、チミジル酸シンターゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、GAPDHトリパノソーマ、グリコーゲンホスホリラーゼ、炭酸脱水酵素、ケモカイン受容体、JAK STAT、RXR及び類似のもの、HIV 1プロテアーゼ、HIV 1インテグラーゼ、インフルエンザ・ノイラミニダーゼ(influenza, neuraminidase)、B型肝炎逆転写酵素、ナトリウムチャンネル、多剤耐性(MDR)、タンパク質P-糖タンパク質(及びMRP)、チロシンキナーゼ、CD23、CD124、チロシンキナーゼp56 lck、CD4、CD5、IL-2受容体、IL-1受容体、TNF-αR、ICAM1、Cat+チャンネル、VCAM、VLA-4インテグリン、セレクトリン、CD40/CD40L、ニューロキニン(newokinins)及び受容体、イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ、p38 MAPキナーゼ、Ras/Raf/MEK/ERK経路、インターロイキン-1変換酵素、カスパーゼ、HCV、NS3プロテアーゼ、HCV NS3 RNAヘリカーゼ、グリシンアミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス-1(HSV-1)、プロテアーゼ、サイトメガロウイルス(CMV)プロテアーゼ、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ、サイクリン依存性キナーゼ、血管内皮増殖因子、オキシトシン受容体、ミクロソーム輸送タンパク質阻害剤、胆汁酸輸送阻害剤、5αレダクターゼ阻害剤、アンギオテンシン11、グリシン受容体、ノルアドレナリン再取り込み受容体、エンドセリン受容体、ニューロペプチドY及び受容体、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、アデノシン受容体、アデノシンキナーゼ及びAMPデアミナーゼ、プリン受容体(P2Y1、P2Y2、P2Y4、P2Y6、P2X1-7)、ファルネシルトランスフェラーゼ、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ、NGFの受容体TrkA、β-アミロイド、チロシンキナーゼFlk-1IKDR、ビトロネクチン受容体、インテグリン受容体、Her-2/neu、テロメラーゼ阻害、サイトゾルホスホリパーゼA2及びEGF受容体チロシンキナーゼを含む、多くの多因子性疾患において機能を回復させるために使用され得るタンパク質が含まれる。更なるタンパク質標的としては、例えば、エクジソン20-モノオキシゲナーゼ、GABA作動性塩素チャンネルのイオンチャンネル、アセチルコリンエステラーゼ、電位感受性ナトリウムチャンネルタンパク質、カルシウム放出チャンネル、及び塩素チャンネルが含まれる。なお更なる標的タンパク質としては、アセチルCoAカルボキシラーゼ、アデニロコハク酸シンセターゼ、プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ、及びエノールピルビルシキミ酸-リン酸シンターゼが含まれる。

【0134】

本発明の標的結合パートナーは又、ハロアルカンデハロゲナーゼ酵素でもあり得る。クロロアルカンペプチド結合部分(C1-C12、多くの場合、約C2-C10アルキルハロ基)を含有する本発明による化合物は、2011年12月6日に出願された国際出願P

CT/US2012/063401号明細書に記載され、2012年6月14日に国際公開第2012/078559号明細書として公開されたような融合タンパク質又は関連の診断タンパク質に使用されるハロアルカンデハロゲナーゼ酵素を阻害及び／又は分解するために使用することができ、その内容は本明細書の一部として援用される。

【0135】

本発明による二機能性分子は標的タンパク質結合パートナーとUchL5の結合パートナーを含む。

UchL5の準備：

UchL5は、次のように準備する。UchL5の遺伝子(DU12771)は、スタンフォード大学のDivision of Signal Transduction and Therapeutics (DSTT) から購入する。全長ドメイン及び触媒ドメインの構築物をPCRにより増幅し、それぞれN末端GSTタグ及びN末端ヘキサヒスチジンタグを含むpGEX-6P-1ベクター及びpNIC28a-Bsa4ベクターにクローニングする。

【0136】

GSTタグを有するタンパク質は、Lee et al, Sci Rep 2015 ; DOI : 10.1038/srep10757の修正法に従って精製する。グルタチオンセファロース4Bレジンをを用いるアフィニティークロマトグラフィーを行う。GSTタグのオンカラム切断を、PreScissionプロテアーゼを用いて行う。得られたタンパク質を、脱塩カラムを用い低塩バッファーに移す。Resource Q (又は同等の) カラムを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、次いで、Superdex 75 16-600 (又は同等の) カラムを用いてサイズ排除クロマトグラフィーを行う。

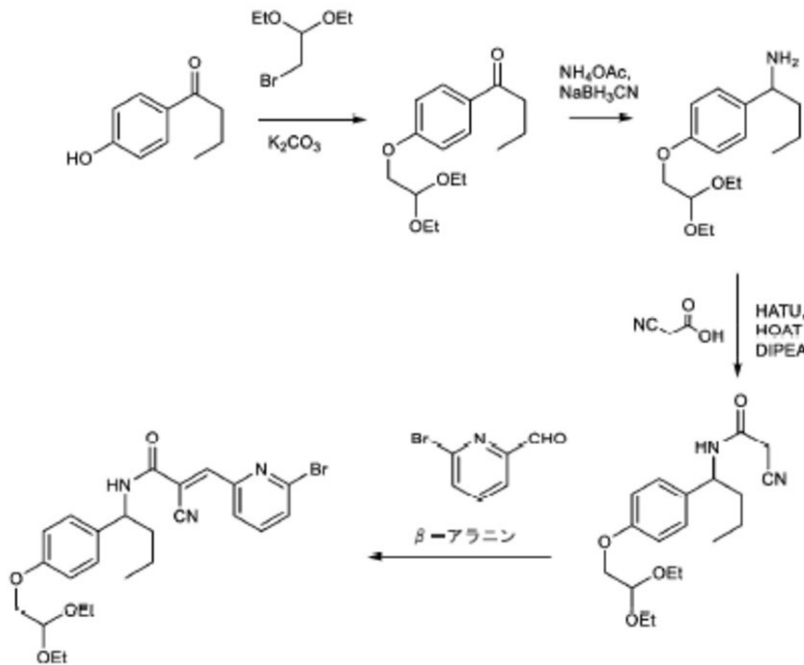
【0137】

Worden et al, NSMB 2014 ; DOI : 10.1038/nsmb.2771から修正した方法によってHisタグを有するタンパク質を精製する。Ni-NTAレジンをを用いるアフィニティークロマトグラフィーを行う。得られた材料を一晩、TEVプロテアーゼで切断する。第2のアフィニティークラムを用いて、切断されたHisタグを除去する。得られた材料を、脱塩カラムを用い低塩バッファーに移す。Resource Q (又は同等の) カラムを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、次いで、Superdex 75 16-600 (又は同等の) カラムを用いてサイズ排除クロマトグラフィーを行う。

【0138】

UchL5結合パートナーは次の用に合成することができる：

10



20

30

40

50

特定の実施形態では、リンカーは、1～12のエチレングリコールサブユニット、例えば、1～10のエチレングリコールサブユニット、1～8のエチレングリコールサブユニット、2～12のエチレングリコールサブユニット (submit s)、2～8のエチレングリコールサブユニット、3～8のエチレングリコールサブユニット、3～6のエチレングリコールサブユニット及び1つのエチレングリコールサブユニット、2つのエチレングリコールサブユニット、3つのエチレングリコールサブユニット、4つのエチレングリコールサブユニット、5つのエチレングリコールサブユニット、6つのエチレングリコールサブユニット、7つのエチレングリコールサブユニット、8つのエチレングリコールサブユニット、9つのエチレングリコールサブユニット、10のエチレングリコールサブユ

ニット、11のエチレングリコールサブユニット又は12のエチレングリコールサブユニットを有する置換又は非置換ポリエチレングリコールリンカーである。

【0141】

特定の実施形態では、リンカーは、1~12の $-CH_2-$ サブユニット、例えば、1~10の $-CH_2-$ サブユニット、1~8の $-CH_2-$ サブユニット、2~12の $-CH_2-$ サブユニット (submit s)、2~8の $-CH_2-$ サブユニット、3~8の $-CH_2-$ サブユニット、3~6の $-CH_2-$ サブユニット及び1つの $-CH_2-$ サブユニット、2つの $-CH_2-$ サブユニット、3つの $-CH_2-$ サブユニット、4つの $-CH_2-$ サブユニット、5つの $-CH_2-$ サブユニット、6つの $-CH_2-$ 、7つの $-CH_2-$ サブユニット、8つの $-CH_2-$ サブユニット、9つの $-CH_2-$ サブユニット、10の $-CH_2-$ サブユニット、11の $-CH_2-$ サブユニット又は12の $-CH_2-$ サブユニットを有する置換又は非置換アルキルリンカーである。

リンカーは、リンカーに沿ったいずれかの位置にO、P、S、N又はSi原子を含む置換PEGリンカー又は置換アルキルリンカーを含み得る。リンカーは又、リンカーに沿ったいずれかの位置においてアリール、アルキレン、アルキル、ベンジル、複素環 (heterocycle)、トリアゾール、スルホキシド又はフェニル基の組合せで置換されていてもよい。

【0142】

いくつかの実施形態では、リンカーは、PEGサブユニットとアルキルエーテル鎖、例えば、 $(-(CH_2CH_2)_{1-11}-O-(CH_2CH_2)_{1-11}-O-)$ 又は $(-(CH_2CH_2)_{1-11}-O-)$ などの組合せを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、 CH_2 サブユニットと酸素、例えば、アルキルエーテル、 $(-(CH_2)_{1-11}-O-(CH_2)_{1-11}-O-)$ 又は $(-(CH_2)_{1-11}-O-)$ などの組合せを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、PEGサブユニットと環構造の組合せを含む。他の実施形態において、リンカーは、 CH_2 サブユニットと環構造の組合せを含む。

リンカーは、UchL5結合パートナーと標的タンパク質結合パートナーが、18~95 Å、例えば、2~4のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には18~25 Å、4~6のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には25~33 Å、6~8のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には33~39 Å、8~12のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には39~53 Å及び12~24のエチレングリコールサブユニットを含むリンカーの場合には53~95 Åの距離だけ離されるような長さである。一実施形態では、リンカーを介して連結された本発明の二機能性分子のUchL5結合パートナーと標的タンパク質結合パートナーは、2原子、3原子、4原子、5原子、6原子、7原子、8原子、9原子、10原子、11原子、12原子、13原子、14原子、15原子、16原子、17原子、18原子、19原子、20原子、21原子、22原子、23原子、24原子、25原子、26原子、27原子、28原子、29原子、30原子、40原子、50原子、60原子、70原子、80原子及び90又はそれを超える原子の距離だけ離されてよい。

【0143】

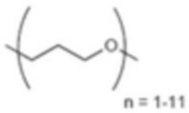
本発明において有用なリンカーの長さ、安定性及びフレキシビリティは、本発明による二機能性分子の2つの結合パートナーの間に所与の空間又は距離を許容し、そして、所与の分子の2つの結合パートナーの間の空間は、二機能性分子により結合される標的タンパク質が、標的タンパク質の分解を促進する配置を採ることを許容する。

本発明によるリンカーは、純粋な材料として又は溶液中で保存される場合に分解又は切断を受けなければ安定であると考えられる。本発明によるリンカーは、代謝されなければ生物学的に安定であると考えられる。

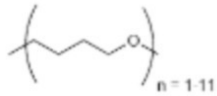
特定の実施形態では、結合パートナーは、1以上のリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態では、結合パートナーは、共有結合により直接連結され、このような直接的連結は「リンカー」という用語の範囲内にある。

【0144】

本発明において有用なリンカーとしては、限定されるものではないが、
【化 9 0】



又は



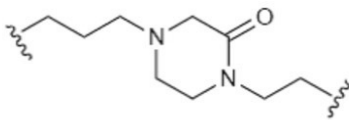
10

及びこれらの組合せ、例えば、
【化 9 1】



が含まれる。

本発明によるリンカーとしては、環構造、例えば、
【化 9 2】



20

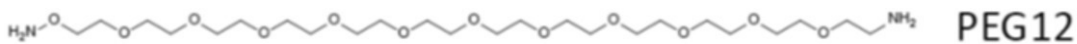
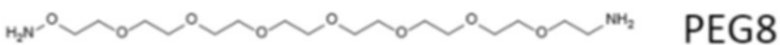
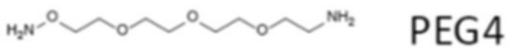
を含むことができる。

【0145】

本発明において有用なリンカーは、一方の末端にオキシム及び他方の末端にアミンを有する PEG リンカー、例えば、

【化 9 3】

30



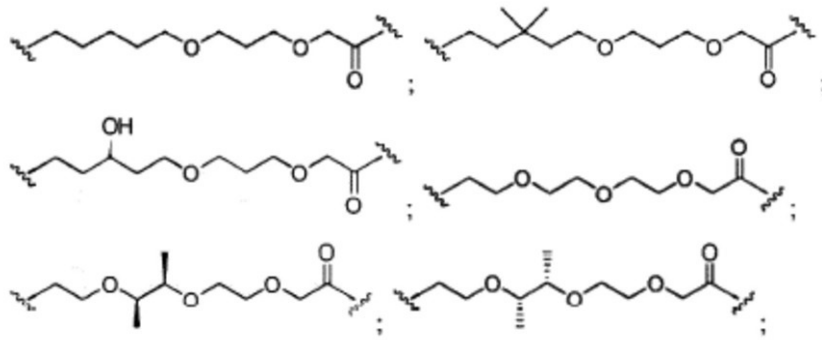
を含み得る。

【0146】

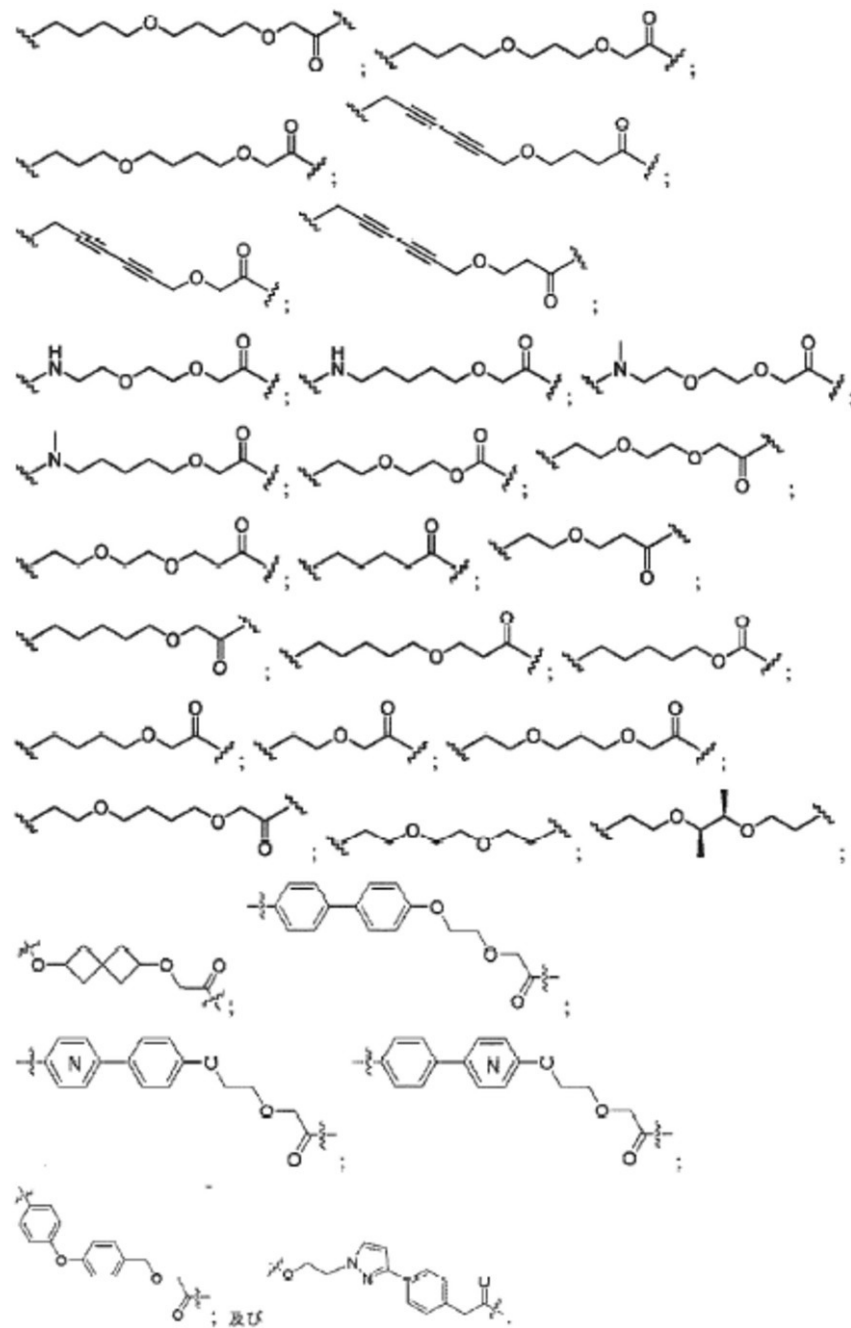
40

本発明によるリンカーとしては、以下から選択されるリンカーを含み得る。

【化 9 4】



10



20

30

40

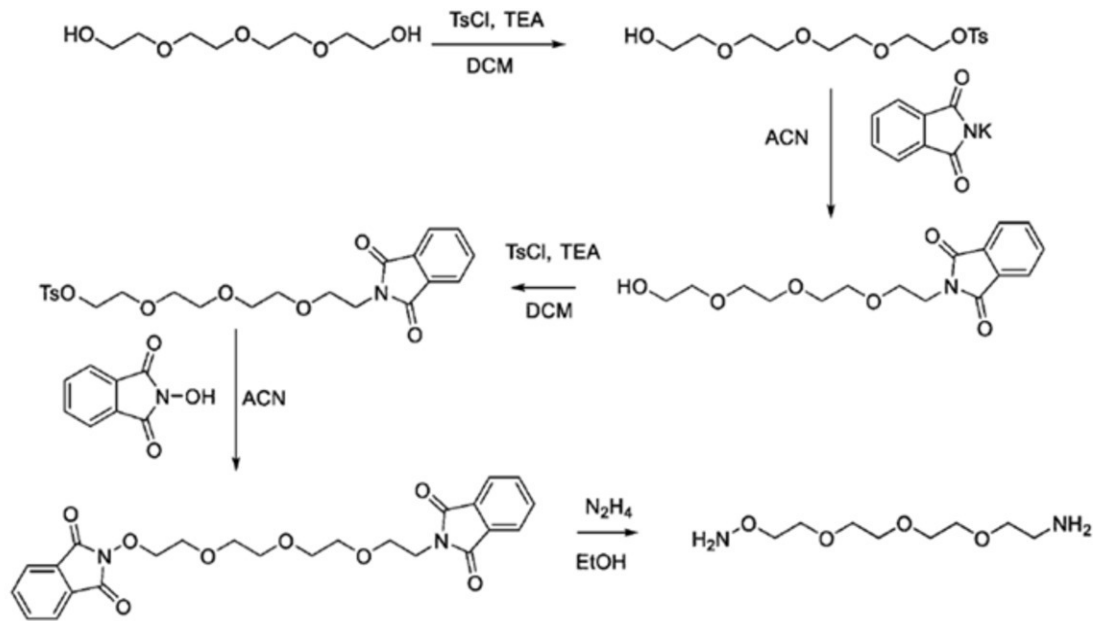
【0147】

本発明によるリンカーは、PEGをモノトシル化した後、そのモノトシル化PEGを9

50

0℃でDMF又はACN中、カリウムフタルイミド（phalimide）と反応させることにより作製することができる。その反応の生成物はトシル化又はメシル化され、塩基としてのTEAの存在下、N-ヒドロキシフタルイミド（phalimide）と反応させる。最終的な脱保護は、還流しているエタノール中、過剰量のヒドラジン水和物で処理することにより行うことができる。

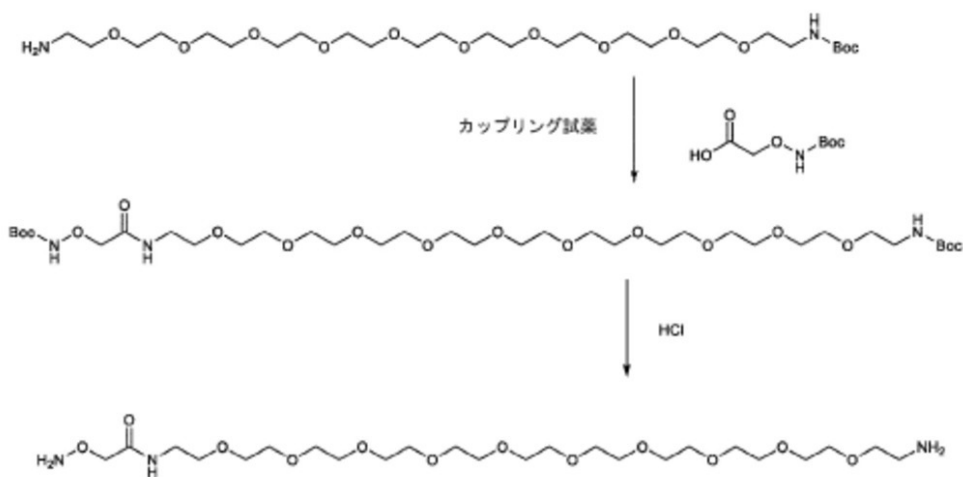
【化95】



【0148】

本発明によるリンカーは又、モノ-Bocで保護されたPEGアミンをBoc-アミノキシ酢酸及びアミドカップリング試薬と反応させることによって作製することができる。生成物は、例えば、HClの存在下で脱保護された酸である。

【化96】



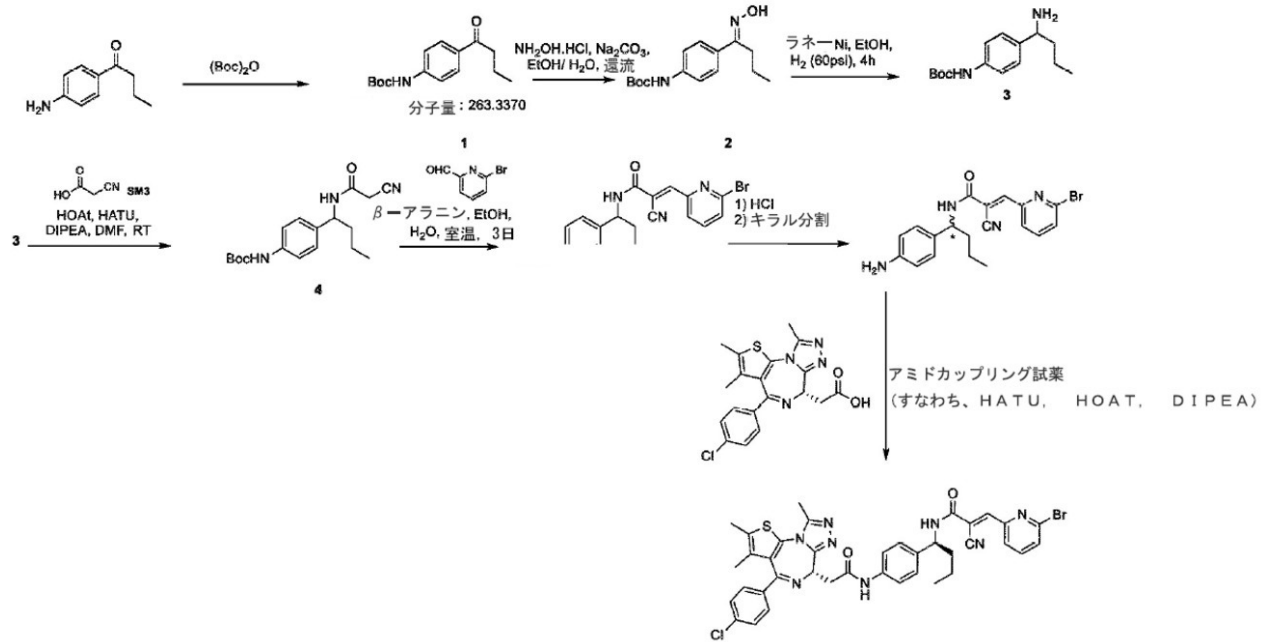
【0149】

本発明は、結合パートナーが直接結合され、例えば以下のように合成される二機能性分子を提供する。

【0150】

UCLH5-BET標的化コンジュゲートの合成

【化 97】



20

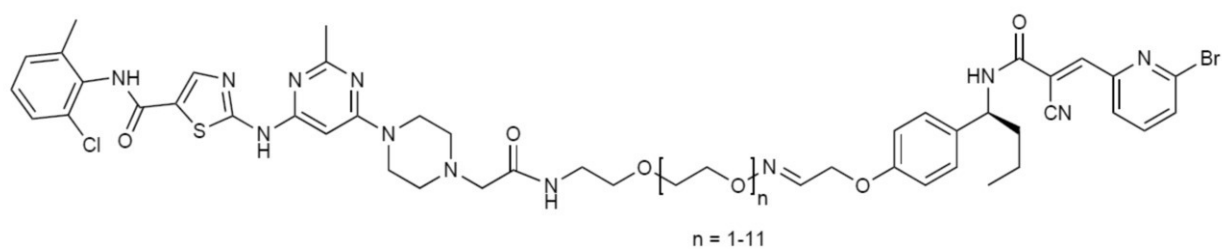
本発明は、例えば本明細書に開示されるような、U C H L 5 結合パートナーと標的タンパク質結合パートナーを有する分子を提供する。

【0151】

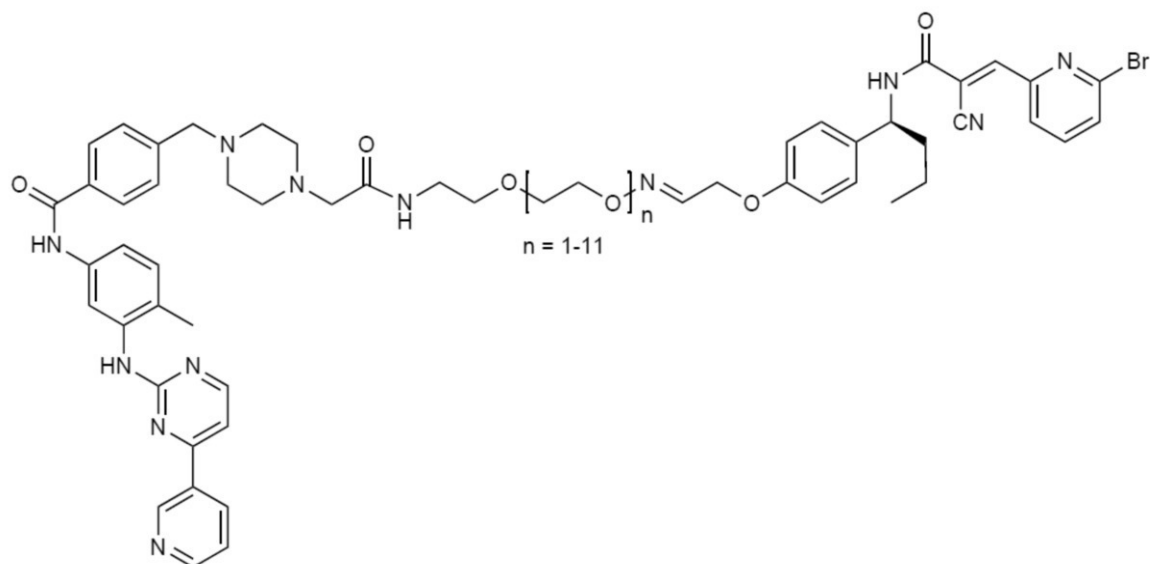
U C H L 5 結合部分を含むキナーゼ標的化分子

本発明は、U c h L 5 結合部分とキナーゼ標的化部分を含む分子を提供する。例示的構造を以下に示す。

【化 9 8】



10



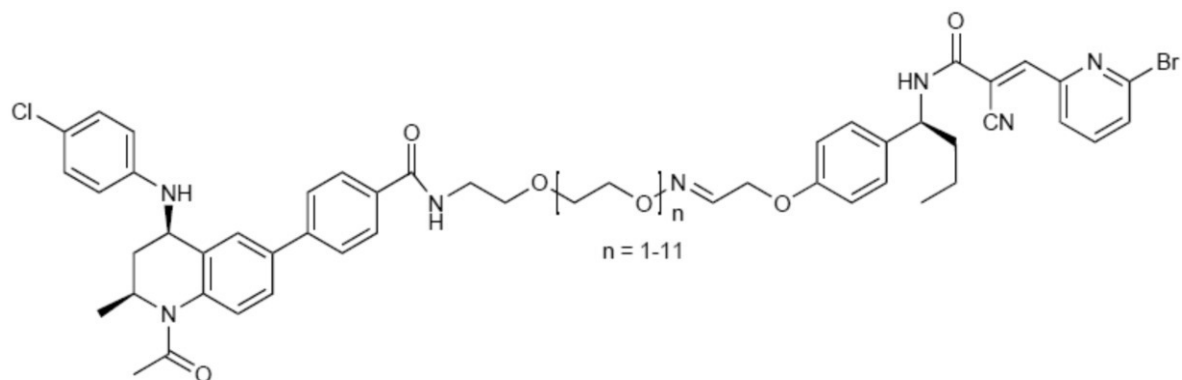
20

【 0 1 5 2】

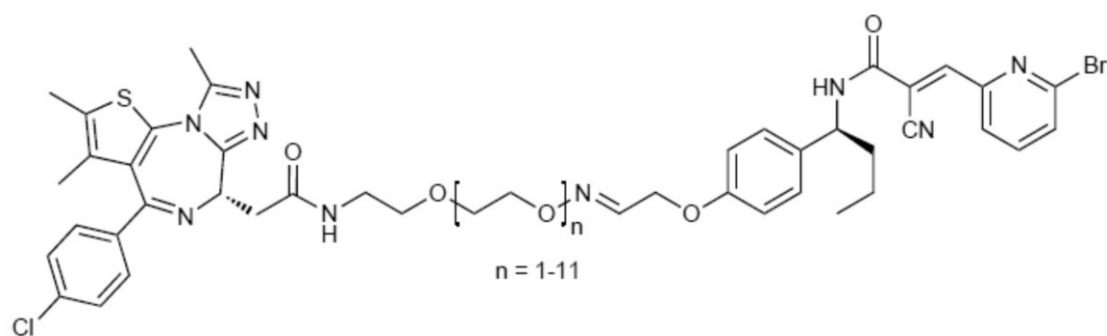
U c h L 5 結合パートナーを含む B E T 標的化分子

本発明は、U c h L 5 結合パートナーと B E T 標的化パートナーを含む分子を提供する。例示的構造を以下に示す。

【化 9 9】



30



40

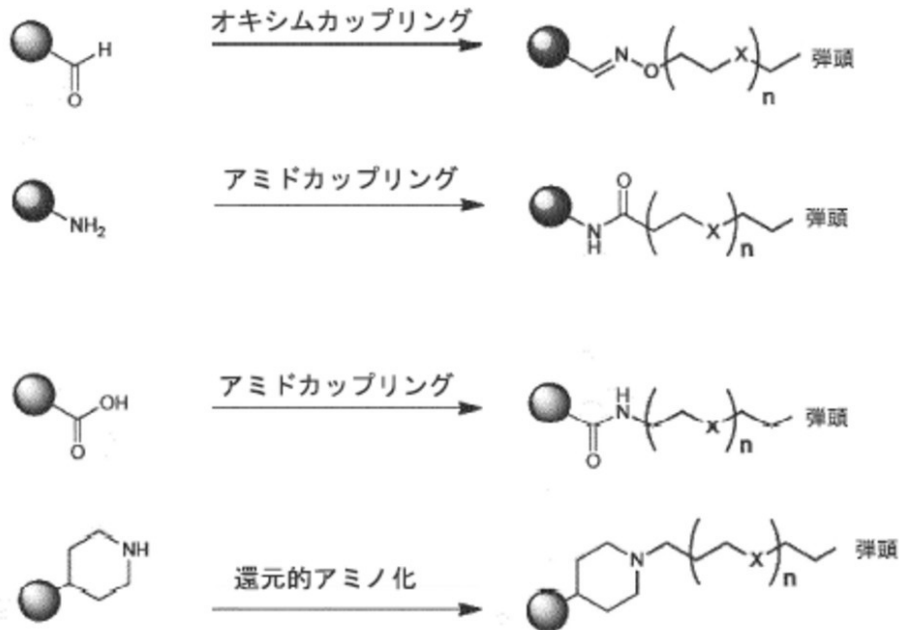
50

【0153】

合成方法

本発明の分子を合成するためには、当技術分野で周知の合成方法が使用される。本発明の分子は、例えば、オキシムカップリング、アミドカップリング又は還元的アミノ化によって合成することができる。

【化100】



10

20

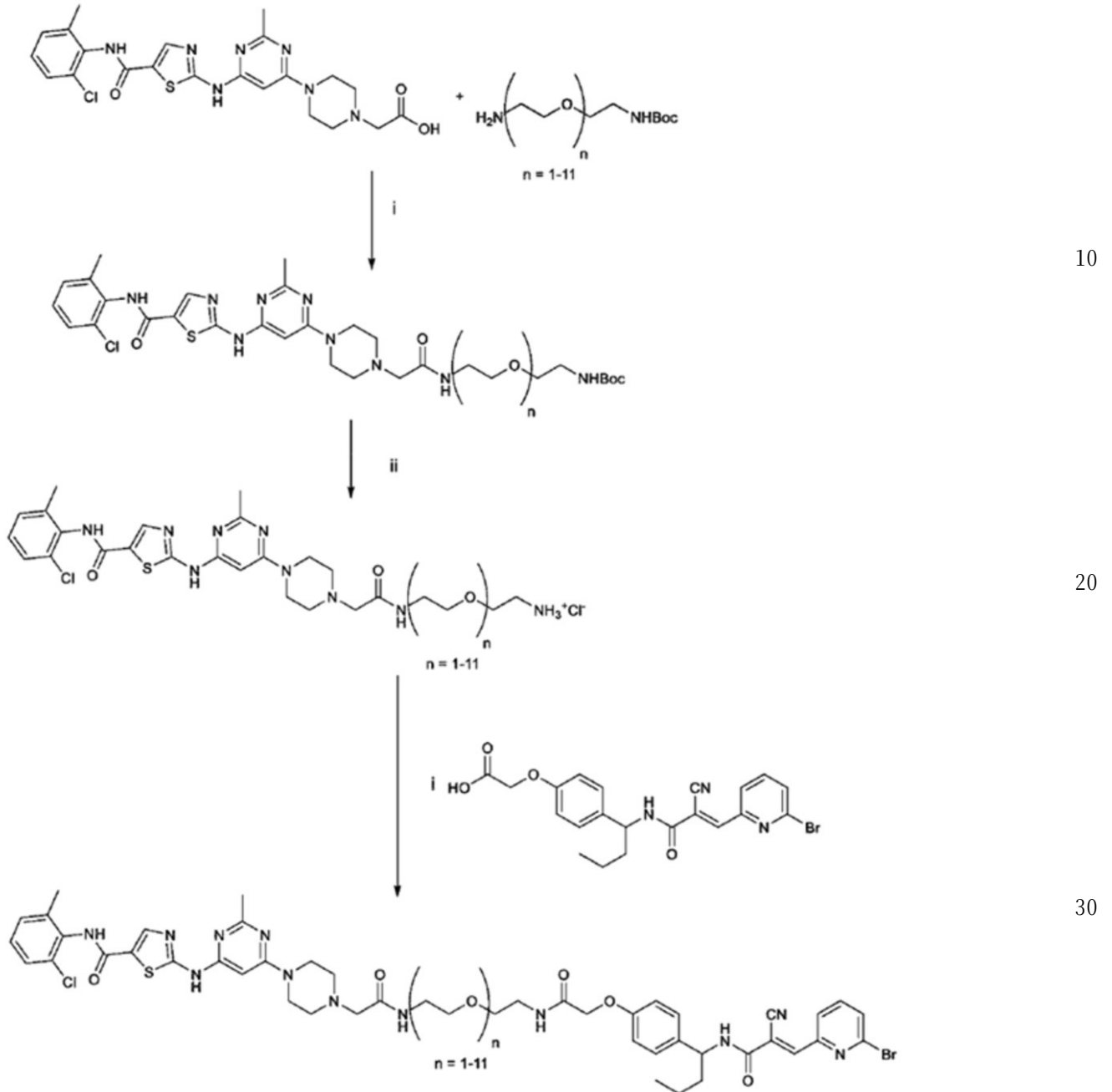
【0154】

標的タンパク質結合パートナーに連結されたU c h L 5 結合パートナーを含む本発明の二機能性分子は、以下に示される方法のうちいずれか1つに従って合成することができる。しかしながら、合成の別法も使用可能である。

両端にアミンを有するP E G リンカーを介してダサチニブに連結されたデグラシン誘導体であるU c h L 5 結合パートナーを含むB C R / A b l キナーゼ標的化二機能性分子の合成

30

【化 1 0 1】



【0 1 5 5】

これらの二機能性分子は、例えば、アミドカップリング試薬、例えば、HATU、COMU、HBTU、HCTU、PyBOP、EDC、DCC、DIC；塩基、すなわち、TEA、DIPEA、NMM及び好適な溶媒、すなわち、DCM、DMF、NMP、THFを使用することにより作製することができる。次に、第1のBoc脱保護は、好適な溶媒、すなわち、DCM、MeOH、ジオキサン、エタノール、ジエチルエーテル中、酸、例えば、HCl又はTFAを使用することにより達成され、その後、第2の及び最終のカップリング反応を行う。

40

【0 1 5 6】

分解のための、標的タンパク質結合パートナーに連結されたUchL5結合パートナーを含む二機能性分子の使用

本発明は、標的タンパク質結合パートナーに連結されたUchL5結合パートナーを含む二機能性分子を用いて、対象とする標的タンパク質を分解する方法を提供する。これら

50

の方法は *in vitro* 及び *in vivo* で使用することができる。これらの方法は、対象とする標的タンパク質、例えば、単離された対象とする標的タンパク質又は対象とする標的タンパク質を含む細胞を、標的タンパク質の分解を可能とする条件下でそれを可能とする時間、本発明の二機能性分子と接触させることを含む。

【0157】

標的タンパク質の分解の判定

分解は、本発明の二機能性分子の存在下及び不在下での標的タンパク質の量を測定及び比較することにより判定される。分解は、例えば、二機能性分子で処理した又は処理しなかった細胞を用いて免疫ブロットアッセイ、ウエスタンブロット解析及び E L I S A を実施することにより判定することができる。タンパク質分解の成功は、特定の時点で分解されたタンパク質の量として示される。本発明の二機能性分子の存在下、特定の時点で、タンパク質の量の減少が見られれば分解は起こっていたことになる。

より詳しくは、1 nM ~ 10 μ M、例えば、1 nM、10 nM、100 nM、1 μ M、及び 10 μ M の本発明の二機能性分子の存在下、24 時間以上、例えば、24 時間、30 時間、36 時間、42 時間、48 時間、54 時間、60 時間、66 時間及び 72 時間に、タンパク質の量に少なくとも 10 %、例えば、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % 又は 100 % の低下が見られれば分解は起こっていたことになる。

【0158】

医薬組成物

特定の実施形態では、本発明は、本発明の分子を含む医薬組成物を提供する。分子は、分子の標的タンパク質結合パートナーに結合する標的タンパク質の分解を誘導し、細胞機能を増強又は低下させるために十分な分子の部分が細胞に入ることを可能とする手段によって、適宜製剤し、細胞の環境に導入することができる。本発明の分子は、リン酸緩衝生理食塩水などのバッファー溶液中に製剤される。このような組成物は一般に、当該分子と薬学上許容される担体を含む。本明細書で使用する場合、「薬学上許容される担体」という語には、医薬投与に適合した生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤及び抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤などが含まれる。補助的有効化合物も又、当該組成物に配合することができる。

【0159】

医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤される。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経口投与（例えば、吸入投与）、経皮投与（局所投与）、経粘膜投与、及び直腸投与が含まれる。非経口適用、皮内適用、又は皮下適用に使用される溶液又は懸濁液は以下の成分を含み得る：注射水、生理食塩水溶液、硬化油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶剤などの無菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などのバッファー及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張度の調節のための薬剤。pH は、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。非経口製剤は、ガラス又はプラスチック製のアンブル、使い捨てシリンジ又は多用量バイアルに封入することができる。

【0160】

注射用に好適な医薬組成物としては、無菌注射溶液又は分散液の即時調合のための無菌水溶液（ここでは、水溶性）又は分散液と無菌粉末が含まれる。静脈内投与に関して、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、クレモフォール E L . T M . （B A S F、P a r s i p p a n y、N . J . ）又はリン酸緩衝生理食塩水（P B S）が含まれる。いずれの場合でも、組成物は無菌でなければならず、容易に注射できる程度の流動性がなければならない。製造及び保管の条件下において安定でなければならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保存されていなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリ

コールなど)、及びこれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用によるか、分散液の場合には必要な粒径の維持によるか、又、界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の回避は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば、糖類、ポリアルコール、例えば、マニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射組成物の吸収延長は、組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含めることによってもたらし得る。

【0161】

無菌注射溶液は、適当な溶媒中に、上記に挙げた成分の1つ又は組合せとともに有効化合物を必要な量で配合した後に必要に応じ濾過除菌を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基本分散媒及び上記に挙げたものの以外の必要な成分を含有する無菌ビヒクルに有効化合物を配合することによって調製される。無菌注射溶液の調製のための無菌散剤の場合、好ましい調製方法は真空乾燥及び凍結乾燥であり、事前に濾過除菌されたその溶液から有効成分と付加的な所望の成分の粉末が得られる。

【0162】

経口組成物としては一般に、不活性希釈剤又は可食担体が含まれる。経口治療投与のためには、有効化合物は賦形剤が配合され、錠剤、トローチ剤、又はカプセル剤、例えば、ゼラチンカプセル剤の形態で 사용할ことができる。経口組成物は又、口内洗浄剤として使用するために液体担体を用いて調製することもできる。製薬上適合する結合剤、及び／又はアジュバント材料を組成物の一部として含んでもよい。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、類似の性質の以下の成分又は化合物のいずれを含んでもよい：微晶質セルロース、トラガカントガム又はゼラチンなどの結合剤；デンプン又はラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、プリモゲル、又はコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム又はSterotesなどの滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロース又はサッカリンなどの甘味剤；又はペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジフレーバーなどの香味剤。

【0163】

吸入による投与に関して、化合物は、好適な噴射剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する与圧容器若しくはディスペンサー、又はネブライザーからのエアゾールスプレーの形態で送達される。このような方法には、米国特許第6,468,798号に記載されているものが含まれる。

又、全身投与は、経粘膜的又は経皮的手段によってもよい。経粘膜又は経皮投与に関しては、透過される障壁に適当な浸透剤が製剤に使用される。このような浸透剤は一般に当技術分野で公知であり、例えば、経粘膜投与に関して、界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻腔スプレー又は坐剤の使用によって達成することができる。経皮投与に関して、有効化合物は、一般に当技術分野で公知のように、軟膏、膏薬、ゲル、又はクリーム中に製剤される。

【0164】

当該化合物は又、直腸送達用の坐剤（例えば、カカオ脂及び他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いて）又は保留浣腸の形態で調製することもできる。

当該化合物は又、限定されるものではないが、McCaffrey et al. (2002), Nature, 418 (6893), 38-9 (流体力学的トランスフェクション)；Xia et al. (2002), Nature Biotechnol., 20 (10), 1006-10 (ウイルス介在送達)；又はPutnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53 (2), 151-160, erratum at Am. J. Health Syst. Pharm. 53 (3), 325 (1996)に記載される方法を含む、当技術分野で公知の方法を用いたトランスフェクション又は感染によって投与するこ

10

20

30

40

50

ともできる。

【0165】

一実施形態では、有効化合物は、身体からの急速排泄から化合物を保護する担体、例えば、インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含む放出制御製剤を用いて調製される。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーが使用可能である。このような製剤は、標準技術を用いて調製することができる。これらの材料は又、Alza Corporation及びNova Pharmaceuticals, Incから商業的に入手することもできる。リポソーム懸濁液（感染細胞をウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で標的化したリポソームを含む）は又、薬学上許容される担体として使用することもできる。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に記載されているように当業者公知の方法に従って調製することができる。

10

【0166】

このような化合物の毒性及び治療効力は、例えばLD₅₀（集団の50％に対する致死用量）及びED₅₀（集団の50％に治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養物又は実験動物における標準的な薬学的手法によって決定することができる。毒性作用と治療効果の間の用量比が治療係数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を用いてもよいが、非感染細胞に対する傷害の可能性を最小とし、それにより副作用を軽減するよう、罹患組織の部位にそのような化合物を標的化する送達系を設計するための配慮がなされるべきである。

20

【0167】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータを、ヒトにおける使用のための用量範囲の処方を使用することができる。このような化合物の用量は好ましくは、毒性がほとんど無いか又は全く無いED₅₀を含む循環濃度の範囲にある。用量は使用する投与剤形及び使用する投与経路に応じてこの範囲内で変更可能である。本発明の方法において使用される化合物に関して、治療上有効な用量は、まず、細胞培養アッセイから見積もることができる。用量は動物モデルで、細胞培養において決定されるようなIC₅₀（すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように処方してもよい。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより精密に決定するために使用することができる。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定可能である。

30

【0168】

本明細書に定義されるような、本発明の分子の治療上有効な量（すなわち、有効用量）は、選択される分子によって異なる。例えば、およそ1pg～1000mgの範囲の単回用量を投与し得る；いくつかの実施形態では、10、30、100、又は1000pg、又は10、30、100、又は1000ng、又は10、30、100、又は1000μg、又は10、30、100、又は1000mgを投与し得る。いくつかの実施形態では、1～5gの組成物を投与することができる。これらの組成物は、1日おきに1回を含む、1日1回以上～週1回以上投与することができる。当業者は、特定の因子が、限定されるものではないが、疾患又は障害の重篤度、過去の治療、対象の健康状態及び／又は年齢、並びに存在する他の疾患を含む、対象を効果的に治療するために要される用量及び時機に影響を及ぼし得ることを認識するであろう。更に、治療上有効な量の本発明の分子を用いた対象の処置は単回処置を含み得るか、好ましくは、一連の処置を含み得る。

40

【0169】

特定の実施形態では、本発明による二機能性分子の用量は、5mg/kg/週～500mg/kg/週の範囲、例えば、5mg/kg/週、10mg/kg/週、15mg/kg/週、20mg/kg/週、25mg/kg/週、30mg/kg/週、35mg/kg/週、40mg/kg/週、45mg/kg/週、50mg/kg/週、55mg/kg/週、60mg/kg/週、65mg/kg/週、70mg/kg/週、75mg/kg/週、80mg/kg/週、85mg/kg/週、90mg/kg/週、95mg/kg/週、

50

g/週、100mg/kg/週、150mg/kg/週、200mg/kg/週、250mg/kg/週、300mg/kg/週、350mg/kg/週、400mg/kg/週、450mg/kg/週及び500mg/kg/週である。特定の実施形態では、本発明による二機能性分子の用量は、10mg/kg/週～200mg/kg/週、20mg/kg/週～150mg/kg/週又は25mg/kg/週～100mg/kg/週の範囲である。特定の実施形態では、二機能性分子は、2週間～6か月、例えば、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、26週間、6か月、8か月、10か月又は1年以上の期間、週1回投与される。特定の実施形態では、この分子は、週2回投与される。他の実施形態では、この二機能性分子は、隔週に投与される。特定の実施形態では、この二機能性分子は、静脈内に投与される。

10

【0170】

本発明の分子は、薬理学上有効な量の分子と薬学上許容される担体を含む医薬組成物として製剤することができる。薬理学上又は治療上有効な量は、意図される薬理学的、治療的又は予防的結果をもたらすために有効な二機能性分子薬剤の量を指す。「薬理学上有効な量」及び「治療上有効な量」又は単に「有効な量」という用語は、意図される薬理学的、治療的又は予防的結果をもたらすために有効な二機能性分子薬剤の量を指す。例えば、所与の臨床処置が、疾病又は障害と関連している測定可能なパラメーターに少なくとも20%の減少が存在すれば有効であると見なされる場合には、その疾患又は障害の治療のための薬物の治療上有効な量は、そのパラメーターに少なくとも20%の減少を果たすために必要な量である。

20

【0171】

適宜製剤された本発明の医薬組成物は、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与、経皮投与、気道投与（エアロゾル）、直腸投与、膣投与及び局所投与（口内投与及び舌下投与を含む）を含む非経口経路によるなどの当技術分野で公知のいずれの手段によって投与することもできる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、静脈内又は内部非経口（intravenous）注入又は注射によって投与される。

【0172】

一般に、分子の好適な用量単位は、0.001～0.25ミリグラム/キログラムレシピエント体重/日の範囲、又は0.01～20マイクログラム/キログラム体重/日の範囲、又は0.01～10マイクログラム/キログラム体重/日の範囲、又は0.10～5マイクログラム/キログラム体重/日の範囲、又は0.1～2.5マイクログラム/キログラム体重/日の範囲であろう。この分子を含む医薬組成物は、1日1回投与することができる。しかしながら、治療薬は又、1日のうちに適当な間隔で投与される2つ、3つ、4つ、5つ、6つ又はそれを超える分割用量を含有する用量単位で投与してもよい。この場合、各分割用量中に含有される分子は、総1日用量単位を達成するために相応に少なくなければならない。用量単位は又、例えば、数日間にわたって分子の持続的且つ一貫した放出をもたらす従来の持続放出製剤を用い、数日間のための単回用量として合わせることもできる。持続放出製剤は当技術分野で周知である。この実施形態において、用量単位は、対応する倍数の1日用量を含有する。製剤にかかわらず、医薬組成物は、例えば、分子の標的タンパク質結合パートナーに結合される標的タンパク質の分解を誘導すること、特定の実施形態では、細胞機能に変化をもたらすことを達成するために十分な量で分子を含有しなければならない。この組成物は、複数単位の分子の合計が十分な用量を含有するように合わせることができる。

30

40

【0173】

細胞培養アッセイ及び動物試験から、ヒトに関して好適な用量範囲を処方するためのデータを得ることができる。本発明の組成物の用量は、毒性がほとんど無いか又は全く無いED₅₀（既知の方法で決定される）を含む循環濃度範囲にある。用量は使用する投与剤形及び使用する投与経路に応じてこの範囲内で変更可能である。本発明の方法において使用される化合物に関して、治療上有効な用量は、まず、細胞培養アッセイから見積もること

50

ができる。用量は動物モデルで、細胞培養において決定されるような IC_{50} （すなわち、症状の最大の半分の阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む化合物の循環血漿濃度範囲を達成するように処方してもよい。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより精密に決定するために使用することができる。血漿中の分子のレベルは、標準的な方法、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定可能である。

これらの医薬組成物は、キット、容器、パック、又はディスペンサー中に、投与に関する説明書とともに含まれ得る。

【0174】

治療方法

本発明は、標的タンパク質の過剰発現により全面的又は部分的に生じる疾患又は障害のリスクがある（又はその感受性がある）対象を処置する予防的方法と治療的方法の両方を提供する。

「治療」、又は「治療する」は、本明細書で使用する場合、疾患若しくは障害、疾患若しくは障害の症状、又は疾患に対する素因を治癒させる、回復させる、緩和する、軽減する、変化させる、矯正する、改善する、向上させる又は影響を及ぼす目的で、疾患若しくは障害、疾患若しくは障害の症状、又は疾患若しくは障害に対する素因を有する患者に対する治療薬（例えば、本発明の分子）の適用若しくは投与、又は患者由来の摘出組織若しくは細胞株に対する治療薬の適用若しくは投与と定義される。

【0175】

一態様において、本発明は、対象において上記のような疾患又は障害を予防するための、対象に治療薬（例えば、本発明の分子）を投与することによる方法を提供する。その疾患のリスクのある対象は、例えば、本明細書に記載されるような診断又は予後アッセイのいずれか1つ又は組合せによって特定することができる。予防薬の投与は、対象において例えばウイルス粒子の検出の前、又は疾患若しくは障害に特徴的な症状の顕在化の前にその疾患又は障害が予防されるように、或いは又、その進行が遅延されるように行うことができる。

本発明の別の態様は、対象を治療的に処置する方法に関し、すなわち、疾患又は障害の症状の発症を変化させる。これらの方法は、*in vitro*で或いは又、*in vivo*で（例えば、本発明の分子を対象に投与することにより）行うことができる。

【0176】

予防的処置法及び治療的処置法の両方に関して、このような処置は、薬理ゲノミクスの分野から得られる知見に基づいて具体的に調整又は修正することができる。「薬理ゲノミクス」は、本明細書で使用する場合、臨床開発中の薬物及び市場にある薬物に対する遺伝子シーケンシング、統計遺伝学、及び遺伝子発現分析などのゲノミクス技術の適用を指す。より具体的には、この用語は、患者の遺伝子が薬物に対するその患者の応答をどのように決定するかという研究（例えば、患者の「薬物応答表現型」、又は「薬物応答遺伝子型」）を指す。薬理ゲノミクスは、臨床家又は医師が、予防的処置又は治療的処置をその処置から最も利益を受けるであろう患者に向けること及び有毒な薬物関連副作用を受けるであろう患者の処置を回避することを可能とする。

【0177】

治療薬は、適当な動物モデルで試験することができる。例えば、本明細書に記載されるような分子は、その薬剤による処置の有効性、毒性、又は副作用を決定するために動物モデルで使用するすることができる。或いは、治療薬は、このような薬剤の作用機序を決定するための動物モデルで使用するすることができる。例えば、薬剤は、このような薬剤による処置の有効性、毒性、又は副作用を決定するための動物モデルで使用するすることができる。或いは、薬剤は、そのような薬剤の作用機序を決定するための動物モデルで使用するすることができる。

【0178】

本発明の二機能性分子は、選択された標的タンパク質のタンパク質分解を増大させるために有用である。タンパク質は、細胞においてそのタンパク質の量を低減するように、標

10

20

30

40

50

的化タンパク質分解のために選択される。細胞における所与の標的タンパク質の量の低減は、所与の疾患の有害な影響を治療、予防、又は軽減するために有利であり得る。いくつかの場合、所与の疾患は、細胞内の所与の標的タンパク質の増量の存在に関与する。本発明の細胞又は対象に二機能性分子を投与した後に疾患の1以上の症状が低減又は消失されれば、その対象はその疾患に関して治療されると言われる。

【0179】

動物モデル

選択された標的タンパク質のタンパク質分解を促進する際の活性に関して二機能性分子を試験するために、分子を動物に投与し、その動物に対する効果を評価すればよい。本発明において有用な動物モデルとしては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる：

【表 3】

動物モデル	治療領域
B 6 C 3 F 1 マウス	心血管
C B 6 F 1 マウス	心血管
CD 2 F 1 (CDF 1) マウス	心血管
D a h l / 塩感受性ラット	心血管
D B A / 2 マウス	心血管
F H H ラット	心血管
H a r t l e y モルモット	心血管
I A F ヘアレスモルモット	心血管
L V G ゴールデンシリアンハムスター	心血管
スナネズミ (M o n g o l i a n G e r b i l)	心血管
ニュージーランド白ウサギ	心血管
肥満傾向CDラット	心血管
肥満耐性CDラット	心血管
自然発症高血圧 (SHR) ラット	心血管
自然発症高血圧心不全 (SHHF) ラット	心血管
自然発症高血圧肥満 (SHROB) ラット	心血管
自然発症高血圧脳卒中傾向 (SHRSP) ラット	心血管
S S - 1 3 B N ラット	心血管
W i s t a r F u r t h ラット	心血管
W i s t a r I G S ラット	心血管
W i s t a r K y o t o (W K Y) ラット	心血管
Z u c k e r ラット	心血管
B 1 0 . A / C r マウス	炎症
L e w i s ラット	炎症
L y 5 . 1 マウス	炎症
N C G マウス	炎症
O T I マウス	炎症
O T I I マウス	炎症
S J L - E l i t e マウス	炎症
W i s t a r I G S ラット	炎症
C 5 7 B L / 6 無菌マウス	代謝性疾患
Z D F ラット	代謝性疾患
C 5 7 B L / 6 無菌マウス	神経科学
A K R マウス	腫瘍学
無胸腺ヌードマウス	腫瘍学

10

20

30

40

BALB/cヌードマウス	腫瘍学
BDIXラット	腫瘍学
Buffaloラット	腫瘍学
C57BL/6無菌マウス	腫瘍学
CD-1ヌードマウス	腫瘍学
Copenhagenラット	腫瘍学
Fox Chase CB17マウス	腫瘍学
Fox Chase SCID Beigeマウス	腫瘍学
Fox Chase SCIDマウス	腫瘍学
Immortomouse	腫瘍学
NCGマウス	腫瘍学
NCI SCID/NCrマウス	腫瘍学
NIH-IIIヌードマウス	腫瘍学
NMRIヌードマウス	腫瘍学
Nobleラット	腫瘍学
NOD SCIDマウス	腫瘍学
NU/NUヌードマウス	腫瘍学
OFAラット	腫瘍学
RNUラット	腫瘍学
SCIDヘアレス類似遺伝子系 (SHC) マウス	腫瘍学
SCIDヘアレス雑種 (SHO) マウス	腫瘍学
Swissヌードマウス	腫瘍学
Wistar Furthラット	腫瘍学

10

20

【0180】

本発明の実施には、特に断りのない限り、当業者の技術の範囲内にある化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA、遺伝学、免疫学、細胞生物学、細胞培養及びトランスジェニックバイオロジーの従来技術を使用する。例えば、Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, 第2版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.); Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning, 第3版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.); Ausubel et al., 1992), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 定期的更新を含む); Glover, 1985, DNA Cloning (IRL Press, Oxford); Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Harlow and Lane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.); Jakoby and Pastan, 1979; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Al

30

40

50

an R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); 論文 Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154及び155 (Wu et al. 編), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker 編, Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell 編, 1986); Riott, Essential Immunology, 第6版, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), (第4版, Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000) 参照。

【0181】

そうではないことが定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の熟練者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本発明の実施又は試験に当たっては、本明細書に記載のものと類似又は等価な方法及び材料を使用することができるが、好適な方法及び材料を以下に記載する。本明細書に記載される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、その全内容が本明細書の一部として援用される。矛盾がある場合には、定義を含む本明細書が優先する。

材料、方法、及び例は単に例示であり、本明細書に記載される本発明の種々の実施形態に限定されることを意図しない。

【実施例】

【0182】

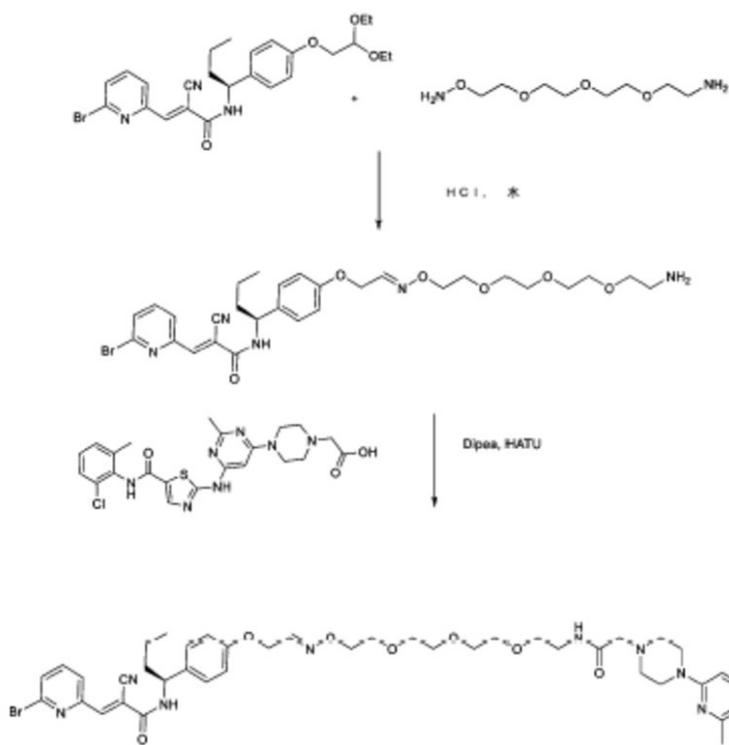
実施例1ー U c h L 5 結合パートナーを含むキナーゼ標的化分子の合成

リンカーを介してU c h L 5 結合パートナーに結合された、キナーゼを標的とする標的タンパク質結合パートナーを含む本発明の分子は、一実施形態では、以下の方法によって作製される。リンカーを介してU c h L 5 結合パートナーに連結された、キナーゼパートナーを標的とする標的タンパク質結合パートナーを含む本発明の二機能性分子を合成するために、U c h L 5 結合パートナーを、アミドカップリング条件下、アミノキシ含有リンカーと、次いで、キナーゼ阻害剤カルボン酸誘導体と反応させることができるアルデヒド基で官能基化すると、所望の二機能性分子が得られる。

【0183】

U c h L 5 結合パートナーを含むキナーゼ標的化分子を合成するためには、以下の合成スキームが使用される。

【化 1 0 2】



10

20

【0184】

実施例 2 - U c h L 5 結合パートナーを含む B E T 標的化分子の合成

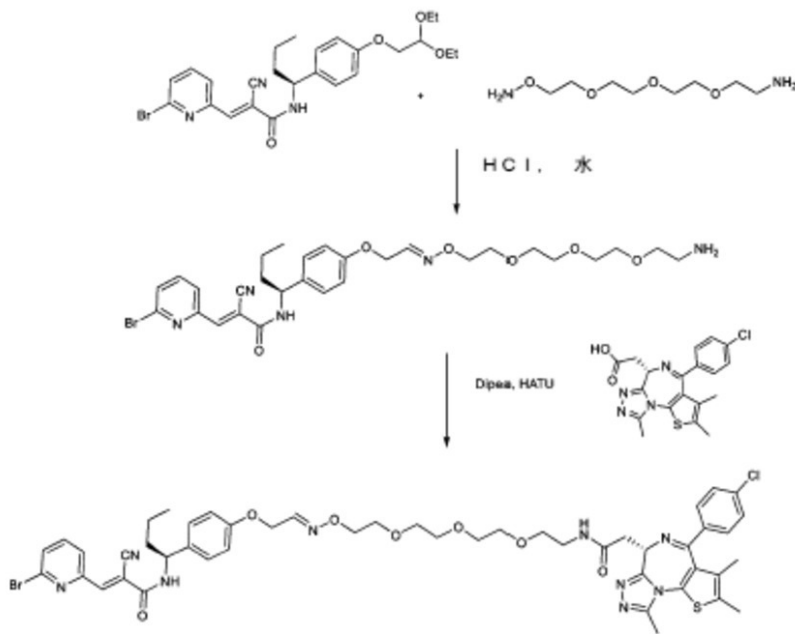
リンカーを介して U c h L 5 結合パートナーに連結された B E T を標的とする標的タンパク質結合パートナーを含む本発明の分子は、以下の方法によって作製される。U c h L 5 結合パートナーを含む B E T 標的化分子を合成するために、U c h L 5 結合パートナーをアルデヒド基で官能基化し、アミドカップリング条件下、アミノキシ含有リンカーと、次いで、キナーゼ阻害剤-カルボン酸誘導体と反応させると、所望の二機能性分子が得られる。

30

【0185】

U c h L 5 結合パートナーを含む B E T 標的化分子は以下のように合成される：

【化 103】



10

【0186】

20

実施例 3 – 二機能性分子の UchL5 及び標的タンパク質への結合

本発明の二機能性分子の UchL5 及び対象標的タンパク質への結合は、例えば、NanoBRET (商標) タンパク質-タンパク質相互作用システムを製造者のプロトコール (Promega) に従って、又は細胞サーマルシフトアッセイ (CETSA) とその後のウェスタンブロット若しくは質量分析によって使用することにより決定される。

【0187】

UchL5 結合パートナーの UchL5 への結合を判定するためのアッセイは、全長プロテアソームの代わりにタンパク質を活性化する働きをする hRpn13 の存在下で行う (Sahtoe DD et al. Mol Cell 2015. DOI: 10.1016/j.molcell.2014.12.039)。次に、UchL5 への結合 (hRpn13 の存在下) を、Lee et al (ChemBioChem 2017; DOI: 10.1002/cbic.201600515) により記載されているように、ユビキチン-ローダミン110 (Rh110) の加水分解を判定することにより評価する。オレゴングリーン標識テトラユビキチン基質 (Li et al. (Nat. Chem. Biol. 2017; DOI: 10.1038/nchembio.2326) 又は Ub-LysGly^{TAMRA} (DOI: 10.1016/j.molcell.2014.12.039) の脱離を含む確立された方法と同様に、分子のハイスループット試験を補助するために蛍光偏光 (FP) アッセイも又使用可能である。

30

又、分子の標的タンパク質への結合を直接評価するために、等温熱量測定 (ITC) 及び/又は表面プラズモン共鳴 (SPR) も使用可能である。

40

【0188】

実施例 4 – 標的タンパク質分解

標的タンパク質分解は、本発明の二機能性分子の存在下及び不在下で標的タンパク質の量を測定することによって判定することができる。分解は、例えば、二機能性分子で処理した又は処理しなかった細胞を用いて免疫ブロット法アッセイ、ウェスタンブロット解析及び ELISA を実施することにより判定される。タンパク質分解の成功は、特定の時点で分解されたタンパク質の量として示される。本発明の二機能性分子の存在下、特定の時点で、タンパク質の量の減少が見られれば分解は起こっていたことになる。

【0189】

実施例 5 – 阻害剤-リンカー-コンジュゲートの作製

50

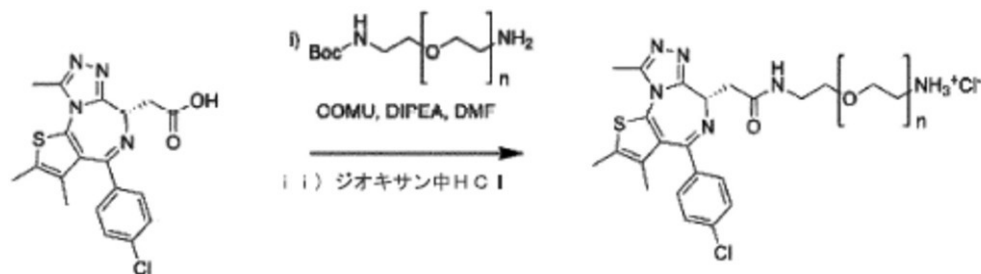
市販の化学物質は、Apollo Scientific、Sigma-Aldrich、Fluorochem、又はManchester Organicから購入し、それ以上精製せずに使用した。

反応は全て、無水溶媒を用いて行った。分取HPLCは、Waters X-Bridge C18カラム（100mm×19mm；5μm粒径、流速25mL／分）を用いたGilson分取HPLCで、15分で0.01%v／vのギ酸を含む水中5%から95%v／vアセトニトリルへの勾配（方法1）を用いて、又は15分で0.01%v／vの水酸化アンモニウム水溶液を含む水中5%から95%v／vアセトニトリルへの勾配（方法2）を用いて行った。

【0190】

液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）は、Bruker Daltonics MicroTOFに接続したAgilent HPLC 1100系又はAgilent Technologies 6130四重極分光計に接続したAgilent Technologies 1200系HPLCを用いて行った。LC-MSについては、使用した分析カラムは、Waters X-bridge C18カラムであった（50mm×2.1mm×3.5mm粒径）；流速0.5mL／分 移動相 水／MeCN＋0.01%HCOOH（方法1A）；95／5 水／MeCNをまず0.5分保持し、次いで、3.5分で95／5から5／95 水／MeCNへの直線勾配、その後、これを2分間維持。全ての化合物の純度は、従前に使用した分析的LC-MSシステムを用いて評価し、純度は>95%であった。

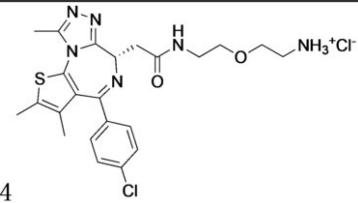
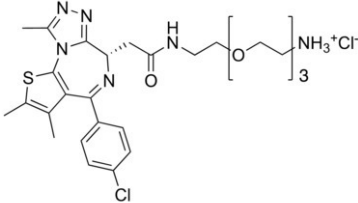
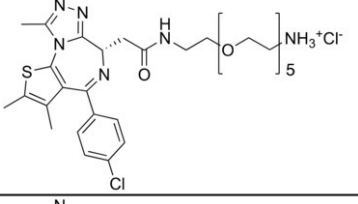
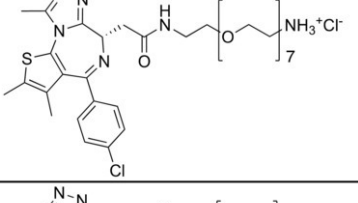
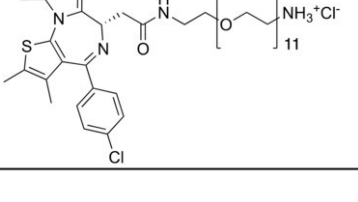
【化104】



【0191】

DMF（1mL）中、モノBoc保護ジアミンリンカー（0.1mmol、1当量）及びJQ1-COOH（40mg、0.1mmol、1当量）の溶液に、COMU（43mg、1mmol、1当量）及びDIPEA（48μL（microl））を加えた。この反応混合物を室温で1時間攪拌した後、氷冷水で急冷した。揮発性物質を真空で除去し、粗混合物を分取HPLCにより精製した（方法2）。目的生成物を含有する画分を減圧下で蒸発させ、残渣（residue）をDCM（1mL）に溶解させ、ジオキサン中無水HClの溶液（4M、1mL）で処理した。1時間後、揮発性物質を減圧下で除去し、余分な酸を除去するために残渣（residue）を凍結乾燥させた。分析データ（HRMS）を以下に示す表IIに示す。

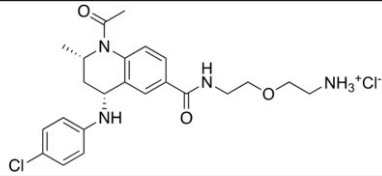
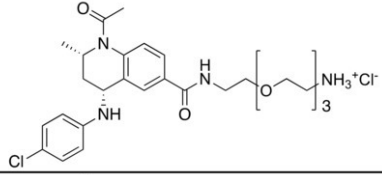
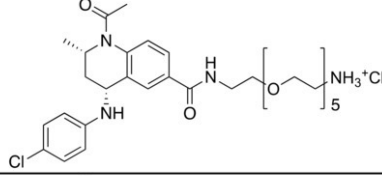
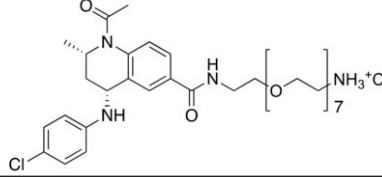
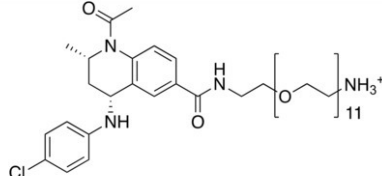
【表 4】

例	構造	m/z [M+H] ⁺
S 1	 4	87.1605
S 2		575.2129
S 3		663.2653
S 4		751.3178
S 5		927.4226

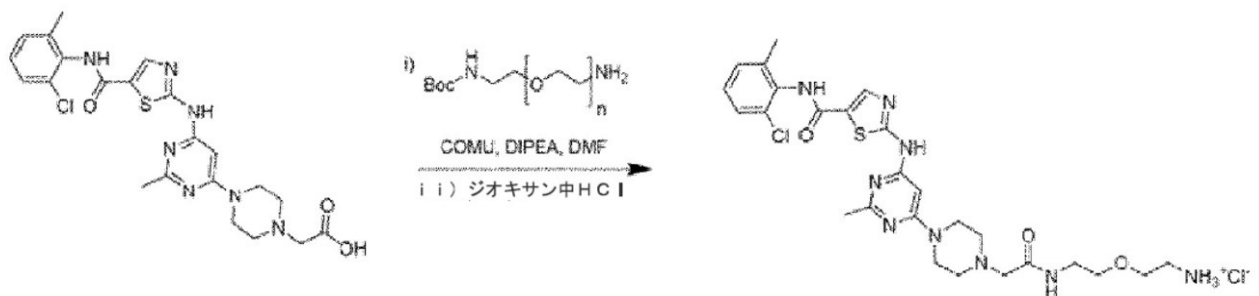
【0192】

DMF (1 mL) 中、モノ Boc 保護ジアミンリンカー (0.1 mmol、1 当量) 及び iBET726 (36 mg、0.1 mmol、1 当量) の溶液に、COMU (43 mg、0.1 mmol、1 当量) 及び DIPEA (48 μL (microl)) を加えた。この反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、氷冷水で急冷した。揮発性物質を真空下で除去し、粗混合物を分取 HPLC により精製した (方法 2)。目的生成物を含有する画分を減圧下で蒸発させ、残渣 (residue) を DCM (1 mL) に溶解させ、ジオキサン中無水 HCl の溶液 (4 M、1 mL) で処理した。1 時間後、揮発性物質を減圧下で除去し、余分な酸を除去するために残渣 (residue) を凍結乾燥させた。分析データ (HRMS) を以下に示す表 III に示す。

【表 5】

例	構造	m/z [M+H] ⁺
S 1 0		445.1928
S 1 1		533.2452
S 1 2		621.2977
S 1 3		709.3501
S 1 4		885.4550

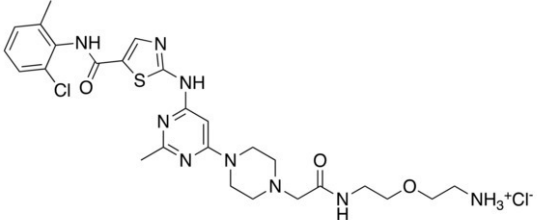
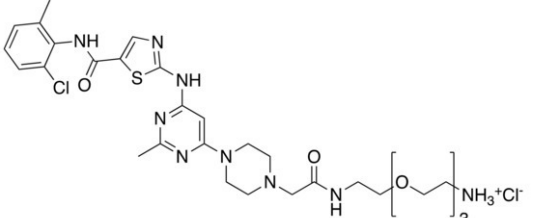
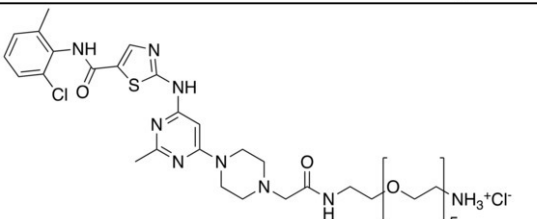
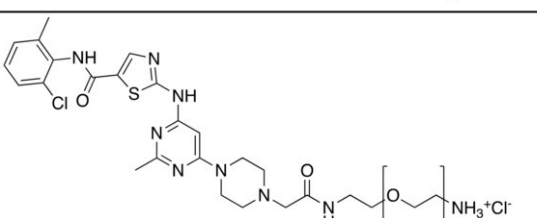
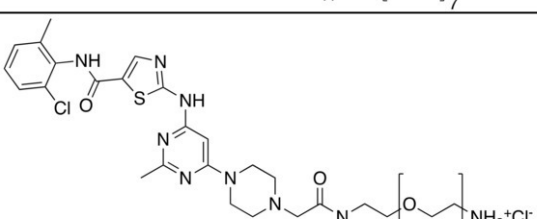
【化 1 0 5】



【0193】

DMF (1 mL) 中、モノ Boc 保護ジアミンリンカー (0.1 mmol、1 当量) 及びダサチニブ-COOH (50 mg、0.1 mmol、1 当量) の溶液に、COMU (43 mg、0.1 mmol、1 当量) 及び DIPEA (48 μ L) を加えた。この反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、氷冷水で急冷した。揮発性物質を真空下で除去し、粗混合物を分取 HPLC により精製した (方法 2)。目的生成物を含有する画分を減圧下で除去し、残渣 (residue) を DCM (1 mL) に溶解させ、ジオキサン中無水 HCl の溶液 (4 M、1 mL) で処理した。1 時間後、揮発性物質を減圧下で除去し、余分な酸を除去するために残渣 (residue) を凍結乾燥させた。分析データ (HRMS) を表 I V に示す。

【表 6】

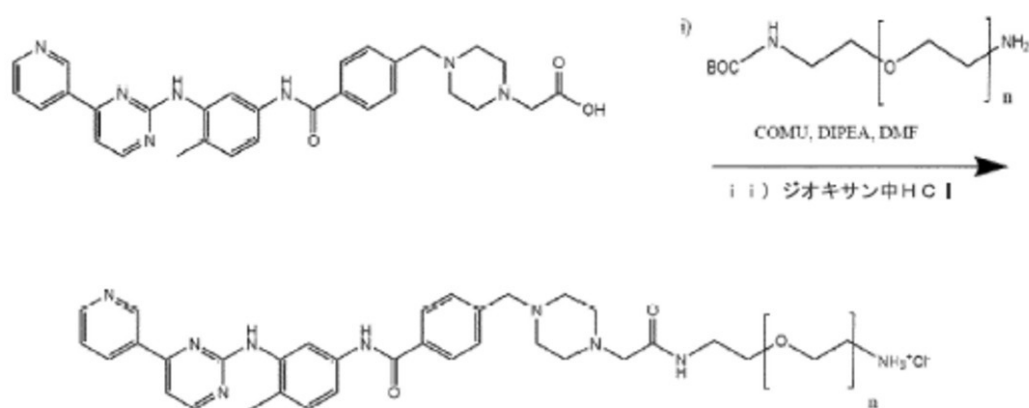
例	構造	m/z [M+H] ⁺
S 1 5		588.2194
S 1 6		676.2718
S 1 7		764.3242
S 1 8		852.3767
S 1 9		1028.4815

10

20

30

【化 1 0 6】



40

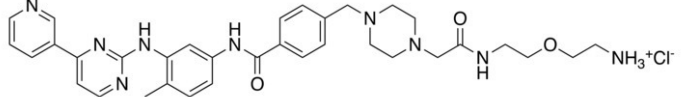
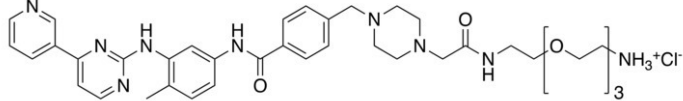
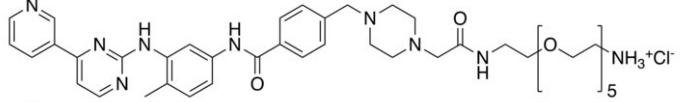
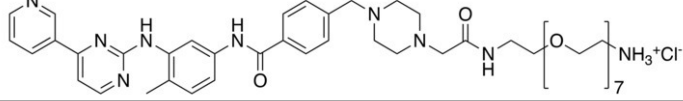
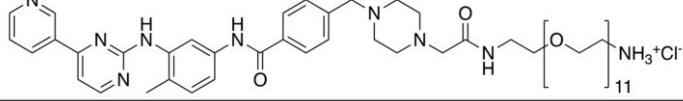
50

【0194】

DMF (1 mL) 中、モノ Boc 保護ジアミンリンカー (0.1 mmol、1 当量) 及びイマチニブ-COOH (54 mg、0.1 mmol、1 当量) の溶液に、COMU (43 mg、0.1 mmol、1 当量) 及び DIPEA (48 μ L) を加えた。この反応混合物を室温で 1 時間乾燥した後、氷冷水で急冷した。揮発性物質を真空下で除去し、粗混合物を分取 HPLC により精製した (方法 2)。目的生成物を含む画分を減圧下で除去し、残渣 (residue) を DCM (1 mL) に溶解させ、ジオキサン中無水 HCl の溶液 (4 M、1 mL) で処理した。1 時間後、揮発性物質を減圧下で除去し、余分な酸を除去するために残渣 (residue) を凍結乾燥させた。分析データ (HRMS) を表 V に示す。

10

【表 7】

例	構造	m/z [M+H] ⁺
S 2 0		624.3 332
S 2 1		712.3 857
S 2 2		800.4 381
S 2 3		888.4 905
S 2 4		1064. 5954

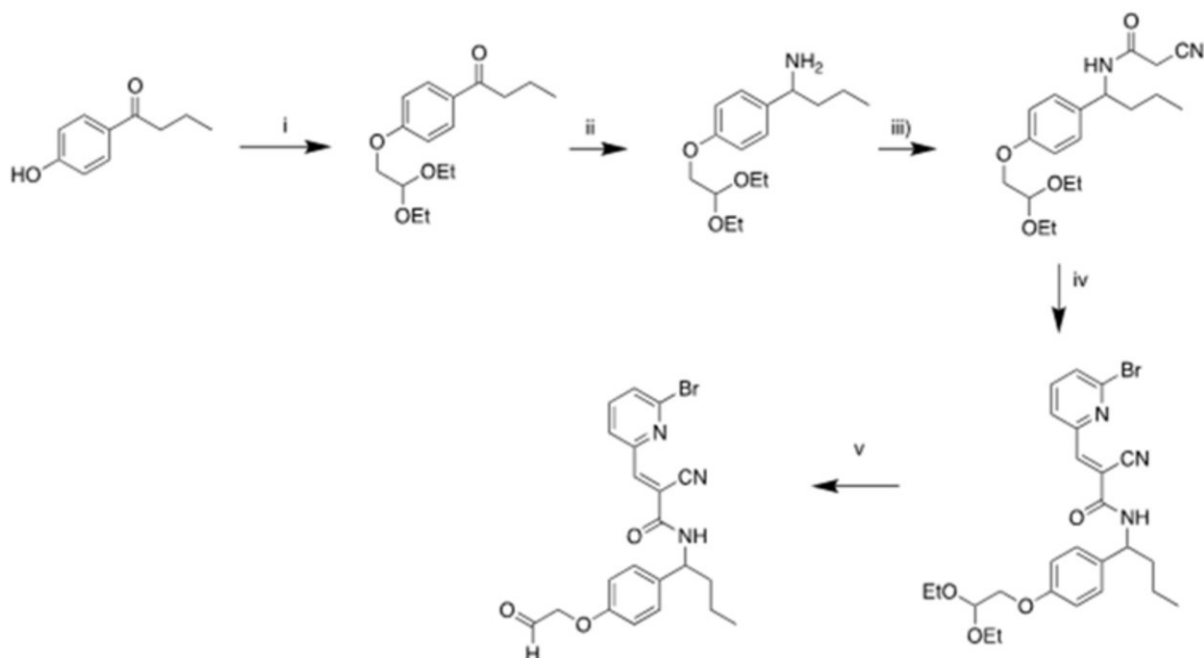
20

30

【0195】

実施例 6 - 2 - (((2 - (4 - (1 - ((E) - 3 - (6 - プロモピリジン - 2 - イル) - 2 - シアノアクリルアミド) ブチル) フェノキシ) エチリデン) アミノ) オキシ) 酢酸の作製

【化 107】



10

スキーム XX： i) プロモアセトアルデヒドジエチルアセタール、 K_2CO_3 (2 当量)、DMF (5 容量)、 $85^\circ C$ 、ii) $NH_2OH \cdot HCl$ (2 当量)、 Na_2CO_3 (3 当量)、エタノール/ H_2O 、 $80^\circ C$ 、次いで、ラネー Ni (w/w)、 H_2 (60 psi)、EtOH、RT；iii) HOAt (1 当量)、HATU (1 当量)、DIPEA (2.2 当量)、iv) DMF、室温、一晚；6-ブロモピコリンアルデヒド、ピペリジン THF；v) I2、アセトン、4 時間、次いで、アミノキシ酢酸、水/アセトニトリル pH = 4.5。

20

【0196】

実施例 7 - (E)-3-(6-ブロモピリジン-2-イル)-2-シアノ-N-(1-(4-(2,2-ジエトキシエトキシ)フェニル)ブチル)アクリルアミドの作製

DMF (5 容量) 中、1-(4-ヒドロキシフェニル)ブタン-1-オン (1 当量) の溶液に、プロモアセトアルデヒドジエチルアセタール (1.2 当量) 及び K_2CO_3 (2 当量) を加えた。この混合物を一晚、 $85^\circ C$ で攪拌した後、ジエチルエーテル (20 容量) で希釈し、水で 3 回洗浄した。有機相を無水 $MgSO_4$ で乾燥させ、濾過し、減圧下で溶媒除去した。粗材料をエタノール (1.5 mL/mmole) に溶解させ、 $NH_2OH \cdot HCl$ (2 当量)、 Na_2CO_3 (3 当量) 及び水 (2.5 mL/mmole) を加えた。この反応フラスコを一晚 $80^\circ C$ に加熱した。冷却後、沈澱を吸引しながら濾過し、粗生成物を冷水で洗浄し、真空下で乾燥させて所望のオキシム生成物を収率 88% で得た。次に、このオキシムをエタノール (0.05 M) に溶解させ、ラネー Ni を加え、16 時間 H_2 (60 psi) に曝した。この混合物をセライトパッドで濾過した後、溶媒を除去し、アミン生成物を回収した。得られたアミン (1 当量) を DMF (0.5 M) 中、シアノ酢酸 (1 当量)、HOAt (1 当量)、HATU (1 当量) 及び DIPEA (2.2 当量) と反応させた。この混合物を一晚反応させ、氷水を加え、この反応混合物を DCM で 3 回抽出した。有機相を無水 $MgSO_4$ で乾燥させ、濾過し、減圧下で溶媒を除去した。粗材料を、DCM 中 0 から 20% MeOH への勾配を用いるシリカカラムクロマトグラフィーにより精製し、所望のシアノ-N-(1-(4-(2,2-ジエトキシエトキシ)フェニル)ブチル)アセトアミドを収率 65% で得た。

30

40

【0197】

THF (0.1 M) 中、2-シアノ-N-(1-(4-(2,2-ジエトキシエトキシ)フェニル)ブチル)アセトアミド (1 当量) の溶液に、6-ブロモピコリンアルデヒド (4 当量) 及びピペリジン (0.01 当量) を加えた。この混合物を $70^\circ C$ で 2 時間攪拌した。減圧下で溶媒を蒸発させ、DCM 中 0 から 20% MeOH への勾配を用いるシリカ

50

カラムクロマトグラフィー後に生成物が単離された。

【0198】

実施例 8 – 2 – (((2 – (4 – (1 – ((E) – 3 – (6 – プロモピリジン – 2 – イ
ル) – 2 – シアノアクリルアミド) ブチル) フェノキシ) エチリデン) アミノ) オキシ)
酢酸の作製

アセトン (20 mL、試薬 ACS、 $\leq 0.5\%$ H_2O) 中、アセタール (1、5 mmol) 及びヨウ素 (125 mg、0.5 mmol) の混合物を室温で 4 時間攪拌した。次に、真空下でアセトン除去し、残渣をジクロロメタン (50 mL) で希釈した。この混合物を 5% $Na_2S_2O_3$ 水溶液 (10 mL)、 H_2O (20 mL)、及びブライン (20 mL) で順次洗浄した。有機層を分離し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過した。溶媒を除去して生成物を得、これを $pH = 4.5$ (酢酸で調整) の水 / アセトニトリル混合物中でアミノキシ酢酸 (1.2 当量) を 2 時間反応させた。溶媒を減圧下で除去し、粗物質を分取 HPLC (方法 1) により精製して純粋な材料を得た。

10

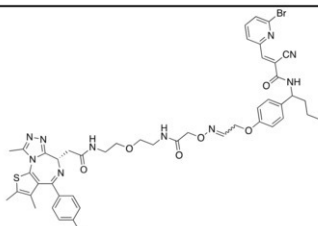
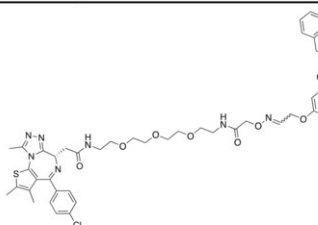
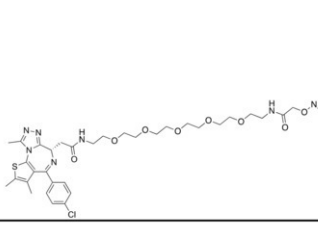
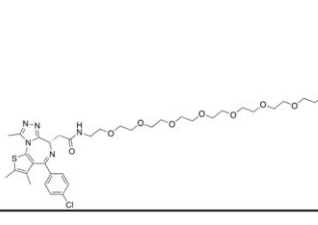
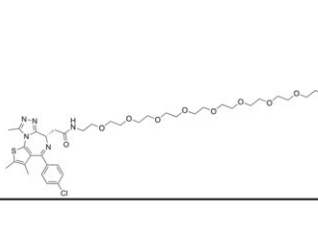
【0199】

実施例 9 – デグラシンコンジュゲートの作製

DMF (0.05 M) 中、弾頭 – リンカーアミン (0.01 mmol) の溶液に、2 – (((2 – (4 – (1 – ((E) – 3 – (6 – プロモピリジン – 2 – イル) – 2 – シアノアクリルアミド) ブチル) フェノキシ) エチリデン) アミノ) オキシ) 酢酸 (0.01 mmol)、COMU (0.01 mmol) 及び DIPEA (0.05 mmol) を加えた。この反応混合物を室温で 1 時間反応させた後、水を加え、真空下で溶媒を除去した。粗材料を逆相 HPLC (方法 1) により精製して最終化合物を得た。分析データ (HRMS) を表 VI a ~ VI d に示す。

20

【表 8】

表 V I a		
例	構造	m/z [M+H] +
0 5 J Q 1		9 8 3 . 2 3 5 1
0 5 J Q 2		1 0 7 1 . 2 8 7 5
0 5 J Q 3		1 1 5 9 . 3 3 9 9
0 5 J Q 4		1 2 4 7 . 3 9 2 4
0 5 J Q 5		1 4 2 3 . 4 9 7 2

10

20

30

表V I b

例	構造	m/z [M+H] +
0 5 I B 1		9 4 1 . 2 6 7 4
0 5 I B 2		1 0 2 9 . 3 1 9 9
0 5 I B 3		1 1 1 7 . 3 7 2 3
0 5 I B 4		1 2 0 3 . 4 2 4 7
0 5 I B 5		1 3 8 1 . 5 2 9 6

10

20

表V I c

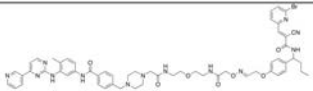
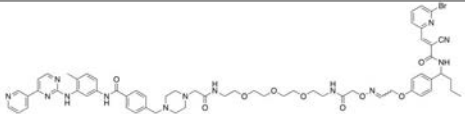
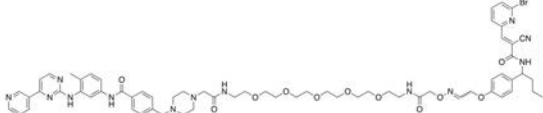
例	構造	m/z [M+H]] ⁺
0 5 D A 1		1 0 8 4 . 2 9 4 0
0 5 D A 2		1 1 7 2 . 3 4 6 4
0 5 D A 3		1 2 6 0 . 3 9 8 9
0 5 D A 4		1 3 4 8 . 4 5 1 3
0 5 D A 5		1 5 2 4 . 5 5 6 1

10

20

30

表V I d

例	構造	m/z [M +H] ⁺
05IM 1		Exact 1120.4079
05IM 2		Exact 1208.4603
05IM 3		Exact 1296.5127
05IM 4		Exact 1384.5651
05IM 5		Exact 1560.6700

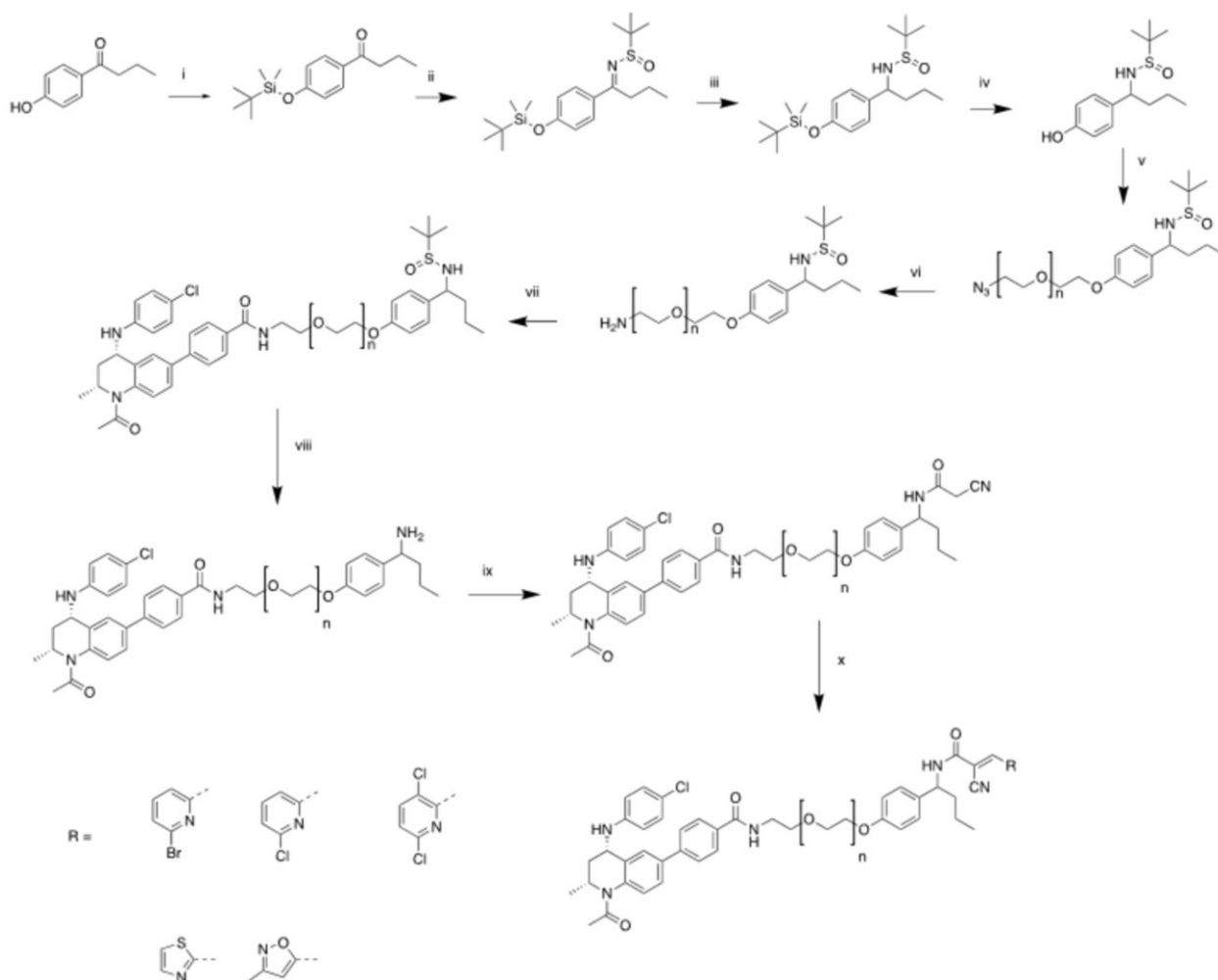
10

20

【0200】

実施例10－ N結合化合物及びO結合化合物の作製
O結合化合物

【化 1 0 8】



10

20

【 0 2 0 1 】

1-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)ブタン-1-オン DMF (1 mL/mmole) 中、1-(4-ヒドロキシフェニル)ブタン-1-オン (1 当量) の溶液に、イミダゾール (2 当量)、次いで、塩化tert-ブチルジメチルシリル (1.3 当量) を加えた。この反応混合物を室温で3時間攪拌した。ジエチルエーテル及びヘプタンの混合物 (1:1、10 mL/mmole) を加え、この溶液を水 (3 回) 及びブラインで洗浄した。有機層をMgSO₄で乾燥させ、溶媒除去して淡黄色のオイルを得、これは-20℃で保存中に固化した。収量：定量的。

30

【 0 2 0 2 】

(N-(1-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)ブチリデン)-2-メチルプロパン-2-スルフィナムイド

トルエン（2 mL / mmol）中、1-（4-（tert-ブチルジメチルシリル）オキシ）フェニル）ブタン-1-オン（1 当量）の溶液に、2-メチル-2-プロパンスルフィナムイド（2 当量）、次いで、チタンエトキシド（4 当量）を加えた。この反応混合物を 90 °C で 16 時間加熱した。酢酸エチルを加え、この反応物を過剰量の水で急冷し、15 分間攪拌した後、セライトパッドで濾過した。有機層を分離し、水相を酢酸エチルで 2 回抽出した。合わせた有機相を MgSO₄ で乾燥させ、溶媒を除去し、粗生成物を、ヘプタン中 0 % から 30 % 酢酸エチルへの勾配を用いるシリカカラムクロマトグラフィーにより精製した。収率：60 %。

40

【 0 2 0 3 】

N-（1-（4-（（tert-ブチルジメチルシリル）オキシ）フェニル）ブチル）-
2-メチルプロパン-2-スルフィナムイド

0℃で、THF（2.5 mL/mmole）中、スルフィンイミン（1当量）の溶液に、

50

L-セレクトリド (THF 中 1.0 M、3 当量) を加えた。得られた溶液を 3 時間かけて室温に温めた。この反応混合物を TLC により分析したところ、最初のイミンの消費が示された。この反応混合物を飽和重炭酸ナトリウム溶液で急冷した。有機層を分離し、水相を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機相を $MgSO_4$ で乾燥させ、溶媒を除去し、粗生成物を、ヘプタン中 10% から 50% 酢酸エチルへの勾配を用いるシリカカラムクロマトグラフィーにより精製し、分析的に純粋な生成物を収率 80% で得た。

【0204】

N-(1-(4-ヒドロキシフェニル)ブチル)-2-メチルプロパン-2-スルフィニアミド

DMF (4 mL/mmole) 中、N-(1-(4-(tert-ブチルジメチルシリル)オキシ)フェニル)ブチル)-2-メチルプロパン-2-スルフィニアミド (1 当量) の溶液を室温で 1 時間、TBAF (THF 中 1 M、1.2 当量) で処理した。この反応混合物をリン酸塩 (phosphate) バッファー pH=5.5 で急冷し、減圧下で溶媒を除去した。粗物質を DCM に溶解させ、水で 2 回、最終的にはブラインで洗浄した。有機相を $MgSO_4$ で乾燥させ、溶媒を除去して粗生成物を得、これをそれ以上精製せずに使用した。収量：定量的

10

【0205】

N-(1-(4-(20-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサシクロ)オキシ)フェニル)ブチル)-2-メチルプロパン-2-スルフィニアミド

DMF (5 mL/mmole) 中、N-(1-(4-ヒドロキシフェニル)ブチル)-2-メチルプロパン-2-スルフィニアミド (1 当量) の溶液に、1-アジド-20-ブromo-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサシクロサン (1.2 当量) 及び K_2CO_3 (3 当量) を加えた。この反応混合物を 70°C で 2 時間激しく攪拌した。DCM を加え、この有機相を少量の水で洗浄した。水相を DCM で抽出した。合わせた有機相を $MgSO_4$ で乾燥させ、溶媒を除去し、粗生成物を分取 HPLC (方法 1) により精製した。収率：66%。

20

【0206】

N-(1-(4-(20-アミノ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサシクロ)オキシ)フェニル)ブチル)-2-メチルプロパン-2-スルフィニアミド

THF/水 (4:1, 5 mL/mmole) 中、N-(1-(4-(20-アジド-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサオキサシクロ)オキシ)フェニル)ブチル)-2-メチルプロパン-2-スルフィニアミドの溶液に、トリフェニルホスフィン (2 当量) を加えた。この反応混合物を 70°C で 6 時間加熱した。溶媒を減圧下で除去し、所望の生成物を分取 HPLC (方法 1) により単離した。収率：72%。

30

【0207】

iBET-726 コンジュゲーション

DMF (100 mL/mmole) 中、リンカー-アミン化合物 (1 当量) 及び iBET 726 (1 当量) の溶液に、COMU (1 当量) 及び DIPEA (2.5 μ L (microl)) を加えた。この反応混合物を室温で 1 時間乾燥した後、氷冷水で急冷した。揮発性物質を真空下で除去し、粗混合物を分取 HPLC (方法 2) により精製した。目的生成物を含有する画分を減圧下で除去し、残渣 (residue) を DCM (1 mL) に溶解させ、ジオキサン中無水 HCl の溶液 (4 M、1 mL) で処理した。1 時間後、揮発性物質を減圧下で除去した。飽和 $NaHCO_3$ 溶液を塩基性の pH となるまで加え、この混合物を DCM で 3 回抽出し、余分な酸を除去するために残渣 (residue) を凍結乾燥させた。合わせた有機相を $MgSO_4$ で乾燥させ、溶媒を除去して目的生成物を得た。

40

【0208】

実施例 11 - シアノ酢酸とのカップリング及びクネーフェナーゲル縮合の手順

従前の合成段階からのアミン生成物 (1 当量) を DMF (100 mL/mmole) 中、シアノ酢酸 (1 当量)、HOAt (1 当量)、HATU (1 当量) 及び DIPEA (2.2 当量) と反応させた。この混合物を一晩反応させ、氷水を加え、真空下で揮発性成分を

50

除去した。粗生成物を分取HPLC（方法1）により精製した。目的生成物を含有する画分を乾燥させ、THF（100mL/mmole）、次いで、所望のアルデヒド（3当量）及び触媒量のピペリジンを加えた。この混合物を70℃で2時間攪拌した。減圧下溶媒を蒸発させ、生成物を分取HPLC（方法1）により単離した。

【表 9】

表 V I I

例	構造	m/z [M+H]] ⁺
0 5 I B 6		1 1 2 3 . 3 8 4 9
0 5 I B 7		1 0 7 9 . 4 3 7 4
0 5 I B 8		1 0 4 8 . 7 1 9 6
0 5 I B 9		1 0 5 1 . 4 3 4 0
0 5 I B 1 0		1 1 1 3 . 3 9 9 4
0 5 I B 1 3		1 1 2 3 . 3 8 4 1
0 5 I B 1 4		1 0 5 1 . 4 3 3 1
0 5 I B 1 5		1 1 2 3 . 3 8 4 4
0 5 I B 1 6		1 0 5 1 . 4 3 3 6

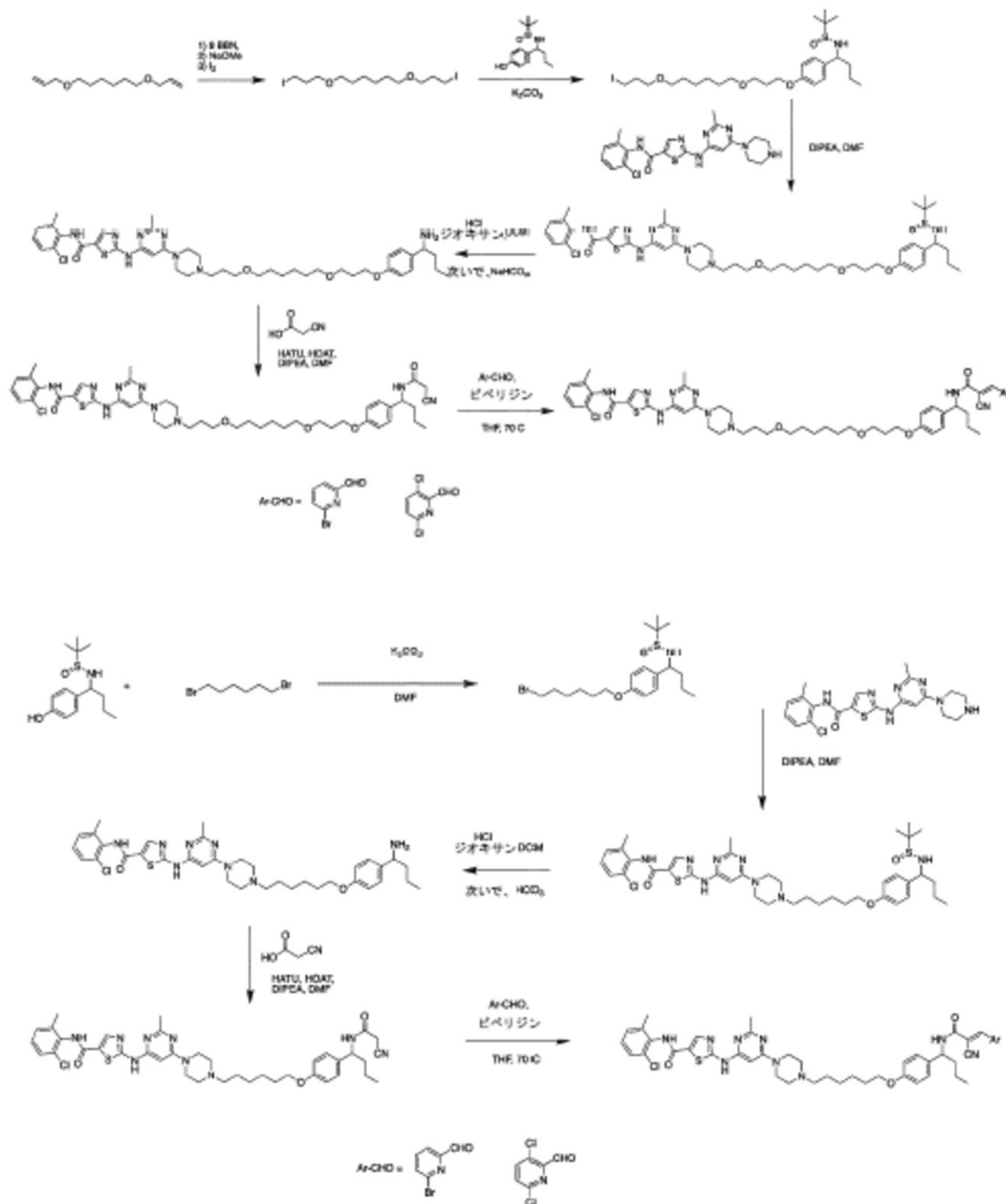
10

20

30

40

実施例 18 : N, O 結合ダサチニブ系化合物の合成
【化 109】



10

20

30

40

50

【0210】

窒素下、0℃で、5 mL の乾燥 THF 中、ジアリルエーテル（400 mg、2.02 mmol）の溶液に、9BBN 溶液（THF 中 0.5 mL、10 mL、5 mmol）を加えた。この反応物を室温で一晩攪拌した。TLC 分析（Hept 中 10% AcOEt、KMnO₄ 染色剤）は、アルケンが存在していないことを示した。この反応混合物を再び 0℃で冷却し、NaOMe（MeOH 中 25%、12 mmol）、次いで、固体ヨウ素（3.0 g、12 mmol）を加えた。この反応混合物を室温で更に 40 分間反応させた。飽和 Na₂S₂O₃ 溶液を加えてこの反応物を急冷した後、Et₂O で抽出した。有機相を M

g S O₄で乾燥させ、揮発性溶媒を蒸発させ、粗物質をヘプタン中0 %から20 % A c O E t への勾配を用いるF C C (T L C 分析のためにK M n O₄ 染色剤)により精製した。651 mg、収率71 %が得られた。

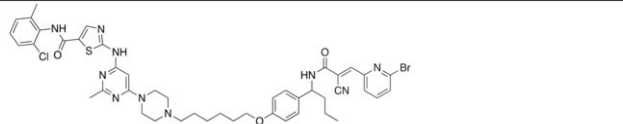
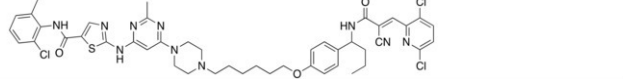
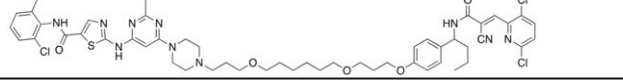
【0211】

D M F (1 m L) 中、N - (1 - (4 - ヒドロキシフェニル) ブチル) - 2 - メチルプロパン - 2 - スルフィンアミド (100 mg、0.37 mmol) の溶液に、ジヨード (d i o d o) 誘導体 (又はジプロモ誘導体) (0.74 mmol)、次いで、K₂ C O₃ (153 mg、1.1 mmol) を加えた。この反応混合物を室温で2 ~ 3 時間攪拌した。L C - M S 及びT L C 分析は、もはや出発材料を示さなかった。この反応物をD C M で希釈し、水で洗浄した。有機相をM g S O₄で乾燥させ、蒸発乾固させた。粗材料をヘプタン中10 %から80 % A c O E t への勾配を用いるF C C により精製した。160 mg、収率73 %が得られた。

【0212】

D M F (0.5 m L) 中、ヨード又はプロモ誘導体 (0.099 mmol) とデスメチルダサチニブ (遊離塩基、40 mg、0.090 mmol) の混合物に、D I P E A (46 μ L、0.27 mmol) を加えた。この反応混合物を室温で24 時間攪拌した。L C - M S 及びT L C 分析は、もはや出発材料を示さなかった。この混合物を減圧下で蒸発乾固させた。粗材料を、D C M 中0 %から15 % M e O H への勾配を用いるF C C により精製した。所望の生成物を含む画分を減圧下で除去し、残渣 (r e s i d e) をD C M (1 m L) に溶解させ、ジオキサン中無水H C l の溶液 (4 M、1 m L) で処理した。1時間後、減圧下で揮発性物質を除去した。飽和N a H C O₃ 溶液を塩基性p H となるまで加え、この混合物をD C M で3 回抽出し、余分な酸を除去するために残渣 (r e s i d e) を凍結乾燥させた。合わせた有機相をM g S O₄で乾燥させ、溶媒を除去して所望の生成物を収率80 %で得た。従前の合成段階からのアミン生成物 (1 当量) をD M F (100 m L / m m o l) 中、シアノ酢酸 (1 当量)、H O A t (1 当量)、H A T U (1 当量) 及びD I P E A (2.2 当量) と反応させた。この混合物を一晩反応させ、氷水を加え、真空下で揮発性成分を除去した。粗生成物を分取H P L C (方法1) により精製した。所望の生成物を含む画分を乾燥させ、T H F (100 m L / m m o l)、次いで、所望のアルデヒド (3 当量) 及び触媒量のピペリジンを加えた。この混合物を70 °C で2 時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発させ、生成物を分取H P L C (方法1) により単離した。

【表10】

05D A6		925.26 88
05D A7		915.27 76
05D A8		1041.3 495
05D A9		1033.5 233

【0213】

実施例12 - 陰性対照の合成

(E) - 3 - (6 - プロモピリジン - 2 - イル) アクリル酸

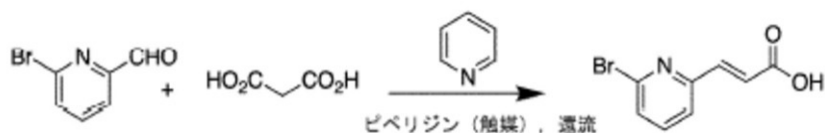
10

20

30

40

【化 1 1 0】



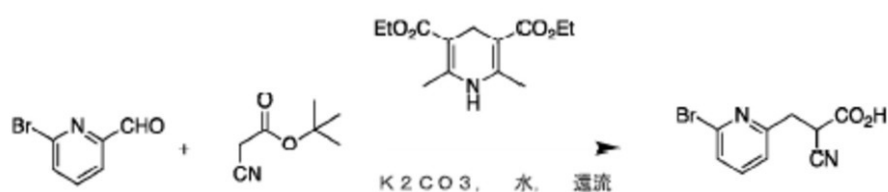
6-ブロモピコリンアルデヒド（2.16 mmol）、マロン酸（0.45 g、4.32 mmol）、ピペリジン（2.0 mL）、ピリジン（20 mL）の混合物を還流下で3～40時間加熱した。真空下で揮発性物質を除去し、酢酸エチル／ヘプタンからの結晶化により純粋な生成物を精製した（収率76%）。

10

【0 2 1 4】

3-(6-ブロモピリジン-2-イル)-2-シアノプロパン酸

【化 1 1 1】



20

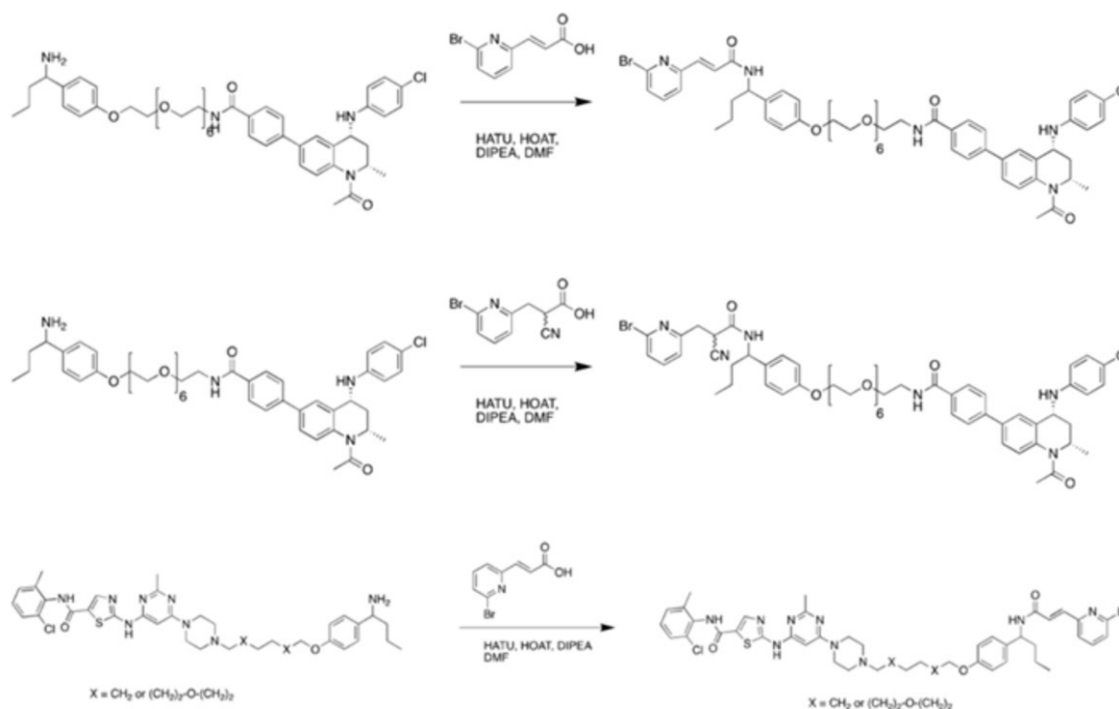
水（2.0 mL）中、2-シアノ酢酸 6-ブロモピコリンアルデヒド tert-ブチル（0.24 mmol）、 K_2CO_3 （0.02 mmol）及び Hantzsch エステル（0.24 mmol）の混合物を100℃で12時間撹拌した。この反応混合物を室温まで冷却し、粗溶液を酢酸エチル（3×5 mL）で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、無水 Na_2SO_4 で乾燥させた。減圧下で溶媒を除去した後、残渣を、DCM中0%から20% MeOHへの勾配を用いるシリカでのカラムクロマトグラフィーにより精製した。生成物は遊離酸として単離された（収率52%）。

【0 2 1 5】

不活性コンジュゲートの合成

30

【化 1 1 2】



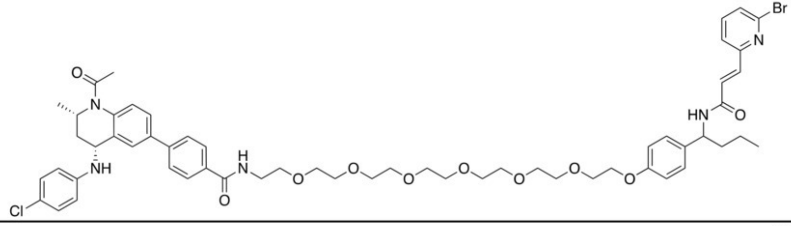
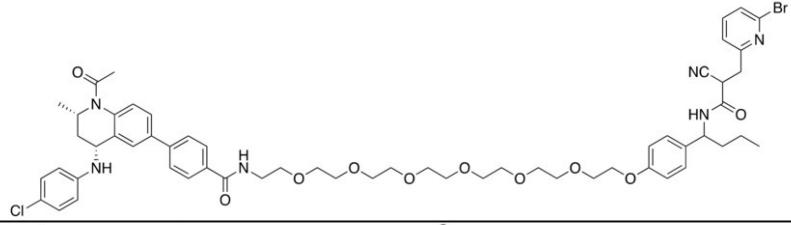
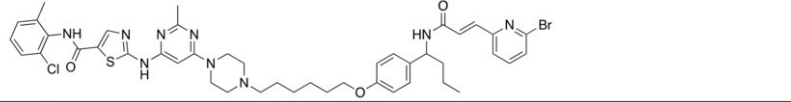
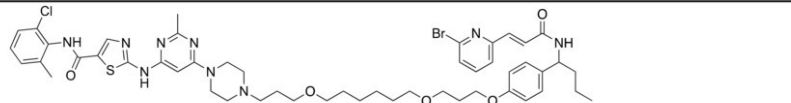
10

20

【0 2 1 6】

アミン含有 i B E T 7 2 6 コンジュゲート（1当量）を、DMF（100 mL/mm o l）中、（E）-3-（6-ブロモピリジン-2-イル）アクリル酸又は3-（6-ブロモピリジン-2-イル）-2-シアノプロパン酸（1当量）、H O A t（1当量）、H A T U（1当量）及びD I P E A（2.2当量）と反応させた。この混合物を一晩反応させ、氷水を加え、真空下で揮発性成分を除去した。粗生成物を分取H P L C（方法1）により精製した。

【表 1 1】

例	構造	m/z [M+H]] ⁺
05IB 11		1098. 3435
05IB 12		1125. 4022
05DA 10		890.2 705
05DA 11		1016. 3542

10

20

【0217】

実施例 13ー デグラシン系代表的化合物によるプロモドメイン及びエクストラターミナルドメイン (bromo- and extra-terminal domain) (BET) タンパク質の分解

細胞培養 HeLa (CCL-2) 細胞及びHEK293 (CRL-1573) 細胞はATCCから購入し、10% FBS、100 μg/mL ペニシリン/ストレプトマイシン及びL-グルタミンを添加したDMEM培地 (Gibco) で培養した。細胞を37℃及び5% CO₂で増殖させ、長くても30代維持した。全ての細胞株を慣例的に、LonzaからのMycAlertキットを用いてマイコプラズマ汚染に関して検査した。

30

HeLa (5×10⁵) 細胞及びHEK293 (1×10⁶) 細胞を標準的な6ウェルプレート (2 mL 培地) に播種し、一晩の後に最終DMSO濃度が0.1% v/vの1 μM化合物で処理した。6時間のインキュベーション時間の後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、complete Mini EDTA 不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した85 μLのRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20000 g、10分、4℃) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。

40

【0218】

免疫ブロット法 タンパク質をNuPage 4~12% ビスートリスゲルでのSDS-PAGEにより分離し、次いで、ウェットトランスファーを用いてAmersham Protran 0.45 NC ニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に転写した。0.1% ツィーン-20を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) 中、5% w/v ミルクを用い、膜をブロッキングした。ブロットは、抗Brd2一次抗体 (Abcam ab139690、1:2,000希釈)、抗Brd3一次抗体 (Abcam ab50818、1:500希釈)、及び抗Brd4一次抗体 (Abcam ab128874、1:

50

1, 000希釈)を適宜用いてプロービングした(4℃で一晩)。翌日、プロットをTBSTで洗浄し、抗チューブリンhFAB-ローダミン(BioRad、12004166)一次抗体、及び抗ウサギIR色素800CW二次抗体(Licor 1:10,000希釈)又は抗マウスIR色素800CW二次抗体(Licor 1:10,000希釈)のいずれかとともにインキュベートした(室温で1時間)。Bio-Rad ChemiDoc MPイメージングシステムを用いてプロットを現像し、Image Studioソフトウェア(Licor)を用いてバンド定量を行った。バンド強度をチューブリン負荷対照に対して正規化し、平均0.1%DMSOビヒクル強度に対する%として報告した。分解データをプロットし、Prism(Graphpadバージョン8)を用いて分析した。

図1のHEK293溶解液からの代表的ウエスタンブロットは、1μMの化合物で6時間処理した後にBrd2、Brd3及びBrd4タンパク質レベルの枯渇を示す。MZ1を陽性対照として使用した。各レーンの下に報告される値は、平均0.1%DMSO対照と比較したBETの存在量を示す。

【0219】

実施例14- 05IB11の負のSAR

HEK293細胞(1×10^6)は、DMSO終濃度0.1%v/vとして、DMSO、1μM 05IB11又は1μM 05IB6とともに6時間インキュベートした。3回の独立した処理(n=3)からの細胞をRIPAバッファで溶解させ、Brd4及びβ-チューブリンに対して免疫ブロッティングを行った。05IB6で、Brd4レベルの有意な枯渇が見られたが、陰性対照05IB11で処理した後では最小の枯渇であった。結果を図2に示す。

【0220】

実施例15- デグラシン系代表的化合物による濃度依存的BET分解

HeLa細胞(5×10^5)及びHEK293細胞(1×10^6)を標準的な6ウェルプレート(2mL培地)に播種し、一晩の後に、DMSO終濃度0.1%v/vとして、所望の濃度(1nM~10μM)の化合物で処理した。6時間の処理時間の後、細胞をDPBS(Gibco)で洗浄し、complete Mini EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche)及びベンゾナーゼを添加した85μLのRIPAバッファ(Sigma-Aldrich)を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離(20000g、10分、4℃)により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファ(Invitrogen)を用いて調製した。

図3の代表的プロットは、漸増濃度の代表的化合物で処理した後にBrd2、Brd3及びBrd4タンパク質レベルの枯渇を示す。バンド強度をβ-チューブリン負荷対照に対して正規化し、平均0.1%DMSOビヒクル強度に対する%として報告し、各点は2回の独立した実験(n=2)の平均±SEMを表す。分解データをプロットし、Prism(Graphpadバージョン8)を用いて分析した。

表V111は、代表的化合物のDC50パラメータを示し、 D_{max} は見られた最大分解であり、DC50は D_{max} の50%を達成するために要される濃度であり、Abs. pDC50はDMSOに比べてタンパク質を50%減少させるために要される-log(濃度)である。

表V111 デグラシン系代表的化合物による濃度依存的分解

D_{max} : + ($D_{max} \leq 25\%$); ++ ($26\% \leq D_{max} \leq 50\%$); +++ ($51\% \leq D_{max} \leq 70\%$); ++++ ($71\% \leq D_{max}$); DC50: A ($DC_{50} \leq 50\text{ nM}$); B ($51\text{ nM} \leq DC_{50} \leq 500\text{ nM}$); C ($501\text{ nM} \leq DC_{50}$)。

【0221】

10

20

30

40

【表 1 2】

表V I I I

	標的	H E K 2 9 3		H e L a	
		D _{max} (%)	D C ₅₀ (nM)	D _{max} (%)	D C ₅₀ (nM)
0 5 I B 1	B r d 4 (L)	++++	A	++	B
	B r d 4 (S)	++++	A	++++	A
	B r d 3	++++	A	++	A
	B r d 2	+++	A	+	B
0 5 I B 2	B r d 4 (L)	++++	A	++++	B
	B r d 4 (S)	++++	A	++++	B
	B r d 3	++++	B	++	B
	B r d 2	+++	B	++	B
0 5 I B 3	B r d 4 (L)	++++	A	++++	B
	B r d 4 (S)	++++	A	++++	A
	B r d 3	++++	A	++++	B
	B r d 2	++++	B	++++	B
0 5 I B 6	B r d 4 (L)	++++	A	++++	B
	B r d 4 (S)	++++	A	++++	A
	B r d 3	+++	B	++++	A
	B r d 2	++	B	++++	A
0 5 I B 1 1	B r d 4 (L)	+	—	+	—
	B r d 4 (S)	++	—	+	—
	B r d 3	+	A	++	B
	B r d 2	+	—	+	—

10

20

30

40

05IB12	Brd4 (L)	+	—	+	—
	Brd4 (S)	++	—	+	—
	Brd3	+	—	++	—
	Brd2	+	—	+	—
05IB9	Brd4 (L)	++++	A	++++	A
	Brd4 (S)	++++	A	++++	A
	Brd3	+++	A	+++	A
	Brd2	+++	A	++++	B
05IB10	Brd4 (L)	++++	A	+++	A
	Brd4 (S)	++++	A	++++	B
	Brd3	++++	B	++++	B
	Brd2	+++	B	++++	A

10

20

【0222】

実施例16： デグラシン系代表的化合物による時間依存的BET分解

HeLa細胞 (3×10^5) 及びHEK293細胞 (0.5×10^6) を標準的な6ウェルプレート (2mL培地) に播種し、一晩の後に、DMSO終濃度0.1% v/vとして、1 μ M濃度の化合物で処理した。所望の時間 (0~8時間) のインキュベーション後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、cOmplete Mini EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した85 μ LのRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20,000g、10分、4℃) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLD

30

【0223】

図4の代表的プロットは、種々の時点で代表的化合物で1 μ M処理を行った後にBrd2、Brd3及びBrd4タンパク質レベルの枯渇を示す。バンド強度を β -チューブリン負荷対照に対して正規化し、平均0.1% DMSOビヒクル強度に対する%として報告し、各点は2回の独立した実験 (n=2) の平均 $\pm$ SEMを表す。分解データをプロットし、Prism (Graphpadバージョン8) を用いて分析した。

表IXは、HEK293細胞及びHeLa細胞における代表的化合物の経時的パラメータを示し、 D_{max} は見られた最大分解であり、 $T_{1/2}$ (時間) は、 D_{max} の50%を達成するために要される濃度であり、Abs. $T_{1/2}$ (時間) は、DMSOに比べてタン

40

【表 13】

表 IX デグラシン系代表的化合物による時間依存的分解

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

10

20

30

40

【0224】

実施例 17: デグラシン系代表的化合物の機構的評価

HeLa細胞（ 5×10^6 ）を標準的な6ウェルプレート（2 mL培地）に播種し、一晩の後に、 $10 \mu\text{M}$ のボルテゾミブで前処理した。0.5時間のブレインキュベーション

50

時間の後に、次いで細胞をビヒクル、 $1\ \mu\text{M}$ のMZ1又は $1\ \mu\text{M}$ の05IB6で処理し、総DMSO終濃度を $0.2\ \text{v/v}$ とした。6時間のインキュベーションの後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、complete Mini EDTA 不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した $85\ \mu\text{L}$ のRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20000g 、 10 分、 4°C) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。

図5の代表的プロットは、 $10\ \mu\text{M}$ のボルテゾミブの存在下及び不在下、 $1\ \mu\text{M}$ の05IB6又はMZ1で6時間処理した後にBrd4タンパク質レベルの枯渇を示す。05IB6による分解は、ボルテゾミブの存在下で完全に遮断され、分解がプロテアソーム依存的であることを示唆する。

【0225】

実施例19： デグラシン系代表的化合物によるABL2の分解

K562 (CCCL-243) 細胞はATCCから購入し、 10% FBS及び $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したIMDM培地 (Gibco) で培養した。細胞を 37°C 及び $5\% \text{CO}_2$ で増殖させ、長くて30代維持した。全ての細胞株を慣例的に、LonzaからのMycobAlertキットを用いてマイコプラズマ汚染に関して検査した。

K562細胞 ($1\sim 1.5\times 10^6$) を標準的な6ウェルプレート (2mL 培地) に播種し、一晩の後に最終DMSO濃度が $0.1\ \text{v/v}$ の $1\ \mu\text{M}$ 化合物で処理した。24時間のインキュベーション時間の後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、complete Mini EDTA 不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した $80\ \mu\text{L}$ のRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 ($20,000\text{g}$ 、 10 分、 4°C) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。免疫プロット分析については、以下の抗体を使用した：抗ABL2 (ab134134、 $1:1,000$ 希釈) 及び抗チューブリンhFAB-ローダミン (BioRad、12004166、 $1:10,000$ 希釈)。

図6のK562溶解液からの代表的ウエスタンブロットは、 $1\ \mu\text{M}$ のダサチニブ系化合物で24時間処理した後にABL2タンパク質レベルの枯渇を示す。DAS-6-2-2-6-CRBN (PROTAC; doi: 10.1002/anie.201507634) を陽性対照として使用した。

【0226】

実施例20— デグラシン系代表的化合物による濃度依存的ABL2分解

K562細胞 (1.2×10^6) を標準的な6ウェルプレート (2mL 培地) に播種し、一晩の後に最終DMSO濃度を $0.1\ \text{v/v}$ として、所望の濃度 ($1\text{nM}\sim 10\ \mu\text{M}$) の化合物で処理した。24時間のインキュベーション時間の後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、complete Mini EDTA 不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した $80\ \mu\text{L}$ のRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20000g 、 10 分、 4°C) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。

図7の代表的プロットは、漸増濃度の代表的化合物で処理した後にABL2タンパク質レベルの枯渇を示す。バンド強度を β -チューブリン負荷対照に対して正規化し、平均 0.1% DMSOビヒクル強度に対する%として報告し、各点は2回の独立した実験 ($n=2$) の平均 $\pm$ SEMを表す。分解データをプロットし、Prism (Graphpadバージョン8) を用いて分析した。

10

20

30

40

50

【0227】

実施例21ー デグラシン系代表的化合物のプロテアソーム依存性

HEK293細胞 (1×10^6) を標準的な6ウェルプレート (2 mL 培地) に播種し、一晩の後に $10 \mu\text{M}$ のボルテゾミブで前処理した。0.5時間のプレインキュベーション時間の後、次いで細胞をビヒクル、 $1 \mu\text{M}$ のMZ1又は $1 \mu\text{M}$ の05IB6で処理し、総DMSO終濃度を0.2% v/vとした。6時間のインキュベーション後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、cOmplete Mini EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した $85 \mu\text{L}$ のRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20,000 g、10分、4℃) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。

10

図5の代表的プロットは、 $10 \mu\text{M}$ のボルテゾミブの存在下及び不在下、 $1 \mu\text{M}$ の05IB6又はMZ1で6時間処理した後にBrd4タンパク質レベルの枯渇を示す。05IB6による分解はボルテゾミブの存在下で完全に遮断され、分解がプロテアソーム依存性であることを示唆する。

【0228】

実施例22ー HEK293細胞におけるデグラシン系代表的化合物の機構的評価

HEK293細胞 (1×10^6) を標準的な6ウェルプレート (2 mL 培地) に播種し、一晩の後に阻害剤 ($5 \mu\text{M}$ のデグラシン又は $1 \mu\text{M}$ のI-BET726) で前処理した。0.5時間のプレインキュベーション時間の後、次いで細胞をビヒクル、 $0.1 \mu\text{M}$ のMZ1又は $0.1 \mu\text{M}$ の05IB9で処理し、総DMSO終濃度を0.2% v/vとした。6時間のインキュベーション後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、cOmplete Mini EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した $85 \mu\text{L}$ のRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20,000 g、10分、4℃) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。

20

図8のHEK293溶解液からの代表的プロットは、 $5 \mu\text{M}$ のデグラシン及び $1 \mu\text{M}$ のI-BET726の存在下及び不在下、 $0.1 \mu\text{M}$ の05IB9又はMZ1で6時間処理した後にBrd4タンパク質レベルの枯渇を示す。05IB9による分解は、デグラシン又はI-BET726いずれかの存在下で完全に遮断されたが、MZ1の分解は、I-BET726によってのみ遮断された。

30

【0229】

実施例23ー HAP1細胞におけるデグラシン系代表的化合物の機構的評価

HAP1細胞 (1×10^6) を標準的な6ウェルプレート (2 mL 培地) に播種し、一晩の後に阻害剤 ($10 \mu\text{M}$ のボルテゾミブ、 $5 \mu\text{M}$ のデグラシン又は $1 \mu\text{M}$ のI-BET726) で前処理した。0.5時間のプレインキュベーション時間の後に、次いで細胞をビヒクル、 $0.1 \mu\text{M}$ のMZ1又は $0.1 \mu\text{M}$ の05IB9で処理し、総DMSO終濃度を0.2% v/vとした。6時間のインキュベーション後、細胞をDPBS (Gibco) で洗浄し、cOmplete Mini EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した $85 \mu\text{L}$ のRIPAバッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20,000 g、10分、4℃) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及びLDSサンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。

40

【0230】

図9のHAP1溶解液からの代表的プロットは、 $5 \mu\text{M}$ のデグラシン及び $10 \mu\text{M}$ のボルテゾミブの存在下及び不在下、 $0.1 \mu\text{M}$ の05IB9又はMZ1で6時間処理した後

50

に Brd 4 タンパク質レベルの枯渇を示す。Brd 4 バンド強度を β -チューブリン負荷対照に対して正規化し、図 9 B に平均 0.1 % DMSO ビヒクル強度に対する % として報告した。各バーは、2 反復で行った 3 回の独立した実験の平均 $\pm$ SEM ($n=3$) である。05IB9 による分解は、ボルテゾミブ及びデグラシンの存在下で完全に遮断されたが、MZ1 の分解はボルテゾミブによってのみ遮断された。これらのデータは、05IB9 による HAP1 細胞における Brd 4 分解がプロテアソーム依存性であること示唆する。更に、過剰なデグラシンは 05IB9 と競合し、Brd 4 分解の低下をもたらす。

【0231】

実施例 24： MV4-11 細胞における c-MYC レベル及び PARP 切断に対するデグラシン系、BET 標的化合物の効果

MV4-11 (0.7×10^6 細胞/mL) を 10 cm プレート 10 % FBS 及び L-グルタミンを添加した 10 mL の DMEM) に播種し、一晩の後に、DMSO 終濃度 0.1 % v/v として、所望の濃度の化合物で処理した。6 時間のインキュベーション時間の後、細胞を DPBS (Gibco) で 2 回洗浄し、complete Mini EDTA 不含プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) 及びベンゾナーゼを添加した 85 μ L の RIPA バッファー (Sigma-Aldrich) を用いて溶解させた。溶解液を遠心分離 (20,000 g、10 分、4 $^{\circ}$ C) により清澄化し、上清の総タンパク質含量を、ブラッドフォード比色定量アッセイを用いて定量した。サンプルは、等量の総タンパク質及び LDS サンプルバッファー (Invitrogen) を用いて調製した。免疫ブロット分析については、以下の抗体を使用した：抗 Brd 2 (ab139690、1:2,000 希釈)、抗 Brd 3 (ab50818、1:500 希釈)、抗 Brd 4 (ab128874、1:1,000 希釈)、抗 c-myc (ab32072、1:1,000 希釈)、抗総 PARP (BD Bioscience #556494; 1:1,000 希釈)、抗切断型 PARP (CST-9541T、1:1,000 希釈)、及び抗チューブリン hFAB-ローダミン (BioRad、12004166、1:10,000 希釈)。

図 10 の代表的免疫ブロットは、漸増濃度の 05IB9 で処理した後に Brd 2、Brd 3、Brd 4、総 PARP 及び c-MYC レベルの枯渇及び対応する切断型 PARP の増加を示す。c-MYC の減少と c-PARP の増加は両方とも阻害剤 (IBET726) 単独及び陰性対照 (05IB11) よりも大きく、これは阻害よりもむしろ標的分解と一致している。

【0232】

実施例 25： デグラシン系代表的化合物による細胞生存に対する影響

代表的化合物の抗増殖効果を、Cell Titer-Glo アッセイ (Promega) を用いて測定した。MV4-11 細胞を、無菌の白色、透明底の 384 ウェル細胞培養マイクロプレート (Greiner Bio-one) にて、RPMI 培地中 2 倍濃度及び 25 μ l 容量でインキュベートした。翌日、試験化合物を RPMI 培地で 2 倍濃度に連続希釈し、次いで、細胞に添加して終容量 50 μ l とした。72 時間のインキュベーションの後、25 μ l の Cell Titer-Glo 試薬を各ウェルに加えた。15 分のインキュベーション後、発光シグナル Pherastar FS で読み取った。アッセイ成分の終濃度は次の通り： 3×10^5 細胞/mL、0.05 % DMSO、及び 5 μ M の以下の化合物。Prism 8 (Graphpad) を用いてデータ (図 11) を処理し、用量反応曲線を作成した。

データは 05IB3、05IB6 及び 05IB9 の細胞毒性 (cytotoxicity) プロフィールを示し、これは IBET726 及び不活性 05IB11 と異なり、このことは標的阻害よりもむしろ標的分解と一致している。デグラシン単独は、有意に低い細胞傷害性を示す。

【0233】

実施例 26： デグラシン系代表的化合物による UCHL5 の共有結合的修飾

組換え UCHL5 (触媒ドメイン; 残基 1~237) を、室温で 1 時間、過剰量の 05IB9 (3:1 モル比) とともにインキュベートした後、LC-MS 分析を行った。無傷

10

20

30

40

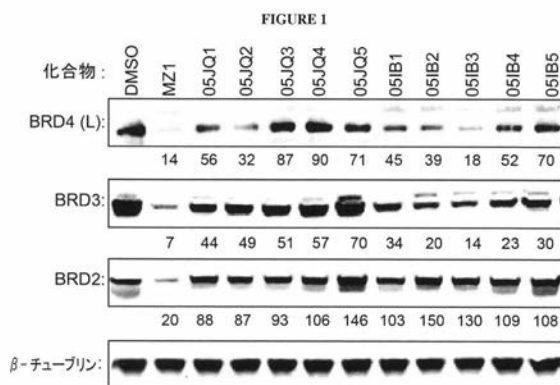
50

のタンパク質質量を、6130四重極分光計及びAgilent ZORBAX 300 SB-C3 5um、2.1×150mmカラムと組み合わせたMax-Lightカートリッジフローセルを取り付けたAgilent Technologies 1200シングル四重極LC-MSシステムにてエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用いて測定した。タンパク質MSの取得はポジティブイオンモードで行い、総タンパク質質量を、MS Chemstationソフトウェア(Agilent Technologies)内のデコンボリューションによって計算した。

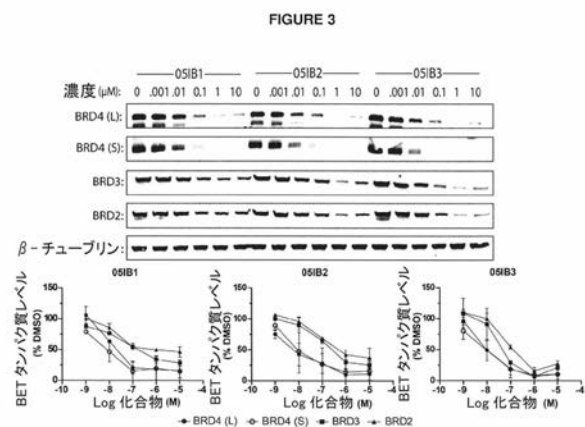
スペクトルのデコンボリューションにより、非修飾タンパク質(26859Da)及び修飾タンパク質(観測値27915Da、予測値27911Da)に相当する質量が明らかになり、これはデグラシン系化合物がUCHL5を共有結合的に修飾し得ることを示す。

10

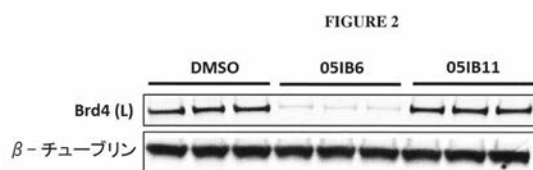
【図1】



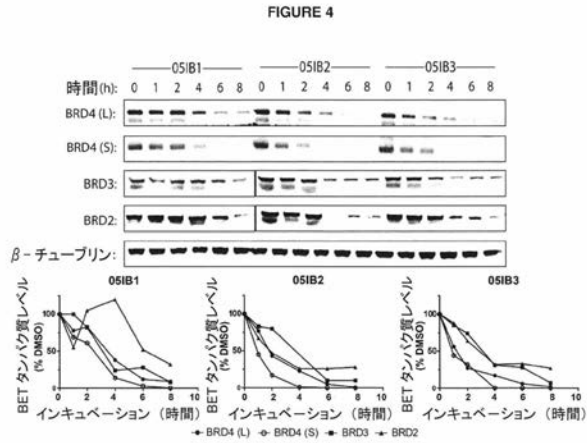
【図3】



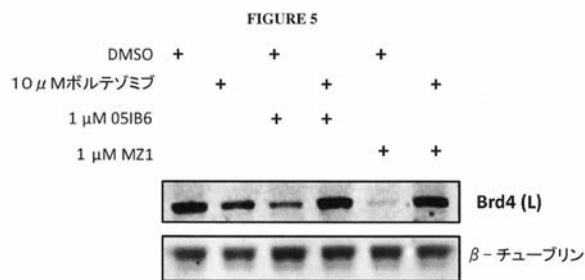
【図2】



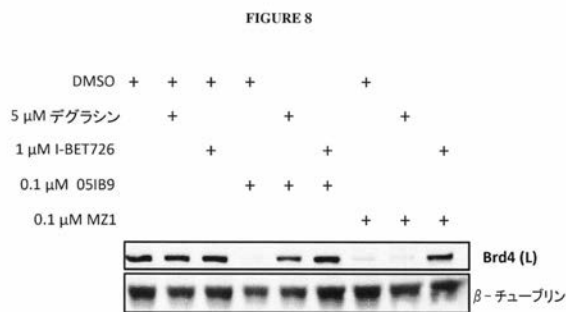
【図 4】



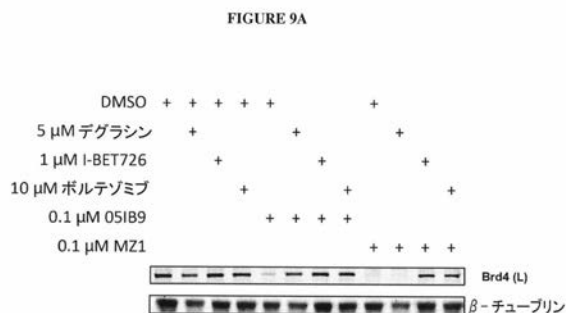
【図 5】



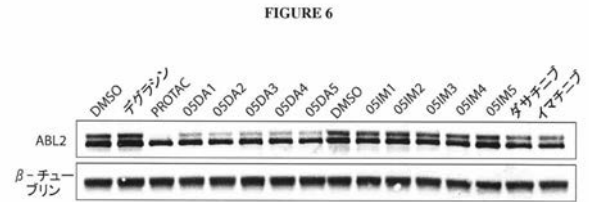
【図 8】



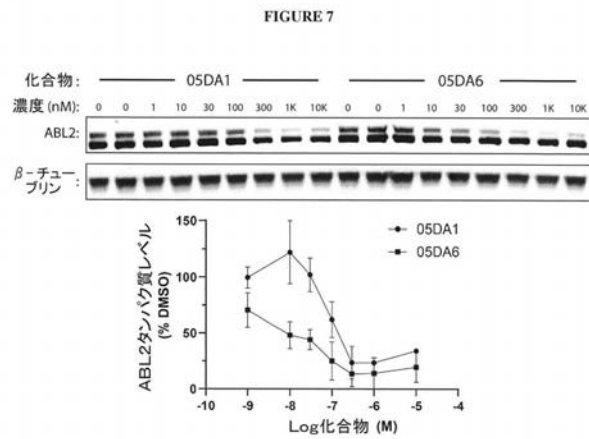
【図 9 A】



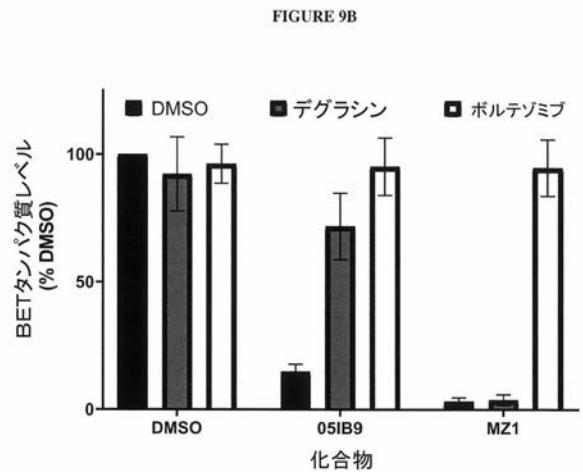
【図 6】



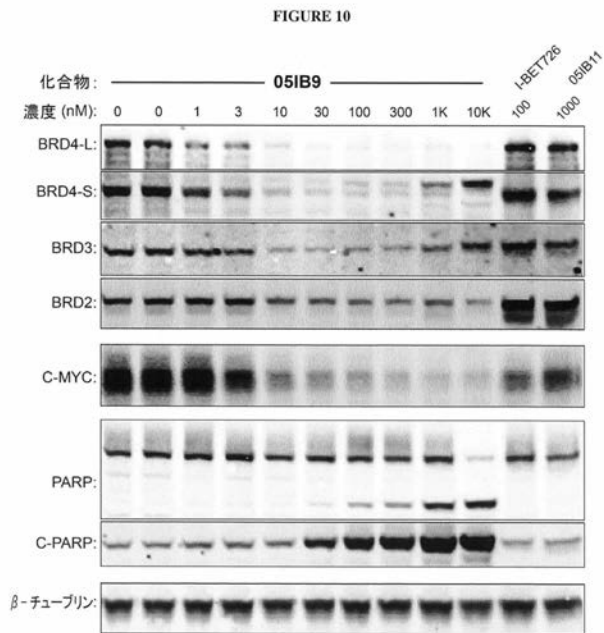
【図 7】



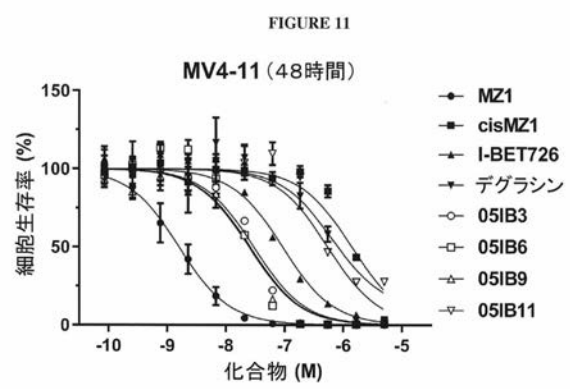
【図 9 B】



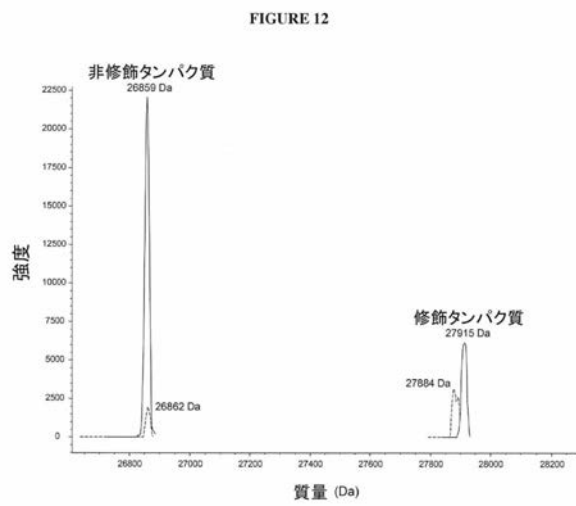
【図 1 0】



【図 1 1】



【図 1 2】



【配列表】

2021533181000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/065479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D401/12 A61K31/4709 A61K31/506 A61K31/5517 C07D401/14
C07D413/12 C07D417/12 C07D417/14 C07D495/14 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/079267 A1 (UNIV YALE [US]) 11 May 2017 (2017-05-11) claims 1, 9, 11, 12, 14 -----	1-35
A	LYMPHOID NEOPLASIA ET AL: "A novel small molecule inhibitor of deubiquitylating enzyme USP14 and UCHL5 induces apoptosis in multiple myeloma and overcomes bortezomib resistance", BLOOD, vol. 123, no. 5, 30 January 2014 (2014-01-30), pages 706-716, XP055610289, DOI: 10.1182/blood-2013-05- page 709, column 1, paragraph b-AP15 inhibits USP14 and UCHL5 page 712, column 2nd, paragraph Combining b-AP15 with SAHA.. - page 713 ----- -/-	1-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2019

Date of mailing of the international search report

29/11/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sotoca Usina, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/065479

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	V. KAPURIA ET AL: "Deubiquitinase Inhibition by Small-Molecule WP1130 Triggers Aggresome Formation and Tumor Cell Apoptosis", CANCER RESEARCH, vol. 70, no. 22, 2 November 2010 (2010-11-02), pages 9265-9276, XP055105970, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1530 page 9275, column 2nd, paragraph 2nd -----	1-35
A	WO 00/62778 A1 (BRISTOL MYERS SQUIBB CO [US]) 26 October 2000 (2000-10-26) claims 1-58; compounds 455, 457 -----	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2019/065479**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-35(partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-35(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2019/ 065479

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-35(partially)

Bifunctional compounds with a degrasyn or analogous moiety and a dasatinib based molecule

2. claims: 1-35(partially)

Bifunctional compounds with a degrasyn or analogous moiety and a
[4-(4-chlorophenyl)-2,3,9-trimethyl-6H-thia-5,7,8,9a-tetraazacyclopenta[e]azulen-6-yl]acetic acid ester based molecule

3. claims: 1-35(partially)

Bifunctional compounds with a degrasyn or analogous moiety and a
1-acetyl-4-[(4-chlorophenyl)amino]-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-carboxamide based molecule

4. claims: 1-35(partially)

Bifunctional compounds with a degrasyn or analogous moiety and an imatinib based molecule

International Application No. PCT/ EP2019/ 065479

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-35(partially)

Claims 1-3, 5, 9-12, 15-19 and 28, 29, 30 encompass and/or relate to moieties in a compound, whose structure is defined by their desired function: "UchL5 binding partner", "target protein binding partner", "linked", "kinase inhibitors", "phosphatase inhibitors", "compounds targeting BET bromodomain-containing proteins", "HDM2/MDM2 inhibitors", "heat shock protein 90 inhibitors", "HDAC inhibitors", "human lysine methyltransferase inhibitors" and "antibodies". The claims do not comply with the requirements of Article 6 PCT, because these definitions do not allow to ascertain the scope of the claims. The fact that any moiety/compound could be screened to find out whether it has the desired activity does not overcome this objection because the person skilled in the art would not be able to know if she/he is working inside the scope of the claims.

These present claims relate to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure within the meaning of Articles 5 and 6 PCT are to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed, from all the enormous number of possible moieties (even those claimed on pages 61-89 with formulae), the application only discloses compounds having a degrasyn or analogous moiety as the UchL5 binding partner and dasatinib, [4-(4-chlorophenyl)-2,3,9-trimethyl-6H-thia-5,7,8,9a-tetraazacyclopenta[e]azulen-6-yl]acetic acid ester, 1-acetyl-4-[(4-chlorophenyl)amino]-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-carboxamide, imatinib as a target protein binding partner (see examples 1 and 2 on pages 115-117, examples 05JQ1-05JQ5 in Table VIa on pages 126-127, examples 05IB1-05IB5 in Table VIb on page 127, examples 05DA1-05DA5 in Table VIc on pages 127-128, examples 05IM1-05IM5 in Table VIId on pages 128-129, examples 05IB66-05IB16 in Table VII on pages 132-133, compounds 05DA6-05DA9 on page 136) .

Furthermore, examples 05IB11, 05IB12, 05DA10 and 05DA11 on page 138 show a degrasyn-based molecule which does not fall under claim 7. The first moiety in these compounds differs in different ways from degrasyn: a cyano group is missing or the double bond has been exchanged by a single bond. Compounds 05IB11 and 05IB12 are seen on table VIII on page 140-141 as being much less active (under most conditions inactive) than their analogues based on degrasyn. Therefore strengthening the view that compounds not falling under claim 7 are not active.

The search has been concentrated on hybrids where the first moiety (UchL5 binding partner) falls under the scope of claim 7 and the second moiety is dasatinib, [4-(4-chlorophenyl)-2,3,9-trimethyl-6H-thia-5,7,8,9a-tetraazacyclopenta[e]azulen-6-yl]acetic acid ester, 1-acetyl-4-[(4-chlorophenyl)amino]-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-carboxamide, imatinib.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary

International Application No. PCT/ EP2019/ 065479

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/065479

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017079267	A1	11-05-2017	
		AU 2016349781 A1	10-05-2018
		BR 112018008918 A2	21-11-2018
		CA 3002709 A1	11-05-2017
		CN 108366992 A	03-08-2018
		EP 3370715 A1	12-09-2018
		JP 2018531983 A	01-11-2018
		KR 20180097530 A	31-08-2018
		US 2017121321 A1	04-05-2017
		US 2018186785 A1	05-07-2018
		WO 2017079267 A1	11-05-2017

WO 0062778	A1	26-10-2000	
		AU 779089 B2	06-01-2005
		BR 0009721 A	13-02-2002
		BR P10009721 B1	21-11-2018
		CA 2366932 A1	26-10-2000
		CN 1348370 A	08-05-2002
		CN 101481359 A	15-07-2009
		CY 1113312 T1	04-11-2015
		CZ 20013677 A3	12-06-2002
		DK 1169038 T3	26-11-2012
		EP 1169038 A1	09-01-2002
		EP 2308833 A2	13-04-2011
		EP 3222619 A1	27-09-2017
		ES 2391550 T3	27-11-2012
		HK 1042433 A1	14-12-2012
		HU 0202708 A2	28-12-2002
		ID 30460 A	06-12-2001
		IL 144910 A	24-07-2007
		JP 3989175 B2	10-10-2007
		JP 2002542193 A	10-12-2002
		KR 100710100 B1	23-04-2007
		KR 20070020153 A	16-02-2007
		LU 92146 I2	05-04-2013
		MX PA01010292 A	23-10-2002
		NO 322470 B1	09-10-2006
		NO 2007005 I1	27-03-2007
		NZ 513639 A	27-02-2004
		PL 351126 A1	24-03-2003
		PT 1169038 E	26-10-2012
		RU 2312860 C2	20-12-2007
		TR 200102969 T2	21-08-2002
		US 6596746 B1	22-07-2003
		US 2004024208 A1	05-02-2004
		US 2004073026 A1	15-04-2004
		US 2004077875 A1	22-04-2004
		US 2005261305 A1	24-11-2005
		US 2005288303 A1	29-12-2005
		US 2006079563 A1	13-04-2006
		US 2014206691 A1	24-07-2014
		US 2015158830 A1	11-06-2015
		US 2016264537 A1	15-09-2016
		US 2018016247 A1	18-01-2018
		US 2019210986 A1	11-07-2019
		WO 0062778 A1	26-10-2000
		ZA 200107204 B	02-12-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/00	(2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 N 15/12	(2006.01)	C 0 7 K 14/00	
		C 1 2 N 15/12	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信

(74)代理人 100156982
弁理士 秋澤 慈

(72)発明者 シウリー アレッシオ
イギリス ディーディー1 4エイチエヌ ダンディー ネザーゲート ユニバーシティ オブ
ダンディー内

(72)発明者 テスタ アンドレア
イギリス ディーディー1 4エイチエヌ ダンディー ネザーゲート ユニバーシティ オブ
ダンディー内

(72)発明者 ヒューズ スコット
イギリス ディーディー1 4エイチエヌ ダンディー ネザーゲート ユニバーシティ オブ
ダンディー内

(72)発明者 ブッチャー スティーブン ピーター
イギリス ディーディー1 4エイチエヌ ダンディー ネザーゲート ユニバーシティ オブ
ダンディー内

Fターム(参考) 4B065 BB40 CA09 CA16 CA24 CA25 CA46
4C076 AA95 CC41 EE41 EE59
4C084 AA17 NA13 ZC20 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA50 CA40 DA75 EA50